

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Estudo Fitoquímico das Raízes de *Platycyamus regnellii*

Dissertação de Mestrado

Luiz Marcos Vita Machado

Orientador: Prof. Dr. Aderbal Farias Magalhães

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Campinas, maio de 2000



UNIDADE	Be
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	M18e
V.	Ex.
TOMBO BC/	42462
PROC.	16-278100
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/10/00
N.º CPD	

CM-00145830-0

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

M18e

Machado, Luiz Marcos Vita

Estudo fitoquímico das raízes de *Platycyamus regnellii* / Luiz Marcos Vita Machado. -- Campinas, SP: [s.n], 2000.

Orientador: Aderbal Farias Magalhães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Leguminosae. 2. Flavonóide.
3. Isoflavonóide. 4. Flavana. I. Magalhães, Aderbal Farias. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Tecendo a manhã

Um galo sozinho não tece uma manhã:
ele precisará sempre de outros galos.
De um que apanhe este grilo que ele
e o lance a outro; de um outro galo
que apanhe o grilo que o galo antes
e o lance a outro; e de outros galos
que com muitos outros galos se cruzem
para que a manhã desde uma teia tênue,
os fios de sol de seus gritos de galo,
se vá tecendo, entre todos os galos.
E se encorpando em tela, entre todos,
se erguendo tenda, onde entrem todos,
se entretendendo para todos, no toldo
(a manhã) que plana livre de armação.
A manhã toldo de um tecido tão aéreo
que, tecido, se eleva por si: luz balão.

João Cabral de Melo Neto

*A João Pedro por provocar em mim
a incomparável alegria de ser pai.*

*A Ana pelo seu amor, incentivo e
compreensão.*

*Aos meus pais Bené e Nice pelo amor
e dedicação desprendidos na minha formação.*

*Aos meus irmãos (e amigos) Mário,
Lúcio, Luciana e Luíza (in memoriam)
pela solidariedade, carinho e bom humor
que sempre balizaram nossa relação.*

*Ao amigo (e irmão) Itaparica pelas
infinitas manifestações de amizade e apoio
durante a realização deste trabalho.*

Agradecimentos

A Aderbal Farias Magalhães pela acertada orientação e apoio.

A Eva pelas valiosas sugestões.

A Valéria, Carlos, Miriam, D. Maria, Celira, Maria del Pilar, Ana Lúcia e Mariza; A Cláudio, Paulo, Laverde, Renato, Bira e Gélson; agradeço ainda a André, Denise, Regina, Marisa, Raquel e Catarina pelo apoio e promoção do ótimo ambiente de trabalho.

A Ana Maria Tozzi pela coleta e identificação da planta e discussões complementares.

A Sérgio, Ezequias, Ana, Kiko, Mônica e Junior pelos valiosos auxílios concedidos.

A Miro pelo encorajamento e amizade.

A Alê, Camila, Gabriel, André, Mira e Ana pelos belos momentos compartilhados e constante torcida.

Aos funcionários da UNICAMP pelos inúmeros serviços prestados.

Ao CNPQ e a FAPESP pelo suporte financeiro.

Resumo

O presente trabalho teve o propósito de isolar e elucidar as estruturas de flavonóides presentes nos extratos das raízes da espécie de planta denominada *Platycyamus regnellii*. Este gênero possui apenas duas espécies e está localizado na tribo Millettieae, próximo aos gêneros *Lonchocarpus* e *Deguelia*, cujas espécies inexploradas estão sendo estudadas no nosso grupo de pesquisa. No âmbito de um projeto mais amplo, que pretende definir a classificação destas plantas, em nível de tribo e subgênero, tentamos corroborar, do ponto de vista químico, o trabalho realizado pela Dra. Ana Maria Tozzi, cuja tese de doutoramento(1989) intitula-se “Estudos Taxonômicos do Gênero *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil”, na área de Botânica.

A partir do estudo do extrato diclorometânico da raiz de *Platycyamus regnellii* isolamos cinco flavonóides, dos quais dois são inéditos. Os novos compostos apresentados são a 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana e 3'-hidroxil-4,4'-dimetoxil isoflavona, além dos já conhecidos vestitol, isoliquiritigenina e medicarpina. A identificação dos compostos foi realizada através da análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMBC, HMQC, UV e IV.

A maioria dos compostos isolados pertence à classe dos isoflavonóides. Este fato constitui uma evidência de que a espécie *Platycyamus regnellii* está bem classificada, alocada na subfamília Papilionoideae e tribo Millettieae.

Após ensaios de bioautografia frente a bactérias constatou-se atividade da isoliquiritigenina contra a *Bacillus subtilis*.

Abstract

This research aimed at isolating and elucidating the structures of flavonoids found in the extract of the roots of a species of plant called *Platycyamus regnellii*. This genus has only two species and is located in the tribe Millettieae, near the genera *Lonchocarpus* And *Deguelia*, which have not been explored and are now under study in our research group. In a wider project wich has intention to define and classify these plants, on the level of tribe and subgenus, we are corroborating chemically with the work of professor phd Ana Maria Tozzi, wich docotrate thesis (1989) is called "Taxonomic Studies of the Genus *Lonchocarpus* Kunth and *Deguelia* Aubl. in Brazil", in Botany.

Starting from the study of the dichloromethane extract of the root of *Platycyamus regnellii* we isolated five flavonoids, two of which are unheard of. The new compounds are 7,4'-dihydroxy-6-methoxyflavan and 3'-hydroxy-4,4'-dimethoxyisoflavona, apart from the already known vestitol, isoliquiritigenin and medicarpin. The identification of the compounds was done through the analysis of ^1H NMR, ^{13}C NMR, HMBC, HSQC, UV and IR spectra.

The majority of the isolated compounds belong to the class of isoflavonoids. This is an evidence that the species *Platycyamus regnellii* is well classified, located on the subfamily Papilionoideae and the tribe Millettieae.

After tests bioauthography facing bacteria, it has been observed an activity of the isoliquiritigenin against *Bacillus subtilis*.

Curriculum Vitae

1. Ensino Médio

Curso técnico em Química pela Escola Técnica Federal da Bahia (1986-1989).

2. Graduação

Cursos de Bacharelado e Licenciatura em Química pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo(1991-1996).

3. Resumos publicados

3.1 L. M. V. Machado, M. G. Constantino. Estudo de Síntese de Anulenos através da Reação de Diels-Alder. II Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica em Química-UFSCar 1996.

3.2 A. F. Magalhães, A. M. G. A. Tozzi, E. G. Magalhães, L. M. V. Machado. Novos Flavonóides Isolados de *Platycyamus regnellii*
XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas, MG 25 a 28 de maio de 1999.

4. Experiência Profissional

4.1 Estágio em Análise Química no laboratório da empresa Metanol do Nordeste S/A durante 4 meses (1989).

4.2 Estágio em laboratório de pesquisa na empresa **COPENE-PETROQUÍMICA DO NORDESTE S/A** durante 2 meses (1989).

4.3 Trabalho na função de Analista de Laboratório na empresa **COPENE-PETROQUÍMICA DO NORDESTE S/A** durante 10 meses (1990).

4.4 Estágio em laboratório de síntese orgânica no **Departamento de Química USP-RP** (1991/1992).

4.5. Trabalho na função de Professor II na disciplina de Química na **E.E.P.S.G. Prof^a. Irene Dias** durante 10 meses (1994).

4.6 Iniciação Científica em laboratório de síntese orgânica no **Departamento de Química USP-RP** (1995).

Índice

1. Introdução	1
1.1. Isoflavonóides	1
1.2. Descrição da planta	11
1.3. Classificação da planta	12
1.4. Objetivo	14
2. Resultados e discussão	15
2.1. Isoflavana (vestitol)	15
2.2. Flavana (7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana)	23
2.3. Chalcona (isoliquiritigenina)	31
2.4. Isoflavona (3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona)	35
2.5. Pterocarpano (medicarpina)	41
3. Parte experimental	45
3.1. Coleta e tratamento das raízes	45
3.2. Métodos cromatográficos	47
3.3. Métodos espectrométricos	47
4. Ensaio biológicos	49
4.1. Bioensaio de letalidade com <i>Artemia salina</i>	49
4.2. Ensaio de bioautografia	52
5. Conclusão	54
Bibliografia	55
Apêndice (espectros)	60

Lista de abreviaturas

CC	Cromatografia em coluna
CCD	cromatografia em camada delgada
CCPC	Cromatografia em camada preparativa contínua
CG/EM	cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas
DEPT	espectro de RMN ^{13}C utilizando transferência de polarização
d	dubleto
dd	duplo dubleto
ddd	duplo duplo dubleto
HMBC	experiência de correlação heteronuclear usando acoplamentos a longa distância
HSQC	experiência de correlação heteronuclear usando acoplamento a uma ligação
F	fração
G	grupo
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento
m/z	razão da massa do íon em daltons pela sua carga (geralmente unitária), um Thomson.
m	múltiplo
NOE	efeito Nuclear Overhauser
RDA	reação retro-Diels-Alder
RMN ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
UV	ultravioleta
δ	deslocamento químico
$[\alpha_d]$	rotação óptica específica

1.Introdução

A família Leguminosae é a segunda maior entre as dicotiledôneas. Economicamente, sua importância é destacada. As leguminosas fornecem alimentos, gomas e resinas, inseticidas e largo número de extratos medicinais¹. A família Leguminosae apresenta-se subdividida em três subfamílias: Mimosoidea, Caesalpinoideae e Papilionoideae. No Brasil, *Deguelia* (17 espécies nativas); *Lonchocarpus* (23 espécies nativas) são exemplos de gêneros da subfamília Papilionoideae.

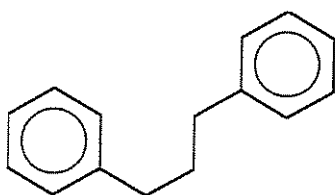
Não há um consenso entre os taxonomistas com relação à classificação do gênero *Lonchocarpus*. Por apresentar características morfológicas semelhantes a outros elementos da subfamília Papilionoideae, este gênero situa-se numa posição de transição. Várias de suas características se intersectam com as de outros gêneros tais como como *Derris*, *Pongamia*, *Milletia* e *Deguelia*².

Diante desse quadro, torna-se necessário a inclusão de algum outro critério investigativo. O estudo químico das várias espécies, e em particular o estudo dos flavonóides como marcadores taxonômicos, é indispensável. A exemplo do que foi realizado por Bohlman³ e colaboradores quando utilizaram a classe de substâncias poliacetilênicas na quimiotaxonomia de vários gêneros

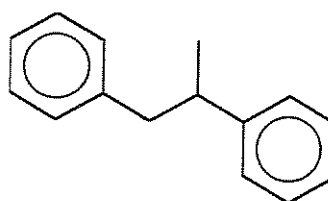
e tribos pertencentes à família Asteraceae ou ainda os trabalhos de Gottlieb⁴ e colaboradores que utilizaram compostos flavonoídicos visando a sistemática das espécies da subfamília Papilionoideae, em função do nível de oxidação/metilação destes compostos orgânicos.

A larga distribuição dos flavonóides em Leguminosae e sua ampla diversidade estrutural são fatores determinantes para a escolha dessa classe de compostos no estudo quimiosistemático⁴. Os flavonóides constituem um dos maiores grupos de compostos do metabolismo secundário de plantas superiores até então exploradas. Além de sua importância para a classificação sistemática, esta classe de compostos vem despertando o interesse de muitos pesquisadores, pois muitos membros são fisiologicamente ativos em seres humanos⁵.

Como derivados das vias biossintéticas do chiquimato e do acetato, os flavonóides possuem uma unidade básica de 15 carbonos, que inclui dois anéis aromáticos, ligados entre si por um fragmento de 3 carbonos ($C_6C_3C_6$).



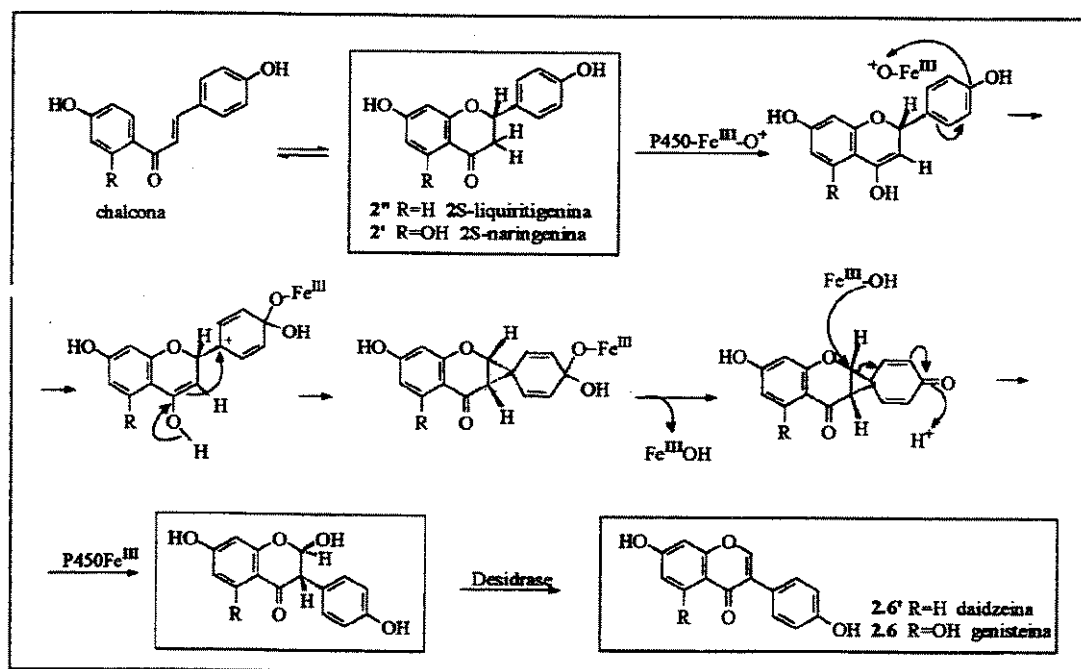
1,3-difenilpropano (I)



1,2-difenilpropano (II)

1.1.Isoflavonóides

Os isoflavonóides formam uma larga e muito distinta subclasse dos flavonóides. Enquanto os flavonóides, no sentido estrito da palavra, baseiam-se na estrutura I, os isoflavonóides baseiam-se na estrutura 1,2-difenilpropano(II), que por sua vez deriva-se de I por um processo enzimático^{6,7} segundo o quadro abaixo.



Quadro1.1. Mecanismo de migração arila 1

O esqueleto do isoflavonóide é estabelecido por uma enzima de migração arila conhecida como isoflavona sintase. Conforme o mecanismo da reação, a migração requer um grupo 4' ou 2'-hidroxil. Este fato explica porque a maioria dos isoflavonóides apresenta estas posições oxigenadas. Os isoflavonóides apresentam limitada distribuição no reino vegetal, e são quase totalmente restrito à subfamília Papilionoideae das Leguminosae⁸. As subfamílias Caesalpinoideae e Mimosoideae da família Leguminosae apresentam poucas plantas que tenham tido registro da presença de isoflavonóides. Entre as dicotiledôneas não leguminosas, um número de famílias são conhecidas por produzir isoflavonóides, mas somente plantas ou gêneros isolados possuem esta habilidade, e a faixa de estruturas produzidas é muito mais limitada que em plantas da família Leguminosae.

Apesar da distribuição restrita dos isoflavonóides no reino das plantas, sua variação estrutural é surpreendentemente larga. Isto surge não somente do número e complexidade dos substituintes sobre o sistema básico 3-fenil cromano, mas também dos diferentes níveis de oxidação nos esqueletos e da presença de anéis heterocíclicos extras. Os isoflavonóides exibem uma extraordinária coleção de estruturas com mais de 900 compostos não glicosilados isolados de plantas superiores⁸.

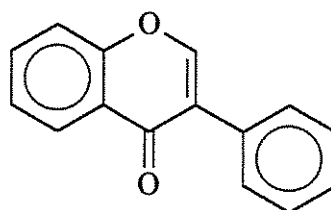
Distribuição (ocorrência)

Acima de 90% dos isoflavonóides caracterizados originados de plantas são produzidos da larga e taxonomicamente avançada subfamília Papilionoideae (cerca de 480 gêneros, 1200 espécies)⁹.

Classificação

Isoflavonas

Isoflavonas constituem o maior grupo de isoflavonóides naturais com cerca de 400 compostos não glicosilados.



Estrutura básica das isoflavonas

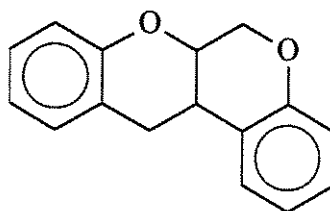
Além do modelo de oxigenação, surge variação estrutural da incorporação do substituinte isoprenil no anel. A ciclização de um grupo isoprenil com a função fenol em

orto resulta na formação de um anel pirano ou furano, podendo ser produzido uma variedade de estruturas dependendo da direção de fusão do anel, nível de oxidação e substituintes oxigenados.

A síntese de isoflavonas naturais é um instrumento importante para elucidação estrutural, embora tenha se tornado menos útil com a sofisticação das técnicas de RMN. Isoflavonas são, tipicamente, o alvo sintético primário, já que a partir destas outros isoflavonóides podem ser obtidos⁸.

Rotenóides

Os rotenóides são uma classe de isoflavonóides caracterizados pela inclusão de um átomo de carbono extra dentro de um anel heterocíclico adicional.

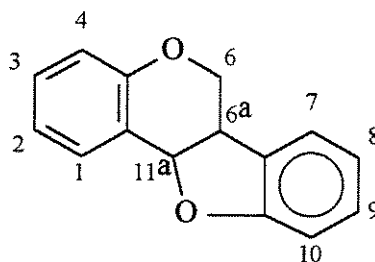


Estrutura básica dos rotenóides

Este sistema surge na natureza por ciclização oxidativa de um 2'-metoxil isoflavona.

Pterocarpanos^{8,10}

Depois das isoflavonas, os pterocarpanos formam o segundo maior grupo de isoflavonóides com cerca de 200 compostos não glicosilados caracterizados. Pterocarpanos possuem um sistema de 4 anéis derivado do esqueleto básico dos isoflavonóides com formação da função éter pela ligação entre as posições 4 e 2'.



Estrutura básica dos pterocarpanos

Embora os pterocarpanos contenham dois centros assimétricos, somente o 6aR, 11aR e 6aS, 11aS são estericamente possíveis. Estudos computacionais mostram que a fusão *trans* entre os anéis C e D é muito menos favorável que a fusão *cis*⁸.

São creditadas a esta classe de isoflavonóides a função de defesa em leguminosas. Muitas plantas quando atacadas por um patógeno (fungo, bactéria) produzem metabólitos que agiriam como uma espécie de barreira química ao ataque. Aos metabólitos que são sintetizados pela planta com esta função dá-se o nome de fitoalexinas⁹.

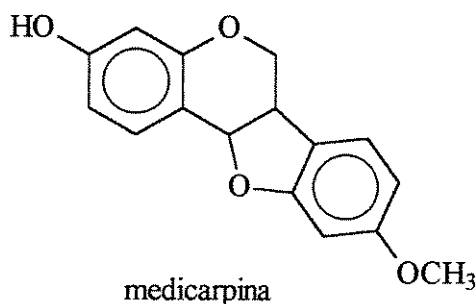
Em geral, os isoflavonóides caem dentro de duas classes dependendo de seu modo de formação. Eles podem, por exemplo, ocorrer como componente de tecido saudável quando o termo isoflavonóide “constitutivo” é aplicado. Mas estão sendo descobertos compostos que acumulam *de novo* na planta como consequência de sua invasão por microrganismos potencialmente patogênicos, geralmente fungo ou bactéria. O uso do termo *de novo* implica que os compostos considerados são formados diretamente dos blocos de construção elementares tais como acetato e chiquimato, e não por um simples processo oxidativo ou hidrolítico utilizando constituintes pré-formados de estrutura molecular relativamente sofisticada. Síntese induzida de enzimas que catalisam as etapas biossintéticas necessárias é considerada como um pré-requisito essencial para a produção *de novo* de compostos isoflavonoídicos⁹.

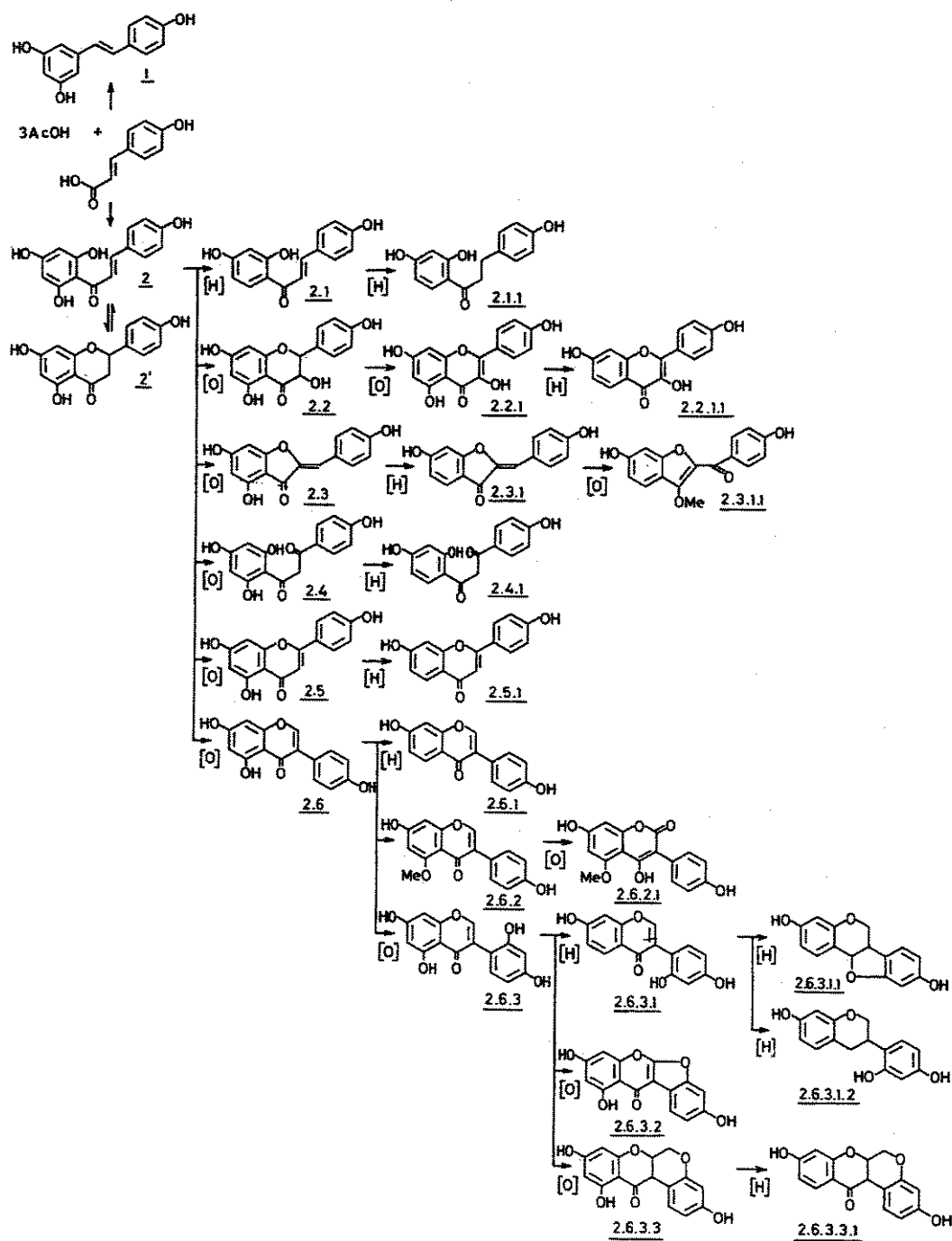
Embora estes isoflavonóides induzidos sejam frequentemente exclusivos dos tecidos invadidos por patógenos, não é impossível que o mesmo composto ocorra constitutivamente em outras espécies. Isoflavonóides induzidos são comumente encontrados em Papilionoideae tendo sido isolados de uma variedade de espécies submetidas à inoculação microbiana ou tratamento com apropriado elicitor abiótico tais como radiação ultra violeta (254 nm) ou produtos químicos fitotóxicos. Se os isoflavonóides formados desta maneira possuem propriedades anti-microbianas eles são usualmente chamados fitoalexinas⁹.

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

Fitoalexinas têm sido obtidas de uma variedade de grupos de plantas. Segundo Ingham⁹, os compostos associados com uma família, frequentemente, diferem de outros tanto em termos de estrutura como de sua origem biossintética. Explica que as espécies integrantes da subfamília Papilionoideae geralmente produzem um ou dois (às vezes vários) isoflavonóides fitoalexinas como uma resposta de defesa a uma invasão microbiana. Investigações em Papilionoideae têm confirmado sua grande habilidade para produzir isoflavonóides fitoalexinas. Os metabólitos induzidos de outras classes de compostos são reduzidos nesta subfamília.

Os isoflavonóides fitoalexinas encontrados com maior regularidade são os pterocarpanos e as isoflavanas. O pterocarpano medicarpina é um dos isoflavonóides fitoalexinas de maior ocorrência.





Quadro 1.1. Rota biossintética dos flavonóides

1.2. Descrição da planta *Platycyamus regnellii*¹²

Nomes populares: pau-pereira, pereiro, folha-de-bolo, mangalô, angelin-rosa, camará-de-bilro, cataguá, pereira vermelha, ubá-açu, jacatupé, pau-pente, pau-pereira-amarela.

Características morfológicas: altura de 10 a 20 m, com tronco de 40 a 60 cm de diâmetro. Folhas compostas trifolioladas; folíolos glabros na face superior e ferrugíneo-mentosas na inferior.

Ocorrência: sul da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás e São Paulo.

Fenologia: floresce durante os meses de fevereiro-abril. Os frutos iniciam a maturação em agosto, com a planta totalmente destituída da folhagem, prolongando-se até o final de setembro.

