

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

Preparo de padrões de isoflavonas de *Glycine max* (L.) Merrill (soja) e contribuição na investigação fitoquímica de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd (cumaru) - otimização de análise cromatográfica e caracterização estrutural de flavonoides

Carolina Passos da Cunha

2013



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

PREPARO DE PADRÕES DE ISOFLAVONAS DE *GLYCINE MAX*
(L.) MERRILL (SOJA) E CONTRIBUIÇÃO NA INVESTIGAÇÃO
FITOQUÍMICA DE *DIPTERYX ODORATA* (AUBL.) WILLD
(CUMARU) - OTIMIZAÇÃO DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA
E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE FLAVONOIDES

CAROLINA PASSOS DA CUNHA

Sob a Orientação do Professor
Raimundo Braz-Filho

e Co-orientação do Professor
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica.

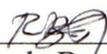
Seropédica, RJ
Março de 2013

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

CAROLINA PASSOS DA CUNHA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no programa de pós-graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica.

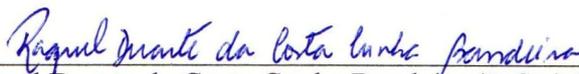
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28 DE MARÇO DE 2013



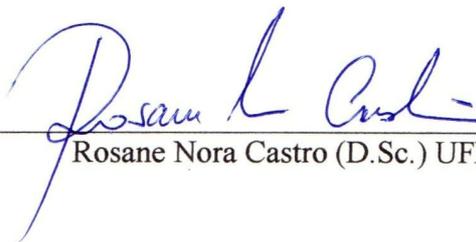
Raimundo Braz-Filho (D.Sc.) UFRRJ/FAPERJ/UENF
(Orientador)



Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (D.Sc.) Embrapa-CTAA
(Co-orientador)



Raquel Duarte da Costa Cunha Bandeira (D.Sc.) INMETRO



Rosane Nora Castro (D.Sc.) UFRRJ



Ilana Felberg (D.Sc.) Embrapa-CTAA
(Suplente)



Mario Geraldo de Carvalho (D.Sc.) UFRRJ
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy e ao Dr. Raimundo Braz-Filho pelo apoio, orientação e confiança.

À Dra. Ilana Felberg pela oportunidade e confiança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos.

À Capes pelo financiamento da bolsa de estudos.

Aos amigos Marcela, Cristiane, Mariana, Sabrina e Almir, que me acompanharam e incentivaram durante estes dois anos de curso.

Aos colegas do laboratório de cromatografia líquida da Embrapa que presenciaram o desenvolvimento deste trabalho com quem pude compartilhar dúvidas e dividir a bancada: Manuela, Sidney, Ana Cristina, Joana, Allien, Juliana, Luciana, Raysa, Thiago.

Ao Leonardo pelo apoio e compreensão.

Aos meus pais Ademir e Deusimar, e minha irmã Ana Cláudia que sempre me apoiaram em cada escolha.

RESUMO

CUNHA, Carolina Passos. **Preparo de padrões de isoflavonas de *Glycine max* (L.) Merrill (soja) e contribuição na investigação fitoquímica de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd (cumaru) - otimização de análise cromatográfica e caracterização estrutural de flavonoides.** 2013. 142p. Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica) Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

As espécies *Glycine max* (soja) e *Dipteryx odorata* (cumaru) da família Leguminosae foram estudadas através da otimização e automatização do isolamento de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando uma válvula seletora de canais da Rheodyne® como coletora de frações. A caracterização estrutural foi feita com base em dados espectrais obtidos por espectrometria de massas (EM), ultravioleta (UV) e ressonância magnética nuclear (RMN¹H, ¹³C, 1D e 2D). Nos grãos de *Glycine max* (soja) foram encontrados os flavonoides daidzina, daidzeína, glicitina, gliciteína, genistina e genisteína. A análise destes compostos em soja e produtos derivados por cromatografia líquida de alta eficiência leva em média 45 minutos, sua quantificação depende da aquisição de padrões analíticos comerciais, o que acarreta um custo elevado à análise. Por isso os flavonoides isolados foram aplicados como padrões cromatográficos e a análise foi otimizada em coluna de 2,4µm, reduzindo em 77% o tempo de análise e 78% o volume de resíduo de solvente gerado. A espécie *Dipteryx odorata*, popularmente usada como fitoterápico, produz sementes com valor comercial, sendo usadas na indústria de cosméticos e perfumes. Em seu endocarpo foram identificados os flavonoides butina, isoliquiritigenina, luteolina, buteína, sulfuretina e 3',4',7-diidroxiflavona. Os flavonoides luteolina, buteína e 3',4',7-triidroflavona não haviam sido identificados nesta espécie anteriormente.

Palavras-chave: Leguminosae, *Glycine max*, *Dipteryx odorata*, flavonoides, soja, cumaru.

ABSTRACT

CUNHA, Carolina Passos. **Preparation of isoflavonoids standards of *Glycine max* (L.) Merrill (soybean) and contribution to the phytochemical investigation of *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd (tonkabean) - optimization of chromatographic analysis and structural characterization of flavonoids.** 2013. 142p. Dissertation (Master Science in Chemistry, Organic Chemistry) Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The *Glycine max* (soybean) and *Dipteryx odorata* (tonka bean) species, belonging to the Leguminosae family, were studied by optimizing and automating the isolation of flavonoids through high performance liquid chromatography, using a channel selector valve from Rheodyne® as fractions collector. The structural characterization was based on spectral data obtained by mass spectrometry (MS), ultraviolet (UV) and nuclear magnetic resonance (¹H NMR, ¹³C, 1D and 2D). In the grains of *Glycine max* were found the flavonoids: daidzin, daidzein, glycitin, glycitein, genistin and genistein. The analysis of these compounds in soy and soy products through high performance liquid chromatography takes about 45 minutes, its quantification is dependent on the purchase of commercial analytical standards, which entails a high cost analysis. Therefore flavonoids standards were applied as standards and separation was optimized in chromatographic column of 2.4 μm, reducing in 77% the analysis time and 78% of the volume of solvent residue generated. The species *Dipteryx odorata*, commonly used as an herbal medicine, produces seeds with commercial value and is used in cosmetics and perfumes. In its endocarp the flavonoids identified were butin, isoliquiritigenin, luteolin, butein, sulfuretin and 3',4',7-trihydroxyflavone. The flavonoids luteolin, butein and 3',4',7-trihydroxyflavone had not been previously identified in this species.

Keywords: Leguminosae, *Glycine max*, *Dipteryx odorata*, flavonoids, soybean, tonkabean.

LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

d - duplete

dd - duplo duplete

s - simpleto

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

DAD – detector arranjo de fotodiodos

Q-TOF MS – Espectrômetro de massas quadrupolo tempo de voo (sigla em inglês *quadrupole time of flight mass spectrometer*)

EM - espectrômetro de massas

UV - ultravioleta

RMN - ressonância magnética nuclear

RMN¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1

RMN¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono-13

1D - unidimensional

2D - bidimensional

BHT – hidroxitolueno butilado (sigla em inglês *butylated hydroxytoluene*)

IEN - eletronebulização

IE - impacto de elétrons

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1.	Flavonoides	3
2.1.1.	Rota biossintética	5
2.2.	Cromatografia líquida um breve histórico	10
2.3.	Cromatografia Líquida	11
2.3.1.	Cromatografia clássica	12
2.3.2.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	13
2.3.3.	Tamanho da partícula	13
2.3.4.	Estrutura da partícula	14
2.3.4.1.	Não porosas	14
2.3.4.2.	Totalmente porosa	14
2.3.4.3.	Peculiar (Core Shell)	15
2.3.5.	Cromatografia aplicada à separação de flavonoides	16
2.4.	Métodos de identificação de flavonoides	18
2.4.1.	Absorção no ultravioleta e visível (UV-Vis)	18
2.4.2.	Espectrometria de massas (EM)	21
2.4.3.	Ressonância magnética nuclear (RMN)	23
2.5.	Glycine max (L.) Merrill. (Soja)	24
2.6.	Dipteryx odorata (Aubl.) Willd. (Cumaru)	27
3.	Parte Experimental	29
3.1.	Reagentes e solventes	29
3.2.	Equipamentos	29
3.3.	Preparo das soluções	30
3.4.	Glycine max (L.) Merrill (Soja)	31
3.4.1.	Descascamento e separação do germe da soja	31
3.4.2.	Extração de isoflavonas	32
3.4.3.	Método cromatográfico convencional para análise de isoflavonas em soja e derivados	33
3.4.4.	Método cromatográfico – Otimização em colunas alternativas	33
3.4.4.1.	Condições cromatográficas – Coluna 1	33
3.4.4.2.	Condições cromatográficas – Coluna 2	34

3.4.5.	Preparo dos padrões analíticos.....	34
3.4.5.1.	Hidrólise ácida das isoflavonas glicosídicas.....	34
3.4.5.2.	Método cromatográfico para o isolamento das isoflavonas.....	35
3.4.6.	Cálculo da concentração das isoflavonas isoladas e preparo da solução estoque....	35
3.4.7.	Preparo da curva analítica.....	37
3.4.8.	Cálculo da concentração de isoflavonas em amostra.....	38
3.4.9.	Comparação do método otimizado com o método convencional.....	38
3.4.10.	Estabilidade das isoflavonas em extrato de soja congelado.....	39
3.5.	<i>Dipteryx odorata</i> (Aulb.) Willd. (Cumaru).....	39
3.5.1.	Fracionamento do extrato.....	39
3.5.2.	Separação cromatográfica dos flavonoides do cumaru.....	40
3.6.	Coleta das frações.....	40
3.7.	Secagem das frações.....	41
3.8.	Caracterização estrutural das substâncias.....	41
3.8.1.	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear.....	41
3.8.2.	Espectrometria de massas (EM).....	42
3.8.3.	Preparo de derivados.....	42
3.8.3.1.	Metilação.....	42
3.8.3.2.	Acetilação.....	43
4.	Resultados e discussão.....	44
4.1.	<i>Glycine max</i> (L.) Merrill (soja).....	44
4.1.1.	Extração e hidrólise básica das isoflavonas glicosídicas.....	44
4.1.2.	Hidrólise ácida da isoflavonas glicosídicas.....	44
4.1.3.	Isolamento das isoflavonas da soja para obtenção de padrões analíticos.....	45
4.1.4.	Caracterização estrutural das isoflavonas isoladas.....	48
4.1.4.1.	Ressonância magnética nuclear.....	48
4.1.4.2.	Espectrometria de massas.....	67
4.1.4.3.	Espectros de ultravioleta.....	69
4.1.4.4.	Preparação de derivado.....	70
4.1.5.	Cálculo da concentração das soluções de isoflavona e preparo da curva analítica..	73
4.1.6.	Comparação das colunas alternativas à coluna convencional.....	75
4.1.7.	Comparação da reposta das colunas convencional e coluna 2.....	77
4.1.8.	Estabilidade das isoflavonas em extrato de soja congelado.....	78
4.2.	<i>Dipteryx odorata</i> (Aulb.) Willd (Cumaru).....	79

4.2.1.	Fracionamento do extrato	80
4.2.2.	Isolamento dos flavonoides do cumaru.....	81
4.2.3.	Elucidação estrutural dos flavonoides	83
4.2.3.1.	Flavanona: CP4 - 3',4',7-triidroxiflavanona.....	83
4.2.3.2.	Flavonas: CP3 - 3',4',7-triidroxiflavona e CP6 - 3',4',5,7-tetraidroxiflavona.....	91
4.2.3.3.	Aurona: CP5 - 3',4',6-triidroxiaurona	102
4.2.3.4.	Chalconas: CP7 - 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona e CP8 - 2',4,4'-triidroxichalcona	109
4.2.3.5.	Preparação dos derivados.....	119
5.	CONCLUSÕES	130
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
7.	ANEXOS	141

1. INTRODUÇÃO

A química de produtos naturais visa separação, elucidação estrutural e caracterização dos constituintes das plantas, contribuindo com uma relação interdisciplinar com diversas áreas da ciência, tais como: botânica, zoologia, biologia molecular, farmacologia, medicina humana e veterinária, entomologia e ecologia (BRAZ-FILHO, 1994). Este ramo da química serviu de base para química medicinal, atualmente grande parte dos medicamentos são baseados em estruturas metabolizadas pelas plantas (VIEGAS *et al.*, 2006). Além de ser importante no estudo quimiotaxonômico das espécies vegetais. O interesse por esse ramo da ciência influenciou o desenvolvimento de tecnologias de separação, como a cromatografia, e de métodos espectroscópicos como UV, EM e RMN que são as ferramentas primordiais utilizadas pelos químicos de produtos naturais.

Os flavonoides, metabólitos especiais biossintetizado pelo metabolismo de organismos vivos, pertencem ao grupo dos compostos fenólicos que possuem em sua estrutura fundamental quinze átomos de carbono, contendo esqueleto básico difenilpropano (C₆C₃C₆) com dois anéis benzênicos conectados por três átomos de carbono. A forma em que os três carbonos centrais, entre os dois grupos fenólicos, são encontrados na natureza e seu estado de oxidação, dão origem ao esqueleto básico das subclasses dos flavonoides: chalconas, diidrochalconas, auronas, diidroauronas, isoflavonas, diidroisoflavonas, flavonas, flavanonas, flavonóis, diidroflavonóis, flavanas e antocianidinas (GROTEWOLD, 2006).

A *Dipteryx odorata* é uma leguminosa nativa no Brasil que possui valor comercial devido ao alto teor de cumarina em suas sementes, que são usadas na indústria de cosmético e perfume. Popularmente, suas sementes são usadas como um fitoterápico, no auxílio do tratamento de úlcera, otite, problemas respiratórios e cardíacos (CARVALHO, 2009). Alguns flavonoides já isolados de diversas partes desta espécie foram isoflavonas, auronas e chalconas (SULLIVAN, 1982; JANG *et al.*, 2003; JANUÁRIO *et al.*, 2005), porém seu endocarpo ainda não foi investigado quanto ao conteúdo destes compostos.

A *Glycine max* L. Merrill é uma leguminosa considerada um alimento funcional, além de ser rico em proteína possui componentes benéficos à saúde humana. Seu consumo está associado à redução de risco de várias doenças, como câncer de mama, próstata e outras formas de câncer hormônio dependentes (MESSINA *et al.*, 2009), osteoporose e doenças cardíacas (HASLER, 2002). As isoflavonas são compostos da classe dos flavonoides, encontradas em leguminosas, dentre elas na soja. Elas têm sido foco de muitos estudos, pois

podem funcionar como moduladores hormonais naturais (MESSINA *et al.*, 2006; WUTTKE *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010).

A análise de isoflavonas em soja e produtos derivados em geral é feita por CLAE-DAD. O método de cromatográfico oficial emprega coluna de 5µm, o que acarreta um tempo longo de análise, em média 45 minutos (AOAC, 2005; KLUMP *et al.*, 2001). Substituir essa coluna por uma com menor partícula reduziria este tempo. A quantificação destes compostos depende da obtenção de padrões cromatográficos, o que gera alto custo para os laboratórios que a realizam, pois a aquisição destes, geralmente depende de importação. Uma alternativa seria o isolamento destes padrões no próprio laboratório.

As contribuições científicas deste trabalho são a otimização e automatização do isolamento dos flavonoides de *Glycine max* e *Dipteryx odorata* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando uma válvula seletora de canais da Rheodyne® empregada como coletora de frações e a caracterização estrutural com base em dados espectrais obtidos pelas técnicas de espectrometria de massas (EM), ultravioleta (UV) e ressonância magnética nuclear (RMN¹H e ¹³C, 1D e 2D). Outras contribuições relevantes são a redução no tempo e no resíduo gerado pela análise de isoflavonas de *Glycine max* através da otimização em coluna de 2,4µm para procedimentos de rotina e o emprego das isoflavonas isoladas como padrões em escala analítica, além da investigação fitoquímica dos flavonoides do endocarpo de *Dipteryx odorata*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Flavonoides

Os flavonóides são metabólitos especiais biossintetizados por organismos vivos que pertencem ao grupo dos compostos fenólicos. Nas plantas estão envolvidos em mecanismos de resposta contra o estresse, como o causado pela elevação da radiação UV-B e infecção por microorganismos ou ataque herbívoro. Desempenham um papel importante na interação com insetos e na fertilidade de algumas espécies (HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Principalmente as antocianinas e flavonóis, atuam nas plantas atraindo polinizadores e disseminadores de sementes. Além da pigmentação em frutas, flores, sementes e folhas (RICE-EVANS, 2004).

Estes compostos são um grupo de substâncias naturais que possuem em sua estrutura fundamental quinze átomos de carbono, constituído de um esqueleto de difenilpropano ($C_6C_3C_6$), dois anéis benzênicos (A e B) conectados por três átomos de carbono (C). Podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides, como as flavolignananas, porém frequentemente ocorrem como glicosídeos. Atualmente já foram identificados cerca de 6500 flavonoides, o maior trabalho publicado foi “The Handbook of Natural Flavonoids”, onde foram listados 6467 flavonoides contendo estrutura, referência e informação sobre atividade biológica (HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

O grau de oxidação dos três carbonos centrais, entre os dois grupos fenólicos, e a forma de conexão com os anéis A e B, dão origem ao esqueleto básico das subclasses dos flavonóides: chalconas, diidrochalconas, auronas, diidroauronas, isoflavonas, diidroisoflavonas, flavonas, flavanonas, flavonóis, diidroflavonóis, flavanas e antocianidinas (GROTEWOLD, 2006; Figura 1).

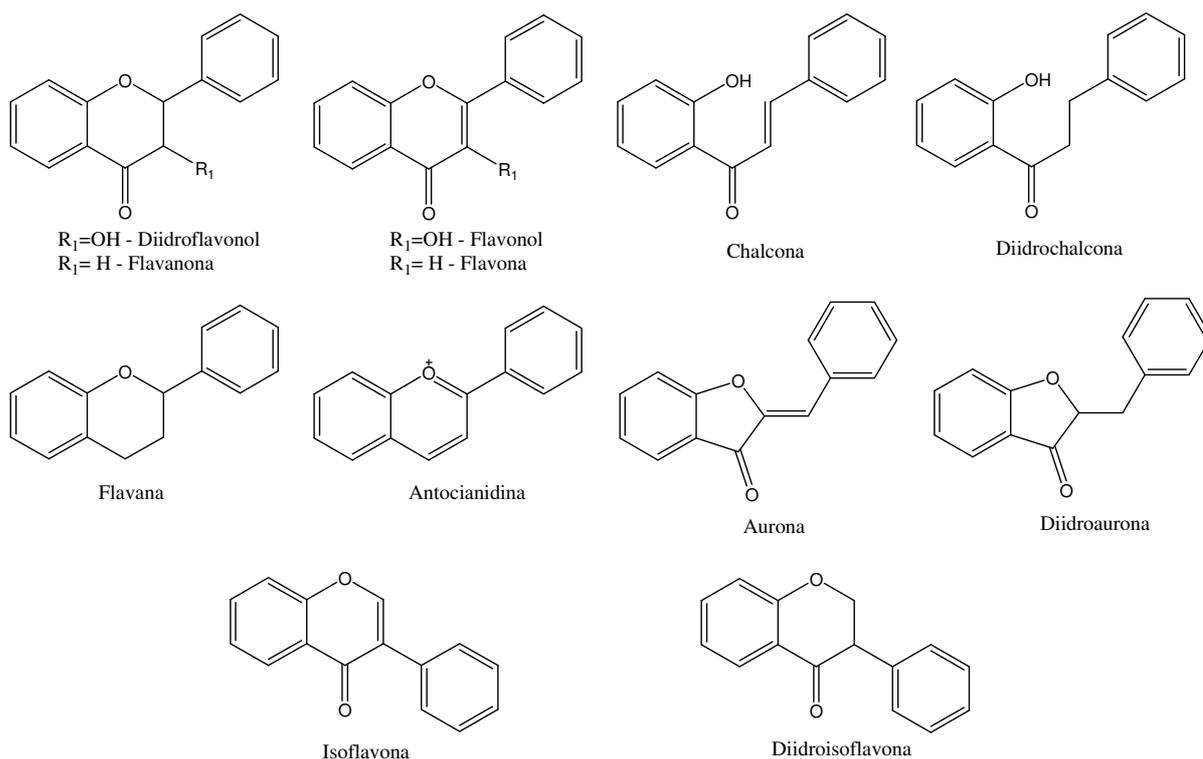


Figura 1. Esqueleto básico das subclasses dos flavonoides

Os flavonoides recebem considerável atenção na literatura, especificamente por sua importância biológica e fisiológica (RIJKE *et al.*, 2006). Diversos efeitos benéficos à saúde humana vêm sendo atribuídos aos flavonoides, acredita-se que esses efeitos baseiam-se principalmente na atividade antioxidante atuando como sequestradores de radicais livres (PRIOR & CAO, 2000) e quelantes de metais (TERAO & PISKULA, 1999). Estudos mostraram que uma dieta rica nesses compostos está associada ao baixo risco de algumas formas de câncer (KNEKT *et al.*, 1997; NEUHOUSER, 2004) e doenças cardiovasculares (HERTOG *et al.*, 1997; YOCHUM, 1999), além de alguns possuírem atividade estrogênica (MIKSICEK, 1995). Quantidades consideráveis de flavonoides são consumidas diariamente na dieta de vegetais e frutas (YÁÑES *et al.*, 2013).

A presença da carbonila em C-4 e uma dupla ligação entre C-2 e C-3 são características importantes para alta atividade antioxidante nos flavonoides. Buteína e outros 3,4-diidrochalconas são mais ativas que suas flavonas análogas por causa da sua habilidade de deslocalização eletrônica. Tratando-se de *orto*-diidroflavonoides a ação como quelante de metais é um importante fator na atividade antioxidante (YÁÑES *et al.*, 2013).

As isoflavonas têm recebido atenção especial, pois podem funcionar como moduladores hormonais naturais (WOLFF *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010, REITER *et al.*, 2009, SANCHES *et al.*, 2010) por possuírem similaridades funcionais ao estrogênio humano 17- β -estradiol (GENOVESE & LAJOLO, 2002; MESSINA *et al.*, 2006), sendo uma aplicação bastante conhecida das isoflavonas durante a pós-menopausa, esse tratamento reduz o risco de perda da densidade óssea e osteoporose (SHEDD-WISE *et al.*, 2011, WEY *et al.*, 2012, BYUN & LEE, 2010), além de possuir atividade antioxidante (LIANG *et al.*, 2010, BARBOSA *et al.*, 2011). Genisteína e daidzeína suprimiram respostas inflamatórias na pele de ratos que estariam associadas ao processo de câncer de pele (KHAN *et al.*, 2012). Estudos sugerem que o consumo das isoflavonas da soja na dieta está associado à redução da severidade da asma e doenças inflamatórias das vias aéreas (BAO *et al.*, 2011).

Estudos recentes relatam atividade anticarcinogênica, anti-inflamatória (LEE *et al.*, 2010) e atenuação da inflamação alérgica das vias aéreas em ratos para a sulfuretina (SONG *et al.*, 2010). Resultados preliminares sugerem que buteína é um potencial agente contra doenças neurodegenerativas (CHO *et al.*, 2012) e câncer de bexiga (ZHANG *et al.*, 2008). Isoliquiritigenina isolada de frutos de *Dipteryx odorata* apresentou efeito preventivo para câncer de mama em ratos. (JANG *et al.*, 2003). Em ensaios *in vitro* inibiu o desenvolvimento de câncer de próstata (KANAZAWA *et al.*, 2003), rins e pulmão (YAMAZAKI *et al.*, 2002). A luteolina tem apresentado efeito em vários tipos de células cancerígenas, pois induz a apoptose (LEUNG *et al.*, 2005; MICHELS *et al.*, 2005; CHOI *et al.*, 2011).

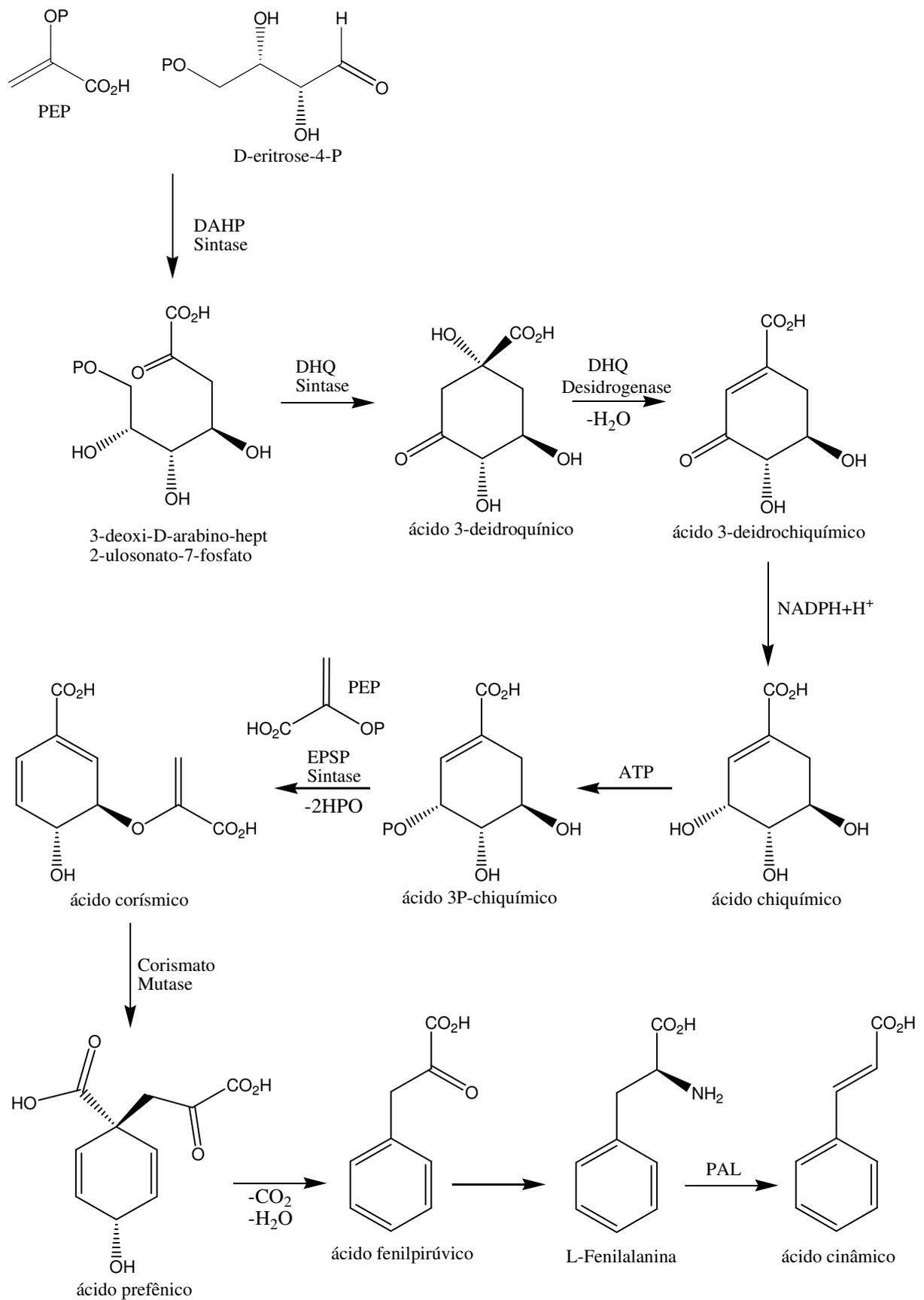
2.1.1. Rota biossintética

Os flavonoides são metabólitos produzidos através do metabolismo especial, ou seja, metabolismo secundário das plantas. Metabólitos primários, como o açúcar, são largamente distribuídos na natureza sendo necessário para o desenvolvimento fisiológico, por exemplo; a divisão celular, crescimento e reprodução. Os metabólitos especiais são derivados dos metabólitos primários e encontrados, principalmente em plantas e algas. Nas plantas, estão envolvidos na necessidade de adaptação ao seu ambiente; por exemplo; pigmentação, mecanismos de defesa química, produtos finais de adaptação química a ambientes de estresse, são induzidos pela radiação solar, sendo sintetizado por tipos de células especializadas em diferentes estágios de desenvolvimento da planta ou durante doença (YÁÑES *et al.*, 2013).

A biossíntese sugere a rota pela qual os metabólitos são sintetizados nos organismos vivos. Os produtos do metabolismo especial são divididos conforme características no esqueleto básico, sendo que cada grupo de metabólitos especiais possui um precursor na rota biossintética. O conhecimento da rota biossintética das classes de metabólitos, aliado aos dados espectroscópicos é importante no processo de elucidação estrutural de produtos naturais.

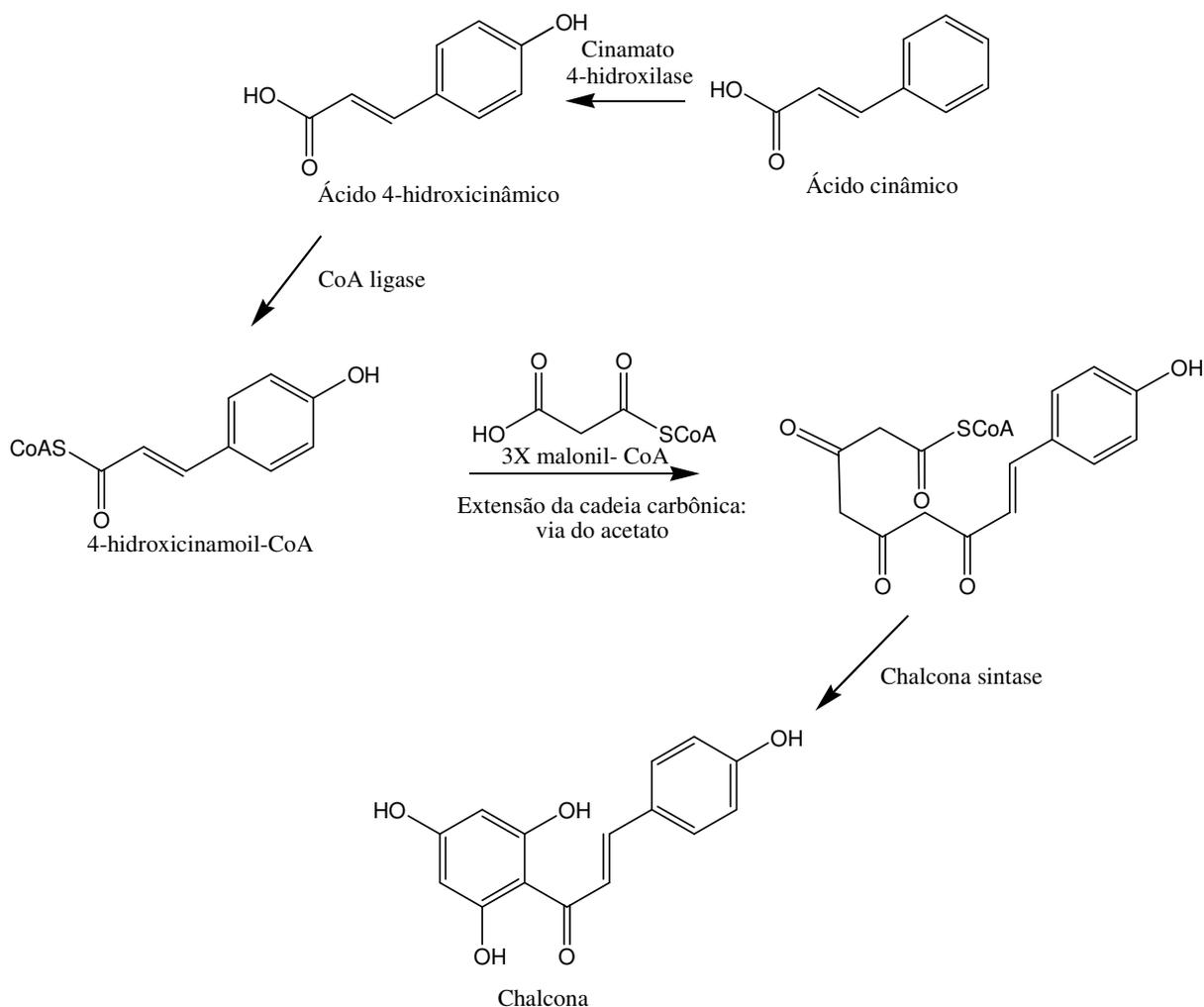
A rota biossintética dos flavonoides é considerada uma via mista, pois o esqueleto básico dos flavonoides resulta de rotas biossintéticas distintas: a via do ácido chiquímico e a via do acetato. A via do ácido chiquímico origina o ácido cinâmico, sendo esta via responsável pela formação do anel B e a ponte de três átomos de carbono. O anel aromático A, é originário da via do acetato (DEWICK, 2002).

A via do ácido chiquímico se inicia com a reação do fosfoenopiruvato com eritrose-4-fosfato para obtenção de 3-deoxi-D-arabino-hept-2-ulosonato-7-fosfato. Esta reação é um tipo de condensação aldólica, catalisada pela enzima deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHP Sintase). Em seguida a deidroquinato sintase (DHQ Sintase) catalisa a conversão de 3-deoxi-D-arabino-hept-2-ulosonato-7-fosfato em ácido 3-deidroquínico. A deidroquinato desidrogenase (DHQ Desidrogenase) promove a desidratação do ácido 3-deidroquínico à ácido 3-dehidrochiquímico via um intermediário imínico. A incorporação de uma molécula de fosfoenopiruvato ao ácido chiquímico ocorre via uma reação de adição e eliminação gerando ácido 3-enolpiruvilchiquímico 3-fosfato (EPSP) é catalisada pela enzima 3-enolpiruvilchiquímico 3-fosfato sintase (EPSP Sintase). A transformação de EPSP em ácido corísmico envolve uma eliminação-1,4 de ácido fosfórico. A transformação do ácido corísmico à ácido prefênico ocorre via rearranjo de Claisen, com transferência do derivado do fosfoenolpiruvato. Esta reação é catalisada pela enzima corismato mutase. Com a descarboxilação e aromatização do ácido prefênico forma-se o ácido fenilpirúvico, que posteriormente sofre transaminação formando a fenilalanina. A enzima fenilalanina amônia liase (PAL) catalisa a eliminação da amônia para formação do ácido cinâmico (Esquema 1; DEWICK, 2002).



Esquema 1. Via do ácido chiquímico (adaptado de DEWICK, 2002)

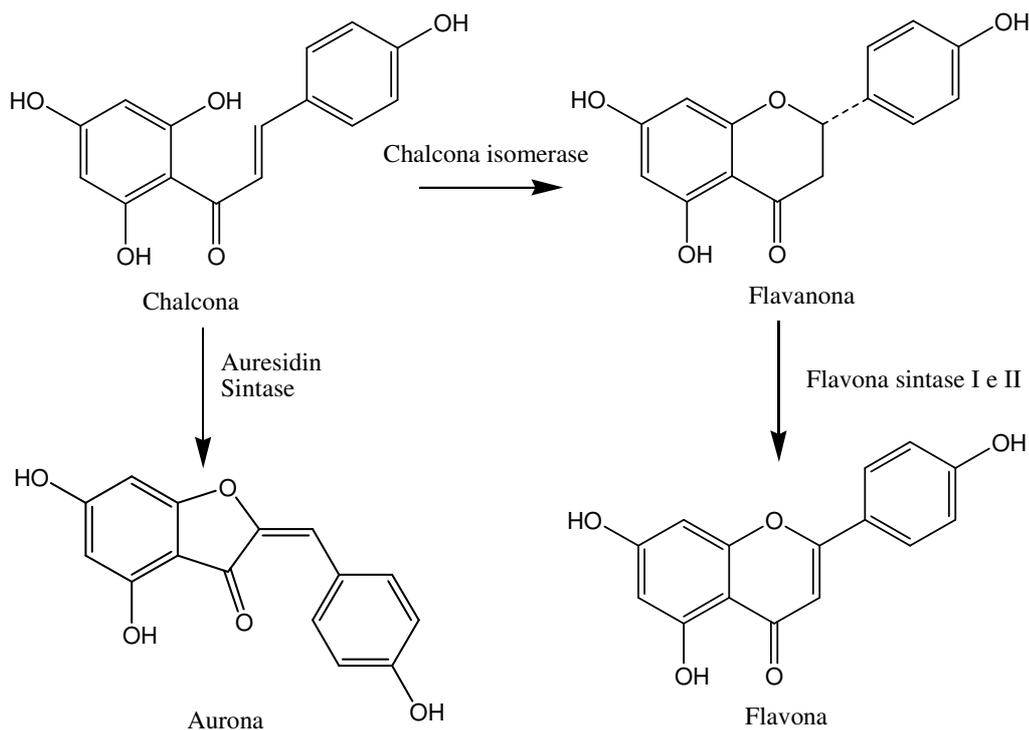
A formação do anel A ocorre pela via do acetato, através da condensação com três moléculas de malonil CoA. A enzima cinamato 4-hidroxilase converte ácido cinâmico em ácido *p*-cumárico e então o grupo acetil-CoA é adicionado pela enzima CoA ligase. O produto é transformado em chalcona pela enzima chalcona sintase. O Esquema 2 apresenta a via do acetato.



Esquema 2. Via do acetato (DEWICK, 2002)

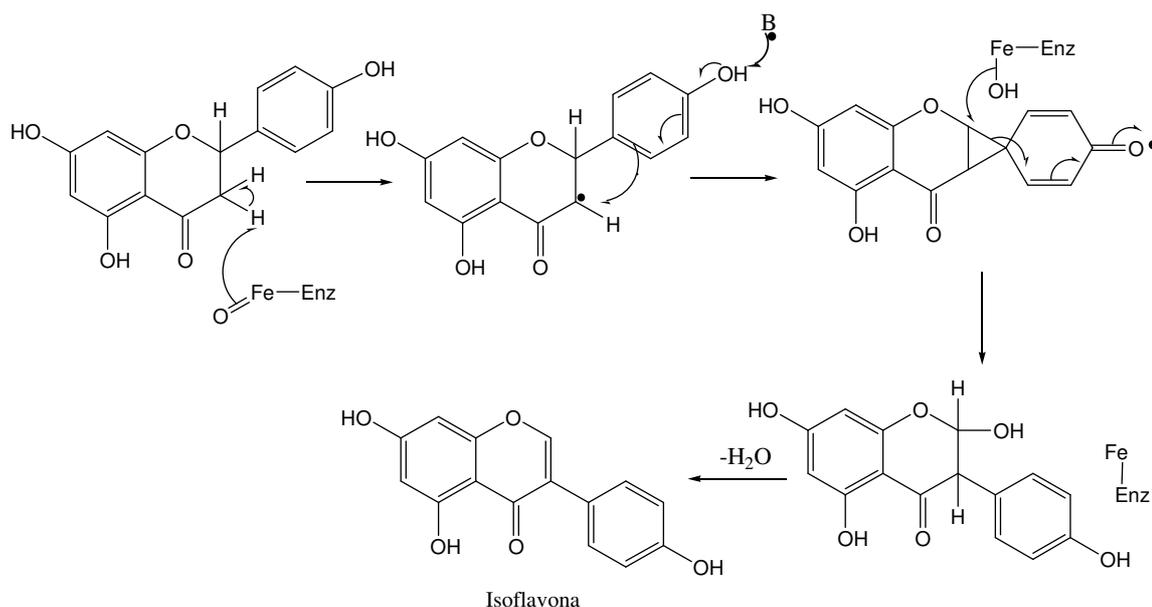
Chalconas são precursores dos demais flavonoides (Esquema 3), a maioria contendo um heterociclo de seis membros, formado por uma reação tipo Michael pelo ataque nucleofílico do fenol à posição β da cetona α,β -instaurada. A chalcona é transformada em flavanona através de reação catalisada pela enzima chalcona isomerase (DEWICK, 2002). A flavanona é precursora das flavonas, isoflavonas e diidroflavonóis. A introdução de uma dupla ligação entre C₂ e C₃ é necessária para a formação das flavonas e flavonóis, são descritas duas flavonas sintase

nesta conversão: a flavona sintase I (dioxigenase) e a flavona sintase II (monoxigenase). A formação do esqueleto aurônico a partir da chalcona é catalisada pela enzima aureusidin sintase (NAKAYAMA, 2002). Modificações na oxigenação dos anéis aromáticos, normalmente ocorrem no estágio de flavanona ou diidroflavonol. Também é possível que ocorram etilações, metilações, glicosilações, isoprenilações, entre outras modificações gerando uma enorme gama de compostos (YÁÑES *et al.*, 2013).



Esquema 3. Formação das subclasses dos flavonoides a partir da chalcona

Os isoflavonoides formam uma subclasse distinta de flavonoides, contendo uma variação estrutural, na qual o anel aromático derivado do chiquimato migrou para o carbono adjacente do heterociclo. Este processo enzimático depende do citocromo P450 e requer NADPH e O_2 como cofatores. Um mecanismo radicalar é proposto (Esquema 4). Este rearranjo é raro na natureza fazendo com que os isoflavonoides sejam praticamente restritos à família *Leguminosae/Fabaceae*. Centenas de isoflavonoides foram identificados, sua variedade estrutural ocorre através de reações de hidroxilação, alquilação, variando o nível de oxidação do heterociclo ou formação de ciclos adicionais (DEWICK, 2002).



Esquema 4. Formação do esqueleto isoflavônico (adaptado de DEWICK, 2002)

2.2. Cromatografia líquida um breve histórico

O botânico russo, Mikhail Semenovich Tswett, observou a separação de componentes do extrato de folhas em coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio e eluído com éter de petróleo. Tswett foi o primeiro a interpretar o processo cromatográfico como é aceito hoje e utilizou o termo cromatografia para descrever as zonas coloridas que se separavam dentro da coluna (TSWETT apud MORHY, 1976). Seu mais importante trabalho referente à cromatografia foi publicado, em 1906; “Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendungen auf die Chemie des Chlorophylls” (Análises de adsorção e método cromatográfico: aplicações na química da clorofila). Até 1919 publicou vários trabalhos e um livro, descrevendo materiais adsorventes usados para cromatografia (VALENTE *et al.* 1983).

A cromatografia não foi bem aceita pelos cientistas da época e permaneceu esquecida por quase 25 anos. Uma das razões foi que os resultados que Tswett obteve com a separação das clorofilas a e b, discordavam do resultado obtido por Willstätter, professor de química orgânica em Munique, no qual obteve, por cristalização fracionada, somente uma clorofila. Por acreditar no método clássico, Willstätter acreditava na decomposição da clorofila durante o processo de adsorção de Tswett (ENGELHARDT, 2004; LIVENGOOD, 2009), atualmente sabemos da existência das clorofilas a e b.

Antes de Tswett, em 1834, Runge usou tecido e papel para testar a separação de mistura de corantes de extrato de plantas (RUNGE apud VALENTE *et al.* 1983). Beyerinck em 1889 utilizou sólidos em camada delgada sobre vidro, para a separação circular de misturas de sais inorgânicos (BEYERING apud ISSAQ, 2002).

Kuhn e Lederer repetiram as experiências de Tswett na separação de xantofilas da gema de ovo. Em 1940, Wilson publicou o primeiro tratamento teórico sobre cromatografia (WILSON apud VALENTE *et al.* 1983). Em 1941 Martin e Synge publicaram um trabalho onde descreveram a cromatografia líquido-líquido e introduziram o conceito da altura de um prato teórico, além disso, discutiram a possibilidade da fase móvel ser um gás (MARTIN & SYNGE, 1941). Em 1956 van Deemter e colaboradores definiram a relação entre a altura equivalente a um prato teórico e parâmetros experimentais das colunas, a chamada equação de van Deemter (VAN DEEMTER *et al.*, 1956). Martin e Howard desenvolveram a cromatografia líquida aplicando as fases reversas. Moore e Stein mecanizaram o processo de cromatografia, usando uma bomba peristáltica, aplicando na separação de aminoácidos usando um fotômetro como detector (MOORE & STEIN, 1963).

Na década de 1960 foram desenvolvidos enchimentos para CLAE. Primeiramente surgiram as partículas peculiares (partícula não porosa recoberta com material poroso) de troca iônica, desenvolvidas por Horvath. Nesta época as partículas eram rígidas e tinham diâmetro entre 40 e 50 μ m e resistentes às pressões impostas pela CLAE (MALDANER & JARDIM, 2009). Em 1969 surgiram os primeiros sistemas de CLAE comerciais (ENGELHARDT, 2004). Mais tarde, por volta de 1970 foram introduzidas partículas totalmente porosas com diâmetro de 10 μ m. Nos anos 1980 surgiram as partículas esféricas com 5 μ m. Com isso as análises tornaram-se mais rápidas e eficientes. Nickless e colaboradores desenvolveram fases estacionárias contendo grupos alquilas quimicamente ligados, o que ampliou a aplicação da técnica (NICKLESS apud MALDANER & JARDIM, 2009).

2.3. Cromatografia Líquida

A cromatografia pode ser classificada em fase normal e reversa. Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel intitula-se cromatografia líquida com fase normal, o inverso é chamado cromatografia líquida com fase reversa. Outra classificação é quanto ao

diâmetro interno das colunas. Colunas preparativas possuem diâmetro de 6-50mm, as analíticas 2-6mm, as microdiâmetro 1-2mm e as capilares possuem diâmetro menor de 1mm (COLLINS, 2006).

As fases móvel e estacionária utilizadas na cromatografia definem o mecanismo envolvido no processo de separação. Incluindo os processos de adsorção, partição, troca iônica e exclusão. Os processos de adsorção e partição são mecanismos de separação físicos estão baseados em interações eletrostáticas, incluindo as ligações de hidrogênio. Quando a fase estacionária é um sólido ocorre a adsorção do soluto na interface entre as partículas sólidas e a fase móvel. No processo de partição a fase estacionária é um líquido espalhado na superfície de um sólido, neste caso a separação baseia-se na diferença de solubilidade dos compostos da amostra nas fases móveis e estacionária (MEYER, 1997).

O mecanismo de exclusão é um processo mecânico. A separação baseia-se no tamanho das moléculas. A fase estacionária é constituída de macromoléculas com ligações cruzadas que possuem poros de tamanhos específicos. As moléculas maiores do analito não entram nos poros e eluem mais rapidamente, enquanto as moléculas menores sofrem a difusão nos poros eluindo com maior tempo de retenção (MC MASTER, 2007).

No processo químico de troca iônica, a separação baseia-se nos diferentes graus de afinidade eletrostática dos íons. A fase estacionária é altamente carregada. Desta forma os trocadores aniônicos têm sítios ativos carregados positivamente, retendo ânions, o inverso ocorre para trocadores catiônicos. Os solutos são eluídos por deslocamentos com outros íons, com mesmo tipo de carga (LANÇAS, 2009).

2.3.1. Cromatografia clássica

A separação cromatográfica clássica é realizada em coluna de vidro com diâmetro interno maior ou igual a 10cm, recheada com partículas de 60 à 200 μ m, a fase móvel elui pela força gravitacional ou pela aplicação de pressão reduzida, as frações separadas são coletadas na parte inferior da coluna. Para a obtenção do material puro muitas vezes é necessário uma nova cromatografia (COLLINS *et al.*, 2006).

Este tipo de cromatografia é utilizada por químicos de produtos naturais desde sua invenção até os dias de hoje. Pois é eficiente na separação/purificação grande quantidade de extratos de plantas e requer material muito simples que pode ser encontrado em qualquer laboratório de química. Porém exige alguma habilidade por parte do analista, utiliza grande

quantidade de solvente na eluição dos analitos e o tempo empregado é longo e tedioso. A fase estacionária usada na separação nem sempre pode ser reutilizada, pois parte da amostra geralmente adsorve de forma irreversível.

2.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os avanços na técnica de cromatografia líquida são, em grande parte, devido à evolução das colunas cromatográficas. Desde a cromatografia clássica até a CLAE, muitos avanços ocorreram no tamanho, forma, estrutura e rigidez das partículas de recheio das colunas cromatográficas. Uma coluna ideal oferece a maior resolução na separação, em um menor tempo possível, possuem grande capacidade de amostra, produz pequena pressão e baixo custo.

Na maioria das separações por CLAE são usadas partículas rígidas à base de sílica, pois esses recheios são estáveis às altas pressões usadas na CLAE. As partículas esféricas são preferíveis para aplicações na CLAE, pois apresentam melhor empacotamento da coluna, maior resistência à pressões altas, leitos homogêneos, compactos e eficientes, quando comparados à partículas irregulares. Partículas irregulares são mais usadas em separações preparativas, porque seu custo é menor (COLLINS *et al.*, 2006).

2.3.3. Tamanho da partícula

Partículas porosas com diâmetros altos possuem poros profundos. A entrada e saída das moléculas dentro dos poros é mais demorada quanto maior a profundidade do poro, por outro lado as moléculas na fase móvel migram mais rapidamente através da coluna o que acarreta alargamento do pico.

A busca por separações cada vez mais rápidas resultou no desenvolvimento da CLAE. A rapidez nas separações pode ser conseguida pela diminuição no volume da coluna e aumento da vazão, porém perde-se eficiência na separação. Com o desenvolvimento de partículas menores pode-se empregar colunas com menores comprimentos sem comprometimento da eficiência, porém a diminuição do tamanho da partícula se limita pelo aumento da pressão do sistema. A equação de van Deemter (Equação 1) mostra a relação entre a altura do prato teórico (H), velocidade linear média da fase móvel (μ), tamanho da

partícula (d_p), coeficiente de difusão do soluto na fase móvel (D_M) e coeficiente de difusão do soluto na fase estacionária (D_S):

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\delta D_M}{\mu} + \frac{8}{\pi^2} \times \frac{k d^2 f \mu}{(1+k)^2 D_S} \quad (\text{Equação 1})$$

Partículas menores que 2 μ m ocasionam separações muito rápidas e eficientes, mas a elevação na pressão de operação desencadeou o desenvolvimento de um sistemas como algumas modificações como: capacidade de trabalhar a pressões muito altas (100 MPa), volumes internos muito menores (conexões, alça de amostragem, cela do detector, bombas), celas do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, melhoramento no sistema de controle e de dados, colunas resistentes para trabalharem a altas pressões e com baixo volume morto, injetores com precisão na faixa de volumes pequenos (MALDANER & JARDIM, 2009). Com o desenvolvimento deste novo sistema surgiu um novo conceito de CLAE que utiliza alta pressão.

2.3.4. Estrutura da partícula

2.3.4.1. Não porosas

As partículas não porosas oferecem uma cromatografia rápida e sem perda de eficiência, pois não há difusão do analito e da fase móvel nos poros, o que também acarreta menor pressão. Porém, a capacidade de amostra é muito pequena, a retenção do analito é baixa e seu uso necessita de equipamentos que possuam volumes extracoluna baixos. Por estes fatores são usadas em separações de macromoléculas, pois estas possuem lenta difusão na fase móvel. Estas partículas oferecem menor resistência à transferência de massa, facilitando o uso de uma faixa ampla de vazões de fase móvel, sem perda de desempenho cromatográfico e são mais resistentes e estáveis às altas pressões e temperaturas. Colunas recheadas com partículas esféricas não porosas de 1,5 μ m chegam a alcançar 30000 pratos/15cm (FEKETE *et al.*, 2012).

2.3.4.2. Totalmente porosa

Partículas totalmente porosas são as mais utilizadas em CLAE. Oferecem vantagens, como alta capacidade de amostra, eficiência, durabilidade e disponibilidade. A diminuição

destas partículas diminui a profundidade dos poros, aumentando a eficiência, uma vez que diminui o alargamento do pico cromatográfico, porém esta vantagem ocorre em detrimento do aumento da pressão (COLLINS *et al.*, 2006).

Colunas recheadas com partículas esféricas porosas de 2,5 μm podem alcançar 25000 pratos/15 cm. Estas mesmas partículas com diâmetro de 1,7 μm alcançam 30000 pratos/15 cm, porém, necessitam de uma instrumentação mais sofisticada para serem empregadas com o máximo de desempenho cromatográfico (FEKETE *et al.*, 2012).

2.3.4.3. Peculiar (Core Shell)

O conceito de partículas sólidas não porosas recobertas com uma camada de material poroso (Figura 2) foi introduzido por Horváth por volta de 1960 usando partículas de 50 μm . Ao longo dos anos, seguindo a tendência, o diâmetro destas partículas diminuiu. Este tipo de partícula inicialmente foi utilizada para separação de proteínas (LANÇAS, 2009). Atualmente, seu emprego tem aumentado e muitos estudos mostram vantagens de sua utilização em relação às partículas totalmente porosas de diâmetro reduzido, como menor pressão e maior eficiência, o volume extracolumna deve ser baixo, para evitar alargamento dos picos (FEKETE *et al.*, 2012).

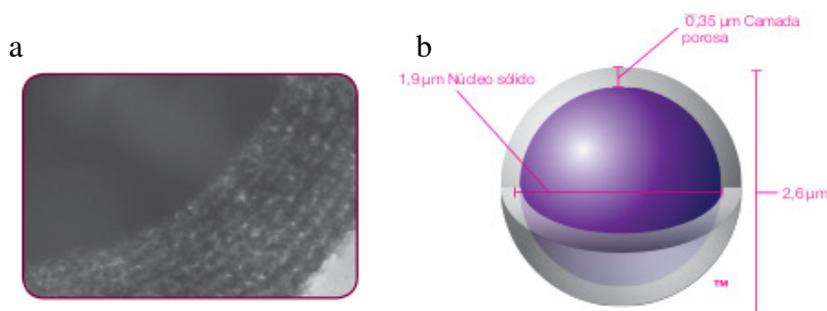


Figura 2. Vista em corte de partícula *core shell* (a) e esquema de uma partícula de 2,6 μm (b) (adaptado de PHENOMENEX, 2013)

Nas partículas peculiares, por não serem totalmente porosas, o tempo gasto para difusão dos analitos ao entrarem e saírem dos poros é menor quando comparado à partículas totalmente porosas. Este caminho mais curto permite uma rápida transferência de massa, o resultado é uma largura menor dos picos e eficiência comparável ou melhor do que as partículas de sub-2 μm totalmente porosas (PHENOMENEX, 2013).

2.3.5. Cromatografia aplicada à separação de flavonoides

Os principais métodos químicos adotados no isolamento de flavonoides envolvem a cromatografia em coluna ou em papel, mas em geral, são métodos demorados e as frações coletadas nem sempre são puras. Já em escala analítica, a cromatografia líquida de alta eficiência é a mais utilizada. Sua maior vantagem em relação a outros métodos cromatográficos, é que oferece alta resolução e análise quantitativa sensível em uma única operação (HARBORNE & WILLIAM, 2000).

Em CLAE o preparo da amostra é muito importante. Para flavonoides as principais formas de preparo da amostra envolvem a extração clássica com metanol e água e a extração em fase sólida (MOLNÁR-PERL & FÜZFAI, 2005; RIJKE *et al.*, 2006).

A extração de flavonoides para análises quantitativas é empregada utilizando-se mistura de metanol e água tanto para extração de agliconas quanto flavonoides glicosilados dependendo do tempo e temperaturas empregados. Amostras líquidas têm sido purificadas utilizando extração em fase sólida com C₁₈ como fase estacionária. A solução da amostra é normalmente acidificada para prevenir a ionização do flavonoide, o que reduziria sua retenção (RIJKE *et al.*, 2006).

A hidrólise do extrato é realizada quando se interessa apenas pelos flavonoides em suas formas agliconas, sendo uma ferramenta para simplificação do cromatograma. Com o processo de hidrólise perdem-se informações como estrutura e posição do açúcar ligado. Em geral é realizada em metanol e água com ácido clorídrico 2M com refluxo à 90°C e dura de 1 à 4h, com ou sem uso de antioxidante, por exemplo BHT (*butylated hydroxytoluene*). Mas hidrólise enzimática com β-glicosidase também é empregada (RIJKE *et al.*, 2006; MOLNÁR-PERL & FÜZFAI, 2005).

O isolamento de flavonoide a partir de amostras sólidas quando o objetivo é a obtenção dos flavonoides separados individualmente com pureza e quantidades suficientes para propósitos de identificação, em geral é um processo demorado e trabalhoso (MOLNÁR-PERL & FÜZFAI, 2005). Quando não se dispõe de equipamentos de CLAE em escala preparativa (coluna com diâmetro interno maior que 10mm), este processo é realizado por cromatografia líquida clássica (em coluna aberta), sendo bastante empregados como fase estacionária sílica gel ou sephadex LH 20, um hidroxipropil derivado de dextrana com ligações cruzadas que

pode ser usado com solventes orgânicos polares ou misturas aquosas contendo estes solventes (COLLINS *et al.*, 2006).

A CLAE em escala preparativa é um dos métodos mais usados para obtenção de flavonoides isolados. Artigos recentes têm empregado a cromatografia em contra corrente tanto em escala analítica quanto preparativa na separação de flavonoides (DUO-LONG *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2008; VALLS *et al.*, 2009). Estes métodos são eficientes e rápidos quando comparados à cromatografia líquida clássica, mas apresentam um custo inicial bastante elevado com a compra de equipamentos.

A CLAE em escala analítica é empregada na separação utilizando colunas de fase reversa (C₁₈) e gradiente de eluição de metanol e água ou acetonitrila e água. A associação à um detector de arranjo de diodos (DAD) serve como uma ferramenta na identificação, pois a análise da curva de absorção do espectro de ultravioleta fornece informações sobre o tipo de flavonoide. O acoplamento com um espectrômetro de massas (EM) fornece um espectro informativo quanto à massa molecular do flavonoide e muitas vezes outras informações sobre a estrutura de acordo com a interpretação dos fragmentos. Mas na maioria das vezes os espectros de massas e ultravioleta não são suficientes para uma conclusão inequívoca sobre a estrutura, sendo necessário o auxílio dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) que fornece informações importantes para a distinção entre isômeros.

Com base nas características espectrais dos flavonoides, sua identificação e quantificação aplicando sistemas de CLAE-DAD são bastante empregados e mostraram seletividade. CLAE acoplado a diversos tipos de detectores de massas são um método de escolha em particular para propósitos de identificação, e menos aplicados na quantificação. Molnár-Perl e Füzfai (2005) revisaram vinte e quatro artigos que utilizaram EM e apenas seis apresentaram resultados de recuperação ou reprodutibilidade.

O uso de equipamentos CLAE-RMN em série tem atraído atenção especial dos químicos de produtos naturais. As principais vantagens são o alto conteúdo de informação, diferenciação de isômeros e padrões de substituição. Algumas desvantagens são o alto custo da instrumentação, uso de solventes deuterados, longos tempos de corrida, baixa sensibilidade (WOLFENDER *et al.*, 2003; WILSON & BRINKMAN, 2003). De qualquer forma, para elucidação estrutural de um novo produto natural, o isolamento preparativo ainda é necessário porque no CLAE-RMN parte da região espectral é perdida e na maioria dos casos CLAE-RMN não fornece o espectro indispensável de ¹³C (WILSON & BRINKMAN, 2003). Na maioria das publicações o modo de fluxo parado é usado para disponibilizar tempos de

aquisição do espectro muito longos entre 1h e alguns dias por pico cromatográfico. Uma alternativa é o uso de fluxos muito baixos, um estudo de flavonoides das raízes *Erythrina vogelii* usando o fluxo de 0,1 mL/min foram identificadas isoflavonas preniladas e isoflavanonas. Neste estudo a massa foi adquirida por CLAE-EM (QUEIROZ *et al.*, 2002).

