



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Exatas - Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Dibenzoilmetanos de *Lonchocarpus filipes*

Érica Luiz dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de concentração Química Orgânica.

Prof^a. Dr^a. Beatriz Helena L. Noronha Sales Maia
Orientadora

Curitiba - Paraná

Março 2008

A Deus, pelo dom da vida e por estar sempre comigo especialmente no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus queridos pais Francisco e Argentina, por me ensinarem a viver com dignidade e que muitas vezes abriram mão dos seus sonhos em prol dos meus.

Muito Obrigada!

Amo vocês!

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve ... e a vida é muito para ser insignificante.”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

- Ao Departamento de Química da UFPR, pela oportunidade concedida;
- Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo;
- À professora Dr^a. Beatriz Helena L. Noronha Sales Maia pela orientação, amizade, compreensão e assistência durante a realização deste trabalho. Muito obrigada por seus ensinamentos!
- Ao professor Dr. Francisco de Assis Marques – Departamento de Química - Universidade Federal do Paraná (**DQ - UFPR**) pela participação na minha formação acadêmica e constante presença no desenvolvimento deste trabalho;
- Ao professor Dr. Brás Heleno de Oliveira (**DQ - UFPR**) e novamente ao professor Dr. Francisco de Assis Marques pelas importantes correções e sugestões durante o Exame de Qualificação;
- Ao Dr. Anderson Barison (**DQ - UFPR**) pelas análises de nOe;
- À professora Dr^a. Eva Gonçalves Magalhães – Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas – (**IQ - UNICAMP**) pela disponibilidade do material botânico;
- À Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológica e Agrícola (**CPQBA – UNICAMP**), pela realização dos testes antimicrobianos;
- À professora Dr^a. Ana Maria A. G. Tozzi – Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas – (**IB - UNICAMP**) pela identificação do material botânico;

- Aos colegas de laboratório Nelissa P. Vaz, Elizabete Bellini, Emmanoel Costa, Jéssica Hirota, Letícia Barros e Maria Helena Verdan pela amizade, auxílio, convivência harmoniosa durante esses dois anos;
- À minha amiga e irmã Fernanda F. de Jesus, pela torcida e incentivo apesar da distância. Sem a sua valiosa ajuda tudo teria sido mais difícil. Com certeza conquistamos esse trabalho juntas!
- Às minhas eternas amigas Ana Paula Pitarelo e Daiane Alberton pelo carinho, companheirismo e torcida pelo sucesso deste trabalho;
- Ao César Chornobai pela amizade e pelo auxílio nos testes de atividade antioxidante.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xv
LISTA DE ESPECTROS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Família Leguminosae (Fabaceae).....	2
1.2 Flavonóides.....	4
1.2.1 Biossíntese.....	6
1.3 Gênero <i>Lonchocarpus</i>	11
1.3.1 Dibenzoilmetanos.....	13
1.3.2 Aplicações e atividades biológicas de algumas espécies de <i>Lonchocarpus</i>	16
1.4 <i>Lonchocarpus filipes</i> Benth.....	18
1.4.1 Dados Botânicos (Tozzi, 1989).....	18
1.4.2 Classificação botânica (Tozzi, 1989).....	20
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Geral	21
2.2 Específicos.....	21

3 PARTE EXPERIMENTAL.....	22
3.1 Análises cromatográficas por CC, CCD e CCDP.....	22
3.2 Equipamentos.....	22
3.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	22
3.2.2 Rotação óptica.....	23
3.2.3 Espectrofotômetro.....	23
3.3 Estudo fitoquímico.....	24
3.3.1 Coleta e identificação do material botânico.....	24
3.3.3 Cromatografia em coluna do extrato de CH ₂ Cl ₂ das cascas das raízes de <i>L. filipes</i>	26
3.3.4 Análise das frações agrupadas.....	28
3.4 Ensaio biológicos.....	36
3.4.1 Ensaio de letalidade sobre <i>Artemia salina</i>	36
3.4.2 Atividade antioxidante.....	36
3.4.3 Atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana).....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Determinação estrutural da substância LF1	40
4.2 Determinação estrutural da substância LF2	41
4.3 Determinação estrutural da substância LF3	42
4.4 Determinação estrutural da substância LF4	44
4.5 Determinação estrutural da substância LF5	48
4.6 Determinação estrutural da substância LF6	50
4.7 Determinação estrutural da substância LF7	52
4.8 Determinação estrutural da substância LF8	55

4.9 Ensaio Biológicos.....	58
4.9.1 Ensaio de letalidade contra Artemia salina.....	60
4.9.2 Atividade antioxidante.....	61
4.9.3 Atividade antimicrobiana.....	64
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXO A.....	73
ANEXO B.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

CC	Coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CIM	Concentração inibitória mínima
CL₅₀	Concentração letal a 50% de amostra
C₀	Carbono quaternário
δ	Deslocamento químico em partes por milhão do hidrogênio e carbono
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DEPT	Espectro de RMN ¹³ C utilizando transferência de polarização
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazina
EP	Éter de petróleo
HMBC	Correlação heteronuclear em múltiplas ligações
HSQC	Correlação heteronuclear em única ligação
Hz	Hertz
IC₅₀	Concentração de amostra que causa 50% de inibição de DPPH
J	Constante de acoplamento
LF	<i>Lonchocarpus filipes</i>
m	Multiplete
MeOH	Metanol
nOe	Efeito Overhauser nuclear
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s	Singleto
sl	Singleto largo
TMS	Tetrametilsilano
tq	Triplo quinteto

LISTA DE TABELAS

Anexo A

Tabela 1 - Atualização da revisão dos dibenzoilmetanos do gênero <i>Lonchocarpus</i> realizada por Sales, 1994 e Sannomiya, 2001	14
Tabela 2 – Relação entre Frações agrupadas/Substâncias isoladas do extrato de CH ₂ Cl ₂ das cascas das raízes de <i>L. filipes</i>	26
Tabela 3 – Microrganismos utilizados no teste antimicrobiano	38
Tabela 4 – Resultados obtidos das concentrações letais (CL ₅₀) dos extratos e substâncias submetidos ao ensaio de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	60
Tabela 5 – Atividade antioxidante das substâncias puras	62
Tabela 6 – Dados de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) e RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância LF1	74
Tabela 7 – Dados de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) e RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância LF2	75
Tabela 8 – Dados de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) e RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância LF3	76
Tabela 9 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, ¹ J) e HMBC (C-H, ⁿ J) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl ₃ ,) da substância LF3	77
Tabela 10 – Dados de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) e RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância LF4	78
Tabela 11 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, ¹ J) e HMBC (C-H, ⁿ J) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl ₃ ,) da substância LF4	79
Tabela 12 – Dados de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) e RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância LF5	80
Tabela 13 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, ¹ J) e HMBC (C-H, ⁿ J) (H 400	81

MHz, C 100 MHz, CDCl₃,) da substância **LF 5**

Tabela 14 – Dados de RMN¹³C (CDCl₃, 100 MHz) e RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) da substância **LF6** 82

Tabela 15 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, ¹J) e HMBC (C-H, ⁿJ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃,) da substância **LF6** 83

Tabela 16 – Dados de RMN¹³C (CDCl₃, 100 MHz) e RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) da substância **LF7** 84

Tabela 17 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, ¹J) e HMBC (C-H, ⁿJ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃,) da substância **LF7** 85

Tabela 18 – Dados de RMN¹³C (CDCl₃, 100 MHz) e RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) da substância **LF8** 86

Tabela 19 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, ¹J) e HMBC (C-H, ⁿJ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃,) da substância **LF8** 87

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esqueleto básico de algumas classes de flavonóides com função de pigmentação na planta (Fonte: Senckel *et. al.*, 2004) 5
- Figura 2** – Pterocarpanos como defesas químicas (Fonte: Firmino, 1998) 6
- Figura 3** – Biossíntese de flavonóides (Fonte: Andersen *et. al.*, 2006) 7
- Figura 4** – Algumas classes de flavonóides e suas rotas biossintéticas (Fonte: Sales, 1994) 9
- Figura 5** – Transformações do grupo prenila (Fonte: Dewick, 2001) 10
- Figura 6** – Transformações do grupo prenila: formação do anel furano dissubstituído (Fonte: Dewick, 2001) 11
- Figura 7** – Revisão bibliográfica dos dibenzoilmetanos isolados de *Lonchocarpus* até 2008 14
- Figura 8** – Dibenzoilmetanos sintéticos bioativos (Fonte: Nogueira *et. al.*, 2003) 15
- Figura 9** – Alguns exemplos de flavonóides com atividade biológica isolados de espécies de *Lonchocarpus* 17
- Figura 10** – Fotos de *L. filipes* no momento da coleta 19
- Figura 11** – Algumas correlações observadas no mapa de contorno HMBC (C,H, ⁿJ) para LF3 43
- Figura 12** – Algumas correlações observadas no mapa de contorno HMBC (C,H, ⁿJ) para LF4 45
- Figura 13** – Representação do isômero Z quanto à repulsão estérica (Fonte: Fumiyuki *et. al.*, 1990) 46
- Figura 14** – Isomerização Z-E de β-metoxichalconas (Fonte: Fumiyuki *et. al.*, 1990) 46
- Figura 15** – Algumas correlações observadas no mapa de contorno HMBC (H, C, ⁿJ) para a substância LF5 49

Figura 16 – Algumas correlações observadas no mapa de contorno HMBC (H, C, ⁿ J) para a substância LF 6	51
Figura 17 – Regioisômeros propostos para a substância LF7	53
Figura 18 – (a) Algumas correlações verificadas no mapa de contorno HMBC (H, C, ⁿ J) para (LF 7) (b) Alguns incrementos observados no experimento de diferença de nOe	54
Figura 19 – Regioisômeros propostos para a substância LF8	56
Figura 20 – (a) Algumas correlações verificadas no mapa de contorno HMBC (H, C, ⁿ J) para LF 8 (b) Alguns incrementos observados no experimento de diferença de nOe	57
Figura 21 – Porcentagem de inibição do DPPH pelas amostras e padrões	62
Figura 22 – Substâncias submetidas ao teste de atividade antioxidante	63

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Extração por Soxhlet das cascas das raízes de <i>L. filipes</i>	25
Esquema 2 – Extração por Maceração do cerne das raízes de <i>L. filipes</i>	25
Esquema 3 – Isolamento da substância LF1	28
Esquema 4 – Isolamento das substâncias LF2 e LF8	29
Esquema 5 – Isolamento das substâncias LF3 , LF4 e LF5	31
Esquema 6 – Isolamento da substância LF6	33
Esquema 7 – Isolamento da substância LF7	35

LISTA DE ESPECTROS

Anexo B	88
E1 – Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância LF1	89
E2 – Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância LF1	90
E3 – Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância LF2	90
E4 – Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância LF2	91
E5 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância LF3	91
E6 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância LF3	92
E7 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância LF3	93
E8 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância LF3	93
E9 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância LF4	94
E10 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância LF4	95
E11 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância LF4	95
E12 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância LF4	96
E13 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância LF5	96
E14 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância LF5	97
E15 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância LF5	97
E16 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância LF5	98
E17 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância LF6	98

E18 - Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância LF6	100
E19 - Mapa de contorno de RMN 2D (¹ H, ¹³ C-HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl ₃) da substância LF6	100
E20 - Mapa de contorno de RMN 2D (¹ H, ¹³ C-HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl ₃) da substância LF6	101
E21 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância LF7	101
E22 - Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância LF7	102
E23 - Mapa de contorno de RMN 2D (¹ H, ¹³ C-HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl ₃) da substância LF7	103
E24 - Mapa de contorno de RMN 2D (¹ H, ¹³ C-HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl ₃) da substância LF7	103
E25 - Experimento de diferença de nOe (400 MHz, CDCl ₃) de LF7	104
E25a - Experimento de diferença de nOe (400 MHz, CDCl ₃) de LF7	104
E26 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância LF8	105
E27 - Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância LF8	106
E28 - Mapa de contorno de RMN 2D (¹ H, ¹³ C-HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl ₃) da substância LF8	106
E29 - Mapa de contorno de RMN 2D (¹ H, ¹³ C-HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl ₃) da substância LF8	107
E30 - Experimento de diferença de nOe (400 MHz, CDCl ₃) de LF8	107
E30a - Experimento de diferença de nOe (400 MHz, CDCl ₃) de LF8	108

RESUMO

Lonchocarpus filipes Benth é uma espécie vegetal brasileira, pertencente à família Leguminosae e sub-família Papilionoideae, sem nenhum estudo químico descrito na literatura. O gênero *Lonchocarpus* possui 150 espécies das quais 24 são nativas do Brasil e tem se destacado pelo número de espécies que são utilizadas na medicina popular, sendo os flavonóides os metabólitos secundários mais comuns e importantes encontrados nesse gênero. O estudo fitoquímico do extrato de diclorometano das cascas das raízes de *Lonchocarpus filipes* Benth, resultou no isolamento de oito flavonóides incluindo sete derivados de dibenzoilmetanos e uma flavona. Três dessas substâncias são inéditas na literatura e foram determinadas como (*E*)-3,4-metilenodioxido-2'-metoxi-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6'':3',4')-7-metoxichalcona (**LF5**), 2'-hidroxi-5'-(3''',3''')-dimetilalil)-8-(α,α -dimetilalil)-furan-(4'',5'':3'4')-dibenzoilmetano (**LF7**) e 2'-O-(3'',3''-dimetilalil)-8-(α,α -dimetilalil)-furan-(4'',5'':3'4')-dibenzoilmetano (**LF8**). O composto (*E*)-9-O-metoxipongamol (**LF4**) é conhecido como produto de síntese e está sendo relatado pela primeira vez como produto natural. Enquanto lancealotina B (**LF1**), pongamol (**LF2**), (*E*)-7-O-metoxipongamol (**LF3**) e 2'-metoxi-(2'',3'',4',3')-furanodibenzoilmetano (**LF6**) já foram isolados de outras fontes vegetais. As estruturas moleculares das substâncias isoladas foram determinadas por técnicas espectroscópicas de RMN 1D (RMN ¹H, ¹³C, NOE 1D) e RMN 2D (HSQC e HMBC) e comparação com os dados espectrais descritos na literatura. No ensaio de atividade antimicrobiana, o extrato de éter de petróleo das cascas das raízes mostrou-se ativo contra a bactéria *Rhodococcus equi*. Pongamol (**LF2**) apresentou atividade antioxidante frente ao radical DPPH. Os extratos de EP, CH₂Cl₂ e MeOH das cascas e do cerne das raízes, lancealotina B **LF1**, pongamol **LF2**, (*E*)-7-O-metoxipongamol (**LF3**), 2'-metoxi-(2'',3'',4',3')-furanodibenzoilmetano (**LF6**) e 2'-O-(3'',3''-dimetilalil)-8-(α,α -dimetilalil)-furan-(4'',5'':3'4')-dibenzoilmetano (**LF8**) mostraram-se ativos no ensaio de letalidade contra *Artemia salina*.

ABSTRACT

Lonchocarpus filipes Benth is a native specie of Brazil, belonging to Leguminosae family and Papilonoideae sub-family. The genus *Lonchocarpus* encompasses 150 species including 24 native to Brazil, contain a great number of species which has been used in folk medicine and the flavonoids have been far the most common and important secondary metabolites found in this genus. The analysis of dichloromethane extract from *Lonchocarpus filipes* Benth bark roots yielded seven dibenzoylmethanes and a flavone. Three of them are novel and were determined as (*E*)-3,4-methylenedioxy-2'-methoxy-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'':3',4')-7-methoxychalcone (**LF5**), 2'-hydroxy-5'-(3''',3''''- dimethylallyl)-8-(α,α - dimethylallyl)-furan-(4'',5'':3'4')- dibenzoylmethane (**LF7**) and 2'-O-(3'',3''- dimethylallyl)-8-(α,α - dimethylallyl)-furan-(4'',5'':3'4')-dibenzoylmethane (**LF8**). Compound (*E*)-9-O-methoxypongamol (**LF4**) is known as synthesis product and related first time as natural product. Lancealotin B (**LF1**), pongamol (**LF2**), (*E*)-7-O-methoxypongamol (**LF3**) and 2'-methoxy-(2'',3'',4',3')-furan dibenzoylmethane (**LF6**) has been previously isolated from other sources. The molecular structures of the isolated compounds were determined by spectral analysis of NMR-1D (NMR ^1H , ^{13}C , NOE 1D) and NMR-2D (HSQC and HMBC) and by comparison of spectral data described in the literature. In the antimicrobial assay, the petrol extract from bark roots was active against bacteria *Rhodococcus equi*. The extracts and compounds lancealotin B (**LF1**), pongamol (**LF20**), (*E*)-7-O-methoxypongamol (**LF3**), 2'-methoxy-(2'',3'',4',3')-furan dibenzoylmethane (**LF6**) and 2'-O-(3'',3''- dimethylallyl)-8-(α,α -dimethylallyl)-furan-(4'',5'':3'4')- dibenzoylmethane (**LF8**) showed high toxicity in the brine shrimp lethality assay and only pongamol (**LF2**) showed antioxidant activity in DPPH.

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimentos, de materiais para o vestuário, habitação, utilidades domésticas, defesa e ataque, na produção de meios de transporte, como utensílios para manifestações artísticas, culturais, religiosas e como meio restaurador da saúde (Schenkel *et. al.*, 2004).

As plantas produzem grande variedade de produtos naturais cuja maioria parece não participar diretamente do seu desenvolvimento e crescimento. No entanto, essas diversas substâncias, geralmente com efeitos biológicos, são tradicionalmente denominadas de metabólitos secundários ou produtos naturais e estão distribuídas diferentemente entre os grupos taxonômicos limitados dentro do reino vegetal (Croteau, 2000; Macedo *et. al.*, 2007).

Algumas funções desses metabólitos são desconhecidas, mas vêm sendo elucidadas com uma frequência crescente. Sabe-se que alguns compostos desenvolvem importantes funções na planta como defesas contra plantas parasitas e patógenos (vírus, bactérias, fungos e insetos). Por outro lado, os metabólitos secundários das plantas podem facilitar a interação animal-plantas produzindo pigmentos ou substâncias voláteis, cuja função é atrair os polinizadores (Dewick 2001; Wink *et. al.*, 2003). Os metabólitos primários em contraste, como os floesteróides, lipídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos são encontrados em todas as plantas e exercem funções essenciais e usualmente evidentes (Croteau, 2000).

Importantes substâncias ativas foram desenvolvidas a partir de bactérias e fungos, como a maioria dos antimicrobianos atualmente em uso como as penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, entre outros (Schenkel *et. al.*, 2004).

Mas, dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários. O reconhecimento das propriedades biológicas destes metabólitos tem alimentado uma busca intensa por novos medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (Pinto *et. al.*,

2002; Macedo, 2007). Como exemplo, pode-se citar alguns fármacos que são comercializados atualmente, obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais, como a vimblastina (Velban[®]), vincristina (Oncovin[®]), que são vendidos como antitumorais. Muitas dessas substâncias isoladas de plantas constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos tais como os fármacos taxol (Paclitaxel; Taxol[®]), usado como antitumoral; etoposídeo (VP-16-213; Vepeside[®]), utilizado no tratamento de câncer de próstata e pulmão, entre outros com participação em um mercado que movimenta cerca de 50 bilhões de dólares anualmente (Pinto *et. al.*, 2002; Schenkel *et. al.*, 2004).

Mais interessante ainda é o acúmulo de substâncias enantiomericamente puras, pelas plantas. A preocupação da indústria farmacêutica com produtos quirais intensificou-se da metade dos anos 90 em diante e o mercado de fármacos cardiovasculares, antibióticos, hormônios, vitaminas, antiinflamatórios e antitumorais, vêm aumentando a cada ano (Pinto *et. al.*, 2002).

Ainda de acordo com Pinto e colaboradores (2002), depois da descoberta desses e outros medicamentos de origem vegetal, é possível entender a corrida entre algumas indústrias, principalmente de nações ricas, pela busca de novas substâncias bioativas.

Portanto, se o rápido desmatamento das florestas naturais existentes na superfície terrestre, não for controlado a tempo, algumas espécies que compõem as florestas brasileiras e que ainda não foram estudadas quimicamente embora sejam amplamente exploradas como fonte de matérias-primas, talvez continuem para sempre desconhecidas (Gottlieb, 1990; Schenkel *et. al.*, 2004).

1.1 Família Leguminosae (Fabaceae)

A família Leguminosae ou Fabaceae é a segunda maior dentre as dicotiledôneas, composta por 750 gêneros e mais de 18.000 espécies mundialmente distribuídas desde

florestas tropicais até desertos quentes (Hegnauer *et. al.*, 1993; Wink *et. al.*, 2003). Está subdividida em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae, as quais são consideradas famílias independentes por alguns taxonomistas. A subfamília Papilionoideae é considerada a mais evoluída e mais amplamente distribuída dentre as três, sendo facilmente diferenciada do grupo pelos caracteres vegetativos, florais e frutíferos (Dutra *et. al.*, 2005; Perez, 2005).

Leguminosae é de grande importância econômica, pois apresenta vasta variedade de espécies alimentícias, além de fornecer madeira de boa qualidade, ração para animais, látex, resinas, matéria-prima na fabricação de tintas, inseticidas, drogas medicinais no seu estado bruto e árvores ornamentais (Hegnauer *et. al.*, 1993). As espécies mais conhecidas e empregadas como fontes alimentícias, são: o grão-de-bico (*Cicer arietinum*), ervilha (*Pisum sativum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), lentilha (*Lens culvaris*) e a soja (*Glycine max*) (Sannomiya, 2001).

Uma característica comum da maioria das espécies pertencentes a essa família é a presença de nódulos nas raízes contendo bactérias do gênero *Rhizobium*, as quais são capazes de captar nitrogênio atmosférico e convertê-lo em outros compostos nitrogenados. Por esta razão, um grande número de leguminosas são adaptadas a habitats áridos ou semidesérticos, além de algumas espécies da subfamília Papilionoideae como *Trifolium repens*, *Medicago sativa* serem utilizadas como fertilizantes (Sannomiya, 2001; Wink *et. al.*, 2003).

As plantas de Leguminosae produzem uma variedade de metabólitos secundários tais como alcalóides, aminoácidos não proteicos, aminas, fenilpropanóides, flavonóides, isoflavonóides, antraquinonas, di-, sesqui- e tri-terpenos. Entre essas classes de substâncias, destacam-se os flavonóides, devido à frequência e diversidade de esqueletos com que são encontrados nas três subfamílias. Deste modo, como são produtos naturais

encontrados em quase todas as famílias estudadas, são de importância taxonômica restrita apenas a essa família (Wink, 2003).

Para Hegnauer e colaboradores (1993) a ocorrência de flavonóides na família Leguminosae está relacionada ao uso etnobotânico das espécies como tintura, inseticidas e drogas medicinais; à quimiotaxonomia os quais podem ser utilizados na determinação de parentesco de híbridos e de novos cultivares e; funções quimioecológicas, como defesa da planta contra herbívoros ou agentes patológicos e atração de polinizadores.

1.2 Flavonóides

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos bioativos mais importantes entre os produtos de origem natural. Eles apresentam muitas variações estruturais resultando na grande diversidade de classes de flavonóides encontrados na natureza como flavonas, flavanonas, isoflavonas, dibenzoilmetanos, flavanonóis, antocianidinas, chalconas entre outros (Pietta, 2000; Cushine *et. al.*, 2005).

Esses metabólitos secundários desempenham importantes funções na natureza e apresentam diversas atividades biológicas (Rije *et. al.*, 2006). Nas plantas, são fontes de pigmento para a coloração de flores e frutos, componentes importantes para o armamento químico da planta contra insetos, fungos, vírus e bactérias e ainda fornecem elementos importantes na proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível (Harborne *et. al.*, 2000; Riije *et. al.*, 2006).

Os flavonóides são uma das mais importantes fontes de pigmento para a coloração de pétalas de flores e frutos da maioria das espécies de vegetais. As chalconas (**1**, figura 1) e auronas (**2**, figura 1), são grupos de flavonóides, geralmente identificados nas mesmas plantas, responsáveis pela coloração amarela. Enquanto as antocianidinas (**3**, figura 1) são substâncias derivadas de sais flavílicos, solúveis em água, as quais proporcionam coloração escarlate, vermelha, azul e violeta, além de conferirem cor vermelha ao vinho.

Uma das mais importantes funções desses pigmentos é de atrair polinizadores e dispersores de sementes, resultando na disseminação de espécies vegetais através da interação entre plantas e animais (Dewick, 2001; Schenkel *et. al.*, 2004).

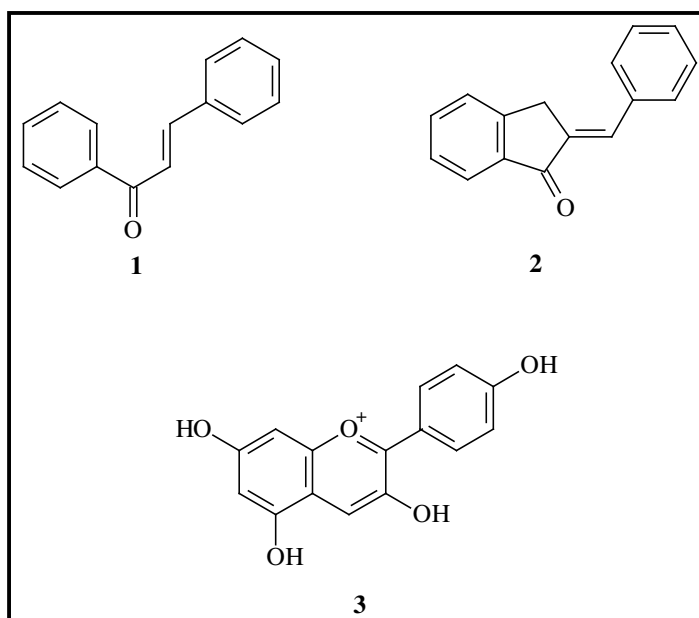


Figura 1 – Esqueleto básico de algumas classes de flavonóides com função de pigmentação na planta (Fonte: Schenkel *et. al.*, 2004)

Os isoflavonóides, constituem uma classe de flavonóides cuja ocorrência é limitada à família Leguminosae (Schijlen *et. al.*, 2004). Estes metabólitos secundários se dividem em várias subclasses tais como as isoflavonas, pterocarpanos, cumestanos, entre outros (Souza, 2003). Nos vegetais, a maioria destas substâncias comporta-se como fitoalexinas, como os pterocarpanos faseorlina (4, figura 2) e medicarpina (5, figura 2), cujos componentes são produzidos pela planta como defesa contra agentes patogênicos, como vírus, fungos e bactérias (Hegnauer *et. al.*, 1993; Firmino, 1998).

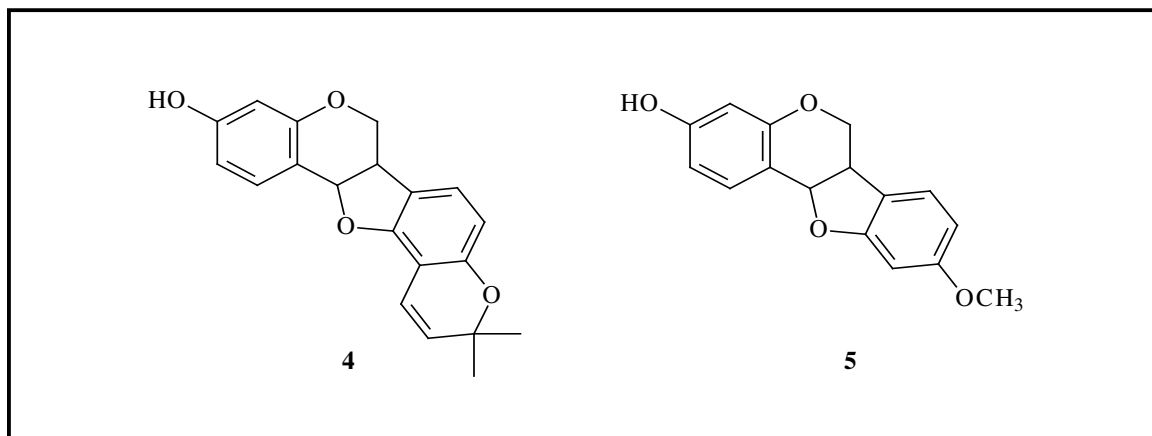


Figura 2 – Pterocarpanos como defesas químicas (Fonte: Firmino, 1998)

Flavonóides têm apresentado diversas atividades biológicas, agindo como antialérgicos, antivirais e fungicidas. As atividades anticâncer, antiinflamatórias e redução de risco de doenças cardiovasculares têm sido atribuídas às propriedades antioxidantes destes produtos naturais (Cushine *et. al.*, 2005; Magalhães *et. al.*, 2007).

Testes desenvolvidos *in vitro* têm demonstrado que flavonóides são excelentes captadores de radicais livres, pois são altamente reativos como doadores de hidrogênios e elétrons (Seyoum *et. al.*, 2006; Velloso *et. al.*, 2007). Sendo que, quanto maior o número de hidroxilas na estrutura do flavonóide maior a atividade como agente doador de hidrogênio e elétrons. Por este motivo, têm sido considerados antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E (Barreiros *et. al.*, 2006).

Devido a vasta diversidade de esqueletos de flavonóides encontrados na natureza, serão apresentados a seguir a via biossintética de alguns destes compostos, divididos em classe de substâncias de acordo com suas estruturas químicas.

1.2.1 Biossíntese

Flavonóides são caracterizados pela presença de quinze átomos de carbono em seu esqueleto básico, arranjado na forma C₆-C₃-C₆ que corresponde a dois anéis aromáticos A

e B interligados por uma unidade de três átomos de carbono, que podem vir ou não dar origem a um terceiro anel (Pietta, 2000).

Os flavonóides são originados de uma via biossintética mista, onde através de uma seqüência de reações de condensação, mediadas por enzimas, três moléculas de malonil-CoA derivadas da via do acetato são condensadas juntamente com uma molécula de 4-hidroxicumaril-CoA, derivada da via do chiquimato. As unidades oriundas da via do acetato dão origem ao anel A enquanto a unidade proveniente da via do chiquimato, dá origem ao anel B e aos três átomos de carbono que interligam os anéis A e B. O primeiro flavonóide formado é uma chalcona que se equilibra com a flavanona correspondente (**Figura 3**) (Andersen *et. al.*, 2006).

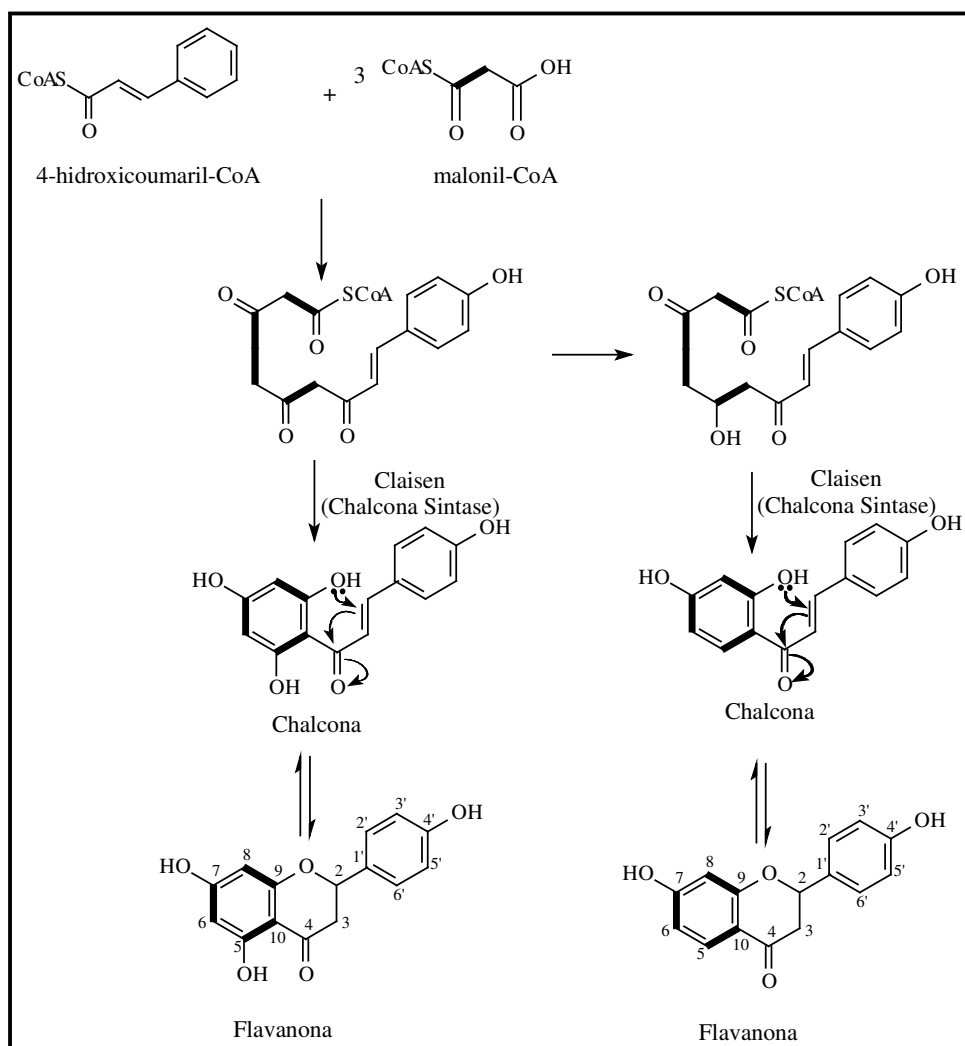


Figura 3 - Biossíntese de flavonóides (Fonte: Andersen *et. al.*, 2006).

A flavanonona é formada por uma adição de Michael, no qual o grupo hidroxílico age como nucleófilo e ataca a cetona α,β -insaturada, sendo o intermediário biossintético da maioria das classes de flavonóides. Em alguns casos, tem sido mostrado através de estudos de incorporação de precursores que os flavonóides são biossintetizados a partir da chalcona (Wong, 1968; Dewick, 2001; Schenkel *et. al.*, 2004). Após a formação deste metabólito secundário, uma série de reações enzimáticas envolvendo oxidações, reduções e alquilações originam os mais distintos esqueletos de flavonóides. As diversas classes de flavonóides diferem principalmente no nível de oxidação e no padrão de substituição do anel C. Quando da mesma classe, estes compostos diferem no padrão de substituição dos anéis A e B (**Figura 4**) (Hegnauer *et. al.*, 1993; Pietta, 2000).

O padrão de hidroxilação do esqueleto básico dos flavonóides, geralmente ocorre nas posições 5, 7 e 4'. Entretanto, podem ocorrer modificações, como perda do grupo OH da posição 5, cujo processo é realizado pela enzima redutase a qual quando atua simultaneamente com a enzima chalcona sintase promove redução deste grupo, antes da formação do primeiro flavonóide na via biossintética (**Figura 3**). Esta alteração, é uma das principais características de flavonóides isolados de espécies da família Leguminosae (Hegnauer *et. al.*, 1993; Dewick, 2001).

Nas espécies da família Leguminosae, a grande diversidade estrutural de flavonóides ocorre devido a quatro fatores: **1)** introdução de grupos hidroxílicos nas posições 6, 8 e 2' dos anéis A e B respectivamente, no esqueleto básico, o qual geralmente apresenta um padrão de substituição 5, 7 e 4'-triidroxi; **2)** perda do grupo hidroxila na posição 5, como citado anteriormente; **3)** metilação de grupos hidroxílicos ou formação de grupos metilenodióxidos; e **4)** inserção de grupos C-alquílicos, tais como metil e especialmente grupos C-prenil os quais podem sofrer diversas modificações, resultando em anéis de cinco ou seis membros (Hegnauer *et. al.*, 1993).

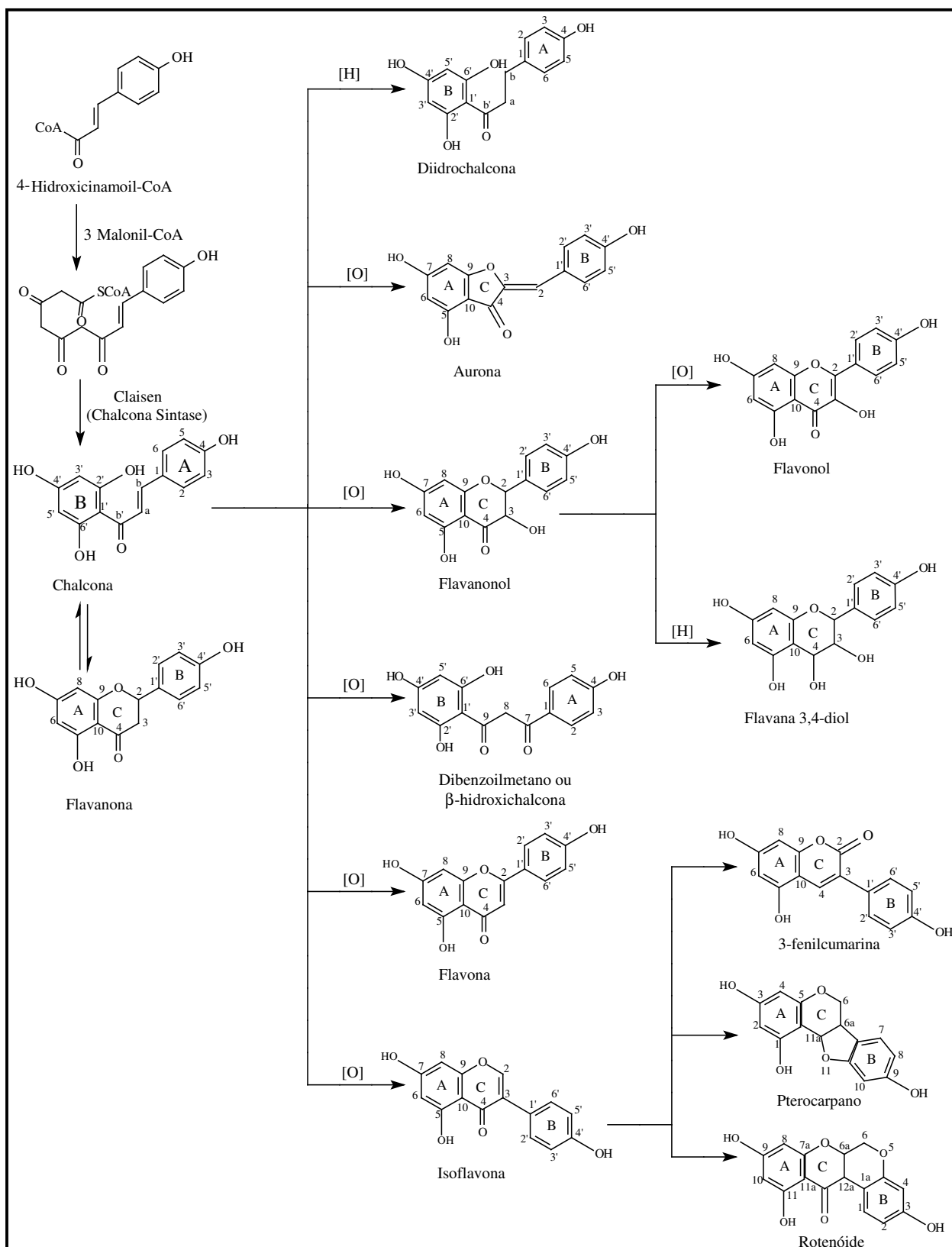


Figura 4 - Algumas classes de flavonóides e suas rotas biossintéticas (Fonte: Sales, 1994)

Os grupos prenila são derivados da via do mevalonato e flavonóides prenilados ocorrem quase que exclusivamente na subfamília Papilionoideae da família Leguminosae (Hegnauer *et. al.*, 1993; Dewick, 2001).

