

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

RAFAELA DOS SANTOS SOARES

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (FABACEAE)

João Pessoa – PB

2012

RAFAELA DOS SANTOS SOARES

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (FABACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha

COORIENTADORA: Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

João Pessoa – PB

2012

RAFAELA DOS SANTOS SOARES

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (FABACEAE)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha

Universidade Federal da Paraíba
(Orientador)

Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho

Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Externo)

Profa. Dra. Maria Célia de Oliveira Chaves

Universidade Federal da Paraíba
(Examinadora Interna)

DEDICATÓRIA

“Aos meus pais, Joacil e fatima, os verdadeiros
mestres da minha vida”

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, em primeiríssimo lugar, por me dar forças para viver longe a minha família, coragem para superar os obstáculos e sabedoria para enfrentá-los.

Aos meus pais, **Joacil A. Soares** e **Maria de Fatima S. Soares**, pela criação e formação do meu caráter, por todo carinho, dedicação, incentivo, apoio e amor incondicional.

Ao meu noivo, **Jorge Augusto F. Maciel**, por nunca interferir na minha vida acadêmica, por sempre me apoiar em tudo, por entender a minha ausência em alguns momentos de estudo e por todo amor compartilhado durante nossa “década”.

Aos meus irmãos, **Thiago S. Soares** e **Matheus S. Soares**, pelo companheirismo, confiança e por me ajudarem sempre que preciso.

A minha família Pessoense, os meus tios, **José Almeida Filho** e **Maria do Carmo S. Almeida**, por todo carinho, apoio, incentivo, acolhimento e por tudo que fizeram por mim desde o primeiro dia em que vim morar em JP. A minha prima **Fernanda S. Almeida**, pela convivência e amizade ao longo de nossas vidas e principalmente aqui em JP. A minha prima **Renata S. Almeida**, pela amizade e que mesmo distante me ajudou muito nessa jornada. Meu primo **Felipe S. Almeida**, por ter me cedido seu “ex-quarto”. Minha tia, **Mariza S. Diniz**, por todo carinho, amizade e hospitalidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Emídio V. L. da Cunha**, por acreditar, confiar e aceitar me orientar, por subir na minha bancada e montar minha primeira coluna, pela acessibilidade, amizade e por todos os ensinamentos desde a graduação.

A minha coorientadora, Profa. Dra. **Maria de Fátima V. de Souza**, pela amizade, disponibilidade, ensinamentos e por todas as risadas.

A Profa. Dra. **Micheline de A. Lima**, por ter me cedido a planta para a pesquisa e a Profa. Dra. **Evelise M. Locatelli**, pela identificação da mesma.

As amigas de infância, **Larissa Furtado** (minha confidente), por entender minhas ausências em alguns momentos e por saber que amizades novas sempre são bem vindas e que as antigas durarão para todo o sempre; e **Isadora Louise**, pela sólida amizade apesar da nossa distância, pelas horas de conversas e pelo incentivo.

Aos meus avós **Virgília**, **Severino** (*in memoriam*), **Laurita**, **Anildo**, ao primos, **Camila**, **Rodrigo**, **Victor**, **Jinny**, **Jack**, **Arthur**; as tias, **Socorro**, **Zefinha**, **Anailda**, as cunhadas, **Ana Paula**, **Ana Carolina** e **Raylanne**, aos sogros, **Maciel** e **Socorro** por todo amor, amizade, convivência, risadas, por todo apoio e incentivo.

Aos meus amigos de graduação, **Joelly**, **Magda**, **João Maurício**, **Hilk**, **Thyago**, por tudo que passamos juntos e por acreditarem em mim, e em especial **Sávio**, o meu maior incentivador para eu estar onde estou.

A **toda minha turma** de pós-graduação, em especial, **Caroline Siqueira**, por toda amizade, companheirismo, pelos cinemas, pizzas de chocolate e pelas dificuldades que passamos juntas por sermos as excluídas de CG (risos), **Sara Alves**, pela amizade, por todas as risadas, por me servir de exemplo pela mulher forte que és, mesmo com todos os obstáculos que teve na vida, **Otemberg Chaves**, pela amizade, por me deixar usar quase 2/3 da nossa bancada e pela paciência para me ensinar tudo que eu precisei, **Everton Queiroz**, por ser o primeiro amigo que fiz na pós-graduação, pela confiança depositada em mim, por todos os seminários que fizemos juntos, por sempre lembrar de mim mesmo quando estamos distantes, **Hellane Fabricia**, pela amizade e pelos incontáveis momentos gargalhadas que você proporciona a todos que estão ao seu redor, **Jéssica, Madalena, Manuela, Sandro, Cinthia, Jeane, Monalisa, Clécia, George, Abraão e Gregório**, pelo carinho, amizade e companheirismo.

Aos alunos de iniciação científica, **Denise, Thalisson, Francisco**, e especialmente **Vinicius Lins**, pela dedicação, por me ajudar sempre que precisei e pelo companheirismo.

Aos amigos de laboratório e da equipe Vanderlei, **Marianne, Camila** (carioca), **Ana Silvia, Jacqueline, Isis, Heloisa, Anne, Yanna, Tiago, Severino, Marcelo** (manso), **Roosevelt, Wemerson, Ana Cláudia, Denise**, pela amizade, companheirismo, ensinamentos, ajuda, apoio e dedicação.

A amiga e concunhada, **Vivianne Marcelino**, pela dedicação incondicional, por estar ao meu lado sempre que preciso, por toda confiança depositada em mim, por não medir esforços para me ajudar e a sua família, **Kalyanne, Dona Lúcia e Seu Otávio**, por me acolherem sempre que precisei.

A **todos os professores** da PgPNSB, pela contribuição com a minha formação e construção deste trabalho, em especial prof. Dr. **Josean F. Tavares**, por todos os ensinamentos.

Aos técnicos, **Vicente e Alexsandro**, pela amizade, pelas brincadeiras, ensinamentos e por me ajudarem sempre que precisei com os espectros de RMN, **Nonato e Ataíde**, pela amizade, por todas as vidrarias cedidas, por todas as placas feitas, **Wellington**, por todos os espectros de IV e **Sócrates**, pela disponibilidade e ensinamentos.

A **todos os funcionários** do Cbiotec, pela competência e apoio, fundamentais para o bom andamento deste trabalho, em especial a secretária **Carol** e ao funcionário **Dinho**, pela disponibilidade e bom humor.

A **UFPB** pelo suporte técnico e estrutural; a **CAPES** pelo apoio financeiro concedido.

Enfim... agradeço a todos que fazem parte da minha vida, mesmo que não tenham sido citados aqui, que contribuem com o meu crescimento profissional e pessoal: **Muitíssimo obrigada!**

RESUMO

SOARES, R. S. **Estudo Fitoquímico de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae)**. 2012. 125 p. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

Dalbergia ecastophyllum (L.) Taub. (Fabaceae), popularmente conhecida como rabo-de-bugio ou marmelo-do-mangue, é uma espécie escandente ou semi-prostrada, encontrada associada a estuários, mangues e dunas. Foi observado que as abelhas coletavam o exsudato vermelho na superfície das partes aéreas dessa espécie sugerindo ser essa é a origem botânica da própolis vermelha. Este trabalho objetivou contribuir para o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Dalbergia* e da família Fabaceae através do estudo fitoquímico da espécie *D. ecastophyllum*. Logo, o material vegetal foi coletado em Rio Tinto – Paraíba e depositado no Herbário do Departamento de Sistemática e Ecologia – UFPB com o código 45738 (JPB). Para o estudo fitoquímico, o vegetal, após secagem e pulverização, foi submetido a processos de extração, partição e cromatografia para isolamento dos constituintes químicos. A estrutura química dos mesmos foi determinada por métodos espectroscópicos, como: Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, além de comparações com modelos da literatura. Da fase hexânica obteve-se o triterpeno friedelina, duas misturas de esteroides, não glicosilado e glicosilado, (β -sitosterol e estigmasterol) e uma mistura com três triterpenos (lupeol, β -amirina e germanicol). Da fase diclorometano foram isolados e identificados dois isoflavonoides, biochanina A e 2'-hidroxi-5'-metoxibiochanina A, sendo essa última substância relatada pela primeira vez no gênero, contribuindo, portanto para a quimiotaxonomia do gênero *Dalbergia* e da família Fabaceae.

Palavras-chave: Fabaceae, *Dalbergia ecastophyllum*, isoflavonoides.

ABSTRACT

SOARES, R. S. **Phytochemical Studies of *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae)**. 2012. 125 p. Dissertation (Master in Phytochemistry of Natural Products and Bioactive Synthetic) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

Dalbergia ecastophyllum (L.) Taub. (Fabaceae), popularly known as "rabo-de-bugio" or "marmelo-do-mangue", it is a scandentia or semi-prostrate species, commonly found in estuaries, mangroves and dunes. It was observed that the bees collected a red exudate from the surface of the parts area of this species suggesting that this is the botanical origin of the red propolis. This study aimed to contribute to the chemotaxonomical knowledge of the genus *Dalbergia* and of the family Fabaceae through the phytochemical study of the species *D. ecastophyllum*. The plant material was collected in Rio Tinto - Paraíba and a voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Department of Systematics and Ecology - UFPB with the code 45738 (JPB). For the phytochemical study, the plant material, after drying and pulverization, was subjected to extraction processes, and partition chromatography to isolate the chemical constituents. The chemical structures were determined by spectroscopic methods, such as IR and ^1H NMR and ^{13}C one and two-D, and comparisons with models of literature. From the hexane phase, the triterpene friedelin, two mixtures of steroids, non-glycosylated and glycosylated (β -sitosterol and stigmasterol) and a mixture of three triterpenes (lupeol, β -amyrin and germanicol) were obtained. From the dichloromethane phase two isoflavones, biochanin A and 2'-hydroxy-5'-metoxibiochanin A were isolated and identified, this latter substance is being reported for the first time in the genus, thus contributing to the chemotaxonomy of the genus *Dalbergia* and family Fabaceae.

Keywords: Fabaceae, *Dalbergia ecastophyllum*, isoflavones.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt	Acetato de etila
APT	<i>Attached Proton Test</i>
Benz	Benzeno
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CES	Centro de Educação e Saúde
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
(CD₃)₂CO	Acetona deuterada
CH₂Cl₂	Diclorometano
¹³C	Carbono 13
C₅D₅N	Piridina deuterada
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo Dupleto
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetil sulfóxido deuterado
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EtOH	Etanol
Ep	Éter de petróleo
¹H	Hidrogênio
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
m/v	Massa/volume
Rf	Fator de retenção

RMN Ressonância Magnética Nuclear

s Simpleto

SH Suspensão Hidroalcoólica

s/ Simpleto largo

t Tripleto

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Representação esquemática da biossíntese dos flavonoides (DEWICK, 1997).....	38
Esquema 2 -	Representação esquemática da biossíntese dos terpenos (TAIZ; ZEIGER, 2004).....	42
Esquema 3 -	Etapas envolvidas no processo de obtenção e particionamento do EEB.....	45
Esquema 4 -	Etapas envolvidas no processamento cromatográfico da fase hexânica de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	48
Esquema 5 -	Etapas envolvidas no processamento cromatográfico da fase diclorometano de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica, em verde, da família Fabaceae no mundo.....	26
Figura 2 -	Subfamílias Faboideae (A), Caesalpinioideae (B) e Mimosoideae (C).....	27
Figura 3 -	Espécies de <i>Dalbergia</i> (<i>D. frutescens</i> , <i>D. cearensis</i> e <i>D. ecastophyllum</i>).....	29
Figura 4 -	Estruturas químicas de compostos isolados referentes ao Quadro 1.....	31
Figura 5 -	Abelhas coletando resina da <i>D. ecastophyllum</i>	32
Figura 6 -	Estruturas químicas de flavonoides isolados da espécie <i>D. ecastophyllum</i>	33
Figura 7 -	Produção da própolis vermelha pelas abelhas.....	34
Figura 8 -	Esqueleto básico dos flavonoides.....	35
Figura 9 -	Esqueletos básicos das subclasses dos flavonoides.....	36
Figura 10 -	Unidade isoprênica.....	39
Figura 11 -	Substâncias isoladas das partes áreas de <i>D. ecastophyllum</i>	54
Figura 12 -	Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de <i>De-1</i>	55
Figura 13 -	Estrutura química de <i>De-1</i> , friedelina.....	57
Figura 14 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>De-1</i>	59
Figura 15 -	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>De-1</i> (δ 0,6 – 2,4 ppm).....	60
Figura 16 -	Espectro de RMN ¹³ C APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>De-1</i>	61
Figura 17 -	Expansão do espectro de RMN ¹³ C APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>De-1</i> (δ 5 – 45 ppm).....	62
Figura 18 -	Expansão do espectro de RMN ¹³ C APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>De-1</i> (δ 28 – 44 ppm).....	62
Figura 19 -	Núcleo esteroidal do tipo estigmasteno.....	63

Figura 20 -	Estruturas químicas de <i>De-2(a/b)</i> : β -sitosterol (à esquerda) e estigmasterol (à direita).....	64
Figura 21 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-2(a/b)</i>	66
Figura 22 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-2(a/b)</i> (δ 3,2 – 5,6 ppm).....	67
Figura 23 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-2(a/b)</i> (δ 0,6 – 2,4 ppm).....	67
Figura 24 -	Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-2(a/b)</i>	68
Figura 25 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-2</i> (δ 70 – 142 ppm).....	69
Figura 26 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-2</i> (δ 10 – 60 ppm).....	69
Figura 27 -	Estruturas químicas de <i>De-3(a/b)</i> : sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (à esquerda) e estigmasterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (à direita).....	71
Figura 28 -	Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de <i>De-3(a/b)</i>	73
Figura 29 -	Expansão do espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de <i>De-3(a/b)</i> (δ 4,8 – 7,2 ppm).....	74
Figura 30 -	Expansão do espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de <i>De-3(a/b)</i> (δ 2,3 – 4,6 ppm).....	74
Figura 31 -	Expansão do espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de <i>De-3(a/b)</i> (δ 0,6 – 2,2 ppm).....	75
Figura 32 -	Espectro de RMN ^{13}C APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>De-3(a/b)</i>	76
Figura 33 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>De-3(a/b)</i> (δ 115 – 155 ppm).....	77
Figura 34 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>De-3(a/b)</i> (δ 50 – 105 ppm).....	77
Figura 35 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>De-3(a/b)</i> (δ 10 – 47 ppm).....	78
Figura 36 -	Estrutura química de <i>De-4a</i> , lupeol.....	80

Figura 37 -	Estruturas químicas de <i>De-4b</i> e <i>De-4c</i> , β -amirina e germanicol, respectivamente.....	81
Figura 38 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-4(a/b/c)</i>	83
Figura 39 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-4(a/b/c)</i> (δ 3,0 – 5,2 ppm).....	84
Figura 40 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-4(a/b/c)</i> (δ 0,6 – 1,8 ppm).....	84
Figura 41 -	Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-4(a/b/c)</i>	85
Figura 42 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-4(a/b/c)</i> (δ 80 – 151 ppm).....	86
Figura 43 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-4(a/b/c)</i> (δ 36 – 56 ppm).....	86
Figura 44 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-4(a/b/c)</i> (δ 14 – 36 ppm).....	87
Figura 45 -	Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de <i>De-5</i>	88
Figura 46 -	Estrutura química de <i>De-5</i> , biochanina A.....	92
Figura 47 -	Espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de <i>De-5</i>	94
Figura 48 -	Expansão do espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de <i>De-5</i> (δ 6,1 – 8,2 ppm).....	95
Figura 49 -	Espectro de RMN ^{13}C APT ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 125 MHz) de <i>De-5</i>	96
Figura 50 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 125 MHz) de <i>De-5</i> (δ 150 – 185 ppm).....	96
Figura 51 -	Espectro HMQC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 e 125 MHz) de <i>De-5</i>	97
Figura 52 -	Expansão do espectro HMQC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 e 125 MHz) de <i>De-5</i> na região de (5,4 – 80 ppm) x (90 – 135 ppm).....	97
Figura 53 -	Espectro HMBC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 e 125 MHz) de <i>De-5</i>	98
Figura 54 -	Expansão do espectro HMBC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 e 125 MHz) de <i>De-5</i> na região de (5,5 – 9,0 ppm) x (152 – 184 ppm).....	98

Figura 55 -	Expansão do espectro HMBC ((CD ₃) ₂ CO, 500 e 125 MHz) de <i>De-5</i> na região de (5,5 – 9,0 ppm) x (90 – 135 ppm).....	99
Figura 56 -	Expansão do espectro HMBC ((CD ₃) ₂ CO, 500 e 125 MHz) de <i>De-5</i> na região de (6,8 – 8,4 ppm) x (123 – 132 ppm).....	99
Figura 57 -	Espectro NOESY ((CD ₃) ₂ CO, 125 e 125 MHz) de <i>De-5</i>	100
Figura 58 -	Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de <i>De-6</i>	101
Figura 59 -	Estrutura química de <i>De-6</i> , 2'-hidroxi-5'-metoxibiochanina A....	105
Figura 60 -	Espectro de RMN ¹ H (DMSO, 500 MHz) de <i>De-6</i>	106
Figura 61 -	Expansão do espectro de RMN ¹ H (DMSO, 500 MHz) de <i>De-6</i> (δ 6,1 – 8,4 ppm).....	107
Figura 62 -	Expansão do espectro de RMN ¹ H (DMSO, 500 MHz) de <i>De-6</i> (δ 6,10 – 6,45 ppm).....	107
Figura 63 -	Expansão do espectro de RMN ¹ H (DMSO, 500 MHz) de <i>De-6</i> (δ 3,1 – 3,9 ppm).....	108
Figura 64 -	Espectro de RMN ¹³ C APT (DMSO, 125 MHz) de <i>De-6</i>	109
Figura 65 -	Espectro HMQC (DMSO, 500 e 125 MHz) de <i>De-6</i>	110
Figura 66 -	Expansão do espectro HMQC (DMSO, 500 e 125 MHz) de <i>De-6</i> na região de (5,8 – 7,6 ppm) x (92 – 120 ppm).....	110
Figura 67 -	Expansão do espectro HMQC (DMSO, 500 e 125 MHz) de <i>De-6</i> na região de (2,6 – 5,0 ppm) x (53 – 59 ppm).....	111
Figura 68 -	Espectro HMBC (DMSO, 500 e 125 MHz) de <i>De-6</i>	111
Figura 69 -	Expansão do espectro HMBC (DMSO, 500 e 125 MHz) de <i>De-6</i> na região de (5,8 – 8,8 ppm) x (138 – 185 ppm).....	112
Figura 70 -	Expansão do espectro HMBC (DMSO, 500 e 125 MHz) de <i>De-6</i> na região de (5,8 – 8,6 ppm) x (90 – 125 ppm).....	112
Figura 71 -	Expansão do espectro HMBC (DMSO, 500 e 125 MHz) de <i>De-6</i> na região de (3,3 – 4,1 ppm) x (141 – 154 ppm).....	113
Figura 72 -	Espectro NOESY (DMSO, 125 e 125 MHz) de <i>De-6</i>	113

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Alguns constituintes químicos isolados de espécies do gênero <i>Dalbergia</i>	30
Quadro 2 -	Sistemas de eluições utilizados no processamento cromatográfico da fase hexânica (Coluna 1.0) de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> , frações coletadas para cada sistema de eluição e grupos de frações reunidas.....	49
Quadro 3 -	Sistemas de eluições utilizados no processamento cromatográfico da fase hexânica (Coluna 1.1) de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> , frações coletadas para cada sistema de eluição e grupos de frações reunidas.....	49
Quadro 4 -	Sistemas de eluições utilizados no processamento cromatográfico da fase diclorometano (Col. 2.0) de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> , frações coletadas para cada sistema de eluição e grupos de frações reunidas.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-1</i> em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C da friedelina em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente), segundo Cano et al. (2000).....	58
Tabela 2 -	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-2(a/b)</i> em CDCl_3 (200 e 50 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C do β -sitosterol e estigmasterol em CDCl_3 , segundo Tomaz et al. (2008).....	65
Tabela 3 -	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-3(a/b)</i> em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (500 e 125 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C do sitosterol-3- O - β -D-glicopiranosídeo e estigmasterol-3- O - β -D-glicopiranosídeo em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 e 100 MHz, respectivamente), segundo Kojima et al. (1990).....	72
Tabela 4 -	Dados comparativos de RMN ^{13}C de <i>De-4(a/b/c)</i> em CDCl_3 (200 e 50 MHz, respectivamente) e do lupeol, segundo Burns et al., (2000); da β -amirina, segundo Bandeira et al. (2007) e do germanicol, segundo González et al. (1981).....	82
Tabela 5 -	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-5</i> em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (500 e 125 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C do biochanina A em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (500 e 125 MHz, respectivamente), segundo Almeida et al. (2008).....	91
Tabela 6 -	Correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) e $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (NOESY) de <i>De-5</i> registrados em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	92
Tabela 7 -	Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-6</i> em DMSO (500 e 125 MHz, respectivamente) e do 2'-hidroxi-5'-metoxibiochanina A, segundo Nkengfack et al. (1989).....	103
Tabela 8 -	Correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) e $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (NOESY) de <i>De-6</i> registrados em DMSO.....	104

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
3.1 Considerações gerais sobre a Família Fabaceae	26
3.2 Considerações sobre o Gênero <i>Dalbergia</i>	28
3.3 Considerações sobre a espécie <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (L.) Taub.	32
3.3.1 A própolis vermelha	33
3.4 Considerações sobre as classes de compostos isolados da espécie <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	35
3.4.1 Flavonoides	35
3.4.1.1 Atividades biológicas dos flavonoides	36
3.4.1.2 Biossíntese dos flavonoides	37
3.4.2 Terpenoide	39
3.4.2.1 Atividades biológicas dos terpenoides	39
3.4.2.2 Biossíntese dos terpenoides	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Levantamento bibliográfico	44
4.2 Coleta do material botânico	44
4.3 Processamento do material botânico	44

4.4	Obtenção e Particionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEB).....	44
4.5	Isolamento e purificação dos constituintes químicos das Fases Hexânica e Diclorometano do Extrato Etanólico Bruto.....	46
4.6	Procedimentos cromatográficos e definição do grau de pureza.....	46
4.7	Processamento cromatográfico da Fase Hexânica do Extrato Etanólico Bruto.....	47
4.8	Processamento cromatográfico da Fase Diclorometano do Extrato Etanólico Bruto.....	50
4.9	Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados de <i>D. ecastophyllum</i>	51
4.9.1	Infravermelho.....	51
4.9.2	Ressonância Magnética Nuclear.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Substâncias isoladas das partes aéreas de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	54
5.2	Determinação estrutural de <i>De-1</i>	55
5.3	Determinação estrutural de <i>De-2(a/b)</i>	63
5.4	Determinação estrutural de <i>De-3(a/b)</i>	70
5.5	Determinação estrutural de <i>De-4(a/b/c)</i>	79
5.6	Determinação estrutural de <i>De-5</i>	88
5.7	Determinação estrutural de <i>De-6</i>	101
6	CONCLUSÕES	114
	REFERÊNCIAS	116

Introdução



INTRODUÇÃO

O uso das plantas medicinais no controle de diversas doenças e pragas talvez seja tão antigo quanto o próprio aparecimento da humanidade (SIMÕES et al., 2007). A Organização Mundial de Saúde (1998) define planta medicinal como sendo todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos.

Indícios do uso de plantas medicinais foram encontrados nas mais antigas civilizações, onde o homem primitivo, ao procurar plantas para o seu sustento, foi descobrindo espécies com ação tóxica ou medicinal. Os benefícios obtidos com a utilização empírica levaram o homem a buscar sempre “novas” plantas, para o tratamento de diversas patologias, e a experiência acumulada foi transmitida por inúmeras gerações, levando ao descobrimento de alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina moderna (SIMÕES et al., 1986).

Ao longo da história, as plantas são fontes de importantes fármacos como: morfina e codeína (*Papaver somniferum*), reserpina (*Rauwolfia serpentina*), digoxina (*Digitalis lanata*), digitoxina (*Digitalis purpurea*), pilocarpina (*Pilocarpus jaborandi*), e o taxol (*Taxus ssp*) (BARREIRO, 1990).

Além dos benefícios, observou-se muitas reações tóxicas associadas a plantas, levando à necessidade de estudos criteriosos relativos à sua utilização. Diversos autores apontam a importância dos estudos químicos e farmacológicos, em várias espécies vegetais, pela intensa produção de metabólitos secundários, que podem ter efeitos farmacológicos benéficos ou tóxicos (BRITO; BRITO, 1993). Estima-se que existam aproximadamente 500.000 espécies de plantas terrestres, das quais são conhecidos aproximadamente 50.000 metabólitos secundários (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Até a década de 50 o uso de vegetais como medicamentos representava o único recurso terapêutico disponível. A partir de então, começaram a ser substituídos por medicamentos contendo substâncias bioativas extraídas de vegetais, bem como seus derivados sintéticos e/ou semissintéticos (LAPA et al., 2003).

A partir da década de 80, ocorreu o aumento significativo do uso de plantas medicinais que pode estar correlacionado com alguns fatores específicos, tais como:

a facilidade de obtenção, o baixo custo e a eficácia demonstrada no combate às doenças. Apesar das plantas nativas serem amplamente utilizadas por séculos, são raros os exemplos de produtos registrados no Brasil contendo vegetais. Apesar da vasta flora medicinal disponível a maior parte das plantas medicinais nativas permanece sendo usada da mesma forma tradicional, com embasamento empírico (BRANDÃO et al., 2006; ALMEIDA, 2003; MACIEL et al., 2002).

Como consequência do crescente interesse da sociedade mundial pelo uso de plantas medicinais, pesquisadores de várias áreas optaram por projetos multidisciplinares envolvendo, no mínimo, a Etnobotânica, Etnofarmacologia e a Fitoquímica, que abrangem a coleta e utilização da planta; que tratam das práticas médicas, especialmente remédios, usados em sistemas tradicionais de medicina; (MACIEL et al., 2002) e objetivam conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar as suas presenças (SIMÕES et al., 2007).

No Brasil há uma grande diversidade de plantas com potencial terapêutico, o que estimula os pesquisadores no estudo de suas possíveis ações farmacológicas, bem como ações tóxicas, a fim de produzir medicamentos com garantia de eficácia e segurança. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase inacreditável de diversidade, em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL; WANI, 1996). Estudos relataram que 61% das 877 novas moléculas ativas introduzidas mundialmente na indústria farmacêutica, durante o período de 1981-2002, foram derivadas ou inspiradas em produtos naturais (NEWMAN et al., 2003).

Segundo Lapa (2001), o valor dos produtos naturais, especialmente das plantas medicinais para a sociedade e para a economia do Estado é incalculável. Cerca de 60 a 80% da população mundial, especialmente em países em desenvolvimento, ainda confiam no poder terapêutico de plantas medicinais no tratamento de suas doenças.

Um exemplo do uso de produto natural bastante utilizado é a própolis, que contém substâncias resinosas coletadas pelas abelhas, sendo usada na medicina popular desde 300 a.C., visto que numerosas propriedades biológicas têm sido encontradas, incluindo atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, entre outras. Um tipo de própolis que está sendo muito estudada é a própolis vermelha,

produzida pelas abelhas a partir da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (DAUGSCH, 2007; SIMÕES et al., 2008).

É a partir dessa premissa que ao longo de mais de três décadas o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba vem contribuindo com a pesquisa científica brasileira nas áreas da botânica, química, controle de qualidade, farmacologia e toxicologia de produtos naturais e sintéticos bioativos.

Como nova contribuição aos trabalhos desenvolvidos no PgPNSB, é apresentado aqui, um estudo fitoquímico da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., pertencente a família Fabaceae, a qual devido a peculiaridade de ser a produtora de uma substância resinosa utilizada pelas abelhas para a produção da própolis vermelha, aliado à carência de trabalhos referentes à constituição química desta espécie, foi proposto isolar, identificar e/ou elucidar alguns constituintes químicos de suas partes aéreas.

Objetivos



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Dalbergia*, através do estudo fitoquímico da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae).

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair, isolar e purificar metabólitos secundários de *D. ecastophyllum* utilizando métodos cromatográficos como: Cromatografia em Coluna e Cromatografia em Camada Delgada;
- Caracterizar estruturalmente os constituintes químicos de *D. ecastophyllum*, através de métodos espectroscópicos como: Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C ;
- Disponibilizar extratos, frações, substâncias isoladas e caracterizadas estruturalmente, para a realização de testes farmacológicos.

Fundamentação Teórica



3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações gerais sobre a Família Fabaceae

Segundo Joly (2002) a família Fabaceae pertence à divisão Angiospermae, maior divisão do reino vegetal, que compreende as plantas superiores que contém sementes encerradas no ovário e, portanto podem formar frutos. Esse grupo domina a flora terrestre (Figura 1), sendo reconhecidas 344 famílias agrupadas em duas classes, as monocotiledôneas e as dicotiledôneas, compreendendo mais de 200.000 espécies.

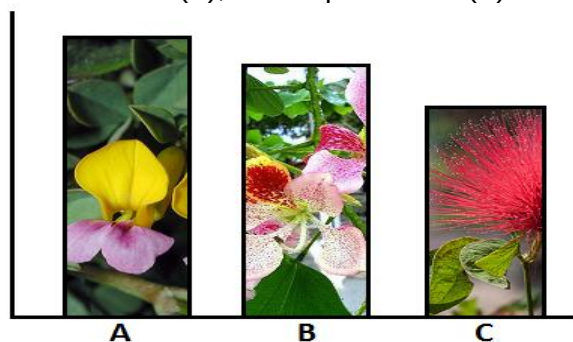
Figura 1 – Distribuição geográfica, em verde, da família Fabaceae no mundo.



Fonte: tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=42000184&tab

A família Fabaceae encontra-se dentre as 291 famílias presentes na classe das dicotiledôneas, sendo considerada a terceira maior deste grupo, superada apenas por Asteraceae e Orchidaceae (VARELA et al., 2004)

De acordo com Lewis et al. (2005) a família Fabaceae é uma das maiores entre as angiospermas, abrangendo cerca de 730 gêneros e 19.500 espécies distribuídas em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (também conhecida como Papilionoideae). Dentre estas três subfamílias (Figura 2, p. 27), Faboideae apresenta-se como o maior, sendo constituída por cerca de 430 gêneros e 12.615 espécies, seguido por Caesalpinioideae com cerca de 150 gêneros e 2.700 espécies e de Mimosoideae com 40 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies (JUDD et al., 1999).

Figura 2 – Subfamílias Faboideae (A), Caesalpinioideae (B) e Mimosoideae (C).Fonte: botany.hawaii.edu

Classificada pelos botânicos mais antigos como Leguminosae, a família Fabaceae é rica em plantas de grande importância para o homem, como plantas ornamentais ou como fonte de corantes e madeira. São plantas de grande importância econômica, as vagens e sementes de muitas das espécies herbáceas são fonte de alimentação para humanos e animais, pertencem a esta família todos os nossos legumes, a maioria constituída por plantas cultivadas tais como *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Pisum sativum* L. (ervilha), *Lens culinaris* Medik. (lentilha), *Vicia faba* L. (fava), *Cicer arietinum* L. (grão-de-bico), *Glycine max* L. (soja) e *Arachis hypogaea* L. (amendoim). São fontes ricas de proteínas bem como de conteúdo mineral, sendo, portanto, de alto valor em áreas deficientes de tais constituintes. Na indústria são muito utilizadas *Astragalus gummifer* (goma-arábica), *Indigofera anil* L. e *Indigofera hirsuta* L. (anil). Como madeiras importantes têm *Myroxylon balsamum* L. (cabriúva ou bálsamo), *Dalbergia brasiliensis* Vog. e *Dalbergia nigra* All. (caviúna), *Machaerium ocutifolium* Vog. e *Machaerium scleroxylon* Tul. (jacarandá), *Centrolobium microchaete* Mart., *Centrolobium robustum* Mart. e *Centrolobium tomentosum* Guill. (araribá), *Bowdichia nitida* Spruce., *Bowdichia virgilioides* H. B. K. e *Bowdichia martiusii* Benth. (sucupira), *Andira bahiensis* N. (angelim) e *Dipteryx odorata* Aubl. (cumarú da Amazônia). Como plantas forrageiras destacam-se *Melilotus alba* e *Medicago sativa* L. (alfafa) (JOLY, 2002; DA SILVA et al., 2004). Algumas espécies são usadas como fertilizantes e aumentam largamente os níveis de nitrogênio do solo (HEYWOOD, 1996). Muitas espécies são também cultivadas apenas para uso ornamental, devido principalmente a suas belas flores como, por exemplo, *Lathyrus odoratus* L. (ervilha de cheiro), *Spartium junceum* L. (giesta), *Lupinus polyphyllus* Lindl. (lupino), certas espécies de *Phaseolus*, *Erythrina crista-galli* L., *Erythrina falcata* Benth., *Erythrina glauca* Willd.,

Erythrina mulungu Mart., *Erythrina velutina* Willd e *Erythrina verna* Vell. (sanduba, maçaranduba, suína, corticeira-do-litoral e mulungu) e *Wisteria floribunda* D. C. e *Wisteria sinensis* Sweet. (glícia) que são trepadeiras de flores roxas (JOLY, 2002; DA SILVA et al., 2004). Boa parte destas plantas pertence, originariamente, à flora brasileira.

O aparelho vegetativo desta família é muito variável. Há árvores, arbustos, ervas e trepadeiras, tanto escandentes como volúveis. Quase sempre apresentam flores compostas, alternantes, com estípulas (SCHULTZ, 1984).

Espécies da família Fabaceae são reputadas pelo grande número de ocorrências de flavonoides, em especial isoflavonoides, sendo que muitos deles apresentam atividade antimicrobiana (DEWICK, 1994), como também pela presença de alcaloides com atividade cardioativa (CORDELL et al., 2001). Também podem ser encontrados taninos, alguns glicosídeos cianogênicos, cristais de proteínas e grãos de amido (JUDD et al., 1999).

3.2 Considerações sobre o Gênero *Dalbergia*

O gênero *Dalbergia* foi proposto pelo filho de Linnaeus em 1781, em memória de Carl Gustav Dahlberg, um soldado no Suriname e coletor para Linnaeus. É considerado o segundo maior gênero da tribo Dalbergieae Bronn ex. D.C. e pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae. Foi descrito para acomodar duas espécies: *D. lanceolaria*, originária de Ceilão, e *D. monetária*, originária do Suriname (CARVALHO, 1989).

O gênero *Dalbergia* é composto por cerca de 500 espécies, onde 39 estão presentes no Brasil. O gênero é dividido em cinco seções (*Pseudoecastaphyllum*, *Triptolemea*, *Ecastaphyllum*, *Selenolobium* e *Dalbergia*), que podem ser definidas por meio das características da inflorescência e do fruto. O gênero *Dalbergia* surgiu na África, de onde dispersou, tanto para o leste, como para o oeste. As diferentes condições climáticas e ecossistemas da Ásia e América do Sul influenciaram os diferentes modos de evolução do gênero (ALMEIDA, 2001). É possível encontrar espécies de *Dalbergia* (Figura 3, p. 29) nos mais variados tipos de vegetação, como: Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Campos Rupestres (CARVALHO, 1997).

Figura 3 – Espécies de *Dalbergia* (*D. frutescens*, *D. cearensis* e *D. ecastophyllum*).



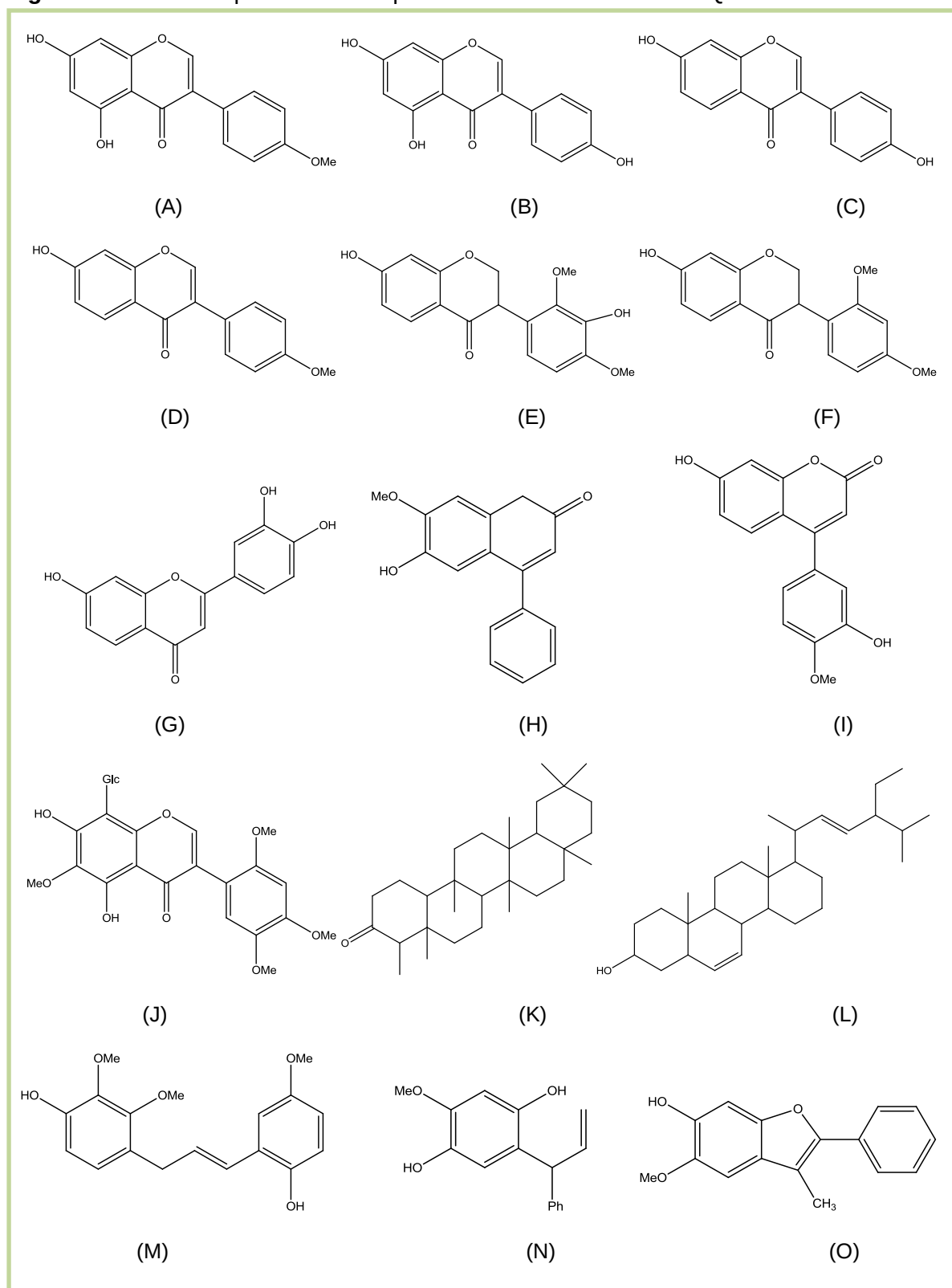
Fonte: <http://www.tropicos.org>

Uma série de fitoconstituintes como flavonoides, glicosídeos, esteroides, quinonas, entre outros, têm sido isolados de várias espécies do gênero, alguns destes estão expostos no Quadro 1 (p. 30), e suas estruturas químicas demonstradas a seguir (Figura 4, p. 31).

Quadro 1 – Alguns constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Dalbergia*.

Constituintes	Espécie	Parte (Extrato)	Estrutura	Referência
Isoflavonoides				
Biochanina A	<i>D. volubilis</i>	Flores (EP)	(A)	Chawla et al., 1974
Genisteína	<i>D. volubilis</i>	Flores (EP)	(B)	Chawla et al., 1974
Daidzeína	<i>D. volubilis</i>	Flores (EP)	(C)	Chawla et al., 1974
Formononetina	<i>D. odorifera</i> T. Chean	Cerne (EtOH)	(D)	Yahara et al., 1989
Isoflavanona				
Violanona	<i>D. odorifera</i>	Cerne (EtOH)	(E)	Yahara et al., 1989
Sativone	<i>D. odorifera</i>	Cerne (EtOH)	(F)	Yahara et al., 1989
Flavanona				
Butin	<i>D. odorifera</i>	Cerne (EtOH)	(G)	Yahara et al., 1989
Neoflavona e Neoflavonoides				
Dalbergina	<i>D. odorifera</i>	Cerne (EtOH)	(H)	Yahara et al., 1989
Volubolina	<i>D. volubilis</i>	Galho jovem (EtOH)	(I)	Chawla et al., 1974
Glicosídeos				
Dalpaniculina	<i>D. paniculata</i> Roxb	Sementes	(J)	Rao; Rao, 1991
Terpenoides e Esteroides				
Friedelina	<i>D. monetaria</i>	Casca/Caule (EtOH)	(K)	Khan; Javed, 1997
Estigmasterol	<i>D. monetaria</i>	Casca/Caule (EtOH)	(L)	Khan; Javed, 1997
Cinamilfenol				
Dalberatin B	<i>D. cultrate</i> Grah	Casca/Caule (EtOH)	(M)	Ito et al., 2003
Quinonas				
Obtustaquinol	<i>D. retusa</i>	Cerne (Benz.)	(N)	Jurd et al., 1972
Furanos				
Parvifurana	<i>D. paniflora</i>	Cerne (EtOH)	(O)	Muangniocharoen; Frahm, 1981

EP: éter de petróleo; EtOH: etanol; Benz: benzeno

Figura 4 – Estrutura química de compostos isolados referentes ao Quadro 1.

Espécies de *Dalbergia* são importantes árvores tropicais de madeira de lei, que apresentam modo de dispersão de sementes principalmente pelo vento. As

valiosas madeiras dos jacarandás são conhecidas desde o Brasil colonial e a importância econômica dessas plantas é citada na literatura já no início daquele período (ROUT et al., 2003).

Várias espécies são relatadas para serem usadas tradicionalmente como expectorante, abortivos, antihelmíntico, antipirético, para emese, azia, doenças de pele, úlceras, obesidade, dispepsia, sífilis, problemas de estômago, entre outros (KIRTIKAR; BASU, 1991; NADKARNI, 1954).

3.3 Considerações sobre a espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub.

Dalbergia ecastophyllum (L.) Taub., popularmente conhecida como rabo-de-bugio ou marmelo-do-mangue, é uma espécie escandente ou semi-prostrada, encontrada associada a estuários, mangues e dunas, onde auxilia na fixação da areia. É bem adaptada a condições de alta salinidade e seus frutos são capazes de flutuar (CAMARGO, 2005; CARVALHO, 1997).

A espécie frequentemente cresce em locais onde há constante vaporização de sal e em solos moderadamente salinos e indivíduos mais velhos tendem a formar densas moitas. No início, seu crescimento é moderado, mas constante. Já espécimes mais velhos crescem 2 m por ano (FRANCIS, 2001).

Foi observado que as abelhas coletavam o exsudato vermelho da superfície da *D. ecastophyllum* (Figura 5), sugerindo que essa é a origem botânica da própolis vermelha (DONNELLY et al., 1973; MATOS et al., 1975).

Figura 5 – Abelhas coletando resina da *D. ecastophyllum*.

