

ESTUDO QUÍMICO DA Anuleia leiocarpa

TESE

apresentada à Escola de Pós-Graduação da Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, para o grau de Doctor Scientiae

RAIMUNDO BRAZ FILHO

1971

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado sob a orientação do Prof. OTTO RICHARD GOTTLIEB.

A meus Pais,

Espôsa e Filhos,

com tôda gratidão.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja agradecer

Ao Conselho Nacional de Pesquisas pelas bolsas de pós-graduação concedidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsas de Pesquisador e material colocado à disposição.

À Universidade de São Paulo pela aparelhagem colocada à disposição.

À Direção do Instituto de Química da Universidade Federal do Ceará na pessoa do Prof. M.M. Ventura pelas facilidades e apoio colocados à disposição.

Aos colegas que trabalham em Química de Produtos Naturais, sob a orientação do Prof. Otto Richard Gottlieb, pelo estímulo que sempre deram.

Ao Prof. Mauro T. Magalhães pelo incentivo e apoio sempre dedicados.

Ao Prof. Fausto Aito Gai, Diretor da Escola de Pós-graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelas facilidades oferecidas.

Ao Prof. Paschoal Senise, Diretor do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pelas facilidades oferecidas.

Aos colegas do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Ceará pelo incentivo, apoio e facilidades oferecidas.

Ao Dr. C.P. Falshaw, por gentileza do Prof. W.D. Collis, The University, Sheffield, Inglaterra pela obtenção de espectros de massa.

Ao Prof. C. Djerassi, Stanford University, Estados Unidos da América do Norte, pela obtenção de espectros de massa.

"Uma fôlha pode ter vinte constituintes diversos. A descoberta de um dêles é mais importante para a humanidade do que a descoberta de uma galáxia".

R. Robinson, trecho de discurso proferido por ocasião da abertura de novo edifício do Departamento de Química Orgânica do Instituto Weizmann de Ciências, Rehovoth, Israel, 05/4/1964.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
<u>CAPÍTULO I.</u>	
Revisão dos métodos modernos de determinação estrutural de flavonas:	
a. Espectrometria no ultra-violeta	5
b. Espectrometria no infra-vermelho	12
c. Espectrometria de ressonância magnética nuclear ...	23
d. Espectrometria de massa	39
<u>CAPÍTULO II.</u>	
A planta e seus constituintes	86
<u>CAPÍTULO III.</u>	
Determinação estrutural de:	
a. Apuleina (AL-11) e 5-O-desmetilapuleina (AL-13) ..	88
b. Oxiaianina A (AL-12) e 5-O-metiloxiaianina A (AL-15)	148
c. Aianina (AL-18)	167
d. Apuleisina (AL-14)	188
e. Apuleitrina (AL-16)	236
f. Apuleidina (AL-19A)	252
g. Apuleirina (AL-19B)	266
h. Leiocarpina (AL-32)	280
i. β -Sitosterol (AL-17)	302
j. (+)-Pinitol (AM-11A)	302
<u>CAPÍTULO IV.</u>	
Parte experimental	304

CAPÍTULO V.

Biossíntese	360
CONCLUSÕES	364
RESUMO	366
BIBLIOGRAFIA	367

INTRODUÇÃO

A Química de Produtos Naturais constitui-se parte da Química Orgânica que visa o esclarecimento e registro da composição química dos seres vivos através do isolamento dos seus constituintes, elucidação das estruturas das substâncias puras isoladas e investigação dos caminhos biossintéticos que conduzem a elaboração destas substâncias, sendo no setor de fitoquímica onde se encontra o maior volume de trabalhos experimentais publicados.

A atividade de pesquisa neste campo proporciona o contacto com problemas cujas soluções exigem imaginação, raciocínio e esforço e mantém um constante fluxo de idéias criativas.

A importância destas pesquisas se traduz no aperfeiçoamento científico de pessoal através do desenvolvimento de uma atividade científica que leva ao conhecimento e aprimoramento de métodos modernos de isolamento dos constituintes que compõem misturas complexas e de determinações estruturais, tais como espectrometria no ultra-violeta, no infra-vermelho, de ressonância magnética nuclear, de massa e dispersão ótica rotatória. Estes objetivos têm proporcionado um constante desenvolvimento de novas técnicas e aperfeiçoamento de instrumentos que, reciprocamente, contribuem para dar uma nova dimensão

aos estudos da química orgânica molecular, incentivando o seu desenvolvimento.

A consecução dos objetivos diretos desta atividade permite a aplicação dos resultados a outros campos da ciência pura e aplicada. A existência de inúmeros antibióticos (penicilina, tetraciclina, cloromicetina), agentes cardioativos (digitoxina), antiespasmódicos (latropina), corticoides (cortisona), pílulas anticoncepcionais (hormônios), substâncias corantes, aromatizantes e edulcorantes, além do tanino utilizado na indústria de couros, deve-se a aplicações tecnológicas da pesquisa em produtos naturais.

A aplicação tecnológica desta pesquisa cresceu ao ponto de conduzir a indústria químico-farmacêutica ao emprêgo de estruturas básicas sintetizadas pelos organismos vivos, principalmente plantas, como ponto de partida para a síntese de produtos industriais de largo consumo e de grande valor econômico. A descoberta de que as dioscoreas, plantas regionais largamente espalhadas no México, são ricas em substâncias fundamentais para a síntese de hormônios, modificou a economia do país em foco, transformando-o de importador em maior exportador de substância daquele tipo, possibilitando-o a vencer inclusive a concorrência de grandes frigoríficos norteamericanos que produziam aquelas substâncias a partir de órgãos animais.

É bastante conhecida a doença provocada em árvores de Citrus pelo fungo Deuterophora tracheiphyla Petri. Esta doença é conhecida como mal seco e é causada pela invasão dos vasos condutores do xilema pelo fungo, provocando desfolhação, secagem dos ramos e morte da planta. Já em 1930, Petri admitia a ocorrência de princípios fungistáticos em diferentes espécies de Citrus [1]. Em 1968, D. Lavie e colaboradores

[2] identificaram um flavonoide de atividade antifungo em extratos de fôlhas e raízes da Cleopatra mandarin, uma variedade conhecida como altamente resistente ao mal sêco [3]. Este resultado demonstra mais uma vez a importância econômica que pode assumir a pesquisa no campo da Química dos Produtos Naturais.

O avultado número de substâncias naturais descobertas e o estudo das correlações entre composição química e posição filogenética de inúmeros vegetais possibilitou o surgimento da Quimiotaxinomia como um novo e promissor campo de investigação científica.

O estudo químico da flora regional é tarefa que vem sendo sistematicamente cumprida em tôdas as partes do mundo através de órgãos governamentais ou, em caráter privado, de grupos especializados mantidos pelas indústrias químico-farmacêutica vinculados às grandes emprêsas.

A grande extensão territorial do nosso país, a variedade de sua flora e ainda reduzido volume de informações sôbre a composição química de suas plantas exigem a ação conjunta de pesquisadores especializados. Esta atividade de pesquisas é compatível com atual conjuntura universitária nacional.

Em face do exposto, buscamos desenvolver uma atividade de pesquisa compatível com a filosofia delineada, resultando êste trabalho que envolve o estudo da composição química da Apuleia leiocarpa. Trata-se de uma árvore da família Leguminosae-Caesalpinioideae. Em vista de sua vasta área de ocorrência, que se estende desde o Nordeste (Estados de Paraíba e Pernambuco) através do Centro do Brasil até o Nordeste da Argentina, não causa admiração a diversidade de nomes triviais sob os quais é conhecida. Entre êstes citam-se Jutai, Garapa.

Amarelo e Grapiapunha. Seu cerne amarelado é muito apreciado para construções, pois possui notável resistência ao tempo. Esta propriedade poderia decorrer da presença de substâncias capazes de inibir o desenvolvimento de micro-organismos e de fungos. O estudo químico da planta, assume, assim, inclusive, interesse prático.

Nas tarefas de isolamento dos constituintes utilizou-se sempre que possível, métodos cromatográficos. Isolou-se (+)-pinitol, β -sitosterol, 1 pterocarpano e 10 flavonas.

A determinação estrutural das substâncias puras isoladas envolveu, principalmente, métodos espectrométricos-espectrometria no ultra-violeta, no infra-vermelho, de ressonância magnética nuclear e de massa-razão pela qual iniciamos a descrição deste trabalho com uma revisão de tais métodos aplicados aos flavonoides.

CAPÍTULO I.

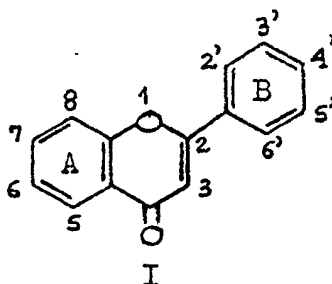
REVISÃO DOS MÉTODOS MODERNOS DE DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE FLAVONAS:

- a. ESPECTROMETRIA NO ULTRA-VIOLETA.
- b. ESPECTROMETRIA NO INFRA-VERMELHO.
- c. ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.
- d. ESPECTROMETRIA DE MASSA.

REVISÃO DOS MÉTODOS MODERNOS DE DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE FLAVONAS

Espectrometria na Região do Ultra-Violeta

A espectrometria no ultra-violeta é uma ferramenta valiosa nos trabalhos de investigação estrutural de diarilpropanoides, particularmente na classe das flavonas, em face da conjugação existente entre os anéis A e B (I). Nesta classe enquadrámos as 3-hidroxi-flavonas (flavonois).

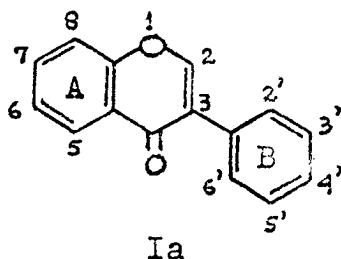


As posições dos máximos de absorção e suas respectivas intensidade podem ser utilizadas para classificação de uma substância diarilpropanóide [4,5].

Em meio neutro, as flavonas exibem pelo menos duas bandas entre 240-390 nm. A banda com máximo de absorção entre 240-280 nm é referida como banda II e entre 300-390 nm como banda I [4,5].

A relação entre as intensidades da banda I e banda II nas flavonas é muito variável, sendo maior ou menor do que 1. O mesmo

não ocorre com as isoflavonas (Ia), sendo esta relação sempre menor do que a unidade. Exclue-se desta dedução as isoflavonas que apresentem dupla ligação conjugada com o esqueleto fundamental.



Conseqüentemente, pode-se ocasionalmente decidir-se pela natureza flavônica ou isoflavônica de uma substância com base no espectro ultra-violeta.

ϵ banda I / ϵ banda II > 1 flavona
 ϵ banda I / ϵ banda II < 1 flavona ou isoflavona

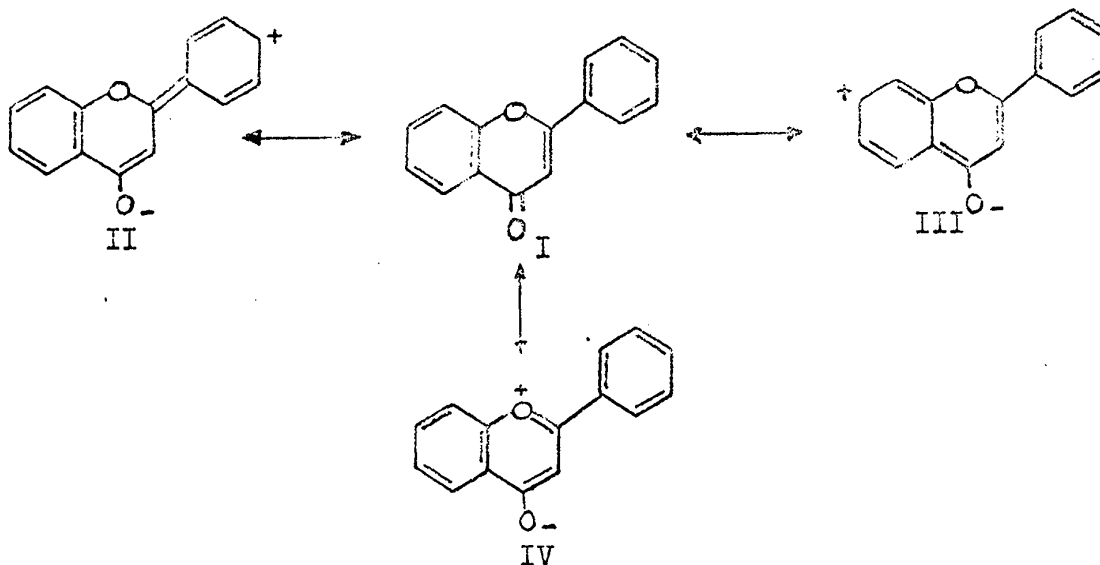
O comprimento de onda da banda I pode também ser informativo para decidir-se entre um esqueleto flavônico ou isoflavônico. Nas isoflavonas esta banda comparece entre 300-330 nm, sendo freqüentemente de muito baixa intensidade.

A presença de um grupo hidroxila no átomo de carbono 3 pode ser deduzida da posição de absorção da banda I, conforme demonstra a Tabela 1, elaborada por Mabry e colaboradores [5].

Tabela 1.

Flavonas	Nº de substâncias examinadas	Faixa da banda I
3-H	50	294 - 352
3-OCH ₃	26	330 - 359
3-OH	27	354 - 387

A posição e intensidade das bandas que aparecem no espectro u.v. de flavonas dependem da contribuição relativa das estruturas canônicas I, II, III e IV [4].



Com base no espectro de flavonas em meio neutro e alcalino, Jurd [4] admite que a estrutura cinamoilica (II) é a principal contribuinte para a banda I enquanto a estrutura benzoilica (III) é a principal responsável pela banda II.

A não contribuição de estrutura canônica tipo cinamoilica (III) no caso das isoflavonas conduz a uma fraca absorção da banda I nestas substâncias.

Em face do exposto, as posições dos máximos e suas respectivas intensidades dependem da posição e de número de funções oxigenadas que sustenta o esqueleto flavônico ou isoflavônico.

Da mesma forma, um próton hidroxílico terá o seu caráter ácido influenciado pela posição que o grupo OH ocupa na arquitetura molecular. Grupo OH localizado em C-7, posição conjugada com o grupo C=O, apresenta maior caráter ácido. Entretanto, grupo OH em C-5, também

conjugado com o C=O, não apresenta acidez. Não é capaz de ser ionizada por base fraca em vista da formação de forte ponte de hidrogênio intramolecular em hexanel. Já uma OH em C-3 apresenta acidez. É capaz de ser ionizada por base fraca. Trata-se aqui de uma OH tipo enólica e a ponte de hidrogênio intramolecular envolve um anel de 5 membros. Portanto, as posições que oferecem maior caráter ácido para protons hidróxilos são 3,4',7 nas flavonas e 7 nas isoflavonas. Grupo OH localizado nestas posições pode ser ionizado por AcONa, uma base fraca.

Diante destas considerações fica evidente a importância da obtenção de espectros u.v. em presença de aditivos. Os aditivos utilizados e suas finalidades são resumidas a seguir:

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

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

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

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

Esta solução é adicionada, nas duas cubetas, em quantidade suficiente para neutralizar a solução de NaOH usada no item anterior (1).

Comparação das curvas obtidas em presença destes aditivos

com a curva obtida em meio neutro, revela se a modificação espectral correspondente à ionização é reversível ou irreversível.

2. Acetato de sódio anidro.

Evidenciada a presença de grupamento OH através de adição de NaOH, toma-se nova alíquota da solução da substância e junta-se acetato de sódio anidro, inclusive na célula referência, até obter uma solução saturada. Este reagente ioniza somente os grupos OH em 7 em flavonoides em geral e em 3,4' e 7 em flavonas em particular. Deslocamento batocrômico de 5 a 20 nm da banda II em presença de acetato de sódio é indicativo da existência de grupo OH em C-7 sendo que a ionização de hidroxila em 3 e/ou 4' afeta principalmente a banda I [4].

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

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

3. Acetato de sódio + ácido bórico.

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

O ácido bórico em presença de acetato de sódio forma complexo com sistema orto-dihidroxilado. A formação de complexo envolvendo sistema orto-dihidroxilado localizado no anel B de flavonas provoca deslocamento batocrômico da ordem de 12 a 30 nm da banda I.

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

O tricloreto de alumínio forma complexo com sistema orto-dihidroxi e 5-hidroxi ou 3-hidroxiflavônicos [4]. A formação de tais complexos é revelado pelos deslocamentos batocrômicos observados nos máximos de absorção do espectro u.v. em presença deste aditivo (Quadro 1) [5].

4a. Solução aquecida de HCl aproximadamente 18%.

Os complexos que envolvem sistema orto-dihidroxi são decompostos pela adição de ácido e os complexos que envolvem o grupo carbonila e grupo OH em 3 ou 5 apresentam-se estáveis com adição de ácido [5]. O Quadro 1, registrado na referência 5, ilustra estas modificações.

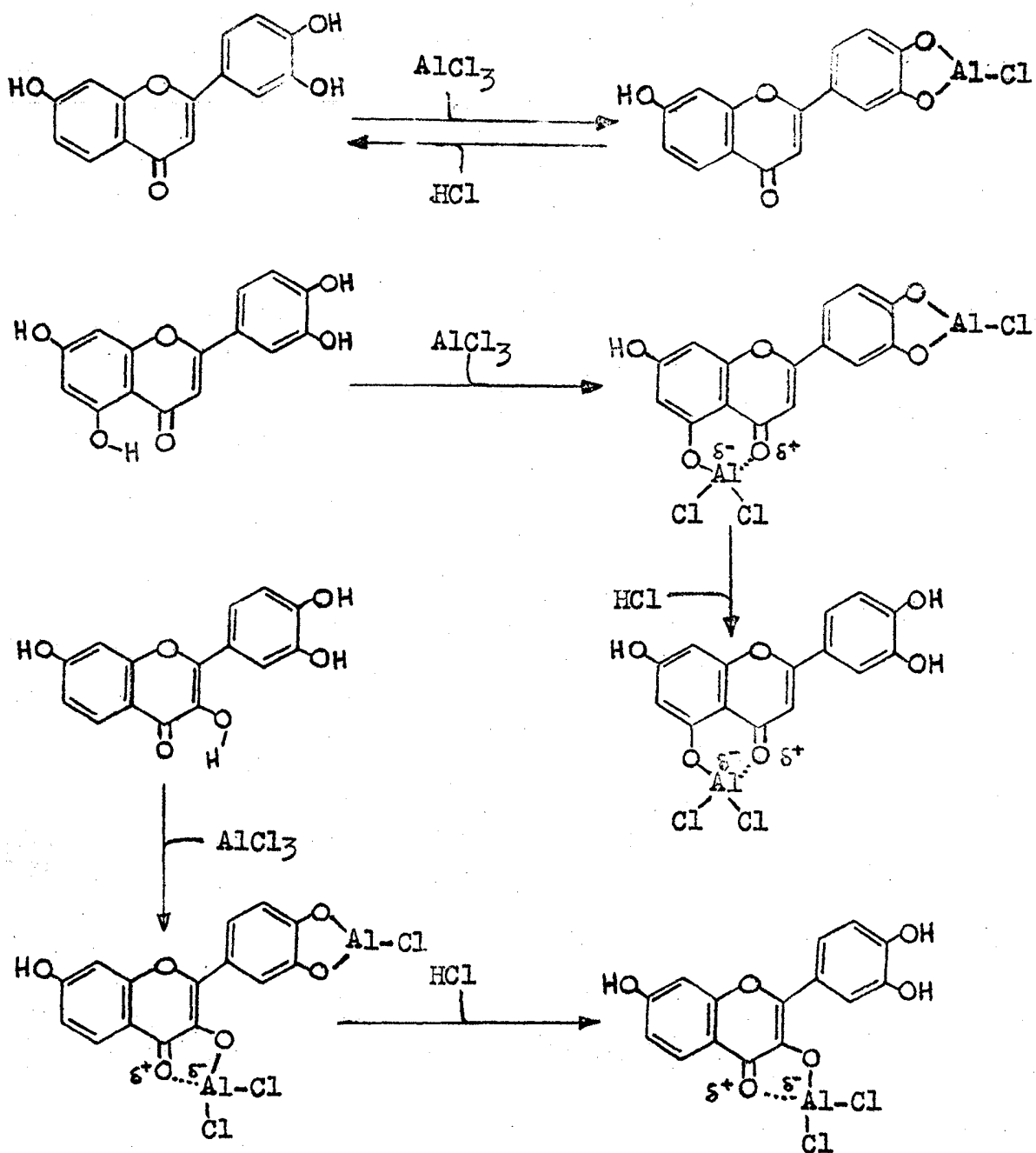
Quando o sistema orto-dihidroxi está localizado no anel B, a comparação do espectro u.v. obtido em presença de $AlCl_3$ com o espectro obtido em presença de $AlCl_3$ mais HCl revela deslocamento hipocrômico (deslocamento para menor comprimento de onda) da ordem de 30-40 nm para a banda I (ou banda Ia em caso da banda I consistir de dois picos).

Deslocamento batocrômico da banda I (em MeOH) em relação a banda Ia (em MeOH+ $AlCl_3$ +HCl) da ordem de 40 a 55 nm é favorável a 5-hidroxiflavonas, enquanto tal deslocamento sendo da ordem de 60 nm sugere 3-hidroxiflavonas.

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

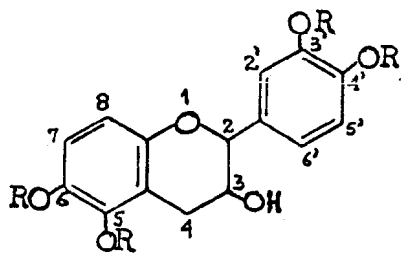
Quadro 1.

Ilustração dos tipos de complexos que $AlCl_3$ pode formar com flavonas em presença ou ausência de ácido.



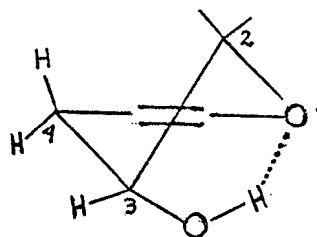
Espectrometria na Região do Infra-Vermelho

A espectrometria no infra-vermelho pode fornecer maior número de informações nos trabalhos de determinação estrutural de diarilpropanóides do que o normalmente admitido, se for convenientemente explorada. Esta dedução se baseia em experiência própria e nos trabalhos publicados em que a atenção dos pesquisadores se prende quase sempre apenas à presença ou ausência de absorções devidas aos estiramentos dos grupos OH e C=O. Para dar ênfase a este ponto citaremos um caso extremo. Whalley [6] lançou mão do método para determinação da estereoquímica do grupo OH localizado na posição 3 de uma (+)-catequina (V). Este pesquisador constatou que o éter 3',4',5,6-tetra-O-metílico (VI) revela a frequência correspondente ao estiramento OH em cerca de 40 cm^{-1} abaixo da frequência normal. Tal comportamento foi atribuído à existência de uma ponte de hidrogênio intramolecular com o oxigênio heterocíclico, compatível somente com OH em posição axial (VII).



V R = H

VI R = Me



VII

Normalmente é possível ganhar pela espectrometria no i. v., além das informações mais evidentes, tais como natureza aromática, aparecendo freqüentemente 4 a 6 bandas identificáveis entre $1625-1400\text{ cm}^{-1}$, presença ou ausência de grupos OH e C=O, até uma idéia sobre a posição e natureza de grupos na vizinhança do C=O e, em menor extensão, posição de grupo OH.

Para demonstrar este ponto focalizaremos em nossos estudo a região correspondente ao estiramento do grupo C=O do anel pirônico e a influência de grupos vizinhos sobre a posição exata de absorção. Para efetua-lo consultamos além de vários trabalhos pertinentes [7-15], principalmente a contribuição de maior vulto ao campo que se deve a Briggs e Colebrook [10].

Flavonas

As flavonas (I) que sustentam um grupo OH na posição 5 revelam a freqüência correspondente ao estiramento do grupo C=O entre $1641-1672\text{ cm}^{-1}$. A influência de outras funções oxigenadas em qualquer posição do esqueleto molecular fica muito atenuada. Através de absorção nesta faixa caracterizam-se ainda as flavonas que apresentam grupos metoxila nas posições 5,6,7,8, ou seja, possuem o anel A tetrametoxilado.

Já as flavonas que ostentam grupo metoxila na posição 5 apresentam a absorção da C=O entre $1608-1649\text{ cm}^{-1}$, mais freqüentemente em 1629 cm^{-1} . Nesta faixa absorvem também 3-hidroxi-5-metoxiflavonas. Portanto, de posse de um espectro i.v. pode-se classificar uma flavona em um dos dois grupos representados na Tabela 2. A presença de função oxigenada em outras posições não interfere nesta classificação.

Tabela 2.

Classificação de flavonas baseada na freqüência de estiramento do grupo C=O.

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

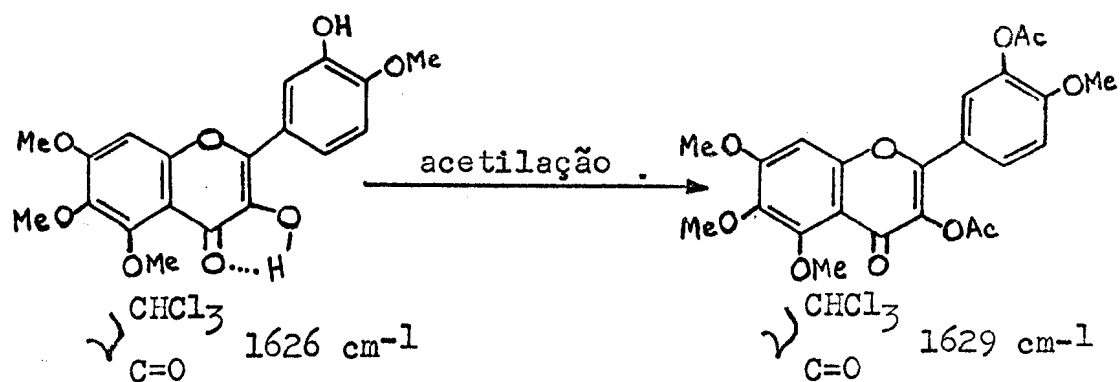
A obtenção de espectros de derivados, tais como éteres metílicos e acetatos, são de grande valia na distinção entre estas classes de substâncias. Assim, eterificação de 5-metoxi, 3,5-dimetoxi e 3-hidroxi-5-metoxiflavonas (C=O, 1629 cm^{-1} , Tabela 2) não revelariam modificação significativa na posição de absorção do estiramento C=O (Tabela 3).

Tabela 3.

Posição de absorção do grupo C=O pirônico em flavonas que sustentam um grupo metoxila em C-5, cm^{-1} .

Flavona	CHCl_3	Ref.
3,3'-dihidroxi-4',5,6,7-tetrametoxi	1626	10
3,3',4',5,6,7-hexametoxi	1626	10
6-hidroxi-3,5,7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxi	1608	10
3,5,6,7-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxi	1610	10
4'-hidroxi-3,3',5,7-tetrametoxi	1629	10
3,3',4',5,7-pentametoxi	1629	10

Espectrometria u.v. neste ponto revela-se de grande utilidade, já que somente aquelas substâncias que contêm o sistema 3-hidroxi-5-metoxi revelariam modificação espectral pela adição de tricloreto de alumínio [4,5]. Entretanto, as 3-hidroxi-flavonas que também ostentam a absorção do grupo C=O em torno de 1629 cm^{-1} (Tabela 2) teriam comportamento análogo em presença de tricloreto de alumínio. Para distinguir entre estas duas classes de substâncias, ou seja, entre 3-hidroxi e 3-hidroxi-5-metoxiflavonas o espectro i.v. do derivado acetilado destaca-se em importância. Tendo em conta que a presença de um grupo OMe em C-5 domina a influência sobre o grupo carbonílico do anel pirônico, é previsível que a acetilação de 3-hidroxi-5-metoxiflavonas não provocaria modificação importante na posição de absorção de C=O pirônico. Em acordo com esta previsão cita-se um exemplo [16] que é válido pelo fato do segundo grupo OH em 3' não estar conjugado com a carbonila do anel heterocíclico.



Já a acetilação de uma substância 3-hidroxiada que não sustenta função oxigenada na posição 5 provoca um deslocamento da frequência de estiramento do grupo C=O pirônico para região de maior energia. Assim, 3-hidroxi-6-metilflavona apresenta um deslocamento de

43 cm^{-1} ao ser acetilada e 3-hidroxi-6-metil-3',4'-dimetoxiflavona de 42 cm^{-1} . Evidentemente, eterificação destas substâncias provocará comportamento semelhante, pois também neste caso ocorre destruição do sistema quelatogênico em pentanel. O Esquema 1 resume estas considerações.

Esquema 1.

u.v AlCl ₃	ν C=O, 1629 cm^{-1}	Eterificação ou Acetilação	ν C=O, 1629 cm^{-1}	ν C=O 1653 cm^{-1}
-	5-metoxiflavonas	→		
-	3,5-dimetoxiflavonas	→		
+	3-hidroxi-5-metoxiflavonas	→		
+	3-hidroxiflavonas	→		

- : inalteração do espectro u.v em presença de AlCl₃
- + : deslocamento batocrômico dos máximos de absorção do espectro u.v. em presença de AlCl₃.

As substâncias que apresentam a absorção do grupo C=O em torno de 1653 cm^{-1} (Tabela 2) comportam-se de maneira diferente. Eterificação de 5-hidroxiflavonas, 3,5-dihidroxiflavonas e 5-hidroxi-3-metoxiflavonas conduz a absorção do grupo C=O para região de menor energia, ou seja, para região de menor frequência (18 a 51 cm^{-1} , Tabela 4). As 5-hidroxiflavonas que sustentam função oxigenada nas posições 6,7 e 8 não demonstram tal comportamento, constituindo-se uma exceção extremamente valiosa para fins analíticos. Assim, a eterificação de uma 5-hidroxiflavona com este padrão de oxigenação revela um deslocamento da banda de absorção do grupo C=O, que não passa de +5 cm^{-1} (Tabela 5).

Contrariando o que ocorre com 3-hidroxiflavonas, as 5-hidroxiflavonas, quando acetiladas, revelam deslocamento da absorção do grupo C=O pirônico para região de menor frequência (Tabela 6).

Briggs e Colebrock [10] propõem justificativas satisfatórias para explicar este fato, a priori estranhável, que 5-hidroxi flavonas apresentam a absorção do grupo C=O em maior frequência do que 5-metoxi flavonas.

Tabela 4.

Espectro i.v. de 5-hidroxi e 5-metoxi flavonas.

Flavona	C=O, cm ⁻¹		
	KBr	Nujol	Ref.
3,3',4',5,7-pentahidroxi	1656	1654	10,7
4',5-dihidroxi-3,3',7-trimetoxi	1656		10
5,7-dihidroxi-3,3',4'-trimetoxi	1653		10
4',5,7-trihidroxi-3,3'-dimetoxi	1650		10
3',4',7-trihidroxi-3,5-dimetoxi	1630		15
3,3',4',5,7-pentametoxi	1629	1627	10,7
3,3',4',5,5',7-hexahidroxi	1655		15
3',5-dihidroxi-3,4',5',7-tetrametoxi		1647	17
3',4',5',7-tetrahidroxi-3,5-dimetoxi	1630		15
3,3',4',5,5',7-hexametoxi		1629	17
3,4',5,7-tetrahidroxi	1660		15
4',5,7-trihidroxi-3-metoxi	1650		15
4',7-dihidroxi-3,5-dimetoxi	1630		15
5,7-dihidroxi-3-metoxi-3',4'-metilenodioxi	1650		10
3,5,7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxi	1629		10
5-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxi	1661		10
3,5,6,7-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxi	1610		10
5,7,8-trihidroxi-3-metoxi-3',4'-metilenodioxi	1658		10
3,5,7,8-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxi	1629		10
3',5-dihidroxi	1653		14
5-hidroxi-3-metoxi	1652		14
3',5-dimetoxi	1645		14
4',5-dihidroxi	1651		14
5-hidroxi-4'-metoxi	1655		14
4',5-dimetoxi	1649		14

Na Tabela 6 aparecem 2'-acetoxi-5'-hidroxi e 2',5-diacetoxi-flavonas, substâncias que merecem atenção especial, razão porque figuram de novo no Quadro abaixo ao lado de 5-hidroxi-2'-metoxiflavona.

Tabela 5.

Espectros i.v. de flavonas 5,6,7,8-tetraoxigenadas.

Flavona	$\nu_{C=O}, \text{ cm}^{-1}$	
	KBr	Ref.
5-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxi	1653	10
3',4',5,6,7,8-hexametoxi	1647	10
5,7-dihidroxi-4',6,8-trimetoxi	1655	20
4',5,6,7,8-pentametoxi	1650	10
3,3',4',5,6,7,8-heptametoxi	1645	10

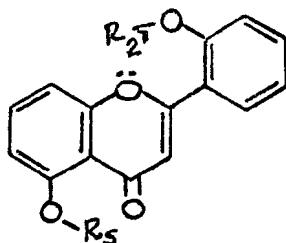
Tabela 6.

Espectros i.v. de 5-hidroxi e 5-acetoxiflavonas.

Flavona	$\nu_{C=O}, \text{ cm}^{-1}$		
	KBr	Nujol	Ref.
3',5-dihidroxi-3,4',5',7-tetrametoxi		1647	17
3',5-diacetoxi-3,4',5',7-tetrametoxi		1631	17
5,7-dihidroxi-3-metoxi	1647		14
5,7-diacetoxi-3-metoxi	1627		14
3',5-dihidroxi	1653		14
3'-acetoxi-5-hidroxi	1647		14
5-acetoxi-3'metoxi	1640		14
3',5-diacetoxi	1642		14
2',5-dihidroxi	1643		14
2'-acetoxi-5-hidroxi	1653		14
2',5-diacetoxi	1647		14
4',5-dihidroxi	1651		14
4',5-diacetoxi	1642		14
5,6-dihidroxi	1651		14
5,6-diacetoxi	1645		14
5,7-dihidroxi	1649		14
5,7-diacetoxi	1639		14

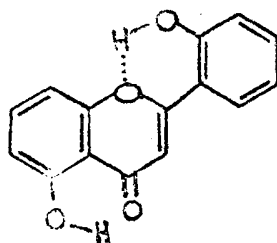
Tabela 6 - Continuação

Flavona	KBr	Mujol	Ref.
5-hidroxi-3'-metoxi	1652		14
5-acetoxi-3'-metoxi	1640		14
5-hidroxi-4'-metoxi	1655		14
5-acetoxi-4'-metoxi	1638		14
7-acetoxi-5-hidroxi	1665		14
5,7-diacetoxi	1639		14
3,3',4',5,7-pentahidroxi		1654	7
3,3',4',5,7-pentacetoxi		1640	7
3,3',4',5,8-pentahidroxi		1655	7
3,3',4',5,8-pentacetoxi		1645	7



R _{2'}	R ₅	$\nu_{C=O}$, cm ⁻¹	$\Delta\nu$, cm ⁻¹
H	H	1643	-
Ac	H	1653	+ 10
Ac	Ac	1647	+ 4 e -16
Me	H	1648	+ 5

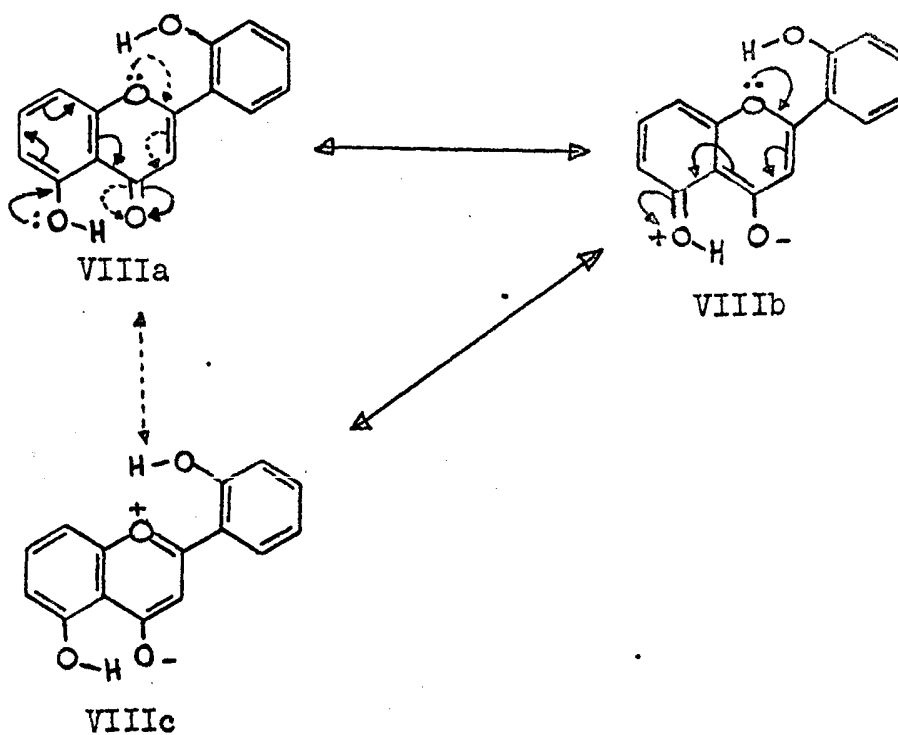
De acôrdo com os dados dêste Quadro, a acetilação ou eterificação de OH em 2' provoca um deslocamento para maior freqüência. Comportamento análogo é constatado por acetilação de 2',5-dihidroxi-flavona. Estas observações são favoráveis à existência de uma ponte de hidrogênio intramolecular em hexanel entre o grupo 2'OH e o oxigênio etérico do anel pirônico (VIII) .



VIII

Com base na argumentação de Briggs e Colebrook [10], tal comportamento é justificável.

Assim, as estruturas canônicas VIIIa, VIIIb e VIIIc têm suas contribuições alteradas se comparadas com substâncias 5-hidroxiladas sem OH na posição 2'. O híbrido de ressonância das 5-hidroxiflavonas que não sustentam OH em 2' recebe maior contribuição da estrutura



canônica VIIIc. Assim, o grupo C=O de 3',5-dihidroxi-flavona absorve em 1653, de 4',5-dihidroxi-flavona em 1651, de 5,7-dihidroxi-flavona em 1649, de 5,6-dihidroxi-flavona em 1951 e de 5-hidroxi-flavona em 1953. Entretanto, 2',5-dihidroxi-flavona revela a absorção do C=O em 1643 cm^{-1} , portanto em menor frequência do que qualquer uma das citadas acima. Em face disto, é lícito atribuir menor contribuição da estrutura canônica VIIIc nas 2'-hidroxi-flavonas. Isto é plenamente justificável já que a ponte de hidrogênio (VIII) restringe a liberdade do par de elétrons não compartilhado do oxigênio heterocíclico. Com a transformação do grupo 2'-OH em 2'-OAc a estrutura VIIIc assume maior importância e daí o grupo C=O pirônico em 2'-acetoxi-5-hidroxi-flavona absorver em 1653 cm^{-1} . Com a acetilação da hidroxila restante em 5 verifica-se o esperado deslocamento para menor frequência. Assim, 2',5-diacetoxi-flavona apresenta a absorção correspondente ao estiramento C=O do esqueleto flavonóide em 1647 cm^{-1} em comparação com 1653 cm^{-1} do monoacetato. Conseqüentemente, estes dados evidenciam a existência da referida ponte de hidrogênio intramolecular.

Isoflavonas

5-Hidroxi-isoflavonas comportam-se de maneira análoga às 5-hidroxi-flavonas.

A Tabela 7 serve para demonstrar esta dedução, embora o número de substâncias apresentadas não seja significativo e a comparação entre algumas se refere a dados de espectros obtidos em condições de meio diferente.

A semelhança de comportamento entre as duas classes de substâncias é prevista em face das 3 estruturas canônicas formuladas para flavonas poderem ser análogamente formuladas para isoflavonas.

Pode-se notar que metilação de uma OH na posição 5 produz um deslocamento da absorção do grupo C=O para menor frequência, do mesmo modo que ocorre com as flavonas. Comportamento análogo é produzido por acetilação. Portanto, no caso das isoflavonas, a tarefa de localização de grupo OH na posição 5 torna-se relativamente fácil, principalmente se corroborada pelo espectro u.v. em presença de AlCl₃.

Tabela 7.

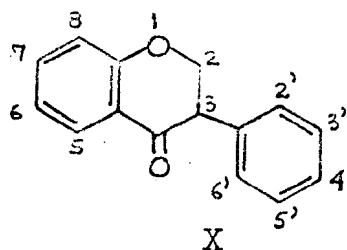
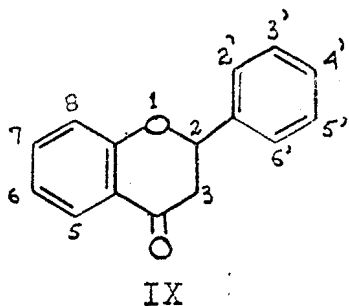
Espectros i.v de 5-hidroxi-isoflavonas e 5-metoxi-isoflavonas.

Isoflavona	ν C=O, cm ⁻¹		Ref.
	Nujol	CHCl ₃	
5,7-dihidroxi-2',4',5',6-tetrametoxi	1667		18
2',4',5,5',6,7-hexametoxi	1642		18
5,7-diacetoxi-2',4',5',6-tetrametoxi	1613		18
5-hidroxi-3',4'-metilenodioxo-6',6'-dimetilpirano (2',3':6,7)		1660	19
5-metoxi-3',4'-metilenodioxo-6',6'-dimetilpirano (2',3':6,7)		1640	19
5-acetoxi-3',4'-metilenodioxo-6',6'-dimetilpirano (2',3':6,7)		1650	19
5,7-dihidroxi-3',4'-metilenodioxo-6-(8,8-dimetilalila)	1650		19
5,7-dimetoxi-3',4'-metilenodioxo-6-(8,8-dimetilalila)		1645	19
5,7-diacetoxi-3',4'-metilenodioxo-6-(8,8-dimetilalila)		1645	19
5-hidroxi-3',4'-metilenodioxo-6',6'-dimetilpirano (2',3':6,7)	1665		19
5-acetoxi-3',4'-metilenodioxo-6',6'-dimetilpirano (2',3':6,7)		1640	19

Flavanonas e Isoflavanonas

As flavanonas (IX) e isoflavanonas (X) comportam-se de maneira diferente quando comparadas com as flavonas e isoflavonas, pois a ausência de ligação dupla entre os átomos de carbono 2 e 3 evita a con

jugação do anel B com a carbonila. Portanto, a introdução de um grupo OH em 5, causará deslocamento da absorção do grupo C=O como normalmente esperado.



As flavanonas são também referidas nos trabalhos [7-10] citados, onde se encontrará maiores detalhes.

Ressonância magnética nuclear

A espectrometria de ressonância magnética nuclear apresenta-se como o método físico de análise orgânica de mais valiosa importância nos trabalhos de determinação estrutural no campo dos diarilpropanoides. A potencialidade deste método fica aumentada com a acessoria das outras espectrometrias. Atualmente, é extremamente raro encontrar-se na literatura trabalho de investigação estrutural sem o comparecimento das espectrometrias, principalmente espectrometria de ressonância magnética protônica.

Um diarilpropanoide pode ter seu esqueleto molecular determinado com base no seu espectro de r.m.n., através de contagem do número de H e da natureza e número de grupos substituintes mais frequentemente encontrados nas substâncias naturais (Quadro 3 e 4). Evidentemente, tais grupos têm sua presença revelada através do pró-

prio espectro de r.m.n.. Além disto, a feição espectral das bandas correspondentes aos protons do anel heterocíclico e suas respectivas posições de absorção permitem avaliar a natureza do diarilpropanoide (Tabela 8).

Tabela 8.

Classificação de diarilpropanoides com base na absorção dos protons do anel heterocíclico. Os deslocamentos químicos são registrados em unidades τ .

Flavonas	3,20-3,46 (s, H-3)
Isoflavonas	1,63-2,27 (s, H-2)
Flavanonas	4,53-4,58 (dd, H-2); 6,97-7,05 (dd, H-3a); 7,04-7,11 (dd, H-3e).
3-OH-Flavanonas ..	4,45-5,04 (d, H-2); 5,28-5,80 (d, H-3)
Isoflavanonas	\sim 5,40 (d, H _A ; d, H _B); \sim 5,80 (dd, H-3)
Chalconas	\sim 2,20 (d, H _B); \sim 2,40 (d, H ∞)
3-OH-Flavanos	\sim 4,95-5,33 (d, H-2); 5,73-5,96 (m, H-3); 6,93-7,34 (dd, 2H, H-4)
Isoflavanos	\sim 5,7 (d, He-2); \sim 6,0 (d, Ha-2); 6,30-6,90 (m, He-3); \sim 7,20 (d, He-4, Ha-4).
Pterocarpanos	\sim 5,6-6,6 (m, 3H, H-6, H-6a); 4,5 (d, H-11a).

Um dos principais problemas encontrados na obtenção de espectros de r.m.n. de diarilpropanoides envolve a baixa solubilidade apresentada pela maioria destas substâncias nos solventes usuais ($CDCl_3$, CD_3COCD_3). Já CD_3SOCD_3 apresenta-se como um solvente capaz de dissolver mesmo as substâncias mais polares [21], inclusive muitos glicosídeos. Se este solvente é anidro pode-se deduzir a posição de grupo hidroxila no esqueleto diarilpropanoide, com base na posição de absorção de protons hidroxílicos (Tabela 9) [21].

Tabela 9.

Posição de absorção de protons hidroxílicos, solvente CD_3SOCD_3 , unidades τ .

	3-OH	3'-OH	4'-OH	5-OH	7-OH
Flavonas	0,3	0,70	-0,7	-2,55	-0,65
	^a 0,6		^a -0,42	^a -3,20	^a -0,93
Isoflavonas	-	-	0,33	-3,00	-0,88
				^a -3,05	^a -0,97
Flavanonas	-	-	-	-2,15	-0,78
				^a -2,20	^a -0,85

Ao lado disto, registra-se algumas desvantagens na utilização do CD_3SOCD_3 como solvente:

- a. a recuperação de amostra torna-se difícil em vista do ponto de ebulição, 189°C, relativamente elevado.
- b. a absorção de água com muita facilidade dá origem ao aparecimento do sinal correspondente aos protons de H_2O em torno 6,5 τ , região de interêsse no espectro de determinação dos diarilpropanoides.
- c. o perigo da facilidade de penetração na pele do pesquisador servindo como veículo para substâncias nêle dissolvidas.
- d. possibilidade de decomposição da amostra. Já observou-se tal fenômeno com algumas substâncias diarilpropanoides.

Em face disto, é sempre conveniente a preparação de derivados solúveis em $CDCl_3$. Entre os derivados mais comumente preparados

cita-se: acetato, éter trimetilsilílico, éter metílico, éter etílico.

A obtenção do acetato ou do éter trimetilsilílico revela-se mais prática em vista da possibilidade de recuperação da substância no seu estado original mediante reação de hidrólise. A reação de esterificação, bem como a de trimetilsililização, é simples de executar. Para o estudo dos éteres trimetilsilílico aconselha-se consultar o trabalho de Mabry e colaboradores [5]. A preparação destes éteres, muitos dos quais solúveis até mesmo em CCl_4 , é tarefa relativamente simples. Tanto a preparação como a hidrólise leva a rendimentos quantitativos.

Locker e colaboradores [22] chamam atenção para a facilidade de hidrólise de acetato de flavanoides através do uso do imidazol como base. Trata-se de uma substância de muito fraca basicidade e que patrocina rendimentos que variam de 60 a 100%. A importância da preparação do acetato derivado reflete-se também na relativa facilidade de contagem do número de grupo OH presente na substância original. Além disto, pode-se deduzir a vizinhança de tais grupos no esqueleto diarilpropanoide.

Flavonas.

O esqueleto básico das flavonas (I) apresenta um total de 10 posições possíveis de substituição. Portanto o número de grupos substituintes e de prótons deve satisfazer esta exigência estrutural.

A presença de H em C-3 pode ser deduzida pelo comparecimento de um sinal simples entre 3,46-3,91 τ [23], espectro registrado em CDCl_3 ou CD_3SOCD_3 como solvente. Entretanto, a presença de um sinal simples nesta região não indica definitivamente a existência de H em C-3. Um próton em C-8, por exemplo, em sistema 5,6,7-trioxigena

do é representado por uma banda simples que aparece também na faixa de absorção referida.

As isoflavonas apresentam o prótom em C-2 entre 2,27 e 1,63 τ . Esta região é mais livre de interferência, sendo consequentemente de maior o valor diagnóstico.

Já que o número, natureza e posição de grupos substituintes no anel A não afetam significativamente as posições de absorção dos prótons do anel B, e vice-versa, estudaremos os padrões de oxigenação dos aneis A e B de diarilpropanoïdes naturais, especialmente as flavonas, separadamente.

Flavonas com anel B não substituído.

A ausência de substituinte no anel B pode ser deduzida pelo aparecimento de duas bandas multiplas, representando dois e três prótons respectivamente. A banda que representa os dois prótons H-2',6' aparece em campo mais baixo que a banda que representa os prótons H-3',4',5' (Tabela 10).

A conjugação com o grupamento carbonílico e o efeito anisotrópico dêste grupo e da ligação dupla do anel heterocíclico justificam o aparecimento da banda correspondente aos prótons H-2',6' em campo mais baixo.

Tabela 10.

Deslocamentos químicos correspondentes a prótons localizados no anel B de diarilpropanoïdes, unidades τ .

<u>Substância</u>	<u>H-2',6'</u>	<u>H-3',4',5'</u>	<u>Referência</u>
Flavonas	2,03 a 2,21	2,43 a 2,54	24
Flavanonas		2,58	24
Isoflavonas	2,52 - 2,61		24

As isoflavonas e flavanonas apresentam uma banda única representando os 5 prótons do anel B (Tabela 10), em face da ausência de conjugação do anel B com o grupo carbonila.

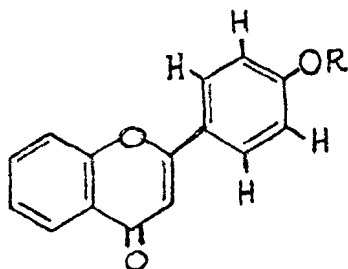
Flavonas com anel B 4'-substituído.

O espectro destas substâncias revela um sistema $A_2 B_2$, rigorosamente um sistema $AA'BB'$. As posições de absorção (Tabela 11) dos prótons, especialmente os prótons 3', 5' (orto ao grupo), variam muito pouco, quando R do grupo OR for R=H ou Me. Entretanto, a comparação de espectros de substâncias em que R=Me com espectros de substâncias em que R=COCH₃ revela-se de importância nos trabalhos de investigação estrutural. Esta análise comparativa permite deduzir pela existência ou não de grupo OH em 4', já que este grupo exerce praticamente o mesmo efeito de proteção exercido pelo grupo OMe. Entretanto a acetilação de um grupo OH em 4', deslocará a banda correspondente aos prótons 3',5' para menor campo, deslocamento paramagnético, enquanto a banda correspondente aos prótons 2',6' não sofre modificação significativa (Tabela 11).

A posição de absorção dos prótons 3',5' não varia significativamente com a natureza do anel heterocíclico, mesmo que esteja o anel B ligado ao átomo de carbono 2 ou 3. O mesmo não ocorre com os prótons 2',6' que recebem influência da natureza do anel heterocíclico.

Tabela 11.

Espectros de r.m.n. de flavonas 4'-oxigenadas. Os valores registrados independem praticamente da natureza e do número de grupos presentes nos outros anéis.



R	H-2',6'	H-3',5'	Solvente	Referência
Me	1,82-2,22	2,95-3,05	CDCl ₃	24,25
Ac	1,76-2,15	2,70-2,76	CDCl ₃	24,25
SiMe ₃	1,90-2,90	2,90-3,35	CCl ₄	5
H	1,90-2,02	3,02-3,10	(CD ₃) ₂ SO	23

Flavonas com anel B 3',4'-dioxigenado.

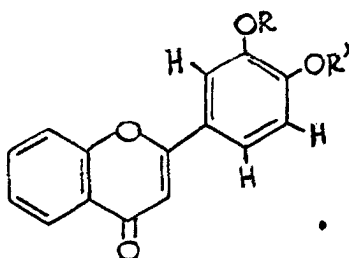
A presença de função oxigenada nas posições 3',4' origina espectros mais complexos do que aqueles das substâncias 4'-oxigenadas. Mesmo assim, este padrão de substituição é facilmente reconhecida no espectro.

O sinal correspondente ao H-5' aparece como banda dupla (J em torno de 8,5Hz) e em campo mais alto em vista do efeito de proteção do grupamento OR (R=H ou Me). Em relação ao anel B 4'-oxigenado, os protons H-2' e H-6' recebem maior influência protetora do grupo OR em 3' do que H-5', já que este último próton ocupa posição meta em relação a função oxigenada adicional sustentada pelo átomo de carbona 3'. Aparecem em campo mais baixo em face da conjugação com o grupo C=O ou pela proximidade da região de desproteção da ligação dupla do anel heterocíclico e do grupo C=O (Tabela 12). Já que o H-6' ocupa posição para em relação ao grupo OR em C-3', recebe menor efei-

to de proteção do que H-2', pois êste último ocupa posição orto. Entretanto, registra-se alguns casos em que o H-6' absorve em campo ligeiramente mais alto do que H-2'. A banda correspondente ao H-6' apresenta-se como um quartêto (J em tôrno de 8,5 e 2,5 Hz) e H-2' como dublête (J em tôrno de 2,5Hz). Na maioria dos casos ocorre superposição destas bandas.

Tabela 12.

Posição de absorção dos protons H-2', H-5' e H-6' no espectro de r.m.n. de flavonas.



R	R'	H-2'	H-6'	H-5'	Solvente	Referência
H	H	2,22-2,40	2,32-2,50	2,99-3,02	(CD ₃) ₂ SO	23
H	Me	2,22	2,19	3,00	CDCl ₃	25
Me	Me	2,10-2,68	2,11-2,50	2,96-3,05	CDCl ₃	24,25
SiMe ₃	Me	2,70-2,80	2,50-2,70	2,90-3,30	CCl ₄	5
SiMe ₃	SiMe ₃					
Me	SiMe ₃	2,20-2,40	2,40-2,60	2,90-3,30	CCl ₄	5

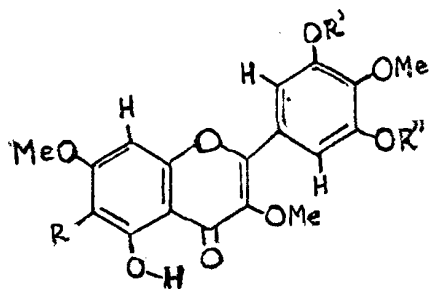
As isoflavonas e flavanonas 3',4'-dioxigenadas revelam espectros em que os protons 2',5' e 6' são representados por bandas mais complexas, usualmente 2 picos aparecem entre 2,90-3,30 τ |5,26|. As posições 2' e 6' nestas substâncias não recebem influência mesomérica do grupo C=O por falta de conjugação.

Flavonas com anel B 3',4',5'-trioxigenado.

A existência de grupos OR (R=H ou Me) nas posições 3',4',5' do anel B de flavonas ocasiona o aparecimento de um sinal único representando os protons localizados nos átomos de carbono 2' e 6'. Este comportamento é previsível. O efeito protetor exercido por um grupo OH e OMe é o mesmo [27]. Os exemplos que figuram na Tabela 13, revelam a posição de absorção dos protons H-2', 6' e a distribuição assimétrica de funções oxigenadas no anel B 3',4',5'-trioxigenado que pode ser deduzida através do espectro de r.m.n. do derivado acetilado.

Tabela 13.

Espectros de r.m.n. de flavonas com anel B 3',4',5'-trioxigenado.



R	R'	R''	H-2',6'	H-2'	H-6'	Ref.
H	H	Me	2,90+			[28]
			s			
H	Me	Me	2,62			[25]
			s			
H	CH ₃ CO	Me		2,40	2,60	[28]
				d	d	
				J=2,0Hz	J=2,0Hz	
H	CH ₃ CO	CH ₃ CO	2,23			[25]
			s			
OMe	Me	Me	2,62			[25]
			s			
OMe	CH ₃ CO	CH ₃ CO	2,24			[25]
			s			

+ Estranhamente, este sinal aparece em campo muito alto. Este dado está em desacordo com Ballantine e Pillinger [27].

As isoflavonas apresentam duas bandas duplas (J em torno de 2Hz), representando 1 próton cada uma, correspondentes aos prótons em C-2' e C-6' [5]. As duas bandas aparecem em torno de 3,30 e 3,40 τ . As diferentes posições de absorção se devem, provavelmente, ao efeito anisotrópico exercido pelo grupamento C=O. O próton que se encontra mais próximo deste grupo sofrerá maior influência desprotetora.

Flavonas com anel B 2',4',5'-trioxigenado.

Pelo que nos consta, substâncias com este padrão de oxigenação não tiveram seus espectros de r.m.n. registrados na literatura. Assim, o nosso trabalho com as substâncias isoladas de Apuleia leiocarpa registra pela primeira vez os espectros de r.m.n. de flavonas com este padrão de substituição. Tais espectros são discutidos no capítulo das determinações estruturais, incluindo os dos derivados acetilados. Os prótons em 3' e em 6' são representados por sinais simples. O próton em 3' ($\sim 3,40\tau$) absorve em campo mais alto do que o próton em 6' ($\sim 2,74\tau$).

Flavonas com anel B 2',3',4'-trioxigenado.

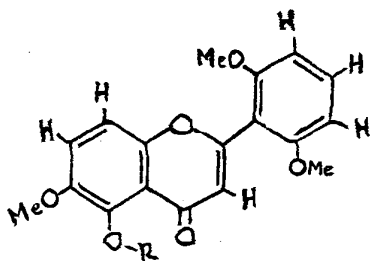
Duas flavonas com este padrão de oxigenação foram também isolados da Apuleia leiocarpa. Os espectros de r.m.n. dos isolados naturais e seus derivados são discutidos no capítulo das determinações estruturais. Os prótons em 5' e 6' são representados por bandas duplas (J em torno de 8,5 Hz). O próton em 6' ($\sim 2,74\tau$) absorve em campo mais baixo do que o próton em 5' ($\sim 3,26\tau$).

Flavonas com anel B 2',6'-dioxigenado.

A zapotina e zapotinina [29,30] são duas flavonas naturais que apresentam um tipo de substituição muito especial, 2',6'-dioxigenado (Tabela 14).

Tabela 14.

Espectros de r.m.n. da zapotina e zapotinina em $CDCl_3$.



R	H-3	Sistema AB		Sistema AB ₂		OH	OMe
		H-7	H-8	H-4'	H-3',5'		
H	3,69	2,74	3,11	2,58	3,36	-2,8	6,22
		d	d	t	d		6,22
		J=9Hz	J=9Hz				6,08
Me	3,70	2,72	2,85	2,61	3,35	-	6,22
		d	d	t	d		6,22
		J=9Hz	J=9Hz				6,03 6,02

Flavonas com anel A 7-oxigenado.

Os prótons H-5, H-6 e H-8 de uma flavona com anel A sustentando uma função oxigenada em C-7 compoem um sistema ABC tendendo a ABX (Tabela 15). O próton em C-5 é representado por uma banda dupla (J em torno de 8,5Hz), o próton em C-6 como uma banda quadrupla (J em torno de 8,5Hz e 2,5Hz), o próton em C-8 por uma banda dupla (J em torno

de 2,5Hz). O próton H-5 absorve em campo mais baixo do que H-6 e este em campo ligeiramente mais baixo do H-8 (Tabela 15). Efeito mesomérico e anisotrópico são os principais responsáveis pela blindagem eletrônica de tais prótons.

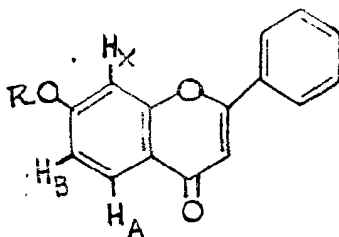
Feição espectral análoga pode ser constatada nos espectros de qualquer diarilpropanoide. Evidentemente, a presença de grupo C=O em 4 altera significativamente a posição de absorção do próton localizado em C-5.

Flavonas com anel A 5,7-dioxigenado.

As substâncias que apresentam este padrão de oxigenação no anel A são distinguidos com relativa facilidade. Nestes casos os prótons H-8 e H-6 constituem um sistema AB, com J em torno de 2,5Hz (Tabela 16). Conforme se deduz da Tabela 16, a comparação de espectros da substância original com o do seu derivado acetilado permite atribuir a presença de grupo OH em C-5 e/ou C-7.

Tabela 15.

Espectros de r.m.n. de flavonas 7-oxigenadas.



R	H _A	H _B	H _X	Solvente	Nº de Subst.	Ref.
Me	1,84	2,98	3,01	CDCl ₃	4	24
	a	a	a			
	1,94	3,04	3,13			
	d	dd	d			
Ac	1,76	2,82	2,60	CDCl ₃	3	24
	a	a	a			
	1,77	2,87	2,65			
	d	dd	d			
SiMe ₃	1,80	2,90	3,00	CCl ₄	3	5
	a	a	a			
	2,10	3,30	3,30			
	d	dd	d			
	J=9Hz	J=9Hz	J=2,5Hz			
		J=2,5Hz				

Flavonas com anel 6,7-dioxigenado.

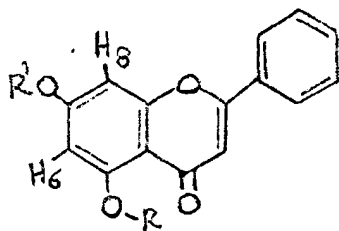
A ocorrência de flavona natural com este padrão de oxigenação é rara. Evidentemente, os prótons localizados em C-5 e C-8 são

representados por bandas simples. Massicot e col. [24] registram os deslocamentos químicos de tais prótons na 6,7-dimetoxiflavona e na 6,7-diacetoxiflavona:

6,7-dimetoxiflavona	$\frac{H-5}{2,52}$	$\frac{H-8}{3,10}$
6,7-diacetoxiflavona	2,00	2,49

Tabela 16.

Espectros de r.m.n. de flavonas 5,7-dioxigenadas



R	R'	H-6	H-8	Solvente	Referência
H	H	3,70 - 3,75	3,45 - 3,54	(CD ₃) ₂ SO	[21,23]
H	Me	3,63 - 3,86	3,44 - 3,72	CDCl ₃	[24,25,28]
H	Me	3,62	3,38	(CD ₃) ₂ SO	[21]
Me	Me	3,64 - 3,70	3,43 - 3,54	CDCl ₃	[24,25,28]
Ac	Me	3,38 - 3,42	3,11 - 3,20	CDCl ₃	[24,28]
Ac	Ac	3,12 - 3,17	2,65 - 2,69	CDCl ₃	[24,25]
SiMe ₃	SiMe ₃	3,80 - 4,00	3,50 - 3,70	CCl ₄	[5]
SiMe ₃	Glicosídeo	3,60 - 3,80	3,10 - 3,50	CCl ₄	[5]

Flavonas com anel A 5,6,7-trioxigenadas

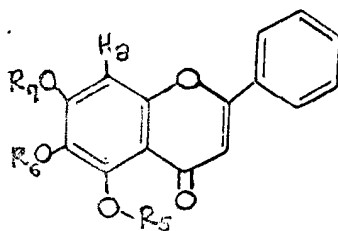
O sinal simples correspondente ao próton em C-8 de flavonas com este padrão de oxigenação tem sua posição de absorção dependente basicamente da natureza dos grupos localizados em C-5 e C-7 (Tabela 17). Substituintes no anel heterocíclico e no anel B também não influem significativamente na posição de absorção de H-8.

Flavonas com anel A 5,7,8-trioxigenadas

O sinal simples correspondente ao próton em C-6 aparece geralmente em campo mais alto do que o correspondente a C-8 (Tabela 18). Substituintes localizados no anel heterocíclico e/ou no anel B também não modificam significativamente a posição de absorção do sinal correspondente a H-6.

Tabela 17.

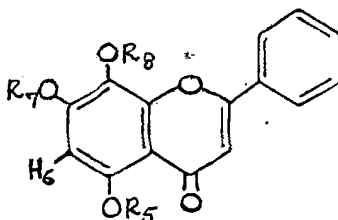
Espectros de r.m.n. de flavonas 5,6,7-trioxigenadas.



R ₅	R ₆	R ₇	H-8	Solvente	Referência
H	Me	Me	3,49	CDCl ₃	[25]
Me	Me	Me	3,20 - 3,25	CDCl ₃	[25,31]
Ac	Me	Me	3,14 - 3,15	CDCl ₃	[25,32]

Tabela 18.

Espectros de r.m.n. de flavonas 5,7,8-trioxigenadas.



R ₅	R ₇	R ₈	H-6	Solvente	Referência
H	Me	Me	3,57 - 3,58	CDCl ₃	[25]
Me	Me	Me	3,54	CDCl ₃	[25]
Ac	Me	Me	3,29 - 3,33	CDCl ₃	[25]
Ac	Ac	Me	3,15 - 3,20	CDCl ₃	[32]
Ac	Ac	Ac	2,99	CDCl ₃	[24]

Grupo metoxila.

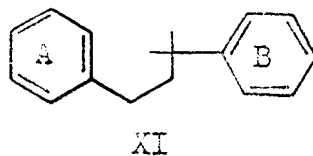
As absorções correspondentes a grupos metoxila aparecem entre 5,90 - 6,40 τ . A influência de solvente na absorção de grupos metoxila tem recebido atenção de alguns pesquisadores [33]. A natureza do solvente pode afetar bastante a posição de absorção de grupos OMe e tal comportamento pode ser ocasionalmente de utilidade na determinação estrutural de flavonas.

Grupo acetoxila.

Grupos acetoxila são revelados por sinais simples. Aparecem entre 7,45 - 7,70 τ [24,25,28,32]. Grupo acetoxila localizado no átomo de carbono 5 é revelado por banda simples que aparece em torno de 7,50 τ , próximo ao limite inferior desta faixa.

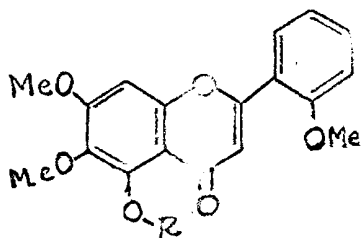
Espectrometria de massa.

O trabalho de Reed e Wilson [34] marcou o início da aplicação da espectrometria de massa no campo dos diarilpropanoides (XI). Os autores estudaram o comportamento de alguns flavonoides e isoflavonoides conhecidos sob o impacto eletrônico no espectrômetro de massa. Os resultados experimentais serviram para demonstrar as possibilidades de utilização deste método para fins de determinação estrutural.



Com o objetivo de justificar esta afirmação é oportuno referir-se às estruturas da zapotina e da zapotinina, substâncias isoladas de Casimiroa edulis da família Rutaceae [35]. Sondheimer e Meisels [36] com base em evidências químicas de interconversão e degradação alcalina formularam as hipóteses estruturais XII e XIII para zapotinina e zapotina, respectivamente. A obtenção de cerca de 50% de ácido salicílico e cerca de 10% de resorcinol por hidrólise alcalina da desmetilzapotina constituiu uma forte evidência química para estas proposições.

Recentemente, trabalhos de síntese da 2',5,6,7-tetrametoxiflavona [37] demonstraram que esta substância tem propriedades físicas diferentes da zapotina.

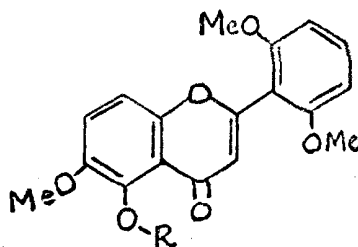


XII, R=H zapotinina

XIII, R=Me zapotina

Em 1967, Garratt, Scheinmann e Sondheimer [29] e, independentemente, Dreyer e Bertelli [30] reformularam as estruturas dos dois isolados naturais com base nos espectros de r.m.n. obtidos em aparelhos que trabalham a 60 MHz e 100 MHz.

Assim, a zapotinina foi definida como 5-hidroxi-2',6,6'-tri metoxiflavona (XIV) e a zapotina como 2',5,6,6'-tetrametoxiflavona (XV).



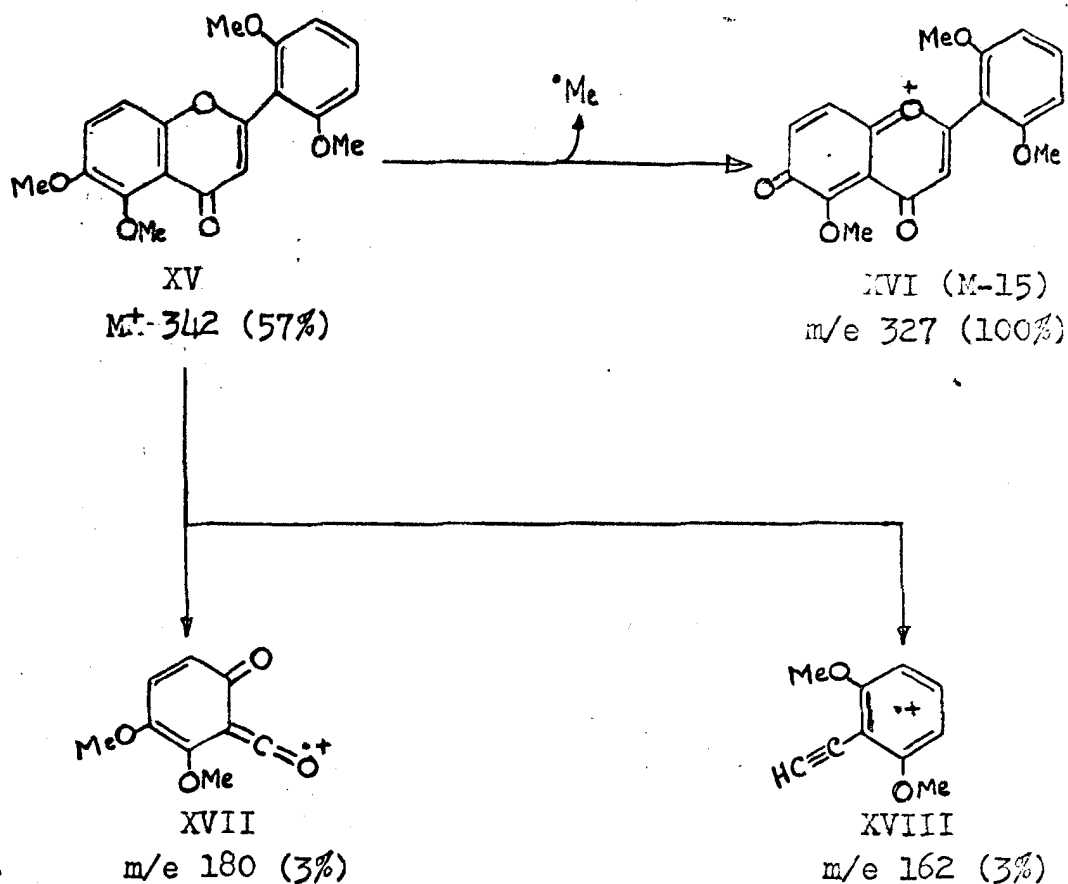
XIV, R=H zapotinina

XV, R=Me zapotina

Dreyer e Bertelli [30] registraram também o espectro de massa da zapotina (XV). O ion molecular (M^+ 342) aparece com uma abundância relativa de 57% e o pico base corresponde à expulsão de CH_3 ($M-15$). A perda fácil de 15 unidades de massa (CH_3) é portanto favorável a existência de um grupo metoxila em C-6, já que esta posição é conjugada com o oxigênio heterocíclico do anel pirônico (XVI, Quadro 2).

Quadro 2.

Caminhos principais de fragmentação da zapotina (XV) no espectrômetro de massa.



Além disto, a fragmentação retro Diels - Alder origina a formação dos fragmentos XVII e XVIII, representados por picos de baixa intensidade relativa (Quadro 2). Entretanto, é lícito atribuir, neste caso, maior valor às abundâncias relativas 3% do que a 50% de ácido salicílico obtido por metodologia química. Vale salientar, que picos em m/e 210 e m/e 132, que seriam correspondentes aos fragmentos originários da estrutura XIII proposta inicialmente para a zapotina através da mesma racionalização mecanística, não aparecem no

espectro de massa.

Três fatores principais podem ser citados para justificar a aceitação crescente da espectrometria de massa pelos pesquisadores, especialmente aqueles ligados ao estudo da química de produtos naturais:

- a. o aparecimento de espectrômetros mais aperfeiçoados que são colocados ao alcance do químico.
- b. a quantidade de substância necessária para obtenção de um espectro de massa (cêrca de 1 mg).
- c. o número de informações que pode ser obtido do espectro de massa, além do pêso molecular das substâncias.

Evidentemente, a potencialidade do método torna-se mais acentuada quando associado aos outros métodos físicos de análise orgânica (espectrometria no u.v., no i.v. e de r.m.n.).

1. Determinação do pêso molecular e fórmula molecular.

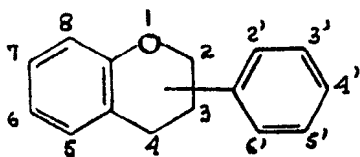
O espectro de massa de um diarilpropanoide é via de regra dominado por um número reduzido de picos, que aparecem predominantemente na região de massas mais elevadas, nas imediações do pico molecular, e na região de massas médias, parte central do espectro.

O pico correspondente ao ion molecular é facilmente reconhecido já que freqüentemente revela-se bastante intenso, não raro constituindo o pico base. Tal comportamento era previsto. A aromaticidade dos flavonoides confere grande estabilidade do ion molecular.

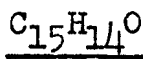
Com base no pêso decorrente do esqueleto básico fundamental (Quadro 3) e nos principais grupos substituintes (Quadro 4) que ocorrem em substâncias naturais, pode-se deduzir a fórmula molecular de um diarilpropanoide. A presença e natureza de grupos substituintes po

dem ser deduzidos com grande segurança por espectrometria de r.m.n.
Quadro 3.

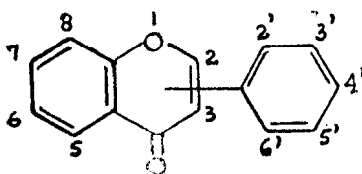
Classes de substâncias diarilpropanóides.



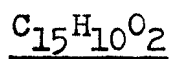
XIX



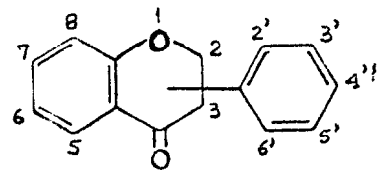
Flavanos
Isoflavanos



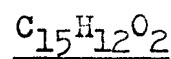
XX



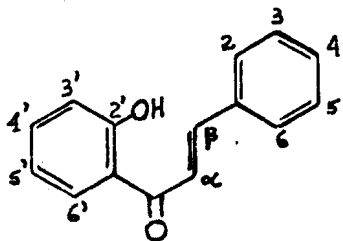
Flavonas
Isoflavonas



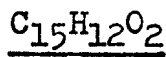
XXI



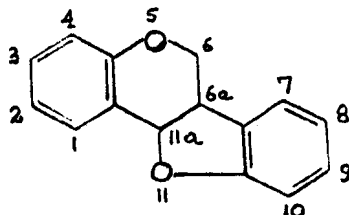
Flavanonas
Isoflavanonas



XXII



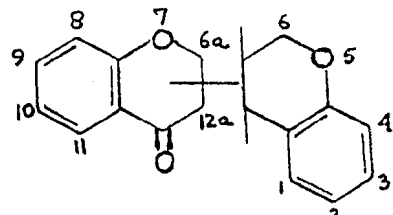
Chalconas



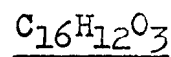
XXIII



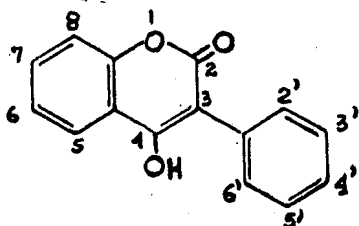
Pterocarpanóides



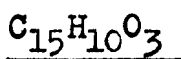
XXIV



Rotenonas
14-oxo-peltoginanos



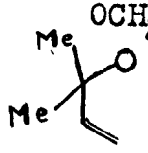
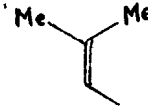

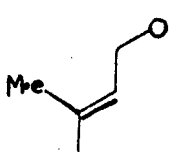
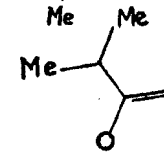
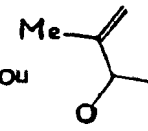
XXV



Isoflavonois

Quadro 4.

Principais substituintes presentes em diarilpropanoide.

<u>Grupo</u>	<u>massa-1ª</u>	<u>massa-2ª</u>
OH	16	
OCH ₃	30	
OCH ₂ O		44
		82
	68	
		40
	84	
 ou 		82

a

Esta coluna indica a massa pela qual o grupo aumenta a massa do diarilpropanoide, ao substituir um ou dois hidrogênios da substância fundamental não substituída.

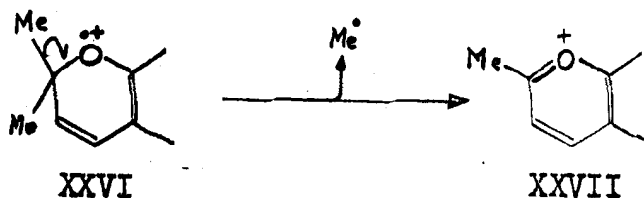
Assim, a soma das massas da substância fundamental e dos grupos substituintes tentativamente escolhidos, permitirá propor fórmula molecular para uma substância. Para exemplificar podemos citar uma substância cujo espectro de massa revela peso molecular 270. Este peso molecular pode corresponder ao peso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

Com base nestes dados poderíamos estar diante de uma flavona, chalcona, isoflavanona ou pterocarpano (Quadro 3) de fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_2(OMe)(OH)$. Evidentemente, os caminhos de fragmentação seguidos pelos pterocarpanos permitem distingui-los das flavanonas, chalconas e isoflavanonas. As rupturas envolvendo o hexanel heterocíclico nos pterocarpanos levam a fragmentos diferentes daqueles originários das flavanonas, chalconas e isoflavanonas. A viabilidade destas fragmentações conduz a análise do espectro para a região de picos que correspondem às massas intermediárias.

2. Análise do espectro de massa nas imediações do ion molecular.

A presença de grupo OMe pode ser atribuída pela análise aritmética do espectro através da perda de 30 e/ou 31 e/ou 15 unidades de massa. Já a presença do grupo OH pode ser proposta através da verificação de picos em M-17 e/ou M-18. A contagem do número de grupo OH pode ser obtido através do espectro de massa do produto de metilação ou acetilação.

Freqüentemente, as substâncias que sustentam o substituinte XXVI apresentam o pico base em M-15 devido a fácil expulsão de radical metila para formar um ion não radicalar (XXVII), com estabilidade significativa.



Portanto, é perfeitamente previsível que o número, a natureza e a posição de grupos substituintes pode modificar significativamente o comportamento de diarilpropanoides no espectrômetro de massa. É evidente, que o aumento de grupos substituintes oxigenados permite uma maior estabilização do ion molecular através de efeitos eletrônicos, principalmente mesomérico.

3. Análise do espectro de massa na região de picos de massas intermediárias.

As fragmentações que envolvem o hexanel heterocíclico podem ser utilizadas para confirmação de um esqueleto diarilpropanoide. Além disto, o número e a natureza de grupos substituintes podem ser conferidos através dos fragmentos que envolvem os aneis A e B. As fragmentações que ocorrem no anel heterocíclico sem rearranjo de hidrogênio são referidas como retro-Diels-Alder (Quadro 5).

Os pterocarpanos (XXIII), apresentam condições estruturais desfavoráveis para este tipo de fragmentação. Por isto os pterocarpanos podem ser distinguidos das chalconas e flavanonas, embora possuam a mesma fórmula básica fundamental, $C_{15}H_{12}O_2$.

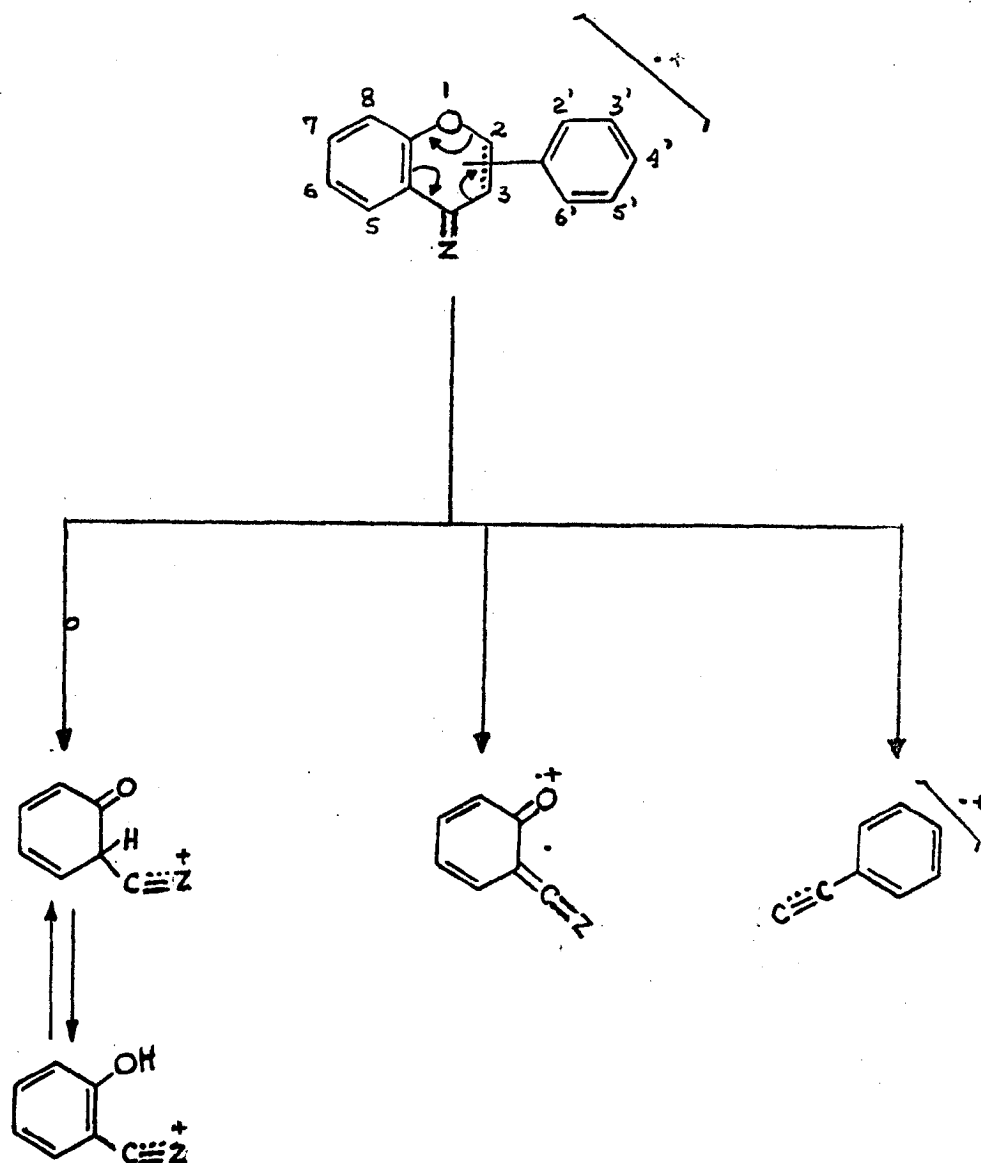
4. Flavonas.

As flavonas apresentam um esqueleto básico de fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_2$ (Quadro 3) e diante das possibilidades de substituintes referidos no Quadro 4 pode-se formular estrutura molecular para estas substâncias.

As flavonas que não sustentam função oxigenado no átomo de carbono 3 revelam a presença de pico em $M-28$ e $M-28/2e$, correspondente à expulsão de monóxido de carbono.

Quadro 5.

Fragmentação envolvendo deslocamento compensado de eletrons sem rearranjo e com rearranjo de hidrogênio. Z = oxigênio ($>C=O$), Z = H, OH ($>CHOH$) ou Z=H,H ($>CH_2$).



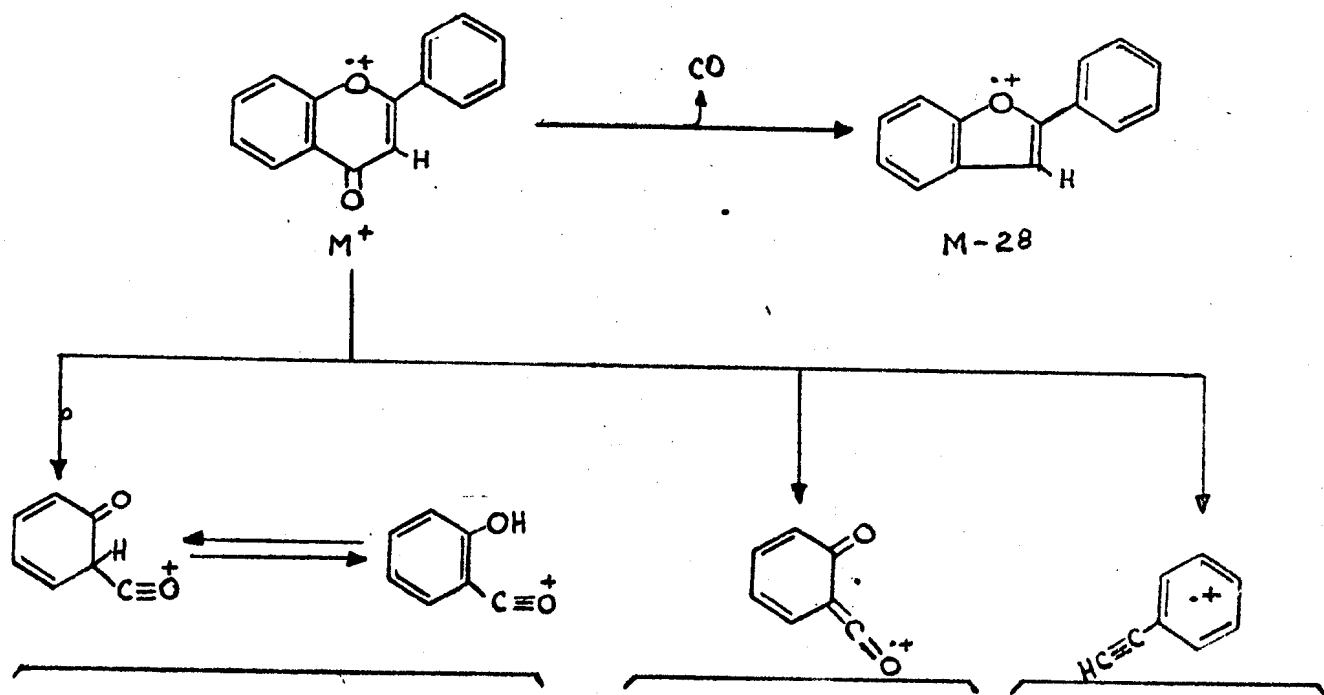
A fragmentação tipo retro-Diels-Alder e o deslocamento compensado de elétrons com rearranjo de hidrogênio, aparecem como caminhos importantes (Quadro 5). Tal comportamento permite, portanto, não só averiguação adicional da natureza flavônica de uma substância, mas também estabelecer uma distribuição dos grupos substituintes nos anéis A e B [34,38,41]. Evidentemente, tais ions podem sofrer novas fragmentações.

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

No Quadro 6 representa-se os caminhos principais de fragmentação de flavonas que não contêm função oxigenada na posição 3 [38].

Quadro 6.

Caminhos principais de fragmentação de flavonas no espectrômetro de massa.



1.	$\frac{C_7O_2H_5}{121}$	%	$\frac{C_7O_2H_4}{120}$	%	$\frac{C_8H_6}{102}$	3
		6		80		12
2.	$\frac{C_7O_2H_4(OH)}{137}$	-	$\frac{C_7O_2H_3(OH)}{136}$	48	$\frac{C_8H_6}{102}$	18
3.	$\frac{C_7O_2H_4(OH)}{137}$	-	$\frac{C_7O_2H_3(OH)}{136}$	5	$\frac{C_8H_5(OCH_3)}{132}$	65
4.	$\frac{C_7O_2H_3(OH)(OCH_3)}{167}$	-	$\frac{C_7O_2H_2(OH)(OMe)}{166}$	7	$\frac{C_8H_6}{102}$	3
5.	$\frac{C_7O_2H_3(OH)_2}{153}$	20	$\frac{C_7O_2H_2(OH)_2}{152}$	20	$\frac{C_8H_5(OH)}{118}$	10
6.	$\frac{C_7O_2H_3(OH)_2}{153}$	-	$\frac{C_7O_2H_2(OH)_2}{152}$	20	$\frac{C_8H_5(OMe)}{132}$	40
7.	$\frac{C_7O_2H_3(OH)_2}{153}$	25	$\frac{C_7O_2H_2(OH)_2}{156}$	4	$\frac{C_8H_4(OMe)_2}{162}$	12
8.	$\frac{C_7O_2H_3(OH)(OMe)}{167}$	4	$\frac{C_7O_2H_2(OH)(OMe)}{166}$	22	$\frac{C_8H_4(OMe)_2}{162}$	38

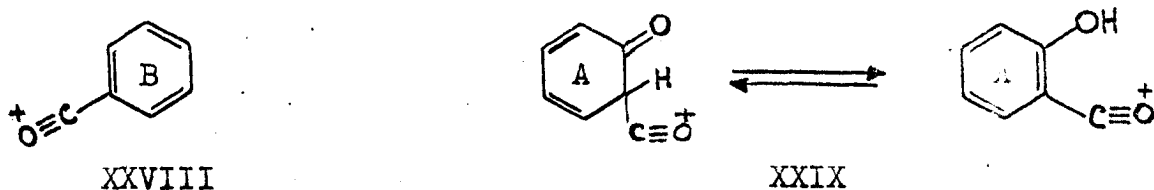
Como se deduz do Quadro 6, os substituintes deslocam os picos em função de suas massas permitindo por conseguinte atribuir a natureza dos substituintes existentes nos anéis A e B.

Itagaki e colaboradores [39] provaram elegantemente a fragmentação retro-Diels-Alder em flavonas, isoflavonas e chalconas através do registro de espectros de derivados halogenados, com base na porcentagem de abundância natural dos halogênios.

As flavonas que sustentam função oxigenada em C-3 comportam-se de maneira diferente no espectrômetro de massa. Embora a fragmentação retro-Diels-Alder possa ocorrer, os picos correspondentes têm abundância relativa fortemente diminuída [41,42].

Audier [38] formulou o fragmento XXVIII como característico de 3-hidroxi-flavonas. A racionalização mecanística de sua formação, que envolve o anel B, foi confirmada através do uso de deutério. O outro fragmento importante no espectro de massa destas substâncias envolve o anel A, oriundo de um deslocamento compensado de elétrons com rearranjo de hidrogênio (XXIX), cujo mecanismo de formação ainda não foi esclarecido. A Tabela 18 relaciona alguns exemplos. Tabela 18.

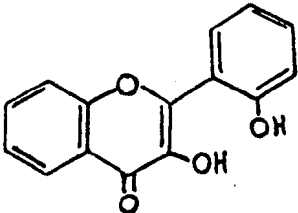
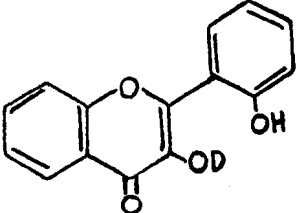
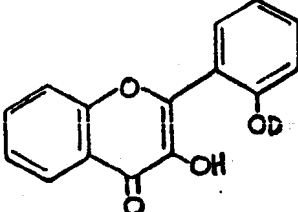
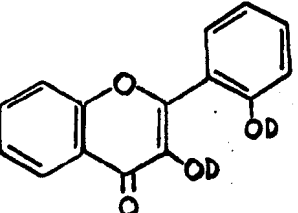
Espectros de massa de 3-hidroxi-flavonas.



Flavona	XXVIII	%	XXIX	%	Ref.
3-hidroxi-5,7-dimetoxi	105	60	181	10	[38]
3,5-dihidroxi-7-metoxi	105	90	167	14	[38]
3,3',4',5,7-pentahidroxi	137	17	153	12	[38]
3,3',5,7-tetrahidroxi-4'-metoxi	151	11	153	14	[38]
3,4',5,7-tetrahidroxi-3'-metoxi	151	7	153	8	[41]
3,3',4',5,6,7-hexahidroxi	137	12	169	-	[43]
2',3-dihidroxi	121	e/ou	121	24	[42]

Merece atenção especial a 2',3-dihidroxi-flavona relacionada na Tabela 13. Esta substância apresenta um pico significativo em m/e 121 (24%) que corresponde ao fragmento tipo XXVIII sustentando um grupo OH e/ou ao fragmento tipo XXIX (Quadro 8). Além disto, curiosamente o espectro de massa desta substância apresenta o pico base em M-17, m/e 237 (100%), revelando portanto a facilidade de interação de oxi-grupos em 2' e 3. Pelter e Stainton [42] deuteraram esta substância e registraram o espectro de massa do produto (Quadro 7).

Quadro 7.

	<u>m/e</u>	<u>Relação</u>
	254	45
	255	50 ^a
	255	50 ^a
	256	70

}

100

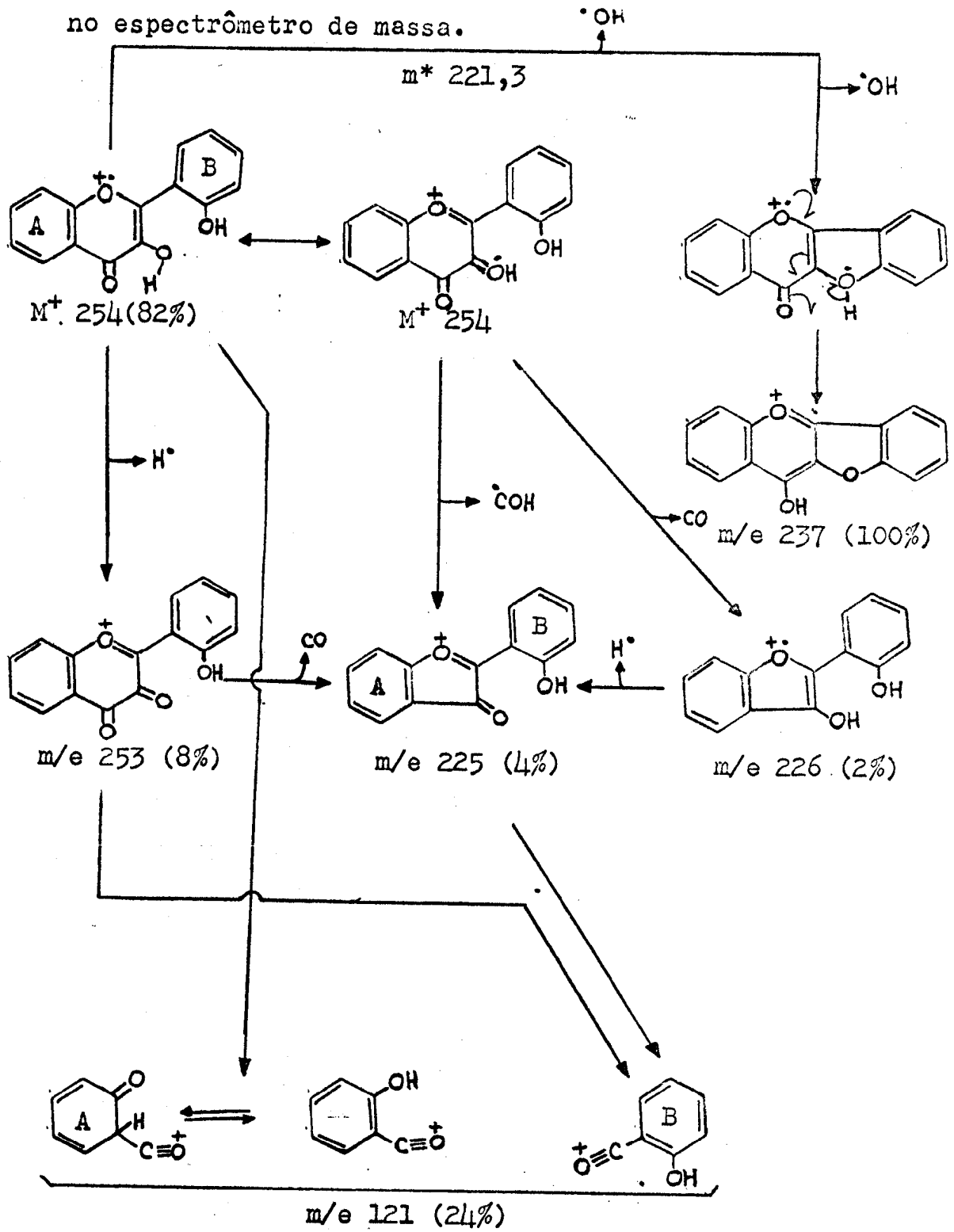
^a Considera-se que a probabilidade de deuteração das duas hidroxilas é idêntica.

O Quadro 8 mostra os caminhos principais de fragmentação da substância. Nele incluímos as duas interpretações estruturais possíveis para o ion m/e 121. Pelter e Stainton [42] não mencionaram a alternativa estrutural deste fragmento que envolve o anel B. Tentaram, outrossim, consubstanciar as propostas que figuram acerca da estrutura dos fragmentos. Para tanto, deuteraram a 2',3-dihidroxi¹flavona. O espectro de massa do produto indicou tratar-se de uma mistura de 4 substâncias. A composição da mistura fica relacionada no Quadro 7.

A segunda coluna do Quadro 9 indica as estruturas dos fragmentos propostos pelos autores ingleses. A intensidade dos picos m/e 121/122 de fato respeita a relação $22,5 + 25/25 + 35$, o que consideraram prova da exatidão de sua proposta. Desejamos chamar a atenção, no entanto, para o fato registrado na coluna 3 deste Quadro 9. É igualmente possível construir um argumento análogo, envolvendo fragmento oriundo do anel B, nos moldes sugeridos por Audier [38].

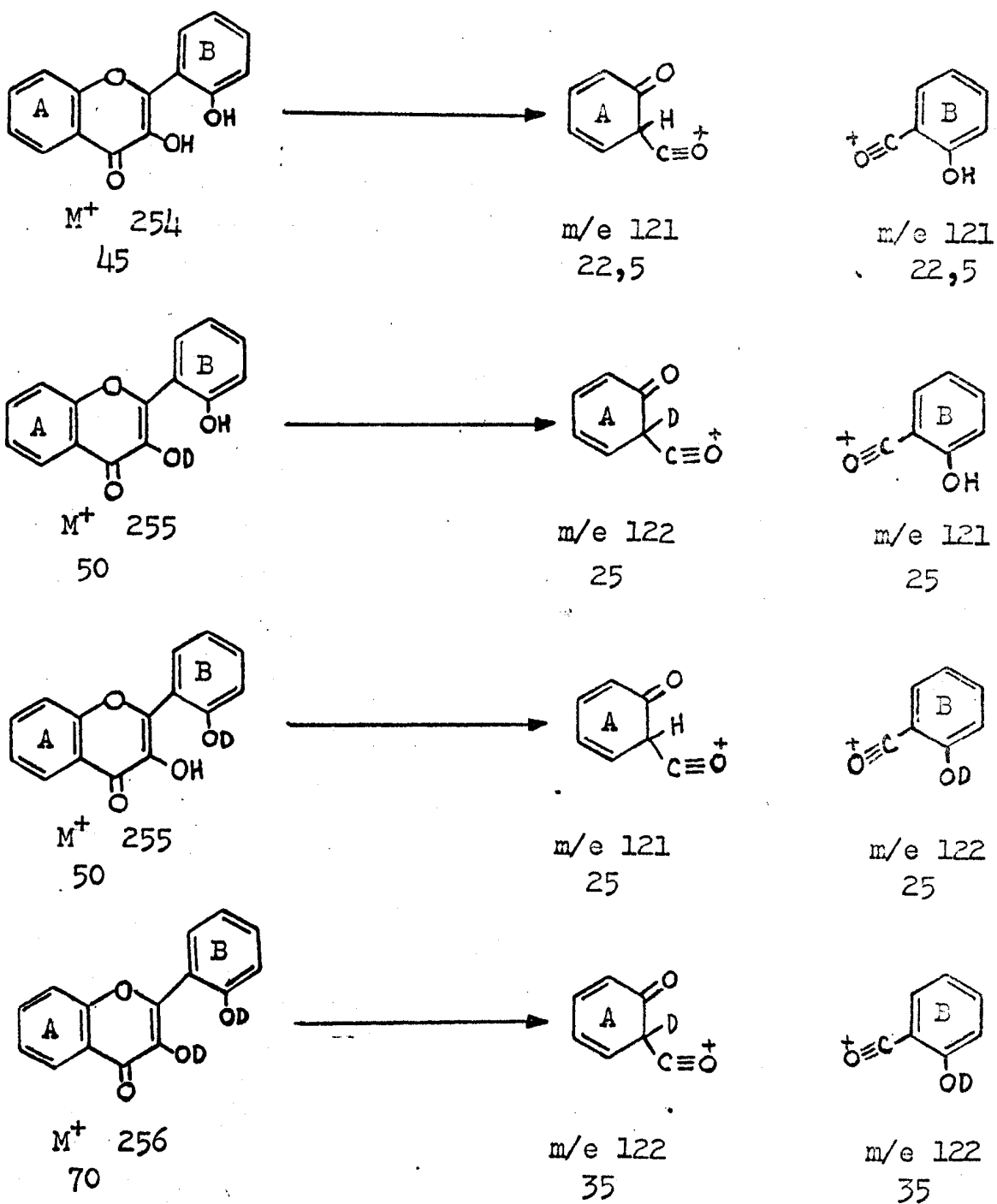
Quadro 8

Caminhos principais de fragmentação da 2',3-dihidroxi-flavona no espectrômetro de massa.



Quadro 9

Interpretação do espectro de massa da 2',3-dihidroxi-flavona deuterada. Supõe-se que a probabilidade de deuteração dos 2 grupos OH seja a mesma.



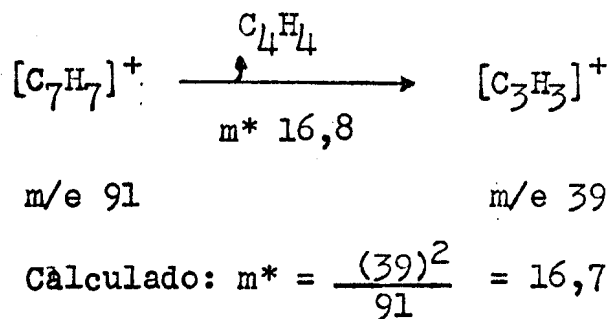
Com base nestes dados a relação 79:100 calculada para picos em m/e 121:122 é também satisfeita. Em face disto, os resultados experimentais apresentados por Pelter e Stainton [42] não eliminam a possibilidade de contribuição do fragmento que envolve o anel B, formula do no Quadro 9. Portanto, a atribuição estrutural de Audier [38] a este fragmento é muito razoável.

A observação destes fatos experimentais permitiu-nos averiguar o comportamento de substâncias análogas contendo um grupo OCH_3 em vez de um grupo OH em C-3. O trabalho descrito por Bowie e Cameron [43] foi dedicado a este tipo de substância. Os autores discutem os espectros de 13 substâncias que sustentam grupo OCH_3 no átomo de carbono 3 e chamam atenção para a importância do espectro de massa para fins de determinação estrutural. Em resumo, os referidos pesquisadores concluíram que:

1. A eliminação de 43 unidades de massa do ion molecular é compatível com a existência de grupo OCH_3 no átomo de carbono 3, $\text{M}-\text{CH}_3\text{CO}$. A quercetagina, 3,3',4',5,6,7-hexahidroxiflavona revela pico em $\text{M}-\text{HCO}$ com abundância relativa 8%.
2. A natureza do grupo localizado no átomo de carbono 6 pode ser deduzida.
3. A ocorrência de fragmentação retro-Diels-Alder pode ser deduzida da análise dos espectros registrados, embora os picos correspondentes sejam de baixa intensidade.

Bowie e Cameron [43] atribuem a formação do pico em $\text{M}-43$ através da expulsão dos elementos do radical acetil por um processo que envolve uma só etapa. Parece-nos que esta proposição baseou-se

fundamentalmente na existência de "picos metaestáveis". Até muito recentemente, a presença de um "pico metaestável", definindo um caminho de fragmentação $m_1 \longrightarrow m_2$ era aceito como uma evidência que o fragmento neutro ou radicalar seria eliminado numa só etapa. Entretanto, Jennings em 1966 [44] verificou a presença de um "pico metaestável" em m/e 16,8 no espectro de massa do tolueno, que corresponde à transição:

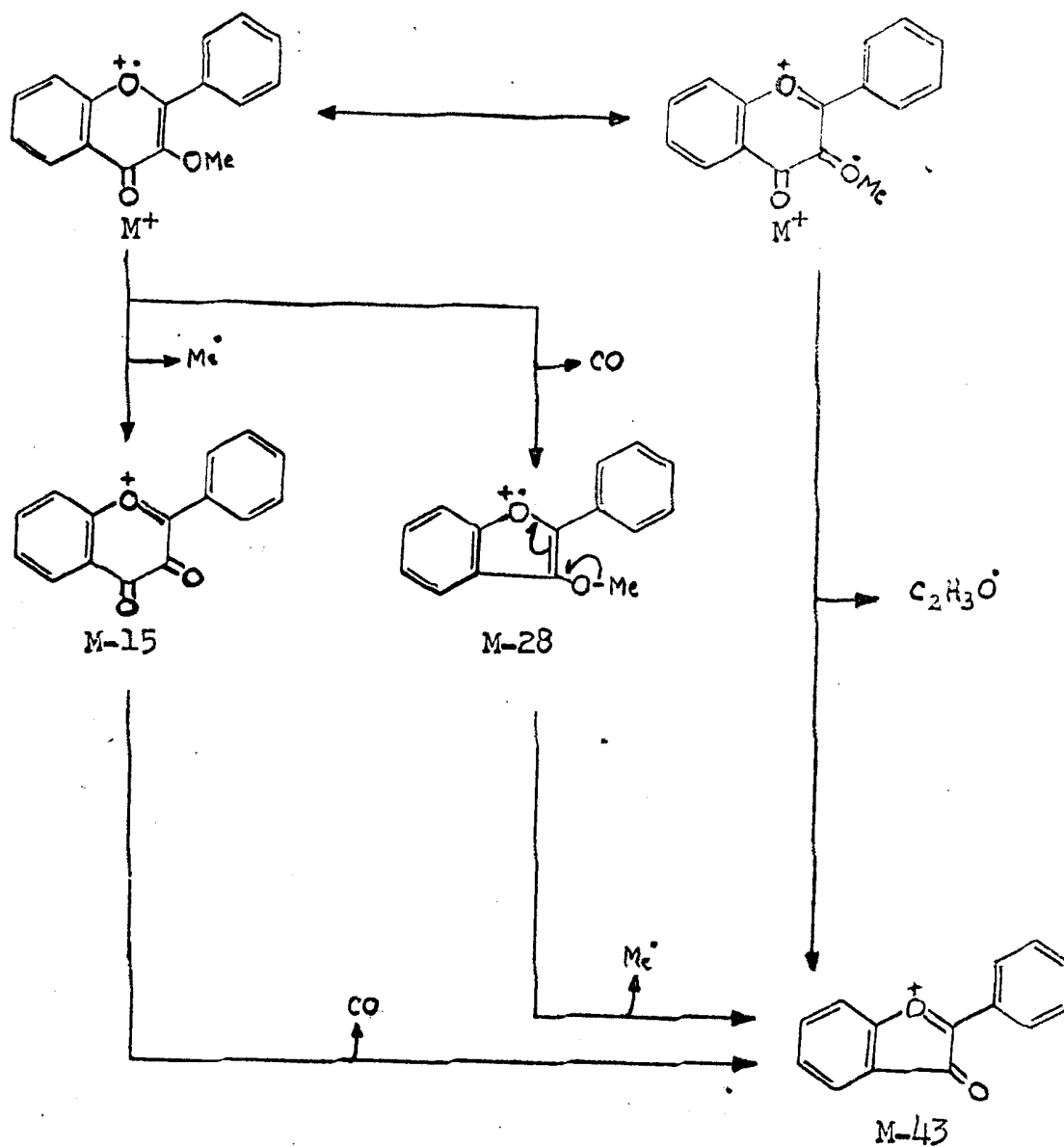


Como esperado, foi estabelecido experimentalmente que C_3H_3 corresponde à perda consecutiva de duas moléculas de acetileno ($\text{C}_2\text{H}_2 + \text{C}_2\text{H}_2$). A técnica utilizada no trabalho de comprovação envolveu observação dos vários "picos metaestáveis" possíveis mudando a voltagem de aceleração [45]. Exemplos adicionais de processos que envolvem 2 etapas e com transições caracterizadas por "picos metaestáveis" são registrados por Budzikiewicz, Djerassi e Williams [46]. É evidente, que em alguns casos pode ocorrer a expulsão de dois grupos por um processo simultâneo mas não necessariamente como uma só entidade, sendo possível também admitir a eliminação de um grupo e logo a seguir o outro.

Em face do exposto, é também viável que o pico M-43 possa originar-se de duas transições consecutivas que envolvem a expulsão de $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ (M-15) e $\text{C}=\text{O}$ (M-28) e/ou de $\text{C}=\text{O}$ (M-28) e $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ (M-15), conforme racionalizado mecanisticamente no Quadro 10.

Quadro 10.

Racionalização mecanística para a expulsão de $C_2H_3O^+$ no espectro de massa de 3-metoxiflavonas.



Portanto, a decisão sôbre os prováveis caminhos de fragmentação necessita de dados experimentais menos discutíveis, através da utilização de isotópos do carbono e/ou do oxigênio, o que exigiria a síntese de substâncias apropriadas. Assim, por exemplo, a síntese de uma substância que conduza à localização de ^{14}C na posição 4 poderá fornecer as informações desejadas (Quadro 10).

Embora Bowie e Cameron [43] não comentam a possibilidade de formação de ion fragmentário tipo XXVIII, pode-se constatar a sua provável ocorrência através da análise dos espectros publicados (Tabela 19) por aqueles autores. Esta dedução é corroborada pela análise dos espectros de massa das substâncias isoladas da Apuleia leio - carpa, substâncias 11 a 19 (Tabela 19). Evidentemente, é possível formular-se mais que um caminho que conduz aos ions fragmentários referidos.

Tabela 19.

Fragmentos envolvendo o anel B de 3-metoxiflavonas no espectro de massa. Registra-se também a abundância relativa dos picos em M-43.

Flavona	M-43		XXVIII	
	m/e	%	m/e	%
1. 4',5,7-trihidroxi-3,3',6-trimetoxi	317	21	151	12
2. 3',5,6-trihidroxi-3,4',7-trimetoxi	317	16	151	7
3. 4',5,7-trietoxi-3,3',6-trimetoxi	401	8	179	10
4. 3',5,6-trietoxi-3,4',7-trimetoxi	401	8	179	6
5. 4',5,7-trideuteroxi-3,3',6-trimetoxi (mistura de não deuterado, mono, di e tri- deuterado).	320	a	152	17
	319	12	151	41
	318	27	-	-
	317	28	-	-
6. 5-hidroxi-3,3',4',6,7-pentametoxi	345	15	165	39
7. 3,3',4',5,6,7-hexametoxi	359	6	165	15
8. 5-hidroxi-3',6-dietoxi-3,4',7-trimetoxi	373	c	179	12
9. 4',5,7-triacetoxi-3,3',6-trimetoxi	443	c	151 ^b	9
10. 3',5,6-triacetoxi-3,4',7-trimetoxi	443	c	151	9
11. 3',5-dihidroxi-3,4',7-trimetoxi (AL-18)	301	45	151	7
12. 2',5,5'-trihidroxi-3,4',7-trimetoxi (AL-12)	317	33	167 ^d	26
13. 2',3',5-trihidroxi-3,4',7-trimetoxi (AL-19A)	317	20	167 ^d	14
14. 2',5'-dihidroxi-3,4',5,7-tetrametoxi (AL-15)	331	12	167	13
15. 2',3',5,6-tetrahidroxi-3,4',7-trimetoxi (AL-14)	333	9	167	5
16. 2',5,5'-trihidroxi-3,4',6,7-tetrametoxi (AL-13)	347	6	167	31
17. 3',5,6-trihidroxi-3,4',5',7-tetrametoxi (AL-16)	347	10	181	6
18. 2',5'-dihidroxi-3,4',5,6,7-pentametoxi (AL-11)	361	5	167	51
19. 3',6-dihidroxi-3,4',5,5',7-pentametoxi (AL-19B)	361	4	181	5

a. O produto trideuterado apresenta ion molecular com abundância relativa de apenas 16%.

b. O pico em m/e 151 pode originar-se após a expulsão de ceteno.

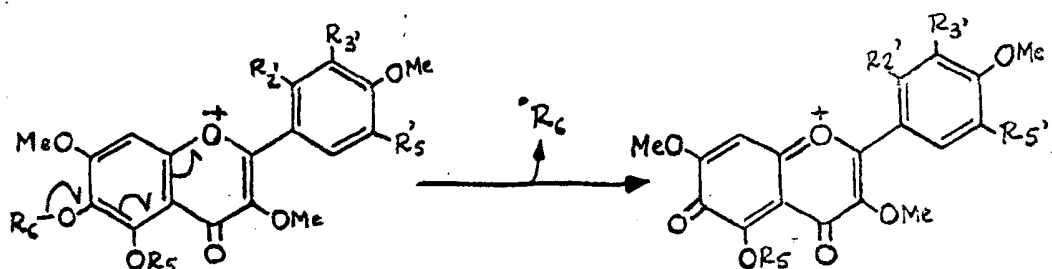
c. Os respectivos valores não foram registrados.

d. Fragmento envolvendo o anel A através de reação retro-Diels-Alder fornece também m/e 167.

A influência de grupo localizado no átomo de carbono 6 do esqueleto flavônico, já notada por Lowie e Cameron, é substantiada pela análise dos espectros de massa dos constituintes naturais e seus derivados da Apuleia leiocarpa (Tabela 20).

Tabela 20.

Comportamento de 3-metoxiflavonas que sustentam função oxigenada em C-6 no espectrômetro de massa.



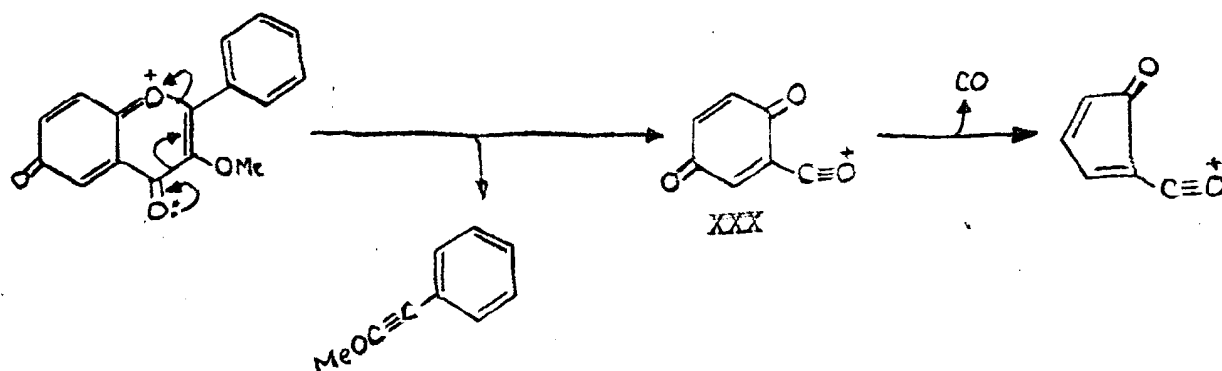
Substância	M ⁺	%	R ₂ '	R ₃ '	R ₅ '	R ₅ '	R ₆	M-R ₆	%
AL-11	404	98	OH	H	Me	OH	Me	389	100
AL-19B	404	100	H	OH	Me	OMe	H	403	43
AL-11Me	432	46	OMe	H	Me	OMe	Me	417	100
AL-13	390	100	OH	H	H	OH	Me	375	34
AL-16	390	100	H	OH	H	OMe	H	389	33
AL-14	376	100	OH	OH	H	H	H	375	23
AL-14Me	432	42	OMe	OMe	Me	H	Me	417	100
AL-14DFM	540	100	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ / \quad \diagdown \\ \phi \quad \phi \end{array}$		H	H	H	539	22

Portanto, é lícito atribuir valor diagnóstico à perda de R₆ diante destas observações experimentais.

A fragmentação tipo retro-Diels-Alder tem sido demonstrado ocorrer, embora os fragmentos correspondentes sejam representados por picos que apareçam com pequena intensidade relativa [42,43].

É previsível que o ion formado com a expulsão de R_6^{\cdot} possa sofrer fragmentação que envolve o anel heterocíclico. Propomos a racionalização mecanística apresentada no Quadro 11 para justificar este processo fragmentário. Evidentemente, também o ion resultante pode sofrer posterior fragmentação, expulsão de CO por exemplo (Quadro 11).

Quadro 11.



A Tabela 21 demonstra que este caminho de fragmentação é razoável, embora o número de exemplos citados seja reduzido.

Tabela 21.

Espectros de massa de flavonas oxigenadas em C-6.

Flavona	XXX		XXI	
	m/e	%	m/e	%
1. 4',5,7-trihidroxi-3,3',6-trimetoxi	167	4	139	2
2. 3',5,6-trihidroxi-3,4',7-trimetoxi	181	2	153	2
3. 5-hidroxi-3,3',4',6,7-pentametoxi	181	12	153	-
4. 3,3',4',5,6,7-hexametoxi	195	9	167	16
5. 5-hidroxi-3',6-dietoxi-3,4',7-trimetoxi	181	11	153	15
6. 2',5'-dihidroxi-3,4',5,6,7-pentametoxi (AL-11)	195	13	167	51
7. 2',5,5'-trihidroxi-3,4',6,7-tetrametoxi (AL-13)	181	15	153	15
8. 2',3',5,6-tetrahidroxi-3,4',7-trimetoxi (AL-14)	181	6	153	8
9. 3',5,6-trihidroxi-3,4',5',7-tetrametoxi (AL-16)	181	6	153	-
10. 2',3,4',5,5',6,7-heptametoxi (AL-11Me)	195	6	167	13
11. 2',3,3',4',5,6,7-heptametoxi (AL-14Me)	195	8	167	12
12. 3',6-dihidroxi-3,4',5,5',7-pentametoxi (AL-19B)	181	5	153	5

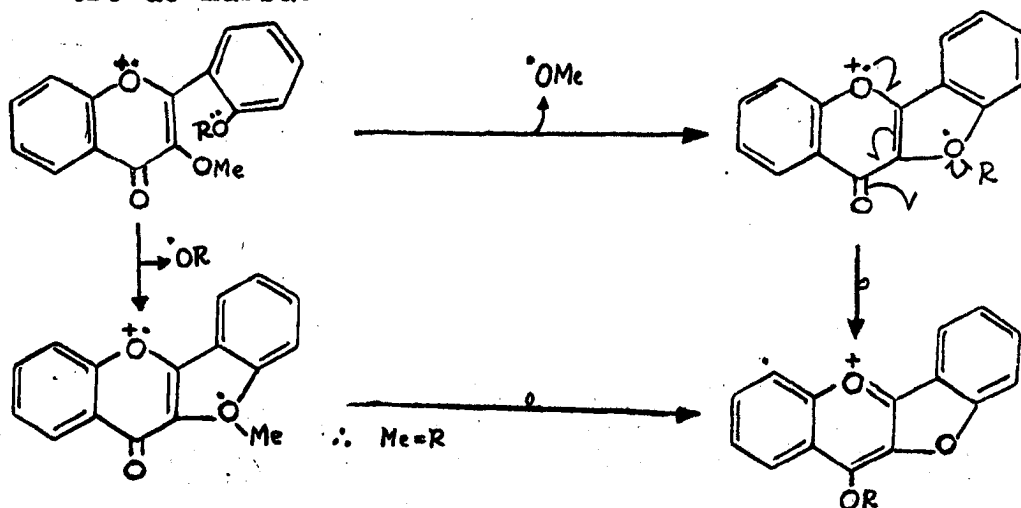
A presença de picos correspondentes a tais fragmentos corroboram com a dedução da existência de grupo R_6 em substância flavônica 6-oxigenada.

Finalmente, as flavonas que sustentam função oxigenada nas posições 2' e 3 revelam típico comportamento no espectrômetro de massa. Pelter e Stainton [42] chamam atenção para a influência de um grupo hidroxila localizado em 2' na 2',3-dihidroxi-flavona (Tabela 18, Quadro 8), que revela o pico base em M-17.

As substâncias flavonoídicas isoladas da Apuleia leiocarpa permitiram ampliar esta dedução, já que estas substâncias sustentam grupo metoxila em C-3 e grupo hidroxila em 2'. Destas substâncias preparou-se também derivados 2',3-dimetoxilados. A análise dos espectros de massa destas substâncias e de seus derivados revelou a nítida influência de tais grupos no processo fragmentativo, tornando possível utilizar o espectro de massa para fins de determinação relativa dos grupos localizados em 2' e 3 (Quadro 12).

Quadro 12.

Comportamento de flavonas 2',3-dioxigenadas no espectrômetro de massa.