As reações de ciclizações do C-prenila, ocorrem por ataque nucleofílico do grupo hidroxila ao epóxido inicialmente formado pela oxidação da ligação dupla deste grupo alquílico. Dependendo da orientação do ataque nucleofílico, o produto será um anel de seis membros, o dimetilpirano ou um anel de cinco membros; o furano (**Figura 5**). O anel furano dissustituído, é biossinteticamente formado pela ação da enzima monooxigenase citocromo P450 dependente que utiliza os cofatores NADPH e oxigênio molecular para a clivagem do grupo hidroxiisopropila cujo fragmento é liberado em forma de acetona. Nesta etapa, não ocorre a formação de nenhum intermediário hidroxilado e o processo é iniciado por um mecanismo via radicalar (**Figura 6**) (Dewick, 2001).

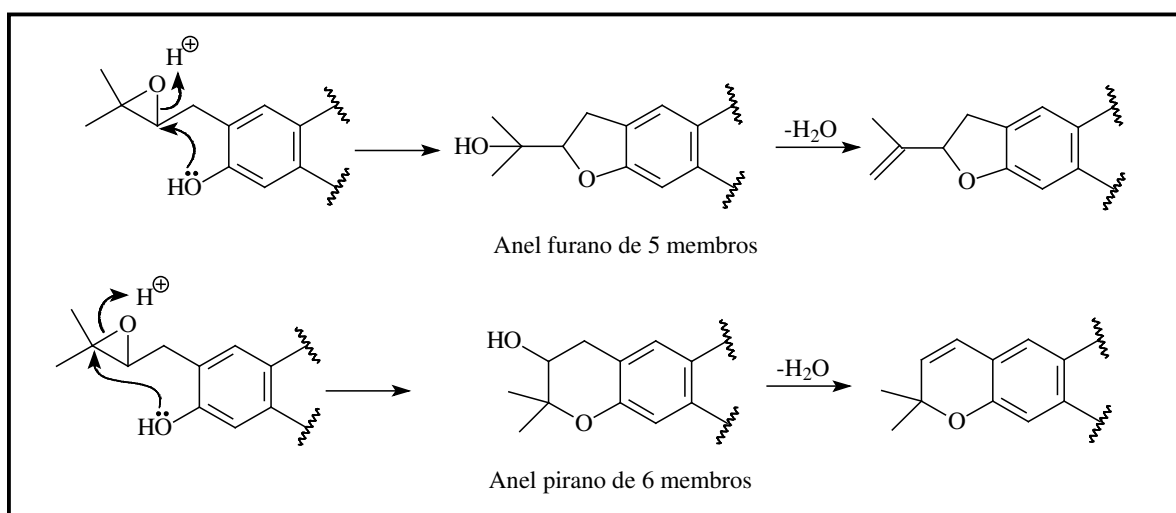


Figura 5 - Transformações do grupo prenila (Fonte: Dewick, 2001)

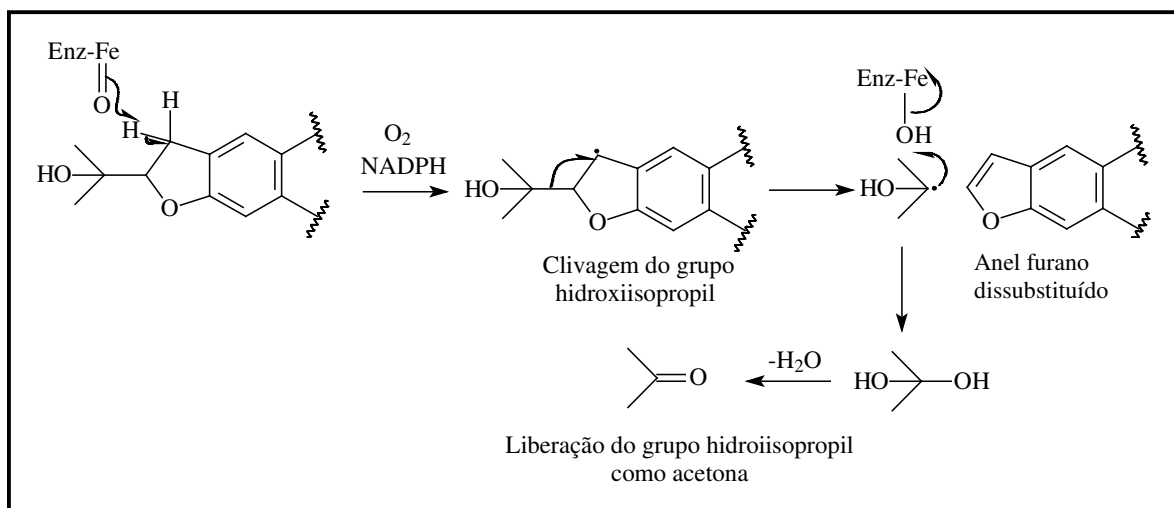


Figura 6 - Transformações do grupo prenila: formação do anel furano dissustituído
(Fonte: Dewick, 2001)

Algumas classes de flavonóides como chalconas, diidrochalconas e flavanonas, tendem a serem encontradas na sua forma livre, ou seja, não associadas a moléculas de açúcares, altamente metiladas e preniladas nas raízes, sementes e madeira de espécies de plantas da família Leguminosae. Enquanto estruturas mais simples e glicosiladas são encontradas em folhas, flores e frutos de espécies desta família (Hegnauer *et. al.*, 1993).

1.3 Gênero *Lonchocarpus*

O gênero *Lonchocarpus* Kunth pertence à subfamília Papilionoideae dentro da família Leguminosae. É considerado um táxon bastante complexo dentro desta família com cerca de 150 espécies registradas, e no Brasil sua ocorrência está restrita a 24 espécies (Magalhães *et. al.*, 1996 e 2007). Apresenta distribuição predominantemente neotropical sendo um importante componente das formações florestais da América Central e do Sul enquanto apenas duas espécies, *L. sericeus* e *L. capassa*, são encontradas na África do Sul (Aganga *et. al.*, 2001; Tozzi *et. al.*, 2007).

Considerando a necessidade de uma definição sistemática para o gênero *Lonchocarpus* especialmente devido à importância econômica revelada por algumas de suas espécies, como *L. urucu* que possui a rotenona cuja substância é um inseticida natural, realizou-se um estudo de revisão taxonômica deste gênero no Brasil (Tozzi, 1989). As várias posições sistemáticas propostas para o gênero *Lonchocarpus* mostram ausência de um consenso entre alguns taxonomistas devido a grande semelhança dos caracteres vegetativos de plantas de sua espécie com aquelas pertencentes a outros gêneros como *Deguelia*, *Tephrosia*, *Milletia*, *Pongamia*, entre outros (Tozzi, 1989).

No entanto de acordo com Tozzi (1992), *Lonchocarpus* apresenta-se como um grupo natural, constituído de espécies muito relacionadas entre si. Neste contexto, pode-se citar a inclusão da espécie *Lonchocarpus utilis* como pertencente ao gênero *Deguelia*. A distinção de *D. utilis* das demais espécies de *Lonchocarpus*, foi baseada no conhecimento das características florais e da inflorescência desta espécie cujos caracteres morfológicos têm sido utilizados como um excelente diagnóstico na classificação de espécies do gênero *Lonchocarpus* e *Deguelia*, além de outras espécies destes gêneros que também foram reclassificadas (Tozzi, 1998; Magalhães *et. al.*, 2007).

As espécies de *Lonchocarpus* são agrupadas em dois subgêneros: *Lonchocarpus* subgênero *Punctati* o qual não está subdividido em seções, e *Lonchocarpus* subgênero *Lonchocarpus* subdividido em cinco seções: *Laxiflori*, *Unguiflori*, *Pubiflori*, *Lonchocarpus* e *Densiflori* (Tozzi, 1989; Magalhães, *et. al.*, 1996). As espécies da seção *Laxiflori* e *Unguiflori* apresentam grandes semelhanças vegetativas e florais entre si, sendo que a primeira também exhibe afinidades morfológicas com espécies alocadas em *Lonchocarpus* subgênero *Punctati* (Tozzi, 1989).

Dados fitoquímicos obtidos de várias espécies de *Lonchocarpus* previamente investigadas permitiram a caracterização de muitos metabólitos secundários, incluindo os estilbenos, triterpenos e derivados de ácido benzóico. Mas, encontrou-se, principalmente

uma grande diversidade estrutural de flavonóides, o qual é característica dominante neste gênero (Hostettmann *et. al.*, 2001; Magalhães *et. al.*, 1996, 2004).

O conjunto de dados morfológicos e fitoquímicos tem resultado em uma excelente ferramenta para a caracterização de famílias, tribos e gêneros de espécies vegetais. Por essa razão, a presença ou ausência de certos produtos naturais tem sido amplamente utilizada para construir uma classificação quimiotaxonômica, sempre tentando estabelecer uma correlação da química com a morfologia das plantas (Sales 1994; Wink, 2003).

1.3.1 Dibenzoilmetanos

Os dibenzoilmetanos são substâncias pertencentes à classe dos flavonóides, raramente encontrados na natureza e têm sido isolados de algumas espécies de *Lonchocarpus* (Magalhães *et. al.*, 1996, 1997; Nogueira *et. al.*, 2003).

Um levantamento bibliográfico realizado na tese de doutorado de Sales em 1994, mostrou que entre as 32 espécies de *Lonchocarpus* estudadas até aquela data, somente *L. costaricensis* e *L. subglaucescens* apresentavam dibenzoilmetanos em sua composição química. Estes metabólitos foram denominados de β -hidroxichalconas (Sales, 1994; Magalhães *et. al.*, 1996, 1997). A atualização deste levantamento bibliográfico até 2008, juntamente com o de Sannomiya em 2001, revelou a descrição de apenas treze derivados de dibenzoilmetanos em *Lonchocarpus* desde seu primeiro relato no gênero até a presente data, cujas substâncias com substituição no C-8 foram isoladas na natureza, apenas de espécies deste gênero (**Tabela 1**) (**Figura 7**).

Deste modo pôde-se mostrar a raridade da ocorrência desses produtos naturais em plantas, sendo registradas ocorrências isoladas somente em gêneros da família Leguminosae que possuem afinidades com o gênero *Lonchocarpus* como *Tephrosia*, *Milletia* e *Pongamia* (Gupta *et. al.*, 1977; Pelter *et. al.*, 1981; Parmar *et. al.*, 1989; Tanaka *et. al.*, 1992, Mbafor *et. al.*, 1995).

Tabela 1 – Atualização da revisão dos dibenzoilmetanos isolados do gênero *Lonchocarpus* realizada por Sales (1994) e Sannomiya (2001)

Espécie	Parte da planta estudada	Dibenzoilmetano isolado	Referência
<i>L. costaricensis</i>	Semente	<u>6</u>	Waterman <i>et. al.</i> , 1985
<i>L. subglaucescens</i>	Raiz	<u>7</u> , <u>8</u> , <u>9</u> e <u>10</u>	Magalhães <i>et. al.</i> , 1996
<i>L. latifolius</i>	Raiz	<u>11</u> e <u>12</u>	Magalhães <i>et. al.</i> , 2000
<i>L. muehlbergianus</i>	Raiz	<u>7-10</u> , <u>13</u> e <u>14</u>	Sannomiya, 2001 Magalhães <i>et. al.</i> , 2004
<i>L. montanus</i>	Raiz	<u>7</u> , <u>11</u> , <u>15</u> , <u>16</u> , <u>17</u> e <u>18</u>	Magalhães <i>et. al.</i> , 2007

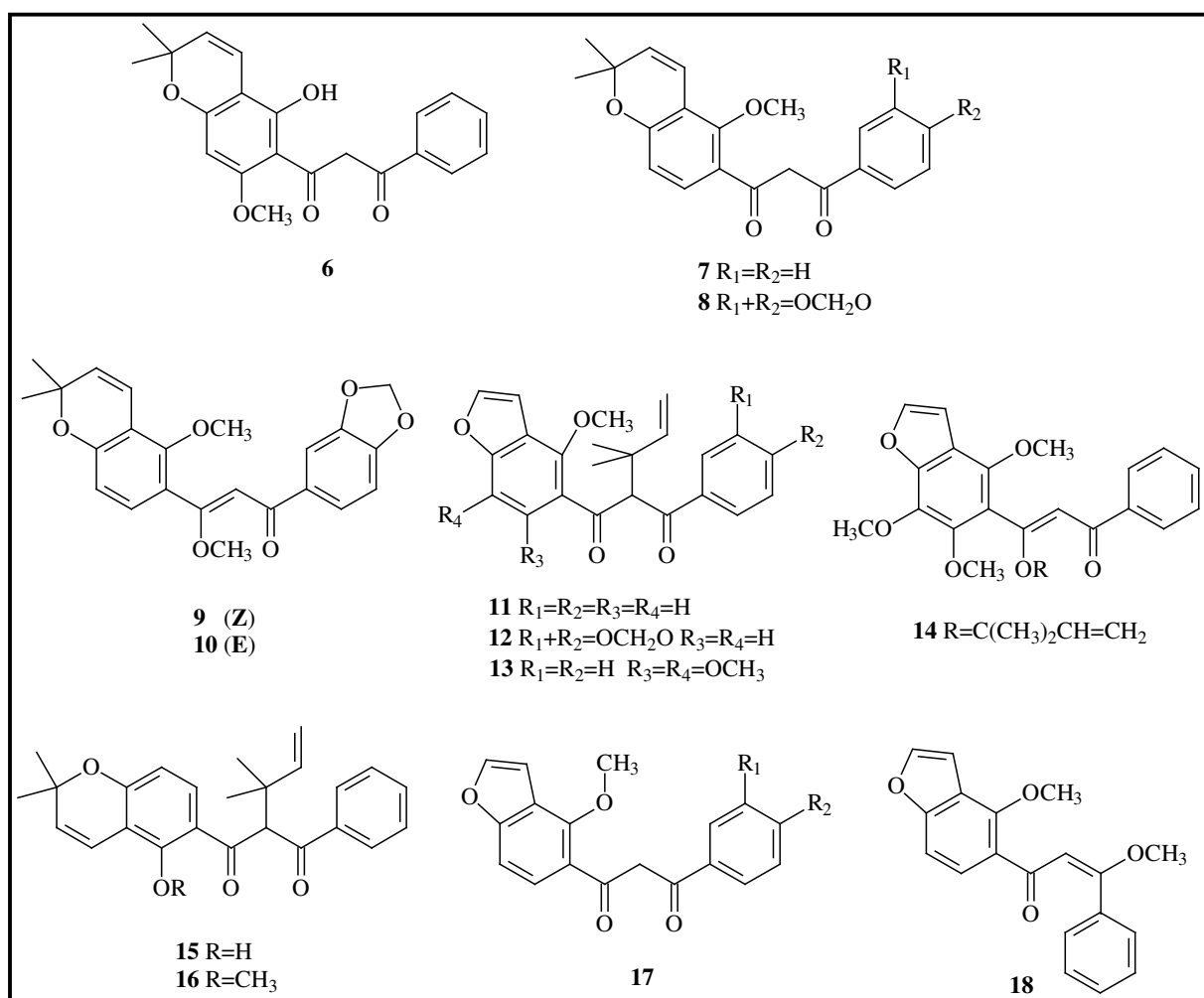


Figura 7 - Revisão bibliográfica dos dibenzoilmetanos isolados de *Lonchocarpus* até 2008

Os dibenzoilmetanos apresentam fortes atividades fotoprotetoras e anticâncer em células humanas (Jackson *et. al.*, 2002; Nogueira *et. al.*, 2003). Por esta razão, são potencialmente fontes de medicamentos e cosméticos. A produção comercial dessas drogas como filtros protetores tem tido fundamentalmente como matéria prima o Eusolex[®] 8020 (**19**, figura 8) e Parsol[®] 1789 (**20**, figura 8), derivados sintéticos de dibenzoilmetanos que previnem a penetração da energia solar em tecidos humanos externos, dificultando assim a danificação de tecidos mais internos pela radiação ultravioleta (Nogueira *et. al.*, 2003).

Testes realizados *in vitro* revelaram que o dibenzoilmetano sintético 1,3-difenil-2-alil-1,3-propanodiona (**21**, figura 8) tem inibido o crescimento de células do câncer de mama, melanoma e pulmão (Nogueira *et. al.*, 2003). Enquanto que testes *in vivo* com 1,3-difenil-propanodiona, outro análogo sintético (**22**, figura 8), mostraram atividade contra células do câncer de próstata (Jackson *et. al.*, 2002).

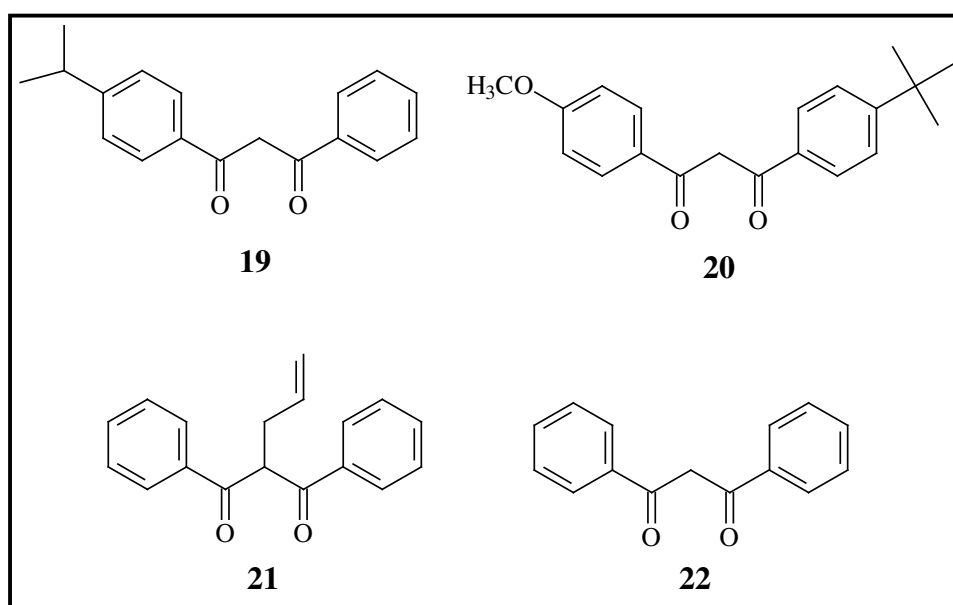


Figura 8 – Dibenzoilmetanos sintéticos bioativos (Fonte: Nogueira *et. al.*, 2003)

A ocorrência de dibenzoilmetanos, principalmente em *Lonchocarpus*, amplia a importância de estudos fitoquímicos com espécies deste táxon, pois estes metabólitos

fornece importante ferramenta na classificação sistemática do gênero, além de servirem como fonte de material com potencial bioativo.

1.3.2 Aplicações e atividades biológicas de algumas espécies do gênero Lonchocarpus

Como citado anteriormente, os flavonóides são os principais metabólitos secundários isolados de espécies de *Lonchocarpus*. O emprego terapêutico de plantas contendo flavonóides é vasto e, em muitos casos, ainda empírico (Schenkel *et. al.*, 2004; Cushine *et. al.*, 2005).

A medicina tradicional mexicana tem utilizado diversas partes de plantas desse gênero como raízes, folhas e frutos no tratamento de tumores, como medicamento estomacal, dores nas costas, convulsões, escorbuto, chagas, como diuréticos, laxantes e parasiticidas. Como exemplo, pode-se citar a espécie *L. oaxacensis* a qual tem sido utilizada por essa população no tratamento de problemas gástricos. Estudos químicos e farmacológicos demonstraram que as flavanonas mundulina (**23**, figura 9) e minimiflorina (**24**, figura 9), isoladas desta espécie, possuem propriedades gastroprotetoras. Testes realizados *in vitro* revelaram que estes componentes reduzem a atividade da enzima ATPase, cujo aumento da atividade está relacionado a distúrbios gástricos (Chilpa *et. al.*, 2006).

Testes desenvolvidos *in vitro* indicaram que a chalcona (**25**, figura 9), isolada de *L. xuul*, exibiu significativa atividade na inibição do crescimento de células do câncer de próstata e atividade leishmanicida. Já a flavana (**26**, figura 9) apresentou atividade biológica *in vitro* na inibição do desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* (Borges-Argáez *et. al.*, 2007).

Até metade do século XX, no norte do Brasil, algumas espécies de *Lonchocarpus* eram amplamente utilizadas na medicina popular sendo conhecidas comumente como “Timbó”. As raízes eram trituradas e o pó usado como inseticida no combate a carrapatos,

bernes, piolhos, pulgas, pragas agrícolas e doenças de pele humana. Os “Timbós” foram objeto de largo comércio no Brasil, incluindo-se vultuosas exportações principalmente para os Estados Unidos na década de 1930-40, os quais aos poucos, foram substituídos por inseticidas químicos (Tozzi, 1989; Schenkel *et. al.*, 2004). Estudos posteriores demonstraram que a atividade biológica destas raízes era atribuída a rotenona (**27**, figura 9). Os rotenóides, são uma classe de flavonóides, responsáveis pela atividade inseticida de muitas plantas de *Lonchocarpus* além de agirem como veneno para peixes (Chilpa *et. al.*, 2006).

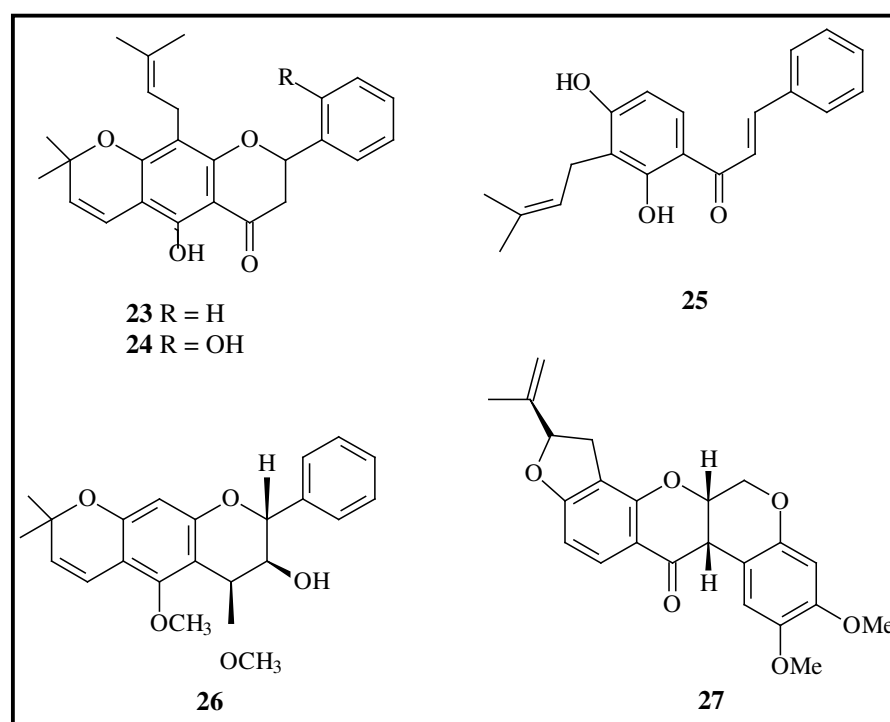


Figura 9 - Alguns exemplos de flavonóides com atividade biológica isolados de espécies de *Lonchocarpus*

Em geral, as espécies de *Lonchocarpus* possuem as mais diversas finalidades. Entre elas pode-se citar a madeira de *L. xuul* utilizada na construção civil e as flores da espécie *L. yucatanensis*, as quais são enormemente apreciadas pelas abelhas para a produção de mel por apresentarem flores vistosas e perfumadas (Borges-Argáez *et. al.*, 2002). *L. leucanthus*,

produz madeira branca e é recomendado na fabricação de papel jornal. Enquanto que *L. nitidus* fornece madeira amarelada, compacta, pouco elástica, pesada e de grande durabilidade em obras internas como portas e rodapés (Tozzi, 1989).

Estes relatos demonstram a importância deste gênero principalmente na medicina popular, onde como citado anteriormente, muitas de suas espécies ainda podem ser estudadas para a descoberta de novas substâncias ativas. Sendo assim, apesar da espécie *Lonchocarpus filipes* ser característica da flora brasileira, existem poucas informações na literatura e até o presente momento nenhum estudo fitoquímico foi realizado.

1.4 *Lonchocarpus filipes* Benth

L. filipes Benth é uma espécie brasileira, cuja distribuição parece restrita ao estado do Rio de Janeiro. É encontrada em matas e bosques da capital, estendendo-se até Petrópolis (Tozzi, 1989). Atualmente é cultivada no Parque Ecológico da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

1.4.1 Dados botânicos (Tozzi, 1989)

É uma espécie arbórea de médio porte (**figura 10**) a qual atinge cerca de 2 a 4 m de altura. Apresenta ramos finos, nitidamente estriados, glabros, quando jovens puberulentos e quando velhos subverrucosos. As folhas apresentam pecíolo e ráquis finos, nitidamente estriados, folíolos elípticos, os laterais largos ou oval-elípticos e o terminal elíptico-obovado, ápice caudada, base arredondada, glabros em ambas as faces, margem levemente revoluta e sinuosa, com 3 a 5 nervuras secundárias levemente proeminentes na face inferior.

Inflorescência pseudo-racemosa, axilar e subterminal, laxa, pauciflora, pêndula. Eixo principal fino, lenticelado. Glabro de 11 a 18 cm de comprimento, eixo com 2 a 3 flores, com 2 a 3 brácteas menores que 1 mm de comprimento, uma para cada flor.

Pedicelo fino, estriado, longo, de 9 a 13 mm de comprimento. Cálice campanulado subtruncado, membranáceo, curto-seríceo na face externa e no ápice da face interna, de 2 a 3 mm de comprimento. Corola branca, membranácea, de 7 a 12 mm de comprimento. Androceu com tubo glabro, com as margens da abertura basal não calosas e esparsos pêlos longos. Flores de estandarte glabrescente e ovário biovulado. Os frutos possuem aparência sub-rômbica, coloração amarelada, geralmente monospermo. A floração ocorre de outubro a fevereiro e a frutificação em março.



(a)



(b)



(c)

Figura 10 - Fotos de *L. filipes* no momento da coleta: (a) Espécie vegetal (b) Raízes superficiais da planta (c) Raiz

1.4.2 Classificação Botânica (Tozzi, 1989)

Nome científico: *Lonchocarpus filipes* Benth

Família: Leguminosae (Fabaceae)

Sub-Família: Papilionoideae

Gênero: *Lonchocarpus* Kunth

Subgênero: *Lonchocarpus*

Seção: *Laxiflori*

Espécie: *filipes*

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Ampliar o conhecimento acerca da composição química das espécies de plantas características da flora brasileira, tendo em vista a sua importância para o aproveitamento racional e a preservação da biodiversidade.

2.2 Específicos

A proposta envolve o estudo químico de *Lonchocarpus filipes*, através do isolamento e identificação dos constituintes químicos presentes nas raízes. Avaliação da atividade biológica dos extratos e das principais substâncias isoladas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Análises cromatográficas por CC, CCD e CCDP

A análise dos extratos e de algumas frações foi realizada em CC de vidro, com comprimento e diâmetro de acordo com as massas de amostras a serem fracionadas. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 com 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh ASTM) da Merck. A proporção de sílica utilizada para empacotar a coluna foi de aproximadamente 20 vezes a massa da amostra a ser purificada.

As análises via CCD foram efetuadas em placas da Merck, gel de sílica 60, com indicador de fluorescência F₂₅₄, com suporte em alumínio de espessura 0,2 mm. As análises em CCDP foram desenvolvidas em placas de vidro de tamanho 20 x 20 cm, espessura de 1,0 mm de gel de sílica 60 da Merck e indicador de fluorescência F₂₅₄. As placas foram reveladas sob luz ultravioleta com comprimentos de onda 254 e 366 nm e nebulizadas com solução de anisaldeído, seguida por aquecimento.

Como eluente cromatográfico, foram utilizados os solventes das marcas Vetec e Synth P.A..

3.2 Equipamentos

3.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

As análises de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (**DQ – UFPR**). Os espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C, NOE 1D e RMN 2D HSQC (H, C, ¹J), HMBC (H, C, ⁿJ) foram registrados em aparelho Avance Bruker (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz) e/ou Bruker AC200 (¹H: 200 MHz; ¹³C: 50 MHz) com campo de 9,4 e 4,7 Tesla, respectivamente. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado, tendo o TMS como padrão interno de referência ($\delta = 0$ ppm). Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm (δ) e são dados em relação ao TMS. As constantes de acoplamento (*J*) foram medidas em Hertz (Hz).

3.2.2 Rotação óptica

Os valores de rotação óptica específica foram obtidos no polarímetro Rudolph Research, modelo Autopol III com lâmpada de sódio (589 nm), à temperatura de ambiente, sendo as amostras solubilizadas em clorofórmio de grau analítico. Os valores de rotação óptica específica foram calculados utilizando-se a seguinte fórmula:

$$[\alpha]_D = \alpha \cdot 100 / l \cdot c$$

$[\alpha]$ = Valor da rotação óptica específica

α = Rotação observada

c = Concentração da substância em $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

l = Caminho óptico da cela (1 dm)

3.2.3 Espectrofotômetro

No teste da atividade antioxidante, as leituras de absorbância das amostras e padrões juntamente com o controle foram obtidas no espectrofotômetro UV-Vis modelo Shimadzu 2401PC Spectrophotometer, à temperatura de 25°C, sendo as amostras e padrões foram solubilizadas em etanol de grau analítico. As medidas espectroscópicas foram realizadas em 517 nm.

3.3 Estudo fitoquímico

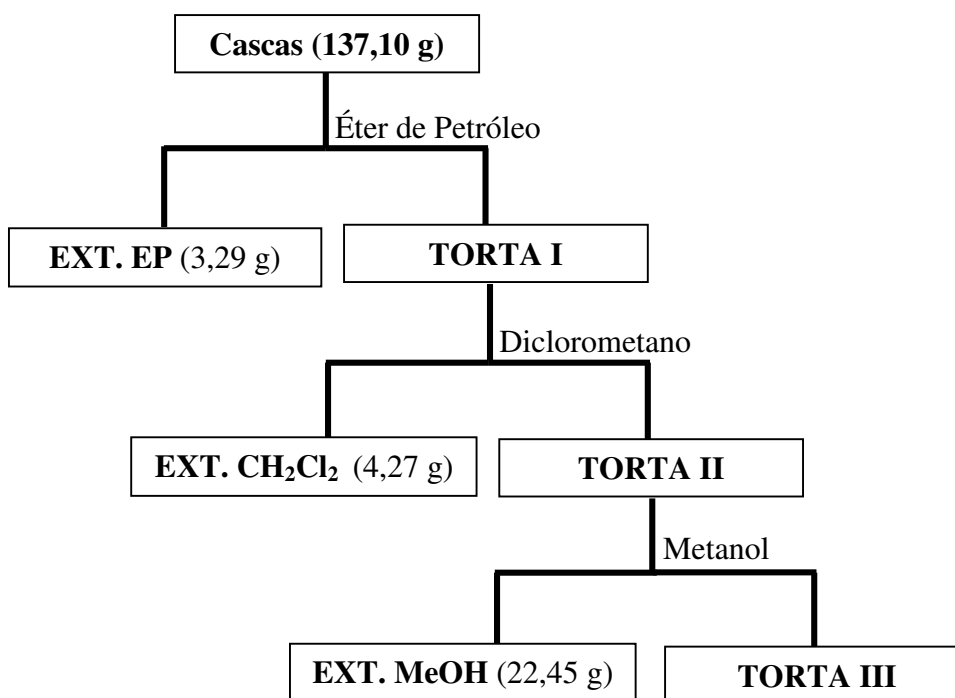
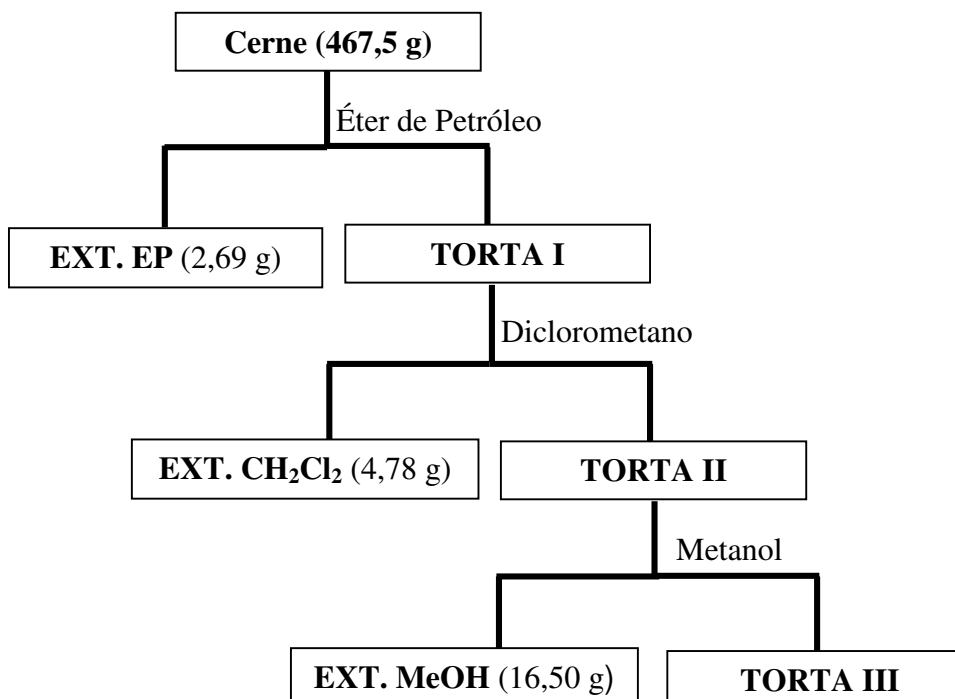
3.3.1 Coleta e identificação do material botânico

As raízes de *Lonchocarpus filipes* foram coletadas em setembro de 2006 no Parque Ecológico da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP pela botânica Dra. Ana Maria Tozzi (Instituto de Biologia, UNICAMP), especialista em taxonomia do gênero *Lonchocarpus*. A exsicata da espécie encontra-se depositada no herbário da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, sob o número 143605.

3.3.2 Obtenção dos Extratos

Após a coleta das raízes superficiais de indivíduos jovens, estas foram pré-secas à sombra à temperatura ambiente e depois secas em estufa de ar circulante a 40°C, sendo as cascas trituradas separadamente do cerne em moinho de quatro facas.

Depois de secas, pesadas e moídas, as cascas (137,1 g) e o cerne (467,5 g) foram respectivamente, submetidos a extração em Soxhlet e por maceração com solventes de ordem crescente de polaridade; EP, CH₂Cl₂ e MeOH. Na extração via Soxhlet deixou-se o material vegetal extraído por dois dias com cada um dos solventes, sendo que em intervalos de 24 horas trocava-os pelo mesmo solvente. Seguiu-se o mesmo procedimento para extração por maceração deixando cada um dos solventes durante cinco dias (**Esquemas 1 e 2**). Os extratos resultantes, foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e à temperatura de 50°C.

Esquema 1 - Extração por Soxhlet das cascas das raízes de *L. filipes***Esquema 2** - Extração por Maceração do cerne das raízes de *L. filipes*.

A análise comparativa por CCD dos três extratos (EP, CH₂Cl₂, MeOH) das cascas e do cerne, mostrou que os extratos EP e CH₂Cl₂ das cascas eram mais ricos em substâncias que os demais. Sendo que o extrato de diclorometano apresentou maior letalidade frente ao teste da *Artemia salina*, sendo, portanto o extrato escolhido para a análise.

3.3.3 Cromatografia em coluna do extrato de diclorometano das cascas

O extrato CH₂Cl₂ (4,27 g) das cascas das raízes de *L. filipes* foi fracionado em uma coluna cromatográfica (50,0 cm x 4,0 cm de diâmetro interno), empacotada com 80,0 g de gel de sílica 60 (0,063 – 0,200 mm).

Iniciou-se a eluição com éter de petróleo 100%, aumentando-se gradativamente a polaridade do eluente pela adição de AcOEt seguida da adição de MeOH até 100%. Obtiveram-se 201 frações de cerca de 30 mL cada, as quais foram reunidas em 32 grupos, após análise por CCD sob lâmpada de UV e nebulização com anisaldeído (revelador universal) (**Tabela 1**).

Com base na massa de material disponível e complexidade da mistura, determinou-se a ordem de prioridade para a purificação via CCDP ou CC de cada fração agrupada.

Tabela 2 - Relação entre Frações agrupadas / Substâncias isoladas do extrato de diclorometano das cascas de raízes de *L. filipes*.

Frações agrupadas	Fração (F)	Massa (mg)	Substâncias isoladas	Massa (mg)
F 1-12	F 1	8,3		
F 13-16	F 13	4,2		
F 17-19	F 17	10,5		
F 20-24	F 20	60,6	LF 7	10,0
F 25-31	F 25	215,7*		
F 32-38	F 32	183,7	LF 2	36,7
			LF 8	53,4

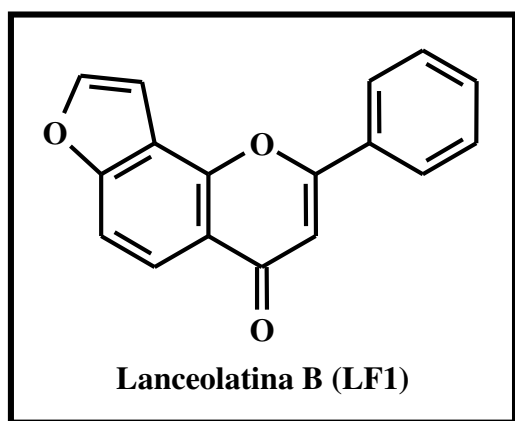
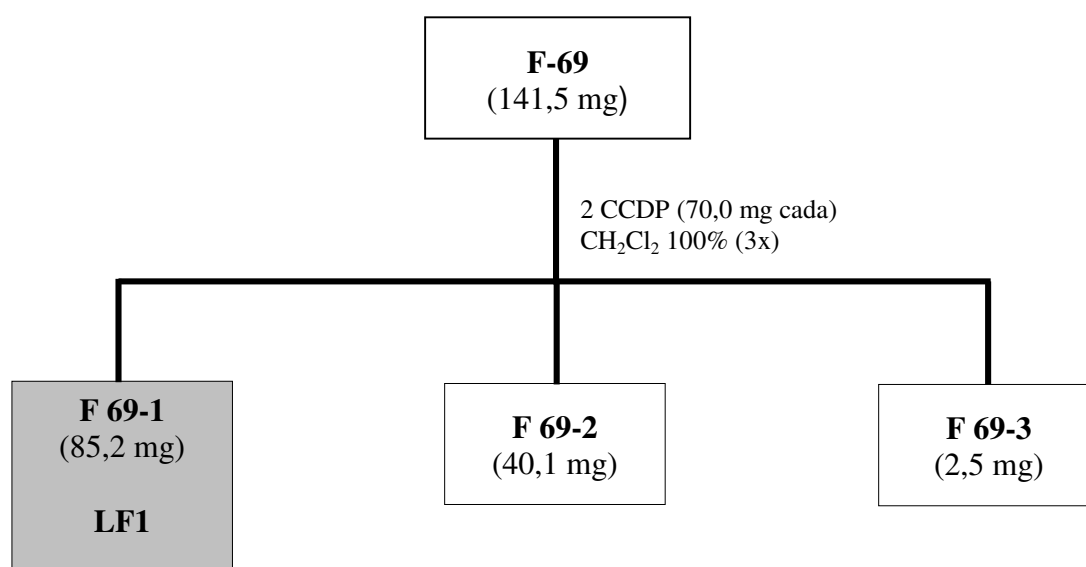
F 39-46	F 39	197,0	LF 6	58,1
F 47-53	F 47	100,8*		
F 54-56	F 54	61,9*		
F 57-60	F 57	286,3	LF 3	14,8
			LF 4	6,6
			LF 5	8,5
F 61-64	F 61	287,4*		
F 65-68	F 65	254,4 [#]		
F 69-70	F 69	141,5	LF 1	85,2
F 71-77	F 71	310,8 [#]		
F 78-81	F 78	49,3		
F 82-86	F 82	90,5		
F 87-95	F 87	69,9		
F 96-103	F 96	21,1		
F 104-109	F 104	16,5		
F 110-115	F 110	9,8		
F 116-124	F 116	9,3		
F 125-126	F 125	13,2		
F 127-129	F 127	13,3		
F 130-136	F 130	175,1		
F 137-141	F 137	24,2		
F 142-144	F 142	10,7		
F 145-151	F 145	45,2		
F 152-155	F 152	15,3		
F 156-168	F 156	9,3		
F 169-176	F 169	5,2		
F 177-188	F 177	4,4		
F 189-201	F 189	2,9		

*Frações bastante semelhantes às estudadas (CCD); [#]Frações estudadas mas com substâncias repetidas

3.3. 4 Análise das frações agrupadas

Os esquemas a seguir correspondem às purificações por CC e/ou CCDP, resultando no isolamento de oito substâncias, cujas subfrações destacadas é o produto natural isolado e os dados espectroscópicos estão descritos após cada um dos esquemas.