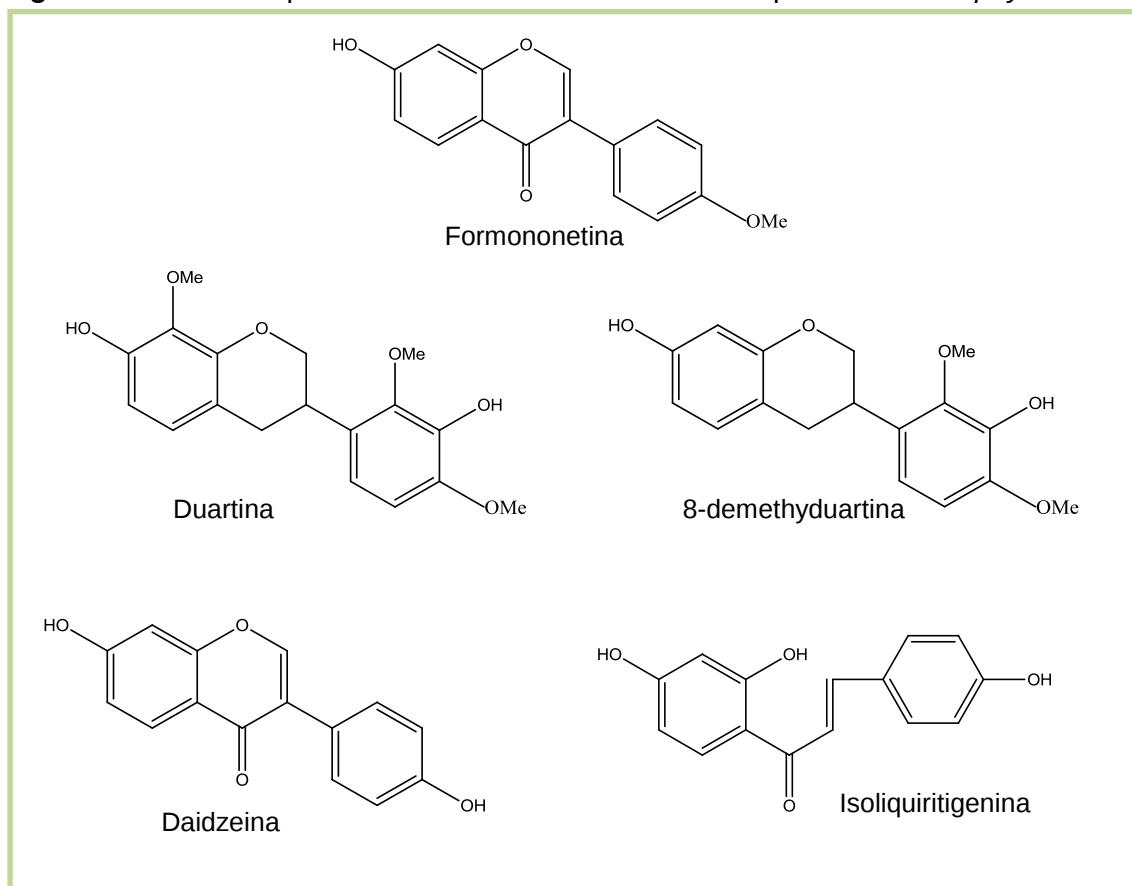


Fonte: www.sulbahianews.com.br/painel/modulos/artigos/images/1313064876.jpg

Poucos estudos foram obtidos com esta espécie, tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico. Um estudo realizado por Donnelly et al. (1973) cita a

presença de flavonoides isolados desta espécie, onde alguns destes compostos encontram-se elencados abaixo (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura química de flavonoides isolados da espécie *D. ecastophyllum*.



3.3.1 A própolis vermelha

O termo própolis já era descrito no século XVI na França e a Farmacopeia de Londres do século XVII lista a própolis como droga oficial (CAPASSO; CASTALDO, 2002; PEREIRA et al., 2002; CAO et al., 2004). A própolis é um dos muitos produtos naturais que vem sendo utilizado durante séculos pela humanidade (VARGAS et al., 2004). O uso de extratos de própolis na medicina popular data de 300 anos a.C. (DA SILVA et al., 2006).

No Brasil, o interesse pela própolis aconteceu somente na década de 80 com o trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer, demonstrando em seu livro, “Abelhas e saúde”, as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural (LIMA, 2006).

As amostras tropicais de própolis, especialmente as brasileiras, têm mostrado diferenças significantes nas suas composições químicas em relação à própolis da zona temperada. Por essa razão, a própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse por parte dos cientistas (TRUSHEVA et al., 2006).

A própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores; além desses, na colmeia, as abelhas adicionam secreções salivares e enzimas (PEREIRA et al., 2002; FRANCO et al., 2000). As abelhas usam a própolis (Figura 7) para protegê-las contra insetos e microrganismos, no reparo de frestas ou danos à colmeia, no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (MARCUCCI, 1996).

A composição química da própolis inclui flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenoides e fenilpropanoides, esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (HU et al., 2005; HAYACIBARA et al., 2005; OZKUL et al., 2004; MATSUDA et al., 2002; ROCHA et al., 2003).

Figura 7 – Produção da própolis vermelha pelas abelhas.



Fonte: agenciasebrae.com.br

A própolis tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, etc. (BANKOVA, 2005; KOSALEC et al., 2005; ALENCAR et al., 2005; SIMÕES et al., 2008).

3.4 Considerações sobre as classes de compostos isolados da espécie *Dalbergia ecastophyllum*

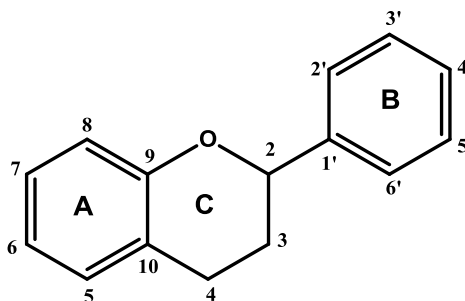
3.4.1 Flavonoides

Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural e são amplamente distribuídas no reino vegetal. Com poucos relatos em algas, alguns representantes foram identificados em briófitas, existindo apenas um relato de ocorrência em fungos. Em pteridófitas também foram encontrados, mas sua variabilidade estrutural é pequena. Todavia estão presentes em abundância nas angiospermas, apresentando nesse grupo enorme diversidade estrutural (SIMÕES et al., 2007).

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas. Entre elas, pode-se citar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (SIMÕES et al., 2000; HARBORNE; WILLIAMS, 2000; HEIM et al., 2002).

Os flavonoides ocorrem em uma grande variedade de formas estruturais. Todos contêm 15 átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), que são denominados A, B e C (Figura 8), como consequência da ligação de dois grupos fenila a uma cadeia de três carbonos, ou seja, são derivados difenilpropânicos (PIETTA, 2000).

Figura 8 – Esqueleto básico dos flavonoides.



As várias classes de flavonoides diferem no grau de oxidação e de substituição do anel C, enquanto que compostos individuais em uma classe diferem quanto à substituição dos anéis A e B. Nos compostos tricíclicos, as unidades

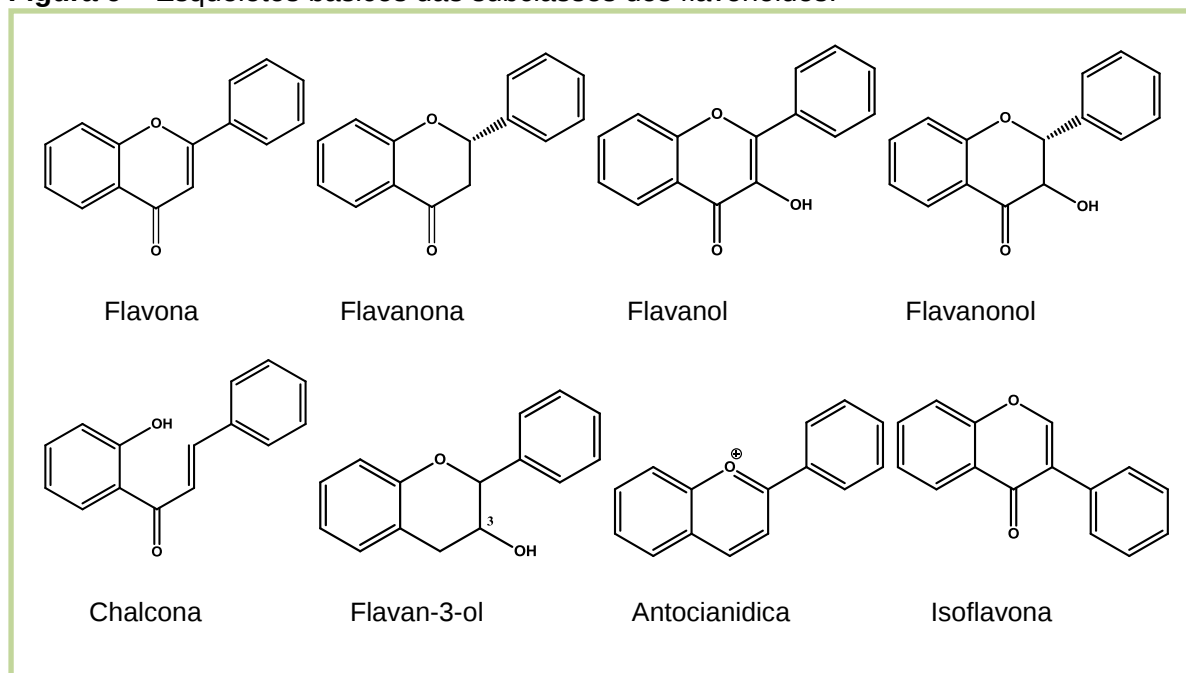
carbônicas são denominadas núcleos A, B e C e os carbonos recebem numeração com números ordinários para os núcleos A e C, e os mesmos números, seguidos de uma linha (') para o núcleo B (PIETTA, 2000).

3.4.1.1 Atividades biológicas dos flavonoides

As atividades dos flavonoides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que podem variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, sulfatações e glicosilações (BIRT et al., 2001).

As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses distintas, tais como: flavona, flavanona, flavanol, flavanonol, chalcona, flavan-3-ol, antocianidinas e isoflavona. (VEITCH; GRAYER, 2008; BOOTS et al., 2008), as quais estão elencadas abaixo (Figura 9).

Figura 9 – Esqueletos básicos das subclasses dos flavonoides.



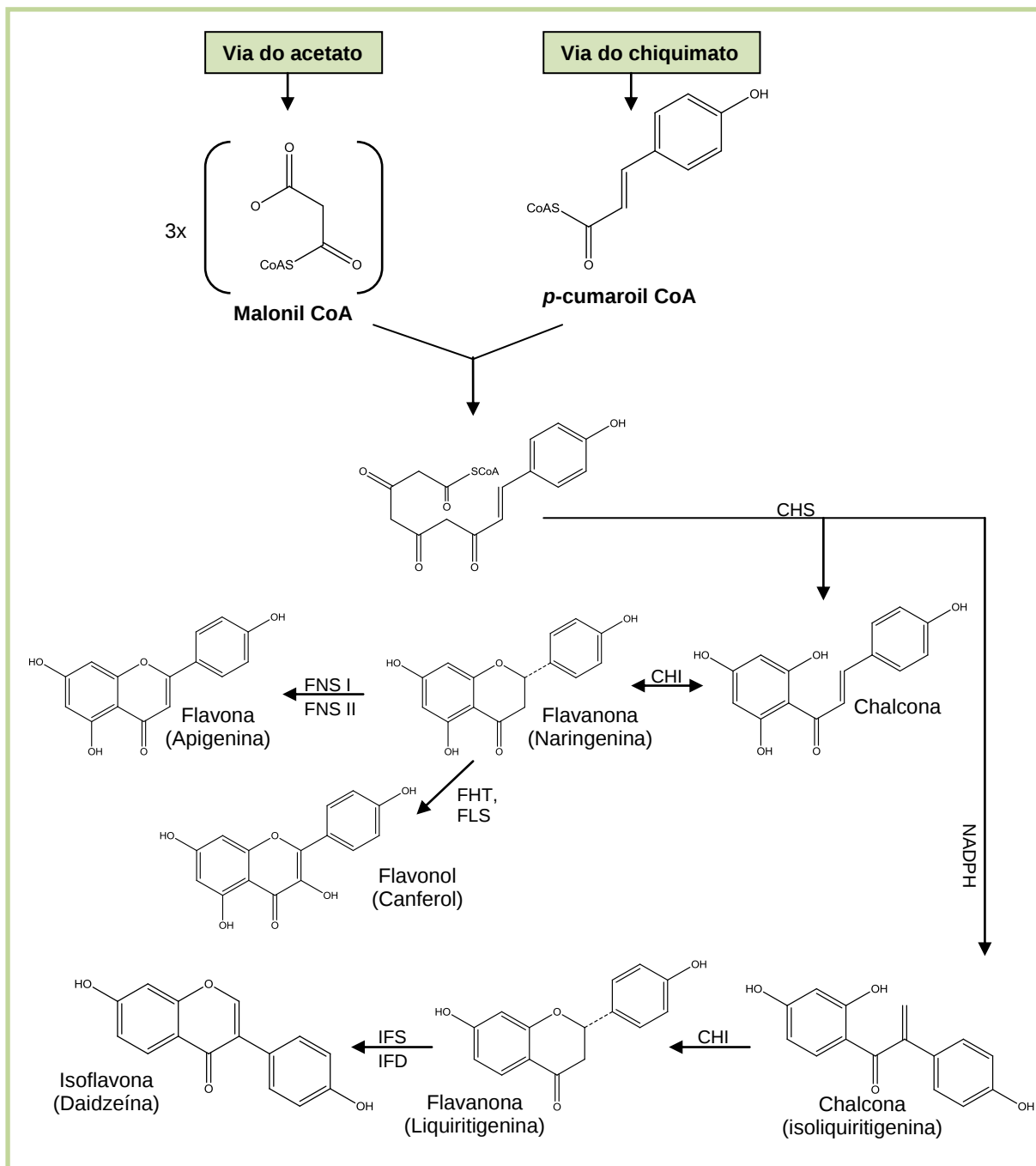
O interesse econômico dos flavonoides é decorrente de suas diferentes propriedades. Ensaios biológicos usando combinações isoladas revelam que os flavonoides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico,

antioxidante, anti-hepatotóxico, anti-hipertensivo, hipolipidêmico, anti-inflamatório, antiplaquetário (PELZER et al., 1998). Estes efeitos podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonoides desempenham nos vários sistemas enzimáticos incluindo hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoredutases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e aminoácido oxidases (FERGUSON, 2001). Os flavonoides têm merecido destaque em virtude de sua ampla gama de ações terapêuticas já demonstradas tanto experimentalmente quanto em humanos (MACHADO et al., 2008).

3.4.1.2 Biossíntese dos flavonoides

O esqueleto básico dos flavonoides, ($C_6-C_3-C_6$), resulta de rotas biossintéticas distintas: a via do ácido chiquímico e a via do acetato (ácido mevalônico) (Esquema 1, p. 38). O anel B e a parte heterocíclica do esqueleto flavônico são originados a partir de um éster do ácido hidroxicinâmico, denominado de *p*-cumaroil-CoA, ao passo que o núcleo A se origina de três unidades de acetato, via malonil-CoA (GOTTLIEB; BORIN, 1998).

A principal enzima envolvida na formação do esqueleto flavônico é a chalcona sintase (CHS), esse catalisa a condensação gradual de três unidades de acetato malonil-CoA com *p*-cumaroil-CoA originando a chalcona. O composto 6'-deoxichalcona, isoliquiritigenina, é um similar sintetizado a partir do malonil-CoA e do *p*-cumaroil-CoA via CHS, envolvendo nessa reação uma redutase dependente (NADPH). Os dois tipos de chalcona citados podem ser precursores diretos das auronas e de outros fenilpropanóides. Mas, em particular o 6-hidroxi e 6-deoxichalcona são os genitores imediatos de todos os tipos de flavonoides e isoflavonoides. A ligação estereoespecífica da chalcona, catalisada pela enzima chalcona isomerase (CHI), origina a flavanona com o esqueleto flavonoide típico (HELLER; FORKMANN, 1994).

Esquema 1 – Representação esquemática da biossíntese dos flavonoides (DEWICK, 1997).

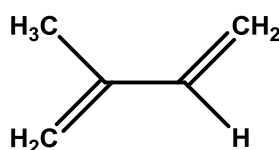
Flavonas são biossintetizadas a partir de flavanonas pela introdução de uma dupla ligação entre C2 e C3. Dois tipos de enzimas, a flavona sintase I (FNS I) e a flavona sintase II (FNS II), são os catalizadores dessa reação. A formação de isoflavonas a partir de flavanonas se dá pela participação da 2-hidroxi-isoflavanona sintase (IFS), um citocromo P₄₅₀ monooxigenase de função mista. A reação envolve um rearranjo oxidativo da flavanona, incluindo a troca do anel da posição C2 para a posição C3 (DEWICK, 1997).

As flavanonas podem também ser hidroxiladas na posição 3, formando dehidroflavonol, que são intermediários biossintéticos na formação do flavanol, catequinas, procianidinas e antocianidinas. Essa reação é catalisada pela 3-flavanona hidroxilase (FHT). Os flavonóis são formados a partir de dehidroflavonóis por introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3, reação esta catalisada pela enzima flavonol sintase (FLS) (HELLER; FORKMANN, 1994).

3.4.2 Terpenoides

Os terpenóides constituem uma grande família de metabólitos secundários, compreendendo cerca de 30.000 terpenos, classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas de cinco carbonos (Figura 10), que vão se ligando entre si, orientadas em sentido cabeça-cauda, formando as seguintes classes: hemiterpenoides (C₅), monoterpenoides (C₁₀), sesquiterpenoides (C₁₅), diterpenoides (C₂₀), triterpenoides (C₃₀), tetraterpenoides (C₄₀) e politerpenoides (>C₄₀) (DUBEY et al., 2003). O isopreno é produzido naturalmente, mas não está envolvido diretamente na formação dos produtos pertencentes a estas classes. As unidades bioquimicamente ativas de isopreno são na realidade o dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e o isopentenil pirofosfato (IPP) (NIERO; MALHEIROS, 2007).

Figura 10 – Unidade isoprênica.



3.4.2.1 Atividades biológicas dos terpenoides

Os terpenoides são compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural apresentando importantes funções biológicas e fisiológicas e, por isso, muitos são utilizados na área farmacêutica (NIERO; MALHEIROS, 2007; RAVEN et al., 2001).

Os hemiterpenoides são o menor grupo dos terpenos, sendo que o seu representante mais conhecido e estudado é o isopreno, um produto volátil liberado de tecidos fotossinteticamente ativos (BUCHANAN et al., 2000)

Os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos voláteis, importantes comercialmente no fabrico de sabões, detergentes, cosméticos e perfumaria, além de serem atrativos dos polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenoides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenos e seus derivados esteroidais apresentam uma gama de funções como proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (NIERO; MALHEIROS, 2007).

Entre os triterpenos está uma importante classe de substâncias, os esteroides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteroides em mamíferos, plantas e insetos. Outra classe importante de triterpenos são as saponinas. Como o próprio nome indica, são prontamente reconhecidas pela formação de espuma em certos extratos vegetais. Essas substâncias são semelhantes ao sabão porque possuem uma parte solúvel (glicose) e outra lipossolúvel (triterpeno). Nas plantas, as saponinas desempenham um importante papel na defesa contra insetos e micro-organismos (PERES, 2004).

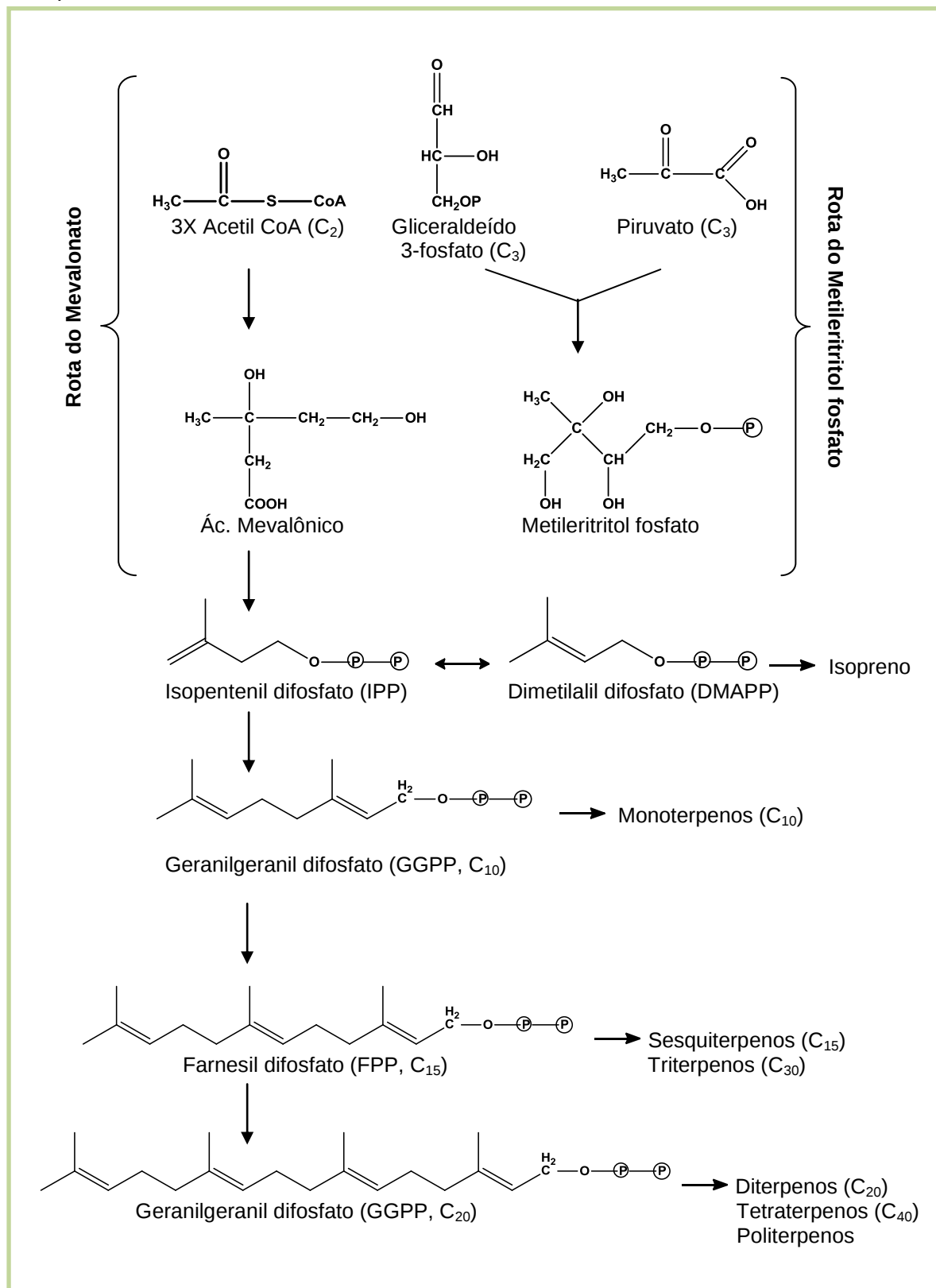
Os triterpenos constituem talvez o grupo mais importante de terpenoides. Eles apresentam diversas propriedades medicinais, destacando-se os efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais (NIERO; MALHEIROS, 2007).

Os tetraterpenoides são carotenoides, pigmentos responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e púrpura dos vegetais, apresentando função essencial na fotossíntese e, especialmente, na pigmentação de flores e frutos. Os politerpenoides são aqueles com mais de oito unidades de isopreno, ou seja, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, como os longos polímeros encontrados na borracha (ROBBERS et al., 1997; BUCHANAN et al., 2000 OLIVEIRA et al., 2003).

3.4.2.2 Biossíntese dos terpenoides

Os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por no mínimo duas rotas diferentes, conforme mostra o esquema abaixo (Esquema 2, p. 42).

Na rota do ácido mevalônico, três moléculas de acetil CoA são ligadas, a partir de uma série de etapas da rota, para formar o ácido mevalônico. Esse importante intermediário de seis carbonos é então pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir o isopentenil difosfato (IPP), que é a unidade básica na formação dos terpenos. O IPP e seu isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP) são as unidades pentacarbonadas ativas na biossíntese dos terpenos que se unem para formar moléculas maiores. Inicialmente o IPP e o DMAPP reagem e formam o geranil difosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos, a partir da qual são formados os monoterpenos. O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranilgeranil difosfato (GGPP), composto de 20 carbonos precursor dos diterpenos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀), respectivamente (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Esquema 2 – Representação esquemática da biossíntese dos terpenos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Material e Métodos



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., realizou-se no decorrer do trabalho laboratorial através do Chemical Abstracts, Biological Abstracts, através do NAPRALERT (banco de dados sobre plantas do ponto de vista químico e biológico), anais de eventos nacionais e internacionais, além de pesquisas no Portal da CAPES, SciFinder e em outras fontes disponíveis na Internet, sendo encontrado raros registros na literatura no que tange ao estudo fitoquímico dessa espécie.

4.2 Coleta do material botânico

O material botânico, partes aéreas, de *D. ecastophyllum* foi coletado no município de Rio Tinto – PB, em setembro de 2010. Sua identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Evelise Marcia Locatelli (Botânica do CES/UFCG, Campus Cuité) e uma exsicata foi preparada e depositada no Herbário do Departamento de Sistemática e Ecologia (DSE) – UFPB, catalogada como 45738 (JPB).

4.3 Processamento do material botânico

O material botânico fresco foi desidratado em estufa com ar circulante, durante 72 horas, a temperatura média de 40 °C, sendo, em seguida, triturado em moinho mecânico, fornecendo 8.800,00 g do pó da planta.

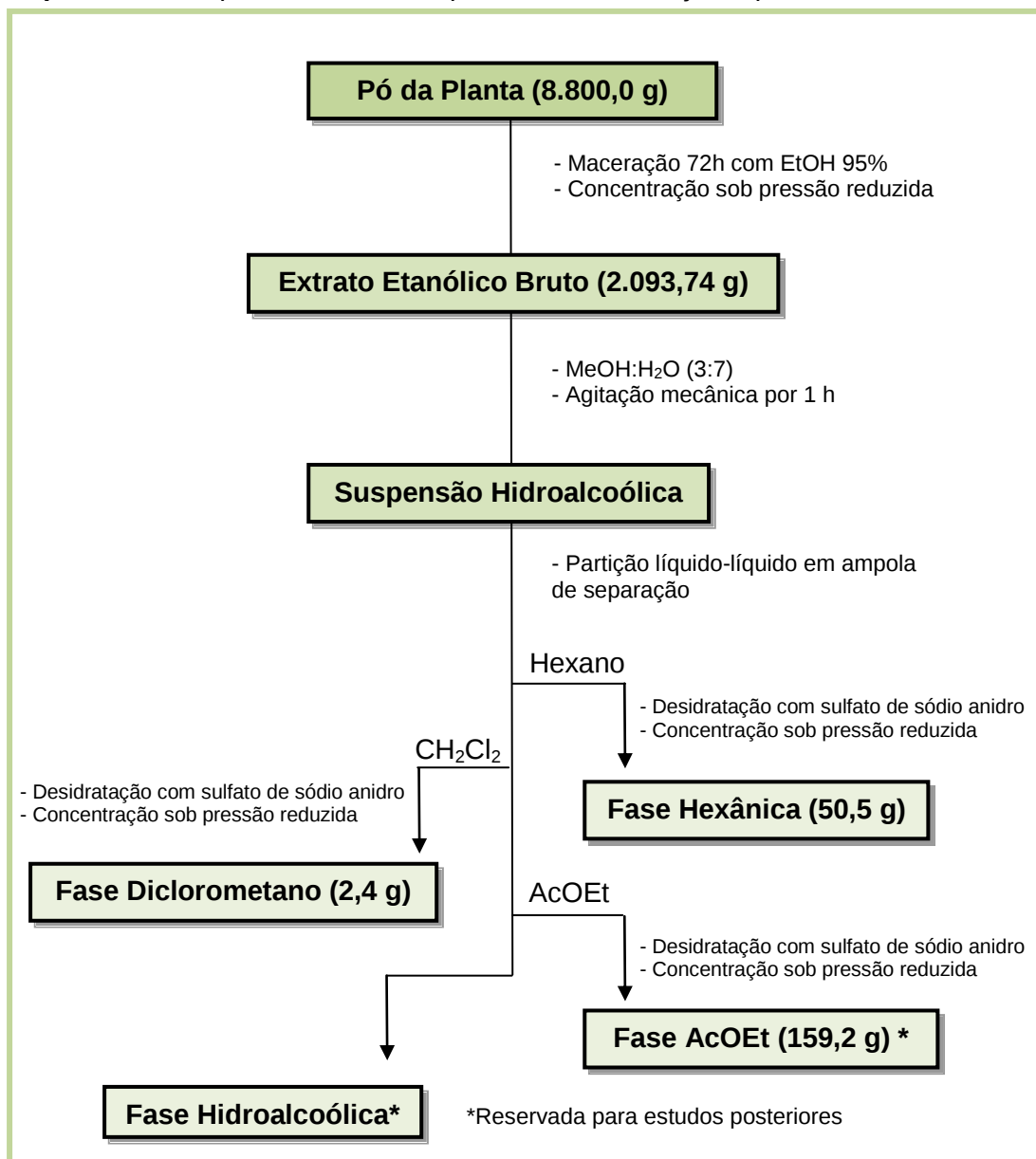
4.4 Obtenção e Particionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEB)

O pó da planta (8.800,00 g) foi macerado em etanol (EtOH) a 95 % por 72 horas, sendo tal processo repetido exaustivamente. Em seguida, a solução extrativa foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C, fornecendo 2.093,74 g (23,8%) do EEB.

Uma alíquota de 300,0 g do EEB foi suspensa em uma solução de MeOH:H₂O (3:7), sob agitação mecânica por uma hora obtendo-se, a suspensão hidroalcoólica

(SH). A SH foi submetida sequencialmente a um particionamento com hexano, diclorometano (CH_2Cl_2) e acetato de etila (AcOEt). As fases obtidas foram, então, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se 50,5 g (16,8%) da fase hexânica, 2,4 g (0,8%) da fase diclorometano e 159,2 g (53,1%) da fase acetato de etila (Esquema 3).

Esquema 3 – Etapas envolvidas no processo de obtenção e particionamento do EEB.



4.5 Isolamento e purificação dos constituintes químicos das Fases Hexânica e Diclorometano do Extrato Etanólico Bruto

O isolamento, purificação e análise dos constituintes químicos das fases hexânica e diclorometano do Extrato Etanólico Bruto de *D. ecastophyllum* foram realizados através de técnicas cromatográficas como: Cromatografia em Coluna (CC) e Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), respectivamente.

4.6 Procedimentos cromatográficos e definição do grau de pureza

Os adsorventes gel de sílica 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh) e sílica flash (partículas com 0,063-0,04 mm, 230-400 mesh) foram utilizados como fase estacionária para a CC, tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas com dimensões variando de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Como fase móvel, nos processos cromatográficos, foram utilizados solventes comerciais destilados no setor de destilação de solventes do Laboratório de Fitoquímica da UFPB, tais como hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

A CCDA foi empregada para a análise e reunião das frações obtidas por cromatografia em coluna e para a análise da pureza dos constituintes isolados. As placas cromatográficas utilizadas para CCDA foram preparadas com uma suspensão gel de sílica PF₂₅₄ (Art. 7749 Merck) em água destilada (1:2 m/v) distribuída sobre a placa de vidro com auxílio de um espalhador mecânico tipo *quick fit*, seguindo técnica descrita por Matos (1997), tendo a camada de sílica espessura igual a 0,3 mm. Como suportes para as placas cromatográficas foram utilizadas placas de vidro com dimensões variadas de 5x20, 10x20 e 20x20 cm. As cromatoplasmas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 100 °C durante duas horas.

As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm como também impregnação das placas em cubas de vidro, saturadas por vapor de iodo. O monitoramento das substâncias através do fator de retenção (R_f) na CCDA foi o método adotado para reunir as frações coletadas durante a cromatografia em coluna.

Para definir o grau de pureza das substâncias isoladas, fez-se o uso de CCDA utilizando-se vários sistemas de solventes.

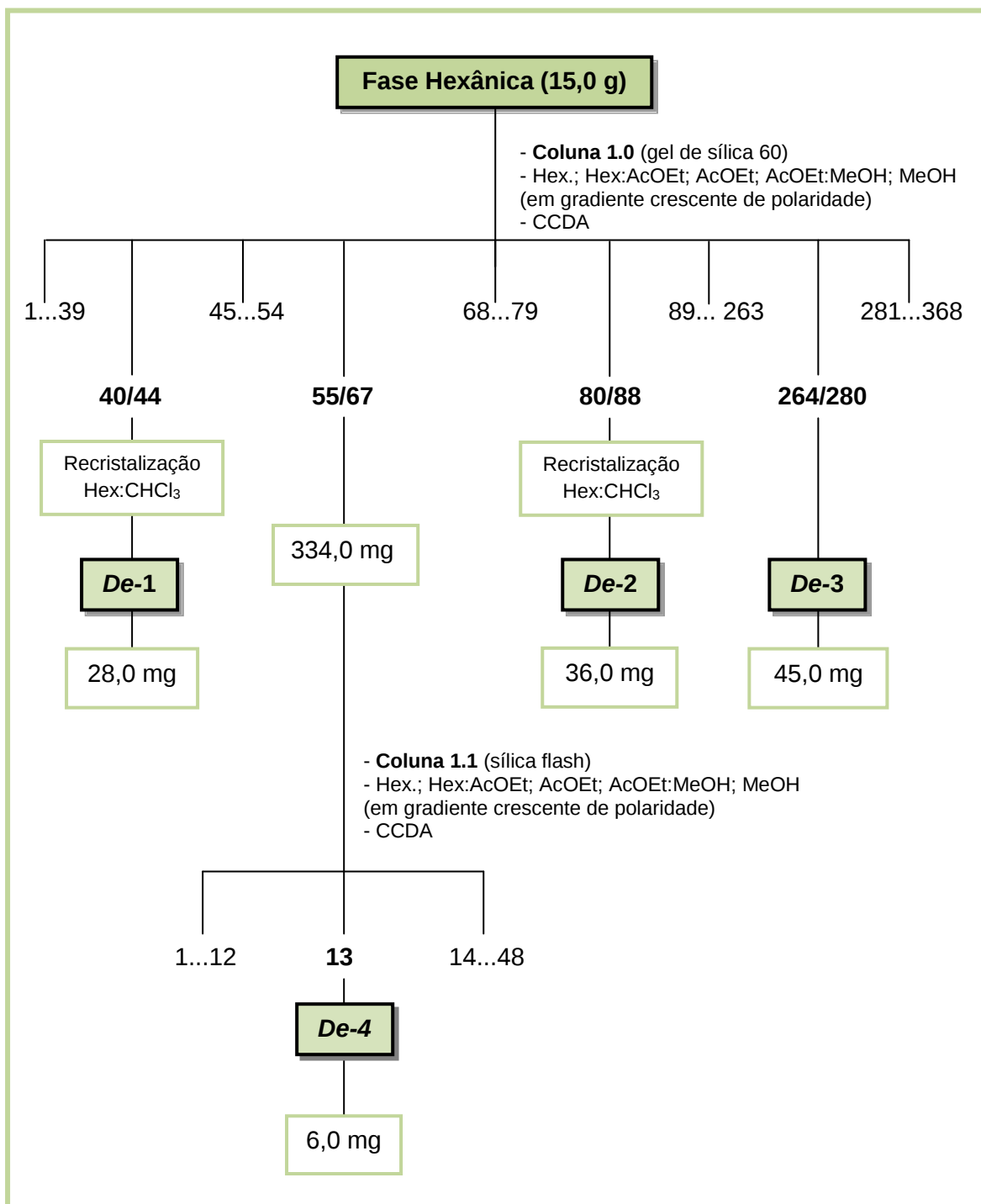
4.7 Processamento cromatográfico da Fase Hexânica do Extrato Etanólico Bruto

Uma alíquota de 15,0 g da fase hexânica (Coluna 1.0) do EEB das partes aéreas de *D. ecastophyllum* foi submetida a uma cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 e como fase móvel foram utilizados hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade, sendo suas frações concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida (Esquema 4, p. 48).

Desta coluna, foram coletadas 368 frações de 150 mL cada, concentradas em evaporador rotativo, analisadas em CCDA e reunidas de acordo com seus R_f's (Quadro 2, p. 49). As frações 40/44 e 80/88 (28,0 e 36,0 mg respectivamente), apresentaram-se como sólidos brancos cristalinos que após sucessivas recristalizações com hexano e clorofórmio, foram submetidas a espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C codificando as substâncias como **De-1** e **De-2**. A fração 264/268 forneceu um precipitado branco (45,0 mg) submetido a espectroscopia de RMN ¹H e RMN ¹³C, sendo codificado como **De-3**.

A fração 55/67 (334,0 mg) foi submetida a nova cromatografia em coluna utilizando como adsorvente sílica flash (Coluna 1.1) e como eluentes hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade (Esquema 4, p. 48). Dessa coluna, foram coletadas 96 frações de 20 mL cada, analisadas em CCDA e reunidas de acordo com seus R_f's (Quadro 3, p. 49). A fração 13 (6,0 mg) apresentou-se na forma de cristais brancos e foram submetidas a espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C codificando a substância como **De-4**.

Esquema 4 – Etapas envolvidas no processamento cromatográfico da fase hexânica de *Dalbergia ecastophyllum*.



Quadro 2 – Sistemas de eluições utilizados no processamento cromatográfico da fase hexânica (Coluna 1.0) de *Dalbergia ecastophyllum*, frações coletadas para cada sistema de eluição e grupos de frações reunidas.

SISTEMA DE ELUIÇÃO	FRAÇÕES OBTIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS
Hexano (100%)	01-32	1-3, 4-10, 11-21, 22-23, 24-30
Hexano:AcOEt (95:5)	33-69	31-39, 40-44 , 45-54, 55-67
Hexano:AcOEt (93:7)	70-84	68-79, 80-88
Hexano:AcOEt (85:15)	85-132	89-94, 95-102, 103-114, 115-130
Hexano:AcOEt (9:1)	133-140	131-138
Hexano:AcOEt (8:2)	141-172	139-145, 146-152, 153-167, 168-176
Hexano:AcOEt (7:3)	173-187	177-180, 181-188
Hexano:AcOEt (6:4)	188-198	189-194
Hexano:AcOEt (1:1)	199-210	195-208
Hexano:AcOEt (4:6)	211-226	209-224
Hexano:AcOEt (3:7)	227-239	225-232, 233-240
Hexano:AcOEt (2:8)	240-253	241-252
Hexano:AcOEt (1:9)	254-263	253-263
AcOEt (100%)	264-279	264-280
AcOEt:MeOH (99:1)	280-294	281-290
AcOEt:MeOH (95:5)	295-319	291-314, 315-322
AcOEt:MeOH (9:1)	320-331	323-342
AcOEt:MeOH (8:2)	332-346	334-368
AcOEt:MeOH (7:3)	347-368	

Quadro 3 – Sistemas de eluições utilizados no processamento cromatográfico da fase hexânica (Coluna 1.1) de *Dalbergia ecastophyllum*, frações coletadas para cada sistema de eluição e grupos de frações reunidas.

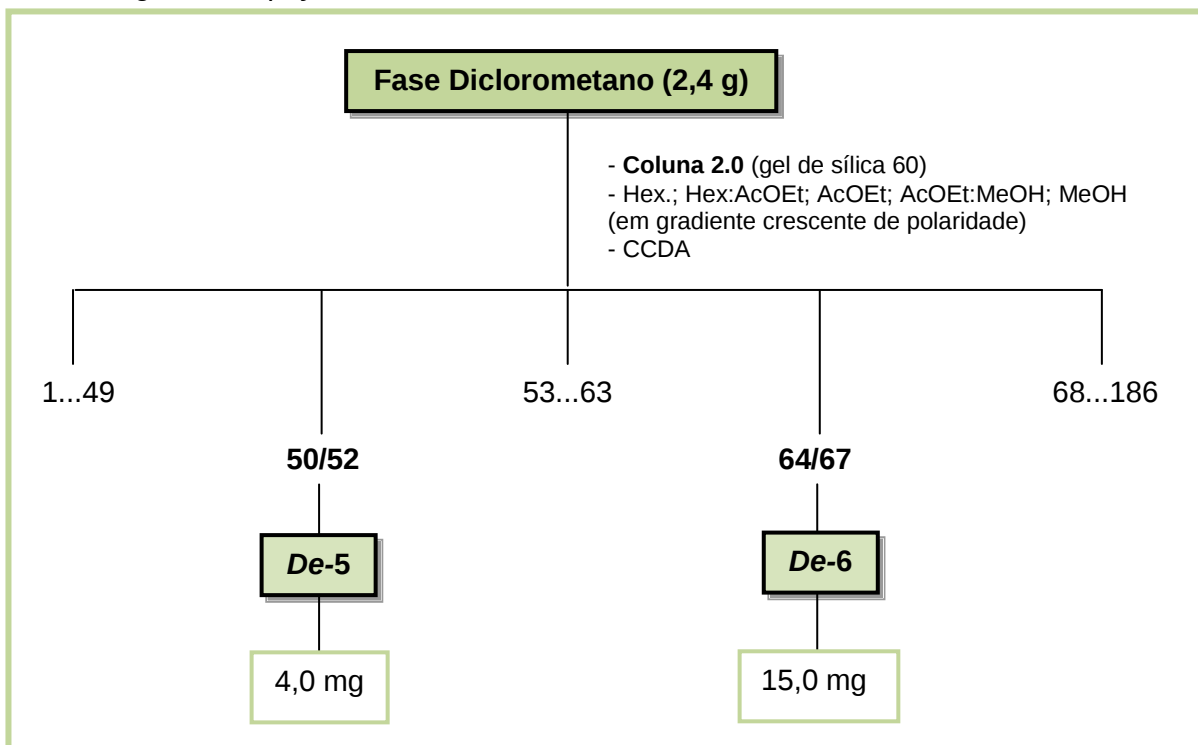
SISTEMA DE ELUIÇÃO	FRAÇÕES OBTIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS
Hexano:AcOEt (98:2)	01-40	1-9, 10-12, 13 , 14-24, 25-27, 28-30, 31-40
Hexano:AcOEt (97:3)	41-46	41-42, 43-48
Hexano:AcOEt (95:5)	47-51	49-51
Hexano:AcOEt (9:1)	52-61	52, 53-54, 55-56, 57-64
Hexano:AcOEt (85:15)	62-71	65-71
Hexano:AcOEt (7:3)	72-79	72-75, 76-82
Hexano:AcOEt (6:4)	80-82	
Hexano:AcOEt (1:1)	83-85	83-87
AcOEt (100%)	86-87	
AcOEt:MeOH (9:1)	88-89	88-90, 91-92
AcOEt:MeOH (8:2)	90-92	
AcOEt:MeOH (7:3)	93-96	93-96

4.8 Processamento cromatográfico da Fase Diclorometano do Extrato Etanólico Bruto

A fase diclorometano (2,4 g) do EEB de *D. ecastophyllum* foi submetida a uma cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 (Coluna 2.0) e como fase móvel foram utilizados hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade, sendo suas frações concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida (Esquema 5).

Foram coletadas 186 frações de 100 mL cada, concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, analisadas em CCDA e reunidas de acordo com seus R_f's (Quadro 4, p. 50). A fração 50/52 forneceu cristais amarelos (4,0 mg) e a fração 64/68 cristais brancos (15,0 mg) as quais foram submetidas a espectroscopia de RMN ¹H e RMN ¹³C sendo codificadas como **De-5** e **De-6**, respectivamente.

Esquema 5 – Etapas envolvidas no processamento cromatográfico da fase diclorometano de *Dalbergia ecastophyllum*.



Quadro 4 – Sistemas de eluições utilizados no processamento cromatográfico da fase diclorometano (Coluna 2.0) de *Dalbergia ecastophyllum*, frações coletadas para cada sistema de eluição e grupos de frações reunidas.

