

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

DISSERTAÇÃO

**IDENTIFICAÇÃO DE BISFLAVONÓIDES DE *Luxemburgia nobilis* e
Ouratea semiserrata (Ochnaceae) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA**

ADRIANA APARECIDA BOSSO

**Seropédica, Rio de Janeiro
Novembro de 2004**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

IDENTIFICAÇÃO DE BISFLAVONÓIDES DE *Luxemburgia nobilis* e
Ouratea semiserrata (Ochnaceae) POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA

ADRIANA APARECIDA BOSSO

Sob a Orientação da Professora
Dra. Rosane Nora Castro
e
Co-orientação
Dr. Mário Geraldo de Carvalho

Dissertação submetida como
requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Ciências
em Química Orgânica.

Seropédica, Rio de Janeiro
Novembro de 2004

Bosso, Adriana Aparecida

Identificação de bisflavonóides de *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/
Adriana Aparecida Bosso – 2004, f. 150.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nora Castro

Co-orientação: Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Química.

Bibliografia: f. 123-130.

1. Bisflavonóides – Teses. 2. *Luxemburgia nobilis* – Teses. 3. *Ouratea semiserrata* – Teses. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. I. Castro, Rosane Nora. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Exatas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

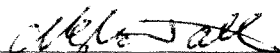
ADRIANA APARECIDA BOSSO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Orgânica como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciências em Química Orgânica, com área de concentração em Química de Produtos Naturais.

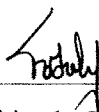
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/11/2004



Profa. Dra Rosane Nora Castro (ICE-DEQUIM-UFRRJ)
(Presidente- Orientadora)



Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho (ICE-DEQUIM-UFRRJ)
(Co-orientador)



Prof. Dr. Fábio de Souza Menezes (Faculdade de Farmácia- UFRJ)



Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima (ICE-DEQUIM-UFRRJ)

Dedico esta dissertação a minha família e ao meu amor Willian,
que sempre acompanharam-me no êxito
deste trabalho.

Quem passou pela vida em branca nuvem,
E em plácido repouso adormeceu;
Quem não sentiu o frio da desgraça;
Quem passou pela vida e não sofreu;
Foi espectro de homem, não foi homem,
Só passou pela vida, não viveu.

Francisco Otaviano

E àquele que me conduziu à carreira científica:

Prof. Dr. César Cornélio Andrei

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antônio e Jacira, pelo amor sempre presente e por incentivarem a minha constante busca ao conhecimento.

Ao meu amor, Willian, por compreender a importância do estudo em minha vida e por suportar a distância que nos separou no desenvolver deste trabalho, valorizando ainda mais o sentimento que há entre nós.

Às minhas irmãs Andréia e Alessandra pelo apoio e estímulo concedidos a mim.

À Professora Dra. Rosane Nora Castro pelo conhecimento, orientação, confiança e liberdade de criação imprescindíveis, concedidos a mim no decorrer deste trabalho. Agradeço também pela oportunidade de conhecer uma pessoa que se mostrou acima de tudo uma grande amiga.

Ao Professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho pelas discussões, opiniões sempre úteis e co-orientação indispensáveis para a realização deste.

Ao Professor Dr. César Cornélio Andrei pelo vínculo de suma importância com a Universidade Estadual de Londrina (UEL) que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho e acima de tudo pela admiração e amizade.

À Jurandir Pereira Pinto (Didi), pela colaboração nas análises por CLAE realizadas na UEL e também pela intensa amizade que nutrimos a alguns anos.

Ao Professor Dr. Marco Edilson e Dr. João Batista pela amizade, otimismo e excelente convívio.

A todos os professores pertencentes ao Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica da UFRur alRJ.

Aos funcionários Eli e Fábio pela convivência amigável e boa vontade nos serviços prestados.

À Sheilla pelo grande incentivo, auxílio, otimismo e sincera amizade, fundamental para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos Ari, Cleber Regina, Virginia pelo companheirismo e cumplicidade em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório Rodney, Welisson, Breno, Vitor, Vanessa pelo alegre convívio.

Aos demais colegas da UFRuralRJ pelo bom relacionamento neste período de mestrado.

Ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de utilização do cromatógrafo líquido, em especial ao laboratório de pesquisa de produção de moléculas bioativas e ao laboratório de química ambiental.

À Universidade Estadual Fluminense pela obtenção dos espectros a 400 MHz, em especial ao Professor Dr. Jan Schripsema pela obtenção dos espectros.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de realizar este trabalho.

Desde já, à banca examinadora pelas sugestões e correções sugeridas a esta dissertação de mestrado.

À CAPES, CNPq e FAPERJ pelos auxílios concedidas.

E por fim, com quem tenho dividido a caminhada.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
• 1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Quimiosistemática	2
1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	4
1.3 Generalidades sobre Flavonóides e Bisflavonóides.	8
1.4 Aspectos Botânicos sobre a família Ochnaceae	11
1.5 Aspectos Químicos da Família Ochnaceae	12
• 2 ROTA BIOSINTÉTICA	21
• 3 OBJETIVOS	29
• 4 PARTE EXPERIMENTAL	30
4.1 Material e Métodos	30
4.2 Derivatização com diazometano	30
4.3 Material vegetal	31
4.4 Elaboração dos extratos e fracionamento para análise por CLAE analítica	31
4.5 Purificação dos Extratos para Fracionamento por CLAE Semipreparativa	35
4.6 Padrões utilizados na cromatografia líquida de alta eficiência	39
4.7 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	42
• 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Monitoramento dos Bisflavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	44
5.1.1 Comportamento Cromatográfico e Espectros de Ultravioleta dos Padrões	46
5.2 Perfis Cromatográficos das Frações Obtidas dos Extratos de <i>Luxemburgia nobilis</i> por CLAE	52
5.3 Isolamento de Bisflavonóides de <i>Luxemburgia nobilis</i> por CLAE Semipreparativa	56
5.3.1 Avaliação Estrutural das Substâncias Isoladas de <i>Luxemburgia nobilis</i>	59
5.4 Isolamento de Bisflavonóides de <i>Ouratea semiserrata</i> A por CLAE Semipreparativa	78
5.4.1 Determinação estrutural das frações isoladas de P-OS-A	81
5.5 Isolamento de Bisflavonóides de <i>Ouratea semiserrata</i> B por CLAE Semipreparativa	108
5.5.1 Avaliação estrutural das substâncias isoladas de <i>Ouratea semiserrata</i> B	110
• 6 CONCLUSÃO	122
• 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esqueleto básico de alguns flavonóides.	9
Figura 2 - Exemplos de bisflavonóides.	10
Figura 3 - Espécime de <i>Luxemburgia nobilis</i>	12
Figura 4 - Espécime de <i>Ouratea semiserrata</i>	12
Figura 5 - Bisflavonóides isolados de <i>Ouratea hexasperma</i>	14
Figura 6 - Bisflavonóides isolados de <i>Ouratea semiserrata</i> (continuação).	16
Figura 7 - Bisflavonóides isolados de <i>Luxemburgia</i>	17
Figura 8 - Esqueleto básico dos flavonóides.	21
Figura 9 - Biossíntese dos flavonóides (E-1: Chalcona sintase, E-2: Chalcona isomerase, E-3: Flavona sintase I (2-hidroxi-flavanona sintase), E-4: Flavona sintase II (2-hidroxi-flanona sintase), E-5: Isoflavona sintase (2-hidroxiisoflavona sintase), E-6: Flavanona-3-hidroxilase e E-7: Flavonol sintase) (DEY & HARBONE, 1997).	23
Figura 10 - Metilação pelo cofator S-adenosil metionina (MANN, 1987).	24
Figura 11 - Proposta biossintética de dimerização na formação da amentoflavona e podocarpusflavona.	25
Figura 12 - Proposta biossintética de dimerização na formação da 2",3"-diidrochnaflavona.	26
Figura 13 - Proposta biossintética de dimerização na formação da luxenchalcona.	27
Figura 14 - Proposta biossintética de dimerização na formação da agathisflavona e 7"-O-28	
Figura 15 - Padrões utilizados nas análises cromatográficas.	40
Figura 16 - Indicação dos anéis A, B e C dos flavonóides.	45
Figura 17 - Separação dos padrões bisflavonóides por CLAE em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 mm) com água- acetonitrila- metanol- ácido acético (39: 40: 20: 1); fluxo 1 mL min ⁻¹ ; detecção em 254 nm.	47
Figura 18 - Espectro de absorção no UV do padrão agathisflavona em água- acetonitrila- metanol- ácido acético (39:40:20:1).	48
Figura 19 - Espectro de absorção no UV do padrão amentoflavona em água- acetonitrila- etanol- ácido acético (39:40:20:1)	49
Figura 20 - Espectro de absorção no UV do padrão 7"-O- metilagathisflavona em água- acetronitrila- metanol- ácido acético (39:40:20:1)	49
Figura 21 - Espectro de absorção no UV do padrão podocarpusflavona em água- acetonitrila- metanol- ácido acético (39:40:20:1).	50
Figura 22 - Espectro de absorção no UV do padrão 2", 3"-diidrochnaflavona em água- cetonitrila- metanol- ácido acético (39:40:20:1)	51
Figura 23 - Espectro de absorção no UV do padrão luxenchalcona em água- acetonitrila metanol- ácido acético (39:40:20:1).	51
Figura 24 - Cromatograma da fração LNFA-D do extrato de acetato de etila das folhas inteiras de <i>Luxemburgia nobilis</i> . Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 mm); água- acetonitrila- metanol- ácido acético (39:40:20:1); fluxo 1 mL.min ⁻¹ ; em 254 nm	53
Figura 25 - Cromatograma da fração LNFA-AC do extrato de acetato de etila das folhas inteiras de <i>Luxemburgia nobilis</i> . Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 mm), em	

água- acetonitrila- metanol- ácido acético (39: 40: 20: 1); fluxo 1 mL.min ⁻¹ ; l = 254 nm.	53
Figura 26 - Comparação dos espectros de absorção no UV do padrão 2'', 3''- diidrochnaflavona e pico 2 (23,4 min) das frações LNFIA-D e LNFIA- AC. Realizado em água- acetronitrila- metanol-ácido acético (39:40:20:1).	54
Figura 27 - Espectro de absorção no UV (254 nm) dos picos identificados como: 1 (17,0 min), 2 (23,40 min) e 3 (32,0 min) nas frações LNFIA-D e LNFIA-AC. Realizado em água-acetonitrila- metanol-ácido acético (39:40:20:1).	55
Figura 28 - Perfil cromatográfico da fração P-LNFIA; Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 mm); metanol-água (75:25); fluxo 1 mL min ⁻¹ ; em 254 nm.	57
Figura 29 - Perfil cromatográfico da fração P-LNFIA. Coluna semipreparativa C -18 (25 cm x 20 mm x 5 mm); eluente metanol-água (75:25); fluxo 5 mL min ⁻¹ ; em 254 nm.	58
Figura 30 - Cromatograma da substância LN-1 comparado com o padrão 2'',3''diidrochnaflavona. Coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 mm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo 1 mL min ⁻¹ ; em 254 nm.	60
Figura 31 - Comparação dos espectros de absorção no UV de 2'', 3''-diidrochnaflavona com o pico 1 da substância LN-1 na fase móvel metanol-água-ácido acético (74:25:1)	60
Figura 32 - Espectro de IV da fração LN-2.....	61
Figura 33 - Perfil cromatográfico da fração LN-2 comparado com do padrão 2'',3''- diidrochnaflavona. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 mm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min ⁻¹ ; em 254 nm.	62
Figura 34 - Comparação dos espectros de absorção no UV de LN-1 e 2'', 3''- Diidrochnaflavona. Realizado em metanol-água-ácido acético (74:25:1).....	62
Figura 35 - Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) da substância LN-2 em DMSO-D ₆	65
Figura 36 - Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) do derivado LN-2 em CDCl ₃	66
Figura 37 - Espectros resultantes da irradiação dupla e subtração de espectros (NOE) do derivado metilado LN-2m em CDCl ₃	67
Figura 38 - Espectro de IV da substância LN-3.	69
Figura 39 - Perfil cromatográfico da fração LN-3 comparado com do padrão 2'', 3''- diidrochnaflavona. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 mm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min ⁻¹ ; em 254 nm.	70
Figura 40 - Comparação dos espectros de absorção no UV de 2'', 3''- diidrochnaflavona e da fração LN-3. Realizado em metanol-água-ácido acético (74:25:1).....	71
Figura 41 - Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-D ₆) de LN-3.....	72
Figura 42 - Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO) de LN-3, expandido na região de 5,4 a 8,0 ppm.....	72
Figura 43 - Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) de LN-3 em CDCl ₃	75
Figura 44 - Espectro resultante da irradiação dupla e subtração de espectros do derivado LN-3m em CDCl ₃	76
Figura 45 - Comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio entreLN-2 e LN-3... ..	77
Figura 46 - Perfil cromatográfico da fração P-OS-A. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 mm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo1 mL min ⁻¹ detecção a l = 254 nm.	79
Figura 47 - Perfil cromatográfico da fração P-OS-A; Coluna semipreparativa C-18 (25cm x20mm x 5 mm); metanol-água (75:25); fluxo 5 mL min ⁻¹ ; detecção a 254 nm.	80

Figura 48 - Sobreposição dos cromatogramas das frações OS-A-2, OS-A-4, OS-A-6 e OS-A-8. Coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 mm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min ⁻¹ ; detecção em 254 nm.	82
Figura 49 - Espectros de absorção no UV da fração OS-A-2, OS-A-4, OS-A-6 e OS-A-8. Realizado em metanol-água- ácido acético (74:25:1).	82
Figura 50 - Espectro de IV da substância OS-1.	83
Figura 51 - Comparação dos cromatogramas da fração OS-1 e padrão amentoflavona. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 mm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min ⁻¹ ; detecção em 254 nm.	84
Figura 52 - Espectros de absorção no UV da substância OS-1 e do padrão amentoflavona.	85
Figura 53 - Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-D ₆) da substância OS-1.	86
Figura 54 - Expansão da região entre 5,8 a 8,2 ppm do espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-D ₆) da substância OS-1.	87
Figura 55 - Comparação dos deslocamentos químicos entre OS-1 e dados da literatura de amentoflavona e 2'',3''-diidroochnaflavona.	87
Figura 56 - Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDC ₃) do derivado OS-1m.	90
Figura 57 - Espectro resultante da dupla irradiação e subtração (NOE) do derivado metilado OS-1m em CDC ₃	91
Figura 58 - Perfil cromatográfico da substância OS-3. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5mm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min ⁻¹ , 1 254 nm.	92
Figura 59 - Espectro de absorção no UV da fração OS-3 em metanol-água-ácido acético (74:25:1).	93
Figura 60 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) de OS-3.	94
Figura 61 - Expansão da região entre 6,3 a 8,5 ppm do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) de OS-3.	95
Figura 62 - Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-D ₆) da substância OS-3, expandido na região de 90 a 100 ppm.	96
Figura 63 - Correlação de sinais de deslocamento químico de OS-3, amentoflavona e robustaflavona na região de 90pp a 115 ppm.	97
Figura 64 - Perfil cromatográfico da substância OS-A-5 e podocarpusflavona A; Coluna analítica C -18 (25cm x 4,6mm x 5 mm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo 1 mL min ⁻¹ ; detecção em 254 nm.	98
Figura 65 - Espectros de absorção no UV da substância OS-A-5 e podocarpusflavona A. Realizado em metanol-água-ácido acético (74:25:1).	98
Figura 66 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) da substância OS-A-5.	100
Figura 67 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) da substância OS-A-5, expandido em 8,4-6,0 ppm.	101
Figura 68 - Perfil cromatográfico da fração OS-A-7; Coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 mm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo 1 mL min ⁻¹ ; em 254 nm.	103
Figura 69 - Espectros de absorção no UV da fração OS-A-7. Realizado em metanol-água-ácido acético (74:25:1).	104
Figura 70 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) da substância OS-A-7.	105
Figura 71 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) da substância OS-A-7.	106

Figura 72 - Perfil cromatográfico da fração P-OS-B. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 mm); eluente metanol-água (75:25); fluxo 1 mL min ⁻¹ ; λ=254 nm.....	108
Figura 73 - Perfil cromatográfico da fração P-OS-B. Coluna semipreparativa C-18 (25 cm x 20 mm x 5 mm); eluente metanol-água (75:25); fluxo 5 mL min ⁻¹ ; em 254 nm.	109
Figura 74 - Perfil cromatográfico das frações OS-B-2, OS-B-4, OS-B-5 e OS-B-7. Coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 mm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min ⁻¹ ; em 254 nm.....	111
Figura 75 - Espectros de absorção no UV da fração OS-B-2, OS-B-4, OS-B-5 e OS-B-7. Realizado em metanol-água- ácido acético (74:25:1).....	111
Figura 76 - Perfil cromatográfico da substância OS-B-6 Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 mm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo 1 mL min ⁻¹ ; λ 254 nm.	112
Figura 77 - Espectro de absorção no UV da substância OS-B-6 realizado em metanol-água-ácido acético (74:25:1).....	113
Figura 78 - Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-D ₆) de OS-B-6.....	114
Figura 79 - Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-D ₆) de OS-B-6, expandido na região de 5,0 a 8,0 ppm	115
Figura 80 - Espectro resultante da irradiação dupla e subtração de espectros (NOE) do derivado OS-B-6 em DMSO-D ₆	117
Figura 81 - Espectro de RMN ¹ H do derivado OS-B-6m realizado em CDCl ₃	119
Figura 82 - Espectros resultantes da irradiação dupla e subtração de espectros do derivado OS-B-6m em CDCl ₃	120

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Procedimentos realizados para fracionar os extratos das folhas inteiras de <i>Luxemburgia nobilis</i>	32
Esquema 2 - Procedimentos realizados para fracionar os extratos das folhas trituradas de <i>Luxemburgia nobilis</i>	34
Esquema 3 - Procedimentos realizados para preparar o extrato de acetato de etila das folhas inteiras de <i>Luxemburgia nobilis</i> para ser fracionado por CLAE semipreparativa.	36
Esquema 4 - Procedimentos realizados para preparar o extrato metanólico das folhas de <i>Ouratea semiserrata</i> A, para ser fracionado análise por CLAE semipreparativa.	37
Esquema 5 - Procedimentos realizados no preparo do extrato metanólico das folhas trituradas de <i>Ouratea semiserrata</i> B para ser fracionada por CLAE semipreparativa.	38

ÍNDICES DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência de constituintes químicos isolados de espécies da família Ochnaceae	18
Tabela 2- Padrões utilizados na cromatografia líquida de alta eficiência	39
Tabela 3 - Comportamento cromatográfico dos padrões utilizados na CLAE-DAD em relação as fases utilizadas.	41
Tabela 4 - Tempo de retenção (t_R) e comprimento de onda (λ_{max}) dos padrões bisflavonóides analisados por CLAE com detector de fotodiodo.	47
Tabela 5 - Tempo de retenção (t_R) e quantidades das frações isoladas de P-LNFIA por CLAE semipreparativo.	58
Tabela 6 - Dados de RMN 1H de LN-2, LN-2m comparados com os valores registrados na literatura do padrão 2'', 3''-diidrochonaflavona e seu respectivo derivado (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2002).	68
Tabela 7 - Dados de RMN 1H de LN-2, LN-3 comparado com os dados da literatura do padrão 2'',3''-diidrochonaflavona (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2002).	73
Tabela 8 - Tempo de retenção (t_R) e quantidades das frações isoladas de P-OS-A por CLAE semipreparativa.	81
Tabela 9 - Dados de RMN de 1H da substância OS-1 comparado com os dados da literatura do padrão amentoflavona (VELANDIA <i>et al.</i> , 2002).	88
Tabela 10 - Dados de RMN de 1H de OS-A-5 comparados com os dados da literatura amentoflavona e podocarpusflavona A (VELANDIA <i>et al.</i> 2002).	102
Tabela 11 - Dados de RMN de 1H de OS-A-7 comparados com os dados da substância OS-1 e dados literatura para amentoflavona (VELANDIA <i>et al.</i> , 2002).	107
Tabela 12 - Tempo de retenção (t_R) e quantidades das frações isoladas de P-OS-B por CLAE semipreparativa	110
Tabela 13 - Dados de RMN de 1H da substância OS-B-6 comparados com os dados da literatura do padrão amentoflavona (VELANDIA <i>et al.</i> , 2002).	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μm	micrograma
δ	deslocamento químico (ppm)
AcOEt	acetato de etila
AcOH	ácido acético
aq	aquoso
<i>ax</i>	axial
CC	cromatografia em coluna (pressão atmosférica)
CCD	cromatografia em camada delgada
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>dl</i>	dubleto largo
DMSO-D ₆	dimetilsulfóxido deuterado
<i>eq</i>	equatorial
g	gramas
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento em Hertz
<i>m</i>	multipleto
MeOH	metanol
MHz	megahertz
min.	Minutos
mL	mililitro
NOE	Nuclear Overhauser Effect
Rf	Fator de Retentividade
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono - 13
<i>s</i>	singleto

<i>sl</i>	singleto largo
T _R	tempo de retenção
UV	ultravioleta

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

RESUMO

BOSSO, Adriana Aparecida. Identificação de Bisflavonóides de *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Seropédica, UFRRJ, 2004. 130 p. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Química de Produtos Naturais.

Este trabalho descreve a análise e o isolamento de bisflavonóides das folhas de *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência analítica e semipreparativa em fase reversa com detector de fotiodo.

A análise por CLAE-DAD dos extratos de acetato de etila das folhas inteiras de *Luxemburgia nobilis* indicou a presença de três bisflavonóides (flavona-flavanona), sendo que apenas a 2'',3''-diidroochnaflavona foi identificada. Após essa análise a ochnaflavona presente foi isolada por CLAE semipreparativa em fase reversa. Do extrato metanólico das folhas trituradas de *Ouratea semiserrata* foram isolados, por CLAE semipreparativa, a amentoflavona, podocarpusflavona A e B, 7,4'-*O*-dimetilamentoflavona e 4''''-*O*-metilrobustaflavona.

As estruturas das substâncias naturais isoladas e dos derivados metilados foram determinadas através das análises dos espectros de IV, RMN ¹H e ¹³C, incluindo comparações com dados da literatura.

Os bisflavonóides podocarpusflavona B, 7,4'-*O*-dimetilamentoflavona, 4''''-*O*-metilrobustaflavona foram identificados pela primeira vez nas folhas de *Ouratea semiserrata*.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada ao detector de fotiodo, mostrou-se eficiente na identificação das substâncias, 2'',3''-diidroochnaflavona e a amentoflavona, como marcadores químico das folhas de *Luxemburgia nobilis* e de *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae), respectivamente.

Palavras chaves: Bisflavonóides, *Luxemburgia nobilis*, *Ouratea semiserrata*, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

ABSTRACT

BOSSO, Adriana Aparecida. Identification of the biflavonoids of *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae) by high-pressure liquid chromatography. Seropédica, UFRRJ, 2004. 130 p. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Química de Produtos Naturais.

This work describes the analyses and the isolation of the biflavonoids from *Luxemburgia nobilis* leaves and *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae) by analytical and semi-preparative high-pressure liquid chromatography, in reversed phase with diode array detection.

The analyses by HPLC-PDA of the ethyl acetate extract from leaves of *Luxemburgia nobilis* indicated the presence of three biflavonoids (flavone-flavanone), being the 2'',3''-diidrochnaflavone the only one identified. After this analysis the ochraflavone present in the extract was isolated by semi-preparative RP-HPLC technique. In the methanolic extract from *Ouratea semiserrata* leaves the amenthoflavone, podocarpusflavone A e B, 7,4'-*O*-dimethylamenthoflavone and 4'''-*O*-methylrobustaflavone were isolated.

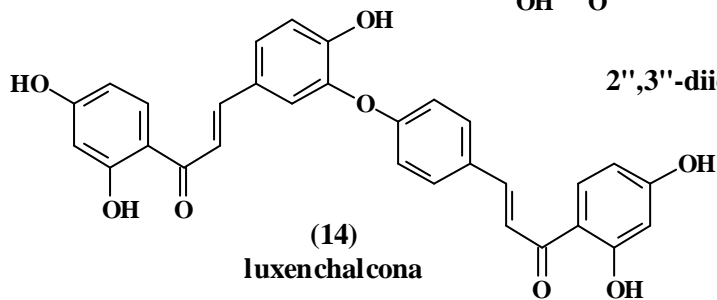
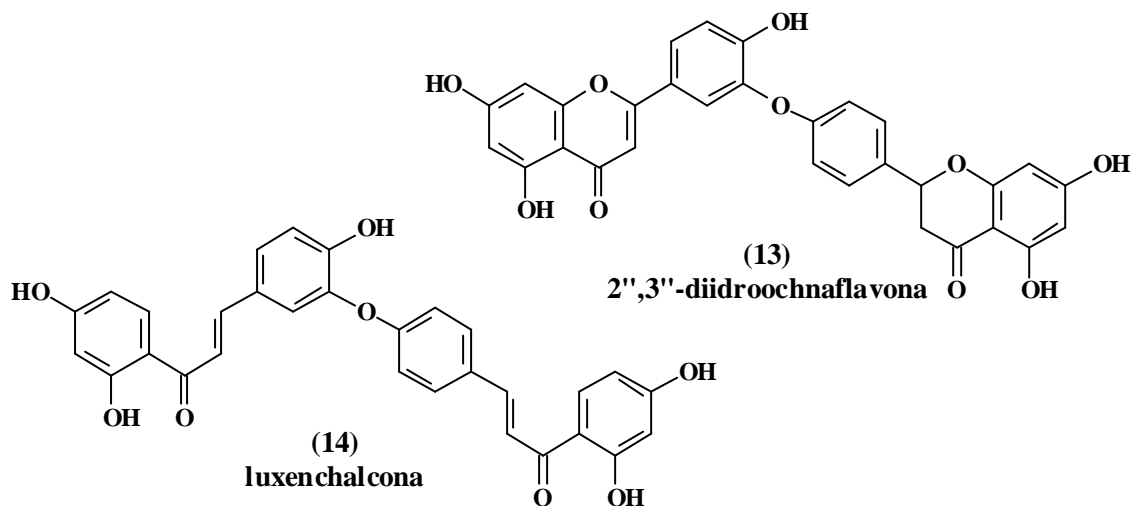
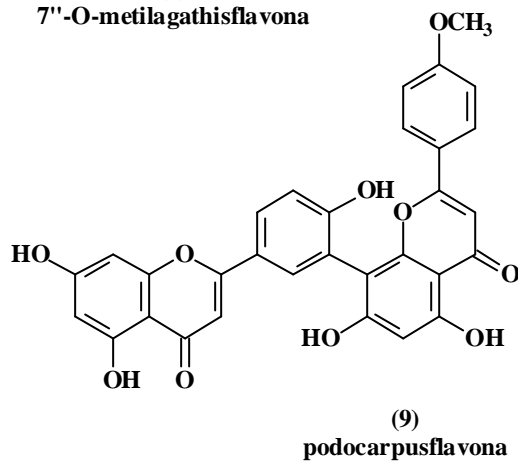
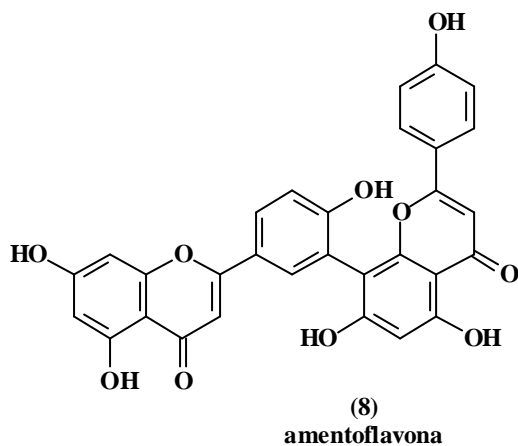
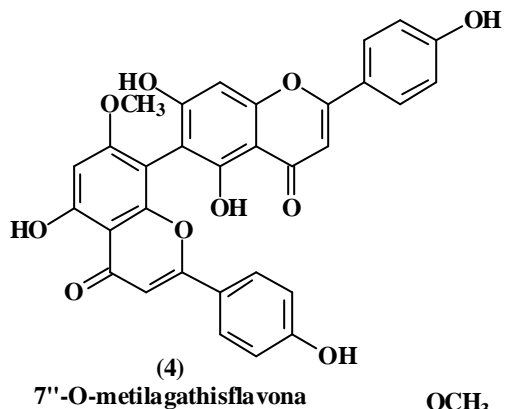
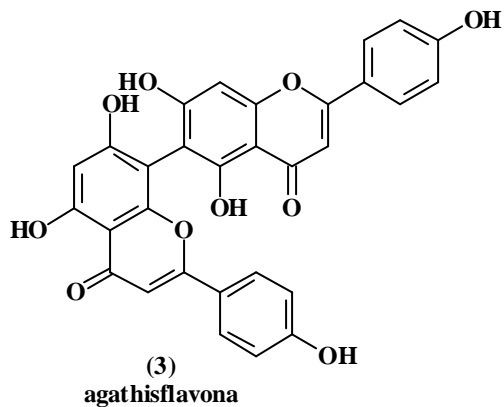
The structures of the natural products and their methyl derivatives were established using IR, ¹H and ¹³C NMR spectral data.

To the best of our knowledge, it is the first time that the biflavonoids podocarpusflavone B, 7,4'-*O*-dimethylamenthoflavone, 4'''-*O*-methylrobustaflavone were identified from the leaves of *Ouratea semiserrata*.

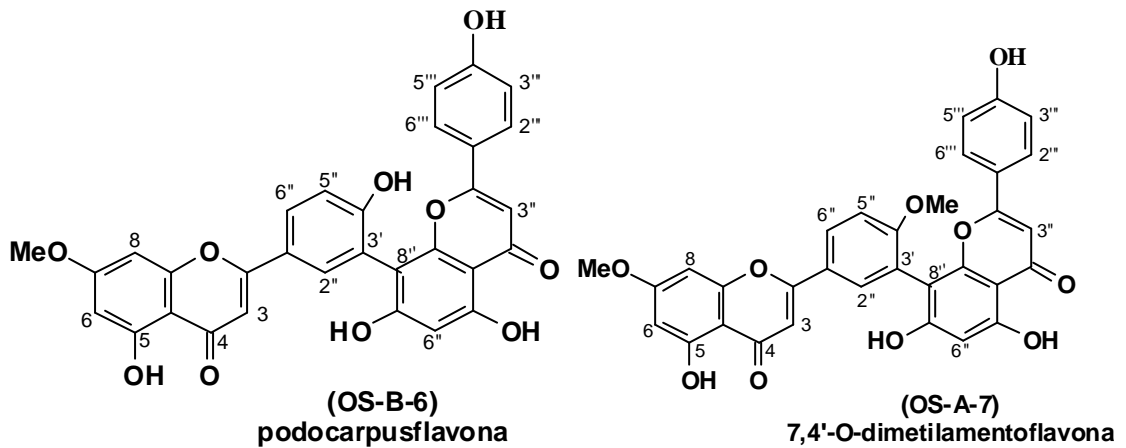
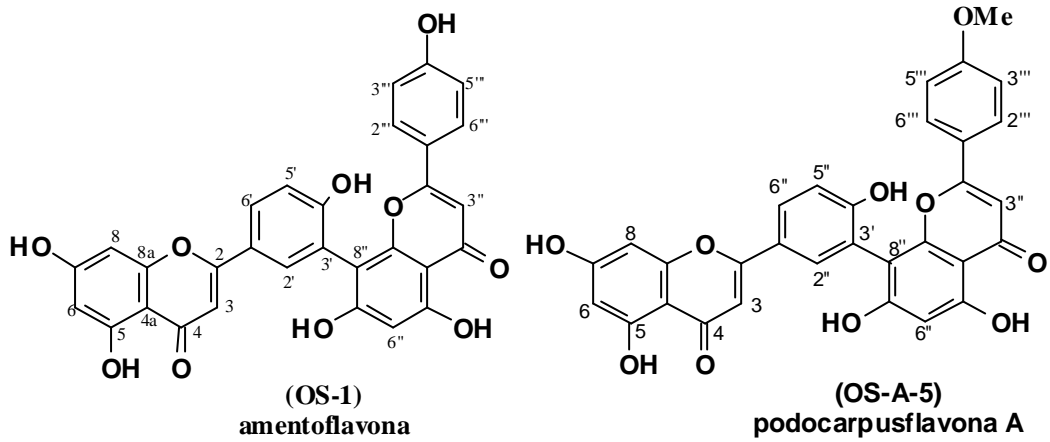
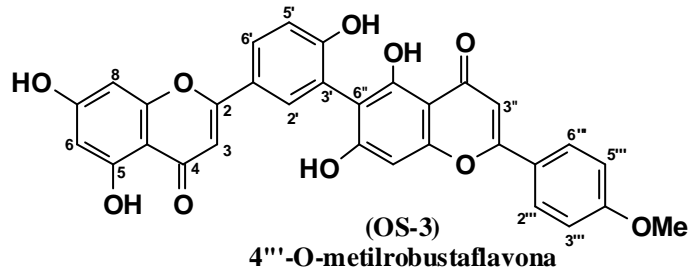
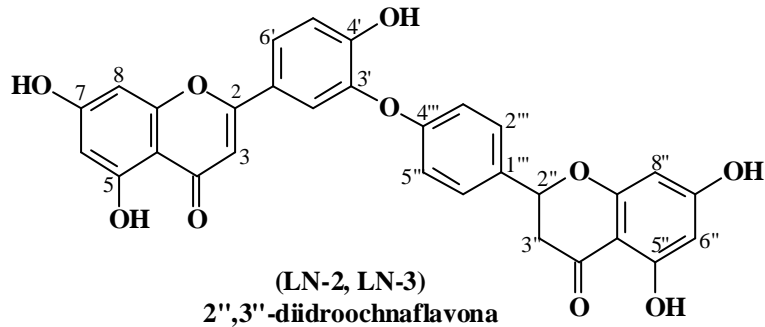
The HPLC-PDA method presented in this work confirms the previous achievements that 2'',3''-diidrochnaflavone can be used as a chemical marker to *Luxemburgia nobilis* and amenthoflavone to *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae).

Key words: Biflavonoids, *Luxemburgia nobilis*, *Ouratea semiserrata*, HPLC.

Padrões utilizados nas análises por CLAE analítica:



Substâncias isoladas:



1 INTRODUÇÃO

A pesquisa de produtos naturais relacionada aos metabólitos especiais tem alcançado uma larga amplitude e diversificação na pesquisa na área de química. A sua importância revela-se devido à aplicação nos mais diversos campos de conhecimento, como os estudos relacionados ao entendimento e ao uso da biodiversidade. Além do interesse econômico, visando explorar os metabólitos especiais na produção de perfumes, corantes, medicamentos, inseticidas, etc. deve-se considerar os conhecimentos científicos que podem ser adquiridos pelos químicos de produtos naturais, contribuindo para o desenvolvimento de diversas áreas da ciência, tais como: Farmacologia, Botânica, Agricultura, Química Orgânica, Evolução e Ecologia Química. Toda a pesquisa relacionada à química de produtos naturais deve ser desenvolvida no sentido de evitar a exploração da natureza visando lucros imediatos sem conservar a biodiversidade.

Há substâncias macromoleculares (proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, etc.) que são produzidas pelos processos metabólicos primários e são estudados pelos bioquímicos. A maioria das substâncias micromoleculares (alcalóides, flavonóides, terpenóides, lignóides, etc.) são considerados metabólitos especiais e são estudadas pelos químicos de produtos naturais (SIMÕES *et al*, 2000).

Até o momento, estima-se que somente 0,5% das plantas superiores tenham sido tocadas, sendo que a grande maioria destas plantas que ainda não foram investigadas, está situada nas zonas tropicais. Além disso, uma grande quantidade de metabólitos especiais de vegetais já isolados e com estrutura determinada, ainda não foram estudados quanto a suas atividades biológicas. Essas substâncias pertencem a várias classes químicas distintas, como alcalóides, terpenos, lignanas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas, esteróides, entre outras (DI STASI, 1996).

A química de produtos naturais possui relações estreitas de interdisciplinaridade com a botânica, uma vez que a sedimentação do conhecimento fitoquímico serve de base para um novo ramo da botânica moderna, a quimiotaxonomia. Os caracteres morfológicos normalmente utilizados na caracterização de espécies vegetais pertencentes ao mesmo gênero, podem ser acrescidos das informações relacionadas com os possíveis constituintes químicos considerados como "marcadores biogenéticos" podendo ser característicos de

cada grupo taxonômico.

A ocorrência de diferentes espécies é extremamente grande, sendo impossível conhecer a composição química de todas, analisando espécies por espécie. Neste caso a quimiosistemática se faz necessária, pois ela permite fazer previsão da composição química de um número significativo de espécies.

1.1 Quimiosistemática

Na investigação fitoquímica, com o objetivo de se isolar os metabólitos especiais da planta, o primeiro passo é a escolha do material vegetal. Esta escolha pode ser bastante difícil, pois se sabe que existem aproximadamente 350.000 plantas sobre a superfície terrestre que não foram sujeitas a nenhum tipo de estudo fitoquímico ou farmacológico.

Entre os diferentes critérios de seleção, a quimiotaxonomia ou ciência da classificação das plantas em função de seus constituintes químicos pode conduzir a informações importantes. Algumas classes de substâncias são características de uma família botânica, de um gênero ou mesmo de uma única espécie.

A quimiosistemática vegetal diz respeito à utilização de dados químicos na resolução de problemas sistemáticos. É uma área interdisciplinar de investigação que não tem parado de crescer desde os anos 40, junto ao desenvolvimento das técnicas de cromatografia e espectrometria, e que se tem revelado extremamente útil na dedução de relações filogenéticas (GOTTHIEB e BORIN, 2003). Entre vários sistemas de classificação dos vegetais já propostos, raros levam em consideração as características químicas. CRONQUIST (1981) citou a ocorrência de metabólitos secundários de cada ordem e família, mas, entretanto, este autor não atribuiu grande relevância a tais dados. Por outro lado, DAHLGREN (1975; 1980; 1989) atribuiu elevada importância aos metabólitos secundários, utilizou o padrão de distribuição de vários produtos (alcalóides provenientes de diferentes rotas biossintética, iridóides, policetilenos, etc.) para elaborar e, posteriormente, modificar seus sistemas de classificação dos vegetais.

Durante séculos a quimiosistemática (também conhecida como sistemática bioquímica ou, ainda, quimiotaxonomia) foi praticada por diferentes culturas, dado que o

reconhecimento das plantas era baseado nas observações de propriedades alimentares, medicinais, olfatórias, etc, apresentadas pelas mesmas; aqueles vegetais que apresentavam propriedades similares pertenciam aos grupos semelhantes. Os primeiros trabalhos publicados datam do final do século XVII, que relacionavam certos grupos de plantas com seus respectivos usos terapêuticos e também, além da morfologia e características organolépticas (odor e sabor) com as propriedades medicinais. No século XVIII a composição química começou a ser introduzida como caracter taxonômico devido à observação que “plantas diferentes nascidas em solos idênticos continham produtos diferentes enquanto que plantas análogas nascidas em solos completamente diferentes formavam produtos análogos”. O desenvolvimento desses conceitos previu a importância da química na taxonomia;(GIBBS, 1963).

O interesse na utilização da química (quimiotaxonomia ou quimiosistemática) e da bioquímica (sistemática bioquímica ou taxonomia molecular) em sistemática vegetal tem aumentado rapidamente nos últimos anos, principalmente, devido ao desenvolvimento de métodos analíticos instrumentais aprimorados, que possibilitaram a análise de um grande número de plantas com maior rapidez, relativa facilidade e precisão. Os processos são selecionados de acordo com a natureza dos compostos em estudo. Para compostos voláteis, por exemplo, a cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas tem fornecido resultados excelentes, já os compostos não voláteis, como flavonóides, utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Estes processos cromatográficos possuem uma alta resolução e sensibilidade, permitindo assim resultados satisfatórios tanto quantitativos quanto qualitativos (GOTTLIEB e BORIN, 2003).

A obtenção de produtos puros de um extrato pode ser um processo longo, caro e necessitar, na maioria dos casos, de várias etapas. Às vezes, pode-se conseguir quantidades ínfimas de um composto desejado e, além disso, este pode ser muito instável. Por isto, é importante que se tenha acesso a diferentes técnicas de isolamento. Hoje em dia, existe a possibilidade de se realizar esquemas rápidos e adequados de separações, por meio da escolha sensata de diferentes técnicas disponíveis. O isolamento e caracterização de metabólitos especiais requerem cada vez mais a utilização de técnicas cromatográficas modernas, que possam aumentar de forma considerável a sensibilidade e a seletividade da análise dos compostos de interesse.

A cromatografia líquida de alta eficiência, por exemplo, tem sido muito usada nos últimos dez anos em quimiotaxonomia, uma vez que grande parte dos compostos que constituem as plantas pode ser analisada por essa técnica (MEURER-GRINES STEVESON, 1994).

1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação, que está fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (AQUINO NETO e SOUZA NUNES, 2003)

O termo cromatografia (“chrom” -cor e “graphie” –escrever) foi empregado pela primeira vez em 1906, pelo botânico russo Mikail Semenovitch Tswett, através do resultado visual obtido com a separação das substâncias coloridas (carotenóides e clobrofila) em seus experimentos. A partir desse trabalho foram introduzidos os conceitos sobre adsorção e desorção que, associados à técnica experimental desenvolvida, deram origem à cromatografia como técnica analítica, sendo que o trabalho visual da separação dos pigmentos foi chamado de cromatograma (ETTE, L.S. 1980)

Apesar deste e de outros estudos precursores, a cromatografia foi praticamente ignorada até a década de 30, quando foi redescoberta. A partir daí, vários trabalhos na área possibilitaram seu aperfeiçoamento.

A incansável busca de técnicas eficientes de análise e separação, fez com que surgisse, na Alemanha durante a 2ª Guerra Mundial, o primeiro trabalho em cromatografia gasosa, que foi rapidamente aperfeiçoada. Esta explosão instrumental estendeu-se à cromatografia líquida, onde foram implantados sistemas altamente pressurizados, associados à fases estacionárias com partículas de diâmetros em torno de 2 a 20 μm , bem como o aperfeiçoamento de adsorventes. Este aperfeiçoamento, com a utilização de novas fases estacionárias, associadas ao desenvolvimento da instrumentação, levaram a cromatografia líquida de alta eficiência, a ser uma técnica com melhor resposta em termos de resolução, quantificação e detecção, bem como em um tempo menor de análise.

Com este avanço tecnológico, a cromatografia líquida de alta eficiência tomou enorme impulso, facilitando em muito a análise de substâncias de baixa volatilidade e das termolábeis que exige condições diferentes da cromatografia gasosa.

Com o crescente interesse no descobrimento de novos metabólitos, existe a necessidade de se separar misturas em quantidades pequenas ou grandes, de maneira eficaz, rápida e econômica. Mesmo sabendo-se que é extremamente difícil satisfazer esses três requisitos com as técnicas de cromatografia utilizadas comumente, é importante conhecer e escolher a técnica mais adequada ao problema.

Comumente, a cromatografia convencional não é suficientemente eficaz para separar quantidades em gramas de estruturas muito próximas. Por outro lado, as técnicas de cromatografia líquida sob pressão, como a CLAE, com a fase estacionária de baixa granulometria, podem realizar separações difíceis graças a melhores fatores de separação.

Na última década a CLAE foi uma das técnicas mais utilizadas para análises e isolamento de produtos naturais a partir de matrizes complexas, por exemplo, os extratos de plantas. A CLAE tem sido utilizada de maneira rotineira como “piloto” para o isolamento em escala preparativa de produtos naturais pela otimização das condições experimentais, pelo controle de diferentes frações obtidas durante o isolamento e pelo controle da pureza final dos compostos isolados (AQUINO NETO e SOUZA NUNES, 2003)

A retenção em CLAE é dependente das interações entre soluto - fase móvel, soluto - fase estacionária e fase móvel - estacionária. Assim a escolha do modo de separação depende da escolha da fase estacionária e da fase móvel para cada classe de soluto.

A fase estacionária normal é compreendida por adsorventes (sílica, alumina) ou fases polares quimicamente ligadas (ciano, diol, amino), as fases móveis utilizadas são normalmente uma mistura de solventes orgânicos sem a adição de água, onde a fase estacionária é mais polar que a fase móvel. As moléculas neutras, menos polares, são mais bem separadas e menos retidas pela cromatografia em fase normal. Já na fase estacionária reversa, ocorre a separação dos compostos polares. Enquanto na cromatografia em fase normal a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, na fase reversa a fase móvel é mais polar que a fase estacionária, sendo estas fases estacionárias quimicamente ligadas. Os grupos octadecil, octil e propil, na cadeia lateral, são usados na preparação de fases

estacionárias a serem utilizadas em fase reversa, enquanto grupos aminoalquil, diol e cianopropil são utilizados na derivatização de sílica, com aplicabilidade em fase normal e reversa (COLLINS, C.H. 1988).

As colunas mais usadas nessa técnica são as de fase reversa octilsilano (C8) e a de octadecilsilano (C18), com um sistema de solventes que vai da água, metanol, acetonitrila, até tetraidrofurano, além de ácido fórmico e ácido acético, tanto em sistema isocrático, como em gradiente. O uso de apenas esses solventes, deve-se à pequena quantidade de solventes orgânicos miscíveis em água. O princípio da retenção em fase reversa é hidrofóbico, a separação se deve, principalmente, a interações entre a parte não polar do soluto (amostra) e a fase estacionária (COLLINS, C.H. 1988).

A adição de ácido acético e ácido fórmico à fase aquosa, que é freqüentemente utilizada como modificadores de fase, deve-se ao fato destes ácidos impedirem a ionização dos grupos acídicos quando presentes na amostra, diminuir os tempos de retenção e influenciar na simetria dos picos (KARCH *et al.* 1976).

Os dois tipos de fases estacionárias podem ser utilizados para análises por CLAE analítica e semipreparativa. A diferença entre a cromatografia semipreparativa e analítica é que, enquanto a última (empregada na separação, identificação e determinação) não se preocupa com a recuperação da amostra, a cromatografia semipreparativa é um processo de purificação e permite o isolamento de substâncias puras contidas em uma mistura.

Semipreparativa é um termo usado para incluir colunas de diâmetros de 8-10mm, empacotadas com partículas de 5-10 μ m, e úteis para a separação de mistura de 1 a 100mg (SNYDER e KIRKLAND, 1979). Essa técnica permite a separação de quantidades maiores por injeções repetidas.

As condições isocráticas são as mais adequadas para a CLAE semipreparativa, pois os problemas de operação são reduzidos e a otimização da separação pode ser realizada em colunas de CLAE analítica antes da transposição para a escala semipreparativa.

A escala analítica, como está implícito, se baseia principalmente, nas análises qualitativas e quantitativas em pequena escala. A baixa capacidade dessas colunas, associada à alta resolução por elas apresentadas, torna a técnica útil para o monitoramento, caracterização e identificação de amostras menos complexas e em pequenas quantidades. Já

a CLAE semipreparativa pode ser utilizada para o isolamento e identificação de constituintes de amostras mais complexas contendo desde poucos miligramas até gramas. Isto se deve, as colunas semipreparativas, as quais são comercializadas com o mesmo empacotamento das colunas analíticas, mas com uma capacidade de carga 20 vezes superior às analíticas, mantendo ainda a sua eficiência (BIDLINGMEYER, B.A. 1987).

O progresso na tecnologia de CLAE tem-se refletido no desenvolvimento contínuo de novas fases estacionárias, em melhoramento na instrumentação e na evolução das técnicas automatizadas. Efetivamente, o maior avanço verificou-se no aumento da seletividade e sensibilidade da detecção.

Como não existe um detector universalmente sensível, várias possibilidades se apresentam, incluindo diferentes modos de detecção no mesmo aparelho, combinando, por exemplo, ultravioleta, fluorescência, espectrometria de massas e condutividade. Muitos outros sistemas podem ser usados consoante aos compostos que se pretende estudar.

O detector UV-Visível é o mais utilizado em CLAE, este detector possui o princípio de absorção de luz ultravioleta ou visível, por parte da amostra, quando nela passa radiação eletromagnética, sendo, entretanto um detector seletivo para moléculas que possuem grupos cromóforos.