Esquema 3 - Isolamento da flavona LF1



Aspecto Físico: agulhas amarelas

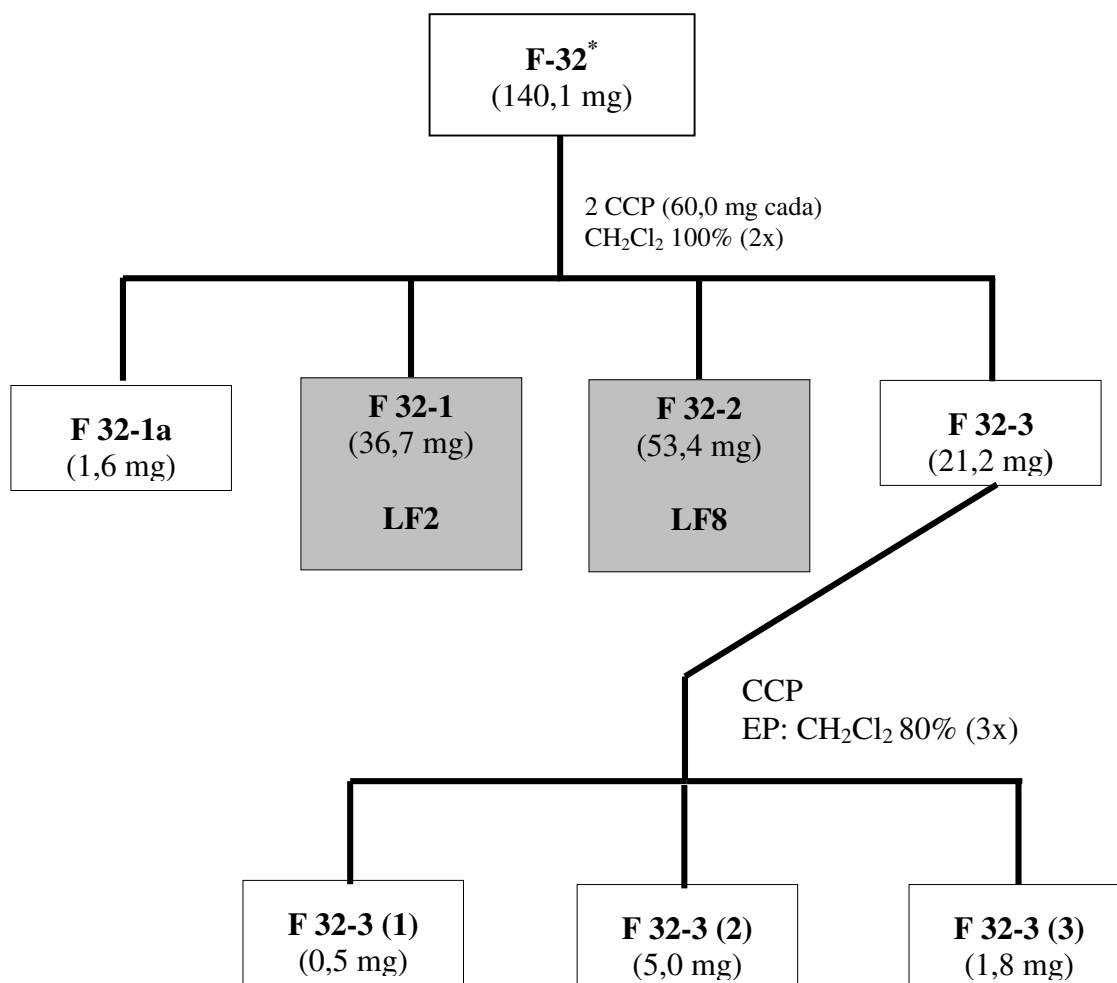
Ponto de fusão: 138,4–138,9 °C **Lit.:** 138 °C

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): Tabela 6 (Anexo A)

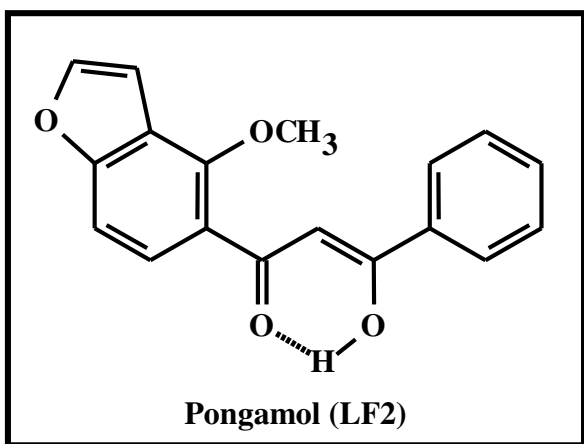
e E1 (Anexo B)

RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃): Tabela 6 (Anexo A)

e E2 (Anexo B)

Esquema 4 - Isolamento dos derivados de dibenzoilmetanos LF2 e LF8

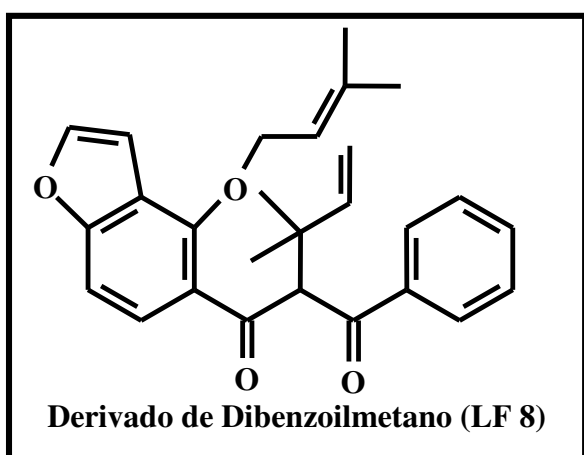
* Apenas parte da fração foi purificada por CCDP.



Aspecto Físico: óleo viscoso vermelho

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) δ : Tabela 7
(Anexo A) e E3 (Anexo B)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ : Tabela 7
(Anexo A) e E4 (Anexo B)



Aspecto Físico: sólido amorfo amarelo
escuro

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): Tabela 18
(Anexo A) e E26 (Anexo B)

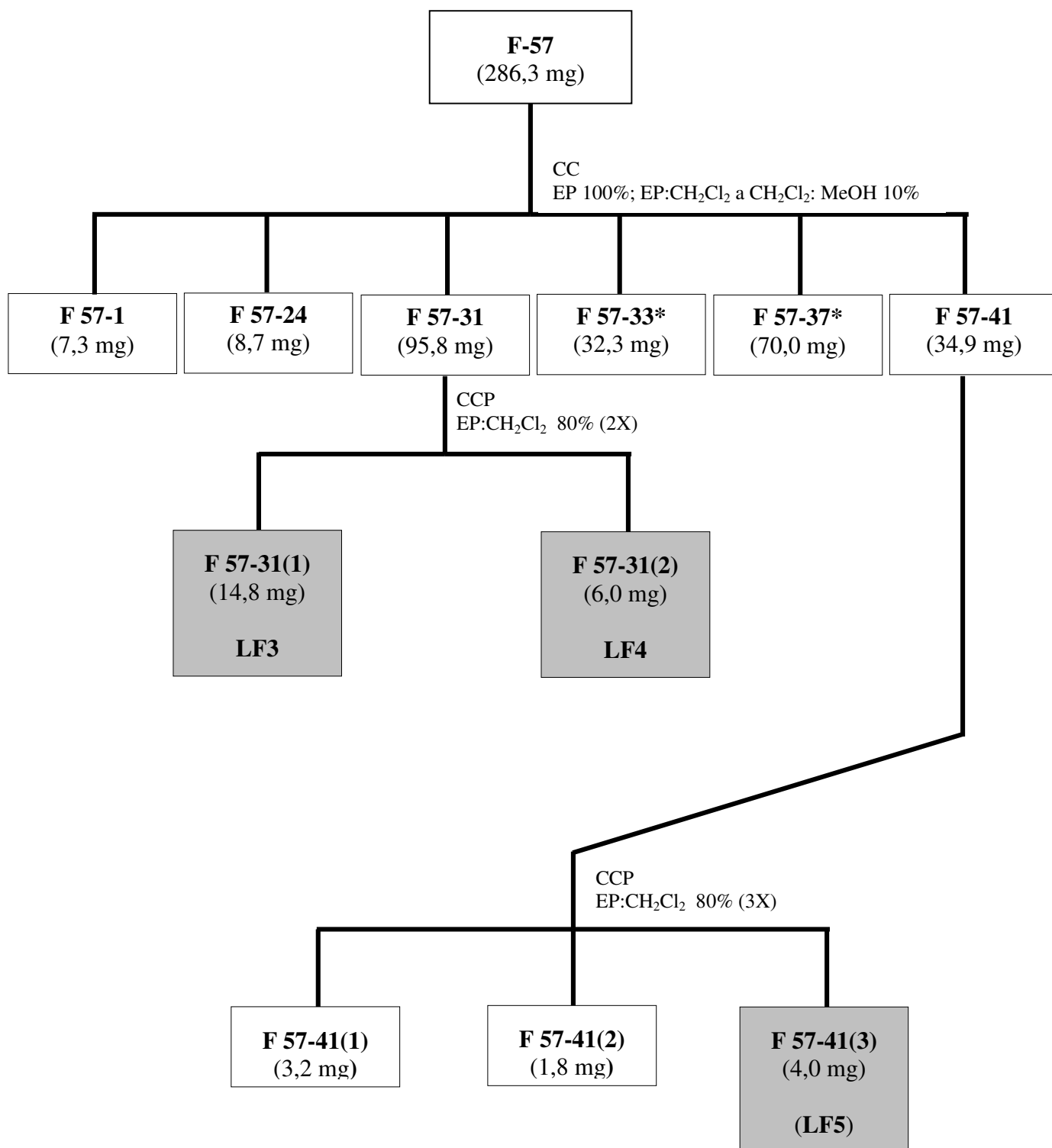
RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃): Tabela 18
(Anexo A) e E27 (Anexo B)

HSQC (H-C, J¹): Tabela 19 (Anexo A) e
E28 (Anexo B)

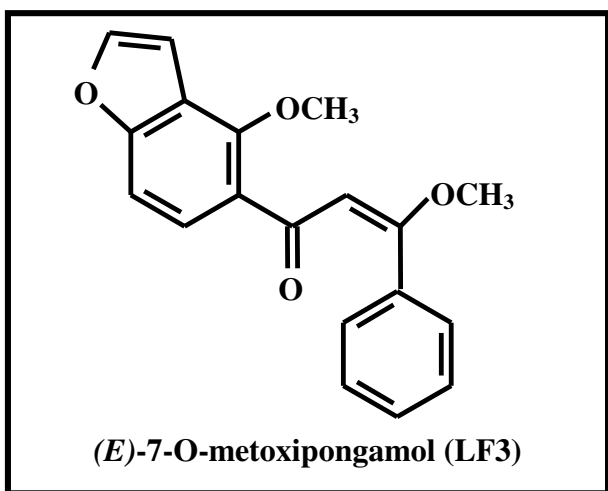
HMBC (C-H, Jⁿ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃): Tabela 19 (Anexo A) e E29 (Anexo
B)

$\alpha_D = -4,82$ (CHCl₃; c = 0,435 g.mL⁻¹)

Esquema 5 - Isolamento dos derivados de dibenzoilmetanos LF 3, LF 4 e LF 5



*Subfrações iguais a F 57-31.



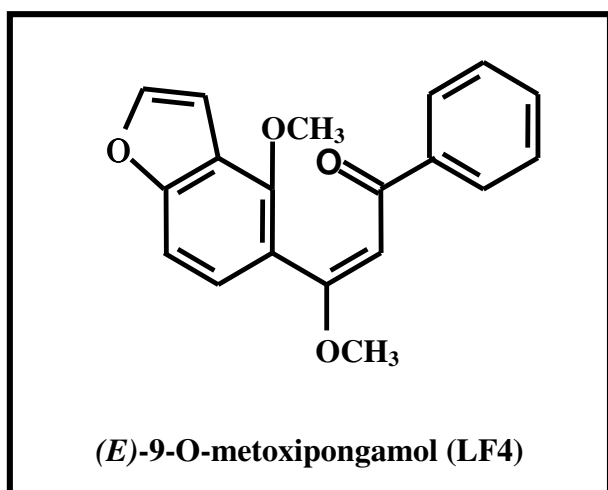
Aspecto Físico: óleo amarelo pálido

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): Tabela 8
(Anexo A) e E5 (Anexo B)

RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃): Tabela 8
(Anexo A) e E6 (Anexo B)

HSQC (H-C, J¹): Tabela 9 (Anexo A) e
E7 (Anexo B)

HMBC (C-H, Jⁿ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃): Tabela 9 (Anexo A) e E8 (Anexo
B)



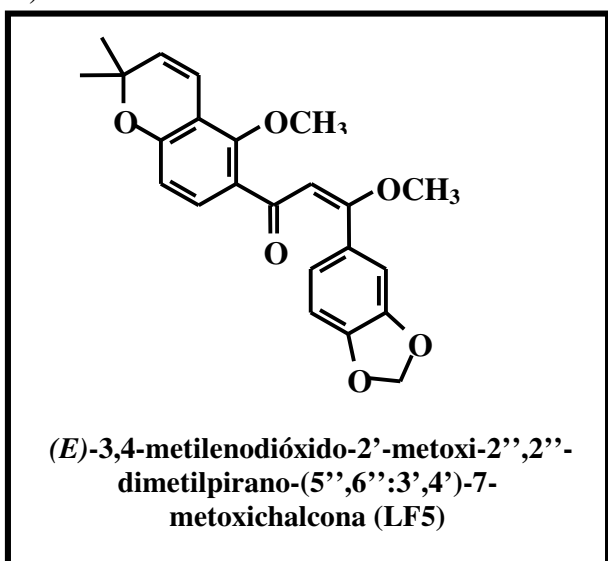
Aspecto Físico: óleo amarelo pálido

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): Tabela 10
(Anexo A) e E9 (Anexo B)

RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃): Tabela 10
(Anexo A) e E10 (Anexo B)

HSQC (H-C, J¹): Tabela 11 (Anexo A)
e E11 (Anexo B)

HMBC (C-H, Jⁿ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃): Tabela 11 (Anexo A) e E12 (Anexo
B)



Aspecto Físico: óleo amarelo pálido

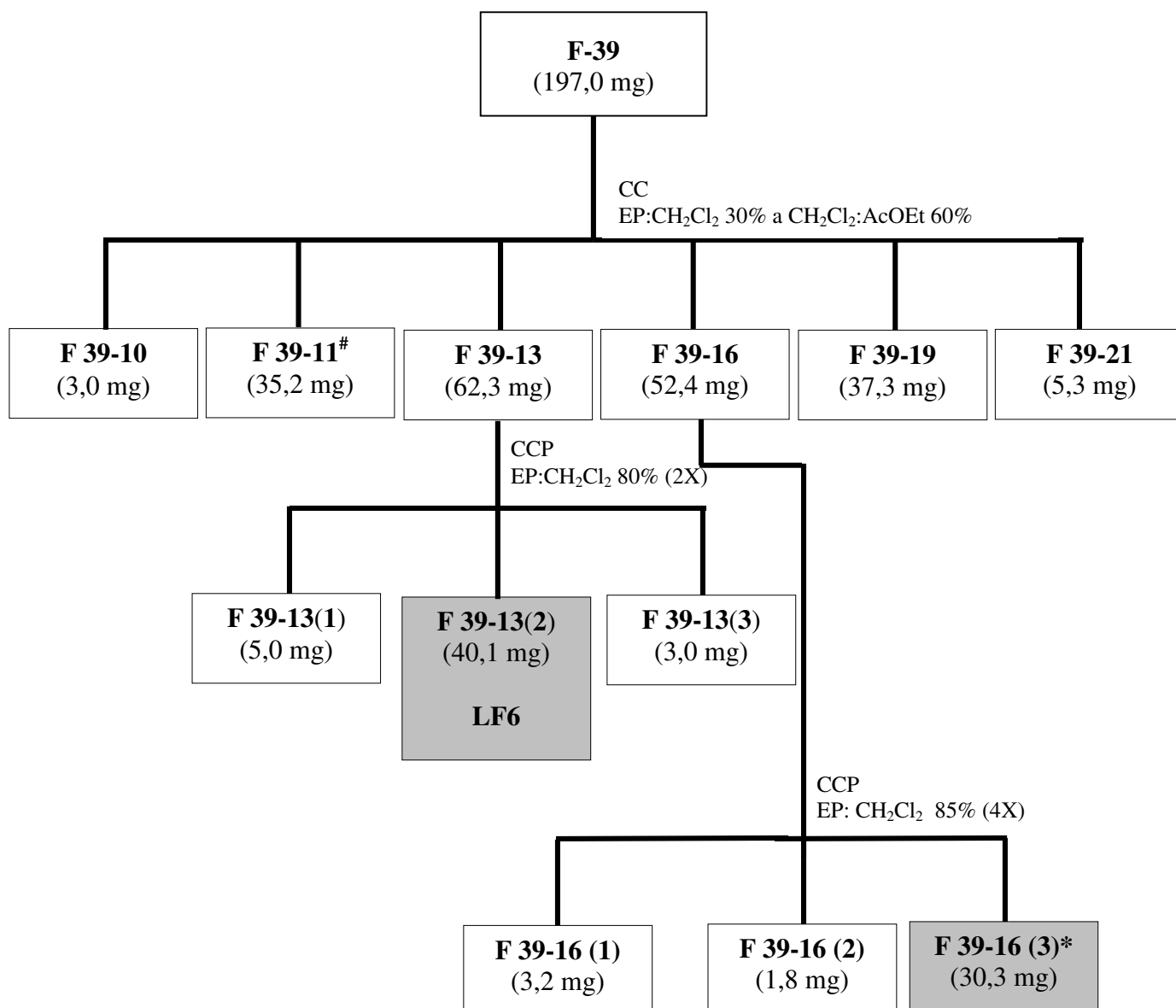
RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): Tabela 12
(Anexo A) e E13 (Anexo B)

RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃): Tabela 12
(Anexo A) e E14 (Anexo B)

HSQC (H-C, J¹): Tabela 13 (Anexo A) e
E15 (Anexo B)

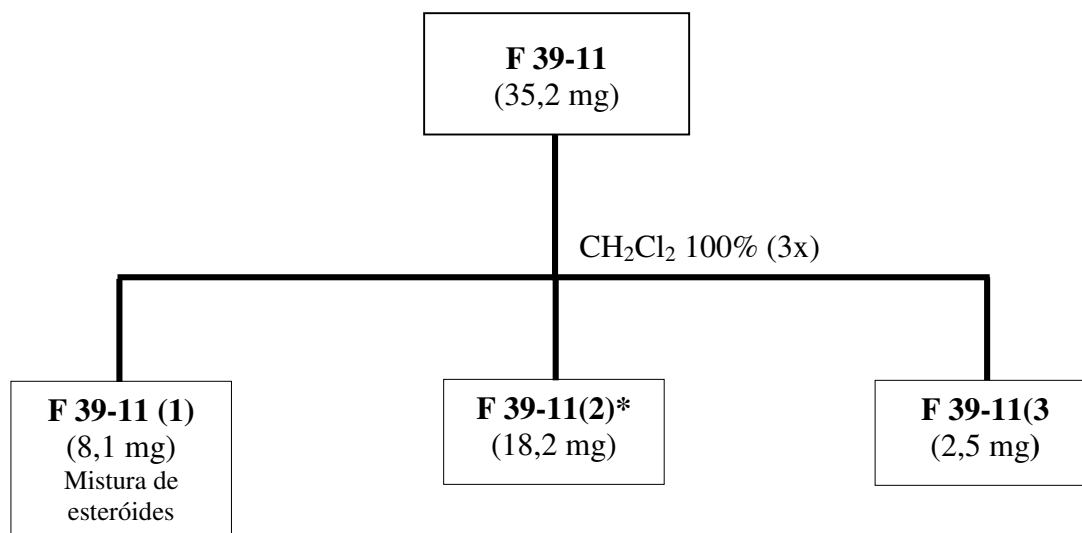
HMBC (C-H, Jⁿ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃): Tabela 13 (Anexo A) e E16 (Anexo B)

Esquema 6 - Isolamento do derivado de dibenzoilmetano LF6

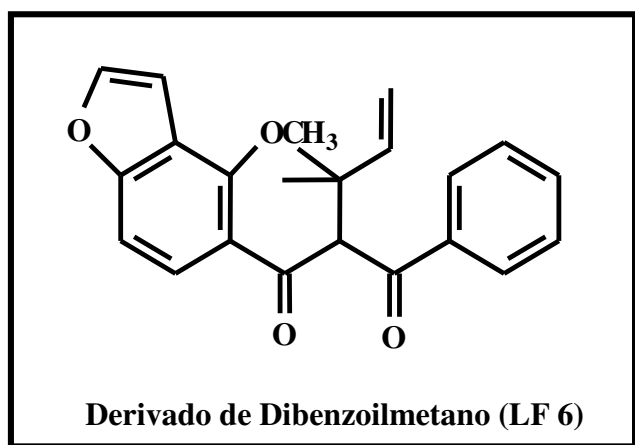


*Igual substância LF3

#Continua na próxima página



*Igual substância **LF 6**



Aspecto Físico: óleo amarelo

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): Tabela 14
(Anexo A) e E17 (Anexo B)

RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃): Tabela 14
(Anexo A) e E18 (Anexo B)

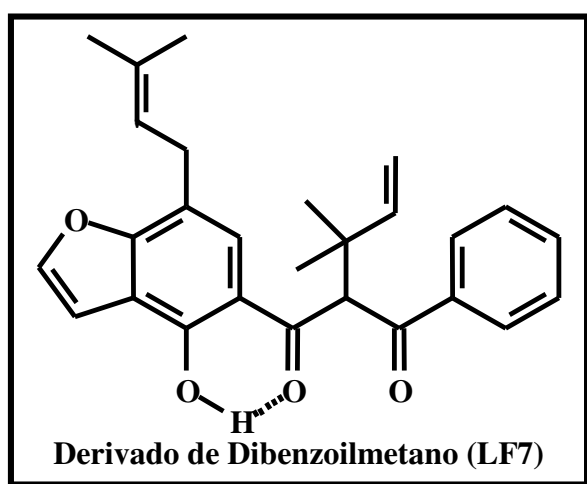
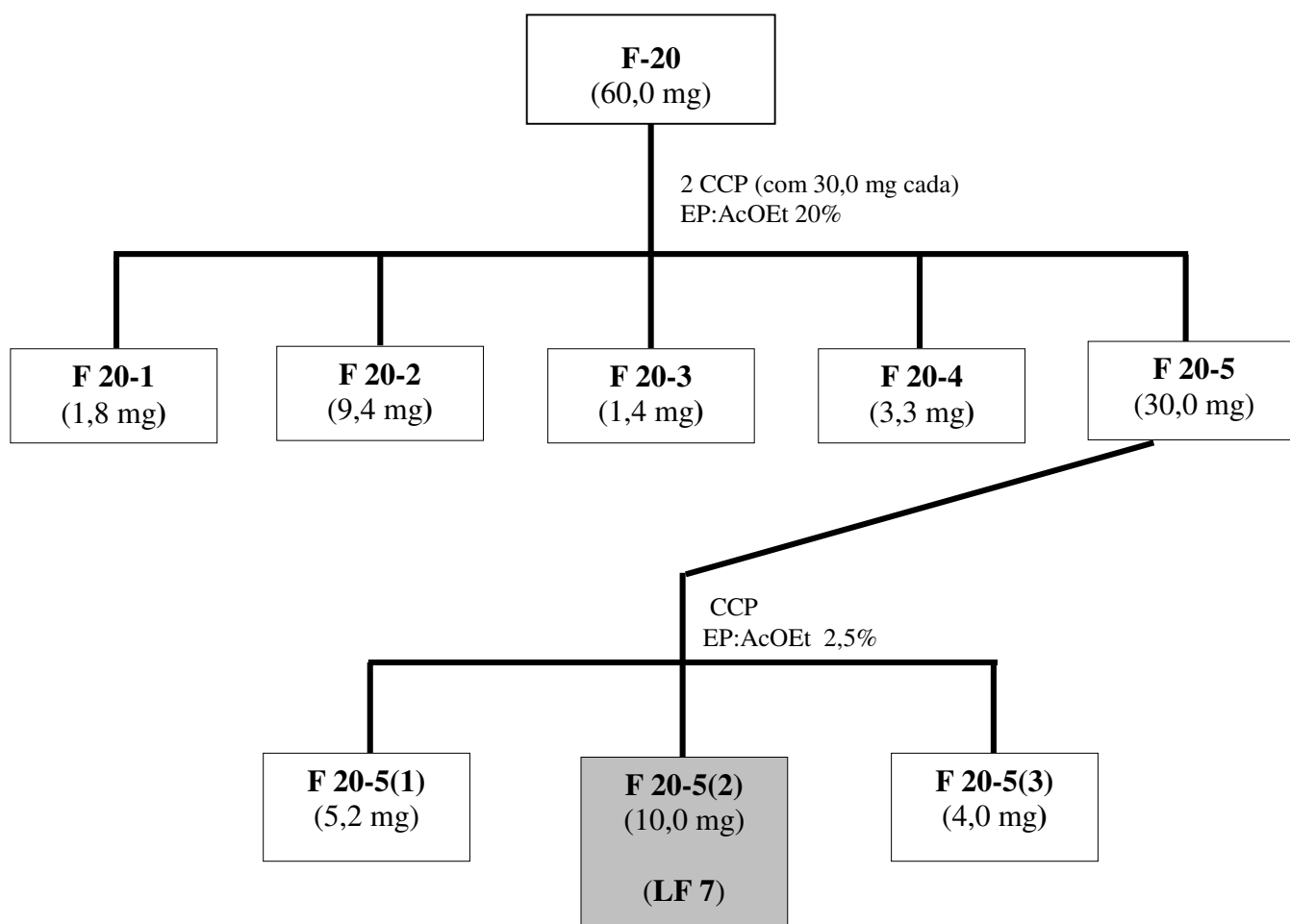
HSQC (H-C, J¹): Tabela 15 (Anexo A) e

E19 (Anexo B)

HMBC (C-H, Jⁿ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃): Tabela 15 (Anexo A) e E20 (Anexo B)

$\alpha_D = +14,83$ (CHCl₃; c = 0,350 g.mL⁻¹)

Esquema 7 - Isolamento do derivado de dibenzoilmetano LF7



Aspecto Físico: óleo amarelo

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): Tabela 16

(Anexo A) e E21 (Anexo B)

RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃): Tabela 16

(Anexo A) e E22 (Anexo B)

HSQC (H-C, J¹): Tabela 17 (Anexo A) e

E23 (Anexo B)

HMBC (C-H, Jⁿ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃): Tabela 17 (Anexo A) e E24 (Anexo

B)

$\alpha_D = -9,04$ (CHCl₃; c = 0,365 g.mL⁻¹)

3.4 Ensaios biológicos e químicos

3.4.1 Ensaio de letalidade contra *Artemia salina*

O ensaio da letalidade contra a *Artemia salina* foi desenvolvido de acordo com a metodologia de Meyer *et. al.*, 1982. Os ovos do crustáceo *Artemia salina* foram aquecidos em um recipiente contendo solução de sal marinho (38 g.L⁻¹), protegidos da luz durante 48 horas para eclosão dos mesmos em larvas do tipo *nauplii*.

As amostras utilizadas no ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foram os extratos de EP, CH₂Cl₂ e MeOH das cascas e do cerne das raízes de *L. filipes* e as substâncias puras **LF1**, **LF2**, **LF3**, **LF6** e **LF8**. As amostras foram feitas em triplicata em frascos de 10 mL, dissolvidas em solventes apropriados nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 10 µg.mL⁻¹ para os extratos e nas concentrações de 125, 100, 50, 25 e 10 µg.mL⁻¹ para as substâncias puras. Todas as etapas foram acompanhadas utilizando-se a cafeína como controle positivo.

Após total evaporação dos solventes, cada um dos frascos (para cada amostra testada) recebeu uma gota de dimetilsulfóxido (DMSO), 3 mL de solução de sal marinho (38 g.L⁻¹), 10 larvas de *Artemia salina* e o volume foi ajustado para 5 mL. Os frascos foram deixados em repouso por 24 horas, sendo em seguida efetuada a contagem das larvas vivas e calculadas as concentrações letais a 50% (CL₅₀) das amostras, por meio de um teste estatístico denominado Probit.

3.4.2 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante das substâncias puras **LF1**, **LF2**, **LF3**, **LF6**, **LF7** e **LF8** foram desenvolvidas de acordo com a metodologia de Andrade *et. al.*, 2007. Alíquotas destas substâncias, ácido ascórbico e ácido cafeico (padrões), foram diluídos em etanol nas concentrações de 0,5, 25, 50, 75 e 100 µg.mL⁻¹. A cada 3mL de cada uma das amostras foram acrescentados 100 µL de solução etanólica de 1,1-difenil-2-picrilhidrazina

(DPPH) 1mM. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada leitura da absorbância em 517 nm, contra um branco específico em cada avaliação, formado somente pelas amostras em suas respectivas diluições. Como controle, foram utilizados 100 µL de solução etanólica de DPPH 1 mM e 3 mL de etanol.

Para avaliar a atividade captadora do radical, foi obtida a porcentagem de inibição, de acordo com a equação:

% de inibição: [(absorbância do controle - absorbância da amostra)/ absorbância do controle) x100

A determinação da concentração de amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração (IC₅₀) inicial de DPPH, foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes.

3.4.3 Atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana)

Os extratos de EP, CH₂Cl₂ e MeOH das cascas e do cerne das raízes de *L. filipes*, foram avaliados quanto à sua atividade antifúngica e antibacteriana contra os microrganismos mostrados na tabela 3 nas concentrações de 1,0 a 0,015 mg.mL⁻¹, de acordo com o método da microdiluição proposto por Eloff, 1998. Este método avalia a atividade antimicrobiana através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada extrato testado contra fungo ou bactéria, cujo método é definido como a menor concentração do extrato ou substância pura capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium).

Na primeira etapa deste ensaio foram depositados 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MH) em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios, com exceção da coluna 12, que foi

utilizada para os controles. Em seguida, na coluna 1 – linha A foram acrescentados 50 µL do extrato a ser testado, de concentração conhecida (uma amostra diferente para cada número ou coluna), até a concentração de 1,0 mg.mL⁻¹. Em seguida, 100 µL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do extrato. Os 100 µL finais foram desprezados.

Tabela 3 - Microrganismos utilizados no teste antimicrobiano

Levedura
<i>Candida albicans</i> CCT 776
Bactérias
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 2576
<i>Staphylococcus aureus</i> CCT 2740
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
<i>Salmonella choleraesuis</i> CCT 4296
<i>Micrococcus luteus</i> CCT 2692
<i>Escherichia caule</i> CCT 0547
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 13388
<i>Rhodococcus equi</i> CCT 0541
<i>Enterococcus faecium</i> CCT 5079
<i>Enterococcus hirae</i> CCT 5073

Na segunda etapa, foram adicionados nos orifícios contendo MH 100 µL de uma suspensão dos microrganismos, de crescimento recente (24 horas), diluídos para concentração final de 10⁴ microrganismos.mL⁻¹. As placas foram seladas com parafilme e

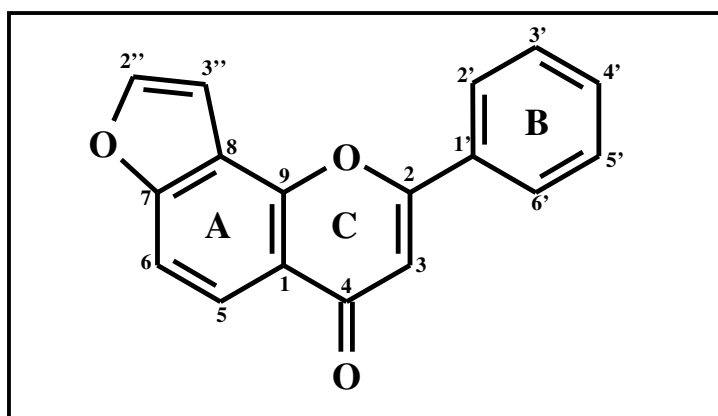
incubadas por 24 h à 37°C. Após este período foram acrescentados 50 µL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifênil tetrazolium) a 0,5%, e a placa re-incubada por 3 h na referida temperatura. A avaliação da atividade antimicrobiana foi detectada com o desaparecimento da coloração vermelha da solução (redução do TTC), de cada um dos extratos testados.

Nos ensaios com as bactérias foram utilizados o meio Nutriente Agar, e para a levedura *C. albicans*, meio Ágar Sabouraud Dextrose. Os antibióticos nistatina e cloranfenicol (Merck) foram utilizados para confirmação da esterilidade do meio de cultura e do crescimento do microrganismo, nas concentrações de 0,25-0,002 mg.mL⁻¹.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico do extrato de diclorometano das cascas das raízes de *L. filipes* resultou no isolamento de 8 flavonóides, sendo sete deles pertencente à classe dos dibenzoilmetanos e apenas a substância **LF1** pertencente à classe das flavonas. Com base nas análises de RMN e comparação desses dados com os de substâncias análogas na literatura, constatou-se que as substâncias **LF5**, **LF7** e **LF8** são inéditas como produto natural e o composto **LF4** conhecido como produto de síntese, agora é relatado pela primeira vez como isolado de fonte natural.

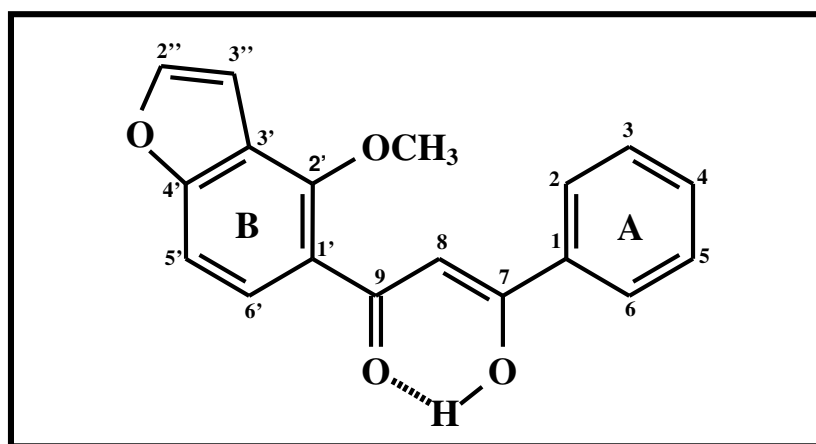
4.1 Determinação estrutural da substância LF1



O espectro de RMN ^1H (Tabela 6, Anexo A; E1, Anexo B) apresentou sinais correspondentes a um anel aromático monossustituído em δ 7,54 (3H, m, H-3', H-4' e H-5'), δ 7,96 (2H, m, H-2' e H-6'). Verificou-se um singlete intenso em δ 6,87 (1H, s, H-3) cujo sinal é característico do H-3 de flavonas e este foi confirmado pelo espectro de RMN ^{13}C (Tabela 6, Anexo A; E2, Anexo B) com o sinal em δ 107,9. Os sinais em δ 7,20 (1H, dd, $J = 2,0$ e $0,8$ Hz, H-3'') e 7,77 (1H, d, $J = 2,0$, H-2'') indicaram a presença de um anel furano, o qual foi confirmado pelos deslocamentos em δ 117,1 (C-8), δ 158,3 (C-7), δ 145,8 (C-2'') e δ 104,1 (C-3'') no RMN ^{13}C . Ainda no espectro de RMN ^{13}C verificou-se a presença de 17 carbonos, sendo 10 CH e 7 C_0 .

A estrutura foi comprovada por comparação dos seus dados de RMN¹H e RMN¹³C com os da literatura sendo determinada como [2'', 3''; 7, 8] furanoflavona, também conhecida como Lanceolata B (Tanaka *et. al.*, 1992; Mbafor, *et. al.*, 1995). Esta substância foi isolada previamente de *Pongamia glabra* (Tanaka *et al.*, 1992), posteriormente de *L. subglaucescens* (Magalhães *et. al.*, 1996), *L. latifolius* (Magalhães *et. al.*, 2000) e *L. montanus* (Magalhães *et. al.*, 2007).

4.2 Determinação estrutural da substância LF2



O espectro de RMN ¹H (Tabela 7, Anexo A; E3, Anexo B) da substância **LF2**, mostrou um singlete bastante desprotegido em δ 16,92 (1H, s, 7-OH) sugerindo a presença de uma hidroxila enólica quelada e um sinal em δ 7,16 (1H, s, H-8) referente ao hidrogênio característico deste tipo de esqueleto, o qual existe em um equilíbrio ceto-enólico, estando preferencialmente na forma enólica.

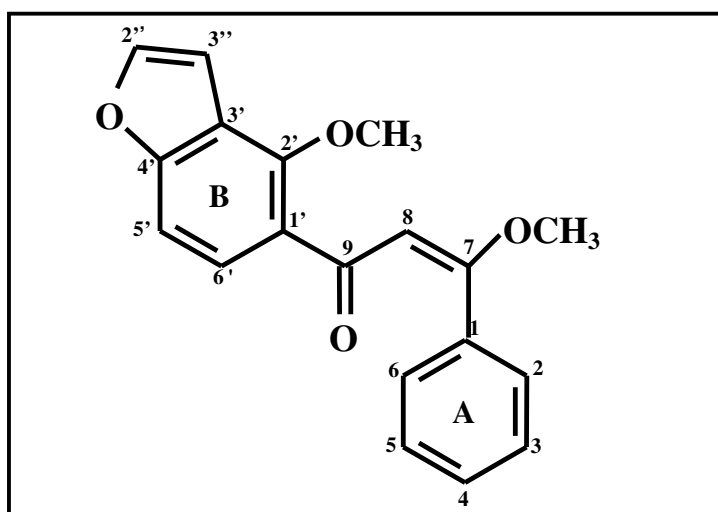
A presença de um sinal referente a um hidrogênio enólico em δ 16,92 é coerente com a forma enol do composto, pois quando um grupo carbonila está presente em uma posição β , a forma enólica é estabilizada por ligação de hidrogênio intramolecular (Costa *et. al.*, 2003).