1.3. Classificação botânica da planta¹³

Família:	Leguminasae
Subfamília:	Papilionoideae
Tribo:	Millettieae
Gênero:	<i>Platycyamus</i>
Espécie:	<i>Platycyamus regnellii</i>

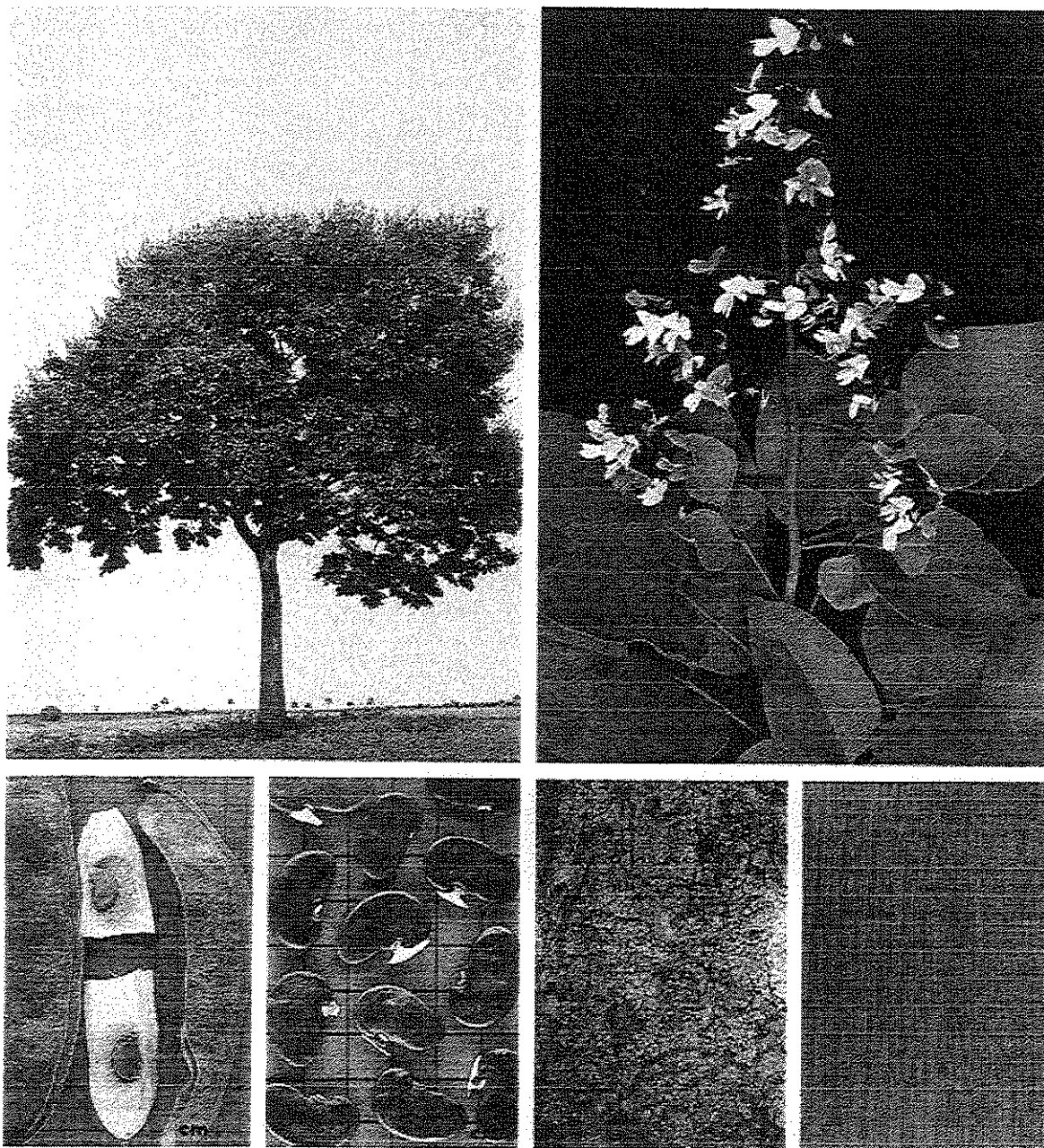


Figura 1. Fotos da planta¹² e suas partes.

1.4. Objetivo

O presente trabalho tem o propósito de isolar e elucidar as estruturas de flavonóides presentes nos extratos das raízes da espécie de planta denominada *Platycyamus regnellii*. Este gênero possui apenas duas espécies e ambas foram alocadas na tribo Millettieae¹³, portanto próximo aos gêneros *Lonchocarpus* e *Deguelia*, cujas espécies inexploradas estão sendo estudadas no nosso grupo de pesquisa. Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo que pretende definir a classificação destas plantas, a nível de tribo e subgênero, numa tentativa de apoiar, do ponto de vista químico, o trabalho realizado pela Dra Ana Maria A. Tozzi cuja tese de doutoramento (1989) intitula-se “Estudos Taxômicos do Gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil².”

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

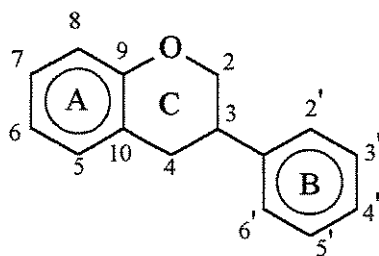
2. Resultados e discussão

Do extrato diclorometânico da raiz de *Platycyamus regnellii* foram isolados 5 flavonóides: uma isoflavana, uma flavana, uma chalcona, uma isoflavona e um pterocarpano. O segundo e o quarto são inéditos.

A determinação estrutural dos compostos isolados foi realizada através de análises espectroscópicas¹⁴ de RMN ¹H, RMN ¹³C, UV e IV e espectrometria de massas^{15,16}. Utilizou-se ainda do efeito Overhauser Nuclear, além das técnicas de RMN bidimensionais¹⁷ HMQC e HMBC.

2.1. Isoflavana

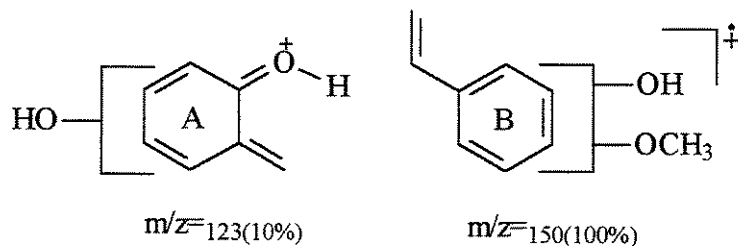
O espectro de RMN ¹H (**E.1**, **E.1a** e **E.1b**; apêndice, pg. 60) indicou claramente um complexo sistema composto por 5 hidrogênios, característico do anel heterocíclico de uma isoflavana¹⁸ (CH₂-CH-CH₂). Os deslocamentos químicos dos hidrogênios do sistema ($\delta_{H4eq}=2,80$, $\delta_{H4ax}=2,96$, $\delta_{H3}=3,47$, $\delta_{H2ax}=3,97$ e $\delta_{H2eq}=4,23$ ppm) são também característicos de uma isoflavana. Análise dos espectros de RMN ¹³C (**E.2**) e DEPT (**E.3**), que mostraram absorções em δ 30,1(C-4), 31,7(C-3) e 69,6 ppm (C-2), sinaliza para esse tipo de estrutura¹⁹. O espectro UV (**E.8**) fortalece nossa proposta.



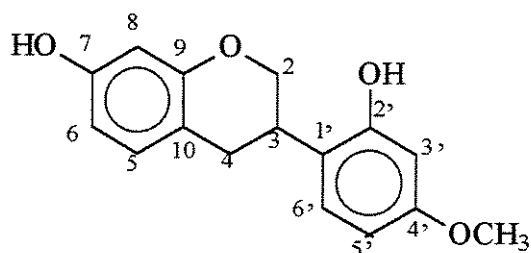
Estrutura básica das isoflavanos

O peso molecular indicado pelo espectro de massas (E.7) e a presença de sinal de somente uma metoxila no espectro de RMN ^1H , além da indicação de outros substituintes aromáticos, sugerem que a estrutura contenha, além da metoxila, duas hidroxilas.

Dois sistemas aromáticos AMX aparecendo, cada um, no espectro de RMN ^1H (E.1a) como um dubleto com acoplamento *orto*, outro dubleto com acoplamento *meta* e, por último, um duplo dubleto com acoplamentos *orto* e *meta* indicam que temos dois substituintes no anel B mantendo posição *meta* entre si e um no anel A. Os fragmentos m/z 150, m/z 123 (decorrentes de clivagem retro-Diels-Alder¹⁶), bem como o pico do íon molecular M^+ 272, no espectro de massas (E.7), sugerem a existência de uma hidroxila no anel A; e uma metoxila mais uma hidroxila no anel B.



No experimento HMBC (E.4), correlação do carbono na posição 4 ($\delta 30,1\text{ppm}$) com um dubleto aromático com acoplamento *orto* (H-5, $\delta 6,89\text{ppm}$) indica que a hidroxila está em posição 7. Como, via de regra, é esperado, ou seja, a posição C-7 oxigenada decorrente da via biossintética²⁰. Finalmente, relações NOE no espectro NOESY (E.6) entre os hidrogênios da metoxila ($\delta 3,72\text{ppm}$) e os hidrogênios H-3' ($\delta 6,50\text{ppm}$) e H-5' ($\delta 6,42\text{ppm}$) sugerem a estrutura completa da isoflavana como 7,2'-dihidroxil-4'-metoxil isoflavana, conhecida comumente como vestitol¹⁸ (1).-



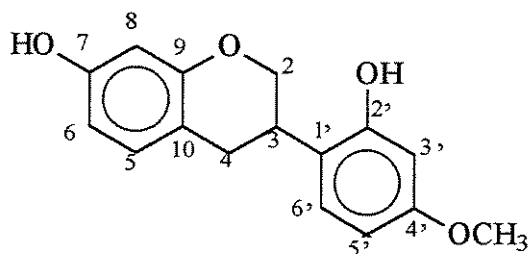
(1)

O anel heterocíclico das isoflavanas guarda semelhanças com o cicloexeno. Apresenta também flexibilidade no anel devido à possibilidade de giro das ligações sigmas, permitindo-lhe assumir diferentes conformações. A técnica de RMN ^1H é muito útil na determinação de configuração relativa em ciclos, pois, sendo estas moléculas semi-rígidas, as interações eletrônicas são razoavelmente invariáveis e isso provoca constantes de acoplamentos

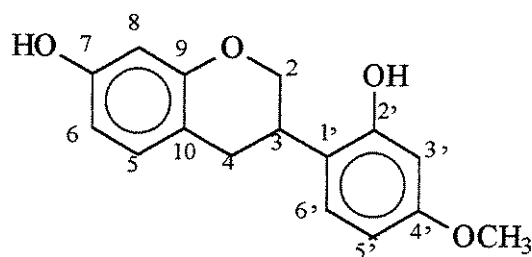
específicas que permitem conhecer a posição relativa dos substituintes²¹. Mediante aplicação da relação entre constantes de acoplamento e ângulo diedro entre os hidrogênios vicinais proposta por Karplus²² foi possível determinar a configuração relativa no estereocentro da isoflavana. A magnitude do acoplamento químico entre o hidrogênio H-3 e o hidrogênio H-4a ($J=11,0$ Hz, **tab 2.1**, pg 19) indica que na conformação mais estável da molécula ambos hidrogênios ocupam a posição pseudo-axial. O grupo fenil duplamente substituído, por ser volumoso, ocupa uma posição equatorial, menos energética.

O vestitol apresentou rotação óptica $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$. A atividade levógira deste composto é atribuída²³ a sua configuração R.

Tabela 2.1. Dados de RMN ^1H (acetona- d_6 , 500 MHz) do vestitol (**E.1**, **E.1a** e **E.1b**; pg. 60-62)

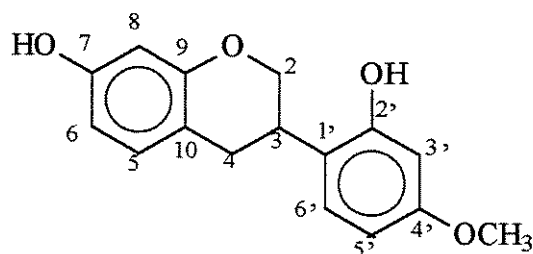


H	δ	multiplicidade e J
2eq	4,23	<i>ddd</i> , $J=10,1$, $J=3,2$, $J=2,0$ Hz
2ax	3,97	<i>t</i> , $J=10,1$ Hz
3	3,47	<i>m</i>
4eq	2,80	<i>ddd</i> , $J=15,5$ Hz, $J=5,0$ Hz, $J=2,0$ Hz
4ax	2,96	<i>dd</i> , $J=15,5$ Hz, $J=11,0$ Hz
5	6,89	<i>d</i> , $J=8,0$ Hz
6	6,36	<i>dd</i> , $J=8,0$ Hz, $J=2,5$ Hz
8	6,28	<i>d</i> , $J=2,5$ Hz
3'	6,50	<i>d</i> , $J=2,5$ Hz
5'	6,42	<i>dd</i> , $J=8,5$ Hz, $J=2,5$ Hz
6'	7,05	<i>d</i> , $J=8,5$ Hz
OCH ₃	3,72	<i>s</i>

Tabela 2.2.Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do vestitol (E.2, pg. 63)

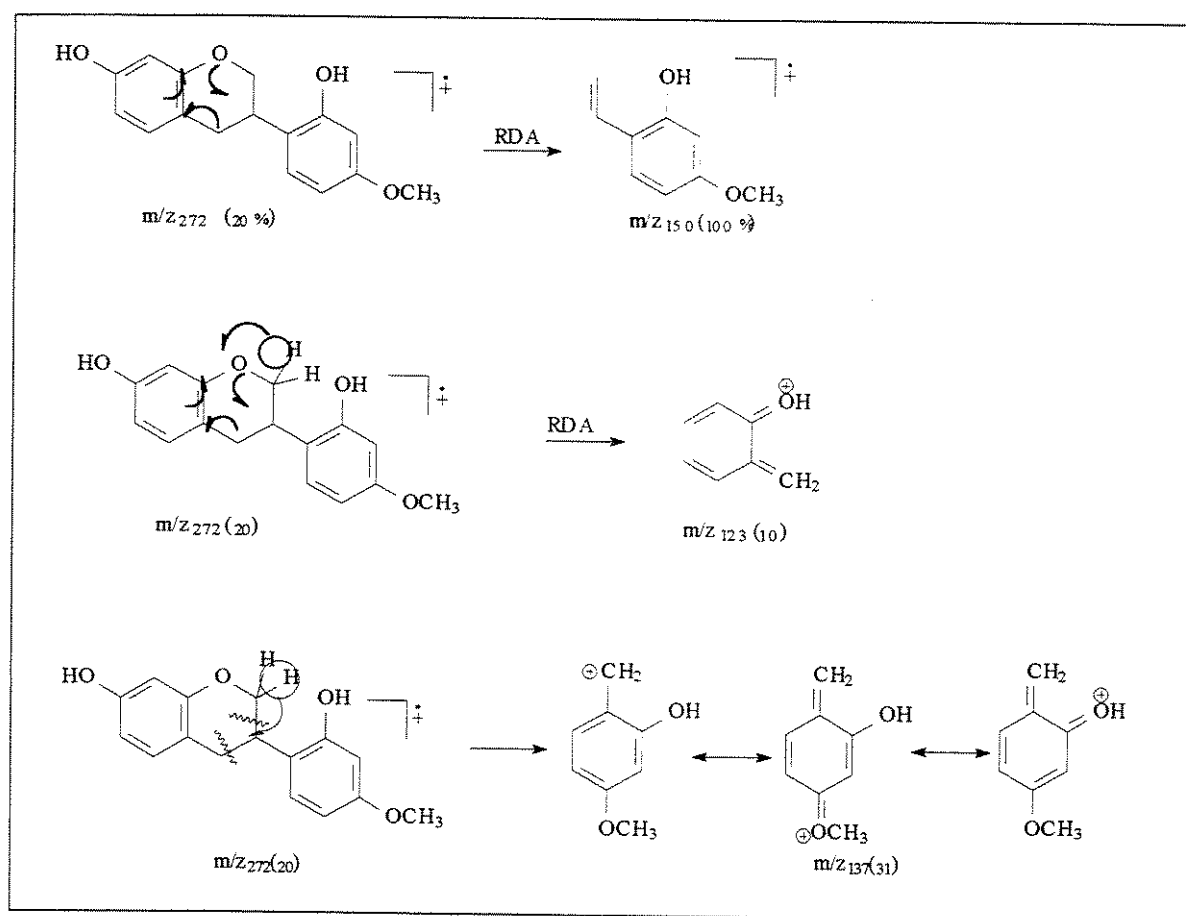
C	δ	C	δ
2	69,6	9	155,4
3	31,7	1'	120,2
4	30,1	2'	156,1
10	113,5	3'	101,7
5	130,3	4'	159,7
6	108,0	5'	104,9
7	156,9	6'	128,0
8	102,9	OCH_3	54,5

Tabela 2.3. Correlações observadas nos espectros HSQC (H-C; j^1) e HMBC (C-H; j^n) para a isoflavana vestitol (**E.4** e **E.5**; pg. 64-65)



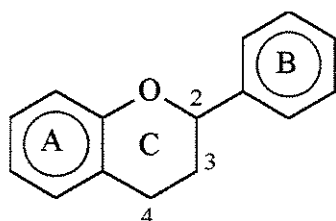
H(δ)	C(δ , J^n)
2eq (4,23)	2(69,6; J^1), 9(155,4; J^3), 1'(120,2; J^3)
2ax (3,97)	2(69,6; J^1), 9(155,4; J^3), 1'(120,2; J^3)
3 (3,47)	3(31,7; J^1); 2'(156,1; J^3), 6'(128,0; J^3), 1'(120,2; J^2), 2(69,6; J^2), 4(30,1; J^2)
4eq (2,80)	4(30,1; J^1), 9(155,4; J^3), 5(130,3; J^3), 1'(120,2; J^3), 10(113,5; J^2)
4ax (2,96)	4(30,1; J^1), 9(155,4; J^3), 5(130,3; J^3), 1'(120,2; J^3), 10(113,5; J^2), 6(108,0; J^4)
5 (6,89)	5(130,3; J^1), 8(102,9; J^4), 4(30,1; J^3), 7(156,9; J^3), 9(155,4; J^3)
6 (6,36)	6(108,0; J^1), 7(156,9; J^2), 8(102,9; J^3), 10(113,5; J^3),
8 (6,28)	8(102,9; J^1), 7(156,9; J^2), 9(155,4; J^2), 10(113,5; J^3)
3'(6,50)	3'(101,7; J^1), 2'(156,1; J^2), 4'(159,7; J^2), 1'(120,2; J^3), 5'(104,9; J^3)
5'(6,42)	5'(104,9; J^1), 4'(159,7; J^2), 3'(101,7; J^3), 1'(120,2; J^3)
6'(7,05)	6'(128,0; J^1), 4'(159,7; J^3), 2'(156,1; J^3), 3'(101,7; J^4), 3(31,7; J^3)
OCH ₃ (3,72)	OCH ₃ (54,5; J^1), 4'(159,7; J^3)

Quadro 2.1. Racionalização mecanística da fragmentação da isoflavana no espectrômetro de massas (E.7, pg. 66)



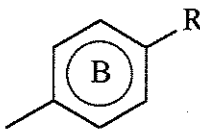
2.2. Flavana

O espectro de RMN ^1H (E.9, E.9a e E9b; apêndice, pg. 68-69) apresentou um duplo dubleto em 4,90ppm, dois duplos duplos dubletos em δ 2,90 e δ 2,67ppm, e multipletos em δ 2,12 e δ 1,99ppm. Estes dados representam um conjunto de sinais característicos do núcleo (O-CH-CH₂CH₂-) de uma flavana²⁴. No espectro de RMN ^{13}C (E.10), as absorções em δ 24,5 (C-4), 30,0 (C-3) e 78,0 ppm (C-2) também sinalizam a presença do anel pirano de uma flavana.^{19,21} O espectro UV (E.16), apresentando λ_{max} 224nm ($\log\epsilon=4,19$) e λ_{max} 294nm ($\log\epsilon=3,60$), fortalece nossa proposta de acordo com a literatura.²⁴

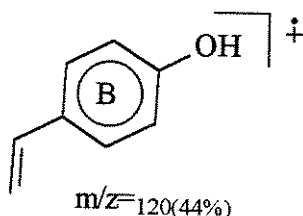


Estrutura básica das flavanas

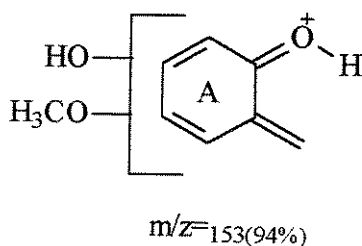
Ainda no primeiro espectro de RMN ^1H , a existência, na região de aromático, de dois dubletos (δ 7,28 e 6,86ppm), cada um integrando para dois hidrogênios e formando um sistema AA'XX', sugere um anel B para-substituído.



O espectro IV (E.15) indica a presença de hidroxila no composto (3383cm^{-1}). O espectro de massas (E.17) apresentou pico m/z 107, compatível com um anel B substituído por uma hidroxila. Este mesmo espectro mostrou ainda pico de m/z 120 proveniente supostamente de uma fragmentação do tipo retro-Diels-Alder que reforça a nossa proposta de substituição do anel B.

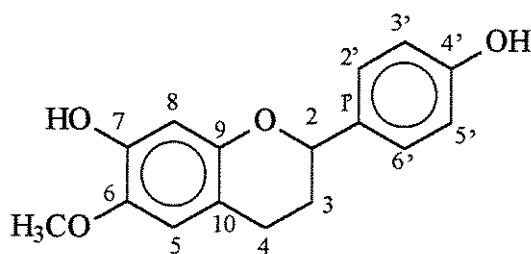


Um singlete em δ 3,77ppm no espectro de RMN ^1H , referente a três hidrogênios, sugere a presença de um grupo metoxila ligado a um anel aromático. O fragmento m/z 153 indicado no espectro de massas, referente a uma cisão retro-Diels-Alder com transferência de um hidrogênio, aponta como substituintes do anel A uma hidroxila e uma metoxila. Assim como, os dois singletos no espectro de RMN ^1H em δ 6,34 e 6,66ppm indicam que o anel A seja 6,7 dissustituído.



A correlação com C-4 no experimento HMBC (E.11) foi útil para atribuição do hidrogênio da posição 5 e assim diferenciá-lo do H-8.

Finalmente, irradiação na frequência de absorção da metoxila, sinalizado no espectro NOESY (E.14), mostrou sua correlação com o H-5. Assim, a estrutura completa da flavana é elucidada como 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana, uma estrutura inédita para esta rara classe de flavonóides.



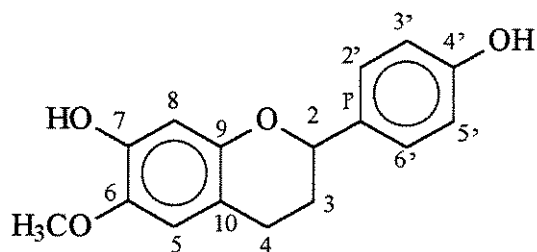
(2)

O espectro de massas de alta resolução (E.18) apresentou a massa do íon molecular de 272,10476, perfeitamente compatível com a fórmula molecular do composto elucidado: $C_{16}H_{16}O_4$ (272,10486).

Com o auxílio das técnicas de RMN bidimensionais HSQC (E.13) e HMBC (E.11) foi possível atribuir os deslocamentos químicos de todos os carbonos e hidrogênios (tabs., pg. 27-29). A análise do espectro de RMN 1H permitiu definir a conformação preferencial do anel C. A lógica é semelhante àquela aplicada na determinação da configuração relativa no centro estereoquímico da isoflavana (vestitol). As constantes de acoplamento $j=10,9$ e

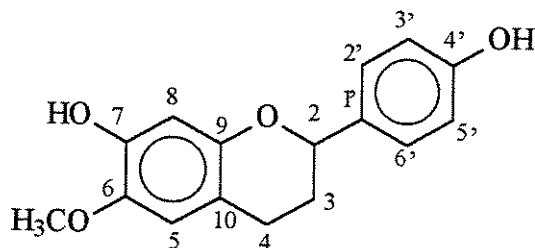
$j=2,2$ Hz do duplo dubleto (tab. 2.4, pg. 27) absorvendo em δ 4,90 ppm (H-2) apontam, respectivamente, para interações axial-axial e axial-equatorial. Assim, a posição do anel B é equatorial na conformação mais estável da estrutura. A flavana apresentou rotação óptica $[\alpha]_D^{20} = -7,4^\circ$.

Tabela 2.4. Dados de RMN ^1H (500MHz/acetona- d_6) da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana (**E.9**, pg. 68)



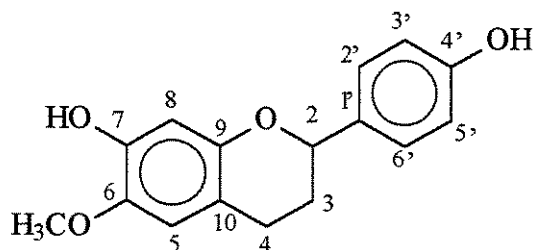
H	δ	multiplicidade e J
2	4,90	<i>dd</i> , $J=10,9\text{Hz}$, $J=2,2\text{ Hz}$
3a	2,12	<i>m</i>
3b	1,99	<i>m</i>
4eq	2,67	<i>ddd</i> , $J=16,2\text{ Hz}$, $J=5,4\text{ Hz}$ e $J=3,0\text{ Hz}$
4ax	2,90	<i>ddd</i> , $J=16,2\text{ Hz}$, $J=11,0\text{ Hz}$ e $J=6,0\text{ Hz}$
5	6,66	<i>s</i>
8	6,34	<i>s</i>
2'e 6'	7,28	<i>d</i> , $J=8,2\text{ Hz}$
3'e 5'	6,86	<i>d</i> , $J=8,2\text{Hz}$
OCH_3	3,77	<i>s</i>

Tabela 2.5. Dados de RMN ^{13}C (125MHz/acetona- d_6) da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana (**E.10**, pg.70)



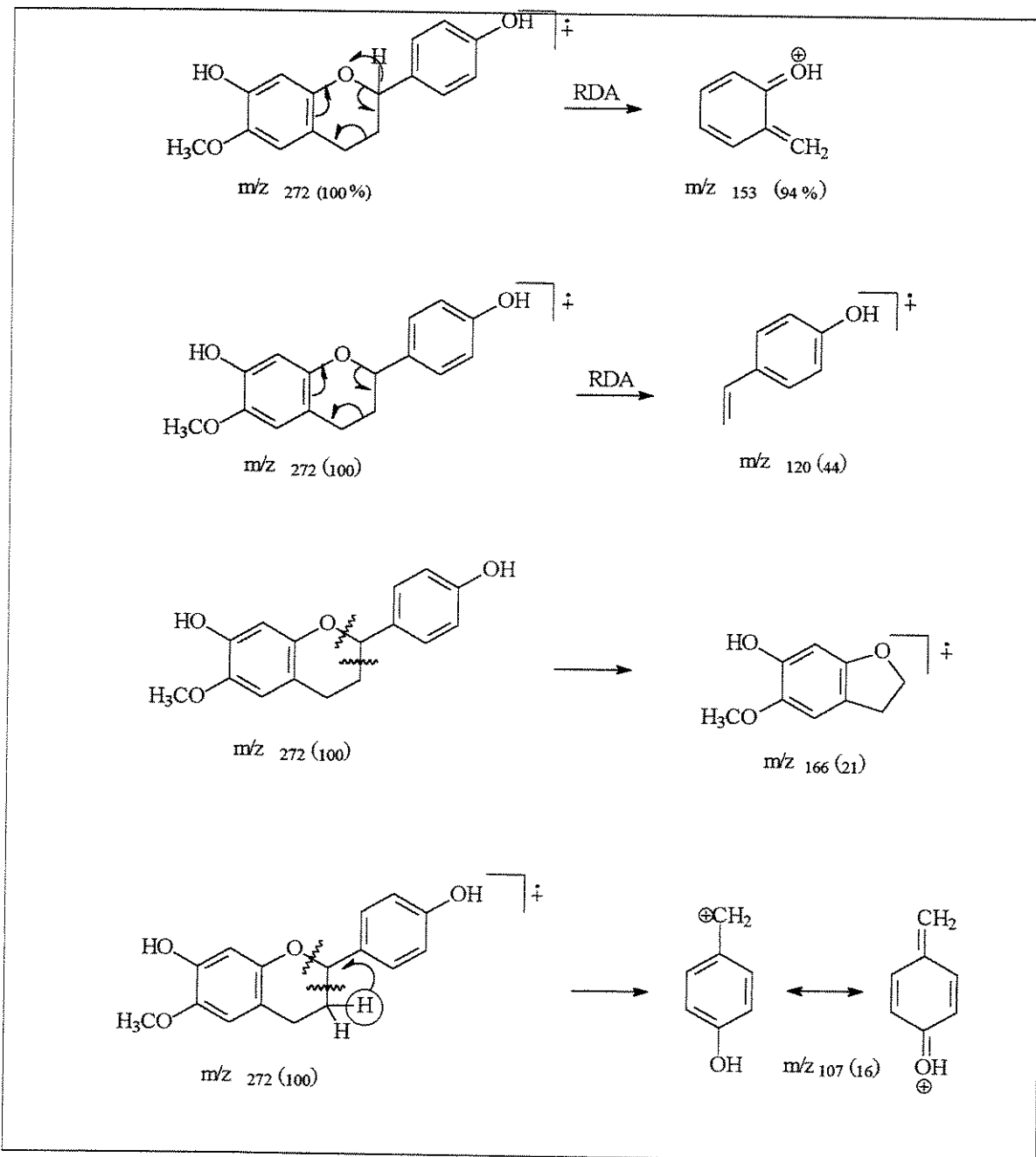
C	δ	C	δ
2	77,2	8	103,7
3	30,0	1'	133,3
4	24,5	2'e 6'	127,5
10	111,9	3'e 5'	115,1
5	112,9	4'	157,2
6	142,0	OCH ₃	56,1
7 e 9	146,0 e 149,7		

Tabela 2.6. Correlações observadas nos espectros HMBC (C-H; j^n) e HSQC (H-C; j^1) para a 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana (E.11-pg. 71 e E.13-pg. 73).



