

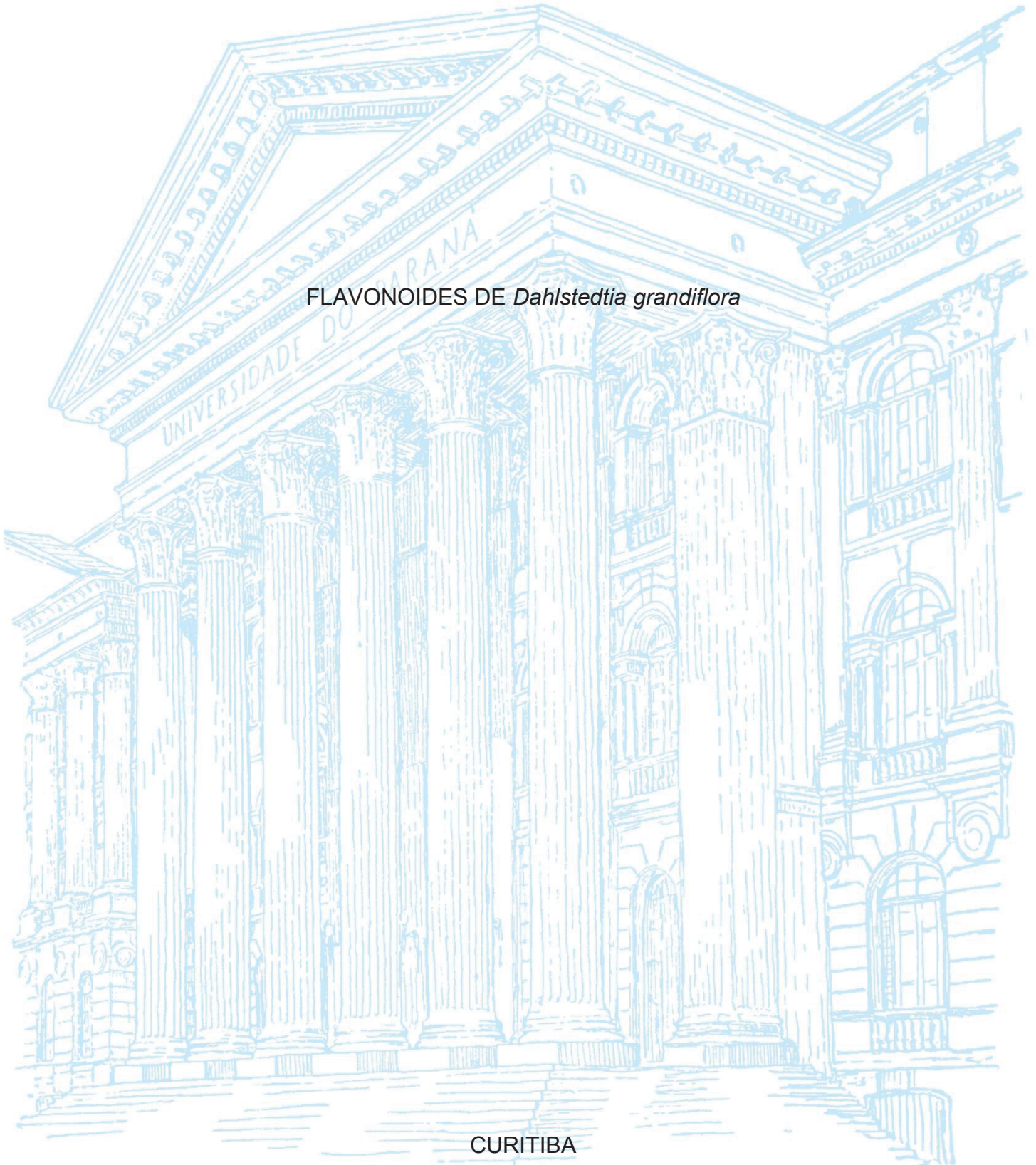
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELITA NEPEL

FLAVONOIDES DE *Dahlstedtia grandiflora*

CURITIBA

2015



ANGELITA NEPEL

FLAVONOIDES DE *Dahlstedtia grandiflora*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica, do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia

CURITIBA

2015

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

N439f

Nepel, Angelita

Flavonoides de dahlstedtia grandiflora [recurso eletrônico] / Angelita
Nepel. – Curitiba, 2015.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas,
Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

Orientador: Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia .

1. Flavonóides. 2. Química vegetal. 3. Produtos naturais. I. Universidade
Federal do Paraná. II. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales.
III. Título.

CDD: 547

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

TERMO DE APROVAÇÃO

FLAVONOIDES DE DAHLSTEDTIA GRANDIFLORA


por

ANGELITA NEPEL


Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador: 
Prof.^a. Dr.^a. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia
Dep. de Química – UFPR


Prof.^a. Dr.^a. Fernanda Rodrigues Garcez
Instituto. de Química – UFMS


Prof.^a. Dr.^a. Ana Luisa Lacava Lordello
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 09 de julho de 2015.

Dedico este trabalho a meus queridos pais que, mesmo não tendo a oportunidade de estudo a mim concedida, sempre me fortalecem e incentivam em minha escolha de prosseguir estudando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, ao que Ele representa e aos Guias espirituais que me acompanham;

À professora Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia por ser um grande exemplo como pesquisadora, professora e ser humano. Serei eternamente grata pelas discussões produtivas sobre nosso projeto, pelas pausas para café, por ser mais do que orientadora, mas também amiga e conselheira. Sem sua paciência e dedicação este projeto não seria possível;

Aos meus queridos pais Marlete de Andrade e Adilson Nepel que me acompanham sempre e me ensinam sobre a vida;

As minhas avós Leonilda e Maria Dirce por todo o apoio e exemplo em toda minha vida;

As minhas irmãs (Dila, Nany e Pepi) e sobrinhos (Aline, Lucas e Miguel) pela alegria de uma família unida e suporte em todos os momentos;

Aos meus padrinhos Jorge e Josélia por comemorarem comigo desde a minha aprovação no mestrado e contribuírem com os conselhos e apoio como segundos pais em minha vida. E a meus padrinhos espirituais que me guiam a cada dia;

Ao meu querido amigo Kahlil que me acompanha desde meus primeiros dias de graduação, por nossas conversas construtivas, apoio e carinho que se fortalece a cada dia;

Aos professores Francisco de Assis Marques e Ana Luísa Lacava Lordello pelas contribuições no relatório de qualificação e defesa e por me ensinarem, em minhas primeiras disciplinas de orgânica, o amor por esta área;

À professora Fernanda Rodrigues Garcez pelas contribuições na banca de defesa;

Ao professor Andersson Barison pela orientação em meus anos de IC e pelo suporte fornecido no centro de RMN da UFPR;

Aos professores (as), técnicos (as) e secretários (as) do DQ-UFPR com os quais tive contato durante aproximadamente 7 anos e me ensinaram desde o básico de conhecimentos químicos a lições que levarei para a vida;

Aos meus amigos do Lapneq: Anderson, Allan, Áurea, Cassiano, Edi, Ina, Kahlil, Manu, Maria, Regi, Sirlei, Tânia e Thalita e pelas dicas, trocas de conhecimento, parceria e principalmente, pelas risadas.

Aos amigos e amigas do DQ-UFPR com os quais tive a oportunidade de conviver: amigos do LabPol, LTEB, CEPESQ, LaSQuE, RMN, Lecosin. Principalmente a meus amigos: Carol, Diego, Gustavo, Laiéli, Marina, Murilo, Mayara, Ricardo, Vinicius e Paulinha pelos churrascos, risadas, ajudas com meu projeto, discussões de resultados e cafés.

A todos os amigos que conquistei nesses dois anos fora do meu ambiente de trabalho, mas que mesmo assim contribuem para eu seguir com meus objetivos dando meu melhor, principalmente aos meus amigos lapeanos que são muitos, mas não posso deixar de citar alguns: Ale, Dirceu, Lu, Fer...

Agradeço aos professores Dr. João Ernesto de Carvalho e Dra. Marta Cristina T. Duarte do CPQBA da UNICAMP pela realização dos testes de atividade antiproliferativa e antimicrobiana, respectivamente;

Agradeço aos professores Dra Ana Maria G. Azevedo e o Dr Marco J. da Silva pela coleta e identificação da planta estudada neste projeto;

Ao professor Dr. Massuo J. Kato e Lydia Fumiko Yamaguchi da USP – SP pelas análises de EMAR;

Órgãos de fomento: CAPES, FINEP, CNPq e Fundação Araucária;

Ao meu país;

A todos que me ajudaram de alguma forma, muito obrigada.

“A ciência nunca resolve um problema sem
criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

RESUMO

Neste trabalho foi realizado o fracionamento do extrato em diclorometano (DCM) das raízes de *Dahlstedtia grandiflora* que resultou na identificação de 42 compostos sendo 5 chalconas, 5 flavanonas, 5 flavonas, 5 flavonóis, 5 derivados de dibenzoilmetano, 3 retrochalconas, 1 diidroretrochalcona, 3 rotenoides, 7 biflavonoides e 3 outras substâncias. As estruturas dos compostos foram determinadas utilizando técnicas espectroscópicas de RMN 1D e 2D e espectrometria de massas, todos os compostos identificados são descritos pela primeira vez para esta espécie vegetal, sendo que doze das substâncias identificadas são inéditas na literatura, três são inéditas como produto natural mas conhecidas como produto de síntese e outras doze nunca haviam sido relatadas no gênero *Dahlstedtia*. Os extratos em éter de petróleo, diclorometano e metanol das raízes de *D. grandiflora* foram comparados quanto à composição química utilizando um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos e concluiu-se que os extratos em éter de petróleo e diclorometano possuem cromatogramas sobreponíveis, indicando que a composição química dos extratos é semelhante, porém, o extrato metanólico apresentou um perfil diferente dos outros. O extrato em DCM apresentou atividade significativa contra duas linhagens de células *in vitro*, câncer de mama e de rim, além de menor toxicidade em relação às células normais quando comparado ao controle positivo (doxorubicina), sugerindo que a espécie estudada possui potencial como um agente anti-câncer. A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos não apresentou nenhuma atividade significativa.

Palavras chaves: *Dahlstedtia grandiflora*; Fitoquímica; Flavonoides prenilados.

ABSTRACT

The phytochemical study of roots from *Dahlstedtia grandiflora* lead to the identification of 42 substances: five chalcones, five flavanones, five flavones, five flavonols, five derivatives from dibenzoylmethane, three retrochalcones, one dihydroretrochalcone, three rotenoids, seven biflavonoids and three other substances. The structures were determined using 1D and 2D NMR and mass spectrometry techniques. All the identified substances are being described for the first time in this species, twelve substances are reported for the first time, three are new as natural compounds but known as synthesis product and twelve are reported in the genus *Dahlstedtia* for the first time in the literature. The petroleum ether, dichloromethane and methanol extracts of roots of *D. grandiflora* were compared with each other regarding the chemical composition using high performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector and was observed that the petroleum ether and dichloromethane extracts have very similar chromatogram, which indicates that the chemical composition of both extracts is very alike. On the other hand, the methanolic extract exhibited a different profile from the others. The antiproliferative assays showed that the dichloromethane extract presented potent activity against cell lines human of breast and kidney and revealed less toxicity relative to normal cells compared to positive control (doxorubicin). These results indicate that this species have potential as an anti-cancer agent. The evaluation of the antimicrobial activity of the extracts did not show significant activity.

Keywords: *Dahlstedtia grandiflora*, Phytochemistry, Prenylated flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Novos fármacos anti-câncer aprovados entre 1981 e 2010. (Fonte: NEWMAN e col., 2010).....	2
Figura 2 – Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas (Fonte: GOBBO-NETO e LOPES, 2007)	3
Figura 3 – Estrutura básica dos flavonoides.....	4
Figura 4 – Rota biossintética de flavonoides e 5-desoxiflavonoides em Leguminosae (SANTOS, 2008).....	6
Figura 5 – Algumas classes de flavonoides e origem biossintética (Fonte: CANZI, 2013).	7
Figura 6 – Formação dos grupos A) furano e pirano e B) furano dissustituído (Fonte: DEWICK, 2001).	9
Figura 7 – Estrutura dos flavonoides rotenona, crisina e apigenina.....	10
Figura 8 – Distribuição geográfica de espécies pertencentes à Família Leguminosae (SANNOMIYA, 2001).	11
Figura 9 – Revisão dos flavonoides identificados do gênero <i>Dahlstedtia</i> até 2015.	15
Figura 10 – <i>Dahlstedtia grandiflora</i> . A. hábito; B. aspecto do caule; C. filotaxia; D. detalhe da inflorescência; E. inflorescência; F. flor em destaque; G. fruto imaturo; H. fruto maturo. (Fonte: SILVA, 2010).	16
Figura 11 – (A) Efeito NOE observado em S2 , grupo 2'',2''-dimetilcromeno linear.	40
Figura 12 – Conformação preferencial do anel C de flavanonas e constantes de acoplamento características.	41
Figura 13 – (A) Efeito NOE observado em S16 , grupo 2'',2''-dimetilcromeno angular.....	46
Figura 14 – Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para S6	47
Figura 15 – (A) Efeito NOE observado em S28 , grupo 2'',2''-dimetilcromeno angular.....	54
Figura 16 – (A) Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para S42	55
Figura 17 – (A) Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para S29	56

Figura 18 – Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para S27	60
Figura 19 – (A) Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para S30	63
Figura 20 – Equilíbrio diceto-cetoenólico estabelecido em dibenzoilmetanos.....	65
Figura 21 – (A) Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para S32	68
Figura 22 – Representação da formação de retrochalconas. Em vermelho: unidade derivada da rota do acetato, em verde: unidade derivada da rota do chiquimato.....	72
Figura 23 – Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para S20	73
Figura 24 – Correlações relevantes observadas no experimento HMBC, em CDCl ₃ , para S23	76
Figura 25 – (A) Efeitos NOE esperado para a primeira proposta de S23	76
Figura 26 – (A) Efeitos telhado em S23 (CDCl ₃).....	77
Figura 27 – Proposta de formação dos dímeros unidos por ciclobutano.....	85
Figura 28 – Estrutura parcial observada para a substância S35 , X e Y indicam que a elucidação da substância não foi finalizada com a análise preliminar dos experimentos de RMN.....	86
Figura 29 – Correlações relevantes observadas no experimento HMBC para S37	89
Figura 30 – Correlações relevantes observadas no experimento HMBC para S39 e S40	93
Figura 31 – Correlações relevantes observadas no experimento HMBC, S25	95
Figura 32 – Correlações relevantes observadas no experimento HMBC, S31	96
Figura 33 – Proposta de biogênese I.....	98
Figura 34 – Proposta de biogênese II.....	99
Figura 35: Cromatogramas dos extratos das raízes de <i>D. grandiflora</i> (254 nm).....	100
Figura 36: Sobreposição dos cromatogramas do extrato metanólico das raízes de <i>D. grandiflora</i> (perfil preto) e da substância S14 (perfil vermelho) (254 nm).....	101
Figura 37: Sobreposição dos cromatogramas do extrato metanólico das raízes de <i>D. grandiflora</i> (perfil vermelho) e da substância S23 (perfil preto) (254 nm).....	101
Figura 38: Estrutura da Doxorubicina.....	103

LISTA DE ESPECTROS

E 1: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S1	1
E 2: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S1	1
E 3: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S1	2
E 4: Espectro de massas de baixa resolução de S1	2
E 5: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S18	3
E 6: Espectro de massas de baixa resolução de S18	3
E 7: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S3	4
E 8: Espectro de massas de baixa resolução de S3	4
E 9: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S19	5
E 10: Espectro de massas de baixa resolução de S19	5
E 11: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S2	6
E 12: Experimentos de NOE 1D (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S2	6
E 13: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S2	7
E 14: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S2	7
E 15: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S4	8
E 16: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S4	8
E 17: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S4	9
E 18: Espectro de massas de baixa resolução de S4	9
E 19: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S7	10
E 20: Espectro de massas de baixa resolução de S7	10
E 21: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S16	11
E 22: Experimentos de NOE 1D (9,4 Tesla) em CDCl_3 de S16	11
E 23: Espectro de massas de baixa resolução de S16	12
E 24: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S6	12
E 25: Espectro de massas de baixa resolução de S6	13
E 26: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S8	13
E 27: Espectro de massas de baixa resolução de S8	14
E 28: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S9	14
E 29: Espectro de massas de baixa resolução de S9	15
E 30: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S13	15
E 31: Espectro de massas de baixa resolução de S15	16
E 32: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S42	16
E 33: Espectro de massas de baixa resolução de S42	17
E 34: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S29	17

E 35: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S14 .	18
E 36: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S12 .	18
E 37: Espectro de massas de baixa resolução de S12 .	19
E 38: Espectro de massas de baixa resolução de S14 .	19
E 39: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S27 .	20
E 40: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S27 .	20
E 41: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S27 .	21
E 42: Espectro de massas de baixa resolução de S27 .	21
E 43: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S30 .	22
E 44: Experimentos de NOE 1D (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S30 .	22
E 45: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S5 .	23
E 46: Espectro de massas de baixa resolução de S5 .	23
E 47: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S32 .	24
E 48: Espectro de massas de alta resolução de S41 .	24
E 49: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S10 .	25
E 50: Espectro de massas de baixa resolução de S22 .	25
E 51: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S20 .	26
E 52: Espectro de massas de baixa resolução de S20 .	26
E 53: Espectro de massas de alta resolução de S20 .	27
E 54: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S21 .	27
E 55: Espectro de massas de alta resolução de S21 .	27
E 56: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S24 .	28
E 57: Espectro de massas de alta resolução de S24 .	28
E 58: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S23 .	29
E 59: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em MeOD de S23 .	29
E 60: Espectro de massas de baixa resolução de S23 .	30
E 61: Espectro de massas de alta resolução de S23 .	30
E 62: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S11 .	31
E 63: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S17 .	31
E 64: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S33 .	32
E 65: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S35 .	32
E 66: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S35 .	33
E 67: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S35 .	33
E 68: Espectro de massas de alta resolução de S35 .	34
E 69: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S34 .	34
E 70: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S36 .	35
E 71: Espectro de massas de alta resolução de S34 .	35

E 72: Espectro de massas de alta resolução de S36	35
E 73: Experimentos de NOE 1D (14,1 Tesla) em CDCl ₃ de S34	36
E 74: Espectro de RMN de ¹ H (14,1 Tesla) em CDCl ₃ de S37, S38, S39 e S40	36
E 75: Mapa de correlação direta ¹ H- ¹³ C (14,1 Tesla) em CDCl ₃ de S37, S38, S39 e S40	37
E 76: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl ₃ de S37, S38, S39 e S40	37
E 77: Perfil cromatográfico da fração F14(12)-6 submetida a análise por CL-EMAR (254 nm).....	38
E 78: Perfil cromatográfico da fração F14(12)-6 submetida a análise por CL-EMAR (330 nm).....	38
E 79: Espectros de massas de alta resolução de alguns picos de F14(12)-6	39
E 80: Espectro de RMN de ¹ H (14,1 Tesla) em CDCl ₃ de S25	40
E 81: Mapa de correlação direta ¹ H- ¹³ C (14,1 Tesla) em CDCl ₃ de S25	40
E 82: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl ₃ de S25	41
E 83: Espectro de RMN de ¹ H (14,1 Tesla) em CDCl ₃ de S26	41
E 84: Espectro de RMN de ¹ H (14,1 Tesla) em CDCl ₃ de S31	42
E 85: Mapa de correlação direta ¹ H- ¹³ C (14,1 Tesla) em CDCl ₃ de S25	42
E 86: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl ₃ de S31	43
E 87: Espectro de massas de alta resolução de S31	43

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Fluxograma de obtenção dos extratos das raízes de <i>D. grandiflora</i>	22
Esquema 2: Isolamento de SX	24
Esquema 3: Isolamento de S1, S2 e S3	24
Esquema 4: Isolamento de S1, S2 e S3	25
Esquema 5: Isolamento de S6, S18, S20, S21, S37, S38, S39, e S40	25
Esquema 6: Isolamento de S4, S5, S6, S22 e S23	26
Esquema 7: Isolamento de S1, S4, S14, S20, S21, S22 e S25	26
Esquema 8: Isolamento de S3, S7, S8, S18, S20, S21, S24, S25, S34, S35 e S36	27
Esquema 9: Isolamento de S9 e S19	28
Esquema 10: Isolamento de S5, S10, S12, S23, S26, S31, S32 e S41	28
Esquema 11: Isolamento de S14, S15, S16	29
Esquema 12: Isolamento de S29, S30 e S42	29
Esquema 13: Isolamento de S25, S26 e S27	30
Esquema 14: Proposta de fragmentação para S1	35
Esquema 15: Proposta de fragmentação para S18	36
Esquema 16: Proposta de fragmentação para S3	37
Esquema 17: Proposta de fragmentação para S19	39
Esquema 18: Proposta de fragmentação para S4	43
Esquema 19: Proposta de fragmentação para S7	45
Esquema 20: Proposta de fragmentação para S6 e S16	46
Esquema 21: Proposta de fragmentação para S8	49
Esquema 22: Proposta de fragmentação para S9	53
Esquema 23: Proposta de fragmentação para S15	54
Esquema 24: Proposta de fragmentação para S42	55
Esquema 25: Proposta de fragmentação para S12	58
Esquema 26: Proposta de fragmentação para S14	59
Esquema 27: Proposta de fragmentação para S27	62
Esquema 28: Proposta de fragmentação para S5	67
Esquema 29: Proposta de fragmentação para S22	71
Esquema 30: Proposta de fragmentação para S20 e S21	74
Esquema 31: Proposta de fragmentação para S23	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies pertencentes aos gênero <i>Dahlstedtia</i>	13
Tabela 2: Revisão dos flavonoides identificados das raízes do gênero <i>Dahlstedtia</i>	14
Tabela 3: Tempos de retenção das substâncias submetidas à CG-EM.....	19
Tabela 4: Rendimento dos extratos das raízes de <i>D.grandiflora</i>	22
Tabela 5: Frações agrupadas obtidas por meio da CC flash do extrato DCM das raízes de <i>D. grandiflora</i>	23
Tabela 6: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias S1 e S18	34
Tabela 7: Dados de RMN (14,1 e 9,4 Tesla) das substâncias S2, S3 e S19	38
Tabela 8: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância S4	41
Tabela 9: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias S6, S7 e S16	43
Tabela 10: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância S8	48
Tabela 11: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias S9, S13, S15, S28, S29 e S42	51
Tabela 12: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias S12 e S14	57
Tabela 13: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância S27	61
Tabela 14: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância S30	64
Tabela 15: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância S5, S32 e S41	66
Tabela 16: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias S10 e S22	70
Tabela 17: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias S20, S21 e S24	73
Tabela 18: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância S23 em $CDCl_3$ e em CD_3OD	78
Tabela 19: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias S11 e S17	81
Tabela 20: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância S33	83
Tabela 21: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias S34, S35 e S36	87
Tabela 22: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias S37 e S38	91
Tabela 23: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias S39 e S40	93
Tabela 24: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância S25	95
Tabela 25: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância S26	96
Tabela 26: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância S31	97
Tabela 27: Valores de TGI, em $\mu g.mL^{-1}$, para os extratos em éter de petróleo (EP), diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) de <i>D. grandiflora</i>	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
CL	Cromatografia em fase líquida
δ	Deslocamento químico
<i>d</i>	Dupleto
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dupleto
EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
EP	Éter de Petróleo
EEt	Éter etílico
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
CD ₃ OD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
NADPH	Fosfato de dinucleotido de nicotinamida e adenina
NOE	Efeito Nuclear Overhauser
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C { ¹ H}	Ressonância Magnética Nuclear de carbono desacoplado do núcleo de hidrogênio
<i>s</i>	Simpleto
<i>s/</i>	Simpleto Largo
TMS	Tetrametilsilano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 PRODUTOS NATURAIS	1
1.2 FLAVONOIDES	4
1.2.1 BIOSÍNTESE DOS FLAVONOIDES	5
1.2.2 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DOS FLAVONOIDES	9
1.3 FAMÍLIA LEGUMINOSAE (FABACEAE).....	10
1.3.1 GÊNERO <i>DAHLSTEDTIA</i>	12
2. OBJETIVOS	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 SUPORTES PARA CROMATOGRAFIA	17
3.1.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC).....	17
3.1.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA (CCDP)	17
3.1.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA (CCDA).....	18
3.1.4 REVELADORES	18
3.2 EQUIPAMENTOS.....	18
3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	18
3.2.2 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	18
3.2.3 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	20
3.2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (EMAR).....	20
3.2.5 ROTAÇÃO ÓPTICA.....	20
3.3 ESTUDO FITOQUÍMICO	21
3.3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	21
3.3.2 SECAGEM E MOAGEM	21
3.3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	21
3.3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM DCM	22
3.3.4.1 Fração F11	24
3.3.4.2 Fração F12	24
3.3.4.3 Fração F13	25
3.3.4.4 Fração F14	25

3.3.4.5 Fração F17	26
3.3.4.6 Fração F18	26
3.3.4.7 Fração F19	26
3.3.4.8 Fração F21	28
3.3.4.9 Fração F24	28
3.3.4.10 Fração F28	29
3.3.4.11 Fração F30	29
3.3.4.12 Fração F33	30
3.4 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA <i>IN VITRO</i>	30
3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i>	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 CHALCONAS	32
4.1.1 IDENTIFICAÇÃO DE S1 E S18	33
4.1.2 IDENTIFICAÇÃO DE S2 , S3 E S19	36
4.2 FLAVANONAS.....	41
4.2.1 IDENTIFICAÇÃO DE S4	41
4.2.2 IDENTIFICAÇÃO DE S6 , S7 E S16	43
4.2.3 IDENTIFICAÇÃO DE S8	47
4.3 FLAVONAS E FLAVONÓIS	50
4.3.1 IDENTIFICAÇÃO DE S9 , S13 , S15 , S28 , S29 E S42	50
4.3.2 IDENTIFICAÇÃO DE S12 E S14	57
4.3.3 IDENTIFICAÇÃO DE S27	59
4.3.4 IDENTIFICAÇÃO DE S30	62
4.4 DIBENZOILMETANOS	64
4.4.1 IDENTIFICAÇÃO DE S5 , S32 E S41	65
4.4.2 IDENTIFICAÇÃO DE S10 E S22	69
4.5 RETROCHALCONAS.....	71
4.5.1 IDENTIFICAÇÃO DE S20 , S21 E S24	72
4.6 RETRODIIDROCHALCONA.....	75
4.7 ROTENOIDES	79
4.7.1 IDENTIFICAÇÃO DE S11 E S17	80
4.7.2 IDENTIFICAÇÃO DE S33	82
4.8 BIFLAVONOIDES	84
4.8.1 IDENTIFICAÇÃO DE S34 , S35 e S36	84
4.8.2 IDENTIFICAÇÃO DE S37 E S38	88

4.8.3 IDENTIFICAÇÃO DE S39 E S40	91
4.9 IDENTIFICAÇÃO DE S25 , S26 E S31	94
4.10 PROPOSTA DE BIOGÊNESE DOS FLAVONOIDES DE <i>D. GRANDIFLORA</i>	97
4.11 COMPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>D. GRANDIFLORA</i>	100
4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA <i>IN VITRO</i>	102
4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i>	103
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
REFERÊNCIAS	105
ANEXO	1S

1. INTRODUÇÃO

1.1 PRODUTOS NATURAIS

A Química de Produtos Naturais é, dentro da química brasileira, a mais antiga e uma das linhas de pesquisas que mais possui pesquisadores (PINTO e *col*, 2002). Esta evidência pode ser relacionada à vasta biodiversidade e extensão do território brasileiro, que possui a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta. Estima-se que de 10 a 20% das espécies vivas conhecidas do mundo ocorrem no Brasil, podendo-se esperar uma maior estimativa ao se levar em conta as inúmeras espécies ainda não relatadas (VALLI e *col*, 2012).

O interesse pelo estudo de espécies brasileiras não se restringe aos pesquisadores nacionais, muitos pesquisadores de outros países possuem preferência pelo estudo de espécies nativas do Brasil. Milhares de plantas nativas permanecem desconhecidas, sendo fundamental sua identificação e seu estudo químico por pesquisadores brasileiros para melhor aproveitar esses recursos, pois muitas espécies vegetais possuem potencial em gerar produtos aplicáveis em diversos setores, como o farmacêutico, alimentício, têxtil, agrícola, dentre outros. No Brasil, os primeiros registros de utilização de plantas nativas como medicamentos foram feitos já pelos colonizadores do país. Além disso, os produtos naturais brasileiros tiveram, desde a colonização, grande importância econômica, principalmente pela extração de corantes do pau-brasil, que foi o principal produto de exportação da colônia durante os mais de duzentos anos de colonização pelos portugueses (PINTO e *col*, 2002).

Mesmo atualmente, plantas são utilizadas como principal fonte de cura em muitos países e regiões, estando também, em grande percentual, presentes nos fármacos para a maioria da população mundial. Em relação aos fármacos anti-câncer, mais de 65% dos novos fármacos aprovados entre 1981 e 2010 são de origem natural ou medicamentos que foram produzidos baseando-se em produtos naturais (Figura 1, pg 2) (NEWMAN e *col.*, 2010).

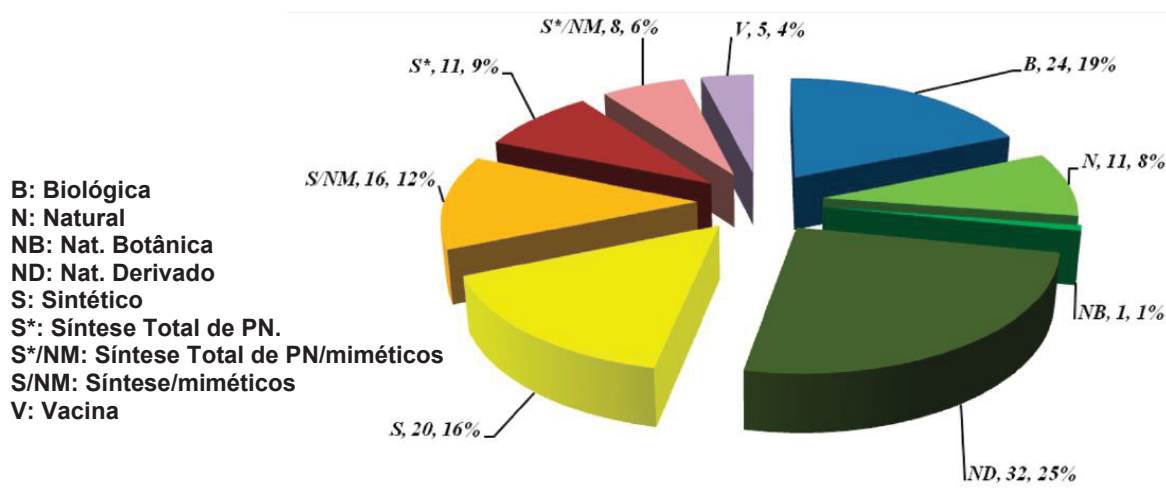


Figura 1 – Novos fármacos anti-câncer aprovados entre 1981 e 2010. (Fonte: NEWMAN e col., 2010)

Em função do grande uso de plantas pela população com a finalidade de tratamento de enfermidades, vários estudos científicos têm sido realizados com o intuito de isolar e identificar os componentes químicos, buscando novos princípios ativos e desvendando os compostos responsáveis pela possível atividade biológica das espécies.

As plantas produzem uma variedade de compostos orgânicos. Alguns desses compostos pertencem ao grupo denominado metabólitos primários, encontrados em todas as plantas e responsáveis pelas funções metabólicas, como os fitoesteroides, lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos. Entretanto, existem compostos que não são necessariamente produzidos por todas as espécies e que não participam diretamente no processo de crescimento e desenvolvimento das plantas, estes são denominados metabólitos secundários ou produtos naturais e são tão importante quanto os metabólitos primários para a espécie vegetal (CROTEAU e col., 2000).

Acredita-se que os metabólitos secundários estejam envolvidos nas interações da planta com outros organismos, como atração de agentes polinizadores e agentes dispersantes de sementes, na prevenção do crescimento de outras plantas e na defesa contra agentes predadores e patógenos, sendo que a produção desses compostos pode variar de acordo com a sazonalidade, condições climáticas dentre outros fatores (CIPOLLINI e col., 1994; DEWICK, 2001; EBY, 1998; MARTIN e col., 1999; MAZZA, 1993; PIETTA e SIMONETTI, 1999; WENNY, 2000, GOBBO-NETO e LOPES, 2007) (Figura 2, pg 3). Uma vez que os metabólitos secundários estão geralmente envolvidos em mecanismos de defesa, esses compostos possuem grande potencial em agirem como princípios bioativos.

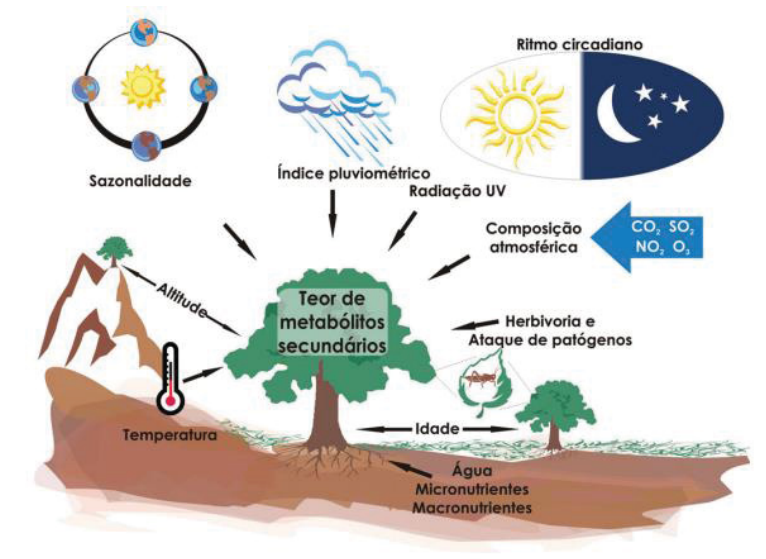


Figura 2 – Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas (Fonte: GOBBO-NETO e LOPES, 2007)

Dois exemplos de compostos, extraídos de espécies vegetais, com princípio ativo determinado são a vincristina, um sal de um alcaloide (sulfato de vincristina) obtido da planta pervinca (*Vinca rósea Linn*); e o taxol, isolado da casca do caule do teixo (*Taxus brevifolia*), os quais são utilizados no tratamento de câncer, por apresentarem função quimioterápica (agentes antineoplásicos) (ANVISA, 2009a; ANVISA, 2009b; GORDALIZA, 2007; SPIRIDON, 2006).

O composto Etoposide (VePesid®) é exemplo de um composto sintético que surgiu baseado no produto natural podofilotoxina, isolado de *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae), uma planta tradicionalmente usada contra o câncer. O medicamento sintético tem sido usado para câncer de testículo e pulmão, mostrando-se menos tóxico e mais potente que o composto natural (KINGHORN, 1987). Desta forma, a pesquisa em produtos naturais demonstra a importância da investigação dos componentes bioativos de espécies vegetais, pois, uma vez descobertos e verificado seu potencial biológico, podem se tornar fontes de medicamentos extraídos diretamente da natureza, ou servirem como modelo para a síntese de novos compostos.

A pesquisa em química de Produtos Naturais no Brasil, teve seu marco associado as pesquisas de isolamento e determinação estrutural, conhecida como fitoquímica clássica. Com a consolidação dessa linha de investigação científica, diversos pesquisadores passaram a ampliar os enfoques das pesquisas englobando trabalhos que envolvem estudos de atividade biológica, ecologia química e biossíntese de micromoléculas. Além disso, houve grande avanço nas pesquisas que visam novas metodologias analíticas no isolamento de produtos naturais. Pode-se enquadrar os diferentes enfoques de pesquisa de produtos

naturais no Brasil em onze linhas de pesquisa: Fitoquímica, Metodologia Analítica, Atividade Biológica, Ecologia Química, Síntese, Biossíntese, Biotransformação, Biotecnologia, Quimiosistemática, Produtos Naturais Marinhos e Química de Microrganismos/Insetos (PINTO *et al.*, 2002).

Além disso, a quimiotaxonomia (classificação de plantas baseada em suas composições químicas - metabólitos secundários), que considera o padrão de ocorrência de metabólitos secundários, fundamentando-se em índices que refletem o grau de oxidação e variações em suas estruturas, auxilia no estabelecimento de grupos de marcadores químicos que em conjunto com outras características das plantas contribuem para a robustez dos estudos taxonômicos do reino vegetal. Uma importante aplicação dos estudos quimiotaxonômicos se dá no uso dessa ciência para auxiliar na busca de classes de substâncias com grande potencial farmacológico e na medicina, uma vez que muitos desses compostos são característicos de certas famílias vegetais (GOTTIEB *et al.* 1996).

1.2 FLAVONOIDES

Flavonoides são caracterizados pela presença de uma estrutura básica, representada na figura 3 (núcleo flavana), que consiste em 15 átomos de carbono dispostos como C6-C3-C6, correspondendo a dois anéis aromáticos interligados por uma unidade de três átomos de carbono, que podem ou não dar origem a um terceiro anel (BRIELMANN *et al.*, 2006; PIETTA, 2000).

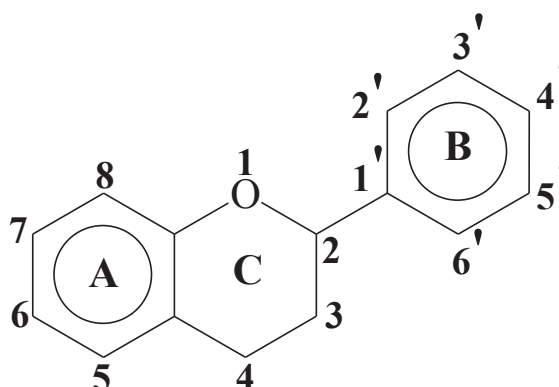


Figura 3 – Estrutura básica dos flavonoides.

Ao englobar as classes de metabólitos secundários, um dos maiores grupos é o dos flavonoides, que, nas plantas, atuam como reguladores no processo de fosforilação, proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (HARBORNE e WILLIAMS, 2000; HEIM

e *col.*, 2002; SIMÕES e PETROVICK, 2000). As flavonas, flavonóis e antocianidinas podem agir como sinais visuais para insetos polinizadores, devido às suas cores atraentes, estando presentes em vinhos, alguns vegetais e bagas, os quais são as maiores fontes de flavonoides na dieta humana (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; HEIM e *col.*, 2002).

Embora geralmente não sejam considerados como nutrientes, os flavonoides são importantes na dieta humana, sendo seu nível de ingestão consideravelmente maior quando comparado com o de vitamina C (70 mg/dia), vitamina E (7-10 mg/dia) e carotenoides (β – caroteno, 2-3 mg/dia) (YAMASAKI e *col.*, 1997). Dependendo do consumo de vegetais e frutos, bem como de bebidas específicas, como vinho tinto, alguns chás e cerveja não filtrada, a ingestão de flavonoides pode variar entre 50 a 800 mg /dia, sendo que o vinho tinto e o chá são os que contêm maior nível de fenólicos totais (LARSON, 1988; PIETTA, 1998).

A distribuição dos flavonoides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo com o filo/ordem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Geralmente, flavonoides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes e frutos. O mesmo composto ainda pode apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra (SIMÕES e *col.*, 2000). Além dos fatores já expostos, fatores abióticos naturais como a radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estações do ano, bem como poluentes, influenciam no metabolismo e na produção desses compostos (CATHERINE e PACKER, 2003; DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Até hoje foram isolados mais de 8.000 flavonoides diferentes, de várias partes da planta como flores, folhas, sementes, frutos, caules e raízes, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos 20 anos (SALES, 1994; SCHENKEL, 2004).

1.2.1 BIODISSÍNTese DOS FLAVONOIDES

A biossíntese dos flavonoides é via mista, ou seja, enquanto 3 unidades de malonil-CoA dão origem ao anel B, o anel A e os três carbonos que interligam os anéis derivam da rota do chiquimato (Figura 4, pg 6) (SANNOMIYA, 2001).

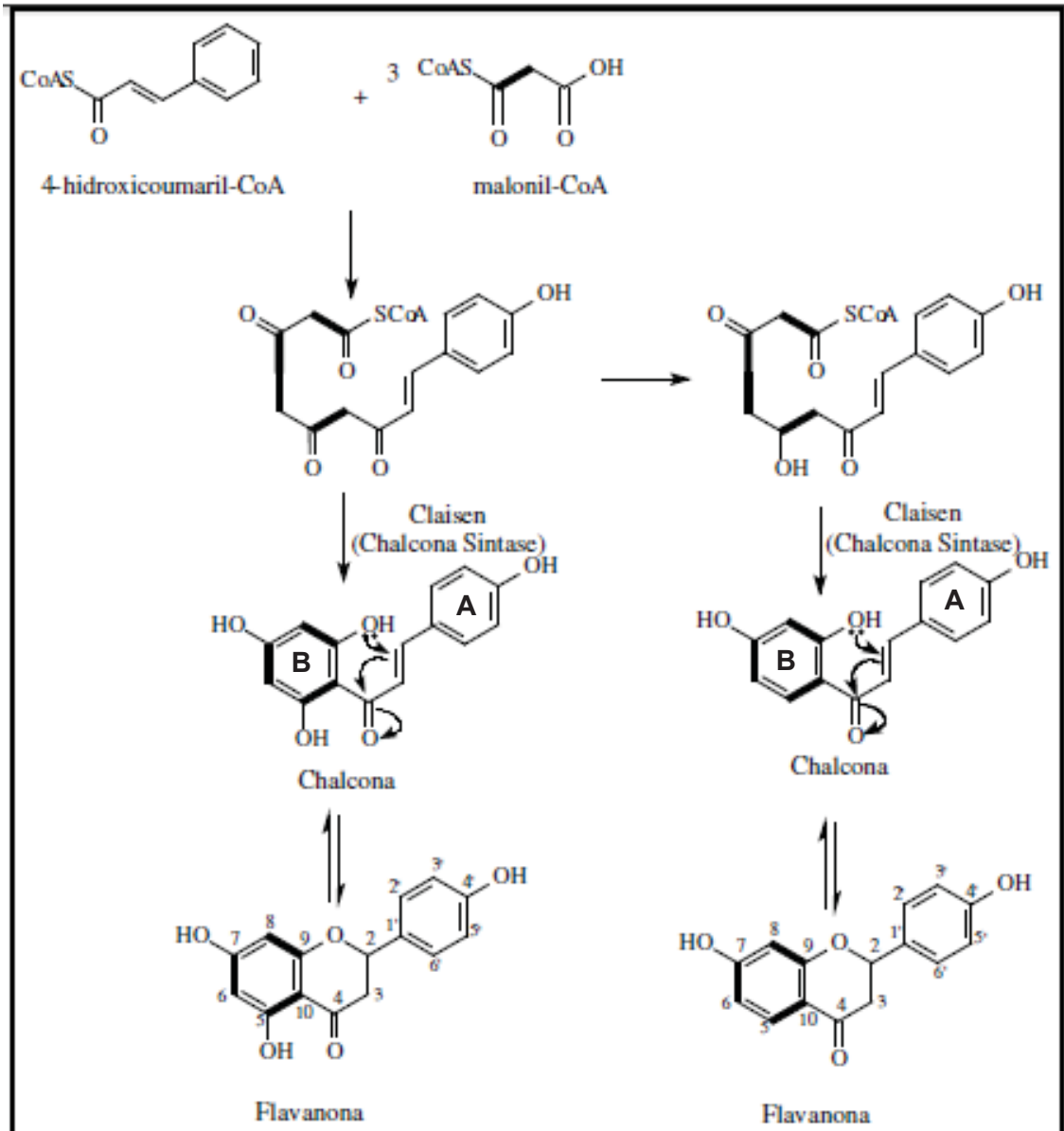


Figura 4 – Rota biossintética de flavonoides e 5-desoxiflavonoides em Leguminosae (SANTOS, 2008).

O primeiro flavonoide a ser formado é a chalcona que facilmente entra em equilíbrio dando origem a flavanona. Esta isomerização se dá por uma adição de Michael com o grupo hidroxílico, agindo como nucleófilo atacando a cetona α,β -insaturada.

As várias classes de flavonoides, como chalconas, flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianinas e isoflavonas, dentre outras apresentadas na figura 5 (Pg 7), diferem no nível de oxidação e padrão de substituição do anel C, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonoide (BRIELMANN e *col.*, 2006). Já seus compostos individuais dentro de uma classe diferem no padrão de substituição dos anéis A, B e C (BRIELMANN e *col.*, 2006; e PIETTA, 2000).

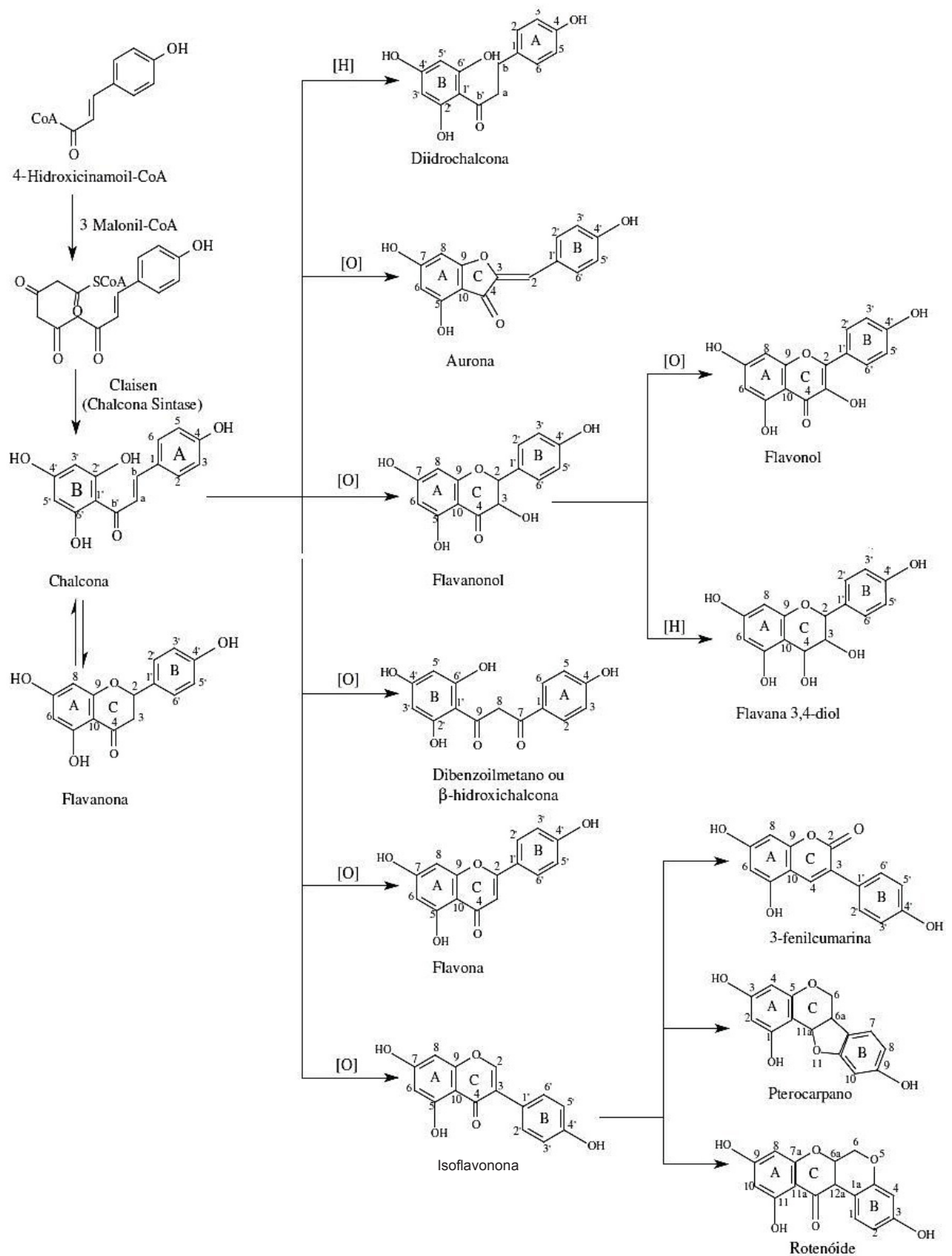


Figura 5 – Algumas classes de flavonoides e origem biossintética (Fonte: CANZI, 2013).

O padrão de hidroxilação do esqueleto básico dos flavonoides (Figura 3) ocorre geralmente nas posições 5, 7 e 4'. Porém, uma característica da maioria dos flavonoides isolados de espécies da família Leguminosae é a ausência de grupo hidroxila na posição 5. A reação de remoção da hidroxila ligada nessa posição é realizada pela enzima redutase que atuando simultaneamente com a enzima chalcona sintase, promove a redução desse grupo, antes da formação das chalconas. Além desta característica, espécies da família Leguminosae possuem grande diversidade estrutural de flavonoides, pois podem ocorrer introdução de hidroxilas nas posições 6, 8 e 2' (do esqueleto básico), metilações de grupos hidroxílicos ou formação de grupos metilenodióxidos e inserção de grupos C-alquílicos, como o grupo prenila. No caso de espécies da subfamília Papilioideae, grupos C-prenila podem sofrer diversas modificações resultando em derivados prenila abertos ou anéis de cinco ou seis membros (HEGNAUER e *col.*, 1993).

Os grupos prenila são derivados da via do mevalonato e as reações de ciclizações do C-prenila ocorrem por ataque nucleofílico do grupo hidroxila ao epóxido formado inicialmente pela oxidação da ligação dupla desse grupo. A diferenciação entre a formação de anéis de seis membros (dimetilpirano) ou de cinco membros (furano) se dá pelas possíveis orientações do ataque nucleofílico realizado por um oxigênio ligado ao flavonoide (Figura 6-a, pg 9).

A biossíntese do anel furano dissustituído é formado pela ação da enzima monooxigenase citocromo P450 que utiliza os cofatores NADPH e oxigênio molecular para realizar a clivagem do grupo hidroxiisopropila. Este processo é iniciado por um mecanismo via radicalar e não envolve a formação de nenhum intermediário hidroxilado (Figura 6-b, pg 9) (DEWICK, 2001).

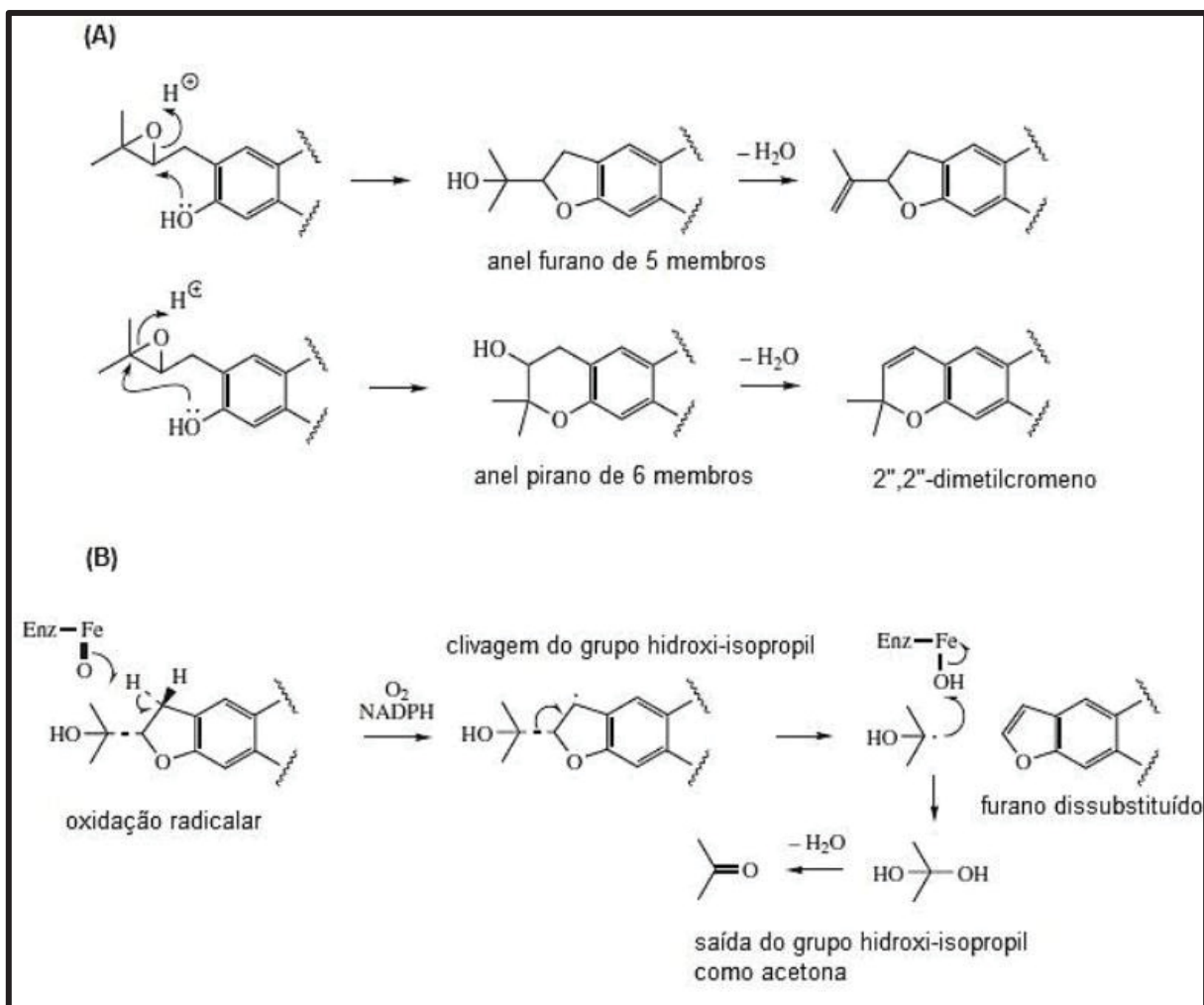


Figura 6 – Formação dos grupos A) furano e pirano e B) furano dissustituído (Fonte: DEWICK, 2001).

1.2.2 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DOS FLAVONOIDES

Os flavonoides se destacam por apresentarem diversas propriedades farmacológicas, relacionadas as estruturas químicas desta classe, que podem variar com diversos padrões de substituições, incluindo hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (BIRT e *col*, 2001). Esses compostos já apresentam diversos relatos de potencial anti-câncer (BLOCK, 1992; BOUMENDJEL e *col.*, 2002; ELANGOVAN e *col.*, 1994, HARBOME e WILLIAMS, 2000; HODEK e *col*, 2002; MIDDLETON, 1996; MIDDLETON e *col.*, 2000; REN e *col.*, 2003), antiviral (SELWAY, 1986), anti-inflamatório (GABOR, 1986; MIDDLETON e *col.*, 1998; MIDDLETON e *col*, 2000), além de apresentarem redução no risco de doenças cardiovasculares (FACINO e *col.*, 1999; HERTOOG e *col.*, 1993; MAZUR e *col.*, 1999; MIDDLETON e *col.*, 2000). Essas atividades biológicas são amplamente atribuídas às propriedades antioxidantes dos flavonoides (MAGALHÃES e *col.*, 2007).

Birt e colaboradores, 2001, descreveram a proliferação celular desregulada como um marcador de aumento da susceptibilidade à neoplasia. A prevenção do câncer geralmente está associada com inibição, reversão ou retardamento da hiperproliferação celular, e muitos flavonoides têm demonstrado inibir a proliferação de linhagens de células cancerosas humanas.

Os flavonoides rotenona, crisina e apigenina, apresentados na figura 7 (Pg 10), já foram citados como potentes inibidores da aromatase, uma enzima que cataliza a aromatização de andrógenos a estrógenos, conhecidos como um dos responsáveis pelo desenvolvimento de câncer de mama (BRUEGGEMEIER e *col.*, 2005; SANDERSON e *col.*, 2004). Ainda, foi demonstrado que há flavonoides que apresentam correlação de dose-resposta entre a inibição do crescimento celular e indução de apoptose em células tumorais (BRUSSELMANS e *col.*, 2005).

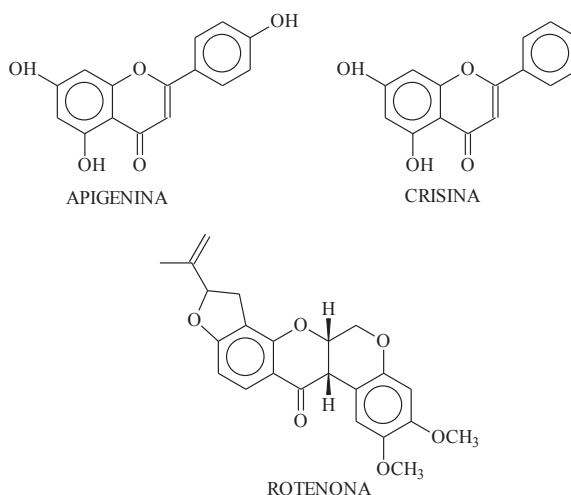


Figura 7 – Estrutura dos flavonoides rotenona, crisina e apigenina.

1.3 FAMÍLIA LEGUMINOSAE (FABACEAE)

A família Leguminosae (Fabaceae) constitui a terceira maior família florífera de angiospermas, abrangendo aproximadamente 750 gêneros, 19.327 espécies e três subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae) (WINK, 2003 e SILVA e *col.*, 2012). Sua distribuição é cosmopolita, ou seja, pode ser encontrada quase em qualquer lugar do mundo. Encontra-se em abundância nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas dos dois hemisférios atmosféricos, um grande número de espécies estão adaptadas a climas áridos e semidesérticos e podem ser encontradas até em regiões alpinas e sub árticas (Figura 8, pg 11). Porém as árvores dessa família são mais representativas nos trópicos e hemisfério

Sul, enquanto as espécies arbustivas e herbáceas encontram-se em maior proporção na zona temperada, principalmente no mediterrâneo (SILVA e col., 2012)



Figura 8 – Distribuição geográfica de espécies pertencentes à Família Leguminosae (SANNOMIYA, 2001).

Esta família possui grande importância econômica, uma vez que engloba diversas espécies alimentícias e espécies que fornecem madeira de alta qualidade. Uma importante particularidade dessa família é seu alto teor de flavonoides (SANNOMIYA, 2001). Sendo que as espécies pertencentes a essa família produzem além de flavonas, flavonóis, chalconas e flavanonas, os isoflavonoides, cuja ocorrência é menos comum na natureza (SANNOMIYA, 2001). As espécies pertencentes a esta família possuem a característica unificadora de possuir como fruto um legume, conhecido popularmente como vagem. Como exemplo, o feijão, soja, lentilha, ervilha e grão de bico são legumes de espécies da família Leguminosae. Em relação às árvores conhecidas, temos o pau-brasil (*Caesalpinia echinata*).

Dentre as subfamílias, destaca-se a Papilinoideae, sendo a maior das três, com 28 tribos, 440 gêneros e cerca de 13.800 espécies (SANNOMIYA, 2001 e SILVA, 2012). Do ponto de vista ecológico, é amplamente conhecido a característica desta e das outras subfamílias de apresentarem simbiose de suas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium* e semelhantes, que contribuem para a fixação do nitrogênio atmosférico nas espécies vegetais. Nesta relação, as bactérias obtêm das plantas fonte de carbono, energia e aminoácidos, liberando o nitrogênio fixado que será convertido em nitrogênio orgânico e utilizado pela planta num processo de grande complexidade e dependência mútua (LODWIG e col., 2003).

A tribo Millettieae (Papilinoideae) composta por cerca de 910 espécies e 45 gêneros apresenta complexa classe de metabólitos secundários. Dentre os gêneros neotropicais de Millettieae, tem-se o gênero *Dahlsledtia* que é muito semelhante morfológicamente com o gênero *Lonchocarpus* (SILVA e col., 2012).

Tanto o gênero *Lonchocarpus* quanto o *Dahlstedtia* destacam-se por apresentar uma vasta quantidade de flavonoides em seus extratos, dos quais, alguns apresentam importantes propriedades farmacológicas. Apesar de ser um gênero com muitos estudos químicos e biológicos na literatura, ainda hoje se observa o isolamento de metabólitos secundários inéditos na natureza, os quais apresentam significativa atividade biológica, como atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes, antivirais e fungicidas.

1.3.1 GÊNERO DAHLSTEDTIA

O gênero *Dahlstedtia* Malme possui distribuição neotropical, com centro de diversidade na porção sul da América do Sul, compreendendo as regiões sul e sudeste do Brasil, as espécies apresentam porte arbustivo/arbóreo e flores grandes de coloração vistosa. De acordo com Silva, 2012, estudos filogenéticos, de recircunscrição e revisão do gênero *Dahlstedtia*, indicaram que a seção *Punctati* pertencente ao gênero *Lonchocarpus sensu lato* apresentava características morfológicas parecidas com espécies de *Dahlstedtia*, o que ocasionou a transferência dessas espécies (seção *Punctati*) para o gênero *Dahlstedtia*. Desta forma, as espécies de *Lonchocarpus sect. Punctati sensu* (Benth.) Taub. p. p. (*L. bahianus*, *L. araripensis*, *L. castaneifolius*, *L. confertiflorus*, *L. hylobius*, *L. glaziovii*, *L. grandiflorus*, *L. muehlbergianus*, *L. calcaratus* e *L. subglaucescens*) e *L. peckoltii* foram reclassificadas para o gênero *Dahlstedtia*. Com esta reclassificação, o gênero *Dahlstedtia*, que possuía apenas 2 espécies e outras 3 espécies descobertas recentemente, passou a totalizar 16 espécies (Tabela 1, pg 13) (SILVA e col., 2010; SILVA e col., 2012; GARCEZ e col., 1998; LIMA e col., 2009; MAGALHÃES e col., 2004; LIU e col., 2008).

Tabela 1: Espécies pertencentes aos gênero *Dahlstedtia*.

Espécies de <i>Dahlstedtia</i> Malme	Nomenclatura antiga
<i>D. pentaphylla</i>	
<i>D. erythrina</i>	<i>Dahlstedtia pinnata</i>
<i>D. burkartii</i> ^a	
<i>D. dehiscens</i> ^a	
<i>D. gwilymii</i> ^a	
<i>D. peckoltii</i> ^b	<i>Lonchocarpus peckoltii</i>
<i>D. araripenses</i>	<i>Lonchocarpus araripensis</i> / <i>Derris araripensis</i>
<i>D. bahiana</i> ^b	<i>Lonchocarpus bahianus</i>
<i>D. calcarata</i> ^b	<i>Lonchocarpus calcaratus</i>
<i>D. castaneifolia</i> ^b	<i>Lonchocarpus castaneiflorus</i>
<i>D. confertiflora</i> ^b	<i>Lonchocarpus confertiflorus</i>
<i>D. floribunda</i> ^b	<i>Lonchocarpus subglaucescens</i>
<i>D. glaziovii</i> ^b	<i>Lonchocarpus glaziovii</i>
<i>D. grandiflora</i> ^b	<i>Lonchocarpus grandiflorus</i>
<i>D. hylobia</i> ^b	<i>Lonchocarpus hylobius</i>
<i>D. muehlbergiana</i> ^b	<i>Lonchocarpus muehlbergianus</i>

^a Novas espécies.

^b Espécies reclassificadas quanto ao gênero pertencente.

Até o momento, apenas 6 espécies do gênero *Dahlstedtia* foram estudadas quimicamente. A revisão bibliográfica (Tabela 2, pg 14) (Figura 9, pg 15) dos produtos naturais das espécies estudadas indica que esse gênero é caracterizado quimicamente pela biossíntese de flavonoides prenilados, compostos que geralmente apresentam atividade biológica contra diversas patologias. Desta forma, o estudo químico destas espécies tende a contribuir para a busca de novos compostos com potencial bioativo. Além disso, uma vez que os gêneros *Dahlstedtia* e *Lonchocarpus* são muito semelhantes morfológicamente, o estudo químico de espécies desses gêneros é de grande importância para contribuir com a quimiotaxonomia dos mesmos.

Tabela 2: Revisão dos flavonoides identificados das raízes do gênero *Dahlstedtia*.

Espécie	Classe das substâncias (nº das estruturas – Figura 8)	Referência
<i>Dahlstedtia araripenses</i>	Diidrochalcona (1); flavanonol (9, 10); flavonol (24, 25, 32, 33); flavona (26); flavana (37, 44).	NASCIMENTO e col., 1980
<i>Dahlstedtia erythrina</i>	Chalcona (6); dibenzoilmetano (51, 52); flavona (20, 23, 31, 34, 35); rotenoide (61).	GARCEZ e col., 1988
<i>Dahlstedtia floribunda</i>	Diidrochalcona (2); chalcona (3, 4); flavanonol (11); flavanona (12, 14, 15, 16); flavona (28, 31); dibenzoilmetano (54, 55, 56, 57); flavana (37, 38, 39, 44, 45, 46); isoflavona (48); rotenoide (62).	MAGALHÃES e col., 1996
<i>Dahlstedtia glaziovii</i>	Chalcona (5, 6); flavanona (13, 14); flavonol (21, 22, 29, 30); flavona (20, 23, 28, 31); dibenzoilmetano (49, 50, 54, 55, 56, 58); rotenoide (60).	CANZI e col., 2014
<i>Dahlstedtia muehlbergiana</i>	Flavana (40, 41, 42, 43, 46, 47); flavanol (32); flavona (27); dibenzoilmetano (53, 57).	MAGALHÃES e col., 2004
<i>Dahlstedtia pentaphylla</i>	Chalcona (6, 7, 8); flavanona (13, 17, 18, 19); flavonol (21, 29, 32, 30); flavona (20, 28); pterocarpano (59).	GARCEZ e col., 1988

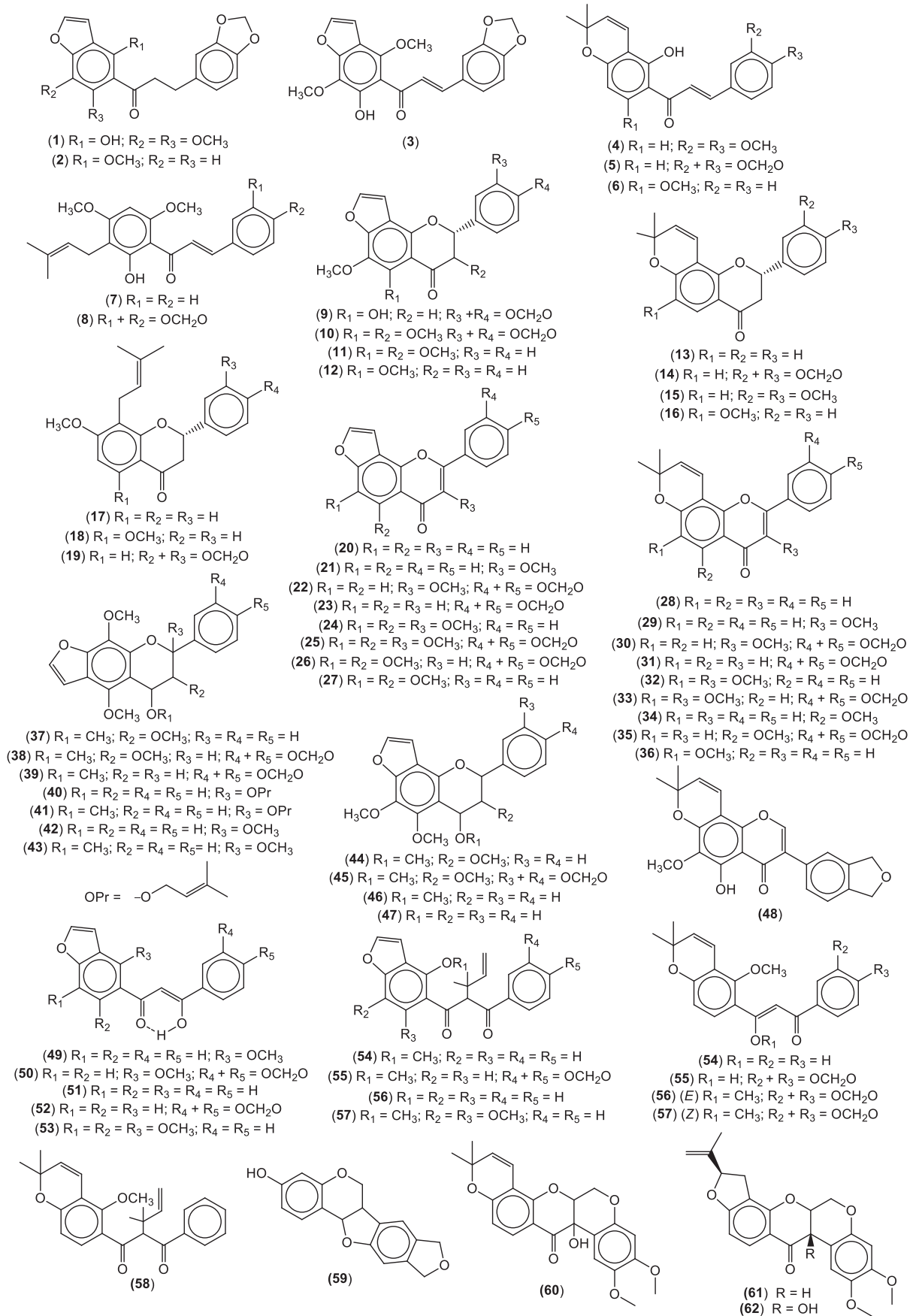


Figura 9 – Revisão dos flavonoides identificados do gênero *Dahlstedtia* até 2015.

.1.3.2 ESPÉCIE DE ESTUDO (*DAHLSTEDTIA GRANDIFORA*)

D. gradiflora (*Lonchocarpus grandiflorus*) é uma espécie rara endêmica das encostas das Florestas Ombrófilas Densas encontradas no estado do Rio de Janeiro, apresentando um padrão Atlântico (Figura 10). Esta espécie não apresenta relatos de estudo fitoquímico na literatura.

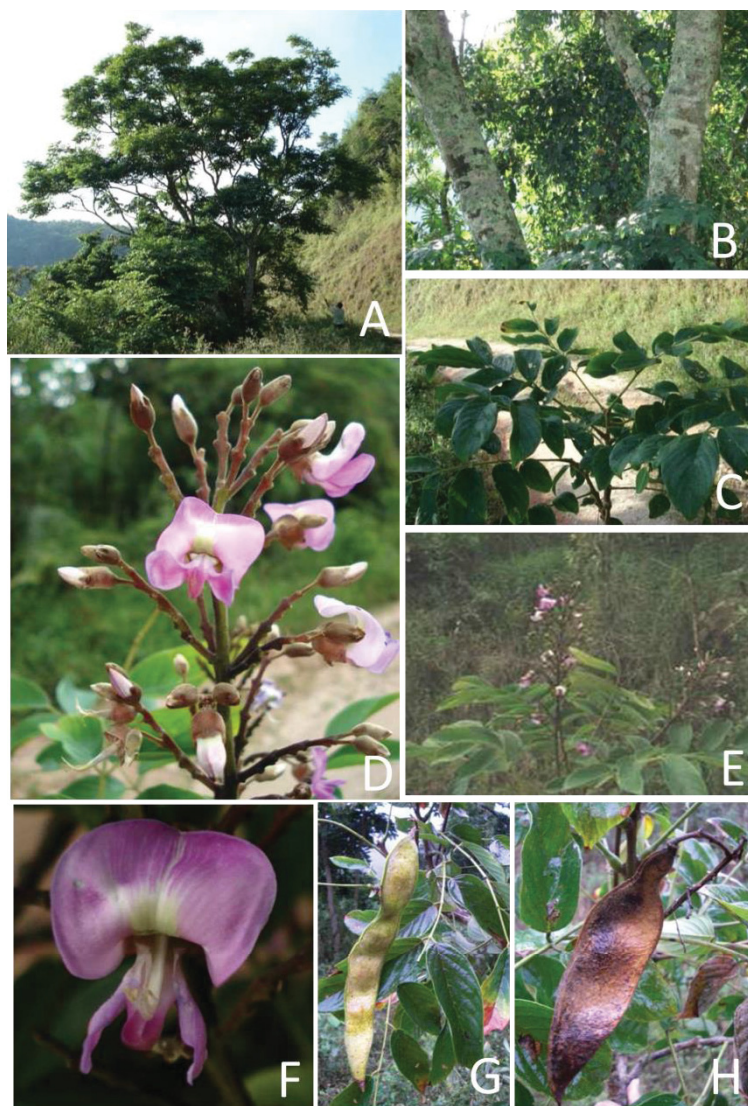


Figura 10 – *Dahlstedtia grandiflora*. **A.** hábito; **B.** aspecto do caule; **C.** filotaxia; **D.** detalhe da inflorescência; **E.** inflorescência; **F.** flor em destaque; **G.** fruto imaturo; **H.** fruto maturo. (Fonte: SILVA, 2010).