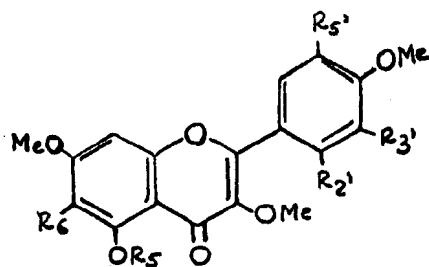


É provável que mesmo o grupo CH_3 possa rearranjar para formar estrutura mais estável, conforme representa-se no Quadro 12. Aliás, a possibilidade de rearranjo de grupamento metila foi demonstrada recentemente por Bowie e col. [47]. A força propulsora para tal rearranjo envolve a estabilidade do ion fragmentário dêle resultante.

A Tabela 22 demonstra a importância dêstes fragmentos nas flavonas 2',3-dioxigenadas em contraposição com aquelas que não sustentam função oxigenada em 2'.

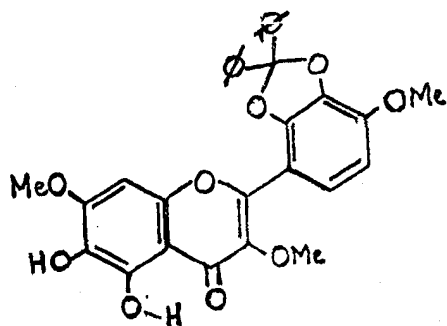
Tabela 22.

Picos em M-17 e/ou M-31 dos constituintes flavônicos isolados de Apuleia leiocarpa.



Substância	M ₊	%	R ₂ '	R ₃ '	R ₅	R ₅ '	R ₆	M-17	%	M-31	%
AL-11	404	98	OH	H	Me	OH	OMe	387	56	373	59
AL-19B	404	100	H	OH	Me	OMe	OH	387	10	373	9
AL-11Me	432	46	OMe	H	Me	OMe	OMe	-	-	401	65
AL-13	390	100	OH	H	H	OH	OMe	373	25	359	49
AL-12	360	100	OH	H	H	OH	H	343	58	329	88
AL-15	374	82	OH	H	Me	OH	H	357	87	343	100
AL-12Me	402	53	OMe	H	Me	OMe	H	-	-	371	100
AL-16	390	100	H	OH	H	OMe	OH	373	6	359	15
AL-14	376	100	OH	OH	H	H	OH	359	36	345	16
AL-14Me	432	42	OMe	OMe	Me	H	OMe	-	-	401	58
AL-14DFM	540	100	O	O	H	H	OH	523	2	509	4
AL-19A	360	100	OH	OH	H	H	H	343	52	329	32
AL-18	344	100	H	OH	H	H	H	327	7	331	5

Merece também destaque especial o derivado obtido da reação da AL-14 com diclorodifenilmetano (AL-14DFM), XXXII.



XXXII

Comparação do espectro de massa deste derivado com o da substância original (AL-14) demonstra claramente a redução da intensidade relativa dos picos em M-17 e M-31. Assim, enquanto a AL-14 revela M-17 com 36% e M-31 com 16%, os picos correspondentes na AL-14DFM aparecem com abundância relativa de 2% e 4%, respectivamente. Esta dificuldade de expulsão de radical OH e/ou OMe revela a influência das funções oxigenadas nas posições 2',3 nos processos de fragmentação.

Além disto, o espectro de massa desta substância revela pico significativo em m/e 358, m/e 182 e m/e 183%. Os fragmentos correspondentes podem ser formulados através do deslocamento compensado de elétrons com rearranjo e sem rearranjo de hidrogênio conforme se demonstra no capítulo de determinação estrutural.

5. Isoflavonas.

As isoflavonas comportam-se de maneira análoga às flavonas. Os fragmentos principais que aparecem no espectro de massa das isoflavonas resultam da fragmentação envolvendo deslocamento compensado de elétrons. Conseqüentemente, pode-se estabelecer a distri-

buição das funções oxigenadas nos anéis A e B. Evidentemente, as influências eletrônicas de grupos substituintes aqui também entram em evidência.

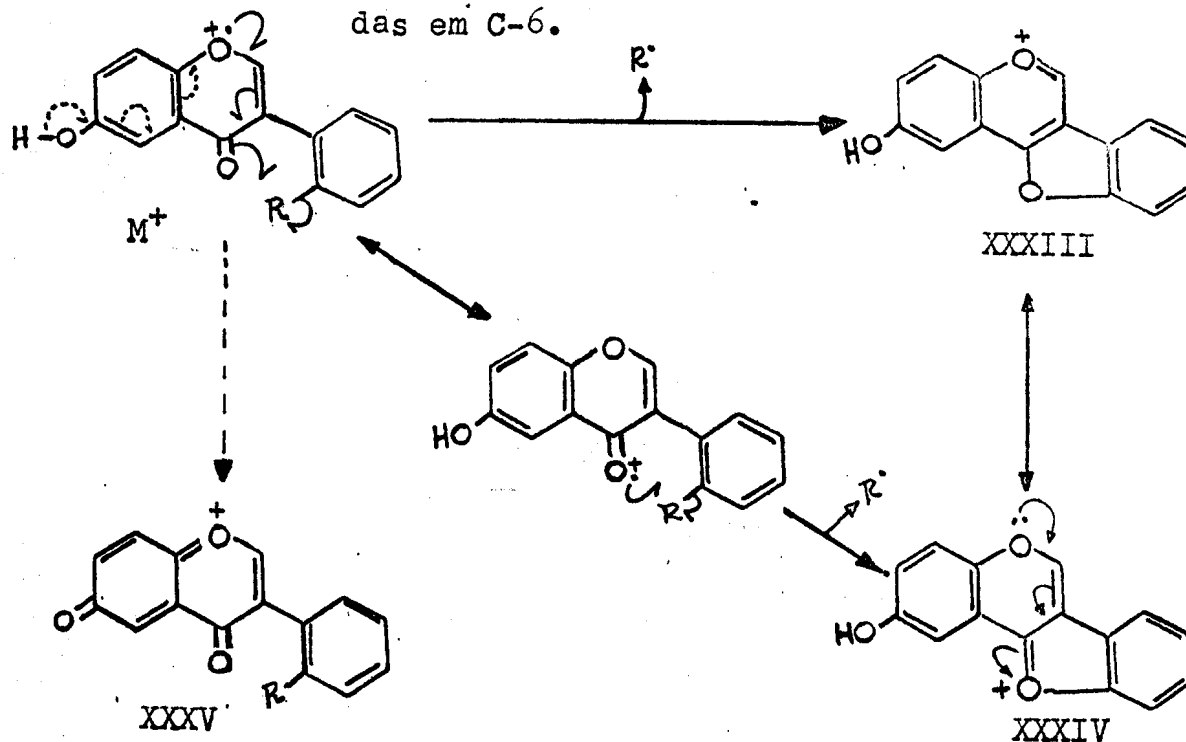
As diferenças principais que podem ser constatadas nos espectros das isoflavonas em relação às flavonas são relacionados a seguir [38,39]:

- a. o pico em M-28 é significativamente menos intenso.
- b. o pico em m/e $\frac{M-28}{2}$ não comparece.
- c. a existência de pico significativo em M/2.
- d. a ocorrência de pico significativo em M-1.

A formação de fragmento iônico de massa M-1 pode ser formulada como envolvendo o grupo C=O pirônico e um átomo de H em 2' (Quadro 13, R=H). Evidentemente, a existência de grupo OH em C-6 pode também contribuir para a formação de M-1 (Quadro 13).

Quadro 13.

Caminhos principais de fragmentação de isoflavonas oxigenadas em C-6.



Com base no Quadro 13, é previsível que a existência de grupo OH ou OCH₃ na posição 2' pode favorecer o aparecimento de pico em M-17 ou M-31.

De fato, em trabalho anterior [48], constatou-se que as isoflavonas 2'-metoxiladas de Pterodon pubescens revelam a eliminação de radical metoxila (OMe) de maneira significativa (Quadro 13, R=OCH₃; Tabela 23). Independentemente, Campbell e colaboradores [49] também chamaram atenção para esta fragmentação (Tabela 23).

Tabela 23.

Influência da substituição em 2' no espectro de massa de isoflavonas.

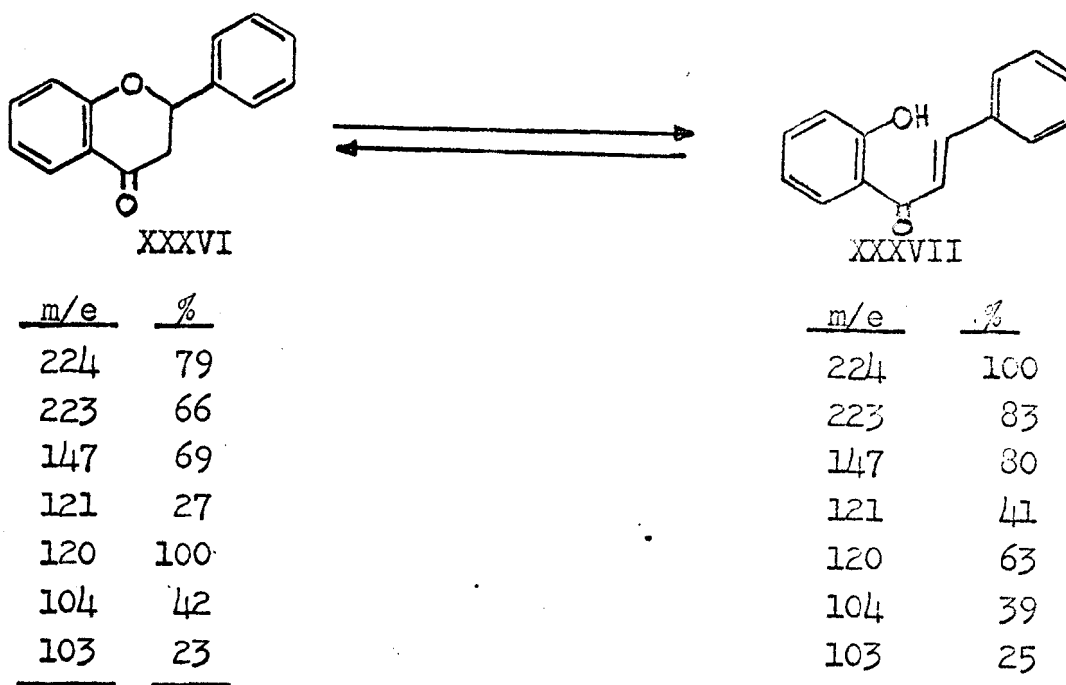
Isoflavona	M ⁺	%	M-1	%	M-31	%	Ref.
2',6,7-trimetoxi-4',5'-metileno-dioxi	356	92	355	-	325	100	[48]
2',3',4',6,7-pentametoxi	372	100	371	-	341	70	[48]
2',4',5',6,7-pentametoxi	372	100	371	-	341	56	[49]
4',5',6,7-tetrametoxi	342	100	341	7	311	2	[49]
2',6,7-trimetoxi	312	100	311	-	281	69	[49]
6,7-dimetoxi	282	100	281	100	251	7	[49]
5,7-dihidroxi-2',4',5,6-tetrametoxi	374	100	373	6	343	17	[34]
2',3',4',6',7-pentametoxi	372	100	371	-	341	90	[50]

Portanto, parece lícito atribuir valor diagnóstico a estes dados. A nossa formulação (XXXIV) para o ion M-31 é uma estrutura canônica da formulação proposta por Campbell e colaboradores [49], XXXIII.

6. Flavanonas e Chalconas.

Os espectros de massa de substâncias destas duas classes são qualitativamente idênticos, conforme revela a comparação dos espectros da flavanona (XXXVI) [40] e da chalcona (XXXVII) [38].

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



Pode-se, entretanto, constatar dos dados figurados acima (m/e 120 e m/e 104) que a fragmentação envolvendo deslocamento compensado de eletrons assume maior importância nas flavanonas e chalconas do que no caso das flavonas e isoflavonas. Em face da possibilidade do equilíbrio referido, pode-se justificar esta maior faci-

lidade de fragmentação pois, as flavanonas apresentam o anel heterocíclico com uma ligação simples C_2-C_3 que facilita a ruptura $C_3-C=O$. As flavonas e isoflavonas apresentam um sistema carbonílico α,β -insaturado, o que dificulta a ruptura da ligação $=C_3-CO$.

Esta fragmentação, em conjunto com o peso correspondente ao esqueleto, permite distinguir estas substâncias dos demais diarilpropanoides e permite localização de substituintes nos anéis A e B.

O Quadro 14 resume os caminhos principais de fragmentação de flavanonas e chalconas. A forma enólica da flavanona favorece as fragmentações que envolvem a expulsão de H^\bullet e $C_6H_5^\bullet$ ou seu equivalente substituído. Evidentemente, esta fragmentação revela-se extremamente útil em análise estrutural, conforme demonstra a Tabela 24.

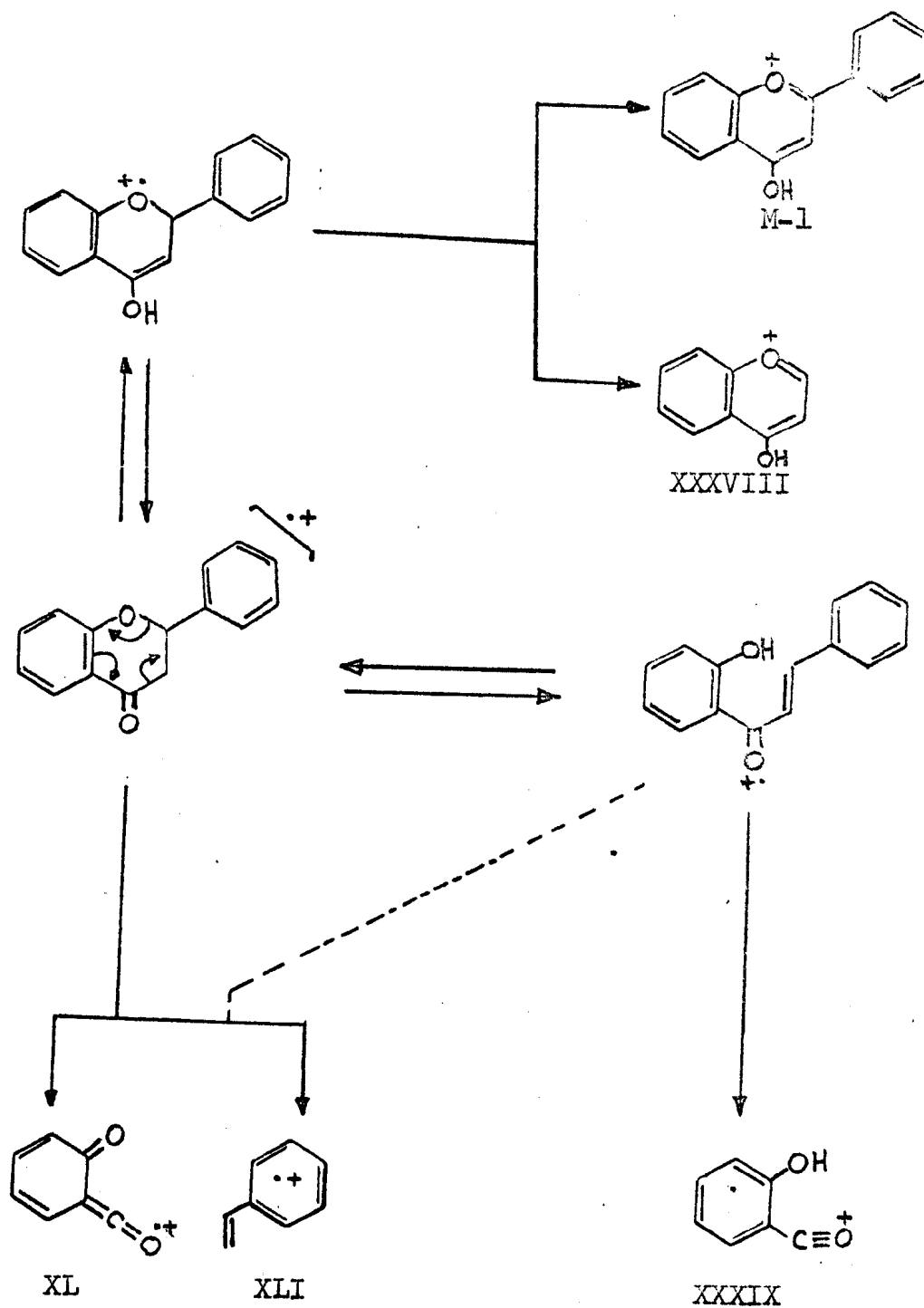
Constata-se (Tabela 24) que as flavanonas e chalconas revelam picos intensos, não raro o pico base, na região correspondente aos fragmentos devido ao deslocamento compensado de elétrons.

As 3-hidroxi-flavanonas (flavanonois) revelam espectro de massa com feição que pode permitir distinção de uma flavanona isômera que não possui grupo OH em 3. Mesmo que tais substâncias apresentem fragmentação que ocorre nas flavanonas sem oxigenação em C-3, constata-se a presença de outros picos correspondentes a fragmentos diversos (Quadro 15, Tabela 25).

Vale salientar, que um fragmento do tipo XXXVIII praticamente não comparece no espectro das 3-hidroxi-flavanonas, enquanto o tipo XLIII pode assumir feição importante (Tabela 25). É provável que o fragmento XXXVIII esteja dependente da enolização (Quadro 14)

Quadro 14.

Caminhos principais de fragmentação de flavanonas.



Quadro 15.

Caminhos principais de fragmentação de 3-hidroxi-flavanonas no espectrômetro de massa.

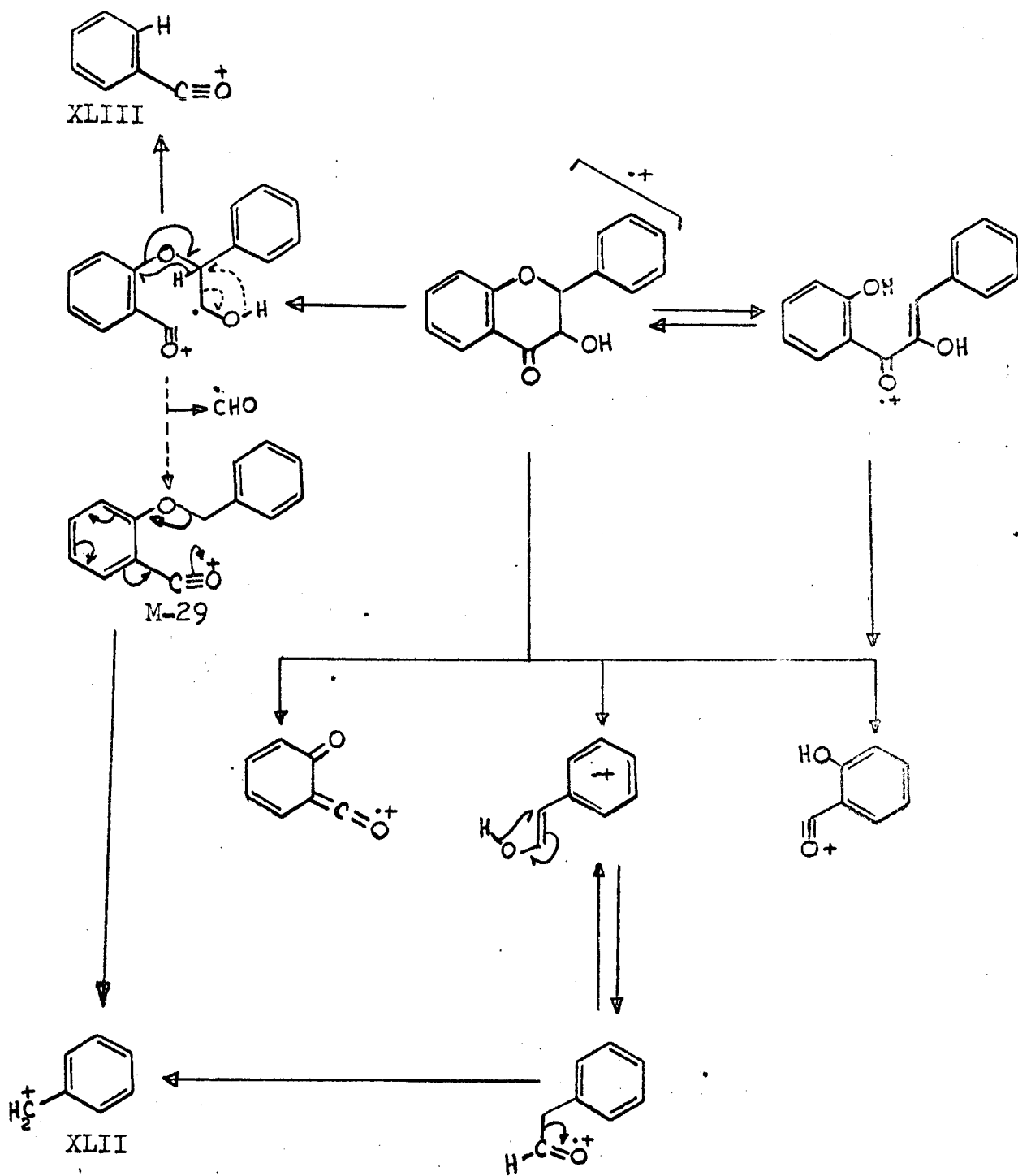


Tabela 24.

Espectro de massa de flavanonas.

Flavanona	M ⁺	%	M-1	%	XXXVIII	%	XXXIX	%	XL	%	XLI	%	Ref.
4'-metoxi	254	43	253	30	147	17	121	30	120	4	134	100	41
5,7-dihidroxi	256	a	255	a	179	52	153	16	152	47	104	15	38
5,7-dimetoxi	284	51	283	9	207	14	181	14	180	100	104	6	41
5-hidroxi-7-metoxi	270	a	269	a	193	95	167	12	166	100	104	12	38
4',5,7-trihidroxi	272	a	271	a	179	18	153	87	152	30	120	100	38
3',4',7-trihidroxi	272	52	271	a	163	15	137	100	136	55	136	55	51
<u>Chalcona</u>													
2'-hidroxi	240	a	239	a	163	100	137	59	136	57	104	40	38
4-metoxi	254	a.	253	a	147	10	121	60	120	3	134	100	38
4,4'-dihidroxi	256	67	255	39	163	26	137	63	136	-	120	29	51
3,4,4'-trihidroxi	272	67	271	14	163	37	137	100	136	43	136	43	51

a. o trabalho consultado não registra as abundâncias respectivas.

Tabela 25.

Espectro de massa de 3-hidroxi-flavanonas.

Flavanona	M ⁺	%	M-1	%	M-29	%	XXXVIII	%	XXXIX	%
3,5,7-trihidro - xi-4'-metoxi	302	75	301	26	273	3	195	-	153	65
3,3',4',5,7-pen- tahidroxi	304	40	303	-	275	49	195	4	153	100
3,5-dihidroxi-7- -metoxi-8-8,8-di metilalila	354	100	353	3	325	18	277	-	235	25

Tabela 25. (Continuação)

Flavanona	XL	%	XLI	%	XLII	%	XLIII	%	Ref.
3,5,7-trihidro - xi-4'-metoxi	152	12	150	89	121	12	137	100	[41]
3,3',4',5,7-pen- tahidroxi	152	40	152	40	123	76	137	-	[38]
3,5-dihidroxi-7- -metoxi-8-8,8-di metilalila	234	7	120	12	91	a	219	51	[34]

a. não registrado na literatura.

e a presença de um grupo OH em C-3 dificulta esta tautomerização. Uma transformação química semelhante é a enolização de cetonas em meio ácido. Após a introdução de um átomo de bromo, por exemplo, no átomo de carbono α em uma cetona, em meio ácido, torna a introdução de mais um bromo no mesmo átomo de carbono mais difícil.

7. Isoflavanonas.

As isoflavanonas apresentam espectros de massa bastante simples. Evidentemente, o pico correspondente ao fragmento tipo XXXVIII, freqüente em flavanonas, não comparece no espectro das isoflavanonas já que o grupo fenila é sustentado pelo átomo de carbono 3.

A fragmentação com deslocamento compensado de elétrons no anel heterocíclico é o processo predominante também nesta classe de substâncias (Quadro 16; Tabela 26). A distribuição dos grupos substituintes nos aneis A e B torna-se, portanto tarefa relativamente fácil, através do reconhecimento de ions fragmentários do tipo XXXIX, XL e XLI.

Quadro 16.

Caminhos principais de fragmentação de isoflavanonas no espectrômetro de massa.

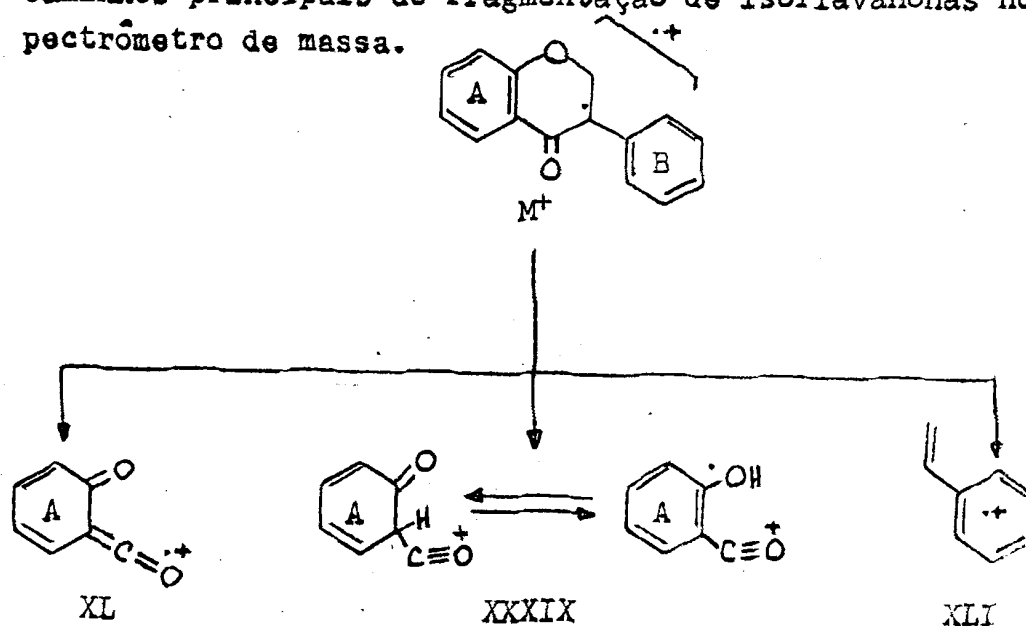


Tabela 26.

Espectros de massa de isoflavanonas.

Isoflavanonas	M ⁺	%	XXXIX	%	XL	%	XLI	%	Ref.
7-metoxi	254	a	151	22	150	100	104	17	[38]
4',7-dimetoxi	284	a	151	12	150	5	134	100	[38]
2',3',4',7-tetrametoxi	344	62	151	16	150	a	194	100	[51]
2',3',4',6',7-pentametoxi	374	29	151	23	150	15	224	100	[50]

a. A literatura não registra as intensidades relativas

O número de substâncias referidas na Tabela 26 é reduzido, mesmo assim é evidente a influência do número de funções oxigenadas na abundância relativa dos fragmentos resultantes da fragmentação por deslocamento compensado de elétrons.

8. Flavanos e Isoflavanos.

As substâncias pertencentes a estas duas classes de diarilpropanoides, incluindo-se 3-hidroxi, 4-hidroxi e 3,4-dihidroxi, derivados, também revelam a fragmentação por deslocamento compensado de elétrons (retro-Diels-Alder) como processo dominante no espectrômetro de massa (Quadro 17, Tabela 27). Entretanto, o valor da massa das substâncias básicas (Quadro 3) é diferente daquele das flavanonas, isoflavanonas e chalconas. Daí porque, mesmo com inclusão dos grupos substituintes mais comuns nas substâncias de origem natural haverá possibilidade de distinção entre estas e aquelas classes de substâncias (Quadro 4).

Quadro 17.

Caminhos principais de fragmentação dos flavanos e isoflavanos espectrômetro de massa.

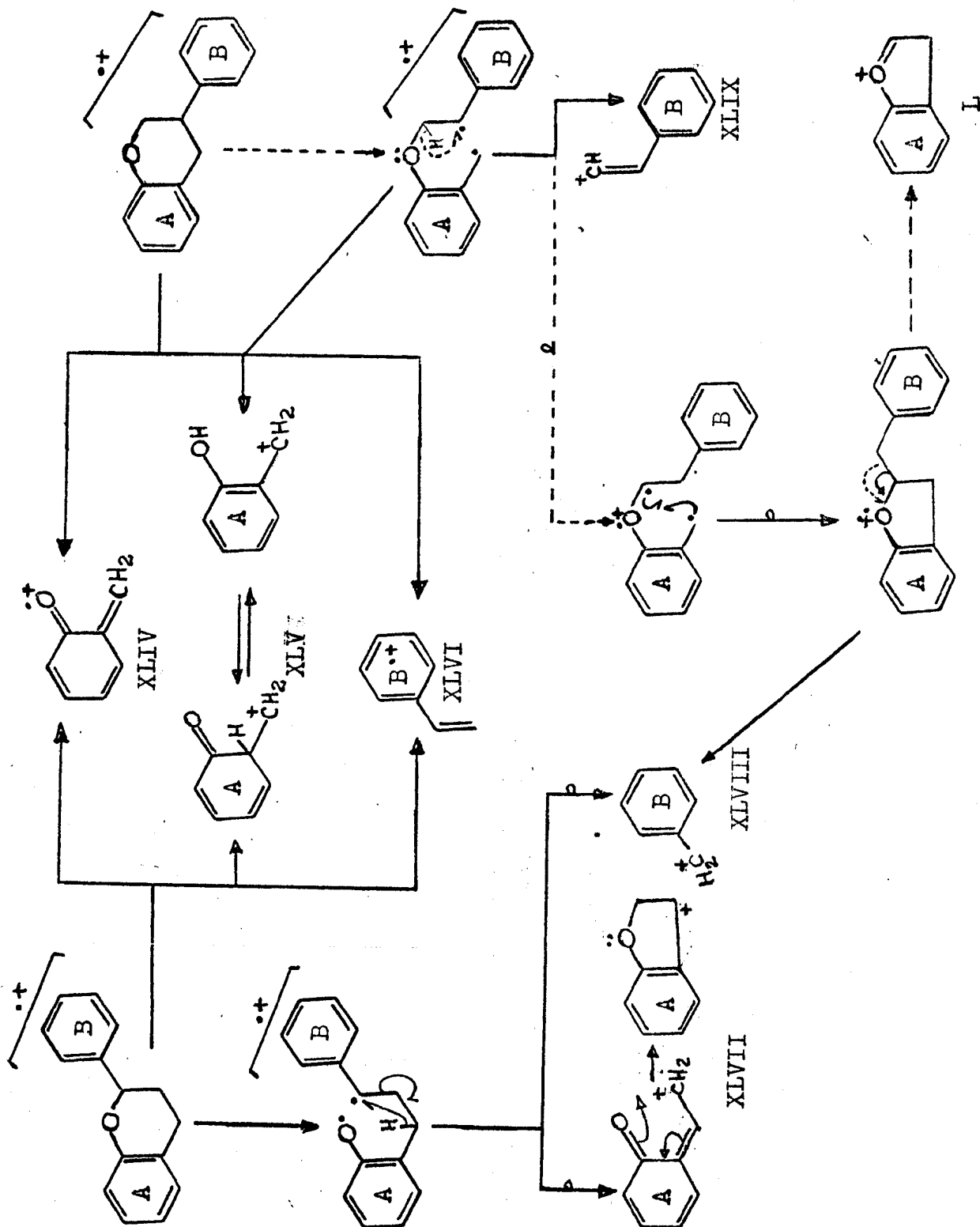


Tabela 27.

Espectros de massa de flavanos e isoflavanos.

Flavano	M ⁺	%	XLIV	%	XLV	%	XLVI	%
4',5,7-trimetoxi	300	95	166	36	167	7	134	100
4-hidroxi	226	24	122	52	123	5	104	100
4-hidroxi-4'metoxi	256	22	122	6	123	-	134	100
<hr/>								
Isoflavano								
<hr/>								
7-metoxi	240	82	136	100	137	5	104	40
4',7-dimetoxi	270	30	136	-	137	-	134	100
2'-hidroxi-4',7-dimetoxi	286	41	136	-	137	84	150	100
2'-hidroxi-4',5'-metileno- nodioxi-7-metoxi	300	41	136	-	137	57	164	100
3',7-dihidroxi-2',4'-di- metoxi	302	72	122	-	123	-	180	100
2',3',4',7-tetrametoxi	330	62	136	10	137	-	194	100
3,4-dihidroxi-4',5'-meti- lenodioxi-2',7-dimetoxi	346	3	152	4	153	18	194	100
4',7-dihidroxi-2',3',6'-tri- metoxi	332	100	122	-	123	-	210	88
2',3',4',7-tetrametoxi	330	-	136	-	137	-	194	100
2',3',4',6',7-pentame- toxi	360	84	136	3	137	4	224	100

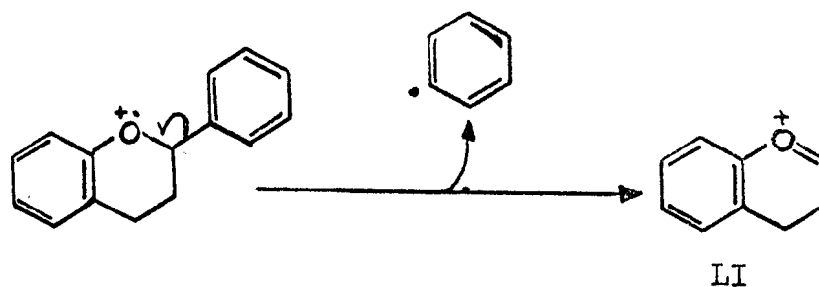
Tabela 27. (Continuação)

Flavano	XLVII	%	XLVIII	%	XLIX	%	Ref.
4',5,7-trimetoxi	179	7	121	33	133	-	41
4-hidroxi	135	-	91	11	103	17	41
4-hidroxi-4'-metoxi	135	21	121	33	133	-	41
<hr/>							
Isoflavano	L	%					
<hr/>							
7-metoxi	149	20	91	10	103	3	38
4',7-dimetoxi	149	10	121	10	133	-	38
2',7-hidroxi-4',7-dimetoxi	149	25	137	84	149	25	41
2'-hidroxi-4',5'-metileno-dioxi-7-metoxi	149	8	151	12	163	38	41
3',7-dihidroxi-2',4'-dime-toxi	135	-	167	30	179	-	51
2',3',4',7-tetrametoxi	149	20	181	23	193	-	51
3,4-dihidroxi-4',5'-metileno-dioxi-2',7-dimetoxi	181	-	165	8	193	-	41
4',7-dihidroxi-2',3',6'-tri metoxi	135	-	197	98	209	-	50
2',3',4',7-tetrametoxi	149	-	181	26	193	-	50
2',3',4',6',7-pentame-toxi	149	5	211	76	223	-	50

Como se pode observar do Quadro 17, a ruptura homolítica nos flavanos ocorre preferencialmente entre o oxigênio heterocíclico e o átomo de carbono 2, enquanto nas isoflavanos esta ruptura ocorre entre os átomos de carbono 3 e 4.

Entretanto, estas rupturas homolíticas, favorecidas mesomericamente, podem originar fragmentos representados pela mesma massa nos flavanos e isoflavanos (Quadro 17). A racionalização mecanística lançada aqui para justificar os fragmentos XLVIII e XLIX originários das isoflavanos envolve um rearranjo de H do átomo de carbono 2 para o átomo de carbono 3. Este processo é razoável já que o H abandona uma posição α em relação ao oxigênio. O radical formado é estabilizado mesomericamente pelos elétrons não compartilhados do oxigênio.

Embora fôsse previsível a formação do ion LI nos flavanos, tal fragmentação não assume importância nas 3 substâncias descritas.



9. Pterocarpanos.

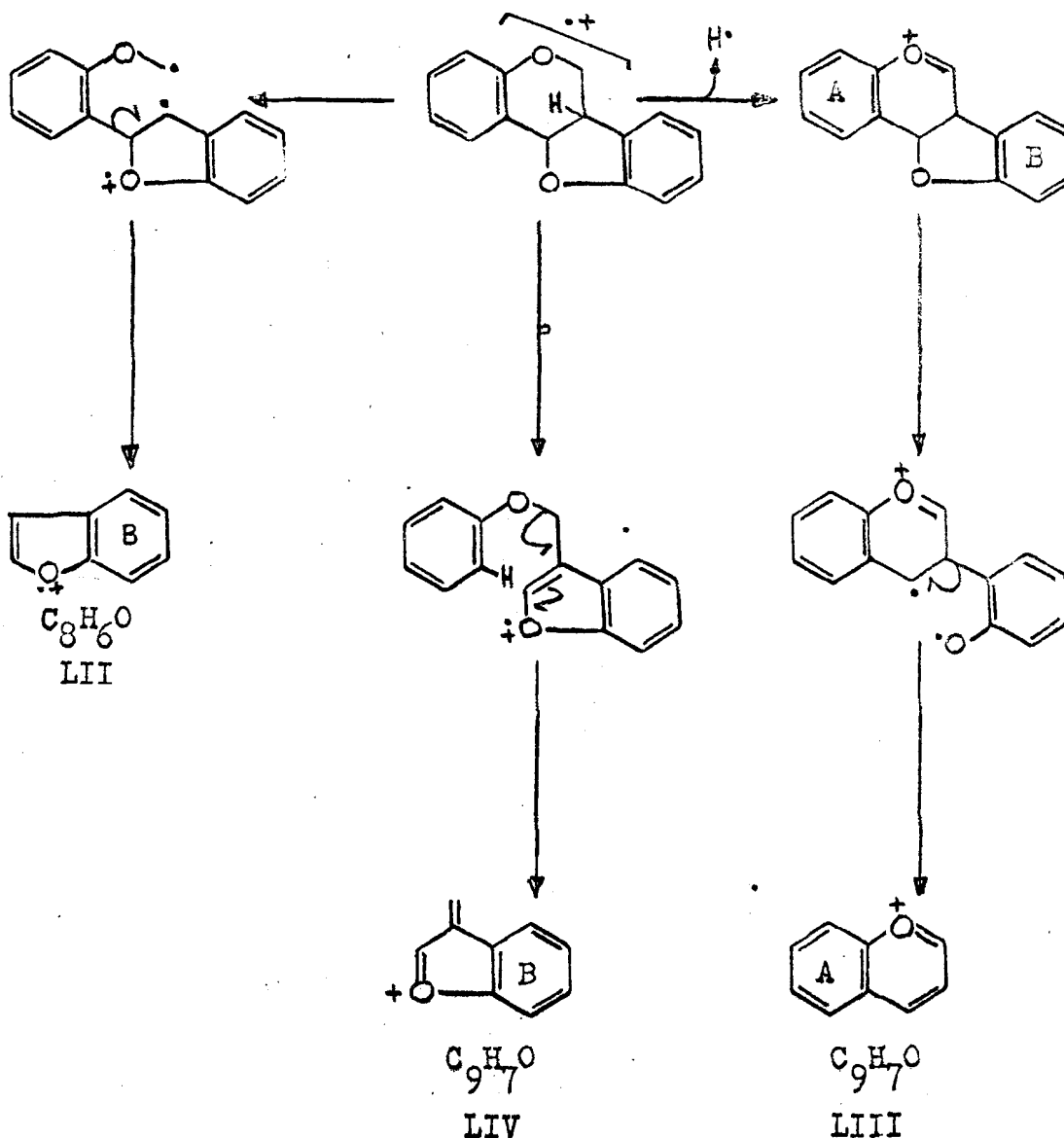
Os pterocarpanoides (XXIII) apresentam a mesma fórmula básica das flavanonas, chalconas e isoflavanonas. Entretanto, os pterocarpanos comportam-se no espectrômetro de massa de maneira diferente, sendo o pico correspondente ao ion molecular quase sempre o pico base e o pico em M-1 significativo. Além disto, a fragmentação

por deslocamento compensado de elétrons deixa de ocorrer em vista da própria arquitetura molecular (Quadro 18) [41].

Conforme se deduz do Quadro 18, o espectro de massa de pterocarpanos não permite assinalar sempre de maneira isofismável os grupos substituintes localizados nos anéis A e B [50]. Assim, por exemplo, 3-metoxi-8,9-metilenodioxipterocarpano (pterocarpina) [42] apresenta espectro de massa que é compatível com localização, no anel A ou no anel B (Quadro 19), de um grupo metoxila.

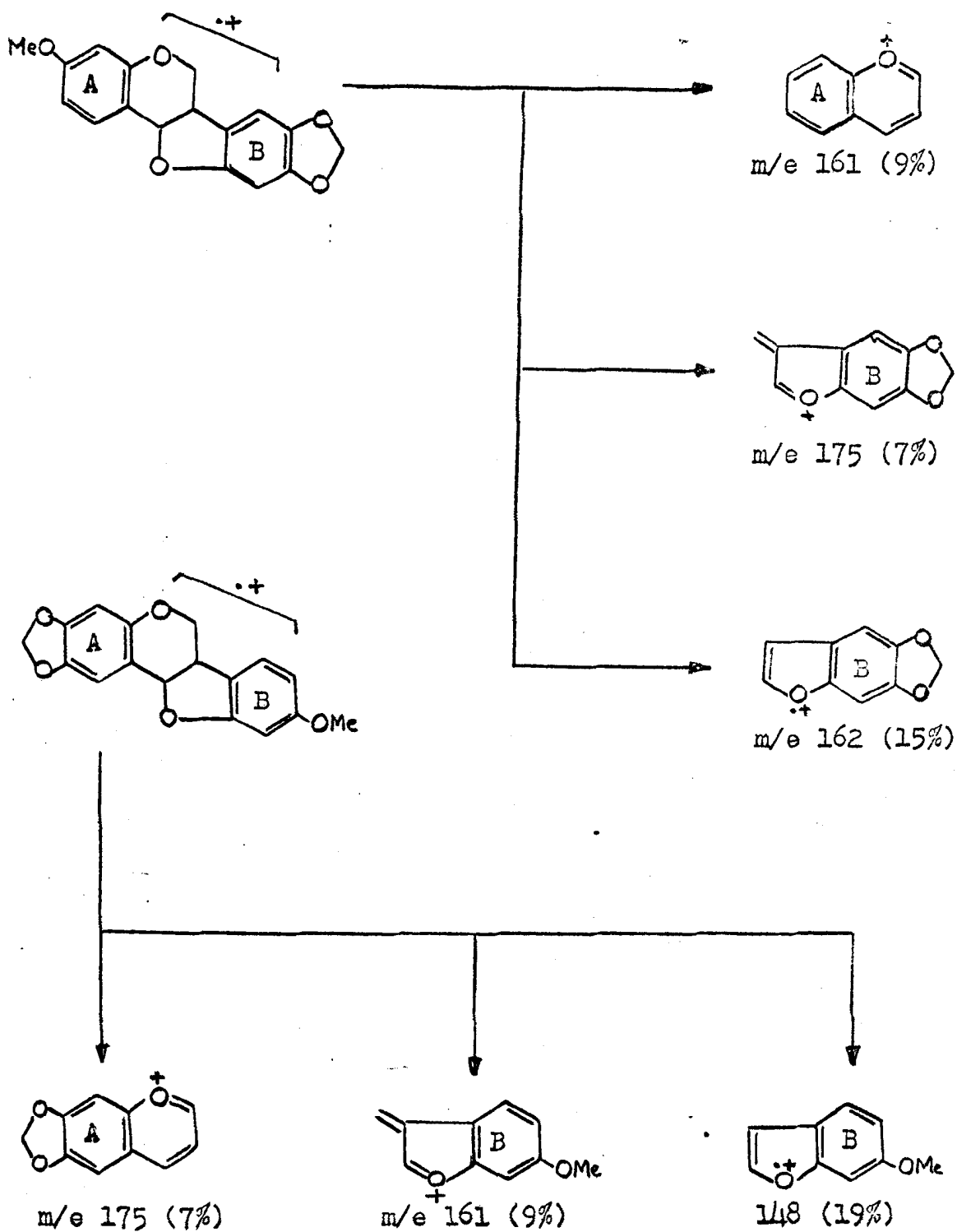
Quadro 18.

Caminhos principais de fragmentação de pterocarpanos no espectrômetro de massa.



Quadro 19.

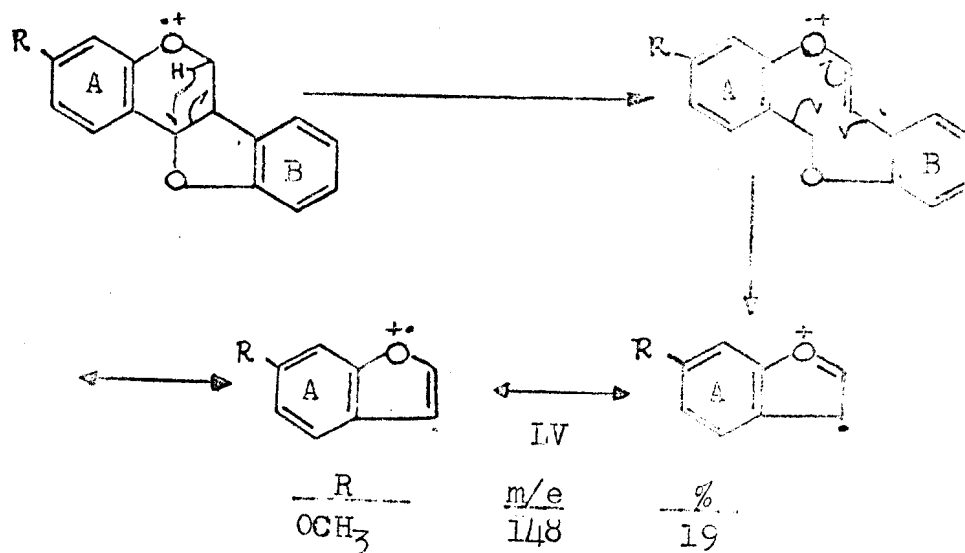
Caminhos principais de fragmentação do 3-metoxi-8,9-metil-
lenodioxipterocarpano no espectrômetro de massa.



Por outro lado, o pico em m/e 148 também pode ser justificado através do fragmento LV, conforme racionalização mecanística envolvendo rearranjo de H (Quadro 20). Entretanto, o fragmento LV resultante tem a mesma fórmula básica C_8H_6O que o fragmento LIII que envolve o anel A (Quadro 18).

Quadro 20.

Fragmentação, envolvendo o anel A de pterocarpanos no espectrômetro de massa.



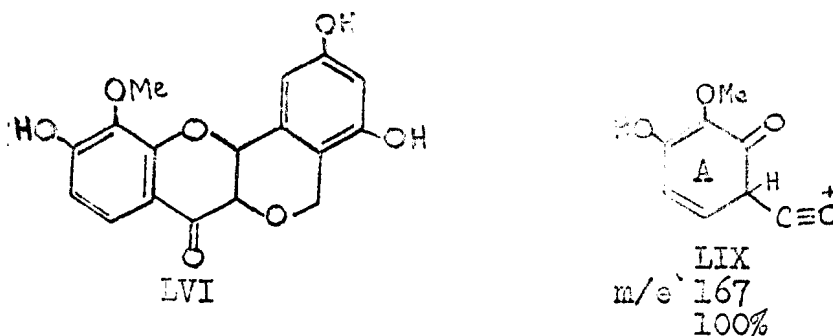
Por isto, é conveniente preparar o derivado isoflavânico, por hidrogenólise com $H_2/Pd/10\%C$, e submeter também este à espectrometria de massa. Sendo fácil a distribuição dos grupos substituintes nos anéis A e B neste derivado, torna-se possível deduzir a estrutura do pterocarpano.

10. Rotenonas e 14-oxopeltoginanos.

As rotenonas e 14-oxopeltoginanos (XXIV, Quadro 3) revelam a fragmentação tipo retro-Diels-Alder como o processo fragmentário mais importante (Quadro 21). Este deslocamento compensado

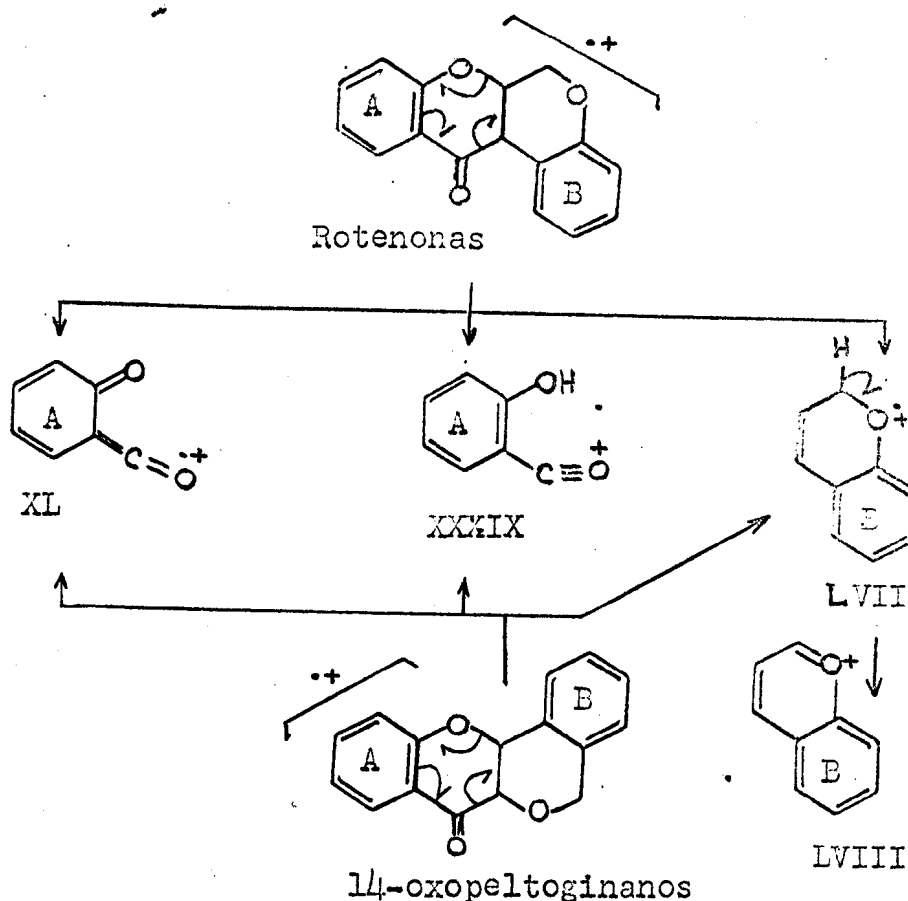
de elétrons conduz ao fragmento envolvendo o anel B (LVII), representado pelo pico base no espectro de massa, excessão feita à guarabina (LVI) que apresenta o pico correspondente ao fragmento LIX como pico base.

Em face disto, a distribuição de grupos substituintes entre os anéis A e B torna-se tarefa relativamente fácil [34, 38, 52].

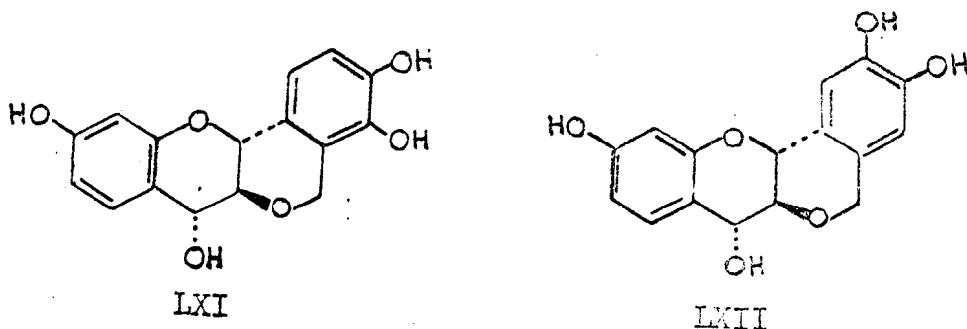


Quadro 21.

Caminhos principais de fragmentação de rotenonas e 14-oxo - peltoginanos no espectrômetro de massa.



Fragmentação análoga é observada em diarilpropanoides que possuem o mesmo esqueleto básico em C_{16} ; como os mopanois e os peltoginois, LXI e LXII respectivamente, que apresentam espectros qualitativa e quantitativamente diferentes [53].



11. Isoflavonois (4-hidroxi-3-fenilcumarinas).

Estas substâncias embora sejam isômeras das 3-hidroxiflavonas comportam-se no espectrômetro de massa de maneira totalmente diferente [54]. Aliás, estas substâncias diferem basicamente de todas as outras que contêm o anel heterocíclico insaturado.

Pelter e col. [54] propõem a existência de três formas tautoméricas interconvertíveis para os isoflavonois (LXIII, LXIV, LXV), envolvendo simples transposição do próton (prototropia). Estes autores admitem que a estrutura LXIV é a principal responsável pela fragmentação no espectrômetro de massa e daí o comportamento semelhante a aquêle apresentado pelas flavanonas.

É muito razoável a hipótese que a presença de uma ligação dupla no anel pirônico contribua para maior estabilização mesomérica do ion molecular. Além disto, estudo do espectro de massa do produto (LXIII) metilado e deuterado revelam a importância do tautô-

mero LXIV na fragmentação que sofrem os isoflavonois. Com base nestes resultados experimentais pôde-se comprovar que os isoflavonois apresentam os caminhos principais de fragmentação representados no quadro 22 (Tabela 28).

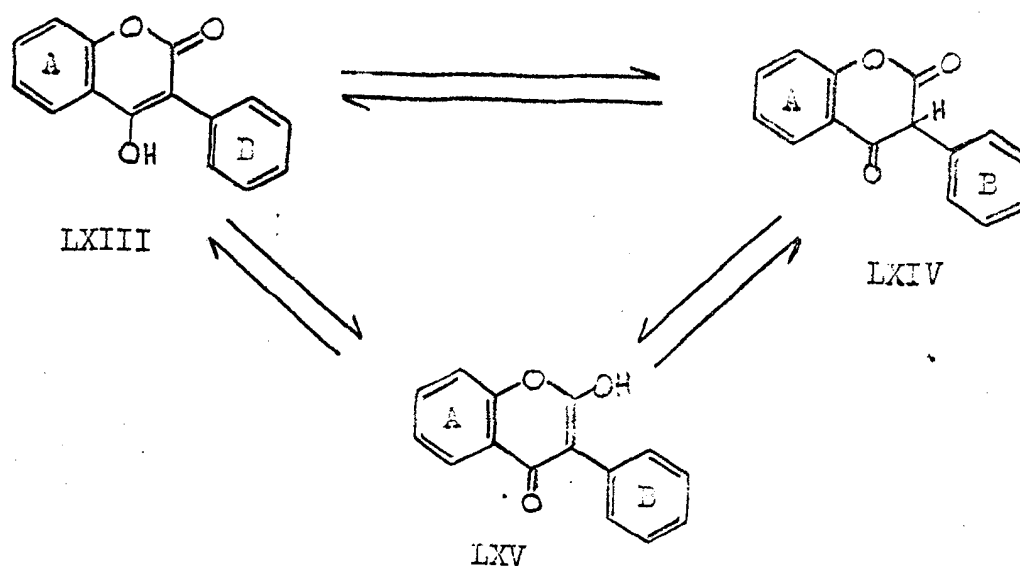


Tabela 28.

Espectros de massa de isoflavonois.

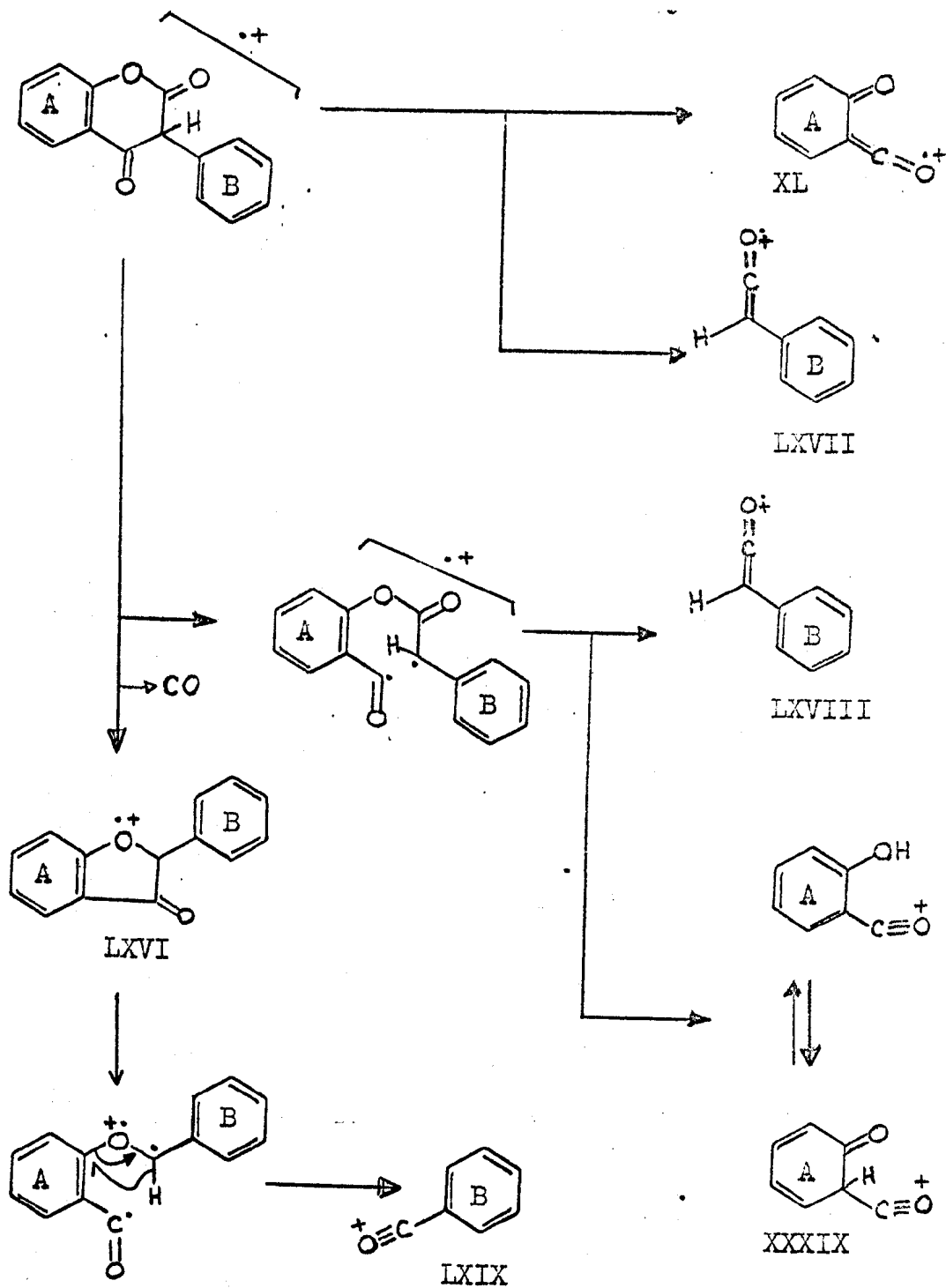
4-hidroxi-3-fenil-cumarina	M ⁺	%	LXVI	%	LXVII	%	LXVIII	%
5,7-dimetoxi	298	52	270	3	118	3	117	-
4'-hidroxi-5,7-dimetoxi	314	100	286	3	134	12	133	-
5,7-dihidroxi	270	65	242	2	118	100	117	2
5,7-dihidroxi-4'-metoxi	300	15	272	-	148	100	147	-

Tabela 28. (Continuação)

4-hidroxi-3-fenil-cumarina	XXXIX	%	XL	%	LXIX	%	Ref.
5,7-dimetoxi	181	100	180	14	105	4	54
4'-hidroxi-5,7-dimetoxi	181	100	180	7	121	7	54
5,7-dihidroxi	153	45	152	40	105	13	54
5,7-dihidroxi-4'-metoxi	153	8	152	-	135	2	54

Quadro 22.

Caminhos principais de fragmentação de isoflavonois (4-hidroxi-3-fenilcumarinas) no espectrômetro de massa.



CAPÍTULO II.

A PLANTA E SEUS CONSTITUINTES.

A PLANTA E SEUS CONSTITUENTES

A Apuleia leiocarpa(Vog.) Macbride (sinon.: A. praecox Mart.)|55| é uma árvore da família Leguminosae-Caesalpinioideae , tribu Cassieae Benth|56|. "Árvore grande, tronco com casca fina, áspera e alvo-acinzentada; ramos novos, lenticelosos; râmulos como as fôlhas novas e inflorescência ferrugineo-pubescentes; fôlhas caducas no inverno, pinadas com 9-12 folíolos alternos, oval-oblongados, o terminal elipsóide ou obovalado, no verso pubérulos, na face glabros, de até 8 cm de comprimento e 3,4 cm de largura; paniculas axilares, curtas, surgindo juntamente com as novas fôlhas; flôres pequenas, amarelas".

Em vista de sua vasta área de ocorrência, que se estende desde o Nordeste (Estados da Paraíba e Pernambuco) através do Centro do Brasil até o Nordeste da Argentina, não causa admiração a diversidade de nomes triviais sob os quais é conhecida. Entre estes citam-se: Jutai, Garapa, Garapa Amarela e Grapiapunha. Seu cerne amarelado é muito apreciado para construções, pois possui notável resistência ao tempo|58|. Na Argentina é utilizada para fazer móveis, interiores de caixões de escritórios, pisos, marcos, postes telegráficos ou de alambrado |55|.

A destacada resistência poderia decorrer da presença de substâncias capazes de inibir o desenvolvimento de micro-organismos e de fungos. O estudo químico da planta assume, assim, inclusive,

interêsse prático.

A árvore utilizada no presente estudo foi coletada nas vizinhanças do Clube Municipal do Gama, no Distrito Federal. A identificação botânica deve-se à gentileza do Dr. Ezelquias Heringer. O tronco foi separado em casca, alburno e cerne. Cada parte, após convenientemente moída, foi extraída com benzeno em aparelho tipo Soxhlet. Manipulação dos extratos permitiu isolar 12 substâncias que receberam os códigos AL-11, AL-12, AL-13, AL-14, AL-15, AL-16, AL-17, AL-18, AL-19A, AL-19B, AL-32, AM-11A e identificação da AL-19 por cromatografia em camada delgada de sílica como oxiaianina B.



Apuleia leiocarpa

- a, fôlhas
- b, folíolo, vista central
- c, ramo de flôres
- d, flôr
- e, fruto esquematicamente, mostrando a semente e o embrião.

CAPÍTULO III.

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE:

- a. APULEINA (AL-11) E 5-O-DESMETILAPULEINA (AL-13).
- b. OXIATIANINA A (AL-12) E 5-O-METILOXIATIANINA (AL-15).
- c. ATIANINA (AL-18).
- d. APULEISINA (AL-14).
- e. APULEITRINA (AL-16).
- f. APULEIDINA (AL-19A).
- g. APULEIRINA (AL-19B).
- h. LEIOCARPIINA (AL-32).
- i. β -SITOSTEROL (AL-17).
- j. (+)-PINITOL (AM-11A).

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

AL-11 e AL-13.

Espectrometria no i.v. (Fig. 1 e 2), no u.v. (Fig. 3 e 4) , de r.m.n. (Fig. 5 e 6) e de massa (Fig. 7 e 8) revelaram a estreita semelhança entre as duas substâncias.

Os espectros i.v., tanto da AL-11 (Fig. 1) como da AL-13 (Fig. 2), mostraram a presença de grupos hidroxila, grupo carbonila, natureza aromática e sugeriram a presença de grupamento éter (Tabela 29).

Os espectros u.v. (Fig. 3 e 4) confirmaram a natureza aromática e a presença de grupos hidroxila, em face da modificação por adição de hidróxido de sódio (Tabela 30). Os deslocamentos batocrômicos dos máximos de absorção da AL-13 por adição de tricloreto de alumínio estavam de acordo com a presença de um OH em C-5 (Tabela 30).

O espectro de r.m.n. (Fig. 5) da AL-11 revelou a presença de 3 sinais, representando um proton cada um, na região correspondente a absorção de protons aromáticos, 5 sinais simples corresponden -

tes a 5 grupos metoxila, 2 outros sinais atribuídos a 2 grupos hidroxila em face da comparação do espectro da substância original com o do acetato dela derivado (AL-11Ac). De fato, notou-se a substituição dos sinais em 2,00 e 4,55 τ por sinais em 7,68 e 7,78 τ correspondentes aos grupos acetila introduzidos (Fig. 9, Tabela 31).

Tabela 29.

Espectros i.v. da AL-11, AL-13 e seus derivados, em KBr, cm^{-1} .

Substância	$\nu_{\text{OH}}, \nu_{\text{C-O}}$	$\nu_{\text{C=O}}$		Aromático	Éter
		Pirônica	Ester		
AL-11	3330 1209-1242	1620	-	1605-1558-1510, 1476	1209-1277 1015-1164
AL-11Ac	-	1640	1768 1208-1235	1613, 1565, 1517, 1481	1208-1276 1018-1160
AL-11Me	-	1637	-	1613, 1570, 1515, 1486	1201-1208 1003-1168
AL-11Et	-	1628	-	1605, 1566, 1514, 1479	1210-1274 1016-1147
AL-11QAc	-	1640	1778 1202-1247	1633, 1615, 1582, 1515, 1492	1202-1297 1021-1173
AL-13	3458 1218-1258	1658	-	1631-1600, 1563, 1508, 1493	1218-1300 1028-1153
AL-13Ac	-	1645	1773 1182-1266	1631, 1582, 1515 1493	1182-1326 1026-1154

A análise do espectro de r.m.n. (Fig. 6) da AL-13 indicou também a presença de 3 sinais, representando um proton cada um, na região de absorção de protons aromáticos, 3 sinais simples represen

tando 4 grupos metoxila. Os 3 sinais restantes -2,28, 2,13 e 4,67 τ , foram atribuídos a protons hidroxílicos já que no espectro do acetato derivado (Fig. 10) eles estão ausentes e aparecem 3 sinais em 7,53, 7,69 e 7,81 τ , representando os grupos acetila introduzidos (Tabela 31).

Tabela 30.

Espectros u.v da AL-11 e AL-13, em meio neutro e com aditivos.

Aditivo	AL-11, nm			AL-13, nm		
	λ MeOH max	λ MeOH max	λ MeOH max	λ EtOH max	λ EtOH max	λ EtOH max
-	250 21.450	315 12.400	335 11.100	260 40.100	305 15.950	350 20.650
NaOH	244 23.500	287 14.400	- -	270 39.500	360 7.200	- -
NaOH+HCl	238 22.200	290 12.400	- -	255 37.200	298 26.550	- -
AcONa	250 21.450	315 12.400	335 11.100	260 40.100	305 15.950	350 20.650
AcONa+H ₃ BO ₃	250 21.450	315 12.400	335 11.100	260 40.100	305 15.950	350 20.650
AlCl ₃	250 21.450	315 12.400	335 11.100	267 37.800	314 17.100	357 13.000

Confirmação adicional de que o derivado acetilado da AL-11 (AL-11Ac) é um diacetato pôde ser obtida da análise aritmética do

Tabela 31.

Espectros de r.m.n. da AL-11, AL-13 e seus derivados.
Solvente CDCl₃. Deslocamentos químicos em unidades τ.

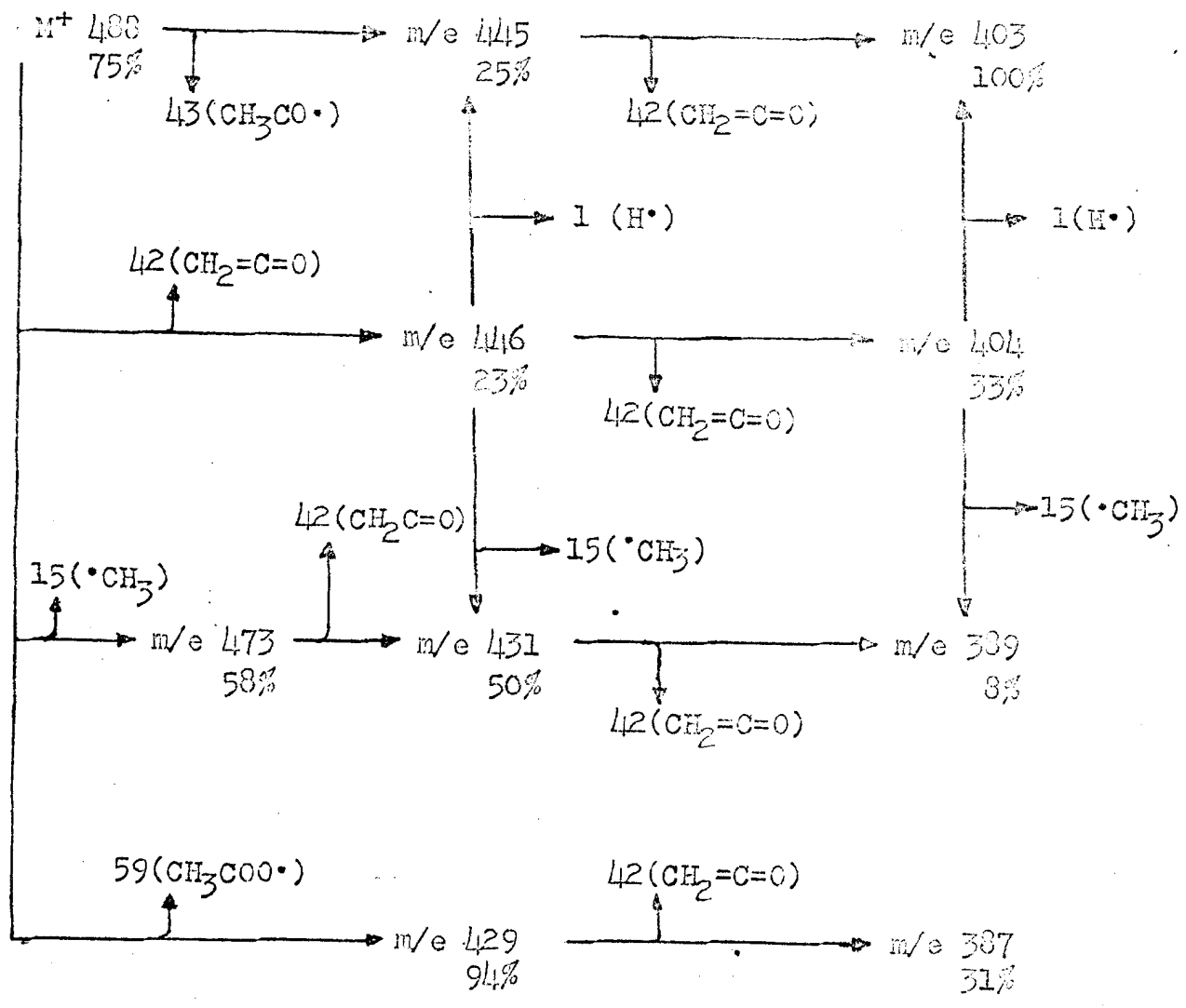
Substância	OH	H-3'	H-6'	H-8	OMe	OCOMe
AL-11	2,00 4,55	3,40	2,77	3,26	6,00 6,05 6,09 6,12 6,15	-
AL-11Ac	-	3,18	2,69	3,36	6,05 6,10 6,11 6,13 6,31	7,68 7,78
AL-11QAc	-	3,14	2,67	3,16	6,08 6,08 6,37	7,54 7,65 7,65 7,86
AL-13	-2,28 2,13 4,67	3,37	2,74	3,47	6,04 6,04 6,07 6,12	-
AL-13Ac	-	3,08	2,57	3,15	6,03 6,08 6,12 6,34	7,47 7,64 7,75

seu espectro de massa (Fig. 11) apresentada no Quadro 23. Racionalizaçãõ mecanística dos principais caminhos de fragmentação desta substância é apresentada no Quadro 24.

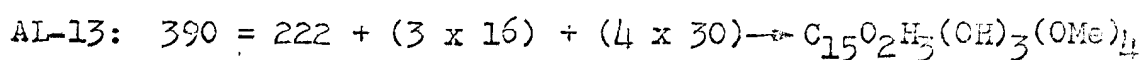
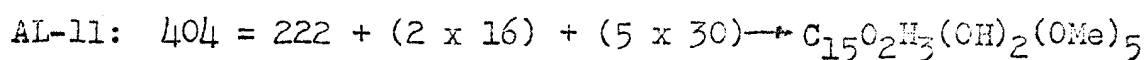
Também o espectro de massa do derivado metílico (Fig. 12) revela tratar de um éter dimetílico.

Quadro 23.

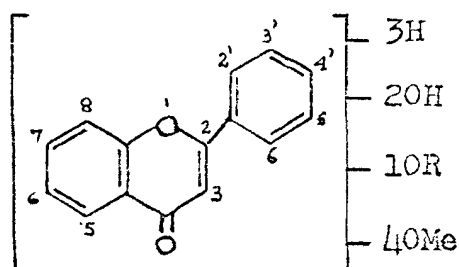
Análise aritmética do espectro de massa do derivado diacetato da AL-11.



Espectrometria de massa revelou ainda peso molecular 404 para a AL-11 e 390 para AL-13 (Fig. 7 e 8), constatando-se uma diferença de 14 unidades de massa entre elas. Todos êsses dados em conjunto permitem deduzir as fórmulas moleculares das 2 substâncias, considerando o esqueleto básico $C_{15}H_{10}O_2$ (Quadro 3):



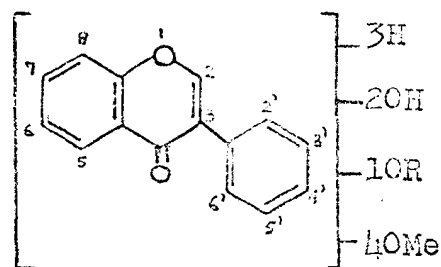
Os dados fornecidos pelos espectros de r.m.n. das duas substâncias solicitam um esqueleto fundamental com 10 posições disponíveis. Esta imposição, em conjunto com os espectros u.v. e i.v. (4 bandas entre $1625 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ e de massa permitiu classificar os dois produtos naturais seja como uma flavona (LXX), seja como uma isoflavona (LXXI).



LXX

AL-11, R=Me

AL-13, R=H



LXXI

AL-11, R=Me

AL-13, R=H

A falta de banda entre $2,08$ e $2,27 \tau$ $[24,59]$ nos espectros de r.m.n. das duas substâncias, como a ausência de ácido fórmico $[60]$ entre os produtos de degradação alcalina da AL-11 excluíram uma es -

estrutura isoflavônica (LXXI) do quadro das possibilidades.

Comparação dos espectros das duas substâncias e de seus derivados permitiram ainda supôr que AL-11 e AL-13 possuíssem o mesmo padrão de substituição, sendo esta última o 5-O-desmetil derivado da AL-11. Que o átomo de carbono 5 da AL-13 sustenta um grupo OH, confirmou-se pela presença de um sinal em campo baixo ($-2,28 \tau$) no seu espectro de r.m.n. (Fig. 6 e Tabela 31). A forte ponte de hidrogênio intramolecular em hexanel e o efeito anisotrópico de grupo C=O justificam a grande desproteção deste proton hidroxílico. Já um grupo OH no C-3 dá origem a um sinal em campo mais alto, em tórno de $0,5 \tau$ [21]. Além disto, sinal em $7,47 \tau$ no espectro de r.m.n. (Fig. 10, Tabela 31) do triacetato derivado da AL-13 (AL-13Ac) é atribuído a metila de grupo acetoxi localizado em C-5 [25].

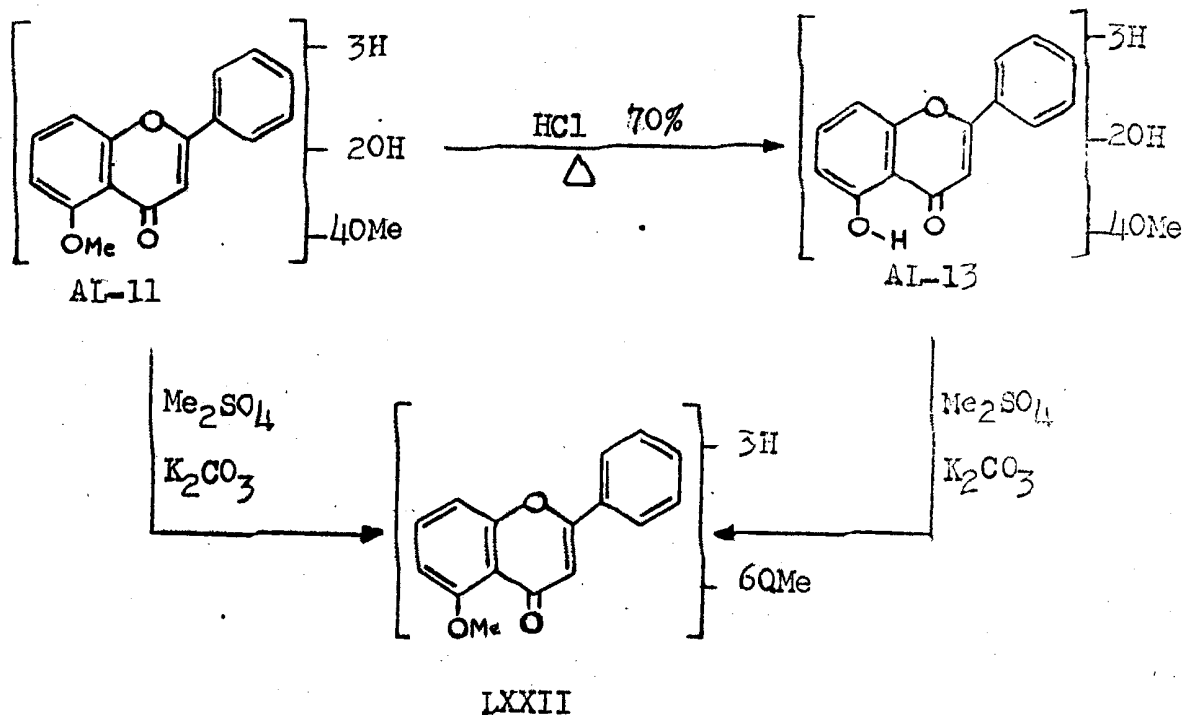
O espectro i.v. da AL-13 (Fig. 2) confirmou mais uma vez a presença de OH em C-5, já que a banda de absorção correspondente ao grupo C=O aparece em 1660 cm^{-1} . Este valor coloca-se bem na faixa prevista para os 5-hidroxiflavonas, $1641-1672 \text{ cm}^{-1}$ [10]. Também a banda de absorção do C=O da AL-11, registrada em 1620 cm^{-1} no seu espectro i.v. (Fig. 1), localiza-se na faixa $1608-1649 \text{ cm}^{-1}$, característica das 5-metoxiflavonas. Eterificação de uma OH localizada no carbono 5 de uma flavona provoca assim um deslocamento da banda de absorção do C=O para menor frequência [10]. Resultado concordante com esta alteração surge da comparação das absorções dos grupos C=O das substâncias naturais em foco. Se um grupo OH encontra-se em C-3 ocorre deslocamento para maior frequência.

Mais uma evidência pode ser citada para presença de um grupo OH em C-5 da AL-13. O espectro i.v. do triacetato derivado (AL-13Ac, Fig. 13) revela a banda de absorção da C=O pirônica em 1629 cm^{-1} em comparação com 1660 cm^{-1} na substância original. O deslocamento para menor frequência constatado é compatível também com a presença do grupo OH em C-5 [10]. Aqui também acetilação de um grupo 3-OH provoca o deslocamento da banda carbonílica para maior frequência.

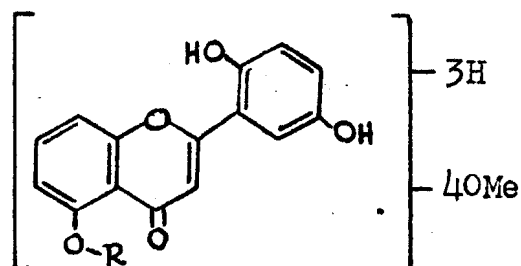
Que as duas substâncias têm o mesmo padrão de substituição confirmou-se definitivamente através de interconversão por desmetilação seletiva utilizando-se ácido clorídrico aquoso a 20% [61] e metilação. Desmetilação seletiva da AL-11 forneceu AL-13 e metilação da AL-11 e AL-13 originaram um mesmo produto derivado, LXXII (Quadro 25).

Quadro 25.

Transformações químicas com a AL-11 e AL-13.



A insabibilidade das duas substâncias em meio alcalino (Tabela 30) pode ser atribuída à presença de sistemas para-diOH e/ou orto-diOH e/ou 3,4'-diOH [4]. A última possibilidade pôde ser eliminada em face da inalteração do espectro da AL-11 por adição de tricloreto de alumínio (Tabela 30), resultado êste incompatível com a existência de grupo OH na posição 3 e/ou 5. A hipótese de sistema orto-diOH também foi eliminada pela inalteração dos espectros u.v. das duas substâncias por adição de $\text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3$ [4]. Ocasionalmente [5] o sistema 5,6-diOH não é revelado pela adição de $\text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3$. Sua presença, no entanto, fica excluída no caso presente, já que a AL-11 não possui grupo OH na posição 5. Diante destas conclusões, devem as substâncias conter um sistema para-diOH. Para localização de tal sistema só dispomos das posições 2' e 5' do anel B, surgindo, assim, as estruturas parciais LXXIII e LXXIV para a AL-11 e AL-13 respectivamente.

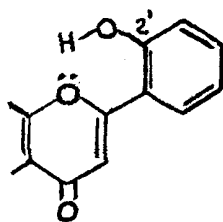


LXXIII - AL-11, R = Me

LXXIV - AL-13, R = H

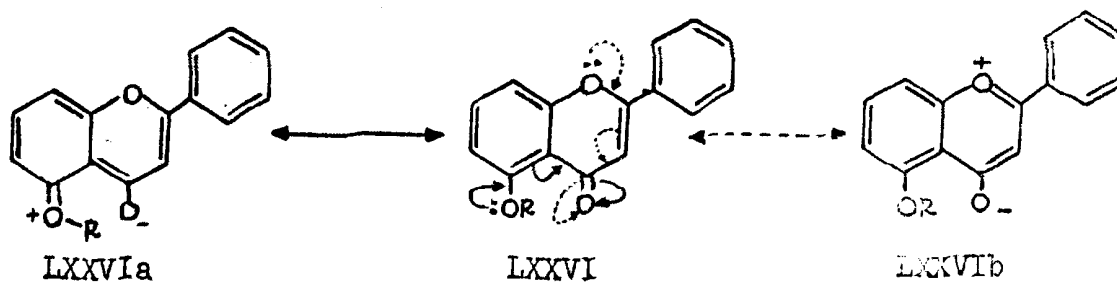
Os sinais em 2,00 e 2,13 τ (Tabela 31) que aparecem nos espectros de r.m.n. da AL-11 e AL-13 (Figura 5 e Figura 6), respectivamente, podem ser atribuídos aos protons dos grupos hidroxila localiza

dos na posição 2' das duas substâncias e os valores de seus deslocamentos químicos sugerem a presença de uma ponte de hidrogênio intramolecular entre este grupo e o oxigênio etérico do anel pirônico (LXXV).



LXXV

Uma evidência adicional da existência do sistema LXXV pôde ser obtida do espectro i.v. da AL-11. Briggs e Colebrook [10] propõem justificativas para o comportamento espectral, o que se aludiu na página segundo o qual 5-hidroxi flavonas apresentam a banda de absorção correspondente ao estiramento C=O em maior frequência do que 5-metoxi flavonas, baseada nas estruturas canônicas LXXVI, LXXVIa e LXXVIb.



Para R=H ou Ac os autores atribuem maior contribuição de LXXVIb para o híbrido, com absorção média característica em 1653cm^{-1} , enquanto LXXVIa não teria contribuição significativa. Entretanto, para R=Me atribuem maior contribuição a LXXVIa com absorção carboni

lica média em 1629 cm^{-1} . Os argumentos apresentados são satisfatórios, já que flavanonas não revelam esta "anomalia", comportando-se como normalmente esperado. Isto é: metilação e acetilação de hidroxila em 5 de flavanonas produz aumento da frequência de absorção carbonílica.

Com base nesta hipótese pode-se prever que a presença de uma ponte de hidrogênio entre 2'-OH e o oxigênio heterocíclico tornaria LXXVIb menor contribuinte, pois o par de elétrons não compartilhado do oxigênio pirônico teria sua liberdade restringida. Daí por que a C=O da AL-11 absorve em frequência tão baixa, 1620 cm^{-1} .

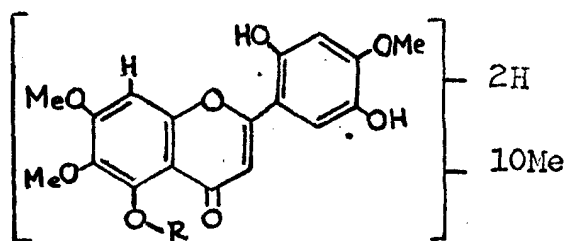
Por outro lado, é também previsível que a acetilação, metilação e etilação de 2'OH conduza a absorção de C=O pirônica para maior frequência, já que ocorre destruição da ponte de hidrogênio e, conseqüentemente, ocorreria uma maior contribuição de LXXVIb. De fato, tal comportamento é constatado nos espectros i.v. do acetato (Fig. 14), do metilado (Fig. 15) e do etilado de AL-11 (Fig. 16), sendo que as absorções do grupo C=O pirônico nestes derivados aparecem 1629 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} e 1626 cm^{-1} , respectivamente (Tabela 29). Uma substância semelhante registrada na literatura [14] comporta-se de maneira análoga, conforme referido no capítulo de previsão dedicado à espectrometria no i.v..

Em face de argumentação baseada em espectrometria no i.v. e de r.m.n., parece lícito assim, atribuir a existência de ponte hidrogênio intramolecular entre 2'-OH e o oxigênio heterocíclico.

Neste ponto, restava localizar 4 grupos metoxila e 3 protons aromáticos na AL-11 e AL-13. Os espectros de r.m.n. das duas

substâncias revelam 3 sinais simples na região correspondente a absorção de protons aromáticos (Fig. 5 e Fig. 6, Tabela 31) representando 1 proton cada um. Conseqüentemente, os 3 protons correspondentes não são quimicamente equivalentes, além de não manterem relação orto e/ou meta entre si. Portanto, a localização de OH pelo menos 2 grupos OMe no anel A e pelo menos um na posição 4' do anel B tornou-se evidente. A comparação dos dois espectros de r.m.n. mostrou diferença de posição significativa de um dos 3 sinais que passa de 3,26 τ na AL-11 (em 5-OMe derivado) para 3,47 τ na AL-13 (em 5-OH derivado), Tabela 31. Tais valores numericos e comportamentos são característicos de H em C-8 de flavonas 5,6,7-trioxigenadas [25], como demonstra a Tabela 32.

Pode-se constatar da Tabela 32 que somente o proton sustentado pelo carbono 8 sofre modificação significativa quando transforma-se 5-hidroxi em 5-metoxiflavona. Assim, foi possível ampliar as estruturas parciais da AL-11 e AL-13, respectivamente para LXXVII e LXXVIII.



LXXVII R=Me

LXXVIII R=H

Os sinais em 2,77 e 2,74 τ (Tabela 31) para a AL-11 e AL-13 respectivamente, só podem corresponder a proton localizado em 6' com a posição para livre de substituinte oxigenado. A introdução de um grupo metoxila em 3' ocasionaria um aumento da densidade eletrônica

Tabela 32.

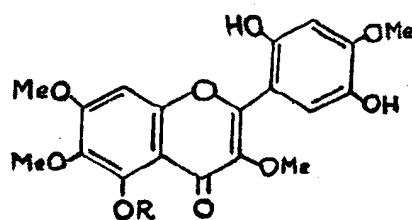
Espectros de r.m.n. de flavonas penta, hexa e heptaorigenadas. Solvente $CDCl_3$. Deslocamentos químicos em unidades τ .

Flavona	H-6	H-8	H-2'	H-6'	H-3'	H-5'	Ref.
5-hidroxi-3,3',4',5',6,7-hexametoxi	-	3,49	2,62	2,62	-	-	[25]
3,3',4',5,5',6,7-heptametoxi	-	3,22	2,62	2,62	-	-	[25]
3',5-dihidroxi-3,4',7,8-tetrametoxi	3,57	-	2,20	2,19	-	3,00	[25]
5-hidroxi-3,3',4',7,8-pentametoxi	3,58	-	2,19	2,12	-	2,97	[25]
3,3',4',5,7,8-hexametoxi	3,54	-	2,10	2,11	-	2,96	[25]
3,4',5,6,7-pentametoxi	-	3,25	1,93		2,98		[25]
3,3'-dihidroxi-4',5,6,7-tetrametoxi	-	3,23	2,26		-	3,05	[16]

na posição 6' e, conseqüentemente, esta blindagem eletrônica provocaria um deslocamento diamagnético do sinal correspondente ao H em 6'. Assim, deveria aparecer em torno de 3,0τ. Este ponto fica claro também comparando valores da Tabela 32.

Com base nos argumentos lançados pôde-se localizar a metoxila remanescente em ambas as substâncias apenas em 3 e estabelecer a posição estrutural da 2',5'-dihidroxi-3,4',5,6,7-pentametoxiflavona (LXXIX) para a AL-11 e da 2',5,5'-trihidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (LXXX) para a AL-13. Ensaio de Gibbs [62], negativo para AL-11 e positivo para AL-13 (Fig. 17), corroboram tais propostas indicando que a posição 8 encontra-se livre de substituição na 5-O-desmetilapuleína (AL-13). Comparação da curva de Gibbs da AL-11 e da 1,4-dihidroxi-xantona (Fig. 18) revela semelhança, comprovando mais uma vez a presença de um sistema para-dihidroxi na AL-11.

Os espectros de massa da AL-11 e AL-13 corroboram as proposições LXXIX e LXXX (Fig. 7 e 8, Quadro 26). O pico em m/e 389 (M-15, 100%) no espectro da AL-11 e em m/e 375 (M-15, 34%) no espectro da AL-13 estão em acôrdo com a existência de grupo metoxila na posição 6 [43].



LXXIX R=Me

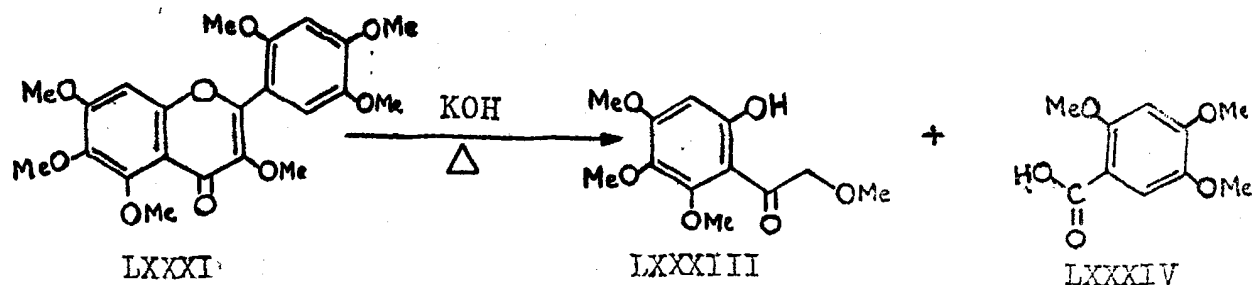
LXXX R=H

Para confirmação das proposições estruturais lançadas recorreu-se a degradação alcalina da di-O-metil AL-11 (AL-11Me, LXXXI), de-O-etil (AL-11Et, LXXXII) e AL-11 (LXXXIX).

A hidrólise em meio alcalino da AL-11Me (LXXXI) permitiu a separação de dois produtos, LXXXIII e LXXXIV (Quadro 27).

Quadro 27.

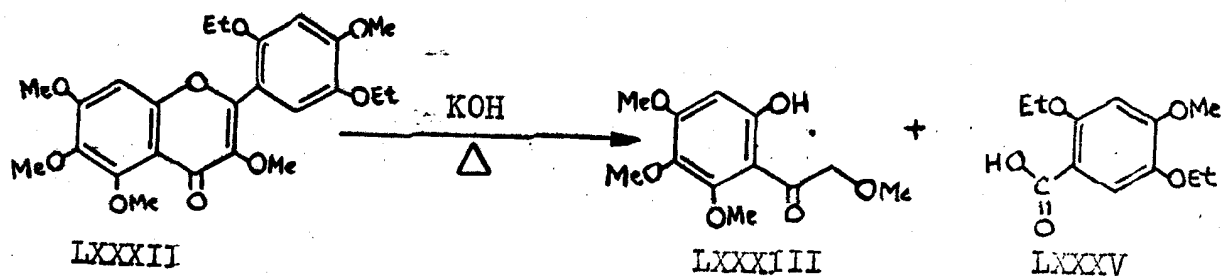
Degradação alcalina da AL-11Me.



6'-Hidroxi-2,2',3',4'-tetrametoxiacetofenona (LXXXIII) foi caracterizada por seus espectros no i.v. (Fig. 19), no u.v., de massa (Fig. 20, Quadro 28), cromatografia em camada delgada e por comparação com amostra autêntica gentilmente cedida pelo Dr. P. R. Jefferies. O ácido 2,4,5-trimetoxibenzoico (LXXXIV) teve sua estrutura confirmada por i.v. (Fig. 21) e comparação com amostra autêntica.

A AL-11Et (LXXXII) por tratamento com alcali forneceu a mesma acetofenona (LXXXIII) e o ácido 2,5-dietoxi-4-metoxibenzoico (LXXXV), Quadro 29;

Degradação alcalina da AL-11Et.

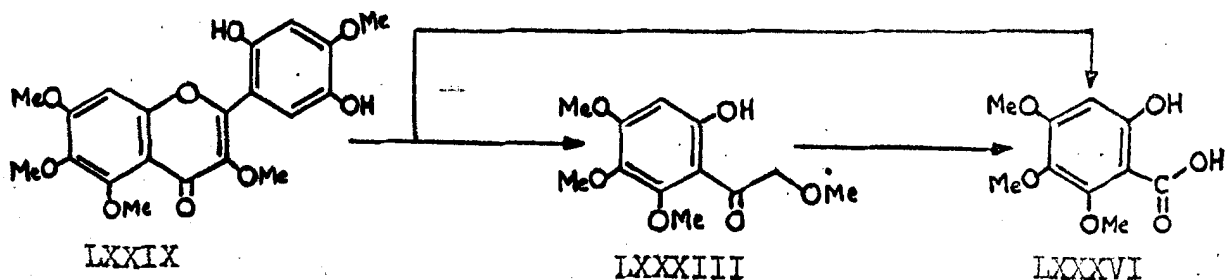


A caracterização do ácido 2,5-dietoxi-4-metoxi envolveu espectrometria no i.v. (Fig. 22). de massa (Fig. 23, Quadro 30), cromatografia em camada delgada e por comparação com amostra autêntica, gentilmente cedida pelo Dr. B.R. Pai.

Procedimento análogo com a AL-11 (LXXIX) levou à formação da mesma acetofenona (LXXXIII) e um ácido carboxílico (i.v., Fig. 24) em pequena quantidade, p.f. 113-115°C. Espectrometria de massa (Fig. 25, Quadro 31) indicou para esta substância peso molecular 228, pico base em 210 unidade de massa, (fácil perda de água), classificando-a como ácido trimetoxi-salicílico. Comparação direta com amostras autênticas mostrou não se tratar nem do ácido 2-hidroxi-3,4,5-trimetoxibenzoico (i.v., Fig. 26; e.m. Fig. 27; Quadro 32), obtido por síntese segundo técnica descrita na literatura [63], e nem o ácido 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxibenzoico (i.v., Fig. 28), p.f. 148-149°C [64]. Os dois ácidos trimetoxisalicílicos restantes não são conhecidos. Entre eles encontra-se o ácido 6-hidroxi-2,3,4-trimetoxibenzoico (LXXXVI) cuja estrutura deve corresponder ao ácido de p.f. 113-115°C, já que deve originar-se do anel A (Quadro 33). O anel B sofre decomposição nas condições de reação utilizadas.

Quadro 33.

Degradação alcalina da AL-11.



Todos êstes dados considerados em conjunto permitem não só a localização insofismável de tôdas as funções oxigenadas, mas confirmam a natureza flavônica do esqueleto e demonstram que os dados espectrais receberam interpretação correta.

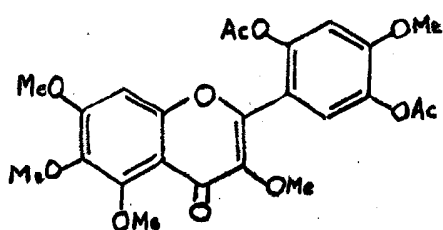
AL-11 corresponde, assim, a estrutura da 2',5'-dihidroxi-, -3,4',5,6,7-pentametoxiflavona (LXXIX) e a AL-13 da 2',5,5'-trihidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (LXXX) e, conseqüentemente, a AL-11Ac possui a estrutura 2',5'-diacetoxi-3,4',5,6,7-tetrametoxiflavona (LXXXVII) e AL-13Ac a estrutura de 2',5,5'-triacetoxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (LXXXVIII).

Ambas as substâncias naturais e seus derivados, são inéditos. A AL-11 foi denominada apuleina e a AL-13 5-O-desmetilapuleina.

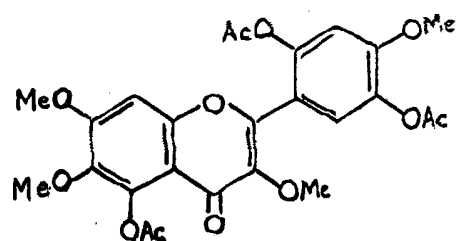
Estabelecidas, assim, as estruturas das duas substâncias e seus derivados, resta interpretar dado experimental que, a priori, era tido em desacôrdo com a existência de um anel A oxigenado em 5,6,7. Ácido nítrico é indicado na literatura como capaz de efetuar desmetilações oxidativas conduzindo a sistemas para-quinólicos [65]. Ação de ácido nítrico sobre a apuleina e a 5-O-desmetilapuleina resultou numa mesma quinona. Sua redução em ácido acético com sulfito de sódio levou a um quinol que foi acetilado sem purificação (AL-11Ac), cujo espectro i.v. aparece na Fig. 29.

O espectro de r.m.n. (Fig. 30, Tabela 31) do acetato mostrou tratar-se de uma tetracetoxi-trimetoxiflavona. O sinal em campo relativamente baixo (7,54 τ), referente a um dos quatro grupos acetoxila, constitui uma evidência de existência de um grupo acetoxi em C-5. O espectro de massa (Fig. 31, Quadro 34) revelou peso molecular 544 e confirma a presença de 4 grupos acetoxila conforme constata-se em sua análise aritmética (Quadro 35).

O tratamento com ácido nítrico da apuleina e 5-O-desmetilapuleina atingiu, assim, tanto o sistema 2',5'-dihidroxilado do anel B, como ainda o anel A. Em base da prova rigorosa da distribuição das funções oxigenadas neste anel, descrita acima, é preciso admitir que o ácido nítrico produz também desmetilações oxidativas conduzindo a sistemas orto-quinônicos. Aliás tal reação envolvendo posições vizinhas foi notada recentemente pela primeira vez. O reagente usado não foi, no entanto, o ácido nítrico, mas o óxido crômico em ácido acético [66]. Conseqüentemente, a estrutura da quinona (LXXXIX), do quinol (XC) e do acetato (XCI) podem ser formuladas (Quadro 36).



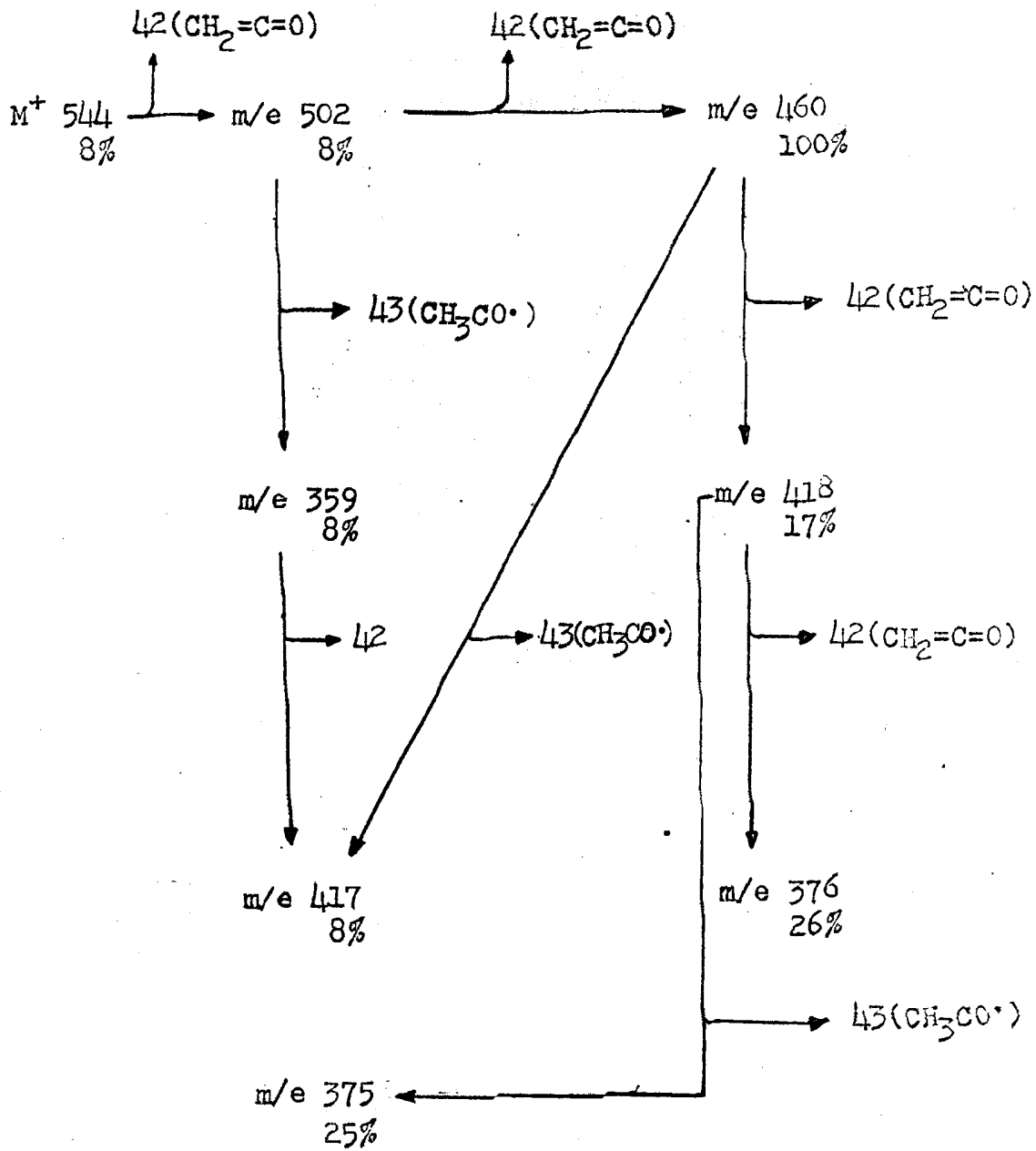
LXXXVII



LXXXVIII

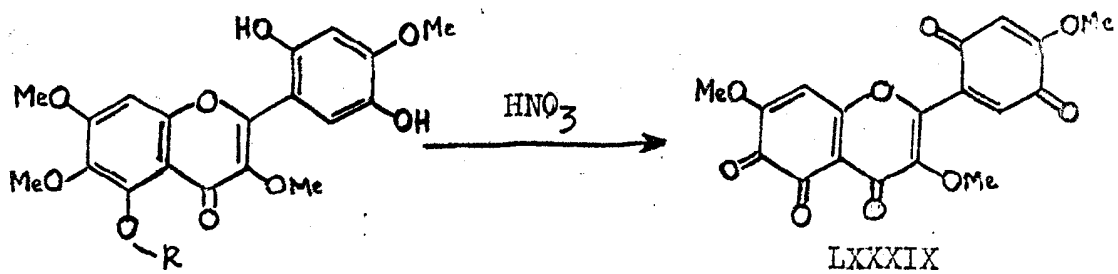
Quadro 35.

Análise aritmética do espectro de massa do acetato do quinol obtido da AL-11.



Quadro 36.

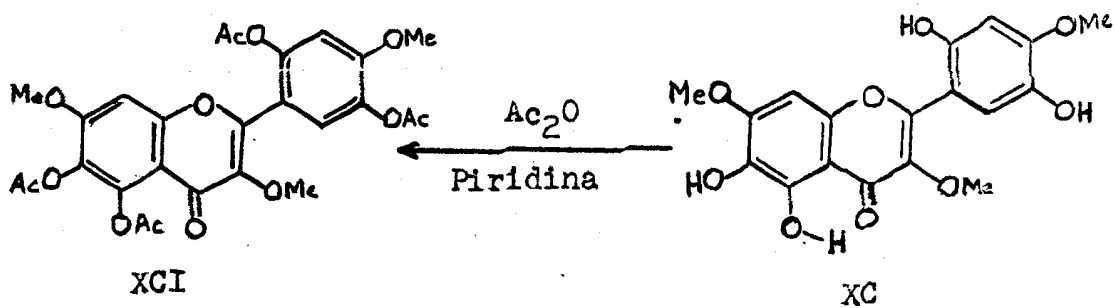
Transformações químicas com a AL-11 e AL-13.



LXXXIX R=Me

LXXX R=H

Na_2SO_3
AcOH



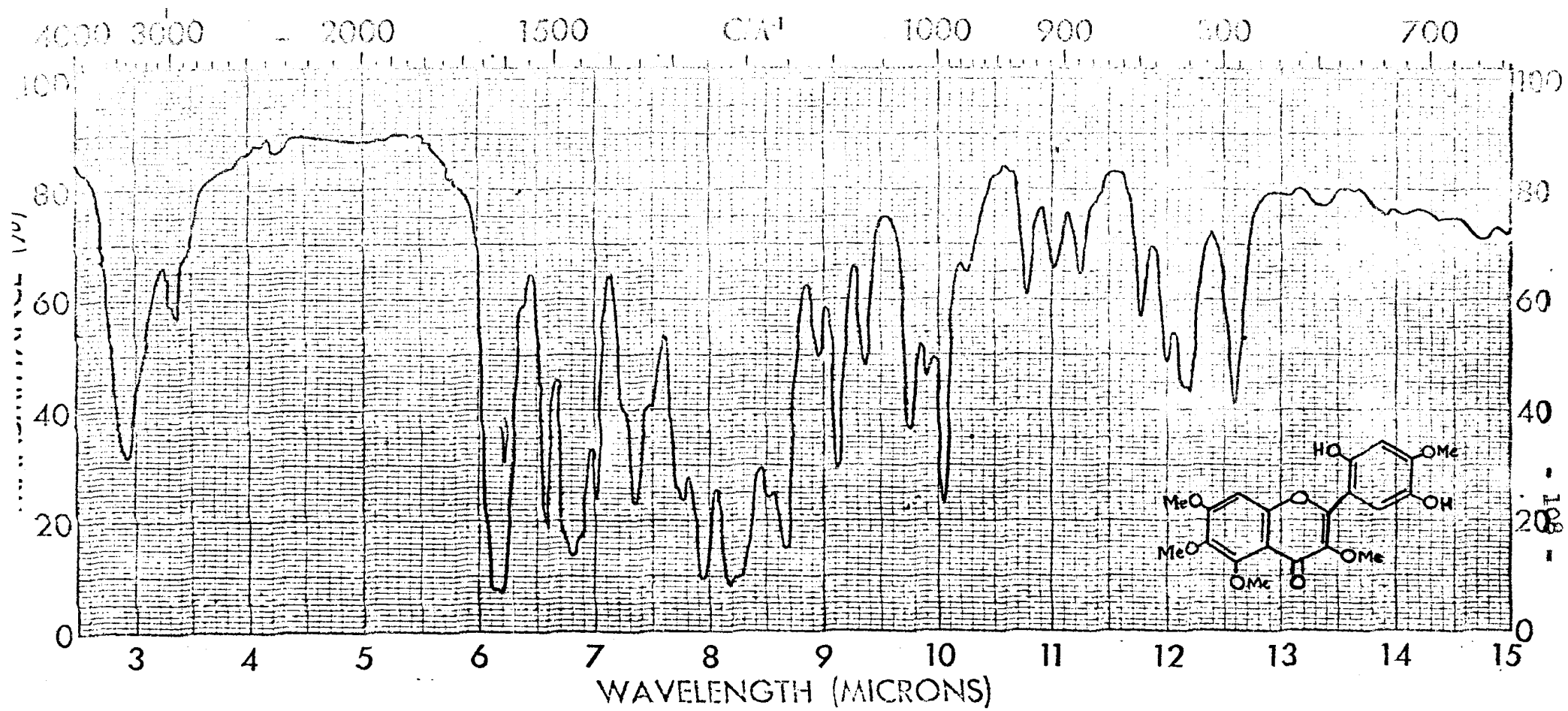


Figura 1.

Espectro i.v. da apuleína (AL-11) = 2',5'-dihidroxi-3,4',5,6,7-pentametoxiflavona
 Fase: KBr

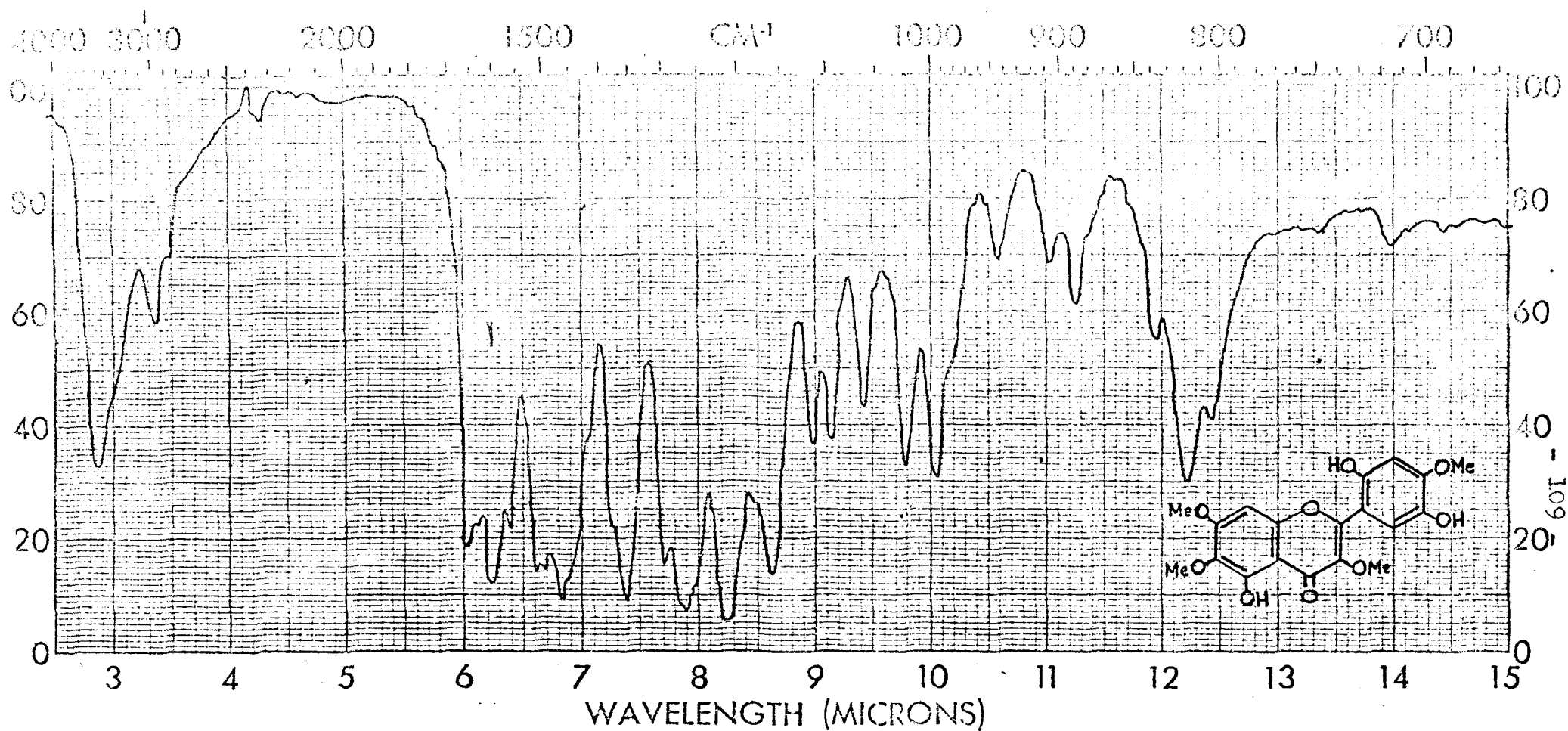


Figura 2.

Espectro i.v. da 5-O-desmetilapuleína (AL-13) = 2',5,5'-trihidroxí-3,4',6,7-tetra
metoxiflavona

Fase: KBr

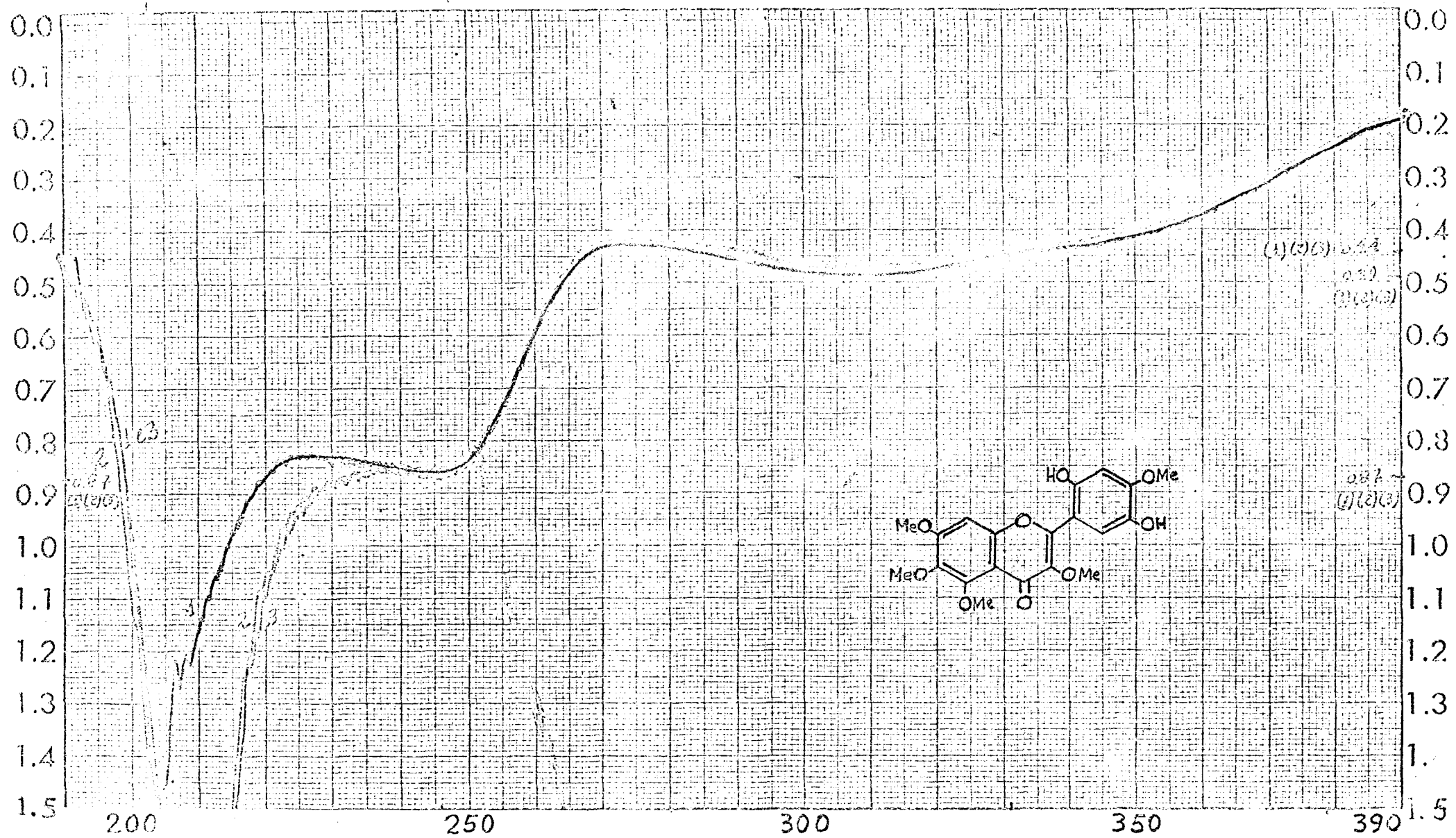


Figura 3.

Espectro u.v. da apuleína (AL-11) = 2',5'-dihidroxi-3,4',5,6,7-pentametoxiflavona

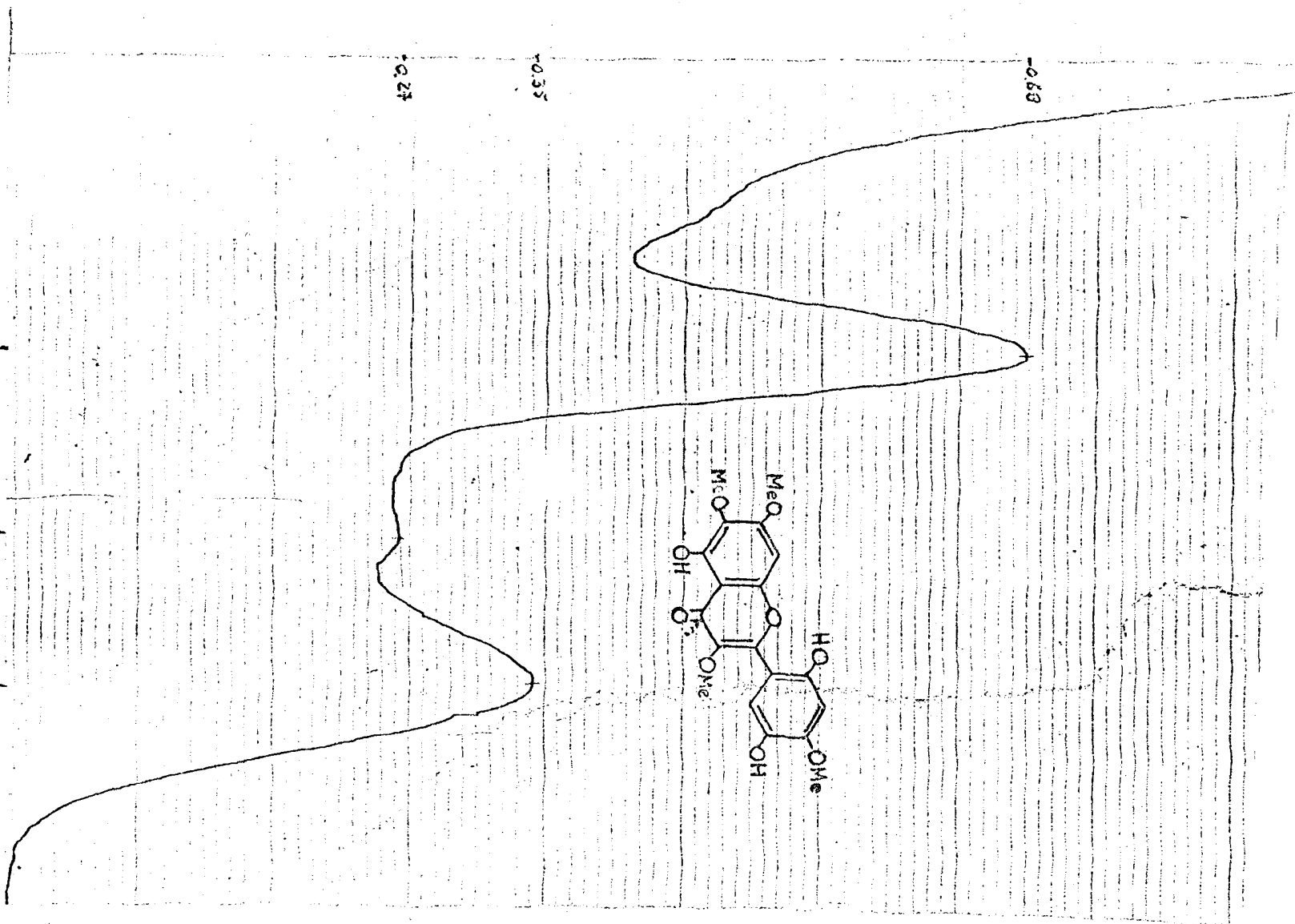


Figura 4.
 Espectro u.v. da 5-O-desmetilapuleína (AL-15) =
 = 2',5,5'-trihidróxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona

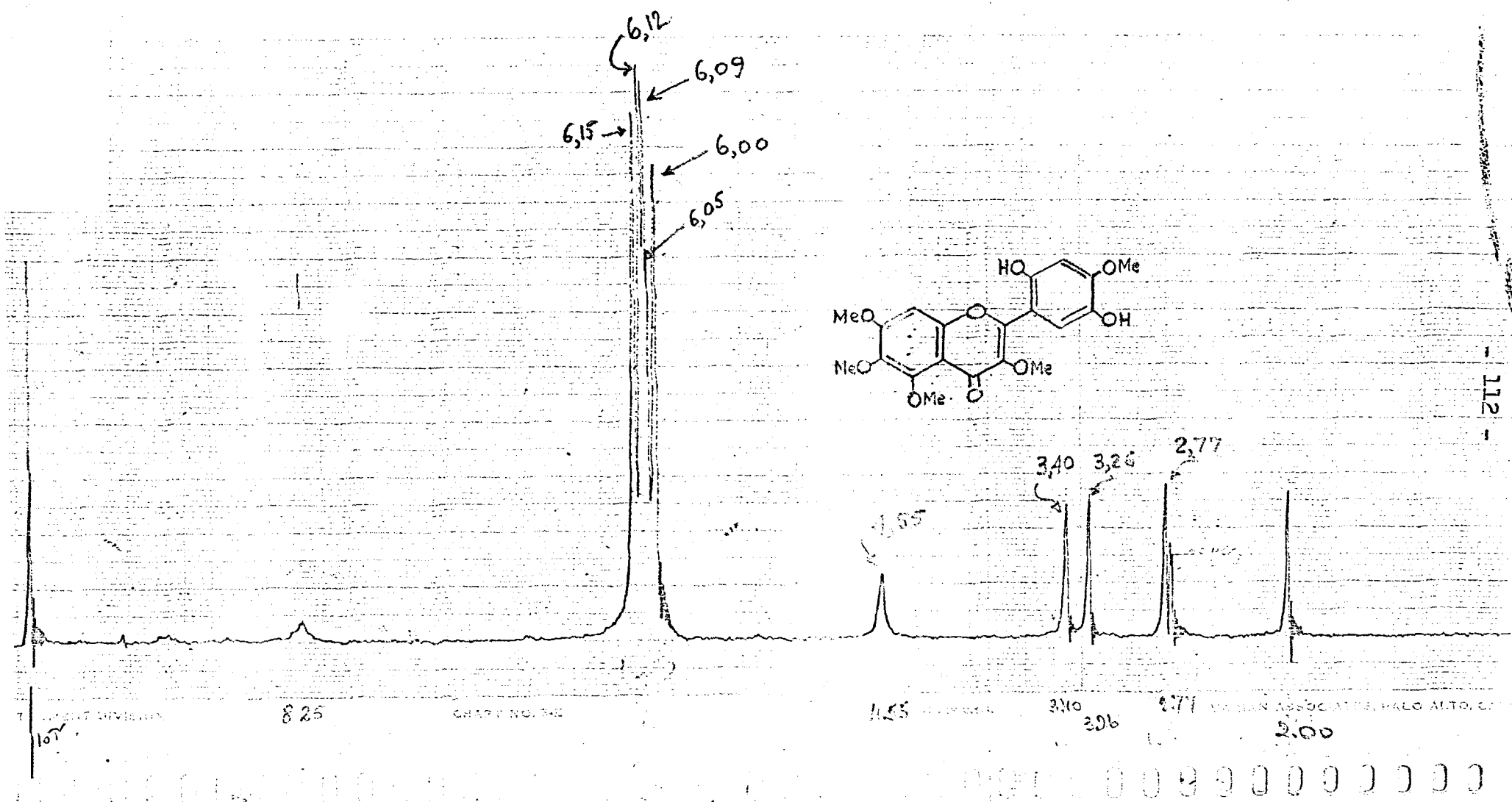


Figura 5.