A CLAE acoplada com detector por fotodiodo tem sido utilizada a mais de uma década em química de produtos naturais. Os espectros no UV de substâncias naturais podem dar informações úteis sobre a classe de substâncias e, no caso de polifenóis, informações sobre a posição das oxigenações.

Dos sistemas de detecção, o maior impacto na análise de flavonóides e derivados, envolve o detector de fotodiodo. Nestes últimos anos verifica-se cada vez mais o recurso a esta metodologia na literatura (RATH *et al*, 1995). Apesar de se estabelecer um determinado comprimento de onda durante a eluição, estes detectores permitem a rápida aquisição de espectros (várias vezes por segundo) e são constituídos por uma série de fotodiodos com cerca de 35 a 1024 unidades sensíveis de luzes individuais.

As técnicas de rotina baseadas em cromatografia de papel (CP) e de coluna (CC) continuam a ser utilizados na separação e purificação de metabólitos especiais, porém as

técnicas cromatográficas instrumentais têm aperfeiçoado o monitoramento de diversos metabólitos especiais em extratos brutos de plantas.

Ênfase e particular atenção serão dados às separações cromatográficas, e particularmente, a cromatografia líquida de alta eficiência, devido a sua grande importância na investigação de compostos polifenólicos. No presente trabalho utilizamos esta metodologia para monitorar e identificar a presença de bisflavonóides em duas espécies de Ochnaceae (*Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata*), que serão avaliados como marcadores sistemáticos desta família.

1.3 Generalidades sobre Flavonóides e Bisflavonóides.

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Os flavonóides ocorrem tanto em estado livre (aglicona) como combinados com açúcar (glicosídeos) ou também sob a forma dimérica (bisflavonóides). Os glicosídeos ocorrem como O-glicosídeos ou C-glicosídeos (BRUNETON, 1991). Mais de 2000 flavonóides são atualmente conhecidos, sendo que, aproximadamente 500 ocorrem em seu estado livre (EVANS, 1996).

A química dos flavonóides é complexa devido ao fato de na sua maioria corresponderem a formas conjugadas, ligando-se a açúcares (OSSES), através de um ou mais grupos fenólicos. Destacam-se os açúcares glicose, galactose, arabinose, ramnose, xilose, apiose e alose, além dos ácidos glicurônico e galacturônico, podendo a complexidade das associações apresentar-se sob a forma de di-, tri- ou oligossacarídeos.

Os flavonóides encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal e são abundantes em diversas famílias, destacando-se em Polygonaceae, Rutaceae, Leguminosae, Ochnaceae e Asteraceae, onde são utilizados como marcadores quimiotaxonômicos (EVANS, 1996). Estão ausentes nas algas, porém aparecem nas briófitas e em todas as plantas superiores (SAMUELSSON, 1992). Eles ocorrem em todas as partes do vegetal, incluindo folhas, raízes, cerne, casca, pólen, flores, néctar e sementes (MARKHAM, 1982), sendo as agliconas mais freqüentes nos tecidos lenhosos (DOMINGUEZ, 1973).

Segundo HARBONE (1988), as flavonas e flavonóis estão amplamente distribuídos em todas as plantas vasculares, enquanto as isoflavonas e bisflavonóides são encontrados

apenas em algumas famílias (Figura 1).

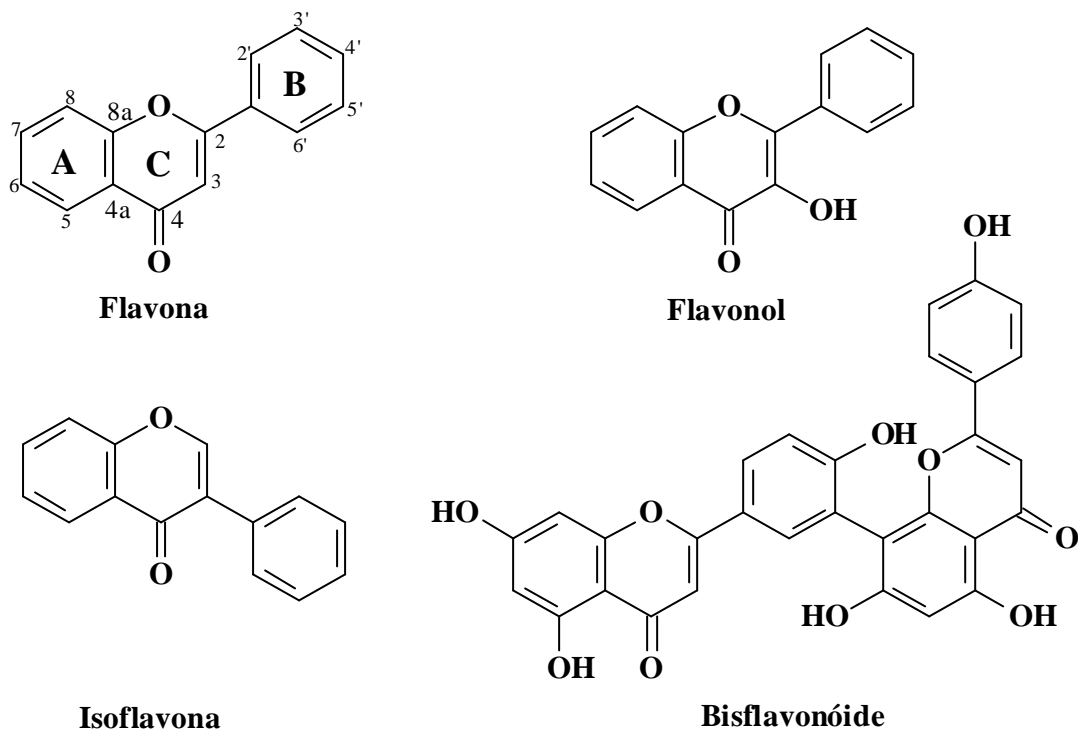


Figura 1 - Esqueleto básico de alguns flavonóides.

Os bisflavonóides constituem uma classe relativamente grande de compostos naturais, que são flavonóides diméricos. A maioria dos bisflavonóides de ocorrência natural são dímeros de flavonas e flavanonas, raramente chalconas, podendo apresentar substituintes nas posições dos carbonos 5, 7, 4' e, mais raramente, 5, 7, 3', 4'. Os monômeros podem ser iguais ou de diferentes tipos: flavona – flavona, flavanona – flavanona ou flavona – flavanona. Algumas hidroxilas podem apresentar-se metoxiladas e os heterosídeos são encontrados em menor frequência.

As ocorrências de um padrão particular de substituição nessas substâncias são frequentemente usadas como indicadores de avanço filogenético (SWAN, 1980).

Os bisflavonóides são diferenciados segundo o tipo de ligação entre os monômeros e o tipo de núcleo fundamental. A ligação das unidades pode-se fazer entre carbono-carbono ou carbono-oxigênio-carbono. Os mais abundantes apresentam ligações C-C dos monômeros entre os C-3' e C-8'', sendo a amentoflavona um exemplo(Figura 2) . Outros bisflavonóides apresentam ligações entre os carbonos 8' e 8'' (cupressuflavona) e carbonos

3' e 6'' (robustaflavona). Os bisflavonóides ligados entre C-O-C mais abundantes são os da classe das hinokiflavonas, que apresentam ligações entre os carbonos 4' e 6'' (Figura 2) (HARBORNE, 1975).

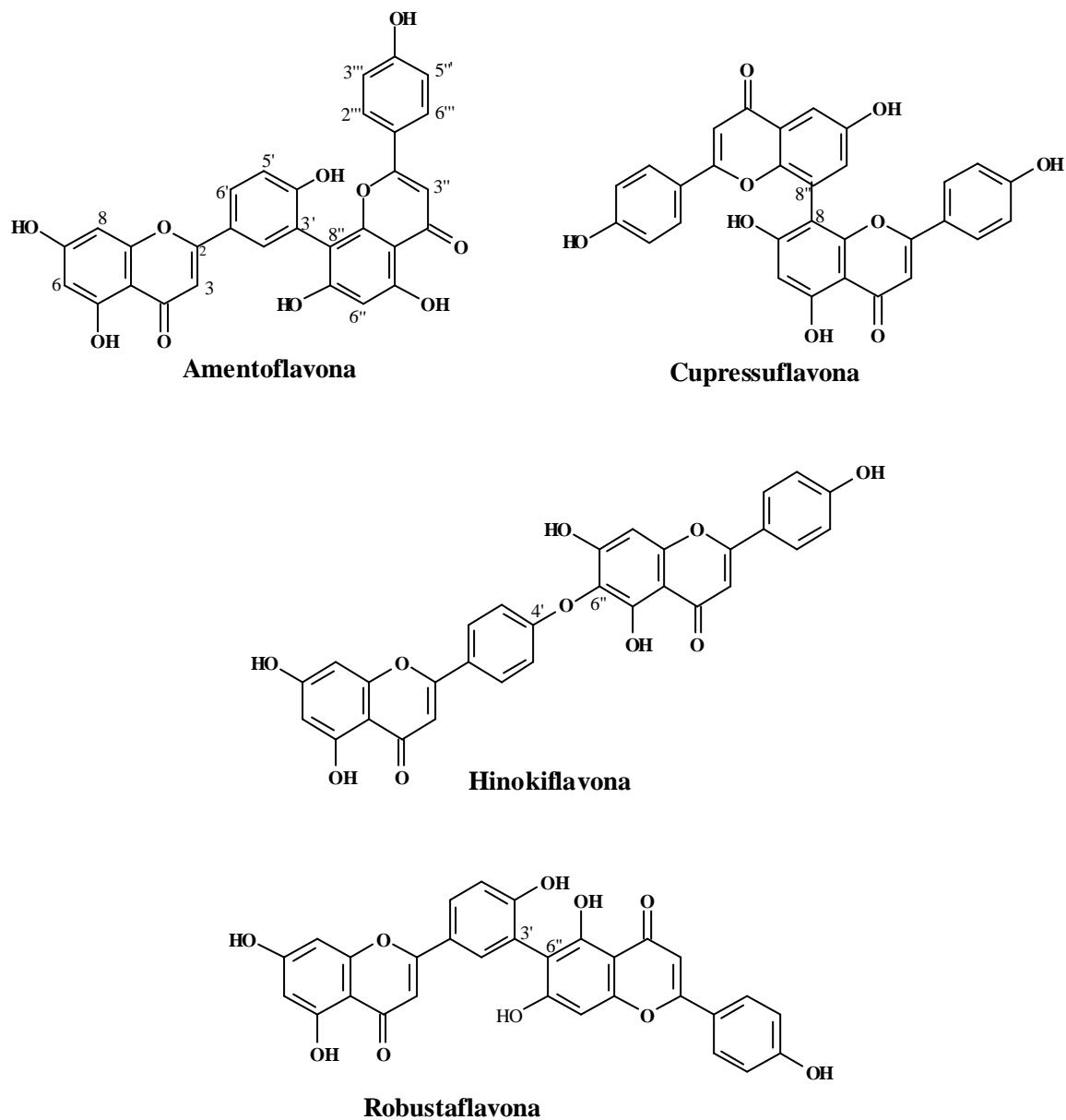


Figura 2 - Exemplos de bisflavonóides.

1.4 Aspectos Botânicos sobre a família Ochnaceae

A família Ochnaceae possui cerca de 28 gêneros e 400 espécies tropicais e subtropicais. No Brasil, ocorrem aproximadamente 9 gêneros com 105 espécies (BARROSO 1986). Dentre elas encontra-se *Luxemburgia nobilis Eichl* (Figura 3) e *Ouratea semiserrata* (Figura 4), sendo espécies arbóreas de médio porte de ocorrência predominante no Sudeste do Brasil. Nesta família inclui poucas plantas de valor econômico, sendo que algumas delas fornecem madeira para construções (gênero *Lophira*) e outras são utilizadas como plantas ornamentais para jardins.

A família Ochnaceae possui a seguinte classificação segundo Cronquist:

CLASSE:	Angiospermae
SUBCLASSE:	Dilliniaceae
SUPERORDEM:	Dillenidae
ORDEM:	Theales
FAMÍLIA:	Ochnaceae

A família Ochnaceae é caracterizada, principalmente, pela presença de metabólitos do grupo dos flavonóides, tetraflavonóides, chalconas e em destaque os bisflavonóides.



Figura 3 - Espécime de *Luxemburgia nobilis*.



Figura 4 - Espécime de *Ouratea semiserrata*.

1.5 Aspectos Químicos da Família Ochnaceae

Até o momento duas espécies de *Luxemburgia* e duas espécies de *Ouratea* foram estudadas, utilizando técnicas tradicionais pelo Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais da UFRRJ. Estes trabalhos já têm permitido perceber diferenças estruturais entres os bisflavonóides presentes nestes gêneros.

O estudo químico de espécies desta família como *Ouratea semiserrata*, *Ouratea hexasperma*, *Luxemburgia nobilis* e *Luxemburgia octandra* realizado pelo Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuralRJ), tem revelado a presença de várias classes de substâncias, sendo os flavonóides e bisflavonóides, os de maior frequência. Para efeitos deste trabalho focalizou-se apenas a classe dos flavonóides e bisflavonóides. Os trabalhos sobre estudos químicos de outras espécies de Ochnaceae realizados por outros pesquisadores do Brasil e do exterior têm fornecido as mesmas informações.

Das raízes de *Ouratea hexasperma*, isolaram um isoflavonóide, identificado como 5, 7, 4'- trimetoxiisoflavona (**1**) e dímeros de isoflavanonas (**2**) (MOREIRA *et al.*, 1994). As folhas desta espécie levaram ao isolamento da agathisflavona (**3**) e outro dímero de flavona, denominado 7''-O-metilagathisflavona (**4**) (MOREIRA *et al.*, 1999). Estudos posteriores desta espécie indicaram a presença de 7,7''-O- dimetillanaraflavona **5** (DANIEL *et al.* 2004). Teste *in vitro* para este bisflavonóide mostrou uma inibição do crescimento de tumores em murinos (CARVALHO *et al.*, 2002).(Figura 5).

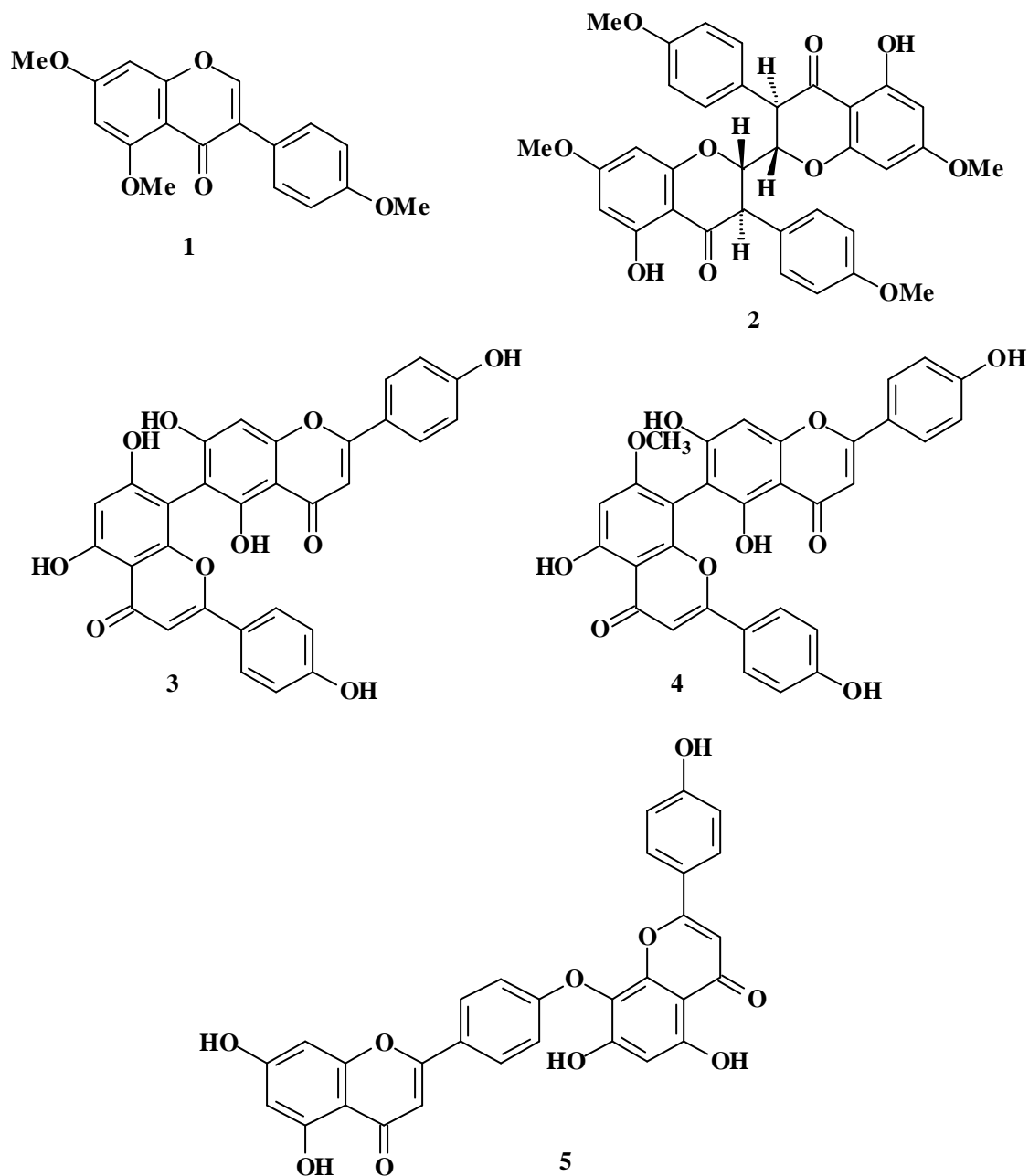


Figura 5 - Bisflavonóides isolados de *Ouratea hexasperma*.

Dos galhos de *Ouratea semiserrata* foram isolados tricloroisoflavona (6) e tetracloroisoflavona (7), e posteriormente, foram isolados das folhas, os bisflavonóides amentoflavona (8), podocarpusflavona (9), lanaraflavona (10), e os novos bisflavonóides 7-*O*-metil lanaraflavona (11) e 7, 4''- *O*- dimetil lanaraflavona (12) (VELANDIA *et al.* 1998, 2002) (Figura 6).

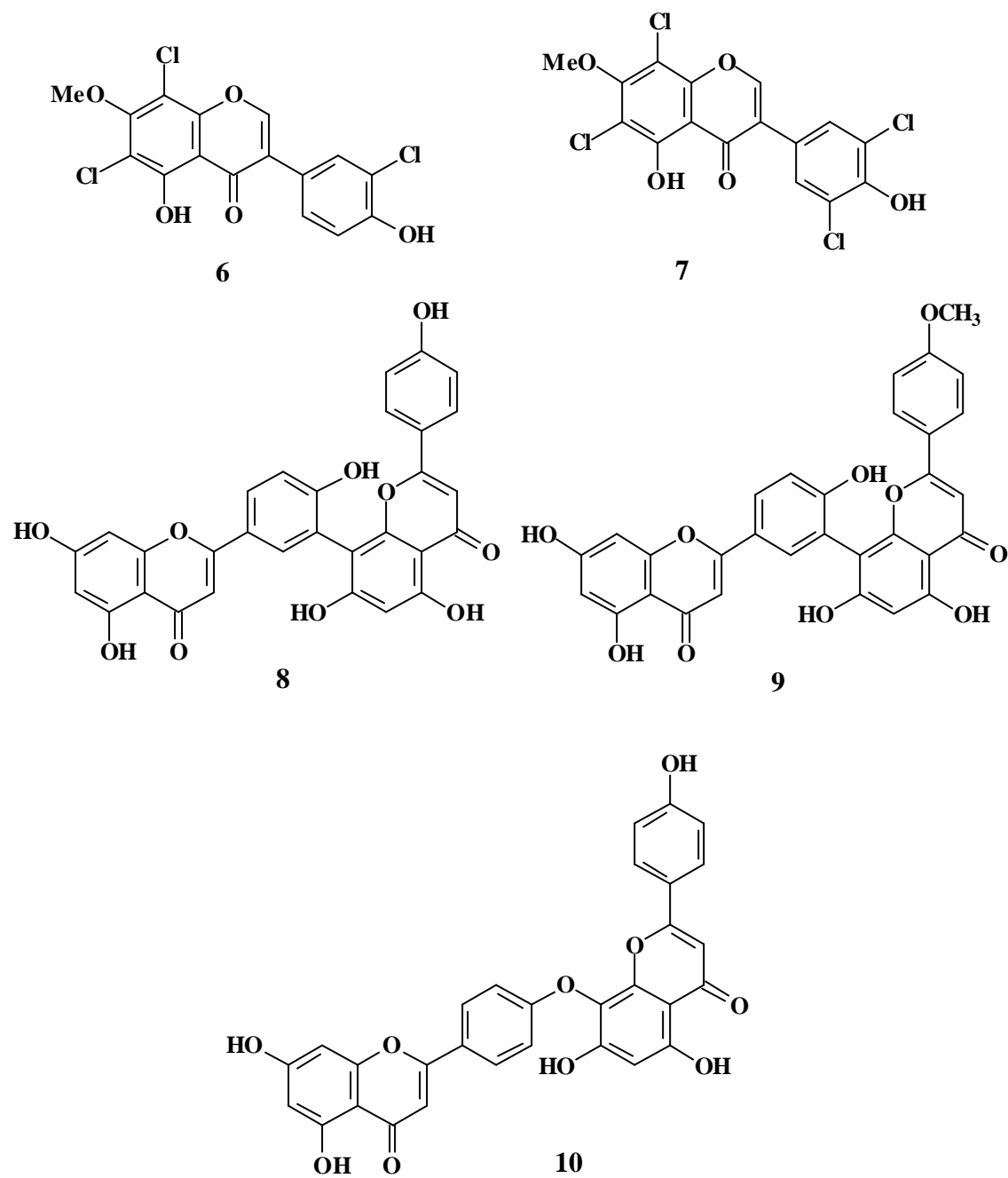


Figura 6. Bisflavonóides aislados de *Ouratea semiserrata* (continua próxima página).

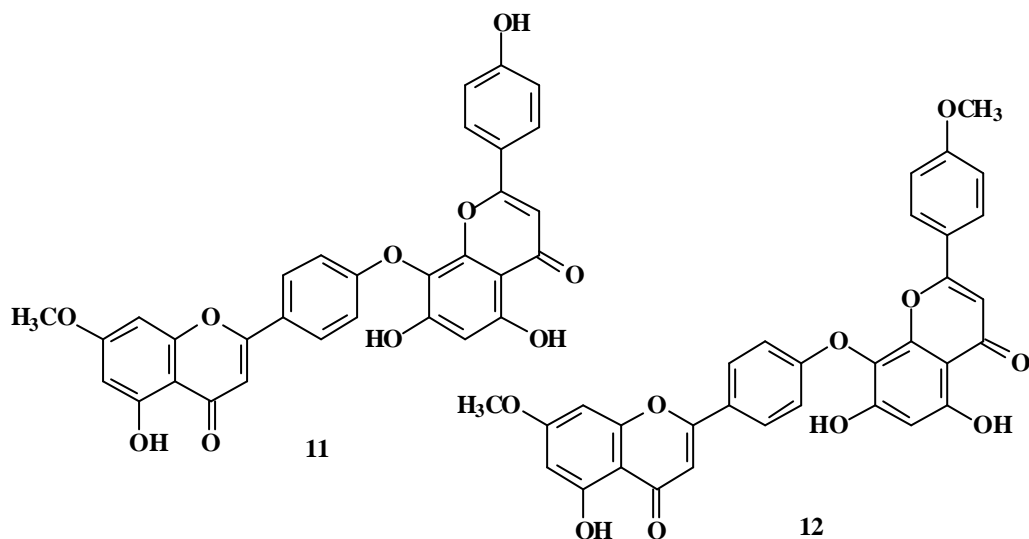


Figura 6 - Bisflavonóides isolados de *Ouratea semiserrata* (continuação).

As folhas de *Luxemburgia nobilis* estudadas por CARVALHO *et al.* (2000) forneceram também os bisflavonóides amentoflavona (**8**) e podocarpusflavona (**9**), isolados anteriormente das folhas de *Ouratea semiserrata*, e um novo bisflavonóide denominado como 2'', 3'' diidrochnaflavona (**13**) (Figura 7).

O estudo químico das folhas de *Luxemburgia octandra* forneceu além de (**13**), uma nova bischalcona, denominada como Luxenchalcona (**14**) (CARVALHO *et al.*, 2003) (Figura 7).

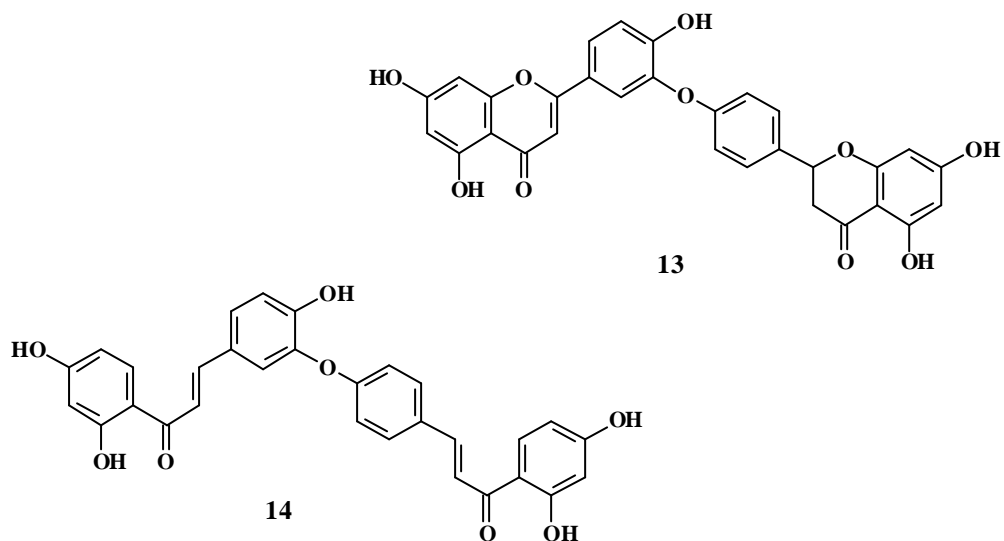


Figura 7 - Bisflavonóides isolados de *Luxemburgia*.

O estudo químico de outras espécies de Ochnaceae também tem conduzido o isolamento e identificação de flavonóides e bisflavonóides dentre outras classes de metabólitos especiais. A Tabela 1 mostra algumas substâncias isoladas das espécies de Ochnaceae já estudadas por outros grupos de pesquisas.

Tabela 1 - Ocorrência de constituintes químicos isolados de espécies da família Ochnaceae

Espécies	Classe das substâncias e substâncias	Referências
<i>Brackenridgea zanguebarica</i>	didrochalcona	DREWES & HUDSON, 1983
<i>Brackenridgea zanguebarica</i>	bisflavanona	DREWES <i>et al.</i> , 1984
<i>Lophira alata</i>	bischalcona	TIH <i>et al.</i> , 1988
<i>Lophira alata</i>	tetraflavonóide	TIH <i>et al.</i> , 1992
<i>Lophira alata</i>	lophirona	TIH <i>et al.</i> , 1992
<i>Lophira alata</i>	cianoglicosídeos	MURAKAMI <i>et al.</i> , 1993
<i>Lophira alata</i>	luteolina	TIH <i>et al.</i> , 2003
<i>Lophira lanceolata</i>	bisflavonóide	GHOOGOMU <i>et al.</i> , 1987
<i>Lophira lanceolata</i>	isombamichalcona, tetraflavonóide	TIH GHOOGOMU <i>et al.</i> , 1989
<i>Lophira lanceolata</i>	bischalcona	TIH GHOOGOMU <i>et al.</i> , 1990
<i>Ochna afzelii</i>	bischalcona	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2001
<i>Ochna beddomei</i>	bisflavanona	JAYAPRAKASAM <i>et al.</i> , 2000
<i>Ochna calodendron</i>	bisflavonóides	MESSANGA <i>et al.</i> , 1994
<i>Ochna calodendron</i>	triflavonóides	MESSANGA <i>et al.</i> , 2002
<i>Ochna integerrima</i>	Bisflavonóides	LIKHITWITAYAWUID <i>et al.</i> , 2001
<i>Ochna obtusata</i>	bisflavonóides	RAO <i>et al.</i> , 1997
<i>Ochna pulchra</i>	vismionas	SIBANDA <i>et al.</i> , 1993
<i>Ochna pumila</i>	bisflavona	KAMIL <i>et al.</i> , 1987
<i>Ochna squarrosa</i>	isoflavona	RAO & GUNASEKAR, 1989
<i>Ouratea flava</i>	bischalcona	MBING <i>et al.</i> , 2003
<i>Ouratea flava</i>	flavumona A	MBING <i>et al.</i> , 2003
<i>Ouratea floribunda</i>	friedelina, friedelanol e lupeol, depsídeo (atranorina)	CARVALHO <i>et al.</i> , 2000
<i>Ouratea multiflora</i>	bisflavonóide	FELÍCIO <i>et al.</i> , 2001
<i>Ouratea reticulata</i>	aquilegiolida	MANGA <i>et al.</i> , 2001
<i>Ouratea spectabilis</i>	bisflavonóide	FELÍCIO <i>et al.</i> , 1995

O estudo químico de espécies contendo flavonóides e bisflavonóides tem sido realizado através das técnicas tradicionais, mas a cromatografia líquida de alta eficiência

está sendo uma nova opção na detecção e isolamento destes metabólitos. Isto se deve à sensibilidade e versatilidade da técnica e da estabilidade destas substâncias (BANKOVA, V.S. *et al.*, 1982) durante a análise, utilizando fase reversa, sem que haja a necessidade de derivatização.

Alguns trabalhos tem sido relatados na literatura relacionados com os flavonóides e bisflavonóides utilizando CLAE e estes descrevem uma separação satisfatória com os sistemas de solvente metanol-água e acetonitrila-água, com adição de ácido acético e/ou ácido fórmico como modificador de fase (KRAUZE-BARANOWASKA, *et al.*, 2004). Outros sistemas de eluição também são relatados, como separação por eluição isocrática em coluna C8 (octil) e como fase móvel álcool isopropílico e éteres cíclicos. A viabilidade destes sistemas foi demonstrada por diferentes extratos de plantas medicinais como: *Ginkgo biloba* L., *Anthemis nobilis* L., *Equisetum arvense* L, onde foram identificados os flavonóides rutina, isoquercetrina, quercetrinaluteolina-7-O-glicosídeo e os bisflavonóides bilobetina, ginkgetina, isoginkgetina entre outros (PIETTA, *et al.* 1988 e 1991) e de *Passiflora incarnata* L., *Crataegus monogyna*, *Helichrysum italicum*, onde foram identificados os flavonóides vitexina, isovitexina, hiperosido e naringenina-4'-O-glicosídeo, canferol-3-O-glicosídeo e 4, 2', 4', 6'- tetraidroxichalcona-2'-O-glicosídeo, respectivamente (PIETTA, *et al.*, 1986, 1991).

Estudos de bisflavonóides por CLAE descritos em alguns trabalhos relacionam esta técnica com a quimiotaxonomia, devido, sobretudo, a bioprodução específica de alguns bisflavonóides em algumas espécies, relativa facilidade de identificação destes, relativa estabilidade e como extensão dessas características, podem ser utilizados na determinação do parentesco filogenético. Como por exemplo, no trabalho descrito por MEURER-GRIMES *et al* (1994), onde foram monitorados bisflavonóides em 32 espécies de *Cycadales*, para avaliação quimiotaxonômica desta família.

Outros trabalhos citam a viabilidade da técnica na análise de extratos, tanto qualitativa quanto quantitativamente, onde se pode utilizar como padrões, bisflavonóides isolados e identificados das espécies em estudos

Como já citado acima, é escassa a bibliografia relativa ao monitoramento de bisflavonóides por CLAE. A quantidade e variedade desses metabólitos variam com o

taxon, daí a possibilidade de utilizar essas substâncias como marcadores químicos da família Ochnaceae o que complementaria o estudo fitoquímico tradicional.

Como efeito, para que uma substância ou uma classe de substância possa ter um papel importante como indicador quimiotaxonômico deve obedecer a determinadas condições:

- Não deve pertencer aos constituintes principais (metabólitos primários);
- Deve acumular-se e por conseqüência intervir de maneira limitada nas reações do metabolismo; e
- Deve ser de fácil detecção.

2 ROTA BIOSSINTETICA

Um dos aspectos fundamentais da fitoquímica é a biossíntese, que sugere os processos pelos quais as substâncias são sintetizadas nos organismos vivos vegetais. Os produtos do metabolismo secundário de uma planta se divide em grupos de substâncias que possuem semelhança entre seus esqueletos básicos; cada um desses grupos tem origem em um precursor próprio, o que caracteriza a biogênese das substâncias.

O conhecimento da composição química e da biogênese da família vegetal em estudo é muito importante no processo de elucidação estrutural das substâncias, pois através deste conhecimento associado aos dados físicos, obtidos de análises espectroscópicas, pode-se propor uma estrutura preliminar que auxilie na caracterização completa dos produtos naturais.

O esqueleto básico dos flavonóides possui dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (C6-C3-C6) resultantes de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico. A via do ácido chiquímico origina a fenilalanina, precursor do ácido cinâmico, sendo este responsável pelo anel aromático **B** e a ponte de três carbonos. A via do acetato resulta no outro anel aromático, anel **A** do esqueleto básico dos flavonóides (Figura 8).

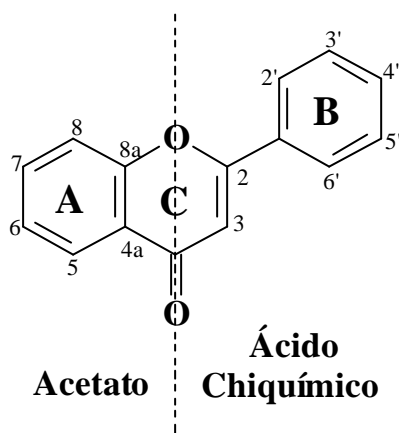


Figura 8 - Esqueleto básico dos flavonóides

O primeiro flavonóide formado na biossíntese é a chalcona e todas as outras formas são derivadas desta através de várias outras rotas. A chalcona é formada pela condensação de 4-*OH*-cumaril CoA com três moléculas de malonil CoA, através da ação da chalcona sintase, enzima limítrofe da síntese de flavonóides, pois catalisa a formação do esqueleto C₁₅ e, deste modo, a entrada de hidroxicinamatos dentro da biossíntese. A ciclização da chalcona durante a síntese da flavanona é catalisada pela chalcona isomerase encontrada fortemente complexada com a chalcona sintase. A flavanona é precursora de três diferentes classes de flavonóides, isto é; flavonas, isoflavonas e diidroflavonóis. Na formação das flavonas e flavonóis ocorre a introdução de uma ligação dupla entre C₂ e C₃. Dois passos são necessários para esta conversão onde são descritas duas flavona sintase: flavona sintase I (dioxigenase) e flavona sintase II (monoxigenase). A monooxigenase dependente da citocromo P-450 que também catalisa a epoxidação para a formação das isoflavonas. Os diidroflavonóis são formados pela ação de uma flavanona-3-hidroxilase (DEY & HARBONE, 1997; HELDT, 1997). A Figura 9 indica as reações enzimáticas envolvidas na produção de algumas classes de flavonóides.

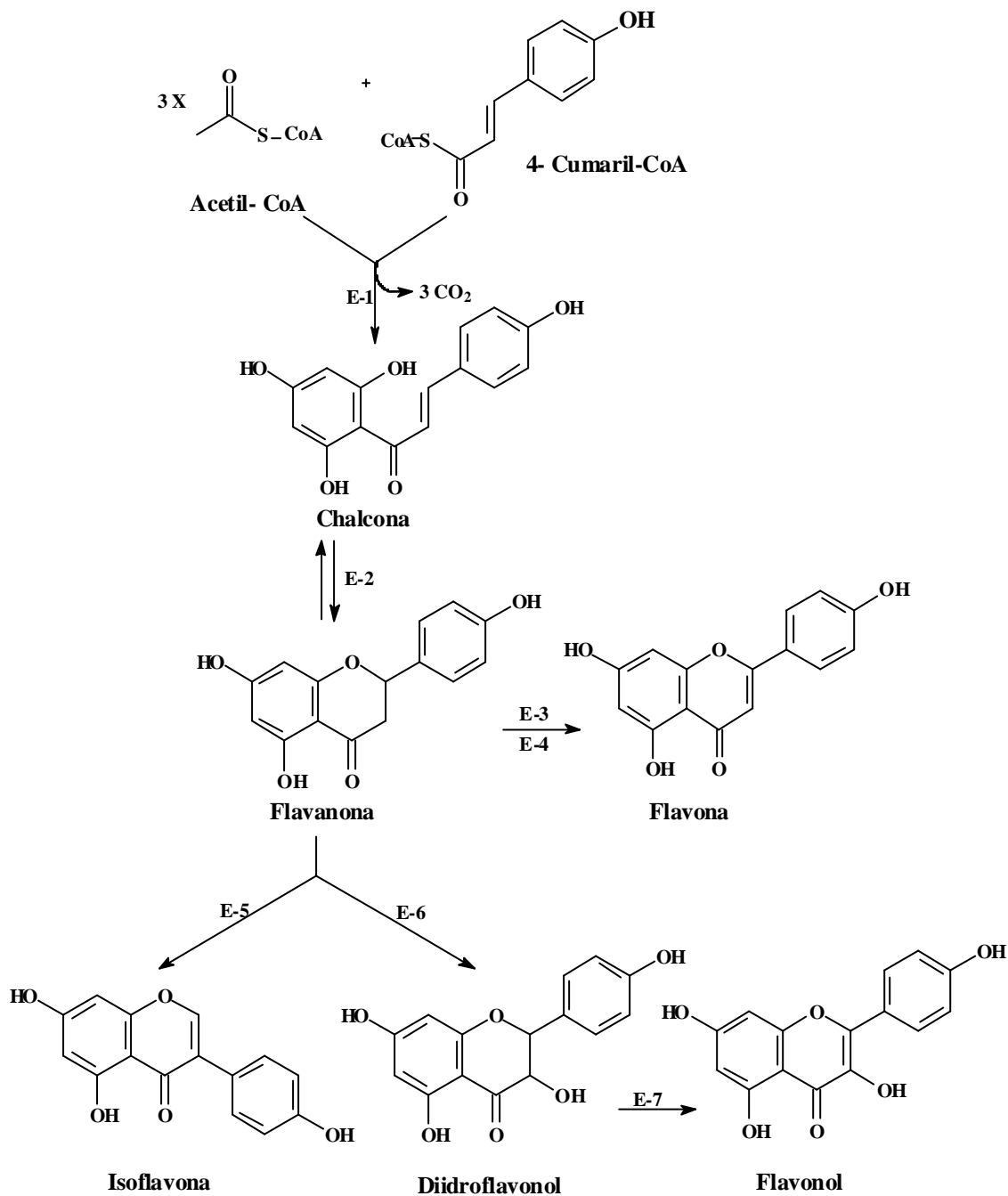


Figura 9 - Biossíntese dos flavonóides (E-1: Chalcona sintase, E2: Chalcona isomerase, E3: Flavona sintase I (2-hidroxiflavanona sintase), E-4: Flavona sintase II (2-hidroxiflanona sintase), E-5: Isoflavona sintase (2-hidroxiisoflavona sintase), E-6: Flavanona-3-hidroxilase e E-7: Flavonol sintase) (DEY & HARBONE, 1997)

Outras modificações podem ocorrer em vários estágios, resultando em hidroxilação adicional (ou redução); metilação de grupos hidroxila ou do núcleo flavônico; isoprenilação de grupos hidroxila ou do núcleo flavônico; metilação de grupos diidroxilícos em posição orto; dimerização (para produzir bisflavonóides); formação de bissulfatos; e também, glicosilação de grupos hidroxila (para formar os flavonóides *O*-glucosídicos) ou do núcleo flavônico (para formar flavonóides *C*-glucosídicos) (MARCANO *et al.*, 1991; DEWICK, 1998).

O padrão de oxigenação original do anel **A** (5, 7-diidroxil) é determinado pelo precursor biossintético, enquanto que no anel **B** é variável, sendo esta também determinada pelo precursor biossintético. Isto depende do número de hidroxila presente no ácido. A modificação no padrão de oxigenação pode ocorrer também após a formação da chalcona e/ou flavanona.

Muitos flavonóides possuem grupos *O*-metil, sendo este derivado do cofator enzimático S-adenosil metionina (Figura 10) (MANN, 1987).

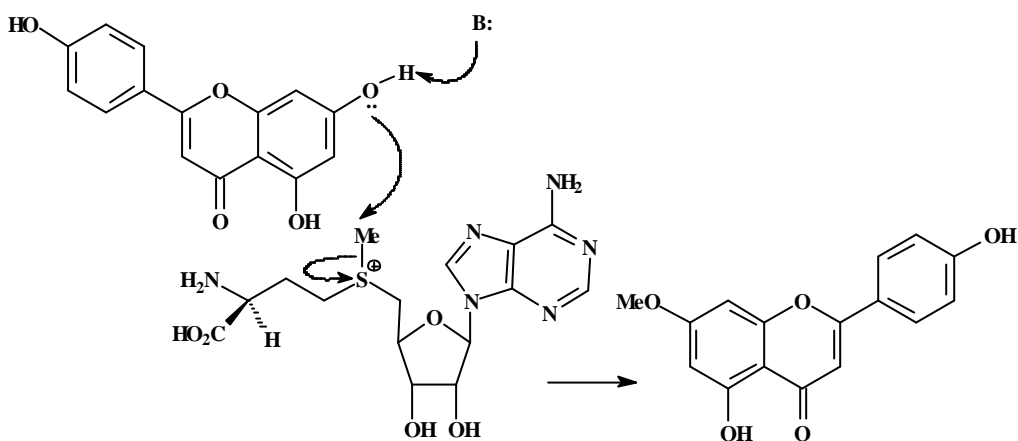


Figura 10 - Metilação pelo cofator S-adenosil metionina (MANN, 1987).

A dimerização resulta na formação dos bisflavonóides, a maioria dos bisflavonóides de ocorrência natural são dímeros de flavonas e flavanonas e raramente chalconas. Os monômeros podem ser iguais ou de diferentes tipos: flavona-flavona, flavanona-flavanona ou flavona-flavanona. Os bisflavonóides apresentam substituintes (hidroxilas e/ou metoxilas) nas posições dos carbonos 5, 7, 4' e, mais raramente na posições 5, 7, 3', 4'.

As Figuras 11, 12, 13 e 14 indicam as reações de dimerização envolvidas na formação dos bisflavonóides utilizados como padrões e dos bisflavonóides isolados neste trabalho por CLAE semipreparativo.

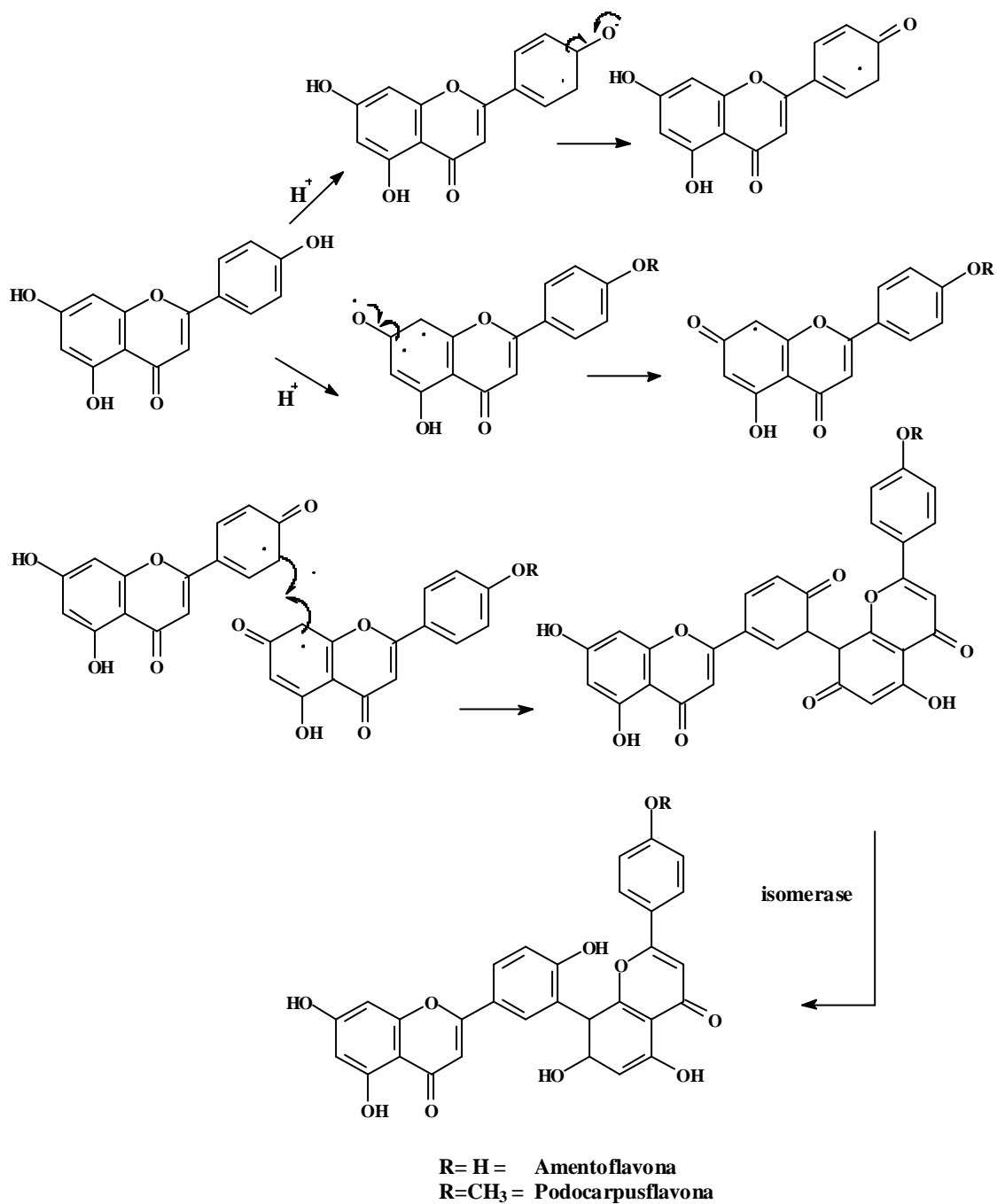


Figura 11 – Proposta biossintética de dimerização na formação da amentoflavona e podocarpusflavona.