Este trabalho propõe o estudo fitoquímico das raízes de *D. grandiflora*, visando o isolamento, determinação estrutural e realização de testes de atividade biológica dos extratos das raízes desta espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Este trabalho tem como objetivo estudar a composição química e avaliar a atividade biológica de raízes de *Dahlstedtia grandiflora* (Az-Tozzi).

2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar os constituintes químicos dos extratos das raízes de *Dahlstedtia grandiflora*;
- Realizar ensaios de atividade antiproliferativa e antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana) dos extratos;
- Ampliar o conhecimento da composição química das espécies de plantas características da flora brasileira;
- Contribuir para a quimiotaxonomia do gênero *Dahlstedtia* (*Lonchocarpus*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SUPORTES PARA CROMATOGRAFIA

3.1.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)

Para a cromatografia em coluna (CC) foram utilizadas colunas de vidro contendo fase estacionária de gel de sílica 60, de partículas de tamanho entre 0,040 e 0,063 mm (230-350 mesh). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade de amostra submetida à cromatografia.

3.1.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA (CCDP)

As purificações em camada delgada em escala preparativa (CCDP) foram desenvolvidas em placas de vidro de tamanho 20 cm x 20 cm ou 10 cm x 10 cm, com espessura de 1 mm de gel de sílica com indicador de fluorescência F₂₅₄. A recuperação das amostras foi efetuada utilizando solventes como: diclorometano, acetato de etila e metanol.

3.1.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA (CCDA)

As análises em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio, que contém como fase estacionária gel de sílica 60 com partículas de 0,2 mm de espessura e indicador de fluorescência F_{254} . As eluições dos compostos foram acompanhadas com o auxílio de reveladores.

3.1.4 REVELADORES

A revelação das substâncias foi feita sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, solução de anisaldeído e solução etanólica de H_2SO_4 (5% v/v).

3.2 EQUIPAMENTOS

3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas no centro de RMN da Universidade Federal do Paraná. Os experimentos de RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$, NOE 1D, HSQC e HMBC foram obtidos em espectrômetros Bruker DPX 200 (com uma sonda QNP de 5 mm), Avance III 400 NMR (com sondas multinucleares de observação direta (BBO) e inversa (BBI) de 5 mm) e Avance III HD 600 NMR (com uma sonda multinuclear QXI de 5 mm), operando a 4,7, 9,4 e 14,1 Tesla respectivamente e observando o núcleo de hidrogênio a 200, 400 e 600 MHz, e o núcleo de carbono-13 a 50, 100 e 150 MHz, respectivamente. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) ou metanol deuterado (CD_3OH) contendo TMS. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm (δ) e referenciados em relação ao TMS (0,00 ppm). As constantes de acoplamentos (J) foram registradas em Hertz (Hz).

3.2.2 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

As análises de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas de baixa resolução foram obtidas no Laboratório de Ecologia Química e Síntese Orgânica (LECOSIN) no DQ UFPR. Os dados foram obtidos em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu® GCMS-QP2010 Plus. Cada amostra foi diluída a aproximadamente 1% (m/v) em diclorometano ultra puro e analisada utilizando as seguintes

condições de análise: coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetilpolisiloxano) com 30m de comprimento, 0,22 mm de diâmetro e 0,25 μm de espessura do filme. Como gás de arraste foi empregado hélio com vazão de 1,02 mL/min em modo split 1:10. A temperatura do injetor foi de 250°C e o sistema de ionização em 70 eV. Foi injetado 1 μL de amostra na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial de 100°C até 200°C, com aquecimento de 3°C por minuto. A tabela 3 contém o tempo de retenção (Rt) de cada substância, identificada neste trabalho, submetida a análise por CG-EM.

Tabela 3: Tempos de retenção das substâncias submetidas à CG-EM.

Substância	Tempo de retenção (min)
S1	8,3
S3	11,6
S4	8,5
S5	11,6
S6	10,9
S7	10,0
S8	10,6
S9	13,3
S10	10,8
S12	10,4
S14	10,3
S15	12,5
S16	12,1
S18	9,6
S19	11,7
S20	10,3
S21	8,4
S22	10,4
S23	8,7
S27	14,6
S42	13,9

3.2.3 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para separação por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE), foi utilizado um cromatógrafo Waters com uma bomba quaternária e injeção automática pertencente ao DQ UFPR. A detecção foi feita com um detector de arranjo de fotodiodos modelo 2998. As análises foram conduzidas utilizando colunas de fase reversa analítica X-Terra C18, 5 μm , 250 x 4,6 mm, ou semipreparativa X-Terra C18, 10 μm , 300 x 7,8, ambas da marca Waters. Como fase móvel foram utilizadas misturas de Acetonitrila (ACN) grau CLAE, filtrada em membrana de nylon (0,45 μm) (Millipore, Brasil) e água ultrapura obtida através de sistema Milli-Q, sendo os solventes desgaseificados por 30 minutos em banho de ultrassom. As amostras foram filtradas em filtro Millex®HV PVDF (0,45 μm) (Millipore®, Ireland).

3.2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (EMAR)

As análises de CL-EM, afim de obter os espectros de massas de alta resolução dos compostos inéditos, foram realizadas no laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os espectros de massas de alta resolução foram adquiridos usando um MS MicroQTOF II (Bruker) quadrupolo (6 eV), equipado com uma fonte de ionização por eletrospray. As aquisições foram feitas em modo positivo ou negativo, dependendo da substância analisada. As condições de análise foram: célula de colisão 12 eV, capilar 3500 V, nebulização de nitrogênio a 4 Bar e temperatura a 200 °C. Para as substâncias puras, as amostras foram injetadas diretamente no espectrômetro de massas, enquanto que as substâncias em mistura foram submetidas a cromatografia em fase líquida num cromatógrafo da Shimadzu, acoplado ao espectrômetro de massas, utilizando uma coluna Phenomenex Luna C18, 3 μm , 150 x 2 mm, forno para colunas: 40 °C, fluxo: 0,2 ml/min, com detector de comprimento de onda UV:254 e 330 nm. Os solventes utilizados foram: H₂O + 0,1 % de ácido fórmico e MeOH + 0,1 % de ácido fórmico no seguinte gradiente: 1 a 2 min 63 % MeOH, 2 a 25 min 63 a 100 % de MeOH, 25 a 28 min 100 % de MeOH.

3.2.5 ROTAÇÃO ÓPTICA

As análises de rotação ótica específicas (OR) foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (DQ UFPR). Os valores de rotação ótica foram determinados em CHCl₃, usando um polarímetro Jasco modelo P-2000 equipado com uma

lâmpada de sódio (589 nm), a temperatura ambiente. Os valores de rotação óptica específica foram calculados baseado na fórmula a seguir:

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

$[\alpha]_D$ = rotação óptica específica

α = rotação óptica observada

c = concentração em $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

l = caminho óptico da cela (1dm)

3.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

3.3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

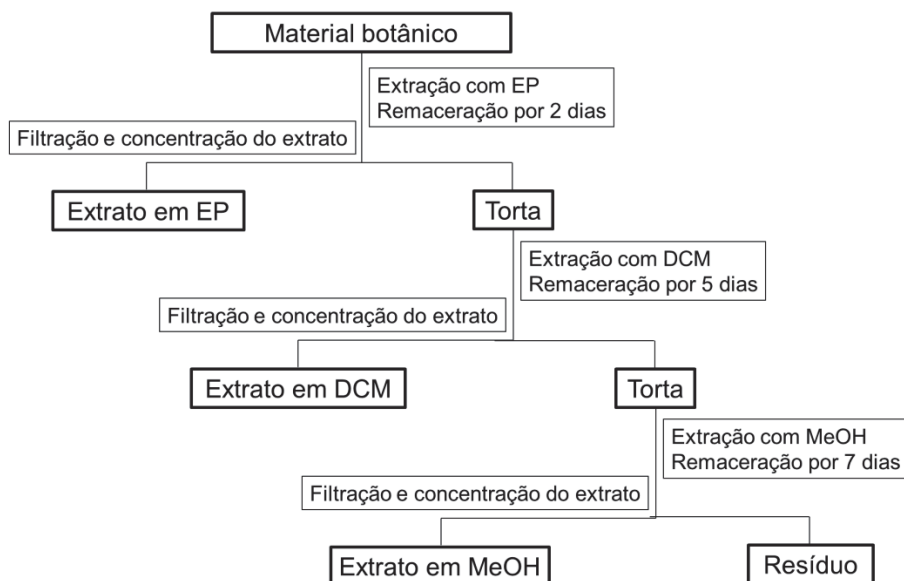
O material vegetal da espécie *Dahlstedtia grandiflora* (Az-Tozzi) foi coletado no estado do Rio de Janeiro em Petrópolis, às margens do Rio Piabanha na Estrada da torre da Embratel, cerca 1 km da torre (22° 30' 10''S, 43° 23' 25''W) e identificado pelos botânicos Dra. Ana Maria Tozzi, do Instituto de Biologia da Unicamp e Dr. Marcos Silva, do Departamento de Biologia da UFG. As exsicatas estão depositadas no herbário da Unicamp sob o número 1077 (UEC-RB).

3.3.2 SECAGEM E MOAGEM

Depois de coletado, o material botânico da espécie em estudo foi pré-seco à sombra, à temperatura ambiente, e depois colocado em estufa de ar circulante a 40 °C, sendo em seguida triturado em moinho de quatro facas Marconi TE340.

3.3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Após seco, moído e pesado, o material vegetal (138,5 gramas de raízes) foi submetido à extração a frio (remaceração) com solventes de ordem crescente de polaridade: éter de petróleo (EP), diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) com renovação do solvente em intervalos de 24 horas, numa média de quatro trocas de cada solvente, conforme o esquema 1 (pg 22). O resíduo remanescente foi desprezado. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e armazenados em dessecador. Os rendimentos dos extratos são apresentados na tabela 1 (Pg 22).



Esquema 1: Fluxograma de obtenção dos extratos das raízes de *D. grandiflora*.

Tabela 4: Rendimento dos extratos das raízes de *D. grandiflora*.

Extrato	Rendimento (g)	Rendimento (%)
EP	0,7726	0,56
DCM	2,3425	1,69
MeOH	7,3679	5,32

3.3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM DCM

O extrato diclorometano (2,2 g) foi submetido ao fracionamento cromatográfico por meio de uma coluna cromatográfica flash (CC, diâmetro interno = 3,0 cm) empacotada com gel de sílica (0,040-0,063 mm, 12 cm), eluída com éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 51 frações. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com similaridades em relação aos respectivos fatores de retenção (R_f s) e padrão de revelação frente ao anisaldeído resultando em 34 frações (tabela 5, pg 23).

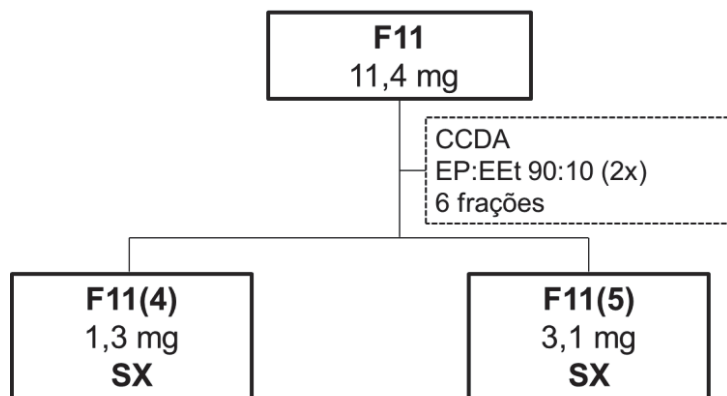
Tabela 5: Frações agrupadas obtidas por meio da CC flash do extrato DCM das raízes de *D. grandiflora*.

Frações agrupadas (Fração)	Massa (mg)	Frações agrupadas (Fração)	Massa (mg)
1-8 (F1)	70,8	33-35 (F33)	169,7
9-10 (F9)	10,8	36 (F36)	64,4
11 (F11)	14,4	37 (F37)	34,9
12 (F12)	12,8	38 (F38)	29,4
13 (F13)	14,9	39 (F39)	37,0
14-16 (F14)	44,0	40 (F40)	20,6
17 (F17)	24,6	41 (F41)	18,9
18 (F18)	24,3	42 (F42)	146,1
19-20 (F19)	121,0	43 (F43)	26,3
21 (F21)	16,6	44 (F44)	17,9
22 (F22)	9,5	45 (F45)	24,1
23 (F23)	15,3	46 (F46)	26,1
24-26 (F24)	110,0	47 (F47)	33,9
27 (F27)	321,1	48 (F48)	38,1
28 (F28)	113,0	49 (F49)	11,4
29 (F29)	198,4	50 (F50)	10,6
30-32 (F30)	177,3	51 (F51)	12,9
Total		2,0211 g	

Todas as frações brutas foram submetidas a análises por RMN (1D e 2D). As frações **F1**, **F9**, **F37** a **F51**, não apresentaram sinais relativos a flavonoides nos espectros de RMN de ¹H então, exceto a fração **F42**, não foram submetidas a demais etapas de purificação, sendo que o fracionamento da fração **F42** não levou ao isolamento de nenhum flavonoide. As frações **F22** (**S9** e **S19**), **F23** (**S9** e **S10**), **F27** (**S11**, **S12**, **S13** e **S33**), **F29** (**S14**, **S15**, **S17** e **S33**) e **F36** (**S28**) tiveram os compostos identificados em mistura e não foram submetidas a outras etapas de purificação. Os próximos tópicos (3.3.4.1 – 3.3.4.12) apresentam os esquemas das etapas de purificações das demais frações do extrato DCM, por técnicas cromatográficas CC, CCDP/CCDA e CLAE.

3.3.4.1 Fração F11

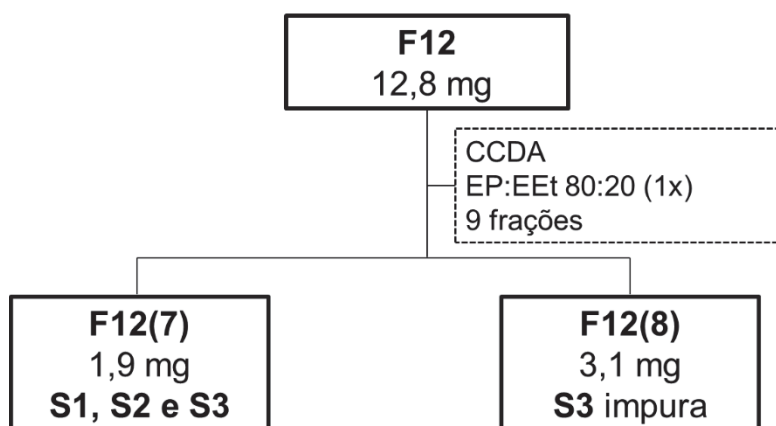
O Esquema 2 apresenta a etapa de purificação de **F11** (11,4 mg), que resultou no isolamento de 1 substância: **SX**, cuja determinação estrutural ainda não foi finalizada.



Esquema 2: Isolamento de **SX**.

3.3.4.2 Fração F12

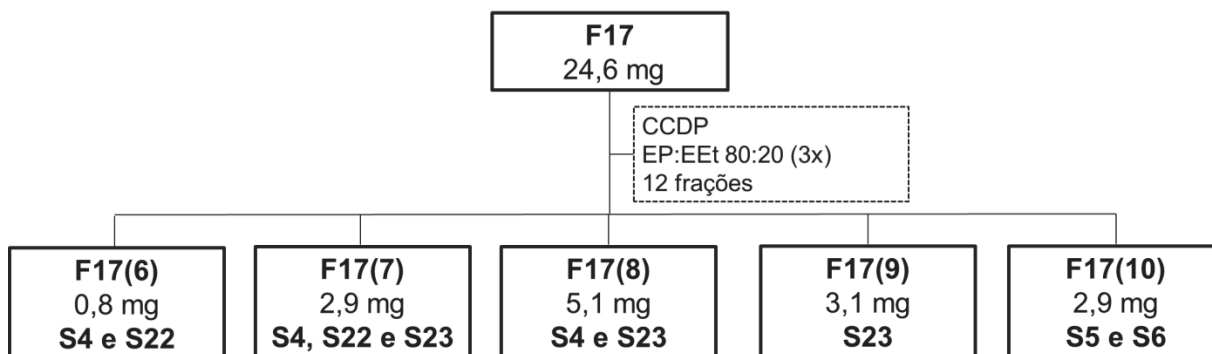
O Esquema 3 apresenta a etapa de purificação de **F12** (12,8 mg), que resultou na identificação de 3 substâncias: **S1**, **S2** e **S3**.



Esquema 3: Isolamento de **S1**, **S2** e **S3**.

3.3.4.5 Fração **F17**

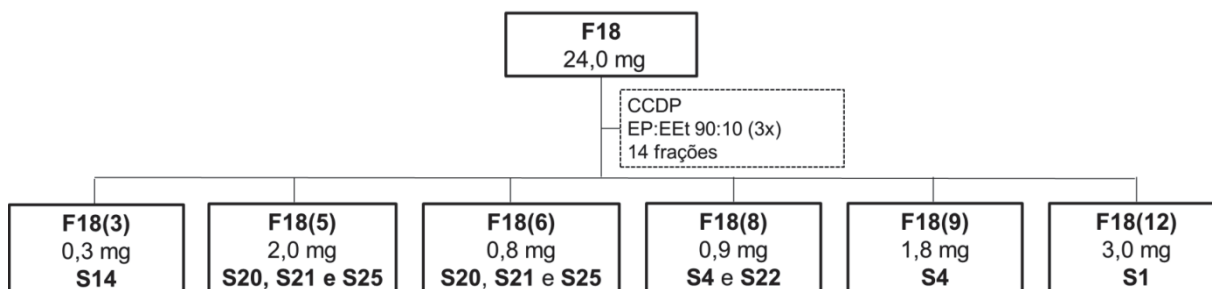
O Esquema 6 apresenta a etapa de purificação de **F17** (24,6 mg), que resultou na identificação das substâncias: **S4, S5, S6, S22 e S23**.



Esquema 6: Isolamento de **S4, S5, S6, S22 e S23**.

3.3.4.6 Fração **F18**

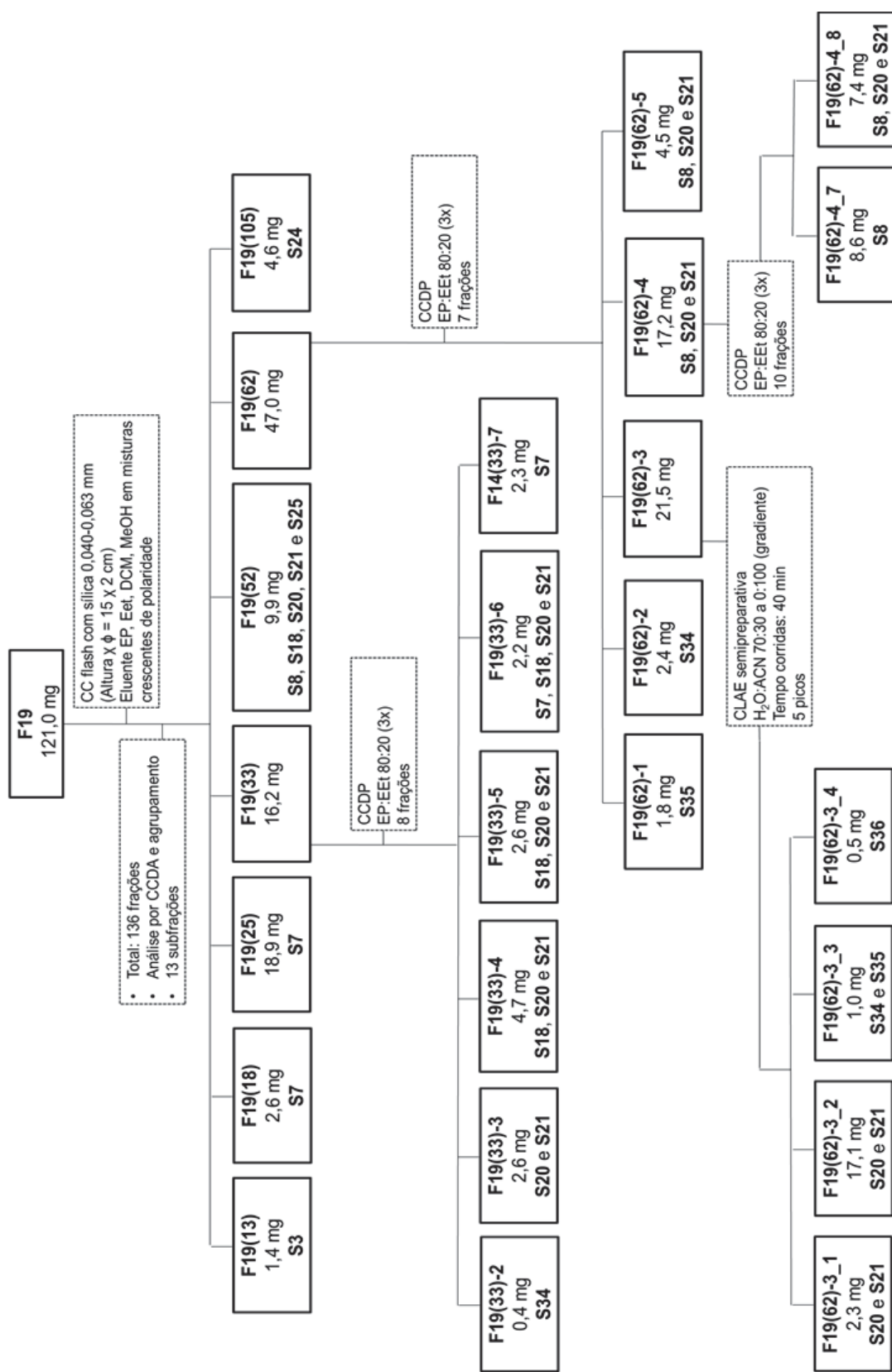
O Esquema 7 apresenta a etapa de purificação de **F18** (24,0 mg), que resultou na identificação das substâncias: **S1, S4, S14, S20, S21, S22 e S25**.



Esquema 7: Isolamento de **S1, S4, S14, S20, S21, S22 e S25**.

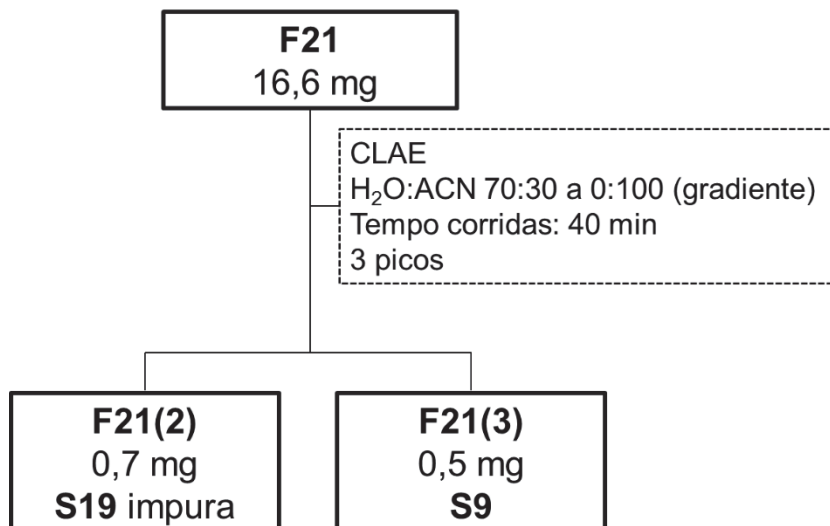
3.3.4.7 Fração **F19**

O Esquema 8 apresenta as etapas de purificação de **F19** (agrupamento das frações 19 e 20 - 121,0 mg), que resultou na identificação das substâncias: **S3, S7, S8, S18, S20, S21, S24, S25, S34, S35 e S36**.



3.3.4.8 Fração **F21**

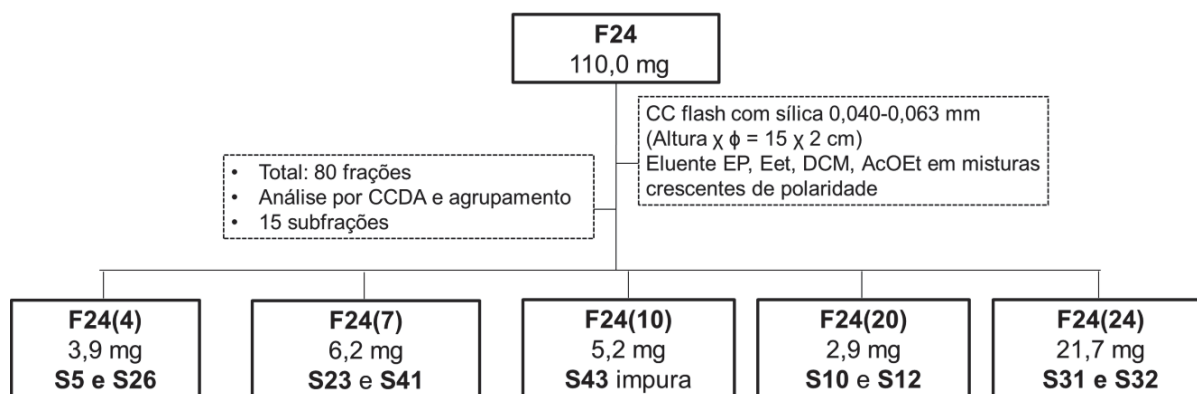
O Esquema 9 apresenta a etapa de purificação de **F21** (16,6 mg), que resultou na identificação das substâncias: **S9** e **S19**.



Esquema 9: Isolamento de **S9** e **S19**.

3.3.4.9 Fração **F24**

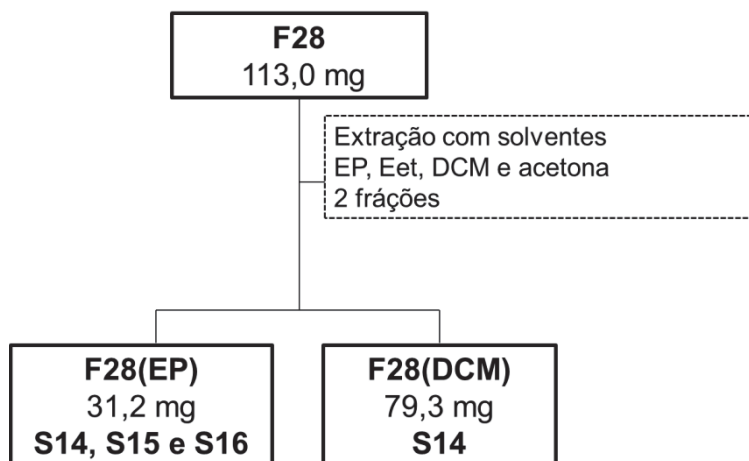
O Esquema 10 apresenta a etapa de purificação de **F24** (110,0 mg), que resultou na identificação das substâncias: **S5**, **S10**, **S12**, **S23**, **S26**, **S31**, **S32** e **S41**.



Esquema 10: Isolamento de **S5**, **S10**, **S12**, **S23**, **S26**, **S31**, **S32** e **S41**.

3.3.4.10 Fração **F28**

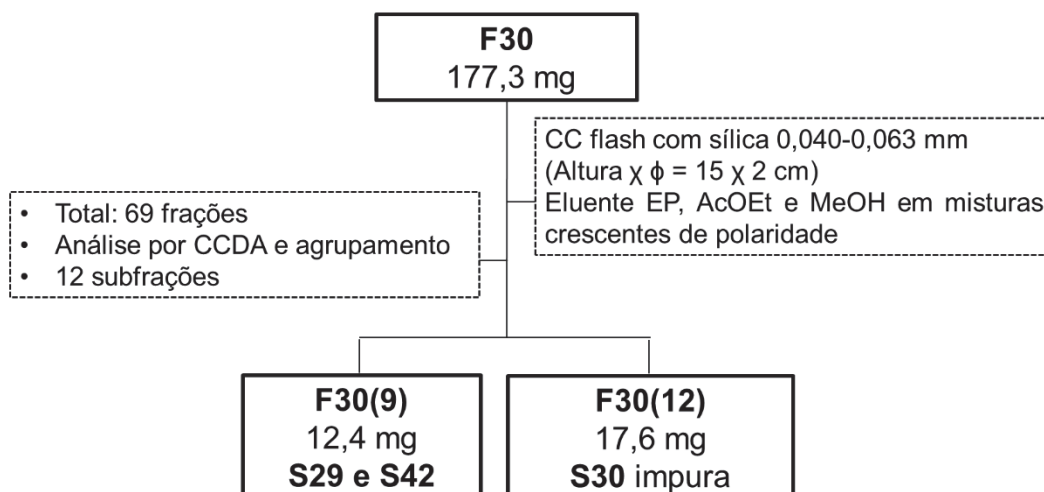
O Esquema 11 apresenta a etapa de purificação de **F28** (113,0 mg), que resultou na identificação das substâncias: **S14**, **S15** e **S16**.



Esquema 11: Isolamento de **S14**, **S15**, **S16**.

3.3.4.11 Fração **F30**

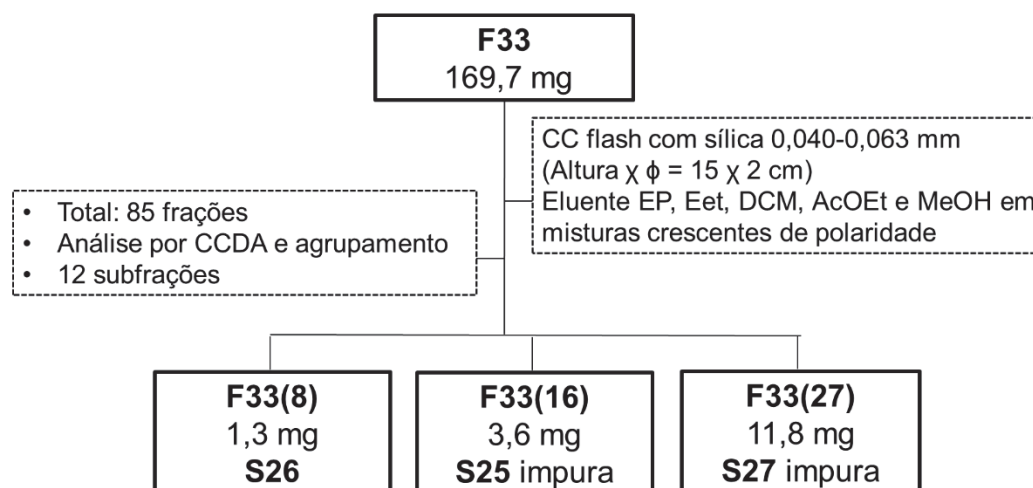
O Esquema 12 apresenta a etapa de purificação de **F30** (177,3 mg), que resultou na identificação das substâncias: **S29**, **S30** e **S42**.



Esquema 12: Isolamento de **S29**, **S30** e **S42**.

3.3.4.12 Fração **F33**

O Esquema 13 apresenta a etapa de purificação de **F33** (169,7 mg), que resultou na identificação das substâncias: **S25**, **S26** e **S27**.



Esquema 13: Isolamento de **S25**, **S26** e **S27**.

3.4 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*

A avaliação da atividade antiproliferativa dos extratos brutos foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida pelo “National Cancer Institute” - NCI-USA, utilizando onze linhagens de células tumorais U251 (glioma, SNC), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo células não pequenas), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (côlon), K562 (leucemia) e HaCat (Queratinócito humano, célula normal imortalizada).

As linhagens de células foram distribuídas em placas de 96 poços (100 μ L célula/poço) e submetidas a quatro níveis diferentes de concentração 0,25; 2,5; 25,0 e 250,0 μ g mL⁻¹ dos extratos, separadamente, em DMSO (0,1%) a 37 °C, com 5% de CO₂ por 48 horas. Como controle positivo foi padronizado a doxorrubicina nas mesmas concentrações das amostras testes. A concentração final de DMSO não afeta a viabilidade da célula. Após um período de incubação de 48 horas, uma solução de ácido tricloroacético 50% foi adicionada e depois de incubação de 30 minutos a 40°C, as células foram lavadas e secadas. A proliferação das células foi determinada pela quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteína celular usando sulforodamina B (SRB), a qual é um corante proteico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra em teste. Os dados

obtidos foram analisados graficamente relacionando a porcentagem de inibição de crescimento com a concentração do extrato teste (FOUCHE e *col.*, 2006).

Os testes antiproliferativos foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicidade do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - UNICAMP, com a colaboração do Dr. João Ernesto de Carvalho.

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos foi testada contra nove microrganismos: *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 11733, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida dubliniensis* CBS 7987 e *Candida krusei* CBS 573.

A subcultura dos microrganismos foi realizada durante a noite a 36°C usando Nutrient Agar (Merck) para as bactérias e Sabouraud Dextrose Agar para *Candida* spp. A preparação dos inóculos para os ensaios foi realizada por diluição de uma massa de células raspadas em solução de NaCl a 0,85%, ajustado a escala de McFarland 0,5 e confirmado pela leitura em espectrofotômetro a 625 nm para bactérias ou 530 nm para levedura.

As suspensões de células foram finalmente diluída para 10⁴ ou 10³ UFC mL⁻¹ para utilização nos ensaios de atividade, respectivamente, para bactérias e levedura. Os testes de Concentração Inibitória Mínima (MIC) foram realizados de acordo com a CLSI (2002 e 2005), utilizando caldo Muller-Hinton sobre uma placa de ensaio de cultura de tecidos (96 poços) ou caldo RPMI-1640. A solução estoque dos extratos brutos foi diluída e transferida para o primeiro poço, e foram feitas diluições em série de modo que concentrações obtidas foram na faixa de 1,0-0,015 mg mL⁻¹. Como controle de referência foram utilizados os antibióticos cloranfenicol e nistatina (Merck) com concentração na faixa de 0,25 - 0,002 mg mL⁻¹. O inóculo foi adicionado a todos os poços e as placas foram incubadas a 36°C durante 48 h. Cada concentração foi realizada em triplicata. A atividade antibacteriana foi detectada por adição de 20 µL de solução de 0,5% de TTC (cloreto de trifeniltetrazólio, Merck) aquoso. MIC foi definido como a concentração mínima da amostra que inibiu o crescimento visível, tal como indicado por coloração TCC (células mortas não são coradas pelo TTC). No caso de *Candida* spp, após o período de incubação, verificou-se mudança na coloração do meio RPMI-1640 passando de rosa (cor original) para amarelo. A mudança indica uma acidificação do meio pelo crescimento dos microrganismos.

Os testes antimicrobianos foram realizados na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - UNICAMP, com a colaboração da Dra. Marta Duarte Teixeira.

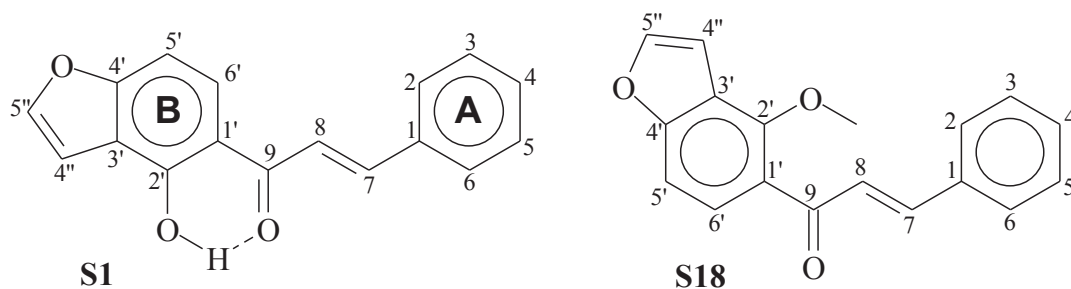
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico do extrato diclorometano das raízes de *D. grandiflora*, resultou, até o momento, na identificação de 42 substâncias (pg 46S e 47S), sendo 5 chalconas, 5 flavanonas, 5 flavonas, 5 flavonóis, 5 dibenzoilmetanos, 3 retrochalconas, 1 diidroretrochalcona, 3 rotenoides, 7 biflavonoides e 3 outras substâncias.

Os compostos foram identificados a partir das frações submetidas a etapas de purificação com base nos dados obtidos de RMN e EM e também a partir da análise dos espectros de RMN (1D e 2D) de todas as frações brutas do extrato. As substâncias **S2**, **S3**, **S4**, **S6**, **S7**, **S8**, **S9**, **S14**, **S23** e **S24** foram isoladas puras enquanto que o restante das substâncias foram obtidas e identificadas em misturas associando os resultados obtidos por RMN (deslocamentos químicos, integrais, multiplicidades) com os resultados obtidos por espectrometria de massas, que possibilitava, através de uma pré separação dos constituintes por cromatografia em fase líquida ou gasosa, obter os espectros de massas (íons moleculares e perfis de fragmentação) de cada constituinte individualmente.

4.1 CHALCONAS

A presença de chalconas é verificada por RMN de ^1H pela constatação de sinais em torno de 7,5 e 8,0 ppm com constantes de acoplamento entre si de aproximadamente 15 Hz, característicos dos hidrogênios de chalconas α - β insaturadas de configuração *E*. Foram identificadas 5 chalconas no extrato DCM das raízes de *D. grandiflora*.

4.1.1 IDENTIFICAÇÃO DE **S1** E **S18**

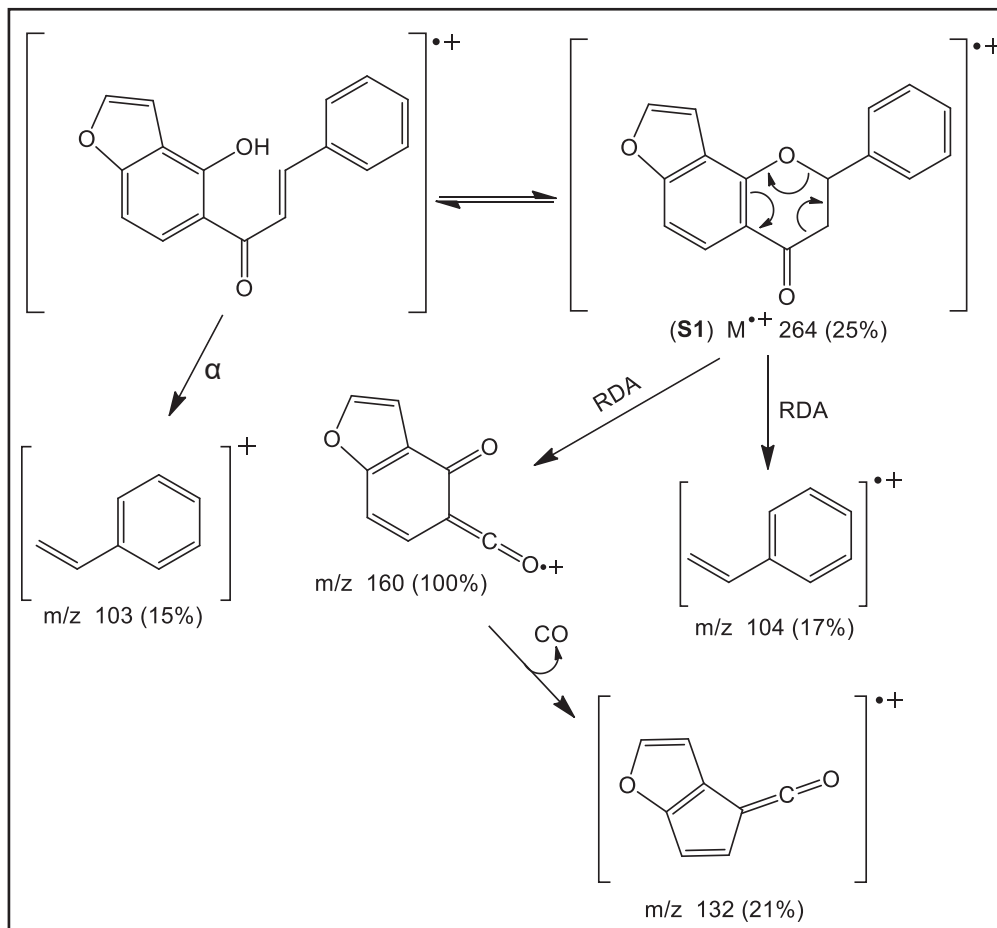
O espectro de RMN de ^1H de **S1** (Anexo, pg 1S e 2S) apresentou além dos sinais característicos dos hidrogênios α e β (H-7 e H-8) de uma chalcona com configuração *E*, sinais em torno de 7,0 e 7,6 ppm com constantes de acoplamento entre si de 2,2 Hz característicos do anel furano como substituinte. Além destes, foi observado um simpleto largo em 13,98 ppm referente ao hidrogênio de uma hidroxila com ligação intramolecular com a carbonila em C-9. Sinais em 7,10 ppm (1H, *dd*, 9,0 e 0,9 Hz) e 7,86 ppm (1H, *d*, 9,0 Hz) demonstraram a presença de hidrogênios de anel benzênico em posição *orto* entre si. Também foi observado um padrão de anel monossustituído para o anel A, através dos valores de integrais, deslocamentos químicos e correlações apresentadas dos experimentos bidimensionais de HSCQ e HMBC (Anexo, pg 1S e 2S). A posição dos substituintes e os deslocamentos químicos referentes aos carbonos da substância foram determinados baseando-se nos experimentos de RMN bidimensionais (HSCQ e HMBC). A atribuição completa da substância **S1** está apresentada na tabela 6 (Pg 34).

Tabela 6: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias **S1** e **S18**.

	S1		S18	
	δ_c , mult.	δ_H , mult. (J em Hz)	δ_c , mult.	δ_H , mult. (J em Hz)
1	134,8, qC		135,2, qC	
2	128,8, CH	7,69 <i>m</i>	128,3, CH	7,61 <i>m</i>
3	129,8, CH	7,45 <i>m</i>	128,4, CH	7,39 <i>m</i>
4	130,9, CH	7,45 <i>m</i>	130,1, CH	7,39 <i>m</i>
5	129,8, CH	7,45 <i>m</i>	128,4, CH	7,39 <i>m</i>
6	128,8, CH	7,69 <i>m</i>	128,3, CH	7,61 <i>m</i>
7	145,1, CH	7,95 <i>d</i> (15,4)	143,2, CH	7,67 <i>d</i> (15,9)
8	121,0, CH	7,70 <i>d</i> (15,4)	127,2, CH	7,47 <i>d</i> (15,9)
9	193,4, qC		192,4, qC	
1'	114,6, qC		125,8, qC	
2'	160,5, qC		153,6, qC	
3'	117,8, qC		119,2, qC	
4'	159,9, qC		158,6, qC	
5'	103,8, CH	7,10 <i>dd</i> (9,0 e 0,9)	106,8, CH	7,29 <i>dd</i> (8,6 e 0,7)
6'	126,2, CH	7,86 <i>d</i> (9,0)	126,8, CH	7,63 <i>dd</i> (8,6)
4''	105,1, CH	7,03 <i>dd</i> (2,2 e 0,9)	105,2, CH	7,00 <i>dd</i> (2,1 e 0,7)
5''	128,6, CH	7,59 <i>d</i> (2,2)	144,9, CH	7,64 <i>d</i> (2,1)
OH (C-2')		13,98 <i>sl</i>		
OCH ₃ (C-2')			61,3, CH ₃	4,10 <i>s</i>

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de DEPT 135, HSQC e HMBC.

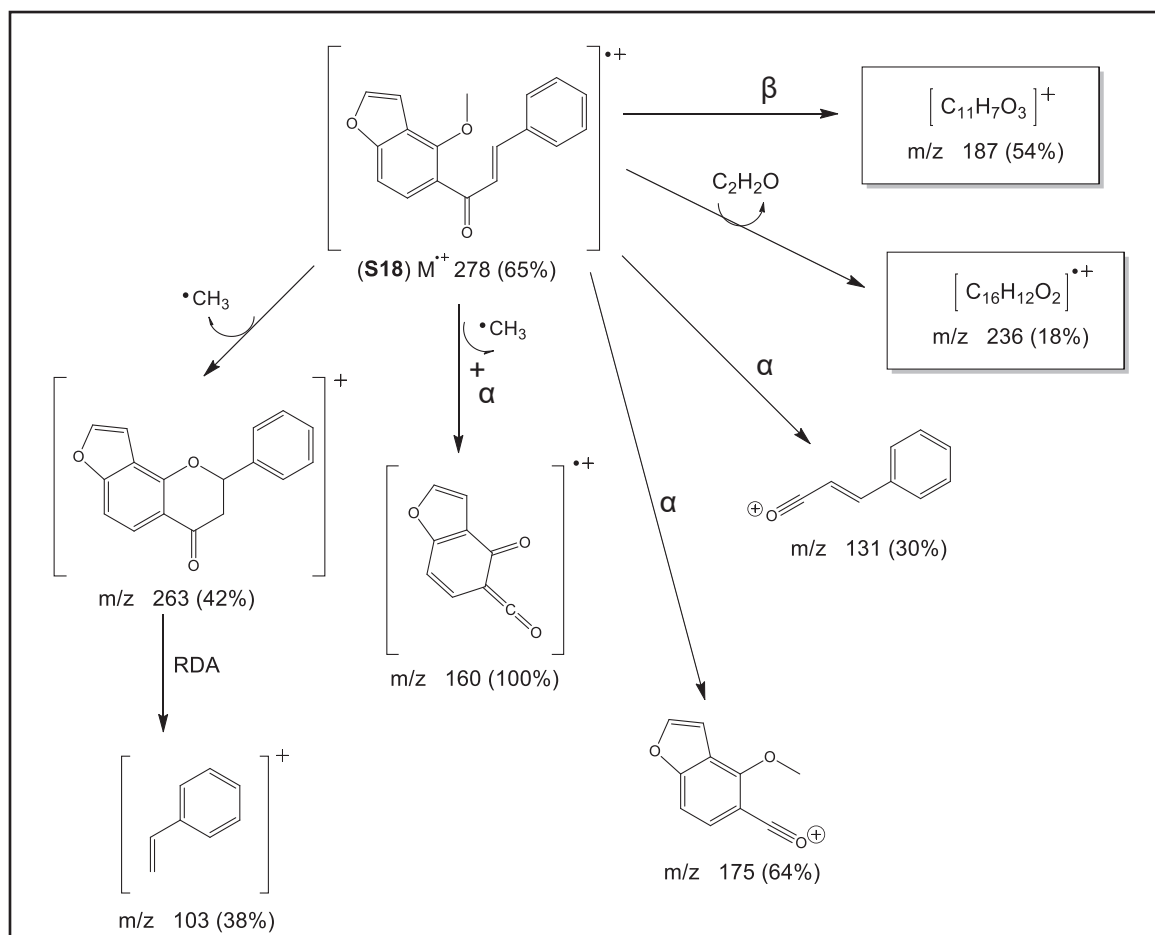
Em relação ao espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S1** (Anexo, pg 2S), pode-se observar, além de picos de óxidos de silício provenientes da coluna cromatográfica (*m/z* 73, 207, 253, 281, 327 e 341), o íon molecular de **S1** em *m/z* 264 (25%) e sinais que indicam equilíbrio intramolecular entre chalcona e flavanona, nesta, através de uma clivagem retro Diels-Alder (RDA) do anel C, é gerado o pico base em *m/z* 160 dessa substância. O esquema 14 (Pg 35) apresenta a proposta de fragmentação para esta substância.



Esquema 14: Proposta de fragmentação para **S1**.

A substância **S1** foi identificada como 2'-hidroxi-[3',4':3'',2'']-furanochalcona, uma substância rara, isolada em apenas três espécies do gênero *Millettia* (SAXENA e col., 1987, SRITULARAK e col., 2002 and WANG e col., 2015), sendo inédita até o momento no gênero *Dahlstedtia*. Esta substância apresentou toxicidade significativa contra larvas de mosquitos da linhagem *Culex quinquefasciatus* (SATYAVANI e col., 2015).

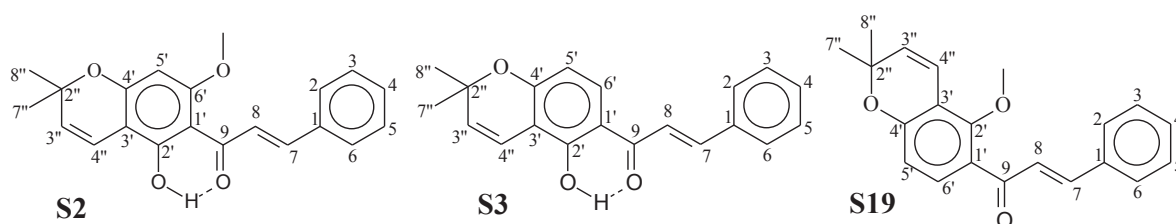
Os experimentos de RMN de **S18** (Anexo, pg 3S) apresentaram sinais e correlações muito semelhantes aos de **S1**, porém, em **S18**, ao invés de um simpleto largo em 13,98 ppm, foi observado no espectro de RMN de ^1H um simpleto em 4,10 ppm (3H) referente aos hidrogênios de um grupo metoxila ligado ao C-2'. Na tabela 6 (pg 34) é apresentada a atribuição completa dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos de **S18**. Em relação ao espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S18** (Anexo, pg 3S), pode-se observar o íon molecular em m/z 278 (65%) e o pico base em m/z 160, este fragmento pode ser explicado por uma perda do grupo metila radicalar simultânea a uma clivagem α carbonila. O esquema 15 (Pg 36) apresenta a proposta de fragmentação para esta substância.



Esquema 15: Proposta de fragmentação para **S18**.

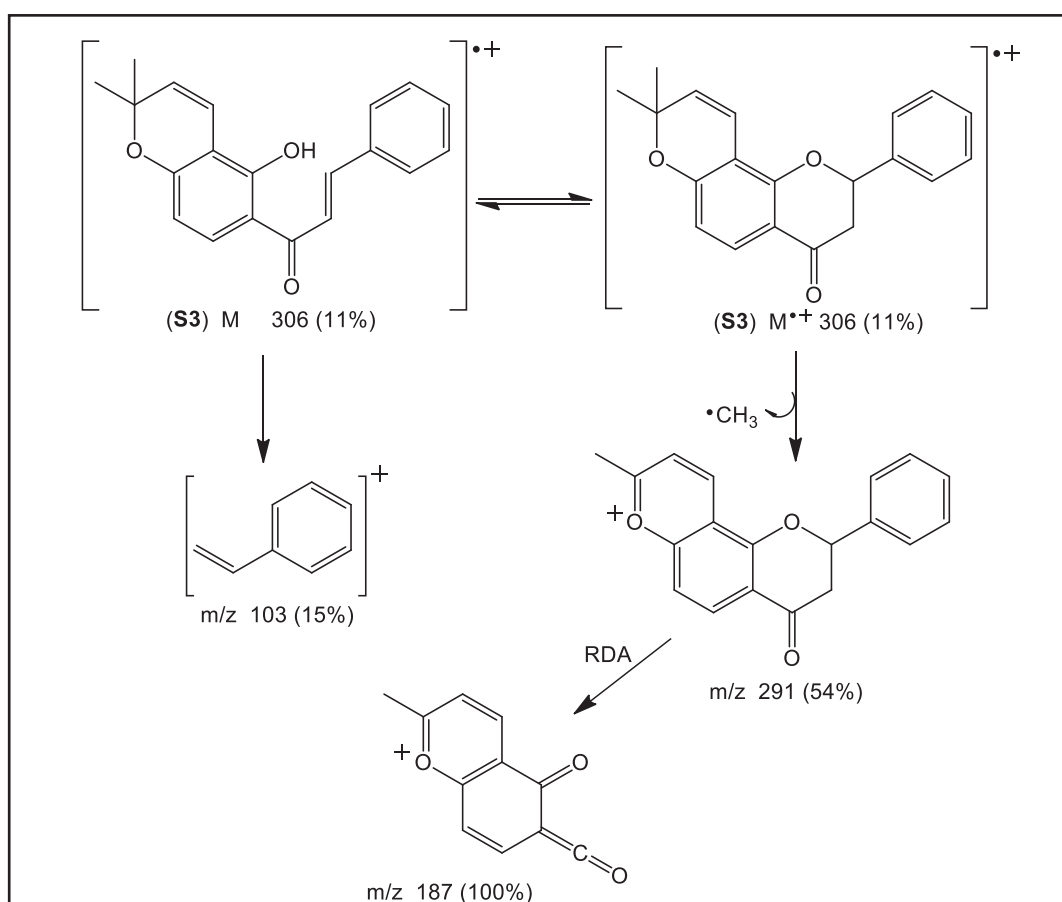
A substância **S18** é conhecida como ovaletenina A e não foi isolada nos gêneros *Lonchocarpus* e *Dahlstedtia*, tendo apenas relatos de sua identificação em 4 espécies de outros gêneros (GUPTA e col., 1977, FAN e col., 2013 e PENG e col., 2014). Esta substância apresentou atividade significativa de indução da enzima NAD(P)H:quinona oxireductase (NQO1), cujo aumento é associado a proteção contra diversos tipos de câncer em modelos animais (WANG e col., 2015).

4.1.2 IDENTIFICAÇÃO DE **S2**, **S3** E **S19**



A análise do espectro de RMN de ^1H de **S3** (Anexo, pg 4S), demonstrou que a única diferença de **S3** para **S1** é que ao invés de apresentar o grupo anel furano como substituinte no anel B, apresenta sinais característico do grupo 2'',2''-dimetilcromeno como substituinte: um simpleto intenso em 1,47 ppm, referente aos 6 hidrogênios dos grupos metilas e dois dupletos em torno de 5,7 e 6,7 ppm com constantes de acoplamento entre si de 10 Hz (Tabela 7 – pg 38).

Em relação ao espectro de massas (impacto de elétrons) de **S3** (Anexo, pg 4S), pode-se observar o íon molecular em m/z 306 (11%) e o pico base em m/z 187. O perfil de fragmentação de massas demonstrou que houve equilíbrio intramolecular entre chalcona e flavanona (esquema 16 – pg 37), sendo que na forma de flavanona houve a clivagem do anel C em consequência de uma reação RDA.



Esquema 16: Proposta de fragmentação para **S3**.

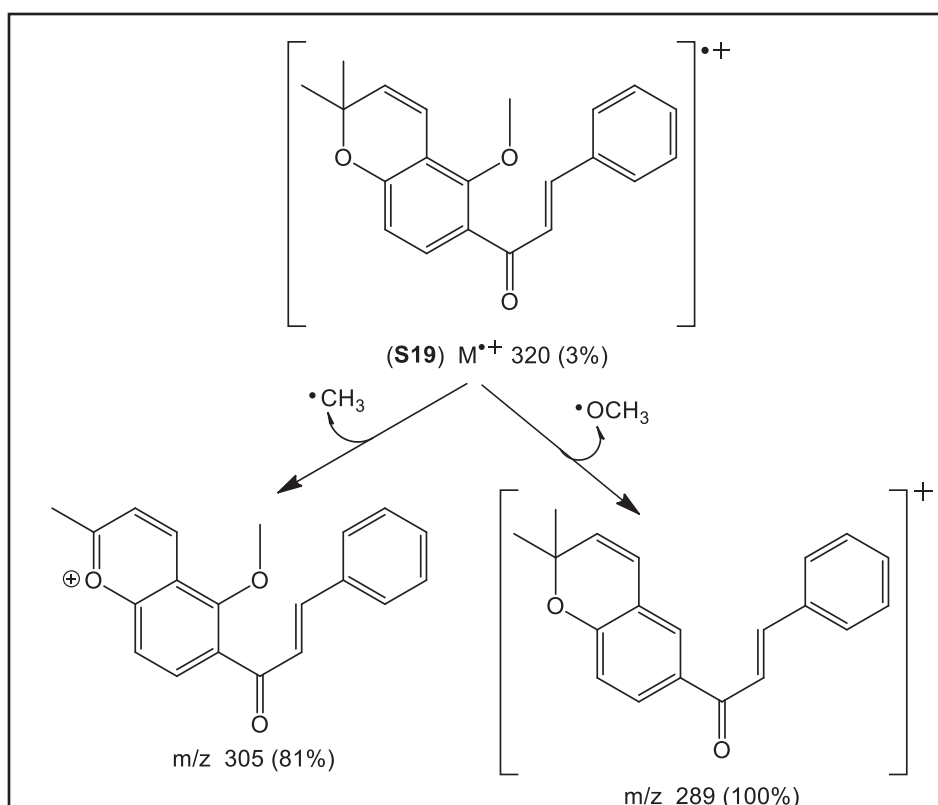
Tabela 7: Dados de RMN (14,1 e 9,4 Tesla) das substâncias **S2**, **S3** e **S19**.

	S2		S3			S19	
	δ_C , <i>mult.</i>	δ_H , <i>mult. (J)</i>	δ_C , <i>mult.</i>	δ_H , <i>mult. (J)</i>		δ_C , <i>mult.</i>	δ_H , <i>mult. (J)</i>
1	--		--			138,9, qC	
2	128,5, CH	7,61 <i>m</i>	128,6, CH	7,65 <i>m</i>		128,5, CH	8,01 <i>m</i>
3	129,1, CH	7,41 <i>m</i>	129,1, CH	7,42 <i>m</i>		128,6, CH	7,49 <i>m</i>
4	129,1, CH	7,41 <i>m</i>	130,9, CH	7,42 <i>m</i>		132,4, CH	7,56 <i>m</i>
5	129,1, CH	7,41 <i>m</i>	129,1, CH	7,42 <i>m</i>		128,6, CH	7,49 <i>m</i>
6	128,5, CH	7,61 <i>m</i>	128,6, CH	7,65 <i>m</i>		128,5, CH	8,01 <i>m</i>
7	142,1, CH	7,77 <i>d</i> (15,6)	144,3, CH	7,88 (15,5)	<i>d</i>	140,0, CH	8,00 <i>d</i> (15,7)
8	121,0, CH	7,88 <i>d</i> (15,6)	120,7, CH	7,56 (15,5)	<i>d</i>	121,0, CH	7,50 <i>d</i> (15,7)
9	192,9, qC		--			190,8, qC	
1'	106,0, qC		--			120,9, qC	
2'	162,4, qC		--			156,5, qC	
3'	103,0, qC		--			115,1, qC	
4'	160,5, qC		--			157,1, qC	
5'	91,5, CH	5,93 <i>d</i> (0,5)	108,8, CH	6,38 <i>dd</i> (8,9 e 0,6)		113,4, CH	6,65 <i>dd</i> (8,6 e 0,6)
6'	162,4, qC		130,8, CH	7,72 <i>d</i> (8,9)		128,7, CH	7,49 <i>d</i> (8,6)
2''	78,2, qC		--			76,8, qC	
3''	125,5, CH	5,47 <i>d</i> (10)	128,4, CH	5,60 <i>d</i> (10)		130,8, CH	5,68 <i>d</i> (10,0)
4''	116,1, CH	6,68 <i>dd</i> (10,0 e 0,5)	115,8, CH	6,76 <i>dd</i> (10,0 e 0,6)		116,7, CH	6,62 <i>dd</i> (10,0 e 0,6)
7''	28,2, CH ₃	1,46 <i>s</i>	28,1, CH ₃	1,47 <i>s</i>		28,2, CH ₃	1,46 <i>s</i>
8''	28,2, CH ₃	1,46 <i>s</i>	28,1, CH ₃	1,47 <i>s</i>		28,2, CH ₃	1,46 <i>s</i>
OH (C-2')		14,48 <i>sl</i>		13,68 <i>sl</i>			
OCH ₃ (C- 2')						62,9, CH ₃	3,81 <i>s</i>
OCH ₃ (C- 6')	55,7, CH ₃	3,92 <i>s</i>					

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de DEPT 135, HSQC e HMBC.

A substância **S3**, conhecida como lonchocarpine não possui relatos até o momento no gênero *Dahlstedtia*, mas já foi relatada diversas vezes no gênero *Lonchocarpus*, ao qual *D. grandiflora* pertencia antes da reclassificação taxonômica realizada por Silva, 2012 (CAVALCANTE e col., 2012; MAGALHÃES e col., 2007 e REYES-CHILPA e col., 2006). Estudos demonstraram que esta substância inibe significativamente a produção de óxido nítrico (NO) nas micróglia (menor célula da neuroglia, que constitui o sistema nervoso), associando **S3** à prevenção de doenças neurodegenerativas (LI e col., 2015).

Os experimentos de RMN de **S19** (Anexo, pg 5S) apresentaram sinais e correlações muito semelhantes aos de **S3**, sendo que em **S19** foi observado no espectro de RMN de ^1H um simpleto em 3,81 ppm (3H) referente aos hidrogênios de um grupo metoxila ligada ao C-2' (Tabela 7 – pg 38). O esquema 17 (pg 39) demonstra a proposta de fragmentação de massas de **S19** (impacto de elétrons), em que o íon molecular foi identificado por um pequeno pico em m/z 320 (3%) e o pico base apresentou m/z 289. **S19** é conhecida como espinochalcona D e só possui um relato de isolamento na literatura, encontrada nas raízes da espécie *Tephrosia spinosa* (PRASAD e col., 2005).



Esquema 17: Proposta de fragmentação para **S19**.

No caso da substância **S2**, a única diferença em relação a **S3**, é que ao invés de apresentar hidrogênios em posição *orto* entre si no anel B, observa-se no espectro de RMN de ^1H dessa substância (Anexo, pg 6S), um duplete em 5,93 ppm com uma constante de acoplamento pequena de 0,6 Hz devido a um acoplamento a longa distância com o hidrogênio H-4'' do anel 2'',2''-dimetilcromeno e um simpleto em 3,92 ppm referente aos hidrogênios de um grupo metoxila ligada ao carbono C-6'. A posição do grupo metoxila ligado ao carbono C-6' ao invés de C-2' foi verificada realizando experimentos de NOE 1D (Anexo, pg 6S). Irradiou-se os hidrogênios do grupo metoxila ocorrendo aumento de sinal do hidrogênio H-5', indicando que este se encontra próximo espacialmente ao grupo metoxila, desta forma, grupo 2''-2''-dimetilcromeno deve estar ligado de forma linear na molécula (Figura 11-a, pg 40). De forma análoga, ao irradiar H-5' foi observado efeito sob os hidrogênios do grupo metoxila. Caso o grupo 2''-2''-dimetilcromeno estivesse ligado de forma angular na molécula e a metoxila estivesse ligada a C-2' a irradiação da mesma acarretaria efeito em H-4'', referente a um dos hidrogênios olefínicos do grupo 2'',2''-dimetilcromeno (Figura 11-b, pg 40). A presença do grupo hidroxila ligado a C-2' foi verificada pelo sinal de um hidrogênio de hidroxila com ligação intramolecular com a carbonila em C-9 em 14,48 ppm no espectro de RMN de ^1H que apresentou correlações com os carbonos C-1', C-2' e C-3' no experimento de HMBC (Anexo, pg 7S). As atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da substância **S2** são apresentadas na tabela 7 (pg 38).

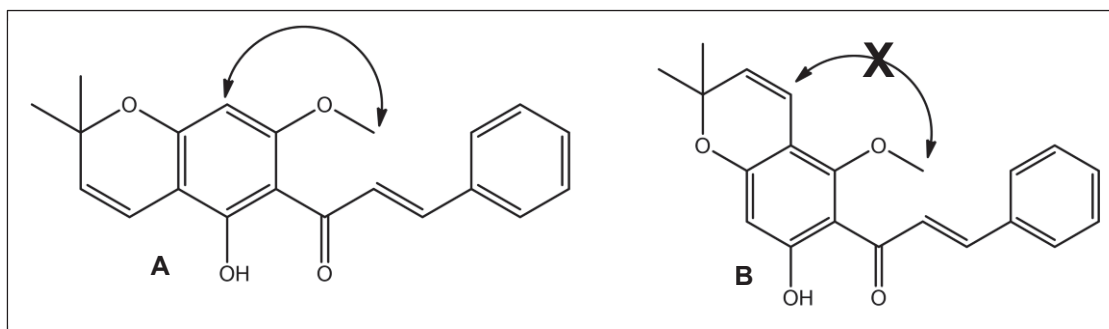


Figura 11 – (A) Efeito NOE observado em **S2**, grupo 2'',2''-dimetilcromeno linear.
(B) Efeitos NOE esperado para 2'',2''-dimetilcromeno ligado angular.

A substância **S2** é conhecida como pongachalcona e tem sido relatada em diversas espécies do gênero *Dahlstedtia* (CANZI, 2013). Estudos de atividade biológica da pongachalcona *in vitro* demonstraram que ela apresenta atividade significativa anti-câncer contra as células humanas M156 (fígado, vias biliares) e HepG2 (hepatoma, células hepáticas) (DECHARCHOCHART *et al.*, 2014). Além disso, **S2** apresenta atividade significativa na inibição da NQ01 (WANG *et al.*, 2015).

4.2 FLAVANONAS

Flavanonas são identificadas por RMN de ^1H pela presença de sinais com deslocamentos químicos em torno de 5,5, 3,1 e 2,9 ppm, multiplicidades e constantes de acoplamento típicas de hidrogênios H-2_{ax} , H-3_{ax} e H-3_{eq} do anel C do esqueleto de flavanonas que se encontra na conformação meia cadeira (Figura 12, pg 41). Foram identificadas 5 flavanonas.

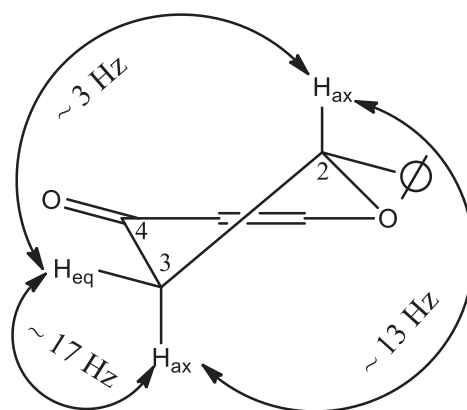
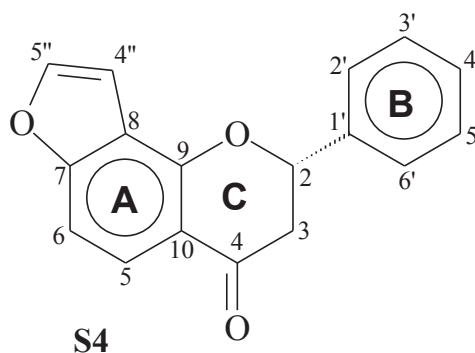


Figura 12 – Conformação preferencial do anel C de flavanonas e constantes de acoplamento características.

4.2.1 IDENTIFICAÇÃO DE **S4**



O espectro de RMN de ^1H (Anexo, pg 8S) de **S4** apresentou além dos sinais característicos do anel C da flavanona, sinais em 6,93 (*dd*, 2,2 e 0,7 Hz) e 7,60 (*d*, 2,2 Hz) ppm indicando a presença do anel furano como substituinte no anel A. Sinais em 7,20 ppm (*dd*, 8,8 e 0,7 Hz) e 7,91 ppm (*d*, 8,8 Hz) demonstraram a presença de hidrogênios de anel benzênico com posição *orto* entre si, no anel A. Também foi observado um padrão de anel monosubstituído para o anel B, através dos valores de integrais, deslocamentos químicos e correlações apresentadas nos experimentos bidimensionais de HSCQ e HMBC (Anexo, pg 8 e 9S). A atribuição completa da substância **S4** está apresentada na tabela 8 (pg 42).

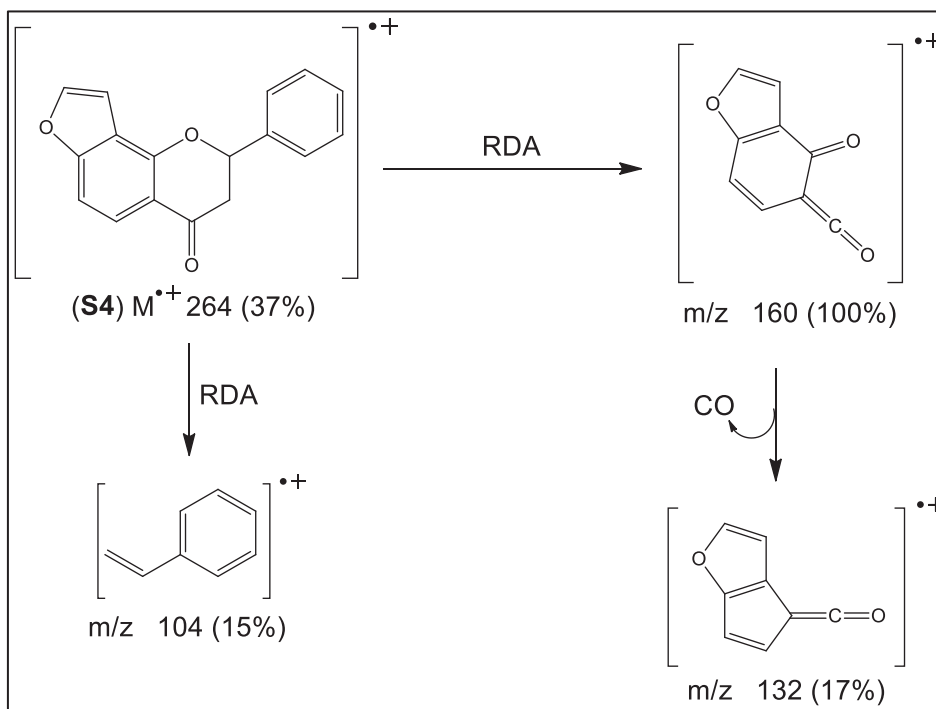
Tabela 8: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância **S4**.

	δ_c , multiplicidade	δ_H , multiplicidade (J em Hz)
2	80,4, CH	5,63 <i>dd</i> (13,4 e 3,0)
3	44,4, CH ₂	2,94 <i>dd</i> (16,8 e 3,0)
		3,15 <i>dd</i> (16,8 e 13,4)
4	191,0, qC	
5	126,5, CH	7,91 <i>d</i> (8,8)
6	106,4, CH	7,20 <i>dd</i> (8,8 e 0,7)
7	160,1, qC	
8	117,4, qC	
9	156,6, qC	
10	115,7, qC	
1'	138,8, qC	
2'	126,2, CH	7,53 <i>m</i>
3'	128,9, CH	7,46 <i>m</i>
4'	128,7, CH	7,41 <i>m</i>
5'	128,9, CH	7,46 <i>m</i>
6'	126,2, CH	7,53 <i>m</i>
4''	104,8, CH	6,93 <i>dd</i> (2,1 e 0,7)
5''	145,0, CH	7,60 <i>d</i> (2,1)

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de DEPT 135, HSQC e HMBC.

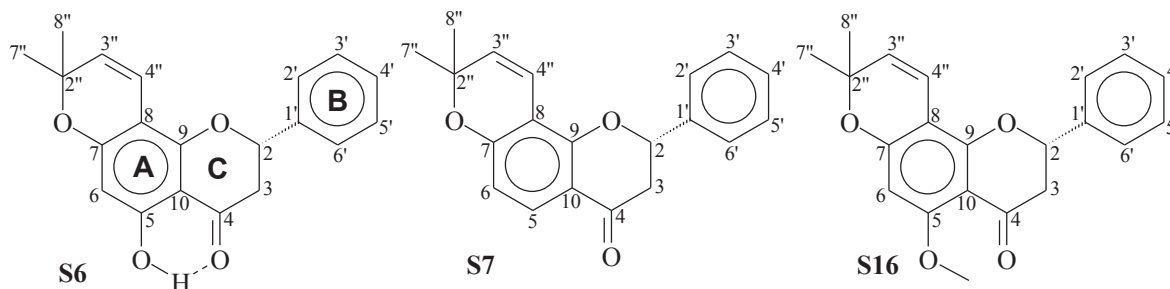
Em relação ao espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S4** (Anexo, pg 9S), pode-se observar o íon molecular em *m/z* 264 (11%) e o pico base em *m/z* 160. Além disso, observaram-se picos resultantes da clivagem do anel C por uma reação RDA, cuja ocorrência é característica em flavanonas. A proposta de fragmentação encontra-se no esquema 18 (pg 43).

A substância **S4** foi identificada como (2S)-[2'',3'':7,8]-furanoflavanona, que possui apenas um relato na literatura, isolada dos frutos da espécie *Pongamia pinnata* (MINAKAWA e *col.*, 2010).



Esquema 18: Proposta de fragmentação para **S4**.