2.4. Métodos de identificação de flavonoides

2.4.1. Absorção no ultravioleta e visível (UV-Vis)

O espectro de UV-Vis de flavonoides normalmente consiste de duas bandas de absorção, a banda I associada à absorção de um sistema cinamoil e a banda II associada à absorção de um sistema benzoil (Figura 3).

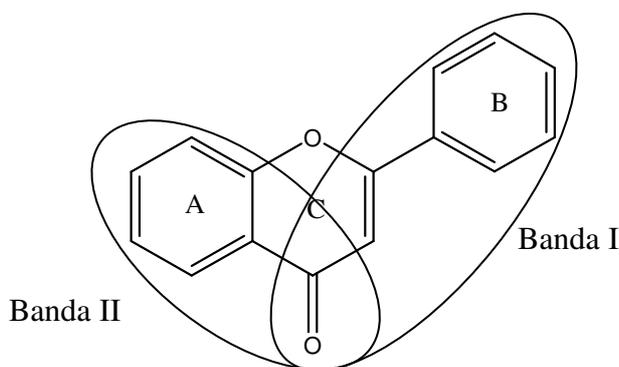
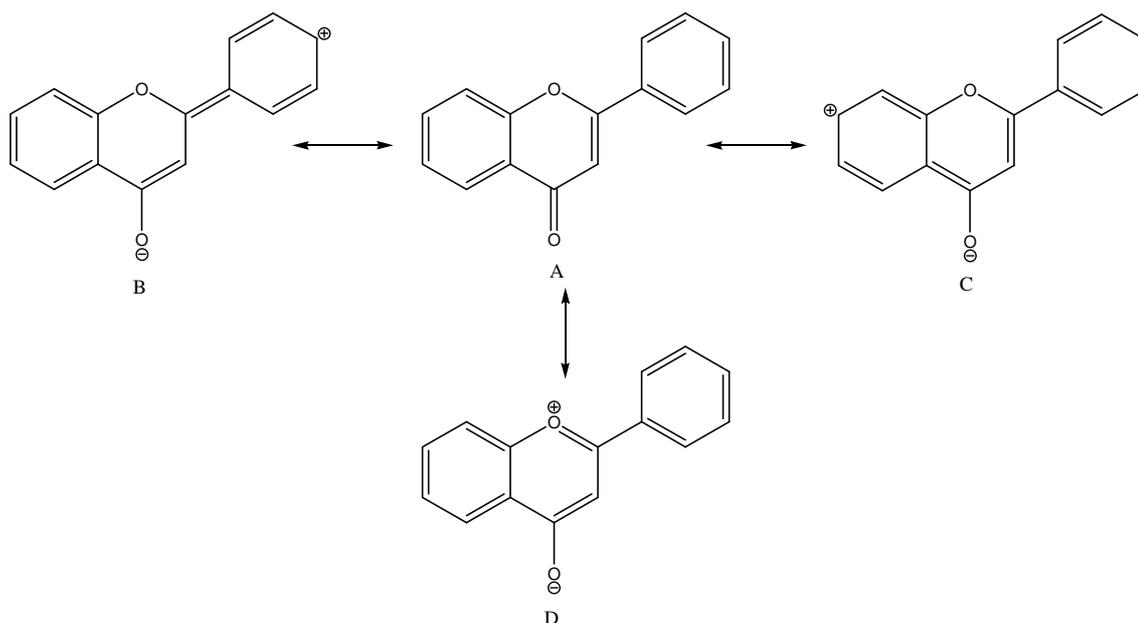


Figura 3. Bandas de absorção dos flavonoides no UV-Vis

A contribuição relativa das estruturas canônicas A, B, C e D influencia a posição e intensidade das bandas no espectro de UV (Esquema 5). Da mesma forma o grau e a posição de funções oxigenadas também influenciam no espectro de UV (BRAZ-FILHO, 1971)



Esquema 5. Estruturas canônicas que contribuem para absorção das flavonas no UV-Vis (BRAZ-FILHO, 1971)

As flavonas exibem absorção da banda I entre 300 e 350nm, enquanto flavonóis absorvem entre 350 e 390. A absorção da banda II para ambos ocorre entre 240 e 280nm em metanol. Em geral a banda I é mais intensa que a banda II, porém em casos de oxigenação do anel A e nenhuma substituição do anel B ocorre o inverso. Conforme aumenta a oxigenação do anel B ocorre deslocamento batocrômico da banda I. A presença de hidroxila na posição 5 de flavonas e flavonóis apresenta efeito batocrômico na banda II (Tabela 1), isso ocorre pela presença de ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico e a o hidrogênio da hidroxila na posição 5.

Tabela 1. Efeito da oxigenação dos anéis A e B em flavonas e flavonóis

Flavona/Flavonol	Posição hidroxilada		Banda I (nm)	Banda II (nm)	Ref.
	Anel A	Anel B			
Apigenina	7,5	4'	336	267	ĐORĐEVIĆ <i>et al.</i> , 2000
Luteolina	7,5	3',4'	349	253,267	ĐORĐEVIĆ <i>et al.</i> , 2000
3',4', 5',5,7-pentaidroxiflavona	7,5	3',4',5'	362	271	LAMER <i>et al.</i> , 1968
4',7-diidroxiflavona	7	4'	329	225	BICKOFF <i>et al.</i> , 1965
3',4', 7-triidroxiflavona	7	3',4'	316, 344	235	WU <i>et al.</i> , 2008
Kaempferol	3,5,7	4'	367	265	SIKORSKA & MATLAWSKA <i>et al.</i> , 2001
Quercetina	3,5,7	3',4'	375	259	SIKORSKA & MATLAWSKA <i>et al.</i> , 2001

Ao contrário do que ocorre com flavonas e flavonóis a banda mais intensa e mais informativa no espectro de UV de isoflavonas, flavanonas e diidroflavonóis é a banda II. Nas isoflavonas não há contribuição do grupo cinamoil (Esquema 5, estrutura canônica A) diminuindo a intensidade da absorção da banda I. A absorção da banda II de isoflavonas aparece em 240 à 270nm. Com o aumento da oxigenação do anel A ocorre deslocamento batocrômico da banda II (Tabela 2). Similarmente às flavonas e flavonóis, com a hidroxilação do C-5 ocorre deslocamento batocrômico na banda II.

Tabela 2. Efeito da oxigenação do anel A em isoflavonas

Isoflavona	Posição oxidada		Banda II (nm)	Ref.
	Anel A	Anel B		
Daidzeína	7	4'	249	MURPHY <i>et al.</i> , 2002
Gliciteína	6,7	4'	256	MURPHY <i>et al.</i> , 2002
Genisteína	5,7	4'	263	MURPHY <i>et al.</i> , 2002

Devido a ausência da dupla ligação entre C-2 e C-3 em flavanonas e diidroflavonóis, não há contribuição do grupo cinamoil (Esquema 5, estrutura canônica A) para a absorção no espectro de UV, por isso apresentam absorção da banda II (entre 240 e 300nm) mais intensa que a banda I. A hidroxila na posição 3 no diidroflavonol não ocasiona diferença significativa no espectro de UV. De forma similar aos demais flavonoides, a presença hidroxila na posição 5 causa deslocamento batocrômico da banda II (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da oxigenação dos anéis A e B em flavanonas e diidroflavonóis

Flavanona/Diidroflavonol	Posição hidroxilada		Banda I (nm)	Banda II (nm)	Ref.
	Anel A	Anel B			
Naringenina	5,7	4'	326	289	REISCH <i>et al.</i> , 1984
Liquiritigenina	7	4'	313	274	MESSENS <i>et al.</i> , 1991
Diidrokaempferol	5,7	4'	329	290	REISCH <i>et al.</i> , 1984

Os espectros de UV de chalconas e auronas são diferenciados dos demais flavonoides. Com a ausência do anel C não há conjugação do grupo hidroxil com o grupo carbonil (Esquema 5, estrutura canônica D) aumentando a contribuição do grupo cinamoil acarretando um desvio batocrômico no espectro de UV das chalconas e aurona em relação ao das flavonas e flavonóis. Apresentam uma intensa banda I e a uma banda II bastante fraca. A banda I das

chalconas apresenta absorção entre 340 e 390nm. Nas auronas a banda I apresenta absorção entre 370 e 430nm. Na região de 220 à 270 ocorre a absorção da banda II com intensidade baixa.

2.4.2. Espectrometria de massas (EM)

A IEN (ionização por elétron nebulização) é uma interface que permite a ionização de amostras em solução, ao contrário da fonte de ionização clássica, a IE (impacto de elétrons) onde somente é possível a ionização de amostras previamente volatizadas. A IEN transfere moléculas polares de alta ou baixa massa molecular de uma solução diretamente para fase gasosa. O conceito de IEN foi desenvolvido por Dole (DOLE et al.,1968), mas foi Fenn quem desenvolveu a fonte IEN e demonstrou sua aplicabilidade (YAMASHITA & FENN, 1984; FENN et al., 1989). É um processo de ionização branda, geralmente moléculas de 600Da são observadas em sua forma monocarregada. Íons multicarregados podem ser observados em moléculas maiores. Por ser compatível com os solventes normalmente usados em CLAE é usado como interface entre as separações por CLAE e as identificações por espectrometria de massas.

No processo de formação de íons por IEN as gotículas carregadas da amostra saem do capilar formando um spray que gera gotas carregadas, e destas formam-se os íons. As gotículas carregadas com várias cargas sofrem a aplicação de uma alta tensão e a evaporação do solvente com auxílio de um fluxo de gás (N_2) e aquecimento. Com a redução no tamanho das gotículas ocorre o aumento da densidade de carga e conseqüentemente a repulsão entre as cargas. Quando a repulsão entre as cargas é maior que a tensão superficial as gotículas se desintegram em gotículas ainda menores. Este é repetido até que o solvente seja totalmente evaporado, restando somente os íons da amostra (COLE, 1997). Para favorecer a formação dos íons normalmente é usado um modificador à solução. Para a protonação de moléculas básicas normalmente usa-se 0,1% de ácido fórmico, facilitando a formação de íons $[M+H]^+$ e detectando-se moléculas carregadas positivamente. Por outro lado, para a desprotonação de moléculas ácidas usa-se 0,1% de hidróxido de amônio, facilitando a formação de $[M+H]^-$ e detectando-se moléculas carregadas negativamente.

Os espectrômetros de massas híbridos do tipo quadrupolo tempo de voo (Q-TOF MS) (Figura 4), são arrançados de forma que dois analisadores de massa são colocados em seqüência, um do tipo quadrupolo (Q) e outro por tempo de voo (TOF), com uma célula de

colisão entre eles (LI *et al.*, 2007). Denomina-se este tipo de experimento como massa em série (EM/EM). Numa primeira etapa, os íons são selecionados no quadropolo (Q), constituído de quatro barras paralelas por onde os íons se movem oscilando, devido à aplicação de voltagem, possibilitando a inversão de polaridade entre as barras. A variação das voltagens ocorre de maneira a se realizar uma varredura na faixa de razão massa carga (m/z) desejada. Com isso, o quadropolo passa a atuar como um filtro de massas, permitindo que apenas os íons que apresentam estabilidade neste campo sejam selecionados. Estes íons são, então, introduzidos na célula de colisão com um gás inerte (argônio ou nitrogênio) onde ocorre a fragmentação. Finalmente, os fragmentos são analisados no analisador de massas por tempo de voo (TOF). No analisador TOF, os íons submetidos a uma diferença de potencial são levados, com alta energia cinética, por um tubo de tamanho específico. Assim, o analisador TOF utiliza o tempo em que íons de diferentes razões massa carga (m/z) levam para atravessar o tubo. Como energia cinética é dada pela relação direta entre a massa e o quadrado da velocidade os íons mais leves terão um tempo de voo mais rápido do que os pesados. Utilizando a equação da energia cinética (K), onde v é a velocidade do íon, é possível calcular a massa molar do composto (m) (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). O analisador TOF tem uma aceleração ortogonal e dupla reflexão geométrica que oferece alta resolução e capacidade de massa acurada. Ele pode ser operado no modo V, que oferece maior faixa de razão massa carga, ou no modo W, que oferece maior resolução (WATERS, 2008).

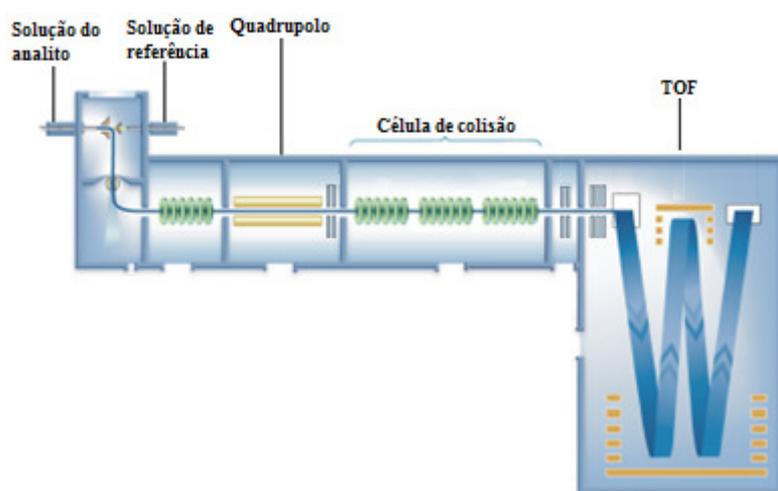


Figura 4. Espectrômetro de massa Q-TOF (adaptado de WATERS, 2008)

A aplicação da espectrometria de massas na elucidação estrutural de flavonoides tem aumentado com o desenvolvimento das fontes de ionização brandas, dos analisadores e do acoplamento de técnicas de separação à espectrometria de massas. A massa molecular do analito e dos fragmentos, principalmente a massa exata, é uma importante ferramenta na determinação estrutural dos flavonoides. Além disso, outras informações podem ser extraídas do espectro de massas com a interpretação dos fragmentos gerados.

A massa molecular do flavonoide mais uma unidade de massa, no caso do flavonoide protonado, geralmente aparece como íons de maior massa no espectro, porém muitas vezes pode ser observada a massa do flavonoide mais vinte e três ou trinta e nove unidades de massa, quando ocorre a complexação do flavonoide com sódio ou potássio, respectivamente.

Devido à baixa concentração dos flavonoides nas matrizes vegetais e a alta sensibilidade dos espectrômetros de massas modernos, muitos artigos tem usado a espectrometria de massas como informação complementar para a determinação estrutural destes compostos. (AGRAWAL, 1989).

2.4.3. Ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma forma de espectrometria de absorção. Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radio frequência em função das características da molécula (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). Atualmente a ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta para os químicos de produtos naturais, pois os espectros obtidos de compostos orgânicos são muito informativos na elucidação estrutural de substâncias.

A espectroscopia de RMN, desde 1946 com os primeiros artigos, emergiu como uma das técnicas mais indispensável para o estudo da estrutura molecular de substâncias. O RMN ^1H tem sido largamente empregada na elucidação estrutural de flavonoides. O deslocamento químico do próton estabelece a natureza do hidrogênio e a constante de acoplamento determina a presença de hidrogênio *orto*, *meta* ou vicinal (AGRAWAL, 1989).

A Tabela 4 apresenta os deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios nas posições 2, 3 e 4 de cada tipo de núcleo de flavonoídico.

Tabela 4. Deslocamento químico de RMN ¹H e ¹³C das subclasses dos flavonoides (adaptado de ANDERSEN & MARKHAN, 2006; AGRAWAL, 1989)

	2/β/10		3/α		4	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
Flavanona	71-80	5,3-5,7	39-47	2,6-2,7; 3,0-3,2	186-199	-
Flavona	157-166	-	102-114	6,6-7,0	175-184	-
Flavonol	140-152	-	133-140	-	171-178	-
Diidroflavonol	78-86	4,6-5,1	71-74	4,5-5,0	186-199	-
Chalcona	136-147	7,0-7,9	116-129	6,6-7,5	187-197	-
Aurona	104-122	6,5-7,5	145-149	-	178-186	-
Isoflavona	150-156	7,9-8,2	122-126	-	174-181	-

Algumas vezes os estudos espectroscópicos de UV, EM e RMN¹H não são suficientes para estabelecer a estrutura, em geral pela dificuldade de distinção entre isômeros. Baseado no espectro de RMN ¹H, a estrutura de uma nova flavona foi identificada como 5,6'-diidroxiflavona. A proposta da estrutura foi questionada quando o espectro de RMN ¹³C foi analisado a partir da mesma estrutura sintetizada. O deslocamento químico dos carbonos das metoxilas deveriam ser três sinais em 59-60ppm e dois em 55-56ppm, mas isso não foi observado. A estrutura correta atribuída foi a 5,6'-diidroxiflavona (AGRAWAL, 1989).

2.5. *Glycine max* (L.) Merrill. (Soja)

O gênero *Glycine* Willd. (Família *Leguminosae*) é subdividido em três subgêneros: *Soja*, *Glycine* e *Bracteata*. A soja cultivada, *G. max* (L.) Merrill e seu ancestral *G. ussuriensis* Regel & Maack, juntos constituem o subgênero *Soja*. O subgênero *Glycine* é formado pelas espécies *G. canescens* F.J. Herm., *G. clandestina* Wendl., *G. falcata* Benth., *G. latrobaena* (Meissn.) Benth., *G. tabacina* (Labill.) Benth. e *G. tomentella* Hayata e o subgênero *Bracteata* é constituído pela espécie *G. wightii* (MIYAKASA, 1981).

A soja (*Glycine max*) é a planta economicamente mais importante do gênero, Dentre os vários componentes da soja, as isoflavonas têm recebido atenção especial, pois além de possuírem atividade antioxidante (BARBOSA *et al.* 2011) podem funcionar como moduladores hormonais naturais (LIU *et al.*, 2010) por possuírem similaridades funcionais ao

estrogênio humano 17- β -estradiol (MESSINA *et al.*, 2009). Ambos possuem uma hidroxila ligada ao anel aromático e outra hidroxila a uma distância idêntica da primeira (WUTTKE *et al.*, 2007). Além de isoflavonas já foi verificada a presença de flavonóis e de cumestrol na soja. Em resposta à estresse químico ou patogênico a soja, biossintetiza fitoalexinas, como as isoflavonas preniladas, que apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana (CHENG *et al.*, 2011), e os gliceolins, cuja potencial atividade antiestrogênica vem sendo estudada (ZIMMERMANN *et al.*, 2010, WOOD, *et al.* 2006).

Como a soja, as demais espécies do gênero *Glycine* também foi verificada a produção gliceolins em resposta à agentes patogênicos (inoculação com *Pseudomonas syringae*) (KEEN, *et al.* 1986). Outra similaridade foi a presença de isoflavonas e flavonóis.

Um membro do gênero *Glycine* que merece destaque é a *G. tomentella*, pois o extrato aquoso de suas raízes apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica em ratos (LU, *et al.* 2007). Sendo o principal flavonóide encontrado, a daidzina, porém esta isoladamente ainda não foi testada (LIN *et al.* 2010).

É importante ressaltar que o perfil flavonoídico das plantas do gênero *Glycine* é similar, o que nos leva a crer que algumas atividades biológicas encontradas na soja podem ser encontradas nas demais plantas do gênero, porém estudos sobre tais espécies são escassos. A Figura 5 apresenta os principais flavonoides isolados das espécies do gênero *Glycine*.

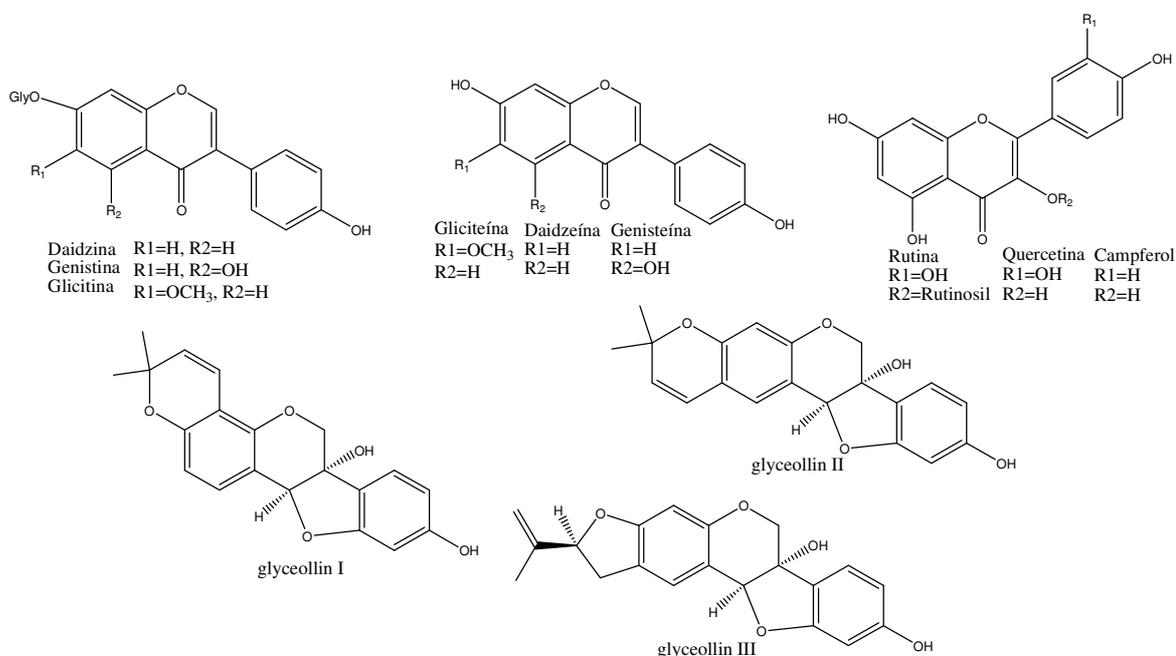


Figura 5. Principais flavonoides isolados das espécies do gênero *Glycine*

Os grãos da espécie *Glycine max* (Soja) são considerados um alimento funcional e seu consumo ou de produtos derivados tem aumentado nos últimos anos. Da família das leguminosas, seus grãos são uma fonte de proteína vegetal que possuem todos os aminoácidos essenciais, além de ser fonte de vitaminas, minerais, fibras e ácidos graxos poliinsaturados (SANCHES *et al.*, 2010). Estudos epidemiológicos demonstram uma maior incidência de alguns tipos de câncer, como mama e próstata e doenças cardiovasculares nas populações ocidentais expostas a quantidades limitadas de soja na dieta. Segundo MESSINA *et al.* (2009) o consumo de soja está associado à redução de risco de doenças como câncer de próstata, mama e outras formas de câncer hormônio dependentes. Além de melhora no sistema cardiovascular identificado por HASLER (2002).

As isoflavonas da soja e derivados são de três tipos em suas formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) e β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina) (Figura 2). Além dos derivados glicosilados acetilados (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina); e glicosilados malonilados (6''-O-malonildaizina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina). A concentração destas formas varia nos grãos de soja e produtos derivados em função do cultivar, região geográfica, práticas agronômicas, condições ambientais e processamento (KIRAKOSYAN *et al.*, 2006; CARRÃO-PANIZZI *et al.*, 2009; GENOVESE & LAJOLO, 2002). Nos grãos de soja e em alimentos não fermentados é verificada uma maior concentração das formas glicosídicas. Os alimentos fermentados possuem um teor mais elevado das formas agliconas (GENOVESE & LAJOLO, 2002). Os derivados malonilados podem ser convertidos em suas formas glicosídicas durante aquecimento no processamento do extrato de soja (BARNES *et al.*, 1994; GENOVESE & LAJOLO, 2002).

Alguns métodos para determinação de isoflavonas de soja usam uma etapa de hidrólise parcial (básica) para conversão dos derivados glicosilados acetilados e malonilados em suas formas β -glicosídicas, este método foi publicado pela AOAC (2005). Outros métodos usam a hidrólise total (ácida) levando os derivados β -glicosídeos em suas formas agliconas (HARON *et al.*, 2009). E ainda existem métodos quem não utilizam hidrólise parcial ou total (MURPHY *et al.*, 2002). SHAO e colaboradores (2011) compararam os métodos com hidrólise e por injeção direta do extrato (sem hidrólise) e avaliaram que não houve diferença significativa no teor de isoflavonas totais, portanto a utilização de cada método depende do interesse do estudo.

Para a análise de isoflavonas em alimentos a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ultravioleta e/ou espectro de massas é largamente utilizada (KLEJDUS *et al.*, 2005). Porém o método oficial descrito na literatura leva em média 45 minutos (AOAC, 2005), demandando tempo e gasto excessivo de solventes.

A aquisição de padrões de isoflavonas comerciais com certificado de garantia quase sempre depende de importação e apresenta custos elevados. Além disso, o tempo consumido na transição envolvendo a compra, a remessa e a chegada do material ao seu destino, pode ocasionar degradação. A pequena quantidade geralmente comprada restringe a possibilidade de análises para confirmação da pureza do material.

2.6. *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Cumaru)

O gênero *Dipteryx* Shreber (Família *Leguminosae*) é constituído pelas espécies *Dipteryx alata* Vogel, *Dipteryx lacunifera* Ducke, *Dipteryx magnifica* (Ducke) Ducke, *Dipteryx micrantha* Harms, *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., *Dipteryx oleifera* Benth., *Dipteryx polyphylla* Huber, *Dipteryx punctata* (S.F.Blake)Amshoff e *Dipteryx rosea* Benth. A espécie *Dipteryx odorata* (*Coumarouna odorata* Aubl.) é conhecida vulgarmente no Brasil como cumaru, cumaru-ferro, cumaru verdadeiro, cumaru-roxo, cumbari ou serrapia e seu nome comercial internacional é tonka. Esta espécie é nativa no Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Honduras, Bolívia e Venezuela (CARVALHO, 2009).

As sementes (castanhas) do cumaru possuem grande demanda no mercado internacional. Devido à presença de cumarina é empregada na indústria de perfumaria, cosméticos e cigarros. Possui madeira de qualidade para utilização na construção civil e em dormentes. Popularmente, as sementes são usadas como um tipo de remédio fitoterápico, com propriedades anestésicas, que auxilia no tratamento de problemas respiratórios e cardíacos, além de combater vermes, incluindo-se amebíase. O óleo da amêndoa pode ser usado diretamente em úlcera bucal, otite, problemas no couro cabeludo e na formulação de veneno para ratos, devido sua capacidade de inibir a coagulação do sangue (CARVALHO, 2009).

A cumarina foi isolada pela primeira vez por Vogel em 1820, de frutos de *Dipteryx odorata* (SULLIVAN, 1982), outros compostos já isolados desta espécie incluem isoflavonóides, auronóides, chalconóides e diterpenóides. Da espécie *Dipteryx lacunifera* já forma isolados diterpenóides, sesquiterpenóides, ácidos graxos e flavonóides e de *Dipteryx alata* triterpenóides, isoflavonóides e auronas (PUEBLA *et al.*, 2010).

O extrato de *Dipteryx alata* apresentou atividade contra o veneno de *Bothrops jararacussu*. Os flavonoides identificados no extrato foram: 8-metoxiretusina, 7-hidroxi-5,6,4'-trimetoxisoflavona, afrormosina, 7-hidroxi-8,3',4'-trimetoxisoflavona, 7,3'-diidroxio-8,4'-dimetoxisoflavona, odoratina, 7,8,3'-triidroxio-4'-metoxisoflavona, 7,8,3'-triidroxio-6,4'-dimetoxisoflavona, dipterixina, isoliquiritigenina, sulfuretina (PUEBLA *et al.*, 2010).

Dos frutos de *Dipteryx lacunifera* foram isolados eriodictiol, butina, buteína, luteolina, sulfuretina e 3',4',7-triidroxiflavona (JUNIOR *et al.*, 2008)

Hayashi and Thomson, em 1974, isolaram cinco isoflavonas do cerne de *Dipteryx odorata* incluindo retusina, 8-metoxiretusina, 3'-hidroxio-8-metoxiretusina, odoratina e dipterixina (SULLIVAN, 1982).

Os compostos 5-metoxiantocercina A, isoliquiritigenina, 6,4'-diidroxio-3'-metoxiaurona, sulfuretina, butina, eriodictiol e 7,3'-diidroxio-8,4'-dimetoxisoflavona, foram isolados do extrato dos frutos de *Dipteryx odorata*. Destes compostos a isoliquiritigenina apresentou potencial preventivo contra de câncer de mama em ratos (JANG *et al.*, 2003).

Januário e colaboradores (2005) isolaram duas isoflavonas do caule de *Dipteryx odorata*, afrormosina e odoratina, destas a afrormosina apresentou efeito contra gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. A Figura 6 apresenta os principais flavonoides já isolados das espécies do gênero *Dipteryx* Shreber.

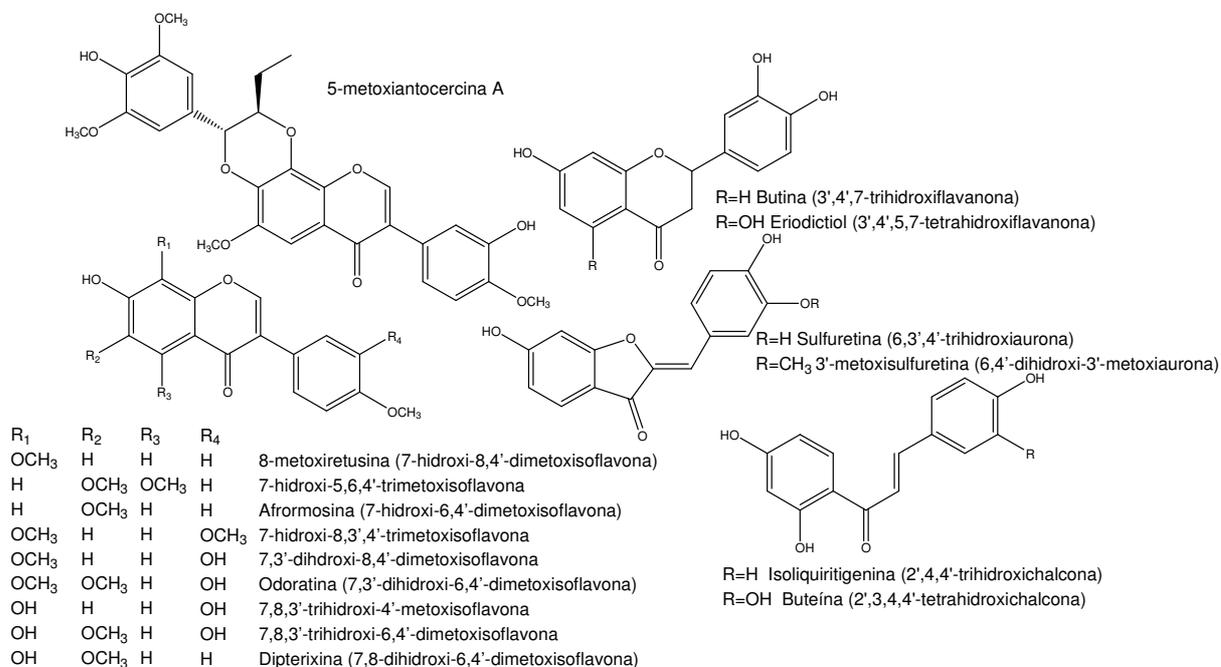


Figura 6. Principais flavonoides isolados das espécies do gênero *Dipteryx*

O uso do cumaru popularmente como planta medicinal e os resultados preliminares sobre algumas atividades biológicas do extrato da planta mostram a importância do estudo dos constituintes desta espécie.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e solventes

Os solventes e reagentes utilizados foram: água milli-Q; ácido acético glacial grau HPLC/Spectro (Tedia, 99%); metanol grau HPLC/Spectro (Tedia, 99%); acetonitrila grau HPLC/Spectro (Tedia, 99%); éter de petróleo grau GC (Tedia, 90-100%); hidróxido de sódio PA (Vetec, 97%); ácido clorídrico PA (Tedia, 37%); *n*-hexano grau ACS (Tedia, 95%); diclorometano grau ACS (Tedia, 99%); acetato de etila grau ACS (Tedia, 99%); piridina grau ACS (Tedia, 99%); anidrido acético grau ACS (Tedia, 94%); clorofórmio grau ACS (Tedia, 98%); bicarbonato de sódio PA (Vetec, 99%); éter etílico grau CG (Tedia, 99%); hidróxido de potássio PA (Vetec, 85%).

3.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: agitador magnético com aquecimento (NT103, Nova técnica); balança analítica com resolução 0,0001g (AY220, Marte); banho-maria com agitação (929, GyromaxTM); centrífuga (Hsiangtai); cromatógrafo líquido com forno para colunas e injetor automático (Alliance[®] 2695, Waters); coluna C₁₈ (YMC-Pack ODS-AM303, 250mmx4,5mm, 5µm); coluna C₁₈ (Phenomenex Kinetex, 50mmx2,1mm, 2,6µm); coluna C₁₈ (Thermo BDS Hypersil, 100mmx4,6mm, 2,4µm); detector de arranjo de fotodiodos UV/Vis (2996, Waters); sistema de aquisição de dados software Empower; válvula seletora motorizada de 14 portas e 6 posições (RV500-104/550-104, Rheodyne[®]); sistema de purificação de água Milli-Q (A10, Milipore); vórtex; rotaevaporador; ultra turrax (T 25, Ika-Werke); cromatógrafo líquido de ultra eficiência com forno e injetor automáticos (ACQUITYTM Ultraperformance LC, Waters); espectrômetro de massas Q-TOF (SYNAPT mass spectrometry, Waters); coluna C₁₈ (ACQUITY UPLC[®] BEH 150mmx2,1mm, 1,7µm); espectrômetro de ressonância magnética nuclear 400 e 500 MHz (AVANCE, Bruker).

3.3. Preparo das soluções

- Solução de hidróxido de sódio 2M

Pesou-se 8,0g do hidróxido de sódio em becker de 200mL. Adicionou-se cerca de 60mL de água Milli-Q suficiente para solubilizar. Transferiu-se quantitativamente para balão de 100mL e avolumou-se com água Milli-Q e homogeneizou-se com agitação manual.

- Solução de extração metanol:água (80:20)

Mediu-se 800mL de metanol em proveta de 1000mL com tampa e adicionou-se 200mL de água Milli-Q. Homogeneizou-se com agitação manual.

- Solução metanol:água (50:50)

Mediu-se com pipeta automática 2,5mL de metanol e 2,5mL de água Milli-Q colocou-se em recipiente de vidro e homogeneizou-se com agitação manual.

- Água-metanol-ácido acético (88:10:2)

Mediu-se 880mL de água Milli-Q em proveta de 1000mL com tampa, adicionou-se 100mL de metanol e 20mL de ácido acético. Homogeneizou-se com agitação manual.

- Metanol-ácido acético (98:2)

Mediu-se 980mL de metanol em proveta de 1000mL com tampa, e adicionou-se 20mL de ácido acético. Homogeneizou-se com agitação manual.

- Água:ácido acético (98:2)

Mediu-se 980mL de água em proveta de 1000mL com tampa, e adicionou-se 20mL de ácido acético. Homogeneizou-se com agitação manual.

- Acetonitrila:ácido acético (98:2)

Mediu-se 980mL de acetonitrila em proveta de 1000mL com tampa, e adicionou-se 20mL de ácido acético. Homogeneizou-se com agitação manual.

- Ácido fórmico 0,1% (v/v)

Em balão volumétrico de 500mL adicionou-se um pouco de água milli-Q e 500µL de ácido fórmico, em seguida completou-se o volume com água milli-Q. Homogeneizou-se com agitação manual.

- Ácido clorídrico 1M

Colocou-se um pouco de água milli-Q em balão volumétrico de 100mL e adicionou-se 8,3mL de HCl concentrado, completou-se o volume com água milli-Q. Homogeneizou-se com agitação manual.

- Bicarbonato de sódio 5,0% (m/m)

Pesou-se 5,0g de bicarbonato de sódio em béquer, adicionou-se água milli-Q e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100mL, completou-se o volume com água milli-Q. Homogeneizou-se com agitação manual.

3.4. *Glycine max* (L.) Merrill (Soja)

Os grãos de *Glycine max* (L.) Merrill (soja) cultivar BRS 133 (cultivar rico em isoflavonas) foram desenvolvidos e disponibilizados pela Embrapa Soja e armazenados em câmara fria à temperatura de 5°C.

3.4.1. Descascamento e separação do germe da soja

O germe de soja foi selecionado para o isolamento dos padrões, pois neste encontra-se maior concentração de isoflavonas. Inicialmente 1Kg de grãos de soja foram deixados em estufa à 100°C por 5 minutos para rompimento da casca. Em seguidas foram passadas em descascador e o germe separado do cotilédone por peneiramento (Figura 7).



Figura 7. Descascamento da soja (a) e germe peneirado (b)

As cascas foram removidas por fluxo de ar comprimido. Toda massa obtida do germe de soja foi desengordurado através de agitação em ultra turrax (10 minutos) com éter de petróleo e posterior filtração em funil de vidro com placa sinterizada (Figura 8). O produto final foi colocado em dessecador sob vácuo por 48 horas.



Figura 8. Moagem e desengorduramento em ultra turrax (a); germe antes do processo de moagem e desengorduramento (b) e germe moído e desengordurado (c)

3.4.2. Extração de isoflavonas

A extração foi baseada no método da AOAC (2005). Pesou-se de 2,0 a 5,0g do germe moído e desengordurado em erlenmeyer de 125mL com tampa de vidro. Adicionou-se 40mL de solução de extração (metanol:água 80:20). A tampa foi travada com barbante. Os frascos ficaram em banho maria por 2h com agitação mecânica e temperatura de 65°C.

Os frascos foram retirados do banho maria e esfriados a temperatura ambiente. Adicionou-se 3mL de solução de hidróxido de sódio 2M e agitou-se por 10 minutos em agitador mecânico. Em seguida, adicionou-se 1mL de ácido acético glacial e homogeneizou-se. O conteúdo do frasco foi transferido para balão volumétrico de 50mL e avolumou-se com a solução de extração (metanol:água 80:20). A solução foi filtrada em papel quantitativo para becker de 150mL. Pipetou-se 5mL do filtrado e transferiu-se para balão volumétrico de 10mL. Adicionou-se 4mL de água milliQ, avolumou-se com metanol.

Os extratos foram centrifugados por 5 minutos a 11000rpm. Transferiu-se o sobrenadante para vial.

3.4.3. Método cromatográfico convencional para análise de isoflavonas em soja e derivados

A separação cromatográfica convencional (AOAC, 2005) foi realizada em fase reversa, coluna C₁₈ (YMC 250mmx4,6mm, com partícula de 5µm), à 45 °C, com fluxo de 1,3mL/min em modo de eluição gradiente de água:metanol:ácido acético 88:10:2 (Fase A) e metanol:ácido acético 98:2 (Fase B) (Tabela 5), tempo de análise de 40 minutos, o volume de injeção foi 25µL. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 200nm à 400nm, o espectro foi extraído à 260nm.

Tabela 5. Gradiente da Fase A (água:metanol:ácido acético 88:10:2) e Fase B (metanol:ácido acético 98:2) em coluna YMC

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	90	10
30,00	40	60
30,05	0	100
35,00	0	100
35,05	90	10
40,00	90	10

3.4.4. Método cromatográfico – Otimização em colunas alternativas

A separação de isoflavonas para análise de soja e derivados foi otimizada em fase reversa, na Coluna 1 (coluna C₁₈, Phenomenex Kinetex, 50mmx2,1mm e 2,6µm) e na Coluna 2 (coluna C₁₈, Thermo BDS Hypersil, 100mmx4,6mm e 2,4µm). Os cromatogramas obtidos em tais colunas foram comparados à coluna convencional.

3.4.4.1. Condições cromatográficas – Coluna 1

A separação cromatográfica de isoflavonas de extrato de soja foi otimizado na coluna 1 (coluna C₁₈, Phenomenex Kinetex, 50mmx2,1mm e 2,6µm), à 45 °C, com fluxo de 0,35mL/min em modo de eluição gradiente de água:metanol:ácido acético 88:10:2 (Fase A) e metanol:ácido acético 98:2 (Fase B) (Tabela 6), tempo de análise de 10 minutos, o volume de injeção foi 5µL. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 200nm à 400nm, o espectro foi extraído à 260nm.

Tabela 6. Gradiente da Fase A (água:metanol:ácido acético 88:10:2) e Fase B (metanol:ácido acético 98:2) na coluna Phenomenex Kinetex

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	98	2
5,00	60	40
5,50	0	100
7,50	0	100
8,00	98	2
10,00	98	2

3.4.4.2. Condições cromatográficas – Coluna 2

A separação cromatográfica de isoflavonas de extrato de soja foi otimizado na coluna 2 (coluna C₁₈, Thermo BDS Hypersil, 100mmx4,6mm e 2,4µm), à 45°C, com fluxo de 1,3mL/min em modo de eluição gradiente de água:metanol:ácido acético 88:10:2 (Fase A) e metanol:ácido acético 98:2 (Fase B) (Tabela 7), tempo de análise de 10 minutos, o volume de injeção foi 5µL. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 200nm à 400nm, o espectro foi extraído à 260nm.

Tabela 7. Gradiente da Fase A (água:metanol:ácido acético 88:10:2) e Fase B (metanol:ácido acético 98:2) na coluna Thermo BDS Hypersil

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	89	11
2,50	83	17
6,50	40	60
7,50	40	60
8,00	89	11
10,00	89	11

3.4.5. Preparo dos padrões analíticos

3.4.5.1. Hidrólise ácida das isoflavonas glicosídicas

Para o preparo dos padrões das isoflavonas foi realizado o descascamento e separação do germe de soja (vide item 3.4.1). A extração de isoflavonas a partir do germe de soja foi realizada conforme descrito no item 3.4.2 (exceto a diluição do extrato). O extrato foi dividido em duas partes. Uma parte foi hidrolisada com ácido clorídrico 2M sob refluxo à 90°C durante duas horas, para conversão das isoflavonas β-glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina) nas suas formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) (GENOVESE, 2001). O extrato e o hidrolisado foram concentrados separadamente por rotaevaporação. O

hidrolisado foi misturado ao extrato na proporção 2:1, a proporção foi então ajustada afim de se obter um cromatograma do extrato das isoflavonas β -glicosídicas e agliconas com as alturas dos picos próximas.

3.4.5.2. Método cromatográfico para o isolamento das isoflavonas

Para isolamento dos padrões o método convencional para análise de isoflavonas em soja e derivados foi otimizado, afim de diminuir o tempo de análise. A mistura do extrato e hidrolisado foi utilizada para preparo dos padrões analíticos. As isoflavonas foram separadas por CLAE. As condições otimizadas foram: coluna C_{18} (YMC 250x4,6 mm, com partícula de 5 μ m) com temperatura de 45°C, fluxo de 1,3mL/min em modo de eluição gradiente de água:metanol:ácido acético 88:10:2 (Fase A) e metanol:ácido acético 98:2 (Fase B) (Tabela 8), tempo de análise 20 minutos e volume de injeção foi 70 μ L. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 200nm à 400nm, o espectro foi extraído à 260nm.

Tabela 8. Gradiente da Fase A (água:metanol:ácido acético 88:10:2) e Fase B (metanol:ácido acético 98:2) na coluna YMC para isolamento dos padrões

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	88,0	12,0
17,50	40,0	60,0
18,00	88,0	12,0
20,00	88,0	12,0

3.4.6. Cálculo da concentração das isoflavonas isoladas e preparo da solução estoque

As frações (isoflavonas) coletadas e secas foram ressuspensas com 1mL de metanol. Calculou-se a concentração da isoflavona correspondente nestas soluções através da lei de Lambert-Beer. Para as soluções de daidzina, glicitina, genistina e daidzeína em metanol, pipetou-se uma alíquota de 10 μ L e diluiu-se para 1mL com metanol, para as soluções de gliciteína e genisteína, pipetou-se uma alíquota de 20 μ L e diluiu-se para 1mL com metanol. Efetuou-se a leitura da absorvância no espectrofotômetro e esta foi utilizada para o cálculo da concentração da solução conforme a Equação 2.

$$\text{Conc. (mg/mL)} = \frac{\text{ABS} \times \text{MM} \times \text{Dil} \times P}{\epsilon} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde,

ABS= Absorvância;

MM= Massa molecular;

Dil= Fator de diluição (50 - gliciteína e genisteína, 100 - daidzina, glicitina, genistina e daidzeína);

P=Pureza; e

ϵ = Coeficiente de extinção molar.

A pureza das isoflavonas isoladas foi calculada pela porcentagem de área dos picos à 260nm, utilizando o software Empower[®] do equipamento.

O comprimento de onda máximo (λ), a massa molar (MM) e o coeficiente de extinção molar (ϵ) de cada isoflavona são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Comprimento de onda máximo, massa molar, coeficiente de extinção molar para cada isoflavona

	λ (nm)	Massa Molar	Coeficiente de extinção molar (ϵ)
Daidzina	250	416	26830
Glicitina	260	447	26713
Genistina	260	432	30895
Didzeína	250	254	31563
Gliciteína	260	285	25388
Genisteína	260	270	35323

Fonte: MURPHY *et al.*, 2002

Para o preparo da solução estoque pipetou-se alíquotas de cada solução de isoflavona (cuja concentração foi calculada através da equação 2) e diluiu-se para 5mL afim de se obter uma solução na concentração de 32 μ g/mL para daidzina e genistina e 8 μ g/mL para glicitina, daidzeína, gliciteína e genisteína. O volume da alíquota foi calculado conforme a Equação 3:

$$\text{Alíquota } (\mu\text{L}) = \frac{\text{CD} \times \text{V}}{\text{CR}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde,

CD= Concentração desejada;

V= Volume final (5 mL); e

CR= Concentração real (equação 2).

3.4.7. Preparo da curva analítica

A curva analítica foi obtida na faixa de concentração de 1,000 à 32,000 $\mu\text{g/mL}$ para a daidzina e genistina e de 0,250 à 8,000 $\mu\text{g/mL}$ para glicitina, daidzeína, gliciteína e genisteína (Tabela 10), com seis pontos injetados em triplicata.

Tabela 10. Concentração de cada isoflavona em cada ponto da curva analítica

Ponto	Concentração da Isoflavona					
	Daidzina ($\mu\text{g/mL}$)	Glicitina ($\mu\text{g/mL}$)	Genistina ($\mu\text{g/mL}$)	Daidzeína ($\mu\text{g/mL}$)	Gliciteína ($\mu\text{g/mL}$)	Genisteína ($\mu\text{g/mL}$)
1	1,000	0,250	1,000	0,250	0,250	0,250
2	2,000	0,500	2,000	0,500	0,500	0,500
3	4,000	1,000	4,000	1,000	1,000	1,000
4	8,000	2,000	8,000	2,000	2,000	2,000
5	16,000	4,000	16,000	4,000	4,000	4,000
6	32,000	8,000	32,000	8,000	8,000	8,000

Para a obtenção da curva analítica na faixa de concentração desejada (Tabela 10) pipetou-se as alíquotas da solução estoque e diluiu-se com solução metanol:água (1:1), conforme a Tabela 11.

Tabela 11. Volume da solução de metanol:água e solução estoque

Pontos da curva	Solução estoque (μL)	Volume de solução Metanol:H ₂ O(1:1) (μL)
1	12,5	387,5
2	25,0	375,0
3	50,0	350,0
4	100,0	300,0
5	200,0	200,0
6	400,0	0,0

3.4.8. Cálculo da concentração de isoflavonas em amostra

A curva analítica foi obtida por regressão linear para cada isoflavona separadamente. A Equação 4 apresenta o cálculo do teor de isoflavona em mg de isoflavona por 100g de amostra.

$$\text{Teor de isoflavona (mg/100g)} = \frac{10 \times \text{Res}}{M} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde,

Res: Resultado obtido através da curva analítica ($\mu\text{g/mL}$)

M: massa de amostra pesada (g)

O teor de isoflavonas totais é a soma do teor de todas as isoflavonas, ele foi expresso em miligrama de aglicona por 100g. Por isso antes da soma, foi feita uma conversão das isoflavonas glicosiladas em suas agliconas equivalentes, multiplicando-se o teor do derivado glicosilado por um fator de conversão (Tabela 12), que equivale a razão entre o peso molecular da aglicona equivalente e do derivado glicosilado (KLUMP *et al*, 2001).

Tabela 12. Massa molecular das isoflavonas e fator de conversão dos derivados glicosilados

Isoflavona	Massa molecular (g)	Fator de conversão
Daidzina	416	0,6106
Glicitina	447	0,6376
Genistina	432	0,6250
Daidzeína	254	-
Gliciteína	285	-
Genisteína	270	-

3.4.9. Comparação do método otimizado com o método convencional

Para comparação dos métodos otimizado e convencional, foram injetados os seis pontos da curva de analítica em cada coluna e analisada uma amostra de extrato de soja em cinco replicatas. Para comparação da equivalência entre os métodos foram utilizados o teste F e o teste T de Student.

3.4.10. Estabilidade das isoflavonas em extrato de soja congelado

O extrato de soja foi obtido por processamento dos grãos. Deste extrato, foi retirada uma alíquota para extração e análise de isoflavonas (dia 0). O restante do extrato de soja foi dividido em alíquotas que foram acondicionadas em congelador. Periodicamente, duas amostras foram retiradas do congelador e submetidas à análise em duplicata quanto ao teor de isoflavonas (Tabela 13).

Tabela 13. Periodicidade da análise

Alíquota do extrato	Tempo (dias)
1	0
2	7
3	15
4	30
5	60
6	90
7	120

3.5. *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Cumaru)

Para a pesquisa de flavonoides foi utilizado o extrato em éter etílico do endocarpo do cumaru, que foi disponibilizado pelo pesquisador Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy. Os frutos foram coletados na reserva Ducke – INPA em Manaus. Os frutos foram secos e quebrados, separando-se o endocarpo da semente. Os endocarpos (3000g) foram moídos em moinho de bolas e extraídos com éter de petróleo por percolação durante 6 dias. A torta foi seca a temperatura ambiente e extraída por percolação com 5L de éter etílico durante 6 dias. O extrato foi seco dando origem a 15g de extrato de éter etílico do endocarpo do cumaru (GODOY, 1992).

3.5.1. Fracionamento do extrato

O extrato foi fracionado através de agitação com hexano ($n\text{-C}_6\text{H}_{12}$) em ultraturrax e filtração, sob vácuo, em funil de vidro com placa sinterizada, procedimento repetido três vezes. Posteriormente, repetiu-se a mesma metodologia utilizando diclorometano (CH_2Cl_2),

em seguida, acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). Obtendo-se assim as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

3.5.2. Separação cromatográfica dos flavonoides do cumaru

As frações foram secas e ressuspendidas em metanol:água (1:1), após centrifugação o sobrenadante foi analisado por CLAE-DAD. A separação cromatográfica foi otimizada utilizando-se coluna C₁₈ (YMC 250x4,6mm, com partícula de 5µm) com temperatura de 45°C, fluxo de 1,3mL/min em modo de eluição gradiente de água:ácido acético 98:2 (Fase A) e acetonitrila:ácido acético 98:2 (Fase B) (Tabela 14), tempo de corrida 14 minutos. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 200nm à 600nm. O cromatograma foi extraído à 253nm.

Tabela 14. Gradiente da Fase A (água:ácido acético 98:2) e Fase B (acetonitrila:ácido acético 98:2) para separação dos flavonoides do cumaru

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	80	20
6,00	60	40
12,00	50	50
12,10	80	20
14,00	80	20

3.6. Coleta das frações

Os flavonoides foram separados por CLAE em coluna analítica acoplada a um detector de arranjo de fotodiodos. Uma válvula seletora motorizada com 14 portas e 6 posições da Rheodyne[®] (Figura 9), acoplada à saída do detector sendo utilizada como coletor de frações. As substâncias de interesse foram coletadas na saída do detector ao eluirem, com a utilização da válvula seletora comandada pelo software Empower[®]. Foram realizadas injeções e coletas sucessivas de forma automatizada.

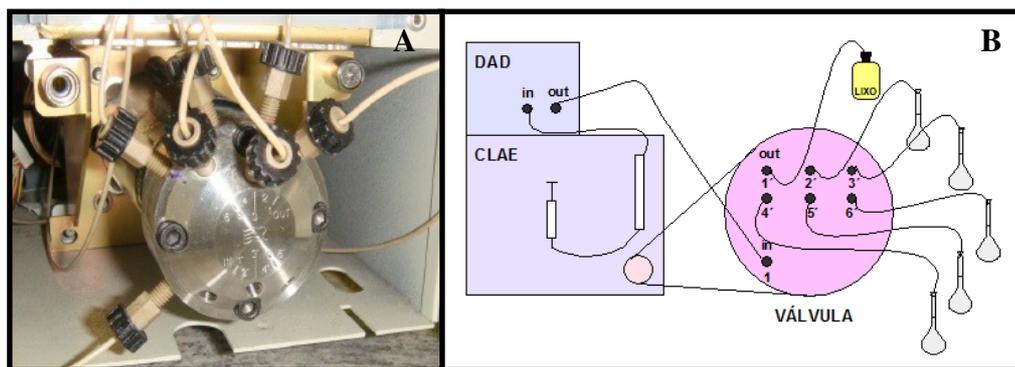


Figura 9. Válvula Rheodyne® (A) e esquema da coleta dos flavonoides (B)

3.7. Secagem das frações

As frações coletadas foram levadas ao rotaevaporador à 35°C durante trinta minutos, para eliminação do solvente orgânico. Em seguida foram colocadas no liofilizador até secagem completa, cerca de 15h. Alternativamente utilizou-se o rotaevaporador à 65°C até secagem completa.

3.8. Caracterização estrutural das substâncias

As substâncias isoladas tiveram sua estrutura determinada através da interpretação dos dados espectrais de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM), espectros de ultravioleta (UV) e preparo de derivados.

3.8.1. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro Bruker AVANCE (operando a 499,80 e 125,69MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente). Os deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) em p.p.m foram referenciados com base nos correspondentes valores residuais do solvente MeOD (δ_{H} 3,31 e δ_{C} 49,15) usado. As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hz. Os espectros heteronucleares 2D HSQC (^1H - ^{13}C -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$) e HMBC (^1H - ^{13}C -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$, n=2 e n=3) foram adquiridos com 8 transições/128 incrementos e 4 transições/128 incrementos, respectivamente. Para os espectros homonucleares 2D COSY- ^1H - ^1H foram usadas larguras espectrais de 5000Hz em ambas as dimensões e o número normal de transições.

3.8.2. Espectrometria de massas (EM)

Os EM foram obtidos por injeção em cromatógrafo líquido de ultra eficiência Acquity (Waters®) acoplado a espectrômetro de massas Q-TOF Synapt (Waters®) ou por infusão direta neste último. A separação foi feita em coluna C₁₈ (ACQUITY UPLC® BEH 2,1mmx150mm e 1,7µm). As condições cromatográficas foram: modo de eluição gradiente (Tabela 15) de acetonitrila (Fase A) e 0,1% de ácido fórmico em água (Fase B), fluxo: 0,35mL/min, temperatura da coluna 45°C, tempo de análise 30 minutos (GODOY, 2012).

Tabela 15. Gradiente de eluição para separação dos flavonoides

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,0	10	90
5,0	15	85
10,5	19	81
11,0	20	80
19,0	70	30
25,0	60	40
26,0	10	90
30,0	10	90

As condições e voltagens utilizadas no espectrômetro de massas foram: modo positivo, analisador modo V, capilar 3,0kV, cone de amostra 25,0V, cone de extração 4,0kV, temperatura da fonte 120°C, temperatura de dessolvação 500°C, fluxo do gás de dessolvatação 750,0L/Hr, energia de colisão 6,0eV.

3.8.3. Preparo de derivados

3.8.3.1. Metilação

Uma solução de diazometano (CH₂N₂) foi preparada em éter etílico conforme procedimento descrito por Carvalho *et al.* (2006). Montou-se um sistema de destilação conectando-se um adaptador de Claisen à um balão de fundo redondo imerso em banho de óleo. Em uma saída lateral do adaptador conectou-se um condensador, na outra um funil de decantação, a saída superior foi tampada. Na saída do condensador conectou-se um adaptador imerso em éter etílico dentro de um erlenmeyer sob banho de gelo, o adaptador continha outra saída que foi conectada à outro erlenmeyer contendo éter. Todo o sistema continha conexões

lisas (Figura 10). Colocou-se 50mL de solução de hidróxido de potássio à 50% no funil de decantação e adicionou-se lentamente ao balão de fundo redondo contendo 20g de nitrosometiluréia e 125mL de éter etílico, sem ligar o aquecimento. Após a adição da base iniciou-se o aquecimento lentamente. De forma que o produto foi sendo destilado à medida que se formava, sendo recolhido em éter etílico resfriado.



Figura 10. Montagem do sistema de destilação para síntese de diazometano

A solução etérea de diazometano foi adicionada em excesso às soluções das substâncias em metanol. Após a eliminação do solvente obtiveram-se as substâncias metiladas.

3.8.3.2. Acetilação

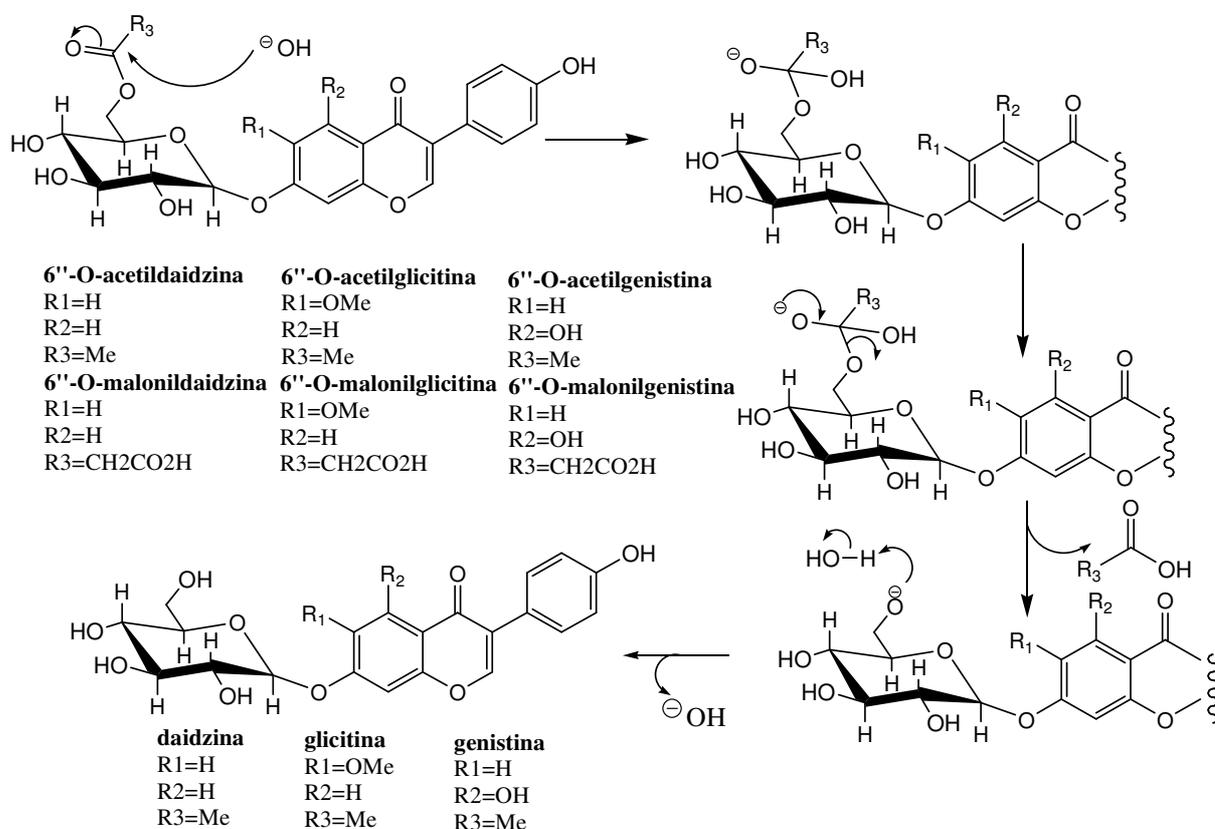
A acetilação foi realizada conforme procedimento adaptado de Matos (2009). Foi adicionada às substâncias solução de anidrido acético:piridina (1:1), e mantida em repouso durante 24h. Em seguida adicionou-se cuidadosamente, 10mL de água gelada. O acetato formado foi extraído, em funil de separação, com 10mL de clorofórmio por 3 vezes. Para retirar o excesso de piridina, lavou-se o extrato clorofórmico 3 vezes com HCl 1M, e em seguida, com água destilada. Verificou-se que o pH estava abaixo de 7. Retirou-se o excesso de ácido, lavando o extrato clorofórmico com solução 5% de bicarbonato de sódio e, em seguida, com água destilada. O extrato clorofórmico foi seco, obtendo-se o produto acetilado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Glycine max* (L.) Merrill (soja)

4.1.1. Extração e hidrólise básica das isoflavonas glicosídicas

As unidades glicosídicas acetiladas (6''-*O*-acetildaidzina, 6''-*O*-acetilglicitina e 6''-*O*-acetilgenistina) e maloniladas (6''-*O*-malonildaidzina, 6''-*O*-malonilglicitina e 6''-*O*-malonilgenistina) das isoflavonas isoladas do germe da soja foram submetidas a hidrólise básica (AOAC, 2005) e obtendo-se os glicosídeos correspondentes. No Esquema 6 foi proposto mecanismo para a formação das isoflavonas β-glicosíladadas.