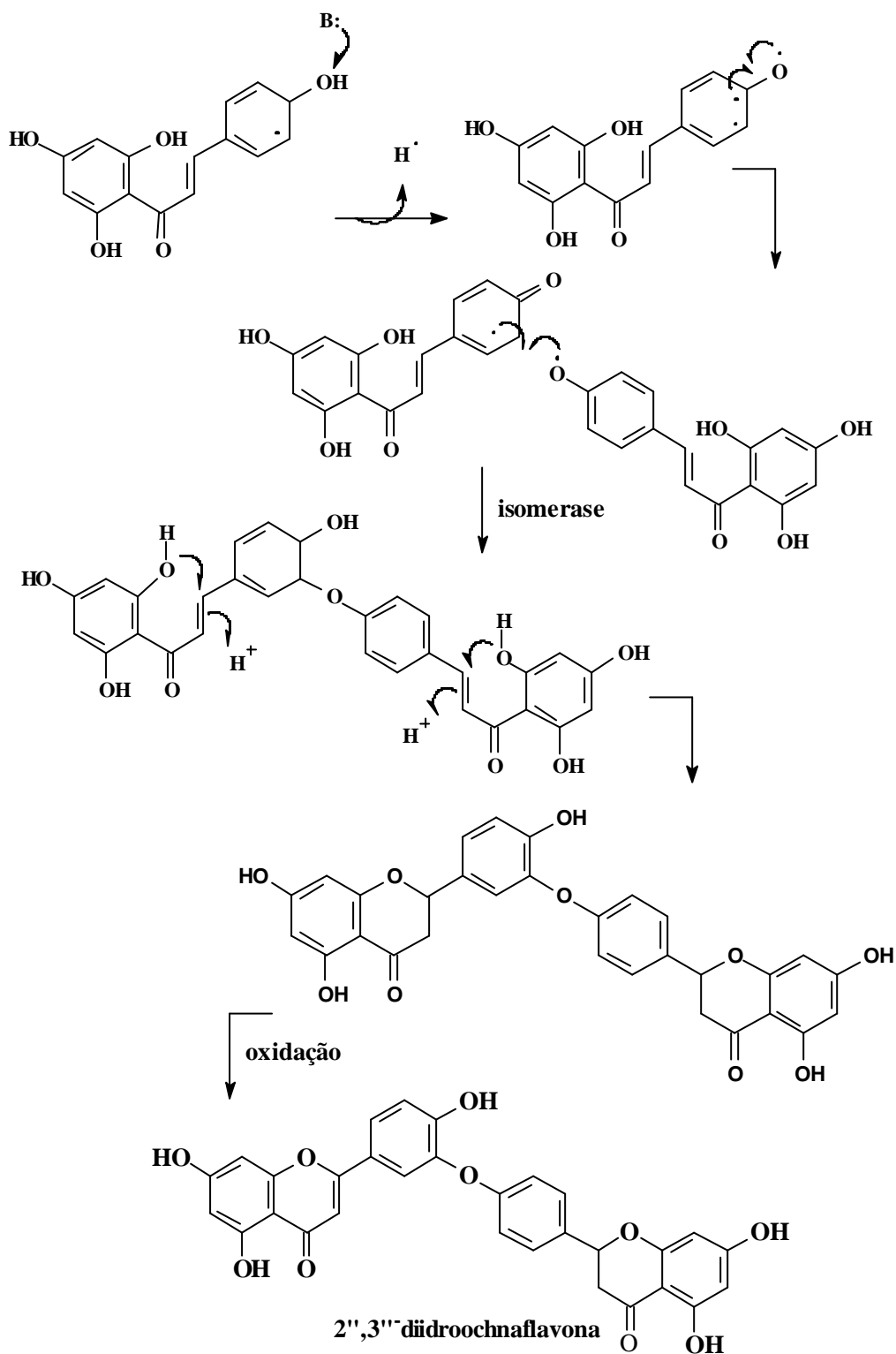


Figura 12 – Proposta biossintética de dimerização na formação da 2'',3''-diidrochalcona.

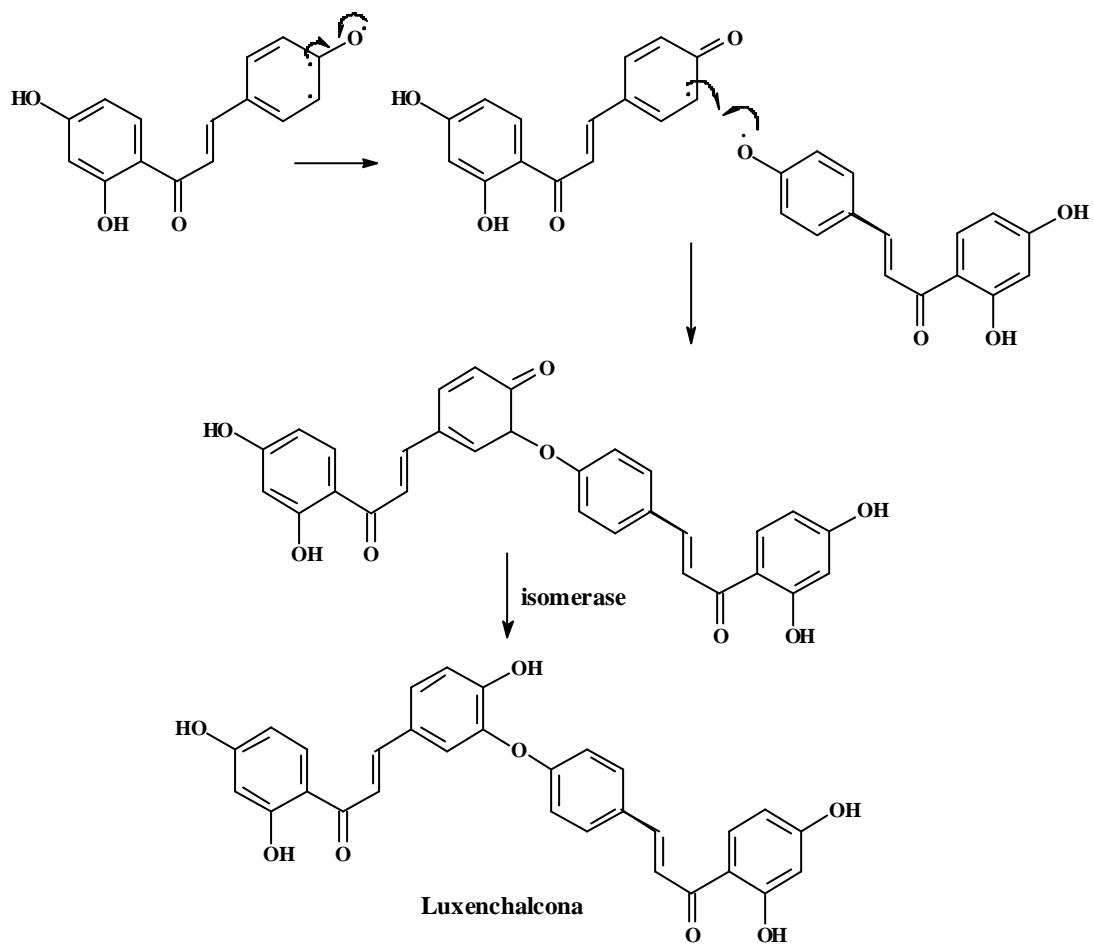


Figura 13 – Proposta biossintética de dimerização na formação da luxenchalcona.

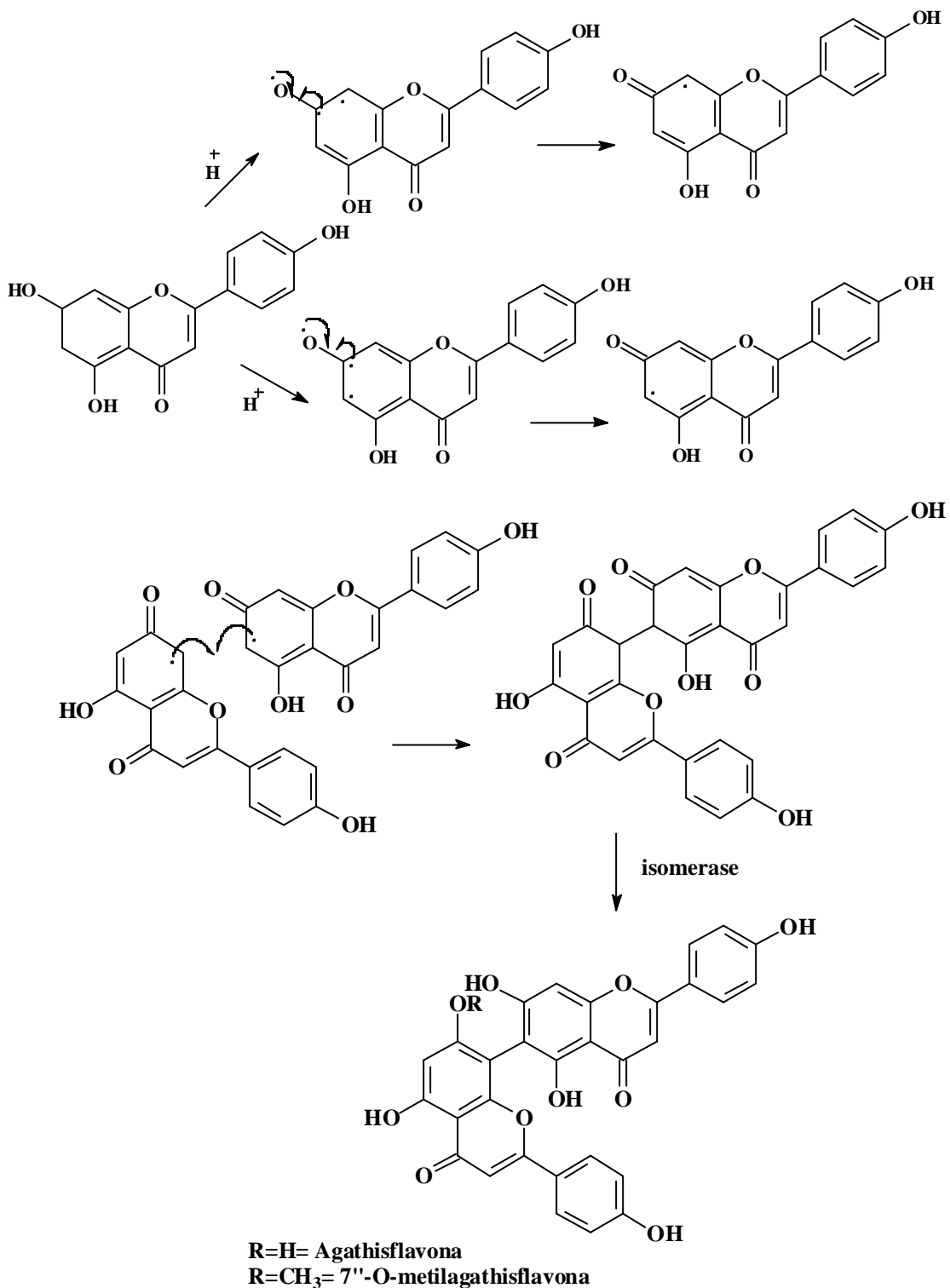


Figura 14 - Proposta biossintética de dimerização na formação da agathisflavona e 7''-O-agathisflavona.

3 OBJETIVOS

Propor uma análise sistemática por CLAE analítica dos extratos das folhas inteiras e trituradas de *Luxemburgia nobilis* com intuito de verificara presença de bisflavonóides na parte interna ou na superfície das folhas.

Avaliar por CLAE-DAD a presença de bisflavonóides isolados anteriormente de *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata*.

Isolar outros bisflavonóides por CLAE semipreparativa destas espécies.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material e Métodos

Os solventes, graus P.A. e espectroscópicos, foram obtidos comercialmente da Vetec e Tedia. A água utilizada na cromatografia líquida foi Milli-Q da Millipore. O ácido acético glacial, grau espectroscópico, foi obtido da Merck e utilizado como modificador de pH da fase aquosa nas análises por CLAE.

As cromatografias em colunas abertas foram realizadas sobre gel de sílica 60 (partículas 230-400 mesh, Vetec) como adsorvente, e utilizou-se os solventes puros e de forma isocrática hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol grau P.A.

A eliminação dos solventes dos extratos e das frações foi feita sob pressão reduzida em evaporadores rotatórios FISATON.

A cromatografia em camada fina (CCF) foi feita em placas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck), e como fase móvel Clorofórmio/acetona/ ácido acético 80:19:1. As substâncias foram visualizadas através da irradiação com lâmpada ultravioleta (254 nm e 365 nm) e/ou pulverizadas com solução 1% de AlCl₃ em etanol como revelador químico, que indica a presença de flavonóides com cor amarelo fluorescente a 365 nm.

Os espectros de ressonância magnética nuclear RMN ¹H e NOE foram executados em espectrômetro Bruker AC-200 (¹H: 200 MHz) e JEOL JNM-GX-400 (¹H: 400 MHz). Os solventes utilizados foram todos deuterados (CDCl₃, DMSO-*D*₆), com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm.

4.2 Derivatização com diazometano

A preparação de derivados metilados nos auxiliou na determinação estrutural das substâncias isoladas, além de aumentar a solubilidade em clorofórmio deuterado. A solução de diazometano foi preparada de acordo com experimental descrito na literatura

(FURNISS, 1994). Adicionou-se às substâncias dissolvidas em metanol uma solução etérea de diazometano em excesso. O solvente foi evaporado fornecendo as substâncias metiladas.

4.3 Material vegetal

As folhas de *Luxemburgia nobilis* foram coletadas no Morro de São Sebastião, Ouro Preto, Minas Gerais no ano de 2002, pelo técnico do herbário Jorge Luís da Silva. A identificação foi feita comparada com a exicata (#6737) preservada no Herbário José Badini, do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

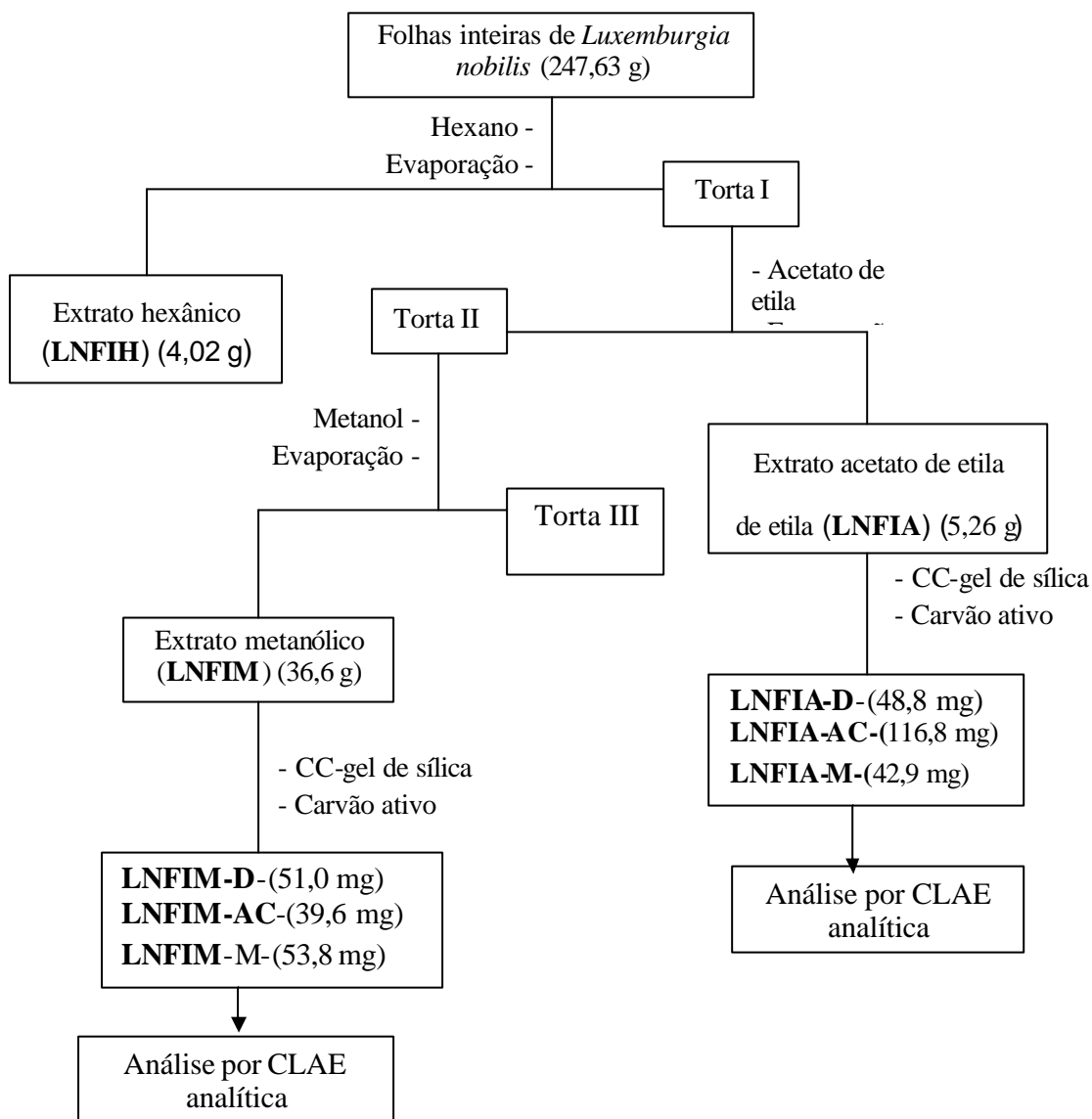
Foram utilizados extratos de folhas de outros dois espécimes de *Ouratea semiserrata*, utilizados anteriormente em trabalhos fitoquímicos do grupo (LQPN) da UFRRJ. Os dois espécimes foram coletados em Ouro Preto (MG) pelo técnico do herbário Jorge Luís da Silva. O primeiro foi coletado no ano de 1993 e o segundo em 2002.

4.4 Elaboração dos extratos e fracionamento para análise por CLAE analítica

As folhas secas e inteiras (247,63 g) de *Luxemburgia nobilis* foram percoladas com *n*-hexano (3 litros), acetato de etila (3 litros) e metanol (3 litros) até completa exaustão mostrada pela descoloração da solução extrativa e análise por CCF, os extratos resultantes foram **LNFIIH** (4,02 g) (**L**uxemburgia **n**obilis **F**olha **I**nteira **H**exano), **LNFIA** (5,26 g) (**L**uxemburgia **n**obilis **F**olha **I**nteira **A**cetato) e **LNFIM** (36,6 g) (**L**uxemburgia **n**obilis **F**olha **I**nteira **M**etanol), respectivamente. Os extratos foram filtrados a vácuo, e concentrados até a secura em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, fornecendo as quantidades indicadas acima.

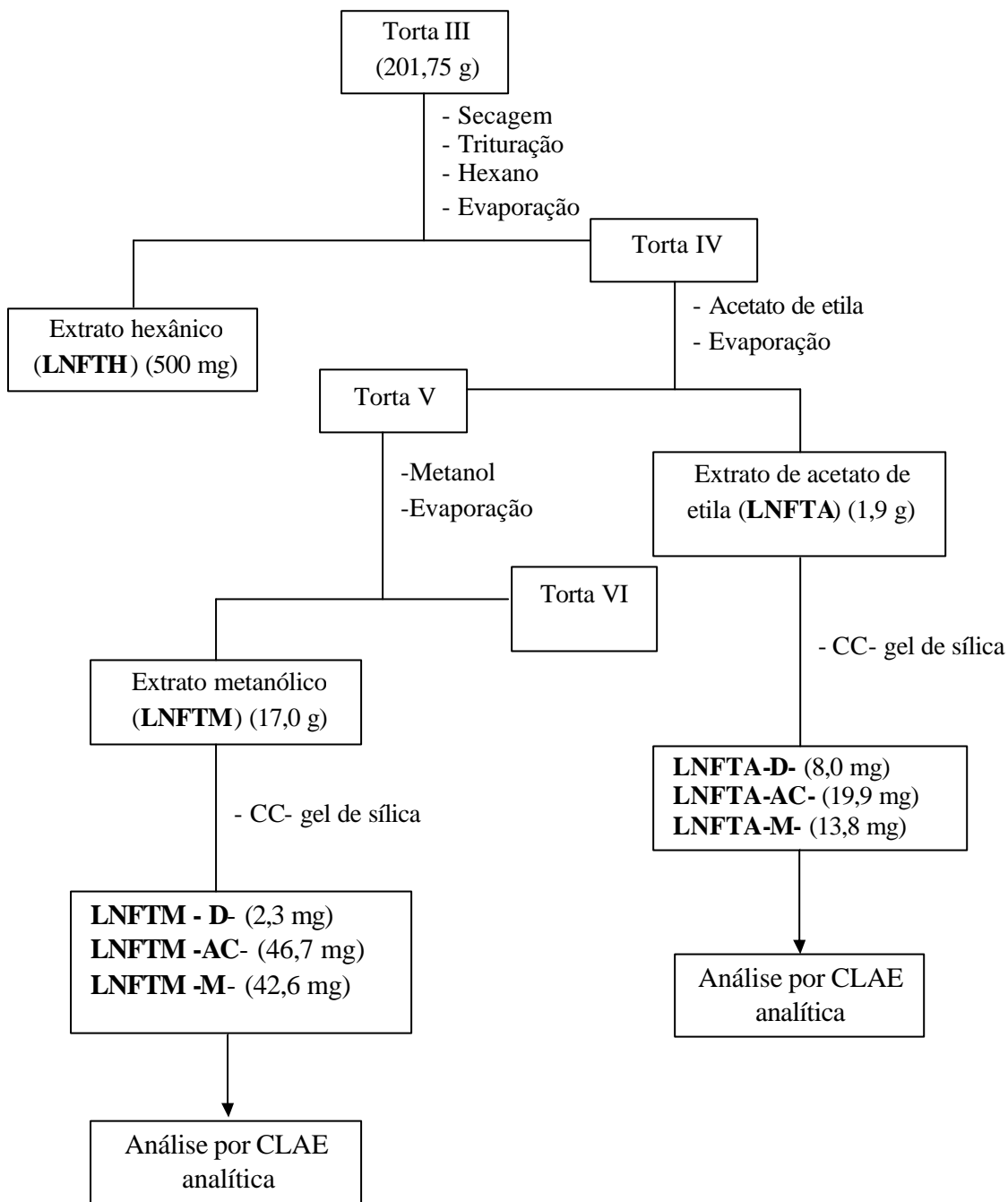
O extrato obtido com hexano (**LNFIIH**) foi desprezado devido ao material mais apolar. Os extratos de acetato de etila (**LNFIA**) e metanólico (**LNFIM**) foram cromatografados em coluna aberta de pressão normal (sílica gel e carvão ativo), a utilização de carvão ativo foi com o intuito de reter a clorofila e outros interferentes, o fracionamento foi realizado com os eluentes diclorometano, acetato de etila e metanol de forma isocrática, resultando em uma fração para cada solvente utilizado, sendo as frações para o extrato de

acetato de etila **LNFIA-D** (48,8 mg), **LNFIA-AC** (116,8 mg) e **LNFIA-M** (42,9 mg) e para o extrato metanólico **LNFIM-D** (51,0 mg), **LNFIM-AC** (39,6 mg) e **LNFIM-M** (53,8 mg). Os solventes foram removidos sob vácuo, resultando nas quantidades relacionadas acima. As frações foram redissolvidas em metanol para análise prévia em CCF e, posteriormente, por CLAE analítico em fase reversa. Estes procedimentos estão de acordo com o Esquema 1.



Esquema 1 - Procedimentos realizados para fracionar os extratos das folhas inteiras de *Luxemburgia nobilis*

O resíduo da extração das folhas inteiras de *L. nobilis* (torta III) foi seco e moído em moinhos de facas e submetido a uma nova extração com *n*-hexano (3 litros), acetato de etila (3 litros) e metanol (3 litros), resultando nos extratos **LNFTH** (*Luxemburgia nobilis* Folha Triturada Hexano) (500 mg), **LNFTA** (*Luxemburgia nobilis* Folha Triturada Acetato) (1,9 g) e **LNFTM** (*Luxemburgia nobilis* Folha Triturada Metanol) (17,0 g). Os extratos de acetato de etila (**LNFTA**) e metanólico (**LNFTM**) foram cromatografados em coluna aberta a pressão normal (gel de sílica e carvão ativo) com os eluentes puros diclorometano, acetato de etila e metanol de forma isocrática. As frações resultantes do extrato de acetato de etila foram **LNFTA-D** (8,0 mg), **LNFTA-AC** (19,9 mg) e **LNFTA-M** (13,8 mg) e para o extrato metanólico **LNFTM-D** (2,3 mg), **LNFTM-AC** (46,7 mg) e **LNFTM-M** (42,6 mg). Os solventes foram removidos sob vácuo resultando nas quantidades relacionadas acima. As frações foram redissolvidas em metanol e analisadas, previamente, por CCF e posteriormente por CLAE analítico (Esquema 2).



Esquema 2 - Procedimentos realizados para fracionar os extratos das folhas trituradas de *Luxenburgia nobilis*

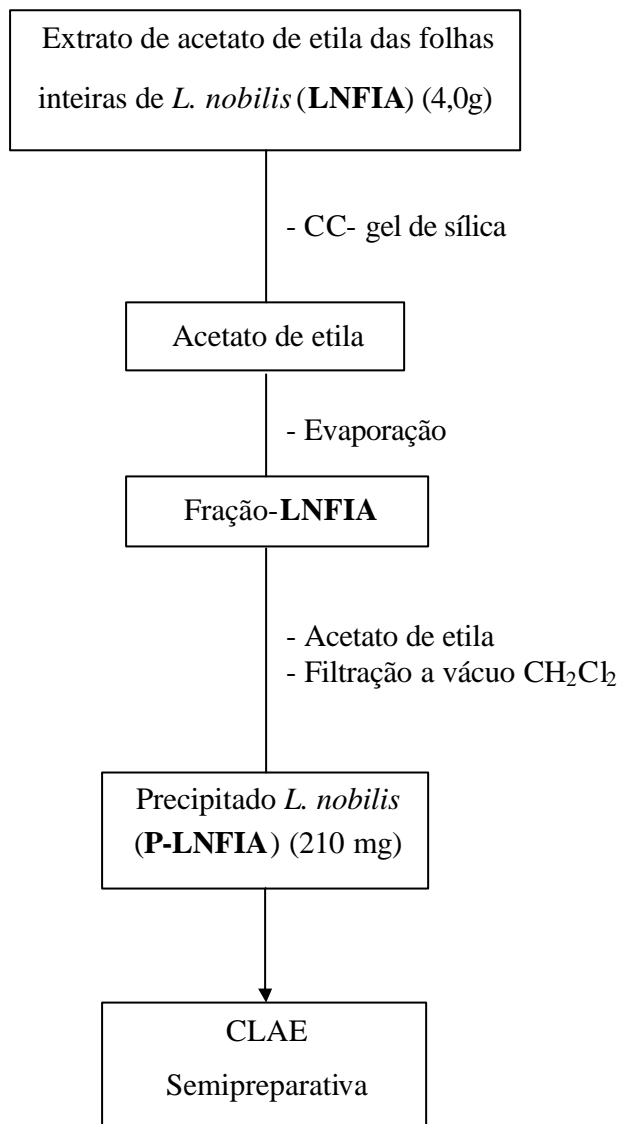
4.5 Purificação dos Extratos para Fracionamento por CLAE Semipreparativa

A análise por CLAE analítica das frações obtidas dos extratos de *Luxemburgia nobilis* permitiu observar picos cuja absorção no UV sugere a presença de outros bisflavonóides, diferentes dos padrões utilizados, a partir desta observação foram realizados fracionamentos por CLAE semipreparativa do extrato de acetato de etila das folhas inteiras de *Luxemburgia nobilis* (**LNFA**) e extrato metanólico das folhas trituradas de *Ouratea semiserrata*, codificada como *Ouratea semiserrata A*, que nas análises por CLAE analítica, realizada pela doutoranda Juliana Feijó, também indicou a presença de bisflavonóides. O extrato metanólico de um outro espécime de *Ouratea semiserrata*, codificado como *Ouratea semiserrata B*, que foi estudada pelo Dr. Javier Rincon Velandia, também foi submetido ao fracionamento por CLAE semipreparativa a fim de compará-lo com o primeiro.

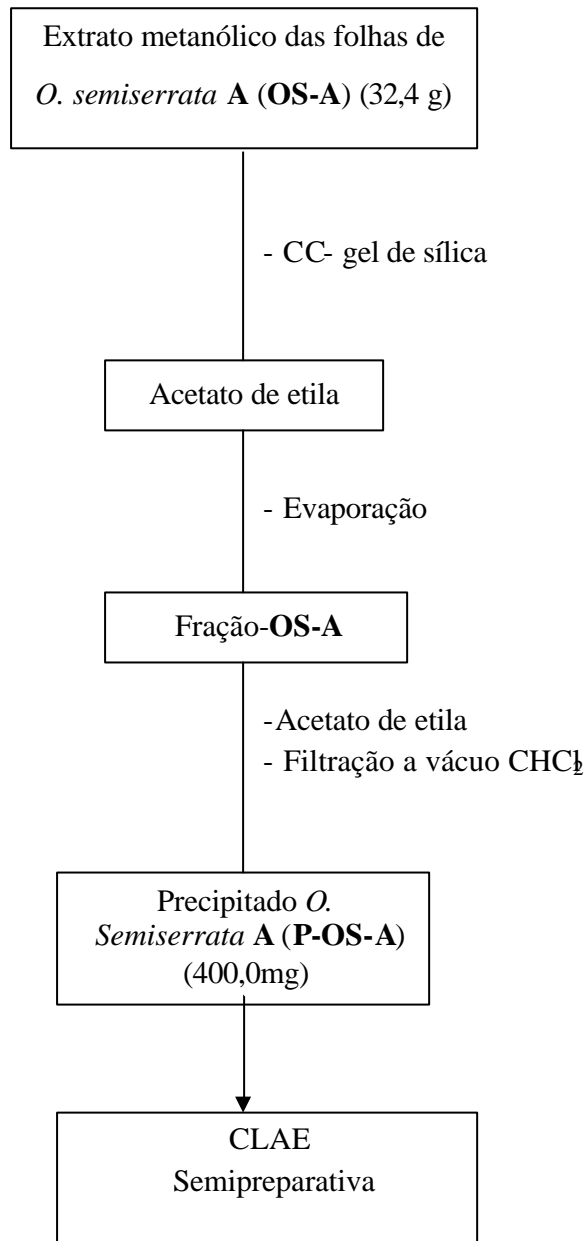
O procedimento desenvolvido para o isolamento dos bisflavonóides dos extratos foi: Os extratos secos de *Luxemburgia nobilis* (4,0g), *Ouratea semiserrata A* (32,4 g) e *Ouratea semiserrata B* (40,0g) foram cromatografados em gel de sílica com o eluente acetato de etila, as frações resultantes foram concentradas até a secura em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. Em seguida foram redissolvidas com acetato de etila e precipitar com diclorometano, a fim de retirar a clorofila e outros interferentes apolares. Os precipitados resultantes foram dissolvidos em metanol e posteriormente concentrados sob vácuo, as frações flavonoídicas resultantes foram solubilizadas em metanol grau espectroscópico, filtradas em membrana de 0,45µm e fracionadas por CLAE semipreparativa.

A fração flavonoídica resultante do extrato de acetato de etila de *L. nobilis* foi codificada como **P-LNFA** (**P**recipitado-**L**uxemburgia **n**obilis **F**olhas **I**nteiras **A**cetato) (210,0 mg), como segue o Esquema 3.

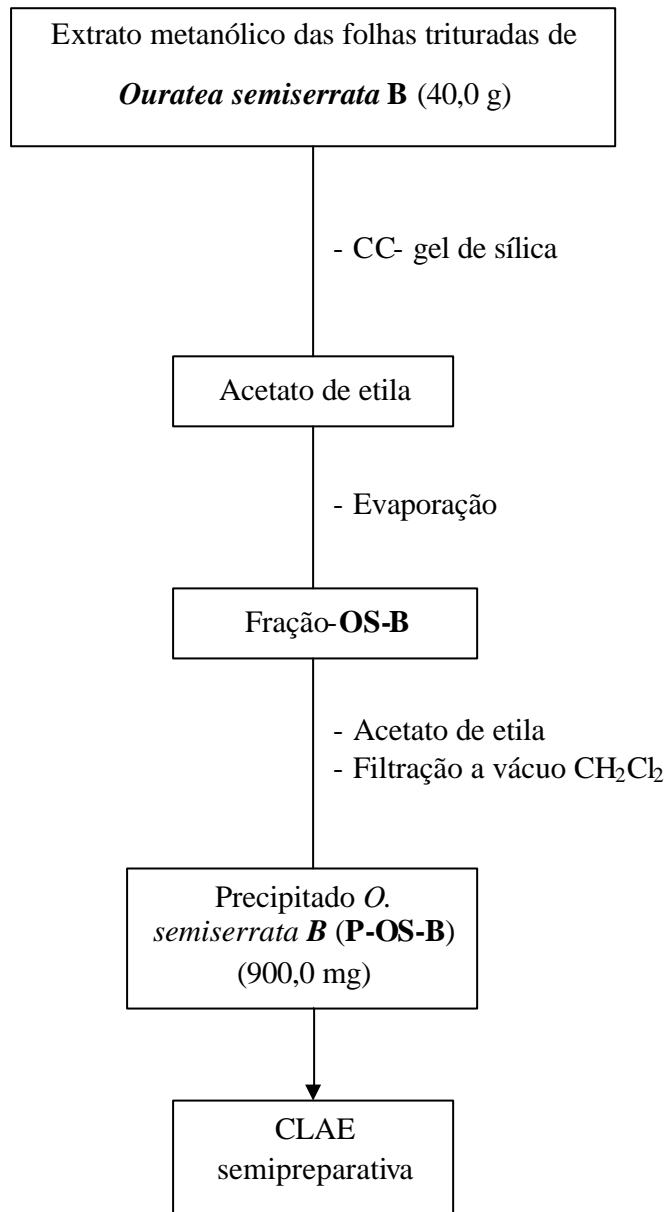
A fração flavonoídica do extrato metanólico de *O. semiserrata A* foi codificada como **P-OS-A** (**P**recipitado-**O**uratea **s**emiserrata **A**) (400,0 mg) e do extrato metanólico de *O. semiserrata B* codificada como **P-OS-B** (**P**recipitado-**O**uratea **s**emiserrata **B**) (900,0 mg). Os procedimentos para o fracionamento por CLAE semipreparativa seguem como descrito nos esquemas 4 e 5.



Esquema 3 - Procedimentos realizados para preparar o extrato de acetato de etila das folhas inteiras de *Luxemburgia nobilis* para ser fracionado por CLAE semipreparativa.



Esquema 4 - Procedimentos realizados para preparar o extrato metanólico das folhas de *Ouratea semiserrata* A, para ser fracionado análise por CLAE semipreparativa.



Esquema 5 - Procedimentos realizados no preparo do extrato metanólico das folhas trituradas de *Ouratea semiserrata* B para ser fracionada por CLAE semipreparativa.

4.6 Padrões utilizados na cromatografia líquida de alta eficiência

Os padrões utilizados nas análises cromatográficas foram isolados e identificados, anteriormente, de outras espécies da família Ochnaceae pelo grupo de pesquisa (LQPN) da UFRuralRJ (Tabela 2) e suas estruturas estão indicadas na Figura 15.

Tabela 2- Padrões utilizados na cromatografia líquida de alta eficiência

Padrões	Espécie	Parte das planta	Referência
Agathisflavona (3)	<i>O. hexasperma</i>	Folhas	MOREIRA <i>et al.</i> , 1999
7''-O-metilagathisflavona (4)	<i>O. hexasperma</i>	Folhas	MOREIRA <i>et al.</i> , 1999
Amentoflavona (8)	<i>O. semiserrata</i>	Folhas	VELANDIA <i>et al.</i> 2002
Podocarpusflavona (9)	<i>O. semiserrata</i>	Folhas	VELANDIA <i>et al.</i> 2002
2'',3''-diidrochnaflavona (13)	<i>L. nobilis</i>	Folhas	CARVALHO <i>et al.</i> , 2000
Luxenchalcona (14)	<i>L. octandra</i>	Galhos, Flores e Folhas	CARVALHO <i>et al.</i> , 2003

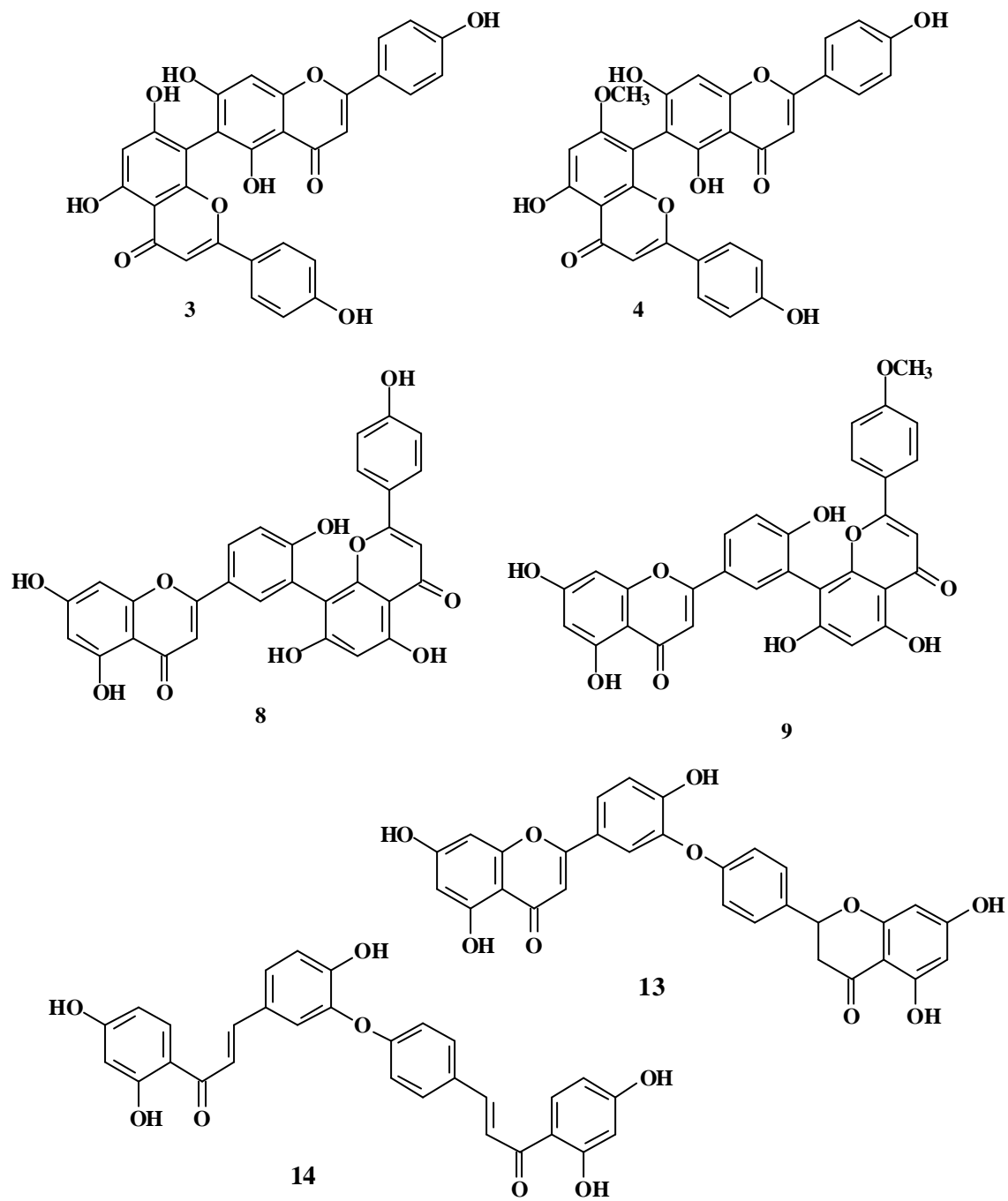


Figura 15 - Padrões utilizados nas análises cromatográficas.

Os padrões citados anteriormente foram utilizados nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência UV-Vis e posteriormente por CLAE acoplada ao detector de arranjo fotodiodo, sendo que a última permitiu a comparação dos seus tempos de retenção e absorção no ultravioleta, em relação aos bisflavonóides monitorados das folhas de *Luxemburgia nobilis* e das substâncias isoladas das frações **P-LNFIA**, **OS-A** e **OS-B** através da CLAE semipreparativa. As análises cromatográficas dos padrões e frações citadas acima foram realizadas em duas fases, sendo a fase água-acetonitrila-metanol-ácido acético (39:40:20:1), utilizada no estudo do monitoramento de bisflavonóides e a fase móvel água-metanol-ácido acético (74:25:1), utilizada na comparação do perfil cromatográfico das substâncias isoladas por CLAE semipreparativa.

A Tabela 3 indica o comportamento cromatográfico dos padrões em relação as fases utilizadas.

Tabela 3 - Comportamento cromatográfico dos padrões utilizados na CLAE-DAD em relação as fases utilizadas.

Padrões de Bisflavonóides	t_r (minutos)^A	l_{max.} (nm)^A	t_r (minutos)^B	l_{max.} (nm)^B
Agathisflavona (3)	5,48	233, 271 e 333	3,60	233, 271 e 333
Amentoflavona (8)	7,61	234, 268, 334	4,56	237, 269 e 336
7''-O-metilagathisflavona (4)	11,07	234, 271 e 334	5,01	234, 271 e 336
Podocarpusflavona (9)	19,67	232, 269 e 333	7,48	234, 271 e 333
2'', 3''-diidroochnaflavona (13)	23,74	234, 270, 290 e 366	6,70	238, 271, 290 e 336
Luxenchalcona (14)	41,91	237 e 369	13,32	237 e 369

Fase móvel água-acetonitrila-metanol-ácido acético (39:40:20:1)^A

Fase móvel metanol-água-ácido acético (74:25:1)^B

4.7 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A metodologia utilizada nesse trabalho para o estudo dos bisflavonóides em Ochnaceae foi adaptado do descrito por MEURER-GRIMES (1994).

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência para os padrões e as frações dos extratos estudados foram realizadas, preliminarmente, em aparelho Shimadzu equipado com uma bomba (modelo LC-6AD), um detector ultravioleta-visível (Modelo SPD-10A) com comprimento de onda variável e software CLASS CR 10.

As amostras e padrões foram injetados através de injetor Rheodyne (modelo 1725) com *loop* de 20 μ L. A separação das substâncias foi realizada em coluna analítica de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m de tamanho de partícula, Betasil), e como fase móvel foi utilizado metanol: água: acetonitrila: ácido acético (39:40:20:1). A eluição foi desenvolvida em sistema isocrático, com velocidade de fluxo de 1 mL.min⁻¹ e monitorada a 254 nm. As amostras e solventes analisados por CLAE foram, previamente, filtradas em membranas de nylon de 0,45 μ m obtidas da Sartorius. Os picos cromatográficos foram identificados inicialmente, por comparação com os tempos de retenção dos bisflavonóides padrões.

Para as análises cromatográficas semipreparativa das frações (**P-LNFIA**, **P-OS-A** e **P-OS-B**), o mesmo aparelho Shimadzu LC-6AD foi utilizado, porém o *loop* utilizado foi de 1 mL. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna semipreparativa de fase reversa C18 (250 mm X 20 mm X 5 μ m de tamanho de partícula, Betasil.), e como fase móvel metanol: água (75:25). A eluição foi desenvolvida com velocidade de fluxo de 5 mL.min⁻¹ e o monitoramento feito a 254 nm.

Posteriormente, as análises cromatográficas das frações e padrões utilizados no monitoramento e das frações isoladas de CLAE semipreparativa juntamente com os padrões foram realizadas num segundo aparelho Shimadzu, Modelo LC-10AD com detector de arranjo de fotodiodo modelo SPD-M 10Avp, módulo de comunicação CBM 10 A, que permitiu a aquisição de espectros de ultravioleta acumulados em varredura de 220 a 400 nm e controlador de temperatura ajustado para 40°C (CTO-10 A). Neste aparelho as condições cromatográficas realizadas para as frações e padrões utilizados no monitoramento foram as mesmas citadas acima, porém para analisar as frações isoladas da

CLAE semipreparativa e compará-las com os padrões, utilizou-se como fase móvel metanol: água: ácido acético (74: 25: 1). O monitoramento dos cromatogramas foi realizado em quatro canais, 254, 270, 300 e 360nm, sendo o comprimento de onda de 254 nm a absorção máxima no UV de melhor resolução para os bisflavonóides. O sistema acoplado a um software (CLASS CR10) possibilitou aquisição do espectro de UV das substâncias analisadas, o que ofereceu uma aproximação ao tipo de substância que se pretende isolar, facilitando ainda a comparação como espectro dos mesmos depois de isolados e caracterizados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Monitoramento dos Bisflavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida é uma das técnicas analíticas instrumentais que mais vem sendo utilizada para separação de misturas orgânicas complexas, neutras ou iônicas. Consiste em uma técnica versátil que possibilita a separação de flavonóides com excelentes resultados.

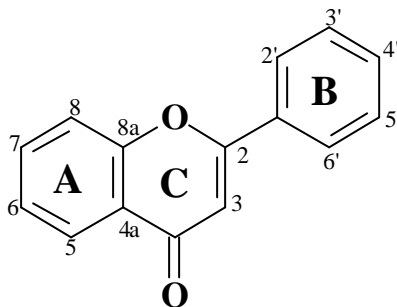
Nesse trabalho a técnica utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodo (CLAE-DAD), utilizando um sistema isocrático com mecanismo de separação por fase reversa (coluna analítica octadesil-C18), resultando em uma rápida e precisa determinação do perfil dos bisflavonóides existentes nos extratos de *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata*.

Para a escolha dos parâmetros cromatográficos (comprimento de onda no UV, dimensões e fase da coluna, escolha da fase móvel, velocidade de fluxo, etc) foram testados, inicialmente, quatro diferentes comprimentos de onda (254 nm, 270 nm, 300 nm e 360 nm), coluna de fase reversa (C18 – octadecil e C8 - octil) e diferentes concentrações de fase móvel. Todas as fases testadas foram realizadas em sistema isocrático, visto a necessidade de posteriormente, se fazer o isolamento de alguns constituintes por CLAE semipreparativa. Aqui, porém estão apresentados apenas os resultados que foram mais adequados para as análises dos extratos em relação aos padrões utilizados.

A técnica de CLAE acoplada ao detector de fotodiodo permitiu monitorar os bisflavonóides, quanto ao seu tempo de retenção e sua absorção no ultravioleta, comparada aos padrões utilizados.

A espectroscopia no ultravioleta associada a CLAE é uma técnica bastante útil para a detecção de flavonóides, durante os processos de monitoramento e/ou isolamento. Os flavonóides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum da benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre

240-285 nm (banda II, devido à absorção do anel **A**, sistema benzoila) e outro entre 300-400 nm (banda I, devido ao anel **B**; sistema cinamoila). A Figura 16 indica a posição dos anéis **A**, **B** e **C** de um flavonóide (SIMÕES *et al.* 2000). A posição precisa e as intensidades relativas destes máximos de absorção dão uma valiosa informação quanto à natureza do flavonóide e ao seu padrão de oxigenação.



Flavonóide

Figura 16 - Indicação dos anéis A, B e C dos flavonóides.

Nas flavonas e flavonóis a banda I aparece entre 304-350 nm, já as flavanonas exibem uma banda I de baixa intensidade, freqüentemente, aparecendo como ombro da banda II. As chalconas apresentam um espectro de UV com a banda I (340-390 nm) dominante e a banda II (220-270 nm), relativamente pequena. O aumento no grau de hidroxilação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico e, conseqüentemente, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda. A metilação ou esterificação dos grupamentos hidroxila não alteram, em geral, os respectivos espectros, exceto na hidroxila característica dos flavonóis, em C-3 ou em C-4', quando se percebe o efeito hipsocrômico na banda de maior comprimento de onda (SIMÕES *et al.*, 2000)

Os bisflavonóides, por sua vez, possuem espectros de absorção no ultravioleta diferentes das classes de flavonóides citados acima, onde a posição das ligações dos monômeros e o padrão de substituição influenciam na conjugação e, conseqüentemente, nos máximos de absorção.

Para a identificação das estruturas recorreu-se ao uso da análise teórica de absorção ultravioleta referida anteriormente e sempre que possível a substância foi submetida a

análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear (RMN) nas suas diversas técnicas.

5.1.1 Comportamento Cromatográfico e Espectros de Ultravioleta dos Padrões

O estudo cromatográfico foi iniciado com a análise do comportamento dos padrões em CLAE, em relação a eluição na coluna C18 e ao seu espectro ultravioleta na fase móvel utilizada, sendo esta água-acetonitrila-metanol-ácido acético (39:40:20:1). Embora o espectro obtido com este solvente não seja substancialmente diferente do que aquele resultante da análise em metanol.

Os padrões foram solubilizados em 5 mL de metanol grau espectroscópico, filtrados em membranas de nylon de 0,45 μ m e, posteriormente, cromatografados separadamente e em mistura para determinar o tempo de retenção. A metodologia utilizada permitiu em uma só análise (50 minutos de tempo de corrida) detectar os seis padrões de bisflavonóides.

O estudo dos espectros de ultravioleta obtidos pelo detector de fotiodo e acumulados em varredura de λ 220-400 nm permitiu que se fizessem algumas considerações relativas à estrutura das substâncias cromatografadas. Esta avaliação permitiu obter espectros dos padrões com elevado grau de pureza, onde todos sinais obtidos puderam ajudar na identificação posterior das substâncias cujas estruturas se pretendia identificar.

Os dados de tempo de retenção e comprimento de onda obtidos para os seis padrões estudados foram reunidos na Tabela 4. Os tempos de retenção descritos foram obtidos com eluição isocrática e fase móvel água-acetonitrila -metanol-ácido acético (39:40:20:1) e todos os padrões analisados possuem tempo de retenção entre 5 a 42 minutos (Figura 17).