H (δ)	C (δ ; j^n)
2 (4,90)	2(77,2; j^1)
3a (2,12)	3 (30,0; j^1)
3b (1,99)	3 (30,0; j^1)
4eq (2,67)	4.(24,5; j^1), 10 (111,9; j^2)
4ax (2,90)	4.(24,5; j^1), 10 (111,9; j^2)
5 (6,66)	5(112,9; j^1), 7 e 9(146,0 e 149,7; j^3), 6(142,0; j^2), 8(103,7; j^4), 10(111,9; j^2), 4(24,5; j^3)
8.(6,34)	8(103,7; j^1), 7 e 9(146,0 e 149,7; j^2), 6(142,0; j^3), 10(111,9; j^3)
2'(7,28)	2'(127,5; j^1), 6'(127,5; j^3), 4'(157,2; j^3), 2(77,2; j^3), 3'(115,1; j^2)
6'(7,28)	6'(127,5; j^1), 2'(127,5; j^3), 4'(157,2; j^3), 2(77,2; j^3), 5'(115,1; j^2)
3'(6,86)	3'(115,1; j^1), 4'(157,2; j^2), 1'(133,3; j^3), 5'(115,1; j^3)
5'(6,86)	5'(115,1; j^1), 4'(157,2; j^2), 1'(133,3; j^3), 3'(115,1; j^3)

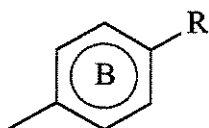
Quadro 2.2. Racionalização mecanística da fragmentação da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana no espectrômetro de massas²⁴ (E.17, pg. 76)



2.3. Chalcona

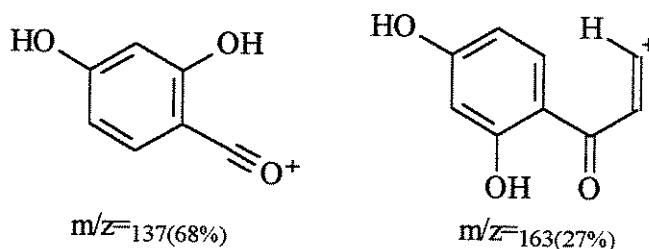
O espectro de RMN ^1H (**E.19**, apêndice, pg. 78) mostrou um singlete em δ 13,6ppm característico de hidroxila quelatogênica. Outras características estruturais foram as indicações, no espectro na região do infravermelho²⁵ (**E.20**), da presença de uma cetona conjugada (1640cm^{-1}) e conjugação trans do $\text{HC}=\text{CH}$ (1613cm^{-1}), além do UV (**E.21**) coerente com os dados da literatura¹⁴ para chalconas.

No espectro de RMN ^1H (**E.19a**), o sistema $\text{AA}'\text{XX}'$ sinalizado pelos dubletos em δ 6,93 (2H) e δ 7,8ppm (2H) são indicativos de para-substituição no anel B.

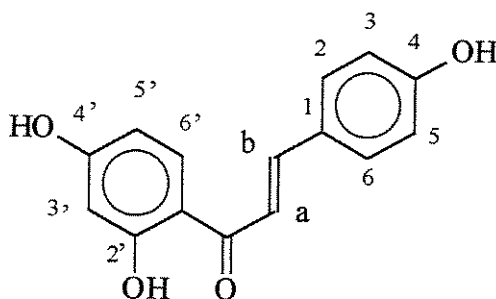


Ausência de sinal no espectro de RMN ^1H (**E.19**) referente à metoxila e a massa molecular indicada no espectro de massas (**E.22**) foram relevantes no processo de elucidação da estrutura. A análise do sistema AMX representado por um duplo dubleto com acoplamento orto (δ 8,12ppm, $J=9,0\text{Hz}$), um dubleto com acoplamento meta (δ 6,37ppm, $J=2,7\text{Hz}$) e um duplo dubleto com acoplamentos orto e meta (δ 6,47ppm, $J=9,0\text{Hz}$, $J=2,7\text{Hz}$). Junto com todas as

outras informações já explicitadas foram suficientes para propor três hidroxilas como substituintes. Foi possível ainda apontar as posições 2', 4' e 4 como aquelas às quais estão ligadas.

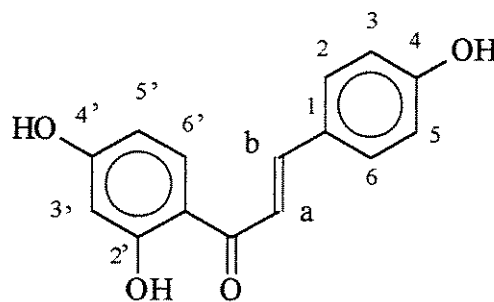


Os fragmentos m/z 137 (68) e m/z 163 (27) reforçam a proposta. Finalmente, comparação dos dados espectroscópicos (UV, IV e RMN ^1H), bem como do ponto de fusão ($195\text{-}198^\circ\text{C}$), com a literatura confirmam a estrutura da chalcona como 2',4',4-trihidroxil chalcona, conhecida usualmente como isoliquiritigenina²⁵.



(3)

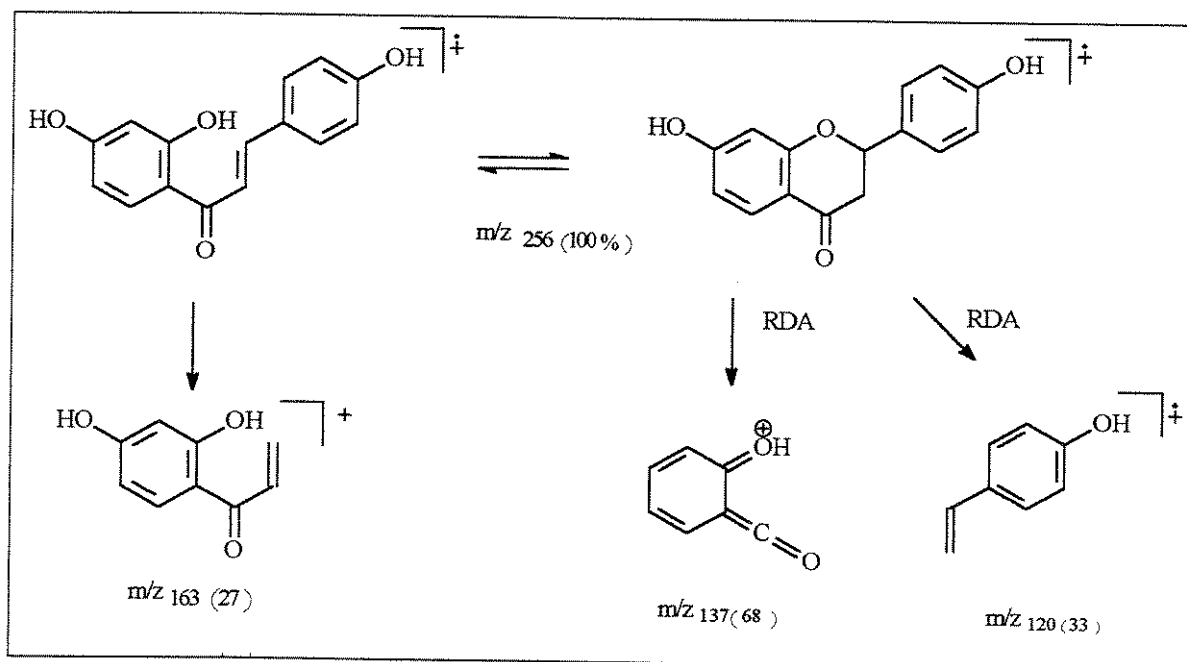
Tabela 2.7. Dados do espectro de RMN ^1H (500 MHz, acetona- d_6 /TMS) da isoliquiritigenina (E.19, pg. 78).



H	δ	multiplicidade e J
2 e 6	7,80	<i>d</i> , $J=9,0$ Hz
3 e 5	6,93	<i>d</i> , $J=9,0$ Hz
3'	6,37	<i>d</i> , $J=2,7$ Hz)
5'	6,47	<i>dd</i> , $J=9,0$ Hz, $J=2,7$ Hz
6'	8,12	<i>d</i> , $J=9,0$ Hz
Ha	7,76	<i>d</i> , $J=18,1$ Hz
Hb	7,79	<i>d</i> , $j=18,1$ Hz

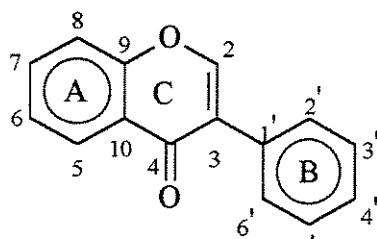
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Quadro 2.3. Racionalização mecanística da fragmentação da isoliquiritigenina no espectro de massas (E.22, pg. 81).



2.4. Isoflavona

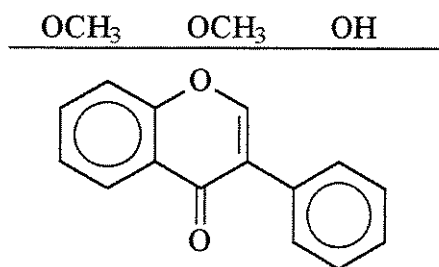
Um singlete bem definido em δ 8,19 ppm apresentado no espectro de RMN ^1H (E.23, E.23a, pg. 82-83) e sinal de carbonila conjugada (δ 174,9ppm) mostrado no espectro de RMN ^{13}C (E.24) são sugestivos de esqueleto de uma isoflavona^{14,19}. Espectro UV (E.27) do composto está de acordo com os dados apresentados na literatura¹⁴ para esta classe de isoflavonóides



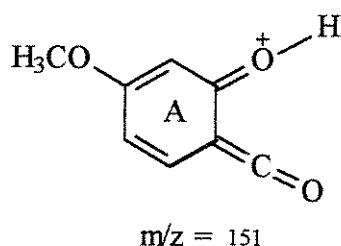
Estrutura básica das isoflavonas

O peso molecular (298) obtido no espectro de massas (E.28), junto com os sinais de duas metoxilas aromáticas ($\delta=3,87$ e $\delta=3,96$ ppm) obtidos no espectro de RMN ^1H (E.23), sugerem a existência de uma hidroxila como terceiro substituinte.

Na figura abaixo verifica-se a isoflavona com seus substituintes, cujas posições permanecem indefinidas.



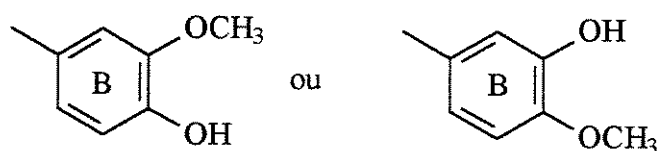
O fragmento m/z 151 apresentado no espectro de massas (**E.28**), resultante de uma cisão do tipo retro-Diels-Alder (cisão característica¹⁶ neste tipo de estrutura), sinaliza para uma metoxila no anel A e uma metoxila mais uma hidroxila no anel B.



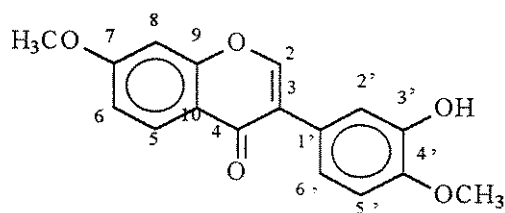
No espectro de RMN ^1H , um duplo dubleto com acoplamentos *orto* e *para* absorvendo em alta frequência ($\delta=8,10\text{ppm}$) foi atribuído ao hidrogênio H-5, ficando a metoxila na posição 7.

Os sinais dos hidrogênios das posições 6 e 8 foram mais difíceis de serem identificados (**E.23** e **E.23b**), devido à absorção do hidrogênio 6' ocorrer na mesma região ($\delta=7,05\text{ ppm}$). O padrão de primeira ordem foi perturbado. A porção MX, do sistema AMX, representados pelos hidrogênios 6 e 8 junto com um componente M' (hidrogênio 6') de um outro sistema A'M'X' sofrem desdobramentos de segunda ordem. Fora desta região mais complexa do espectro aparecem os outros dois sinais do anel B. Os dubletos em $\delta 6,97\text{ ppm}$ (H-5') e $\delta 7,16\text{ ppm}$ (H-2').

No experimento visando detectar possível efeito Overhauser Nuclear (E.26) constatou-se correlação entre o hidrogênio da posição 2 com os hidrogênios H-6' e H-2', após irradiação na frequência do primeiro (H-2). Este resultado aponta 3' e 4' como as posições dos substituintes no anel B. Assim, teríamos duas possibilidades:



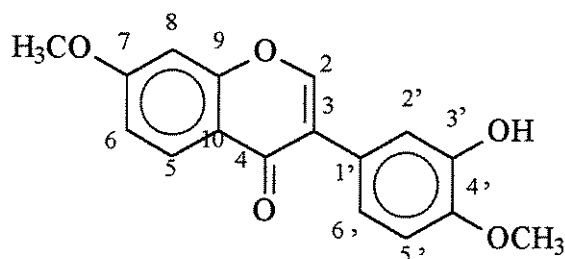
Finalmente, irradiação (E.26a) na frequência de absorção da metoxila do anel B ($\delta=3,87$ ppm) provocou aumento exclusivamente no sinal do dubleto em $\delta=6,97$ ppm (H-5'), indicando 4' como a posição da metoxila. Assim, a estrutura é elucidada como 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona, um isoflavonóide inédito.



(4)

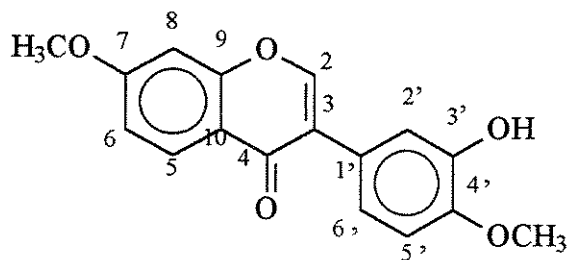
O espectro de massas de alta resolução (E.29) apresentou a massa do íon molecular de 298,08439, perfeitamente compatível com a fórmula molecular da isoflavona elucidada: $C_{17}H_{14}O_5$ (298,08412).

Tabela 2.8. Dados do espectro de RMN ^1H (500 MHz, acetona- d_6) da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona (**E.23**, pg. 82).



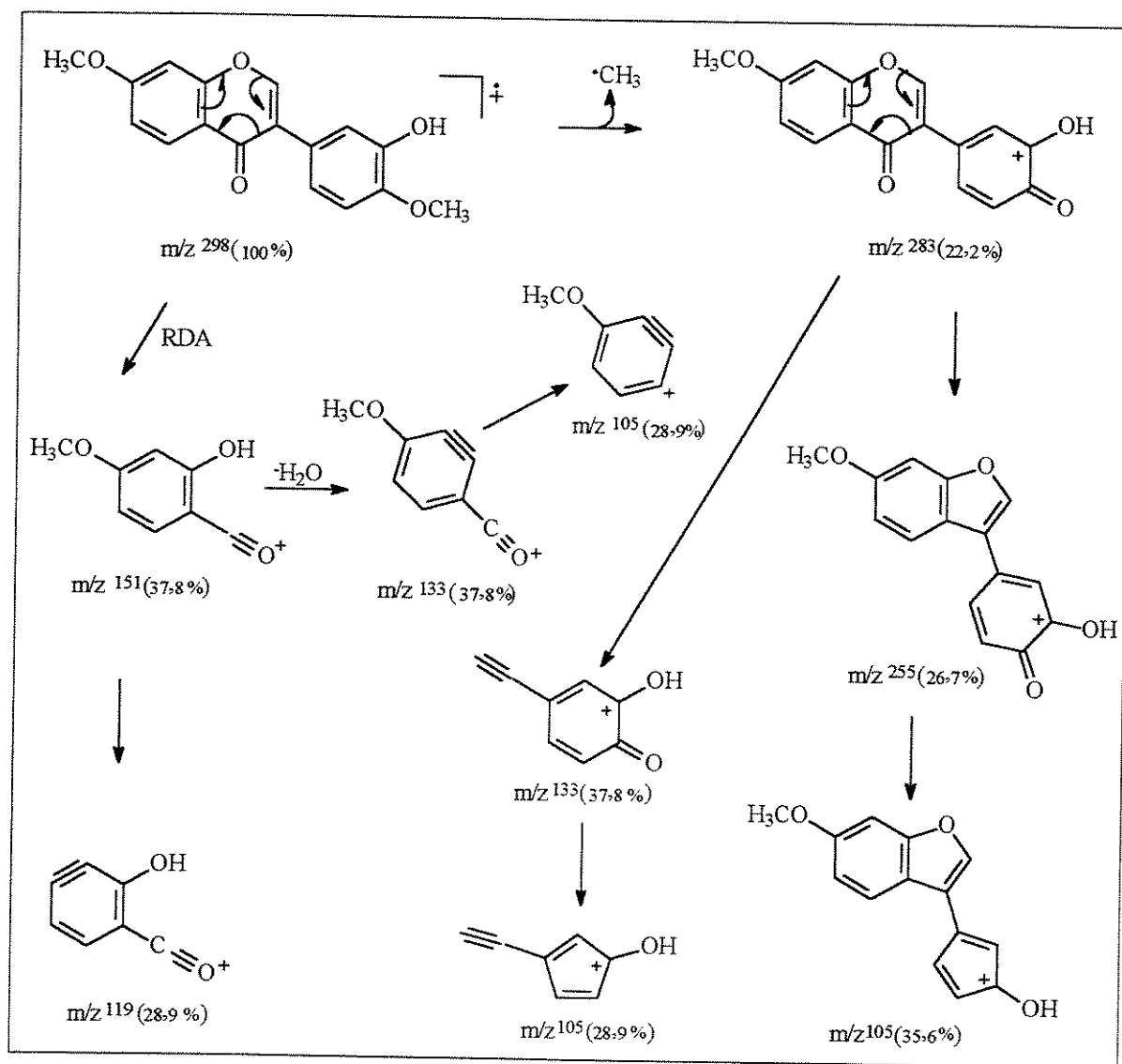
H	δ	multiplicidade e J
2	8,19	<i>s</i>
5	8,10	<i>dd</i> , $J=8,5\text{ Hz}$, $J=0,5\text{ Hz}$
6	7,07	<i>dd</i> , $J=8,5\text{ Hz}$, $J=2,0$
8	7,03	<i>dl</i> , $J=2,0\text{ Hz}$
2'	7,16	<i>d</i> , $J=2,0\text{ Hz}$
5'	6,97	<i>d</i> , $J=8,5\text{ Hz}$
6'	7,05	<i>dd</i> , $J=8,5\text{ Hz}$, $J=2,0\text{ Hz}$
7-OCH ₃	3,96	<i>s</i>
3'-OCH ₃	3,87	<i>s</i>

Tabela 2.9. Dados do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, acetona) da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona (**E.24**, pg. 84).



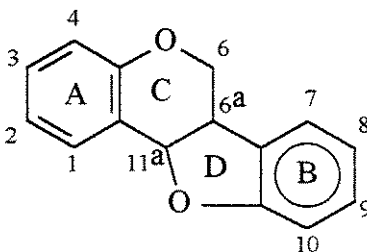
C	δ	C	δ
2	153,0	9	158,1
3 e 1'	124,6 e 125,5	10	118,5
4	174,9	2'	116,2
5	127,5	3' e 4'	146,5
6	111,5	5'	114,7
7	164,4	6'	120,4
8	100,4	2 OCH ₃	55,8 e 55,6

Quadro 2.4. Racionalização mecanística da fragmentação da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona no espectro de massas (E.28, pg. 87).



2.5. Pterocarpano

O complexo sistema formado, no espectro de RMN ^1H (**E.30** e **E.30a**, apêndice, pg. 89-90), por 4 hidrogênios em δ 5,55 (H-11a), 4,24 (H-6eq) e 3,60 ppm (H-6ax e H-6a) bem como as constantes de acoplamento entre eles $J_{\text{H11a-H6a}} = 7,2$ Hz, $J_{\text{H6eq-H6a}} = 4,8$ Hz e $J_{\text{H6eq-H6ax}} = 10,8$ Hz são característicos do anel heterocíclico de pterocarpanos²³.



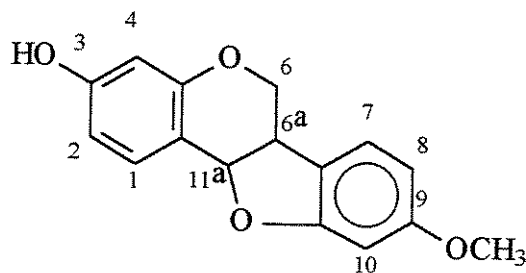
Estrutura básica dos pterocarpanos

O espectro UV (**E.31**) mostrou-se de acordo com esta proposta. O fragmento m/z 161 apresentado no espectro de massas (**E.32**), indicando que os substituintes estão em anéis distintos, mais a presença de dois dubletos com acoplamento orto no espectro de RMN ^1H e, finalmente, análise comparativa por CCD com padrão isolado anteriormente em nosso laboratório apontaram a estrutura da medicarpina como composto isolado. A comparação por cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada usando sistemas de desenvolvimento variados. Posterior comparação dos dados espectrométricos

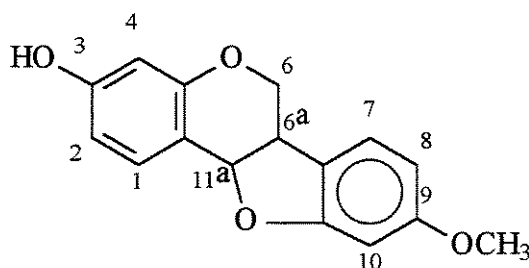
de massas e RMN ^1H com a literatura²⁶ confirmaram a estrutura do pterocarpano.

A presença de dois centros estereoquímicos nos pterocarpanos implica na possibilidade da existência de quatro estereoisômeros. Entretanto, como é estabelecido que a junção dos dois anéis heterocíclicos é uma fusão *cis*, somente um par de enantiômeros é possível²⁷. É aceita a configuração absoluta para o (-) pterocarpano como 6aR e 11aR. E o (+) enantiômero como 6aS, 11aS.

O pterocarpano isolado apresentou rotação óptica $[\alpha_D^{20}] = -292^\circ$.

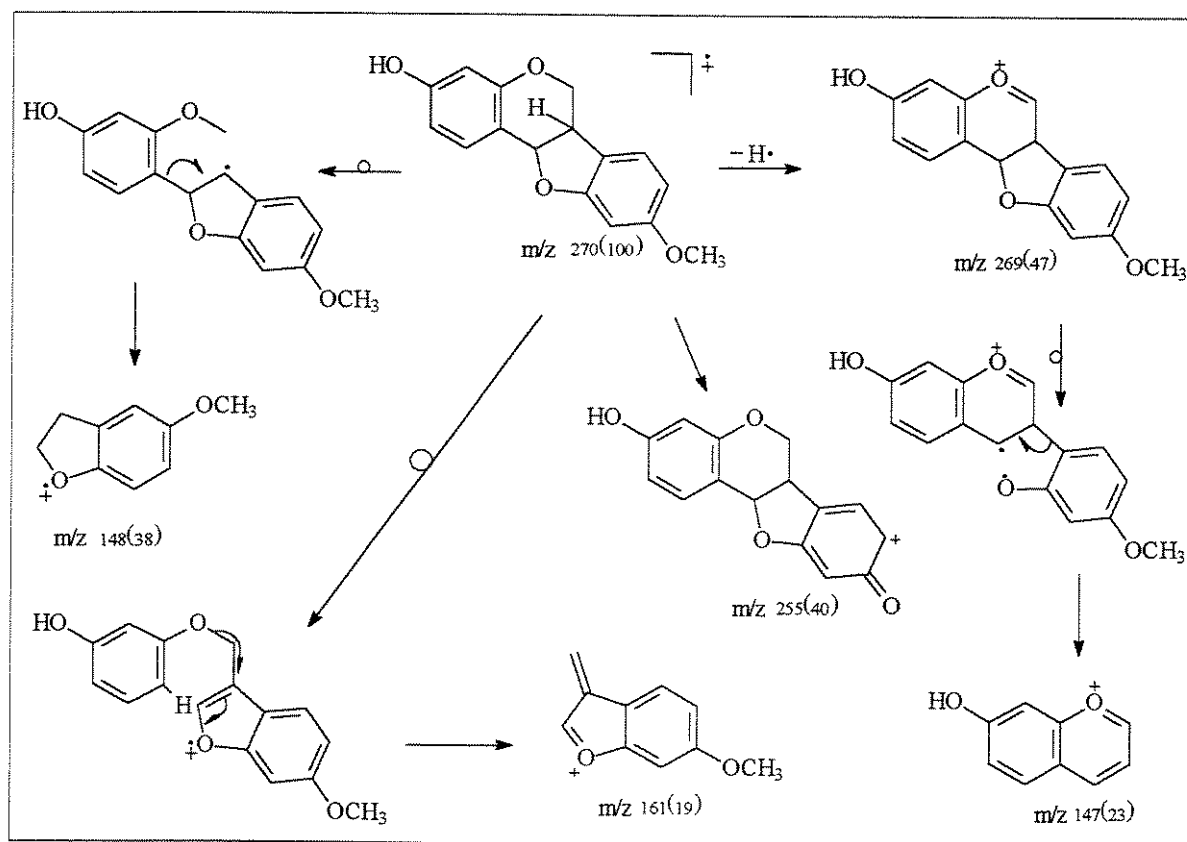


(5)

Tabela 2.10. Dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da medicarpina (**E.30**, pg. 89)

H	δ	multiplicidade e J
1	7,39	<i>d</i> , $J=8,4$ Hz
2	6,55	<i>dd</i> , $J=8,4$ Hz, $J=2,7$ Hz
4	6,42	<i>d</i> , $J=2,4$ Hz
6ax e 6a	3,60	<i>m</i>
6eq	4,24	<i>dd</i> , $J=10,8$ Hz
7	7,13	<i>d</i> , $J=8,7$ Hz
8 e 10	6,46	<i>m</i>
11a	5,50	<i>d</i> , $J=7,2$ Hz

Quadro 2.5. Racionalização mecanística da fragmentação da medicarpina no espectro de massas (E.32, pg. 92).