SISTEMA DE ELUIÇÃO	FRAÇÕES OBTIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS
Hexano (100%)	01-02	1-3
Hexano:AcOEt (95:5)	03-29	4, 5-10,11-13,14-20, 21-31
Hexano:AcOEt (93:7)	30-36	32-40
Hexano:AcOEt (9:1)	37-47	41-49
Hexano:AcOEt (85:15)	48-52	50-52
Hexano:AcOEt (8:2)	53-63	53-57, 58-59, 60-61, 62-63
Hexano:AcOEt (75:25)	64-69	64-68
Hexano:AcOEt (7:3)	70-74	69-71, 72-73
Hexano:AcOEt (6:4)	75-86	74-82, 83-90
Hexano:AcOEt (1:1)	87-101	91-93, 94-100
Hexano:AcOEt (4:6)	102-113	101-132
Hexano:AcOEt (3:7)	114-124	
Hexano:AcOEt (2:8)	125-136	
Hexano:AcOEt (1:9)	137-145	133-154
AcOEt (100%)	146-153	155-169
AcOEt:MeOH (95:5)	154-158	
AcOEt:MeOH (9:1)	159-167	
AcOEt:MeOH (8:2)	168-180	
AcOEt:MeOH (7:3)	181-186	

4.9 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados de *D. ecastophyllum*

A caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados de *D. ecastophyllum* foi realizada pela análise dos espectros obtidos através dos métodos espectroscópicos no Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono-13 (RMN ^{13}C), utilizando técnicas uni e bidimensionais (HMQC, HMBC, NOESY e COSY), além de comparações com modelos da literatura.

4.9.1 Infravermelho

Os dados espectrais na região do infravermelho foram obtidos em aparelho Perkin-Elmer, FT-IR-1750 do Laboratório de Fitoquímica do Centro de Biotecnologia

(CBiotec) da UFPB, utilizando-se de 1 a 3 mg da amostra em pastilhas de KBr. As absorções foram registradas em cm^{-1} .

4.9.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos nos espectrômetros Mercury-Varian a 200 e 500 MHz do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise – Central Analítica da UFPB (LMCA-UFPB), otimizados para técnicas uni e bidimensionais, utilizando-se quantidades variáveis de amostras. Os solventes empregados para solubilizar as amostras foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), dimetil sulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) e acetona deuterada ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) cujos picos característicos em RMN ^1H e ^{13}C serviram como padrão interno durante a obtenção dos espectros.

As constantes de acoplamento (J) em Hz e os deslocamentos químicos (δ) em partes por milhão (ppm) foram referenciados para RMN de ^1H pelos sinais característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas dos solventes: CHCl_3 (7,24 ppm), $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (7,55 ppm), $\text{DMSO}-d_6$ (2,49 ppm) e $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (2,04 ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , os deslocamentos químicos foram referenciados pelos sinais dos carbonos dos solventes deuterados: CDCl_3 (77,0 ppm), $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (135,5 ppm), $\text{DMSO}-d_6$ (39,5 ppm) e $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (29,8 ppm).

As multiplicidades dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete) e *m* (multiplete). Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos pela técnica APT convencionados com os sinais de carbonos não hidrogenados (C) e metilênicos (CH_2) acima da linha base e sinais de carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3) abaixo da linha base.

Os espectros de RMN também foram otimizados para as técnicas bidimensionais como: HMQC, espectro de correlação heteronuclear, que correlaciona entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos; HMBC, espectro de correlação heteronuclear, que correlaciona entre os hidrogênios e carbonos a duas ($^2J_{\text{CH}}$) e três ($^3J_{\text{CH}}$) ligações; NOESY, espectro de correlação homonuclear, que correlaciona os hidrogênios espacialmente; e COSY, estabelece as correlações entre hidrogênios que são responsáveis, entre si, pelo desdobramento do sinal, e assim discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN ^1H .

Resultados e Discussão

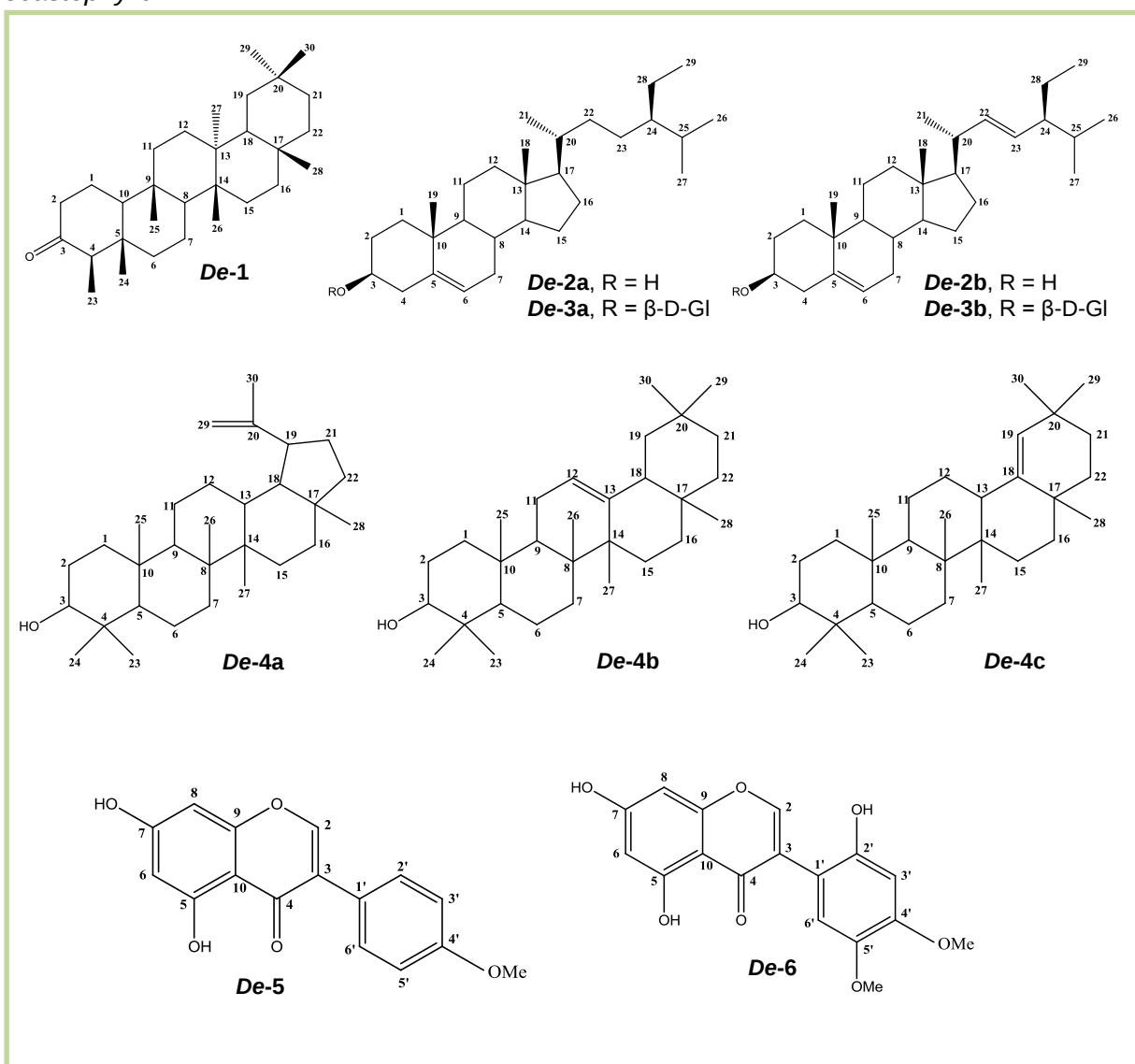


5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Substâncias isoladas das partes aéreas de *Dalbergia ecastophyllum*

O estudo fitoquímico do EEB das partes aéreas de *Dalbergia ecastophyllum* resultou no isolamento e identificação estrutural de dez substâncias. Da fase hexânica foram isolados quatro compostos, codificados como **De-1**, **De-2(a/b)**, **De-3(a/b)** e **De-4(a/b/c)** e da fase diclorometano mais dois compostos, **De-5** e **De-6** (Figura 11).

Figura 11 – Estruturas químicas das substâncias isoladas das partes áreas de *D. ecastophyllum*.

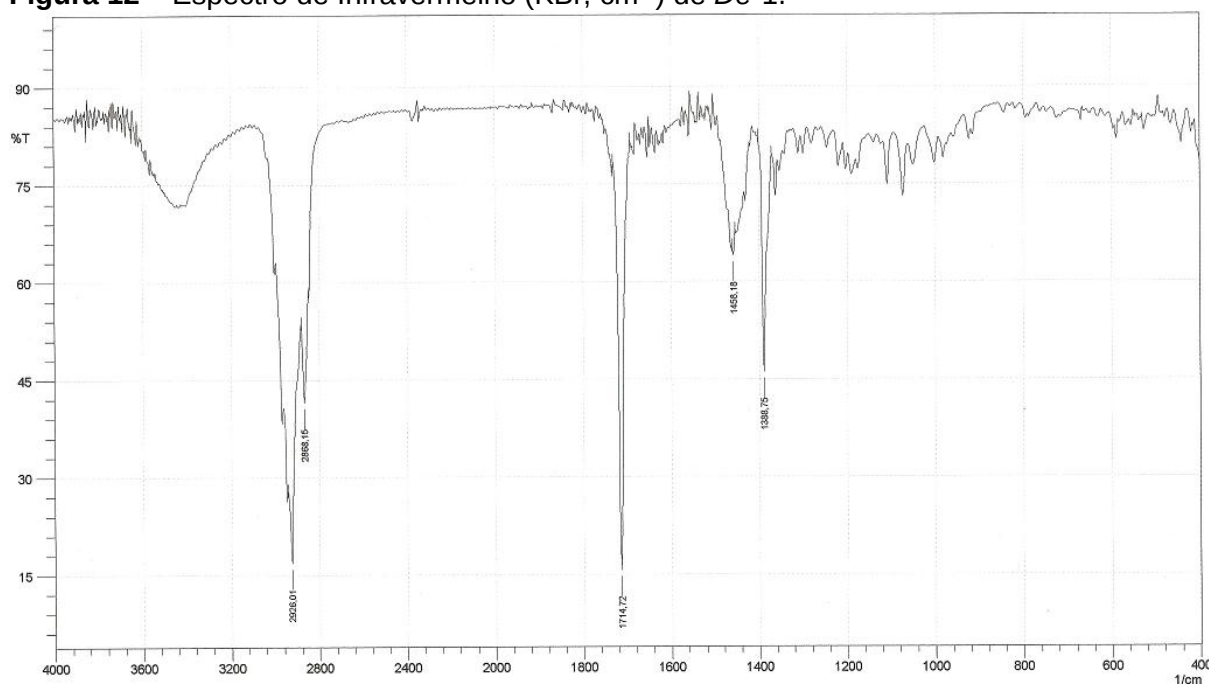


5.2 Determinação estrutural de De-1

A substância codificada como *De-1* foi obtida na forma de cristais brancos com massa de 28,0 mg, correspondendo a 1,87 % em relação à massa da fase hexânica.

O espectro de absorção na região do IV (Figura 12) revelou uma banda de absorção intensa em 1714 cm^{-1} , típica de estiramento de carbonila (C=O) não conjugada. Também foi observado bandas características de dobramento de CH_2 em 1458 cm^{-1} e CH_3 em 1388 cm^{-1} , além de uma absorção na região de 2926 cm^{-1} , correspondente a deformação axial do grupo C-H sp^3 (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Figura 12 – Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *De-1*.



O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 14, p. 59) e sua expansão (Figura 15, p. 60) evidenciou um envelope de sinais na região entre δ_{H} 0,69 e 2,33, característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, sugestivo de substâncias que possuem esqueleto triterpênico pentacíclico. Foram observados sinais em δ_{H} 0,69, 0,84, 0,86, 0,92, 0,97, 1,02, 1,15 e 1,31, condizentes com as metilas H-27, H-23, H-29, H-24, H-30, H-25, H-26 e H-28, desse tipo de esqueleto.

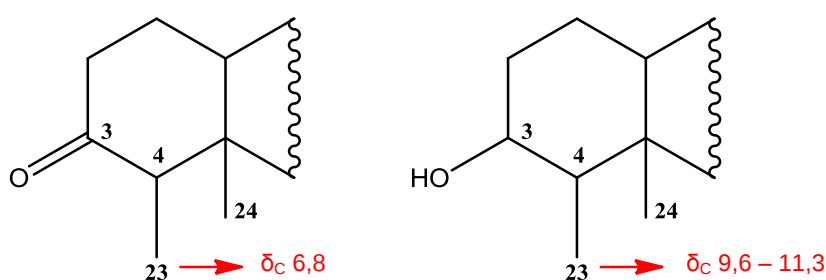
O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (Figura 16, p. 61) e suas expansões (Figura 17 e 18, p. 62) revelou a presença de 30 sinais, dos quais 7

foram referentes a carbonos não hidrogenados, 4 a carbonos metínicos, 11 a carbonos metilênicos e 8 a carbonos metílicos, evidenciando tratar-se a substância de um triterpeno.

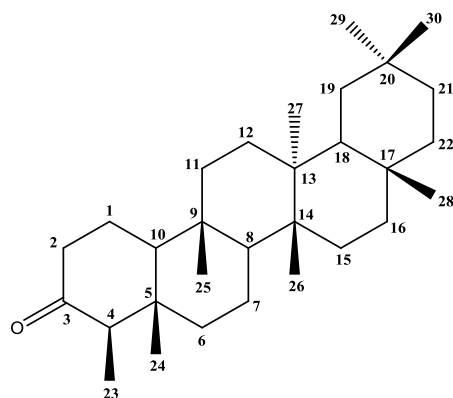
A presença do grupo oxo é caracterizada por deslocamento químico entre δ_C 198,4 e δ_C 219,0. A insaturação de grupos oxo resulta em sinais de carbono mais desprotegido que os das ligações olefínicas. Em geral, carbonos carbonílicos saturados absorvem entre δ_C 211,9 e 219,0 e em moléculas α,β insaturadas encontram-se mais protegidos absorvendo entre δ_C 198,4 e 206,2. No espectro de RMN ^{13}C de *De-1* observou-se um deslocamento químico em δ_C 213,3 evidenciando a presença de uma carbonila em C-3, corroborando com o espectro de IV. (MAHATO; KUNDU, 1994).

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 16, pág. 61), pôde-se observar um sinal em δ_C 58,1, que de acordo com a literatura (CANO et al., 2000) é característico dos triterpenos da serie friedelano, os quais possuem grupos metila vicinais em C-4 e C-5, além de um outro grupo metila em δ_C 17,9, inserido em C-9.

Observou-se ainda um sinal com deslocamento químico em δ_C 6,8 (Figura 17, p. 62), típico de absorções do C-23 devido ao efeito γ -gauche da metila C-24 e pelo efeito do cone de proteção da carbonila em C-3. Ao contrário de compostos hidroxilados em C-3, que desprotegem o C-23 deslocando sua absorção para uma faixa entre δ_C 9,6 a 11,3, como demonstrado abaixo (MAHATO; KUNDU, 1994).

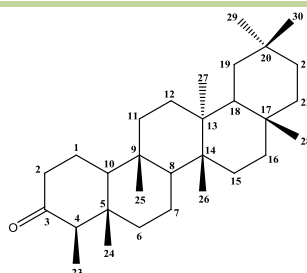


Estas informações, em conjunto com os valores de RMN ^{13}C descritos na literatura (Tabela 1, p. 58), permitiram identificar *De-1*, como sendo o triterpeno Friedelan-3-ona, mais conhecido como friedelina (Figura 13, p. 57) (CANO et al., 2000).

Figura 13 – Estrutura química de De-1, friedelina.

Trata-se do primeiro relato do isolamento de friedelina dessa espécie, porém outras espécies do gênero *Dalbergia* já apresentaram esse composto em sua constituição, tais como *D. hainanensis*, *D. monetaria*, *D. variabilis* e *D. volubilis* (ZHANG et al., 2003; KUROSAWA et al., 1978). Estudos desenvolvidos por Antonisamy et al. (2011), mostraram que a friedelina possui atividades anti-inflamatória, analgésica e antipirética quando testadas em camundongos.

Tabela 1 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de De-1 em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C da friedelina em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente), segundo Cano et al. (2000).



friedelina

C	Literatura	De-1	
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
1	22,2	22,2	-
2	41,5	41,5	-
3	213,2	213,3	-
4	58,2	58,1	2,24 (m)
5	42,1	42,1	-
6	41,3	41,2	-
7	18,2	18,2	-
8	53,1	53,0	-
9	37,4	37,4	-
10	59,4	59,4	-
11	35,6	35,5	-
12	30,5	30,4	-
13	39,7	39,6	-
14	38,3	38,2	-
15	32,4	32,3	-
16	36,0	35,9	-
17	30,0	29,9	-
18	42,8	42,7	-
19	35,3	35,3	-
20	28,1	28,1	-
21	32,7	32,7	-
22	39,2	39,2	-
23	6,8	6,8	0,84 (d, $J = 5,0$ Hz, 3H)
24	14,6	14,6	0,92 (s)
25	17,9	17,9	1,02 (s)
26	20,2	20,2	1,15 (s)
27	18,6	18,6	0,69 (s)
28	32,1	32,0	1,31 (s)
29	35,0	35,0	0,86 (s)
30	31,8	31,7	0,97 (s)

Figura 14 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De-1*.

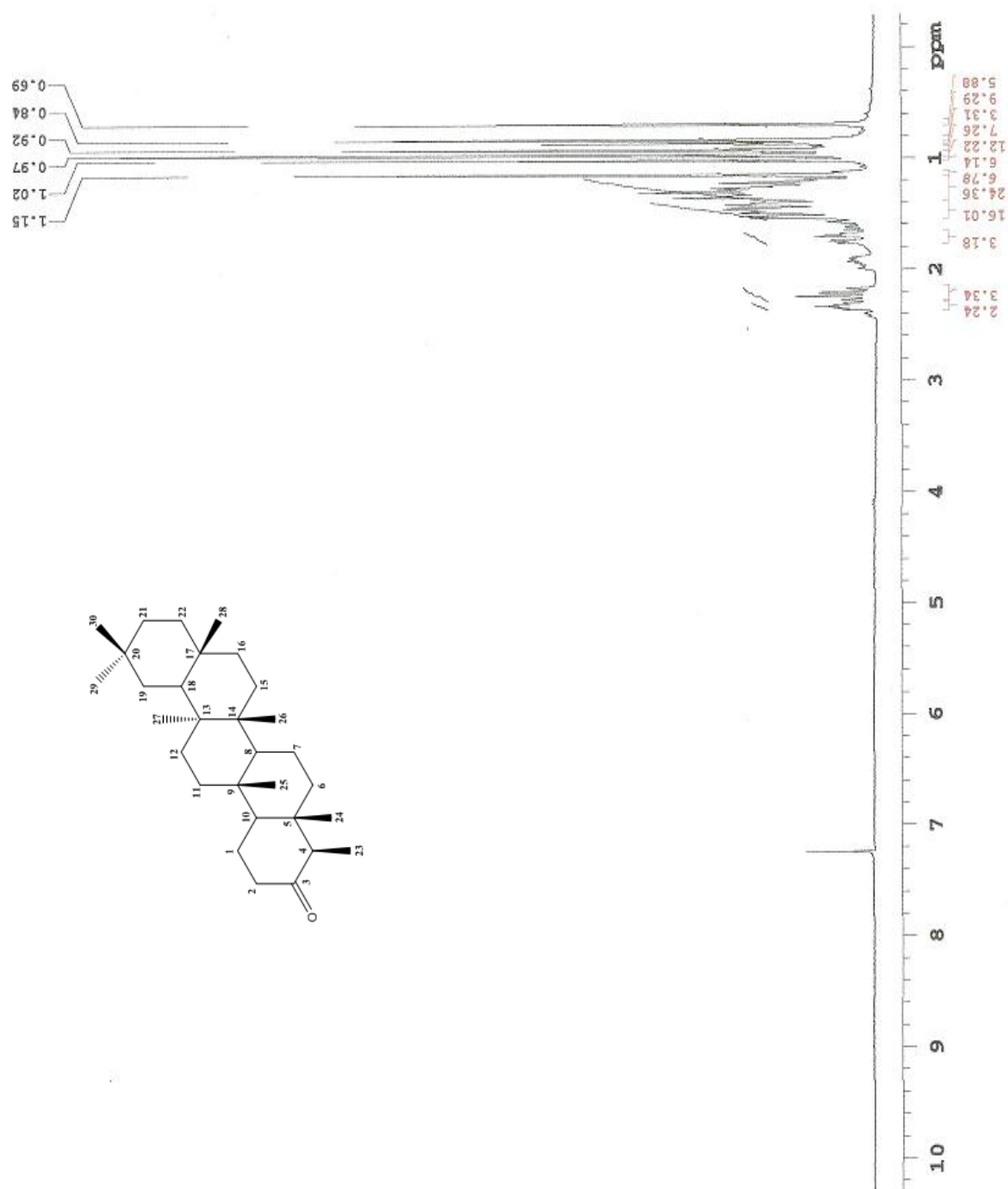


Figura 15 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de De-1 (δ 0,6 – 2,4).

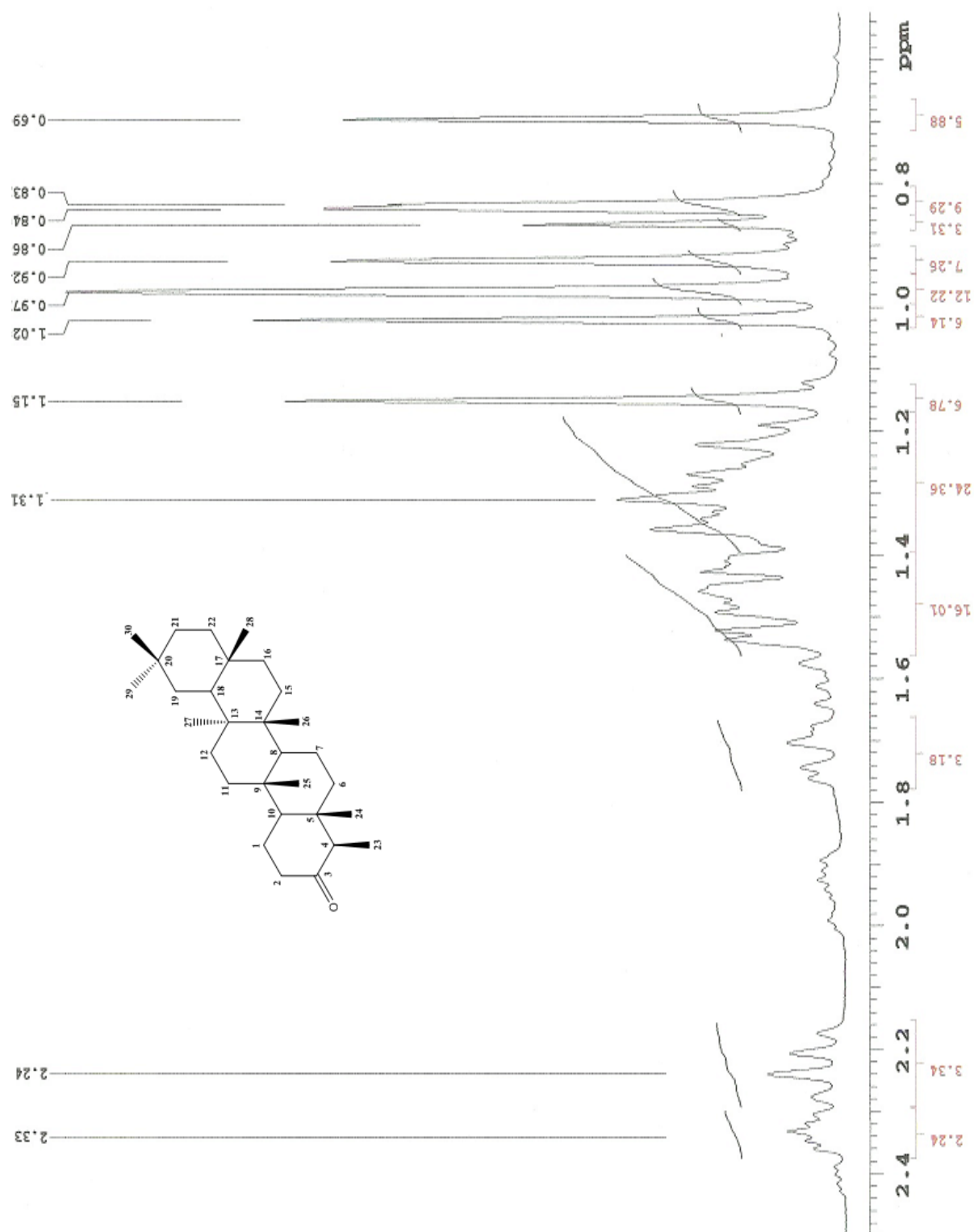


Figura 16 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 125 MHz) de De-1.

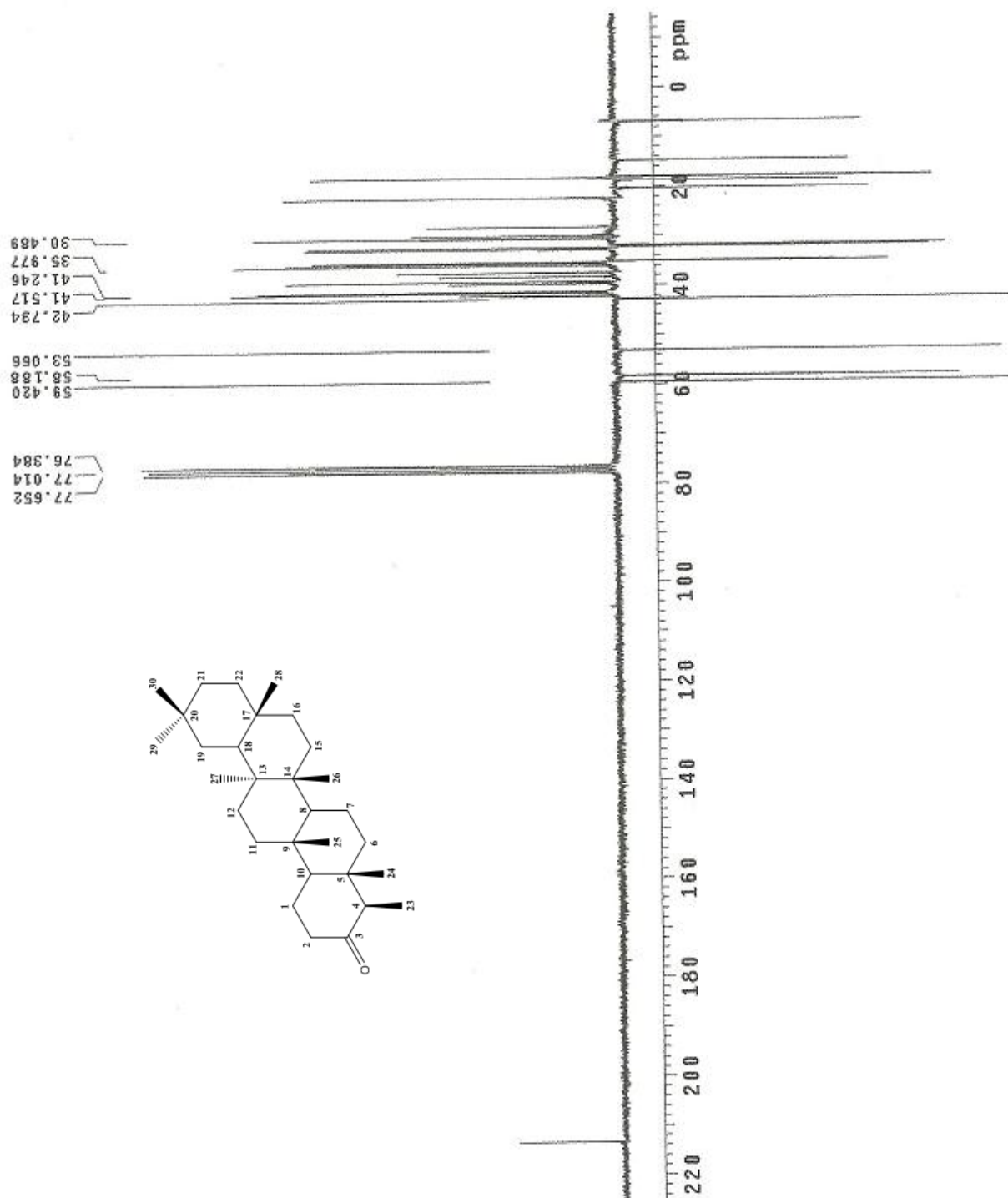
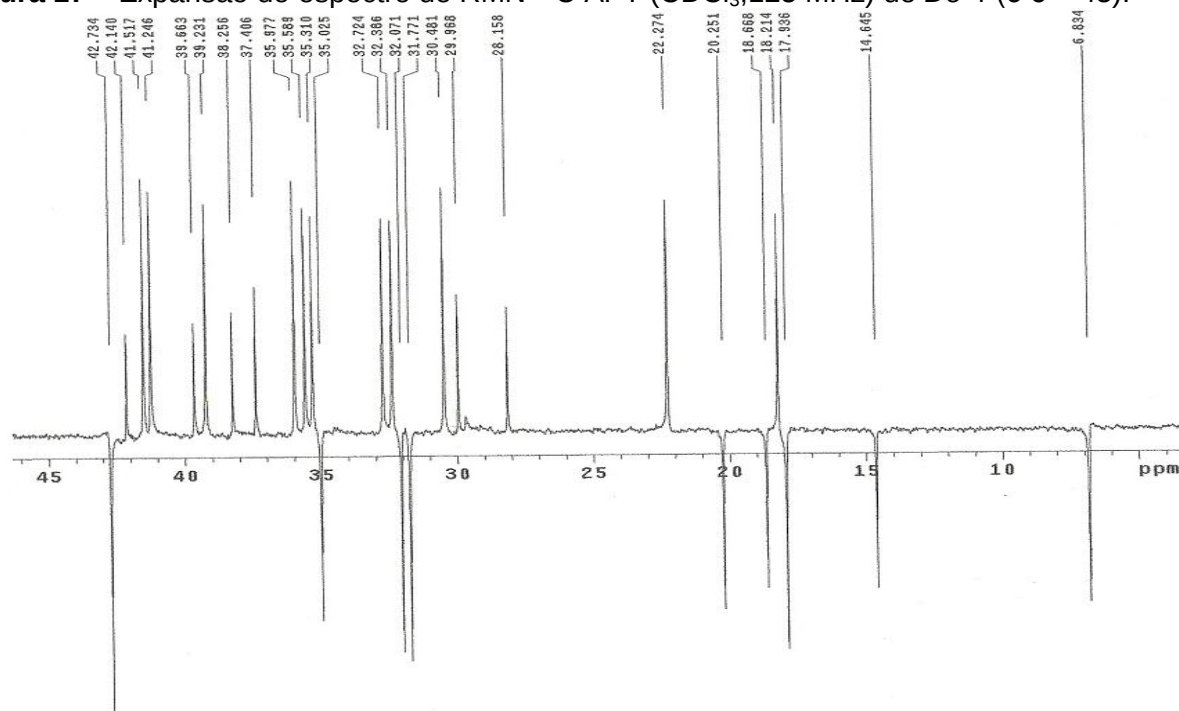
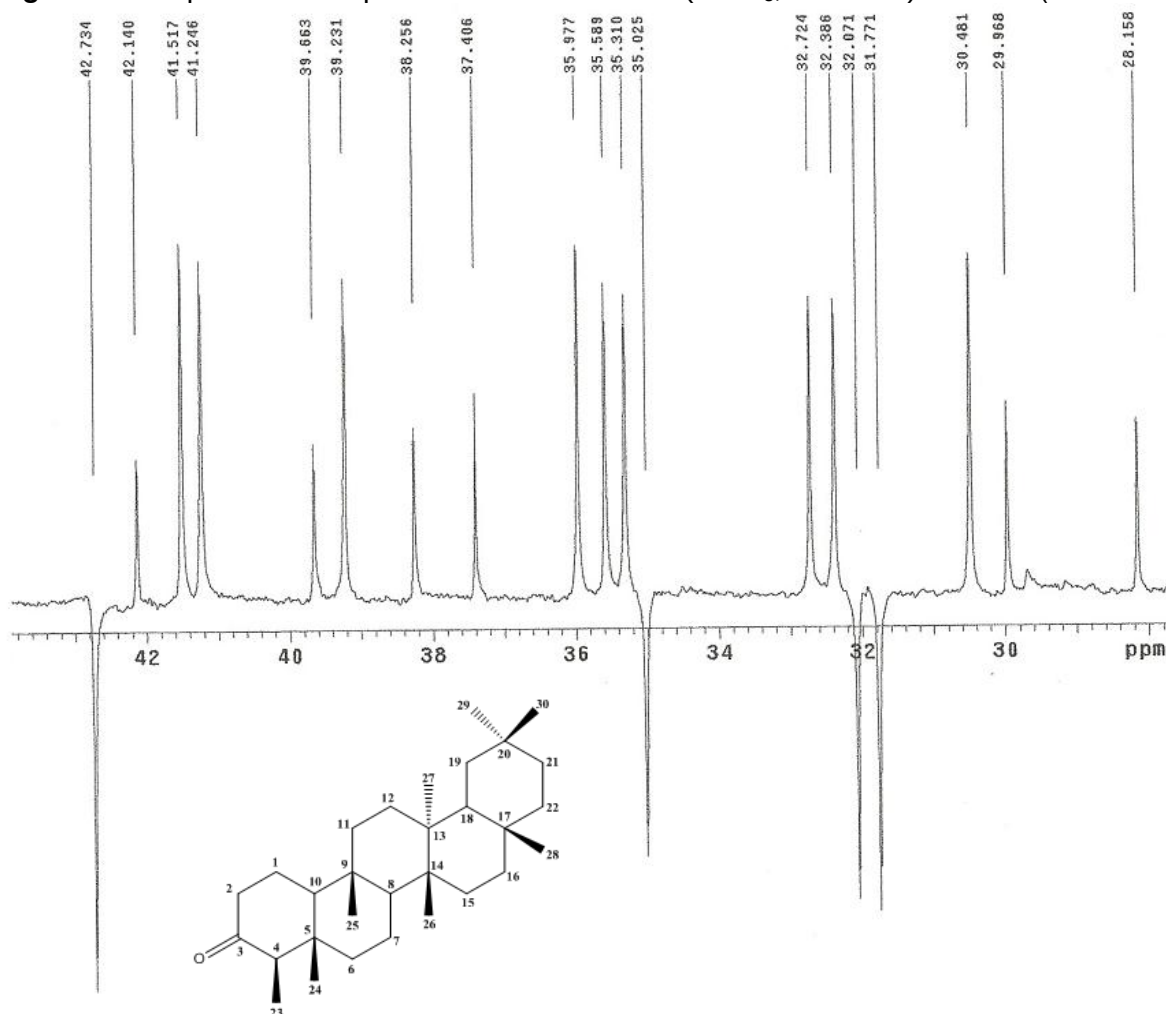


Figura 17 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 125 MHz) de De-1 (δ 5 – 45).**Figura 18** - Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 125 MHz) de De-1 (δ 28 – 44).

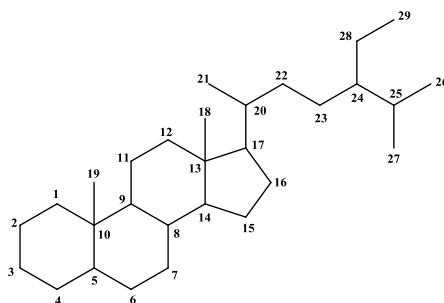
5.3 Determinação estrutural de De-2(a/b)

A substância codificada como *De-2* foi obtida na forma de cristais brancos com 36,0 mg de massa, correspondendo a 2,40 % em relação à massa da fase hexânica.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 21, p. 66) e suas expansões apresentaram um conjunto de deslocamentos químicos simples e de alta multiplicidade, característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, em δ_{H} 0,6 - 2,2 que são compatíveis com substâncias que possuem esqueleto terpênico e/ou esteroidal (KOJIMA et al., 1990). Um multipletto em δ_{H} 3,49 (Figura 22, p. 67) mostrou-se característico de hidrogênio oximetínico na posição 3 em triterpenos e/ou esteroides. Um dupletto largo em δ_{H} 5,32 ($J = 4,0$ Hz) e dois duplos dupletos, acoplando *trans* entre si, em δ_{H} 4,97 ($J = 8,2$ e 15,3 Hz) e 5,13 ($J = 8,2$ e 15,3 Hz) permitiram sugerir duas unidades olefínicas para *De-2*, trissubstituída na posição C-6 e dissubstituída na posição C-22-C-23, (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

No espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, CDCl_3) (Figura 24, p. 68) e nas expansões, sinais intensos e outros duplicados permitiram afirmar que *De-2* tratava-se de uma mistura de duas substâncias, ambas apresentando o mesmo esqueleto carbônico: núcleo esteroidal do tipo estigmasteno C_{29} , (Figura 19) (KOJIMA et al., 1990).

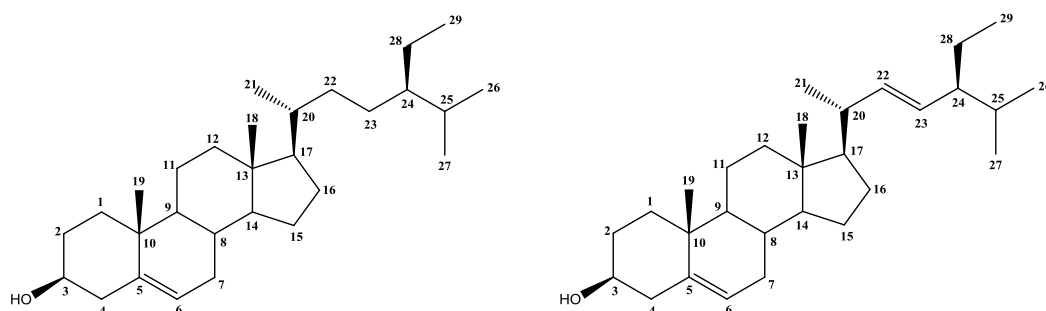
Figura 19 – Núcleo esteroidal do tipo estigmasteno.



Um sinal intenso em δ_{C} 71,7 (Figura 25, p. 69) referente a dois carbonos oximetínicos em C-3; sinais para carbonos sp^2 metínico em δ_{C} 121,6 (2C) e não hidrogenado em δ_{C} 140,7 (2C) compatíveis com dupla ligação localizada entre C-5 e C-6; outros em δ_{C} 138,3 (1C) e 129,2 (1C) para carbonos sp^2 metínicos condizentes

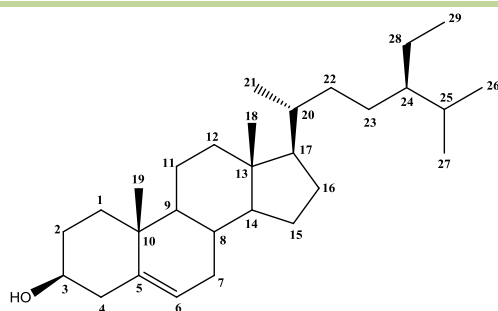
com dupla ligação entre C-22 e C-23; bem como, os demais dados espectrais permitiram identificar *De-2* como sendo uma mistura de β -sitosterol (*De-2a*) e estigmasterol (*De-2b*) (Figura 20, p.64). Esta afirmação está fundamentada em comparações dos dados espectrais de *De-2* observados em RMN de ^1H e ^{13}C com os dados apresentados por Tomaz et al. (2008) para as mesmas substâncias (Tabela 2, p. 65).

Figura 20 – Estruturas químicas de *De-2(a/b)*: β -sitosterol (à esquerda) e estigmasterol (à direita).

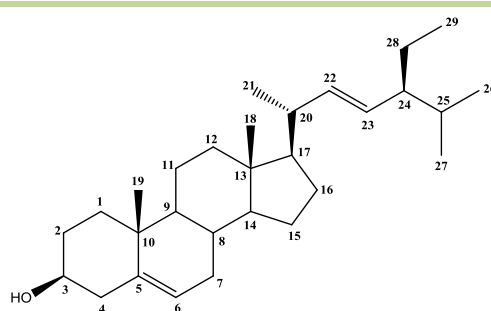


O β -sitosterol e o estigmasterol são relatados em todo o Reino Vegetal, estando a mistura relatada pela primeira vez na espécie em estudo, porém o β -sitosterol já foi encontrado isoladamente na *D. ecastophyllum*, *D. volubilis* e *D. sericea* (CHAWLA; MITTAL, 1987; AIYAR et al., 1974).

Tabela 2 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de De-2(a/b) em CDCl_3 (200 e 50 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C do β -sitosterol e estigmasterol em CDCl_3 , segundo Tomaz et al. (2008).



β -sitosterol



estigmasterol

C	Lit. De-2a			Lit. De-2b	Lit. De-2b	Lit. De-2b
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,2	37,2	-	37,2	37,2	-
2	31,4	31,6	-	31,4	31,6	-
3	71,7	71,7	3,49 (m, 1H)	71,7	71,7	3,49 (m, 1H)
4	42,1	42,2	-	42,1	42,2	-
5	140,7	140,7	-	140,7	140,7	-
6	121,6	121,6	5,32 (dl, J=4,0 Hz, 1H)	121,6	121,6	5,32 (dl, J=4,0 Hz, 1H)
7	31,9	31,8	-	31,9	31,8	-
8	31,8	31,8	-	31,8	31,8	-
9	50,1	50,1	-	50,1	50,1	-
10	36,4	36,4	-	36,4	36,4	-
11	21,0	21,0	-	21,0	21,0	-
12	39,7	39,7	-	39,6	39,6	-
13	42,2	42,1	-	42,2	42,1	-
14	56,7	56,7	-	56,8	56,8	-
15	24,3	24,2	-	24,3	24,3	-
16	28,2	28,2	-	28,9	28,9	-
17	56,0	56,0	-	55,9	55,9	-
18	11,8	11,8	-	11,9	11,9	-
19	19,3	19,3	-	19,3	19,3	-
20	36,1	36,1	-	40,5	40,5	-
21	18,7	18,9	-	21,2	21,2	-
22	34,0	33,9	-	138,3	138,3	4,97 (dd, J=8,2 e 15,3 Hz, 1H)
23	26,0	26,0	-	129,2	129,2	5,13 (dd, J=8,2 e 15,3 Hz, 1H)
24	45,7	45,7	-	51,2	51,2	-
25	29,0	29,0	-	29,0	29,0	-
26	19,8	19,8	-	20,1	21,1	-
27	19,0	19,0	-	18,9	18,7	-
28	23,0	23,0	-	25,4	25,4	-
29	12,0	12,2	-	12,2	12,0	-

Figura 21 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *De-2(a/b)*.