4.2.2 IDENTIFICAÇÃO DE **S6**, **S7** E **S16**



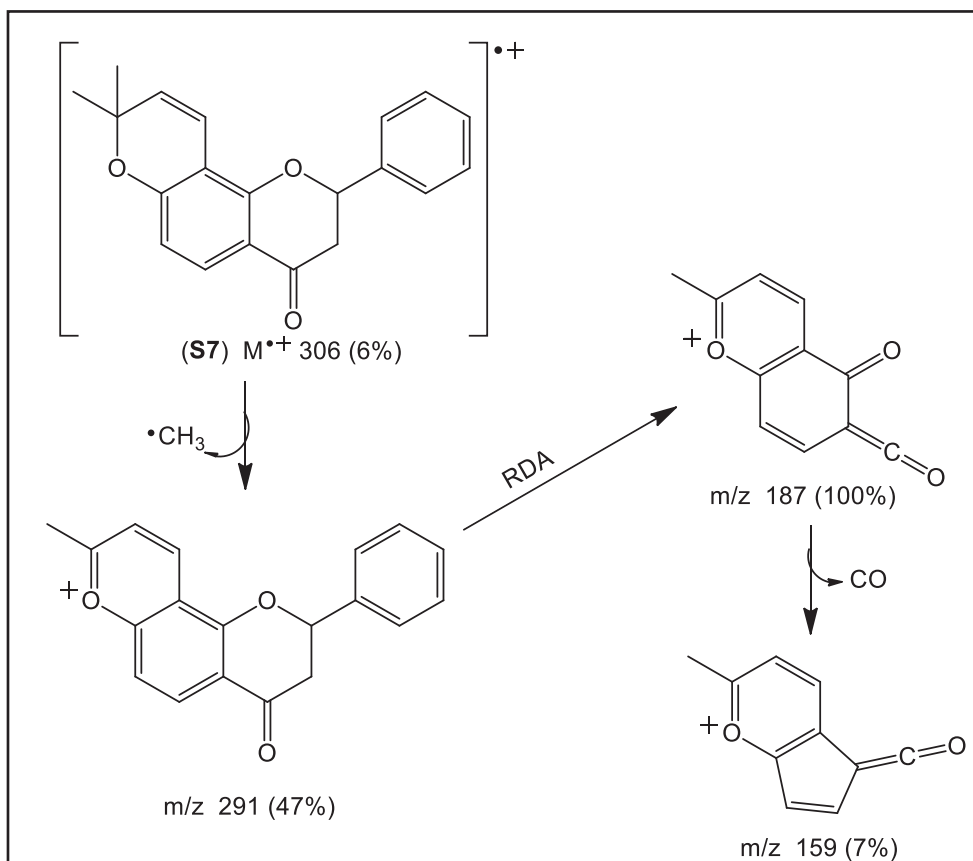
A análise do espectro de RMN de ^1H de **S7** (Anexo, pg 10S) demonstrou que a única diferença de **S7** para **S4** é que ao invés de apresentar o grupo anel furano como substituinte, há sinais característicos do grupo 2'',2''-dimetilcromeno para esta substância. Ou seja, dois simpletos em 1,45 (3H) e 1,47 (3H) ppm respectivamente, referente aos hidrogênios dos grupos metilas do anel 2'',2''-dimetilcromeno e dois dupletos em 5,57 (1H, *d*, 10,1 Hz) e 6,55 (1H, *dd*, 10,1 e 0,5 Hz) ppm respectivamente. Os dados de deslocamento químico de hidrogênios e carbonos para **S7** estão descritos na tabela 9 (pg 44).

O espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S7** (Anexo, pg 10S) apresentou pico referente ao íon molecular em m/z 306 (6%) e ao pico base em m/z 187. A proposta de fragmentação encontra-se no esquema 19 (pg 45).

Tabela 9: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias **S6**, **S7** e **S16**.

	S6		S7		S16	
	δ_c , mult	δ_H , mult. (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)
2	79,1, CH	5,44 <i>dd</i> (13,1 e 3,2)	77,8, CH	5,47 <i>dd</i> (13,1 e 3,0)	79,0, CH	5,38 <i>dd</i> (13,1 e 3,1)
3	43,4, CH ₂	2,84 <i>dd</i> (17,1 e 3,2) 3,06 <i>dd</i> (17,1 e 13,1)	44,4, CH ₂	2,84 <i>dd</i> (16,8 e 3,0) 3,01 <i>dd</i> (16,8 e 13,1)	45,7, CH ₂	2,82 <i>dd</i> (16,5 e 3,1) 2,99 <i>dd</i> (16,5 e 13,1)
4	195,7, qC		190,6, qC		189,1, qC	
5	163,8, qC		128,0, CH	7,75 <i>d</i> (8,7)	162,1, qC	
6	97,7, CH	6,00 <i>d</i> (0,5)	111,2, CH	6,00 <i>dd</i> (8,7 e 0,5)	93,9, CH	6,04 <i>d</i> (0,5)
7	162,4, qC		159,7, qC		160,0, qC	
8	102,9, qC		109,5, qC		102,8, qC	
9	156,7, qC		157,7, qC		--	
10	103,0, qC		114,8, qC		105,7, qC	
1'	138,6, qC		139,1, qC		138,9, qC	
2'	126,0, CH	7,46 <i>m</i>	126,0, CH	7,44 <i>m</i>	125,9, CH	7,43 <i>m</i>
3'	128,9, CH	7,44 <i>m</i>	128,8, CH	7,44 <i>m</i>	128,7, CH	7,39 <i>m</i>
4'	128,8, CH	7,40 <i>m</i>	128,6, CH	7,38 <i>m</i>	128,4, CH	7,34 <i>m</i>
5'	128,9, CH	7,44 <i>m</i>	128,8, CH	7,44 <i>m</i>	128,7, CH	7,39 <i>m</i>
6'	126,0, CH	7,46 <i>m</i>	126,0, CH	7,44 <i>m</i>	125,9, CH	7,43 <i>m</i>
2''	78,2, qC		77,6, qC		78,0, qC	
3''	126,5, CH	5,47 <i>d</i> (10,0)	128,9, CH	5,57 <i>d</i> (10,0)	126,4, CH	5,44 <i>d</i> (10,0)
4''	115,6, CH	6,55 <i>dd</i> (10,0 e 0,5)	115,9, CH	6,65 <i>dd</i> (10,0 e 0,5)	116,0, CH	6,58 <i>dd</i> (10,0 e 0,5)
7''	28,6, CH ₃	1,43 <i>s</i>	28,1, CH ₃	1,45 <i>s</i>	28,4, CH ₃	1,43 <i>s</i>
8''	28,3, CH ₃	1,45 <i>s</i>	28,4, CH ₃	1,47 <i>s</i>	28,4, CH ₃	1,45 <i>s</i>
OH (C-5)		12,07 <i>sl</i>				
OCH ₃ (C-5)					56,1 CH ₃	3,86 <i>s</i>

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de DEPT 135, HSQC e HMBC.



Esquema 19: Proposta de fragmentação para **S7**.

A substância **S7**, identificada como 2''-2''-dimetilcromeno-[6'',5'':7,8]-flavanona, possui diversos relatos de isolamento tanto em espécies de *Lonchocarpus* (MONACHE e col., 1978) como em espécies do *Dahlstedtia* (GARCEZ e col., 1988 e CANZI, 2013). Esta flavanona apresentou atividade contra o fungo *Staphilococcus aureus* (MAGALHÃES e col., 2007).

Em relação à substância **S16**, a única diferença de **S7**, é que ao invés de apresentar hidrogênios em posição *orto* no anel A, o espectro de RMN de ^1H (Anexo, pg 11S) apresenta um duplete em 6,04 ppm (1H) com uma constante de acoplamento pequena de 0,5 Hz devido ao acoplamento a longa distância com o hidrogênio H-4'' do anel 2'',2''-dimetilcromeno e um singlete em 3,86 ppm (3H) referente aos hidrogênios de um grupo metoxila ligado ao carbono C-5. Em **S16**, foi confirmado que o anel 2'',2''-dimetilcromeno está ligado de forma angular em relação à molécula e que a metoxila está ligada a C-5 realizando a irradiação dos sinais referentes a H-6, H-4'' e da metoxila em experimentos de NOE 1D (Anexo, pg 11S). A figura 13-a (pg 46) demonstra a estrutura de **S16** e os hidrogênios próximos espacialmente na molécula, a partir dos resultados dos experimentos de NOE 1D. Se o grupo 2'',2''-dimetilcromeno estivesse disposto de forma linear à molécula, ao irradiar o sinal referente a metoxila seria esperado o aumento do sinal H-4'' e vice e versa (Figura 13-b, pg 46).

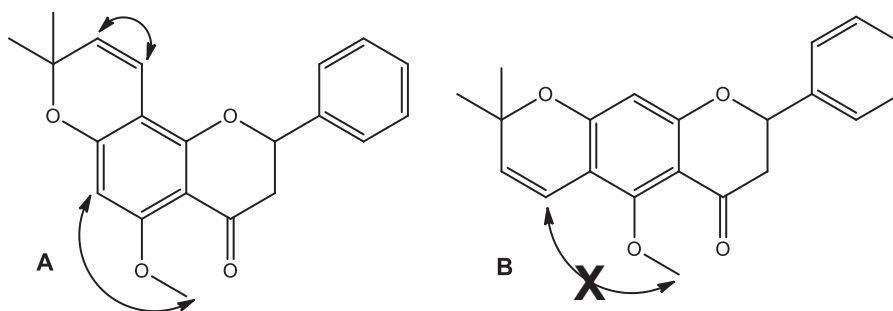
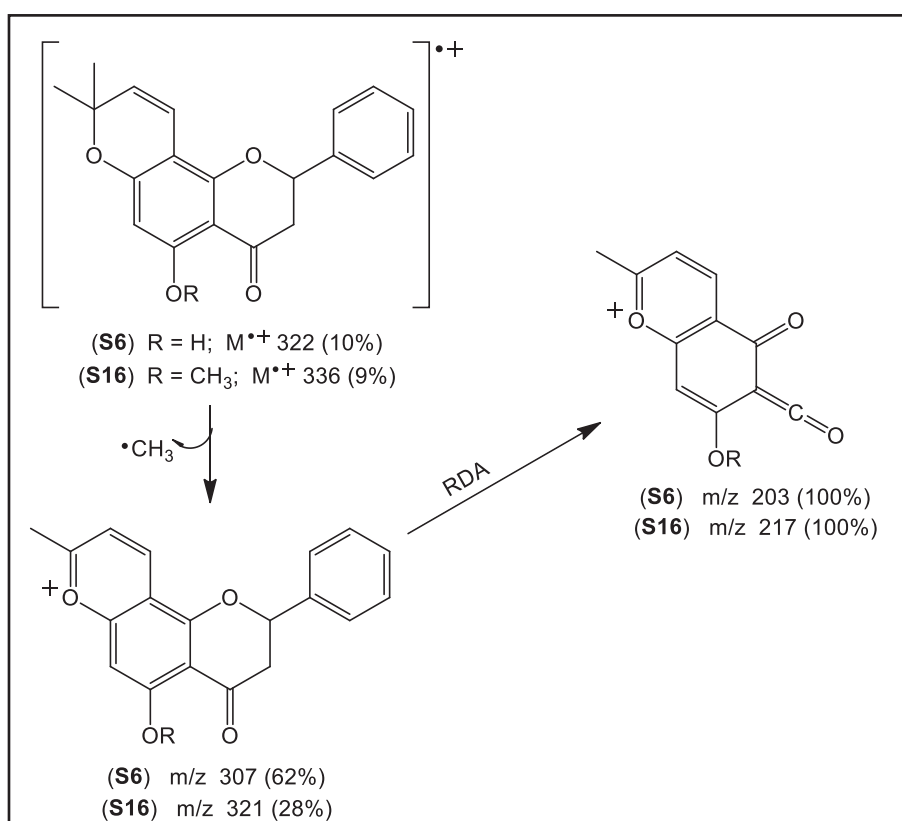


Figura 13 – (A) Efeito NOE observado em **S16**, grupo 2'',2''-dimetilcromeno angular.
(B) Efeitos NOE (esperado) para 2'',2''-dimetilcromeno linear

Foi possível observar no espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S16** (Anexo, pg 12S), além de picos de óxidos de silício provenientes da coluna cromatográfica (m/z 73, 207, 253, 281, 327 e 341), o íon molecular desta substância em m/z 336 (9%) e o pico base em m/z 217, referente a clivagem RDA do anel C. A proposta de fragmentação encontra-se no esquema 20 (pg 46).



Esquema 20: Proposta de fragmentação para **S6** e **S16**.

A substância **S6** é muito semelhante a **S16**, diferenciando que ao invés de uma metoxila ligada ao carbono C-5 há a presença de uma hidroxila ligada nesta posição. Neste caso, o espectro de RMN de ¹H (Anexo, pg 12S) possui um simpleto largo em 12,07 ppm, referente ao hidrogênio do grupo hidroxila em uma ligação intramolecular com o oxigênio

da carbonila em C-4. As posições das substituições no anel benzênico A foram verificadas analisando os experimentos bidimensionais de HSQC e HMBC (Figura 14). Os dados de deslocamento químico de hidrogênios e carbonos para as substâncias **S6** e **S16** estão descritos na tabela 9 (pg 44). Assim como em **S16**, o espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S6** (Anexo, pg 13S) apresentou picos referentes a óxidos de silício provenientes da coluna cromatográfica (m/z 73, 207, 253, 281, 327 e 341) e o pico base de **S6** foi referente a clivagem RDA do anel C (m/z 203) e foi possível observar o íon molecular em m/z 322 (10%). A proposta de fragmentação para **S6** encontra-se no esquema 20 (pg 46).

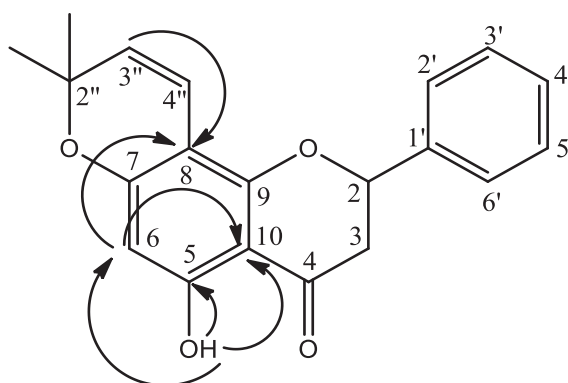
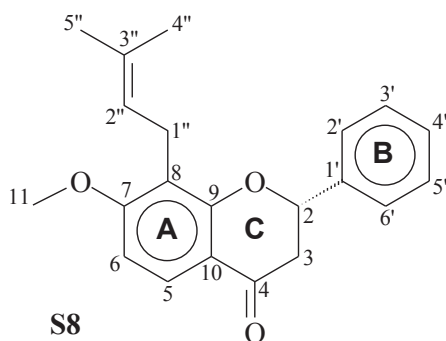


Figura 14 – Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para **S6**.

As substâncias **S6** e **S16** são relatadas na literatura como obovatina e pongachina, respectivamente, mas são inéditas no gênero *Dahlstedtia*. Porém, estas substâncias já foram relatadas em espécies de *Lonchocarpus*, gênero ao qual *D. grandiflora* era classificada antes da reclassificação por Silva em 2012 (CAVALCANTE e col., 2012 e CASSIDY e col., 2011).

4.2.3 IDENTIFICAÇÃO DE **S8**



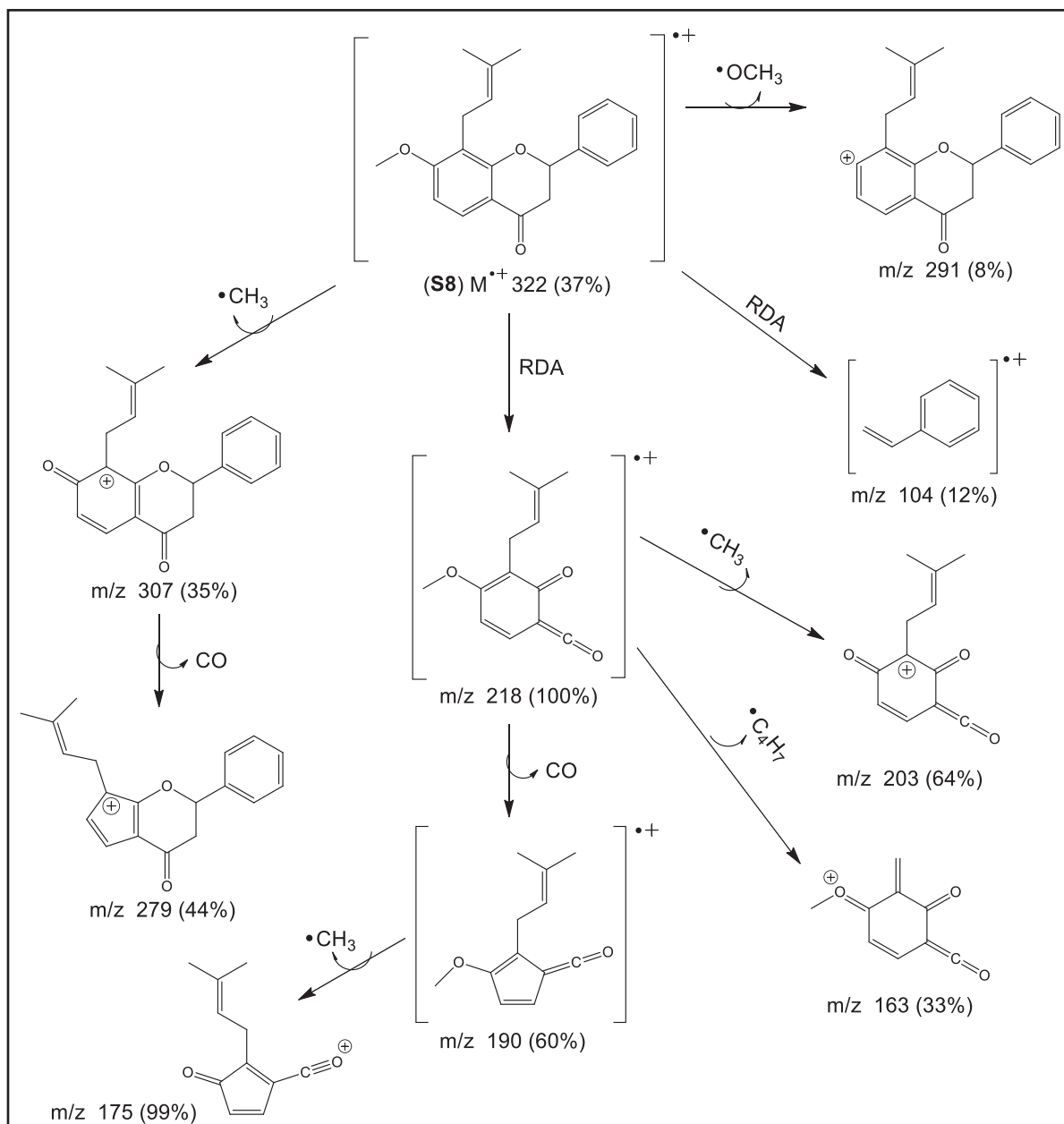
O estudo dos espectros de RMN de **S8** (Anexo, pg 13S) demonstrou que esta substância não apresenta sinais característicos dos anéis furano ou 2'',2'' dimetilcromeno

como substituintes no anel A, entretanto, o espectro de RMN de ^1H possuía sinais de hidrogênios referentes à duas metilas em $\sim 1,6$ ppm, multipletto em 5,18 ppm referente a um hidrogênio sobre ligação dupla e um multipletto em 3,36 ppm (2H) característicos do grupamento prenila. A partir da análise dos experimentos de RMN bidimensionais (HSCQ e HMBC), constatou-se que esse grupo está ligado ao anel A da flavanona na posição C-8. Ainda, foi observado no espectro de RMN de ^1H um simpleto referente a hidrogênios do grupo metoxila em 3,89 ppm e sinais de hidrogênios ligados à anel benzênico com constantes de acoplamento *orto* entre si. Assim, como todas as outras flavanonas identificadas, **S8** apresentou padrão de sinais de anel benzênico monosubstituído para o anel B. A atribuição completa dos deslocamentos químicos para os hidrogênios e carbonos de **S8** é apresentada na tabela 10 (pg 48).

Tabela 10: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância **S8**.

	δ_{C} , multiplicidade	δ_{H} , multiplicidade (J em Hz)
2	79,5, CH	5,45 <i>dd</i> (12,9 e 3,0)
3	44,5, CH ₂	2,86 <i>dd</i> (16,8 e 3,0)
		3,00 <i>dd</i> (16,8 e 12,9)
4	191,4, qC	
5	126,4, CH	7,83 <i>d</i> (8,7)
6	105,0, CH	6,64 <i>d</i> (8,7)
7	163,3, qC	
8	117,8, qC	
9	160,0, qC	
10	115,3, qC	
11	55,9, CH ₃	3,89 <i>s</i>
1'	139,4, qC	
2'	126,1, CH	7,47 <i>m</i>
3'	128,7, CH	7,40 <i>m</i>
4'	128,5, CH	7,34 <i>m</i>
5'	128,7, CH	7,40 <i>m</i>
6'	126,1, CH	7,47 <i>m</i>
1''	22,1, CH ₂	3,36 <i>m</i>
2''	121,9, CH	5,18 <i>m</i>
3''	131,7, qC	
4''	17,8, CH ₃	1,66 <i>s</i>
8''	25,7, CH ₃	1,65 <i>s</i>

O espectro de massas (impacto de elétrons) de **S8** (Anexo, pg 14S) apresentou o pico base em m/z 218, referente a clivagem RDA no anel C do núcleo flavanona e pico referente ao íon molecular em m/z 264 (37%), além desses, foram observados diversos picos de fragmentação para esta molécula (esquema 21, pg 49).



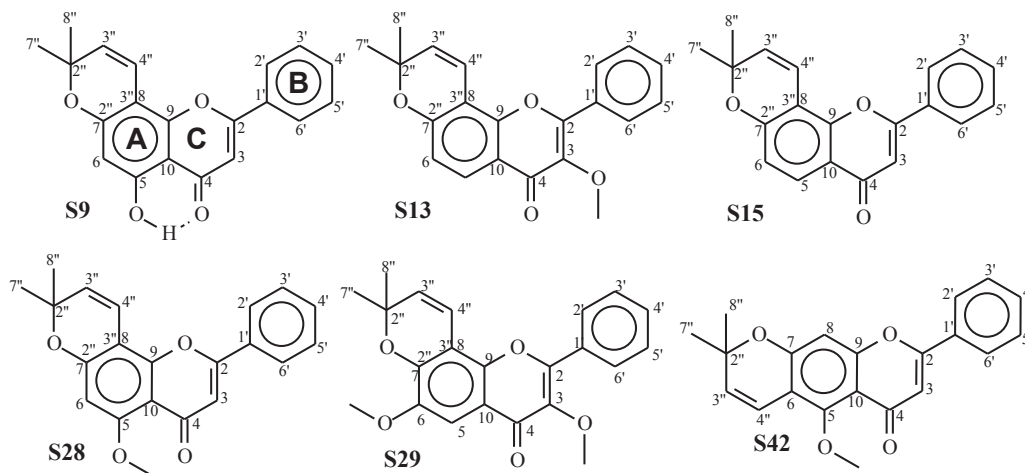
Esquema 21: Proposta de fragmentação para **S8**.

A substância **S8** é conhecida na literatura como Isoderricina A e já foi relatada em uma espécie de *Dahlstedtia*, isolada das raízes de *D. pentaphylla* (GARCEZ e col., 1988).

4.3 FLAVONAS E FLAVONÓIS

As flavonas se originam principalmente a partir de reações de oxidação das flavanonas gerando uma insaturação entre os carbonos C-2 e C-3. Foram identificadas 5 flavonas e 5 flavonóis (oxigênio ligado no C-3).

4.3.1 IDENTIFICAÇÃO DE **S9**, **S13**, **S15**, **S28**, **S29** E **S42**



Os espectros de RMN de **S9** (Anexo, pg 14S) são muito semelhantes aos de **S6**, porém como as flavonas são planares, diferentemente das flavanonas, os hidrogênios dos dois grupos metilas do 2'',2''-dimetilcromeno são homotípicas, igual ambiente químico, apresentando assim um simpleto referente à seis hidrogênios em 1,49 ppm no espectro de RMN de ^1H . Além disso, observou-se no um simpleto referente a um hidrogênio em H-3, uma vez que não possui hidrogênios próximos como nas flavanonas, com deslocamento químico de 6,67 ppm ligado a um carbono em 106,0 ppm corroborando com a estrutura base de uma flavona. A tabela a seguir contém a atribuição completa dos hidrogênios e carbonos para **S9** (pg 51).

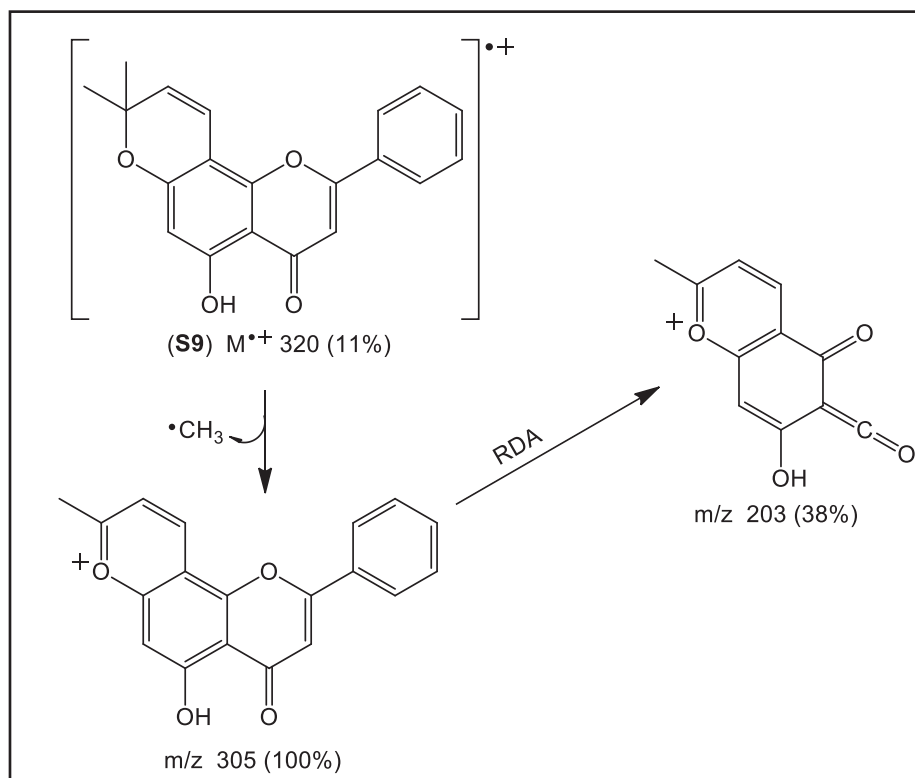
Tabela 11: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias **S9**, **S13**, **S15**, **S28**, **S29** e **S42**.

S9		S13		S15		S28		S29		S42		
δ_c , mult	δ_H , mult. (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)	
2	163,4, qC	154,6, qC	162,5, qC	160,4, qC	154,3, qC	160,9, qC						
3	106,0, CH	6,67 s	141,2, qC	107,2, CH	6,69 s	108,8, CH	6,64 s	141,0, qC	108,6, CH	6,65 s		
4	--		174,5, qC	177,8, qC		177,9, qC		174,1, qC			177,1, qC	
5	161,8, qC		126,2, CH	8,00 d (8,8)	125,9, CH	7,93 d (8,7)	160,5, qC	104,6, CH	7,52 s	155,2, qC		
6	100,4, CH	6,30 d (0,4)	115,1, CH	6,83 dd (8,8 e 0,5)	115,2, CH	6,80 dd (8,7 e 0,6)	96,8, CH	6,31 s/	146,9, qC	112,8, qC		
7	159,6, qC		157,3, qC	157,6, qC		158,0, qC		147,4, qC		158,6, qC		
8	101,2, qC		109,1, qC	109,3, qC		102,6, qC		110,3, qC		100,9, CH	6,71 d (0,6)	
9	--		151,3, qC	152,2, qC		153,8 qC		145,2, qC		---		
10	105,4, qC		118,1, qC	117,8, qC		108,6, qC		---		112,3, qC		
1'	--		130,8, qC	131,8, qC		131,4, qC		130,9, qC		131,4, qC		
2'	126,3, CH	7,89 m	128,4, CH	8,07 m	126,1, CH	7,80 m	126,1, CH	7,84 m	128,3, CH	8,08 m	125,9, CH	7,86 m
3'	129,1, CH	7,54 m	128,8, CH	7,51 m	128,7, CH	7,38 m	129,0, CH	7,49 m	128,6, CH	7,52 m	128,5, CH	7,52 m
4'	131,8, CH	7,56 m	130,5, CH	7,50 m	131,4, CH	7,48 m	131,1, CH	7,50 m	130,4, CH	7,50 m	131,1, CH	7,50 m
5'	129,1, CH	7,54 m	128,8, CH	7,51 m	128,7, CH	7,38 m	129,0, CH	7,49 m	128,6, CH	7,52 m	128,5, CH	7,52 m
6'	126,3, CH	7,89 m	128,4, CH	8,07 m	126,1, CH	7,80 m	126,1, CH	7,84 m	128,3, CH	8,08 m	125,9, CH	7,86 m
2''	77,9, qC		77,7, qC	77,7, qC		78,5, qC		77,9, qC		77,6, qC		

3"	127,5, CH	5,63 <i>d</i>	130,3, CH	5,71 <i>d</i>	130,6, CH	5,73 <i>d</i>	127,5, CH	5,63 <i>d</i>	130,5, CH	5,75 <i>d</i>	139,8, CH	5,72 <i>d</i>
		(10,0)		(10,0)		(10,0)		(10,0)		(10,0)		(10,1)
4"	114,9, CH	6,81 <i>dd</i>	115,1, CH	6,87 <i>dd</i>	115,2, CH	6,85 <i>dd</i>	115,3, CH	6,84 <i>d/</i>	115,5, CH	6,89 <i>d</i>	116,2, CH	6,74 <i>dd</i>
		(10,0 e 0,4)		(10,0 e 0,5)		(10,0 e 0,6)		(10,0)		(10,0)		(10,1 e 0,6)
7"	28,3, CH ₃	1,49 <i>s</i>	28,2, CH ₃	1,49 <i>s</i>	28,2, CH ₃	1,49 <i>s</i>	28,2, CH ₃	1,50 <i>s</i>	28,1, CH ₃	1,56 <i>s</i>	28,3, CH ₃	1,48 <i>s</i>
8"	28,3, CH ₃	1,49 <i>s</i>	28,2, CH ₃	1,49 <i>s</i>	28,2, CH ₃	1,49 <i>s</i>	28,2, CH ₃	1,50 <i>s</i>	28,1, CH ₃	1,56 <i>s</i>	28,3, CH ₃	1,48 <i>s</i>
OH		12,79 <i>sl</i>										
(C-5)												
OCH ₃			60,2, CH ₃	3,87 <i>s</i>					60,1, CH ₃	3,89 <i>s</i>		
(C-3)												
OCH ₃												
(C-5)							56,2, CH ₃	3,91 <i>s</i>				
OCH ₃												
(C-6)									56,4, CH ₃	3,97 <i>s</i>	62,8, CH ₃	3,92 <i>s</i>

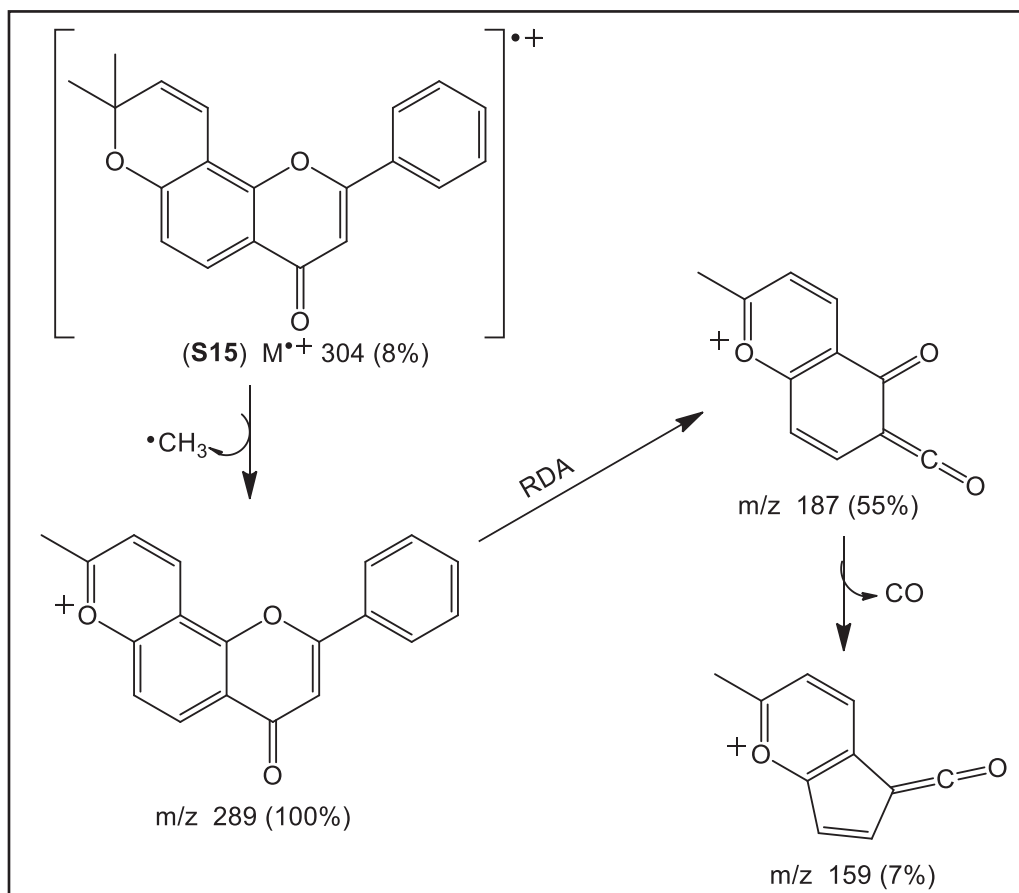
Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de DEPT 135, HSQC e HMBC.

Os principais sinais do espectro de massas (impacto de elétrons) de **S9** (Anexo, pg 15S) correspondem ao íon molecular de **S9** em m/z 320 (11%) e o pico base em m/z 305, referente a perda de um radical metila (esquema 22, pg 53), além destes, é possível observar neste caso, picos referentes a óxidos de silício provenientes da coluna cromatográfica (m/z 73, 207, 253, 281, 327 e 341).



Esquema 22: Proposta de fragmentação para **S9**.

A flavona **S15** é semelhante à flavanona **S7**, diferenciando apenas pelo padrão de oxidação com uma ligação dupla entre C-2 e C3, apresentando então, o sinal de um simpleto em 6,69 ppm referente ao hidrogênio H-3. Já o composto **S13** é semelhante ao **S15**, sendo que ao invés de apresentar um hidrogênio ligado a C-3, há uma metoxila ligada nesta posição, observando assim, um simpleto em 3,87 ppm referente a três hidrogênios no espectro de RMN de ^1H (Anexo, pg 15S). A tabela 11 (pg 51) contém a atribuição completa dos hidrogênios e carbonos para **S13** e **S15**. O espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S15** (Anexo, pg 16S) apresentou o pico base referente a perda de um radical metila (m/z 289) e foi possível observar o íon molecular em m/z 304 (8%). A proposta de fragmentação para **S15** encontra-se no esquema 23 (pg 54).



Esquema 23: Proposta de fragmentação para **S15**.

A substância **S28** é parecida com a flavanona **S16**, sendo que até os resultados por NOE 1D foram semelhantes (Figura 15, pg 54). Já a substância **S42** (Anexo, pg 16S) possui os mesmos conjuntos de sinais de **S28**, 2 simpletos em 6,65 e 6,71 ppm (1H cada), 1 simpleto em 3,92 ppm (3H), conjunto de sinais de anel benzênico monossustituído (anel B) e de anel 2'',2''-dimetilcromeno como substituinte no anel A. Porém, a análise dos experimentos de HMBC e NOE 1D, indicou que o anel 2'',2''-dimetilcromeno está disposto de forma linear à molécula (Figura 16, pg 55). Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C das substâncias **S28** e **S42** estão dispostos na tabela 11 (pg 51).

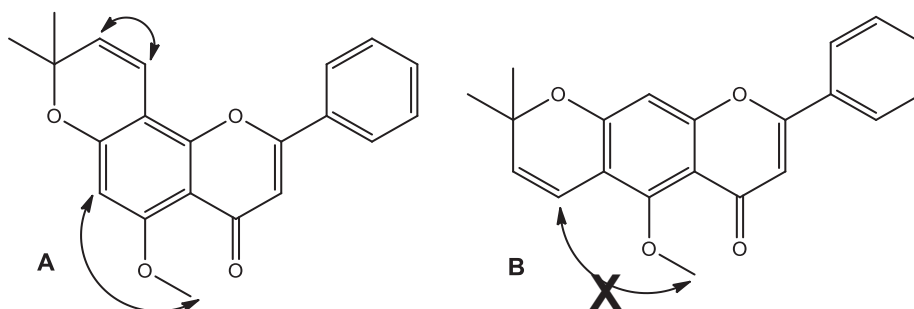


Figura 15 – (A) Efeito NOE observado em **S28**, grupo 2'',2''-dimetilcromeno angular.

(B) Efeitos NOE (esperado) para 2'',2''-dimetilcromeno angular.

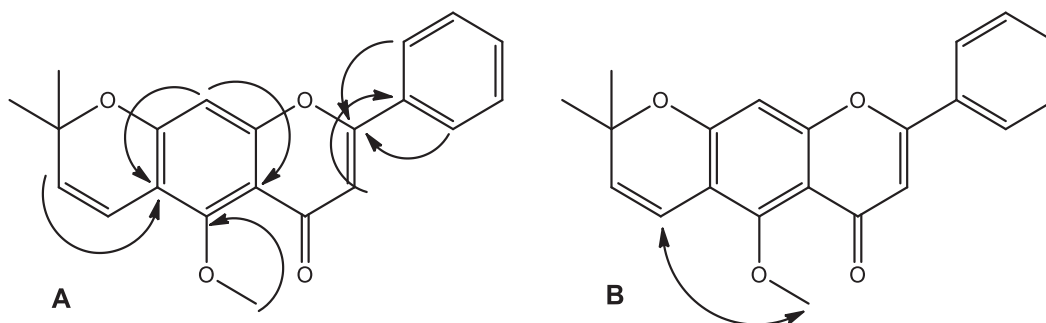
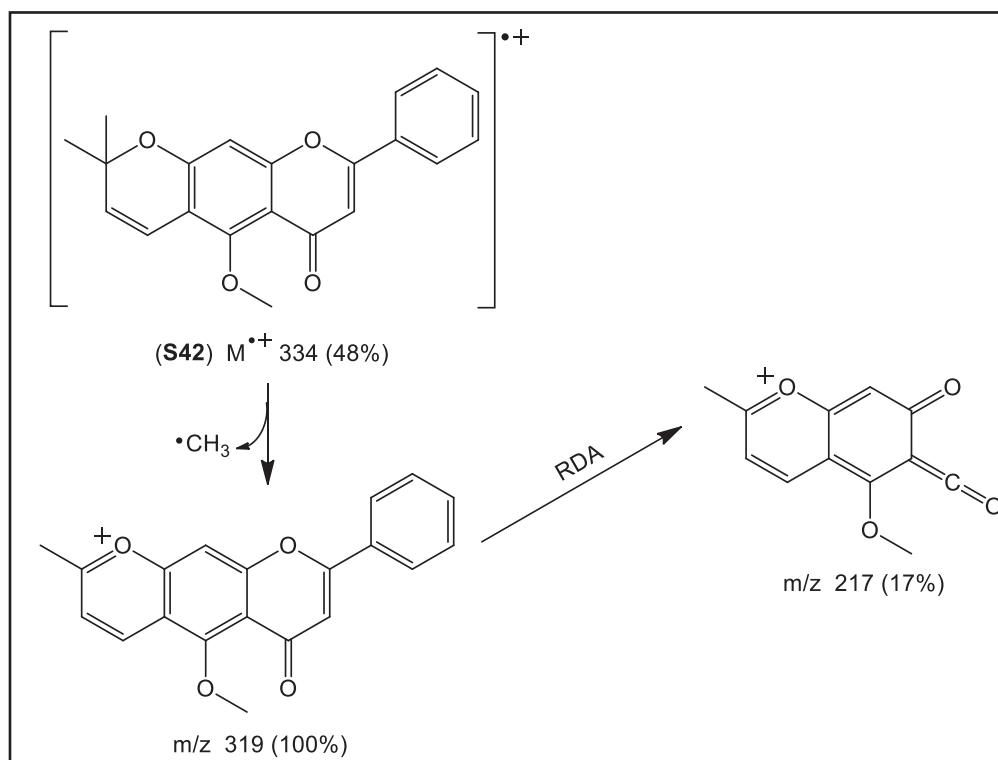


Figura 16 – (A) Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para **S42**.

(B) Hidrogênios próximos espacialmente, observado por NOE 1D em **S42**.

Assim como em **S9**, o pico base no espectro de massas (impacto de elétrons) da substância **S42** (EM – Anexo, pg 17S) possui picos referentes a óxidos de silício provenientes da coluna cromatográfica (m/z 73, 207, 253, 281, 327 e 341) e o pico base referente a perda de um radical metila (m/z 319), pode-se observar também o íon molecular em m/z 334 (48%) (esquema 24, pg 55).



Esquema 24: Proposta de fragmentação para **S42**.

O espectro de RMN 1H de **S29** (Anexo, pg 17S) apresentou 2 sinais (3H cada) referente a 2 grupos metoxilas, um simpleto em 7,52 ppm, conjunto de sinais indicando que o anel B não possui substituições, e sinais que indicam que o grupo 2'',2''-dimetilcromeno é um substituinte do anel A.

Através das correlações observadas no mapa de correlação a longa distância (HMBC) e dos efeitos observados para os sinais irradiados nos experimentos de NOE 1D (Figura 17, pg 56), constatou-se que o anel 2'',2''-dimetilcromeno está disposto de forma angular em relação à molécula e que as metoxilas estão ligadas aos carbonos C-3 e C-6. A oxidação em C-6 é atípica em flavonoides, indicando que houve uma etapa de oxidação em C-6 durante a biossíntese desse composto. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **S29** estão descritos na tabela 11 (pg 51).

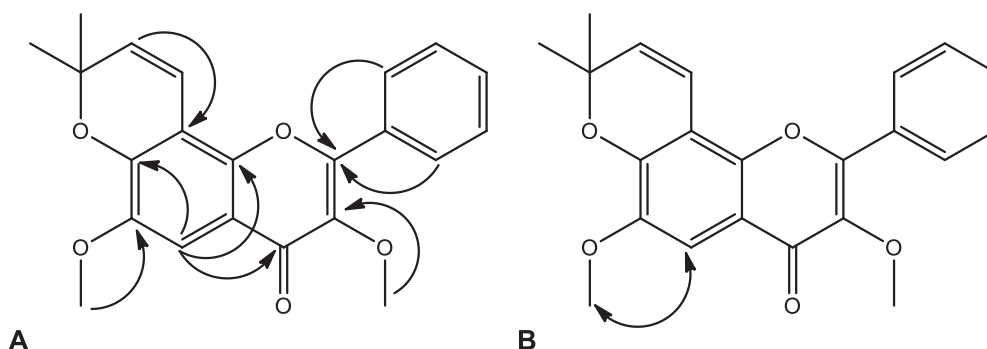
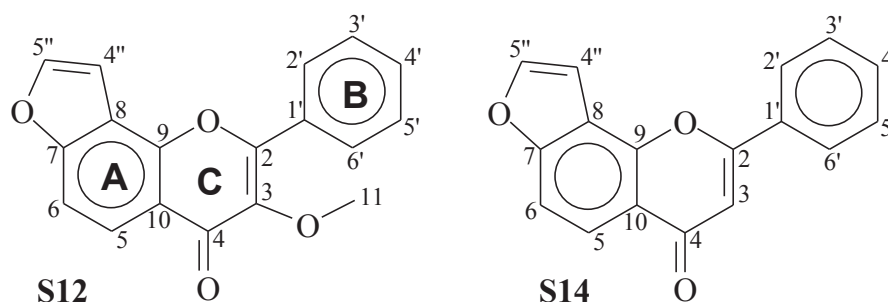


Figura 17 – (A) Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para **S29**.
(B) Hidrogênios próximos espacialmente, observado por NOE 1D em **S29**.

As substâncias **S13**, **S15**, **S28** e **S29** possuem diversos relatos na literatura, conhecidas como karanjacromeno, 2'',2''-dimetilcromeno-[7,8:6'',5'']-flavona, isopongaflavona e 3,6-dimetoxi-2'',2''-dimetilcromeno-[7,8:6'',5'']-flavona respectivamente, e já foram isoladas tanto em *Lonchocarpus* (MAGALHÃES e col., 2000 e 2007), como em espécies de *Dahlstedtia* (GARCEZ e col., 1988; MAGALHÃES e col., 1996 e CANZI e col., 2014). A substância **S9** ainda não foi isolada no gênero *Dahlstedtia*, mas possui alguns relatos de identificação em outros gêneros como o *Tephrosia* (VILAIN, 1983). A substância **S42** é rara, além de inédita nos gêneros *Lonchocarpus* e *Dahlstedtia*, foi encontrada em apenas duas espécies do gênero *Tephrosia* (CAMELE e col., 1980 e VILAIN, 1983). Estudos *in vitro* demonstraram que a flavona **S15** apresentou atividade biológica contra os fungos *Fusarium oxysporium* e *Rhizopus orizae* (MAGALHÃES e col., 2007) e a substância **S28** apresentou atividade significativa na inibição da NQ01 (WANG e col., 2015). Estudos *in vivo* demonstraram que **S29** apresentou atividade gastroprotetora (CAMPOS e col., 2008).

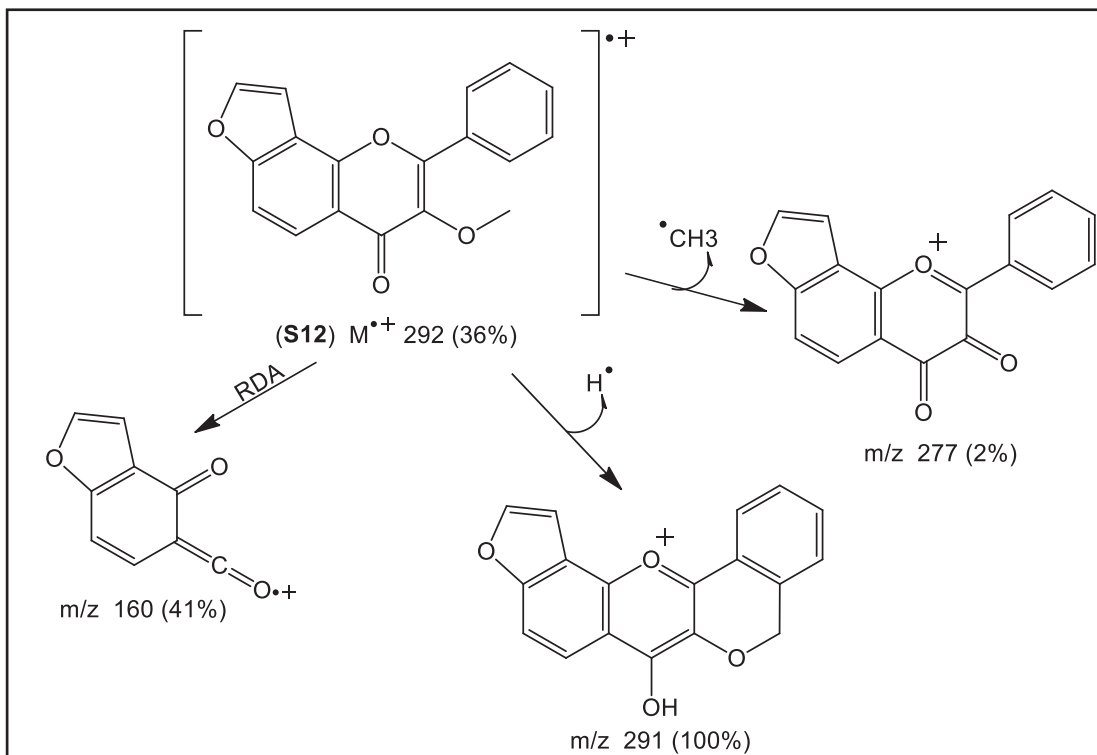
4.3.2 IDENTIFICAÇÃO DE **S12** E **S14**

A flavona **S14** (Anexo, pg 18S) é semelhante à flavanona **S4**, diferenciando apenas pelo padrão de oxidação com uma ligação dupla entre C-2 e C3, apresentando então, o sinal de um simpleto em 6,79 ppm referente ao hidrogênio H-3. Já o flavonol **S12** (Anexo, pg 18S) é semelhante a **S14**, sendo que ao invés de apresentar um hidrogênio ligado a C-3, possui um grupo metoxila ligado a esse carbono. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos de **S12** e **S14** estão descritos na tabela 12 (pg 57).

Tabela 12: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias **S12** e **S14**.

	S12		S14	
	δ_C , mult.	δ_H , mult. (J em Hz)	δ_C , mult.	δ_H , mult. (J em Hz)
2	154,7, qC		165,5, qC	
3	141,7, qC		107,8, CH	6,90 s
4	174,9, qC		178,1, qC	
5	121,9, CH	8,16 <i>d</i> (8,8)	121,7, CH	8,16 <i>d</i> (8,8)
6	110,0, CH	7,51 <i>dd</i> (8,8 e 0,8)	110,1, CH	7,55 <i>dd</i> (8,8 e 0,8)
7	158,0, qC		158,2, qC	
8	116,9, qC		117,0, qC	
9	149,9, qC		150,7, qC	
10	119,5, qC		119,0, qC	
1'	130,9, qC		131,6, qC	
2'	128,5, CH	8,13 <i>m</i>	126,1, CH	7,96 <i>m</i>
3'	128,7, CH	7,52 <i>m</i>	129,1, CH	7,55 <i>m</i>
4'	130,5, CH	7,53 <i>m</i>	131,5, CH	7,55 <i>m</i>
5'	128,7, CH	7,52 <i>m</i>	129,1, CH	7,55 <i>m</i>
6'	128,5, CH	8,13 <i>m</i>	126,1, CH	7,96 <i>m</i>
4''	104,2, CH	7,15 <i>dd</i> (2,1 e 0,8)	104,1, CH	7,22 <i>dd</i> (2,2 e 0,8)
5''	145,8, CH	7,73 <i>d</i> (2,1)	145,6, CH	7,77 <i>d</i> (2,2)
OCH ₃ (C-3)	60,2, CH ₃	3,92 s		

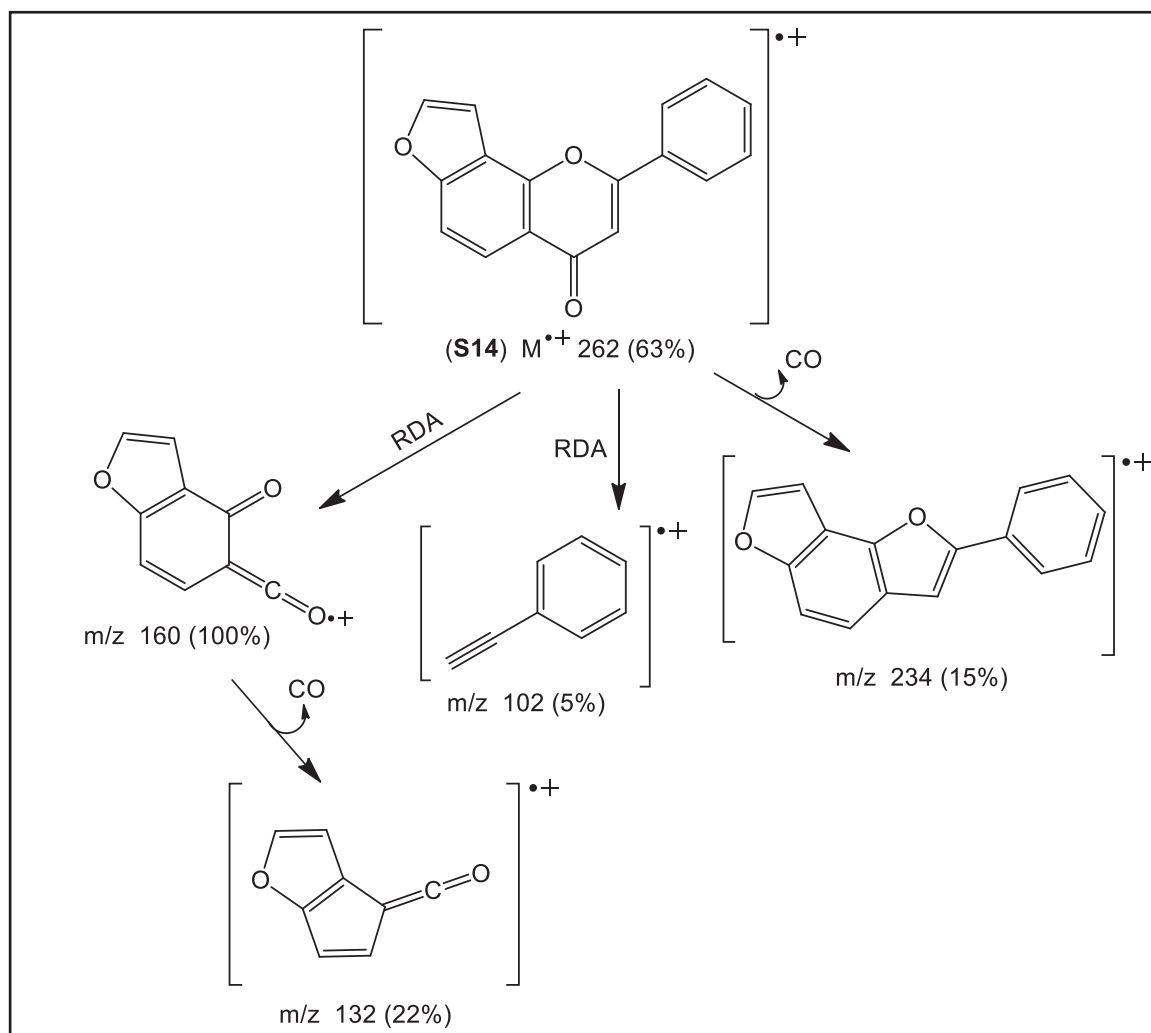
O espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S12** (Anexo, pg 19S) apresentou além dos picos de óxidos de silício provenientes da coluna cromatográfica (m/z 73, 207, 253, 281, 327 e 341), pico referente ao íon molecular em m/z 292 (32%) e ao pico base em m/z 291, referente a perda de um hidrogênio radicalar. A proposta de fragmentação encontra-se no esquema 25 (pg 58).



Esquema 25: Proposta de fragmentação para **S12**.

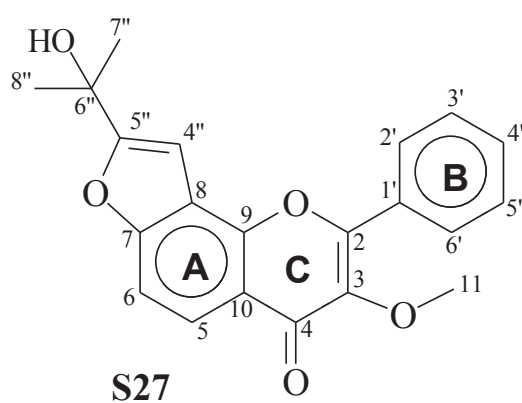
Foi possível observar no espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S14** (Anexo, pg 19S) o íon molecular em m/z 262 (63%) e o pico base em m/z 160, referente a clivagem RDA do anel C. A proposta de fragmentação encontra-se no esquema 26 (pg 59).

As substâncias **S12** e **S14** são conhecidas como karanjina e lanceolata B respectivamente, e já foram relatadas diversas vezes na literatura, inclusive sobre isolamento em espécies de *Lonchocarpus* e *Dahlstedtia* (GARCEZ e col., 1988; MAGALHÃES e col., 2000 e CANZI e col., 2014). Dentre os inúmeros estudos de atividade biológica e aplicações da karanjina, pode-se destacar a sua atividade anti-HIV (PANDEY e col., 2014).



Esquema 26: Proposta de fragmentação para **S14**.

4.3.3 IDENTIFICAÇÃO DE **S27**



Em um aspecto geral, a flavona **S27** é muito semelhante à flavona **S12**. Porém, no espectro de RMN de ^1H (Anexo, pg 20S), observou-se que embora houvesse o hidrogênio H-6 com constantes de acoplamentos de 8,8 e 0,7 Hz, típico de quando há hidrogênio em relação *orto* e acoplamento a longa distância com o hidrogênio H-4'' do anel furano, o hidrogênio H-4'' não apresentava constante de acoplamento em torno de 2,2 Hz, típica em anéis furanos dissustituídos. Todavia, observou-se a presença de um simpleto intenso em 1,73 s (6H) referente a duas metilas e ao analisar os experimentos de HSQC e HMBC (Anexo, pg 20S e 21S) constatou-se que as metilas pertencem a um grupo hidroxisopropila ligado ao carbono C-5'' conforme indica a figura 18. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C para esta substância estão descritos na tabela 13 (pg 61).

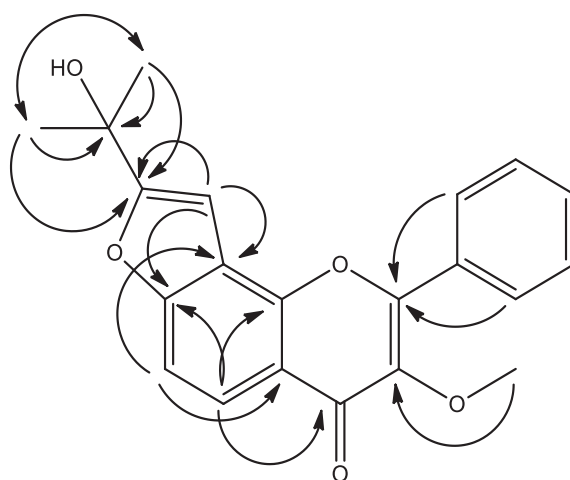


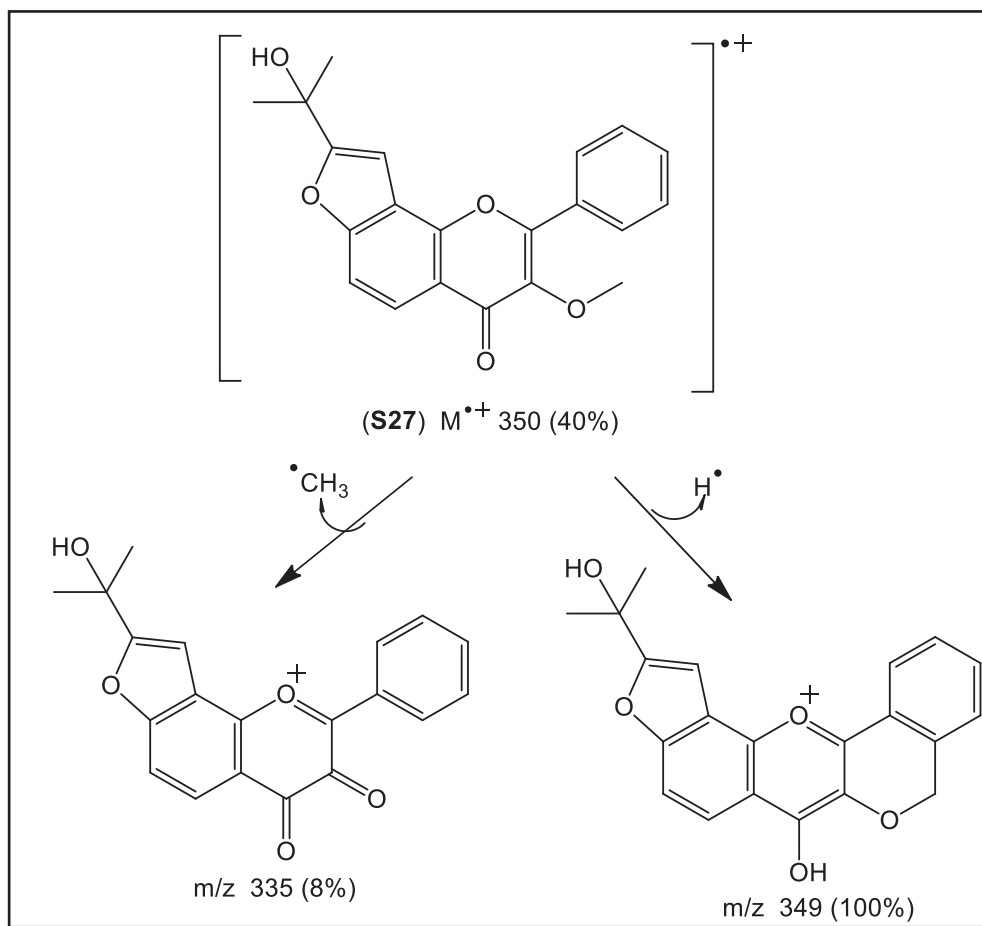
Figura 18 – Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para **S27**.

Tabela 13: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância **S27**.

	δ_c , <i>multiplicidade</i>	δ_H , <i>multiplicidade (J em Hz)</i>
2	154,9, qC	
3	141,7, qC	
4	175,1, qC	
5	121,6, CH	8,13 <i>d</i> (8,8)
6	109,9, CH	7,47 <i>dd</i> (8,8 e 0,7)
7	157,8, qC	
8	117,7, qC	
9	149,6, qC	
10	119,5, qC	
1'	---	
2'	128,3, CH	8,13 <i>m</i>
3'	128,6, CH	7,54 <i>m</i>
4'	130,6, CH	7,53 <i>m</i>
5'	128,6, CH	7,54 <i>m</i>
6'	128,3, CH	8,13 <i>m</i>
4''	98,1, CH	6,97 <i>d</i> (0,7)
5''	164,4, qC	
6''	69,3, qC	
7''	28,8, CH ₃	1,73 <i>s</i>
8''	28,9, CH ₃	1,73 <i>s</i>
OCH ₃ (C-3)	60,3, CH ₃	3,92 <i>s</i>

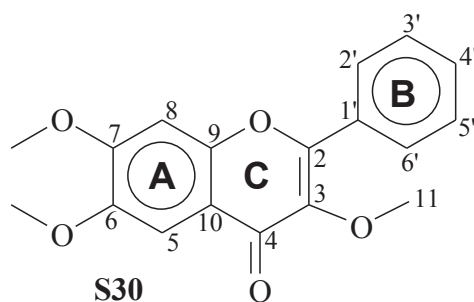
Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de DEPT 135, HSQC e HMBC.

O espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S27** (Anexo, pg 21S) apresentou pico referente ao íon molecular em m/z 350 (40%) e ao pico base em m/z 349, referente a perda de um hidrogênio radicalar, para esta substância, observou-se também picos intensos referentes a óxidos de sílico provenientes da coluna cromatográfica (m/z 73, 207, 253, 281, 327 e 341). A proposta de fragmentação encontra-se no esquema 27 (pg 62). Esta substância possui apenas um relato na literatura, isolada das cascas do caule de *Pongamia pinnata* (YIN, 2006).



Esquema 27: Proposta de fragmentação para **S27**.

4.3.4 IDENTIFICAÇÃO DE **S30**



A substância **S30** trata-se de um flavonoide que não possui substituintes derivados do grupo prenila e possui um padrão de oxidação atípico entre os flavonoides. É esperado que em flavonóis, o anel A possua oxidações alternadas nos carbonos (C-5, C-7 e C-9 oxigenados), tendo em vista que essa parte do esqueleto básico de um flavonoide deriva da rota do acetato. Porém, ao analisar os experimentos de RMN (Espectro de RMN de ^1H – anexo, pg 22S), constatou-se que **S30** não possuía substituições no anel B, mas possuía um grupo metoxila ligado ao carbono C-3, dois hidrogênios no anel A com relação *para* entre si e dois grupos metoxila com relação *orto* entre si, também no anel A. Sendo assim, o anel A, possui carbonos oxigenados em C-6 e C-7, apresentando

um padrão sequencial. Isto indica que provavelmente ocorreram etapas de redução no carbono C-5 e de oxidação no C-6 durante a biossíntese dessa substância. A figura 19-a demonstra as principais correlações observadas no mapa de correlação a longa distancia (HMBC). A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos para **S30** é apresentada na tabela 14 (pg 64). Este composto foi também confirmado pela análise de experimentos de NOE 1D. Ao irradiar o sinal em 7,58 ppm (H-5) houve efeito de transferência de polarização para os hidrogênios da metoxila ligada a C-6 (incremento do sinal em 3,99 ppm), de modo análogo, ao irradiar o sinal em 6,95 ppm, houve incremento do sinal em 4,00 ppm, referente aos hidrogênios na metoxila ligada a C-7. Além disso, os sinais referentes aos hidrogênios da metoxila em C-3 (3,88 ppm) e H-2' e H-6' foram irradiados resultando em transferência de polarização uns sobre os outros (Figura 19b, pg 63). Até o momento, **S30** é inédita como produto natural, mas já foi obtida como produto de síntese por Rao e colaboradores (1945).

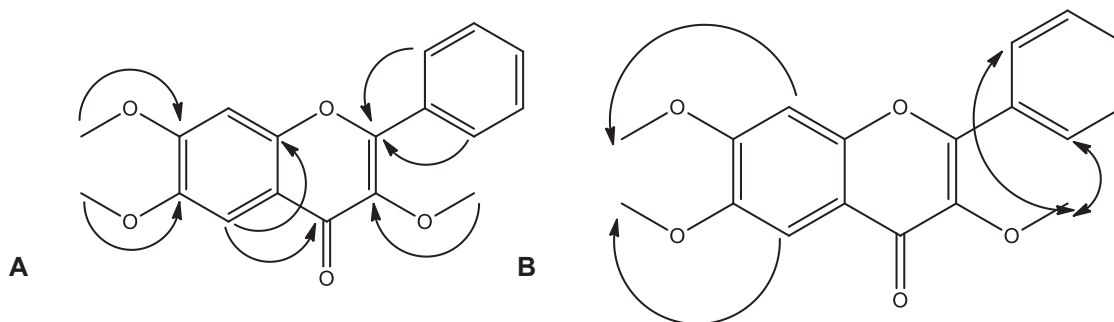


Figura 19 – (A) Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para **S30**.

(B) Hidrogênios próximos espacialmente, observado por NOE 1D em **S30**.

Tabela 14: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância **S30**.

	δ_c , multipilicidade	δ_H , multipilicidade (<i>J</i> em Hz)
2	155,3, qC	
3	141,2, qC	
4	174,3, qC	
5	104,4, CH	7,58 <i>s</i>
6	147,4, qC	
7	154,6, qC	
8	115,7, CH	6,95 <i>s</i>
9	151,5, qC	
10	117,7, qC	
1'	131,0, qC	
2'	128,4, CH	8,08 <i>m</i>
3'	128,6, CH	7,50 <i>m</i>
4'	130,5, CH	7,50 <i>m</i>
5'	128,6, CH	7,50 <i>m</i>
6'	128,4, CH	8,08 <i>m</i>
OCH ₃ (C-3)	60,2, CH ₃	3,88 <i>s</i>
OCH ₃ (C-6)	56,4, CH ₃	3,99 <i>s</i>
OCH ₃ (C-7)	56,4, CH ₃	4,00 <i>s</i>

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de DEPT 135, HSQC e HMBC.

4.4 DIBENZOILMETANOS

Também conhecidos como β -hidroxichalconas, o esqueleto básico desta classe de compostos apresenta sinais característicos em espectros de RMN como simpleto largo em torno de 16 ppm nos espectros de RMN de ¹H referente ao hidrogênio enólico com interação intramolecular com um grupo ceto, estabelecendo um equilíbrio diceto-cetoenólico num sistema de três carbonos (Figura 20, pg 65) e/ou simpleto que possua correlação no mapa de correlação de HMBC com 2 carbonos, a duas ligações, em torno de 185 ppm. Foram identificados 5 derivados de dibenzoilmetano neste trabalho.

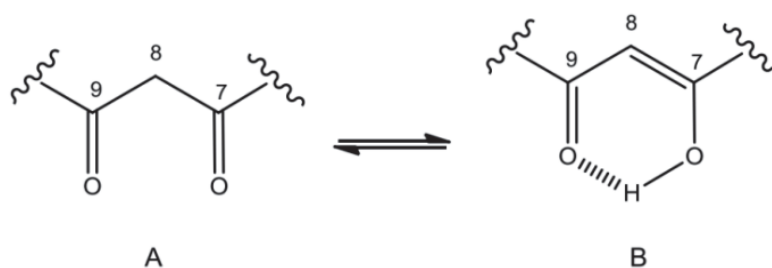
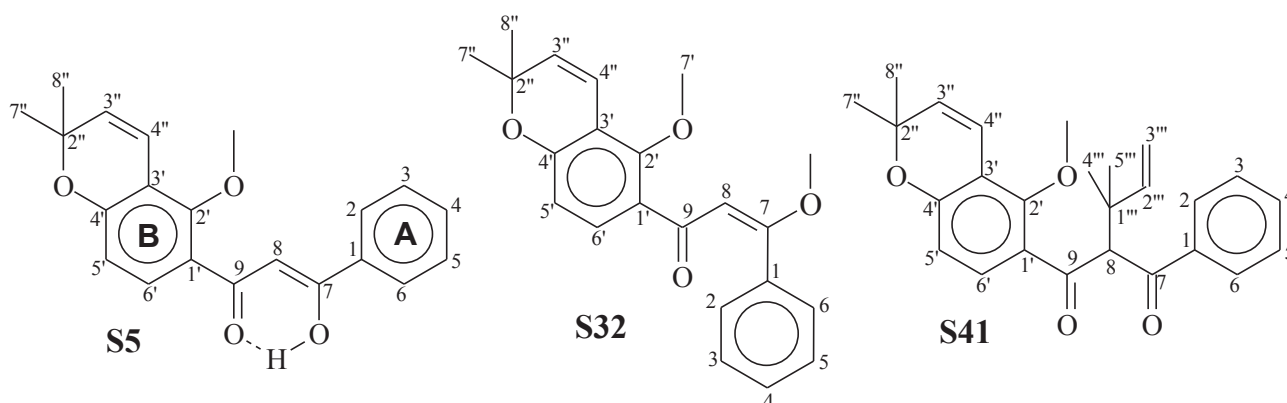


Figura 20 – Equilíbrio diceto-cetoenólico estabelecido em dibenzoilmetanos.

4.4.1 IDENTIFICAÇÃO DE **S5**, **S32** E **S41**

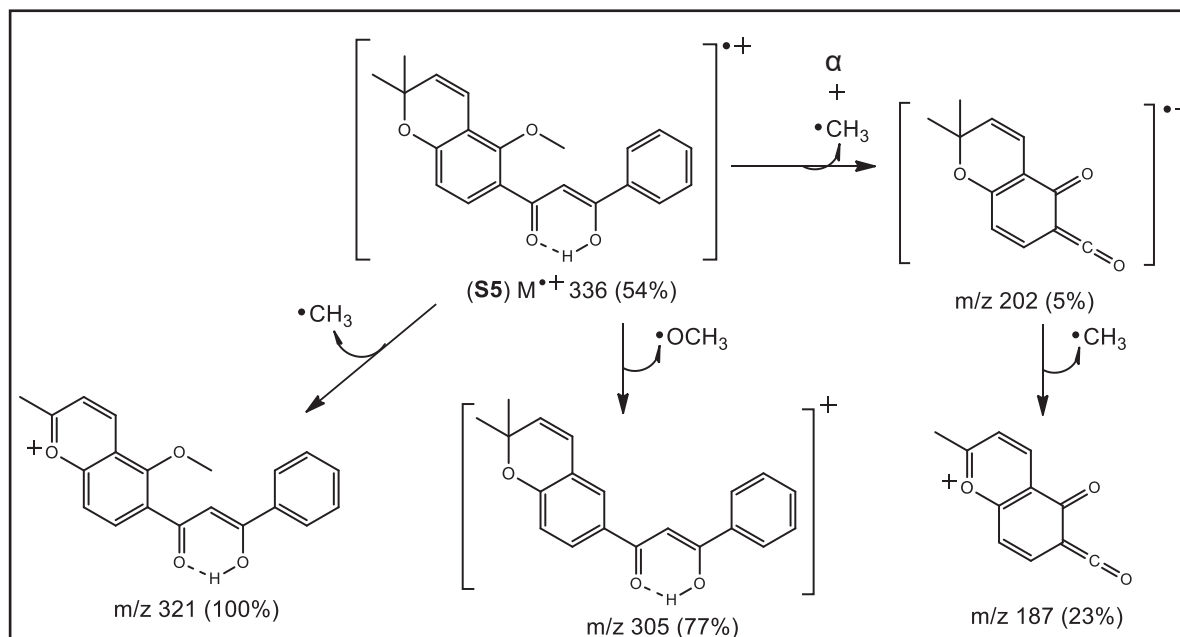


O espectro de RMN de ^1H (Anexo, pg 23S) de **S5** apresentou sinais característicos do esqueleto básico de dibenzoilmetano, simpleto largo em 16,86 ppm e simpleto em 7,14 ppm que no mapa de correlação de HMBC apresentou correlação com os carbonos em 184,4 e 185,2 ppm. Verificou-se também um padrão de anel monossustituído para o anel A, enquanto que para o anel B, observou-se sinais correspondentes ao anel 2'',2'' dimetilcromeno e simpleto referente a um grupo metoxila como substituintes e dois dupletos com constantes de acoplamento de 8,7 Hz indicando a presença de dois hidrogênios *orto* entre si. A identificação desta substância foi realizada com base nos resultados dos experimentos de RMN de ^1H e bidimensionais (HSCQ e HMBC). A tabela 15 (pg 66) demonstra os deslocamentos dos hidrogênios e carbonos desta substância.