Ainda no espectro de RMN ¹H, verificou-se um anel aromático monossustituído através dos sinais em δ 7,48 (3H, m, H-3, H-4 e H-5) e δ 7,99 (2H, dd, $J = 7,6$ e $1,4$ Hz,

H-2 e H-6), um anel aromático tetrassubstituído pelos seguintes grupos: um anel furano δ 6,99 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-3''), δ 7,62 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'') e um grupo metoxila em δ 4,13 (3H, s, 2'-OCH₃). A localização destes grupos foi determinada pelos acoplamentos *orto* em δ 7,30 (1H, d, $J = 8,6$, H-5') e δ 7,87 (1H, d, $J = 8,6$, H-6').

O espectro de RMN ¹³C (Tabela 7, Anexo A; E4, Anexo B) mostrou sinais referentes a 7 C₀, 10 CH e 1 OCH₃, sendo que dois C₀ apresentaram deslocamentos químicos em δ 184,6 e δ 186,0 referente aos sinais das carbonilas C-7 e C-9. A estrutura foi confirmada por comparação com dados espectroscópicos da literatura e determinada como β -hidroxibenzenofuranochalcona (Parmar *et. al.*, 1989). Este composto é conhecido como Pongamol o qual foi isolado pela primeira vez das raízes de *Pongamia glabra* (Parmar *et. al.*, 1989) e posteriormente de *L. montanus* (Magalhães *et. al.*, 2007).

4.3 Determinação estrutural da substância LF3



Na literatura, existem poucos relatos de β -metoxichalconas. Entretanto, Fumiyuki *et. al.*, 1990 relata estudos de isomerização de β -metoxichalconas em gel de sílica e propriedades espectrais dos isômeros *E* e *Z*, incluindo estudos de raio-x. Desta classe de flavonóides, isolaram-se três substâncias; **LF3**, **LF4** e **LF5**.

O espectro de RMN ^1H (Tabela 8, Anexo A; E5, Anexo B) da substância **LF3** mostrou sinais referentes aos seguintes substituintes: um anel furano em δ 7,57 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-3'') e 6,91 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2''), dois grupamentos OCH_3 sendo um ligado a anel benzênico δ 4,09 (3H, s, 2'- OCH_3) e outro à cadeia acíclica δ 3,88 (3H, s, 7- OCH_3), dois acoplamentos de hidrogênios aromáticos em posição *orto* δ 7,15 (1H, dd, $J = 8,4$ e $0,8$ Hz, H-6') e 7,50 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5') e um anel aromático monossustituído em δ 7,30 (3H, m, H-3, H-4 e H-5), δ 7,44 (1H, m, H-2 e H-6). O espectro de RMN ^{13}C (Tabela 8, Anexo A; E6, Anexo B) mostrou sinais referentes a 2 OCH_3 , 9 CH e 7 C_0 .

Através da análise no mapa de contorno de HMBC (Tabela 9, Anexo A; E8, Anexo B), pôde-se determinar corretamente a posição das metoxilas na estrutura pelas correlações dos sinais entre o grupo metoxila em δ 3,88 (7- OCH_3) com δ 170,5 (C-7) e entre o grupo metoxila em δ 4,09 (2'- OCH_3) com δ 152,7 (C-2'). Estes resultados confirmaram que os sinais das metoxilas são referentes a uma β -metoxila (7- OCH_3) e uma metoxila aromática (2'- OCH_3). Ainda pelo mapa de contorno HMBC, observou-se a correlação entre os sinais em δ 7,50 (H-6') com δ 190,9 (C-9) e com δ 152,7 (C-2'), comprovando que ambos, a carbonila e o grupo metoxila aromático, estão ligados ao mesmo anel aromático da β -metoxichalcona (**Figura 11**).

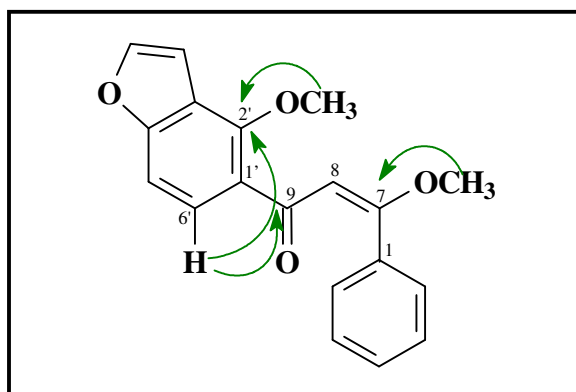
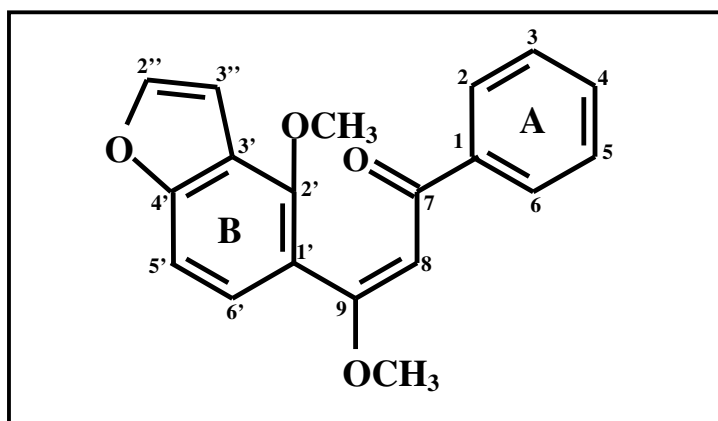


Figura 11 – Algumas correlações observadas no mapa de contorno HMBC (H, C, ^nJ) para a substância **LF3**

Diante desses resultados e comparação com os dados espectroscópicos da literatura (Fumiyuki *et. al.*, 1990), determinou-se a estrutura da (*E*)-7-*O*-metoxipongamol a qual foi isolada pela primeira vez de *Tephrosia purpurea* (Pelter *et. al.*, 1981) e posteriormente no gênero *Lonchocarpus*, de *L. montanus* (Magalhães *et. al.*, 2007).

4.4 Determinação estrutural da substância LF4



No espectro de RMN ^1H (Tabela 10, Anexo A; E9, Anexo B) da substância **LF4** observaram-se os mesmos substituintes do composto **LF3**, sendo um anel furano em δ 7,55 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-3'') e 6,90 (1H, dd, $J = 2,0$ e 0,8 Hz, H-2''), dois grupamentos OCH_3 sendo um ligado a anel benzênico δ 3,98 (3H, s, 2'- OCH_3) e outro à cadeia acíclica δ 3,93 (3H, s, 9- OCH_3), dois acoplamentos de hidrogênios aromáticos em posição *orto* δ 7,15 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5') e 7,20 (1H, dd, $J = 8,4$ e 0,8 Hz, H-6') e um anel aromático monossustituído em δ 7,35-7,39 (2H, m, H-3 e H-5), δ 7,45 (1H, m, H-4) e δ 7,88 (2H, m, H-2 e H-6). A presença destes substituintes, também foi confirmada por comparação com os dados de RMN ^{13}C (Tabela 10, Anexo A; E10, Anexo B) e com dados espectroscópicos da literatura (Fumiyuki *et. al.*, 1990).

A principal diferença entre as duas substâncias **LF3** e **LF4** é a localização das metoxilas. Pela análise do mapa de contorno de HMBC para o composto **LF4** (Tabela 11, Anexo A; E12, Anexo B), pôde-se observar as correlações dos sinais entre o grupo

metoxila em δ 3,93 (9-OCH₃) com δ 169,3 (C-9) e entre o grupo metoxila em δ 3,98 (2'-OCH₃) com δ 150,9 (C-2'). Ainda analisando o mapa de contorno HMBC, observou-se a correlação entre os sinais em δ 7,20 (H-6') com δ 169,3 (C-9) e com δ 150,9 (C-2') comprovando que contrariamente à substância **LF3** ambas as metoxilas agora estão ligadas ao mesmo anel aromático da β -metoxichalcona (**Figura 12**).

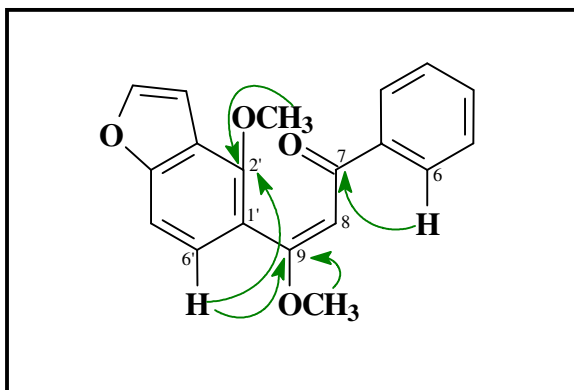


Figura 12 – Algumas correlações observadas no mapa de contorno HMBC (H, C, ⁿJ) para a substância **LF4**

Esta substância é conhecida na literatura como produto de síntese, da metilação de Pongamol com diazometano e foi determinada como (*E*)-9-O-metoxipongamol (Pelter *et al.*, 1981) a qual, está sendo relatada pela primeira vez como produto natural.

4.4.1 Isomerização *Z-E* das β -metoxichalconas **LF3** e **LF4**

Para Fumiyuki e colaboradores (1990), as substâncias **LF3** e **LF4** são isômeros de posição (regioisômeros) e não isômeros configuracionais (*Z* e *E*), pois quando um regioisômero é submetido a análise em CCD bidimensional observa-se apenas uma substância. Isto foi verificado ao examinar ambas substâncias via CCD bidimensional, cuja análise foi confirmada pelos espectros de RMN¹H e RMN¹³C que se tratava apenas uma única substância em cada caso. Os isômeros configuracionais se interconvertem em sílica observando-se duas substâncias na CCD.

O fato do isômero *E* ser considerado o produto termodinâmico é devido a ausência da forte repulsão estérica entre a metoxila e a carbonila quando estas estão do mesmo lado da ligação dupla (isômero *Z*) (**Figura 13**). A metoxila deve procurar uma posição que minimize a repulsão entre os pares de elétrons livres dos oxigênios e a repulsão dipolo entre as duas funções oxigenadas, interconvertendo-se no isômero *E* mais estável (Fumiyuki *et. al.*, 1990).

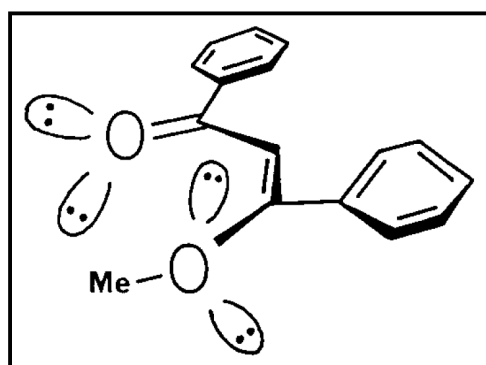


Figura 13 - Representação do isômero *Z* quanto à repulsão estérica (Fonte: Fumiyuki *et. al.*, 1990)

No entanto, a isomerização de β -metoxichalconas de *Z* para *E* ocorre quando o isômero *Z* está em contato com gel de sílica, solventes polares ou expostos à luz cujas condições favorecem a interconversão por mecanismos iônicos e/ou radicalares, conforme **Figura 14** (Fumiyuki *et. al.*, 1990).

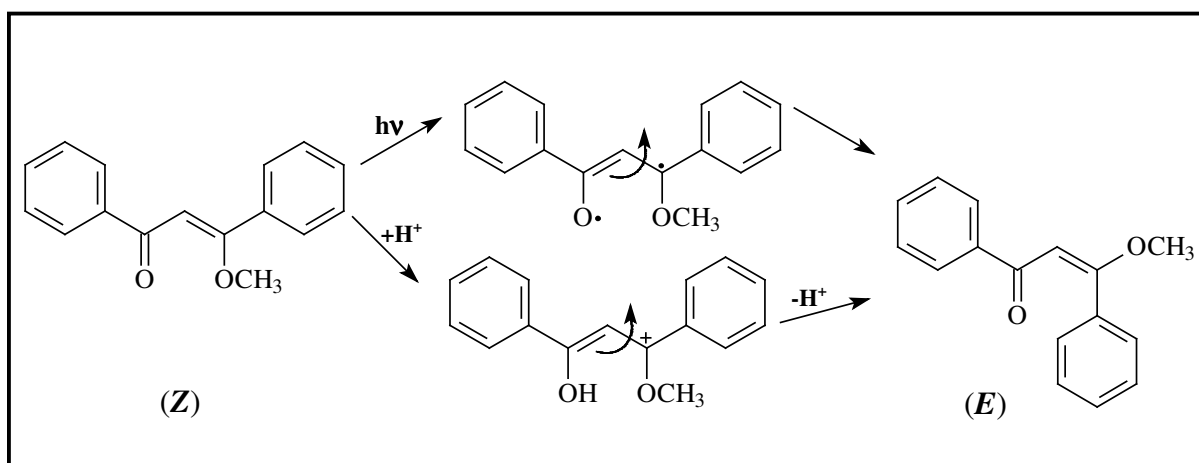


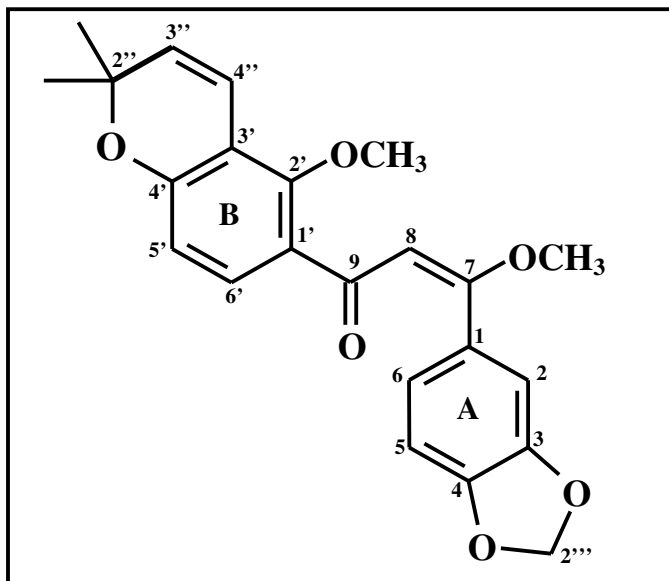
Figura 14 - Isomerização *Z-E* de β -metoxichalconas (Fonte: Fumiyuki *et. al.*, 1990)

Comparando os espectros de RMN ^{13}C das substâncias **LF3** (Tabela 8, Anexo A; E6, Anexo B) e **LF4** (Tabela 10, Anexo A; E10, Anexo B), verificou-se uma diferença significativa no deslocamento químico do C-8 de ambas as substâncias. No regioisômero **LF3** observou o sinal em δ 103,1 e no regioisômero **LF4** em δ 99,7.

Ainda de acordo com Fumiyuki e colaboradores (1990) no isômero *E*, o anel B faz um ângulo de 25° com a carbonila e esta faz outro ângulo de 25° com a ligação dupla. Entretanto, o anel A é girado 50° em torno da ligação dupla, resultando na perda de coplanaridade da molécula. Como o anel A está fora do plano da ligação dupla, deixa o C-8 na sua região de proteção e este anel, permanece na região de desproteção do anel B. Portanto, os carbonos dos substituintes em posição *orto* ao anel B ficam na região de desproteção deste anel, além de possuírem uma desproteção adicional da carbonila, resultando no deslocamento do C-8 para campo baixo em relação ao C-8 do regioisômero **LF4** (Pavia *et. al.*, 2001; Silverstein *et. al.*, 2006).

Na substância **LF4** o anel A também está fora do plano da ligação dupla entretanto, o grupo metoxila ligado à cadeia acíclica o qual faz parte do substituinte em posição *orto* no anel B, protege o carbono olefínico (C-8) da desproteção do anel B. Este efeito, provoca um deslocamento químico do carbono olefínico (C-8) para campo alto em relação ao C-8 da substância **LF3** (Fumiyuki *et. al.*, 1990).

4.5 Determinação estrutural da substância LF5



O espectro de RMN ^1H (Tabela 12, Anexo A; E13, Anexo B) da substância **LF5** se diferenciou da substância **LF3** por apresentar sinais em δ 1,42 (6H, s, 2''-CH₃), δ 5,66 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, H-3'') e δ 6,57 (1H, dd, $J = 10,0$ e 0,5 Hz, H-4'') característicos de um anel 2,2-dimetilcromeno e um singlete em δ 5,94 (2H, s, H-2''') indicando a presença de um grupo metilenodióxido. A posição deste grupo no anel A foi confirmada através do espectro de RMN ^1H , pelos sinais referentes a um acoplamento *orto*; em δ 6,72 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5), um acoplamento *orto* e *meta* em δ 7,00 (1H, dd, $J = 8,0$ e 1,6 Hz, H-6) e um acoplamento *meta* em δ 6,92 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H-2). Enquanto a localização do grupo 2,2-dimetilcromeno no Anel B foi definida pelos sinais em δ 6,54 (1H, dd, $J = 8,4$ e 0,8 Hz, H-5') e δ 7,40 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6') os quais correspondem aos sinais de dois hidrogênios acoplado em *orto*. Esses substituintes foram confirmados pelo espectro de RMN ^{13}C (Tabela 12, Anexo A; E14, Anexo B) o qual mostrou sinal referente a carbonila em δ 190,0 (C-9) e do carbono ligado a metoxila em cadeia acíclica em δ 170,2 (C-7).

Através de uma análise análoga ao das substâncias **LF3** e **LF4** no mapa de contorno HMBC (Tabela 13, Anexo A; E16, Anexo B), verificou-se as correlações dos sinais entre o grupo metoxila em δ 3,85 (7-OCH₃) com δ 170,2 (C-7) e entre o grupo metoxila em δ 3,80 (2'-OCH₃) com δ 155,4 (C-2'). Estas análises confirmaram que os sinais das metoxilas são referentes a uma β -metoxila (7-OCH₃) e uma metoxila aromática (2'-OCH₃). Ainda pelo mapa de contorno HMBC, observou-se a correlação entre os sinais em δ 7,40 (H-6') com δ 190,0 (C-9) e com δ 155,4 (C-2'), comprovando que a carbonila e o grupo metoxila aromático estão ligados ao mesmo anel aromático B da β -metoxichalcona (**Figura 15**).

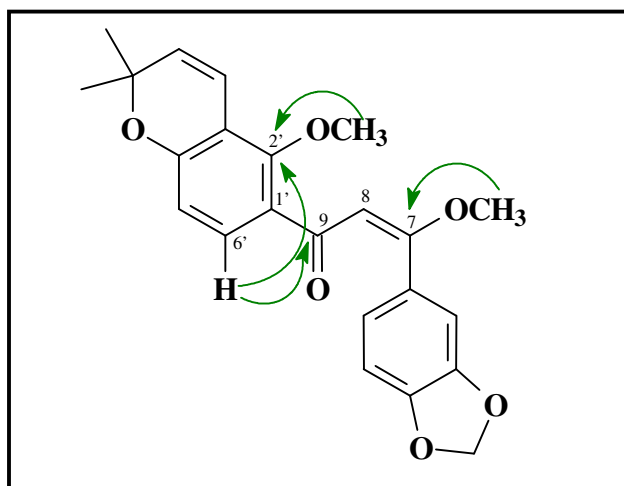
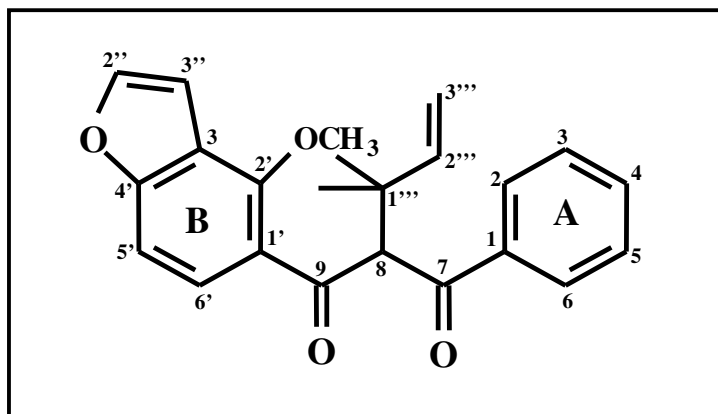


Figura 15 – Algumas correlações observadas no mapa de contorno HMBC (H, C, ⁿJ) para a substância **LF5**

Diante desses resultados concluiu-se que a substância em questão é da classe dos dibenzoilmetanos, denominada (*E*)-3,4-metilenodióxido-2' metoxi-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6'':3',4')-7-metoxichalcona. Através de um minucioso levantamento bibliográfico no banco de dados Scifinder, verificou-se que a substância é inédita na literatura.

4.6 Determinação estrutural da substância LF6



O espectro de RMN ^1H (Tabela 14, Anexo A; E17, Anexo B) mostrou sinais referentes a um anel aromático monossustituído em δ 7,95 (2H, m, H-2 e H-6), δ 7,44 (3H, m, H-3, H-5 e H-6') e δ 7,53 (1H, dt, $J = 7,2$ e $2,0$ Hz, H-4), um hidrogênio metínico em δ 5,74 (1H, s, H-8), um anel furano em δ 7,58 (1H, d, $J = 2,4$, H-2'') e δ 6,93 (1H, dd, $J = 2,4$ e $0,8$, H-3''), um grupo α,α -dimetilalil em δ 6,08 (1H, dd, $J = 17,1$ e $10,4$ Hz, H-2'''), δ 4,86 (1H, dd, $J = 10,4$ e $0,8$ Hz, H-3''')b), δ 4,93 (1H, dd, $J = 17,1$ e $0,8$ Hz, H-3''')a), δ 1,21 (3H, sl, 1'''-CH₃) e δ 1,23 (3H, sl, 2'''-CH₃) e um grupo metoxila ligado ao anel aromático em δ 3,84 (3H, s, 2'-OCH₃). O espectro de RMN ^{13}C (Tabela 14, Anexo A; E18, Anexo B) indicou a presença de 3 CH₃, 1 CH₂, 11 CH e 8 C₀, sendo dois dos carbonos quaternários (C₀) referentes as carbonilas em δ 195,4 (C-7) e δ 197,6 (C-9).

Os dados dos mapas de contorno HSQC (Tabela 15, Anexo A; E19, Anexo B) e HMBC (Tabela 15, Anexo A; E20, Anexo B) e comparação destes resultados com os da literatura (Magalhães *et. al.*, 1997), possibilitaram definir a estrutura proposta para o derivado de dibenzoilmetano **LF6**. Pelo HSQC verificou-se a correlação entre os sinais δ 5,74 (1H, s, H-8) e δ 66,8 (CH; C-8) o qual mostrou que o deslocamento em δ 5,74, refere-se ao hidrogênio ligado a um carbono sp^3 entre as duas carbonilas. Através do mapa de contorno HMBC, observou-se as correlações também em δ 5,74 (1H, s, H-8) com δ 195,4

(C-7) e δ 197,6 (C-9) referentes as duas carbonilas além dos carbonos em δ 25,8 (1'''-CH₃), δ 41,6 (C-1''') e δ 146,1 (C-2''') pertencentes ao grupo α,α -dimetilalil. Diante do exposto, confirmou-se a posição deste grupo no C-8 (**Figura 16**).

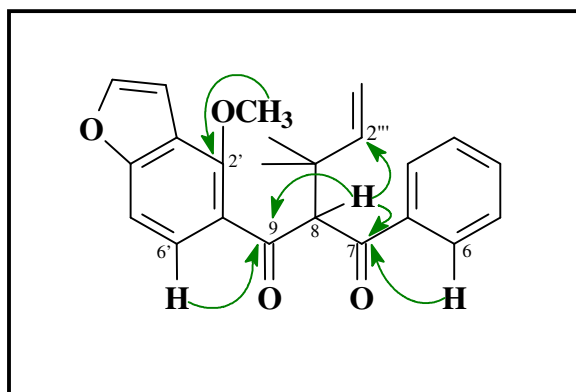


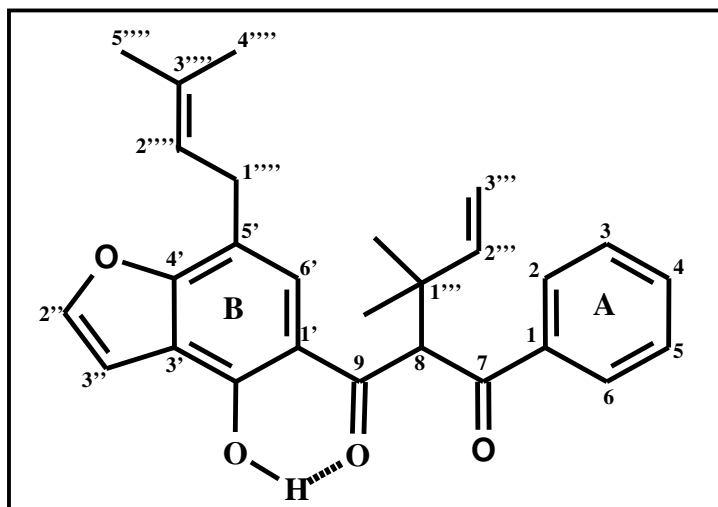
Figura 16 - Algumas correlações verificadas no mapa de contorno HMBC (H, C, ⁿJ) para a substância **LF6**

O valor da rotação óptica observada para esta substância foi de $[\alpha]_{20}^D = +14,83$ na concentração de 0,35 g.mL⁻¹.

A presença do grupo α,α -dimetilalil localizado no carbono de posição 8 já é conhecida, e sabe-se que este grupo neste sítio promove uma interação relativamente forte com os substituintes do anel aromático resultando na não enolização do composto, devido a perda de coplanaridade na molécula (Magalhães *et. al.*, 1997).

A substância foi determinada como 2'-metoxi-[2'', 3'', 4', 3']-furanodibenzoilmetano sendo isolada pela primeira vez das raízes de *L. latifolius* (Magalhães *et. al.*, 1997) e posteriormente de *L. montanus* (Magalhães *et. al.*, 2007).

4.7 Determinação estrutural da substância LF7



O espectro de RMN ^1H (Tabela 16, Anexo A; E21, Anexo B) apresentou sinais referentes a um anel aromático monossustituído em δ 7,95 (2H, m, H-2 e H-6), δ 7,53 (1H, dt, $J = 7,2$ e $2,0$ Hz, H-4) e δ 7,42 (2H, m, H-3 e H-5), um grupo metínico em δ 5,54 (1H, s, H-8), um hidrogênio aromático não acoplado em δ 7,56 (1H, sl, H-6') e um sinal em δ 13,16 (1H, s, 2'-OH) sugerindo a presença de uma hidroxila quelada. O anel furano foi evidenciado pelos sinais em δ 6,97 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-3'') e δ 7,58 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'') e um grupo isoprenila em δ 3,50 (2H, d, $J = 7,6$ Hz, H-1'''), δ 5,33 (1H, ts, $J = 7,2$ e $1,6$ Hz, H-2'''), δ 1,73 (3H, s, 4''''-CH₃) e δ 1,79 (3H, s, 5''''-CH₃).

Ainda pelo espectro de RMN ^1H confirmou-se a presença do grupo α,α -dimetilalil, pelos deslocamentos em δ 6,20 (1H, dd, $J = 17,6$ e $10,8$ Hz, H-2'''), δ 4,98 (1H, dd, $J = 10,8$ e $0,8$ Hz, H-3''')b), δ 5,03 (1H, dd, $J = 17,6$ e $0,8$ Hz, H-3''')a), δ 1,31 (3H, sl, 1''-CH₃) e δ 1,33 (3H, sl, 1'''-CH₃). Os dados espectroscópicos deste composto estão de acordo com os da literatura, pois foram comparados com um derivado análogo isolado de *L. latifolius* (Magalhães *et. al.*, 1997). Assim o C-8 deve ser o centro estereogênico o qual foi constatado pela sua atividade óptica $[\alpha]_{20}^D = -9,04$ ($c = 0,365$ g.mL⁻¹, CH₂Cl₂).

O espectro de RMN ^{13}C (Tabela 16, Anexo A; E22, Anexo B) indicou a presença de 27 átomos de carbono que juntamente com o mapa de contorno HSQC (Tabela 17, Anexo A; E23, Anexo B), mostraram ser: 4 CH_3 , 2 CH_2 , 11 CH e 10 C_0 .

Através do mapa de contorno HSQC pôde-se correlacionar todos os carbonos metínicos, metilênicos e metílicos com seus respectivos hidrogênios como, por exemplo, os sinais em δ 5,54 (1H, s, H-8) com o sinal em δ 62,1 (CH; C-8) novamente confirmando que esta correlação refere-se ao hidrogênio ligado a um carbono sp^3 entre as carbonilas como na substância **LF6**. O mapa de contorno HMBC (Tabela 17, Anexo A; E24, Anexo B) mostrou correlação entre o sinal em δ 7,95 (H-2 e H-6) com o sinal da carbonila em δ 194,0, indicando a posição da mesma no C-7. Observou-se a correlação do sinal em δ 3,50 (H-1''''') com os sinais em δ 117,5 (C-5'), δ 125,6 (C-6') e δ 158,7 (C-4') assegurando assim a presença do grupo isoprenila no anel benzênico B. Também verificou a correlação do sinal em δ 7,56 (H-6') com δ 199,8, confirmando a posição da carbonila no C-9 (**Figura 17a**). Diante destes resultados têm-se duas possibilidades de localização dos grupos isoprenila e do anel furano para a substância **LF7** (**Figura 17**).

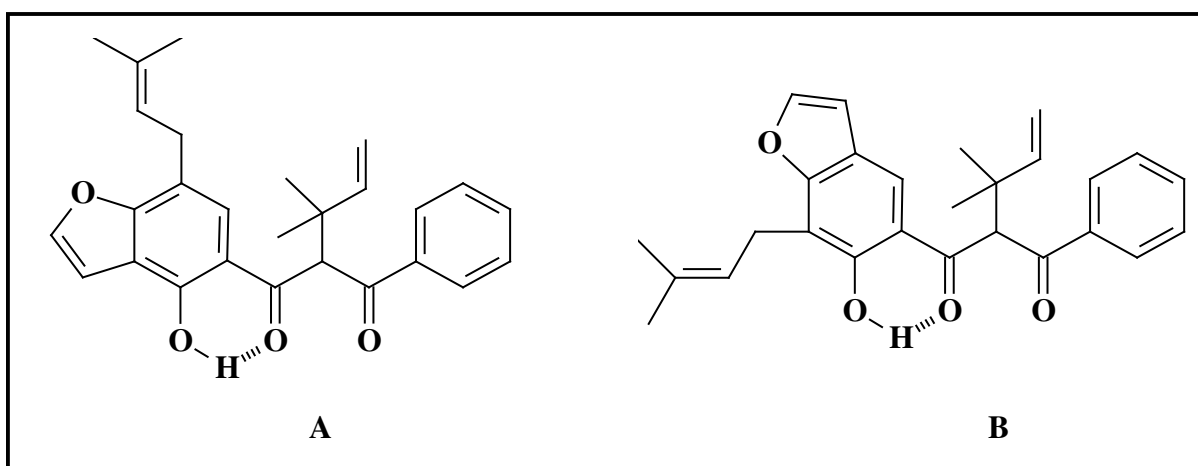


Figura 17 - Regioisômeros propostos para a substância **LF7**

O experimento de diferença de nOe (E25, Anexo B) mostrou que os grupos isoprenila e α, α -dimetilalil estavam próximos espacialmente (**Figura 18b**), pois ao irradiar o hidrogênio em δ 3,50 (H-1'''), houve incrementos em δ 7,56 (H-6') além dos hidrogênios em δ 5,33 (H-2''') e 1,74 (H-5'''). Realizou-se o procedimento inverso, ou seja, ao irradiar o hidrogênio em δ 7,56 (H-6') provocou incrementos em δ 3,50 (H-1''') além do hidrogênio em 5,54 (H-8). Também se irradiou o hidrogênio em δ 6,97 (H-3'') e observou apenas incremento em 7,58 (H-2''). Diante destes resultados, foi proposta a estrutura **A** para a substância isolada (**LF7**) (**Figura 17**).

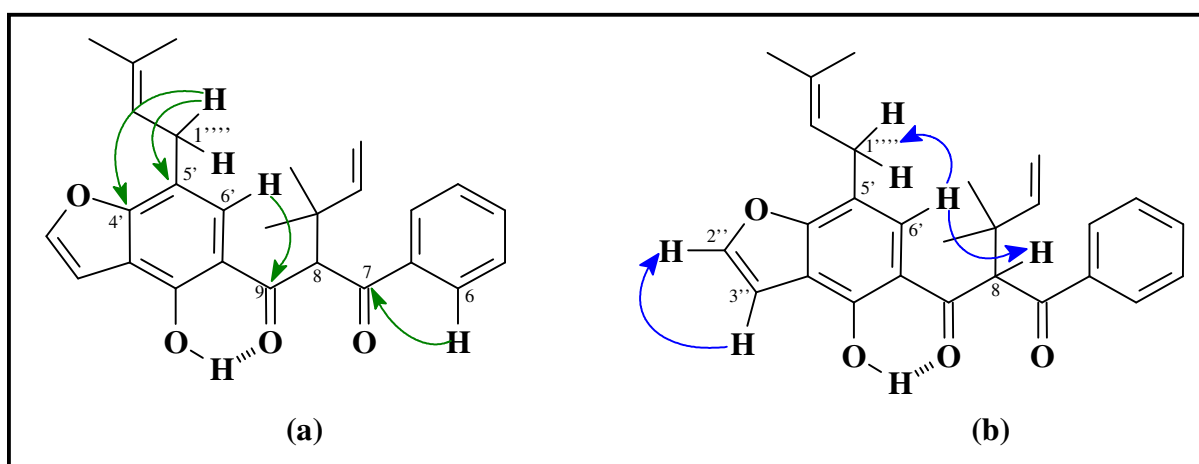


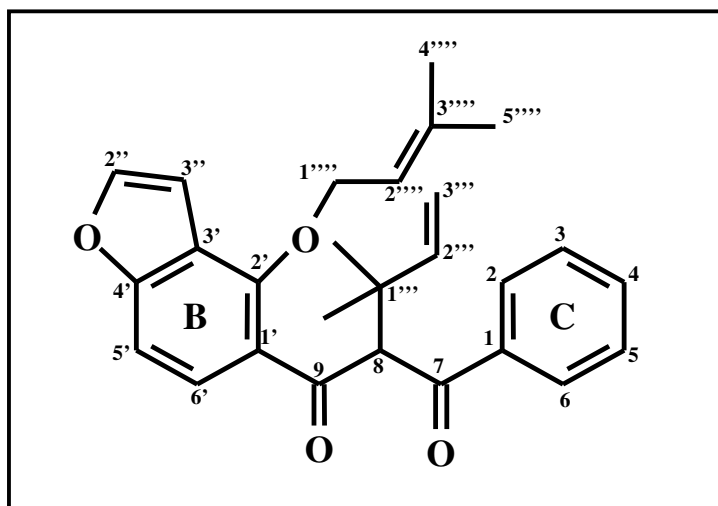
Figura 18 - (a) Algumas correlações verificadas no mapa de contorno HMBC (H, C, n J) para **LF7** (b) Alguns dos incrementos observados no experimento de diferença de nOe

Esta substância também é um derivado de dibenzoilmetano, denominada de 2'-hidroxi-5'-(3''',3''''-dimetilalil)-8-(α, α' -dimetilalil)-furano-[4'',5''':3',4']-dibenzoilmetano. Após minucioso levantamento bibliográfico no banco de dados Scifinder, verificou-se que o composto está sendo relatado pela primeira vez na literatura.

Vale ressaltar, que derivados de dibenzoilmetanos com o grupo prenila modificado localizado no carbono entre as duas carbonilas (C-8), têm sido isolados apenas de espécies

do gênero *Lonchocarpus* (Magalhães *et. al.*, 2000, 2004 e 2007). Este é o sexto relato desta classe de substâncias no gênero *Lonchocarpus* e na natureza.

4.8 Determinação estrutural da substância LF8



Os espectros de RMN ^1H (Tabela 18, Anexo A; E26, Anexo B) e RMN ^{13}C (Tabela 18, Anexo A; E27, Anexo B) desta substância, mostraram-se muito semelhantes ao da substância **LF7**, diferindo apenas que o grupo isoprenila agora está ligado ao oxigênio. Isto foi proposto baseado nos deslocamentos dos hidrogênios em δ 4,74 (1H, m, H-1'''), δ 4,65 (1H, m, H-1''') e do carbono em δ 70,4 (C-1'''), característico de carbono metilênico ligado a oxigênio. No espectro de RMN ^1H observou-se os demais sinais referentes ao grupo isoprenila em δ 5,31 (1H, tq, $J = 7,0$ e $1,3$, H-2'''), δ 1,49 (3H, s, 4'''-CH₃), δ 1,64 (3H, s, 5'''-CH₃) cujos deslocamentos foram confirmados pelo espectro de RMN ^{13}C pelos sinais em δ 139,3 (C-3'''), δ 119,1 (C-2'''), δ 17,9 (C-4''') e 25,6 (C-5''').

O mapa de contorno HMBC (Tabela 19, Anexo A; E29, Anexo B) mostrou correlação entre os sinais em δ 8,01 (H-2 e H-6) com o sinal da carbonila em δ 195,8 indicando a posição da mesma no C-7. Ainda pelo mapa de contorno de HMBC verificou-

se a correlação dos sinais em δ 4,74 (H-1a''') e δ 4,65 (H-1b''') com o carbono em δ 151,3 (C-2') e do sinal em 7,40 (H-6') com δ 106,8 (C-5'), δ 118,7 (C-3'), δ 151,3 (C-2') e δ 158,4 (C-4') assegurando assim a posição do grupo O-prenila no carbono C-2' do anel benzênico tetrassubstituído. Também se verificou a correlação deste sinal em 7,40 (H-6') com o carbono em δ 197,9 confirmando a posição da carbonila no C-9 (**Figura 20a**). Diante dessas informações propôs-se os isômeros **A** e **B** (**Figura 19**).

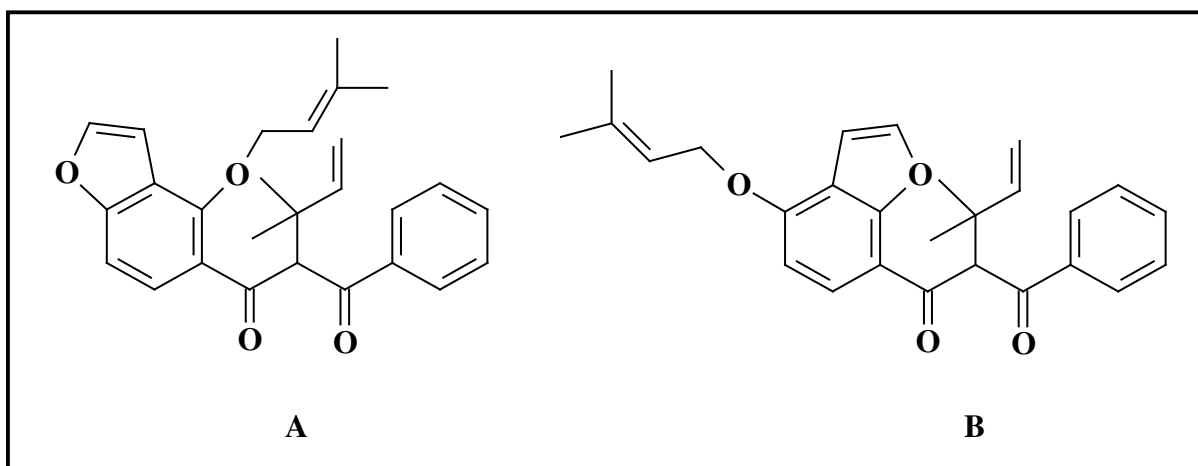


Figura 19 - Regioisômeros propostos para a substância **LF8**

A posição do grupo O-prenila no carbono C-2' foi confirmada por experimento de diferença de nOe (E30, Anexo B), onde a irradiação dos hidrogênios metilênicos do grupo O-prenila em δ 4,74 (H-1''''a) e 4,65 (H-1''''b) causou incrementos no sinal do hidrogênio do anel furano em δ 6,91 (H-3'') e nos hidrogênios metílicos do grupo α,α -dimetilalil em δ 1,19 (1''''CH₃). O espectro de HMBC também confirmou a posição deste grupo, como citado anteriormente, pela correlação dos hidrogênios em δ 4,74 (H-1a''') com δ 151,3 (C-2'). Diante destes resultados, definiu-se como correta a estrutura **A** (**Figura 19**).