Espectro de r.m.n. da apuleína (AL-11) = 2',5'-dihidroxi-3,4',5,6,7-pentametoxiflavona.

Solvente: CDCl₃

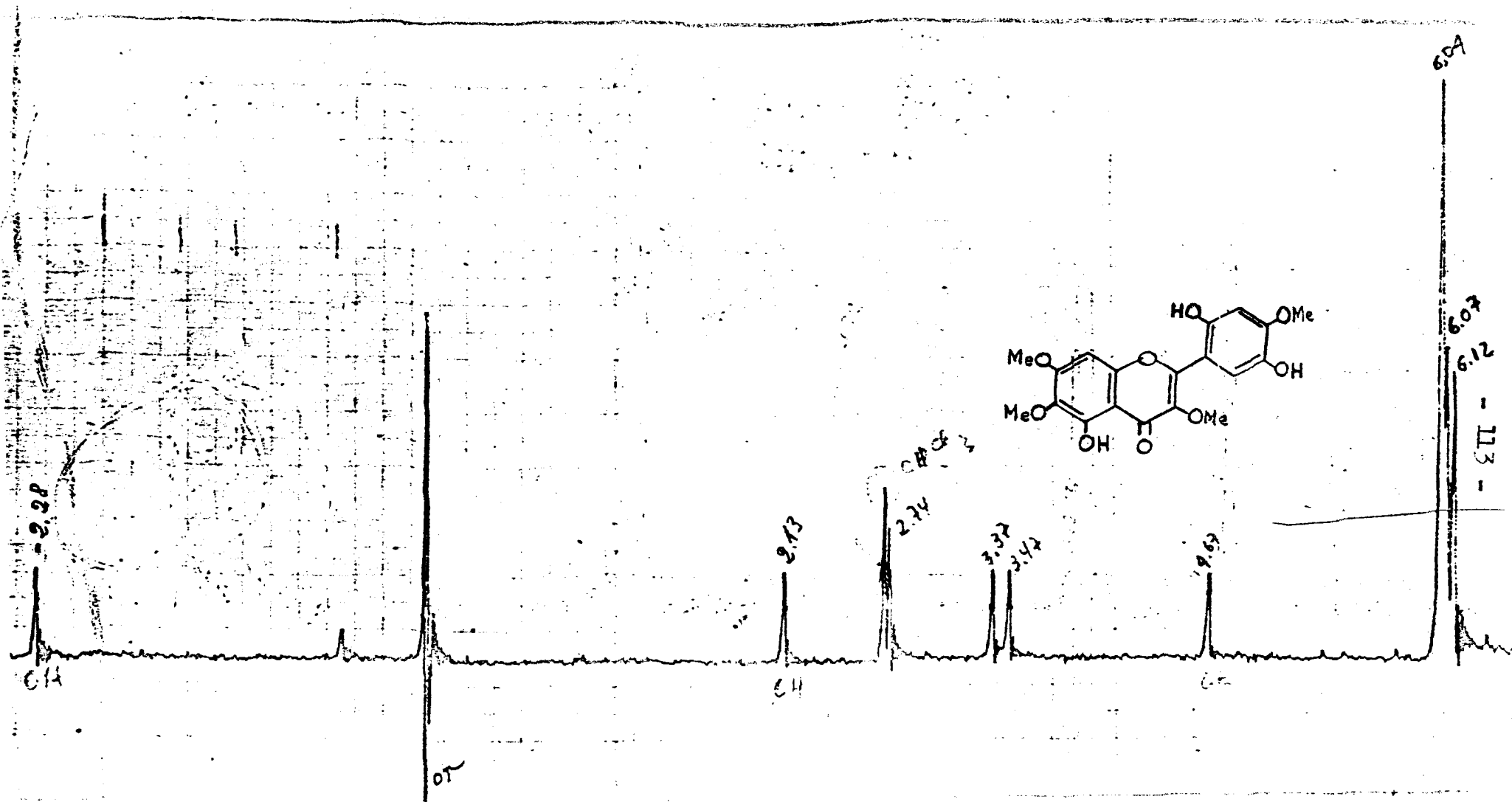


Figura 6

Espectro de r.m.n. da 5-desmetilapuleína (113) = 2',5,5'-trihidroxi-3,4',6,7-tetra metoxiflavona.

Solvente: CDCl₃

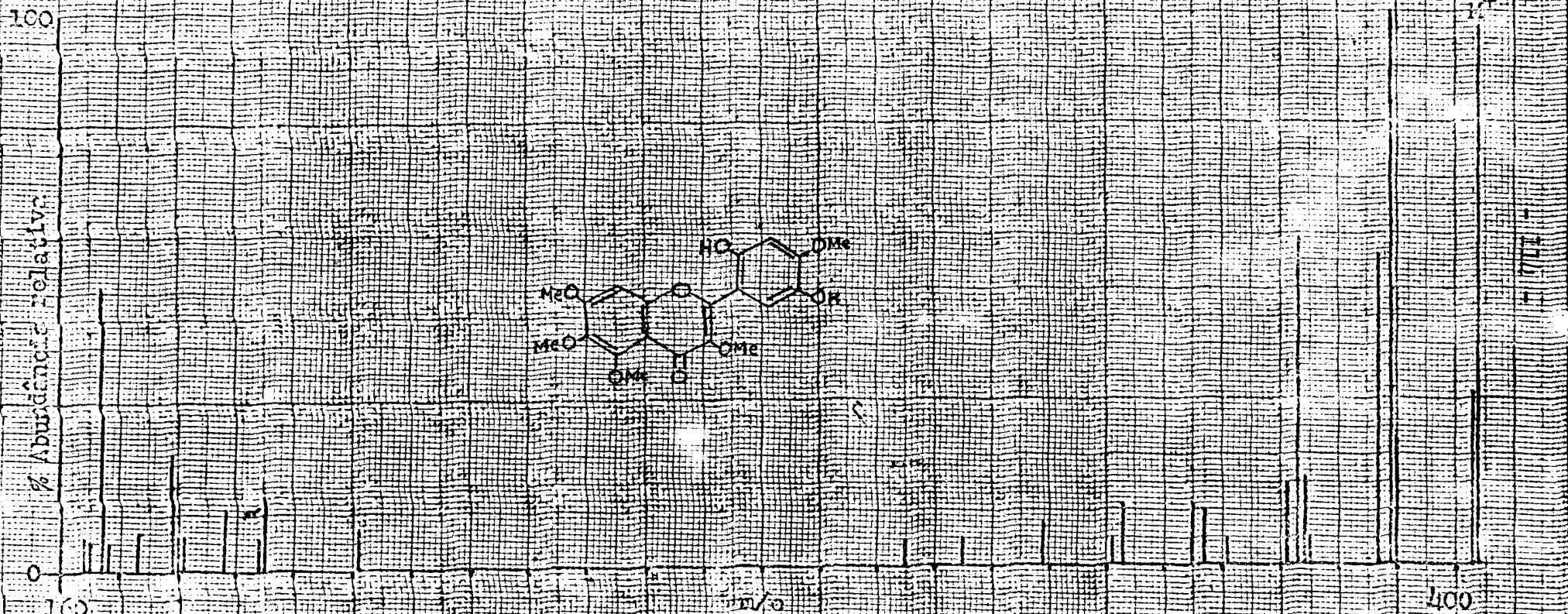
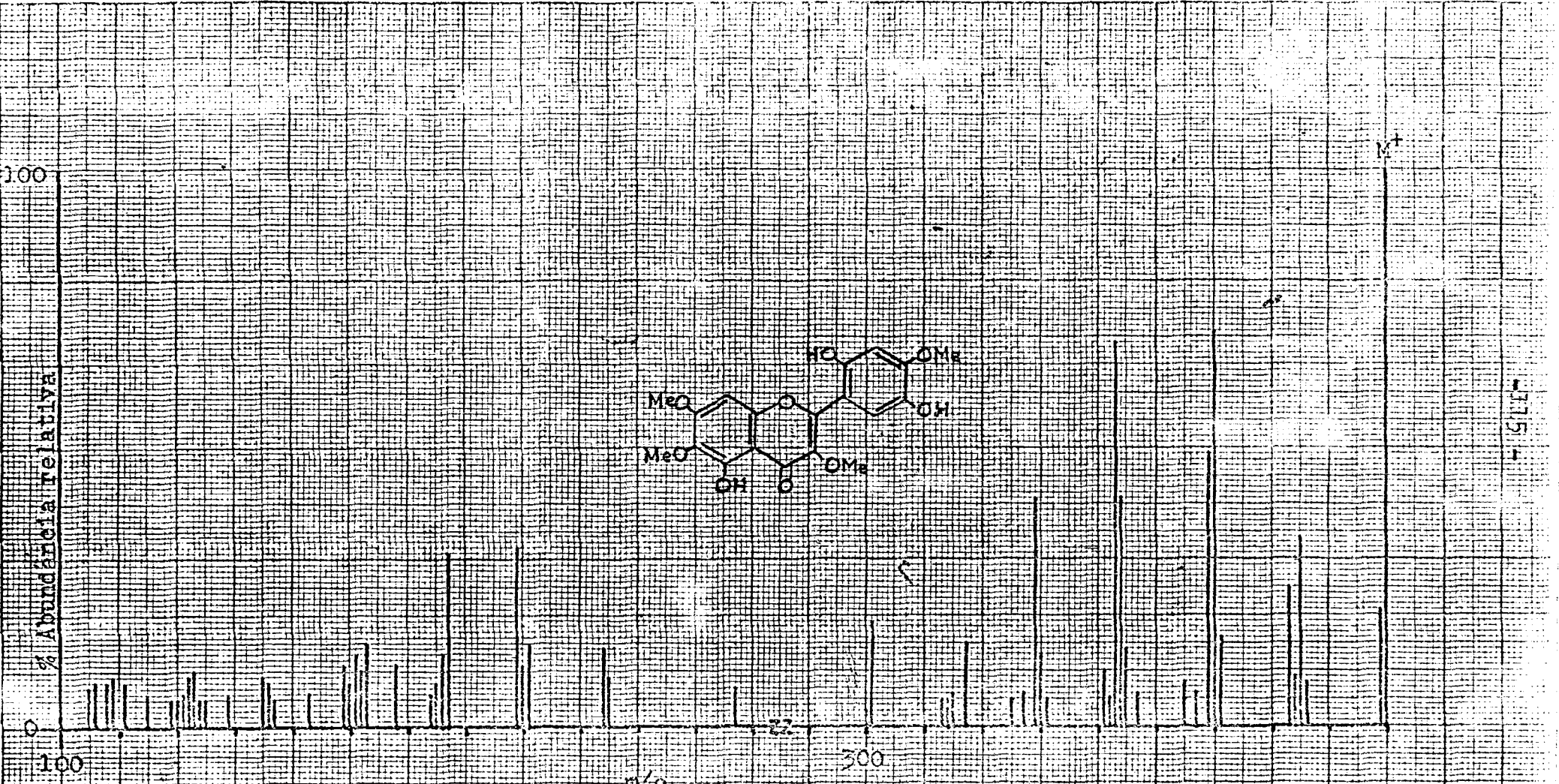


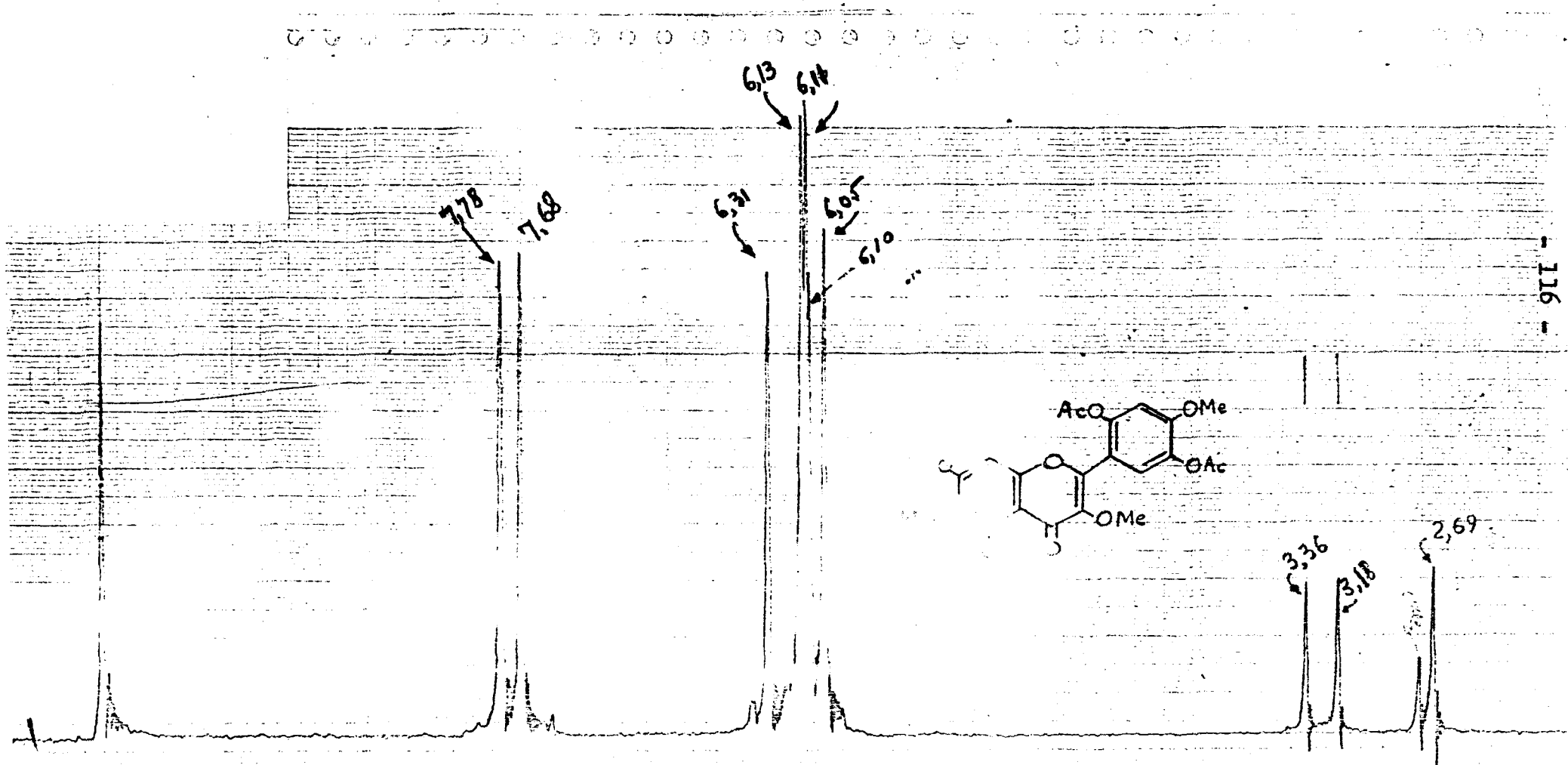
Figura 7.

Espectro de massa da apuleína (AL-11) = 2',9'-dihidroxi-3,4',5,6,7-penta metoxiflavone.



315

Figura 8. Espectro de massa da 5-O-desmetilapuleína (AL-13) = 2',5,5'-trihidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona.



D Figura 9. Espectro de r.m.n. da di-O-acetilapuleína (AL-11Ac) = 2',5'-diacetoxi-3,4',5,6,7-pentame-
 toxiflavona. Solvente: CDCl₃

107

DATE	DEC. SHIFT	REF. STD.	R.F. FIELD	R.F. GAIN	REMARKS	PERMEABILITY	SWEEP RATE	TIME CONST.	SCALE FACTOR
21-1-70		TMS	8210 ³	11c		NORM: 8	16 UNITS	0.05 SECS	6

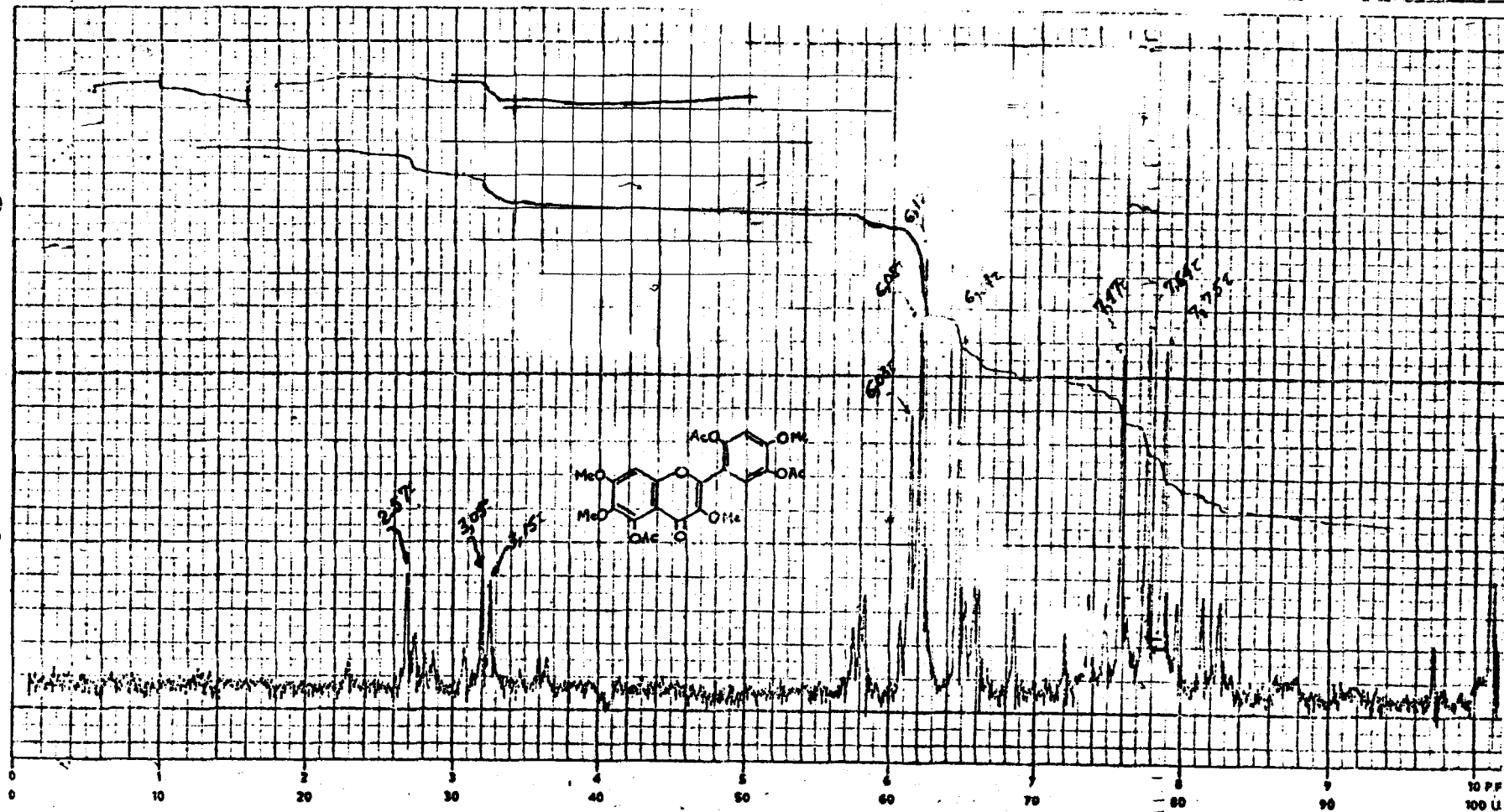


Figura 10.

PART NO. 468-1112

PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD, BUCKS.

Espectro de r.m.n. de tri-O-acetil-5-O-desmetilapuleina (AL-13Ac)=2',5,5'-triacetoxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona. Solvente: CDCl_3 .

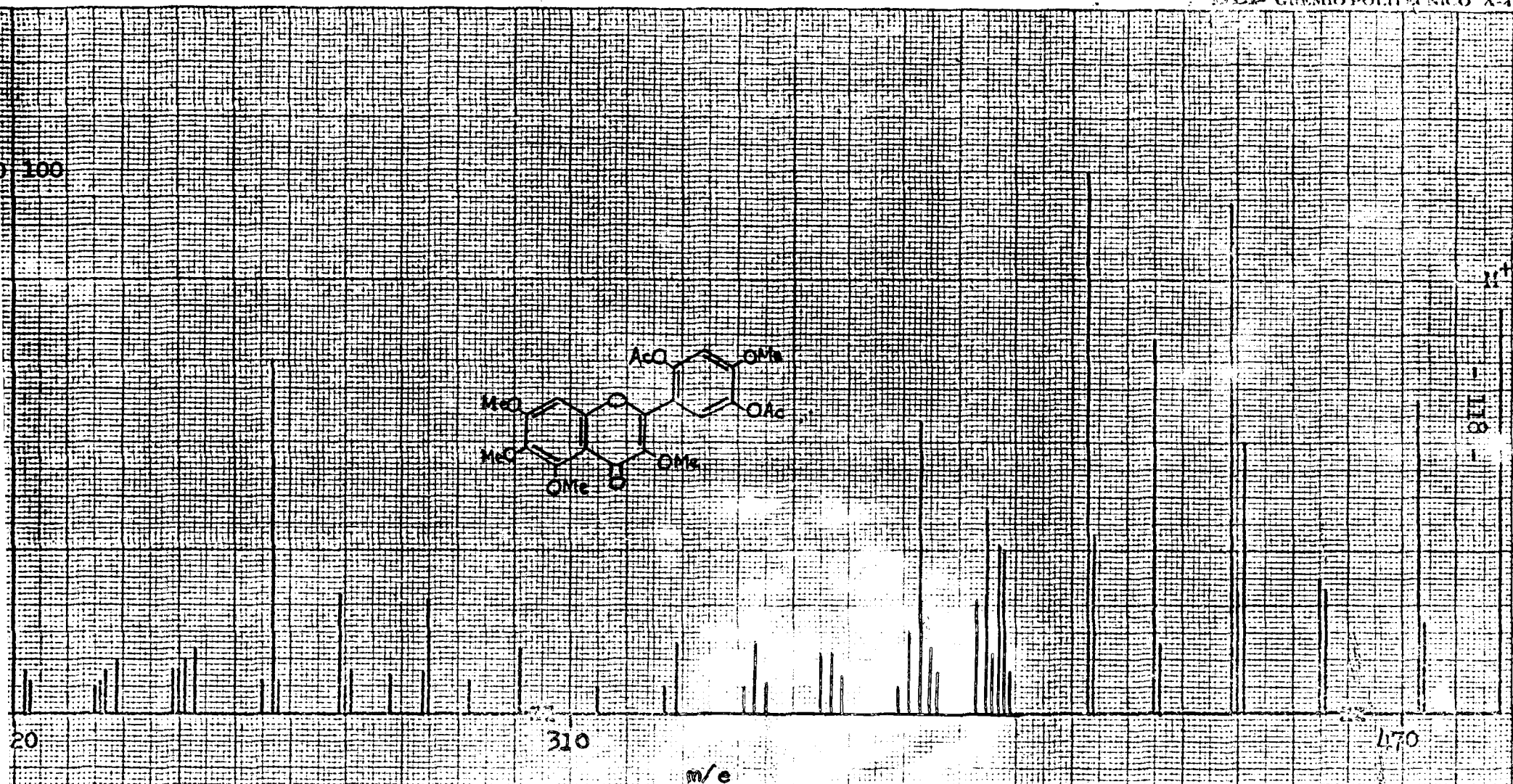


Figura 11.

Espectro de massa da 2',5'-di-O-acetilapuleína (AL-11Ac) = 2',5'-diacetoxi-3,4,5,6,7-pentametoxiflavona.

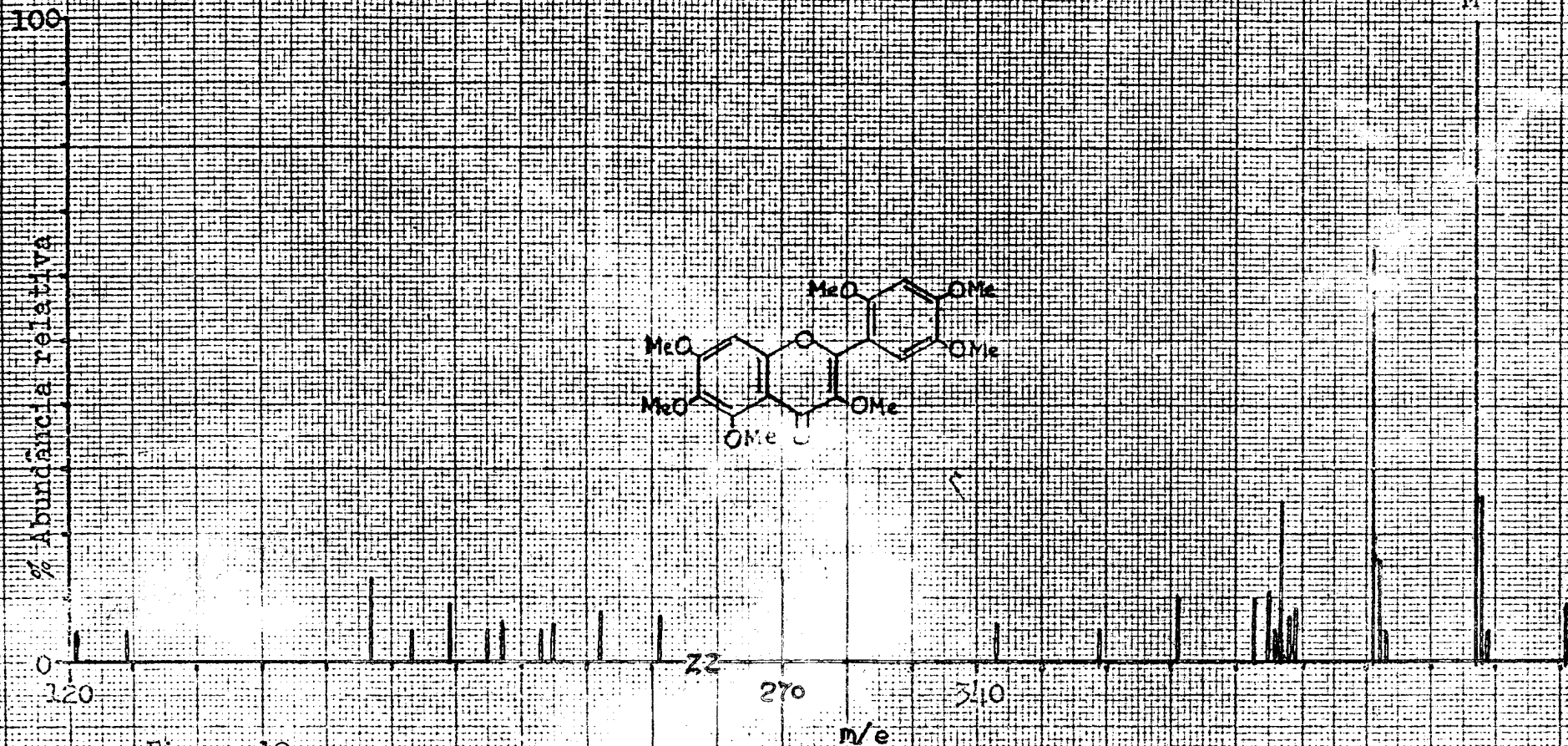


Figure 12.

Espectro de massa da di-O-metilapuleina (AL-11Me) = 2¹, 3, 4¹, 5, 5¹, 6, 7-nepte metoxiflavona.

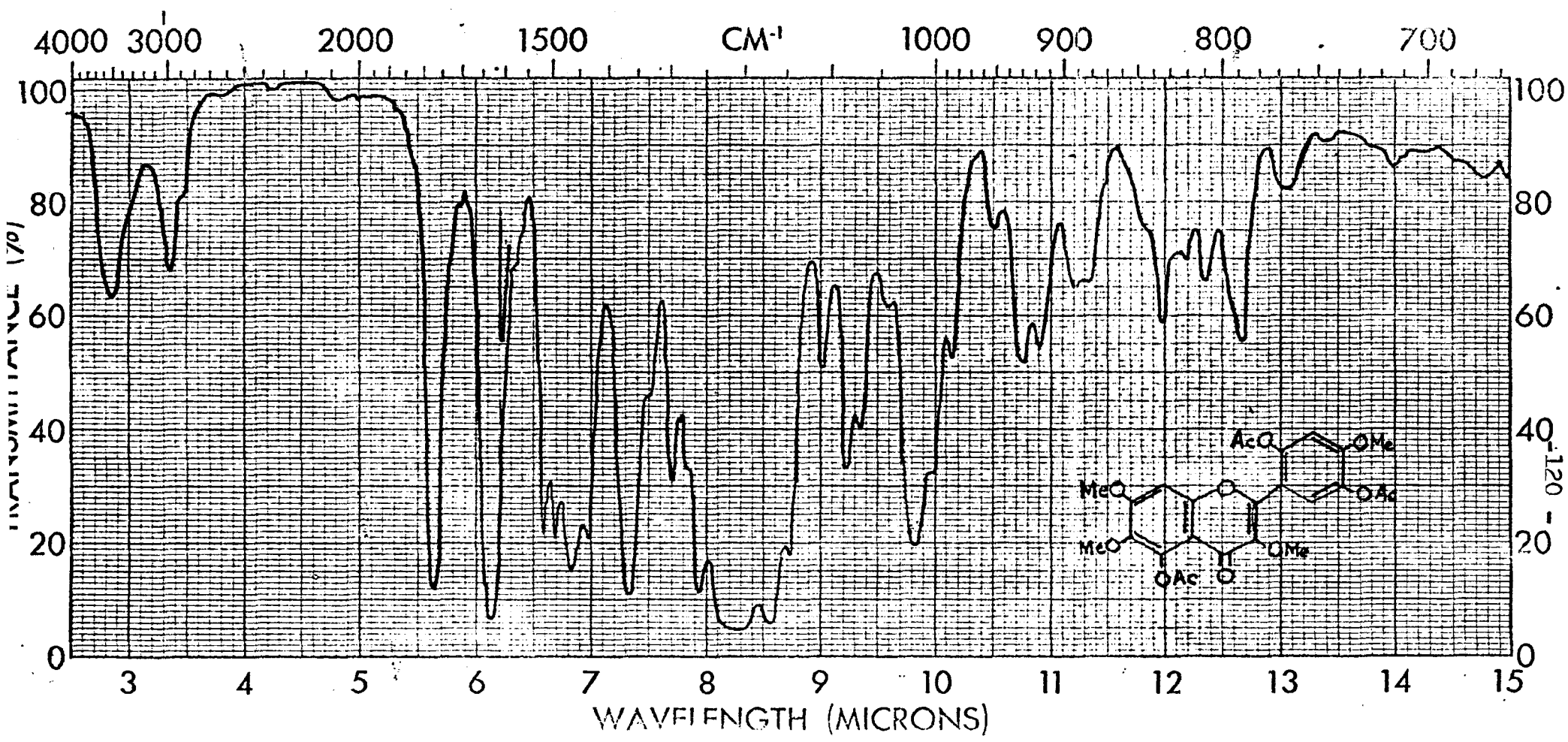


Figura 13.

Espectro de infravermelho de tri-O-acetil-5-O-desmetilapuleina (AL-13Ac) = 2',5,5'-triacetoxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona.

Fase: KBr

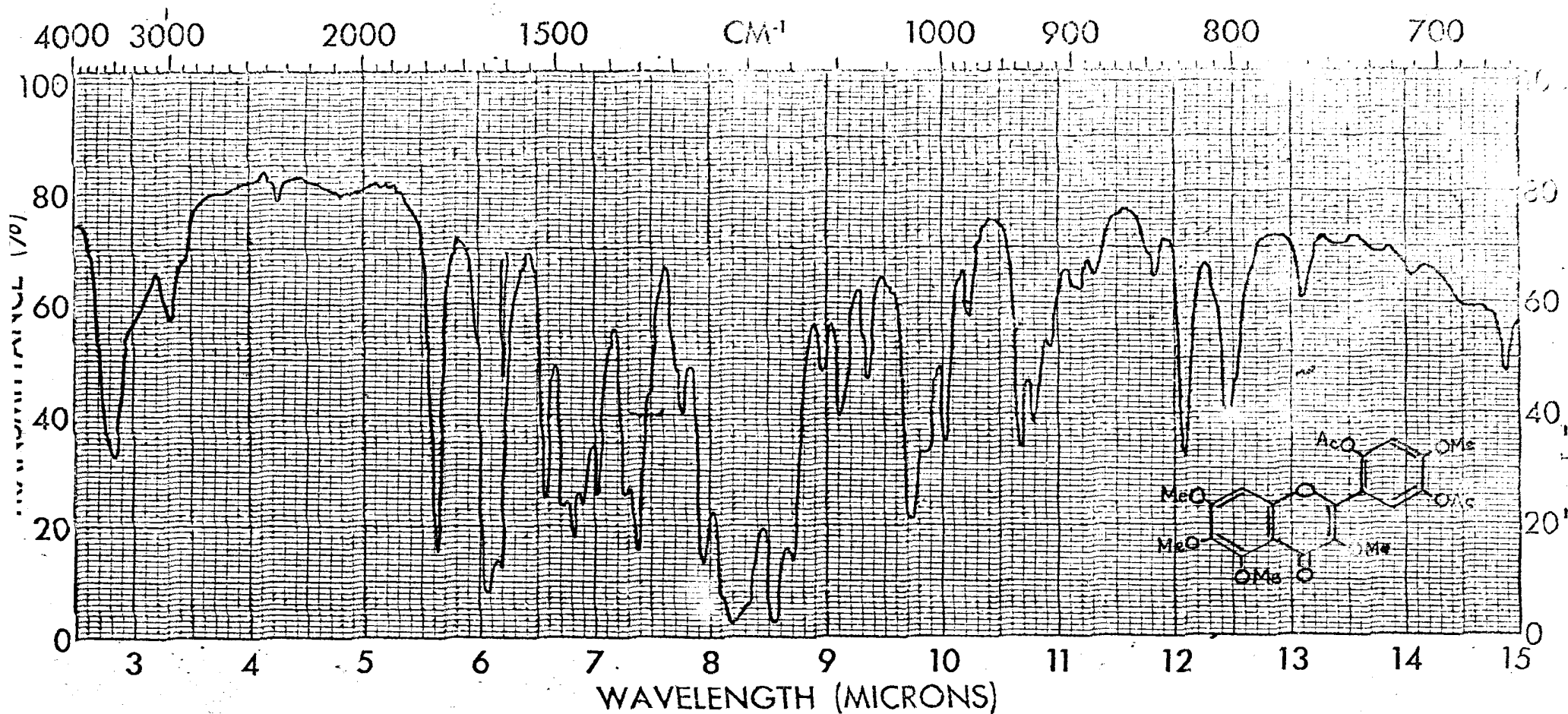


Figura 14.

Espectro i.v. da di-O-acetilapuleina (AL-11 Ac) = 2',5'-diacetoxi-3,4',5,6,7-pentametoxiflavona.

Fase: KBr

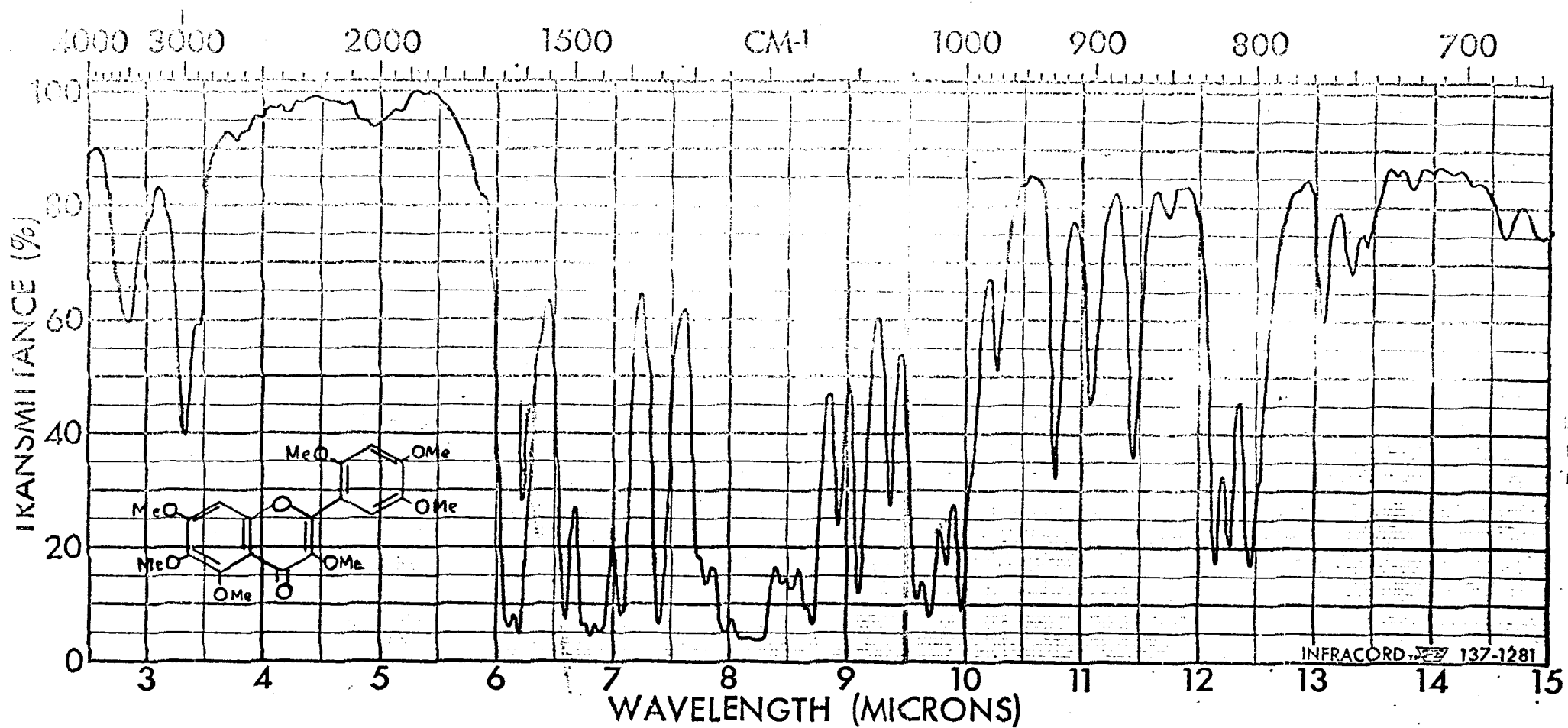
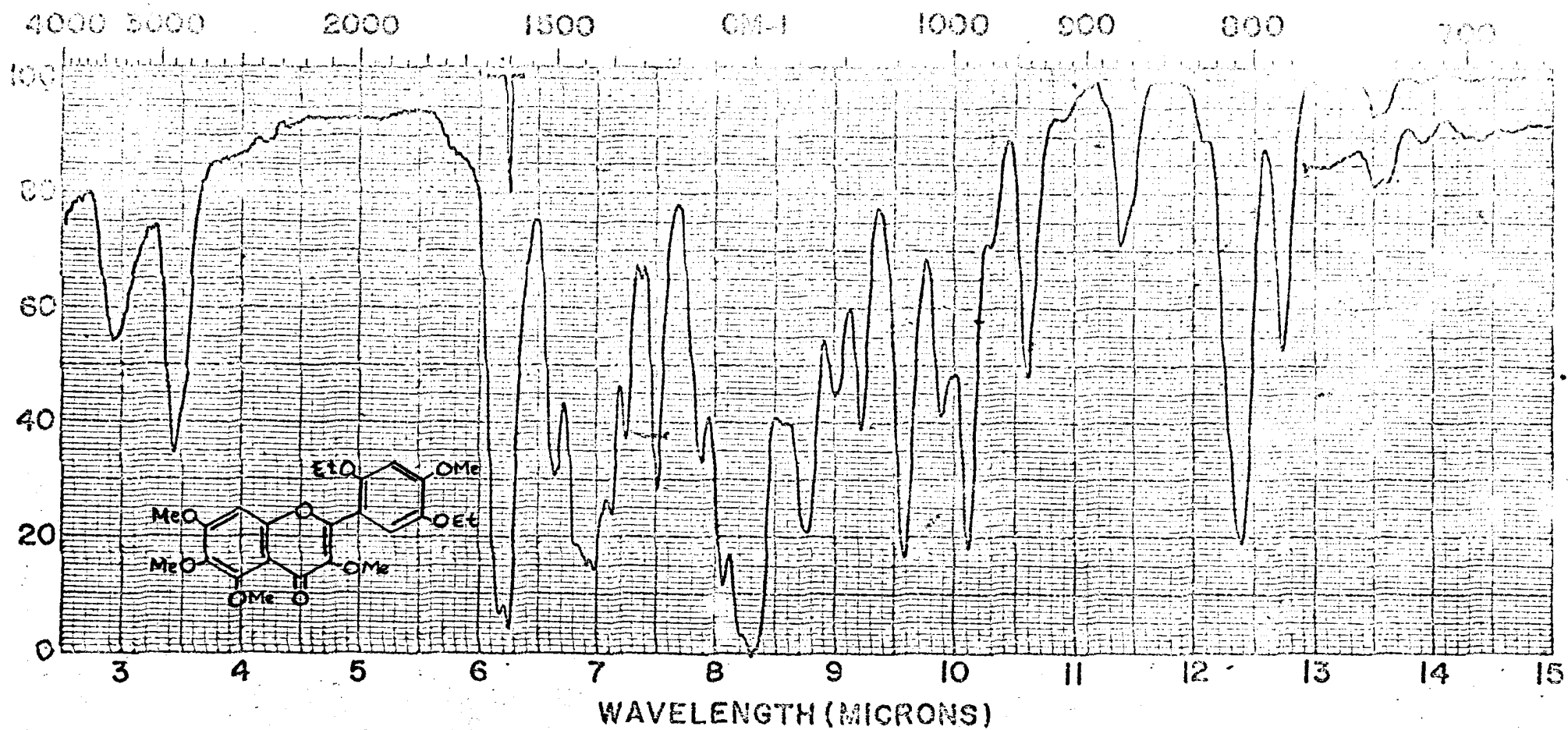


Figura 15.

Espectro i.v. da di-O-metilapuleina (AL-11Me) = 2',3,4',5,5',6,7-heptame toxiflavona.

Fase: KBr

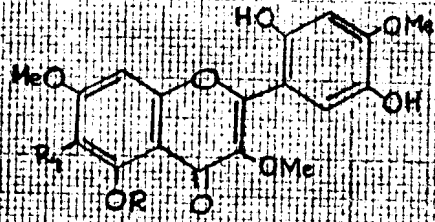


- 125 -

Figura 16.

Espectro i.v. da di-O-etilapuleina (AL-11Et) = 2',5'-dietoxi-3-4',5,6,7-
-pentametoxiflavona.

Fase: KBr



R = Me, R₁ = OMe apuleina
R = H, R₁ = H oxiaianina A
R = H, R₁ = OMe 5-O-desmetilapuleina.

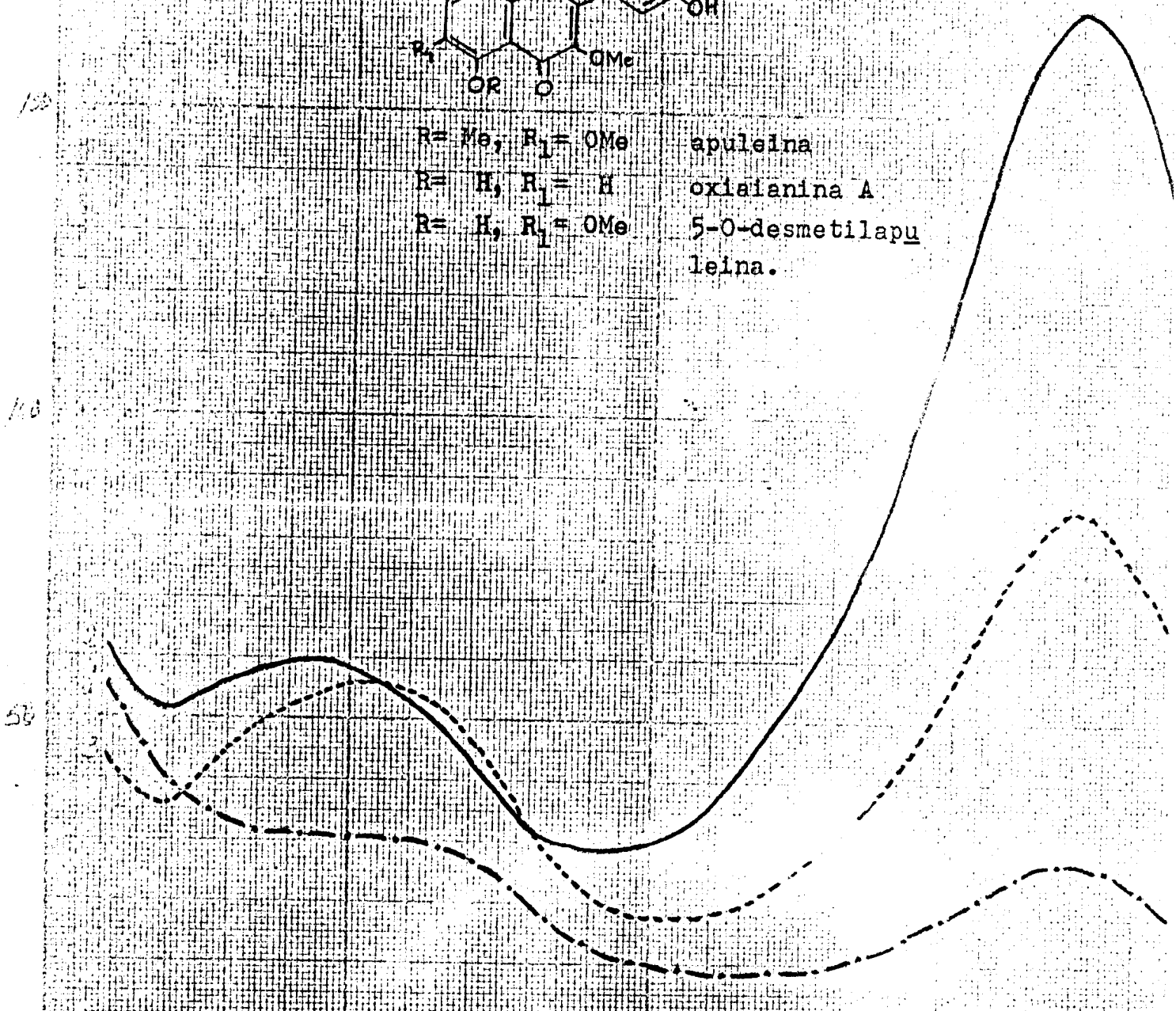


Figura 17.

Ensaio de Gibbs

-.-.-.-. apuleina

———— oxiaianina A

----- 5-O-desmetilapuleina

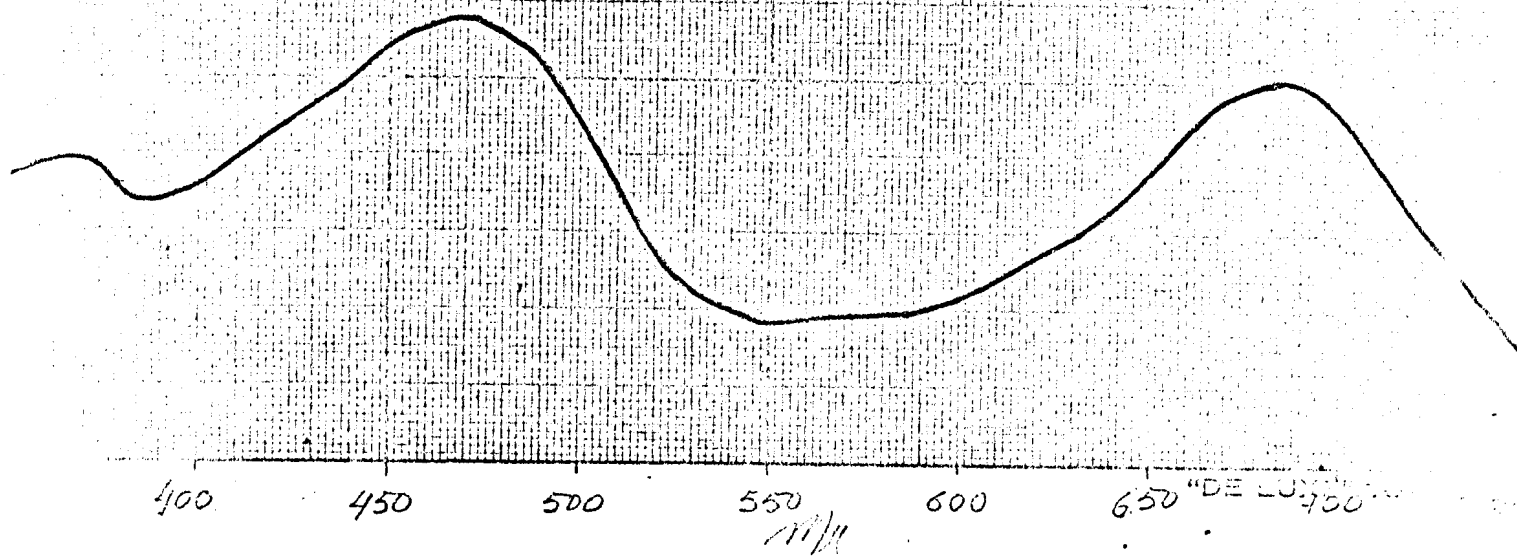
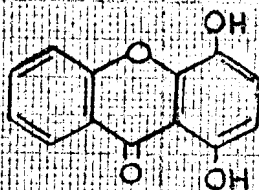


Figura 18.

Ensaio de Gibbs da 1,4-dihidroxixantona.

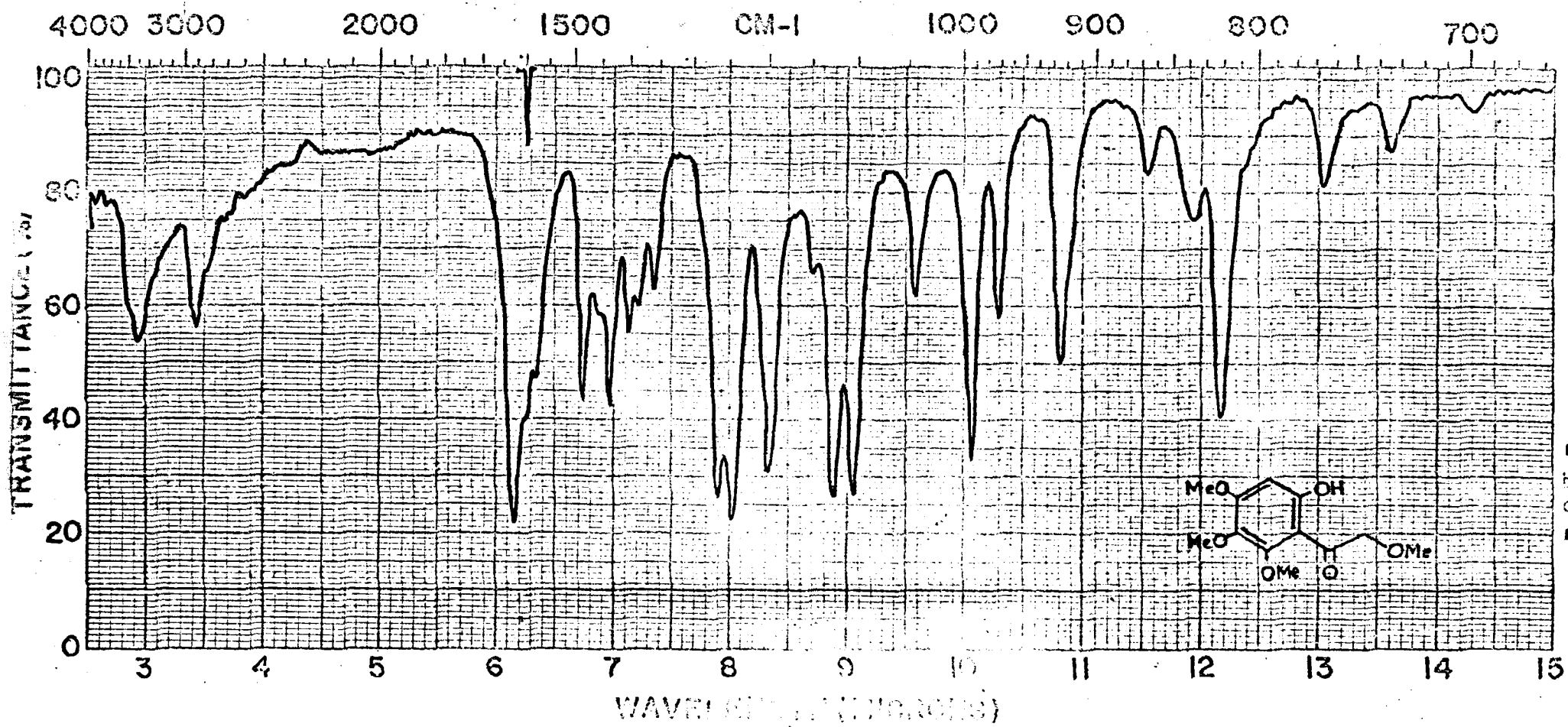


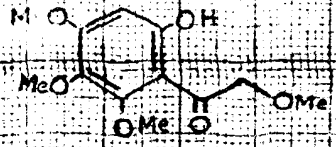
Figura 19.

Espectro i.v. da 6'-hidroxi-2,2',3',4'-tetrametoxiacetofenona

Fase: KBr

100

% Abundância relativa



60

m/e

M⁺

Figura 20.

Espectro de massa da 5^o-hidroxi-2,2',3',4'-tetrametoxiacetofenona.

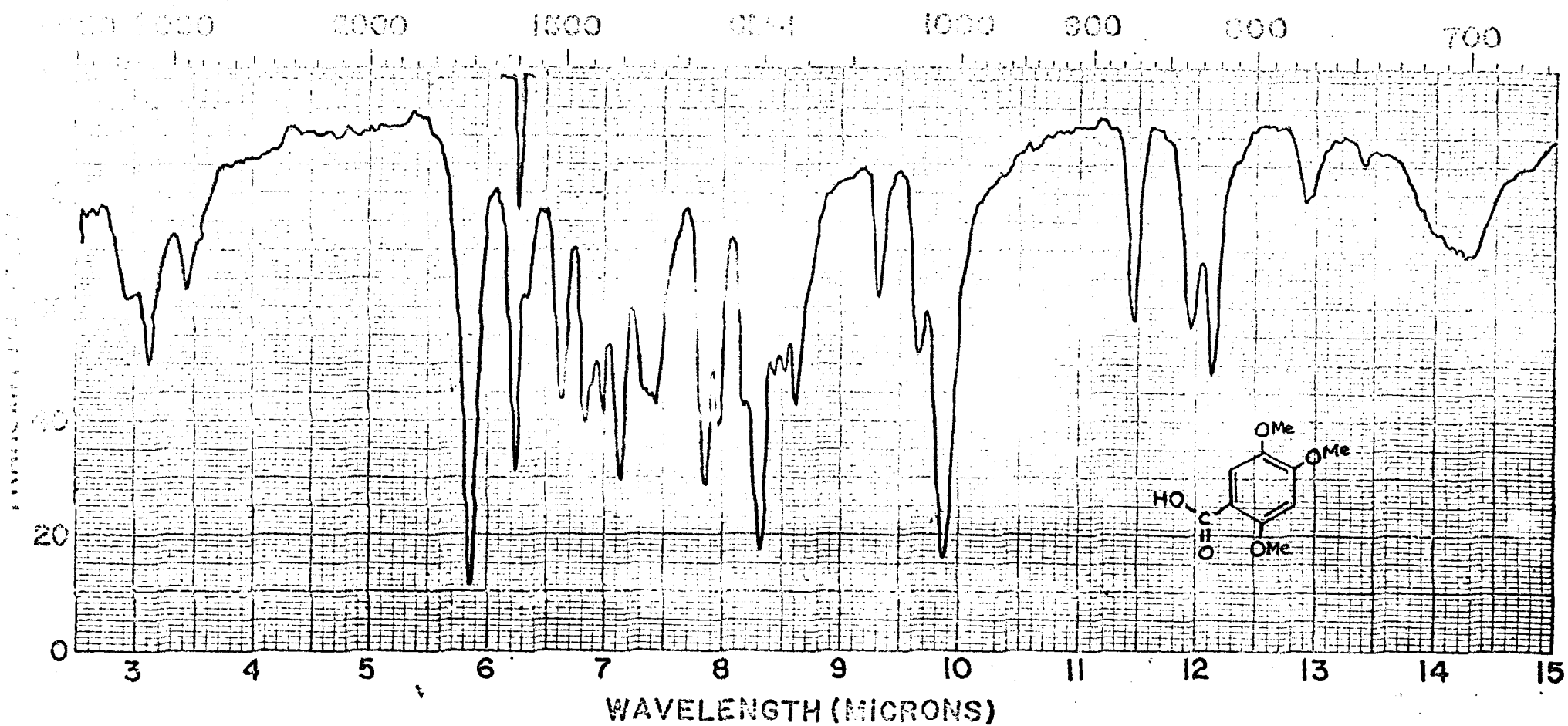


Figura 21.

Espectro i.v. do ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico

Fase: KBr

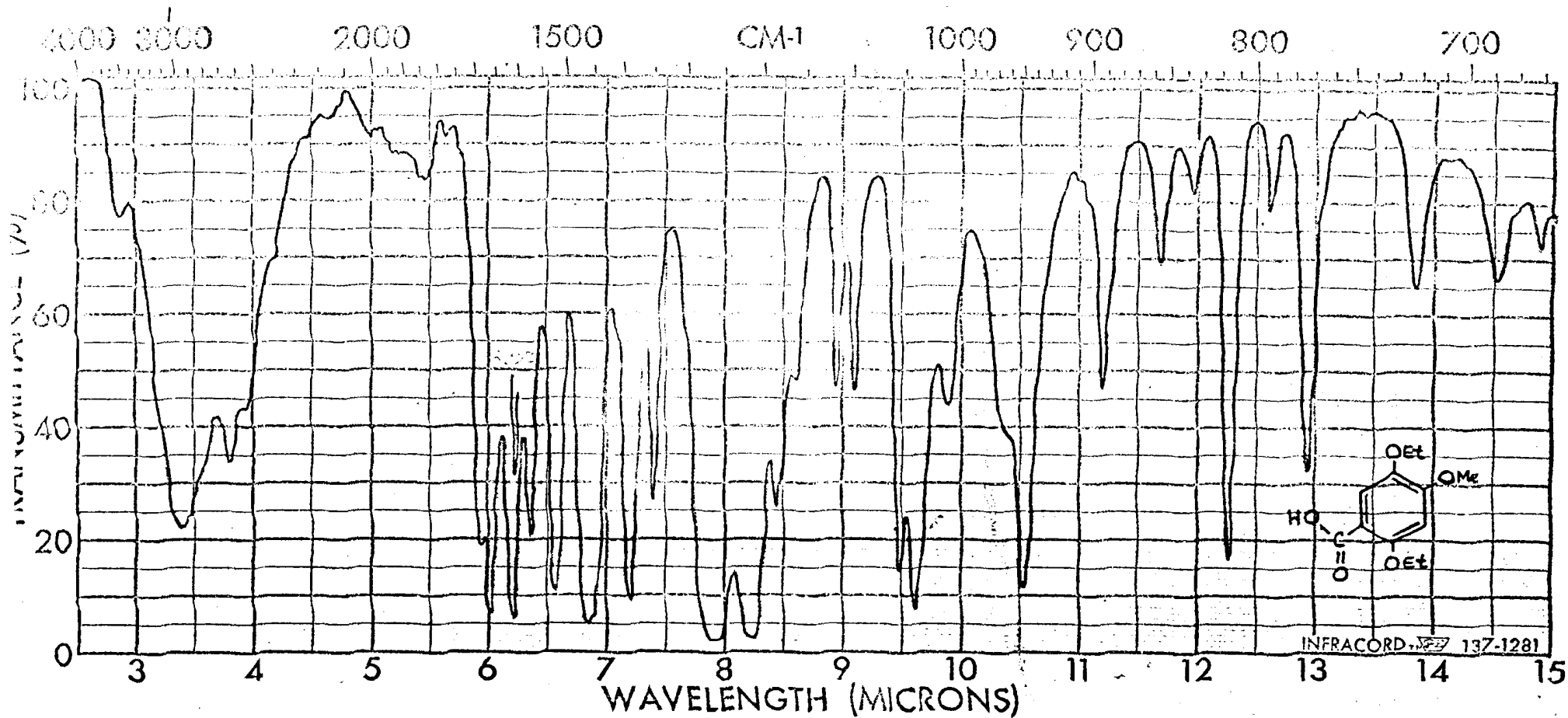


Figura 22.

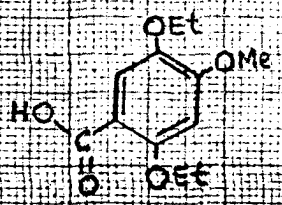
Espectro i.v. do ácido 2,5-dietoxi-4-metoxibenzóico.

Fase: KBr

100

% Abundância relativa

0
50



m/e

M⁺

Figura 23.

Espectro de massa do ácido 2,5-dietoxi-4-metoxibenzóico.

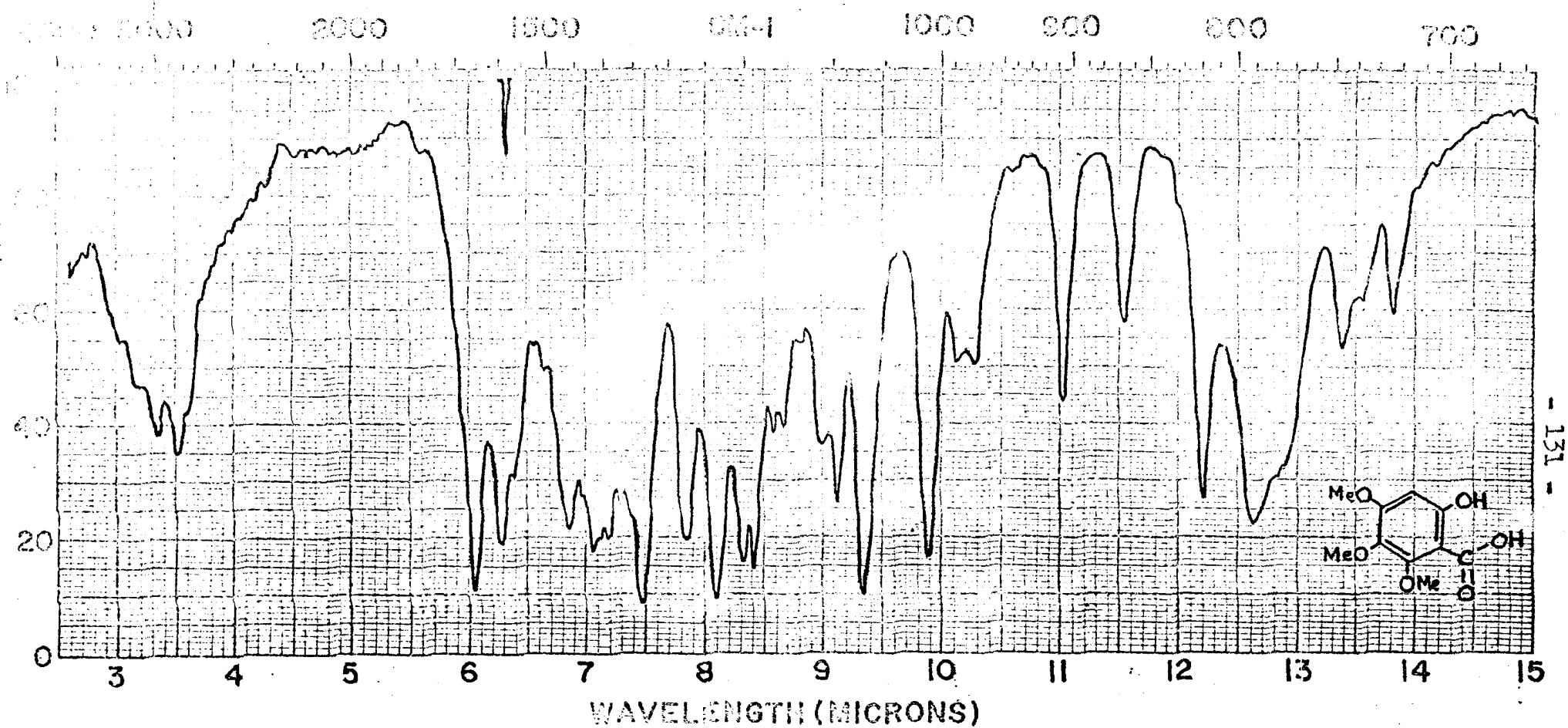


Figura 24.

Espectro i.v. do ácido 6-hidroxi-2,3,4-trimetoxibenzóico

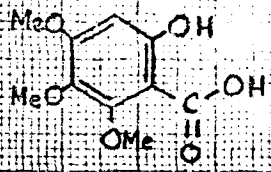
Fase: KBr

100

% Abundância relativa

50

0



m/e

M+

Figura 25.

Espectro de massa do ácido 6-hidroxi-2,3,4-trimetoxibenzóico.

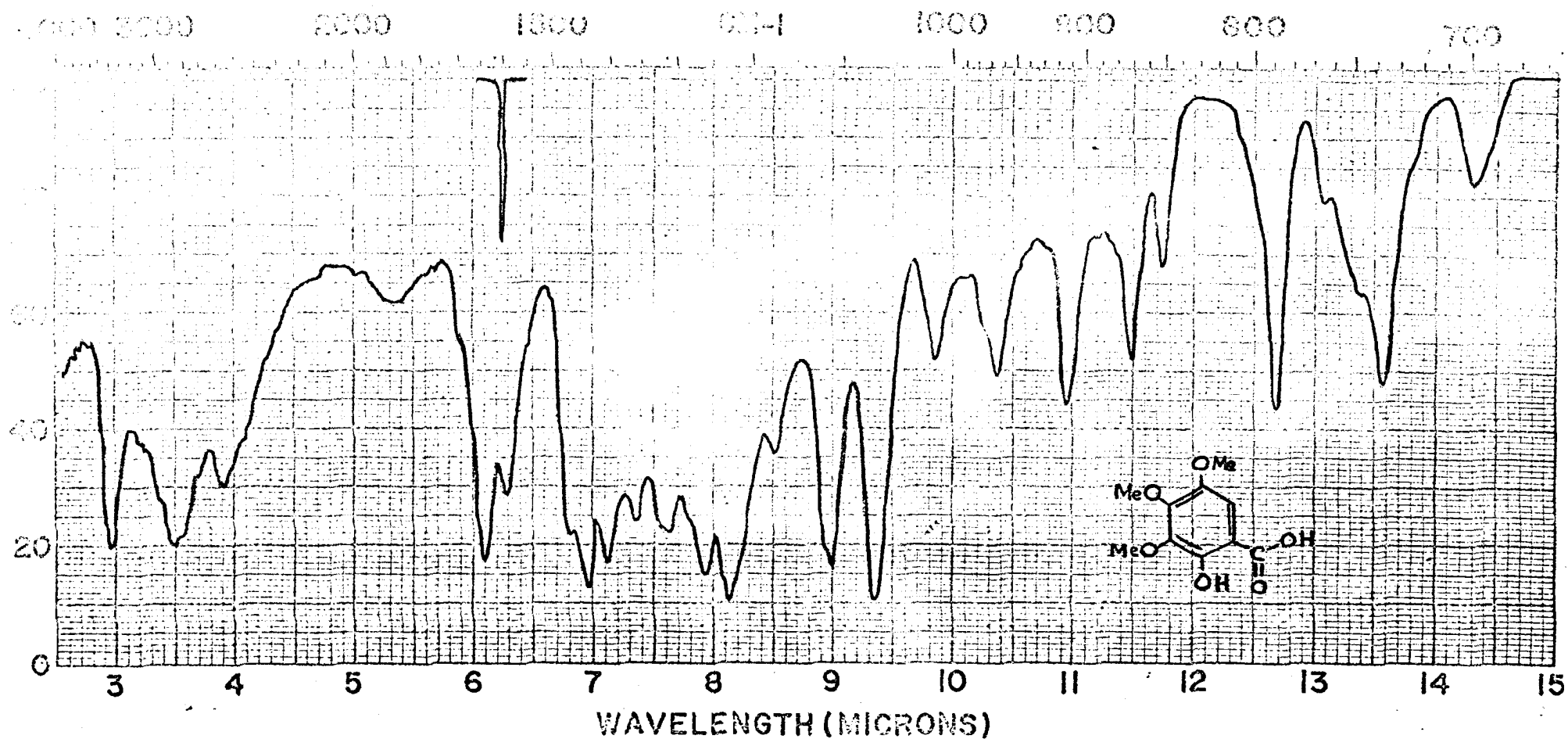


Figura 26.

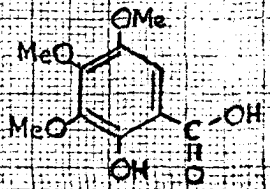
Espectro i.v. do ácido 2-hidroxi-3,4,5-trimetoxibenzóico.

Fase: KBr

100

% Abundância relativa

0
50



m/e

M⁺

Figura 27.

Espectro i.v. do ácido 2-hidroxi-3,4,5-trimetoxibenzóico.

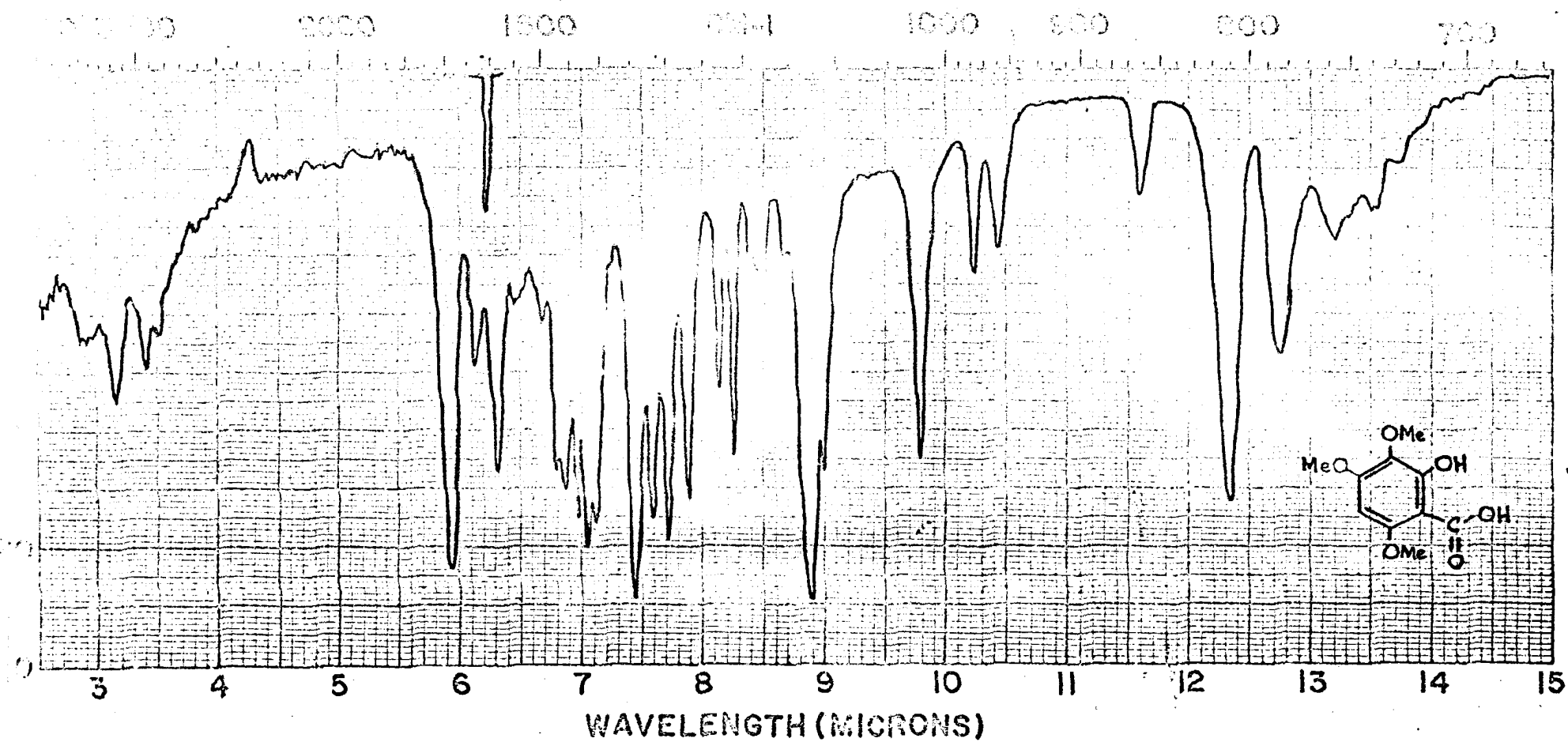


Figura 28.

Espectro i.v. do ácido 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxibenzóico.

Fase: KBr

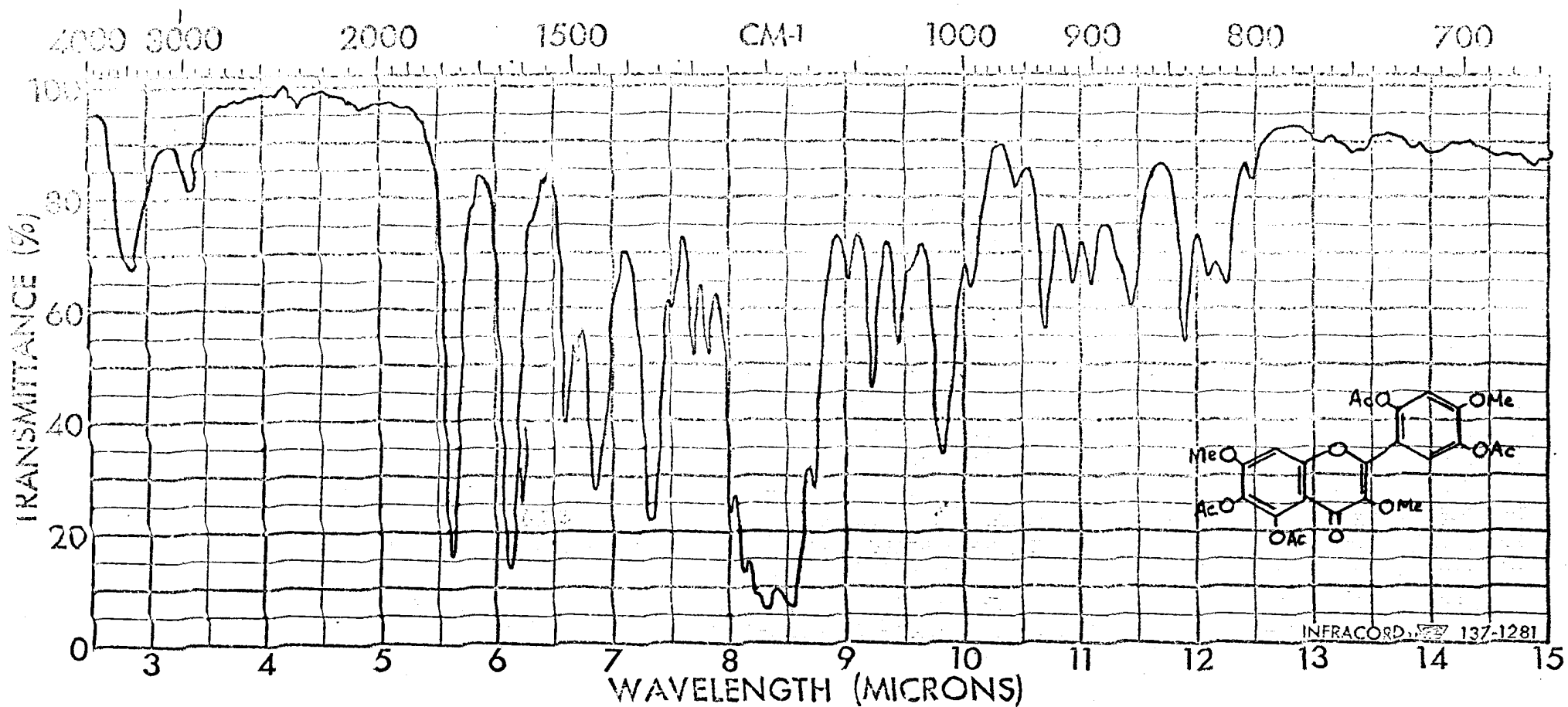


Figura 29.

Espectro i.v. da 2',5,5',6-tetracetoxi-3,4',7-trimetoxiflavona (AL-11QAc).

Fase: KBr

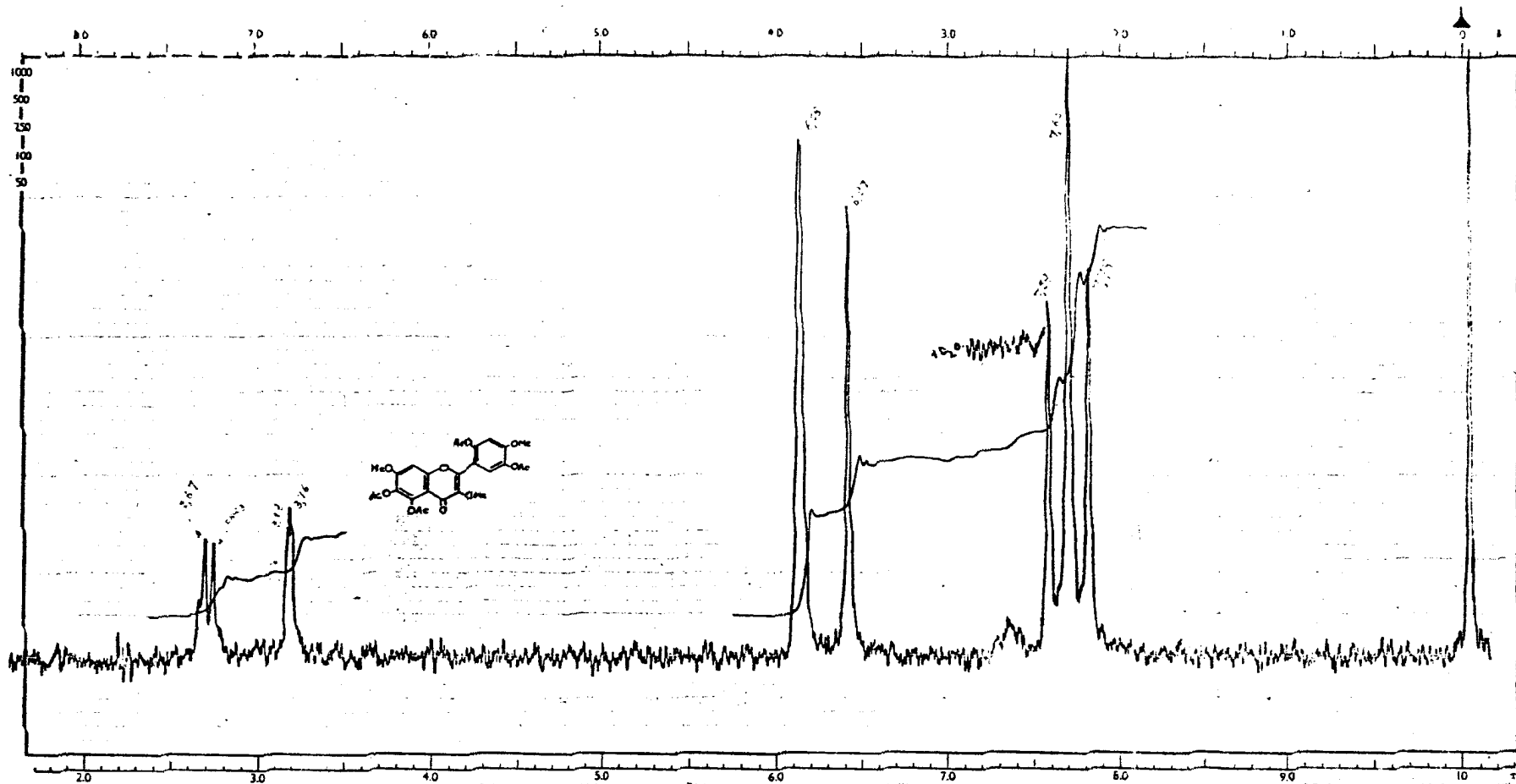


Figura 30. Espectro de r.m.n. da 2',5,5',6-tetracetoxi-3,4',7-tri-O-metilflavona (AL-11QAc).
Solvente: CDCl_3

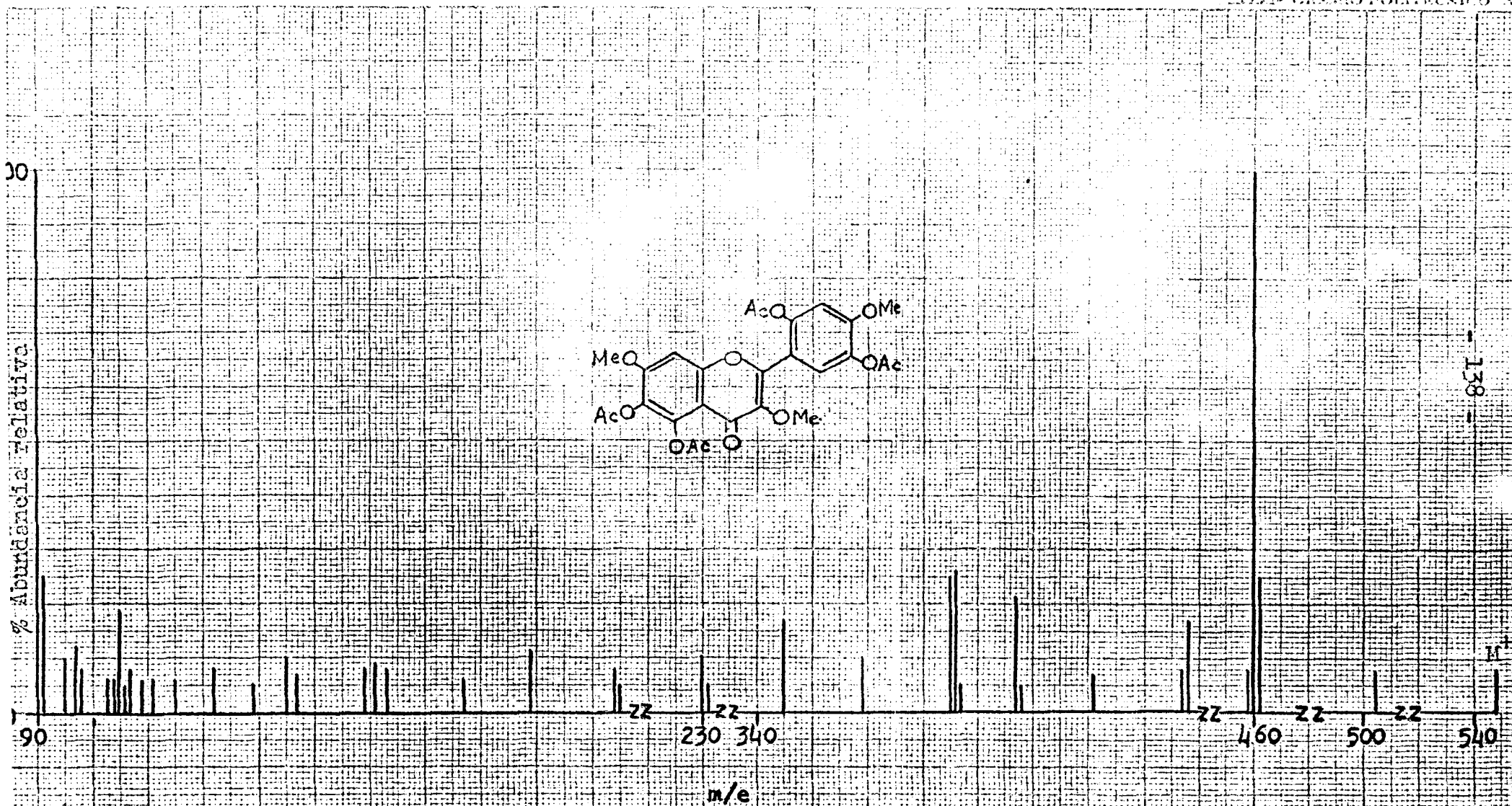
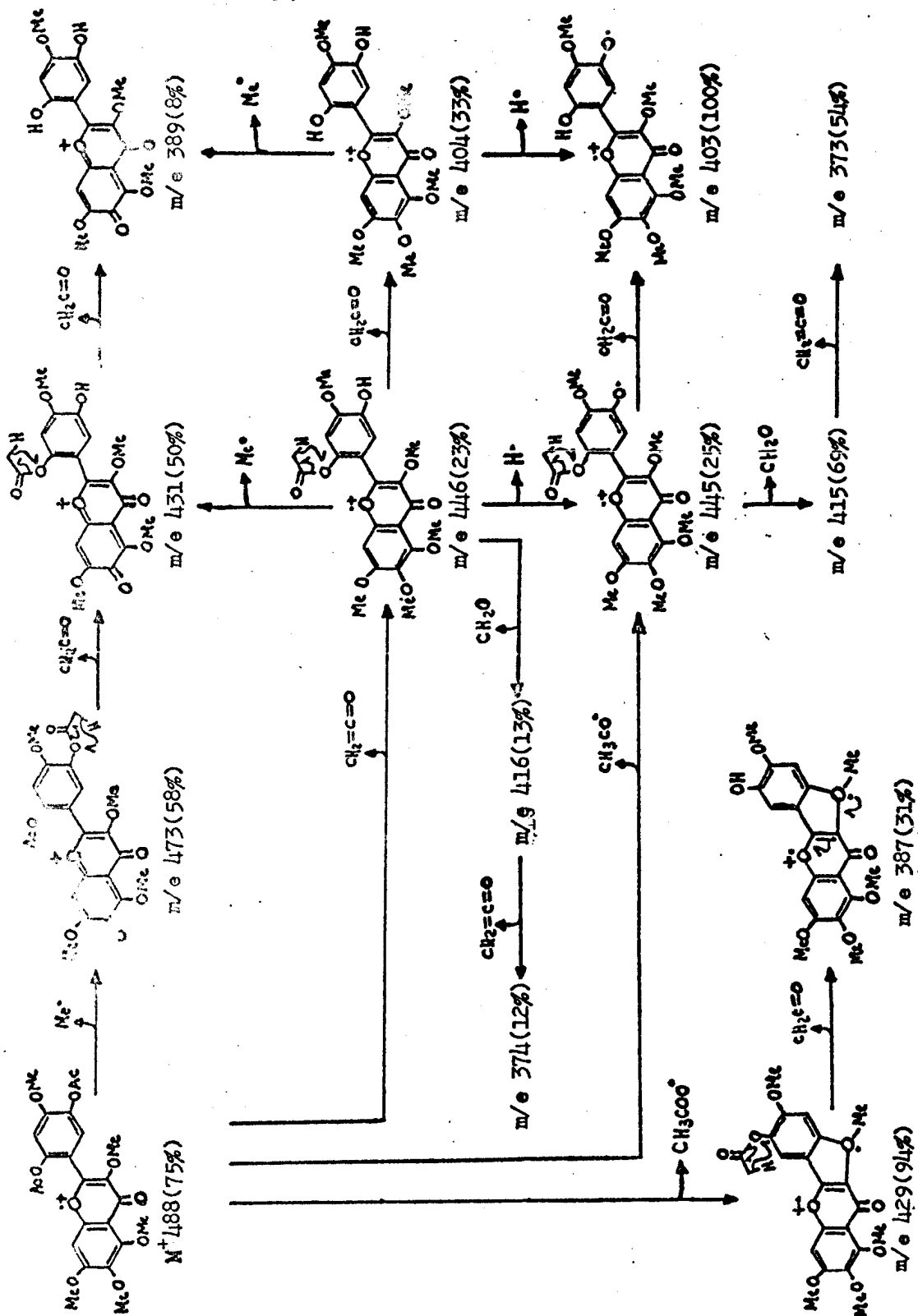


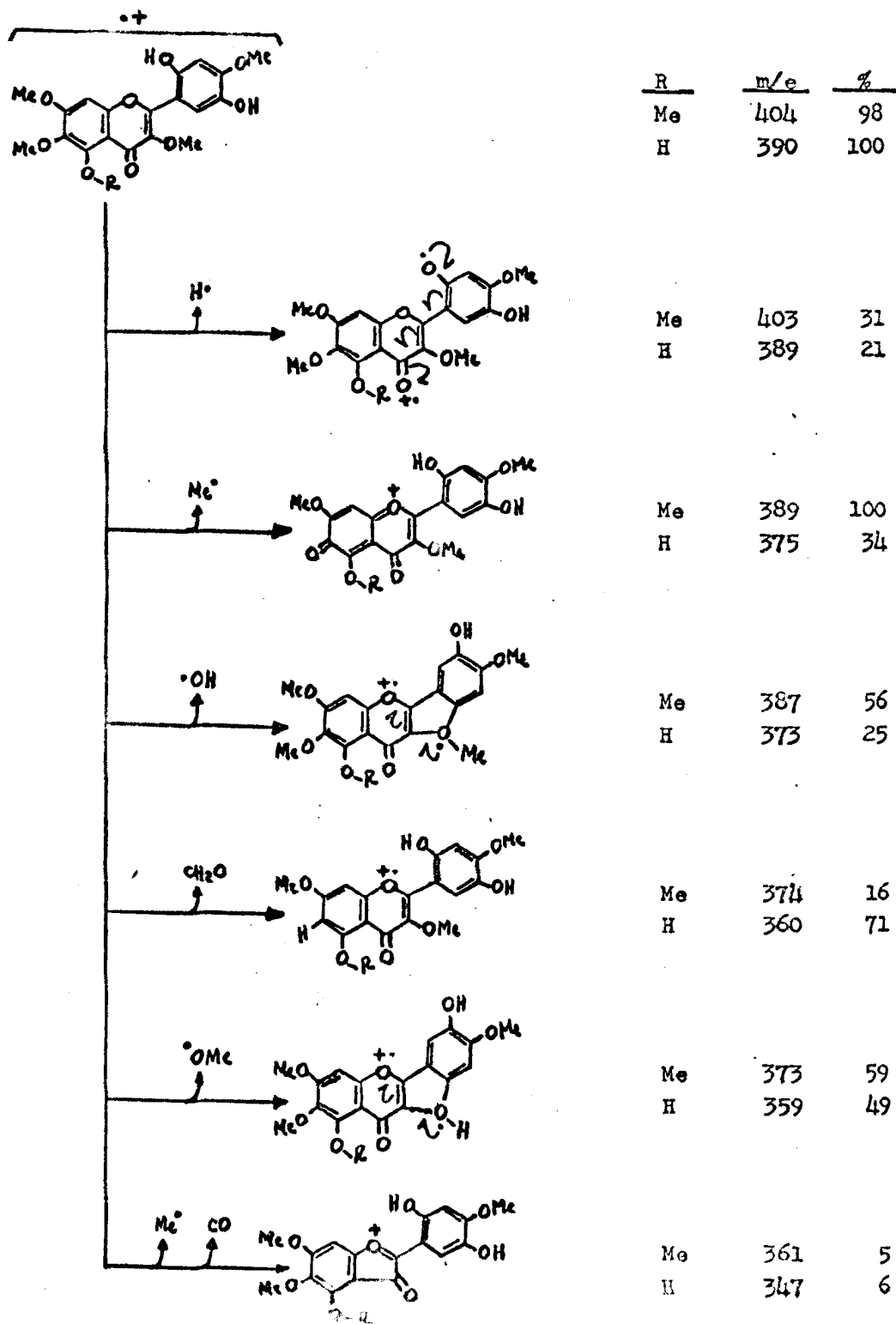
Figura 31.

Espectro de massa da 2',5',6-tetracetoxy-3,4',7-trimetoxiflavona (AL-11QAc).



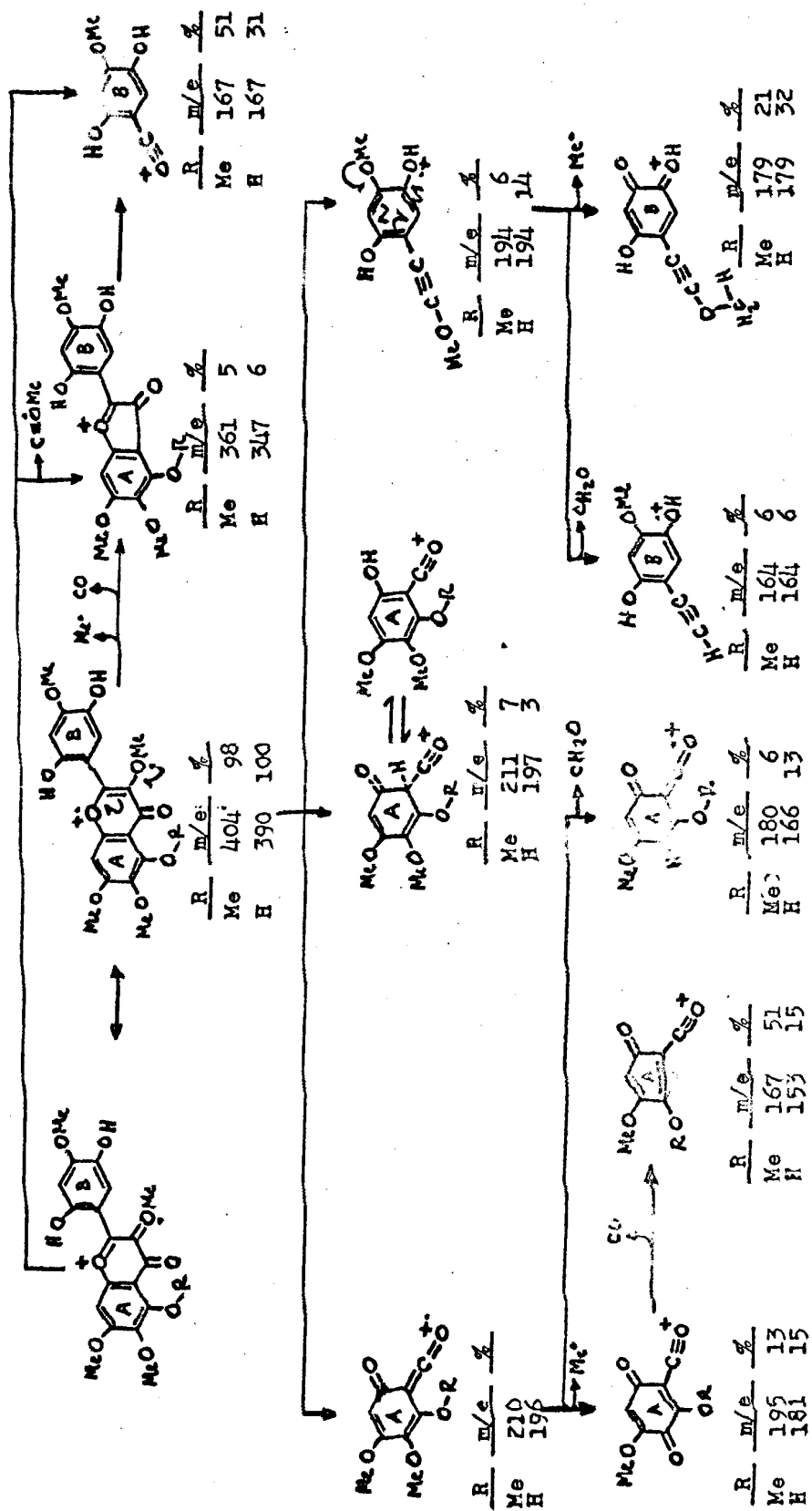
Quadro 24.

Caminhos principais de fragmentação da di-O-acetilpuleína (AL-11Ac)=2',5'-diacetoxi-3,4',5,6,7-pentametoxiflavona no espectrômetro de massa.

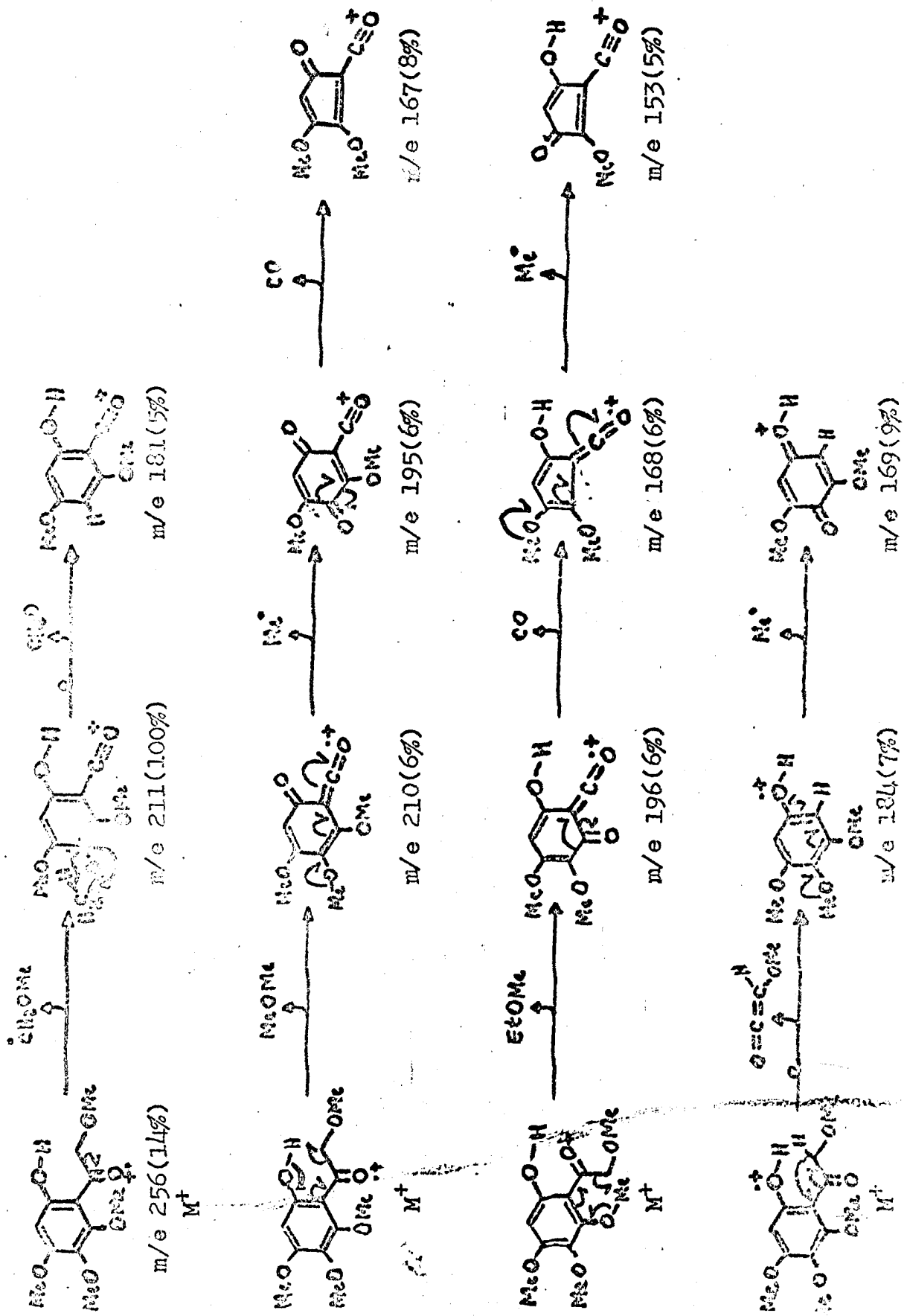


Quadro 20.

Caminhos principais de fragmentação da apuleína (AL-11)=2',5'-dihidroxi-3,4',5,6,7-pentametoxi-flavona no espectrômetro de massa.

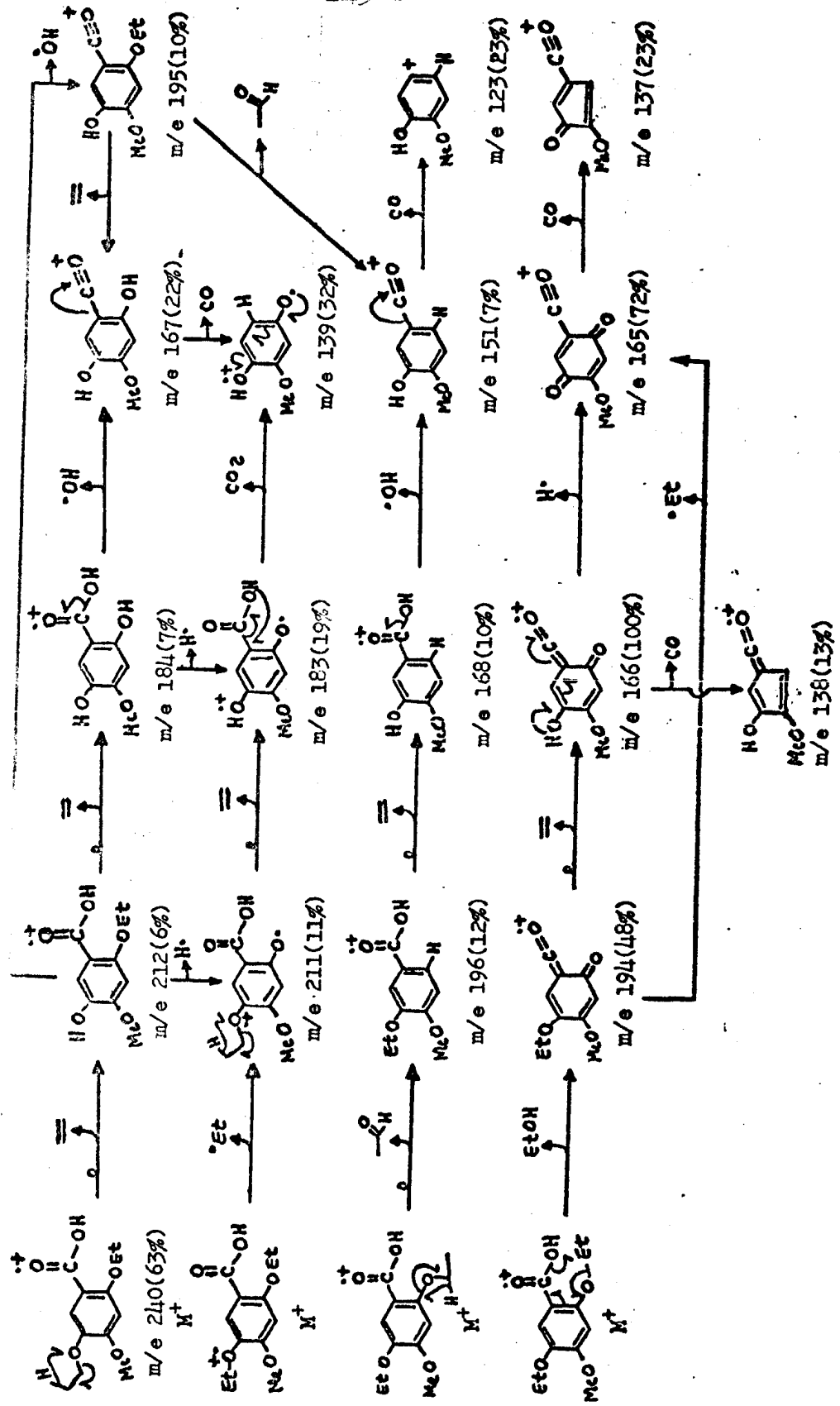


Quadro 26. Continuação



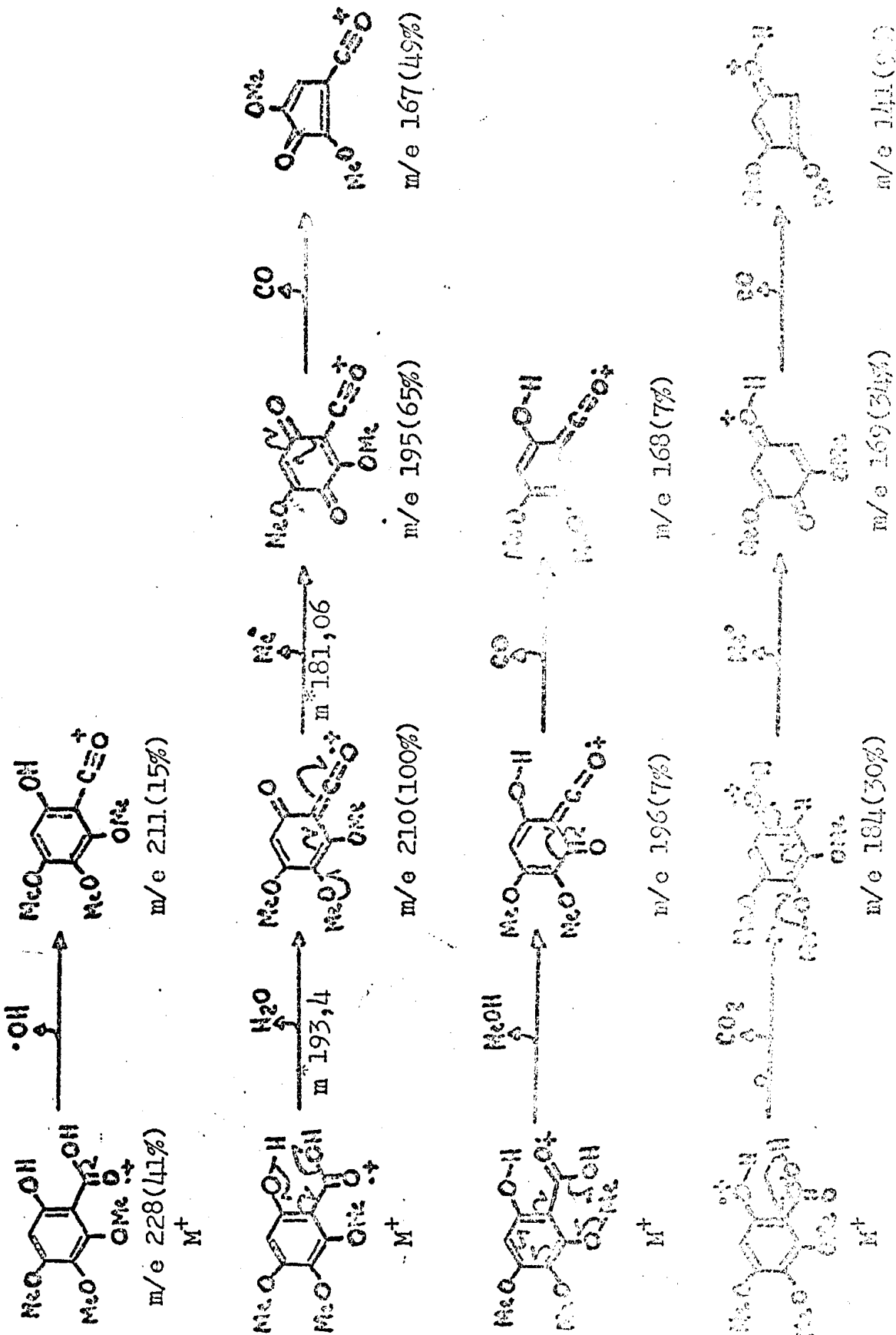
Quadro 28.

Caminhos principais de fragmentação da 6'-hidroxil-2,2',3,4'-tetrametoxiacetofenona no espectrometro de massa.



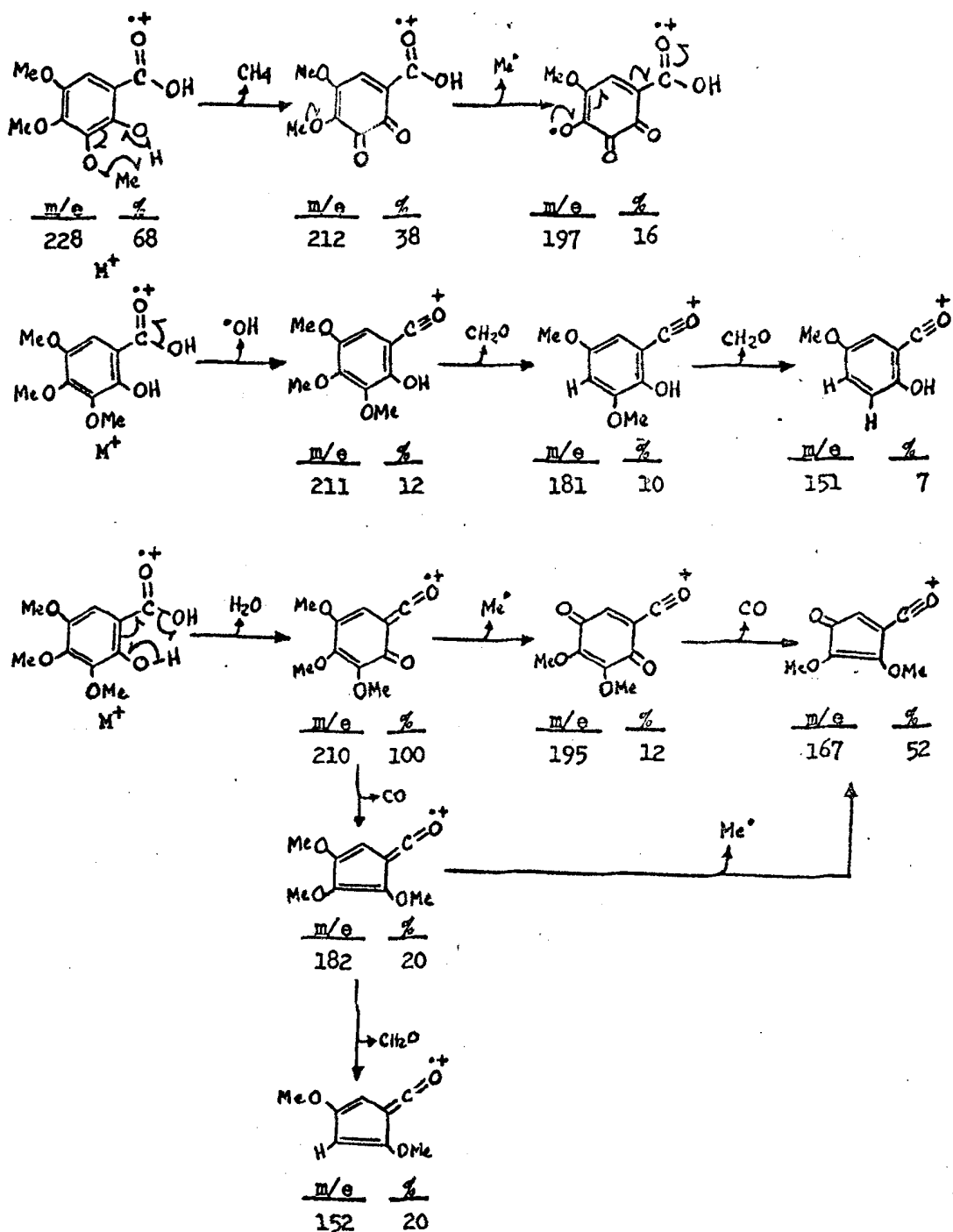
Quadro 30.

Camínhos principais de fragmentação do ácido 2,5-dietoxi-4-metoxibenzoico no espectrômetro de massa.



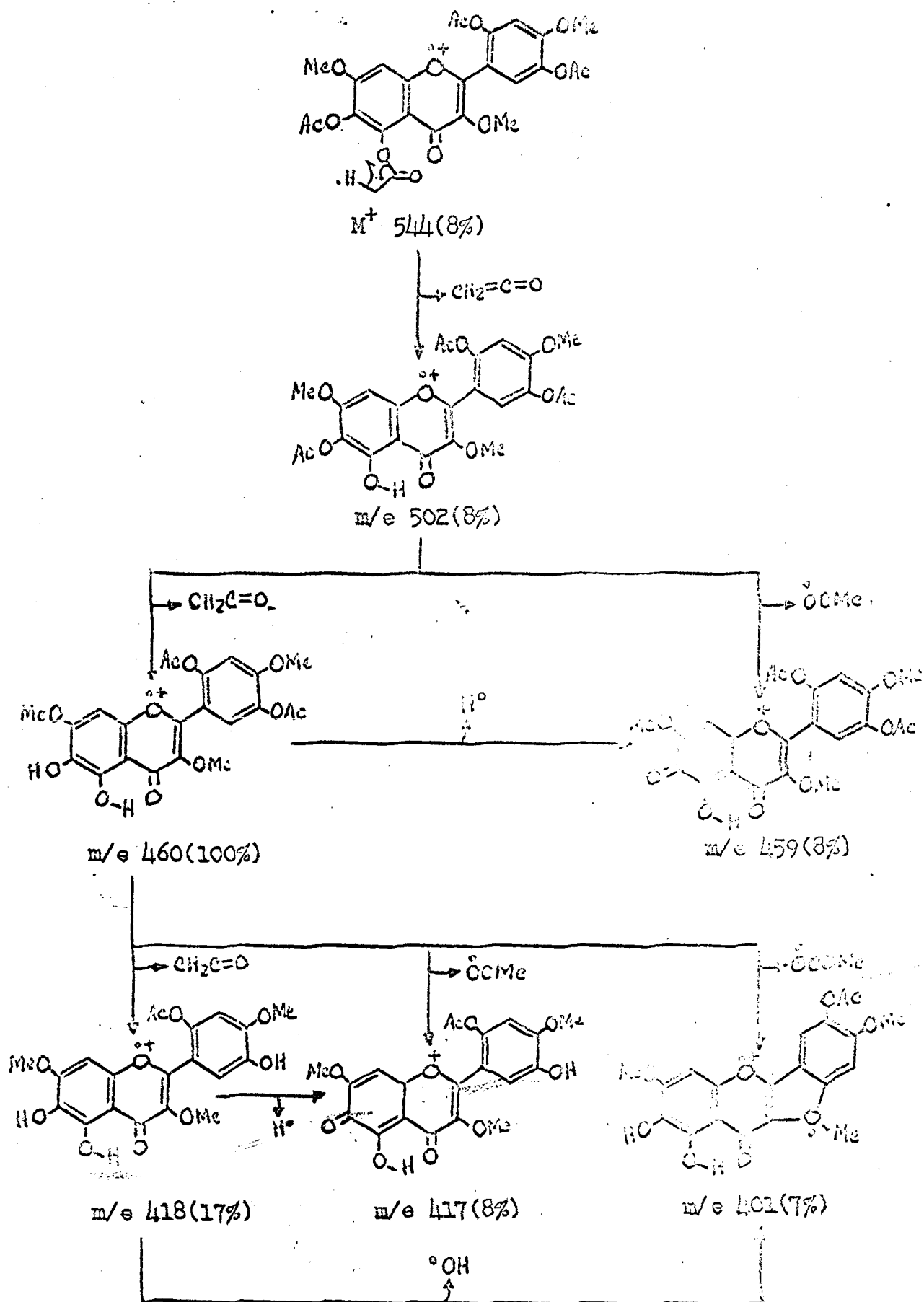
Quadro 31.

Caminhos principais de fragmentação do ácido 6-hidroxi-2,3,4-trimetoxibenzoico no espectrômetro de massa.



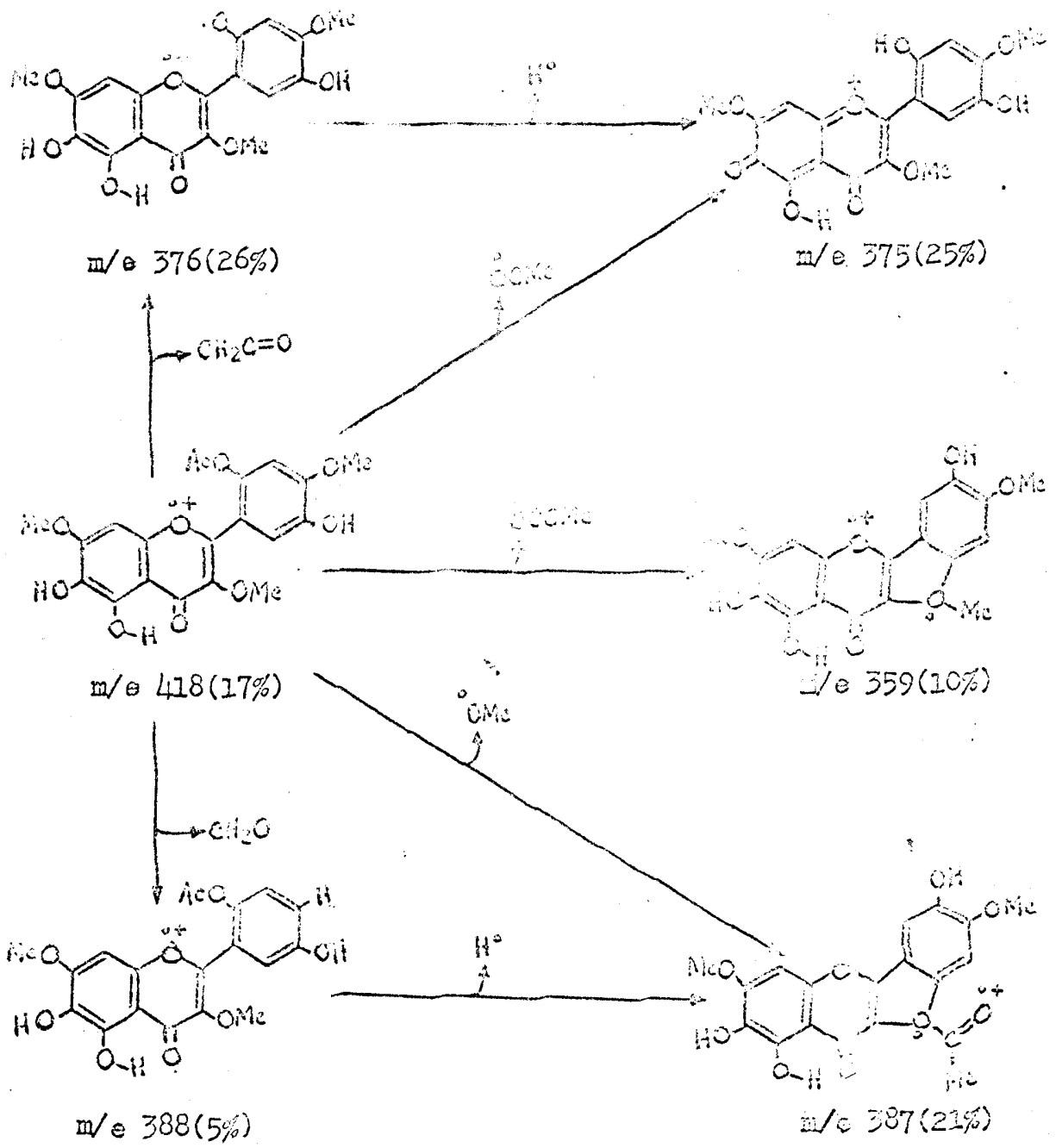
Quadro 32.

Caminhos principais de fragmentação do ácido 2-hidroxi-3,4,5-trimetoxibenzoico no espectro metro de massa.



Quadro 34.