3. Parte experimental

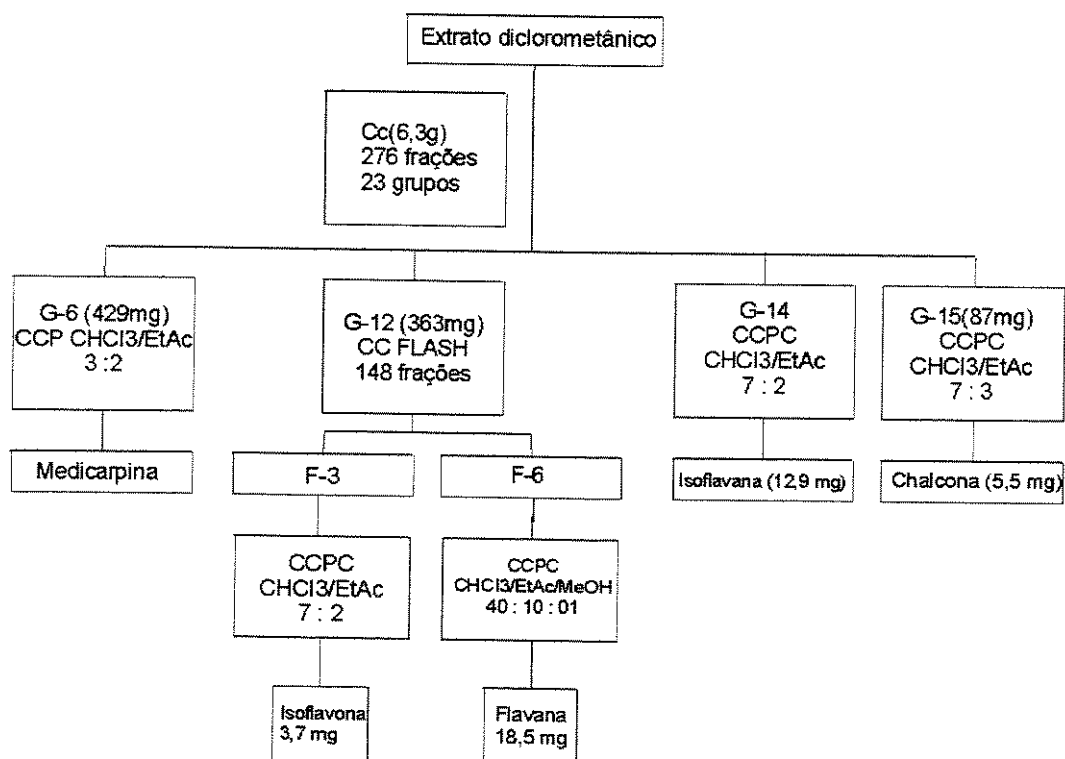
3.1. Coleta e tratamento das raízes

As raízes de *Platycyamus regnellii* foram coletadas no Estado de Minas Gerais em abril de 1997. Após tratamentos de secagem ao ar e em estufa a 40°C, a raiz foi moída e uma pequena porção do pó resultante foi submetida ao processo de extração via soxhlet. Usou-se como agente extrator, primeiramente, o éter de petróleo; em seguida, diclorometano; e por último, metanol.

Após análise comparativa por cromatografia em camada delgada dos três extratos obtidos, constatou-se semelhança (em relação à composição de flavonóides) entre os dois primeiros. Submetemos, então, todo o pó da raiz a extração usando apenas diclorometano como agente extrator.

Do extrato diclorometânico, foi tomado 6,3 gramas e fracionado por cromatografia clássica em coluna de sílica-gel 70-230 Mesh. Usou-se diclorometano como eluente, aumentando-se sua polaridade por acréscimo gradativo de metanol.

As frações coletadas foram analisadas previamente por cromatografia em camada delgada e selecionadas em grupo. Mediante cromatografia “FLASH”²⁸ e cromatografia preparativa em placas, isolou-se os 5 flavonóides.



Fluxograma 3.1. Isolamento dos flavonóides

3.2. Métodos cromatográficos

Na cromatografia em camada delgada (CCD), as placas (sílica gel GF₂₅₄/Merck) foram reveladas mediante irradiação de luz ultravioleta (254 e 365nm) e nebulização com solução de anisaldeído (etanol/anisaldeído/ácido sulfúrico/ácido acético 90:5:5:1), seguida de aquecimento.

As placas de cromatografia em camada delgada preparativa foram confeccionadas em nosso laboratório com sílica-gel PF₂₅₄ (Merck).

As cromatografias em coluna “FLASH” e em coluna clássica foram empacotadas com sílica-gel 200-400 e 70-230mesh, respectivamente, utilizando-se cerca de 50g de sílica por cada grama de amostra analisada.

3.3. Métodos espectrométricos

Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C foram obtidos nos espectrômetros Varian-Gemini 300 BB e INOVA 500.

Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro CG/EM 5988 HP, por impacto de elétrons (70eV) usando uma coluna DB-5 sob as seguintes condições:

condições:	temperatura inicial	50°C
	tempo inicial	01minuto

Razão de aquecimento	15°C/minuto
temperatura final	290°C
tempo final	20minutos

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram registrados no espectrofotômetro CARY 5G UV-VIS NIR Spectrophotometer. O solvente utilizado foi o metanol grau HPLC e cela de quartzo de 1cm. Os valores da absorvidade molar (ϵ) foram calculados por:

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

$$l = \text{caminho ótico da cela} \quad A = \text{absorbância}$$

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer modelo 1600 (FTIR), em pastilha KBr. A referência utilizada foi a absorção em 1601 cm^{-1} de um filme de poliestireno.

Os valores de rotação óptica α foram medidos, usando solvente metanol grau HPLC, em um polarímetro Carl Zeiss Jena Polamart A com lâmpada de mercúrio (546nm) e devidamente corrigidos para raia D da lâmpada de sódio segundo as relações: $[\alpha]_{\text{Hg}} = [\alpha]_{\text{obs}}/cl$, onde:

$$c = \text{concentração da amostra (g/ml)} \quad l = \text{comprimento da cela (0,1dm)}$$

$$[\alpha]_{\text{obs}} = \text{rotação lida no aparelho} \quad t = \text{temperatura (°C)}$$

$$[\alpha]_{\text{Hg}} = 1,17543[\alpha]_{\text{Na}} \quad [\alpha]_{\text{Na}}^t = [\alpha]_{\text{Na}}^{20} [1 + 0,000143(t-20)]$$

4. Ensaio biológicos

4.1. Bioensaio de letalidade com *Artemia salina* (“brine shrimp Letality Test”)

Os flavonóides são uma classe de metabólitos secundários que apresentam uma variedade de compostos com atividade biológica²⁹. Devido à sua atividade antimicrobial, muitos flavonóides são apontados na planta como uma espécie de barreira química aos microrganismos invasores.

Muitos compostos naturais são isolados, caracterizados e publicados sem que sua atividade biológica tenha sido testada. Muitas vezes isso ocorre devido ao custo ou complexidade do ensaio. O teste da *Artemia salina*³⁰ constitui um ensaio geral que pode detectar um largo espectro de atividade farmacológica em plantas. Vale ressaltar o significado deste teste como uma indicação da atividade citotóxica. Possui ainda as vantagens de rapidez, simplicidade e baixo custo.

O ensaio foi desenvolvido de acordo com a técnica proposta por McLaughlin. Ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em solução de sal marinho (38 g/L), em pequeno tanque coberto parcialmente, de modo

que os ovos ficassem na parte escura e os camarões na região iluminada. Esperou-se 48h para que os ovos se convertessem em larvas.

O extrato diclorometânico foi então diluído segundo esquema 1. Após evaporação total do solvente, cada um dos nove frascos recebeu cerca de 3,0 mL de solução salina (38g/L), 10 larvas de camarão e o volume final foi ajustado para 5,0 mL. Depois de 24h em repouso, procedeu-se a contagem do número de camarões sobreviventes. Esses dados foram analisados em programa Finney para análise estatística e assim determinar os valores de DL50. O programa foi adquirido junto ao Dr. McLaughlin. O extrato mostrou-se ativo apresentando uma $DL50=10,52 \mu\text{g/mL}$.

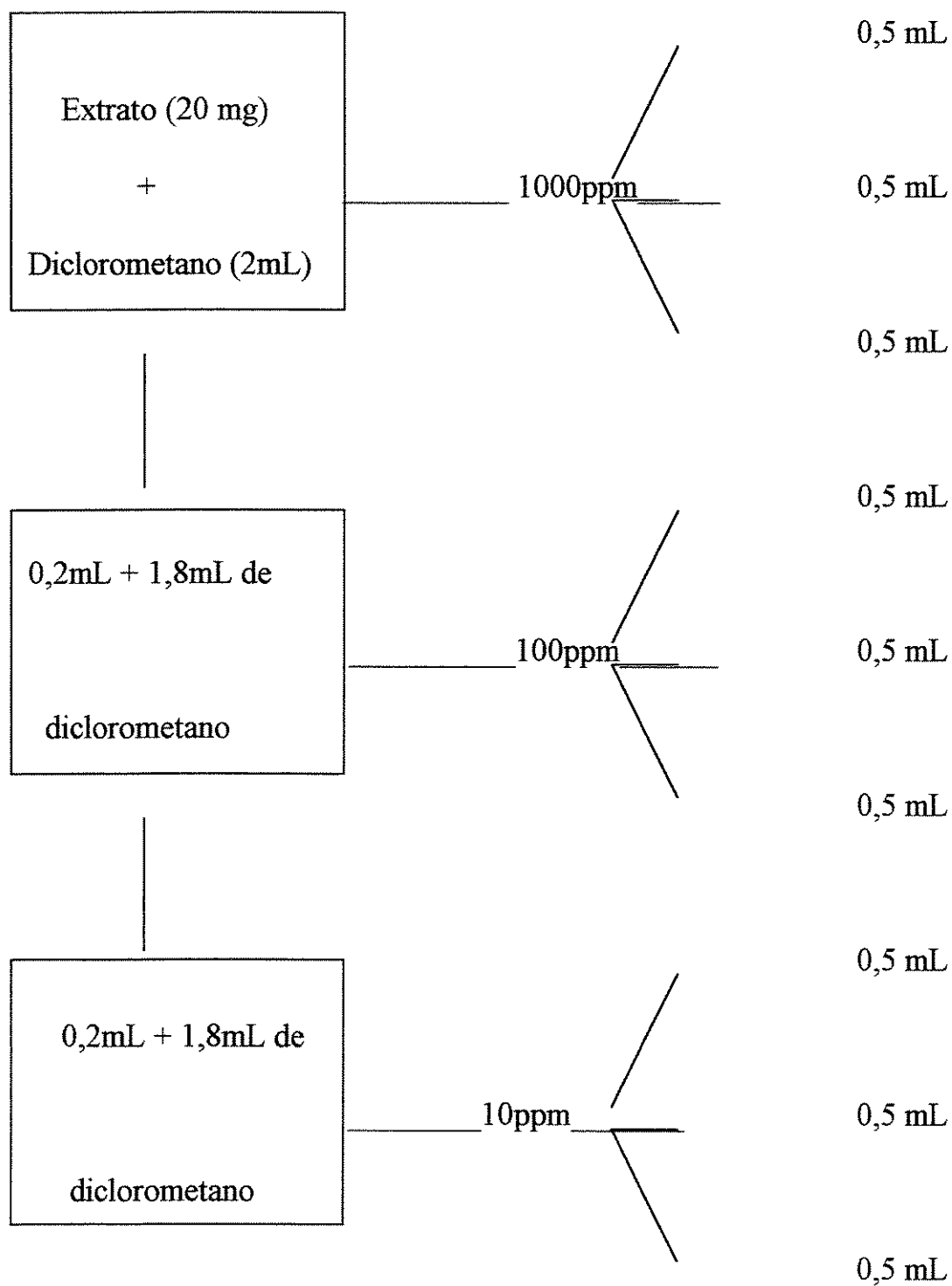


Figura 4.1. Procedimento para diluição do extrato

4.2. Ensaio de bioautografia³¹

Este ensaio foi realizado segundo o protocolo descrito por Saxena³¹, com algumas modificações adaptadas ao nosso laboratório. Tanto o extrato quanto os compostos isolados foram dissolvidos em metanol na concentração de 10mg/mL. Foram aplicadas em duas placas CCD (Merck sílica-gel GF₂₅₄, 6x6cm) 2µL de cada composto e 1µL de antibiótico (clorafenicol) e desenvolvidas em clorofórmio/acetato de etila 3:2. Após o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda de 254nm e 365nm. 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 90mm de diâmetro, na qual foi adicionada 20mL de meio de cultura específico ao microrganismo testado; Após solidificação do meio, inoculou-se 200mL de suspensão do microrganismo contendo cerca de 10⁶ células/mL, realizando-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 bacteriano. Todas as placas foram encubadas por 24h a temperatura de 37°C, 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.

O meio de cultura utilizado foi o NA (Agar Nutriente) constituído de peptona (5g) + extrato de carne (3g) + agar (15g) + água destilada (1L).

A chalcona isoliquiritigenina apresentou atividade frente a *Bacillus subtilis*. Os demais flavonóides não apresentaram atividade antibacteriana a estas linhagens

Tabela 4.1. Avaliação da atividade antibacteriana dos flavonóides isolados

	isoflavana (vestitol)	flavana	chalcona (isoliquiritigenina)	isoflavona	pterocarpano (medicarpina)
<i>Staphylococcus aureus</i> CCT 4295	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> CCT 5050	-	-	-	-	-
<i>Rodococcus equi</i> CCT 0541	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 0089	-	-	+	-	-

5-CONCLUSÃO

O presente estudo nos permitiu isolar 5 flavonóides, sendo dois deles inéditos. Vale ressaltar que *Platycyamus regnellii* compõe um gênero de apenas duas espécies e que ainda não havia sido estudada, portanto trata-se de um trabalho inédito.

Todos os flavonóides isolados que apresentaram atividade óptica são levógiros.

A maioria dos compostos isolados pertence à classe dos isoflavonóides. Este fato constitui uma evidência de que a espécie *Platycyamus regnellii* estaria bem classificada alocada na sub família papilionoideae e tribo Miletieae conforme estabelecido pela classificação vigente. Entretanto, a avaliação quimiossistemática da sua posição a nível de gênero seria mais prudentemente efetuada após estudo químico da outra espécie do gênero.

A chalcona isoliquiritigenina apresentou atividade bactericida contra *Bacillus subtilis* CCT 0089.

6. Bibliografia

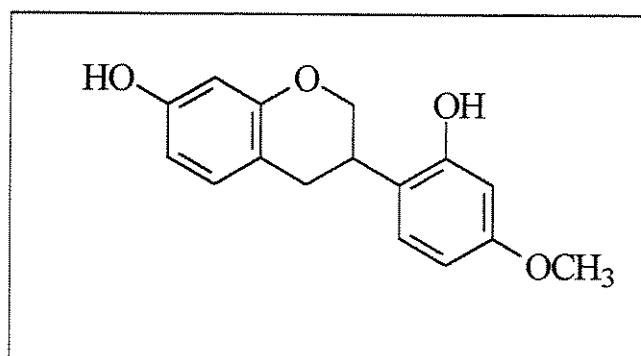
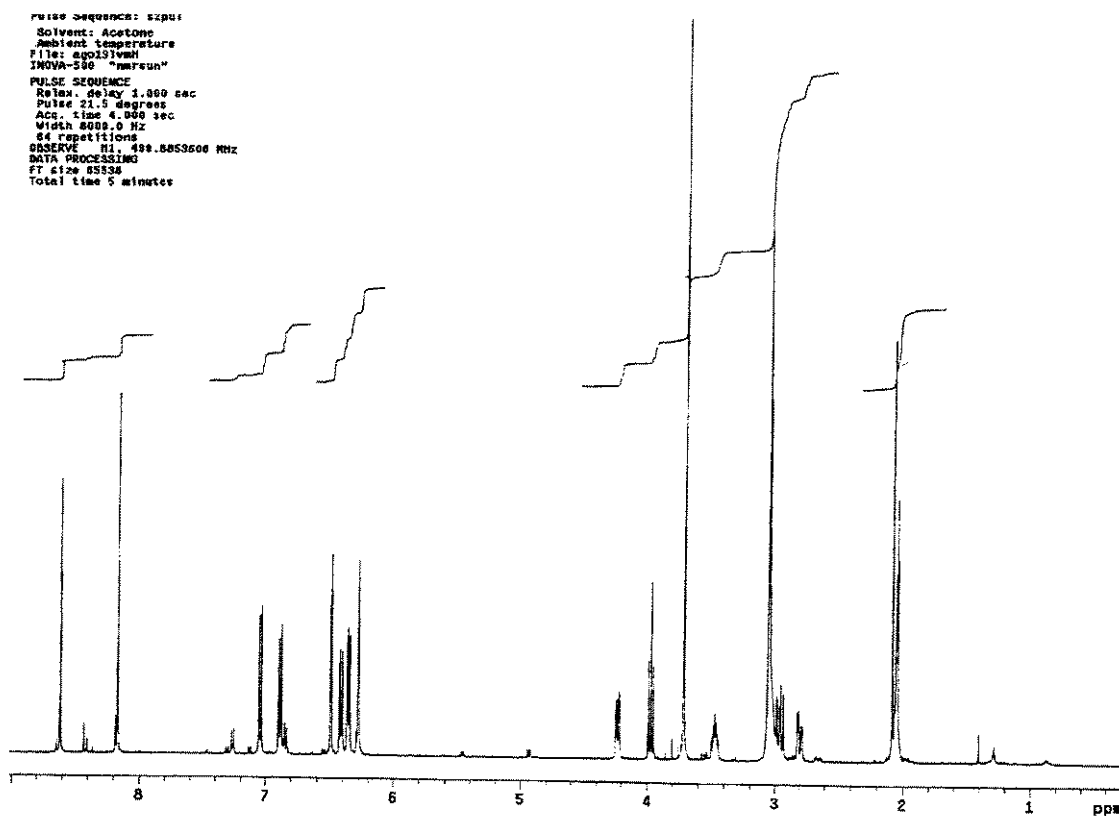
1. HEGNAUER, R & GRAYER-BARKMEIJER, R.J., Relevance of Seed Polysaccharides and Flavonoids for the Classification of the Leguminosae: A Chemotaxonomic Approach, *Phytochemistry*, **34**, (1), 3, (1993).
2. TOZZI, A.M.G., Estudos Taxonômicos dos Gêneros *Lonchocarpus kunth* e *Deguelia Aubl.* no Brasil, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia-UNICAMP, Campinas, (1989).
3. BOHLMANN, F.B., ZDERO, T., Naturally Occurring Acetylenes, cap.6, N.Y., Academic Press, (1973).
4. GOTTLIEB, O.R., Micromolecular Evolution, Systematic and Ecology, Springer-Verlog, Berlim, cap.14, (1982).
5. ROWE, J.W, Natural Products of Woods Plants I , Springer Verlag Berlim Heideeburg, 535, (1989).
6. BARRON, D., IBRAHIM, R.K., Isoprenylated Flavonoids-A Survey, *Phytochemistry*, **43**, 921, (1996).
7. TAHARA, S., IBRAHIM, R.K., Prenylated Isoflavonoids- An Update, *Phytochemistry*, **38**, 5, 1073, (1995).

8. HARBORNE, J.B. The Flavonoids Advances in Research since 1986, Chapman & Hall, London, Cap.5, (1994).
9. INGHAM, J.L., Naturally Occurring Isoflavonoids (1855-1981), University of Reading, U.K., (1982).
10. PACHLER, K.G.R., UNDERWOOD, W.G.E., A Proton Magnetic Resonance Study of some Pterocarpan Derivatives, *Tetrahedron*, **23**, 1817, (1966)
11. GOTTLIEB, O.R. Micromolecular Evolution, Systematic and Ecology, Springer-Verlog, Berlim, p.121 (1982).
12. LORENZ, H., Árvores Brasileiras - Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil. Ed. Plantarum, (1992).
13. GEESINK, R., Tribe 6. Tephrosieae (Benth) Hutch em: R.M Polhill, & P.H Raven, (ed.), *Advances in Legume sistematics*, vol 1, (1981).
14. MARKHAM, K.R. e MABRY, T.J., Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids, em: *The Flavonoids*, ed. J.B. Harborne, T.J. Mabry, e H. Mabry, N.Y., Academic Press, cap.2, (1975).
15. MCLAFFERTY, F.W. E TURECEK, F., Interpretation of Mass Spectra, USB, cap. 4, (1993).

16. MARKHAM, K.R. e MABRY, T.J., Mass Spectroscopy of Flavonoids”, em: *The Flavonoids*, ed. J.B. Harborne, T.J. Mabry, e H. Mabry, N.Y., Academic Press, p.78, (1975).
17. MAHATO, S.B. E KUNDU, A.P., ^{13}C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-A Compilation and some Salients Features. *Phytochemistry*, **37**, 1517, (1994).
18. HARBORNE, J.B. E MABRY, T.J., Advances in Research: The Flavonoids,.Chapman & Hall, 536, (1982).
19. AGRAWAL, P.K., Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier, (1989).
20. GOMES, C.M.R., GOTTLIEB, O.R., BETTOLO, G.B.M., MONACHE, F.D. e POLHILL, R.M., Systematic Significance of Flavonoids in Derris and Lonchocarpus, *Biochem Syst. and Ecol.*, **9**, 129, (1981)
21. ROMERO, J. R. Fundamentos da Estereoquímica dos Compostos Orgânicos, cap. 6, Holos ed., (1998).
22. KARPLUS, M., Contact Electron-Spin Couplin of Nuclar Magnetic Moments, *J.Chem. Phys.*, **30**, 11, (1959).
23. WONG, E., The Isoflavonoids, em: *The Flavonoids*, ed. J.B.Harborne, T.J.Mabry, e H.Mabry, N.Y.,Academic Press, cap. 14, (1975).

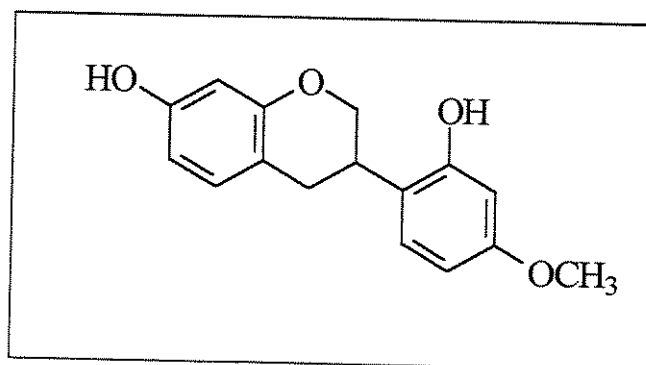
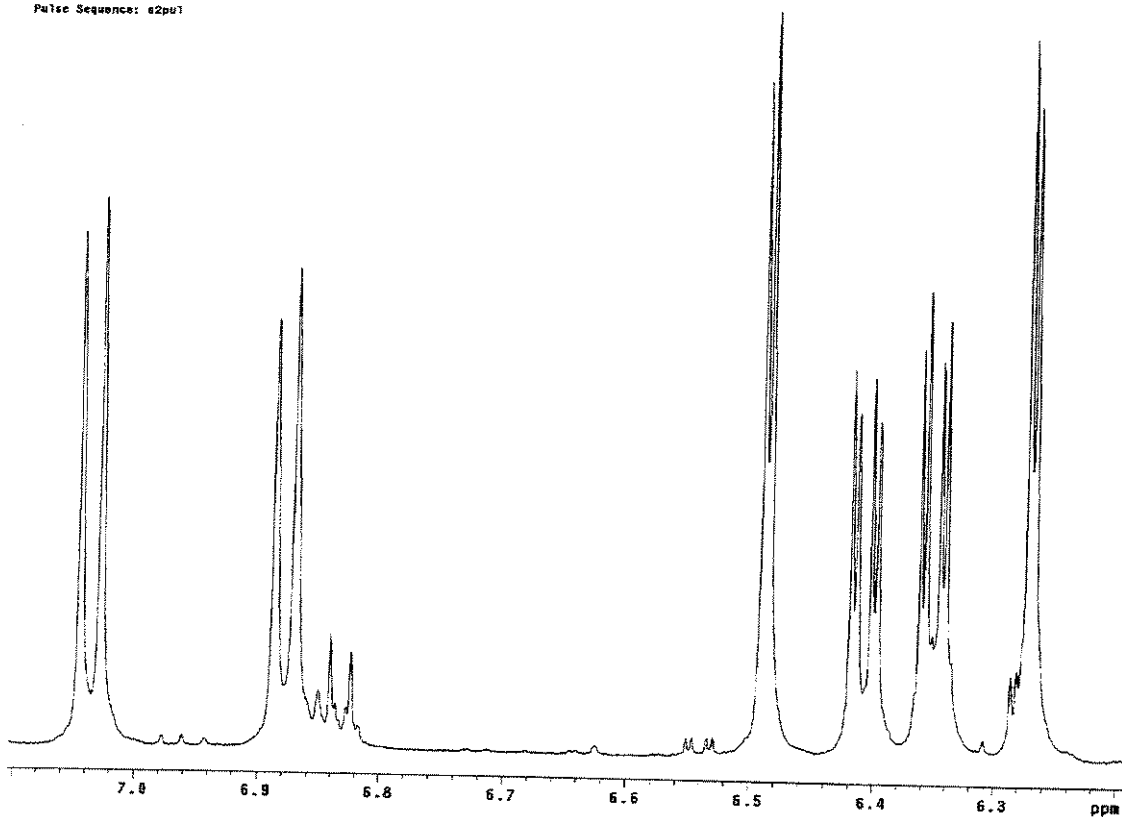
24. SAINI, K.S. E GHOSAL, S., Naturally Occurring Flavans Unsubstituted in the Heterocyclic Ring, *Phytochemistry*, **23**, 2415, (1984).
25. SRIVASTAVA, S.K., SRIVASTAVA, S.D. e TIWARI, K.P., 4,4'-Dihydroxychalcone-2'-O-(4-O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranoside from *Viburnum cortinifolium* Indian. *J. Chem.*, **20B** (4), 347, (1981).
26. HERATH, H.M.T.B., DASSANAYAKE, R.S., PRIYADARSHANI, A.M.A., SUSILA, S., WANNIGAMA, G.P. e JOANNE J., Isoflavonoids and a Pterocarpan from *Gliricidia sepium*, *Phytochemistry*, **47**, 117 (1998).
27. VAN ETEN H.D., Antifungal Activity of Pterocarpan and other Selected Isoflavonoids, *Phytochemistry*, **15**, 655, (1975).
28. STILL, W.C., KHAN, M.C. e MITRA, A., Rapid Chromatographic Technique for Preparatives Separations with Moderate Resolution, *J. Org. Chem.*, **43**, 2923, (1978).
29. MIDDLETON JR, E. E KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer em The Flavonoids Advances in Research Since 1986, ed. J.B.Harborne, Chapman & hall, London, cap. 15, (1994).

30. MCLAUGHLIN, J.L., MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E. JACOBSEN, L.B. e NICHOLS, D.E., Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, *J. Med. Plant Research*, **45**, 31, (1982).
31. SAXENA, G., FAMER, S., TOWERS, G.H.N., HANCOCK, R.E.W., Use of Specific Dyes in the Detection of Antimicrobial Compounds from Crude Plants Extracts Using a Thin Layer Chromatography Agar Overlay Technique, *Phytochem. Analys.*, **6**, 125, (1995).