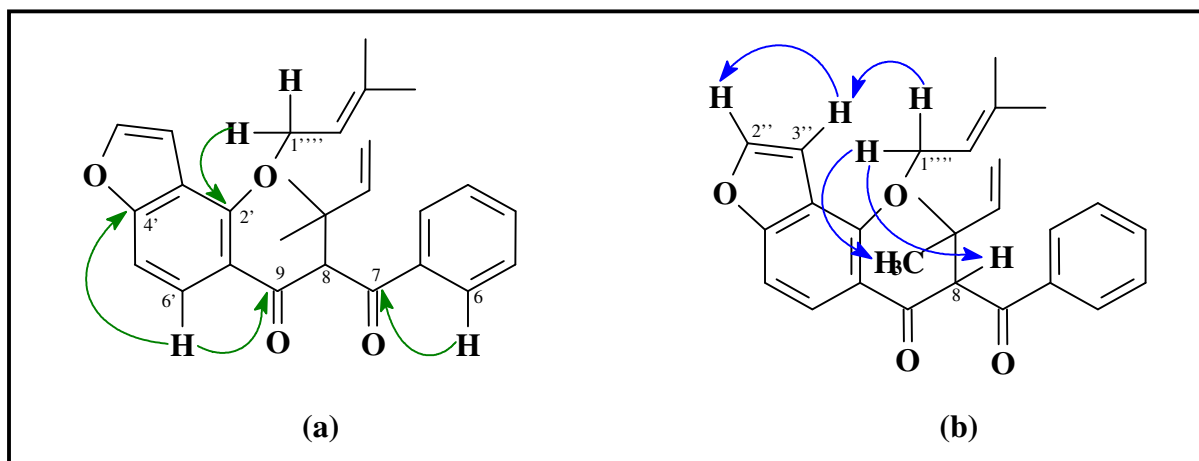


Figura 20 - (a) Algumas correlações verificadas no mapa de contorno HMBC (H, C, nJ) para **LF 8** (b) Alguns dos incrementos observados no experimento de diferença de nOe

O valor da rotação óptica observada para esta substância foi de $[\alpha]_{20}^D = -4,82$ na concentração de $0,435 \text{ g.mL}^{-1}$.

Esta substância também é um derivado de dibenzoilmetano, denominada de 2'-O-(3''''',3'''''-dimetilalil)-8-(α,α -dimetilalil)-furano(4'',5'':3',4')-dibenzoilmetano. Após levantamento bibliográfico no Scifinder, verificou-se que este produto natural também é inédito na literatura. Como citado anteriormente, esta classe de compostos com o grupo prenila modificado localizado no C-8, até o presente momento, foi isolado apenas de espécies de *Lonchocarpus*. Este é o sétimo relato deste grupo de substâncias neste gênero e na natureza.

4.9 Ensaios biológicos e químicos

As plantas, representam uma das mais ricas fontes de substâncias naturais com potencial bioativo. Do ponto de vista farmacológico são inúmeras as vantagens do uso destes compostos, dentre elas estão: alta diversidade estrutural, vasta variedade de efeitos biológicos e servem como modelo para o desenvolvimento de novas drogas análogas com maior atividade e/ou menor toxicidade (Rancan *et. al.*, 2002).

Apesar do avanço da síntese orgânica e surgimento de novos processos biotecnológicos, plantas medicinais e suas propriedades bioativas juntamente com seus princípios ativos puros, têm despertado o interesse de pesquisadores do mundo inteiro no intuito de encontrar novos agentes contra microrganismos causadores de doenças infecciosas, os quais adquirem resistência a antibióticos utilizados clinicamente bem como a descoberta de novos agentes quimioterápicos usados no tratamento de doenças como câncer e AIDS (Awal *et. al.*, 2004; Cushine *et. al.*, 2005).

Os flavonóides constituem um dos grupos de metabólitos secundários com grande potencial terapêutico, curativo e preventivo de várias enfermidades (Schenkel *et. al.*, 2004). Pesquisas têm demonstrado que algumas classes destas substâncias são responsáveis por ação antitumoral considerável, podendo agir como antivirais, anti-hemorrágicos, antiinflamatórios, antimicrobianos e antivirais (Harborne *et. al.*, 2000; Cushine *et. al.*, 2005), bem como atividades antialérgicas e prevenção de doenças coronárias (Pietta, 2000). Estes metabólitos, como citado anteriormente, têm se destacado por apresentarem atividades antioxidantes onde algumas de suas substâncias naturais possuem capacidade para proteger organismos e células de danos induzidos pelo stress oxidativo o qual tem sido considerado o agente causador de doenças degenerativas e câncer (El-Massry *et. al.*, 2002; Wu *et. al.*, 2005).

Diante do exposto, neste trabalho foram realizados ensaios de letalidade contra *Artemia salina* o qual é considerado um teste preliminar para avaliar a capacidade de

extratos ou substâncias puras com atividades inseticidas e/ou antitumorais (Awal *et. al*, 2004) e teste antimicrobiano dos extratos de EP, CH₂Cl₂ e MeOH das cascas e do cerne das raízes e de algumas das substâncias isoladas de *L. filipes*. Realizou-se o teste da atividade antioxidante para algumas das substâncias puras.

4.9.1 Ensaio de letalidade contra *Artemia salina*

Os extratos EP, CH₂Cl₂ e MeOH das cascas das raízes de *L. filipes* mostraram forte letalidade contra larvas de *Artemia salina*, com 100% de mortalidade dos microcrustáceos. Após as 24 h de incubação, no frasco controle, nenhum microcrustáceo morreu, confirmando a atividade dos extratos. A menor concentração de extrato utilizada no teste foi de 10 µg.mL⁻¹ e mesmo assim, verificou-se 100% de mortalidade, portanto são considerados extratos super ativos (CL₅₀ < 10 µg.mL⁻¹). Para calcular a concentração letal para matar 50% da população (CL₅₀) utilizou-se um teste estatístico denominado Probit. Neste caso não foi necessário utilizá-lo.

Os extratos EP, CH₂Cl₂ e MeOH do cerne das raízes de *L. filipes* mostraram-se tóxicos para *Artemia salina* (Tabela 4), sendo que o extrato que apresentou maior atividade foi o de diclorometano (CL₅₀= 0,51 µg.mL⁻¹).

Tabela 4 - Resultados obtidos das concentrações letais (CL₅₀) dos extratos e substâncias submetidos ao ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina*.

Amostras	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Extrato EP do cerne	2,76
Extrato CH ₂ Cl ₂ do cerne	0,51
Extrato MeOH do cerne	12,44
Extrato EP da casca	< 5,0
Extrato CH ₂ Cl ₂ da casca	< 5,0
Extrato MeOH da casca	< 5,0
Lanceolatina B (LF 1)	6,72
Pongamol (LF 2)	13,22
<i>E</i> -7-O-metoxipongamol (LF 3)	5,30
LF6	8,63
LF8	9,95

De acordo com a literatura consultada sobre estudo fitoquímico do gênero *Lonchocarpus*, na maioria das vezes, os flavonóides são encontrados em uma concentração considerável no extrato de diclorometano. Uma vez que os flavonóides vêm apresentando uma infinidade de atividades biológicas, sugeriu-se que esta maior atividade do extrato de CH_2Cl_2 do cerne se deva à presença desta classe de compostos no extrato.

Dentre as substâncias puras testadas, todas se mostraram ativas frente ao ensaio de letalidade contra *Artemia salina* sendo (*E*)-7-O-metoxipongamol **LF3** a substância que apresentou maior atividade com $\text{CL}_{50}=5,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seguida da lanceolatina B **LF1** com $\text{CL}_{50}=6,72 \mu\text{g.mL}^{-1}$, posteriormente a 2'-metoxi-[2'', 3'', 4', 3']-furnanodibenzoilmetano **LF6** com $\text{CL}_{50}=8,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 2'-O-(3'',3''-dimetilalil)-8-(α,α -dimetilalil)-furano-(4'',5'':3'4')-dibenzoilmetano **LF8** com $\text{CL}_{50}=9,95$ e pongamol **LF2** exibindo $\text{CL}_{50}=13,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Estes dados mostram que todos os flavonóides testados foram ativos contra o teste de toxicidade contra a *Artemia salina*.

4.9.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pela determinação da captação do radical DPPH (IC_{50}) pelas substâncias puras **LF1**, **LF2**, **LF3**, **LF6**, **LF7** e **LF8** e pelos padrões de ácido ascórbico e ácido cafeico. A porcentagem de inibição do radical DPPH para as amostras e padrões (0,5 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) está representada na **Figura 21**.

O padrão de ácido ascórbico apresentou $\text{IC}_{50} = 0,531 \mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstrando que possui atividade antioxidante mais significativa que o padrão de ácido cafeico $\text{IC}_{50} = 0,827 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Tabela 5**). Ao analisar a figura 21, verificou-se que dentre os flavonóides testados, apenas Pongamol **LF2** apresentou moderada atividade antioxidante $\text{IC}_{50} = 30,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$ quando comparado com as concentrações dos padrões DPPH. Para as outras substâncias, não observou atividade antioxidante significativa uma vez que possuem

atividade abaixo dos níveis de detecção quando comparados aos padrões ácido cafeico e ascórbico (Tabela 5) (Figura 22).

Tabela 5 – Atividade antioxidante dos padrões e das substâncias puras

Amostras/Padrões	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Ácido ascórbico	0,531
Ácido cafeico	0,827
Lanceolatina B (LF 1)	232,3
Pongamol (LF 2)	30,22
<i>E</i> -7-O-metoxipongamol (LF 3)	310,55
LF 6)	233,20
LF 7*	154,13
LF 8 [@]	135,98

[#]2'-methoxy-(2'',3'',4',3')-furandibenzoylmethane

^{*}2'-hydroxy-5'-(3''',3''''- dimethylallyl)-8-(α,α- dimethylallyl)-furan-(4'',5''':3'4')- dibenzoylmethane

[@]2'-O-(3'',3''- dimethylallyl)-8-(α,α- dimethylallyl)-furan-(4'',5''':3'4')- dibenzoylmethane

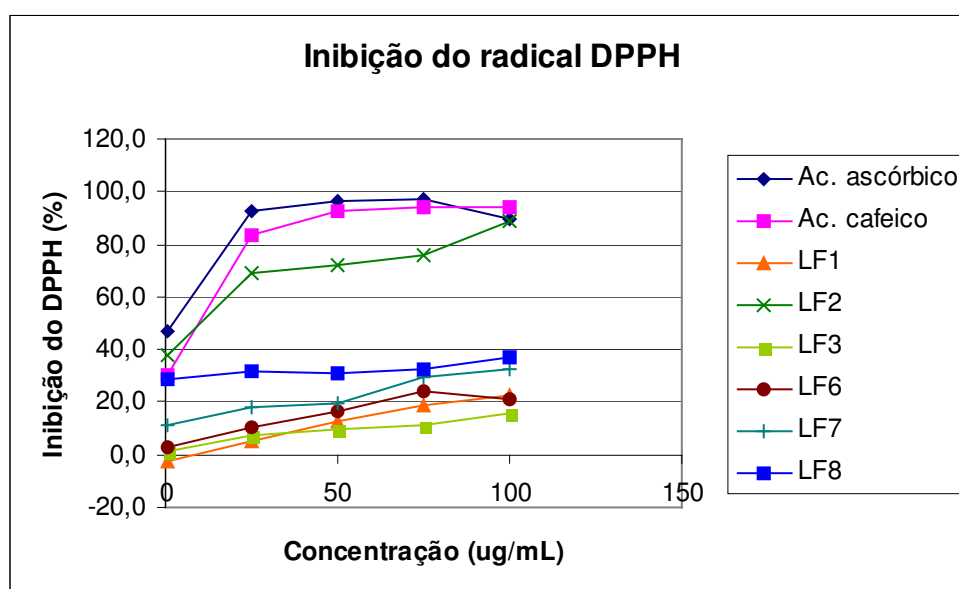


Figura 21 - Porcentagem de inibição do DPPH pelas amostras e padrões

Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois quanto maior o número de hidroxilas livres na estrutura do flavonóide maior a atividade como agente doador de hidrogênio e elétron e conseqüentemente maior a sua capacidade como agente antioxidante. Sendo que flavonóides monoiidroxilados apresentam atividade antioxidante muito baixa (Cooper-Driver, 1998; Barreiros *et. al.*, 2006).

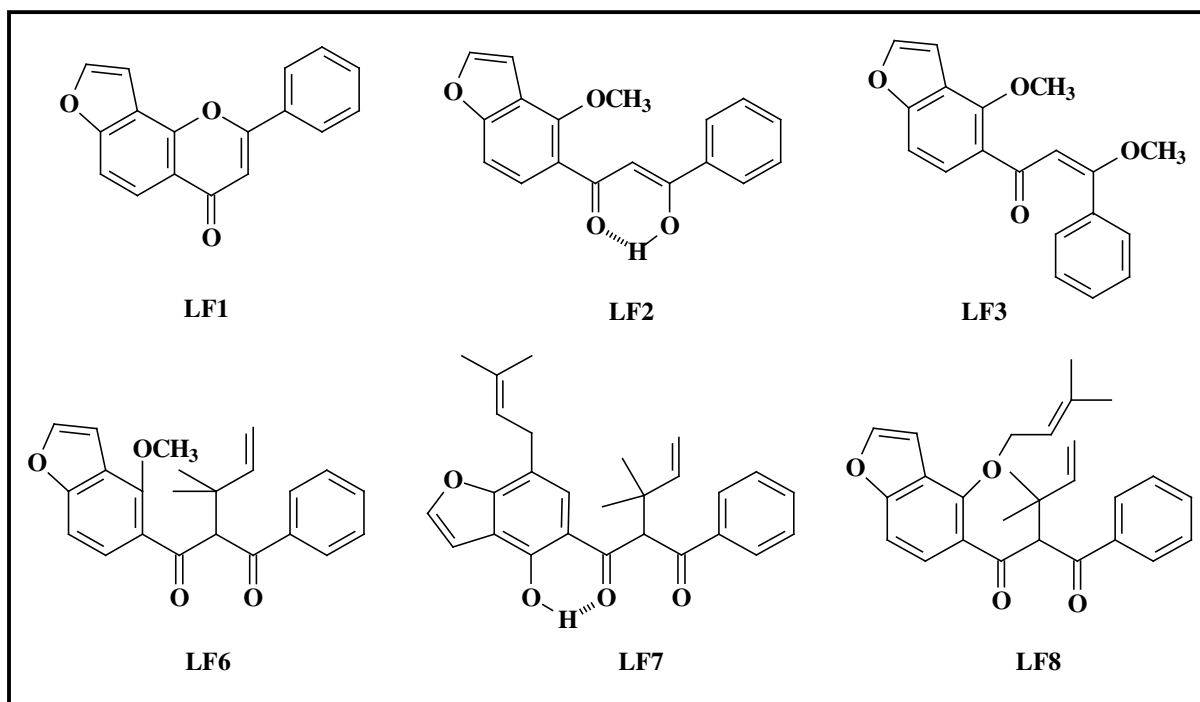


Figura 22 – Substâncias submetidas ao teste de atividade antioxidante

A maior atividade apresentada por pongamol **LF2** (**Figura 22**) em relação às outras substâncias testadas, pode ser justificada pelo equilíbrio ceto-enólico aliado à ocorrência de ligação de hidrogênio intramolecular, tornando o hidrogênio da hidroxila em C-7 ou C-9 mais lábil que o habitual de ligações de hidrogênio. Com a saída deste hidrogênio como radical, ocorre a estabilização do radical flavanoil formado através da ressonância com a carbonila e com as ligações duplas conjugadas da estrutura (Barreiros *et. al.*, 2006; Hansen *et. al.*, 2006).

A atividade antioxidante dos flavonóides também está relacionada à estabilidade do seu radical formado, pois quando o flavonóide doa um hidrogênio radicalar, sua estrutura

fica como radical, o qual não deve ser reativo para não propagar a reação em cadeia. No caso dos flavonóides estes radicais são estabilizados pela presença dos grupos 4-carbonila e grupos hidroxílicos nas posições 5 ou 3. A insaturação do anel C ou localizada entre os três átomos de carbono que interligam os anéis A e B também influencia na estabilidade deste radical (Cooper-Driver *et. al.*, 1998; Barreiros *et. al.*, 2006).

4.9.3 Atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana)

Os extratos de EP, CH₂Cl₂ e MeOH do cerne e das cascas das raízes de *L. filipes* foram testados contra 10 bactérias e um fungo (Tabela 3), sendo que apenas o extrato de EP das cascas apresentou moderada atividade antimicrobiana na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ somente contra a bactéria *Rodococcus equi*. Os extratos foram testados nas concentrações de 1,0 a 0,015 mg.mL⁻¹, sendo que neste teste são consideradas ativas as amostras com CIM ≤ 1,0 mg.mL⁻¹ (Ellof, 1998).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies de *Lonchocarpus* que já foram quimicamente estudadas possuem um predomínio de flavonóides. Os dibenzoilmentanos constituem uma classe de flavonóides raramente encontrados na natureza (Magalhães *et. al.*, 1997, Nogueira, *et. al.*, 2003).

O estudo fitoquímico do extrato de diclorometano das cascas das raízes de *L. filipes* resultou no isolamento de oito flavonóides. Com exceção da flavona, todas as demais substâncias pertencem à classe dos dibenzoilmetanos dos quais **LF5**, **LF7** e **LF8** são inéditos na literatura e a substância **LF4** é descrita agora como produto natural.

A presença de derivados de dibenzoilmetanos em *L. filipes* é de importante relevância quimiotaxonômica para a sistemática do gênero *Lonchocarpus*, pois estes metabólitos secundários apresentam ocorrências isoladas somente em gêneros da família Leguminosae que possuem afinidades com *Lonchocarpus* como *Tephrosia*, *Milletia* e *Pongamia*. Estes resultados confirmam a proximidade cladística destes quatro gêneros.

O isolamento de Lanceolatina B (**LF1**), Pongamol (**LF2**), (*E*)-7-O-metoxipongamol (**LF3**) e 2'-metoxi-[2'',3'',4',3']-furanodibenzoilmetano (**LF6**) confirma as afinidades existentes entre as espécies *L. filipes* e *L. montanus*. A primeira está alocada na seção *Laxiflori* enquanto *L. montanus* pertence à seção *Unguiflori* as quais de acordo com Tozzi (1989) possuem características morfológicas bastante semelhantes. Estes resultados mostram que além da proximidade vegetativa destas duas seções há também uma proximidade na composição química das espécies que as compõe. *L. campestris*, Firmino (1998) está classificada na mesma seção que *L. filipes* e, no entanto não há nenhuma proximidade química dos componentes isolados de tais espécies. Estes dados são de grande importância quimiotaxonômica para uma posterior reclassificação das espécies.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGANGA, A. A.; MOSASE, K. W.. 2001. Tanin content, nutritive nvalue and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capassa*, *Zizyphus mucronata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology* 91, 107-113.
- ANDERSEN, O. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.. 2006. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. London: 1ª ed Taylor & Francis Group, 1006-1007p.
- ANDRADE, A. C.; COSTA, K. C.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A.. 2007. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyrifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17,231-235.
- AWAL, M. A.; NAHAR, A.; HOSSAIN, M. S.; BARI, M.A.; RAHMAN, M.; HAQUE, M. E. A.. 2004. Brine Shrimp toxicity of leaf and seed extracts of *Cassia alata* Linn. and their antibacterial potency. *Journal Medicinal Science* 4,188-193.
- BARREIROS, A. L. B. S; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova*, 29, 113-126.
- BORGES-ARGÁEZ, R. B.; RODRIGUEZ, L. M. P.; WATERMAN, P. G.. 2002. Flavonoids from two *Lonchocarpus* species of the Yucatan Peninsula. *Phytochemistry* 60, 533-540.
- BORGES-ARGÁEZ-, R.; BALNBURY, L.; FLOWERS, A.; GIMÉNEZ-TURBA, A.; RUIZ, G.; WATERMAN, P. G.; PEÑA- RODRÍGUEZ, L. M.. 2007. Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus* spp.. *Phytomedicine* doi:10.1016/j.phymed.2006.11.027.
- CHILPA, R. R.; BAGGIO, H. C.; SOLANO, A. D.; MUÑIZ E. E.; KAUFFMAN, C. F.; SANCHEZ, I. R.; VELA, M. S.. 2006. Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 167-172.

- COOPER-DRIVER, G. A.; BHATTACHARYA, M.. 1998. Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry* 38, 1165-1174.
- COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELOS, M.. 2003. Substâncias carboniladas e derivados. Série Química Orgânica. Porto Alegre: 1ª ed. Bookman Ltda, 54p.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G.. Natural Products (Secondary Metabolites). *In*: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, cap. 24.
- CUSHINE, T. P. T.; LAMB, A. J.. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 343-356.
- DEWICK, P.M. 2001. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Chichester: 2ª ed. John Wiley & Sons, Ltda, 5 e 6p, 135, 145-149p.
- DUTRA, V. F.; MESSIAS, M. C. T. B.; GARCIA, F. C. P.. 2005. Papilionoideae (Leguminosae) nos campos ferruginosos do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: florística e fenologia. *Revista Brasileira de Botânica* 28, 493-504.
- EL-MASSRY, K. F.; EL-GHORAB, A. H., FAROUK, A.. 2002. Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L.. *Food Chemistry* 79, 331-336.
- ELLOF, J.N., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64, 711-713.
- FIRMINO, C. A. Estudo fitoquímico das raízes de *Lonchocarpus campestris*-Tozzi - Campinas, 1998, Tese de Doutorado em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.
- FUMIYUKI, K.; CHENG, X.; TSUDA, Y.. 1990. Z-E Isomerization of β -metohoxychalcones: preferred existence of E-isomers in naturally occurring β -metohoxychalcones. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 38, 1862-1871.
- GOTTLIEB, O.R. 1990. Phytochemicals: Differentiation and function. *Phytochemistry* 29, 1715-1724.

- GUPTA, R. K.; KRISHNAMURTI, M.. 1977. New dibenzoylmethane and chalcone derivatives from *Milletia ovalifolia* seeds. *Phytochemistry* 16, 1104-1105.
- HANSEN, K. V.; WINTHER, M.; SPANGET-LARSEN.. 2006. Intramolecular hydrogen bonding. Spectroscopic and theoretical studies of vibrational transitions in dibenzoylmethane enol. *Journal of Molecular Structure* 790, 74-79.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A.. 2000. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEYER, R. J.. 1993. Relevance of Seed Polysaccharides and Flavonoids for the Classification of the Leguminosae – A Chemotaxonomic Approach . *Phytochemistry* 34, 3-16.
- HOSTETTMANN, K IOSET, J. R.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P.. 2001. Five New Prenylated Stilbenes from the Root Bark of *Lonchocarpus chiricanus*. *Journal Natural Products* 64, 710-715.
- JACKSON, K. M.; DELEON, M.; VERRET, R., HARRIS, W. B.. 2002. Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells. *Cancer Letters* 178, 161-165.
- MACEDO, F. C. J.. 2007. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. *Química Nova* 30, 116-124.
- MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; SALES, B. H. L. N.; MAGALHÃES, E. G.1996. Twenty-three Flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens* roots. *Phytochemistry* 42, 1459-1471.
- MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; BLANCO, I. S.; NOGUEIRA, M. A. 1997. Three Dibenzoylmethane Derivatives from *Lonchocarpus* species. *Phytochemistry* 46, 1029-1033.

- MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; BLANCO, I. S.; SORIANO, M. D. P. C.. 2004. Flavonoids from *Lonchocarpus muehbergianus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 76, 651-661.
- MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; NOGUEIRA, M. A.; QUEIROZ, S. C. N.. 2000. Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots. *Phytochemistry* 55, 787-792.
- MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; SALES, B. H. L. N.; MAGALHÃES, E. G.; SANNOMIYA, M.; SORIANO, M. D. P. C.; PEREZ, M. A. F.. 2007. Flavonoids from *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79, 351-367.
- MBAFOR, J. T.; ATCHADE, A. T.; NKENGFAK, A. E.; FOMUM, Z. T.; STERNER, O.. 1995. Furanoflavones from root bark of *Millettia sanagana*.. *Phytochemistry* 40, 949-952.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L.. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal Medicinal Plant Research* 45, 31-34.
- NOGUEIRA, M. A.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; BILOTI, D. N.; LAVERDE, A.; PESSINE, A. B. T.; CARVALHO, J. E.; KHON, L. K.; ANTÔNIO, M. A.; MARSAIOLI, A. J.. 2003. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. *Il Farmaco*, 58, 1163-1169.
- PARMAR, V. S.; RATHORE, J. S.; JAIN, R.; HENDERSON, D. A.; MALONE, J. F.. 1989. Occurrence of pongamol as the enol structure in *Tephrosia purpurea*. *Phytochemistry* 28, 591-593.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.. 2001. Introduction to spectroscopy. Bellingham: 3^a ed. Books/Cole, 125p.

- PELTER, A.; WARD, R. S.. 1981. 8-Substituted flavonoids and 3'-substituted 7-oxygenated chalcones from *Tephrosia purpurea*. *Journal Chemical Society - Perkin Transactions I* 9, 2491-2498.
- PEREZ, M. A. F.. Diterpenos de *Myrocarpus frondosus* Allemão: Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica-Campinas, 2005, Dissertação de Mestrado em Química, Instituto de Química, Unicamp.
- PIETTA, P. G.. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal Natural Products* 63, 1035-1042.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A.. 2002. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*. 25: (Supl. 1) 45 – 61.
- RANCAN, F.; ROSAN, S.; BOEHM, K.; FERNANDEZ, E.; HIDALGO, M. E.; QUIHOT, W.; RUBIO, C.; PIAZENA, H.; OLTMANN, U.. 2002. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology* 68, 133–139.
- RIJE, E.; OUT, P.; NIESEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER C.; BRINKMAN U. A.. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112, 31-63.
- SALES, B. H. L. N. Flavonóides de *Lonchocarpus subglaucescens* (Benth) – Leguminosae e síntese de β -hidroxichalconas - Campinas, 1994, Tese de Doutorado em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.
- SANNOMIYA, M.. Análise fitoquímica de *Platymiscium floribundum* var. *latifolium* e *Lonchocarpus Montanus*. Isolamento, determinação estrutural e atividade biológica - Campinas, 1994, Tese de Doutorado em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R.. 2004 Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M.O.; Schenkel, E.P.;

- Gosmann, G.; Mello, J.C.P. de; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed. rev. ampl., Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS, cap. 15.
- SCHIJLEN, E. G. W. M.; VOS, C. H. R.; TUNEN, A. J., BOVY, A. G.. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65, 2631-2648.
- SEYOUM, A.; ASRES, K.; EL-FIKY, F. K.. 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* doi:10.1016/j.phytochem.2006.07.002.
- SILVERSTEIN, R. M.; MARKHAN, K. N.. 2005. Spectroscopic identification of organics compounds. EUA: 7ª ed. Jhon Wiley & Sons, INC, 140p.
- TANAKA, T.; IINUMA M.; YUKI, K.; FUJII, Y.; MIZUNO, M.. 1992. Flavonoids in root bark of *Pongamia pinnata*. *Phytochemistry* 31, 993-998.
- TOZZI, A. M. G. A.. Estudos taxonômicos dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil – Campinas, 1989, Tese de Doutorado em Biologia, Instituto de Biologia, Unicamp.
- TOZZI, A. M. G. A.. 1992. *Lonchocarpus monilis* (L.) Az. – Tozzi, comb. Nov. (Leguminosae – Papilionoideae): considerações nomenclaturais e taxonômicas. *Rev. Bras. Bot.*, 15(2), 151-155.
- TOZZI, A. M. G. A.. 1998. A identidade do timbó-verdadeiro: *Deguelia utilis* (A.C.Sm.) A.M.G.Azevedo (Leguminosae – Papilionoideae). *Revista Brasileira de Biologia* 58 511-516.
- TOZZI, A. M. G. A.; SILVA, M. J.. 2007. Sinonimizações em *Lonchocarpus* Kunth (Leguminosae - Papilionoideae - Millettieae). *Rodriguésia* 58, 275-282.
- VELLOSA, J. C. R.; Barbosa, V. F., Khalil, N. M.; Santos, A. F. F. M.; Furlan, M.; Brunetti, I. L.; Oliveira, O. M. M. F.. 2007. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. *Brazilian Journal of Pharmaceutica Sciencies* 43, 447-453.

- WATERMAN, P. G.; MAHMOUD, E. N.. 1985. Flavonoids from the seeds of *Lonchocarpus costaricensis*. *Phytochemistry* 24, 571-574.
- WINK, M.. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64, 3-19.
- WINK, M.; MOHAMED, G. I. A.. 2003. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 897-917.
- WONG, E.. 1968. The role of chalcones and flavanones in flavonoid biosynthesis. *Phytochemistry* 7, 1751-1758.
- WU, J. H.; TUNG, Y. T.; WANG, S. Y.; SHYUR, L. F.; KUO, Y. H.; CHANG, S.T.. 2005. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5917-5921.

ANEXO A

Tabela 6 - Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) e RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância **LF1**

C/H	δ_{C}	δ_{H}
1	-	-
2	162,6	-
3	107,9	6,87 (1H, s)
4	178,2	-
5	121,7	8,15 (1H, d, 8,8 Hz)
6	110,1	7,54 m
7	158,3	-
8	117,1	-
9	150,7	-
10	119,2	-
1'	131,6	-
2' e 6'	126,1	7,96 (2H, m)
3' e 5'	129,0	7,54 m
4'	131,5	7,54 m
2''	145,8	7,77 (1H, d, 2,0 Hz)
3''	104,1	7,20 (1H, dd, 2,0 e 0,8 Hz)

Tabela 7 - Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) e RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância **LF2**

C/H	δ_{C}	δ_{H}
1	135,6	-
2 e 6	127,0	7,99 (2H, dd, 7,6 e 1,4 Hz)
3 e 5	128,6	7,50 m
4	132,1	7,50 m
7	184,2	-
8	97,8	7,16 (1H, s)
9	186,0	-
1'	122,1	-
2'	153,7	-
3'	119,5	-
4'	158,6	-
5'	107,0	7,30 (1H, d, 8,6 Hz)
6'	126,0	7,87(1H, d, 8,6 Hz)
2''	144,8	7,62 (1H, d, 2,0 Hz)
3''	105,2	6,99 (1H, d, 2,0 Hz)
OCH ₃	61,1	4,13 (3H, s)
OH	-	16,92 (1H, s)

Tabela 8 - Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) e RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **LF 3**

C/H	δ_{C}	δ_{H}
1	135,6	-
2 e 6	128,8	7,44 (2H, m)
3 e 5	127,5	7,30 (2H, m)
4	129,5	7,30 (1H, m)
7	170,5	-
8	103,1	6,30 (1H, s)
9	190,9	-
1'	127,5	-
2'	152,7	-
3'	119,0	-
4'	158,1	-
5'	106,4	7,15 (1H, dd, 8,4 e 0,8 Hz)
6'	126,7	7,50 (1H, d, 8,4 Hz)
2''	144,5	7,57 (1H, d, 2,1 Hz)
3''	105,0	6,91 (1H, d, 2,1 e 0,8 Hz)
Ar-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	61,3	4,09 (3H, s)
R-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	56,3	3,88 (3H, s)

Tabela 9 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, 1J) e HMBC (C-H, nJ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃) da substância **LF3**

δ_H	(H-C, J^1)	(H-C, J^n)
3,88	56,3	103,1(C-8) e 170,5 (C-7')
4,09	61,3	152,7 (C-2')
6,30	103,1	127,5 (C-1'), 135,6 (C-1), 170,5 (C-7) e 190,9 (C-9)
6,91	105,0	119,0 (C-3'), 144,5 (C-2'') e 158,1 (C-4')
7,15	106,4	119,0 (C-3'), 144,5 (C-2''), 152,7f (C-2') e 158,1 (C-4')
7,30	127,5	128,8 (C-2 e C-6) e 135,3 (C-1)
7,44	128,8	129,5 (C-5 e C-3), 135,3 (C-1) e 170,5 (C-7)
7,50	126,7	152,7 (C-2'), 158,1 (C-4') e 190,9 (C-9)
7,57	144,5	119,0 (C-3') e 158,1 (C-4').

Tabela 10 - Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) e RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **LF4**

C/H	δ_{C}	δ_{H}
1	139,7	-
2 e 6	127,9	7,88 (2H, m)
3 e 5	128,1	7,35-7,39 (2H, m)
4	131,8	7,45 (1,m)
7	189,9	-
8	99,7	6,40 (1H, s)
9	169,3	-
1'	121,1	-
2'	150,9	-
3'	118,4	-
4'	157,4	-
5'	106,1	7,15(1H, d, 8,4 Hz)
6'	126,0	7,20 (1H, dd , 8,4 e 0,8 Hz)
2''	144,1	7,55 (1H, d, 2,0 Hz)
3''	105,1	6,90 (1H, dd, 2,0 e 0,8 Hz)
Ar-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	60,3	3,98 (3H, s)
R-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	56,3	3,93 (3H, s)

Tabela 11 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, 1J) e HMBC (C-H, nJ) (H 400 MHz, C 100 MHz, $CDCl_3$,) da substância **LF4**

δ_H	(H-C, 1J)	(H-C, nJ)
3,93	56,3	169,3 (C-9)
3,98	60,3	150,9 (C-2')
6,40	99,7	121,1 (C-1'), 169,3 (C-9) e 189,9 (C-7)
6,90	105,1	118,4 (C-3'), 144,1 (C-2'') e 157,4 (C-4')
7,15	126,0	150,9 (C-2'), 157,4 (C-4') e 169,3 (C-9)
7,20	106,1	118,4 (C-3'), 121,1 (C-1'), 157,4 (C-4') e 150,9 (C-2')
7,35-7,39	128,1 (2C)	127,9 (C-2 e C-6) e 139,7 (C-1)
7,45	131,8	127,9 (C-2 e C-6)
7,55	144,1	118,4 (C-3') e 157,4 (C-4')
7,88	127,9 (2C)	128,1 (C-3 e C-5), 131,8 (C-4) e 189,9 (C-7)

Tabela 12 - Dados de RMN¹³C (CDCl₃, 100 MHz) e de RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) da substância **LF5**

C/H	δ _C	δ _H
1	129,0	-
2	107,6	6,92 (1H, d, 1,6 Hz)
3	146,9	-
4	148,9	-
5	109,6	6,72 (1H, d, 8,0 Hz)
6	123,7	7,00 (1H, dd, 8,0 e 1,6 Hz)
7	170,2	-
8	101,9	6,24 (1H, s)
9	190,0	-
1'	127,2	-
2'	155,4	-
3'	114,5	-
4'	156,7	-
5'	112,4	6,54 (1H, dd, 8,4 e 0,8 Hz)
6'	131,1	7,40 (1H, d, 8,4 Hz)
2''	77,6	-
3''	130,3	5,66 (1H, d, 10,0 Hz)
4''	116,6	6,57 (1H, dd, 10,0 e 0,56 Hz)
2'''	101,2	5,94 (2H, s)
2''-CH ₃	27,9	1,42 (6H, s)
R-OCH ₃	56,4	3,85 (3H, s)
Ar-OCH ₃	63,3	3,80 (3H, s)

Tabela 13 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, 1J) e HMBC (C-H, nJ) (H 400 MHz, C 100 MHz, $CDCl_3$,) da substância **LF5**

δ_H	(H-C, 1J)	(H-C, nJ)
1,42	27,9	77,6 (C-2'') e 130,3 (C-3'')
3,80	63,3	155,4 (C-2')
3,85	56,4	170,2 (C-7) e 101,9 (C-8)
5,66	130,3	27,9 (2''- $\underline{C}H_3$), 77,6 (C-2'') e 114,5 (C-3')
5,94	101,2	146,9 (C-3) e 148,9 (C-4)
6,24	101,9	129,0 (C-1) e 170,2 (C-7)
6,54	112,4	114,5 (C-3'), 127,2 (C-1') e 156,7 (C-4')
6,57	-	77,6 (C-2''), 114,5 (C-3'), 156,7 (C-4') e 155,4 (C-2')
6,72	-	129,0 (C-1) e 148,9 (C-4)
6,92	-	123,7 (C-6), 146,9 (C-3) e 170,2 (C-7)
7,00	-	109,6 (C-5)
7,40	131,1	155,4 (C-2'), 156,7 (C-4') e 190,0 (C-9)

Tabela 14 - Dados de RMN¹³C (CDCl₃, 100 MHz) e de RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) da substância **LF6**

C/H	δ _C	δ _H
1	138,7	-
2 e 6	128,8	8,02 (2H, m)
3 e 5	128,4	7,44 m
4	132,6	7,53 (1H, tt, 7,2 e 1,2 Hz)
7	195,4	-
8	66,8	5,74 (1H, s)
9	197,6	-
1'	127,2	-
2'	152,3	-
3'	117,4	-
4'	158,7	-
5'	106,6	7,18 (1H, dd, 8,8 e 0,8 Hz)
6'	126,7	7,44 m
2''	144,7	7,58 (1H, d, 2,4 Hz)
3''	105,5	6,93 (1H, dd, 2,4 e 0,8)
1'''	41,6	-
2'''	146,1	6,08 (1H, dd, 17,1 e 10,4 Hz)
3a'''	111,5	4,93 (1H, dd, 17,1 e 0,8 Hz)
3b'''	111,5	4,86 (1H, dd, 10,4 e 0,8 Hz)
1''' - <u>C</u> H ₃	26,4	1,21 (3H, s)
1''' - <u>C</u> H ₃	25,8	1,23 (3H, s)
2' - O <u>C</u> H ₃	60,1	3,84 (3H, s)

Tabela 15 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, 1J) e HMBC (C-H, nJ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃,) da substância **LF 6**

δ_H	(H-C, 1J)	(H-C, nJ)
1,21	26,4	25,8 (1'''-CH ₃), 41,6 (C-1'''), 66,8 (C-8) e 146,1 (C-2''')
1,23	25,8	26,4 (1'''-CH ₃), 41,5 (C-1'''), 66,8 (C-8) e 146,1 (C-2''')
3,84	60,1	152,3 (C-2'), 105,5 (C-3'') e 117,4 (C-3'')
4,88	111,5	41,6 (C-1''') e 146,1 (C-2''')
4,93	111,5	41,6 (C-1''') e 146,1 (C-2''')
5,74	66,8	25,8 (1'''-CH ₃), 41,6 (C-1'''), 146,1 (C-2'''), 195,4 (C-7) e 197,6 (C-9)
6,08	146,1	26,4 (1'''-CH ₃), 41,5 (C-1'''), 66,8 (C-8) e 111,5 (C-2''')
6,93	105,5	117,4 (C-3'), 144,7 (C-2'') e 158,7 (C-4')
7,18	106,6	117,4 (C-3'), 126,7 (C-6'), 158,7 (C-4') e 127,2 (C1')
7,44	126,7	128,8*(C-2), 138,7 (C-1), 132,6 (C-4)
7,44	128,4* (2C)	106,6 (C-5'), 117,4 (C-3'), 152,3 (C-2'), 158,7 (C-4') e 197,6 (C-9)
7,53	132,6	128,8* (C-2 e 6), 128,4* (C-3 e 5)
7,58	144,7	105,5 (C-3''), 117,4 (C-3') e 158,7 (C-4')
8,02	128,8*	128,4* (C-3 e 5), 132,6 (C-4) e 195,4 (C-7)

* Valores intercambiáveis

Tabela 16 - Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) e RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **LF7**

C/H	δ_{C}	δ_{H}
1	137,9	-
2 e 6	128,7	7,95 (2H, m)
3 e 5	128,4	7,42 (2H, m)
4	133,2	7,53 (1H, dt, 7,2 e 2,0 Hz)
7	194,0	-
8	62,1	5,54 (1H, s)
9	199,8	-
1'	114,6	-
2' e 4'	158,5	-
3' e 5'	117,5	-
6'	125,6	7,56 (1H, sl)
2''	144,4	7,58 (1H,d, 2,0 Hz)
3''	105,3	6,97 (1H, d, 2,0 Hz)
1'''	41,5	-
2'''	145,8	6,20 (1H, dd, 17,6 e 10,8 Hz)
3a'''	112,0	5,03 (1H, dd, 17,6 e 0,8 Hz)
3b'''	112,0	4,98 (1H, dd, 10,8 e 0,8 Hz)
1''''	27,3	3,50 (2H, d, 7,6 Hz)
2''''	120,9	5,33 (1H, tq, 7,2 e 1,3 Hz)
3''''	134,1	-
4'''' - CH_3	17,8	1,73 (3H, sl)
5'''' - CH_3	25,7	1,79 (3H, sl)
1''' - $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	26,0*	1,31* (3H, sl)
1''' - $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	26,3*	1,33* (3H, sl)
OH	-	13,16 (1H, s)

*Valores intercambiáveis.