Caminhos principais de fragmentação da 2',5,5',6-tetracetoxi-3,4',7-trimetoxiflavona no espectrômetro de massa.



Quadro 34. Continuação.

AL-12 e AL-15.

Com a experiência ganha na determinação das estruturas da AL-11 e AL-13, foi relativamente fácil o estabelecimento das estruturas dos restantes constituintes isolados da planta, pois sua natureza flavônica ficou clara mediante simples comparação de espectros. A semelhança entre AL-12 e AL-15 ficou evidente da comparação dos espectros u.v. (Fig. 32, Fig. 33; Tabela 33), i.v. (Fig. 34 e Fig. 35), de r.m.n. (Fig. 36, Fig. 37, Fig. 38; Tabela 34) e de massa (Fig. 39, Fig. 40; Quadro 37).

Tabela 33.

Espectros u.v. da AL-12 e AL-15.

Aditivo	AL-12			AL-15		
	$\lambda_{\text{EtOH max}}$	$\lambda_{\text{EtOH max}}$	$\lambda_{\text{EtOH max}}$	$\lambda_{\text{EtOH max}}$	$\lambda_{\text{EtOH max}}$	$\lambda_{\text{EtOH max}}$
-	257 43.250	291 14.000	350 20.700	253 43.000	290 21.450	345 27.650
NaOH	268 33.850	358 16.900		250 45.200	315 26.800	
NaOH+HCl	254 22.550	294 13.650		248 43.600	295 28.700	
AcONa	257 43.250	291 14.000	350 20.700	253 43.000	290 21.450	345 27.650
AcONa+H ₃ BO ₃	257 43.250	291 14.000	350 20.700	253 43.000	290 21.450	345 27.650
AlCl ₃	270 41.850	314 12.200	400 8.950	253 43.000	290 21.450	345 27.650

Tabela 34.

Espectros de r.m.n. da AL-12 e AL-15Ac. Os deslocamentos químicos são referidos em unidades τ e as constantes de acoplamentos em Hz.

Substância	OH	H-3'	H-6'	H-6	H-8	OMe	OCOCH ₃
AL-11	2,00 4,55	3,40	2,77	-	3,26	6,00 6,05 6,09 6,12 6,15	-
AL-13	-2,28 2,13 4,67	3,37	2,74	-	3,47	6,04 6,04 6,07 6,12	
AL-12	-2,35 2,14 4,72	3,41	2,73	3,63 d J=2,0	3,53 d J=2,0	6,10 6,17 6,17	
AL-12Ac	-	3,16	2,65	3,41 ou 3,26 d J=2,6	3,26 ou 3,41 d J=2,6	6,13 6,13 6,39	7,55 7,66 7,78
AL-15Ac	-	3,13	2,58	3,63 d J=2,1	3,56 d J=2,1	6,04 6,10 6,12 6,29	7,66 7,78
AL-11Ac	-	3,18	2,69	-	3,36	6,05 6,10 6,11 6,13 6,31	7,68 7,78
AL-13Ac	-	3,08	2,57	-	3,15	6,03 6,08 6,12 6,34	7,47 7,64 7,75

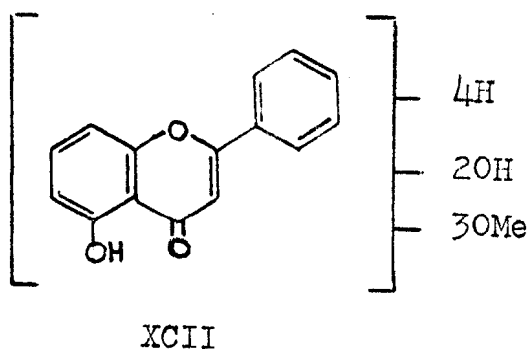
A presença de pelo menos dois grupos OH tanto na AL-12 como na AL-15 foi deduzida do fato que ambas as substâncias se decompõem em meio alcalino (Tabela 33). Estes 2 grupos OH devem manter relação orto ou para ou ocupar as posições 3,4'. O sistema orto-diOH fica eliminado em face do espectro u.v. não revelar modificação por adição de acetato de sódio-ácido bórico (Tabela 33).

Que o carbono 5 da AL-12 sustenta um grupo OH conclue-se da alteração do espectro u.v. em presença de $AlCl_3$ (Tabela 33), da frequência do estiramento carbonílico no espectro i.v. ($1653cm^{-1}$, Fig. 34) e do comparecimento de um sinal em campo baixo ($-2,35 \tau$) no espectro de r.m.n. (Fig. 36). O mesmo não ocorre com a AL-15. A frequência de estiramento do grupo C=O em $1626 cm^{-1}$ no seu espectro i.v. (Fig. 35) sugere a presença de um grupo OMe nesta posição. Esta dedução é apoiada pela não modificação do seu espectro u.v. por adição de $AlCl_3$, indicando ausência de grupo OH em 3 e/ou 5 no esqueleto fundamental.

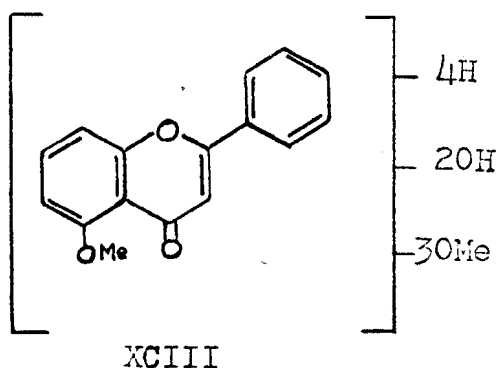
A comparação dos espectros de r.m.n. da AL-12 (Fig. 36) e da AL-15 (Fig. 38) com a apuleína e 5-O-desmetilapuleína (Tabela 34) revelou o estreito parentesco entre estas substâncias.

O espectro de r.m.n. da AL-12 (Fig. 36, Tabela 34) ostentou 2 bandas simples e duas bandas duplas ($J=2Hz$), representando um próton cada uma, na região correspondente à absorção de prótons aromáticos, 2 sinais representando 3 grupos metoxila e 3 outros sinais atribuídos a 3 grupos hidroxila. O espectro de r.m.n. do acetato derivado AL-12Ac (Fig. 37, Tabela 34), confirmou a existência de 3 grupos OH na substância original. Confirmação adicional resultou da compara

lar 360, com o éter metílico dela derivado (Fig. 41, Quadro 38) pêsso molecular 402. Estes dados em conjunto permitiram formular a estrutura parcial XCII para a AL-12.



Análise comparativo dos espectros de r.m.n. dos acetatos da AL-15 (Fig. 38, Tabela 34) e da AL-12 (Fig. 37, Tabela 34) sugeriu o mesmo padrão de substituição para as duas substâncias, devendo assim a AL-15 ser considerada como o derivado 5-O-metilado da AL-12. Os espectros da massa revelando pêsso molecular 360 para a AL-12 e 374 para a AL-15 concordam com esta hipótese, já que diferem entre si de 14 unidades de massa. Assim, pôde-se propôr a estrutura parcial XCIII para a AL-15.

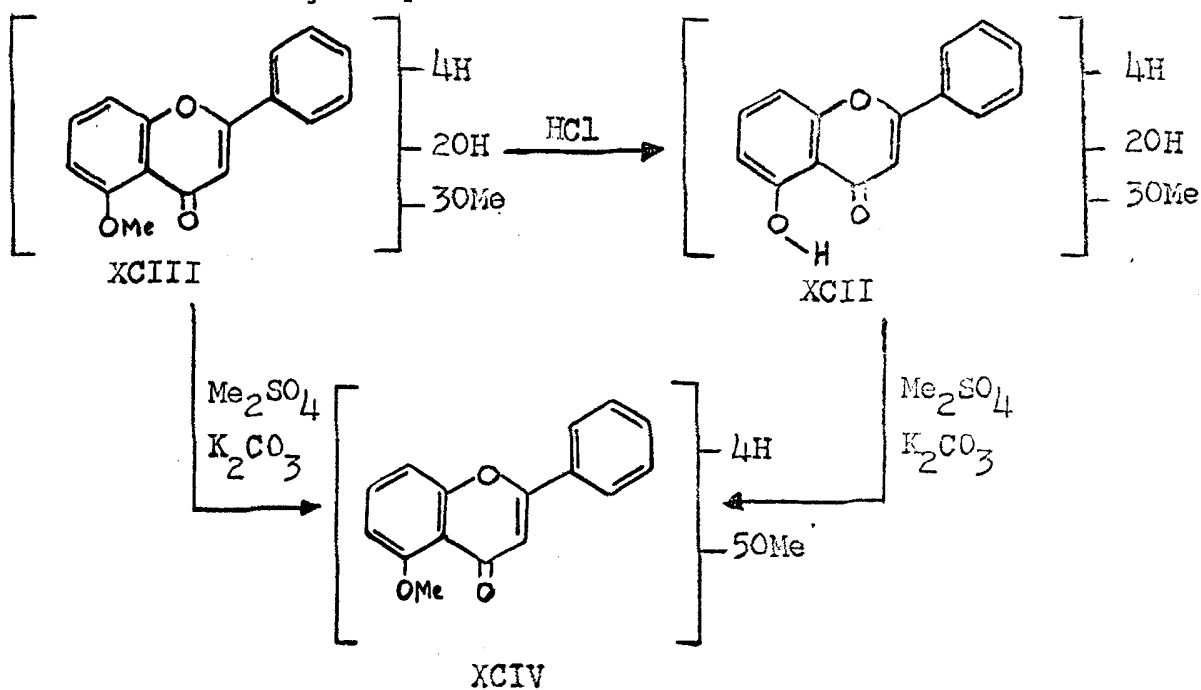


De fato, foi possível comprovar a relação entre AL-12 e AL-15 não só transformando ambos no mesmo O-metil derivado (XCIV, i.v., Fig. 42), mas ainda convertendo a AL-15 (XCIII) na AL-12 (XCII) por

desmetilação parcial (Quadro 39). O reagente utilizado nesta reação (HCl aquoso a 20%) é seletivo para 5-metoxi-grupo em sistema flavônico. Estes resultados serviram ainda para eliminar a possibilidade de existência de sistema 3,4'-diOH, já que o espectro u.v. da AL-15 não sofre alteração pela adição de $AlCl_3$. Como os espectros u.v., tanto da AL-12 como da AL-15 não sofrem modificação por adição de acetato de sódio-ácido bórico foi possível explicar a instabilidade das duas substâncias em meio alcalino apenas pela existência de um sistema para-diOH.

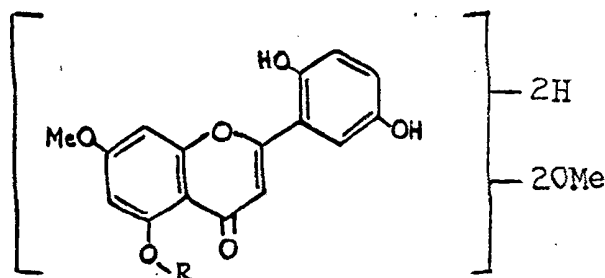
Quadro 39.

Transformações químicas com a AL-12 e AL-15.



A localização de protons nas posições 6 e 8 foi inferida pelos valores dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento ($J=2Hz$) das duas bandas duplas no espectro de r.m.n. da AL-12 (Fig. 36). Tais sinais sofrem deslocamentos paramagnéticos no espectro do acetato dela derivado e este fenômeno demonstrou mais uma vez a

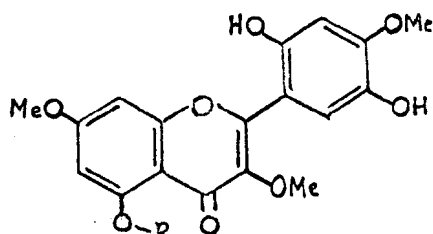
existência de OH em C-5. Tal comportamento não foi observado no espectro da AL-15Ac, conforme se mostra na Tabela 34. Conseqüentemente, a AL-12 possui o anel A 5-hidroxi-7-metoxilado e AL-15 5,7-dimetoxilado. Aliás, a ausência de função hidroxila na posição 7 das duas substâncias foi também revelada pela não modificação dos espectros u.v. por adição de AcONa. Diante disto, o sistema para-diOH, tanto na AL-12 como na AL-15, localiza-se obrigatoriamente no anel B. Neste ponto, pôde-se ampliar as estruturas parciais de AL-12 para XCV e da AL-15 para XCVI.



AL-12, XCV, R=H
 AL-15, XCVI, R=Me

A existência de um grupo OH na posição 2' foi também indicada pelo espectro de r.m.n. da AL-12. O sinal em 2,14 τ (Tabela 34) é compatível com a existência de uma ponte de hidrogênio entre o grupo OH e o oxigênio etérico do anel pirônico e já referido neste trabalho. Reforçando esta hipótese, constatou-se que a absorção do C=O no espectro i.v. da AL-15 aparece em 1626 cm^{-1} (Fig. 35) enquanto o espectro i.v. do seu acetato revelou tal absorção em 1641 cm^{-1} (Fig. 43), ocorrendo portanto um deslocamento para maior frequência. Tal comportamento é perfeitamente previsível com base na argumentação lançada para a apuleína e confirmou, mais uma vez, a existência de OH em 2'.

A localização dos 2 protons e dos 2 grupos metoxila restantes foi relativamente fácil, já que o sinal simples em 2,7 τ no espectro de r.m.n. da AL-12, só pôde ser atribuído a um proton em 6' que deveria ter uma metoxila em meta (feição da banda) e um H em para (deslocamento químico da banda). Consáquentemente, a metoxila restante ocupa a posição 3. Estes argumentos permitiram, portanto, formular a AL-12 como 2',5,5'-trihidroxi-3,3',7-trimetoxiflavona (XCVII) e a AL-15 como 2',5'-dihidroxi-3,4',5,7-tetrametoxiflavona (XCVIII).

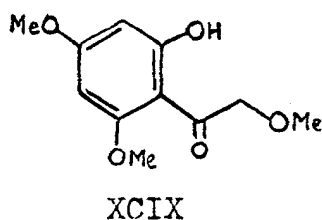


AL-12, XCVII, R=H
AL-15, XCVIII, R=Me

A análise dos espectros de massa das duas substâncias concorrou com estas deduções, não só quanto à distribuição das funções oxigenadas nos aneis A e B, como também quanto à localização da posição relativa de grupos (Quadro 37). Merece atenção especial a presença de picos significativos correspondentes aos fragmentos resultantes da expulsão dos radicais $\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{OMe}$, o que está em acôrdo com a propoção já lançada para a apuleína (Quadro 37).

A confirmação definitiva do padrão de substituição do anel B foi feito pelo exame do produto de hidrólise do éter metílico, que conduziu à obtenção do ácido 2,4,5-trimetoxibenzoico. Não houve maior preocupação na obtenção da 6-hidroxi-2,2',4'-trimetoxiacetofeno(XCIX)

que deveria resultar do anel A, já que a pequena quantidade obtida apresentou dificuldade de cristalização. Aliás, flavonas 2',6'-oxigenadas apresentam relativa estabilidade quando submetidas a tratamento alcalino devido a dificuldade de aproximação do reagente pelo lado reativo da molécula [29, 30]. Já que as nossas substâncias apresentam função oxigenada na posição 2', é razoável esperar-se rendimentos fracos.



A estrutura da 2',5,5'-trihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona (XCVII) que assim se deduz para AL-12 foi descrita para a oxiaianina A, constituinte de Distemonanthus benthamianus [67]. A AL-15 é inédita e foi designada 5-O-metiloxiaianina A.

Jain, Mathur e Seshadri [68] sintetizaram 2',5,5'-trihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona (XCVII) e verificaram diferenças entre o seu espectro i.v. e de uma amostra de oxiaianina A (Fig. 44) fornecida pelo Prof. F.E. King, embora os autores registrem estreita concordância em reações de cor, espectros u.v. e p.f.. Isto, em conjunto com o fato que o procedimento utilizado por King, King e Stokes [67] para isolar oxiaianina A de Distemonanthus benthamianus inclui tratamento alcalino destrói XCVII, forçaram os autores Indianos a considerar a proposta estrutural lançada para a substância natural como errada.

A identidade da AL-12 com uma amostra de oxiaianina A natural, gentilmente cedida pelo Dr. T.J. King, foi revelada por i.v., u.v.,

cromatografia em camada delgada e p.f. misto. Conseqüentemente, quando o Prof. T.R. Seshadri nos informou que a AL-12 era idêntica à oxiaianina A sintética (Fig. 45) a proposição estrutural originalmente formulada para a oxiaianina A foi estabelecida como correta e restava somente considerar a questão da natureza da amostra enviada pelo Prof. F.E. King ao Prof. T.R. Seshadri.

Este problema foi resolvido ao constatar-se que a oxiaianina-A, quando cristalizada de uma variedade de solventes, tais como acetato de etila-éter de petróleo, acetato de etila-benzeno ou metanol, fornece espectro i.v. em KBr (Fig. 46) idêntico àquêles que é publicado por Seshadri e colaboradores [68] para a oxiaianina-A sintética. Por outro lado, quando a AL-12 era dissolvida em cloroformio e o solvente removido por evaporação, o resíduo, embora indistinguível de AL-12 por espectrometria de r.m.n., no u.v. e de massa, como também por cromatografia em camada delgada e p.f., dá um espectro i.v. em KBr (Fig. 47) idêntico àquêles publicado por Seshadri e colaboradores [68] para a oxiaianina-A natural recebida da Inglaterra. Com este resultado conseguiu-se não só confirmar a estrutura da AL-12 (XCVII), mas também desfazer dúvidas lançadas na literatura sobre a estrutura da oxiaianina-A.

Aliás, o p.f. 181-183°C do derivado acetilado da AL-12 (i.v., Fig. 48) está em acôrdo com o registrado por King, King e Stokes [67].

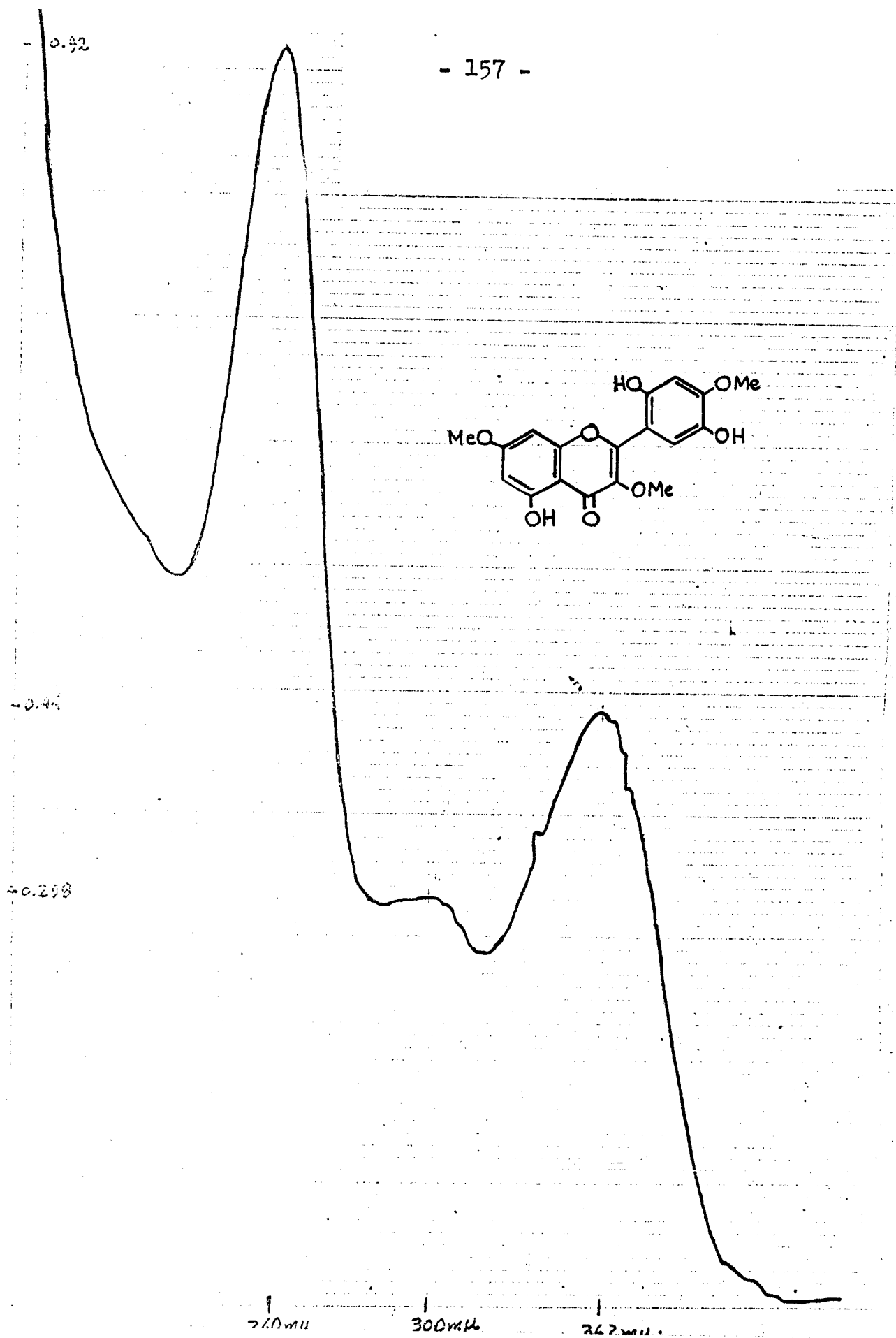


Figura 32.

Espectro u.v. da oxialanina A (AL-12) =
= 2',5,5'-trihidroxi-3,4',7-trimetoxifla
vona.

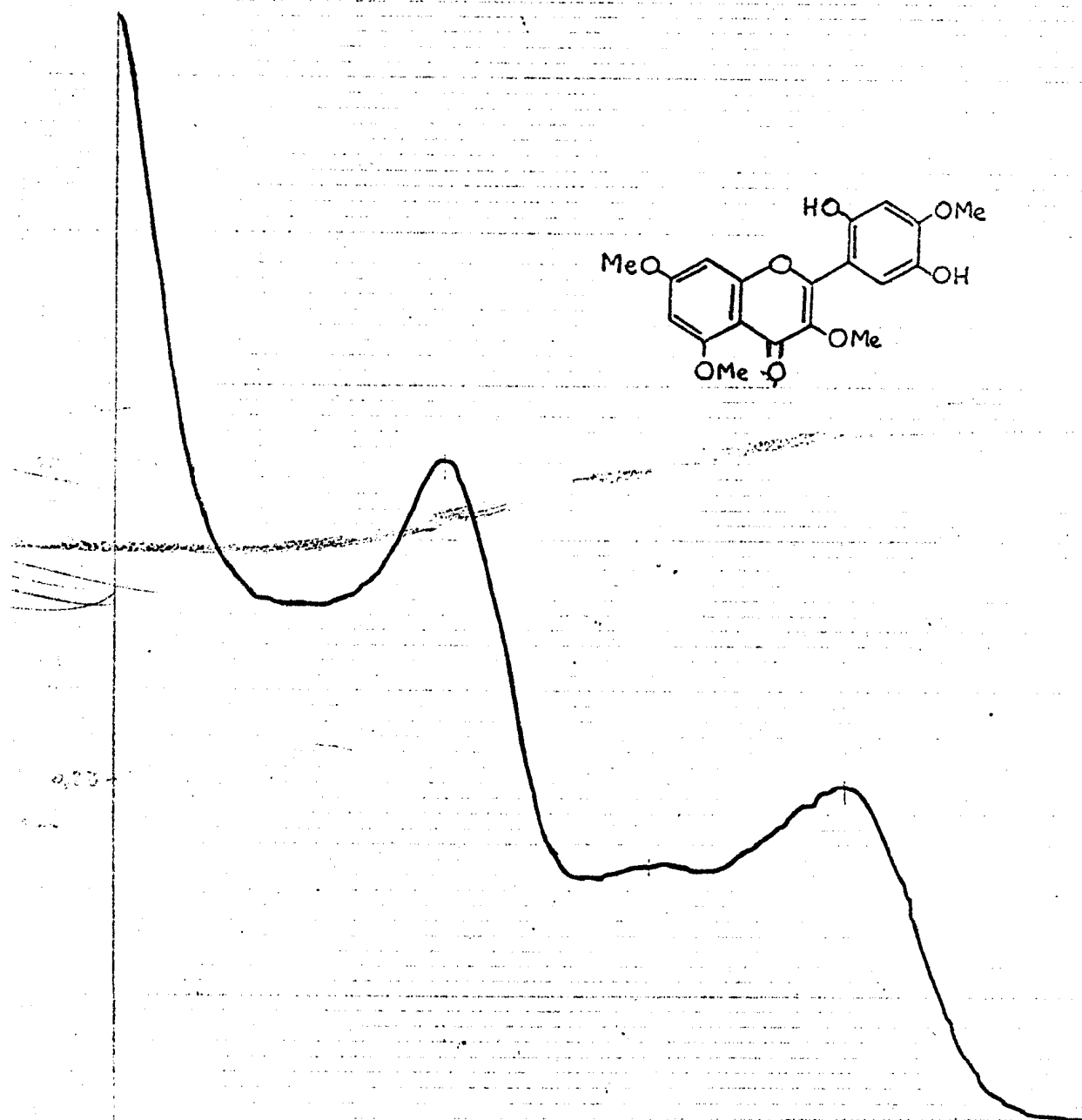


Figura 33.

Espectro u.v. da 5-O-metiloxiaianina A
(AL-15) = 2',5'-dihidroxi-3,4',5,7-tetra
metoxiflavona.

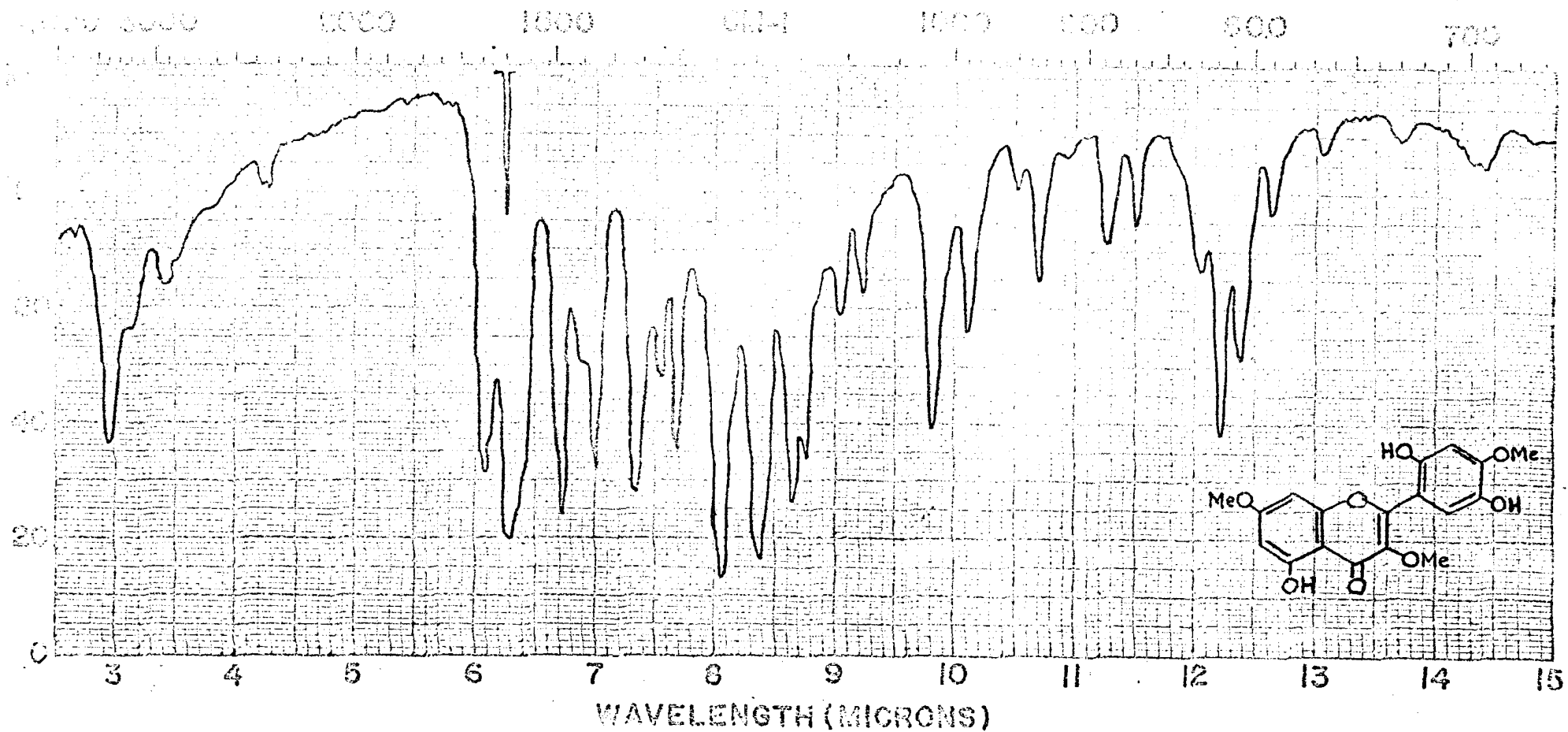


Figura 34.

Espectro i.v. da oxieianina A (AL-12) = 2',5,5'-trihidroxi-3,4',7-trime
toxiflavona.

Fase: KBr

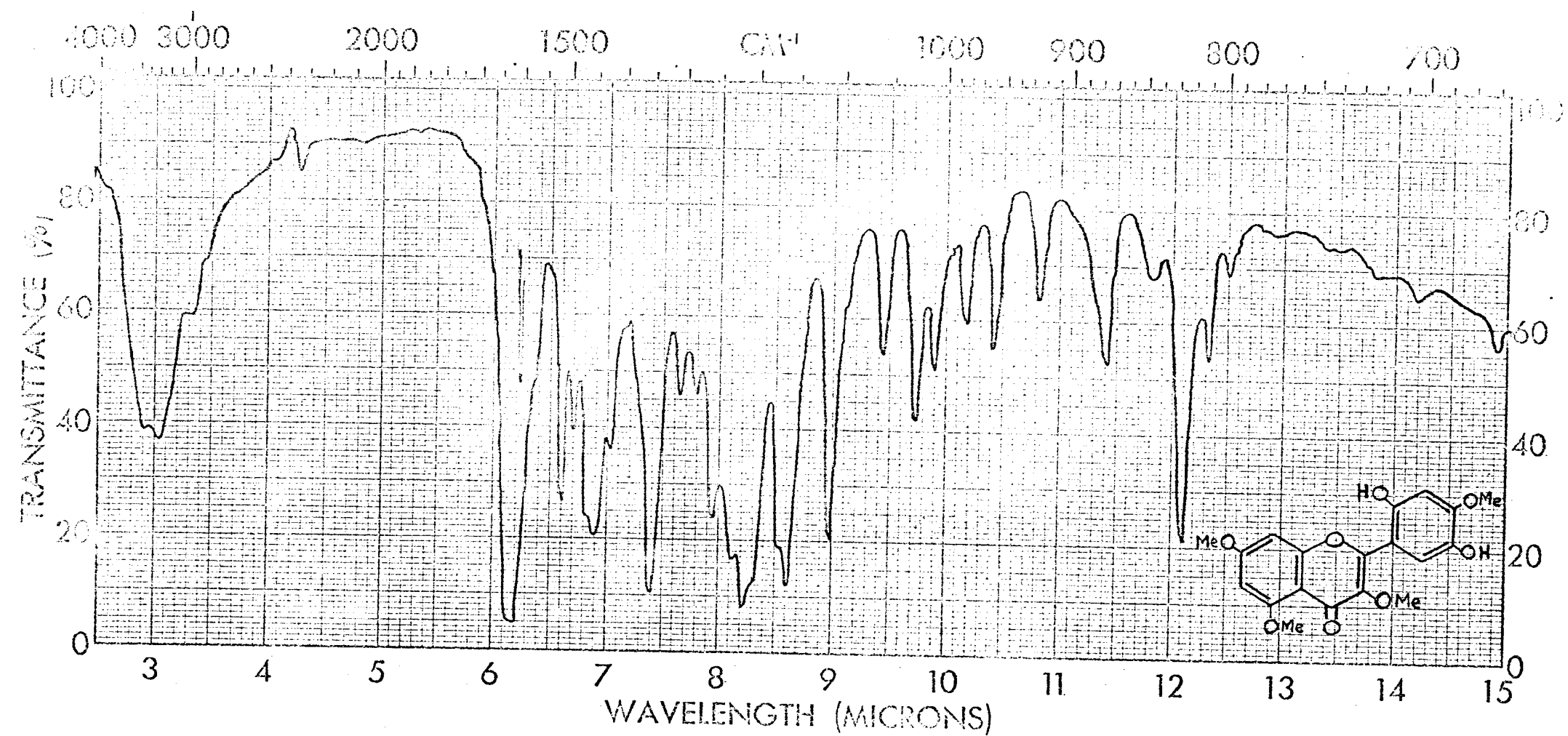


Figura 35.

Espectro i.v. da 5-O-metiloxianina A (AL-15) = 2',5'-dihidroxi-3,4',5,7-tetra metoxiflavona.

Fase: KBr

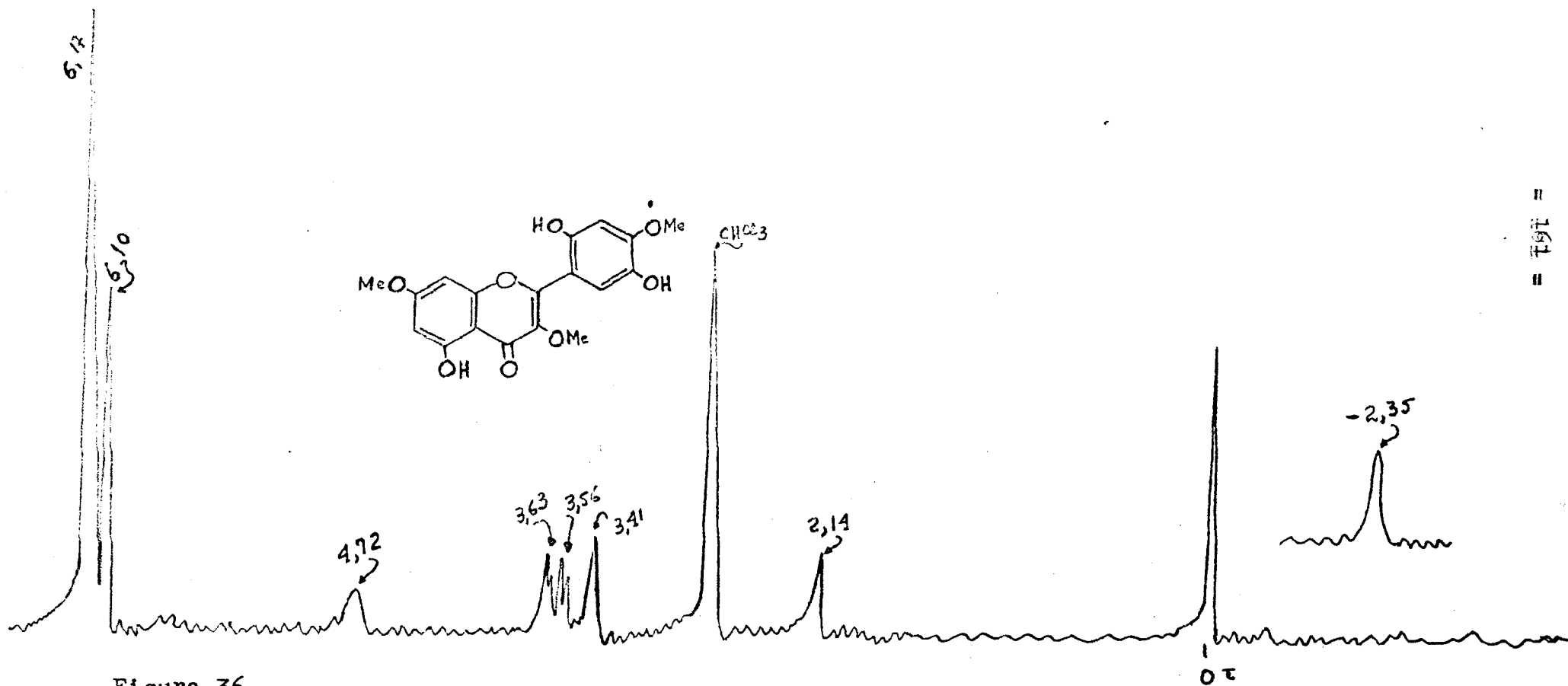


Figura 36.

Espectro de r.m.n. da oxialanina A (AL-12)=2',5,5'-trihidroxi-3,4',7'-trimetoxiflavona.

Solvente: CDCl₃

DATE	DEC. SHIFT	REF. STD.	R.F. FIELD	R.F. GAIN	REMARKS	SENSITIVITY NORM: 4.8 INT: 8	SWEEP RATE. 16 120 UNITS PER MIN.	TIME CONST. 0.01 SECS 0.05 M. SECS	SCALE FACTOR 6.3
28.2.70		TMS	8x10 ²	1/2					

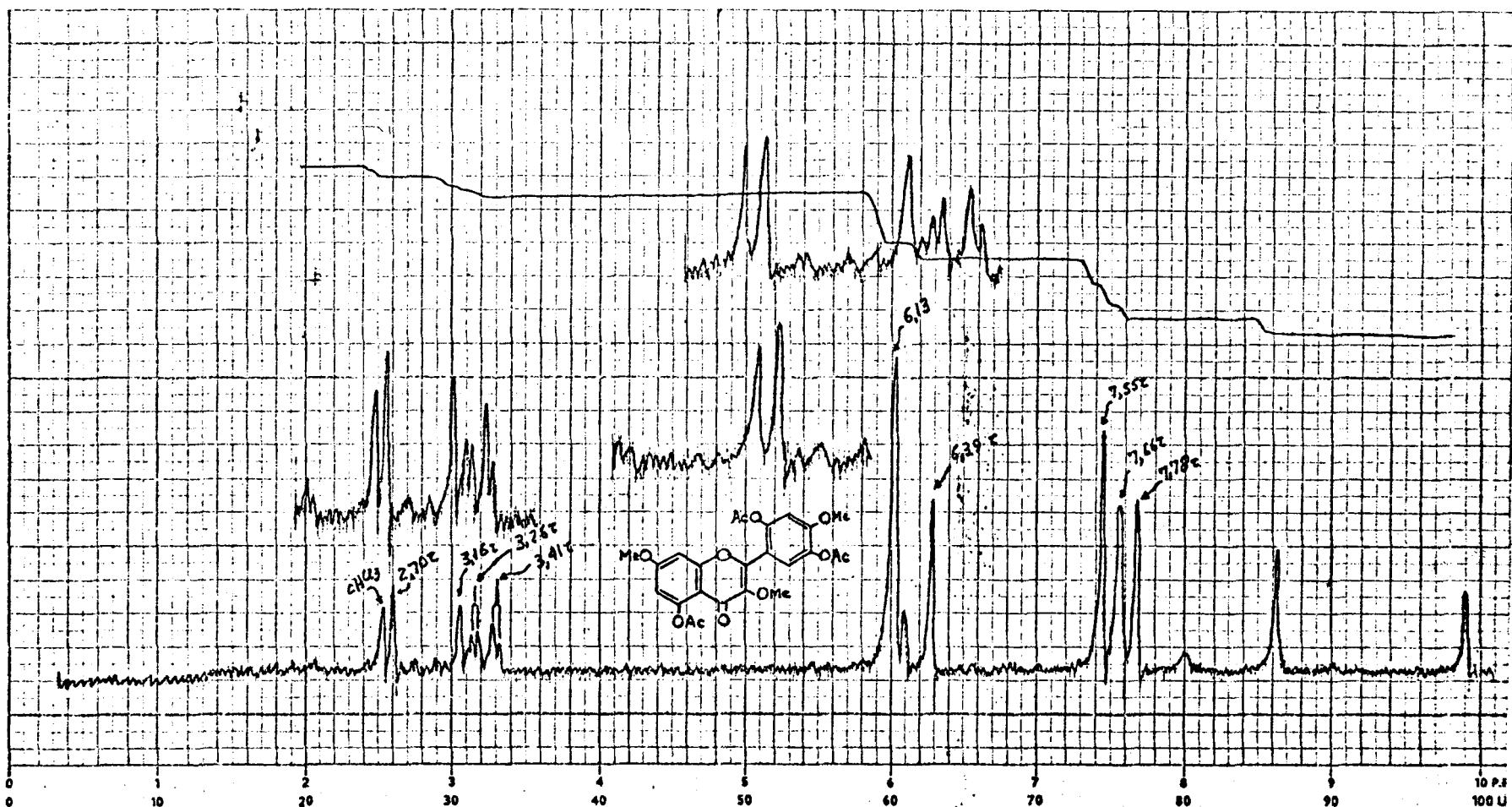
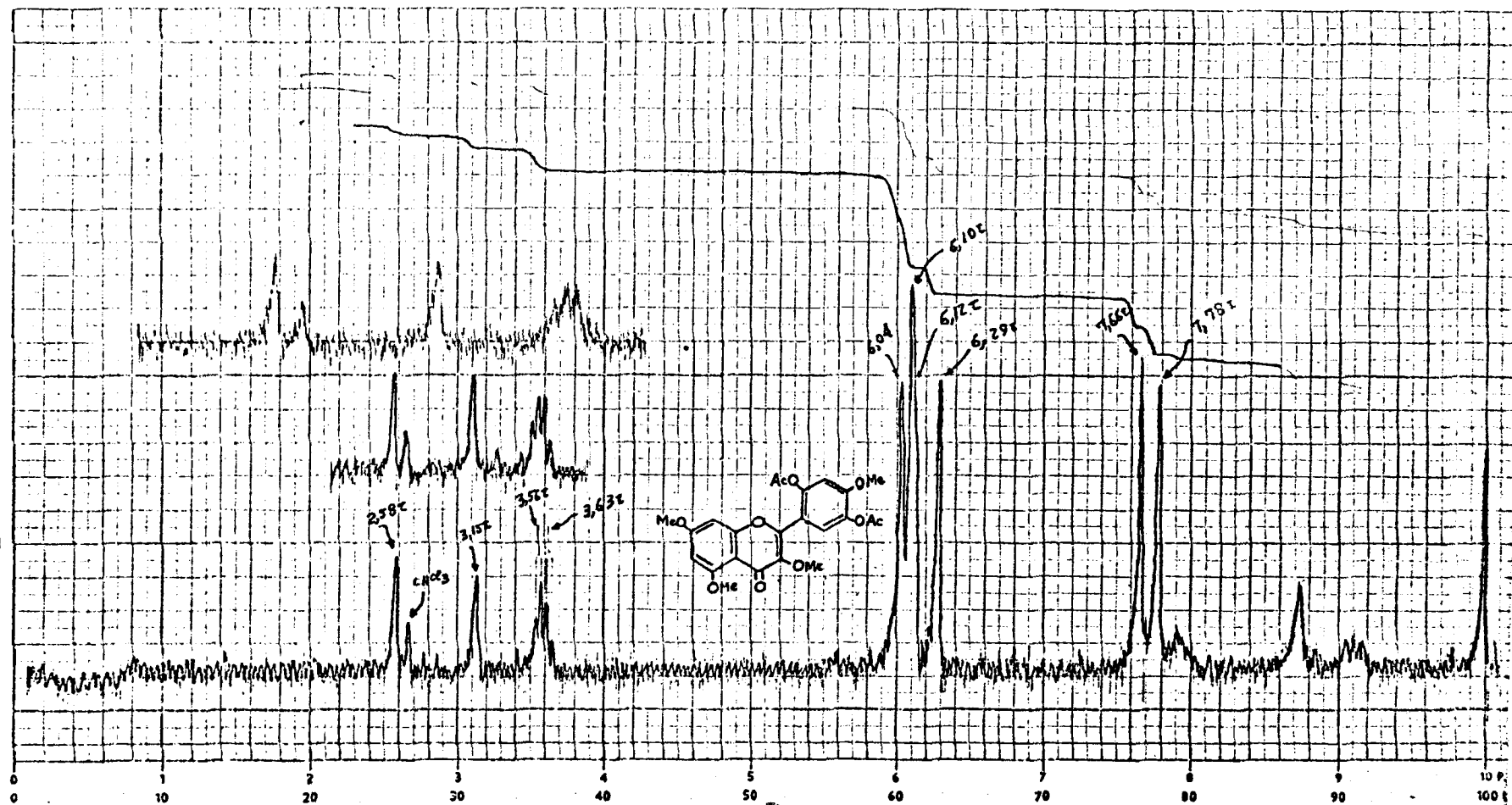


Figura 37. PART No. 468-1112
 Espectro de r.m.n. da 2',5,5'-tri-O-acetiloxianina A (AL-12Ac)=2',5,5'-triacetoxi-3,4',7-trimetoxiflavona. Solvente: CDCl₃

PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD, BUCKS.

89F

DATE	DEC. SHIFT	R.F. STD.	R.F. FIELD	R.F. GAIN	REMARKS	SENSITIVITY	SWEEP RATE.	TIME CONST.	SCALE FACTOR
25.2.70		TMS	8×10^3	112		NORM: 8 INT: 8	16 LIMITS PER MIN 128, 64	0.01 SEC 0.1, 1, 10, 100	6 CPS PER DIV



- 163 -

Figura 38. PART Nº. 468-1112
 Espectro de r.m.n. da 2',5'-di-O-acetil-5-O-metiloxiaianina A (AL-15Ac) =
 =2',5'-diacetoxi-3,4',5,7-tetrametoxiflavona. Solvente: CDCl₃.

PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD. SUCKS.

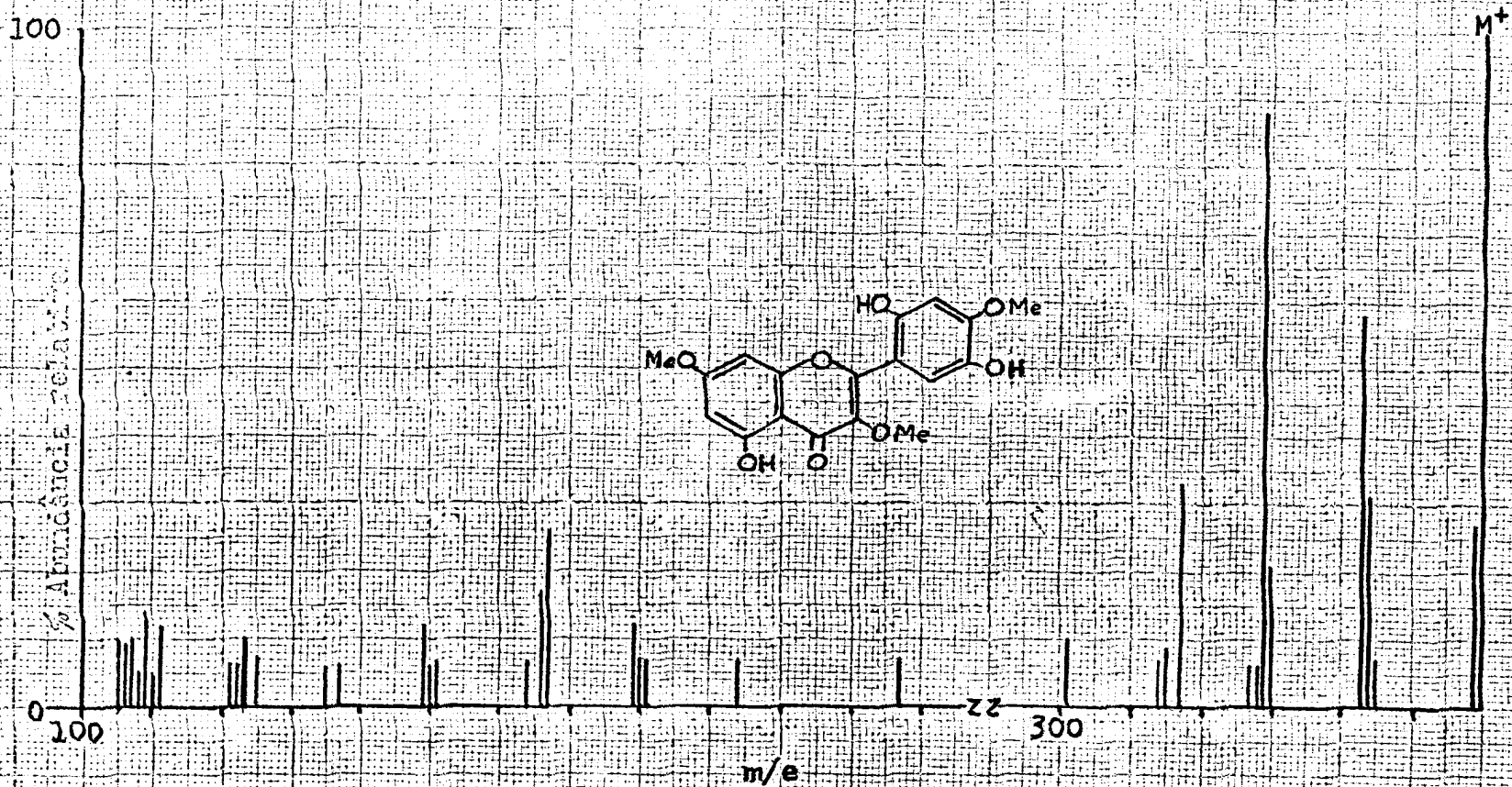


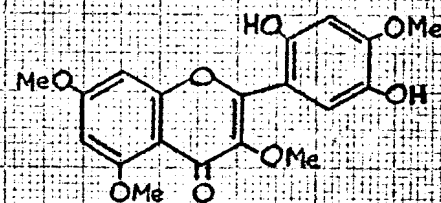
Figura 39.

Espectro de massa da oxialanina A (AL-12) = 2',5,5'-trihidroxi-
-3,4',7-trimetoxiflavona.

100

% Abundância Relativa

0



22

290

m/e

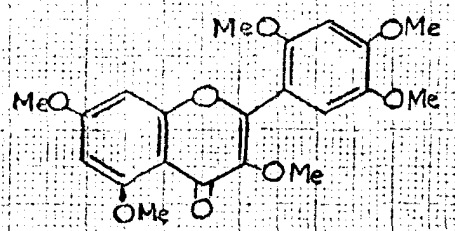
M⁺

Figura 40.

Espectro de massa da 5-O-metiloxianina A (AL-15) = 2',5'-dihidroxi-3,4',5,7-tetrametoxiflavona.

100

100
0



22 350

m/e

M⁺

196

Figura 41. Espectro de massa da 2',5,5'-tri-0-metiloxiaianina A (AL-12Me) = 2',3,4',5,5',7-hexametoxiflavona.

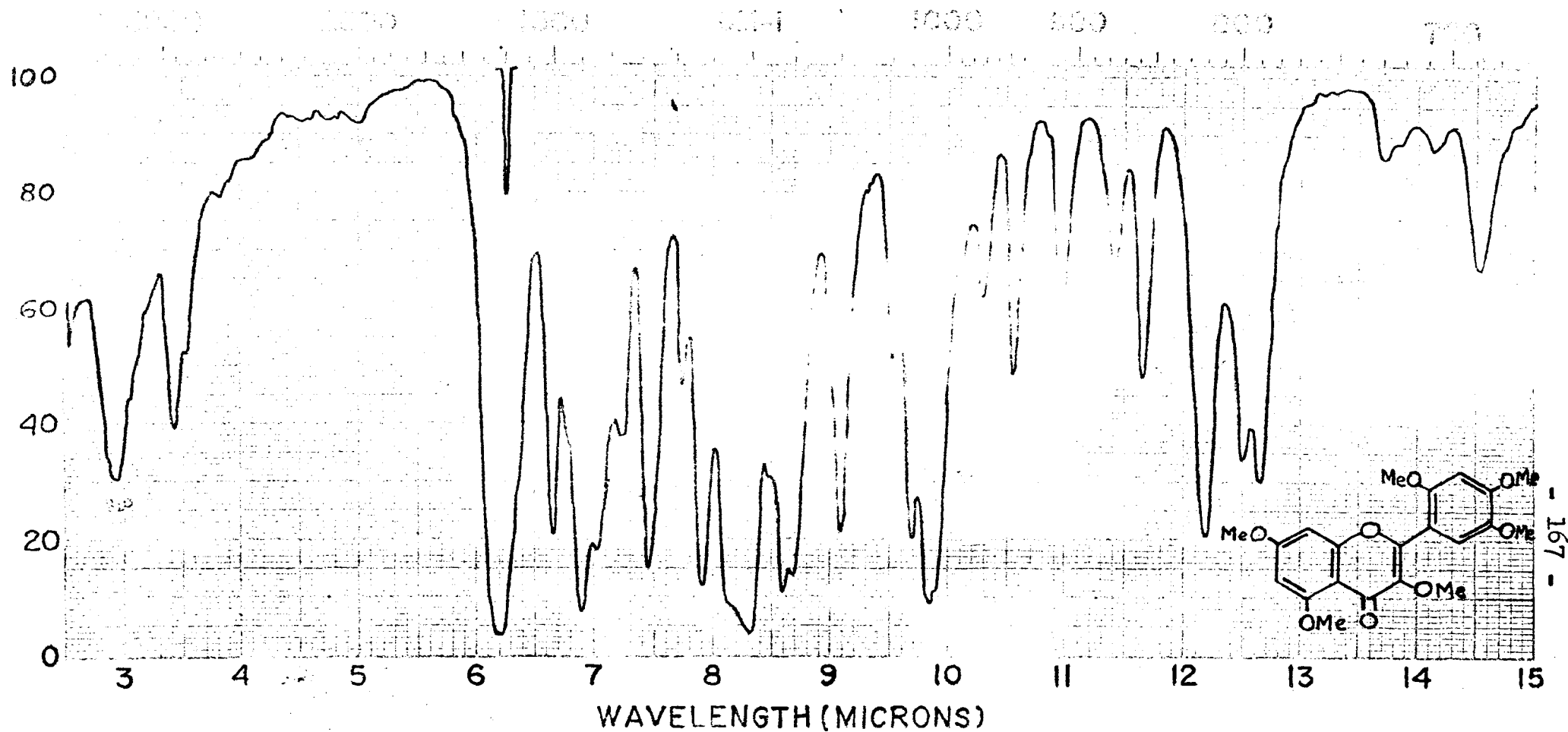


Figura 42.

Espectro i.v. da 2',5,5'-tri-0-metiloxiaianina A (AL-12Me) = 2',3,4',5,5',7-hexametoxiflavona.

Fase: KBr

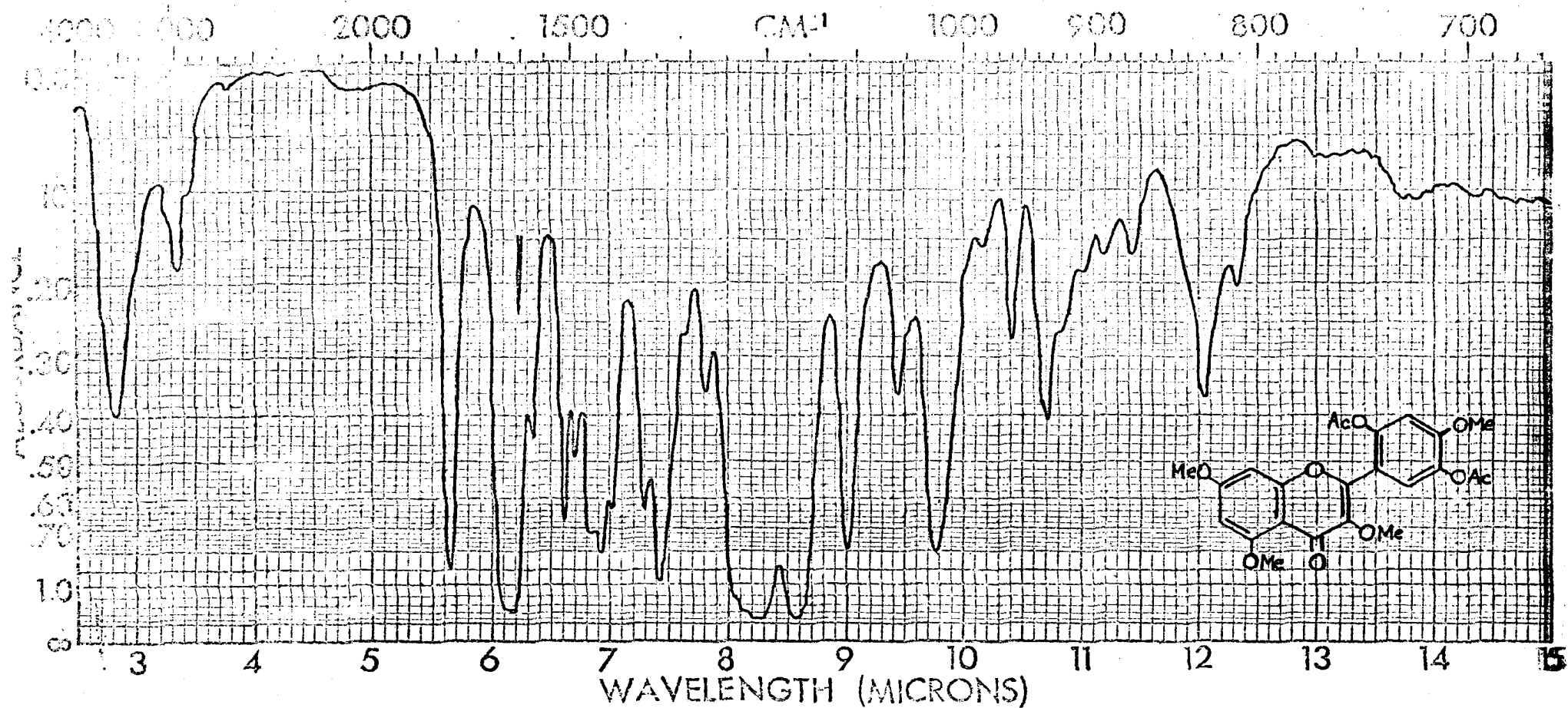


Figura 43. Espectro i.v. da 2',5'-di-O-acetil-5-O-metiloxialanina A (AL-15Ac)=2',5'-
-diacetoxi-3,4',5,7-tetrametoxiflavona.

Fase: KBr

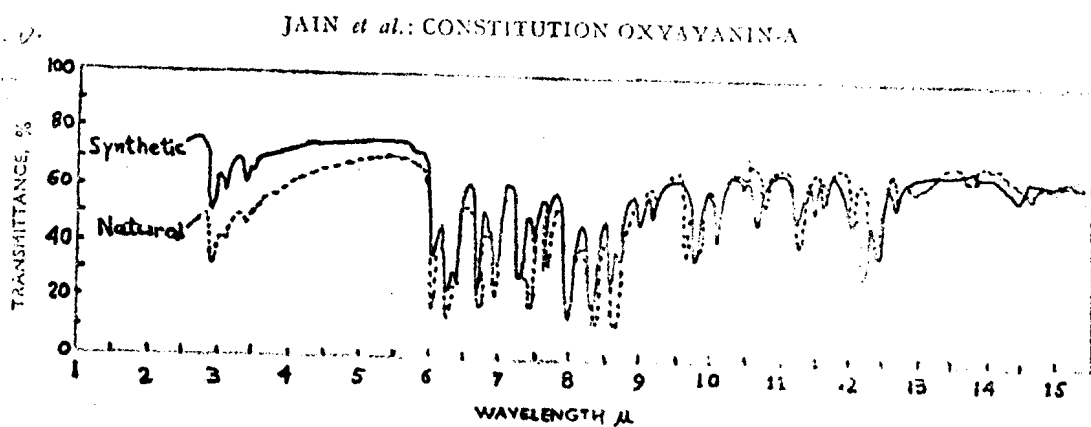


Figura 44.

Espectros i.v. da oxiaianina A natural e oxiaianina A sintética.

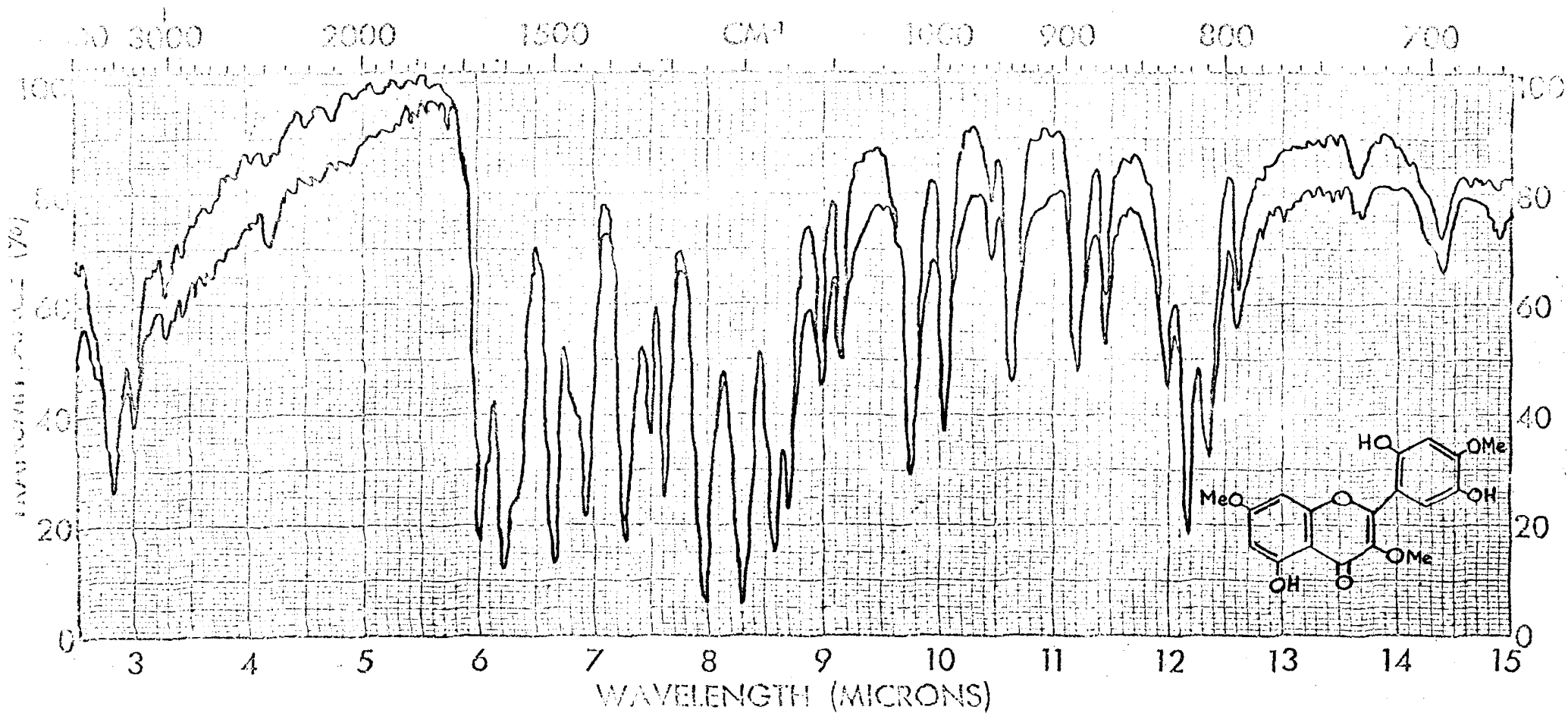


Figura 45.

Espectros i.v. da oxialanina A natural (AL-12) e oxialanina A sintética.

Fase: KBr

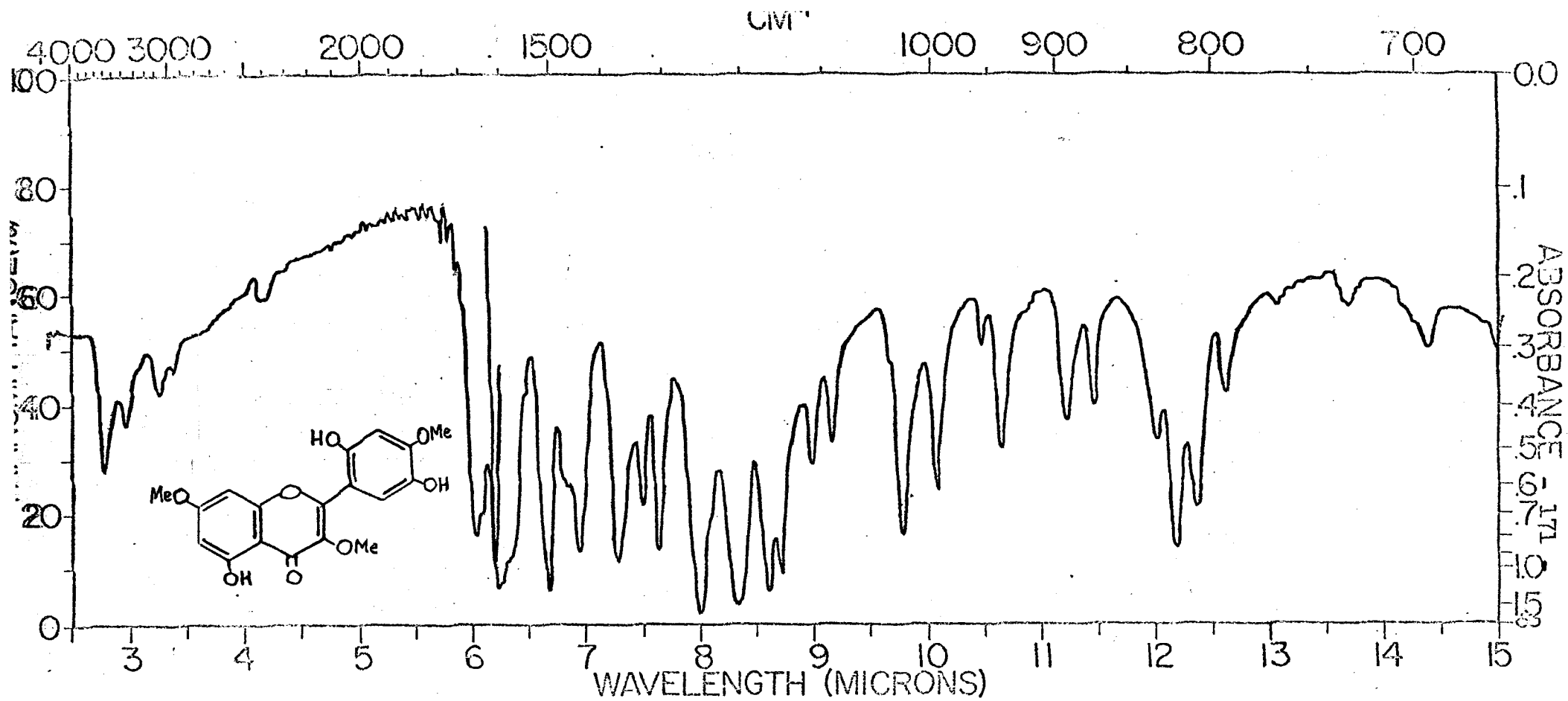


Figura 46.

Espectro i.v. da oxiaianina A natural (T.J.King).

Fase: KBr

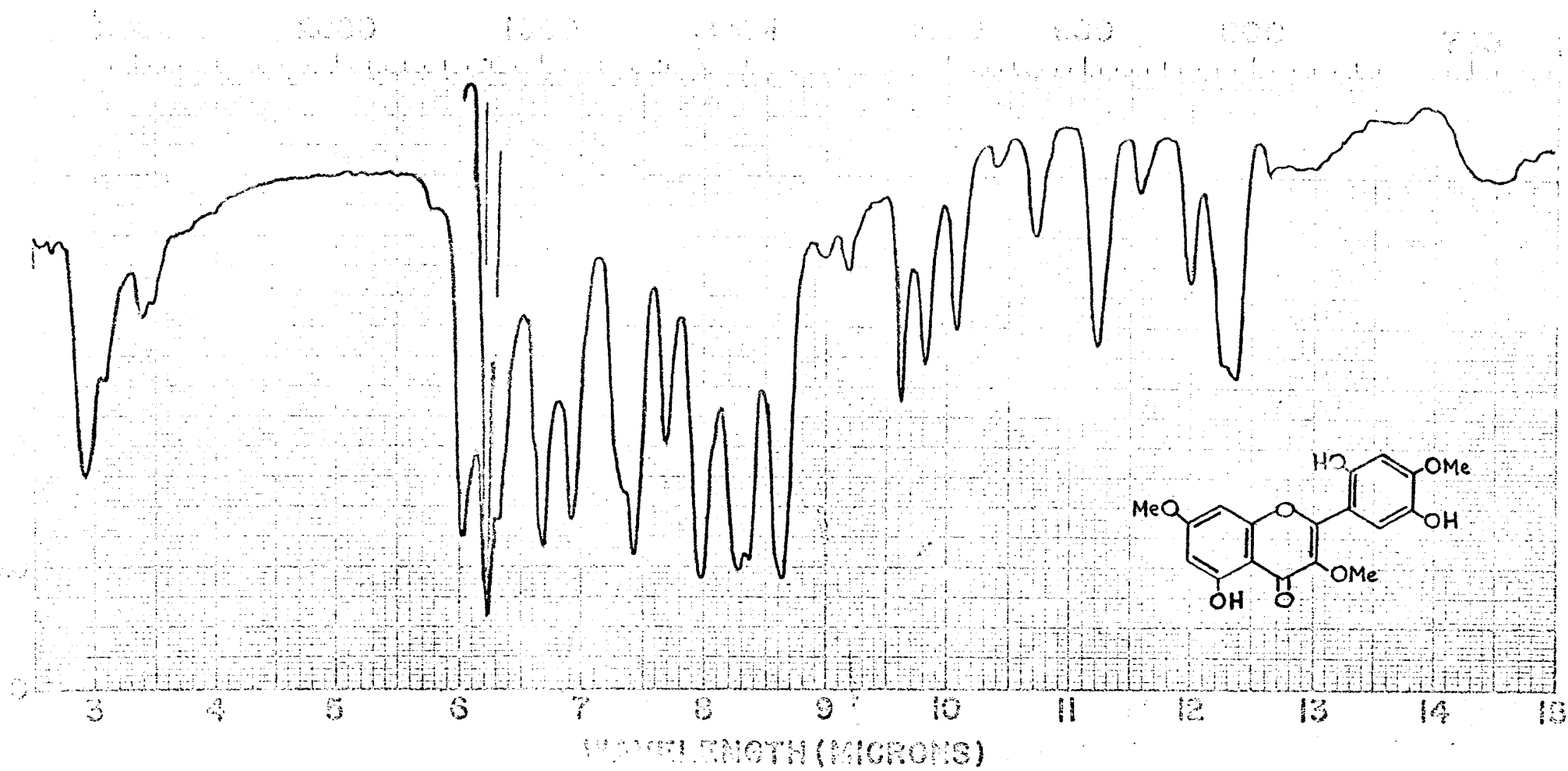


Figura 47.

Espectro i.v. da oxiaianina A natural (AL-12) não cristalina.

Fase: KBr

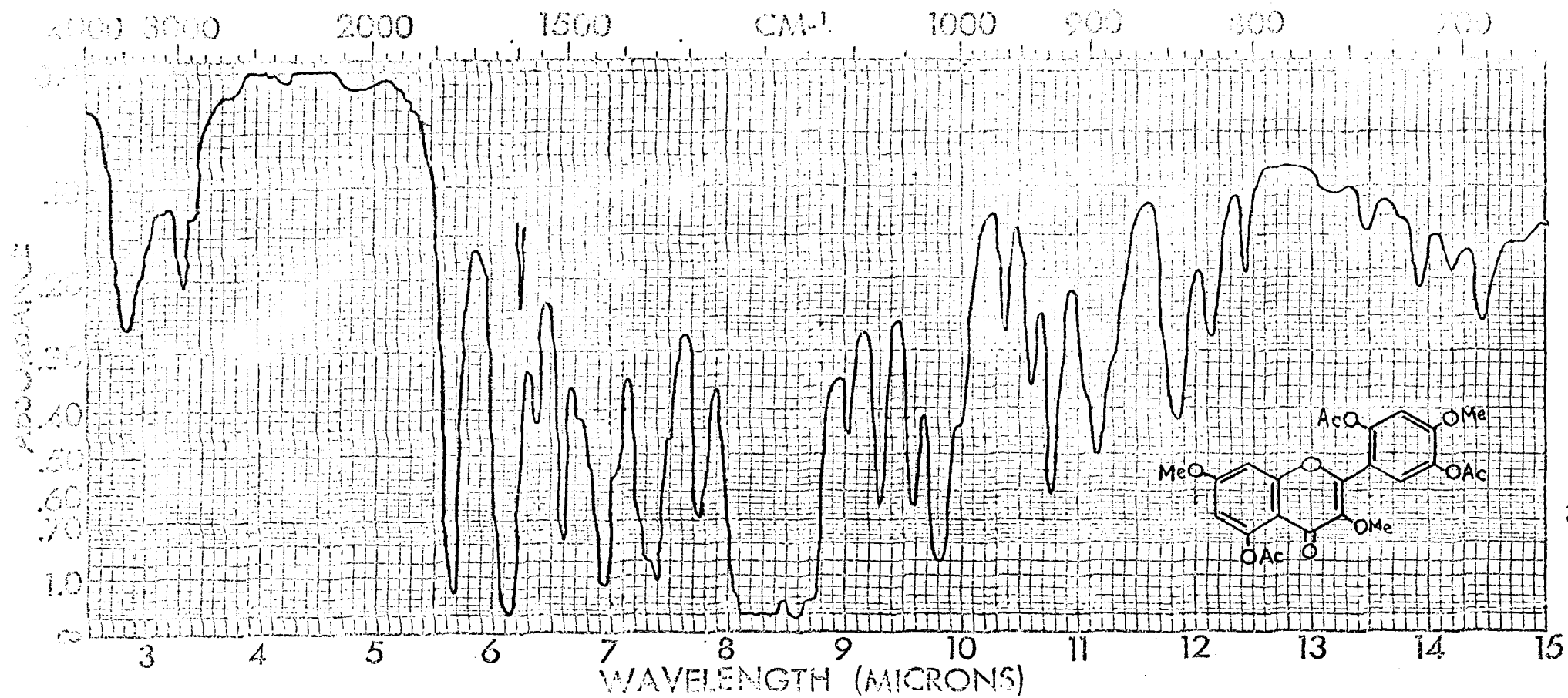
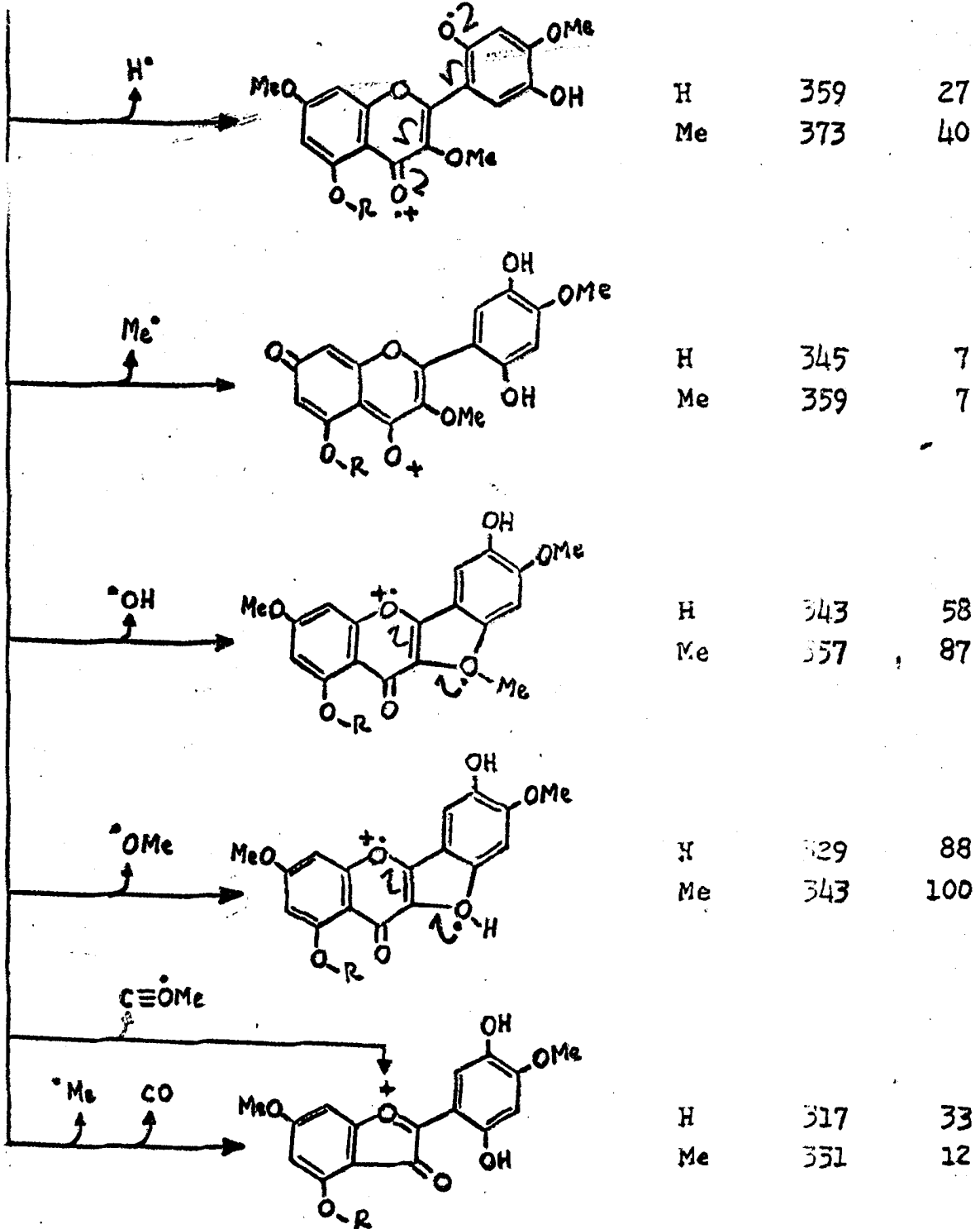
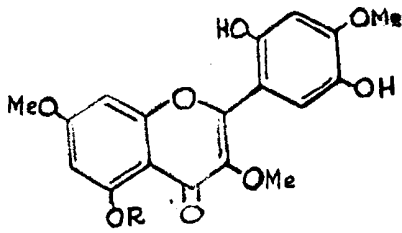


Figura 48.

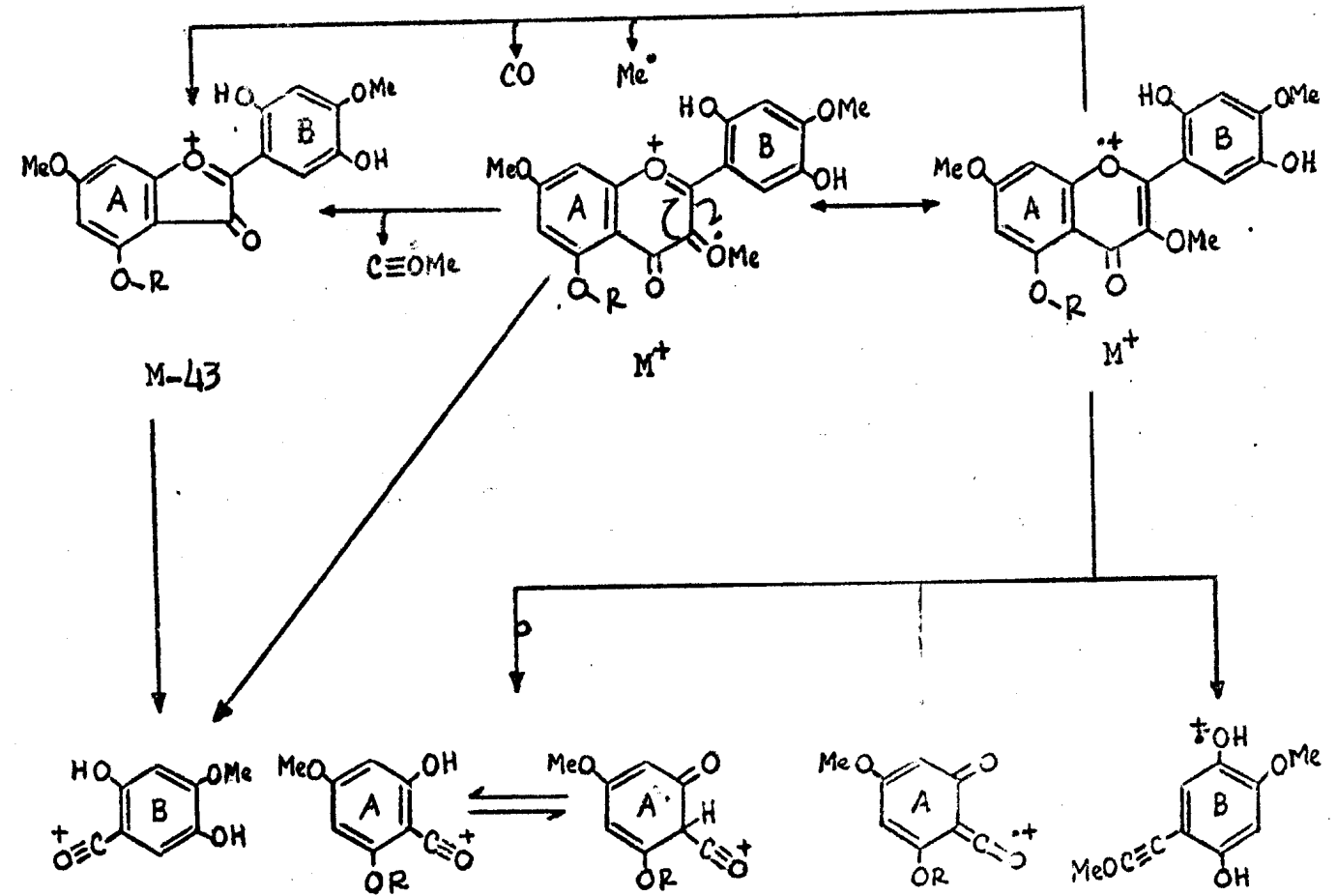
Espectro i.v. da 2',5,5'-tri-O-acetiloxiaianina A (AL-12Ac) = 2',5,5'-triacetoxi-3,4',7'-trimetoxiflavona.

Fase: KBr



Quadro 37.

Caminhos principais de fragmentação da 2',5,5'-trihidroxidoxi-3,4',7-trimetoxiflavona (AL-12) e 2',5'-dihidroxi-3,4',5,7-tetrametoxiflavona (AL-15) no espectrômetro de massa.

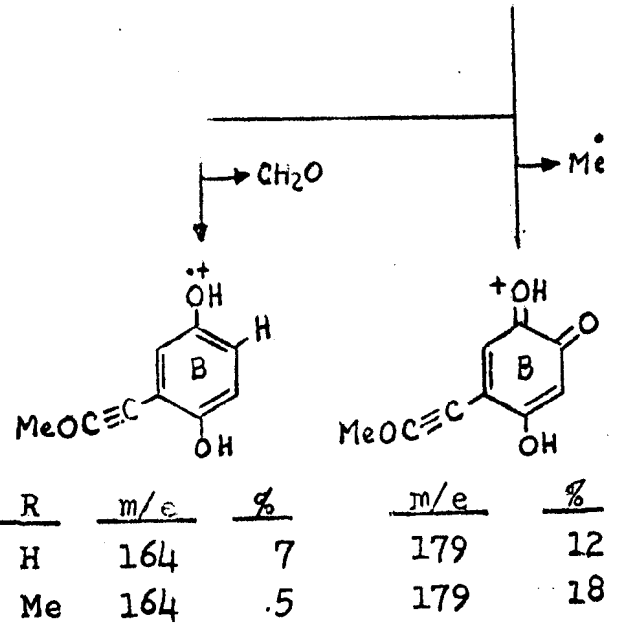


R	m/e	%
H	167	26
Me	167	13

m/e	%
167	26
181	25

m/e	%
166	17
180	4

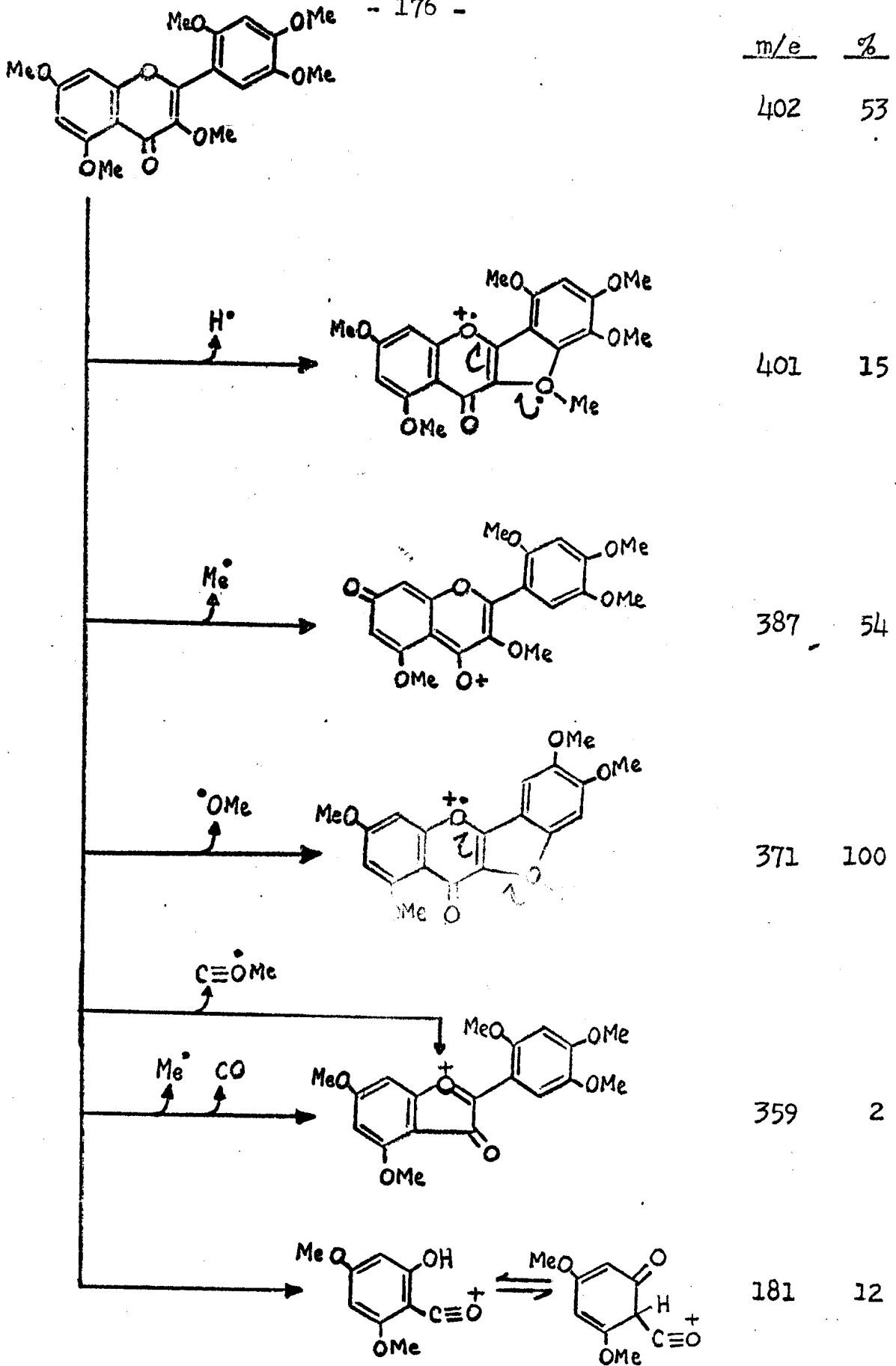
m/e	%
194	7
194	7



R	m/e	%
H	164	7
Me	164	5

m/e	%
179	12
179	18

Quadro 37. Continuação.



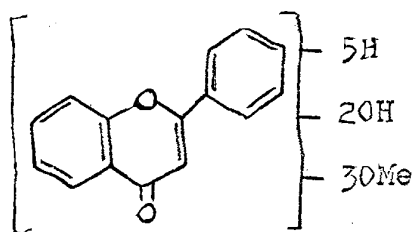
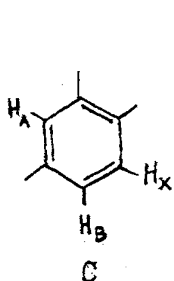
Quadro 38. Caminhos principais de fragmentação da 2',3,4',5,5',7-hexametoxiflavona (AL-12Me=AL-15Me) no espectrômetro de massa.

AL-18.

Espectrometria no u.v. (Fig. 49), no i.v. (Fig. 50), de r.m.n. (Fig. 51) e de massa (Fig. 52; Quadro 40) serviram para classificar esta substância como flavonoide.

O espectro de r.m.n. revelou a presença de 2 sinais simples representando 3 grupos metoxila, duas bandas duplas representando um sistema AB correspondente aos protons em C-6 e C-8 ($J=2\text{Hz}$), 1 banda dupla ($J=9\text{Hz}$) representando 1 proton acoplado com outro em orto, 1 banda dupla ($J=2\text{Hz}$) representando 1 proton acoplado com outro em meta, uma banda quadrupla ($J=9,0$ e $J=2\text{Hz}$) representando 1 proton acoplado com protons em orto e meta, caracterizando-se assim um sistema ABX (C), e mais dois outros sinais simples atribuídos a 2 grupos hidroxila (Tabela 35).

O espectro de massa (Fig. 52, Quadro 40) revelou peso molecular 344, confirmando, assim, a natureza flavonoide de substância (CI).



CI

Tabela 35.

Espectros de r.m.n. da AL-18 e AL-12. Solvente CDCl_3 . Deslocamentos químicos em unidades τ .

Substância	OH	H-6	H-8	H-2'	H-3'	H-5'	H-6'	OMe
AL-12	-2,35	3,63	3,56	-	3,41	-	2,73	6,10
	2,14	d	d					6,17
	4,72	J=2,0	J=2,0					6,17
AL-18	-2,86	3,68	3,56	2,32	-	3,02	2,27	6,02
	4,22	d	d	d		d	dd	6,12
		J=2,0	J=2,0	J=2,0		J=9,0	J=2,0	6,12
							J=9,0	

A localização de um grupo OH no átomo de carbono 5 é indicada pela presença de um sinal em corpo baixo (-2,86 τ) no espectro de r.m.n. (Fig. 51, Tabela 35), pela posição de absorção do grupo carbonila no espectro i.v. (1656 cm^{-1} , Fig. 50) e pela alteração dos espectros u.v. com adição de tricloreto de alumínio (Tabela 36).

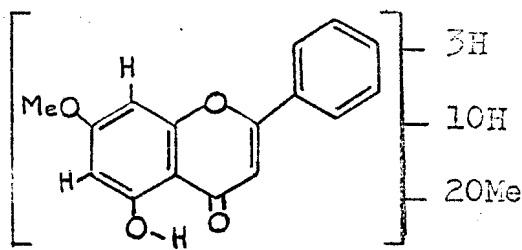
O anel A deve sustentar mais uma função oxigenada na posição 7, já que o espectro de r.m.n. revelou sinais duplos ($J=2\text{Hz}$) correspondentes aos protons em C-6 e C-8, que assim devem manter relação meta entre si. Já que o espectro u.v. não revela modificação pela adição de acetato de sódio, deduz-se que o grupo OH restante não ocupa a posição 7 e/ou 4' [4]. Conseqüentemente, o átomo de carbono 7 sustenta um

Tabela 36.

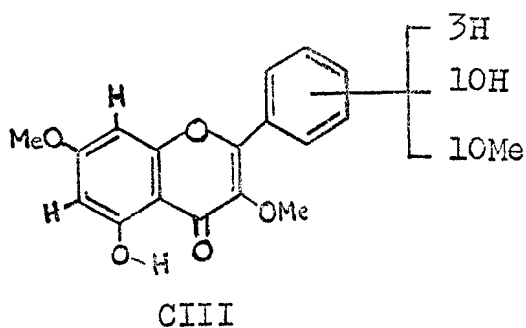
Espectros u.v. da AL-10 em meio neutro e com aditivos.

Aditivos	λ_{max} EtOH	λ_{max} EtOH	λ_{max} EtOH	λ_{max} EtOH	λ_{max} EtOH
-	255 8.500	265 7.000	295 3.650	353 7.550	-
NaOH	270 10.100	290 4.300	380 4.950	-	-
NaOH+HCl	255 8.650	265 7.250	295 3.650	353 7.400	-
AcONa	255 8.500	265 7.000	295 3.650	353 7.550	-
AcONa+H ₃ BO ₃	255 8.500	265 7.000	295 3.650	353 7.550	-
AlCl ₃	265 7.650	275 7.350	295 3.900	353 5.700	393 5.700

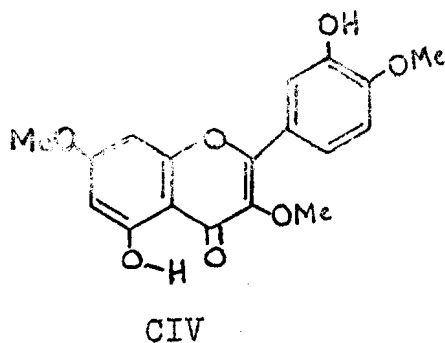
grupo metoxila e define-se o anel A como 5-hidroxi-7-metoxi (CII);
dêntido àquele da AL-12 (Tabela 35).



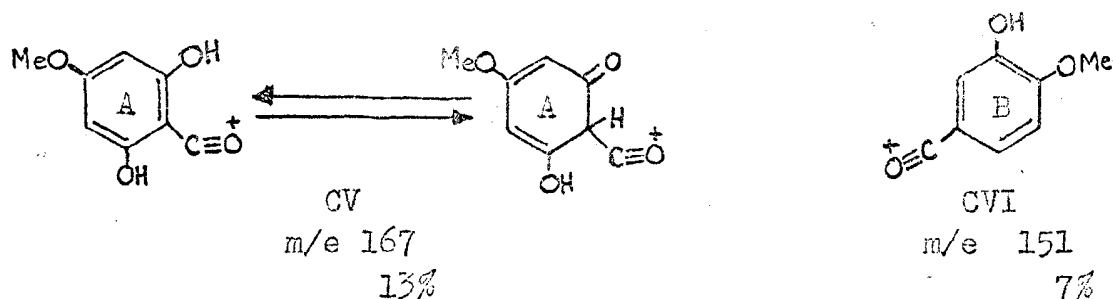
A ausência de sinal simples em torno de $3,40 \tau$ no espectro de r.m.n. (Fig. 51, Tabela 35) indicou que a posição 3 contém substituinte [24], grupo OH ou OMe. A posição de absorção correspondente ao proton hidroxílico restante ($4,22 \tau$) impossibilita a presença de grupo OH nesta posição. Evidência adicional da presença de OMe em 3 é obtida do espectro de massa devido ao pico que aparece em m/e correspondente a M-43 (Fig. 52, Quadro 40). Assim, surge a formulação parcial. CIII.



Os 3 protons aromáticos do anel B compõem um sistema ABX(C). Os deslocamentos químicos e os valores das constantes de acoplamentos são compatíveis apenas com protons localizados nas posições 2',5',6'. Conseqüentemente, o grupo OH e OMe devem ocupar as posições 3',4'. Localizou-se o grupo OMe em 4', em vista da inalteração da espectro u.v. com adição de acetato de sódio (Tabela 36). Em face disto, pôde-se propôr a estrutura CIV para a AL-18.



A análise do espectro de massa corrobora esta proposição estrutural (quadro 40). Os picos em m/e 167 e em m/e 151 unidades de massa estão em acôrdo com a presença de um grupo OH e um grupo OMe tanto no anel A (CV) como no anel B (CVI).



A comparação dos espectros de massa da substância AL-18 com as descritas anteriormente demonstra a influência de substituintes em 2'. Assim, os picos em M-17 e M-31 apresentam abundância relativa muito menor na AL-18 (CIV) do que nas apuleínas e oxiaianinas A.

A estrutura da 3',5-dihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona atribuída à AL-18 foi descrita para a aianina, constituinte de Distemonanthus benthamianus [69]. Comparação direta com amostra autêntica gentilmente cedida por T.J.King, demonstrou a identidade das duas substâncias naturais.

Finalmente, resta considerar que o processo de separação da oxiaianina A e da aianina descrito por King, King e Sellars [69] envolveu tratamento alcalino que, ao que se sabe agora, promove a destruição muito rápida da oxiaianina A. Verificou-se que cromatografia em sílica constitui método de separação mais eficaz.

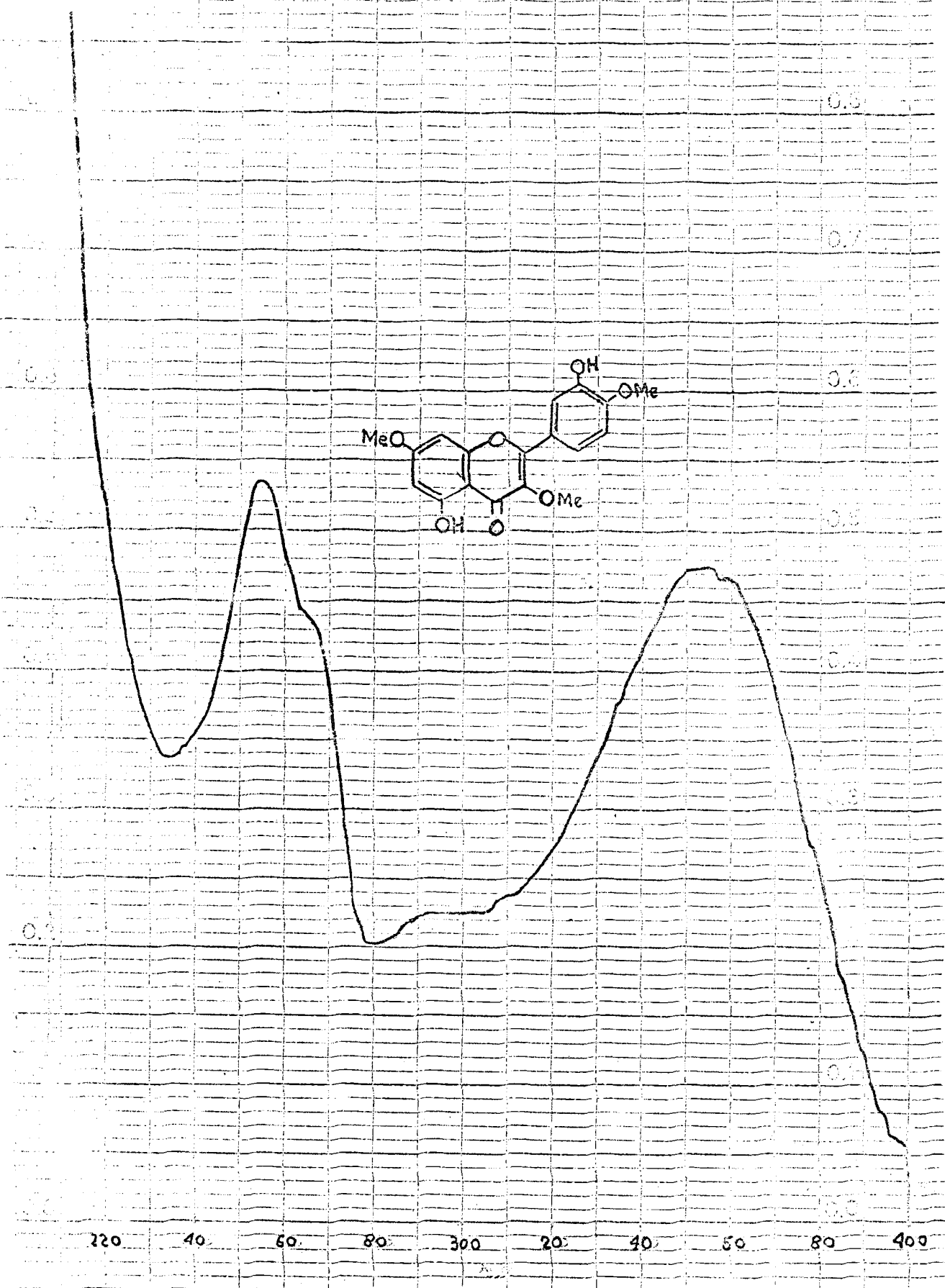


Figura 49.

Espectro u.v. da alanina (AL-18) = 3',5-dihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona.

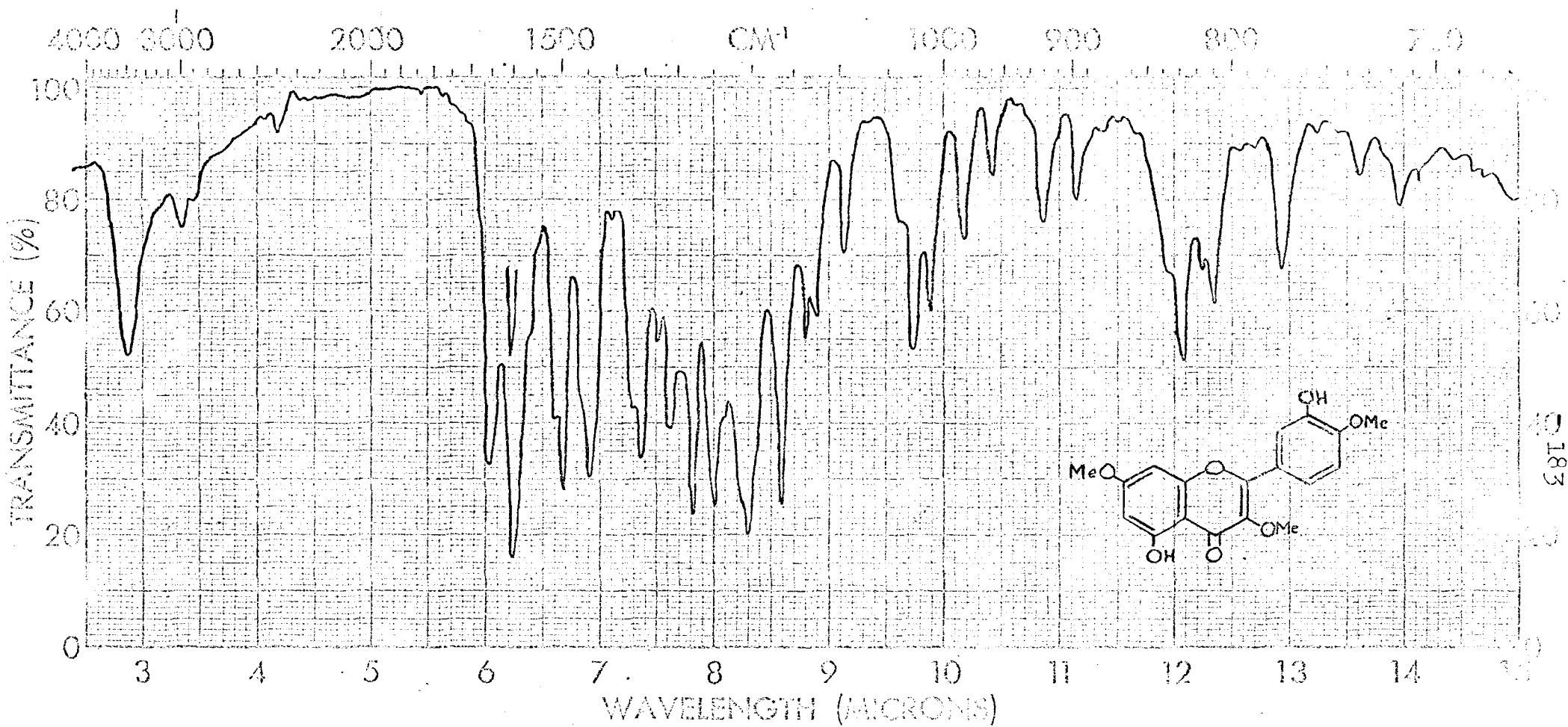
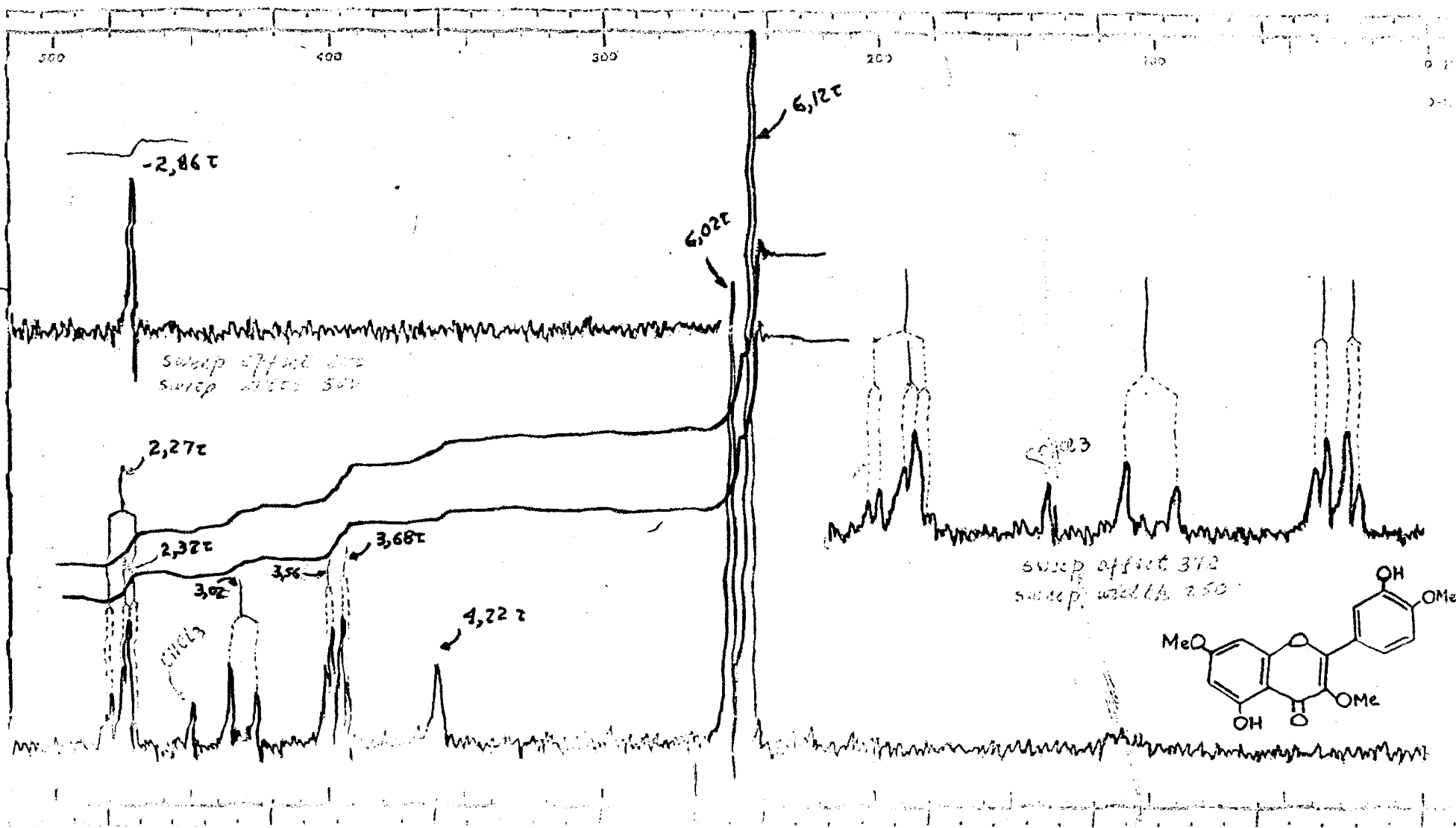


Figura 50.

Espectro i.v. da aianina (AL-18) = 3',5-dihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona.

Fase: KBr



181

Figura 51.

Espectro de r.m.n. da aianina (AL-18) = 3',5-dihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona.

Solvente: CDCl₃

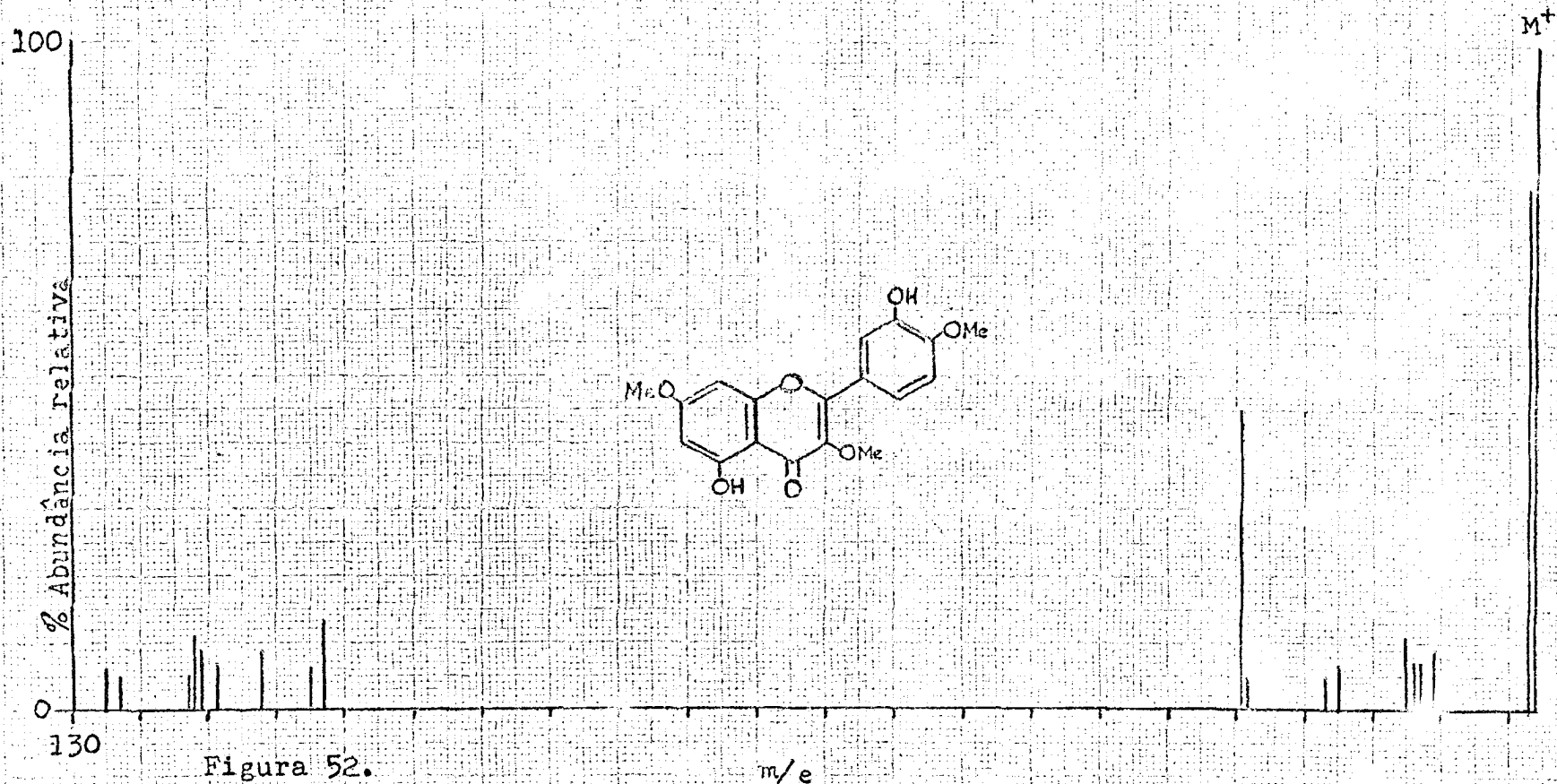
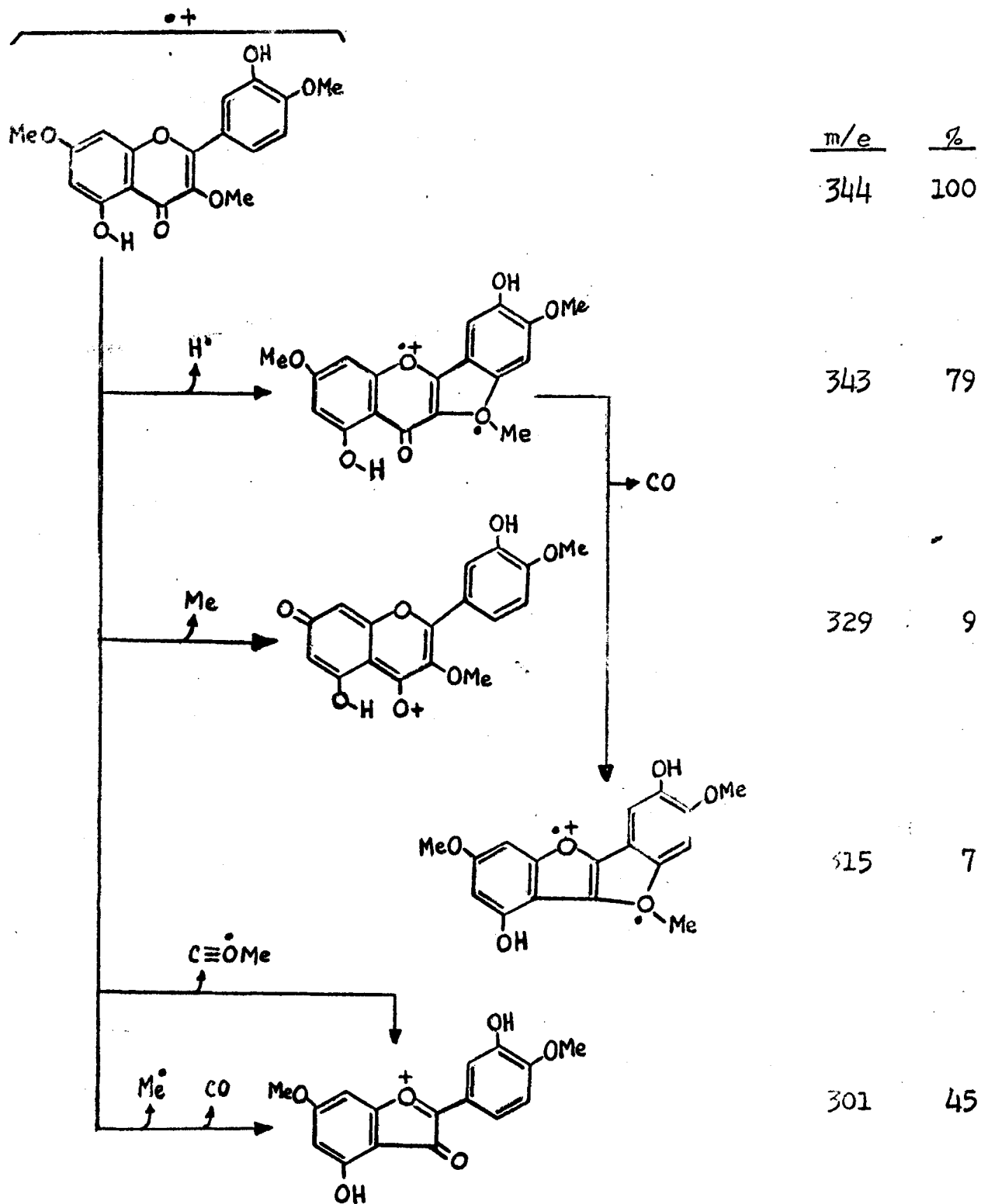


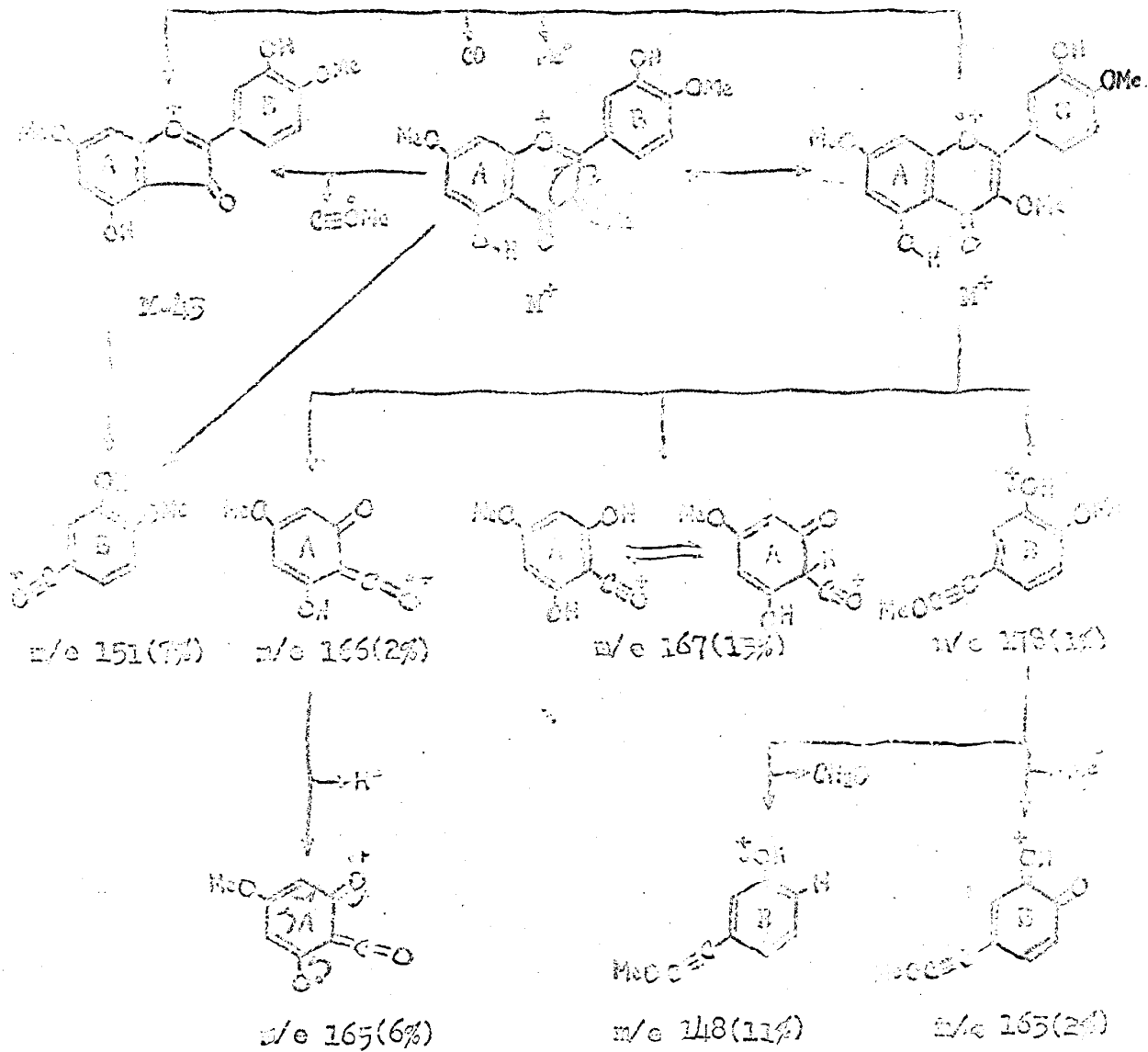
Figura 52.

Espectro de massa da aianina (AL-18) = 3',5-dihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona.



Quadro 40.

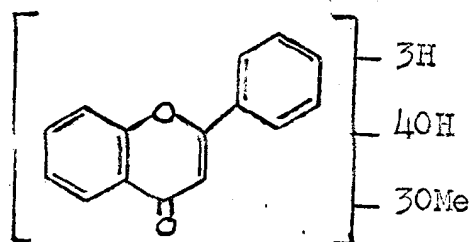
Caminhos principais de fragmentação da aianina (AL-18)=3',5-dihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona.



Quadro 40. Continuação.

AL-14.

A classificação desta substância entre as flavonas se deve aos espectros no i.v. (Fig. 53), no u.v. (Fig. 54), de r.m.n. (Fig. 55, Tabela 37) e de massa (Fig. 56, Quadro 41). Trata-se, de acordo com os espectros de massa e de r.m.n. de uma tetrahidroxi-trimetoxi-flavona (CVIII). A confirmação insofismável da existência de 4 grupos OH resulta da comparação dos espectros de r.m.n. da substância original com o do seu acetato (AL-14Ac; Fig. 57, Tabela 37) e do seu éter metílico (AL-14Me, Fig. 58, Tabela 37), constatando-se o desaparecimento dos sinais em $-2,24$; $2,02$, $4,16$ e $4,56 \tau$ nos espectros dos derivados. Além disto, o espectro de massa do derivado metilado revela a peso molecular M^+432 (Fig. 59, Quadro 42).



CVIII

Os argumentos relacionados abaixo caracterizam a existência de um grupo OH no carbono 5 do isolado natural:

a. alteração do espectro u.v. pela a adição de tricloreto de alumínio (Tabela 38). Comportamento análogo é observado nos espectros u.v. do derivado tri-O-metilado (Tabela 38).

b. posição de absorção da banda correspondente ao estiramento carbonílico, 1667 cm^{-1} (Fig. 53). O espectro do derivado tetrametílico (Fig. 60) revela tal absorção em 1641 cm^{-1} , e o espectro do tetracetato (Fig. 61) em 1634 cm^{-1} , como esperado.

Tabela 37.

Espectros de r.m.n. da AL-14 e seus derivados. Solvente CDCl_3 . Deslocamentos químicos em unidades τ .