E.1. Espectro de RMN ^1H da isoflavana vestitol

E.1a. Expansão do espectro de RMN ^1H da isoflavana vestitol

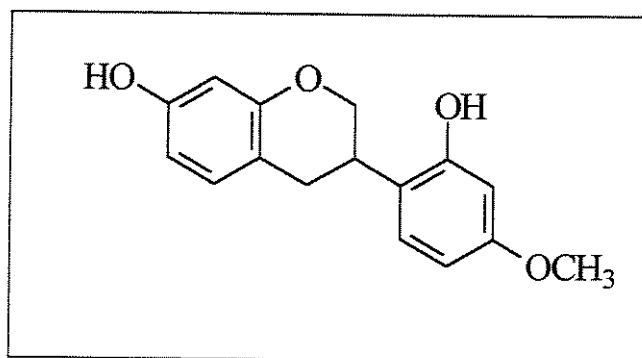
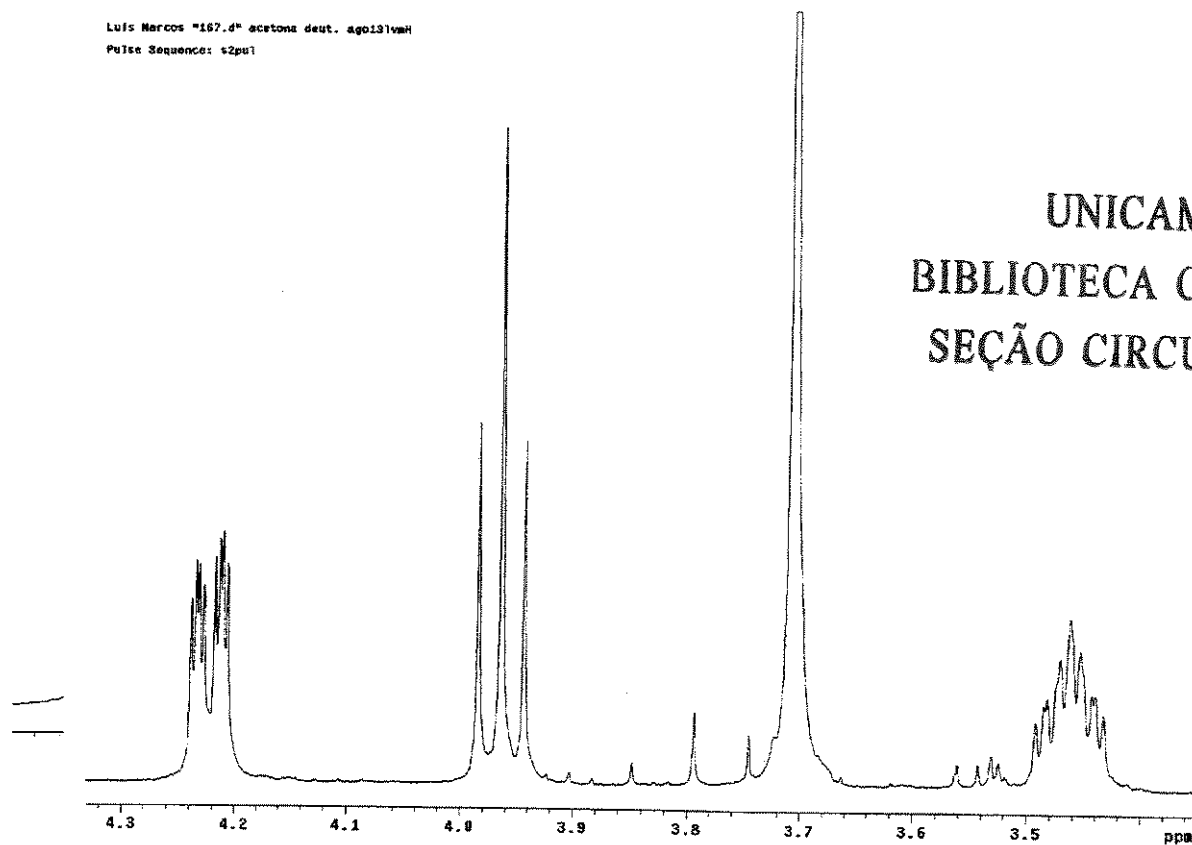
Leis Marcos "167.d" acetone d₆, agolSivm
Pulse Sequence: g2pu1

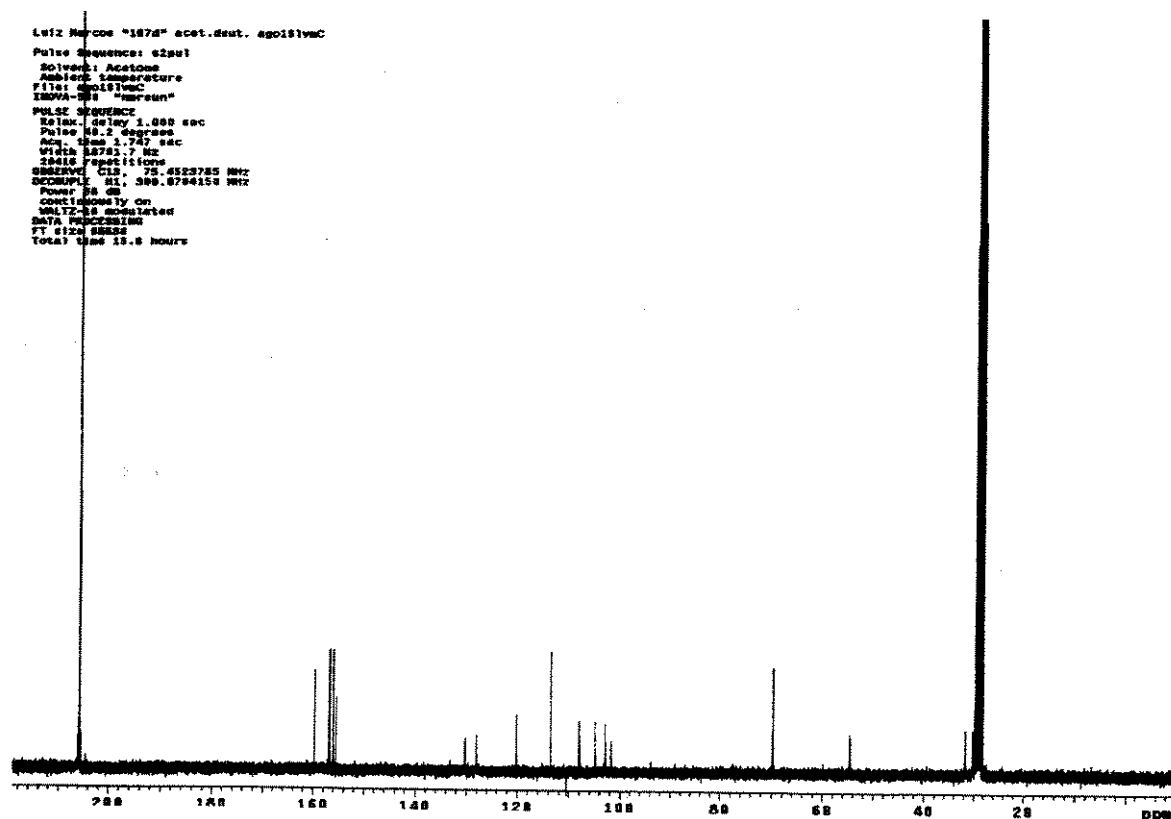


E.1b. Expansão do espectro de RMN ^1H da isoflavana vestitol.

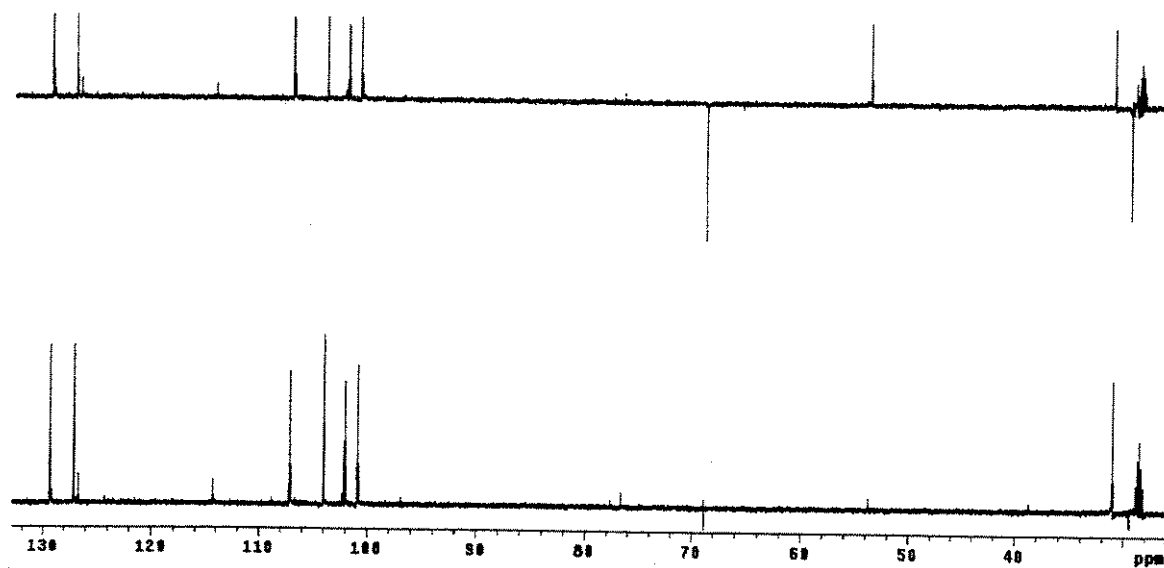
Luis Marcos "167.d" acetona deut. ago131vml
Pulse Sequence: s2pu1

Luis Marcos "167.d" acetona deut. ago131vml
Pulse Sequence: s2pu1

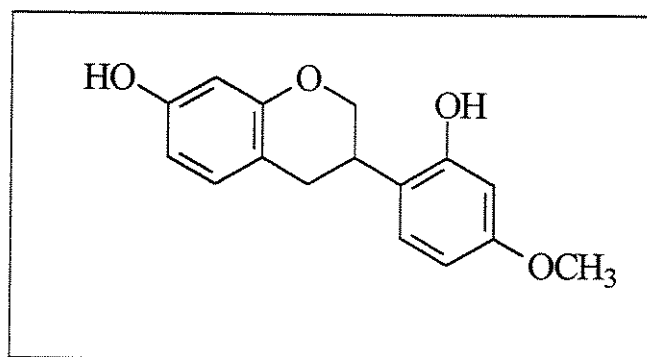
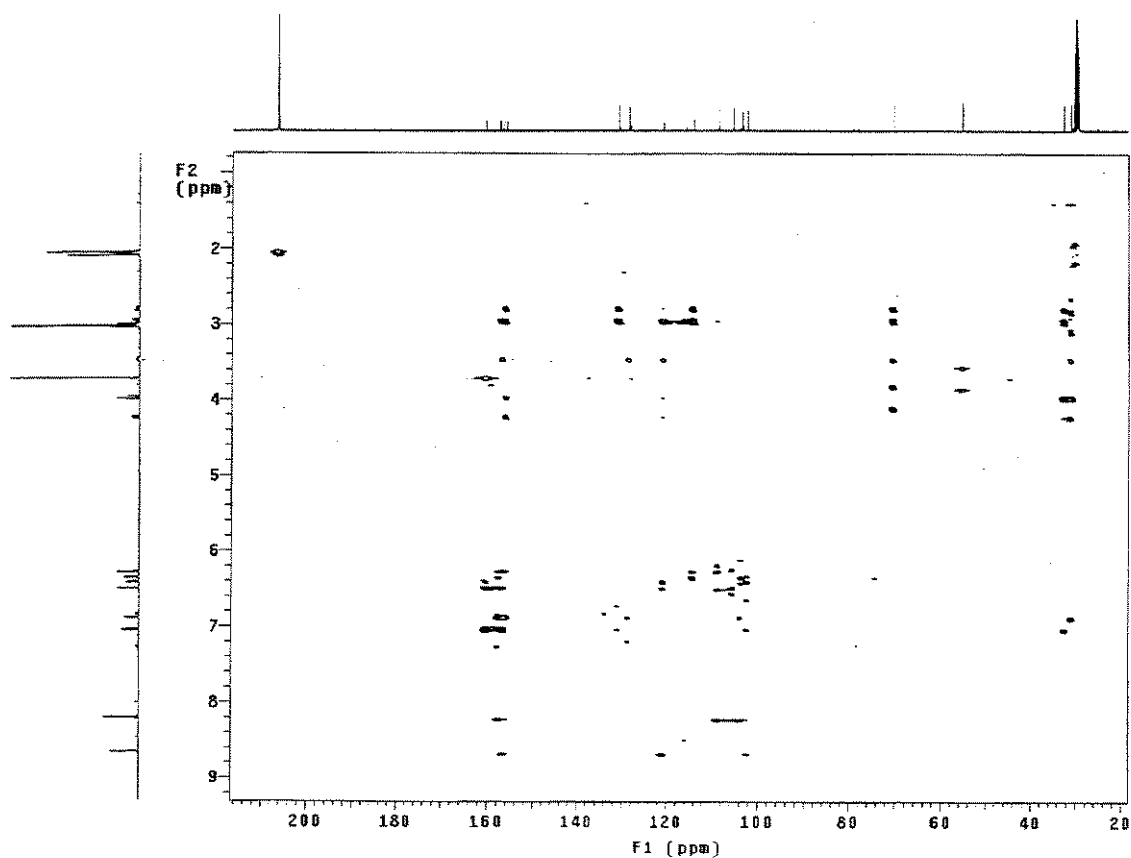


E.2. Espectro de RMN ^{13}C da isoflavana vestitol

E.3. Espectro DEPT (90° e 135°) da isoflavana vestitol

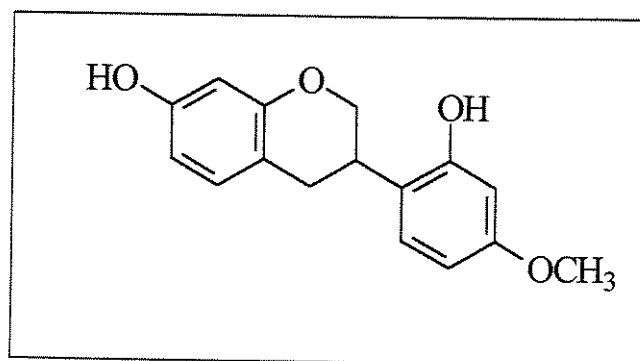
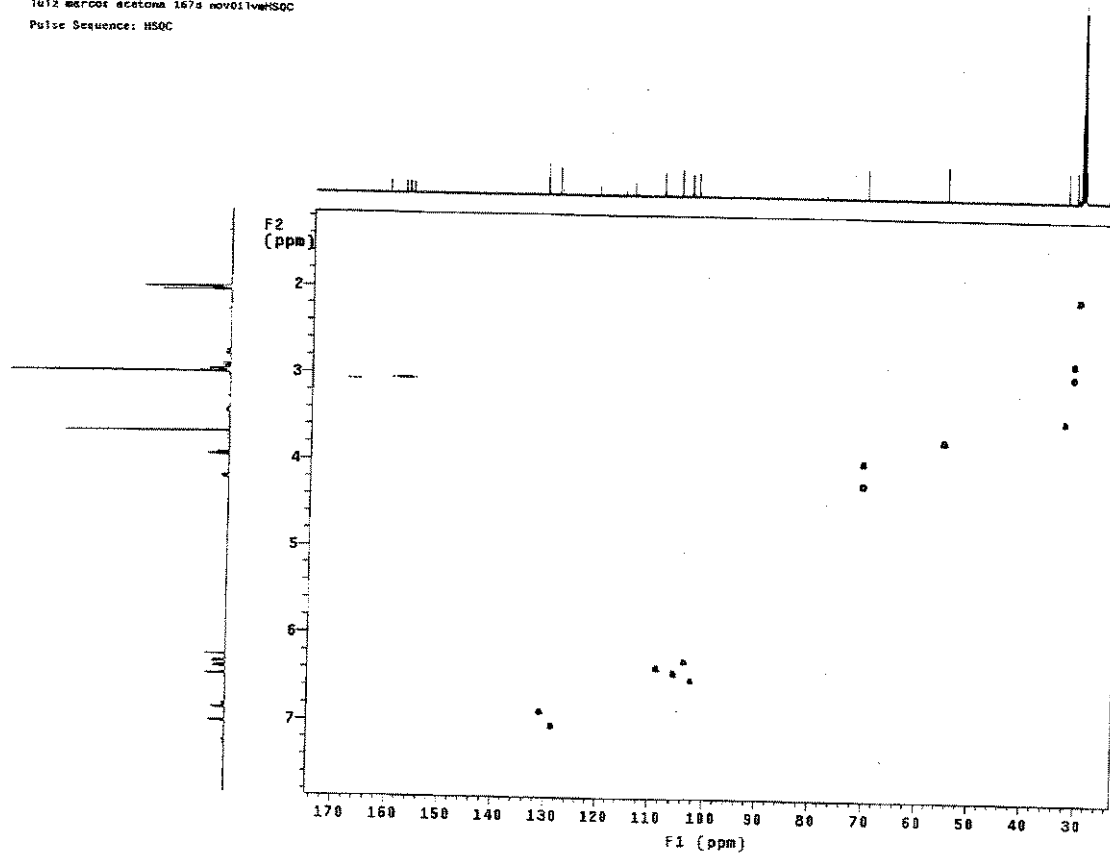


E.4. Espectro HMBC da isoflavana vestitol



E.5. Espectro HSQC da isoflavana vestitol

1u12 mrc001 acetona 167d nov011veHSQC
Pulse Sequence: HSQC



E.6. Espectro NOESY da isoflavana vestitol

LUIZ MARCOS "197-6" acetone d6-d11, nov051mvp0510

Pulse Sequence: NOESY1D

Solvent: acetone

Acquisition Temperature

INSTRUMENT: spect

PULSE SEQUENCE: NOESY1D

Acq. delay: 2.000 sec

Pulse 90.0 degrees

Pulse 180.0 degrees

Acq. time: 4.000 sec

Width: 6000.0 Hz

112 repetitions

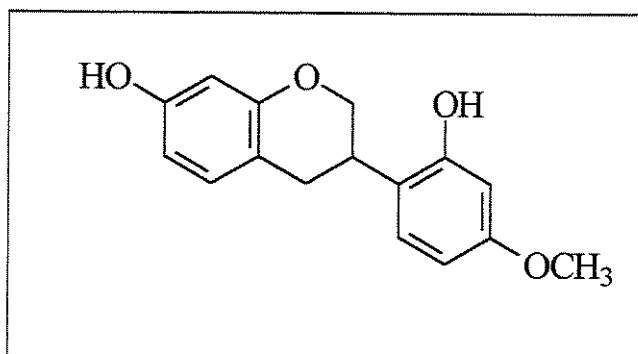
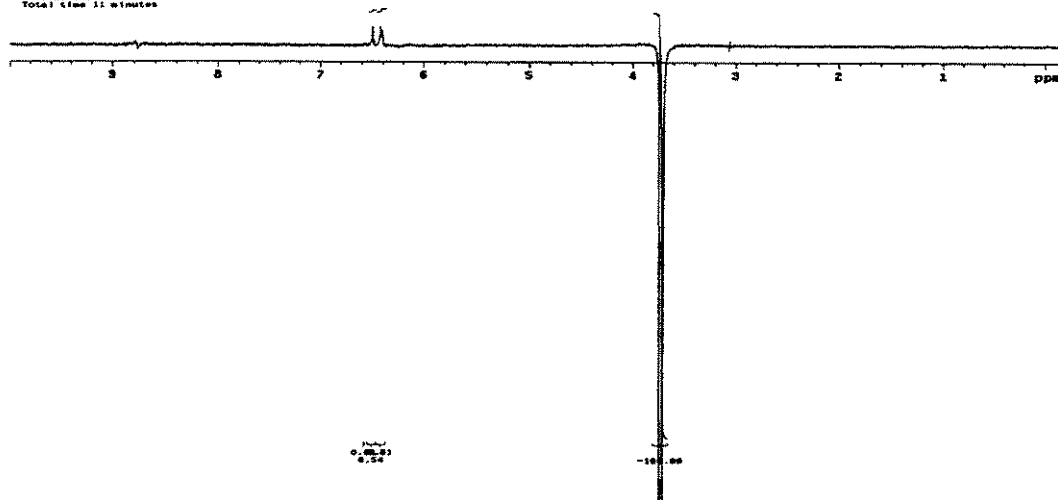
SPECTRO: 400.14898433888 MHz

DATA PROCESSING

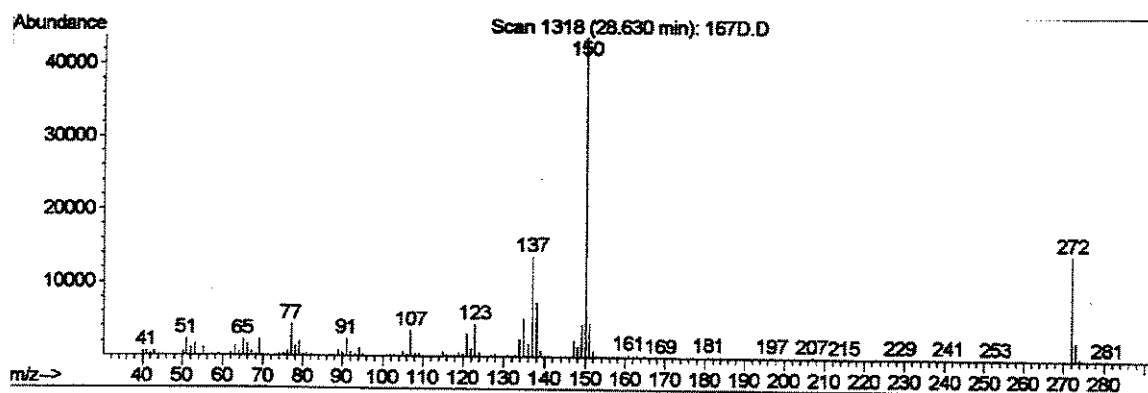
Line broadening: 1.0 Hz

FT size: 65536

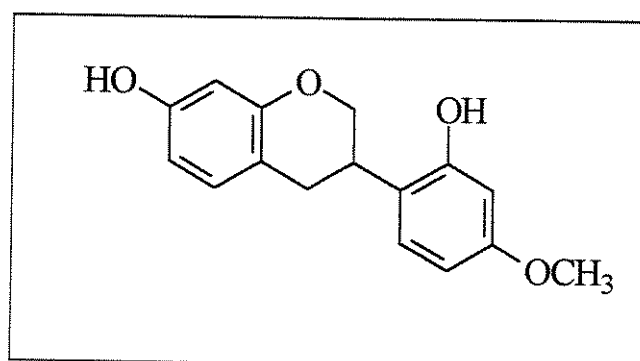
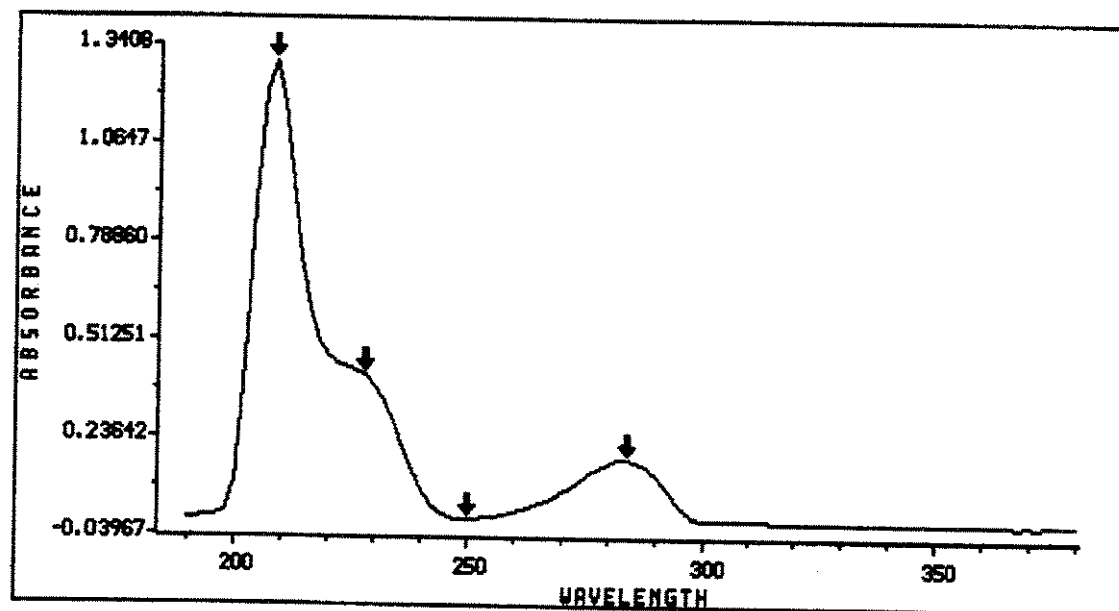
Total time: 11 minutes

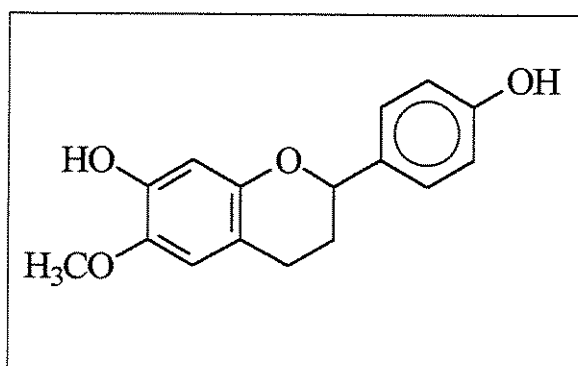
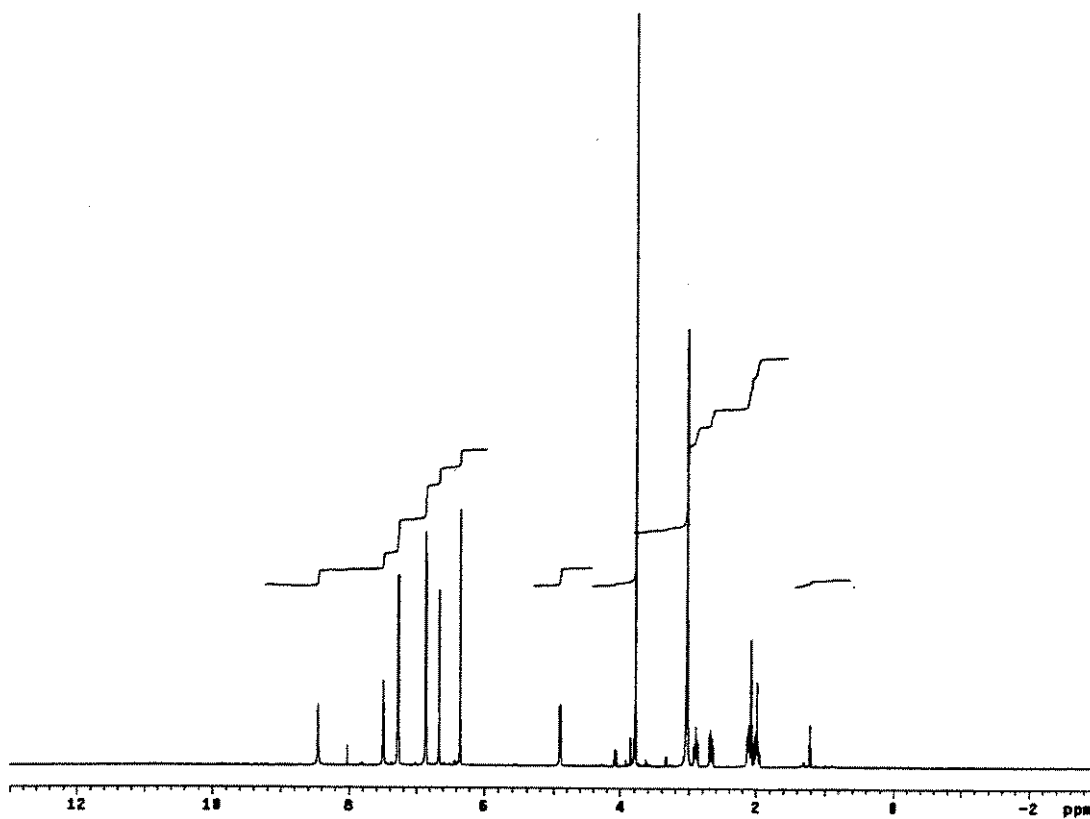