Tabela 4 - Tempo de retenção (T_R) e comprimento de onda (λ_{max}) dos padrões bisflavonóides analisados por CLAE com detector de fotodiodo.

Picos	Padrões de Bisflavonóides	t_r (minutos)	λ_{max} (nm)
1	agathisflavona (3)	5,48	233, 271 e 333
2	amentoflavona (8)	7,61	234, 268, 334
3	7''-O-metilagathisflavona (4)	11,07	234, 271 e 334
4	podocarpusflavona (9)	19,67	232, 269 e 333
5	2'', 3''-diidrochnaflavona (13)	23,74	234, 270, 290 e 366
6	luxenchalcona (14)	41,91	237 e 369

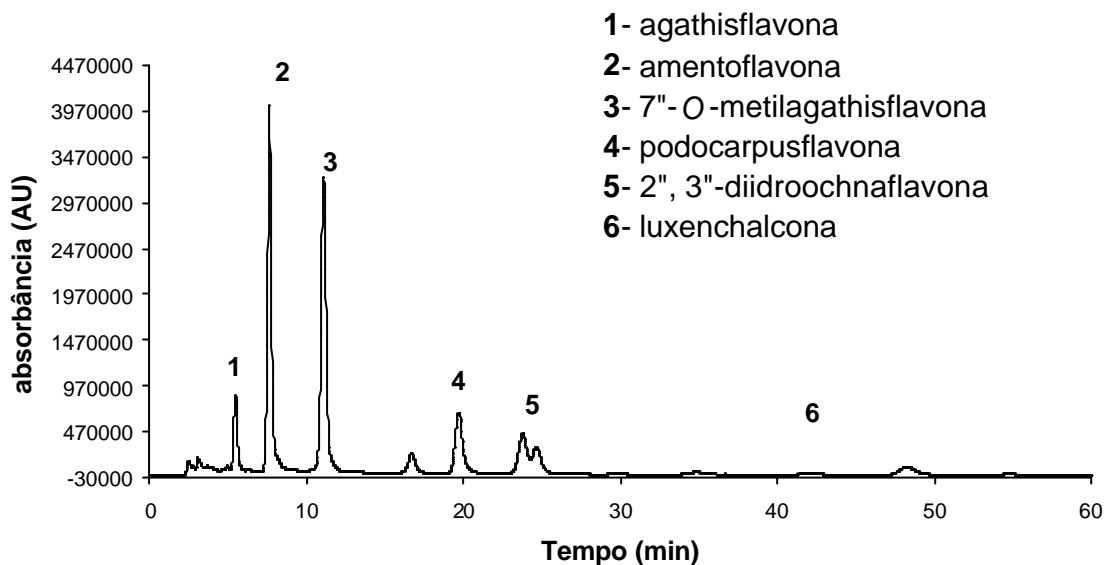


Figura 17 - Separação dos padrões bisflavonóides por CLAE em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m) com água- acetonitrila- metanol- ácido acético (39: 40: 20: 1); fluxo 1 mL min⁻¹; detecção em 254 nm

Uma análise rápida dos espectros ultravioleta obtidos pelo detector de fotiodo acumulados com varredura de λ 220-400 nm indicaram uma semelhança relativa aos máximos de absorção dos padrões agathisflavona (Figura 18), amentoflavona (Figura 19), 7''-*O*-metilagathisflavona (Figura 20) e podocarpusflavona (Figura 21). Os padrões de bisflavonóides referidos são dímeros de flavonas e diferem-se pelas posições das ligações entre os monômeros e pela presença do grupo metoxila. Estes possuem um número de bandas de absorção diferente daqueles observados no espectro de ultravioleta de um flavonóide, que consiste tipicamente de duas bandas de absorção máxima. Nos bisflavonóides a banda que ocorre a λ_{\max} 334 nm (banda I), é devido a absorção dos anéis **B** (sistema cinamoila) das duas unidades flavônicas, os outros dois máximos de absorção que ocorrem entre λ_{\max} 232-234 e λ_{\max} 268-271 (banda II), são devidos as absorções diferenciadas dos anéis **A** (sistema benzoila) das unidades flavônicas. A posição e as intensidades destas bandas apresentam variações devido ao padrão de substituição e oxigenação diferenciados que podem alterar, assim, a conjugação dos sistemas diméricos.

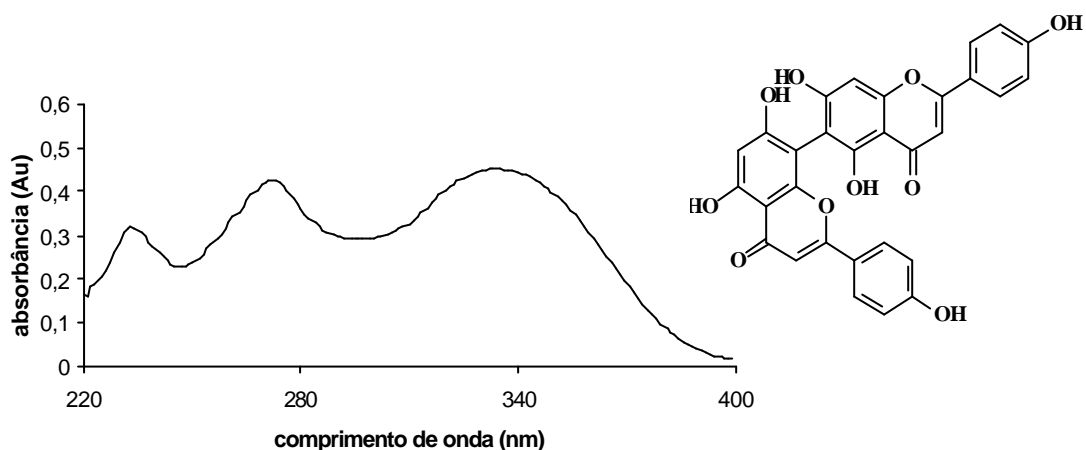


Figura 18 - Espectro de absorção no UV do padrão agathisflavona em água-acetonitrila-metanol-ácido acético (39:40:20:1).

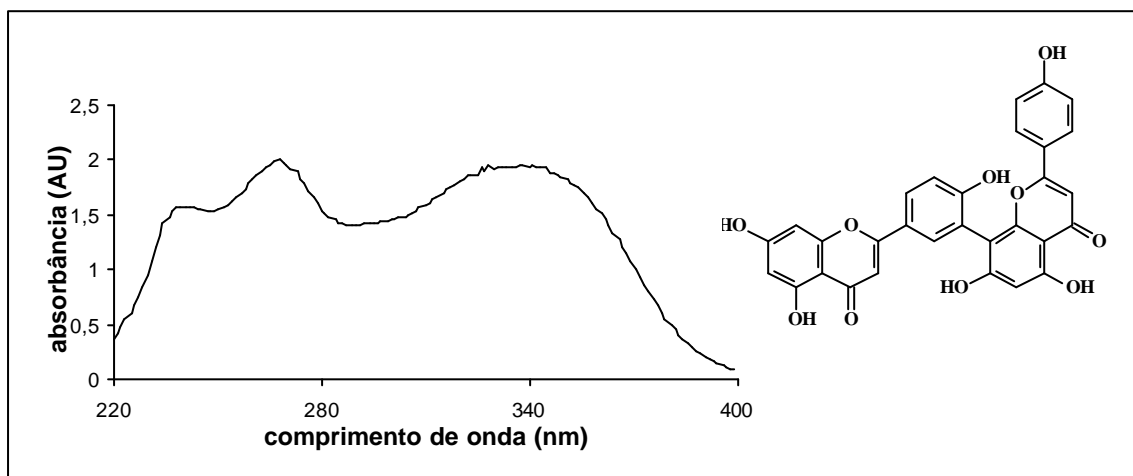


Figura 19 - Espectro de absorção no UV do padrão amentoflavona em água-acetonitrila-etanol-ácido acético (39:40:20:1)

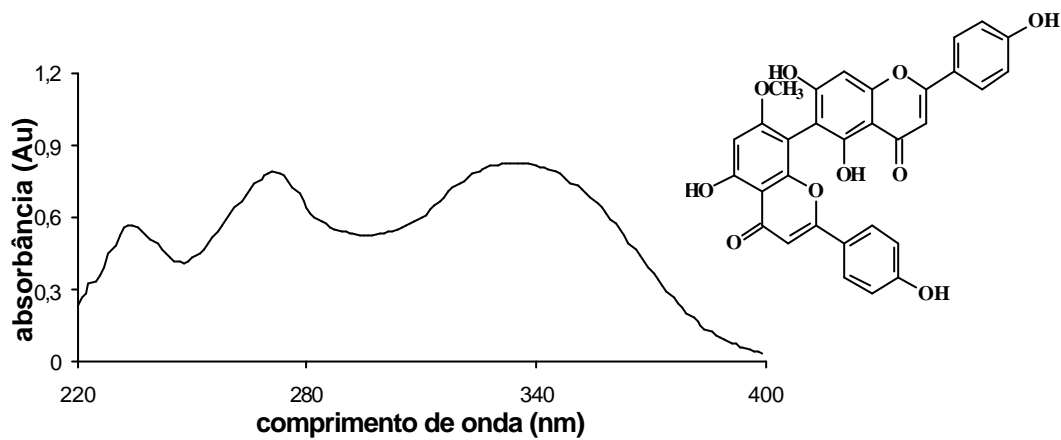


Figura 20 - Espectro de absorção no UV do padrão 7''-O-metilgathisflavona em água-acetonitrila-metanol-ácido acético (39:40:20:1)

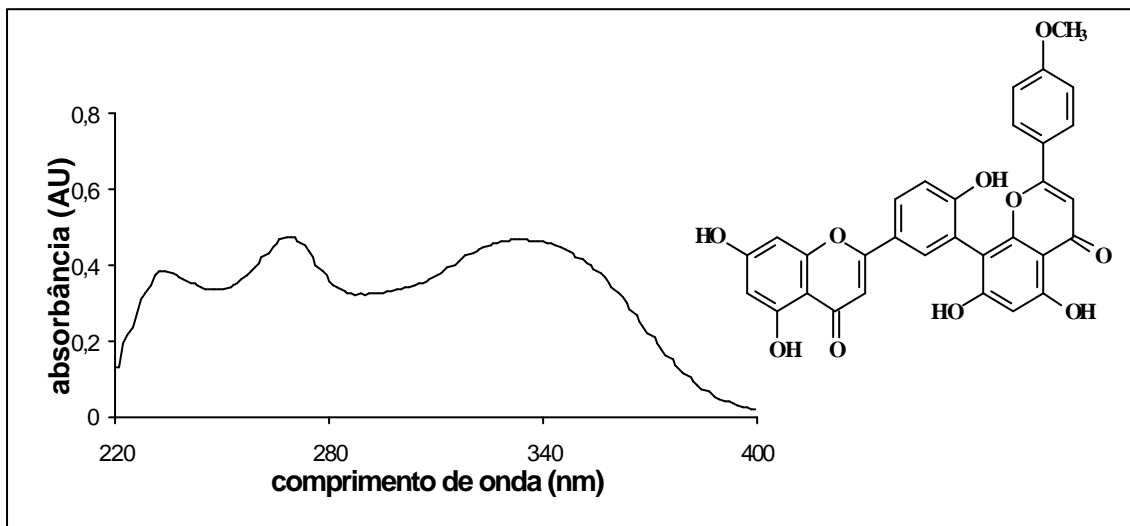


Figura 21 - Espectro de absorção no UV do padrão podocarpusflavona em água-acetonitrila-metanol-ácido acético (39:40:20:1).

O padrão 2", 3"-diidrochnaflavona possui uma estrutura formada pela ligação de dímeros de flavona e flavanona e apresenta quatro máximos de absorção (Figura 22). A banda em $\lambda_{\text{máx}}$ 234 (banda II, correspondente ao anel **A**) e 270 nm (banda I, correspondente ao anel **B**) estão relacionadas a unidade flavanônica, enquanto os máximos de absorção em $\lambda_{\text{máx}}$ 290 (banda II, referente ao anel **A**) e 336 nm (banda I, referente ao anel **B**) estão relacionados à absorção da unidade flavônica. A banda I da unidade flavônica apresenta um deslocamento batocrômico por possuir um sistema mais conjugado e um padrão de substituição diferente da unidade flavanônica.

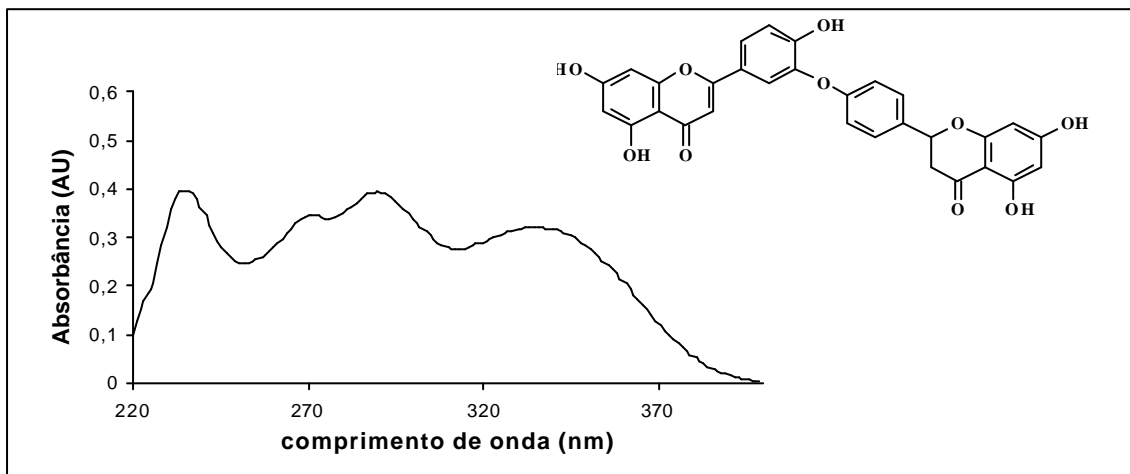


Figura 22 - Espectro de absorção no UV do padrão 2'', 3''-diidrochalcona em água - cetonitrila-metanol-ácido acético (39:40:20:1)

O padrão luxenchalcona possui uma estrutura de dímeros de chalconas, possuindo então um núcleo fundamental 1,3-diarilpropano. Sendo assim, este padrão apresenta dois máximos de absorção no UV, um em λ_{Max} 237 nm que corresponde ao anel **A** (banda II) e outro a λ_{Max} 369 nm correspondente ao anel **B** (banda I; Figura 23).

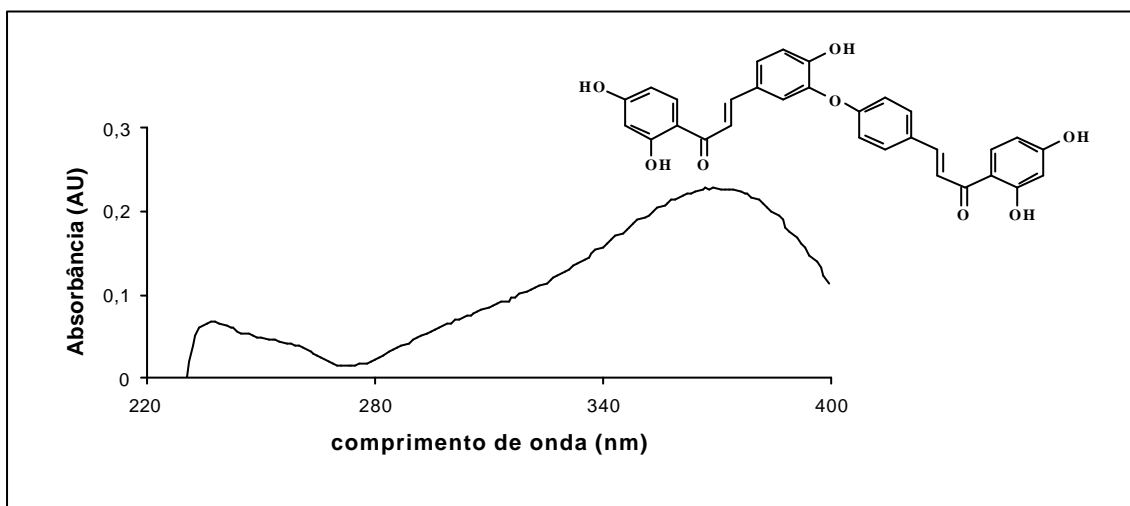


Figura 23 - Espectro de absorção no UV do padrão luxenchalcona em água-acetonitrila metanol-ácido acético (39:40:20:1).

Na técnica de CLAE adotada as substâncias analisadas podem ser estudadas quanto à sua absorção no ultravioleta sem que para isso seja necessário o seu isolamento. Além desse fato, esta metodologia é uma preciosa ferramenta para a avaliação estrutural dos bisflavonóides, complementando outras análises, que permite verificar se durante o processo de isolamento da substância as características da mesma se mantêm, comparando o seu comportamento cromatográfico e de absorção antes e depois do processo completo.

5.2 Perfis Cromatográficos das Frações Obtidas dos Extratos de *Luxemburgia nobilis* por CLAE

Após análise dos perfis cromatográficos dos padrões e de seus respectivos espectros de absorção no ultravioleta, passou-se ao monitoramento dos bisflavonóides nas frações obtidas dos extratos das folhas de *Luxemburgia nobilis*.

As frações dos extratos das folhas inteiras e moídas de *Luxemburgia nobilis* foram previamente analisadas por cromatografia de camada fina (CCF) em gel de sílica F₂₅₄, tendo como fase móvel clorofórmio-acetona (80:20 v/v). As amostras foram comparadas com os padrões através da avaliação do R_f (fator de retenção) e absorção no UV (λ 365 nm). Após eluição e revelação das cromatofolhas de sílica com solução 1% AlCl₃ em etanol, pode-se observar a presença de inúmeras manchas, incluindo algumas que indicavam ser bisflavonóides.

Em seguida foram realizadas as análises por CLAE para as seis amostras obtidas dos extratos das folhas inteiras (**LNFA-D**, **LNFA-AC**, **LNFA-M**, **LNFM-D**, **LNFM-AC** e **LNFM-M**) e para seis amostras obtidas dos extratos das folhas trituradas (**LNFTA-D**, **LNFTA-AC**, **LNFTA-M**, **LNFTM-D**, **LNFTM-AC** e **LNFTM-M**) de *Luxemburgia nobilis*, sendo obtidas segundo Esquema 1 e Esquema 2 (pág. 32 e 34)

As análises dos tempos de retenção e máximos de absorção das frações obtidas para os extratos **LNFA-M**, **LNFM-D**, **LNFM-AC**, **LNFM-M**, **LNFTA-D**, **LNFTA-AC** e **LNFTA-M**, **LNFTM-D**, **LNFTM-AC** e **LNFTM-M** não indicaram a presença de nenhum dos bisflavonóides. Exceto pelos perfis cromatográficos das frações **LNFA-D** (Figura 24) e **LNFA-AC** (Figura 25) que apresentam três picos principais. Nos dois cromatogramas, os picos com tempo de retenção \dagger 23,40 minutos (pico **2** indicado nos cromatogramas), quando comparado com os tempos de retenção e o espectro ultravioleta dos padrões

analisados, permitiu identificar a presença da 2'', 3''diidrochnaflavona (Figura 17, pico 5, pg.48)

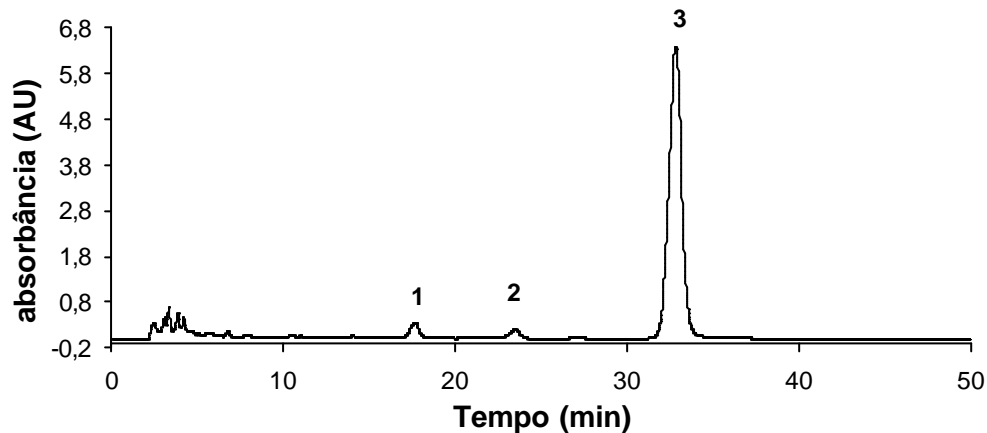


Figura 24 - Cromatograma da fração **LNFIA-D** do extrato de acetato de etila das folhas inteiras de *Luxemburgia nobilis*. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m); água-acetonitrila-metanol-ácido acético (39:40:20:1); fluxo 1 mL.min⁻¹; em 254 nm

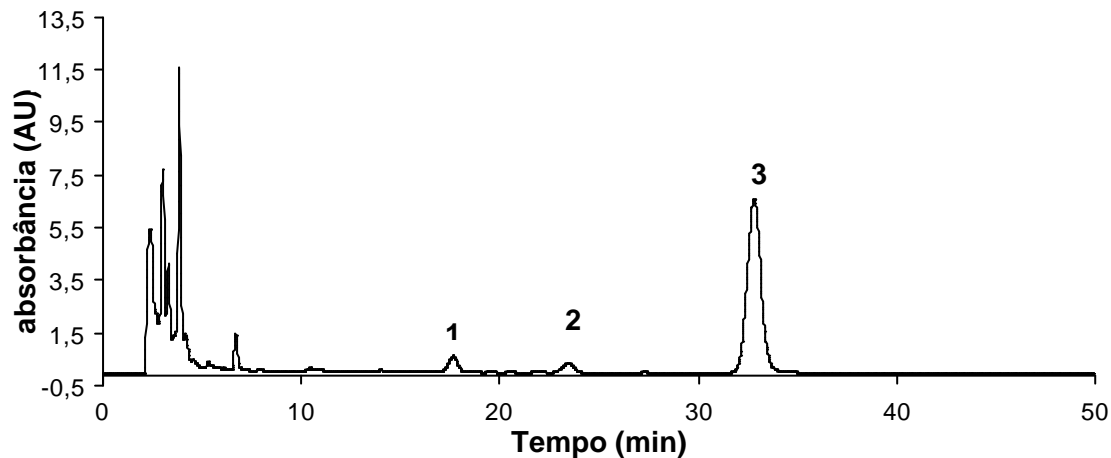


Figura 25 - Cromatograma da fração **LNFIA-AC** do extrato de acetato de etila das folhas inteiras de *Luxemburgia nobilis*. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m), em água-acetonitrila- metanol- ácido acético (39: 40: 20: 1); fluxo 1 mL.min⁻¹; λ = 254 nm.

Apesar da semelhança dos tempos de retenção dos picos **2** (t_r 23,40 minutos) com o padrão 2'', 3''-diidrochnaflavona **13**, os espectros de ultravioleta foram imprescindíveis para a identificação. A sobreposição da curva de UV do padrão com os máximos de absorção em λ_{max} 234, 270, 290 e 336 nm com as amostras, confirmou a presença de 2'', 3''-diidrochnaflavona nessas frações.

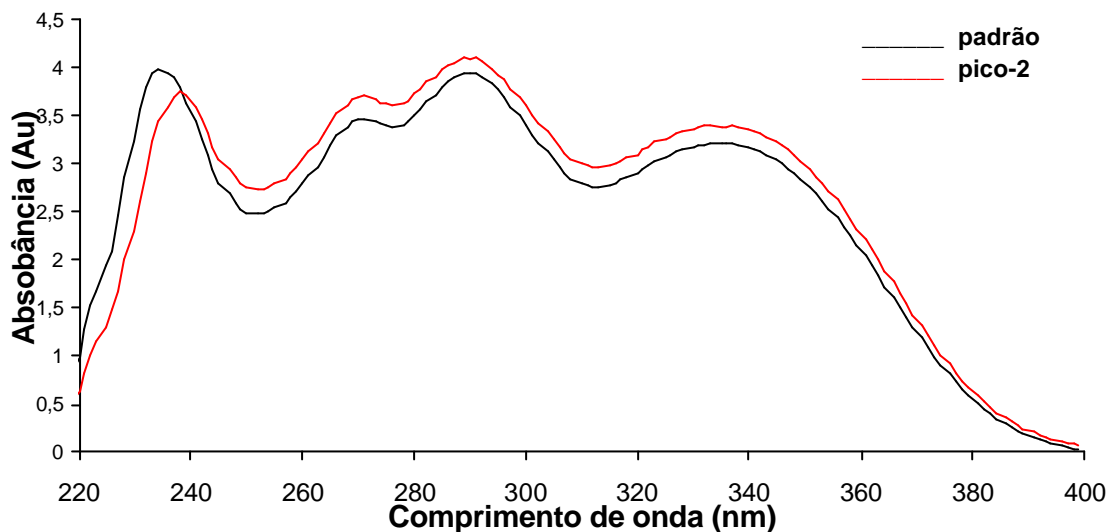


Figura 26 - Comparação dos espectros de absorção no UV do padrão 2'', 3''- diidrochnaflavona e pico 2 (23,4 min) das frações **LNFA-D** e **LNFA-AC**. Realizado em água-acetonitrila-metanol-ácido acético (39:40:20:1).

Nos cromatogramas das amostras **LNFA-D** e **LNFA-AC** foram observados, além do pico identificado como 2'', 3''-diidrochnaflavona (t_r 23,40 minutos), a presença de outros dois picos com os tempos de retenção de 17,6 minutos (pico **1** no cromatograma) e 32,8 minutos (pico **3**, no cromatograma), não compatíveis com nenhum dos tempos de retenção dos padrões analisados. No entanto, analisando os espectros de ultravioleta referentes a esses tempos de retenção, o perfil de absorção com máximos de absorção em λ_{max} 238, 271, 290 e 332 nm (Figura 27), mostrou-se semelhante ao perfil de um esqueleto para bisflavonóide (flavona-flavanona). Estas possíveis substâncias não identificadas anteriormente foram isoladas por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa, para ter sua identificação realizada por métodos espectrométricos (RMN ^1H e ^{13}C) e IV, e que serão posteriormente apresentadas.

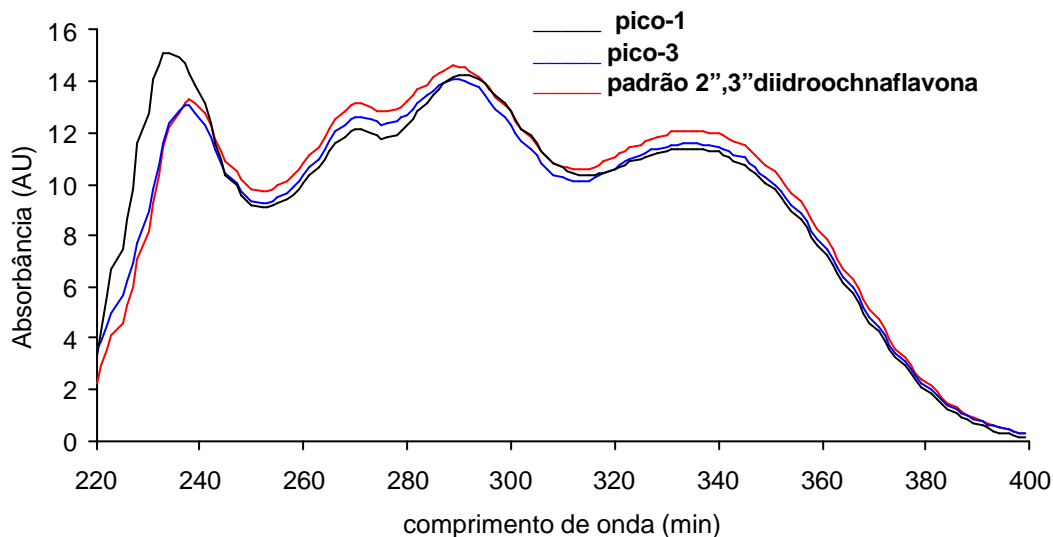


Figura 27 - Espectro de absorção no UV (254 nm) dos picos identificados como: 1 (17,0 min), 2 (23,40 min) e 3 (32,0 min) nas frações **LNFA-D** e **LNFA-AC**. Realizado em água-acetonitrila-metanol-ácido acético (39:40:20:1).

A técnica utilizada no atual trabalho revelou-se mais eficiente e sensível do que as técnicas tradicionais utilizadas na identificação de metabólitos especiais. O estudo do monitoramento de bisflavonóides realizado por CLAE acoplada a um detector de arranjo fotodiodo detectou três bisflavonóides, sendo um identificado através da comparação do tempo de retenção e máximos de absorção com padrões de bisflavonóides como 2'', 3''-diidrochnaflavona, que foi isolado de folhas de *Luxemburgia nobilis* através de técnica tradicional no ano de 2000.

5.3 Isolamento de Bisflavonóides de *Luxemburgia nobilis* por CLAE Semipreparativa

O monitoramento por CLAE analítica das frações **LNFA-D** e **LNFA-AC** obtidas de *Luxemburgia nobilis* permitiu observar picos cujos tempos de retenção e absorções no UV sugeriram a presença de outros bisflavonóides diferentes daqueles padrões utilizados. A partir desta observação foi realizado o fracionamento por CLAE semipreparativa do extrato de acetato de etila das folhas inteiras de *Luxemburgia nobilis* (**LNFA**, 4,0 g). O extrato **LNFA** foi pré-purificado, inicialmente, a fim de eliminar a clorofila e outros interferentes como descrito no Esquema 3 (pg.36), resultando na fração **P-LNFA** (210,0 mg).

A fração **P-LNFA** foi primeiramente analisada por CLAE analítica (Figura 28), para avaliar o seu perfil e definir os parâmetros cromatográficos a serem utilizados na CLAE semipreparativa. Como se desejava isolar pequenas quantidades de amostra com alto grau de pureza, trabalhou-se em condições analíticas fazendo-se o escalonamento necessário para a separação semipreparativa. Nessa etapa, utilizou-se uma coluna preparativa de 25 cm x 20 mm de diâmetro interno com o mesmo material da coluna analítica, ou seja, octadesil (C-18) de 5 µm de tamanho de partícula.. Porém, um novo eluente foi testado no sistema analítico com o objetivo de tornar a análise mais rápida, diminuir o gasto de solvente, além do fato de evitar o uso de ácido acético, que tornaria mais trabalhoso o processo de evaporação do solvente, após o fracionamento por CLAE semipreparativa, e posterior elucidação estrutural. A mistura binária de metanol-água (75:25) mostrou-se eficiente e reproduzível comparada à análise feita anteriormente para as frações **LNFA-D** e **LNFA-AC** (pg. 54 e 55). Optou-se assim, em usar esta fase móvel para o processo de isolamento com CLAE semipreparativa.

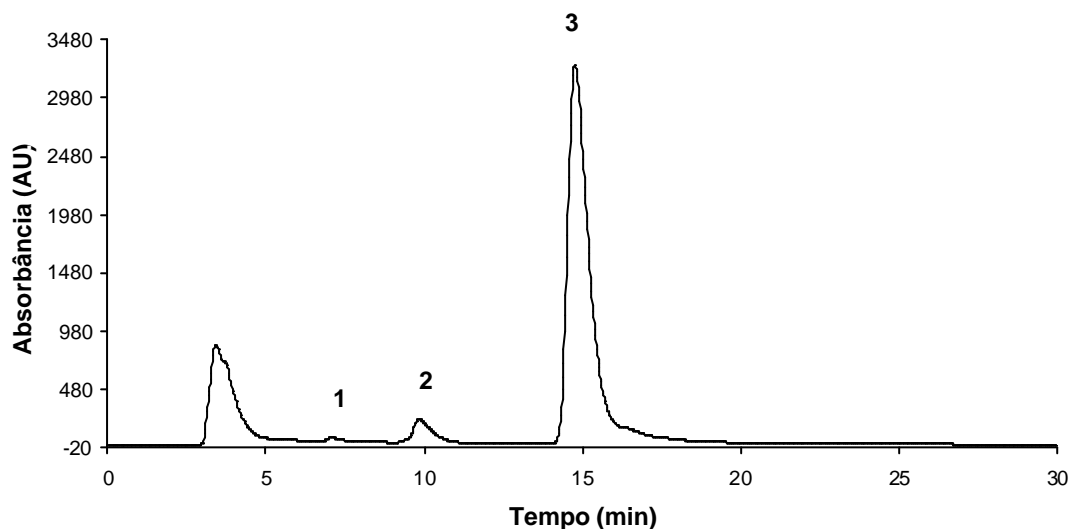
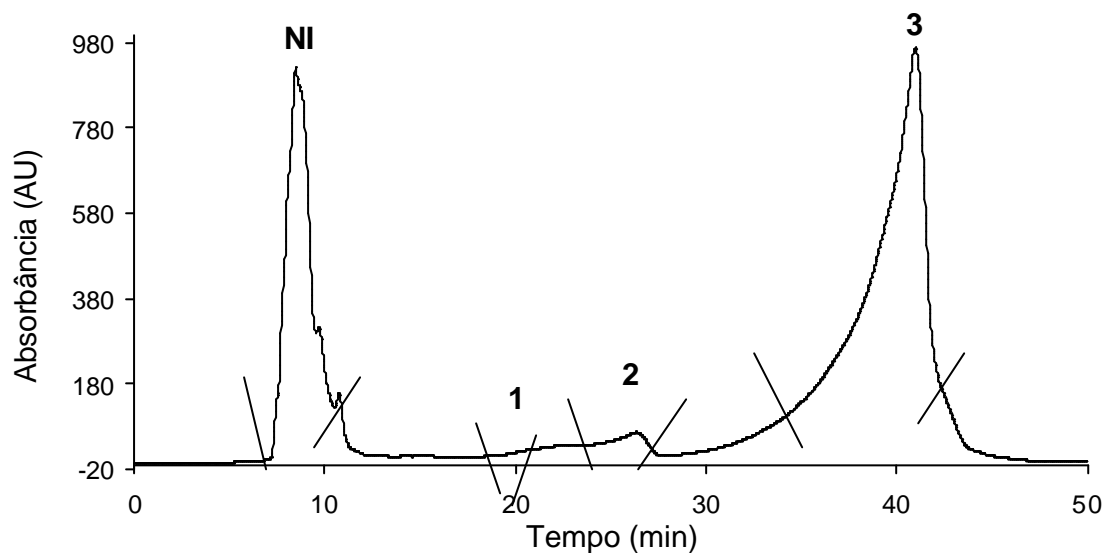


Figura 28 - Perfil cromatográfico da fração **P-LNFIA**; Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μm); metanol-água (75:25); fluxo 1 mL min^{-1} ; em 254 nm.

Após a análise do extrato em coluna analítica, partiu-se inicialmente para separação dos constituintes presentes na amostra, em coluna semipreparativa de fase reversa C18 (250 mm X 20 mm X 5 μm de tamanho de partícula), fase móvel metanol-água (75:25), porém com velocidade de fluxo de 5 mL min^{-1} e o monitoramento realizado a $\lambda = 254$ nm.

Depois de otimizada a condição para a separação por CLAE semipreparativa, procedeu-se a etapa de isolamento da fração **P-LNFIA**, através de sucessivas injeções de 1 mL da amostra solubilizada em metanol grau espectroscópico, onde foram obtidas quatro frações como indicado na Figura 29. No cromatograma abaixo foram indicadas as áreas dos cortes dos picos das frações, que foram recolhidas durante o processo de isolamento.



NI - não identificado

Figura 29 - Perfil cromatográfico da fração P-LNFIA. Coluna semipreparativa C-18 (25 cm x 20 mm x 5 µm); eluente metanol-água (75:25); fluxo 5 mL min⁻¹; em 254 nm.

Após o recolhimento das frações separadas na CLAE semipreparativa, o metanol presente na amostra foi evaporado no evaporador rotatório, a temperatura ambiente, e em seguida a fase aquosa foi congelada e liofilizada e estas resultaram em um pó fino de coloração amarela e suas quantidades estão relacionadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Tempo de retenção (t_r) e quantidades das frações isoladas de **P-LNFIA** por CLAE semipreparativo.

Picos	Tr (minutos) semipreparativa	Tr (minutos) analítica	Código	Quantidade (mg)
NI	7,0-12,1	-	NI	37,8
1	19,05 – 22,79	5,19	LN-1	0,7
2	25,8 – 27,20	6,70	LN-2	5,1
3	35,8 – 42,7	7,48	LN-3	44,5

Após evaporação do solvente, as amostras foram solubilizadas em metanol grau espectroscópico, analisadas novamente por CLAE analítico acoplada a um detector de arranjo de fotodiodo, para avaliar sua pureza, e em seguida foram submetidas as análises espectroscópicas (RMN ^1H) para auxiliar na sua determinação estrutural.

5.3.1 Avaliação Estrutural das Substâncias Isoladas de *Luxemburgia nobilis*

A substância **LN-1** (0,7 mg) foi analisada apenas por CLAE analítica acoplada ao detector de arranjo fotodiodo (CLAE-DAD), em virtude da pequena quantidade obtida por CLAE semipreparativa.

A análise cromatográfica realizada em metanol-água-ácido acético (74:25:1), indicou a presença de dois picos com tempo de retenção em t_r 5,19 e t_r 6,72 minutos, respectivamente. A comparação do T_R e espectro de absorção no UV obtidos para a substância **LN-1** com a do padrão 2'', 3''diidrochnaflavona (Figura 30), foi compatível apenas com o pico minoritário (t_r 6,72 min.). O pico com T_R 5,19 minutos, embora não compatível com o padrão, indicou máximos de absorção no UV (λ_{max} 237, 270, 290 e 336 nm) semelhantes aos esqueletos de bisflavonóides com ligação etérea flavona-flavanona (Figura 31).

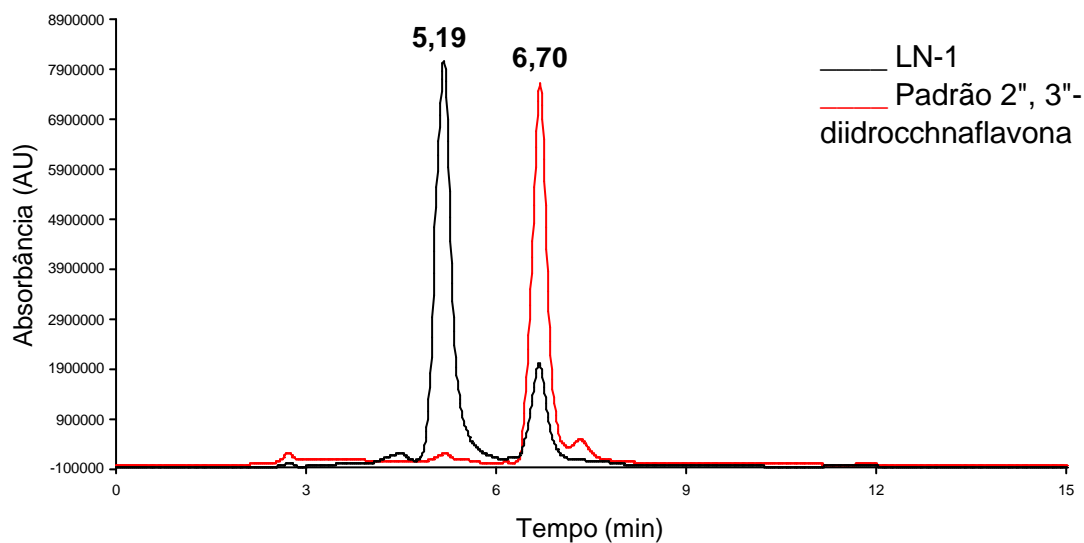


Figura 30 - Cromatograma da substância **LN-1** comparado com o padrão 2'',3''-dihidrochonaflavona. Coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo 1 mL min⁻¹; em 254 nm.

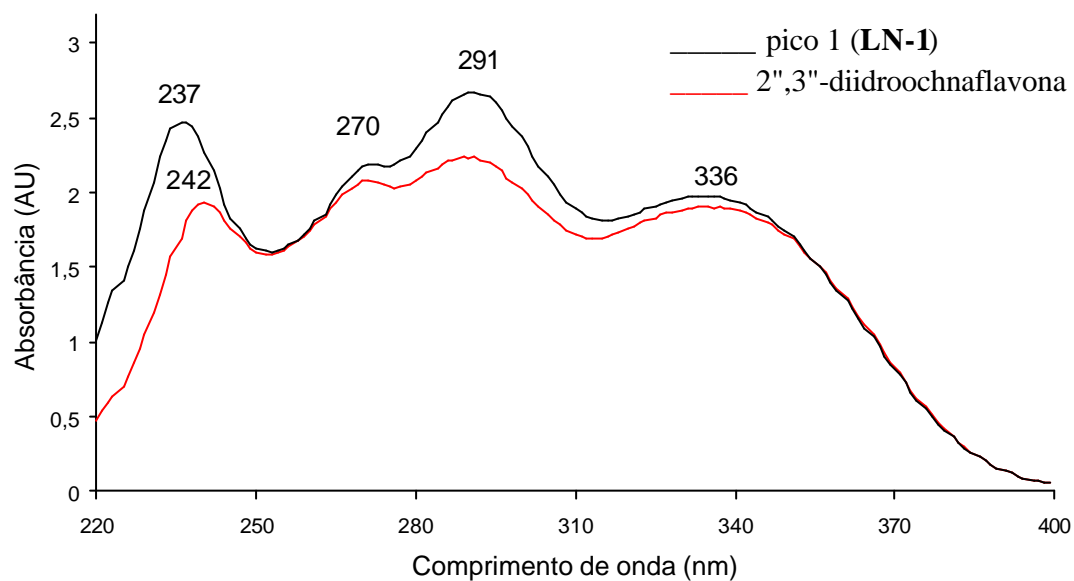


Figura 31 - Comparação dos espectros de absorção no UV de 2'',3''-dihidrochonaflavona com o pico 1 da substância **LN-1** na fase móvel metanol-água-ácido acético (74:25:1)

A fração codificada como **LN-2** foi caracterizada através de análises espectroscópicas no IV, RMN ^1H e CLAE-DAD, além da preparação do derivado metilado, que auxiliou na determinação estrutural da substância.

A análise do espectro na região do IV (Figura 32) revelou absorções características de estiramento de hidroxila em ligação de hidrogênio ($\nu_{\text{O-H}}$) em $3378,8\text{ cm}^{-1}$ e de estiramento de carbonila quelada e conjugada ($\nu_{\text{C=O}}$) em $1646,7\text{ cm}^{-1}$. As absorções em $1609,3$; $1504,9$ e $1430,5\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas à deformação axial de $\nu_{\text{C=C}}$ de aromático e em $1225,6\text{ cm}^{-1}$ de deformação de $\nu_{\text{C-O}}$ de fenol.



Figura 32 - Espectro de IV da fração LN-2.

A utilização da CLAE acoplada ao detector de fotodiodo permitiu comparar o perfil cromatográfico (T_R) e os máximos de absorção (nm) no espectro de UV da fração **LN-2** com a do padrão 2'', 3-diidroochnaflavona. A análise do perfil cromatográfico de **LN-2** comparada com 2'', 3-diidroochnaflavona, realizado em metanol-água-ácido acético (74:25:1), indicou o mesmo tempo de retenção $T_R = 6,70$ minutos (Figura 33) e a comparação dos máximos de absorção obtido no UV revelaram os mesmos perfil de espectro $\lambda_{\text{máx}}$ 242, 270, 290 e 336 nm (Figura 34). Esta comparação indicou a presença de 2'', 3-diidroochnaflavona, sugerida anteriormente pelo estudo do monitoramento de *Luxemburgia nobilis* por CLAE.

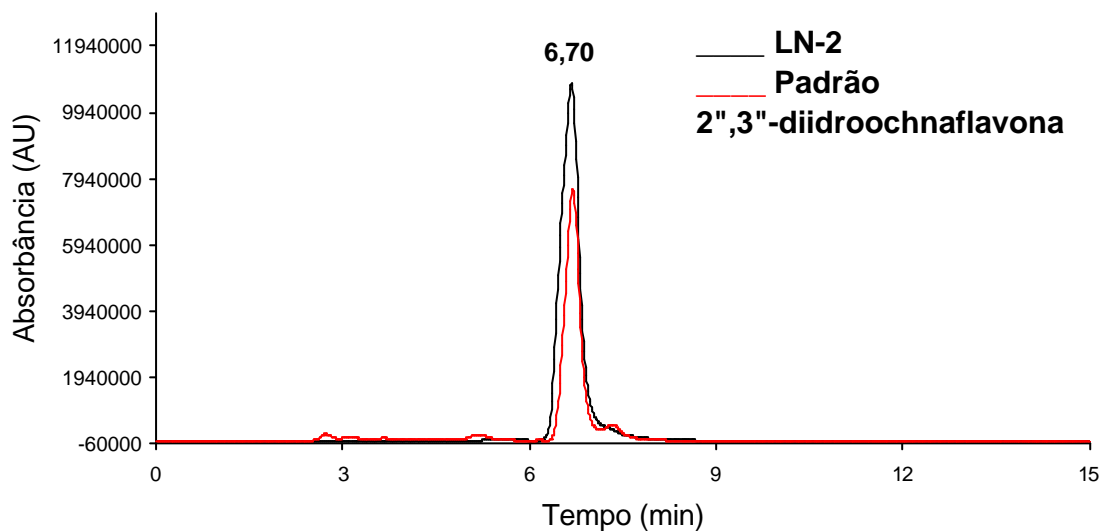


Figura 33 - Perfil cromatográfico da fração **LN-2** comparado com do padrão 2'',3''-diidrochnaflavona. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min⁻¹; em 254 nm.

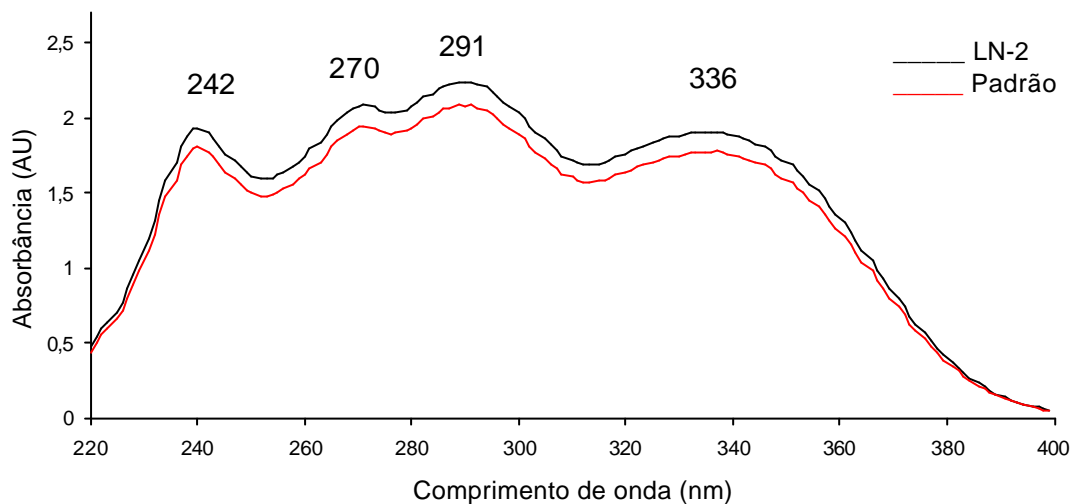
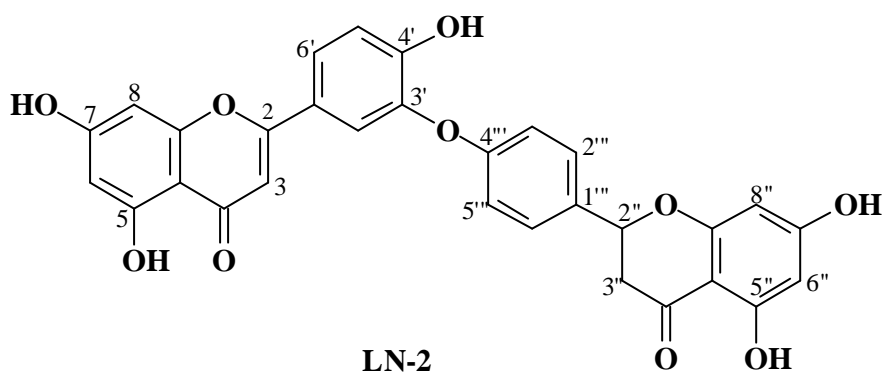


Figura 34 - Comparação dos espectros de absorção no UV de **LN-1** e 2'', 3'' - Diidrochnaflavona. Realizado em metanol-água-ácido acético (74:25:1).