Substância	OH	H-8	H-5'	H-6'	OMe	OCOCH ₃
AL-14	-2,24 2,02 4,16 4,56	3,42	3,26 d J=8,4	2,76 d J=8,4	6,00 6,00 6,09	-
AL-14Me	-	3,33	3,23 d J=8,4	2,86 d J=8,4	5,97 6,06 6,06 6,06 6,06 6,23	-
AL-14Ac	-	3,20	2,98 d J=8,6	2,47 d J=8,6	6,09 6,09 6,35	7,53 7,65 7,68 7,76
AL-14-tri-O-Me	-2,72	3,52	3,19 d J=8,5	2,79 d J=8,5	6,05 6,05 6,05 6,05 6,20	-
AL-tri-O-MeAc	-	3,18	3,20 d J=8,5	2,82 d J=8,5	6,05 6,05 6,05 6,12 6,28	7,48
AL-14DFM	-2,53 4,52	3,42	3,28 d J=9,0	2,10 a 2,76	5,90 5,90 6,10	-

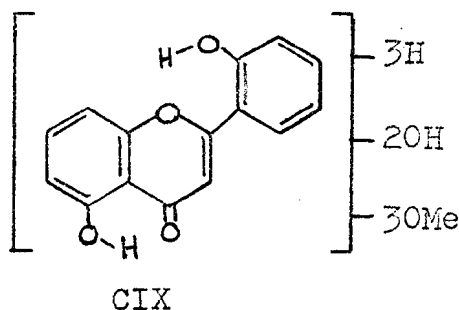
c. comparecimento de sinal em campo baixo (-2,24 τ) no espectro de r.m.n. (Fig. 55, Tabela 37). No espectro do acetato ocorre o sinal correspondente ao grupamento CH_3 de cetoxila localizado em C-5 (Fig. 57, Tabela 37), aparece em 7,53 τ como esperado.

Tabela 38.

Espectros u.v. de AL-14 e seu derivado trimetilado, em meio neutro e com aditivos.

Aditivos	AL-14			AL-14-Tri-O-Me		
	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH
-	237 56.600	272 21.600	328 19.750	234 22.300	261 20.050	310 14.750
H ₂ O	dec.	dec.		276 24.700	370 5.400	
NaOH+HCl	irrev.	irrev.		234 20.600	261 18.550	312 13.250
AcONa	237 25.600	272 20.200	332 14.100	234 22.300	261 20.050	312 14.750
AcONa+H ₃ BO ₃	240 25.850	277 23.950	335 21.600	234 22.300	261 20.050	310 14.750
AlCl ₃	242 26.000	280 18.750	385 24.200	272 18.100	295 10.800	338 13.250
AlCl+HCl	270 20.950	282 18.750	350 18.750	272 17.650	295i 11.500	330 13.100

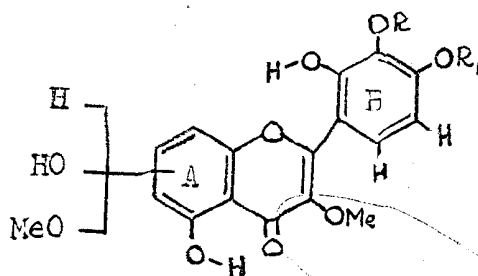
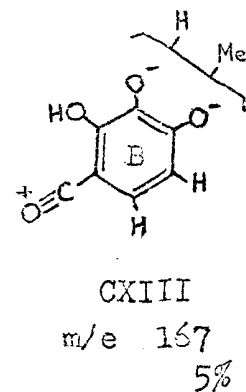
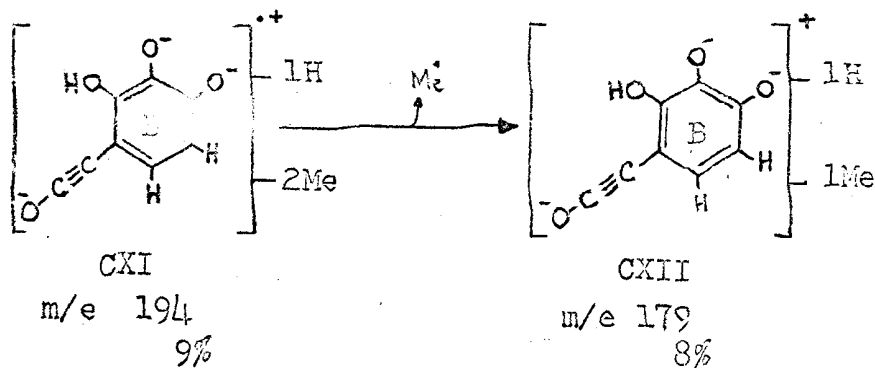
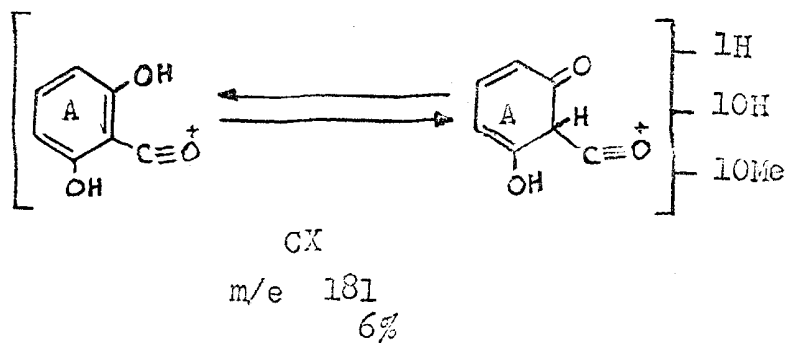
O sinal em 2,02 τ correspondente a próton hidroxílico que aparece no espectro de r.m.n. (Fig. 55) permitiu localizar mais um grupo OH agora na posição 2', já que as 2'-hidroxiflavonas descritas ostentam esta feição espectral. Assim, surgiu a formulação parcial CIX.



Uma mesma constante de acoplamento ($J=8,4\text{Hz}$) para as duas bandas duplas que aparecem no espectro da r.m.n. (Fig. 55) em 2,76 e 3,26 τ indicou que os prótons correspondentes interagem entre si e mantêm relação orto. Os valores destes deslocamentos químicos e razões biogenéticas permitiram formular a hipótese de tais prótons ocuparem as posições 6' e 5' sendo, conseqüentemente, o anel B 2',3',4'-trioxigenado.

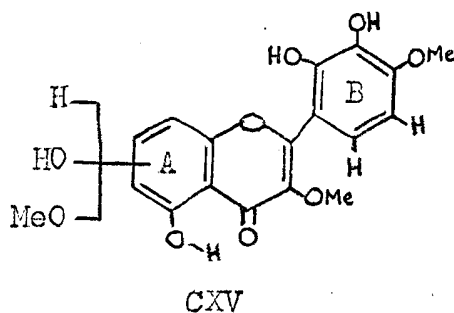
A análise do espectro de massa (Fig. 56, Quadro 41) neste ponto serviu para distribuição das funções oxigenadas nos anéis A e B. Assim, a presença de picos em m/e 194, 181, 179 e 167 está em acôrdo com a existência de 2 grupos OH e um grupo OMe no anel A e dois grupos OH e dois grupos OMe no anel B e/ou anel heterocíclico. O pico em m/e 181 (6%) pode ser atribuído ao fragmento CX, enquanto os picos em 194, 179 e 167 podem devido a fragmentos do anel B representados respectivamente pelas estruturas CXI, CXII e CXIII.

Já que os dois outros sinais representantes de prótons hidroxílicos registrados no espectro de r.m.n. (Tabela 37) estão em desacôrdo com existência de grupo OH na posição 3, conforme critério já considerado, resta a possibilidade de tal posição sustentar um grupo OMe. A presença de pico em M-43 no espectro de massa apoia esta dedução. Com estas informações foi possível atingir-se a formulação parcial CXIV.



Inalteração do espectro u.v. pela adição de acetato de sódio (Tabela 38) sugere a ausência de grupo OH em 7 e/ou 4' [4]. Conseqüentemente, tais posições devem ser ocupadas por grupos metoxila. Evidência adicional da existência de um sistema orto-diOH no anel B se deduziu da alteração do espectro u.v. por adição de acetato de sódio + ácido bórico [4] e do deslocamento hipsocrômico (35nm) da banda que aparece em maior comprimento de onda (banda I no espectro u.v.) em presença de tricloreto de alumínio mais ácido clorídrico quando comparado com o espectro obtido com adição somente de tricloreto de alumínio (Tabela 38) [5]. Mabry e colaboradores atribuem este deslocamento provocado pelo ácido clorídrico à decomposição de complexos de alumínio que envolvem sistemas orto-diOH. O valor do deslocamento hipsocrômico, quando o sistema orto-diOH encontra-se no anel B, oscila em torno de 30-40 nm. Entretanto, os complexos que envolvem o grupamento C=O e grupo OH em 5 e/ou 3 não são afetados pela adição de ácido clorídrico [5].

É lícito, portanto, definir a oxigenação do anel B como 2',3'-dihidroxi-4'-metoxi (CXV).



O espectro de massa (Fig. 56, Quadro 41) revela picos significativos em M-17 e M-31. Estes picos estão em acôrdo com a existên-

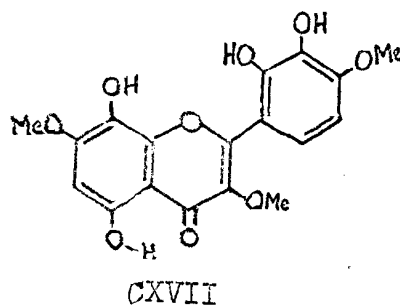
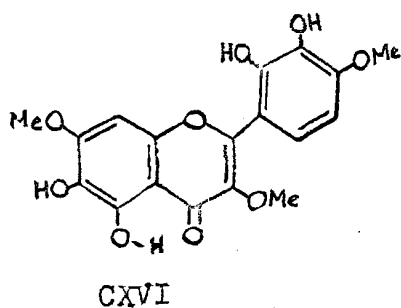
cia de um grupo OH em 2' e OMe em 3, comportando-se, portanto, a AL-14 de maneira análoga às apuleínas e oxiaianinas.

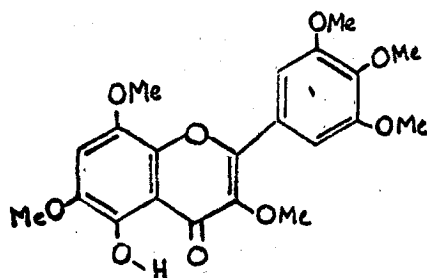
Os deslocamentos paramagnéticos verificados nos sinais correspondentes aos prótons 5',6' ao se passar do espectro de r.m.n. da AL-14 para o de seu tetracetato (Fig. 57, Tabela 37), -0,28 e -0,29 τ respectivamente, forneceram suporte adicional para o padrão de oxigenação atribuído ao anel B. Tal comportamento é atribuído a prótons que mantêm relação orto e/ou para a grupos OH [25].

Neste ponto, restava definir o padrão de oxigenação do anel A. Razões biogenéticas e inalteração do espectro u.v. com acetato de sódio foram utilizados para localizar o grupo OMe na posição 7. Diante disto, o grupo OH restante pode ocupar a posição 6 ou 8. Conseqüentemente, 2 possibilidades estruturais podem ser formuladas para a AL-14, CXVI e CXVII.

A instabilidade da substância em meio alcalino (Tabela 38) está em acôrdo com qualquer uma destas proposições.

Cogitou-se também da possibilidade de um anel A 5,6,8-trioxi genadas mesmo que a literatura registre um único exemplo de tal sistema. Trata-se da gardenina (CXVIII) constituinte de planta [70] e que teve sua estrutura comprovada definitivamente por síntese [71].





CXVIII

Entretanto, a ausência de função oxigenada na posição 7 da AI-14, ou seja o anel A 5,6,8-trioxigenado, é pouco provável. E o que será demonstrado a seguir tomando como base a posição de absorção dos prótons do carbono 7 da zapotinina (XIV) e zapotina (XV) [25, 30], em CDCl_3 .

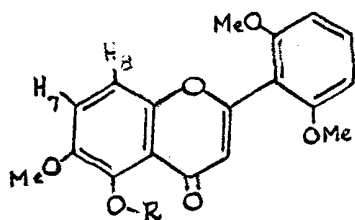
Duas razões fundamentais levaram-nos a admitir que os valores menores (2,74 e 2,71 τ) sejam atribuíveis aos prótons ligados aos carbonos 7:

a. a posição 7 é conjugada com um grupo carbonila, resultando daí uma desproteção desta posição em vista, principalmente, do efeito mesomérico (Quadro 43).

b. o comportamento do próton em C-8 em relação à presença de grupo OH ou OMe no carbono 5, embora não se tratando de um sistema 5,6,7-trioxigenado [25]. O H-8 em uma 5,6,7-trimetoxi-flavona absorve em torno de 3,23 τ , enquanto em uma 5-hidroxi-6,7-dimetoxi-flavona a absorção esperada ocorre em torno de 3,49 τ . Tal comportamento foi útil na determinação estrutural da apuleína (H-8, 3,23 τ).

Quadro 43.

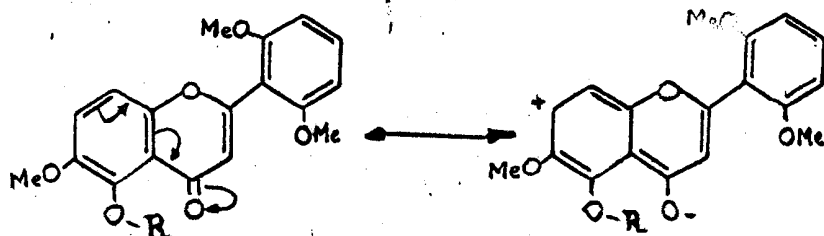
Posição de absorção do próton em C-7 e do próton C-8 nos espectros de r.m.n. da zapotina (XIV) da zapotina (XV).



XIV, R=H

XV, R=Me

R	H-7	H-8	Ref.
H	2,74	3,11	29
Me	2,71	2,81	30



e 5-O-desmetilapuleína (H-8, 3,47 τ). Portanto, a metilação de 5-OH em tal sistema provoca um deslocamento do H-8 de cerca de 0,21-0,26 τ . Em face disto, parece lícito atribuir a uma banda espectral que osten-

ta comportamento análogo correspondência com o H-8 em sistema 5,6-dioxi^genado. Comparação dos valores correspondentes na zapotina e zapotina demonstra um deslocamento paramagnética de $0,30 \tau$.

A dar crédito a estas conclusões, também a AL-14 possui um próton em C-8, pois ao metilá-la uma das bandas da região aromática do espectro de r.m.n. se desloca de $3,42$ a $3,33 \tau$.

Voltemos mais uma vez à hipótese da oxigenação 5,6,8 para a AL-14.

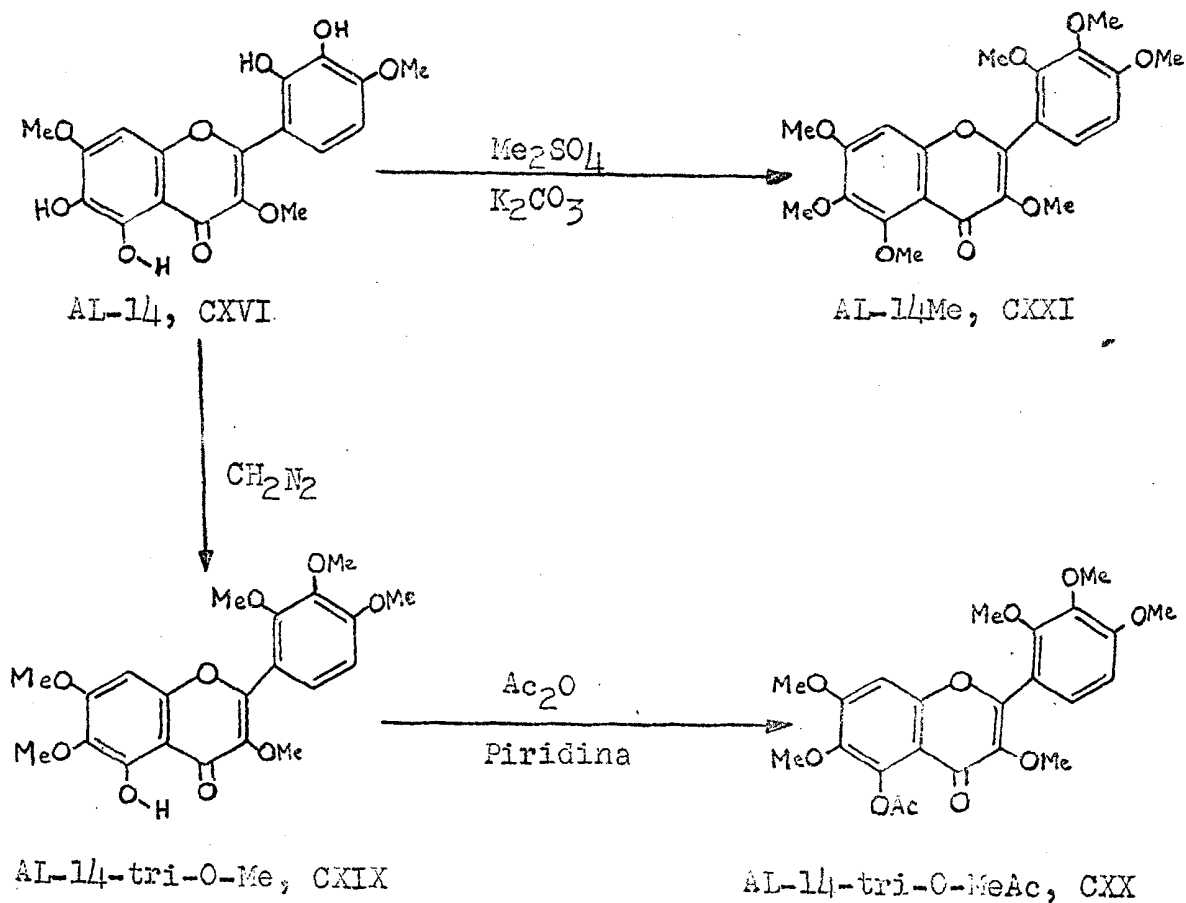
O próton em C-7 da zapotina (XII) dá lugar a um sinal em $2,74 \tau$. Um derivado hipotético desta substância que suportasse uma metoxila em C-8 deveria, por isto, segundo Ballantine e Pillinger [27], ostentar este sinal em $2,74 + 0,45 = 3,19 \tau$. Ora, este valor é significativamente inferior ao valor $3,42 \tau$ observado para o próton do anel A da AL-14. Este isolado natural, por isto, não sustenta próton em C-7. Aliás, os espectros de r.m.n. da AL-14 e do seu tetracetato (Tabela 37) revelam que o sinal em $3,42 \tau$ que aparece no espectro da substância original desloca-se para $3,20 \tau$ no espectro do acetato. Este deslocamento paramagnético de $0,22 \tau$ indica que o próton correspondente ocupa posição orto ou para em relação a um grupo OH. Já que a presença de um grupo OH em 5 é indiscutível, a possibilidade de existência de grupo OH em 7 fica fora de cogitações definitivamente. Além disto, tal próton também não pode ocupar a posição 3, reforçando-se assim a localização correta de um grupo OMe nesta posição.

Para decidir definitivamente entre as duas possibilidades, correu-se à preparação de derivados. Assim preparou-se o derivado trimetilado utilizando diazometano (CXIX). Acetilação subsequente dê

te derivado com piridina-anidrido acético levou ao acetato CXX. O derivado tetrametilado da AL-14 (CXVI) foi obtido por reação com sulfato de dimetila. Estas reações estão resumidas no Quadro 44.

Quadro 44.

Transformações químicas com a AL-14.



A existência de grupo OH na posição 5 do derivado obtido por tratamento com diazometano (CXIX) e, por conseguinte, também na AL-14, foi deduzida das observações seguintes:

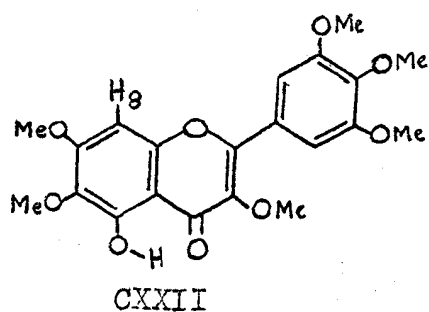
a. alteração do espectro u.v. por adição de tricloreto de alumínio (Tabela 38).

b. absorção da banda correspondente ao estiramento carbonílico (1650 cm^{-1}) no seu espectro i.v. (Fig. 62). Já o espectro do pro-

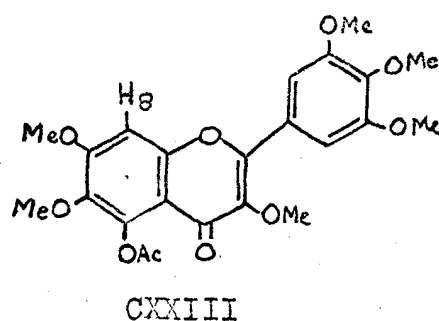
duto acetilado revela a absorção da carbonila pirônica em 1635 cm^{-1} , como previsto (Fig. 63).

c. sinal em campo baixo ($-2,72\tau$, Tabela 37) no espectro de r.m.n. (Fig. 64). O sinal em $7,48$ no espectro do seu acetato (Fig. 65) localiza o grupo acetoxila correspondente no carbono 5 do esqueleto fundamental.

O espectro de r.m.n. (Fig. 64, Tabela 37) deste derivado trimetilado (CXXIX) registra um sinal simples em $3,52\tau$ em completo acôrdo com o esperado para H-8. Já o espectro do derivado tetrametilado (CXXI, Fig. 58, Tabela 37), revela o sinal correspondente em $3,33\tau$. Tal comportamento é atribuído a próton localizado em C-8 e não em C-6 [25], conforme já tivemos oportunidade de fazer referências. Além disto, este sinal é deslocado para $3,18\tau$ no espectro do derivado trimetil-monoacetilado (CXX, Fig. 65, Tabela 37). Henrick e Jefferies [25] registram os espectros das substâncias CXXII e CXXIII, mostrando a banda referente ao H-8 nestas substâncias em completa analogia de comportamento com a banda atribuível a H-8 da AL-14 e seus derivados.



H-8: $3,49\tau$



H-8: $3,14\tau$

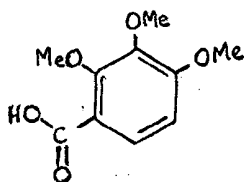
$\Delta\tau = 0,35$

Diante de tôdas estas evidências, a possibilidade CXVII foi afastada do campo das hipóteses. Conseqüentemente, resta a estrutura CXVI como mais provável para a AL-14. Aliás um ensaio de Gibbs modificado [62] característico para orto-diOH reforça esta dedução (Fig. 66).

A hidrólise alcalina do derivado tetrametílico (CXXI) levou a mistura da qual se separou ácido carboxílico e fenol por solubilização, respectivamente, em bicarbonato e em hidróxido de sódio aquosos.

O espectro de r.m.n. (CCl_4) do constituinte fenólico revelou absorções em 3,76 τ (H), 5,44 τ ($-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{O}$), 5,90 τ (OMe), 6,03 τ (OMe), 6,21 τ (OMe) e 6,48 τ (OMe) compatíveis com a estrutura de 6'-hidroxi-2,2',3',4'-tetrametoxiacetofenona (LXXXIII). De fato, o espectro de r.m.n. de amostra autêntica desta substância revelou coincidência de todos os sinais. Cromatografia em camada delgada de sílica também evidenciou identidade entre as duas substâncias.

O ácido carboxílico teve sua estrutura elucidada através de seus espectros no i.v. (Fig. 67), de r.m.n. (Fig. 68) e o p.f. 99-100,5^o C, como ácido 2,3,4-trimetoxibenzoico (CXXIV). A literatura [72] registra para êste o p.f. 100^oC, enquanto o ácido 2,3,6-trimetoxibenzoico tem p.f. 146^oC [73].

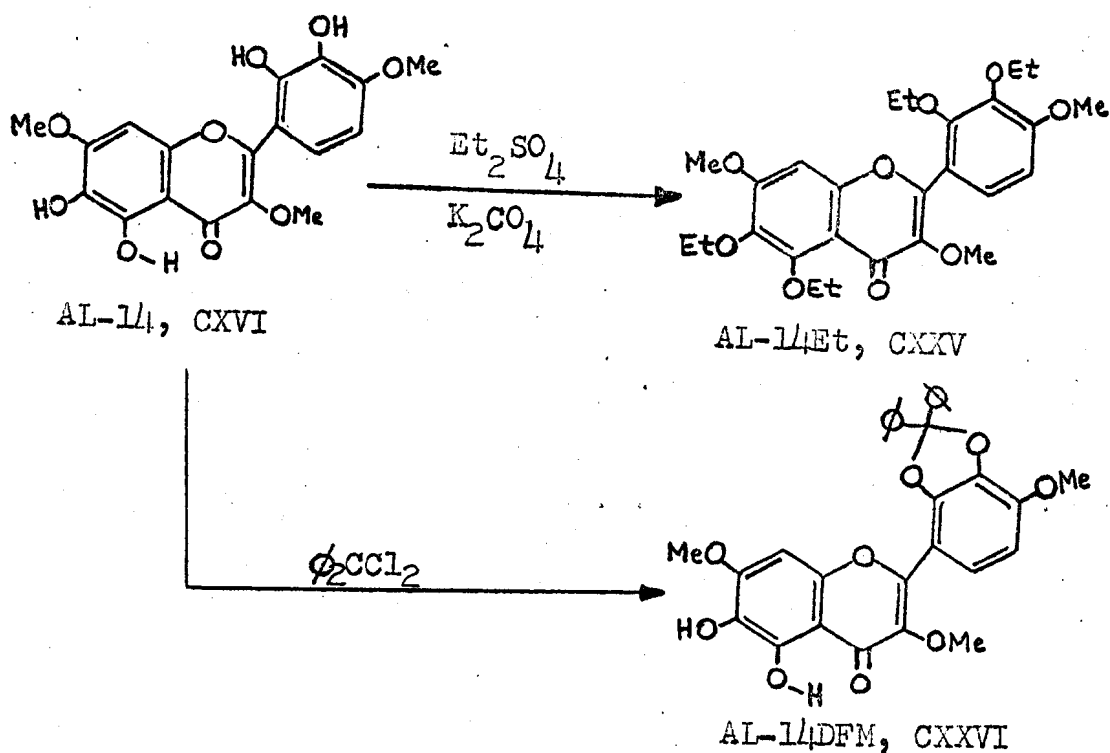


CXXIV

Todos êstes resultados permitiram comprovar o padrão de substituição da AL-14 e seus derivados. Restava confirmar a presença de 2 grupos OH no anel A e 2 no anel B e as suas posições relativas. Com êstes objetivos em mente preparou-se o éter tetraetílico (CXXV, i.v. Fig. 69) afim de degradá-lo por hidrólise alcalina. Submeteu-se a substância AL-14 também a tratamento com diclorodifenilmetano obtendo-se, assim, o derivado 2',3',4'-difenilmetil (CXXVI). O Quadro 45 resume estas operações.

Quadro 45.

Transformações químicas com a AL-14.



O espectro de r.m.n. (Fig. 70) do ácido carboxílico, isolado da mistura de degradação alcalina do éter tetraetílico (AL-14Et), por extração com solução aquosa de bicarbonato de sódio, apresentou sinais plenamente compatíveis com a estrutura do ácido 2,3-dietoxi-4-metoxibenzóico (CXXVII), Tabela 39.

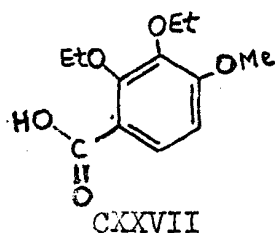


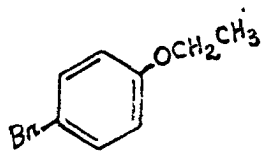
Tabela 39.

Espectro de r.m.n. do ácido 2,3-dietoxi-4-metoxibenzoico.

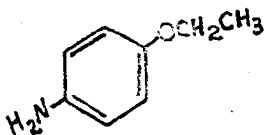
H-6	H-5	2-OCH ₂	3-OCH ₂	4-OMe	2-CH ₃	3-CH ₃	COOH
2,12	3,22	5,58	5,94	6,12	8,56	8,64	indet.
d	d	q	q	s	t	t	
J=9,4Hz	J=9,4Hz	J=6,9Hz	J=6,9Hz		J=6,9Hz	J=6,9Hz	

Este espectro de r.m.n. não só revela indiretamente a existência de 2 grupos OH no anel B da AL-114 (CXVI) mas também confirma a presença de um destes grupos na posição 2', já que o quarteto representando os prótons metilênicos de um dos grupos -OCH₂- apareceu em campo relativamente baixo em face do efeito anisotrópico do grupo carbonila do COOH. Como esperado, p-bromofenetol (CXXVIII), p-fenetidina (CXXIX) e 7-etoxi-4-metilcumarina (CXXX) apresentam a absorção correspondente ao grupo -OCH₂- em campo relativamente alto 6,07, 6,07 e 5,92 τ, respectivamente [74].

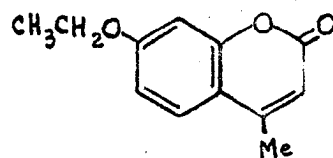
Em adendo a esta conclusão, o grupo OMe do ácido orto-metoxibenzoico absorve em 5,93τ e do ácido para-metoxibenzoico absorve em 6,12 τ [75].



CXXVIII

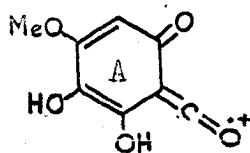


CXXIX



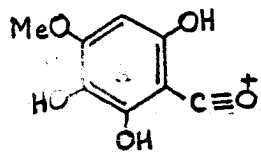
CXXX

Os espectros no u.v. em presença de tricloreto de alumínio (Tabela 40), no i.v. (Fig. 71) e de r.m.n. (Fig. 72, Tabela 37) do O,C-difenilmetileno derivado da AL-14 (AL-14DFM, CXXVI) revelam a presença de grupo OH na posição 5 desta substância, donde se conclue que o sistema orto-diOH do anel A não sofreu reação nas condições utilizadas, devido à quelação da OH em 5 e a fatores espaciais. O espectro de massa (Fig. 73, Quadro 46), revelou massa molecular 540 e confirmou que o sistema orto-diOH envolvido na reação com diclorodifenilmetano encontra-se no anel B. Assim, os picos em m/e 182, 183 e 358 devem originar-se por fragmentação tipo retro-Diels-Alder e devem corresponder aos fragmentos CXXXI, CXXXII e CXXXIII, respectivamente (Quadro 46).



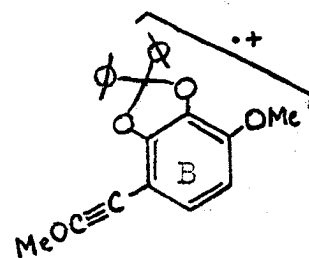
CXXXI

m/e 182
5%



CXXXII

m/e 183
5%



CXXXIII

m/e 358
16%

Este espectro ostentou picos de abundância relativamente insignificante em M-17 (4%) e M-31 (4%), em comparação com M-17

Tabela 40.

Espectros u.v. da AL-14DFM, em meio neutro com aditivos.

Aditivos	λ EtOH max	λ EtOH max	λ EtOH max
-	240 29.250	280 29.400	330 27.750
NaOH	223 51.750	255 27.380	360 17.600
NaOH+HCl	215 69.750	260 25.100	
AcONa	240 29.250	280 29.400	330 27.750
AcONa+H ₃ BO ₃	285 27.750	325 20.400	
AlCl ₃	240 30.750	295 30.450	363 31.100

Tabela 41.

Espectros da r.m.n. da AL-14.

Substância	Solvente	OH	H-8	H-5'	H-6'	OMe
AL-14	CDCl ₃	-2,24	3,42	3,26	2,76	6,00
		2,02		d	d	6,00
		4,16		J=8,4	J=8,4	6,09
		4,56				
AL-14	CD ₃ COCD ₃	-2,54	3,30	3,28	2,95	6,04
		2,00		d	d	6,10
		2,17		J=8,5	J=8,5	6,18
		2,53				
AL-14	CD ₃ SOCD ₃	-2,54	3,26	3,36	3,11	6,11
		0,94		d	d	6,13
		1,15		J=8,5	J=8,5	6,29
		1,27				

(36%) e M-31 (16%) no espectro da substância original. Tal fato corrobora a transformação do grupo 2'-OH no derivado, pois já foi visto que picos intensos em M-17 e M-31 exige a presença do sistema 2'-OH e 3'-OMe ou 2'-OMe e 3-OH.

A instabilidade deste derivado em meio alcalino (Tabela 40) e alteração do espectro u.v. em presença de $\text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3$ confirma a presença do sistema orto-diOH no anel A.

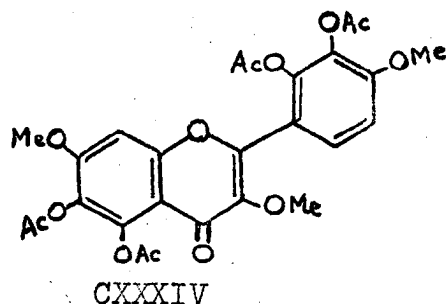
Para concluir, resta considerar o espectro de r.m.n. da AI-14 em CDCl_3 comparativamente com os espectros em CD_3COCD_3 e CD_3SOCD_3 .

O espectro obtido em hexadeuteroacetona (Fig. 74) revelou deslocamento paramagnético ($2,00 \tau$) significativo para dois sinais correspondentes a prótons hidroxílicos. Assim, os sinais que aparecem em $4,16$ e $4,56 \tau$ no espectro obtido em CDCl_3 são registrados no espectro em CD_3COCD_3 em $2,17$ e $2,53 \tau$, demonstrando interação de tais prótons com o grupo $\text{C}=\text{O}$ do solvente por ponte de hidrogênio intermolecular. Entretanto, o sinal em $2,02 \tau$ no espectro em CDCl_3 não sofre modificação significativa pela mudança de solvente. Esta observação leva a admitir que tal próton hidroxílico encontra-se em posição que não sofre ação por este solvente, constituindo-se em uma evidência adicional para a existência de ponte de hidrogênio intramolecular entre o grupo OH em 2' e o oxigênio etéreo do anel pirônico. O comportamento do OH em C-5 é racionalizável se imaginarmos que o átomo de carbono carbonílico do anel pirônico é deficiente em elétrons e como tal permite a aproximação do oxigênio carbonílico do solvente. Conseqüentemente, o oxigênio carbonílico pirônico torna-se mais rico em elétrons fortalecendo a ponte de hidrogênio quelatogênica. Resulta

dêste fenômeno uma menor blindagem eletrônica do próton da hidroxila em C-5 que se espelha no aumento em deslocamento químico da banda cor respondente no espectro de r.m.n..

O espectro em hexadeuterodimetilsulfóxido (Fig. 75, Tabela 41), revelou deslocamento paramagnético das bandas de todos os prótons hidroxílicos, observando os fenômenos discutidos no parágrafo anterior que aqui aparecem mais acentuados. A eletronegatividade do S, bem menor que a do C, torna o grupo S=O mais polar que o grupo C=O, facilitando associação do solvente com o centro deficiente em elétrons do substrato.

A substância inédita AL-14, definida como 2',3',5,6-tetrahidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona (CXVI), foi denominada apuleisina. Conseqüentemente, o derivado acetilado é a 2',3',5,6-tetra-O-acetilapuleisina (CXXXIV), o derivado tetraetilado é a 2',3',5,6-tetra-O-etilapuleisina (CXXV), o derivado tetrametilado é a 2',3',5,6-tetra-O-metilapuleisina (CXXI), o derivado trimetilado, é a 2',3',6-tri-O-metilapuleisina (CXIX), o derivado trimetilado-monoacetilado é a 2',3',6-tri-O-metil-5-O-acetilapuleisina (CXX) e o derivado 0,0-difenilmetilado é a 2',3'-O,0-difenilmetilenoapuleisina (CXXXVI).



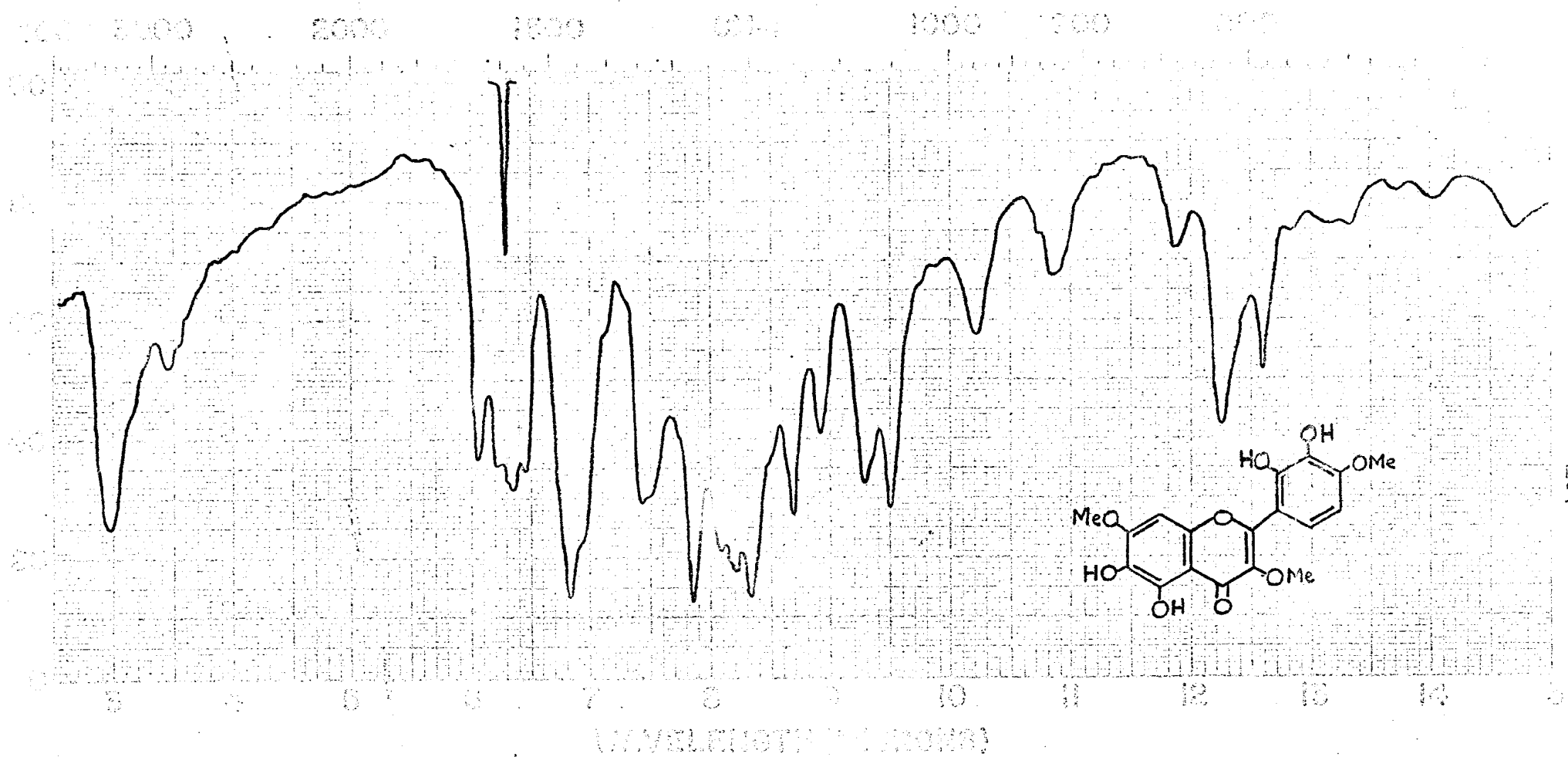


Figura 53.

Espectro i.v. da apuleisina (AL-114) = 2',3',5,6-tetrahidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona.
 Fase: KBr

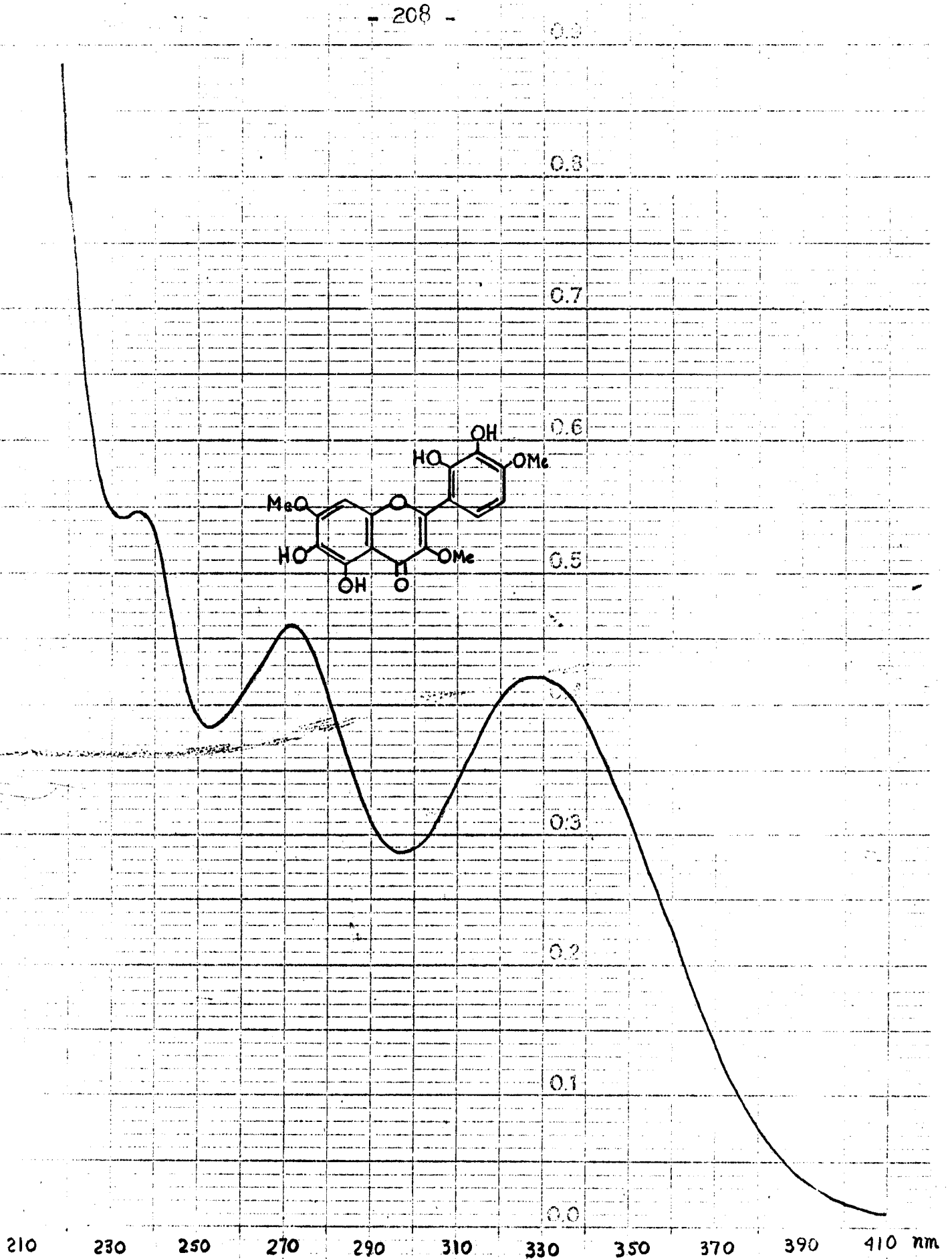


Figura 54. Espectro u.v. da apuleisina (AL-14) = 2',3',5,6-tetrahydroxi-3,4',7-trimetoxiflavona.

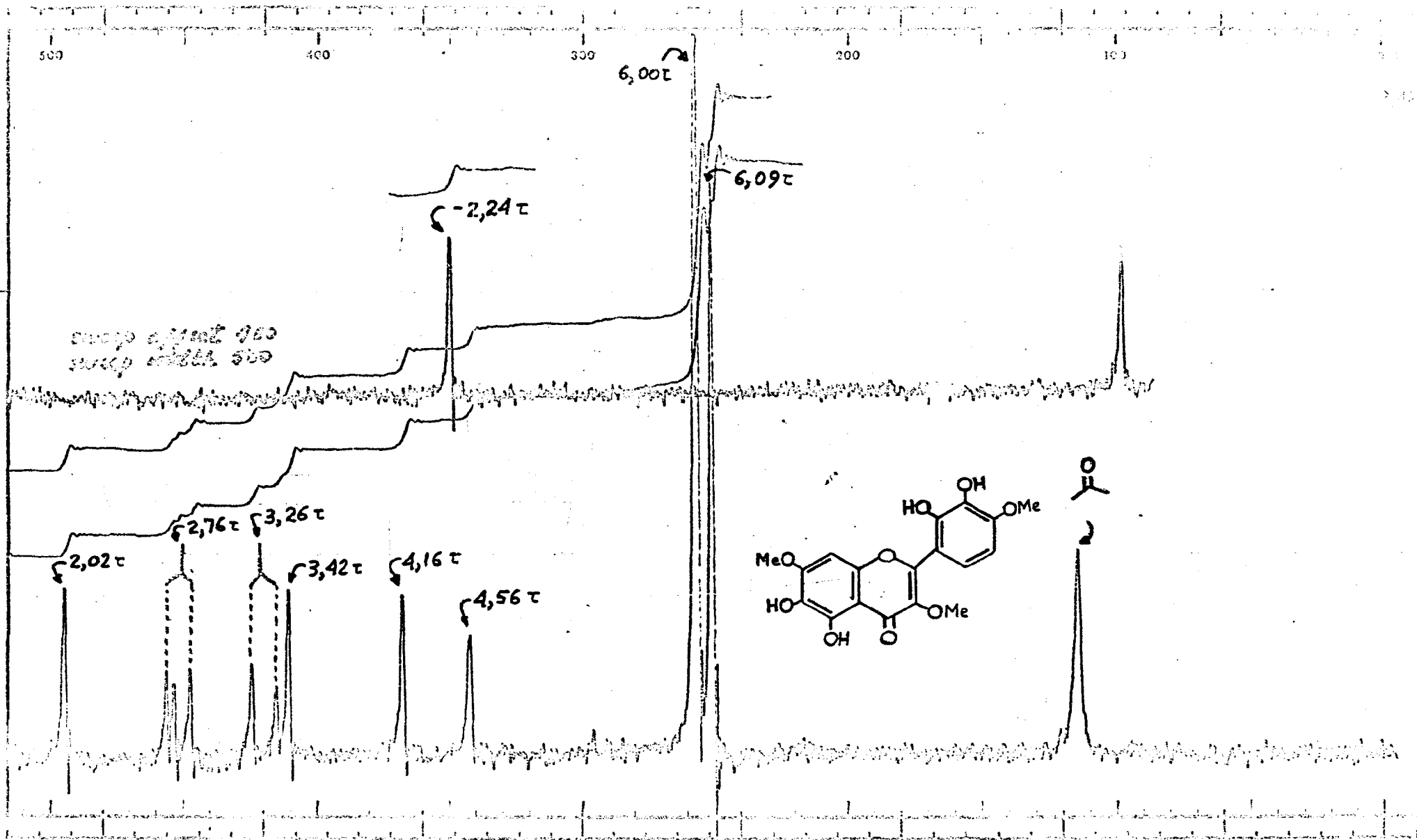


Figura 55.

Espectro de r.m.n. da apuleisina (AL-14) = 2',3',5,6-tetrahydroxi-3,4',7-trimetoxi flavona.

Solvente: CDCl_3

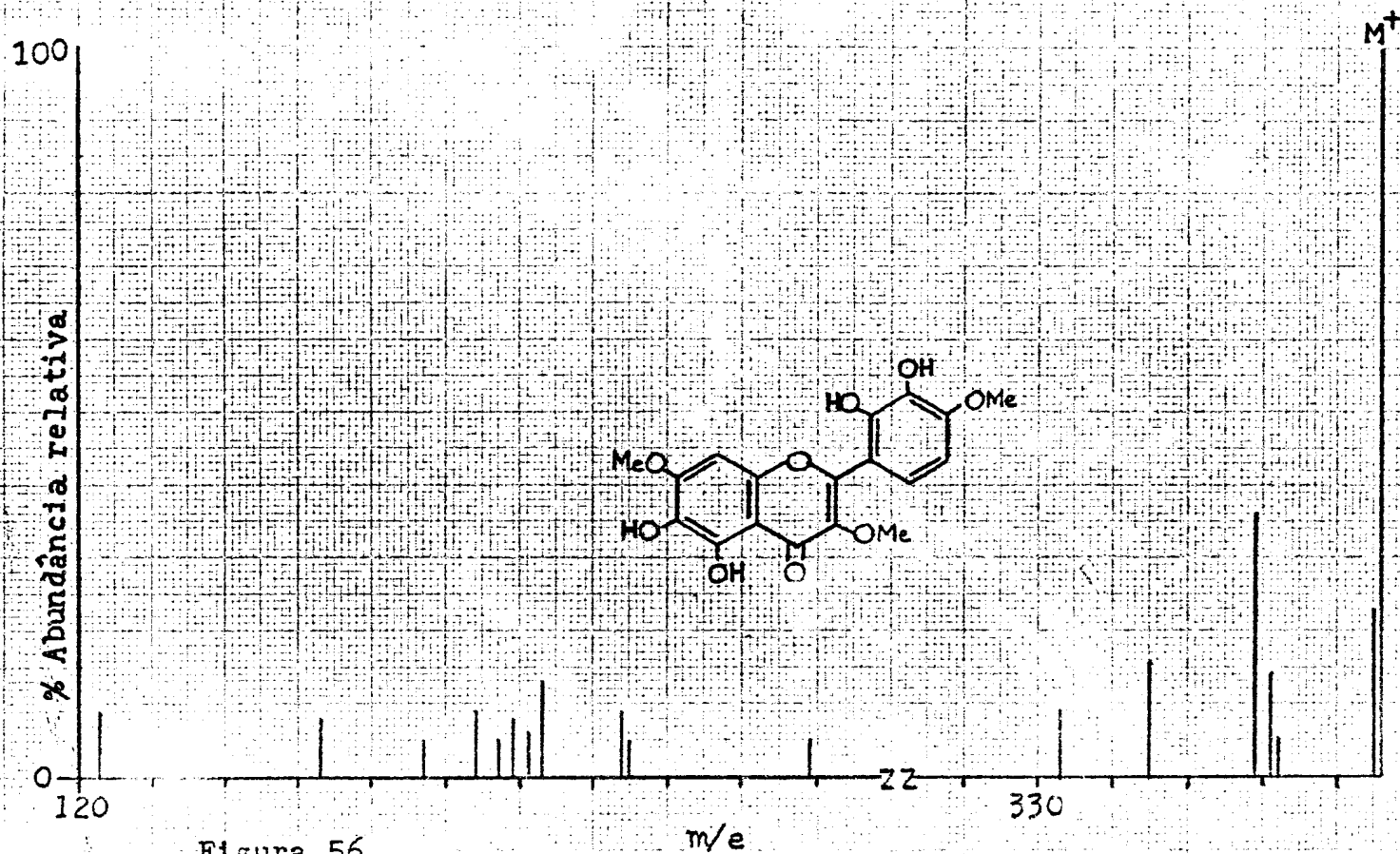
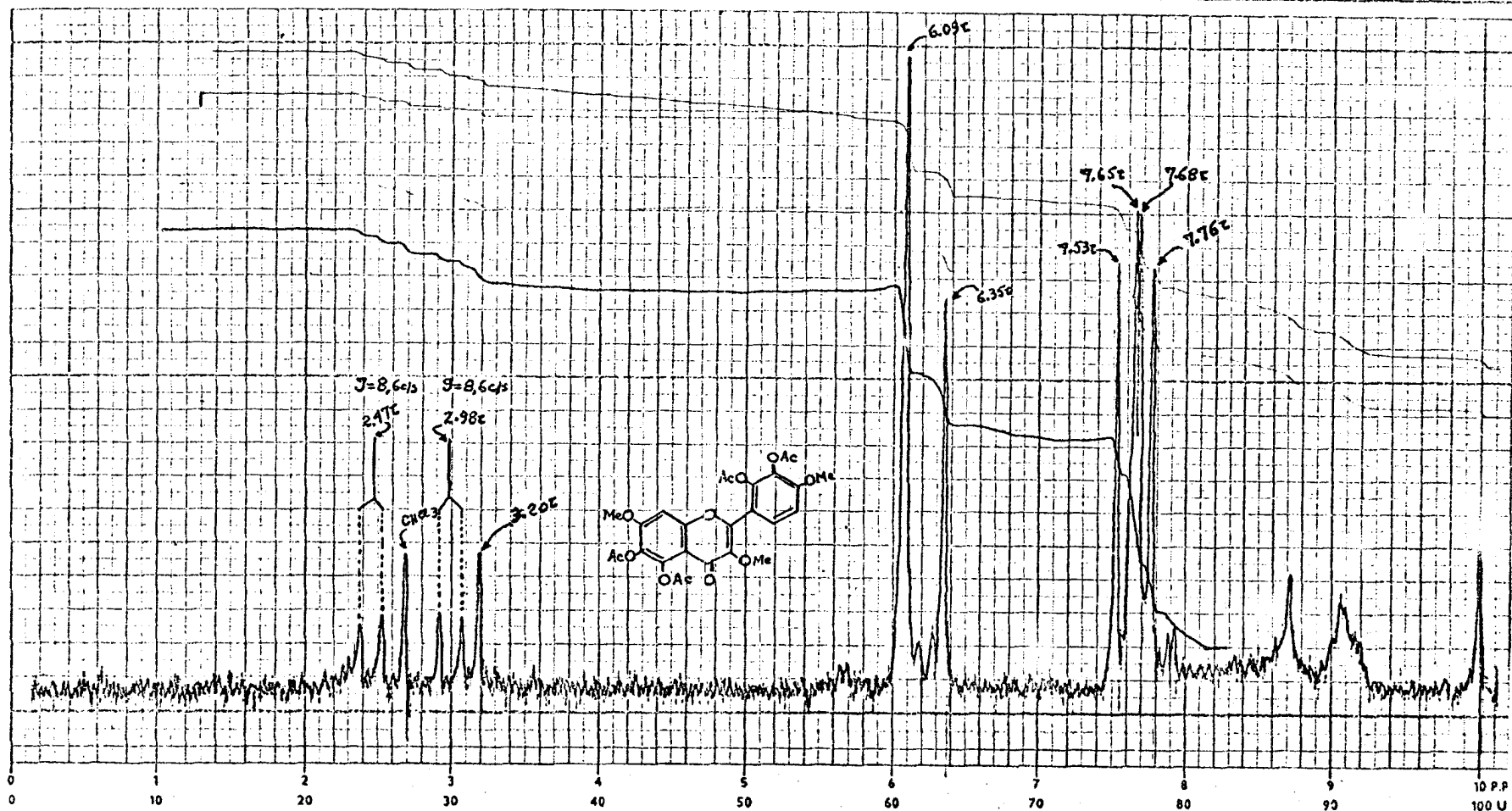


Figura 56.

Espectro de massa da apuleisina (AL-14) = 2',3',5,6-tetrahidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona.

DATE 3/7/69	DEC. SHIFT	REF. STD. TMS	R.F. FIELD 8×10^2	R.F. GAIN 1/2	REMARKS 57	SENSITIVITY NORM: 8 INT: 8	SWEEP RATE. 16 UNITS PER MIN 122	TIME CONST. 0.05 SECS 0.15 PL SECS	SCALE FACTOR 6
----------------	------------	------------------	-------------------------------	------------------	---------------	----------------------------------	--	--	-------------------



PART NO. 468-1112

PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD. BUCKS.

Figura 57.

Espectro de r.m.n. da 2',3',5,6-tetra-O-acetilapuleisina (AL-14Ac)=2',3',5,6-tetracetoxi-3,4',7-trimetoxiflavona. Solvente: CDCl_3

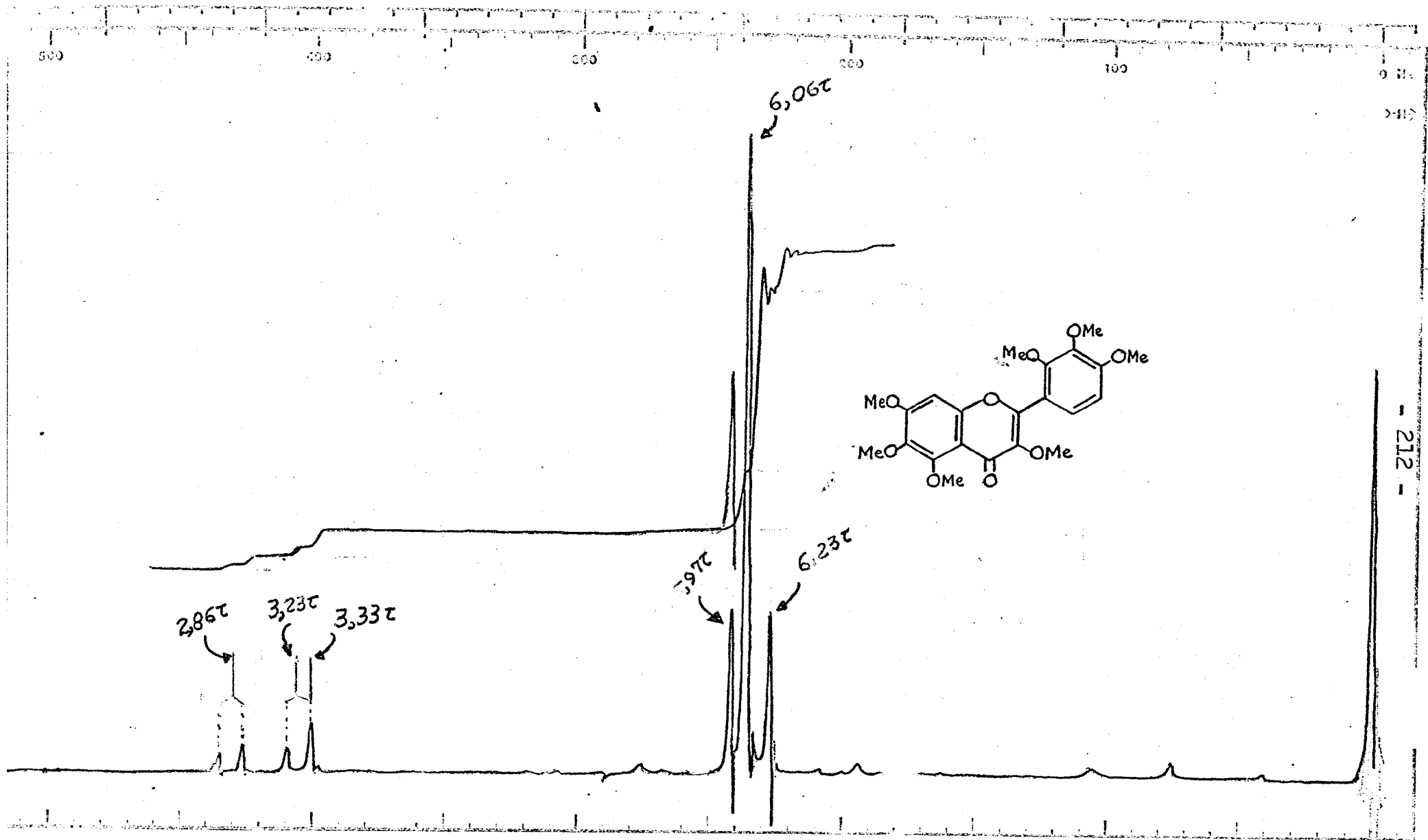


Figura 58.

Espectro de r.m.n. da 2',3',5,6-tetra-O-metilapuleisina (AL-14Me) = 2',3,3',4',5,6,7,-
-heptametoxiflavona.

Solvente: CDCl_3

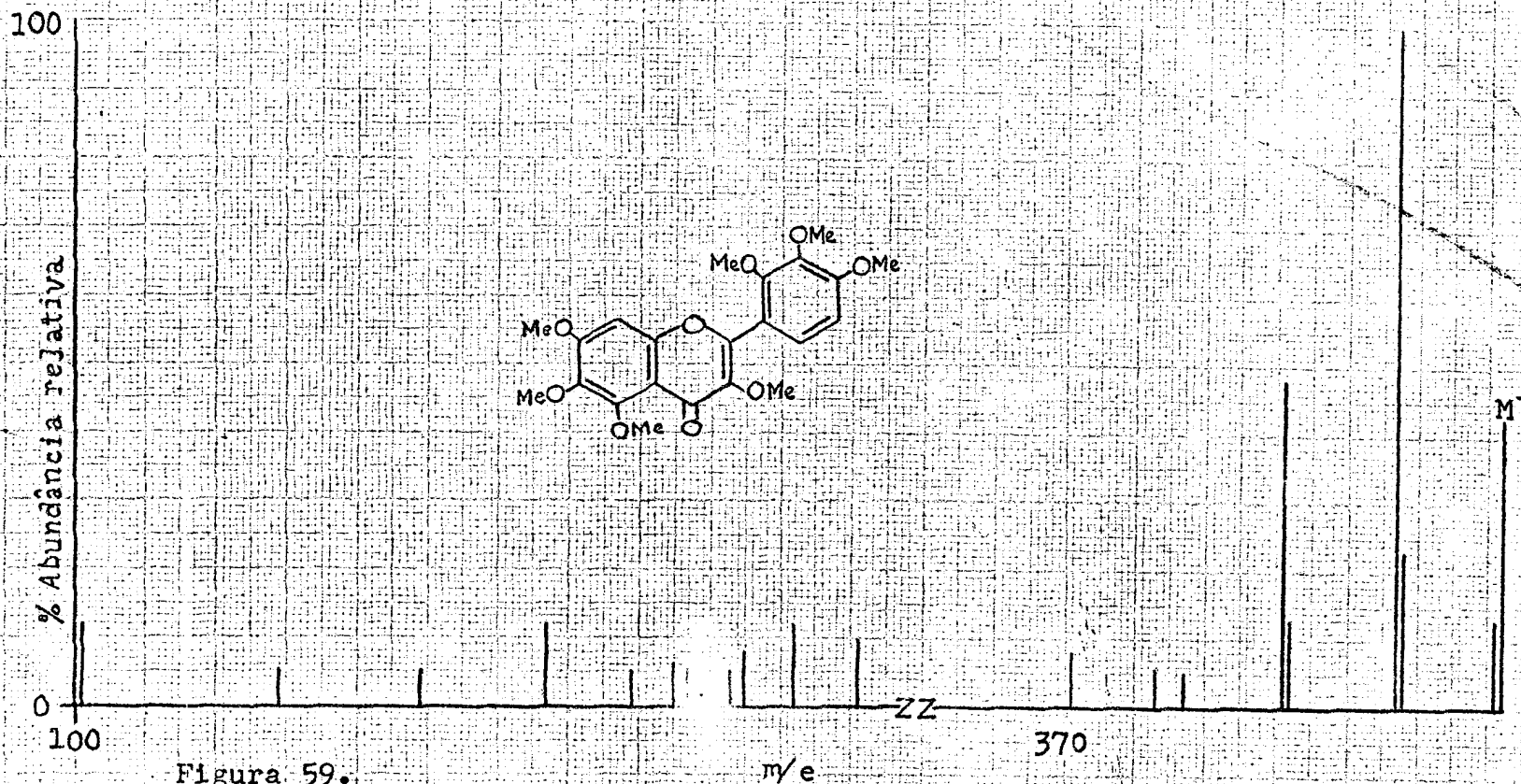


Figura 59.

Espectro de massa da 2',3,3',5,6-tetra-O-metilapuleína (AL-14Me) =
= 2',3,3',4',5,6,7-heptametoxiflavona.

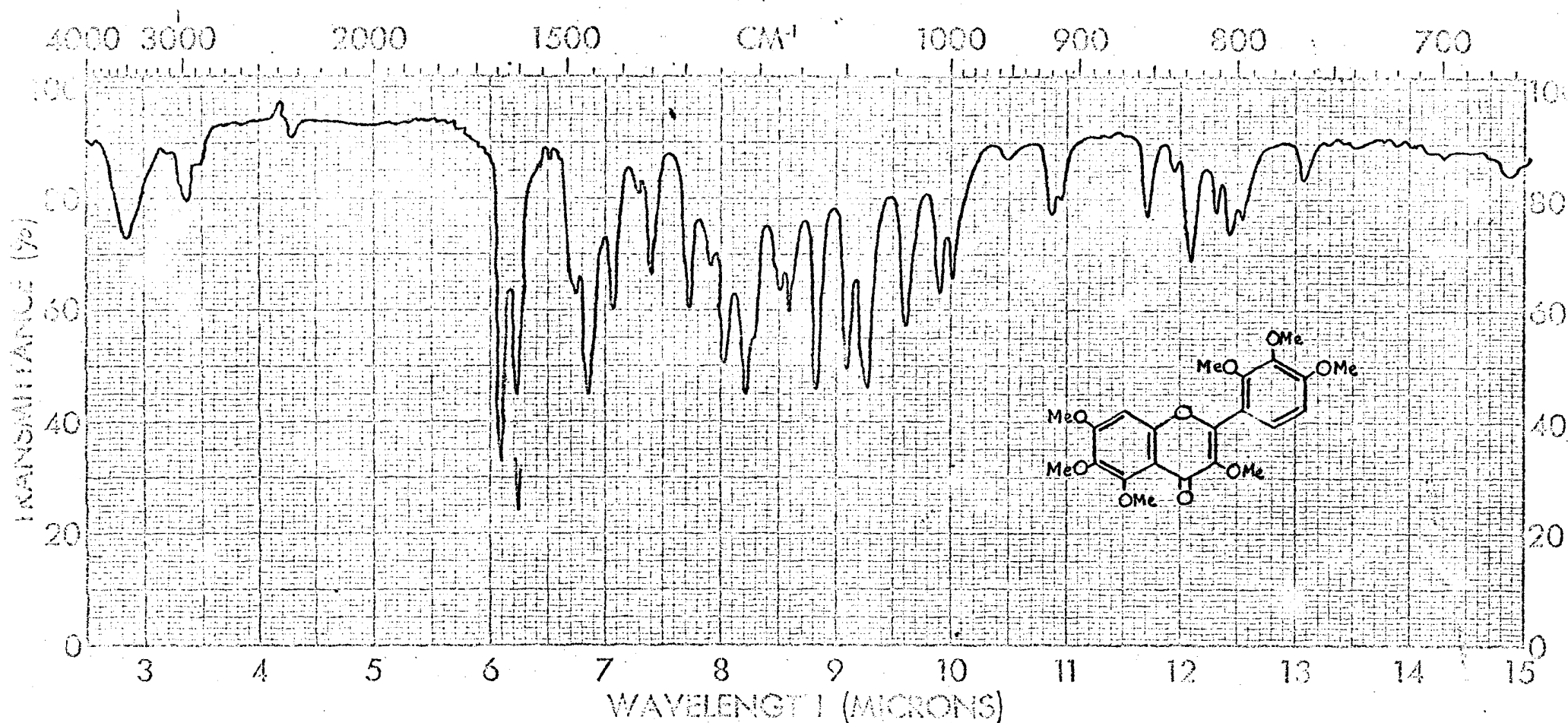


Figura 60.

Espectro i.v. da 2',3',5,6-tetra-O-metilapuleisina (AL-14Me) = 2',3,3',4',5,6,7-hepta metoxiflavona.

Fase: KBr

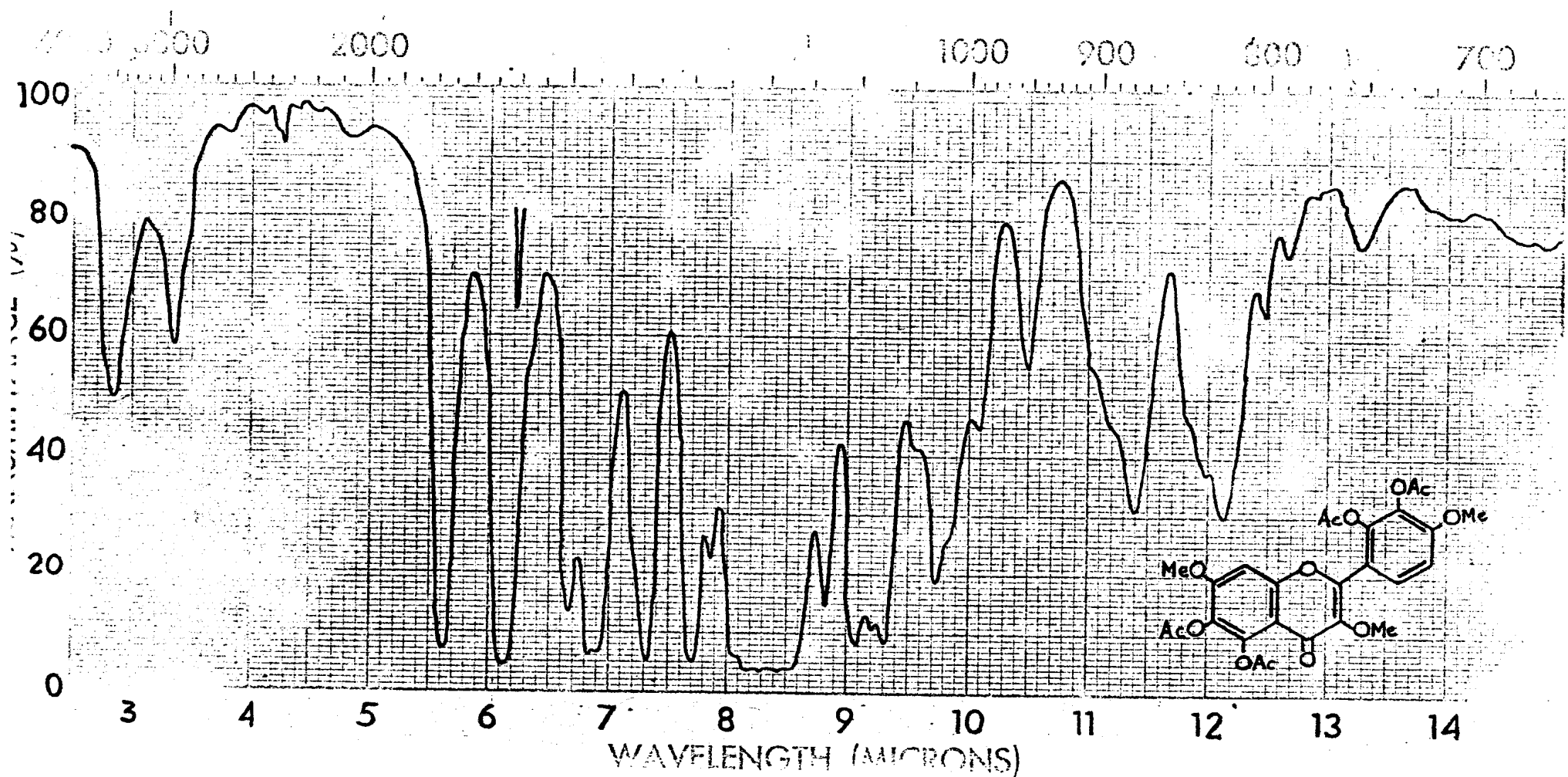


Figura 61.

Espectro i.v. da 2',3',5,6-tetra-O-acetilapuleisina (AL-14Ac) = 2',3',5,6-tetrace
toxi-3,4',7-trimetoxiflavona.

Fase: KBr

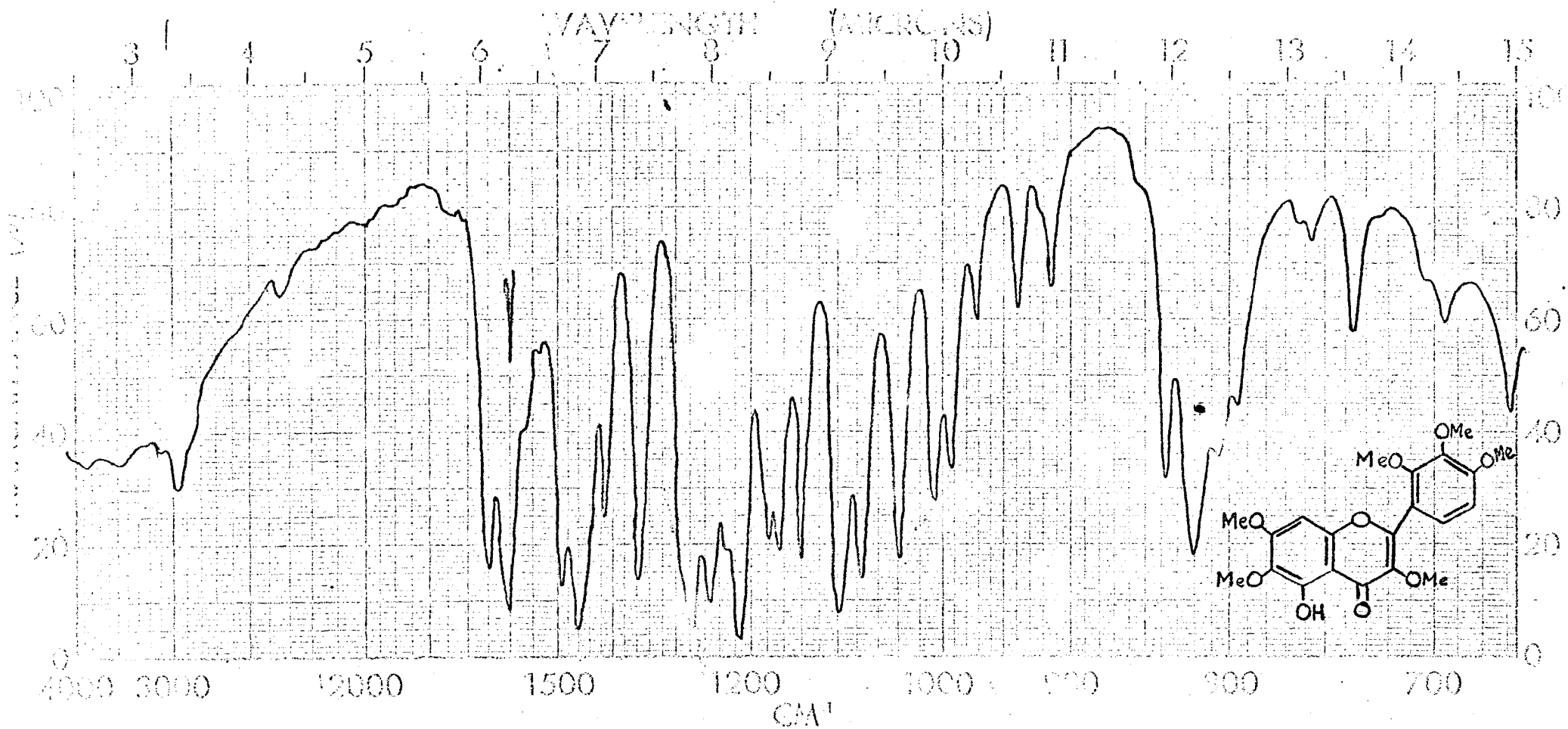


Figura 62.

Espectro i.v. da 2',3',6-tri-O-metilapuleisina (AL-14-tri-O-Me) = 5-hidroxi-2',3,3',4',6,7-hexametoxiflavona.

Fase: KBr

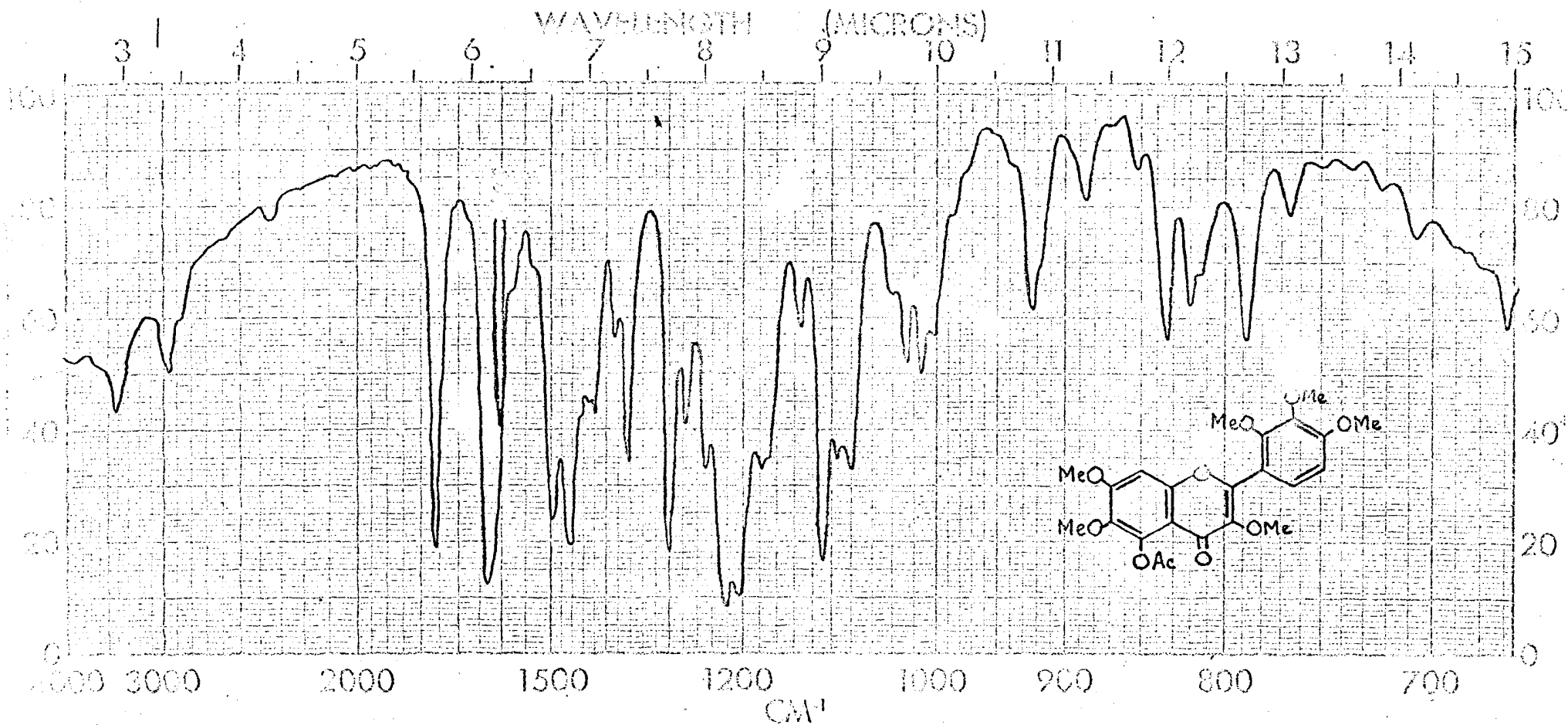


Figura 63.

Espectro i.v. da 5-0-acetil-2',3',6-tri-0-metilapuleisina (AL-14-tri-0-MeAc) = 5-ace
toxi-2',3,3',4',6,7-hexametoxiflavona.

Fase: KBr

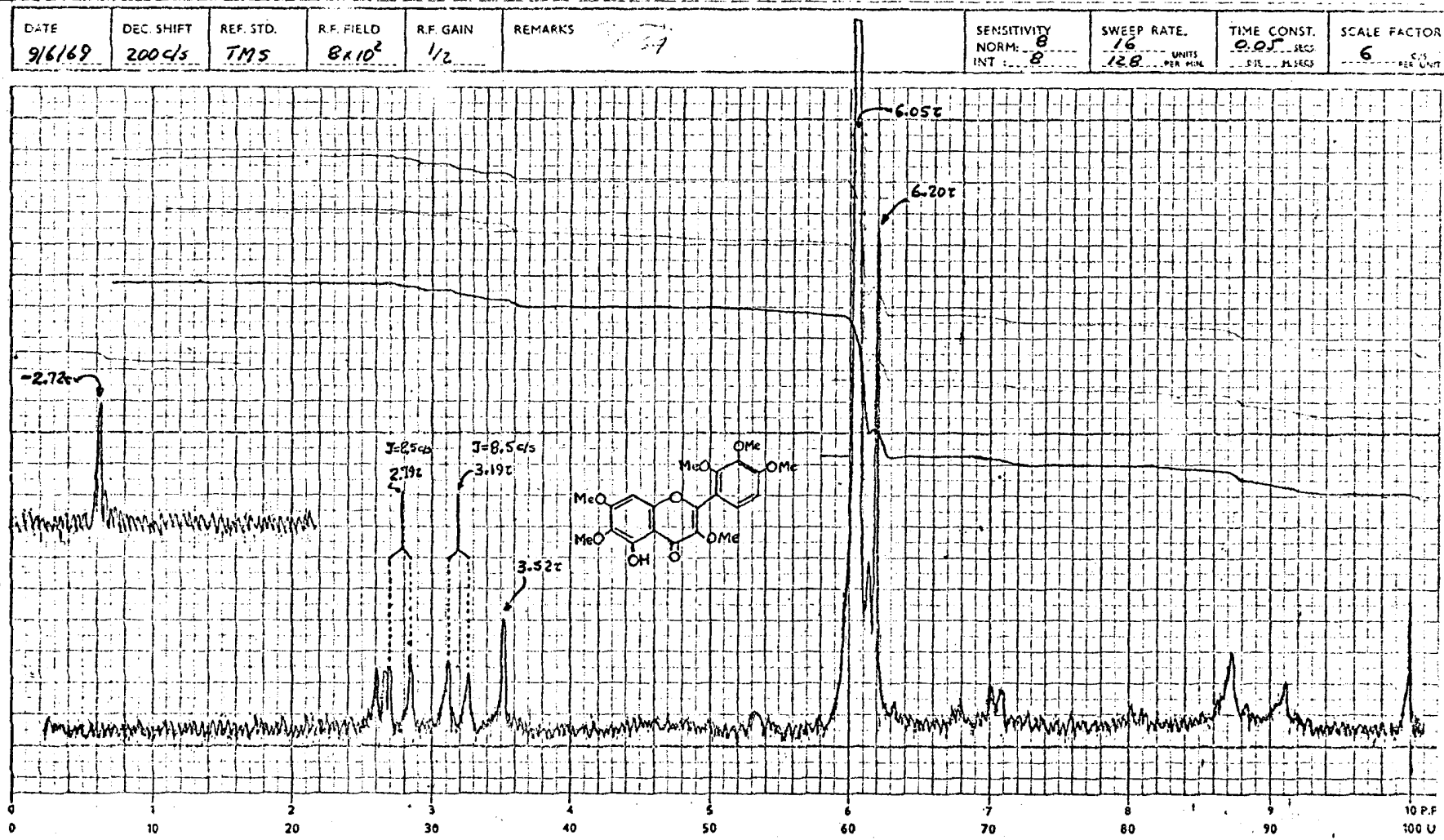


Figura 64.

PART NO. 468-1112

PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD, BUCKS.

Espectro de r.m.n. da 5-O-acetil-2',3',6-tri-O-metilapuleisina (AL-14-tri-O-MeAc) =5-hidroxi-2',3,3',4',6,7-hexametoxiflavona. Solvente: CDCl₃.

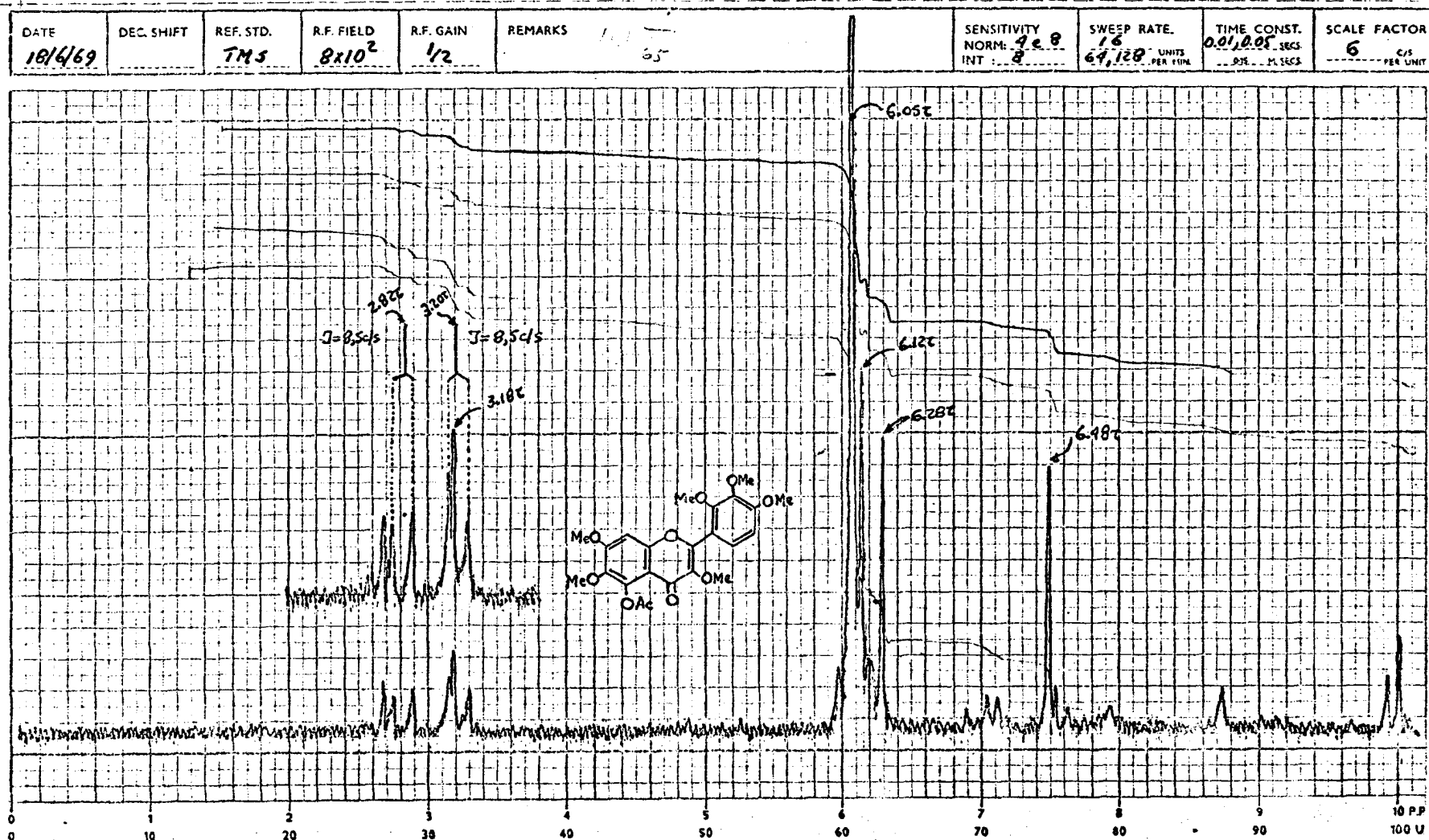


Figura 65. PART Nº. 466-1112
 Espectro de r.m.n. da 5-O-acetil-2',3',6-tri-O-metilapuleisina (AL-14-tri-O-MeAc) =
 =5-acetoxi-2',3,3',4',6,7-hexametoxiflavona. Solvente: CDCl₃.

PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD, BUCKS

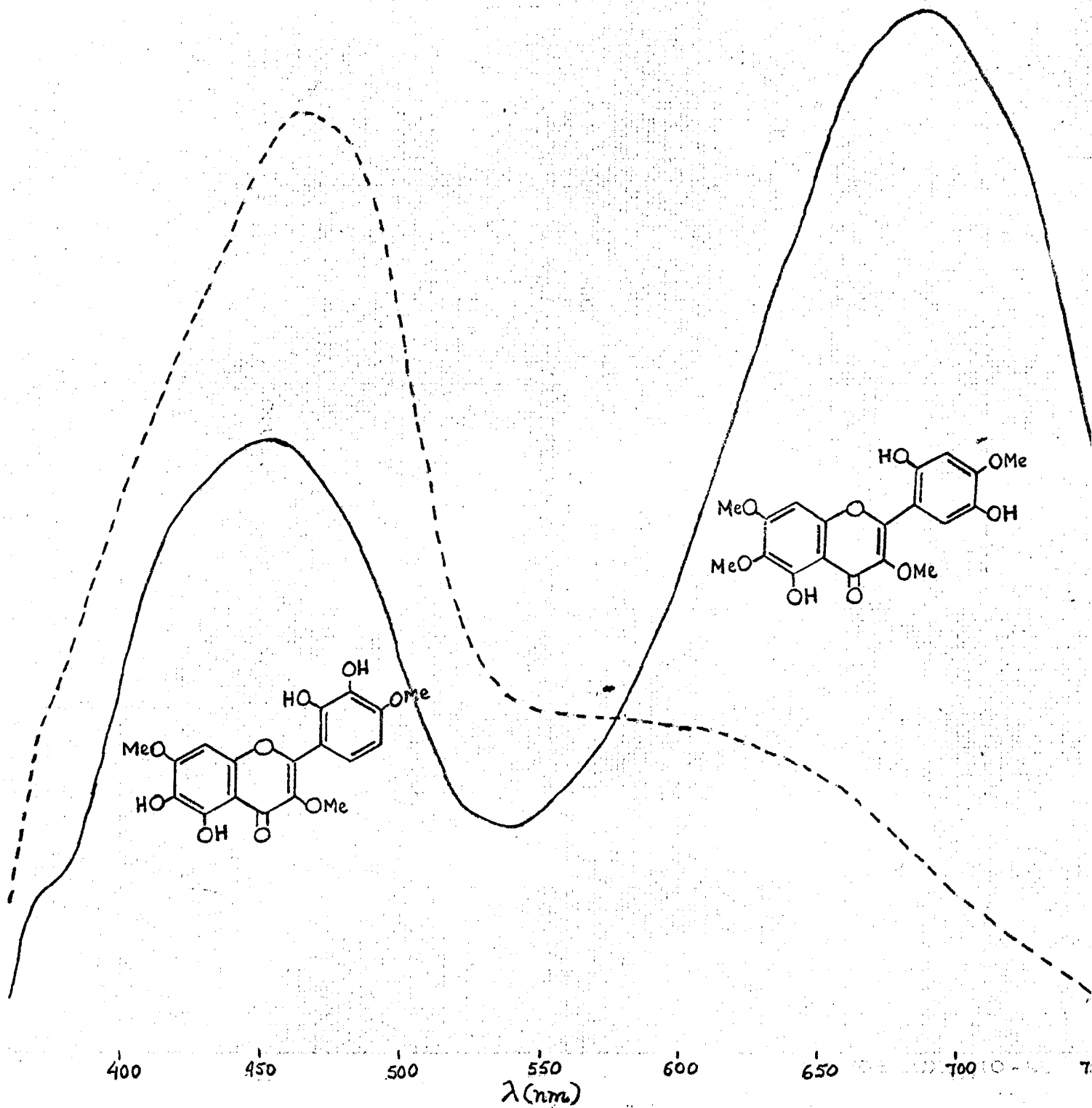


Figura 66. Ensaio de Gibbs da 5-O-desmetilapuleina (—) e da apuleisina (-----).

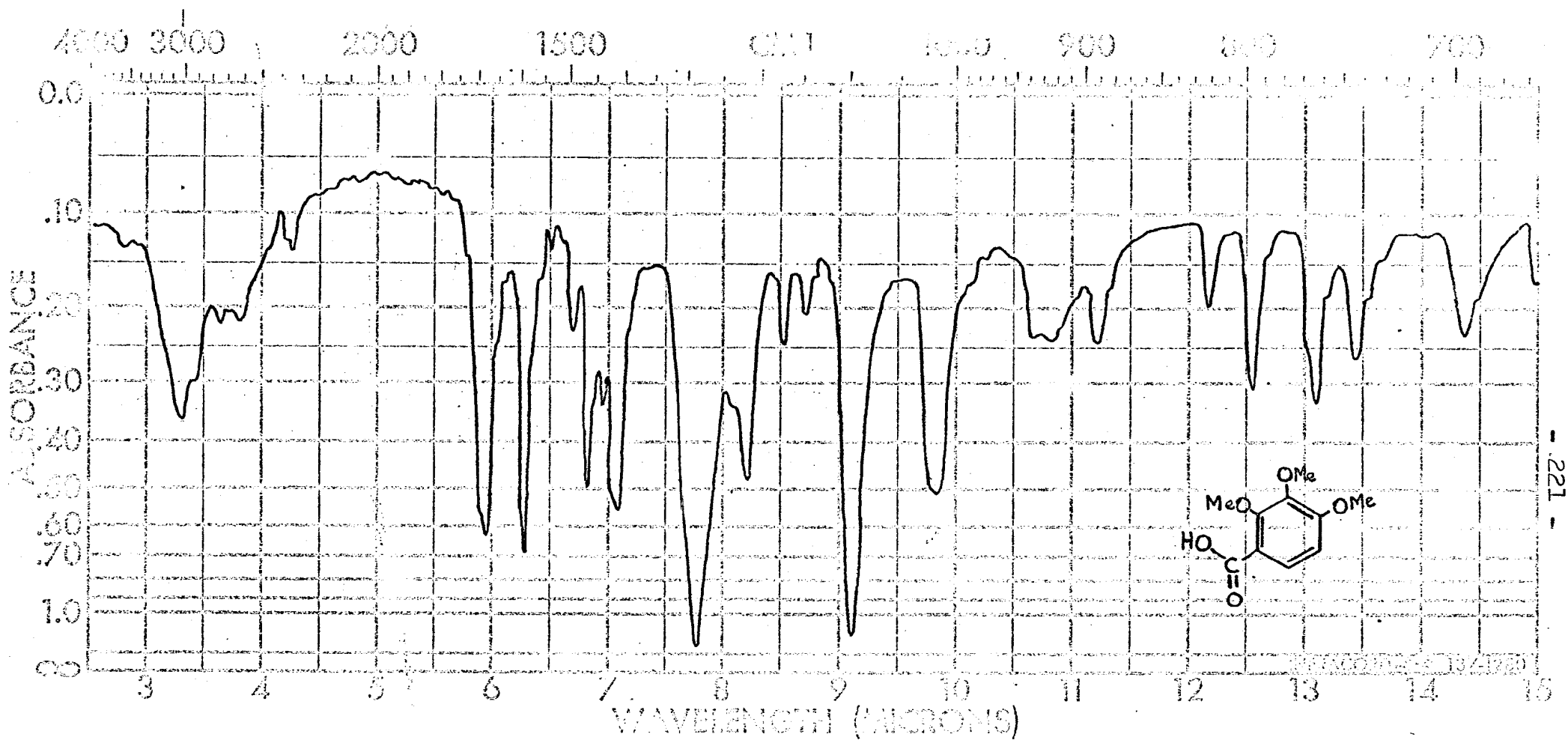
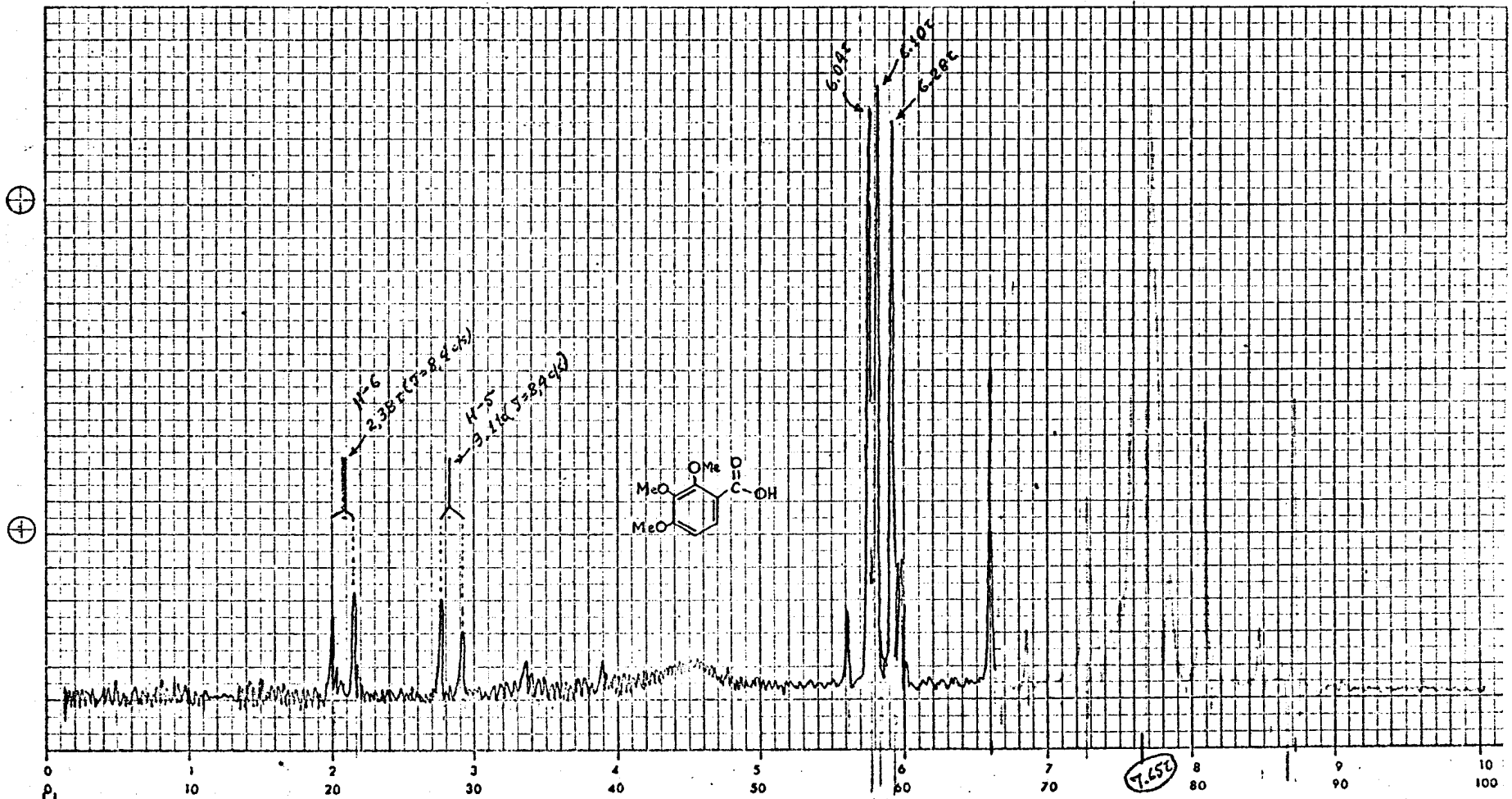


Figura 67. Espectro i.v. do ácido 2,3,4-trimetoxibenzóico.

Fase: KBr

DATE 2/1/60	DEC. SHIFT	REF. STD.	R.F. FIELD 8×10^2	R.F. GAIN $\frac{1}{2}$	REMARKS CH ₃ COCH ₃ : 7.93 - 7.65 = +0.28 53	SENSITIVITY NORM: 8 INT:	SWEEP RATE 16 UNITS PER MIN	TIME CONST. 0.02 SECS 0.15 M SECS	SCALE FACTOR 6 C/S PER UNIT
----------------	------------	-----------	-------------------------------	----------------------------	--	--------------------------------	--------------------------------------	---	--------------------------------------



PART No. 468-1112

PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD, BUCKS.

Figura 68.

Espectro de r.m.n. do ácido 2,3,4-trimetoxibenzoico.

Solvente: CH₃COCH₃

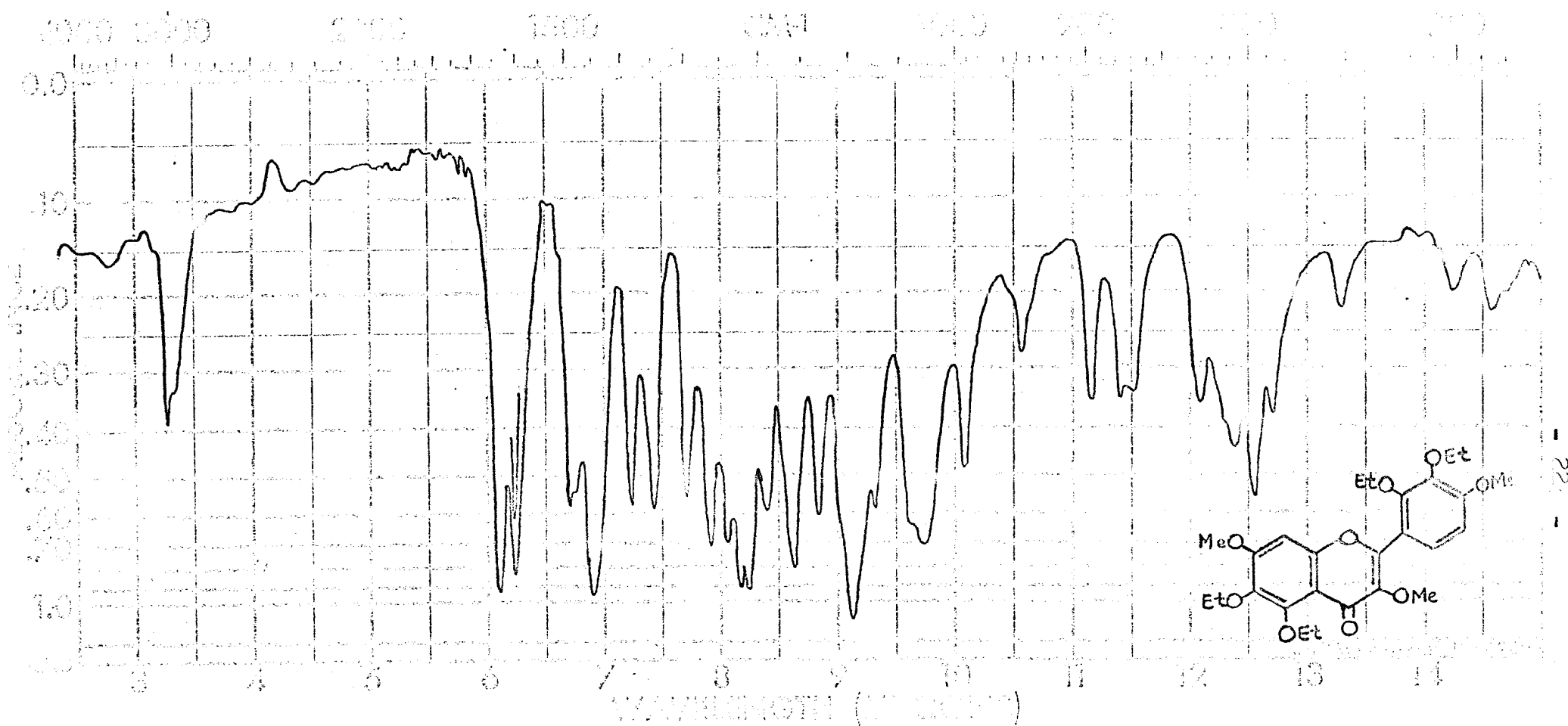


Figura 69.

Espectro i.v. da 2',3',5,6-tetra-O-etilapuleisina (AL-14Et) = 2',3',5,6-tetraetoxi-
-3,4',7-trimetoxiflavona.

Fase: KBr

DATE 24/1/65	DEC. SHIFT	REF. STD. TMS	R.F. FIELD 8×10^2	R.F. GAIN $4\frac{1}{2}$	REMARKS Todos picos mho desdobrados: +0,15%	SENSITIVITY NORM: B	SWEEP RATE 10 UNITS PER MIN	TIME CONST. 0.05 SECS	SCALE 6	FACT PER UNIT
-----------------	------------	------------------	-------------------------------	-----------------------------	--	------------------------	--------------------------------	--------------------------	------------	------------------

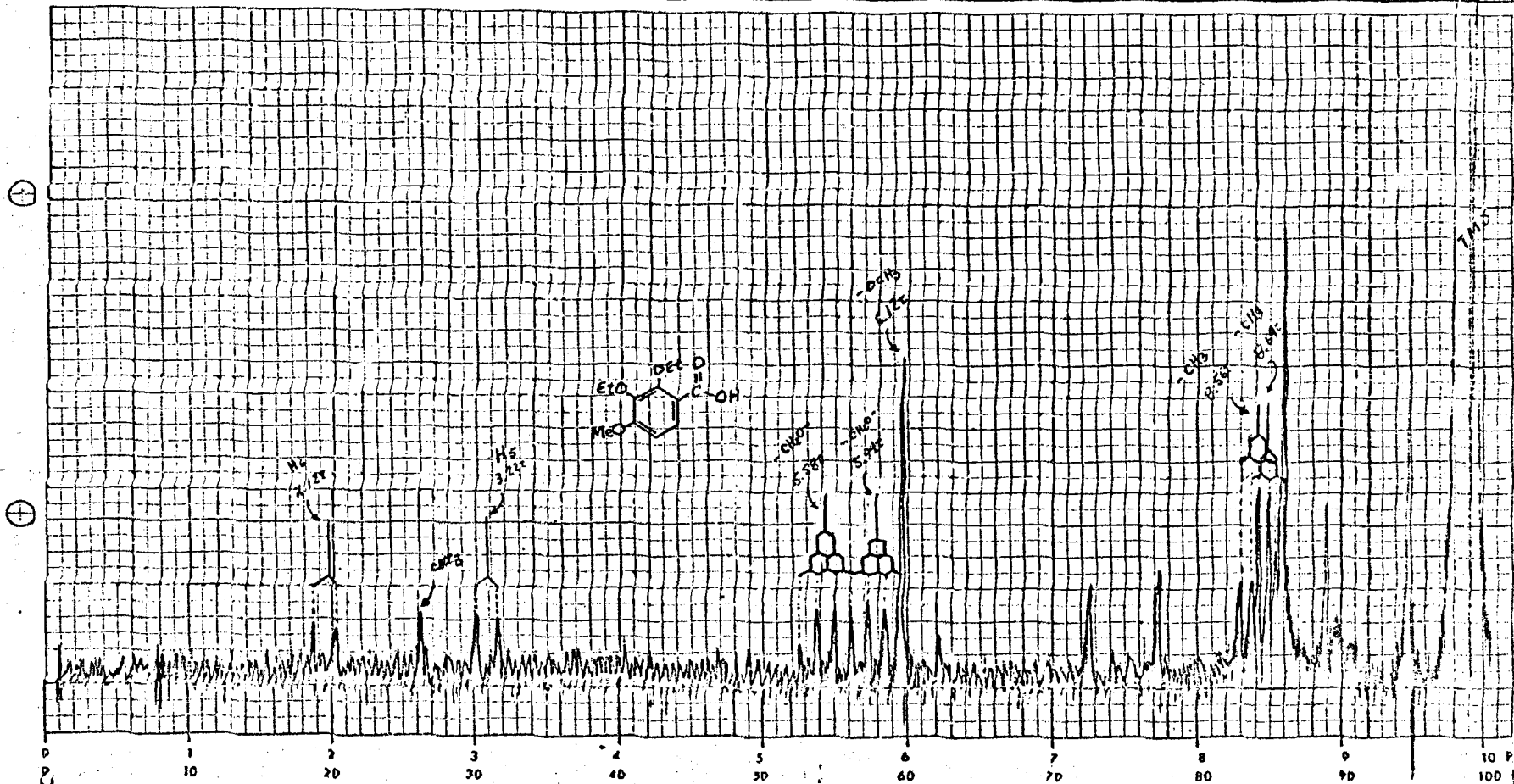


Figura 70.

Espectro de r.m.n. do ácido 2,3-dietoxi-4-metoxibenzoico.

Solvente: CCl_4

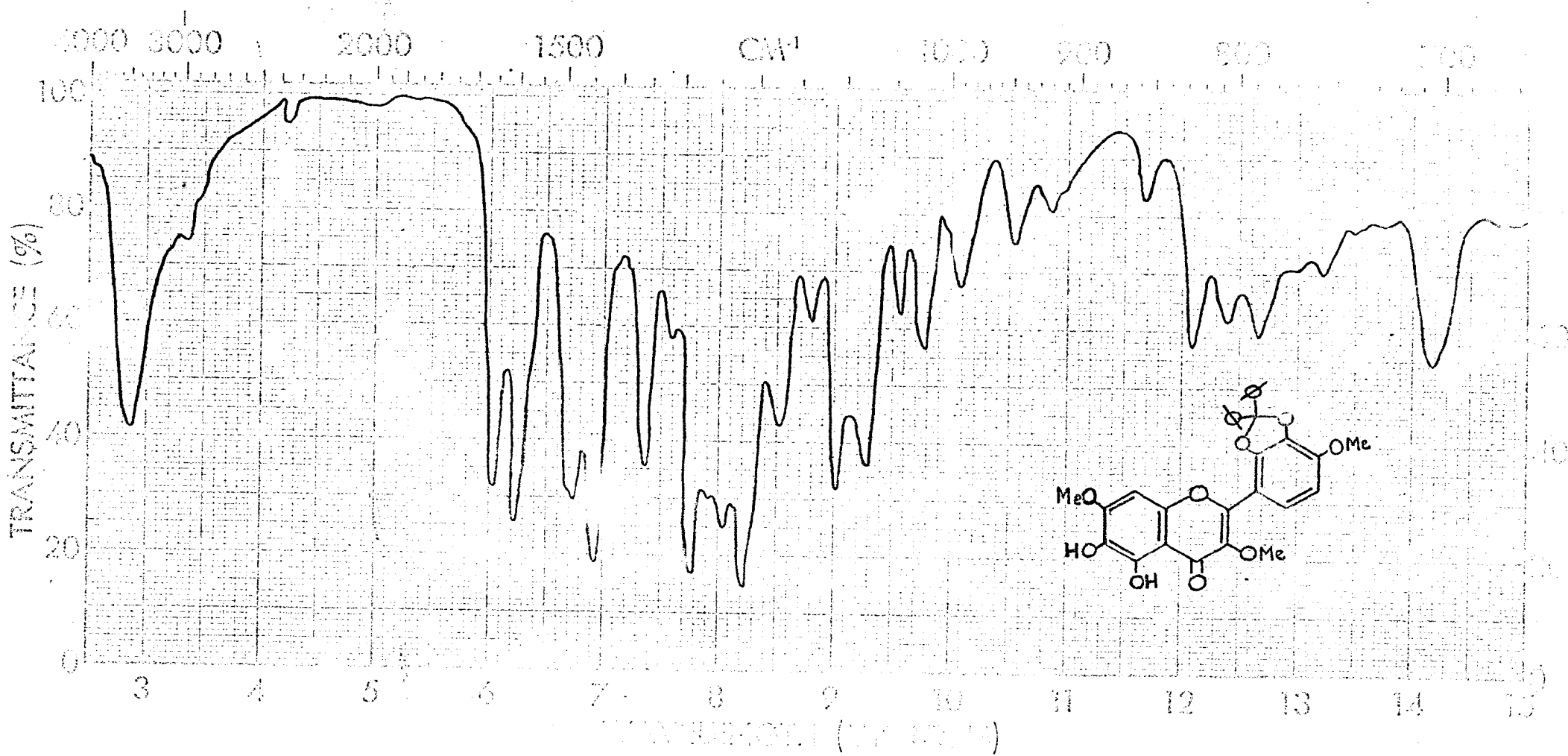


Figura 71.

Espectro i.v. da 2',3'-di-O-difenilmetilapuleisina (AL-14DFM).

Fase: KBr

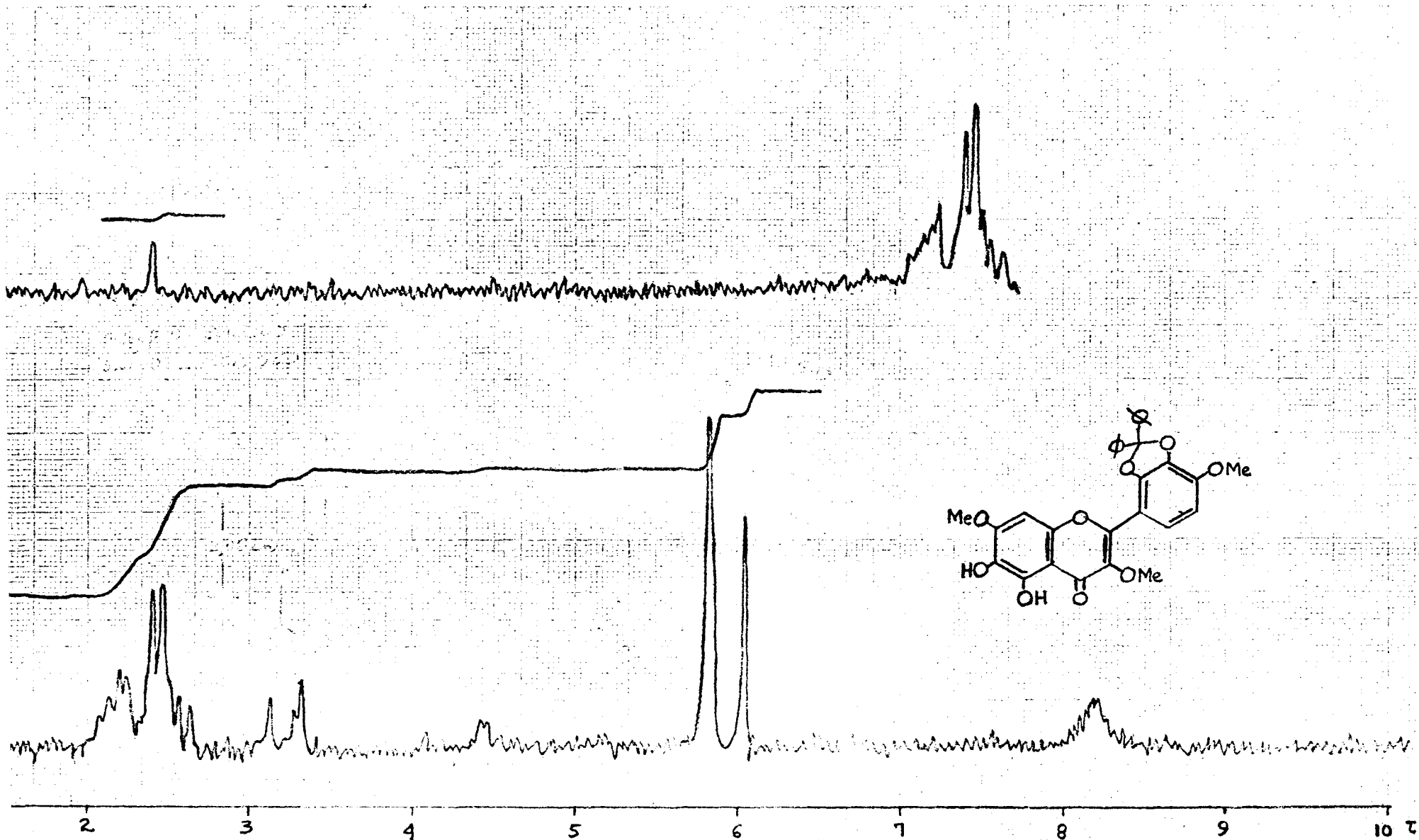


Figura 72.

Espectro de r.m.n. da 2',3'-di-O-difenilmetilapuleisina (AL-14DFM).

Solvente: CDCl_3 .

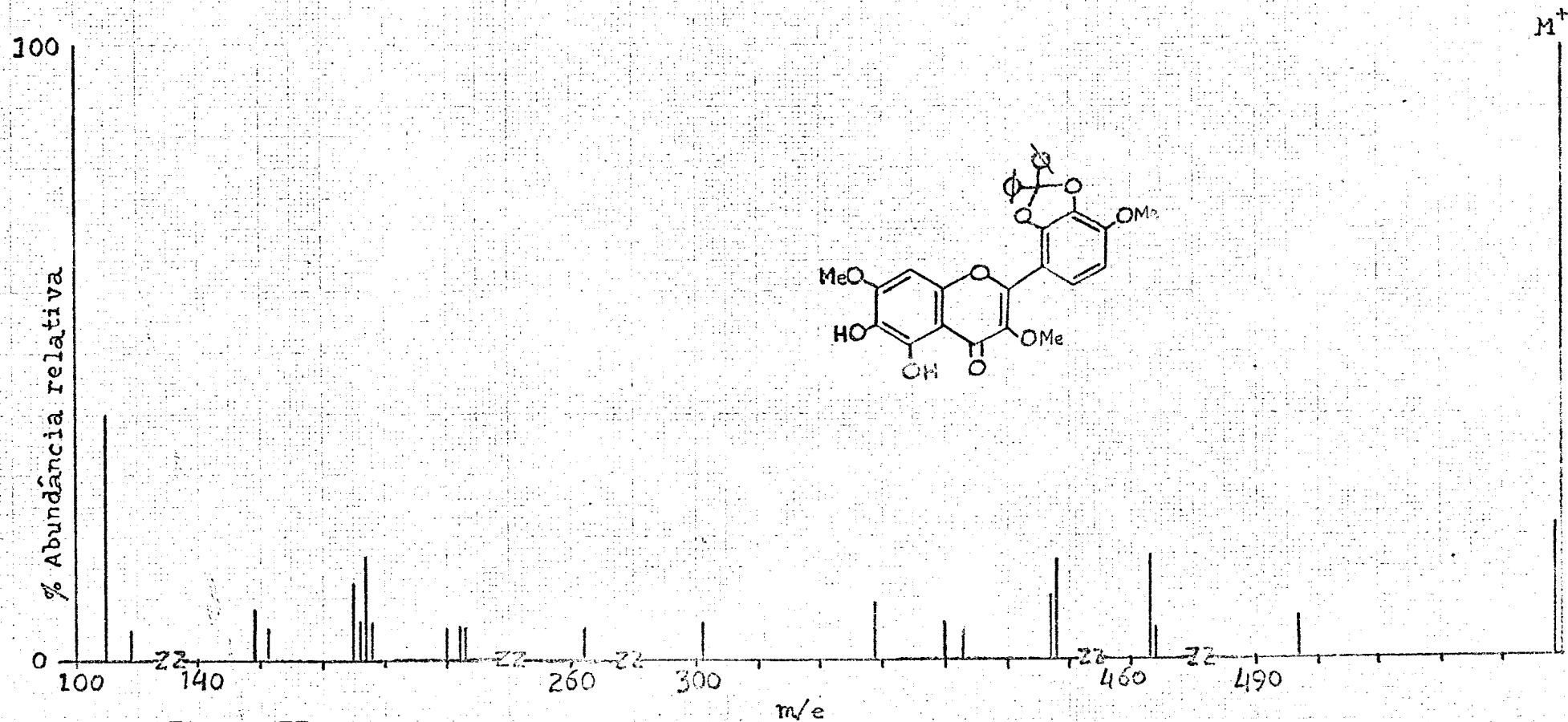
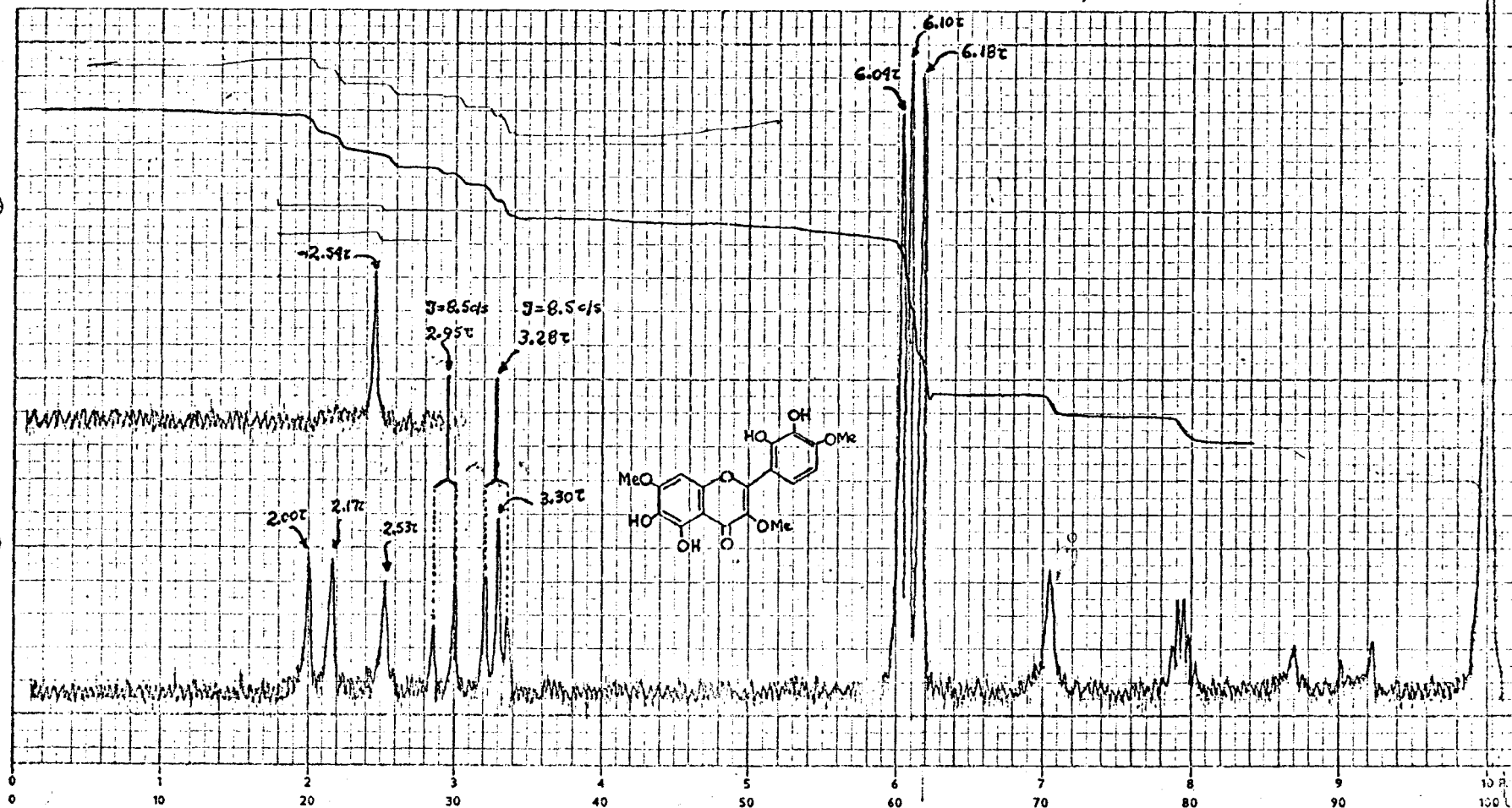


Figura 73.

