

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

RAFAELA DOS SANTOS SOARES MACIEL

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

João Pessoa – PB

2016

RAFAELA DOS SANTOS SOARES MACIEL

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

Tese 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 Doutor 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

2016

M152c Maciel, Rafaela dos Santos Soares.
Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub (Fabaceae) / Rafaela dos Santos Soares Maciel.- João Pessoa, 2016.
143f. : il.
Orientador: Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha
Coorientadora: Maria de Fátima Vanderlei de Souza
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Farmacoquímica. 3. Fabaceae.
4. *Dalbergia ecastophyllum*. 5. Atividade antioxidante.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

RAFAELA DOS SANTOS SOARES MACIEL

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha

Universidade Federal da Paraíba
(Orientador)

Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

Universidade Federal da Paraíba
(Coorientadora)

Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Universidade Federal da Paraíba
(Examinador interno)

Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

Universidade Federal da Paraíba
(Examinadora interna)

Profa. Dra. Temilce Simões de Assis

Universidade Federal da Paraíba
(Examinadora externa)

Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa

Universidade Federal da Paraíba
(Examinador externo)

DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus tios Maria do Carmo e José de Almeida,
por todo suporte dado sempre que precisei
longe da minha casa.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, 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 esposo, Jorge Augusto F. Maciel, por nunca interferir na minha vida acadêmica, por sempre me apoiar em tudo e por entender a minha ausência nos momentos de estudo.

Aos meus irmãos, sogros e cunhadas, pelo companheirismo, confiança e por me ajudarem sempre que preciso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emídio V. L. da Cunha, pela confiança, 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.

Aos meus familiares e amigos por tudo que passamos juntos e por sempre acreditarem em mim.

A todos os amigos que fiz durante a pós-graduação, em especial, Sara Alves, Caroline Duarte, Camila Figueiredo, Vivianne Marcelino, Ana Silvia Suassuna, Jéssica Celestino, Jacqueline Alves, Madalena Teles, Élide Vieira, Clarice Noleto, Otemberg Chaves, Jéssica Karina, Milen Maria, Maria Sallett, Tainá, Fábio Tenório, Adriana Fernandes, Abrahão Alves e Marianne Guedes (*in memoriam*), pela amizade, companheirismo, ensinamentos, ajuda e dedicação.

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, Nonato, Evandro, Alexsandro e Sócrates pela amizade, disponibilidade e ensinamentos.

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

A UFPB pelo suporte técnico e estrutural; ao CNPq 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

MACIEL, R. S. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae)**. 2016. 142 p. Tese (Doutorado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

Dalbergia ecastophyllum (L.) Taub., popularmente conhecida como rabo-de-bugio ou marmelo-do-mangue, é uma espécie da família Fabaceae, de significativa importância comercial, visto que a própolis vermelha tem origem do exsudato resinoso presente no caule desta espécie. Este trabalho objetivou contribuir o estudo fitoquímico do gênero *Dalbergia* (Fabaceae) através do estudo fitoquímico da espécie *D. ecastophyllum*. Para tanto, o material vegetal (partes aéreas e raízes) 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 material vegetal, após secagem e pulverização, foi submetido a processos de extração, partição e cromatografia para isolamento dos constituintes químicos. As estruturas químicas dos mesmos foram determinadas por métodos espectroscópicos e comparações com modelos da literatura. Das frações das partes aéreas foram isoladas as substâncias 13²-hidroxi-17³-etoxifeoforbídeo A, feoftina A, fitol e isoquercitrina. Já das frações das raízes foram isolados o cedrol, acetato de ácido morolique, daidzeína, formononetina, β -sitosterol e estigmasterol; e 4-geranil-3,5-dihidroxi-4'-metoxi-*trans*-stilbeno. Sendo este último isolado pela primeira vez na literatura. A fração acetato de etila das partes aéreas apresentam uma excelente atividade antioxidante frente ao DPPH ($CE_{50} = 0,85 \pm 0,236 \mu\text{g/ml}$).

Palavras-chave: Fabaceae, *Dalbergia ecastophyllum*, atividade antioxidante.

ABSTRACT

MACIEL, R. S. S. **Contribution to the phytochemical study of *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae)**. 2016. 142 p. Thesis (PhD in Phytochemistry of Natural and Synthetic Bioactive Products) – Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2016.

Dalbergia ecastophyllum (L.) Taub., popularly known as “rabo-de-bugio” or “marmelo-do-mangue”, is a species of the Fabaceae family, with expressive commercial value, since propolis comes from resinous exudates present in the stem of this species. This study aimed to contribute the phytochemistry study of *Dalbergia* (Fabaceae) genus through the phytochemical study of *D. ecastophyllum* species. The plant material (leaves and roots) was collected in Rio Tinto - Paraíba and deposited in the Herbarium of the Department of Systematics and Ecology – UFPB with the 45738 code (JPB). For phytochemical study, the plant material after drying and pulverization, was subjected to extraction processes, partition and chromatography to isolate the chemical constituents. The chemical structures thereof were determined by spectroscopic methods and comparisons with literature data. The fractions of the leaves allowed isolation of 13²-17³-hydroxy-ethoxypheophorbide A, pheophytin A, phytol and isoquercitrin substances. Since fractions of the roots were isolated the cedrol, acetate morolic acid, daidzein, formononetin, β -sitosterol and stigmasterol; and 4-geranyl-3,5-dihydroxy-4'-methoxy-*trans*-stilbene. The latter substance was isolated for the first time in the literature. The ethyl acetate fraction of the leaves has excellent antioxidant activity against DPPH ($IC_{50} = 0.85 \pm 0.236$ g/ml).

Keywords: Fabaceae, *Dalbergia ecastophyllum*, antioxidant activity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

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
CH₂Cl₂	Diclorometano
¹³C	Carbono 13
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-DAD	Cromatografia líquida acoplada ao arranjo de diodo
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas
CL-RMN	Cromatografia líquida acoplada à ressonância magnética nuclear
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetil sulfóxido deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EEB	Extrato Etanólico Bruto
Ep	Éter de petróleo
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH	Etanol
¹H	Hidrogênio
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
UNICAL	Unidade de Caracterização e Análise
<i>m</i>	Multiplete
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
m/v	Massa/volume

Mo Modelo

Rf Fator de retenção

RMN Ressonância Magnética Nuclear

s Singleto

s/ Singleto largo

t Tripleto

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1 - Etapas envolvidas na obtenção e particionamento do EEB	41
Esquema 2 - Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase hexânica do EEB das partes aéreas de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	44
Esquema 3 - Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase acetato de etila do EEB das partes aéreas de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	45
Esquema 4 - Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase hexânica do EEB das raízes de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	47
Esquema 5 - Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase diclorometano do EEB das raízes de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	48

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Distribuição geográfica da família Fabaceae no mundo, representado em verde no mapa	26
Figura 2 - Espécies do gênero <i>Dalbergia</i> (a - <i>D. frutescens</i> , b - <i>D. cearenses</i> , c – <i>D. lanceolaria</i> e d - <i>D. ecastophyllum</i>)	28
Figura 3 - Abelhas coletando a resina vermelha da <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	32
Figura 4 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-1</i>	59
Figura 5 - Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-1</i> (δ 5,6 – 9,8)	59
Figura 6 - Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-1</i> (δ 1,1 – 4,9)	60
Figura 7 - Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-1</i>	60
Figura 8 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-1</i> (δ 122-152)	61
Figura 9 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-1</i> (δ 10 - 62)	61
Figura 10 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-2</i>	65
Figura 11 - Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-2</i> (δ 6,36 – 6,6) e (δ 7,96 – 8,03)	65
Figura 12 - Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-2</i> (δ 3,2 – 5,2)	66
Figura 13 - Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-2</i> (δ 0,72 – 0,85)	66
Figura 14 - Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-2</i> (δ 1,5 – 2,45)	67
Figura 15 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-3</i>	70
Figura 16 - Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-3</i> (δ 5,36 – 5,44) e (δ 4,11 – 4,15)	70
Figura 17 - Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-3</i> (δ 0,8 – 1,7)	71
Figura 18 - Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>De-3</i>	71
Figura 19 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>De-3</i> (δ 31– 41)	72

Figura 20 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>De-3</i> (δ 16– 28)	72
Figura 21 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-4</i>	76
Figura 22 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-4</i> (δ 0,7 – 2,8) e (δ 3,6 – 5,4)	76
Figura 23 -	Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-4</i>	77
Figura 24 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-4</i> (δ 13 – 44)	77
Figura 25 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-5</i>	80
Figura 26 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-5</i> (δ 0,7 – 2,0)	80
Figura 27 -	Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>De-5</i>	81
Figura 28 -	Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>De-5</i> na região de (0,0 – 2,1) x (12 – 44)	81
Figura 29 -	Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>De-5</i> na região de (0,5 – 1,9) x (20 – 80)	82
Figura 30 -	Espectro de RMN ^1H (DMSO, 200 MHz) de <i>De-6</i>	87
Figura 31 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (DMSO, 200 MHz) de <i>De-6</i> (δ 6,7 – 8,5)	87
Figura 32 -	Espectro de RMN ^{13}C – APT (DMSO, 50 MHz) de <i>De-6</i>	88
Figura 33 -	Espectro de RMN ^1H (DMSO, 200 MHz) de <i>De-7</i>	91
Figura 34 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (DMSO, 200 MHz) de <i>De-7</i> (δ 7,2 – 8,5)	91
Figura 35 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (DMSO, 200 MHz) de <i>De-7</i> (δ 6,45 – 7,15)	92
Figura 36 -	Espectro de RMN ^{13}C – APT (DMSO, 50 MHz) de <i>De-7</i>	92
Figura 37 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (DMSO, 50 MHz) de <i>De-7</i> (δ 153-80)	93
Figura 38 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (DMSO, 50 MHz) de <i>De-7</i> (δ 102-133)	93
Figura 39 -	Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de <i>De-8</i>	98
Figura 40 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de <i>De-8</i> (δ 7,56 – 7,9)	98
Figura 41 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de <i>De-8</i> (δ 6,15 – 6,95)	99

Figura 42 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de <i>De-8</i> (δ 3,2 – 5,2)	99
Figura 43 -	Espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de <i>De-8</i>	100
Figura 44 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de <i>De-8</i> (δ 90 – 185)	100
Figura 45 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de <i>De-8</i> (δ 60 – 79)	101
Figura 46 -	Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de <i>De-8</i> na região de (7,45 – 8,1) x (110 – 165) ..	101
Figura 47 -	Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de <i>De-8</i> na região de (6,15 – 7,0) x (90 – 180)	102
Figura 48 -	Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de <i>De-8</i> na região de (4,95 – 5,5) x (130 – 141) ..	102
Figura 49 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-9</i>	106
Figura 50 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>De-9</i> (δ 0,4 – 2,7) e (δ 3,0 – 5,5)	106
Figura 51 -	Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-9</i>	107
Figura 52 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-9</i> (δ 28 – 58)	107
Figura 53 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>De-9</i> (δ 11 – 28)	108
Figura 54 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-10</i>	112
Figura 55 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-10</i> (δ 6,2 – 7,6)	112
Figura 56 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-10</i> (δ 3,0 – 5,5)	113
Figura 57 -	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>De-10</i> (δ 0,8 – 2,3)	113
Figura 58 -	Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>De-10</i>	114
Figura 59 -	Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>De-10</i> (δ 102 – 144)	114
Figura 60 -	Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>De-10</i>	115
Figura 61 -	Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>De-10</i> nas regiões de (6,0–7,9) x (100–140) ...	115
Figura 62 -	Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (CDCl_3 , 500	

	e 125 MHz) de <i>De</i> -10 nas regiões de (0,4 – 3,0) x (10 – 60) ...	116
Figura 63 -	Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>De</i> -10	116
Figura 64 -	Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>De</i> -10 nas regiões de (6,1–7,7) x (100 – 165) .	117
Figura 65 -	Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>De</i> -10 nas regiões de (0,0 – 4,2) x (10 – 180)..	117

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1 - Teor de fenólicos totais das frações CH ₂ Cl ₂ e AcOEt das partes aéreas e raízes de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	118
Gráfico 2 - Teor de flavonoides totais das frações CH ₂ Cl ₂ e AcOEt das partes aéreas e raízes de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	120
Gráfico 3 - CE ₅₀ frente a redução de DPPH das frações CH ₂ Cl ₂ e AcOEt das partes aéreas e raízes de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	121

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1 - Estrutura química de compostos isolados no gênero <i>Dalbergia</i>	31
Quadro 2 - Estrutura química de compostos isolados da resina de <i>D. ecastophyllum</i>	33
Quadro 3 - Estrutura química de compostos isolados das partes aéreas de <i>D. ecastophyllum</i>	34
Quadro 4 - Massa do material botânico seco, massas e rendimentos do EEB e das fases hexânica, diclorometano e acetato de etila das partes aéreas e raízes de <i>D. ecastophyllum</i>	41
Quadro 5 - Condições cromatográficas da CLAE para isolamento de De8	45
Quadro 6 - Substâncias isoladas das partes áreas de <i>D. ecastophyllum</i> ..	53
Quadro 7 - Substâncias isoladas das raízes de <i>D. ecastophyllum</i>	54
Quadro 8 - Coeficiente de correlação (R^2) entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante e o teor de flavonoides totais e a atividade antioxidante	123

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Substâncias isoladas em espécies do gênero <i>Dalbergia</i>	30
Tabela 2 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-1</i> em CDCl_3 (200 e 50 MHz, respectivamente) e do 17 ^{3} -etoxifeoforbídeo A em CDCl_3 , segundo Silva et al. (2010)	58
Tabela 3 - Dados de RMN ^1H de <i>De-2</i> em CDCl_3 (500 MHz) e do núcleo porfirínico da feofitina A em CDCl_3 , segundo Nogueira, T. B. S. S (2009)	64
Tabela 4 - Dados de RMN ^1H de <i>De-2</i> em CDCl_3 (500 MHz) e do grupo fitil da feoftina A em CDCl_3 , segundo Schwikkard et al. (1998)	64
Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-3</i> em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e do fitol em CDCl_3 , segundo Melos et al. (2007)	69
Tabela 6 - Dados de RMN ^{13}C de <i>De-4</i> em CDCl_3 (50 MHz) e de RMN ^{13}C do 3-acetoxi-olean-18-en-28-oico em CDCl_3 , segundo González et al. (1981)	75
Tabela 7 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-5</i> em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais e do cedrol em CDCl_3 , segundo Cheng et al. (2012)	79
Tabela 8 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-6</i> em DMSO (200 e 50 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C do formononetina em DMSO, segundo Zielinska et al. (2008)	86
Tabela 9 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-7</i> em DMSO (200 e 50 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C do daidzeina em DMSO, segundo Tanaka et al. (2014)	90
Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-8</i> em CD_3OD (200 e 50 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C de isoquercitrina em CD_3OD , segundo Costa et al. (2007)	97
Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-9</i> em CDCl_3 (200 e 50 MHz, respectivamente) β -sitosterol (Mo1) e estigmasterol (Mo2) em CDCl_3 , segundo Tomaz et al. (2008)	105
Tabela 12 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>De-10</i> em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais e RMN ^1H e ^{13}C de 4-geranil-3,5,4'-trihidroxi- <i>trans</i> -stilbeno em CD_3CN , segundo Chistensen et al. (1988)	111

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
3.1 Considerações gerais sobre a Família Fabaceae	26
3.2 Considerações sobre o Gênero <i>Dalbergia</i>	27
3.3 Considerações sobre <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (L.) Taub.	32
3.3.1 Substâncias isoladas das partes aéreas de <i>D. ecastophyllum</i>	34
3.4 Flavonoides com atividade biológica	35
3.5 Terpenoides com atividade biológica	35
3.6 O emprego de técnicas hifenadas no estudo de produtos naturais ...	36
3.7 Radicais livres e Antioxidantes	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Coleta e identificação do material botânico	40

4.2 Processamento do material botânico	40
4.3 Processos de extração e particionamento	40
4.4 Isolamento e purificação dos constituintes químicos	42
4.5 Processamento cromatográfico da fase hexânica do EEB das partes aéreas	43
4.6 Processamento cromatográfico da fase acetato de etila do EEB das partes aéreas	44
4.7 Processamento cromatográfico da fase hexânica das raízes	46
4.8 Processamento cromatográfico da fase diclorometano do EEB das raízes	47
4.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodo (CL-DAD)	48
4.10 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados	48
4.11 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	49
4.12 Determinação de atividade antioxidante	49
4.12.1 Teor de fenólicos totais	49
4.12.2 Teor de flavonoides totais	50
4.12.3 Determinação do DPPH	50
4.12.4 Análises estatísticas	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Substâncias isoladas das partes aéreas de <i>D. ecastophyllum</i>	53
5.2 Substâncias isoladas das raízes de <i>D. ecastophyllum</i>	54
5.3 Identificação estrutural das substâncias com esqueletos porfirínicos	55
5.3.1 Identificação estrutural de <i>De-1</i>	55
5.3.2 Identificação estrutural de <i>De-2</i>	62
5.4 Identificação estrutural de substâncias com esqueletos terpênicos	68
5.4.1 Identificação estrutural do <i>De-3</i>	68

5.4.2 Identificação estrutural de <i>De-4</i>	73
5.4.3 Identificação estrutural do <i>De-5</i>	78
5.5 Identificação estrutural de esqueleto flavonoidíco	83
5.5.1 Identificação estrutural de <i>De-6</i>	83
5.5.2 Identificação estrutural de <i>De-7</i>	89
5.5.3 Identificação estrutural de <i>De-8</i>	94
5.6 Identificação estrutural de substâncias com esqueleto esteroideal	103
5.6.1 Identificação estrutural de <i>De-9</i>	103
5.7 Determinação estrutural de substância com esqueleto stilbeno	109
5.7.1 Determinação estrutural de <i>De-10</i>	109
5.8 Atividade antioxidante	118
5.8.1 Teor de fenólicos totais	118
5.8.2 Teor de flavonoides totais	119
5.8.3 Atividade antioxidante pelo método de DPPH	120
5.8.4 Correlação entre teor de fenólicos totais e flavonoides totais com a atividade antioxidante (DPPH)	122
6.0 CONCLUSÃO	125
REFERÊNCIAS	127

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O Brasil é detentor da maior biodiversidade do planeta, possuindo um patrimônio genético potencialmente capaz de render-lhe benefícios econômicos imensuráveis, atingindo cerca de 25% de todas as espécies vegetais conhecidas (JOLY et al., 2011).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada No 26/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, fitoterápicos são medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou partes de plantas medicinais (raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes), que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos.

Com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia as plantas medicinais estão tendo seu valor terapêutico pesquisado e ratificado pela ciência e vem crescendo sua utilização recomendada por profissionais de saúde (LOPÉZ, 2006).

O uso de plantas medicinais, popularmente conhecidas, é bastante comercializada através de propagandas que prometem benefícios seguros, por se tratar de uma fonte natural. Muitas vezes, entretanto, as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validade científica, por não terem sido investigadas, ou por não terem suas ações farmacológicas comprovadas em testes científicos não clínicos ou clínicos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Um exemplo do uso de produto natural é a própolis, que contém substâncias resinosas coletadas pelas abelhas em várias plantas, sendo usada na medicina popular desde 300 anos antes de Cristo (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 bastante estudada é a própolis vermelha, produzida pelas abelhas a partir da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (DAUGSCH, 2007; SIMÕES; ARAÚJO; ARAÚJO, 2008; LOPEZ et al., 2015; OMAR, et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015).

Diante dos progressos alcançados pelos métodos analíticos, os conhecimentos sobre as plantas medicinais foram consideravelmente aumentados, com um elevado número de novos constituintes isolados e vários estudos farmacológicos comprovando a ação de várias substâncias, bem como trabalhos referentes aos mecanismos que envolvem a bioformação desses constituintes no vegetal, com resultados comunicados em reuniões científicas e revistas especializadas, fomentando-se portanto a nível internacional (DA CUNHA, 2003).

Diante destas justificativas, evidenciamos a importância do estudo das plantas medicinais para a obtenção de novas moléculas bioativas, obtendo-se, portanto, protótipos para a síntese de novas moléculas ou para adaptar as moléculas já existentes, tornando-as mais potentes ou ativas. Assim, damos continuidade ao estudo da *D. ecastophyllum* desenvolvido no mestrado, com o intuito de isolar metabólitos secundários de outras partes da espécie em questão, visto que muitos estudos são realizados com a própolis vermelha e raros com a espécie vegetal que a produz.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir com o estudo fitoquímico do gênero *Dalbergia* (Fabaceae) por meio da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair, isolar e purificar os metabólitos secundários de *D. ecastophyllum*, utilizando métodos cromatográficos;
- Caracterizar estruturalmente os constituintes químicos de *D. ecastophyllum*, através de métodos espectroscópicos;
- Determinar atividade antioxidante das frações (acetato de etila e diclorometano).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

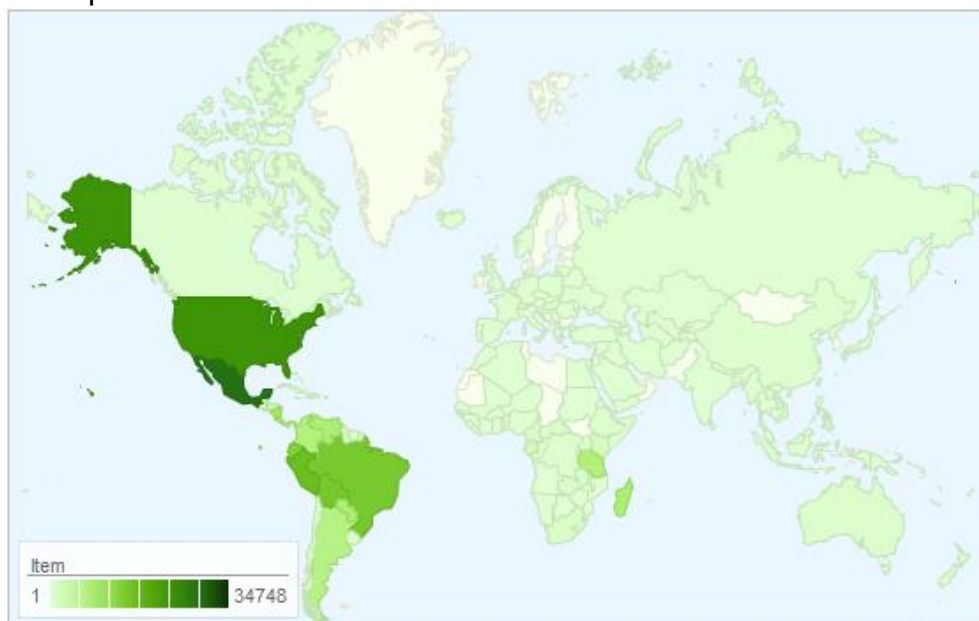
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a Família Fabaceae

A família Fabaceae pertence à divisão Angiospermae, que compreende as plantas superiores que contém sementes encerradas no ovário podendo, portanto, formar frutos (JOLY, 2002).

Segundo Varela et al., (2004) a família é distribuída mundialmente (Figura 1) sendo composta por mais de 700 gêneros e cerca de 20.000 espécies de árvores, arbustos, trepadeiras e ervas.

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



Fonte: Adaptado de <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=42000184&tab=maps>.
Acessado em: 29 de junho de 2015

Três subgrupos são geralmente reconhecidos como pertencentes à família Fabaceae: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (Papilionoideae). Em muitas classificações, estas são consideradas como subfamílias, mas elas são algumas vezes tratadas como famílias separadas. Dentre estes três subgrupos, 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).

Fabaceae encontra-se entre um dos grupos botânicos mais estudados tanto do ponto de vista químico como farmacológico. Os gêneros que se apresentam como plantas herbáceas, considerados sob o ponto de vista quimiotaxonômico, são mais difundidas nas regiões temperadas, enquanto que as plantas lenhosas são mais representativas nas regiões tropicais e subtropicais. De modo geral, caracterizam-se como ervas anuais ou perenes, eretas, prostradas, difusas ou escandentes, subarbustos, arbustos eretos e árvores de pequeno, médio e grande porte, com sistema radicular bem desenvolvido e predominância da raiz principal sobre suas ramificações (SCHULTZ, 1984).