A análise por RMN de ^1H da fração **LN-2** e do derivado metilado **LN-2m** auxiliou na confirmação estrutural.

Nas análises dos espectros de RMN de ^1H (Figura 35) percebeu-se dois singletos em campo baixo (δ_{H} 12,12 e 12,91 ppm), correspondentes aos hidrogênios dos grupos hidroxilas localizadas no átomo de carbono C-5 envolvidos em ligação de hidrogênio com o grupo carbonila no C-4. Na região de deslocamento químico dos hidrogênios aromáticos foram observados dois sinais para hidrogênios no anel A, com acoplamento em *meta*, δ_{H} 6,18 (*d*, $J=1,8$ Hz; H6) e 6,42 (*d*, $J=1,8$ Hz; H8) indicando que as posições 5,7-são oxigenadas para esta unidade flavonoídica. Para uma outra porção do anel B da estrutura flavonoídica, o espectro de RMN ^1H permitiu observar sinais típicos de um sistema AA'BB', indicados pelos dubletos em δ_{H} 7,44 (*d*, $J=8,5$ Hz, H2'''-6''') e δ_{H} 6,90 (*d*, $J=8,5$ Hz, 3'''-5'''), acoplando entre si. Os deslocamentos químicos dos sinais em δ_{H} 7,79 (*d*, $J=8,2$ Hz, H-6'), 7,72 (*sl*, H-2') e δ_{H} 7,10 (*d*, $J=8,2$ Hz, H5') permitiram reconhecer a presença de átomos de hidrogênio formando um sistema ABC compatível com o anel B de flavonóides com substituições nas posições 3' e 4'. Outro singlete em δ_{H} 6,77 (*s*, H3) representa o H3 da flavona e o sinal em δ_{H} 5,87 (2H) corresponde aos hidrogênios 6'',8'' do anel A de flavanona. Esta unidade foi confirmada pelos sinais em δ_{H} 5,49 (*d*, $J=9,70$ Hz; H-2''), 3,20 (*dd*, $J=16,9$ e 11,5 Hz; H_{ax}-3'') e 2,72 (*d*, $J=16,6$ Hz; H_{eq}-3'').



Os deslocamentos químicos detectados no RMN de ^1H permitiram deduzir que a substância **LN-2** é um dímero de flavona-flavanona, apontado anteriormente pelo espectro de UV (Figura 34) sendo estes dados compatíveis com os deslocamentos químicos de 2'', 3''-diidrochnaflavona. Na Tabela 5 foram listadas as atribuições dos deslocamentos químicos da substância **LN-2** comparada com os de 2'', 3''-diidrochnaflavona, isoladas anteriormente de *Luxemburgia nobilis* por métodos tradicionais (OLIVEIRA, *et al.* 2002).

Considerando que as unidades de flavonóides poderiam estar ligadas através dos carbonos 3'-O-4''' e sem alterar significativamente o espectro de RMN, resolveu-se fazer experimentos adicionais com o derivado **LN-2m** para confirmar as posições envolvidas na ligação entre as mesmas e confirmar as posições onde foram incorporado diazometano.

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 36 e Tabela 5) da substância **LN-2m** permitiu identificar dois sinais de hidroxila em campo baixo a δ_{H} 12,02 e 12,72, as quais não foram incorporadas pelo diazometano, confirmando a presença dos hidrogênios dos grupos hidroxilas localizadas no átomo de carbono C-5 envolvidos em ligação de hidrogênio com o grupo carbonila no C-4. Três sinais em δ_{H} 3,78; 3,84 e 3,89 ppm, correspondente aos hidrogênios dos grupos metoxilas localizados no átomo de carbono C-4', C-7 e C-7''. Os espectros obtidos com o experimento de NOEDIFF (Figura 37 a, b, c, d), através da irradiação na frequência dos grupos metoxilas, permitiu confirmar as posições indicadas acima devido aos sinais δ_{H} 6,42 (*d*, *J*= 2,1 Hz; H-6); 6,33 (*d*, *J*= 2,1 Hz; H-8); 7,10 (*d*, *J*= 112,6 Hz; H-5'); 6,05 (*d*, *J*= 2,1 Hz; H-6'' e H-8'') dos hidrogênios vizinhos aos respectivos grupos irradiados. A conexão entre os monômeros foi confirmada devido ao NOE no dubleto em δ_{H} 7,10 (H-5') e por não apresentar este efeito no H-2' no (δ_{H} 7,68). Estas observações permitiram confirmar que as duas unidades flavonoídicas estão ligadas através da ligação C-3'-O-C-4'''.

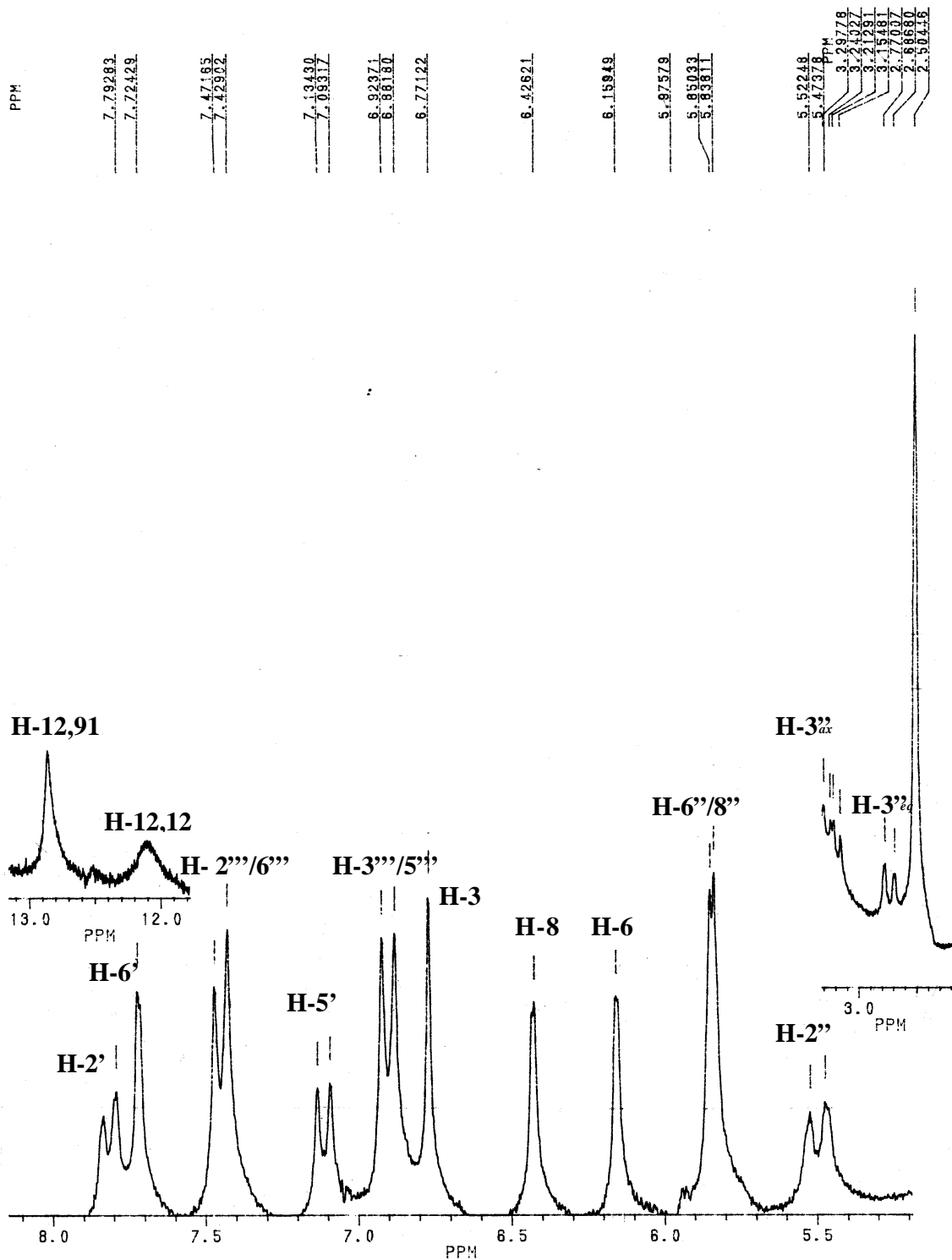


Figura 35 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) da substância LN-2 em DMSO- D_6 .

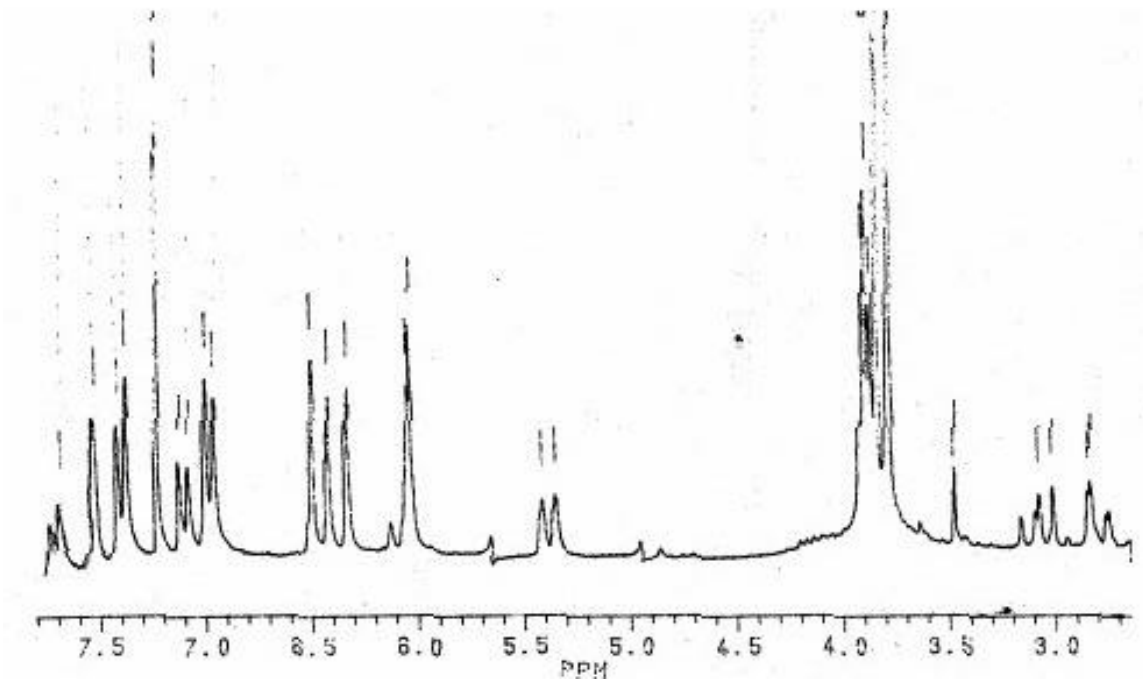
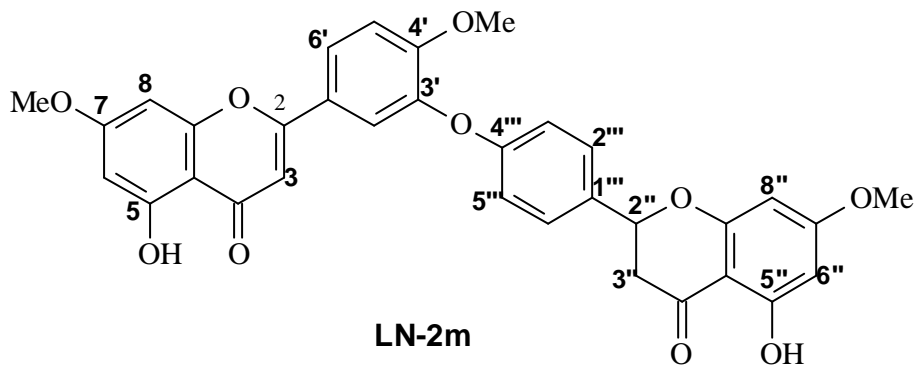


Figura 36 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) do derivado LN-2 em CDCl₃



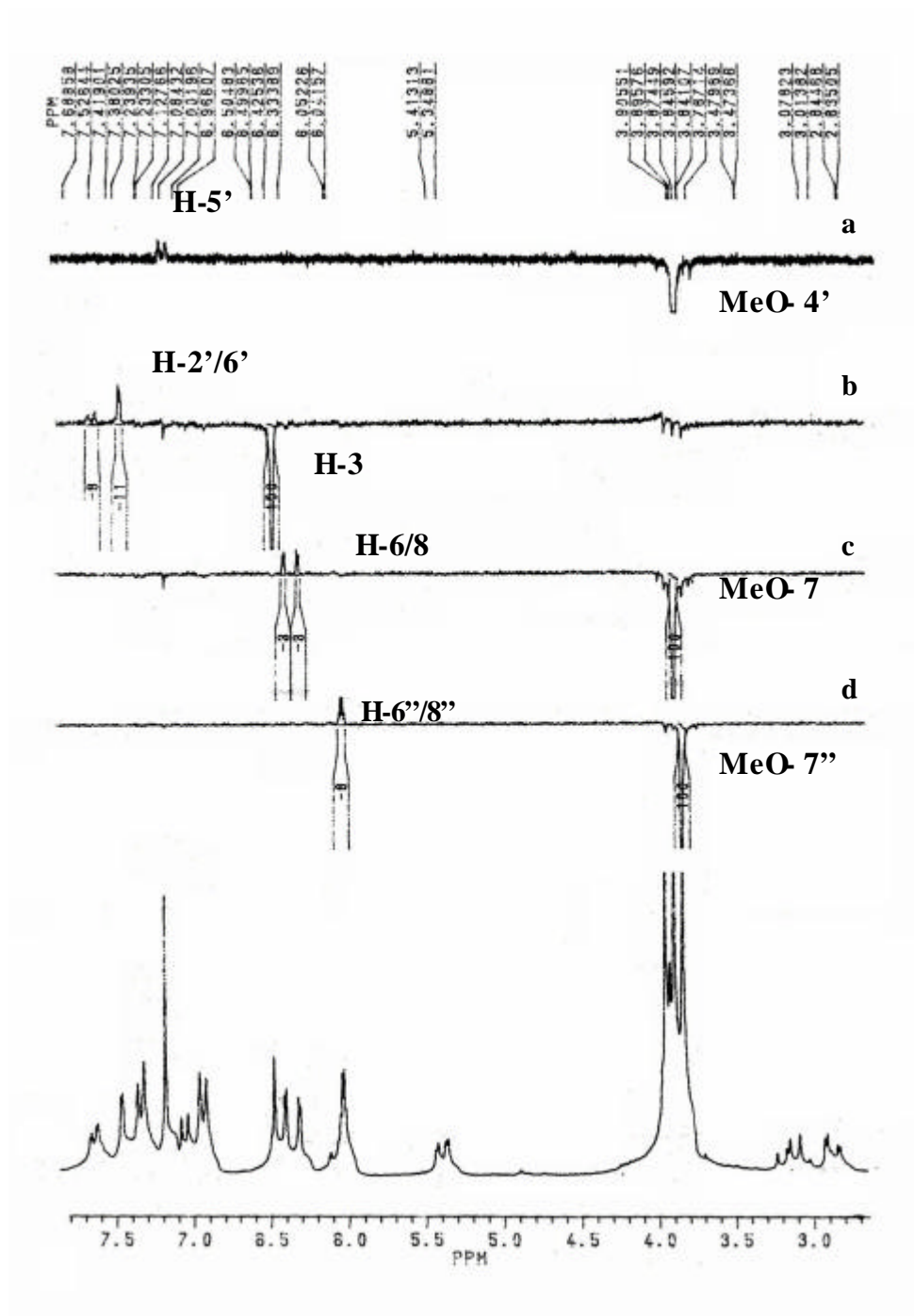


Figura 37 - Espectros resultantes da irradiação dupla e subtração de espectros (NOE) do derivado metilado LN-2m em CDCl_3 .

Tabela 6 - Dados de RMN ^1H de **LN-2**, **LN-2m** comparados com os valores registrados na literatura do padrão **2''**, **3''**-diidrochnaflavona e seu respectivo derivado (OLIVEIRA *et al.*, 2002)

C	d_{H} (mult., J Hz) LN-2 ^a	d_{H} (mult., J Hz) LN-2m ^b	d_{H} (mult., J) $d_{\text{H-2'',3''}}$ - diidrochnaflavona ^c	d_{H} (mult., J) $d_{\text{H-2'',3''}}$ - diidrochnaflavona (metilado) ^b
3	6,77(s)	6,49	6,62 (s)	6,76 (s)
5	12,89 (s, OH)	12,72 (s, OH)	12,71 (s, OH)	12,88 (s, OH)
6	6,18 (d, J= 1,8 Hz)	6,42 (d, 2,1 Hz)	6,11 (d, J= 2,0 Hz)	6,70 (d, J= 2,0 Hz)
8	6,42 (d, J= 1,8 Hz)	6,33 (d, J=2,1 Hz)	6,37 (d, J=2,0 Hz)	6,30 (d, J= 2,0 Hz)
2'	7,72 (sl)	7,68 (d, J= 2,0 Hz)	7,62 (d, J= 7,8 Hz)	7,48 (d, J=2,0 Hz)
5'	7,10(d, J=8,2 Hz)	7,10 (d, J= 12,6 Hz)	7,06 (d, J= 7,8 Hz)	7,37 (d, J=8,7 Hz)
6'	7,79 (d, J= 8,2 Hz)	7,52 (sl)	7,71 (dd, J= 2,0 e 7,8 Hz)	8,01 (dd, J=2,0 e 8,7 Hz)
2''	5,49 (d, J=9,7 Hz)	5,37 (d, 12,8 Hz)	5,39 (dd, J= 12,7 e 6,0 Hz)	5,53 (dd, J=10,0 e 2,0 Hz)
3''	3,20 (dd, J=16,6 e 11,5 Hz), 2,72 (d, =16,6 Hz)	3,05 (d, J= 12,8 Hz), 2,84 (d, J= 1,9 Hz)	3,11 (dd, J= 16,6 e 12,7 Hz); 2,66 (dd, J=16,6 e 6,0 Hz)	3,21 (dd, J=16,7 e 10,0 Hz); 2,82 (dd, J= 16,7 e 2,0 Hz)
5''	12,12 (s, OH)	12,02 (s, OH)	11,99 (s, OH)	12,11 (s, OH)
6''	5,87 (sl)	6,05 (d, J= 2,1 Hz)	5,81 (d, J= 2,0 Hz)	6,04 (d, J= 2,0 Hz)
8''	5,87 (sl)	6,05 (d, J= 2,1 Hz)	5,82 (d, J=2,0 Hz)	6,04 (d, J= 2,0 Hz)
2'''	7,44 (d, J=8,3 Hz)	7,40 (d, J= 7,1 Hz)	7,36 (d, J= 7,8 Hz)	7,54 (d, J= 7,8 Hz)
3'''	6,90 (d, J=8,3 Hz)	6,98 (d, J= 7,1 Hz)	6,83 (d, J= 7,8 Hz)	6,83 (d, J= 7,8 Hz)
5'''	6,90 (d, J=8,3 Hz)	6,98 (d, J= 7,1 Hz)	6,83 (d, J= 7,8 Hz)	6,83 (d, J= 7,8 Hz)
6'''	7,44 (d, J=8,3 Hz)	7,40 (d, J= 7,1 Hz)	7,36 (d, J= 7,8 Hz)	7,54 (d, J= 7,8 Hz)
H₃CO	-	3,78-3,84-3,89 (s)	-	3,75-3,91 (s)

200 MHz, DMSO-D₆^a

200 MHz, CDCl₃^b

400 MHz, DMSO-D₆^c

A substância codificada como **LN-3** também foi caracterizada através de análises espectroscópicas no IV, RMN ^1H e CLAE-DAD, além da preparação do derivado metilado **LN-3m** que auxiliou na determinação estrutural da substância.

A análise do espectro na região do IV (Figura 38) revelou absorções características de estiramento de hidroxila em ligação de hidrogênio ($\nu_{\text{O-H}}$) em $3378,8\text{ cm}^{-1}$ e de estiramento de carbonila quelada e conjugada ($\nu_{\text{C=O}}$) em $1646,7\text{ cm}^{-1}$. As absorções em $1609,3$; $1504,9$ e $1430,5\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas a deformação axial de $\nu_{\text{C=C}}$ de aromático e em $1225,6\text{ cm}^{-1}$ de deformação de $\nu_{\text{C-O}}$ de fenol.

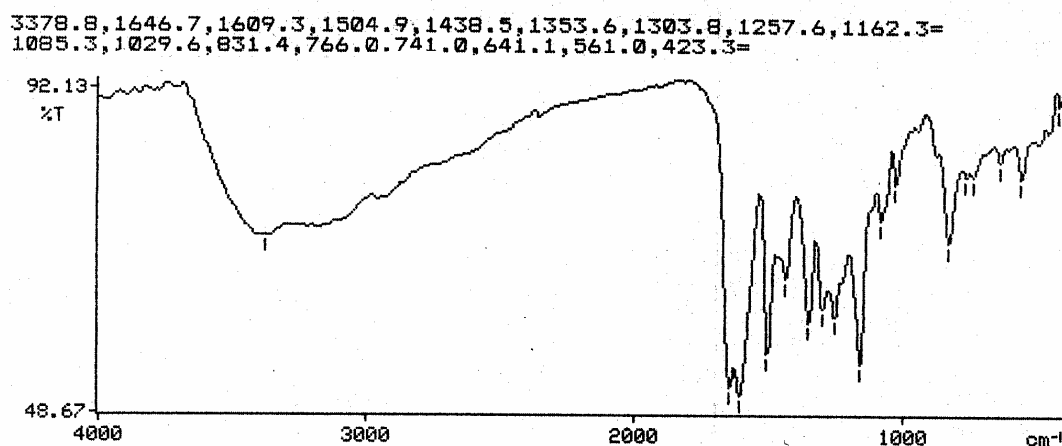


Figura 38 - Espectro de IV da substância **LN-3**.

A análise por CLAE da substância **LN-3**, realizada em metanol-água-ácido acético (74:25:1), indicou tempo de retenção T_R 7,48 minutos (Figura 39) e o espectro de UV indicou máximo de absorção em 242, 270, 290 e 336 nm (Figura 40). O perfil cromatográfico, baseado no tempo de retenção e absorção no UV, da substância **LN-3** foi comparada com o do padrão 2'', 3''-diidrochnaflavona, nas mesmas condições cromatográficas, que apresentou tempo de retenção (T_R) 6,70 minutos e máximo de absorção $\lambda_{\text{máx}}$ 242, 270, 290 e 336 nm. A análise indicou diferença no tempo de retenção, mas foi observado que o espectro de UV possui os mesmos máximos de absorção, indicando o perfil de um bisflavonóides com ligação flavona-flavanona, mas que não corresponde com o padrão 2'', 3''-diidrochnaflavona, esta análise condiz com o resultado

do estudo de monitoramento de folhas de *Luxemburgia nobilis* por CLAE, item 5.1.

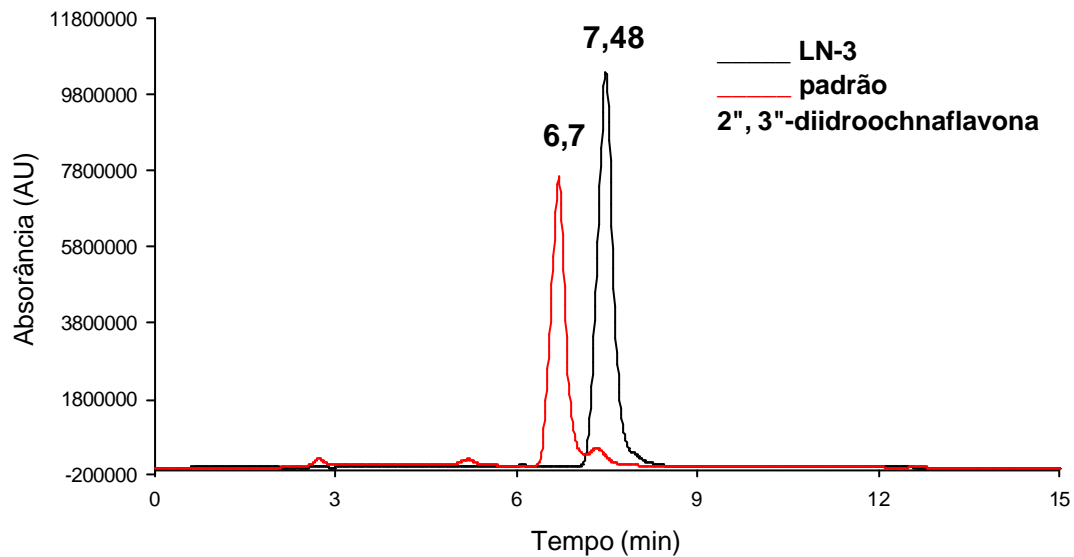


Figura 39 - Perfil cromatográfico da fração **LN-3** comparado com do padrão 2'', 3''-dihidrochalcona. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min⁻¹; em 254 nm.

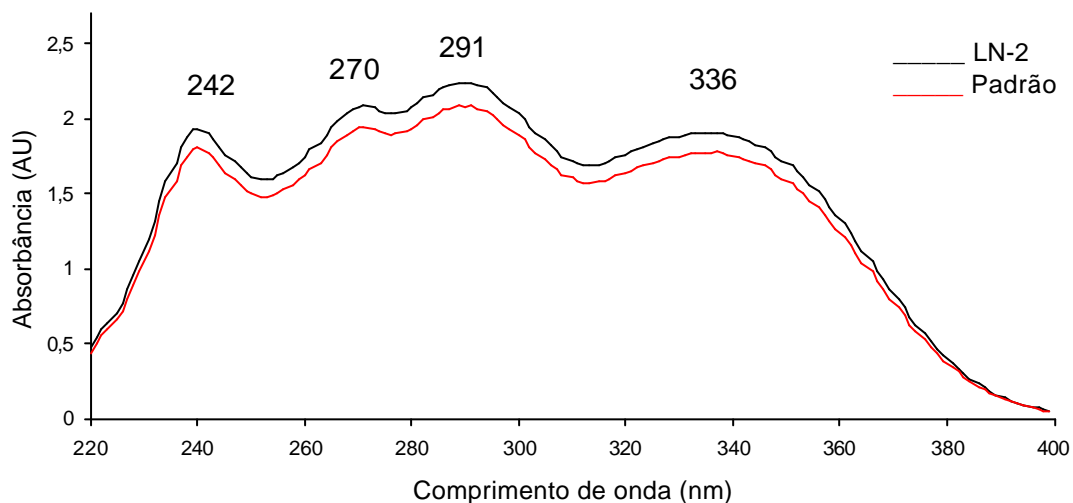


Figura 40 - Comparação dos espectros de absorção no UV de 2'', 3''- diidrochnaflavona e da fração **LN-3**. Realizado em metanol-água-ácido acético (74:25:1).

A substância **LN-3** também foi analisada por RMN ^1H e foi metilada com diazometano para auxiliar na análise estrutural da mesma forma que foi realizada com **LN-2**.

O espectro de RMN ^1H da substância **LN-3** (Figura 41 e 42) apresentou-se semelhante ao espectro da fração **LN-2**, identificada como 2'',3''-diidrochnaflavona (pg. 65). Percebeu-se presença de três duplos dubletos em δ_{H} : 5,55 ($J= 12,4$ e $2,9$ Hz; $\text{H}2''$), 3,34 ($J= 17,2$ e $12,4$ Hz; $\text{H}3''_{\text{ax}}$) e 2,76 ($J=17,2$ e $2,9\text{Hz}$, $\text{H}3''_{\text{eq}}$) que confirmaram a unidade de flavanona. O sinal em δ_{H} : 6,84 (s, 1H) foi atribuído ao H-3 de uma flavona. Os demais sinais que também indicam semelhança com os de **LN-2** estão descritos na Tabela 6 (pg. 68)

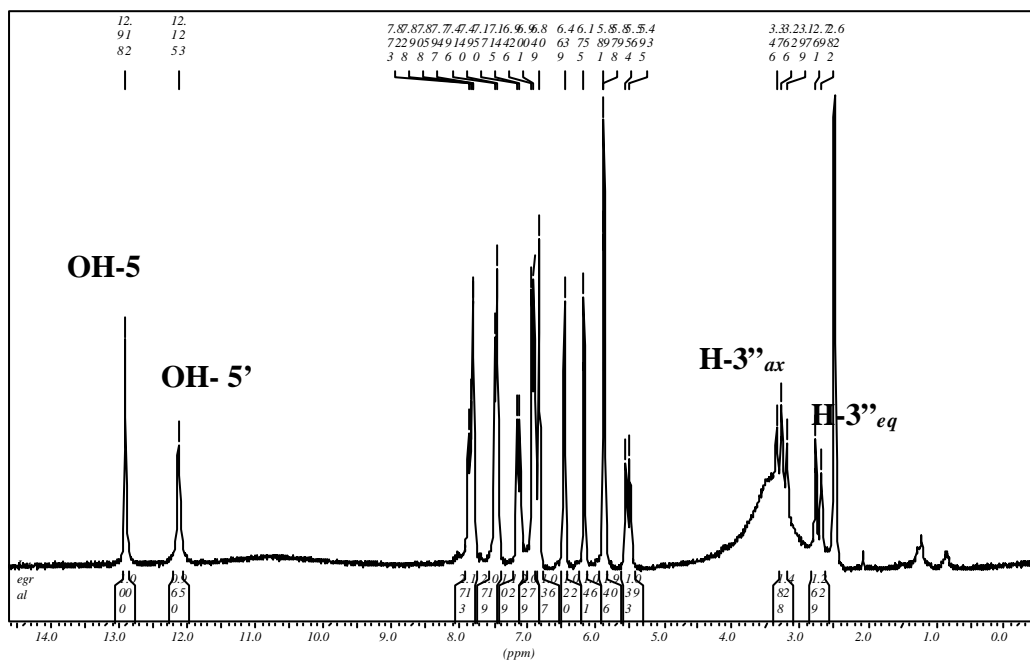


Figura 41 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz, DMSO-D₆) de LN-3

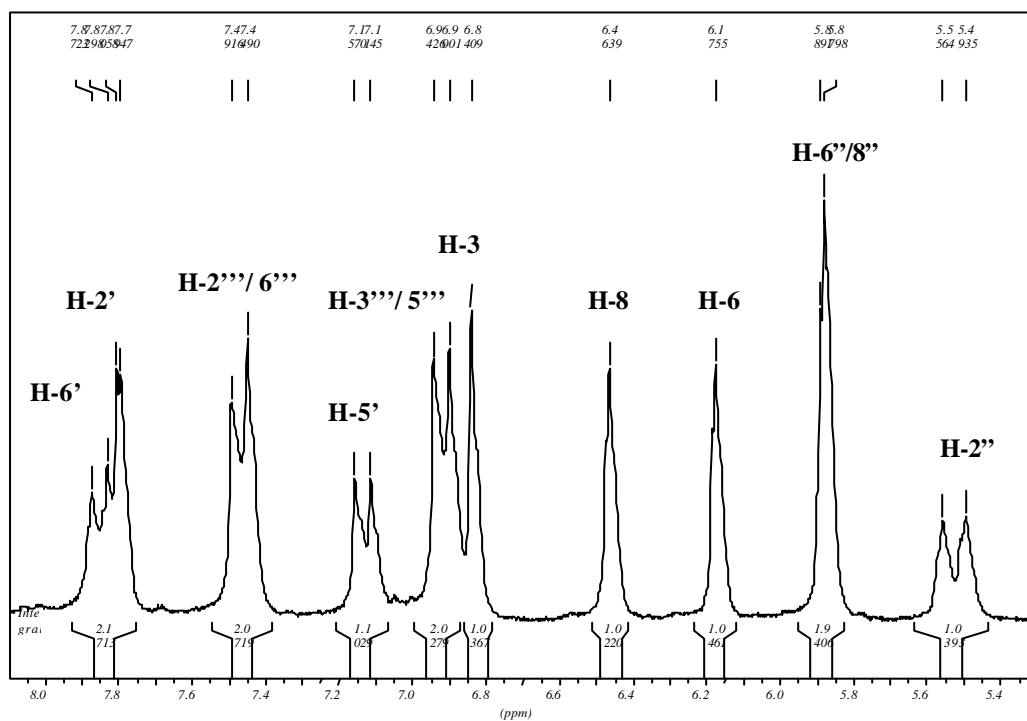
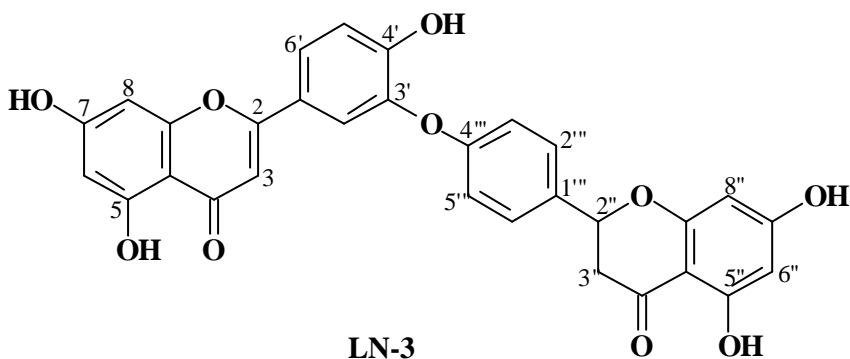


Figura 42 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz, DMSO) de LN-3, expandido na região de 5,4 a 8,0 ppm

Tabela 7 - Dados de RMN ¹H de LN-2, LN-3 comparado com os dados da literatura do padrão 2'',3''-diidrochnaflavona (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

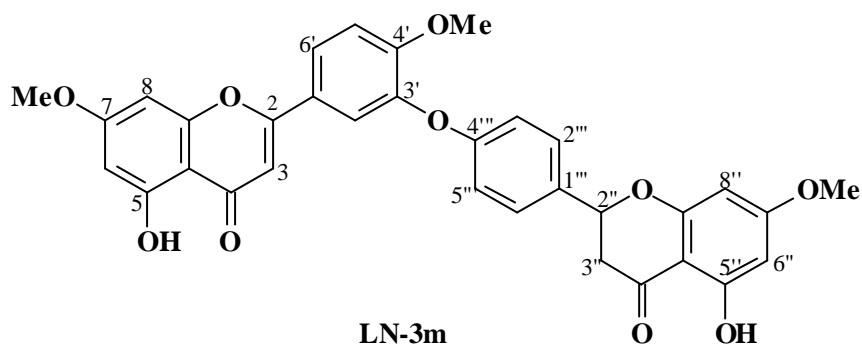
C	d _H - LN-2 ^a	d _H - LN-3 ^a	d _H - 2'',3''-diidrochnaflavona ^b
3	6,77(s)	6,84 (s)	6,62 (s)
5	12,89 (s, OH)	12,91 (s, OH)	12,71 (s, OH)
6	6,18 (d, J= 1,8 Hz)	6,17 (d, J= 1,8 Hz)	6,11 (d, J= 2,0 Hz)
8	6,42 (d, J= 1,8 Hz)	6,46 (d, J= 1,8 Hz)	6,37 (d, J=2,0 Hz)
2'	7,72 (sl)	7,79 (d, J=2,1 Hz)	7,62 (d, J= 7,8 Hz)
5'	7,10(d, J=8,2 Hz)	7,15 (d, J= 8,6 Hz)	7,06 (d, J= 7,8 Hz)
6'	7,79 (d, J= 8,2 Hz)	7,82 (dd, J=2,1 e 8,6 Hz)	7,71 (dd, J= 2,0 e 7,8 Hz)
2''	5,49 (d, J=9,7 Hz)	5,55 (dd, J= 12,6 e 3,6 Hz)	5,39 (dd, J= 12,7 e 6,0 Hz)
3''	3,20 (dd, J=16,6 e 11,5 Hz), 2,72 (d, J=16,6 Hz)	3,34 (dd, J= 17,15 e 12,6 Hz), 2,76 (dd, J= 17,15 e 3,6 Hz)	3,11 (dd, J= 16,6 e 12,7 Hz); 2,66 (dd, J=16,6 e 6,0 Hz)
5''	12,12 (s, OH)	12,12 (s, OH)	11,99 (s, OH)
6''	5,87 (sl)	5,88 (d, J= 1,8 Hz)	5,81 (d, J= 2,0 Hz)
8''	5,87 (sl)	5,88 (d, J= 1,8 Hz)	5,82 (d, J=2,0 Hz)
2'''	7,44 (d, J=8,3 Hz)	7,44 (d, J= 8,8 Hz)	7,36 (d, J= 7,8 Hz)
3'''	6,90 (d, J=8,3 Hz)	6,90 (d, J= 8,8 Hz)	6,83 (d, J= 7,8 Hz)
5'''	6,90 (d, J=8,3 Hz)	6,90 (d, J= 8,8 Hz)	6,83 (d, J= 7,8 Hz)
6'''	7,44 (d, J=8,3 Hz)	7,44 (d, J= 8,8 Hz)	7,36 (d, J= 7,8 Hz)

200MHz, DMSO^a
400Mhz, DMSO^b



Para verificar o padrão da ligação entre as unidades fez-se o derivado metilado **LN-3m**

O espectro de RMN ^1H de **LN-3m** (Figura 43) também apresentou semelhança nos deslocamentos químicos de hidrogênios com a substância **LN-2m**, como nos três sinais em δ_{H} : 3,81; 3,87 e 3,93 correspondente as metoxilas 4', 7 e 7''. Os espectros obtidos (Figura 44 a, b, d) através de irradiação dupla e subtração de espectros na frequência dos grupos metoxilas confirmaram as posições indicadas acima., pois foi gerado NOE nos dubletos em δ_{H} 6,11 (H-6), 6,37 (H-8), 7,06 (H-5'), 5,81 (H-6'') e 5,82 (H-8''). A conexão 3'-O-4'' entre os monômeros foi confirmada pela irradiação na frequência do grupo metoxila 4' que gerou NOE no dubleto em δ_{H} 7,06 (H-5') (Figura 44 d) e por não apresentar NOE no δ_{H} : 7,55 (H-2').



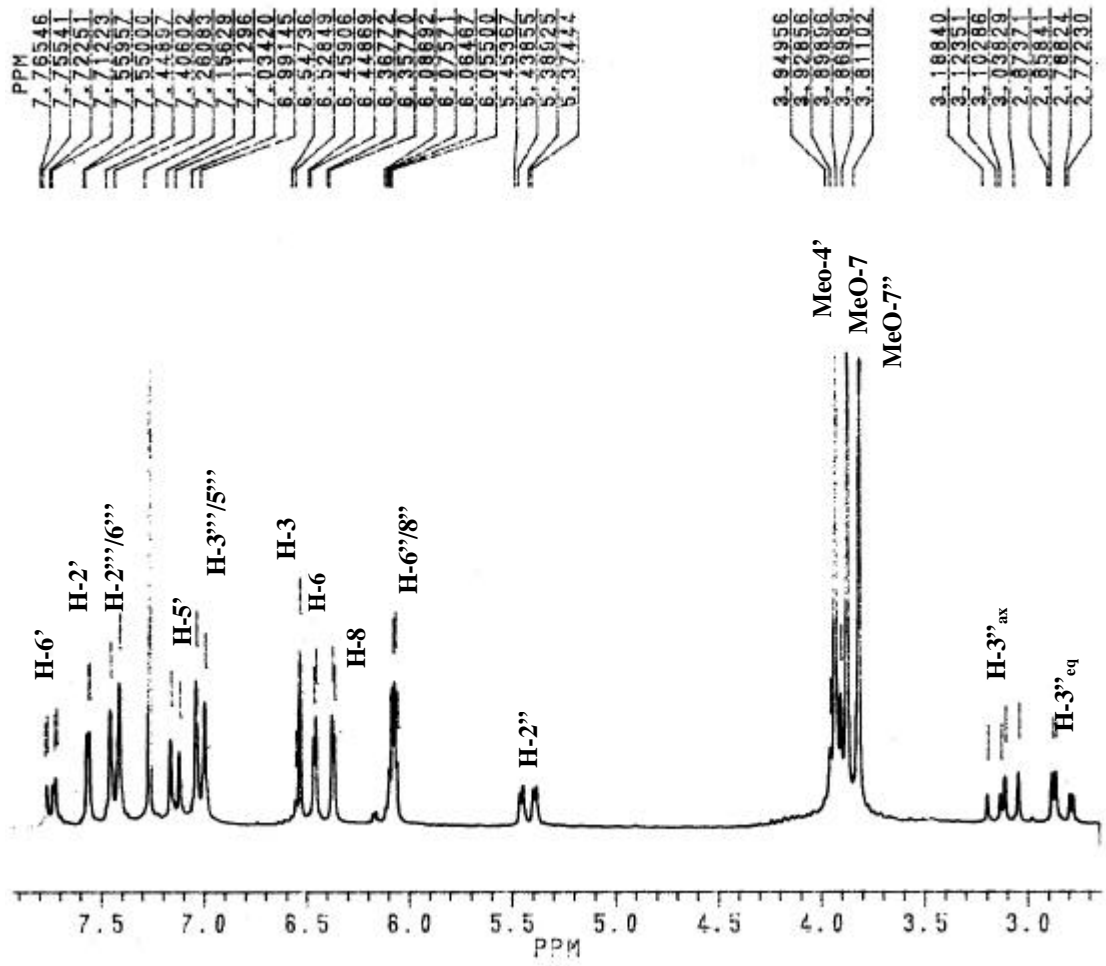
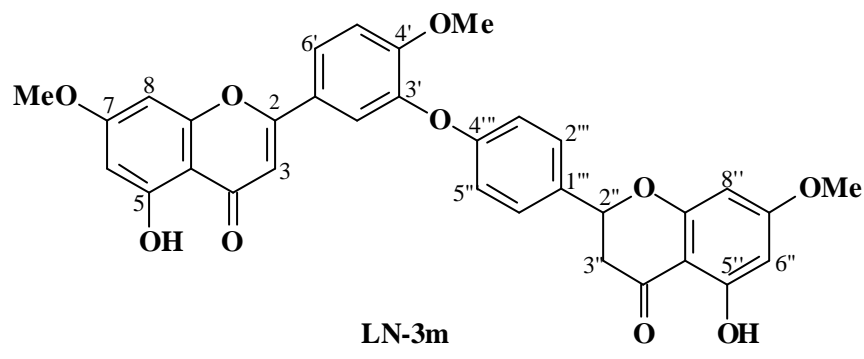


Figura 43 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) de LN-3 em CDCl₃.



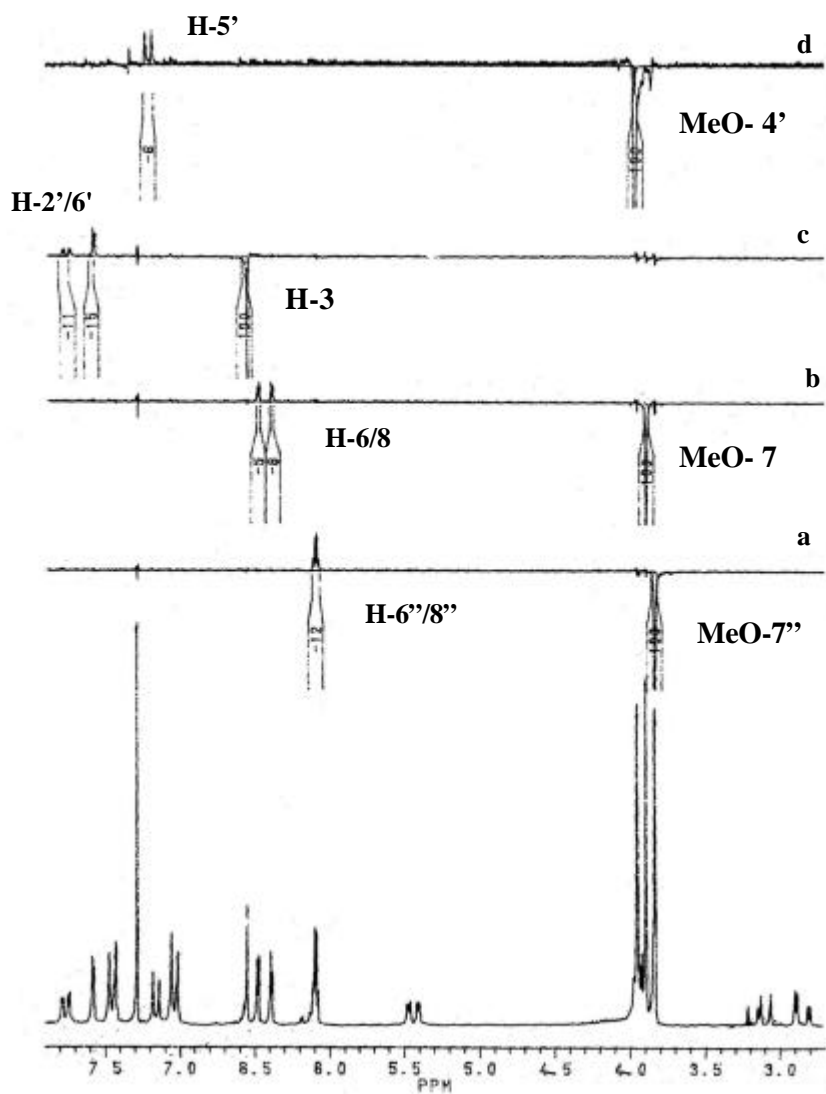
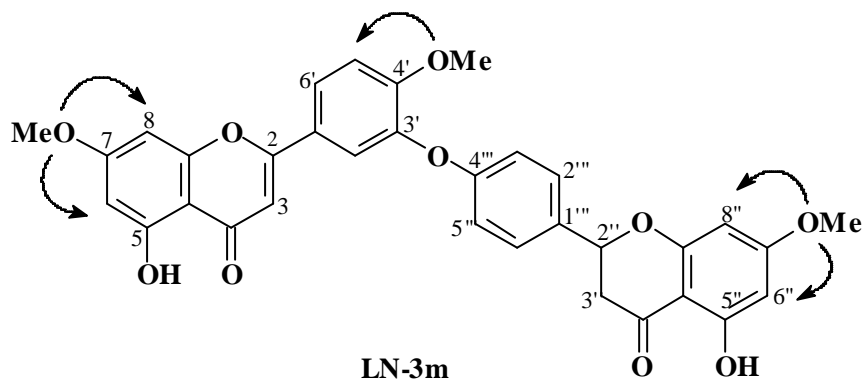


Figura 44 - Espectro resultante da irradiação dupla e subtração de espectros do derivado **LN-3m** em CDCl_3 .



A comparação das análises dos espectros de RMN ^1H realizadas para as substâncias **LN-3** e **LN-2** revela algumas diferenças entre os deslocamentos químicos de hidrogênio das mesmas (Figura 45).

Apesar da semelhança na análise de UV (Fig. 40), as análises de RMN (Tabela 7) e dos tempos de retenção (T_r) de ambas, sendo a última análise realizada em várias condições cromatográficas (colunas de fase reversa e fase normal, fases móveis, fluxo, temperatura, etc) nos indicaram que as substâncias **LN-2** e **LN-3** possuem uma semelhança estrutural mas não possuem a mesma identidade. Experimentos adicionais serão necessários para a confirmação estrutural dessas substâncias.