Espectro de massa da 2',3'-di-O-difenilmetilapuleisina (AL-14DFM).

DATE 30/6/69	DEC. SHIFT 3.0045	REF. STD. TMS	R.F. FIELD 8×10^2	R.F. GAIN 1/2	REMARKS 74	SENSITIVITY NORM: B INT: B	SWEEP RATE 16 UNITS PER MIN 64 PER MIN	TIME CONST. 0.05 SECS 0.315 MS SECS	SCALE FACTOR 6
-----------------	----------------------	------------------	-------------------------------	------------------	---------------	----------------------------------	--	---	-------------------



PART NO. 468-1112

PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD. BUCKS

Figura 74.

Espectro de r.m.n. da apuleisina (AL-14)=2',3',5,6-tetrahydroxi-3,4',7-trime toxiflavona. Solvente: CD_3COCD_3 .

DATE	DEC. SHIFT	REF. STD.	R.F. FIELD	R.F. GAIN	REMARKS	SENSITIVITY NORM. INT.	SWEEP RATE. LVPTS PER MIN.	TIME CONST. SECS	SCALE FACTOR
30/6/69	300 c/s	TMS	8×10^2	1	Fig 51	8	16 6.9	0.05 0.1	6 C/M PER UNIT

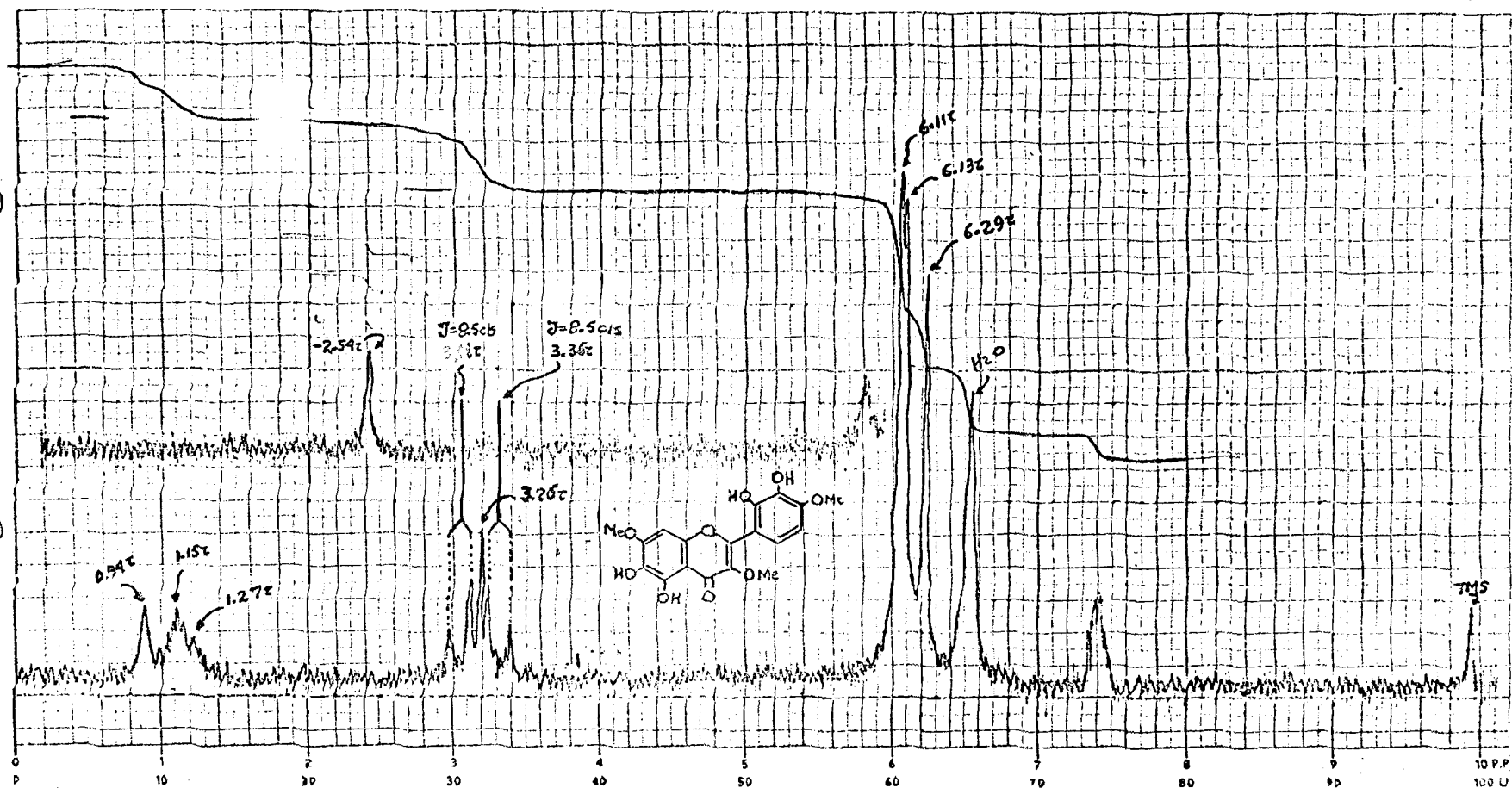
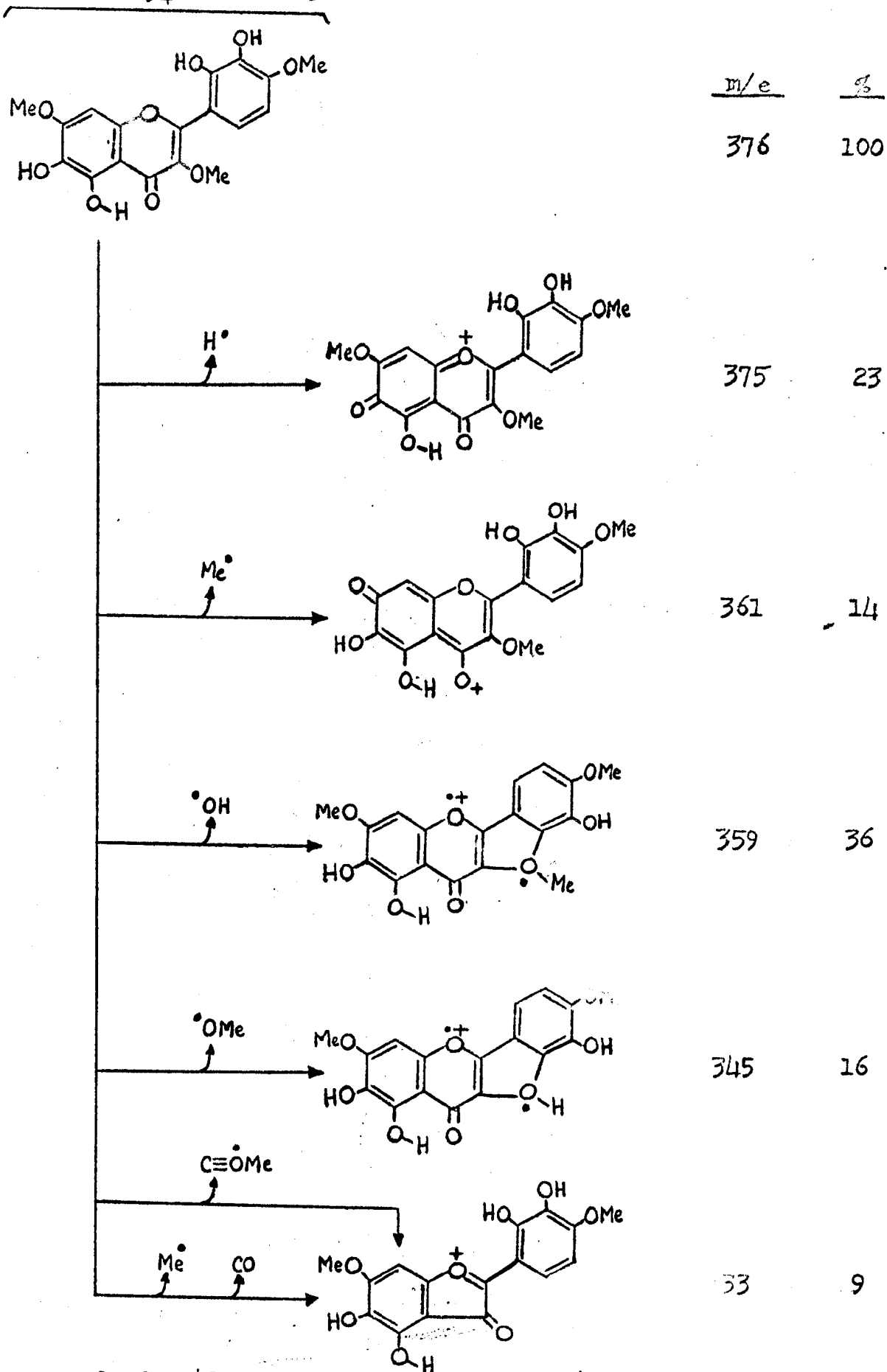


Figura 75. Espectro de r.m.n. da apuleisina (AL-14)=2',3',5,6-tetrahidroxi-3,4',7-trime toxiflavona. Solvente: CD_3SOCD_3 .

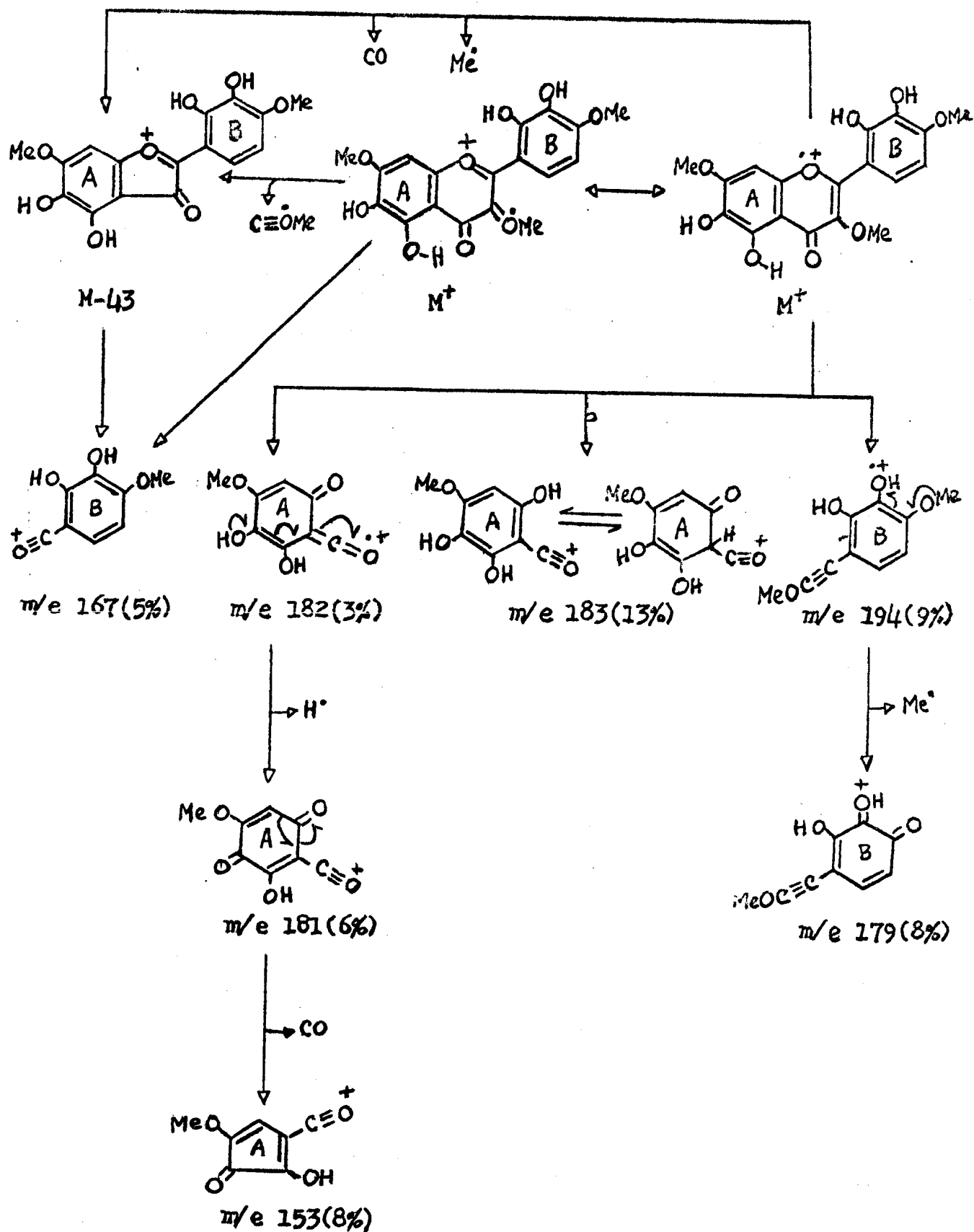
PART NO. 446-1112

PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD, BUCKS

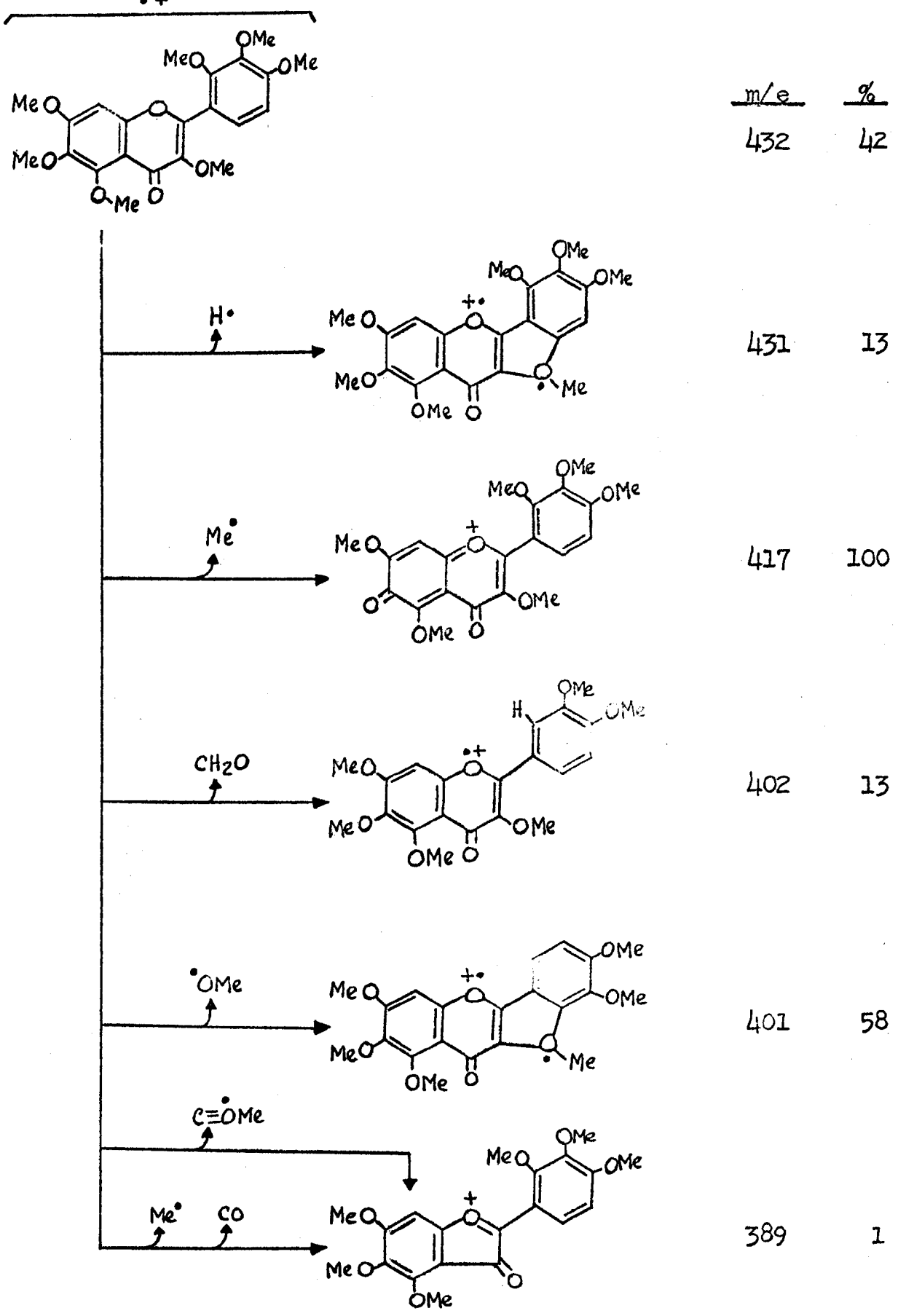


Quadro 41.

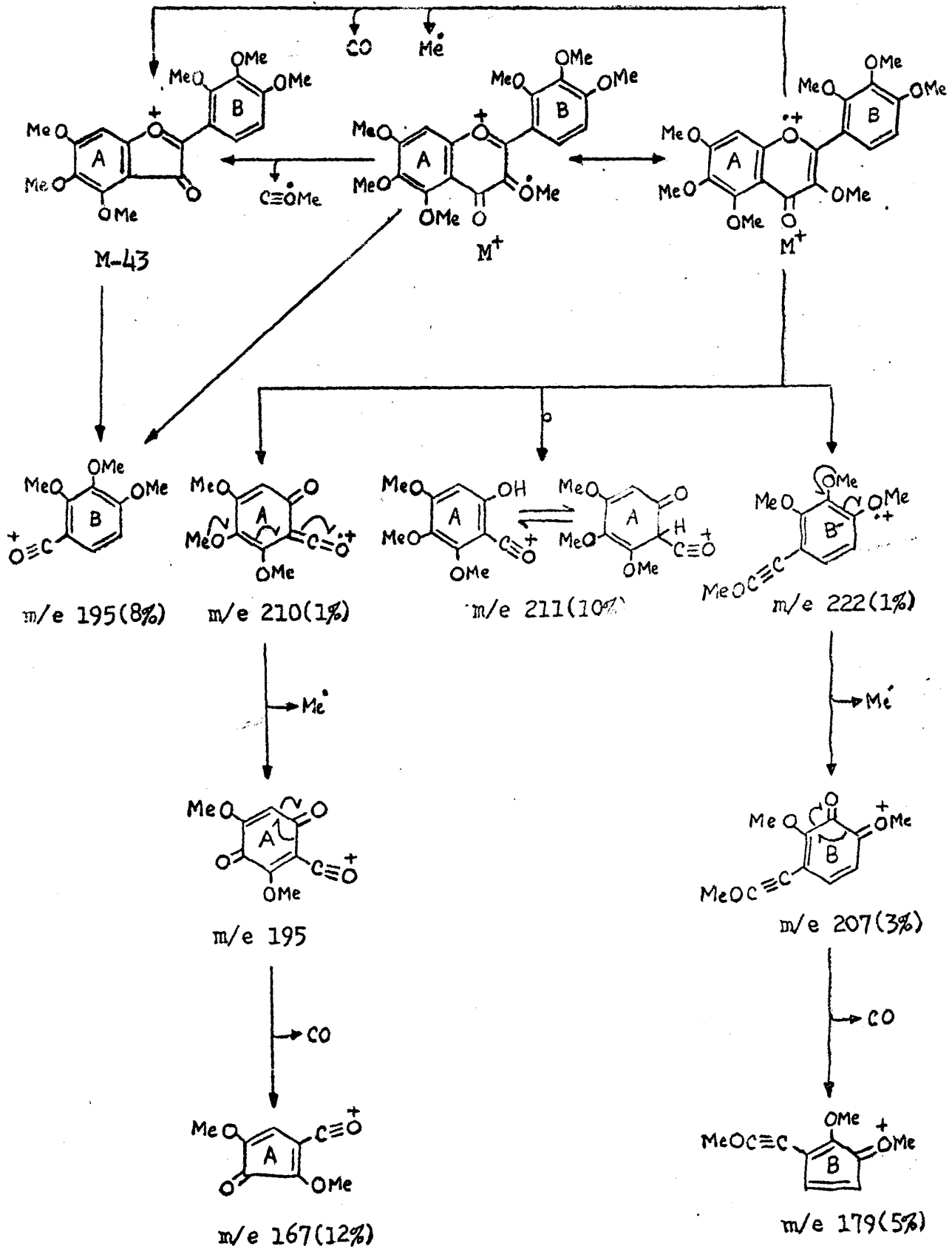
Caminhos principais de fragmentação da apulei-sina (AL-14)=2',3',5,6-tetrahidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona no espectrômetro de massa.



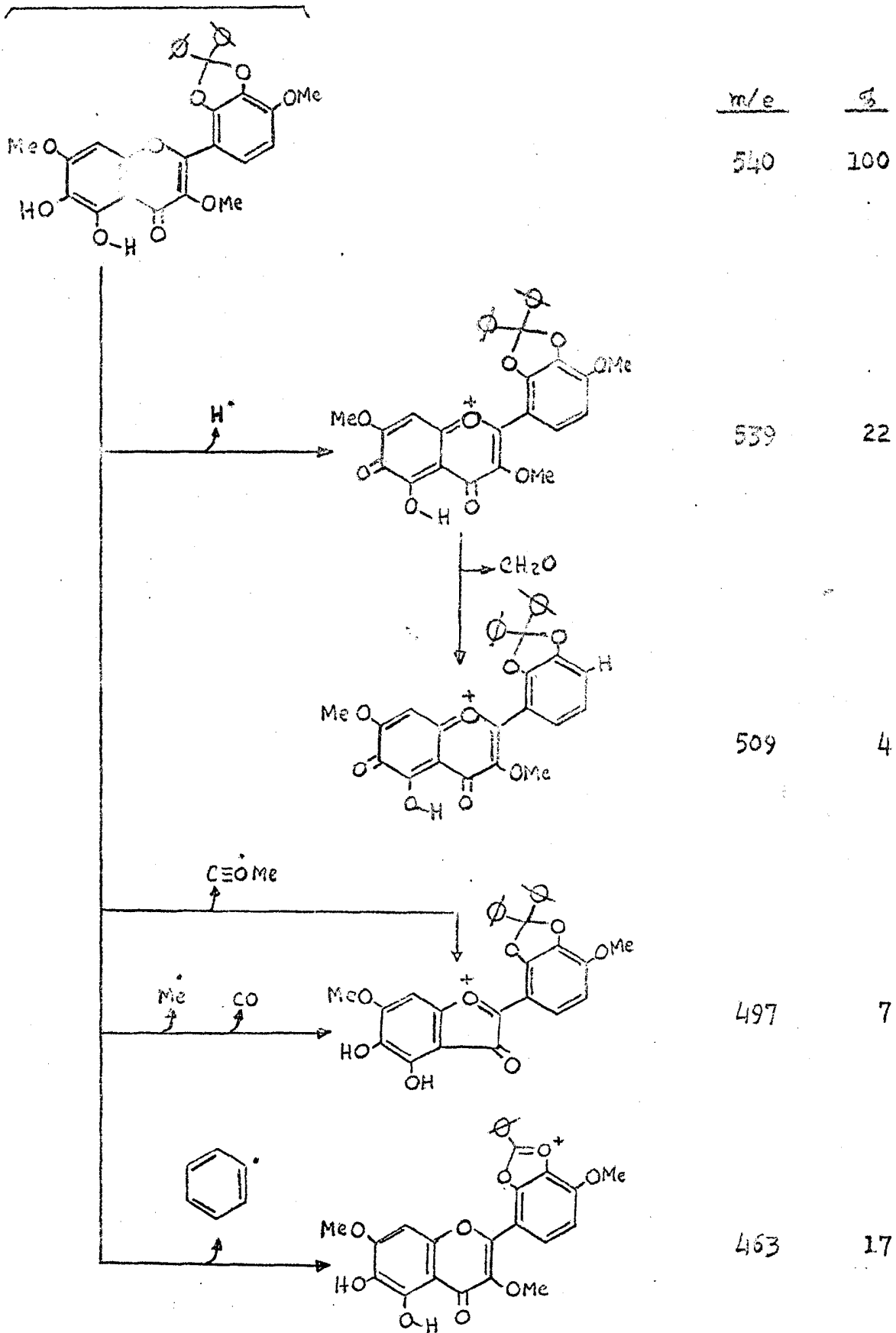
Quadro 41. Continuação.



Quadro 42. Caminhos principais de fragmentação da 2',3',5,6-tetra-O-metilapuleisina (AL-114Me)=2',3,3',4',5,6,7-heptametoxiflavona no espectrômetro de massa.

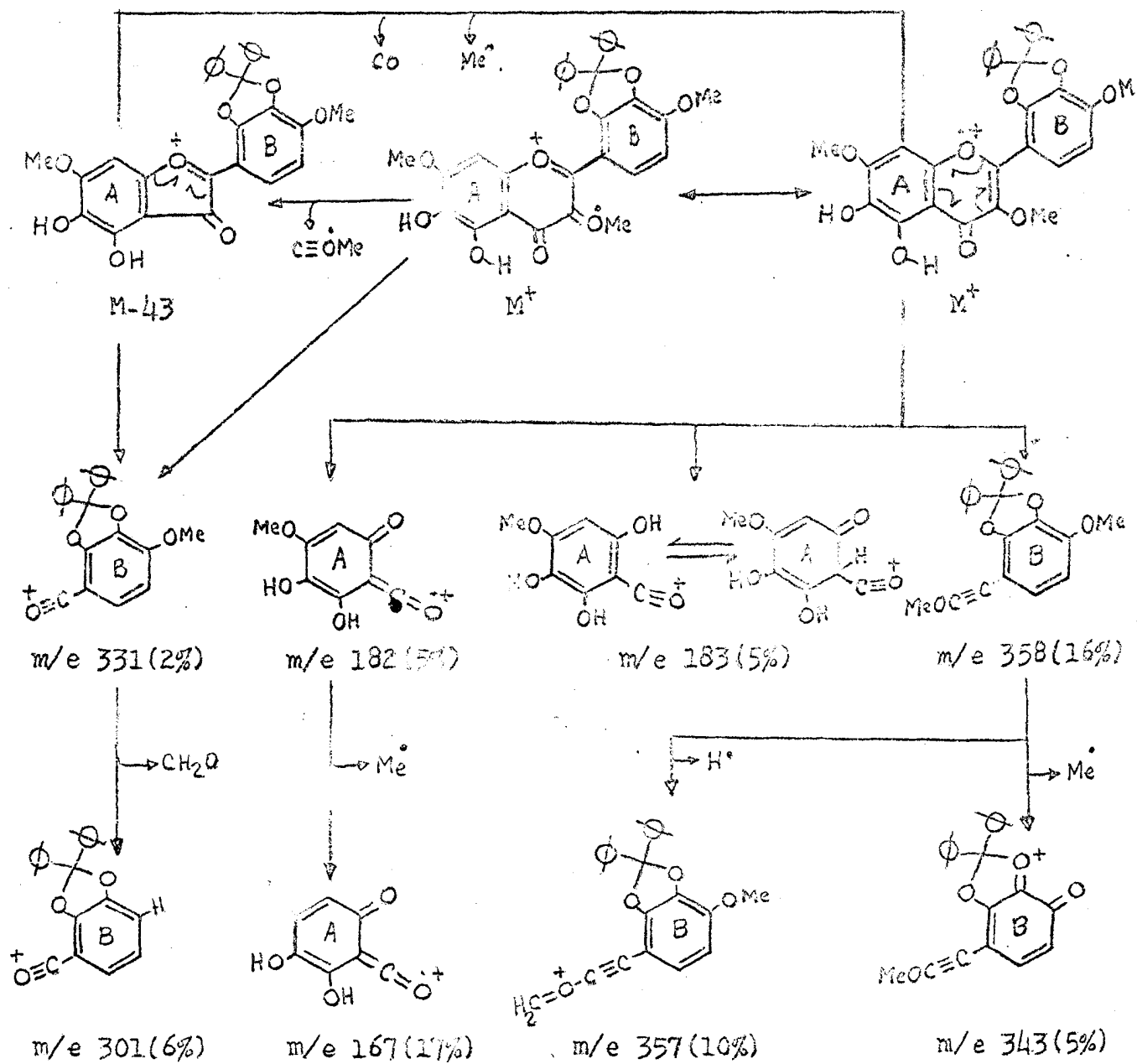


Quadro 42. Continuação.



Quadro 46.

Caminhos principais de fragmentação da 2',3'-
-di-O-difenilmetilapuleisina (AL-14DFM) no
espectrômetro de massa.

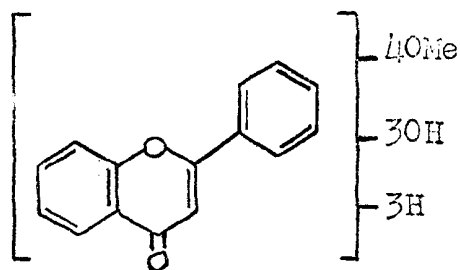


Quadro 46.
Continuação.

AL-16.

A natureza flavônica desta substância também foi deduzida através da análise dos espectros u.v. (Fig. 76), i.v. (Fig. 77), de r.m.n. (Fig. 78) e de massa (Fig. 79). O espectro u.v. por si só é suficiente para eliminar a possibilidade de tratar-se de uma isoflavona, já que a banda I, isto é, a banda que aparece em maior comprimento de onda, figurou em comprimento de onda incompatível com tal esqueleto, e sua intensidade em relação a banda II que ocorre em volta de 240 nm, foi maior de que 1. Isoflavonas apresentam sempre uma relação menor do que 1 entre a banda I e banda II. Além disto, o espectro de r.m.n. (Fig. 78) não registrou sinal entre 2,00-2,27 , faixa em que absorve o próton 2 do anel pirônico de um esqueleto isoflavonoidico.

A presença de 3 sinais representando 4 grupos metoxila, 2 sinais representando 3 prótons aromáticos e 3 sinais representando 3 grupos hidroxila no espectro de r.m.n. (Tabela 42), em conjunto com o peso molecular 390 fornecido pelo espectro de massa (Fig.79, Quadro 47), permitiram formular a estrutura CXXXV.



CXXXV

Tabela 42.

Espectros de r.m.n. da AL-16 e AL-16Ac. Solvente CDCl_3 .
Deslocamentos químicos em unidades τ .

Substância	OH	H-8	H-2'	H-6'	OMe	$\text{CC}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{CH}_3}$
AL-16	-2,43 3,70 4,35	3,45	2,64	2,64	5,99 6,01 6,05 6,12	-
AL-16Ac	-	3,08	2,32 d J=2,3	2,55 d J=2,3	6,07 6,07 6,07 6,18	7,54 7,63 7,68

Tabela 43.

Espectros u.v. da AL-16 e oxiaianina B, em meio neutro e com aditivos.

Aditivos	AL-16				Oxiaianina B [67]			
	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH
-	238 13.600		282 16.050	340 19.050	238 16.800	253 17.650	280 18.300	345 24.100
NaOH	240 15.150		300 11.900	365 13.550				
NaOH+HCl	235 13.250		275 9.800	314 12.450				
AcONa	238 13.600		282 16.050	340 19.050				
AcONa+ H_2PO_3	240 12.450		288 18.600	335 17.350				
AlCl_3	240 12.950	256 11.000	298 14.950	374 20.300	241 11.400	265 13.900	294 17.700	383 25.100
AlCl_3 +HCl	240 11.950	256 9.400	298 15.000	365 18.650	241 8.400	262 11.500	293 16.100	374 21.200

O espectro de r.m.n. (Fig. 80) do produto de acetilação demonstrou que os sinais em $-2,34$, $3,70$ e $4,35\tau$ do espectro da AL-16 correspondem a prótons hidroxílicos (Tabela 42).

Que o carbono 5 sustenta um grupo OH se deduziu dos seguintes dados:

a. alteração do espectro u.v. em presença de triclorêto de alumínio e em presença de tricloreto de alumínio mais ácido clorídrico (Tabela 43).

b. absorção do grupo C=O em 1653 cm^{-1} (Fig. 77) e os deslocamentos desta absorção para menores frequências, observados nos espectros do derivado trimetilado (1639 cm^{-1} , Fig. 81) e do derivado triacetilado (1632 cm^{-1} , Fig. 82).

c. o sinal em $-2,43\tau$ (Tabela 42) no espectro de r.m.n. (Fig. 78) e o sinal em $7,54\tau$ (Tabela 42) no espectro do triacetato (Fig. 80).

O deslocamento químico do sinal simples ($2,65\tau$) representando 2 prótons registrado no espectro de r.m.n. (Tabela 42) é compatível apenas com prótons localizados nas posições 2',6' em um anel B 3',4',5'-trioxigenado.

A localização de um grupo metoxila na posição 3 se baseia nos resultados obtidos dos espectros de r.m.n. da substância original (Fig. 78) e do derivado acetilado (Fig. 80) e descritos abaixo:

a. a ausência de sinal representando o próton de OH em C-3, em torno de $0,5\tau$ (Tabela 42).

b. o sinal simples que aparece em $3,45\tau$ no espectro da substância sofre um deslocamento paramagnético de $0,37\tau$. Tal comporta

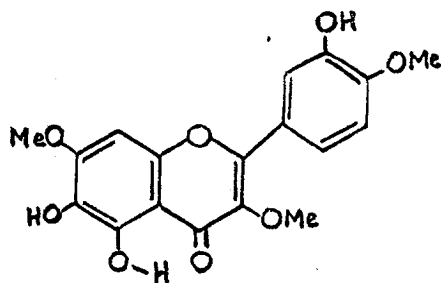
mento não é previsto para um próton localizado no carbono 3, embora o valor $3,45\tau$ em si seja compatível [24].

c. a presença de pico em M-43 no espectro de massa (Fig. 79, Quadro 47) é compatível com OMe em C-3 [43].

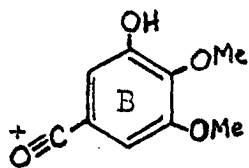
Que a posição 3' sustenta uma função hidroxila fica evidente, também, da comparação dos espectros de r.m.n. (Tabela 42), em face dos deslocamentos paramagnéticos verificados para as bandas referentes aos prótons em 2', 6'. Conseqüentemente, a posição 5' deve ser ocupada por um grupo metoxila.

Já que o espectro u.v. de flavonas (incluindo flavonas 3-oxigenadas) contendo um sistema orto-dihidroxi no anel B revela um deslocamento batocrômico de 12-30 nm da banda I em presença de acetato de sódio + ácido bórico [5], que não foi observado no caso presente, a posição 4' também deve ser ocupada por um grupo metoxila (Tabela 43). Inalteração do espectro em presença de acetato de sódio também revelou ausência de OH em 4' e 7' (Tabela 43). Além disto, comparação dos espectros obtidos após adição de tricloreto de alumínio e tricloreto de alumínio mais ácido clorídrico apoiam esta dedução. O deslocamento hipocrômico da banda I observada (Tabela 43) foi de 9 nm, enquanto o previsto seria de 30-40 nm [5]. Aliás, a oxiaianina B (CXXXVI) comporta-se de maneira análoga em relação a AL-16 (Tabela 43), sendo também de 9 nm o deslocamento hipocrômico constatado. Diante destes resultados o anel A deve ser dihidroximonometoxilado.

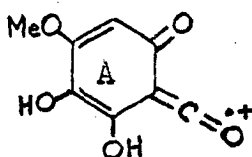
O espectro de massa (Fig. 79, Quadro 47) corroborou com estas deduções através dos picos em m/e 181 (CXXXVII), m/e 182 (CXXXVIII) e m/e 183 (CXXXIX).



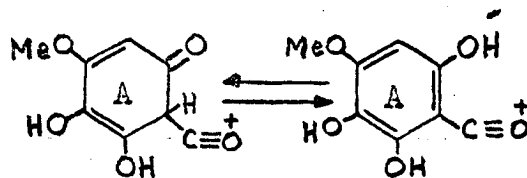
CXXXVI



CXXXVII
m/e 181
6%

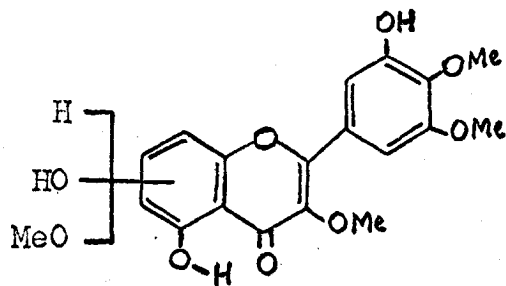


CXXXVIII
m/e 182
5%



CXXXIX
m/e 183
5%

O conjunto de dados aludidos permitiu, portanto, formular a estrutura parcial (CXL) para a substância natural em análise.



CXL

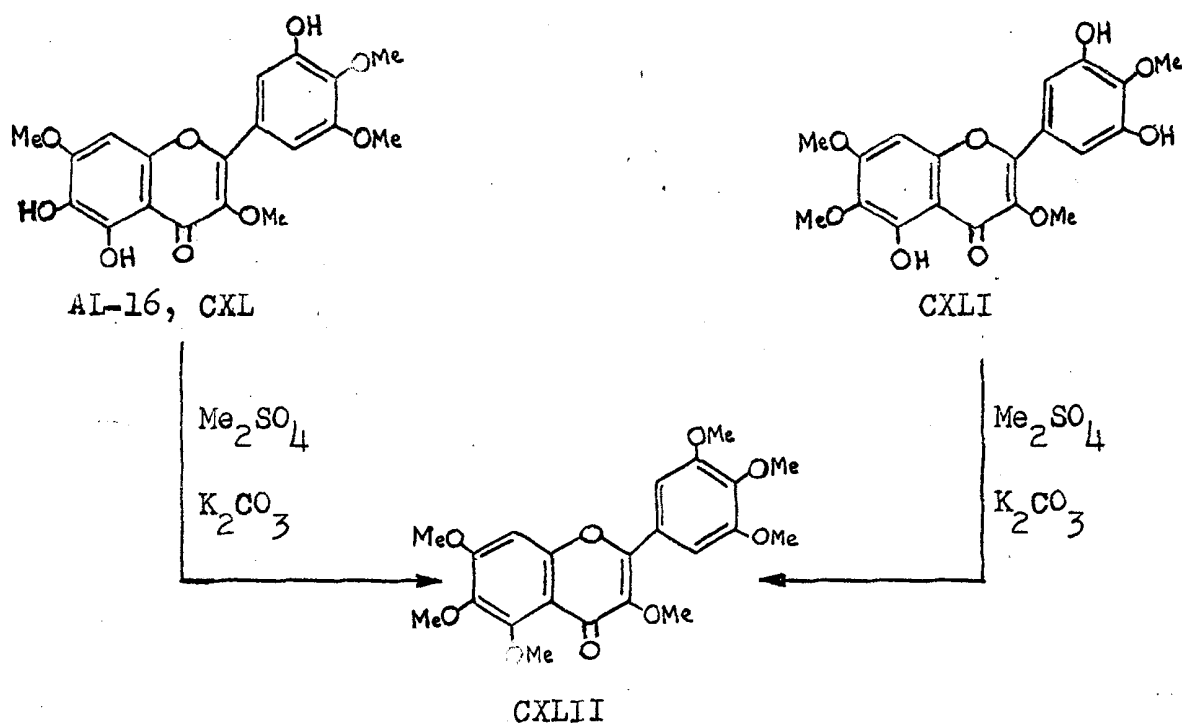
A frequência do sinal simples em $3,46 \tau$ no espectro de r.m.n. é compatível com um próton em C-8 para anel A que sustenta um grupo OH na posição 5, conforme já referido. O deslocamento deste sinal para $3,08 \tau$ ao se passar para o espectro de r.m.n. do acetato está em acordo com esta proposição.

Aliás, a instabilidade da substância em meio alcalino revelou-se concordante com um sistema 5,6-dihidroxi (Tabela 43).

Conforme esperado as metilações de AL-16 e de 3',5,5'-trihidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (CXLI) forneceu um mesmo produto CXLII (Quadro 48).

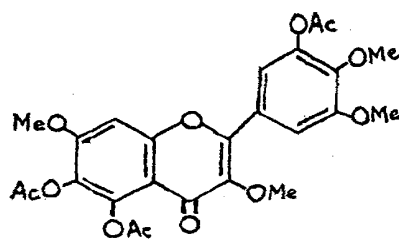
Quadro 48.

Metilação da AL-16 e da 3',5,5'-trihidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona.



Assim, surge a AL-16 como sendo a 3',5,6-trihidroxi-3,4',5',7-tetrametoxiflavona (CXL), substância inédita que foi denominada apu

leitrina. Conseqüentemente, definiu-se o derivado metilado (AL-16Me) como 3',5,6-tri-O-metilapuleitrina (CXLIII) e o derivado acetilado (AL-16Ac) como 3',5,6-tri-O-acetilapuleitrina (CXLIIII).



CXLIII

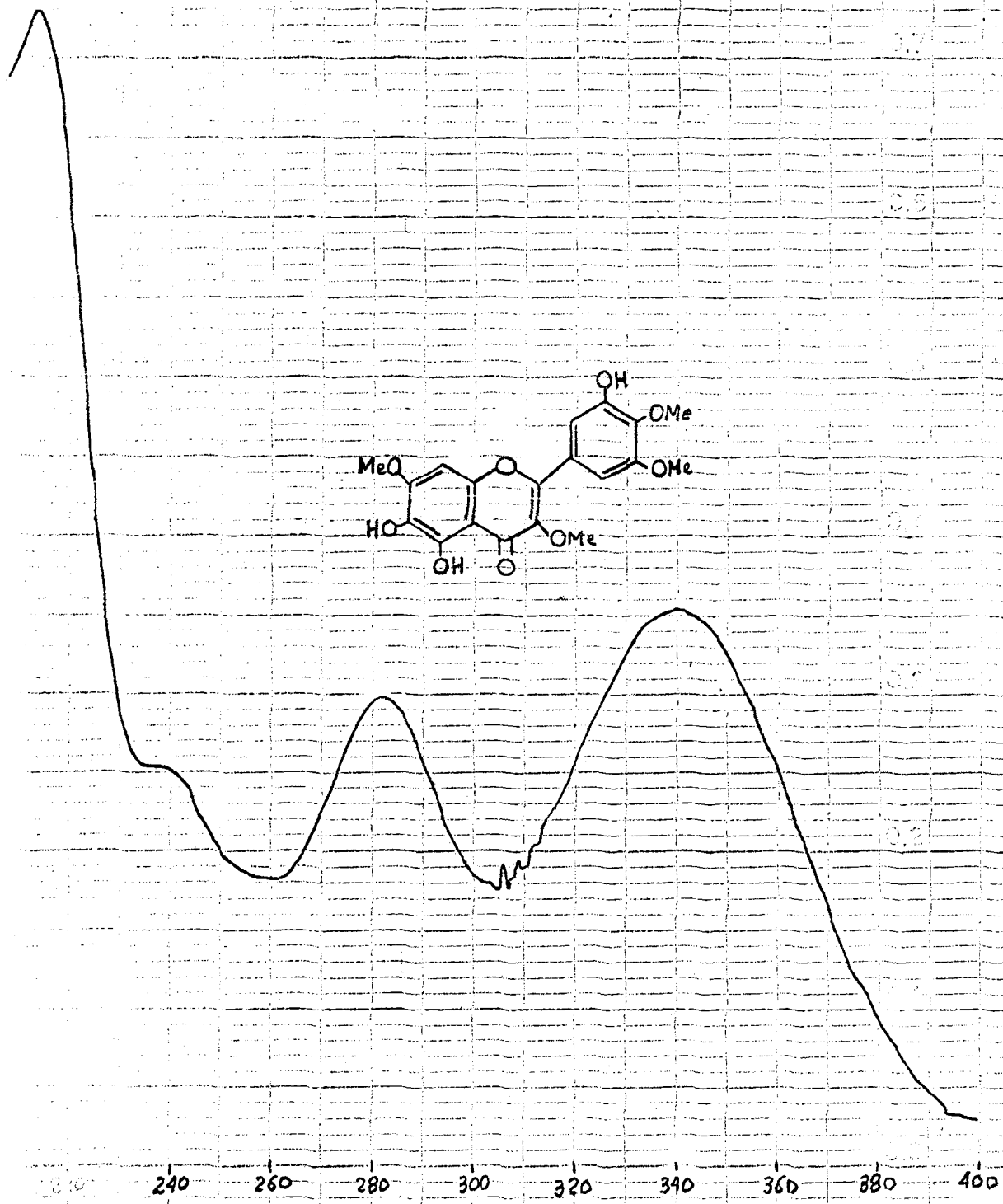


Figura 76.

Espectro u.v. da apuleitrina (AL-16) = 3',5,6-tri
hidroxi-3,4',5',7-tetrametoxiflavona.

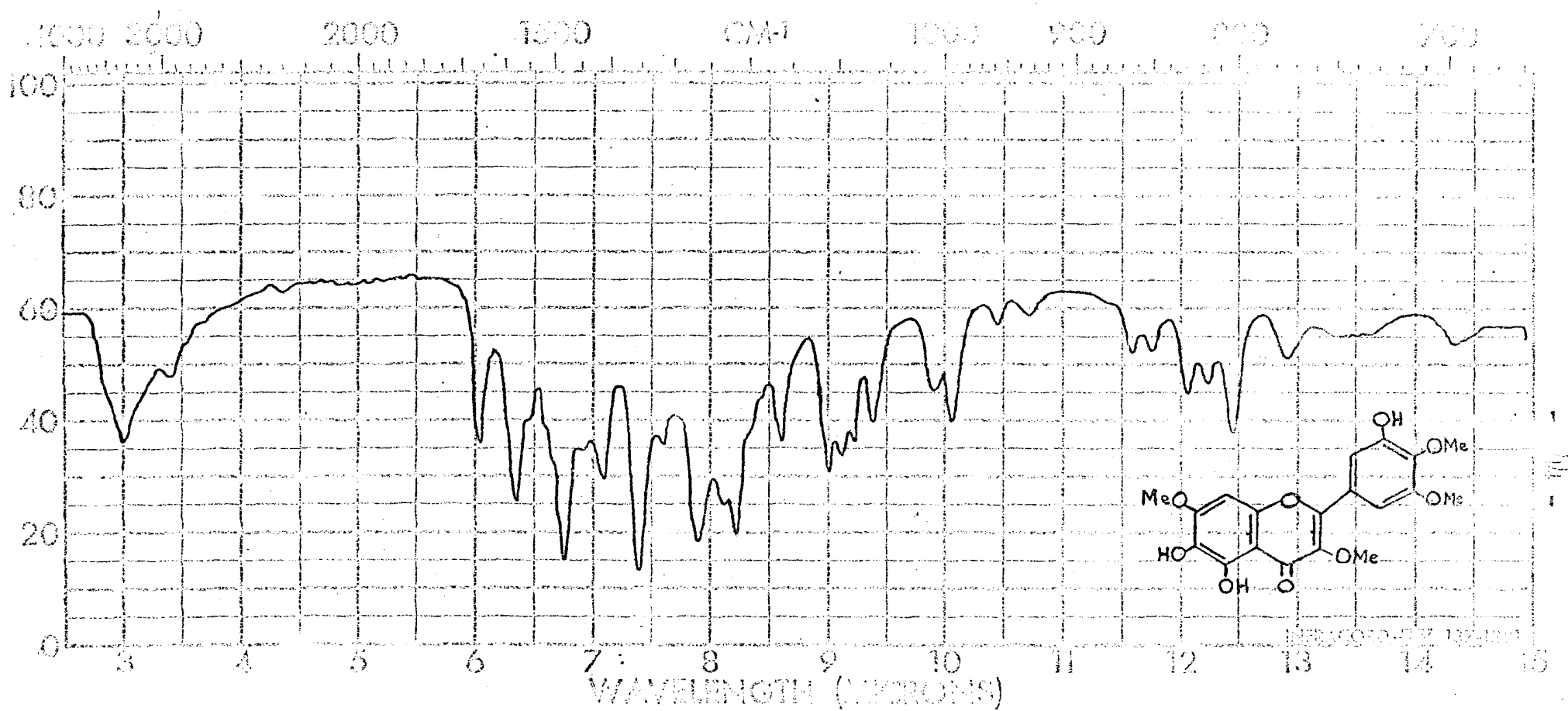


Figura 77. Espectro i.v. da apuleitina (AL-16) = 3',5,6-trihidroxi-3,4',5',7-tetrametoxiflavona.
Fase: KBr.

DATE	DEC. SHIFT	REF. STD.	R.F. FIELD	R.F. GAIN	REMARKS	SENSITIVITY NORM: 8 INT: 8	SWEEP RATE 16 69,120 UNITS PER MIN.	TIME CONST. 0.05 SECS.	SCALE FACTOR 6
9.9.69	200c/s	TMS	8×10^2	1/2					

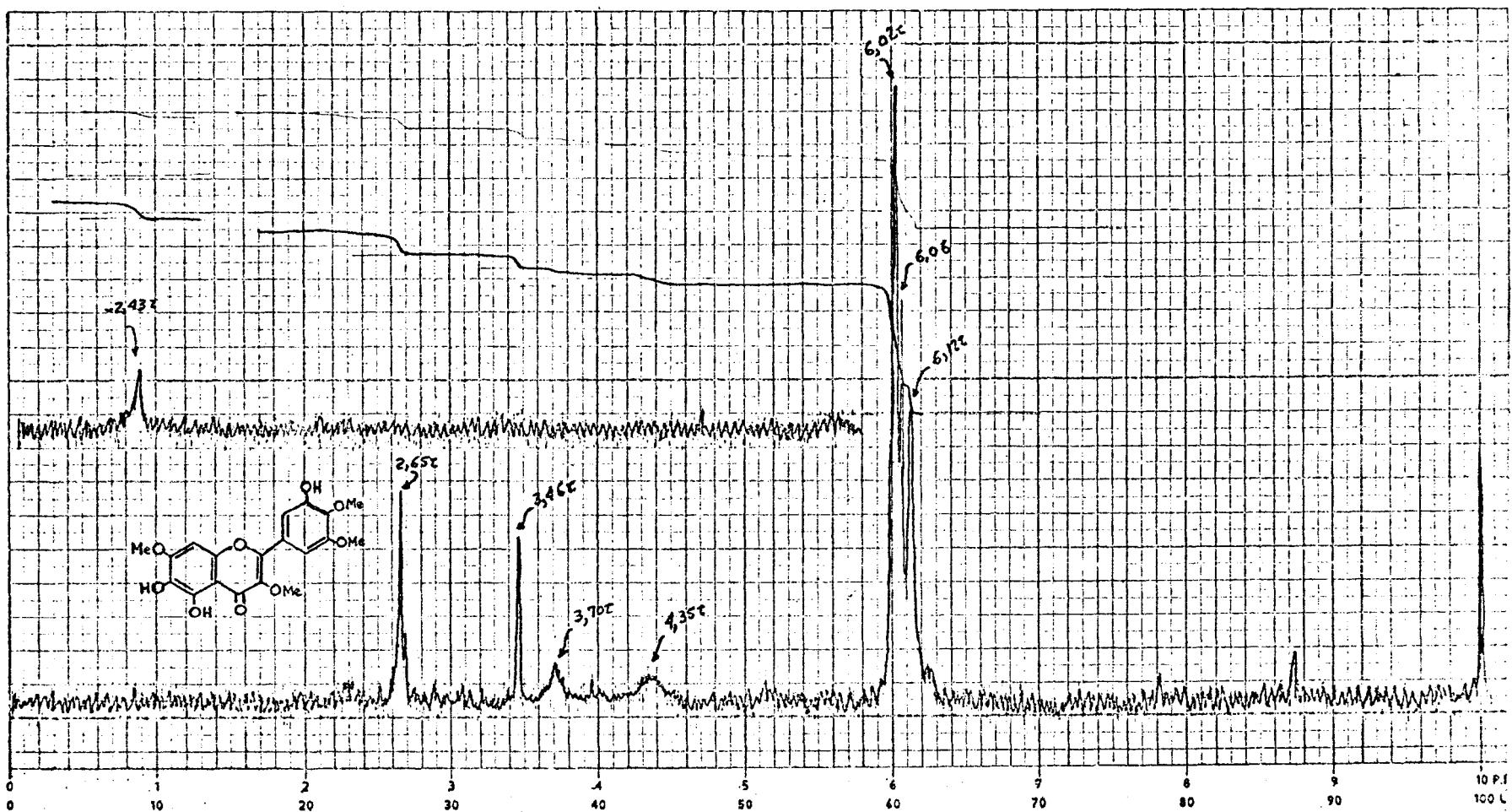


Figura 78.

Espectro de r.m.n. da apuleitriina (AL-16) = 3',5,6-trihidroxi-3,4',5',7-tetra metoxiflavona. Solvente: $CDCl_3$.

- 21 -

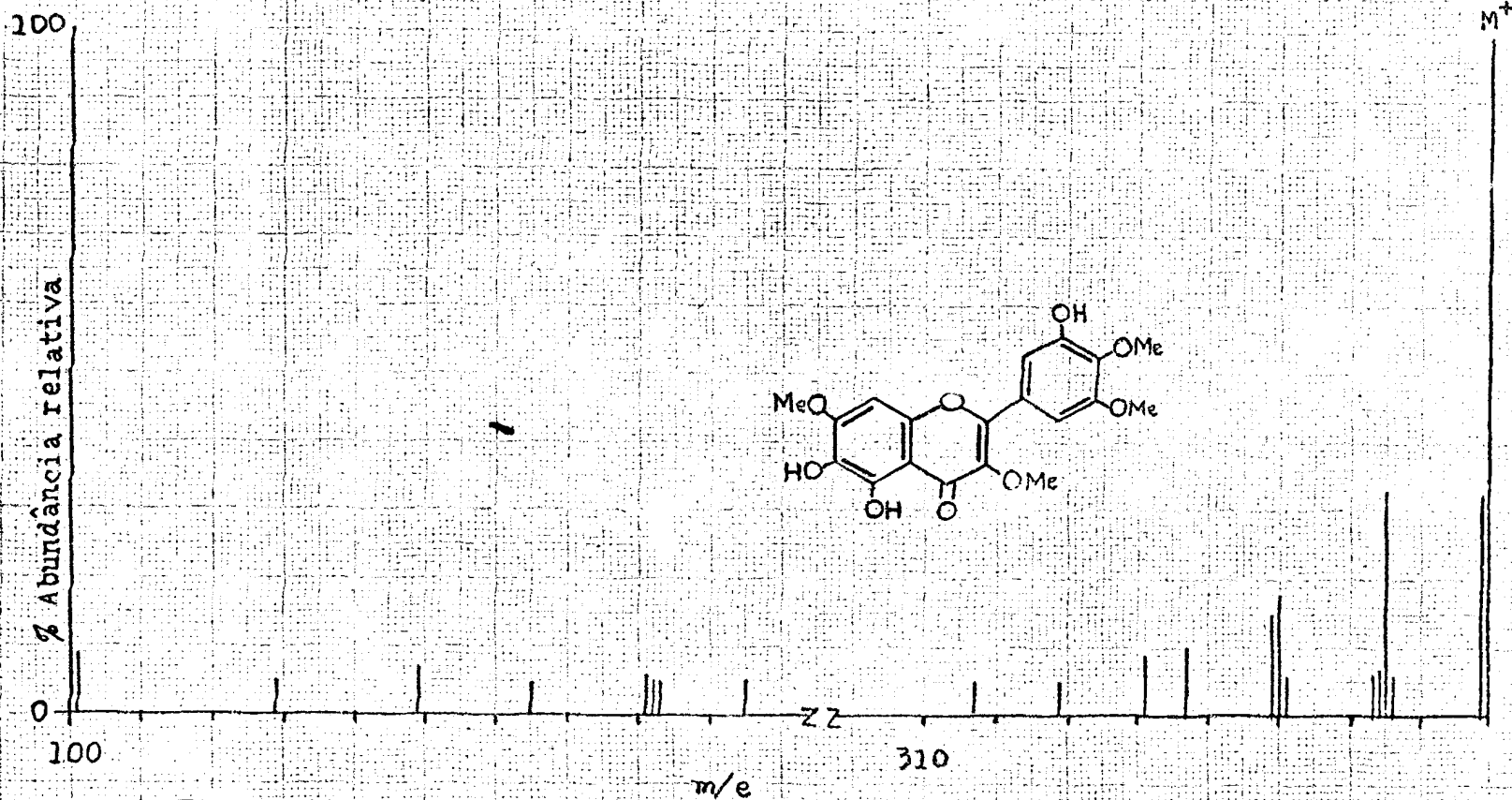
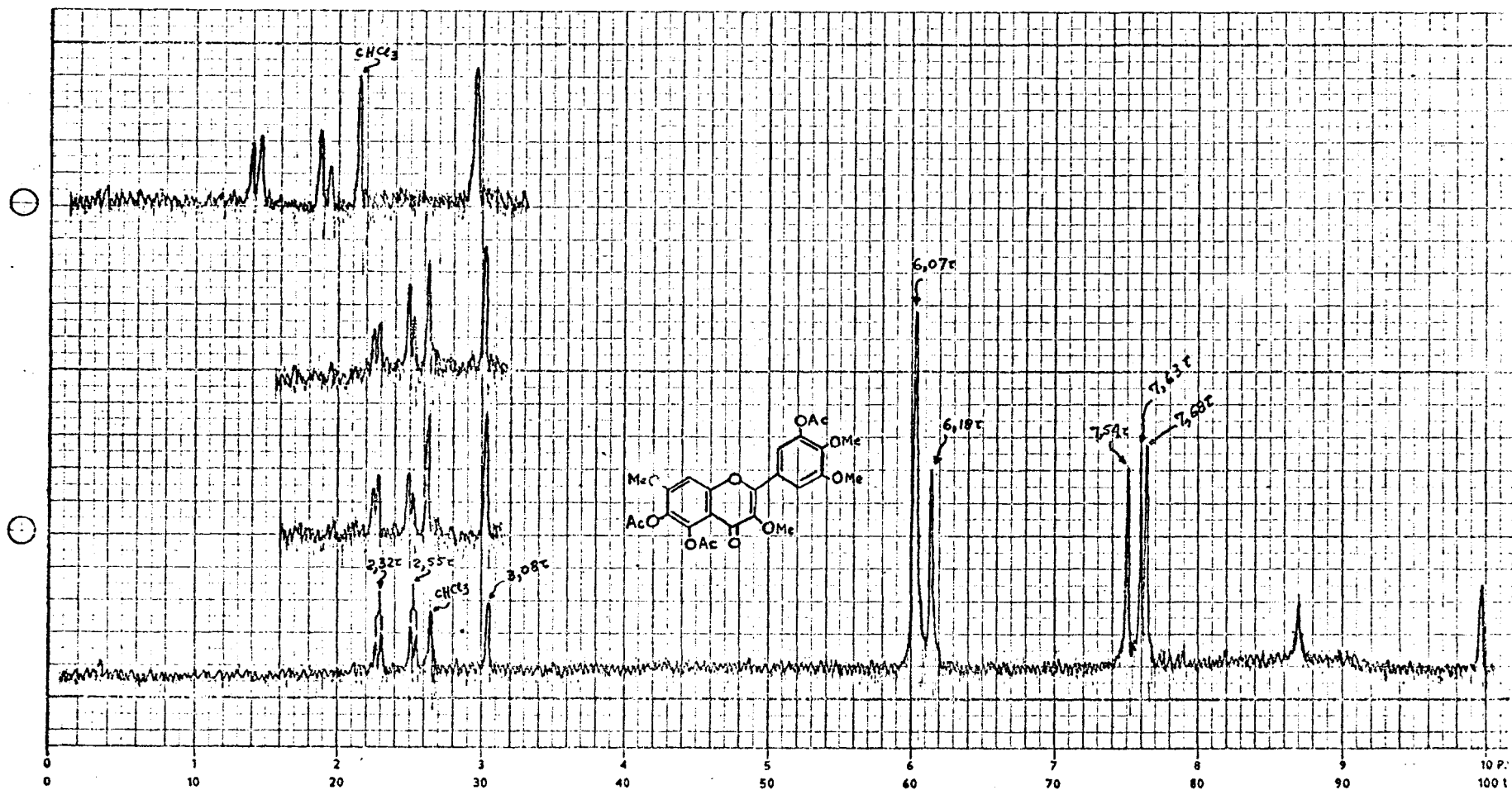


Figura 79.

Espectro de massa da apuleitrina (AL-16) = 3',5,6-trihidroxi-
-3,4',5',7-tetrametoxiflavona.

DATE 10.9.69	DEC. SHIFT	REF. STD. TMS	R.F. FIELD 8×10^2	R.F. GAIN 1/2	REMARKS	SENSITIVITY NORM: 100	SWEEP RATE 16 UNITS PER MIN.	TIME CONST. 0.01 SECS	SCALE FACTOR 34.6
-----------------	------------	------------------	-------------------------------	------------------	---------	--------------------------	---------------------------------	--------------------------	----------------------



- 217

PART Nº 448-1112

PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD, BUCKS.

Figura 80. Espectro de r.m.n. da 3',5,6-tri-O-acetilapuleitrina (AL-16Ac) = 3',5,6-tria
cetoxi-3,4',5',7-tetrametoxiflavona. Solvente: CDCl₃.

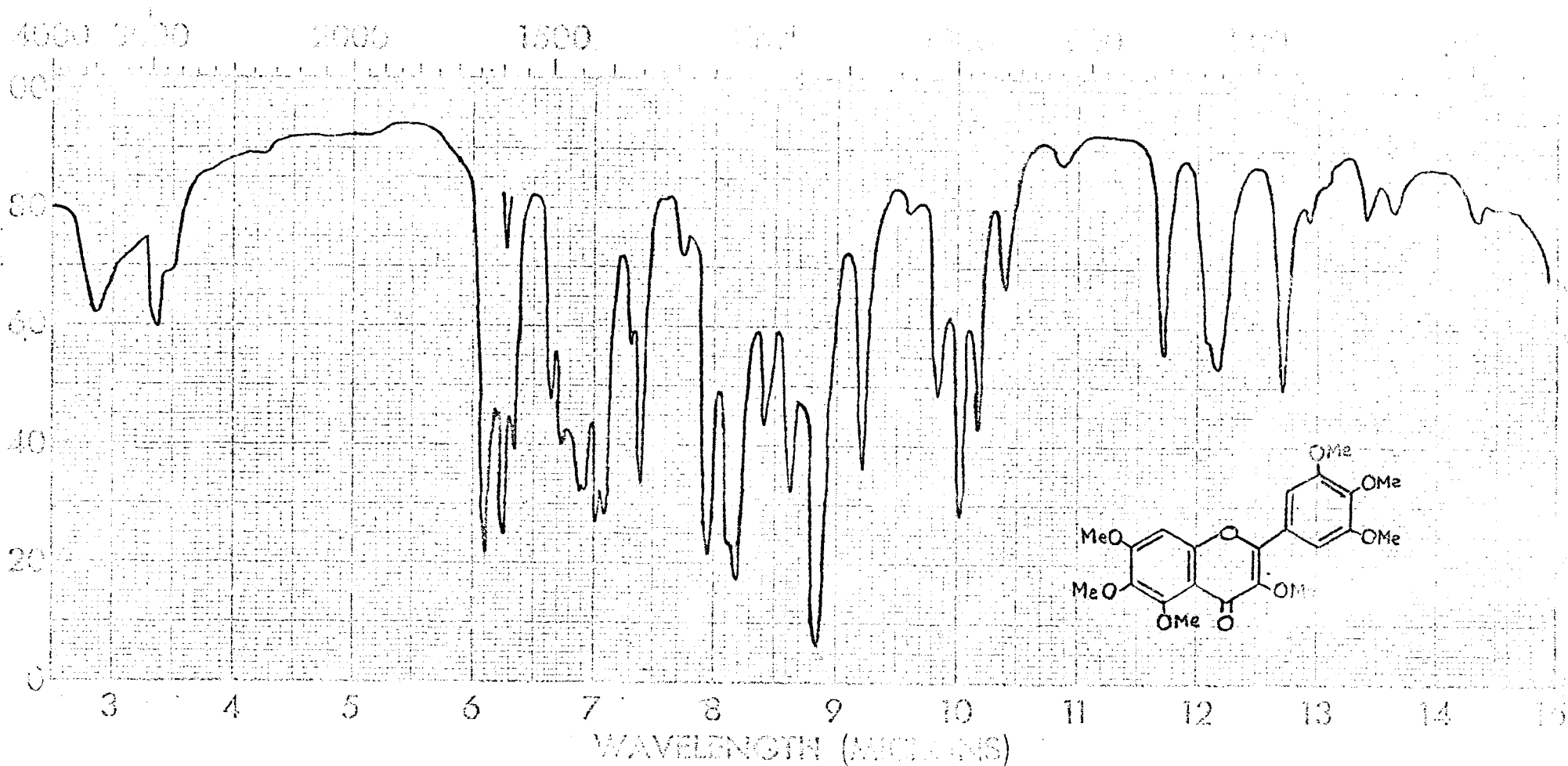


Figure 81.

Espectro i.v. da 3',5,6-tri-O-metilapaleitrina (AL-16Me) = 3,3',4',5,5',6,7-heptametoxi flavona.

Fase: KBr

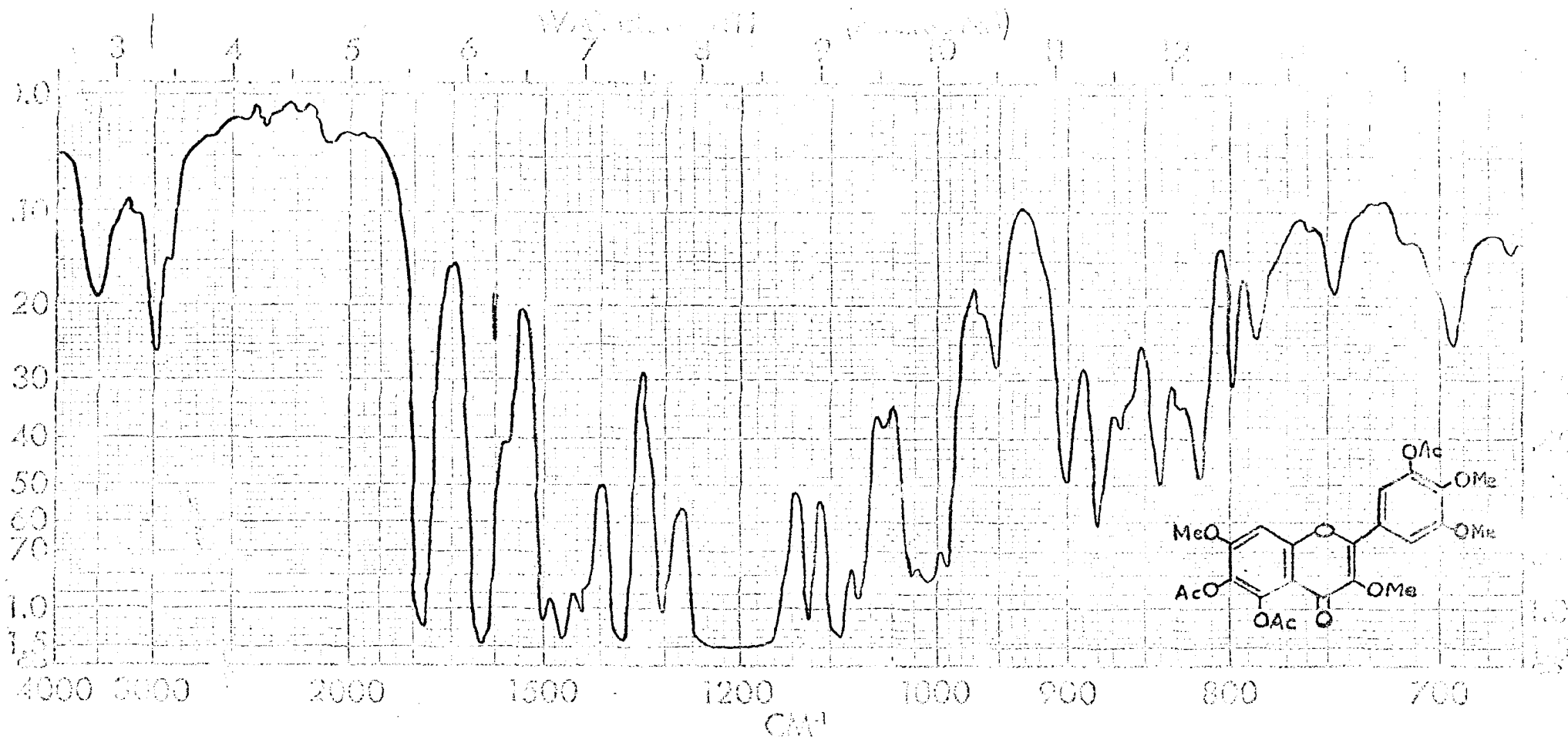
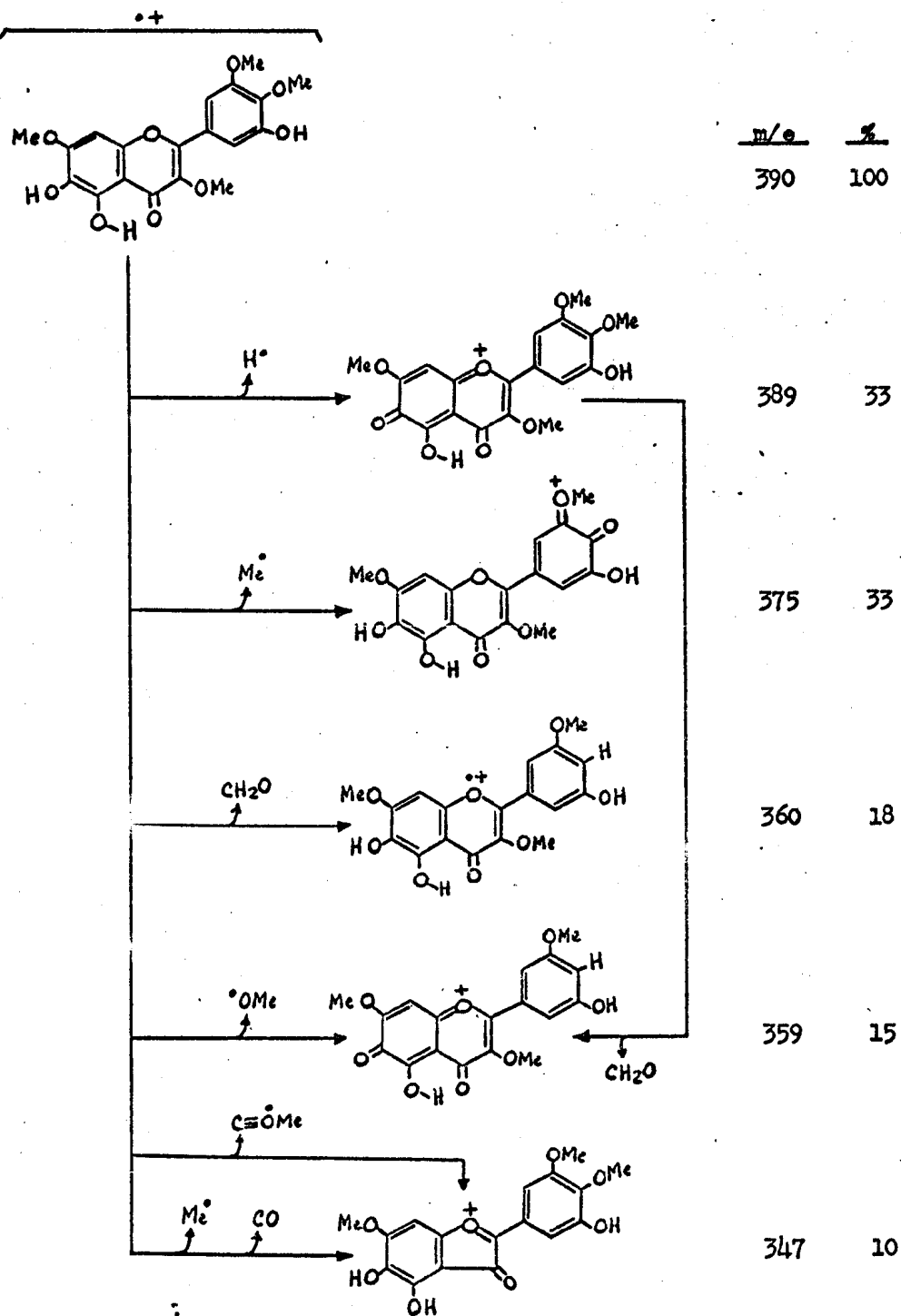


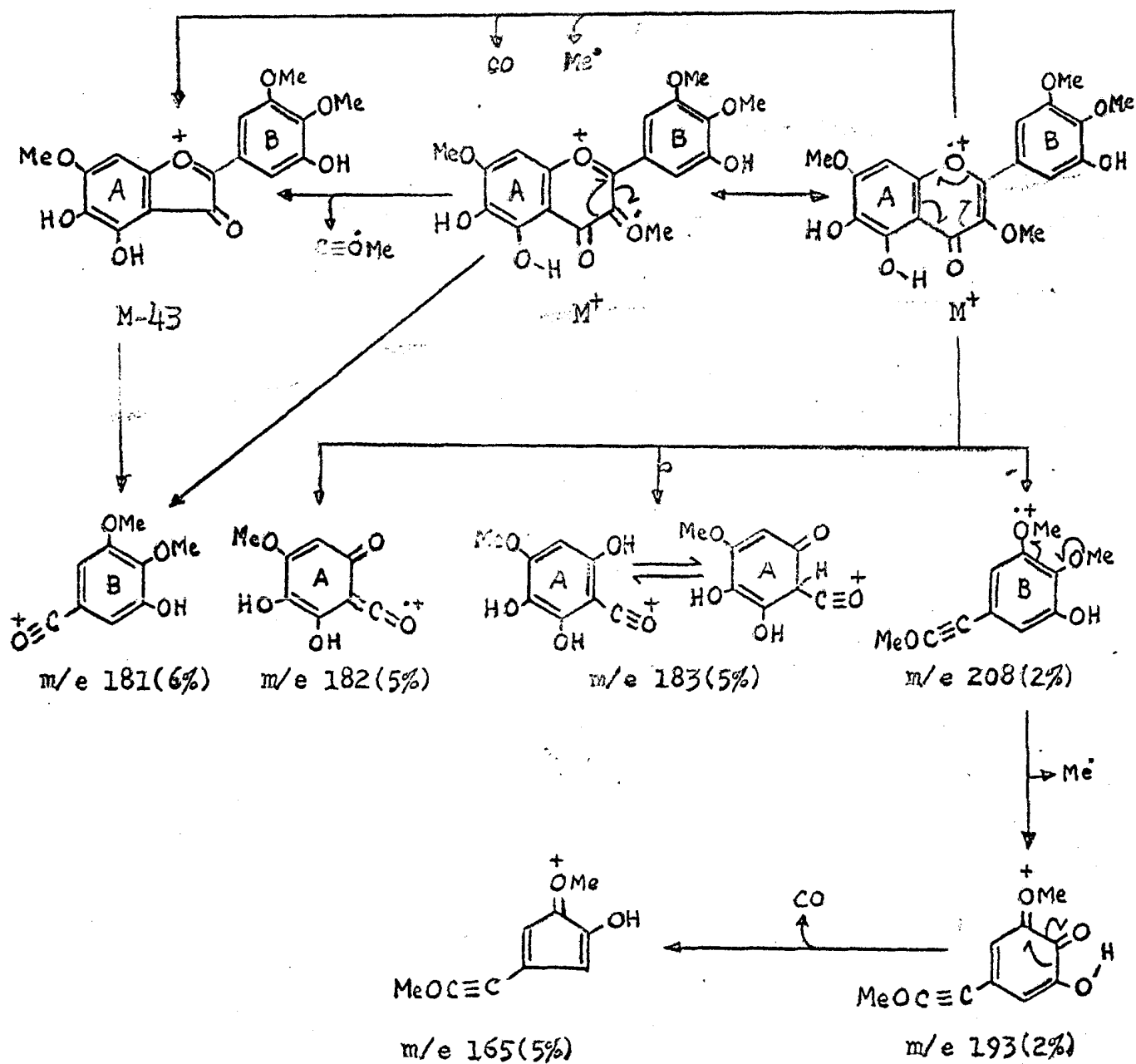
Figura 82.

Espectro i.v. da 3',5,6-tri-O-acetilapuleitrina (AL-16Ac) = 3',5,6-triacetoxi-3,4',5',7-tetrametoxiflavona.

Fase: KBr.



Quadro 47. Caminhos principais de fragmentação da apuleitrina (AL-16)=3',5,6-trihidroxi-3,4',5',7-tetrametoxiflavona no espectrômetro de massa.



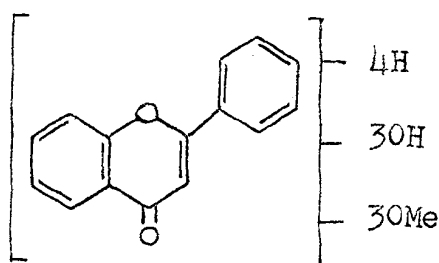
Quadro 47.

Continuação

AL-19A.

Os espectros u.v. (Fig. 83), i.v. (Fig. 84), de r.m.n. (Fig. 85) e de massa (Fig. 86) revelaram a estreita semelhança desta substância com as já descritas.

A formulação parcial CXLIV resulta da análise do espectro de r.m.n. (Tabela 44) e do peso molecular 360 indicado pelo espectro de massa (Fig. 86, Quadro 49).



CXLIV

A confirmação do número de grupos hidroxila foi obtida pela comparação dos espectros de r.m.n. da substância natural e do acetato dela derivado (Tabela 44).

Os deslocamentos químicos 3,62 e 3,54 τ das duas bandas com constante de acoplamento 2,3Hz caracterizaram 2 prótons nas posições 6 e 8 respectivamente. Conseqüentemente, as posições 5 e 7 são oxigenadas. Que a posição 5 sustenta uma função hidroxila evidencia-se dos seguintes dados espectrais:

a. alteração do espectro u.v. em presença do tricloreto de alumínio (Tabela 45).

b. posição de absorção do grupo C=O no espectro i.v. (1650 cm^{-1} , Fig. 84) e o seu deslocamento para região de menor energia no espectro i.v. do acetato derivado (1638 cm^{-1} , Fig 87).

Tabela 44.

Espectros de r.m.n. da AL-19A e AL-14 e seus derivados e da AL-12.

Substância	OH	H-6	H-8	H-5'	H-6'	OCH ₃	OCOCH ₃
AL-19A	-2,46 1,95 4,05	3,62 d J=2,3	3,54 d J=2,3	3,27 d J=8,7	2,73 d J=8,7	6,02 6,13 6,13	-
AL-19AAc	-	3,25 ou 3,35 d J=2,3	3,35 ou 3,25 d J=2,3	2,96 d J=8,7	2,42 d J=8,7	6,09 6,12 6,35	7,55 7,70 7,80
AL-14	-2,24 2,02 4,16 4,56	-	3,42	3,26 d J=8,4	2,76 d J=8,4	6,00 6,00 6,09	-
AL-14Ac	-	-	3,20	2,98 d J=8,6	2,47 d J=8,6	6,09 6,09 6,35	7,53 7,65 7,68
				H-3'	H-6'		
AL-12	-2,35 2,14 4,72	3,63 d J=2,0	3,56 d J=2,0	3,41	2,73	6,10 6,17 6,17	-
AL-12Ac	-	3,26 d J=2,6	3,41 d J=2,6	3,16	2,65	6,13 6,13 6,39	7,55 7,66 7,78

Tabela 45.

Espectros u.v. da AL-19A, em meio neutro e com aditivos.

Aditivo	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH	λ_{max} MeOH
-	230 10.650	260 11.250	300 5.300	333 6.700
NaOH	265 10.900	360 4.500		
NaOH+HCl	255 11.150	290 5.250	320 3.900	
AcONa	238 9.000	255 11.400	300 4.800	335 6.350
AcONa+H ₃ BO ₃	233 26.200	260 9.850	295 3.900	343 6.300
AlCl ₃	268 12.750	300 3.750	360 5.700	400 9.450
AlCl ₃ +HCl	270 11.000	300 3.750	334 4.650	385 4.950

c. sinal em $-2,46 \tau$ (Tabela 44) no espectro de r.m.n.. A banda simples em $7,55 \tau$ (Fig. 88, Tabela 44) correspondente a um grupo OCOCH_3 em 2-5 no espectro do acetato apoia esta dedução.

As duas bandas duplas restantes ($J=8,7\text{Hz}$) foram correlacionadas com os prótons em $5',6'$ por simples comparação de espectros de r.m.n. (Tabela 44). Tais sinais demonstram comportamento idêntico àquele observado na apuleisina (AL-14). Em face disto, o anel B sustenta funções oxigenadas em $2',3',4'$.

A localização de uma função oxigenada na posição 3 foi evidente, já que os espectros de r.m.n. não revelaram nenhuma banda simples representando 1 próton na região entre $3,20$ e $3,50 \tau$.

O espectro de massa (Quadro 49) é favorável à existência de um anel A monohidroximonometoxilado e um anel B dihidroximonometoxilado.

Que a posição 3 contém um grupo metoxila concluiu-se das seguintes observações:

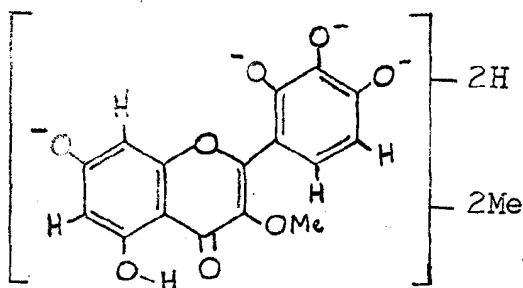
a. a banda I, isto é, a banda que aparece em região de menor energia do espectro u.v. tem o seu máximo registrado em 333nm . Ora, flavonas com um grupo OH na posição 3 ostentam a banda I entre $354-387\text{nm}$, enquanto aquelas que contêm um OMe nesta posição revelam a banda referida entre $330-359\text{nm}$ [5].

b. a ausência de sinal em torno de $0,5 \tau$ no espectro de r.m.n..

c. presença de pico em M-43 (Fig. 86, Quadro 49) no espectro de massa.

Com os argumentos lançados pôde-se propôr a formulação par

cial CXLV.



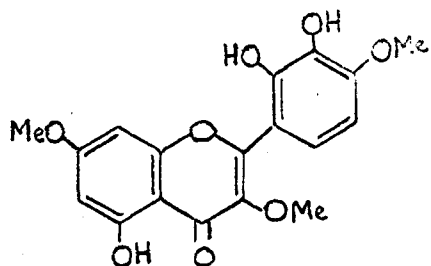
CXLV

A existência de um sistema orto-diOH no anel B foi deduzida dos espectros u.v. em presença de acetato de sódio mais ácido bórico, em presença de tricloreto de alumínio e tricloreto de alumínio mais ácido clorídrico e da instabilidade da substância em meio alcalino (Tabela 45). Assim, a posição 7 é ocupada por um grupo metoxila.

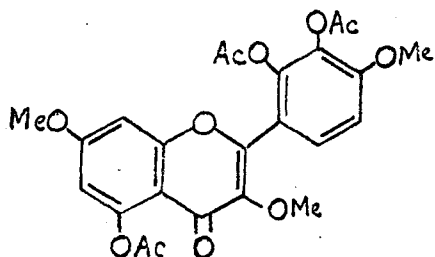
O sinal correspondente a próton de grupo hidroxila que aparece em $1,95\tau$ indicou a existência de tal grupo na posição 2'. A presença de picos intensos em M-17 (52%) e M-31 (32%) no espectro de massa confirmou esta atribuição (Quadro 49). Aliás, inalteração do espectro u.v. utilizando acetato de sódio como aditivo é favorável à presença de grupos metoxila em 7 e 4'.

Conseqüentemente, a estrutura da AL-19A define-se como 2',3',5-trihidroxí-3,4',7-trimetoxiflavona (CXLVI), substância nova que foi denominada apuleidina. Sendo assim, o seu acetato derivado deve ser formulado como 2',3',5-tri-O-acetilapuleidina (CXLVII).

Neste ponto, merece consideração a absorção em deslocamento químico relativamente baixo, isto é $6,35\tau$, correspondente a um grupo

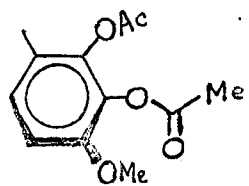


CXLVI



CXLVII

metoxila no espectro de r.m.n. da 2',3',5-tri-O-acetilapuleidina (CXLVII, Tabela 44). Esta substância oferece a oportunidade de discutir tal dado, embora não seja a única d'êste trabalho que revela o fenômeno. Parece lícito admitir que em todos êstes casos o grupo metoxila em 4' localiza-se no cone de proteção do grupo C=O da acetoxila em 3' como figurado em CXLVIII.



CXLVIII

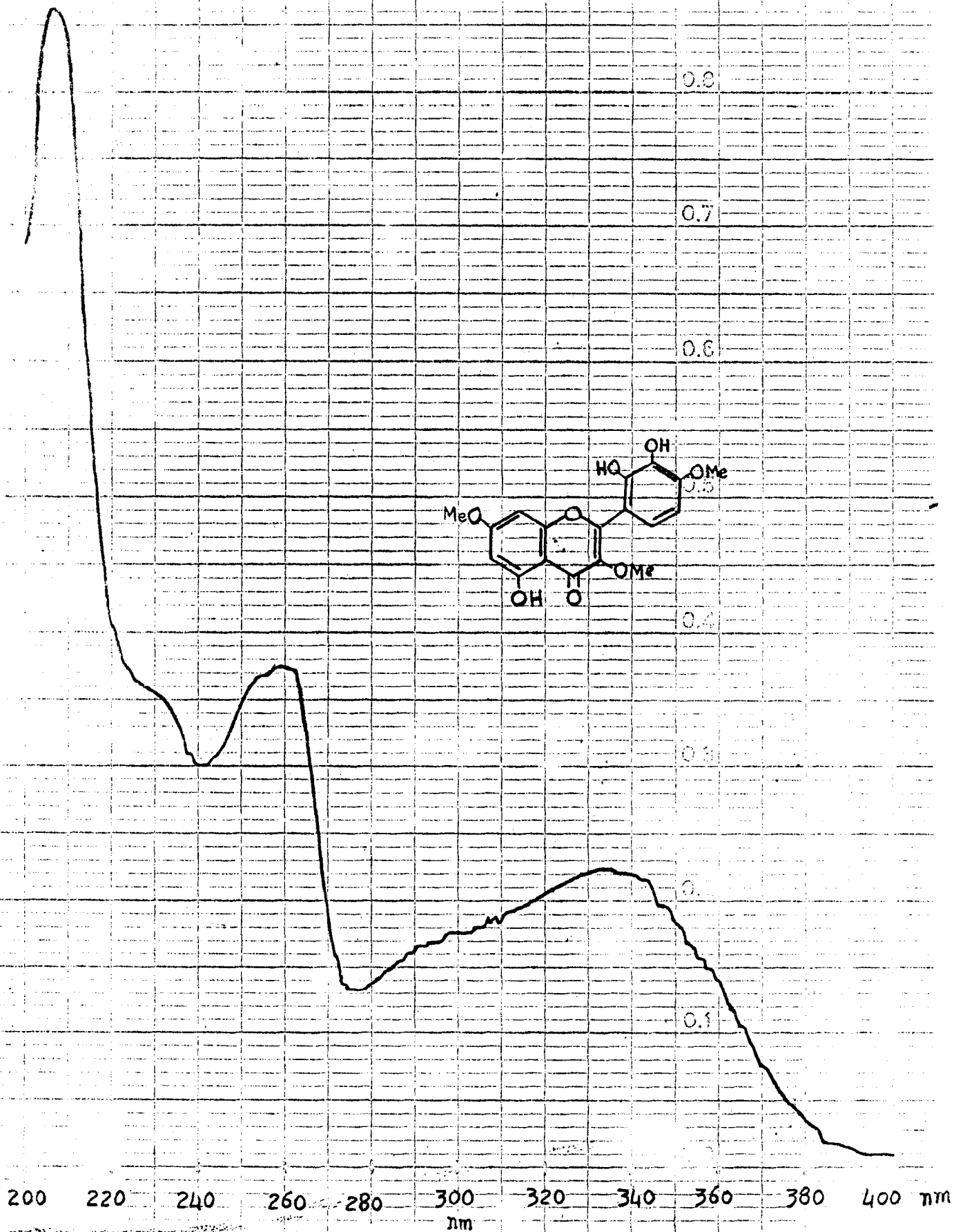


Figura 83.

Espectro u.v. da apuleidina (AL-19A) = 2',3',5-trihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona.

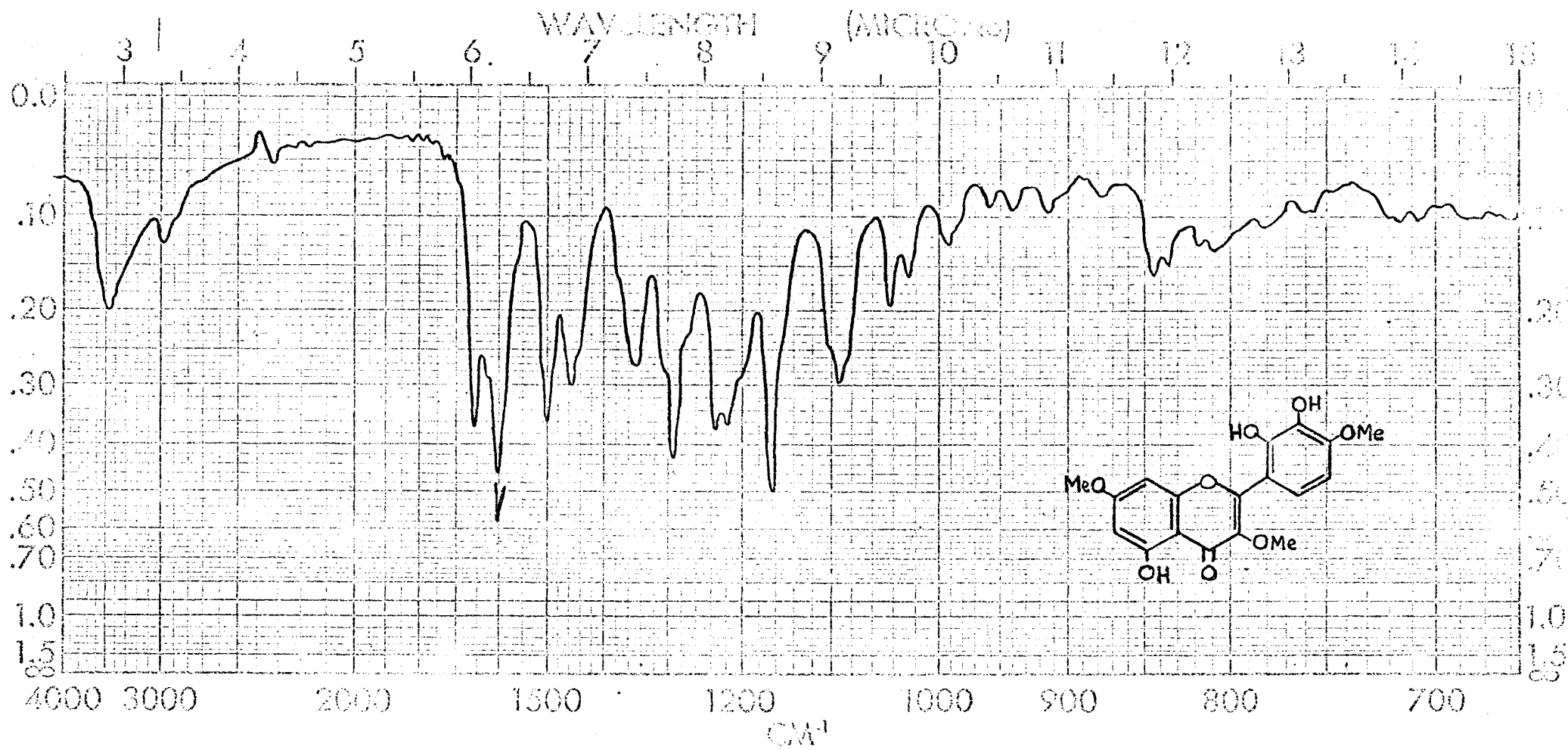


Figura 84.

Espectro i.v. da apuleidina (AL-19A) = 2',3',5-trihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona.

Fase:KBr

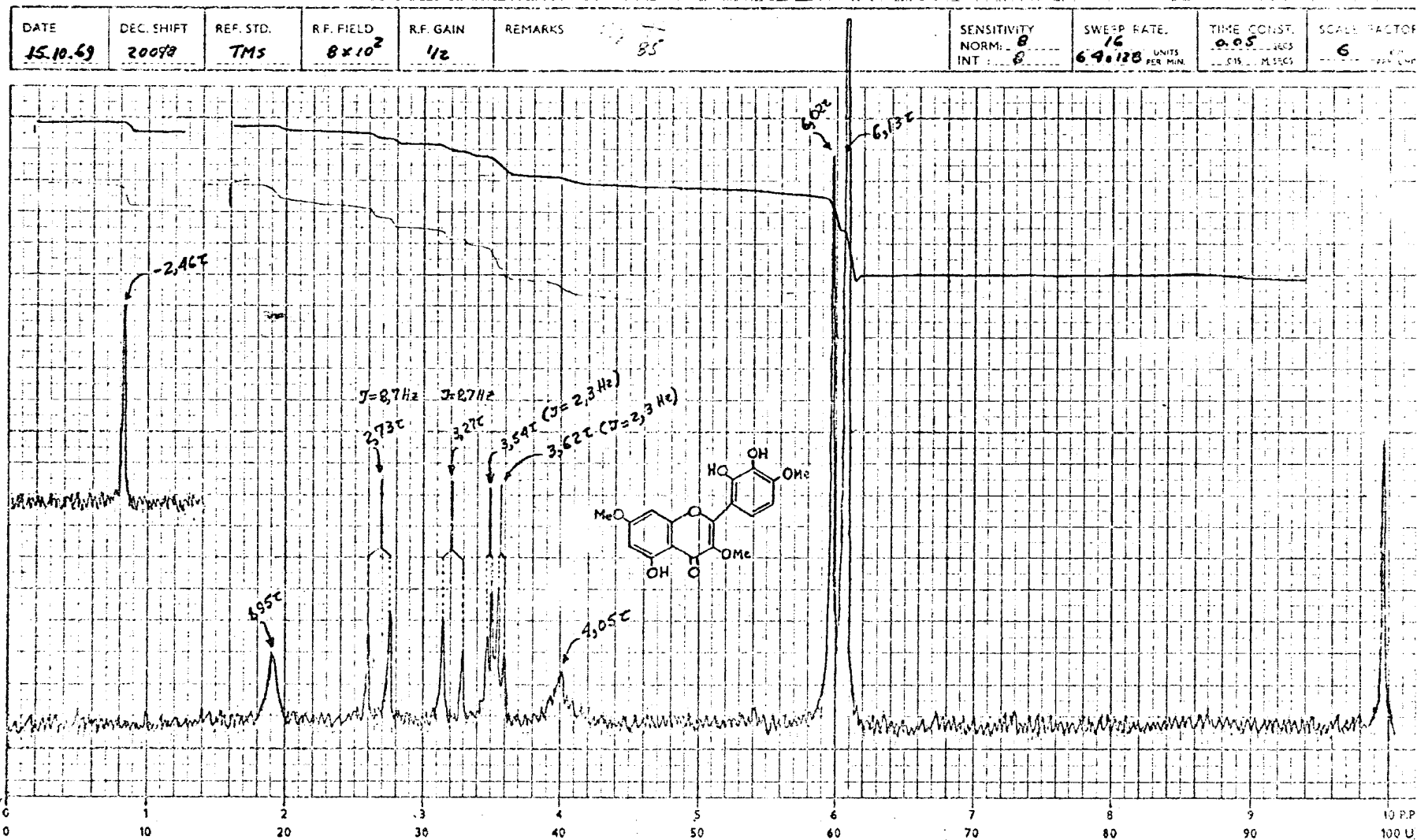


Figura 85. PART Nº 468-1112
Espectro de r.m.n. da apuleidina (AL-19A)=2',3',5-trihidroxi-3,4',7-trimetoxi flavona. Solvente: CDCl_3 .

PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD, BUCKS.

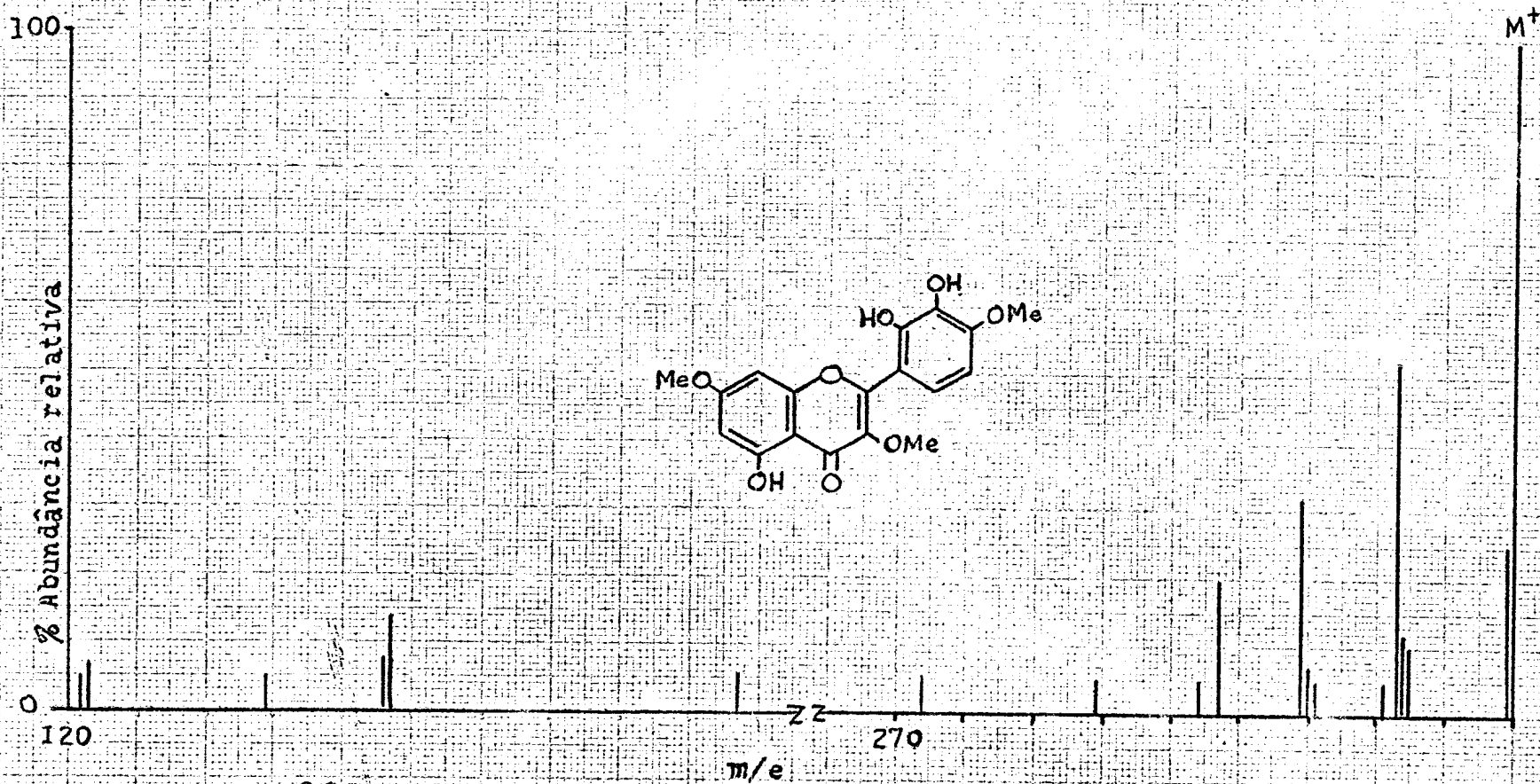


Figura 86.

Espectro de massa da apuleidina (AL-19A) = 2',3',5-trihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona.

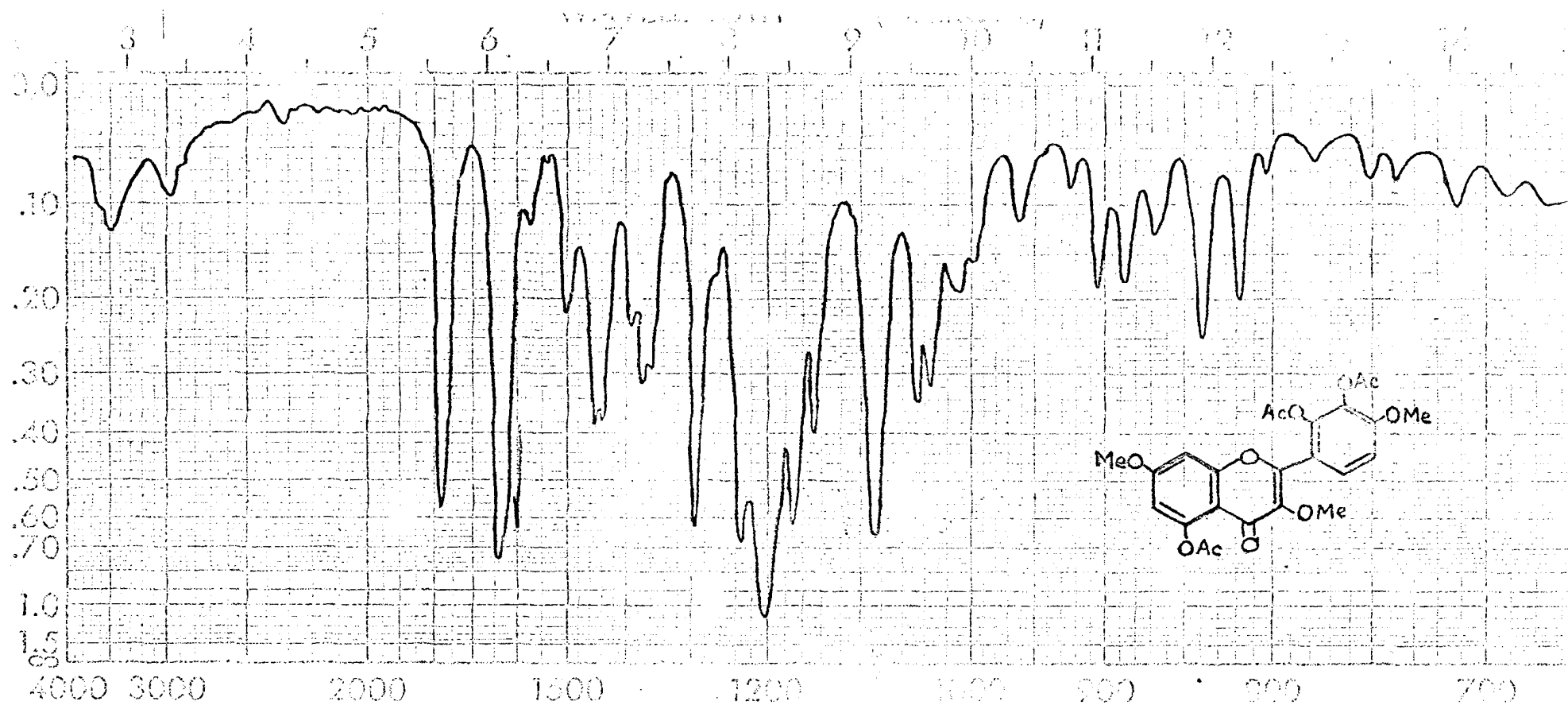


Figura 87.

Espectro i.v. da 2',3',5-tri-O-acetilapuleidina (AL-19AAc) = 2',3',5-trihidroxiflavona-3,4',7-trimetoxiflavona.

Fase:KBr

DATE 17.10.63	DEC. SHIFT	REF. STD. TMS	R.F. FIELD 8×10^2	R.F. GAIN 1/2	REMARKS	SENSITIVITY NORM: 8 INT: 8	SWEEP RATE. 16 128 UNITS PER MIN	TIME CONST. 0.05 SECS DIS. 1.5 SECS	SCALE FACTOR 6.3 C/S PER CM
------------------	------------	------------------	-------------------------------	------------------	---------	----------------------------------	--	---	--------------------------------

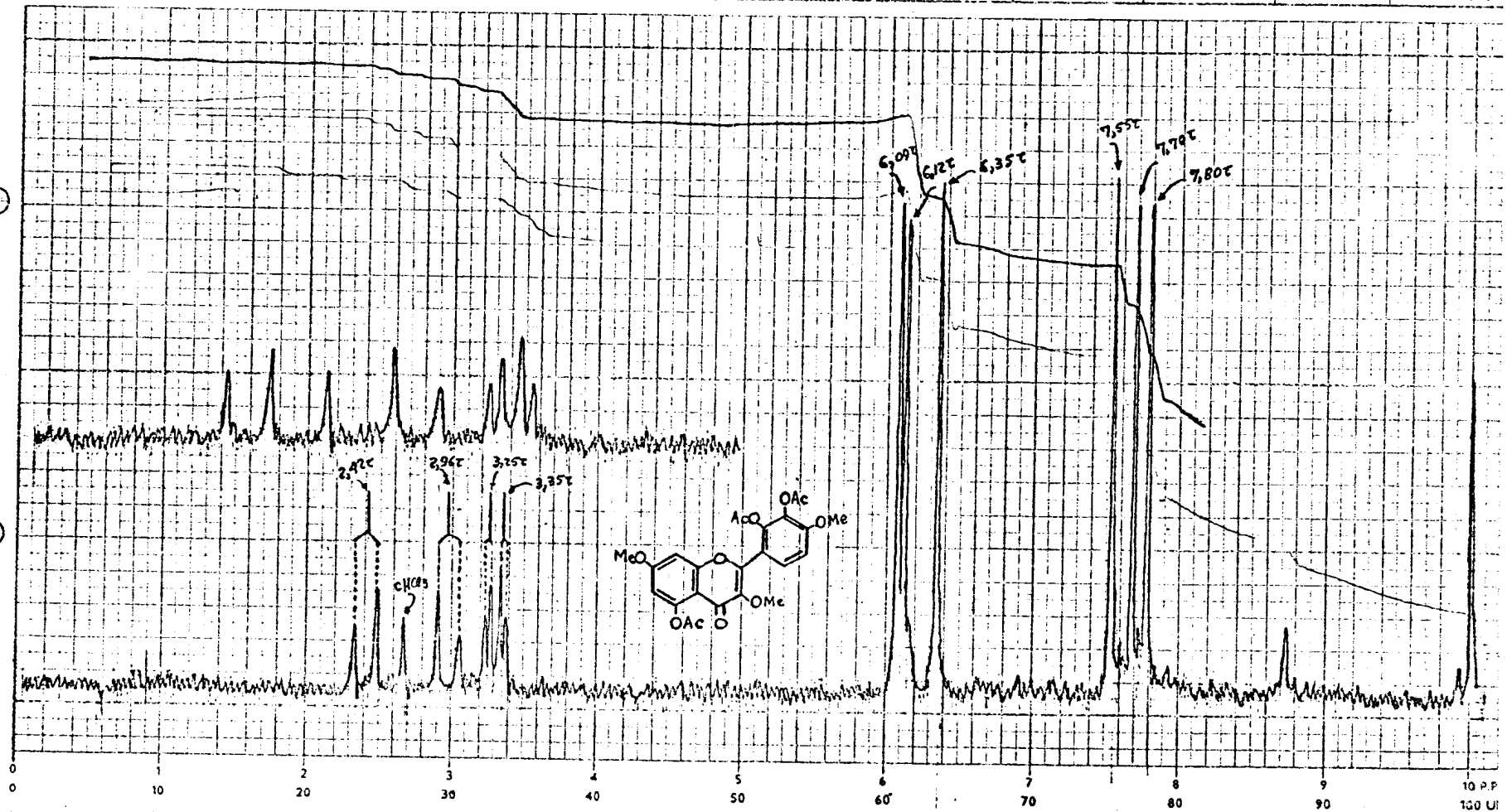
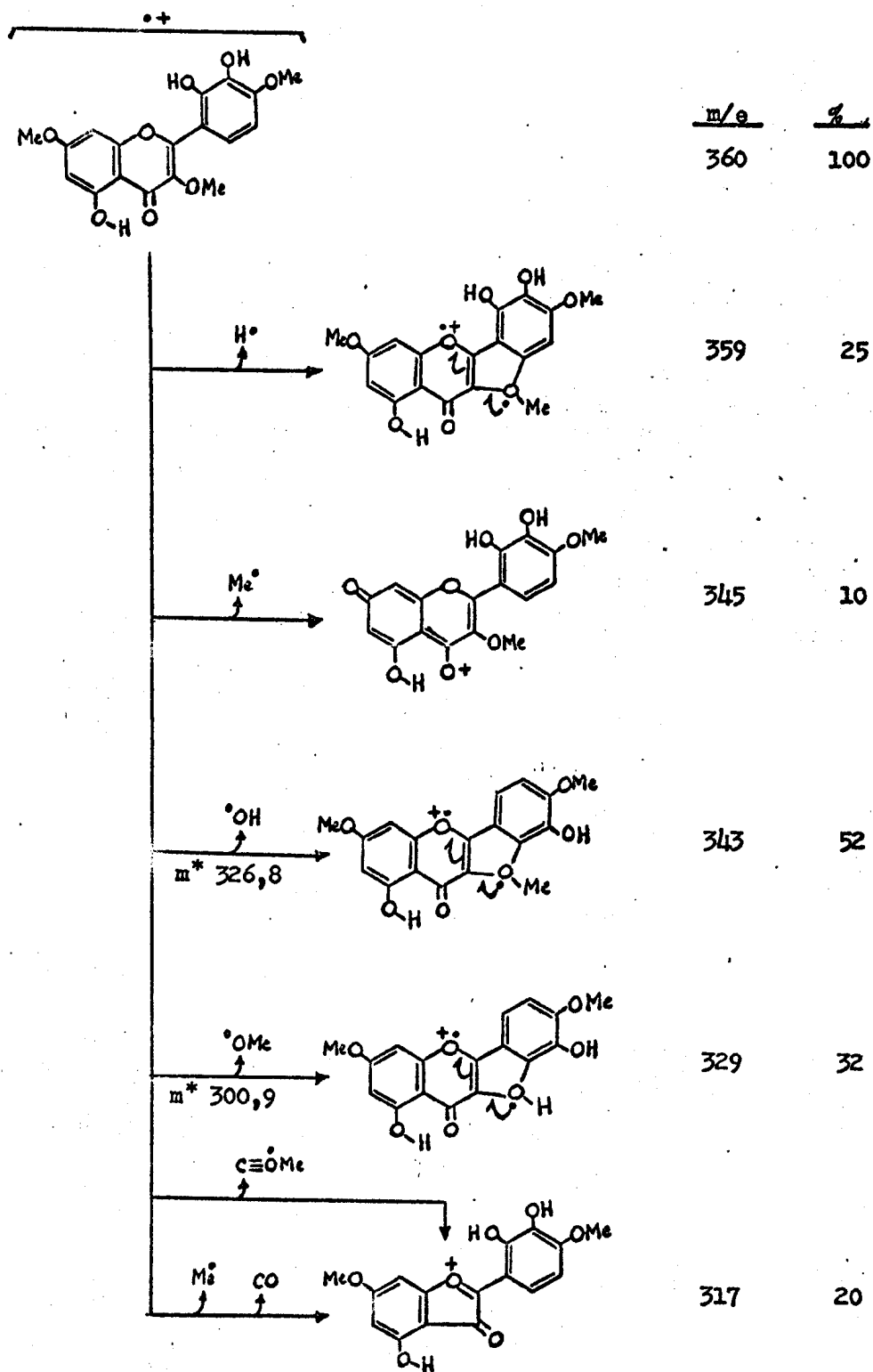


Figura 88.

PART Nº 468-1112

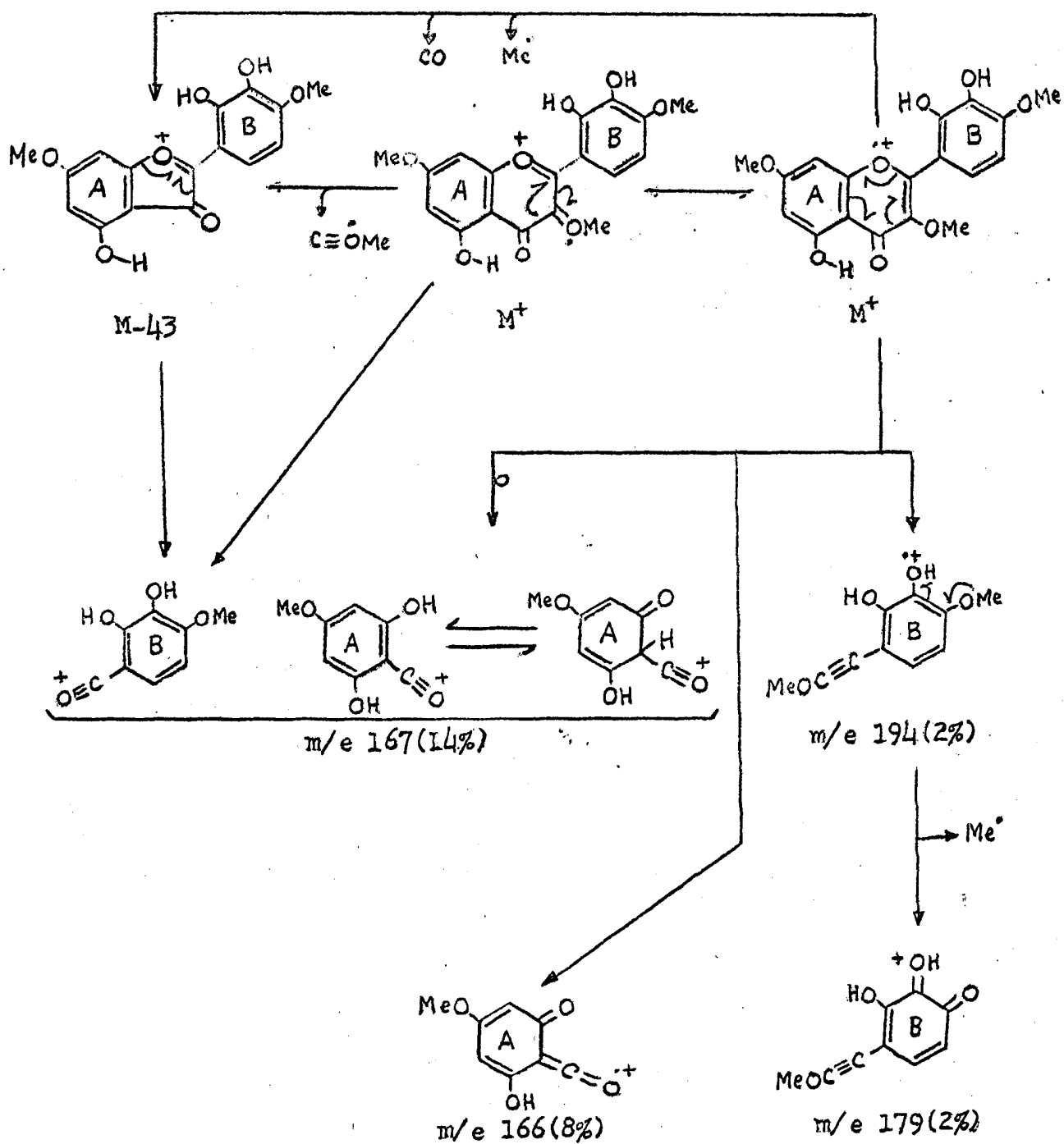
PERKIN-ELMER LTD. BEACONSFIELD. BUCKS

Espectro de r.m.n. da 2',3',5-tri-O-acetilapuleidina (AL-19AAc)=2',3',5-triacetoxi-3,4',7-trimetoxiflavona. Solvente: $CDCl_3$.



Quadro 49.

Caminhos principais de fragmentação da apuleidina (AL-19A) = 2',3',5-trihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona no espectrômetro de massa.

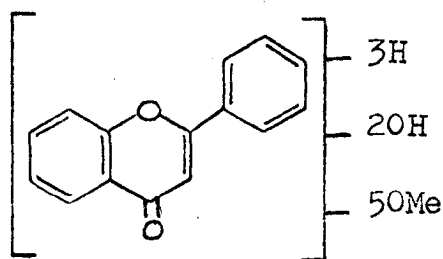


Quadro 49. Continuação.

AL-19B

A natureza flavônica desta substância foi deduzida dos espectros u.v. (Fig. 89), i.v. (Fig. 90), de r.m.n. (Fig. 91) e de massa (Fig. 92, Quadro 50).

Os espectros de r.m.n. (Tabela 46) e de massa (pêso molecular 404, Quadro 50) foram utilizados para lançar a formulação parcial CXLIX.



A estreita semelhança desta substância com a apuleitrina (AL-16) ficou evidente mediante simples comparação de espectros, entre eles os de r.m.n. (Tabela 46).

Comprovou-se a presença de 2 grupos hidroxila através de comparação dos espectros de r.m.n. da substância original (Fig. 91) e do acetato dela derivado (Fig. 93).

A ausência de função hidroxila nas posições 3 e/ou 5 foi concluída em vista dos seguintes argumentos:

a. inalteração do espectro u.v. por adição de tricloreto de alumínio (Tabela 47). Este resultado experimental revela ausência de grupo OH em C-5 e em C-3.

b. ensaio negativo com FeCl_3 aquoso a 10%.

Tabela 46.

Espectros de r.m.n. da AL-19B, AL-16 e seus derivados acetilados. Solvente CDCl_3 . Deslocamentos químicos em unidades τ .

Substância	OH	H-8	H-2'	H-6'	OCH_3	OCOCH_3
AL-19B	3,90 4,20	3,23	2,68	2,68	5,97 6,02 6,02 6,08 6,13	-
AL-19Bac	-	3,25	2,33 d J=2,1	2,62 d J=2,1	6,07 6,07 6,10 6,10 6,13	7,65 7,65
AL-16	-2,43 3,70 4,35	3,45	2,64	2,64	5,99 6,01 6,05 6,12	-
AL-16Ac	-	3,08	2,32 d J=2,3	2,55 d J=2,3	6,07 6,07 6,07 6,18	7,54 7,63 7,68

Tabela 47.

Espectros u.v. da AL-19B em meio neutro e com aditivos.

Aditivo	$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$
-	236 11.550	270 8.750	330 14.200	-
NaOH	253 13.800	293 11.450	340 9.600	-
NaOH+HCl	236 10.450	267 8.100	330 12.550	-
AcONa	230 12.550	240 12.450	295 11.700	332 10.350
AcONa+H ₃ BO ₃	235 12.000	270 8.500	330 12.800	-
AlCl ₃	235 11.800	270 8.400	330 12.850	-
AlCl ₃ +HCl	235 10.750	270 7.900	330 12.300	-

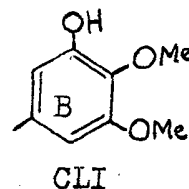
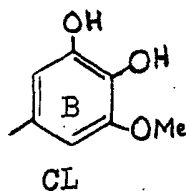
c. à posição de absorção do grupo C=O no espectro i.v. (1620 cm^{-1} , Fig. 90) revela ausência de grupo OH em C-5. Conforme já referido, flavonas que sustentam grupo OH em C-5 revelam a absorção carbonílico em torno de 1653 cm^{-1} .

d. posição de absorção (1629 cm^{-1} , Fig. 94) do grupo C=O pirônico no derivado acetilado em comparação com a absorção do mesmo grupo (1620 cm^{-1}) na substância original.

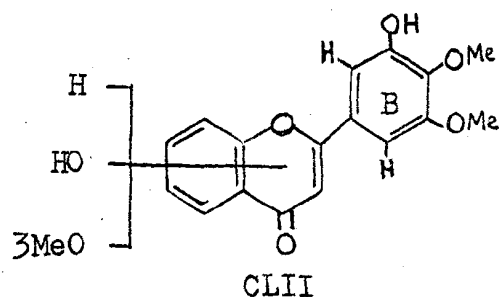
e. ausência de sinal em campo baixo do espectro de r.m.n. (Fig. 91).

f. ausência de sinal em torno de 7,50 τ no espectro de r.m.n. do derivado acetilado AL-19BAc (Fig. 95).

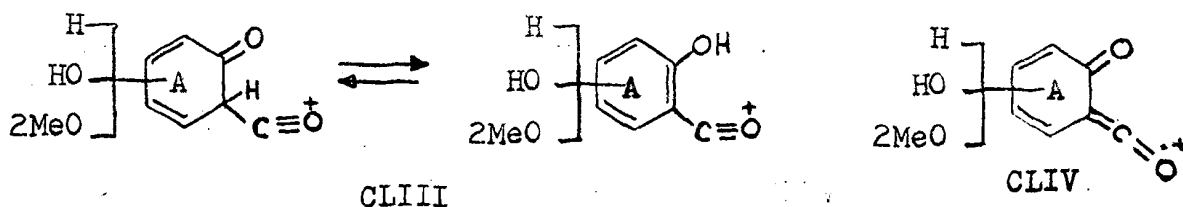
A banda representando dois prótons que aparece na região correspondente a absorção de prótons aromáticos do espectro de r.m.n. só (Tabela 46) pode ser atribuída aos hidrogênios equivalentes entre si localizados nas posições 2' e 6' do anel B. Já o espectro de r.m.n. do produto de acetilação (AL-19BAc, Fig. 95) ostenta 2 bandas duplas ($J=2,1\text{Hz}$) representando tais prótons. Esta modificação da feição espectral revela substituição assimétrica no anel B. Para satisfazer esta exigência temos 2 possibilidades estruturais (CL, CLI). Comportamento análogo constatou-se com a AL-16 (Tabela 46).