As espécies comerciais mais importantes, da família Fabaceae, incluem *Glycine max* (soja), *Pisum sativum* (ervilha), *Arachis hypogaea* (amendoim) e *Medicago sativa* (alfafa). As folhas são geralmente compostas pinadas, trifoliada ou palmadas. Quase sempre apresentam flores compostas, alternantes, com estípulas. A fruta é geralmente uma leguminosa, ou vagem, que se abre quando seca, liberando as sementes (HOSCH, 2009)

Espécies da família Fabaceae são reputadas pelo grande número de ocorrências de flavonoides, em especial isoflavonoides, onde muitos deles apresentam atividade antimicrobiana (HARBORNE, 1994), como também pela presença de alcaloides com atividade cardioativa (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 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*

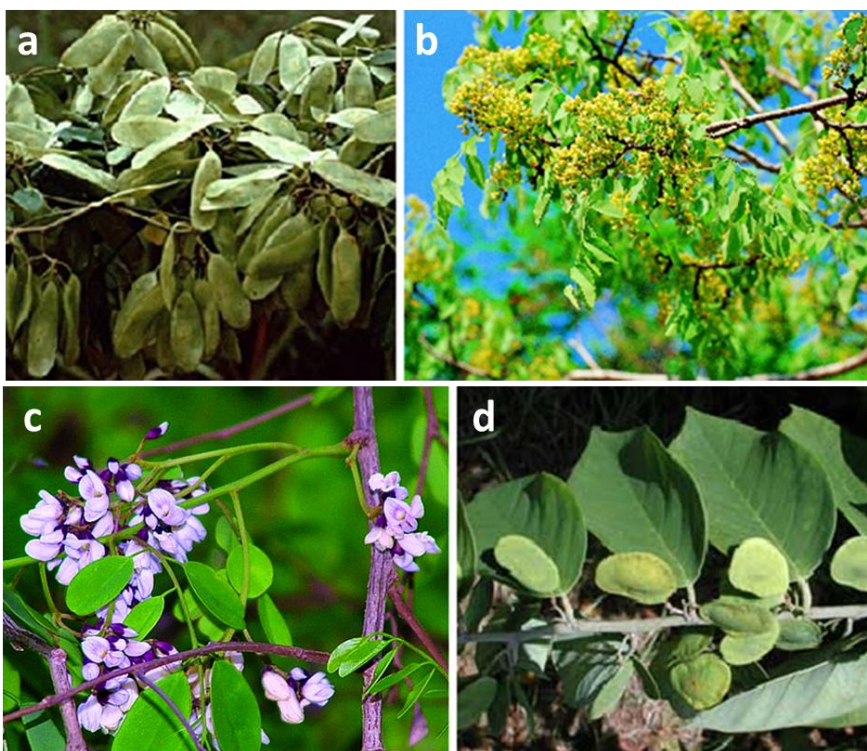
O gênero *Dalbergia* foi proposto pelo filho de Linnaeus em 1781, em memória de Carl Gustav Dahlberg, um soldado no Suriname e coletor para Linnaeus. É considerado o segundo maior gênero da tribo Dalbergieae Bronn ex. D.C. e pertence à família Fabaceae, subgrupo Faboideae (Papilionoideae). Foi descrito 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 2) nos mais variados tipos de vegetação, como: Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Campos Rupestres (CARVALHO, 1997).

São árvores tropicais de madeira de lei, 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).

Figura 2 – Espécies do gênero *Dalbergia* (a - *D. frutescens*, b - *D. cearenses*, c – *D. lanceolaria* e d - *D. ecastophyllum*).



Fonte: Adaptado de <http://www.tropicos.org>. Acessado em: 29 de junho de 2015.

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

Uma série de fitoconstituintes têm sido isolados de várias espécies do gênero *Dalbergia* como os flavonoides, glicosídeos, esteroides, quinonas, terpenoides entre outros. Alguns destes estão expostos na Tabela 1, além da espécie e parte da planta em que foi extraída, e suas respectivas estruturas químicas demonstradas posteriormente no Quadro 1.

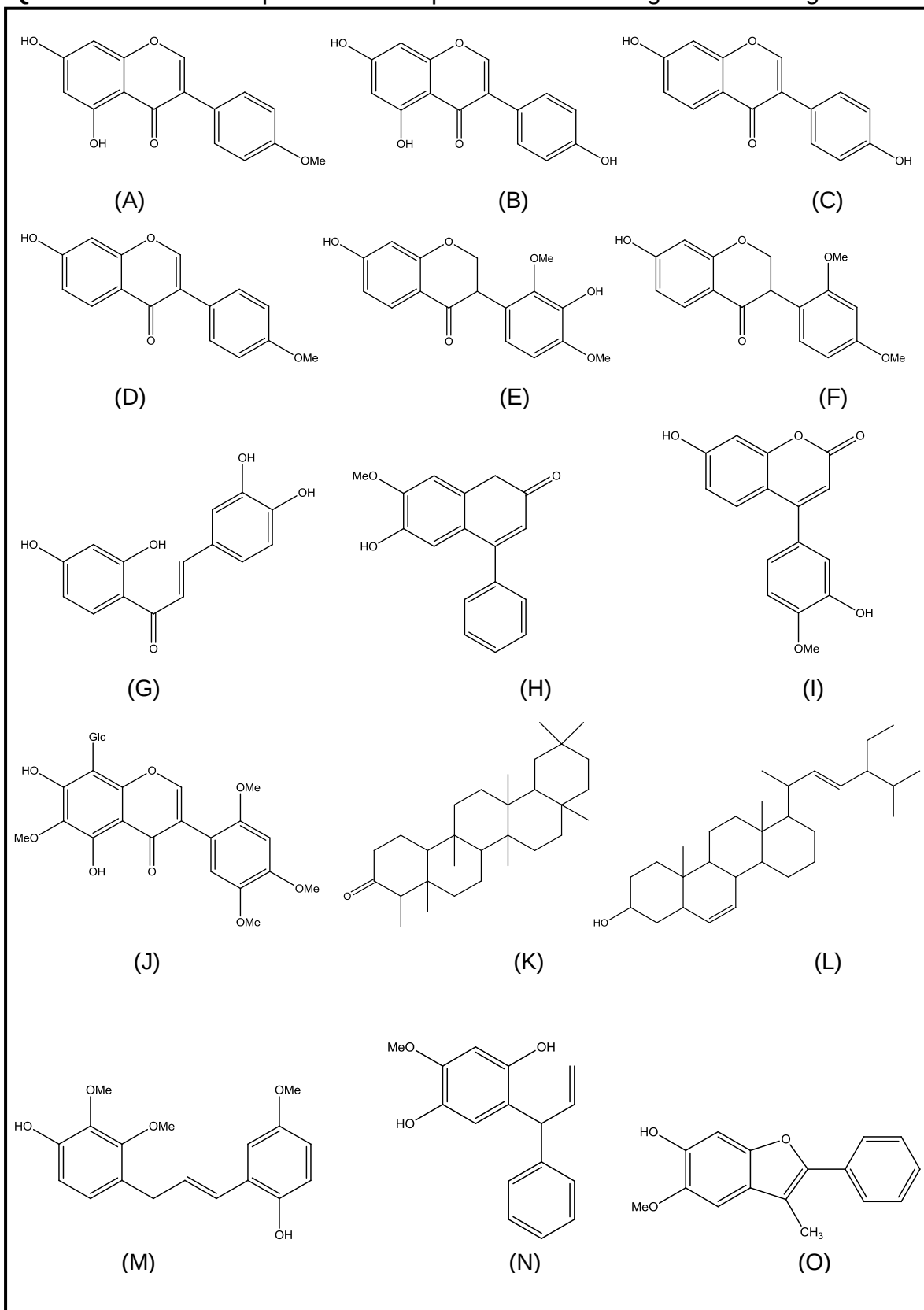
Tabela 1 – Substâncias isoladas em espécies do gênero *Dalbergia*.

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
Sativona	<i>D. odorifera</i>	Cerne (EtOH)	(F)	Yahara et al., 1989
Flavanona				
Butina	<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 e Rao, 1991
Terpenoides e Esteroides				
Friedelina	<i>D. monetaria</i>	Casca/Caule (EtOH)	(K)	Khan e Javed, 1997
Estigmasterol	<i>D. monetaria</i>	Casca/Caule (EtOH)	(L)	Khan e Javed, 1997
Cinamilfenol				
Dalberatina 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 e Frahm, 1982

Fonte: Próprio autor

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

Quadro 1 - Estrutura química de compostos isolados no gênero *Dalbergia*.



Fonte: Próprio autor

3.3 Considerações sobre *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). No início, seu crescimento é moderado, mas constante. Já espécimes mais velhos crescem 2 metros por ano (FRANCIS, 2001).

Foi observado que as abelhas coletavam o exsudato vermelho da superfície da *D. ecastophyllum* (Figura 3), sugerindo que essa é a origem botânica da própolis vermelha (DONNELLY; KEENAN; PRENDERGAST, 1973; MATOS; GOTTLIEB; ANDRADE, 1975).

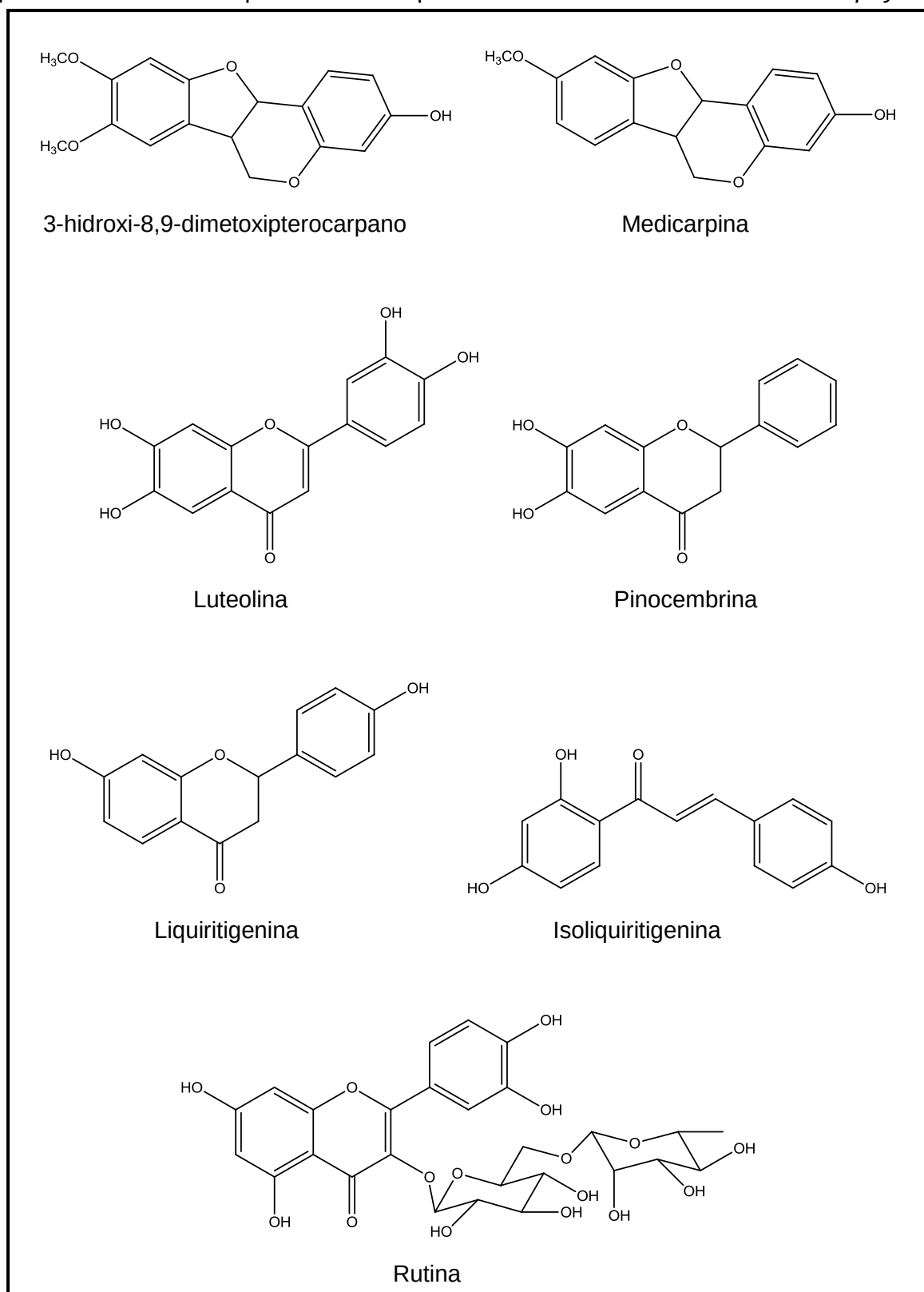
Figura 3 – Abelhas coletando a resina vermelha da *Dalbergia ecastophyllum*.



Fonte: Adaptado de <http://www.sulbahianews.com.br/painel/modulos/artigos/images/1313064876.jpg>. Acessado em: 27 de maio de 2015

Segundo Silva (2008), extratos da resina de *D. ecastophyllum* apresentaram alta concentração relativa das isoflavonas 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpina e medicarpina. A avaliação da resina de *D. ecastophyllum* coletada no nordeste brasileiro de acordo com Daugsch (2007), mostrou a presença de flavonoides como rutina, liquiritigenina, isoliquiritigenina, luteonina além de pinocembrina (Quadro 2).

Quadro 2 – Estrutura química de compostos isolados da resina de *D. ecastophyllum*.

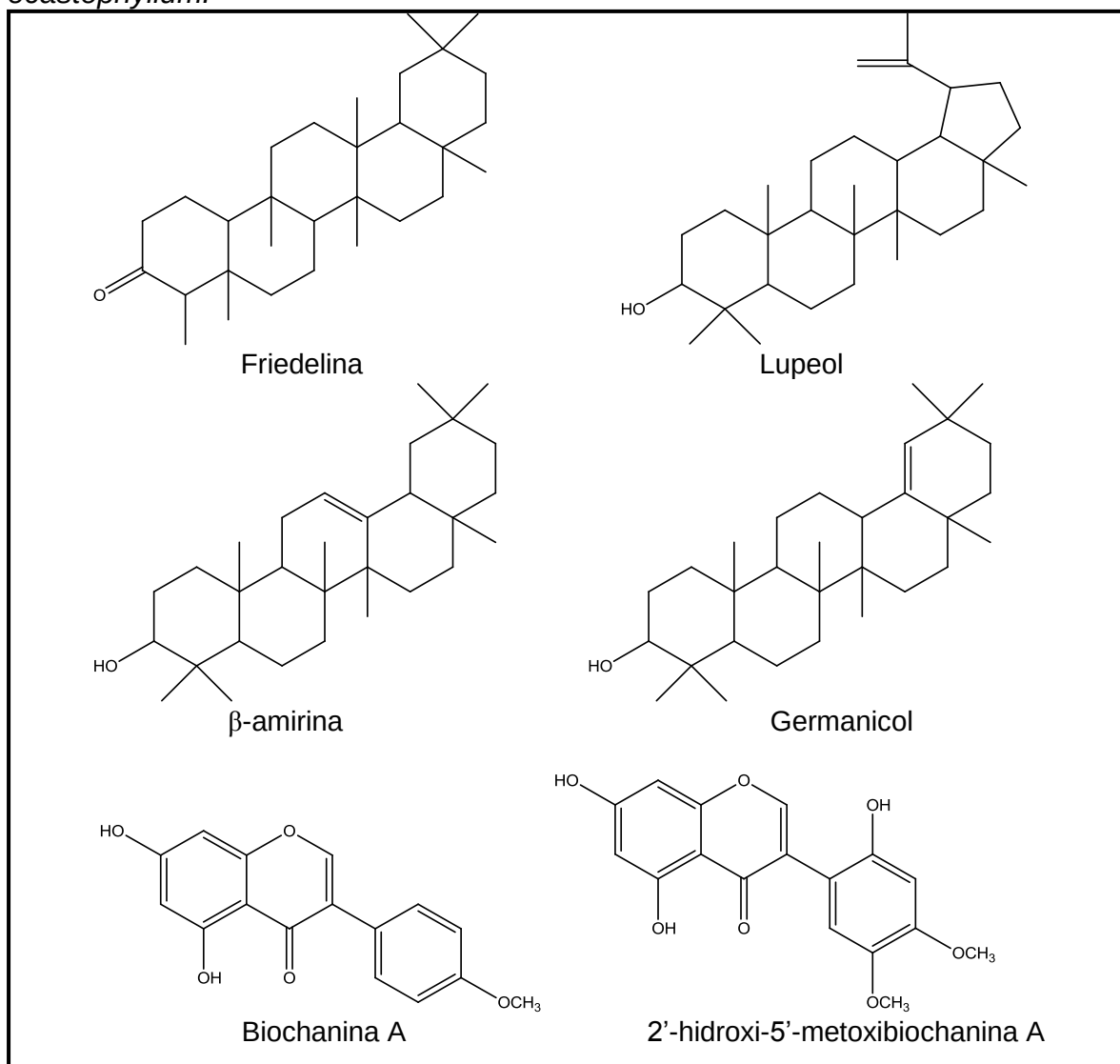


Fonte: Próprio autor

3.3.1 Substâncias isoladas das partes aéreas de *D. ecastophyllum*

O estudo fitoquímico, das fases hexano e diclorometano, das partes aéreas de *D. ecastophyllum* evidenciou a presença de dois isoflavonoides, o biochanina A, que foi relatada pela primeira vez na espécie e o 2'-hidroxi-5'-metoxibiochanina A, que foi 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 do conhecimento químico do gênero (Quadro 3) (SOARES, 2012).

Quadro 3 – Estrutura química de compostos isolados das partes aéreas de *D. ecastophyllum*.



Fonte: Próprio autor

3.4 Flavonoides com atividade biológica

Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos naturais e são amplamente distribuídos no reino vegetal, presentes em abundância nas angiospermas, apresentando nesse grupo enorme diversidade estrutural (SIMÕES et al., 2000).

As atividades bioquímicas dos flavonoides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que podem variar com substituições incluindo desde hidrogenação, hidroxilações, metilações, sulfatações até glicosilações (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001).

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 como efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, anti-hepatotóxico, anti-hipertensivo, hipolipidêmico, anti-inflamatório, antiplaquetário (PELZER et al., 1998; ROTHE et al., 2015; RUSSO et al., 2015). Estas atividades podem estar relacionadas às propriedades inibitórias que os flavonoides desempenham nos vários sistemas enzimáticos incluindo hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoredutases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinas e aminoácido oxidases (FERGUSON, 2001).

A atividade antioxidante dos flavonoides é a combinação das suas propriedades quelantes do ferro e sequestrador de radicais livres, além do inibição oxidase, evitando a formação de espécies de oxigênio reativo (JIMÉNEZ et al., 2009). Esta classe de metabólitos secundários tem merecido destaque em virtude de sua ampla gama de ações terapêuticas já demonstradas tanto experimentalmente quanto em humanos (MACHADO et al., 2008).

3.5 Terpenoides com atividade biológica

O uso de plantas contendo terpenos na medicina popular é bem conhecido. Segundo Coloma et al., (2011) os terpenos encontram-se dentre as classes de produtos naturais de ampla ocorrência em plantas superiores. Além de organismos marinhos, algas, microrganismos e em menor extensão em fungos (CONNOLLY e

HILL, 2005). Apresentam uma grande diversidade estrutural que deriva da junção cabeça-cauda de unidades isoprênicas, que contém cinco átomos de carbonos. As estruturas químicas dos terpenos formadas através da junção de duas ou mais unidades isoprênicas são chamadas de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e outros. Dessas classes, os monoterpenos e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais e das resinas. Os representantes das demais classes são em sua maioria sólidos e podem ser encontrados na forma livre, glicosilados ou como ésteres (DZUBAK et al., 2005).

Plantas contendo derivados terpênicos têm sido usadas como sedativas, tranquilizantes e anticonvulsivantes. Muitos óleos voláteis possuem uma grande variedade de atividades farmacológicas, tais como ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva. Compostos como linalool, limoneno e citrônolol possuem ação anticonvulsivante, enquanto mentol e mircenol, atividade analgésica. Muitos derivados monoterpênicos têm demonstrado atividades sobre o SNC, incluindo sedativa, antinociceptiva e antidepressiva (DE SOUZA et al., 2007; SOUSA et al., 2007; PERAZZO et al., 2008; LEITE et al., 2008).

Os triterpenos pentacíclicos estão relacionados com o tratamento da Diabetes Tipo 2, como os revelados do tipo oleanano, ursano e lupano, que diminuem os níveis de glicose no sangue, atuando como inibidores da enzima glicogênio fosforilase. Dentre esses triterpenos, estão o ácido oleanólico, ácido maslínico e seus derivados, ácido arjunólico e ácido corosólico. Essa inibição tem feito dessas substâncias alvos terapêuticos promissores para o tratamento de doenças causadas por anomalias no metabolismo do glicogênio (CHEN et al., 2006; WEN et al., 2008; LIANG et al., 2011)

3.6 O emprego de técnicas hifenadas no estudo de produtos naturais

O termo “técnicas hifenadas” refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida que as técnicas convencionais. As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos à base de plantas medicinais são a cromatografia e a espectroscopia. Um exemplo típico é o acoplamento de métodos eficientes de separação como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

com técnicas como Espectrofotometria de Ultravioleta UV (DAD – detectores de arranjo de diodo), Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que fornecem informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes da amostra, funcionando como detectores (RODRIGUES et al., 2006)

Apesar da limitação da existência de cromóforos na molécula para a detecção em UV, o desenvolvimento do DAD estimulou o seu emprego em produtos naturais. Esta técnica foi e tem sido muito empregada, por exemplo, no controle de qualidade de plantas medicinais, busca de metabólitos ativos, em estudos de ecologia química e até estudos quimiossistemáticos. Além da vantagem de obtermos o espectro de UV de cada substância, o que fornece uma informação estrutural, ainda limitada, o baixo preço do equipamento em relação a outras técnicas foi a principal razão para seu sucesso. Contudo, a necessidade de uma maior informação estrutural de cada componente de uma mistura complexa analisada levou ao desenvolvimento de técnicas hifenadas mais modernas, como o acoplamento da CLAE com EM (CL-EM) e com ressonância magnética nuclear (CL-RMN) (PINTO et al., 2002).

Estas técnicas criaram possibilidades para o *screening* químico ou determinação do perfil metabólico dos componentes de extratos de produtos naturais, pois originam um método rápido e confiável para a distinção entre compostos previamente identificados e novas moléculas, diretamente a partir de extratos vegetais brutos. Isso elimina, ou diminui muito, a necessidade do processo de isolamento e purificação de compostos já conhecidos, e direciona o isolamento de constituintes apresentando características espectroscópicas novas, diferentes ou de interesse biológico (NIELSEN e SMEDSGAARD, 2003).

3.7 Radicais livres e Antioxidantes

O gênero *Dalbergia* é rico em polifenóis que apresentam atividade antioxidante, como os flavonoides. Testes realizados com espécie *D. brasiliensis*, mostrou que extratos de suas folhas e casca do caule exibiram grande capacidade antioxidante e extrato dos galhos de *D. decipularis* também apresentou atividade antioxidante (DALARMI, 2012; MOREIRA et al., 2012)

Os radicais livres são moléculas inorgânicas e orgânicas, que contém átomos com um ou mais elétrons não pareados, com existência independente. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas quimicamente muito reativas, altamente instáveis e com meia-vida muito curta (BERNARDES et al., 2010; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; FANG et al., 2002).

As Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) são formadas a partir do oxigênio, quando produzidas em excesso são extremamente tóxicas e podem causar danos irreversíveis e quando o organismo encontra dificuldades em neutralizá-las, se tornam potencialmente perigosas, podendo causar diversas doenças, evidenciando o dano oxidativo causado por essas moléculas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Segundo Korkina e Afans'ev (1997), ERO's são capazes de oxidar, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas celulares. Contribuem para o envelhecimento celular, mutagênese, carcinogênese e doença coronariana possivelmente através da desestabilização das membranas (SASTRE et al., 2000; TAKABE et al., 2001; KAWANISHI et al., 2001; KHAN e BASEER, 2000; MARIOD et al., 2009).

Antioxidantes são substâncias que, em baixas concentrações, em relação ao substrato oxidável, retardam ou inibem a sua oxidação sendo, portanto, capazes de sequestrar radicais livres (ALI et al., 2008).

Estudos sugerem que antioxidantes exógenos, quando presentes na dieta em quantidades significativas, contribuem para a prevenção de doenças graves e crônicas, como alguns tipos de câncer, cardiopatias, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias associadas à formação de radicais, durante o processo de oxidação (CARRATU e SANZINI, 2005; TEERASRIPREECHA et al., 2012; DALEPRANE e ABDALLA, 2013).

MATERIAL E MÉTODOS

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e identificação do material botânico

O material vegetal (partes aéreas e raízes) da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. foi coletado no município de Rio Tinto, Estado da Paraíba, identificado pela Prof^a Evelise Márcia Locatelli, (Botânica do CES/UFCG, Campus Cuité). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Sistemática e Ecologia (DSE) – UFPB e catalogada como 45738 (JPB).

4.2 Processamento do material botânico

As partes aéreas da espécie vegetal foram desidratadas em estufa, com ar circulante, durante 72 horas, a temperatura média de 40 °C, sendo, em seguida, triturada em moinho mecânico, fornecendo 8,8 Kg do pó da planta. O mesmo procedimento foi realizado para as raízes, obtendo-se 2,2 Kg.