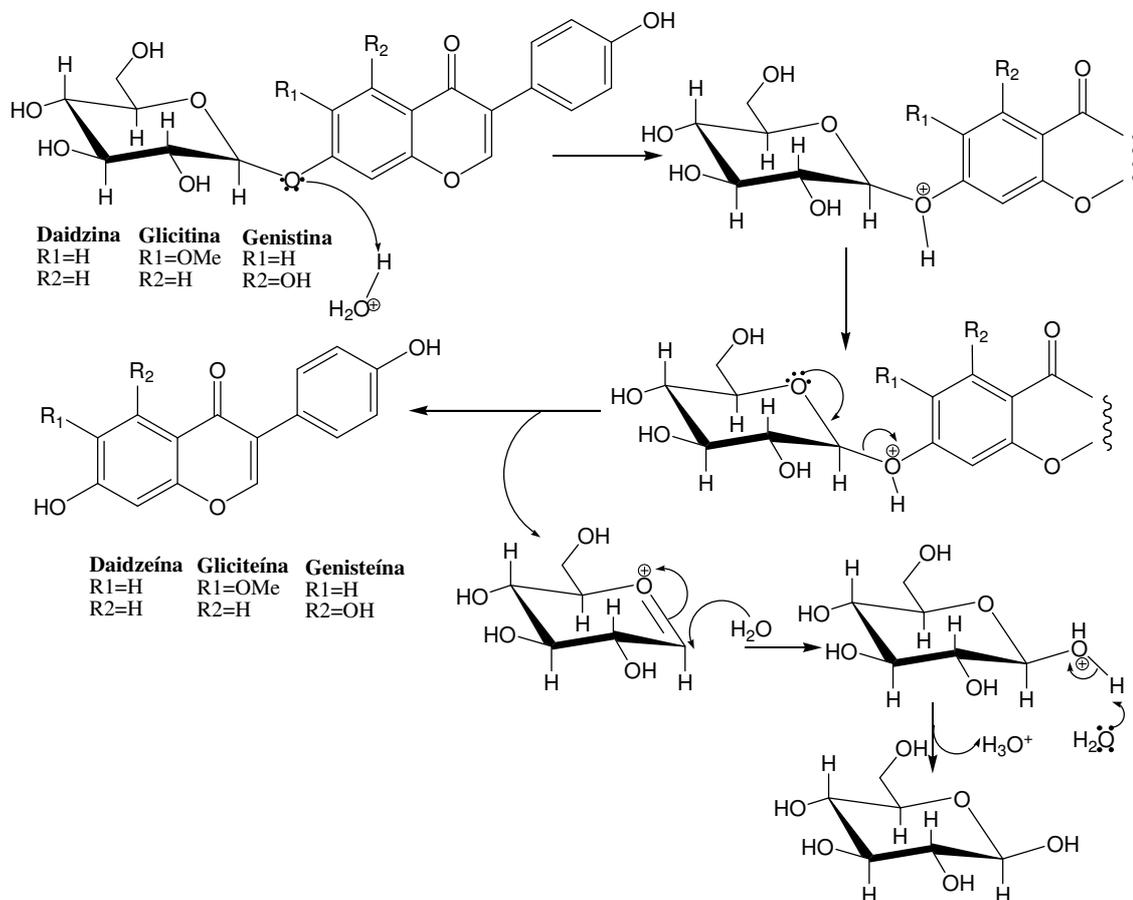


Esquema 6. Mecanismo proposto para a hidrólise dos grupos ésteres (6''-*O*-acil) das unidades glicosídicas das isoflavonas.

4.1.2. Hidrólise ácida da isoflavonas glicosídicas

A presença das agliconas isoflavônicas no extrato do germe de soja eram consideradas inexistentes ou encontravam-se em baixa concentração. Assim, tornou-se necessária a obtenção de padrões destes isoflavonóides através de hidrólise ácida para transformação das

isoflavonas β -glicosídicas em suas respectivas agliconas. O Esquema 7 resume mecanismo proposto para a hidrólise ácida das isoflavonas glicosiladas isoladas.



Esquema 7. Mecanismo proposto para a hidrólise ácida das isoflavonas glicosiladas

4.1.3. Isolamento das isoflavonas da soja para obtenção de padrões analíticos

O isolamento das isoflavonas envolveu a utilização de um sistema de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em escala analítica através de injeções e coletas sucessivas. Uma vez que a quantificação de isoflavonas tornou-se uma análise de rotina no laboratório, não é necessário investimento elevado em equipamentos e os gastos aparecem apenas com a compra de solventes, que no caso da CLAE alcançou patamar relativamente pequeno.

Foram isoladas por CLAE em escala analítica seis isoflavonas: três glicosiladas (daidzina = PS1, glicitina = PS2 e genistina = PS3) e três não glicosiladas, (daidzeína = PS4, gliciteína = PS5 e genisteína = PS6).

Para o isolamento das isoflavonas da soja através de CLAE em escala analítica recomenda-se como desejável uma coluna que suporte um grande volume de amostra, seja reprodutiva e robusta e que o tempo de separação seja o menor possível, pois serão realizadas sucessivas injeções e coletas. Por isso, com base na capacidade e robustez foi selecionada a coluna C₁₈ YMC 250mmx4,6 mm, com partícula de 5 µm.

As condições cromatográficas otimizadas estão descritas no item 3.4.5.2. A Figura 11 apresenta o cromatograma das seis isoflavonas isoladas da mistura obtida do extrato do germe de soja (conforme descrito em 3.4.2) com a parte hidrolisada (conforme descrito em 3.4.5.1): daidzina (PS1), glicitina (PS2) e genistina (PS3), existentes naturalmente na soja ou obtidas por hidrólise básica do grupo acila (Esquema 6) e daidzeína (PS4), gliciteína (PS5) e genisteína (PS6), produzidas por hidrólise ácida (Esquema 7).

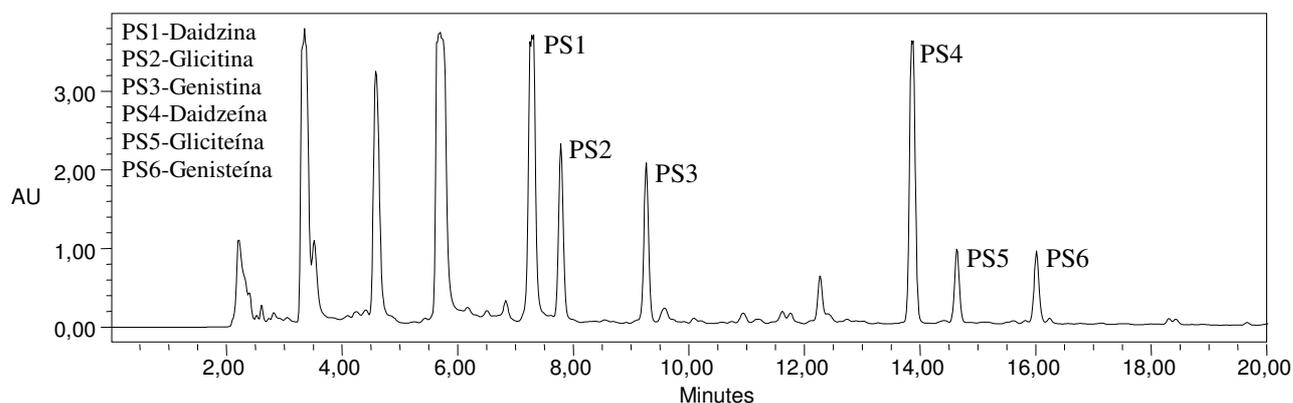


Figura 11. Cromatograma das isoflavonas daidzina, genistina, glicitina, daidzeína, genisteína e gliciteína à 260nm em coluna de fase reversa (YMC C₁₈ 250mmx4,6mm, 5µm)

A otimização de uma separação envolve a minimização do tempo de corrida ao máximo sem prejuízo da qualidade do resultado final. Trata-se de uma das etapas mais importantes, já que dela dependem dois fatores importantes: a pureza do material isolado e a quantidade de solvente gasto (resíduo gerado). Devido à diferença de polaridade entre as isoflavonas glicosídicas (mais polares) e as agliconas correspondentes (menos polares), durante o tempo de retenção de 9,5 à 13,5 minutos não ocorreu eluição de nenhuma substância de interesse. A importância da redução deste tempo para a diminuição do tempo de corrida estimulou a tentativa de aumento da força da fase móvel (aumento da porcentagem da fase B – metanol:ác. acético 98:2), o que ocasionou a aproximação dos picos da daidzeína e gliciteína (Figura 12). Tal proximidade dificultaria a coleta, comprometendo a pureza destas isoflavonas e, por isso, não foi possível alcançar a pretendida redução de tempo.

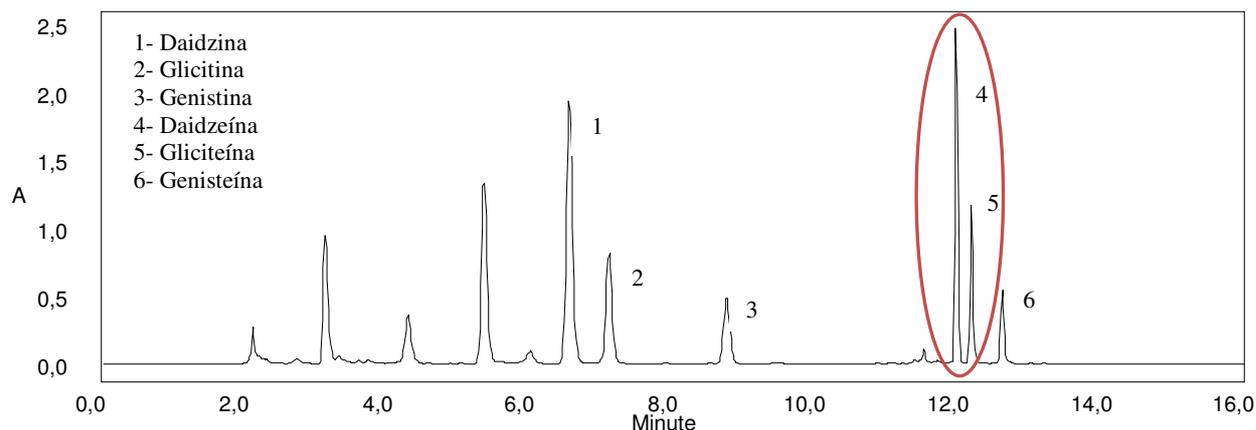


Figura 12. Cromatograma da redução no tempo de retenção das isoflavonas agliconas com comprometimento da resolução entre os picos da daidzeína e gliciteína

A metodologia descrita no item 3.6 da Parte Experimental foi aplicada para o isolamento das seis isoflavonas (PS1 a PS6). A válvula seletora de canais da Rheodyne® foi conectada na saída do detector e cada um de seus canais programados para abrir e fechar conforme o tempo de retenção de cada substância de interesse. O Anexo A sumariza os procedimentos para o isolamento das isoflavonas da soja.

Foram isoladas as isoflavonas daidzina (900 µg), glicitina (600 µg), genistina (400 µg), daidzeína (400 µg), gliciteína (200 µg) e genisteína (60 µg), com grau de pureza avaliado na região ultravioleta através do λ_{\max} 260nm, obtendo-se como resultados 97,96 %, 95,24 %, 94,48 %, 99,42 %, 96,62 % e 95,83 %, respectivamente. A Figura 13 apresenta o cromatograma das isoflavonas isoladas.

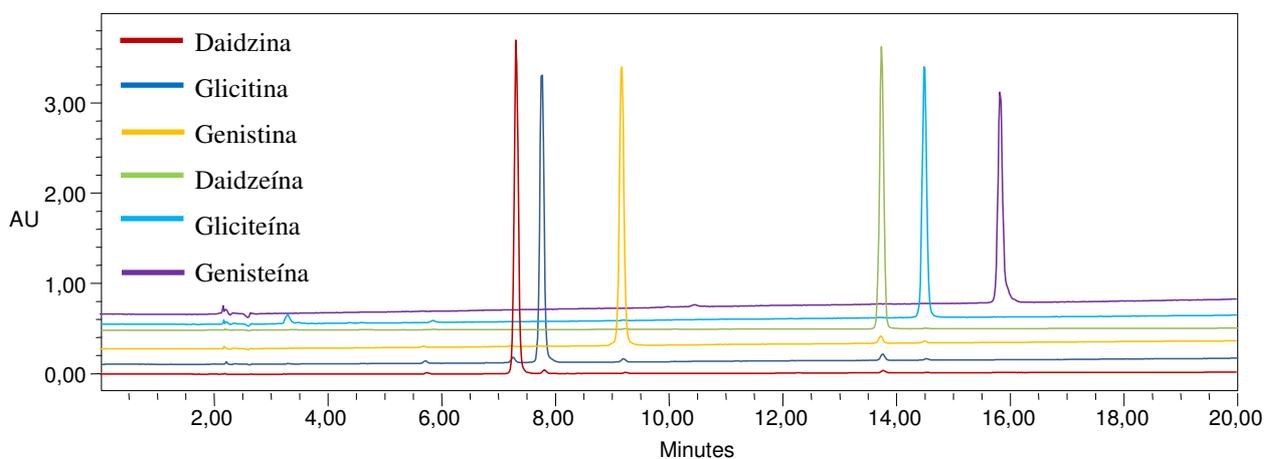


Figura 13. Cromatograma das isoflavonas isoladas à 260nm em coluna de fase reversa (YMC C₁₈ 250mmx4,6mm, 5µm)

Foram necessárias 295 injeções de 20 minutos cada, sendo necessários apenas 4 dias para obtenção das seis isoflavonas em quantidade e pureza suficientes para confirmação estrutural, viabilizando também a sua utilização como padrão analítico. Nesta tarefa foram consumidos 2,7 litros de metanol, 4,9 litros de água e 152 mL de ácido acético, quantidades muito menores do que seriam gastas se o isolamento fosse realizado da forma clássica (coluna aberta). A pequena quantidade de resíduo gerado assume importância, tanto ambientalmente como financeiramente, pois além do custo da compra do solvente o correto descarte deve ser feito por empresas especializadas, o que gera um custo adicional.

A injeção e coleta durante a eluição foram automatizadas e, por isso, após a otimização da metodologia o analista ficou disponível para a execução de outras atividades durante o processo de isolamento em andamento.

A quantidade relativamente pequena de material isolado revelou-se suficiente para confirmação estrutural e para utilização como padrão analítico. Assim, o isolamento foi classificado como bastante eficiente, tanto com base na qualidade do produto isolado, quanto na economia do método estabelecido.

4.1.4. Caracterização estrutural das isoflavonas isoladas

A caracterização estrutural das isoflavonas isoladas (daidzina, daidzeína, glicitina, gliciteína, genistina e genisteína) foi realizada com base na interpretação dos dados espectrais de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas, ultravioleta e preparação de derivados.

4.1.4.1. Ressonância magnética nuclear

As estruturas das isoflavonas (Figura 14) revelaram-se bastante semelhantes, aparecendo nos espectros de RNM muitos sinais similares, permitindo primeiramente uma abordagem de forma geral, e em seguida, tratando de enfatizar as diferenças estruturais reveladas pelos espectros.

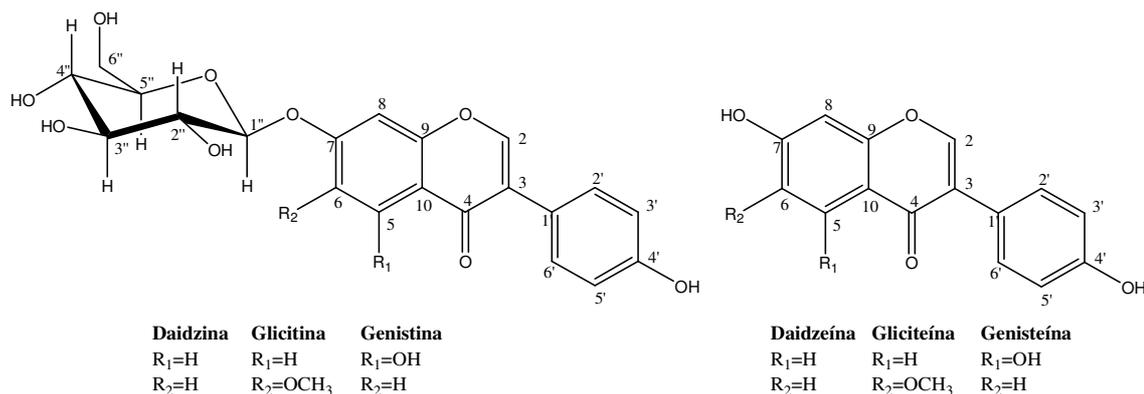


Figura 14. Estrutura das isoflavonas isoladas dos grãos de soja

Os espectros de RMN ¹H das isoflavonas **daidzina** (Figura 16), **daidzeína** (Figura 18), **glicitina** (Figura 19), **gliciteína** (Figura 21) e **genistina** (Figura 22) apresentaram um simpleto em δ_H 8,14-8,24, sinal característico de hidrogênio ligado ao carbono 2 do esqueleto isoflavônico. Foi possível observar os sinais dupletos (com valor de J indicando interação *orto*) em δ_H entre 7,39 e 7,42 (H-2'/H-6') e entre 6,85 e 6,88 (H-3'/H-5') representantes do sistema AA'BB' do anel B, indicando a presença de substituinte em C-4'. Nos espectros de RMN ¹³C (Tabela 15 e Figuras 17, 20 e 23 para **daidzina**, **glicitina** e **genistina**, respectivamente) confirmou se tratar de uma isoflavona através dos sinais atribuídos aos átomos de carbono CH-2 (δ_C 152,9 - 155,50), 3 (δ_C 124,0 - 125,26) e C-4 (δ_C 175,9, presença de carbonila conjugada com o oxigênio), valores diferentes dos observados (por exemplo) em torno de δ_C 164 para C-2 e 103 para CH-3 em flavonas e 192 para do C-4 em flavanonas (AGRAWAL, 1989).

A presença da unidade β -O-glicopiranosila nas isoflavonas glicosiladas foi reconhecida pelos sinais dupletos representantes dos átomos de hidrogênio ligados ao carbono anomérico H-1'' (δ_H 5,05 - 5,17, d, J = 7,6 a 7,3 Hz, axial) e os demais sinais entre δ_H 3,41-3,6, atribuídos aos hidrogênios H-2'', H-3'', H-4'' e H-5'', e δ_H 3,74 e 3,95 correspondentes aos hidrogênios metilênicos 2H-6'' (Tabela 15). Os hidrogênios localizados na posição 6'' da molécula de glicose aparecem representados por dois sinais (δ_H 3,74 e δ_H 3,95), justificados pela ligação ao carbono quiral CH-5'' gerando ambientes químicos diferentes (Figura 15). A projeção de Newman permite observar a diferença de ambiente químico para os hidrogênios 2H-6'' (H-6''a e H-6''b). Estes hidrogênios são chamados proquirais e diastereotópicos, pois a troca deles por outro átomo, por exemplo deutério, gera um centro assimétrico, sendo que as moléculas formadas formam um par de diastereoisômeros (ROMERO, 1998).

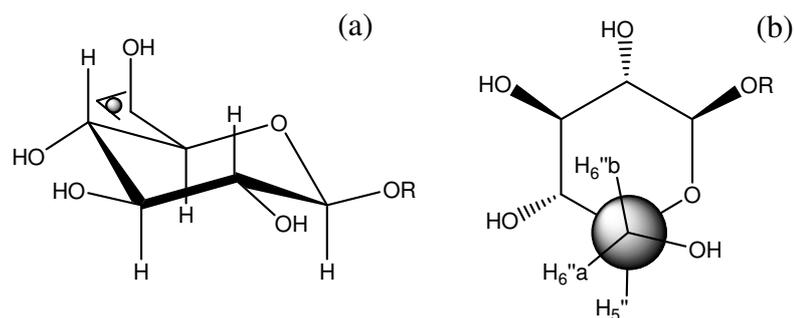


Figura 15. Conformação cadeira (a) e projeção de Newman (b) para molécula de glicose

Nos espectros de RMN ^{13}C (Tabela 15) a existência de um carbono metínico em δ_{C} 99,6, (região de carbono ligado à dois oxigênios) confirmou a presença do carbono anomérico (CH-1'). Um carbono metilênico (CH₂-6'') em δ_{C} 60,2 (ligado à dois hidrogênios diastereotópicos) e quatro carbonos metínicos na região δ_{C} 69,0-76,2 confirmaram a presença da unidade glicopiranosila na molécula.

A metodologia usada no isolamento das isoflavonas mostrou ser satisfatória quanto à pureza do material, isso pode ser observado nos espectros de RMN, pois apesar dos sinais serem baixos, devido a pouca quantidade de amostra, as impurezas são mínimas, os espectros apresentam-se bastante limpos. As Figuras 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23 apresentam os espectros de RMN das isoflavonas isoladas.

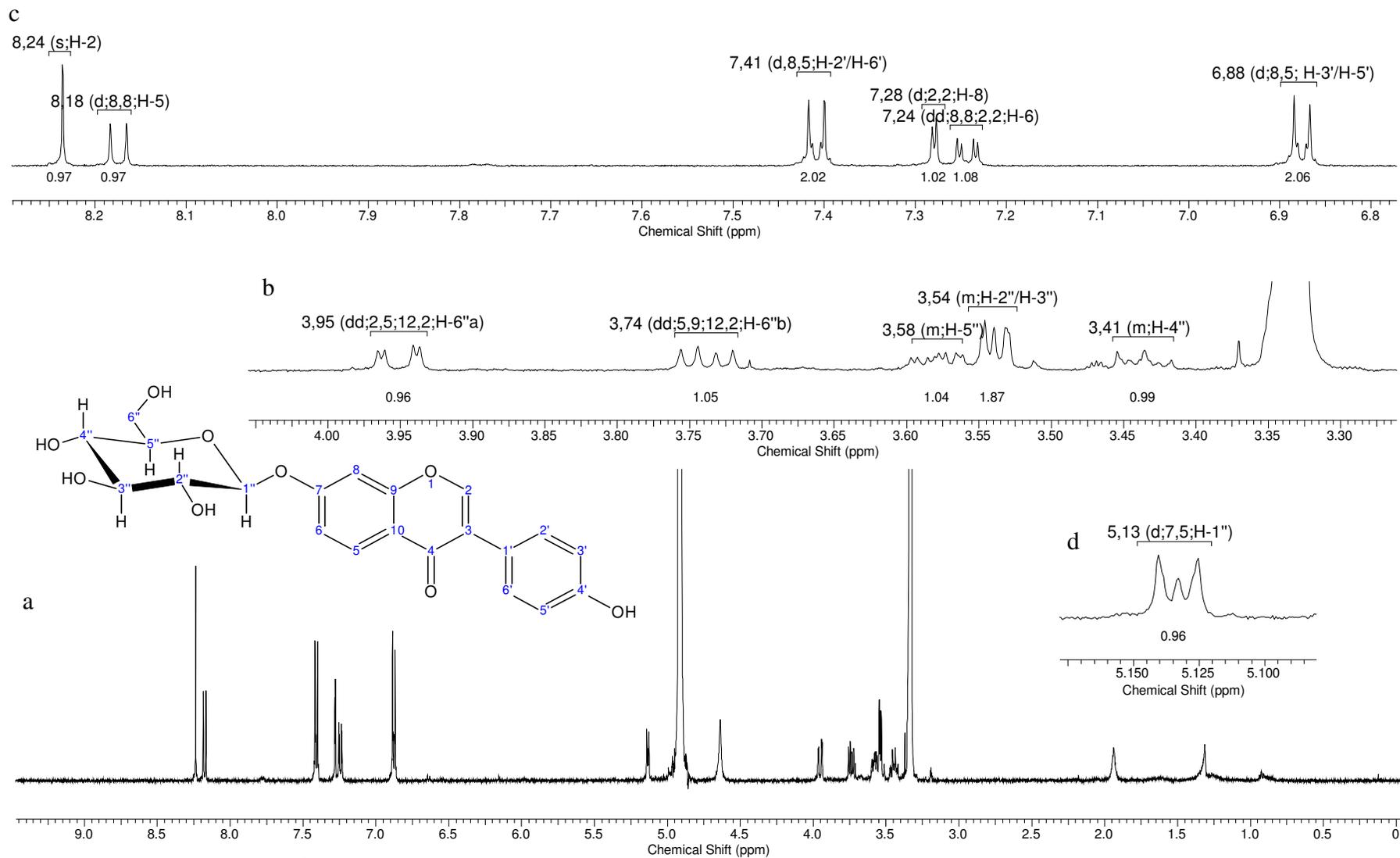


Figura 16. Espectro de RMN¹H (500 MHz, em MeOH-*d*₄) da **daidzina** isolada (a) e expansões das regiões δ_H 3,3 à 4,0 (b), δ_H 6,8 à 8,3 (c) e δ_H 5,0 à 5,2 (d).

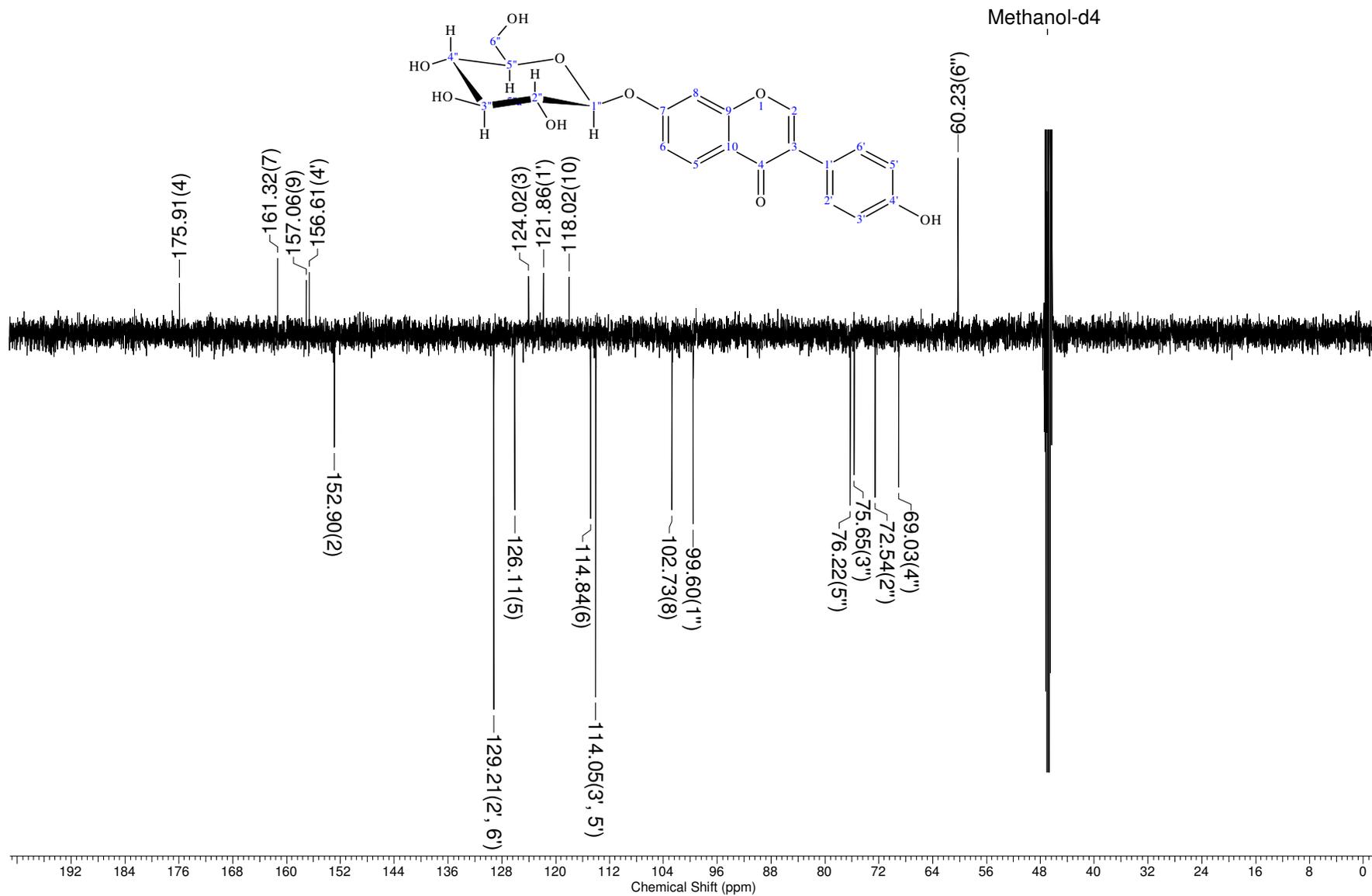


Figura 17. Espectro de RMN¹³C DEPTQ (125 MHz), MeOH-*d*₄ da **daidzina** isolada

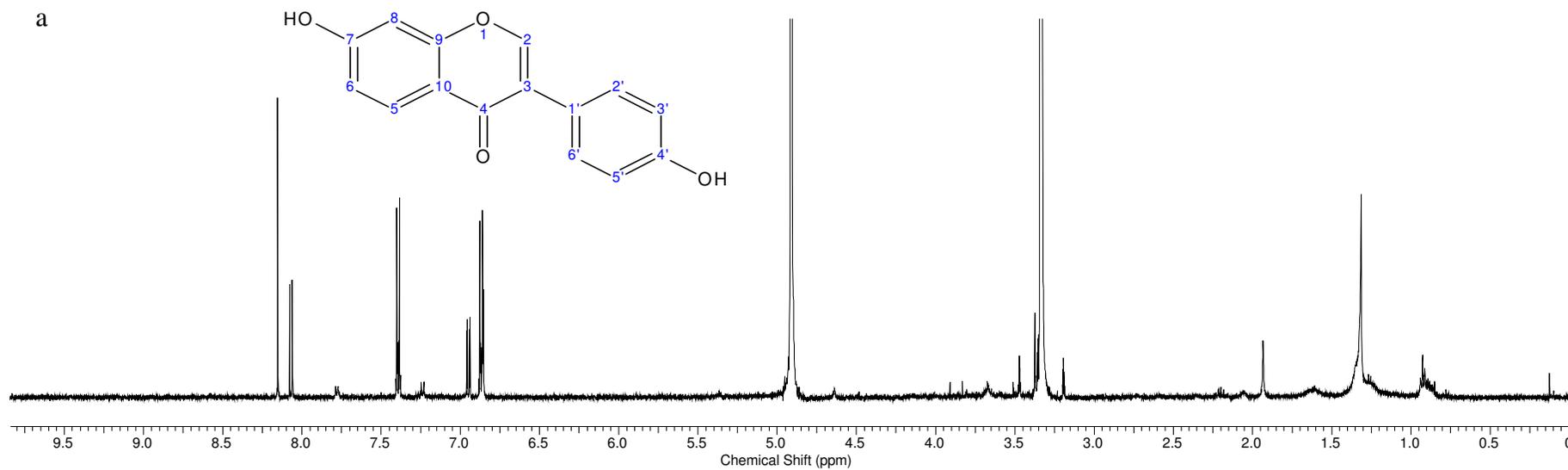
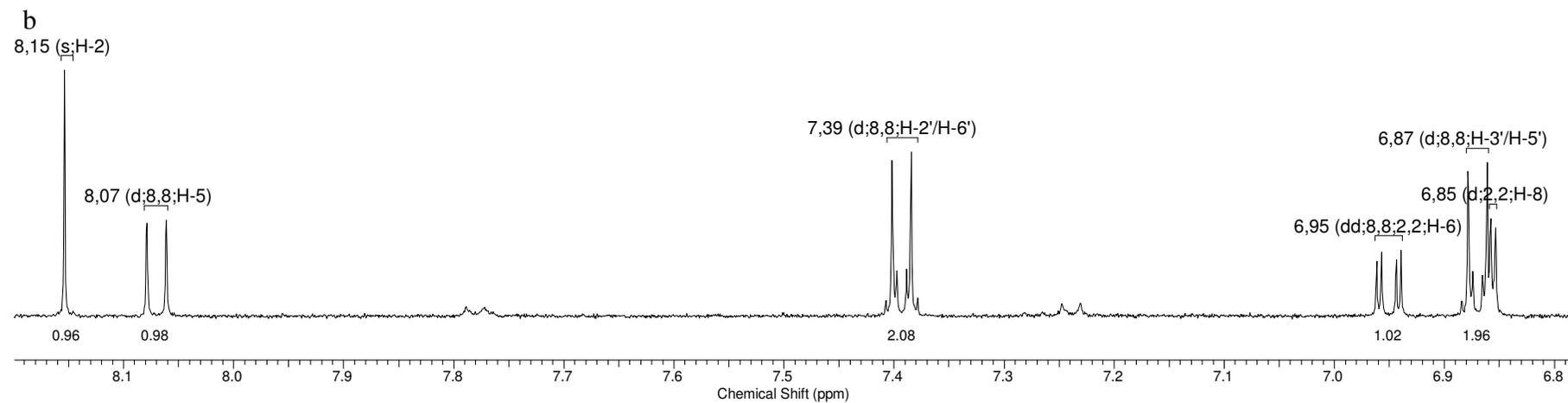


Figura 18. Espectro de RMN¹H (500 MHz, em MeOH-*d*₄) da **daidzeína isolada** (a) e expansão da região de δ_{H} 6,8 à 8,2 (b)

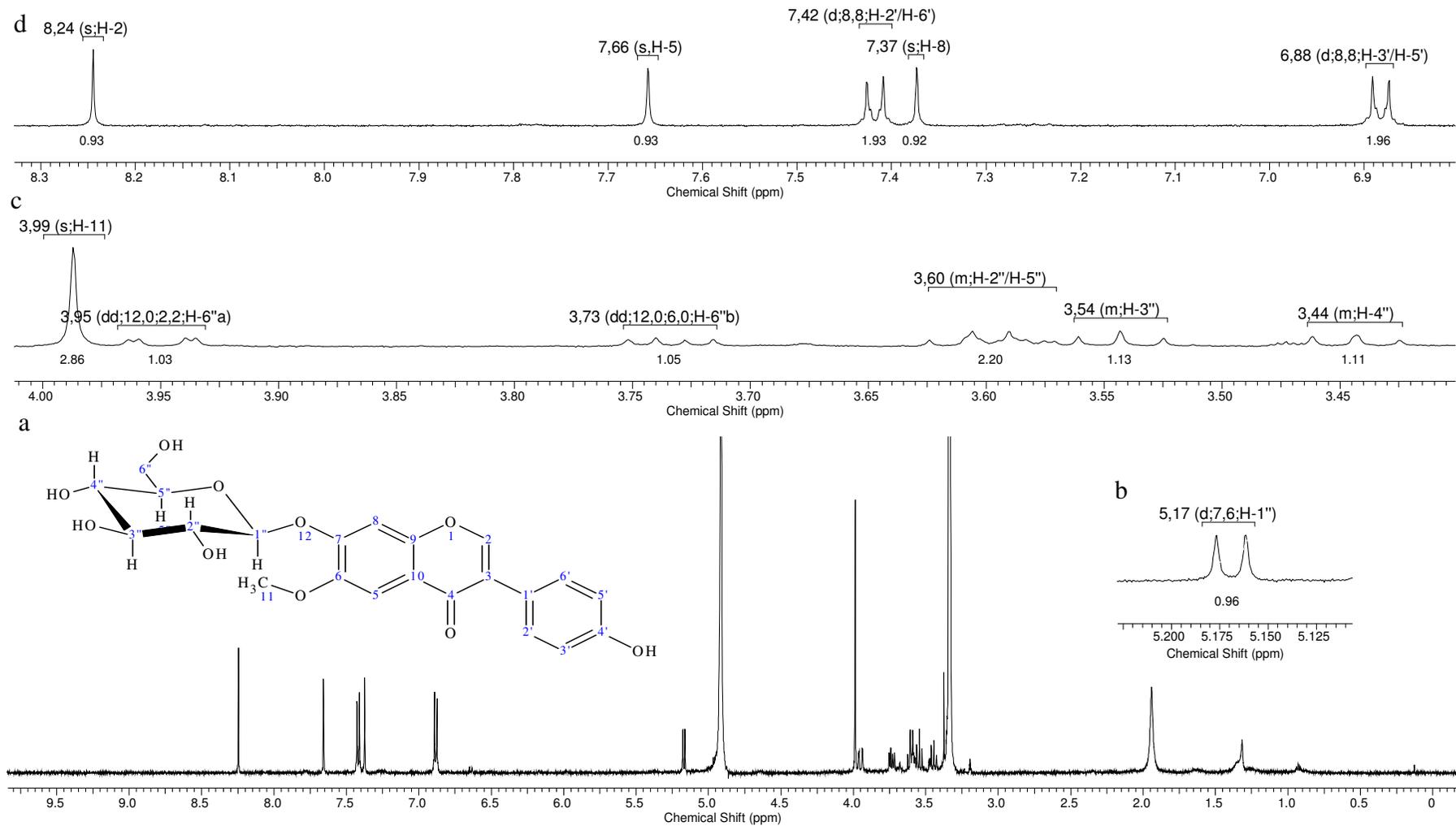


Figura 19. Espectro de RMN¹H (500 MHz, em MeOH-*d*₄) da **glicitina** isolada (a) e expansão das regiões δ_H 5,0 à 5,3 (b), δ_H 3,3 à 4,0 (c) e δ_H 6,8 à 8,3 (d)

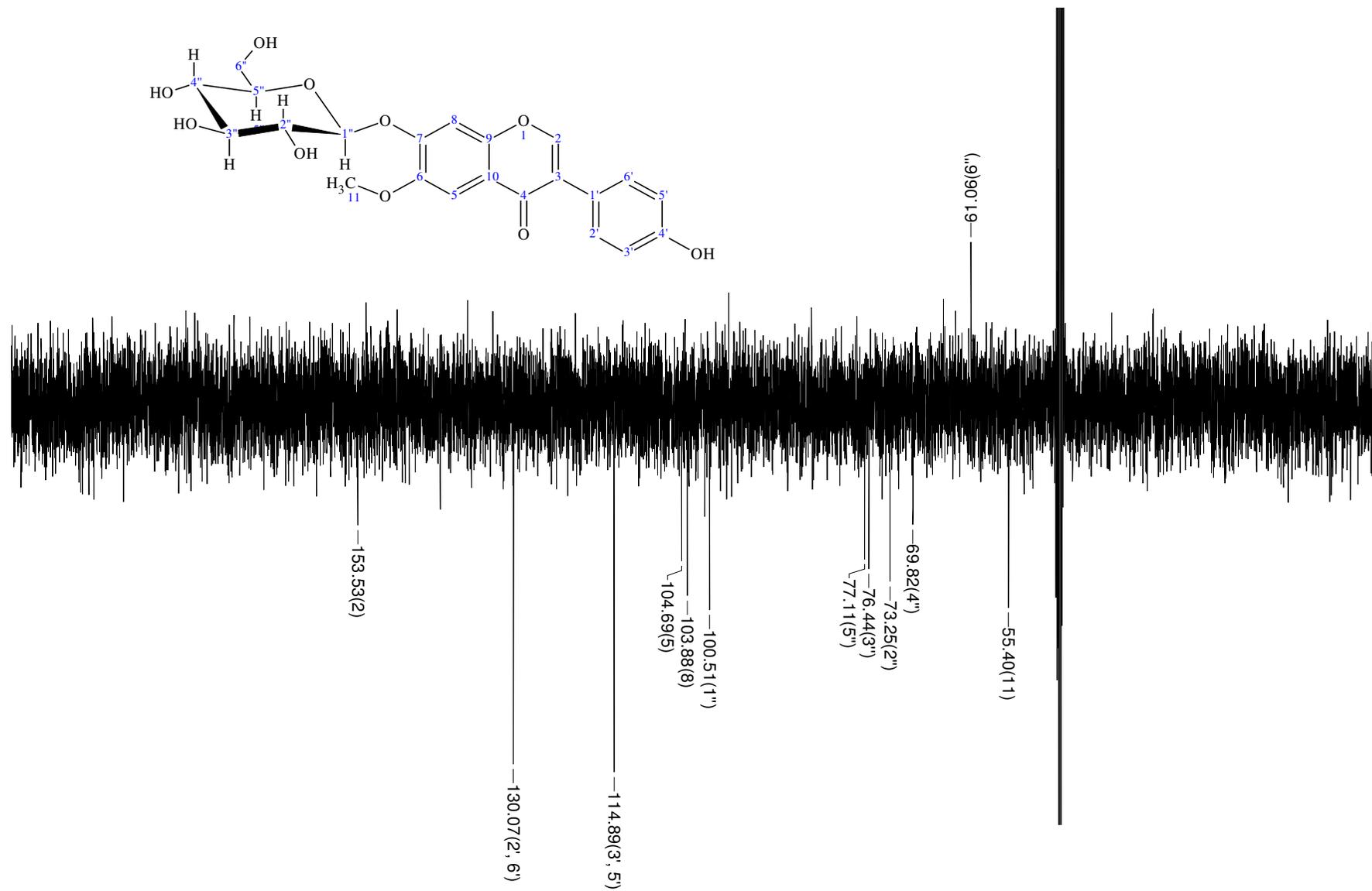


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, em MeOH- d_4) da **glicitina** isolada

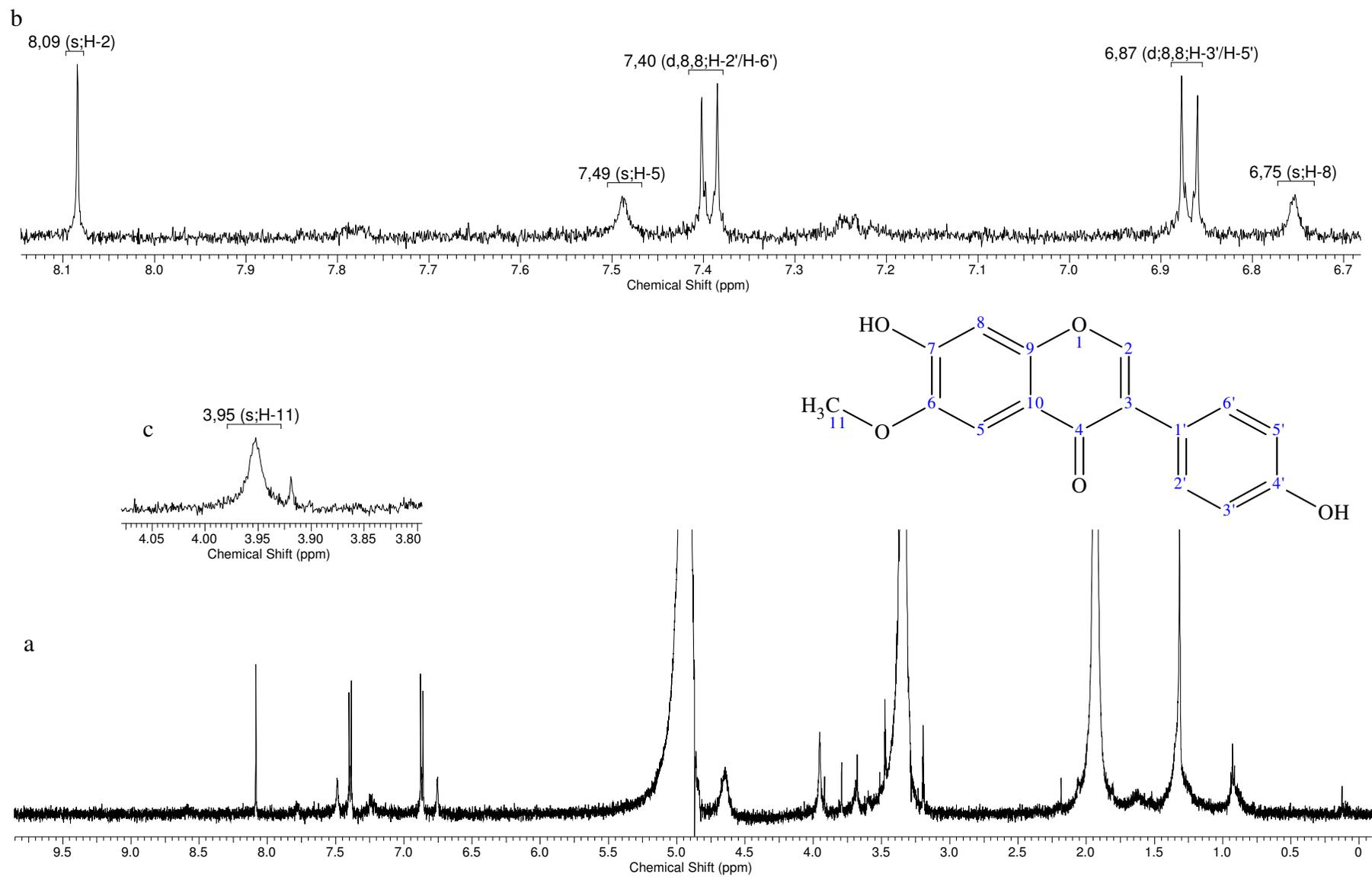


Figura 21. Espectro de RMN¹H (500 MHz, em MeOH-*d*₄) da **gliciteína** isolada (a) e expansão das regiões δ_{H} 6,7 à 8,2 (b) e δ_{H} 3,7 à 4,1 (c)

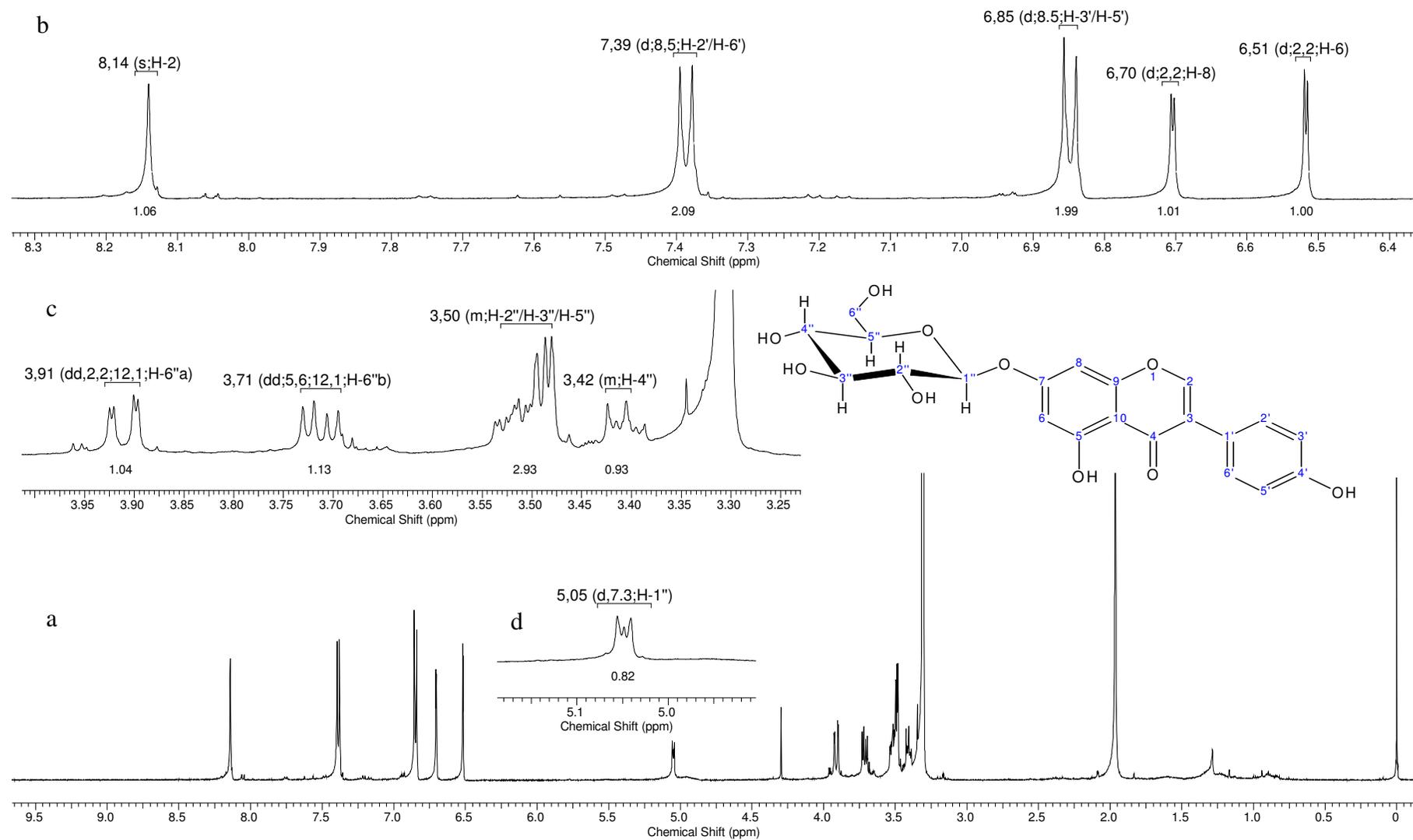


Figura 22. Espectro de RMN¹H (500 MHz, em MeOH-*d*₄) da **genistina** isolada (a) e expansão das regiões δ_{H} 6,4 à 8,2 (b) δ_{H} 3,3 à 4,0 (c) δ_{H} 4,7 à 5,2

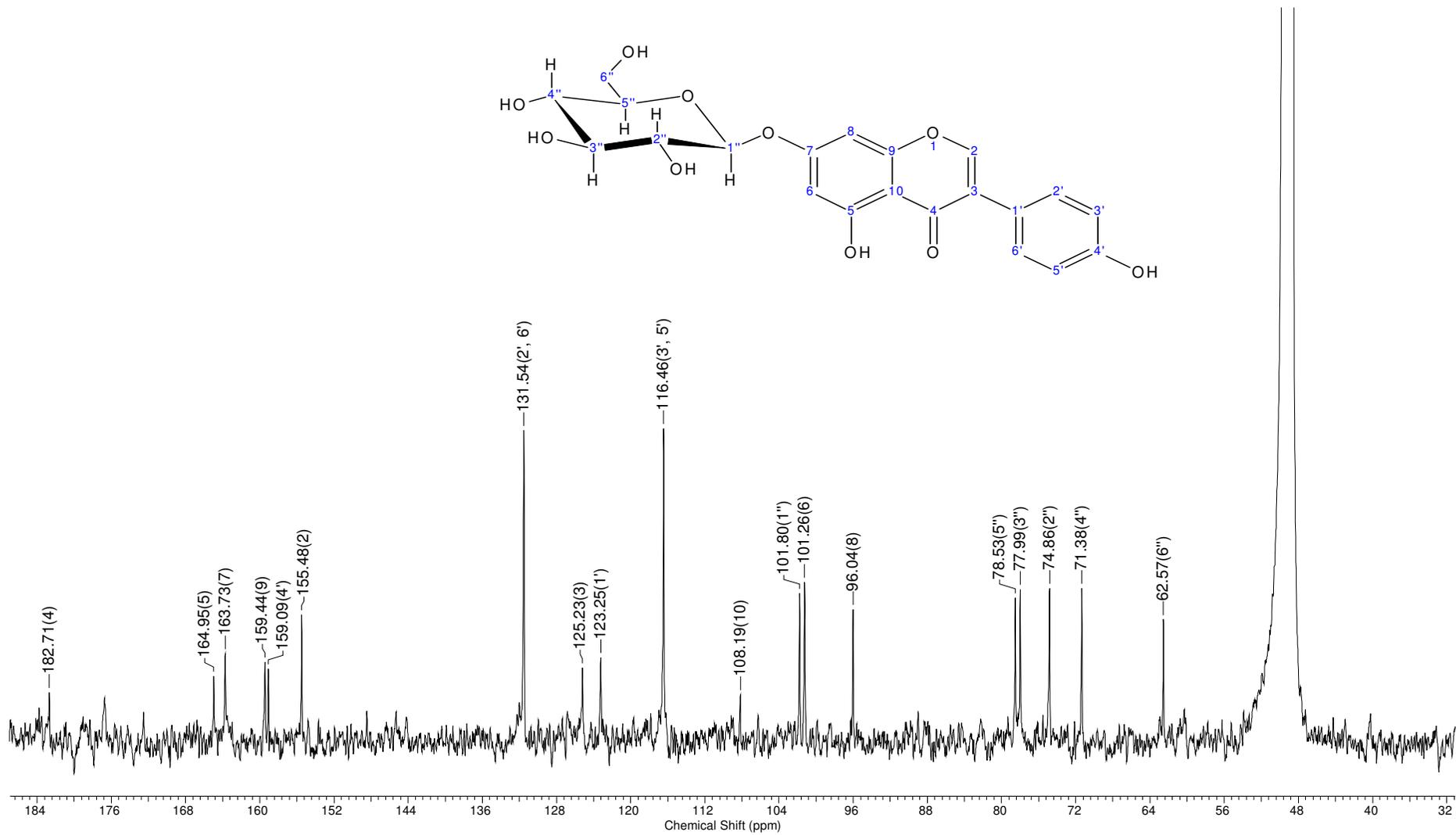


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, em MeOH- d_4) da **genistina** isolada

Até agora foram descritos os deslocamentos químicos que são essenciais para a identificação do esqueleto isoflavônico e para a presença da molécula de glicose, porém é importante apresentar os pontos chave para a diferenciação das estruturas das isoflavonas e estas diferenças estão fundamentadas no anel A.

Na **daidzina** e na **daidzeína** o anel A sustenta apenas um substituinte no átomo de carbono C-7, revelado por um sinal duplete ($J = 8,8$ Hz) em δ_H 8,1-8,2, atribuído a H-5, já que se encontra em posição *orto* com H-6 e sentindo a ação anisotrópica e efeito retirador de elétrons da carbonila. O sinal de H-6 mostrou-se como duplo-duplete em δ_H 7,0-7,2 (dd, $J = 8,8$ e 2,2 Hz) devido à interação adicional com o H-8 (δ_H 6,9-7,3 (d, $J = 2,2$ Hz) em posição *meta*., Estes acoplamentos foram confirmados pelo espectro 2D de correlação homonuclear 1H - 1H -COSY (Figura 24) da **daidzina isolada**, observando-se também sinais transversais correspondentes aos acoplamentos entre os hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' e os previstos entre os átomos de hidrogênio da unidade glicopiranosila sumarizados na Figura 24.

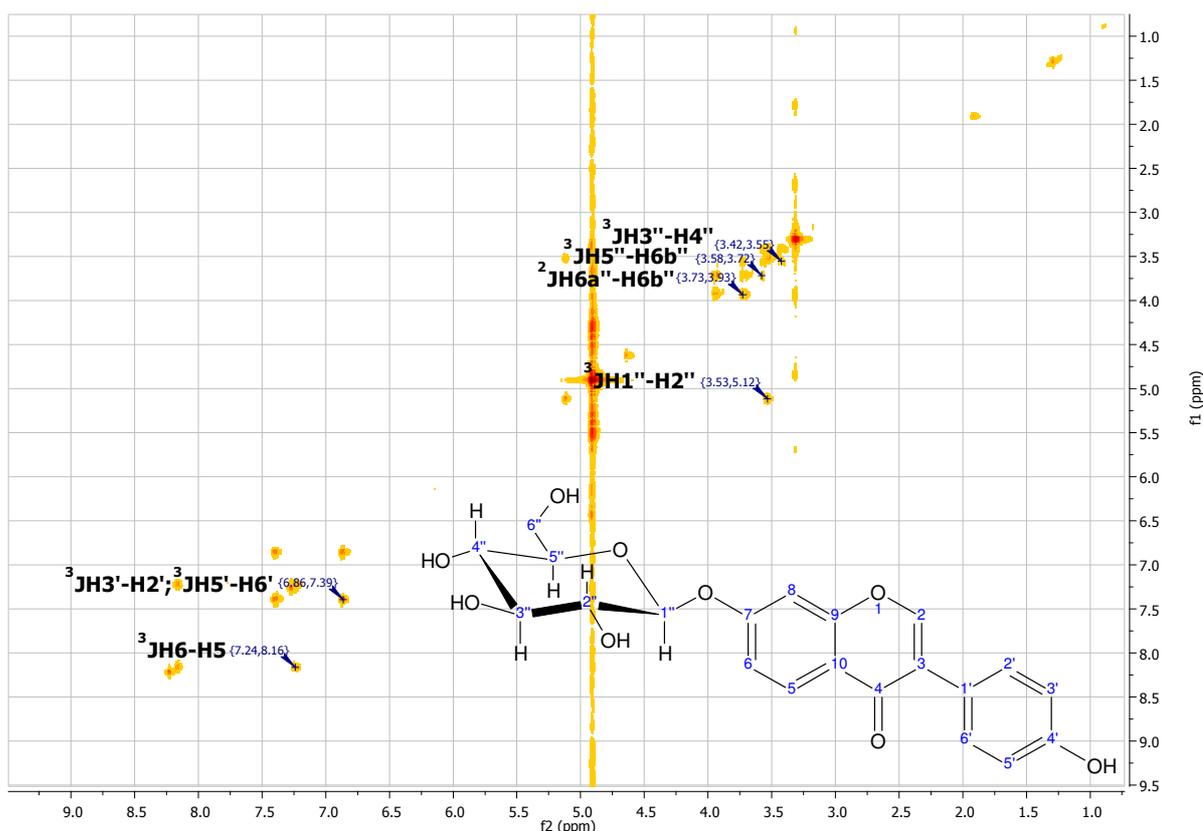


Figura 24. Espectro de RMN 1H 2D de correlação homonuclear 1H - 1H -COSY da **daidzina**

O espectro de RMN¹H 2D de correlação homonuclear ¹H-¹H-COSY (Figura 25) da **daidzeína**, bastante simples como esperado, revelou os mesmos acoplamentos observados para a unidade isoflavônica (aglicona) do espectro da **daidzina**.