Tabela 15: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância S5, S32 e S41.

	S5		S32		S41	
	δ_C , mult.	δ_H , mult.	δ_C , mult.	δ_H , mult.	δ_C , mult.	δ_H , mult.
1	135,7, qC		135,4, qC		---	
2	127,1, CH	7,97 m	128,9, CH	7,43 m	---	7,98 m
3	128,6, CH	7,47 m	127,8, CH	7,30 m	---	---
4	132,1, CH	7,53 m	127,9, CH	7,30 m	---	---
5	128,6, CH	7,47 m	127,8, CH	7,30 m	---	---
6	127,1, CH	7,97 m	128,9, CH	7,43 m	---	7,98 m
7	184,5, qC		170,6, qC		195,8, qC	
8	96,5, CH	7,14 s	102,3, CH	6,32 s	66,1, CH	5,65 s
9	185,2, qC		189,5, qC		196,3, qC	
1'	121,8, qC		126,9, qC		---	
2'	156,2, qC		155,4, qC		156,2, qC	
3'	115,1, qC		114,3, qC		114,4, qC	
4'	157,6, qC		156,6, qC		---	
5'	112,8, CH	6,67 dl (8,7)	112,5, CH	6,51 dd (8,6 e 0,7)	112,7, CH	6,54 dd (8,6 e 0,7)
6'	130,5, CH	7,73 d (8,7)	131,2, CH	7,39 d (8,6)	---	7,26 m
2''	77,0, qC		76,4, qC		76,6, qC	
3''	130,6, CH	5,70 d (10,0)	130,4, CH	5,64 d (10,0)	130,7, CH	5,65 d (10,0)
4''	116,4, CH	6,68 dl (10,0)	116,6, CH	6,58 dd (10,0 e 0,7)	116,5, CH	6,52 dd (10,0 e 0,7)
7''	28,2, CH ₃	1,47 s	28,0, CH ₃	1,42 s	27,9, CH ₃	1,46 s
8''	28,2, CH ₃	1,47 s	28,0, CH ₃	1,42 s	27,9, CH ₃	1,38 s
1'''					41,7, qC	
2'''					145,9, qC	
3'''					---	4,91 dd (17,3 e 1,1) 4,87 dd (10,7 e 1,1)
4'''					26,0, CH ₃	1,19 s
5'''					26,2, CH ₃	1,21 s
OCH ₃ (C-2')	62,5, CH ₃	3,81 s	62,3, CH ₃	3,81 s	62,7, CH ₃	3,81 s
OH (C-7)	16,86 s/					
OCH ₃ (C-7)			56,4, CH ₃	3,87 s		

Foi possível observar no espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S5** (Anexo, pg 23S) picos referentes ao íon molecular em m/z 336 (54%) e ao pico base desta substância em m/z 321, referente a perda de um radical metila, foi possível observar também, picos intensos referentes a óxidos de sílico provenientes da coluna cromatográfica (m/z 73, 207, 253, 281, 327 e 341). A proposta de fragmentação encontra-se no esquema 28 (pg 67).



Esquema 28: Proposta de fragmentação para **S5**.

A substância **S32** (Espectro de RMN de ^1H – anexo, pg 24S) é muito semelhante a **S5**, a diferença encontra-se que ao invés de apresentar um grupo hidroxila com ligação intramolecular, apresenta um grupo metoxila ligado ao carbono C-7. Verificou-se a posição da metoxila e a configuração da ligação dupla analisando experimentos de HMBC e NOE 1D, respectivamente. No mapa de correlações a longa distância (HMBC), tanto os hidrogênios H-2 e H-6, como os hidrogênios da metoxila com deslocamento químico de 3,87 ppm apresentaram correlação com o carbono em 170,6 ppm, enquanto que, o hidrogênio H-6' além de apresentar correlação com a carbonila (C-9) em 189,5 ppm correlaciona com o carbono em 155,4 ppm (C2'), ao qual, os hidrogênios da metoxila com deslocamento químico de 3,81 ppm também correlacionam. Desta forma, verificou-se que o carbono C-9 trata-se de uma carbonila, enquanto o carbono C-7 é um carbono ligado a uma metoxila (Figura 21-a, pg 68). Para a determinação da configuração da ligação dupla, foram irradiados os sinais referentes as metoxilas e H-8 (Figura 21-b, pg 68). Ao irradiar a metoxila ligada no C-7, constatou-se que houve transferência de polarização para o hidrogênio H-8 e ao irradiar H-8 houve incremento no sinal referente à metoxila em C-7, indicando assim, que tanto a metoxila como o hidrogênio H-8 são próximos espacialmente. Logo, constatou-se que a

configuração deste composto é *E* (Figura 21-b, pg 68). A atribuição completa dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos desta substância encontra-se na tabela 15 (pg 66).

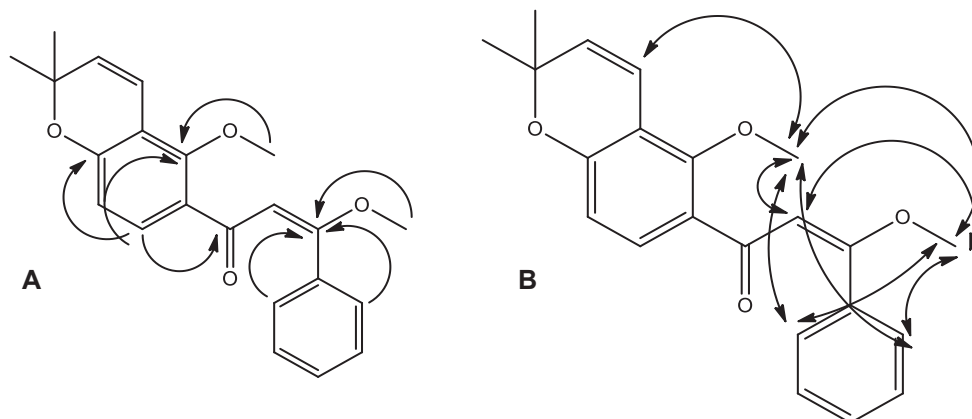
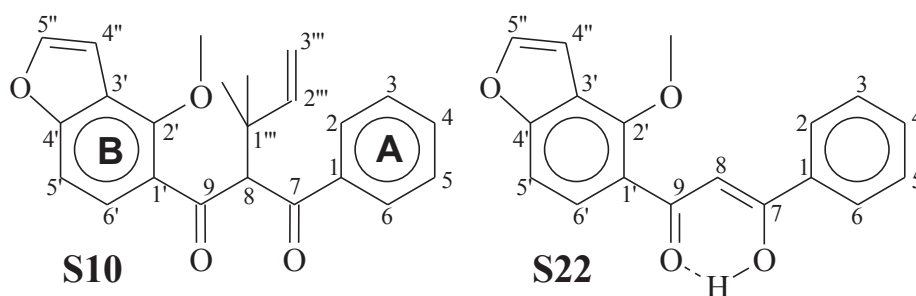


Figura 21 – (A) Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para **S32**.
(B) Hidrogênios próximos espacialmente, observado por NOE 1D em **S32**.

A substância **S5** é conhecida na literatura como purpurenona e já foi isolada das raízes da espécie *D. floribunda* (MAGALHÃES e col., 1996). Já a substância **S32** é inédita como produto natural até o momento, sendo relatada por MAGALHÃES, em 1996, como produto de isomerização em sílica gel do seu estereoisômero.

Através do estudo dos experimentos de RMN de ^1H , HSQC e HMBC de **S41** verificou-se a presença de um simpleto em 5,65 ppm que apresentou correlações com carbonos em 41,7, 145,9, 195,8 e 196,53, indicando que a substância é um derivado de dibenzoilmetano com o grupo dimetilalila ligado ao carbono C-8. Além disso, verificou-se a possibilidade de anel benzênico monossustituído para o anel A e sinais que indicam que o anel B tem como substituintes um anel 2'',2''-dimetilcromeno e uma metoxila, sendo que os dois hidrogênios do anel B estão *orto* entre si, pois apresentam constante de acoplamento igual a 8,6 Hz. Esta substância possui estereocentro em C-8, porém, o valor de rotação ótica ainda não foi medido pelo fato de o composto não estar puro. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C que foram possíveis se obter pelos experimentos de RMN estão apresentados na tabela 15 (pg 66). Uma vez que este composto foi identificado como um minoritário de uma fração muito complexa, a fração foi submetida a análise por CLAE-EM, sendo então, confirmado por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) (eletrospray – modo positivo). O composto **S41** ($\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_4$) teve sua massa molecular calculada por EMAR no modo positivo, que revelou um pico referente ao íon pseudo-molecular do aduto de sódio de m/z 427,1889 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e íon m/z 405,2061 $[\text{M}+\text{H}]$ (Anexo, pg 24S). Esta substância foi isolada uma vez, em *Lonchocarpus montanus* e ainda não possui relatos de atividade biológica para ela (MAGALHÃES e col., 2007).

4.4.2 IDENTIFICAÇÃO DE **S10** E **S22**

Através do estudo dos experimentos de RMN de ^1H , HSQC e HMBC de **S10** (Anexo, pg 25S) verificou-se a presença de um simpleto em 5,73 ppm que apresentou correlações com carbonos em 25,9, 41,7, 146,3, 195,4 e 197,5, indicando que a substância é um dibenzoilmetano com o grupo dimetilalila ligado ao carbono C-8. Além disso, verificou-se padrão de anel benzênico monossustituído para o anel A e sinais que indicam que o anel B tem como substituintes um anel furano e uma metoxila, sendo que os dois hidrogênios do anel B estão *orto* entre si, pois ambos apresentam constante de acoplamento igual a 8,7 Hz. Esta substância possui estereocentro em C-8, porém, o valor de rotação ótica ainda não foi medido pelo fato de o composto não estar puro. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados na tabela 16 (pg 70).

A substância **S10** é conhecida na literatura como 2'-metoxi-8-(α - α -dimetilalila)-[3',4':4'',5'']-furanodibenzoilmetano e foi isolada pela primeira vez em *L. latifolius* e *D. muehlbergiana* (MAGALHÃES e col., 1997 e 2000). Ensaio *in vitro* demonstraram atividade contra os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae* (MAGALHÃES e col., 1998).

Tabela 16: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias **S10** e **S22**.

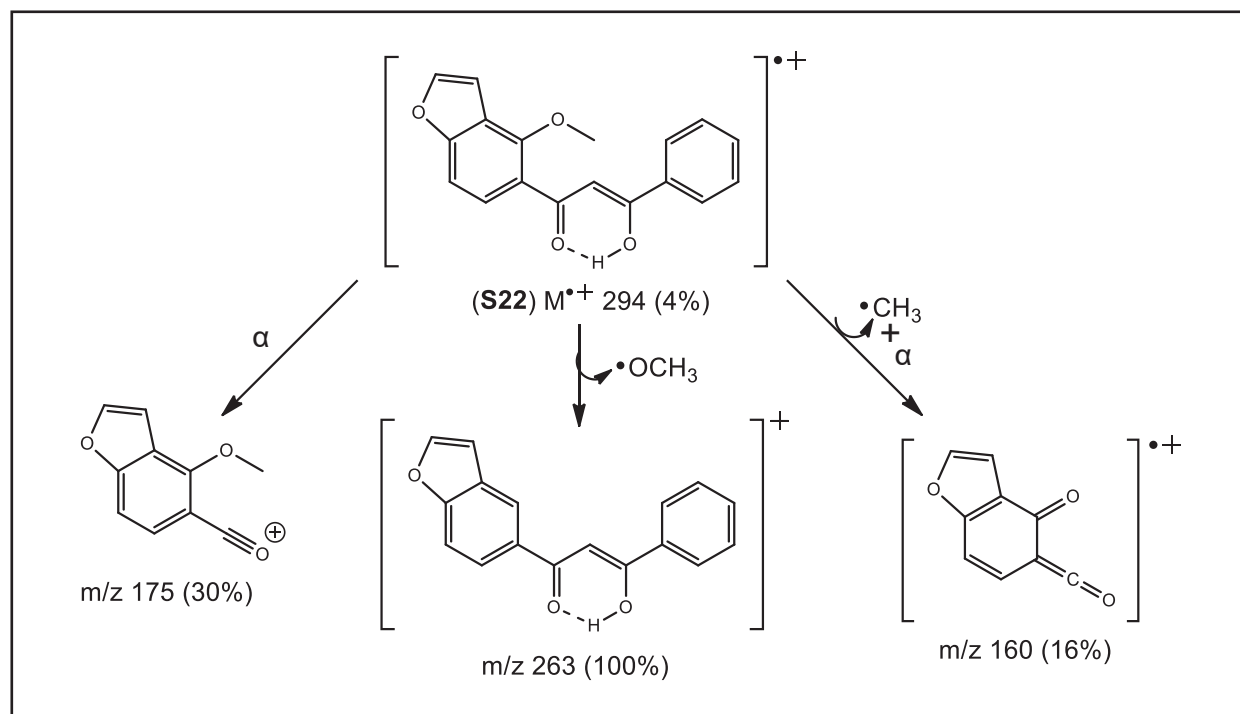
	S10		S22	
	δ_C , <i>mult.</i>	δ_H , <i>mult. (J em Hz)</i>	δ_C , <i>mult.</i>	δ_H , <i>mult. (J em Hz)</i>
1	138,8, qC		136,3, qC	
2	128,9, CH	8,01 <i>m</i>	127,4, CH	7,98 <i>m</i>
3	128,2, CH	7,44 <i>m</i>	128,8, CH	7,49 <i>m</i>
4	132,6, CH	7,51 <i>m</i>	132,5, CH	7,53 <i>m</i>
5	128,2, CH	7,44 <i>m</i>	128,8, CH	7,49 <i>m</i>
6	128,9, CH	8,01 <i>m</i>	127,4, CH	7,98 <i>m</i>
7	195,4, qC		184,1, qC	
8	66,9, CH	5,73 <i>s</i>	98,0, CH	7,17 <i>s</i>
9	197,5, qC		186,5, qC	
1'	127,2, qC		121,7, qC	
2'	152,2, qC		153,9, qC	
3'	117,6, qC		---	
4'	158,8, qC		153,4, qC	
5'	106,6, CH	7,17 <i>dd</i> (8,7 e 0,8)	107,2, CH	7,32 <i>dd</i> (8,7 e 0,9)
6'	126,3, CH	7,43 <i>d</i> (8,7)	126,8, CH	7,88 <i>d</i> (8,7)
4''	105,2, CH	6,92 <i>dd</i> (2,2 e 0,8)	105,2, CH	7,00 <i>dd</i> (2,3 e 0,9)
5''	144,6, CH	7,58 <i>d</i> (2,2)	144,9, CH	7,63 <i>d</i> (2,3)
1'''	41,7, qC			
2'''	146,3, CH	6,09 <i>dd</i> (17,5 e 10,9)		
3'''	111,6, CH ₂	4,91 <i>dd</i> (17,5 e 0,9) 4,87 <i>dd</i> (10,9 e 0,9)		
4'''	25,9, CH ₃	1,23 <i>s</i>		
5'''	26,5, CH ₃	1,21 <i>s</i>		
OCH ₃ (C-2')	60,2, CH ₃	3,85 <i>s</i>	61,2, CH ₃	4,15 <i>s</i>
OH				16,90 <i>s/</i>

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃.

Multiplicidades determinadas por experimentos de DEPT 135, HSQC e HMBC.

A análise do espectro de RMN de ¹H de **S22** demonstrou que a única diferença de **S5** para **S22** é que ao invés de apresentar o grupo 2'',2''-dimetilcromeno como substituinte, apresenta sinais característico do anel furano como substituinte, dois dupletos em torno de 7,0 e 7,6 ppm com constantes de acoplamento entre si de 2,2 Hz. A atribuição dos hidrogênios e carbonos dessa

molécula está exposta na tabela 16 (pg 70) e a proposta de fragmentação de massas (impacto de elétrons) é apresentada no esquema 29 (pg 71).



Esquema 29: Proposta de fragmentação para **S22**.

A substância **S22** é conhecida como pongamol, possuindo diversos relatos na literatura e foi encontrada tanto em *Lonchocarpus* como em *Dahlstedtia* (GARCEZ e col. 1988, CANZI, 2013). Dentre os inúmeros estudos de atividade biológica do pongamol, pode-se destacar sua atividade significativa, *in vivo*, hiperglicêmica (TAMRAKARA e col., 2008).

4.5 RETROCHALCONAS

As retrochalconas compõem uma classe muito rara de flavonoides. Os espectros de RMN de ^1H de chalconas e retrochalconas são muito similares, a diferenciação entre essas duas classes de compostos se dá pelas análises de experimentos adicionais de RMN como HMBC e pelo estudo de fragmentação nas análises de EM. Assim como nas chalconas, a presença de rechalconas pode ser verificada por RMN de ^1H pela constatação de sinais em torno de 7,50 e 7,80 ppm com constantes de acoplamento entre si de aproximadamente 15 Hz, característicos dos hidrogênios sobre ligação dupla com configuração *E*. Porém, nesta classe de compostos, pelos experimentos de HMBC os hidrogênios H-2 e H-6 correlacionam com o carbono de carbonila ao invés do carbono de ligação dupla, como ocorre nas chalconas. Segundo Shin-ichi (1981), a formação das

retrochalconas se dá pela redução de dibenzoilmetanos. Todas as retrochalconas identificadas nesse trabalho são inéditas na literatura (Figura 22, pg 72).

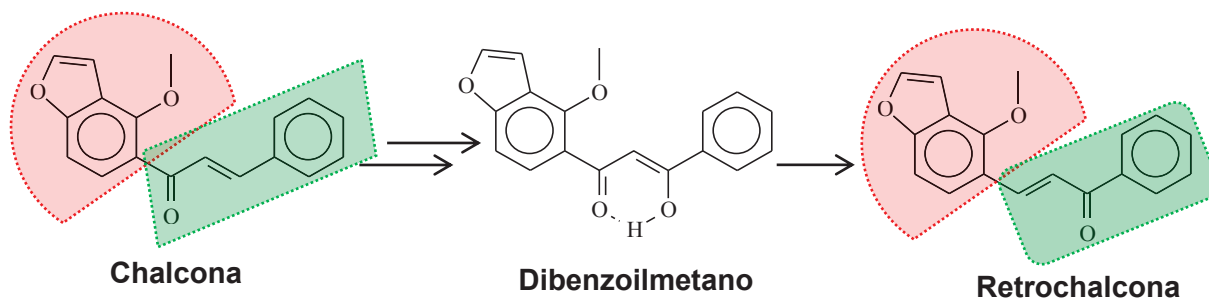
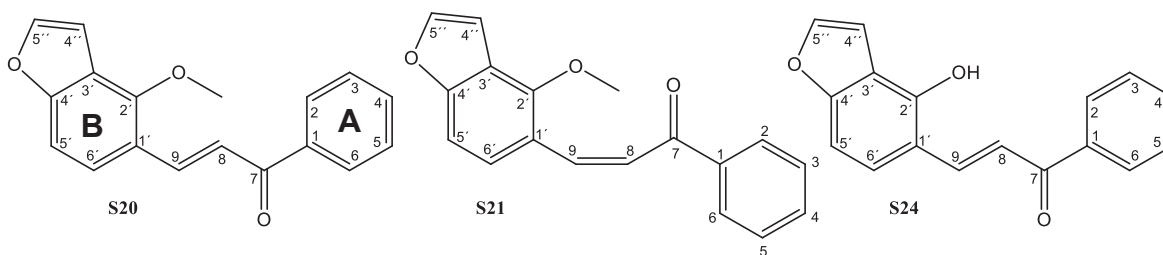


Figura 22 – Representação da formação de retrochalconas. Em vermelho: unidade derivada da rota do acetato, em verde: unidade derivada da rota do chiquimato.

4.5.1 IDENTIFICAÇÃO DE **S20**, **S21** E **S24**



O conjunto de sinais no espectro de RMN de ^1H (Anexo, pg 26S) de **S20** é muito semelhante ao de **S18**. Ambos apresentam multipletos característicos de hidrogênios de anel benzênico monossustituído, dupletos referentes a dois hidrogênios sobre ligação dupla com configuração *E*, dois dupletos de hidrogênios de anel benzênico com relação *orto* entre si. Além disso, observaram-se sinais referentes a hidrogênios olefínicos de anel furano e de um grupo metoxila como substituintes. Através da análise dos experimentos bidimensionais de HSQC e HMBC, observou-se que os hidrogênios H-2 e H-6 correlacionam com a carbonila C-7, enquanto que o hidrogênio H-6' apresenta correlação com um carbono olefínico. Desta forma, os fragmentos foram conectados como demonstrado na figura 23 (pg 72). Os valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de **S20** estão descritos na tabela 17 (pg 73).

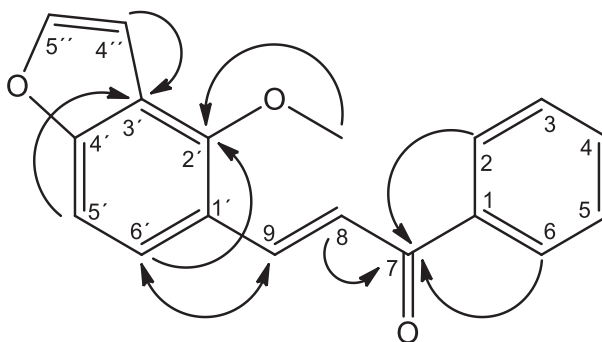


Figura 23 – Correlações relevantes observadas no experimento de HMBC para **S20**.

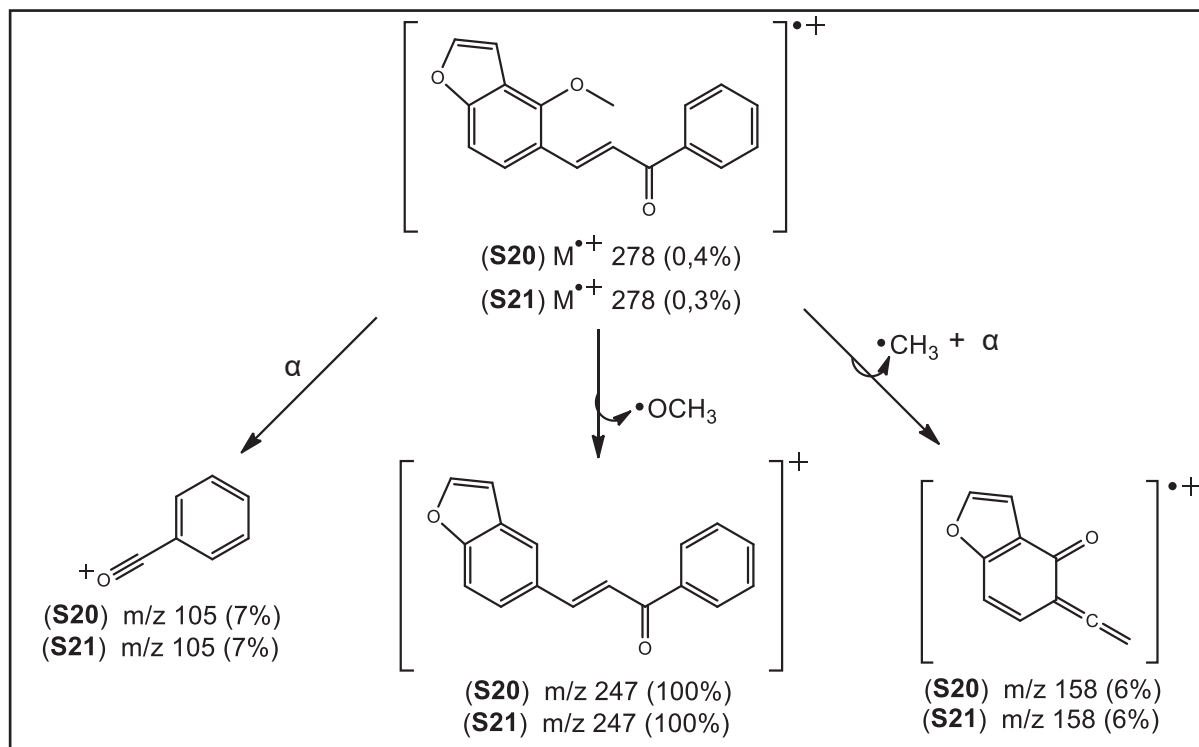
Tabela 17: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias **S20**, **S21** e **S24**.

	S20		S21		S24	
	δ_c , mult	δ_H , mult. (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)
1	138,6, qC		137,6, qC		138,5, qC	
2	128,4, CH	8,03 <i>m</i>	128,7, CH	7,95 <i>m</i>	128,7, CH	8,10 <i>m</i>
3	128,5, CH	7,50 <i>m</i>	128,2, CH	7,37 <i>m</i>	128,6, CH	7,54 <i>m</i>
4	132,4, CH	7,58 <i>m</i>	132,7 CH	7,47 <i>m</i>	132,9, CH	7,61 <i>m</i>
5	128,5, CH	7,50 <i>m</i>	128,2, CH	7,37 <i>m</i>	128,6, CH	7,54 <i>m</i>
6	128,4, CH	8,03 <i>m</i>	128,7, CH	7,95 <i>m</i>	128,7, CH	8,10 <i>m</i>
7	190,8, qC		194,1, qC		192,2, qC	
8	121,4, CH	7,57 <i>d</i> (15,8)	125,6, CH	6,66 <i>d</i> (12,7)	119,2, CH	7,66 <i>d</i> (15,8)
9	140,3, CH	8,26 <i>d</i> (15,8)	135,9, CH	7,33 <i>d</i> (12,7)	141,9, CH	8,66 <i>d</i> (15,8)
1'	120,6, qC		120,4, qC		115,6, qC	
2'	153,6, qC		151,5, qC		151,2, qC	
3'	118,5, qC		117,7, qC		117,6, qC	
4'	158,2, qC		157,3, qC		158,1, qC	
5'	106,8, CH	7,24 <i>dd</i> (8,7 e 0,7)	105,6, CH	7,01 <i>dd</i> (8,7 e 0,8)	105,0, CH	7,13 <i>dl</i> (8,7)
6'	124,6, CH	7,63 <i>d</i> (8,7)	126,8, CH	7,31 <i>d</i> (8,7)	124,4, CH	7,62 <i>d</i> (8,7)
4''	105,3, CH	6,99 <i>dd</i> (2,1 e 0,7)	105,1, CH	6,89 <i>dd</i> (2,2 e 0,8)	104,7, CH	7,24 <i>dl</i> (2,2)
5''	144,5, CH	7,59 <i>d</i> (2,1)	143,9, CH	7,50 <i>d</i> (2,2)	144,6, CH	7,59 <i>d</i> (2,2)
OCH ₃ (C-2')	60,6, CH ₃	4,16 <i>s</i>	60,0, CH ₃	4,05 <i>s</i>		

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃.

Multiplicidades determinadas por experimentos de DEPT 135, HSQC e HMBC.

Foi possível observar no espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S20**, o íon molecular em m/z 278 (0,4%) e o pico base m/z 247 (100%), referente a perda de 31 unidades, indicando a perda de um radical metoxila. O esquema 30 (pg 74) demonstra a proposta de fragmentação para o composto **S20** a partir dos picos observados no EM (Anexo, pg 26S).



Esquema 30: Proposta de fragmentação para **S20** e **S21**.

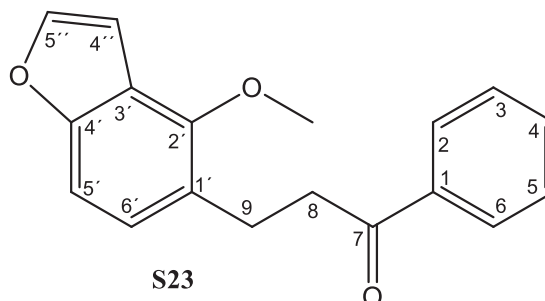
A substância **S20** ($C_{18}H_{14}O_3$) teve sua massa molecular calculada por EMAR (eletrospray – modo positivo), que revelou um pico referente ao íon pseudo-molecular do aduto de sódio de m/z 301,0866 $[M+Na]^+$ (Anexo, pg 27S).

A substância **S21** apresentou sinais e correlações muito semelhantes às de **S20** nos experimentos de RMN. A principal diferença observada no espectro de RMN de 1H (Anexo, pg 27S) para esta substância, deu-se pela diminuição de 17 Hz para 12Hz nas constantes de acoplamento entre os hidrogênios e diferentes deslocamentos químicos observados para os hidrogênios olefínicos dessa substância, indicando que, neste caso, se trata de uma retrochalcona com a ligação dupla de configuração Z. A atribuição completa dos valores de deslocamentos químicos para esta substância encontra-se na tabela 17 (pg 73). O espectro de massas desta substância é praticamente igual ao de seu isômero (**S20**) (Anexo, pg 27S).

O espectro de RMN de 1H (Anexo, pg 28S) de **S24** é semelhante ao de **S20**, sendo que em **S24** (tabela 17, pg 73) não há sinal referente a hidrogênios de grupo metoxila, indicando que ao invés desse grupo como substituinte, há uma hidroxila ligada ao carbono C-2'. Esta substância foi confirmada analisando o seu espectro de massas de alta resolução, em que a fórmula molecular do

composto ($C_{17}H_{12}O_3$) foi calculada por EMAR (eletrospray – modo negativo) revelando um pico referente ao íon $[M - H]^-$ em m/z 263,0702 $[M - H]^-$ (Anexo, pg 28S).

4.6 RETRODIIDROCHALCONA



Diidrochalconas são originadas pela redução da ligação dupla α,β das chalconas, e como as chalconas, são anéis biaril-propanos abertos. No entanto, neste estudo, foi isolado um composto que seria resultado da redução da ligação dupla de uma retrochalcona. Desta forma, pode ser considerado como uma retrodiidrochalcona (FLEISCHER, 1998).

O espectro de RMN de 1H (Anexo, pg 29S) de **S23**, realizado a temperatura ambiente e usando $CDCl_3$ como solvente, possui sinais referente a hidrogênios de anel benzênico monossustituído, dois multipletos que integram para 2H, cada sinal, em 3,28 e 3,12 ppm, dupletos de 2,2 Hz típicos de hidrogênios de anel furano em 6,90 e 7,54 ppm (1H, cada), um simpleto em 4,07 ppm (3H) e um sinal que aparenta ser um simpleto em 7,15 ppm que integra para 2 hidrogênios. Ao analisar os experimentos de HSQC e HMBC, constatou-se que os hidrogênios H-2 e H-6 do anel benzênico B apresentavam correlação a três ligações com uma carbonila, correlação em 199,9 ppm, da mesma forma, os hidrogênios alifáticos apresentaram correlação a longa distância com a carbonila e valores de deslocamentos químicos de carbonos condizentes com carbonos α e β a carbonila. Os hidrogênios da metoxila apresentaram correlação com o carbono em 151,2 ppm, indicando que a metoxila é um substituinte de anel benzênico, assim como as correlações dos hidrogênios do anel furano indicam que este também é substituinte de um anel benzênico. Em relação as correlações do sinal em 7,15 ppm (2H): 25,4, 125,1, 151,1 e 156,0, constatou-se que estes hidrogênios pertenciam ao mesmo anel benzênico ao qual a metoxila e anel furano são substituintes e que o carbono (25,4 ppm) ao qual os hidrogênios em 3,12 ppm estão ligados, também é substituinte neste anel benzênico. Uma vez que o sinal em 7,15 ppm aparentava um simpleto, foi proposto, que tratava-se de dois hidrogênios com relação *para* entre si com valores iguais de deslocamento químico, por não ser visualizado constantes de acoplamento que indicasse estarem com relação *orto* ou *meta* entre si. Desta forma, a figura 24 (pg 76) apresenta a primeira proposta para a substância **S23**.

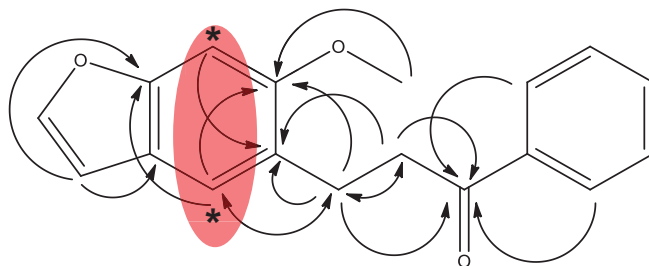


Figura 24 – Correlações relevantes observadas no experimento HMBC, em CDCl_3 , para **S23**.

* As correlações dos hidrogênios em 7,15 ppm não podem ser diferenciadas pois todas as correlações estão numa mesma linha vertical.

A fim de verificar a proposta da substância **S23**, com os hidrogênios do anel A com relação *para* entre si e com o anel furano disposto de forma linear na molécula, foram realizados experimentos de NOE 1D irradiando os hidrogênios da metoxila, o hidrogênio em 6,90 ppm (do anel furano) e o hidrogênio relativo ao sinal em 7,15 ppm. Caso a proposta estivesse correta, a irradiação da metoxila causaria efeito sobre o sinal em 7,15 ppm, pois um dos hidrogênios deste sinal estaria próximo espacialmente à metoxila (Figura 25-a, pg 76). No entanto, observou-se aumento da intensidade do sinal em 6,90 ppm, indicando que a metoxila está próxima espacialmente ao anel furano. Para que isto ocorra, é necessário que os hidrogênios no anel benzênico estejam *orto* entre si (Figura 25-b, pg 76), mas como não foi observado, num primeiro momento, constantes que corroborassem com esta hipótese, os experimentos de RMN foram repetidos solubilizando a amostra em CD_3OD , buscando uma diferenciação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios que em CDCl_3 apresentam sinal único em 7,15 ppm. Esta troca de solventes para a solubilização da amostra foi realizada, pois mudanças de solventes, bem como variações de temperatura, podem acarretar em diferenciação do ambiente químico dos núcleos dos átomos de uma determinada substância, conseqüentemente, utilizar solventes e temperaturas diferentes podem afetar nos deslocamentos químicos dos átomos de um determinado composto.

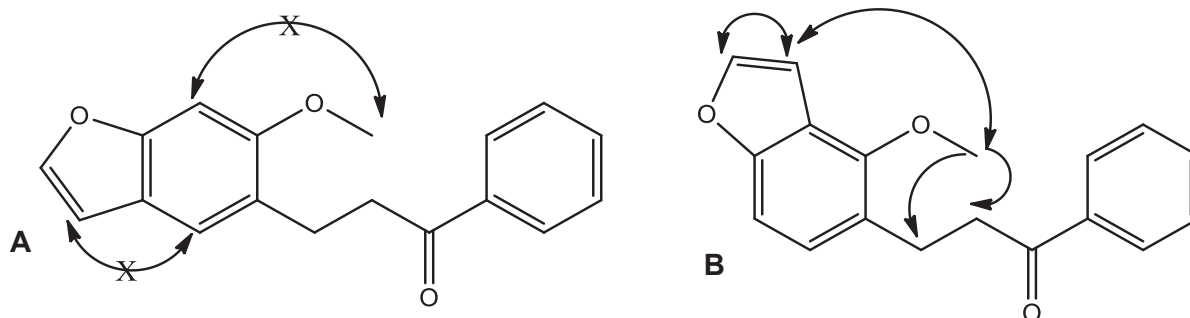


Figura 25 – (A) Efeitos NOE esperado para a primeira proposta de **S23**.

(B) Efeitos NOE observados e proposta condizente por NOE para **S23**.

Em CD₃OD (Anexo, pg 29S), o sinal que em CDCl₃ possuía deslocamento de 7,15 ppm se desdobrou em dois sinais, podendo então, além de diferenciar os deslocamentos dos dois hidrogênios e suas correlações individuais nos experimentos bidimensionais, verificar que, de fato, os hidrogênios acoplam entre eles com constantes de 8,4 Hz, confirmando que apresentam relação *orto* entre si. Desta forma, pode-se provar que a substância **S23** é a condizente com os experimentos de NOE 1D (Figura 25-b, pg 76). O sinal que aparenta um simpleto quando se utiliza CDCl₃ pode ser explicado devido ao efeito telhado muito pronunciado (Figura 26, pg 77). Este efeito se intensifica conforme dois hidrogênios que acoplam entre si diminuem a diferença de deslocamento químico entre eles, ou seja, passando de um padrão AX para um padrão AB, ou até mesmo, um padrão AA', como observado quando a amostra foi realizada em CDCl₃.

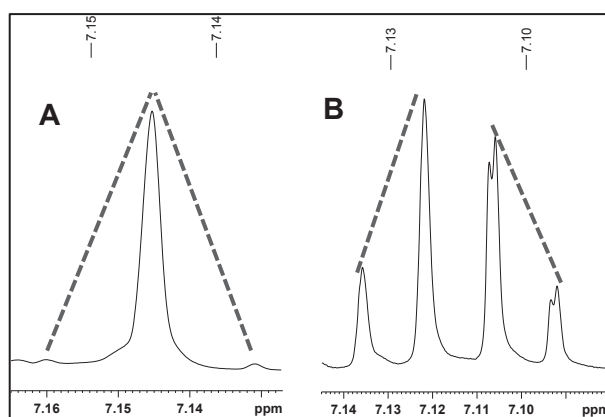


Figura 26 – (A) Efeitos telhado em **S23** (CDCl₃).

(B) Efeitos telhado em **S23** (CD₃OD).

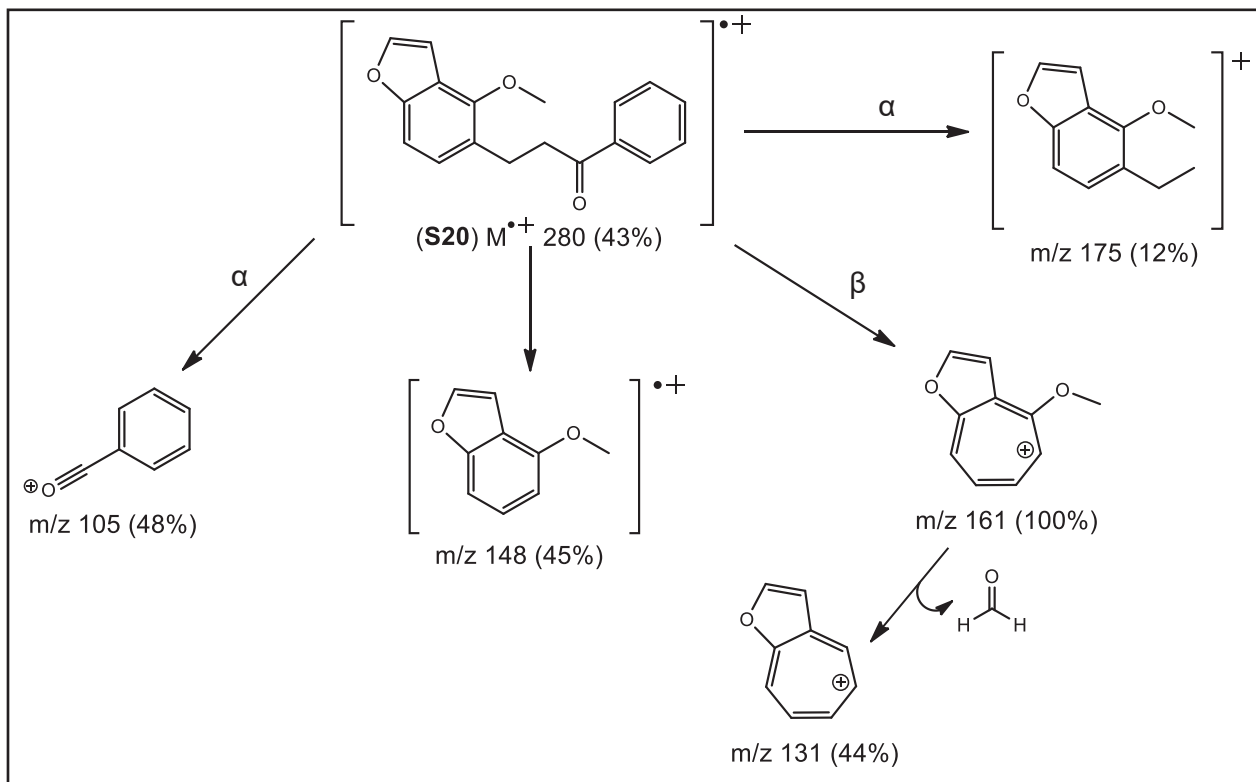
A tabela 18 (pg 78) apresenta os valores de deslocamento químicos dos hidrogênios e carbonos da substância **S23**, comparando os valores quando os experimentos foram realizados em CDCl₃ e CD₃OD.

Em relação ao espectro de massas de baixa resolução (impacto de elétrons) de **S23** (Anexo, pg 30S), observou-se o pico referente ao íon molecular em m/z 280 (43%), o pico base (m/z 161) pode ser atribuído a uma quebra da ligação β ao anel benzênico, formando um íon tropílio substituído. A proposta de fragmentação para esta molécula encontra-se no esquema 31 (pg 79).

Tabela 18: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância **S23** em CDCl₃ e em CD₃OD.

	CDCl ₃		CD ₃ OD	
	δ_C , <i>mult.</i>	δ_H , <i>mult. (J em Hz)</i>	δ_C , <i>mult.</i>	δ_H , <i>mult. (J em Hz)</i>
1	137,0, qC		138,3, qC	
2	128,1, CH	7,98 <i>m</i>	129,3, CH	7,98 <i>m</i>
3	128,6, CH	7,44 <i>m</i>	129,8, CH	7,47 <i>m</i>
4	133,0, CH	7,54 <i>m</i>	134,3, CH	7,58 <i>m</i>
5	128,6, CH	7,44 <i>m</i>	129,8, CH	7,47 <i>m</i>
6	128,1, CH	7,98 <i>m</i>	129,3, CH	7,98 <i>m</i>
7	199,9, qC		202,3, qC	
8	40,1, CH ₂	3,28 <i>m</i>	41,0, CH ₂	3,29 <i>m</i>
9	25,4, CH ₂	3,12 <i>m</i>	26,5, CH ₂	3,07 <i>m</i>
1'	125,1, qC		125,8, qC	
2'	151,2, qC		152,4, qC	
3'	118,5, qC		119,5, qC	
4'	156,0, qC		157,3, qC	
5'	106,0, CH	7,14 <i>d</i> (8,6)	106,7, CH	7,10 <i>dd</i> (8,6 e 0,8)
6'	126,5, CH	7,15 <i>d</i> (8,6)	127,5, CH	7,13 <i>d</i> (8,6)
4''	104,6, CH	6,90 <i>d</i> (2,3)	105,7, CH	7,01 <i>dd</i> (2,3 e 0,8)
5''	144,0, CH	7,54 <i>d</i> (2,3)	145,5, CH	7,65 <i>d</i> (2,3)
OCH ₃ (C-2')	60,1, CH ₃	4,07 <i>s</i>	60,6, CH ₃	4,07 <i>s</i>

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm).

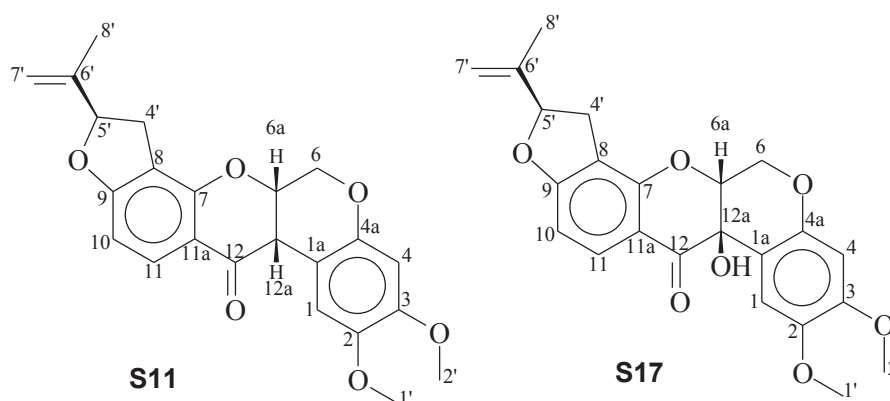


Esquema 31: Proposta de fragmentação para **S23**.

Esta substância ($C_{18}H_{16}O_3$), inédita na literatura, teve sua massa molecular calculada por EMAR (eletrospray – modo positivo), que revelou um pico referente ao íon pseudo-molecular do aduto de sódio de m/z 303,0996 $[M+Na]^+$ (Anexo, pg 30S).

4.7 ROTENOIDES

A presença dos rotenoides é verificada nos espectros de RMN de 1H por sinais em torno de 4-5 ppm, com multiplicidades e constantes de acoplamento típicas dos hidrogênios H-6 pseudoaxial (12 e 3 Hz) e , H-6 pseudoequatorial (12 e 1 Hz) e H-6a nos rotenoides. Foram identificados três rotenoides. Esta classe de compostos é derivada das isoflavonas, a partir de hidroxilação/metilação (C-5', C-4' e C-2') e, posterior, ciclização do anel B (tipo condensação de Claisen) o qual se funde ao anel C.

4.7.1 IDENTIFICAÇÃO DE **S11** E **S17**

O espectro de RMN de ^1H (Anexo, pg 31S) de **S11** apresentou multipletos entre 4-5 ppm referentes aos hidrogênios H-6 e H-6a e um duplete em 3,82 ppm de 4,1 Hz correspondente a um hidrogênio ligado ao carbono C-12a, sendo estes conjuntos de sinais característicos ao esqueleto básico de um rotenoide. No entantando, como **S11** foi identificada em mistura e houve grande sobreposição de sinais nesta região, não foi possível obter as constantes de acoplamentos detalhadas de cada sinal, que foram observados como multipletos. Ainda observaram-se sinais referentes a dois grupos metoxilas e do grupo isopropenila diidrofurano como substituintes, de hidrogênios com constantes de acoplamento *orto* entre si e simpletos 6,43 e 6,77 ppm. Através dos dados de correlações dos experimentos bidimensionais (HSQC e HMBC) e comparação com dados da literatura a substância foi identificada como rotenona, uma substância muito relatada na literatura, mas nunca isolada no gênero *Dahlstedtia*. Esta substância é utilizada como pesticida, porém há relatos de alta toxicidade desse composto frente a diversos animais, principalmente aos peixes, uma vez que ele está associado a diversas disfunções respiratórias. Plantas que produzem altos teores de rotenona são conhecidas como icnotóxicas e eram usadas por tribos indígenas para facilitar a pescaria, uma vez que estas espécies são muito mais tóxicas aos peixes do que ao homem (MASCARO e col., 1998 e MELO e col., 2015).

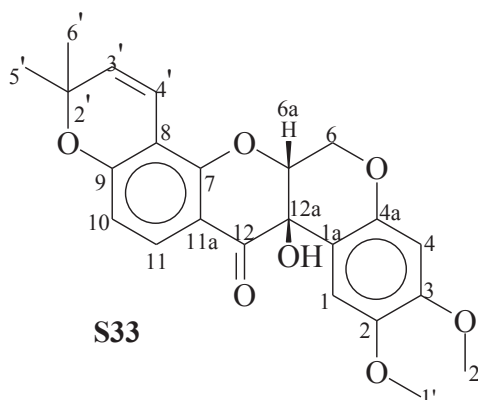
A única diferença para a **S17** (Espectro de RMN de ^1H – anexo, pg 31S) em relação a **S11** é a presença do grupo hidroxila ligado ao C-12a, sendo assim, a substância foi identificada como 12a-hidroxirotenona, que já foi isolada no gênero *Dahlstedtia*, das raízes de *D. floribunda* (MAGALHÃES e col., 1996). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C dessas substâncias estão descritos na tabela 19 (pg 81).

Tabela 19: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias **S11** e **S17**.

	S11		S17	
	δ_c , <i>mult.</i>	δ_H , <i>mult. (J em Hz)</i>	δ_c , <i>mult.</i>	δ_H , <i>mult. (J em Hz)</i>
1	110,7, CH	6,77 <i>s</i>	109,7, CH	6,59 <i>s</i>
1 ^a	104,9, qC		108,7, qC	
2	143,8, qC		143,9, qC	
3	149,3, qC		151,0, qC	
4	101,1, CH	6,43 <i>s</i>	101,0, CH	6,46 <i>s</i>
4a	147,5, qC		148,4, qC	
6	63,3, CH ₂	4,15 <i>m</i>	63,8, CH ₂	4,51 <i>m</i>
		4,58 <i>dd</i> (12,1 e 3,1)		4,59 <i>m</i>
6a	72,2, CH	4,90 <i>m</i>	76,1, CH	4,60 <i>m</i>
7	158,0, qC		157,6, qC	
8	113,2, qC		113,1, qC	
9	167,3, qC		167,9, qC	
10	104,9, CH	6,48 <i>d</i> (8,6)	105,2, CH	6,49 <i>d</i> (8,6)
11	130,1, CH	7,83 <i>d</i> (8,6)	130,0, CH	7,81 <i>d</i> (8,6)
11 ^a	112,8, qC		112,0, qC	
12	189,0, qC		191,1, qC	
12a	44,5, CH	3,82 <i>d</i> (4,1)	67,6, qC	
1'	56,4, CH ₃	3,74 <i>s</i>	56,3, CH ₃	3,69 <i>s</i>
2'	55,8, CH ₃	3,78 <i>s</i>	55,8, CH ₃	3,78 <i>s</i>
4'	31,0, CH ₂	2,94 <i>dd</i> (15,8 e 8,2)	31,1, CH ₂	2,91 <i>dd</i> (15,8 e 8,2)
		3,28 <i>dd</i> (15,8 e 9,8)		3,26 <i>dd</i> (15,8 e 9,8)
5'	87,9, CH	5,20 <i>dd</i> (9,8 e 8,2)	87,9, CH	5,19 <i>dd</i> (9,8 e 8,2)
6'	143,0, qC		142,9, qC	
7'	112,6, CH ₂	4,91 <i>sl</i>	112,6, CH ₂	4,91 <i>sl</i>
		5,05 <i>sl</i>		5,04 <i>sl</i>
8'	17,2, CH ₃	1,75 <i>sl</i>	17,1, CH ₃	1,74 <i>sl</i>

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃.

Multiplicidades determinadas por experimentos de HSQC e HMBC.

4.7.2 IDENTIFICAÇÃO DE **S33**

O espectro de RMN de ^1H (Anexo, pg 32S) de **S33** mostrou-se semelhante ao de **S11**. Sendo que em **S33** não se observaram sinais referentes ao grupo isopropenila diidrofurano e sim do grupo 2'',2''-dimetilcromeno como substituinte. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C dessa substância estão descritos na tabela 20 (pg 83). Esta substância é conhecida como tefrosina e possui diversos relatos na literatura, sendo relatada pela primeira vez no gênero *Dahlstedtia* em *D. glaziovii* (CANZI e col., 2014).

Tabela 20: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância **S33**.

	δ_c , mult.	δ_H , mult. (J em Hz)
1	110,8, CH	6,79 s
1 ^a	105,0, qC	
2	143,7, qC	
3	149,3, qC	
4	101,1, CH	6,43 s
4a	147,3, qC	
6	66,4, CH ₂	4,15 <i>m</i> 4,60 <i>dd</i> (12,1 e 3,1)
6a	72,5, CH	4,89 <i>m</i>
7	156,9, qC	
8	109,0, qC	
9	159,9, qC	
10	111,5, CH	6,43 <i>dd</i> (8,6 e 0,4)
11	128,8, CH	7,73 <i>d</i> (8,6)
11 ^a	112,7, qC	
12	189,2, qC	
12a	44,3, CH	3,82 <i>d</i> (4,1)
2'	77,6, qC	
3'	128,8, CH	5,53 <i>d</i> (10,0)
4'	115,8, CH	6,63 <i>dd</i> (10,0 e 0,4)
5'	28,6, CH ₃	1,36 s
6'	28,4, CH ₃	1,43 s
OCH ₃ (C-2)	56,4, CH ₃	3,75 s
OCH ₃ (C-3)	55,8, CH ₃	3,77 s

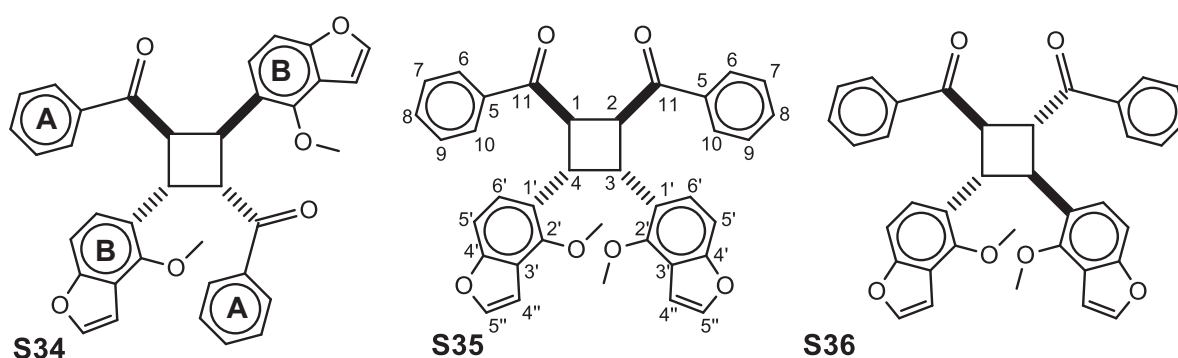
Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃.

Multiplicidades determinadas por experimentos de HSQC e HMBC.

4.8 BIFLAVONOIDES

Neste trabalho foram identificados 7 biflavonoides, todos inéditos na literatura. Destes, três são dímeros unidos pelos carbonos α e β de retrochalconas, gerando um ciclobutano, dois são dímeros de retrochalconas unidas pelo oxigênio da carbonila e dois são biflavonoides unidos pelo oxigênio da carbonila de uma retrochalcona com uma chalcona. A identificação dos dímeros se dá pela análise conjunta dos dados obtidos por RMN (1D e 2D) com resultados obtidos por EMAR.

4.8.1 IDENTIFICAÇÃO DE **S34**, **S35** e **S36**



As substâncias **S34**, **S35** e **S36** são dímeros de retrochalconas unidos pelos carbonos da ligação dupla gerando o ciclobutano. Diversas espécies relataram a presença de dímeros de chalconas unidos por um ciclobutano (ALJANCIC *et al.*, 2014; KAMARA *et al.*; 2005; KATERERE *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2009; SEIDEL *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013) mas, o estudo das raízes de *D. grandiflora* verificou, pela primeira vez, a ocorrência de dimerização em retrochalconas. Acredita-se que a formação destes dímeros ocorra por uma cicloadição [2+2] (Figura 27, pg 85) (CESARIN-SOBRINHO e NETTO-FERREIRA, 2002; YANG *et al.*, 2011).

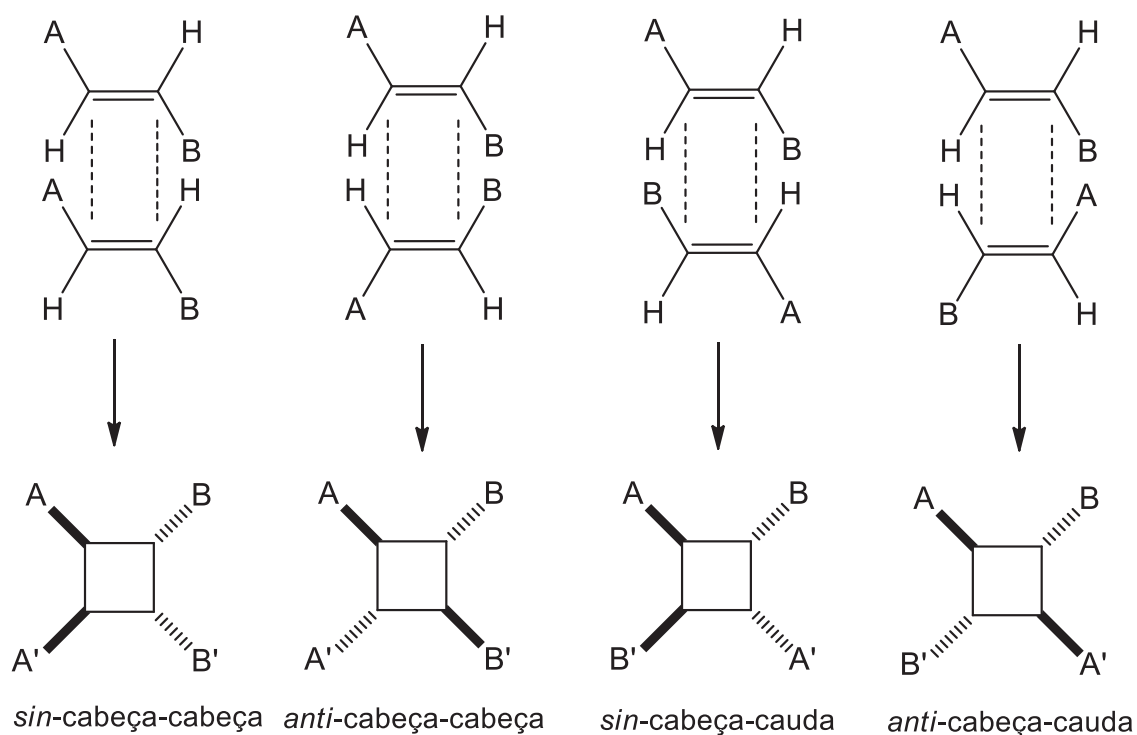


Figura 27 – Proposta de formação dos dímeros unidos por ciclobutano.

O espectro de RMN de ^1H (Anexo, pg 32S) de **S35**, possui sinais referentes a hidrogênios de anel benzênico monossustituído, dois multipletos que integram para 1 H cada sinal, em 4,83 e 4,87 ppm, dupletos de 2,1 Hz, típicos de hidrogênios de anel furano, em 6,74 e 7,44 ppm (1H, cada), um simpleto em 3,77 ppm (3H) e dois sinais que indicam 2 hidrogênios benzênicos com relação *orto* entre si em 7,02 (*dd*, 8,5 e 0,7 Hz) e 7,07 ppm (*d*, 8,5 Hz), respectivamente.. Ao analisar os experimentos de HSQC e HMBC (Anexo, 33S), constatou-se que os multipletos em 4,83 e 4,87 ppm correlacionavam a longa distância com carbonos de deslocamento químico igual ao observado para as suas correlações $^1J_{\text{CH}}$. Além disso, observaram-se correlações de hidrogênios do anel benzênico monossustituído com uma carbonila, assim como os multipletos mencionados (4,83 e 4,87 ppm) também correlacionavam com esta carbonila. Os hidrogênios em *orto* do outro anel benzênico possuem correlações que confirmam a substituição deste anel com uma metoxila, anel furano e com o carbono ligado diretamente ao multiplete em 4,83 ppm (H-3 e H-4). Estas informações indicaram que a substância se tratava de um derivado da retrochalcona **S21** (Figura 28, pg 86).

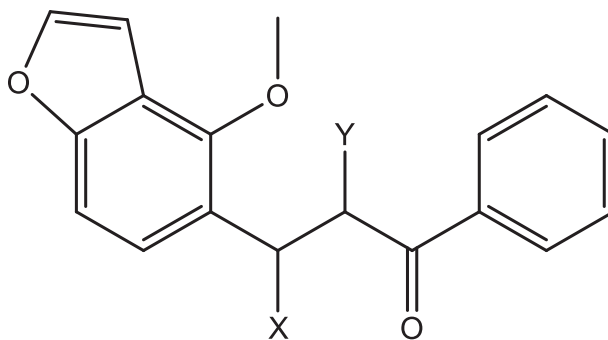


Figura 28 – Estrutura parcial observada para a substância **S35**, X e Y indicam que a elucidação da substância não foi finalizada com a análise preliminar dos experimentos de RMN.

Ao realizar uma busca na literatura, verificou-se a possibilidade de **S35** ser um dímero unido por um ciclobutano, explicando o perfil dos multipletos em 4,83 e 4,87 ppm (H-3 e H-4; H-1 e H-2 respectivamente), que possuem um sistema de acoplamento no espectro de RMN de ^1H complexo do tipo AA'BB'. Esta proposta foi confirmada por EMAR, eletrospray – modo positivo, (Anexo, pg 34S) em que o pico com m/z 579,1780 confirma a fórmula molecular $\text{C}_{36}\text{H}_{28}\text{O}_6$ com aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Além disso, a presença de um fragmento com m/z 259,0775 $[\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_2+\text{Na}]^+$, formado por dois anéis A, indicou que o composto era produto de uma dimerização do tipo cabeça-cabeça (única que possibilita uma fragmentação que produza picos de massa relativa a 2 anéis iguais, A-A ou B-B) (Figura 26, pg 85). A comparação do formato dos multipletos referentes aos hidrogênios do ciclobutano com substâncias similares da literatura (MONTAUDO e col., 1974), indicou que **S35** pode ser um dímero do tipo *sin*-cabeça-cabeça. Os dados de deslocamento químico para esta substância estão descritos na tabela 21 (pg 77).

Tabela 21: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias **S34**, **S35** e **S36**.

	S34		S35		S36	
	δ_c , mult	δ_H , mult. (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)
1	50,1, CH	4,90 <i>dd</i> (10,7 e 7,5)	49,3, CH	4,86 <i>m</i>	47,9, CH	4,45 <i>m</i>
2	36,1, CH	5,39 <i>dd</i> (10,7 e 7,5)	49,3, CH	4,86 <i>m</i>	41,4, CH	4,61 <i>m</i>
3	50,1, CH	4,90 <i>dd</i> (10,7 e 7,5)	39,6, CH	4,83 <i>m</i>	47,9, CH	4,45 <i>m</i>
4	36,1, CH	5,39 <i>dd</i> (10,7 e 7,5)	39,6, CH	4,83 <i>m</i>	41,4, CH	4,61 <i>m</i>
5	136,9, Qc		136,2, qC		136,3, qC	
6	128,2, CH	7,75 <i>m</i>	128,1, CH	7,83 <i>m</i>	128,6, CH	7,85 <i>m</i>
7	127,9, CH	7,24 <i>m</i>	128,6, CH	7,35 <i>m</i>	128,4, CH	7,29 <i>m</i>
8	132,4, CH	7,35 <i>m</i>	132,6, CH	7,46 <i>m</i>	133,1, CH	7,48 <i>m</i>
9	127,9, CH	7,24 <i>m</i>	128,6, CH	7,35 <i>m</i>	128,4, CH	7,29 <i>m</i>
10	128,2, CH	7,75 <i>m</i>	128,1, CH	7,83 <i>m</i>	128,6, CH	7,85 <i>m</i>
11	199,6, qC		198,5, qC		199,9, qC	
1'	123,1, qC		123,3, qC		125,4, qC	
2'	150,7, qC		151,5, qC		150,8, qC	
3'	117,2, qC		117,9, qC		117,6, qC	
4'	155,9, qC		155,8, qC		156,0, qC	
5'	105,5, CH	7,09 <i>dd</i> (8,6 e 0,7)	105,1, CH	7,02 <i>dd</i> (8,5 e 0,8)	106,1, CH	7,24 <i>dd</i> (8,6 e 0,7)
6'	124,2, CH	7,30 <i>d</i> (8,6)	124,2, CH	7,07 <i>d</i> (8,5)	124,2, CH	7,52 <i>d</i> (8,6)
4''	104,7, CH	6,74 <i>dd</i> (2,2 e 0,7)	104,9, CH	6,74 <i>dd</i> (2,1 e 0,7)	104,8, CH	6,77 <i>dd</i> (2,2 e 0,7)
5''	144,5, CH	7,42 <i>d</i> (2,2)	143,6, CH	7,44 <i>d</i> (2,1)	144,0, CH	7,50 <i>d</i> (2,2)
OCH ₃ (C-2')	59,6, CH ₃	3,90 <i>s</i>	59,8, CH ₃	3,77 <i>s</i>	59,5, CH ₃	3,57 <i>s</i>

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de HSQC e HMBC.

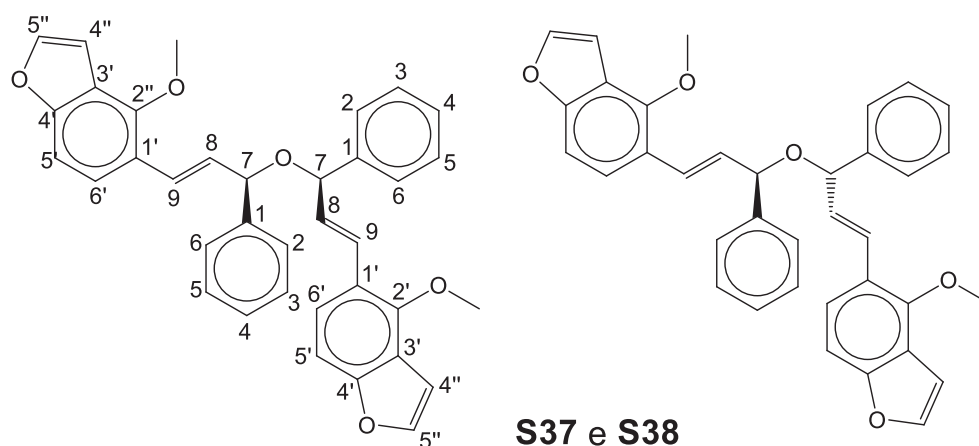
Os espectros de RMN das substâncias **S34** e **S36** são muito semelhantes aos de **S35**, sendo a principal diferença na multiplicidade dos hidrogênios ligados ao ciclobutano (H-1 – H-4) (espectros de RMN de ¹H – anexo, pg 34S e 35S). Em relação ao EMAR,

(eletrospray – modo positivo) nenhuma dessas substâncias (EMAR – anexo, pg 35S) possuem picos que indique serem dímeros do tipo cabeça-cabeça. O padrão de multiplicidade dos sinais de hidrogênios do ciclobutano (ZHANG e *col.*, 2013), 4,90 (2H, *dd*, 10,7 e 7,5 Hz) e 5,39 (2H, *dd*, 10,7 e 7,5 Hz) e o fato que a irradiação desses sinais nos experimentos de NOE 1D gerou aumento dos sinais em 5,39 e 4,90 ppm, respectivamente (Anexo, pg 36S), indicaram que **S34** pode ser um dímero do tipo *sin*-cabeça-cauda. A massa molecular ($C_{36}H_{28}O_6$) calculada por EMAR (eletrospray – modo positivo), revelou picos referente aos íons pseudo-molecular do aduto de sódio e potássio de m/z 579,1973 $[M+Na]^+$ e 607,2299 $[M+K]^+$ respectivamente. Os sinais dos hidrogênio do ciclobutano de **S36** (Anexo, pg 35S) são mais complexos do que os de **S34** e **S35**. Embora o perfil de fragmentação no espectro de massas dessa substância (Anexo, pg 35S) não confirme, a comparação do formato dos multipletos referentes aos hidrogênios do ciclobutano com substâncias similares da literatura (CESARIN-SOBRINHO e NETTO-FERREIRA, 2002), indica que **S36** pode ser um dímero do tipo *anti*-cabeça-cabeça. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos de **S34** e **S36** estão descritos na tabela 21 (pg 87).

Ainda que tenha sido proposto configurações relativas aos dímeros derivados do ciclobutano com base em substâncias similares descritas na literatura, há a necessidade de estudos mais elaborados para a confirmação destas propostas.

4.8.2 IDENTIFICAÇÃO DE **S37** E **S38**

A pesquisa dos Produtos Naturais de *D. grandiflora* revelou uma nova classe de biflavonoides, em que as duas subunidades de flavonoides são unidos pela carbonila, esta descoberta resultou na identificação de 4 substâncias inéditas na literatura.



Os espectros de RMN das frações que contém a substância **S37** (Anexo, pg 36S e 37S) são complexos, pois estas frações contém vários compostos em mistura. Porém, a análise detalhada de cada experimento de RMN realizado destas frações, indicou a presença de anel benzênico monossustituído, anel benzênico com hidrogênios com relação *orto* entre si, substituído com anel furano e uma metoxila. Além disto, foram observados sinais de hidrogênios nos espectros de RMN de ^1H sobre ligação dupla com configuração *E*, porém, diferente das outras substâncias identificadas neste trabalho, um dos hidrogênios da ligação dupla era um duplo duplete com a segunda constante de acoplamento de 7,6 Hz, sugerindo um carbono vizinho hidrogenado. O outro sinal no espectro com constante de acoplamento de 7,6 Hz, em 5,21 ppm, apresentou correlação direta no mapa de HSQC com um carbono em 79,8 ppm, desta forma, constatou-se que este carbono está ligado a um oxigênio. Ao analisar as correlações a longa distância, HMBC, pode-se verificar que o anel benzênico monossustituído está ligado ao carbono em 79,8 ppm que, liga-se ao carbono olefínico na ligação dupla com configuração *E* que, está ligada ao anel benzênico substituído com o anel furano e a metoxila (Figura 29, pg 89). Foi proposto que a substância **S37** tratava-se de um dímero de retrochalcona, pois o hidrogênio em 5,21 ppm (H-7) apresentou correlação a longa distância com um carbono com o mesmo deslocamento químico ao qual estava ligado (Figura 29, pg 89).

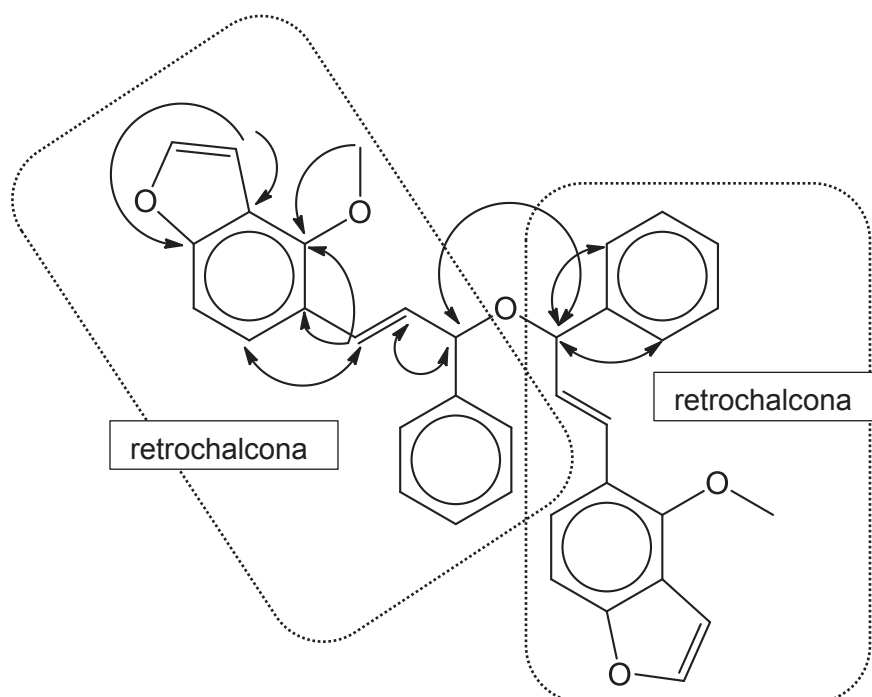


Figura 29 – Correlações relevantes observadas no experimento HMBC para **S37**.

Para verificar se o composto **S37** tratava-se de um dímero, a fração que continha esta substância foi submetida a análise por CL-EMAR (eletrospray – modo positivo), sendo que foi observado picos que revelavam a fórmula molecular $C_{37}H_{32}O_5$ com aduto de sódio, m/z 565,1999 $[M+Na]^+$ (Anexo, 38S), confirmando assim, esta substância como um dímero da retrochalcona **S20**.

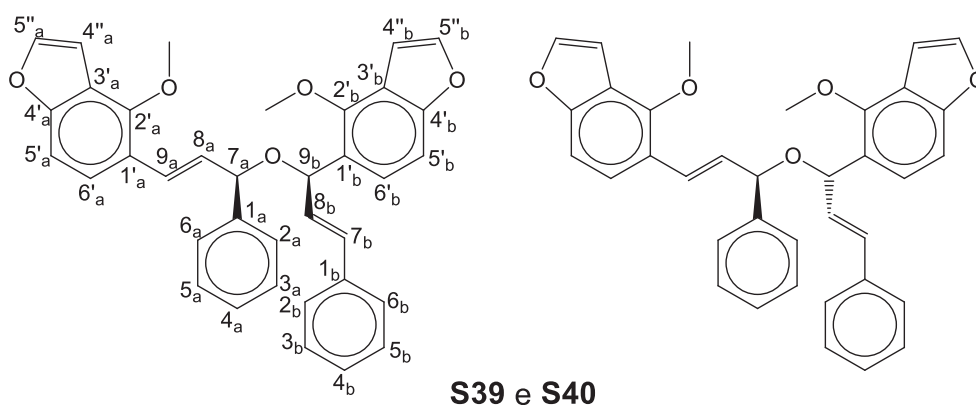
Nas mesmas frações em que foi identificada a substância **S37**, verificou-se também outro conjunto de sinais semelhantes ao de **S37**, ou seja, um outro dímero, também unido pela carbonila de **S20**. As diferenças dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos de **S37** e **S38** são muito pequenas, como exemplo o hidrogênio H-7 que em **S37** possui deslocamento em 5,21 ppm, em **S38**, é observado em 5,17 ppm. Analisando todos os experimentos de RMN, verificou-se que **S37** e **S38** possuem relação diastereoisomérica entre si. Estes compostos não são enantiômeros, pois se assim fossem, ambos não seriam diferenciados diretamente por RMN, ou seja, possuiriam exatamente os mesmos deslocamentos químicos para todos os átomos nas moléculas. Estes compostos possuem dois estereocentros (possibilidade de quatro estereoisômeros), e suas configurações absolutas não puderam ser determinadas, uma vez que não foram obtidos puros. Devido a similaridade das unidades ligadas aos estereocentros dessas moléculas, tem-se a possibilidade destes dímeros apresentarem configurações *R,R*; *S,S* (par enantiomérico) e *R,S*, este último possuindo um plano de simetria sendo aquiral, ou seja, um composto meso. Embora não se possa atribuir uma estereoquímica relativa diretamente para **S37** ou **S38**, pode-se afirmar que este par de compostos são diastereoisômeros e que um deles apresenta estereoquímica relativa *R,R* enquanto o outro, *R,S*. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos destas substância estão descritos na tabela 22 (pg 91).