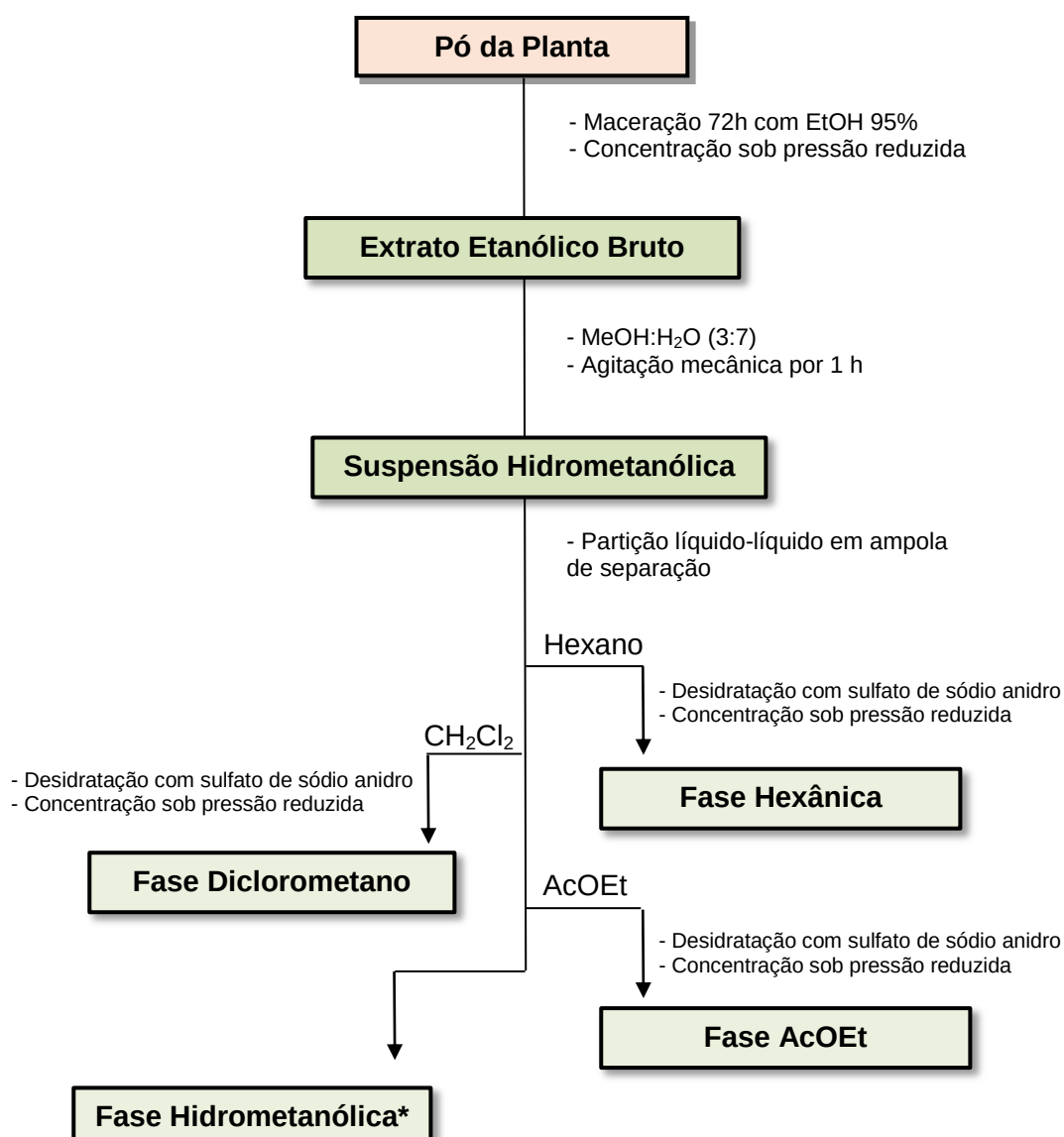
4.3 Processos de extração e particionamento

O pó das partes aéreas e raízes foram submetidos à maceração com etanol a 95% por 72 horas, separadamente. Após extração, as soluções foram concentradas em rota-evaporador sob pressão reduzida à temperatura de 45 °C obtendo-se o Extrato Etanólico Bruto (EEB). Uma alíquota dos EEBs, de cada parte, foi dissolvida em MeOH:H₂O (7:3), e homogeneizado sob agitação mecânica por uma hora, para obtenção da solução hidrometanólica que foi submetida sequencialmente a um particionamento em ampola de separação com hexano, diclorometano e acetato de etila. As fases foram, então, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida (Esquema 1).

Quadro 4 – Massa do material botânico seco, massas e rendimentos do EEB e das fases hexânica, diclorometano e acetato de etila das partes aéreas e raízes de *D. ecastophyllum*.

	Partes aéreas	Raízes
Material botânico seco e pulverizado	8800 g	2200 g
EEB (rendimento)	1940 g (22 %)	172 g (7,8 %)
EEB para partição	300 g	172 g
Fase hexânica (rendimento)	50,5 g (16,8 %)	26,2 g (15,2 %)
Fase diclorometano (rendimento)	2,4 g (0,8 %)	51,5 g (29,9 %)
Fase acetato de etila (rendimento)	159,2 g (53 %)	34,6 g (20,1 %)

Fonte: Próprio autor

Esquema 1 – Etapas envolvidas na obtenção e particionamento do EEB

Fonte: Próprio autor

4.4 Isolamento e purificação dos constituintes químicos

O isolamento, purificação e análise dos constituintes químicos foi realizado através de métodos cromatográficos, tais como: Cromatografia em Coluna (CC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e Preparativa (CCDP).

Para a CC utilizou-se sílica gel (ART 7734 da MERCK de partículas com dimensões entre 63 – 200 μm e 70 – 230 mesh), sílica gel F60 (Sílica flash® F60 com partículas de dimensões entre 40 – 60 μm e 230 – 400 mesh), XAD e/ou Sephadex-LH20, tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujos comprimentos e diâmetros variaram de acordo com a quantidade de amostra.

As amostras foram eluídas com os solventes comerciais hexano, diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (CH_3OH) destilados na UFPB, puros ou em misturas binárias. A CCDA e a CCDP foram empregadas para análise e purificação das frações obtidas por CC, respectivamente. Para isto, foram usadas placas de vidro (10,0 x 20,0 cm e 20,0 x 20,0 cm) preparadas com uma suspensão de sílica gel PF₂₅₄ (ART 7749 da MERCK) em água destilada (1:2 m/v) distribuída sobre a placa de vidro com ajuda de um espalhador mecânico tipo “quick fit”, seguindo técnica descrita por Matos (1997). As cromatoplasas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 120 °C durante duas horas. A revelação das substâncias em CCDA foi executada pela exposição das cromatoplasas a radiação ultravioleta (UV) sob dois comprimentos de ondas, 254 e 366 nm, em aparelho MINERALIGHT (modelo UVGL-58), bem como, pela impregnação das placas em cubas de vidro saturadas com vapores de iodo.

Por CCDA, as frações semelhantes foram reunidas de acordo com os fatores de retenção (R_f). A recuperação das amostras separadas por CCDP foi feita por extração com CH_2Cl_2 e/ou $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:MeOH}$ (9:1 v/v), seguida de filtração sob pressão reduzida e concentração em evaporador rotativo.

4.5 Processamento cromatográfico da Fase Hexânica do EEB das partes aéreas

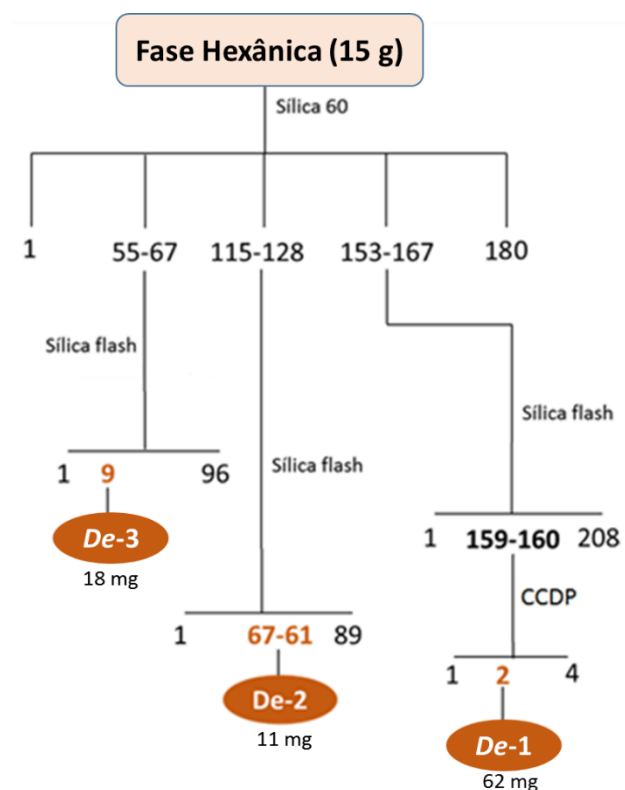
Uma alíquota de 15,0 g da fase hexânica do EEB das partes aéreas de *D. ecastophyllum* foi submetida a uma cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 e como fase móvel os solventes hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade, sendo suas frações concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Dessa coluna, foram coletadas 180 frações, concentradas em rotaevaporador, analisadas em CCDA e reunidas de acordo com seus R_f's (Esquema 2).

A fração 55/67 (334,0 mg) foi submetida a nova cromatografia em coluna utilizando como adsorvente sílica flash e como eluentes hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade, de onde, foram coletadas 96 frações, analisadas por CCDA e reunidas de acordo com suas semelhanças. A fração 9 (6,0 mg) após análise por CCDA em vários sistemas de solvente, foi submetida a espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C, codificando a substância como **De-3** (18 mg).

A fração 115/128 (202,0 mg), foi submetida a uma cromatografia em coluna utilizando sílica flash e metodologia similar a anterior foi realizada, onde coletou-se 89 frações. A fração 67/71 apresentou-se na forma de pó verde escuro, sendo submetida a espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C, denominando-se **De-2** (11 mg).

Da fração 153/167 (300,0 mg) por cromatografia em coluna de sílica flash utilizando metodologia descrita acima, obteve-se 208 frações. A fração 159/160 (123,0 mg) foi submetida a uma CCDP utilizando CH₂Cl₂ (100%) e após cinco eluições, obteve-se quatro faixas. Após análise por CCDA a faixa 2 extraída, foi concentrada e submetida a espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C recebendo o código **De-1** (62 mg),

Esquema 2 – Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase hexânica do EEB das partes aéreas de *Dalbergia ecastophyllum*.



Fonte: Próprio autor

4.6 Processamento cromatográfico da fase acetato de etila do EEB das partes aéreas

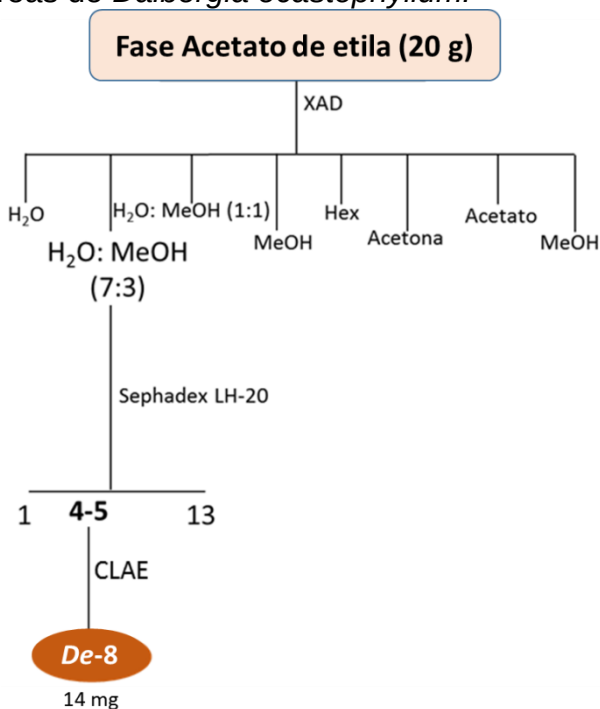
Uma alíquota de 20,0 g da fase AcOEt foi solubilizada em água e aplicada em uma coluna utilizando como fase estacionária XAD e como fase móvel os seguintes solventes e sistemas: água, água:metanol (7:3), água:metanol (1:1), metanol, hexano, acetona, acetato de etila e metanol novamente (ROCHA e SILVA et al., 2007).

Posteriormente as frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e as que continham água foram secas utilizando liofilizador.

A fração água:metanol (7:3) foi submetida a CC utilizando sephadex-LH20 como fase fixa e MeOH como fase móvel, obtendo-se 13 subfrações que foram reunidas em 5 grupos após monitoramento por CCDA (Esquema 3).

O grupo 4/5 foi submetido a CLAE e a análise cromatográfica foi realizada em modo gradiente, utilizando acetonitrila (MeCN) e H₂O em mistura binária como sistema de eluição. A análise foi feita por injeção direta na concentração de 100 µg/ml, variando-se a proporção de MeCN de 5 a 95%, no tempo de 0 a 45 min.

Esquema 3 – Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase acetato de etila do EEB das partes aéreas de *Dalbergia ecastophyllum*.



Fonte: Próprio autor

Deste processo cromatográfico obteve-se um pó amarelo que após espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C a substância foi codificada como **De-8** (14 mg) e as condições cromatográficas para o isolamento estão relacionadas no Quadro 5.

Quadro 5 - Condições cromatográficas da CLAE para isolamento de *De-8*.

Condição	Descrição
Concentração da amostra	100 µg/mL
Volume de injeção	20 µL
Fase móvel	MeCN:H ₂ O (5 a 95%) gradiente
Fluxo	3 mL/min
Comprimento de onda	384 nm
Tempo de retenção	16,94 min

Fonte: Próprio autor

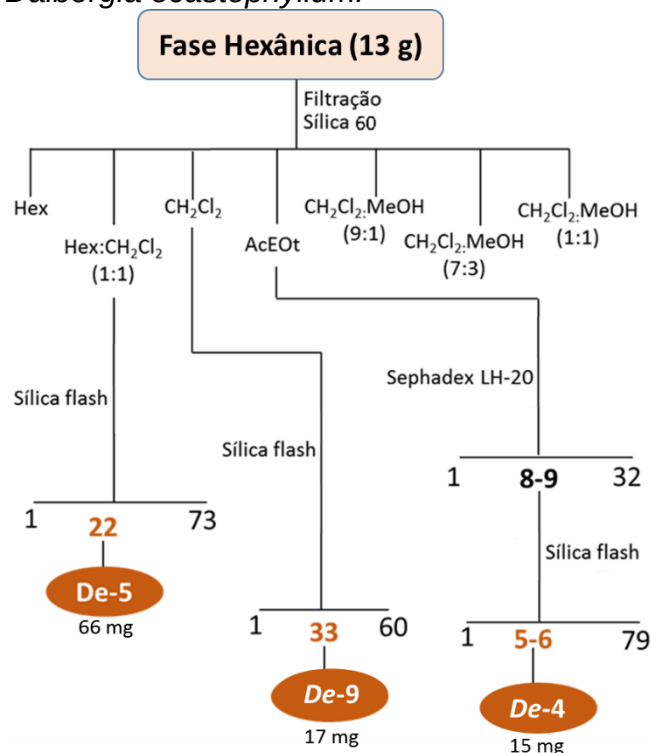
4.7 Processamento cromatográfico da fase hexânica do EEB das raízes

Uma alíquota (13,0 g) foi submetida a uma filtração a vácuo utilizando sílica gel 60 em funil de büchner e os seguintes solventes e sistemas: hexano, hex:CH₂Cl₂ (1:1), CH₂Cl₂, AcOEt, CH₂Cl₂:MeOH (9:1), CH₂Cl₂:MeOH (7:3), CH₂Cl₂:MeOH (1:1). Todas as frações foram, então, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida (Esquema 4).

A fração hex:CH₂Cl₂ (1:1) (3,2 g) foi submetida a uma CC utilizando-se sílica flash como fase estacionária e como fase móvel hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade, sendo suas 73 frações concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e em seguida analisadas por CCDA. A fração 22 mostrou-se na forma de cristais e após a espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C recebeu o código **De-5** (66 mg).

Uma CC foi realizada, utilizando sílica flash, para a fração CH₂Cl₂ (2,7 g) e adotou-se metodologia semelhante à descrita anteriormente. Obteve-se 60 subfrações que após avaliação por CCDA, a fração 33 foi submetida a espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C, sendo codificada como **De-9** (17 mg).

A fração AcOEt (4,7 g) foi submetida a uma CC com Sephadex LH-20 utilizando MeOH, o que rendeu 32 subfrações. A subfração 8/9 foi purificada em uma nova cromatografia utilizando sílica flash e os solventes hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH com metodologia similar as anteriores. Das 79 frações resultantes, a fração 5/6 foi submetida a espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C e codificada de **De-4** (15 mg).

Esquema 4 – Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase hexânica do EEB das raízes de *Dalbergia ecastophyllum*.

Fonte: Próprio autor

4.8 Processamento cromatográfico da fase diclorometano do EEB das raízes

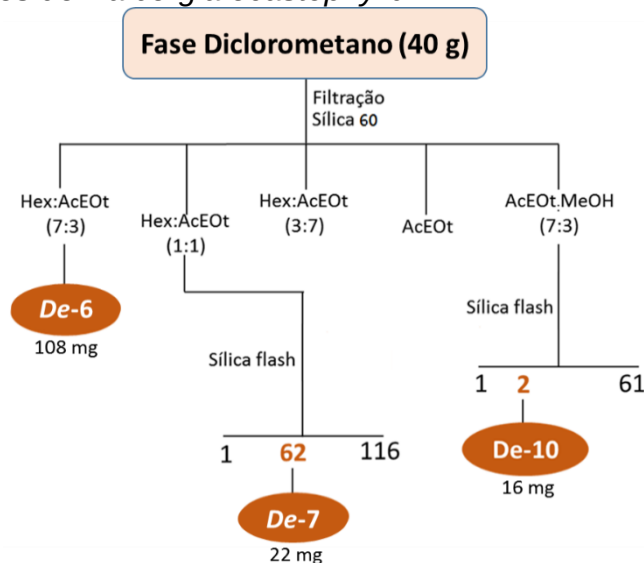
Uma alíquota (40,0 g) da fase CH_2Cl_2 foi submetida a uma filtração a vácuo utilizando sílica 60 em funil de büchner e os seguintes solventes e sistemas: hex:AcOEt (7:3), hex:AcOEt (1:1), hex:AcOEt (3:7), AcOEt e AcOEt:MeOH (7:3). Todas as frações foram, então, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida (Esquema 5).

A fração hex:AcOEt (7:3) foi suspensa em clorofórmio (CHCl_3) obtendo-se um precipitado na forma de pó amarelo e um sobrenadante, que após evaporação do solvente foi submetida a espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C e codificada como **De-6** (108 mg).

A fração hex:AcOEt (1:1) (5,0 g) foi submetida a CC utilizando sílica flash e solventes hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 116 subfrações. Dessa cromatografia, a subfração 62 apresentou-se na forma de pó amarelo, que após espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C foi codificado como **De-7** (22 mg).

A fração AcOEt:MeOH (7:3) (0,8 g) também foi submetida a CC utilizando sílica flash com metodologia semelhante a anterior, obtendo-se 61 subfrações. A subfração 2 cristalizou após evaporação do solvente e recebeu o código **De-10** (16 mg) após espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C .

Esquema 5 – Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase diclorometano do EEB das raízes de *Dalbergia ecastophyllum*.



Fonte: Próprio autor

4.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)

Para a análise das amostras em CLAE-DAD, fez-se o uso de um aparelho SHIMADZU série M10Avp, constituído de duas bombas LC-6AD, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10Avp, módulo controlador SCL-10Avp e injetor manual (Rheodyne), e um loop de 20 μL , com uma coluna C18 da marca ACE, modelo 121-2546 de 250 x 4,6 mm, com 5 μm de tamanho de partícula. Para injeção da amostra realizou-se filtração prévia em filtro de seringa (Filter Pro – 13 x 0,45 μm).

4.10 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados

A identificação e/ou elucidação estrutural das substâncias isoladas foi realizada através de métodos espectroscópicos e comparações com modelos da literatura.

4.11 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , que informam sobre os diferentes tipos de hidrogênios e carbonos da molécula, respectivamente, foram obtidos em espectrômetros VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz e VARIAN-MERCURY-NMR 200 MHz, ambos da Unidade de Caracterização e Análise (UNICAL) da UFPB. As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se pequena quantidade das mesmas em solventes deuterados da marca Cambridge Isotope Laboratories: clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e DMSO (DMSO-d_6). O TMS foi utilizado como padrão interno, os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz foram referenciados para RMN de ^1H pelos sinais característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas dos solventes: CDCl_3 (δ_{H} 7,24), CD_3OD (δ_{H} 3,31) e DMSO-d_6 (δ_{H} 2,50). Para os espectros de RMN de ^{13}C , os deslocamentos químicos foram referenciados pelos sinais dos carbonos dos solventes deuterados: CDCl_3 (δ_{C} 77,0), CD_3OD (δ_{C} 49,0) e DMSO-d_6 (δ_{C} 39,5).

As multiplicidades dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), dl (dubleto largo), t (triplete), q (quarteto) e m (multiplete). Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos pela técnica APT com a seguinte convenção: 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: HMQC, espectro de correlação heteronuclear, que permite fazer uma correlação entre hidrogênios e seus respectivos carbonos; HMBC que permite fazer uma correlação entre hidrogênios e carbonos a duas (^2J) e três (^3J) ligações; (KAISER, 2000).

4.12 Determinação de atividade antioxidante

4.12.1 Teor de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (HOSU et al., 2014). Foi adicionado 0,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu (10%) a 0,120 ml das fases diclorometano e acetato de etila do EEB (das

partes aéreas e raízes de ambas as fases) e diluído apropriadamente. A mistura de reação foi deixada reagir por 5 min e, em seguida, 0,4 ml de uma solução de carbonato de sódio (7,5%) foi utilizado para neutralizar a mistura. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente, em local escuro durante 120 min e a absorbância foi medida a 765 nm.

4.12.2 Teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio descrito por Hosu (2014) com modificações. Uma alíquota de 0,1 ml das fases diclorometano e acetato de etila do EEB, (das partes aéreas e raízes de *D. ecastophyllum*), foi tratada com 0,1 ml de uma solução de AlCl_3 (2,5%). Após 30 min, a absorbância da mistura foi medida a 410 nm.

4.12.3 Determinação do DPPH

A atividade de eliminação de radicais livres da amostra foi medida *in vitro* por ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (LINARES et al., 2015; BREM et al., 2004). O volume de 0,1 ml de uma solução de DPPH (0,03 mM) foi adicionada a 0,1 ml de solução das fases diclorometano e acetato de etila do EEB (das partes aéreas e raízes) em diferentes concentrações (0 - 200 µg/ml). Após 30 minutos de incubação no escuro, à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 518 nm. O ácido ascórbico foi usado como referência. A porcentagem de inibição do radical livre de DPPH foi calculada com base no controle de leitura utilizando a seguinte equação:

$$\text{DPPH eliminado (\%)} = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}} \times 100$$

Onde A_{controle} é a absorbância da reação de controle e A_{amostra} é a absorbância na presença de extrato/padrão.

A atividade antioxidante do extrato foi expressa como CE_{50} , que é a concentração (em µg/ml) do extrato que inibe 50% a formação de radicais de DPPH.

4.12.4 Análises estatísticas

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e repetidas em pelo menos três dias diferentes .