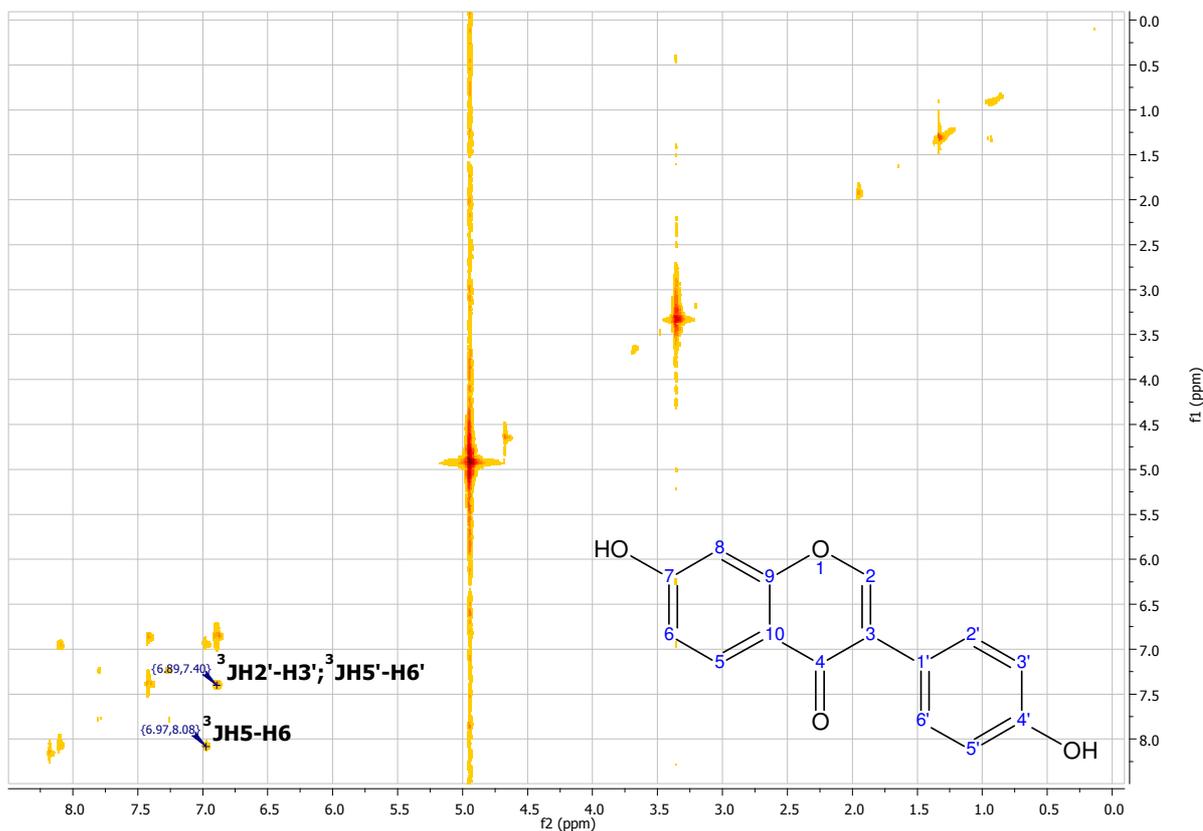


Figura 25. Espectro de RMN¹H 2D de correlação homonuclear ¹H-¹H- COSY da **daidzeína**

Para a atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários (δ_C) usou-se o espectro RMN 2D HMBC de correlação heteronuclear C (Figura 26). A localização da unidade glicopiranosila no esqueleto isoflavônico da **daidzina** foi confirmada através da correlação observada entre o carbono C-7 (δ_C 161,3) e ambos hidrogênios H-5 (δ_H 8,18, $^3J_{CH}$) e anomérico H-1'' (δ_H 5,13, $^3J_{CH}$) e. Outras correlações heteronucleares foram inseridas na Figura 26, que contribuiriam significativamente para a correta e inequívoca atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C), resumidos na Tabela 15.

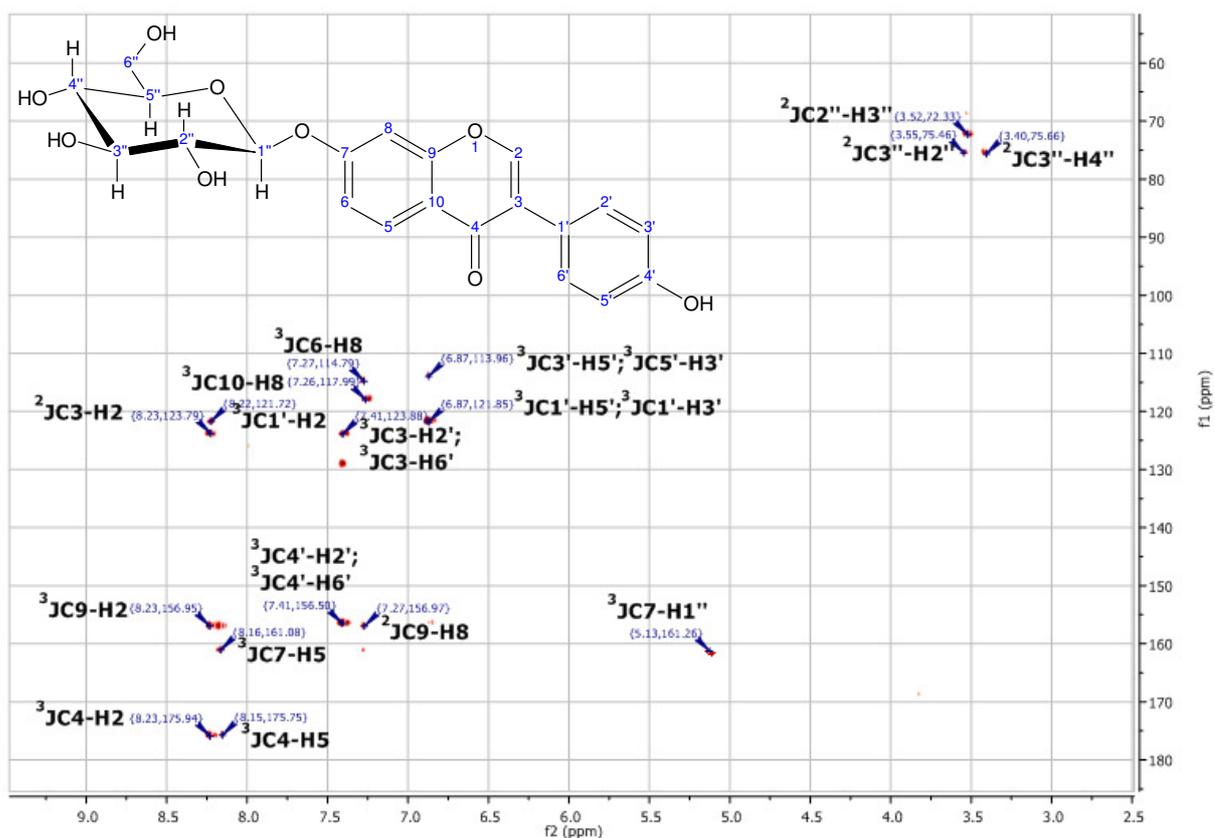


Figura 26. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC da **daidzina**

Os espectros de RMN¹H da **glicitina** e da **gliciteína** apresentaram dois singletos correspondentes aos átomos de hidrogênio H-5 (δ_{H} 7,5-7,7) e H-8 (δ_{H} 6,8-7,4) do anel A. Simpleto em δ_{H} 3,9, com integral para três hidrogênios, ligado à carbono em δ_{C} 55,4 confirmaram a presença de metoxila.

No espectro 2D ¹H-¹H-COSY (Figura 27) da **glicitina** observou-se os sinais transversais correspondentes ao acoplamento entre os hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel B, além dos previstos para os átomos de hidrogênio da unidade glicopiranosila (Figura 27). Assim como no espectro de **glicitina**, o espectro 2D ¹H-¹H-COSY (Figura 28) da **gliciteína** observou-se o acoplamento entre os hidrogênios H-2'/H-6 e H-3'/H-5'.

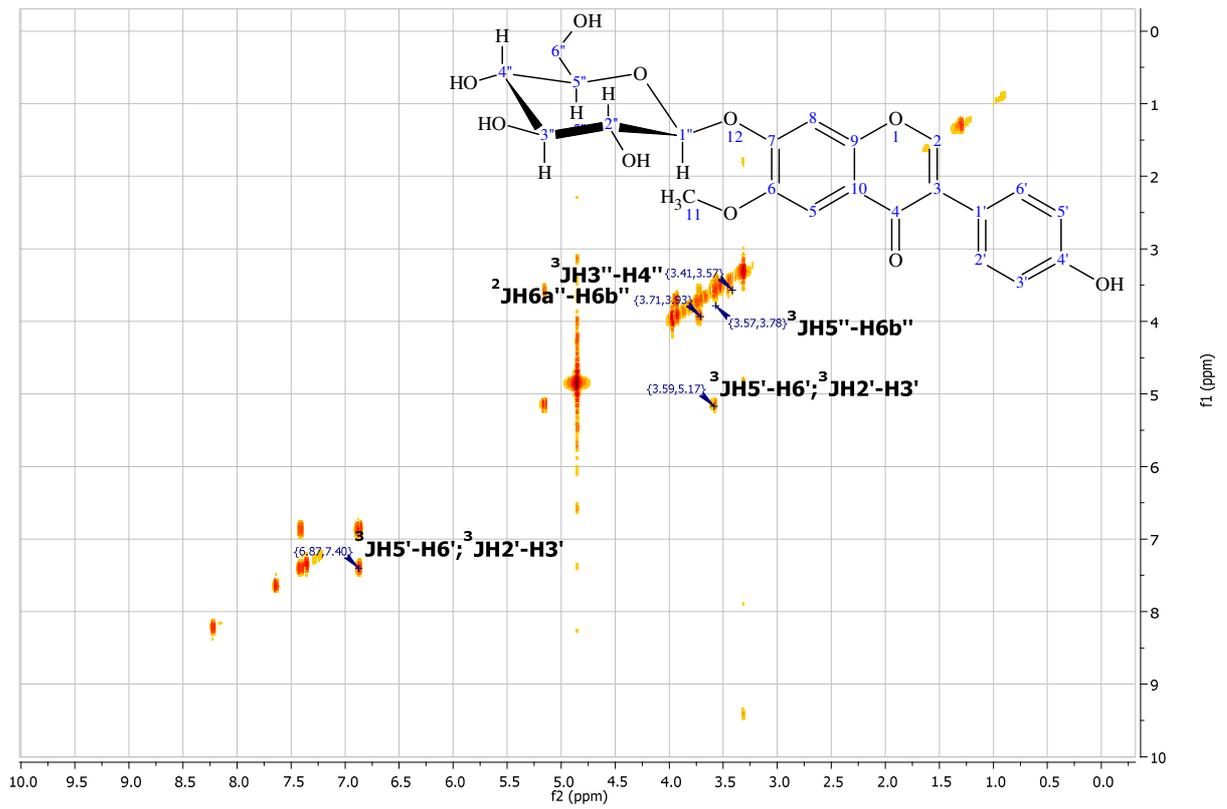


Figura 27. Espectro de RMN¹H 2D de correlação homonuclear ¹H-¹H- COSY da glicitina

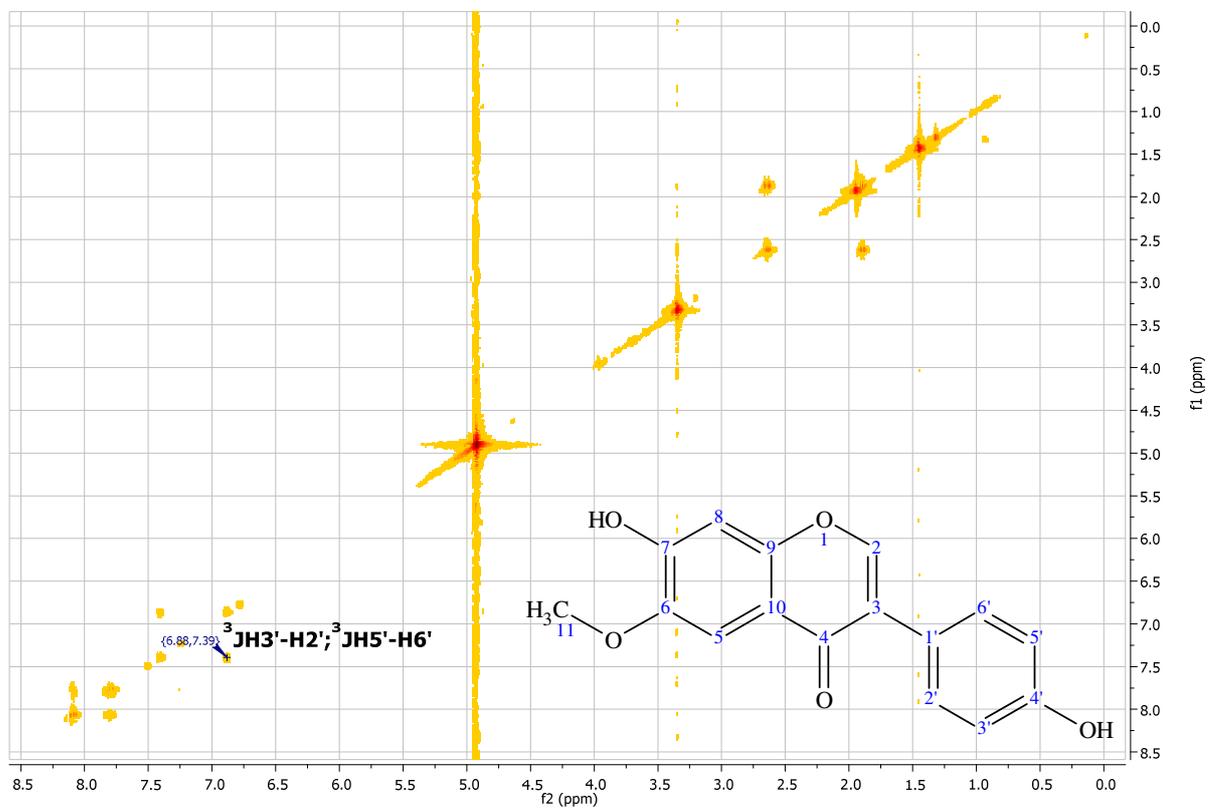


Figura 28. Espectro de RMN¹H 2D de correlação homonuclear ¹H-¹H- COSY da gliciteína

A posição da metoxila foi confirmada pela correlação de seus hidrogênios com o carbono 6 observada no espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC (Figura 29). Este espectro também foi útil para visualização dos carbonos quaternários, que não foi possível no espectro de RMN ^{13}C .

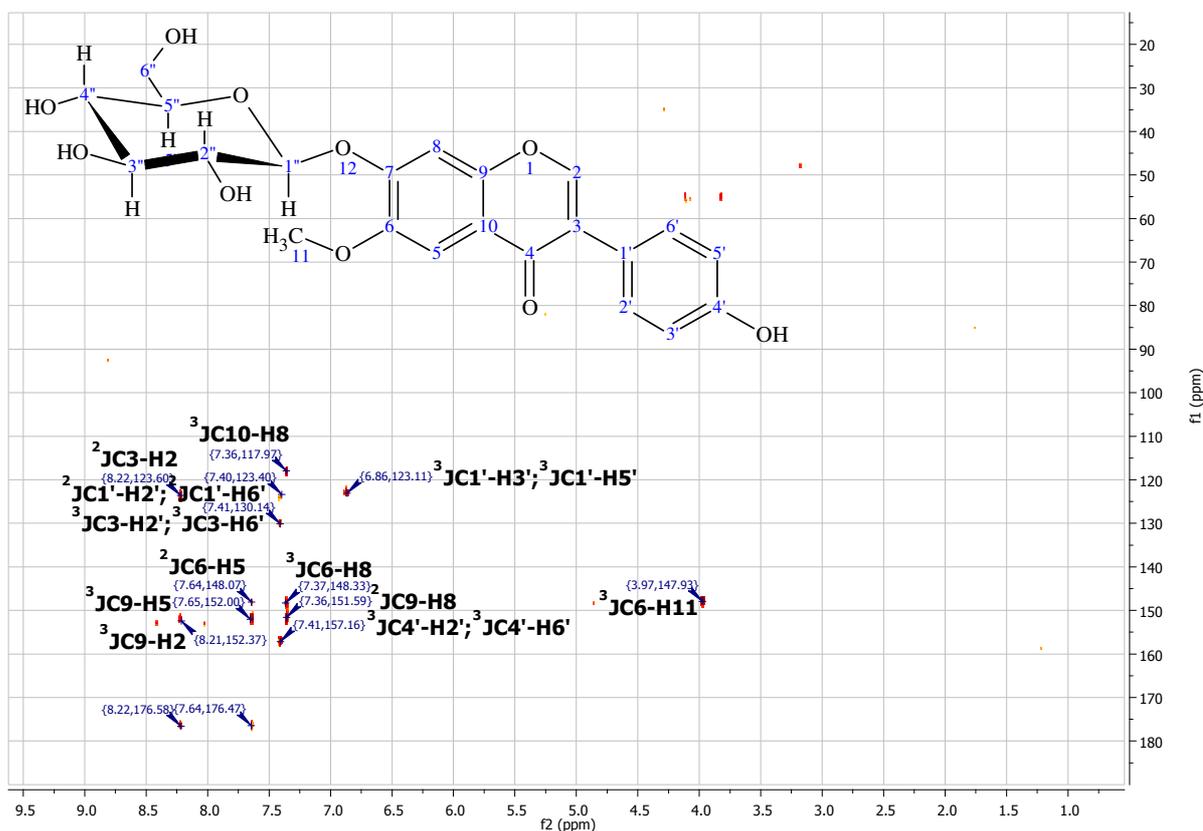


Figura 29. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC da **glicitina**

O espectro de RMN ^1H da **genistina** apresentou dois dupletos em δ_{H} 6,70 e 6,51, com uma constante de acoplamento ($J=2,2\text{Hz}$), prevista para interação de hidrogênios *meta* relacionados, condizente com a presença de átomos de hidrogênio nas posições 6 (H-6) e 8 (H-8). No espectro 2D ^1H - ^1H -COSY da **genistina** (Figura 30) foi observada a correlação dos hidrogênios H-2'/H-6' e 3'/H-5''. Assim como as correlações entre os hidrogênios da unidade glucopiranosila.

A atribuição dos carbonos quaternários foi feita com base no espectro 2D HMBC (Figura 31). A posição da unidade glicopiranosila no esqueleto isoflavônico da **genistina** foi confirmada através da correlação observada do hidrogênio anomérico (δ_{H} 5,05) com o carbono 7 (δ_{H} 163,75, $^3\text{J}_{\text{CH}}$).

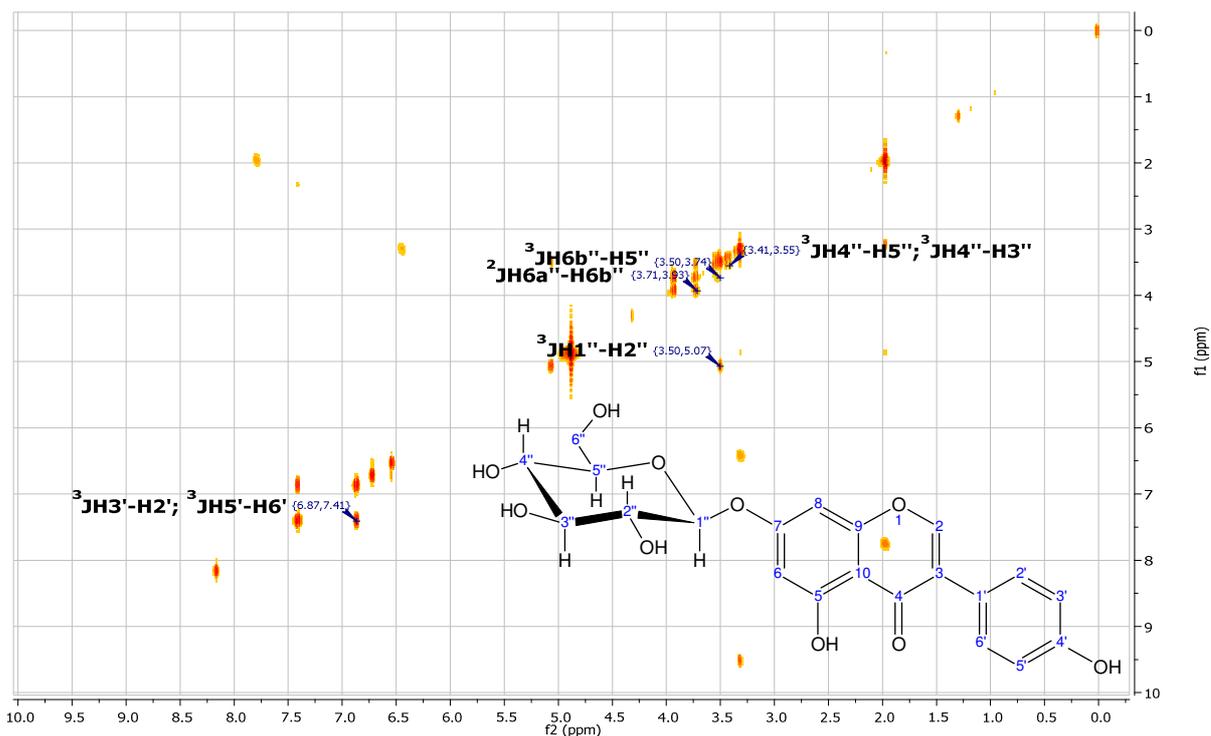


Figura 30. Espectro de RMN¹H 2D de correlação homonuclear ¹H-¹H- COSY da genistina

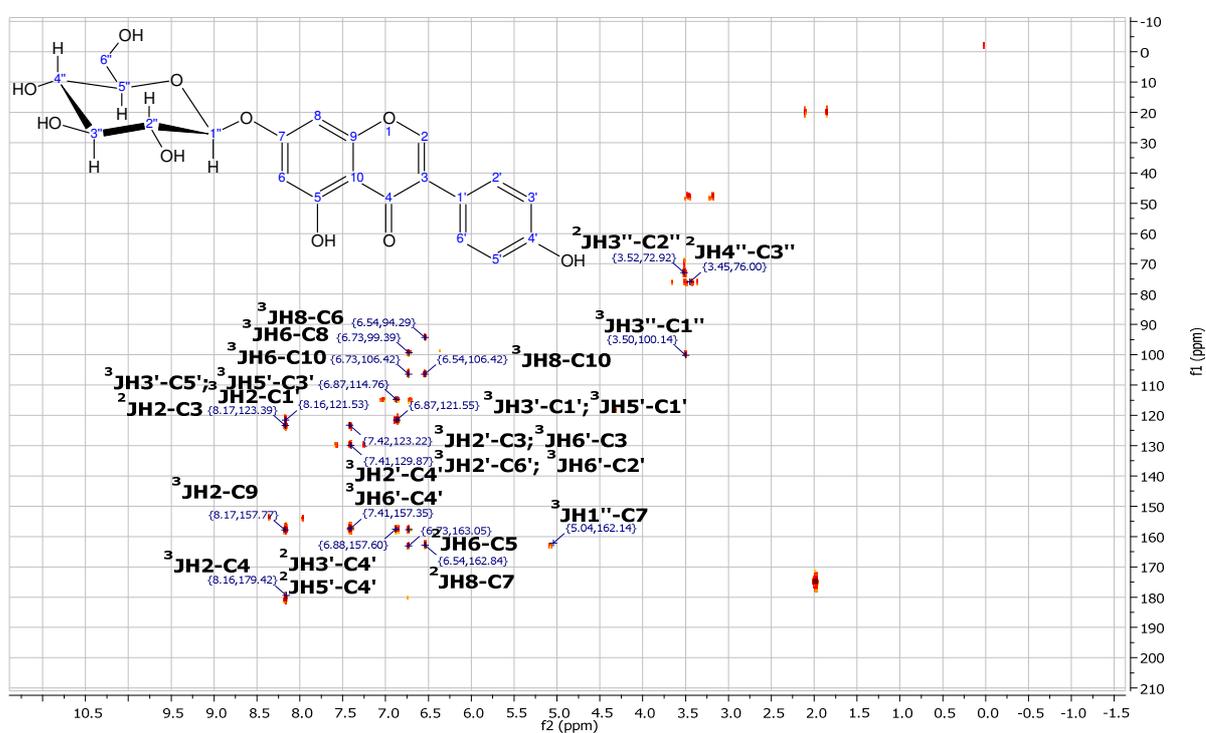


Figura 31. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC da genistina

A Tabela 16 apresenta os dados espectrais de RMN assim como as correlações observadas no espectro de RMN 2D HSQC.

Tabela 16. Dados espectrais de RMN¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) das isoflavonas isoladas, inclusive informações do HSQC. Deslocamentos químicos de hidrogênios em δ_H (ppm) e carbono-13 em δ_C (ppm). Constante acoplamento (J) em Hz (entre parenteses)

	Daidzina HSQC		Daidzina Literatura ^a		Glicitina HSQC		Glicitina Literatura ^a	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	152,9	8,24(s)	153,1	8,35(s)	153,5	8,24(s)	153,2	8,37(s)
3	124,0	-	123,7	-	nd	-	123,3	-
4	175,9	-	174,7	-	nd	-	174,6	-
5	126,1	8,18(d,8,8)	126,9	8,05(d,8,8)	104,7	7,66(s)	105,0	7,48(s)
6	114,8	7,24(dd,8,8;2,2)	115,4	7,14(dd,8,8;2,4)	nd	-	147,7	-
7	161,3	-	161,3	-	nd	-	152,7	-
8	102,7	7,28(d,2,2)	103,3	7,22(d,2,4)	103,9	7,37(s)	103,0	7,32(s)
9	157,0	-	157,2	-	nd	-	151,7	-
10	118,0	-	118,5	-	nd	-	118,0	-
11(OCH ₃)	-	-	-	-	55,4	3,99(s)	55,0	3,88(s)
1'	121,8	-	122,2	-	nd	-	122,8	-
2'	129,2	7,41(d,8,5)	129,9	7,41(d,8,7)	130,1	7,42(d,8,8)	130,3	7,41(d,8,6)
3'	114,0	6,88(d,8,5)	114,9	6,82(d,8,7)	114,9	6,88(d,8,8)	115,2	6,82(d,8,6)
4'	156,6	-	157,0	-	nd	-	157,6	-
5'	114,0	6,88(d,8,5)	115,5	6,82(d,8,7)	114,9	6,88(d,8,8)	115,2	6,82(d,8,6)
6'	129,2	7,41(d,8,5)	129,9	7,41(d,8,7)	130,1	7,42(d,8,8)	130,3	7,41(d,8,6)
1''	99,6	5,13(d,7,5)	100,1	5,09(d,7,5)	100,5	5,17(d,7,6)	99,8	5,17(d,7,4)
2''	72,5	3,54(m)	73,1	3,20(m)	73,2	3,60(m)	73,2	3,30(m)
3''	75,6	3,54(m)	76,4	3,30-3,36(m)	76,4	3,54(m)	76,9	3,30(m)
4''	69,0	3,41(m)	69,6	3,44-3,52(m)	69,8	3,44(m)	69,8	3,17(m)
5''	76,2	3,58(m;5,9;2,5)	77,2	3,44-3,52(m)	77,1	3,60(m)	77,4	3,46(m)
6a''	60,2	3,95(dd,12,2;2,5)	60,6	3,74(m)	61,1	3,95(dd,12,0;2,2)	60,8	3,70(m)
6b''		3,74(dd,12,2;5,9)	60,6	3,46(m)		3,73(dd,12,0;6,0)		3,46(m)

*Espectros de RMN-DEPTQ foram usados para deduzir o número de hidrogênios nos átomos de carbono. Os valores de J foram deduzidos dos espectros 1D de RMN¹H e os espectros COSY colaboram nas atribuições dos δ_H e δ_C .

nd = não determinado devido a pequena quantidade de amostra isolada

a= Dados da literatura (RIBANI, 2008)

Tabela 16. Continuação

	Daidzeína	Daidzeína Literatura ^a	Gliciteína	Gliciteína Literatura ^b	Genistina HSQC	Genistina Literatura ^c	Genistina Literatura ^c	Genistina Literatura ^c
	δ_H	δ_H	δ_H	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	8,15(s)	8,25(s)	8,09(s)	8,19(s)	155,5	8,14(s)	155,8	8,41(s)
3	-	-	-	-	125,2	-	123,7	-
4	-	-	-	-	182,7	-	181,7	-
5	8,07(d,8,8)	7,94(d,8,7)	7,49(s)	7,43(s)	164,9	-	163,8	-
6	6,95(dd,8,8;2,2)	6,93(dd,8,7;2,1)	-	-	101,2	6,51(d,2,2)	100,1	6,46(d,2,1)
7	-	-	-	-	163,7	-	164,2	-
8	6,85(d,2,2)	6,83(d,2,1)	6,75(s)	6,91(s)	96,0	6,70(d,2,2)	95,9	6,72(d,2,1)
9	-	-	-	-	159,4	-	158,4	-
10	-	-	-	-	108,2	-	101,0	-
11(OCH ₃)	-	-	3,95(s)	3,88(s)	-	-	-	-
1'	-	-	-	-	123,2	-	123,7	-
2'	7,40(d,8,8)	7,38(d,8,4)	7,40(d,8,8)	7,37(d,8,7)	131,5	7,39(d,8,5)	131,3	7,40(d,8,7)
3'	6,87(d,8,8)	6,77(d,8,4)	6,87(d,8,8)	6,79(d,8,7)	116,4	6,85(d,8,5)	116,3	6,82(d,8,7)
4'	-	-	-	-	159,1	-	155,8	-
5'	6,87(d,8,8)	6,77(d,8,4)	6,87(d,8,8)	6,79(d,8,7)	116,4	6,85(d,8,5)	116,3	6,82(d,8,7)
6'	7,40(d,8,8)	7,38(d,8,4)	7,40(d,8,8)	7,37(d,8,7)	131,5	7,39(d,8,5)	131,3	7,40(d,8,7)
1''	-	-	-	-	101,8	5,05(d,7,3)	100,7	5,05(d,7,5)
2''	-	-	-	-	74,8	3,50(m)	74,2	3,91-3,30
3''	-	-	-	-	78,0	3,50(m)	77,6	3,91-3,30
4''	-	-	-	-	71,4	3,42(m)	70,7	3,91-3,30
5''	-	-	-	-	78,5	3,50(m)	78,4	3,91-3,30
6a''	-	-	-	-	62,6	3,91(dd,12,1;2,2)	61,8	3,91-3,30
6b''	-	-	-	-		3,71(dd,12,1;5,6)		3,91-3,30

*Espectros de RMN-DEPTQ foram usados para deduzir o número de hidrogênios nos átomos de carbono. Os valores de J foram deduzidos dos espectros 1D de RMN¹H e os espectros COSY colaboram nas atribuições dos δ_H e δ_C .

nd = não determinado devido a pequena quantidade de amostra isolada

a= Dados da literatura (RIBANI, 2008)

b= Dados da literatura (PARK, 1999)

c= Dados da literatura (WANG *et al.*, 1999)

4.1.4.2. Espectrometria de massas

No espectro de massa acurada das isoflavonas glicosiladas (Figura 32) observou-se a transição m/z 417,1071 \rightarrow m/z 255,0638 para a **daidzina** (PS1), m/z 447,2482 \rightarrow m/z 285,1559 para a **glicitina** (PS2) e m/z 433,1111 \rightarrow m/z 271,0602 para a **genistina** (PS3), representando reação de fragmentação envolvendo a molécula protonada: $[M+H]^+$ e eliminação de uma molécula correspondente à unidade glicopiranosila ($[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$, Esquema 8).

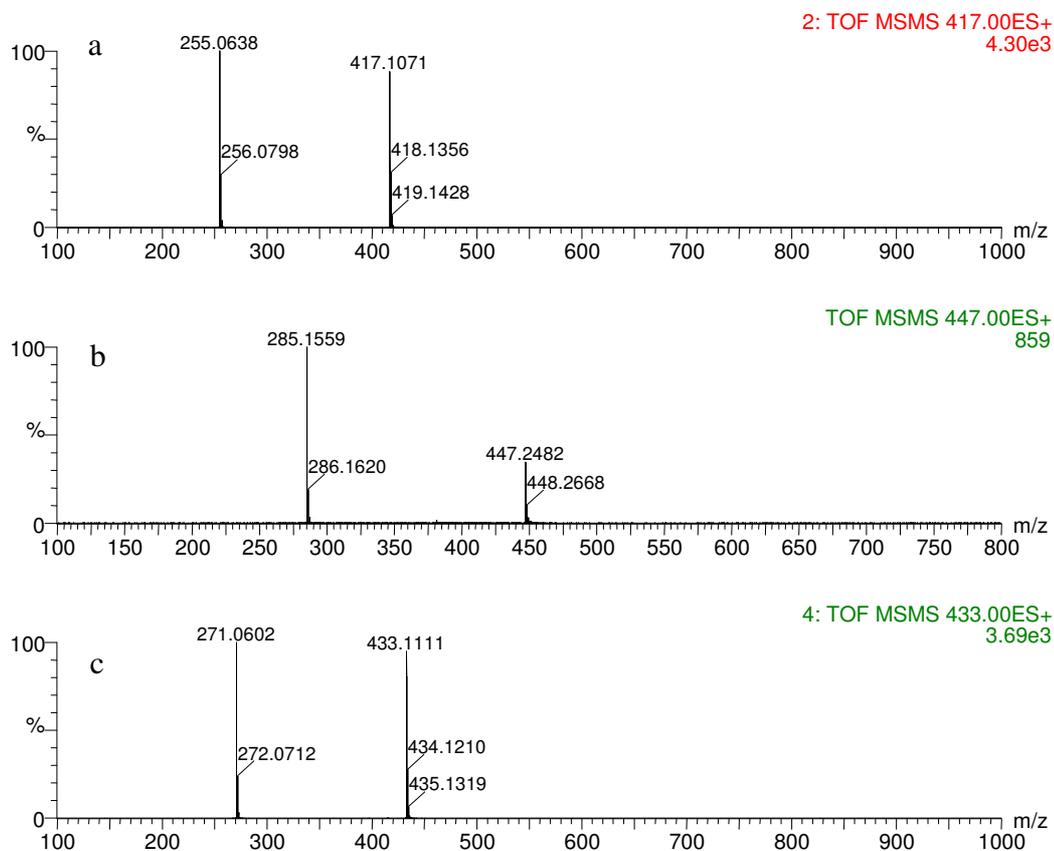
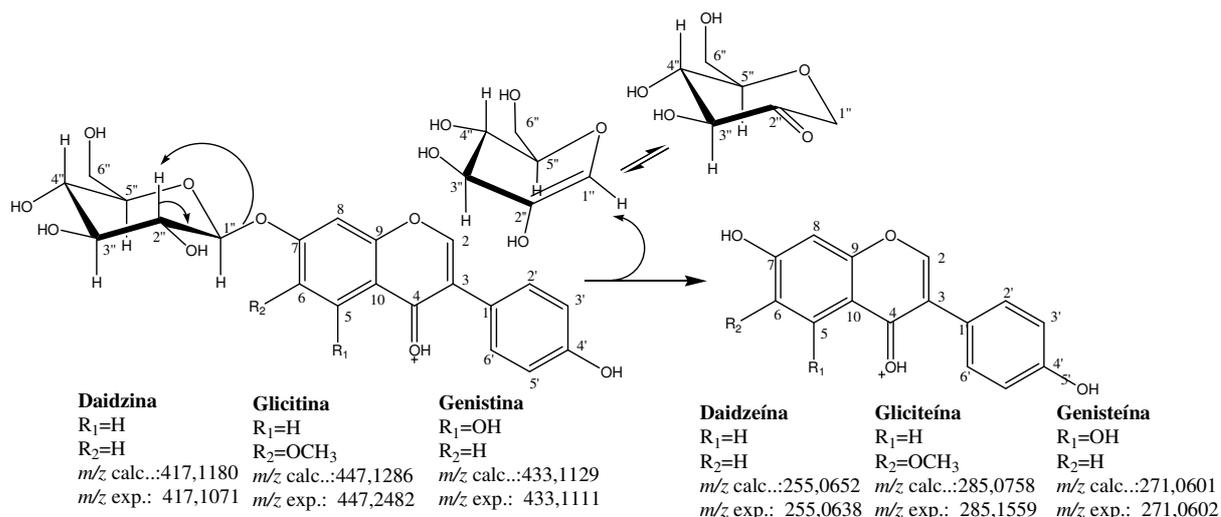


Figura 32. Espectro de massas (modo positivo) da **daidzina** (a); **glicitina** (b) e **genistina** (c)



Esquema 8. Proposta de mecanismo de fragmentação para as isoflavonas glicosiladas

Nos espectros de massa acurada das agliconas isoflavônicas (modo positivo, Figura 33) foram observados apenas os íons correspondentes às agliconas protonadas ($[M+H]^+$, Figura 34).

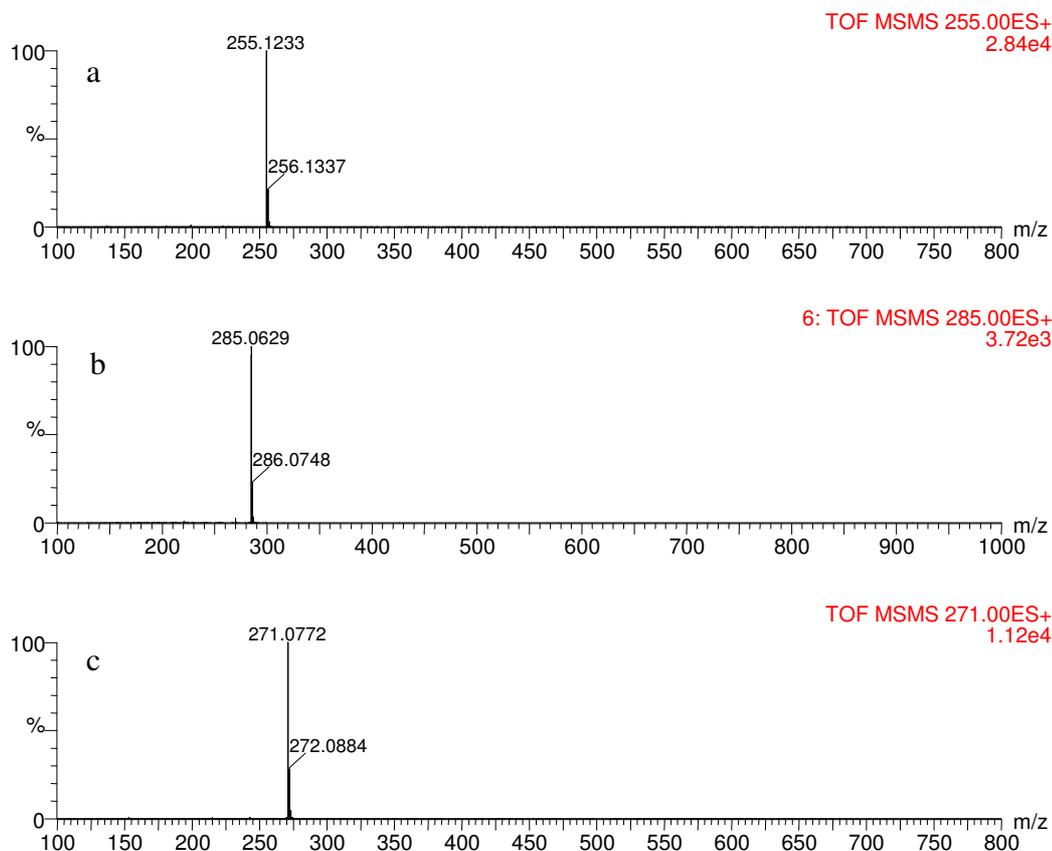
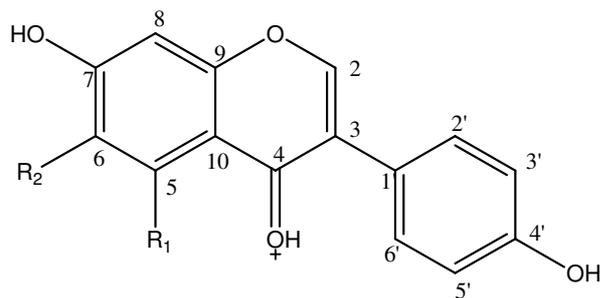


Figura 33. Espectro de massas (modo positivo) da **daidzeína** (a); **gliciteína** (b) e **genisteína** (c)



Daidzeína

R₁=H

R₂=H

m/z calc.:255,0652

m/z exp.: 255,1233

Gliciteína

R₁=H

R₂=OCH₃

m/z calc.:285,0758

m/z exp. :285,0629

Genisteína

R₁=OH

R₂=H

m/z calc.:271,0601

m/z exp.: 271,0772

Figura 34. Proposta de protonação molecular das agliconas isoflavônicas (modo positivo)

4.1.4.3. Espectros de ultravioleta

A **daidzina** e a **daidzeína** apresentaram espectros na região do ultravioleta (Figura 35) com absorções em λ_{\max} 250 nm, referente à banda II, e 303 nm, referente à banda I; a **glicitina** e a **gliciteína** revelaram tais bandas λ_{\max} 258 nm (banda II) e 318 nm (banda I); para **genistina** e a **genisteína** observou-se a banda II em λ_{\max} 260 nm. Nas isoflavonas a banda II é a mais intensa que a banda I. Não foi observado efeito significativo no espectro na região do ultravioleta quando a glicosilação envolveu a hidroxila localizada no carbono 7.

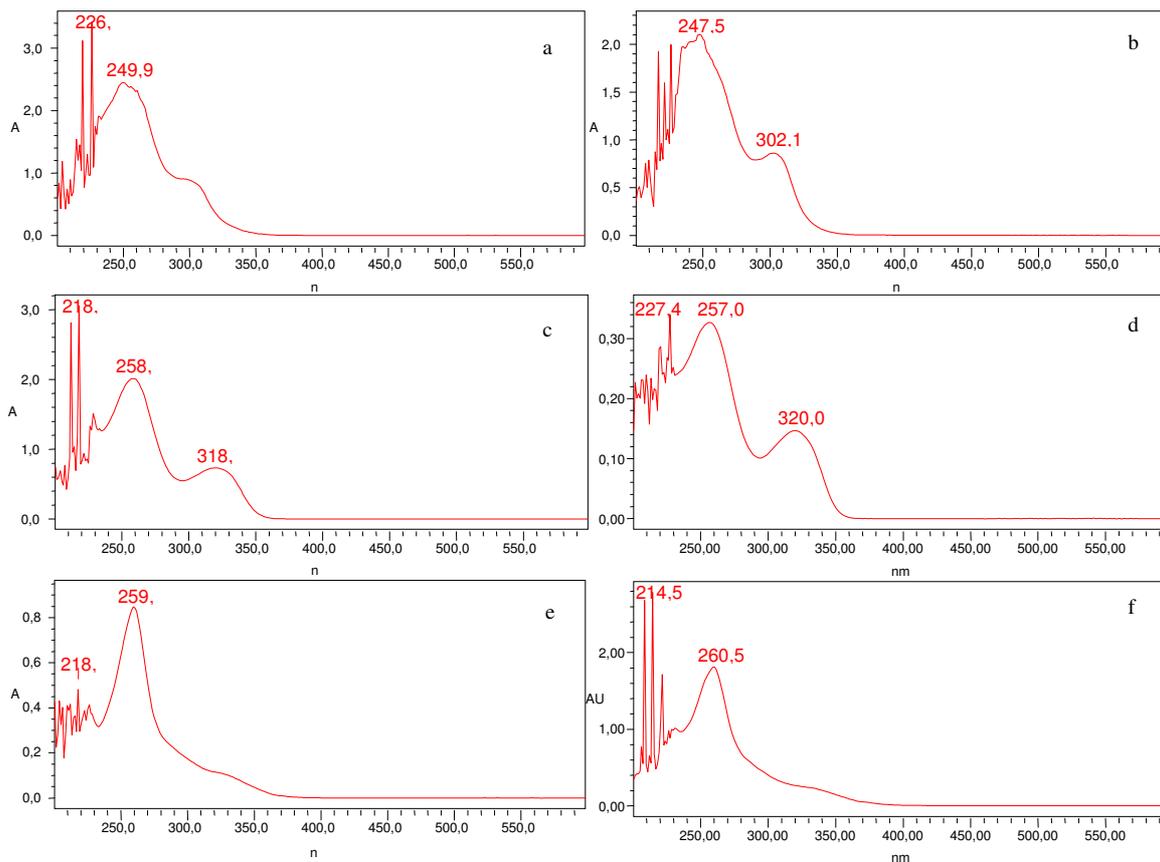


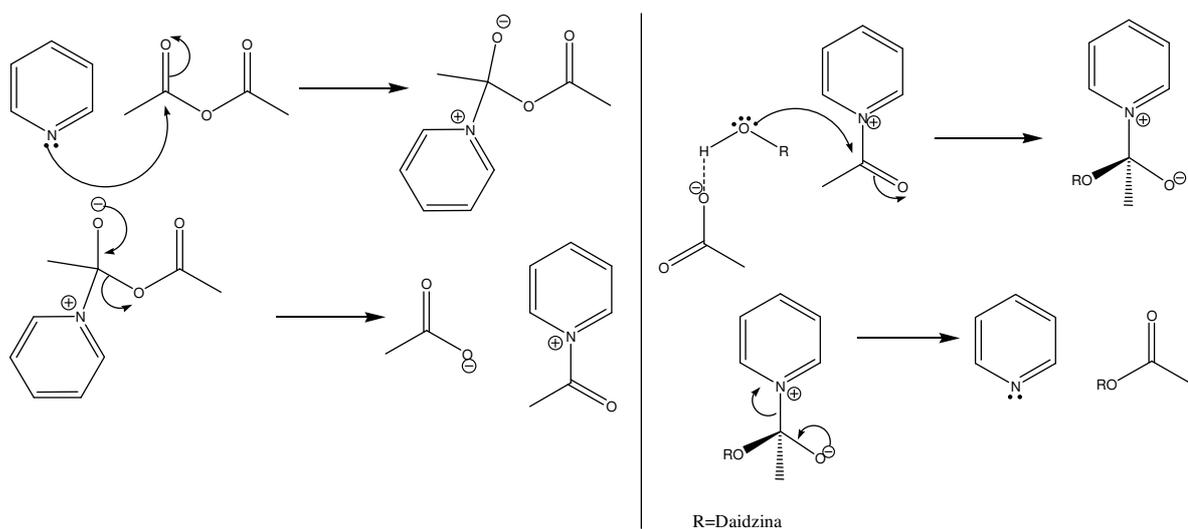
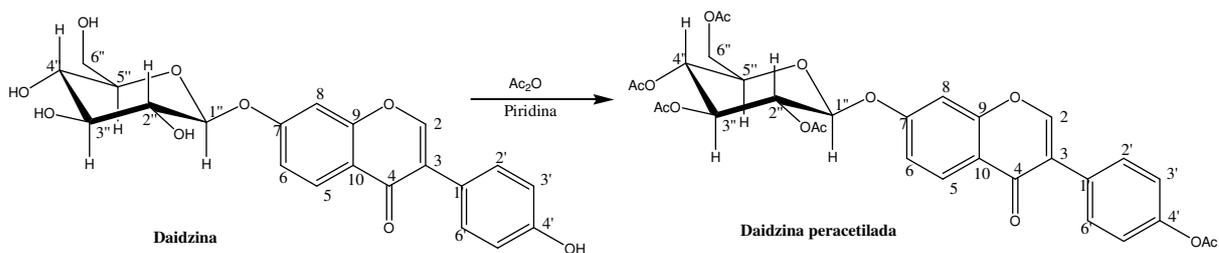
Figura 35. Espectros de ultravioleta da daidzina (a), daidzeína (b), glicitina (c), gliciteína (d), genistina (e) e genisteína (f)

A quantidade isolada de **genisteína** não foi suficiente para obtenção dos espectros de RMN.

Os espectros de RMN, UV e EM das isoflavonas estão condizentes com dados da literatura (PARK *et al.*, 1999; MURPHY *et al.*, 2002; RIBANI, 2008). Por isso, neste caso por se tratar de substâncias muito bem descritas e já isoladas anteriormente desta matriz, estes dados são suficientes para confirmação estrutural adicional.

4.1.4.4. Preparação de derivado

Foi preparado um derivado acetilado da **daidzina**, isoflavona obtida em maior quantidade. A acetilação foi realizada através de reação de anidrido acético com a **daidzina**, na presença de piridina (MATOS, 2009). O Esquema 9 apresenta a reação de acetilação da daidzina e o mecanismo proposto para a reação.



Esquema 9. Reação de acetilação da daidzina e mecanismo proposto para a reação

A Figura 36 apresenta o espectro de massa acurada da **daidzina acetilada**. O acréscimo de 210 unidades de massa (cinco unidades de acetil) confirmou a existência de cinco hidroxilas, quatro da unidade glicopiranosila e uma da aglicona.

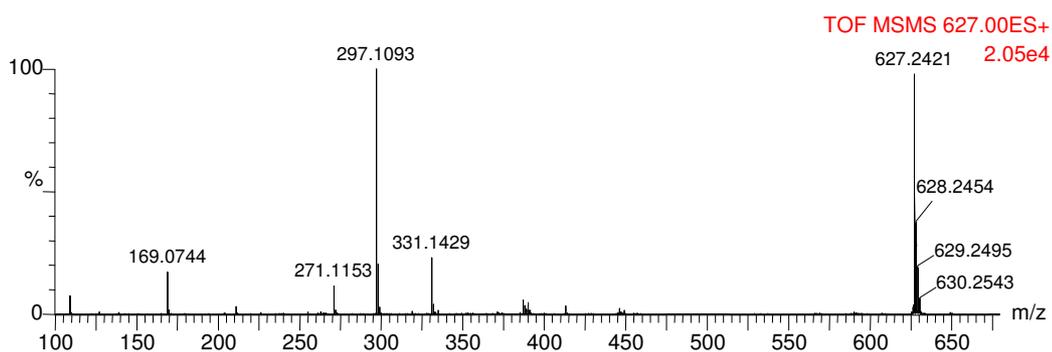
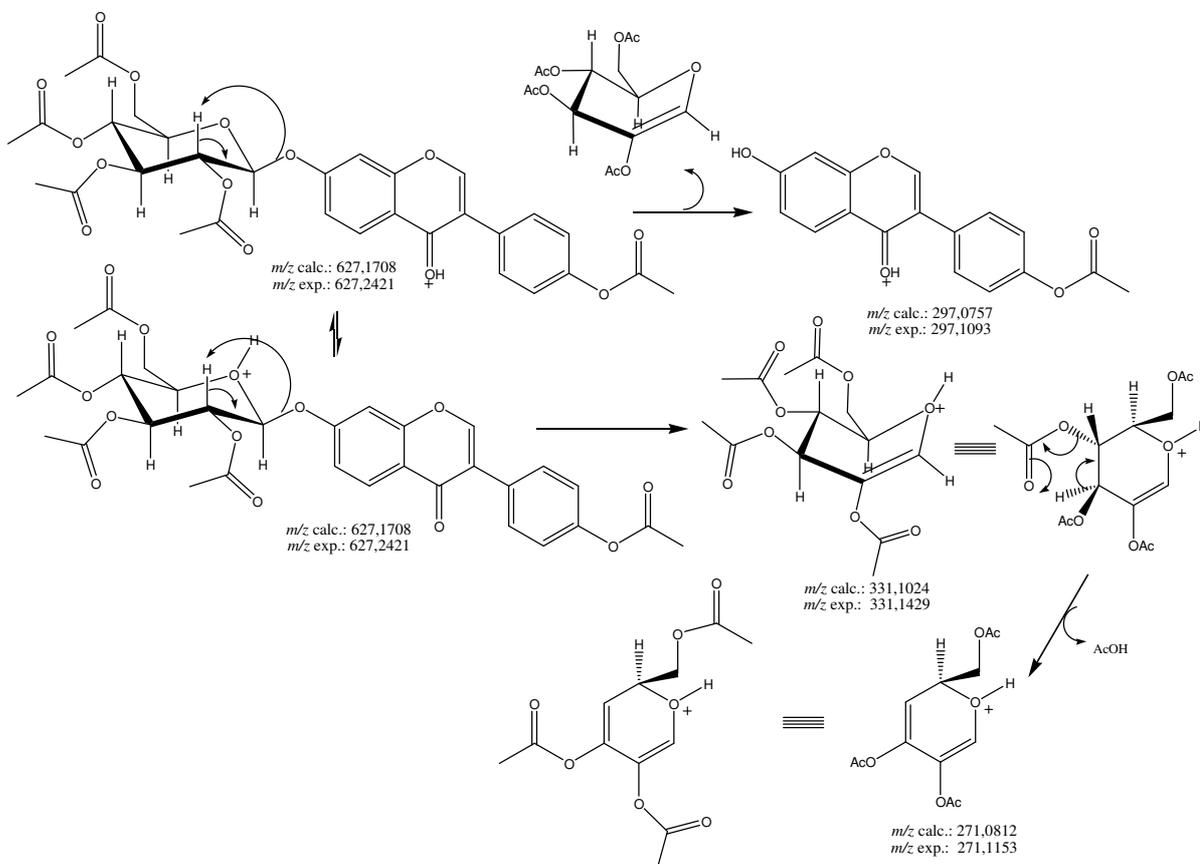


Figura 36. Espectro de massas da daidzina acetilada (modo positivo)

O Esquema 10 apresenta proposta de fragmentação para justificar os picos principais observados no espectro de massas. A principal reação de fragmentação justificou o pico

observado em: m/z 297,1093 (m/z 627,2421 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 297,1093 $[M+H-C_{14}H_{18}O_9]^+$), formado pela perda de molécula correspondente ao grupo glicopiranosila acetilado.



Esquema 10. Proposta de fragmentação da **daidzina peracetilada** no espectrômetro de massas (modo positivo), justificando-se somente os principais picos observados.

Foi observado efeito hipsocrômico ($\Delta\lambda$ 7 nm) na absorção da banda I após a acetilação do grupo hidroxílico na posição 4' da **daidzina**. Esta diferença pode ser explicada pela atenuação do efeito mesomérico doador de electrons contribuído pelo átomo oxigênio após a acetilação, já que o grupo carbonila exerce também efeito retirador de elétrons por mesomeria. Como esperado, a retenção da **daidzina acetilada** ($Tr=22,5$) em fase reversa foi maior que a da **daidzina** ($Tr=7,2$) justificada pela redução de polaridade da daidzina acetilada (Figura 37).

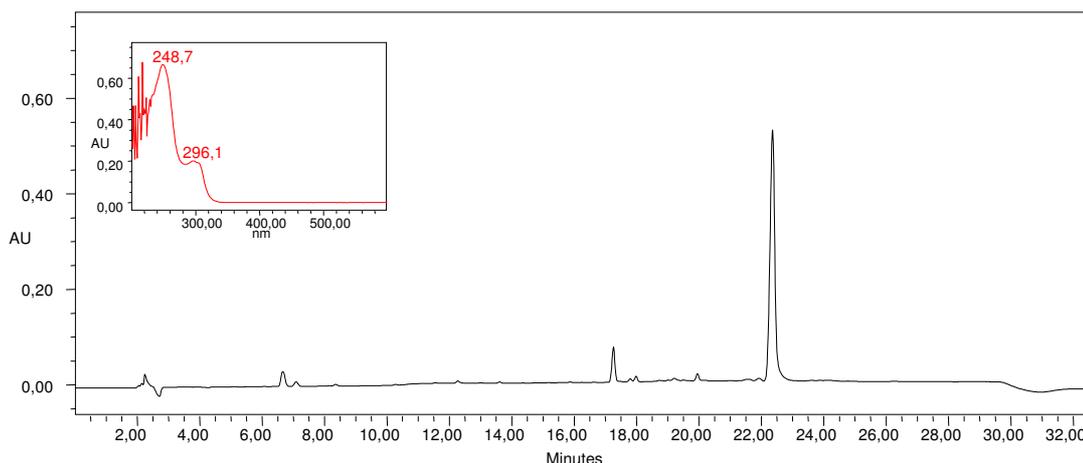


Figura 37. Cromatograma e espectro de ultravioletada **daidzina acetilada** à 260nm em coluna de fase reversa (YMC C₁₈ 250mmx4,6mm, 5µm)

4.1.5. Cálculo da concentração das soluções de isoflavona e preparo da curva analítica

A pureza das isoflavonas isoladas foi determinada através da porcentagem dos picos no cromatograma, pela análise por CLAE-DAD. A quantificação foi determinada através da lei de *Lambert Beer* à 260nm.

A Tabela 17 sumariza os dados utilizados para quantificação dos padrões, tais como: a absorvância lida em espectrofotômetro, a concentração real (Equação 2) para as soluções de isoflavona e o volume da alíquota (Equação 3) utilizada no preparo da solução estoque.

Tabela 17. Absorvância (ABS), concentração e volume da alíquota para as soluções de isoflavonas

	ABS	Concentração real (Equação 2, mg/mL)	Volume da alíquota (Equação 3, µL)
Daidzina	0,589	0,895	179
Glicitina	0,383	0,610	66
Genistina	0,294	0,388	412
Daidzeína	0,530	0,424	94
Gliciteína	0,172	0,093	429
Genisteína	0,326	0,119	335

Foram misturadas em balão volumétrico de 5mL, as alíquotas de cada solução de isoflavona apresentadas na Tabela 17 e o volume foi completado com solução de metanol e

água (1:1). Para o preparo dos pontos (níveis) de curva analítica foram feitas diluições conforme a Tabela 10 (item 3.4.7).

Cada ponto da curva analítica foi preparado em vial do injetor automático e injetado em triplicata. A Figura 38 apresenta a curva analítica para cada isoflavona com seus respectivos coeficientes de determinações (R^2), sendo que para todas as isoflavonas se apresentou maior que 0,99. Portanto, como o coeficiente de determinação é maior que 0,9 a curva analítica é considerada linear na faixa de trabalho utilizada.