Tabela 22: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias **S37** e **S38**.

	S37		S38	
	δ_c , mult	δ_H , mult. (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)
1	141,9, qC		141,7, qC	
2	127,2, CH	7,50 <i>m</i>	126,9, CH	7,48 <i>m</i>
3	128,5, CH	7,37 <i>m</i>	---	7,37 <i>m</i>
4	127,6, CH	7,28 <i>m</i>	132,7 CH	7,29 <i>m</i>
5	128,5, CH	7,37 <i>m</i>	---	7,37 <i>m</i>
6	127,2, CH	7,50 <i>m</i>	126,9, CH	7,48 <i>m</i>
7	79,8, CH	5,21 <i>d</i> (7,6)	79,7, CH	5,17 <i>d</i> (7,4)
8	129,9, CH	6,28 <i>dd</i> (16,1 e 7,6)	130,0, CH	6,35 <i>dd</i> (16,0 e 7,4)
9	126,2, CH	7,05 <i>d</i> (16,1)	135,9, CH	7,01 <i>d</i> (16,70)
1'	122,3, qC		122,3, qC	
2'	150,8, qC		150,8, qC	
3'	119,1, qC		117,7, qC	
4'	156,4, qC		157,3, qC	
5'	106,7, CH	7,16 <i>m</i>	106,7, CH	7,16 <i>m</i>
6'	123,1, CH	7,40 <i>d</i> (8,6)	123,1, CH	7,44 <i>d</i> (8,7)
4''	104,8, CH	6,89 <i>m</i>	104,8, CH	6,89 <i>m</i>
5''	144,1, CH	7,53 <i>m</i>	144,1, CH	7,53 <i>m</i>
OCH ₃ (C-2')	60,7, CH ₃	4,01 <i>s</i>	60,7, CH ₃	4,00 <i>s</i>

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de HSQC e HMBC.

4.8.3 IDENTIFICAÇÃO DE **S39** E **S40**



Os conjuntos de sinais nos espectros de RMN de ^1H das substâncias **S39** e **S40** são muito semelhantes aos de **S37** e **S38**. Ambos apresentam multipletos característicos de hidrogênios de anel benzênico monossustituído, sinais referentes a dois hidrogênios sobre ligação dupla com configuração *E* vizinha a um carbono hidrogenado, anel benzênico com dois hidrogênios com relação *orto* entre si. Além disso, observaram-se sinais referentes a hidrogênios olefínicos de anel furano e de um grupo metoxila como substituintes. Porém, diferente de **S37** e **S38**, ao analisar os experimentos bidimensionais de HSQC e HMBC, observou-se que os hidrogênios vizinhos as ligações duplas com configuração *E*, ligados a carbonos sp^3 oxigenado, correlacionam entre si, mas ambos possuem ambientes químicos diferentes, ou seja, valores de deslocamento químico de hidrogênio e carbono diferentes, e as outras correlações observadas, sugerem que as duas unidades de flavonoides unidas são diferentes. Analisando o conjunto total de correlações, nos mapas de HMBC e HSQC (Figura 30, pg 93), foi confirmado que as duas unidades de flavonoides não eram iguais, sendo uma, derivada da retrochalcona **S20** e outra, derivada da chalcona **S18**. Assim como em **S37** e **S38**, **S39** e **S40** apresentam sinais duplicados, com correlações similares, indicando tratar-se de dois diastereoisômeros. Estas substâncias possuem dois estereocentros, que não foram definidos. Mas pode-se sugerir uma estereoquímica relativa para este par de compostos, ou seja, se um possui configuração relativa *R,R* seu diastereoisômero deve possuir configuração relativa *R,S*. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos destas substâncias estão descritos na tabela 23 (pg 93). A proposta destas substâncias foi realizada baseando-se nos resultados obtidos por CL-EMAR (eletrospray – modo positivo) das frações que as contém, pois estas frações apresentaram vários picos que sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{32}\text{O}_5$, que é a fórmula molecular dos compostos **S37**, **S38**, **S39** e **S40**. O uso desta técnica se mostrou como uma poderosa ferramenta, uma vez que estes compostos foram obtidos em mistura, dificultando a elucidação apenas por RMN, devido a sobreposição de alguns sinais. Além disto, uma vez que temos o valor de massa molecular com precisão, as propostas estruturais tornam-se mais confiáveis. Porém, uma interessante proposta de continuação deste estudo seria o re-isolamento destes compostos, a fim de certificar sua elucidação e buscar meios para a determinação das configurações absolutas de cada substância.

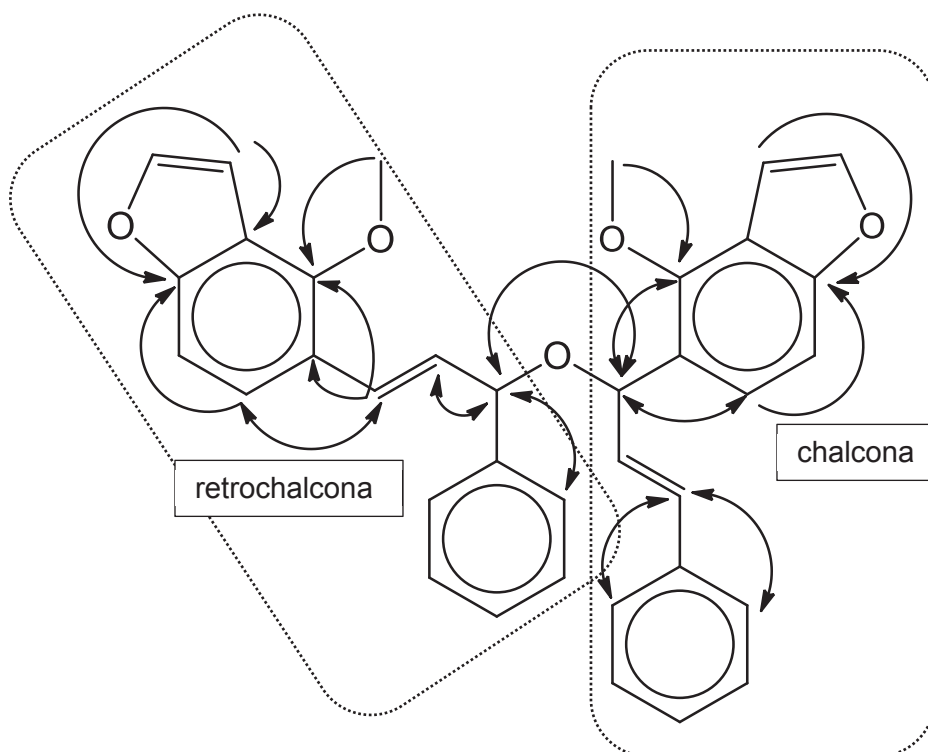


Figura 30 – Correlações relevantes observadas no experimento HMBC para **S39** e **S40**.

Tabela 23: Dados de RMN (14,1 Tesla) das substâncias **S39** e **S40**.

	S39		S40	
	δ_c , mult	δ_H , mult. (J)	δ_c , mult	δ_H , mult (J)
1 _a	142,0, qC		141,8, qC	
2 _a	126,7, CH	7,48 <i>m</i>	127,2, CH	7,48 <i>m</i>
3 _a	128,5, CH	7,28 <i>m</i>	128,5, CH	7,28 <i>m</i>
4 _a	127,6, CH	7,37 <i>m</i>	128,5, CH	7,37 <i>m</i>
5 _a	128,5, CH	7,28 <i>m</i>	128,5, CH	7,28 <i>m</i>
6 _a	126,7, CH	7,48 <i>m</i>	127,2, CH	7,48 <i>m</i>
7 _a	80,1, CH	5,13 <i>d</i> (7,5)	79,8, CH	5,08 <i>d</i> (7,5)
8 _a	130,2, CH	6,28 <i>dd</i> (16,0 e 7,5)	129,9, CH	6,35 <i>dd</i> (15,9 e 7,5)
9 _a	126,1, CH	6,98 <i>d</i> (16,0)	126,5, CH	7,05 <i>d</i> (15,9)
1 _a '	---		---	
2 _a '	150,9, qC		150,9, qC	
3 _a '	119,2, qC		119,2, qC	
4 _a '	156,5, qC		156,5, qC	
5 _a '	---	---	---	---
6 _a '	123,2	---	123,2	---
4 _a ''	104,8, CH	6,89 <i>m</i>	104,8, CH	6,89 <i>m</i>
5 _a ''	144,1, CH	7,53 <i>m</i>	144,1, CH	7,53 <i>m</i>

OCH ₃ (C-2 _a ')	60,5, CH ₃	3,98 s	60,5, CH ₃	3,96 s
1 _b	137,0, qC		137,0, qC	
2 _b	126,5, CH	7,37 m	126,5, CH	7,37 m
3 _b	128,3, CH	7,28 m	128,3, CH	7,28 m
4 _b	127,1, CH	7,19 m	127,1, CH	7,19 m
5 _b	128,3, CH	7,28 m	128,3, CH	7,28 m
6 _b	126,5, CH	7,37 m	126,5, CH	7,37 m
7 _b	130,5, CH	6,62 d (15,9)	130,5, CH	6,63 d (15,9)
8 _b	130,6, CH	6,39 dd (15,9 e 6,7)	131,0, CH	6,45 dd (15,9 e 6,5)
9 _b	73,2, CH	5,65 d (6,7)	73,0, CH	5,75 d (6,5)
1 _b '	125,6, qC		125,6, qC	
2 _b '	150,9, qC		150,9, qC	
3 _b '	118,3, qC		118,3, qC	
4 _b '	156,5, qC		156,5, qC	
5 _b '	---	---	---	---
6 _b '	124,5, CH	7,59 d (8,5)	124,4, CH	7,52 m
4 _b ''	104,8, CH	6,89 m	104,8, CH	6,89 m
5 _b ''	144,0, CH	7,56 m	144,0, CH	7,55 m
OCH ₃ (C-2 _b ')	60,3, CH ₃	3,93 s	60,3, CH ₃	3,90 s

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de HSQC e HMBC.

4.9 IDENTIFICAÇÃO DE **S25**, **S26** E **S31**

O espectro de RMN ¹H de **S25** (Anexo, pg 40S) possui sinais de hidrogênios com constantes de acoplamento de 8,6 Hz entre si na região de aromáticos, indicando a presença de anel benzênico com 2 hidrogênios em *orto*, dois sinais com constante de acoplamento de 2,2 Hz em 7,05 e 7,63 ppm, respectivamente, característicos de anel furano. Além destes, foi observado um simpleto intenso (3H) em 4,26 ppm e um simpleto (1H) em 10,48 ppm, sugerindo a presença de um grupo metoxila e um hidrogênio de aldeído, respectivamente. A análise dos experimentos bidimensionais (Anexo, 40S e 41S) comprovou que os grupos furano, metoxila e a função aldeído estão ligados ao anel benzênico que apresenta os 2 hidrogênios com relação *orto* entre si (Figura 31, tabela 24, pg 85). Esta substância nunca foi isolada como produto natural, mas é descrita na literatura como um produto de uma etapa sintética com a finalidade de obtenção de compostos bioativos (AMAHD e *col.*, 2006).

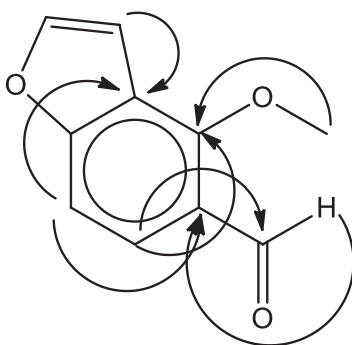


Figura 31 – Correlações relevantes observadas no experimento HMBC, **S25**.

Tabela 24: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância **S25**.

	δ_c , <i>mult</i>	δ_H , <i>mult.</i> (J)
1	121,6, qC	
2	158,0, qC	
3	117,4, qC	
4	160,8, qC	
5	106,6, CH	7,26 <i>dd</i> (8,6 e 0,9)
6	124,7, CH	7,82 <i>d</i> (8,6)
7	189,2, CH	10,48 <i>s</i>
4'	105,9, CH	7,05 <i>dd</i> (2,3 e 0,9)
5'	144,8, CH	7,63 <i>d</i> (2,3)
OCH ₃ (C-2)	60,6, CH ₃	4,26 <i>s</i>

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de HSQC e HMBC.

O espectro de RMN de ¹H **S26** (Anexo, pg 41S) é muito simples, possui apenas sinais de anel benzênico monossustituído e analisando os mapas de correlações (HSQC e HMBC), constatou-se que o substituinte deste anel é uma carboxila. Logo, a substância foi identificada como o ácido benzoico (tabela 25, pg 96), e pode ser encontrada em muitas espécies vegetais. Uma grande aplicação deste composto é na conservação de alimentos.

Tabela 25: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância **S26**.

	δ_c , <i>mult</i>	δ_H , <i>mult.</i> (J)
1	138,1, qC	
2	130,2, CH	8,13 <i>m</i>
3	128,8, HC	7,79 <i>m</i>
4	132,8, CH	7,91 <i>m</i>
5	128,8, CH	7,79 <i>m</i>
6	130,2, CH	8,13 <i>m</i>
7	196,9, qC	

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em $CDCl_3$. Multiplicidades determinadas por experimentos de HSQC e HMBC.

Em relação a substância **S31**, o espectro de RMN de 1H (Anexo, pg 42S) apresentou sinais característicos de anel benzênico monossustituído, conjuntos de sinais que indicam a presença de um anel benzênico substituído com o grupo metoxila, anel furano e 2 hidrogênios com relação *orto* entre si. A região alifática do espectro apresentava diversos multipletos, em 2,83 ppm (2H), 2,00 ppm (1H), 2,08 ppm (1H) e um duplo duplete (8,6 e 4,6 Hz) em 4,62 ppm. Através da análise do mapa de correlação de HMBC (Figura 32, pg 96), foi proposto que este composto trata-se da substância de um derivado de **S23** com a carbonila reduzida. Os dados de deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos de **S31** são descritos na tabela 26 (pg 97).

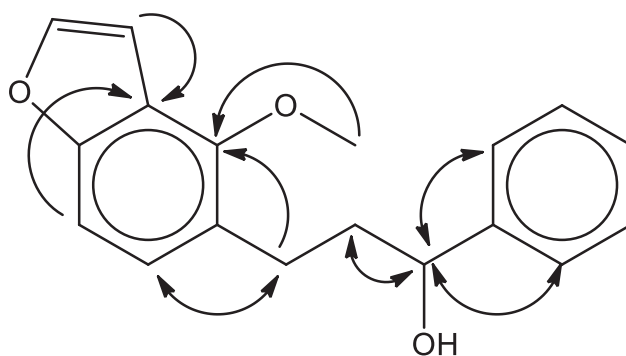


Figura 32 – Correlações relevantes observadas no experimento HMBC, **S31**.

Esta substância ($C_{18}H_{18}O_3$) teve sua massa molecular calculada por EMAR (eletrospray – modo positivo) que revelou um pico referente ao íon pseudo-molecular do aduto de sódio de m/z 305,1126 $[M+Na]^+$ (Anexo, pg 43S).

Tabela 26: Dados de RMN (14,1 Tesla) da substância **S31**.

	δ_C , <i>mult</i>	δ_H , <i>mult. (J)</i>
1	144,8, qC	
2	126,1, CH	7,34 <i>m</i>
3	128,0, CH	7,32 <i>m</i>
4	127,5, CH	7,25 <i>m</i>
5	128,0, CH	7,32 <i>m</i>
6	126,1, CH	7,34 <i>m</i>
7	73,4, CH	4,62 <i>dd</i> (8,6 e 6,4)
8	40,5, CH ₂	2,00 <i>m</i> 2,08 <i>m</i>
9	26,1, CH ₂	2,83 <i>m</i>
1'	125,6, qC	
2'	160,0, qC	
3'	118,8, qC	
4'	155,7, qC	
5'	106,2, CH	7,16 <i>dd</i> (8,6 e 0,9)
6'	126,4, CH	7,08 <i>d</i> (8,6)
4''	104,6, CH	6,88 <i>dd</i> (2,3 e 0,9)
5''	144,0, CH	7,53 <i>d</i> (2,3)
OCH ₃ (C-2')	60,3, CH ₃	4,03 <i>s</i>

Experimentos obtidos a 293 K com TMS como referencia interna (0,00 ppm) em CDCl₃. Multiplicidades determinadas por experimentos de HSQC e HMBC.

4.10 PROPOSTA DE BIOGÊNESE DOS FLAVONOIDES DE *D. grandiflora*

O estudo dos constituintes químicos das raízes de *D. grandiflora* resultou na identificação de várias classes de flavonoides com semelhanças entre os de mesma classe. Desta forma, é possível propor uma biogênese para estes compostos. Na literatura são descritos muitos resultados sobre a biossíntese de flavonoides, sendo que estes podem seguir diversas rotas de derivações nos esqueletos principais de cada classe, logo não é possível afirmar uma proposta de biossíntese sem um estudo aprofundado. Porém, as próximas figuras apresentam propostas de biogênese (I e II) para alguns compostos isolados neste trabalho. A figura 33 (pg 98) são apresentados os flavonoides que apresentam o grupo 2''-2'''-dimetilcromeno, enquanto que, na figura 34 (pg 99), os flavonoides contendo o substituinte furano.

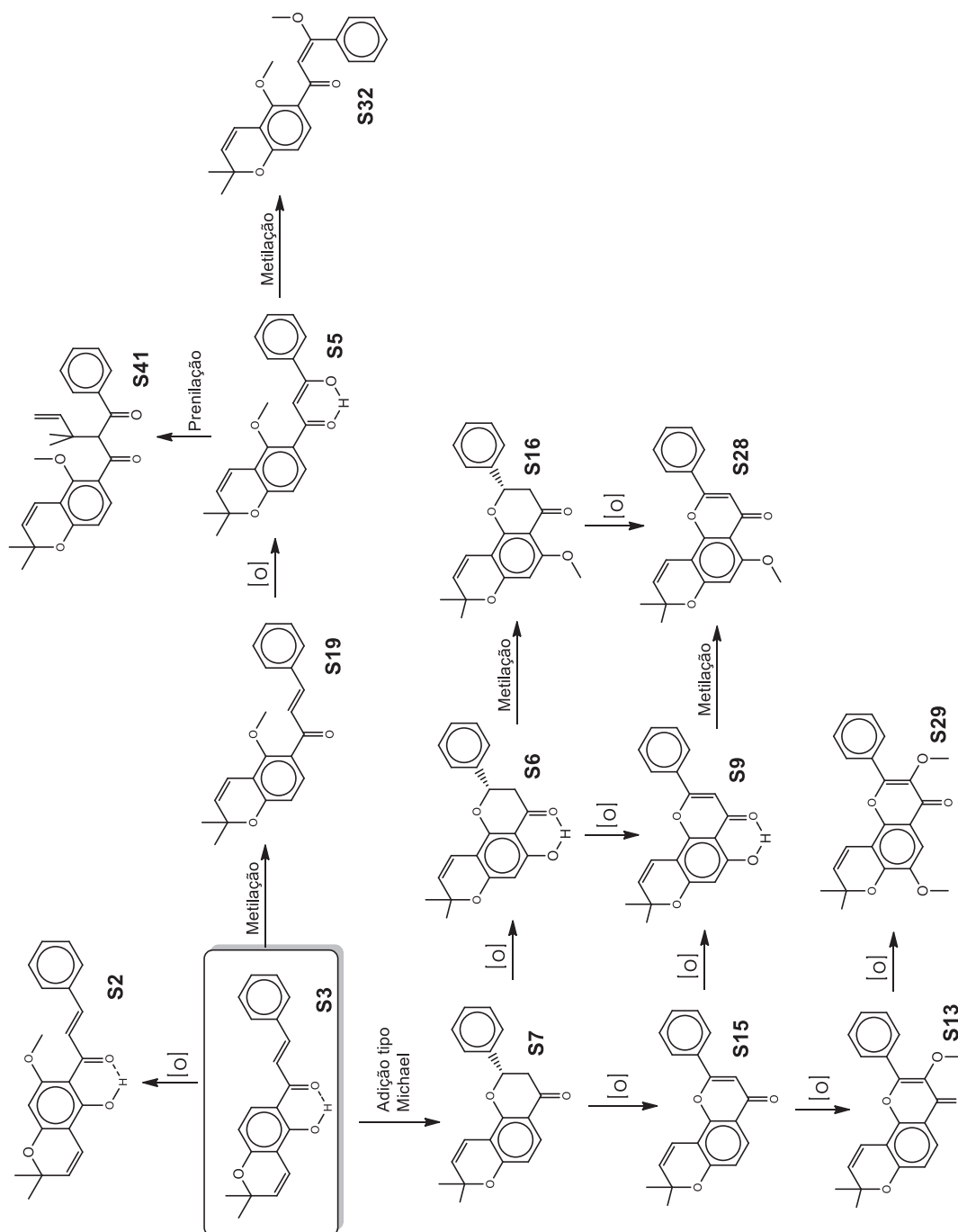


Figura 33 – Proposta de biogênese I.

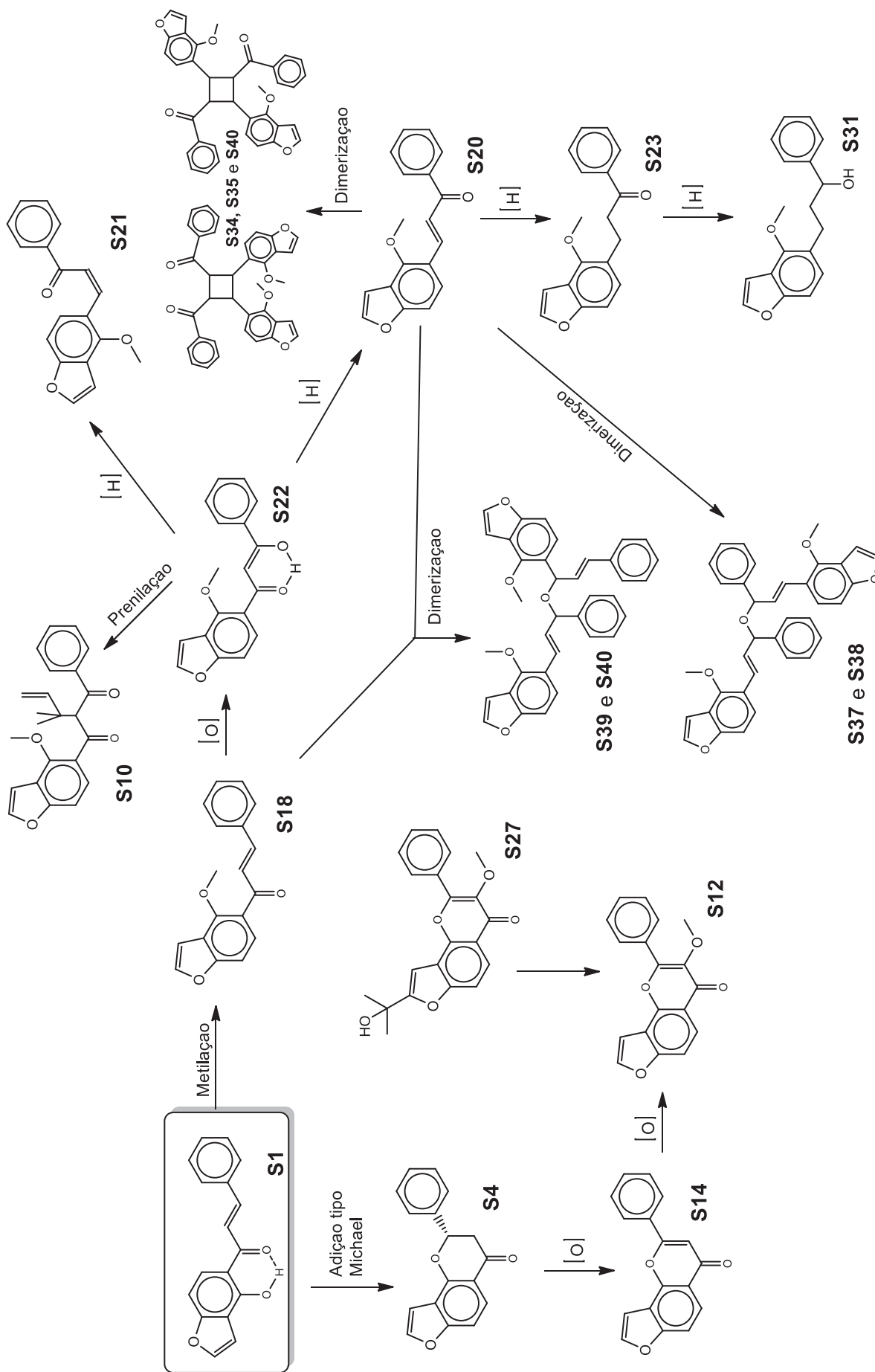


Figura 34 – Proposta de biogênese II.

4.11 COMPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE *D. grandiflora*.

Para comparação dos três extratos das raízes de *D. grandiflora*, estes foram submetidos a análises por CLAE. Analisando os perfis cromatográficos (gradiente de fase móvel de 5 a 100% de ACN em H₂O), constatou-se que os extratos em EP e DCM possuem alta similaridade (sobreponíveis) (Figura 35, pg 100), diferenciando-se apenas em relação a alguns picos minoritários, indicando que a composição química dos mesmos é praticamente igual. Em relação ao extrato em MeOH, alguns picos majoritários são sobreponíveis aos demais extratos, porém, este possui um perfil cromatográfico bastante diferenciado (Figura 35, pg 100).

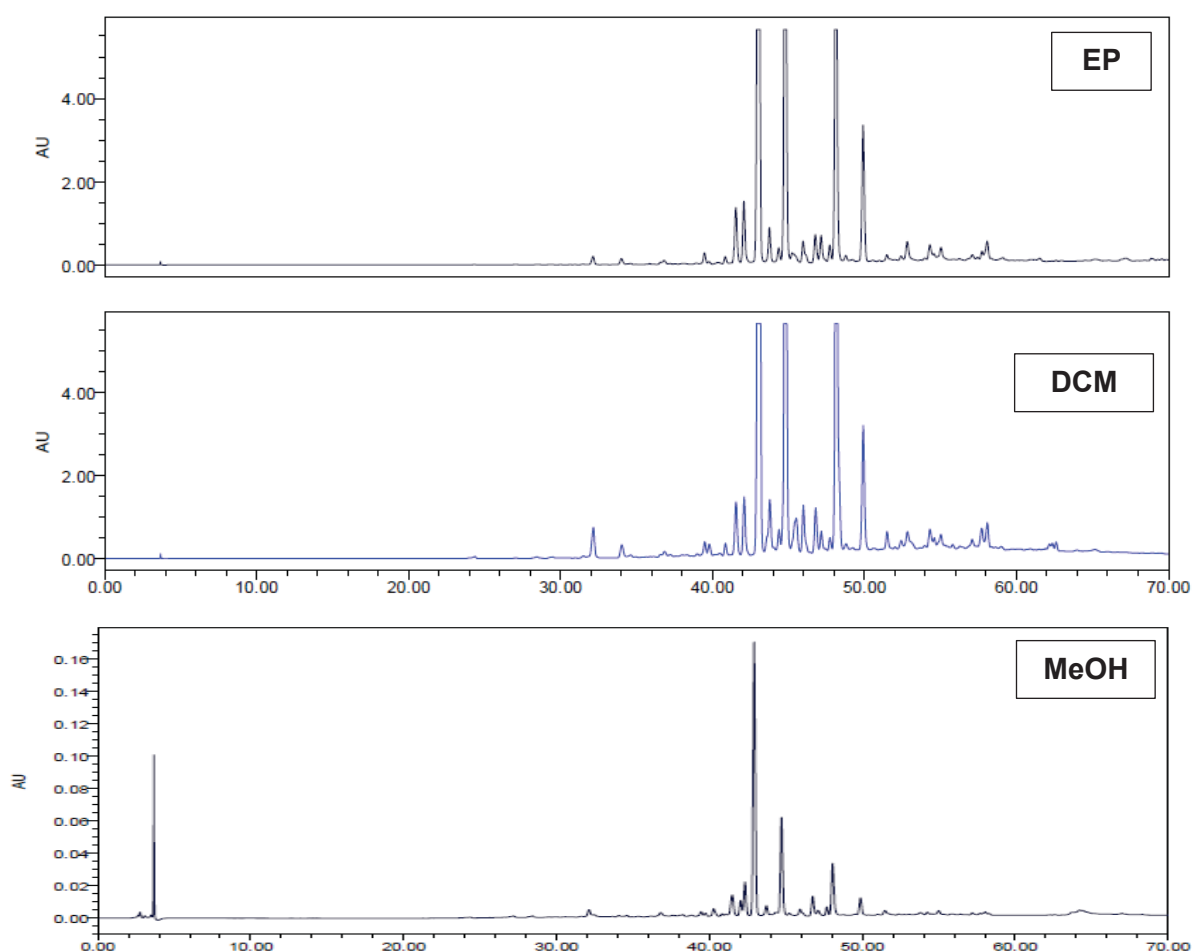


Figura 35: Cromatogramas dos extratos das raízes de *D. grandiflora* (254 nm).

Ao comparar os perfis cromatográficos das substâncias isoladas puras do extrato em DCM com o extrato metanólico, foi possível identificar duas substâncias (**S14** e **S23**) no extrato em MeOH. O perfil dessas substâncias apresentou coincidência com o tempo de retenção no cromatograma do extrato e superposição dos espectros no UV (254 nm) (Figuras 36 e 37, pg 101).

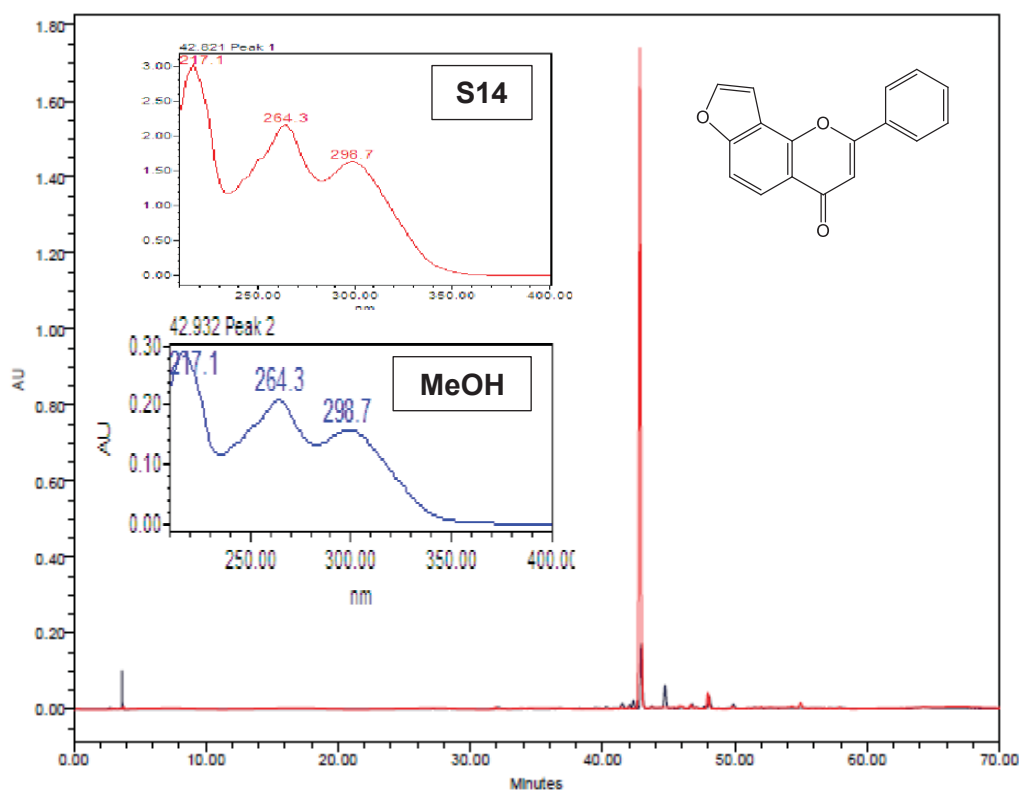


Figura 36: Sobreposição dos cromatogramas do extrato metanólico das raízes de *D. grandiflora* (perfil preto) e da substância **S14** (perfil vermelho) (254 nm).

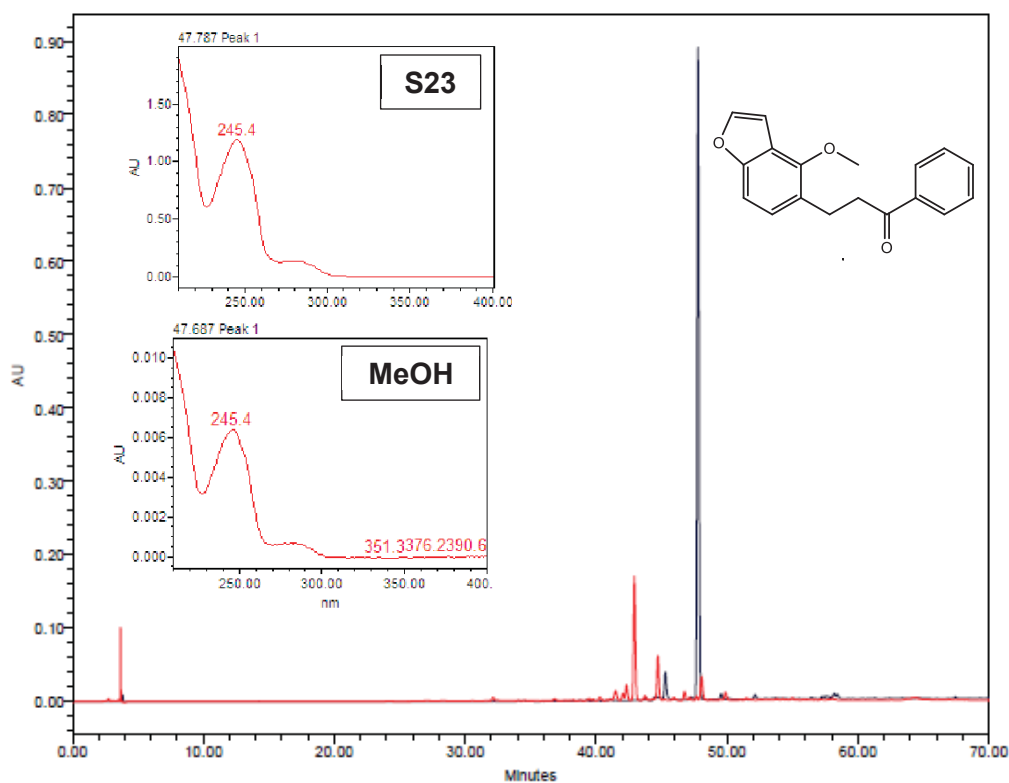


Figura 37: Sobreposição dos cromatogramas do extrato metanólico das raízes de *D. grandiflora* (perfil vermelho) e da substância **S23** (perfil preto) (254 nm).

4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*

Conforme exposto na introdução deste trabalho, mais de 60% dos novos fármacos anti-câncer aprovados entre 1981 e 2010 são de origem natural ou sintetizados baseando-se em produtos naturais que apresentaram grande atividade biológica contra determinados tumores (NEWMAN e *col.*, 2010). Desta forma, os extratos das raízes de *D. grandiflora* foram submetidos a avaliação de atividade antiproliferativa, *in vitro*, com objetivo de avaliar o potencial dessa espécie como possível fonte de compostos bioativos. Conforme o levantamento apresentado na discussão desta dissertação, é possível verificar que diversas substâncias identificadas neste trabalho possuem relatos de atividades biológicas significativas frente a alguns testes. A tabela 27 (pg 102), demonstra a atividade dos extratos brutos, sendo os valores de atividade antiproliferativa para esses extratos expressos em termos da concentração necessária para a inibição total das células testadas (TGI – *total growth inhibition*) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Sendo que, a tabela 27 foi construída a partir da análise dos gráficos da atividade antiproliferativa de cada extrato testado (Anexo, pg 44S e 45S).

Tabela 27: Valores de TGI, em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para os extratos em éter de petróleo (EP), diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) de *D. grandiflora*.

	2	u	m	A	7	4	p	O	H	K	Q
Doxorrubicina	0,29	0,081	1,0	1,8	0,33	0,25	2,1	>25	6,3	0,23	0,19
EP	14,3	11,2	10,2	12,7	6,8	7,3	12,0	10,0	14,8	26,3	2,8
DCM	12,2	114,0	5,4	13,7	5,0	12,6	14,2	9,9	11,5	>250	2,9
MeOH	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	57,8	177,2

2 = U251 (glioma, SNC); u = UACC-62 (melanoma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3; h = HT29 (colorectal); k = K562 (leucemia); q = HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

Segundo Fouche (2006), a atividade antiproliferativa é considerada significativa quando $\text{TGI} < 6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, moderada quando $6,25 < \text{TGI} < 15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, fraca quando $15 < \text{TGI} < 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e inativa quando $\text{TGI} > 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Seguindo esta classificação o extrato em éter de petróleo mostra-se muito promissor uma vez que mostrou atividade moderada contra quase todas as células testadas e menos danoso às células normais quando comparado ao controle positivo doxorrubicina, que é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de câncer (Figura 38, pg 103).

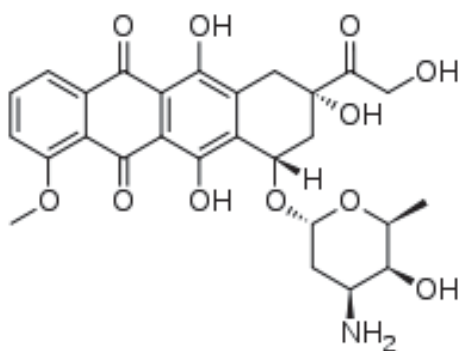


Figura 38: Estrutura da Doxorubicina.

O extrato em DCM apresentou atividade significativa contra duas linhagens de células, câncer de mama (MCF-7) e de rim (786-0), além de apresentar atividade moderada para 6 outras linhagens. Esse extrato mostrou-se menos danoso às células normais quando comparado ao controle positivo doxorrubicina. O extrato metanólico mostrou-se inativo para todas as células, mas o valor de TGI próximo de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para células de leucemia e alto valor de TGI para células normais ($> 170 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apontam que é interessante uma investigação mais detalhada sobre seus compostos, afim de verificar se há melhora da atividade *in vitro* após etapas de purificação desse extrato.

Baseando-se nos testes antiproliferativos, pode-se sugerir que a espécie estudada possui uma vertente promissora para estudos mais aprofundados a respeito de seu potencial como um agente anti-câncer.

4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

Os três extratos avaliados quanto à atividade antimicrobiana se mostraram inativos frente aos 10 microrganismos testados.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No estudo dos componentes fixos do extrato em diclorometano das raízes de *D. grandiflora* foi possível identificar 42 substâncias, sendo 10 isoladas puras (**S2, S3, S4, S6, S7, S8, S9, S14, S23 e S24**) e o restante identificadas em misturas.

Dentre as substâncias identificadas, doze são inéditas na literatura (**S20, S21, S23, S24, S31, S34, S35, S36, S37, S38, S39, e S40**), sendo as substâncias **S31, S34-40** ainda sem estereoquímica definida. Três das substâncias identificadas (**S25, S30 e S32**) são inéditas como produtos naturais, sendo encontradas como produto de síntese. Ainda, doze substâncias nunca haviam sido relatadas no gênero *Dahlstedtia*: **S1, S3, S4, S6, S9, S11, S16, S18, S19, S27, S41 e S42**, e as substâncias: **S3, S6, S11, S16 e S41** já foram encontradas em espécies do gênero *Lonchocarpus*, ao qual *D. grandiflora* pertencia antes da reclassificação taxonômica realizada por Silva em 2012. O estudo fitoquímico dessa espécie demonstrou que ela, do ponto de vista químico, produz compostos diferenciados em relação as outras espécies do gênero, como as retrochalconas e os dímeros. Além disto, a grande diversidade de compostos biossintetizados por *D. grandiflora* instiga o desenvolvimento de estudos de biossíntese de flavonoides raros, como as retrochalconas identificadas.

A análise dos extratos das raízes de *D. grandiflora* por CLAE revelou que os extratos em DCM e EP possuem composição química semelhante. Enquanto que o extrato em MeOH apesar de possuir alguns compostos presentes nos extratos menos polares, apresenta um perfil químico diferenciado.

A avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos em éter de petróleo e em diclorometano apresentou resultados promissores, sendo que o extrato em DCM apresentou atividade significativa contra duas linhagens de células (câncer de mama e de rim) além de menor dano às células normais quando comparado ao controle positivo doxorrubicina. Sugerindo que esta espécie possui um potencial farmacológico.

Por fim, a conclusão deste projeto de mestrado demonstra que, mesmo com a variedade de enfoques da pesquisa de produtos naturais, estudos fitoquímicos prévios das diversas espécies vegetais continua contribuindo para a pesquisa científica, uma vez que o conhecimento do perfil de metabólitos produzidos por uma espécie vegetal é a base para as demais linhas de pesquisa envolvendo produtos naturais.

REFERÊNCIAS

AHMAD, G.; MISHRA, P. K.; GUPTA, P.; YADAV, P. P.; TIWARI, P.; TAMRAKAR, A. K.; SRIVASTAVA, A. K.; RAKESH, M. 2006. Synthesis of novel benzofuran isoxazolines as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 16 (8): 2139-2143.

ALJANCIC, I. S.; VUCKOVIC, I.; JADRANIN, M.; PESIC, M.; DORDEVIC, I.; PODOLSKIRENIC, A.; STOJKOVIC, S.; MENKOVIC, N.; VAJS, V. E.; MILOSAVLJEVIC, S.M. 2014. Two structurally distinct chalcone dimers from *Helichrysum zivojinii* and their activities in cancer cell lines. **Pytochemistry** 98: 190-196.

ANVISA – disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25283-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25283-1-0].PDF)>. Acesso em 02/09/2013a.

ANVISA – disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[31658-4-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[31658-4-0].PDF)>. Acesso em 02/09/2013b.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonóides and isoflavonoids. **Pharmacology and Therapeutics** 90: 157-177.

BLOCK, G. 1992. The data support a role for antioxidants in reducing câncer risk. **Nutrition Reviews** 50: 207-213.

BOUMENDJEL, A.; DI PIETRO, A.; DUMONTET, C.; BARRON, D. 2002. Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to p-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. **Medicinal Research Reviews** 22: 512–529.

BRIELMANN, H.; SETZER W. N.; KAUFMAN P. B.; KIRAKOSYAN. A.; CSEKE, L. J. **Phytochemicals: the chemical components of plants**. In: Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber SL, Duke JA, Brielmann HL (eds) Natural products from plants, 2ed. CRC, Boca Raton, pp 1–49, 2006.

BRUEGGEMEIER, R. W.; HACKETT J. C.; DIAZ-CRUZ, E. S. 2005. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. **Endocrine Reviews** 26: 331–345.

BRUSSELMANS, K.; VROLIX, R.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J. V. 2005. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. **The Journal of Biological Chemistry** 280:5636–5645.

CAMELE, G.; DELLE, M. F.; DELLE, M. G.; BETTOLO, G. B. M. 1980. Three new flavonoids from *Thephrosia praecans*. **Pytochemistry** 19 (4): 707-709.

CAMPOS, D. A.; LIMA, A. F.; PESSOA, O. D. L.; RIBEIRO, S. R. L.; SILVEIRA, E. R.; RAO, S. R.; SANTOS, F. A. 2008. Gastroprotective effect of a flavone from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) and de possible mechanism. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 60: 391-397.

CASSIDY, E. C.; SETZER, W. N. 2011. Lonchocarpus Polyphenolics and their Biological Activities. **The Natural Products Journal** 30: 75-104.

CANZI, E. F. 2013. **Flavonoides das raízes de *Dahlstedtia glaziovii* (PAPILINOIDEAE)**, Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, UFPR.

CANZI, E. F.; MARQUES, F. A.; TEIXEIRA, S. D.; TOZZI, A. M. G. A.; SILVA, M. J.; DUARTE, R. M. T.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A. L. T. G.; MONTEIRO, P. A.; CARVALHO, J. E.; MAIA, B. H. L. N. S. 2014. Prenylated Flavonoids from Roots of *Dahlstedtia glaziovii* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** 25 (6): 995-1001.

CATHERINE, A. R.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. 2ed. New York/ Basel. Copyright, 2003.

CAVALCANTE, M. G. B.; SILVA, R. M.; BANDEIRA, P. N.; SANTOS, H. S. dos; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R. 2012. Furanoflavones and other Chemical Constituents of *Lonchocarpus obtusos*. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 23 (2): 301-305.

CESARIN-SOBRINHO, D. e NETTO-FERREIRA, J. C. 2002. Fotoquímica de chalconas fluoradas no estado sólido. **Química Nova** 25: 62-68.

CIPOLLINI, M. L.; WALLACE-SENFT, D. A.; WHIGHAM, D. F. 1994. A model of patch dynamics, seed dispersal, and sex ratio in the dioecious shrub *Lindera benzoin* (Lauraceae). **Journal of Ecology** 82: 621-633.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. **Natural products (secondary metabolites)**. In: Buchanan, B.; Grisse, W.; Jones, R. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, cap. 24, p.1250-1318, 2000.

DECHARCHOOCHART, P.; SUTHIWONG, J.; SAMATIWAT, P.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; YENJAI, C. 2014. Cytotoxicity of compounds from the fruits of *Derris indica* against cholangiocarcinoma and HepG2 cell lines. **J. Nat. Med.** 68: 730-736.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. **Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos**. Curitiba. Visão Acadêmica, pp. 33-40, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: 2^a ed. John Wiley & Sons, Ltda, 5, 6, 135, pp 145-149. 2001.

EBY, P. 1998. An analysis of diet specialization in frugivorous *Pteropus poliocephalus* (Megachiroptera) in Australian subtropical rain forest. **Australian Journal of Ecology** 23: 443-456.

ELANGO VAN V, SEKAR N; GOVINDASAMY S. 1994. Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. **Cancer Lett** 87: 107–113.

FACINO, R. M.; CARINI, M.; ALDINI, G.; BERTI, F.; ROSSONI, G.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. 1999. Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischemic damage in rats. **Life Sciences** 64: 943–949.

FAN, L.; YI, T.; XU, F.; ZANGH. J.; LI, D.; XIE, Y.; QIN, S.; CHEN, H. 2013. Characterization of flavonoids in the ethnomedicine *Fordia cauliflorae* radix and its adulterant *Millettiae pulchrae* radix by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS. **Molecules** 18: 15134–15152.

FLEISCHER, T. C.; WAIGH, R. D.; WATERMAN, P. G. 1998. A novel retrodidydrochalcone from the stem bark of *Uvaria mocoli*. **Phytochemistry** 47: 1387-1391.

FOUCHE, G. 2006. Investigation of South African plants for anticancer proprieties. **Pharmacologyonline** 3: 494–500.

GABOR, M. 1986. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of flavonoids. **Progress in Clinical and Biological Research** 213: 471–480.

GARCEZ, F. R.; SCRAMIN, S.; NASCIMENTO, M. C. AND MORS, W. B. 1988. Prenylated flavonoids as evolutionary indicators in the genus *Dahlstedtia*. **Pytochemistry** 4: 1079-1083.

GOBBO-NETO, L., LOPES, N. P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova** 30: 374-381.

GORDALIZA, M. 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology** 9: 767–776.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B; KAPLAN, M. A. C. 1996. Biodiversidade: Um Enfoque Químico-Biológico. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal do Rio de Janeiro. V.1. Rio de Janeiro.

GUPTA, R. K. 1977. New dibenzoilmethane and chalcone derivatives from *Milletia ovalifolia* seeds. **Pytochemistry** 16: 1104–1105.

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

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEYER, R. J. 1993. Relevance of Seed Polysaccharide and Flavonoids for the Classification of the Leguminosae – A Chemotaxonomic Approach. **Phytochemistry** 34: 3-16.

HEIM, E. K.; TAGLIAFERRO, R. A.; BOBILYA, J. D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry** 13 (1): 572-584.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **The Lancet** 342: 1007–1011.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions** 139: 1–21.

KAMARA, B. I.; MANONG, D. T. L.; BRANDT, E. V. 2005. Isolation and synthesis of a dimeric dihydrochalcone from *Agapanthus africanus*. **Pytochemistry** 66: 1126-1132.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; KENNEDY, A. R.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. 2004. Cyclobutanes from *Combretum albopunctatum*. **Pytochemistry** 65: 433-438.

KINGHORN, A. D. 1987. Biologically Active Compounds from Plants with Reputed Medicinal and Sweetening Properties. **Journal of Natural Products** 50: 1009-1024.

KUMAR, M.; RAWAT, P.; RAHUJA, N.; SRIVASTAVA, A. K. 2009. Antihyperglycemic activity of phenylpropanoyl esters of catechol glycoside and its dimers from *Dodecadenia grandiflora*. **Pytochemistry** 70: 1448-1455.

LARSON, R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry** 27: 969-978.

LI, J.; JIANG, Z.; LI, X.; HOU, Y.; LIU, F.; LI, N.; LIU, X.; YANG, L.; CHEN, G. 2015. Natural therapeutic agents for neurodegenerative diseases from a traditional herbal medicine *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. 25: 53-58.

LIMA, A. F.; MILEO, P. G. M.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. P. 2009. ¹H and ¹³C NMR assignments of new methoxylated furanoflavonoids from *Lonchocarpus araripensis*. **Magnetic Resonance in Chemistry**. 47 (2): 165-168.

LIU, Y. VEENA, C. K; MORGAN, K.; JEKABSONS, M. B.; NAGKE, D. G. AND ZHOU, Y. D. 2008. Methylalpinumisoflavone Inhibits Hypoxia-inducible Factor-1 (HIF-1) Activation by Simultaneously Targeting Multiple Pathways. **Journal of biological chemistry**, 27: 5859-5868.

LODWIG, E. M.; HOSIE, A. H. F.; BOURDÉS, A.; FINDLAY, K. 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–*Rhizobium* symbiosis. **Nature** 422: 722–726.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; SALES, B. H. L. N.; MAGALHÃES, E. G. 1996. Twenty-three Flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens* roots. **Pytochemistry** 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. **Pytochemistry** 46: 1029–1033.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; NOGUEIRA, M. A.; RONCANCIO, V. J. F. 1998. Ensayos Biológicos com extractos obtenidos de raízes de *Lonchocarpus latifolius* (WILLD) D. C. Y de um nuevo dibenzoilmetano aislado. **Revista Ceres** 45 (260): 351–358.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. A.; MAGALHÃES, E. G.; NOGUEIRA, M. A.; QUEIROZ, S. C. N. 2000. Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots. **Pytochemistry** 55: 787–792.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; BLANCO, I. S.; SORIANO, M. D. P. C. 2004. Flavonoids from *Lonchocarpus muehlbergianus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 76: 651–661.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; SANNOMIYA, M.; SORIANO, M.P. C.; PEREZ, M. A. F. 2007. Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 79 (3): 351-367.

MASCARO, U. C. P.; RODRIGUES, L. A.; BASTOS, L. K.; SANTOS, E; COSTA, J. P. C. 1998. Valores de DL₅₀ em peixes e no rão tratados com pó de raízes de *Derris* spp e suas implicações ecotoxicológicas. **Pesq Vet Brasileira** 18 (2): 53-56.

MARTIN, J. M.; MADIGOSKY, S. R.; GU, Z.; ZHOU, D; WU, J.; MCLAUGHLIN, J. L. 1999. Chemical Defense in the Zebra Swallowtail Butterfly, *Eurytides marcellus*, Involving Annonaceous Acetogenins. **Journal of Natural Products** 62: 2-4.

MAZUR, A.; BAYLE D, LAB, C.; ROCK, E.; RAYSSIGUIER, Y. 1999. Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL-oxidation in vitro. **Atherosclerosis** 149: 421–422.

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains**. CRC Press: Boca Raton. 1993.

MELLO, K. M.; OLIVEIRA, R.; GRISOLIA, C. K.; DOMINGUES, I.; PIECZARKA, J. C.; SOUZA FILHO, J.; NAGAMACHI, C. Y. 2015. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. **Environ Sci Pollut Res** *in press*.

MIDDLETON, E. J. R., 1996. Biological properties of plant flavonoids: an overview. **Pharmaceutical Biology** 34: 344–348.

MIDDLETON, E. J. R. 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 439: 175–182.

MIDDLETON, E. J. R.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews** 52: 651–673.

MINAKAWA, T.; TOUME, K.; AHMED, F.; SADHU, S. K.; OHTSUKI, T.; ARAI, M. A.; ISHIBASH, M. 2010. Constituents of *Pongamia pinnata* Isolated in a Screening for Activity to Overcome Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Resistance. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** 58 (11): 1549–1551.

MONACHE, F. D.; SUAREZ, L. E. C.; MARINI-BETTOLO, G. B. 1978. Flavonoids from the seeds of six *Lonchocarpus species*. **Pytochemistry** 17: 1812–1813.

NASCIMENTO, M. C.; MORS, W. B. 1981. Flavonoids of *Derris araripensis*. **Pytochemistry** 20: 147–152.

NEWMAN, D. V.; GRAGG, G. M.; MARINI-BETTOLO, G. B. 1978. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products** 75: 311–335.

PANDEY, A. K.; BAJPAI, A. K.; KUMAR, A.; PAL, M.; BABOO, V.; DWIVEDI, A. 2014. Isolation, Identification, Molecular and Eletronic Structure, Vibraional Spectroscopic Investigation, and Anti-HIV-1 Activity of Karanjin Using Density Functional Theory. **Journal of Theoretical Chemisttry** 1: 1–13.

PENG, Y.; CHEN, Y.; GAO, C.; YAN, T.; CAO, W.; HUANG, R. 2014. A new 1,2-ethanedione benzofurano derivative from *Tephrosia purpurea*. **Journal of Natural Products** 28: 1705–1708.

PIETTA, P. G.; SIMONETTI, P. In **Antioxidant Food Supplements in Human Health**; Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa, T., Eds.; Academic Press: San Diego, pp 283-308, 1999.

PIETTA, P. G. In **Flavonoids in Health and Disease**; Rice-Evans, C. A., Packer, L., Eds.; Marcel Dekker: New York, pp 61-110, 1998.

PIETTA, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products** 63: 1035-1042.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPOES, N. P.; EPIFANIO, R. A. 2002. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova** 25 (1): 45-61.

PRASAD, Y. R.; CHAKRADHAR, V.; BADU, Y. H. 2005. A new chalcone from *Tephrosia spinoa*. **International Journal of Chemical Sciences** 3 (4): 735-738.

RAO, K. V.; ROW, L. R.; SESHADRI, T. R. 1945. 6,7-Dihydroxyflavonols. II. **Proceedings – Indian Academy of Sciences, Section A** 22A:297–303.

REN, W.; QIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.; ZHANG, L. 2003. Flavonoids: Promising anticancer agents. **Medicinal Research Reviews** 23:519–534.

REYES-CHILPA, R.; BAGGIO, C. H.; ALAVEZ-SOLANO, D.; ESTRADA-MUNIZ, E.; KAUFFMAN, F. C.; SANCHEZ, R. I.; MESIA-VELA, 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.

SALES, B. H. L. N. 1994. **Flavonoides de *Lonchocarpus subglaucescens* (Benth)-Luguminosae e Síntese de β-hidroxichalconas-Campinas**, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.

SANDERSON, J. T.; HORDIJK, J.; DENISON, M. S.; SPRINGSTEEL, M. F.; NANTZ, M. H.; VAN DEN BERG, M. 2004. Induction and inhibition of aromatase (CYP10) activity by

natural and synthetic flavonoids compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. **Toxicological Sciences** 82:70–79.

SANNOMIYA, M. 2001. **Análise Fitoquímica de *Platymiscium floribundum* var. *latifolium* e *Lonchocarpus montanus*: Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica**, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.

SANTOS, L. S. 2008. **Dibenzoilmetanos de *Lonchocarpus filipes***, Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, UFPR.

SATYAVANI, S. R.; KANJIT, S.; RAO, M. S.; PRASA, R. B. N.; MURTHY, U. S. N. 2015. Synthesis and mosquito larvicidal activity of furanochalcones and furanoflavonoids analogous to karanjin. **Med. Chem. Res** 24: 842-850.

SAXENA, D. B.; STOMAR, S. S.; SINGH, R. P.; MUKERJEE, S. K. 1987. A new chalcones from *Millettia ovalifolia*. **Indian J. Chem.** 26B, 704.

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. 2004.

SELWAY, J. W. 1986. Antiviral activity of flavones and flavans. **Progress in Clinical and Biological Research** 213: 521–536.

SEIDEL, V.; BAILLEUL, F.; WATERMAN, P. G. 2000. (*Rel*)-1 β ,2 α -di-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzoyl)-3 β ,4 α -di-(4-methoxyphenyl)-cyclobutane and other flavonoids from the aerial parts of *Goniothalamus gardneri* and *goniothalamus thwaitesii*. **Pytochemistry** 55: 439-446.

SHIN-ICHI, A.; TSUTOMU, F. 1981. Biosynthesis of a retrochalcone, echinatin: a feeding study with advanced precursors. **Tetrahedron** 22 (22): 2097–2098.

SILVA, M. J. da; TOZZI, A. M. G. A.; LEWIS, G. P. 2010. Two new species of *Lonchocarpus* (Luguminosae, Papilionoideae, Millettieae) from Brazil. **Kew Bulletin** 65: 29-35.

SILVA, M. J. da; QUEIROZ, L. P. de; TOZZI, A. M. G. A.; LEWIS, G. P.; SOUSA, A. P. 2012. Phylogeny and biogeography of *Lonchocarpus* sensu lato and its allies in the tribe Millettieae (Leguminosae, Papilionoideae). **Taxon** 61 (1): 93-108.

SIMÕES, C. M. O.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2^a ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, 2000.

SPIRIDON, K. E., 2006. Terrestrial Plant-Derived Anticancer Agents and Plants used in Anticancer Research. **Critical Reviews in Plant Science** 25: 79-113.

SRITULARAKA, B.; LIKHITWITAYAWUIDA, K.; CONRAD, J.; KRAUS, W. 2002. Flavonoids from the roots of *Millettia erythrocalyx*. **Pytochemistry** 61:943–947.

TANAKA, T.; IINUMA, M.; YUKI, K.; FUJII, Y.; MIZUNO, M. Flavonoids in root bark of *Pongamia pinnata*. **Phytochemistry** 31 (3):993-998.

VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-CAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; FURLAN, M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S. 2012. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química Nova** 35 (11): 2278-2287.

VILAIN, C. 1983. Isopongaflavone from *Tephrosia barbiger* seeds. **Pharmazie** 38 (12): 876-877.

WENNY, D. G. 2000. Seed dispersal, seed predation, and seedling recruitment of *Ocotea endresiana* (Lauraceae) in Costa Rica. **Ecological Monographs** 70 (2): 331-351.

WANG, W.; WANG, J.; LI, N.; ZHANG, X.; ZHAO, W.; LI, J.; SI, Y. 2015. Chemopreventive flavonoids from *Millettia pulchra* Kurz var-laxior (Dunn) Z. Wei (Yulangsán) function as Michael reaction acceptors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** 25: 1078-1081.

WINK, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Pytochemistry**: 64 (1) 3-19.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; IKEHARA, N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. **PLANT PHYSIOLOGY** 115: 1405-1412.

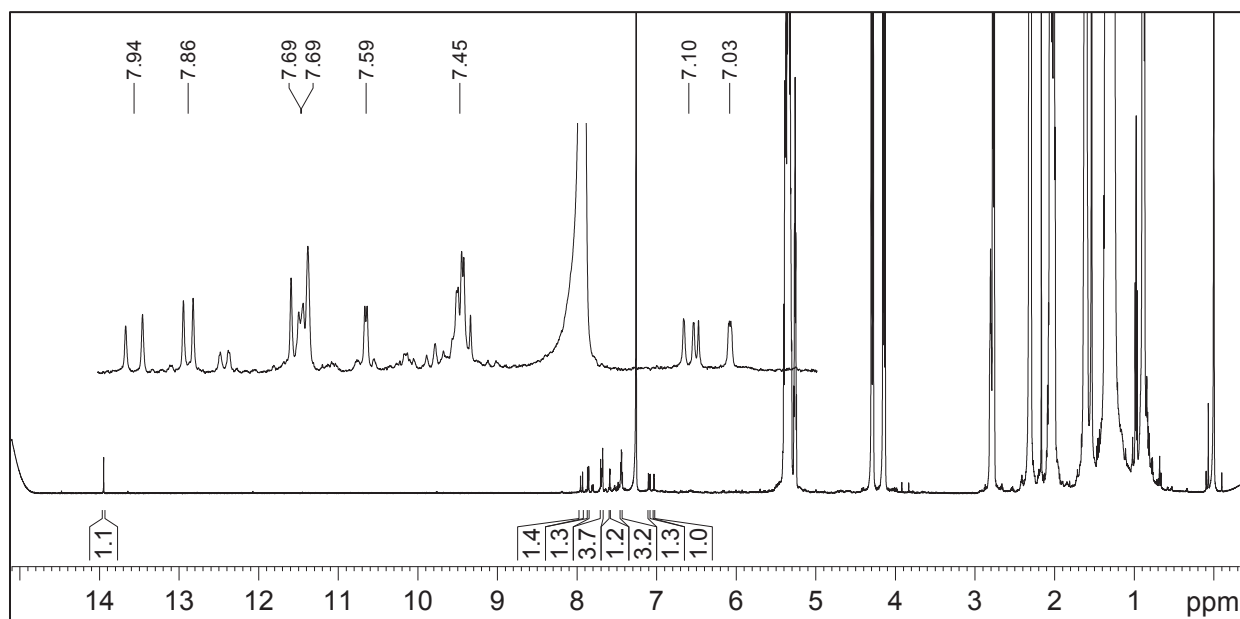
YANG, C.; WANG, X.; WANG, J.; LUO, J.; LUO, J.; KONG, L. 2011. A [2+2] Cycloaddition Dimer and a Diels-Alder Adduct from *Alpinia katsumadai*. **ORGANIC LETTERS** 13 (13): 3380-3383.

YIN, H.; WU, J.; NAN, H.; ZHANG, S. 2006. New prenylated flavones from *Pongamia pinnata*. **PARMAZIE** 61 (1): 76-78.

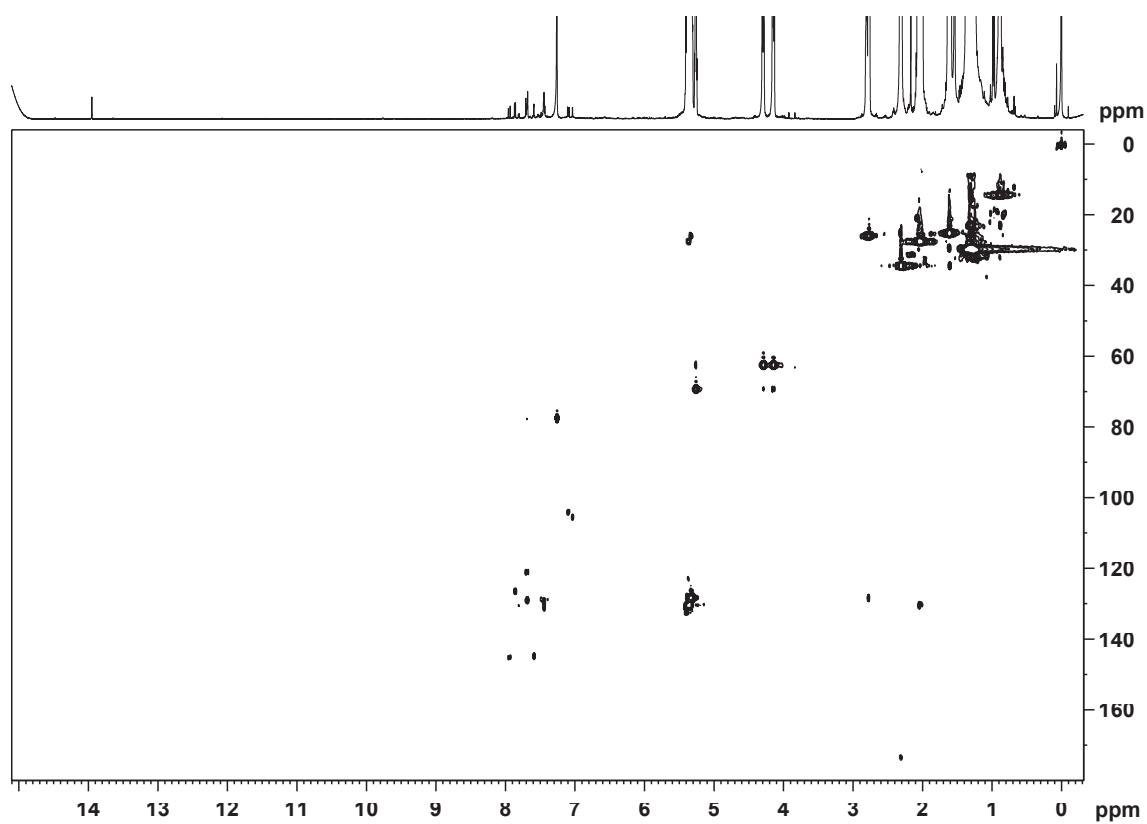
ZHANG, X.; LI, L.; WANG, S.; QUE, S.; YANG, W.; ZHANG, F.; GONG, N.; CHENG, W.; LIANG, H.; YE, M.; JIA, Y. ZHANG, Q. 2013. Oxyfadichalcones A-C: three chalcone dimers fused through a cyclobutane ring from Tibetan medicine *Oxytropis falcate* Bunge. **Tetrahedron** 69: 11074-11079.

Anexo

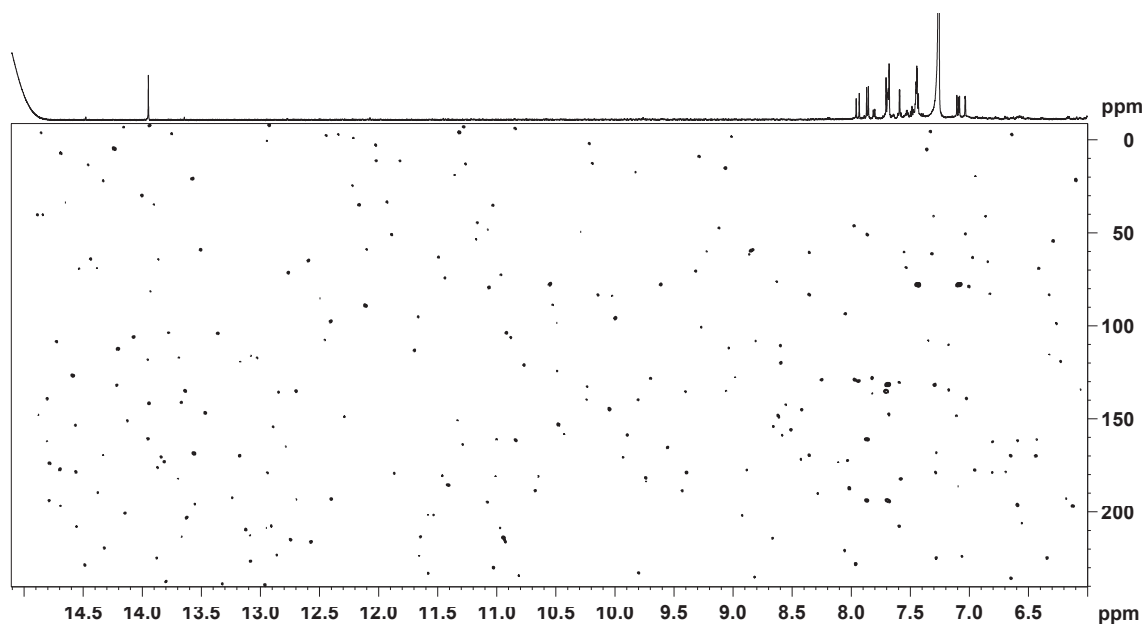
Relação de Espectros



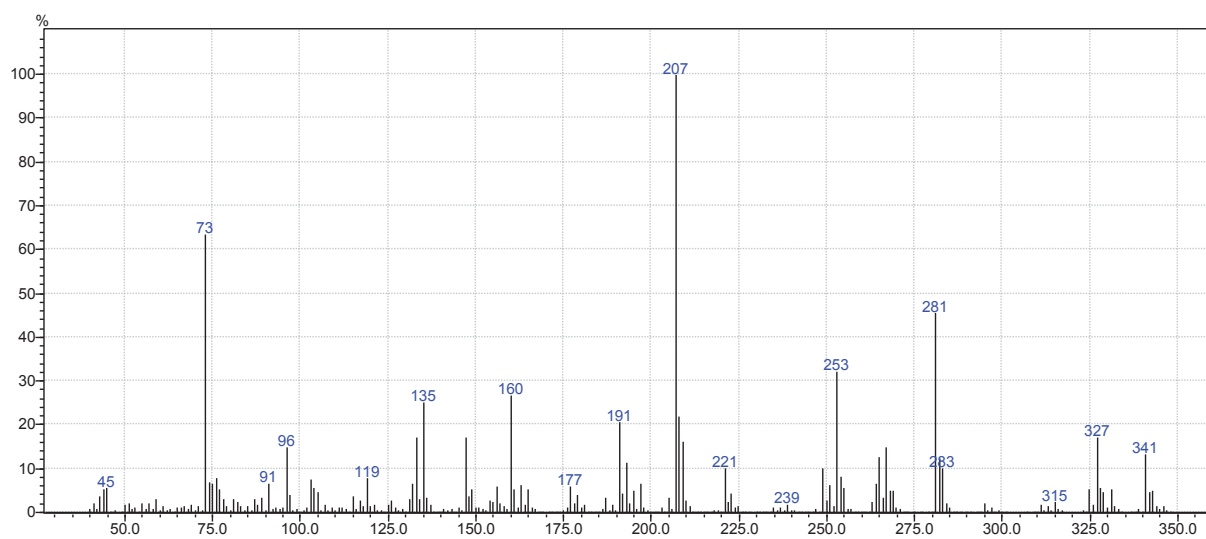
E 1: Espectro de RMN de ¹H (14,1 Tesla) em CDCl₃ de **S1**.