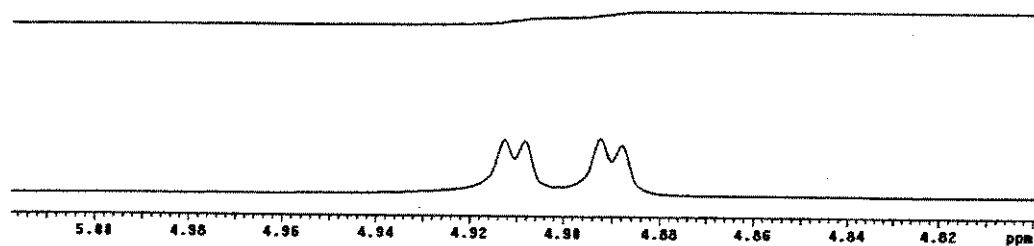
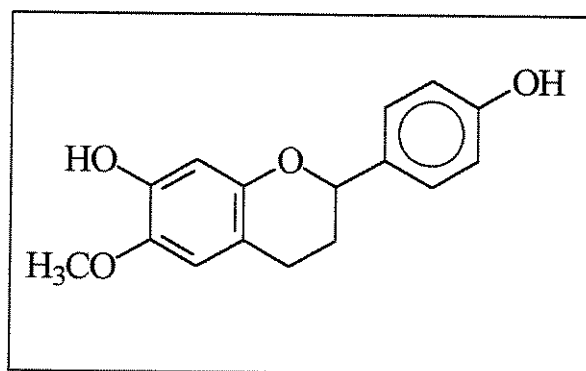
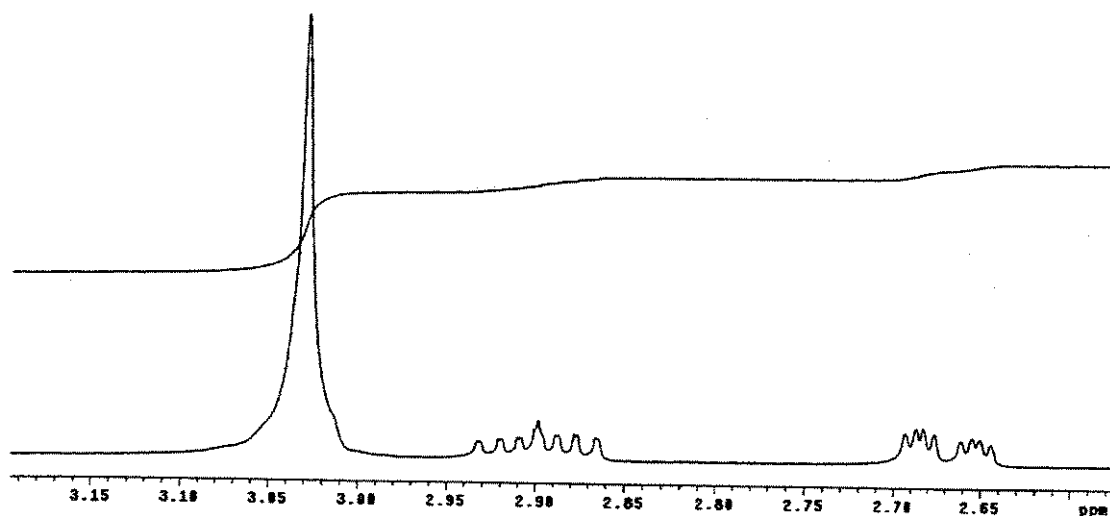
E.7. Espectro de massas da isoflavana vestitol

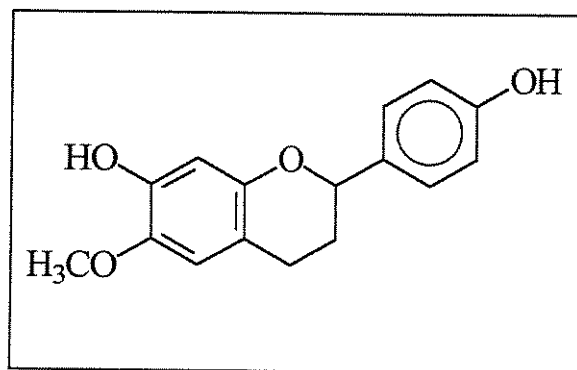
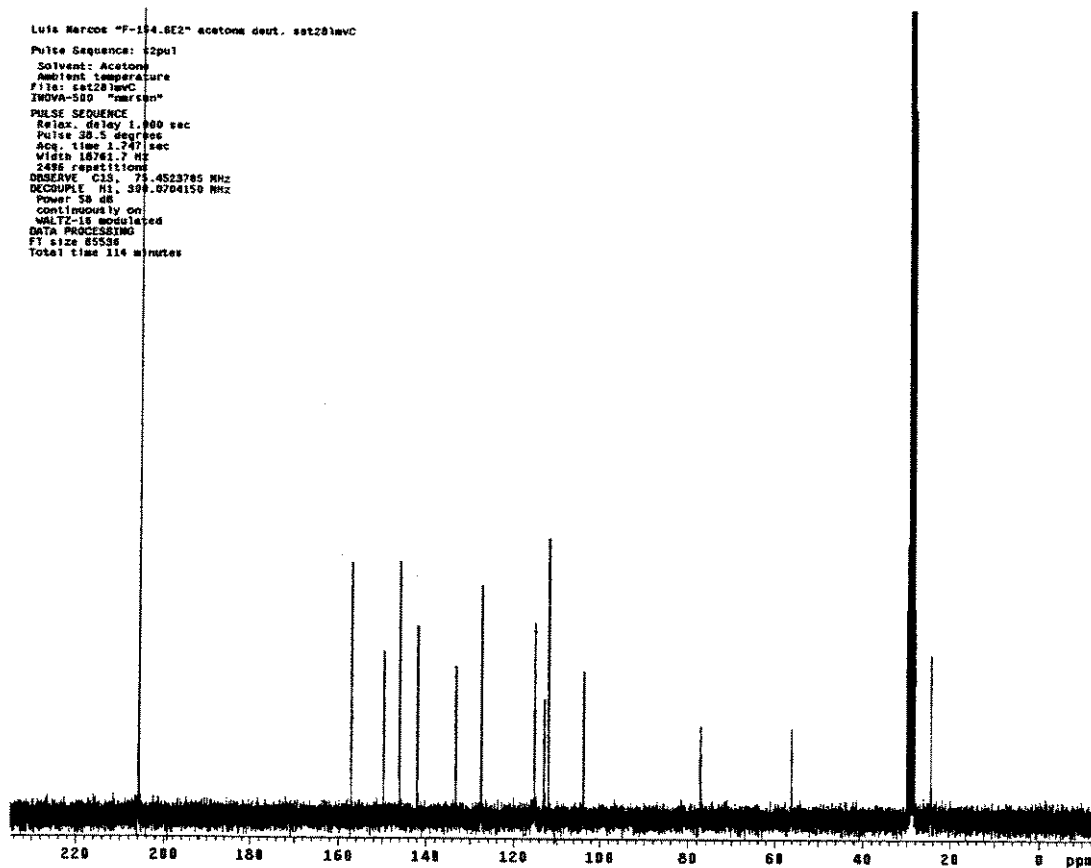


E.8. Espectro UV da isoflavana vestitol

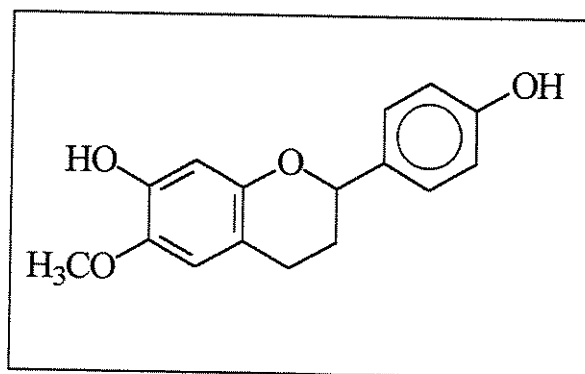
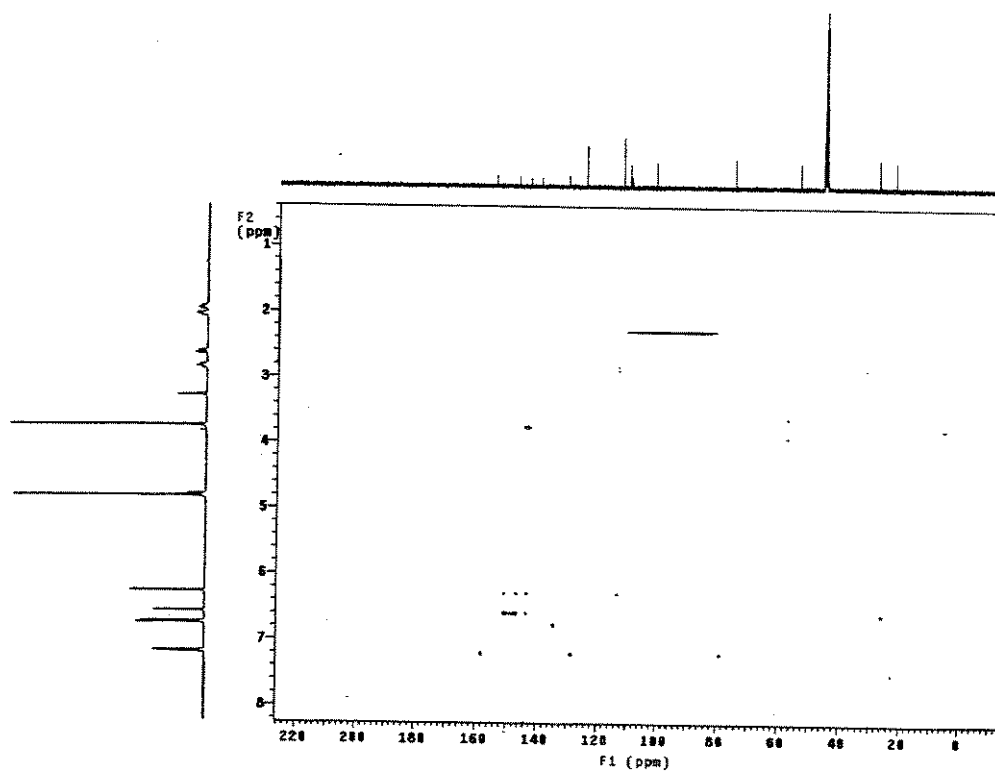


E.9. Espectro de RMN ^1H da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana

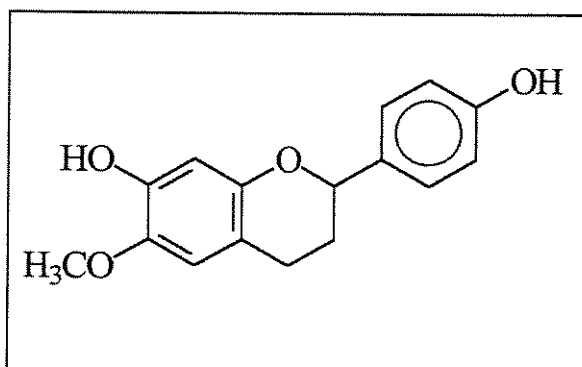
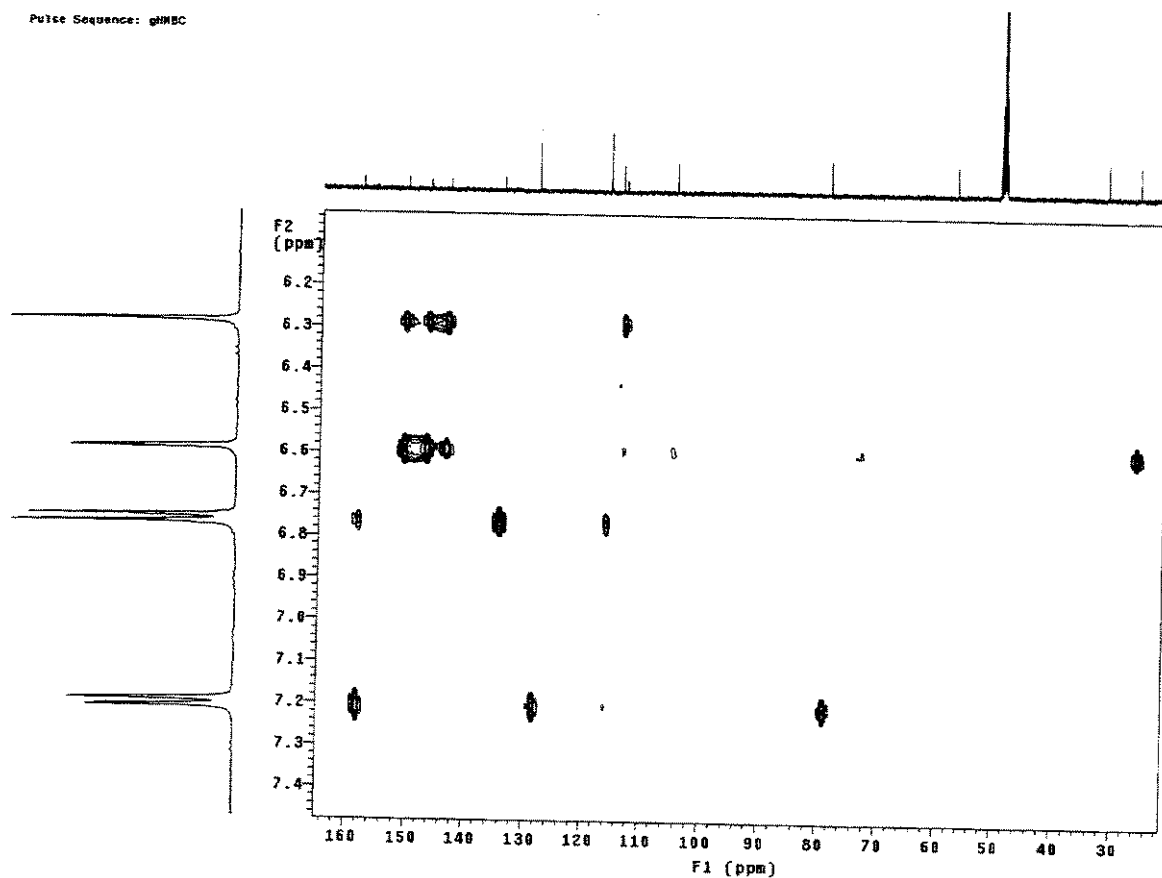
E.9a. Expansão do espectro de RMN ^1H da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana**E.9b.** Expansão do espectro de RMN ^1H da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana

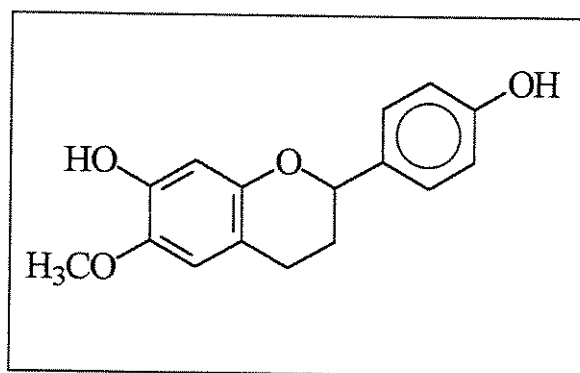
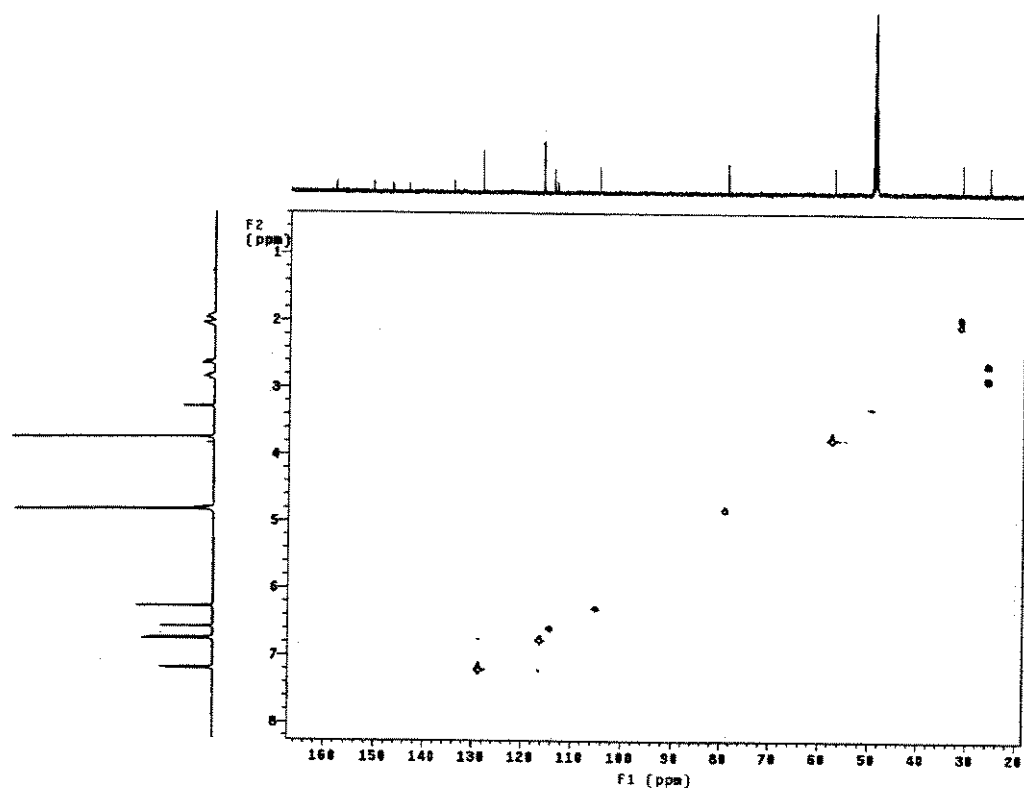
E.10. Espectro de RMN ^{13}C da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana

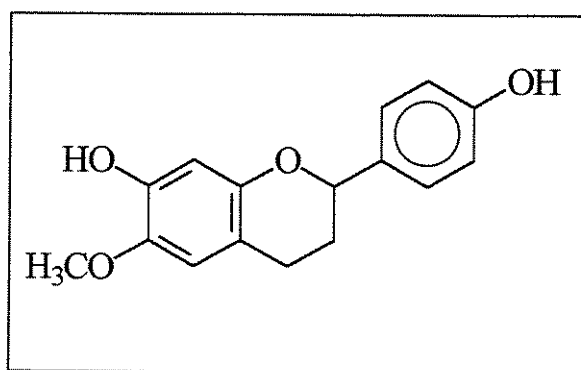
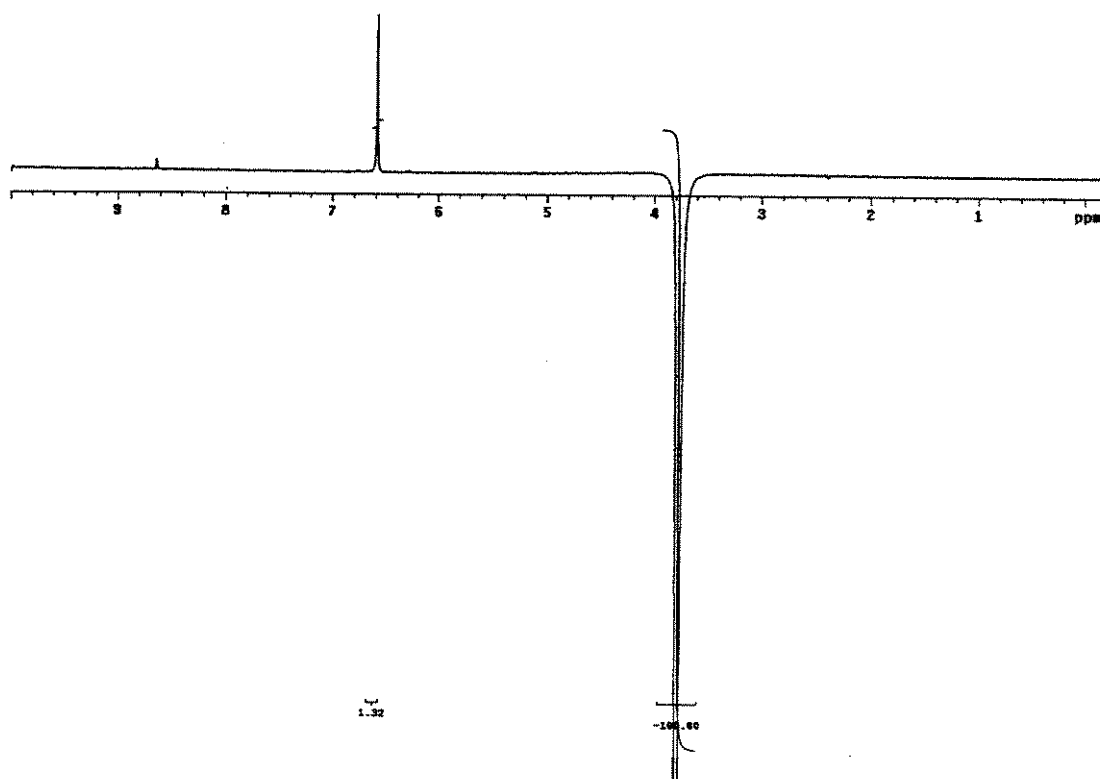
E.11. Espectro HMBC da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana

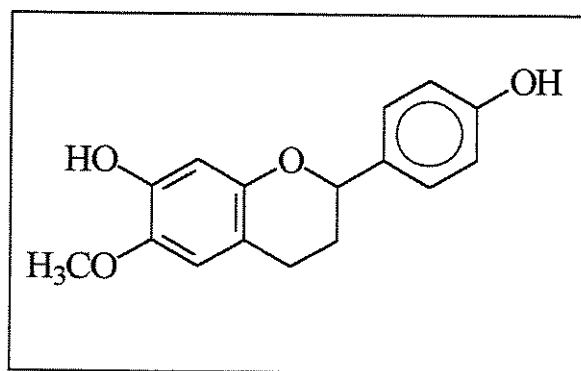
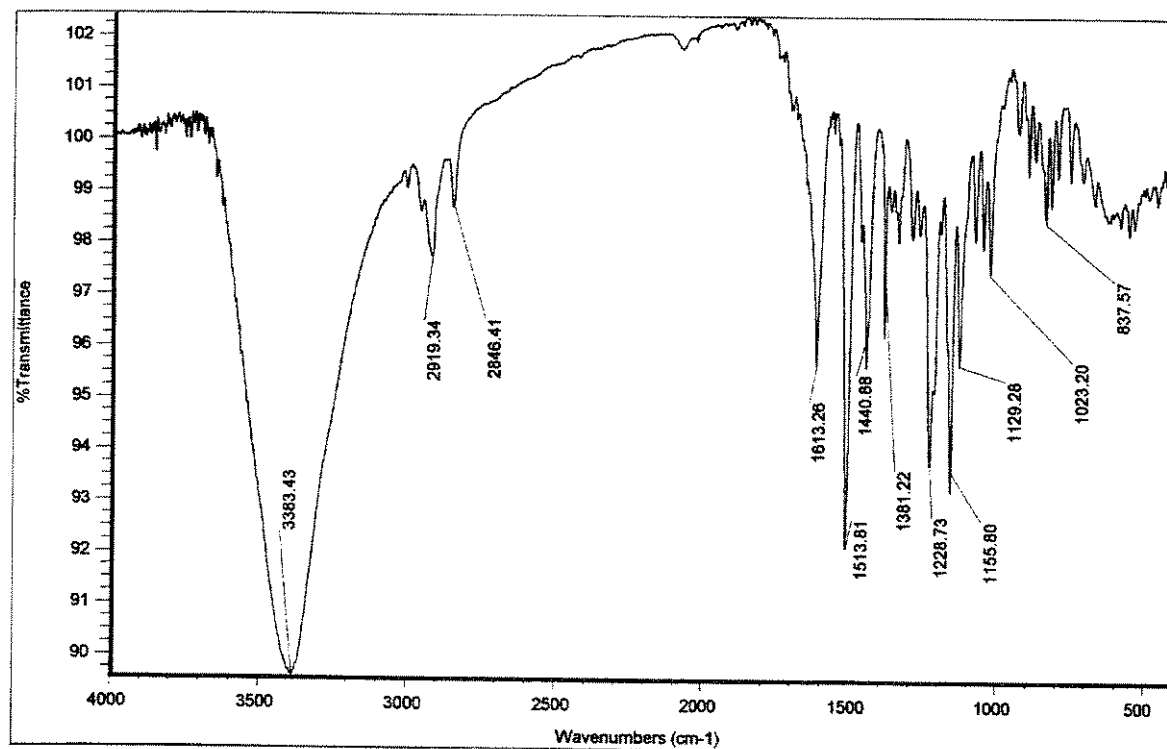


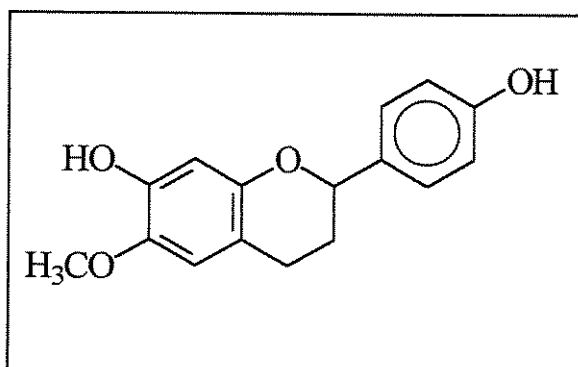
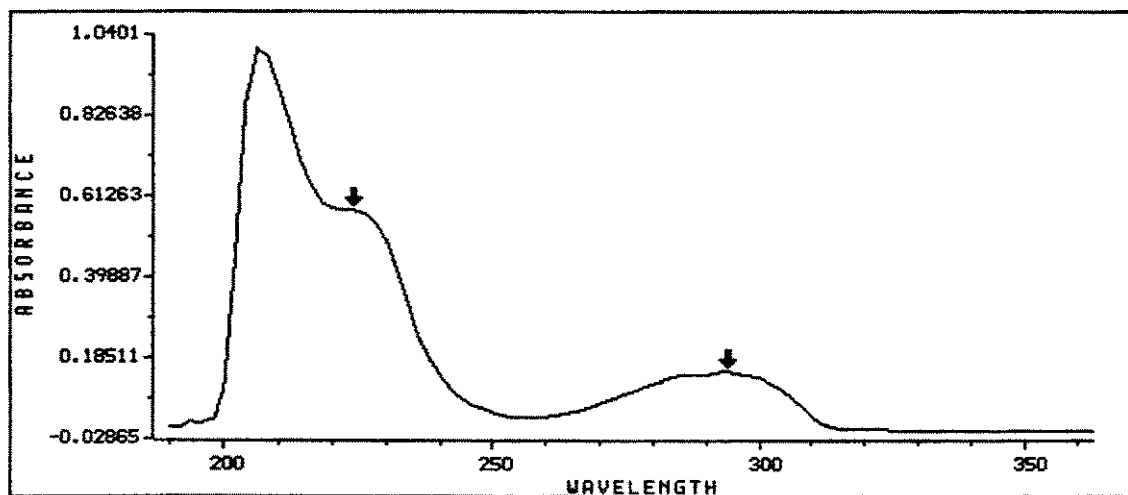
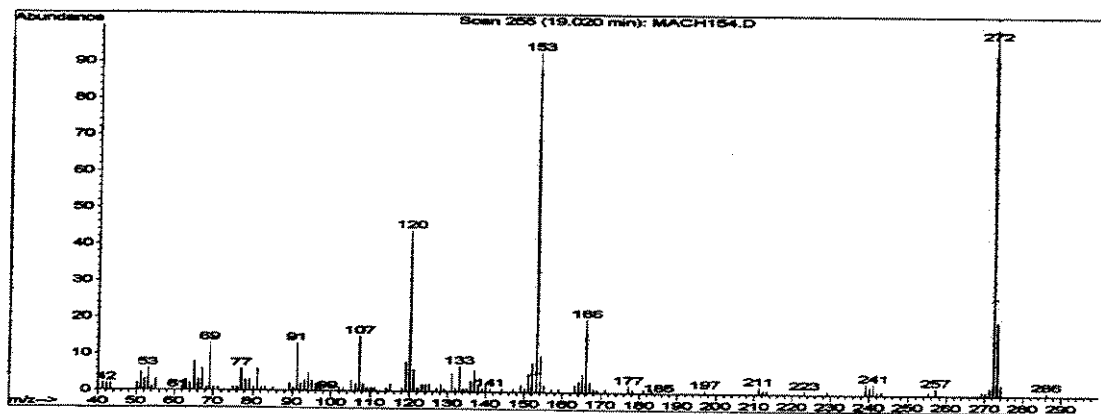
E.12. Expansão do espectro HMBC da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana