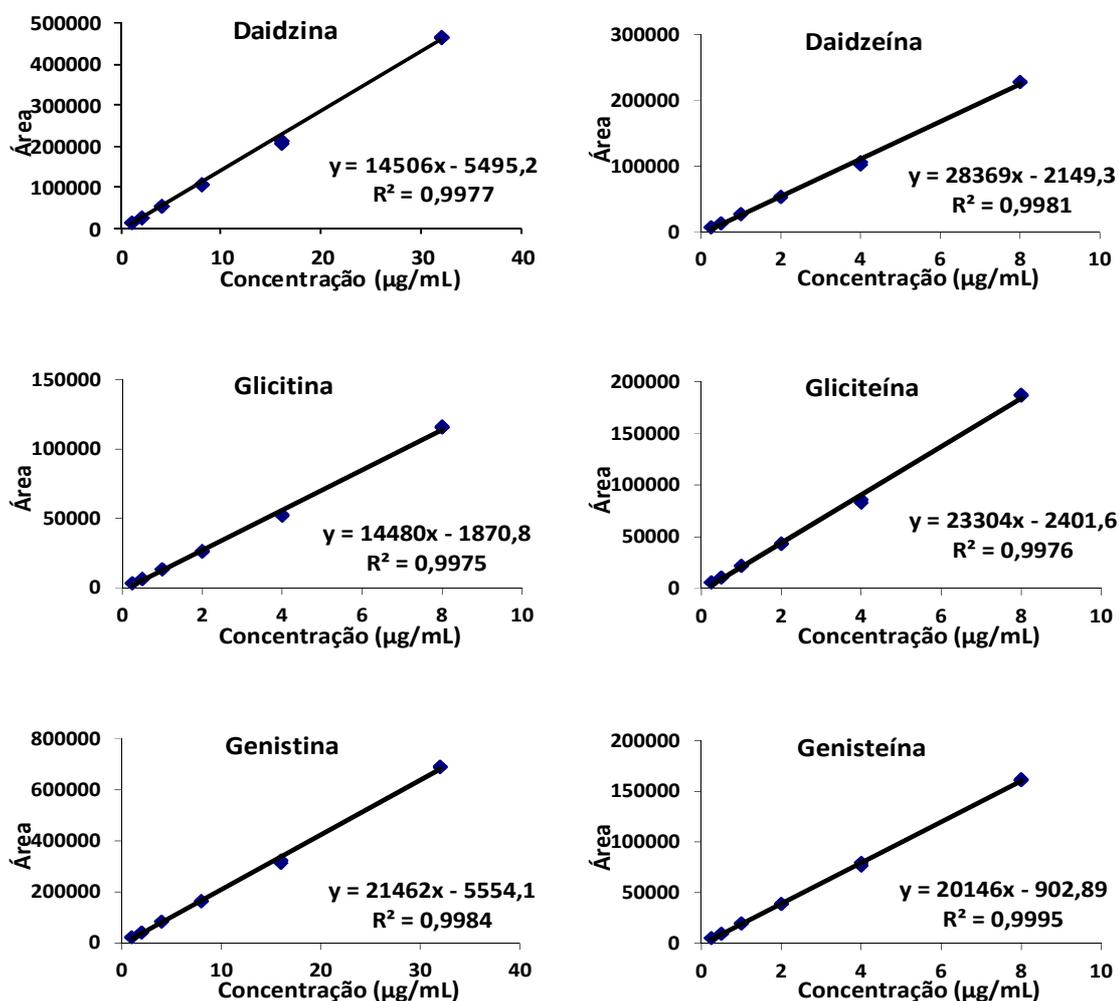


Figura 38. Curva de calibração para as isoflavonas

4.1.6. Comparação das colunas alternativas à coluna convencional

A diminuição no tempo de separação é um fator que é cada vez mais visado por laboratórios que utilizam a CLAE, mas para isso é necessária redução no tamanho das colunas. O comprimento da coluna influencia diretamente o tempo de separação, ao passo que o diâmetro interno é inversamente proporcional ao fluxo da fase móvel. Isto significa redução no volume de fase móvel com a utilização de colunas menores. Porém, para que a redução no tamanho da coluna não afete a eficiência da separação é preciso que as partículas de recheio da coluna possuam diâmetro reduzido.

A redução do diâmetro das partículas aumenta a pressão da análise. Para separação em colunas com partículas de diâmetros menores que $2\mu\text{m}$ é necessário o uso de sistemas de cromatografia líquida que utilizem altas pressões. Como este tipo de equipamento não está disponível em todos os laboratórios, o objetivo foi otimizar a separação das isoflavonas do extrato de soja em um sistema de CLAE usando colunas com partículas maiores que $2\mu\text{m}$.

A separação de isoflavonas do extrato de soja em coluna convencional (coluna C_{18} , YMC-Pack ODS-AM303, $250\text{mm}\times 4,5\text{mm}$ e $5\mu\text{m}$), que leva em média 45 minutos conforme método AOAC (2005) (vide item 3.4.3). A separação foi otimizada na coluna 1 (coluna C_{18} , Phenomenex Kinetex, $50\text{mm}\times 2,1\text{mm}$ e $2,6\mu\text{m}$) (vide item 3.4.4.1) e coluna 2 (coluna C_{18} , Thermo BDS Hypersil, $100\text{mm}\times 4,6\text{mm}$ e $2,4\mu\text{m}$) (vide item 3.4.4.2). Os cromatogramas obtidos em tais colunas foram comparados à coluna convencional. A Figura 39 sumariza os cromatogramas do extrato de soja nas colunas testadas.

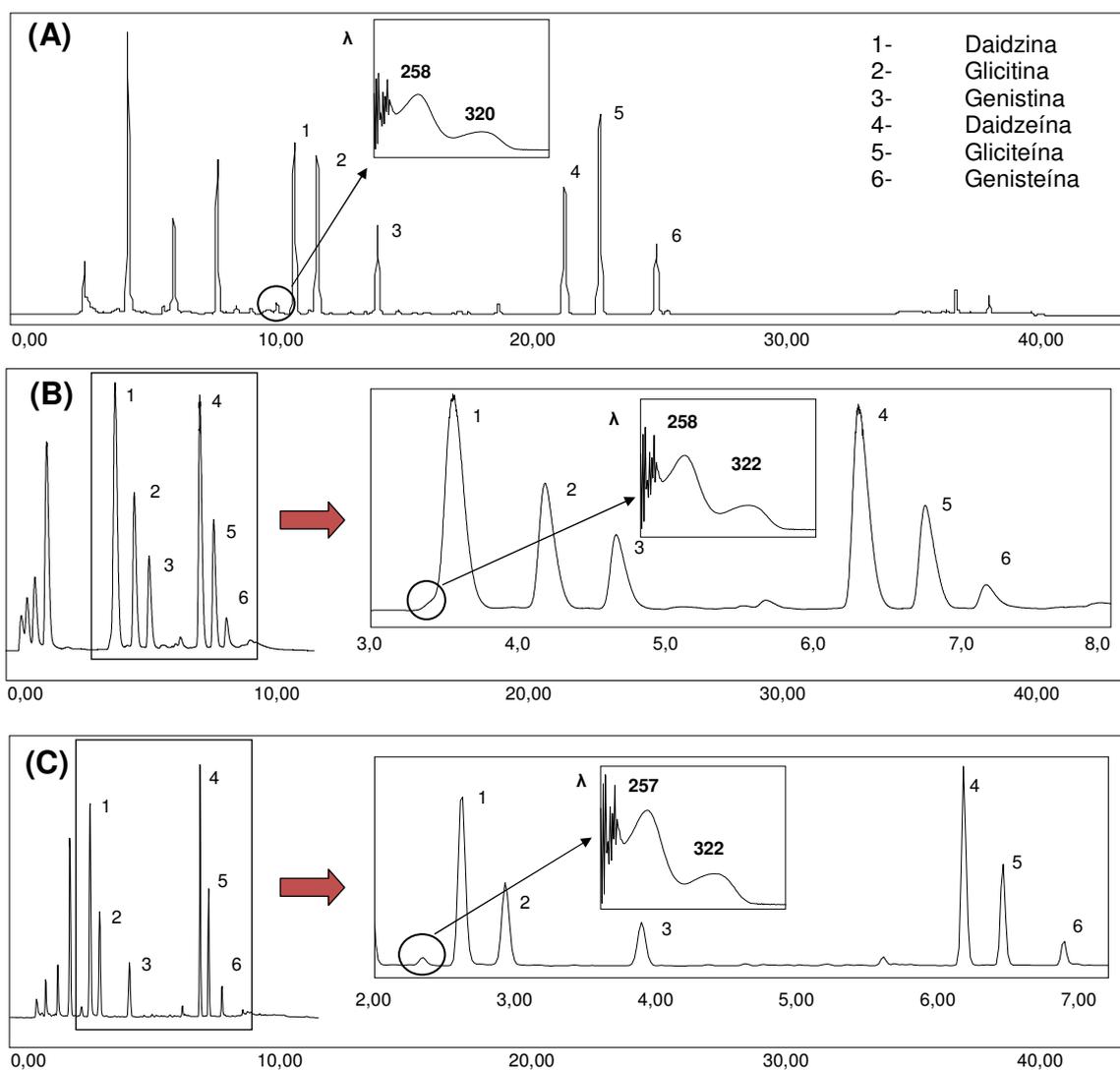


Figura 39. Comparação cromatográfica de isoflavonas envolvendo as colunas: (A) convencional, (B) 1 e (C) 2

A Tabela 18 apresenta as condições de análise em cada coluna, bem como a redução do volume de solvente em relação à coluna convencional.

Tabela 18. Condições cromatográficas e redução do volume de solvente usado nas colunas testadas

Coluna	Dimensões da coluna	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Volume (mL)	Redução de volume (%)
Convencional	250mmx4,5mm e 5 μ m	45	1,3	58,5	0
Coluna 1	50mmx2,1mm e 2,6 μ m	10	0,35	3,5	94
Coluna 2	100mmx4,6mm e 2,4 μ m	10	1,3	13	78

Apesar da coluna 1 ter apresentado maior redução no volume de solvente, a coluna 2 revelou picos mais finos e bem resolvidos, quando também foi possível separar um interferente inevitável com a utilização da coluna 1, como é possível perceber na Figura 39. A coluna 1 possui partículas com a tecnologia *core shell* e as colunas convencionais e 2 possuem partículas totalmente porosas, como visto na literatura este tipo de partícula normalmente apresenta comparável ou maior eficiência que as totalmente porosas, porém no caso das colunas utilizadas para o teste o comprimento da coluna 2 é o dobro da coluna 1, por isso foi observada uma melhor separação com a utilização da coluna 2.

A coluna 2 apresentou elevada eficiência na separação cromatográfica de isoflavonas de soja, revelando picos finos e bem resolvidos. Além disso, sua utilização viabilizou uma redução de 78% no volume de solvente e 77% no tempo de análise quando comparado com a coluna convencional. Por isso esta coluna foi selecionada para substituição da coluna convencional em análises de rotina, mas para isso é necessário comparar a resposta desta em relação à convencional em análises quantitativas.

4.1.7. Comparação da resposta das colunas convencionais e coluna 2

A comparação da resposta da coluna 2 (coluna C₁₈, Thermo BDS Hypersil, 100mmx4,6mm e 2,4µm) com a coluna convencional (coluna C₁₈, YMC-Pack ODS-AM303, 250mmx4,5mm e 5µm) foi avaliada através da comparação da análise de extrato de soja em cinco replicatas em cada coluna. A comparação da resposta foi avaliada através do teste F e do teste T de Student. A Tabela 19 sumariza a média, o desvio padrão (DP), a variância, o coeficiente de variação (CV), e o resultado dos testes estatísticos.

Tabela 19. Média, desvio padrão (DP), variância, coeficiente de variação (CV) e testes estatísticos

Isoflavona	Coluna	Média (mg/100g)	DV	Variância	CV (%)	T_{calc}	T_{tab}	F_{calc}	F_{tab}
Daidzina	CC	8,64 ^a	0,267	0,071 ^g	3,09	0,73		1,49	
	C2	8,77 ^a	0,326	0,106 ^g	3,71				
Glicitina	CC	1,29 ^b	0,025	0,001 ^h	1,97	0,59		3,26	
	C2	1,30 ^b	0,046	0,002 ^h	3,53				
Genistina	CC	25,71 ^c	0,625	0,390 ⁱ	2,43	0,83		1,98	
	C2	25,42 ^c	0,443	0,197 ⁱ	1,74				
Daidzeína	CC	2,27 ^d	0,102	0,010 ^j	4,47	2,06	2,31	1,73	6,39
	C2	2,16 ^d	0,077	0,006 ^j	3,58				
Gliciteína	CC	ND	-	-	-				
	C2	ND	-	-	-				
Genisteína	CC	7,26 ^e	0,192	0,037 ^l	2,64	0,26		4,57	
	C2	7,29 ^e	0,090	0,008 ^l	1,23				
Totais	CC	45,17 ^f	1,149	1,321 ^m	2,54	0,34		1,53	
	C2	44,94 ^f	0,928	0,862 ^m	2,07				

*As médias/variâncias com letras iguais não apresentam diferença significativa (P<0.05)

As colunas apresentaram resultados equivalentes, tanto quanto ao teor de isoflavonas quanto à variância da análise. Não foi encontrada uma matriz que contivesse gliciteína naturalmente, por isso não foi possível fazer a comparação das metodologias para este analito.

Esta foi uma comparação prévia das metodologias, porém para garantir a confiabilidade do método é aconselhável a validação da metodologia, mas este não é o objetivo do trabalho.

4.1.8. Estabilidade das isoflavonas em extrato de soja congelado

A Tabela 20 sumariza a média do teor de isoflavonas e desvio padrão em cada dia de ensaio.

Tabela 20. Média da concentração de cada isoflavona em equivalente em agliconas para as isoflavonas glicosídicas, isoflavonas totais (\pm desvio padrão)

Dia	Média da concentração (mg/100g) em equivalente em aglicona (\pm desvio padrão)						
	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Daidzina	Glicitina	Genistina	Totais
0	0,28 \pm 0,01	ND	0,34 \pm 0,02	7,36 \pm 0,39	ND	10,52 \pm 0,22	18,49 \pm 0,43
7	0,25 \pm 0,02	ND	0,34 \pm 0,03	8,63 \pm 0,62	ND	11,41 \pm 0,70	20,02 \pm 2,12
15	0,26 \pm 0,01	ND	0,31 \pm 0,01	8,21 \pm 0,13	ND	11,11 \pm 0,24	19,89 \pm 0,37
30	0,24 \pm 0,01	ND	0,32 \pm 0,01	7,86 \pm 0,07	ND	10,78 \pm 0,09	19,20 \pm 0,15
60	0,28 \pm 0,05	ND	0,37 \pm 0,10	8,57 \pm 0,11	ND	11,17 \pm 0,10	20,39 \pm 0,22
90	0,27 \pm 0,03	ND	0,36 \pm 0,01	8,12 \pm 0,27	ND	10,84 \pm 0,32	19,58 \pm 0,61
120	0,25 \pm 0,01	ND	0,33 \pm 0,02	8,37 \pm 0,22	ND	10,83 \pm 0,28	19,78 \pm 0,52

ND= Não detectado

A Figura 40 sumariza o teor relativo (dia 0=100%) de cada isoflavona (**daidzina, genistina, daidzeína e genisteína**) e isoflavonas totais por dia de ensaio.

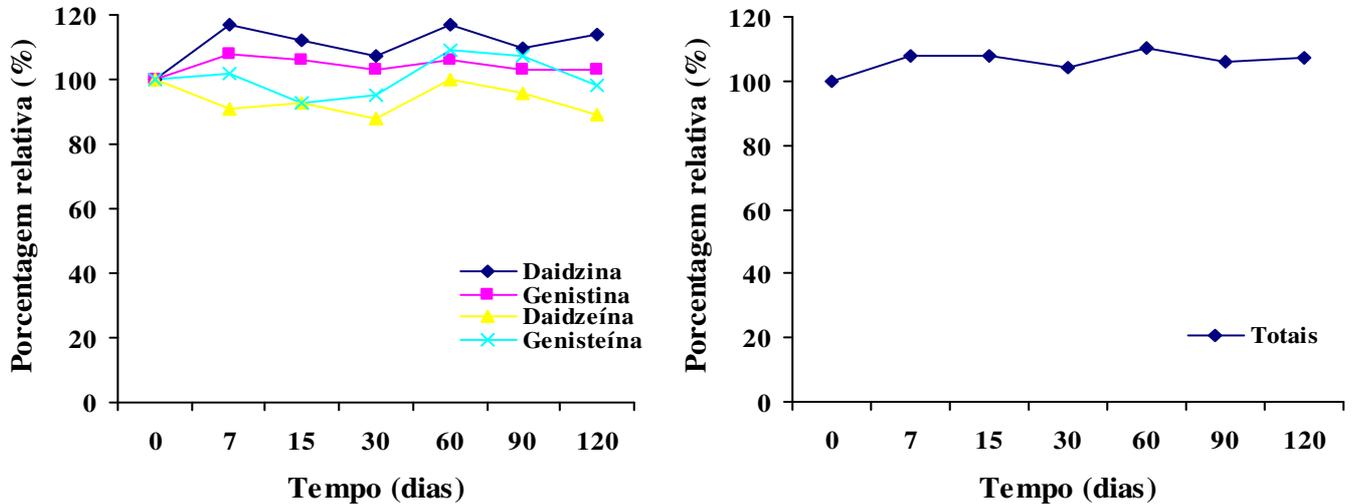


Figura 40. Concentração de isoflavonas totais e individuais (**daidzina, genistina, daidzeína e genisteína**) em porcentagem relativa por dia de ensaio

Não foi observada tendência de alteração na concentração de isoflavonas durante o período avaliado. A pequena variação observada é devido à análise ter sido realizada em dias diferentes. Portanto as isoflavonas mantiveram-se estáveis durante o período avaliado, tanto individualmente quanto o teor de isoflavonas totais.

4.2. *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd (Cumaru)

A Figura 41 apresenta o endocarpo e a semente de *Dipteryx odorata* Willd Aubl. (Cumaru)

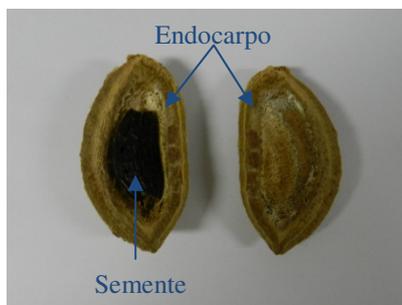


Figura 41. Endocarpo e semente do *Dipteryx odorata* Willd Aubl. (Cumaru)

4.2.1. Fracionamento do extrato

Para a pesquisa de flavonoides foi utilizado um extrato em éter etílico do endocarpo do cumaru (GODOY, 1992). Foi realizado um fracionamento do extrato bruto com quatro solventes com polaridades diferentes: hexano ($n\text{-C}_6\text{H}_{12}$), diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) (vide item 3.5.1). As frações obtidas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos, em coluna de fase reversa (coluna C_{18} , YMC-Pack ODS-AM303, 250mm x 4,5mm e 5 μm) nas condições descritas no item 3.5.2, o cromatograma foi extraído à 253nm (Figura 42).

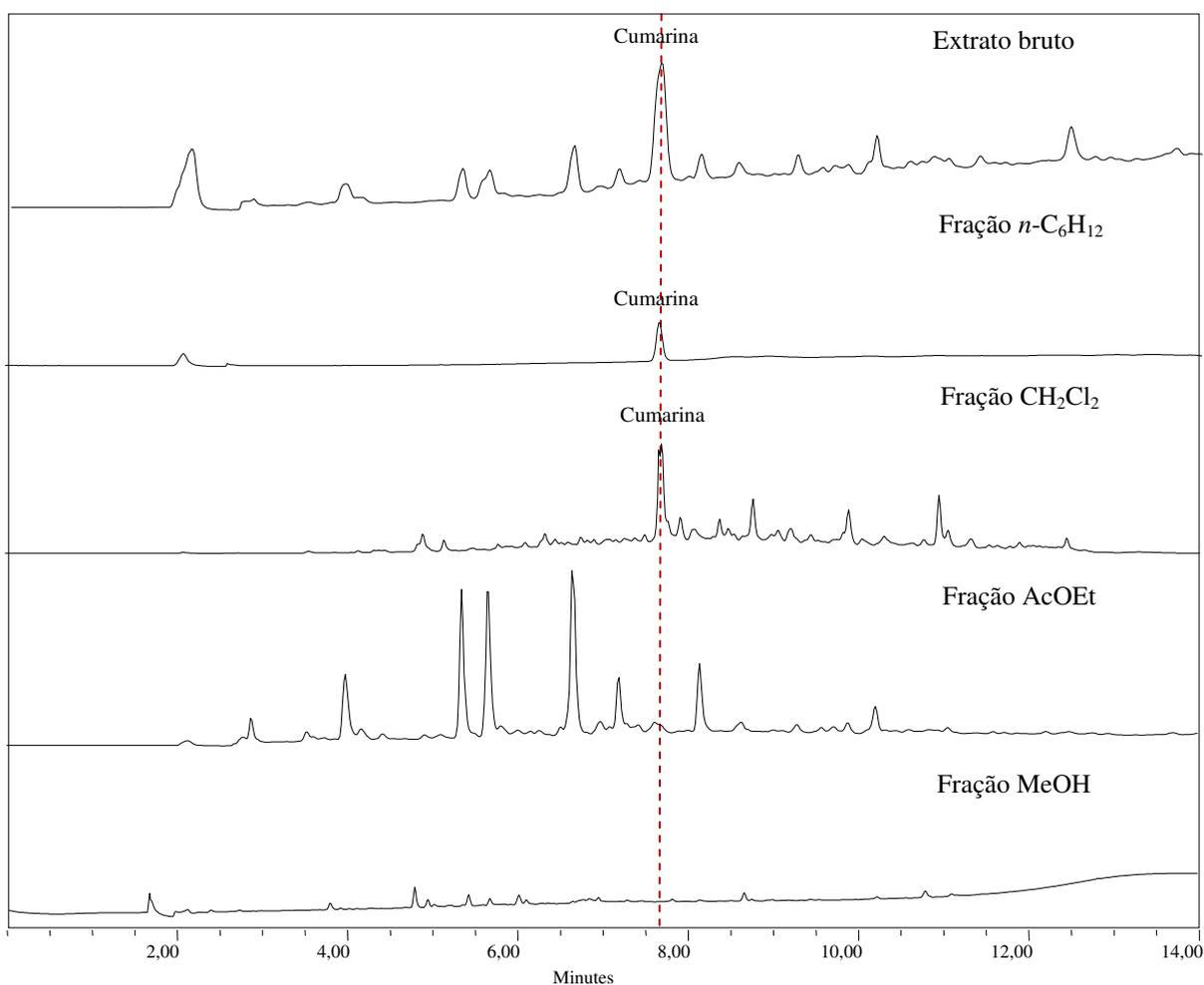


Figura 42. Cromatograma do extrato bruto e das frações do cumaru em coluna de fase reversa (coluna C_{18} , YMC-Pack ODS-AM303, 250mm x 4,5mm e 5 μm) à 253nm

O extrato bruto e as frações em hexano e diclorometano apresentaram um pico majoritário em 7,8 minutos. O espectro de ultravioleta apresentou absorção λ 275nm (Figura

43) e no espectro de massas acurada (Figura 44) foi observada a transição m/z 147,0834 \rightarrow m/z 103,0997, que corresponde à perda de massa de 43,9837, $[M+H]^+$ gerando $[M+H-CO_2]^+$, atribuiu-se este pico à **cumarina** (Figura 43), pois seus dados espectrais são condizentes com a literatura (SULLIVAN, 1982), além da planta ser conhecida pela presença da **cumarina**.

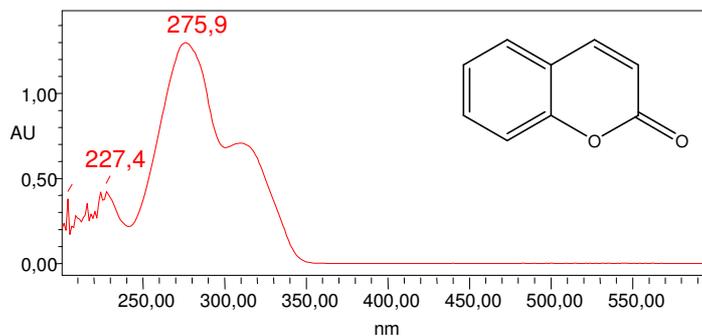


Figura 43. Espectro de ultravioleta da **cumarina**

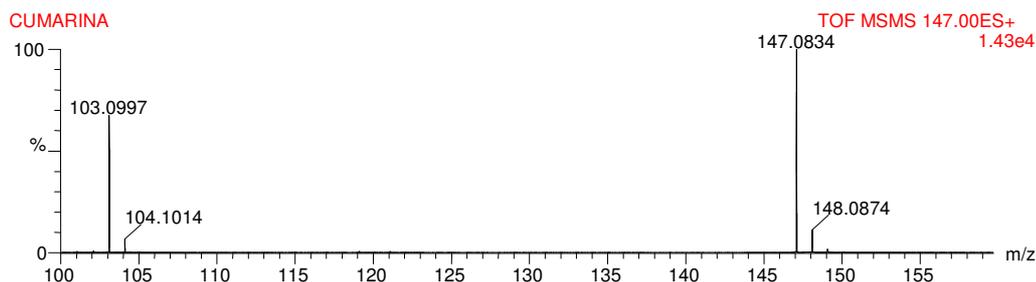


Figura 44. Espectro de massas da **cumarina**

A elevada proporção da **cumarina** no extrato bruto e nas frações de hexano ($n-C_6H_{12}$) e diclorometano (CH_2Cl_2) dificultaria a coleta dos flavonoides. As frações de acetato de etila (AcOEt) e de metanol (MeOH) não revelaram a presença de **cumarina**. Por isso a fração de AcOEt foi selecionada para o isolamento dos flavonoides com base na maior concentração destes compostos.

4.2.2. Isolamento dos flavonoides do cumaru

A metodologia aplicada no isolamento das isoflavonas do extrato de soja mostrou-se eficiente na obtenção de padrões de isoflavonas. A mesma metodologia foi aplicada no

isolamento de flavonoides do cumaru, programando-se a purificação de amostras em quantidades adequadas para obtenção de espectros de qualidade para facilitar a determinação estrutural inequívoca e para preparação de derivados quando necessários para confirmações estruturais, de flavonoides em matrizes ainda não estudadas. O Anexo B sumariza os procedimentos para o isolamento dos flavonoides do cumaru.

Para a separação dos flavonoides foi aplicada a cromatografia líquida de alta eficiência com coluna C₁₈ (YMC 250mm x 4,6mm, com partícula de 5µm), como descrito no item 3.5.2. Após o fracionamento do extrato, a fração em acetato de etila foi seca, ressuspensa em metanol:água (1:1) e centrifugada. A Figura 45 apresenta a separação dos seis flavonoides da fração de acetato de etila à 253nm.

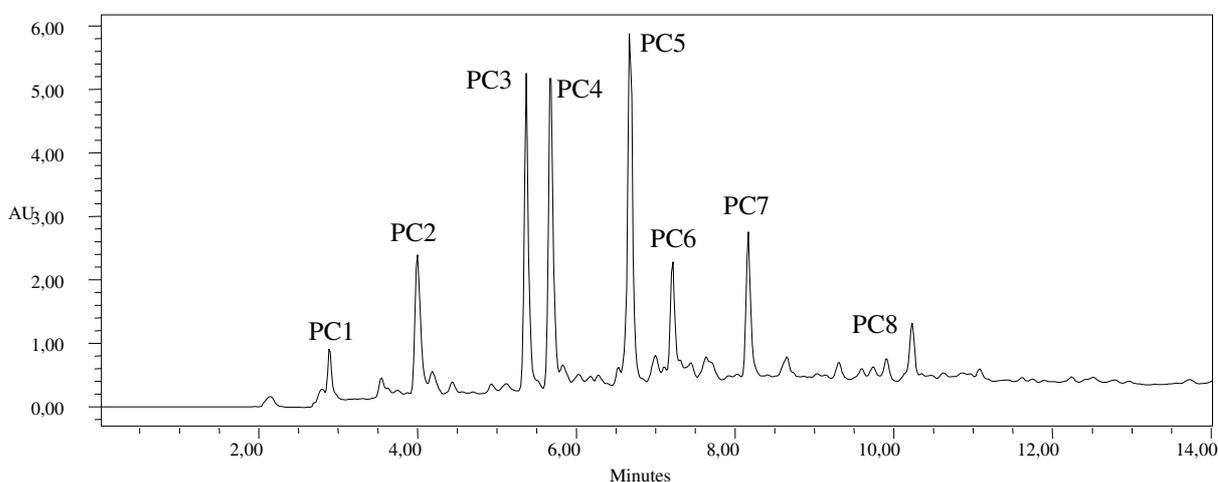


Figura 45. Cromatograma dos flavonoides na fração de acetato de etila do cumaru em coluna de fase reversa (C₁₈ YMC 250mm x 4,6mm, com partícula de 5µm) à 253nm

Os picos PC1 e PC2 não foram identificados. A Figura 46 apresenta o cromatograma dos flavonoides isolados do cumaru.

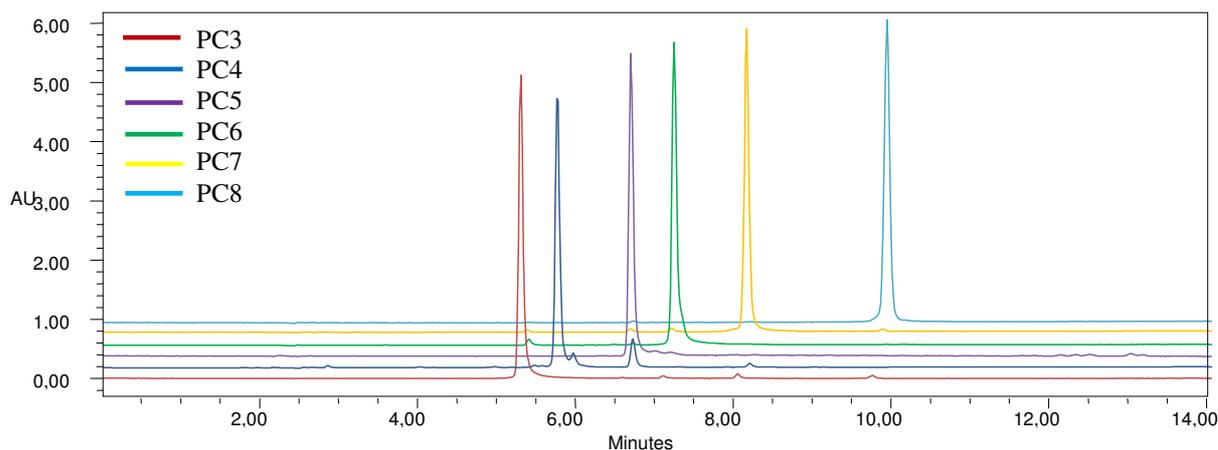


Figura 46. Cromatograma dos flavonoides isolados da fração de acetato de etila do cumaru em coluna de fase reversa (C₁₈ YMC 250mm x 4,6mm, com partícula de 5µm) à 253nm

Foram isolados do extrato em acetato de etila do cumaru duas flavonas, uma flavanona, uma aurona e duas chalconas, com pureza e quantidade suficientes para determinação estrutural. A metodologia foi eficiente no isolamento de flavonoides e viável econômica e ambientalmente, pois foram gastos apenas em 9,9 dias de uso do cromatográfico líquido de alta eficiência e apenas 6,9 litros de acetonitrila, 0,37 litros de ácido acético e 11,2 litros de água. Ressalta-se que, foram usadas injeção e coleta automatizadas, o que dispensa o trabalho do analista em tempo integral.

4.2.3. Elucidação estrutural dos flavonoides

Os espectros de flavonoides da mesma classe apresentam muitas semelhanças, por isso os próximos tópicos serão divididos por subclasse de flavonoide, facilitando assim a compreensão.

4.2.3.1. Flavanona: CP4 - 3',4',7-triidroflavanona

Nos espectros de RMN ¹H (Figura 48) e ¹³C-DEPTQ (Figura 49) foram observados os sinais dos grupos metínico CH-2 (δ_H 5,32, H-2/δ_C 79,68, CH-2) e metilênico CH₂-3 (δ_H 2,68 (H-3a) e 3,00 (H-3b)/δ_C 43,62, CH₂-3) e da carbonila C-4 (δ_C 192,14), característicos de flavanona. Os hidrogênios diasterotópicos ligados ao carbono metilênico CH₂ acoplam entre si, acoplamento *geminado* J=17,0 Hz, e acoplam com o hidrogênio H-2, com J=2,8 e 12,9 Hz

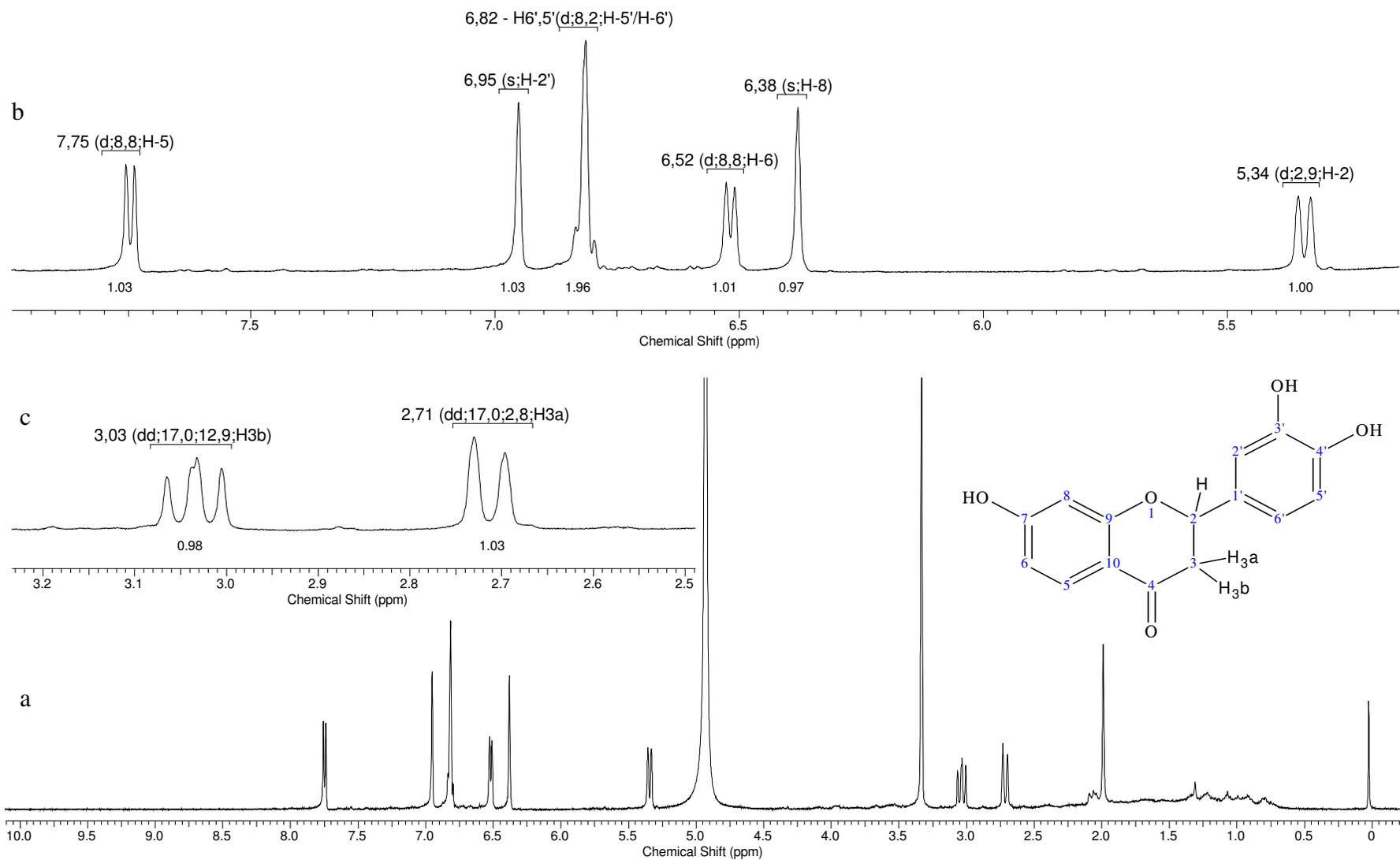


Figura 48. Espectro de RMN ^1H (500MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da **3',4',7 triidroxiflavanona** (a) e expansão das regiões de δ_{H} 2,5 à 3,2 (b) e δ_{H} 5,2 à 8,0 (c)

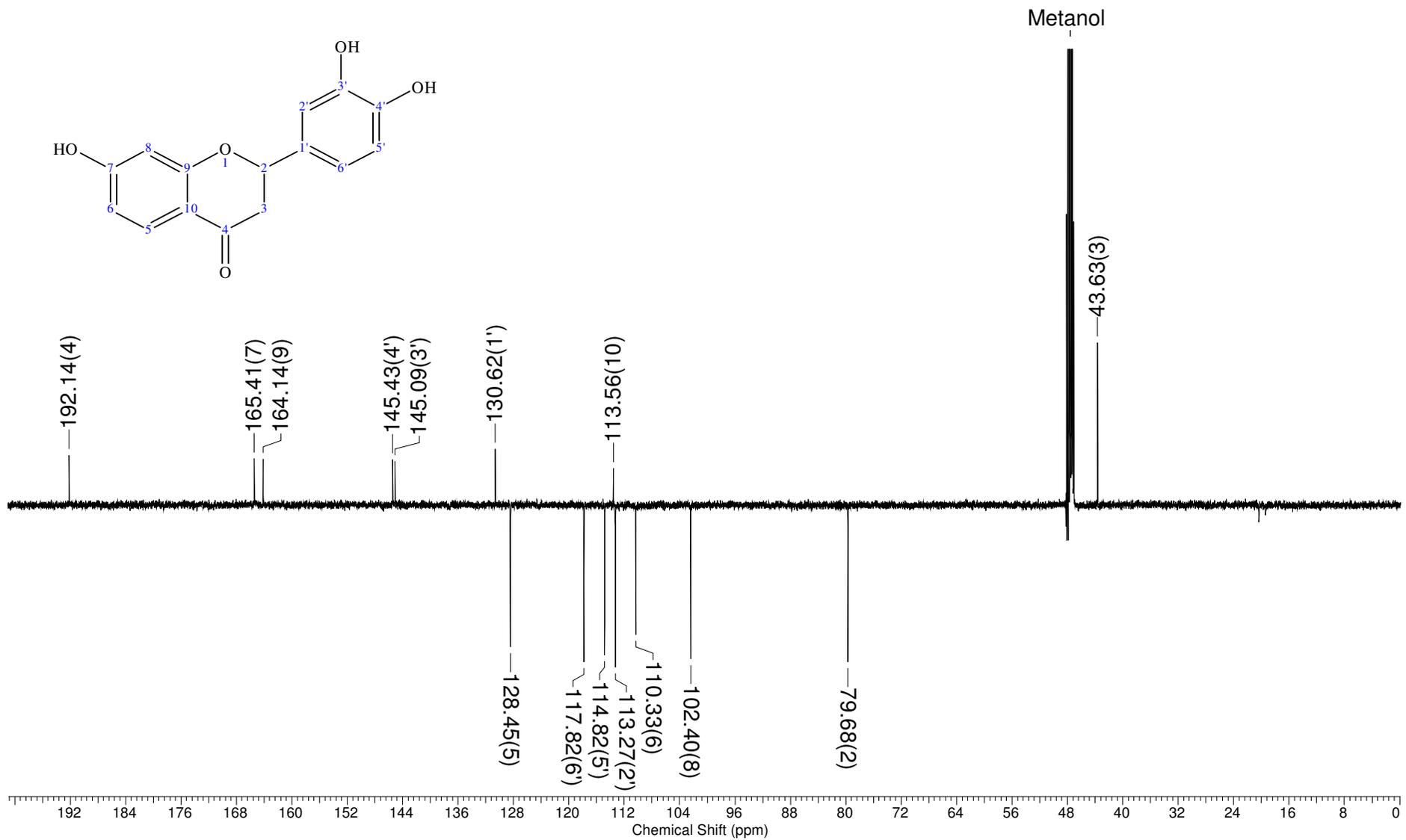


Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz, em MeOH- d_4) da 3',4',7-triidroxi flavanona

No espectro 2D ^1H - ^1H -COSY (Figura 50) confirmou-se o acoplamento dos hidrogênio diastereotópicos (H-3a e H-3b) e ambos com H-2, além de H-6 com H-5.

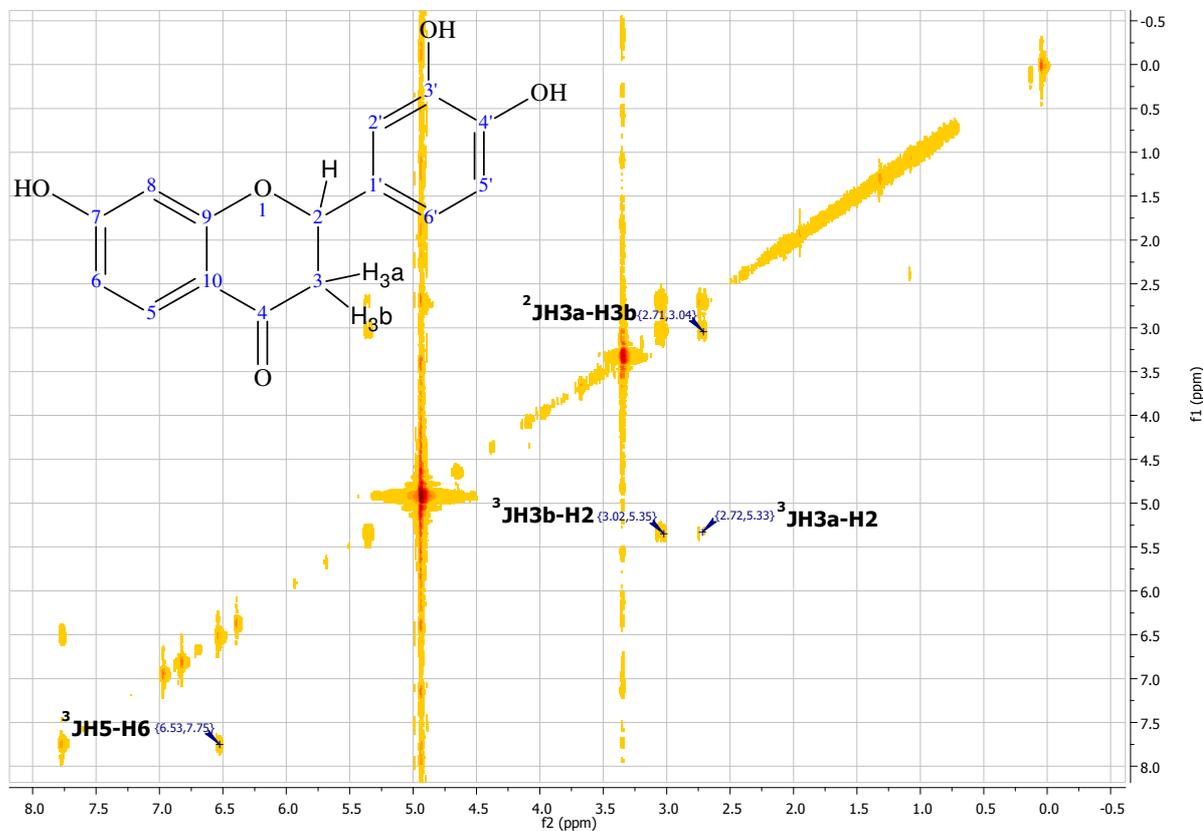


Figura 50. Espectro de RMN ^1H 2D de correlação homonuclear ^1H - ^1H - COSY da 3',4',7-triidroflavanona

Para garantir a identificação dos sinais H-2', H-5' e H-6' do anel no RMN ^1H usou-se o espectro 2D HMBC (Figura 51). O acoplamento heteronuclear de H-2' (δ_{H} 6,95, sl) e H-6' (δ_{H} 6,81, dd) com CH-2 (δ_{C} 79,68, $^3\text{J}_{\text{CH}}$) e as correspondentes multiplicidades foram importantes na atribuição dos respectivos hidrogênios. Os sinais atribuídos ao anel A foram um simpleto largo em δ_{H} 6,35 (H-8) e dois dupletos em δ_{H} 6,52 (dl, $J=8,8$ Hz, H-6) e δ_{H} 7,75 (d, $J=8,8$ Hz, H-5). Foi também possível observar no espectro 2D HMBC o acoplamento heteronuclear de H-5 (δ_{H} 7,75) com a carbonila (C-4 (δ_{C} 192,14, $^3\text{J}_{\text{CH}}$) e com C-9 (δ_{C} 164,14, $^3\text{J}_{\text{CH}}$), assim como entre o H-6 (δ_{H} 6,49) e C-10 (δ_{C} 110,33, $^3\text{J}_{\text{CH}}$) e H-8 (δ_{H} 6,35) e C-9 (δ_{C} 164,14, $^2\text{J}_{\text{CH}}$). Todas estas informações permitiram definir a posição hidroxilada no carbono C-7 do anel A da flavanona.

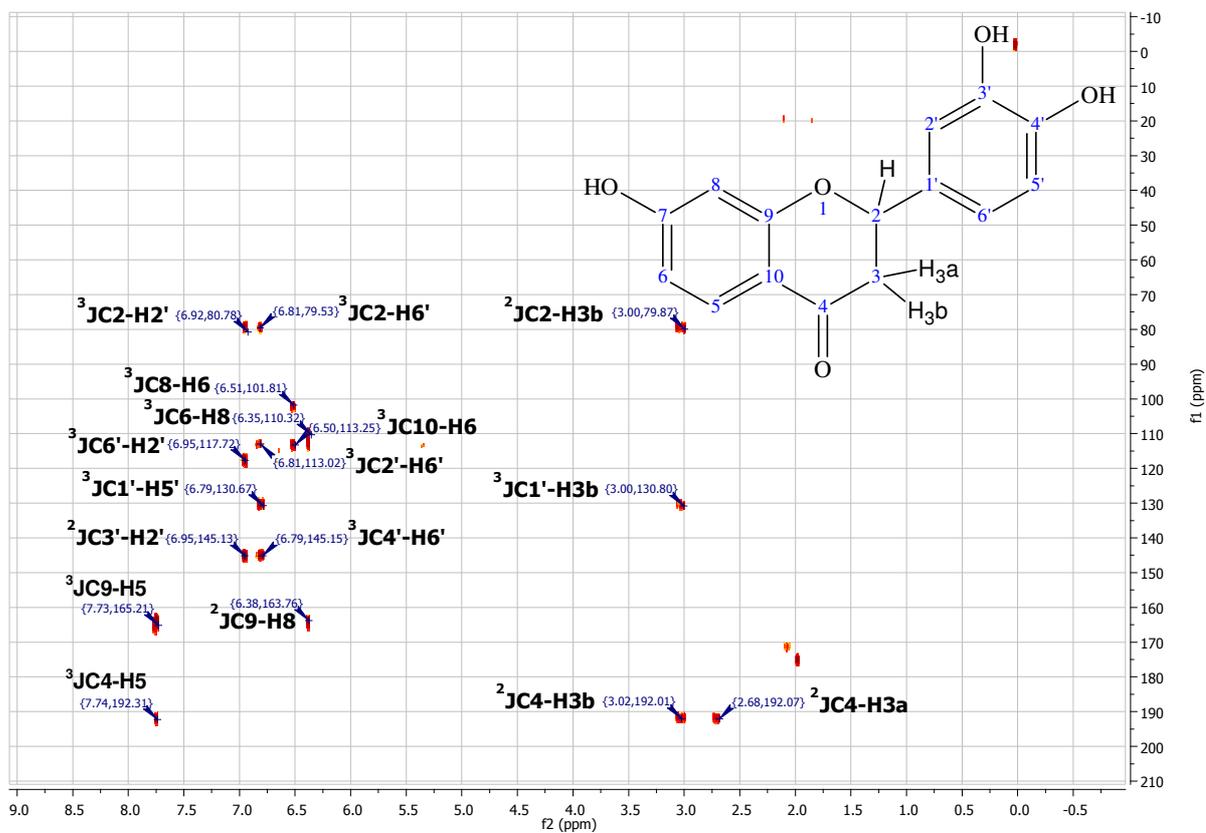


Figura 51. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC da **3',4',7-triidroflavanona**

A Tabela 21 sumariza os dados espectrais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e carbono 13 (RMN¹³C), assim como as correlações heteronucleares observadas nos espectros 2D HSQC e HMBC.

Tabela 21. Dados espectrais de RMN (^1H : 500 MHz e ^{13}C : 125 MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da **3',4',7-triidroxiflavanona**, inclusive resultados de correlações heteronuclares obtidos de 2D-HSQC e HMBC. Deslocamentos químicos em δ (ppm, δ_{H} e δ_{C}) e constantes de acoplamento (J) em Hz entre parênteses

	HSQC		HMBC		Literatura ^a	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
2	79,68	5,34(dd,12,9)	H-3b	H-2'; H-6'	81,1	5,32(dd,10,5, 2,4)
3a	43,63	2,71(dd,17,0,2,8)	-	-	45,0	2,69(dd,2,4,13,4)
3b	43,63	3,03(dd,17,0,12,9)	-	-	45,0	3,01(dd,13,4,10,5)
4	192,14	-	H-3a;H-3b	H-2;H-5	193,5	-
5	128,45	7,75(d,8,8)	-	-	129,6	7,72(d,8,6)
6	110,33	6,52(dd,8,8)	-	H-8	111,7	6,49(dd,8,6,2,2)
7	165,41	-	-	-	166,7	-
8	102,40	6,38(s)	-	H-6	103,6	6,35(d,2,2)
9	164,14	-	H-8	-	165,5	-
10	113,56	-	-	H-6	115,0	-
1'	130,62	-	-	H-5';H-3b	132,1	-
2'	113,27	6,95(s)	-	H-6'	114,7	6,92(d,1,8)
3'	145,09	-	H-2'	-	146,5	-
4'	145,43	-	-	H-6'	146,8	-
5'	114,82	6,82(d,8,2)	-	-	116,3	6,79(dd,7,8)
6'	117,82	6,82(d,8,2)	-	H-2'	119,2	6,80(d,1,8)

*RMN-DEPTQ foi usado para deduzir o número de hidrogênios nos átomos de carbono. Os valores de J foram deduzidos dos espectros 1D de RMN^1H e os espectros COSY colaboram nas atribuições δ_{H} e δ_{C} .

a- Dados da literatura (TIAN *et al*, 2004)

No espectro de massa acurada (Figura 52) observou-se a presença de pico em m/z 137,0423 correspondente à fragmentação do íon molecular protonado m/z 273,0901 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) pela prevista reação retro Diels Alder, confirmando a presença de uma hidroxila no anel A e duas no anel B (Esquema 11).

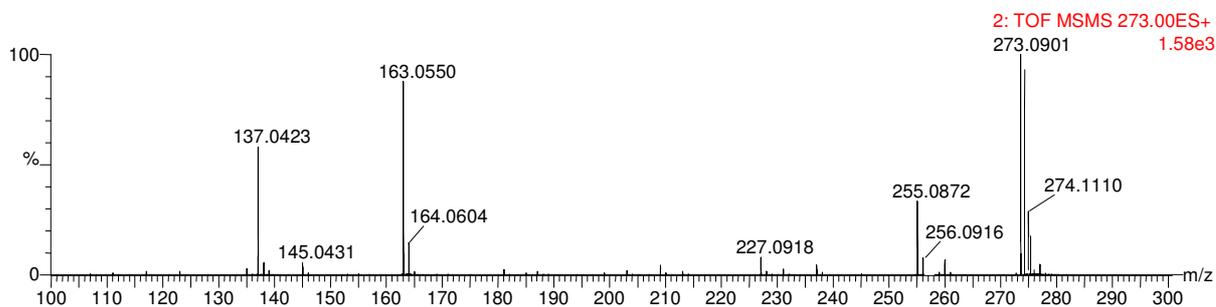
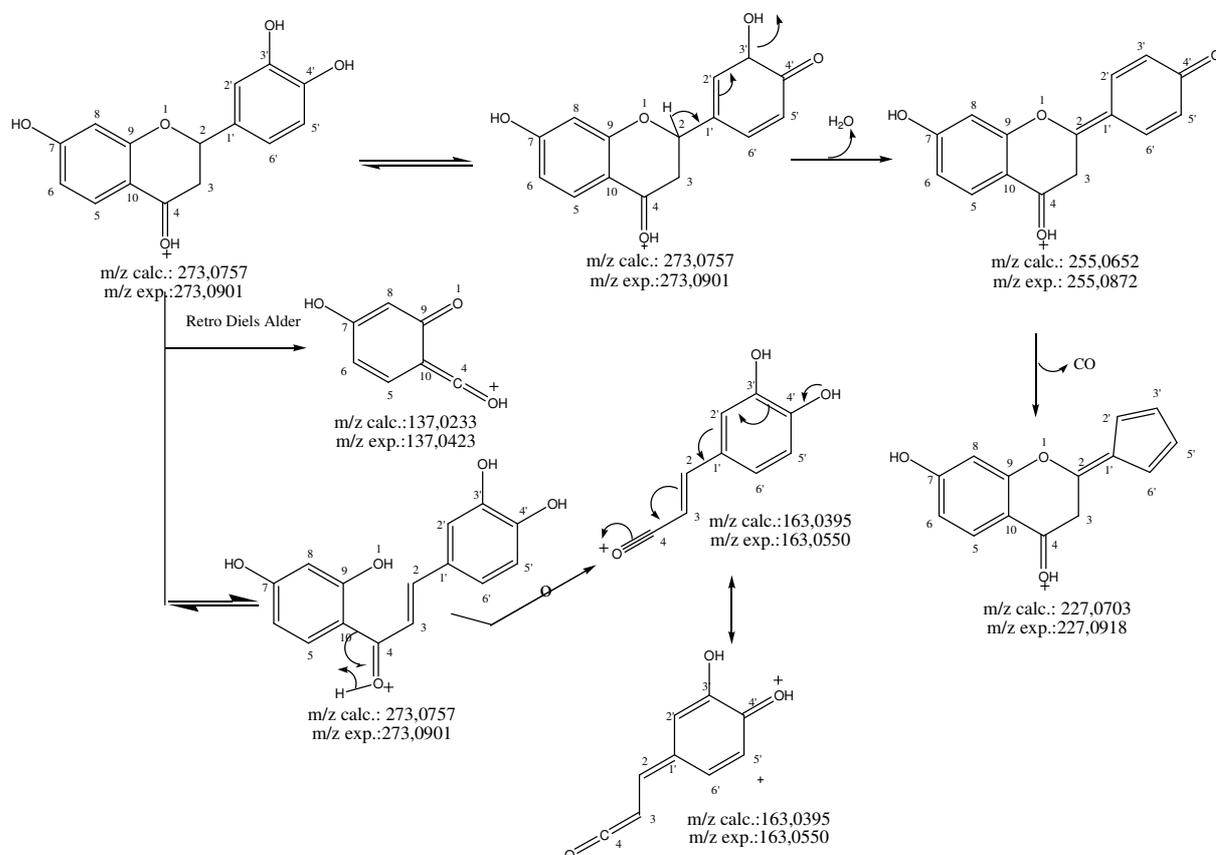


Figura 52. Espectro de massas da **3',4',7-triidroxiflavanona**

O Esquema 11 apresenta os fragmentos propostos para justificar os principais picos observados no espectro de massas da **3',4',7-triidroxiflavanona**.



Esquema 11. Mecanismo proposto para a fragmentação da **3',4',7-triidroxiflavanona** no espectrômetro de massas

O espectro de ultravioleta (UV) da **3',4',7-triidroxiflavanona** (Figura 53) apresentou absorção λ_{\max} 277 nm referente à banda II. Nas flavanonas a banda II é mais intensa que a banda I, já que o cromóforo responsável pela absorção da banda I (anel B) nas flavanonas, não está conjugado com a carbonila.

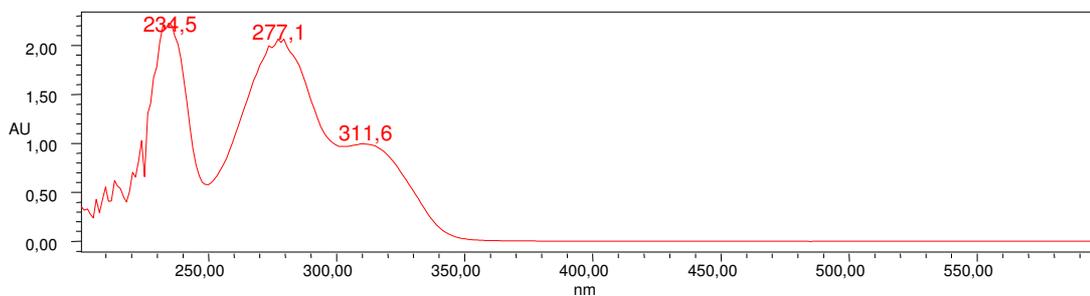


Figura 53. Espectro de ultravioleta da **3',4',7-triidroxiflavanona**

Todos os dados espectrais obtidos dos experimentos com a substância isolada estão em acordo como os valores decritos na literatura para a **3',4',7-triidroxiflavona**, conhecida como **butina** (TIAN *et al*, 2004).

4.2.3.2. Flavonas: CP3 - 3',4',7-triidroxiflavona e CP6 - 3',4',5,7-tetraidroxiflavona

Os espectros de RMN ^1H (Figuras 55 e 57) e ^{13}C -DEPTQ (Figuraa 56 e 58) revelaram sinais do grupo metínico CH-3 com deslocamentos químicos referente ao hidrogênio 3 em δ_{H} 6,57- 6,67, e ao carbono 3 em δ_{C} 102-103. O carbono 2 apresentou deslocamento químico em torno de δ_{C} 164 e a carbonila (C-4) em δ_{H} 178,8 para a **3',4',7-triidroxiflavona** (Figura 56) e δ_{C} 182,47 para a **3',4',5,7-tetraidroxiflavona** (Figura 58). Esta diferença entre os deslocamentos químicos da carbonila das duas flavonas pode ser justificada pela existência de hidroxila na posição 5 do anel A da **3',4',5,7-tetraidroxiflavona**, formando ligação de hidrogênio intramolecular em hexa-anel com a carbonila (Figura 54), causando efeito de desproteção no carbono da carbonila quelada (**3',4',5,7-tetraidroxiflavona**).

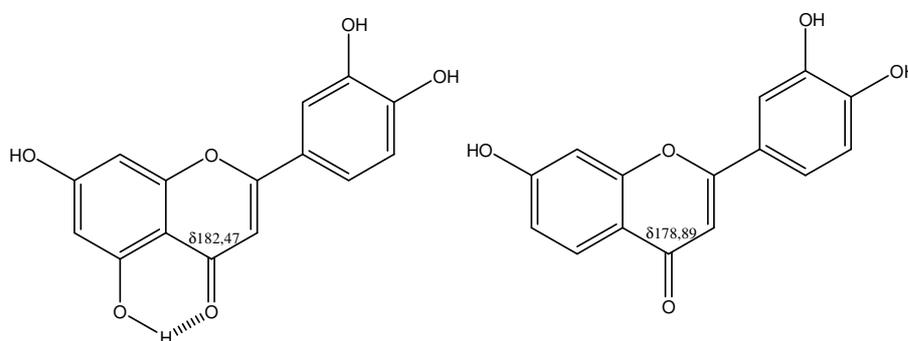


Figura 54. Efeito de hidroxila na posição 5 no deslocamento químico de C-4 no RMN ^{13}C

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -DEPTQ da **3',4',7-triidroxiflavona** (Figura 56) e **3',4',5,7-tetraidroxiflavona** (Figura 58) permitiu reconhecer na **3',4',7-triidroxiflavona** oito carbonos não hidrogenados [(C) $_8$] e sete metínicos [(CH) $_7$] e na **3',4',5,7-tetraidroxiflavona** nove não hidrogenados [(C) $_9$] e seis metínicos [(CH) $_6$] (Tabela 22), além de revelar os δ_{C} dos carbonos do anel A como os principais argumentos para justificar a inequívoca diferença entre os dois flavonóides, em plena concordância com presença da hidroxila no átomo de carbono C-5 da estrutura de **3',4',5,7-tetraidroxiflavona** acima deduzida (Figura 54).