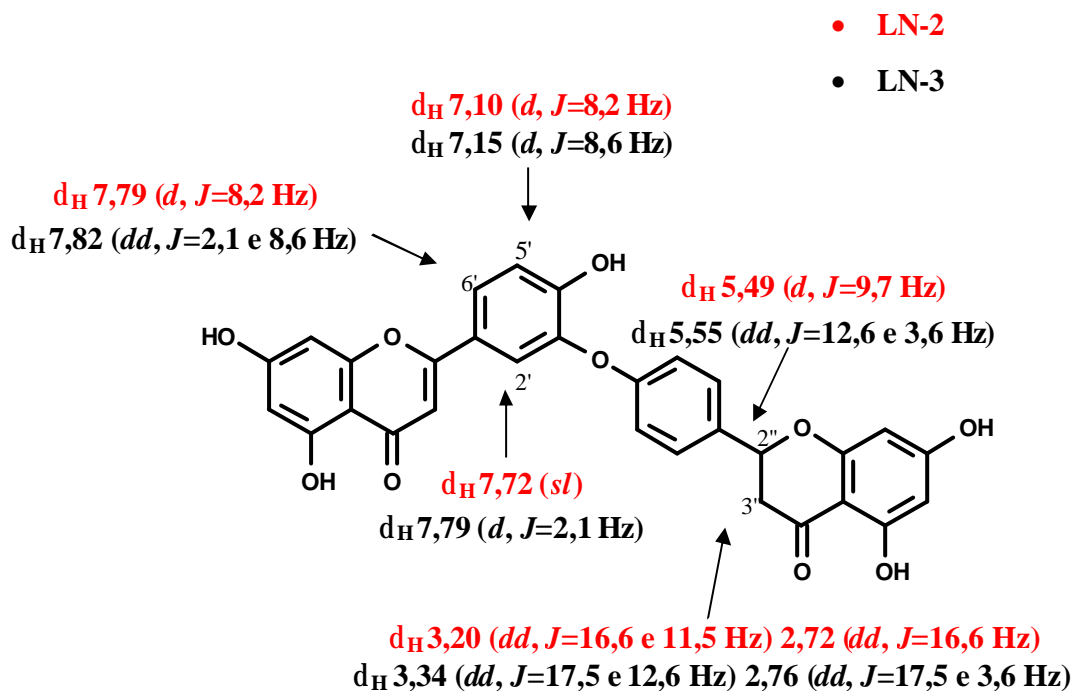
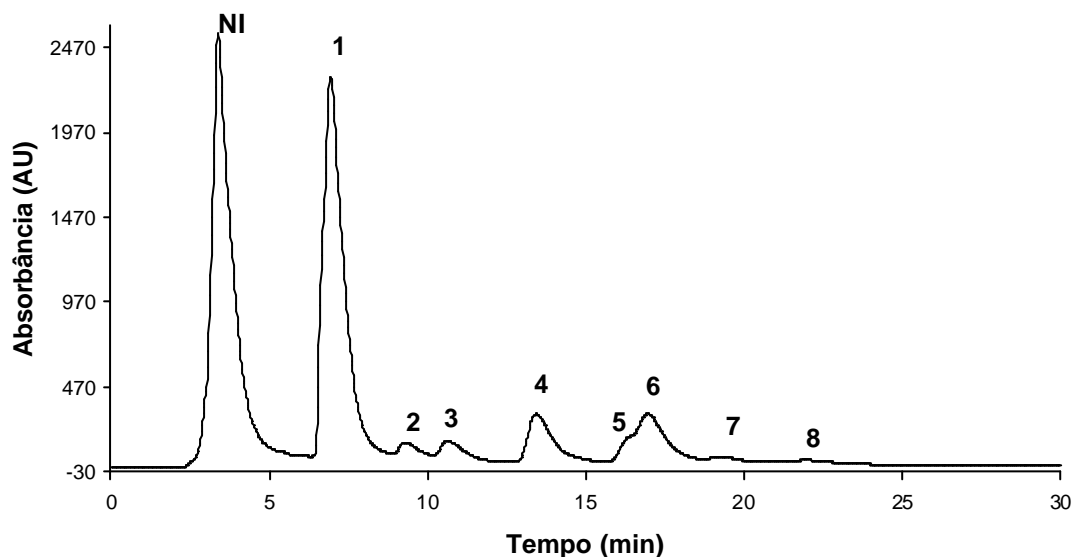


Figura 45 - Comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio entre **LN-2** e **LN-3**.

5.4 Isolamento de Bisflavonóides de *Ouratea semiserrata* A por CLAE Semipreparativa

O estudo que está sendo realizado pela doutoranda Juliana Feijó (2004) sobre o monitoramento por CLAE acoplada a um detector de arranjo de fotodiodo, da fração **OSFMTD** obtida do extrato metanólico das folhas trituradas de *Ouratea semiserrata*, permitiu observar picos cujos tempos de retenção e absorções no UV sugeriram a presença de outros bisflavonóides não identificados anteriormente. A partir desta observação resolveu-se realizar o fracionamento por CLAE semipreparativa do extrato metanólico das folhas trituradas de *Ouratea semiserrata*, codificado como **OS-A**. O extrato metanólico de **OS-A** foi pré-purificado, a fim de eliminar a clorofila e outros interferentes, para obtenção de uma fração flavonoídica como descrito no Esquema 4 (pg.37), resultando na fração **P-OS-A** (400,0 mg).

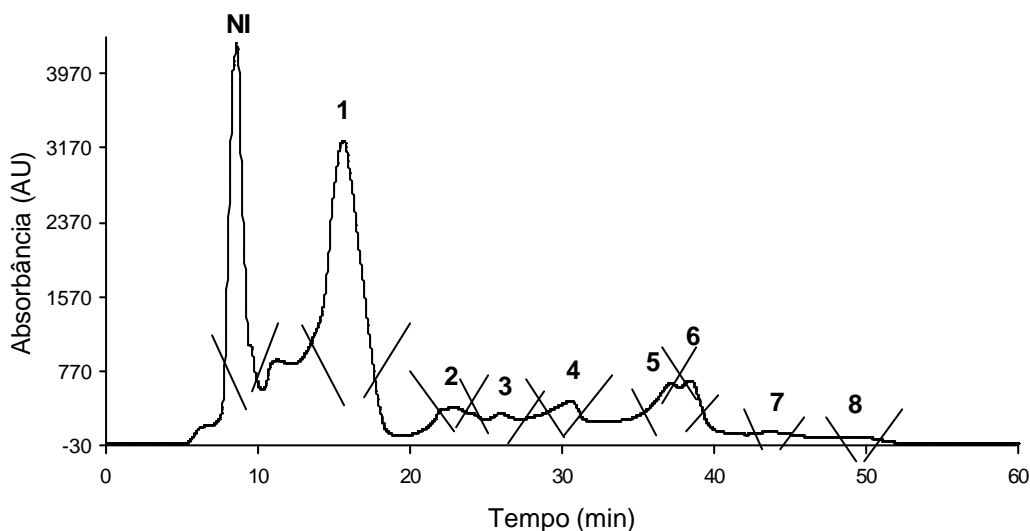
A fração **P-OS-A** foi inicialmente analisada por CLAE analítica (Figura 46), para avaliar o seu perfil e definir os parâmetros cromatográficos a serem utilizados na CLAE semipreparativa.



NI= não identificado

Figura 46 - Perfil cromatográfico da fração **P-OS-A**. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo 1 mL min^{-1} detecção a $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Após a análise do extrato em coluna analítica, partiu-se inicialmente para separação dos constituintes presentes na amostra, em coluna semipreparativa de fase reversa C18 (250 mm X 20 mm X $5 \mu\text{m}$ de tamanho de partícula), fase móvel metanol-água (75:25), porém com velocidade de fluxo de 5 mL min^{-1} e o monitoramento realizado a $\lambda = 254 \text{ nm}$. O processo de isolamentos dos picos da fração **P-OS-A** foi realizado através de sucessivas injeções de 1 mL da amostra solubilizada em metanol grau espectroscópico, onde foram obtidas nove frações como indicado na Figura 47. No cromatograma abaixo estão indicadas as áreas dos picos das frações que foram recolhidas durante o processo de isolamento. Algumas frações foram novamente fracionadas para obtenção de um maior grau de pureza.



NI= não identificado

Figura 47 - Perfil cromatográfico da fração **P-OS-A**; Coluna semipreparativa C-18 (25cm x20mm x 5 μ m); metanol-água (75:25); fluxo 5 mL min⁻¹; detecção a 254 nm.

Após o isolamento das frações por CLAE semipreparativo, o metanol presente foi evaporado no evaporador rotatório à temperatura ambiente, e em seguida a fase aquosa foi congelada e liofilizada. As amostras liofilizadas resultaram em um pó fino de coloração amarela e suas quantidades estão relacionadas na Tabela 8.

Em seguida, as amostras foram solubilizadas em metanol grau espectroscópico, analisadas novamente por CLAE analítico acoplada a um detector de arranjo de fotodiodo, para avaliar sua pureza, e em seguida foram submetidas as análises espectroscópicas (RMN ¹H e ¹³C) para auxiliar na sua determinação estrutural.

Os seus perfis cromatográficos também foram comparados com os das frações isoladas do extrato metanólico de outro espécime de *Ouratea semiserrata* (que será discutido adiante). As frações com os perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas para obtenção de maior massa e analisadas por métodos espectrométricos (RMN ¹H e ¹³C) para determinação estrutural das mesmas.

Tabela 8 - Tempo de retenção (t_r) e quantidades das frações isoladas de **P-OS-A** por CLAE semipreparativa.

Pico	t_r (minutos) semipreparativa	t_r (minutos) analítica	Código	Quantidade (mg)
NI	7,75-9,68	-	NI	107,1
1	13,30-17,8	4,55	OS-A-1	85,1
2	21,50-23,9	5,65	OS-A-2	1,5
3	24,0-27,35	6,67	OS-A-3	6,1
4	28,7-31,6	7,30	OS-A-4	3,5
5	35,9-37,6	7,45	OS-A-5	2,5
6	38,1-39,6	8,70	OS-A-6	5,0
7	42,0-45,8	9,50	OS-A-7	1,8
8	47,3-51,8	17,0	OS-A-8	0,5

NI= pico não identificado

5.4.1 Determinação estrutural das frações isoladas de P-OS-A

As frações codificadas como **OS-A-2**, **OS-A-4**, **OS-A-6** e **OS-A-8** (Tabela 8) foram analisadas por CLAE-DAD, utilizando como fase móvel metanol-água-ácido acético (74:25:1) e indicaram tempo de retenção em 5,65; 7,30, 8,70 e 17,0 minutos, respectivamente (Figura 48) e os espectros de UV indicaram máximos de absorção em λ_{max} 236, 269 e 336 nm (Figura 49). A comparação dos perfis cromatográficos destas frações com os dos padrões de bisflavonóides, nas mesmas condições cromatográficas, apresentaram-se diferentes, mas foram observados máximos de absorção idênticos aos dos padrões. Isto permitiu sugerir que são substâncias da classe dos bisflavonóides. Devido a pequena quantidade e/ou grau de impureza não foi possível realizar análises espectrométricas e a determinação estrutural das mesmas.

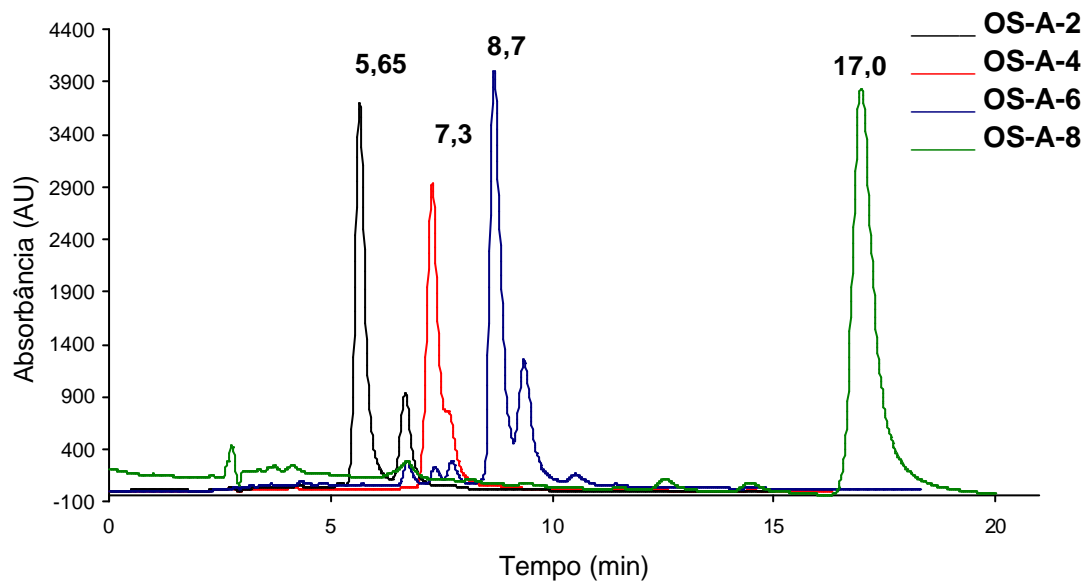


Figura 48 - Sobreposição dos cromatogramas das frações **OS-A-2**, **OS-A-4**, **OSA-6** e **OS-A-8**. Coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min⁻¹; detecção em 254 nm.

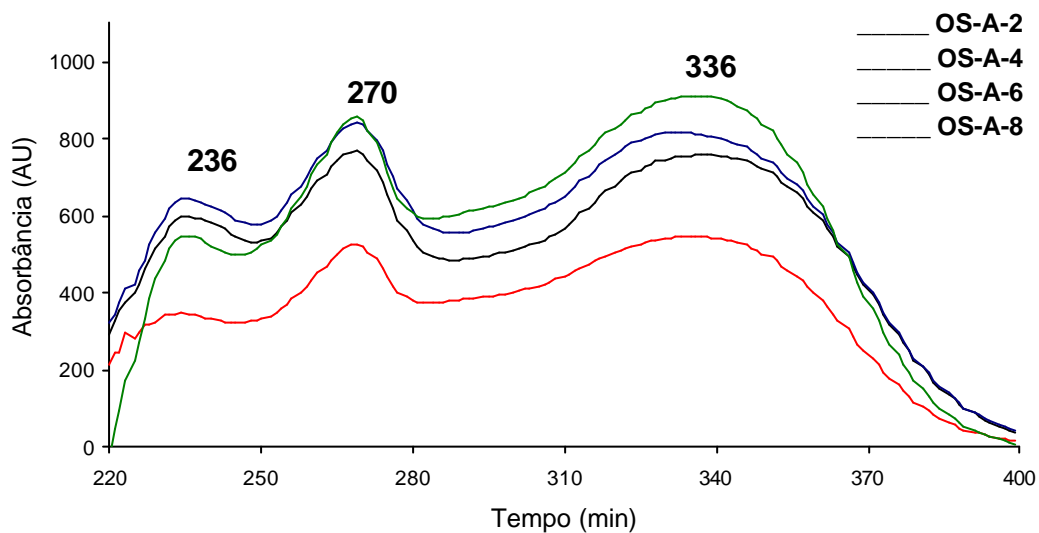


Figura 49 - Espectros de absorção no UV da fração **OS-A-2**, **OS-A-4**, **OSA-6** e **OS-A-8**. Realizado em metanol-água- ácido acético (74:25:1).

As frações **OS-A-1**, **OS-A-3** (Tabela 8) foram comparadas, através do tempo de retenção e do espectro de UV, com as frações **OS-B-1** e **OS-B-3** (Tabela 12, pg.110) isoladas de **P-OS-B** (discutidas adiante). A análise por CLAE mostrou-se semelhança entre as frações **OS-A-1** e **OS-B-1** e entre **OS-A-3** e **OS-B-3** e estas foram reunidas para obtenção de maior massa para facilitar a determinação estrutural. As frações reunidas foram codificadas como **OS-1** e **OS-3** para melhor compreensão.

A fração **OS-1** foi caracterizada por métodos espectrométricos (RMN ^1H e IV) e por CLAE acoplada a um detector de arranjo fotodiodo, além da preparação de derivado metilado que auxiliou na confirmação da proposta estrutural da substância natural.

A análise do espectro na região do IV (Figura 50) para a substância **OS-1** revelou absorção em $\nu_{\text{O-H}}$ $3420,4\text{ cm}^{-1}$, correspondente ao estiramento de hidroxila e em $\nu_{\text{O-H}}$ $1653,6\text{ cm}^{-1}$, correspondente ao estiramento de carbonila quelada e conjugada. As absorções em $1609,8$; $1500,9$ e $1426,15\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas a deformação axial $\nu_{\text{C=C}}$ de aromático e em a deformação $1242,6\text{ cm}^{-1}$ de deformação de $\nu_{\text{C-O}}$ de fenol.

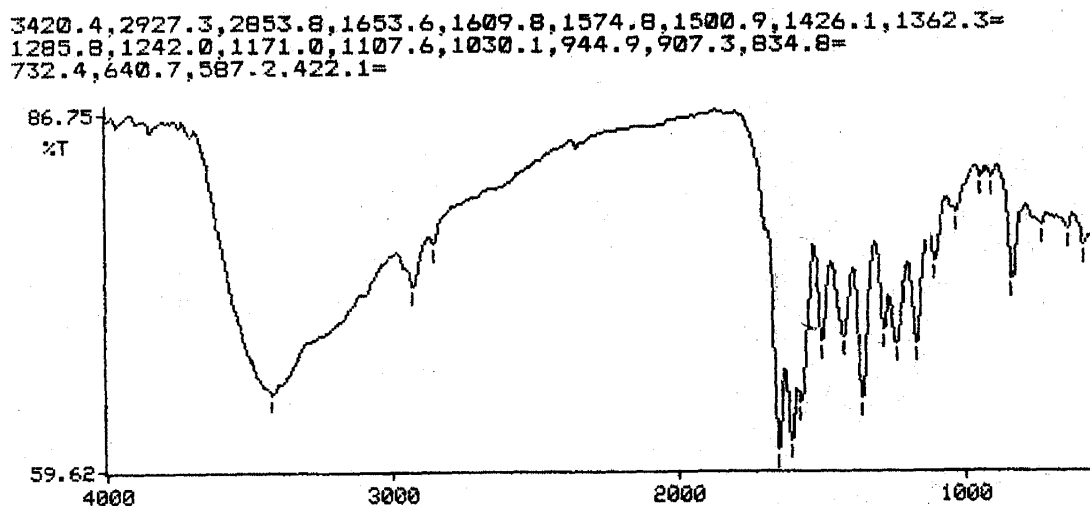


Figura 50 - Espectro de IV da substância **OS-1**.

A análise por CLAE da substância **OS-1** realizada em metanol-água-ácido acético (74:25:1) indicou tempo de retenção de 4,56 minutos (Figura 51) e máximos de absorção no ultravioleta em 234, 270 e 333 nm (Figura 52). O perfil cromatográfico de **OS-1** quando

comparado com a do padrão amentoflavona, nas mesmas condições cromatográficas, mostrou-se idêntico, sugerindo ser a mesma substância. Isto veio a corroborar o estudo de monitoramento de *Ouratea semiserrata* por CLAE, realizada pela doutoranda Juliana Feijó Daniel (2004).

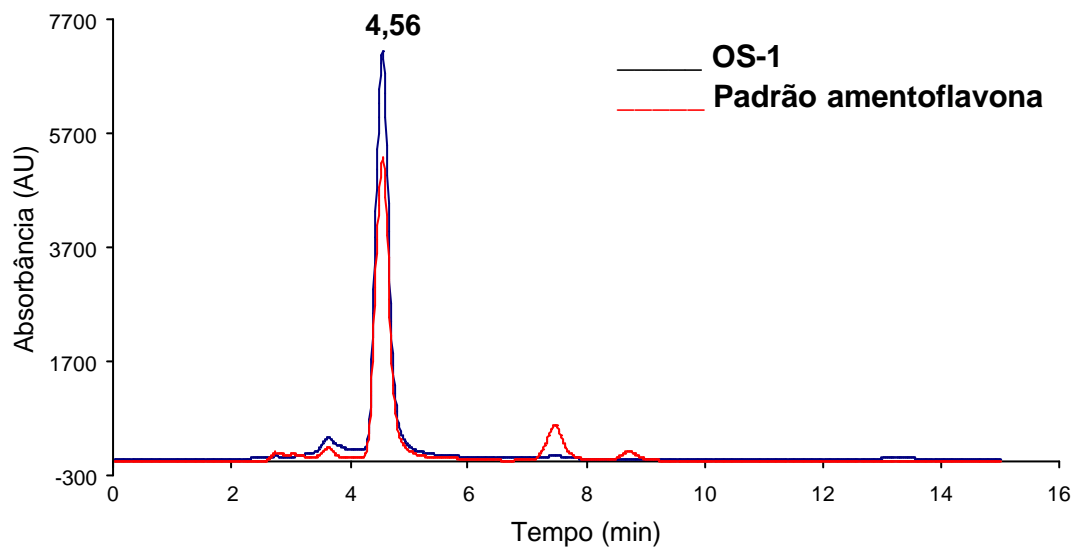


Figura 51 - Comparação dos cromatogramas da fração **OS-1** e padrão amentoflavona. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min⁻¹; detecção em 254 nm.

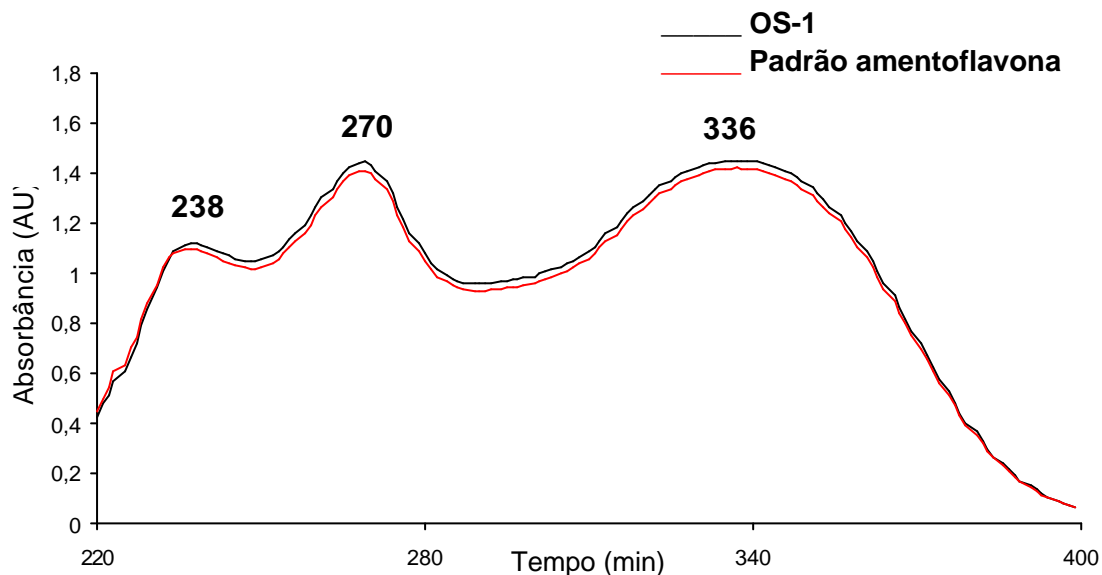


Figura 52 - Espectros de absorção no UV da substância OS-1 e do padrão amentoflavona.

As análises dos espectros de RMN ^1H (Figuras 53 e 54) permitiram perceber dois singletos em campo baixo ($\delta_{\text{H}} 13,10$ e $12,97$ ppm), correspondentes aos hidrogênios dos grupos hidroxilas localizados no átomo de carbono C-5 envolvidos na ligação de hidrogênio com o grupo carbonila no C-4. Na região de deslocamento químico dos hidrogênios aromáticos foram observados dois sinais para hidrogênios no anel A de flavona, com acoplamento *meta* $\delta_{\text{H}} 6,17$ (*d*, $J=1,88$ Hz, H-6) e $6,44$ (*d*, $J=1,88$ Hz, H-8); indicando que as posições 5,7 são oxigenadas nesta unidade de flavonóide. Os deslocamentos químicos, a multiplicidade e os valores das constantes de acoplamento (J) dos sinais em $\delta_{\text{H}}: 8,0-7,9$ (*m*, H-6'), $8,0-7,9$ (*m*, H-2') e $7,12$ (*d*, $J=8$ Hz, H-5') permitiram reconhecer a presença de átomos de hidrogênio formando um sistema ABC compatível com anel aromático trissubstituído; podendo constituir o anel **B** de flavonóides com substituições nas posições 3' e 4'.

A comparação destes valores com os deslocamentos químicos dos hidrogênios do anel **B** de modelos da literatura (VELANDIA *et al*, 2002) (OLIVEIRA *et al*, 2002) (Figura 55) permitiram propor o sistema de ligação entre as unidades como na amentoflavona.

Considerando como amentoflavona, o outro anel **B** da estrutura flavonoídica foi caracterizado como um sistema AA'BB', representado pelo par de dubletos em $\delta_{\text{H}} 7,56$ (*d*;

$J=8,8$ Hz; H-2''',6''') e 6,69 (d ; $J= 8,8$ Hz; 3'''/5'''), acoplando entre si. Além dos sinais citados acima, o espectro de RMN ^1H mostra dois singletos em δ_{H} 6,82 (s , H-3'') e 6,78 (s , H-3) confirmando a presença de duas unidades flavônicas. Esta proposta foi confirmada pelo singlete em δ_{H} 6,36 (s , H-6''), o que justifica a ligação 3'-8'' entre as unidades (VELANDIA *et al*, 2002).

Os dados citados acima indicam que os deslocamentos encontrados para a substância **OS-1** foram compatíveis com os deslocamentos químicos da amentoflavona. Na Tabela 9 estão listadas as atribuições dos deslocamentos químicos de **OS-1** comparados com os deslocamentos químicos da amentoflavona, isolada de *Ouratea semiserrata* por métodos tradicionais no ano de 1997 (VELANDIA *et a.*, 2002).

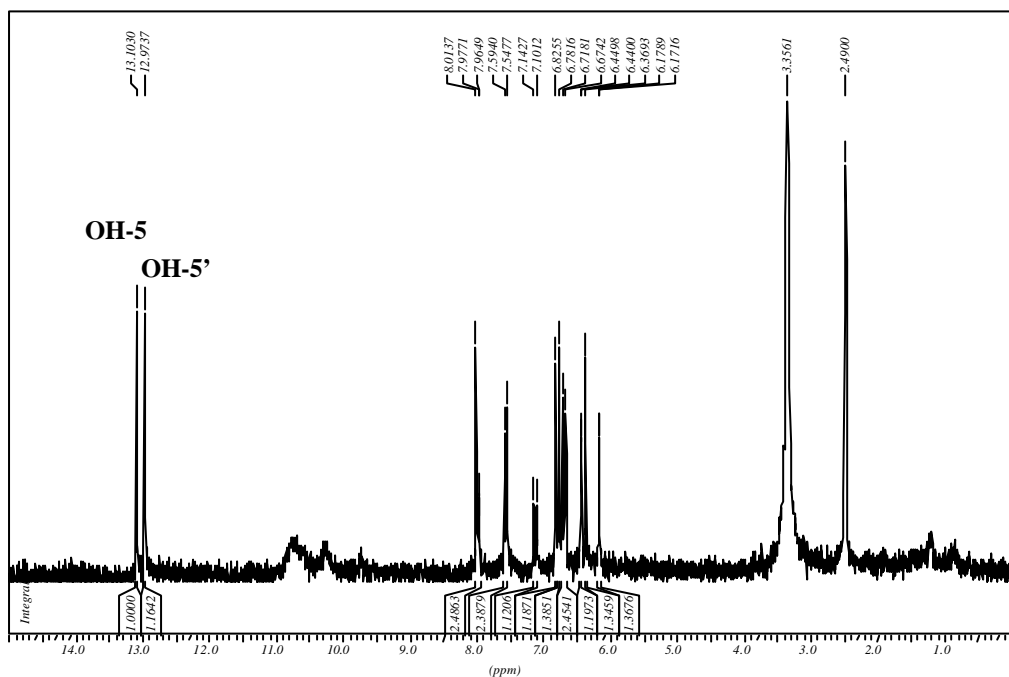


Figura 53 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO- D_6) da substância **OS-1**.

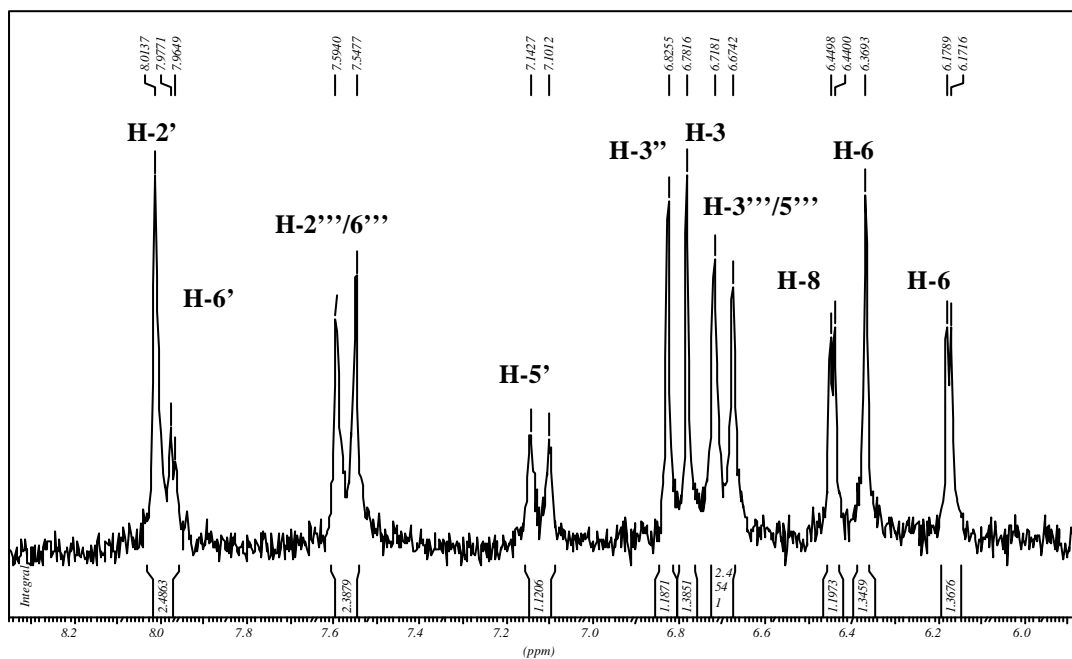


Figura 54 - Expansão da região entre 5,8 a 8,2 ppm do espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO-D_6) da substância **OS-1**.

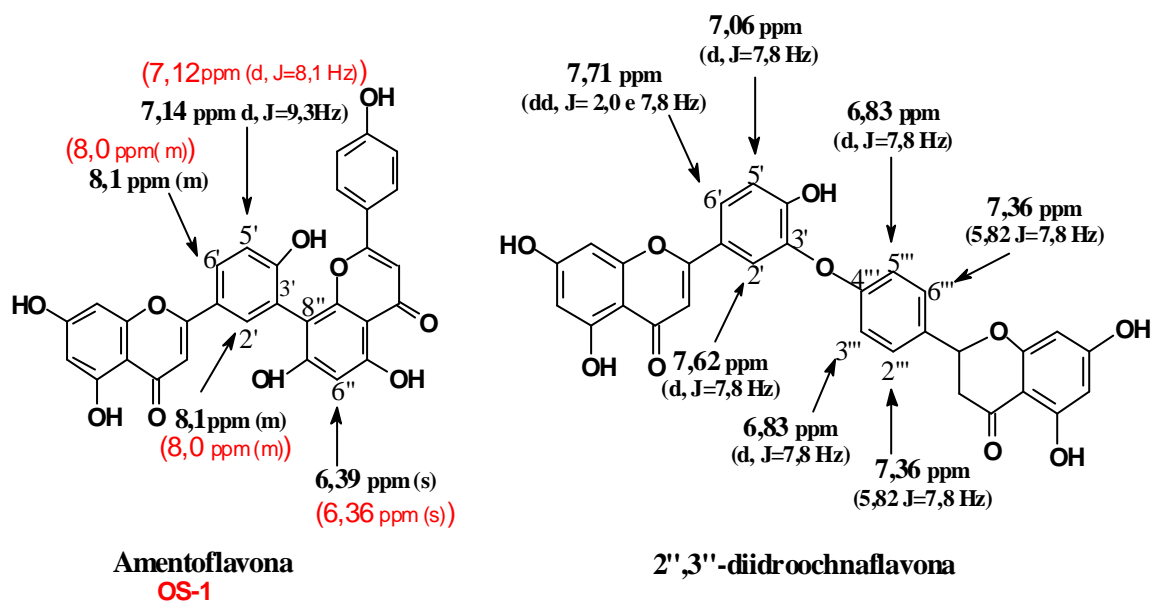
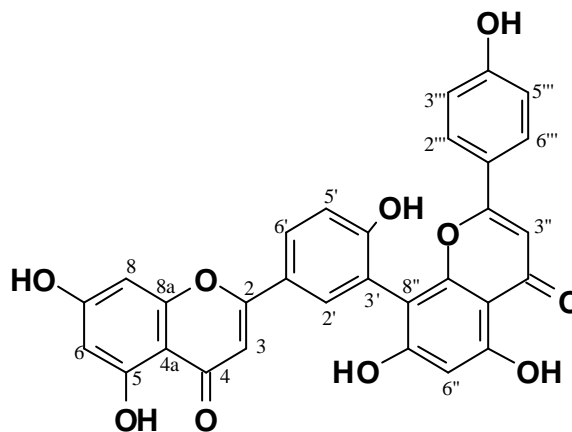


Figura 55 - Comparação dos deslocamentos químicos entre **OS-1** e dados da literatura de amentoflavona e 2'',3''-dihydrochnaflavona

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H da substância **OS-1** comparado com os dados da literatura do padrão amentoflavona (VELANDIA *et al.*, 2002).

C	δ H OS-1	δ H Amentoflavona
3	6,78 (s)	6,79 (s)
6	6,17 (d, $J=1,88$ Hz).	6,18 (d, $J=2$, Hz).
8	6,44 (d, $J=1,88$ Hz)	6,46 (d, $J=2$, Hz)
2'	8,0-7,9 (m)	8,1-7,9 (m)
5'	7,12 (d, $J= 8,12$ Hz)	7,14 (d, $J= 9,3$ Hz)
6'	8,0-7,9 (m)	8,1-7,9 (m)
3''	6,82 (s)	6,84 (s)
6''	6,36 (s)	6,39 (s)
2''', 6'''	7,56 (d, $J=8,8$ Hz)	7,57 (d, $J=8,6$ Hz)
3''', 5'''	6,69 (d, $J=8,8$ Hz)	6,71 (d, $J=8,7$ Hz)
HO-5	12,97 (s)	12,97 (s)
HO-5'	13,10 (s)	13,10 (s)



OS-1

A substância **OS-1** foi metilada com diazometano obtendo a substância **OS-1m** que permitiu confirmar a estrutura através dos deslocamentos químicos dos sinais no espectro de RMN ^1H e com irradiação na frequência dos grupos metoxilas. Isto permite inclusive, confirmar a posição da ligação entre os monômeros.

O espectro de RMN ^1H (Figura 56) do derivado **OS-1m** permite observar dois sinais de hidroxila em campo baixo a δ_{H} 13,1 e 12,79, confirmando a presença de duas

hidroxilas queladas e quatro sinais de metoxilas em δ_H 3,78; 3,80; 3,83 e 3,86 que foram incorporadas na hidroxilas nas posições 4', 4'', 7 e 7''.

As posições das metoxilas foram confirmadas através do efeito nuclear Overhauser (NOE) (Figura 57, a, b, c, d). A irradiação nos hidrogênios da metoxila em δ_H 3,78 (Figura 57 a) gerou NOE nos hidrogênios aromáticos H-3''' e H-5''' (δ_H 6,82), confirmando sua localização no carbono 4'''. As irradiações nas frequências dos grupos metoxilas em δ_H 3,80 (Figura 57 b) gerou NOE no hidrogênio H-5' (δ_H 7,16), em δ_H 3,83 (Figura 57 c) gerou NOE nos hidrogênios H-6 e H-8 (δ_H 6,35 e 6,43) e em δ_H 3,86 (Figura 57d) gerou NOE no hidrogênio H-6'' (δ_H 6,53), confirmando as posições das metoxilas respectivamente em 4', 4 e 7''.

O experimento NOEDIFF do derivado **OS-1m** permitiu também confirmar a conexão entre as unidades em C-3' e C-8'', através da irradiação na metoxila MeO-4', que gerou NOE apenas no duplete δ_H 7,17 (H-5') e não apresentou NOE no hidrogênio em δ_H 8,0 (H-2'). A irradiação na metoxila MeO-7'', gerou NOE apenas ,no singlete em δ_H 6,53 (H-6''), confirmando assim, que as unidades flavônicas estão ligadas pelos carbonos C-3' e C-8''.

As análises espectrométricas de RMN 1H , da substância natural e do respectivo derivado metilado, e de CLAE aliada a comparação com os dados da literatura permitiu propor a estrutura da **OS-1** como 5,4',7-triidroxiflavona-(3'-8'')-5,4',7'''-triidroxiflavona denominada como amentoflavona.

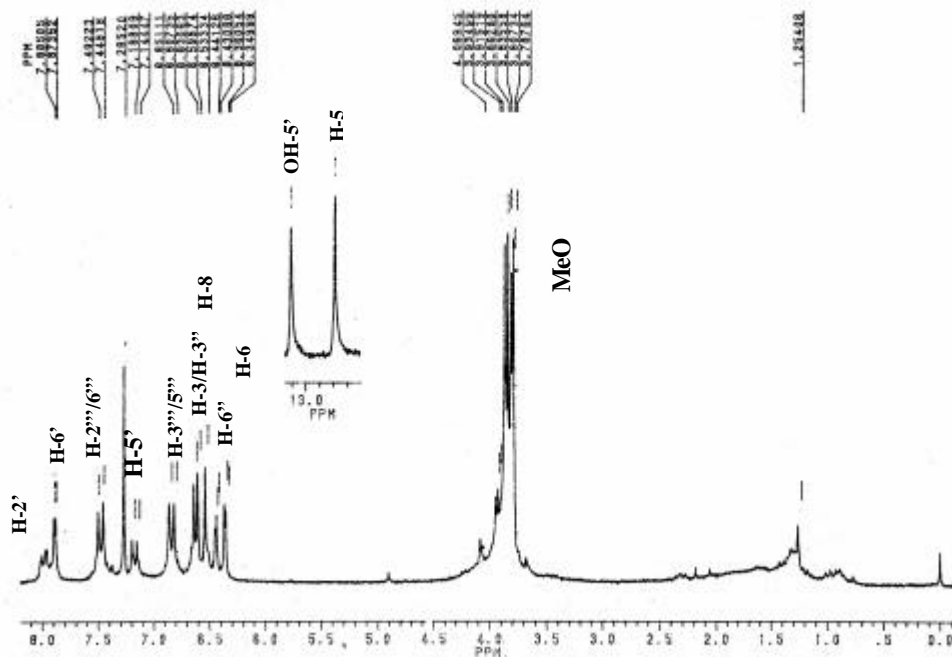
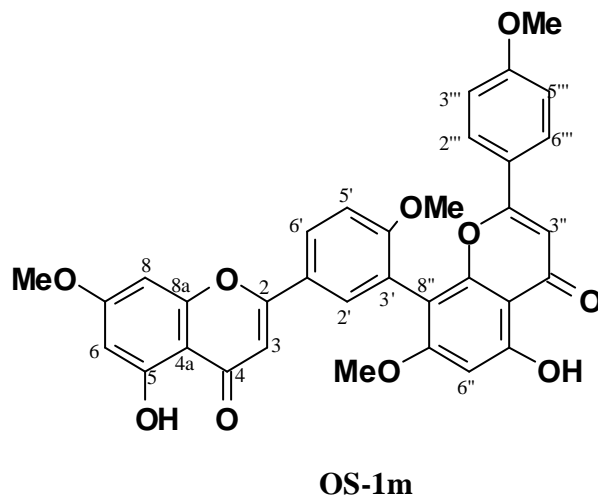


Figura 56 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do derivado OS-1m.



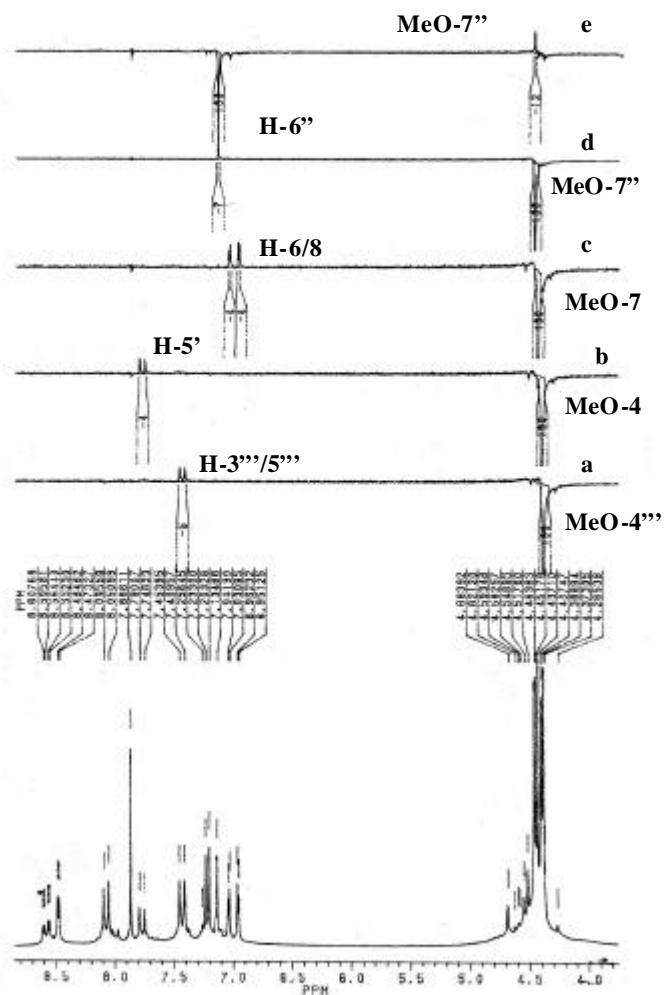
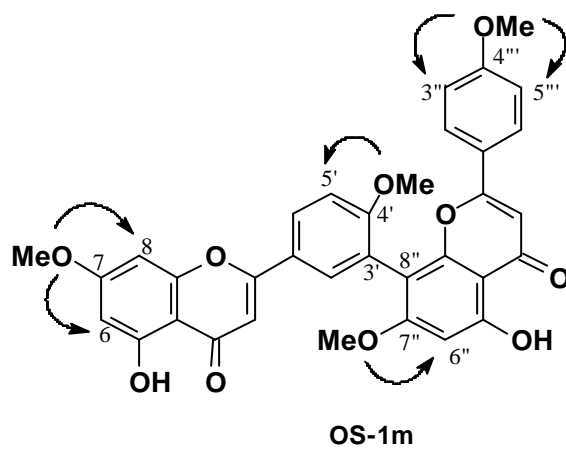


Figura 57 - Espectro resultante da dupla irradiação e subtração (NOE) do derivado metilado **OS-1m** em CDCl_3 .



A fração **OS-3** também foi caracterizada através das análises por CLAE-DAD e RMN ^1H e ^{13}C .

A análise por CLAE acoplada a um detector de arranjo fotodiodo, realizada em metanol-água-ácido acético (74:25:1) indicou, tempo de retenção em 6,67 minutos (Figura 58) com ultravioleta com máximos de absorção em 234, 269 e 336 nm (Figura 59). Esta substância teve o seu perfil cromatográfico comparado com aqueles padrões de bisflavonóides. A substância **OS-3** não mostrou-se compatível com nenhum dos padrões estudados. Mas, entretanto, os máximos de absorção no UV sugerem a presença de bisflavonóides que apresentam ligação flavonas entre os anéis **A** e **B**.

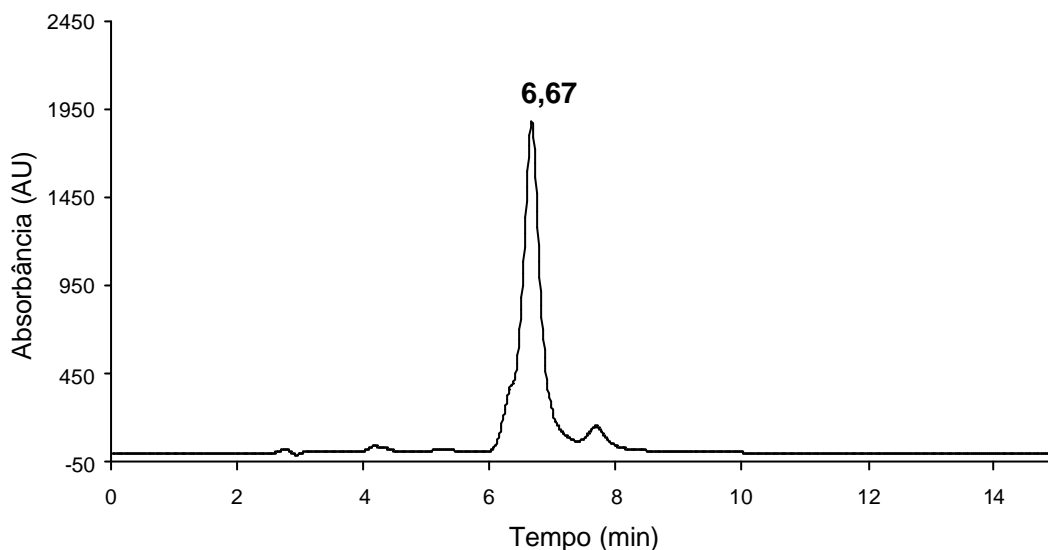


Figura 58 - Perfil cromatográfico da substância **OS-3**. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min $^{-1}$, λ 254 nm.

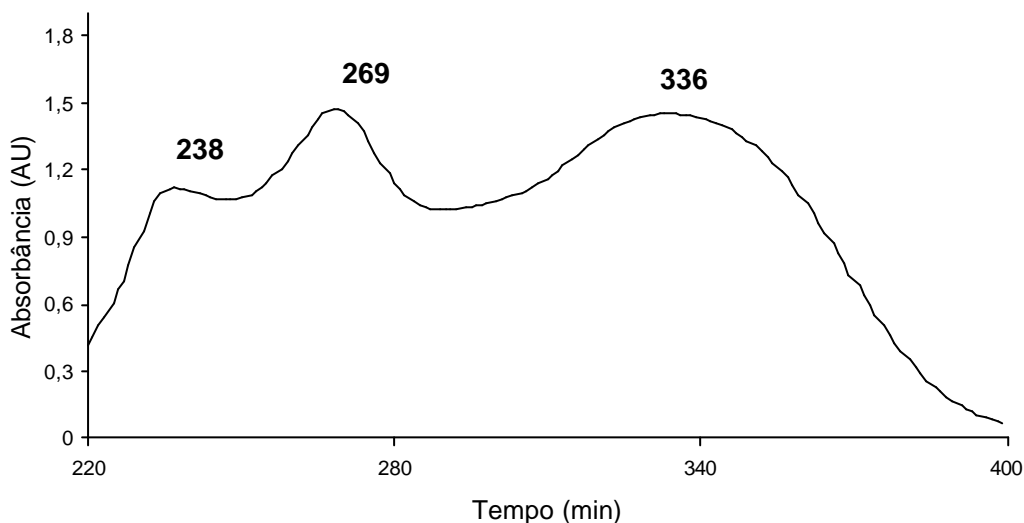


Figura 59 - Espectro de absorção no UV da fração **OS-3** em metanol-água-ácido acético (74:25:1).

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 60 e 61) nos auxiliou na caracterização da fração **OS-3**, além dos singletos em campo baixo em $\delta_{\text{H}} 13,07$ e $13,16$ ppm, observou-se sinais de hidrogênios aromáticos em $\delta_{\text{H}} 7,88$ (*d*, $J=3,1$ Hz, H-6'), $8,20$ (*sl*, H-2') e $6,89$ (*d*, $J=3,6$ Hz, H-5'), compatíveis com sistema ABC e em $\delta_{\text{H}} 7,78$ (*d*, $J=4,4$ Hz, H-2'''-6''') e $6,71$ (*d*, $J=4,4$ Hz, 3'''-5''') do sistema AA'BB', e dos sinais em $\delta_{\text{H}} 6,02$ (*sl*, H-6) e $6,18$ (*sl*, H-8) do anel A (5,7-dioxigenado) e três sinais simples em $\delta_{\text{H}} 6,79$ (*s*, H-3''), $6,75$ (*s*, H-3) e em $\delta_{\text{H}} 6,13$ (*s*, H-6''). Os deslocamentos químicos destes hidrogênios são semelhantes aos de amentoflavona. A diferença no deslocamento do hidrogênio H6'', em relação a amentoflavona, sugere a presença de um grupo metoxila ligado na posição 4'''.