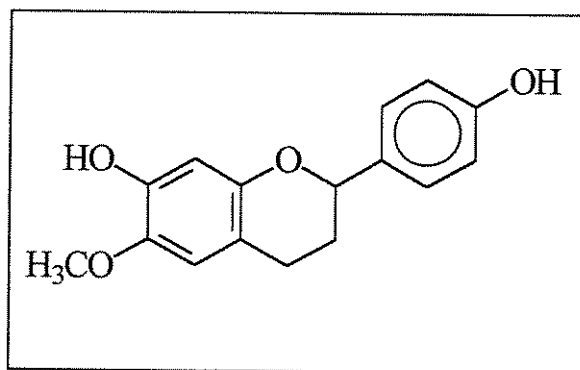
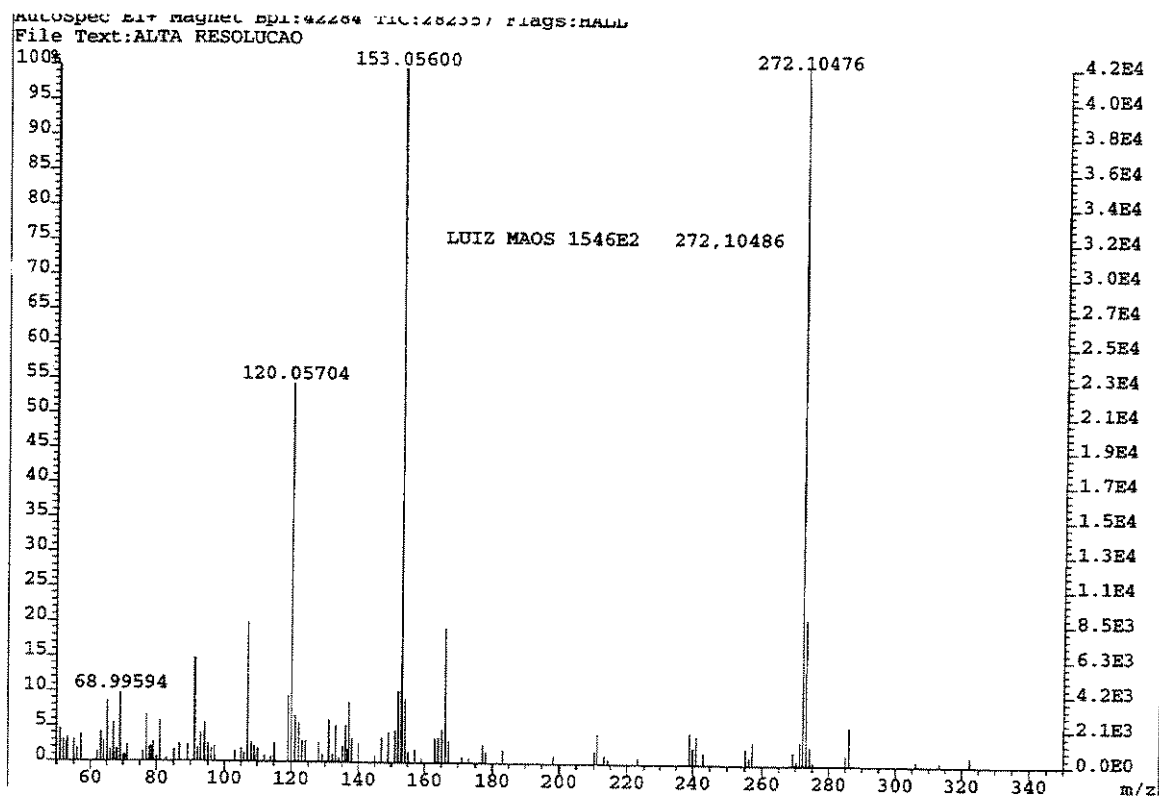
E.13. Espectro HSQC da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana

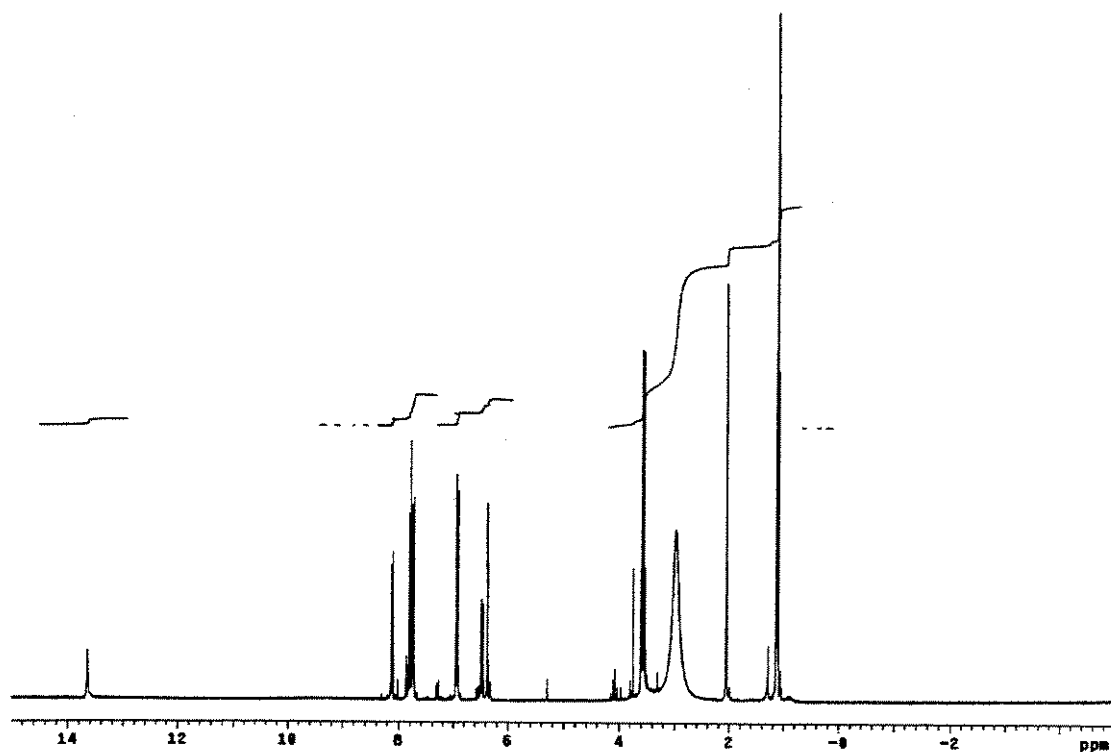
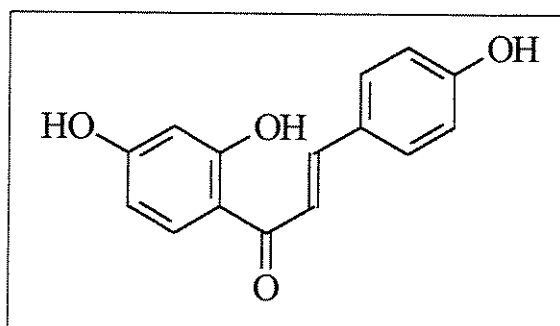
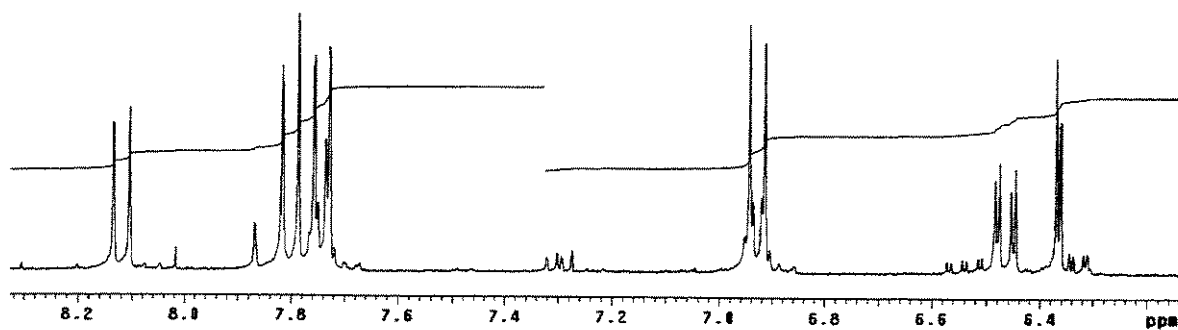
E.14. Espectro NOESY da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana

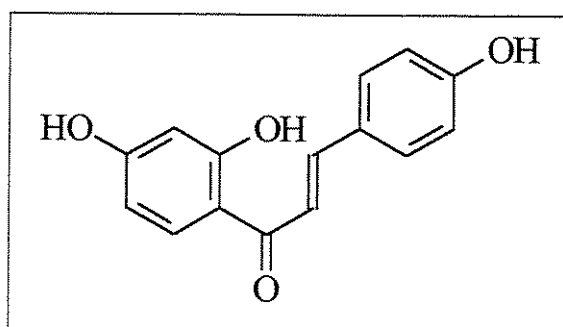
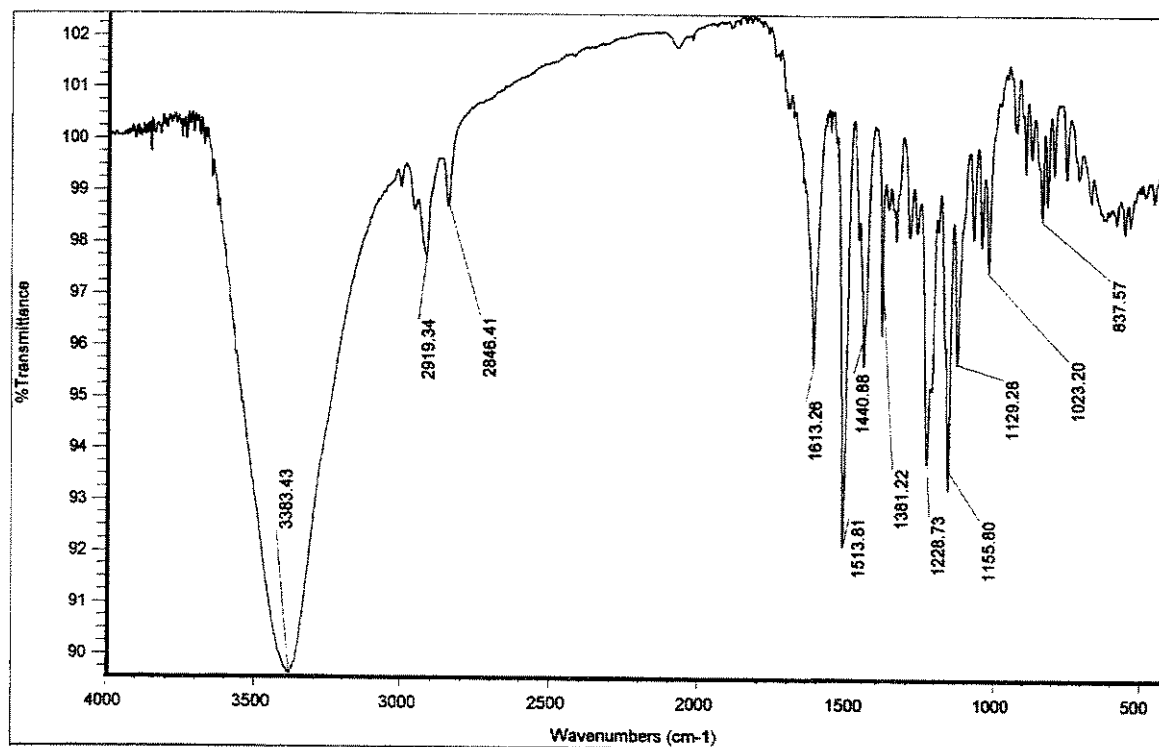
E.15. Espectro IV da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana

E.16. Espectro UV da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana**E.17. Espectro de massas da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana**

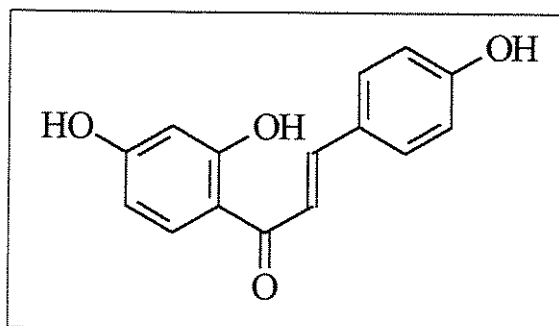
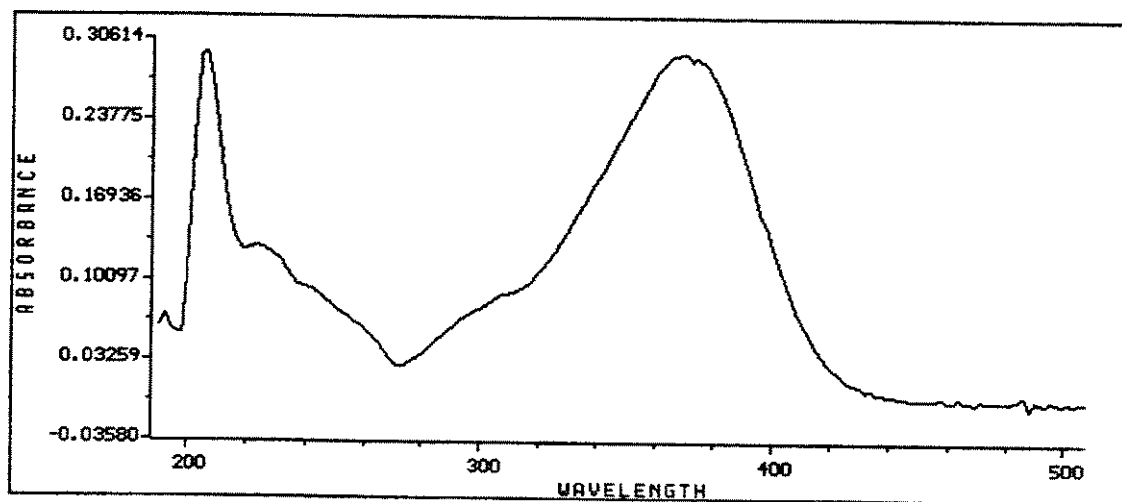
E.18. Espectro de massas de alta resolução da 7,4'-dihidroxil-6-metoxil flavana



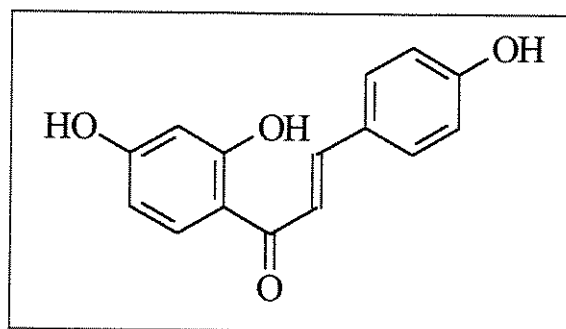
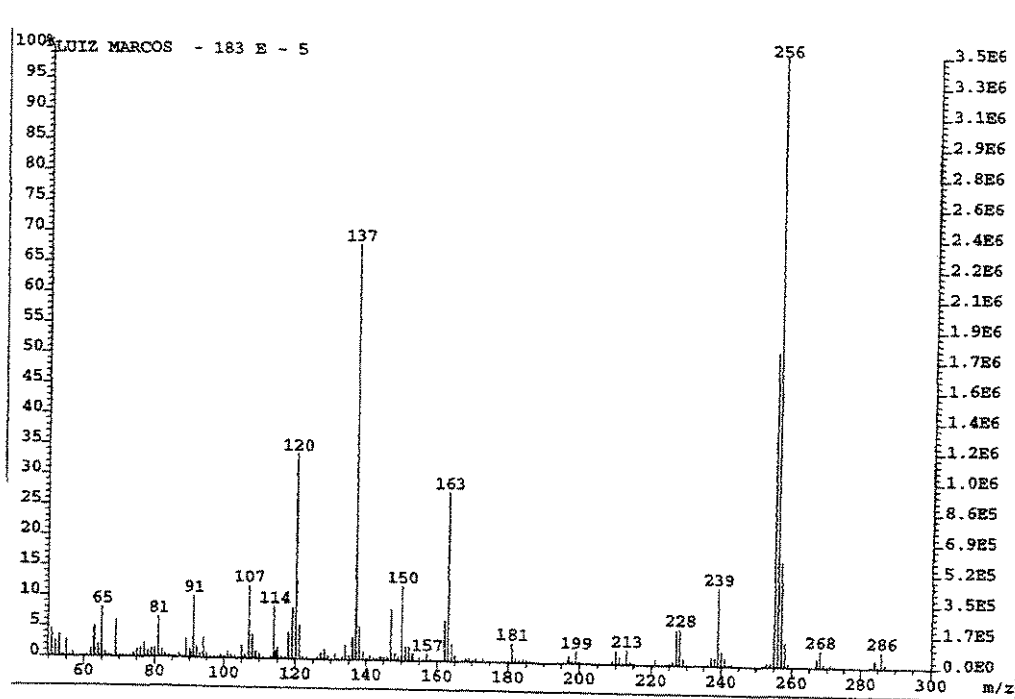
E.19. Espectro de RMN ^1H da chalcona isoliquiritigenina**E.19a.** Expansão do espectro de RMN ^1H da chalcona isoliquiritigenina

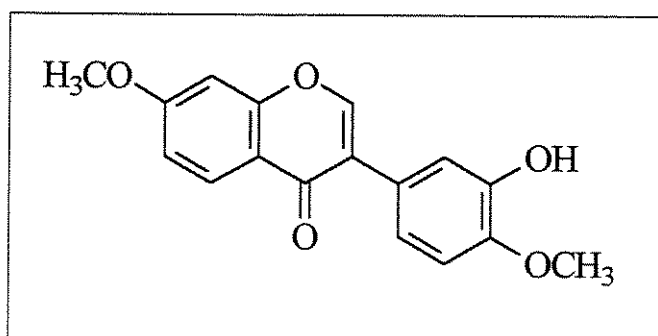
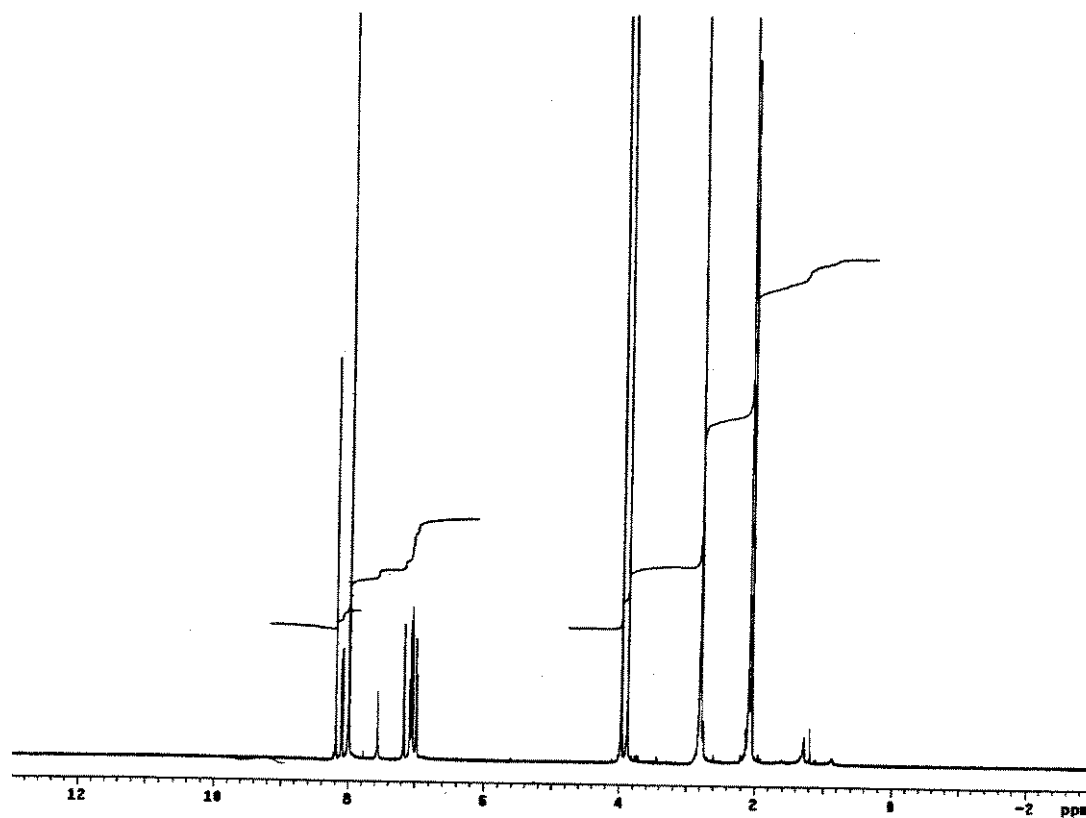
E.20. Espectro IV da chalcona isoliquiritigenina

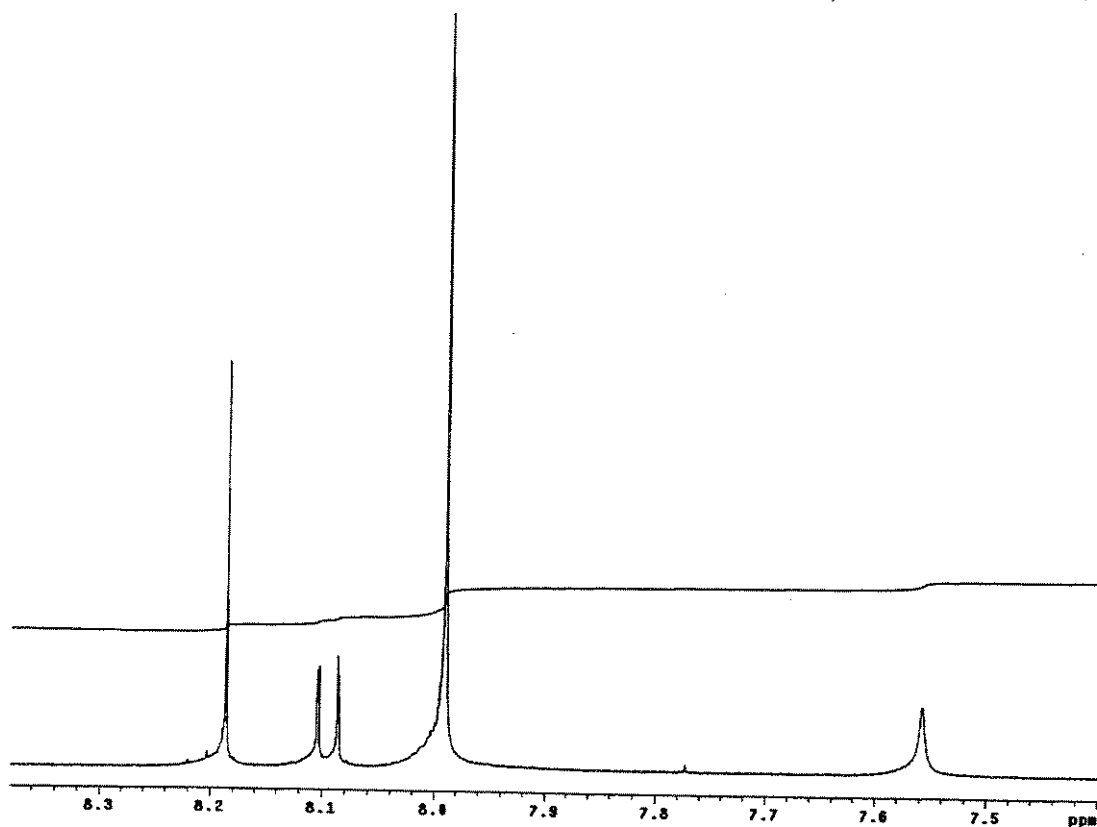
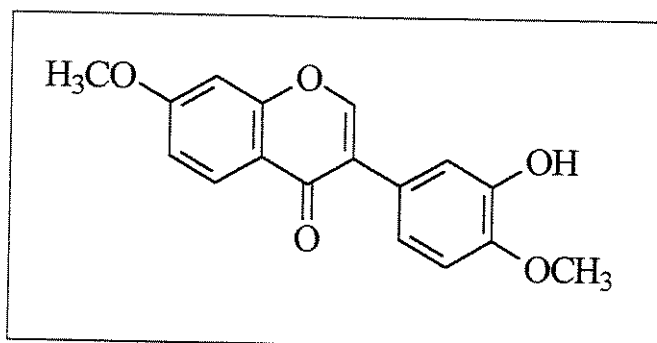
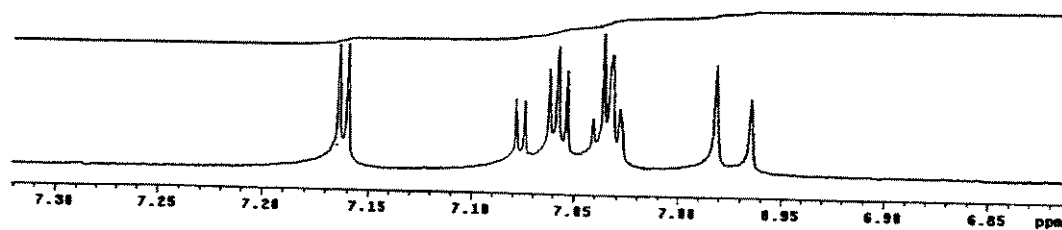
E.21. Espectro UV da chalcona isoliquiritigenina



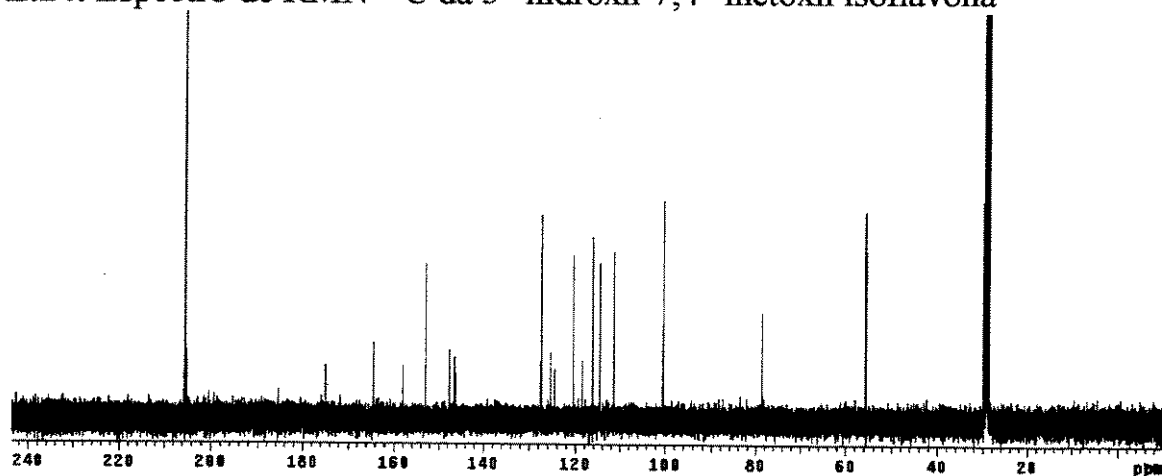
E.22. Espectro de massas da chalcona isoliquiritigenina