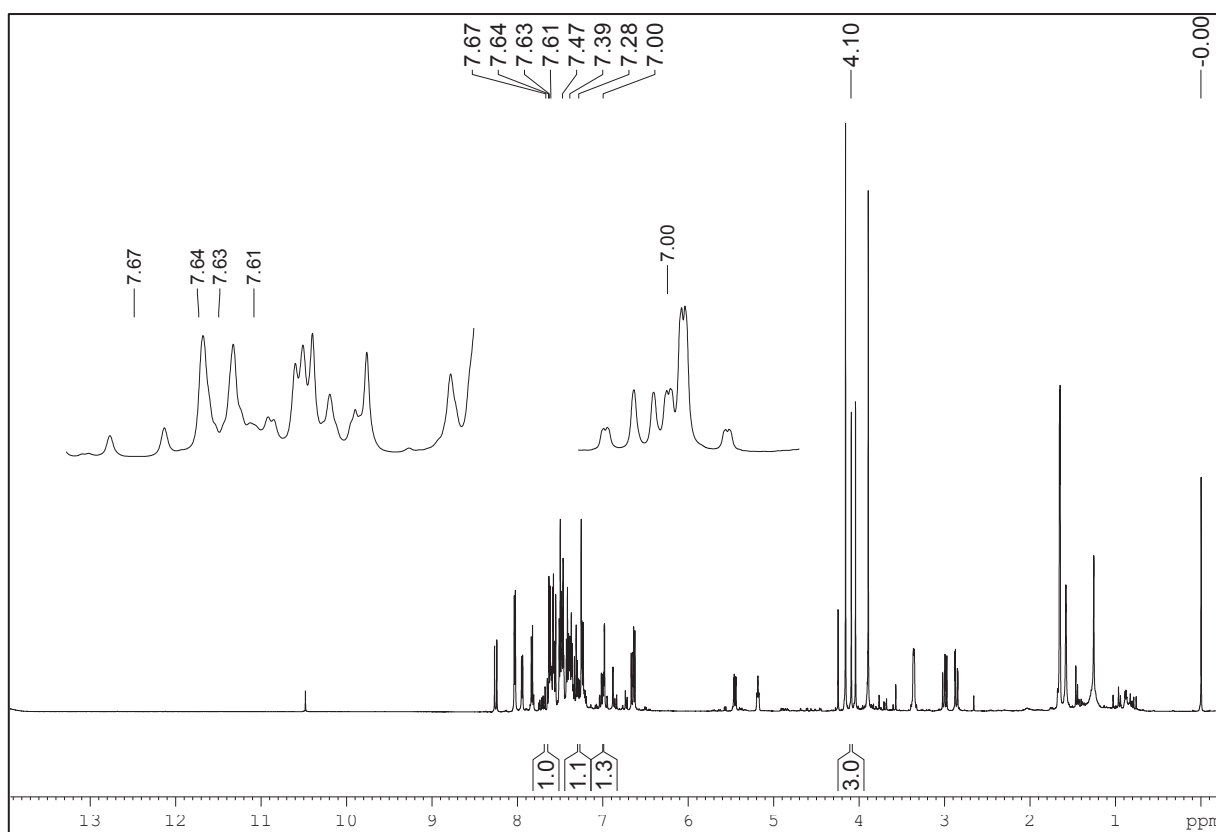
E 2: Mapa de correlação direta ¹H-¹³C (14,1 Tesla) em CDCl₃ de **S1**.



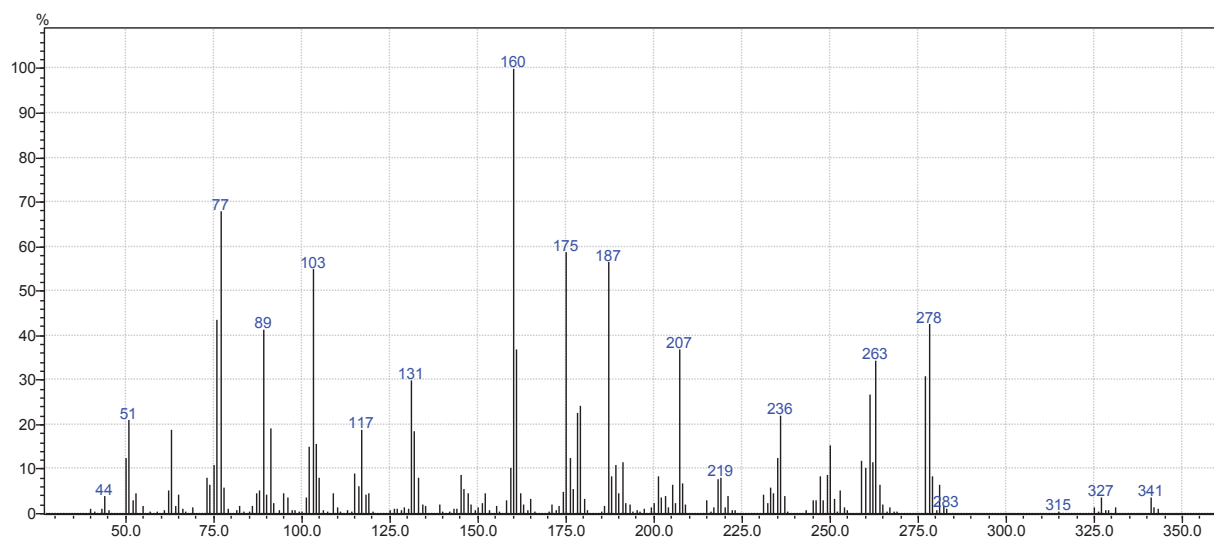
E 3: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S1**.



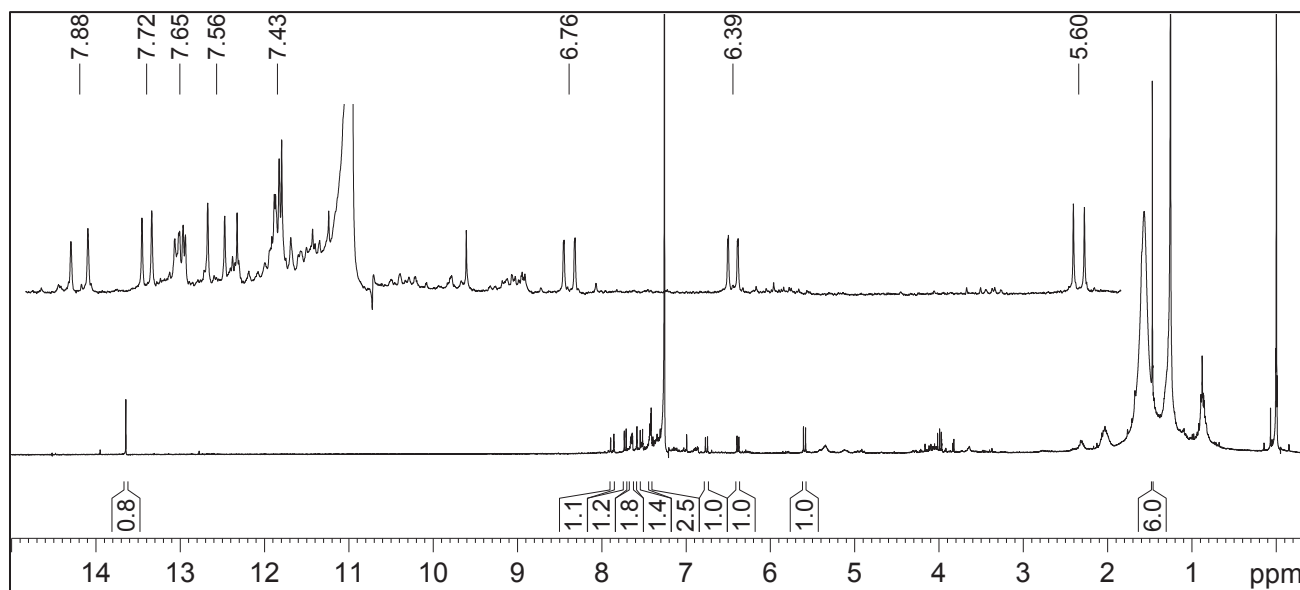
E 4: Espectro de massas de baixa resolução de **S1**.



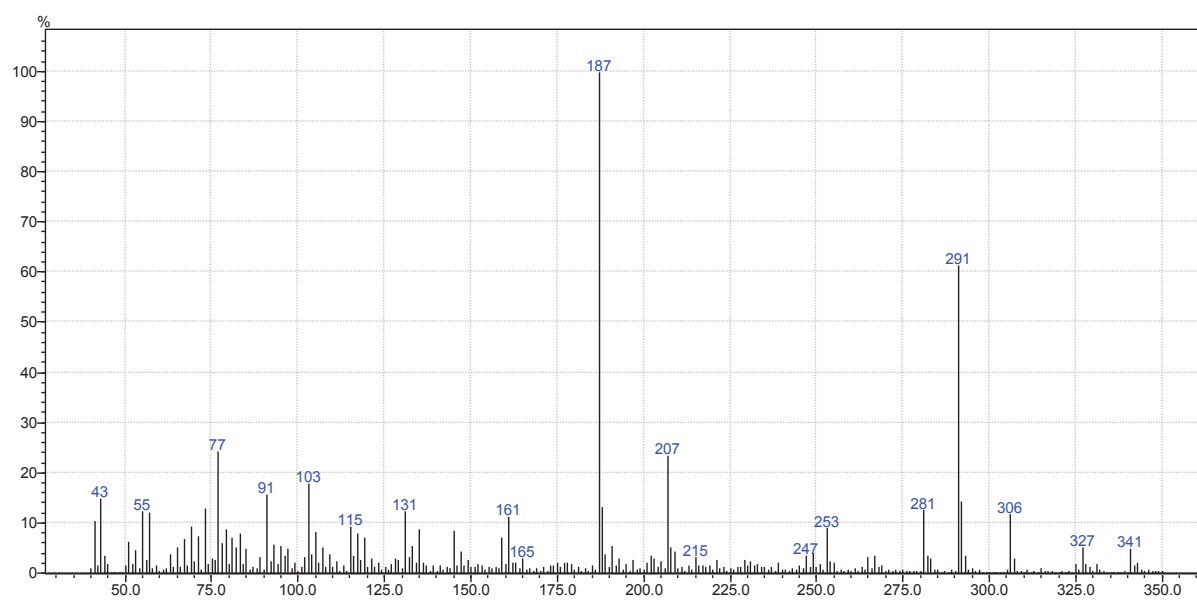
E 5: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S18**.



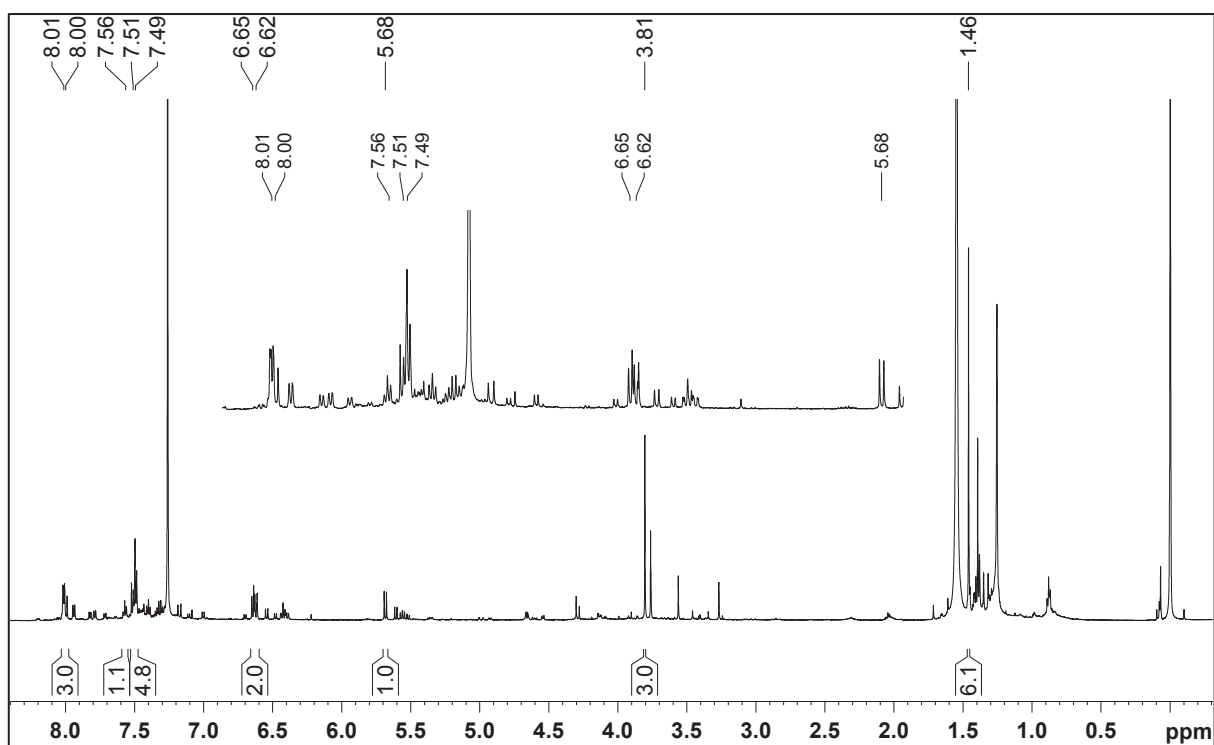
E 6: Espectro de massas de baixa resolução de **S18**.



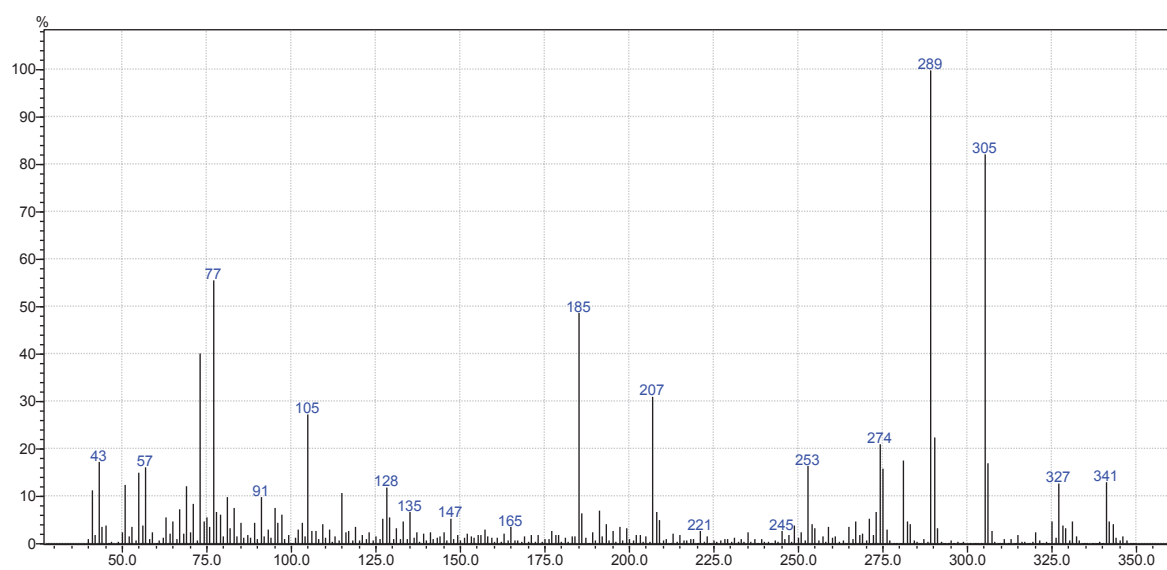
E 7: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S3**.



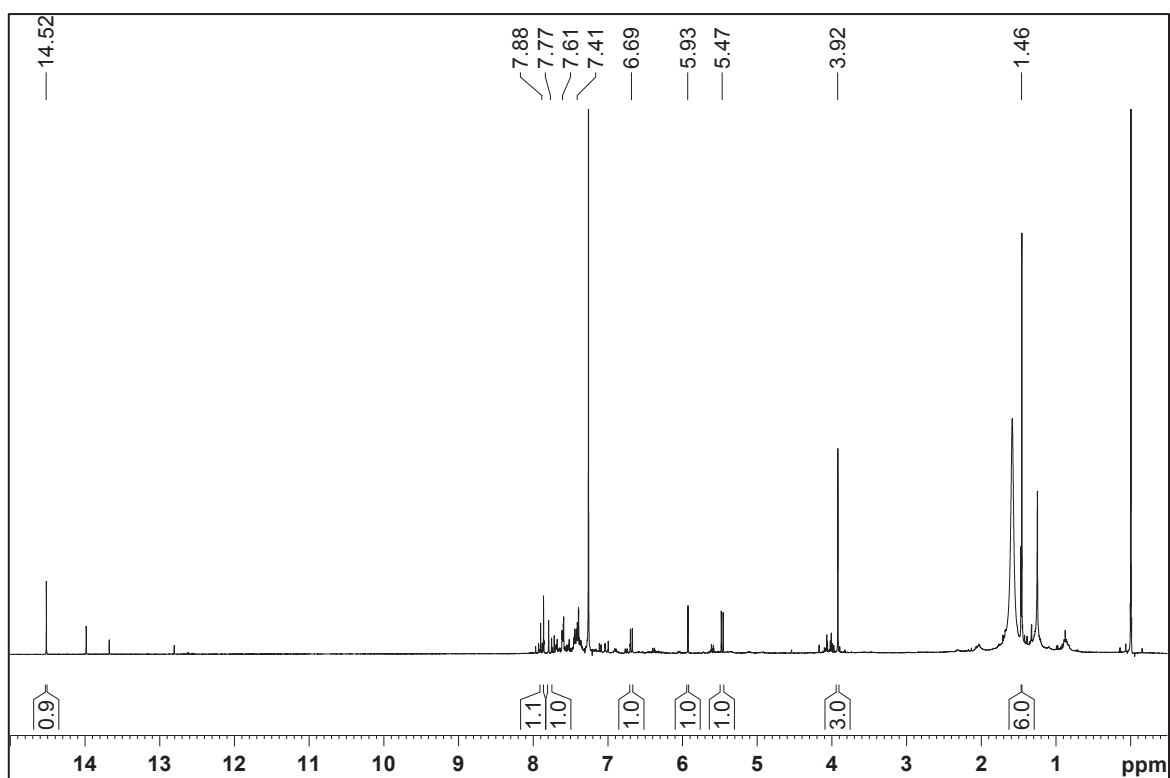
E 8: Espectro de massas de baixa resolução de **S3**.



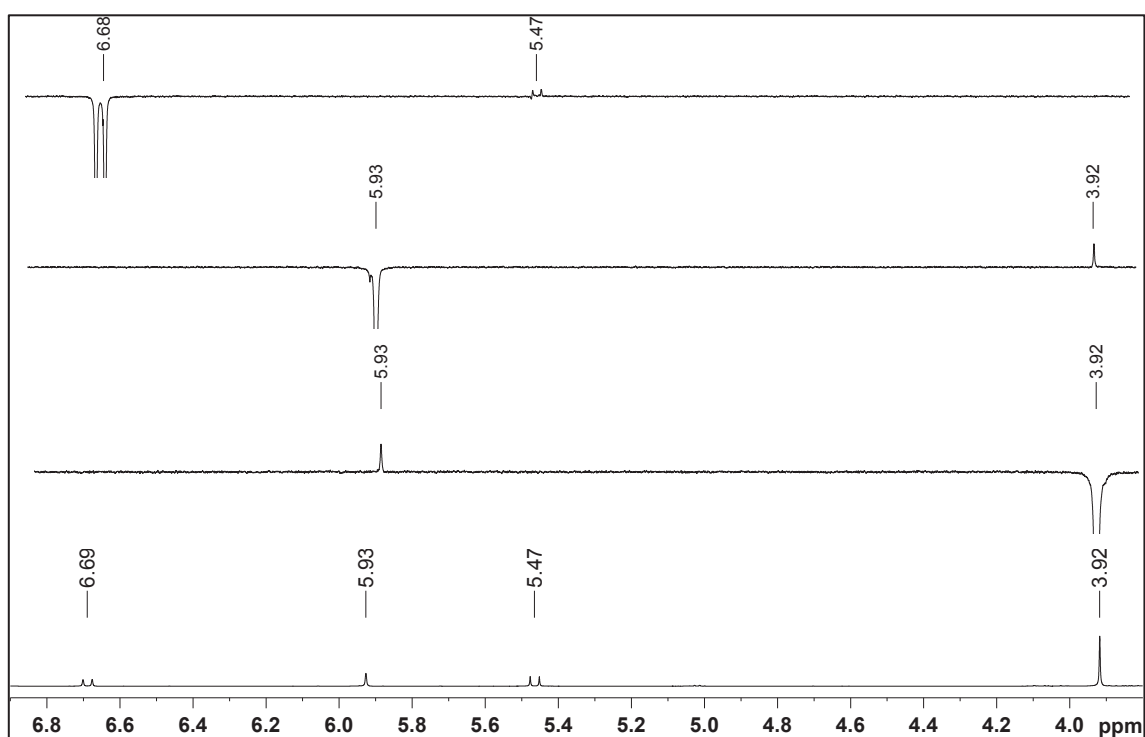
E 9: Espectro de RMN de ¹H (14,1 Tesla) em CDCl₃ de **S19**.



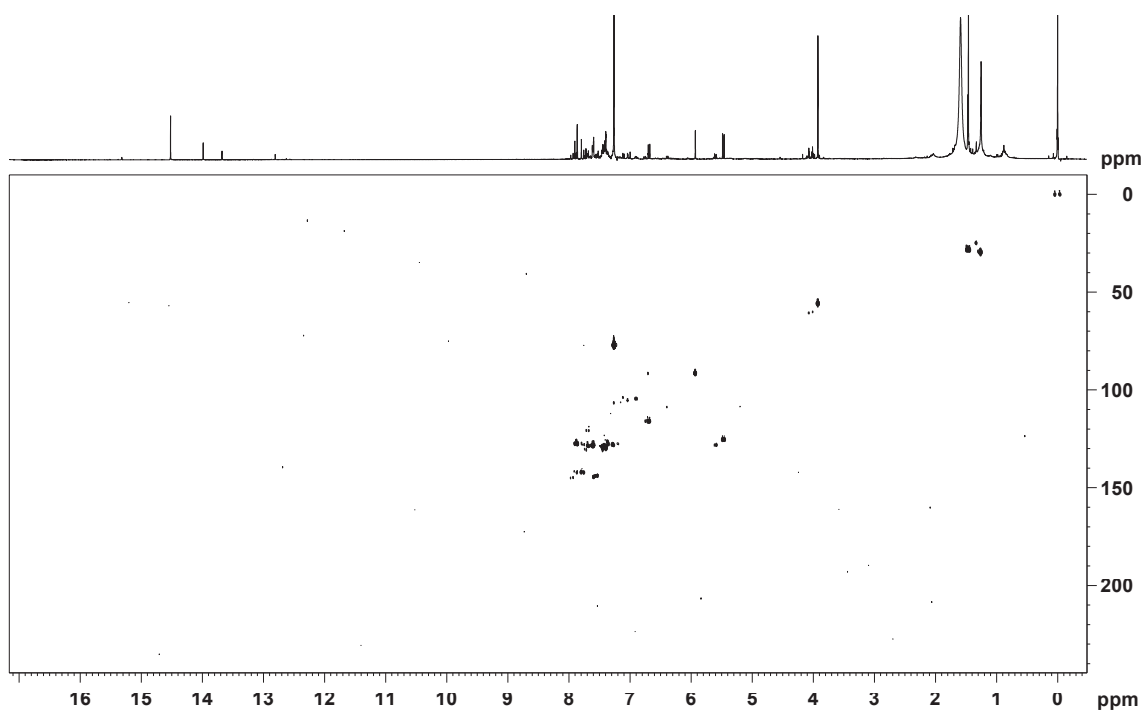
E 10: Espectro de massas de baixa resolução de **S19**.



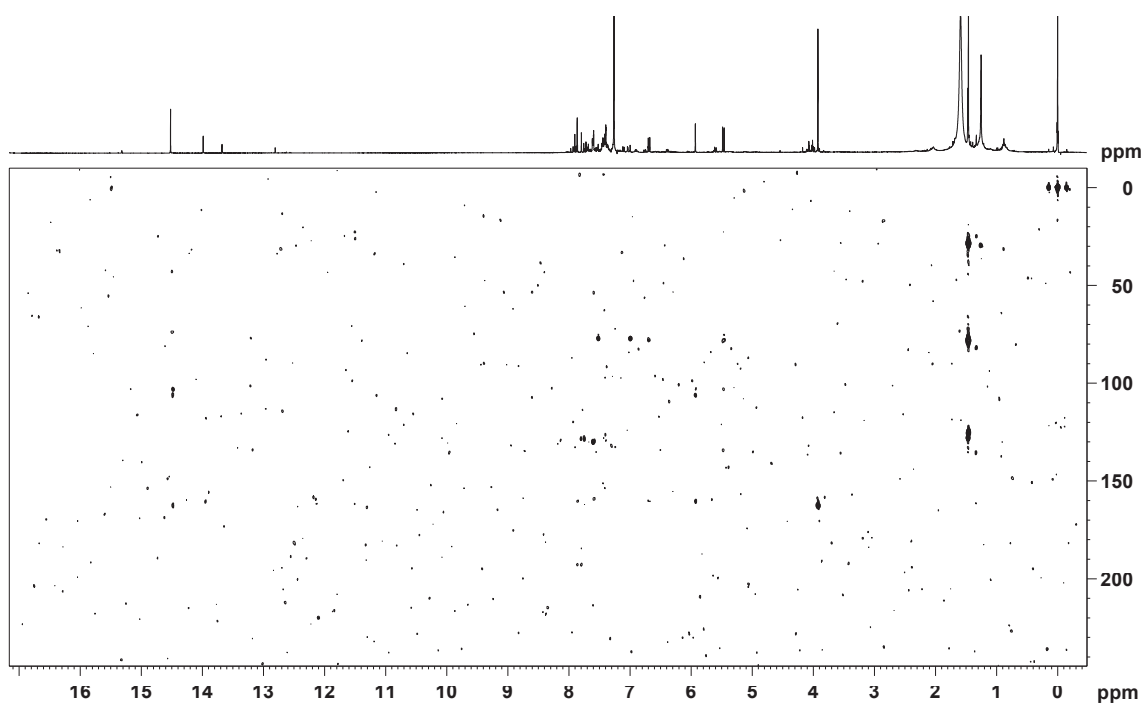
E 11: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S2**.



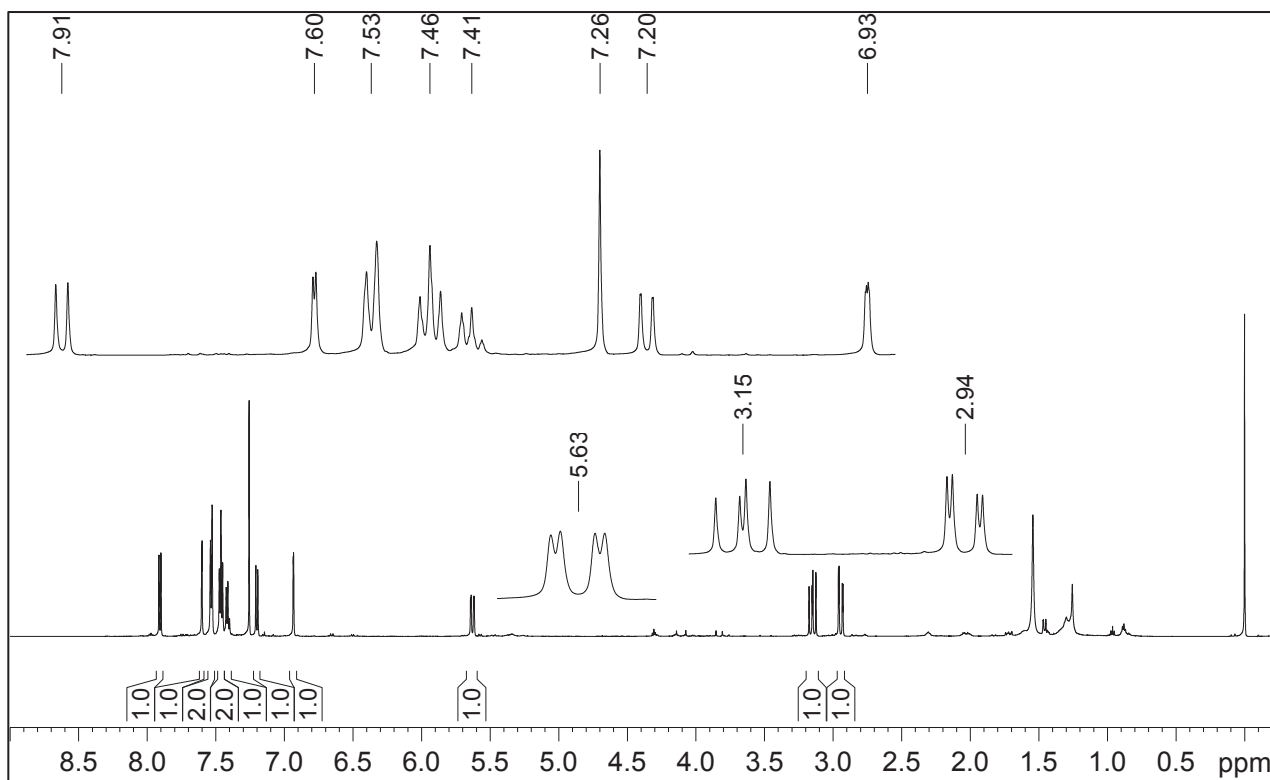
E 12: Experimentos de NOE 1D (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S2**.



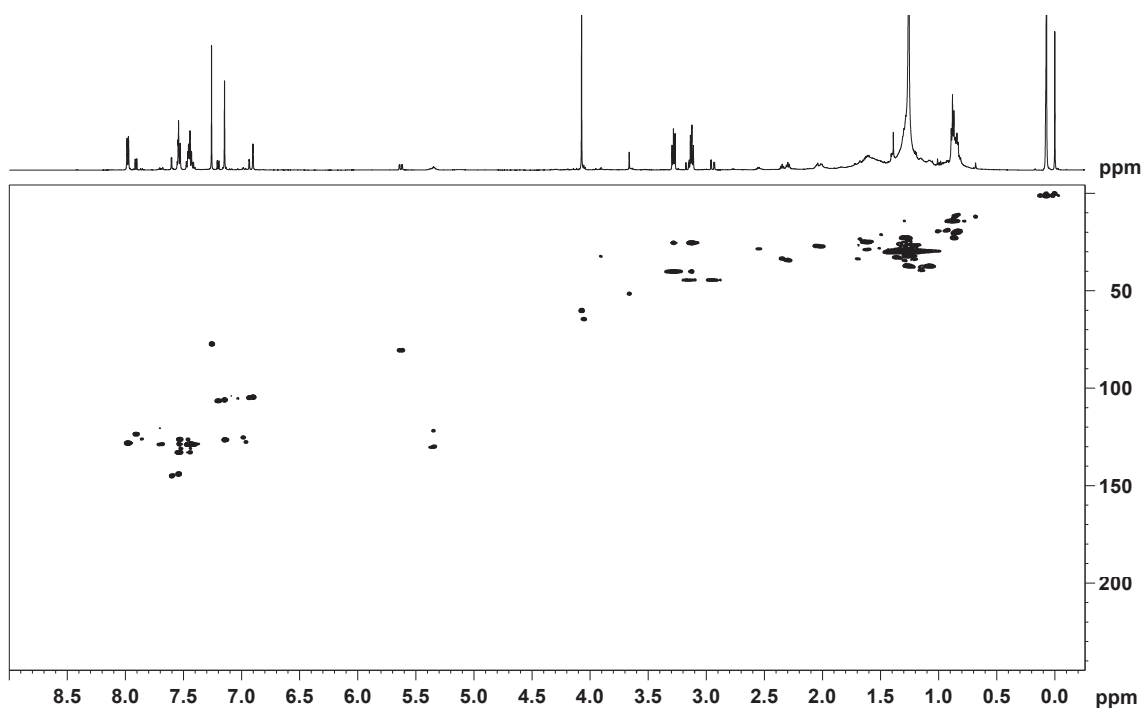
E 13: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S2**.



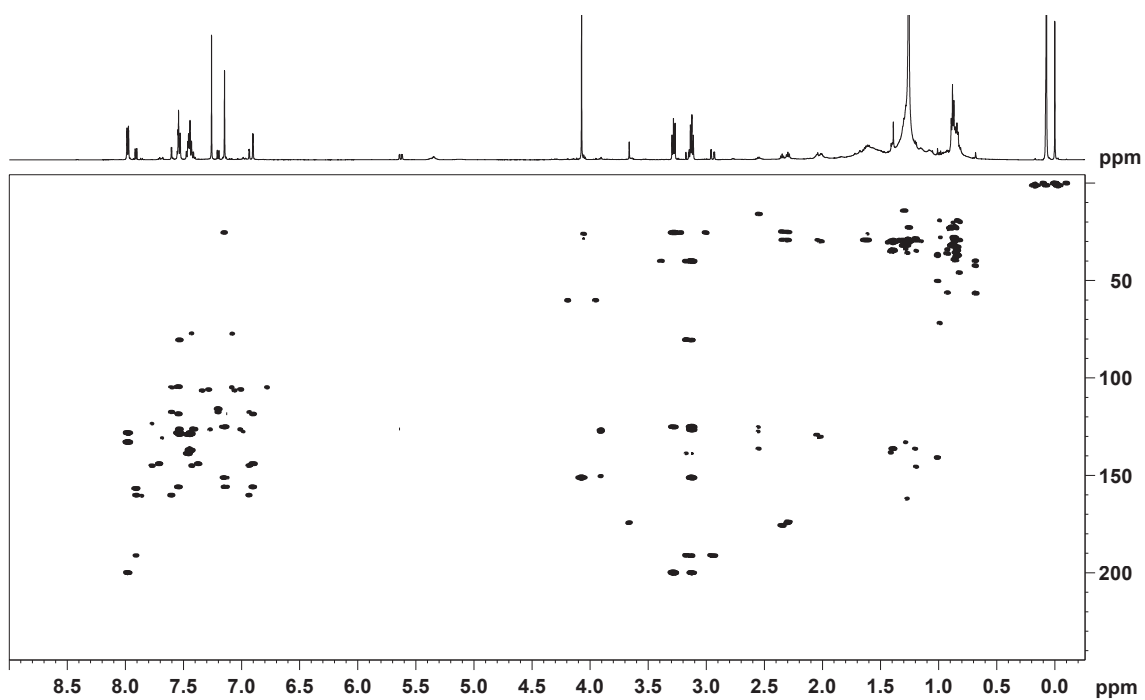
E 14: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S2**.



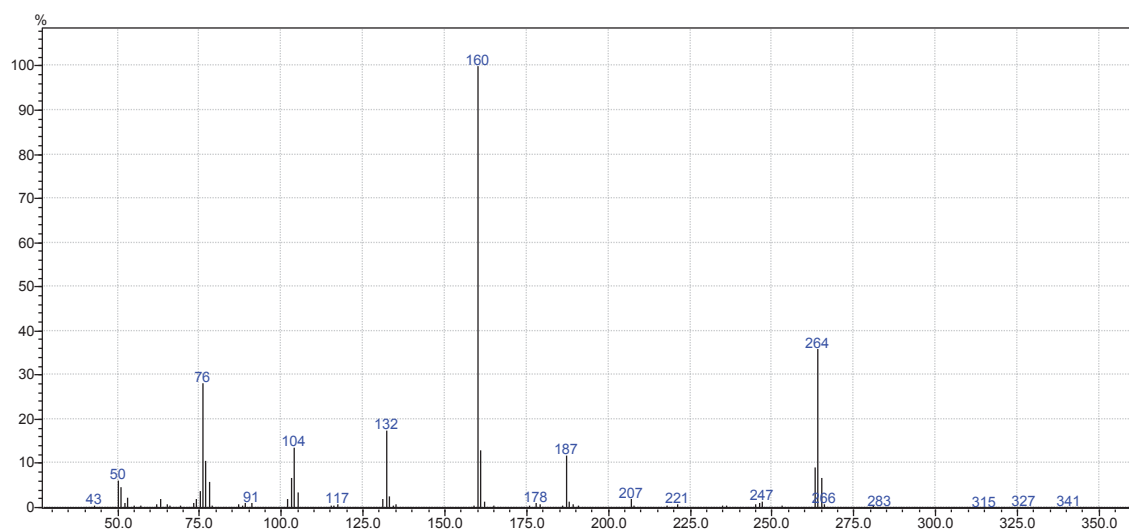
E 15: Espectro de RMN de ¹H (14,1 Tesla) em CDCl₃ de **S4**.



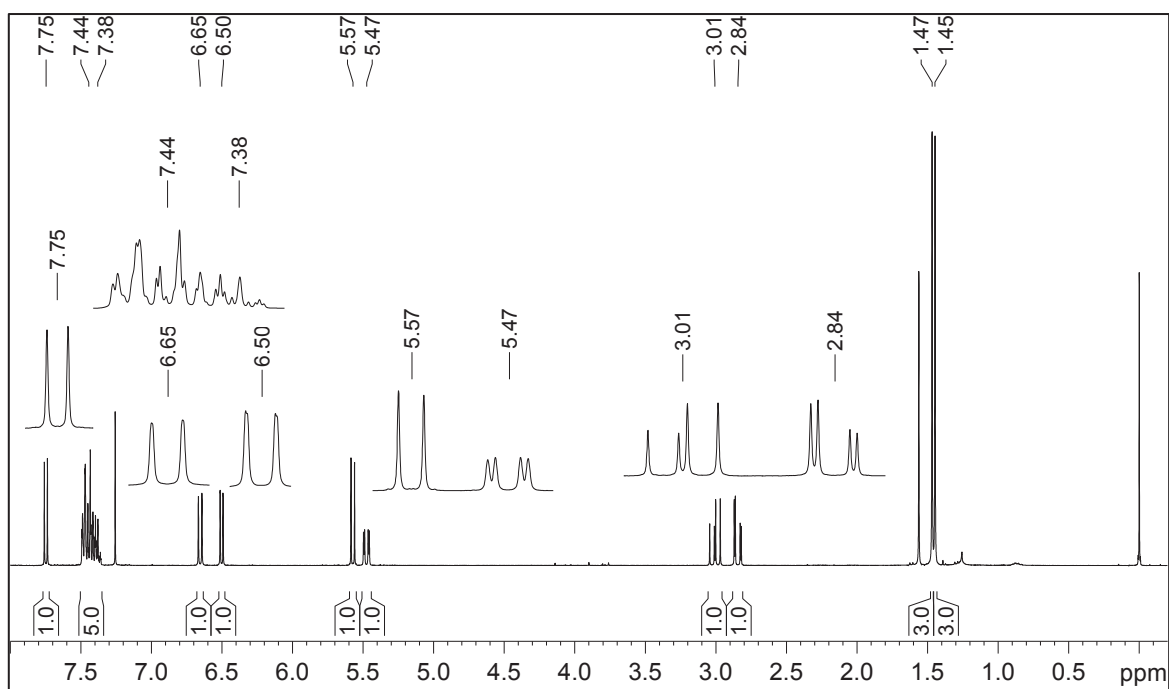
E 16: Mapa de correlação direta ¹H-¹³C (14,1 Tesla) em CDCl₃ de **S4**.



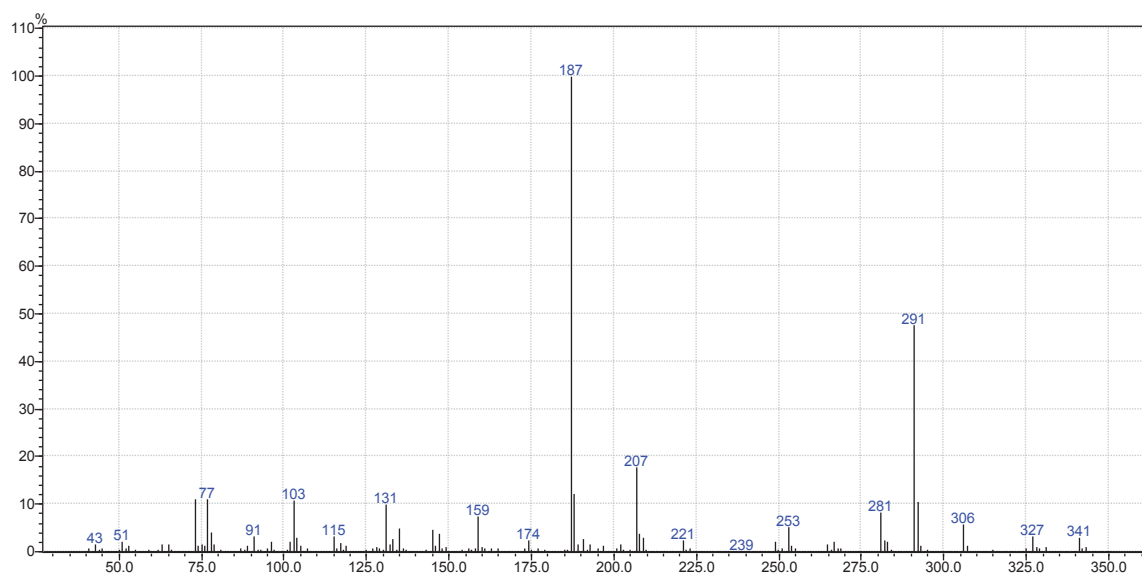
E 17: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S4**.



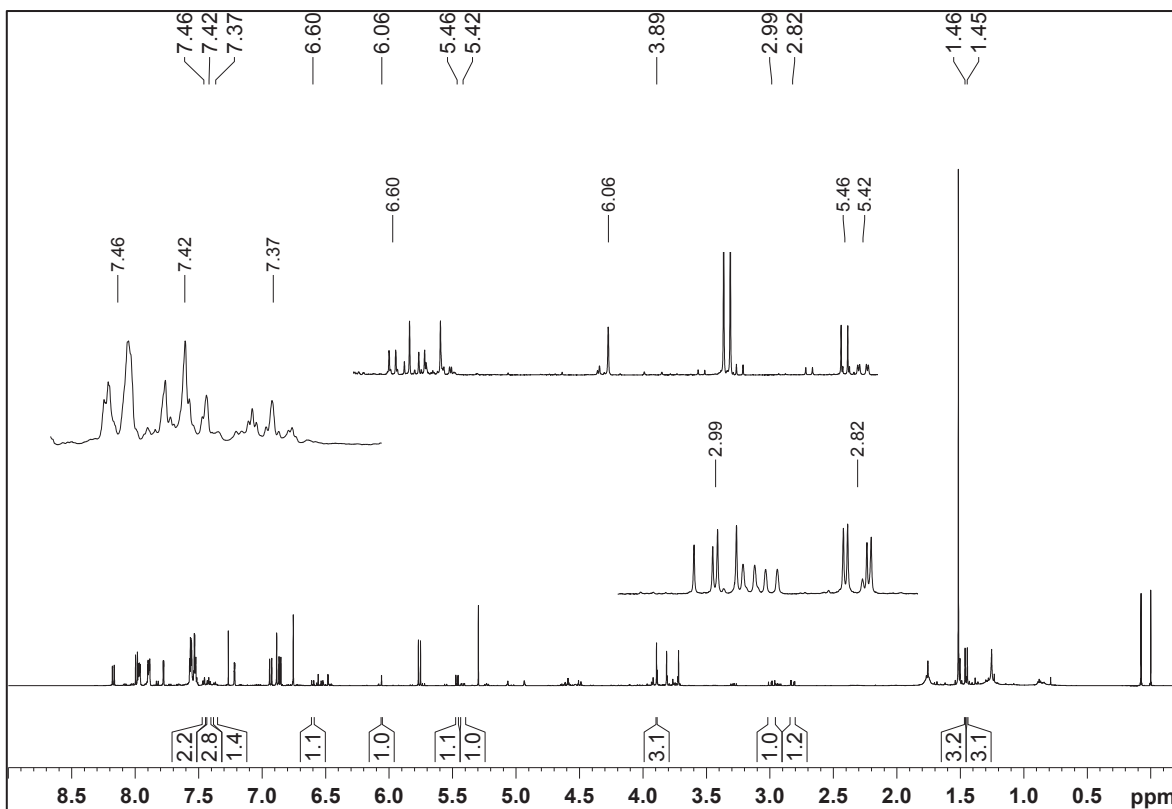
E 18: Espectro de massas de baixa resolução de **S4**.



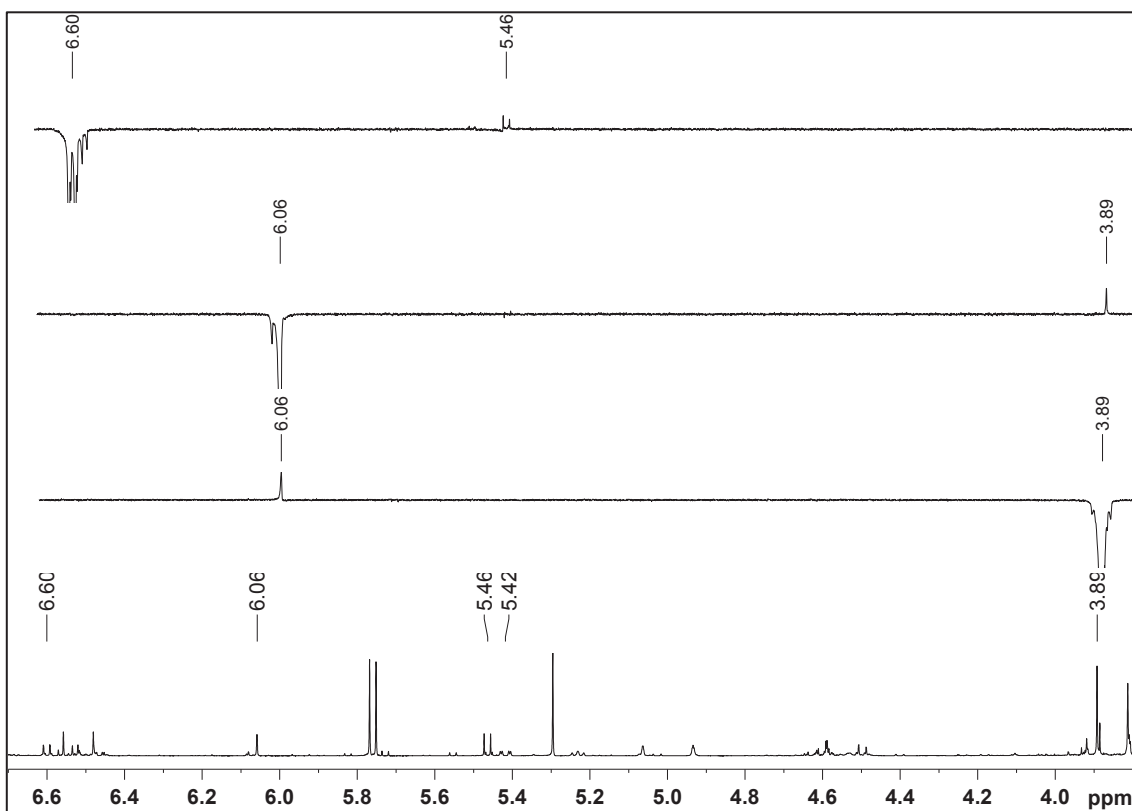
E 19: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S7**.



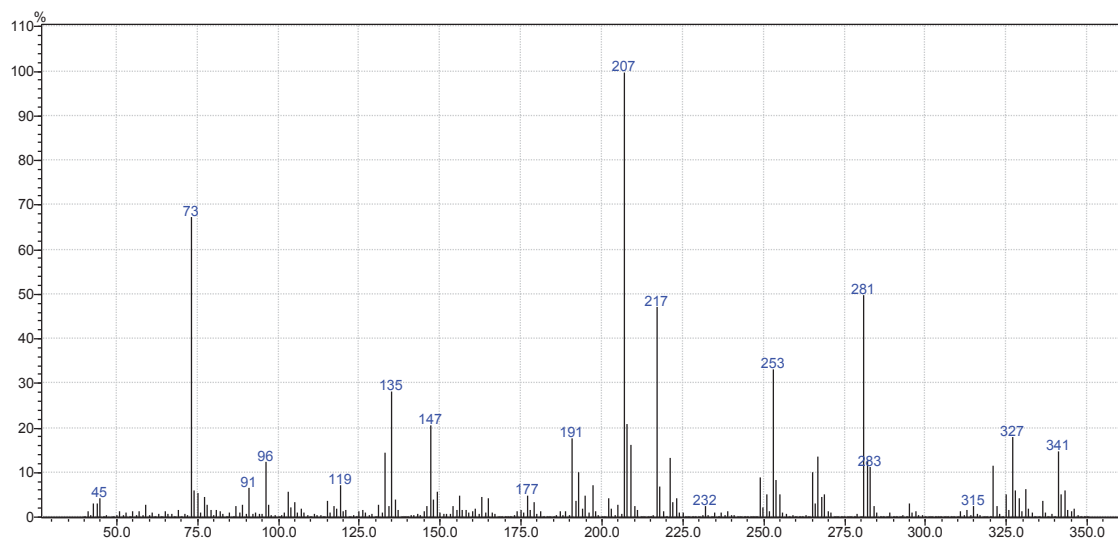
E 20: Espectro de massas de baixa resolução de **S7**.



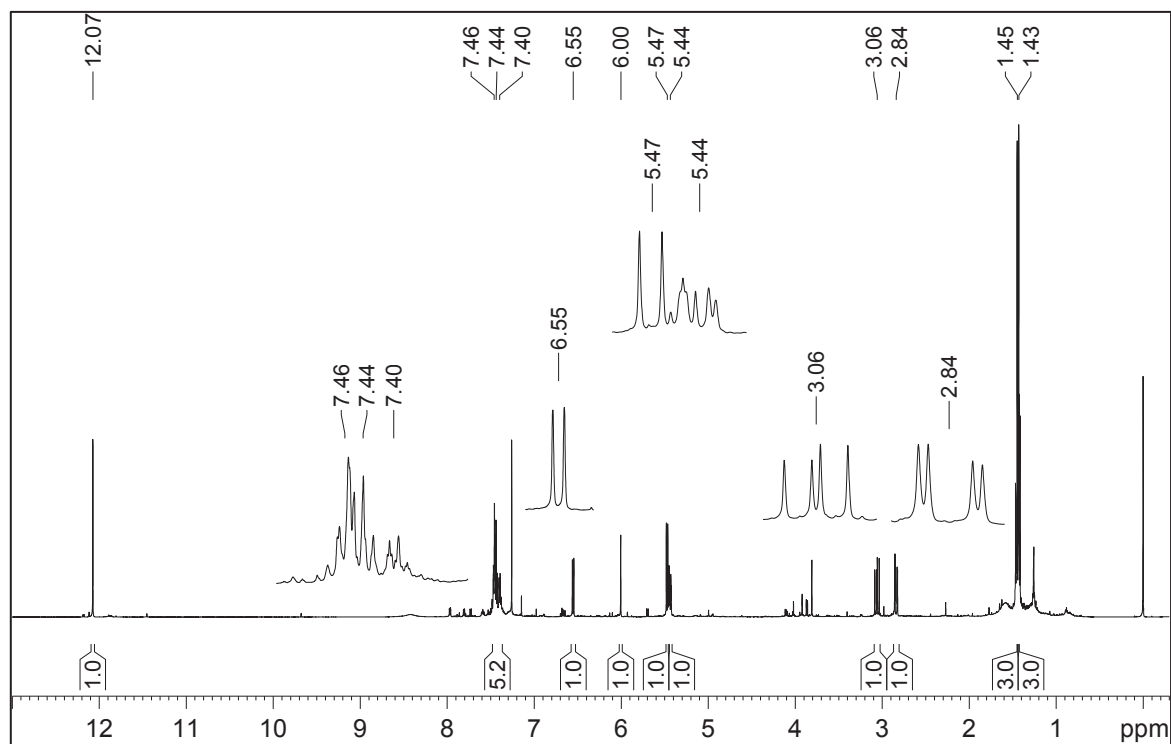
E 21: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S16**.



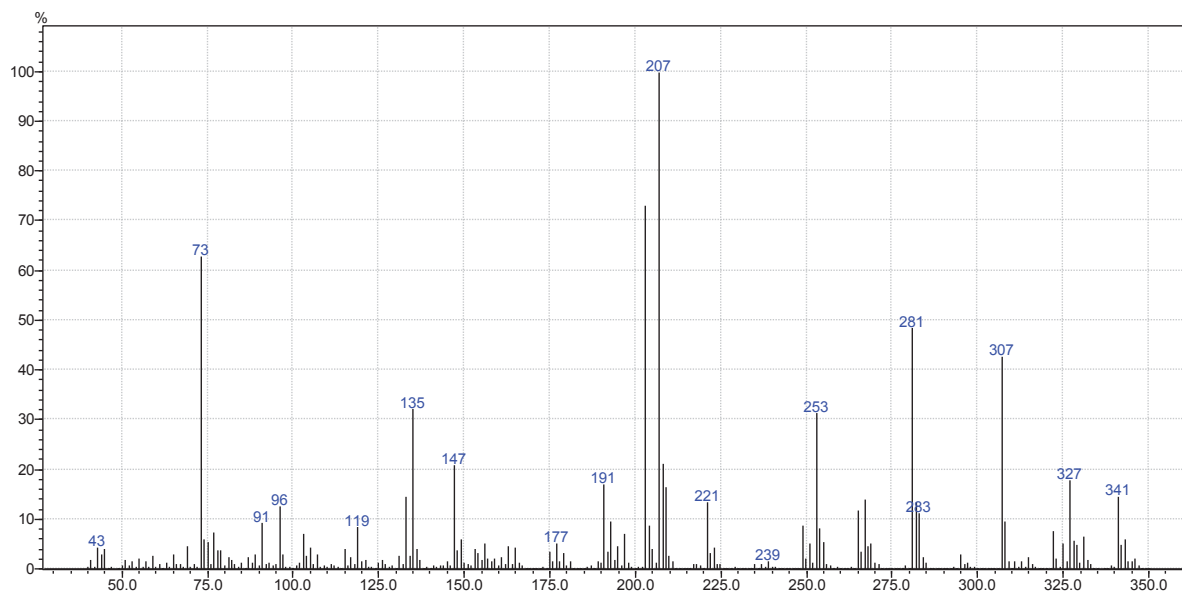
E 22: Experimentos de NOE 1D (9,4 Tesla) em CDCl_3 de **S16**.



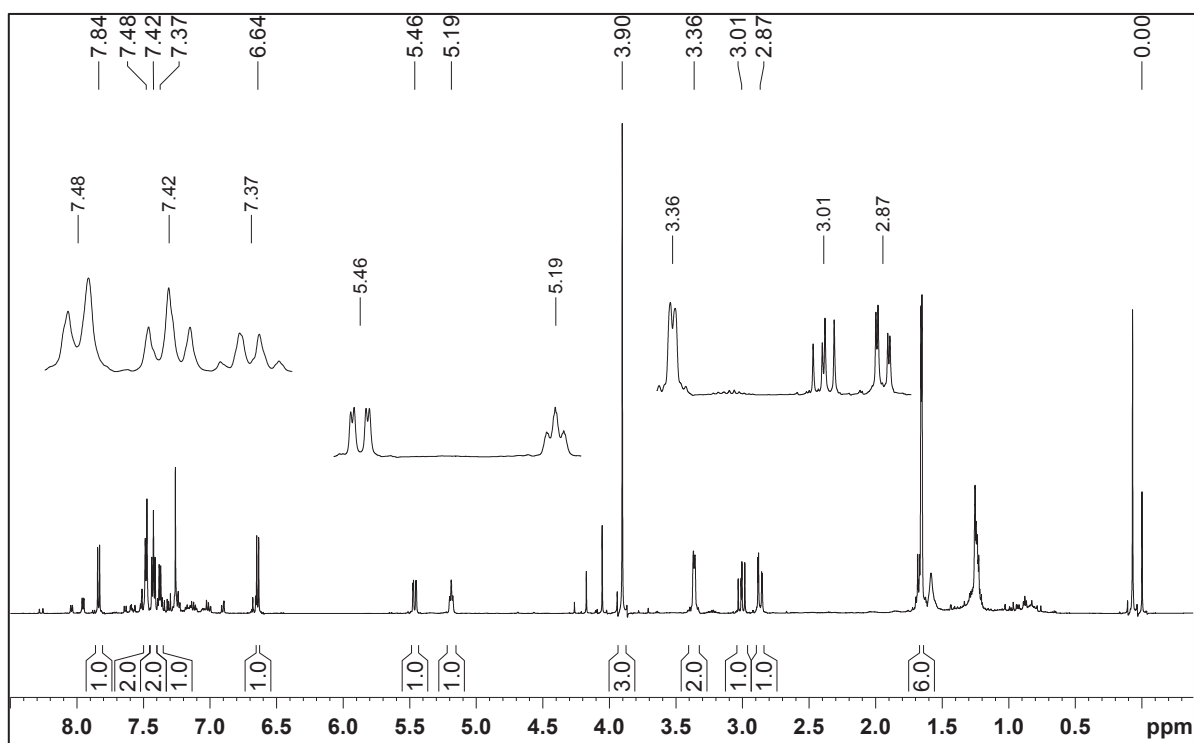
E 23: Espectro de massas de baixa resolução de **S16**.



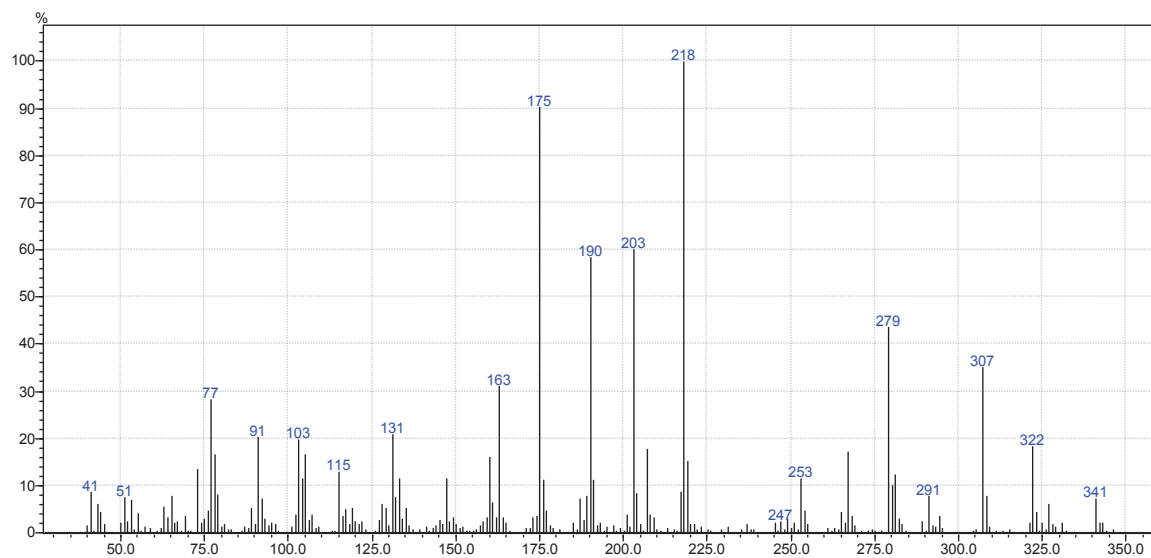
E 24: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S6**.



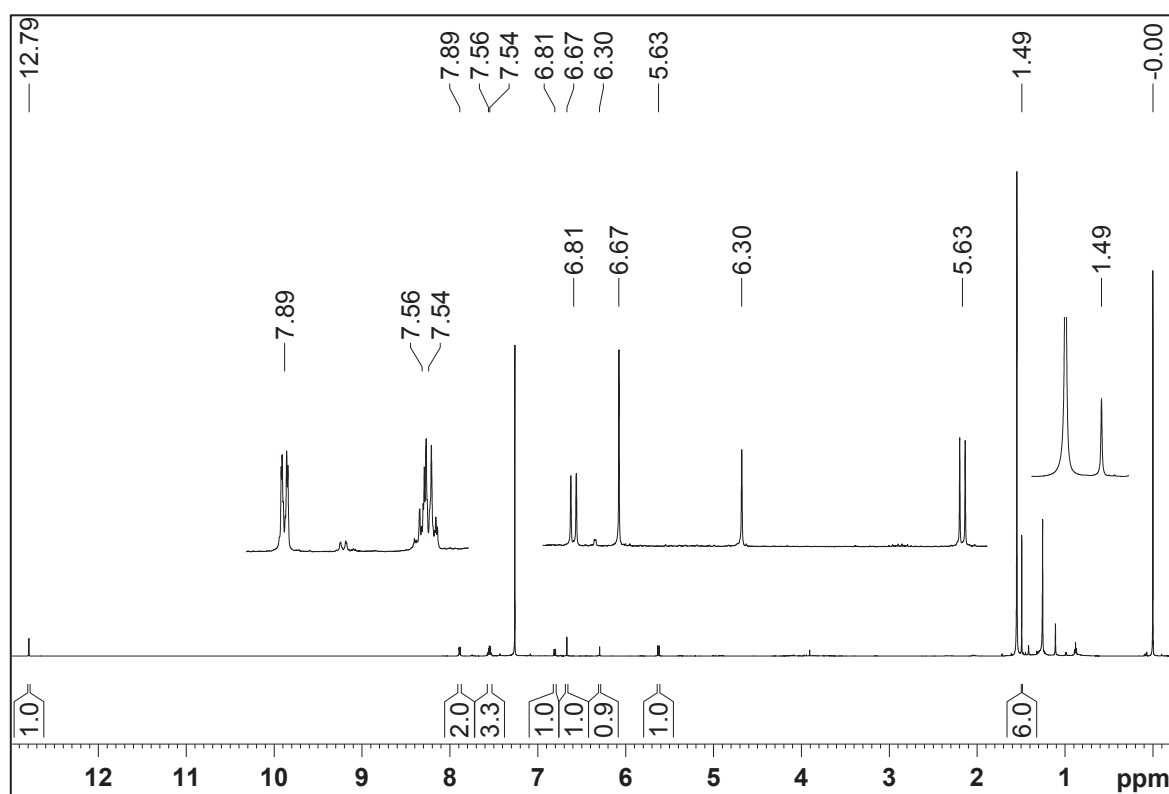
E 25: Espectro de massas de baixa resolução de S6.



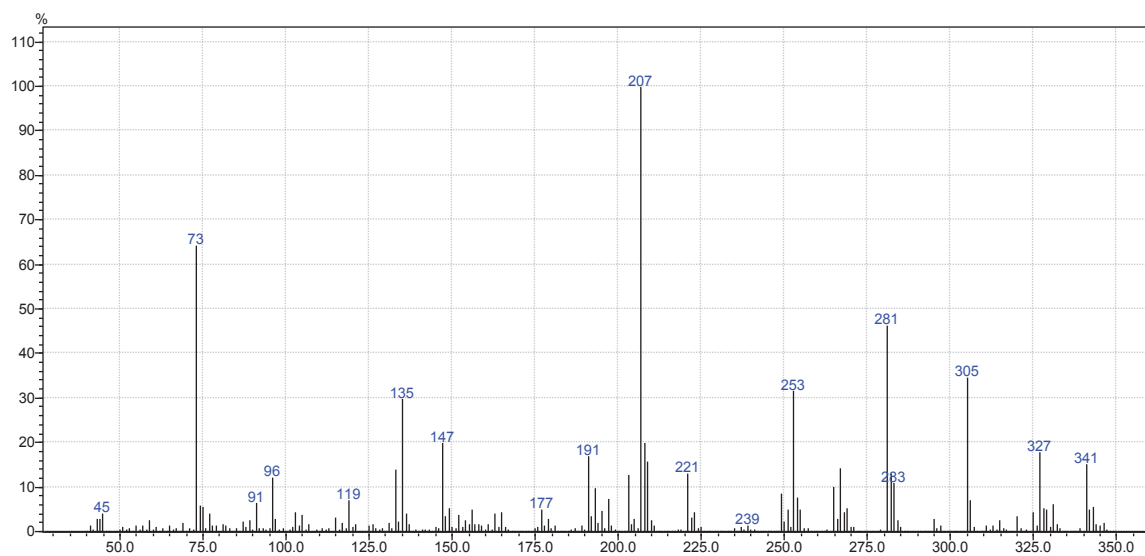
E 26: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S8.



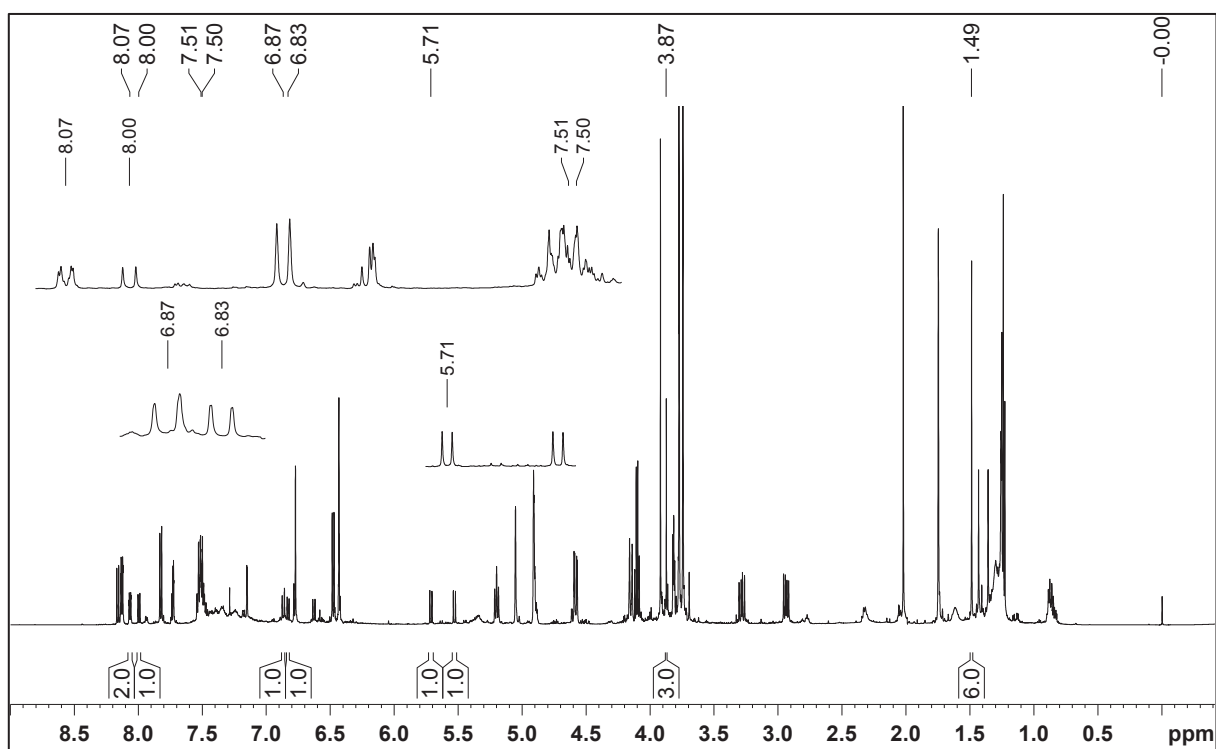
E 27: Espectro de massas de baixa resolução de S8.



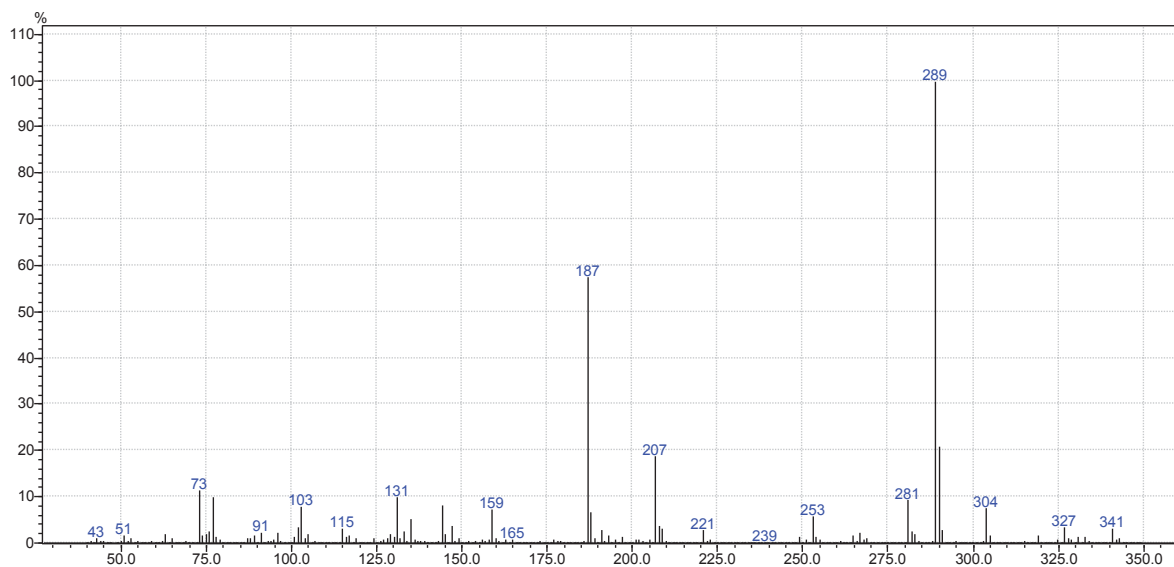
E 28: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S9.



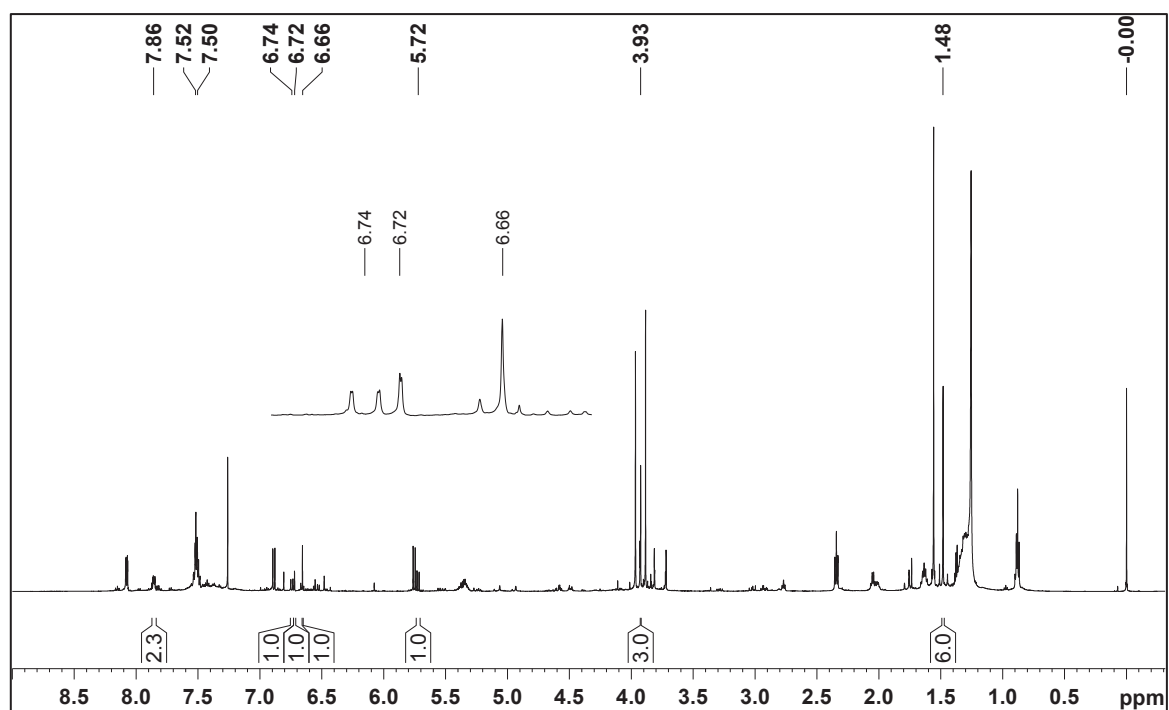
E 29: Espectro de massas de baixa resolução de **S9**.



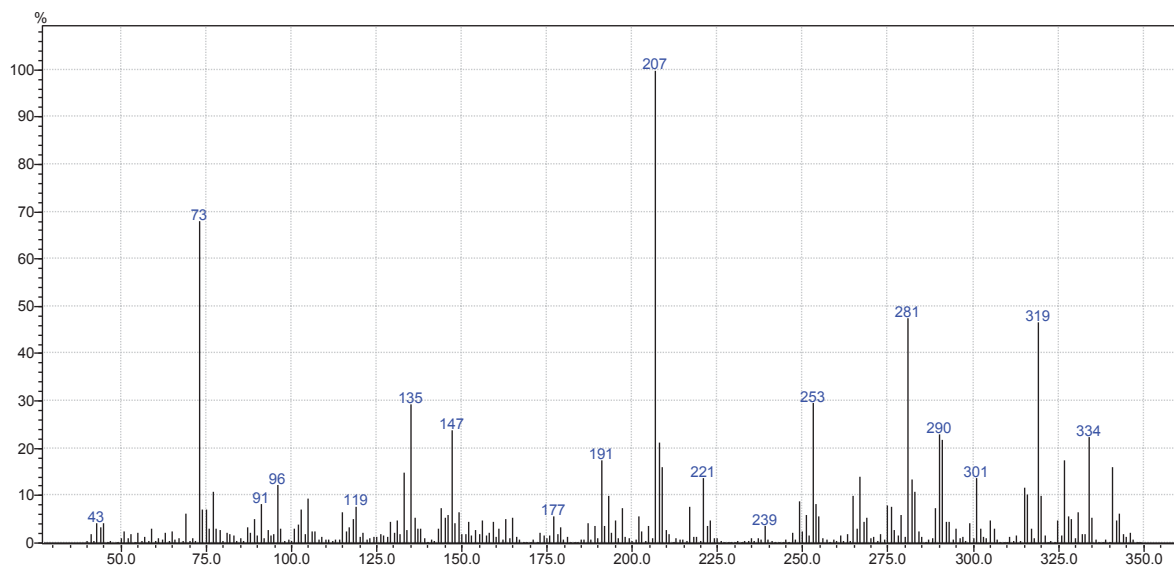
E 30: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S13**.