Os espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplado e APT (Fig. 62) apresentam, entre outros sinais, os deslocamentos químicos em $98,5$, $95,9$ e $93,8$ ppm dos anéis **A** de flavonas. Estes valores foram comparados com os relacionados para os diferentes padrões de ligação envolvendo os anéis **B** e **A** (Figura 63) (CHARI *et al*, 1977). Esta comparação permitiu sugerir a estrutura da robustaflavona para **OS-3**. A baixa resolução e os sinais adicionais do espectro de RMN ^1H não permitiram ter garantia desta proposta. Se considerar o sinal em $3,59$ ppm, com intensidade compatível para metoxila, e o valor de

114,0 ppm para o carbono 4'', pode-se sugerir a 4''-metil-robustaflavona como componente de OS-3.

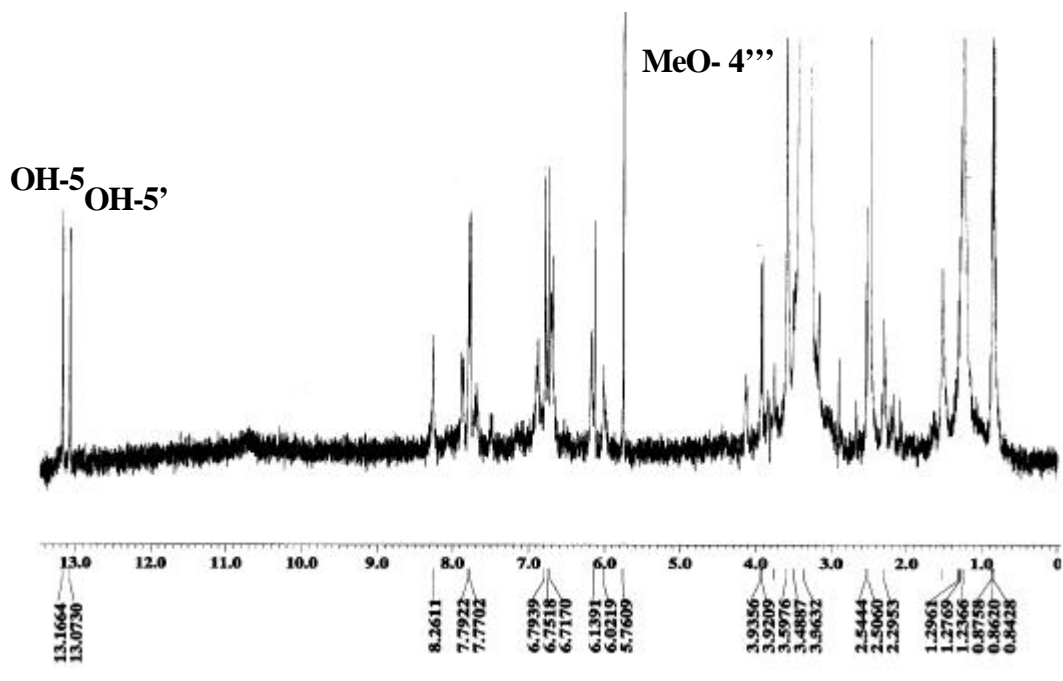
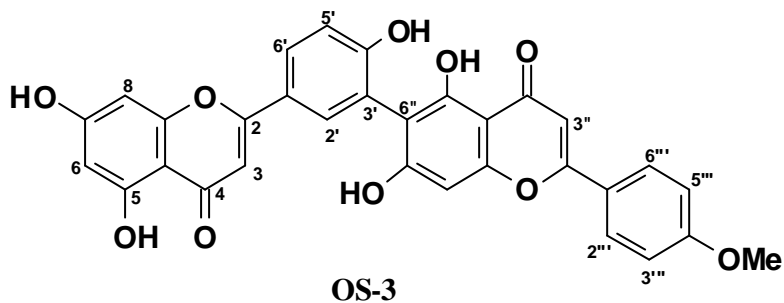


Figura 60 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) de OS-3.



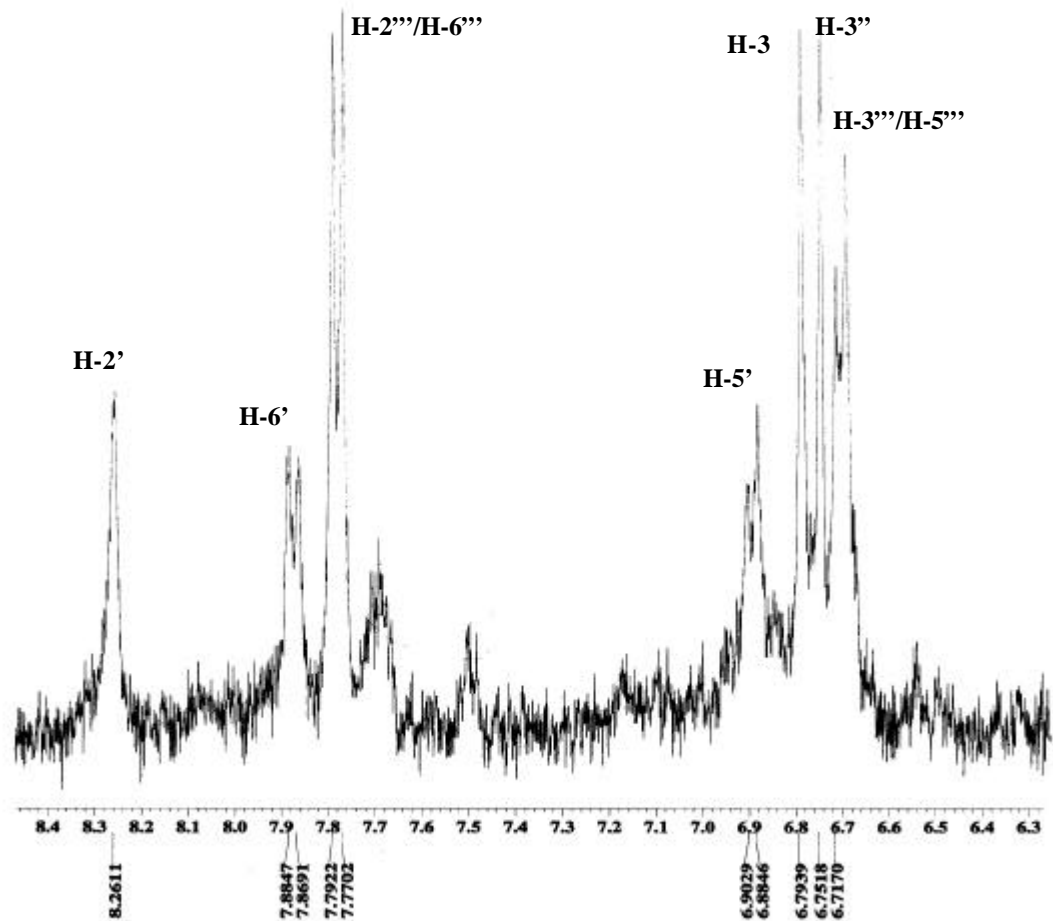
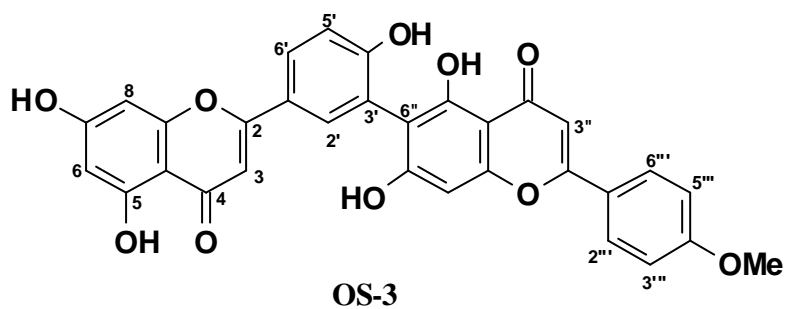


Figura 61 - Expansão da região entre 6,3 a 8,5 ppm do espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) de OS-3.



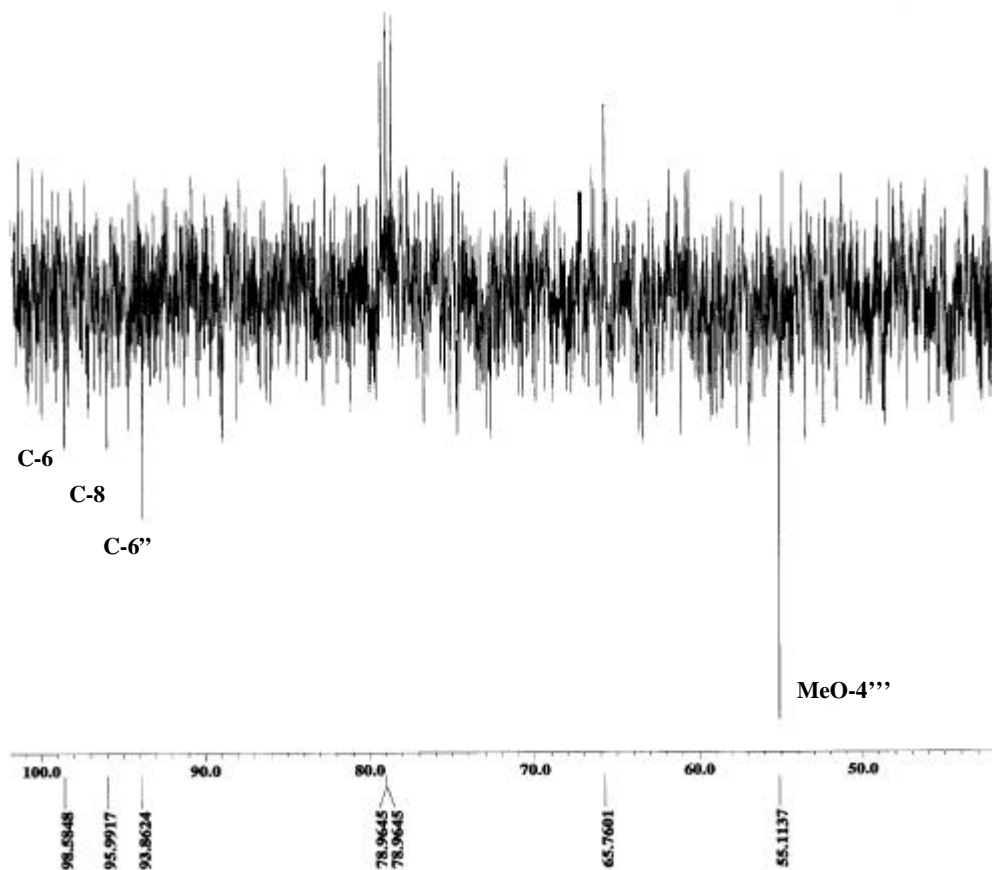
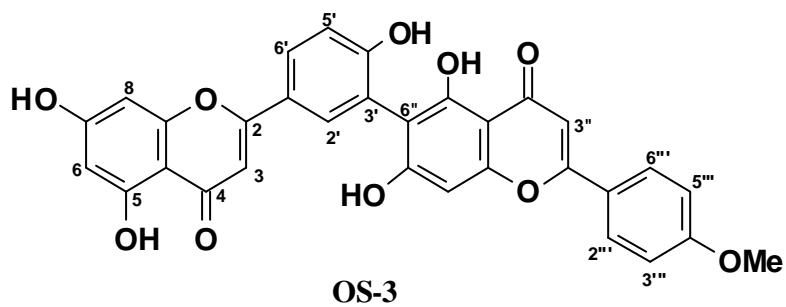


Figura 62 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-D_6) da substância OS-3, expandido na região de 90 a 100 ppm.



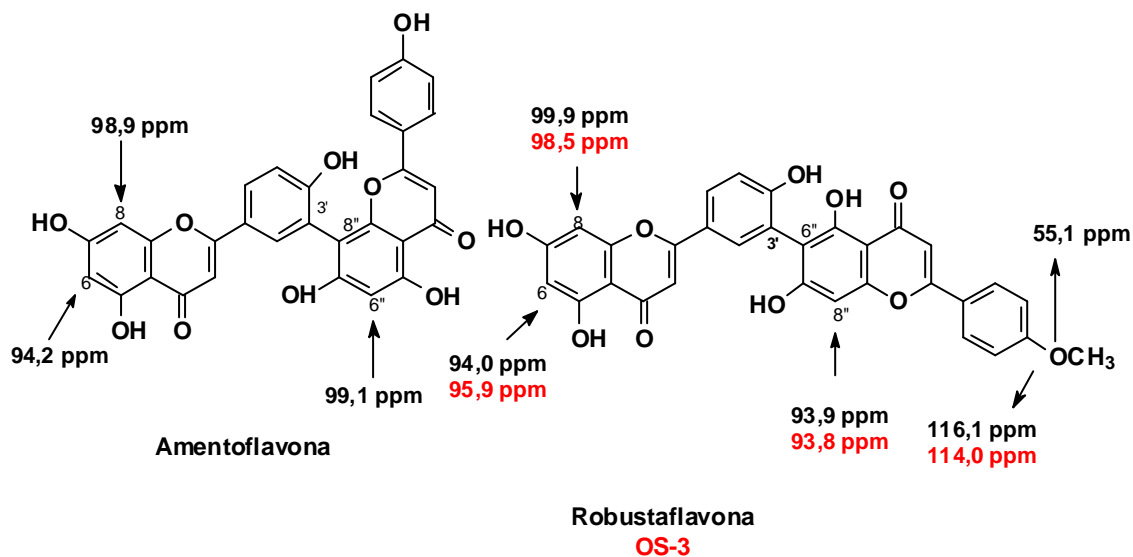


Figura 63 - Correlação de sinais de deslocamento químico de **OS-3**, amentoflavona e robustaflavona na região de 90pp a 115 ppm

A fração **OS-A-5** foi submetida a análises por CLAE-DAD e RMN ¹H para nos auxiliar na caracterização da mesma.

A análise do tempo de retenção e espectro de UV, comparado com o padrão podocarpusflavona A, realizada em metanol:água-ácido acético (74:25:1), indicou que estes possuem tempo de retenção idênticos em 7,45 minutos (Figura 64) e os máximos de absorção também (λ_{\max} 234, 269 e 333 nm) (Figura 65), esta análise sugere a possível presença de podocarpusflavona A.

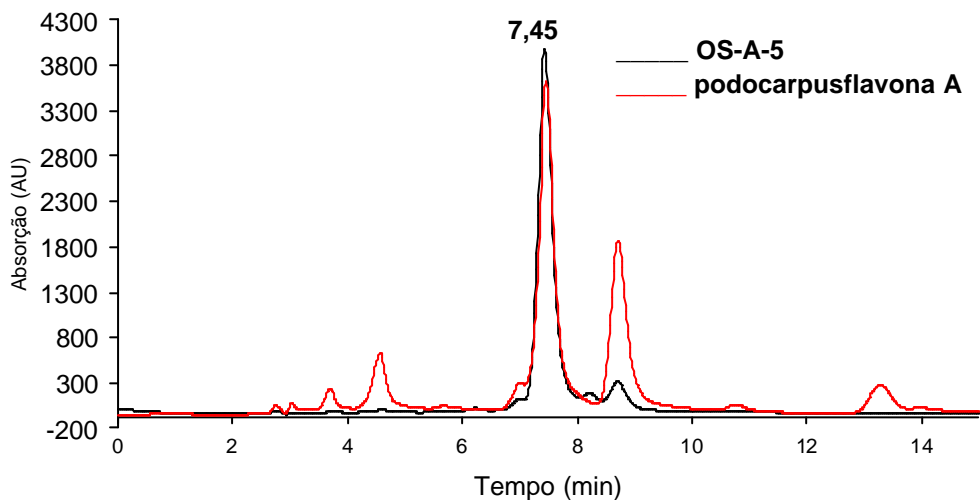


Figura 64 - Perfil cromatográfico da substância **OS-A-5** e podocarpusflavona A; Coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo 1 mL min⁻¹; detecção em 254 nm

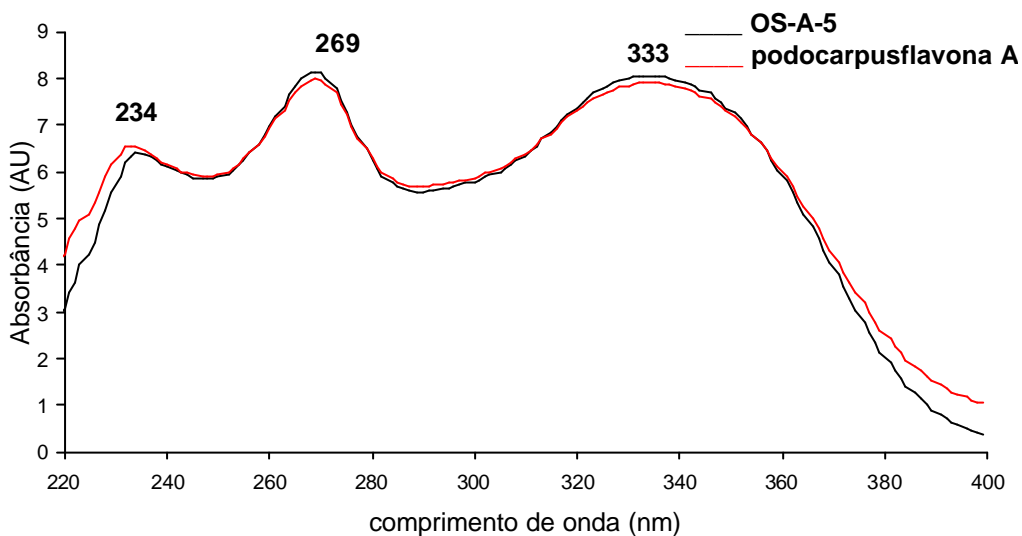


Figura 65 - Espectros de absorção no UV da substância **OS-A-5** e podocarpusflavona A. Realizado em metanol-água-ácido acético (74:25:1).

As análises dos espectros de RMN ¹H (Figuras 66 e 67) permitiu verificar a presença de duas unidades flavônicas indicados pelos deslocamentos químicos dos H-3 (s, 6,81 ppm) e H-3'' (s, 6,87 ppm), além de dois sistemas distintos de substituição para anel A,

confirmado pelos hidrogênios em δ_H 6,17 (*d*, $J= 1,1$ Hz, H-6), δ_H 6,38 (*sl*, H-8) para o primeiro sistema e em δ_H 6,30 (*s*, H-6'') para o segundo sistema e também verificou-se sistemas AA'BB' e ABC indicados pelos hidrogênios em δ_H 7,56 (*d*; $J=8,8$ Hz; H-2''',6'''), 6,69 (*d*; $J= 8,8$ Hz; 3'''/5''') e em δ_H 7,98 (*d*, $J= 1,88$ Hz, H-6'), 8,05 (*sl*, H-2'), 7,12 (*d*, $J=4,4$ Hz, H-5') respectivamente.

A comparação destes e outros valores com os deslocamentos químicos dos hidrogênios dos anéis **A** e **B** de modelos da literatura, permitiu propor o sistema de ligação entre as unidades como nas amentoflavonas (Tabela 10) (VELANDIA, *et al* 2002)

O sinal simples em 3,71(3H) representa um grupo metoxila, sendo este não observado no deslocamento químico dos hidrogênios de amentoflavona, Esta informação nos levou à comparação deste deslocamento químico com os da literatura para podocarpusflavona A (VELANDIA, *et al* 2002) (Tabela 10), que se apresenta em δ_H 3,74 (3H) permitindo propor que o grupo metoxila se apresenta ligado na posição 4'''. A confirmação da posição do grupo metoxila será confirmado com a realização do experimento de RMN-NOESY.

Estas informações obtidas com análise espectrométrica de RMN 1H e de CLAE-DAD aliado a comparação com os dados da literatura permitiu propor a estrutura da **OS-A-5** como 5, 7, 4'- triidroxiflavona-(3'-8'')- 5'', 7''-diidroxí- 4'''-metoxiflavona, conhecida como podocarpusflavona A.

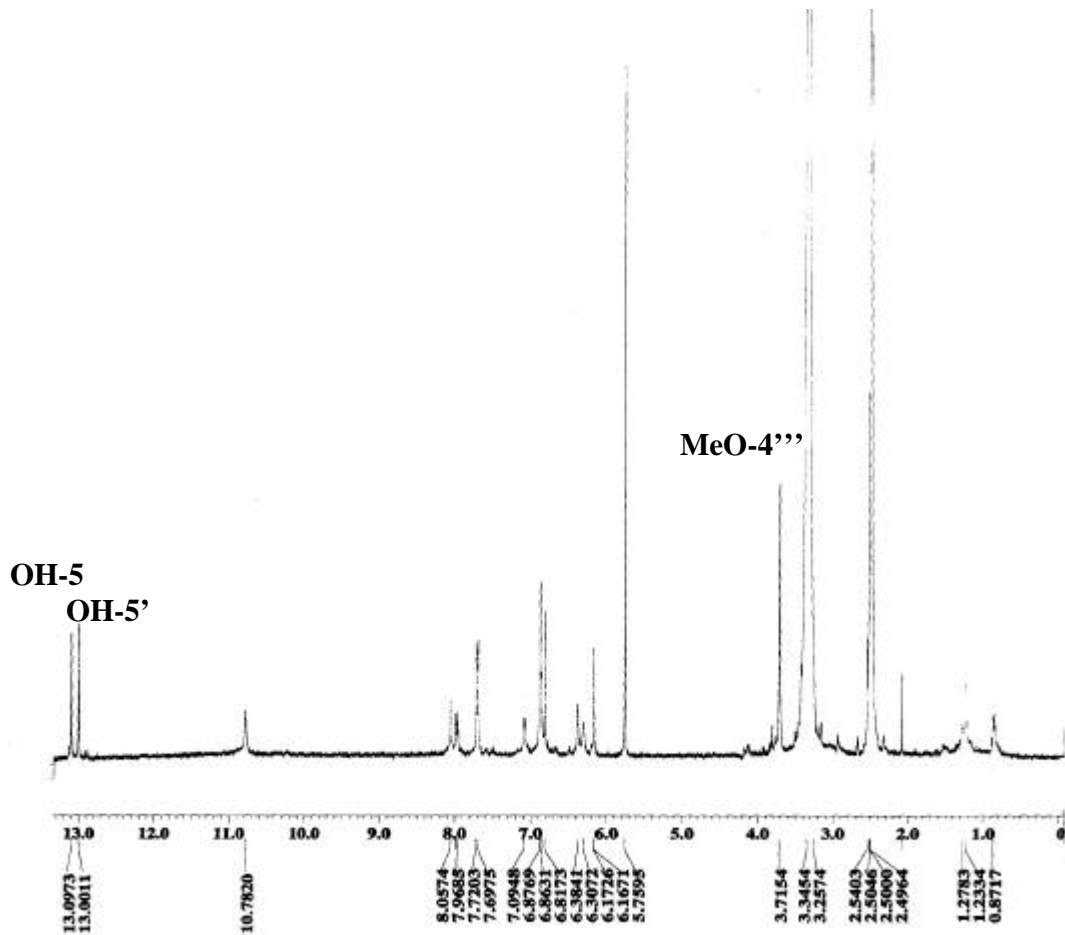
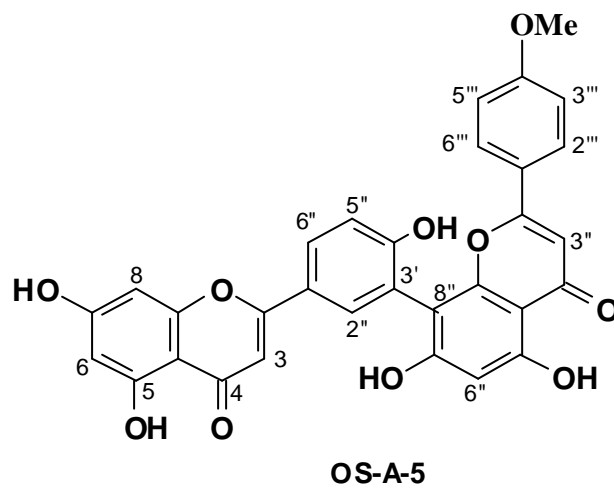


Figura 66 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) da substância OS-A-5



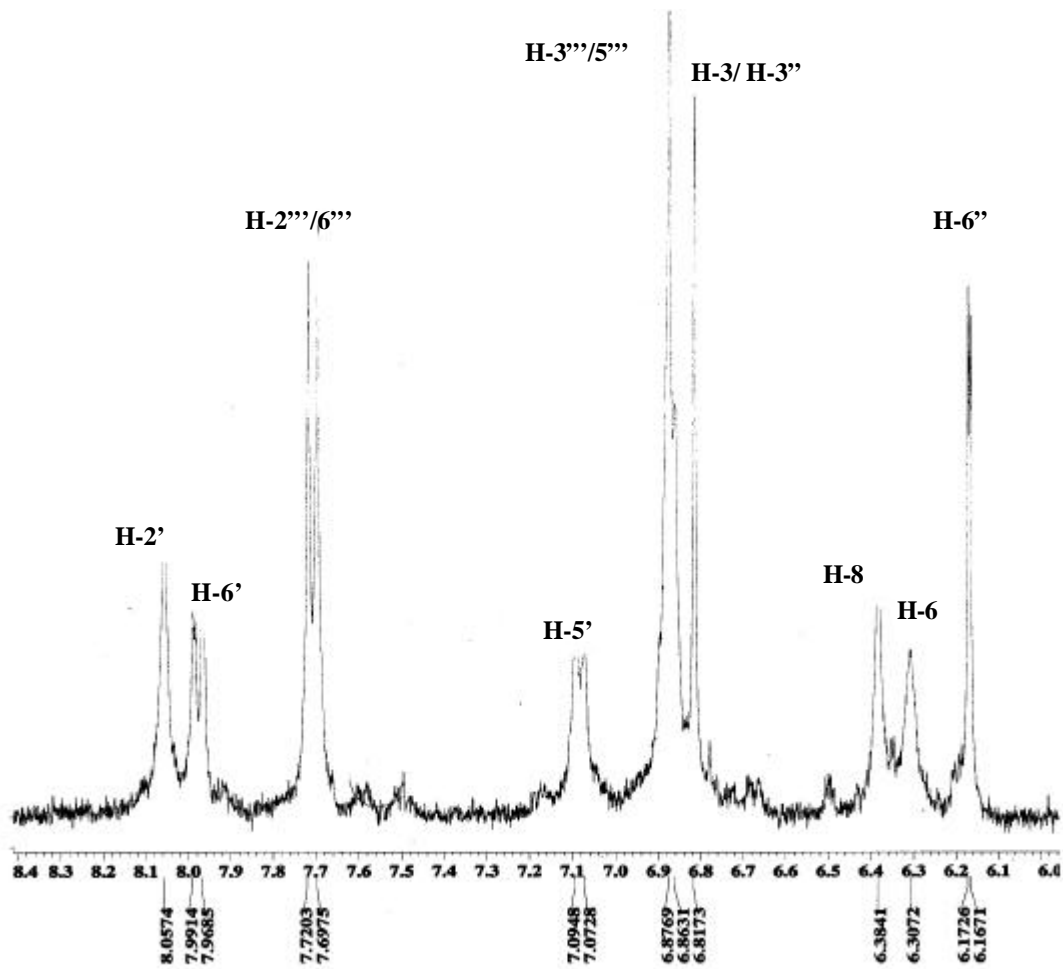


Figura 67 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) da substância OS-A-5, expandido em 8,4-6,0 ppm

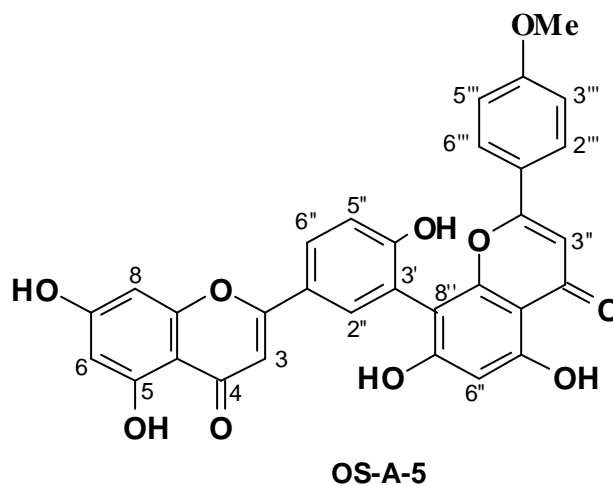
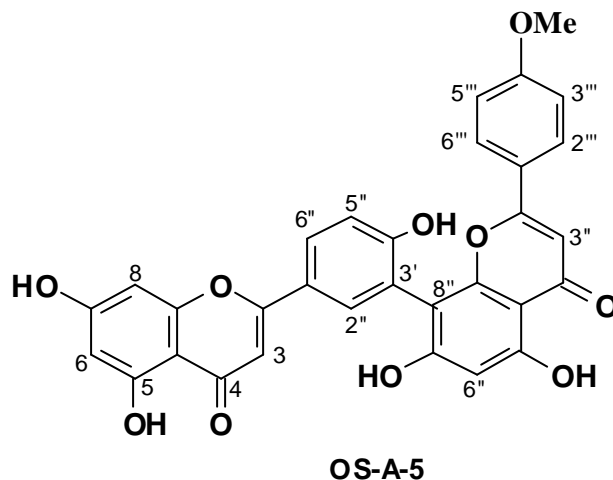


Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H de **OS-A-5** comparados com os dados da literatura amentoflavona e podocarpusflavona A (VELANDIA *et al.* 2002).

C	d H OS-A-5	d H Podocarpusflavona A	d H Amentoflavona
3	6,87 (s)	6,88 (s)	6,79 (s)
6	6,17 (d, $J=1,1$ Hz)	6,17 (d, $J=2$)	6,18 (d, $J=2$, Hz)
8	6,38 (sl)	6,44 (d, $J=2,0$ Hz)	6,46 (d, $J=2$, Hz)
2'	8,05 (sl)	8,1-7,9 9 (m)	8,1-7,9 (m)
5'	7,07 (d, $J= 4,4$ Hz)	7,14 (d, $J=8,8$ Hz)	7,14 (d, $J= 9,3$ Hz)
6'	7,98 (d, $J= 4,4$ Hz)	8,1-7,9 (m)	8,1-7,9 (m)
3''	6,81 (s)	6,82 (s)	6,84 (s)
6''	6,30 (s)	6,40 (s)	6,39 (s)
2''', 6'''	7,70 (d, $J=4,5$ Hz)	7,67 (d, $J=8,9$ Hz)	7,57 (d, $J=8,6$ Hz)
3''', 5'''	6,86 (sl)	6,91 (d, $J=8,9$ Hz)	6,71 (d, $J=8,7$)
MeOH-4'''	3,71	3,74	
HO-5	13,00 (s)	12,95 (s)	12,97 (s)
HO-5'	13,09 (s)	13,06 (s)	13,10 (s)



A substância **OS-A-7** foi caracterizada através de análises espectrométricas (RMN ^1H) e por CLAE acoplada a um detector de arranjo de fotodiodo. Nesta análise a substância **OS-A-7** foi analisada por CLAE usando metanol-água-ácido acético (74:25:1) como fase móvel, obtendo tempo de retenção de 9,50 minutos (Figura 68) e o espectro de UV indicou máximo de absorção em 238, 270 e 333 nm (Figura 69). Esta análise indicou que a fração **OS-A-7** possui perfil semelhante aos de bisflavonóides (flavona-flavona) ligados pelos anéis **A** e **B**.

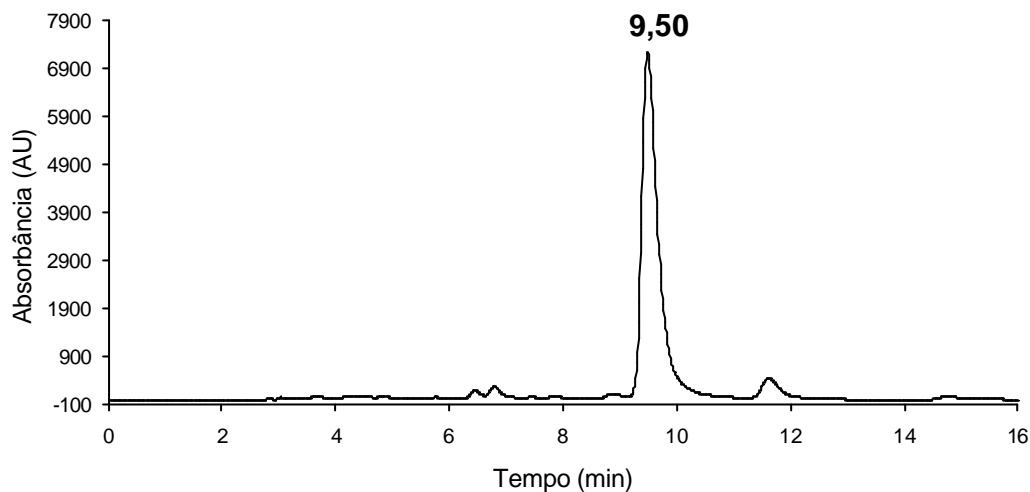


Figura 68 - Perfil cromatográfico da fração **OS-A-7**; Coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo 1 mL min^{-1} ; em 254 nm.

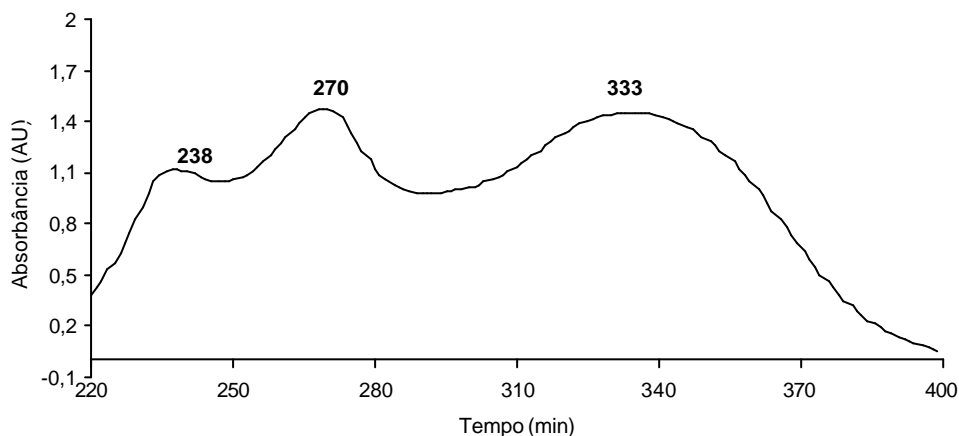


Figura 69 - Espectros de absorção no UV da fração **OS-A-7**. Realizado em metanol-água- ácido acético (74:25:1).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 70 e 71) da substância **OS-A-7**, permitiu observar dois singletos em campo baixo (δ_{H} 12,93 e 13,09 ppm), correspondentes aos hidrogênios dos grupos hidroxilas localizadas no átomo de carbono C-5 envolvidos em ligação de hidrogênio com o grupo carbonila no C-4. Os demais dados de RMN ^1H foram comparados com valores observados no espectro de **OS-1**. Estes valores estão relacionados na Tabela 11 e foram comprados com os dados da amentoflavona e, inclusive de **OS-1** (VELANDIA et al., 2002).

A principal diferença está na presença de dois singletos em δ_{H} 3,83 e 3,79, correspondente a dois grupos metoxila. As posições dos grupos metoxilas foram indicadas pela comparação dos deslocamentos dos hidrogênios de **OS-A-7** com os dados da literatura de amentoflavona. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios H6, H8 e H-5' em δ_{H} 6,37, 6,79 ppm e δ_{H} 7,37 ppm, respectivamente, para **OS-A-7** e para amentoflavona da literatura em δ_{H} 6,21, 6,48 ppm e δ_{H} 7,14 ppm, respectivamente, mostraram que estes estão localizados nas posições 7 e 4'. Estas informações indicam que a fração **OS-A-7** possui a estrutura do bisflavonóide 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona-(3-8'')- 5 ,4''' ,7'' - triidroxiflavona denominada como 7,4'-dimetilamentoflavona.

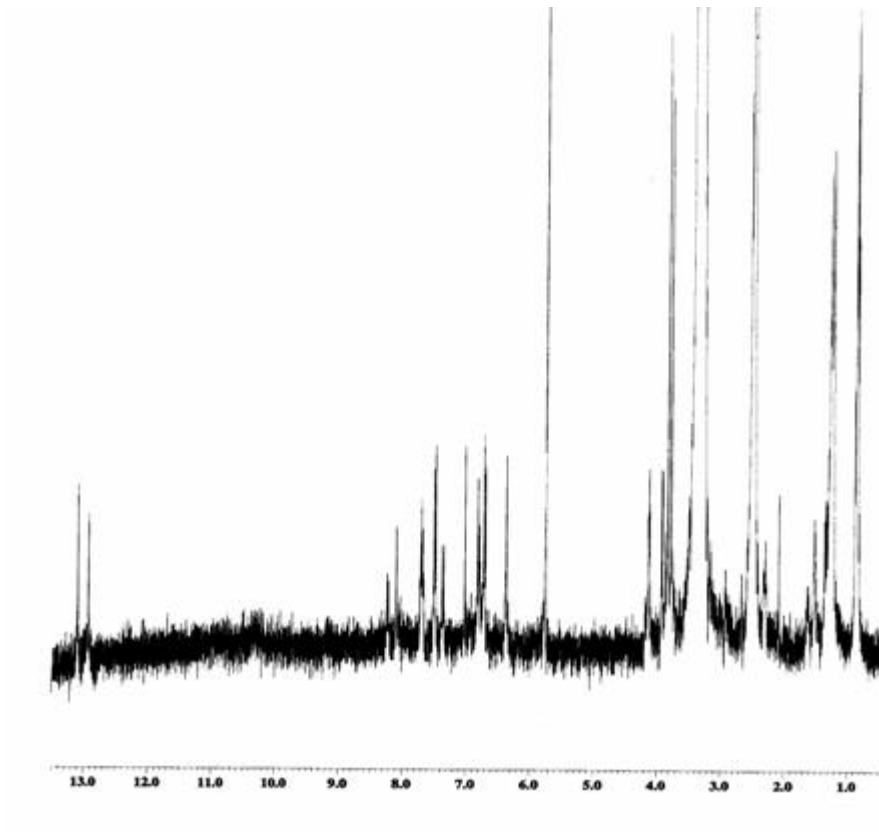
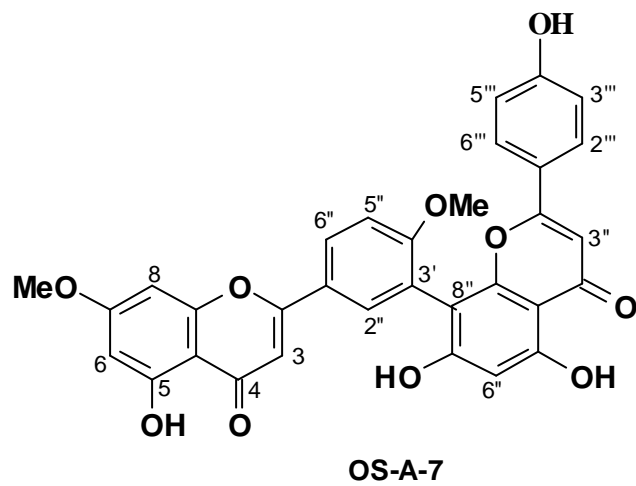


Figura 70 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) da substância OS-A-7.



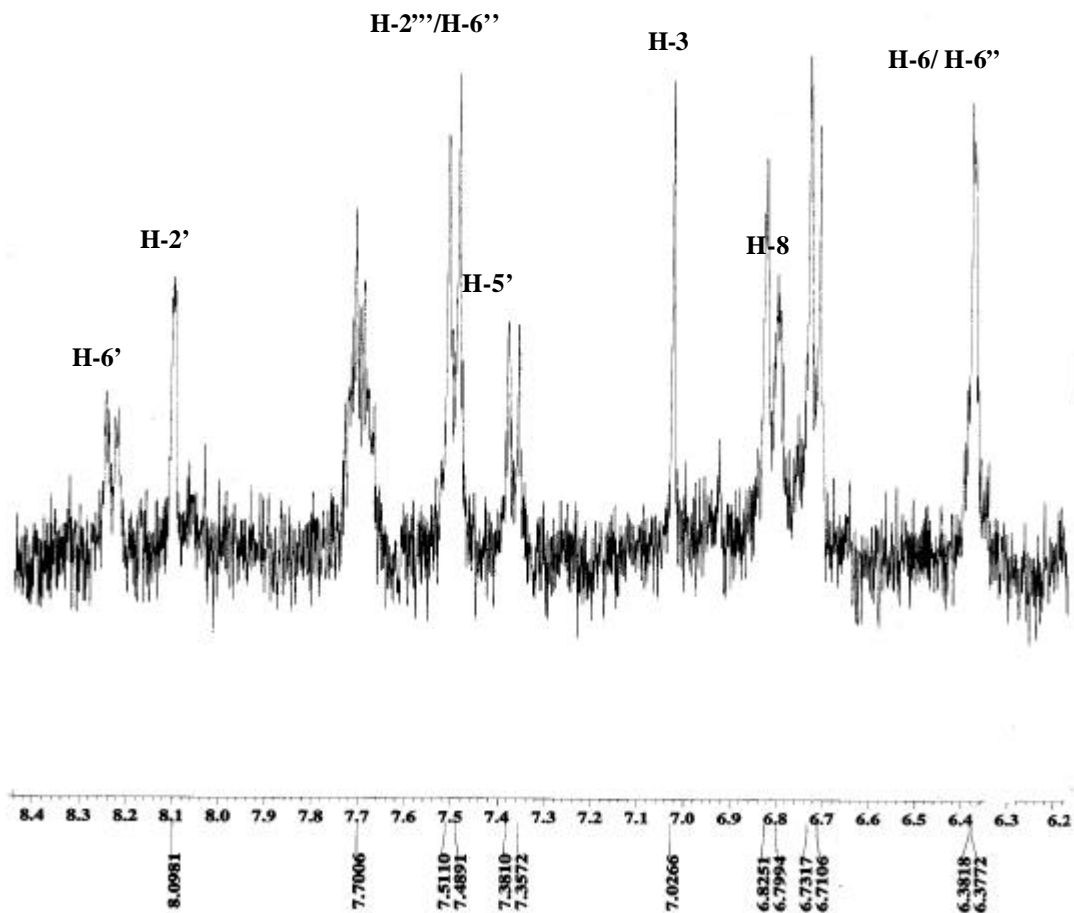


Figura 71 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) da substância OS-A-7.

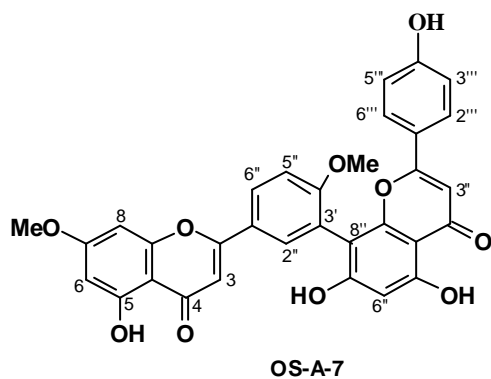
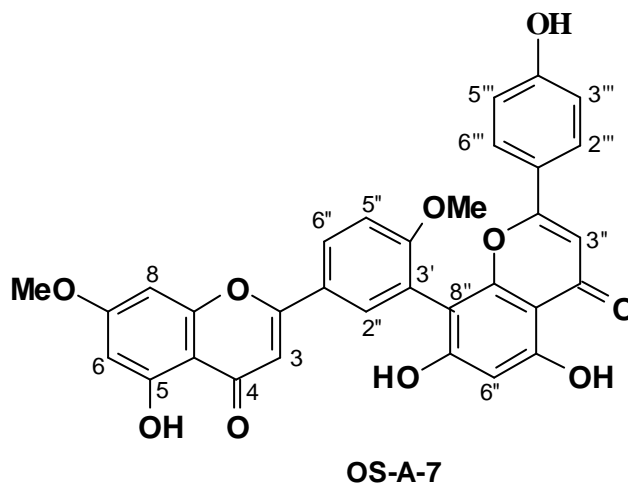


Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H de **OS-A-7** comparados com os dados da substância **OS-1** e dados descritos na literatura para amentoflavona (VELANDIA *et al*, 2002)

C	d H OS-A-7	d H OS-1	d H Amentoflavona
3	6,82 (s)	6,78 (s)	6,79 (s)
6	6,37 (sl)	6,17 (d, $J= 1,88$ Hz)	6,18 (d, $J=2,$ Hz)
8	6,79 (sl)	6,44 (d, $J= 1,88$ Hz)	6,46 (d, $J=2,$ Hz)
2'	8,09 (sl)	8,0-7,9 (m)	8,1-7,9 (m)
5'	7,37 (d, $J= 8,1$ Hz)	7,12 (d, $J= 8,12$ Hz)	7,14 (d, $J= 9,3$ Hz)
6'	8,2 (dd, $J= 8,1$ e $2,2$ Hz)	8,0-7,9 (m)	8,1-7,9 (m)
3''	7,0 (s)	6,82 (s)	6,84 (s)
6''	6,37 (s)	6,36 (s)	6,39 (s)
2''', 6'''	7,50 (d, $J=4,3$ Hz)	7,56 (d, $J=8,8$ Hz)	7,57 (d, $J=8,6$ Hz)
3''', 5'''	6,72 (d, $J=4,3$ Hz)	6,69 (d, $J=8,8$ Hz)	6,71 (d, $J=8,7$ Hz)
MeO-7	3,83 (s)		-
MeO-4'	3,79 (s)		-
HO-5	12,93 (s)	12,97 (s)0	12,97 (s)
HO-5'	13,10 (s)	13,10 (s)	13,10 (s)



5.5 Isolamento de Bisflavonóides de *Ouratea semiserrata* B por CLAE Semipreparativa

O extrato metanólico de *Ouratea semiserrata* B, coletada em 1993, foi estudado anteriormente através de técnicas tradicionais (VELANDIA, 2002). O presente fracionamento por CLAE semipreparativa teve o objetivo de comparar as diferentes técnicas de isolamento e tentar identificar outros bisflavonóides e confirmar os componentes detectados como mistura.

O extrato metanólico de *Ouratea semiserrata* B, codificado como OS-B foi pré purificado a fim de eliminar a clorofila e outros interferentes como em descrito no Esquema 5 (pág. 38), resultando na fração P-OS-B (900,0 mg).

A definição dos parâmetros cromatográficos a serem utilizados na CLAE semipreparativa foi avaliada inicialmente por CLAE analítica, através da análise do perfil cromatográfico da fração P-OS-B (Figura 72) e a mistura binária de metanol: água (75:25), utilizada no isolamento de bisflavonóides em *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata* A, mostrou-se eficiente e reprodutível para a análise de OS-B e então optou-se usar esta fase móvel para o processo de isolamento na CLAE semipreparativa.

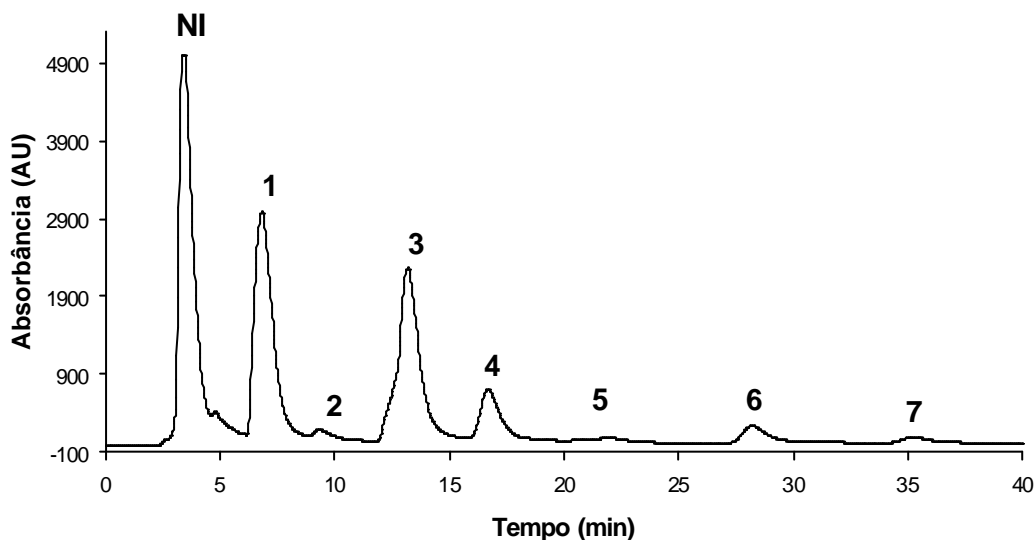


Figura 72 - Perfil cromatográfico da fração P-OS-B. Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm); eluente metanol-água (75:25); fluxo 1 mL min⁻¹; λ=254 nm.