Tabela 17 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, ^1J) e HMBC (C-H, ^nJ) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF7**

δ_{H}	(H-C, ^1J)	(H-C, ^nJ)
1,31	26,0*	*26,3 ($1''''\text{-CH}_3$), 41,5 (C-1'''), 62,10 (C-8), 112,0 (C-3''') f e 145,8 (C-2''')
1,33	26,3*	*26,0 ($1''''\text{-CH}_3$), 41,5 (C-1'''), 62,1 (C-8), 112,0 (C-3''') f e 145,8 (C-2''')
1,73	-	25,7 (C-5'''), 120,9 (C-2''') e 134,1 (C-3''')
1,79	25,7	17,8 (C-4'''), 120,9 (C-2''') e 134,1 (C-3''')
3,50	27,3	117,5 (C-5'), 120,9 (C-2'''), 125,6 (C-6'), 134,1 (C-3''') e 158,7 (C-4')
4,98	112,0	41,5 (C-1''') e 145,8 (C-2''')
5,03	112,0	41,5 (C-1'''), 62,10 (C-8) e 145,8 (C-2''')
5,33	120,9	17,8 (C-4'''), 25,6 (C-5''') e 27,3 (C-1''')
5,54	62,1	26,3 ($1''''\text{-CH}_3$), 41,5 (C-1'''), 114,6 (C-1'), 145,8 (C-2'''), 194,0 (C-7) e 199,8 (C-9)
6,20	145,8	26,3 ($1''''\text{-CH}_3$), 41,5 (C-1''') e 62,10 (C-8)
6,97	105,3	117,5 (C-3'), 144,4 (C-2'') e 158,5 (C-2')
7,42	128,7	128,7 (C-2- e C-6), 137,9 (C-1)
7,53	133,2	128,4 (C-3 e C-5)
7,56	125,2	27,3 (C-1'''), 114,6 (C-1'), 117,5 (C-5'), 158,5 (C-4' e C-2') e 199,8 (C-9)
7,58	144,4	158,5 (C-4') e 117,5 (C-3'),
7,95	128,4	128,4 (C-3 e C-5), 133,2 (C-4) e 194,0 (C-7)
13,16	-	114,6 (C-1'), 117,5 (C-3'), 158,5 (C-2') e 199,8 (C-9)

* Valores intercambiáveis

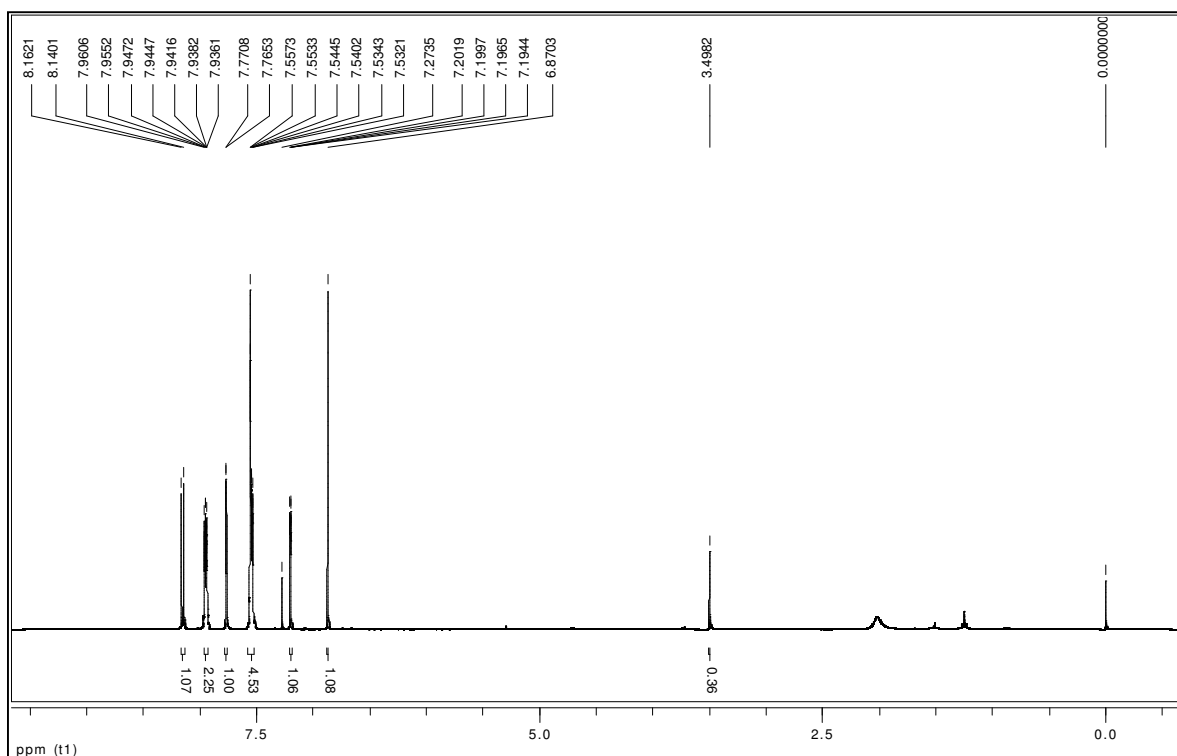
Tabela 18 - Dados de RMN¹³C (CDCl₃, 100 MHz) e RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) da substância **LF8**

C/H	δ_C	δ_H
1	138,7	-
2 e 6	128,8	8,01 (2H, m)
3 e 5	128,2	7,40 (2H, m)
4	132,5	7,50 (1H, tt, 7,3 e 1,2 Hz)
7	195,8	-
8	66,5	5,87 (1H, s)
9	197,9	-
1'	128,3	-
2'	151,3	-
3'	118,7	-
4'	158,4	-
5'	106,8	7,18 (1H, dd, 8,6 e 0,96 Hz)
6'	126,7	7,40 (1H, m)
2''	144,7	7,58 (1H, d, 2,2 Hz)
3''	105,5	6,91 (1H, dd, 2,2 e 0,9 Hz)
1'''	41,5	-
2'''	145,8	6,09 (1H, dd, 17,4 e 10,7 Hz)
3a'''	111,4	4,91 (1H, dd, 17,4 e 1,1 Hz)
3b'''	111,4	4,83 (1H, dd, 10,7 e 1,1 Hz)
1a''''	70,4	4,74 (1H, m)
1 b''''	70,4	4,65 (1H, m)
2''''	199,1	5,31(1H, tq, 7,0 e 1,3 Hz)
3''''	139,3	-
4'''' - CH ₃	17,8	1,49 (3H, s)
5'''' - CH ₃	25,6	1,64 (3H, s)
1''' - <u>C</u> H ₃	26,1	1,19 (3H, s)
1''' - <u>C</u> H ₃	26,1	1,19 (3H, s)

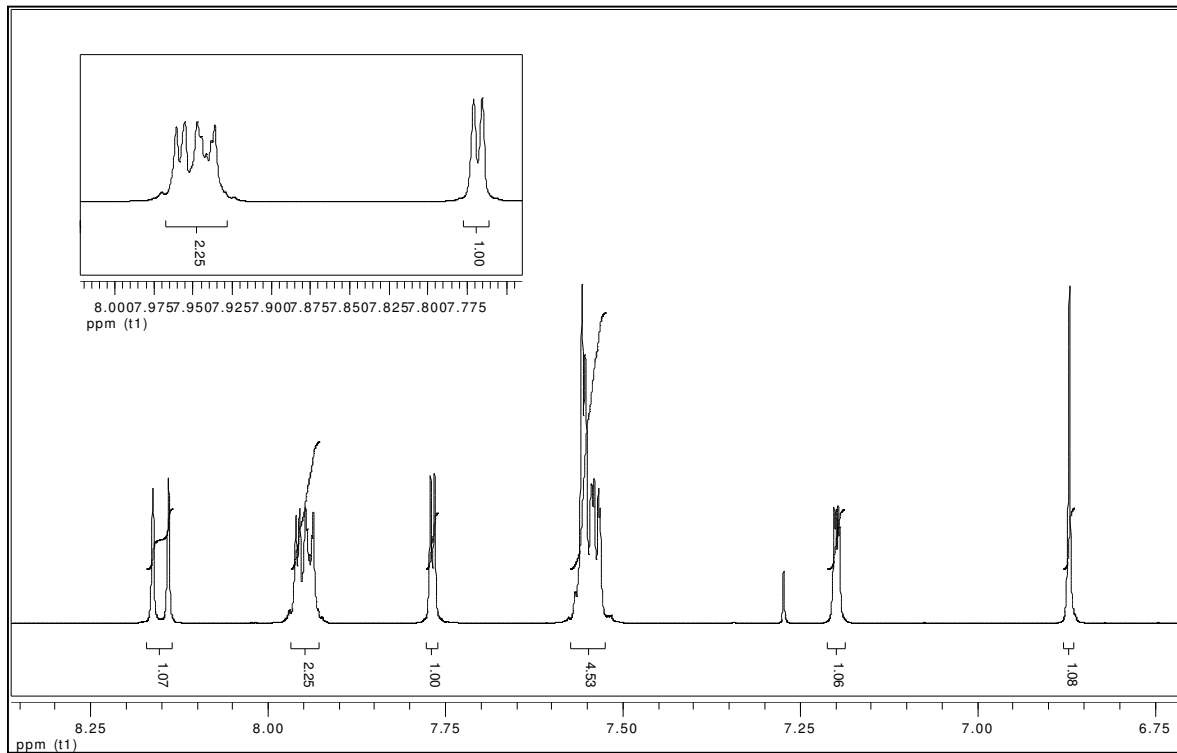
Tabela 19 - Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, J^1) e HMBC (C-H, J^n) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3 ,) da substância **LF8**

δ_H	(H-C, J^1)	(H-C, J^n)
1,19	26,1	26,1 (2CH_3 -1'''), 41,4 (C-1'''), 66,5 (C-8), 111,4 (C-3''') e 146,0 (C-2''')
1,49	17,9	25,6 (5''''-CH ₃), 119,1 (C-2''''') e 139,3 (C-3''''')
1,64	25,6	17,9 (4''''-CH ₃), 119,1 (C-2''''') e 139,3 (C-3''''')
4,70	70,4	119,1 (C-2'''''), 139,3 (C-3''''') e 151,3 (C-2')
4,83	11,4	41,4 (C-1'''), 66,5 (C-8)* e 146,0 (C-2''')
4,91	111,4	41,4 (C-1''') e 146,0 (C-2''')
5,31	119,1	17,9 (4''''-CH ₃) e 25,6 (5''''-CH ₃)
5,87	66,5	41,4 (C-1'''), 146,0 (C-2'''), 195,8 (C-7), 197,2 (C-9) e 26,1 (2CH_3 -1''')
6,09	146,0	26,1 (2CH_3 -1'''), 41,4 (C-1''') e 66,5 (C-8)
6,91	105,5	118,7 (C-3'), 144,7 (C-2'') e 158,4 (C-4')
7,18	106,8	118,7 (C-3'), 126,7 (C-6'), 128,3 (C-1'), 151,3 (C-2') e 158,4 (C-4').
7,40	128,2 (2C) e 126,7	128,2 (C-2 e C-6), 138,7 (C-1), 106,8 (C-3'), 118,7 (C-3'), 151,3 (C-2'), 158,4 (C-4') e 197,9 (C-9)
7,50	132,5	128,8 (C-2 e C-6), 138,7 (C-1) e 128,2 (C-3 e C-5)
7,58	144,7	118,7 (C-3'), 158,4 (C4'), 105,5 (C-3'')
8,01	128,8 (2C)	128,8 (C-2 e C-6), 132,5 (C-4) e 195,8 (C-7)

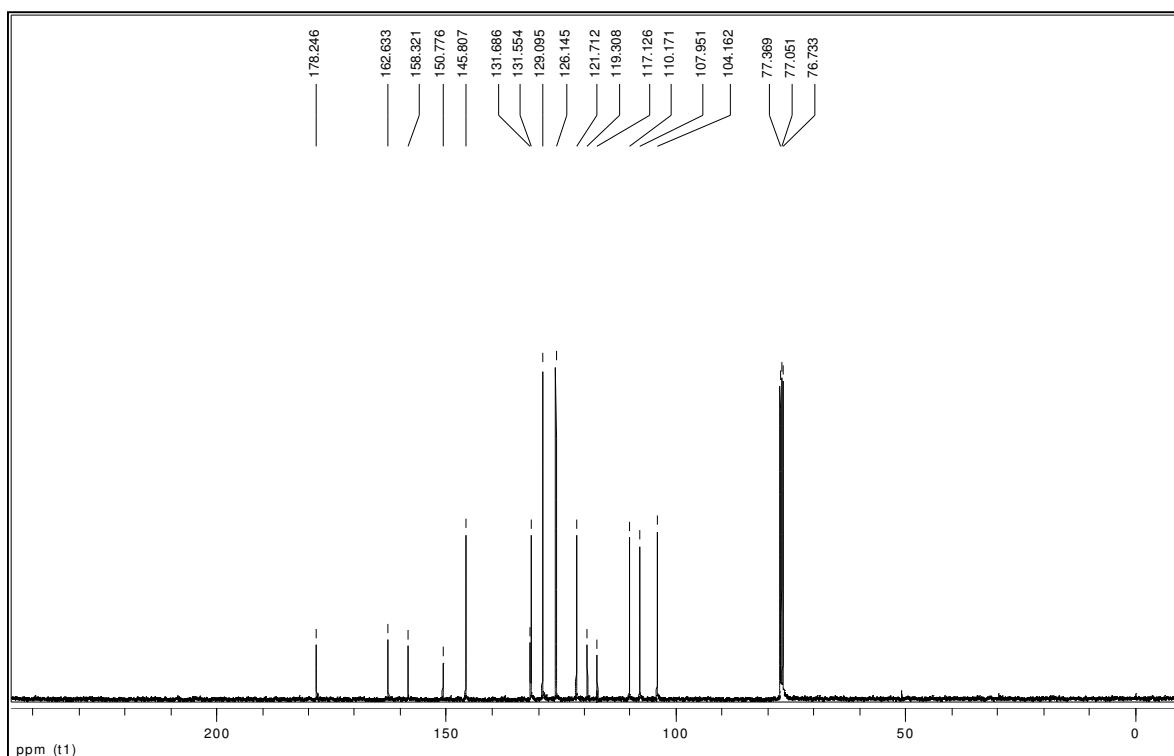
ANEXO B



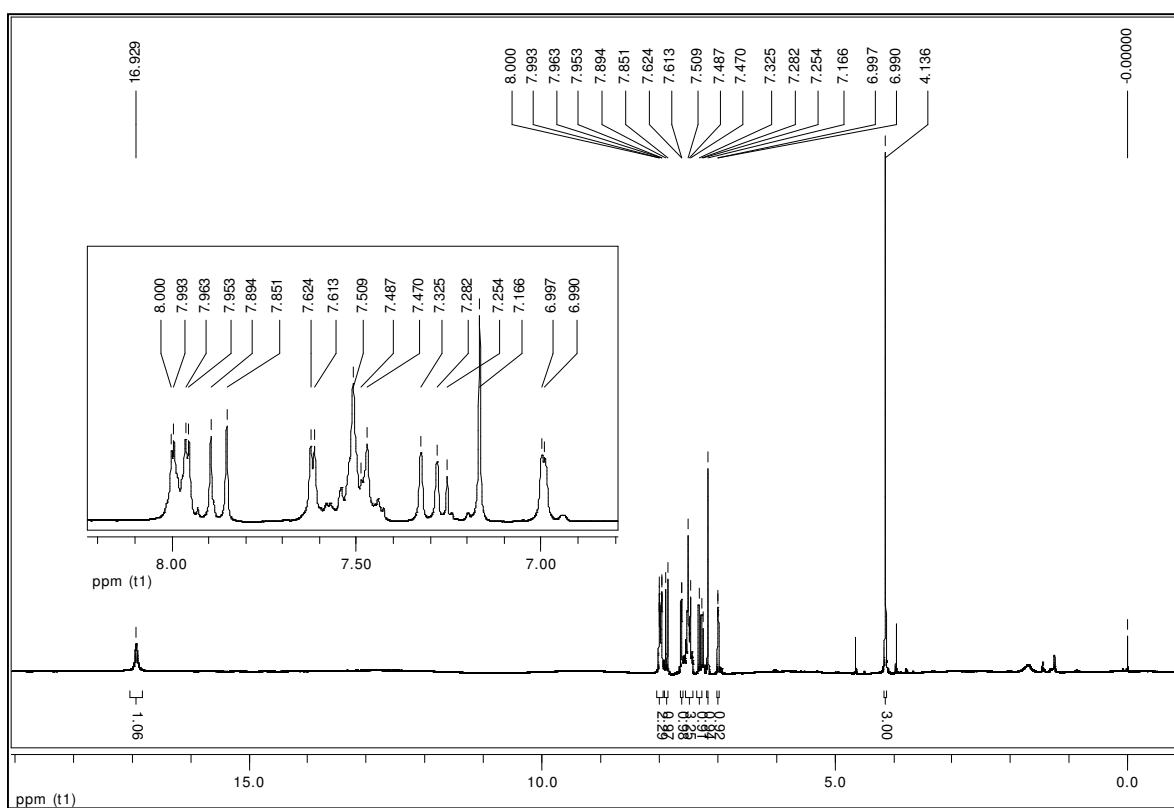
E1 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância **LF1**



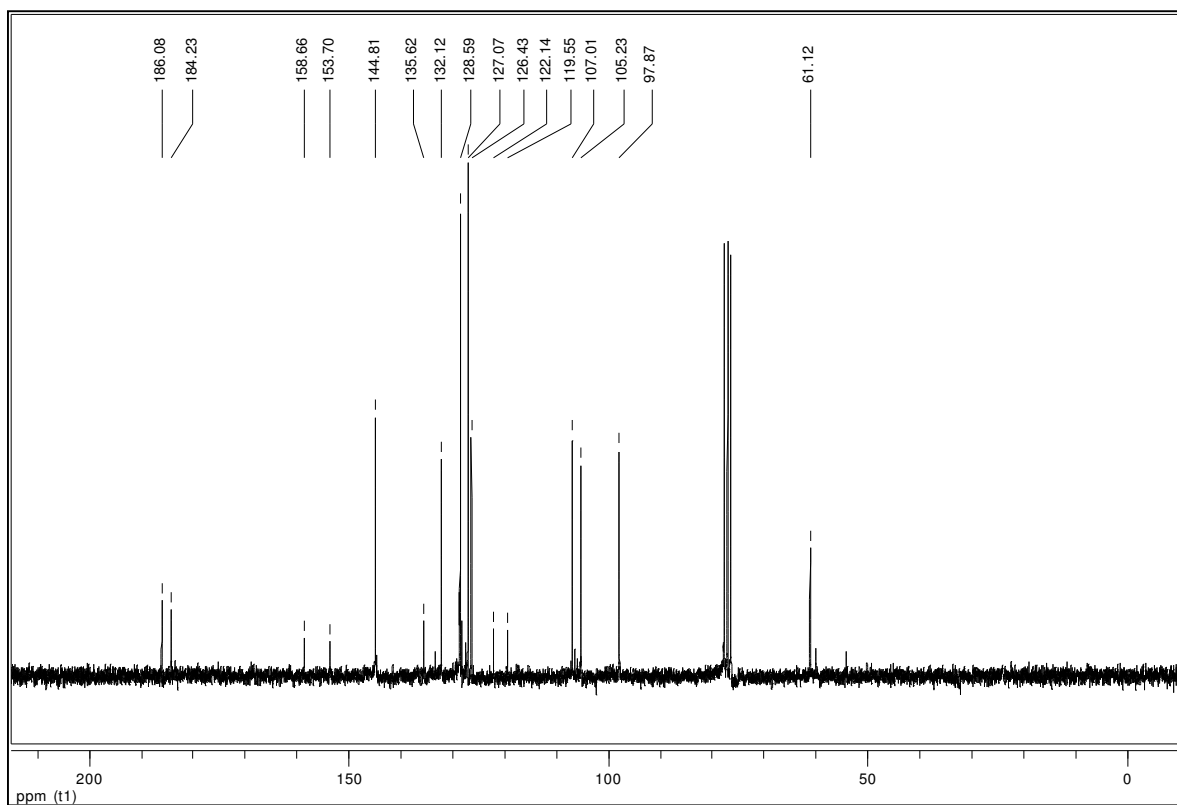
E1a – Expansão do espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância **LF1**



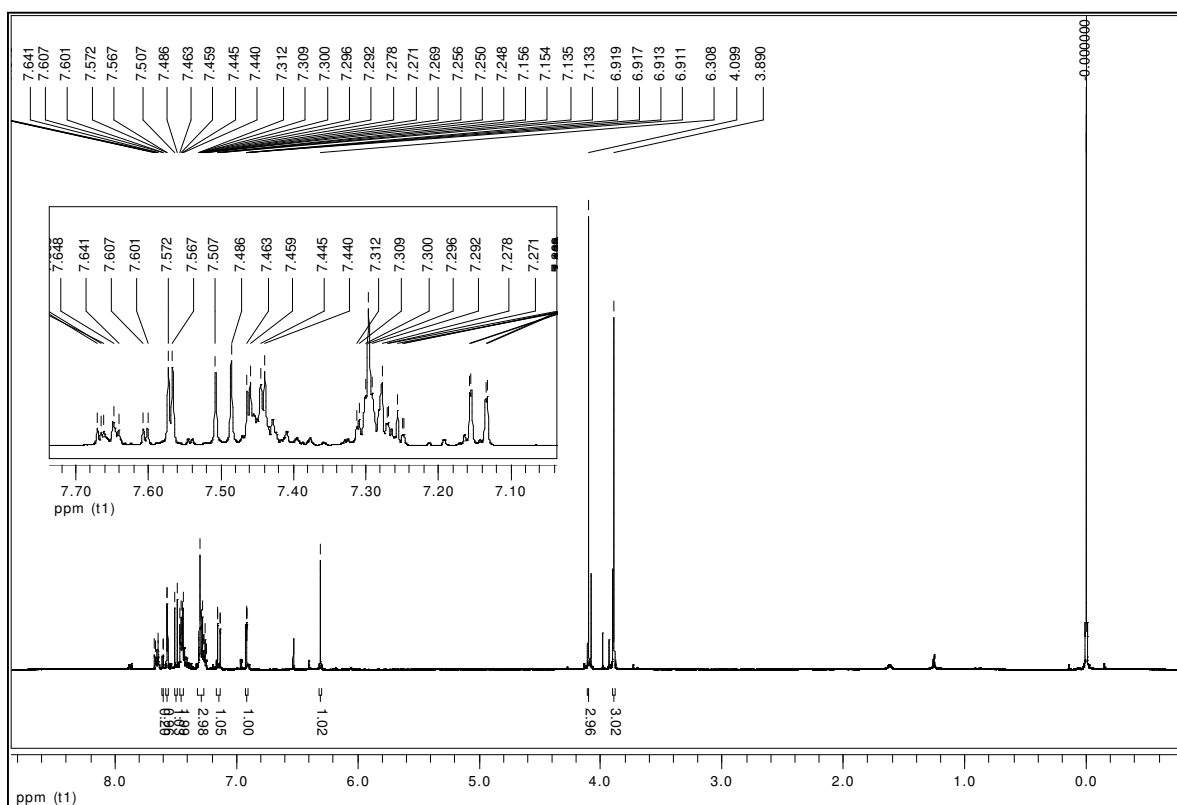
E2 - Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) da substância **LF1**



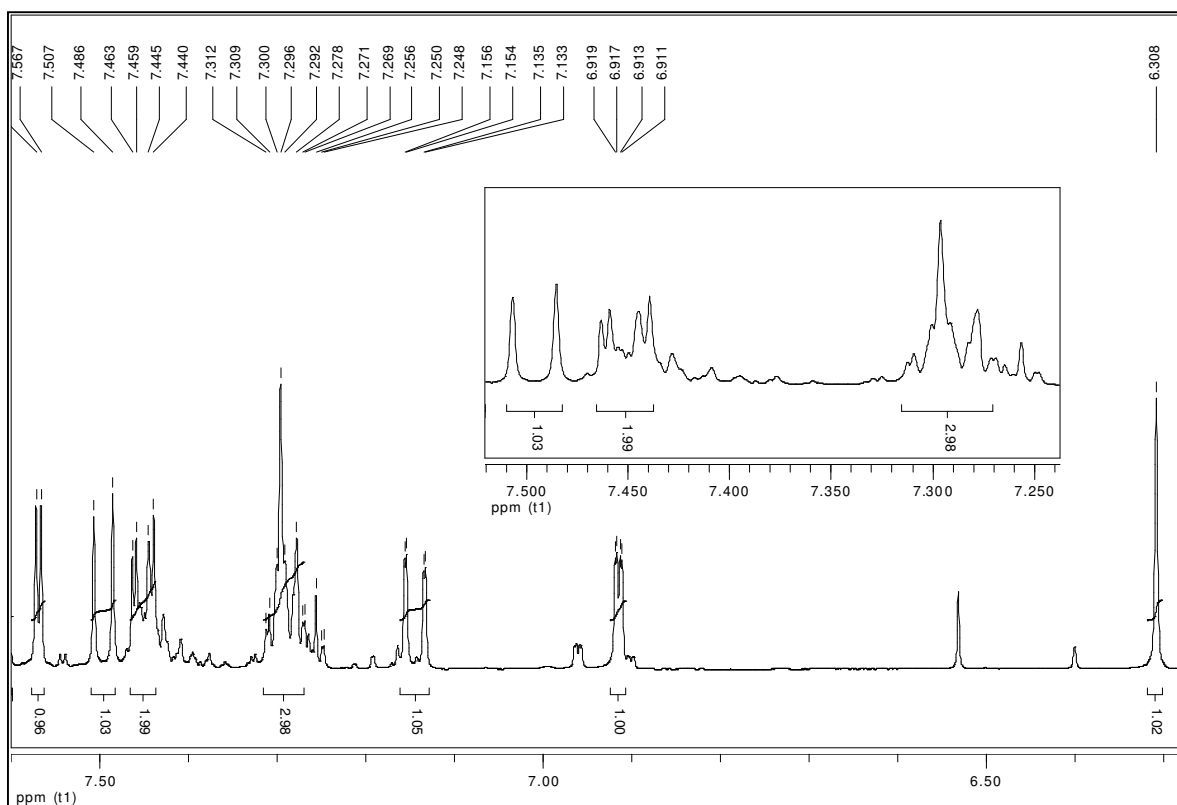
E3 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **LF2**



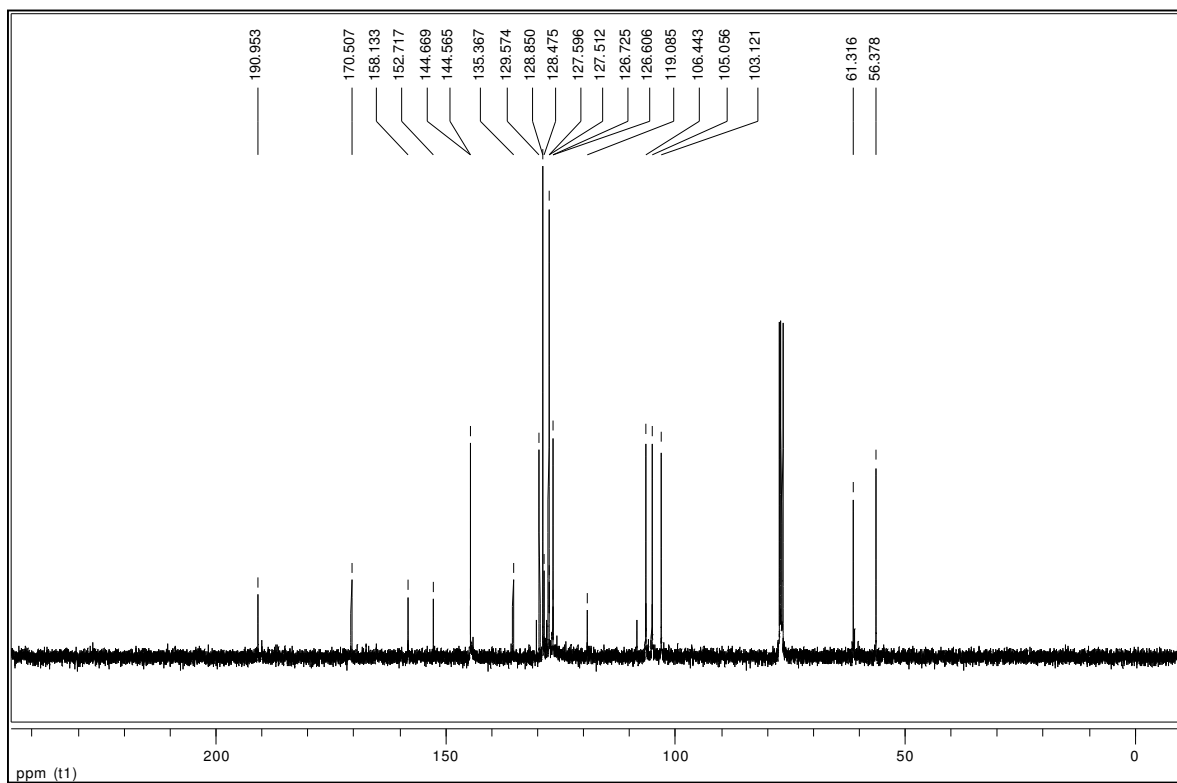
E4 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância **LF2**



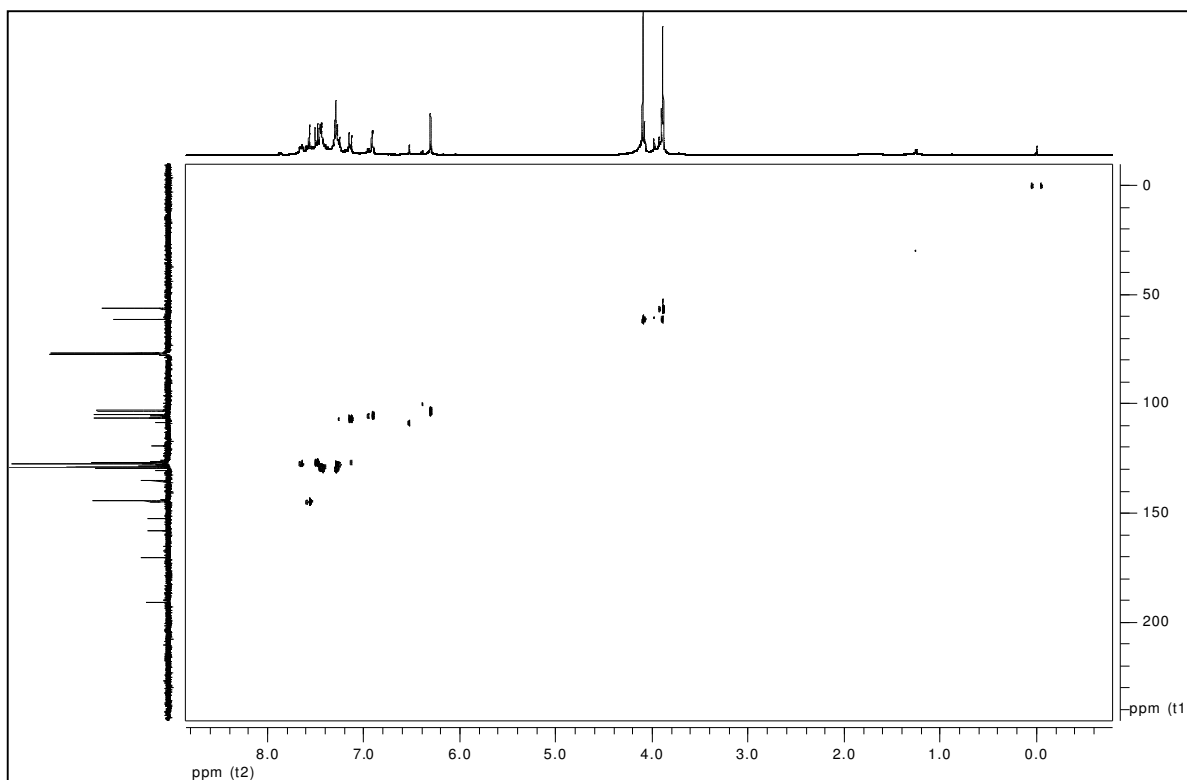
E5 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **LF3**



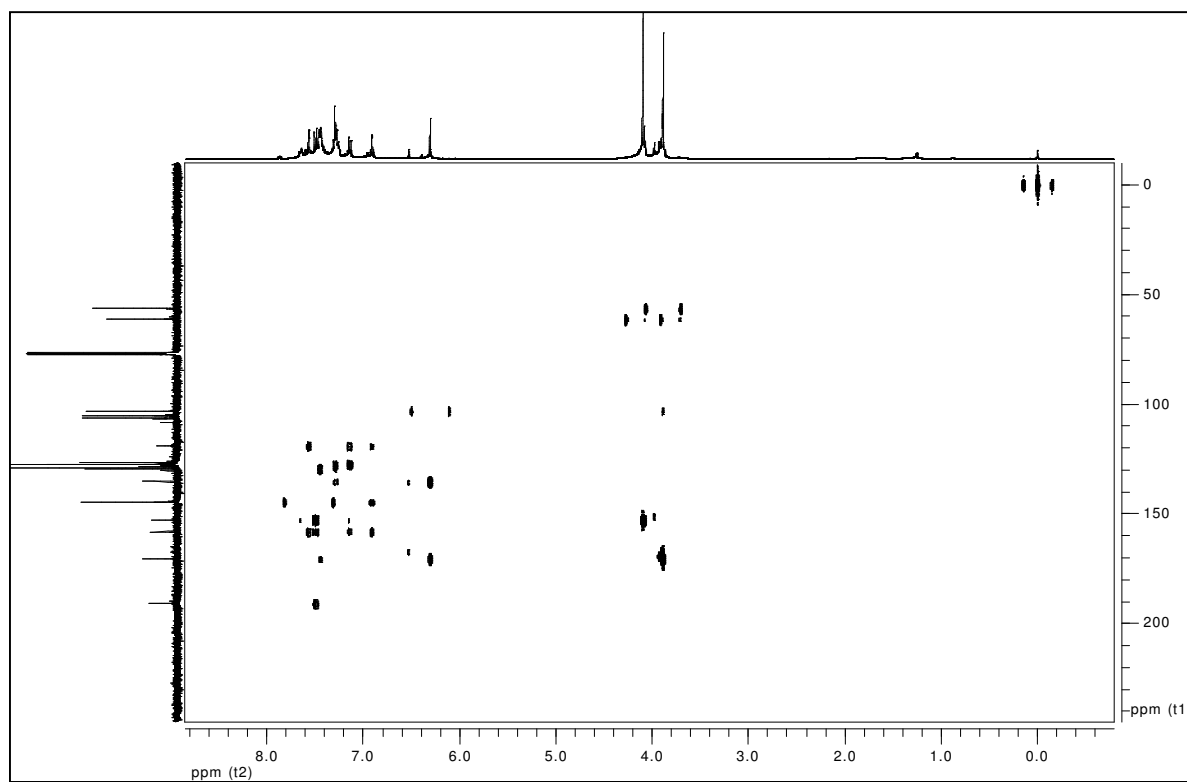
E5a – Expansão do espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da substância **LF3**



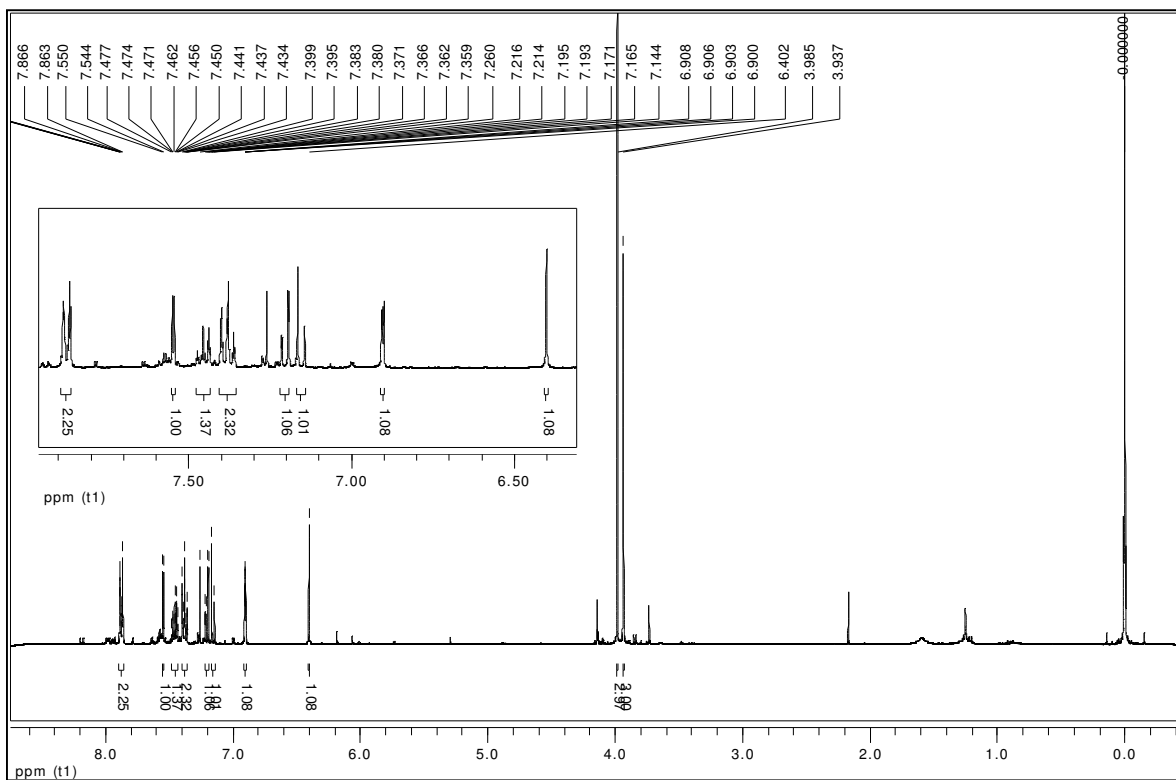
E6 – Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) da substância **LF3**