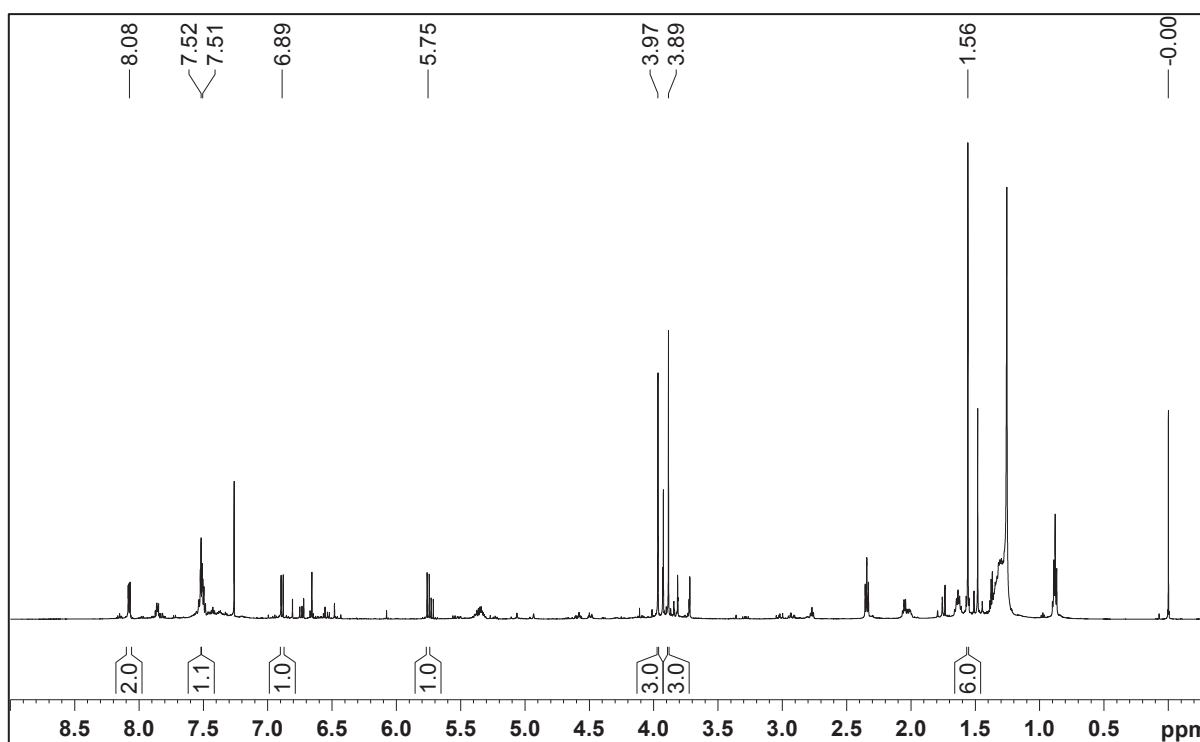
E 31: Espectro de massas de baixa resolução de S15.



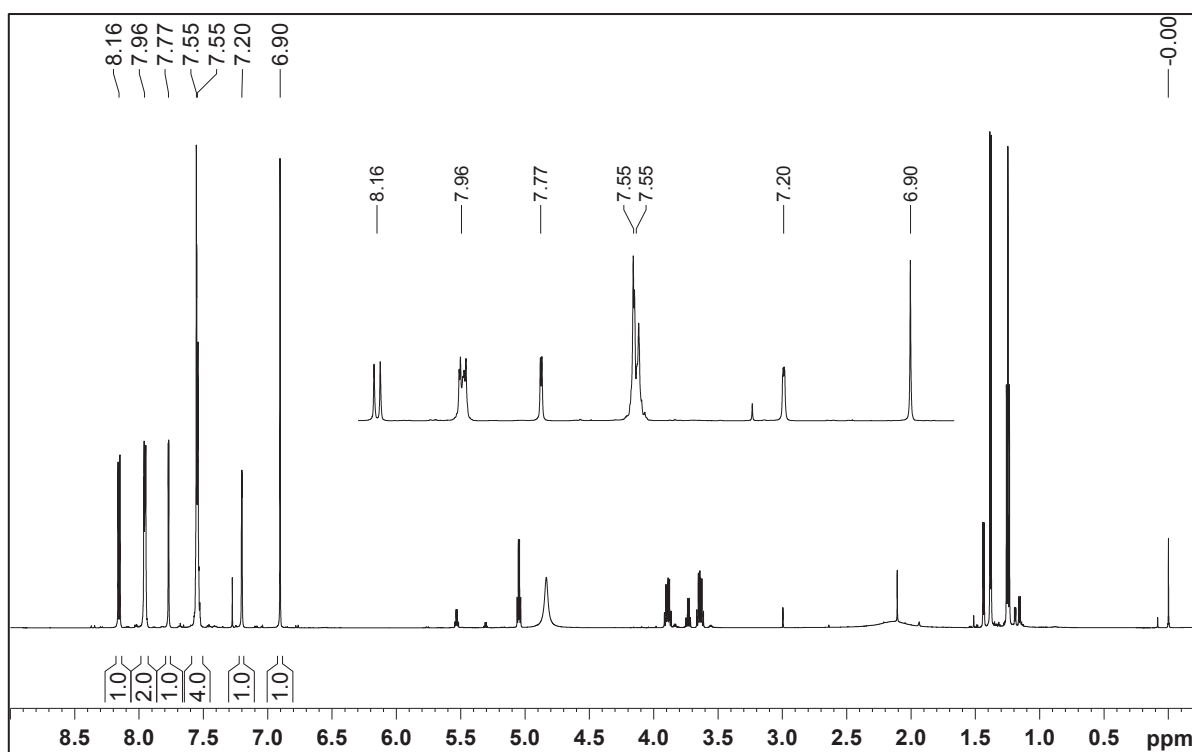
E 32: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S42.



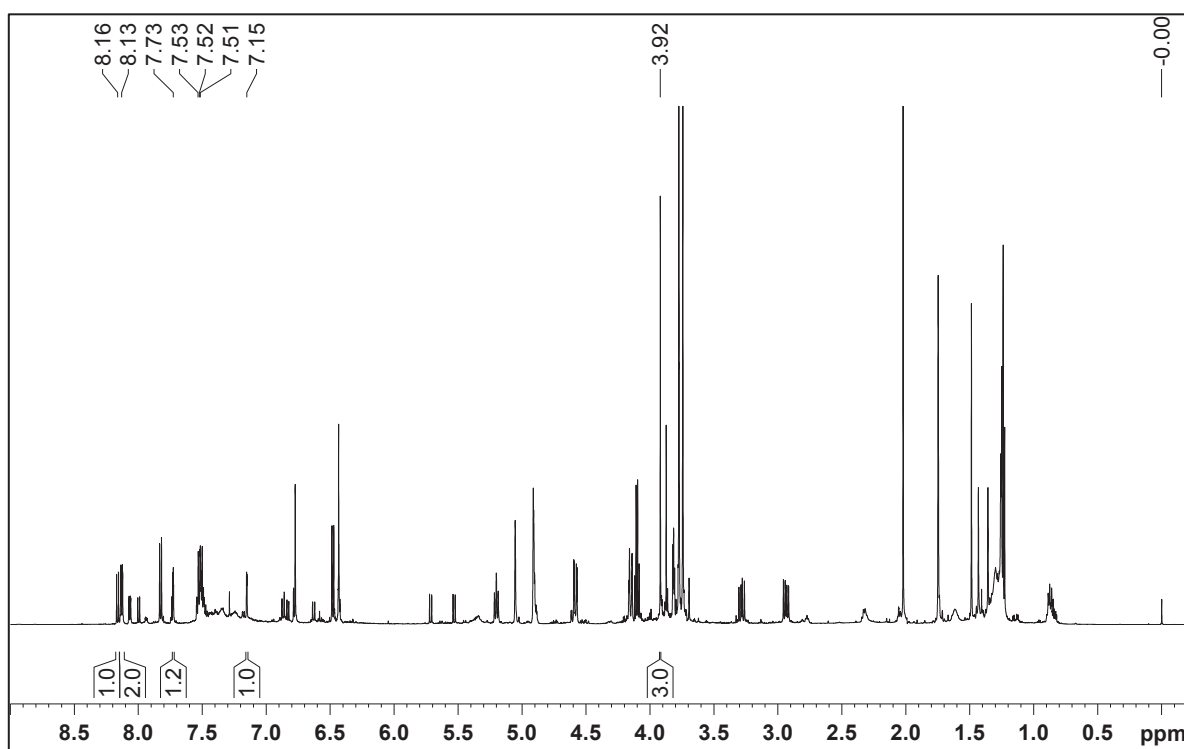
E 33: Espectro de massas de baixa resolução de S42.



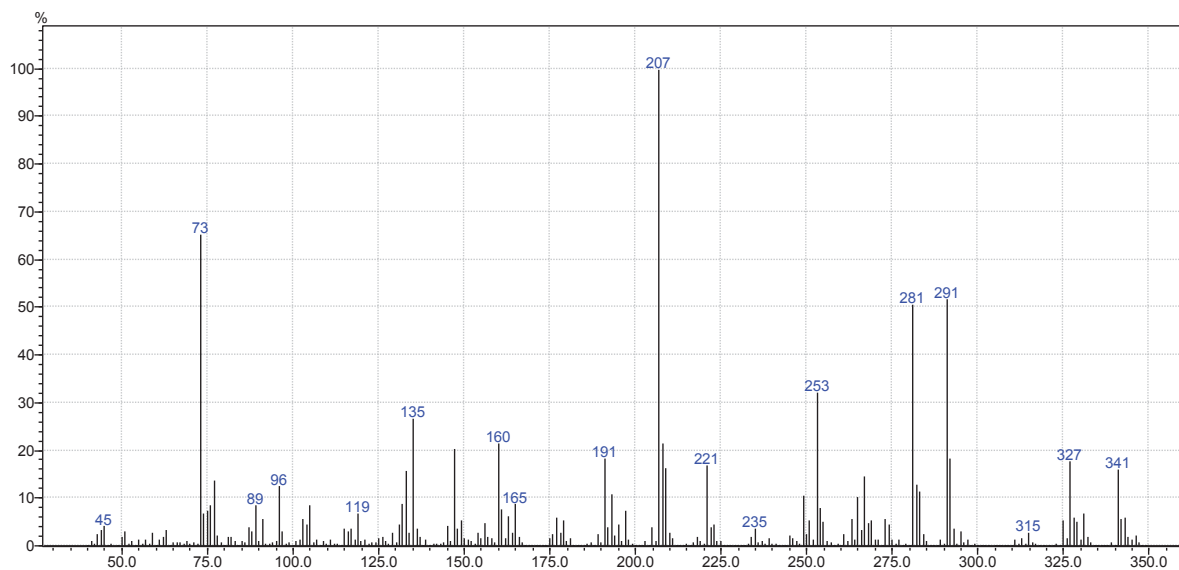
E 34: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de S29.



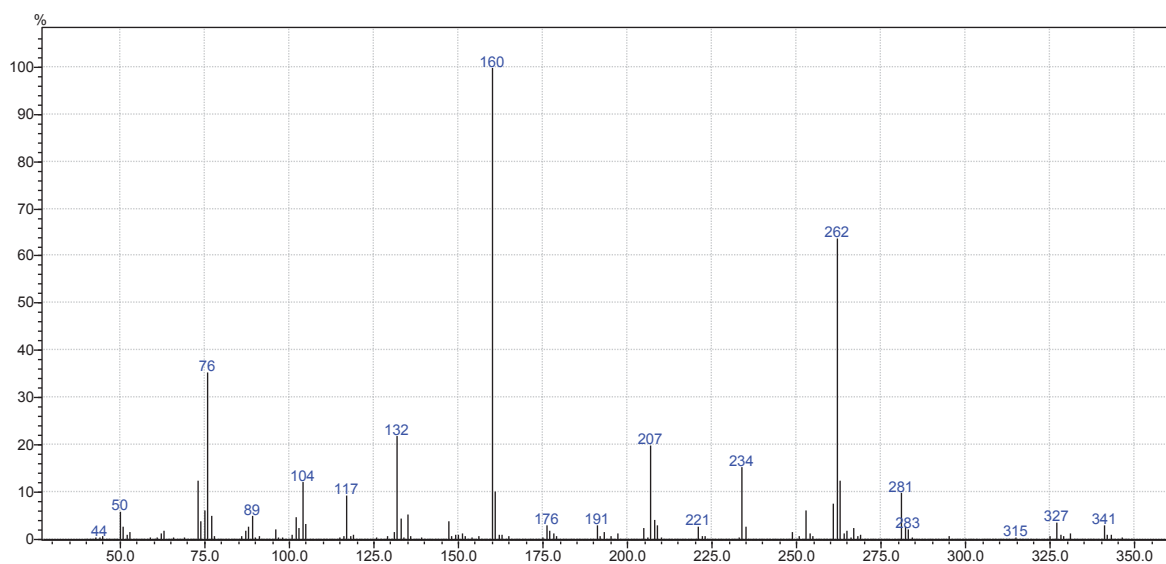
E 35: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S14**.



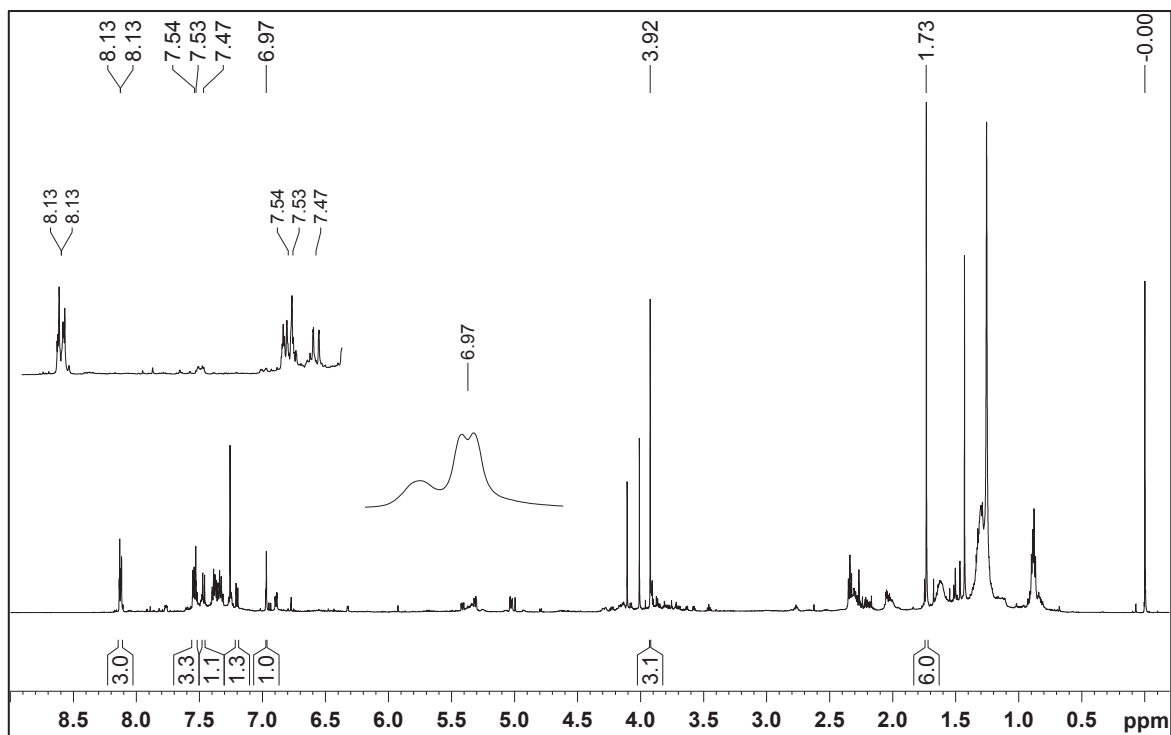
E 36: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S12**.



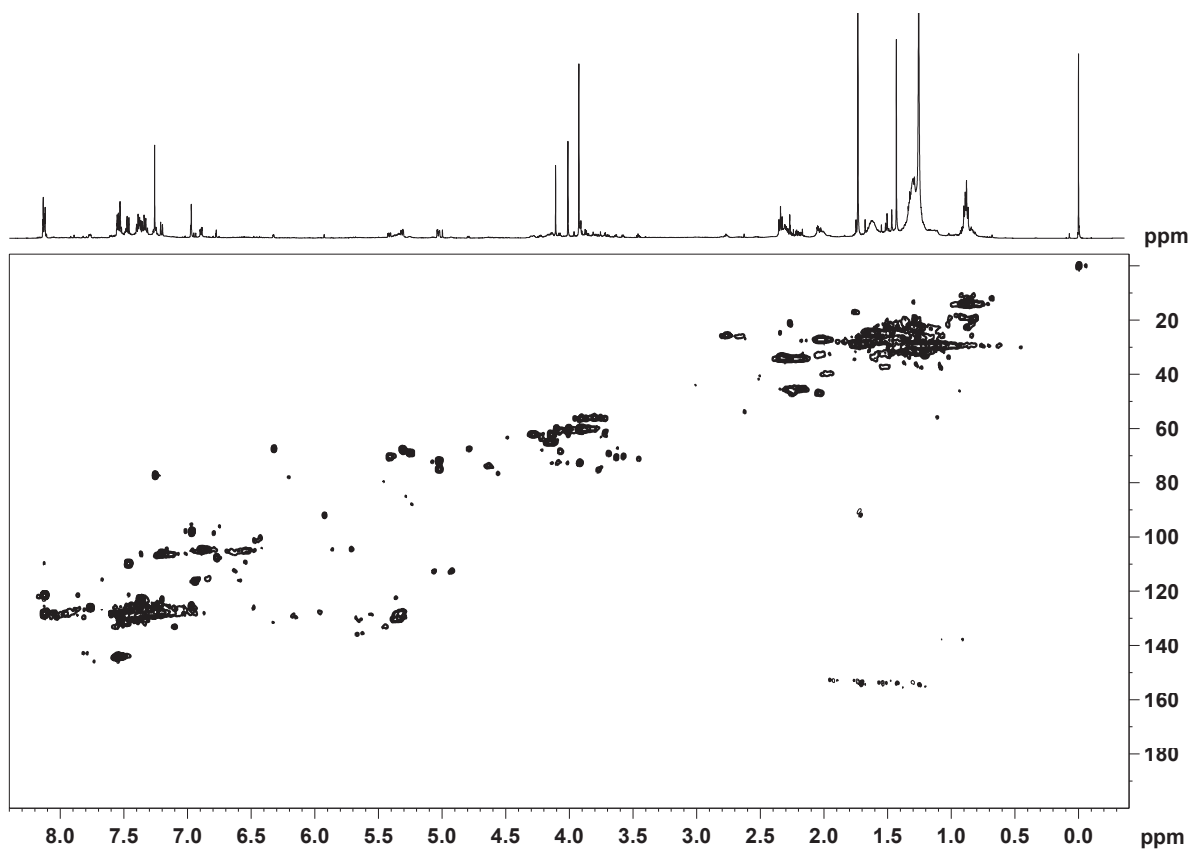
E 37: Espectro de massas de baixa resolução de **S12**.



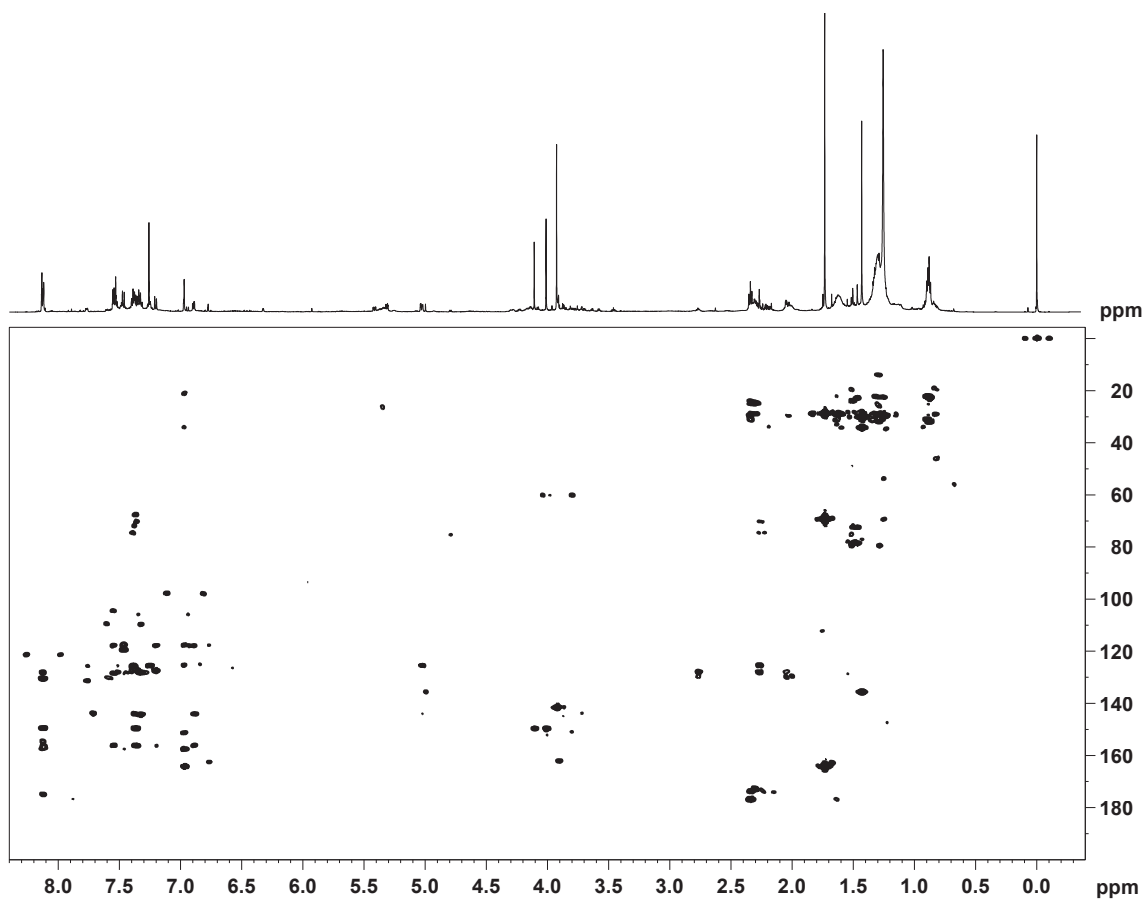
E 38: Espectro de massas de baixa resolução de **S14**.



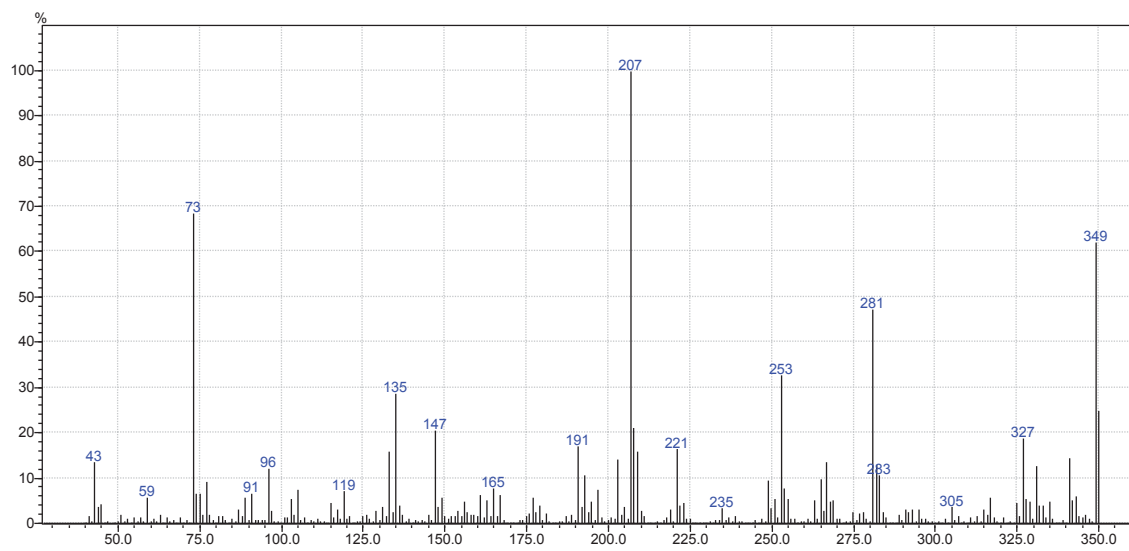
E 39: Espectro de RMN de ¹H (14,1 Tesla) em CDCl₃ de S27.



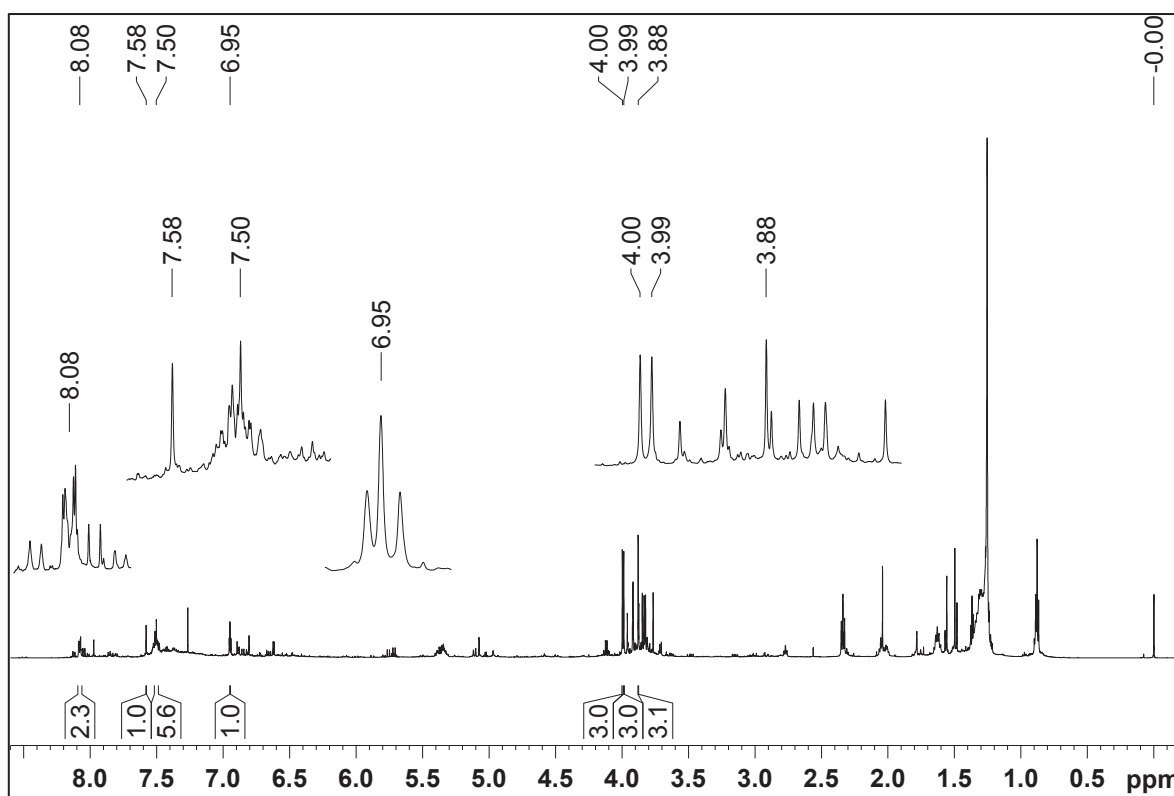
E 40: Mapa de correlação direta ¹H-¹³C (14,1 Tesla) em CDCl₃ de S27.



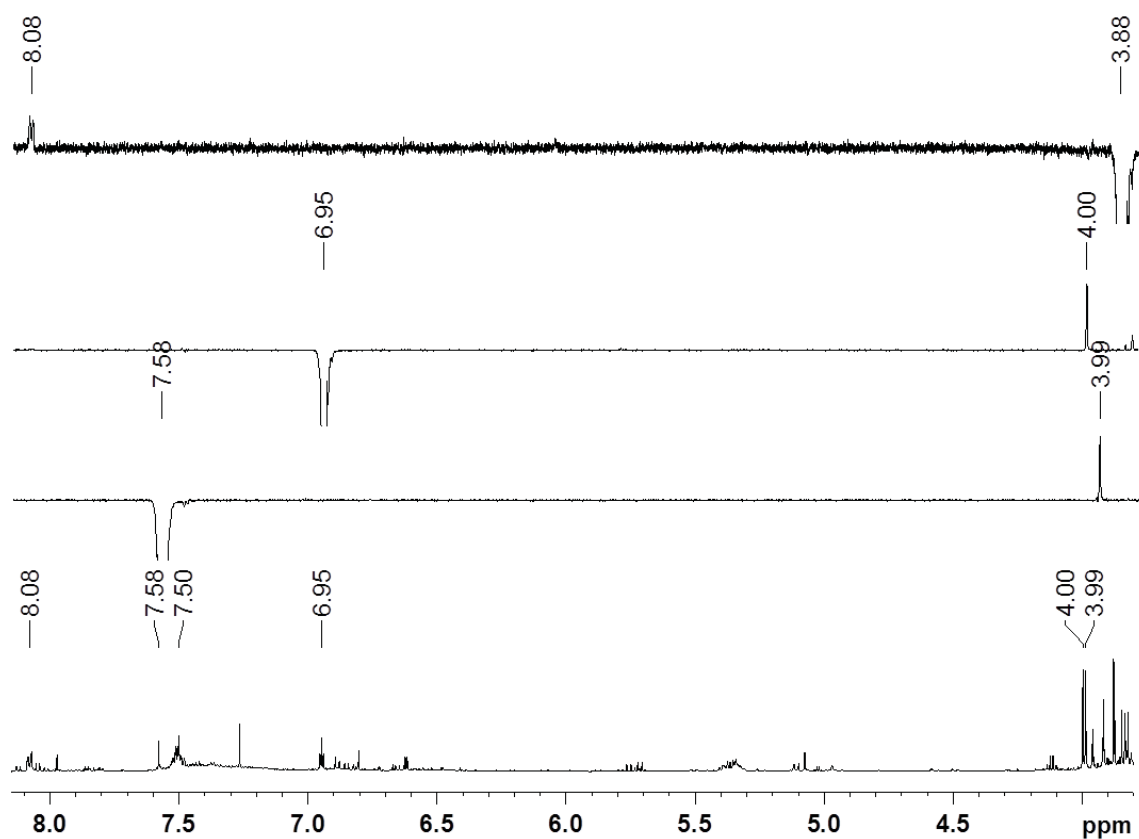
E 41: Mapa de correlação ¹H-¹³C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl₃ de **S27**.



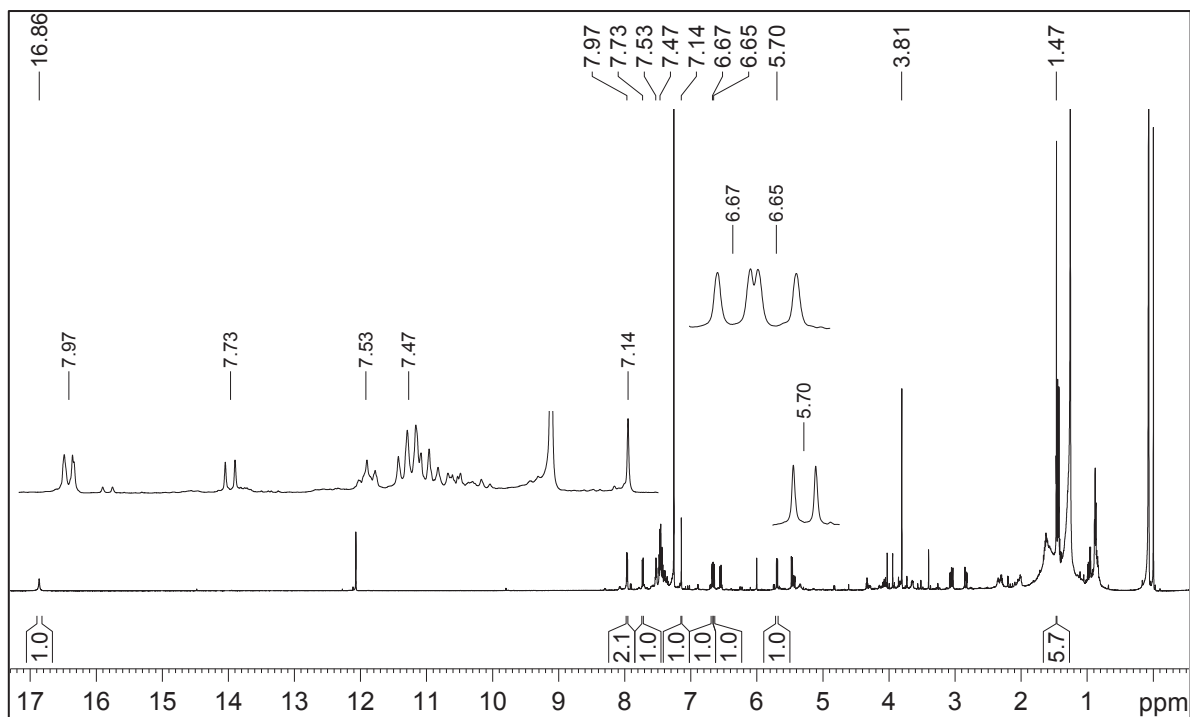
E 42: Espectro de massas de baixa resolução de **S27**.



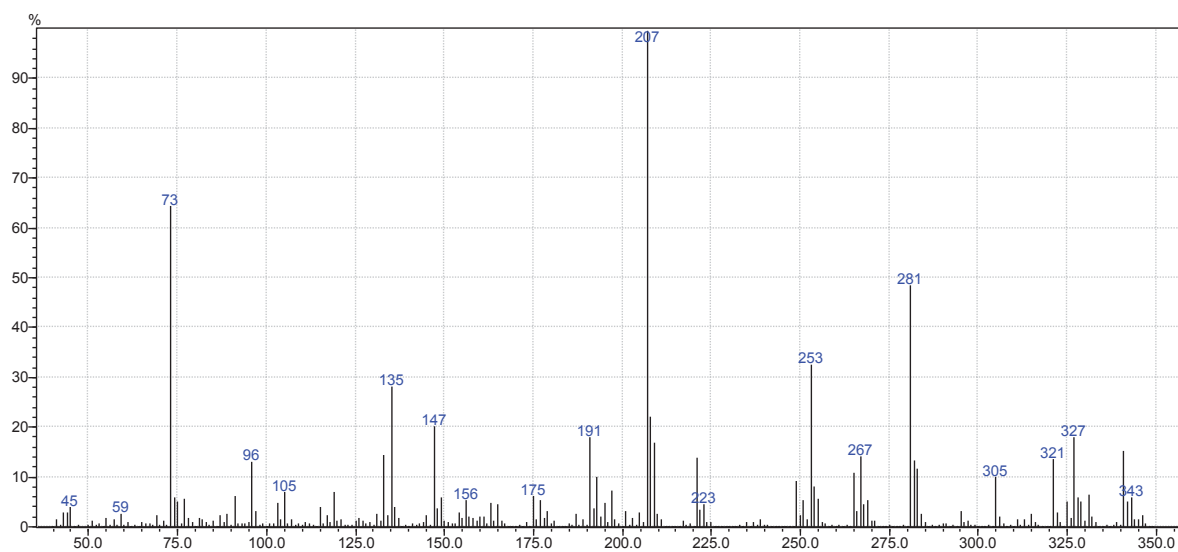
E 43: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S30**.



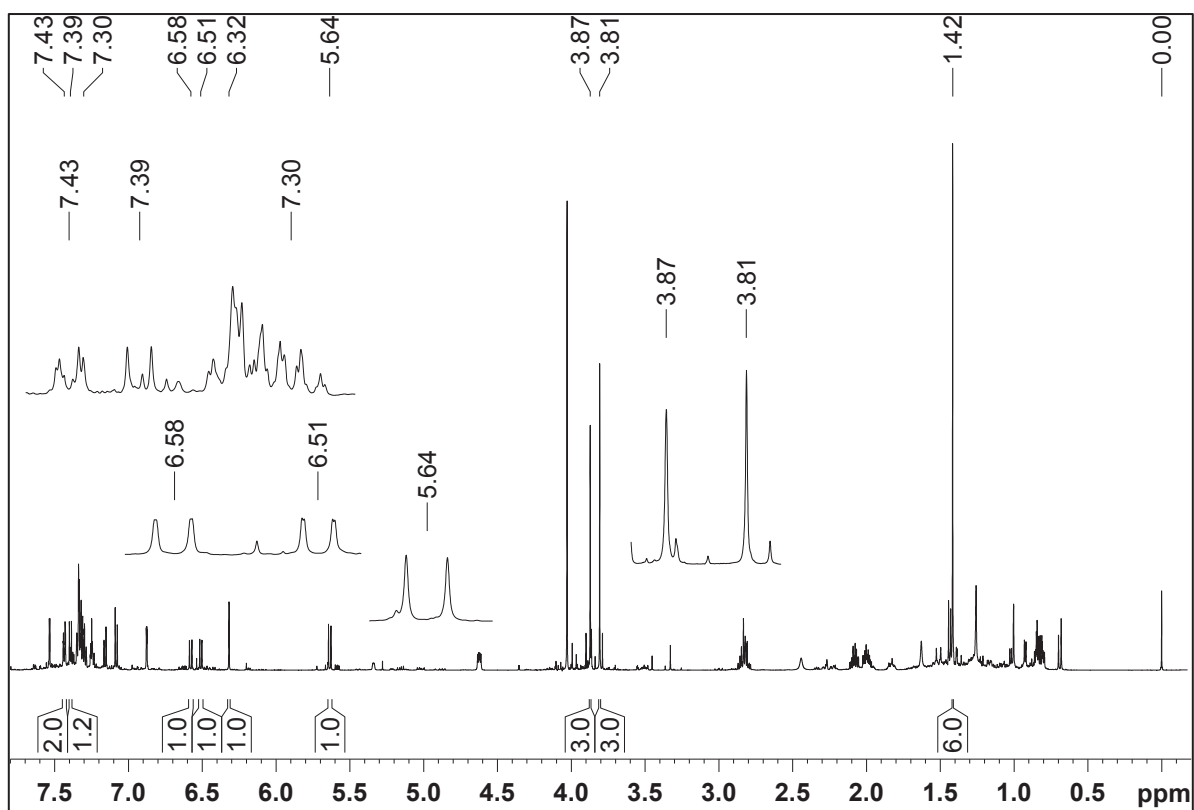
E 44: Experimentos de NOE 1D (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S30**.



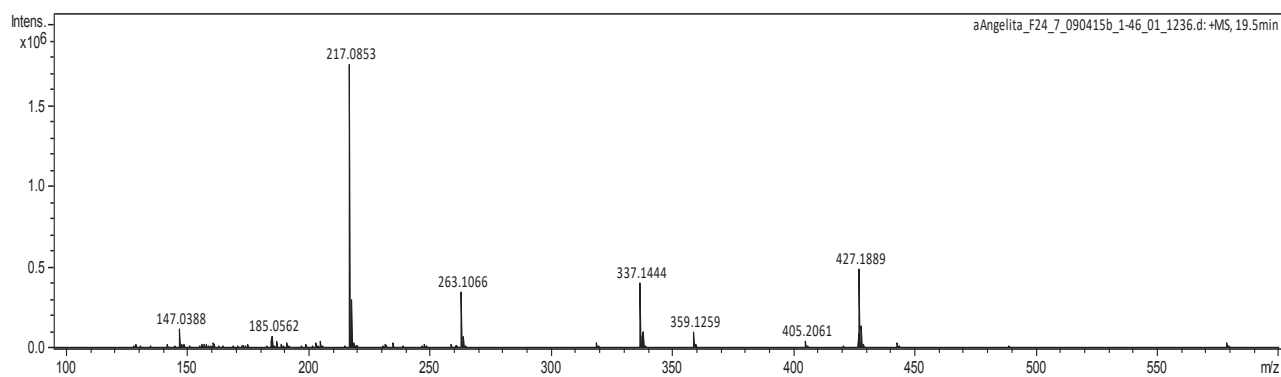
E 45: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S5**.



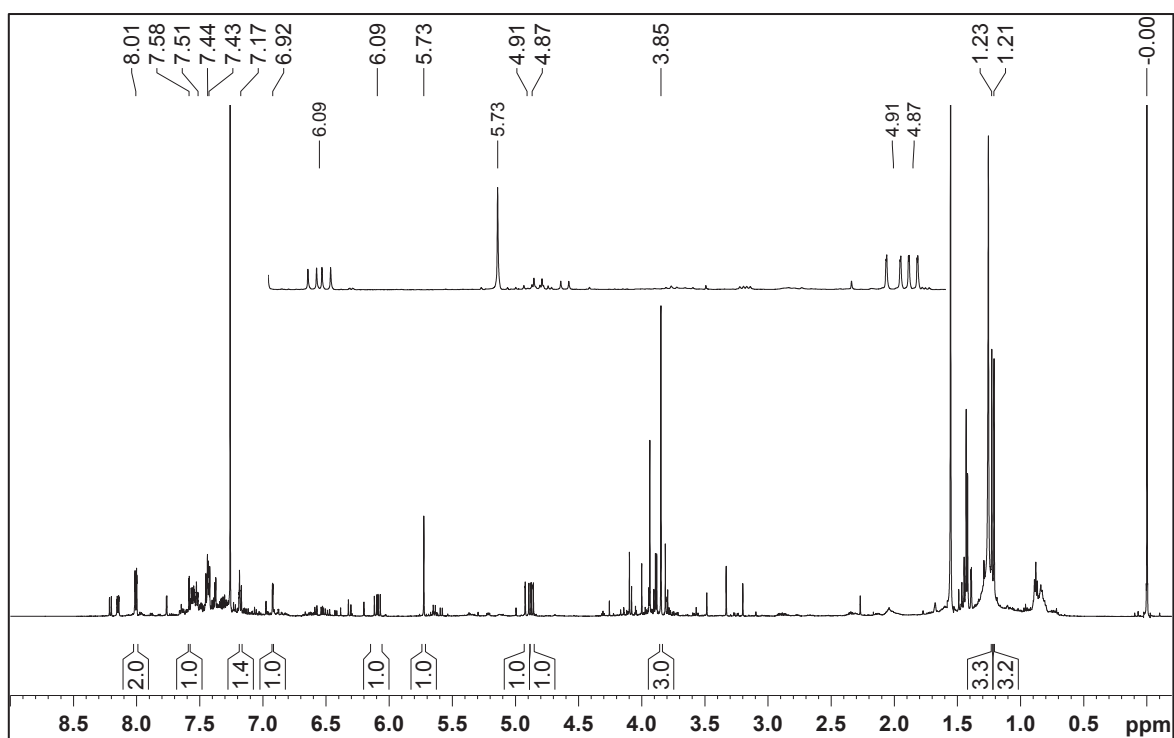
E 46: Espectro de massas de baixa resolução de **S5**.



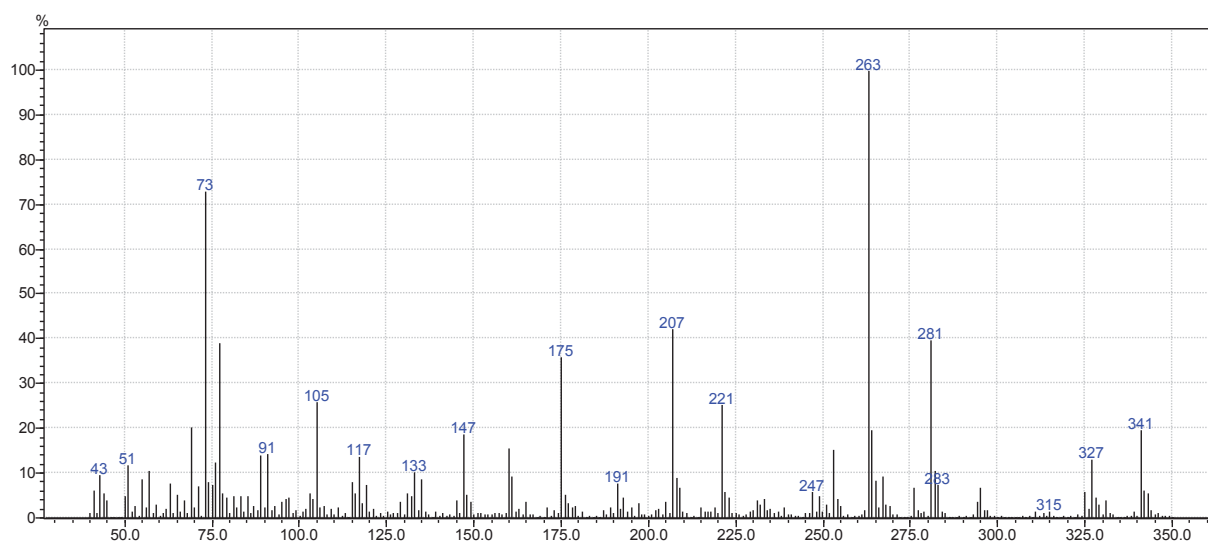
E 47: Espectro de RMN de ¹H (14,1 Tesla) em CDCl₃ de S32.



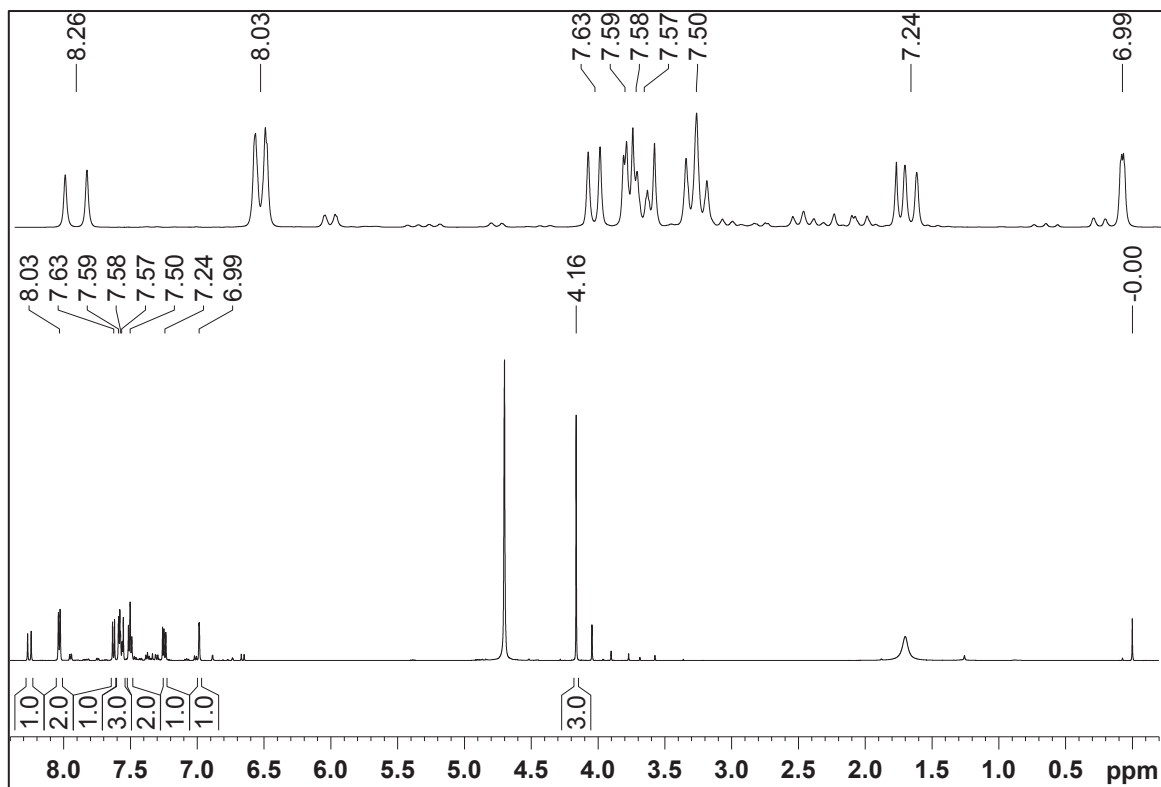
E 48: Espectro de massas de alta resolução de S41.



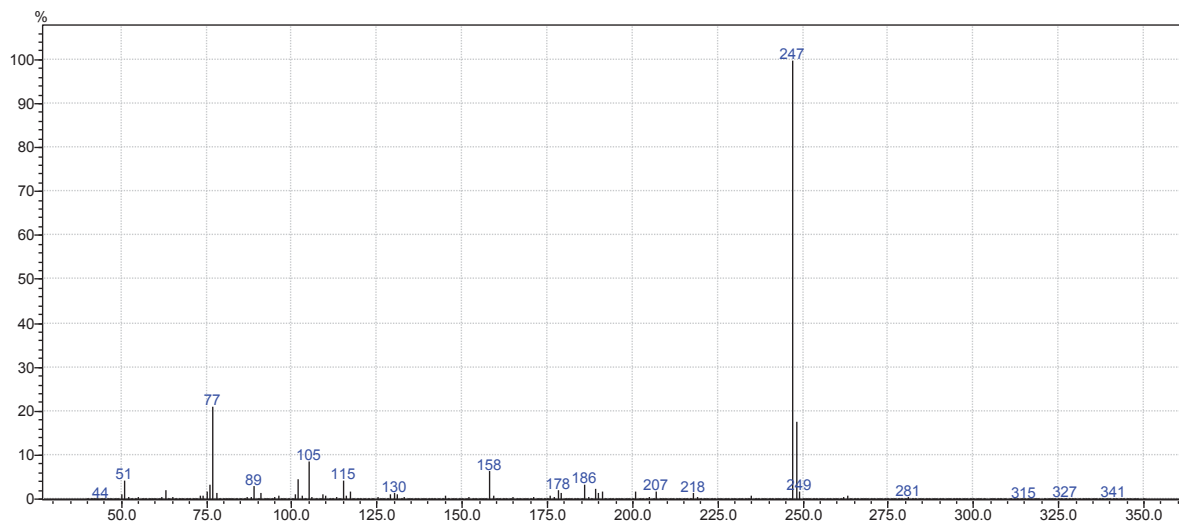
E 49: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S10**.



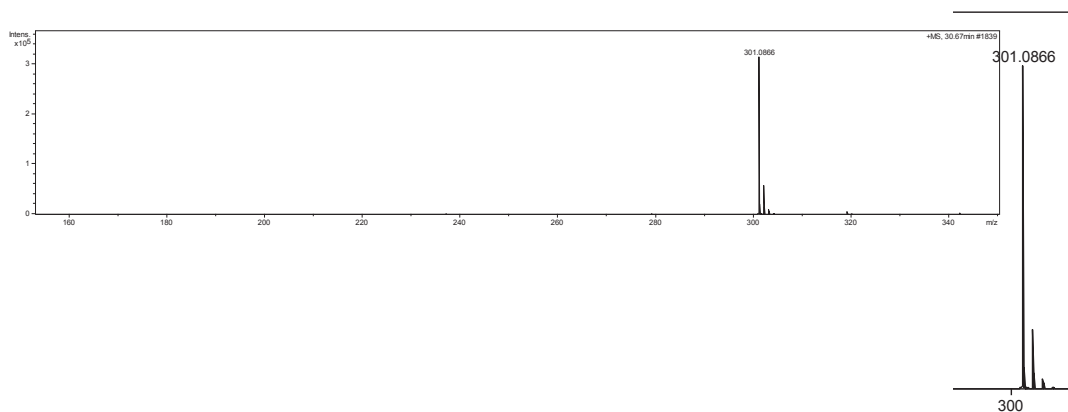
E 50: Espectro de massas de baixa resolução de **S22**.

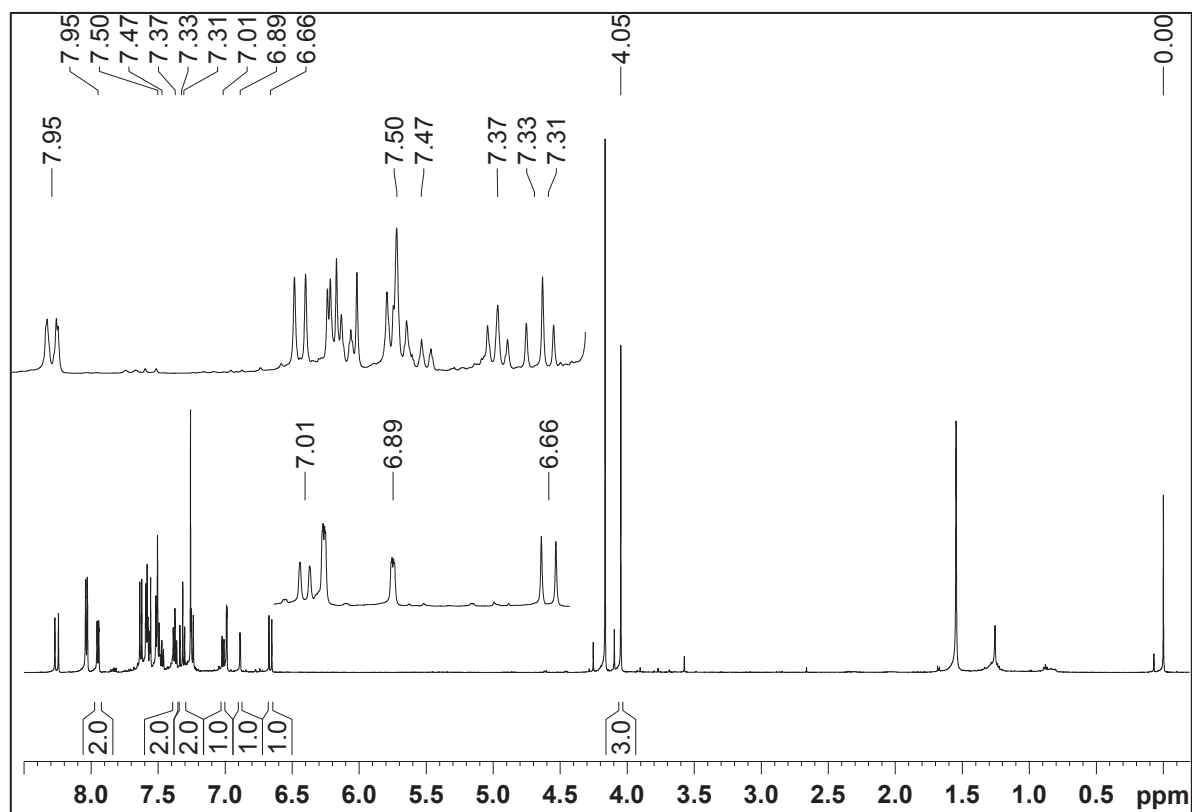
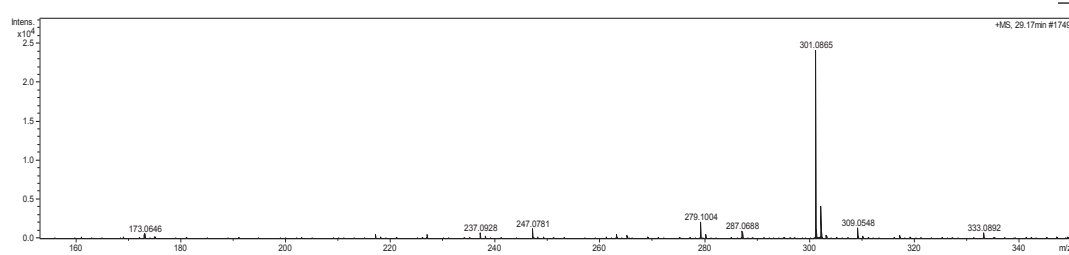
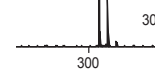


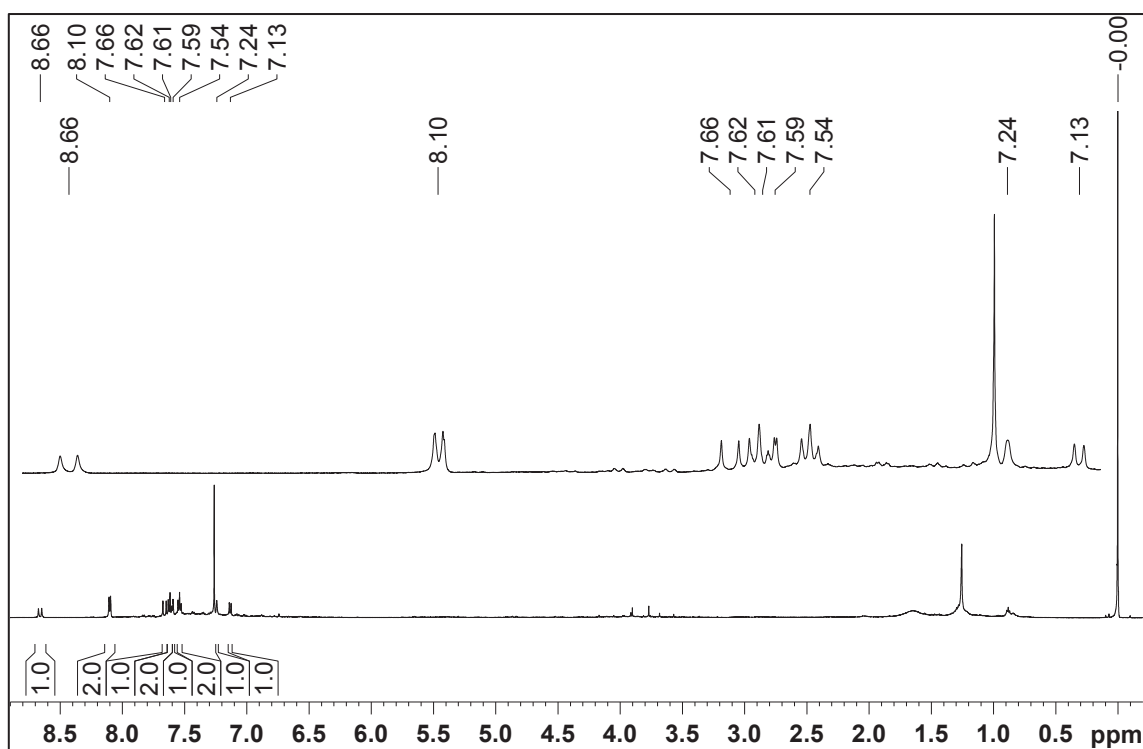
E 51: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S20**.



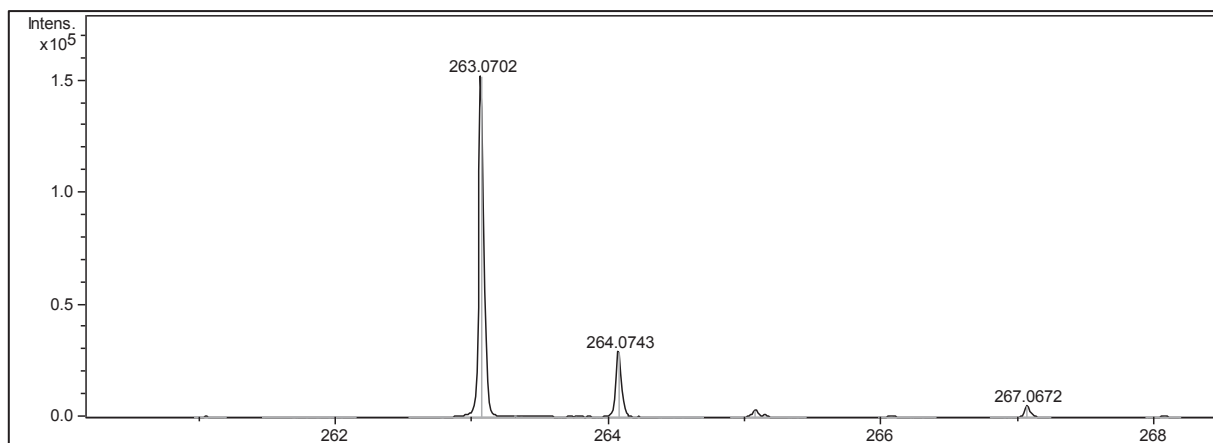
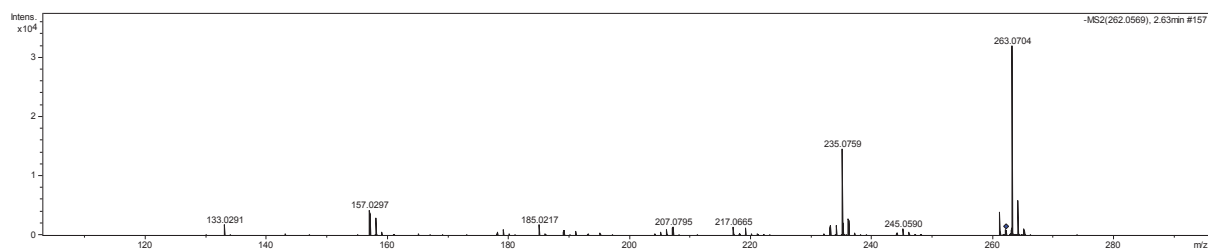
E 52: Espectro de massas de baixa resolução de **S20**.



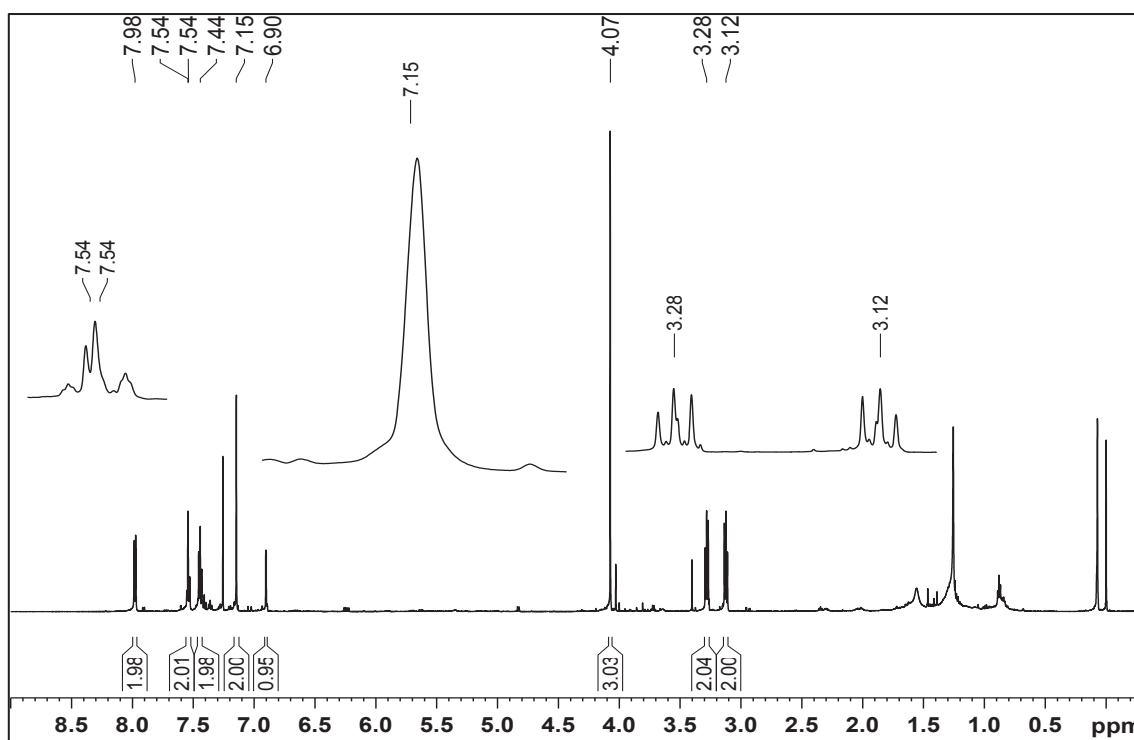
E 53: Espectro de massas de alta resolução de **S20**.**E 54:** Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S21**.**E 55:** Espectro de massas de alta resolução de **S21**.



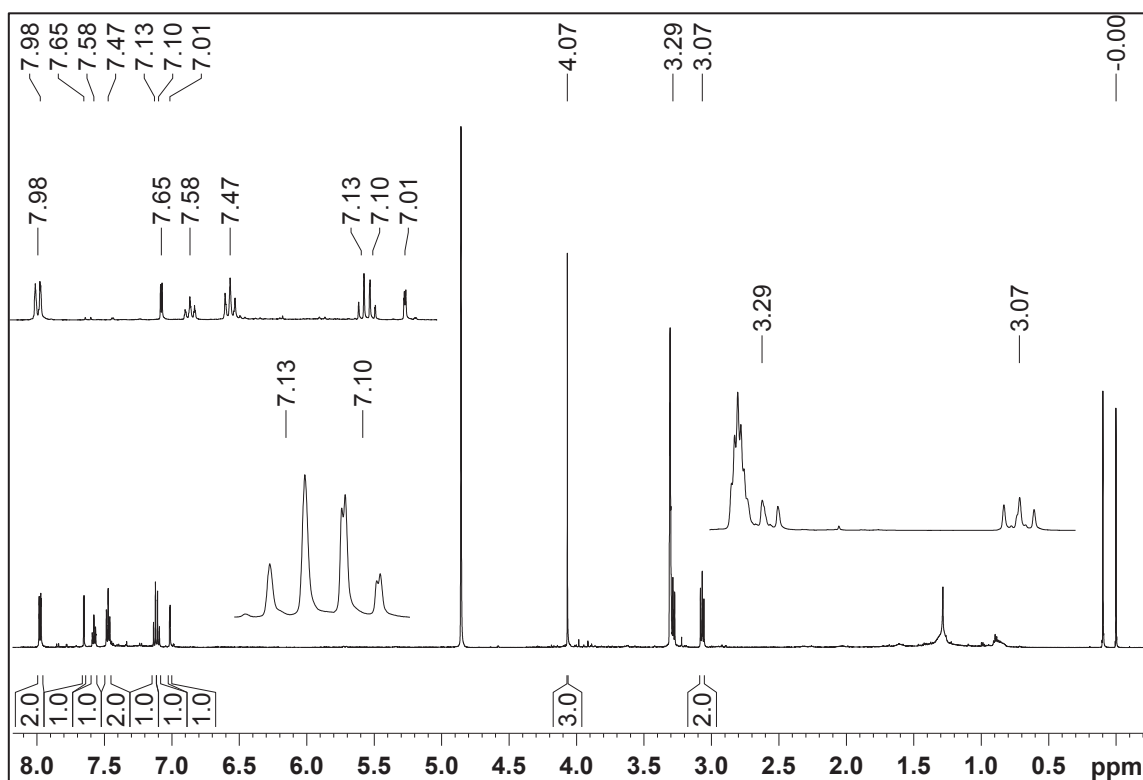
E 56: Espectro de RMN de ¹H (14,1 Tesla) em CDCl₃ de **S24**.



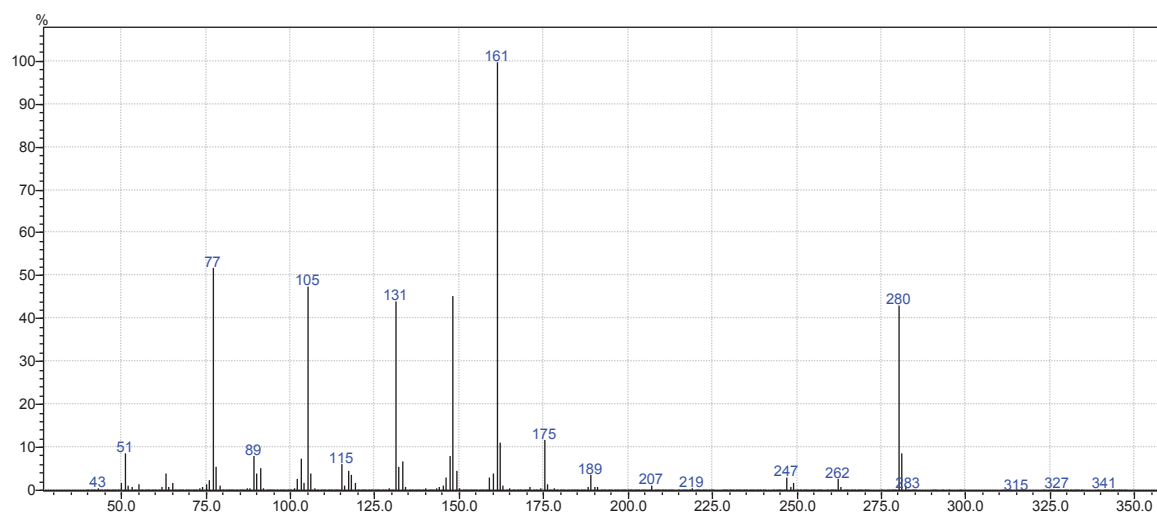
E 57: Espectro de massas de alta resolução de **S24**.



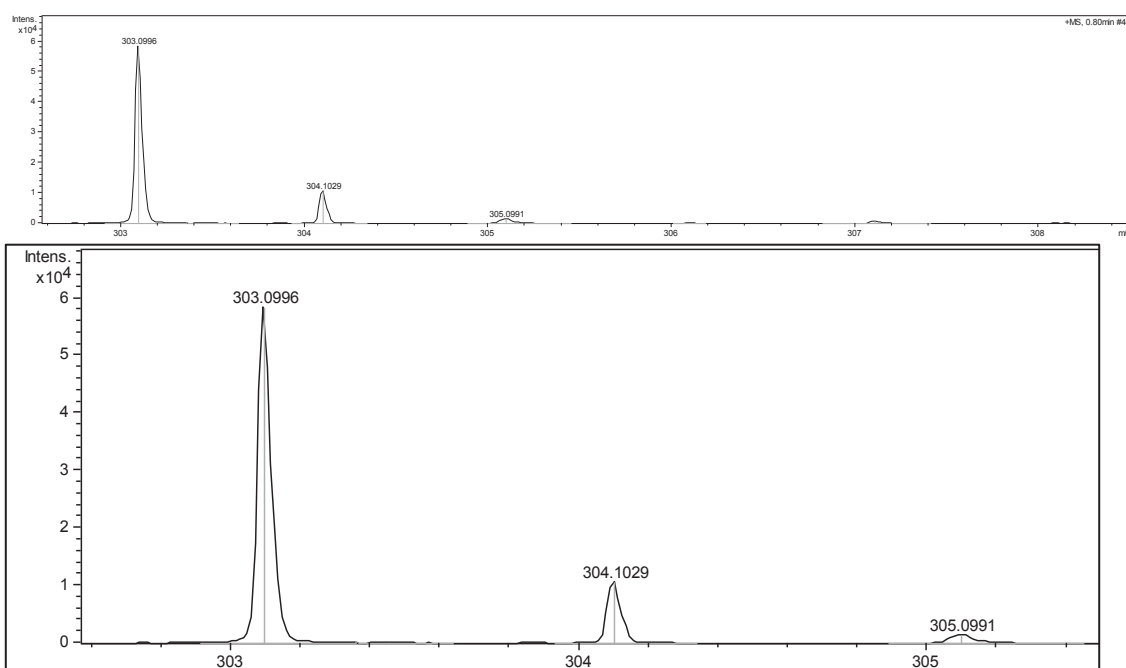
E 58: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S23**.



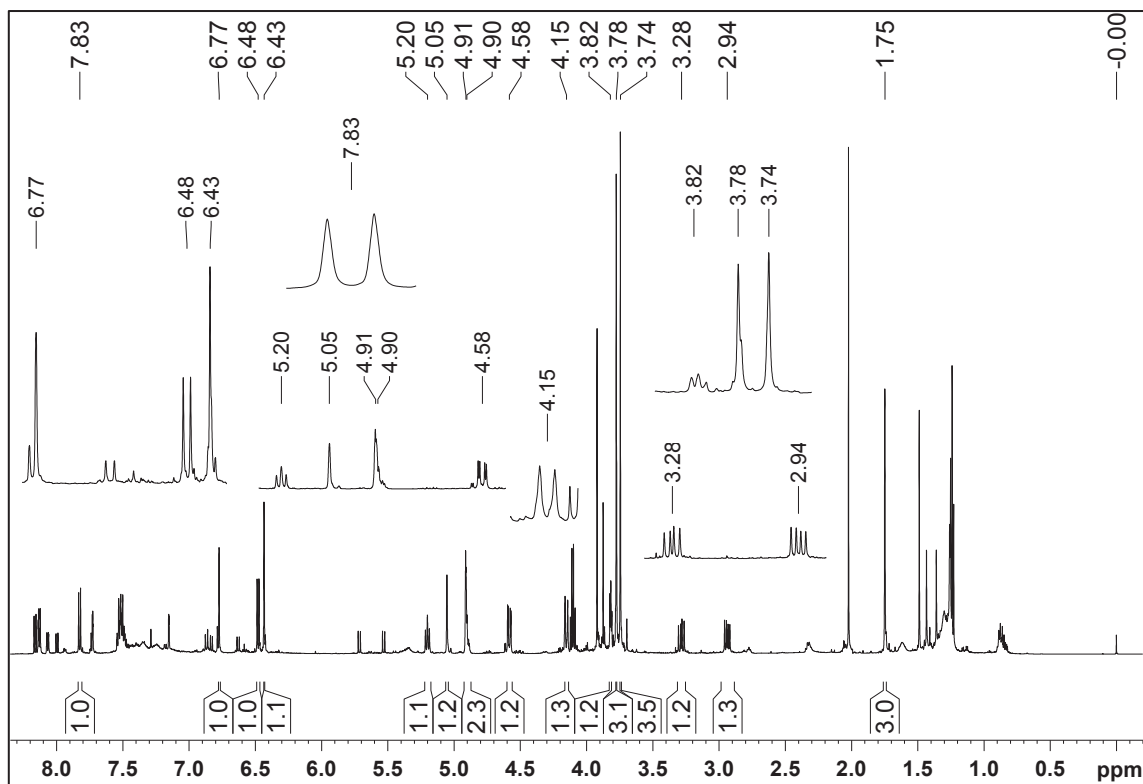
E 59: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em MeOD de **S23**.