O fracionamento por CLAE semipreparativa foi realizado em uma coluna semipreparativa de fase reversa C18 (250 mm X 20 mm X 5 μ m de tamanho de partícula, Betasil) e como fase móvel metanol-água (75:25). A eluição foi desenvolvida com velocidade de fluxo de 5 mL min⁻¹ e o monitoramento foi realizado a 254 nm. O processo de fracionamento dos picos da fração **P-OS-B** foi realizado através de sucessivas injeções de 1 mL da amostra solubilizada em metanol grau espectroscópico, onde foram obtidas sete frações como indicado na Figura 73. Devido sobrecarga de massa (como nos picos **1** e **2** e **5** e **6**), algumas frações foram obtidas impuras e foram novamente fracionadas para obtenção de um grau de pureza maior.

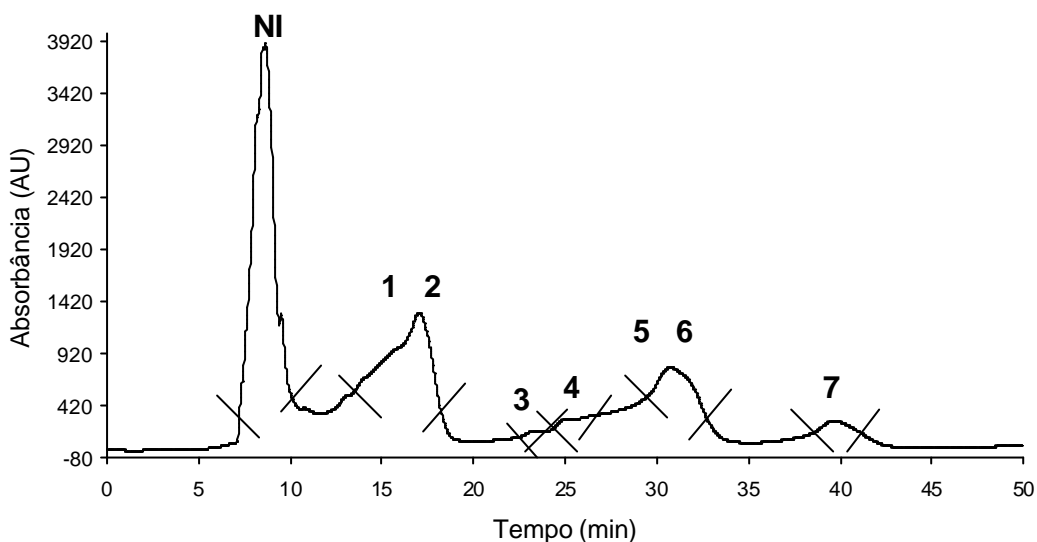


Figura 73 - Perfil cromatográfico da fração **P-OS-B**. Coluna semipreparativa C-18 (25 cm 20 mm x 5 μ m); eluente metanol-água (75:25); fluxo 5 mL min⁻¹; em 254 nm.

Após o isolamento das frações por CLAE semipreparativa, o metanol presente foi evaporado a temperatura ambiente, e em seguida a fase aquosa foi congelada e liofilizada, e estas resultaram em um pó fino de coloração amarela e suas quantidades foram relacionadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Tempo de retenção (t_r) e quantidades das frações isoladas de **P-OS-B** por CLAE semipreparativa

Picos	t_r (minutos) semipreparativa	t_r (minutos) analítica	Código	Quantidade (mg)
NI	7,2-9,3	-	NI	343,6
1	13,7-18,2	4,56	OS-B-1	105,2
2	22,2-23,9	5,22	OS-B-2	1,5
3	24,3-27,1	6,67	OS-B-3	2,0
4	29,3-33,0	6,74	OS-B-4	0,7
5	38,4-41,6	7,31	OS-B-5	0,3
6		8,70	OS-B-6	16,3
7		9,39	OS-B-7	1,6

As frações obtidas foram analisadas por CLAE analítico acoplada a um detector de arranjo de fotodiodo e seus perfis cromatográficos foram comparados com os das frações isoladas de **P-OS-A**. Algumas frações obtiveram os mesmos tempos de retenção e espectros de UV. A partir destas observações algumas frações foram reunidas, para em seguida serem analisadas por métodos espectroscópicos (RMN ^1H), que auxiliou na determinação estrutural das substâncias.

5.5.1 Avaliação estrutural das substâncias isoladas de *Ouratea semiserrata* B

As frações codificadas como **OS-B-2**, **OS-B-4**, **OS-B-5** e **OS-B-7** (Tabela 12) foram analisadas por CLAE-DAD, em metanol-água-ácido acético (74:25:1) e indicaram tempo de retenção em 5,22; 6,74; 7,31 e 9,39 minutos, respectivamente (Figura 74). Os seus espectros de UV indicaram máximos de absorção em 236, 269 e 336 nm (Figura 75). Essas frações não indicaram tempo de retenção semelhantes aos dos padrões com máximos de absorção idênticos. Devido à pequena quantidade e ao grau de pureza das amostras, não foi possível realizar análises espectrométricas para chegar a determinação estrutural das mesmas. Temos, entretanto, a certeza da presença de bisflavonóides, diferentes dos padrões utilizados.

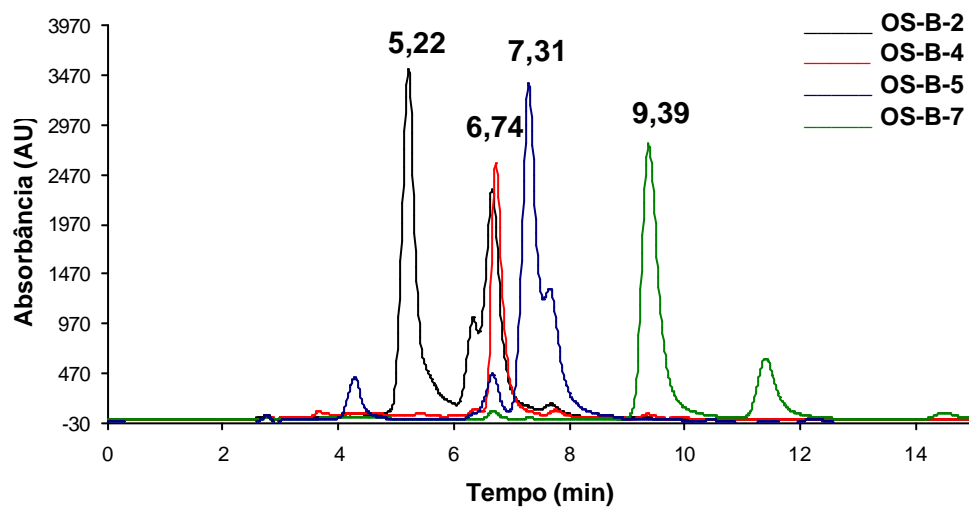


Figura 74 - Perfil cromatográfico das frações **OS-B-2**, **OS-B-4**, **OS-B-5** e **OS-B-7**. Coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo de 1 mL min⁻¹; em 254 nm

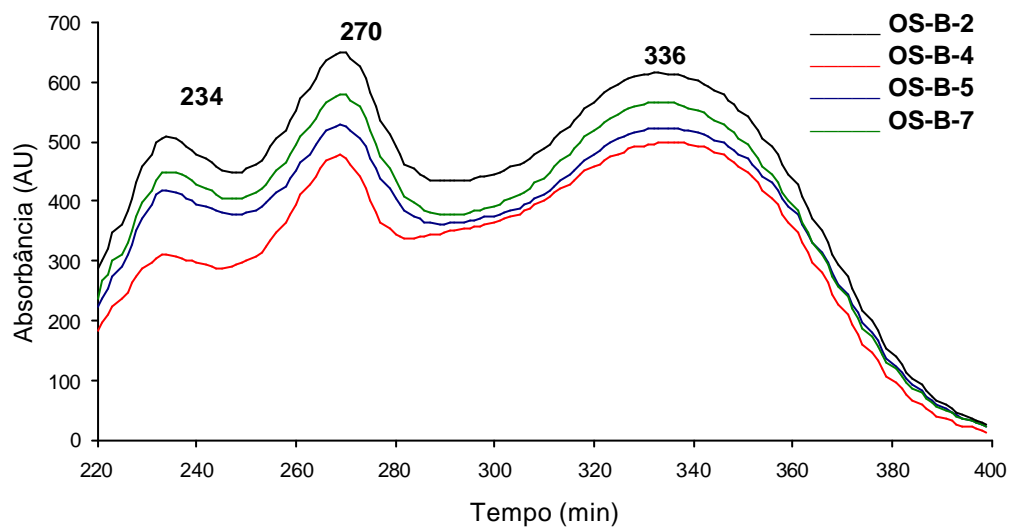


Figura 75 - Espectros de absorção no UV da fração **OS-B-2**, **OS-B-4**, **OS-B-5** e **OS-B-7**. Realizado em metanol-água- ácido acético (74:25:1)

A substância **OS-B-6** foi caracterizada através de análises espectroscópicas (RMN ^1H e IV) e por CLAE acoplada a um detector de arranjo de fotodiodo.

A análise por CLAE da fração **OS-B-6**, realizada em metanol-água-ácido acético (74:25:1), indicou, tempo de retenção em 7,68 minutos (Figura 76) e o espectro de absorção no UV mostrou máximos em 234, 269 e 336 nm (Figura 77). Esta análise permite deduzir que a fração **OS-B-6** possui perfil semelhante aos dos bisflavonóides isolados neste trabalho e também daqueles utilizados como padrões, mas com o tempo de retenção diferente.

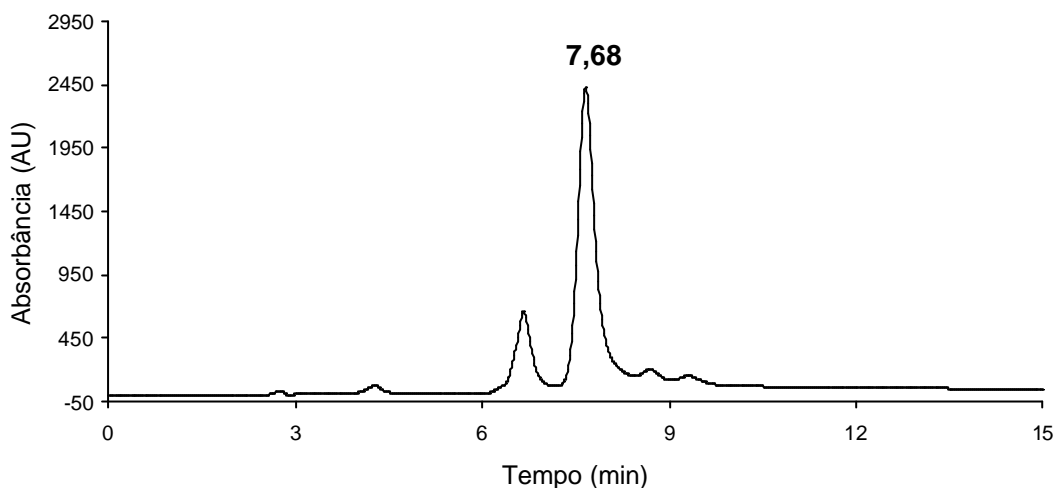


Figura 76 - Perfil cromatográfico da substância **OS-B-6** Coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μm); eluente metanol-água-ácido acético (74:25:1); fluxo 1 mL min^{-1} ; λ 254 nm.

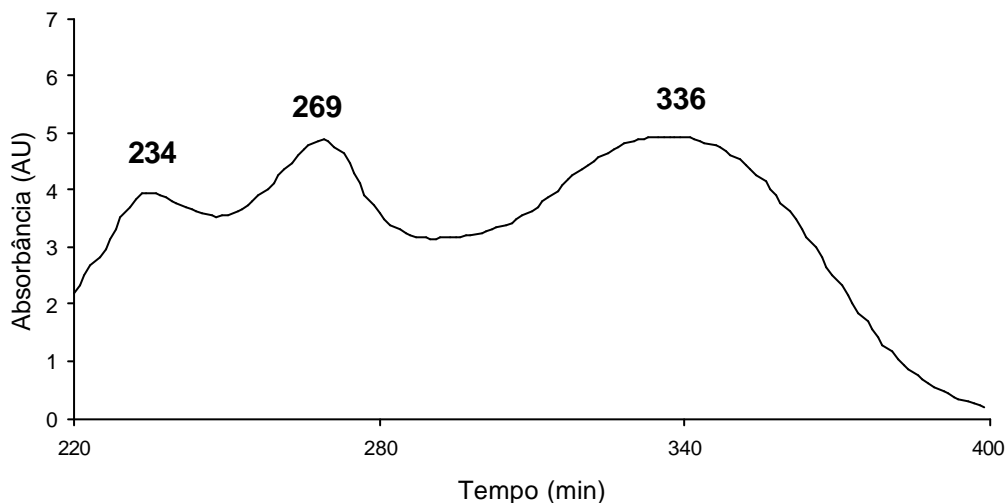


Figura 77 - Espectro de absorção no UV da substância **OS-B-6** realizado em metanol-água- ácido acético (74:25:1).

O espectro de RMN ^1H da substância **OS-B-6** (Figura 78 e 79) apresentou-se semelhante ao espectro da substância **OS-1**, identificada como amentoflavona (pág. 86), a principal diferença entre os espectros é na presença de apenas um singletos em δ_{H} 3,82 ppm correspondente a um grupo metoxila.

A Tabela 13 apresenta os deslocamentos químicos de hidrogênio da substância **OS-B-6** comparados com dados da literatura de amentoflavona (VELANDIA *et al.* 2002). Esta comparação indicou diferenças entre os deslocamentos químicos dos hidrogênios H-6 e H-8 (δ_{H} 6,35 e 6,77 (sl)) da substância **OS-B-6** com os respectivos hidrogênios de amentoflavona (dados da literatura)(VELANDIA *et al.*, 2002), permitindo sugerir a localização do grupo metoxila na posição 7. A posição deste grupo metoxila foi confirmada pelo experimento NOEDIFF (Figura 80). A irradiação nos hidrogênios da metoxila em δ_{H} 3,82 gerou NOE nos hidrogênios aromáticos H6 e H-8 em δ_{H} 6,35 (sl) e 6,77 (sl), confirmando a posição do grupo metoxila no carbono C-7.

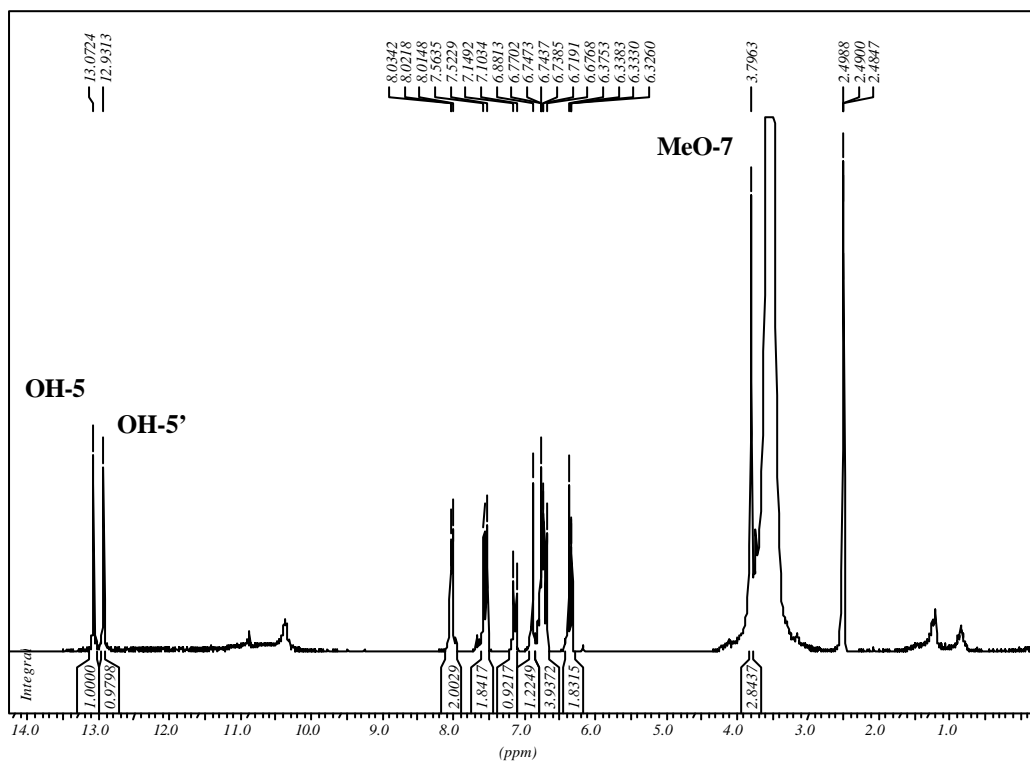
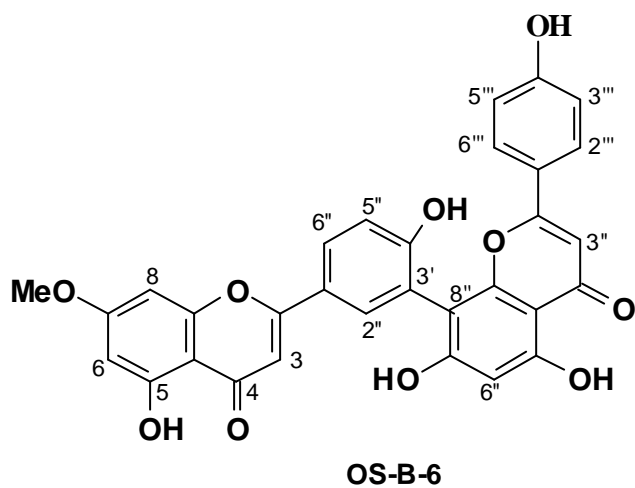


Figura 78 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO-D_6) de OS-B-6



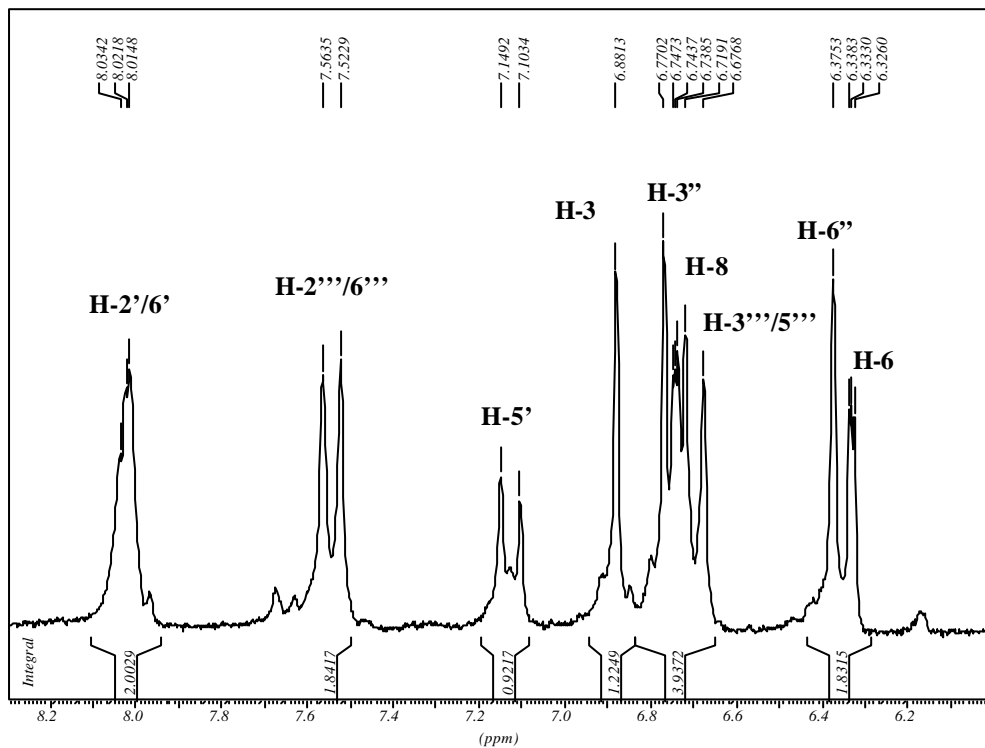


Figura 79 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO-D_6) de **OS-B-6**, expandido na região de 5,0 a 8,0 ppm

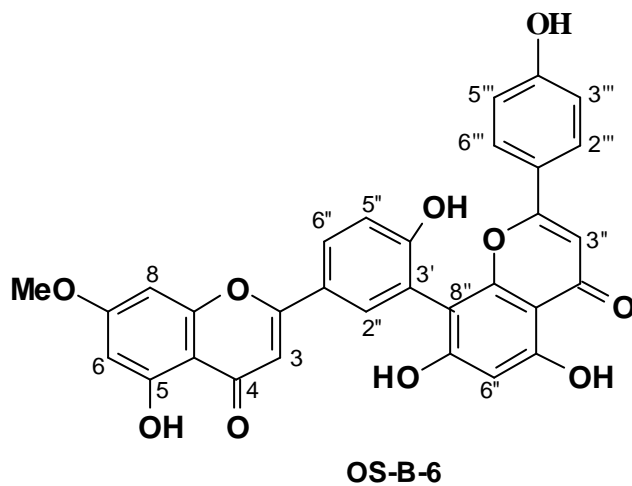
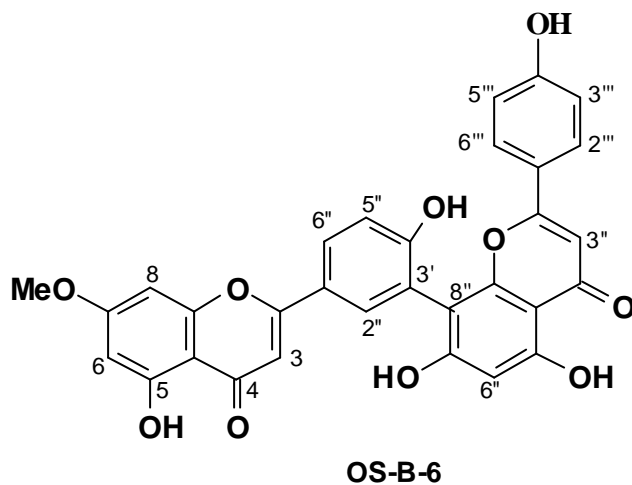


Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H da substância **OS-B-6** comparados com os dados da literatura do padrão amentoflavona (VELANDIA *et al.*, 2002).

C	d H OS-B-6	d H Amentoflavona
3	6,91 (s)	6,79 (s)
6	6,35 (sl)	6,18 (d, $J=2$, Hz).
8	6,77 (sl)	6,46 (d, $J=2$, Hz)
2'	8,05 (sl)	8,1-7,9 (m)
5'	7,14 (d, $J=4,2$ Hz)	7,14 (d, $J=9,3$ Hz)
6'	8,0 (sl)	8,1-7,9 (m)
3''	6,83 (s)	6,84 (s)
6''	6,38 (s)	6,39 (s)
2''', 6'''	7,57 (d, $J=4,2$ Hz)	7,57 (d, $J=8,6$ Hz)
3''', 5'''	6,71 (d, $J=4,2$ Hz)	6,71 (d, $J=8,7$ Hz)
HO-5	12,97 (s)	12,97 (s)
HO-5'	13,10 (s)	13,10 (s)
MeO-7	3,82 (s)	-

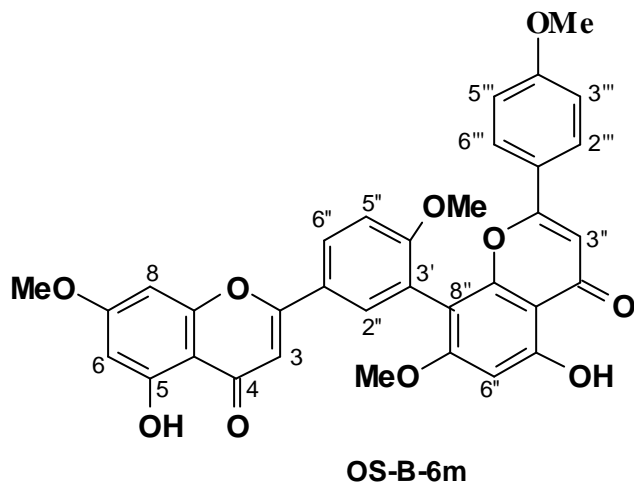


às metoxilas. Isto confirma a presença de três hidroxilas adicionais na estrutura com propriedades ácidas suficientes para a incorporação de diazometano.

O experimento de NOEDIFF (Figura 82) foi realizado para confirmar as posições das metoxilas, a irradiação nas frequências dos grupos metoxilas gerou NOE nos hidrogênios em δ_H 6,35 (H-6), 6,42 (H-8), para MeO-7, nos hidrogênios 6,83 (H-3'''-H-5''') para MeO-4''', no hidrogênio em δ_H 6,53 (H-6'') referentes a MeO-7'' e no hidrogênio em δ_H 7,15 (H-5') vizinho a MeO-4', como indicado na estrutura, pg. 123, posterior à Figura 82).

A conexão entre os monômeros nas posições C-3' e C-8'' foi confirmada ao irradiar a MeO-4' e verificando NOE no dubleto em δ_H 7,17 (H-5') e não apresentou NOE no hidrogênio δ_H 7,87(H-2') a irradiação na MEO-7'' gerou NOE no singlete em δ_H 6,53, H-6''), confirmando assim a ligação dos monômeros.

Estas análises do derivado metilado **OS-B-6m** permitiram confirmar as propostas anteriores e definir a estrutura 5, 4' -diidroxil-7-metoxiflavona-(3'-8'')-5, 4', 7''' - triidroxiflavona denominada como 7-O-metilamentoflavona para **OS-B-6**.



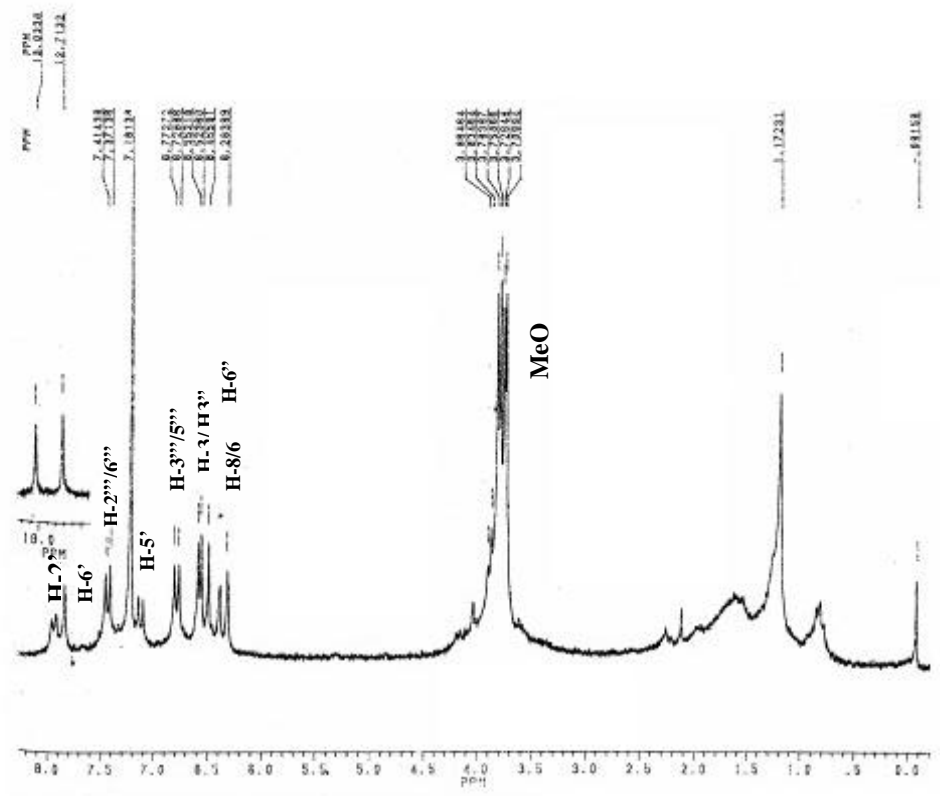
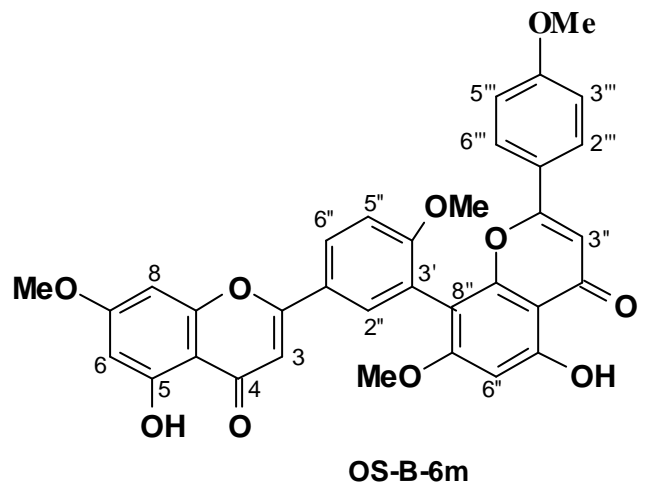


Figura 81 - Espectro de RMN ¹H do derivado OS-B-6m realizado em CDCl₃



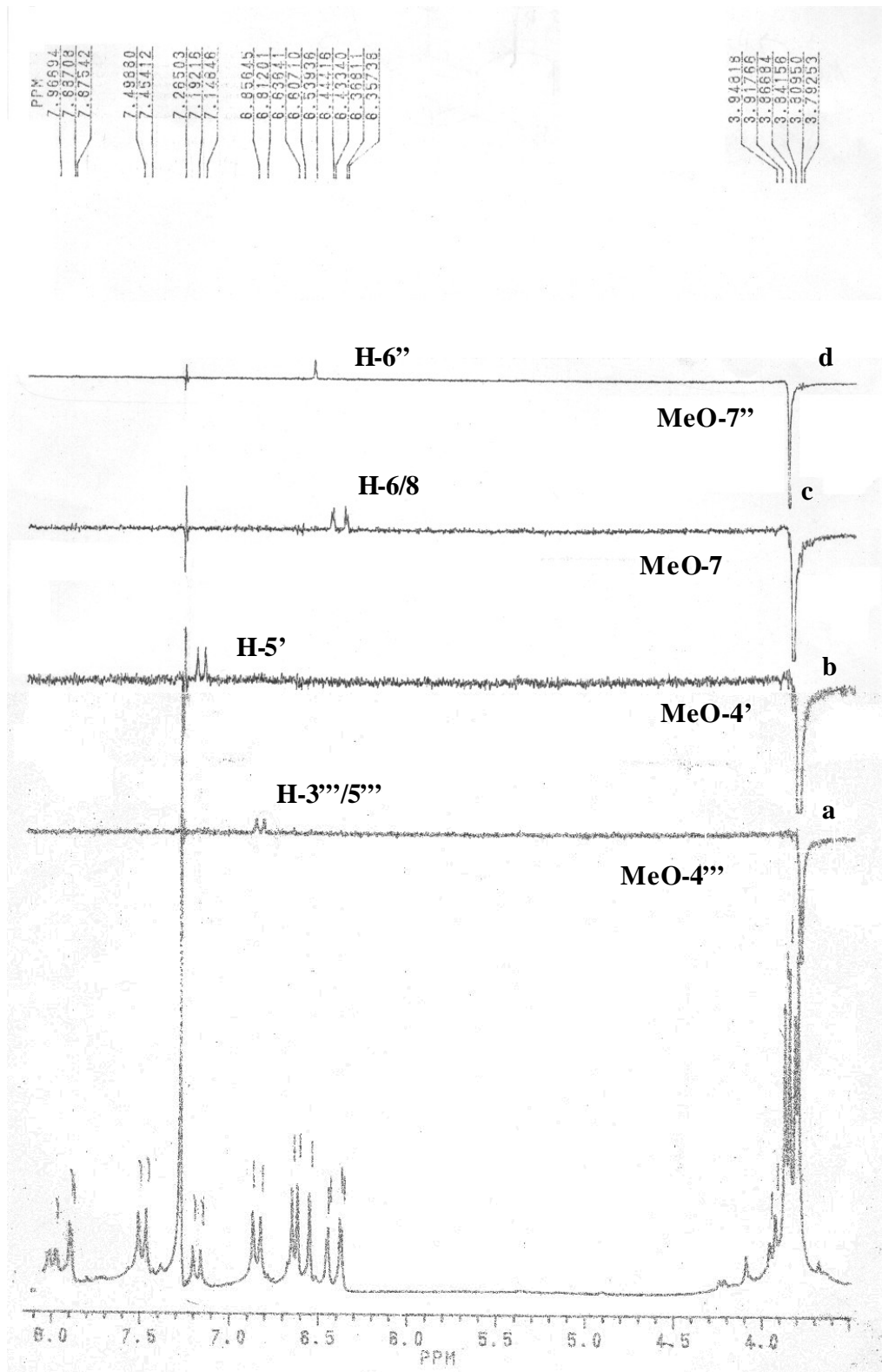
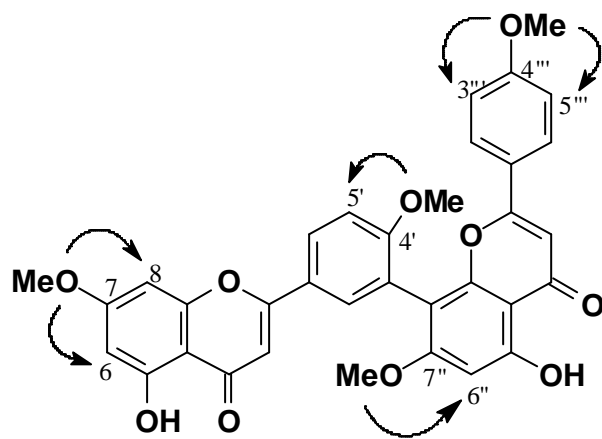


Figura 82 - Espectros resultantes da irradiação dupla e subtração de espectros do derivado OS-B-6m em CDCl₃.



OS-B-6m

6 CONCLUSÃO

O monitoramento por CLAE-DAD mostrou a presença de bisflavonóides apenas nas folhas inteiras de *Luxemburgia nobilis*.

As substâncias 2'',3''-diidrochnaflavona e amentoflavona foram confirmadas por CLAE como marcadores químicos de *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata*, respectivamente.

Os bisflavonóides podocarpusflavona B, 7,4'-*O*-dimetilamentoflavona e 4''-*O*-metilrobustaflavona foram identificados pela primeira vez nas folhas de *Ouratea semiserrata*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUINO NETO, F. R. DE; NUNES, D.S.S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Interciência, 2003.
- BANKOVA V.S.; POPOV S.S.; MAREKOV N.L. 1982. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *Journal of chromatography*, 242, 135-143, 1982.
- BARROSO, G.M. Sistemática de angiospermas do Brasil. Minas Gerais: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, v.2, p.377, 1986.
- BIDLINGMEYER, B.A . Preparative liquid chromatography, Elsevier Publishing Co. 1987)
- BRUNETON, J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza Editorial Acribia, 1991.
- CARVALHO, M.G. de, CARVALHO, G.J.A. de; BRAZ-FILHO, R Chemical constituents from *Ouratea floribunda*: Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of Atranorin and its new acetyl derivative. *J. Braz. Chem. Soc.*, 11 (2), 143-147, 2000.
- CARVALHO, M.G. de; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, M.C.C.; ECHEVARRIA, A.; BRAZ-FILHO, R.; GRYNBERG, N.F. Phytochemical and Pharmacology II of the Series “ Recent Progress in Medicinal Plants”; Majumdar, D.K., Govil, J.N., Singh, V.K. eds., SCI tech Publishing LLC: Texas, USA, 8,77-92, 2002.
- CARVALHO, M.G. de; ALVES, C.C.F.; SILVA, K.G.S. Luxenchalcone, a new bichalcone from *Luxemburgia octandra*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 15 (1), 146-149, 2003.

- CHARI, V. M.; ILYAS, M.; WAGNER, H.; NESZMELYI, A. ¹³C-NMR SPECTROSCOPY OF BIFLAVONOIDS. *Phytochemistry*.16, 1273-1278, 1977.

- COLLINS, C.H. In: Collins, C.H.; Braga, G.L. Introdução a métodos cromatográficos. ed. Unicamp, p.13-33, 1988.

- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia Univ., 1981.

- DAHLGEN, G. The last Dahlgrenogram, a system of classification of the dicotyledons. In:TAN, K. *Plant taxonomy, phyto geography and related subjects*. Edinburg Univ., p. 249-260, 1989.

- DAHLGEN, R.M.T. A revised system of classification of the angiosperms. *Bot. J. Linnean Soc.*, V.80, p. 91-124, 1980.

- DAHLGEN, R.M.T.; A system of classification of the angiosperms to be used to demonstrate the distribution of characters. *Botaniska Notiser*, V. 128, p. 181-197, 1975.

- DANIEL, J.F.S.; CARVALHO, M.G. de; CARDOSO, R.S.; AGRA, M.F.; EBERLIN, M.N. Other Flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). *J. chromatogr.* (in press), 2004.

- DANIEL, J.F.S.; Metobólitos especiais isolados de *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae), *Dipladenia martiana* (Apocinaceae) e *Caesalpineia peltophoroides* (Leguminosae). 2004. Tese de doutorado (em andamento).

- DEY, P.M; HARBONE, J.B. *Plant Biochemistry*. London: Academic Press, 554, 1997.

- DEWICK, P.M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. London: John Wiley, 466, 1998.

- Di STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência - Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. Universidade Estadual Paulista, 230, 1996.

- DOMINGUEZ, X.A. Métodos de investigación fitoquímica. México: Limusa, 1973.

- DREWES, S.E. & HUDSON, N.A. Brackenin, a dimeric dihydrochalcone from *Brackenridgea zanguebarica*. *Phytochemistry*, 22 (12), 2823-2825, 1983.

- DREWES, S.E.; HUDSON, N.A.; BATES, R.B.; LINZ, G.S. Novel dimeric chalcone-based pigments from *Brackenridgea zanguebarica*. *Tetrahedron Lett.*, 25 (1), 105-108, 1984.

- ETTE, L.S. In: Horváth, C. High performance liquid chromatography. Advances and perspectives. Academic Press, New York, v.1, p.1-74, 1980.

- EVANS, W.C. "Trease and Evans" Pharmacognosy. 14 ed. London: W.B. Saunders, 612, 1996.

- FELICIO, J.D.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M.M.; COSTANTINO, L.; ALBASINI, A.; LINS, A. P. Inhibition of Lens Aldose Reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. *Planta Medica*, 61, 217-220, 1995.

- FELICIO, J.D.; ROSSI, M.H.; PARK, H.R; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M.M.; DAVID, J.M.; CORDEIRO, I. Biflavonoids from *Ouratea multiflora*. *Fitoterapia*, 72, 453-455, 2001.

- FURNISS, B.S., HANNAFORD, A.J., SMITH, P.W.G. e TATGHELL, A.R. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry. Fifth Edition. 443, 1994.

- GIBBS, R.D. History of Chemical Taxonomy. In: SWAIN. Chemical plant taxonomy. London: Academic, 41-88, 1963.

- GOTTLIEB, O.R. e BORIN, M.R. de M.B. Quimiosistemática como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões. Parte I: Biodiversidade e matérias-primas farmacêuticas. Ed. 5, p. 91-105, 2003. Editora Universidade UFRG/Ed. Da UFSC.

- GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B.L.; MARTIN, M.T.; BODO, B. Lophirone A, a biflavonoid with unusual skeleton from *Lophira lanceolata*. *Tetrahedron Lett.*, 28 (26), 2967-2968, 1987.

- HARBONE, J.B. The flavonoids. London: Chapman and Hall, 694-708, 1975.

- HARBONE, J.B. The flavonoids: advances in research since 1980. London: Chapman and Hall, 1988.

- HELDT, H.W. Plant Biochemistry and Molecular Biology. 1 ed. New York: Oxford University Press, 522, 1997.

- JAYAPRAKASAM, B.; DAMU, A.G.; RAO, K.V.; GUNASEKAR, D.; BLOND, A.; BODO, B. 7-O-Methyltetrahydrochonaflavone, a new biflavanone from *Ochna beddomei*. *J. Nat. Prod.*, 63 (4), 507-508, 2000.

- KAMIL, M.; KHAN, N.A.; ALAM, M.S. ILYAS, M.A biflavone from *Ochna pumila*. *Phytochemistry*, 26 (4), 1171-1173, 1987.

- KARCH, K.; SEBASTIAN, I.; HALÁSZ, I.; ENGELHARDT, H. Optimization of reverse-phase separation. *Journal Chromatog.*, 122, 171-184, 1976.

- KRAUZE-BARANOWSKA, M.; BACZEK, T.; GLOD, D.; KALISZAN, R.; WOLLENWEBER, E. HPLC separation of O-acylated flavonoids and biflavones from some species of gymnospermae. *Chromatographia*, 60, 9-15, 2004.
- LIKHITWITAYAWUID, K.; RUNGSERICHAI, R.; RUANGRUNGSI, N.; PHADUNGCHAROEN, T. Flavonoids from *Ochna integerrima*. *Phytochemistry*, 56, 353-357, 2001.
- MANGA, S. S. E.; MESSANGA, B. B.; SONDEGAM, B. L. 7,8-Dihydrobenzofuranones from *Ouratea reticulata*. *Fitoterapia*, 72, 706-708, 2001.
- MANN, J. Secondary Metabolism, Claredon Press, Oxford, 8, 1987.
- MARCANO, D.; MASAHISA, H. Fitoquímica orgânica. Caracas: Universidade Central de Venezuela, 81, 1991.
- MARKHAM, K.R. Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press, 1982. 113, 1992.
- MBING, J. N.; BASSOMO, M. Y.; PEGNYEMB, D. E.; TIH, R. G.; SONDEMGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Constituents of *Ouratea flava*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 31, 215-217, 2003.
- MBING, J. N.; PEGNYEMB, D. E.; GHOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark. *Phytochemistry*, 63, 427-431, 2003.
- MESSANGA, B.; GHOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Biflavonoids from *Ochna calodendron*. *Phytochemistry*, 35 (3), 791-794, 1994.

- MESSANGA, B.; KIMBU, S.F.; SONDEGAM, B. L.; BODO, B. Triflavonoids of *Ochna calodendron*. *Phytochemistry*, 59, 435-438, 2002.

- MEURER-GRIMES, B.; STEVENSON, D. W.; The biflavones of the *Cycadales* Revisited: Biflavones in *Stangeria eriopus*, *Chigua restrepoi* and 32 other Species of *Cycadales*. *Biochem. System. and Ecology*, 22 (6), 595-603, 1994.

- MOREIRA, I. C.; CARVALHO, M. G. de; BASTOS, A. B. F. O.; BRAZ-FILHO, R. A. flavone dimer from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry* , 51, 833-838, 1999.

- MOREIRA, I. C.; SOBRINHO, D. C.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Isoflavanone dimers hexaspermone A, B and C from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry*, 35 (6), 1567-1572, 1994.

- MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; TANAKA, S.; HIROTA, M.; IRIE, R.; TAKEDA, N.; TATEMATSU, A.; KOSHIMIZU, K. Bitter cyanoglucosides from *Lophira alata*. *Phytochemistry*, 32 (6), 1461-1466, 1993.

- OLIVEIRA, M.C.C. de; CARVALHO, M.G. de; SILVA, C.J. da; WERLE, A.A. New biflavonoid and other constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). *J. Braz. Chem. Soc.*, 13 (1), 119-123, 2002

- PEGNYEMB, D. E.; TIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Biflavonoids from *Ochna afzelii*. *Phytochemistry*, 57, 579-582, 2001.

- PIETTA, P.G.; MAURI, P.L.; MANERA, E.; CEVA, P.L. Isocratic liquid chromatographic method for the simultaneous determination of *Passiflora incarnata* L. and *Crataegus monogyna* flavonoids in drugs. *J. Chromatogr.* 357, 233-238, 1986.

- PIETTA, P.G.; MAURI, P.L.; MANERA, E.; RAVA, A.. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the analysis of biflavones in *Ginkgo biloba* L. extracts. *J. Chromatogr.* 437, 453-456, 1988.

- PIETTA, P.G.; MAURI, P.L.; GARDANA, C.; FACINO, R.M.; CARINI, M. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoid glucosides from *Helichrysum italicum*. *J. Chromatogr.* 537, 449-452, 1991.

- PIETTA, P.G.; MAURI, P.L.; BRUNO, A. Identification of flavonoids from *Ginkgo biloba* L., by high-performance liquid chromatography with diode-array UV detection. *J. Chromatogr.* 553, 223-231, 1991a.

- RAO, C. V.; GUNASEKAR, D. Squarrosin, a new isoflavone from *Ochna squarrosa* (Linn.). *Indian Journal of Chemistry*, 28 B, 780-781, 1989.

- RAO, K. V.; SREERAMULU, K.; RAO VENKATA, C.; GUNASEKAR, D. Two new biflavonoids from *Ochna obtusata*. *J. Nat. Prod.*, 60, 632-634, 1997.

- RATH, G.; TOURÉ, A.; WOLFENDER, J.L.; HOSTETTMANN, K.. Characterization of C-glycosylflavones from *Dioscorea rotundifolia* by liquid chromatography – UV diode array detection – Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*, 41(5, 6), 332-342, 1995.

- SAMUELSSON, G. Drugs of natural origin – A textbook of Pharmacognosy. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press, 320, 1992.

- SIBANDA, S.; NYANYIRA, C.; NICOLETTI, M. GALEFFI, C. Vismiones L and M from *Ochna pulchra*. *Phytochemistry*, 34 (6), 1650-1652, 1993.

- SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia- Da Planta ao Medicamento. Editora Universidade UFRG/Ed. Da UFSC, 2000.
- SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J. Introduction to modern liquid chromatography. Willey- Interscience, 1979.
- SWAN, T. In Pigments in Plants (Czygan, F., ed.). Fischer. Stuttgart, 224-236, 1980.
- TIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of the chalcone dimers Lophirone F, G and H from *Lophira lanceolata* stem bark. *Phytochemistry*, 29 (7), 2289-2293, 1990.
- TIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of Lophirones B and C, Biflavonoids from the bark of *Lophira lanceolata*. *Phytochemistry*, 28 (5), 1557-1559, 1989.
- TIH, A. E.; GHOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. A new chalcone dimer from *Lophira alata*. *Tetrahedron Lett.*, 29 (45), 5797-5800, 1988.
- TIH, A. E.; GHOGOMU, R. T.; SONDEGAM, B. L.; CAUX, C.; BODO, B. Constituents of *Lophira alata* leaves. *Biochem. Syst. Ecol.*, 31, 549-551, 2003.
- TIH, A.; MARTIN, M. T.; TIH GHOGOMU, R.; VUIDEPOT, I.; SONDEGAM, B. L.; BODO, B. Lophiroflavans B and C, Tetraflavonoids of *Lophira alata*. *Phytochemistry*, 31 (10), 3595-3599, 1992.
- TIH, A.; TIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Tetraflavonoids of *Lophira alata*. *Phytochemistry*, 31 (3), 981-984, 1992a.

- VELANDIA, J. R.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Novel trichloro- and tetrachloroisoflavone isolated from *Ouratea semiserrata*. *Nat. Prod. Lett.*, 12 (3), 191-198, 1998.

- VELANDIA, J. R.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R.; WERLE, A. A. Biflavonoids and a glucopyranoside derivative from *Ouratea semiserrata*. *Phytochem. Anal.*, 13, 283-292, 2002.