A CI_{50} foi calculada utilizando o modelo probit de regressão (programa SPSS, versão 13.0) e nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$). Diferenças entre os grupos foram analisados utilizando análise de uma via de variância (ANOVA) com o pós teste de Bonferroni usando o software GraphPad Prism® versão 6.0, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

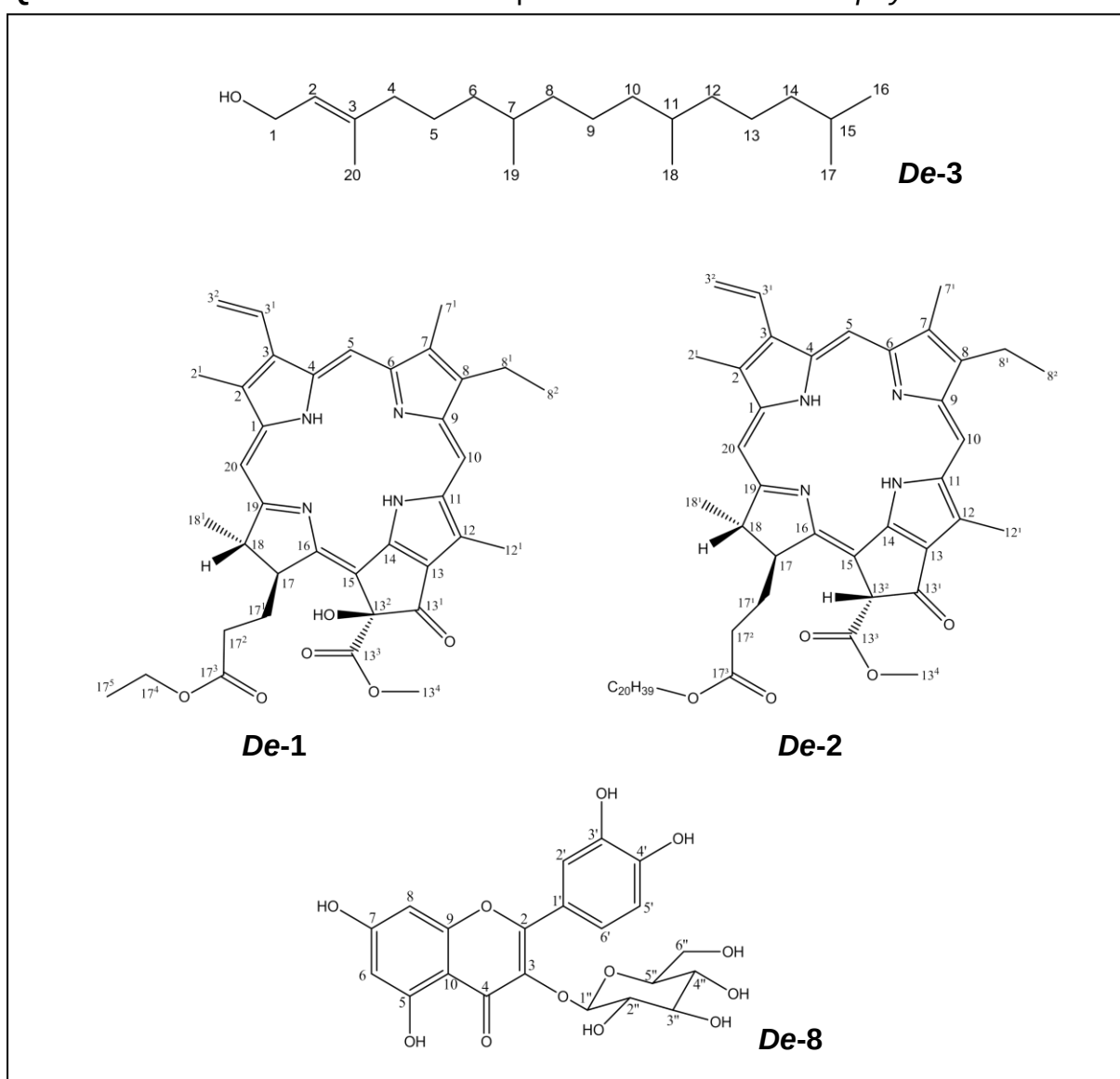
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Substâncias isoladas das partes aéreas de *D. ecastophyllum*

O estudo fitoquímico do EEB das partes aéreas de *Dalbergia ecastophyllum* resultou no isolamento e identificação estrutural de quatro substâncias. Da fase hexânica foram isoladas três substâncias, codificadas como **De-1**, **De-2** e **De-3**; e da fase acetato de etila uma substância, **De-8** (Quadro 6).

Quadro 6 – Substâncias isoladas das partes áreas de *D. ecastophyllum*.

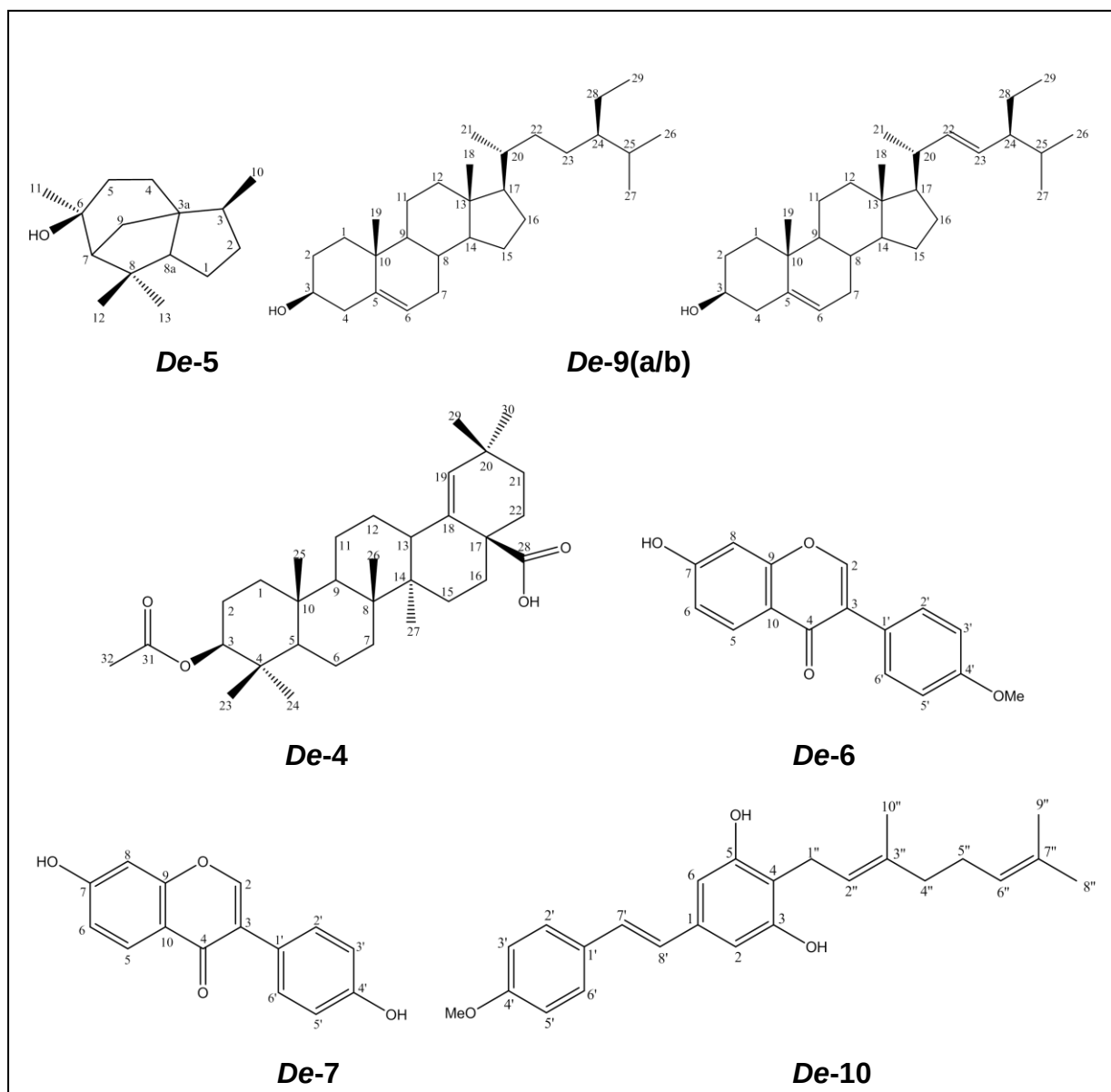


Fonte: Próprio autor

5.2 Substâncias isoladas das raízes de *D. ecastophyllum*

O estudo fitoquímico do EEB das raízes de *Dalbergia ecastophyllum* resultou no isolamento e identificação estrutural de seis substâncias. Da fase hexânica foram isoladas três substâncias, codificadas como **De-4**, **De-5** e **De-9**; e da fase diclorometano mais três substâncias, **De-6**, **De-7** e **De-10** (Quadro 7).

Quadro 7 – Substâncias isoladas das raízes de *D. ecastophyllum*.



Fonte: Próprio autor

5.3 Identificação estrutural das substâncias com esqueletos porfirínicos

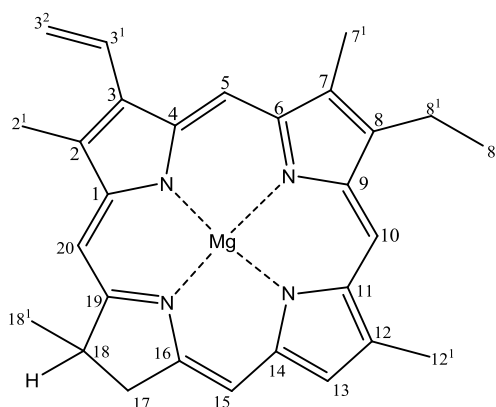
5.3.1 Identificação estrutural de De-1

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de De-1 (Figura 4) apresentou sinais característicos de compostos que possuem núcleo porfirínico: três singletos em δ_{H} 9,53, 9,35 e 8,65 correspondentes aos hidrogênios olefínicos H-10, H-5 e H-

Características físico-químicas de De-1	
Estado físico	Sólido
Forma/cor	Pó verde
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	62 mg / 0,41%

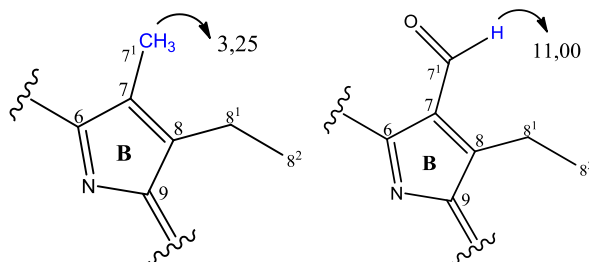
20, respectivamente; um duplo-dublete em δ_{H} 7,92 ($J = 11,6$ e $17,8$ Hz) acoplando *trans* com um dublete em δ_{H} 6,23 ($J = 17,8$ Hz) e *cis* com outro duplo-dublete em δ_{H} 6,13 ($J = 1,2$ e $11,6$ Hz), condizentes aos hidrogênios do grupo vinila terminal inserido na posição 3 (H-3¹, H-3² (*trans*) e H-3² (*cis*), respectivamente); e três singletos em δ_{H} 3,61, 3,38 e 3,13 referentes aos hidrogênios H-12¹, H-2¹ e H-7¹ de três metilas ligadas à carbonos olefínicos, respectivamente.

Estes dados foram corroborados pelo espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, CDCl_3) (Figura 7) que destacou sinais em δ_{C} 104,1 (C-10), 97,8 (C-5) e 93,9 (C-20) do núcleo porfirínico, em δ_{C} 128,9 (C-3¹) e 122,9 (C-3²) do grupo vinila terminal, bem como, em δ_{C} 12,3 (C-12¹), 12,1 (C-2¹) e 11,1 (C-7¹) para as três metilas olefínicas (SCHWIKKARD et al., 1998; TOMAZ et al., 2008; HUANG et al., 2007).



O deslocamento químico em δ_{H} 3,13 (s, 3H) (Figura 6) permitiu classificar o derivado porfirínico como do tipo A, uma vez que este sinal corresponde aos hidrogênios do grupo metila em C-7. A ausência de um sinal em aproximadamente δ_{H} 11,00 referente ao hidrogênio do grupo aldeído em C-7, característico dos

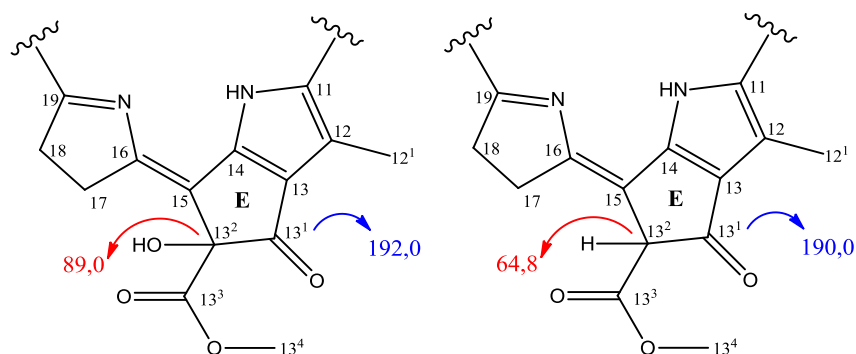
derivados porfirínicos do tipo *B*, fortaleceu tal classificação (BUCHANAN et al., 1996; SCHWIKKARD et al., 1998).



Um singleto largo em δ_H -1,88 (Figura 4), atribuídos ao hidrogênio N-H pirrólicos protegidos pela corrente de anel formada quando o composto é submetido a um campo magnético, sugeriu a ausência do íon magnésio central na molécula, o que indicou que o composto tratava-se de um derivado da clorofila. (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

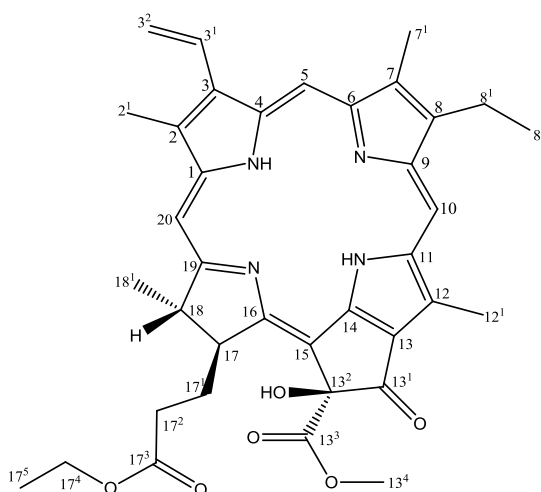
No espectro de RMN ^1H (Figura 4), foi observado a ausência de um conjunto de sinais de alta multiplicidade em δ_H 0,75–2,00 provenientes de hidrogênios CH, CH₂ e CH₃ alifáticos que sugerem a presença de um grupo fitil (-C₂₀H₃₉) comumente encontrado em substâncias com natureza porfirínica do tipo feofitina (SCHWIKKARD et al., 1998; HUANG et al., 2007; JERZ et al., 2007). Todavia no espectro de RMN ^{13}C (Figura 9), observou-se a presença de sinais em δ_C 60,5 e 14,1, característicos de um grupo etoxi em C-17⁴ e 17⁵ respectivamente, provavelmente no lugar da cadeia fitil, classificando assim a substância como feoforbídeo (SCHWIKKARD et al., 1998; SILVA et al., 2010).

Derivados porfirínicos geralmente são encontrados na natureza apresentando o anel E do tipo ciclopentanona. Neste anel, a carbonila cetônica encontra-se localizada em C-13¹ e apresenta deslocamento químico em aproximadamente δ_C 190,0–192,0. O sinal para carbono C-13² pode variar conforme o tipo de substituinte que possui, sendo aproximadamente δ_C 89,0 quando se trata de um carbono quaternário hidroxilado ou δ_C 64,0 quando o mesmo é um carbono metínico não hidroxilado (KOBAYASHI et al., 1991; MATSUO et al., 1996).



A presença de sinais em δ_C 191,9 (C-13¹) e 88,9 (C-13²) (Figura 7), bem como, de um singlete largo em δ_H 5,59 condizente com hidroxila para o hidrogênio H-13² (Figura 5) permitiram propor uma estrutura do tipo ciclopentanona hidroxilada para o anel E de *De*-1.

Assim, a análise dos dados de RMN de ¹H e ¹³C de *De*-1, bem como, a comparação com os dados da literatura citados por Silva et al. (2010), permitiram identificá-la como sendo a 13²-hidroxi-17³-etoxifeoforbídeo A (Tabela 2).



13²-hidroxi-17³-etoxifeoforbídeo A

Tabela 2 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *De-1* em CDCl_3 (200 e 50 MHz, respectivamente) e do 17³-etoxifeoforbídeo A em CDCl_3 , segundo Silva et al. (2010).

C		<i>De-1</i>	<i>Mo</i>	<i>De-1</i>	<i>Mo</i>
		δ_{C}		δ_{H}	
1	C	142,0	142,3		
2	C	131,8	132,0		
2 ¹	CH ₃	12,1	12,4	3,38 (s)	3,46 (s)
3	C	136,2	136,6		
3 ¹	CH	128,9	129,7	7,92 (dd, J=17,8 e 11,6 Hz)	8,06 (dd, J=18 e 12 Hz)
3 ²	CH ₂	122,9	123,2	6,23 (d, J=17,8 Hz)	6,34 (d, J=18 Hz)
				6,13 (dd, J=11,6 e 1,2 Hz)	6,23 (d, J=12 Hz)
4	C	136,2	136,6		
5	CH	97,8	98,2	9,35 (s)	9,52 (s)
6	C	154,6	155,6		
7	C	136,4	136,8		
7 ¹	CH ₃	11,1	11,6	3,13 (s)	3,30 (s)
8	C	144,9	145,5		
8 ¹	CH ₂	19,3	19,8	3,67 (d, J=4,4 Hz)	3,75 (q, J=9 Hz)
8 ²	CH ₃	17,3	17,8	1,65 (m)	1,75 (t, J=8 Hz)
9	C	149,9	150,1		
10	CH	104,1	104,6	9,53 (s)	9,65 (s)
11	C	137,7	138,1		
12	C	129,6	129,3		
12 ¹	CH ₃	12,3	12,6	3,61 (s)	3,64 (s)
13	C	129,6	129,3		
13 ¹	C	191,9	192,3		
13 ²	C	88,9	60,7		
13 ³	C	172,5	172,7		
13 ⁴	CH ₃	53,4	53,7	3,71 (s)	3,77 (s)
14	C	150,4	151,2		
15	C	107,7	107,9		
16	C	162,7	162,7		
17	CH	51,8	52,0	4,70 (dl, J=7,6 Hz)	4,70 (dl, J=9 Hz)
17 ¹	CH ₂	29,6	29,9	2,25-2,34 (m)	2,26-2,31 (m)
17 ²	CH ₂	31,5	31,8		2,05-2,09 (m)
17 ³	C	172,7	172,7		
17 ⁴	CH ₂	60,5	60,8	4,10 (m)	4,06 (q, J=8 Hz)
17 ⁵	CH ₃	14,1	14,4	1,15 (t, J=7 Hz)	1,17 (t, J=7 Hz)
18	CH	50,3	50,5	4,51 (q, J=7 Hz)	4,52 (q, J=7 Hz)
18 ¹	CH ₃	22,7	22,9	1,65 (m)	1,71 (d, J=7 Hz)
19	C	173,5	173,1		
20	CH	93,9	93,9	8,65 (s)	8,67 (s)
	NH	-	-	-1,88 (sl)	
	OH-13			5,59 (sl)	5,54 (s)

Figura 4 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *De-1*.

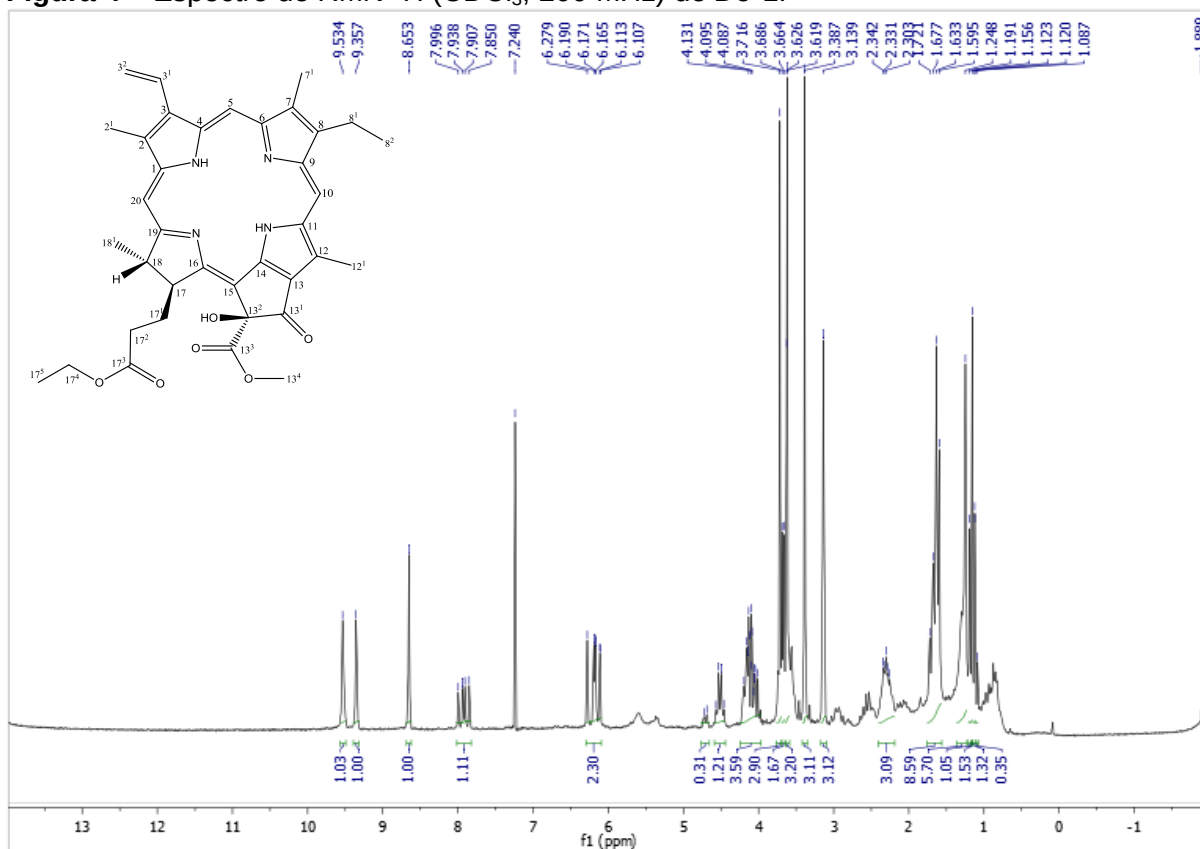


Figura 5 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *De-1* (δ 5,6 – 9,8).

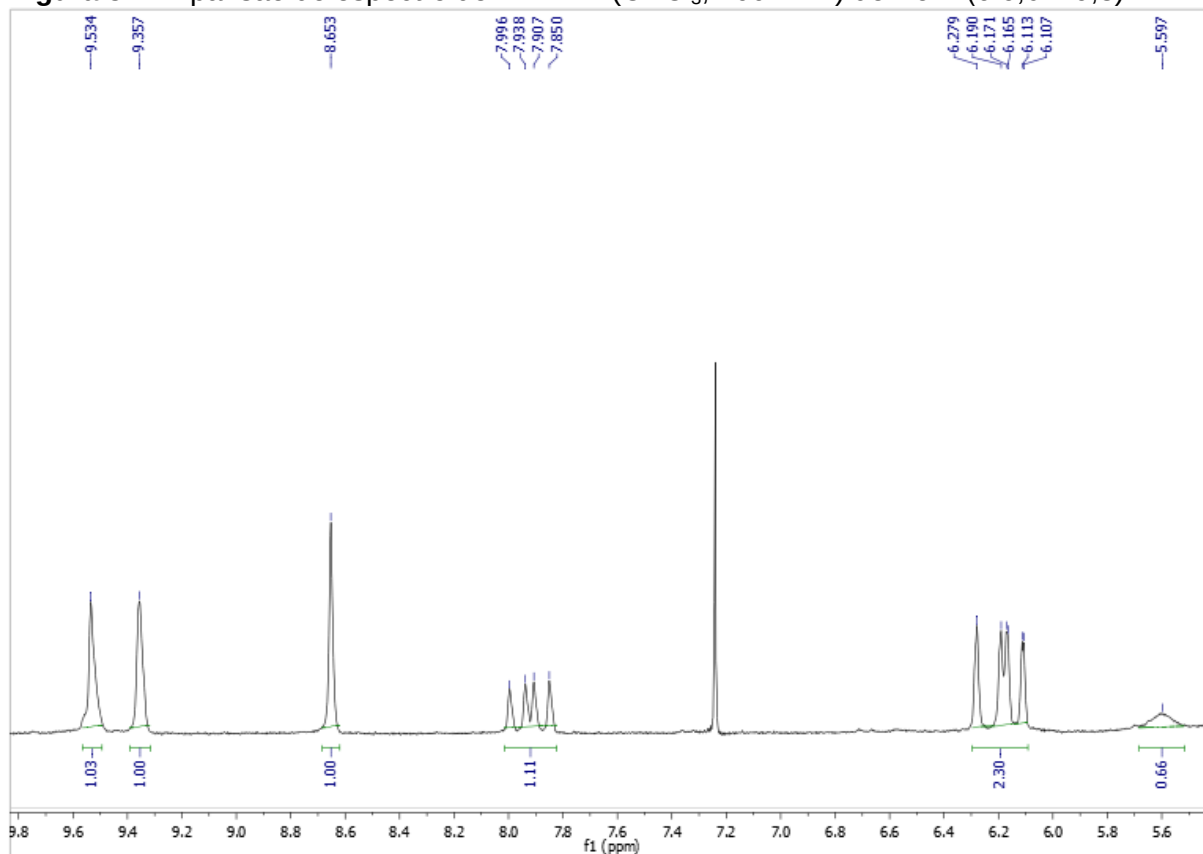


Figura 6 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *De*-1 (δ 1,1 – 4,9).