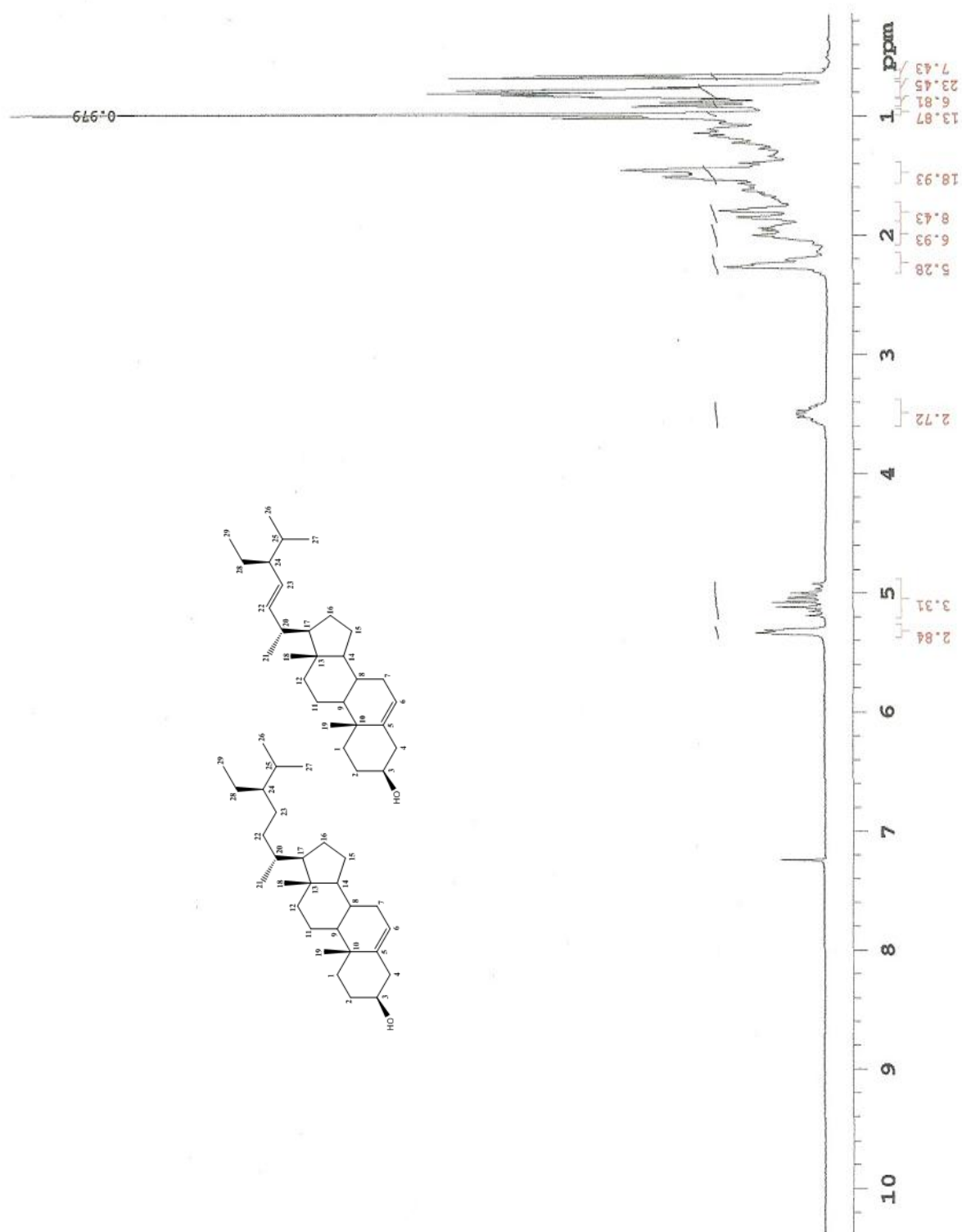


Figura 22 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de De-2(a/b) (δ 3,2 – 5,6).

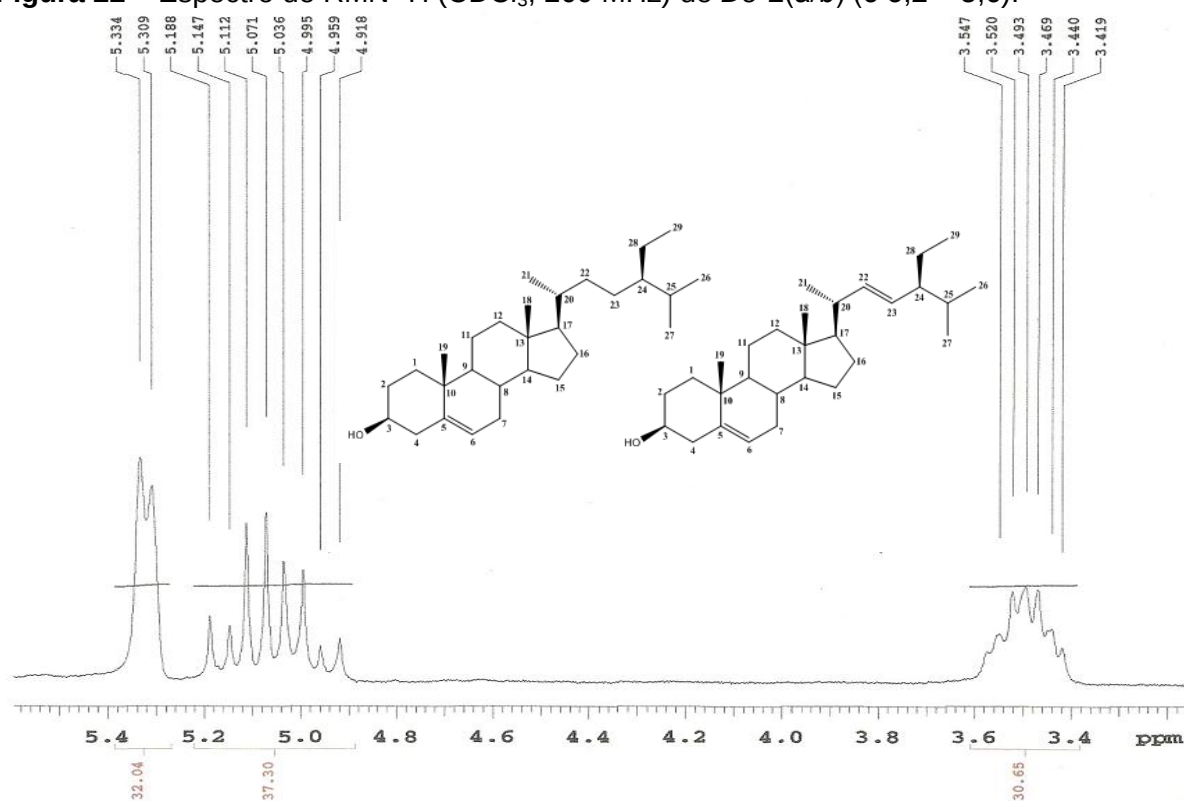


Figura 23 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de De-2(a/b) (δ 0,6 – 2,4).

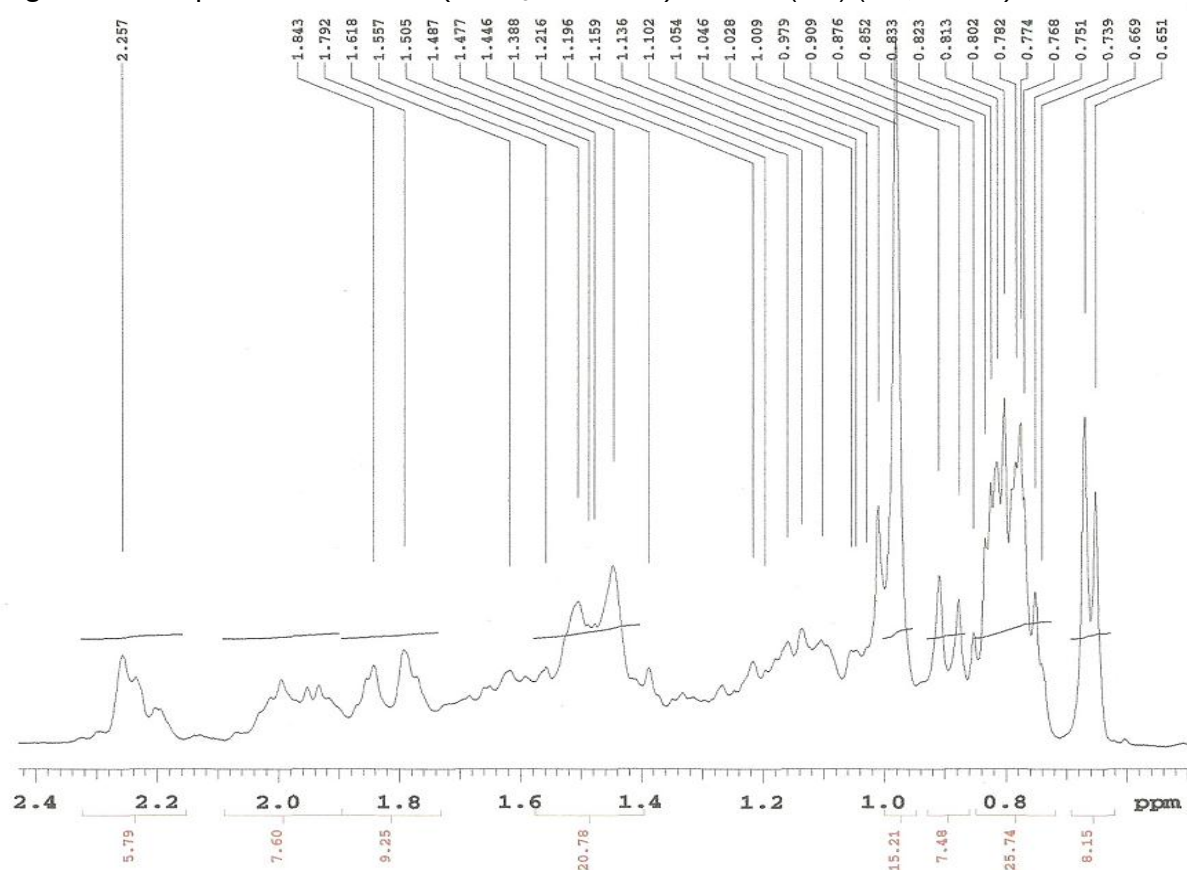


Figura 24 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de De-2(a/b).

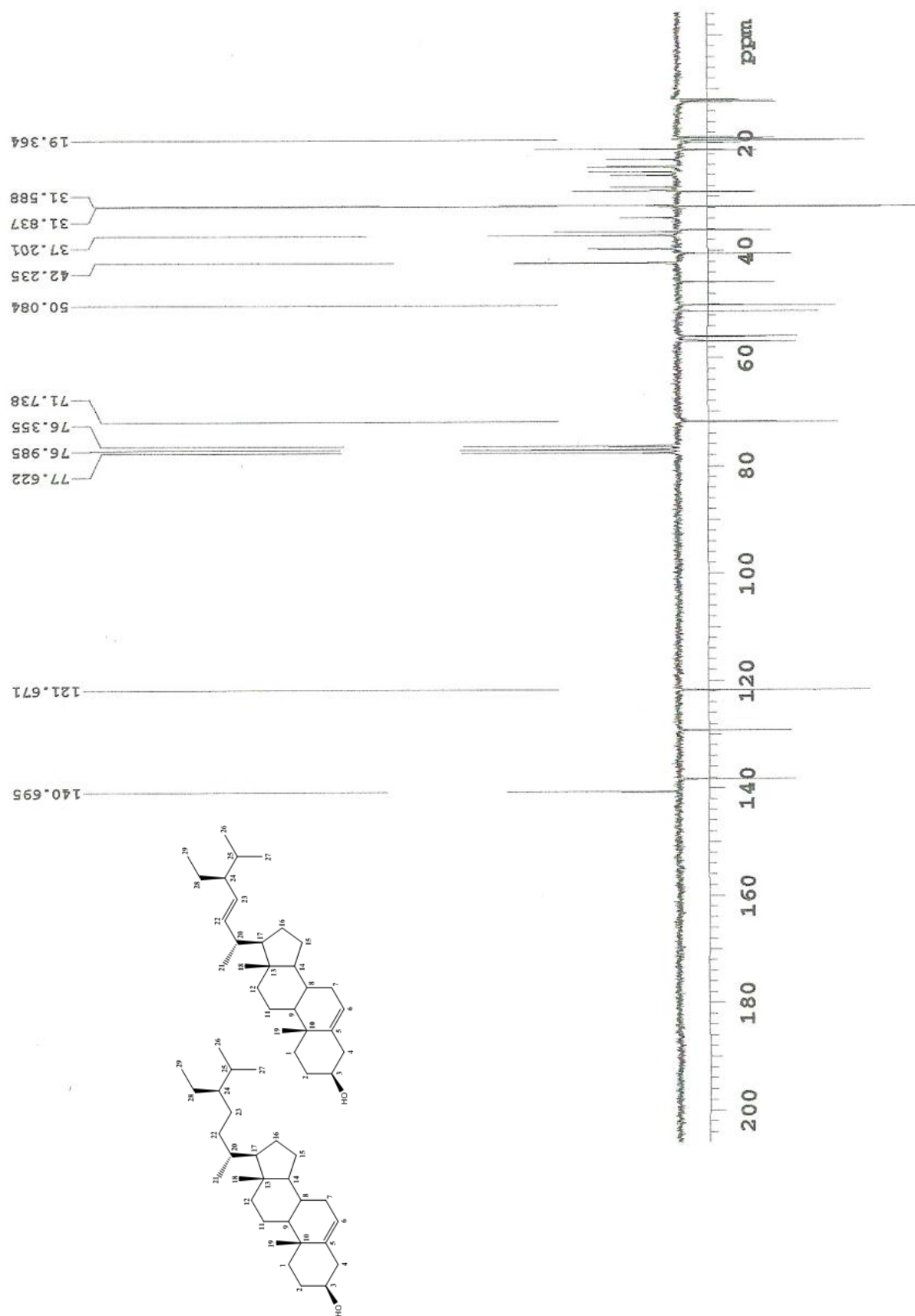
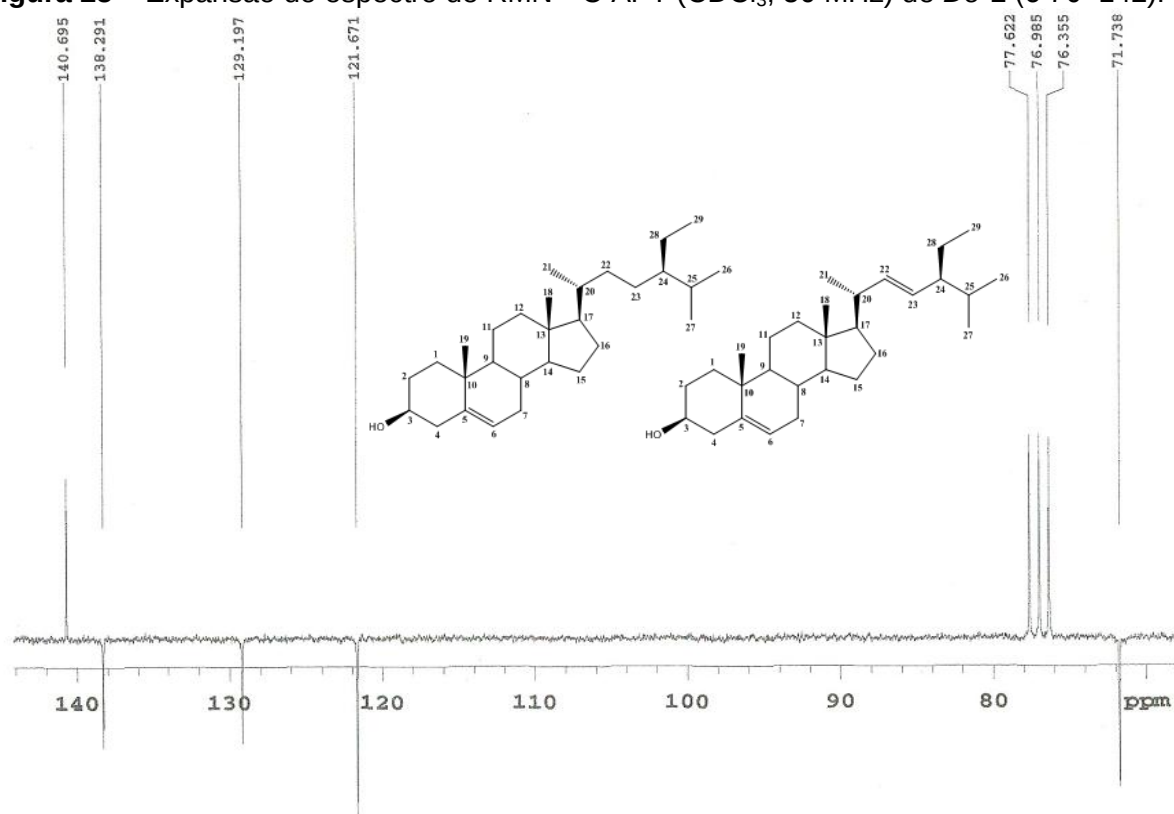
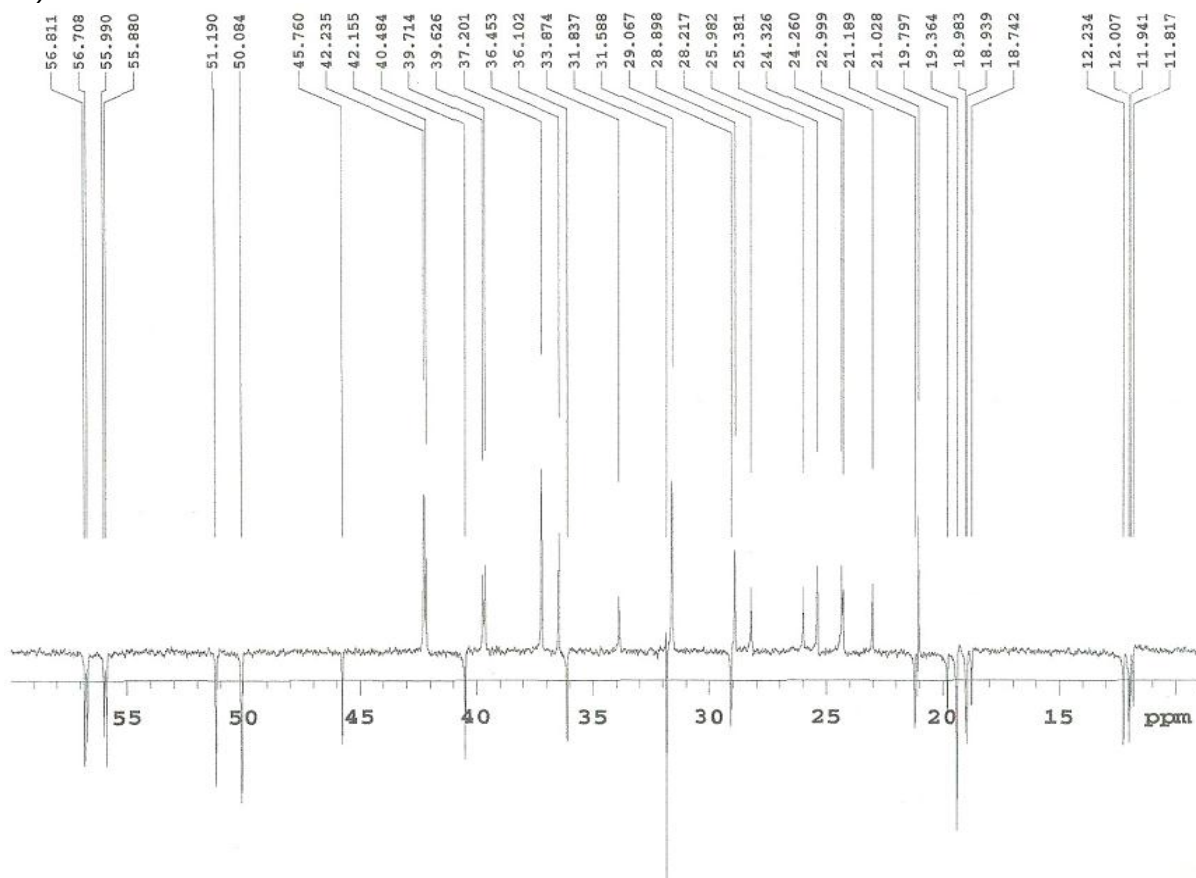


Figura 25 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de *De-2* (δ 70–142).**Figura 26** – Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de *De-2* (δ 10 - 60).

5.4 Determinação estrutural de *De-3(a/b)*

A substância codificada como *De-3* foi obtida na forma de cristais brancos com 45,0 mg de massa, correspondendo a 3,00 % em relação à massa da fase hexânica.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figura 28, p. 73) e suas expansões (Figura 29, 30 e 31 p. 74 e 75) apresentaram um conjunto de deslocamentos químicos de alta multiplicidade em δ_{H} 0,64 – 1,71 característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, compatíveis com substâncias que possuem esqueleto terpênico e/ou esteroidal (KOJIMA et al., 1990). A presença da unidade osídica foi sugerida por um conjunto de absorções entre δ_{H} 4,00 e 5,01 típicos de hidrogênios oximetínicos da referida unidade (KASAI et al., 1987). Um multipeto em δ_{H} 3,92 referente ao hidrogênio carbinólico, permitiu propor a existência da unidade osídica no C-3. Esta sugestão fundamenta-se no deslocamento do H-3 em *De-3* quando comparado com o mesmo hidrogênio na aglicona (*De-2*) (KOJIMA et al., 1990). Adicionalmente, o espectro de RMN ^1H revelou um simpleto largo em δ_{H} 5,32, o qual é típico do hidrogênio olefínico H-6 de esteróides (AHMED et al., 1992) e multipletos na região entre δ_{H} 5,22 e 5,18, referentes aos hidrogênios olefínicos H-22 e H-23 da estrutura do estigmasterol, sugerindo que a substância em questão tratava-se de uma mistura de esteroides.

Os sinais no espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figura 32, pág. 76) e suas expansões (Figura 33, 34 e 35, p. 77 e 78) corroboraram as sugestões anteriores, ao exibir valores entre δ_{C} 11,96 e 21,45, característicos de carbonos metílicos em esteroides. A presença da unidade de açúcar também pôde ser reafirmada pelo pico em δ_{C} 102,56, cujo valor encontra-se na faixa de absorção usualmente atribuída ao carbono anomérico da glicose (AQUINO et al., 1988). Absorções em δ_{C} 140,92 e 121,87 correspondem a C-5 e C-6, respectivamente, no esqueleto de esteroides como β -sitosterol e estigmasterol, observaram-se ainda para o estigmasterol dois sinais menos intensos em δ_{C} 138,78 e δ 129,47 referentes aos carbonos olefínicos C-22 e C-23, respectivamente, reforçando a sugestão dada para uma mistura destes esteroides.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C em comparação com os valores obtidos na literatura (KOJIMA et al., 1990) permitiu identificar *De-3* como a mistura de

Sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (*De-3a*) e Estigmasterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (*De-3b*) (Tabela 3, p. 72), essa mistura está sendo relatada pela primeira vez na espécie (Figura 27).

Figura 27 – Estruturas químicas de *De-3(a/b)*: sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (acima) e estigmasterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (abaixo).

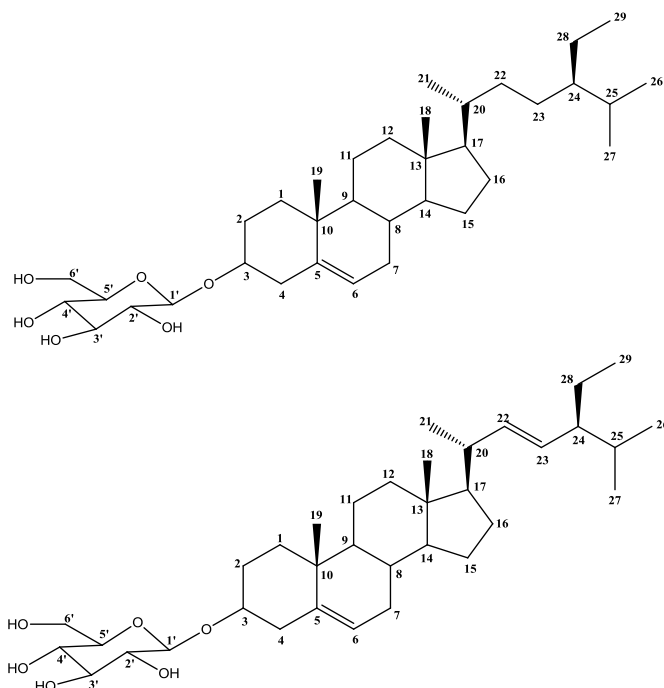
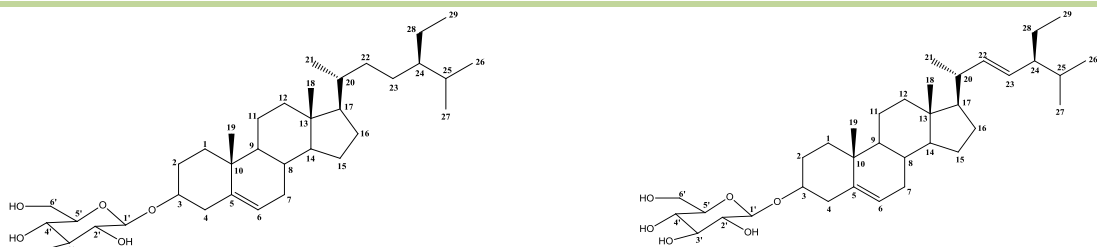


Tabela 3 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *De-3(a/b)* em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (500 e 125 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C do sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo e estigmasterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 e 100 MHz, respectivamente), segundo Kojima et al. (1990).



sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo				estigmasterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo			
C	Lit. δ_{C}	<i>De-3a</i>		Lit. δ_{C}	<i>De-3b</i>		
		δ_{C}	δ_{H}		δ_{C}	δ_{H}	
1	37,6	37,4	-	37,6	37,4	-	
2	30,3	30,2	-	30,3	30,2	-	
3	78,3	78,1	3,92 (m)	78,3	78,1	3,92 (m)	
4	39,4	39,3	-	39,4	39,3	-	
5	141,0	140,9	-	141,0	140,9	-	
6	122,0	121,8	5,32 (sl)	122,0	121,8	5,32 (sl)	
7	32,2	32,1	-	32,2	32,1	-	
8	32,1	32,0	-	32,1	32,0	-	
9	50,4	50,3	-	50,4	50,3	-	
10	37,0	36,9	-	37,0	36,9	-	
11	21,4	21,2	-	21,4	21,2	-	
12	40,0	39,9	-	39,9	39,9	-	
13	42,4	42,4	-	42,4	42,4	-	
14	57,0	56,8	-	57,1	56,9	-	
15	24,6	24,4	-	24,7	24,5	-	
16	28,7	28,5	-	29,4	29,2	-	
17	56,3	56,2	-	56,2	56,0	-	
18	12,0	11,9	-	12,3	12,1	-	
19	19,3	19,1	-	19,3	19,1	-	
20	36,5	36,3	-	36,9	36,3	-	
21	19,1	19,0	-	21,7	21,4	-	
22	34,3	34,2	-	138,9	138,7	5,22 (m)	
23	26,4	26,4	-	129,5	129,4	5,18 (m)	
24	46,1	46,0	-	51,5	51,4	-	
25	29,5	29,4	-	32,2	32,0	-	
26	19,5	19,2	-	21,4	19,9	-	
27	20,1	19,4	-	20,1	19,4	-	
28	23,4	23,4	-	25,8	25,6	-	
29	12,2	12,1	-	12,6	12,4	-	
1'	102,6	102,5	-	102,6	102,5	-	
2'	75,4	75,2	-	75,4	75,2	-	
3'	78,7	78,5	-	78,7	78,5	-	
4'	71,7	71,6	-	71,7	71,6	-	
5'	78,5	78,3	-	78,5	78,3	-	
6'	62,9	62,8	-	62,9	62,8	-	

Figura 28 – Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de *De-3(a/b)*.

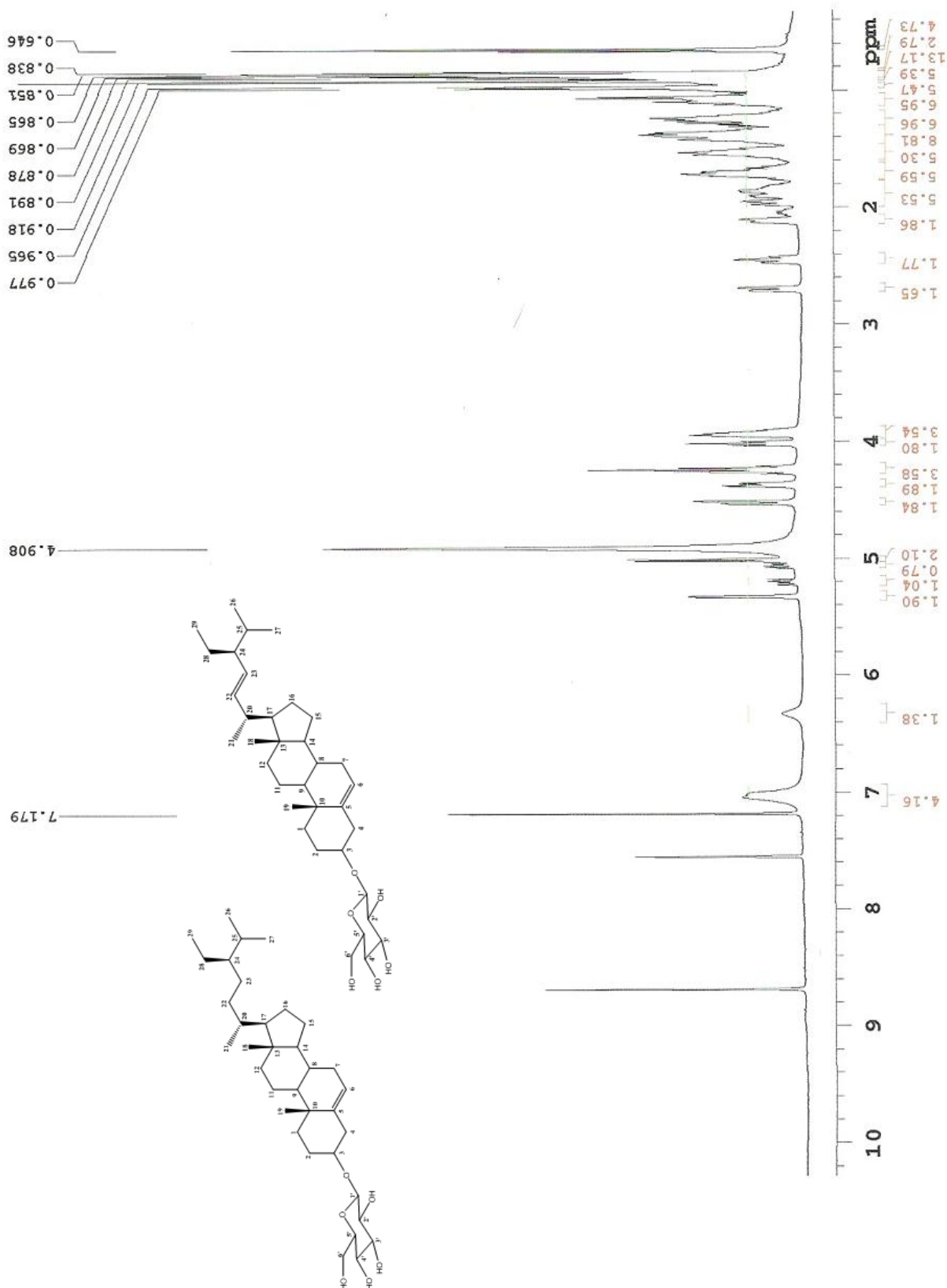


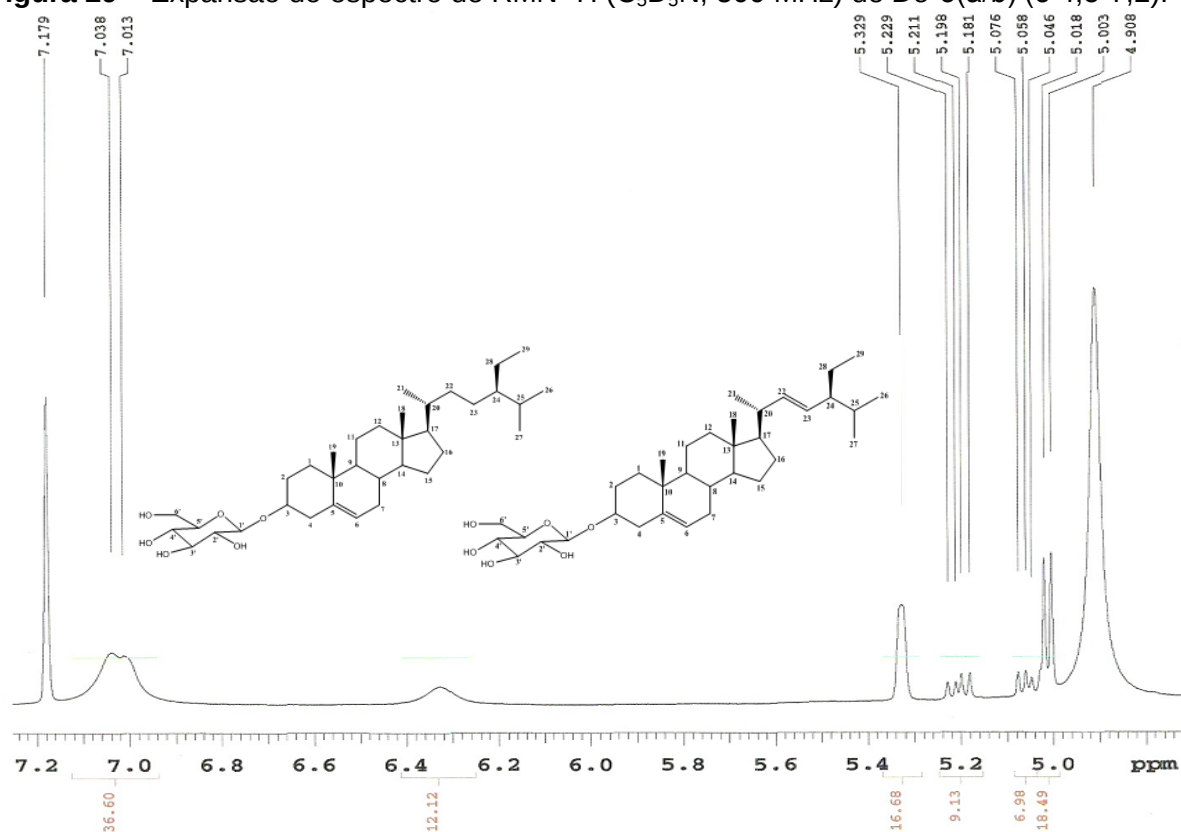
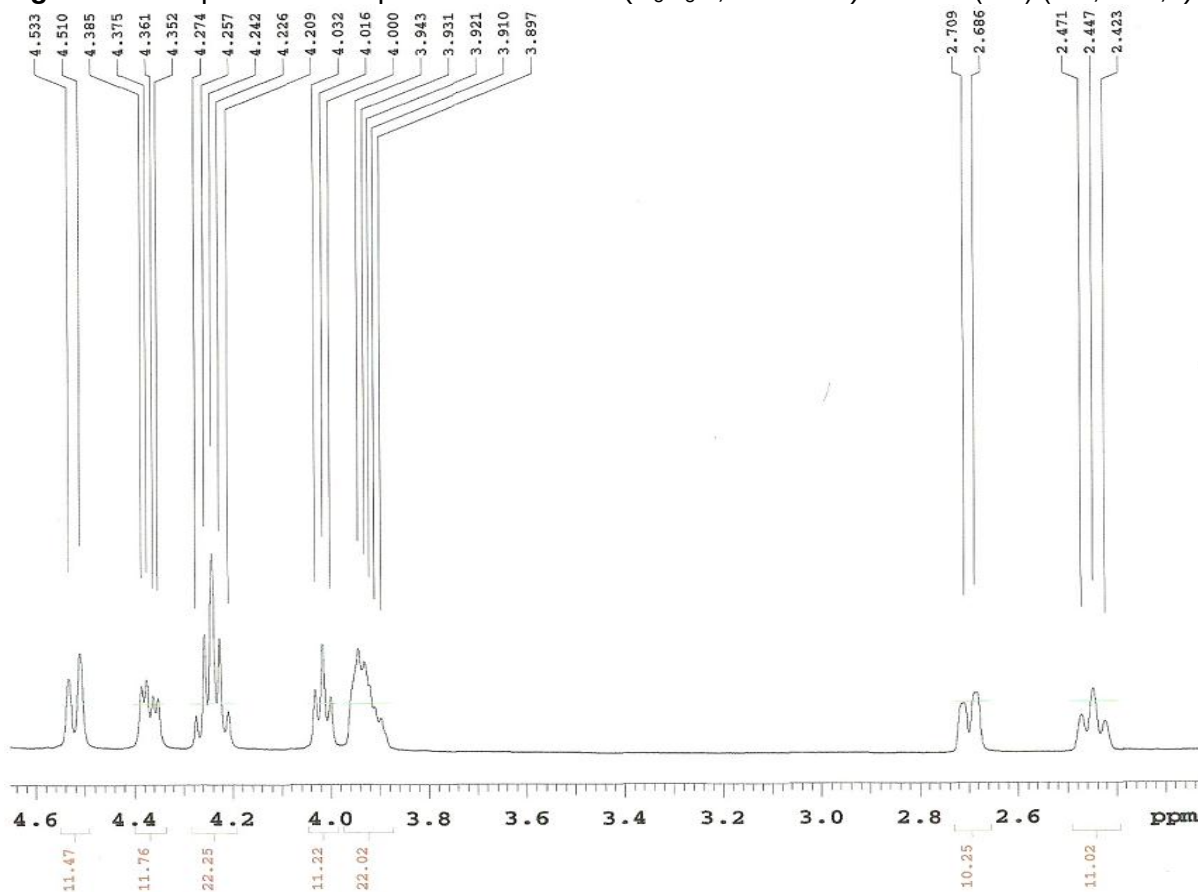
Figura 29 – Expansão do espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de *De*-3(a/b) (δ 4,8-7,2).**Figura 30** – Expansão do espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de *De*-3(a/b) (δ 2,3 - 4,6).

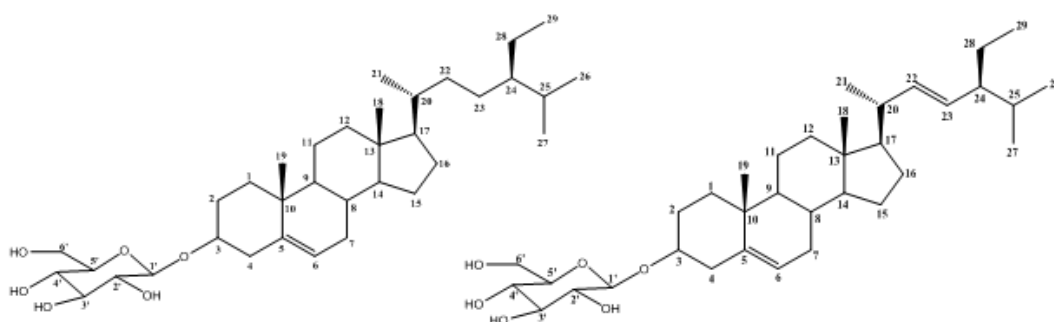
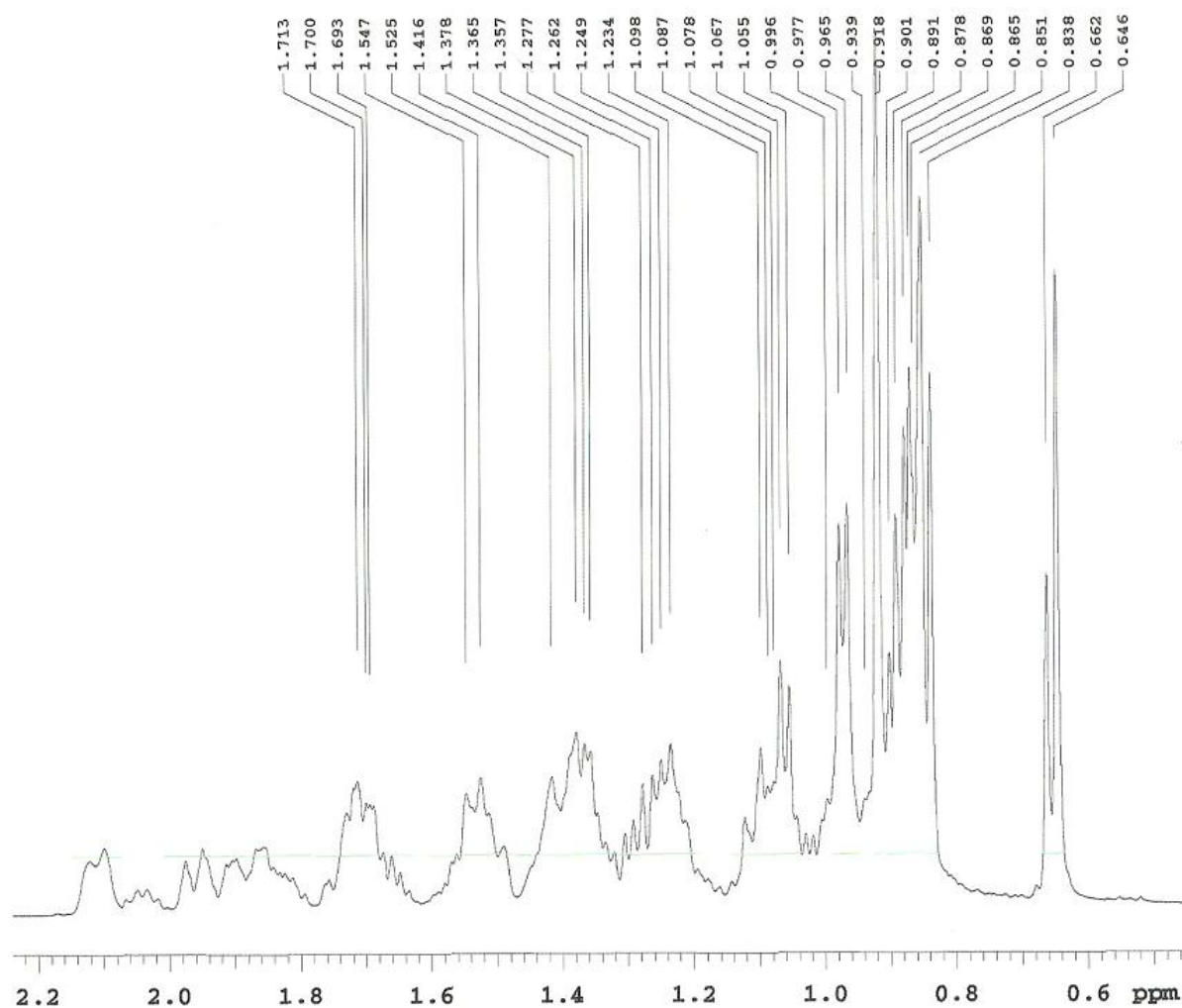
Figura 31 – Expansão do espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de *De-3(a/b)* (δ 0,6 - 2,2).

Figura 32 – Espectro de RMN¹³C APT (C₅D₅N, 125 MHz) de De-3 (a/b).