Com base na análise comparativa adicional dos espectros de RMN¹H e ¹³C-DEPTQ das flavonas **3',4',7-triidroxiflavona** e **3',4',5,7-tetraidroxiflavona** verificou-se que a diferença nos valores dos δ_H e δ_C dos átomos de hidrogênio e carbono-13 do anel B dos dois flavonoides é praticamente insignificante (Tabela 22): três não hidrogenados (**CP3/CP6**): C-1 (δ_C 122,56/ δ_C 122,27), C-3' (δ_C 145,63/ δ_C 145,67) e C-4' (δ_C 149,40/ δ_C 149,64), posição conjugada com a carbonila; e três metínicos (**CP3/CP6**): CH-2' (δ_C 112,75/ δ_H 7,43, sl/ δ_C 112,78/ δ_H 7,41), CH-5' (δ_C 114,89/ δ_H 6,94, d, 8,1 / δ_C 115,41/ δ_H 6,93) e C-6' (δ_C 118,82// δ_H 7,44, d, 8,1/ δ_C 118,90/ δ_H 7,41). O duplete do H-5' em δ_H 6,93-6,94 aparece com menor δ_H do que os observados para H-2' e H-6' (ambos em δ_H 7,41-7,4) que sentem o efeito de desproteção exercido pela carbonila conjugada, o que se verificou não ocorrer em flavanonas, pela ausência da conjugação. Os valores dos δ_H dos H-2' e H-6' revelam que os efeitos mesoméricos *orto* (H-2') e *para* (H-6') exercido pela hidroxila localizada no C-3' são praticamente iguais. Já com a observação dos espectros de RMN¹³C-DEPTQ (Figuras 57 e 59) os δ_C do CH-2' e CH-6' revelaram que tais efeitos, *orto* e *para*, são significativamente diferentes e permitem as atribuições dos correspondentes sinais com relativa facilidade (Tabela 22).

O conhecimento de tais efeitos de ligação de hidrogênio, anisotrópico, de conjugação, *orto* e *para* facilitou a atribuição dos δ_H (sem esquecer a importância da multiplicidade de sinais e valor de J) e δ_C dos átomos de hidrogênio e carbono também do anel A dos dois flavonóides (Tabela 22). A presença da hidroxila (efeito mesomérico protetor *orto* e *para*) no C-5 de **3',4',5,7-tetraidroxiflavona** justifica as modificações observadas (Tabela 22) nos δ_H do H-6 (efeito *orto*) e H-8 (efeito *para*) e nos δ_C dos carbonos C-5 (efeito *ipso*, indutivo retirador de elétrons), CH-6 (efeito *orto*), CH-8 (efeito *para*) e C-10(efeito *orto*). .

As Figuras 55, 56, 57 e 58 apresentam o espectro de RMN¹H e ¹³C-DEPTQ da **CP3 = 3',4',7-tetraidroxiflavona** e **CP6 = 3',4',5,7-tetraidroxiflavona**, respectivamente.

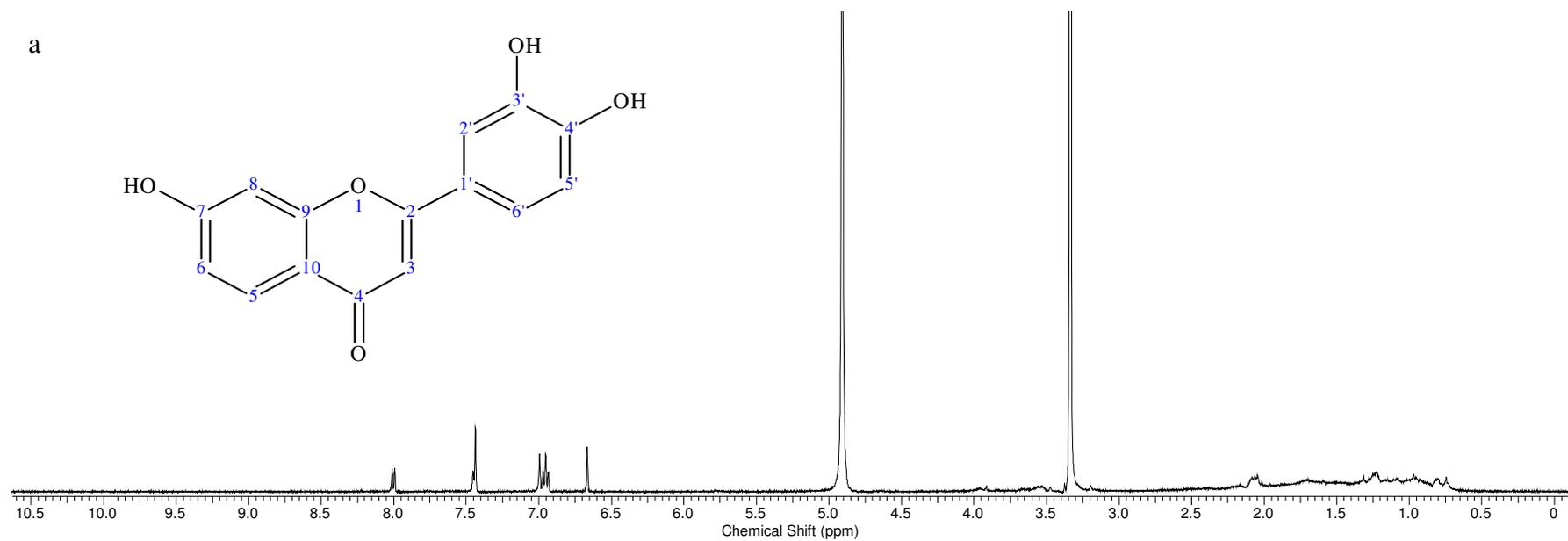
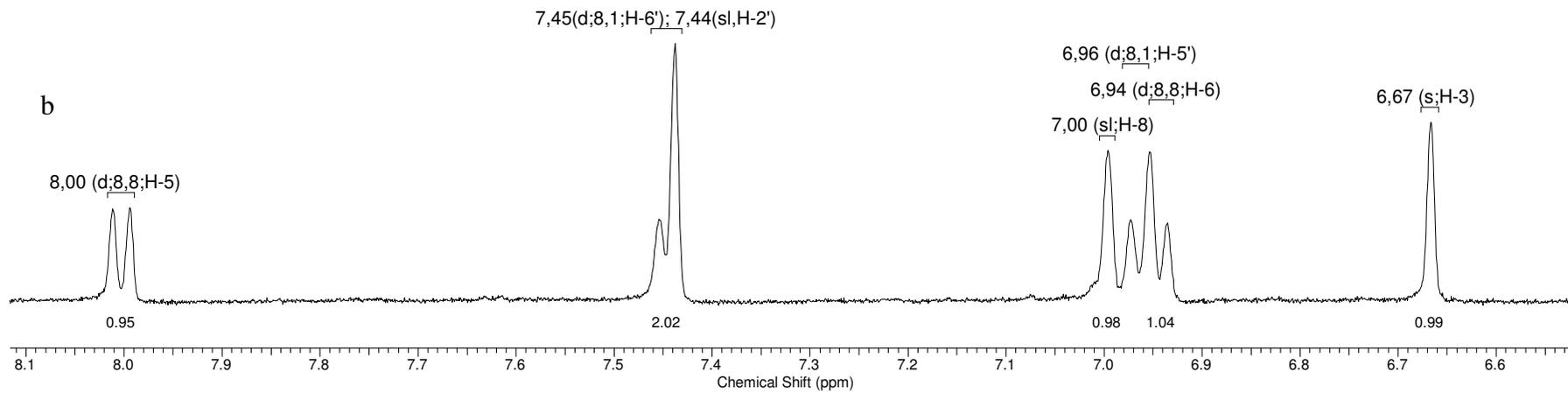


Figura 55. Espectro de RMN ^1H (500MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da **3',4',7-triidroflavona** (a) e expansão da região de δ_{H} 6,5 à 8,1 (b)

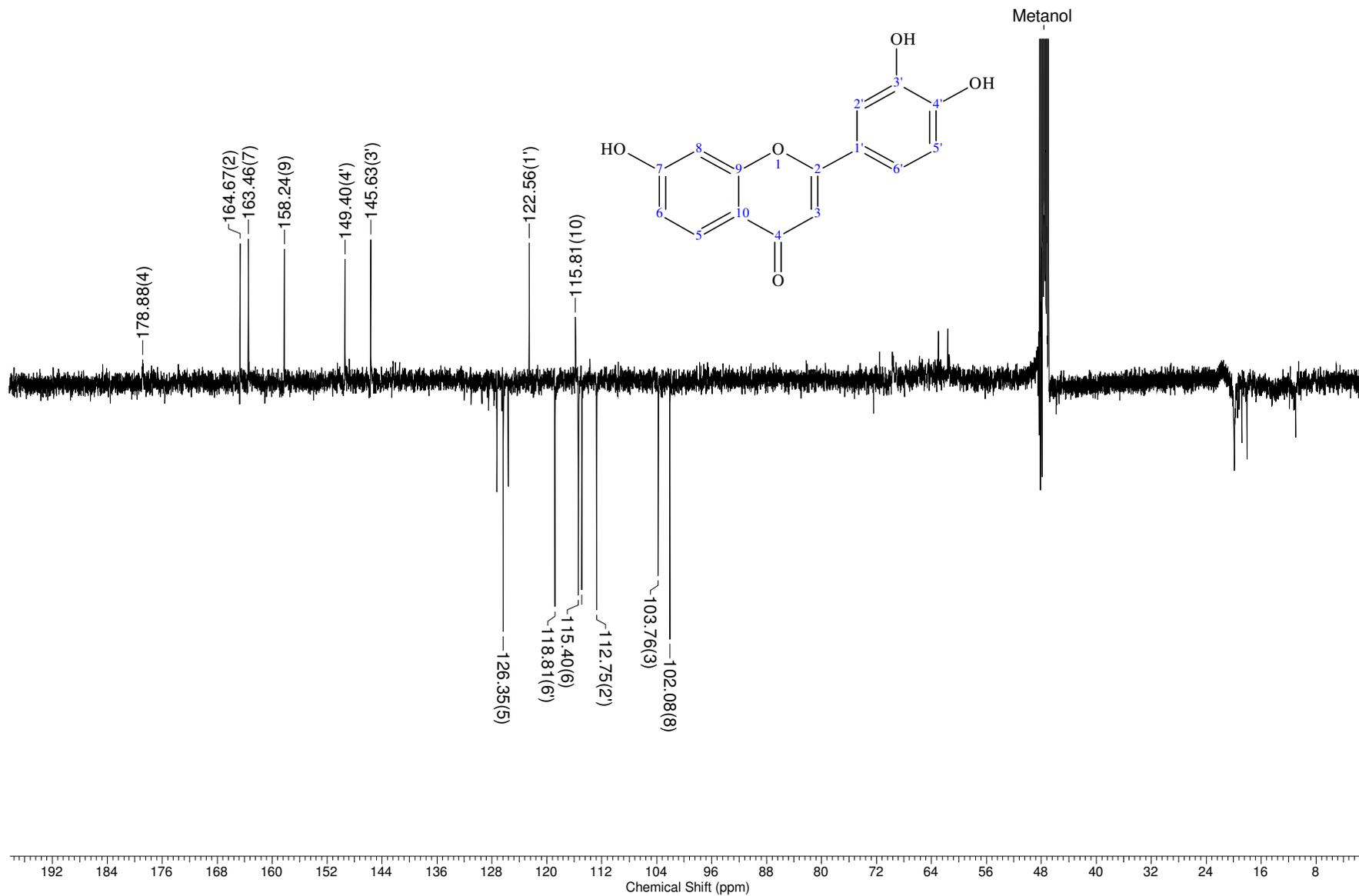


Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz, em MeOH-d_4) da 3',4',7-triidroxiavona

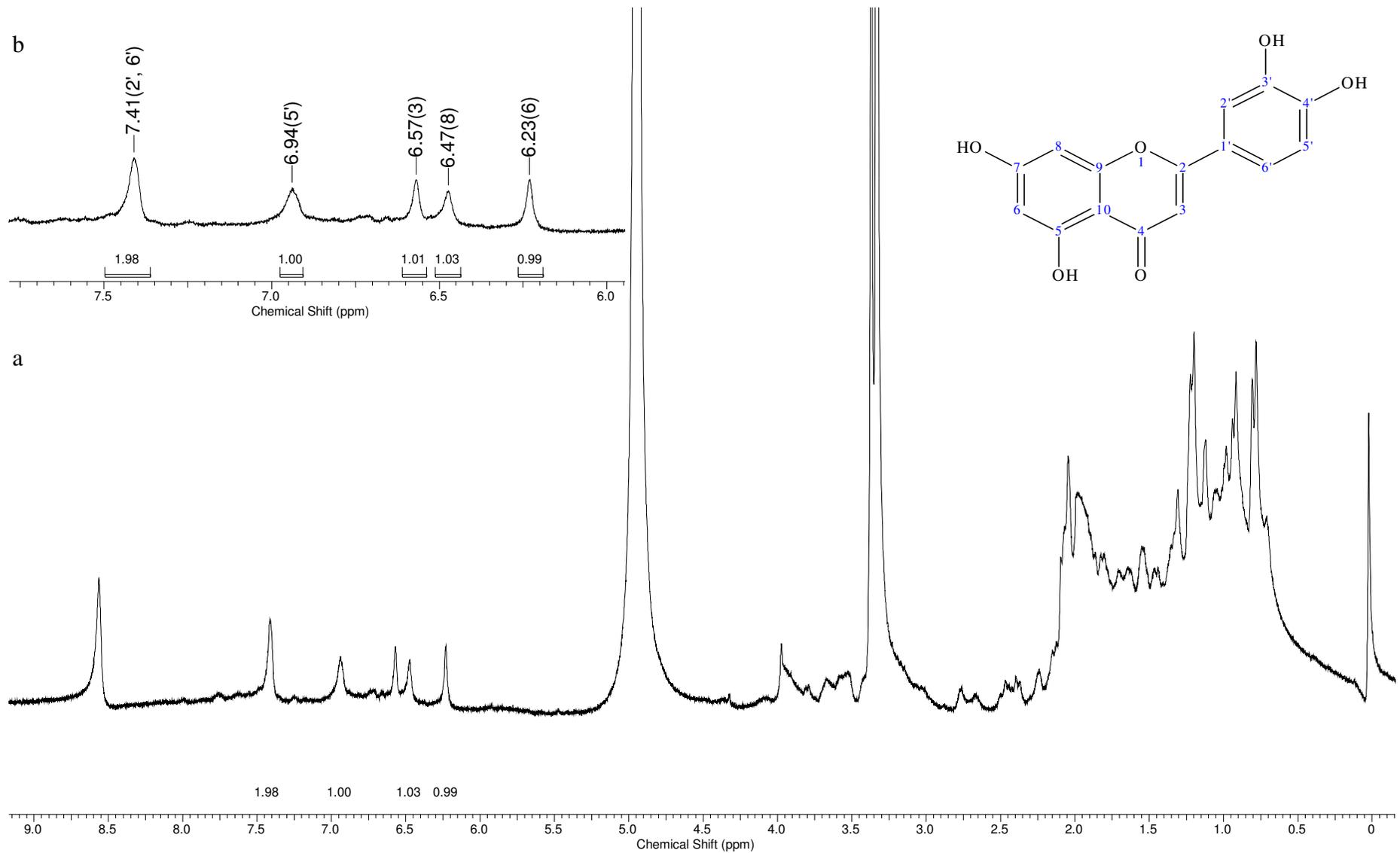


Figura 57. Espectro de RMN ^1H (500MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da 3',4',5,7-tetraidroxiflavona (a) e expansão de 6,0 à 8,0 (b)

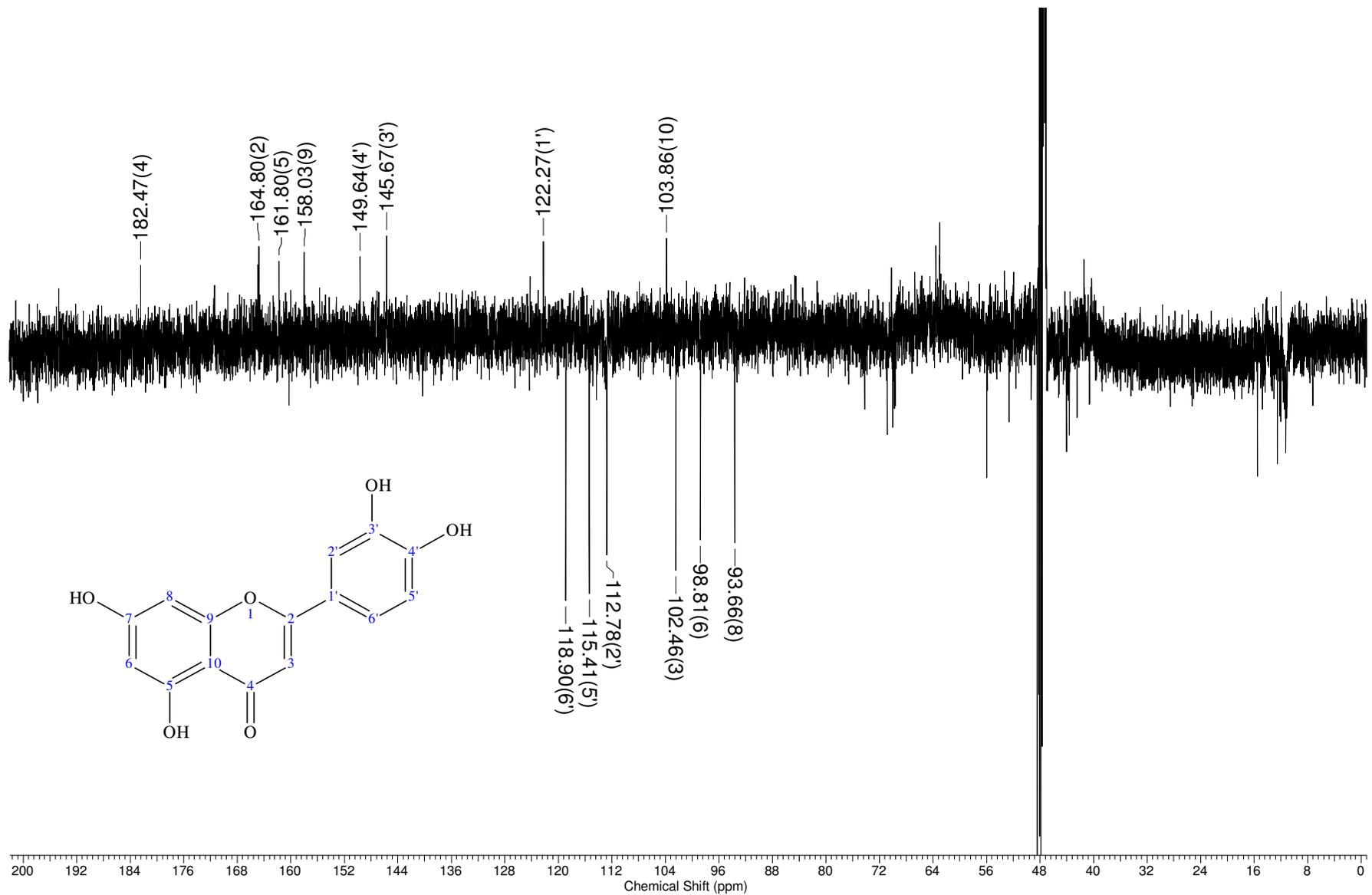


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da 3',4',5,7-tetraidroxiflavona

Assim, a diferença entre as duas flavonas está fundamentada no anel A. No espectro de RMN¹H da **3',4',7-triidroxiavona** foi observado um duplete desprotegido (δ_H 8,00) atribuído a H-5, por estar *orto* à carbonila, que acopla com um duplete em δ_H 6,96 (H-6) com $J=8,8\text{Hz}$. Além de um simpleto largo em δ_H 7,00 atribuído a H-8. No espectro 2D COSY (Figura 59) confirmou-se o acoplamento entre H-5' e H6' e entre H-5 e H-6.

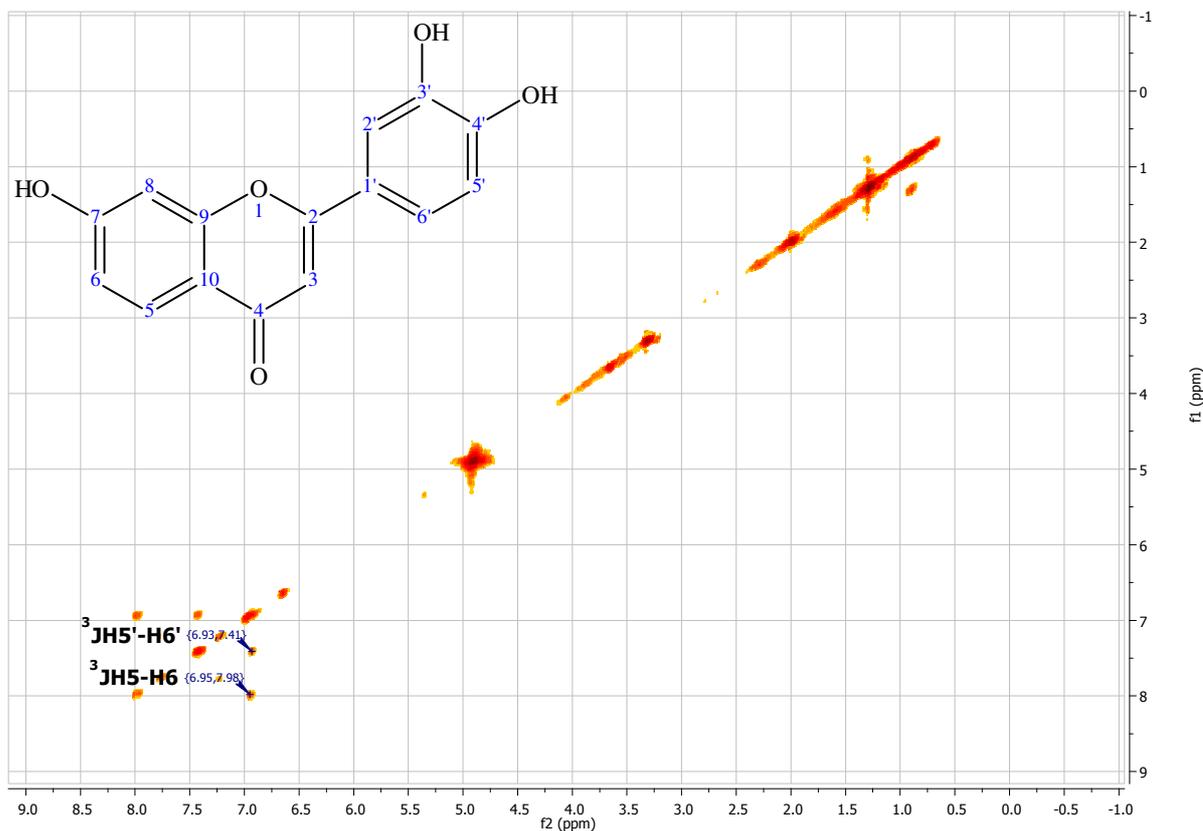


Figura 59. Espectro de RMN¹H 2D de correlação homonuclear ¹H-¹H- COSY da **3',4',7-triidroxiavona**

Para a atribuição inequívoca dos carbonos 2 (δ_C 164,67) e 7 (δ_C 163,46) utilizou-se o espectro 2D HMBC (Figura 60), onde observou-se a correlação do C-7 com H-5 e do C-2 com H-3.

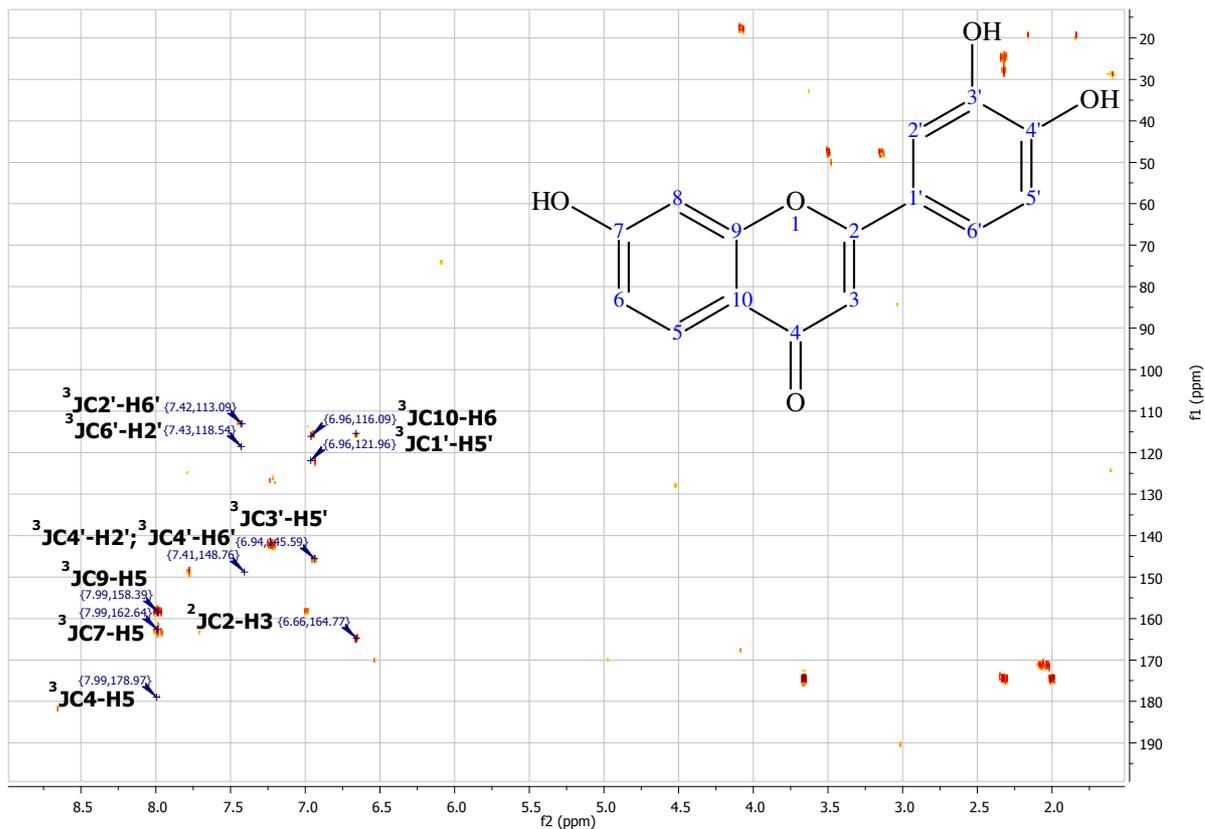


Figura 60. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC da **3',4',7-triidroxi flavona**

Na estrutura da **3',4',5,7-tetraidroxiflavona** com anel A 5,7-diidroxilado, as posições das hidroxilas foram facilmente identificadas com base nos dois simpletos largos observados no espectro RMN¹H e, assim como seus respectivos carbonos, encontram-se protegidos por mesomeria devido à presença das hidroxilas nas posições 5 e 7. Foi possível observar o acoplamento entre H6' e H5' no espectro 2D ¹H-¹H- COSY (Figura 61).

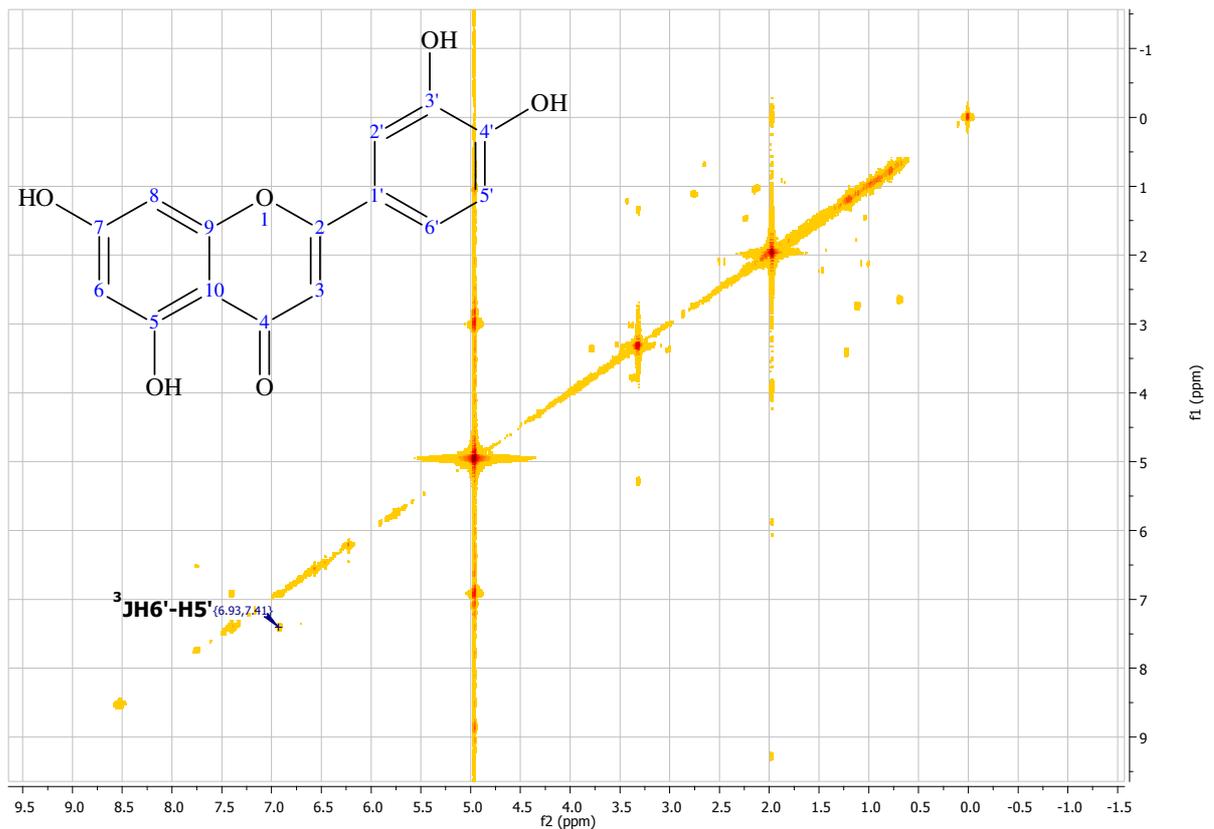


Figura 61. Espectro de RMN¹H 2D de correlação homonuclear ¹H-¹H- COSY da **3',4',5,7-tetraidroxiflavona**

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C e da **3',4',5,7-tetraidroxiflavona** (Figuras 57 e 58) apresentaram sinais baixos, principalmente dos carbonos quaternários que levam mais tempo para relaxação, mas isto não foi problema na determinação estrutural, uma vez que se trata de uma substância conhecida e a comparação do conjunto de espectros analisados com dados da literatura nos dão segurança em afirmar se tratar de tal estrutura. Caso se tratasse de uma substância desconhecida seria necessária um maior número de injeções e coletas ou tempo maior de aquisição do espectro, a fim de melhorar os sinais.

A Tabela 22 sumariza os dados espectrais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e carbono-13 (RMN¹³C) e as correlações observadas no espectro de RMN 2D HSQC das duas flavonas isoladas.

Tabela 22. Dados espectrais de RMN (^1H : 500 MHz e ^{13}C : 125 MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da **3',4',4-triidroxiflavona** e **3',4',5,7-tetraidroxiflavona**, inclusive resultados de correlações heteronuclares obtidos de 2D-HSQC. Deslocamentos químicos em δ (ppm, δ_{H} e δ_{C}) e constantes de acoplamento (J) em Hz entre parênteses

	CP3 - 3',4',7-triidroxiflavona				CP6 - 3',4',5,7-tetraidroxiflavona			
	HSQC		Literatura ^a		HSQC		Literatura ^b	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	164,67	-	165,7	-	164,80	-	163,9	-
3	103,76	6,67(s)	103,8	6,8(s)	102,46	6,57	102,9	6,65(s)
4	178,89	-	180,4	-	182,47	-	181,9	-
5	126,35	8,00(d, 8,8)	127,8	8,1(d)	161,80	-	161,5	-
6	115,40	6,96(d, 8,8)	114,2	6,96(d, 8,8)	98,81	6,23	98,9	6,18(d,2,1)
7	163,46	-	165,3	-	ND	-	164,1	-
8	102,08	7,00(sl)	105,2	6,98(sl)	93,66	6,47	93,9	6,43(d,2,1)
9	158,24	-	157,9	-	158,03	-	157,3	-
10	115,81	-	116,6	-	103,86	-	103,8	-
1'	122,56	-	124,1	-	122,27	-	121,6	-
2'	112,75	7,43(sl)	116,5	7,48(sl)	112,78	7,41	113,4	7,39(d,2,2)
3'	145,63	-	147,2	-	145,67	-	145,8	-
4'	149,40	-	151,0	-	149,64	-	149,7	-
5'	114,89	6,94(d,8,1)	116,9	6,98(sl)	115,41	6,93	116,1	6,89(d,9,0)
6'	118,82	7,44(d, 8,1)	120,2	7,45(d,8,0)	118,90	7,41	119,0	7,40(dd,9,0,2,2)

*RMN-DEPTQ foi usado para deduzir o número de hidrogênios nos átomos de carbono. Os valores de J foram deduzidos dos espectros 1D de RMN^1H e os espectros COSY colaboram nas atribuições δ_{H} e δ_{C} .

ND= não detectado

a- Dados da literatura (CARVALHO *et al.*, 2010)

b- Dados da literatura (PARK *et al.*, 2007)

No espectro de massa acurada (Figura 62) das duas flavonas isoladas, os fragmentos gerados pela fragmentação retro Diels-Alder puderam confirmar a quantidade de hidroxilas em cada anel. Além disso, foram observados fragmentos resultantes da perda de água e monóxido de carbono. No espectro de massa da **3',4',5,7-tetraidroxiflavona** não foi observado o íon molecular. O Esquema 12 sumariza o mecanismo proposto para formação de tais fragmentos.

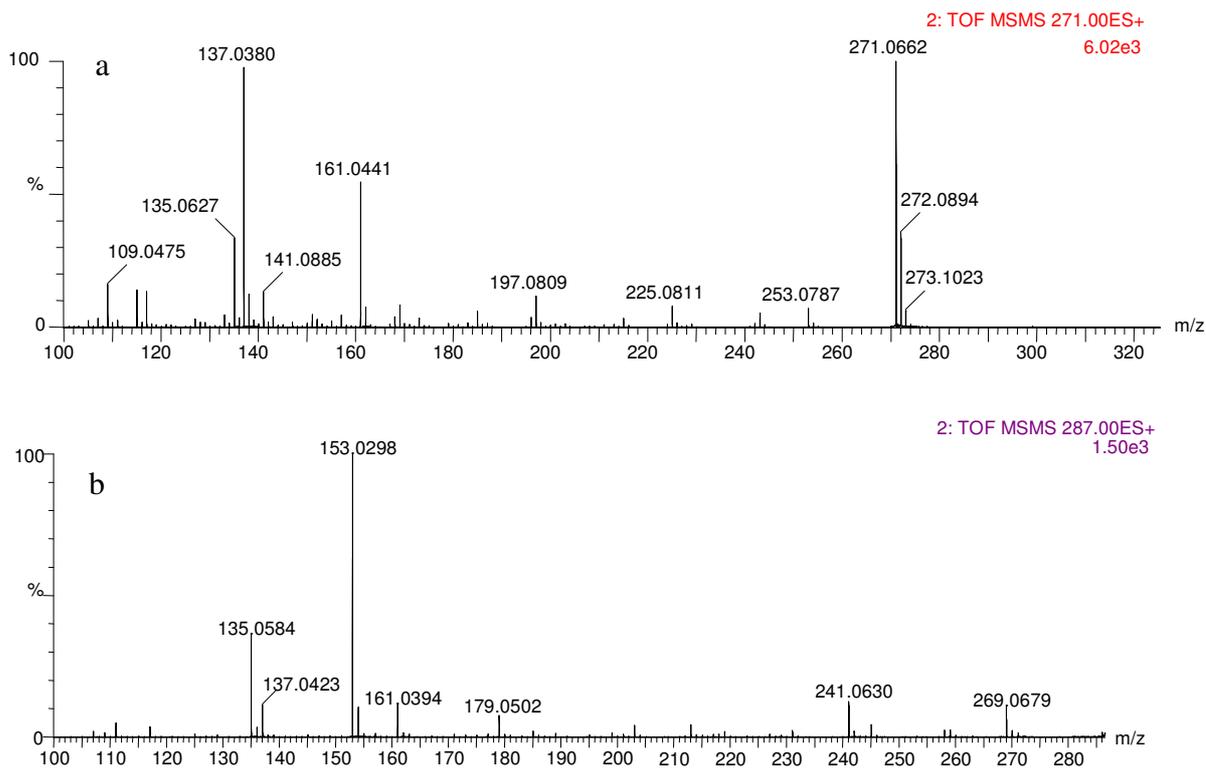
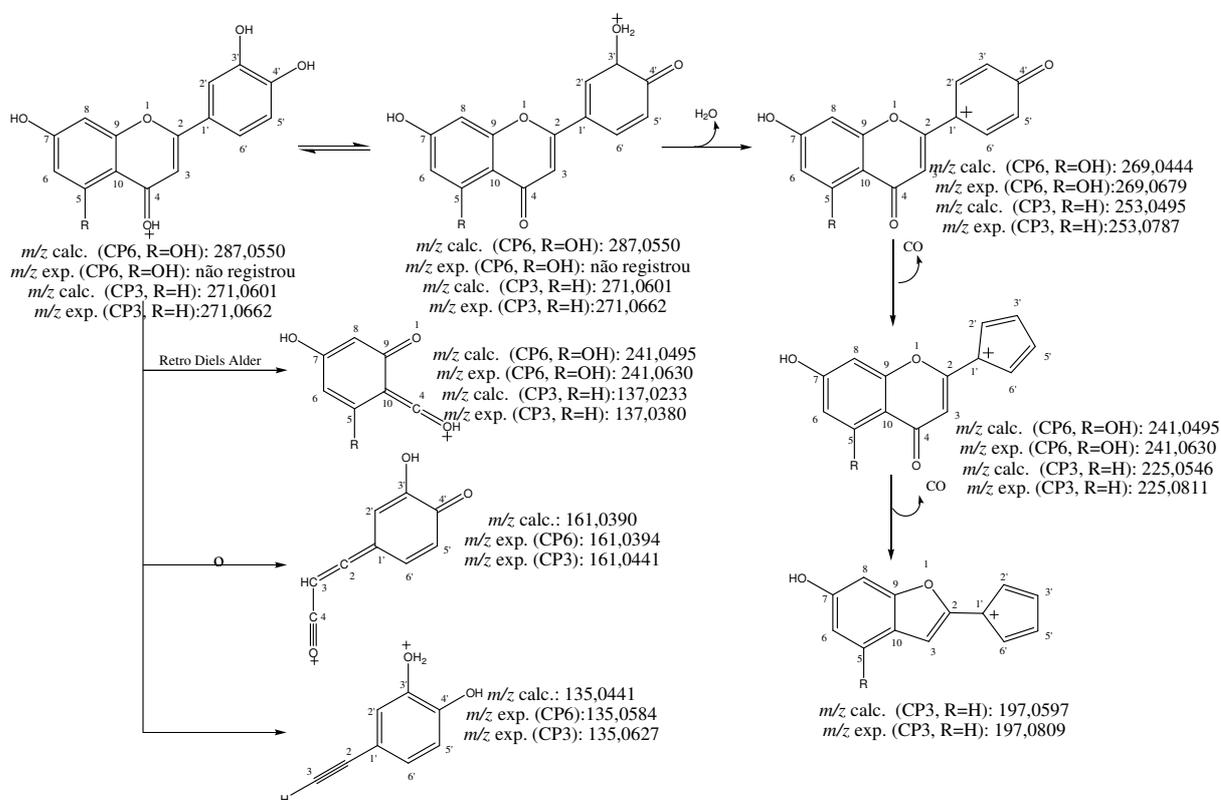


Figura 62. Espectro de massas da **3',4',7-triidroxi**flavona (a) e da **3',4',5,7-tetraidroxi**flavona (b)



Esquema 12. Mecanismo proposto para a fragmentação da **3',4',7-triidroxi**flavona e **3',4',5,7-tetraidroxi**flavona em espectro de massas de alta resolução

O espectro de ultravioleta da **3',4',7-triidroxiavona** apresentou absorção em λ_{\max} 342,7 nm, referente a banda I da flavona com hidroxila na posição 4'. O espectro de ultravioleta da **3',4',5,7-triidroxiavona** revelou absorção em λ_{\max} 348,7 nm, referente à banda I e uma banda fraca em λ_{\max} 252,2 nm referente à banda 2 (Figura 63).

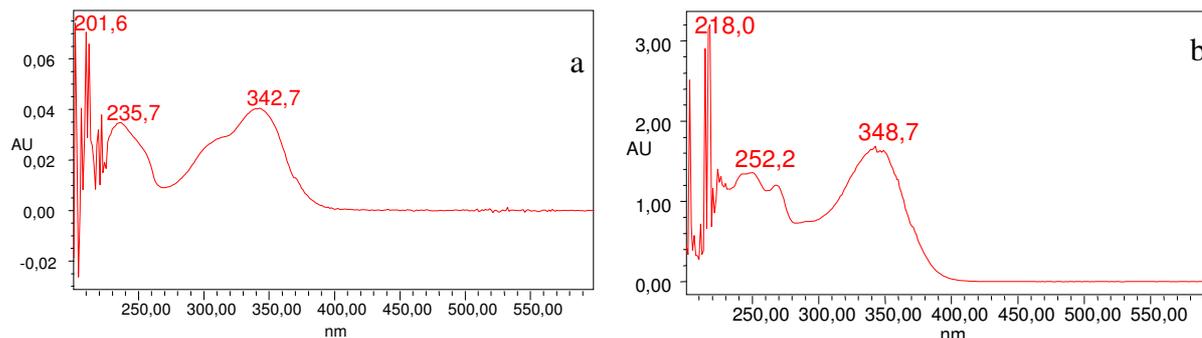


Figura 63. Espectro de ultravioleta da **3',4',7-triidroxiavona** (a) e da **3',4',5,7-tetraidroxiavona** (b)

Todos os dados espectrais obtidos dos experimentos com as substâncias isoladas CP3 e CP6 estão de acordo com os dados já apresentados na literatura para **3',4',7-triidroxiavona** e **3',4',5,7-tetraidroxiavona (luteolina)**, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2007). Ambas flavonas foram isoladas pela primeira vez desta espécie.

4.2.3.3. Aurona: CP5 - 3',4',6-triidroxiavona

O espectro de RMN ^1H (Figura 65) apresentou um simpleto em δ_{H} 6,72 atribuído ao hidrogênio H-10 da aurona. No espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ (Figura 66) observou-se sinais de carbonos não hidrogenados em δ_{C} 183,07 referente à carbonila C-3 e em δ_{C} 146,29 referente ao carbono C-2 e de carbono metínico em δ_{C} 112,71 referente ao carbono CH-10, sugerindo um esqueleto aurônico para **CP5**. O espectro 2D HMBC (Figura 68) mostrou a correlação via três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio H-10 (δ_{H} 6,72) e ambos os carbonos CH-2' (δ_{C} 117,52) e CH-6' (δ_{C} 125,01), confirmando um esqueleto de aurona. O deslocamento químico do carbono CH-10 (δ_{C} 112,71) incorpora uma valiosa informação sobre a configuração geométrica da molécula, já que auronas com configuração *Z* apresentam deslocamento químico de CH-10 em torno de δ_{C} 104,0-112,8, e os isômeros *E* δ_{C} 119,8-122,2 (AGRAWAL, 1989). Tal informação nos leva a concluir que a aurona isolada se trata da (*Z*)-

3',4',6-triidroxiurona, revelando a participação do efeito γ do oxigênio carbonílico no δ_C do CH-10 (δ_C 112,71) (Figura 64).

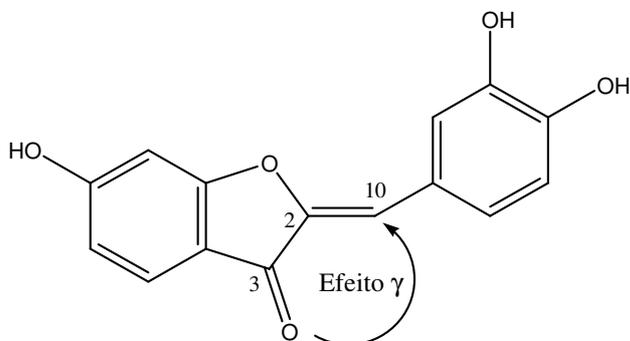


Figura 64. Efeito γ exercido pelo carbono carbonílico no δ_C de C-10

A localização dos substituintes hidroxílicos do anel A da **3',4',6-triidroxiurona** foi facilitada pela comparação com os espectros de RMN da **3'4',7-triidroxiflavona** e **3'4',7-triidroxiflavanona**, flavonóides com o mesmo padrão de substituição. Para o anel B observou-se dois dupletos que acoplam entre si com $J=8,00\text{Hz}$, atribuídos a H-5' (δ_H 6,87) e a H-6' (δ_H 7,26). Além de um simpleto em (δ_H 7,55) atribuído a H2'.

No espectro 2D ^1H - ^1H -COSY (Figura 66) foi verificada os acoplamentos entre H-6' e H-5', H-4 e H-5 e de H2' com H6'.

A atribuição dos carbonos quaternários foi confirmada com base nas correlações observadas no espectro de RMN 2D HMBC (Figura 67). A correlação $^3J_{\text{C-H}}$ de H-10 com C2' e C3, além de $^2J_{\text{C-H}}$ de H-10 com C-1' e C-2 confirmam a atribuição correta deste hidrogênio e carbonos.

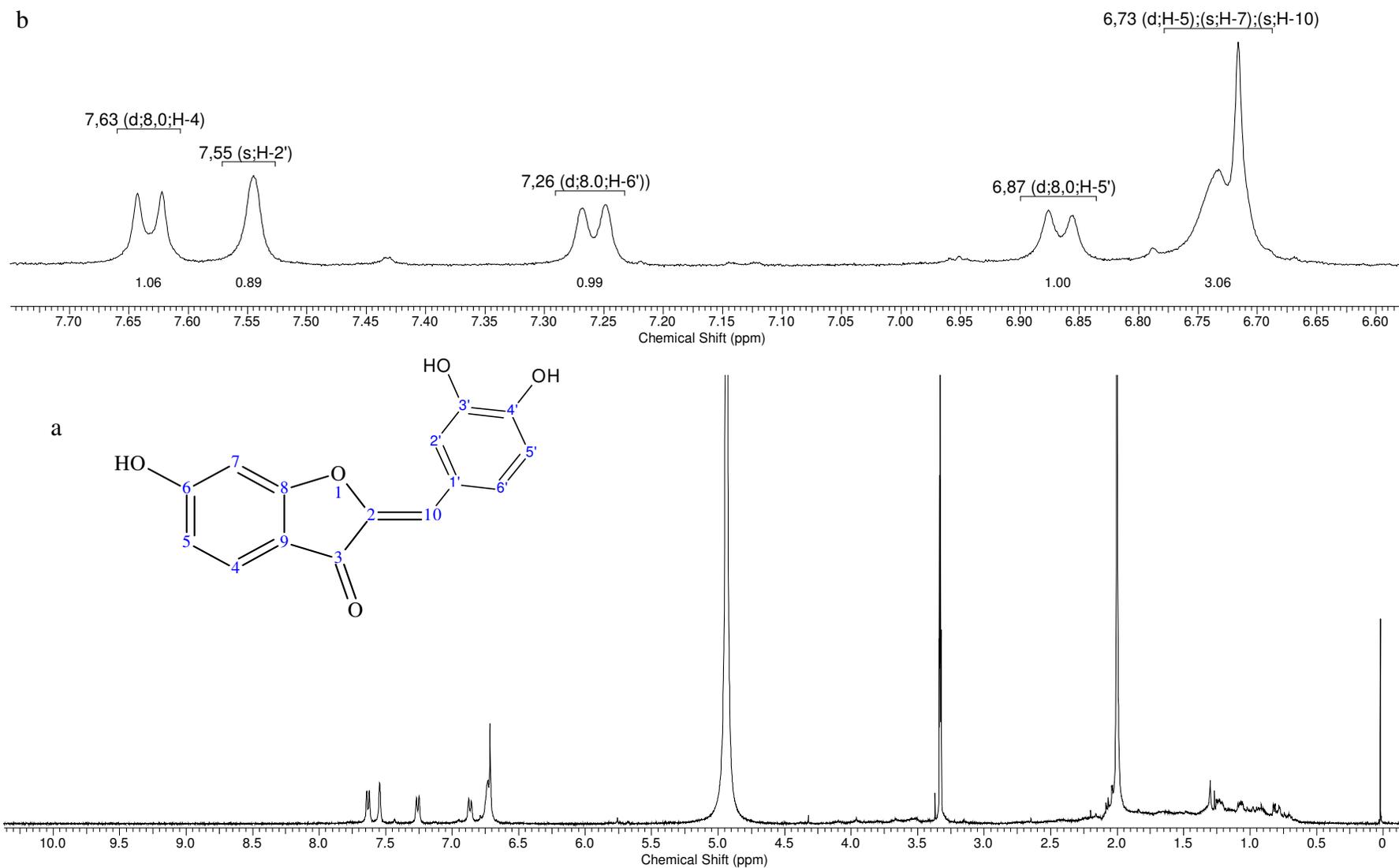


Figura 65. Espectro de RMN ^1H (400MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da **3',4',6-triidroiaurona** (a) e expansão da região $\delta_{\text{H}} 6,6$ à $7,7$ (b)

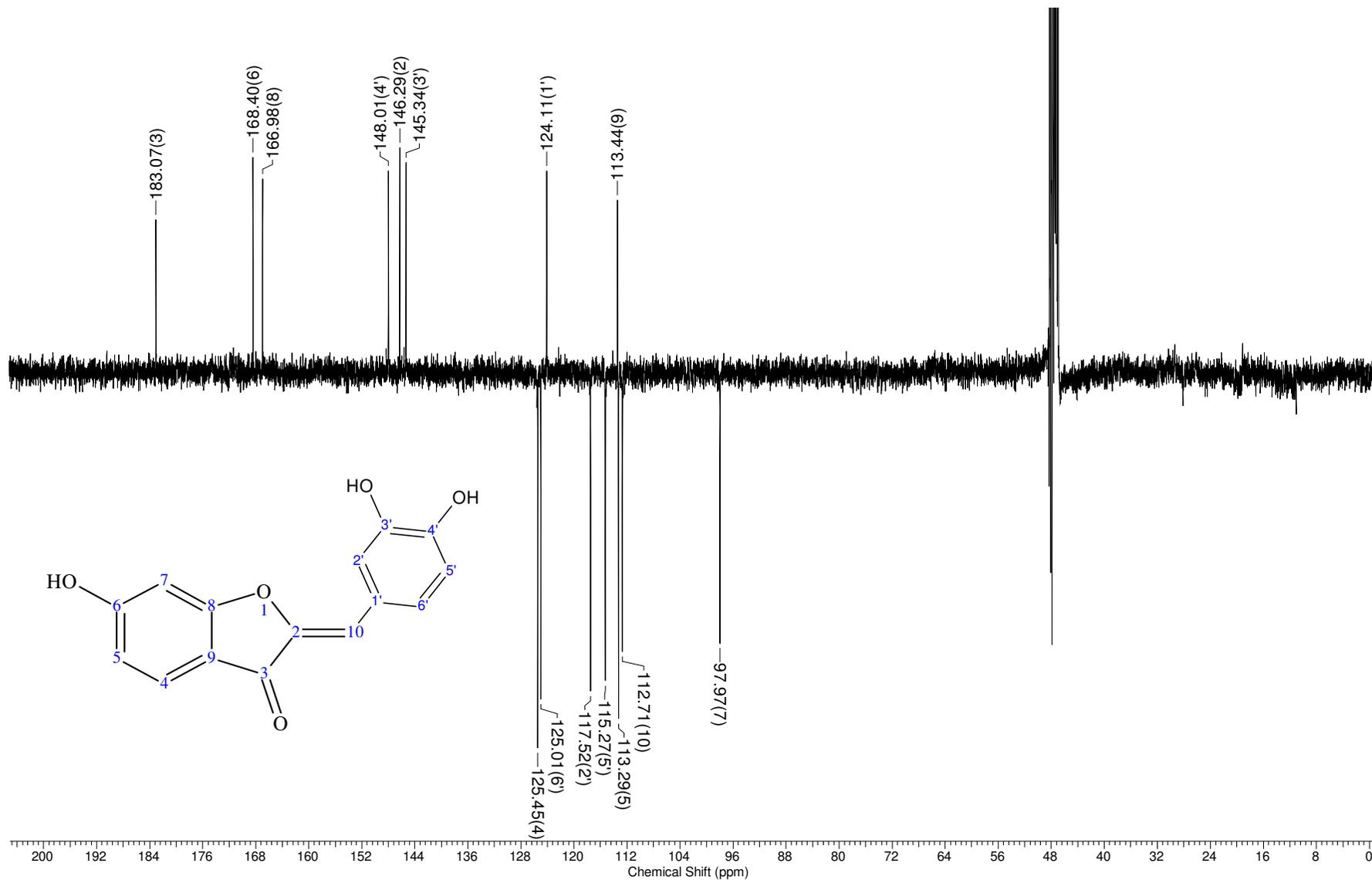


Figura 66. Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da 3',4',6-triidroxiaurona

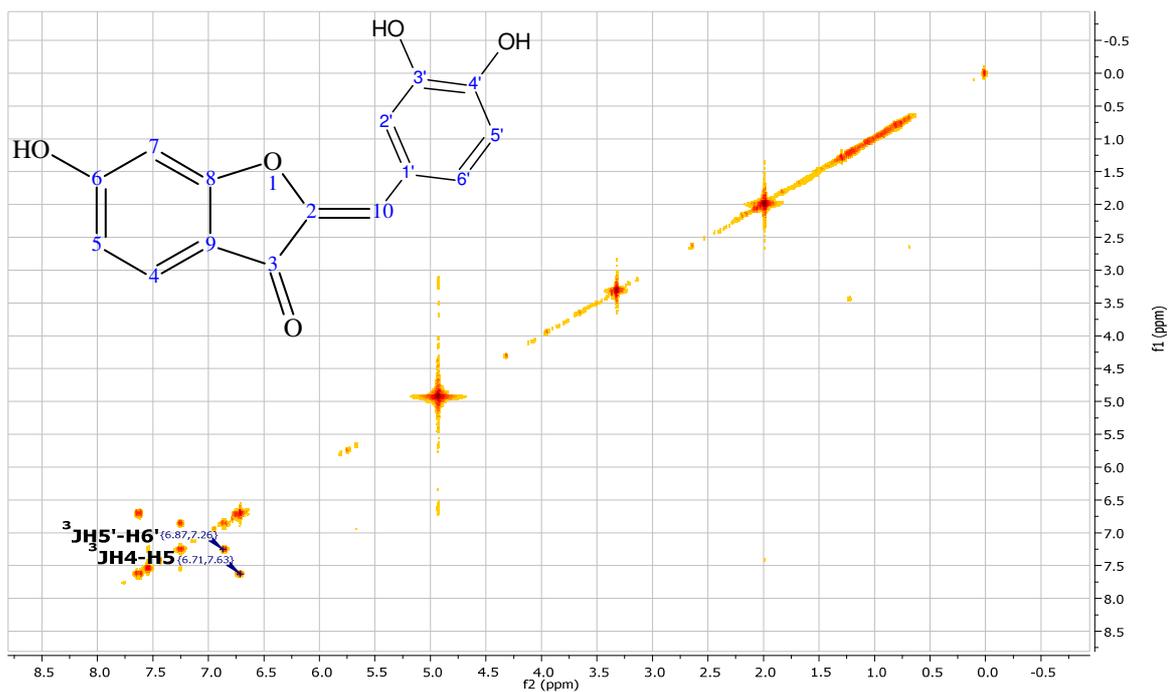


Figura 67. Espectro de RMN¹H 2D de correlação homonuclear ¹H-¹H- COSY da 3',4',6-triidroxiarona

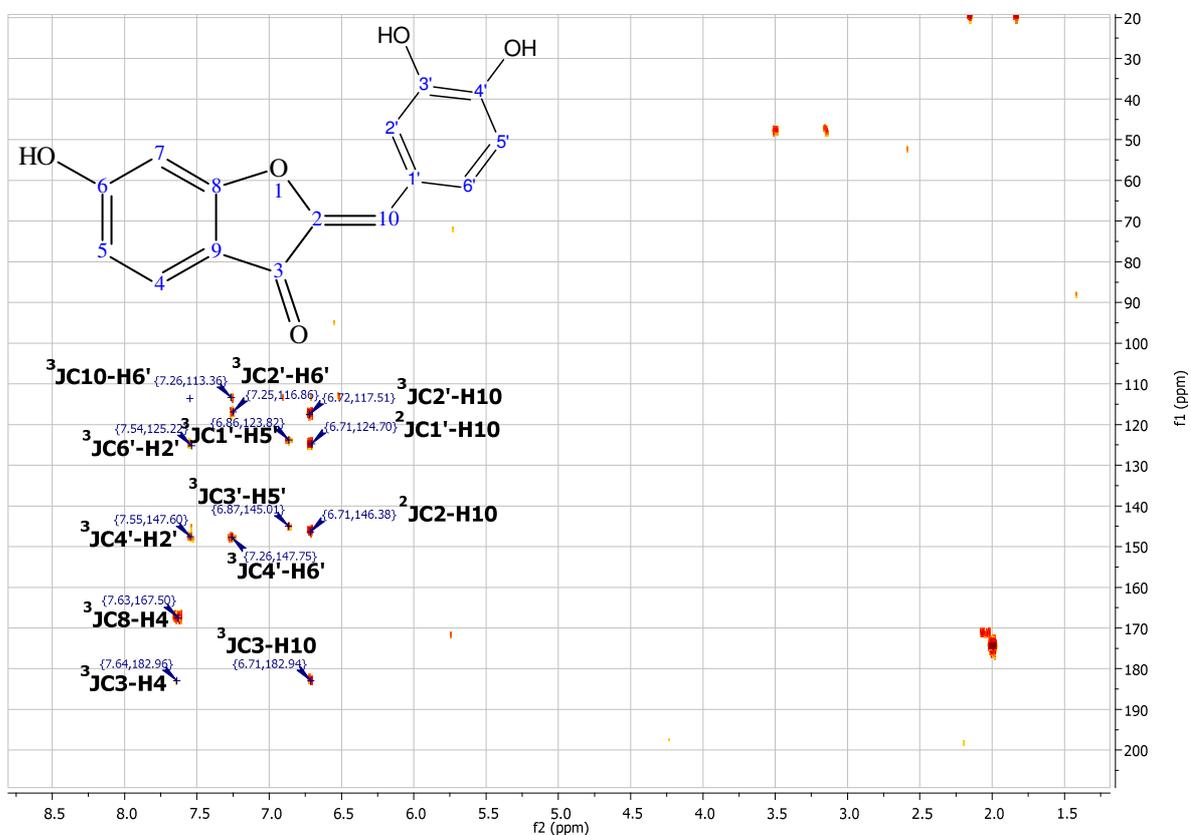


Figura 68. Espectro de RMN 2D HMBC da 3',4',6-triidroxiarona

A atribuição dos carbonos metínicos foi facilitada pela colaboração fornecida pelo espectro 2D HSQC. A Tabela 23 apresenta os dados espectrais obtidos dos espectros RMN ^1H , ^{13}C , 2D HSQC e HMBC.