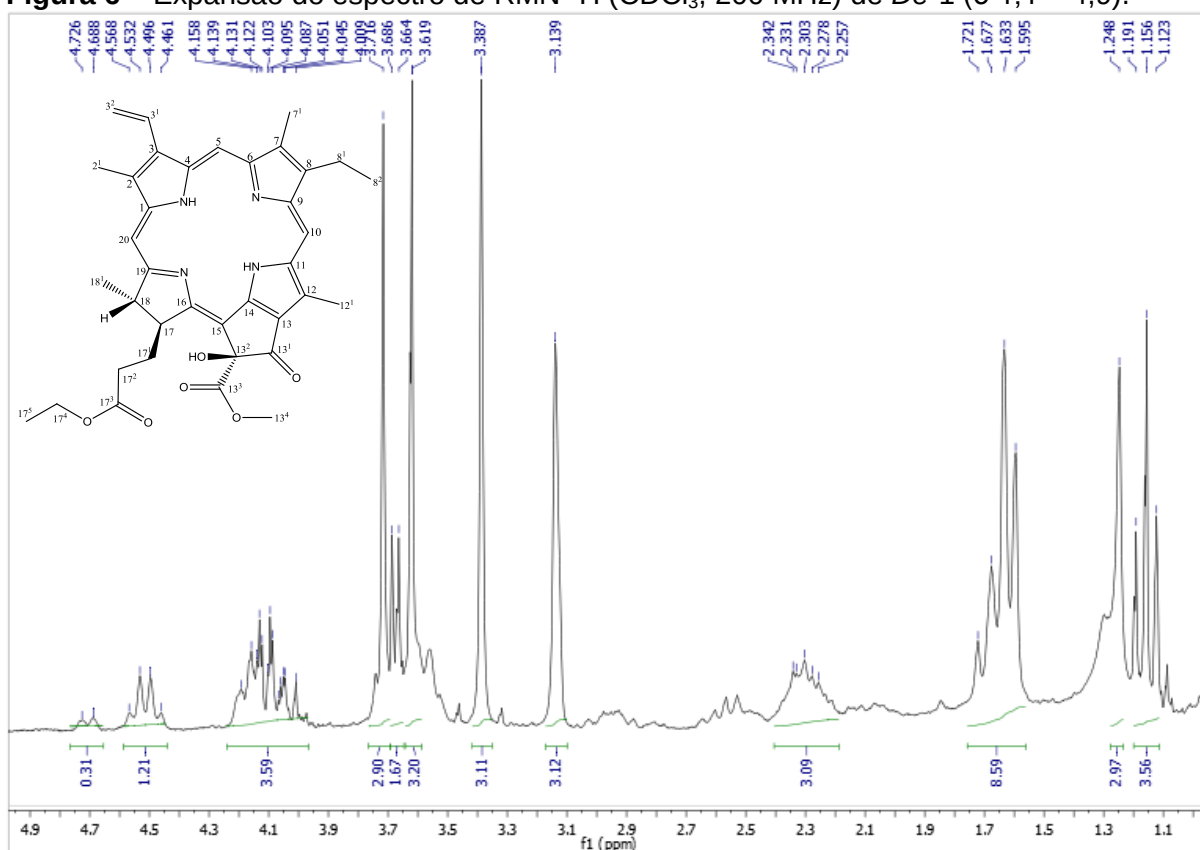


Figura 7 – Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de *De*-1.

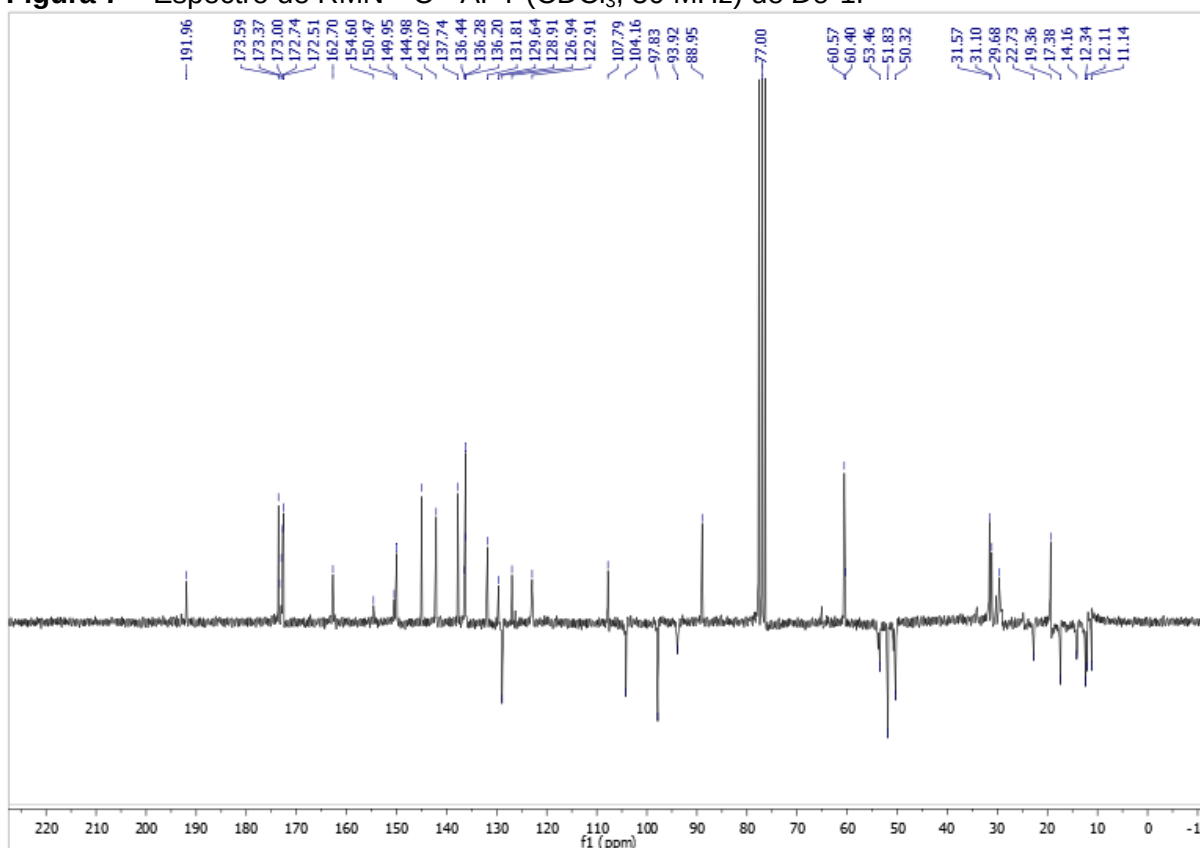


Figura 8 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de De-1 (δ 122-152).

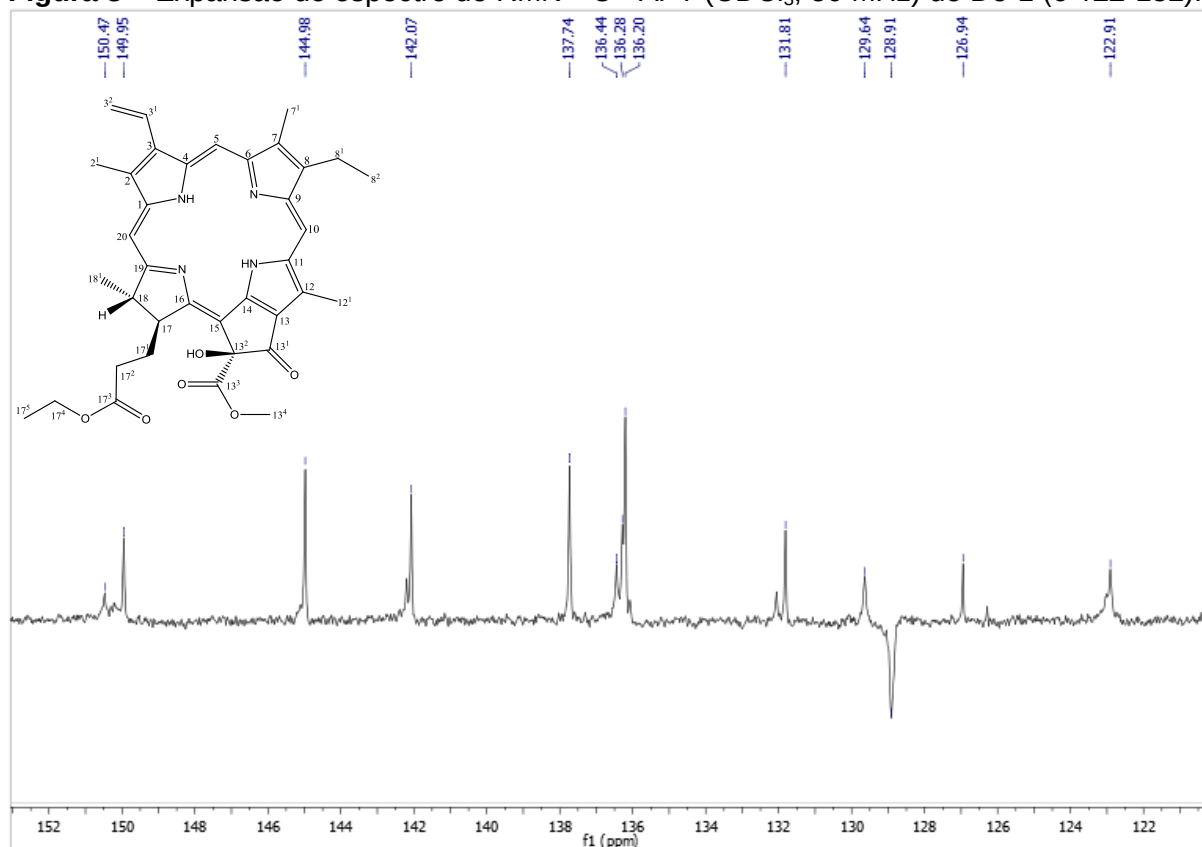
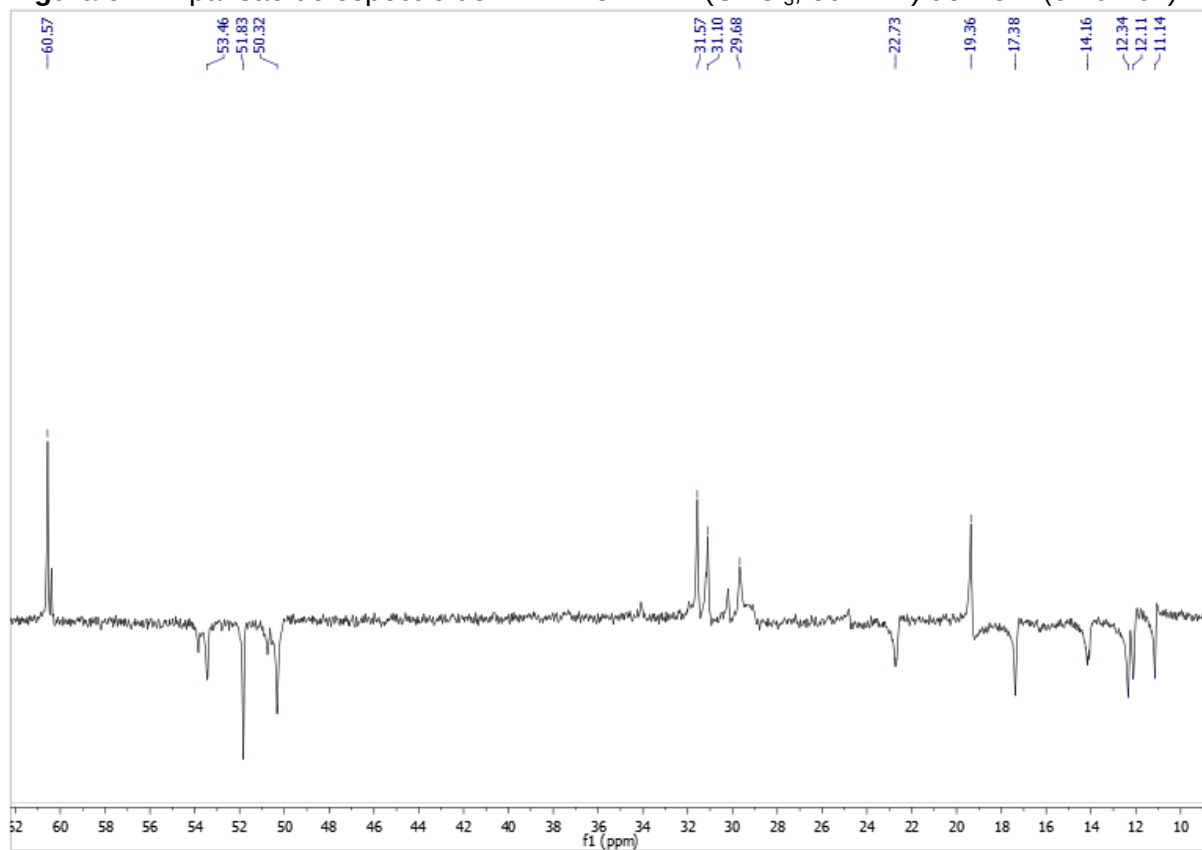


Figura 9 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de De-1 (δ 10 - 62).



5.3.2 Identificação estrutural de *De-2*

Assim como *De-1*, o espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *De-2* (Figura 10) apresentou sinais que permitiram sugerir que a substância em questão também apresentava um núcleo porfirínico.

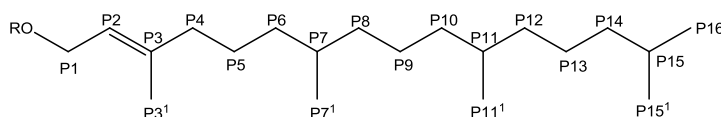
Características físico-químicas de <i>De-2</i>	
Estado físico	Sólido
Forma/cor	Pó verde
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	11 mg / 0,07%

Foi observado três sinais em δ_{H} 3,40, 3,25 e 3,70 referentes aos hidrogênios H-2^1 , H-7^1 e H-12^1 de três metilas olefínicas, respectivamente; três singletos em δ_{H} 9,51, 9,66 e 8,69 correspondentes aos hidrogênios olefínicos H-5 , H-10 e H-20 respectivamente. O sinal em δ_{H} 3,25 referente a H-7^1 , com integral para três hidrogênios determinou que o núcleo porfirínico tratava-se do tipo A (BUCHANAN et al., 1996; SCHWIKKARD et al., 1998).

Os sinais para o grupo vinila terminal inserido na posição 3, foram observados em um duplo-dublete δ_{H} 7,99 ($J = 12$ e 15 Hz) acoplando *trans* com um duplo-dublete em δ_{H} 6,29 ($J = 17,5$ e $1,5$ Hz) e *cis* com outro duplo-dublete em δ_{H} 6,20 ($J = 11,5$ e $1,5$ Hz) condizentes com as posições H-3^1 , H-3^2 (*trans*) e H-3^2 (*cis*), respectivamente (Figura 11).

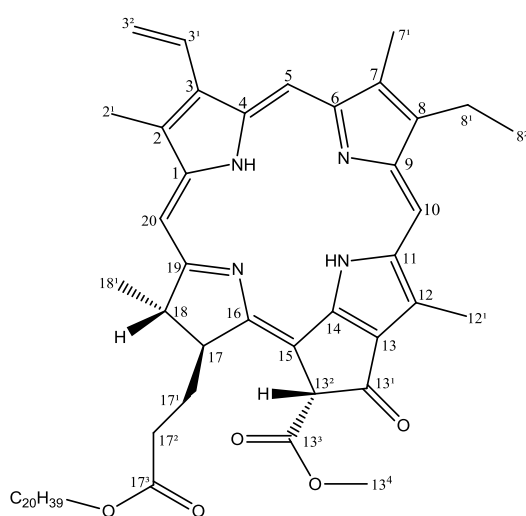
Ao contrário de *De-1*, o espectro de *De-2* apresentou um singlete em δ_{H} 6,28 correspondente ao H-13^2 que permitiu propor uma estrutura do tipo ciclopentanona hidrogenada para o anel E.

Na expansão do espectro de RMN ^1H (Figura 1), foi observado um conjunto de sinais de alta multiplicidade em δ_{H} 0,76–2,00 provenientes de hidrogênios CH , CH_2 e CH_3 alifáticos que sugerem a presença de um grupo fitil ($-\text{C}_{20}\text{H}_{39}$) caracterizando *De-2* como uma substância de natureza porfirínica do tipo feoftina (HUANG et al., 2007; JERZ et al., 2007). O dublete em δ_{H} 4,10 ($J = 5,5$ Hz, 2H) e o tripleto em δ_{H} 5,15 ($J = 7,5$ Hz, 1H) reforçaram esta proposta uma vez que correspondem aos deslocamentos químicos dos hidrogênios H-P1 e H-P2 da cadeia fitílica, respectivamente (SCHWIKKARD et al., 1998; HUANG et al., 2007; JERZ et al., 2007).



Ainda foram vistos sinais para metilas como o singlete em δ_H 1,57 (3H) característico de metila sobre dupla em H-P3¹; dubletos em δ_H 0,77 ($J = 6,5$ Hz) e 0,78 ($J = 7$ Hz) condizentes com as metilas inseridas em carbonos metínicos H-P7¹ e H-P11¹, respectivamente; e o dubleto em δ_H 0,82 ($J = 6,5$ Hz, 6H) correspondente as metilas terminais H-P15¹ e H-P16 (Figura 13 e 14).

A compilação dos dados espectrais e comparações com modelos da literatura (SILVA et al., 2006, Tabela 3) e (SCHWIKKARD et al., 1998, Tabela 4), permitiram identificar a substância De-2 como sendo a feofitina A.



feofitina A

Tabela 3 – Dados de RMN ^1H de *De-2* em CDCl_3 (500 MHz) e do núcleo porfirínico da feofitina A em CDCl_3 , segundo Nogueira, T. B. S. S. (2009).

H	<i>De-2</i>	Mo
	δ_{H}	
2 ¹	3,40 (s)	3,39 (s)
3 ¹	7,99 (dd, $J = 15$ e 12 Hz)	7,98 (dd, $J = 15,8$ e 11,3 Hz)
3 ²	6,29 (dd, $J = 17,5$ e 1,5 Hz)	6,28 (dd, $J = 15,9$ e 2,29 Hz)
	6,20 (dd, $J = 11,5$ e 1,5 Hz)	6,17 (dd, $J = 11,3$ e 2,28 Hz)
5	9,51 (s)	9,36 (s)
7 ¹	3,25 (s)	3,21 (s)
8 ¹	3,61 (m)	3,66 (q)
8 ²	1,68 (m)	1,68 (t)
10	9,66 (s)	9,50 (s)
12 ¹	3,70 (s)	3,68 (s)
13 ²	6,28 (s)	6,26 (s)
13 ⁴	3,86 (s)	3,88 (s)
17	4,25 (m)	4,20 (m)
17 ¹	2,26 (m)	-
17 ²	2,02 (m)	-
18	4,50 (m)	4,45 (m)
18 ¹	1,82 (d, $J = 7,5$ Hz)	1,80 (d)
20	8,69 (s)	8,55 (s)

Tabela 4 – Dados de RMN ^1H de *De-2* em CDCl_3 (500 MHz) e do grupo fitil da feofitina A em CDCl_3 , segundo Schwikkard et al. (1998).

H	<i>De-2</i>	Mo
	δ_{H}	
P1	4,10 (d, $J = 5,5\text{Hz}$, 2H)	4,47 (m, 2H)
P2	5,15 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H)	5,14 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H)
P3 ¹	1,57 (sl, 3H)	1,57 (sl, 3H)
P7 ¹	0,77 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	0,77 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H)
P11 ¹	0,78 (d, $J = 7$ Hz, 3H)	0,78 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)
P15 ¹	0,82 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	0,82 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)
P16	0,82 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	0,82 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)

Figura 10 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de De-2.

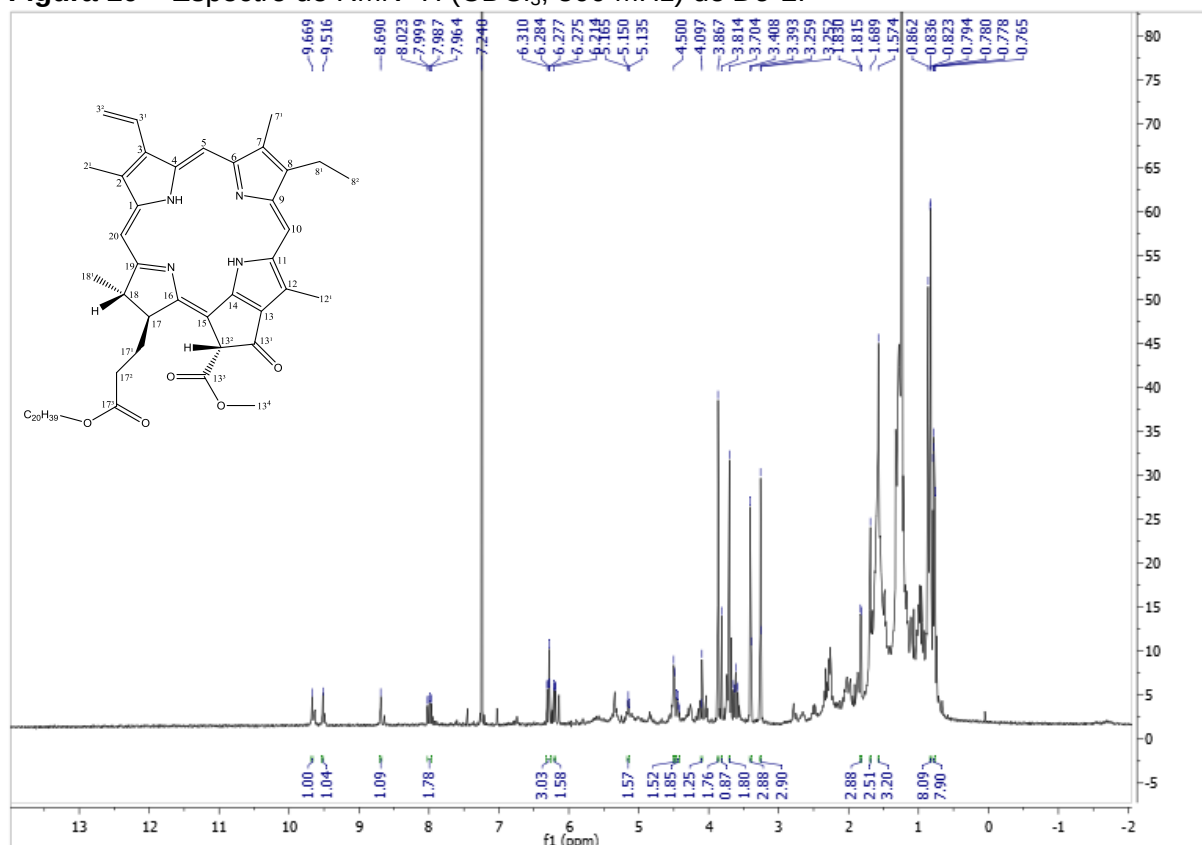


Figura 12 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De-2* (δ 3,2 – 5,2).

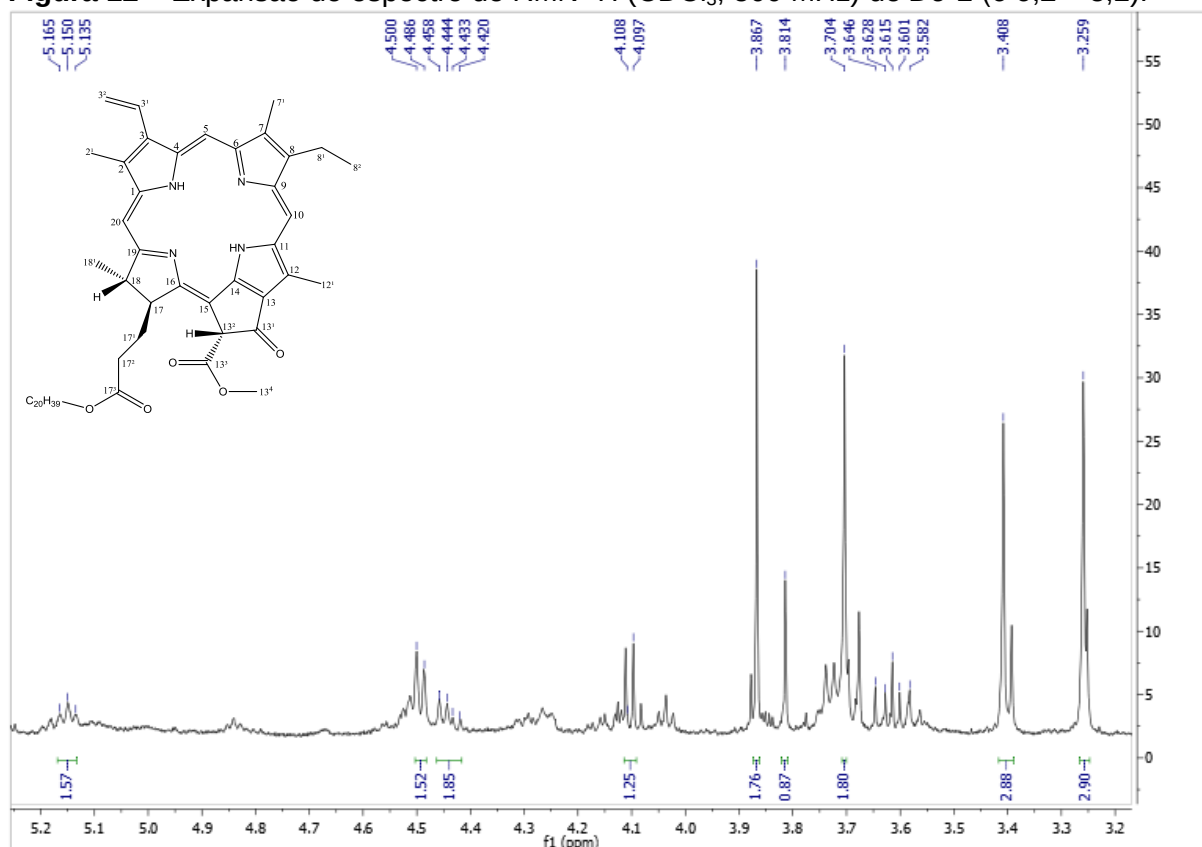


Figura 13 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De-2* (δ 0,72 – 0,85).