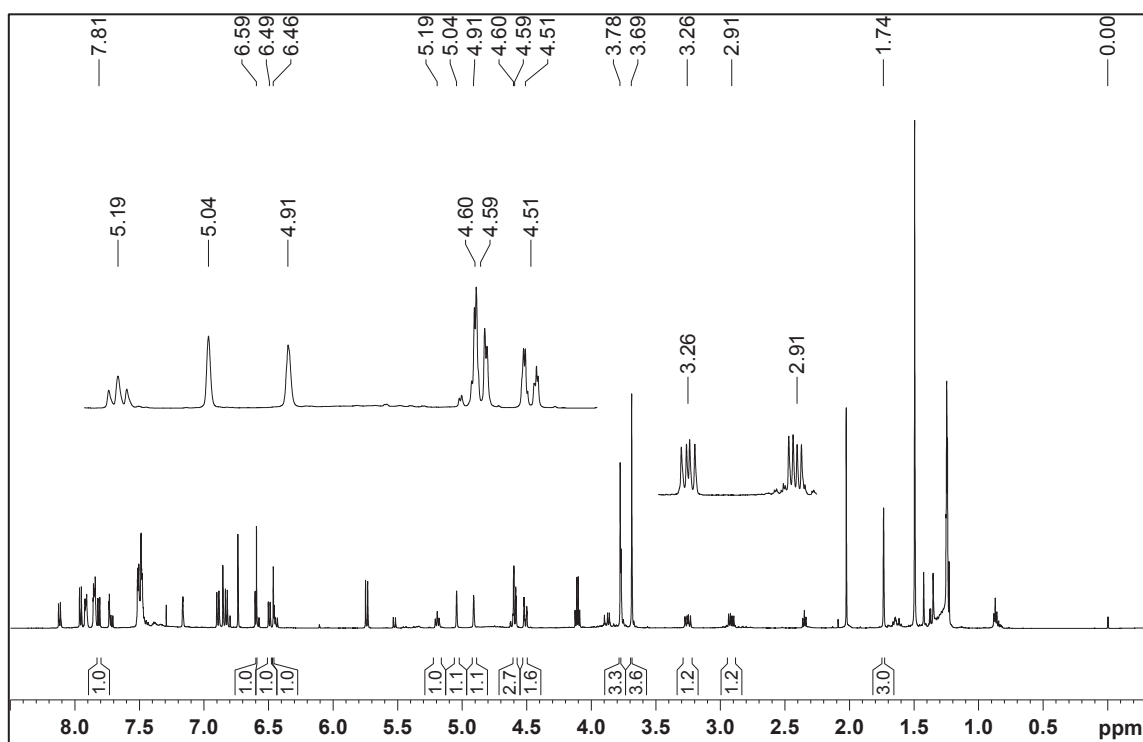
E 60: Espectro de massas de baixa resolução de S23.



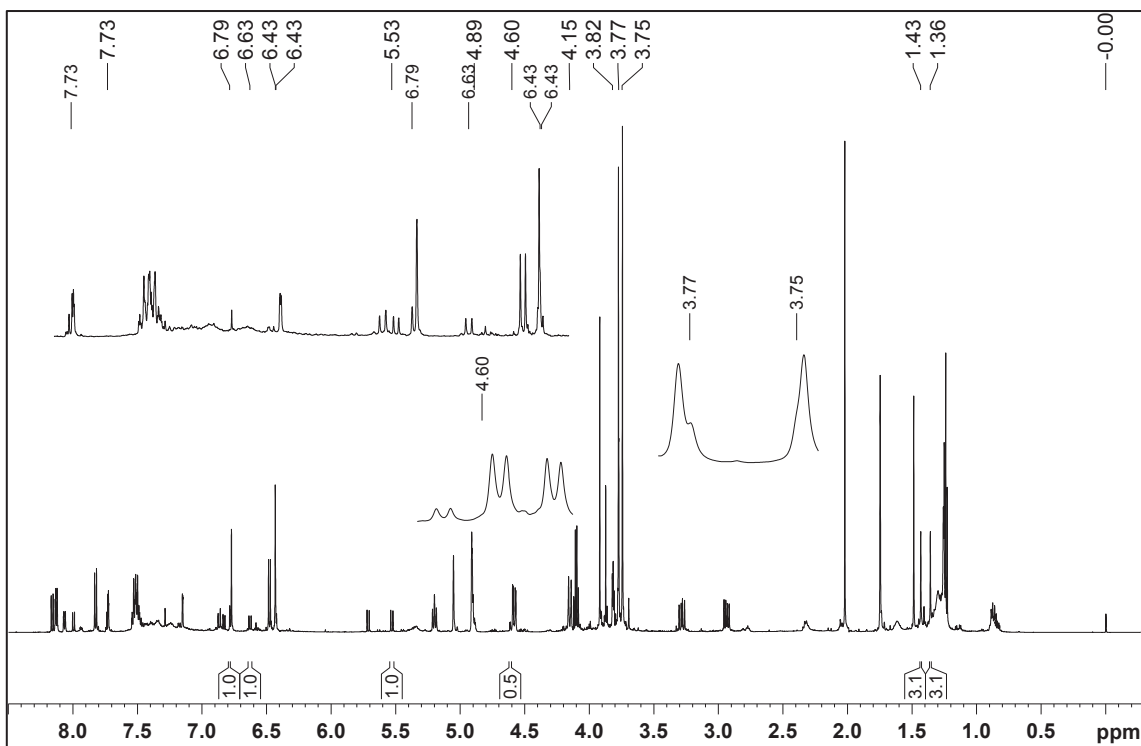
E 61: Espectro de massas de alta resolução de S23.



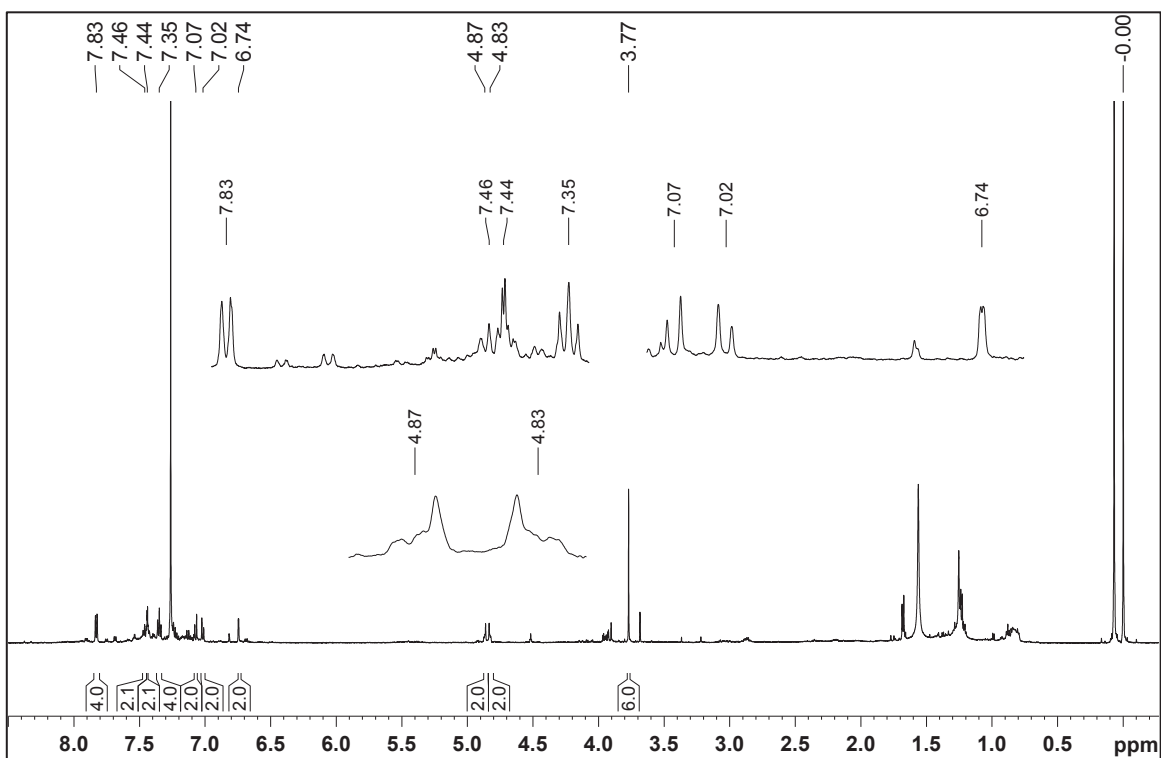
E 62: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S11**.



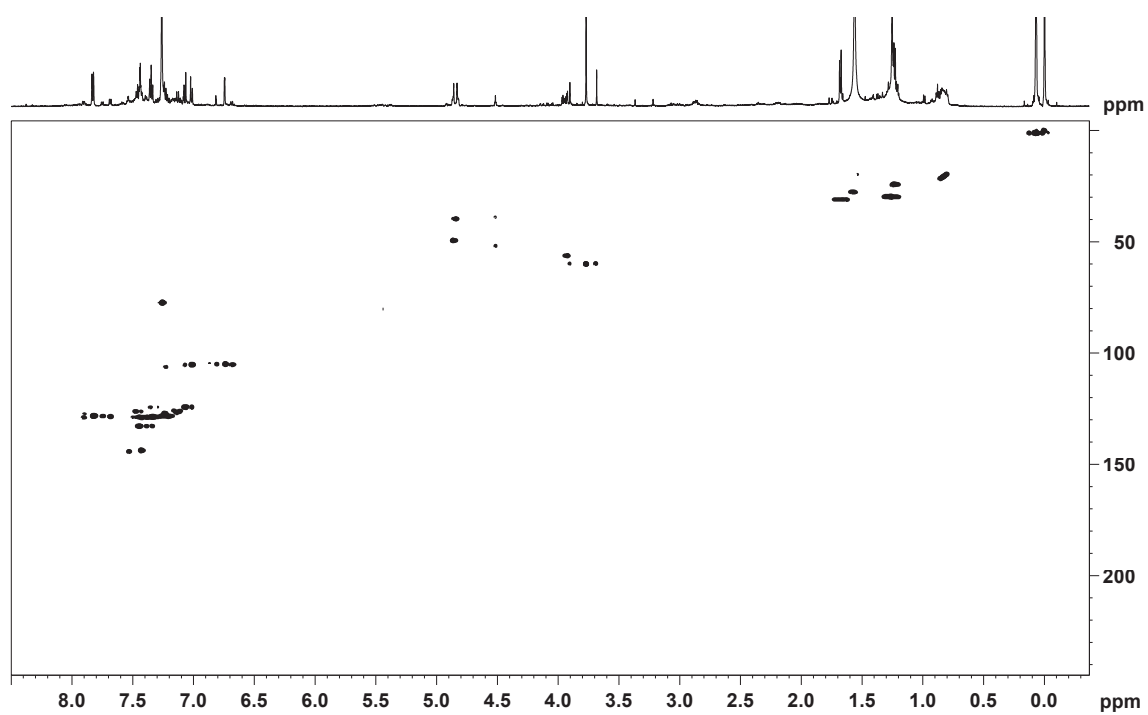
E 63: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S17**.



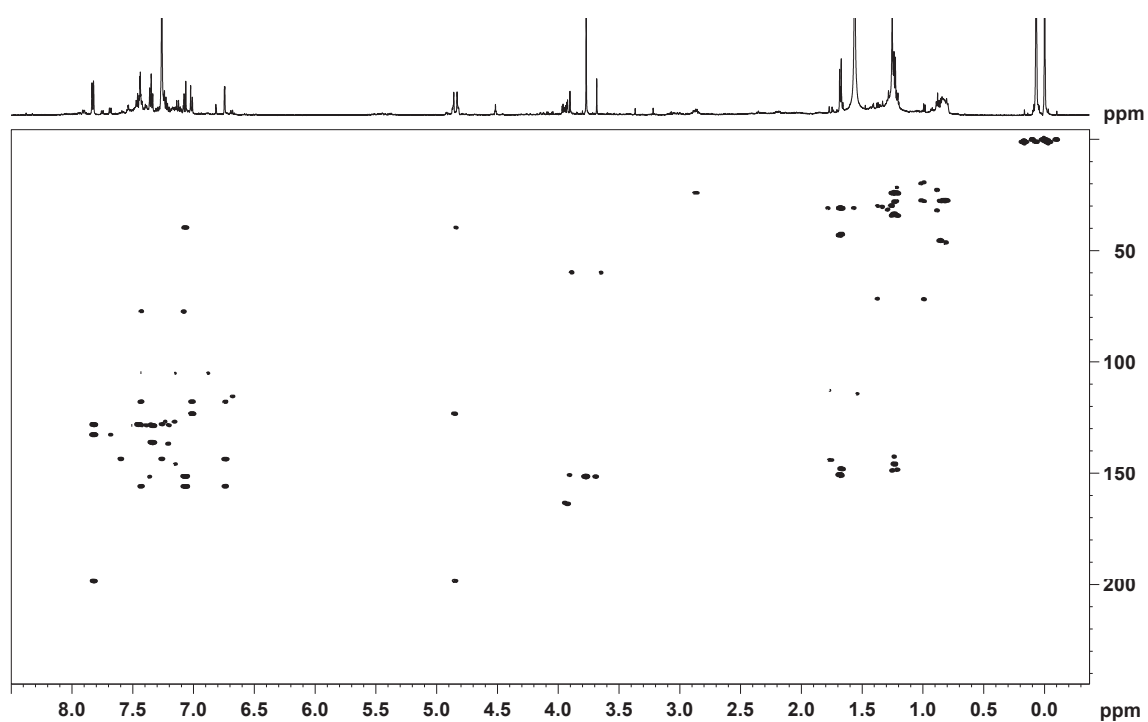
E 64: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S33**.



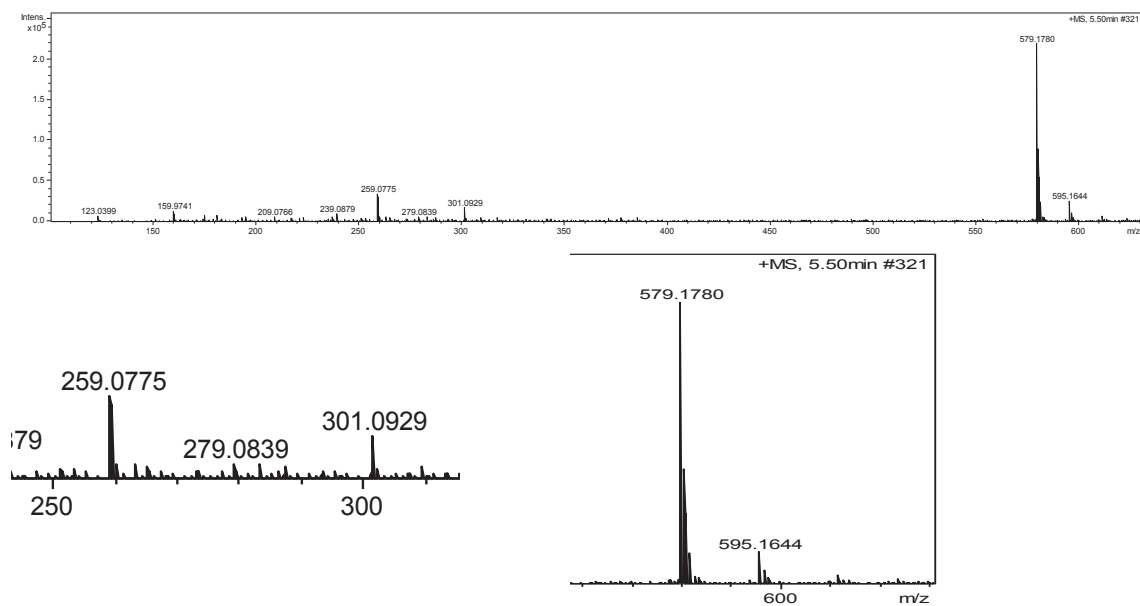
E 65: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S35**.



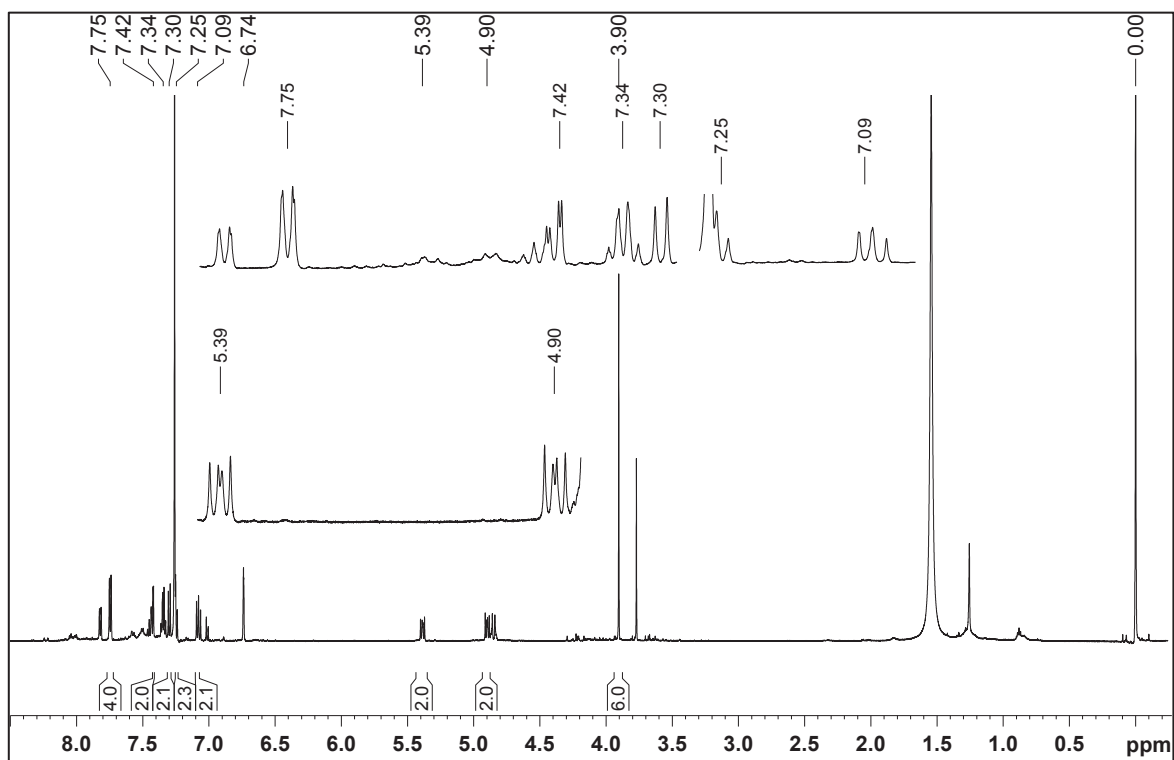
E 66: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S35**.



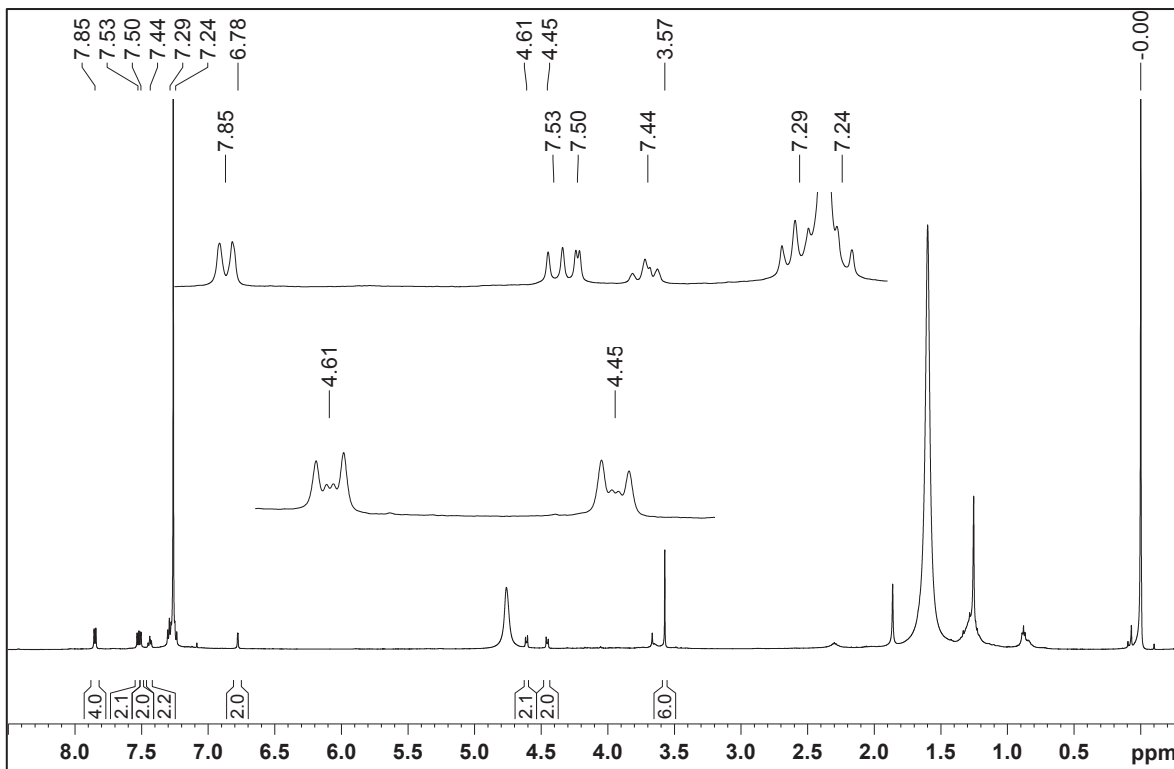
E 67: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S35**.



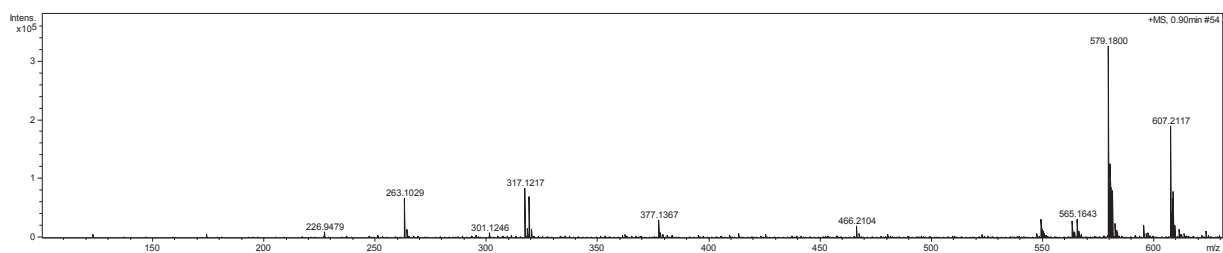
E 68: Espectro de massas de alta resolução de **S35**.



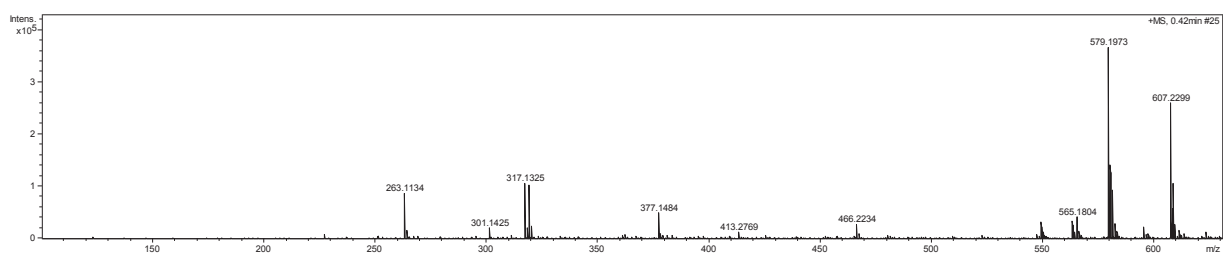
E 69: Espectro de RMN de ¹H (14,1 Tesla) em CDCl₃ de **S34**.



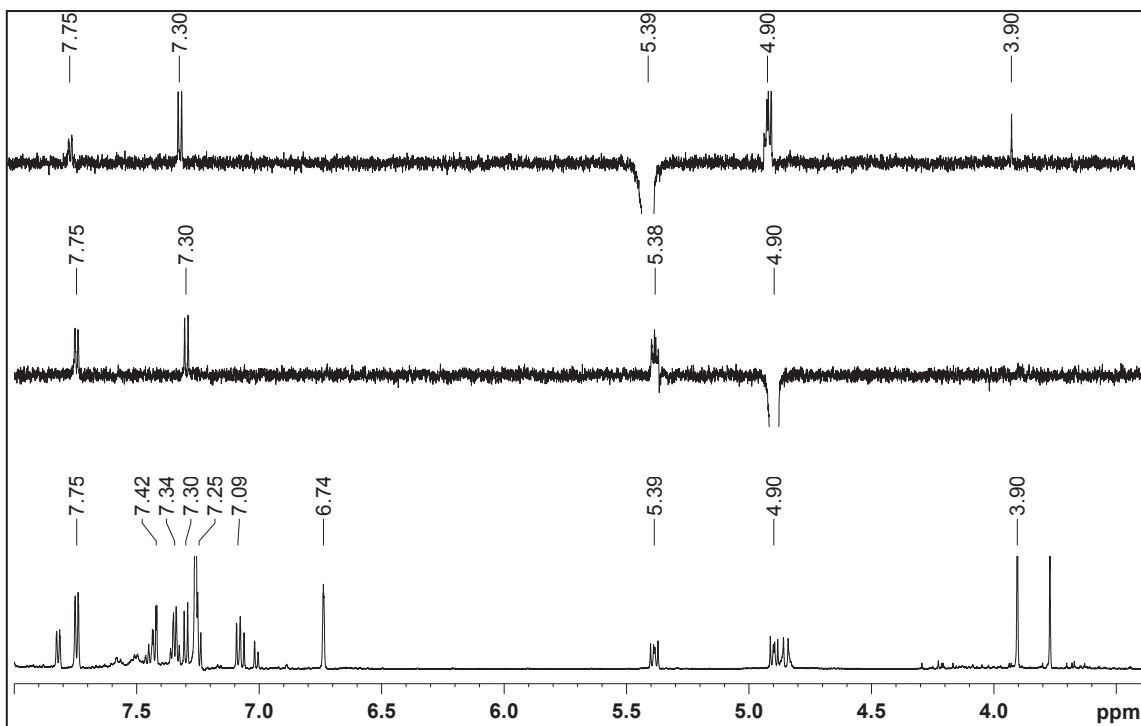
E 70: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S36**.



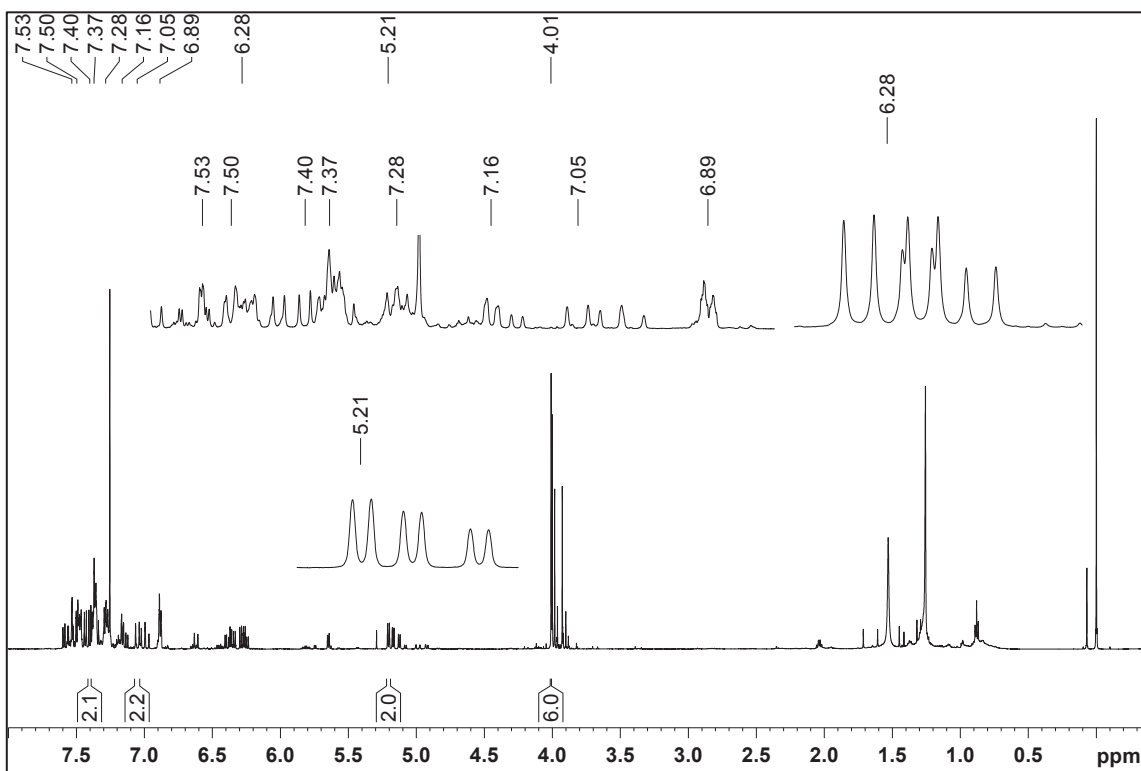
E 71: Espectro de massas de alta resolução de **S34**.



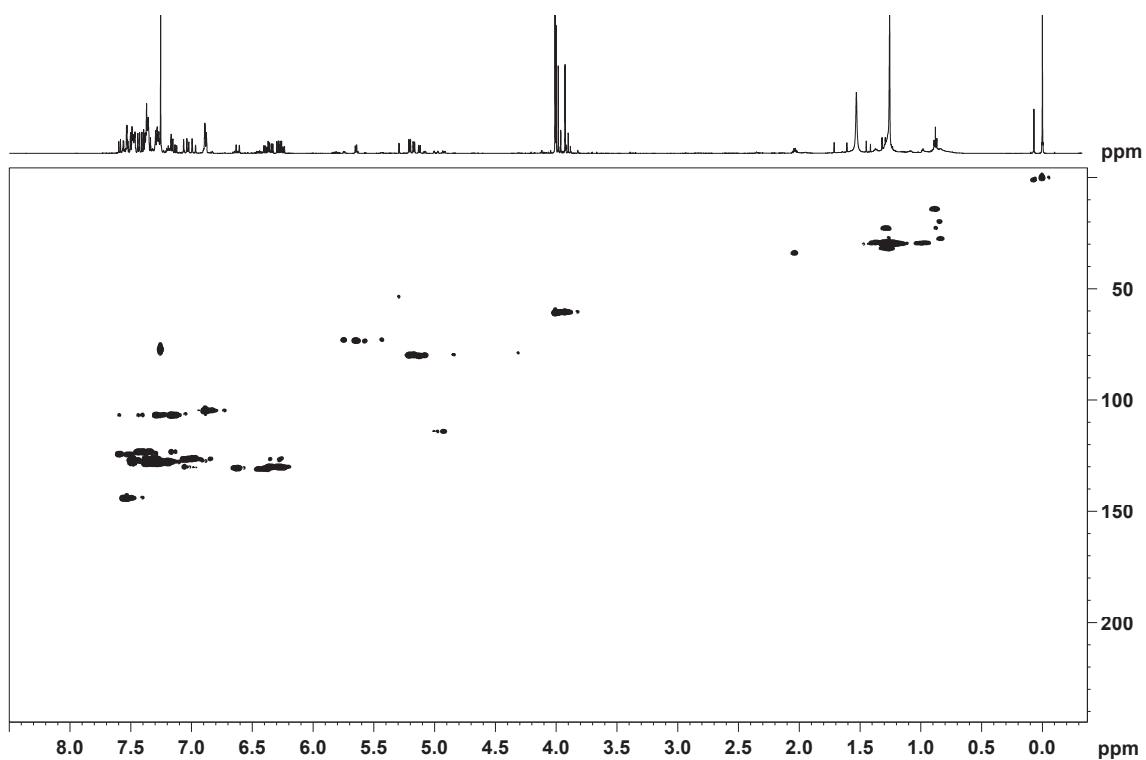
E 72: Espectro de massas de alta resolução de **S36**.



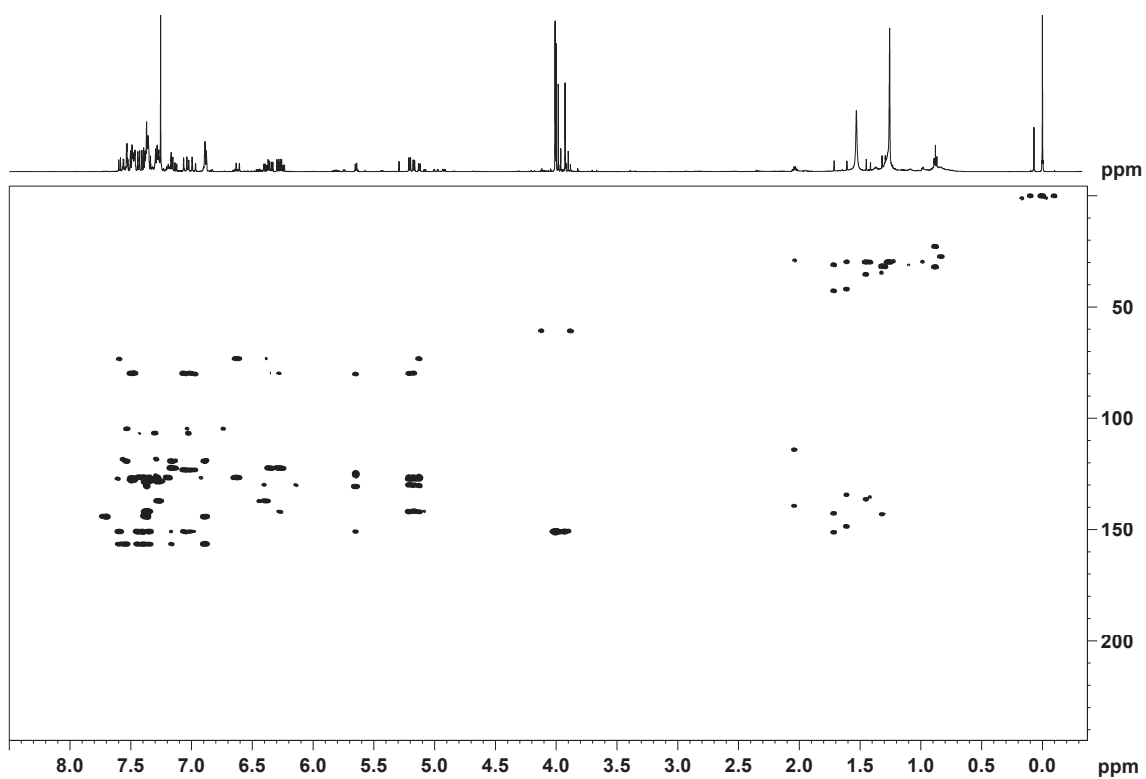
E 73: Experimentos de NOE 1D (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S34**.



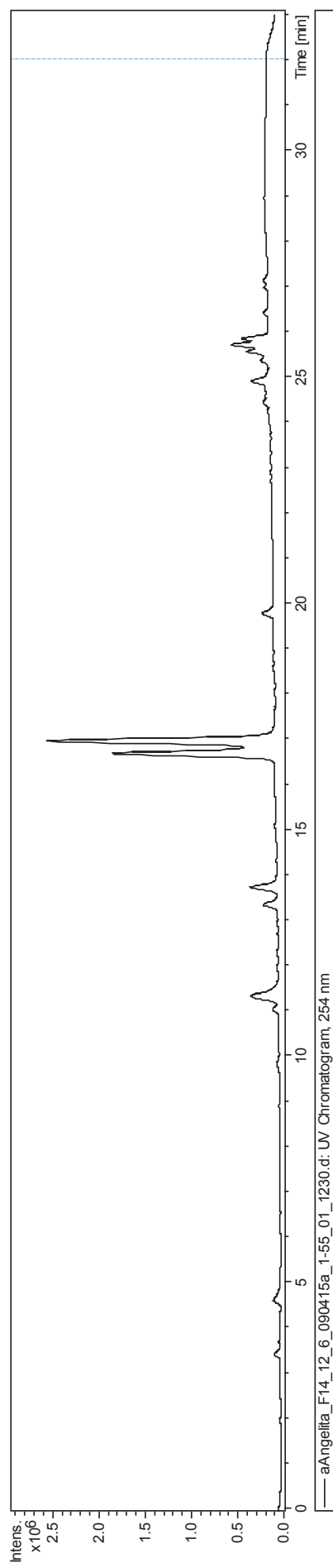
E 74: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S37**, **S38**, **S39** e **S40**.



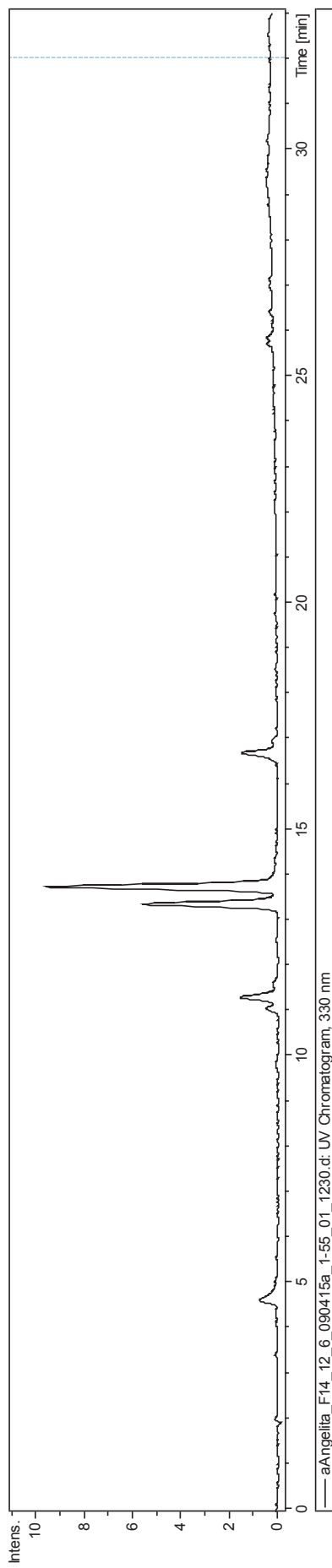
E 75: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S37**, **S38**, **S39** e **S40**.



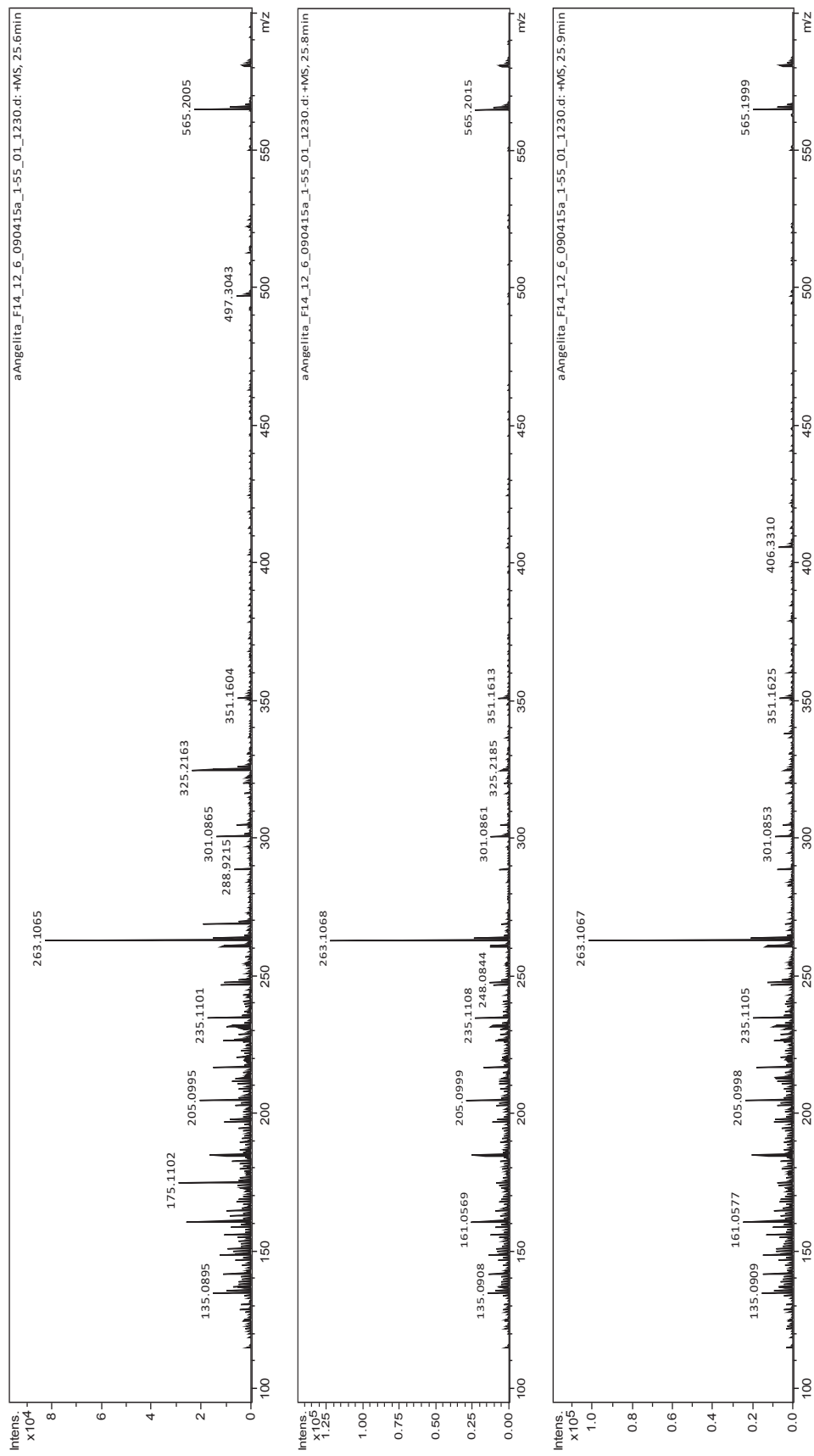
E 76: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S37**, **S38**, **S39** e **S40**.

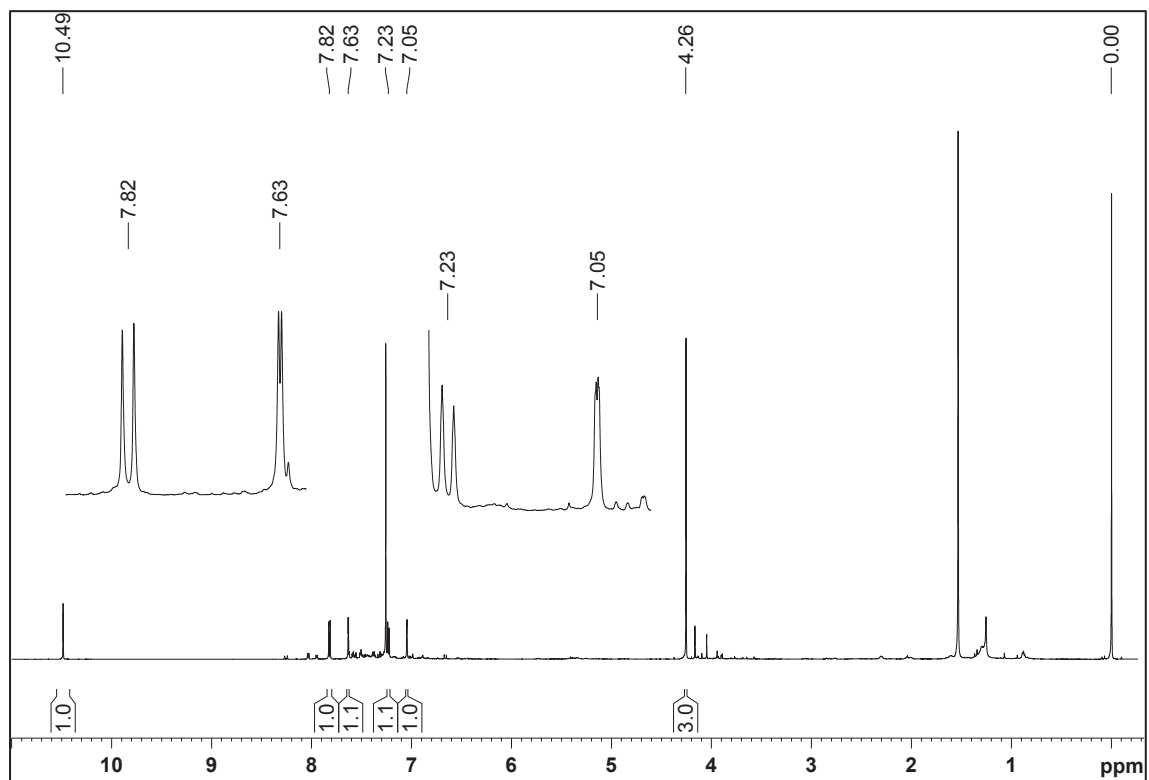


E 77: Perfil cromatográfico da fração **F14(12)-6** submetida a análise por CL-EMAR (254 nm).

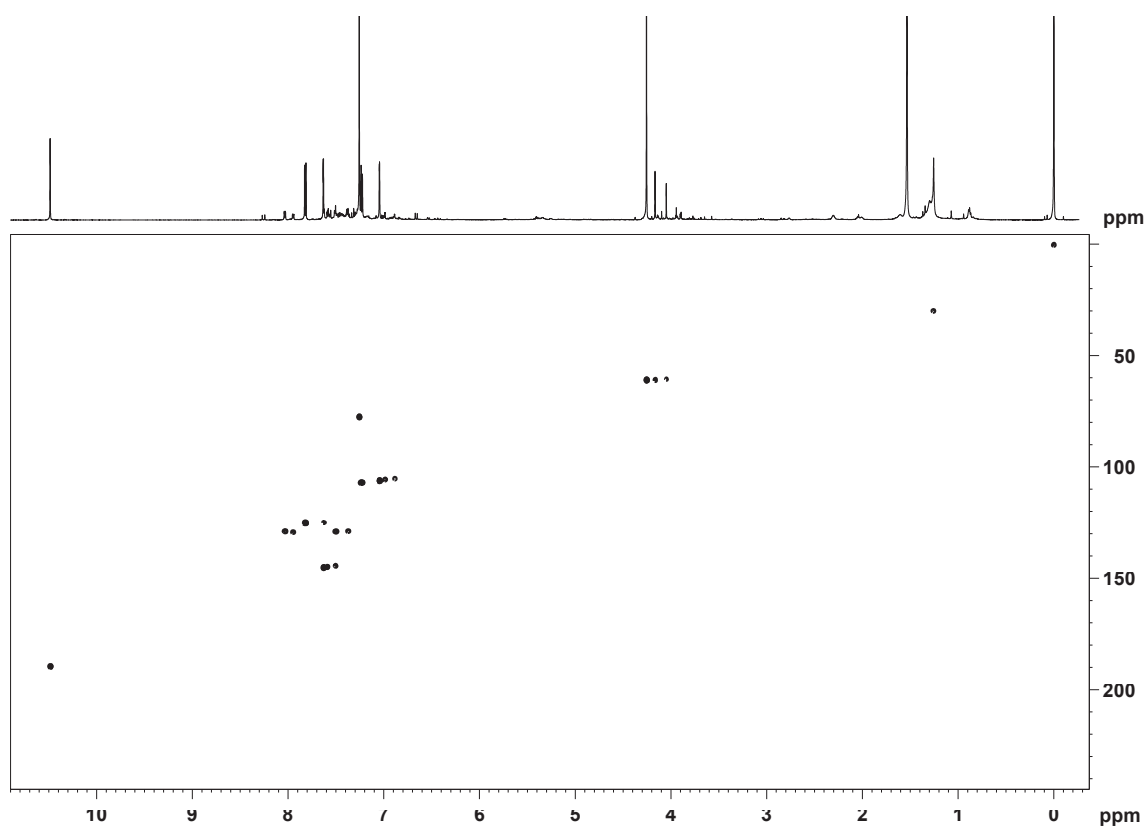


E 78: Perfil cromatográfico da fração **F14(12)-6** submetida a análise por CL-EMAR (330 nm).

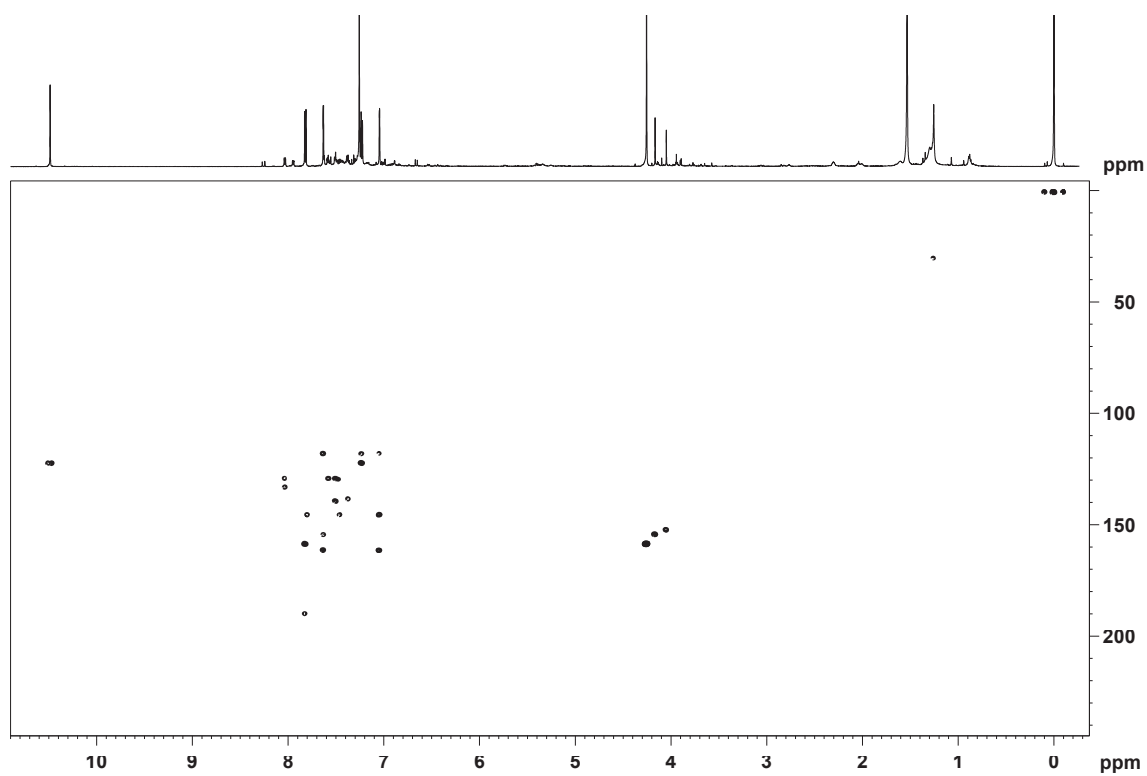
**E 79: Espectros de massas de alta resolução de alguns picos de F14(12)-6.**



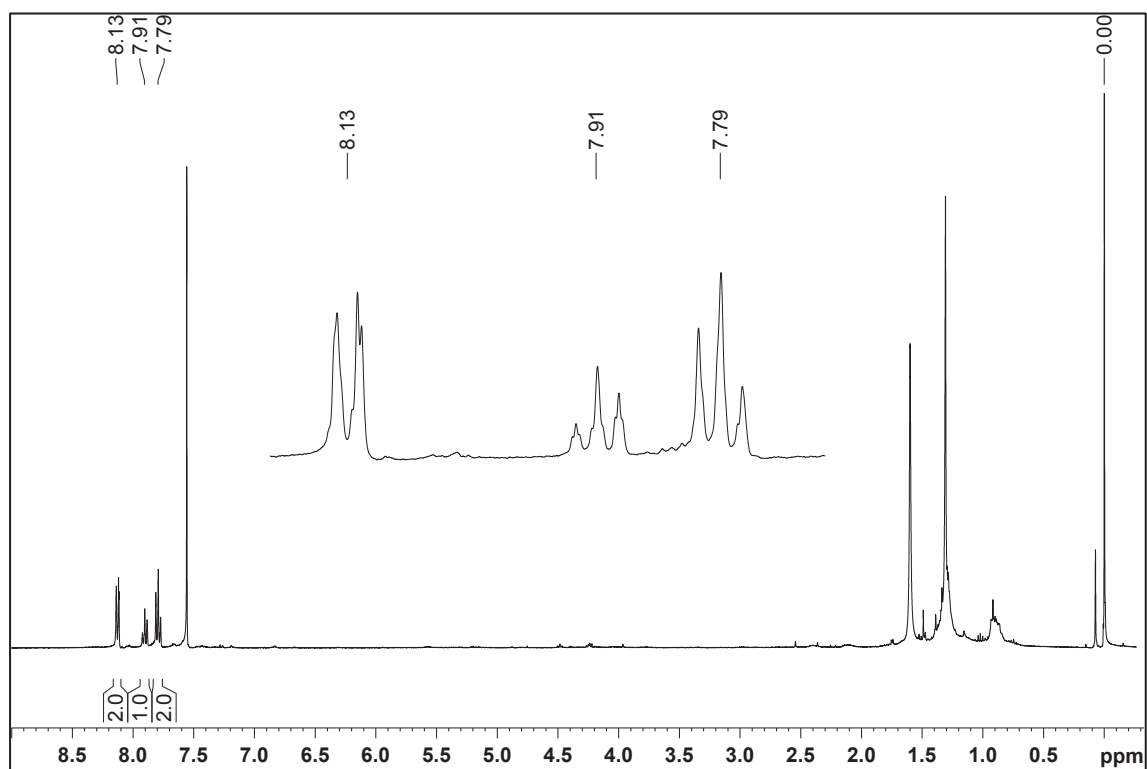
E 80: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S25**.



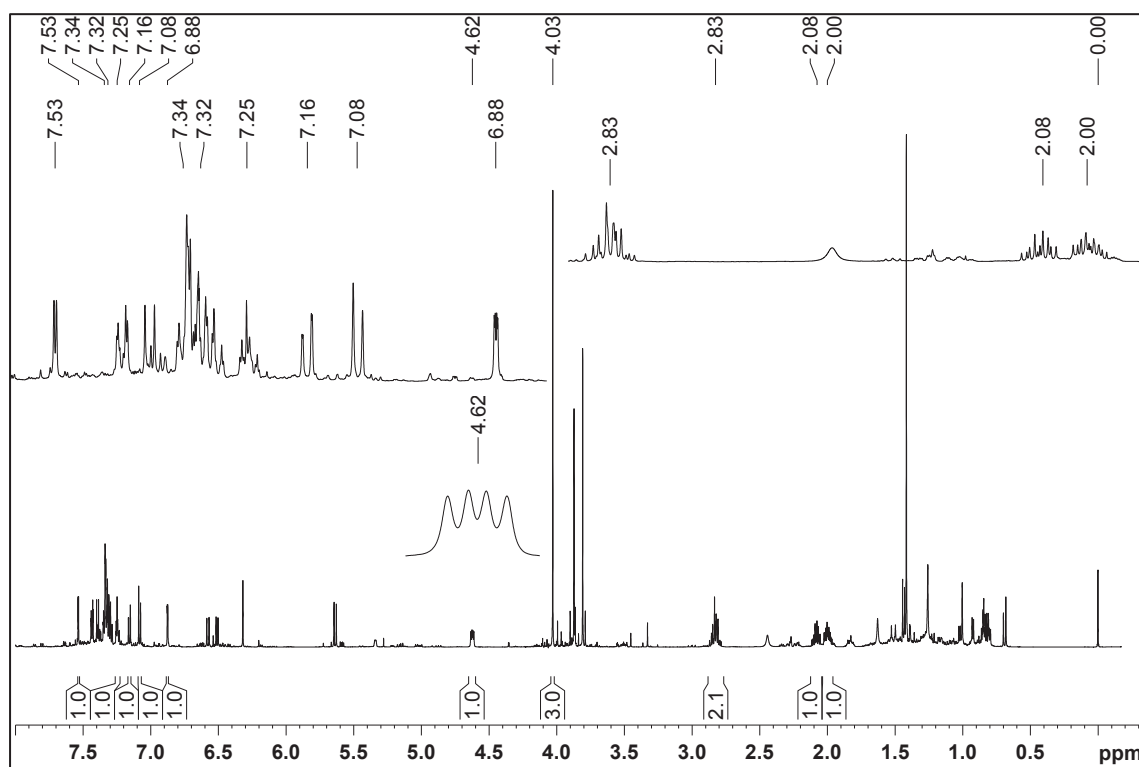
E 81: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S25**.



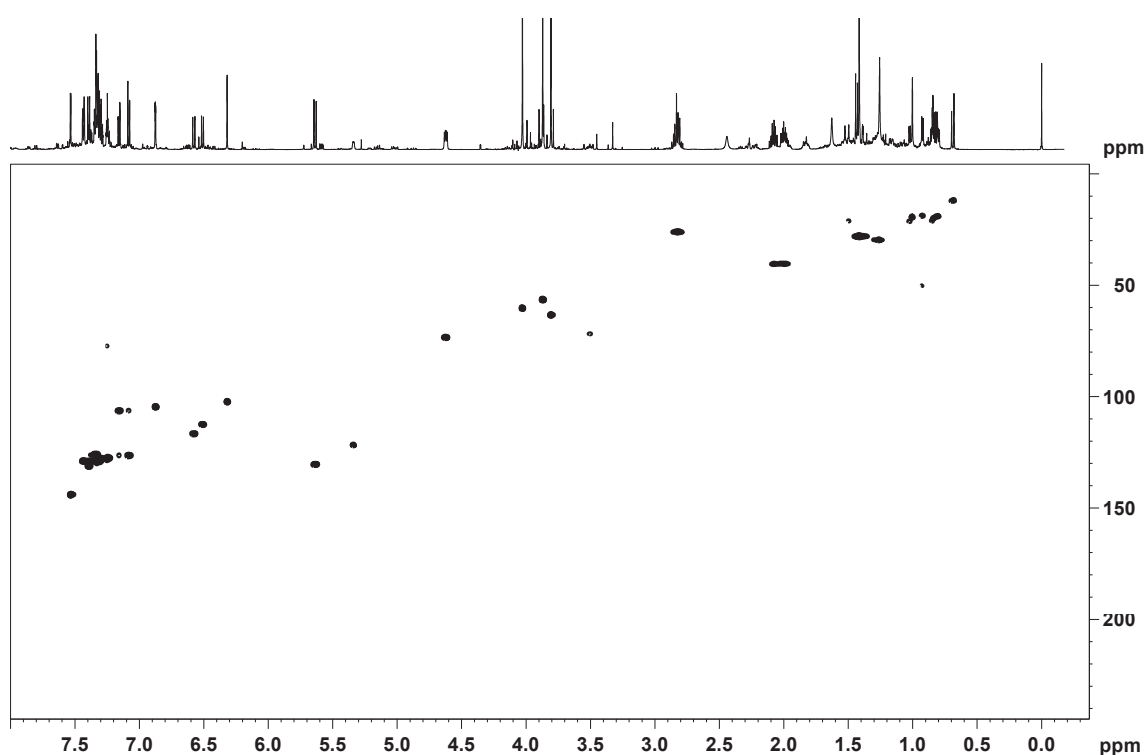
E 82: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S25**.



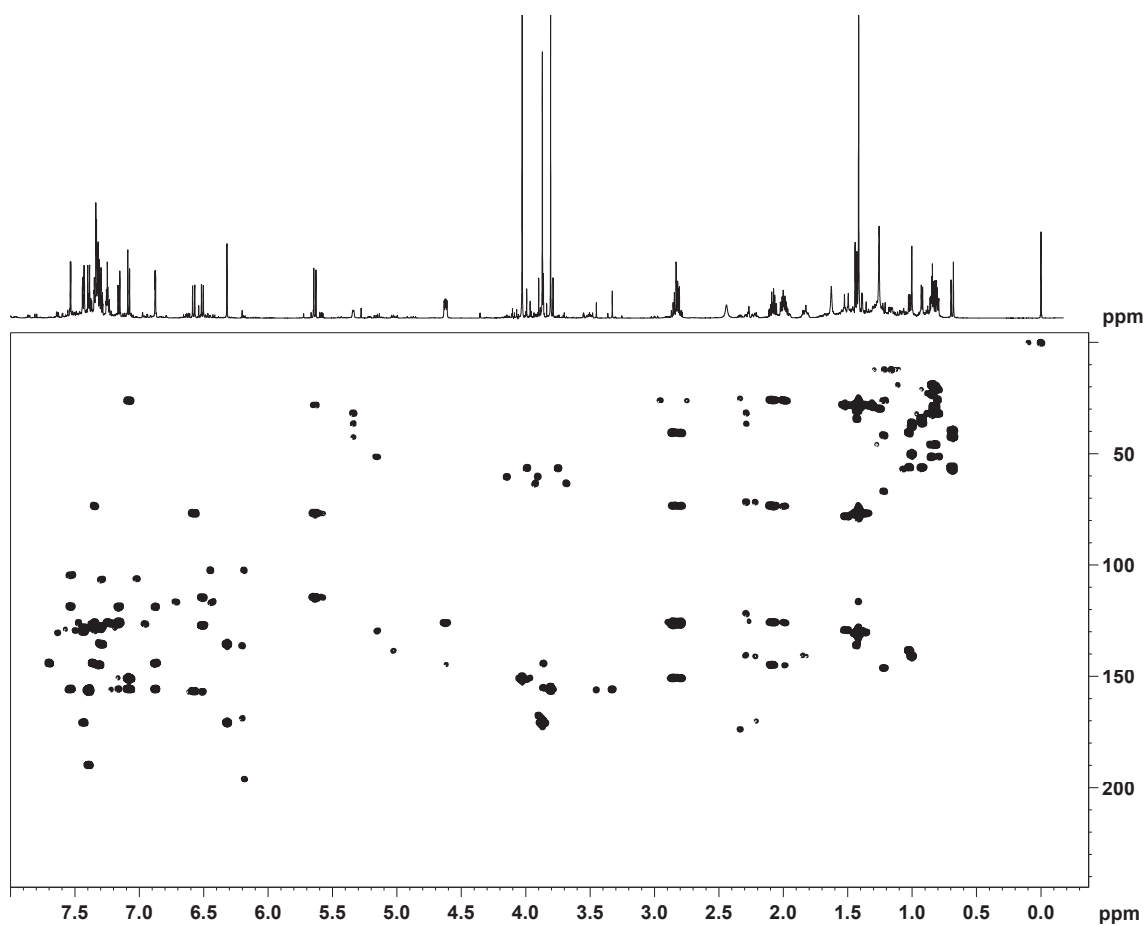
E 83: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S26**.



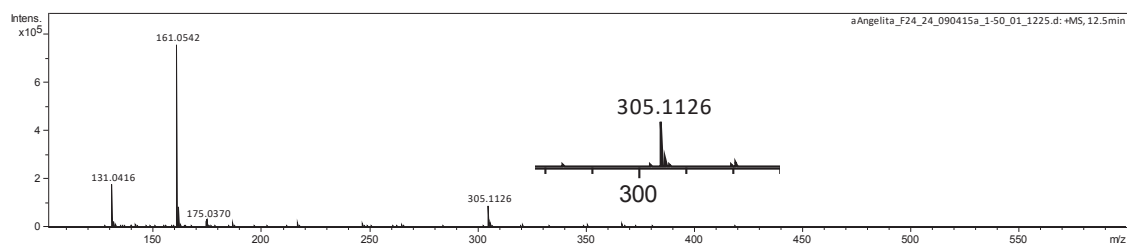
E 84: Espectro de RMN de ^1H (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S31**.



E 85: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (14,1 Tesla) em CDCl_3 de **S25**.



E 86: Mapa de correlação ¹H-¹³C a longa distância (14,1 Tesla) em CDCl₃ de **S31**.



E 87: Espectro de massas de alta resolução de **S31**.

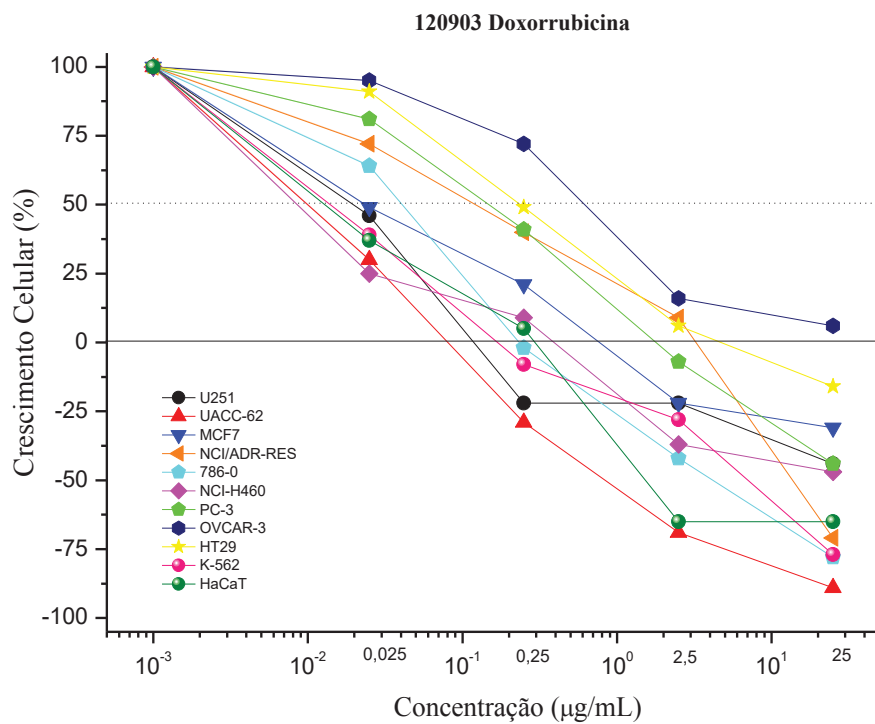


Gráfico da atividade antiproliferativa do controle positivo (doxorrubicina).

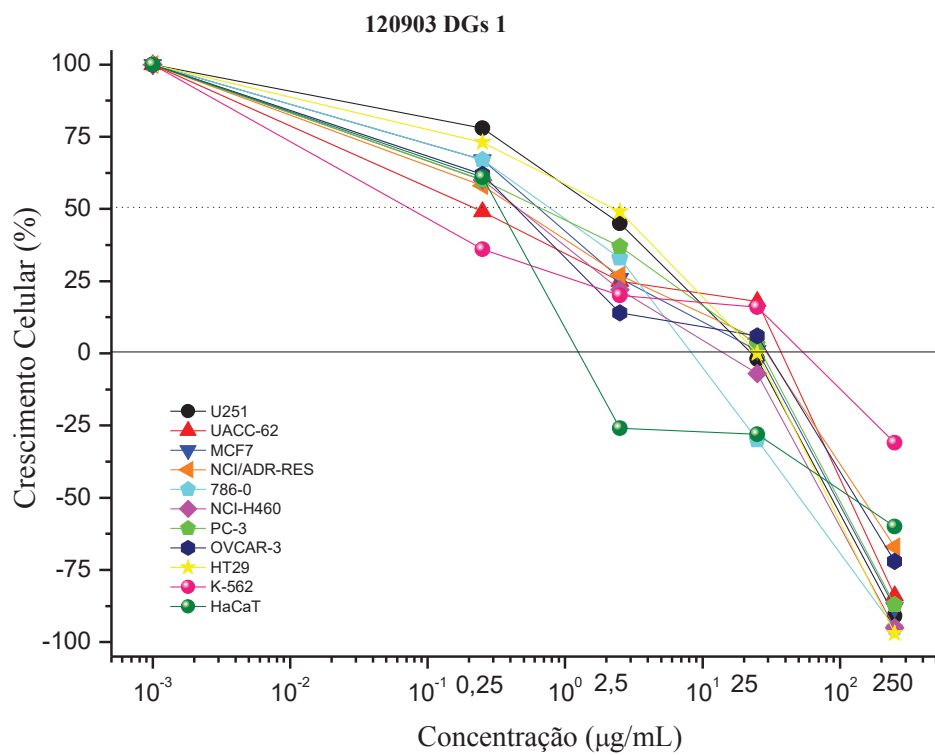


Gráfico da atividade antiproliferativa do extrato em éter de petróleo.

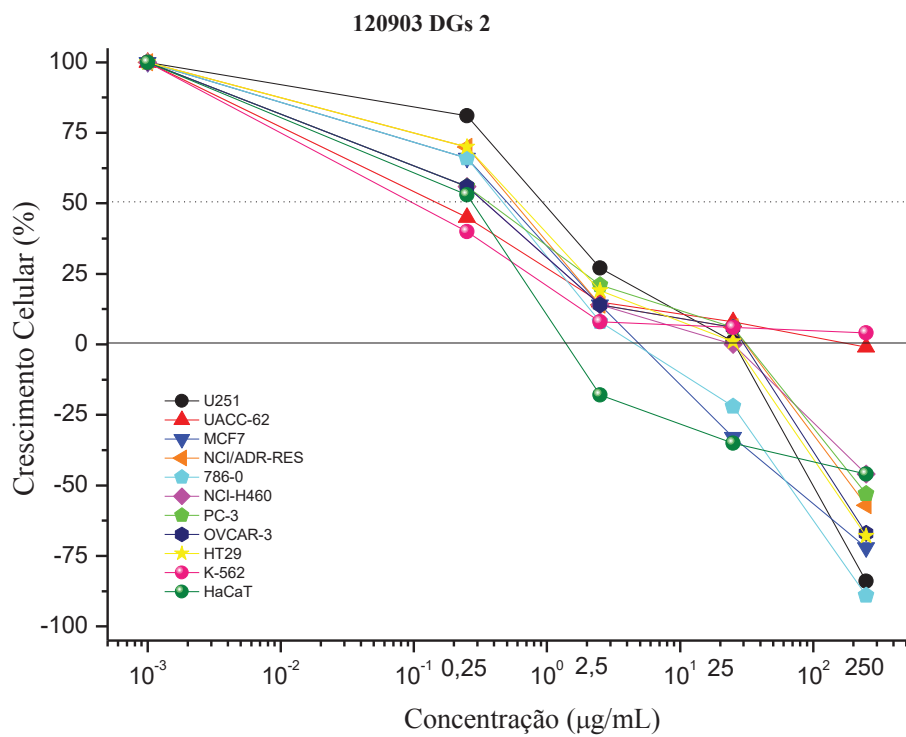


Gráfico da atividade antiproliferativa do extrato em diclorometânico.

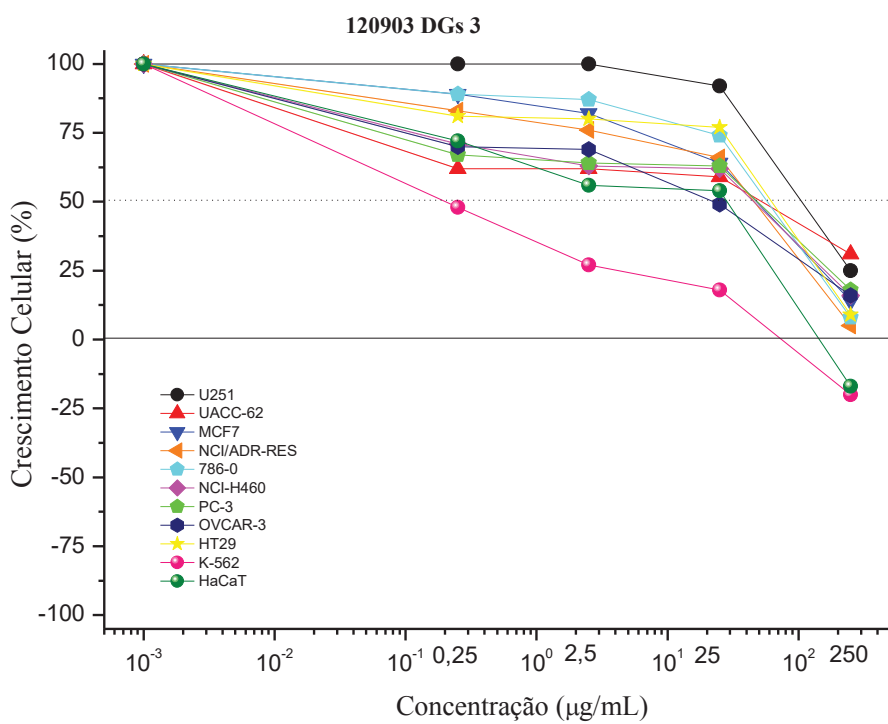


Gráfico da atividade antiproliferativa do extrato metanólico.

Substâncias identificadas nas raízes de *D. grandiflora*