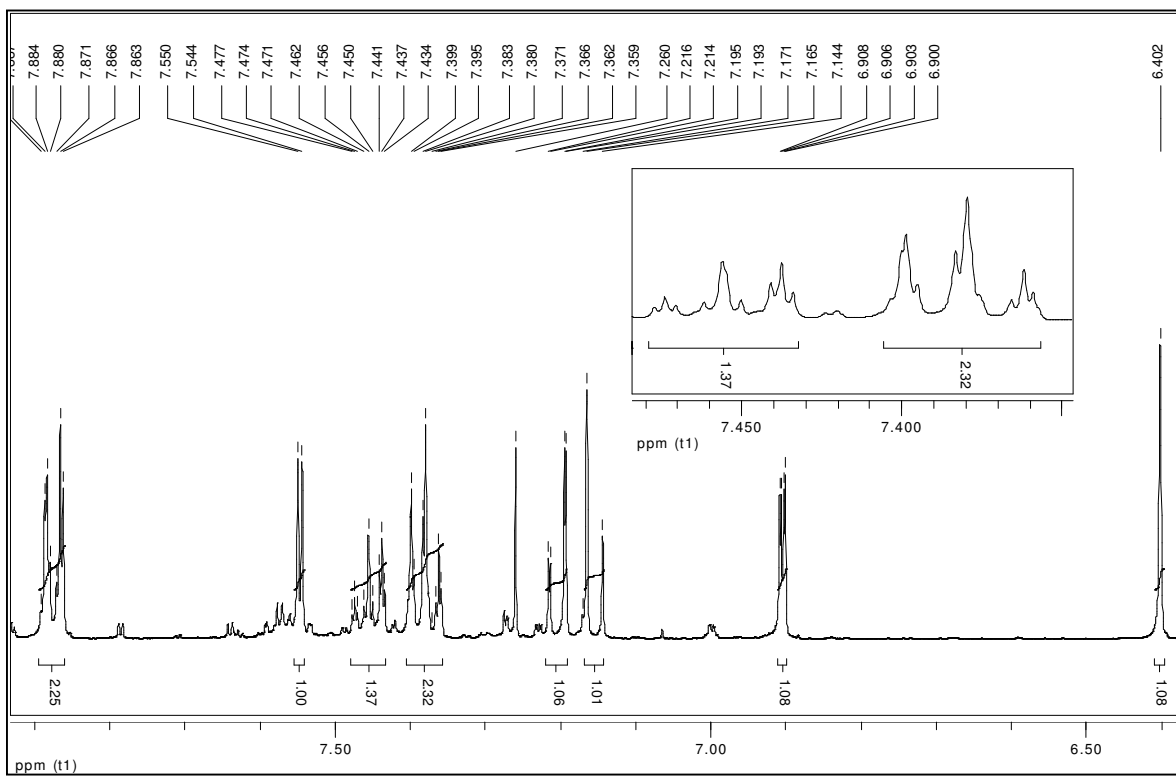
E7 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF3**



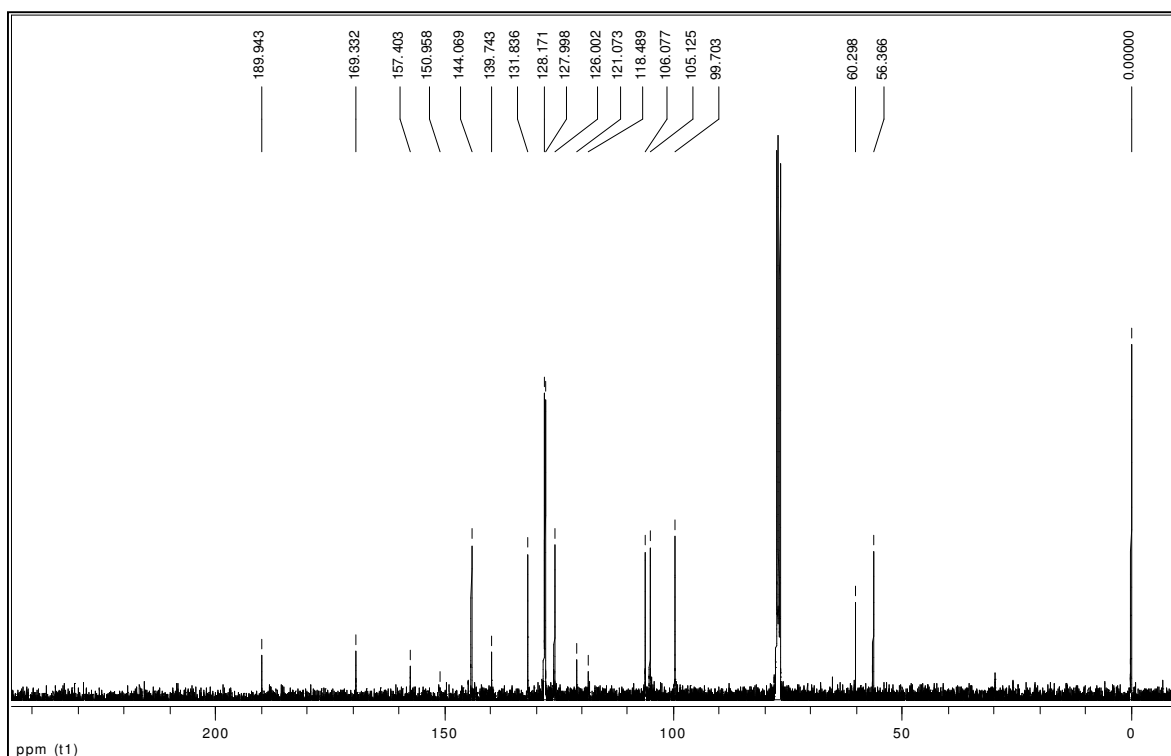
E8 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF3**



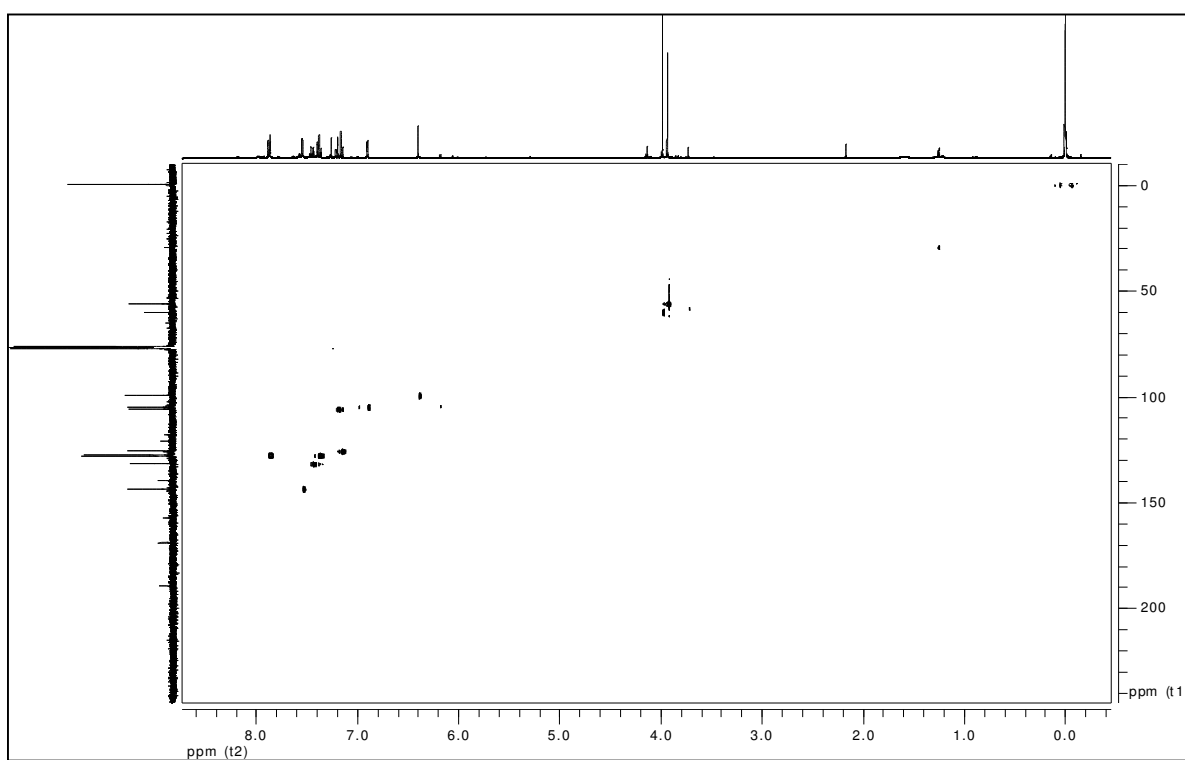
E9 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **LF4**



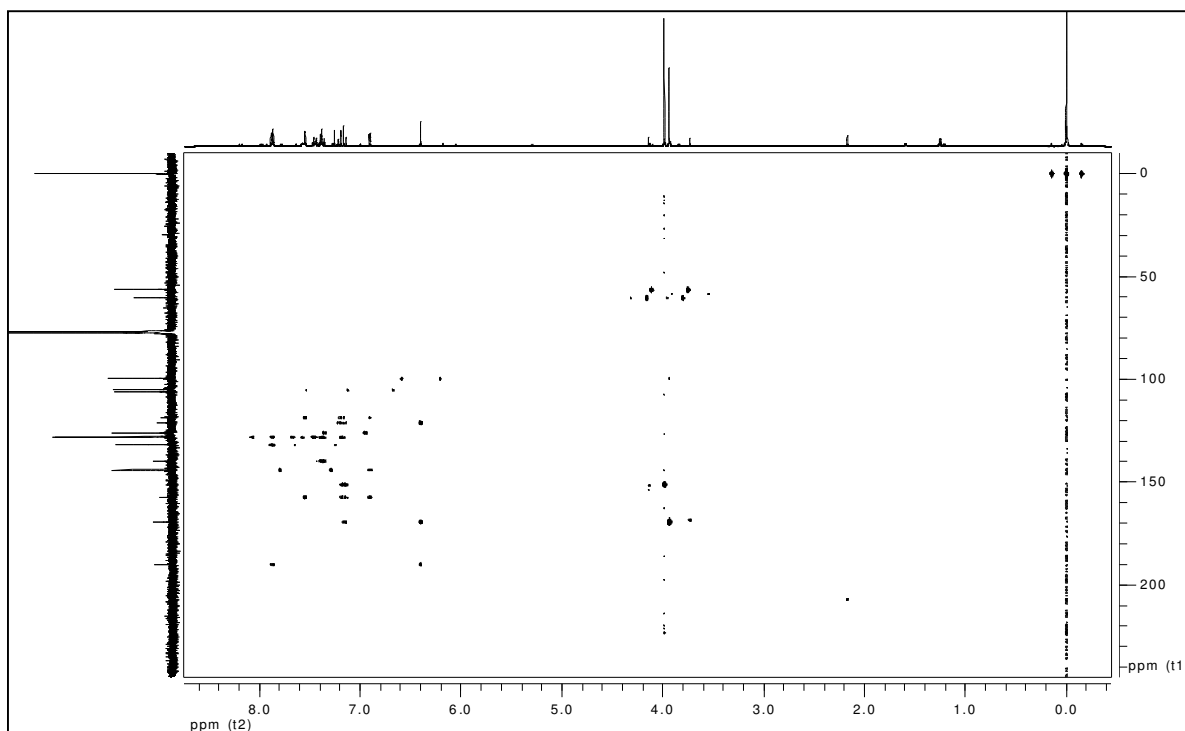
E9 – Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **LF4**



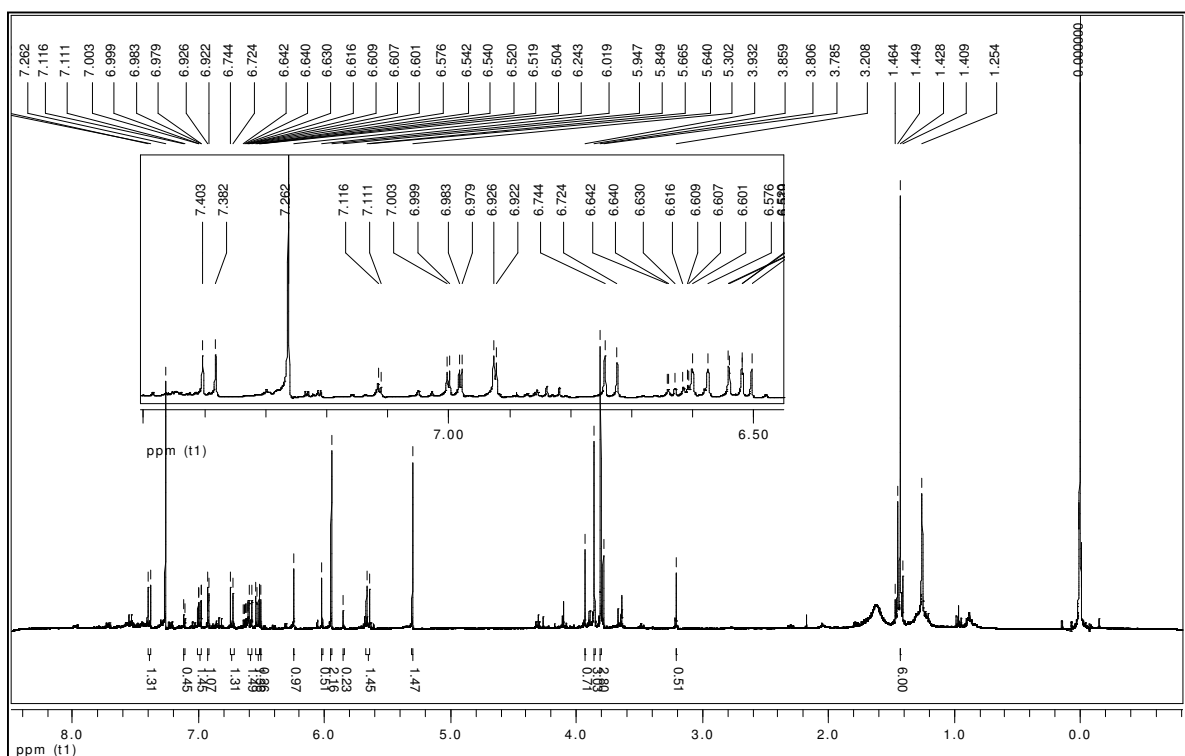
E10 - Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) da substância **LF4**



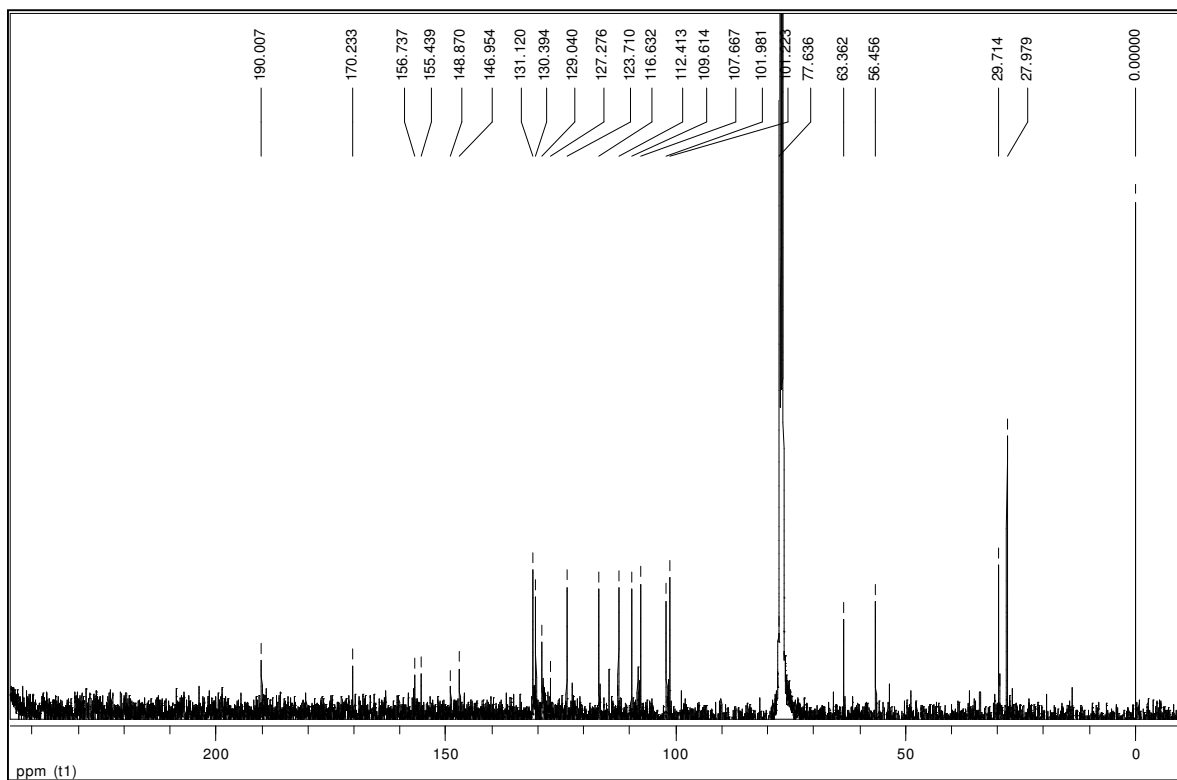
E11 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF4**



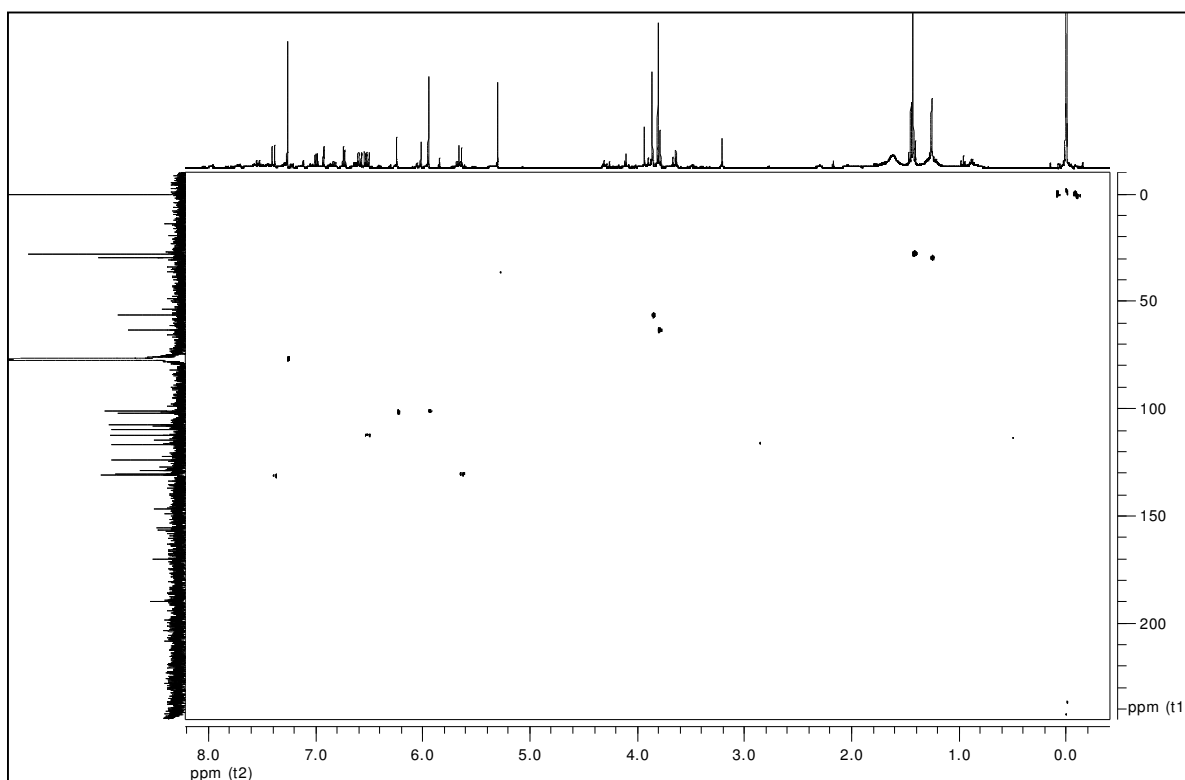
E12 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF4**



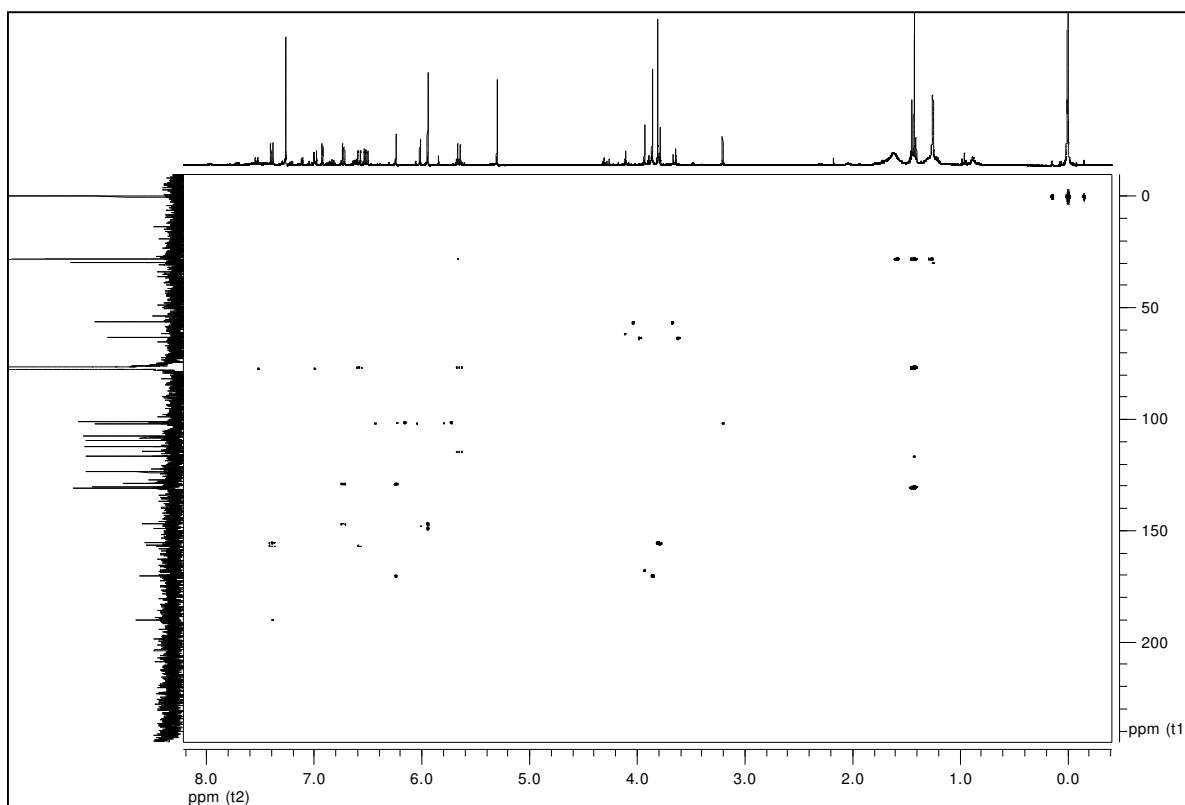
E13 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **LF5**



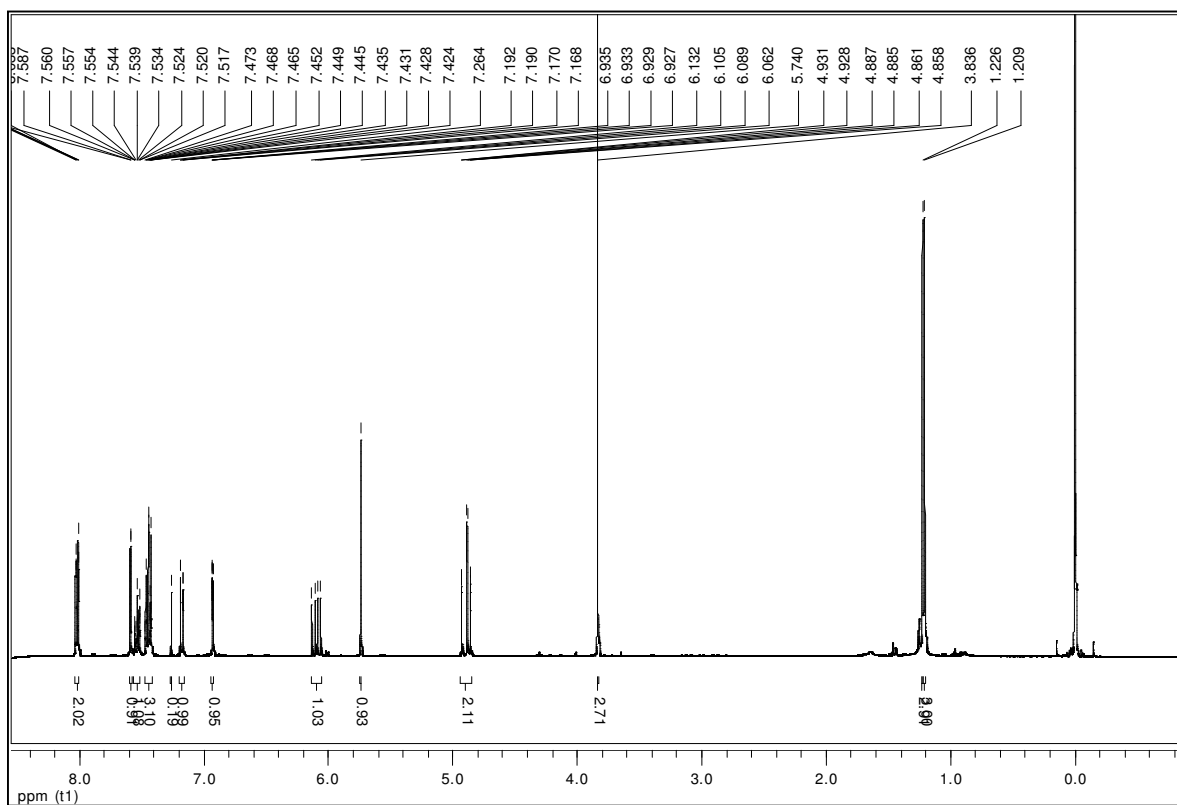
E14 – Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) da substância **LF5**



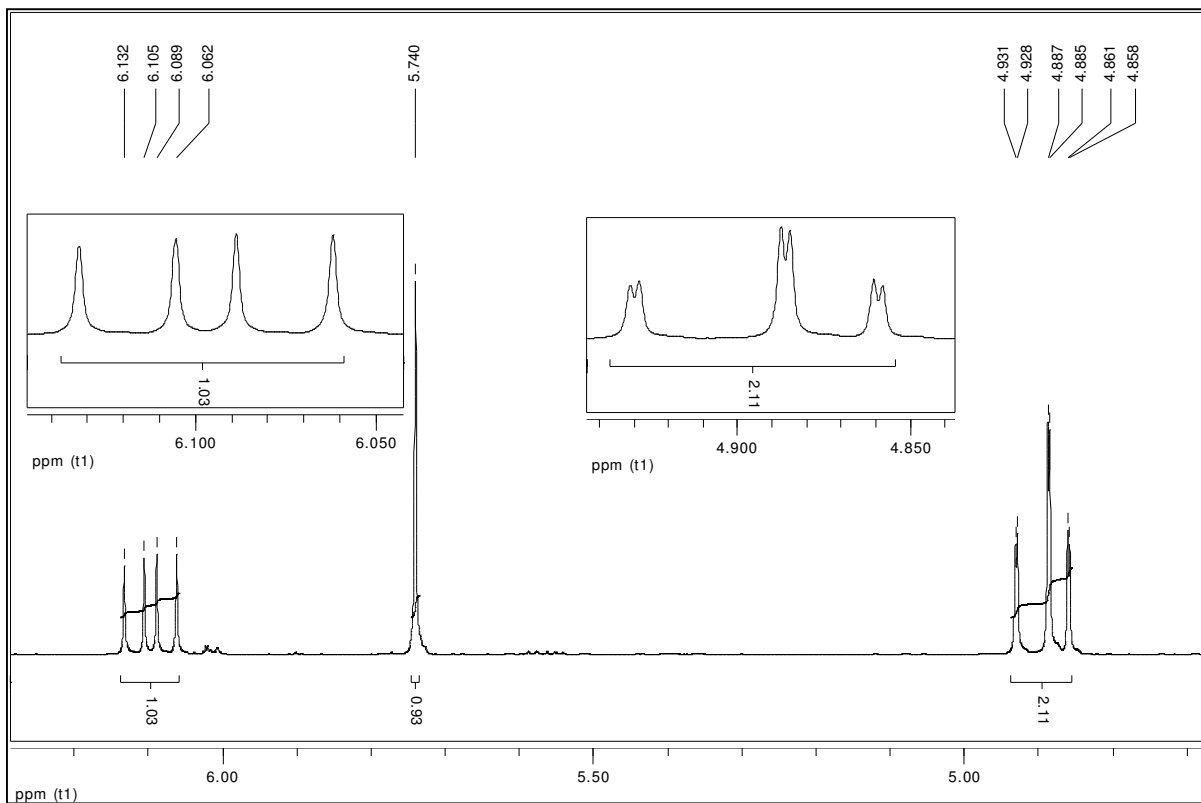
E15 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF5**



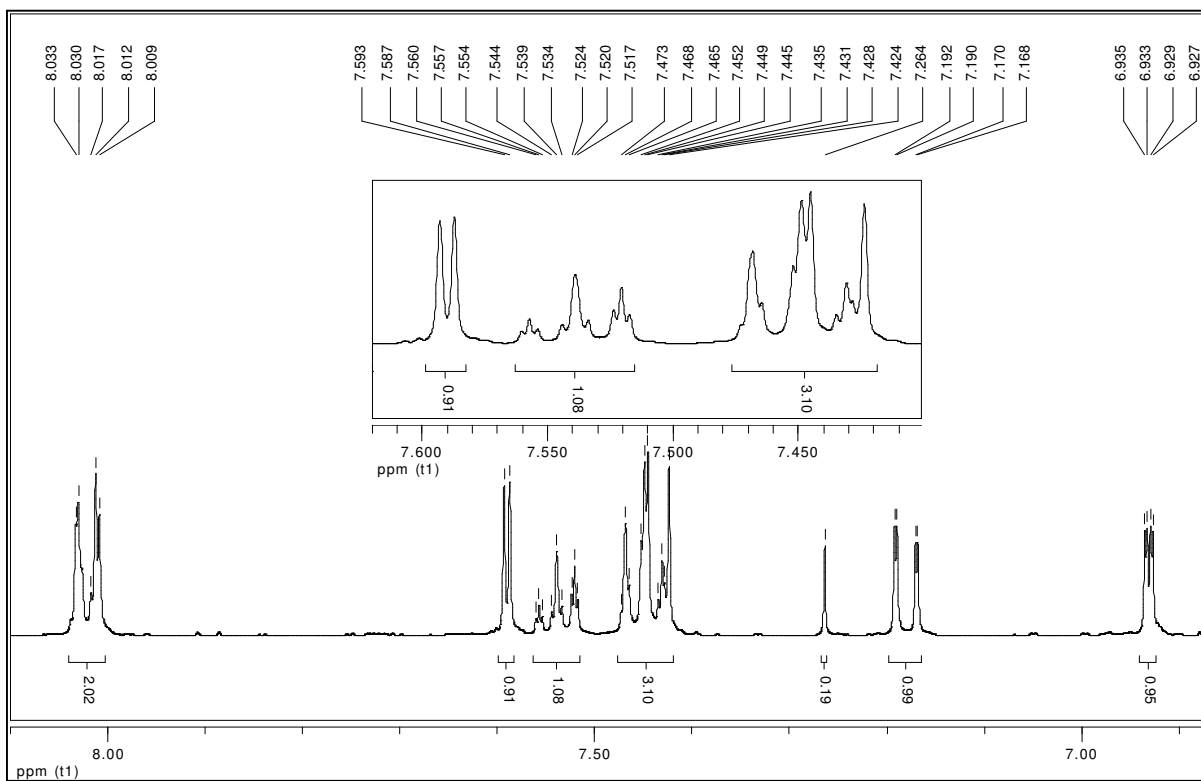
E16 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF5**



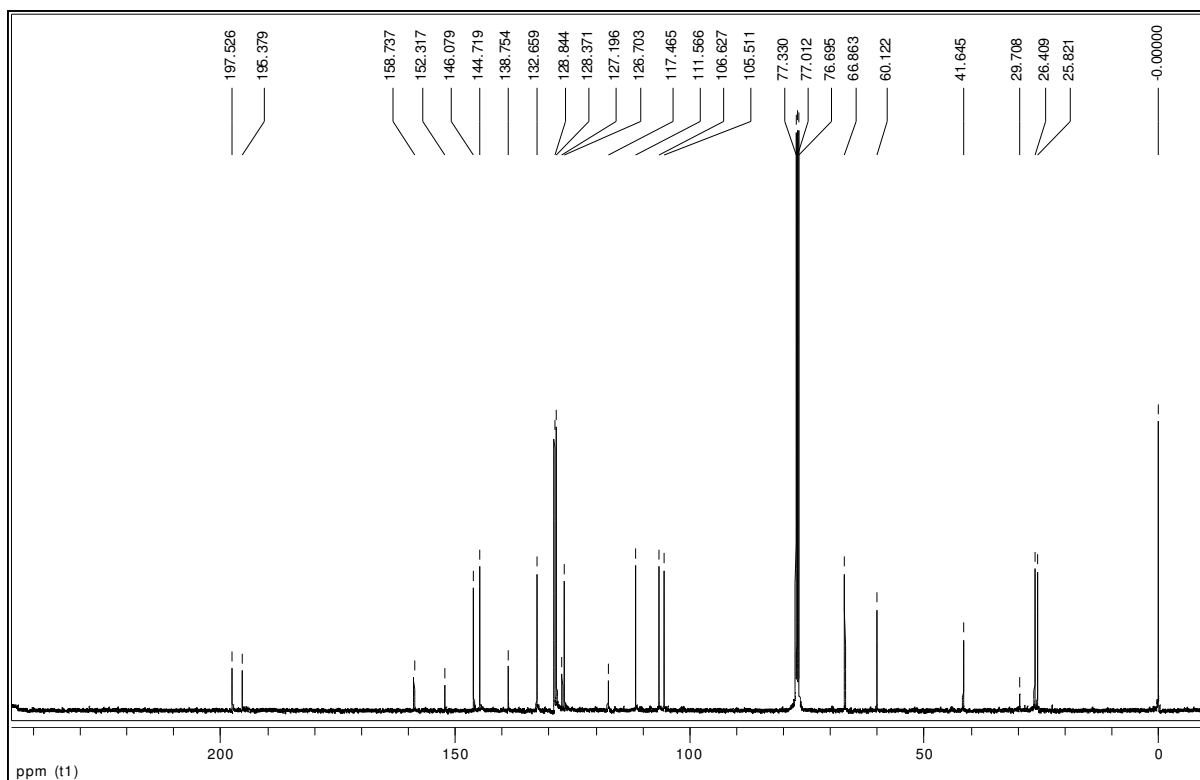
E17 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **LF6**



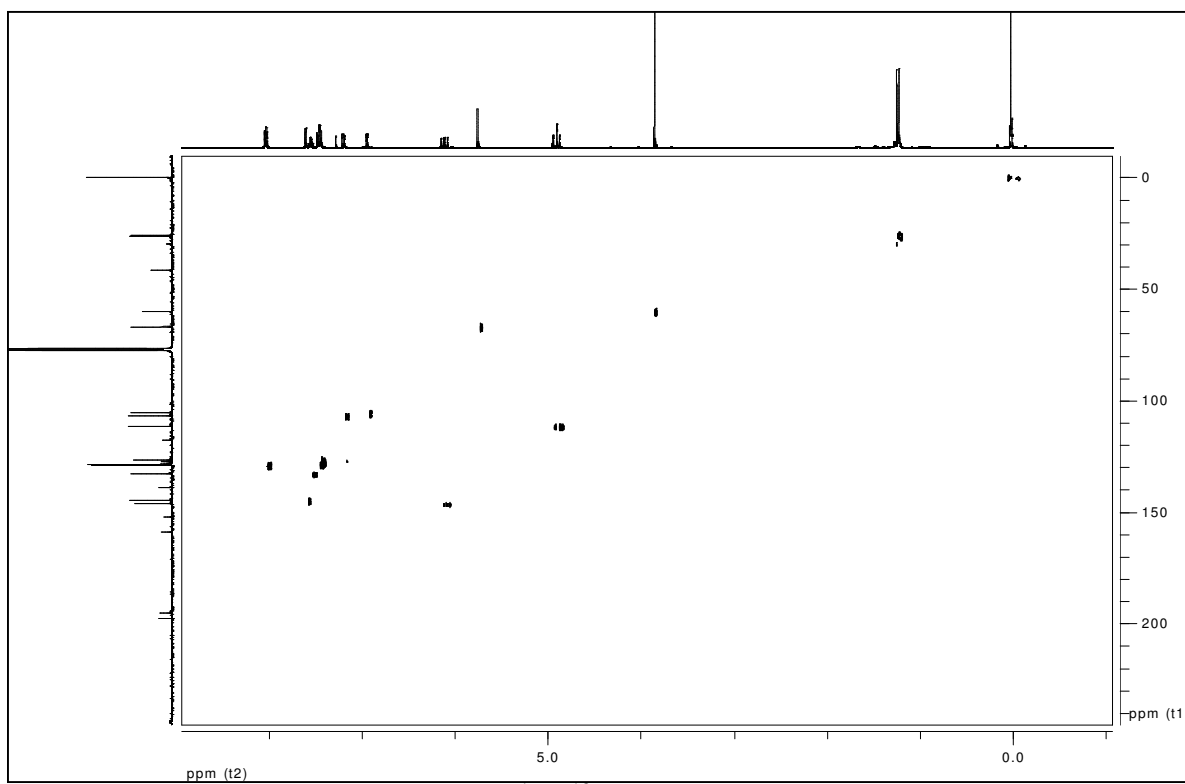
E17a – Expansão do espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância LF6



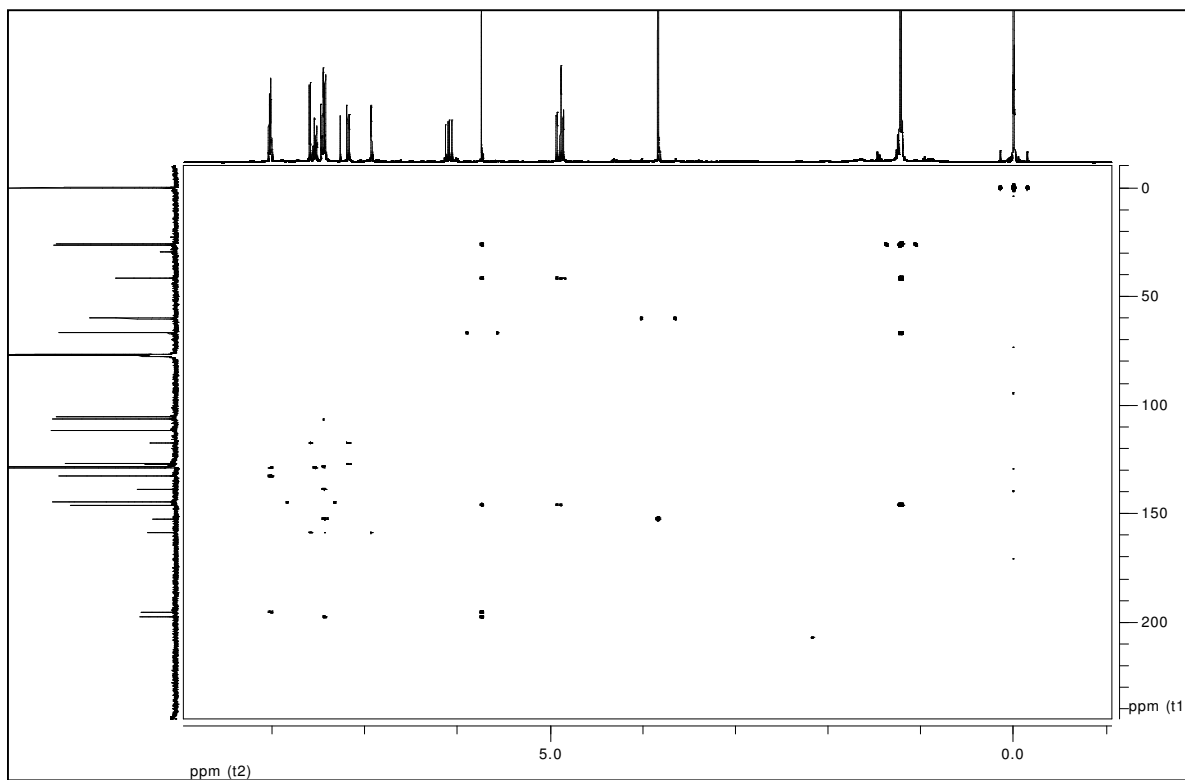
E17b – Expansão do espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância LF6