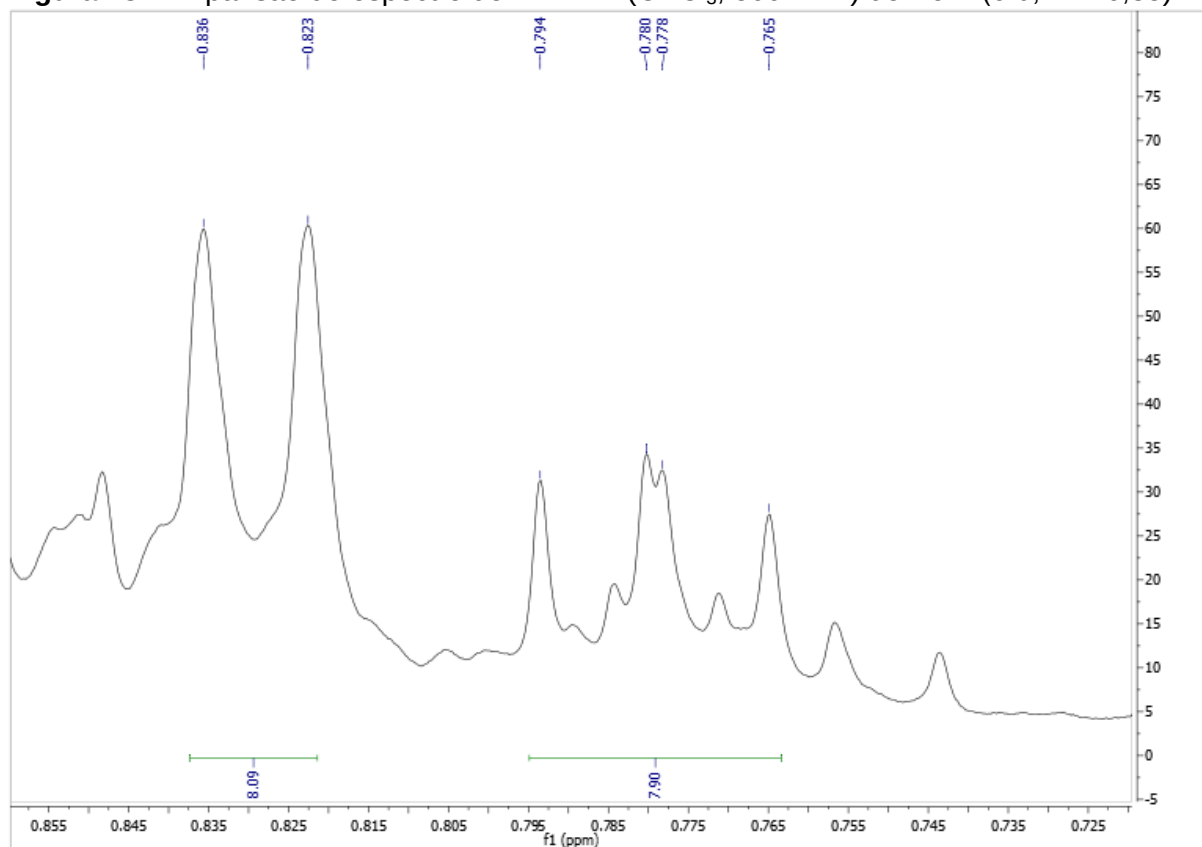
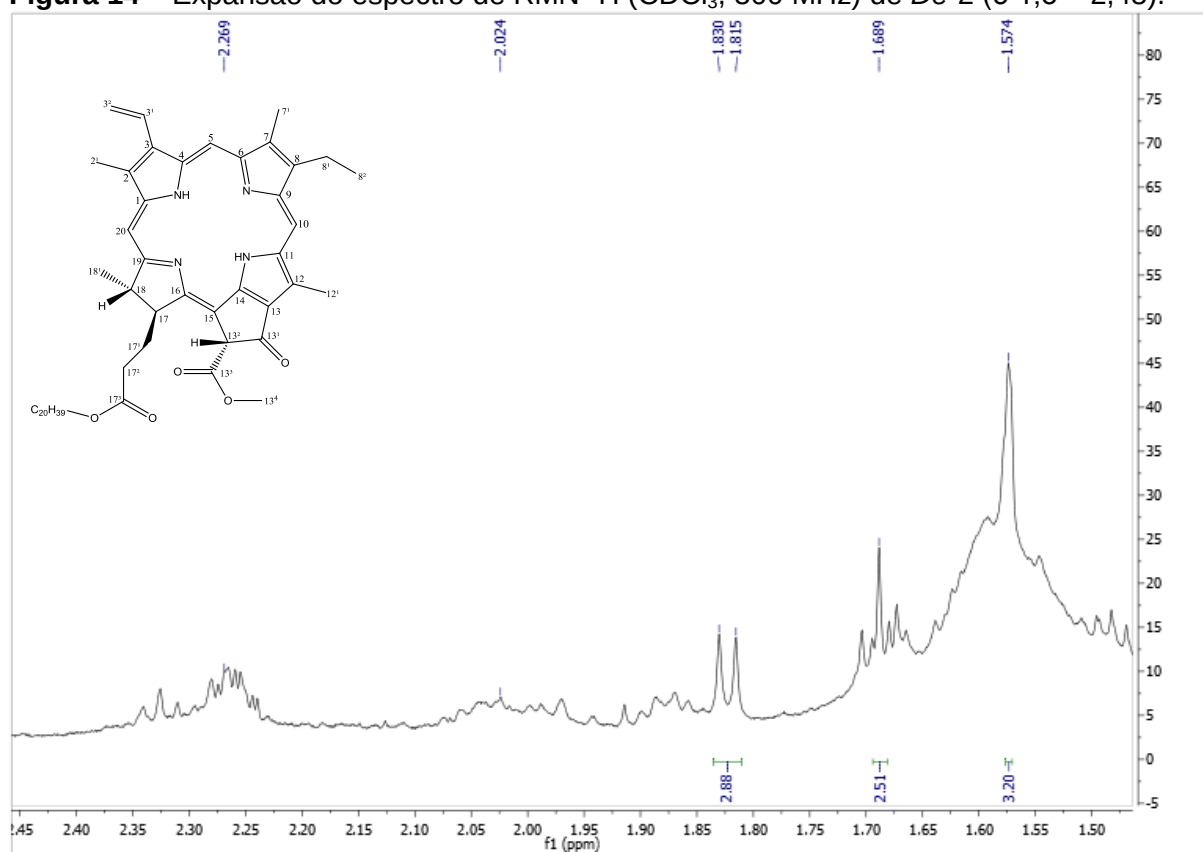


Figura 14 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De-2* (δ 1,5 – 2,45).



5.4 Identificação estrutural de substâncias com esqueletos terpênicos

5.4.1 Identificação estrutural do *De-3*

O espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) de *De-3* (Figura 18) apresentou 20 sinais, compatíveis com um diterpeno alifático, semelhantes aos da cadeia fitílica de *De-2*.

Características físico-químicas de <i>De-3</i>	
Estado físico	Sólido
Forma/cor	Amorfo branco
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	18 mg / 0,12%

Nas expansões dos espectros de RMN ^{13}C (Figuras 19 e 20) o sinal metilênico em δ_{C} 59,4 sugeriu a presença de um carbono oxigenado e os sinais em δ_{C} 140,2 e 123,1 foram compatíveis com a unidade ofelínica presente na cadeia diterpênica, além de cinco sinais metílicos em δ_{C} 22,7, 22,6, 19,7, 19,7 e 16,1 característicos da cadeia fitílica (ALARIF et al., 2010).

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 15), foi observado um conjunto de sinais de alta multiplicidade em δ_{H} 0,81–2,00 provenientes de hidrogênios CH , CH_2 e CH_3 alifáticos. O dubleto em δ_{H} 4,13 ($J = 7$ Hz, 2H) corrobora com a presença de um hidrogênio oximetilênico em H-1 e o tripleto de quarteto em δ_{H} 5,38 (tq, $J = 7$; 2,5 e 1,0 Hz, 1H) acoplando *cis*, confirma a presença de unidade olefínica em H-2 e H-3 (HUANG et al., 2007; JERZ et al., 2007).

A compilação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de *De-3* em comparações com modelo da literatura (Tabela 5) (MELOS et al., 2007) permitiram concluir que *De-3* trata-se do diterpeno acíclico fitol.

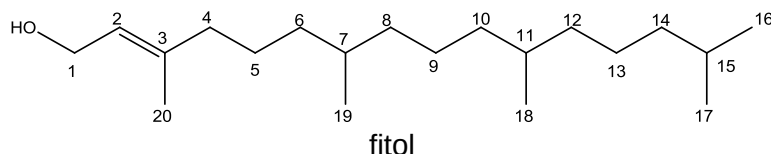


Tabela 5 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *De-3* em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e do fitol em CDCl_3 , segundo Melos et al. (2007).

C	<i>De-3</i>	Mo	<i>De-3</i>	Mo
	δ_{C}		δ_{H}	
1	59,4	59,4	4,13 (d, $J = 7$ Hz, 2H)	4,12 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H)
2	123,1	123,1	5,38 (tq, $J = 7,0$; 2,5 e 1,0 Hz, 1H)	5,36 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H)
3	140,2	140,1	-	-
4	39,8	39,8	1,97 (m, 2H)	1,94 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H)
5	25,1	25,1	-	-
6	36,6	36,6	-	-
7	32,8	32,7	-	-
8	37,3	37,2	-	-
9	24,4	24,5	-	-
10	37,3	37,3	-	-
11	32,7	32,6	-	-
12	37,4	37,3	-	-
13	24,7	24,7	-	-
14	39,3	39,3	-	-
15	27,9	27,9	-	-
16	22,7	22,7	-	-
17	22,6	22,6	-	-
18	19,7	19,7	-	-
19	19,7	19,7	-	-
20	16,1	16,1	1,64 (s, 3H)	1,64 (s; 3H)
OH	-	-	9,96	-

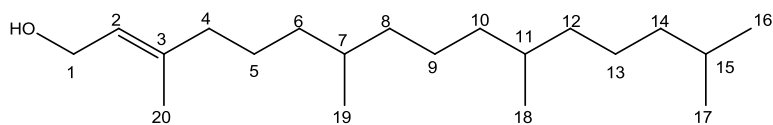


Figura 15 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De-3*.

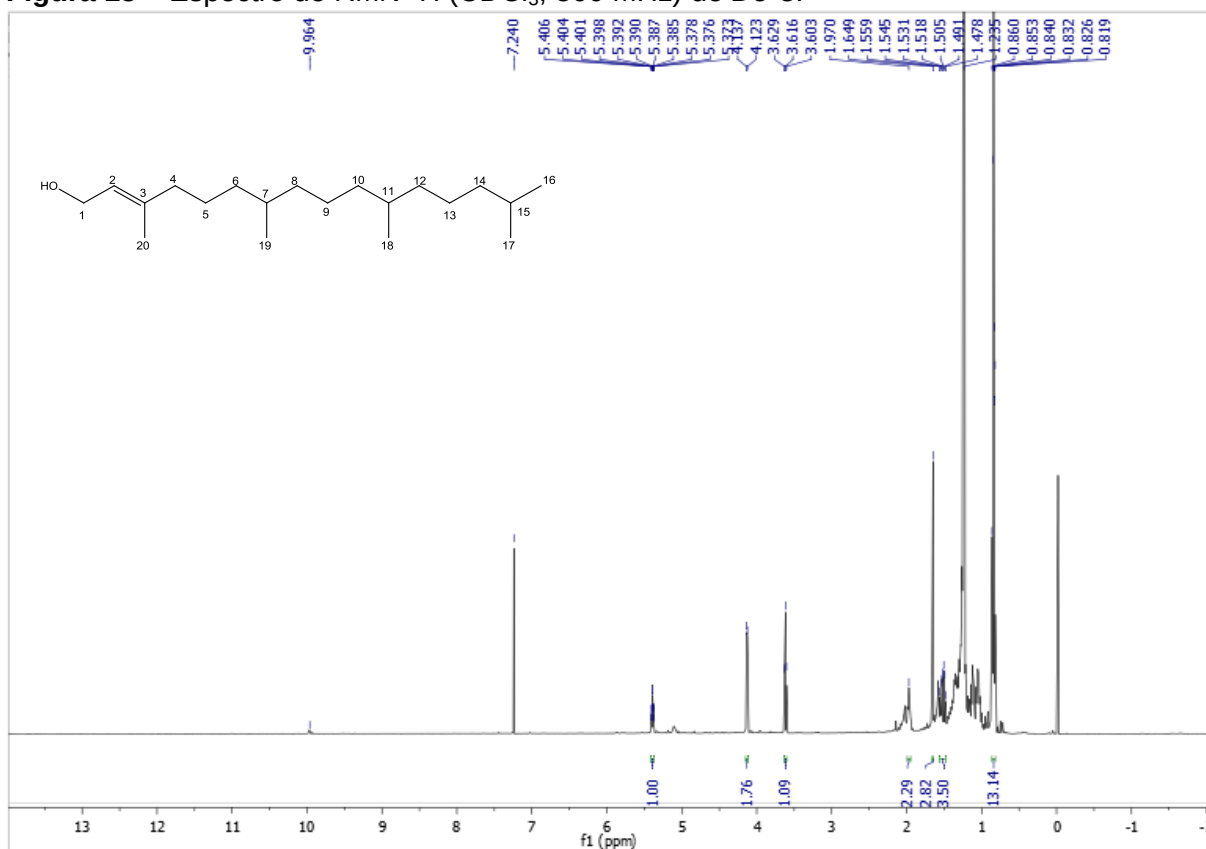


Figura 16 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De-3* (δ 5,36 – 5,44) e (δ 4,11 – 4,15).

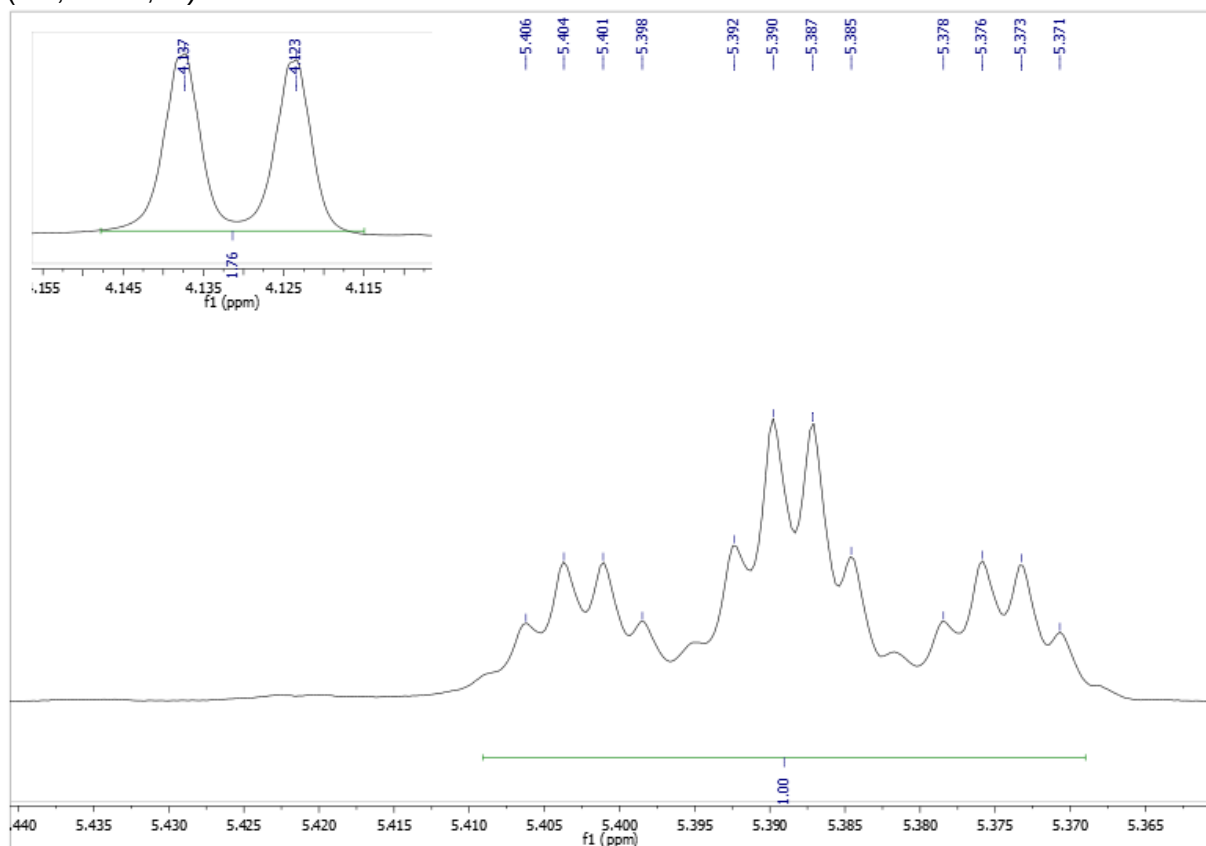


Figura 17 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De-3* (δ 0,8 – 1,7).

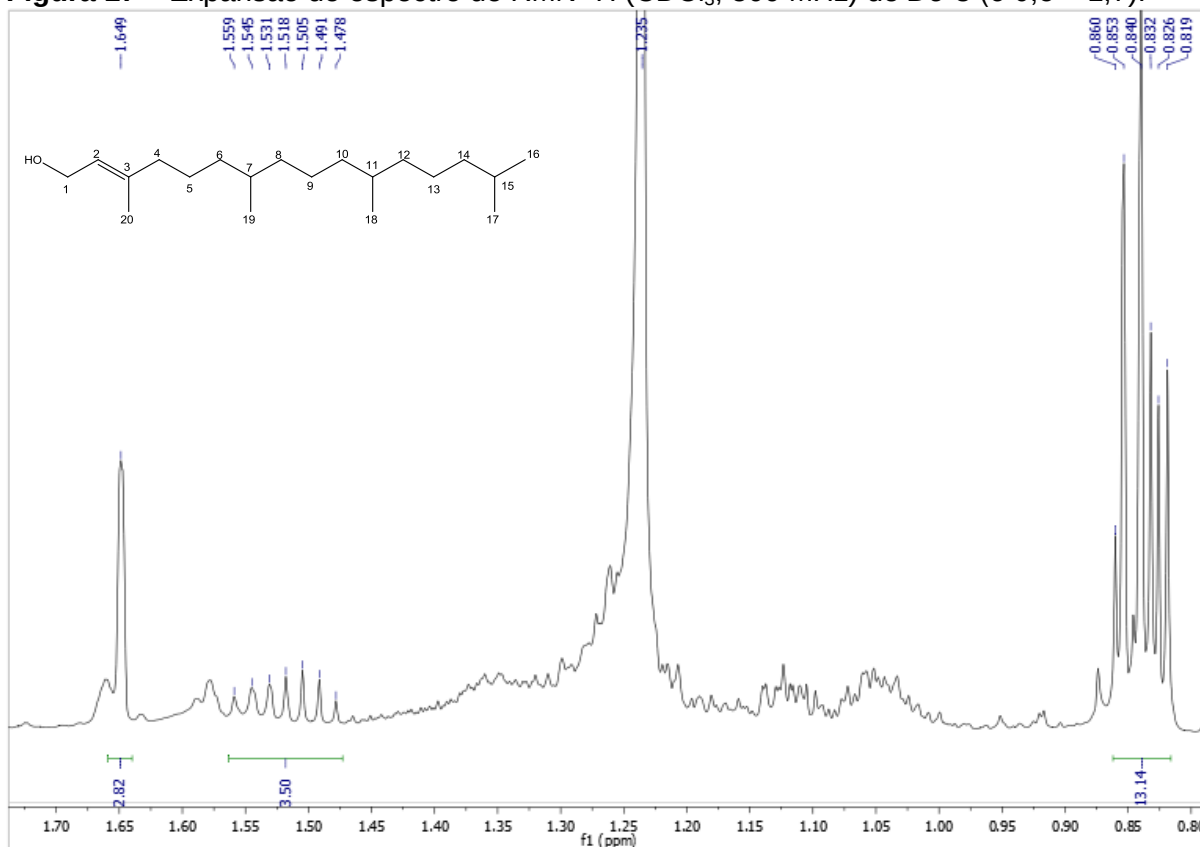


Figura 18 – Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *De-3*.

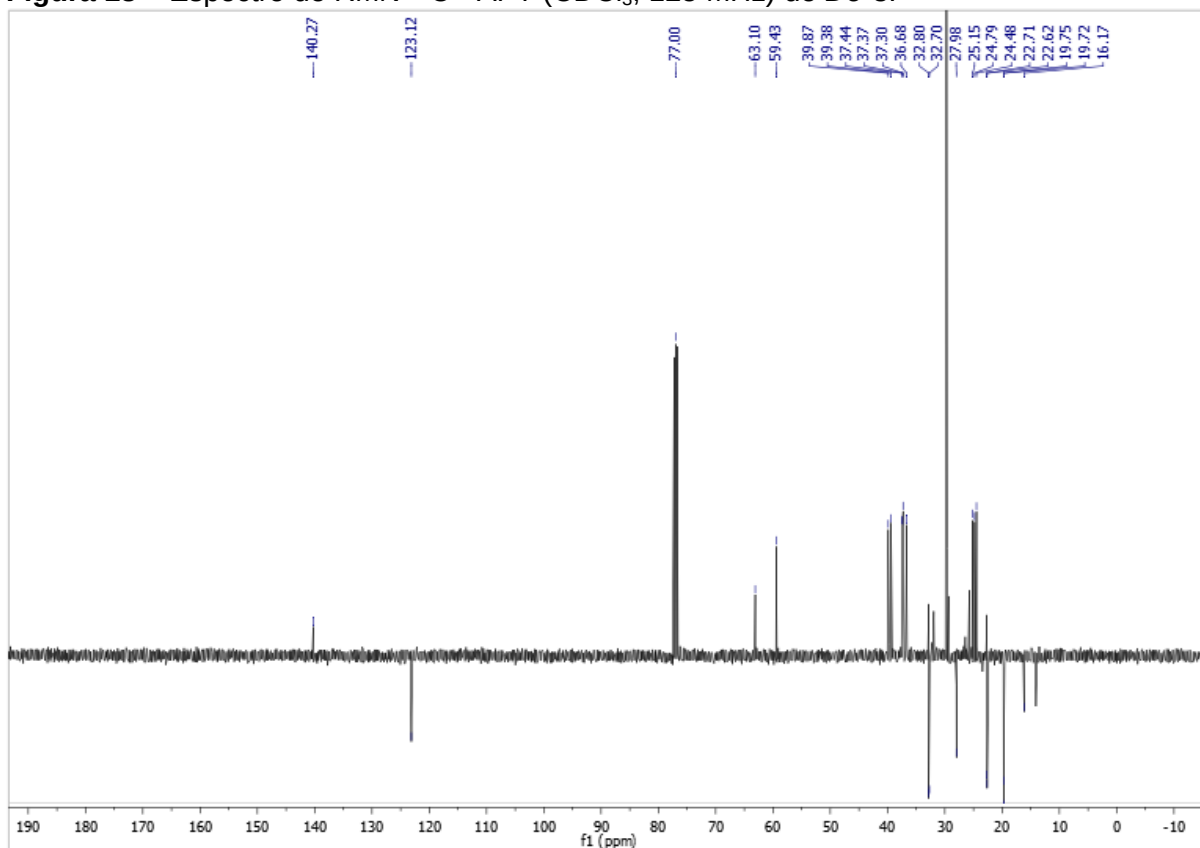


Figura 19 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *De*-3 (δ 31– 41).