Tabela 23. Dados espectrais de RMN (^1H : 500 MHz e ^{13}C : 125 MHz, em MeOH- d_4) da **3',4',6-triidroxiurona**, inclusive resultados de correlações heteronuclares obtidos de 2D-HSQC e HMBC. Deslocamentos químicos em δ (ppm, δ_{H} e δ_{C}) e constantes de acoplamento (J) em Hz entre parênteses

	HSQC		HMBC		Literatura ^a	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
2	146,29	-	H-10	-	147,7	-
3	183,07	-	-	H-4,H-10	184,5	-
4	125,45	7,63(d,8,00)	-	-	126,9	7,61(d,8,5)
5	113,29	6,73(d)	-	-	116,7	6,70(dd, 8,5,2,2)
6	168,40	-	-	-	169,8	-
7	97,97	6,73(s)	-	-	99,4	6,68(d,2,2)
8	166,98	-	-	H-4	168,3	-
9	113,44	-	-	-	114,9	-
10	112,71	6,73(s)	-	H-6'	114,7	6,69(s)
1'	124,11	-	H-10	H-5'	125,5	-
2'	117,52	7,55(s)	-	H-6',H-10	114,1	7,51(d, 1,9)
3'	145,34	-	-	H-5'	146,7	-
4'	148,01	-	-	H-2',H-6'	149,4	-
5'	115,27	6,87(d,8,00)	-	-	118,9	6,83(dd,8,3)
6'	125,01	7,26(d,8,00)	-	H-2'	126,4	7,23(dd,8,3,1,9)

*RMN-DEPTQ foi usado para deduzir o número de hidrogênios nos átomos de carbono. Os valores de J foram deduzidos dos espectros 1D de RMN ^1H e os espectros COSY colaboram nas atribuições δ_{H} e δ_{C} .

a- Dados obtidos na literatura (WANG *et al.*, 2007).

Na Figura 69 registrou-se o espectro de massa acurada da **3',4',6-triidroxiurona**.

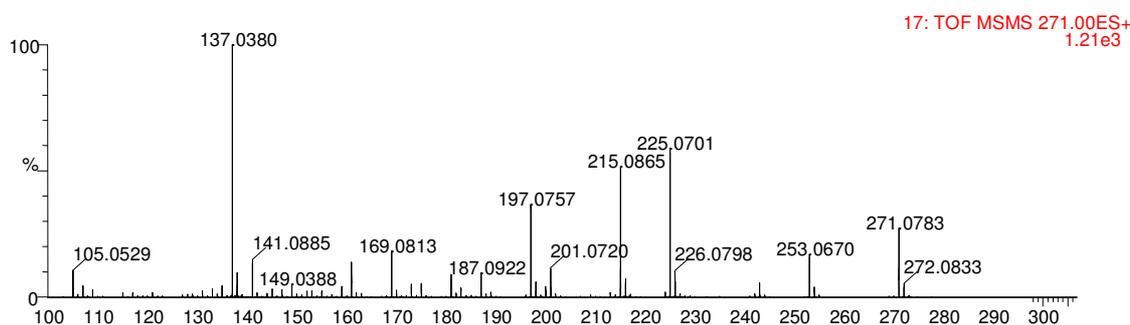
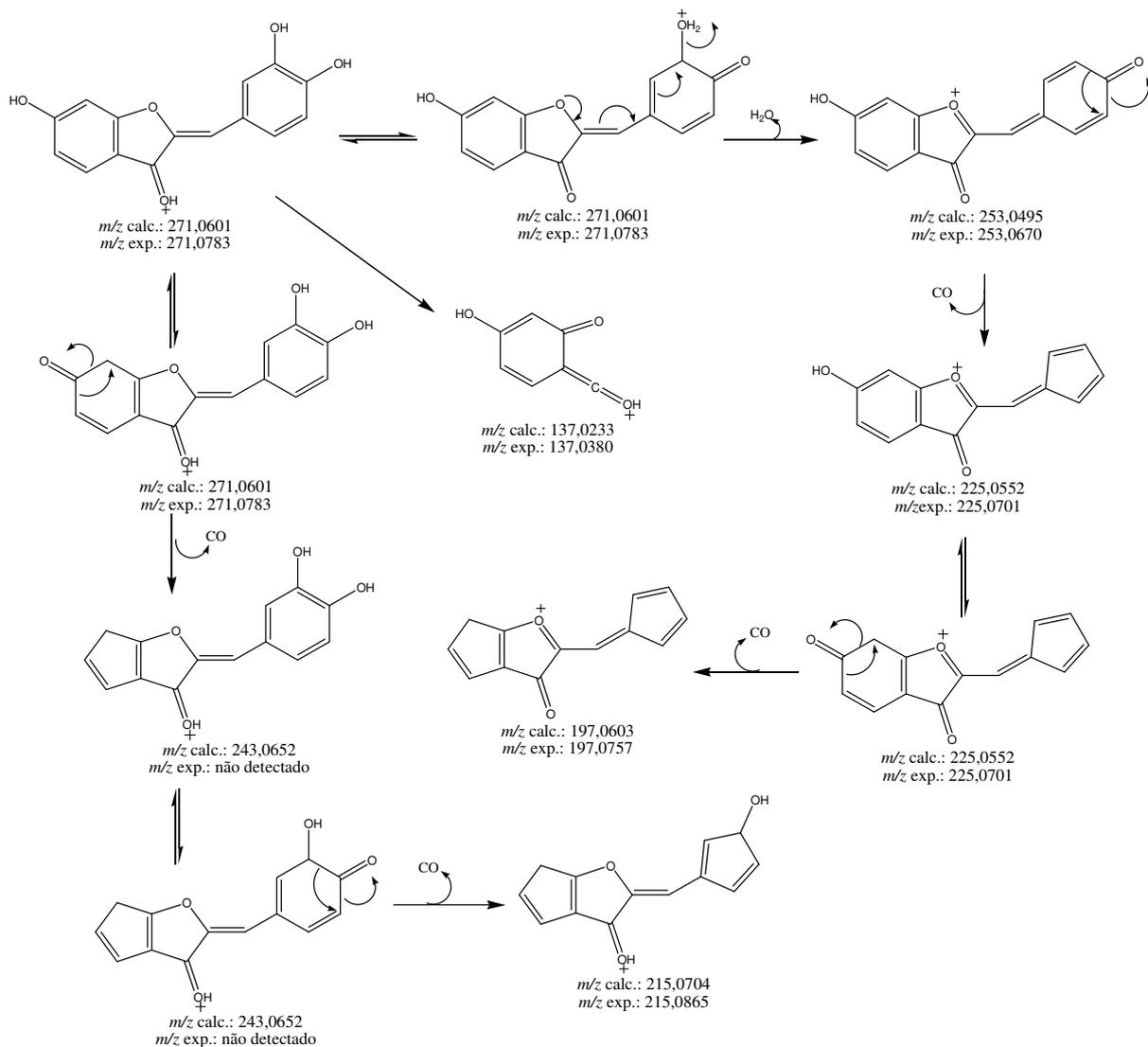


Figura 69. Espectro de massas da **3',4',6-triidroxiurona**

No Esquema 13 resumiu-se o mecanismo de fragmentação proposto para formação de fragmentos correspondentes aos principais picos observados no espectro de massas da **3',4',6-triidroxiurona**.



Esquema 13. Mecanismo proposto para fragmentação da **3',4',6-triidroxiurona** no espectrômetro de massas

O espectro de ultravioleta da **3',4',6-triidroxiurona** (Figura 70) apresentou absorção em λ 395,3nm, referente à banda I.

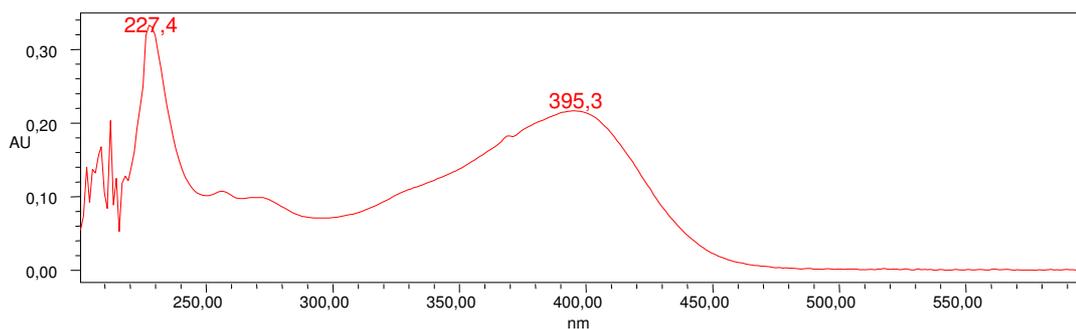


Figura 70. Espectro de ultravioleta da **3',4',6-triidroxiaurona**

Os dados espectrais discutidos revelaram-se condizentes com dados da literatura para a **3',4',6-triidroxiaurona**, conhecida como **sulfuretina** (WANG *et al.*, 2007).

4.2.3.4. Chalconas: CP7 - **2',3,4,4'-tetraidroxichalcona** e CP8 - **2',4,4'-triidroxichalcona**

As chalconas foram identificadas com base no deslocamento químico dos hidrogênios *alfa* H- α (δ_H 7,59-7,65) e *beta* H- β (δ_H 7,76-7,81) à carbonila, apresentando uma constante de acoplamento $J=15\text{Hz}$ entre eles, revelando configuração geométrica *trans* entre tais hidrogênios. Da mesma forma os carbonos *alfa* C- α (δ_C 116) e *beta* C- β (δ_C 144) também foram úteis na identificação do esqueleto de chalcona. Os δ_H e δ_C dos átomos de hidrogênio e o carbono-13 na posição *beta* à carbonila são mais desprotegidos que na posição *alfa*, pois sofrem o efeito retirador de elétrons por mesomeria da carbonila.

O anel A das duas chalconas isoladas possuem o mesmo padrão de substituição, por isso os espectros de RMN ^1H (Figura 71 e 73) de ambas apresentaram dois dupletos que acoplam entre si com J 8,2-8,8Hz, acoplamento em *orto*, estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios 5' (δ_H 6,45) e 6' (δ_H 8,00) e um simpleto em δ_H 6,32 referente a H3'. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 72 e 74) o carbono carbonílico (C-7) apresentou-se desprotegido (δ_C 192) indicando que a carbonila está quelada, isso confirma a presença de hidroxila na posição 2'.

O espectro de RMN ^1H da **2',3,4'-triidroxichalcona** revelou um sistema AA'BB', que foi atribuído ao anel B, que somente é possível com a presença de substituinte (hidroxila) em C-4'. O espectro de RMN ^1H da **2',3,4,4'-tetraidroxichalcona** apresentou um dupletos em δ_H 7,15 (H-6) coplando com um dupletos em δ_H 6,86 (H-5) com $J=7,9\text{Hz}$, acoplamento em *orto*, e um simpleto em δ_H 7,22 (H-2).

b

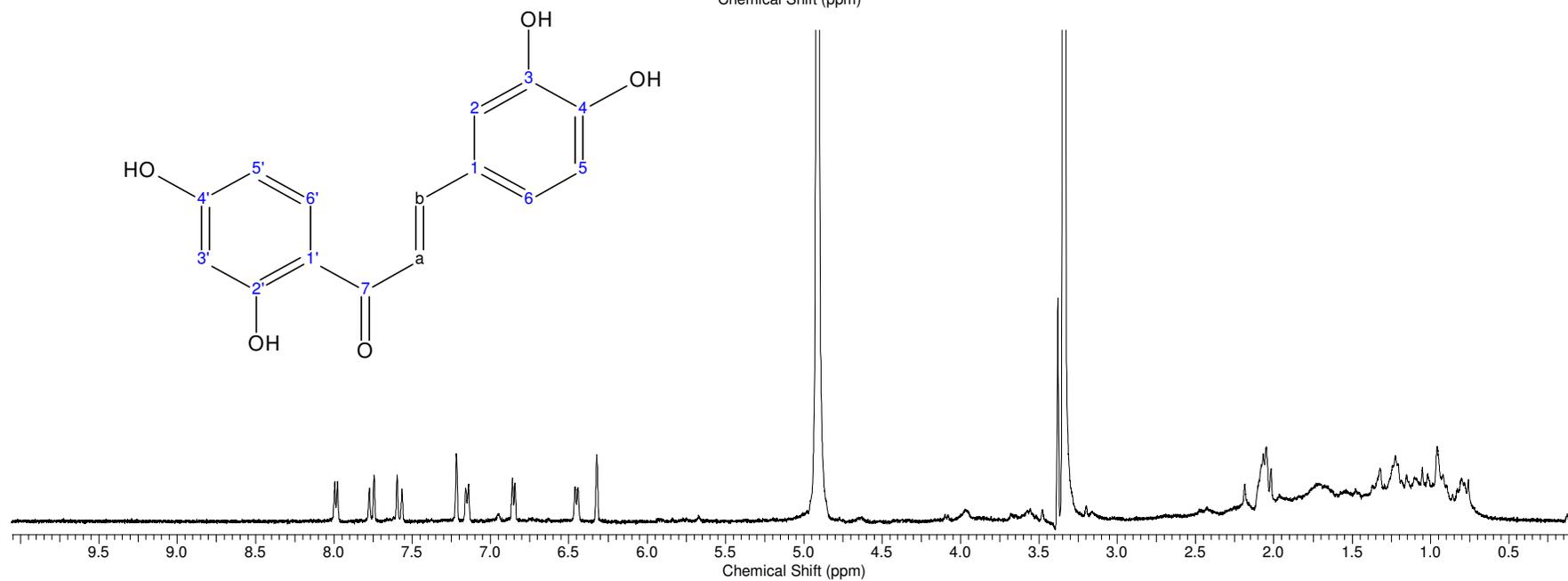
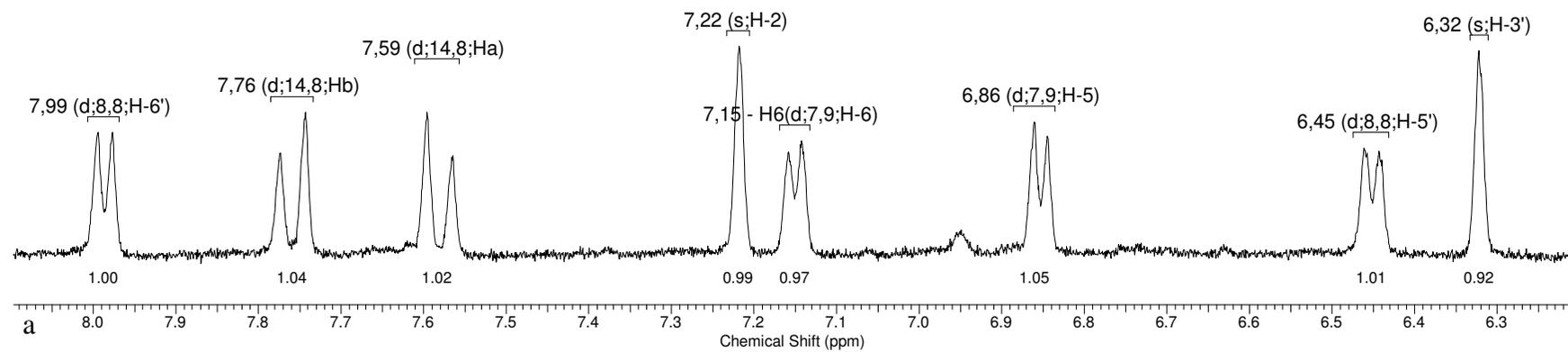


Figura 71. Espectro de RMN ^1H (500MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da **2',3,4,4'-tetraidroxichalcona** (a) e expansão da região de δ_{H} 6,0 à 8,4 (b)

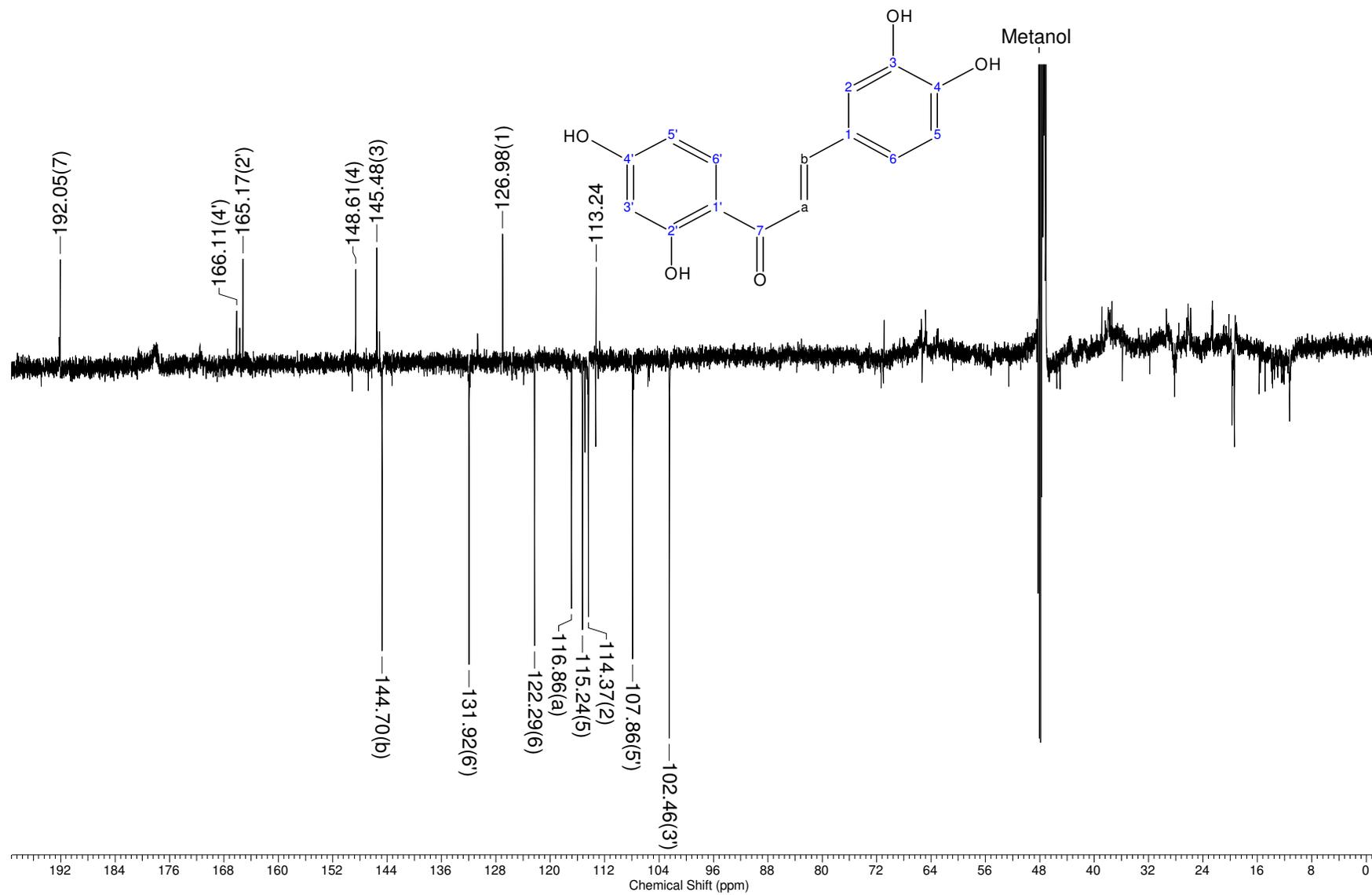


Figura 72. Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona

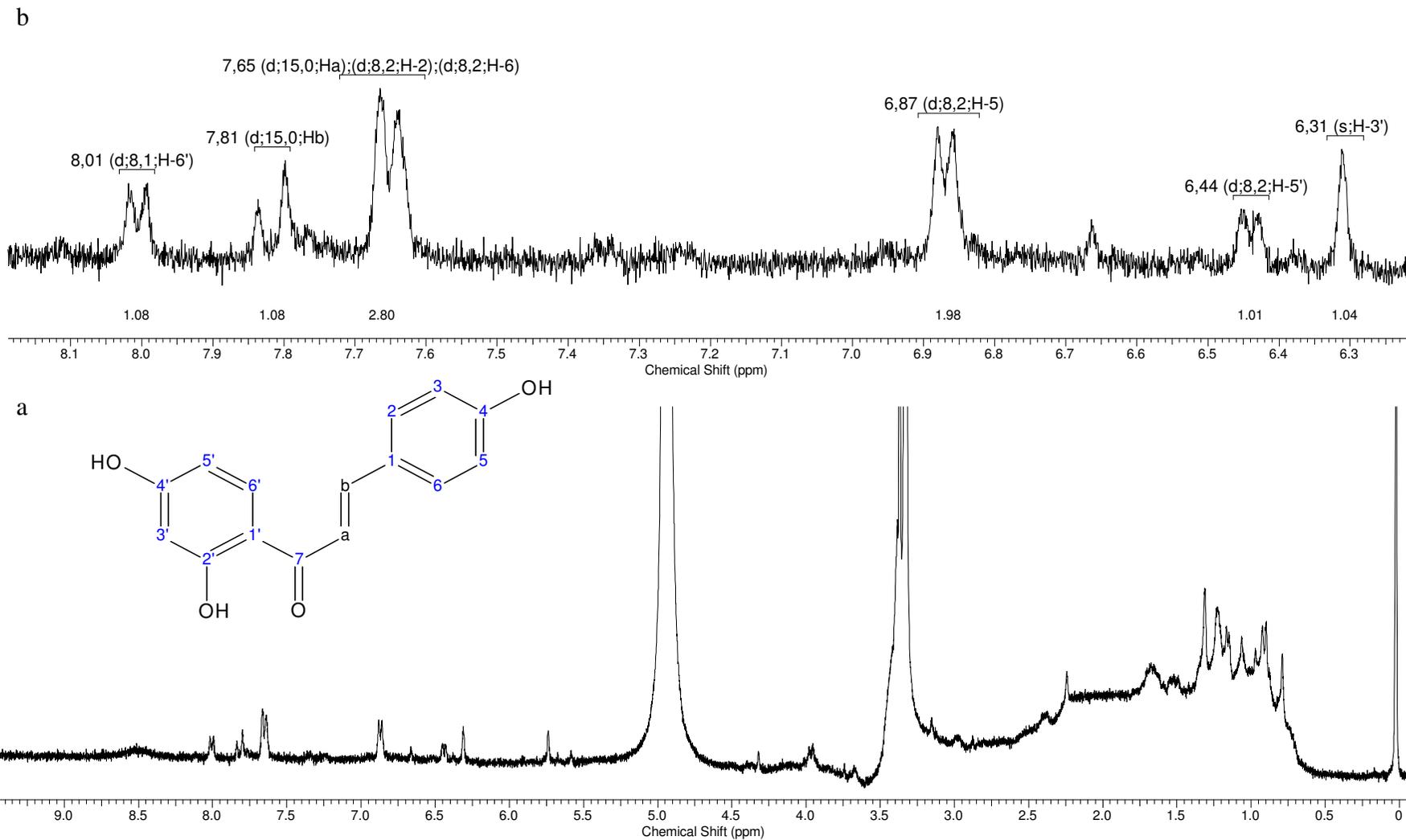


Figura 73. Espectro de RMN ^1H (400MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da **2',4,4'-trihidroxichalcona** (a) e expansão da região de δ_{H} 6,2 à 8,2 (b)

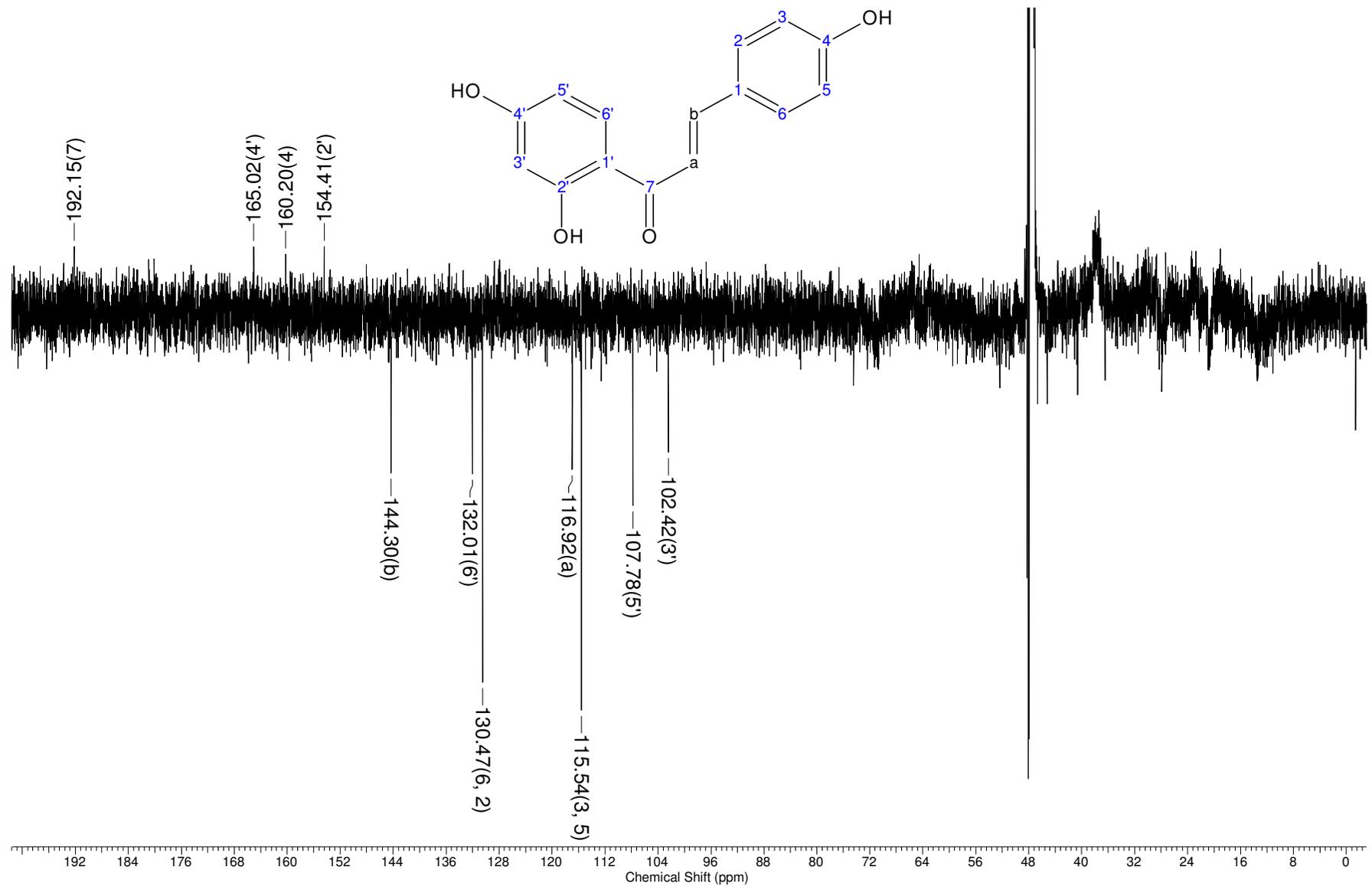


Figura 74. Espectro de RMN ¹³C-DEPTQ (125 MHz, em MeOH-*d*₄) 2',4,4'-triidroxichalcona

A atribuição dos carbonos metínicos foi confirmada pelo espectro de RMN 2D HSQC. A Tabela 24 sumariza os dados espectrais do espectro de RMN¹H e ¹³C e as correlações observadas no espectro de RMN 2D HSQC.

Tabela 24. Dados espectrais de RMN (¹H: 500 MHz e ¹³C: 125 MHz, em MeOH-*d*₄) da **2',3',4, 4'-tetraidroxichalcona** e **2',4,4'-triidroxichalcona**, inclusive resultados de correlações heteronuclares obtidos de 2D-HSQC. Deslocamentos químicos em δ (ppm, δ_H e δ_C) e constantes de acoplamento (J) em Hz entre parênteses

	CP7 - 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona				CP8 - 2',3,4'-triidroxichalcona			
	HSQC		Literatura ^a		HSQC		Literatura ^b	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
C=O	192,05	-	193,9	-	192,14	-	193,6	-
α	116,86	7,59(d, 14,8)	118,7	7,47	116,92	7,65(d,15,0)	118,4	7,54
β	144,70	7,76(d,14,8)	146,6	7,67	144,30	7,81(d,15,0)	145,7	7,73(d,15,4)
1	126,98	-	128,9	-	ND	-	127,9	-
2	114,37	7,22(s)	117,1	7,12	130,47	7,65(d,8,2)	131,8	7,54
3	145,48	-	147,3	-	115,54	6,87(d,8,2)	116,9	6,88(d,8,6)
4	148,61	-	150,4	-	160,19	-	161,5	-
5	115,24	6,86(d,7,9)	116,3	6,76	115,54	6,87(d,8,2)	116,9	6,88(d,8,6)
6	122,29	7,15(d,7,9)	124,1	7,06	130,47	7,65(d,8,2)	131,8	7,54
1'	113,24	-	115,2	-	ND	-	114,7	-
2'	165,17	-	166,8	-	154,41	-	166,4	-
3'	102,46	6,32(s)	104,3	6,23	102,41	6,31(s)	103,9	6,25(d,2,4)
4'	166,12	-	168,0	-	165,01	-	167,5	-
5'	107,86	6,45(d,8,8)	109,6	6,35	107,78	6,44(d,8,2)	109,2	6,37(dd,8,8)
6'	131,92	7,99(d,8,8)	133,8	7,89	132,00	8,01(d,8,2)	133,4	7,89(d,8,8)

*RMN-DEPTQ foi usado para deduzir o número de hidrogênios nos átomos de carbono. Os valores de J foram deduzidos dos espectros 1D de RMN¹H e os espectros COSY colaboram nas atribuições δ_H e δ_C .

a- Dados da literatura (TIAN *et al.*, 2004)

b- Dados da literatura (ZHAO *et al.*, 2011).

No espectro de RMN homonuclear 2D COSY da **2',3,4,4'-tetraidroxichalcona** (Figura 75) foi possível observar o acoplamento de H-5 com H-6, H-5' com H-6' e H- α com H- β . O espectro e RMN 2D HMBC (Figura 76) foi útil para a atribuição correta e inequívoca dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários.

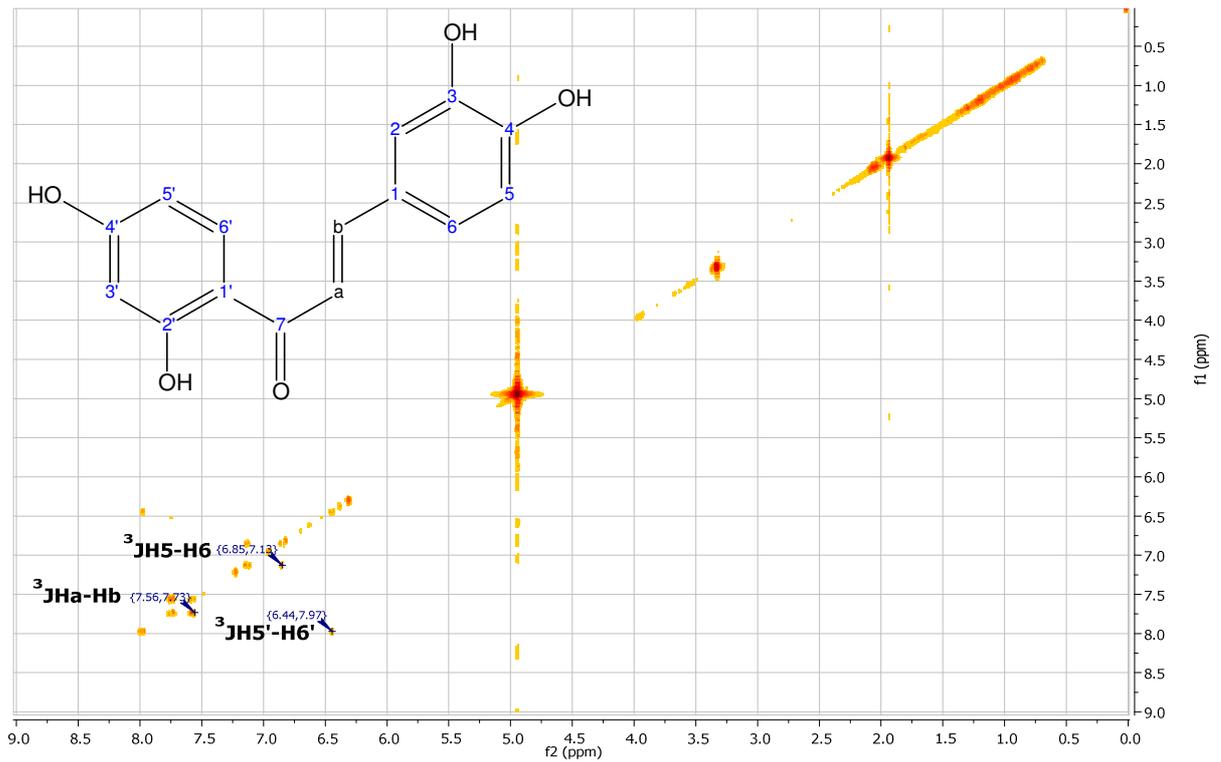


Figura 75. Espectro de RMN¹H 2D de correlação homonuclear ¹H-¹H- COSY da 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona

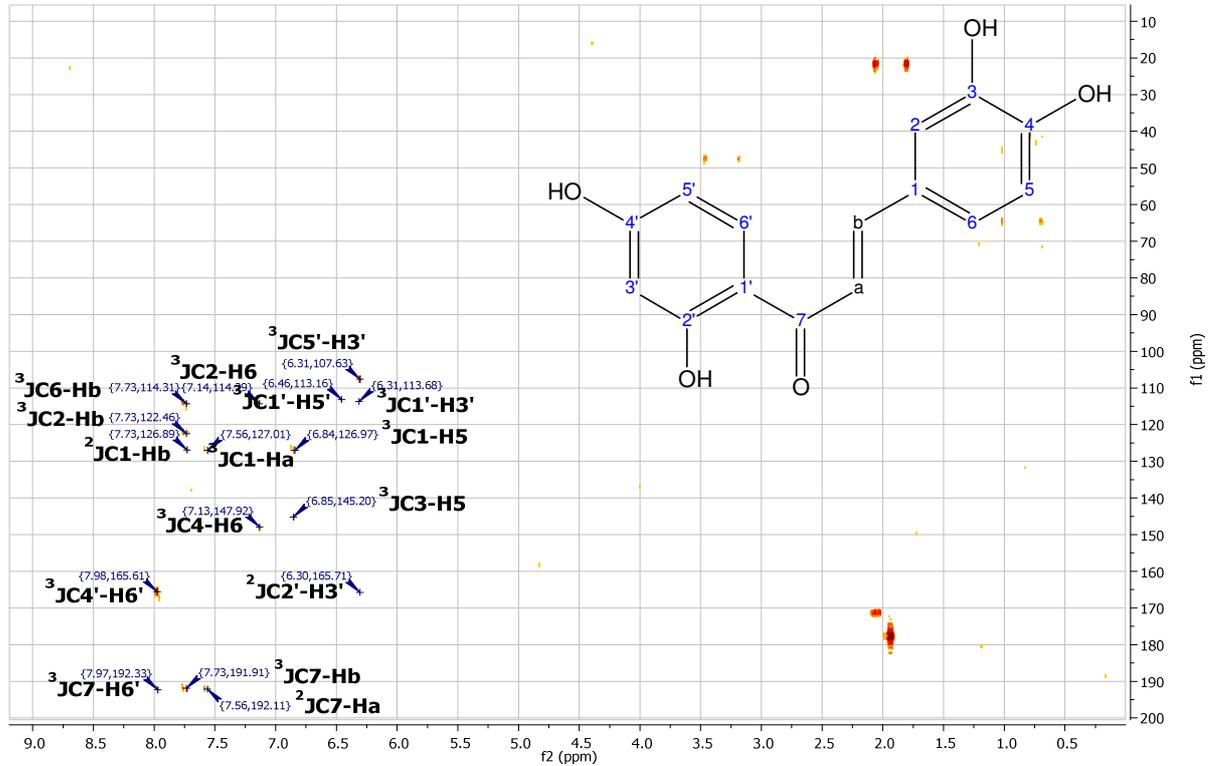


Figura 76. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC da 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona

No espectro de RMN homonuclear 2D COSY da **2',4,4'-triidroxichalcona** (Figura 77) foi possível observar o acoplamento de H-5 com H-6, H-2 com H-3, H-5' com H-6' e H- α com H- β .

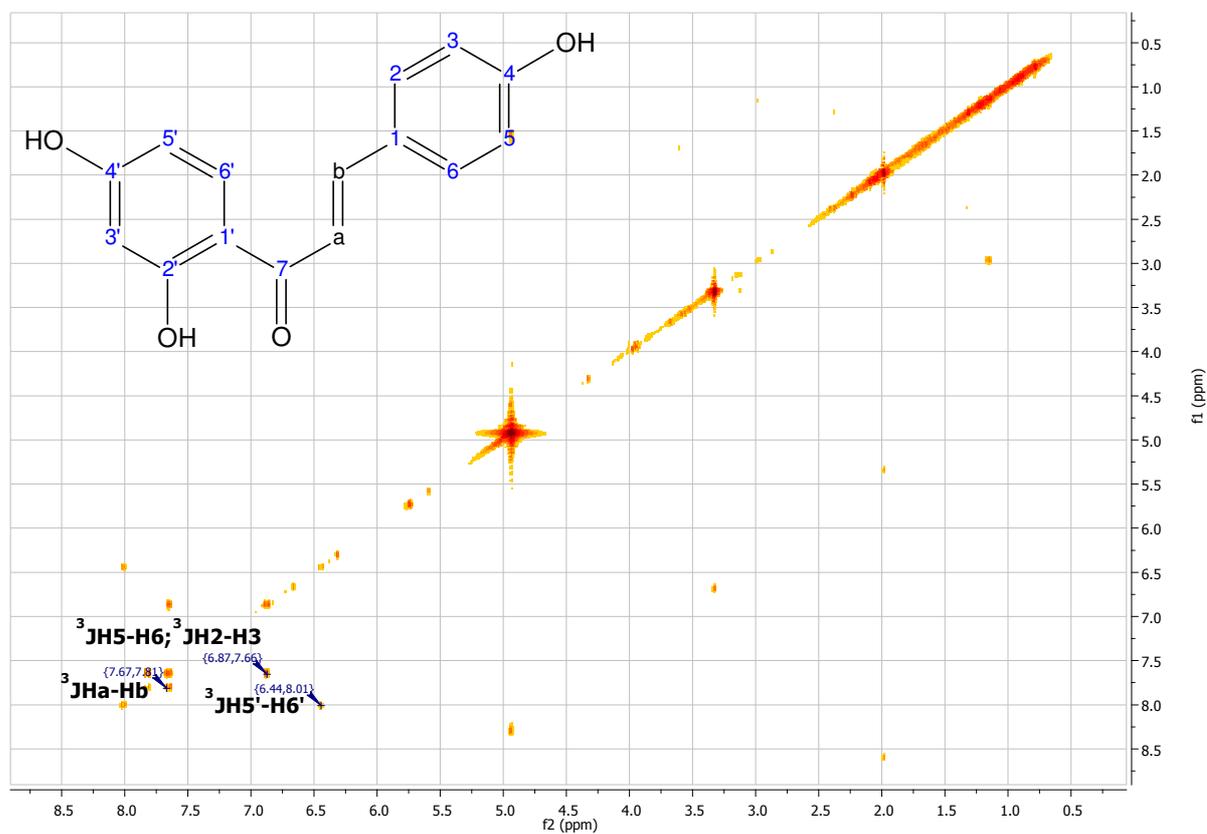


Figura 77. Espectro de RMN¹H 2D de correlação homonuclear ¹H-¹H- COSY da **2',4,4'-triidroxichalcona**

O espectro de RMN 2D HMBC (Figura 78) foi útil para a atribuição correta e inequívoca dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários.

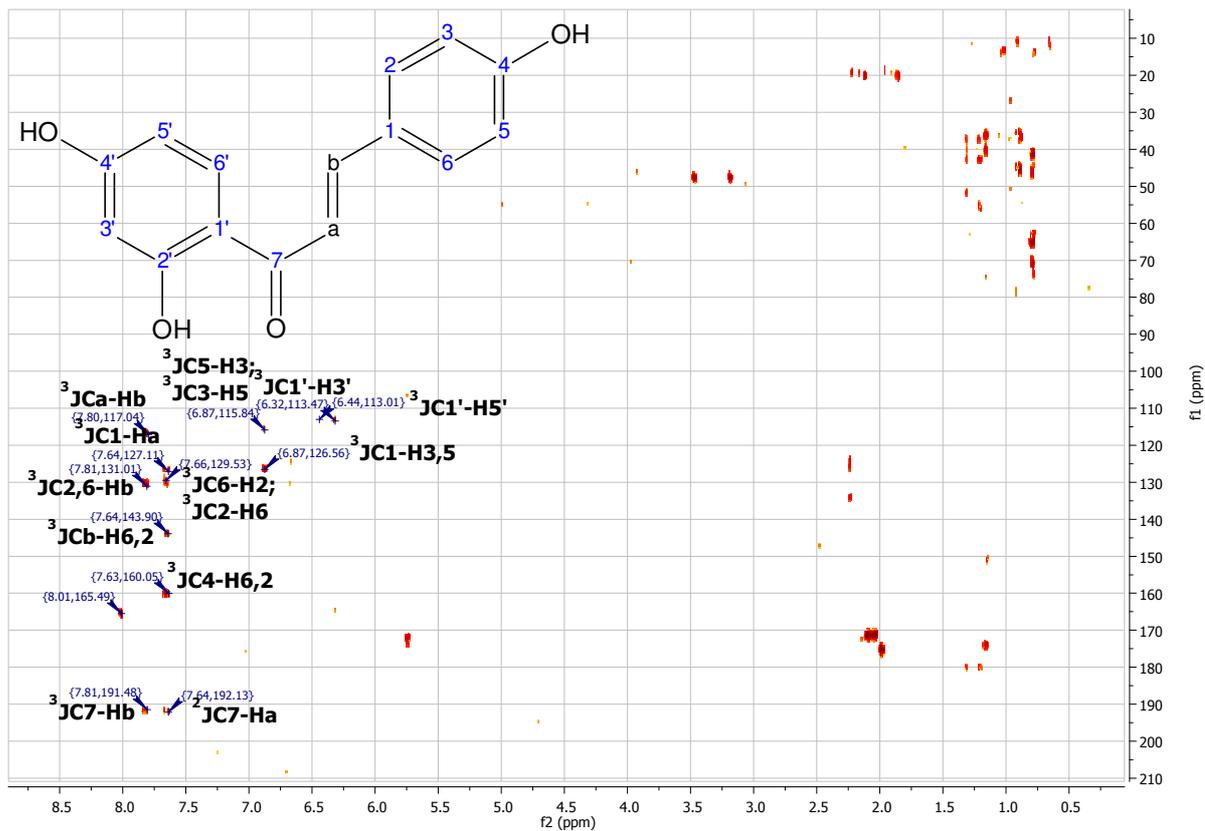


Figura 78. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC da 2',4,4'-trihidrochalcona

O espectro de massa acurada da 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona (Figura 79) apresentou grande semelhança com o espectro da 3',4',7-trihidroflavanona, em função do equilíbrio existente entre chalcona e flavanona.

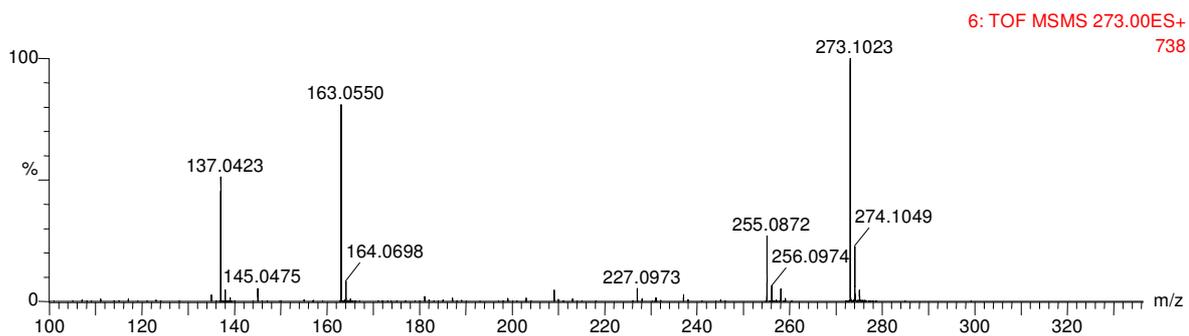


Figura 79. Espectro de massas da 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona

A Figura 80 apresenta o espectro de massas da 2',4,4'-trihidrochalcona.

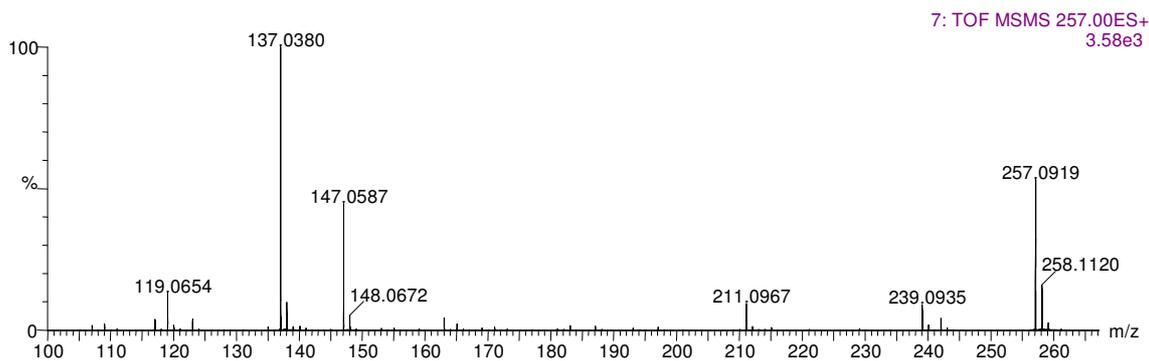
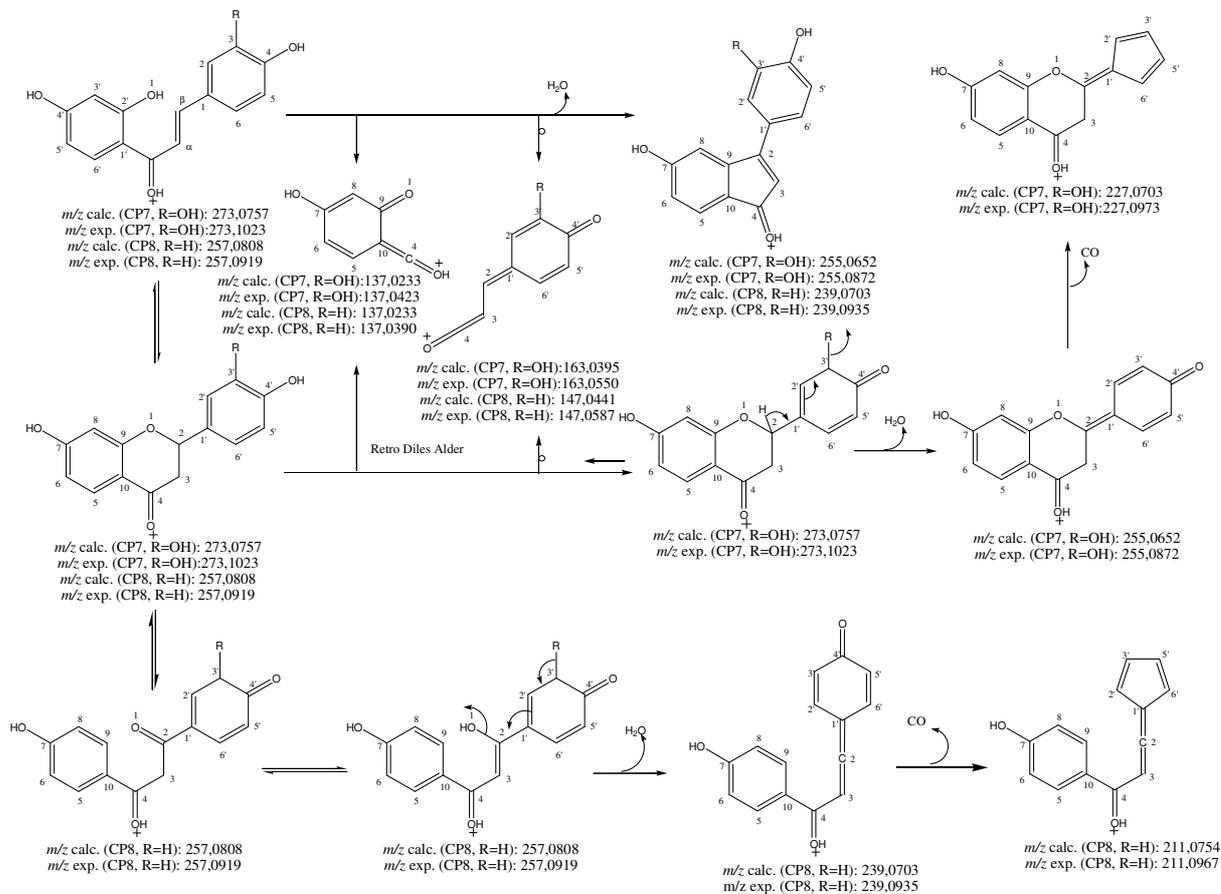


Figura 80. Espectro de massas da **2',4,4'-trihidrochalcona**

Para as duas substâncias observamos a fragmentação do íon molecular ($[M+H]^+$) através do mecanismo retro Diels Alder, que mais uma vez foi útil na atribuição da quantidade de hidroxilas em cada anel. O Esquema 14 apresenta os fragmentos propostos para justificar os íons observados nos espectros massas exatas da **2',3,4,4'-tetraidroxichalcona** (Figura 79) e **2',4,4'-trihidrochalcona** (Figura 80).



Esquema 14. Mecanismo proposto para a fragmentação da **2',3,4,4'-tetraidroxichalcona** e da **2',4,4'-trihidrochalcona**

O espectro de ultravioleta da **2',3,4,4'-tetraidroxichalcona**, apresenta absorção em λ 380nm e da **2',4,4'-triidroxichalcona** λ 368nm, referente à banda I (Figura 81).

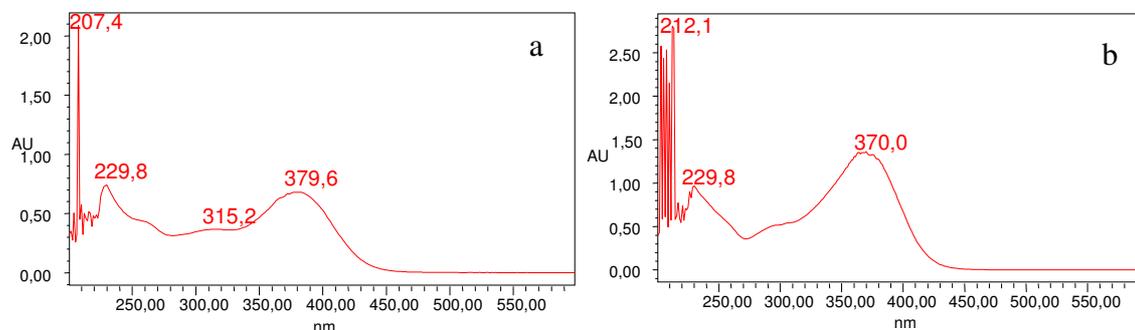
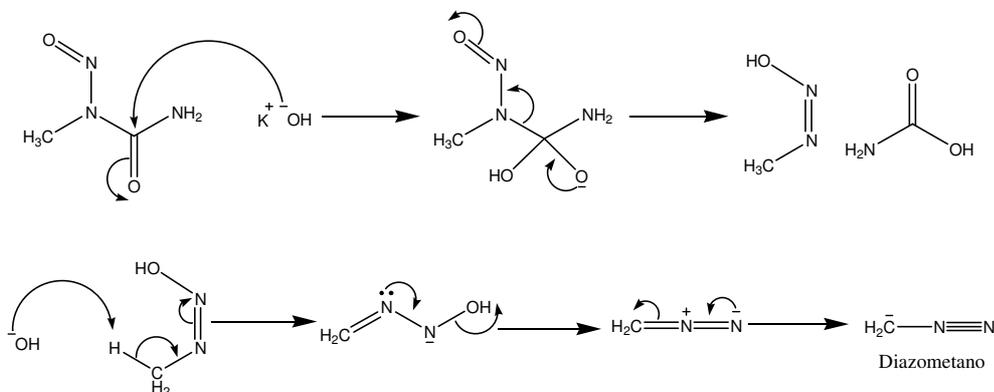


Figura 81. Espectro de ultravioleta da **2',3,4,4'-tetraidroxichalcona** (a) e da **2',3,4'-triidroxichalcona** (b)

Todos os dados espectrais obtidos dos experimentos com as substâncias isoladas CP7 e CP8 estão de acordo com os valores encontrados na literatura para **2',3,4,4'-tetraidroxichalcona** (**buteína**) e **2',4,4'-triidroxichalcona** (**isoliquiritigenina**), respectivamente (TIAN *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2011). O flavonoide **2',3,4,4'-tetraidroxichalcona** foi isolada pela primeira vez desta espécie.

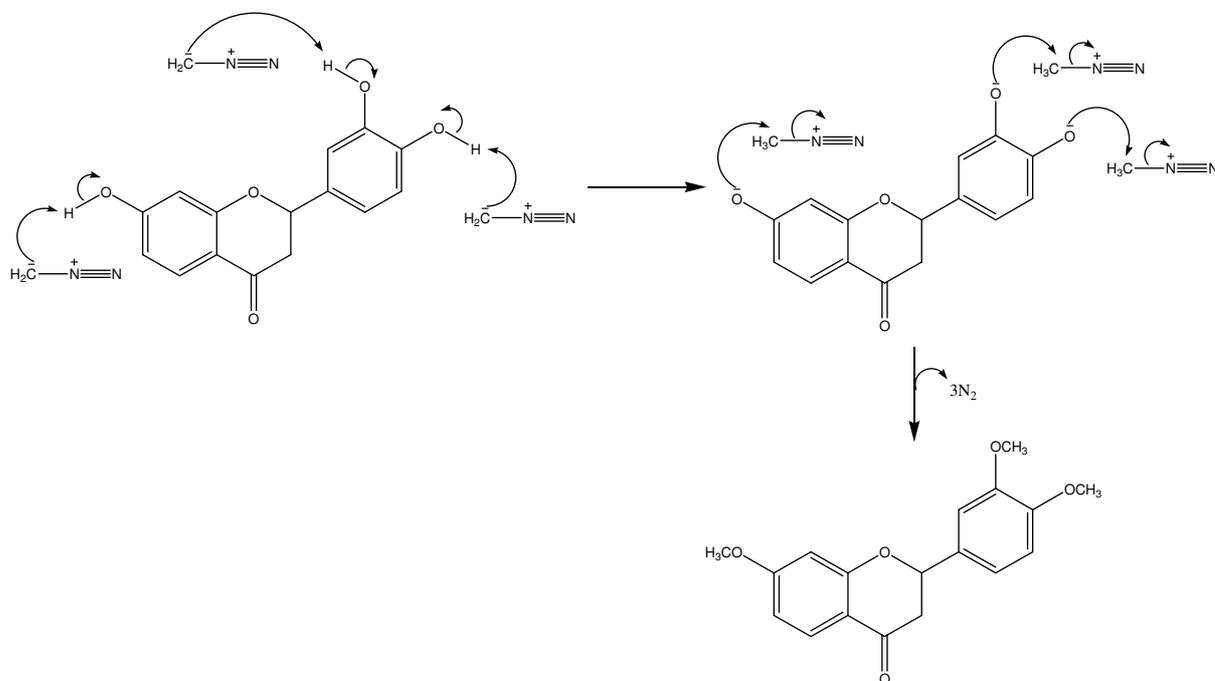
4.2.3.5. Preparação dos derivados

Os flavonoides isolados do cumaru foram submetidos à reação com diazometano. O diazometano foi sintetizado a partir de reação de nitrosometiluréia com hidróxido de potássio (CARVALHO *et al.*, 2006). O Esquema 15 apresenta o mecanismo proposta para síntese do diazometano.



Esquema 15. Mecanismo proposto para síntese do diazometano (adaptado de CARVALHO *et al.*, 2006)

O Esquema 16 apresenta o mecanismo proposto para a metilação da **3',4',7-triidroxi flavanona** com o diazometano.



Esquema 16. Mecanismo proposto para metilação de fenol (CARVALHO *et al.*, 2006)

Os flavonoides metilados foram analisados por espectrometria de massas. A Figura 82 apresenta os espectros de massa acurada dos flavonoides metilados. No espectro da **3',4',7-trimetoxiflavona** (CP3M), **3',4',7-trimetoxiflavanona** (CP4M), **3',4',6-trimetoxiaurona** (CP5M), o acréscimo de 42 unidades de massa na razão massa carga do íon molecular confirmou a existência de três posições hidroxiladas nos flavonoide originais. No espectro da **3',4',7-trimetoxi-5-hidroxi flavona** (CP6M) e **3,4,4'-trimetoxi-2'-hidroxichalcona** (CP7M) o acréscimo de 42 unidades de massa na razão massa carga do íon molecular confirmou a existência de três posições hidroxiladas e uma hidroxila quelatogênica, pois esta não sofre reação com diazometano. No espectro da **4,4'-trimetoxi-2'-hidroxichalcona** (CP8M) o acréscimo de 28 unidades de massa na razão massa carga do íon molecular confirmou a existência de duas posições hidroxiladas e uma hidroxila quelatogênica.