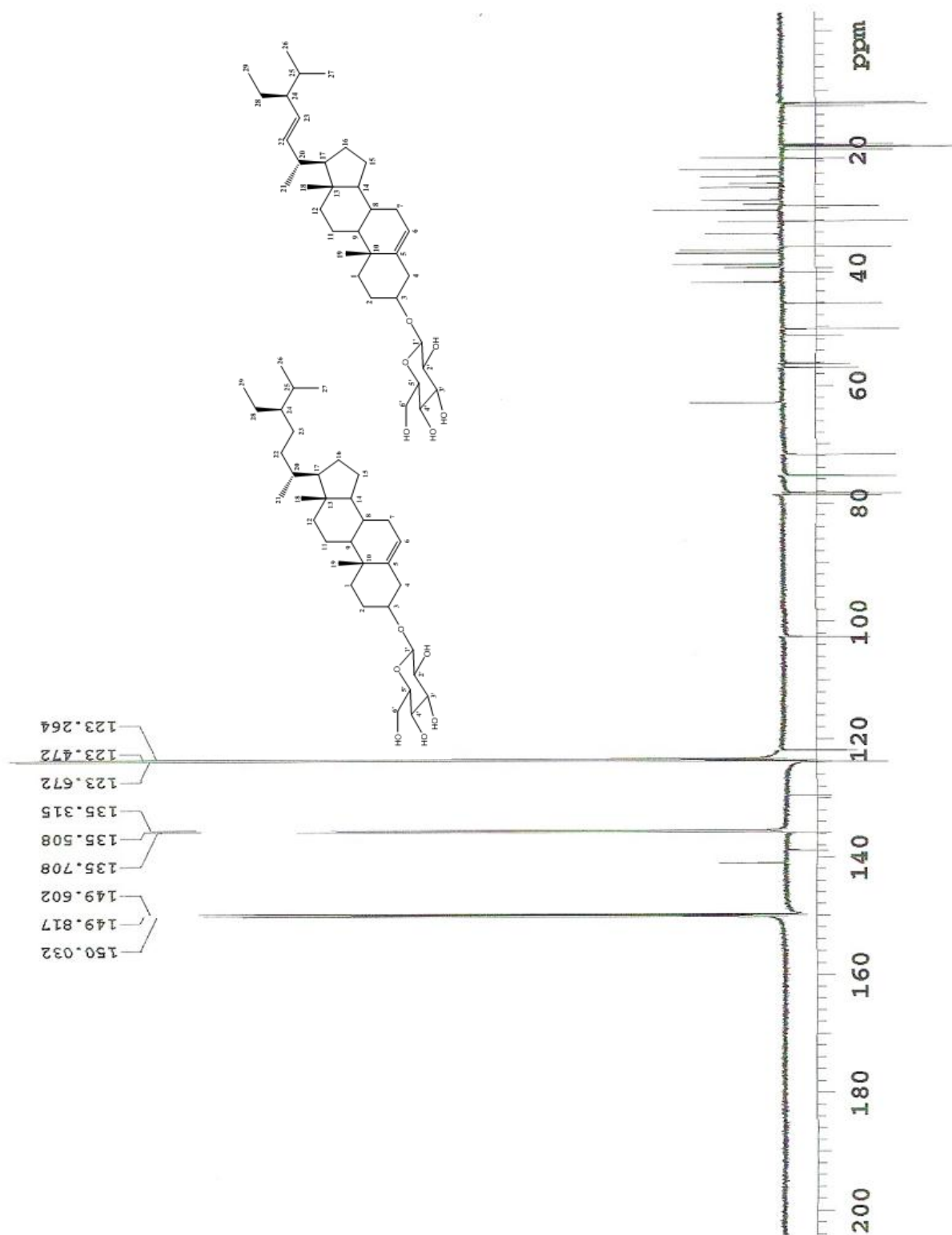


Figura 33 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de *De-3(a/b)* (δ 115 - 155).

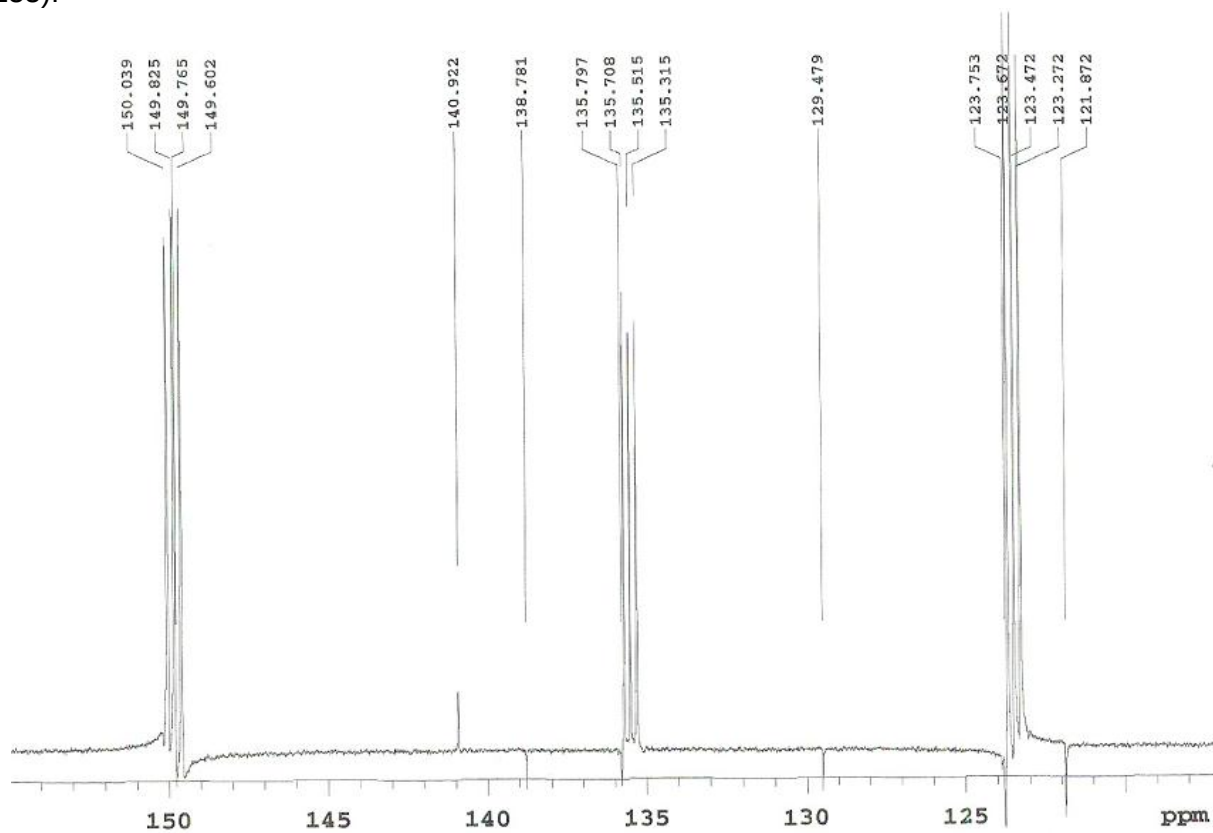


Figura 34 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125MHz) de *De-3(a/b)* (δ 50 - 105).

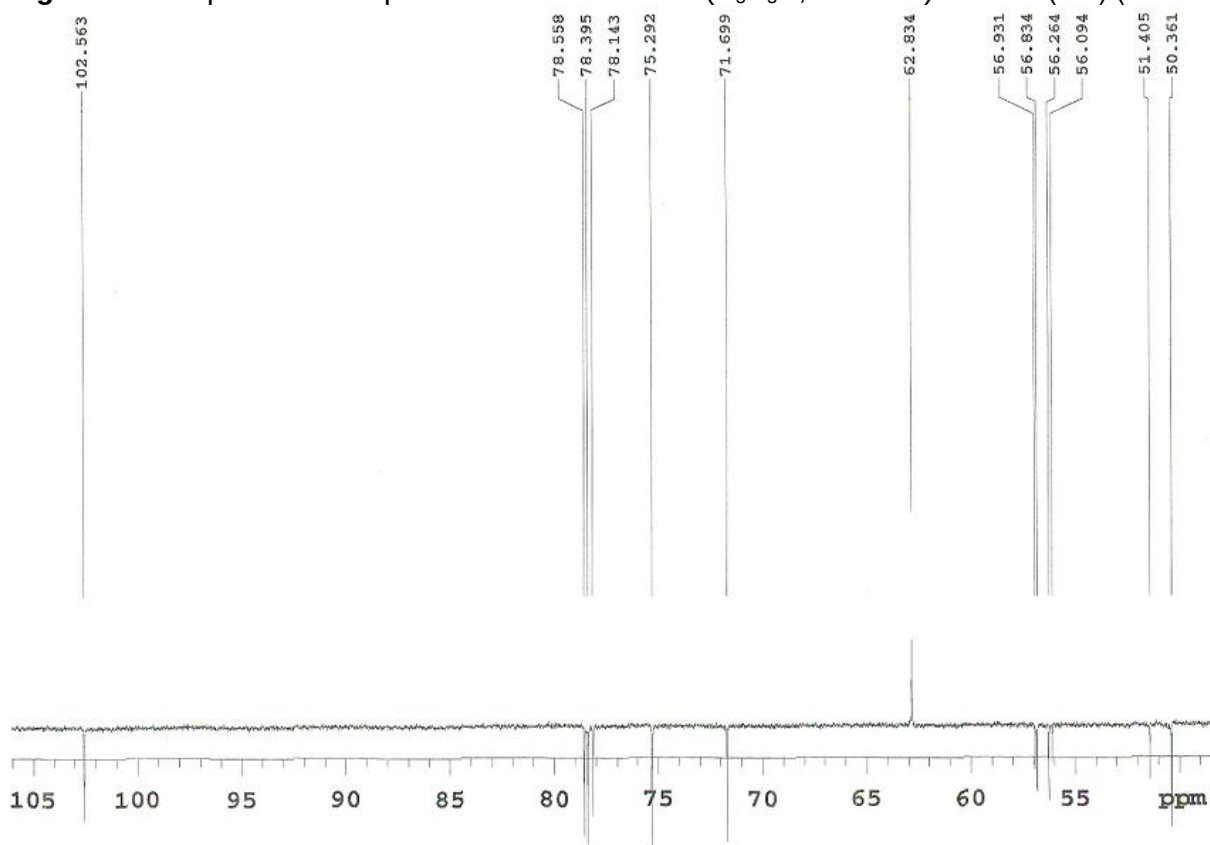
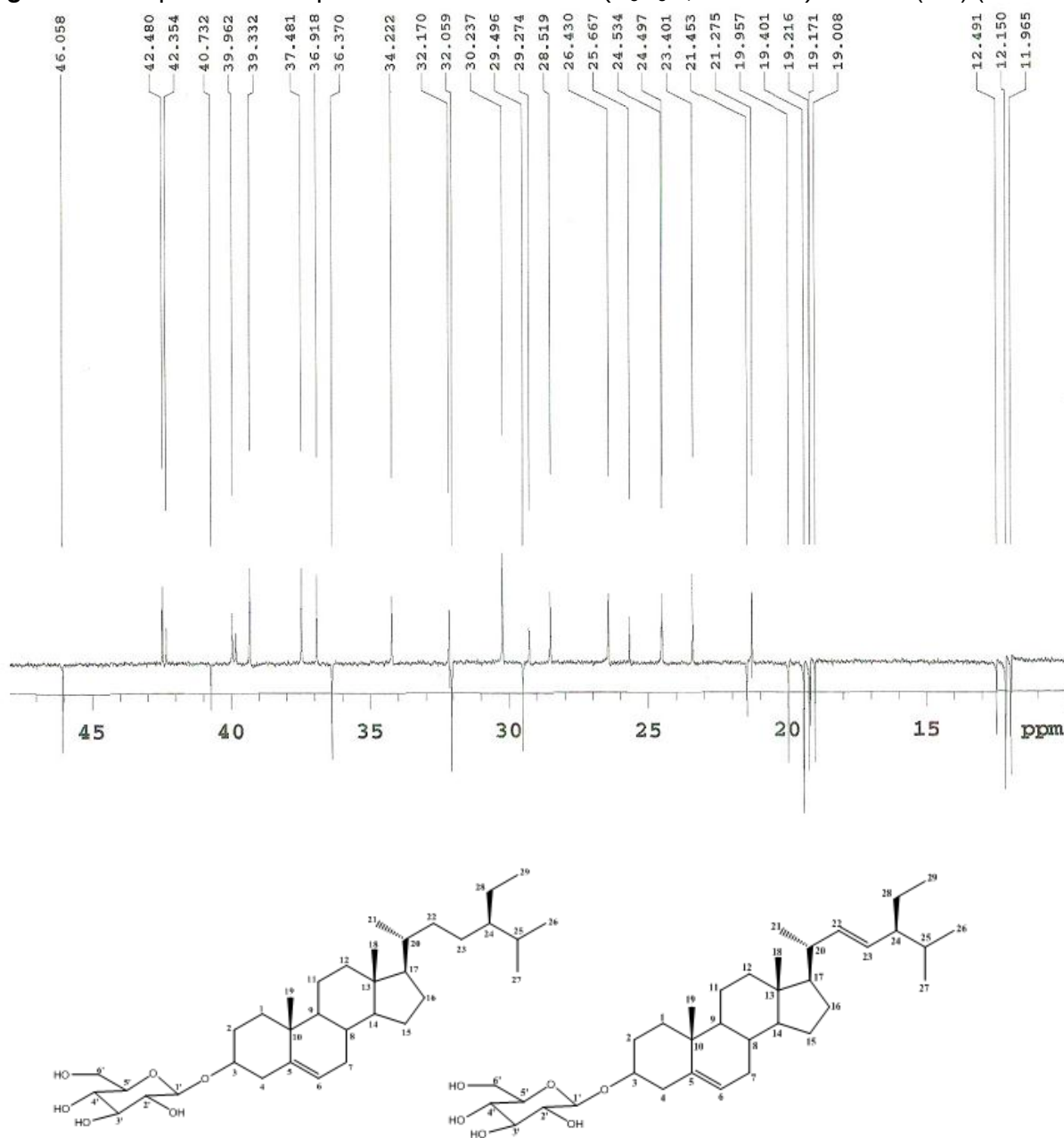


Figura 35 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de *De*-3(a/b) (δ 10-47).

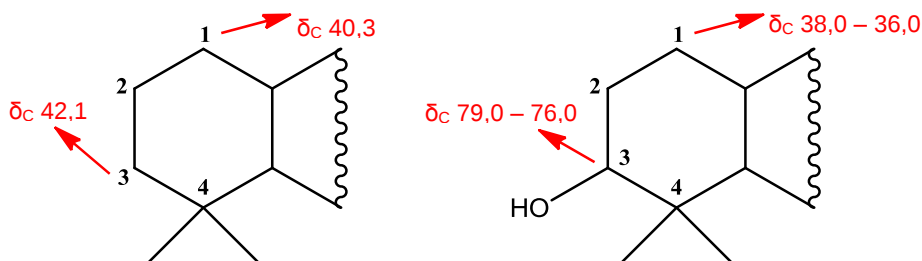
5.5 Determinação estrutural de De-4(a/b/c)

A substância codificada como De-4 foi obtida na forma de cristais brancos com 4,0 mg de massa, correspondendo a 0,40 % em relação à massa da fase hexânica.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 38, p. 83) e suas expansões apresentaram um envelope de sinais de alta multiplicidade em δ_{H} 0,71 – 1,65 característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, condizentes com substâncias que possuem esqueleto terpênico (KOJIMA et al., 1990).

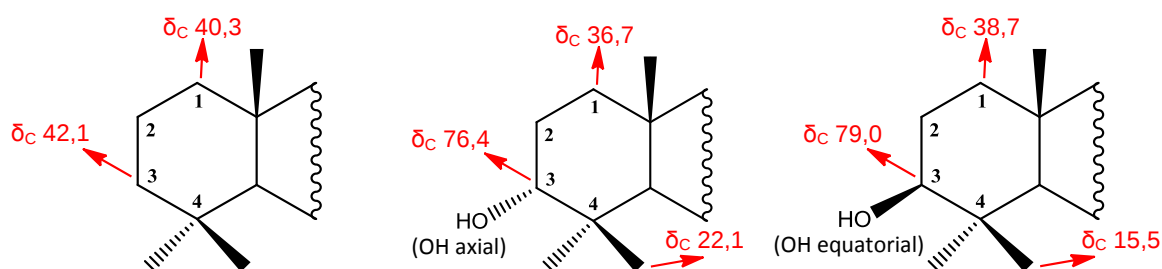
No espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, CDCl_3) (Figura 41, p. 85) e suas expansões verificou-se a presença de 78 sinais, dos quais 17 foram referentes a carbonos não hidrogenados, 16 a carbonos metínicos, 28 a carbonos metilênicos e 17 a carbonos metílicos, sugerindo tratar-se de uma mistura. Os sinais em δ_{C} 150,98 e 109,30 ppm são característicos de triterpenos pentacíclicos da série lupano com insaturação entre C-20 e C-29. Adicionalmente observaram-se sinais para carbonos sp^2 em δ_{C} 121,68 e 145,18, além de δ_{C} 142,73 e 129,68 cujos valores de deslocamento químico são característicos de insaturação entre C-12 e C-13 e entre C-18 e C-19, respectivamente, da serie oleanano.

Dentre os carbonos metínicos observou-se um sinal intenso em δ_{C} 78,97 que sugere a presença de carbono oximetínico (Figura 42, p. 86). A inserção da hidroxila no C-3 foi revelada com base em informações da literatura onde em triterpenos quando há a ausência da hidroxila nessa posição, o C-3 registra um sinal em δ_{C} 42,1 e C-1 em δ_{C} 40,3; todavia quando o C-3 apresenta-se hidroxilado esse encontra-se entre δ_{C} 79,0 e 76,0 e C-1 entre δ_{C} 38,0 e 36,0 devido ao efeito γ -gauche, como ilustrado abaixo (MAHATO; KUNDU, 1994).



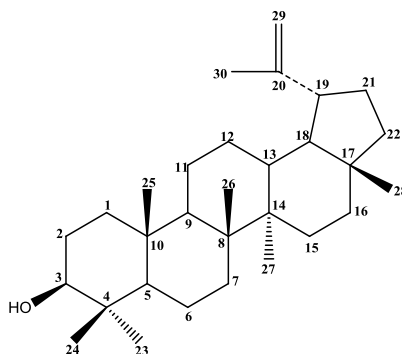
Para definir a estereoquímica da hidroxila observou-se que a mesma quando se encontra na posição equatorial o C-3 fica menos protegido do que na posição axial, em adição a metila axial ligada a C-4 é protegido cerca de δ_{C} 6,5 ppm e o

grupo metilênico na posição C-1 é desprotegido δ_C 2,0 ppm em comparação com o isômero axial devido ao efeito γ -gauche, corroborando com os sinais apresentados em δ_C 78,9, δ_C 15,3 (e 15,4) e δ_C 38,6 (38,5) para C-3, C-24 e C-1, respectivamente.



A presença de sinal no espectro de RMN ^1H (Figura 40, p. 84) em δ_H 1,65 ppm mostrou-se característico de metila ligada a carbono olefínico e simpletos δ_H 0,71, 0,73, 0,76, 0,80, 0,91, 0,94 e 1,00 ppm foram condizentes com a presença de seis metilas quaternárias, correspondentes a H-23, H-24, H-25, H-26, H-27 e H-28, respectivamente. Foi observado também um multipeto em δ_H 3,18 ppm, atribuído a um hidrogênio ligado a carbono carbinólico em H-3, além de um simpleto largo em δ_H 4,65 ppm e um multipeto em δ_H 4,54 atribuídos a hidrogênios olefínicos em H-29. A reunião desses dados em comparação com os descritos na literatura (BURNS et al., 2000) (Tabela 4, p. 82), permitiram identificar *De-4a* como sendo o triterpeno da série lupano, lup-20(29)-en-3-ol também denominado lupeol (Figura 36).

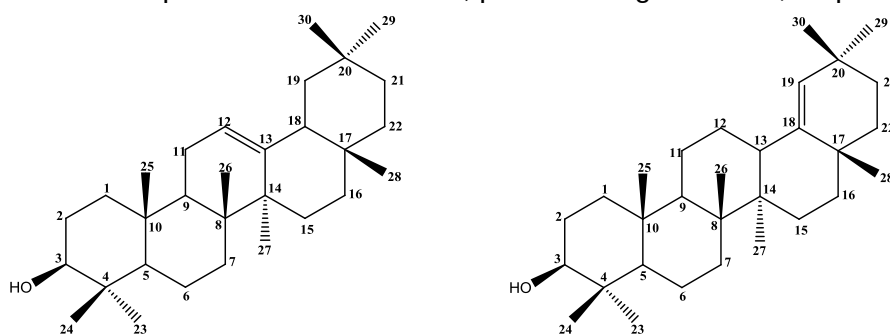
Figura 36 – Estrutura química de *De-4a*, lupeol.



Na expansão do espectro de RMN ^1H (Figura 39, p. 84) também foram observados sinais referentes ao triterpeno da série oleanano, como o multipeto em δ_H 5,16 atribuído ao hidrogênio olefínico H-12, corroborando com a sugestão feita

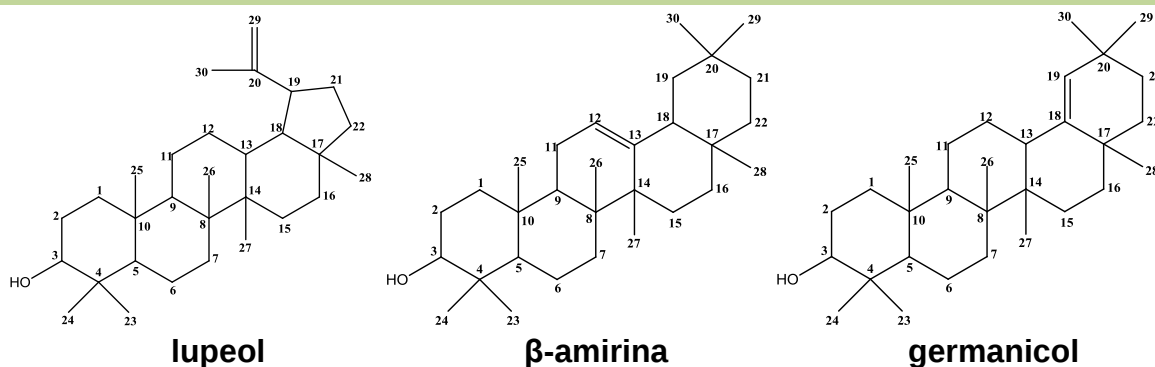
anteriormente no espectro de RMN ^{13}C para uma dupla ligação entre C-12 e C-13. Um simpleto largo em δ_{H} 4,82 ppm correspondente ao hidrogênio olefínico H-19, confirmando a proposta do espectro de RMN ^{13}C para uma dupla ligação entre C-18 e C-19. Esses dados comparados com a literatura (BANDEIRA et al., 2007; GONZALÉZ et al., 1981) (Tabela 4, p. 82), permitiram identificar *De*-4b e *De*-4c como sendo os triterpenos olean-12-en-3-ol (β -amirina) e olean-18-en-3-ol (germanicol), respectivamente (Figura 37).

Figura 37 – Estruturas químicas de *De*-4b e 4c, β -amirina e germanicol, respectivamente.



A mistura do lupeol, β -amirina e germanicol, está sendo relatada pela primeira vez na espécie em estudo, sendo apenas o Lupeol e a β -amirina encontrados isoladamente em outras espécies do gênero *Dalbergia* como *D. hainanensis* e *D. sissoo* (ZHANG et al., 2003; RAGAB et al., 2006).

Tabela 4 – Dados comparativos de RMN ^{13}C de De-4(a/b/c) em CDCl_3 (200 e 50 MHz, respectivamente) e do lupeol, segundo Burns et al. (2000); da β -amirina, segundo Bandeira et al. (2007) e do germanicol, segundo González et al. (1981).



C	Literatura	De-4a	Literatura	De-4b	Literatura	De-4c
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	38,6	38,6	38,6	38,5	38,5	38,5
2	27,3	27,3	27,3	27,3	27,4	27,1
3	78,9	78,9	79,1	78,9	79,0	78,9
4	38,8	38,8	38,8	38,7	39,0	38,9
5	55,2	55,2	55,2	55,1	55,7	55,4
6	18,2	18,3	18,4	18,3	18,3	18,3
7	34,2	34,2	32,6	32,6	34,7	34,3
8	40,7	40,7	39,8	39,7	40,8	40,7
9	50,3	50,3	47,6	47,5	51,3	51,1
10	37,1	37,1	36,9	36,9	37,3	37,3
11	20,9	20,8	23,5	23,5	21,2	21,0
12	25,0	25,0	121,7	121,6	26,2	26,1
13	38,8	38,0	145,2	145,1	39,0	38,3
14	42,7	42,7	41,7	41,6	43,4	43,2
15	27,4	27,4	21,6	21,0	27,6	27,4
16	35,5	35,5	26,9	26,8	37,7	37,6
17	42,9	42,9	32,5	32,4	34,4	34,5
18	48,2	48,2	47,2	47,1	142,8	142,7
19	47,9	47,9	46,8	46,7	129,8	129,6
20	150,8	150,9	31,1	31,0	32,3	32,3
21	29,8	29,8	34,7	34,7	33,4	33,2
22	39,9	39,9	37,1	37,1	37,4	37,1
23	27,9	27,9	28,1	28,0	28,0	27,9
24	15,3	15,3	15,5	15,4	15,4	15,4
25	16,1	16,1	15,6	15,5	16,1	16,1
26	15,9	15,9	16,8	16,7	16,7	16,6
27	14,5	14,5	26,0	25,9	14,6	14,5
28	17,9	17,9	28,4	28,3	25,3	25,2
29	109,3	109,3	33,4	33,3	31,3	31,3
30	19,2	19,2	23,7	23,6	29,2	29,1

Figura 38 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de De-4(a/b/c).

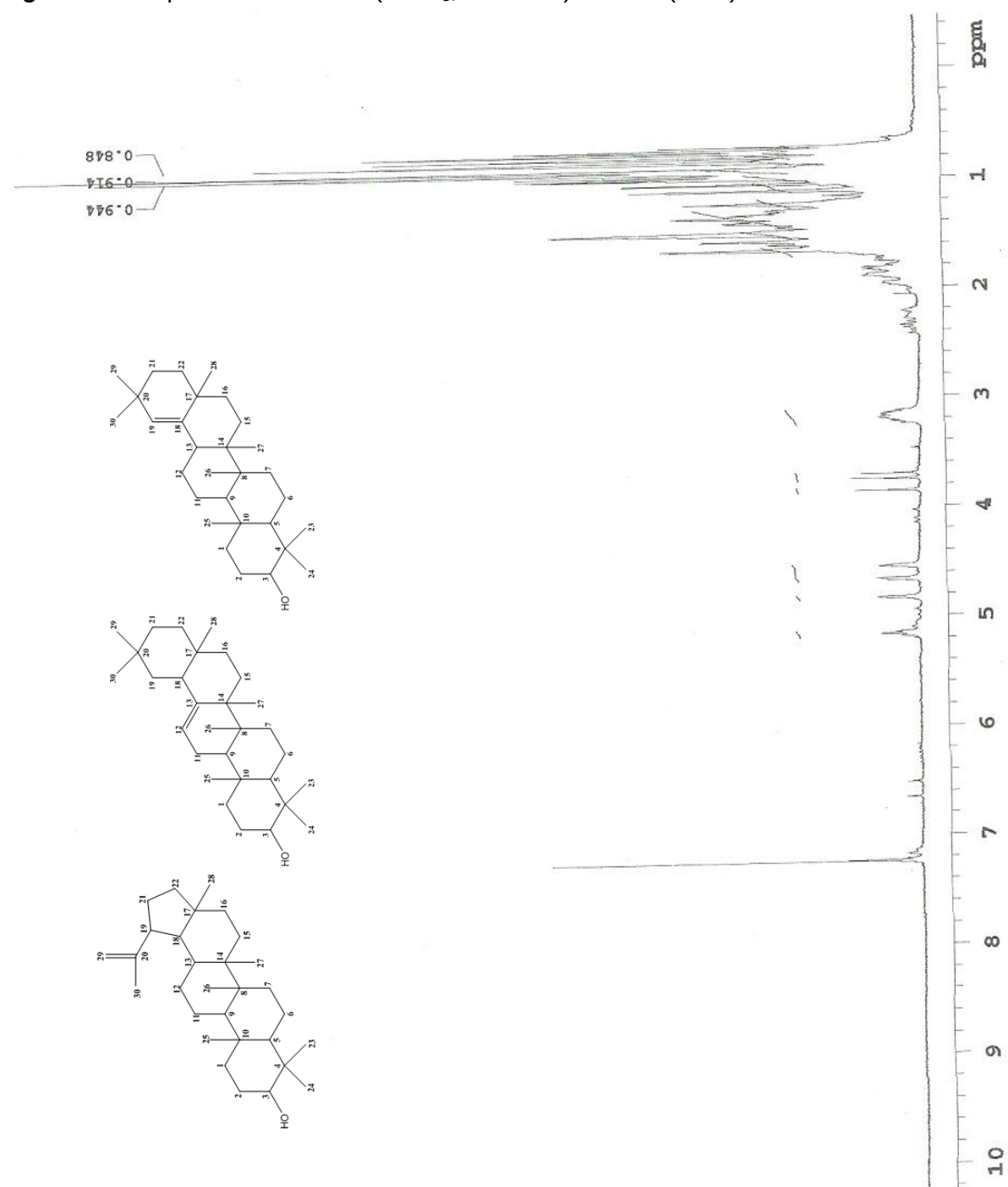


Figura 39 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *De-4(a/b/c)* (δ 3,0 -5,2).

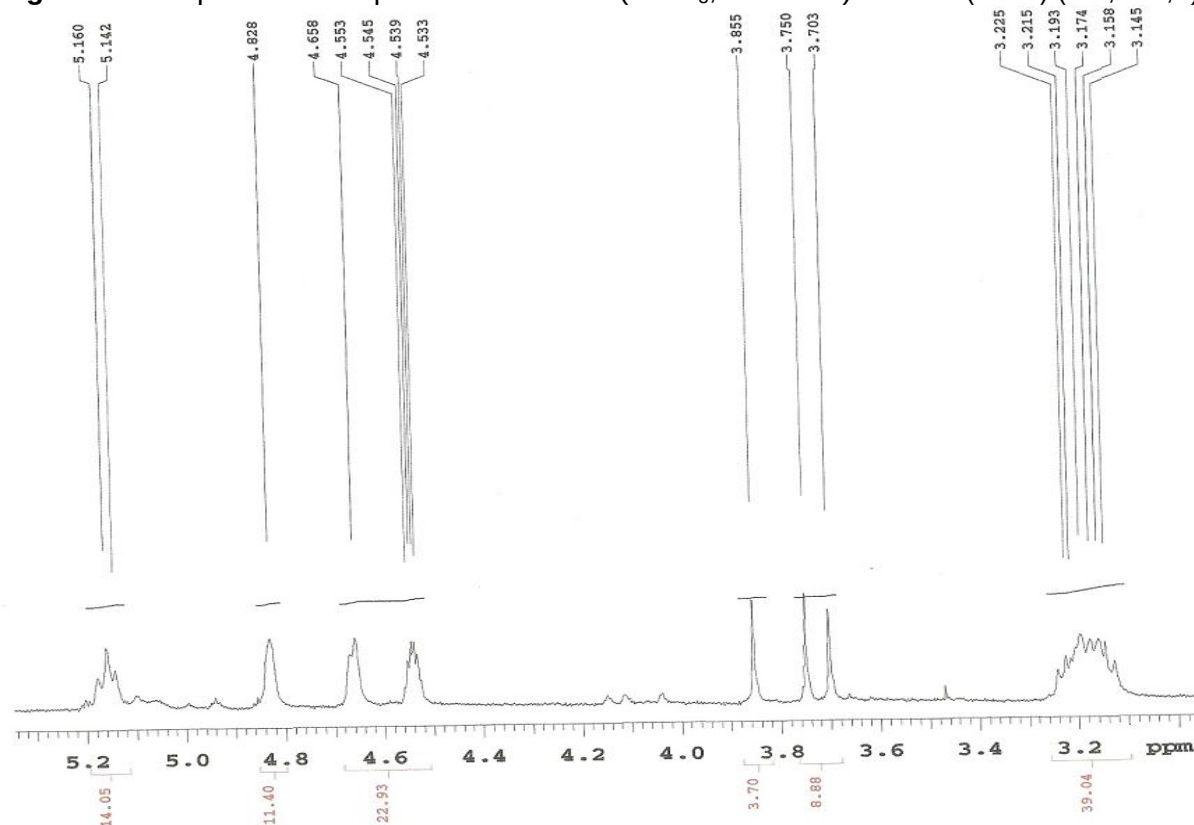


Figura 40 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *De-4(a/b/c)* (δ 0,6 -1,8).

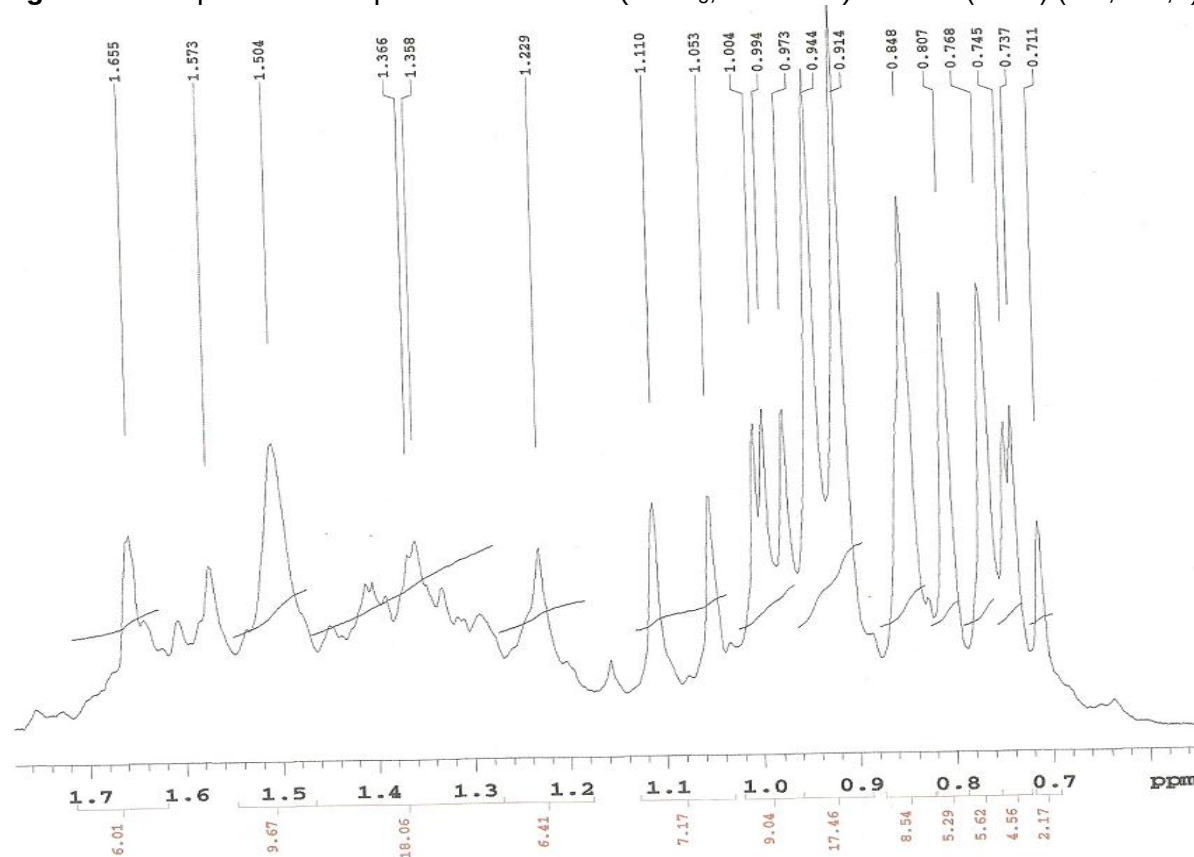


Figura 41 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de De-4(a/b/c).