A ausência de sistema 3,4', orto e/ou para-dihidroxilado foi deduzida da estabilidade da substância em meio alcalino (Tabela 47). Confirmação adicional da ausência de sistema orto-dihidroxilado foi obtida da inalteração do espectro u.v. em presença de acetato de sódio mais ácido bórico (Tabela 47). Conseqüentemente, o sistema 3',4'-dihidroxi-5'-metoxilado foi excluído do campo das possibilidades e o anel B da AL-19B define-se com 3'-hidroxi-4',5'-dimetoxilado (CLII).



O espectro de massa sugeriu ainda para a substância em estudo um anel A monohidroxidimetoxilada em vista de comparecimento de picos em m/e 197 (3%) e m/e 196 (2%), compatíveis com os fragmentos CLIII e CLIV, respectivamente (Quadro 50).

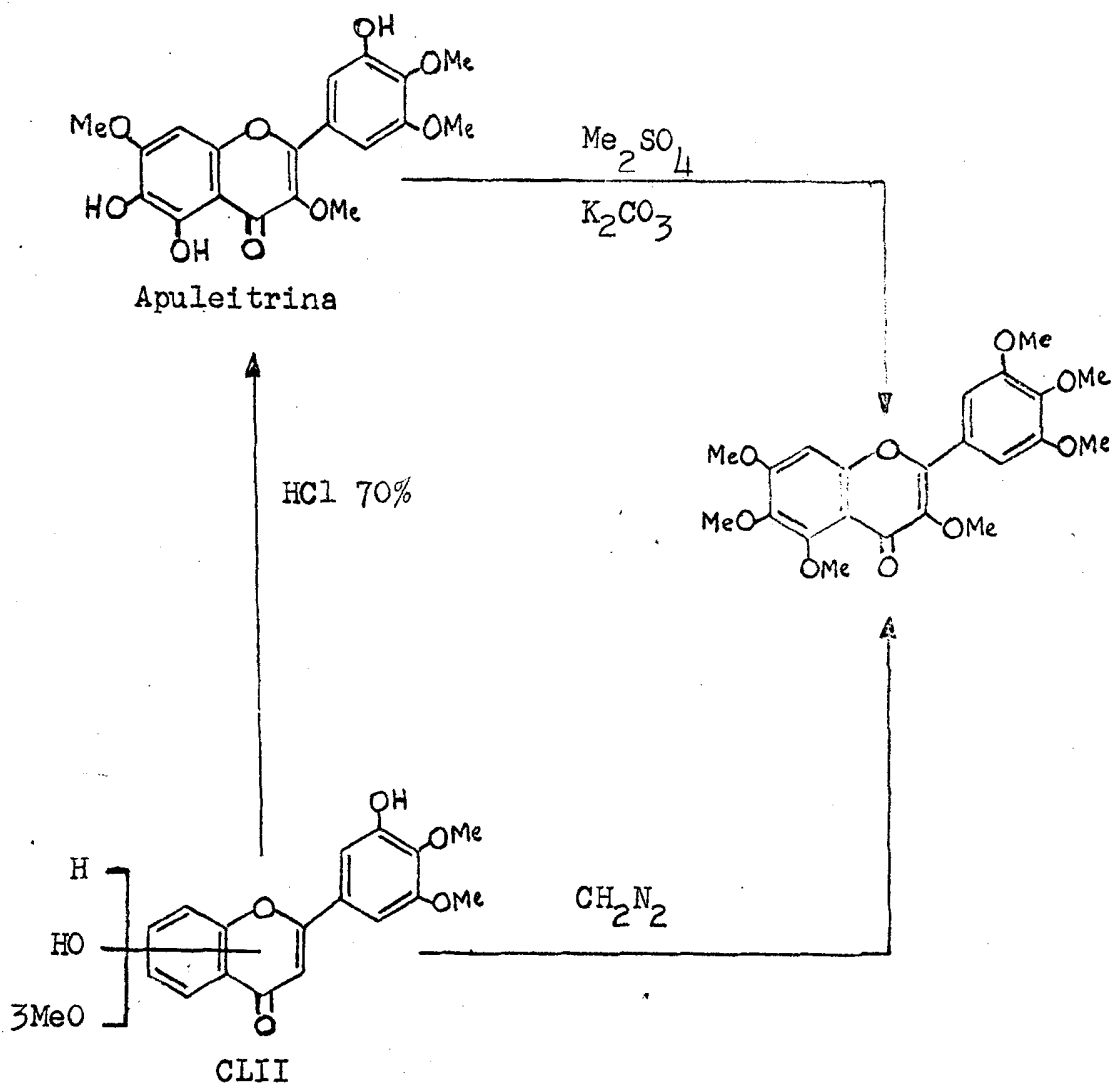


Neste ponto, admitiu-se a possibilidade desta substância possuir o mesmo padrão de oxigenação da apuleitrina (AL-16). Esta

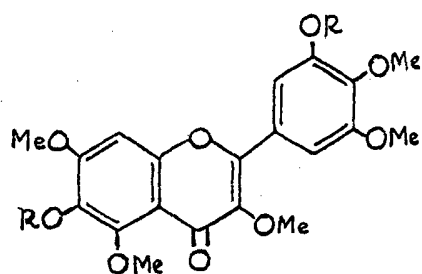
hipótese foi confirmada. O produto de metilação da AL-19B com diazometano revelou-se idêntico ao produto de metilação da apuleitri-
na (AL-16) com sulfato de dimetila e desmetilação seletiva da
AL-19B forneceu AL-16 (Quadro 51).

Quadro 51.

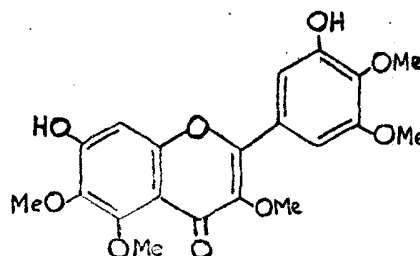
Transformações químicas com a AL-19B e AL-16.



Já que a ausência de grupo hidroxila nos átomos de carbono 3 e 5 pôde ser deduzida, estas posições sustentam grupos metoxila. Em face disto, duas possibilidades estruturais poderam ser formuladas para a AL-19B, CLV e CLVI.



CLV, R=H
CLVII, R=Ac



CLVI

A estrutura CLVI foi afastada do campo das possibilidades em base dos espectros de r.m.n. da substância original e do seu derivado acetilado. O sinal simples correspondente ao próton em C-8 aparece em $3,25\tau$ no espectro de r.m.n. da substância original (AL-19B) e em $3,23\tau$ no espectro do derivado acetilado (Tabela 46). Este comportamento revela-se incompatível com a presença de grupo OH em C-7 (CLVI), posição que mantém relação orto com base no próton em foco. A situação estrutural expressa em CLVI seria revelada por deslocamento paramagnético do sinal que representa o H-8 ao transformar o grupo OH em acetoxila por acetilação.

Conseqüentemente, a estrutura da 3',6-dihidroxi-3,4',5,5',7-pentametoxiflavona (CLV) foi proposta para a AL-19B. Esta substância foi denominada apuleirina. Assim, o derivado acetilado define-se como 3',6-diacetoxi-3,4',5,5',7-pentametoxiflavona (CLVII).

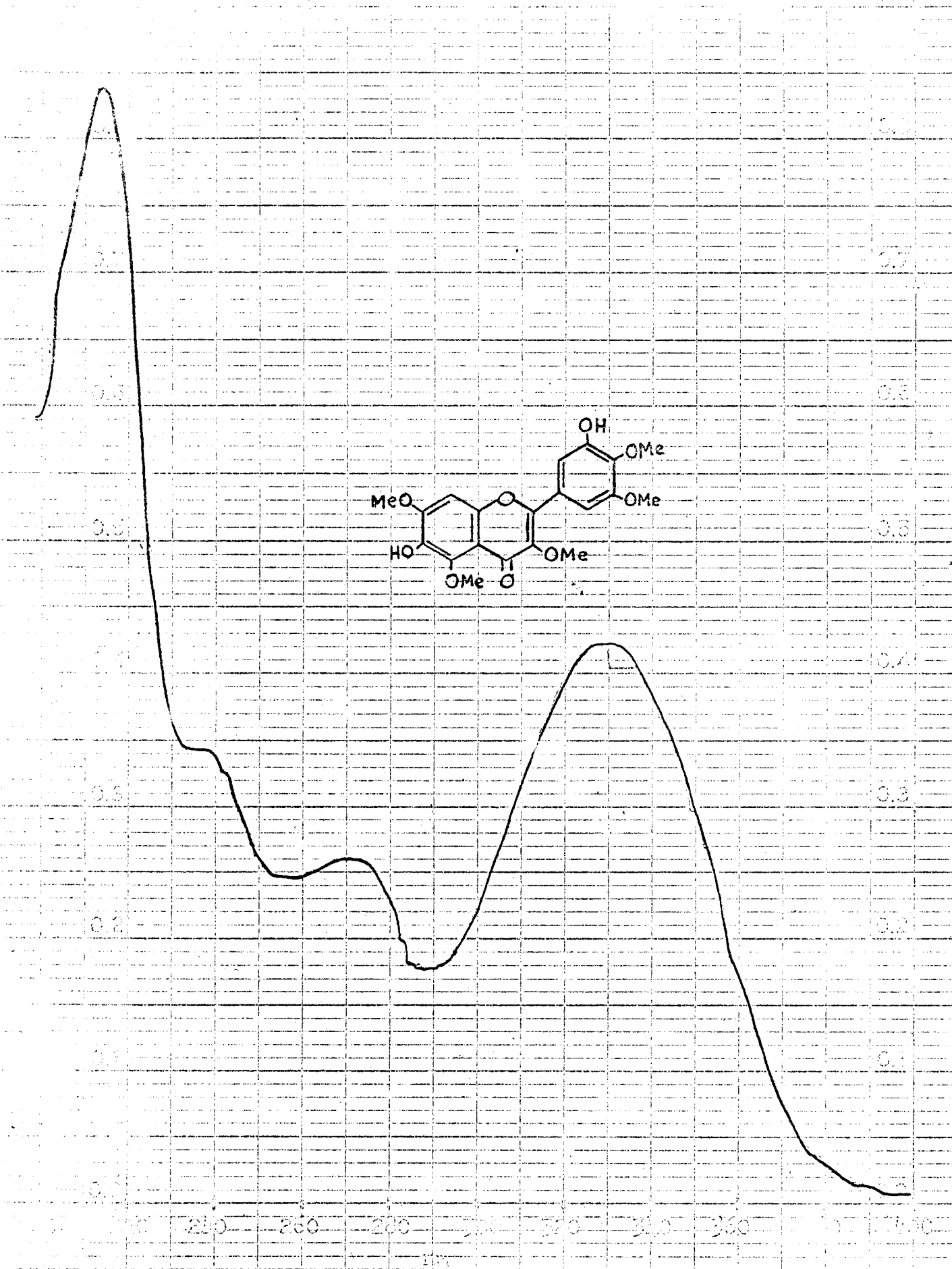


Figura 89. Espectro u.v. da apuleirina (AL-19B) = 3',6-dihidroxi-3,4',5,5',7-pentametoxiflavona.

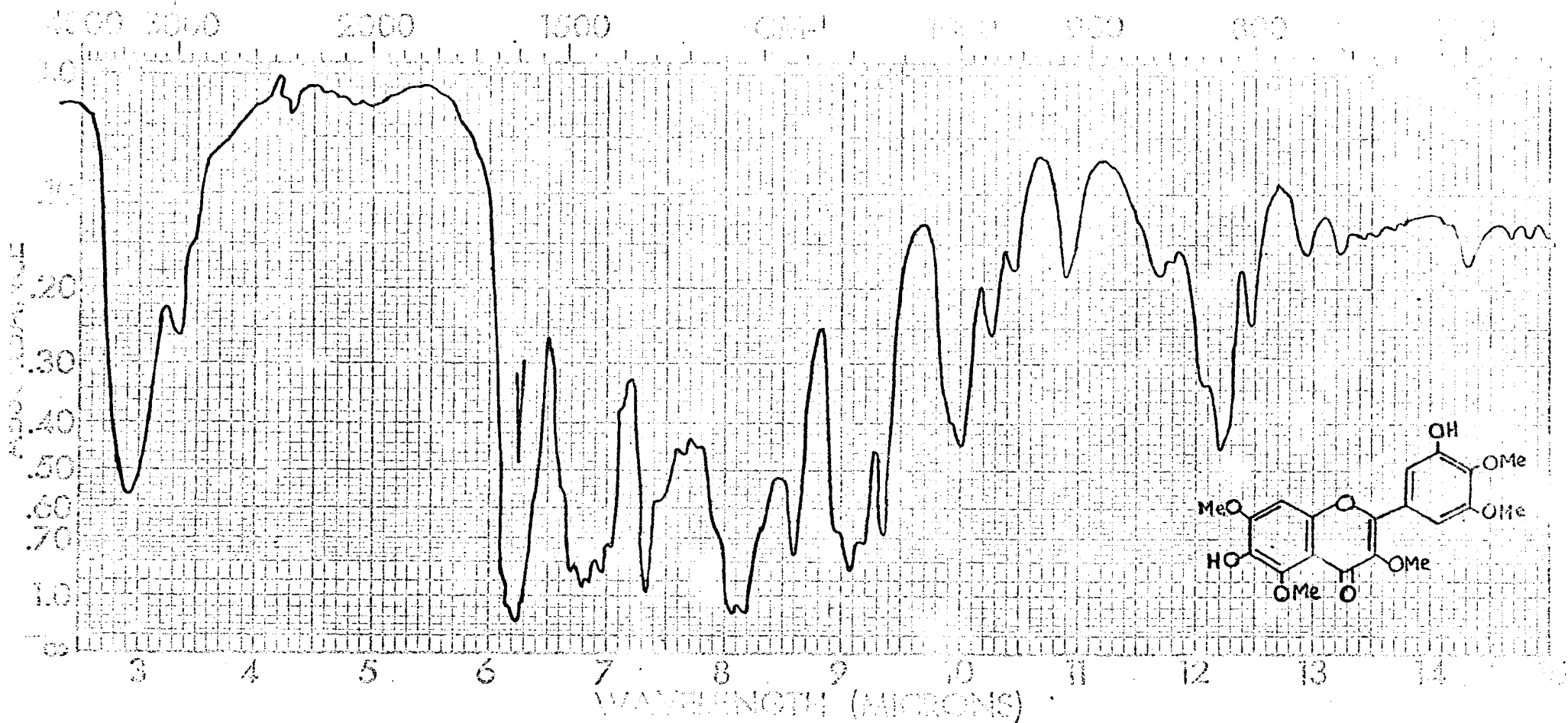


Figura 90.

Espectro i.v. da apuleirina (AL-19B) = 3',6-dihidroxi-3,4',5,5',7-pentametoxiflavona.

Fase: KBr

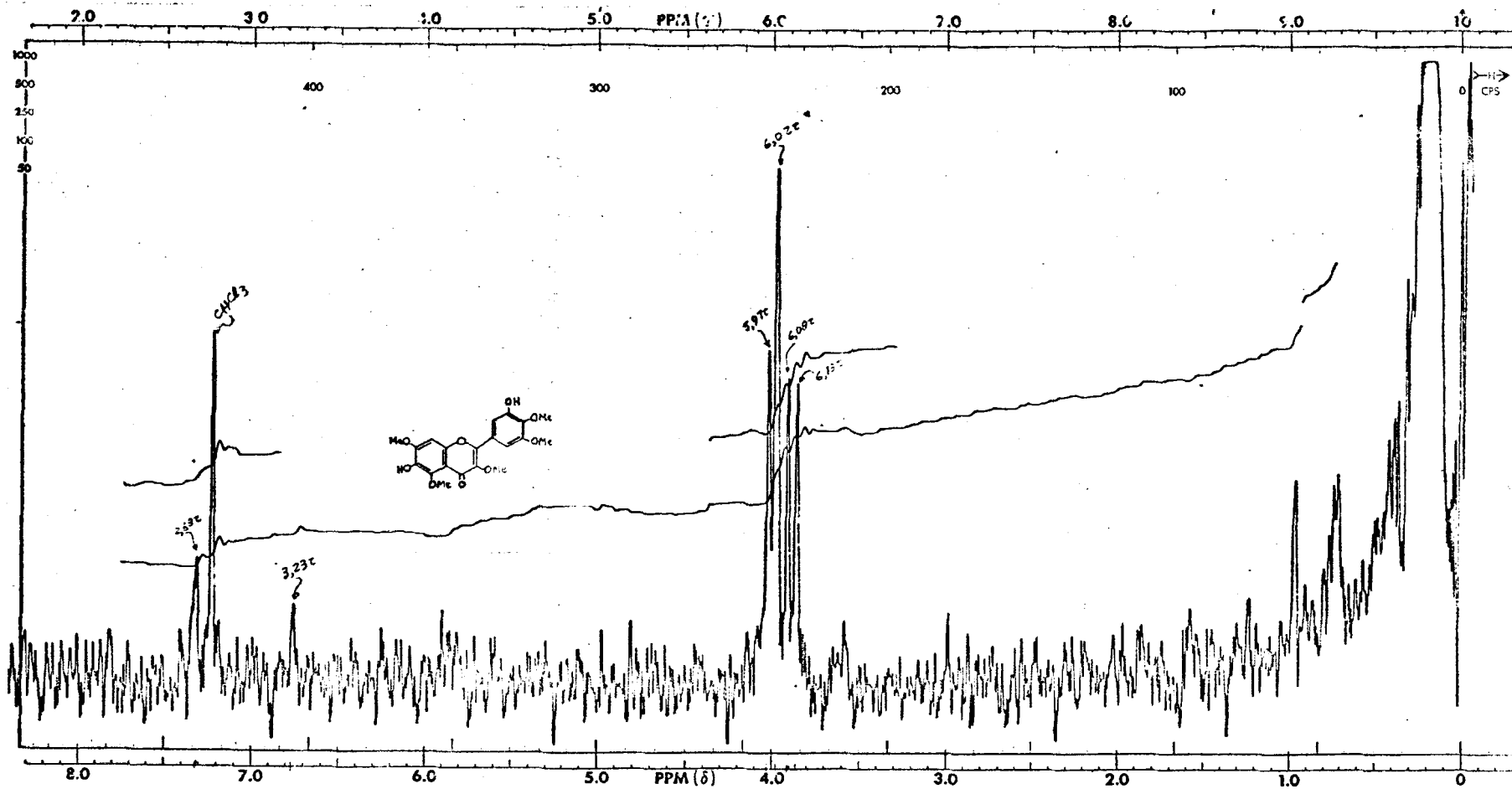


Figura 91.

Espectro de r.m.n. da apuleirina (AL-19B)=3',6-dihidroxi-3,4',5,5',7-penta
metoxiflavona. Solvente: CDCl_3 .

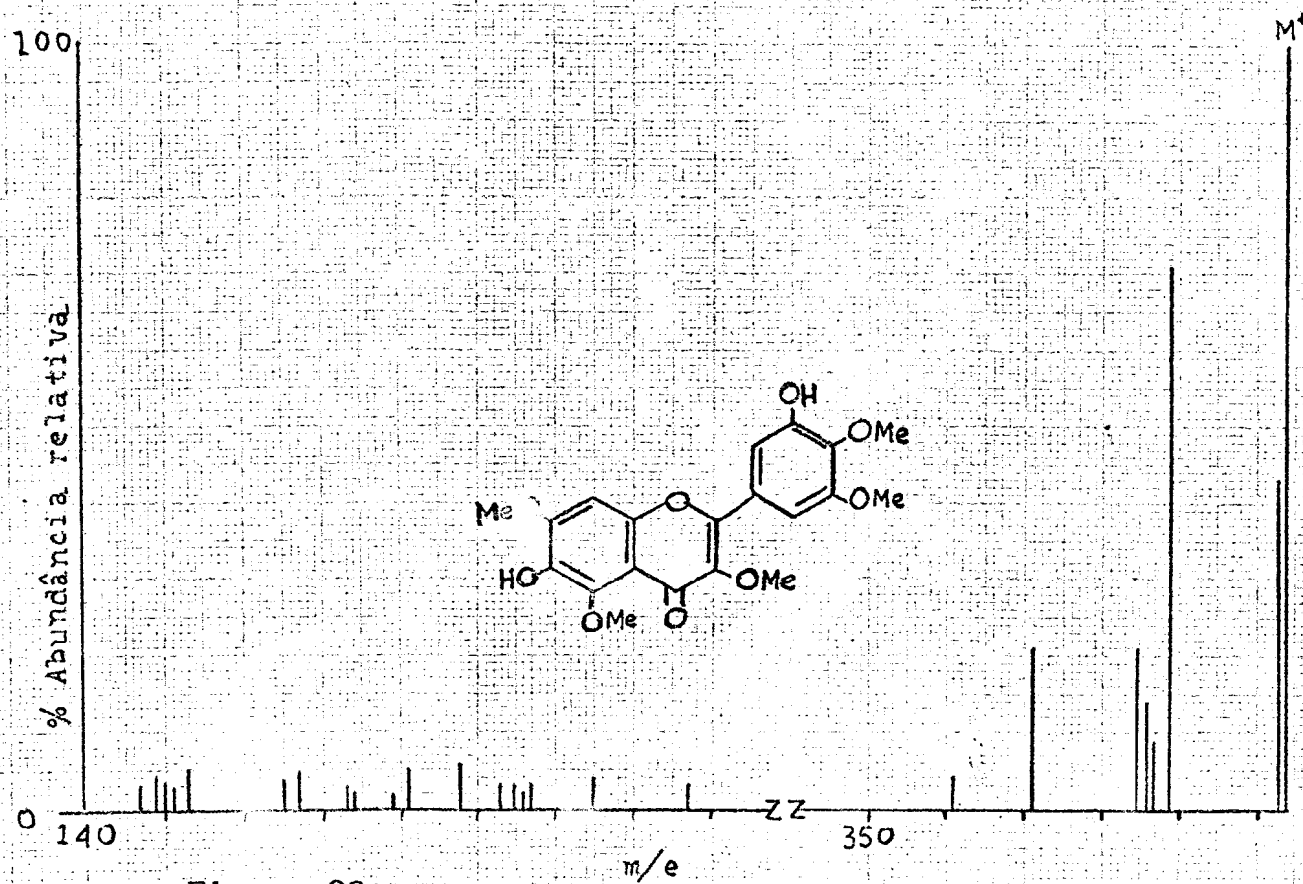


Figura 92.

Espectro de r.m.n. da apuleirina (AL-19B) = 3',6-dihidroxi-3,4',5,5',7-pentametoxiflavona.

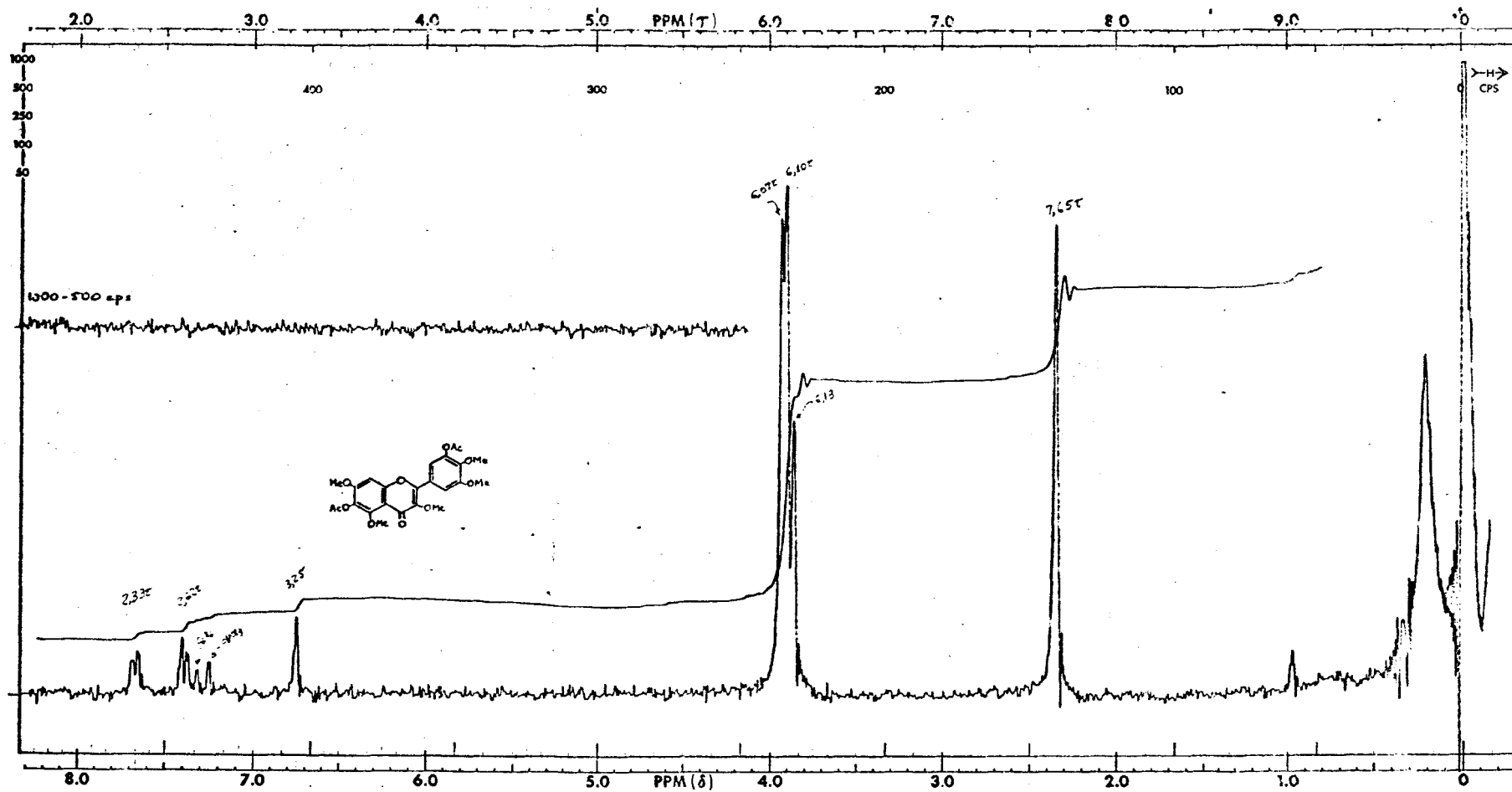


Figura 93. Espectro de r.m.n. da 3',6-di-O-acetilapuleirina (AL-19Bac)=3',6-diacetoxi-3,4,5,5',7-pentametoxiflavona. Solvente: CDCl_3 .

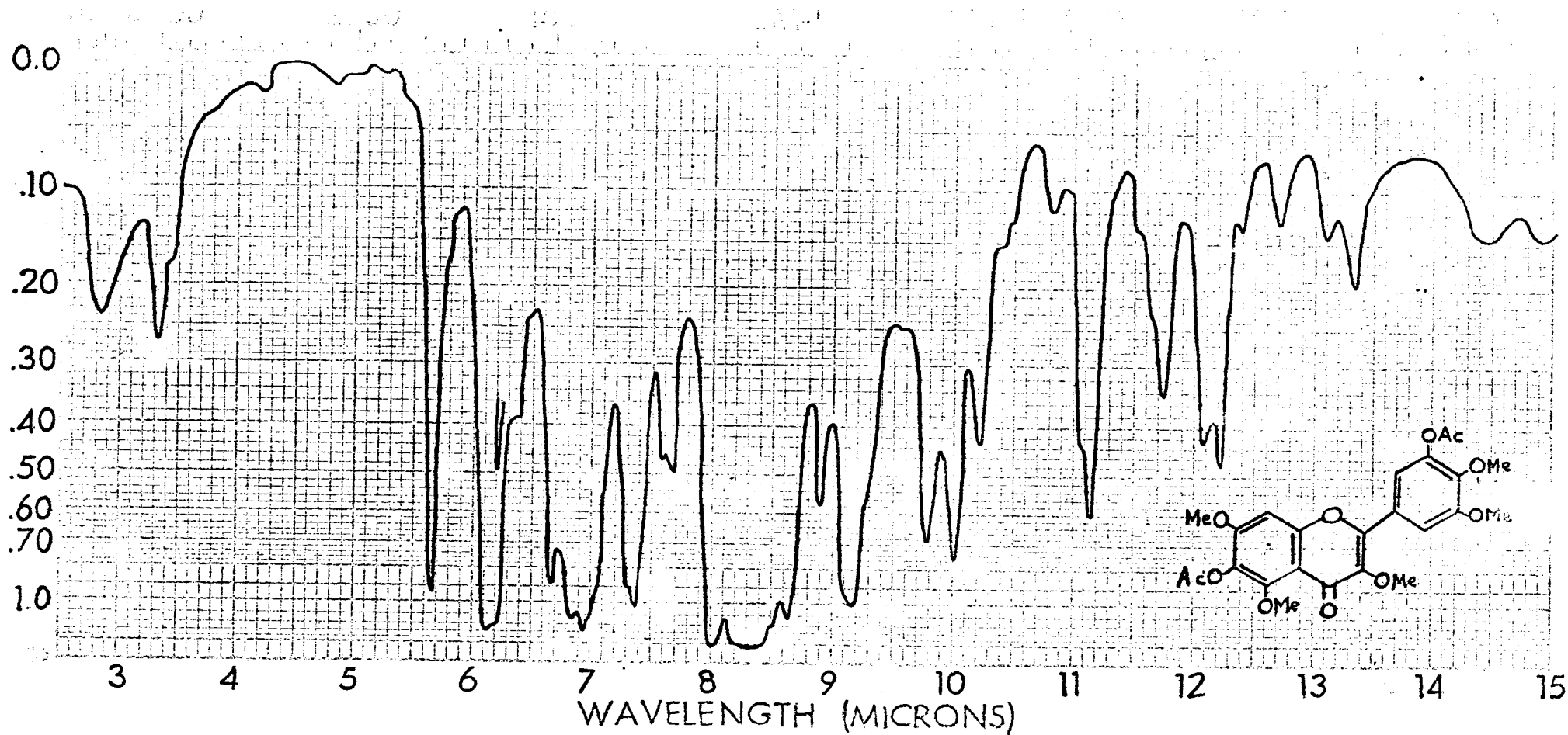
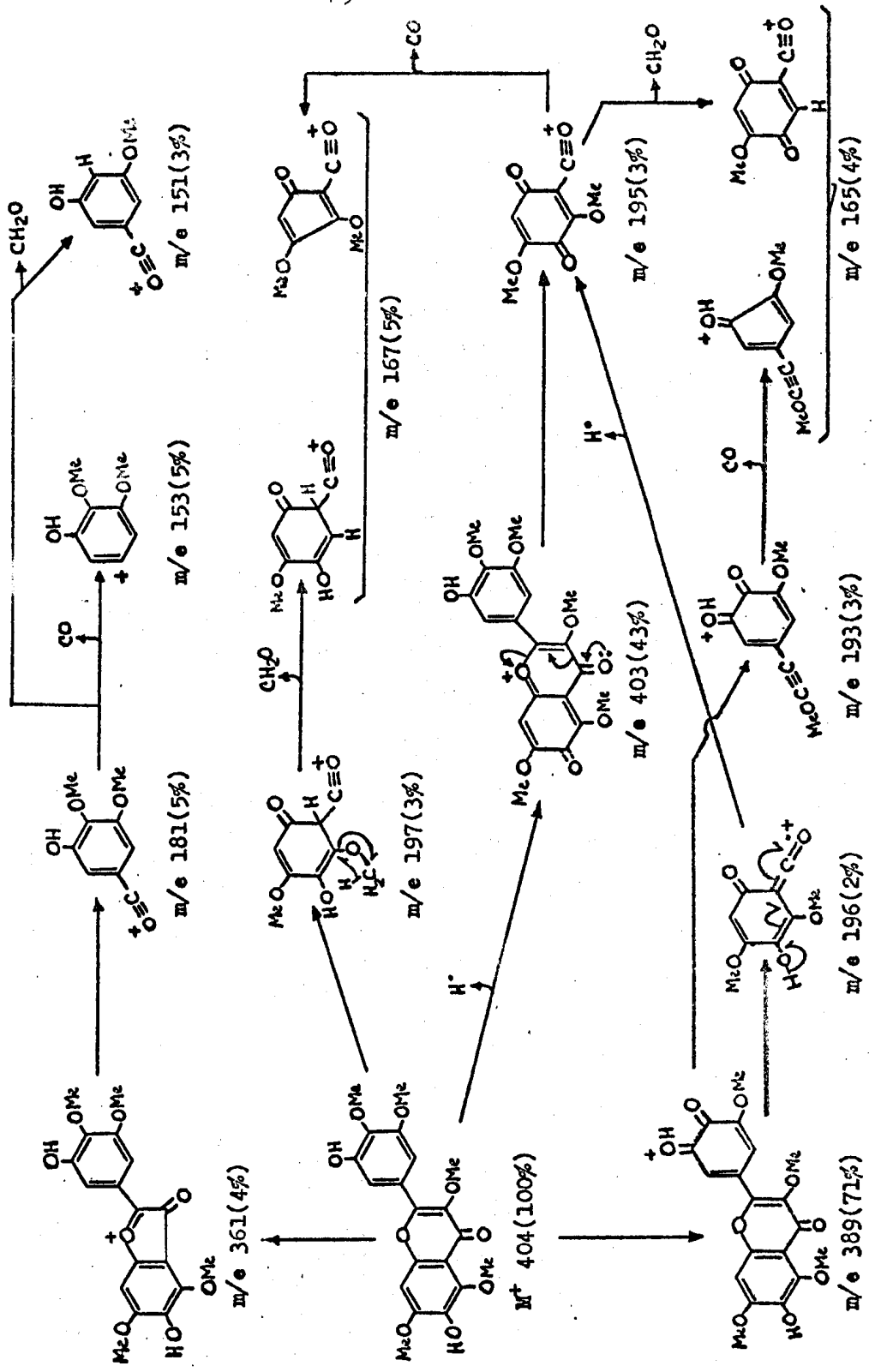


Figura 94.

Espectro i.v. da 3',6-di-O-acetilapuleirina (AL-19BAc) = 3',6-diacetoxi-3,4',5,5',7-pentametoxiflavona.

Fase: KBr



Quadro 50. Caminhos principais de fragmentação da apuleirina (AL-19B)=3',6-dihidroxi-3,4',5,5',7-pentametoxiflavona no espectrômetro de massa.

AL-32.

Esta substância foi classificada como pterocarpano em vista de seus espectros no u.v. (Tabela 48) [76], no i.v. (Fig. 95) [76, 77] de r.m.n. (Fig. 96) [76, 78, 79, 80] e de massa (Fig. 97, Quadro 52). O espectro de massa sugeriu, através da massa do ion molecular (M^+ 350), substituição por uma unidade metilenodioxí e soldadura com um anel 2,2-dimetilcromênico. Esta última feição estrutural foi a razão do pico base em M-15, causado pela formação de um ion benzopirílio (Quadro 52) oriunda da perda de um radical metila da porção cromênica da molécula. Formulou-se, assim, a estrutura parcial CLVIII.

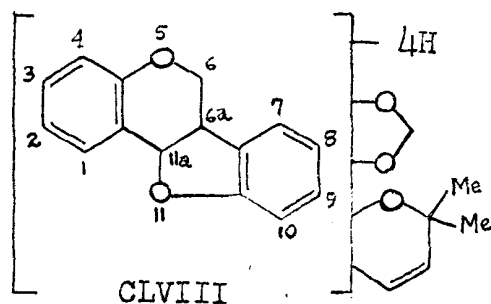
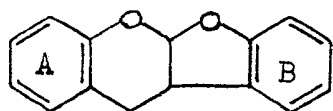


Tabela 48.

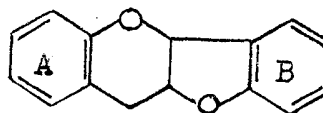
Espectros u.v. da AL-32 e AL-32H, em meio neutro e com adição de hidróxido de sódio.

Aditivo	AL-32			AL-32H		
	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$
-	230 14.000	290 4.200	308 4.400	230 12.750	238 6.000	300 6.550
NaOH	230 14.000	290 4.200	308 4.400	227 28.650	280 6.750	317 7.100

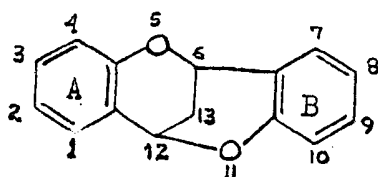
A evidência de uma estrutura de pterocarpano era clara , inclusive também porque outros esqueletos fundamentais que contêm natureza flavanica tais como CLIX, CLX e CLXI não podem estar presente na AL-32, o que será demonstrado a seguir.



CLIX



CLX



CLXI

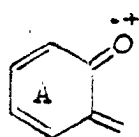
As estruturas CLIX e CLX foram excluídas em vista da análise do espectro de massa (Fig. 97, Quadro 52). Fragmentação tipo retro-Diels-Alder destas estruturas forneceria os fragmentos CLXII e CLXIII que seriam representados por picos abundantes. Unindo os diferentes substituintes, seja a um, seja ao outro dos fragmentos, calculam-se os valores da Tabela 49. Picos em m/e 173 (19%) e 185 (12%) de fato ocorreu no espectro da AL-32, mas não podem ser atribuídos aos fragmentos correspondentes CLXII e CLXIII pois o anel 2,2-dimetilcromênico não pôde estar ligado ao mesmo tempo aos anéis A e B (Tabela 49).

Em apóio a nossa formulação de fragmentação de anel 2,2-dimetilcromênico cita-se o exemplo do ácido robústico (Quadro 53)

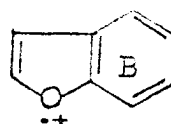
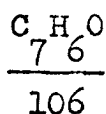
[81] e em apôio à formulação de fragmentos retro-Diels-Alder do heterocíclicos cita-se o exemplo do mopano (Quadro 54) [98].

Por fim, a estabilidade do ion molecular (M^+ 350, 80%) da AL-32 e do ion M-15 (m/e 335, 100%) favorecem a natureza pterocar-pânica da substância em estudo.

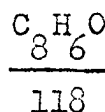
Tabela 49.



CLXII



CLXIII



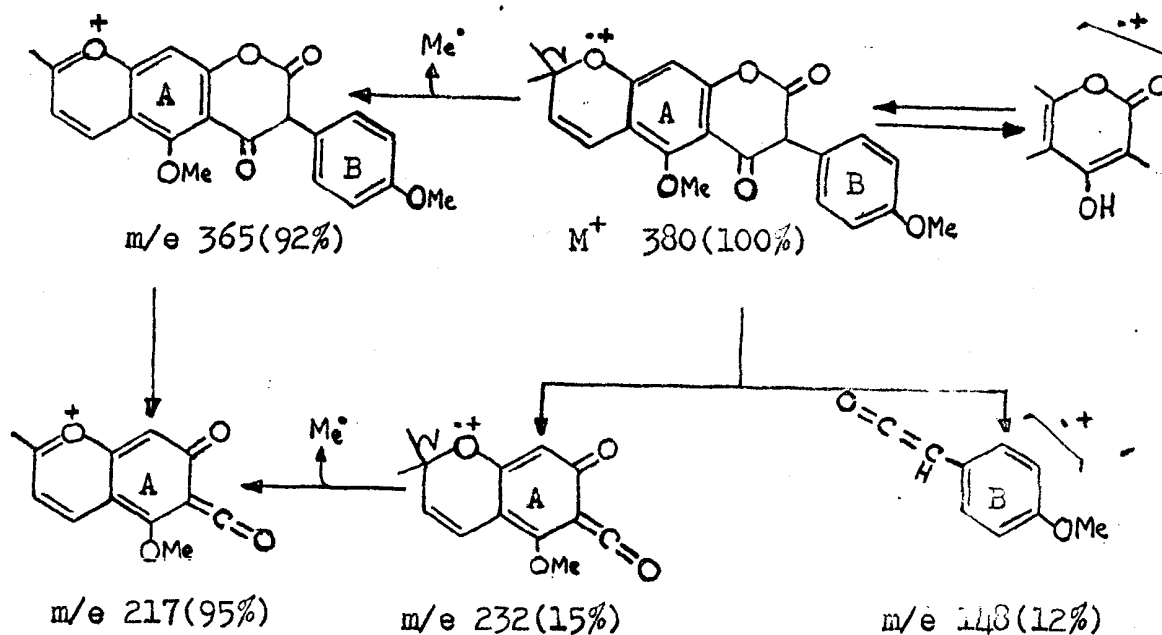
Fragmentos correspondentes aos ions CLXII e CLXIII substituídos no espectrômetro de massa.

Substituintes	CLXII		CLXIII	
	m/e	%	m/e	%
-OCH ₂ O-	150	-	162	2
	188	-	200	-
	173	19	185	12

O espectro de r.m.n. (Tabela 50) exclue a estrutura tipo cianomaclurina CLXI [82]. Tal substância apresentaria sinais em 4,30 4,70 e 7,80 τ correspondentes aos prótons H-6, H-12 e os 2H do carbono 13, respectivamente. A numeração utilizada é a proposta por Seshadri e colaboradores [82].

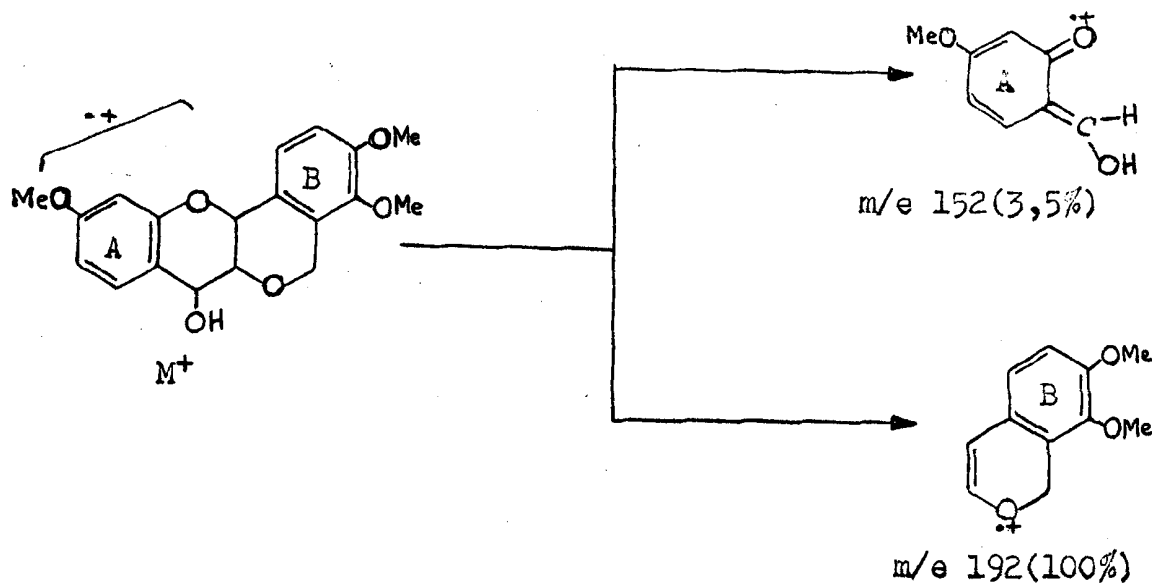
Quadro 53.

Caminhos principais de fragmentação do ácido robústico no espectrômetro de massa.



Quadro 54.

Fragmentação retro-Diels-Alder do moobano no espectrômetro de massa.



Os espectros de r.m.n. (Tabela 50) da AL-32 obtidos em CCl_4 (Fig. 96) e CH_3CN (Fig. 98) como solventes, permitiram averiguar confirmação para o anel 2,2-dimetilcromênico através da comparação com espectros de outras substâncias que contêm o mesmo sistema (Tabela 51).

Além dos sinais atribuídos aos prótons do anel cromênico, constatou-se ainda a presença de mais 2 bandas duplas ($J=8,6\text{Hz}$) e 2 simples, na região de absorções de prótons aromáticos, representando um próton cada uma. Conseqüentemente, a substância deve conter ainda dois prótons que mantêm relação orto e prótons que mantêm relação para, além do grupo metilenodioxí representado pela banda que aparece em $4,07 \tau$ (Fig. 96, Tabela 50). Em face disto, 4 estruturas alternativas puderam ser formuladas com base no fato que todos os pterocarpanos conhecidos sustentam funções oxigenadas nas posições 3 e 9 (CLXIV, CLXV, CLXVI e CLXVII).

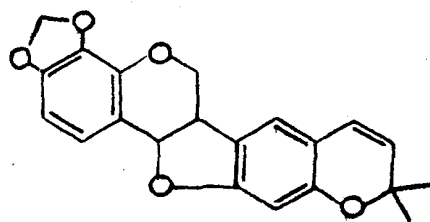
Destas, as estruturas CLXIV e CLXV foram eliminadas, pois exigiriam que os sinais em campo mais baixo do espectro de r.m.n. fôsem simples e não duplos ($J=8,6 \text{ Hz}$) como acontece. Estes sinais seriam devidos no CLXIV a H-7 e no caso CLXV a H-1.

Para decidir entre as duas possibilidades restantes tentou-se recorrer ao espectro de massa. Entretanto, a localização dos substituintes nos anéis A e B não foi possível pois, como demonstrado previamente [50], o fragmento mais abundante pode ser formulado envolvendo o anel A (CLXVIII) ou B (CLXIX), embora o pico em m/e 175 (4%) seja compatível com um anel B sustentando

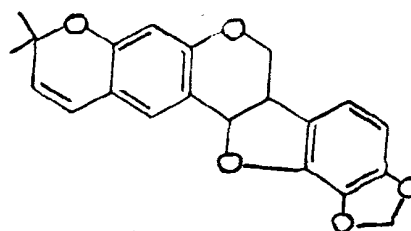
Tabela 50.

Espectros de r.m.n. da AL-32 obtidos em CCl_4 e CH_3CN .

H	τ	banda	J, Hz	τ	banda	J, Hz
H-1	2,76	d	8,6	2,80	d	8,6
H-2	3,48	d	8,6	3,58	d	8,6
H-7	3,31	s	-	3,19	s	-
H-10	3,58	s	-	3,62	s	-
H-4'	3,34	d	9,4	3,44	d	10,3
H-3'	4,48	d	9,4	4,38	d	10,3
H-11a	4,58	d	6,0	4,60	d	4,3
H-6eq	5,63	m	-	5,65	m	-
	a			a		
	5,93			6,00		
H-6ax	6,18			6,17	m	-
	a	m	-	a		
H-6a	6,73			6,75		
OCH_2O	4,02	s	-	4,13	s	-
O-CMe_2	8,50	s	-	indet.		



CLXIV



CLXV

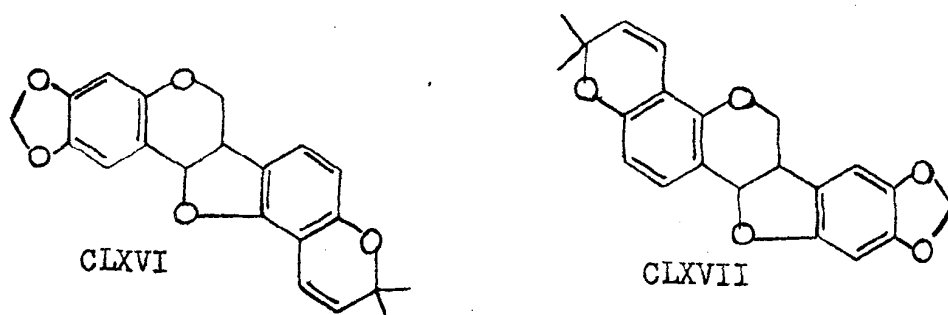
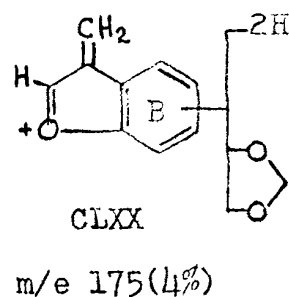
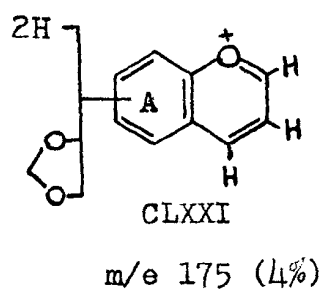
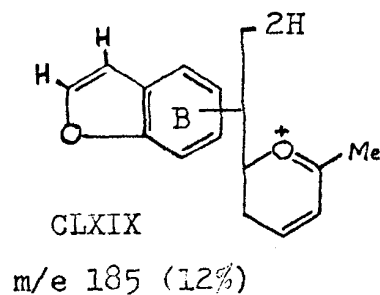
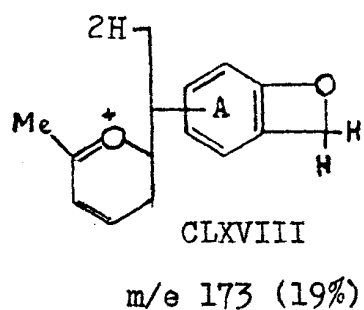


Tabela 51.

Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento das absorções correspondente a anel 2,2-dimetilcromênico.

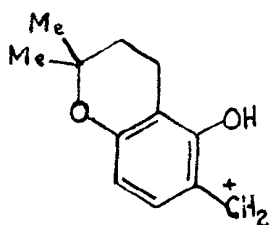
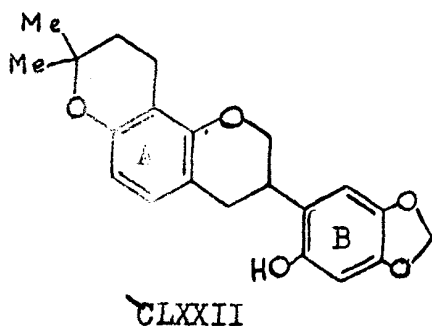
Substância	H-4'	J, Hz	H-3'	J, Hz	OC_1e_2	Ref.
AL-32 (CCl_4)	3,34	9,4	4,48	9,4	8,53	-
Ichthynona	3,21	10,0	4,29	10,0	8,44	59
Jamaicina	3,20	10,0	4,28	10,0	8,51	59
Ichthyinol	3,32	10,0	4,40	10,0	8,50	59
Piscidol	3,31	10,0	4,31	10,0	8,52	59
Toxicarol	3,30	10,0	4,47	10,0	8,52	84
Robustona	3,28	10,0	4,40	10,0	8,54	85
Ácido robustico	3,42	10,0	4,21	10,0	8,54	85
Robustina	3,40	10,0	4,15	10,0	8,49	85
Chandalona	3,29	10,0	4,40	10,0	8,55	86
Warangalone	3,23	10,0	4,35	10,0	8,52	86
Escadenina	3,11	10,0	4,28	10,0	8,52	86
Lodrocarpina	3,46	10,0	4,22	10,0	8,51	86
Sorbifolin	3,38	10,0	4,44	10,0	8,52	87

o grupo metilenodioxí (CLXX) também o é com o anel A (CLXXI).

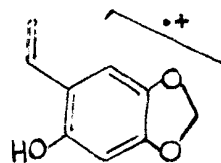


Como esperado, a interpretação do espectro de massa (Fig. 99, Quadro 55) do tetrahydro derivado da AL-32, o isoflavono (CLXXII) obtido por hidrogenação catalítica foi decisivo. A fragmentação tipo retro-Diels-Alder produziu os ions CLXXIII e CLXXIV em alta abundância relativa. O grupo 2,2-dimetilcromânico pôde assim ser localizado no anel A, enquanto o grupo metilenodioxí deve ocupar posições do anel B. Com êste resultado a estrutura CLXVI também foi afastada do campo das possibilidades.

A ausência de sinal em tórno de 5,0τ no espectro r.m.n. (Fig. 100) eliminou uma estrutura flavânica para êste derivado [83].



m/e 191 (98%)



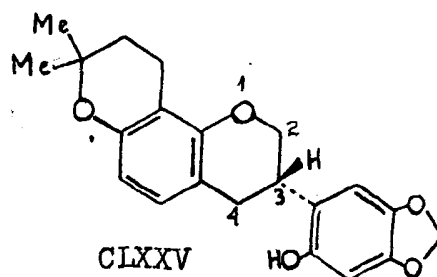
m/e 164 (100%)

O espectro i.v. (Fig. 101) do isoflavano (CLXXII) revelou ausência da banda em 1639 cm^{-1} que compareceu no espectro (Fig. 95) da substância original. Conseqüentemente, esta banda foi atribuída à ligação dupla do anel 2,2-dimetilcromênico.

A região aromática no espectro de r.m.n. (Fig. 100) do isoflavano (CLXXII) mostrou 4 bandas, cada uma representando um próton: 2 bandas duplas centradas em 3,16 e 3,70 τ ($J=8,6\text{ Hz}$) e 2 bandas simples em 3,31 e 3,49 τ . Claramente, o deslocamento químico do sinal em menor campo revela a existência de próton que não mantém relação orto ou para com oxigrupos [50], uma condição que pode ser encontrada somente para um H em C-5 de um anel A oxigenada em C-7. Desde que o sinal em consideração é caracte

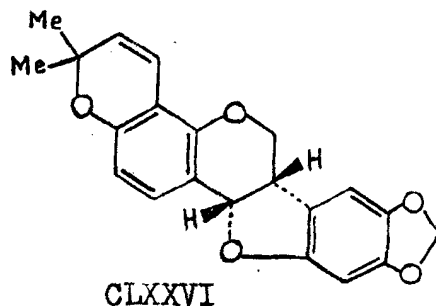
rizado por uma constante de acoplamento orto, o segundo H deve ocorrer em C-6. O deslocamento químico (3,70 τ) da banda representando este H em C-6 é, compatível com a posição, mantendo relação orto e para com funções oxigenadas. Os prótons do anel B dão origem a duas bandas simples e devem ser para relacionados. A estrutura CLXXII foi conseqüentemente assinalada para o tetrahydroderivado da AL-32.

A configuração 3S para o isoflavano CLXXII foi deduzida da sua curva de dispersão ótica rotatória (Fig. 102). Esta curva mostra um efeito Cotton negativo na região entre 260 e 300 nm, em analogia com as curvas de isoflavanos 3S [83] conhecidos que não sustentam substituintes adicional em C-6 [50]. Sendo assim a estrutura CLXXV surge para isoflavano descrito acima como CLXXII sem relacionar a configuração.



Uma vez que a hidrogenação catalítica, permitindo passar da AL-32 ao isoflavano CLXXV não afetou C-3 desta última, deve a AL-32 possuir configuração idêntica no C-6a. Na razoável suposição que os anéis heterocíclicos estejam unidos por uma

função cis resulta para A1-32 a configuração 6aS, 11aS incorporada na formulação CLXXVI. Utilização de modelo para junção trans revela forte tensão [78].



Confirmação da estrutura resulta de tôdas as características de espectro de r.m.n. (Fig. 96). Os valores dos deslocamentos químicos observados (3,31 e 3,58 τ) e esperados (3,33 e 3,60 τ) [78] para os singletes devido aos prótons em C-7 e C-10 estão em excelente acôrdo. A confirmação da configuração absoluta foi obtida através da curva de dispersão ótica rotatória (Fig. 103). Esta curva revela, entre 350-220 nm, precisamente o curso esperado para 6a(S), 11a(S) pterocarpanos [88].

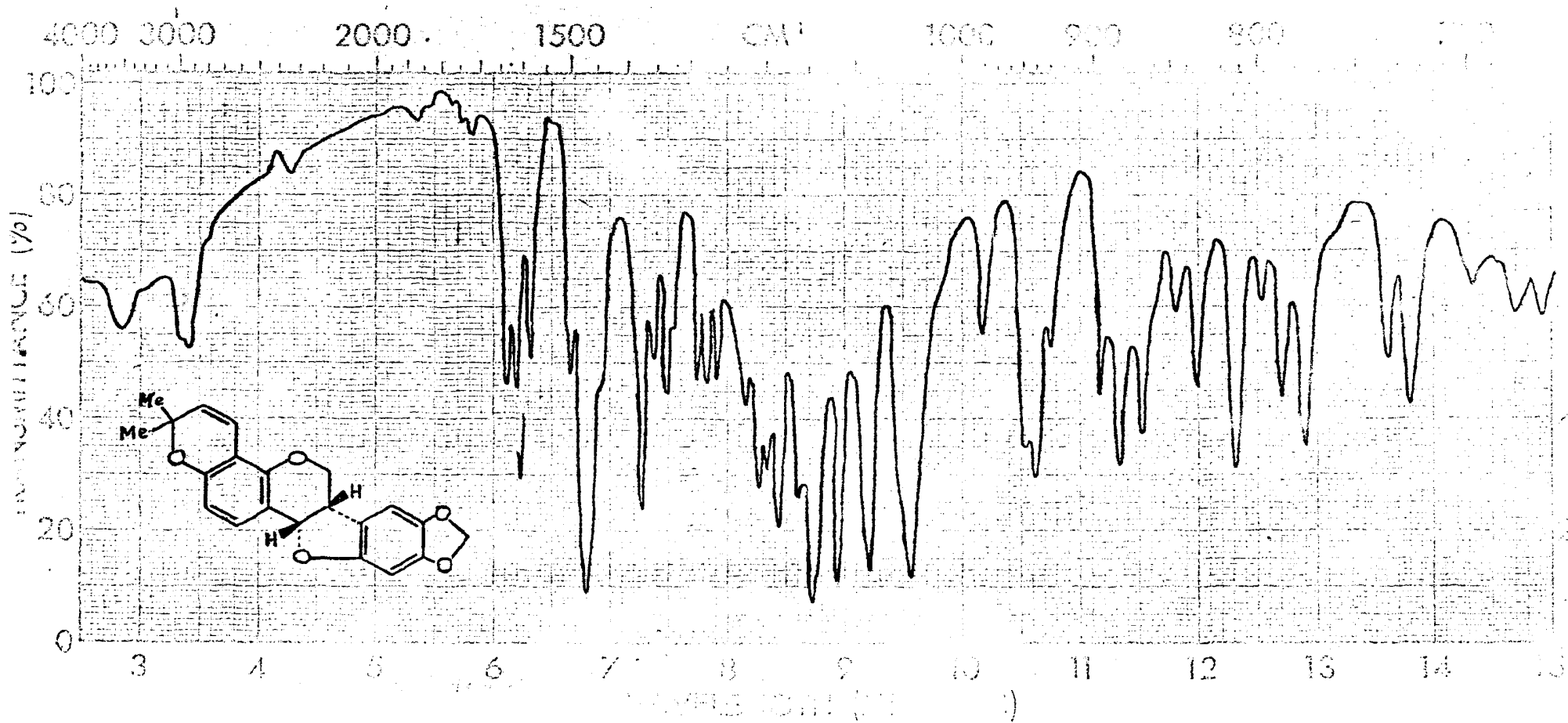


Figura 95. Espectro i.v. da leiocarpina (AL-32).

Fase: KBr

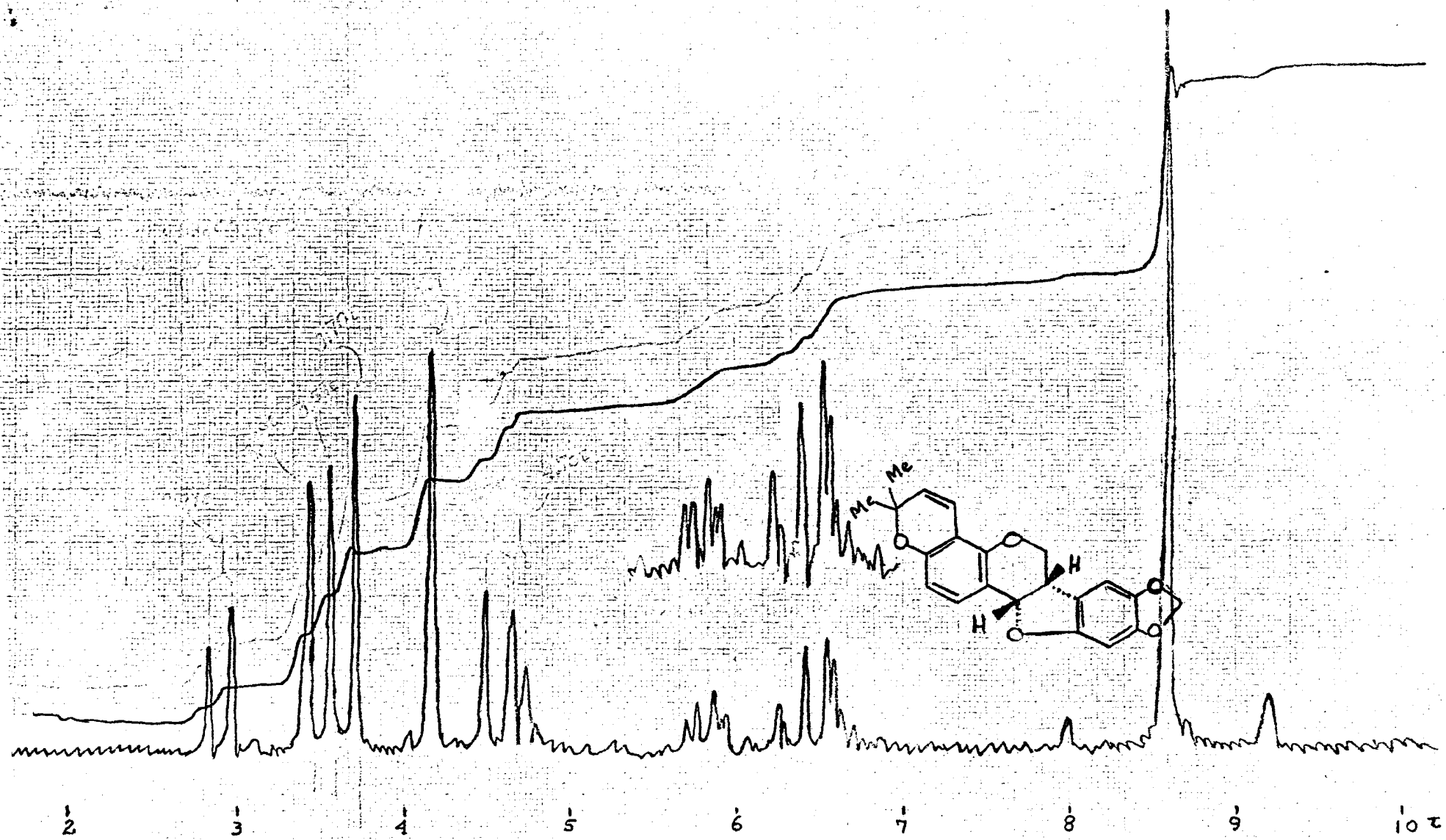


Figura 96.
Espectro de r.m.n. da lelocarpina (AL-32).
Solvente: CCl₄.

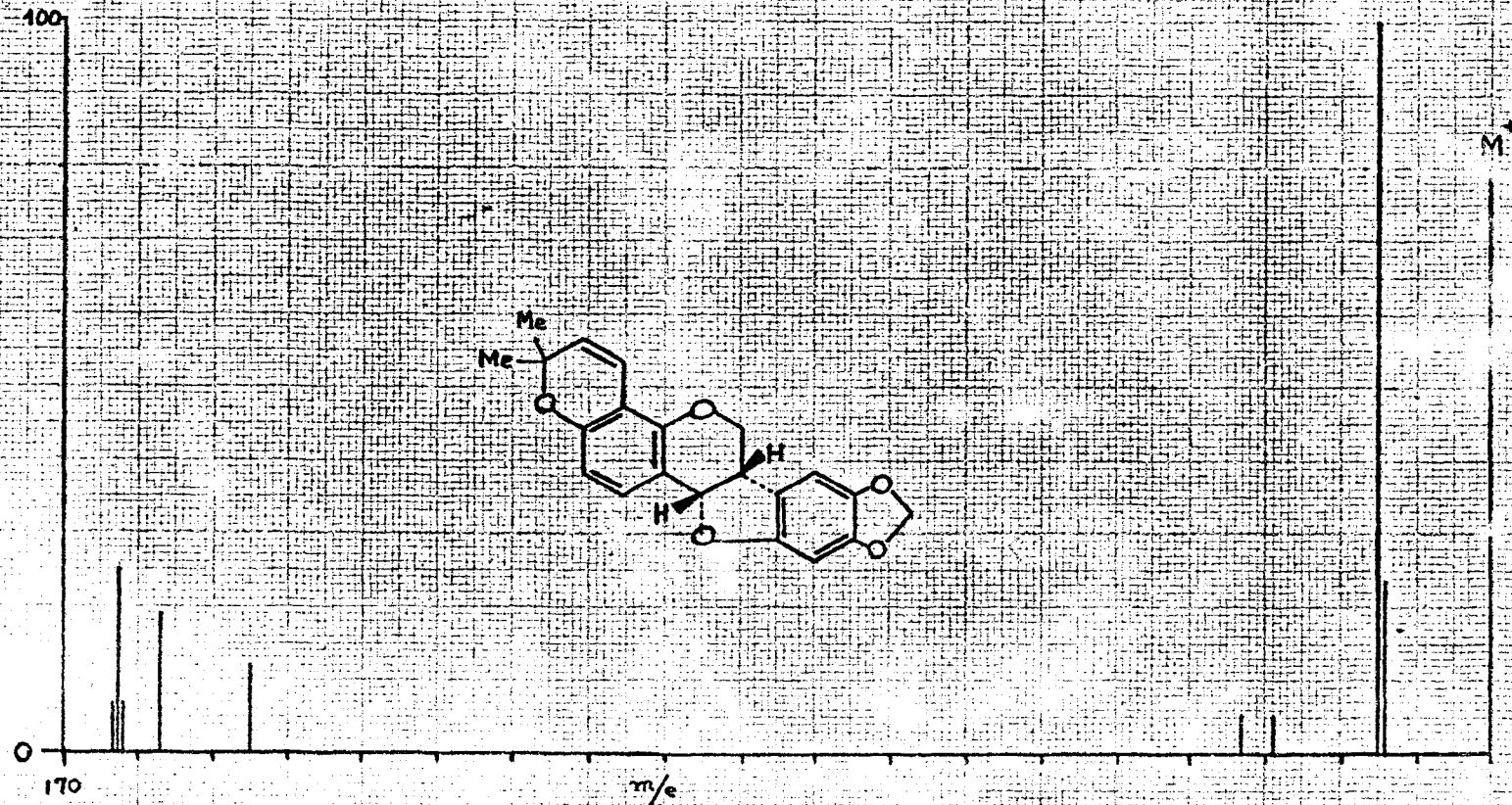


Figura 97. Espectro de massa da leiocarpina (AL-32).

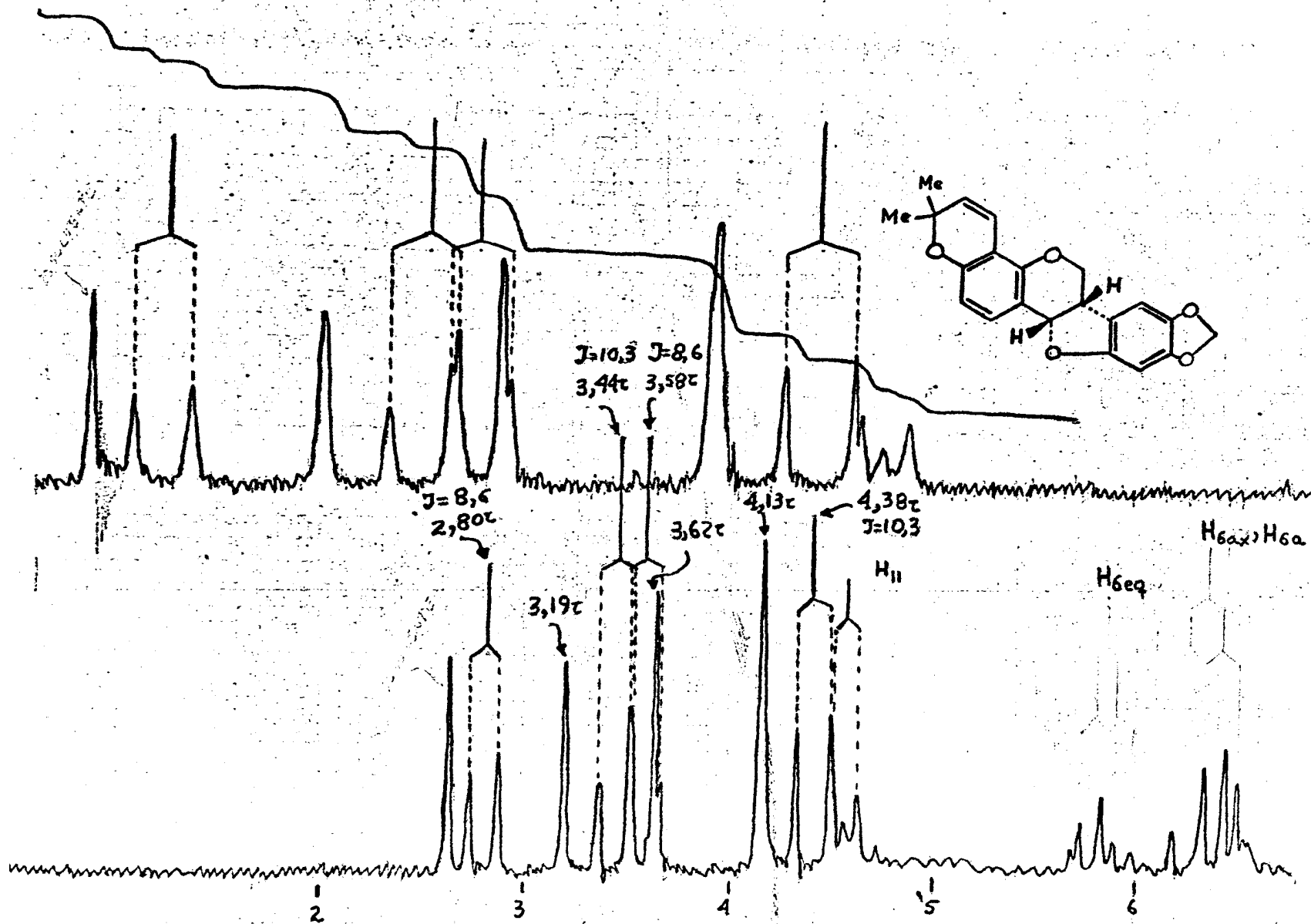


Figura 98.

Espetro de r.m.n. da leiocarpina (AL-32). Solvente: CH_3CN .

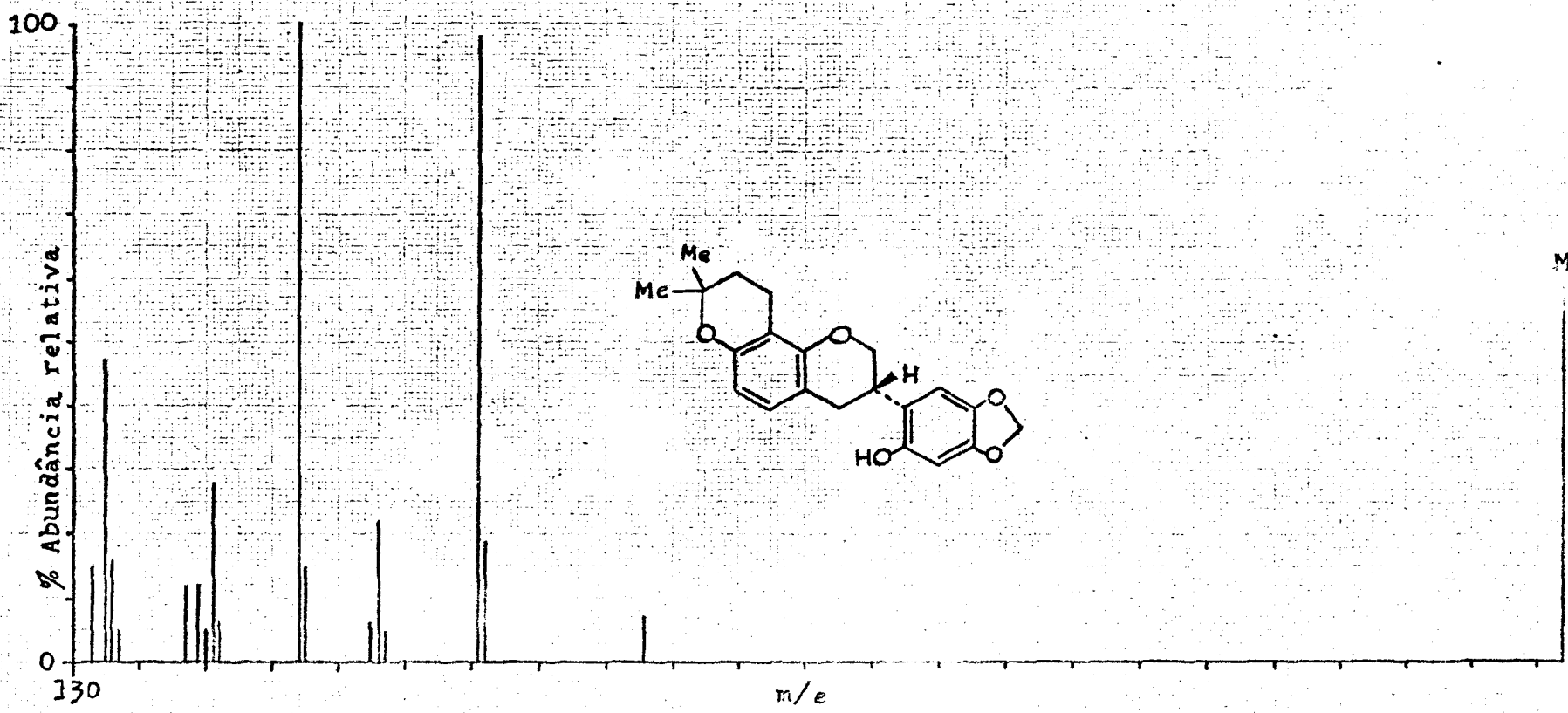


Figura 99.

Espectro de massa da tetrahidroleiocarpina (AL-32H).

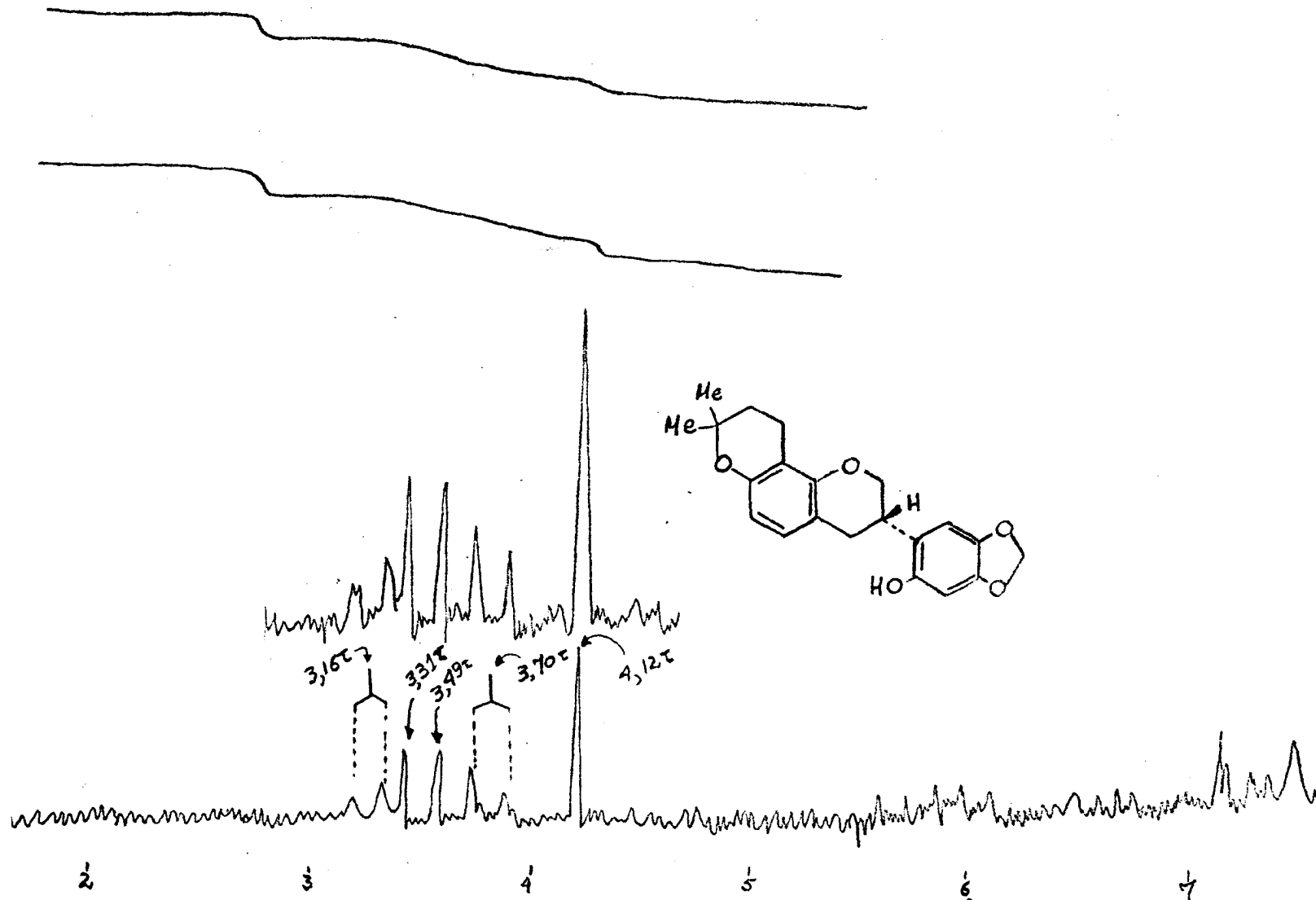


Figura 100.

Espectro de r.m.n. da tetrahidroleiocarpina (AL-32H).

Solvente: CH₃CN.

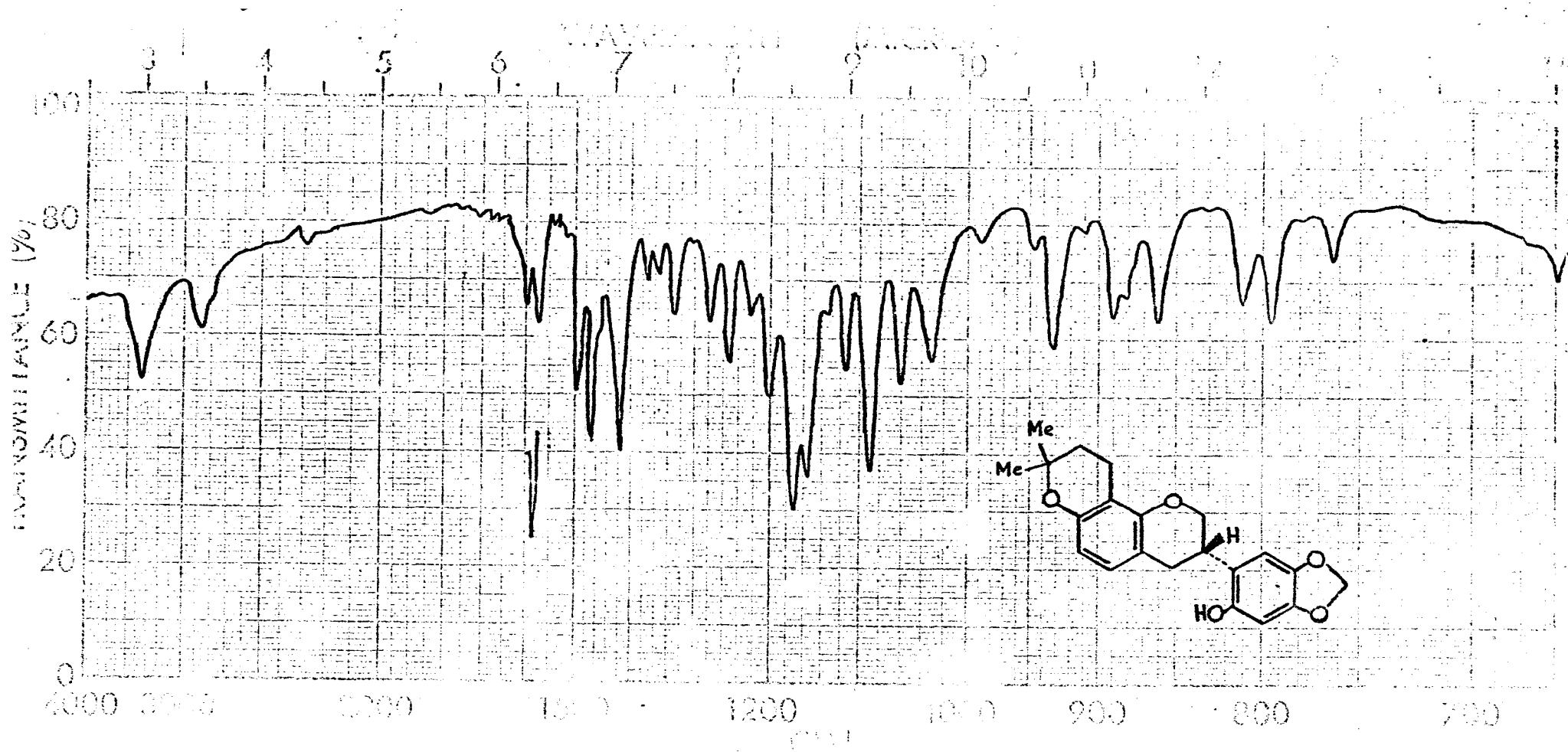


Figura 101.

Espectro i.v. da tetrahidroleiocarpina (AL-32H).

Fase: KBr

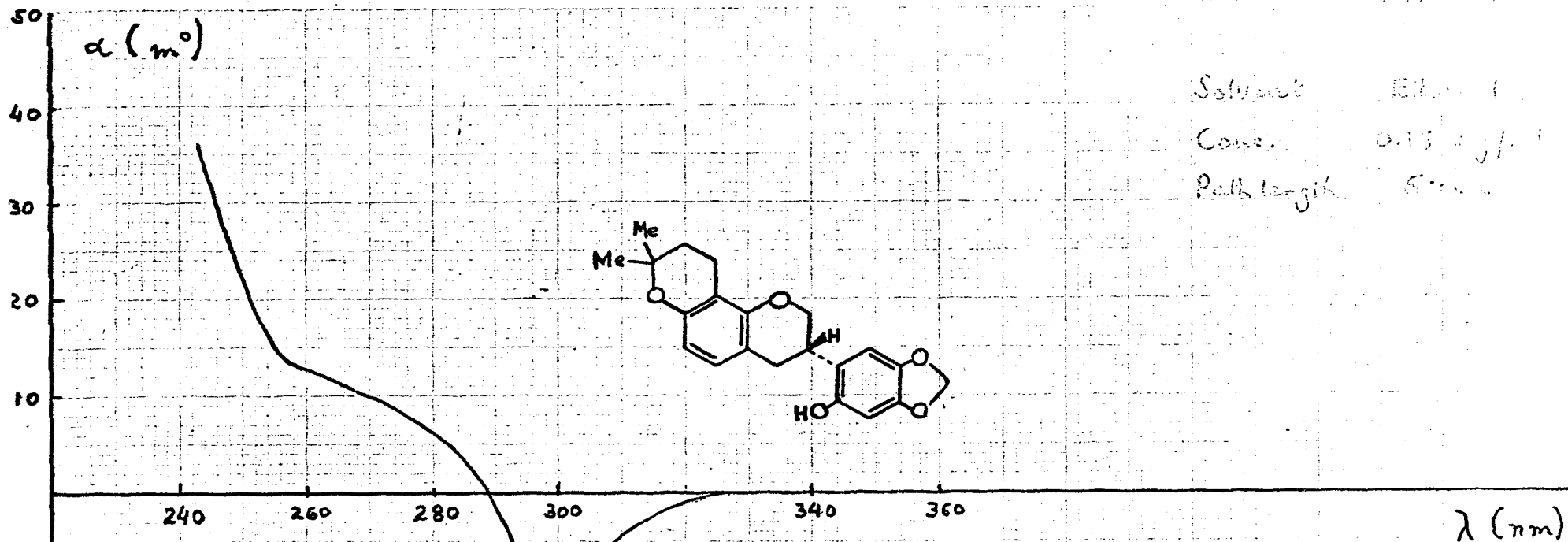


Figura 102. Dispersão ótica rotatória da tetrahidroleiocarpina (AL-32H).
 Solvente: Etanol (0,18 mg/ml).

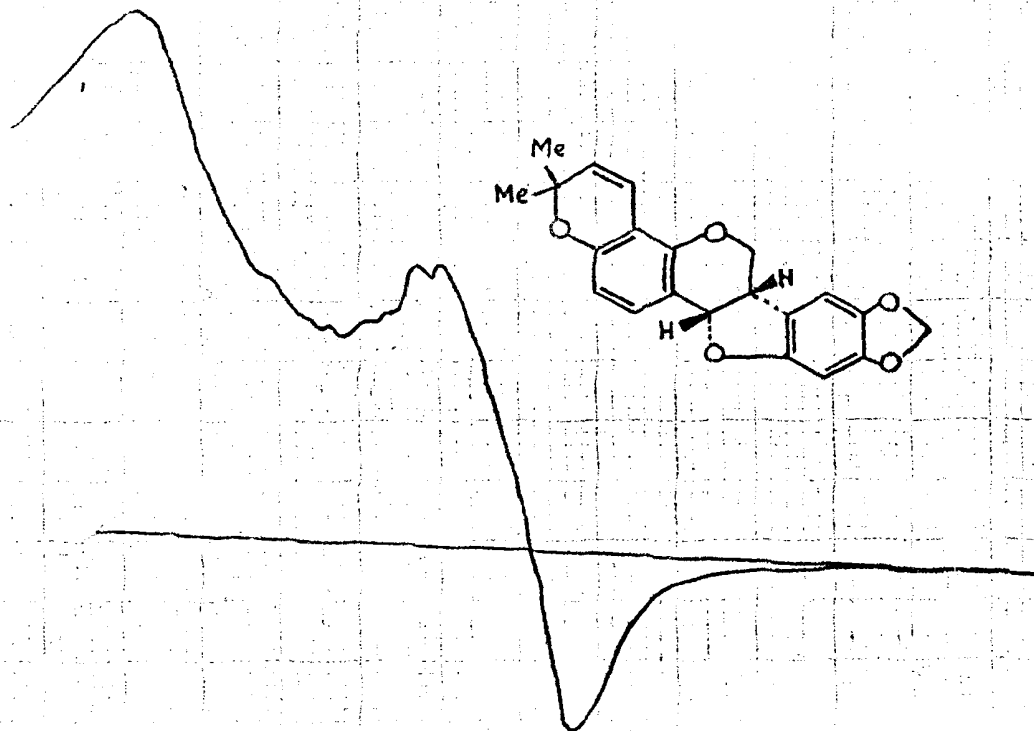
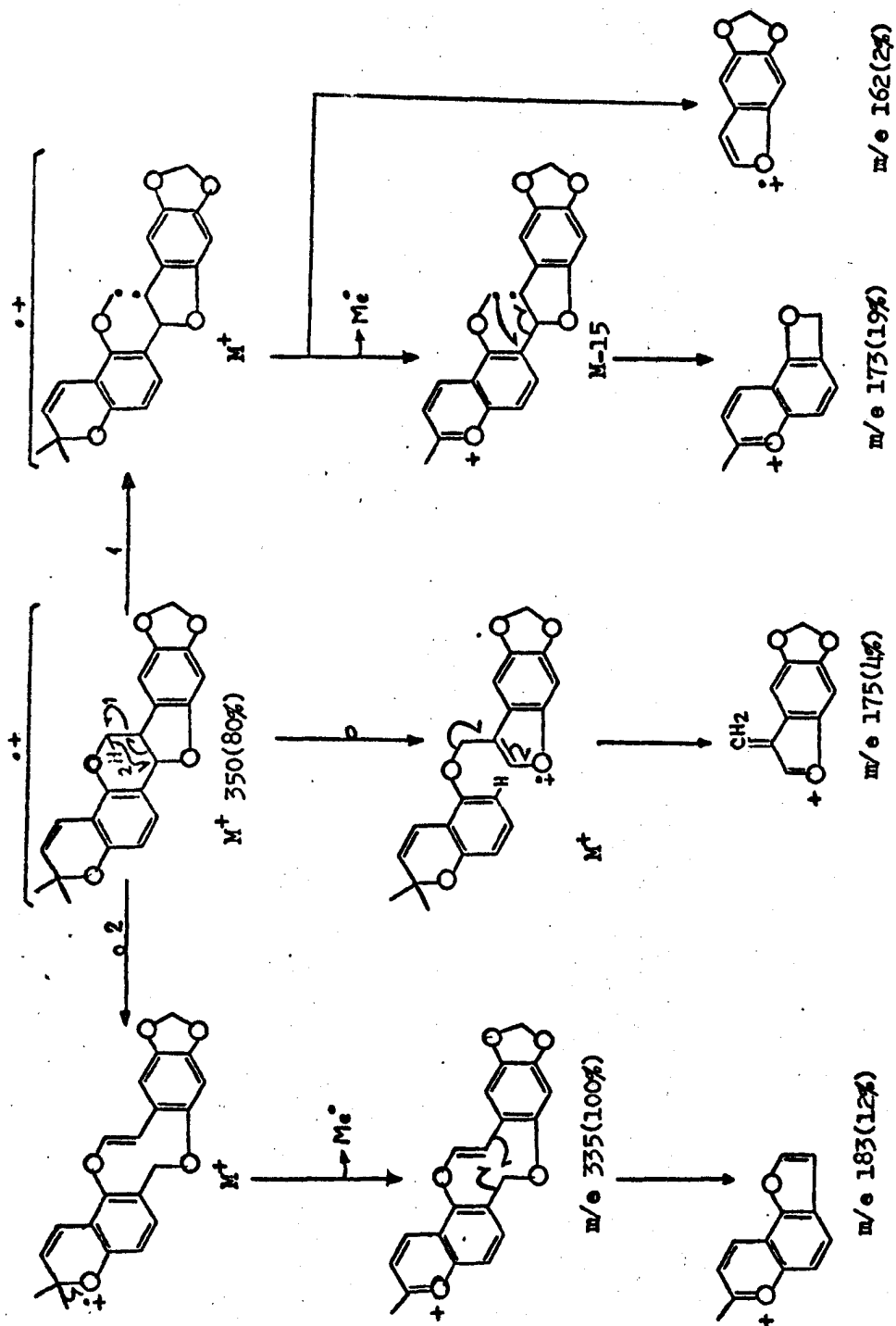


Figura 103.

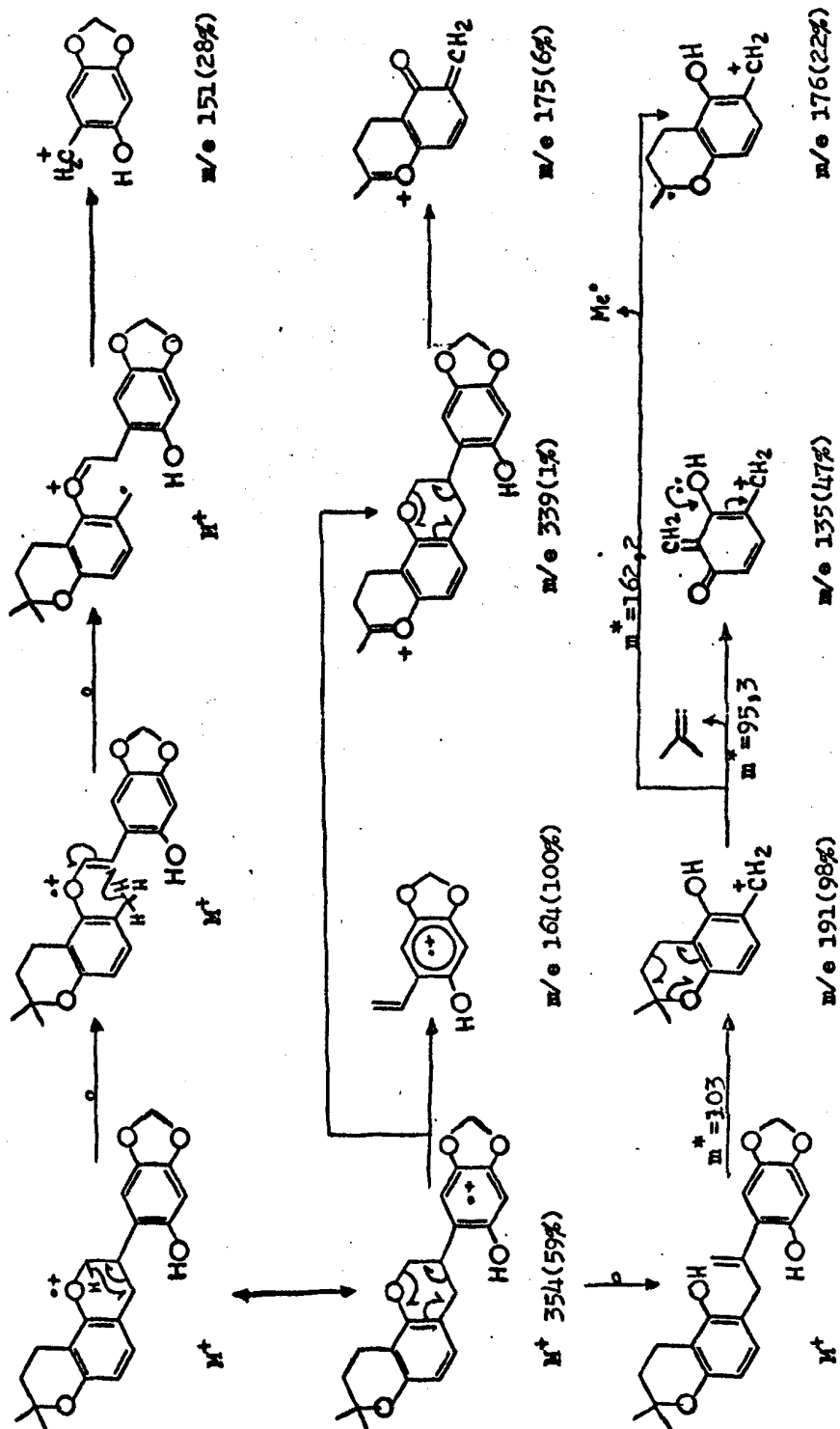
Dispersão ótica rotatória da leiocarpina (AL-32)

Solvente: Etanol (0,196 mg/ml).



Quadro 52.

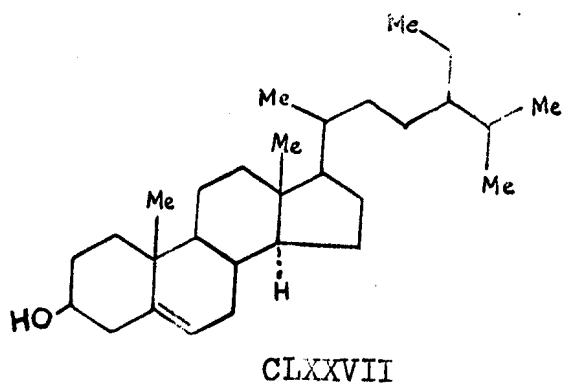
Caminhos principais de fragmentação da leiocarpina (AL-32) no espectrômetro de massa.



Quadro 55. Caminhos principais de fragmentação da tetrahydroeleiocarpina (AL-32H) no espectrômetro de massa.

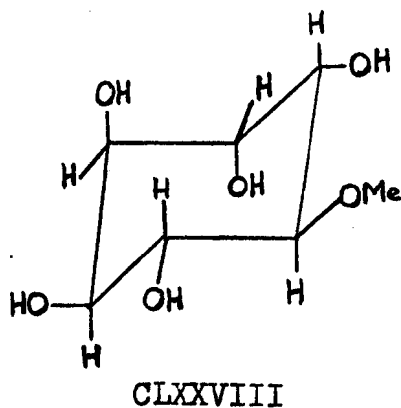
AL-17.

As constantes físicas indicaram tratar-se do β -sitosterol (CLXXVII). Comparação direta com amostra autêntica confirmou esta identificação.



AM-11A.

As constantes físicas e o espectro i.v. (Fig. 104) revelaram tratar-se do (+)-pinitol (CLXXVIII). A identidade desta substância com amostra autêntica foi comprovada.



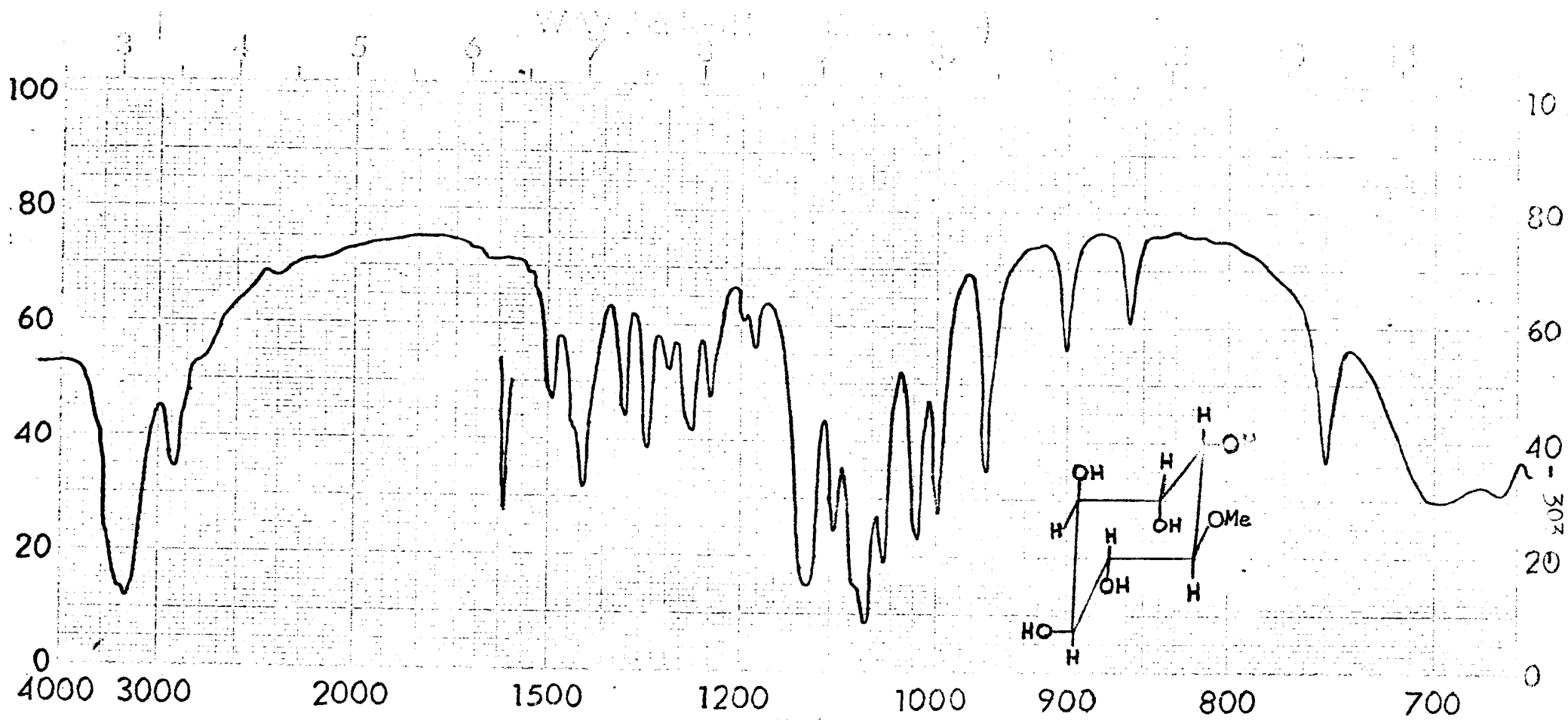


Figura 104.

Espectro i.v. do (+)-pinitrol (AM-11A).

Fase: KBr

CAPÍTULO IV.

PARTE EXPERIMENTAL.

PARTE EXPERIMENTAL

Material e Métodos

1. Separações por cromatografia em coluna foram efetuadas utilizando sílica gel 0,05 - 0,20 mm da "Merck Reagenzien". Para cromatografia em escala analítica utilizou-se sílica gel G e sílica gel H, seg. STAHL, da "Merck Reagenzien" em camada delgada.
2. Os pontos de fusão foram determinados usando microscópio de aquecimento, seg. Kofler.
3. Os critérios de pureza adotados foram: nitidez de ponto de fusão e obtenção de mancha única por cromatografia em camada delgada, variando-se adsorventes, sistemas de desenvolvimento e reveladores.
4. Os espectros ultra-violeta foram registrados no espectrômetro Perkin-Elmer modelo 202, existente na Faculdade Nacional de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro por cortesia do Dr. B. Gilbert, no espectrômetro da Unicam, modelo SP 700, Unicam Instruments Ltda., existente na Universidade de Brasília, no espectrômetro Cary, modelo 14, Varian Associates, existente na Uni

versidade de São Paulo. Os espectros foram registrados em meio neutro (MeOH ou EtOH) e com a ação de aditivos. A mesma quantidade de aditivo foi juntada nas duas células (célula referência e célula a mostra). Os aditivos e suas condições de uso são relacionadas abaixo:

- a. solução aquosa de NaOH 20% (1 a 2 gotas);
 - b. solução de HCl concentrado (d 1, 13). Adicionada em quantidade suficiente para neutralizar a solução de NaOH usada na etapa a;
 - c. acetato de sódio anidro. Este reagente foi adicionado diretamente nas células;
 - d. acetato de sódio e ácido bórico. Após a varredura do espectro com as condições do item c, juntou-se ácido bórico;
 - e. solução etanólica de $AlCl_3$ anidro a 5% ou 10%.
 - f. solução de HCl a 10%. Adicionada à solução contendo $AlCl_3$ usada na etapa e.
5. Os espectros infra-vermelho foram registrados no espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 137 B, existente na Faculdade Nacional de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, por gentileza do Dr. B. Gilbert, no espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 137, existente na Universidade de São Paulo. Utilizaram-se comprimidos contendo, conforme o caso, 0,5 a 1,0 mg de amostras por 100 mg de KBr.
6. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram varridos em aparelho A-60 e HR-100 da Varian Associates, Palo Alto, Ca.

lifornia, U.S.A., existente na Universidade Sheffield e na Universidade de Salford, Inglaterra, por cortesia, respectivamente, do Prof. W.D. Ollis e do Dr. F. Scheinmann, no espectrômetro da Varian, modelo T-60, durante sua permanência em exposição no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Universidade de São Paulo e no espectrômetro da Perkin-Elmer, modelo RIO, existente na Universidade de São Paulo. Como solvente foram utilizados, sempre que possível CDCl_3 e CCl_4 , apenas nos casos em que a amostra se revelou insolúvel nestes solventes e para verificar a influência na frequência de absorção de bandas, lançou-se mão de outro solvente (F_3CCOOH , C_6H_6 , CH_3COCH_3). Tetrametilsilano e acetona foram usados como referência interna. Os deslocamentos químicos foram anotados em unidades τ (ppm). Constantes de acoplamento foram dadas em Hz. Banda simples s, banda dupla d, banda triplíce t, banda múltipla m.

7. Os espectros de massa foram obtidos no espectrômetro modelo MS9 da Associated Electrical Industries pelo Dr. C. P. Falshaw, por gentileza do Prof. W.D. Ollis, Universidade de Sheffield, Inglaterra. Serviram em todos os casos para determinação do peso molecular e, em alguns casos, para determinação da estrutura através da interpretação do padrão de fragmentação da substância.
3. Curvas de dispersão ótica rotatória foram registrados em espectropolarímetro de Rudolph, para solução em etanol, pelo Dr. N. Jones, por gentileza do Prof. W.D. Ollis, Universidade de Sheffield, Inglaterra.

9. Comparação direta entre substância envolveu determinação de ponto de fusão misto, espectros no infra-vermelho e cromatografia em camada delgada variando-se adsorventes, sistemas de desenvolvimento e reveladores.

Isolamento dos constituintes da Apuleia leiocarpa

O tronco foi separado em cerne, alburno e casca. Estes foram reduzidos a pequenos fragmentos e submetidos a moagem. Os pós do cerne (5 kg), do alburno (10 kg) e da casca (1,2 kg) foram extraídos, separadamente, com benzeno em aparelho tipo Soxhlet. As soluções benzênicas foram concentradas parcialmente.

O Esquema 1 resume tais operações que conduziram a três produtos, assim designados:

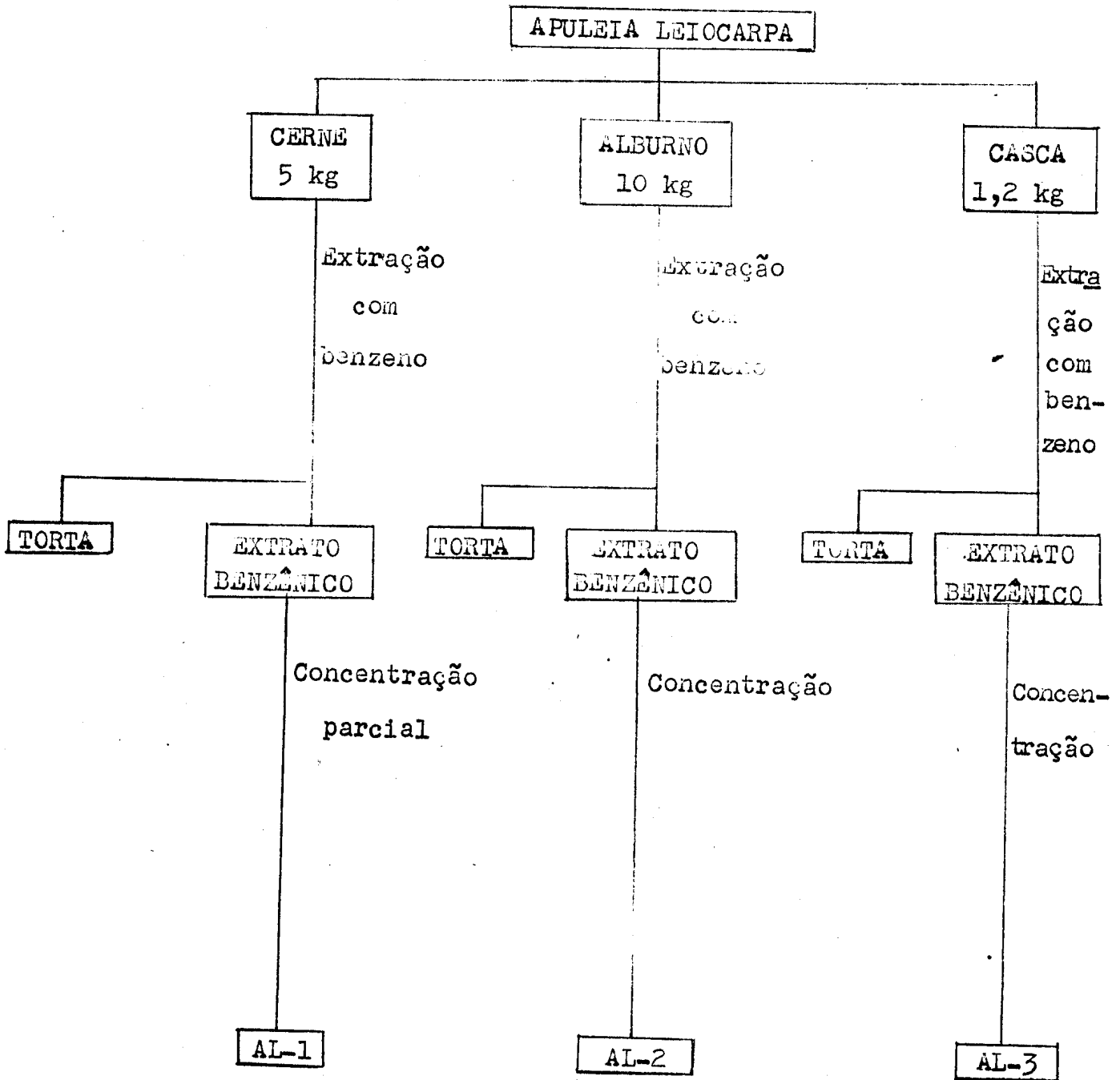
- AL-1 = proveniente do cerne
- AL-2 = proveniente do alburno
- AL-3 = proveniente da casca.

Extrato benzênico do cerne - Esquema 2

A solução benzênica concentrada dos extrativos do cerne (AL-1) deixou precipitar um óleo que foi separado e que solidificou posteriormente (OQS). A solução remanescente depositou vagarosamente as frações cristalinas FC-1 a FC-9, que foram separadas por filtrações sucessivas. Comparação das frações FC-1, FC-2 e FC-3, por cromatografia em camada delgada de sílica, revelou tratar-se de mistura de constituição idêntica. Estas frações reunidas (FC-1-3) foram submetidas a extração com acetona quente, resultando uma par

Esquema 1.

Operações que conduziram à obtenção dos extratos do cerne (AL-1), do alburno (AL-2) e da casca (AL-3).



te solúvel e uma parte insolúvel. A parte insolúvel, após cristalizações sucessivas em acetona, forneceu 1,5 g de uma substância que foi denominada AL-11.

A parte solúvel, após evaporação da acetona, foi cromatografada em coluna, empregando-se sílica como adsorvente. Coletaram-se 36 frações de 50 ml cada, usando-se benzeno: acetato de etila 1:1 como eluente.

A análise comparativa das frações, por cromatografia em camada fina de sílica, permitiu reuni-las nos seguintes grupos:

Frações 1-2: Estas frações combinadas, após recristalizações em benzeno: acetato de etila, forneceram 80 mg de uma substância que foi chamada AL-12.

Fração 3: Apresentou-se como uma mistura de AL-12 e AL-13.

Frações 4-5: Após recristalização em benzeno obtêve-se 90 mg de AL-13.

Frações 6-8: Apresentou-se como uma mistura de AL-11, AL-12 e AL-13.

Frações 9-15: Recristalização em acetona forneceu mais 500 mg de AL-11.

Frações 16-29: Apresentou-se como uma mistura de AL-11 e AL-15.

Frações 30-36: O material resultante da reunião destas frações, após recristalização em acetona, conduziu à ob-

tenção de 70 mg de uma substância que foi denominada AL-15.

As frações cristalinas FC-4, FC-5, FC-6 e FC-7 foram reunidas após comparação em camada delgada de sílica (FC-4-7). Apresentaram-se como uma mistura das quatro substâncias descritas acima com AL-14.

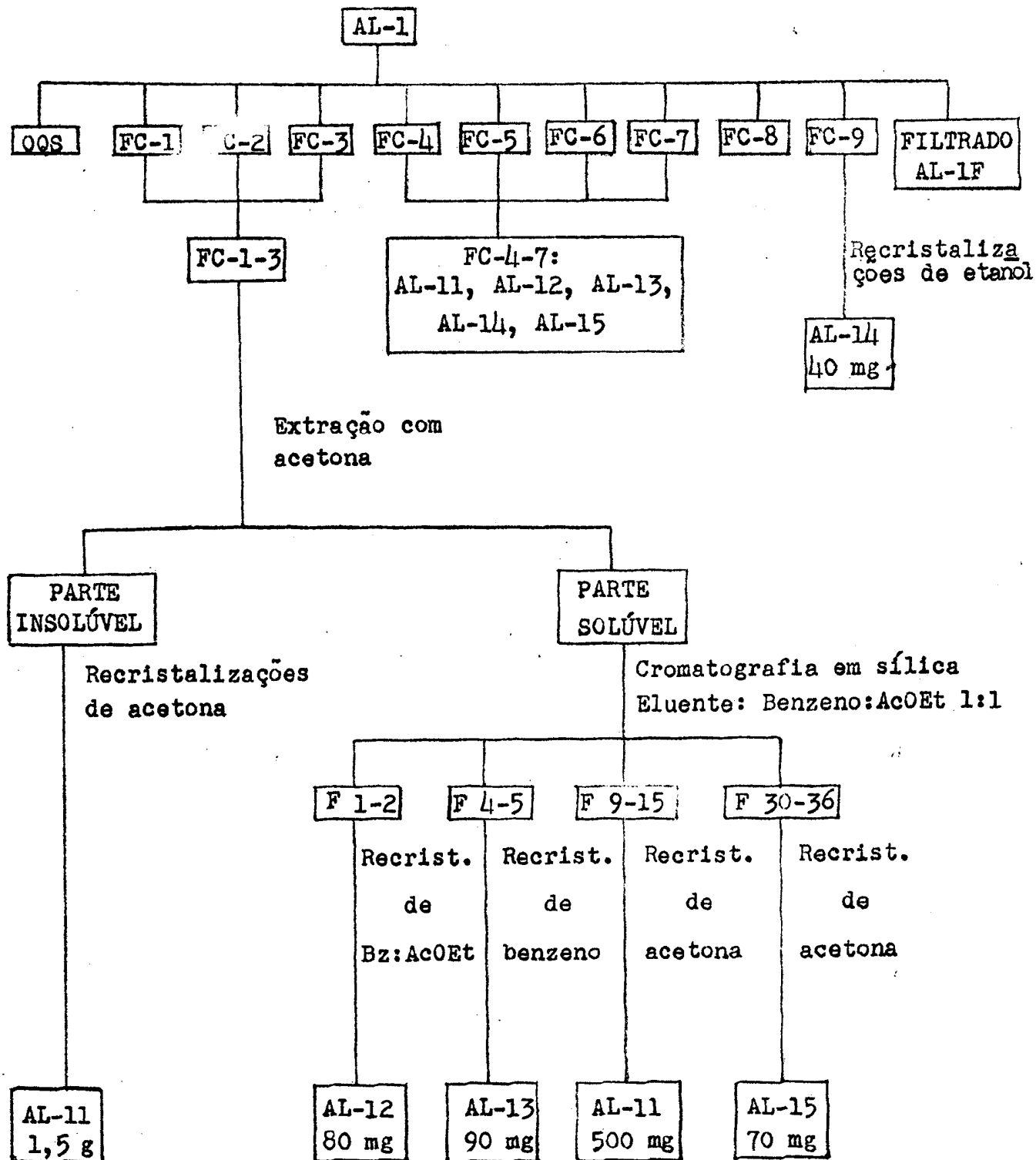
A fração cristalina FC-8 foi recristalizada em acetona, obtendo-se 903,5 mg de uma mistura cristalina de AL-12, AL-13, AL-14 e uma outra substância que foi denominada AL-18. Tomou-se 400 mg e submeteu-se à cromatografia em coluna de sílica, usando-se benzeno: acetato de etila 1:1 como eluente. Nas frações F-1 a F-3 (120 mg) encontrou-se a AL-18 em mistura com a AL-12. Fêz-se recromatografia em coluna de sílica e o mesmo eluente anterior foi usado. Recolheu-se 46 frações de 2 ml cada. As frações F-3 a F-8, após cromatografia em camada delgada de sílica revelaram-se idênticas e constituídas principalmente de AL-18. Estas frações reunidas, foram recristalizadas em metanol, obtendo-se 2 mg de AL-18. O filtrado foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa e forneceu mais 7 mg de AL-18.

A fração cristalina FC-9, após recristalizações sucessivas em etanol, forneceu mais uma substância que recebeu a sigla AL-14, 40 mg.

O Esquema 2 apresenta um resumo das operações que conduziram ao isolamento das substâncias descritas.

Esquema 2.

Resumo das operações que conduziram ao isolamento da AL-11, AL-12, AL-13 e AL-15.



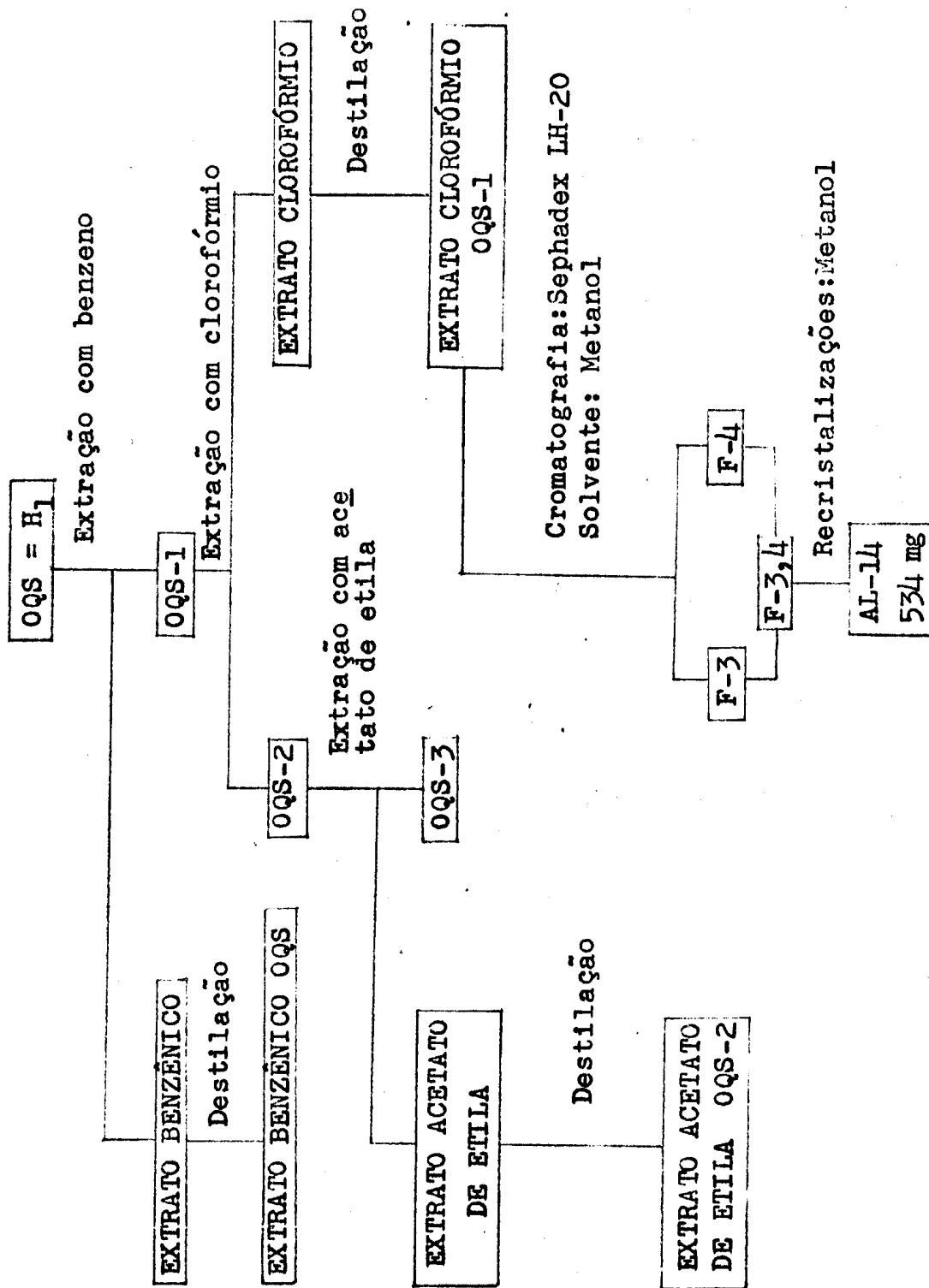
Elaboração do OQS-1 (Esquema 3) permitiu o isolamento de maior quantidade de AL-14. Esta fração foi extraída sucessivamente com benzeno, clorofórmio e acetato de etila. O extrato clorofórmico apresentou a AL-14 como constituinte principal. Submeteu-se 1 g deste material a um peneiramento molecular, por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (48 g) gelificada com metanol. Usando-se o mesmo solvente para eluição, coletou-se 10 frações de 25ml cada, as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica. As frações 3 e 4, constituídas predominantemente de AL-14, foram reunidas e recristalizadas em metanol. Obteve-se assim, mais 534 mg desta substância. O Esquema 3 apresenta um resumo destas operações.

Uma parte do filtrado AL-1F (200 ml, Esquema 2) foi submetida a concentração sob vácuo até um 1/3 do volume inicial. Esta solução permitiu a separação de 3 frações oleosas que foram denominadas respectivamente O-1 (AL-1F), O-2 (AL-1F), O-3 (AL-1F) e duas frações cristalinas FC-4 (AL-1F) e FC-5 (AL-1F). O Esquema 4 resume estas operações.

Solubilização da fração oleosa O-1(AL-1F) em metanol a quente, seguido de repouso, permitiu separação em frações cristalinas, constituídas principalmente de AL-12, AL-13 e AL-14, e um filtrado contendo em torno de 270 mg de material natural. Este filtrado foi submetido a peneiramento molecular em Sephadex LH-20 gelificado em metanol usando-se o mesmo solvente como eluente. Foram recolhidas 14 frações de 10 ml cada uma. As frações que revelaram interesse de estudo foram F-3, F-7 e F-8 (Esquema 5).