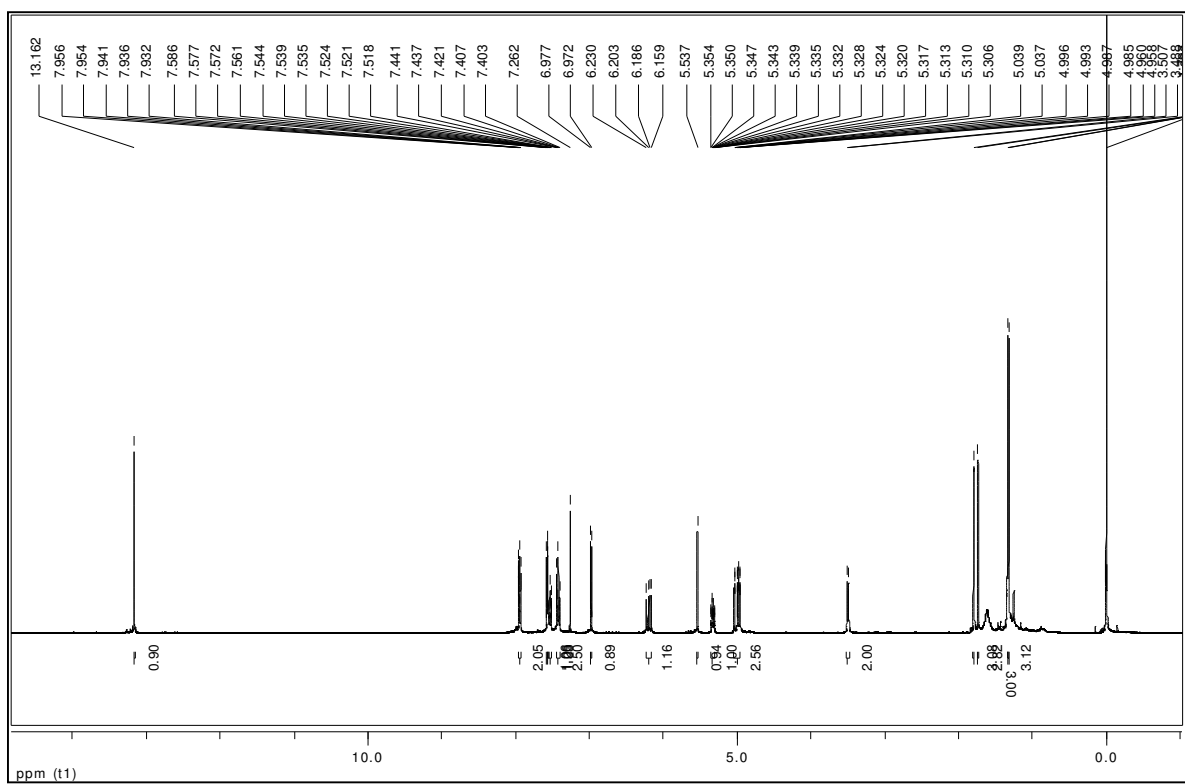
E18 - Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) da substância **LF6**



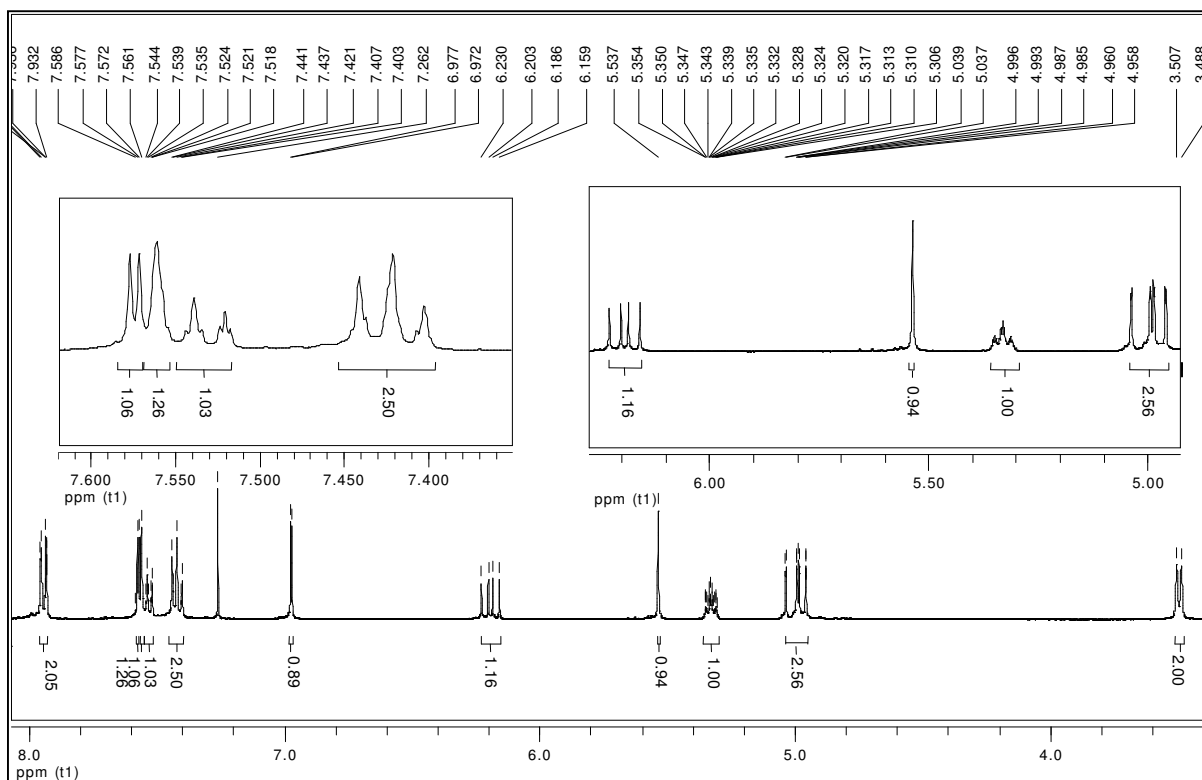
E19 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF6**



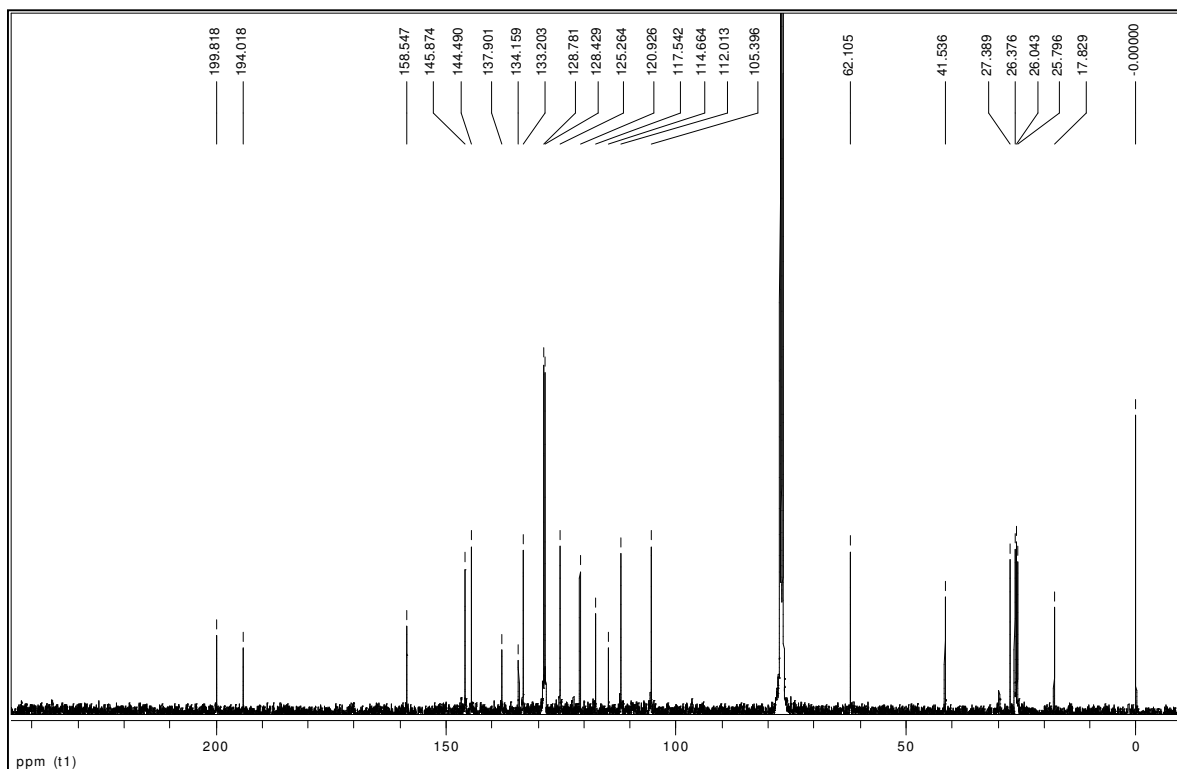
E20 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF6**



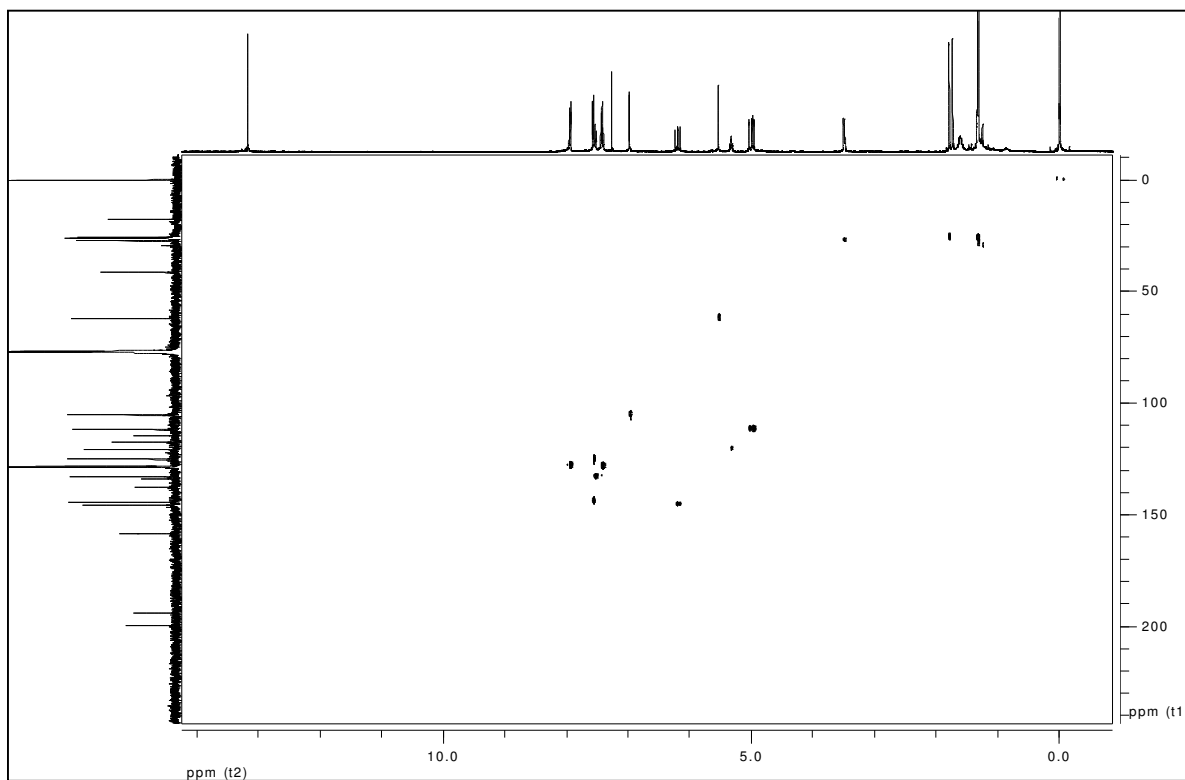
E21 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **LF7**



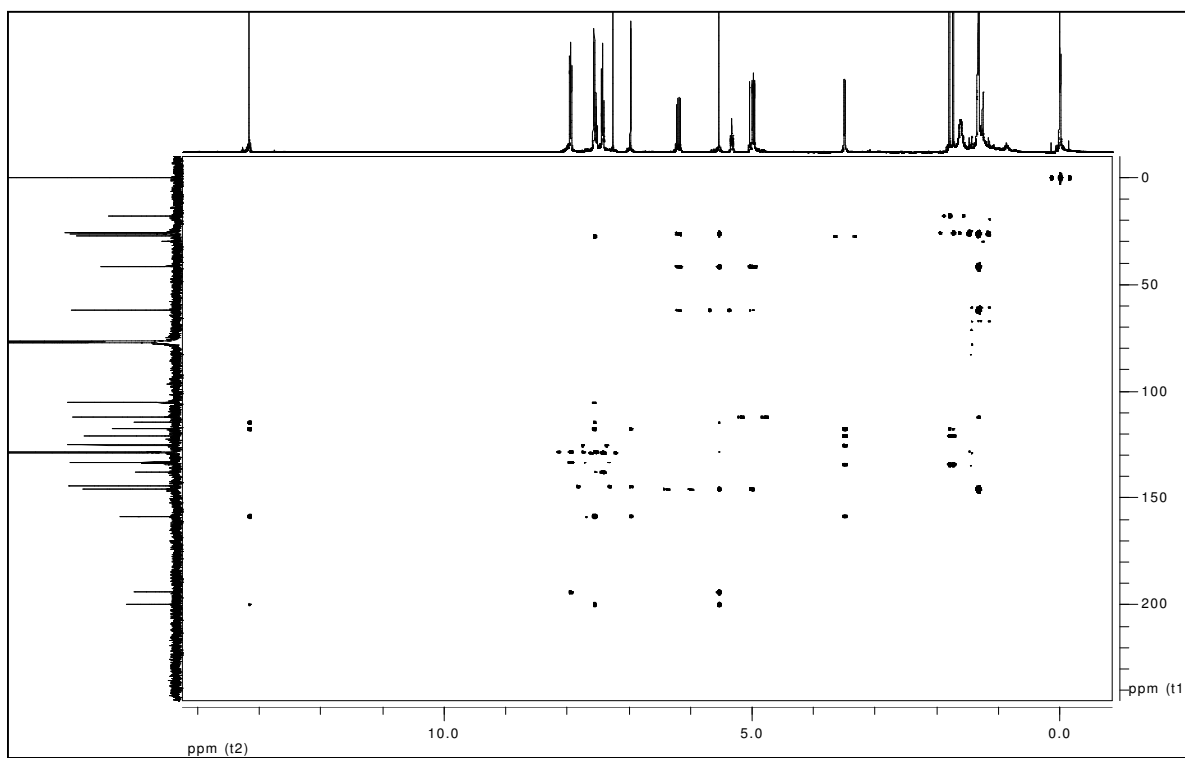
E21a – Expansão do espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância **LF7**



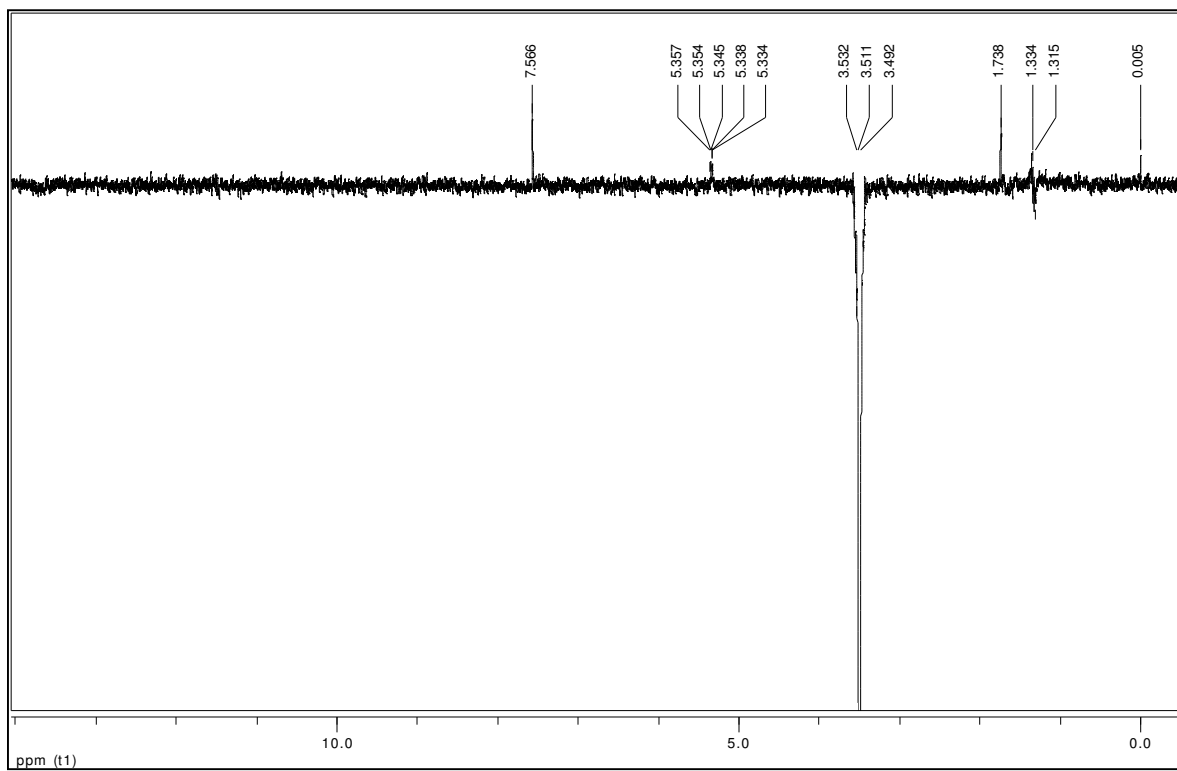
E22 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) da substância **LF7**



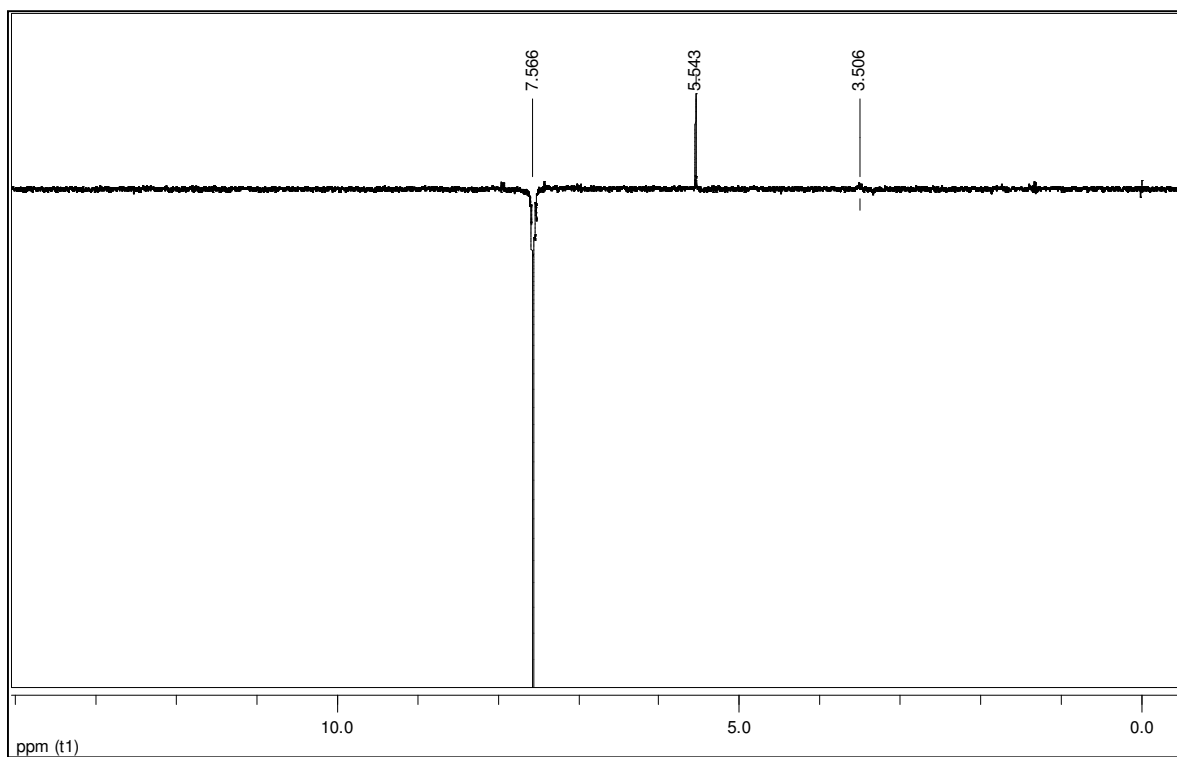
E23 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF7**



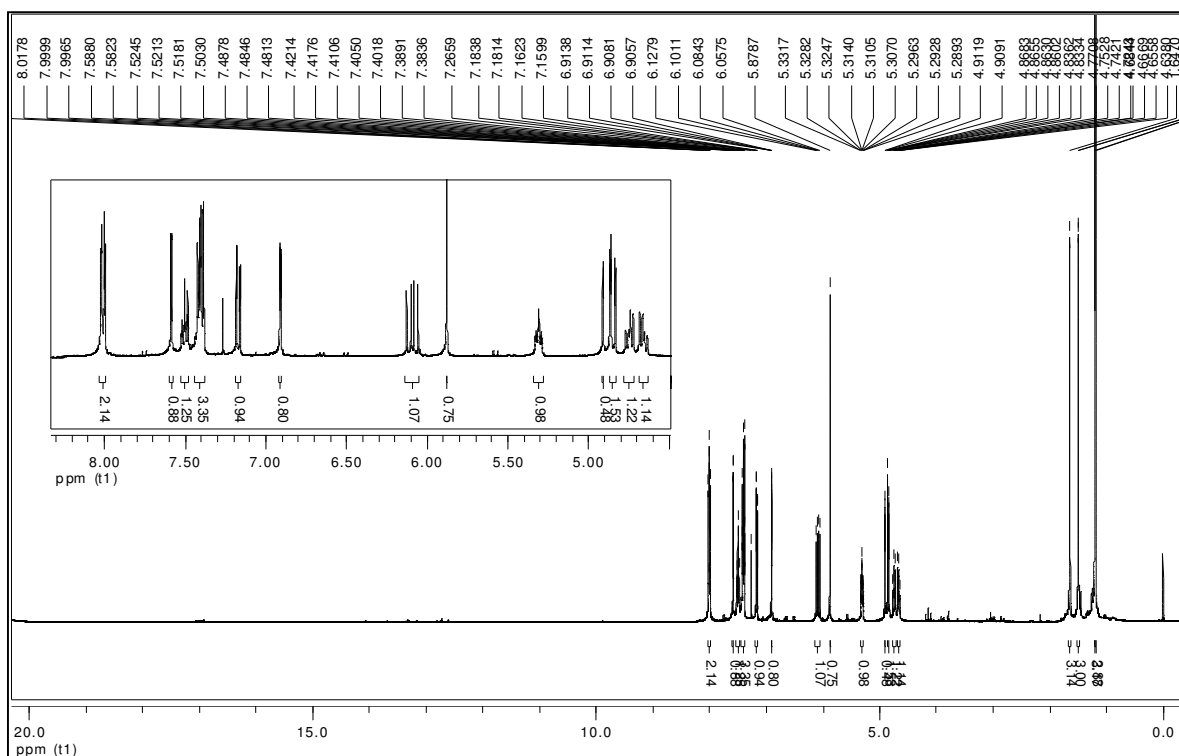
E24 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF7**

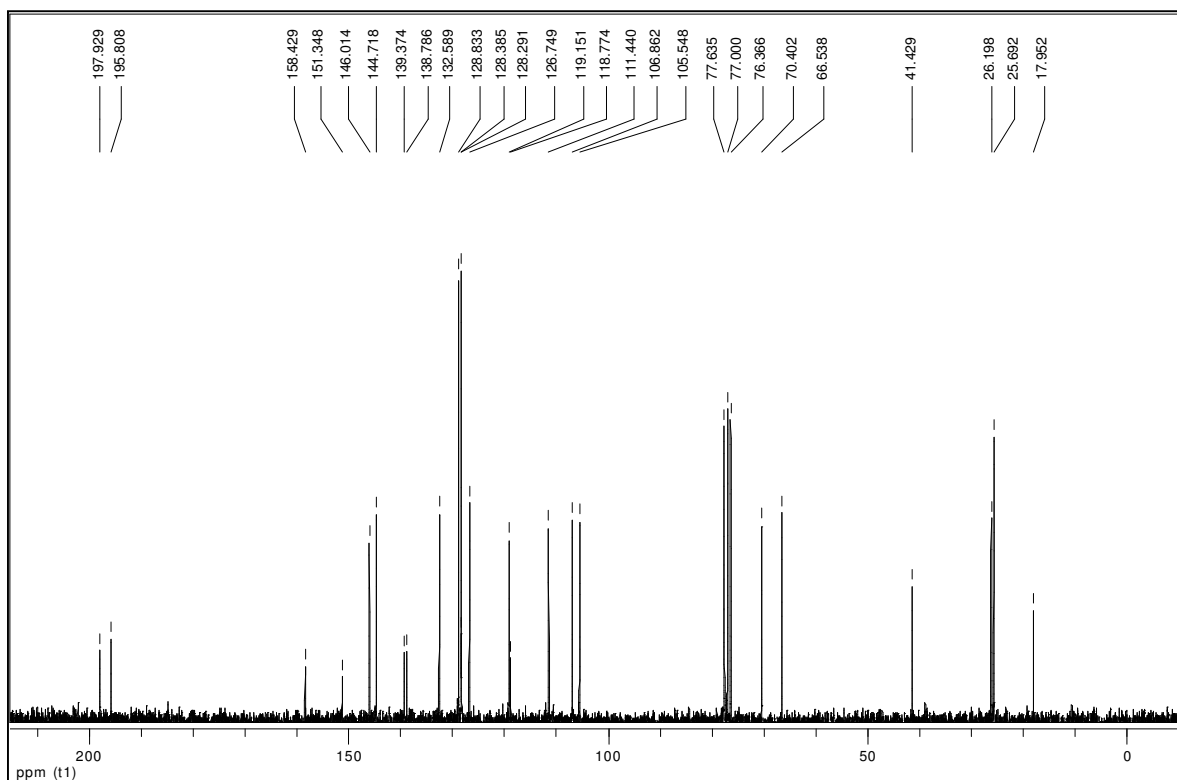


E25 – Experimento de diferença de nOe (400 MHz, CDCl₃) de LF7

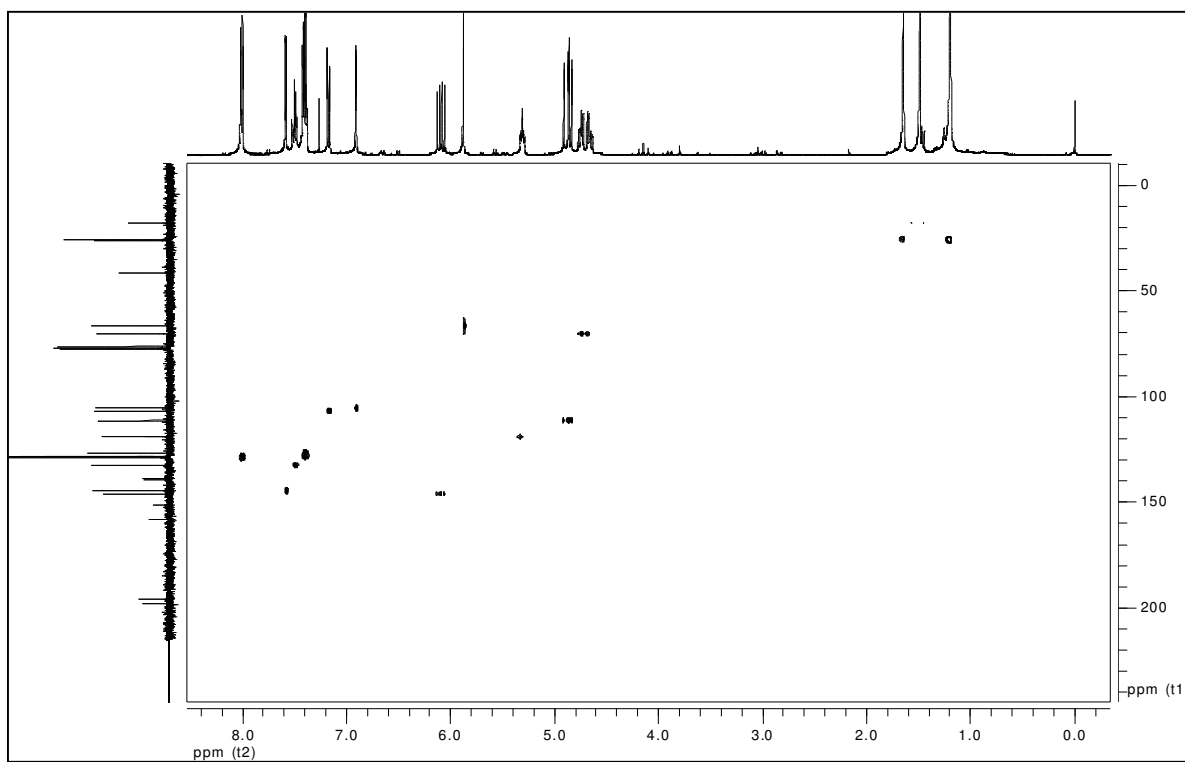


E25a – Experimento de diferença de nOe (400 MHz, CDCl₃) de LF7

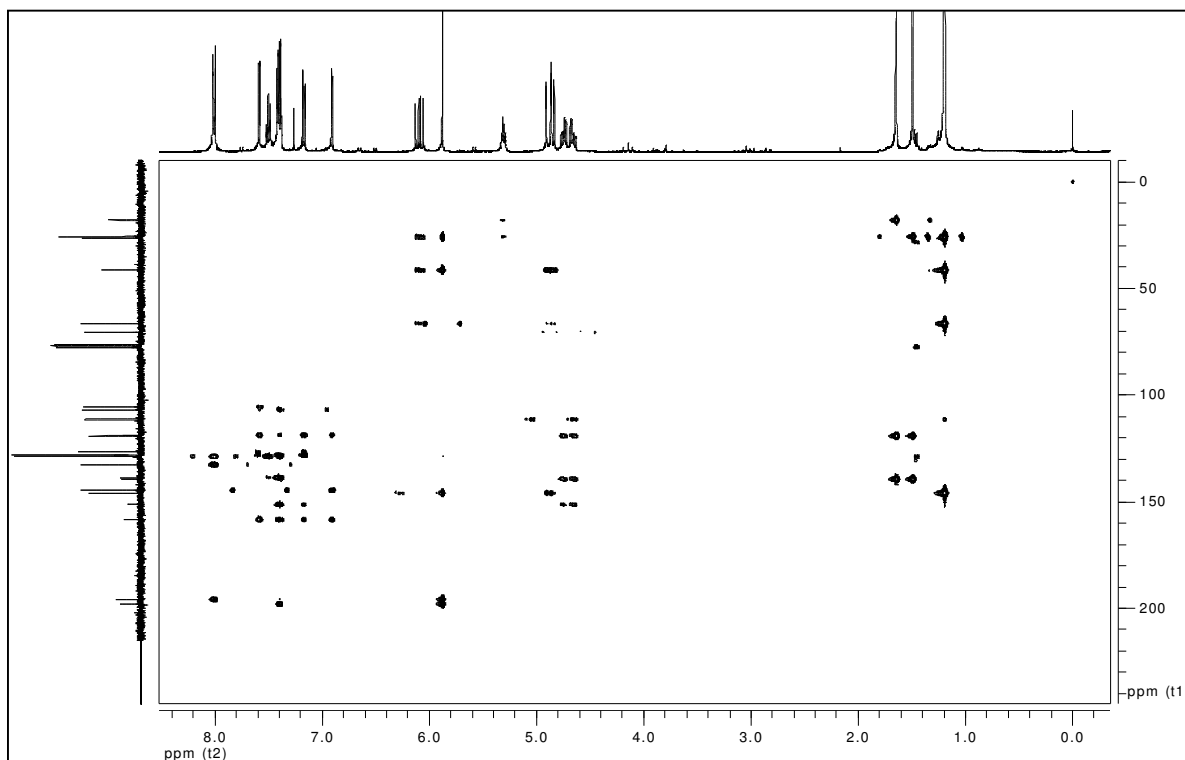




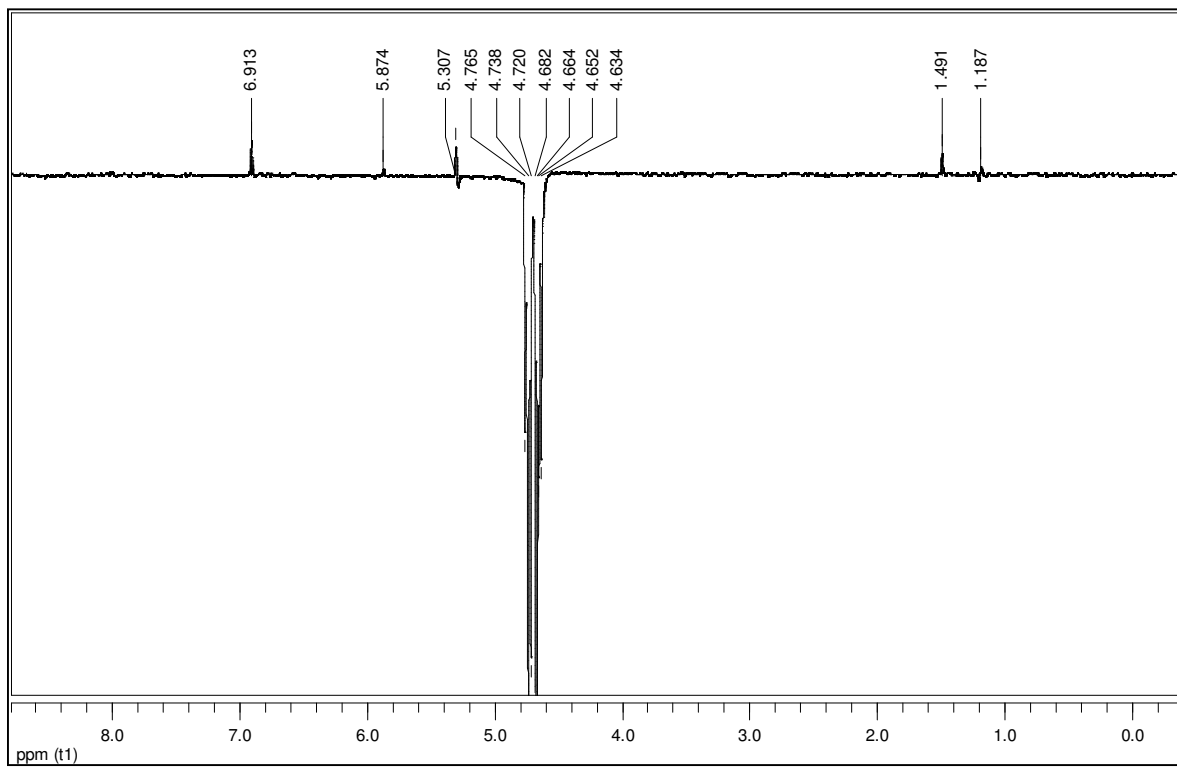
E27 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **LF8**



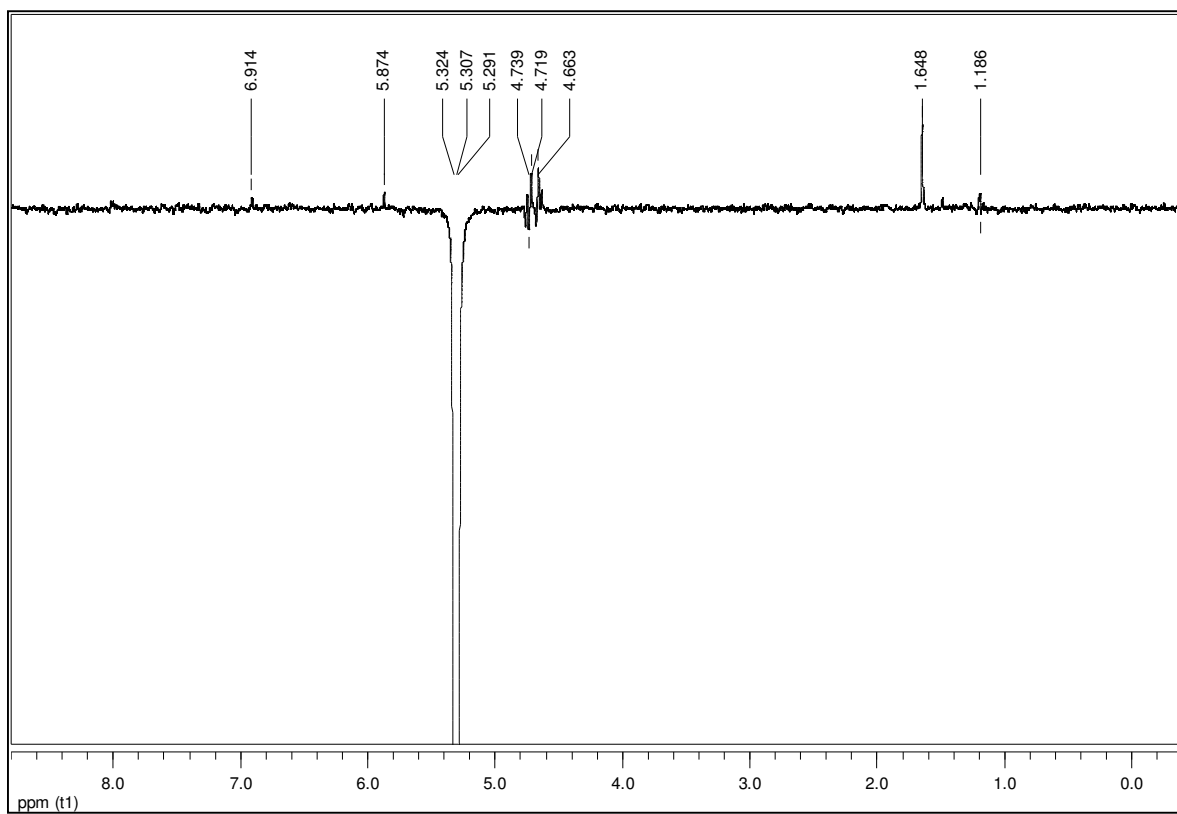
E28 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF8**



E29 - Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) da substância **LF8**



E30 - Experimento de diferença de nOe (400 MHz, CDCl_3) de **LF8**



E30a - Experimento de diferença de nOe (400 MHz, CDCl₃) de **LF8**