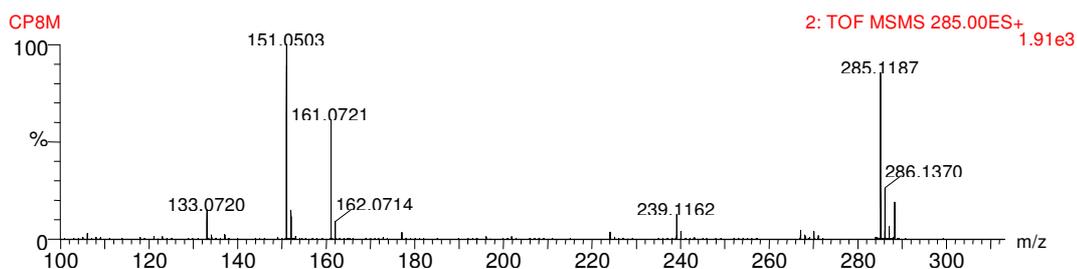
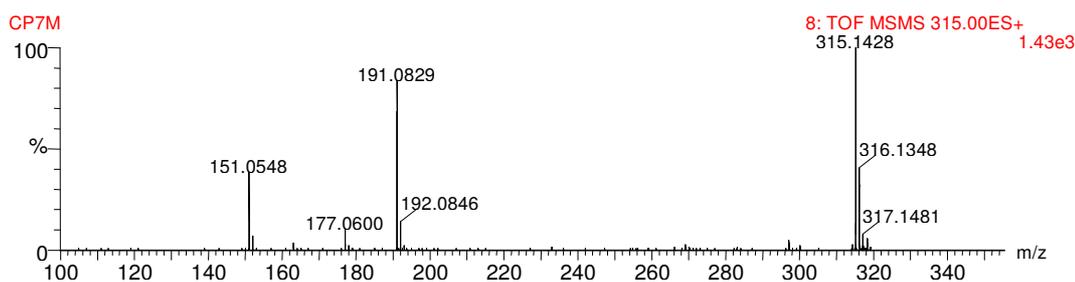
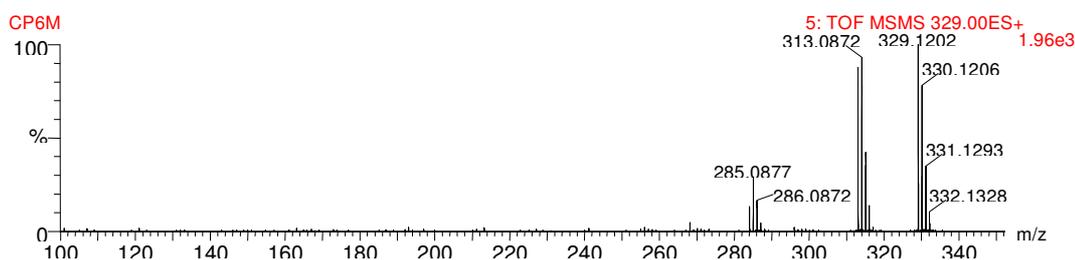
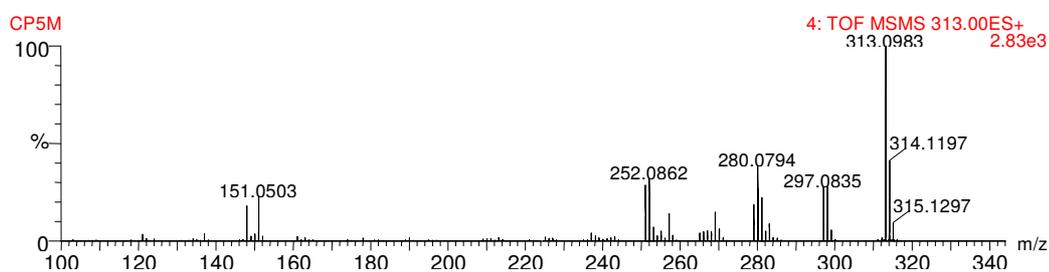
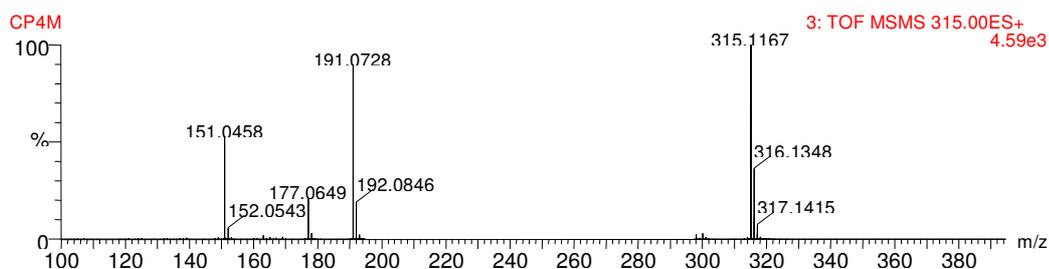
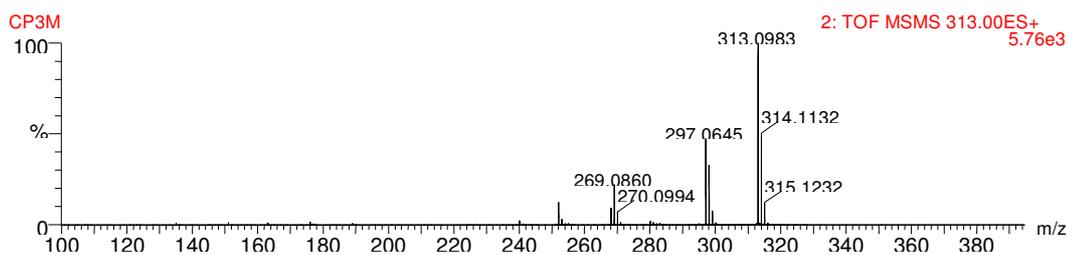
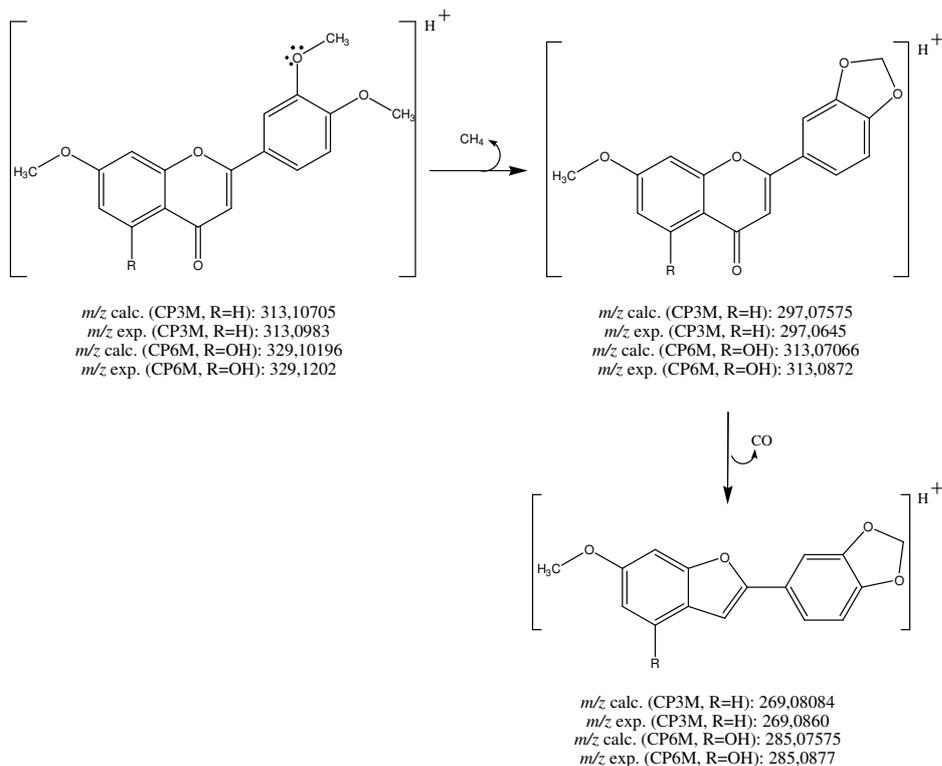


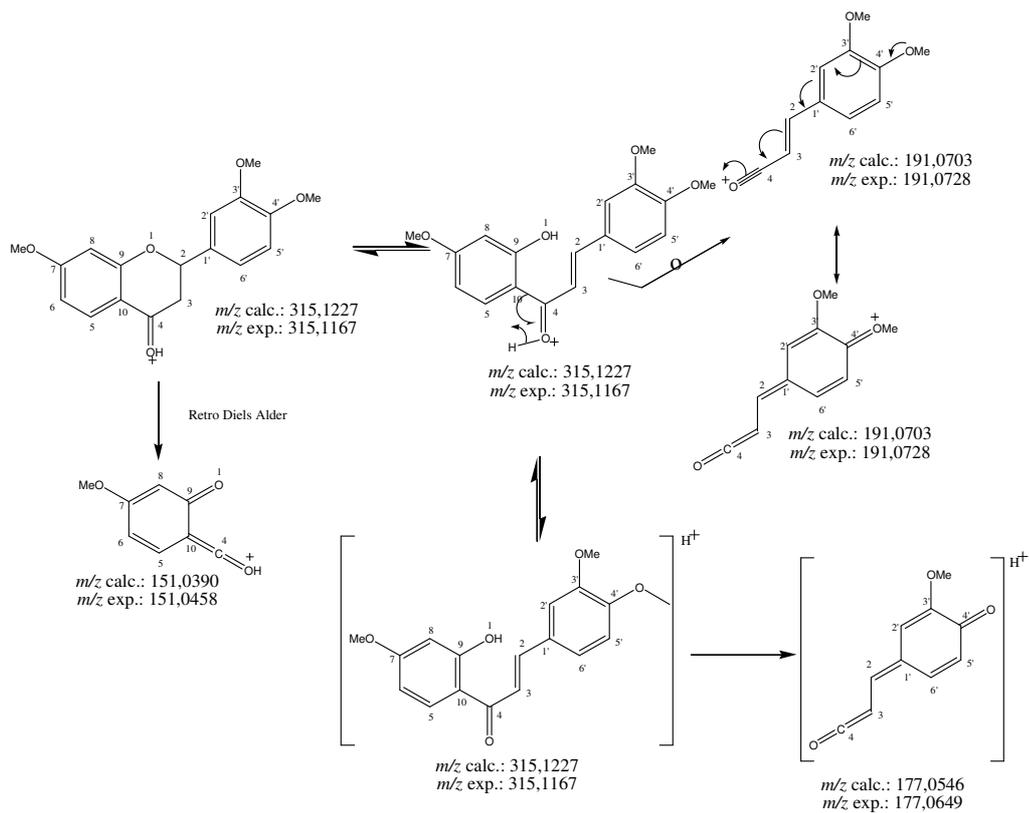
Figura 82. Espectros de massas dos flavonoides metilados

Nos espectros de massas de **3',4',7-trimetoxiflavona (CP3M)** e **3',4',7-trimetoxi-5-hidroxi-5-flavona (CP6M)** observou-se fragmentos provenientes da perda de metano $[M+H-CH_4]^+$ e monóxido de carbono $[M+H-CO]^+$. O Esquema 17 apresenta a proposta para os fragmentos observados.



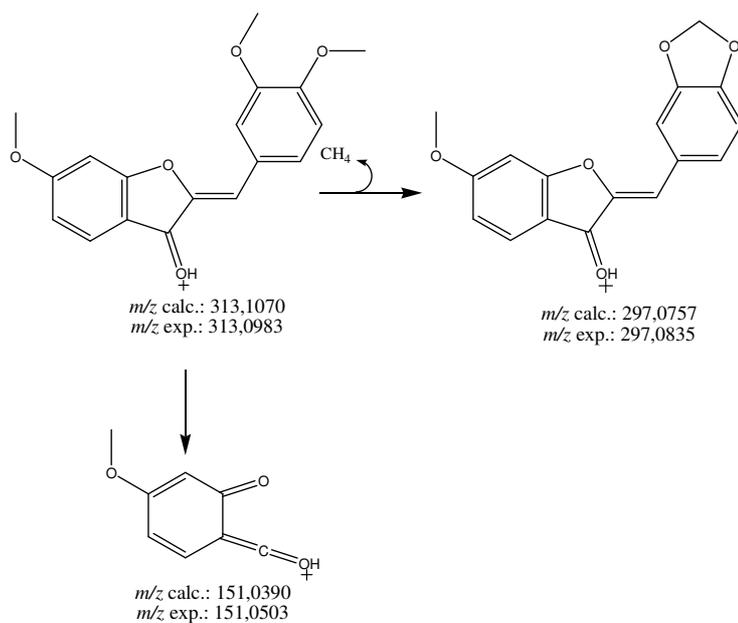
Esquema 17. Proposta para os fragmentos do espectro de massas da **3',4',7-trimetoxiflavona (CP3M)** e da **3',4',7-trimetoxi-5-hidroxi-5-flavona (CP6M)**

No espectro de massas da **3',4',7-trimetoxiflavanona (CP4M)** observou-se a fragmentação retro Diels Alder. O Esquema 18 apresenta os íons propostos para os fragmentos observados.



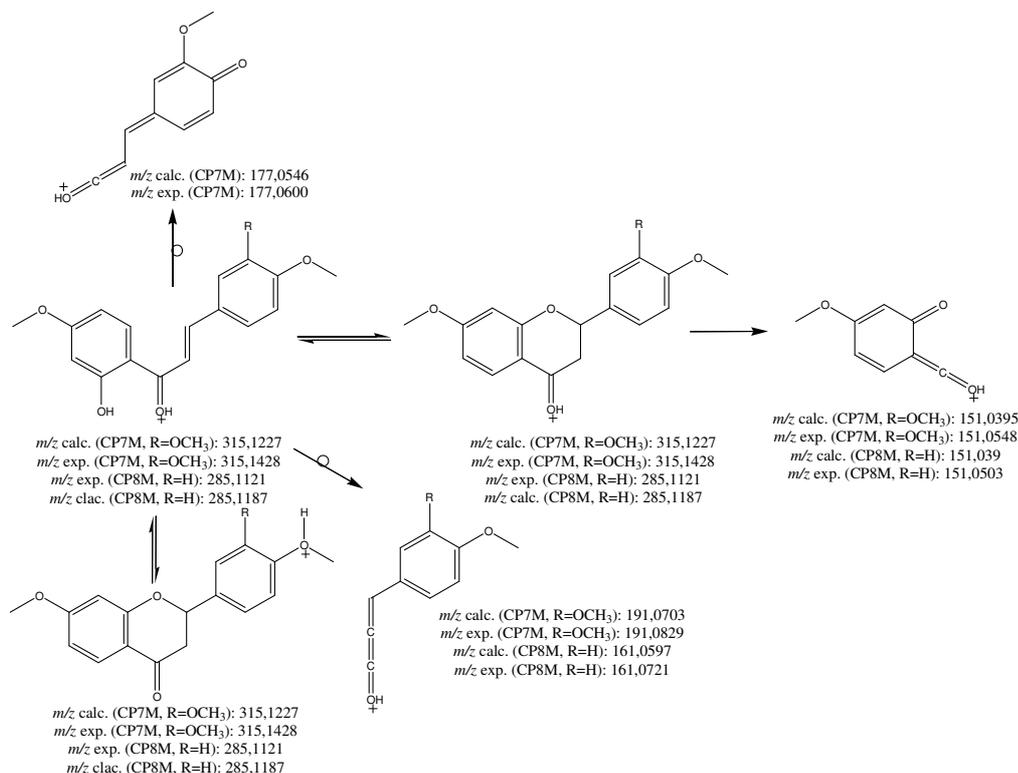
Esquema 18. Proposta para os fragmentos do espectro de massas da **3',4',7-trimetoxiflavanona (CP4M)**

A Esquema 19 apresenta a proposta para os fragmentos observados no espectro de massas da **3',4',6-trimetoxiaurona (CP5M)**.



Esquema 19. Proposta para os fragmentos do espectro de massas da **3',4',6-trimetoxiaurona (CP5M)**

O Esquema 20 apresenta os íons propostos para os fragmentos observados no espectro de massas da **3,4,4'-trimetoxi-2'-hidroxichalcona** (CP7M) e **3,4'-dimetoxi-2'-hidroxichalcona** (CP8M). No espectro das chalconas também foi observado o íon m/z 151, proveniente do mecanismo de fragmentação retro Diels Alder.



Esquema 20. Proposta para os fragmentos do espectro de massas da **3,4,4'-trimetoxi-2'-hidroxiflavanona** (CP7M) e **3,4'-dimetoxi-2'-hidroxiflavanona** (CP8M)

As Figuras 83, 85 e 86 apresentam o espectro de RMN ¹H dos derivados **3',4',7-trimetoxiflavona** (CP3M), **3',4',7-trimetoxiflavanona** (CP4M) e **3',4',6-trimetoxiaurona** (CP5M) e a Figura 84 apresenta o espectro de RMN ¹³C do derivado **3',4',7-trimetoxiflavona** (CP3M).

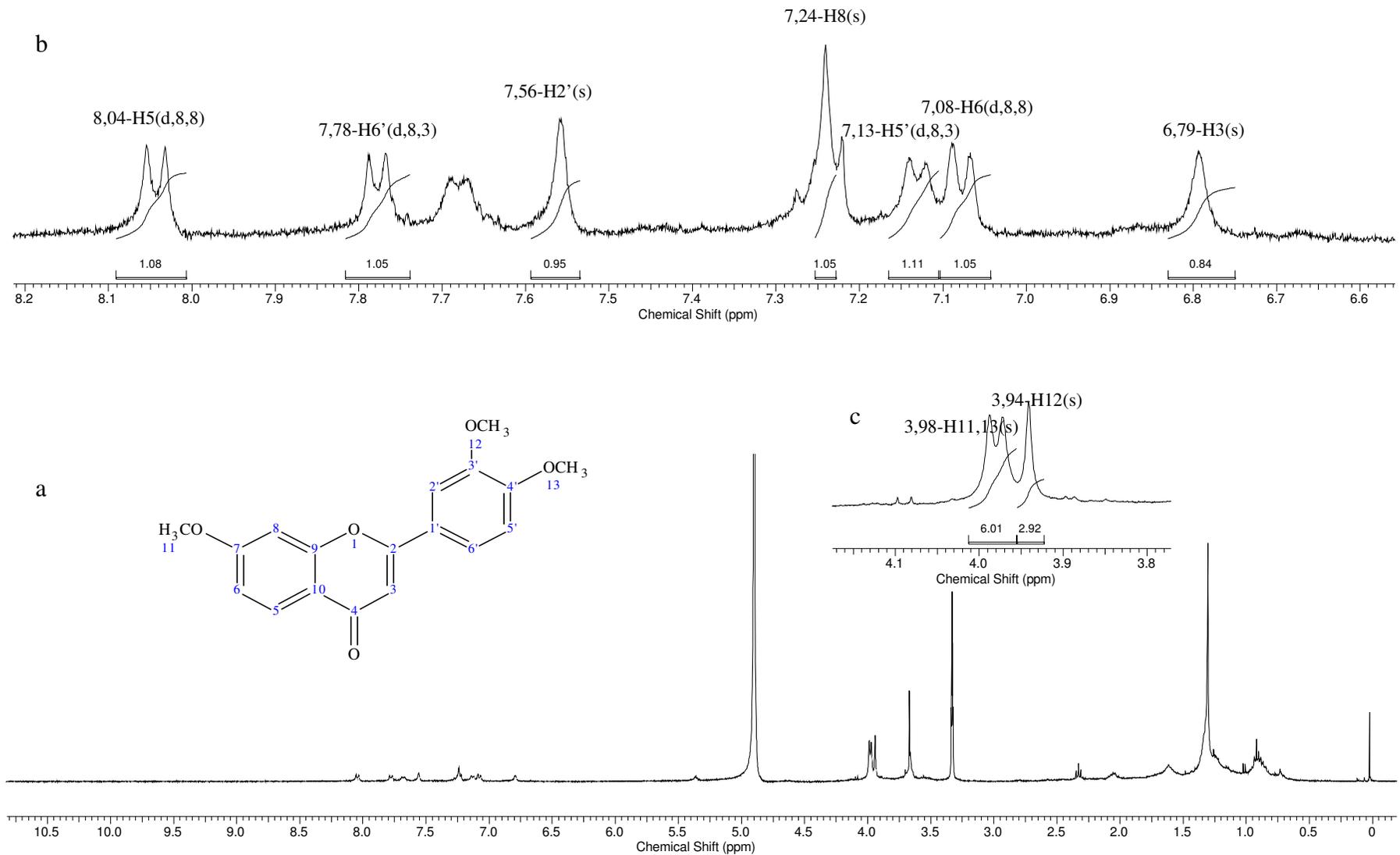


Figura 83. Espectro de RMN ¹H (400MHz, em MeOH-*d*₄) da **3',4',7-trimetoxiflavona** (a), expansão das regiões de δH 6,6 à 8,2 (b) e 3,8 à 4,1 (c)

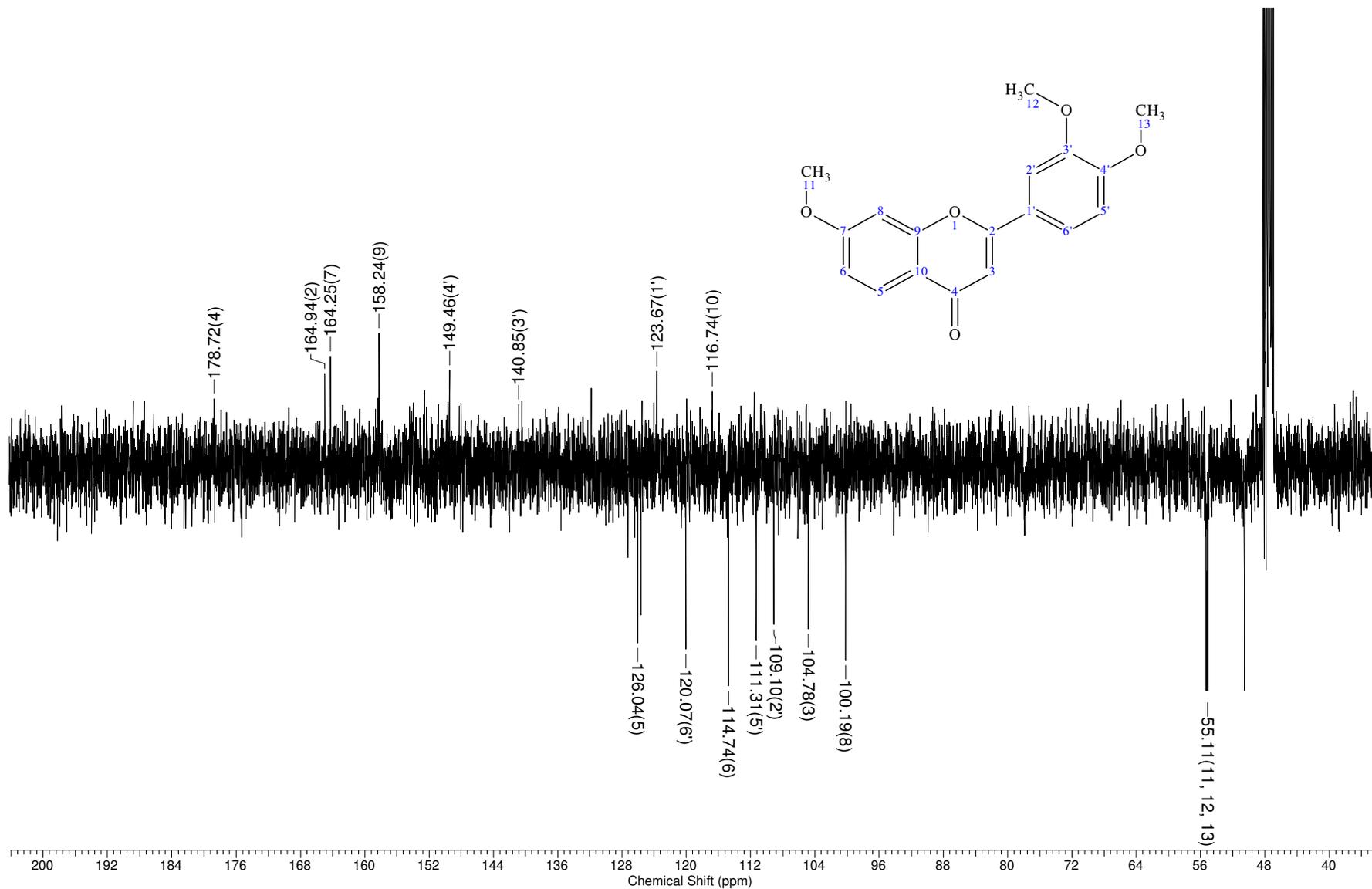


Figura 84. Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da **3',4',7-trimetoxiflavona** (a) (400MHz)

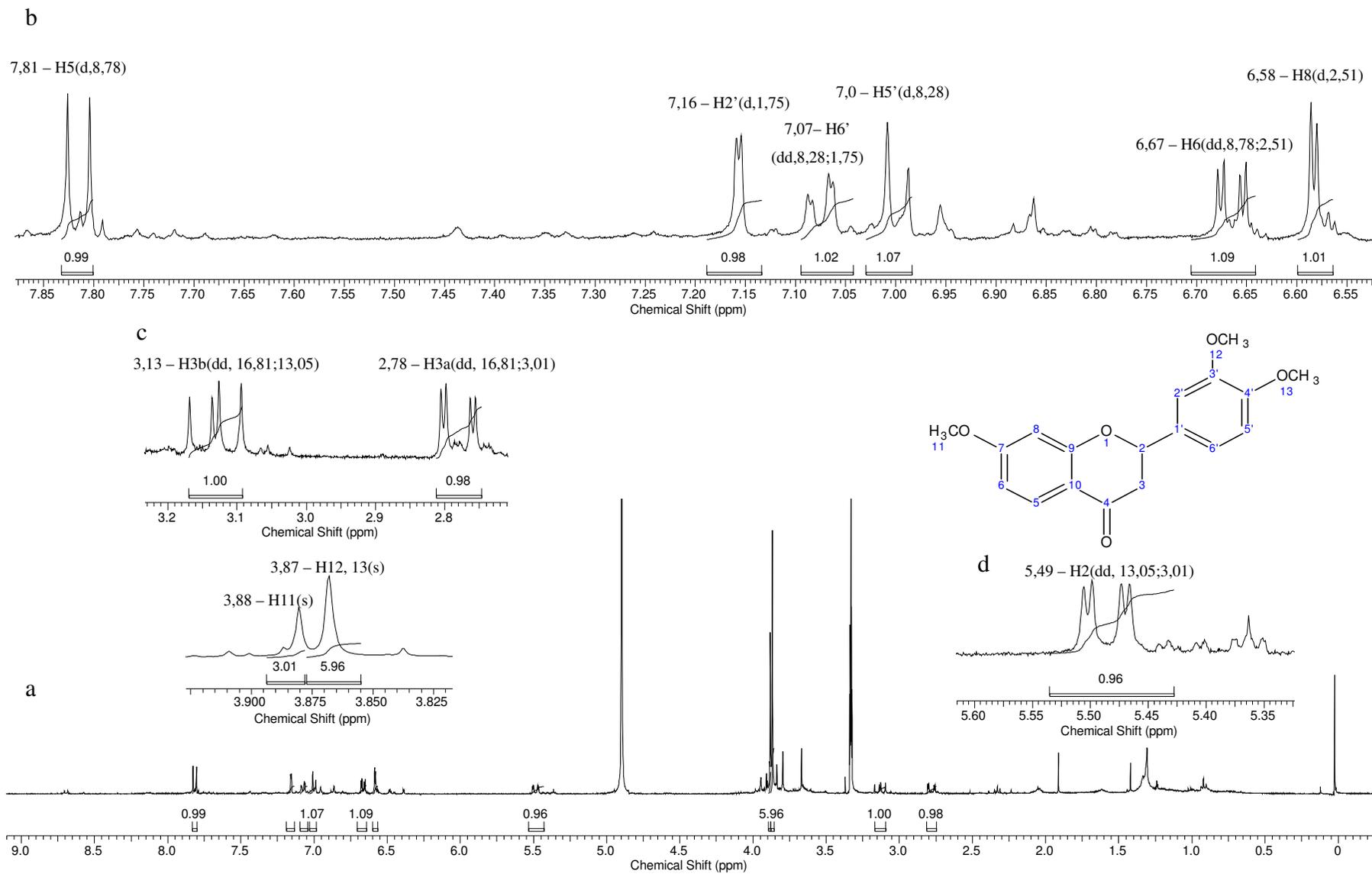


Figura 85. Espectro de RMN ^1H (400MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da 3',4',7-trimetoxiflavanona (CP4M) (a) e expansão das regiões de 6,5 à 7,8 ppm (b), 2,6 à 3,2 ppm (c) e 5,3 à 5,6 ppm (d)

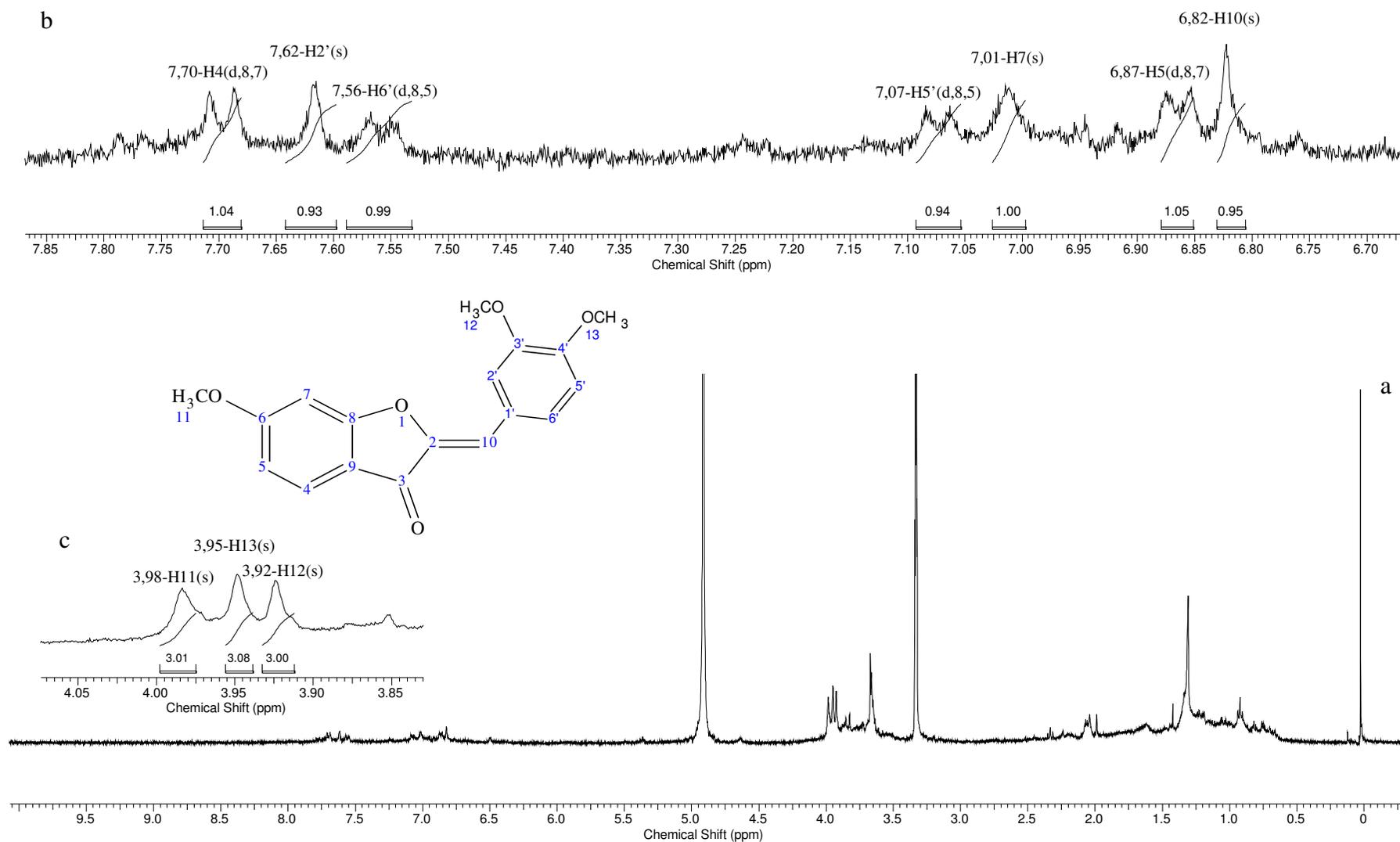


Figura 86. Espectro de RMN ^1H (400MHz, em $\text{MeOH-}d_4$) da **3',4',6-trimetoxiaurona** (CP5M) (a) e expansão das regiões 6,7 à 7,8 ppm (b) e 3,8 à 4,0 ppm (c)

A metilação das hidroxilas causou um deslocamento para campo mais baixo nos sinais dos protons ligados aos carbonos adjacentes aos carbonos das hidroxilas metiladas. No espectro de RMN ^{13}C da **3',4',7-trimetoxiflavona** observou-se a proteção dos carbonos adjacentes às hidroxilas metiladas. Os sinais de H-6, H-5' e H-8, que no espectro de RMN ^1H da **3',4',7-triidroxiflavona** revelavam o mesmo deslocamento químico, após a metilação das hidroxilas tais sinais foram resolvidos. O mesmo aconteceu para os sinais H-5' e H-6' da **3',4',7-triidroxiflavanona**, assim como para H-10, H-5 e H-7 da **3',4',6-triidroxiaurona**. Com base nesta observação a metilação pode ser uma ferramenta para resolução dos sinais. A análise dos espectros dos derivados foram úteis para confirmação das estruturas propostas para os flavonoides isolados.

5. CONCLUSÕES

O método de isolamento proposto revelou-se eficiente quanto à obtenção de flavonoides isolados, e econômico quanto à geração de resíduo de solventes. Foram isoladas seis isoflavonas, daidzina, daidzeína, glicitina, gliciteína, genistina e genisteína de *Glycine max*, com pureza e quantidade suficientes para confirmação estrutural e aplicação como padrões analíticos, reduzindo assim o custo da análise de isoflavonas em soja e produtos derivados.

A otimização da separação cromatográfica das isoflavonas de *Glycine max* em coluna com partícula de 2,4µm, permitiu redução de 77% do tempo de análise e quantidade de resíduo gerado.

Na investigação fitoquímica o método proposto mostrou-se prático, eficiente e econômico. Foram isolados seis flavonoides do endocarpo de *Dipteryx odorata*, butina, buteína, isoliquiritigenina, luteolina, sulfuretina e 3',4',7-triidroxiflavona, em quantidade suficiente para determinação estrutural e preparação de derivados. Destes flavonoides, a buteína, luteolina e 3',4',7-triidroxiflavona foram isoladas pela primeira vez desta espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, O. M.; MARKHAN, K. R. **Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group. 2006. 1197p.

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. New York, NY: Elsevier. 1989. 515p.

ALPERT, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography**, v. 499, p. 177-196, 1990.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**; 18th ed. AOAC: Gaithersburg, Maryland, 2005.

BAO, Z.; HONG, L.; GUAN, Y.; DONG, X.; ZHENG, H.; TAN, G.; XIE, Q. Inhibition of airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling by soy isoflavone in a murine model of allergic asthma. **International Immunopharmacology**. v. 11, p. 899–906, 2011.

BARBOSA, A.C.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Effect of free or protein-associated soy isoflavones on the antioxidant status in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 91, p. 721–731, 2011.

BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: Extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 42, n. 11, p. 2466-2474, 1994.

BICKOFF, E. M.; LIVINGSTON, A.L.; WITT, S. C. Identification of 7,4'-dihydroxyflavone in forages. **Phytochemistry**, v. 4, p. 523-524, 1965.

BRAZ-FILHO, R. **Estudo Químico da *Apuleia leiocarpa***. 1971. 373 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova**, v. 1, n 5, p. 405-445, 1994.

BYUN, J.S.; LEE, S.S.,. Effect of soybeans and sword beans on bone metabolism in a rat model of osteoporosis. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 56, p. 106–112, 2010.

CARVALHO, M. G.; GOMES, M. S. R.; OLIVEIRA, M. C. C.; SILVA, C. J.; CARVALHO, A. G. Chemical constituents from *Piptadenia rígida* Benth., Fabaceae, “angico”. **Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy**. Aop 3911, ISSN 0102-695X, 2010.

CARVALHO, M. G.; JUNIOR, J. G. R.; CAVATTI, L. C.; SUZART, L. R.; CORNELIUS, M. T. F.; SILVA, V. C.; CARDOSO, M. A. R. Determinação estrutural de flavonoides com análise de espectros de RMN de ^1H 1D e reação com diazometano. **Revista Universidade Rural, Série de Ciências Exatas e da Terra**, v. 25, n. 1-2, p. 46-60, 2006.

CARVALHO, P. E. R. Cumaru-ferro *Dipteryx odorata*. **Comunicado técnico Embrapa**, n. 225, ISSN 1517-5030, 2009.

CHENG, J.; YUAN, C.; GRAHAM, T. L. Potential defense-related prenylated isoflavones in lactofen-induced soybean. **Phytochemistry**, v. 72, p. 875-881, 2011.

CHO, N.; CHOI, J. H.; YANG, H.; JEONG, E. J.; LEE, K. Y.; KIM, Y. C.; SUNG, S. H. S. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of flavonoids isolated from *Rhus verniciflua* in neuronal HT22 and microglial BV2 cell lines. **Food and Chemical Toxicology**. v. 50, p. 1940–1945, 2012.

CHOI, A. Y.; CHOI, J. H.; YOON, H.; HWANG, K.; NOH, M. H.; CHOE, W.; YOON, K.; HA, J.; YEO, E.; KANG, I. Luteolin induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in Neuro-2a mouse neuroblastoma cells. **European Journal of Pharmacology**. v. 668, p. 115–126, 2011.

COLE, R. B. **Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, and applications**, John Wiley & Sons, New York, 1997.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. 2006. 453 p.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, LTD, 2002.

DOLE, M., MACH, L. L., HINES, R. L., Molecular Beams of Macroions. **Journal of Chemical Physics**, v. 49, p. 2240-2249, 1968.

DORĐEVIĆ, S.; ČAKIĆ, M.; AMR, S. The extraction of apigenin and luteolin from the sage *Salvia officinalis* L. from Jordan. **Working and Living Environmental Protection**, v. 1, n. 5, p. 87-93, 2000.

DUO-LONG, D.; YUAN-YUAN, Z.; XIAO-FEN, C.; XIN-YI, H.; SHI-LAN, F. Advances in Application of High-Speed Countercurrent Chromatography in Separation and Purification of Flavonoids. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 269-275, 2011.

ENGELHARDT, H. One century of liquid chromatography from Tswett's columns to modern high speed and high performance separations. **Journal of chromatography B**, v.800, p.3-6. 2004.

FENN, J. B., MANN, M., MENG, C.K., WONG, S. F. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64-71, 1989.

FEKETE, S.; OLÁH, E.; FEKETE, J. Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. **Journal of chromatography A**, v.1228, p.57-71. 2012.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 20, p. 5987-5993, 2002.

GODOY, R. L.; PACHECO, S.; GOUVÊA, A. C. M. S.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M. C. P. A.; SOARES, A. G. Separação e identificação de flavonoide por UPLC-ESI-QTOF-MSMS. **Anais do Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas**. 05 à 08 de outubro de 2012, Florianópolis, SC.

GODOY, R. L. Metodologia de Análise de Geoquímica Orgânica Aplicada a Química de Produtos Naturais. 1992. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

GROTEWOLD, E. **The Science of Flavonoids**, New York: Springer, 2006, 273 p.

HASLER, C.M. The cardiovascular effects of soy products. **Journal of Cardiovascular Nursing**, v. 16, n. 4, p. 50-63, 2002.

HARON, H., ISMAIL, A., AZLAN, A., SHAHAR, S., & PENG, L. Daidzein and genistein contents in tempeh and selected soy products. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1350–1356, 2009.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry** v. 55, p. 481-504, 2000.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. **Lancet**, v.349, p.699-699, 1997.

ISSAQ, H. J. A century of separation science. New York, NY, USA: Marcel Dekker. 2002. 761 p.

JANG, D. S.; PARK, E. J.; HAWTHORNE, M. E.; VIGO, J. S.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Seeds of *Dipteryx odorata* (Tonka Bean). **Journal of Natural Products**. v. 66, n. 5, p. 583-587, 2003

JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; DOMÉZIO, L. A.; PIETRO, R. C. L.R.; CASTILHO, M. S.; TOMAZELA, D. M.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; FRANÇA, S. C. Isolation and Structure Determination of Bioactive

Isoflavones from Callus Culture of *Dipteryx odorata*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 7, p. 740-742, 2005.

JUNIOR, G. M. V.; Sousa, C. M. M.S.; Cavalheiro, A. J.; Lago, J. H.G.; Chaves, M. H. Phenolic Derivatives from Fruits of *Dipteryx lacunifera* Ducke and Evaluation of Their Antiradical Activities. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, p.2159-2167, 2008.

KANAZAWA, M.; SATOMI, Y.; MIZUTANI, Y.; UKIMURA, O.; KAWAUCHI, A.; SAKAI, T.; BABA, M.; OKUYAMA, T.; NISHINO, H.; MIKI, T. Isoliquiritigenin Inhibits the Growth of Prostate Cancer. **European Urology**. v. 43, p. 580–586, 2003

KEEN, N. T.; LYNE, R. L.; HYMOWITZ, T. Phytoalexin production as a chemosystematic parameter within the genus *Glycine*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 15, p. 481-486, 1986.

KHAN, A. Q.; KHAN, R.; REHMAN, M. U.; LATEEF, A.; TAHIR, M.; ALI F.; SULTANA S. Soy isoflavones (daidzein & genistein) inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced cutaneous inflammation via modulation of COX-2 and NF- κ B in Swiss albino mice. **Toxicology**. v. 302, p. 266– 274, 2012.

KLEJDUS, B.; MIKELOVÁ, R.; JITKA PETRLOVÁ, J.; POTESIL, D.; ADAM, V.; STIBOROVÁ, M.; HODEK, P.; VACEK, J.; KIZEK, R.; KUBÁN, V. Determination of isoflavones in soy bits by fast column high-performance liquid chromatography coupled with UV–visible diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1084, p. 71–79, 2005.

KLUMP, S. P.; ALLRED, M. C.; MACDONALD, J. L.; BALLAN, J. M. Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 84, n. 6, p. 1865-1883, 2001.

KNEKT, P. M.; SEPPÄNEN, R.; HELLÖVAARA, TEPPÖ, L.; PUKKALA, E. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. **American Journal of Epidemiology**., v.146, p.223-230, 1997.

LAMER, E.; MALCHER, E.; GRIMSHAW, J. Identification of 3',4',5',5',7-pentahydroxyflavone and its 3' monoglucoside. **Tetrahedron Letters**, n. 12, p. 1419-1421, 1968.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. Campinas, SP: Editora Átomo, 382 f. 2009.

LEE, D.; JEONG, G.; LI, B.; PARK, H.; KIM, Y. Anti-inflammatory effects of sulfuretin from *Rhus verniciflua* Stokes via the induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages. **International Immunopharmacology**. v. 10, p. 850–858, 2010.

LEUNG, H. W.; WU, C.; LIN, C.; LEE, H. Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 508, p. 77– 83, 2005.

LI, H.; DEINZER, M. L. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 1739, 2007.

LIANG, X.; WANG, X; LI, Z; HAO, Q; WANG, S.. Improved in Vitro Assays of Superoxide Anion and 1,1-Diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH) Radical-Scavenging Activity of Isoflavones and Isoflavone Metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.11548–11552, 2010.

LIN, J-T.; LIU, S-C.; TSAY, G. J.; YANG, D-J. Composition of flavonoids and phenolic acids in *Glycine tomentella* Hayata cultivated in various soils. **Food Chemistry**, v. 121, p. 659-665, 2010.

LIU, Z.; HO,S.;CHEN, Y.; HO, Y. A mild favorable effect of soy protein with isoflavones on body composition - a 6-month double-blind randomized placebo-controlled trial among Chinese postmenopausal women. **International Journal of Obesity**. v. 34, p. 309–318, 2010.

LIVENGOOD, J. Why was M. S. Tswett's chromatographic adsorption analysis rejected? **Studies in history and philosophy of science**, v.40, p.57-69. 2009.

LU, T-C.; CO, Y-Z.; HUANG, H-W.; HUNG, Y-C.; LIN, Y-C.; PENG, W-H. Analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Glycine tomentella* root in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 142-148, 2007.

MC MASTER, M. C. **HPLC a practical user's guide**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons. 2007. 202 p.

MALDANER, L. & JARDIM, I. C. S. F. O Estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química nova**, v.32, n.1, p.214-222. 2009.

MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1 A theory of chromatography, 2 Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. **Biochemical Journal**, v. 35, p. 1358-1368, 1941.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3ed. Fortaleza: edições UFC, 2009.

MEYER, V. R. **Practical High Performance Liquid Chromatography**. New York, NY, USA: John Wiley & Sons. 1997. 376 p.

MESSINA, M.; MCCASKILL-STEVENSON, W.; LAMPE, J. W. Addressing the Soy and Breast Cancer Relationship: Review, Commentary, and Workshop Proceedings. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 18, p. 1275-1284, 2006.

MESSINA, M., WATANABE, S.; SETCHELL, K.D.R. Report on the 8th international symposium on the role of soy in health promotion and chronic disease prevention and treatment. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 4, p. 796S-802S, 2009.

MICHELS, G.; WÄTJEN, W.; NIERING, P.; STEFFAN, B.; THI, Q. T.; HOVOLOU, Y.; KAMPKÖTTER, A.; BAST, A.; PROKSCH, P.; KAHL, R. Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. **Toxicology**, v. 206, p. 337-348, 2005.

MIKSICEK, R. J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.208, p.44-50, 1995.

MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Zs. Chromatographic, capillary eletrophoretic and capillary eletrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1073, p. 201-227, 2005.

MOORE, S; STEIN, W. H. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. **Methods in Enzymology**, v. 6, p. 819-831, 1963.

MORHY, L. Cromatografia (I): evolução histórica: a fase antiga. **Ciência e Cultura**, v. 28, n. 10, p. 1185-1189, 1976.

MURPHY, P.A.; BARUA, K, HAUCK, C. C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 129-138, 2002.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Eds). A soja no Brasil. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981.

NAKAYAMA, T. Enzymology of Aurone Biosynthesis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 487-491, 2002.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. **Nutrition and Cancer**, v.50, p.1-7, 2004.

PARK, H.; PARK, J.; MOON, J.; LEE, K.; JUNG, W.; OH, S.; LEE, H.; Isoflavone glycosides from the flowers of *Pueraria thunbergiana*. **Phytochemistry**, v. 51, p.147, 1999.

PARK, Y; MOON, B-H.; LEE, E; LEE, Y; YOON, Y.; AHN, J-H.; LIM,Y. Spectral Assignments and Reference Data. ¹H and ¹³C-NMR data of hydroxyflavone Derivatives. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 45, p. 674-679, 2007.

PHENOMENEX HOME PAGE. Core Shell Technology. Disponível em <<http://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>> Acesso em 20 de fevereiro de 2013.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implication. **Horticultural Science.**, v.35, p.588-592, 2000.

PUEBLA, P.; OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L. M.; SANTOS, M. G.; SILVA, R. V.; RUBEM-MAURO, L.; FELICIANO, A. S. Chemical Constituents of the Bark of *Dipteryx alata* Vogel, an Active Species against *Bothrops jararacussu* Venom. **Molecules**, v. 15, p. 8193-8204, 2010.

QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J.; ATINDEHOU, K.K.; TRAORE, D.; HOSTETTMANN, K. O n-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatographic micro-fractionation. **Journal of Chromatography A**, v. 974, p. 123–134, 2002.

REISCH, J.; HUSSAIN, R. A.; MESTER, I. Flavonoids from *Flindersia australis*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 9, p. 2114-2115, 1984.

REITER, E.; BECK, V.; MEDJAKOVIC, S.; JUNGBAUER, A. Isoflavones are safe compounds for therapeutical applications – Evaluation of in vitro data. **Gynecological Endocrinology**. v. 25, n. 9, p. 554–580, 2009.

RIBANI, M. **Obtenção e aplicação de padrões de isoflavonas de soja**. 2008. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

RICE-EVANS, C. Serial review: flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Radical Biology & Medicine**, v.36, n.7, p.838-849, 2004.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W.M.A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1112, p. 31-63, 2006.

ROMERO, J. R. **Fundamentos de estereoquímica**. Ribeirão Preto, SP: USP. 1998, 108p.

SANCHES, T. R.; GOMES, A. B.; LOPES, V. A.; COSTA, L. R. L. G.; MOSCA, L. M. Avaliação dos sintomas climatéricos na mulher em menopausa e pós-menopausa em uso de proteína isolada de soja. **Journal Health Sciences Institute**, v. 28, n. 2, p. 169-73, 2010.

SHAO, S; DUNCAN, A. M.; YANG, R; MARCONE, M. F.; RAJCAN, I; TSAO, R. Systematic evaluation of pre-HPLC sample processing methods on total and individual isoflavones in soybeans and soy products. **Food Research International**. v. 44 , p. 2425–2434, 2011.

SHEDD-WISE, K. M.; ALEKEL, D. L.; HOFMANN, H.; HANSON, K. B.; SCHIFERL, D. J.; HANSON, L. N.; LOAN, M. D. V. The Soy Isoflavones for Reducing Bone Loss Study: 3-Yr Effects on pQCT Bone Mineral Density and Strength Measures in Postmenopausal Women. **Journal of Clinical Densitometry: Assessment of Skeletal Health**, v. 14, n 1, p. 47-57, 2011.

SIKORSKA, M.; MATLAWSKA, I. Kaempferol, isorhamnetin and their glycosides in the flowers of *Asclepias syriaca* L. **Acta Poloniac Pharmaceutic – Drug Research**, v. 58, n. 4, p. 269-272, 2001.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6ª edição, Editora LTC: Rio de Janeiro, 2000.

SONG, M.; JEONG, G.; LEE, H.; KWON, K.; LEE, S.; PARK, J.; KIM, Y.; PARK, B. Sulfuretin attenuates allergic airway inflammation in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 400, p. 83–88, 2010.

SULLIVAN, G. Occurrence of umbelliferone in seeds of *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p.609-610, 1982.

TERAO, J.; PISKULA, M. K. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. **Nutrition**, v.15, p.790- 791, 1999.

TIAN, G.; ZHANGA, U.; ZHANGA, T.; YANG, F.; ITO, Y. Separation of flavonoids from the seeds of *Vernonia anthelmintica* Willd by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, p. 219-222, 2004.

VALENTE, A. L. P.; COLLINS, C. H.; MANFREDI, J. E. Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. p. 103-109, junho, 1983.

VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTÍ, M. P.; BORRÀS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7143–7172, 2009.

VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**, v. 5, p. 271-289, 1956.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, L. H. L.; JÚNIOR, J. M. S.; NUNES, M. G.; SIMÕES, R. S.; KAARI, C.; HAIDAR, M. A.; BARACAT, E. C. Efeitos da isoflavona e dos estrogênios conjugados equinos sobre a qualidade de vida na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 29, n. 5, p. 248-52, 2007.

WANG, H.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; BOOREN, A. M.; GRAY, J. I. Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). **Journal Agricultura and Food Chemistry**. v. 47, p. 840-844, 1999.

WANG, J.; WANG, N.; YAO, X.; KITANAKA, S. Structures and Anti-histamine Activity of Chalcones & Aurones Compounds from *Bidens parviflora* Willd. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 1, n. 2, p. 23-29, 2007.

WATERS. Waters Synapt Mass Spectrometry System Operator's Guide. 2008.

WEY, P.; LIU, M.; CHEN, Y.; CHEN, D. Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in Women. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. p. 243-248, 2012.

WILSON, I. D.; BRINKMAN, U. A. TH. Hyphenation and hypernation. The practice and prospects of multiple hyphenation. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 325–356, 2003.

WOLFENDER, J.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance–mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 437-455, 2003.

WOLFF, L. P. G.; MARTINS, M. R.; BEDONE, A. J.; MONTEIRO, I. M. U. Avaliação do Endométrio em Menopausas Após Uso de Isoflavonas. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 52, n. 6, p. 419-23, 2006.

WOOD, C. E.; CLARKSON, T. B.; APPT, S. E.; FRANKE, A. A.; BOUE, S. M.; BUROW, M. E.; MCCOY, T.; CLINE, J. M. Effects of Soybean Glyceollins and Estradiol in Postmenopausal Female Monkeys. **Nutrition and cancer**, v. 56, n. 1, p. 74–81, 2006.

WU, J.; TUNG, Y.; CHIEN, S.; WANG, S.; KUO, Y.; SHYUR, L.; CHANG, S. Effect of Phytocompounds from the Heartwood of *Acacia confusa* on Inflammatory Mediator Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1567-1573, 2008.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. Isoflavones—Safe food additives or dangerous drugs? **Ageing Research Reviews**, v. 6 p. 150–188, 2007.

YAMASHITA, M., FENN, J. B. Electrospray Ions Source – Another Variation on the Free-jet Theme. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, p. 4451-4459, 1984.

YAMAZAKI, S.; MORITA, T.; ENDO, H.; HAMAMOTO, T.; BABA, M.; JOICHI, Y.; KANEKO, S.; OKADA, Y.; OKUYAMA, T.; NISHINO, H.; TOKUE, A. Isoliquiritigenin suppresses pulmonary metastasis of mouse renal cell carcinoma. **Cancer Letters**. v. 183, p. 23–30, 2002.

YÁÑEZ, J. A.; REMSBERG, C. M.; TAKEMOTO, J. K.; VEGA-VILLA, K. R.; ANDREWS, P. K.; SAYRE, C. L.; MARTINEZ, S. E.; DAVIES, N. M. Polyphenols and flavonoids: an overview. In: I. John Wiley & Sons (Ed.). **Flavonoid Pharmacokinetics: Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology**, 2013.

YANG, C.; LI, D.; WAN, X. Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods An approach to isolation and purification of the main individual theaflavins from black tea. **Journal of Chromatography B**, v. 861, p. 140–144, 2008.

YOCHUM, L.; KUSHI, L. H.; MEYER, K.; FOLSOM, A. R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. **American Journal Epidemiology**, v.149, p.943-949, 1999.

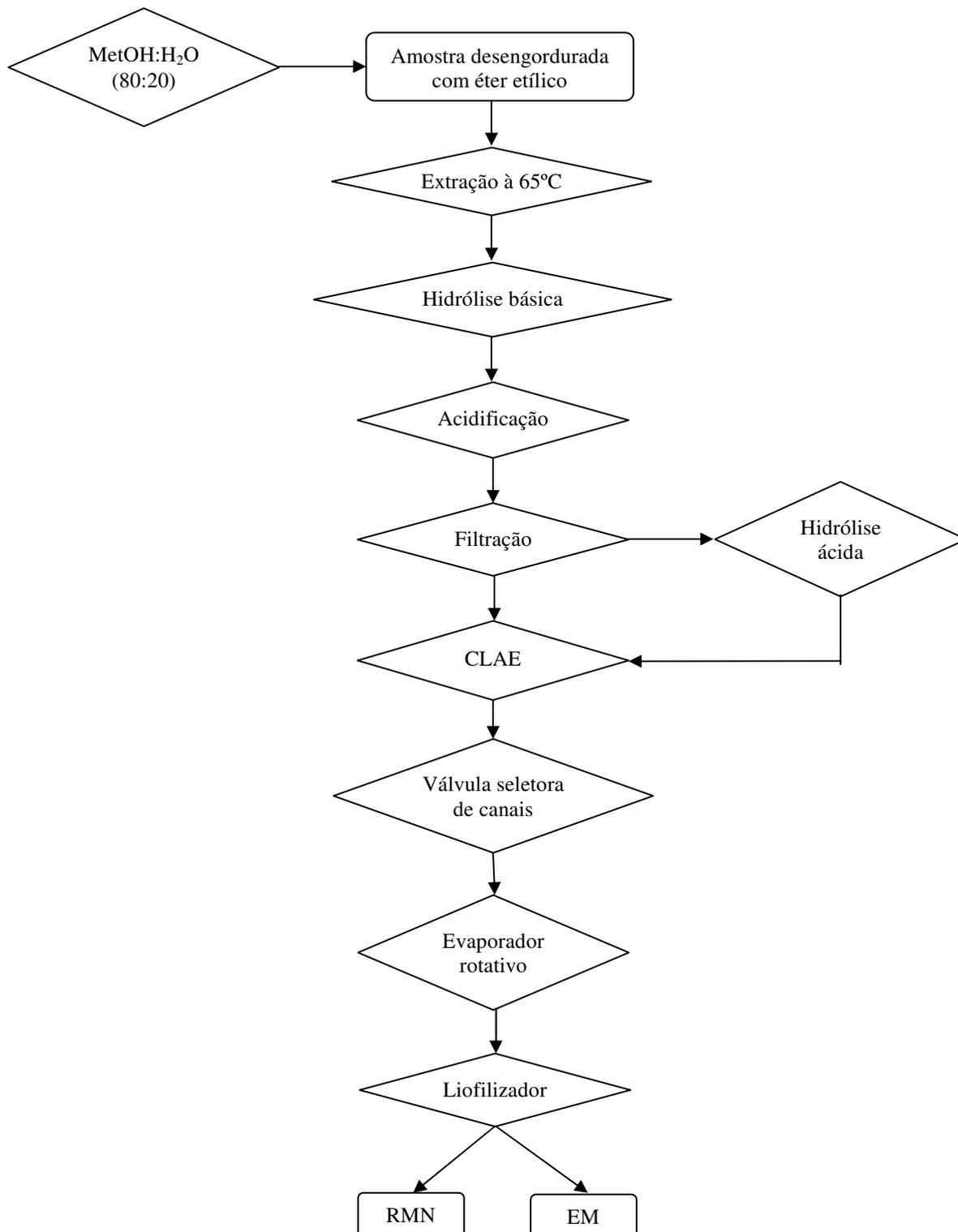
ZHAO, X.; MEI, W.; GONG, M.; ZUO, W.; BAI, H.; DAI, H. Antibacterial Activity of the Flavonoids from *Dalbergia odorifera* on *Ralstonia solanacearum*. **Molecules**, v. 16, p. 9775-9782, 2011.

ZHANG L.; CHEN, W.; LI, X. A novel anticancer effect of butein: Inhibition of invasion through the ERK1/2 and NF- κ B signaling pathways in bladder cancer cells. **FEBS Letters**. v. 582, p. 1821–1828, 2008.

ZIMMERMANN, M. C.; TILGHMAN, S. L.; BOUÉ, S. L.; SALVO, V. A.; ELLIOTT, S.; WILLIAMS, K. Y.; SKRIPNIKOVA, E. V.; ASHE, H.; PAYTON-STEWART, F.; VANHOY-RHODES, L.; FONSECA, J. P.; CORBITT, C.; COLLINS-BUROW, B. M.; HOWELL, M. H.; LACEY, M.; SHIH, B. Y.; CARTER-WIENTJES, C.; CLEVELAND, T. E.; MCLACHLAN, J. A.; WIESE, T. E.; BECKMAN, B. S.; BUROW, M. E. Glyceollin I, a Novel Antiestrogenic Phytoalexin Isolated from Activated Soy. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 332, n. 1, p. 35-45, 2010.

7. ANEXOS

ANEXO A – Fluxograma para o isolamento das isoflavonas da soja



Anexo B – Fluxograma para isolamento dos flavonoides do cumaru