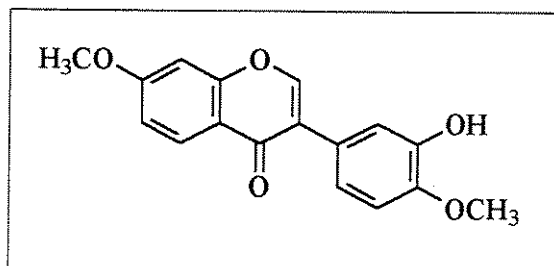
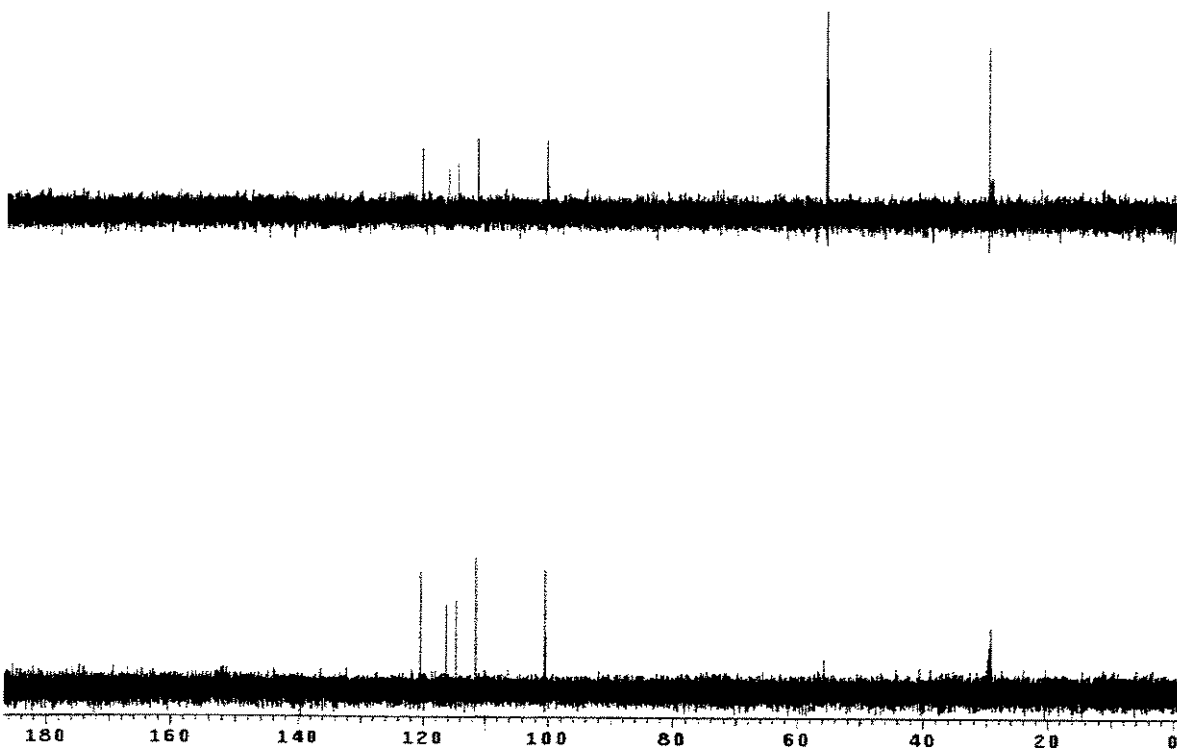
E.23. Espectro de RMN ^1H da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona

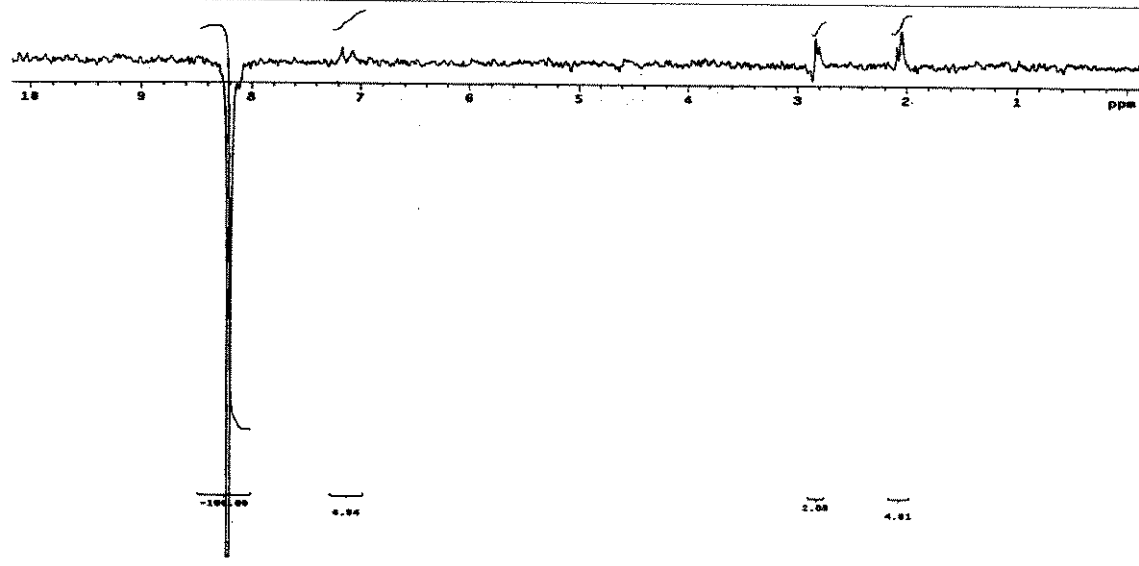
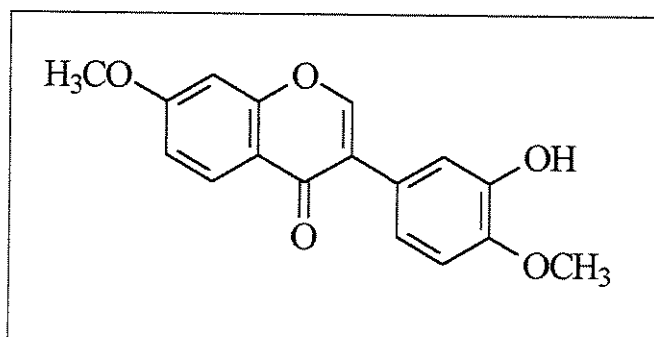
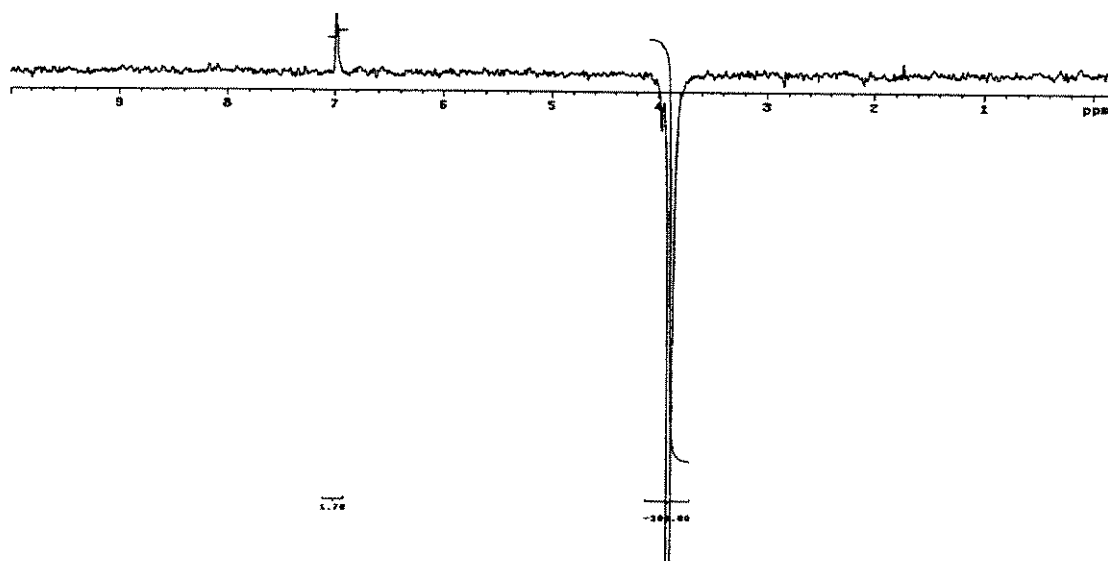
E.23a. Expansão do espectro de RMN ^1H da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona**E.23b.** Expansão do espectro de RMN ^1H da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona

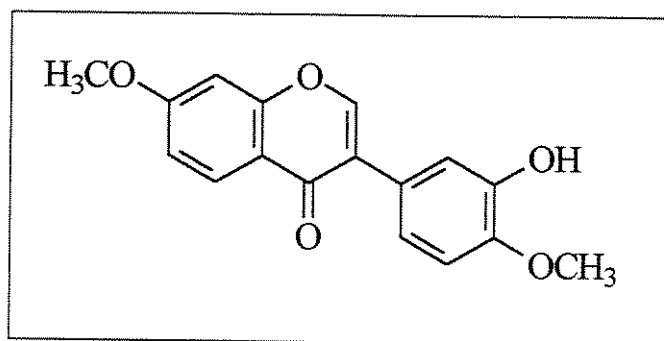
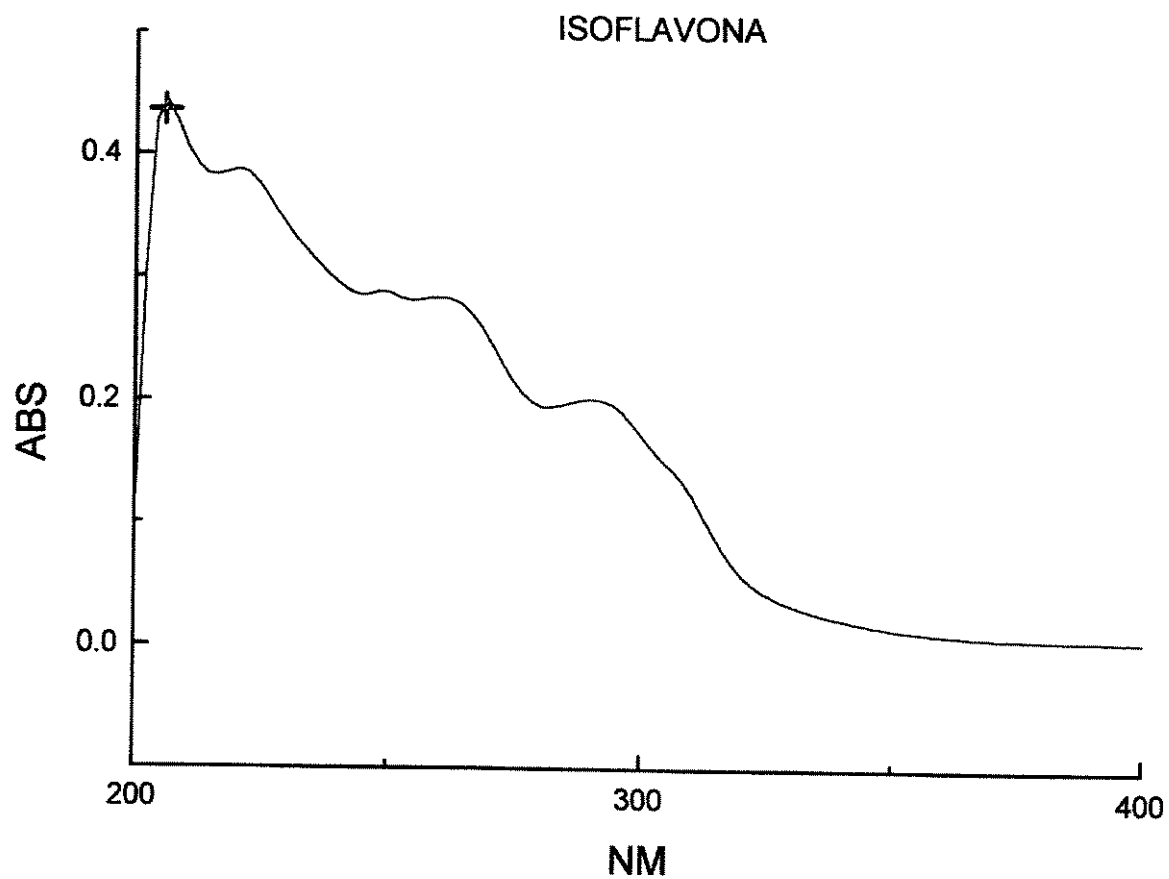
E.24. Espectro de RMN ^{13}C da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona

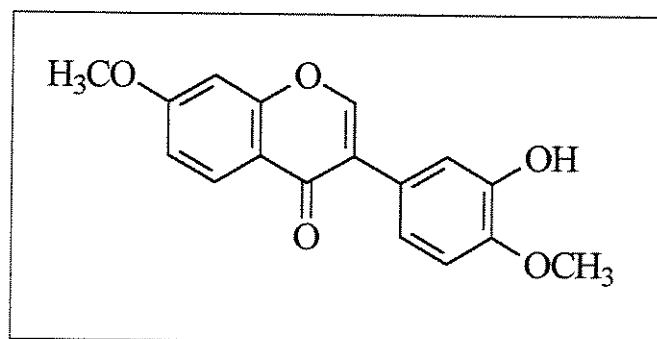
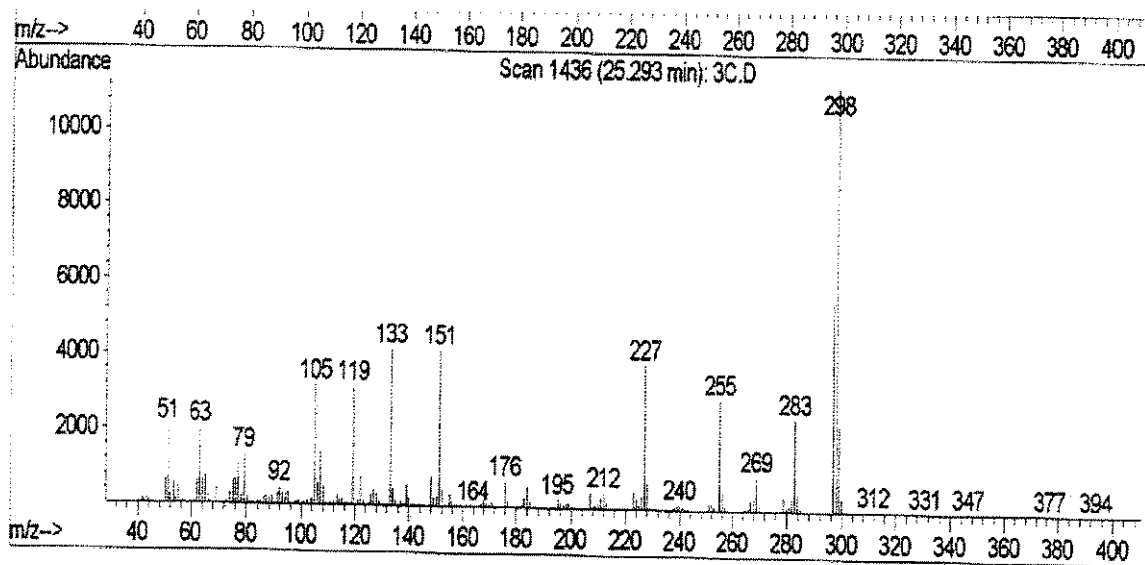


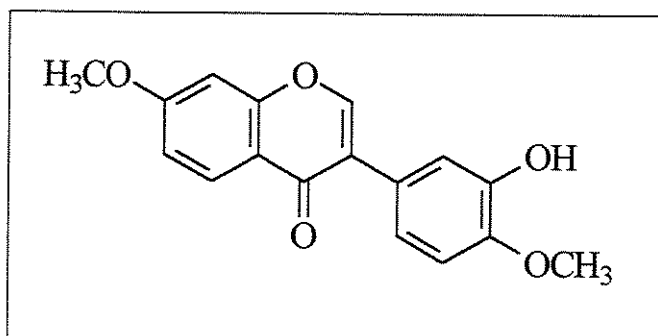
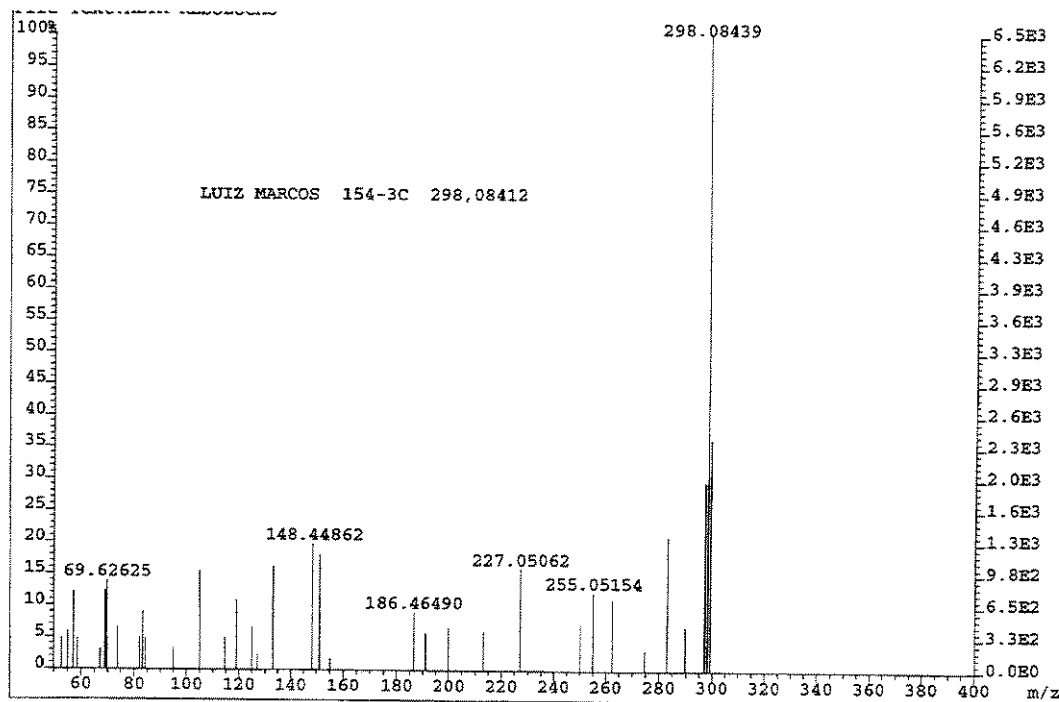
E.25. Espectro DEPT (90° e 135°) da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona

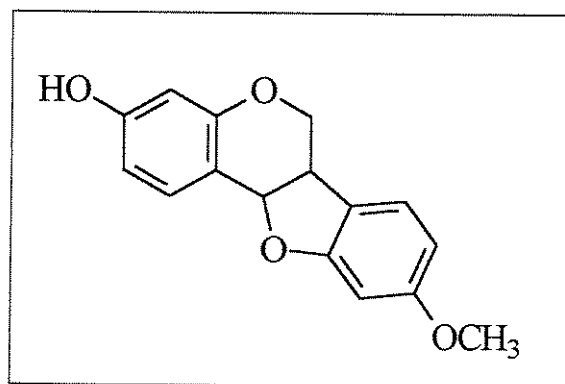
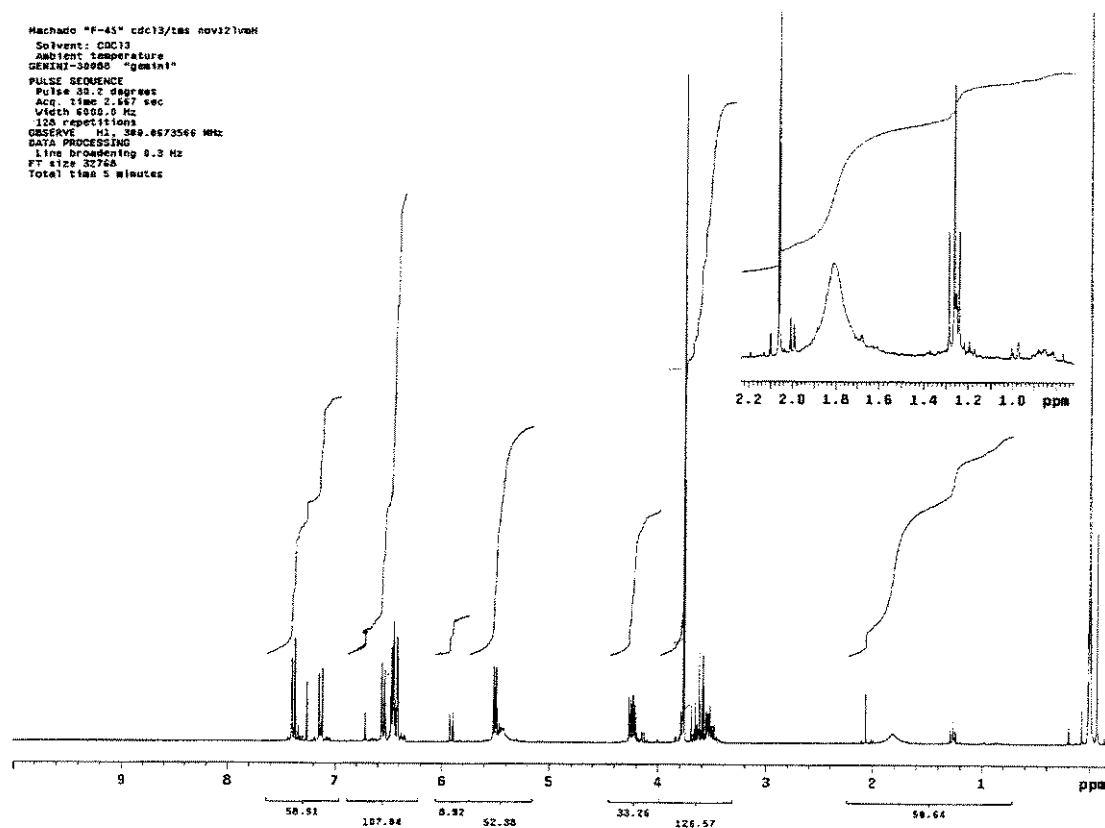


E.26. Espectro NOESY da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona**E.26a Espectro NOESY da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona**

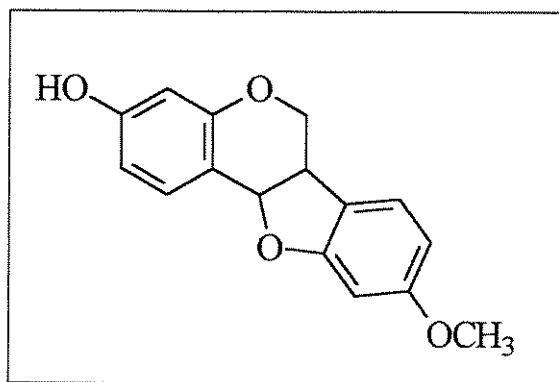
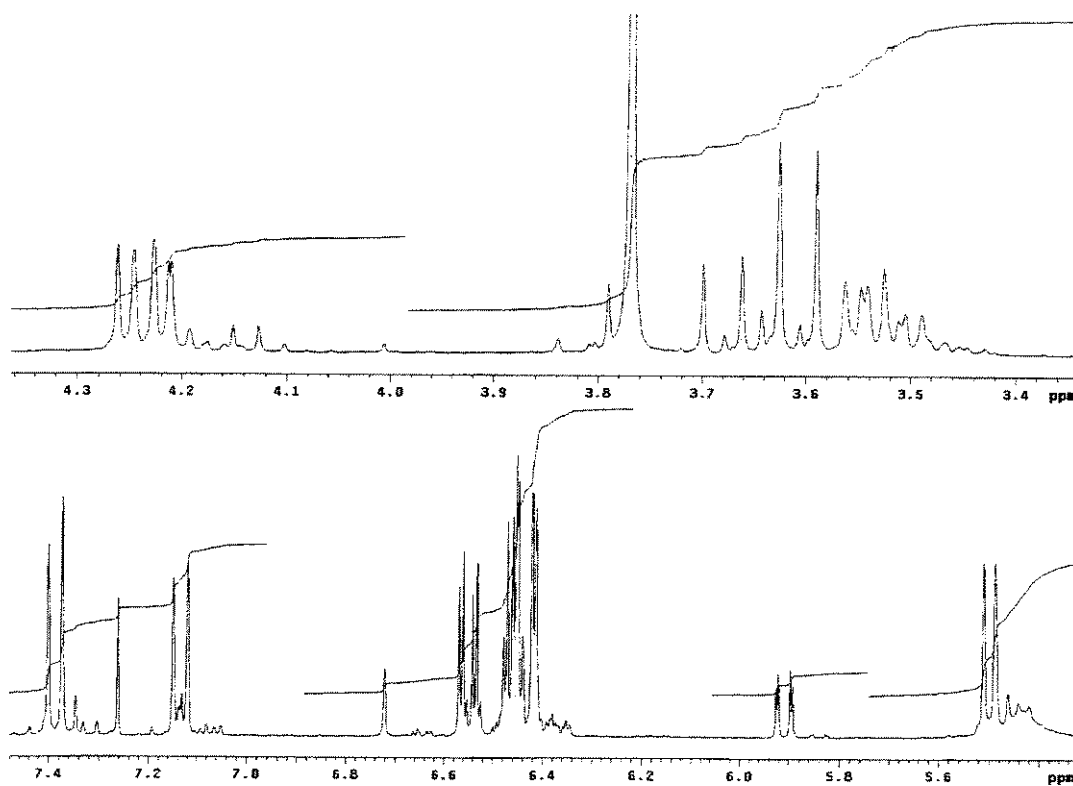
E.27. Espectro UV da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona

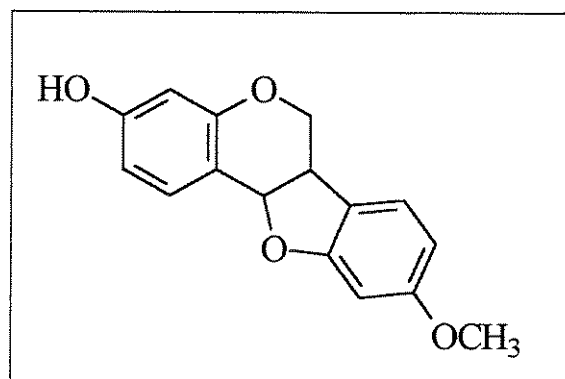
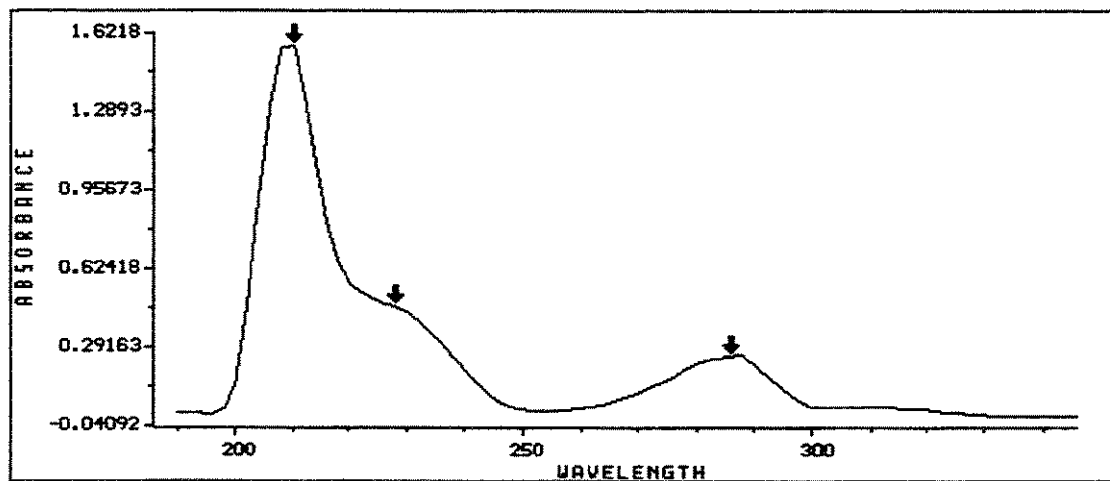
E.28. Espectro de massas da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona

E.29. Espectro de massas de alta resolução da 3'-hidroxil-7,4'-metoxil isoflavona

E.30. Espectro de RMN ^1H do pterocarpano medicarpina

E.30a. Expansão do espectro de RMN ^1H do pterocarpano medicarpina



E.31. Espectro UV do pterocarpano medicarpina

E.32. Espectro de massas do pterocarpano medicarpina