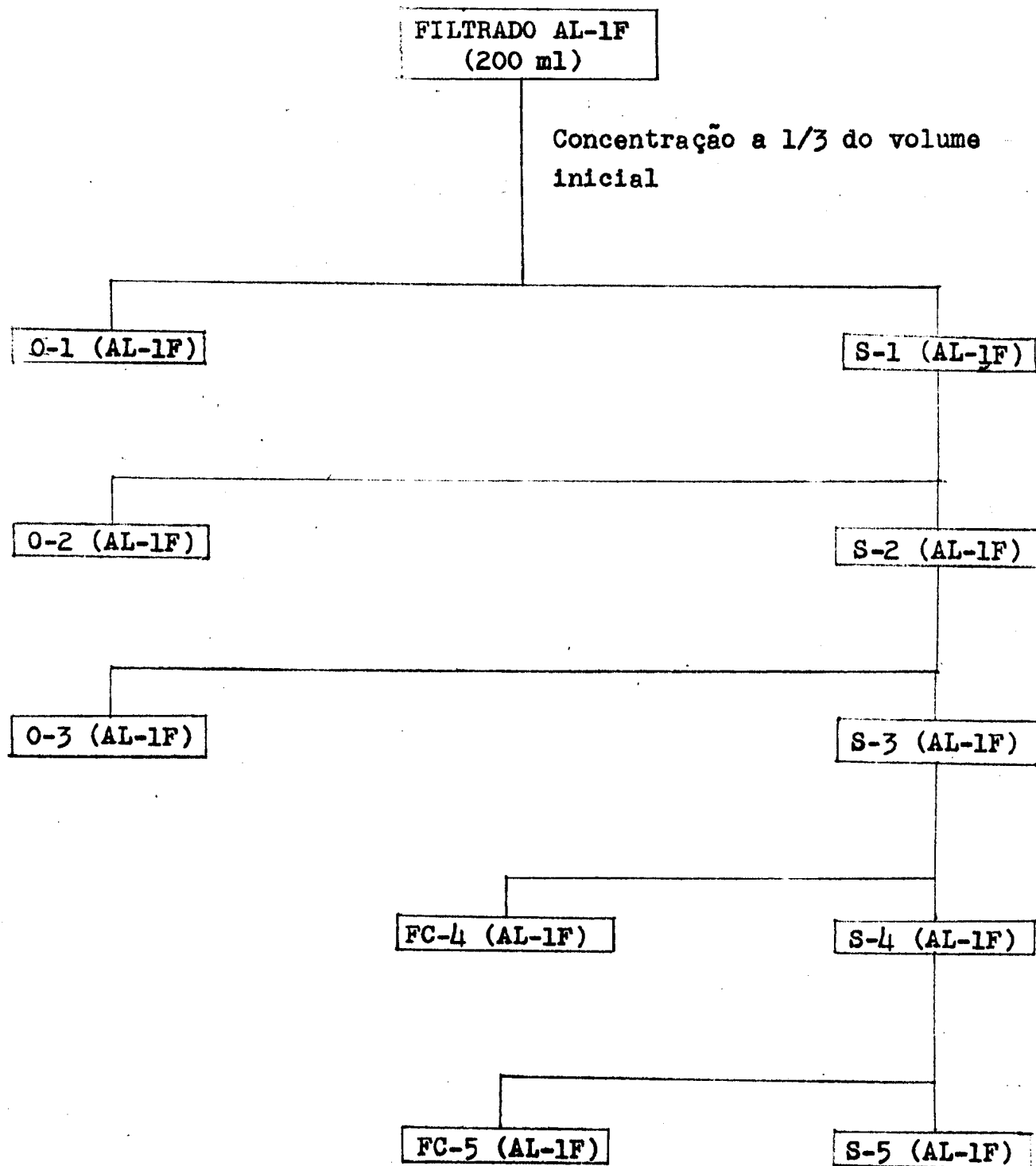
Esquema 3.

Résumé das operações que conduziram ao isolamento de maior quantidade de AL-14.



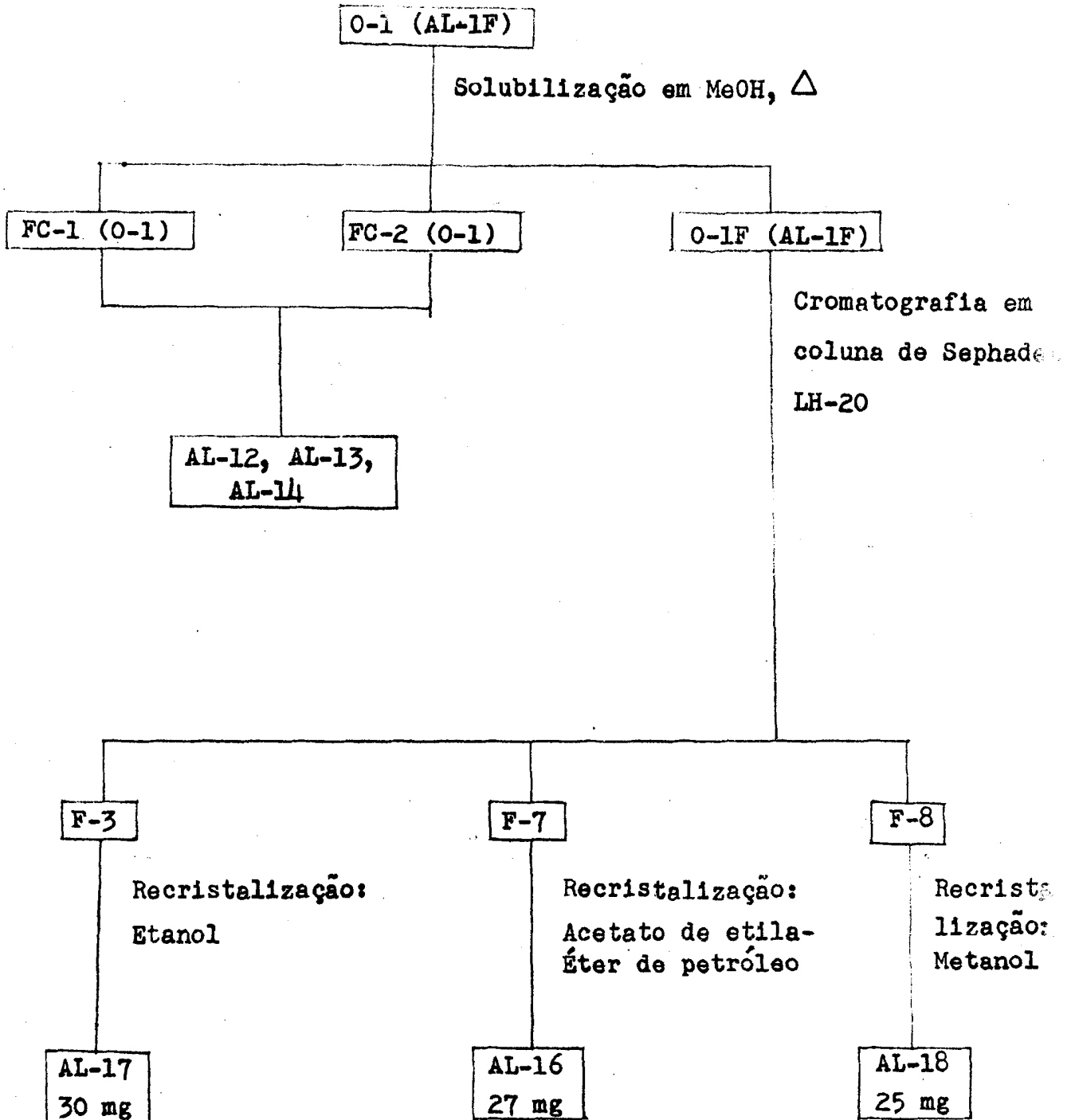
Esquema 4.

Elaboração de parte do filtrado do extrato benzênico do cerne.



Esquema 5.

Resumo das operações que conduziram ao isolamento de AL-16, AL-17 e AL-18.



Fração 3: Recristalização em EtOH forneceu 30 mg de AL-17.

Fração 7: Recristalização em acetato de etila-éter de petróleo (2 vezes) forneceu 27 mg de AL-16.

Fração 8: Recristalização em metanol forneceu 25 mg de AL-18.

A fração 0-2 (AL-1F) revelou-se de constituição semelhante a 0-1 (AL-1F) por cromatografia em camada delgada de sílica (solvente benzeno-acetato de etila 2:8).

Solubilização da fração 0-3 (AL-1F) em metanol a quente, seguida de repouso, permitiu separação de 2 frações cristalinas, constituídas principalmente de AL-12 e AL-13, e uma solução metanólica. Destilação do metanol, solubilização em clorofórmio e extração com solução aquosa saturada de bórax conduziu à separação de uma fração solúvel em bórax e uma fração insolúvel. O extrato bórax foi em seguida lavado com CHCl_3 , acidificado com ácido clorídrico concentrado e submetido a extração com clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada com água, seca com sulfato de sódio anidro e destilada sob vácuo. O resíduo sólido (1,9 g) foi cromatografado em coluna de sílica (60 g), usando-se como solvente benzeno-acetato de etila 2:8. Foram recolhidas 10 frações de 200 ml cada uma.

A análise comparativa das frações por cromatografia em camada delgada de sílica permitiu reuni-las nos seguintes grupos (Esquema 6):

Fração 1: Não revelou interêsse de estudo, pouca quantidade de mistura complexa.

Fração 2 (343.6 mg): Recristalização em tetracloreto de carbono forneceu 129 mg de AL-19A.

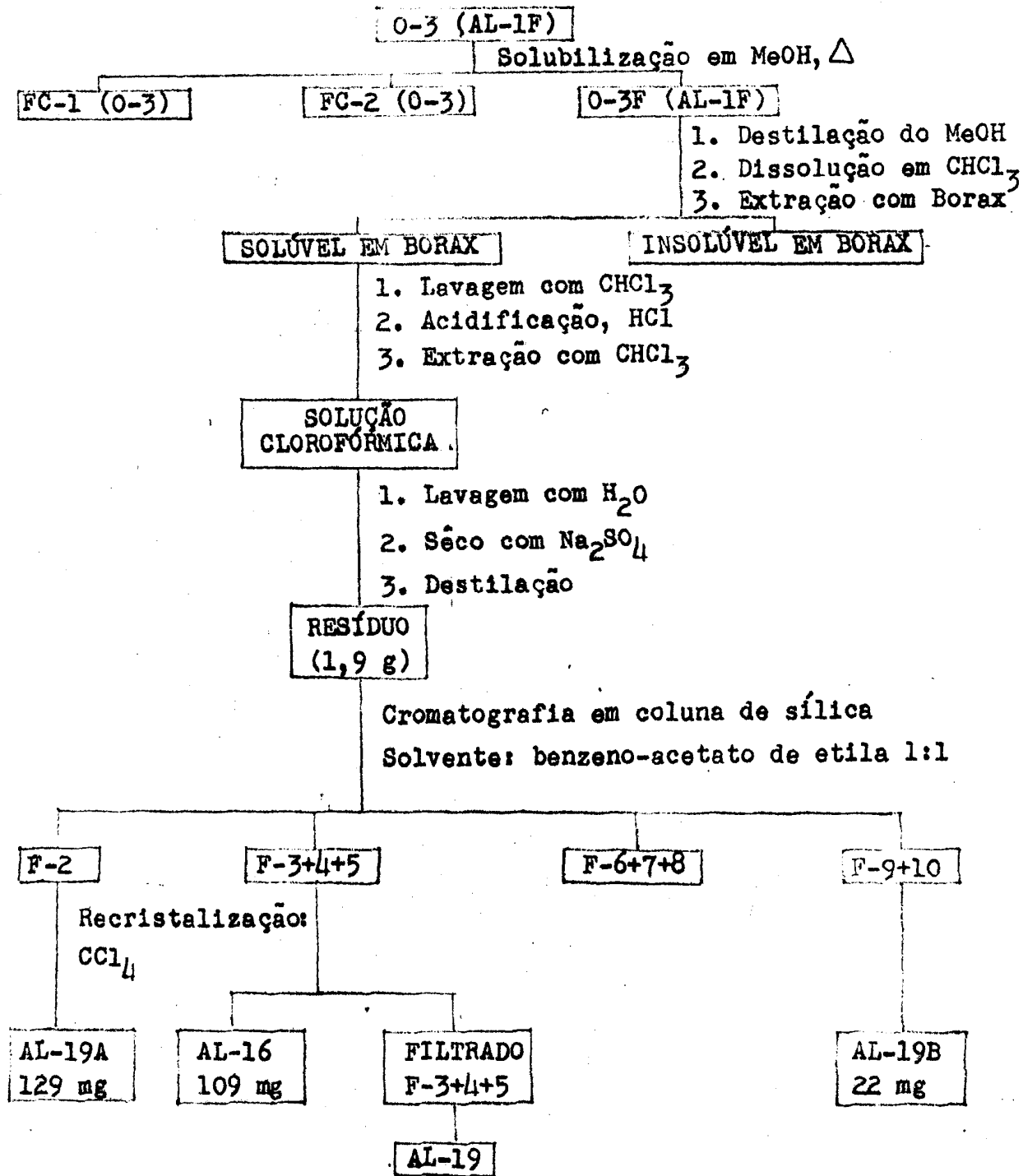
Fração 3+4+5: Recristalização em acetona-éter de petróleo forneceu mais 109 mg de AL-16. No filtrado constatou-se a presença de AL-19 por cromatografia em camada delgada de sílica, usando-se cloroformio como solvente.

Fração 6+7+8: Mistura de AL-16 e AL-19B, principalmente.

Fração 9 + 10: Recristalização em benzeno forneceu 22 mg de AL-19B.

Esquema 6.

Resumo das operações que conduziram ao isolamento da AL-16, AL-19A e AL-19B.



Extrato benzênico do alburno - Esquema 7

A solução benzênica dos extrativos do alburno após concentração parcial permitiu a separação de 4 frações cristalinas denominadas FC2-1, FCa-3 e FCa-4. Cromatografia analítica em camada delgada de sílica (solvente: benzeno-acetato de etila 1:1) permitiu constatar a presença de:

FCa-1 (8,5 g): AL-11 e AL-15;

FCa-2 (620 mg): AL-11, AL-12, AL-13, AL-14 e AL-15;

FCa-3 (610 mg): AL-11, AL-12, AL-13, AL-14 e AL-15;

FCa-4 (822 mg): AL-11, AL-13, AL-14 e AL-15.

Recristalização da FCa-4 (822 mg) em metanol forneceu FCa-4A (228 mg), constituída de uma mistura de AL-11 e AL-14; sendo esta última altamente predominante e com mais uma recristalização no mesmo solvente obteve-se AL-14 (218 mg), p.f. 195-197°C. A comprovação definitiva da identidade desta substância foi feita por p.f. misto e espectrometria no infra-vermelho.

Concentração dos filtrados reunidos FCa-4A, até metade do volume inicial, levou à separação de mais 3 frações cristalinas denominadas FCa-4Aa, FCa-4Ab e FCa-4Ac. Cromatografia analítica em camada delgada de sílica (solvente: benzeno-acetato de etila(1:1) revelou trata-se de misturas:

FCa-4Aa (74,7 mg): AL-11 e AL-15, sendo a primeira predominante;

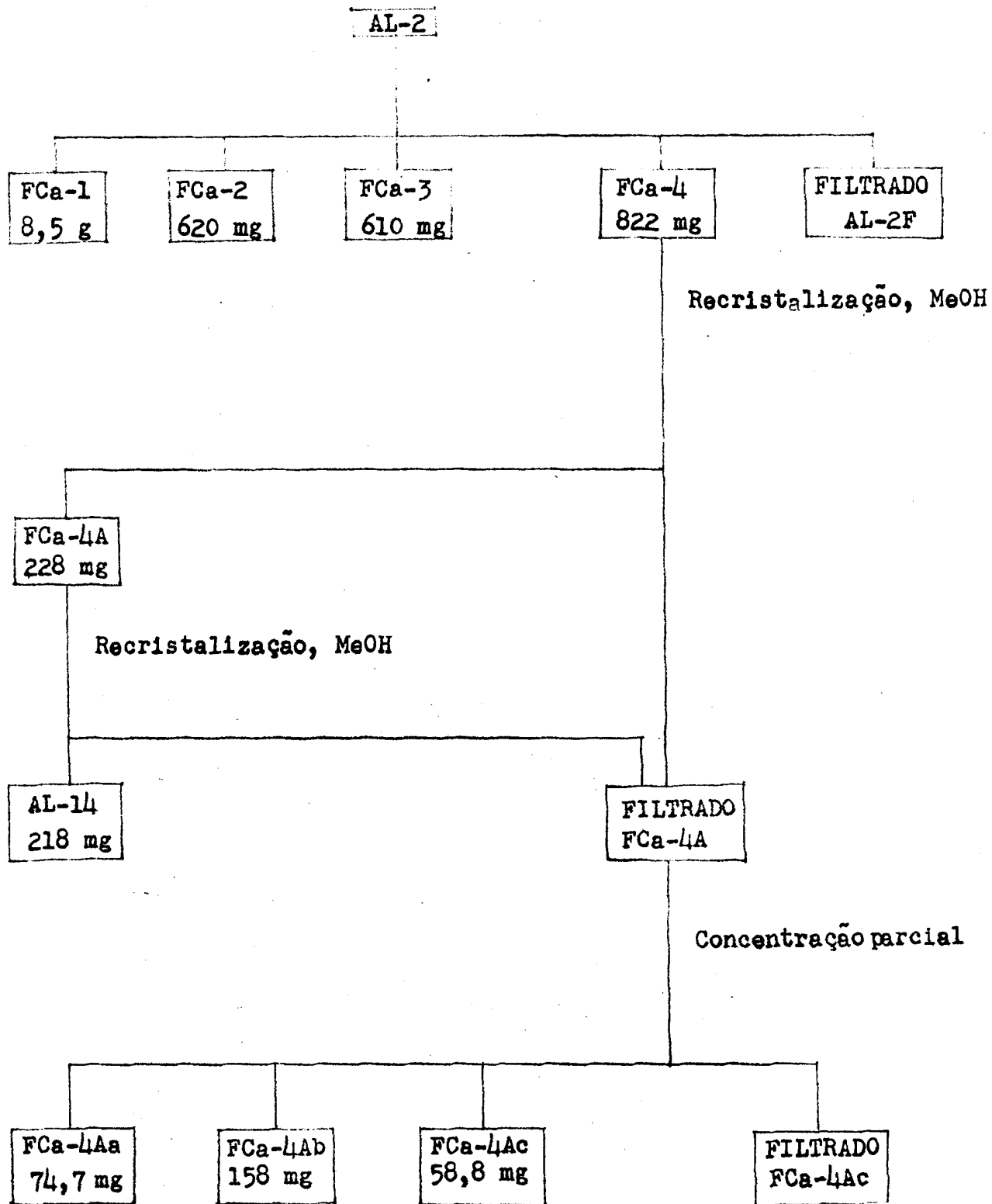
FCa-4Ab (150 mg): AL-11, AL-13, AL-14 e AL-15;

FCa-4Ac (58,8 mg): AL-13 e AL-14, sendo a segunda predominante.

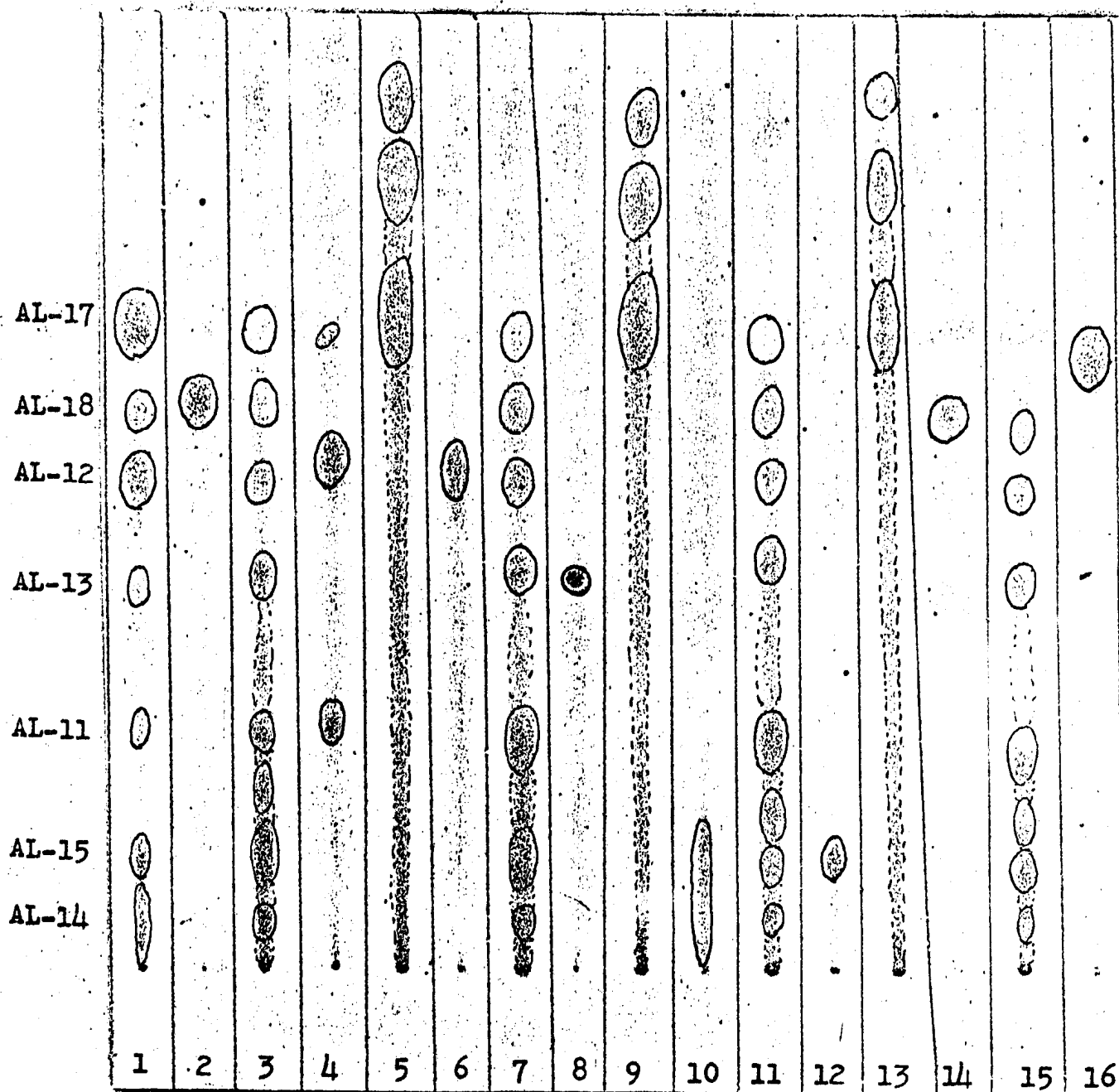
O esquema 7 resume estas operações.

Cromatografia em camada delgada de sílica (solvente: benzeno-acetato de etila 1:1) do filtrado AL-2F (Esquema 7) sugeriu a presença de AL-11, AL-12, AL-13, AL-14, AL-15, AL-16, AL-17, AL-18, AL-19A e AL-19B (Cromatograma 1).

Esquema 7. Resumo das operações que conduziram ao isolamento de mais AL-14.



Cromatograma 1.



Solvente: benzeno-acetato de etila 1:1

1. AL-11 + AL-12 + AL-13 + AL-14 + AL-15 + AL-17 + AL-18

2,14. AL-18

3,7,11,15. Filtrado AL-2

4. AL-11 + AL-12 + AL-17

5,9,13. Extrato benzênico da casca

6. AL-12

8. AL-13

10. AL-14

12. AL-15

16. AL-17

Extrato benzênico da casca - Esquema 8

Destilação do solvente orgânico da solução benzênica dos constituintes da casca (AL-3) forneceu 16 g de residuo escuro. Este material foi separado em 2 partes, sendo 3 g submetidas a fracionamento cromatográfico em coluna de sílica (90 g). Foram recolhidas 41 frações de 25 ml cada uma, iniciando-se a eluição com benzeno seguindo-se com polaridade crescente até clorofórmio-20 % metanol.

Cromatografia analítica em camada delgada de sílica permitiu reunir as frações em 13 grupos, conforme esquematizado no Esquema 8.

Recristalização da F-8-12 em etanol forneceu 130 mg de AL-32, cristais brancos em forma de placas retangulares p.f. 98-100°C.

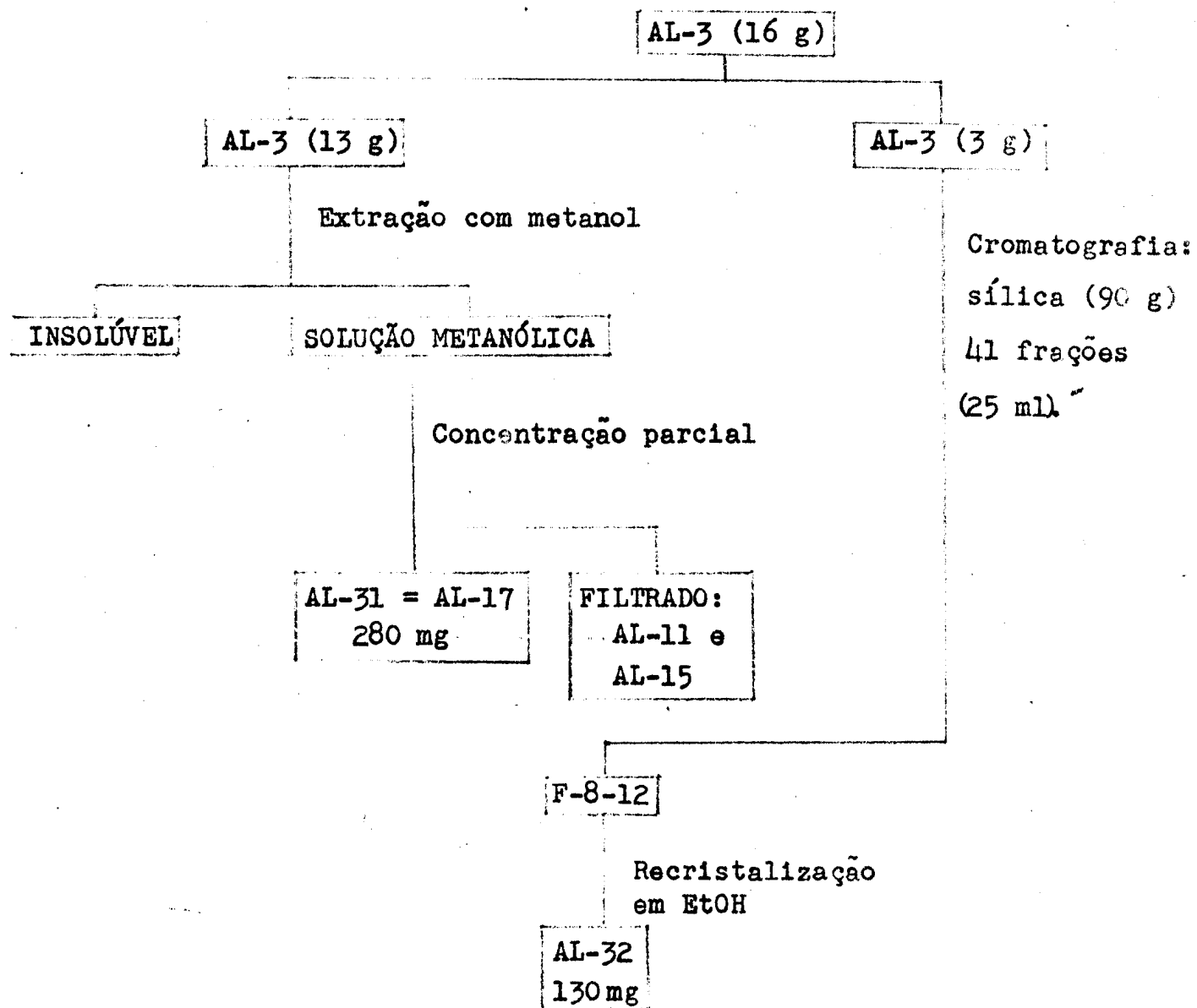
Os grupos de frações restantes apresentaram-se como misturas complexas e as tentativas de refracionamento não conduziram a resultados satisfatórios.

As 13 g restantes foram submetidas a extração com metanol originando uma fração solúvel e uma insolúvel. Concentração parcial da fração solúvel permitiu a separação de 280 mg de AL-17. Cromatografia em camada delgada de sílica (solvente benzeno-acetato de etila 1:1) a água mãe sugeriu a presença de AL-11 e AL-15, entre outros constituintes.

Estas operações estão resumidas no Esquema 8.

Esquema 8.

Resumo das operações que conduziram ao isolamento da AL-32 e AL-17.



Constituintes da Apuleia leiocarpa e seus derivados.

Apuleina (AL-11).

Cristais em placas retangulares, levemente amareladas (acetona), p.f. 211-213°C; $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 250, 315, 335infl.

(ϵ resp. 21.450, 12.400, 11.100); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{NaOH}}$ (nm): 244,

287 (ϵ resp. 23.500, 14.400); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{NaOH} + \text{HCl}}$ (nm); 238, 290

(ϵ resp. 22.200, 12.400); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AcONa}}$ (nm): nenhuma altera-

ção; $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3}$ (nm): nenhuma alteração; $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} +$

$\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ (nm): nenhuma alteração. ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹): 3330, 2038,

1620, 1605, 1558, 1510, 1476, 1455, 1438, 1413, 1347, 1320, 1277,

1242, 1209, 1193, 1164, 1142, 1108, 1084, 1059, 1015, 997, 984, 899,

881, 839, 823, 811, 784; RMN τ (CDCl₃): 6,15 (s) 3H (OMe), 6,12 (s)

3H (OMe), 6,09 (s) 3H (OMe), 6,05 (s) 3H (OMe), 6,00 (s) 3H (OMe),

4,55 (s) 1H (OH), 3,40 (s) 1H (H₃), 3,26 (s) 1H (H₈), 2,77 (s) 1H

(H₆), 2,00 (s) 1H (OH); EM: M⁺ 404 (98%); m/e (%) 403 (31), 390

(23), 389 (100), 387 (56), 375 (5), 374 (16), 373 (59), 371 (15),

361 (5), 357 (10), 355 (11), 343 (11), 341 (5), 329 (8), 315 (5),

303 (5), 211 (7), 195 (13), 194 (6), 188 (11), 181 (6), 180 (6),

179 (21), 173 (7), 168 (5), 167 (51), 165 (5), 164 (6); ensaio de

Gibbs |62| λ_{\max} (nm): 450, 690 (A resp. 0,3, 0,27).

Ensaio de cor:

AL-11 em EtOH + H₂SO₄ conc. → amarelo intenso passando a esverdeado e a verde musgo com aquecimento.

AL-11 em EtOH + NaOH aquoso 2% → laranja-avermelhado passando para laranja pálido e com aquecimento verde-claro.

AL-11 em EtOH + Zn + HCl → vermelho púrpuro.

AL-11 em EtOH + FeCl₃ 0,5% → negativo.

Acetilação da Apuleína.

Apuleína (AL-11, 404 mg) foi tratada com uma mistura de anidrido acético (5 ml) e piridina (5 ml). A solução foi aquecida por 10 minutos em banho-maria e deixada uma noite à temperatura ambiente. A seguir, juntou-se gelo triturado e separou-se o acetato precipitado. Este foi, então, lavado com HCl a 10% até a eliminação da piridina e, posteriormente, com água até pH neutro. Após recristalizações em ~~hexano-benzeno~~ obteve-se 345 mg de 2', 5'-di-O-acetilapuleína (AL-11Ac), p.f. 158-160°C, cristais brancos em forma de agulhas; $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (nm): 230, 254, 308 (resp. 24.650, 19.050, 21.450); $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 2941, 1768, 1640, 1613, 1565, 1517, 1481, 1475, 1453, 1435, 1408, 1361, 1339, 1276, 1235, 1208, 1160, 1140, 1105, 1087, 1062, 1018, 989, 971, 929, 919, 908, 890, 877, 840, 821, 796, 758; RMN (CDCl₃): 7,78 (s) 3H(OCOMe), 7,68 (s) 3H(OCOMe), 6,31 (s) 3H(OMe), 6,13 (s) 3H(OMe), 6,11(s) 3H(OMe), 6,10 (s) 3H(OMe), 6,05 (s) 3H(OMe), 3,36 (s) 1H(H₃), 3,18 (s) 1H(H₃), 2,69 (s) 1H(H₆); EM:M⁺ 488(75%); m/e (%) 474 (17) 473 (58), 446 (23), 445 (25), 431 (50), 430(23), 429(94), 416 (13), 415 (69), 404 (33), 403 (100), 389 (8), 388(30), 386(8), 385 (38), 383 (12), 375 (6), 374 (12), 373 (54), 369(5), 359 (7),

357 (11), 355(11), 345 (8), 343 (14), 341 (5), 329 (13), 327(5),
315 (5), 211 (12), 202 (6), 195 (21), 194 (8), 188 (7), 181(8),
180 (5), 179 (22), 168 (6), 167 (65), 165 (6), 153 (12), 151(10),
150 (8), 149 (8), 139 (10), 137 (8), 136 (6), 135 (5), 135 (5),
123 (6), 122 (8), 109 (7), 107 (6), 105 (5).

Metilação da apuleína.

Apuleína (AL-11, 655 mg) em acetona anidra (50 ml) foi tratada com sulfato de dimetila (2 ml) e K_2CO_3 calcinado (2 g). A amostra foi mantida em ebulição durante 24 horas. A seguir foi deixada adquirir temperatura ambiente e filtrada. Por evaporação do solvente, resultou um resíduo oleoso que foi cromatografado em coluna de sílica, usando-se como eluente benzeno: acetato de etila 1:1. Recolheu-se 40 frações de 10 ml cada uma. As frações 6-33 reunidas forneceram por evaporação um resíduo (463 mg) que, após recristalizações em metanol, levou à 2', 5'-di-O-metilapuleína (AL-11Me) (230 mg), p.f. 159-160°C, cristais incolores em placas retangulares; λ_{\max}^{EtOH} (nm): 245, 320 (ϵ resp. 23.200, 16.200); $\lambda_{\max}^{EtOH+NaOH}$ (nm): nenhuma alteração; ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹): 3056, 2930, 1637, 1613, 1570, 1515, 1436, 1462, 1447, 1407, 1340, 1288, 1271, 1241, 1221, 1201, 1168, 1159, 1144, 1134, 1106, 1085, 1053, 1031, 1019, 1003, 989, 914, 888, 859, 809, 801, 788, 751, 736, 727; EM: M⁺ 432 (46%); m/e (%) 431 (9), 419 (5), 418 (26), 417 (100), 403 (5), 402 (16) 401 (65), 389 (3), 388 (7), 387(25), 386 (5), 385 (11), 383 (10), 371 (10), 359 (5), 343 (6), 273 (5), 211 (7), 202 (3), 195 (6), 193 (5), 187 (6), 185 (5), 179 (9),

175 (5), 167 (13), 129 (5), 121 (5).

Etilação da Apuleína.

A solução da apuleína (AL-11), 490 mg) em acetona anidra (100 ml) foi tratada com sulfato de dietila (5 ml) e carbonato de potássio calcinado (7 g). A mistura foi mantida em refluxo durante 35 horas. A seguir foi deixada adquirir temperatura ambiente e filtrada. Evaporação da acetona, sob vácuo, deixou um material escuro oleoso que foi cromatografado em coluna de sílica usando-se benzeno: clorofórmio(2:8) como eluente. Foram colhidas 10 frações de 20 ml cada. O combinado das frações 1, 2, 3 e 4, após recristalização em benzeno, forneceu 2', 5'-di-O-etilapuleína (AL-11Et). Apresentou-se sob forma de agulhas, brancas, p.f. 129-131°C; $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ (nm): 247, 320 (ϵ resp. 21.700, 16.250); $\nu_{\text{máx}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹) 2912, 1628, 1605, 1566, 1514, 1479, 1454, 1440, 1409, 1386, 1338, 1274, 1246, 1225, 1210, 1147, 1116, 1090, 1049, 1016, 994, 976, 948, 882 811, 791, 749, 740.

Desmetilação oxidativa da apuleína (AL-11) a AL-11 quinona.

Apuleína (344 mg) foi tratada com HNO₃ (d= 1,40, 8,6 ml) e agitada com bastão durante 30 minutos com intermitente aquecimento em banho-maria. Após repouso de 30 minutos em banho de gelo, juntou-se água e extraiu-se com clorofórmio. O extrato clorofórmico foi seco com sulfato de magnésio e destilado. O produto da reação (AL-11-quinona, 210 mg) apresentou-se com coloração laranja intensa, p.f. 120-130°C; $\nu_{\text{máx}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹) 2889, 2824, 1696, 1660, 1654, 1605, 1542, 1508, 1437, 1408, 1350, 1235-1178,

1155, 1114, 1080, 1031, 985, 970, 913, 870, 848, 821, 815.

Redução da AL-11-quinona a 2',5, 5', 6-tetrahidroxi-3, 4', 7-trimetoxiflavona (AL-11-quinol).

AL-11-quinona (210 mg), p.f. 120-130°C, foi dissolvida em ácido acético glacial. Juntou-se 1,05 g de sulfito de sódio. A mistura foi aquecida em banho-maria por 3 minutos. Após resfriamento nas condições ambientes, adicionou-se água e extraiu-se com clorofórmio. O extrato clorofórmico após seco com sulfato de magnésio e destilação forneceu 2', 5, 5', 6-tetrahidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona (AL-11-quinol), p.f. 250-260°C; $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹) 3369-3138, 2912, 2830, 2452-2235, 1639, 1590, 1563, 1475, 1452, 1431, 1343, 1248, 1238, 1211, 1152, 1106, 1088, 1053, 1012, 978, 939, 913, 890, 883, 831, 819, 809.

Acetilação de 2', 5, 5', 6-tetrahidroxi-3,4', 7-trimetoxiflavona.

O AL-11-quinol, obtido como descrito acima e sem purificação, foi tratado com anidrido acético (1,5 ml) e piridina (1,5 ml). A solução foi deixada em repouso por 24 horas e, em seguida, juntou-se água gelada. O precipitado resultante foi separado, lavado com ácido clorídrico a 10% e com água. Após secagem, foi cromatografado em coluna de sílica (eluente: benzeno-acetato de etila 1:1) e recristalizado em benzeno, forneceu 2', 5, 5', 6-tetra-O-acetilapuleína (AL-11-quinol-Ac, 41 mg), p.f. 210-215°C, cristais brancos sob forma de agulhas; $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (nm): 230, 250, 306 (ϵ resp. 15.650, 10.900, 13.050; $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹) 2930, 1778, 1640, 1633, 1615, 1582, 1515, 1492, 1456, 1440,

1365, 1352, 1331, 1297, 1281, 1247-1145, 1109, 1085, 1062, 1051, 1021, 999, 962, 938, 918, 905, 878, 846, 831, 822, 811; RMN τ (CDCl_3): 7,86 (s) 3H (OCOMe), 7,65 (s) 6H (2 OCOMe), 7,54 (s) 3H (OCOMe), 6,37 (s) 3H (OMe), 6,08 (s) 6H (2 OMe), 3,16 (s) 1H (H_g), 3,14 (s) 1H (H_z), 2,67 (s) 1H (H_g); EM: M^+ 544 (8); m/e (%) 502 (8), 461 (25), 460 (100), 459 (8), 418 (17), 417 (8), 401 (7), 388 (5), 387 (21), 377 (5), 376 (26), 375 (25), 359 (10), 345 (17), 231 (5), 230 (10), 195 (8), 194 (8), 179 (11), 167 (6), 153 (8), 151 (9), 149 (8), 137 (7), 135 (10), 129 (5), 122 (8), 115 (6), 111 (6), 109 (6), 107 (8), 106 (5), 105 (19), 104 (6), 103 (6).

Hidrólise alcalina da 2', 5'-di-O-metilapuleína (AL-11Me).

AL-11Me (153 mg) e KOH (2,5 g) em etanol (10 ml) e água (2,5 ml) foram mantidos sob refluxo por 8 horas. A solução foi concentrada e, após resfriamento, acidificada (H_3PO_4 10%) e extraída com éter etílico. A solução etérica foi extraída com NaHCO_3 aquoso a 5% e depois com NaOH a 3%. A solução em bicarbonato foi acidificada e extraída com clorofórmio. Evaporação do solvente orgânico levou a um resíduo que, após filtração em coluna de sílica (eluente: CHCl_3) e cristalização em benzeno-éter de petróleo, forneceu o ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico (13,4 mg), p.f. 139-141°C, lit, [67] p.f. 143-144°C, cristais agulhas brancas; $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) 3400, 3225, 2917, 2851, 2713-2336, 1719, 1613, 1590, 1518, 1476, 1459, 1430, 1413, 1372, 1361, 1354, 1284, 1265, 1232, 1232, 1213, 1195, 1171, 1082, 1046, 1024, 883, 847, 835, 785, 782, 756, 724, 719, 717, 711. A solução em hidróxido de

sódio foi acidificada e extraída com clorofórmio. Evaporação do solvente orgânico levou a um resíduo que se apresentou como material oleoso (19,8 mg). Este foi filtrado em coluna de sílica (eluente: CHCl_3) e depois cristalizado em éter de petróleo, resultando 6'-hidroxi-2,2',3',4'-tetrametoxiacetofenona, cristais sob forma de agulhas, brancas p.f. 67-69°C, lit. [90] 70-71°C; $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (μ): 216, 230, 284 (ϵ resp. 5.550, 4.550, 5.400); $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (μ): 242, 282, 365. (ϵ resp. 4.850, 2.400, 2.450); $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH} + \text{AlCl}_3}$ (μ): 216, 234, 290, 305 inf. (ϵ resp. 6.400, 5.100, 5.400, 4.600); $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) 3421, 2923, 2857, 1634, 1613, 1585, 1492, 1461, 1443, 1414, 1395, 1369, 1274, 1256, 1208, 1157, 1133, 1051, 1001, 979, 933, 875, 846, 830, 775, 743, 707; EM: M^+ 256 (14%); m/e (%) 212 (12), 211 (100), 210 (6), 196 (6), 195 (6), 184 (7), 169 (10), 168 (6), 167 (8), 153 (5), 149 (5), 69 (9).

Hidrólise alcalina da apuleína (AL-11).

Apuleína (20 mg) e hidróxido de sódio 10% (H_2O : MeOH 1:1) foram mantidas sob refluxo em banho-maria durante 4 horas. Findo o refluxo removeu-se o metanol substituindo simultaneamente por água. A solução aquosa foi acidificada com ácido fosfórico aquoso a 10% e extraída com clorofórmio. A solução clorofórmica foi extraída com solução aquosa saturada de NaHCO_3 e depois com NaOH aquoso a 3%. A solução em bicarbonato foi acidificada (HCl 10%) e extraída com clorofórmio. Evaporação do solvente orgânico e sublimação forneceu o ácido 6-hidroxi -2,3,4-trimetoxibenzoico (rendimento extremamente baixo).

113-115°C; $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) 3323, 3168, 3017, 2872, 2726-2349, 1679, 1613, 1586, 1493, 1483, 1456, 1439, 1427, 1414, 1393, 1376, 1360, 1299, 1258, 1225, 1212, 1189, 1175, 1135, 1119, 1093, 1034, 1012, 996, 930, 890, 842, 816, 803, 799, 775, 760, 747; EM: M^+ 228(41%); m/e (%) 211 (15), 210 (100), 196 (7), 195 (65), 184(30), 169 (34), 168 (7), 167 (49), 141 (9), 139 (6), 111 (7), 105 (5), 69 (40), 66 (7), 55 (5), 53 (18). A solução em hidróxido de sódio foi acidificada e extraída com clorofórmio. Evaporação do clorofórmio e cristalização do resíduo em éter de petróleo forneceu 6'-hidroxi-2, 2', 3', 4'-tetrametoxiacetofenona, p.f. 67-69°C, lit. |90| 70-71°C, revelado por cromatografia em camada delgada de sílica.

Hidrólise alcalina da 2', 5'-di-O-etilapuleína (AL-11Et).

AL-11Et (40 mg) dissolvida em solução de KOH em etanol absoluto a 10% (5 ml) foi mantida em refluxo em banho-maria por 10 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida, o resíduo dissolvido em água, acidificado e extraído com clorofórmio. A solução clorofórmica foi extraída com solução aquosa saturada de NaHCO_3 . A solução em bicarbonato foi acidificada e extraída com clorofórmio. Evaporação do solvente orgânico e sublimação forneceu o ácido 2,5-dietoxi-4-metoxibenzóico (2 mg), p.f. 152-154°C, lit. |67| 155-156°C; $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) 2904, 2862, 2638-2474, 1677, 1651, 1610, 1600, 1511, 1448, 1379, 1345, 1253, 1208, 1110, 1094, 1051, 1035, 1006, 962, 946, 888, 855, 812, 771; EM: M^+ 240 (63%); m/e (%) 212 (6), 211 (11), 196 (12), 195 (10), 194

(48), 184 (8), 183 (18), 168 (10), 167 (22), 166 (100), 165 (72), 151 (7), 144 (22), 139 (32), 138 (13), 137 (23), 135 (12), 128 (6), 125 (15), 123 (23), 122 (5), 119 (7), 115 (6), 111 (32), 110 (7), 109 (18), 108 (6), 107 (12), 105 (16), 103 (6) 97(13), 96 (7), 95 (21), 93 (21), 91 (13), 84 (12), 82 (15), 81 (22), 80 (7), 79 (22), 78 (9), 77 (13), 72 (5), 71 (12), 70 (15), 69 (29), 69 (29), 68 (9), 67 (29), 66 (9), 65 (13), 64 (9), 63(13), 62 (7), 59 (7), 58 (9), 57 (24), 56 (32), 55 (65), 54 (9), 53 (31), 52 (15), 51 (22), 50 (16). Evaporação da solução clorofórmica remanescente resultou um material oleoso, no qual foi constatada a presença de 6'-hidroxi-2,2',3', 4'-tetrametoxiacetofenona, por cromatografia em camada delgada de sílica.

Síntese do ácido 2-hidroxi-3,4,5-trimetoxibenzóico.

Ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico (10 g) foi dissolvido em clorofórmio (100 ml) e água (1 ml). Após iniciado o refluxo, adicionou-se vagarosamente uma solução de bromo (7,6 g) em clorofórmio (20 ml). Terminada a adição de bromo (2 horas), filtrou-se a solução em carvão ativo e evaporou-se o clorofórmio. O produto da reação, p.f. 120-135°C (11,5 g) foi hidrolizado com NaOH 3N (f= 0,9288, 57 ml) em presença de óxido cuproso(0,177 g), em refluxo por 7 horas sob corrente de nitrogênio. Findo o refluxo a solução foi acidificada. A acidificação tornou a solução incolor e produziu precipitação. O material precipitado foi separado (10,7 g), p.f. 80-115°C. Redissolução do produto

em água, tratamento com carvão ativo e repouso de duas horas permitiu separação de cristais (2,5 g) que não deram coloração com clorêto férrico 5% etanólico. O filtrado foi concentrado parcialmente sob vácuo. Separou-se mais duas frações cristalinhas que deram ensaio positivo com cloreto férrico. Recristalização em benzeno-éter de petróleo forneceu o ácido 2-hidroxi-3,4,5-trimetoxibenzóico, p.f. 101-103°C, lit. [63] 104-105°C.
✓_{max} ^{KBr} (cm⁻¹) 3395, 2972, 2862, 2582-2505, 1644, 1595, 1478, 1442, 1411, 1367, 1321, 1268, 1238, 1181, 1125, 1117, 1076, 1021, 970, 918, 875, 858, 794, 770, 754, 704; RMN τ (CDCl₃): 6,15 (s) 3H (OMe), 6,06 (s) 3H (OMe), 5,96 (s) 3H (OMe), 2,85 (s) 1H (H₂), -0,3 (s) 2H (2OH); EM: M⁺ 228 (68); m/e (%) 212 (38), 211 (12), 210 (100), 209 (8), 197 (16), 195 (12), 182 (20), 181 (10), 179 (6), 167 (52), 152 (20), 151 (7), 149 (7), 139 (8), 121 (5), 111 (12), 105 (11), 96 (6), 94 (10), 81 (6), 69 (8), 68 (8), 66 (7), 65 (5), 55 (8), 54 (5), 53 (32).

Síntese do ácido 2,3,4,5-tetrametoxibenzóico.

Acido 2-hidroxi-3,4,5-trimetoxibenzóico (35,7 mg), sulfato de dimetila (1 ml), carbonato de potássio calcinado antes do uso (1 g) e acetona (10 ml) foram mantidos sob refluxo durante 19 horas. A acetona foi removida por destilação e água (20 ml) adicionada ao resíduo. A mistura foi extraída com cloroformio. Evaporação do solvente levou a um resíduo que foi tratado com hidróxido de sódio a 10% (em H₂O: MeOH 1:1 5 ml). A mistura foi mantida sob refluxo por duas horas, resfriada até a

temperatura ambiente e extraída com clorofórmio. Evaporação do clorofórmio e sublimação forneceu o ácido (15,8 mg), p.f. 79-81°C, lit. [63] 87-88°C, cristais incolores. $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹) 2898, 2817, 2633-2508, 1664, 1590, 1571, 1483, 1457, 1433, 1407, 1393, 1326, 1275, 1240, 1232, 1191, 1184, 1124, 1071, 1025, 999, 965, 926, 867, 811, 783, 743, 722.

Ensaio de isoflavona com a AL-11.

Apuleína (20 mg) e hidróxido de sódio a 10% (em MeOH: H₂O 1:1, 1,5 ml) foram mantidos sob refluxo por 75 minutos. O metanol foi eliminado por destilação e substituído por água simultaneamente. Após resfriamento até temperatura ambiente e acidificação com ácido fosfórico a 10%, deixou-se em repouso a 0°C durante uma noite. Não ocorrendo precipitação, embora confirmado o pH ácido, fêz-se a destilação com vapor d'água. Tomou-se 3 alíquotas de 2 ml cada uma e titulou-se com NaOH 0,01N (fator f=1). Comparação dos resultados com os ensaios em branco revelou ausência de ácido fórmico entre os produtos da reação [60]. O não destilado foi extraído com clorofórmio. A solução clorofórmica foi extraída com solução saturada aquosa de NaHCO₃. A solução em bicarbonato foi acidificada e extraída com clorofórmio. Evaporação do solvente orgânico e sublimação forneceu o ácido 6-hidroxi-2,3,4-trimetoxibenzóico, p.f. 113-115°C.

Desmetilação seletiva da apuleína a 2', 5, 5' -trihidroxi-3,4', 6,7-tetrametoxiflavona (5-O-desmetilapuleína).

Apuleína (100 mg) e ácido clorídrico a 20% (70 ml) fo-

ram aquecidos em banho-maria por 30 minutos, com agitação intermitente. Após resfriamento na temperatura ambiente e adição de água, extraiu-se com clorofórmio (3 x 50 ml). O extrato clorofórmico foi lavado com água, sêco com sulfato de magnésio e destilado. O resíduo apresentou-se como uma mistura da substância original e o produto desmetilado. Este, após separação por cromatografia em camada fina, foi identificado com a 5-O-desmetilapuleína por p.f., p.f. misto, i.v. e cromatografia em camada delgada analítica.

5-O-Desmetilapuleína (AL-13).

Cristais: sob forma de agulhas alaranjadas, p.f. 228-230°C (benzeno); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm): 260, 305, 350, (ϵ resp. 40.100, 15.950, 20.650); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): 270, 360 (ϵ resp. 39.500, 7.200); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH} + \text{HCl}}$ (nm): 255, 298, (ϵ resp. 37.200, 26.550); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{HCl}}$ (nm): nenhuma alteração; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa}}$ (nm): nenhuma alteração; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3}$ (nm): nenhuma alteração; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AlCl}_3}$ (nm): 267, 314, 357 (ϵ resp. 37.800, 17.100, 13.000); ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}) 3458, 2951, 2884, 1658, 1631, 1600, 1563, 1508, 1493, 1384, 1358, 1300, 1279, 1271, 1258, 1218, 1163, 1117, 1099, 1065, 1028, 999, 986, 950, 915, 908, 894, 843, 823, 810; RMN τ (CDCl_3): 6,12 (s) 3H (OMe), 6,07 (s) 3H (OMe), 6,04 (s) 6H (2OMe), 4,67 (s) 1H (OH), 3,47 (s) 1H (H_g), 3,37 (s) 1H (H_z), 2,74 (s) 1H (H_g), 2,13 (s) 1H (OH), -2,28 (s) 1H (OH); EM: M⁺

390 (100%); m/e (%) 389 (21), 376 (8), 375 (34), 374 (9), 373 (25), 361 (16), 360 (71), 359 (49), 357 (6), 355 (8), 347 (6), 345 (14), 344 (41), 343 (69), 342 (5), 341 (10), 331 (5), 330 (13), 329 (41), 327 (6), 325 (6), 317 (15), 315 (6), 314 (5), 313 (5), 301 (19), 217 (7), 195 (9), 194 (14), 181(15), 180(11), 179 (32), 167 (31), 166 (13), 165 (8), 164 (6), 158 (11), 153 (15), 152 (10), 151 (13), 150 (8), 149 (11), 143 (6), 137 (5), 136 (6), 135 (9), 129 (6), 125 (5), 124 (5), 123(10), 122 (9), 121 (6), 120 (5), 119 (5), 115 (6), 111 (8), 109 (9), 108 (8), 106 (8), 105 (7).

Metilação de 5-O-Desmetilapuleína.

5-O-Desmetilapuleína (40 mg), sulfato de metila(0,3 ml), carbonato de potássio recém-calcinado (0,4 g) e acetona (13 ml) foram mantidos sob refluxo por 16 horas. Elaboração segundo técnica descrita, resultou 2',5'-di-O-metilapuleína, revelado por p.f., p.f. misto, i.v. e placa comparativa de sílica.

Acetilação da 5-O-Desmetilapuleína.

Procedimento análogo ao descrito anteriormente para acetilação, obteve-se cristais em placas retangulares, brancos p.f. 198-200°C (etanol); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm): 233, 254, 310 (ε resp. 24.350, 17.250, 20.950); ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹) 3080, 2960, 1773, 1645, 1631, 1582, 1515, 1493, 1465, 1455, 1431, 1354, 1326, 1289, 1266, 1250, 1220, 1211-1182, 1154, 1132, 1095, 1071, 1057, 1026, 999, 984, 969, 936, 910, 901, 877, 863, 831, 817, 804, 793, 771, 750,

7,46, 6,97; RMN τ (CDCl₃): 7,75 (s) 3H (OCOCH₃), 7,64 (s) 3H (OCOCH₃), 7,47 (s) 3H (OCOCH₃), 6,34 (s) 3H (OMe), 6,12 (s) 3H (OMe), 6,08 (s) 3H (OMe), 6,03 (s) 3H (OMe), 3,15 (s) 1H (H₃), 3,08 (s) 1H (H₃), 2,57 (s) 1H (H₆).

Oxialanina A (AL-12).

Cristais alaranjados, agulhas, p.f. 225-227°C, (benzeno-acetato de etila) lit. [67]. 229-230°C; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm): 257, 291, 350; (ϵ resp. 43.250, 14.000, 20.700); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): 268, 358 (ϵ resp. 33.850, 16.900), $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH} + \text{HCl}}$ (nm): 254, 294 (ϵ resp. 22.550, 13.650); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa}}$ (nm): nenhuma alteração; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa} + \text{H}_2\text{BO}_3}$ (nm): nenhuma alteração; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AlCl}_3}$ (nm): 270, 314, 400 (ϵ resp. 41.850, 12.200, 8.950); \checkmark
 KBr_{\max} (cm⁻¹) 3386, 3193, 2923, 2849, 1653, 1595, 1494, 1457, 1437, 1370, 1333, 1307, 1249, 1201, 1164, 1150, 1114, 1094, 1026, 996, 959, 943, 923, 895, 878, 838, 827, 815, 800, 774, 738, 707, 702; RMN τ (CDCl₃): 6,17 (s) 6H (2OMe), 6,10 (s) 3H (OMe), 4,72 (s) 1H (OH), 3,63 (d, J=2Hz) 1H (H₃), 3,56 (d, J=2Hz) 1H (H₃), 3,41 (s) 1H (H₃), 2,73 (s) 1H (H₆), 2,14 (s) 1H (OH), -2,35 (s) 1H (OH); EM: M⁺ 360 (100%); m/e (%) 359 (27), 345 (7), 344 (31), 343 (58), 330 (21), 329 (88), 328 (6), 327 (6), 317 (33), 315 (9), 314 (7), 301 (10), 217 (7), 194 (7), 181 (7) 180 (7), 179 (12), 167 (26), 166 (17), 164 (7), 151 (7), 150 (6), 149 (12), 137 (6), 135 (6), 125 (7), 123 (10), 121 (6), 111 (12) 110 (5),

109 (14), 108 (5), 107 (10), 106 (9), 105 (10).

Acetilação da Oxiaianina A.

Oxiaianina A (AL-12, 45 mg) foi tratada com uma mistura de anidrido acético (1,5 ml) e piridina (1,5 ml). A solução foi aquecida durante 20 minutos em banho-maria e deixada 22 horas à temperatura ambiente. A seguir juntou-se água fria e extraiu-se com clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada com ácido clorídrico a 10% (3 x 10 ml), depois com água e seca com sulfato de sódio anidro. Destilação do clorofórmio sob vácuo forneceu o triacetato derivado (AL-12Ac, 54 mg). Recristalização em benzeno-éter de petróleo forneceu cristais brancos (28 mg), p.f. 181-183°C, lit. [67] 183-184°C; $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$): 2990, 2904, 1781, 1762, 1644, 1631, 1570, 1520, 1491, 1444, 1417, 1375, 1356, 1338, 1295, 1247-1188, 1169, 1148, 1111, 1079, 1047, 1025, 1005, 968, 910, 901, 890, 852, 848, 829, 810, 746, 723, 709, 605. RMN τ (CDCl₃): 7,78 (s) 3H (OCOMe), 7,66 (s) 3H (OCOMe), 7,55 (s) 3H (OCOMe), 6,39 (s) 3H (OMe), 6,13 (s) 6H (2 OMe), 3,41 (d, J=2,6 Hz) 1H (H₆ ou H₈), 3,26 (d, J=2,6 Hz) 1H (H₈ ou H₆), 3,16 (s) 1H (H₃), 2,65 (s) 1H (H₆).

Metilação da Oxiaianina A (AL-12-Me).

Oxiaianina A (100 mg), sulfato de metila (2,5 ml), carbonato de potássio calcinado antes do uso (1,24 g) e acetona (25 ml) foram mantidos sob refluxo por 48 horas. Findo o refluxo, adicionou-se água e extraiu-se com clorofórmio. Destilação

do clorofórmio deixou um resíduo sólido. Este foi filtrado em coluna de sílica (eluente: benzeno-acetato de etila 1:1), eluindo-se quatro frações. As frações 1, 2 e 3, após reunidas e recristalizadas em benzeno: éter de petróleo e depois em metanol, forneceram o éter trimetílico (42 mg), p.f. 189-191°C, lit. [67] 193-194°C, cristais incolores; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm): 245, 295, 324 (ϵ resp. 20.600, 7.800, 10.050); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): nenhuma alteração; ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 2934, 2843, 1634, 1626, 1514, 1459, 1435, 1399, 1389, 1352, 1302, 1276, 1243, 1230, 1215, 1173, 1161, 1110, 1063, 1041, 1027, 1022, 981, 958, 921, 887, 868, 831, 810, 801, 739, 732, 718, 699; EM: M^+ 402 (53%); m/e (%) 401 (15), 388 (13), 387 (54), 373 (7), 372 (24), 371 (100), 359 (2), 357 (5), 356 (5), 355 (6), 353 (10), 187 (12), 181 (12), 151 (6), 121 (5).

Hidrólise alcalina de 2',5,5'-tri-O-metiloxiaianina A.

2',5,5'-tri-O-metiloxiaianina A (34 mg) e hidróxido de sódio (0,1 g) em etanol (5 ml) foram mantidos sob refluxo por 7 horas. O solvente foi evaporado, o resíduo dissolvido em água acidificada e extraída com clorofórmio. A solução clorofórmica foi extraída com solução de NaHCO_3 aquosa a 5%. A solução em bicarbonato foi acidificada e extraída com clorofórmio. Evaporação do clorofórmio e cristalização em benzeno-éter de petróleo forneceu o ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico, p.f. 139-141°C.

5-O-Metiloxiaianina A (AL-15).

Cristais incolores, p.f. 258-260°C (Etanol); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm):

252, 345 (ϵ resp. 43.000, 27.650); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): 250,
315 (ϵ resp. 45.200, 26.800); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH} + \text{HCl}}$ (nm): 248,
295 (ϵ resp. 43.600, 28.700); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa}}$ (nm): nenhuma al-
teração; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3}$ (nm): nenhuma alteração; ν_{\max}^{KBr}
(cm^{-1}) 3340, 3244, 2917, 1626, 1515, 1499, 1447, 1426, 1351,
1317, 1265, 1238, 1223, 1213, 1181, 1167, 1119, 1060, 1037, 1019,
995, 970, 935, 888, 858, 838, 824; EM: M^+ 374 (82%); m/e (%)
373 (40), 359 (7), 358 (18), 357 (87), 355 (5), 345 (6), 344
(24), 343 (100), 342 (13), 341 (17), 339 (8), 331 (12), 328 (15),
325 (16), 314 (7), 301 (7), 299 (5), 194 (7), 181 (25), 179 (18),
173 (29), 167 (13), 164 (5), 151 (13), 149 (9), 137 (13), 136
(5), 135 (5), 123 (5), 122 (6), 121 (5), 111 (7), 109 (7), 108
(6), 107 (5), 106 (8).

Acetilação da 5-O-Metiloxiaianina A.

5-O-Metiloxiaianina A (AL-15, 28 mg) foi tratada com uma mistura de anidrido acético (1,5 ml) e piridina (1,5 ml). A solução foi aquecida por 10 minutos em banho-maria e deixada 17 horas à temperatura ambiente. A seguir, juntou-se água fria e extraiu-se com clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada com ácido clorídrico a 10%, até eliminar toda piridina, depois com água e seca com sulfato de sódio anidro. Destilação do clorofórmio sob vácuo forneceu o diacetato derivado (AL-15Ac, 33 mg). Cristalização em benzeno-éter de petróleo forneceu cristais brancos (25 mg), p.f. 188-190°C; ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 2988, 2892,

1769, 1641, 1612, 1577, 1515, 1492, 1466, 1445, 1424, 1372, 1346, 1282, 1244-1200, 1165, 1113, 1060, 1024, 990, 963, 937, 926, 911, 895, 876, 842, 832, 812; RMN τ (CDCl₃): 7,78 (s) 3H (OCOMe), 7,66 (s) 3H (OCOMe), 6,29 (s) 3H (OMe), 6,12 (s) 3H (OMe), 6,10 (s) 3H (OMe), 6,04 (s) 3H (OMe), 3,63 (d, J=2,1Hz) 1H (H₆), 3,56 (d, J=2,1Hz) 1H (H₆), 3,13 (s) 1H (H₃), 2,58 (s) 1H (H₆).

Metilação da 5-O-metiloxiaianina A (AL-15) a 2',3,4',5,5',7-hexametoxiflavona.

5-O-Metiloxiaianina A (65,2 mg) em acetona anidra (20 ml) foi tratada com sulfato de metila (0,2 ml) e carbonato de potássio calcinado (0,2 g). A mistura foi mantida em ebulição durante 24 horas. Após a mistura adquirir a temperatura ambiente, juntou-se água e extraiu-se com clorofórmio. O extrato clorofórmico foi lavado com água, seco com sulfato de sódio e destilado sob vácuo. O resíduo sólido, p.f. 177-185°C (35,6 mg), após recristalização com metanol, forneceu 2',3,4',5,5',7-hexametoflavona, p.f. 189-191°C, lit. [67] 193-194°C, cristais incolores; $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (nm): 248, 295, 330 (ϵ resp. 57.900, 30.950, 34.950); $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): nenhuma alteração; $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 2934, 2843, 1647, 1626, 1514, 1459, 1435, 1399, 1352, 1302, 1276, 1243, 1230, 1215, 1173, 1161, 1110, 1063, 1041, 1027, 1022, 981, 958, 921, 887, 868, 831, 810, 801, 739, 732. O p.f. misto com amostra autêntica não sofreu abaixamento.

Desmetilação seletiva da 5-O-metiloxiaianina A a oxiaianina A.

5-O-Metiloxiaianina A (20 mg) em ácido clorídrico aquo

so 20% (14 ml) foi mantida em refluxo durante 30 minutos. Após a mistura atingir a temperatura ambiente, adicionou-se água e extraiu-se com clorofórmio. Comparação do produto da reação em cromatografia em camada delgada não revelou alteração no material original. O material recuperado foi aquecido nas mesmas condições por mais 1 hora. Procedimento como acima descrito revelou a presença de oxiaianina A.

Aianina (AL-18).

Cristais alaranjados sob forma de agulhas, p.f. 170-172°C, lit. [69] 172-174°C; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm): 255, 265, 295, 353 (ϵ resp. 8.500, 7.000, 3.650, 7.550); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): 270, 290, 380 (ϵ resp. 10.100, 4.300, 4.950); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH} + \text{HCl}}$ (nm): 255, 265, 295, 353 (ϵ resp. 8.650, 7.250, 3.650, 7.400); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa}}$ (nm): nenhuma alteração; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3}$ (nm): nenhuma alteração; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AlCl}_3}$ (nm): 265, 275, 295, 353, 393 (ϵ resp. 7.650, 7.350, 3.900, 5.700, 5.700); ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹): 3623, 3077, 2985, 1667, 1613, 1531, 1506, 1473, 1379, 1362, 1333, 1316, 1282, 1250, 1205, 1166, 1136, 1126, 1098, 1029, 1011, 982, 962, 922, 897, 826, 816, 808, 772, 735, 714; EM: M⁺ 344 (100%); m/e (%) 343 (79), 329 (9), 327 (7), 326 (7), 325 (11), 315 (7), 313 (5), 302 (5), 301 (45), 167 (13), 165 (6), 158 (9), 151 (7), 149 (9), 148 (11), 137 (5), 135 (6).

Apuleisina (AL-14).

Cristais sob forma de agulhas amarelas, p.f. 193-195°C

(MeOH); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm): 237, 272, 328 (ϵ resp. 25.600, 21.600, 19.750); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): decomposição; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH} + \text{HCl}}$ (nm): irreversível; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa}}$ (nm): 237, 272, 332, (ϵ resp. 25.600, 20.200, 14.100); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3}$ (nm): 240, 277, 335 (ϵ resp. 25.850, 23.950, 21.600); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AlCl}_3}$ (nm): 242, 280, 385 (ϵ resp. 26.000, 18.750, 24.200); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}}$ (nm): 270, 282, 350 (ϵ resp. 20.550, 18.750, 18.750); ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 3430, 2938, 1667, 1623, 1595, 1568, 1456, 1358, 1340, 1287, 1255, 1234, 1216, 1166, 1135, 1091, 1065, 986, 930, 852, 848, 825, 818, 802, 786, 768, 760; RMN $\tau(\text{CDCl}_3)$: 6,09 (s) 3H (OMe), 6,00 (s) 6H (2OMe), 4,56 (s) 1H (OH), 4,16 (s) 1H (OH), 3,42 (s) 1H (H_8), 3,26 (d, $J=8,4\text{Hz}$) 1H (H_5), 2,76 (d, $J=8,4\text{Hz}$) 1H (H_6), 2,02 (s) 1H (OH), -2,24 (s) 1H (OH); EM: M^+ 376 (100%); m/e (%) 375 (23), 362 (5), 361 (14), 359 (36), 345 (16), 333 (9), 195 (5), 194 (9), 183 (13), 181 (6), 179 (8), 177 (5), 174 (9), 167 (5), 153 (8), 123 (9). Ensaio de Gibbs |62| λ_{\max} (μ): 460, 590 (A resp. 1,68, 0,59). Coloração verde com cloreto férrico 5% etanólico.

Acetilação da apuleisina.

Apuleisina (50 mg) foi tratada com uma mistura de anidrido acético (1 ml) e piridina \hat{s} eco (1 ml), mantida sob refluxo por 20 minutos em banho-maria e deixada em repouso uma noite. A seguir adicionou-se água gelada e extraiu-se com clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada com ácido clorídrico a 10%, depois com água e \hat{s} eco com sulfato de sódio. Destilação sob vácuo do clo

roformio forneceu o tetra-O-acetilderivado (60,0 mg), que foi recristalizado em etanol, p.f. 204-206°C; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm): 230, 250, 308. (ϵ resp. 24.100, 18.600, 19.800); ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 2976, 2890, 1783, 1631, 1585, 1504, 1464, 1449, 1389, 1370, 1299, 1272, 1250-1156, 1134, 1103, 1087, 1075, 1047, 1029, 1015, 990, 952, 905, 893, 877, 845, 833, 825, 803, 791, 752; RMN τ (CDCl_3) 7,76(s) 3H (OCOCH_3), 7,68 (s) 3H (OCOCH_3), 7,65 (s) 3H (OCOCH_3), 7,53(s) 3H (OCOCH_3), 6,35 (s) 3H (OMe), 6,09 (s) 6H (2OMe), 3,20 (s) 1H(H_8), 2,98 (d, J= 8,6Hz) 1H (H_5), 2,47 (d, J= 8,6Hz) 1H (H_6).

Metilação da Apuleisina.

Apuleisina (250 mg) dissolvida em acetona sêca (20 ml) foi tratada com sulfato de metila (1 ml) e carbonato de potássio (2 g). A mistura foi mantida sob refluxo até ensaio negativo com cloreto férrico etanólico a 5%. Após a solução atingir a temperatura ambiente, destilou-se a acetona, redissolveu-se em água e extraiu-se com cloroformio. A solução cloroformica foi lavada com uma solução de NaOH aquoso a 3%, sêca com Na_2SO_4 anidro e destilado. O resíduo sólido escuro foi cristalizado em metanol. O material cristalino foi filtrado em coluna de sílica (eluente: acetato de etila-benzeno 1:1) e recristalizado em metanol. O derivado metilado(200 mg) apresentou-se como cristais agulhas incolores, p.f. 186-188°C. $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm): 235, 255, 308 (ϵ resp. 27.050, 21.200, 17.500); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): nenhuma alteração; ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 3025, 2917, 1632, 1588, 1491, 1469, 1440, 1396, 1353, 1331, 1275, 1245, 1223, 1196, 1184, 1152, 1143, 1112, 1077, 1057, 1018,

986, 974, 928, 893, 831, 814, 802, 789, 779, 772, 739; RMN (CDCl₃): 6,23 (s) 3H (OMe), 6,06 (s) 15H (5 OMe), 5.97 (s) 3H (OMe), 3,33 (s) 1H (H₈), 3,23 (d, J=8,4Hz) 1H (H₅), 2,86 (d, J=8,4Hz) 1H (H₆); EM: M⁺ 432 (42); m/e (%) 431 (13), 418 (23), 417 (100), 402 (13), 401 (58), 387 (5), 383 (6), 371 (8), 211 (10), 202 (12), 195 (8), 193 (5), 187 (5), 185 (6), 179(5), 167 (12), 149 (5), 129 (5), 101 (12).

Hidrólise alcalina de 2',3',5,6-tetra-O-metilapuleisina.

Uma mistura de 2',3',5,6-tetra-O-metilapuleisina (80 mg), KOH (1,5 g), etanol (11 ml) e água (3 ml) foi mantida sob refluxo até verificar-se ausência do derivado natural entre os produtos de reação por cromatografia em camada fina. A solução fria foi lavada com clorofórmio e em seguida acidificada com H₃PO₄ 10% e extraída com cloroformio. A solução cloroformica foi extraída com solução aquosa de NaHCO₃ a 5% e depois com NaOH aquoso 3%. A solução em bicarbonato foi acidificada e extraída com clorofórmio. Evaporação do solvente orgânico, filtração em coluna de sílica (eluente CHCl₃) e cristalização em benzeno-éter de petróleo forneceu o ácido 2,3,4-trimetoxiben-zóico p.f. 99-100, 5°C, lit. [72]. 100°C. ^{KBr} max (cm⁻¹): 3021, 2915, 2740, 2618, 1681, 1590, 1493, 1468, 1439, 1410, 1284, 1220, 1174, 1148, 1099, 1021, 1011, 937, 925, 893, 820, 797, 763, 743, 697. RMN (acetona) 6,28 (s) 3H (OMe) 6,10 (s) 3H (OMe), 6,04 (s) 3H (OMe), 3,11 (d, J= 8,4Hz) 1H (H-5), 2,38 (d, J=8,4Hz) 1H H-6); A solução em hidróxido de sódio foi acidificada e ex-

traída com clorofórmio. Evaporação do clorofórmio e cristalização em benzeno-éter de petróleo forneceu 6'-hidroxi-2,2',3',4', -tetrametoxiacetofenona, revelado por cromatografia em camada delgada comparativa e ressonância magnética nuclear.

Etilação da apuleisina.

A apuleisina (130 mg) foi dissolvida em acetona (20 ml). Adicionou-se sulfato de dietila (1,5 ml) e carbonato de potássio calcinado (5 g) e a mistura foi mantida em refluxo até ensaio negativo com cloreto férrico a 5%. Após a mistura da reação atingir a temperatura ambiente filtrou-se e a acetona foi destilada. O resíduo foi dissolvido em clorofórmio e filtrado em coluna de sílica. Evaporação do clorofórmio e cristalização em benzeno-éter de petróleo forneceu 2',3',5,6,-tetra-O-etil-3,4,7,-trimetoxiflavona (80 mg) p.f. 110-112°C; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm): 235, 252, 306 (ϵ resp. 20.050, 15.300, 13.400; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): nenhuma alteração; ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 3049, 2985, 1639, 1605, 1493, 1449, 1383, 1348, 1299, 1264, 1241, 1225, 1212, 1190, 1161, 1131, 1107, 1098, 1075, 1042, 1028, 991, 945, 898, 877, 868, 826, 808, 796, 787, 752, 702, 685;

Metilação seletiva da apuleisina.

Apuleisina (77 mg) foi tratada com solução etérea de CH_2N_2 (25 ml) durante 48 horas nas condições ambientes. A solução foi preparada de nitrosometilureia (500 mg) em contato com

uma solução aquosa de NaOH 1:1 (50 ml). O excesso de diazometano foi eliminado com ácido acético glacial. A solução etérea foi lavada com solução aquosa de NaHCO_3 (5%), seca com Na_2SO_4 anidro e destilada. Cristalização do sólido levemente amarelo em benzeno-hexano forneceu 2',3',6-tri-O-metil-apuleisina (50,5 mg), cristais brancos, p.f. 136-138°C; $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 234, 261, 310 (ϵ resp. 22.300, 20.050, 14.750); $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{NaOH}}$ (nm): 276, 370 (ϵ resp. 24.700, 5.400); $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{NaOH} + \text{HCl}}$ (nm): 234, 261, 312 (ϵ resp. 20.600, 18.560, 13.250); $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ (nm): 272, 295, 338 (ϵ resp. 18.100, 10.800, 13.250); $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}}$ (nm): 272, 295, 330 (ϵ resp. 17.650, 11.500, 13.100); $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3200-3300, 2950, 2860, 2700-2200, 1648, 1600, 1570, 1490, 1460, 1438, 1410, 1355, 1290, 1275, 1250, 1215, 1175, 1165, 1140, 1098, 1075, 1040, 1005, 992, 972, 938, 915, 837, 820, 805, 795, 763, 758, 736, 704, 695, 668; RMN τ (CDCl_3): 6,20 (s) 3H(OMe), 6,05 (s) 15H (5OMe), 3,52 (s) 1H (H_8), 3,19 (d, $J=8,5\text{Hz}$) 1H (H_5), 2,79 (d, $J=8,5\text{Hz}$) 1H (H_6), -2,72 (s) 1H (OH).

Acetilação da 2',3',6-tri-O-metilapuleisina.

2',3',6-tri-O-metilapuleisina (40 mg) foi tratada com uma mistura de anidrido acético (2 ml) e piridina seca (2 ml), mantida sob refluxo por 15 minutos em banho-maria e deixada em repouso uma noite. A seguir adicionou-se água e extraiu-se com clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada com ácido clorídrico a 10%, depois com água e seca com sulfato de sódio ani-

dro. Destilação do clorofórmio forneceu 5-O-acetil-2',3',6-tri-O-metilapuleisina (42 mg), após recristalizada em benzeno-hexano, p.f. 204-206°C; $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (nm): 233, 250i, 306 (ϵ resp. 18.550, 13.400, 13.600); $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 2970, 2870, 1750, 1635, 1620, 1570, 1495, 1460, 1420, 1385, 1362, 1300, 1275, 1250, 1220, 1205, 1175, 1165, 1130, 1110, 1092, 1080, 1040, 1025, 1010, 1000, 922, 885, 850, 835, 820, 812, 786, 765, 708, 670; RMN τ (CDCl₃): 7,48 (s) 3H (OCOCH₃), 6,28 (s) 3H (OMe), 6,12 (s) 3H (OMe), 6,05 (s) 12H (4OMe), 3,20 (d, J=8,5Hz) 1H (H₅), 3,18 (s) 1H (H₈), 2,82 (d, J=8,5Hz) 1H (H₆).

Reação de apuleisina com diclorodifenilmetano.

Apuleisisna (35,4 mg) e diclorodifenilmetano (172,4 mg) foram aquecidos durante 10 minutos em banho de glicerina mantido a 140-150°C. Após resfriamento nas condições ambientes, adicionou-se benzeno e a solução foi deixada em repouso durante uma noite. Cromatografia em camada delgada de sílica revelou ainda a presença de apuleisina. O benzeno foi destilado, adicionou-se mais 124 mg de diclorodifenilmetano e o aquecimento foi prolongado por mais 12 minutos. Adição de benzeno à solução fria permitiu a separação de 11 mg de precipitado. Adição de éter de petróleo ao filtrado permitiu a separação de mais 6,4 mg de precipitado, revelado idêntico ao anterior por cromatografia em camada delgada de sílica. Recristalização dos precipitados reunidos em EtOH forneceu 2',3'-O-difenilmetilapuleisina, cristais em placas retangulares alaranjadas, p.f. 232-234°C; $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$

(nm): 240, 280, 330 (ϵ resp. 29.250, 29.400, 27.750);
 $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): 223, 255, 360 (ϵ resp. 51.750, 27.380,
17.600); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH} + \text{HCl}}$ (nm): 215, 260 (ϵ resp. 69.750,
25.100); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa}}$ (nm): nenhuma alteração; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3}$
(nm): 285, 325 (ϵ resp. 27.750, 20.400); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{AlCl}_3}$
(nm): 240, 295, 363 (ϵ resp. 30.750, 30.470, 31.100); $\checkmark_{\max}^{\text{KBr}}$
(cm^{-1}): 3450, 3230-2500, 1645, 1590, 1555, 1536, 1499, 1472,
1442, 1358, 1285, 1266, 1239, 1218, 1164, 1110, 1082, 1076,
1046, 1020, 988, 953, 856, 845, 825, 798, 763, 699, 670; RMN τ -
(CDCl_3): 6,10 (s) 3H (OCH_3), 5,90 (s) 6H (2OCH_3), 4,52 (s) 1H
(OH), 3,42 (s) 1H (H_3), 3,28 (d, $J=9\text{Hz}$) 1H (H_5), 2,10-2,76
(m) 11H ($\text{H}_6, 2\text{C}_6\text{H}_5$), -2,53 (s) 1H (OH); EM: M^+ 540 (100%):
m/e (%) 539 (22), 497 (7), 464 (5), 463 (17), 358 (16), 357
(10), 343 (5), 340 (6), 301 (6), 167 (17), 166 (6), 165 (12),
151 (5), 149 (8), 109 (5), 105 (40).

Apuleitrina (AL-16).

Cristais em placas retangulares, amarelos (Benzeno-
acetato de etila - éster de petróleo), p.f. 175-177°C; $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$
(nm): 238, 282, 340 (ϵ resp. 13.600, 16.050, 19.050); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{NaOH}}$
(nm): 240, 300, 365 (ϵ resp. 15.150, 11.900, 13.550);
 $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{NaOH} + \text{HCl}}$ (nm): 235, 275, 314 (ϵ resp. 13.250,
9,800, 12.450); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AcONa}}$ (nm): nenhuma alteração; $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3}$
(nm): 240, 288, 335 (ϵ resp. 12.450, 18.600,

17.350); $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ (nm): 240, 256, 298, 374 (ϵ resp. 12.950, 11.000, 14.950, 20.300); $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}}$ (nm): 240, 256, 298, 365 (ϵ resp. 11.950, 9.400, 15.000, 13.650); $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3333, 2941, 1653, 1575, 1550, 1504, 1481, 1443, 1410, 1351, 1313, 1266, 1233, 1215, 1163, 1111, 1098, 1085, 1065, 1010, 994, 957, 933, 864, 851, 830, 817, 803, 775; RMN τ (CDCl_3), 6,12 (s) 3H (OCH_3), 6,05 (s) 3H (OCH_3), 6,01 (s) 3H (OCH_3), 5,99 (s) 3H (OCH_3), 4,35 (s) 1H (OH), 3,70 (s) 1H (OH), 3,45 (s) 1H (H_β), 2,64 (s) 2H (H_2 , H_6), -2,43 (s) 1H (OH); EM: M^+ 390 (100%); m/e (%) 389 (33), 376 (6), 375 (33), 374 (7), 373 (6), 361 (6), 360 (18), 359 (15), 347 (10), 341 (9), 329 (5), 317 (5), 195 (5), 183 (5), 182 (5), 181 (6), 165 (5), 149 (7), 129 (5) 101 (9).

Acetilação da Apuleitrina.

Apuleitrina (40 mg) foi tratada com uma mistura de anidrido acético (2 ml) e piridina seca (2 ml), mantida sob refluxo por 15 minutos em banho-maria e deixada em repouso durante uma noite. Findo este período eliminou-se o excesso de anidrido acético com H_2O (20 ml) e extraiu-se exaustivamente com CHCl_3 . A solução clorofórmica foi lavada com ácido clorídrico 10% até eliminar toda piridina, a seguir com água, seca com sulfato de sódio anidro e destilada sob vácuo. Cristalização do resíduo sólido em metanol forneceu 3',5,6-tri-O-acetilapuleitri-na (34,95 mg), cristais em placas retangulares, brancos, p.f. 215-218°C; $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (nm) 230, 245, 320, 337 (ϵ resp. 18.850, 14.950,

14.550, 14.050); $\checkmark_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 2970, 2870, 1780, 1770, 1632, 1612, 1570, 1500, 1465, 1435, 1370, 1360, 1304, 1260-1160, 1125, 1095, 1090, 1070, 1048, 1024, 1010, 993, 963, 953, 900, 900, 880, 865, 858, 842, 830, 817, 800, 786, 747, 715, 695; RMN τ (CDCl₃): 7,68 (s) 3H (OCOCH₃), 7,63 (s) 3H (OCOCH₃), 7,54 (s) 3H (5-OCOCH₃), 6,18 (s) 3H (OCH₃), 6,07 (s) 9H (3·OCH₃), 3,08 (s) 1H (H₈), 2,55 (d, J= 2,3Hz) 1H (H₅), 2,32 (d, J= 2,3Hz) 1H (H₆).

Metilação da Apuleitrina.

Apuleitrina (25 mg) em acetona anidra (10 ml) foi tratada com sulfato de dimetila (8 gôtas) e carbonato de calcinado (250 mg). A mistura foi mantida em ebulição até ensaio negativo com FeCl₃ aquoso 10%. A seguir, evaporou-se a acetona, dissolveu-se em água e extraiu-se com éter etílico (5 x 20 ml). A solução etérea foi lavada com água, seca com sulfato de sódio anidro e destilado sob vácuo. Recristalização em acetato de etila-éter de petróleo (p.e. 50-70°C) forneceu 3',5,6-tri-O-metilapuleitrina (9 mg) cristais em placas retangulares p.f. 152-154°C lit. [90] 155-156°C; $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (nm): 237, 260, 325 (ϵ resp. 17.560, 13.050, 21.100); $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): nenhuma alteração; $\checkmark_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 2967, 2857, 1639, 1600, 1577, 1504, 1481, 1453, 1443, 1427, 1412, 1370, 1351, 1290, 1258, 1229, 1220, 1188, 1159, 1133, 1086, 1042, 1015, 999, 983, 962, 919, 853, 826, 822, 787, 775, 745, 733. Revelado idêntico ao produto obtido da metilação da 3',5,5'-trihidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona por cromatografia em camada delgada da sílica (solvente: benzeno-acetato de etila).

etila 8:2).

Metilação da 3',5,5'-trihidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona.

3',5,5'-trihidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (1 mg) em acetona anidra (5 ml) foi tratada com sulfato de metila (1 gôta) e K_2CO_3 calcinado antes do uso (50 mg). A mistura foi mantida em ebulição até constatar-se inalteração da quantidade relativa da substância totalmente metilada original por cromatografia em camada delgada de sílica. A seguir a mistura foi filtrada e K_2CO_3 lavado com acetona (3 vezes). A solução acetônica foi destilada a pressão reduzida. A solução clorofórmica do resíduo foi lavada com NH_4OH 10%, depois com água seca com sulfato de sódio anidro e destilada. Cristalização em benzeno-hexano forneceu 3,3',4',5,5',6,7-heptametoxiflavona, cristais brancos, p.f. 150-152°C. Cromatografia em camada delgada de sílica (solvente benzeno-acetato de etila 8:2) revelou identidade com 3',5,6-tri-O-metilapuleitrina e diferente da 2',5'-di-O-metilapuleina e 2',3',5,6-tetra-O-metilapuleisina.

Apuleidina (AL-19A).

Cristais em placas retangulares, levemente amarelos, (tetracloreto de carbono), p.f. 154-156°C; λ_{max}^{MeOH} (nm): 230, 260, 300, 333 (ϵ resp. 10.650, 11.250, 5.300, 6.700); $\lambda_{max}^{MeOH + NaOH}$ (nm): 265, 360 (ϵ resp. 10.900, 4.500); $\lambda_{max}^{MeOH + NaOH + HCl}$ (nm): 255, 290, 320 (ϵ resp. 11.150, 5.250, 3.900); $\lambda_{max}^{MeOH + AcONa}$

(nm): 238, 255, 300, 335 (ϵ resp. 9.000, 11.400, 4.800, 6.350);
 $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3}$ (nm): 233, 260, 295, 343 (ϵ resp.
26.200, 9.850, 3.900, 6.300); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ (nm): 268, 300, 360,
400 (ϵ resp. 12.750, 3.750, 5.700, 9.450); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}}$ (nm):
270, 300, 334, 385, (ϵ resp. 11.000, 3.750, 4.650, 4.950); ν_{\max}^{KBr}
(cm^{-1}) 3500, 2960, 2870, 1650, 1620, 1600, 1570, 1500, 1458, 1440,
1380, 1355, 1345, 1305, 1290, 1270, 1235, 1220, 1200, 1168, 1100,
1090, 1085, 1045, 1025, 990, 985, 960, 940, 915, 905, 880, 875,
845, 835, 820, 810, 780, 760, 720, 715, 705; RMN τ (CDCl_3): 6,13
(s) 6H (2 OCH_3), 6,02 (s) 3H (OCH_3), 4,05 (s) 1H (OH), 3,62
(d, $J=2,3\text{Hz}$) 1H (H_6), 3,54 (d, $J=2,3\text{Hz}$) 1H (H_8), 3,27 (d, $J=$
8,7Hz) 1H ($\text{H}_{5,1}$), 2,73 (d, $J=8,7\text{Hz}$) 1H ($\text{H}_{6,1}$), 1,95 (s) 1H(OH),
-2,46 (s) 1H (OH); EM: M^+ 360 (100%); m/e (%) 359 (25), 345
(10), 344 (12), 343 (52), 341 (5), 331 (5), 330 (7), 329 (32),
317 (20), 314 (5), 299 (5), 274 (5), 217 (6), 167 (14), 166 (8),
149 (5), 123 (7), 122 (5).

Acetilação da apuleidina.

Apuleidina (40 mg) foi tratada com uma mistura de anidrido acético (1,5 ml) e piridina secca (1,5 ml), mantida sob refluxo em banho-maria durante 10 minutos e deixada em repouso por 24 horas. Terminado este período eliminou-se o excesso de anidrido acético com água e extraiu-se com clorofórmio (5 x 15 ml). A solução clorofórmica foi lavada com ácido clorídrico 10% até eliminar toda piridina, a seguir com água, secca com sulfato

de sódio anidro e destilada sob vácuo. Cristalização do resíduo sólido (44,65 mg) em MeOH forneceu 2',3',5-tri-O-acetilapuleidina (24,5 mg), cristais brancos, placas retangulares, p.f. 198-200°C; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm) 225, 253, 305 (ϵ resp. 27.250, 21.950, 22.050); ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}) 2970, 2870, 1770, 1638, 1620, 1575, 1500, 1490, 1450, 1440, 1390, 1370, 1360, 1300, 1270, 1230, 1200, 1190, 1170, 1150, 1090, 1048, 1035, 1010, 997, 960, 924, 905, 887, 868, 840, 820, 804, 780, 752, 738, 713; RMN τ (CDCl_3): 780 (s) 3H (OCOCH_3), 7,70 (s) 3H (OCOCH_3), 7,55 (s) 3H (OCOCH_3), 6,35 (s) 3H (OCH_3), 6,12 (s) 3H (OCH_3), 6,09 (s) 3H (OCH_3), 3,35 (d, $J=2,3\text{Hz}$) 1H (H_6 ou H_8), 3,25 (d, $J=2,3\text{Hz}$) 1H (H_8 ou H_6), 2,96 (d, $J=8,7\text{Hz}$) 2H (H_5), 2,42 (d, $J=8,7\text{Hz}$) 2H (H_6).

Apuleirina (AL-19B).

Cristais levemente amarelos (Benzeno). p.f. 218-220;
 $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 236, 270, 330 (ϵ resp. 11.550, 8.750, 14.200);
 $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{NaOH}}$ (nm) 253, 293, 340 (ϵ resp. 13.800, 11.450, 9.600); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{NaOH} + \text{HCl}}$ (nm) 236, 267, 330 (ϵ resp. 10.450, 8.100, 12.550); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AcONa}}$ (nm) 230, 240, 295, 332 (ϵ resp. 20.550, 12.450, 11.700, 10.350); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3}$ (nm) 235, 270, 330 (ϵ resp. 12.000, 8.500, 12.800); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ (nm) 235, 270, 330 (ϵ resp. 11.800, 8.400, 12.850); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}}$ (nm) 235, 270, 330 (ϵ resp. 10.750, 7.900, 12.300);
 ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 3425, 2967, 2857, 1620, 1600, 1563, 1515, 1471,

1460, 1443, 1418, 1362, 1333, 1284, 1242, 1220, 1198, 1160, 1111, 1100, 1091, 1070, 1008, 998, 971, 956, 916, 855, 847, 828, 820, 813, 800, 772, 756, 698, 669; RMN τ (CDCl₃): 6,13 (s) 3H (OMe), 6,08 (s) 3H (OMe), 6,02 (s) 6H (2OMe), 5,97 (s) 3H (OMe), 4,20 (s) 1H (OH), 3,90 (s) 1H (OH), 3,23 (s) 1H (H₈), 2,68 (s) 2H (H₂, H₆);

Acetilação da Apuleirina.

Apuleirina (AL-19B, 85 mg) foi tratada com uma mistura de anidrido acético (2 ml) e piridina (2 ml). A solução foi aquecida durante 20 minutos em banho-maria e deixada uma noite à temperatura ambiente. Findo este período juntou-se água fria e extraiu-se com clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada com ácido clorídrico a 10%, depois com água e seca com sulfato de sódio anidro. Destilação do clorofórmio sob vácuo forneceu o diacetato derivado. Recristalização em benzeno-éter de petróleo forneceu cristais brancos (46 mg), p.f. 174-175°C; \checkmark ^{KBr} max (cm⁻¹): 2985, 2899, 1768, 1629, 1626, 1605, 1567, 1502, 1462, 1441, 1418, 1370, 1353, 1319, 1307, 1250, 1244, 1221-1183, 1176, 1156, 1124, 1100, 1089, 1075, 1020, 1000, 978, 962, 952, 925, 905, 897, 867, 858, 851, 826, 813, 806, 787, 763, 751; RMN τ (CDCl₃): 7,65 (s) 6H (2 OCOMe), 6,13 (s) 3H (OCH₃), 6,10 (s) 6H (2 OMe), 6,07 (s) 6H (2 OMe), 3,25 (s) 1H (H₈), 2,62 (d, J= 2,1Hz) 1H (H₆), 2,33 (d, J= 2,1Hz) 1H (H₂).

EM: M^+ 404 (100%); m/e (%) 403 (43), 390 (14), 389 (71), 387 (10), 386 (14), 385 (21), 371 (21), 361 (4), 217 (3), 205 (4), 197 (3), 196 (2), 195 (3), 193 (3), 188 (6), 181 (5), 179 (2), 174 (2), 173 (3), 167 (5), 165 (4), 153 (5), 151 (3), 150 (3), 149 (4), 147 (3).

Metilação da apuleirina.

Uma solução de CH_2N_2 em éter etílico (15 ml) foi preparada de nitrosometilureia (367 mg) em contacto com uma solução aquosa de NaOH 1:1 (50 ml). A fase etérea foi adicionada à apuleirina (10 mg), juntou-se álcool metílico (2 ml) para completar solubilização e manteve-se a solução nas condições ambientais durante 25 horas. Comparação desta solução com 3',5,6-tri-O-metilapuleitrina por cromatografia em camada delgada de sílica, $CHCl_3$ -3% MeOH como solvente de desenvolvimento, revelou idêntico comportamento dos dois derivados em todos os aspectos cromatográficos, sendo que o derivado da apuleirina apresenta uma pequena quantidade de impureza de menor Rf. A seguir destilou-se o éter etílico. O resíduo incolor foi dissolvido em $CHCl_3$ e filtrado em volume de sílica. Destilação do $CHCl_3$ e recristalização em acetato de etila-éter de petróleo forneceu cristais incolores (6 mg), p.f. 142-144°C. Recristalização no mesmo sistema de solventes originou 3',4'-di-O-metilapuleirina (3 mg), cristais brancos em placas retangulares, p.f. 151-153°C, p.f. misto com 3',5,6-tri-O-metilapuleitrina não revelou abaixamento; \checkmark_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 2967, 2857, 1639, 1600, 1577, 1504, 1481,

1453, 1443, 1427, 1412, 1370, 1351, 1290, 1258, 1229, 1220, 1188, 1159, 1133, 1086, 1042, 1015, 999, 983, 962, 919, 853, 826, 822, 787, 775, 745, 733, Revelado idêntico a 3',5,6-tri-O-metilapuleirina também por cromatografia em camada delgada de sílica (solvente CHCl_3 - 3% MeOH).

Desmetilação seletiva da apuleirina.

A apuleirina (10 mg) e ácido clorídrico aquoso a 20% (7 ml) foram aquecidos em banho-maria durante 30 minutos. Após a solução atingir a temperatura das condições ambientes, juntou-se água e extraiu-se com clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada com água e extraída com solução saturada de bórax. Na solução clorofórmica remanescente constatou-se a presença da apuleirina (AL-19B). O extrato bórax foi acidificado com ácido clorídrico concentrado e extraído com clorofórmio. Esta solução clorofórmica foi lavada com água, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada parcialmente. A presença da apuleirina nesta solução foi revelada por cromatografia em camada delgada de sílica. Utilizou-se 3 sistemas de solvente para desenvolvimento cromatográfico: clorofórmio - 2% metanol, benzeno-acetona (1:1) e clorofórmio - 10% acetona.

Leiocarpina (AL-32).

Cristais em placas retangulares (etanol), brancos, p.f. 98-100°C; $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (nm) 230, 290, 308, (ϵ resp. 14.00, 4.200, 4.400); $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): nenhuma alteração; $\lambda_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3003,

2933, 1639, 1613, 1587, 1504, 1471, 1441, 1374, 1359, 1335, 1323, 1307, 1290, 1276, 1264, 1245, 1225, 1211, 1199, 1185, 1163, 1147, 1117, 1094, 1087, 1055, 1047, 982, 950, 941, 930, 895, 883, 868, 847, 833, 812, 797, 787, 775, 735, 725, 698, 680, 671; RMN τ (CCl₄): 8,50 (s) 6H (2 CH₃), 6,18-6,73 (m) 2H (H-6ax, H-6a), 5,63-5,93 (m) 1H (H-6eq.), 4,58 (d, J= 6Hz) 1H (H_{11a}), 4,48 (d, J= 9,4Hz) 1H (H₃), 4,02 (s) 2H (OCH₂O), 3,58 (s) 1H (H₁₀), 3,48 (d, J= 8,6Hz) 1H (H₂), 3,34 (d, J= 9,4Hz) 1H (H₄), 3,31 (s) 1H (H₇), 2,76 (d, J= 8,6Hz) 1H (H₁); EM: M⁺ 350 (80%); m/e (%) 336 (23), 335 (100), 321 (5), 317 (5), 185 (12), 173 (19), 168 (7), 167,5 (24), 167 (6); DOR: $|\phi|$ 435 0, $|\phi|$ 326 -11.200, $|\phi|$ 310 0, $|\phi|$ 294 + 14.600, $|\phi|$ 250 + 31.400 (etanol, c 0, 196 mg/ml, 440 - 240 nm).

Hidrogenação da Leiocarpina.

Uma suspensão de Pd/10% C (250,8 mg) em ácido acético glacial (15 ml) foi agitada passando corrente de H₂ durante 5 minutos. Em seguida juntou-se a leiocarpina (100 mg) dissolvida em etanol (5 ml) e continuou-se passando H₂ até constatar-se ausência de substância original por cromatografia em camada delgada de sílica (solvente: benzeno). O catalizador foi eliminado por filtração em coluna de sílica. Após destilação do etanol juntou-se água e extraiu-se com tetracloreto de carbono. Esta solução foi lavada com água, seca com sulfato de sódio anidro e destilada sob vácuo. O resíduo sólido recristalizado em tetracloreto de carbono forneceu (3S)-2'hidroxi-4',5'-metileno -

dioxi-6", 6"-dimetilpirano-(2", 3": 8,7)-isoflavano(72 mg), cristais brancos, p.f. 184-186°C; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm): 230, 288, 300 (ϵ resp. 12.750, 6.000, 6.500); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}}$ (nm): 227, 280, 317 (ϵ resp. 28.650, 6.750, 7.100); ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}) 3420, 2920, 2900, 1610, 1590, 1510, 1490, 1440, 1390, 1371, 1350, 1299, 1270, 1242, 1220, 1190, 1175, 1154, 1132, 1110, 1080, 1050, 1010, 967, 952, 910, 902, 880, 830, 815, 783; RMN τ ($\text{CH}_3\equiv\text{N}$): 4,12 (s) 2H (OCH_2O), 3,70 (d, $J=8,6\text{Hz}$) 1H (H_6), 3,49 (s) 1H (H_3), 3,31 (s) 1H (H_6), 3,16 (d, $J=8,6\text{Hz}$) 1H (H_5); EM: M^+ 354 (59%); m/e (%) 216 (7), 192 (16), 191 (98), 177 (5), 176 (22), 175 (6), 165 (15), 164 (100), 152 (6), 151 (28), 150 (5), 149,5 (8), 149 (12), 147(12), 137 (5), 136 (16), 135 (47), 133 (15); ensaio de Gibbs negativo; DOR: $|\phi|_{326}^0$, $|\phi|_{298} -4520$, $|\phi|_{289}^0$, $|\phi|_{260} + 4580$, $|\phi|_{250} + 8650$ (etanol, 0, 18 mg/ml).

β -sitosterol (AL-17).

Cristais brancos (MeOH), p.f. 134-136°C, lit. [101] 140-142°C; ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}) inter al 3400, 2920, 1640, 1460, 1380, 1068, 1030.

Pinitol (AM-11A).

Cristais brancos (EtOH), p.f. 185-187°C, lit. [102] 185-186°C; $[\alpha]_D^{20}$ + 60° (MeOH), $c=0,891$ lit. [102] + 65°; ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 3570-3330, 2980, 2817, 1515, 1470, 1450, 1379, 1340, 1309, 1282, 1276, 1250, 1206, 1190, 1936, 1226, 1104, 1085, 1072, 1053, 1022, 1002, 963, 905, 862, 752.

CAPÍTULO V.

BIOSÍNTESE.

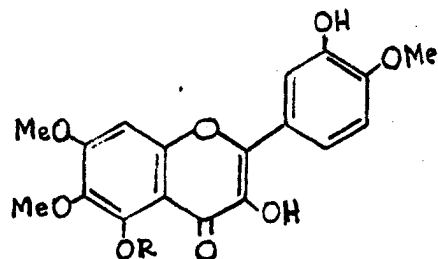
BIOSSÍNTESE

A biossíntese do anel A dos flavonoides envolve a via acetato-malonato, enquanto o anel B se origina pela via chiquimato-prefenato. De acôrdo com êste fato, já comprovado experimentalmente, a oxigenação dêstes anéis deveria incidir nas posições 5,7 e 3',4'.

Mesmo que a análise estatística de localização de oxigrupos em flavonoides confirma, como se sabe, esta previsão, muitos casos de oxigenação adicional ocorrem. O estudo dos constituintes flavônicos da *Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macbr. parece revelar o mecanismo pelo qual se passam estas oxigenações.

A metilação de grupo hidroxila localizado em C-4' em preferência a tal grupo em C-3' é relativamente raro em flavonoides naturais. Dois exemplos são eupatina (CLXXIXa) e eupatorina (CLXXIXb), que têm estreita relação estrutural com a oxiaianina B (CXXXVI).

A proposição da derivação do anel B trioxigenado dos constituintes da *Apuleia* de precursôres dioxigenados é apresentada no Quadro 56.

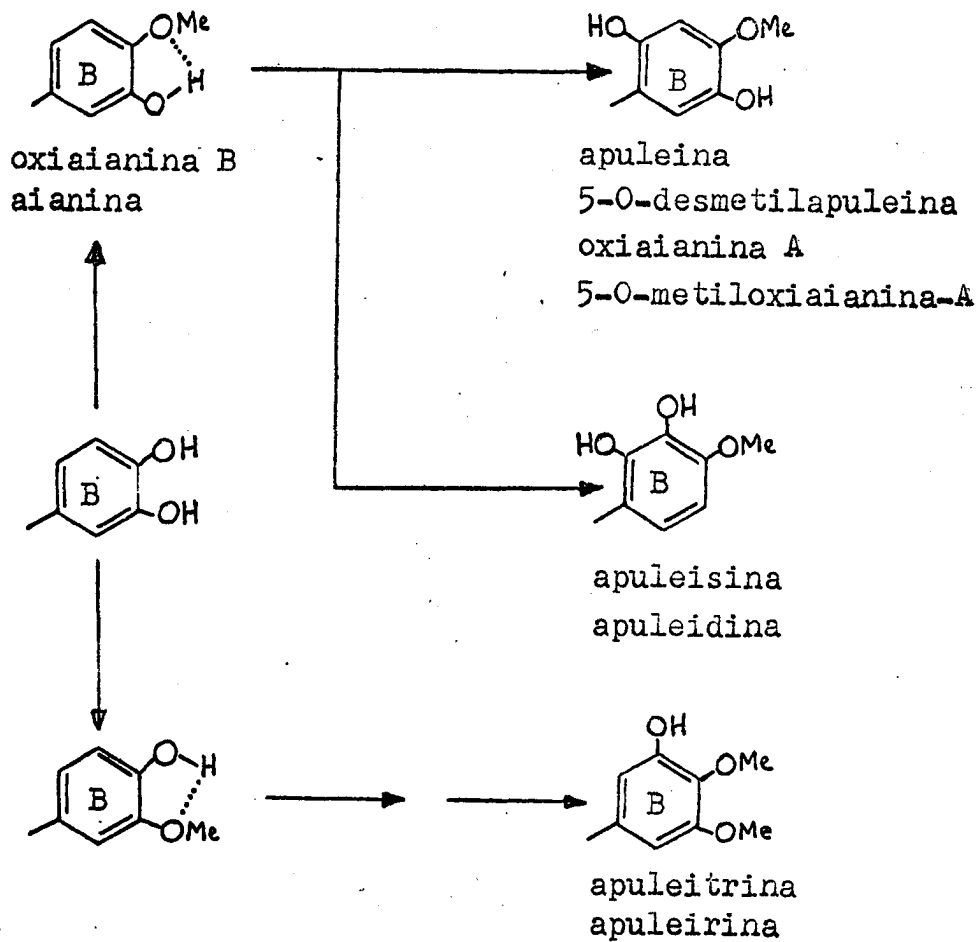


CLXXIXa R=H, eupatina

b R=Me, eupatoretina

Quadro 56.

Proposição da derivação da oxigenação do anel B em flavonas isoladas da Apuleia leiocarpa.



Postula-se que o grupo hidroxila, e não o grupo metoxila, controla a orientação do ataque eletrofílico do cation ^+OH ou seu equivalente biológico, para as posições orto ou para. Efeitos desta natureza foram atribuídos para a habilidade de grupo hidroxila estabelecer ponte de hidrogênio com o grupo metoxila [89]. Como resultado da ponte de hidrogênio intramolecular, os efeitos mesomérico e indutivo tornam a densidade eletrônica maior nas posições orto e para em relação ao grupo OH do que em relação ao grupo metoxila. Estes efeitos eletrônicos justificam porque o usual padrão de substituição 4'-hidroxi-3'-metoxi em diarilpropanoídes naturais origina os derivados usuais 3',4',5'-trioxigenados, enquanto, que pelo menos em espécies Disthemomanthus e Apuleia, o não usual 3'-hidroxi-4'-metoxi produz os não usuais padrões de substituição 2',3',4'- e 2',4',5'-trioxigenadas.

Que o padrão 3',4',5'-trioxigenado é na verdade comum entre os flavonoides pode-se deduzir também da presença da apuleitrina (CXL) e da apuleirina (CLV) encontrados como constituintes da Apuleia. Idêntico padrão de substituição tem sido encontrado em outras espécies não relacionadas tais como Eremophila fraseri F. Muell, família Euphorbiaceae [90] e Murrya paniculata (Linn.) Jack, família Rubiaceae [91]. Em contradistinação, anéis B 2'-oxigenados são razoavelmente espalhados nos isoflavonoides da família Leguminosae [92] e proposição mecanística racionaliza este fato [93]. A oxiaianina A era o único 2'-hidroxi-flavonoide registrado em espécies da família Leguminosae. Não obstante, trabalhos recentes [94, 95, 96] registram 27 representantes adicio -

nais desta classe, isolados de espécies de Acanthaceae, Datisca-
ceae, Labiatae, Meliaceae, Moraceae e Rutaceae. Suas biossinte-
ses, por outro lado, não seguem necessariamente o mesmo caminho
sugerido para os constituintes da Apuleia e pelo menos algumas
destas substâncias podem ser derivados do usual caminho acetato-
chiquimato [97].

CONCLUSÕES

RESUMO

BIBLIOGRAFIA

CONCLUSÕES

O estudo da composição química da espécie Apuleia leiocarpa, família leguminosae-Caesalpinoideae, permitiu o isolamento de (+)-pinitol, β -sitosterol, 10 flavonas e um pterocarpano.

Entre as flavonas estudadas, 6 (seis) sustentam função hidroxila no átomo de carbono 2'. Recentemente foi registrado que oxiaianina A e oxiaianina B isolados de Disthemonanthus benthamianus [67] podem causar dermatites [99]. Claramente, este resultado é uma outra indicação que estimula investigação da atividade fisiológica das substâncias da Apuleia leiocarpa.

Comparação da composição química da Apuleia leiocarpa com Apuleia molaris por cromatografia em camada delgada de sílica não revelou diferença entre as duas espécies. Este resultado está em acôrdo com a opinião que o gênero Apuleia Mart é monotípico [100].

Cromatografia em coluna e em camada delgada de sílica, quando convenientemente utilizadas, constituem poderosas ferramentas nas tarefas de isolamento, verificação de pureza e para

fins analíticos comparativos. A aplicação de peneiramento molecular utilizando sephadex LH-20 gelificada com solvente orgânico é extraordinariamente útil em muito casos de isolamento.

Os métodos espectrométricos (espectrometria no u.v. no i.v., de r.m.n. e de massa) são poderosos métodos físicos de análise orgânica com os quais o químico que se dedica à química de produtos naturais tem o seu trabalho de investigação estrutural tremendamente facilitado. Tal metodologia foi usada exaustivamente durante o estudo das 33 substâncias que compõem este trabalho.

RESUMO

O extrato benzênico do cerne da Apuleia leiocarpa (Vog.) Macbr., família Leguminosa-Caesalpinioideae contém (+)-pinitol, β -sitosterol e 10 flavonas. Três destas flavonas são conhecidas como aianina (CIV), oxiaianina A (XCVII) e oxiaianina B (CXXXVI). A constituição das 7 novas flavonas, apuleina (LXXIX), 5-O-desmetilapuleina (LXXX), apuleisina (CXVI), apuleitrina (CXL), apuleirina (CLV), apuleidina (CXLVI) e 5-O-metiloxiaianina A (XCVIII) foram estabelecidas. Proposição estrutural é também lançada para a leiocarpina (CLXXVI), um novo pterocarpano isolado do extrato benzênico da casca. O padrão de oxigenação fora do comum das flavonas estudadas neste trabalho é discutido.

Comparação de extratos de diferentes partes da espécie Apuleia molaris, por cromatografia em camada delgada de sílica, não revelou diferença em composição química com relação a Apuleia leiocarpa.

BIBLIOGRAFIA

- | 1| Z. Petri, Boll. Real Staz. Pat. Veg. Firenze. 10, 353(1930)
- | 2| J. Pinkas, D. Lavie e Mathilda Chorin, Phytochemistry, 7, 169 (1968).
- | 3| A. Ben-Aziz, M. Chorin, S.P. Monselise e I.Reichert, Science, 135, 1066 (1962).
- | 4| L. Iurd, The Chemistry of Flavonoid Compounds, T.A.Geissman Editor, pág. 107, Pergamon Press, London (1962).
- | 5| T.J.Mabry, K.R.Markham e M.B.Thomas, "The Systematic Identification of Flavonoids", Springer-Verlag New York Inc., New York, U.S.A. (1969).
- | 6| W.B.Whalley, Symp. Veg. Tannins, Cambridge, 1956; Soc.Leath Trad. Chem., 151 (1956).
- | 7| H.L. Hergert e E.F.Kurth, J.Am. Chem. Soc., 75, 1622 (1953)
- | 8| B.L.Shaw e T.H. Simpson, J. Chem. Soc., 655 (1955).
- | 9| G.E. Inglett, J. Org. Chem., 23, 93 (1958).
- | 10| L.H. Briggs e L.D. Colebrook, Spectrochimica Acta, 18, 939 (1962).
- | 11| A. Jacot - Guillarmod e A. Piguet, Helv. Chim. Acta, XLVI, 49 (1963).
- | 12| Ph. Lebreton e J. Chopin, Spectrochimica Acta, 19, 2099 (1963).
- | 13| J.H. Looker, S.A. Kagal e J.R. Edman, J. Heterocyclic Chem., 3, 61 (1966).

- [14] J.H. Looker, W.W. Hanneman, S.A. Kagal, J.I. Dappen e J.R. Edman, *J. Heterocyclic Chem.*, 3, 55 (1966).
- [15] H. Pacheco e M^{lle} A. Grouiller, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 779 (1955).
- [16] S.M. Kupchan, C.W. Sigel, J.R. Knox e M.S. Udayamurthy, *J. Org. Chem.*, 34, 1460 (1969).
- [17] G. Berti, O. Livi, D. Segnini e I. Caverio, *Tetrahedron*, 23, 2295 (1967).
- [18] O.R. Gottlieb e M. Taveira Magalhães, *J. Org. Chem.*, 26, 2449 (1961).
- [19] A.J. East, W.D. Ollis e R.E. Wheeler, *J. Chem. Soc.*, (C), 365 (1969).
- [20] L. Farkas, M. Nogradí, V. Sudasaman e W. Herz, *J. Org. Chem.*, 31, 3228 (1966).
- [21] T.J. Batterman e R.J. Hiquet, *Aust. J. Chem.*, 17, 428 (1964).
- [22] J.H. Looker, M.J. Holm, J.L. Minor e S.A. Kagal, *J. Heterocyclic Chem.*, 1, 253 (1964).
- [23] M^{lle} A. Grouiller, *Bull. Soc. Chim. France*, 2105 (1965).
- [24] J. Massicot e J.-P. Marthe, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1962 (1962); J. Massicot, J.-P. Marthe e S. Heitz, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2712 (1963).
- [25] C.A. Henrick e P.R. Jefferies, *Aust. J. Chem.*, 17, 934 (1964).
- [26] A.J. East, W.D. Ollis e R.E. Wheeler, *J. Chem. Soc.* (C), 365 (1969).
- [27] J.A. Ballantine e C.T. Pillinger, *Tetrahedron*, 23, 1691 (1967)
- [28] G. Berti, O. Livi, D. Segnini e I. Caverio, *Tetrahedron*, 23, 2295 (1967).
- [29] P.J. Garratt, F. Scheinmann e F. Sondheimer, *Tetrahedron*, 23, 2413 (1967).

- |30| D.L. Dreyer e D.J. Bertelli, Tetrahedron, 23, 4607(1967).
- |31| S.M. Kupchan, C.W. Sigel, J.R. Knox e M.S. Udayamurthy, J.Org. Chem., 34, 1460 (1969).
- |32| E.L. Ghisalberti, P.R. Jefferies e C.I. Stacey, Aust. J. Chem., 20, 1049 (1967).
- |33| R.G. Wilson, J.H. Bowie e D.H. Williams, Tetrahedron, 24, 1407 (1967).
- |34| R.I. Reed e J.M. Wilson, J. Chem. Soc., 5949 (1963).
- |35| F.A. Kinel, J. Romo, G. Rosenkranz e F. Sondheimer, J. Chem. Soc., 4163 (1956).
- |36| F. Sondheimer e A. Meisels, Tetrahedron, 9, 139 (1960).
- |37| L. Farkas e M. Nogradi, Chem. Ber., 98, 164 (1965); B.R. Pai, P. S. Subramaniam e V. Subramanyan, Tetrahedron, 21, 3573 (1965); V.V.S. Murti, P.V. Raman e T.R. Seshadri, Curr. Sci., 34, 398 (1965); Chem. Abstr., 63, 6956 (1965).
- |38| Henri Audier, Bull. Soc. Chim. France, 2892 (1966).
- |39| Y. Itagari e col., Bull. Chem. Soc., Japan, 39, 538 (1966)
- |40| C.S. Barnes e J.L. Occolowitz, Aust. J. Chem., 17, 975 (1964).
- |41| A. Pelter, P. Stainton e M. Barber, J. Heterocyclic Chem., 2, 262 (1965).
- |42| A. Pelter e P. Stainton, J. Chem. Soc., (C), 1933 (1967).
- |43| J.H. Bowie e D.W. Cameron, Aust. J. Chem., 19, 1627 (1966)
- |44| K.R. Jennings, Chem. Comm., 283 (1966).
- |45| J.H. Beynon, R.A. Saundess e A.E. Williams, Nature, 204, 67 (1964); K.R. Jennings, J. Chem. Phys., 43, 4176 (1965).
- |46| H. Budzikiewicz, C. Djerassi e D.H. Williams, "Mass Spectrometry of Organic Compounds", Holden-Day, Inc., São Francisco, U.S.A., pág. 29 (1969).

- [47] J.F. Bowie, R.G. Cooks, S. - O. Lawesson, P. Jakobsen e G. Schroll, Chem. Comm., 539 (1966).
- [48] R. Braz Filho, O. R. Gottlieb e R.M. Viegas Assumpção, An. Acad. Brasil. Ciênc., 42, Suplemento, 111 (1970).
- [49] R.V.M. Campbell, S.H. Harper e A.D. Kemp., J.Chem. Soc., (C), 1787 (1969).
- [50] A. Pelter e P.I. Amenechi, J. Chem. Soc., (C), 887 (1969).
- [51] Alaíde da Silva Oliveira, Tese de doutoramento, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, págs. 197-198 (1967).
- [52] José Rêgo, Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, pág. 29 (1968).
- [53] S.E. Drewes e H. Budzikiewicz, J. Chem. Soc., (C), 63(1969)
- [54] A. Pelter, P. Stainton, A.P. Johnson e M. Barber, J. Heterocyclic Chem., 2, 256 (1965).
- [55] Arturo Burkart, "Las Leguminosas Argentinas - Silvestres y cultivadas", 2ª edição, pág. 162, Acme Agency, Soc. de Resp. Ltda, Suipacha 58, Buenos Aires (1952).
- [56] João Angely, "Flora Analítica do Paraná". 2ª edição, pág. 362, vol. 7 (1965).
- [57] F.C. Hoehne, M. Kuhlmann e O. Handro, "O Jardim Botânico de São Paulo", Departamento de Botânica do Estado, Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio, pág. 431 (1941).
- [58] R. Braga, "Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará", 2ª edição, pág. 313, Imprensa Oficial, Fortaleza-Ceará (1960).
- [59] J.S.P. Schwarz, A.I. Cohen, W.D. Ollis, H.A. Kaczka e L.M. Jackman, Tetrahedron, 20, 1317 (1964).
- [60] C.A. Stamm, H. Schmid e J. Buchi, Helv. Chim. Acta, 41, 2006 (1958).

- |61| P.Sondheimer e A.Meisels, Tetrahedron, 9, 1143 (1960).
- |62| A.A. Lins Mesquita, D. de Barros Corrêa, O.R.Gottlieb e M. Taveira Magalhães, Anal. Chim. Acta, 42, 311 (1968).
- |63| W. Meyer e R. Fikenstschler, Ber., 91, 1936 (1958).
- |64| T.R. Govindachari, P.C. Parthasarathy, B.R. Pai, e P.S. Subramanian, Tetrahedron, 21, 3237 (1965).
- |65| M. Krishnamurti, T.R. Seshadri e P.R. Shankanan, Tetrahedron, 22, 941 (1966).
- |66| D. Kumari, S.K. Mukerjee e T.R. Seshadri, Tetrahedron Letters, 3767 (1966).
- |67| F.E. King, T.J. King e P.J. Stokes, J. Chem. Soc., 4587 (1954).
- |68| A.C. Jain, S.K. Mathur e T.R. Seshadri, Indian J. Chem., 4, 365 (1966).
- |69| F.E. King. T.J. King e K. Sellars, J. Chem. Soc., 92(1952)
- |70| P.B. Kumar, J. Indian Chem. Soc., 22, 235 (1945).
- |71| T.R. Seshadri, Proc. Indian Acad. Sci., 29A, 91 (1948)
- |72| K.R.Hargreaves, A. McGookin e A. Robertson, J.Appl. Chem. (London), 8, 273 (1958).
- |73| Chem. Abst., 47, 8040a (1947).
- |74| N.S.Ehacca, D.P. Hollis, L.F.Johnson, A.E.Pier e J.N. Shoolery, "NMR spectra catalog", volume 1, espectros 198, 208 e 294, Varian Associates, Palo Alto, California (1962).
- |75| N.S.Ehacca, D.P.Hollis, L.F.Johnson, A.E.Pier e J.N. Shoolery, "NMR spectra catalog", volume 1, espectros 195 e 196, Varian Associates, Palo Allo, California (1962).
- |76| E.L. Van Duuren, J. Org. Chem., 26, 5013 (1961).
- |77| A. Braga de Oliveira, Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais pág. 29 (1967).

- |78| K.G.R. Pachler e W.G.E. Underwood, *Tetrahedron*, 23, 1817 (1967).
- |79| D.R. Perrin, *Tetrahedron Letters*, 29 (1964).
- |80| K.Fukui, M. Nakayama e T. Harano, *Bull. Chem. Soc., Japan*, 42, 233 (1969),
- |81| A.P. Johnson e A. Pelter, *J. Chem. Soc., (C)*, 606 (1966).
- |82| G.B. Bhatia, S.K. Mukujee e T.R. Seshadri, *Tetrahedron*, Supl. 7, 139 (1966); *Tetrahedron Letters*, 1717 (1966).
- |83| K.Kurosawa, W.D. Ollis, B.T. Redman, I.O. Sutherland, O.R. Gottlieb e H. Magalhães Alves, *Chem. Comm.*, 1265 (1968).
- |84| J. S. P.Schwarz, A.I. Cohen, W.O. Ollis, E.A. Kaczka e L. M. Jackman, *Tetrahedron*, 20, 1317 (1964).
- |85| A.J. East, W.D.Ollis e R.E. Wheeler, *J. Chem. Soc., (C)*, 365 (1969).
- |86| C.P. Falshaw, R.A. Harmer, W.D. Ollis, R.E. Wheeler, V.R. Laeitha e N.V. Subba Rao, *J. Chem. Soc., (C)*, 374 (1969).
- |87| W.R. Chan, D.R.Taylor e C.R. Willis, *J.Chem. Soc., (C)*, 2540 (1967).
- |88| Judith Trehearne Cook, Tese de Ph.D., Universidade de Sheffield, pág. 81 (1966).
- |89| M. Barroeta, G. Ghuchani e J.Zabicky, *J. Org. Chem.*, 31, 2330 (1966).
- |90| P.R.Jefferies, J.R.Knox e E.J. Middleton, *Aust. J. Chem.*, 15, 532 (1962).
- |91| D.L. Dreyer, *J. Org. Chem.*, 33, 3574 (1969).
- |92| H. Crisebach e W.D. Ollis, *Experientia*, 11, 4 (1961).
- |93| W.D. Ollis, em "Recent Advances in Phytochemistry" T.J. Mabry, R.E. Alston e V.C. Runeckles, editores, volume 1, pág. 348, Appleton-Century-Crofts, New York (1968).

- | 94| S.C. Datta, V.V.S. Murti e T.R. Seshadri, Indian J.Chem., 7, 110 (1969).
- | 95| P.C. Parthasarathy, P.V. Radhakrishnam, S.A.Rathi e K. Venkataraman, Indian J. Chem., 7, 101 (1969).
- | 96| T.R. Govindachari, B.R. Pai, M. Srinivasan e P.S. Kalyanaraman, Indian J. Chem., 7, 306 (1969).
- | 97| D.L. Dreyer, J. Org. Chem., 33, 3577 (1968).
- | 98| S.E. Drewes e H. Budzikiewiez, J. Chem. Soc., (C), 63 (1969).
- | 99| J.W.W. Morgan e J. Thonson, Brit. J. Industr. Med., 24, 156 (1967).
- |100| C.T. Rizzini, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, comunicação pessoal (1969); vêrtambém S.J. Record e P.W. Hess, "Timbers of the New Woorld", pág. 253, Yale University Press, New Haven (1943).
- |101| Alaide Braga de Oliveira, Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais, pág. 188 (1967).
- |102| W. Karrer, Konstitution und Vorkommen der Organischen Pflanzenstoffe, pag. 117, Birkhäuser Verlag, Basel, (1958).