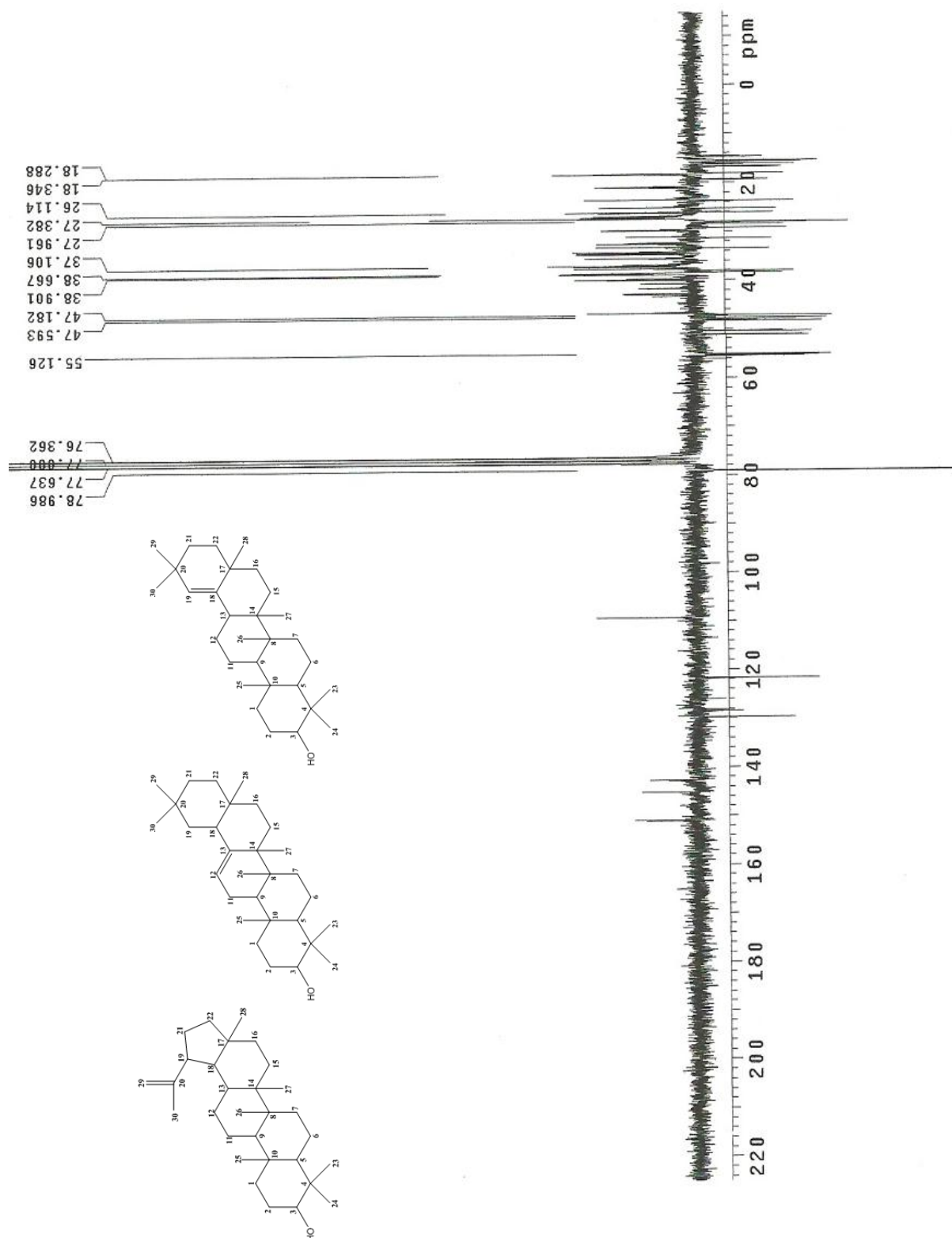


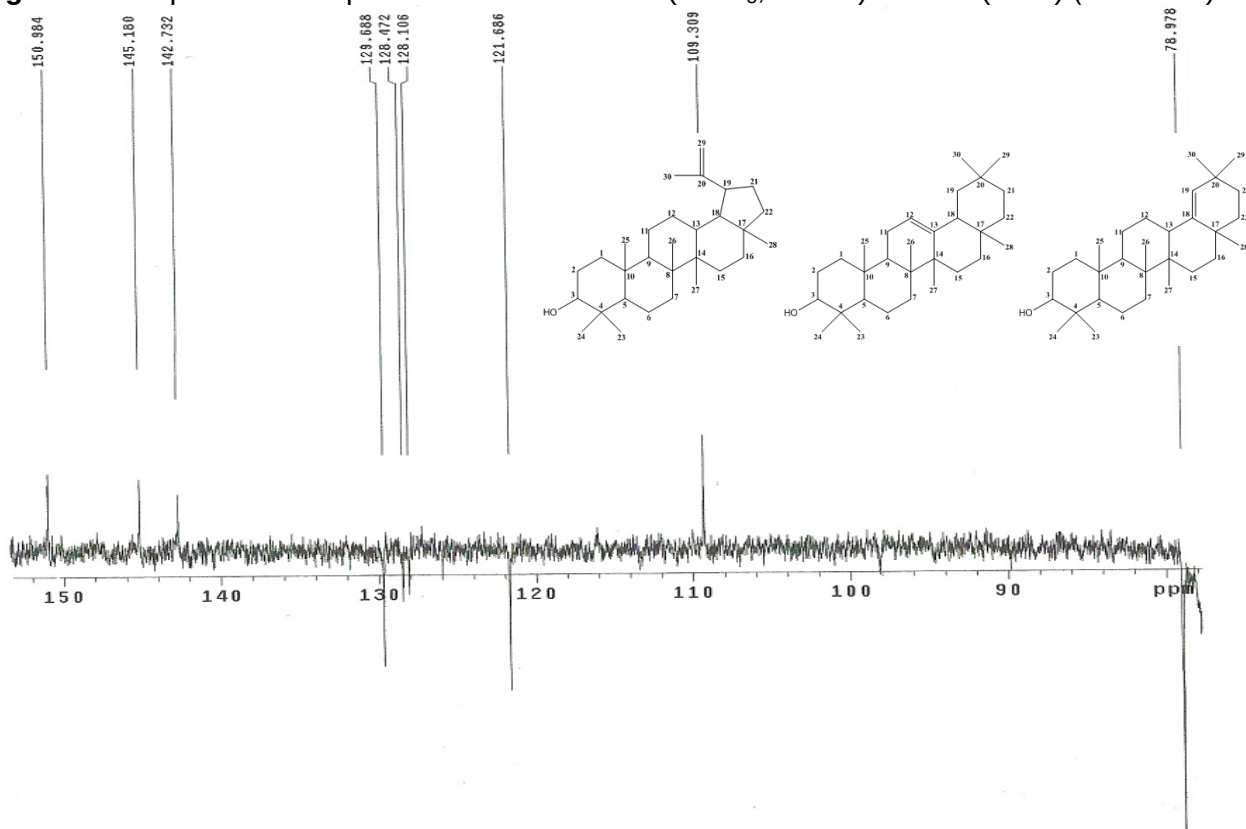
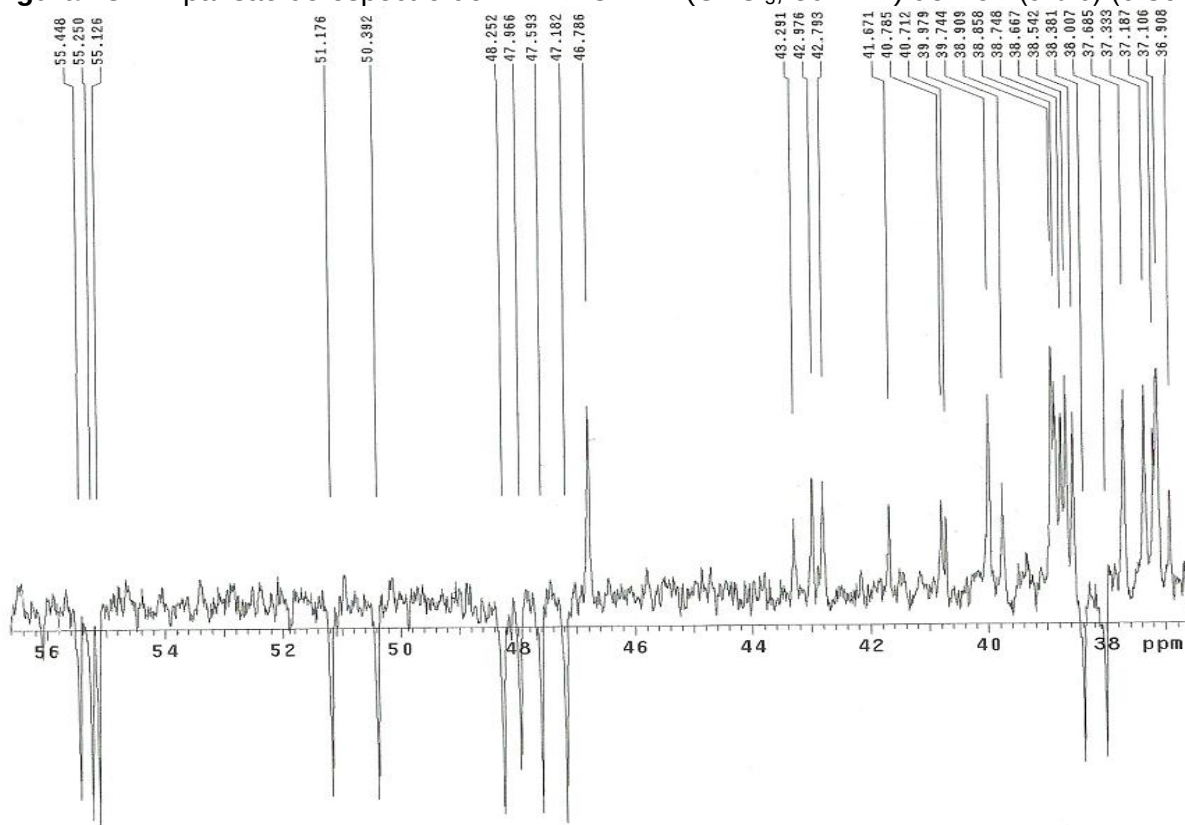
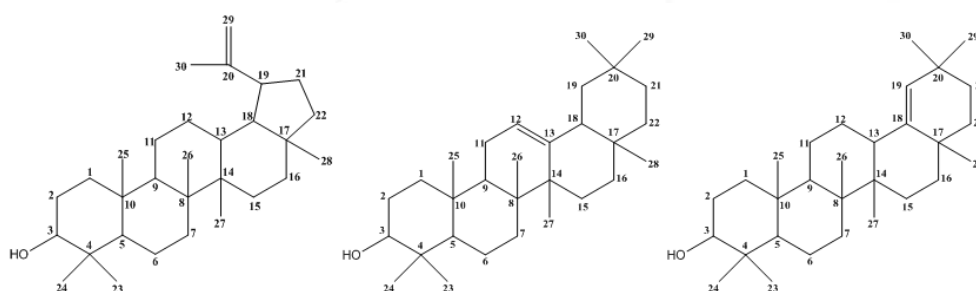
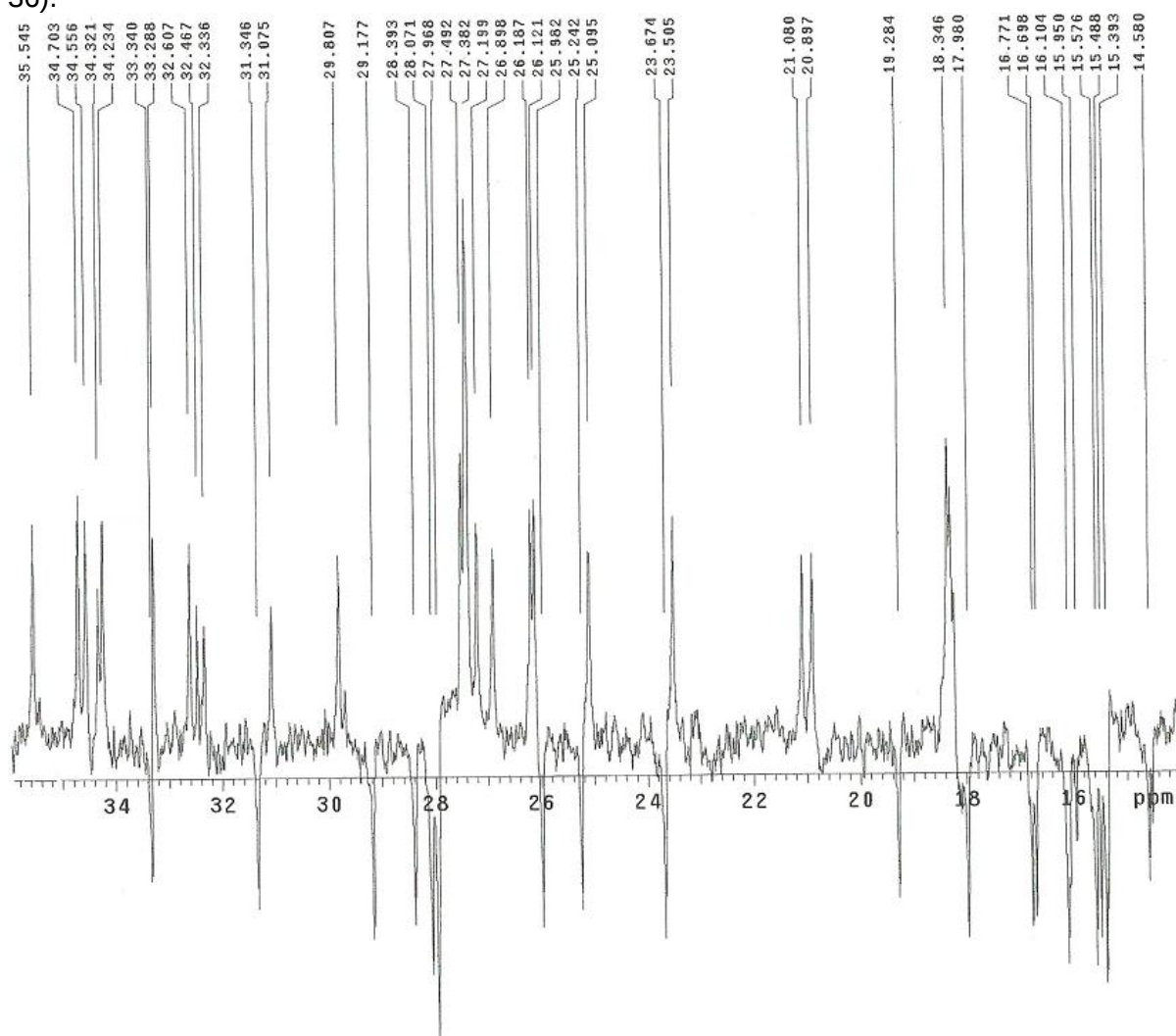
Figura 42 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50MHz) de *De*-4(a/b/c) (δ 80 -151).**Figura 43** - Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de *De*-4(a/b/c) (δ 36-56).

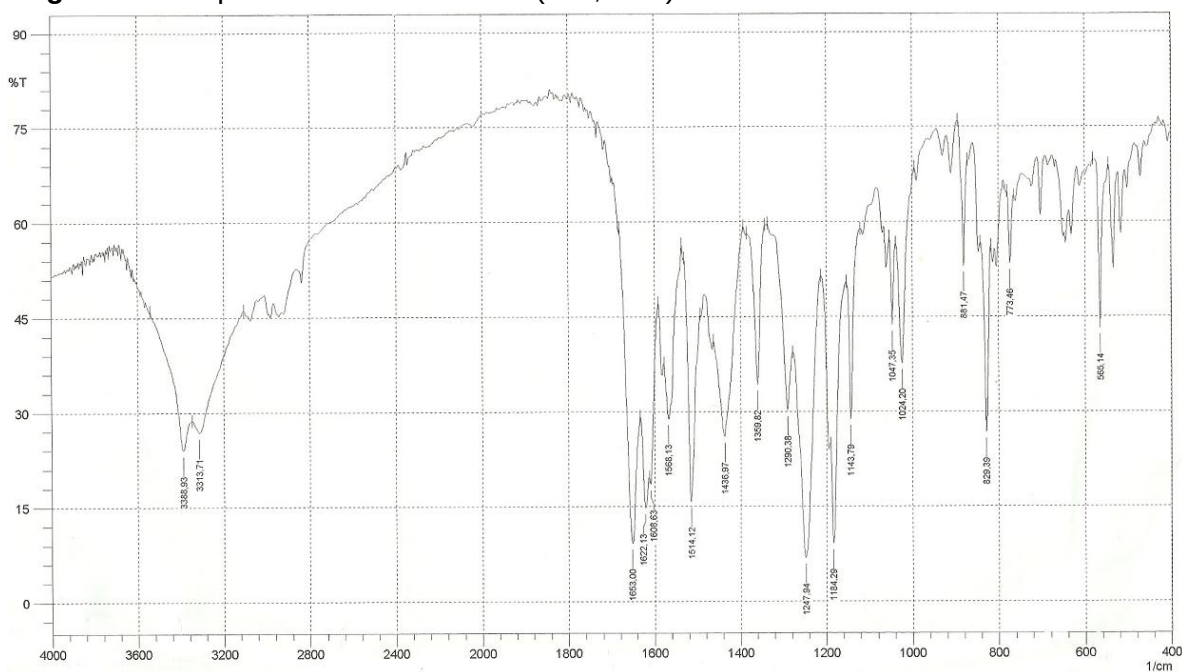
Figura 44 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de *De*-4(a/b/c) (δ 14 - 36).

5.6 Determinação estrutural de De-5

A substância De-5 foi isolada como cristais amarelos, com 4 mg de massa (correspondendo a 0,17 % em relação à massa da fase diclorometano), sob luz ultravioleta apresentou fluorescência que fez sugerir a presença de grupo cromóforo na estrutura química.

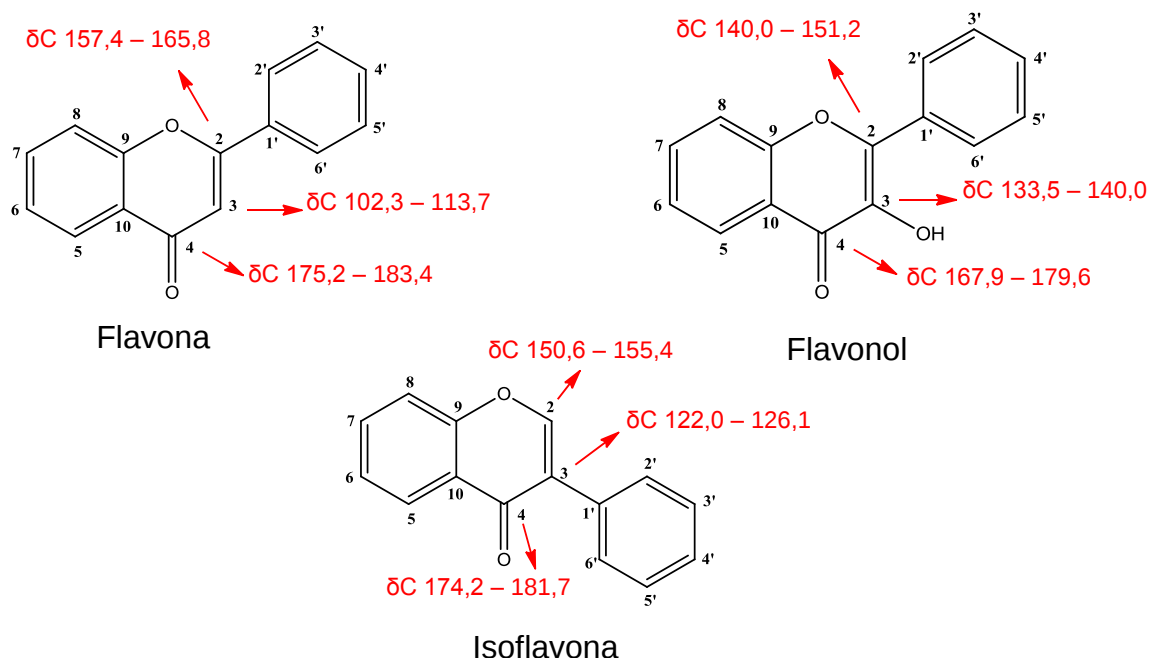
O espectro de IV (Figura 45) mostrou características típicas de um composto que apresenta hidroxila fenólica não impedida estericamente, pela presença de uma banda de grande intensidade em 3388 cm^{-1} , corroborada pela absorção em 1184 cm^{-1} de estiramento de C-O fenólico, além da presença da banda em 3313 cm^{-1} indicativa de OH quelada. Absorções em 1653 e 1622 cm^{-1} indicaram a presença de carbonila cetônica conjugada e as bandas em 1568 e 1514 cm^{-1} revelaram a natureza aromática da substância. Também foram observadas absorções em 1240 e 1047 cm^{-1} de estiramento assimétricos e simétricos, respectivamente, de C-O-C de éteres arílicos (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Figura 45 – Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de De-5.



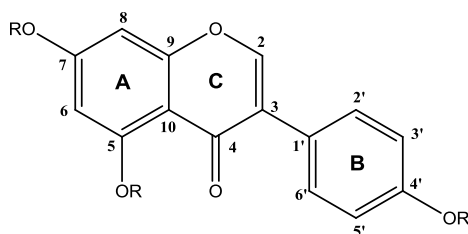
O espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) (Figura 49, p. 96) e suas expansões apresentaram 16 sinais, sendo 15 para carbonos sp^2 que são compatíveis com a unidade $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ característica de flavonoides e 1 característico de metoxila (ALBUQUERQUE et al., 2007). O tipo de flavonoide foi determinado por

análise dos dados de RMN ^{13}C para diferentes flavonoides compilados por Agrawal (1989) e Pelter et al. (1976) conforme mostrado abaixo:



Os sinais para carbonos sp^2 em δC 154,4 e 123,8 sugeriram a presença de dupla ligação entre C-2 e C-3, respectivamente, bem como o sinal em δC 181,5 para carbonila em C-4, indicaram que o flavonoide correspondia a uma isoflavona.

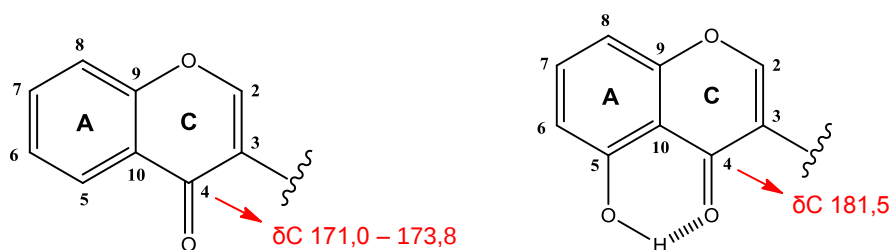
Ainda no espectro de RMN ^{13}C (Figura 49, p. 96), sinais para carbonos metínicos sp^2 em δC 99,8 (C-6) e 94,5 (C-8), além dos sinais intensos em δC 131,0 (C-2'/6') e 114,5 (C-3'/5') permitiram sugerir a presença de um anel A 5,7-dissubstituído e um sistema AA'BB' de anel B com substituinte em C-4', respectivamente (ALBUQUERQUE et al., 2007). O sinal em δC 55,5 sugere a presença de uma metoxila como substituinte no anel A ou B.



O espectro de RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) (Figura 47, p. 94) e as expansões apresentaram deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 49, p. 96) para a presença de um

esqueleto flavonoídico com o seguinte padrão de substituição: dois dupletos com integral para dois hidrogênios cada, acoplando *orto* entre si, em δ_H 7,53 ($J = 8,5$ Hz) e 6,98 ($J = 9$ Hz) compatíveis com os hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5', respectivamente, do sistema AA'BB' de anel B de flavonoide; e outros dois dupletos para um hidrogênio cada, acoplando *meta* entre si, em δ_H 6,28 ($J = 2,0$ Hz) e 6,41 ($J = 2,0$ Hz), característicos de flavonoides que possuem anel A 5,7-dissubstituído, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente. (PIZZOLATTI et al., 2003)

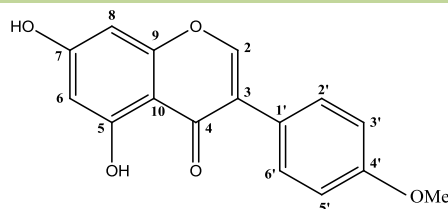
Ainda no espectro de RMN 1H , observou-se o sinal em δ_H 12,97, característico de hidroxila quelada, corroborando com a expansão do espectro de RMN ^{13}C (Figura 50, p. 96), onde o sinal em δ_C 181,5 (C-4), indicativo de carbonila quelada, inferiu a presença de hidroxila em C-5 em ligação de hidrogênio com a carbonila em C-4, já que a ausência desta força intramolecular protegeria a carbonila fazendo-a absorver em aproximadamente δ_C 171,0 - 173,8 (AGRAWAL, 1989):



A análise dos dados de RMN 1H e ^{13}C citados por Almeida e colaboradores (2008) permitiu atribuir os demais sinais apresentados por *De-5* (Tabela 5, p. 91).

No espectro bidimensional heteronuclear HMBC e suas expansões (Figura 53, 54, 55 e 56, p. 98 e 99), onde observamos correlações a duas e três ligações, apresentou correlação entre δ_H 6,28 e 6,41 com δ_C 165,1 ($^2J_{CH}$) e entre δ_H 6,28 com δ_C 163,9 ($^2J_{CH}$), o que possibilitou afirmar as posições C-7 e C-5, respectivamente, e que estas apresentavam-se substituídas. O substituinte em C-5 foi confirmado através das correlações entre δ_H 12,97, característico de OH em ponte, com os deslocamentos químicos em δ_C 163,9 ($^2J_{CH}$), 106,1 e 99,8 ($^3J_{CH}$). O simpleto em δ_H 9,91 e a presença de uma banda característica de OH não impedida estericamente, confirmam a presença de OH em C-7.

Tabela 5 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de De-5 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (500 e 125 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C do biochanina A em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (500 e 125 MHz, respectivamente), segundo Almeida et al. (2008).



biochanina A

C	Literatura		De-5	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	154,6	8,19 (s)	154,4	8,17 (s)
3	123,9	-	123,8	-
4	181,6	-	181,5	-
5	164,0	-	163,9	-
6	100,0	6,28 (d, $J=1,9$ Hz)	99,8	6,28 (d, $J=2,0$ Hz)
7	165,2	-	165,1	-
8	94,6	6,41 (d, $J=1,9$ Hz)	94,5	6,41 (d, $J=2,0$ Hz)
9	159,1	-	159,0	-
10	106,2	-	106,1	-
1'	124,3	-	124,2	-
2'	131,2	7,55 (d, $J=8,7$ Hz)	131,0	7,53 (d, $J=8,5$ Hz)
3'	114,6	7,00 (d, $J=8,7$ Hz)	114,5	6,98 (d, $J=9,0$ Hz)
4'	160,0	-	160,7	-
5'	114,6	7,00 (d, $J=8,7$ Hz)	114,5	6,98 (d, $J=9,0$ Hz)
6'	131,2	7,55 (d, $J=8,7$ Hz)	131,0	7,53 (d, $J=8,5$ Hz)
OMe	55,7	3,83 (s)	55,5	3,82 (s)
5-OH	-	-	-	12,97 (s)
7-OH	-	-	-	9,91 (s)

Observaram-se ainda no HMBC correlações entre os dupletos em δ_{H} 7,53 e 6,98 com os sinais intensos em δ_{C} 131,0 ($^3J_{\text{CH}}$) e 114,5 ($^3J_{\text{CH}}$), respectivamente, corroboram com a presença de um sistema AA'BB', além das correlações entre δ_{H} 7,53 e 6,98 com δ_{C} 160,7 ($^3J_{\text{CH}}$) que confirmam a presença de um substituinte em C-4', o qual é identificado através do espectro bidimensional homonuclear NOESY, onde observamos correlações espaciais entre os deslocamentos químicos δ_{H} 6,98 e δ_{H} 3,82, confirmando que este carbono encontrava-se metoxilado (Tabela 6, p. 92).

No espectro bidimensional heteronuclear HMQC e as expansões (Figura 51 e 52, p. 97), onde observamos correlações diretas, observou-se correlação em δ_{H} 8,17

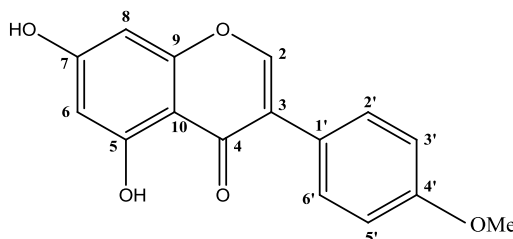
com δ_C 154,4 (Tabela 6), além das correlações no HMBC para δ_H 8,17 com δ_C 123,8, 159,0 e 181,5, pode-se confirmar que o flavonoide correspondia a um isoflavonoide.

Tabela 6 – Correlações entre sinais de $^1H \times ^{13}C$ (HMQC e HMBC) e $^1H \times ^1H$ (NOESY) de *De-5* registrados em $(CD_3)_2CO$.

	HMQC		HMBC		NOESY
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^1H \times ^1H$
C					
3	123,8	-	H-2	H-2', H-6'	-
4	181,5	-	-	H-2	-
5	163,9	-	H-6, OH-5	-	-
7	165,1	-	H-6, H-8	-	-
9	159,0	-	H-8	H-2	-
10	106,1	-	-	H-6, H-8, OH-5	-
1'	124,2	-	-	H-3', H-5'	-
4'	160,7	-	H-3', H-5'	H-2', H-6'	-
CH					
2	154,4	8,17 (s, 1H)	-	-	H2'/H6'
6	99,8	6,28 (d, J=2,0 Hz, 1H)	-	H-8, OH-5	-
8	94,5	6,41 (d, J=2,0 Hz, 1H)	-	H-6	-
2'	131,0	7,53 (d, J=8,5 Hz, 2H)	-	H-6'	H-2, H3'/H5'
3'	114,5	6,98 (d, J=9,0 Hz, 2H)	-	H-5'	H2'/H6', 4'OMe
5'	114,5	6,98 (d, J=9,0 Hz, 2H)	-	H-3'	H2'/H6', 4'OMe
6'	131,0	7,53 (d, J=8,5 Hz, 2H)	-	H-2'	H-2, H3'/H5'
4'-OMe	55,5	3,82 (s, 3H)	-	-	H3'/H5'
5-OH	-	12,97 (s)	-	-	-

A compilação dos dados de IV, RMN 1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) em comparação com os valores obtidos na literatura, permitiu identificar *De-5* como sendo 5,7-dihidroxi-3-(4-metoxifenil) ou 5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona, mais conhecido como biochanina A (Figura 46).

Figura 46 – Estrutura química de *De-5*, biochanina A



O isoflavonoide biochanina A está sendo relatado pela primeira vez na espécie, porém já foi relatado como isolado da própolis vermelha e de outras

espécies de *Dalbergia* como, *D. odorifera* e *D. sissoides*, além de estudos que revelam atividade anti-inflamatória (WATANABE et al., 2008; WANG et al., 2011; KAVISWAMI et al., 2002).

Figura 47 – Espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de De-5.

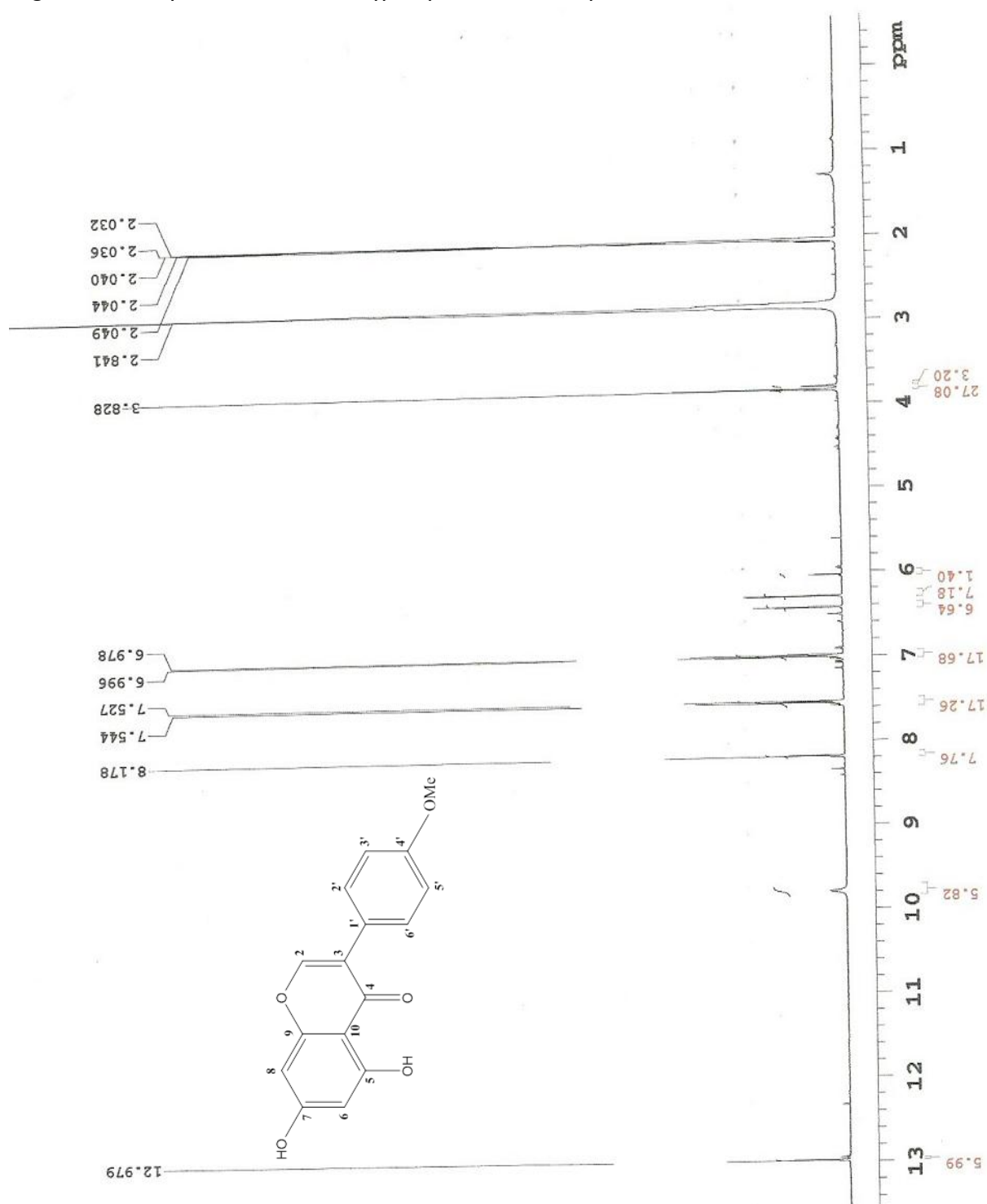


Figura 48 – Expansão do espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de De-5 (δ 6,1-8,2).

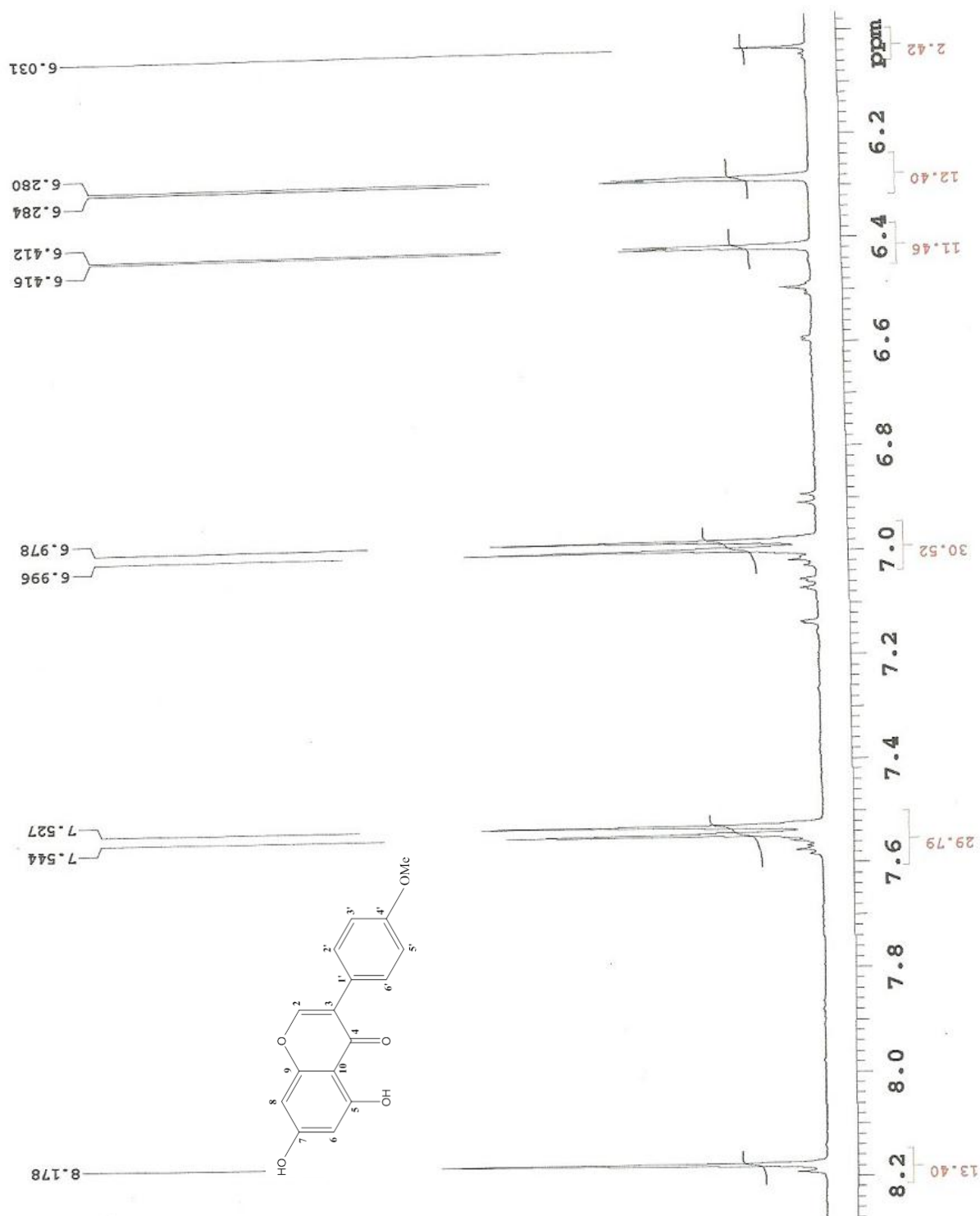


Figura 49 – Espectro de RMN ^{13}C APT ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 125 MHz) de De-5.

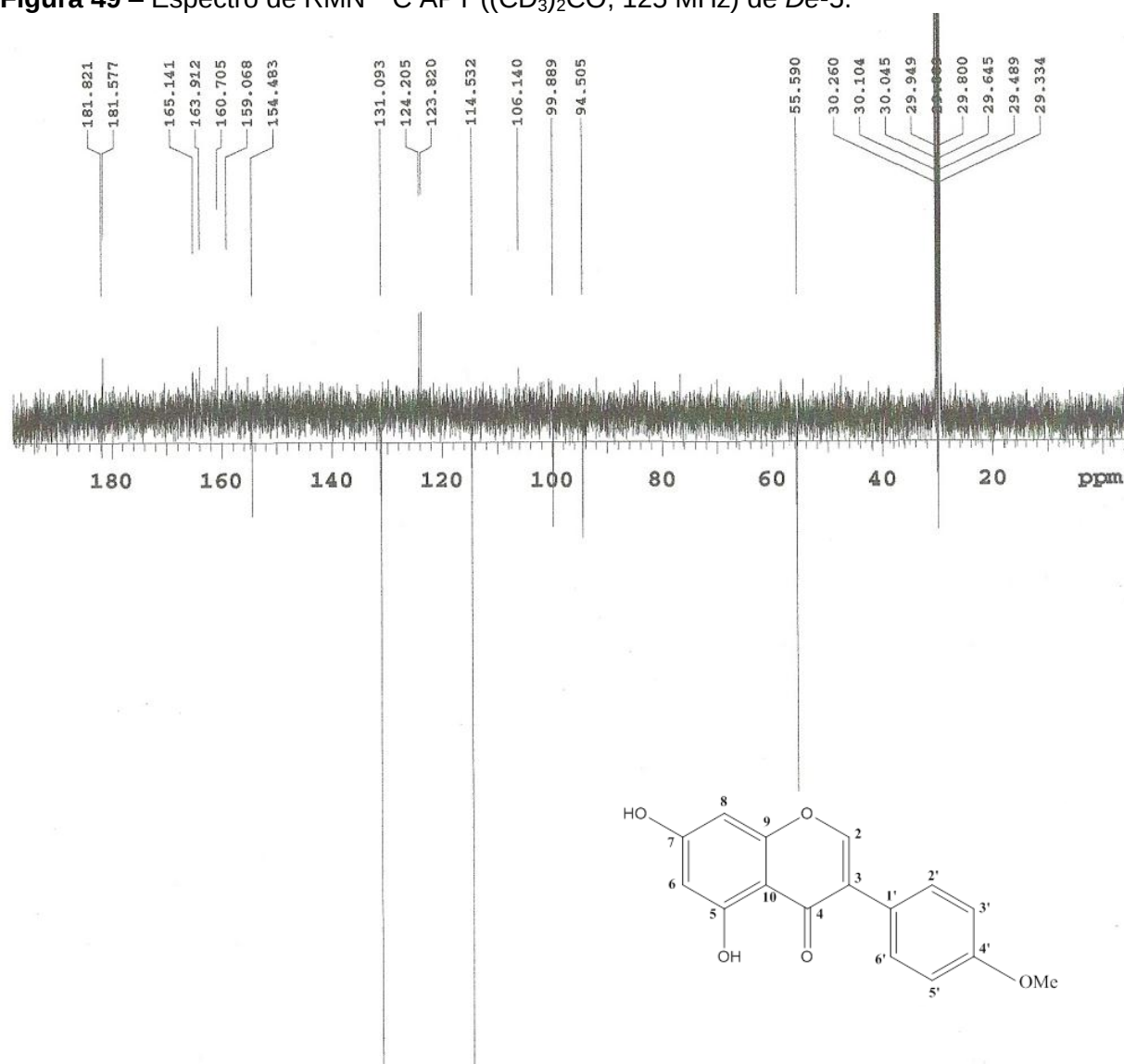


Figura 50- Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 125 MHz) de De-5 (δ 150-185).

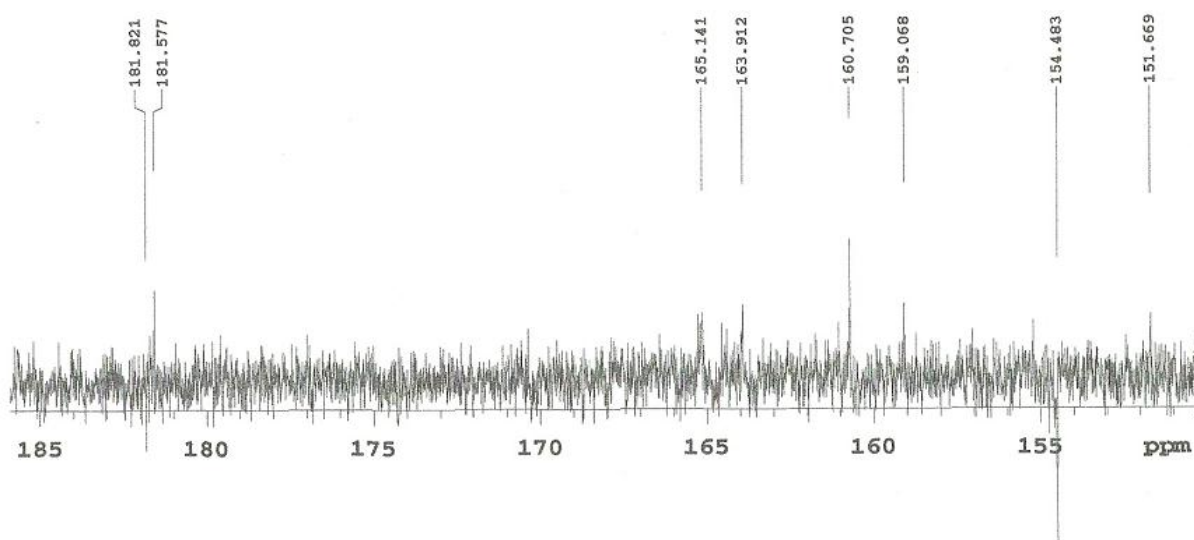


Figura 51 – Espectro HMQC ((CD₃)₂CO, 500 e 125 MHz) de De-5.

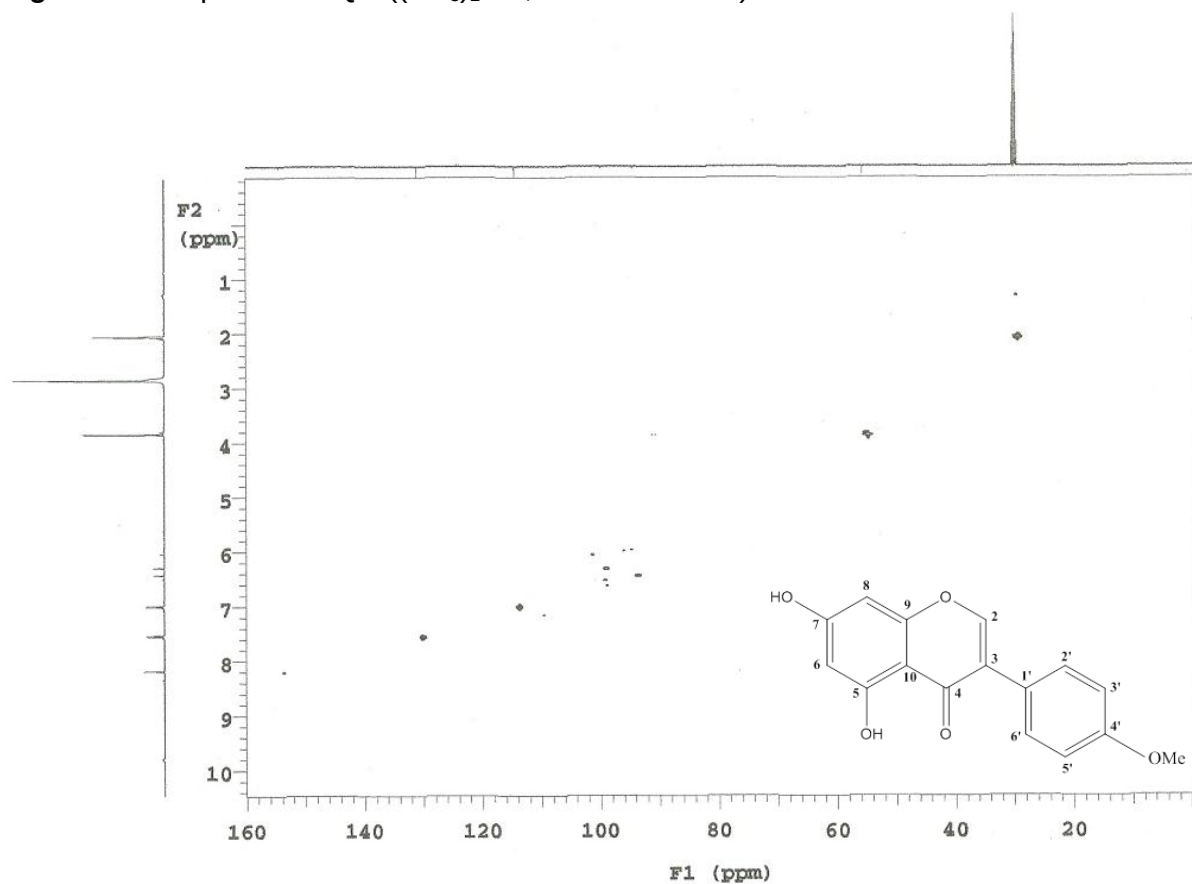


Figura 52 – Expansão do espectro HMQC ((CD₃)₂CO, 500 e 125 MHz) de De-5 na região de (5,4 – 8,0) x (90 – 135).

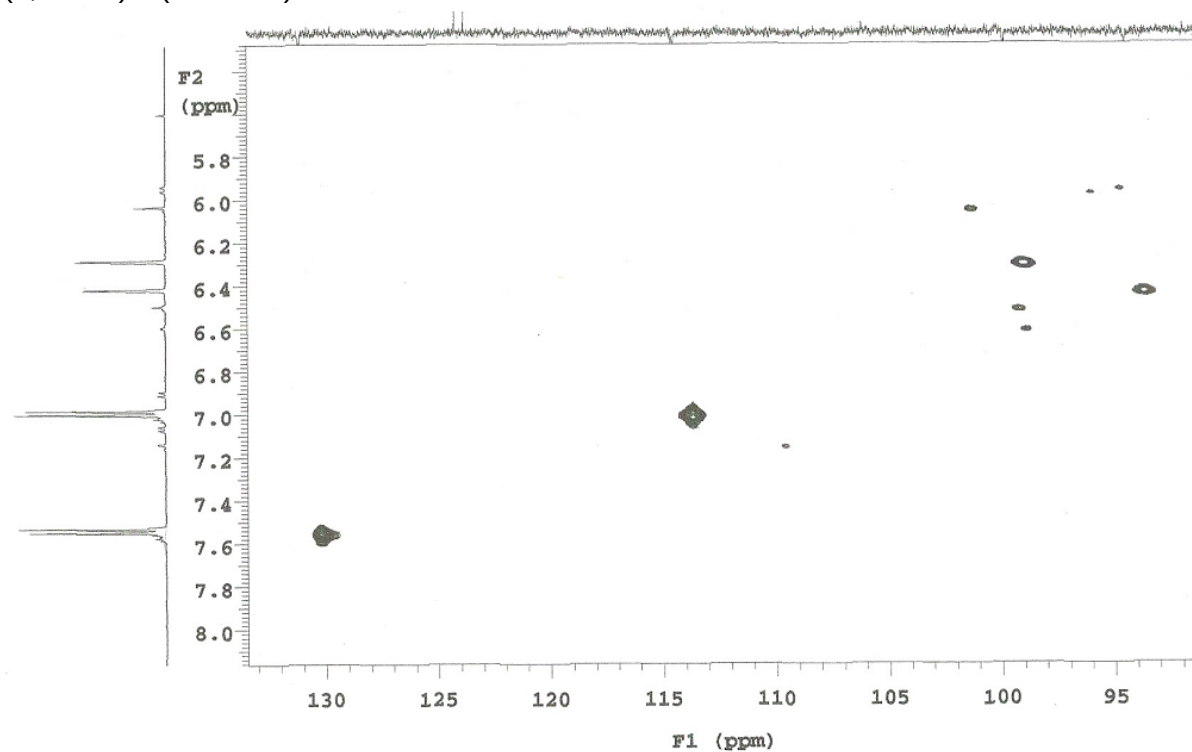


Figura 53 – Espectro HMBC ((CD₃)₂CO, 500 e 125 MHz) de *De*-5.

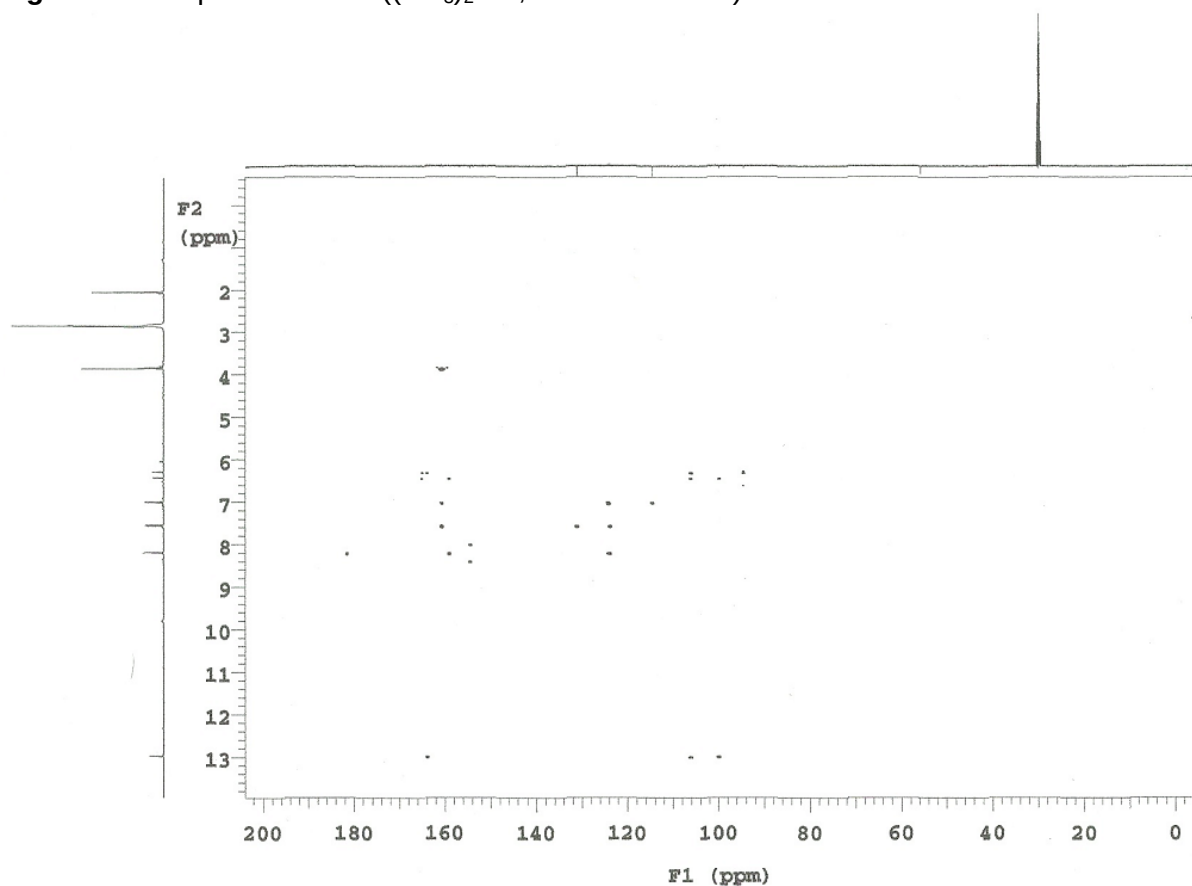


Figura 54 – Expansão do espectro HMBC ((CD₃)₂CO, 500 e 125 MHz) de *De*-5 na região de (5,5 – 9,0) x (152 – 184).

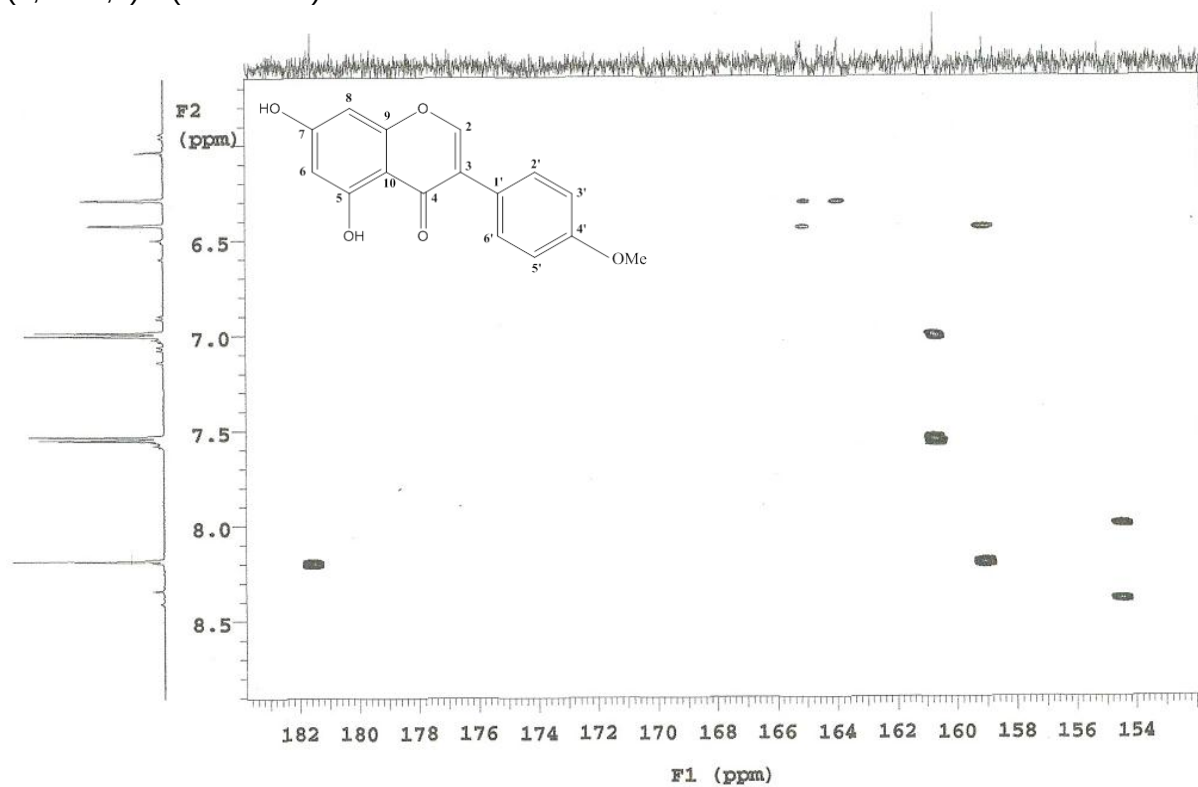


Figura 55 – Expansão do espectro HMBC ((CD₃)₂CO, 500 e 125 MHz) de *De-5* na região de (5,5 – 9,0) x (90 – 135).

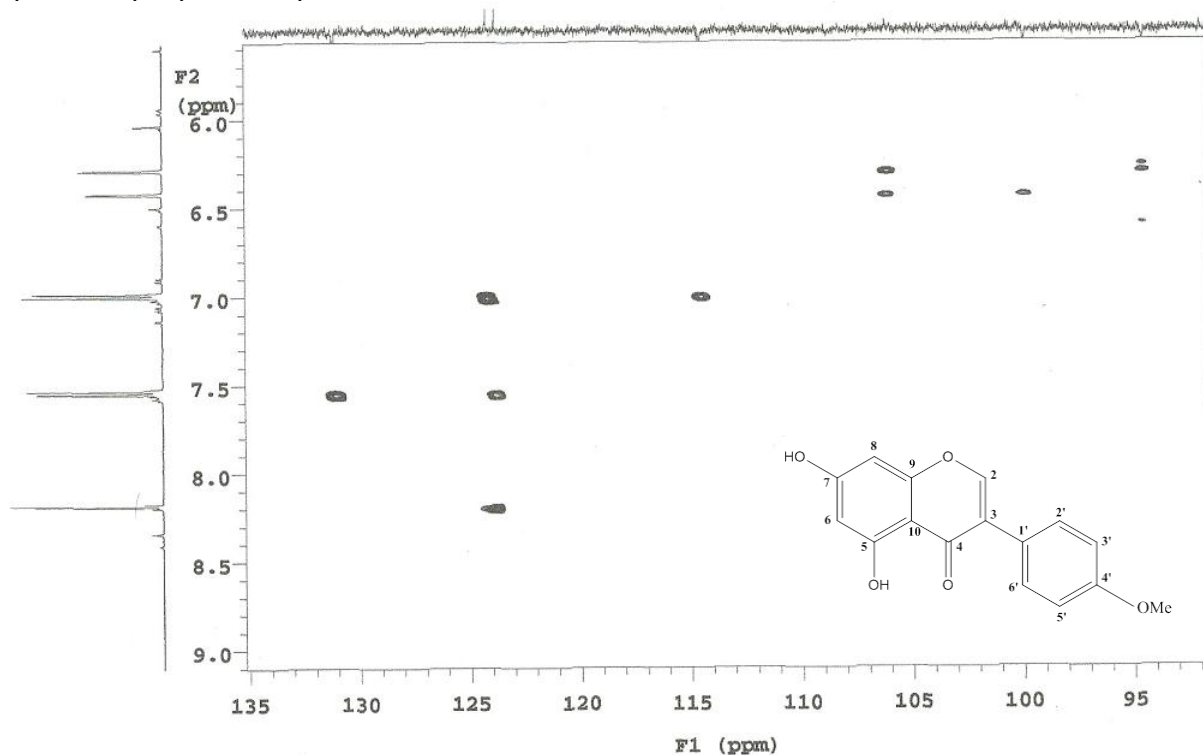


Figura 56 – Expansão do espectro HMBC ((CD₃)₂CO, 500 e 125 MHz) de *De-5* na região de (6,8 – 8,4) x (123 – 132).

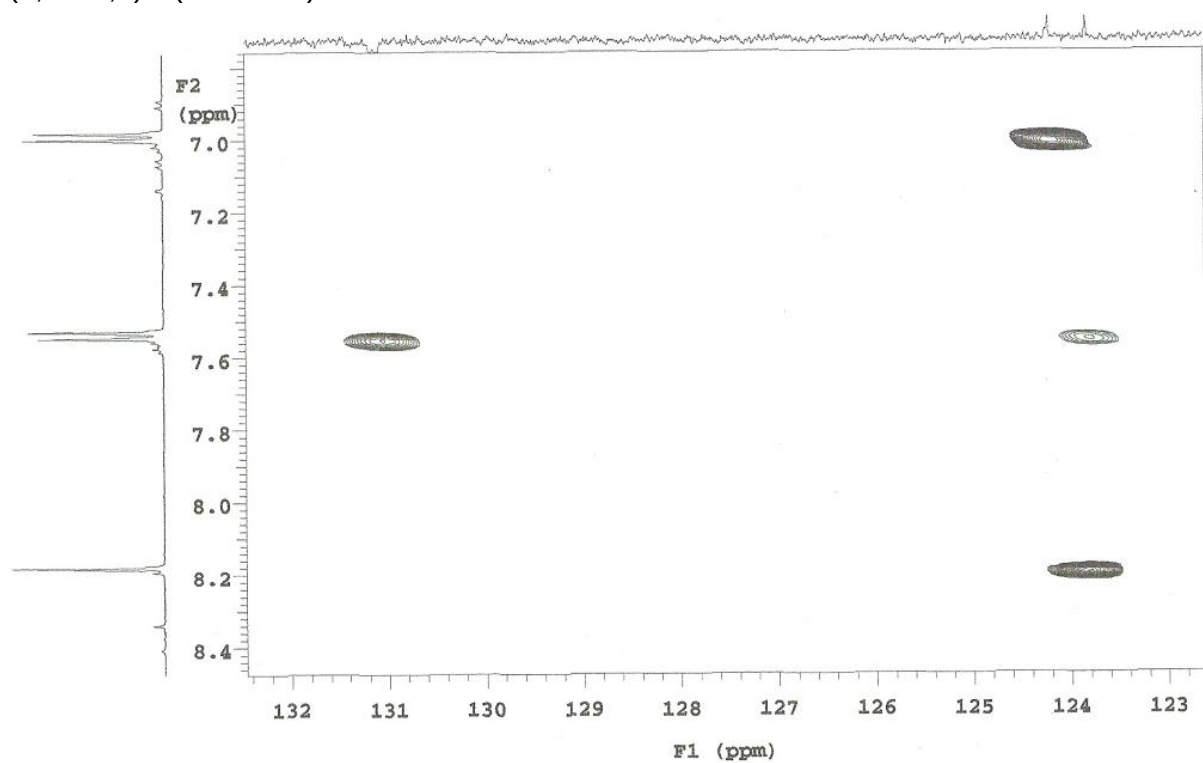
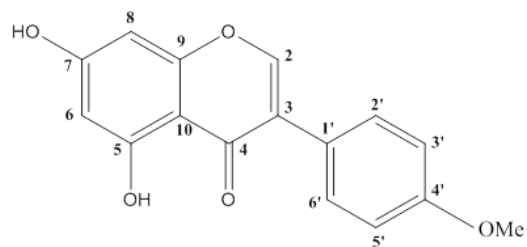
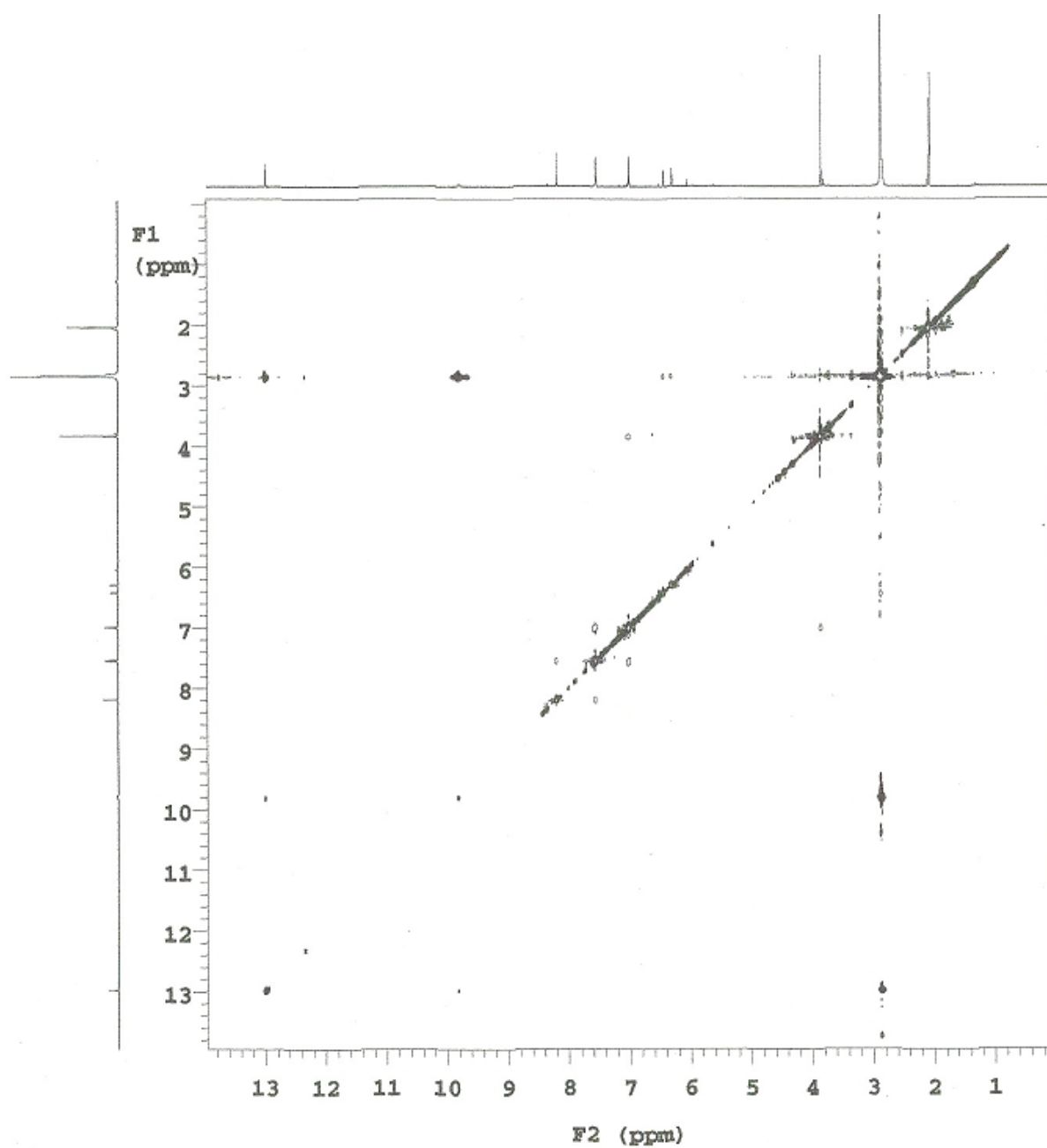


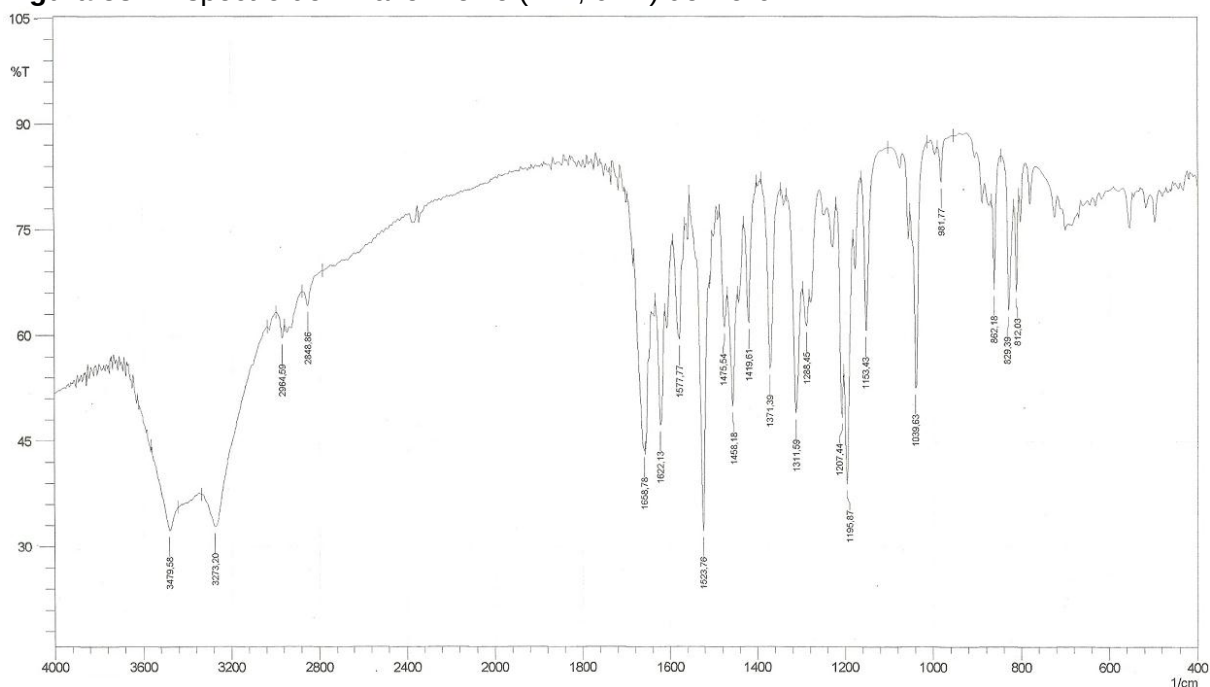
Figura 57 – Espectro NOESY ((CD₃)₂CO, 125 e 125 MHz) de De-5.

5.7 Determinação estrutural de De-6

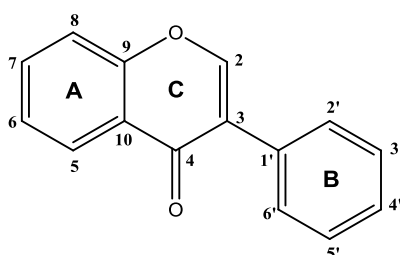
A substância De-6 foi isolada como cristais brancos, com 15 mg de massa (correspondendo a 6,25 % em relação à massa da fase diclorometano), sob luz ultravioleta apresentou fluorescência que fez sugerir a presença de grupo cromóforo na estrutura química.

O espectro de IV (Figura 58) mostrou características típicas de um composto com várias hidroxilas fenólicas não impedidas estericamente, pela presença de uma banda de grande intensidade em 3479 cm^{-1} e 3273 cm^{-1} indicativa de OH quelada corroborada pela absorção em 1207 cm^{-1} de deformação angular de C-O fenólico e presença de banda em 1311 cm^{-1} de C-O de éter. Absorções em 1658 e 1622 cm^{-1} indicaram a presença de carbonila cetônica conjugada e em ponte, respectivamente, além de bandas em 1577 e 1523 cm^{-1} revelaram a natureza aromática da substância. Também foram observadas absorções em 1195 e 1039 cm^{-1} de estiramento assimétricos e simétricos, respectivamente, de C-O-C de éteres arílicos (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Figura 58 – Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de De-6



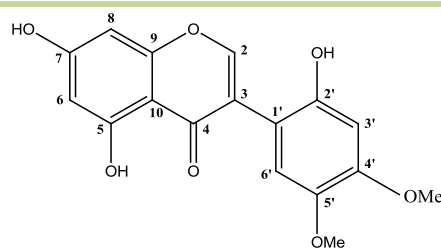
O espectro de RMN ^{13}C - APT (125 MHz, DMSO) (Figura 64, p. 109) e suas expansões apresentaram 17 sinais, sendo 15 para carbonos sp^2 que são compatíveis com a unidade $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ característica de flavonoides e 2 característicos de metoxilas (ALBUQUERQUE et al., 2007). Assim como demonstrado em *De-5*, o tipo de flavonoide foi determinado por análise dos dados de RMN ^{13}C , onde o sinal em δ_{C} 180,0 indicativo de carbonila em C-4, bem como os sinais para carbonos sp^2 em δ_{C} 155,2 e 120,2 sugeriram a presença de dupla ligação entre C-2 e C-3, indicaram que a substância correspondia a um flavonoide do tipo isoflavona.



Ainda no espectro de RMN ^{13}C (Figura 64, p. 109), sinais para carbonos metínicos sp^2 em δ_{C} 98,9 (C-6) e 93,6 (C-8), permitiram sugerir a presença de um anel A 5,7-dissubstituído. Sinais em δ_{C} 56,6 e 55,9 sugere a presença de duas metoxilas como substituintes no anel A ou B.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO) (Figura 60, p. 106) e suas expansões exibiram deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta dos espectros de RMN ^{13}C para a presença de um esqueleto flavonoídico com o seguinte padrão de substituição: dois dupletos para um hidrogênio cada, acoplando *meta* entre si, em δ_{H} 6,20 ($J = 1,5$ Hz) e 6,36 ($J = 1,5$ Hz), característicos de flavonoides que possuem anel A 5,7-dissubstituído, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente (PIZZOLATTI et al., 2003). Dois singletos em δ_{H} 6,56 e 6,83 estabeleceram a presença de dois prótons no anel B. Um simpleto em δ_{H} 8,14, característico de H-2, devido a desproteção sofrida por ser H- β -carbonílico e por estar ligado diretamente a carbono oxigenado, confirma que o flavonoide trata-se de uma isoflavona. Além de um sinal em δ_{H} 12,91, característico de hidroxila quelada em C-5, corroborando proposta pelo espectro de IV.

A análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C citados por Nkengfack e colaboradores (1989) permitiu atribuir os demais sinais apresentados por *De-6* (Tabela 7, p. 103).

Tabela 7 – Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *De-6* em DMSO (500 e 125 MHz, respectivamente) e do 2'-hidroxi-5'-metoxibiochanina A, segundo Nkengfack et al. (1989).**2'-hidroxi-5'-metoxibiochanina A**

C	Literatura		<i>De-6</i>	
	δC	δH	δC	δH
2	155,5	8,02 (s)	155,2	8,14 (s)
3	110,4	-	120,2	-
4	181,0	-	180,0	-
5	158,5	-	161,8	-
6	99,3	6,43 (d, J=2,7 Hz)	98,9	6,20 (d, J=1,5 Hz)
7	164,5	-	164,3	-
8	94,0	6,27 (d, J=2,7 Hz)	93,6	6,36 (d, J=1,5 Hz)
9	163,3	-	157,5	-
10	105,6	-	104,2	-
1'	121,0	-	109,2	-
2'	153,0	-	147,8	-
3'	100,8	6,64 (s)	100,8	6,56 (s)
4'	148,3	-	152,0	-
5'	141,5	-	141,0	-
6'	116,4	6,94 (s)	116,6	6,83 (s)
5-OH	-	13,02 (s)	-	12,91 (s)
7-OH	-	9,98 (s)	-	-
2'-OH	-	7,95 (s)	-	-
4'OMe	56,1	3,80 (s)	55,9	3,62 (s)
5'OMe	56,7	3,68 (s)	56,6	3,70 (s)

No espectro bidimensional heteronuclear HMBC e suas expansões (Figura 68, 69, 70 e 71, p. 111, 112 e 113), onde se observam correlações a duas e três verificou-se correlação entre δH 12,91 com δC 161,8 ($^2J_{\text{CH}}$), 104,2 e 98,9 ($^3J_{\text{CH}}$) o que possibilitou afirmar que *De-6* apresentava-se hidroxilado na posição C-5.

Ainda no espectro HMBC, pôde-se verificar a correlação entre δH 8,14 com δC 180,0 ($^3J_{\text{CH}}$), corroborando com o espectro de RMN ^{13}C onde de que *De-6* tratava-se de uma isoflavona. As atribuições dos carbonos 1' e 3 foi possível mediante as correlações entre δH 6,56 e 8,14 com δC 109,2 e entre δH 6,83 e 8,14 com δC 120,2, o que permitiu definir δC 109,2 e 120,2 para C-1' e C-3, respectivamente. Retificando o

artigo de Nkengfack et al. (1989) (Tabela 7, p. 103) onde afirma que C-3 é mais blindado que C-1'. Correlações entre δ_H 3,62 com δ_C 152,0 ($^3J_{CH}$) e δ_H 3,70 com δ_C 141,0 ($^3J_{CH}$) confirmou a presença de duas metoxilas em C-4' e C-5', respectivamente. Essas posições foram reafirmadas analisando o espectro de NOESY $^1H \times ^1H$ (Figura 72, p. 113), observou-se correlações entre os sinais δ_H 3,62 com 6,56 e entre δ_H 3,70 com 6,83, ratificando que as posições C-4' e C-5' apresentavam-se metoxiladas (Tabela 8).

No espectro bidimensional heteronuclear HMQC e suas expansões (Figura 65, 66 e 67 p. 110 e 111), onde se observam correlações diretas, observou-se correlações entre δ_H 6,83 com δ_C 116,6 e entre δ_H 6,56 com δ_C 100,8, referentes a prótons em C-6' e C-3'. Além de correlações entre o duplete em δ_H 6,20 com δ_C 98,9 e o duplete em δ_H 6,36 com δ_C 93,6 correspondentes ao C-6 e C-8, respectivamente.

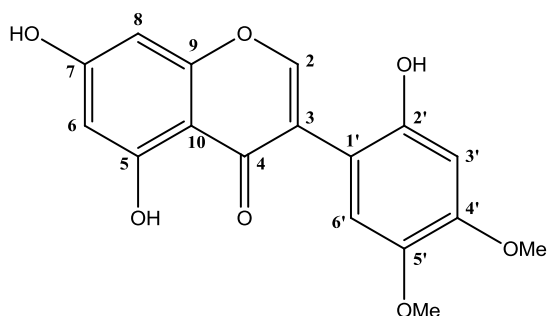
Tabela 8 – Correlações entre sinais de $^1H \times ^{13}C$ (HMQC e HMBC) e $^1H \times ^1H$ (NOESY) de *De-6* registrados em DMSO.

	HMQC		HMBC		NOESY
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^1H \times ^1H$
C					
3	120,2	-	H-2	H-6'	-
4	180,0	-	-	H-2	-
5	161,8	-	H-6, 5-OH	-	-
7	164,3	-	H-6, H-8	-	-
9	157,5	-	H-8	-	-
10	104,2	-	-	H-6, H-8, 5-OH	-
1'	109,2	-	-	H-2, H-3'	-
2'	147,8	-	H-3'	H-6'	-
4'	152,0	-	H-3'	H-6', 4'-OMe	-
5'	141,0	-	H-6'	H-3', 5'-OMe	-
CH					
2	155,2	8,14 (s)	-	-	H-6'
6	98,9	6,20 (d, J=1,5 Hz)	-	H-8, 5-OH	-
8	93,6	6,36 (d, J=1,5 Hz)	-	H-6	-
3'	100,8	6,56 (s)	-	-	4'-OMe
6'	116,6	6,83 (s)	-	-	H-2, 5'-OMe
5-OH	-	12,91 (s)	-	-	-
4'-OMe	56,6	3,70 (s)	-	-	H-3'
5'-OMe	55,9	3,62 (s)	-	-	H-6'

A ausência de sinais no espectro de RMN ^1H correspondentes a H-2' e H-7 e a presença de banda característica de OH não impedida estericamente no IV (Figura 60, p. 106) somado as comparações com dados da literatura confirmaram que C-2' e C-7 apresentavam-se hidroxilados (Tabela 7, p. 103).

A reunião dos dados de IV, RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) em comparação com os valores obtidos na literatura, permitiu identificar *De-6* como sendo 2'-hidroxi-5'-metoxibiochanina A (Figura 59).

Figura 59 – Estrutura química de *De-6*, 2'-hidroxi-5'-metoxibiochanina A



O 2'-hidroxi-5'-metoxibiochanina A está sendo relatado pela primeira vez no gênero e estudos relatam a sua atividade antioxidante (WENG et al., 2000; AI-LI et al., 2006).

Figura 60 – Espectro de RM N ^1H (DMSO, 500 MHz) de De-6.

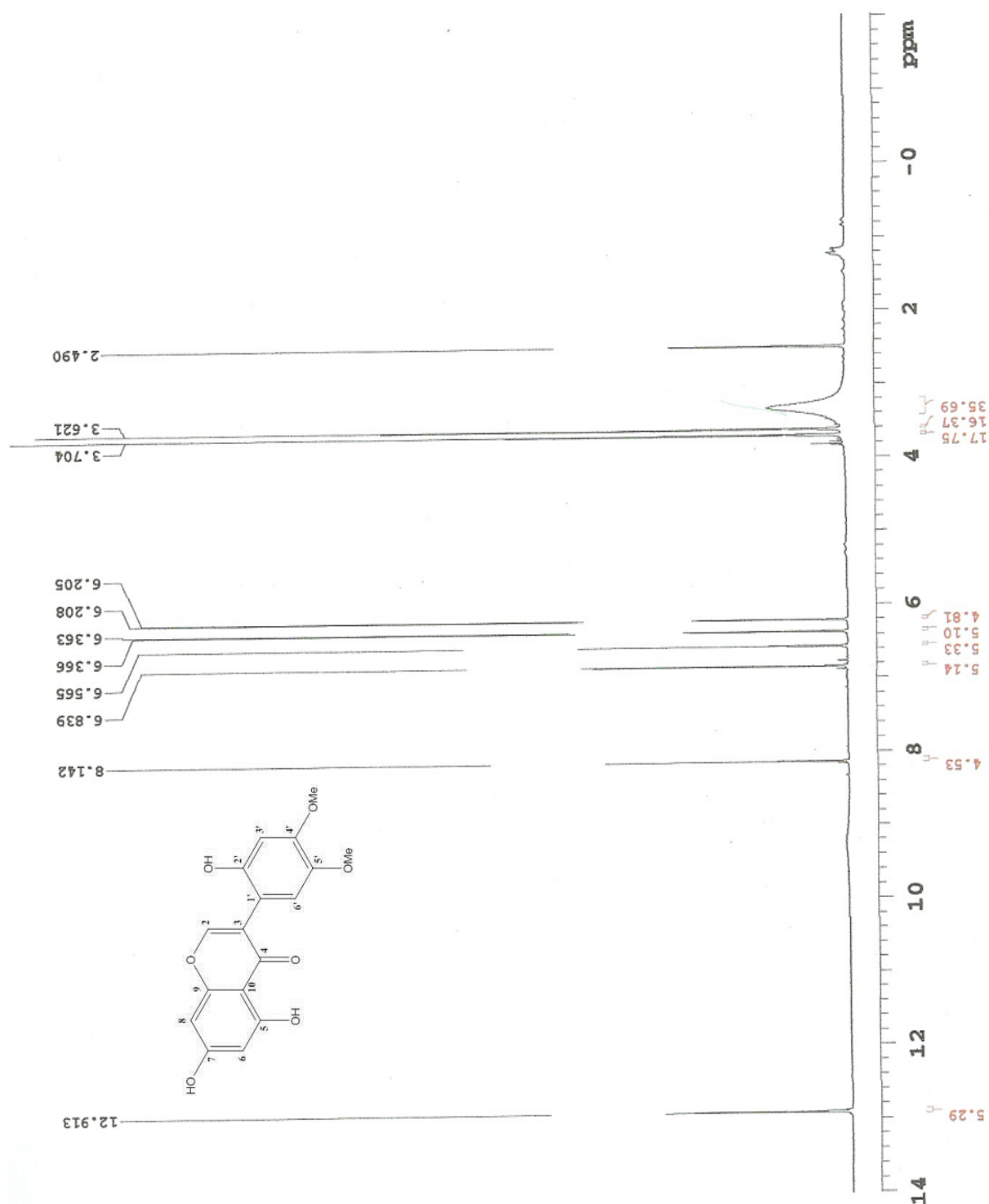


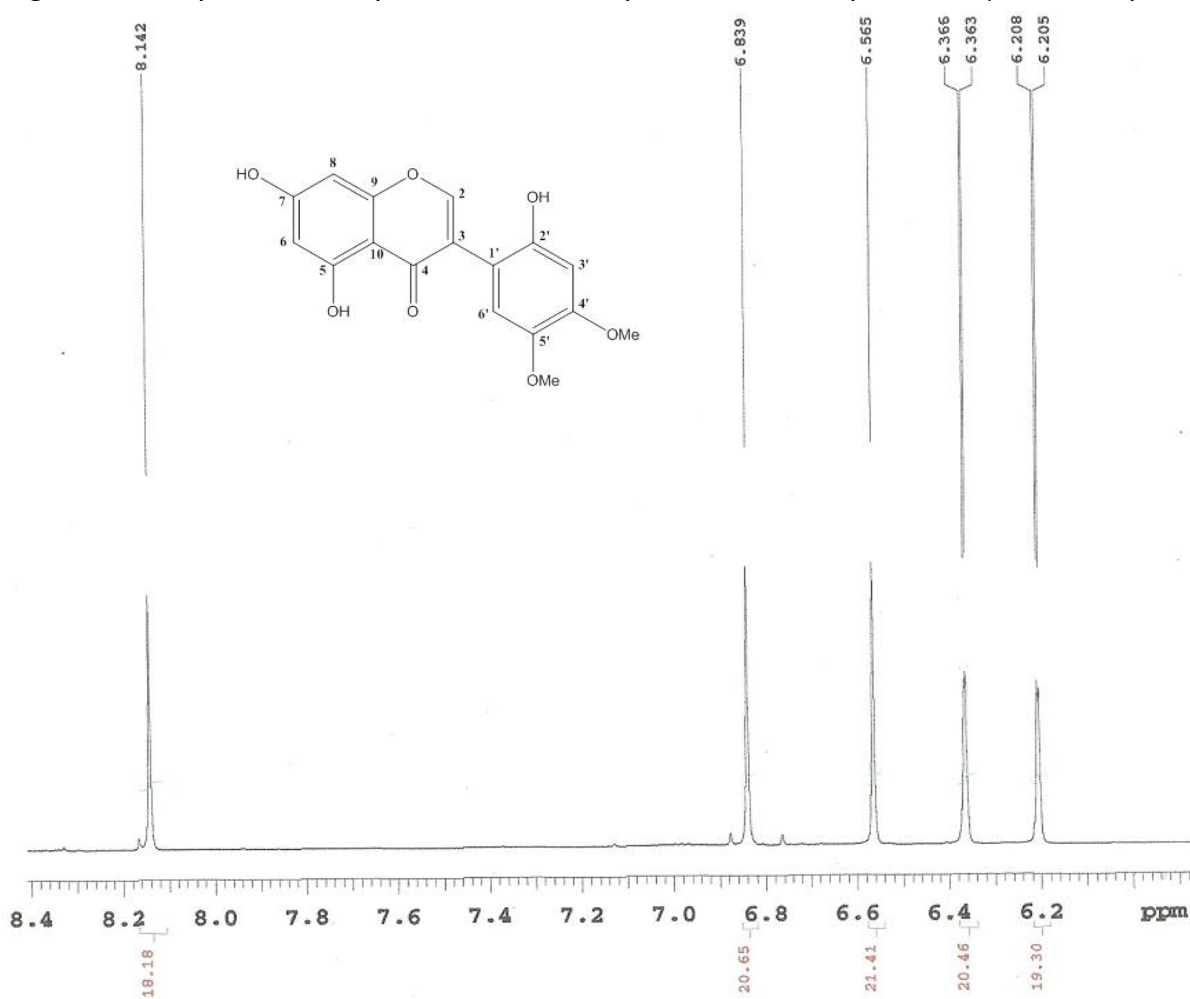
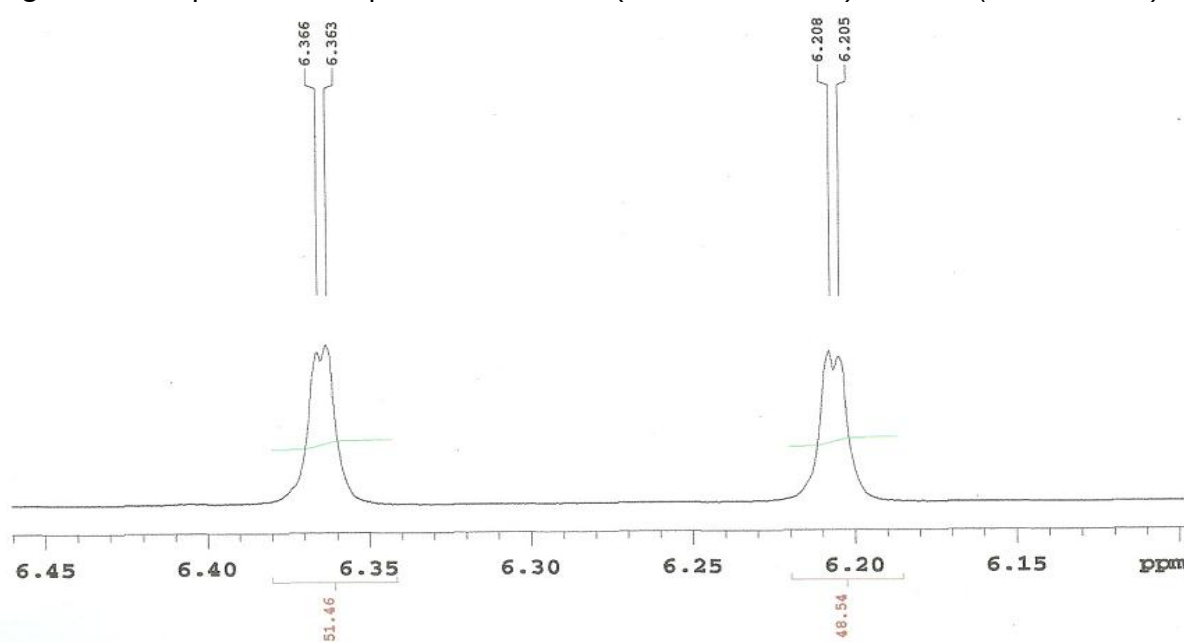
Figura 61 – Expansão do espectro de RMN ^1H (DMSO, 500 MHz) de De-6 (δ 6,1 – 8,4).**Figura 62** – Expansão do espectro de RMN ^1H (DMSO, 500 MHz) de De-6 (δ 6,10 - 6,45).

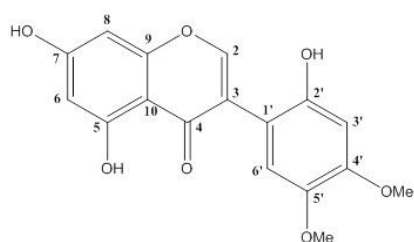
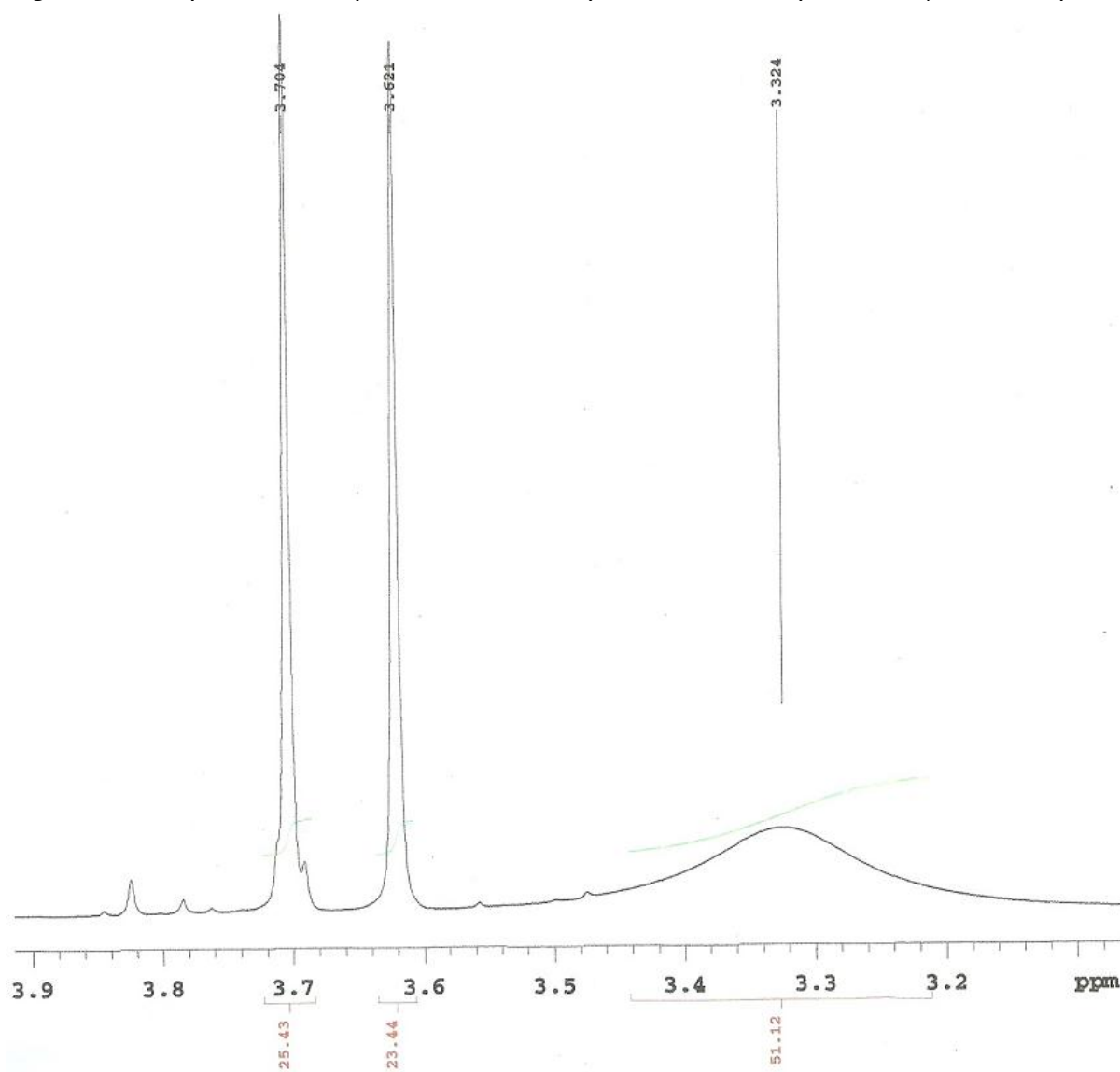
Figura 63 – Expansão do espectro de RMN ^1H (DMSO, 500 MHz) de De-6 (δ 3,1 – 3,9).

Figura 64 – Espectro de RMN ^{13}C APT (DMSO, 125 MHz) de De-6.

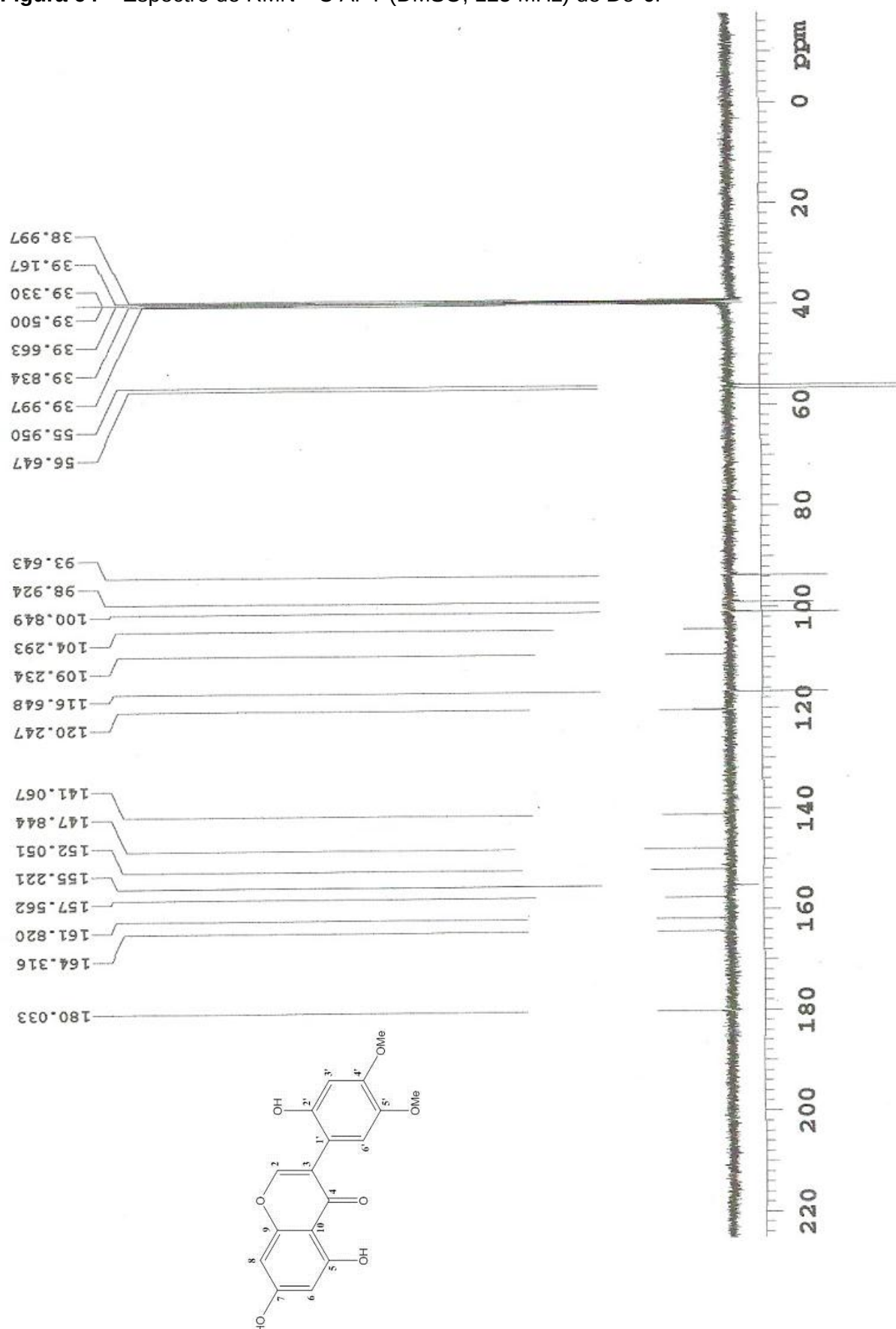


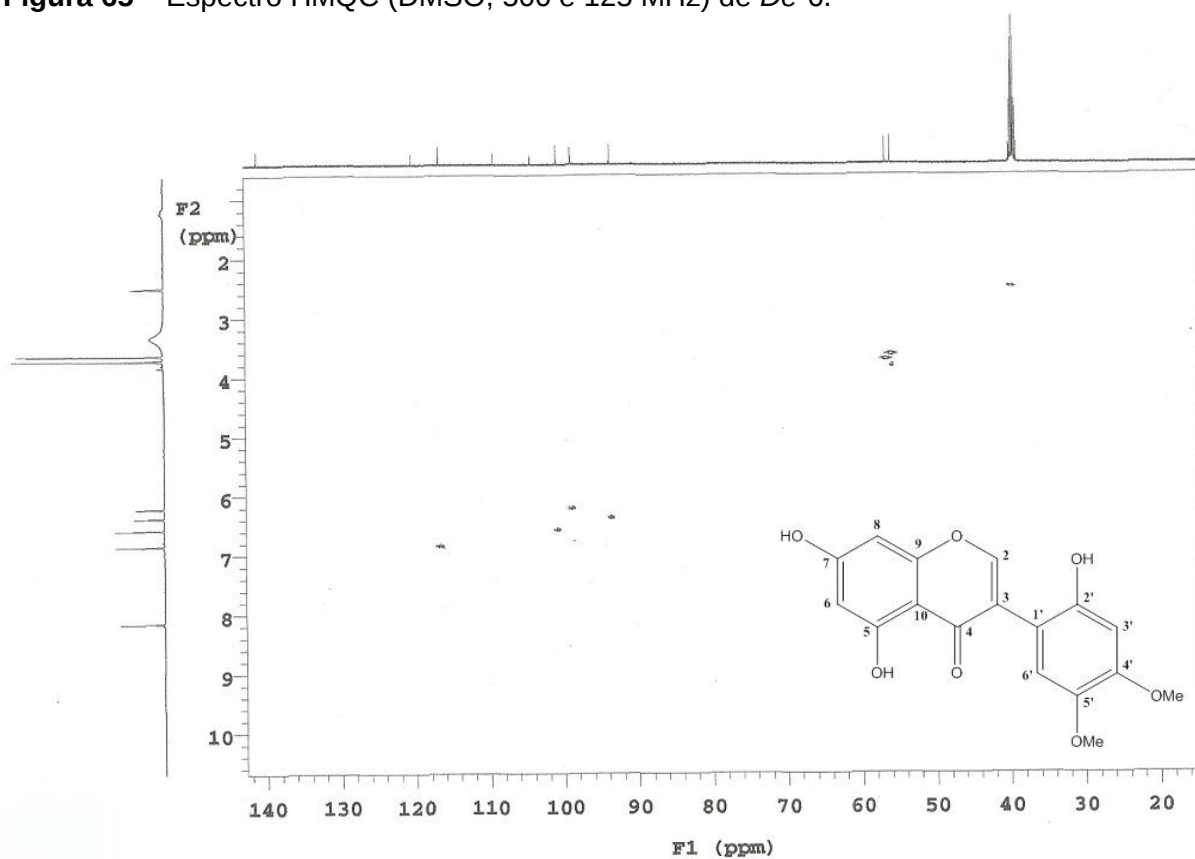
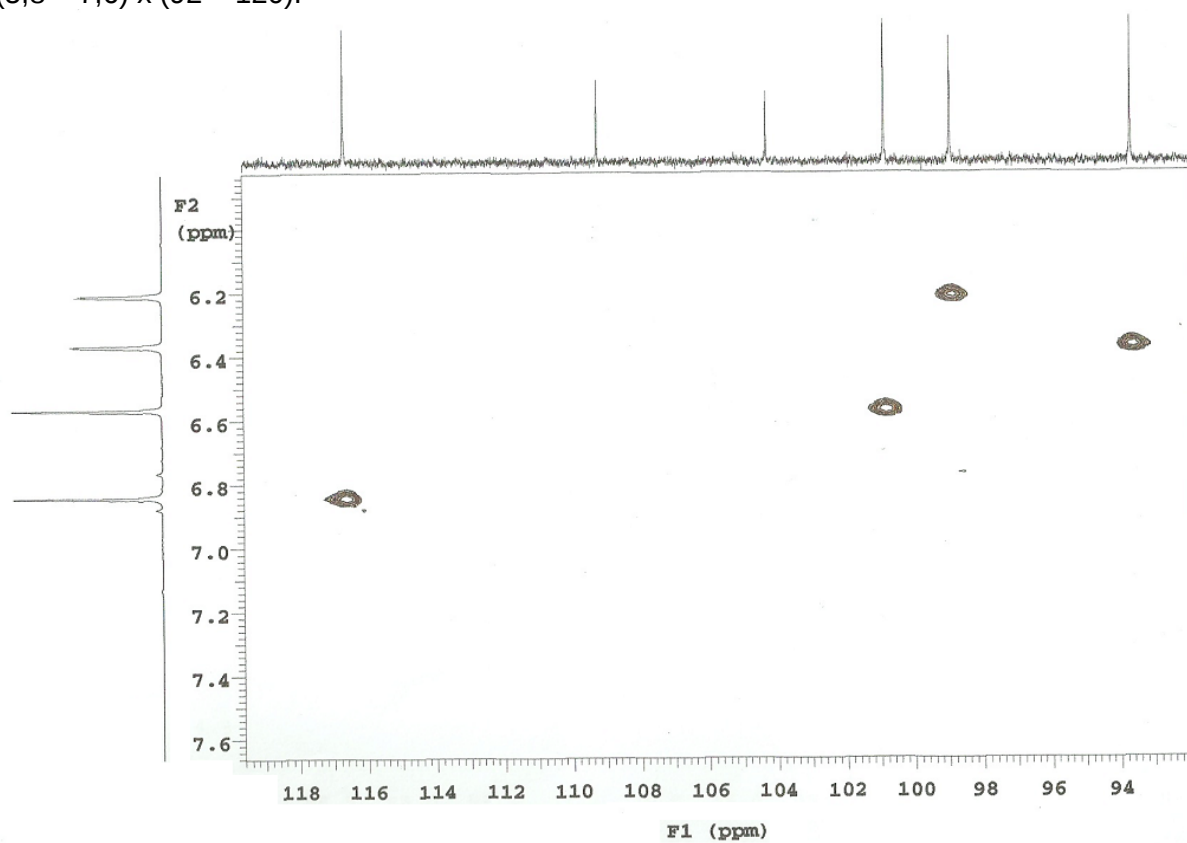
Figura 65 – Espectro HMQC (DMSO, 500 e 125 MHz) de *De-6*.**Figura 66** – Expansão do espectro HMQC (DMSO, 500 e 125 MHz) de *De-6* na região de (5,8 – 7,6) x (92 – 120).

Figura 67 – Expansão do espectro HMQC (DMSO, 500 e 125 MHz) de *De-6* na região de (2,6 – 5,0) x (53 – 59).

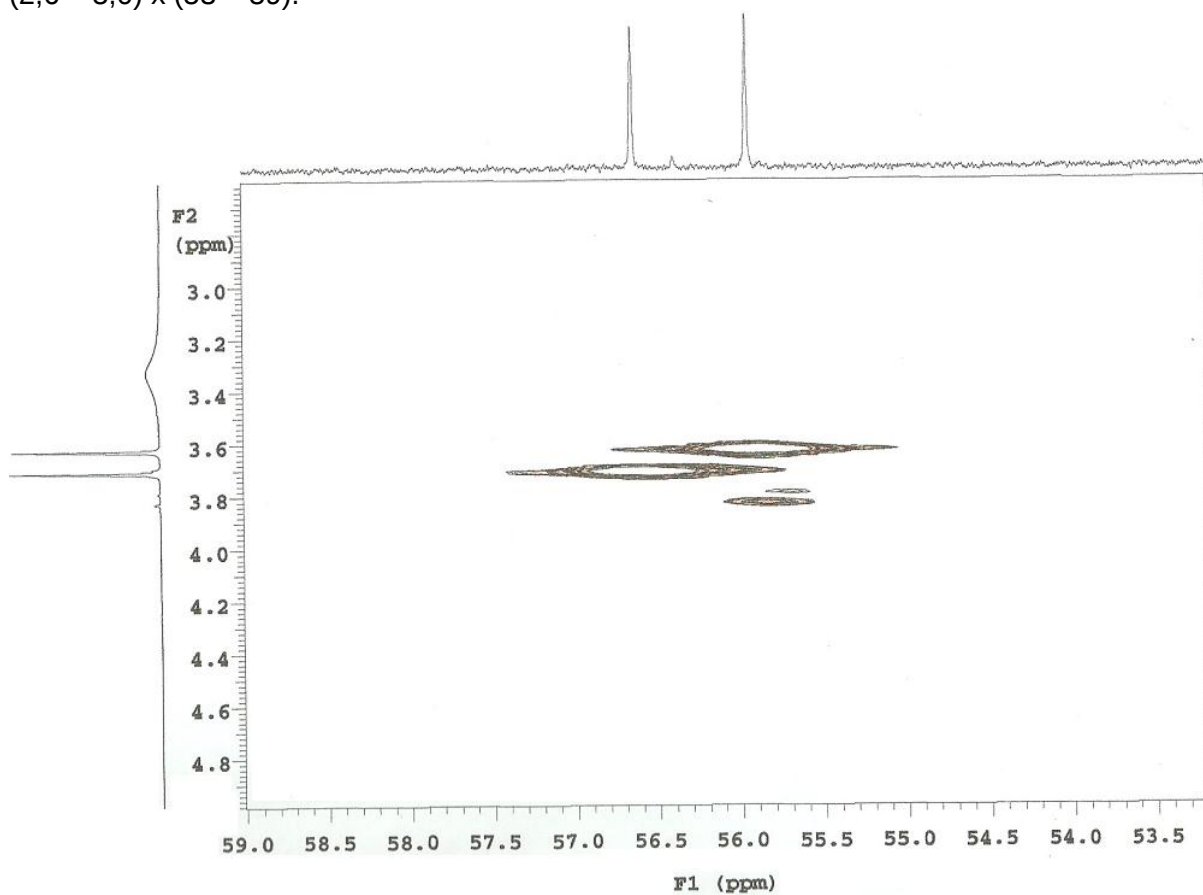


Figura 68 – Espectro HMBC (DMSO, 500 e 125 MHz) de *De-6*.

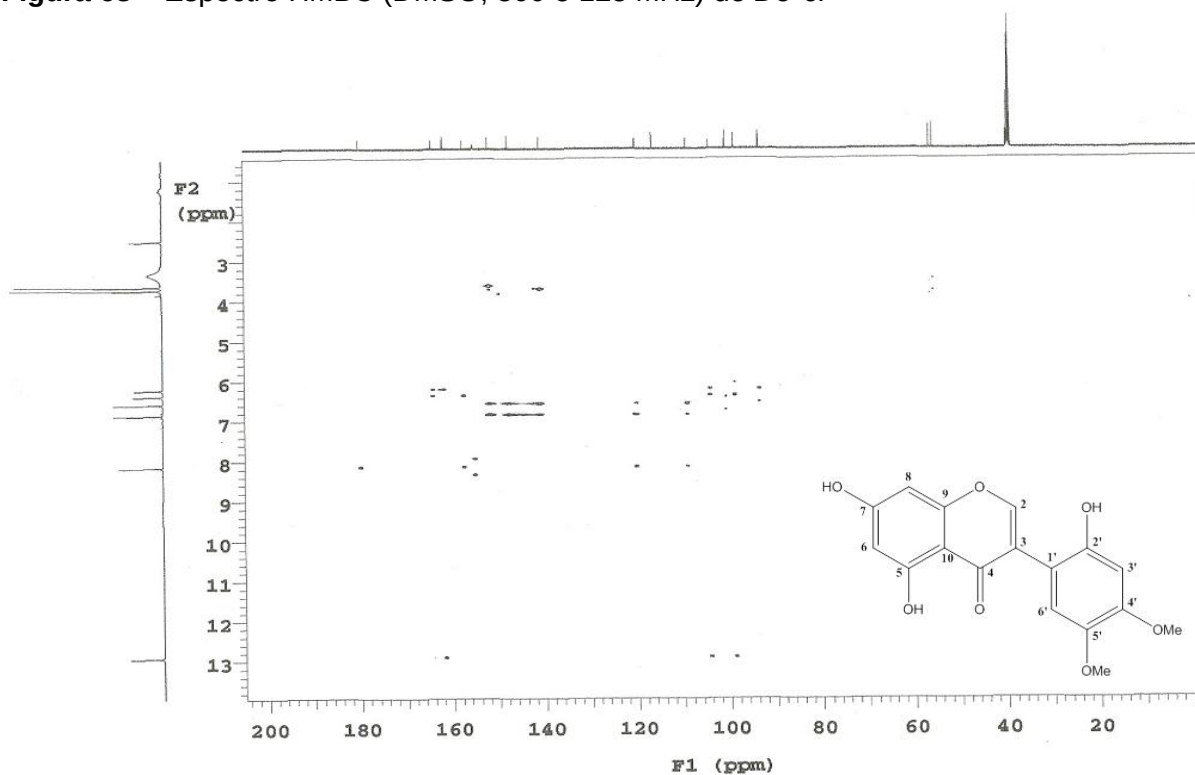


Figura 69 – Expansão do espectro HMBC (DMSO, 500 e 125 MHz) de *De-6* na região de (5,8 – 8,8) x (138 – 185).

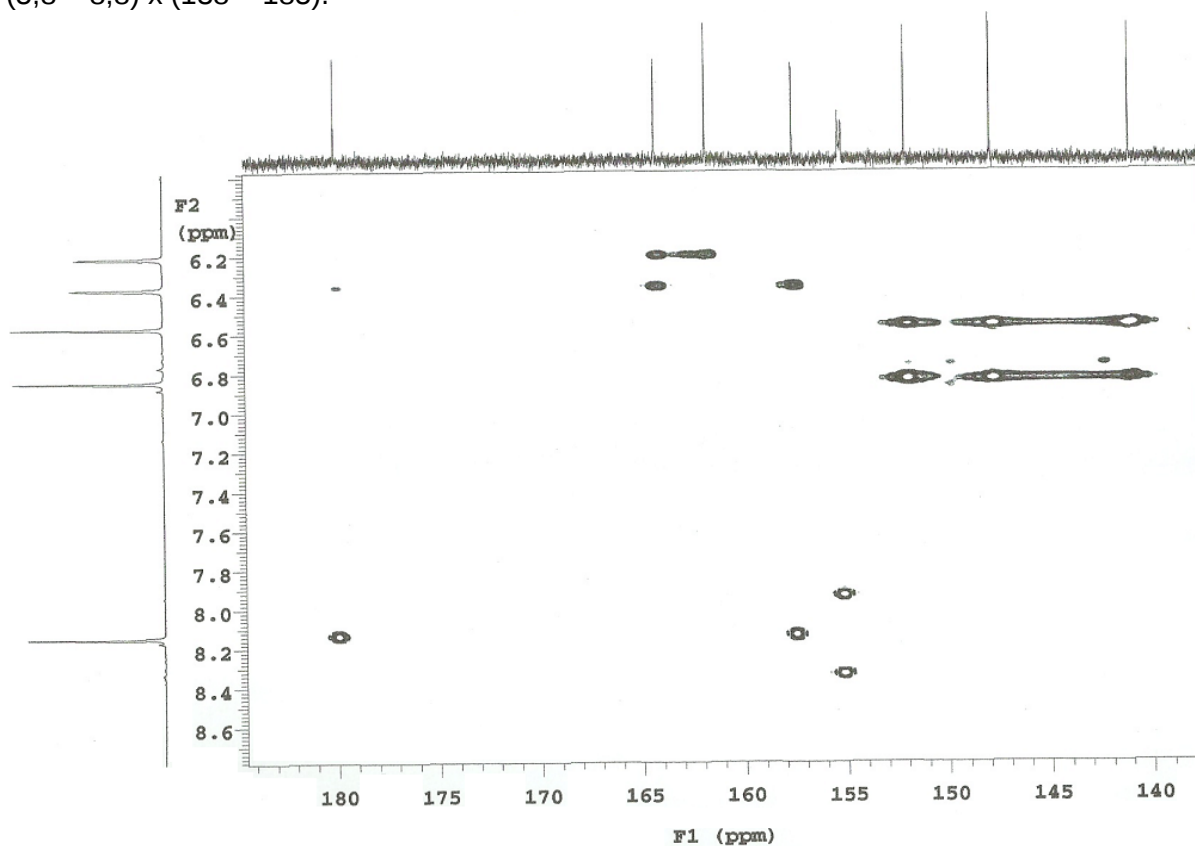


Figura 70 – Expansão do espectro HMBC (DMSO, 500 e 125 MHz) de *De-6* na região de (5,8 – 8,6) x (90 – 125).

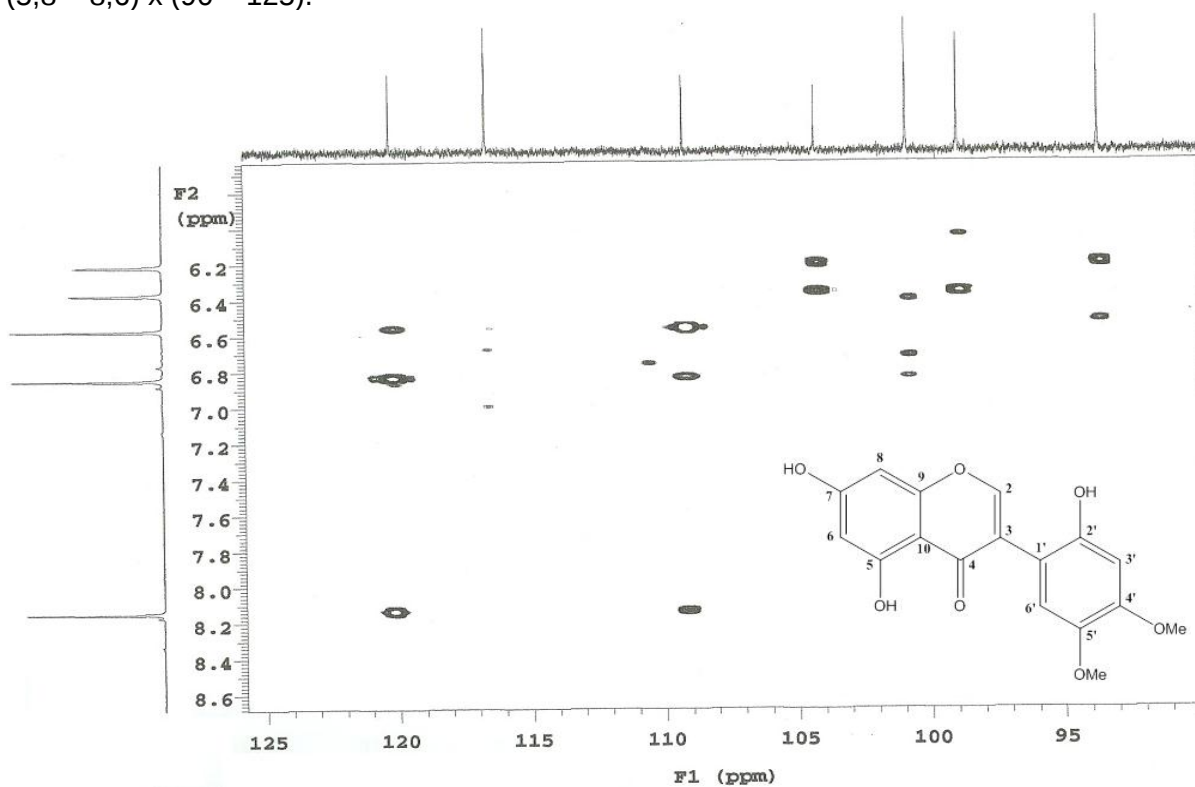


Figura 71 – Expansão do espectro HMBC (DMSO, 500 e 125 MHz) de *De-6* na região de (3,3 – 4,1) x (141 – 154).

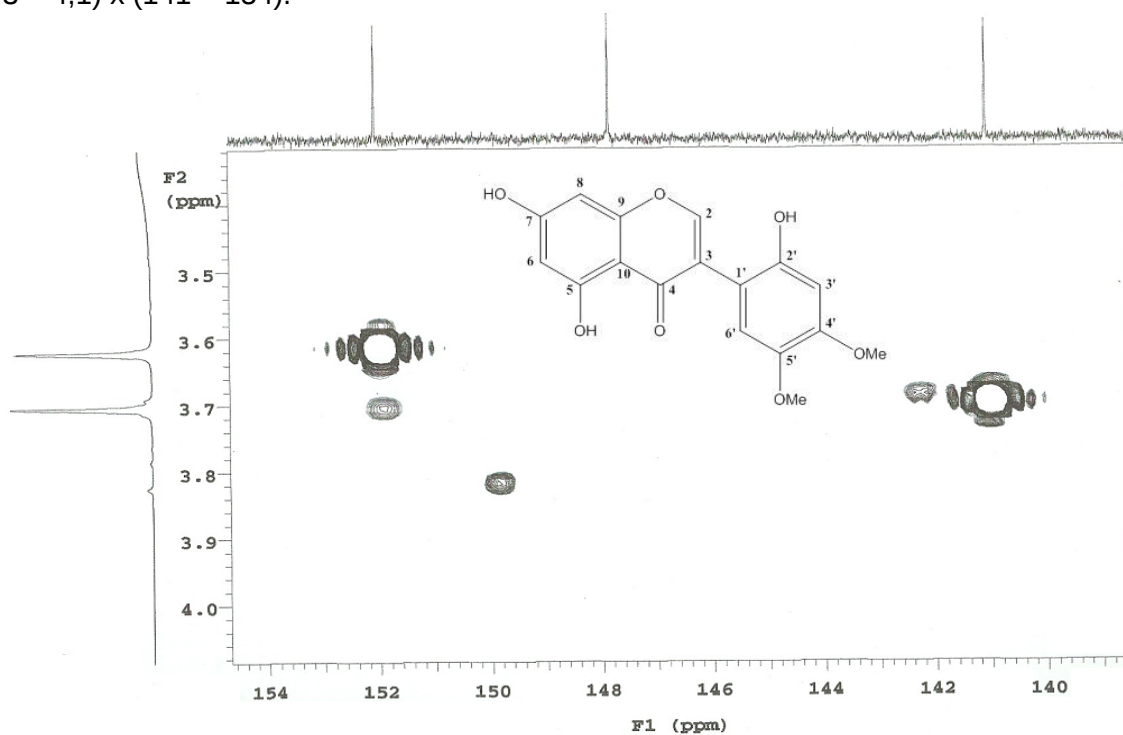
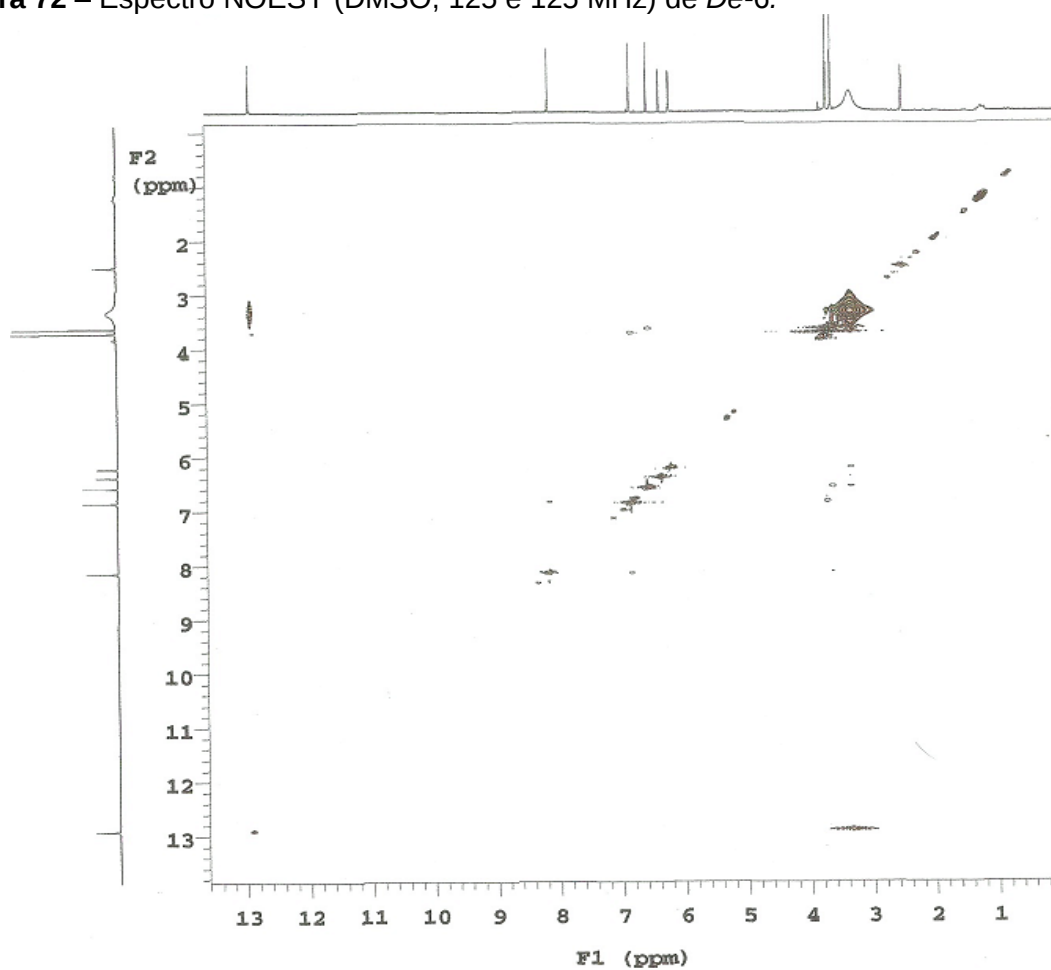


Figura 72 – Espectro NOESY (DMSO, 125 e 125 MHz) de *De-6*.



Conclusões



CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. corroborou com os trabalhos desenvolvidos por Donnelly e colaboradores (1973) e Matos e colaboradores (1975) pois evidencia a espécie como bioprodutora de isoflavonoides.

A espécie apresentou em sua constituição química dois isoflavonoides, o biochanina A, que está sendo relatada pela primeira vez na espécie e o 2'-hidroxi-5'-metoxibiochanina A, que está sendo relatado pela primeira vez no gênero. Também foram isolados triterpenos da série friedelano, a friedelina, e uma misturas de três triterpenos das séries lupano (lupeol) e oleanano (β -amirina e germanicol), contribuindo assim para o enriquecimento quimiotaxônomico deste gênero.

Além dessas, foram isolados misturas de esteroides, β -sitosterol e estigasterol, glicosilados e não glicosilados.

Este estudo além de fornecer importantes conhecimentos básicos sobre a espécie propõe novos estudos, como os de atividade biológica. Sendo assim, pretende-se dar continuidade ao estudo químico, utilizando a fase acetato de etila, bem como, realizar estudos de atividade farmacológica.

Referências



REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989.
- AHMED, W.; AHMAD, Z.; MALIK, A. Stigmasteryl galactoside from *Rhynchosia minima*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 4038-4039, 1992.
- AI-LI, J.; CHANG-HAI, W. Antioxidant properties of natural components from *Salvia plebeia* on oxidative stability of ascidian oil Process. **Biochemistry**, v. 41, p. 1111–1116, 2006.
- AIYAR, V.N.; DAYAL, R.; SESHADRI, T.R. Triterpenoids from the stem-bark of *Dalbergia sericea*. **Current Science**, v. 43, n. 3, p. 75-76, 1974.
- ALBUQUERQUE, I.L.; ALVES, L.A.; LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; BRAZ FILHO, R. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 828-831, 2007
- ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; GUZMÁN, J.P.; PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência Rural**, v. 35, p. 909-915, 2005.
- ALMEIDA, A.B.A.; MELO, P.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; CARLI, L.; NUNES, C.S.; HAUN, M.; SOUZA-BRITO, A.R.M. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity os semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. **European Journal of Pharmacology**, v. 472, n. 3, p. 205-212, 2003.
- ALMEIDA, J.G.L.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. NMR spectral assignments of a new [C–O–C] isoflavone dimer from *Andira surinamensis*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, p. 103–106, 2008.
- ALMEIDA, M.P. **Avaliação da diversidade genética de acessos ex situ de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) por meio de marcadores RAPD como subsídio para sua conservação**. 2001. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, 2001.
- AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CERRI, R.; MELOO, J. F.; Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2927-2930, 1988.
- ANTONISAMY, P.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in

mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 1070–1077, 2011.

BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; COSTA, S.M.O.; SANTOS, H.S. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α - e β -amirina. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 17, n. 2, 2007.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114-117, 2005.

BARREIRO, E.J. Produtos Naturais e Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.

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

BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p. 325-337. 2008

BRANDÃO, M.G.L.; GOMES, C.G.; NASCIMENTO, A.M. Plantas nativas da medicina tradicional brasileira: uso atual e necessidade de proteção. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, p. 24-29, 2006.

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of brasilian medicinal plant research. **J. of Ethnopharmacol**, v. 49, n. 2, p. 53-67, 1993.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **Americam Society of Plant Physiologists**, p. 1250- 1318, 2000.

BURNS, D.; REYNOLDS, W.F.; BUCHANAN, G.; REESE, P.B.; ENRQUEZ, R. G. Assignment of ^1H and ^{13}C spectral and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, p. 488-493, 2000.

CAMARGO, R.A. **A tribo Dalbergieae (Leguminosae - Faboideae) no estado de Santa Catarina, Brasil**. Departamento de Botânica: UFRGS, 2005.

CANO, A.; BUCIO, J.L.; ESPINOZA, M.; CANCINO-RUIZ, A. Sesqui- and Tri-Terpenoids from *Esenbeckia* species (Rutaceae). **Revista de la Sociedad Química de México**, v. 44, n. 2, p. 155-57, 2000.

CAO, Y.H.; WANG, Y.; YUAN, Q. Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis. **Chromatographia**, v. 59, p. 135-140, 2004.

CAPASSO, F.; CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 7, p. 31-36, 2002.

CARVALHO, A.M. **Systematics studies of the genus *Dalbergia* L. f. in Brazil**. 1989. 374 p. Tese. University of Reading, UK, 1989.

CARVALHO, A.M. A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. **Brittonia**, v. 49, n. 1, p. 87-100, 1997.

CHAWLA, H.; CHIBBER, S.S.; SESHADRI, T.R. Volubilin, a new isoflavone-c-glycoside from *Dalbergia volubilis* flowers. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2301-2304, 1974.

CHAWLA, H.M.; MITTAL, R.S. Structure of a new rotenolone from *Dalbergia volubilis* twigs. **Journal of Chemical Research, Synopses**, v. 5, p. 168-169, 1987.

CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

DA SILVA, J.F.M.; SOUZA, M.C.; MATTA, S.R.; ANDRADE, M.R.; VIDAL, F.V.N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, p. 431-435, 2006.

DA SILVA, M.F.; SOUZA, L.A.G.; CARREIRA, L.M.M. **Nomes Populares das Leguminosas do Brasil**. Manus: Editora da Universidade Federal do Amazonas (EDUA), 2004.

DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. 2007. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências do Alimento) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

DEWICK, P.M. Isoflavonoids. In: HARBORNE, J. B. (ed.). **The Flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1994.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. New York: John Wiley & Sons Ltd., 1997.

DONNELLY, D.M.X.; KEENAN, P.J.; PRENDERGAST, J.P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 1157-1161, 1973.

DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, v. 28, n. 5, p. 637, 2003.

FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89-111, 2001.

FRANCIS, J.K. *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taubert. [online] US Forest Service, 2001. Disponível em: <<http://www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/shrubs/Dalbergia>> [Acessado em: 27/10/2011].

FRANCO, S.L.; BRUSCH, M.L.; MOURA, L.P.P.; BUENO, J.H.P. Avaliação Farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9, p. 1-10, 2000.

GONZÁLEZ, A.G.; FRAGA, B.M.; GONZÁLEZ, P.; HERNANDEZ, M.G.; RAVELO, A.G. ¹³C NMR spectra of olean-18-ene derivatives. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 1919-1921, 1981.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Quantitative chemical biology IV: analogies of metabolical mechanism and biological evolution. **Anais de Academia Brasileira de Ciência**, v. 70, p. 719-726, 1998.

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

HAYACIBARA, M.F.; KOO, H.; ROSALEN, P.L.; DUARTE, S.; FRANCO, E.M.; BROWEN, W.H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A. *In vitro* and *vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 110-115, 2005.

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

HELLER, W.; FORKMANN, G. Biosynthesis of flavonoids. In: HARBORNE, J. B. (ed.). **The Flavonoids**. London: Chapman & Hall, 1994.

HEYWOOD, V.H. **Flowering Plants of the World**. Londres: BT Batsford, 1996.

HU, F.; HEPBURN, H.R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S.E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 276-283, 2005.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; KANEMATSU, T.; RUANGRUNGSI, N.; HIGASHIHARA, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. New Cinnamylphenols from *Dalbergia* species with cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v. 66, p.1574-1577, 2003.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant Systematics: a Phylogenetic Approach**. USA: Sinauer Associates, 1999.

JURD, I.; STEVENS, K. Phenolic and quinoidal constituents of *Dalbergia retusa*. **Tetrahedron Letters**, v. 21, p. 2149-2152, 1972.

KASAI, R.; MATSUMOTO, K.; NIE, R.L.; MORITA, T.; AWAZU, A; ZHOU, J.; TANAKA, O. Sweet and bitter cucurbitane glycosides from *Hemsleya carnosiflora*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1371-1376, 1987.

KAVISWAMI, S.; VETRICHELVAN, T.; NAGARANJAN, N.S. Possible mechanism of anti-inflammatory activity of biochanin-a isolated from *Dalbergia sissooides*. **Indian Drugs**, v. 39, n. 3, p. 161-162, 2002.

KHAN, M.S.Y.; JAVED, K. Chemistry and pharmacology of *Dalbergia* species. **Indian Drugs**, v. 34, n. 7, p. 373-382, 1997.

KIRTIKAR, K.R.; BASU, B.D. **Indian medicinal plants**. v. 3, Lalitmohan Basu Parkashan: Allahabad, 1991.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunellavulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharmaceutica**, v. 55, p. 423-430, 2005.

KUROSAWA, K.; OLLIS, W.D.; SUTHERLAND, I.O.; GOTTLIEB, O.R. Isoflavonoid constituents of *Dalbergia* and *Machaerium* species. Part 4. Variabilin, a 6a-hydroxypterocarpan from *Dalbergia variabilis*. **Phytochemistry**, n. 17, v. 8, p. 1417-18, 1978.

LAPA, A. J. et al. **Validation of Medicinal Plants in Latin America: Reasons and Goals**. Comunicação pessoal, 2001.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LAUDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação farmacológica de plantas medicinais**. Porto Alegre: Editora Lagoa LTDA, 2003.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Royal Botanical Gardens: Kew, 2005.

LIMA, M.G. **A produção de própolis no Brasil**. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica, 2006.

MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA JR., V.F., ECHEVARRIA, A., GRYNBERG, N.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1-2, p. 33-39, 2008.

MAHATO, S. B.; KANDU, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517, 1994.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MATOS, F.J.A.; GOTTLIEB, O.R.; ANDRADE, C.H.S. Flavonoids from *D. ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 825-826, 1975.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MATSUDA, A.H.; MACHADO, L.B.; MASTRO, N.L. Thermal analysis applied to irradiated propolis. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 63, p. 353-355, 2002.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 105-111, 2001.

MUANGNOICHAROEN, N.; FRAHM, A.W. Neoflavlanoids of *Dalbergia parviflora*, **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 767-772, 1982.

NADKARNI, K.M. **Indian material medical**. 3 ed. Bombay: Popular book depot, 1954.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais Aspectos Químicos e Biológicos de Terpenos. In: Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**, Editora Univali, 2007.

NKENGFAK, A.E.; SANSON, D.R.; TEMPESTA, M.L. Two new flavonoids from *Erythrina erzotzocha* **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 2, p. 320-324, 1989.

OLIVEIRA, R.B.; GODOY, S.A.P.; COSTA, F.B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review**, Geneva: World Health Organization, 1998.

OZKUL, Y.; SILICI, S.; ERÖGLÜ, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, v. 12, p. 742-747, 2004.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PELTER, A.; WARD, R.S.; GRAY, T.I. The Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectra of Flavonoids and related compounds. **Journal of the Chemical Society**, n. 23, p. 2475-2483, 1976.

PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A.O.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **Il Farmaco**, v. 53, p. 421-424, 1998.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – SP: ESALQ/USP, 2004.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, p. 327, 1997.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA-JUNIOR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E.; BRAZ FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

RAGAB, A.E.; MOSTAFA, S.M.; EL-SHAMY, I.; IBRAHIM, A.R.S. Further phytochemical studies of *Dalbergia sissoo* Roxb growing in Egypt, Mansoura. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 2, p. 176-194, 2006.

RAO, J.R.; RAO, S.R. Dalpaniculin, a C-glycosylisoflavone from *Dalbergia paniculata* seeds. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 715-716, 1991.

RAVEN, P.H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCHA, L.; DOS SANTOS, L.R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A.; ARAÚJO G.L.; TEIXEIRA, L.A.; SHARAPIN, N. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 71-74, 2003.

ROUT, G.R.; BHATACHARYA, D.; NANDA, R.M.; NAYAK, S.; DAS, P. Evaluation of genetic relationships in *Dalbergia* species using RAPD markres. **Biodiversity and Conservation**, v. 12, n. 2, p. 197-206, 2003.

SCHULTZ, A.R.H. **Introdução à Botânica Sistemática**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1984.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C.C.; ARAÚJO, D.B.; ARAÚJO, R.P.C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 84-89, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.O.; IRGANG, B.E.; STEHMAN, J.R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da UFRS, 1986, p.176.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.M.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2 ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.M.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TOMAZ, A.C.A.; NOGUEIRA, R.B.S.S.; PINTO, D.S.; AGRA, M.F.; SOUZA, M. F.V.; DA-CUNHA, E.V.L. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 47-52, 2008.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **e CAM**, v. 3, p. 249-254, 2006.

VARELA, E.S.; LIMA, J.P.M.S.; GALDINO, A.S.; PINTO, L.S.; BEZERRA, W.M.; NUNES, E.P.; ALVES, M.A.O.; GRANGEIRO, T.B. Relationships in subtribe Dicleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. **Phytochemistry**, v. 65, p. 59-69, 2004.

VARGAS, A.C.; LOGUERCI, A.P.; WITT, N.M.; DA COSTA, M.M.; SÁ E SILVA, M.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159-163, 2004.

VEITCH, N.C.; GRAYER, R.E.J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 3, p. 555-611, 2008.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 51, p. 239-254, 1996.

WANG, F.; ZHANG, D.; MA, F.; GAI, Q. Extraction process of biochanin A from *Dalbergia odorifera* T. Chen leaves. **Zhiwu Yanjiu**, v. 31, n. 3, p. 367-370, 2011.

WATANABE, E.; CHIKAMATSU, Y.; MIYASAKA, K. Topical formulations containing propolis extracts containing isoflavones. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, p. 13, 2008.

WENG, X.C.; WANG, W. Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeian*. **Food Chemistry**, v. 71, p. 489-493, 2000.

YAHARA, S.; OGATA, T.; SAIJO, R.; KONISHI, R.; YAMAHARA, J.; MIYAHARA, K.; NOHARA, T. Isoflavan and related compounds from *Dalbergia odorifera*. **Ind Chem Pharm Bull**, v. 37, n. 4, p. 979-987, 1989.

ZHANG, P. ; WU, Y. ; YU, D. Chemical constituents from the leaves of *Dalbergia hainanensis*. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, n. 28, v. 6, p. 527-530, 2003.