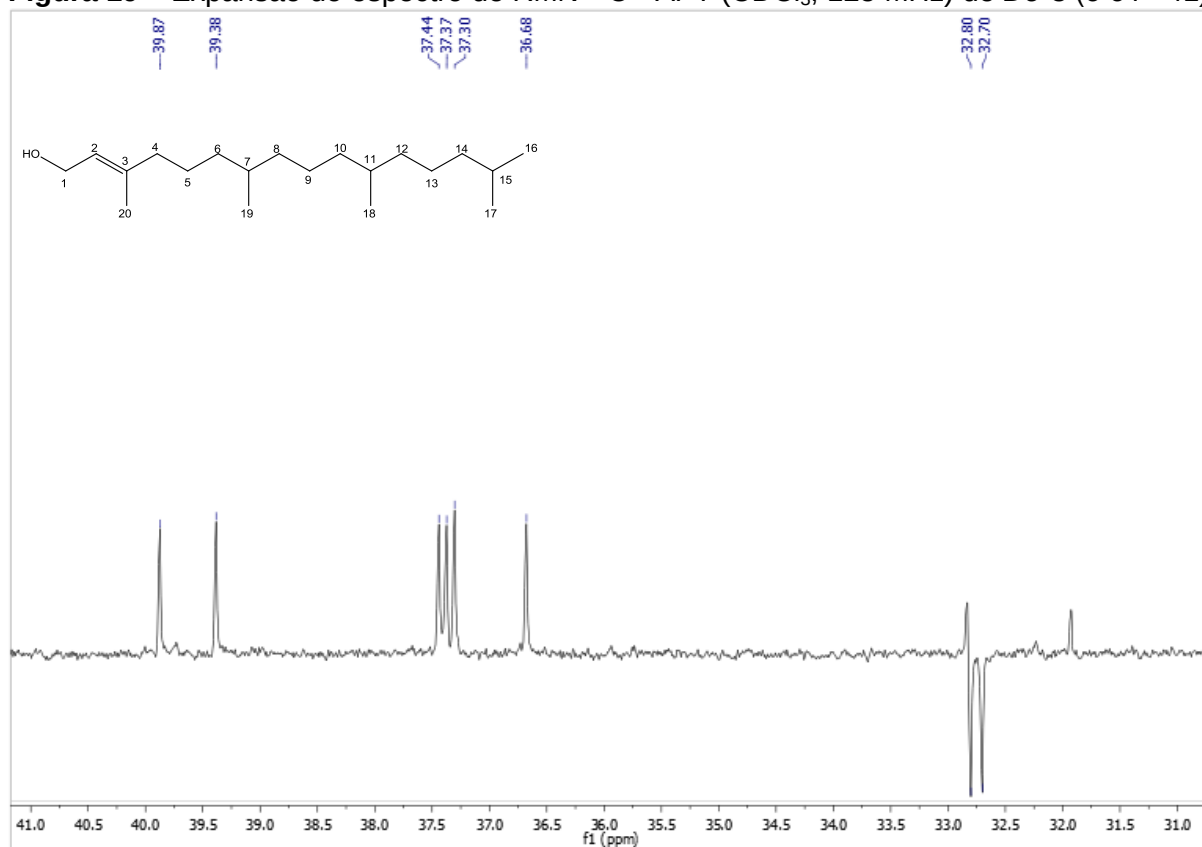
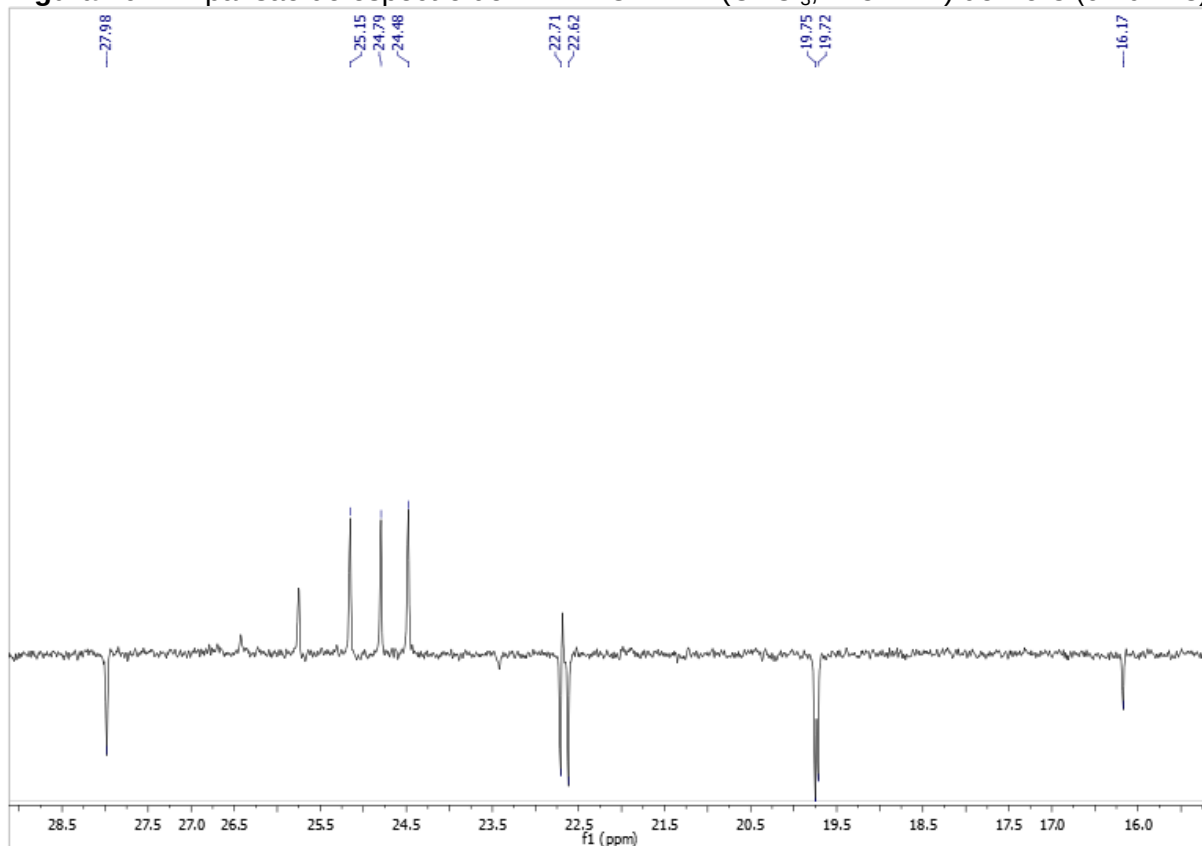


Figura 20 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *De*-3 (δ 16– 28).



5.4.2 Identificação estrutural de *De-4*

A substância codificada como *De-4* apresentou no seu espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 21) um conjunto de sinais de alta multiplicidade em δ_{H} 0,74 – 2,3 característicos de substâncias pertencentes a classe dos terpenoides ou esteroides.

Características físico-químicas de <i>De-4</i>	
Estado físico	Sólido
Forma/cor	Amorfo branco
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	15 mg / 0,11%

Todavia, os sinais referentes a sete metilas em δ_{H} 0,74 (3H), 0,82 (6H, d, $J = 1,6$ Hz), 0,86 (3H), 0,95 (6H) e 0,97 (3H), além de um singlete característico de metila de acetato em δ_{H} 2,02, foram compatíveis com uma estrutura triterpênica acetilada (Figura 22).

O singlete em δ_{H} 5,15 sugere a presença de hidrogênio olefínico. Um tripleto em δ_{H} 4,45 ($J = 8,0$ Hz) pode ser atribuído a um hidrogênio oximetínico (Figura 22), sinal que sugere a presença de um grupo acetato na posição C-3, visto que, quando o substituinte em C-3 é uma hidroxila o H-3 absorve em torno de δ_{H} 3,20 – 3,60 (AGETA et al., 1995).

Um total de 30 sinais, observados no espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, CDCl_3) (Figura 23), corroborou com a proposta do espectro de RMN ^1H de que *De-4* seria um triterpeno (SIMÕES et al., 2010).

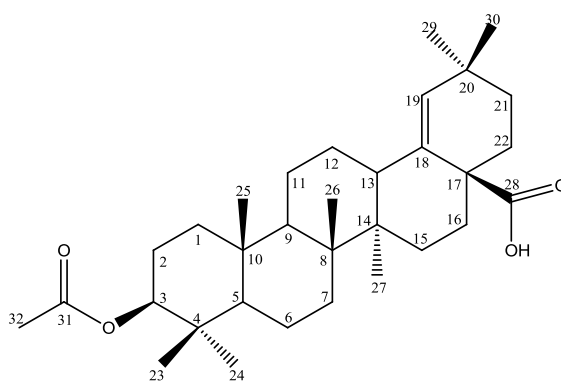
A presença do grupo acetato na posição C-3, sugerida pelo espectro de RMN ^1H (Figura 23), foi fortalecida no espectro de RMN ^{13}C pelo sinal em δ_{C} 80,9, pois quando o C-3 possui como substituinte o grupo OH, sua absorção ocorre abaixo de δ_{C} 79,0. Outros sinais que fortalecem essa sugestão são δ_{C} 171,1 atribuído a C=O de grupo acetato e δ_{C} 21,3 condizente com metila ligada à carbonila de éster (SIMÕES et al., 2010).

Um sinal em δ_{C} 180,8 referente à carbonila de ácido levantou a hipótese de que o C-28 seria substituído por um grupo ácido e não por uma metila. Essa hipótese foi fortalecida pela desproteção sofrida pelo C-17 que absorveu em δ_{C} 47,9. Quando o substituinte em C-17 é um grupo metila, este absorve em aproximadamente δ_{C} 35,0 (TELES et al., 2014)

Sabendo-se que os sinais olefínicos da substância *De-4* foram δ_{C} 136,7 e 133,3, para carbono não hydrogenado e carbono metínico respectivamente, e que o

C-17 encontrava-se substituído por um grupo ácido, os sinais foram condizentes com carbonos olefinicos (C-18 e C-19), de esqueleto triterpênico do tipo 18,19-oleanano (GONZÁLEZ et al., 1981).

Sendo assim, os espectros de RMN ^1H e ^{13}C e comparações com dados da literatura (Tabela 6) permitiram identificar *De-4* como o 3-acetoxi-olean-18-en-28-oico, conhecido também como acetato de ácido morolique, relatado pela primeira vez no gênero *Dalbergia*.



3-acetoxi-olean-18-en-28-oico

Tabela 6 – Dados de RMN ^{13}C de *De-4* em CDCl_3 (50 MHz) e de RMN ^{13}C do 3-acetoxi-olean-18-en-28-oico em CDCl_3 , segundo González et al. (1981).

C	<i>De-4</i>	Mo
	δ_c	
1	38,5	38,7
2	23,6	23,7
3	80,9	81,0
4	37,7	37,9
5	55,5	55,7
6	18,0	18,2
7	34,4	34,5
8	40,6	40,8
9	51,0	51,2
10	37,1	37,2
11	20,9	21,0
12	25,9	26,0
13	41,3	41,3
14	42,5	42,7
15	29,3	29,4
16	33,5	33,5
17	47,9	48,0
18	136,7	136,7
19	133,3	133,1
20	32,0	32,1
21	33,4	33,5
22	33,3	33,5
23	27,9	28,0
24	16,5	16,5
25	15,9	16,0
26	16,7	16,7
27	14,8	14,9
28	180,8	182,8
29	30,3	30,3
30	29,0	29,1
31	171,1	171,9
32	21,3	21,6

Figura 21 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de De-4.

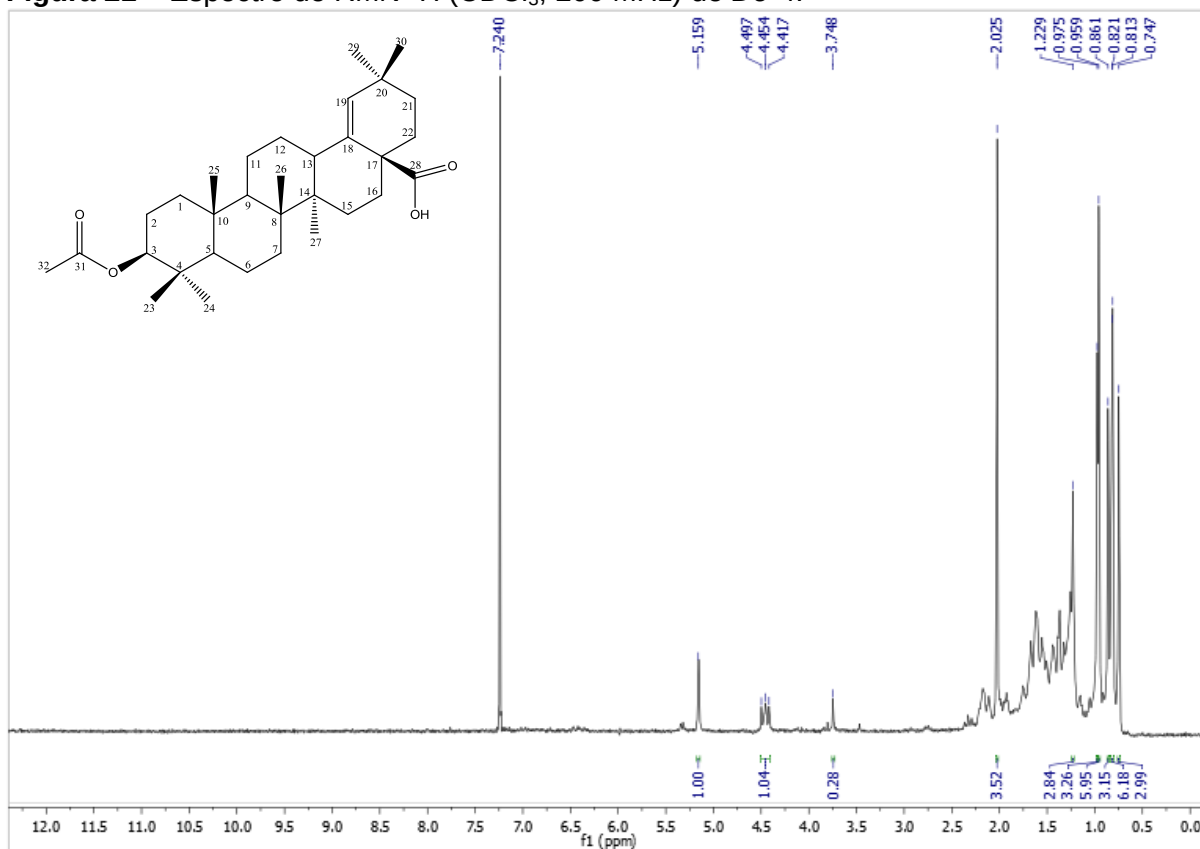


Figura 22 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de De-4 (δ 0,7 – 2,8) e (δ 3,6 – 5,4).

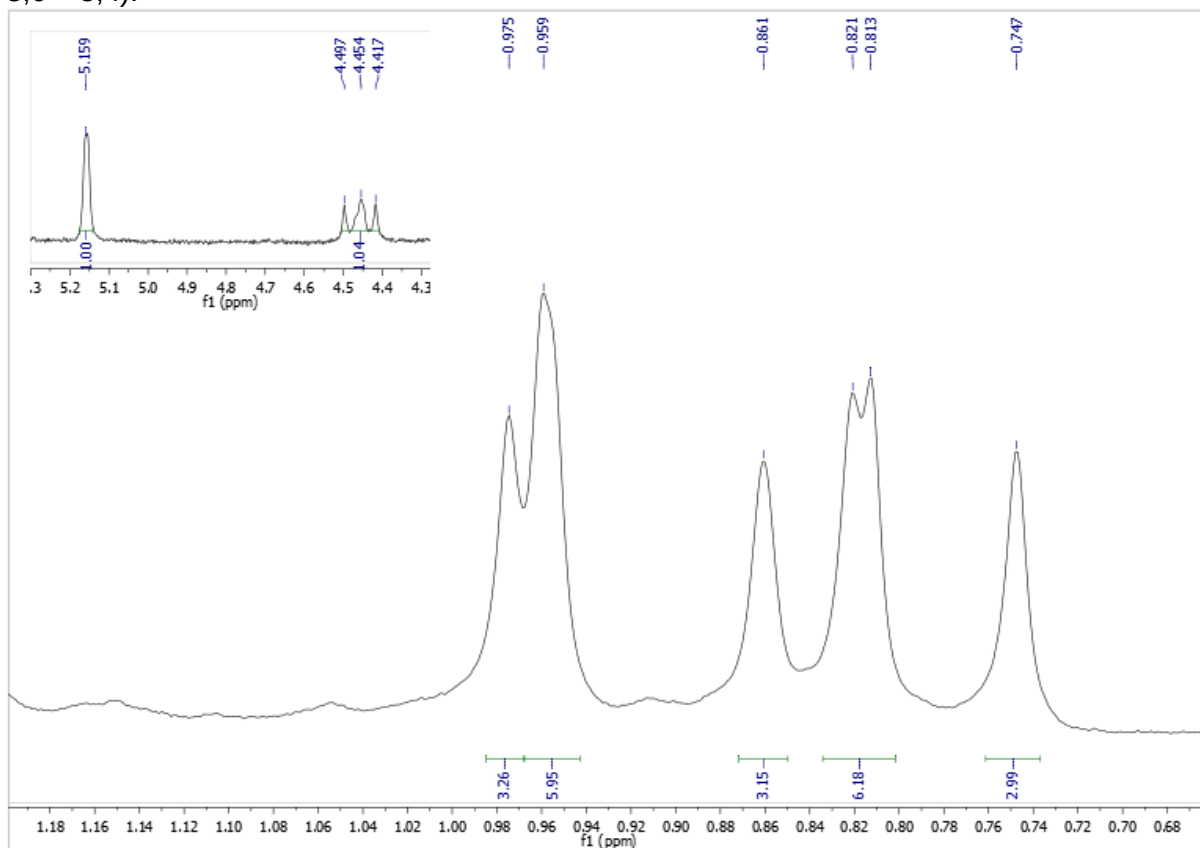


Figura 23 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de De-4.

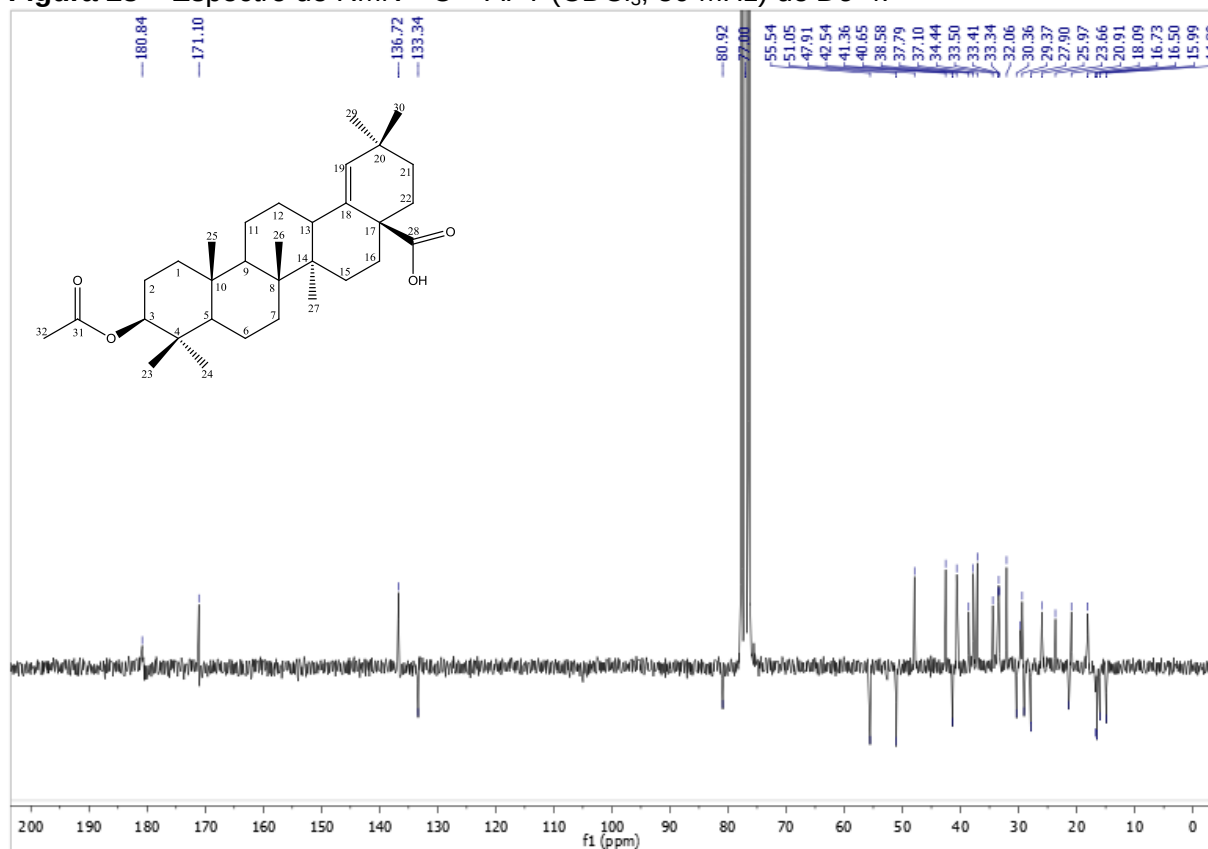
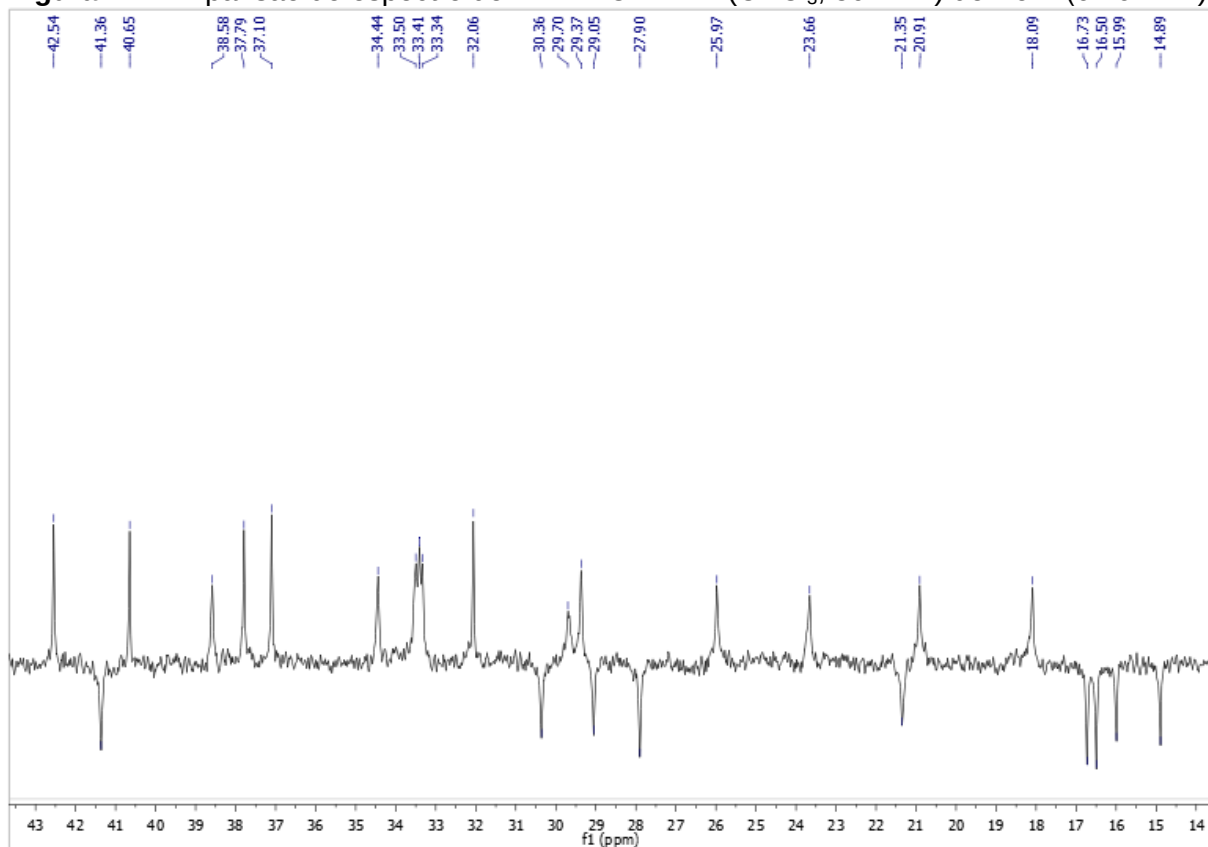


Figura 24 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de De-4 (δ 13 – 44).



5.4.3 Identificação estrutural de De-5

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 25) da substância denominada como De-5, observou-se a presença de um envelope de sinais entre δ_{H} 0,76 – 1,82 característicos de absorções de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos de esqueleto terpênico ou esteroidal (BROWN et al., 2003).

Características físico-químicas de De-5	
Estado físico	Sólido
Forma/cor	Cristal branco
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	66 mg / 0,51%

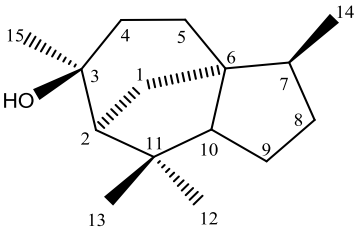
Na expansão do espectro de RMN ^1H (Figura 26) foi visto a presença de três singletos em δ_{H} 1,24; 1,18 e 0,92, cada um deles integrando para 3H, além de um dubleto em δ_{H} 0,77 (3H, $J = 7,5$ Hz), confirmando a presença de quatro metilas (BROWN et al., 2003).

O espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) (Figura 27) apresentou 15 sinais, compatíveis com terpenoides do tipo sesquiterpeno. Dentre eles, três para carbonos não hidrogenados (δ_{C} 43,2; 53,9 e 74,9), sendo o último característico de carbono oxigenado; três metínicos (δ_{C} 41,3; 56,4 e 60,8); cinco metilênicos (δ_{C} 25,2; 31,4; 35,1; 36,9 e 41,8) e quatro metílicos (δ_{C} 15,4; 27,5; 28,8 e 30,1) (CHENG et al., 2012).

Esses dados indicam a fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$, compatível com 3 graus de insaturação. Como não há carbonos olefínicos no espectro de De-5, a substância deve ser tricíclica.

A análise dos espectros HMQC e HMBC (Figura 27 e 28), mostrou que os grupos metila em δ_{H} 0,92 e 1,24 estavam ligados ao carbono não hidrogenado em δ_{C} 43,2 e apresentavam correlação a ^3J com o carbono metínico em δ_{C} 60,8 e a metila em δ_{H} 1,18 ligada ao carbono não hidrogenado oxigenado em δ_{C} 74,9 também apresentou correlação a ^3J com o carbono metínico em δ_{C} 60,8. Todavia a metila em δ_{H} 0,77 ligada ao carbono metínico em δ_{C} 41,3 mostrou correlação a ^3J com o carbono não hidrogenado em δ_{C} 53,9.

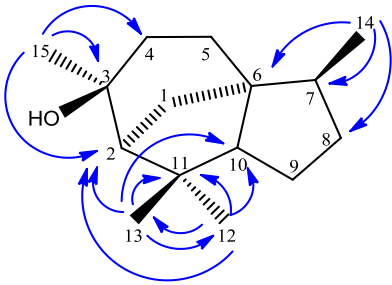
Logo, os deslocamentos químicos atribuídos juntamente com a compilação dos dados espectrais e modelos da literatura (Tabela 7), permitiram identificar De-5 como o sesquiterpeno cedrol, isolado pela primeira vez na espécie em estudo.



cedrol

Tabela 7 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *De-5* em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais e do cedrol em CDCl_3 , segundo Cheng et al. (2012).

C	<i>De-5</i>	Mo	<i>De-5</i>	Mo	HMBC	
	δ_{C}		δ_{H}		$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	41,8	42,0	1,65 – 1,36	-	-	-
2	60,8	61,0	1,58	-	-	-
3	74,9	75,1	-	-	-	-
4	35,1	35,4	1,78	-	-	-
5	31,4	31,6	1,38	-	-	-
6	53,9	54,1	-	-	-	-
7	41,3	41,5	1,69	-	-	-
8	36,9	37,0	1,88 – 1,29	-	-	-
9	25,2	25,4	1,34 – 1,37	-	-	-
10	56,4	56,5	1,80	-	-	-
11	43,2	43,4	-	-	-	-
12	28,8	28,9	0,92 (3H, s)	0,97 (3H, d)	C11	C2, C10, C13
13	27,5	27,3	1,24 (3H, s)	1,30 (3H, s)	C11	C2, C10, C12
14	15,4	15,6	0,77 (3H, d, $J = 7,5$)	0,81 (3H, d, $J = 7,2$)	C7	C6, C8
15	30,1	30,2	1,18 (3H, s)	1,24 (3H, s)	C3	C2, C4



Correlações de HMBC

Figura 25 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De*-5.

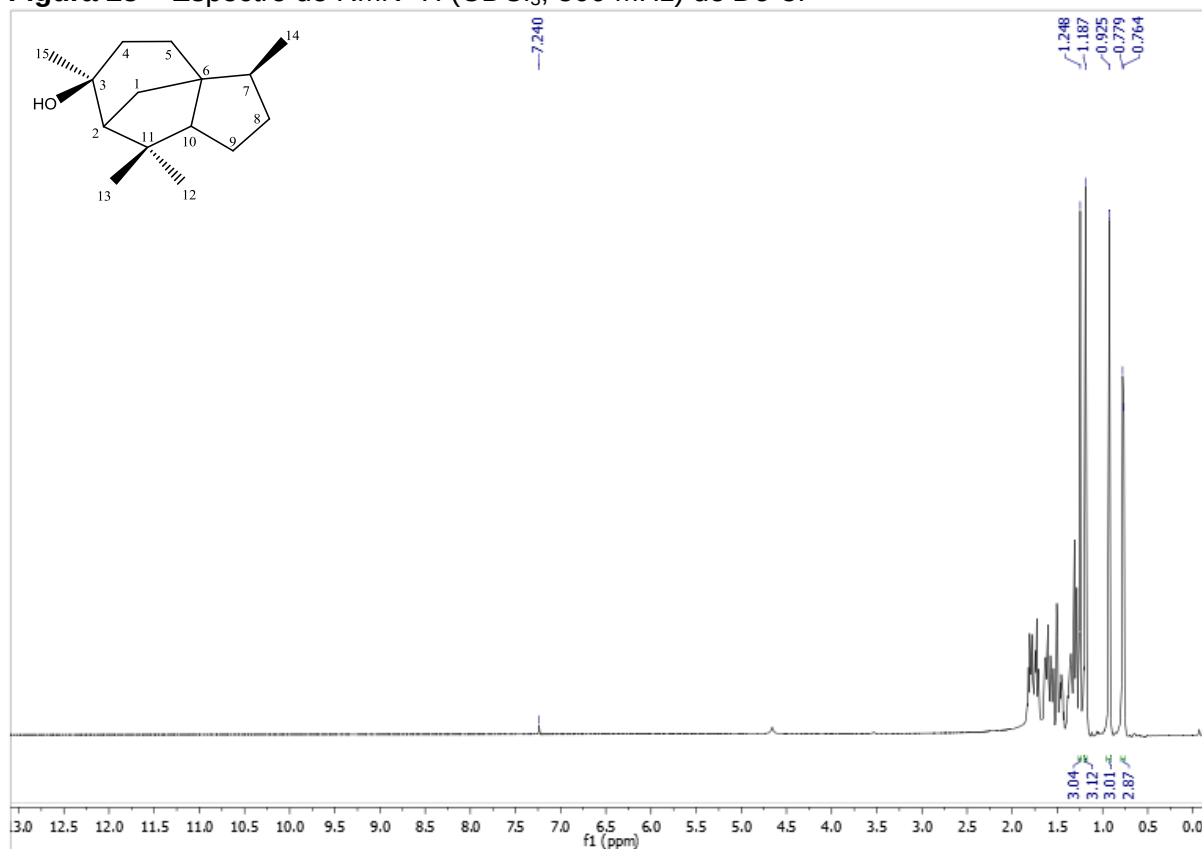


Figura 26 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De*-5 (δ 0,7 – 2,0).

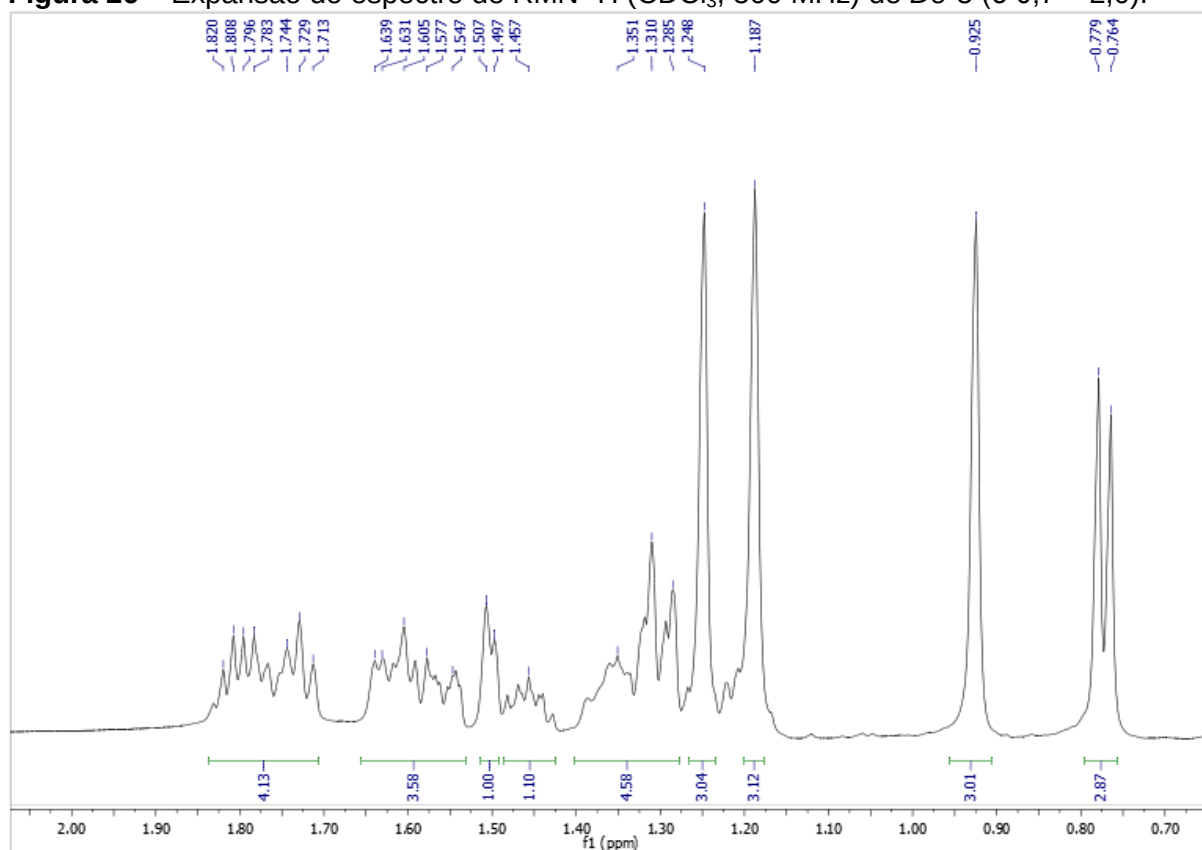


Figura 27 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de De-5.

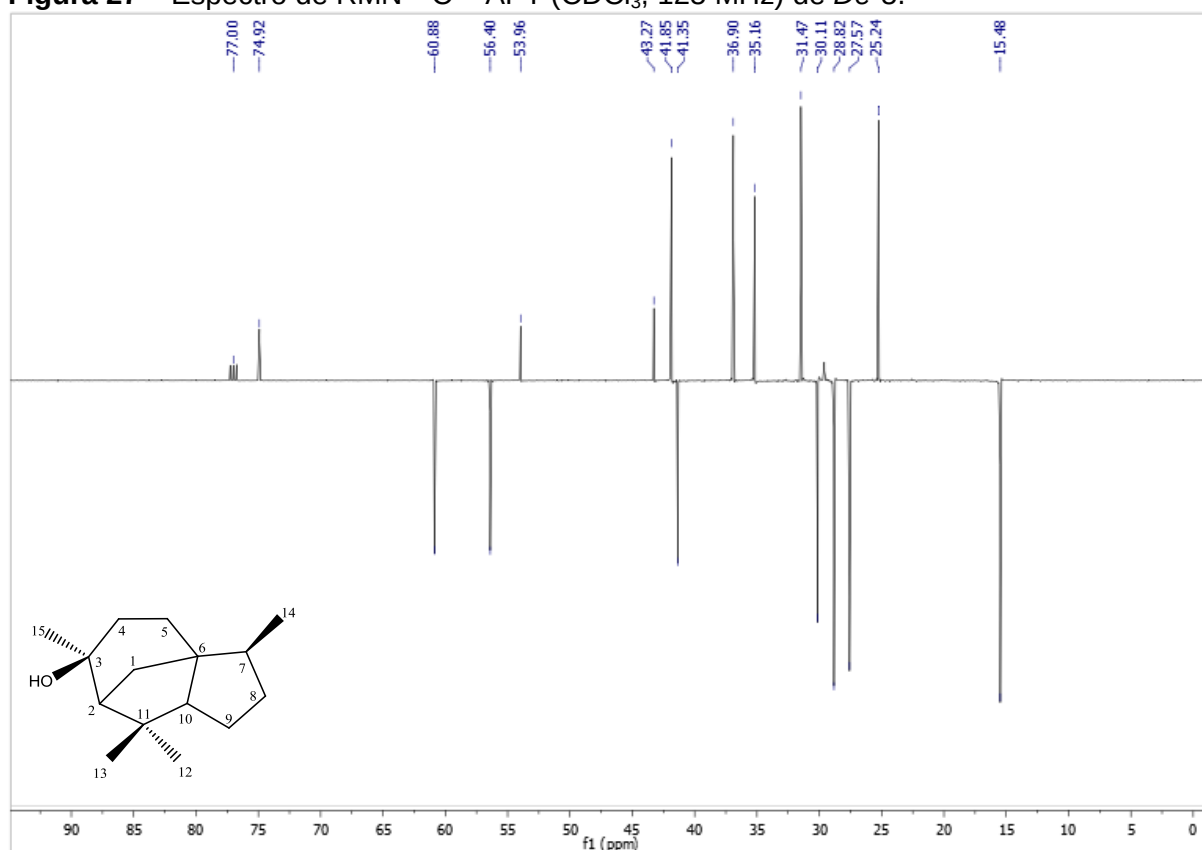


Figura 28 – Expansão do mapa de contorno ^1H x ^{13}C HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de De-5 na região de (0,0 – 2,1) x (12 – 44).

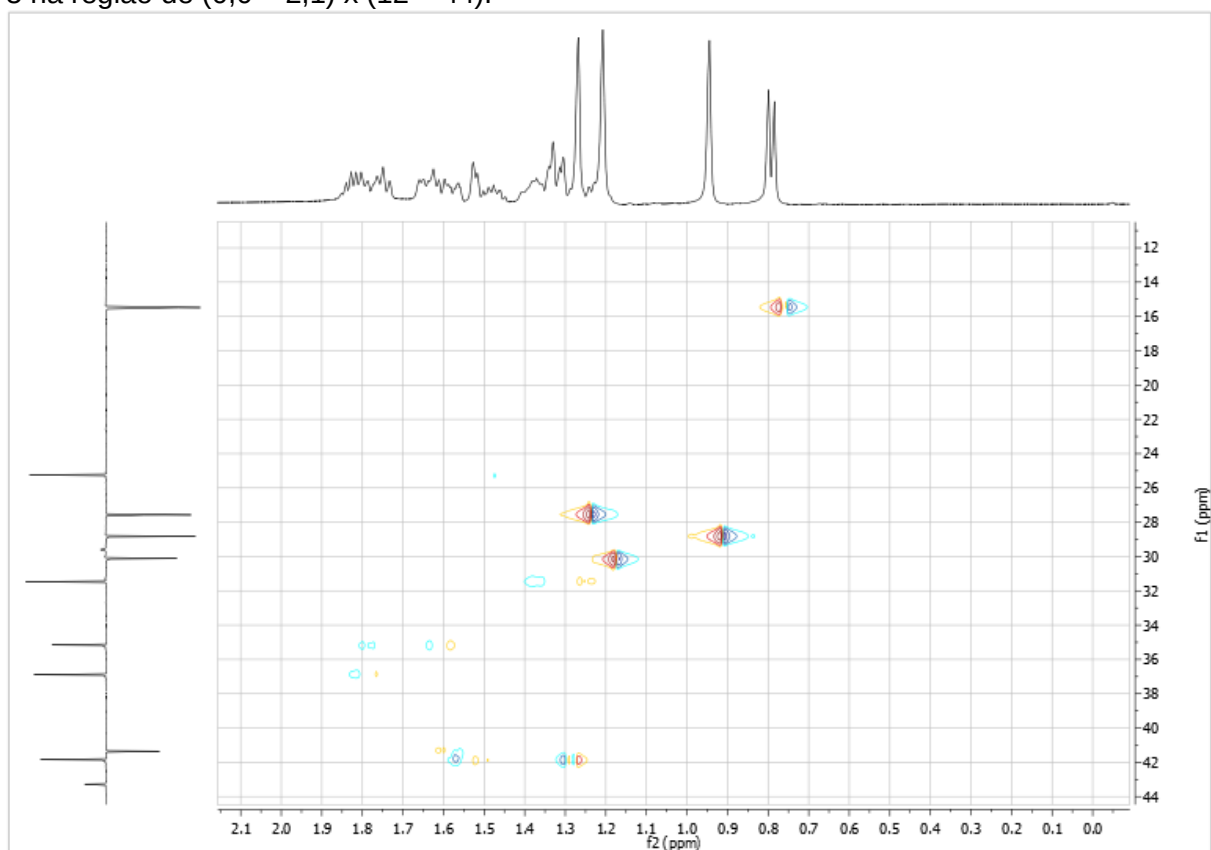
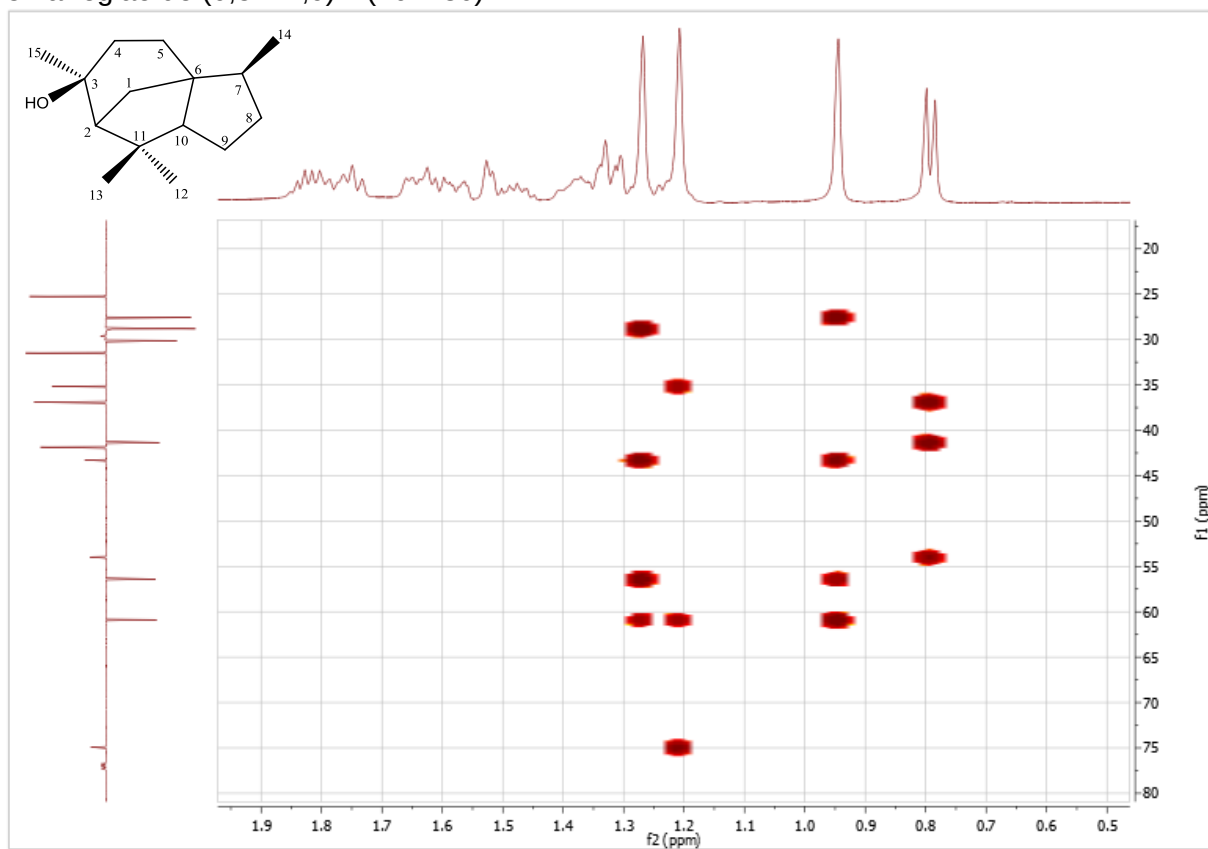


Figura 29 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de De-5 na região de (0,5 – 1,9) x (20 – 80).



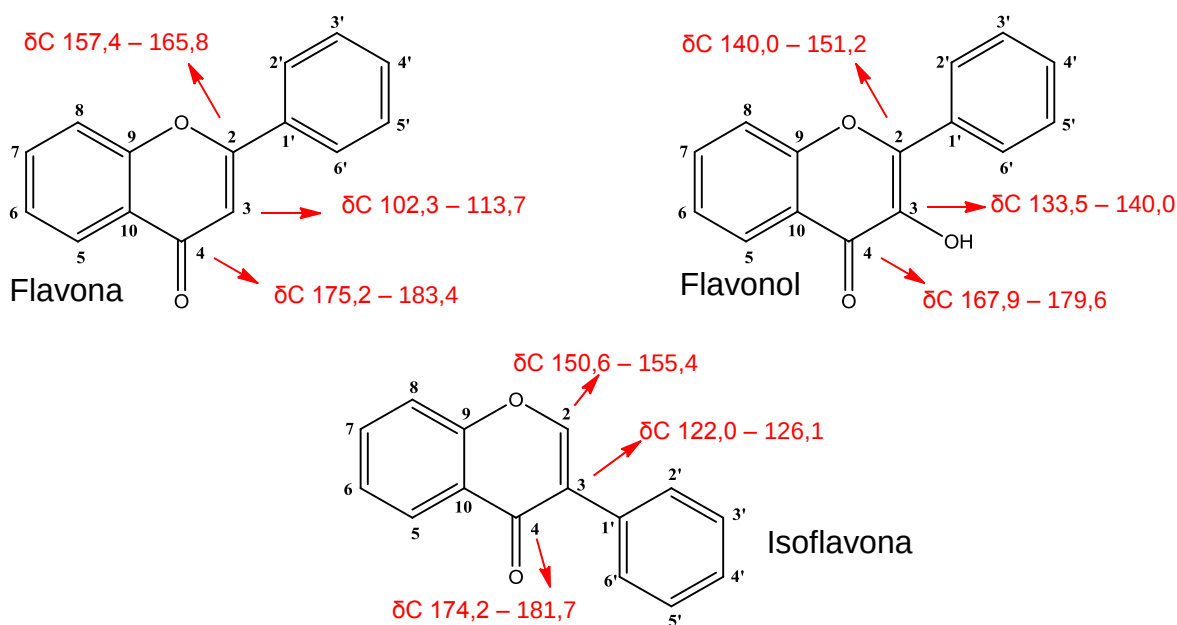
5.5 Identificação estrutural de esqueleto flavonoidico

5.5.1 Identificação estrutural de De-6

O espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, DMSO) (Figura 32) e suas expansões apresentaram 14 sinais, sendo 13 para carbonos sp^2 que são compatíveis com a unidade $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ característica de flavonoides e 1

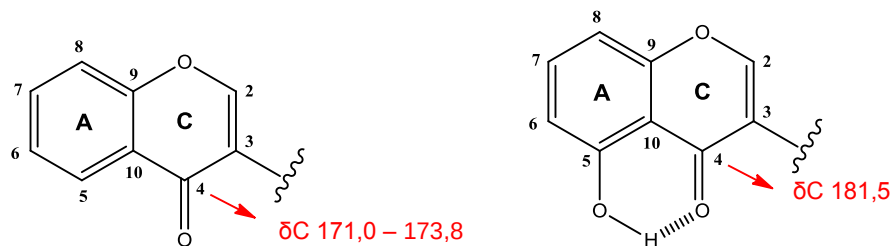
característico de metoxila (ALBUQUERQUE et al., 2007). O tipo de flavonoide foi determinado por análise dos dados de RMN ^{13}C para diferentes flavonoides compilados por Agrawal (1989) e Pelter et al. (1976) conforme mostrado abaixo:

Características físico-químicas de De-6	
Estado físico	Sólido
Forma/cor	Pó amarelo
Solubilidade	CH_3OH
Massa/Rendimento	108 mg / 0,27%



Os sinais para carbonos sp^2 em δ_{C} 153,1 e 124,2 sugeriram a presença de dupla ligação entre C-2 e C-3, respectivamente, bem como o sinal em δ_{C} 174,6 para carbonila em C-4, indicaram que o flavonoide correspondia a uma isoflavona.

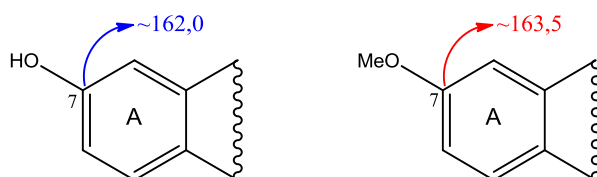
No espectro de RMN ^{13}C (Figura 32), onde apresenta o sinal em δ_{C} 174,6 (C-4), indicativo de carbonila não quelada, sugeriu a ausência de hidroxila em C-5, já que a presença desta força intramolecular desprotegeria a carbonila fazendo-a absorver em aproximadamente δ_{C} 181,5 (AGRAWAL, 1989):

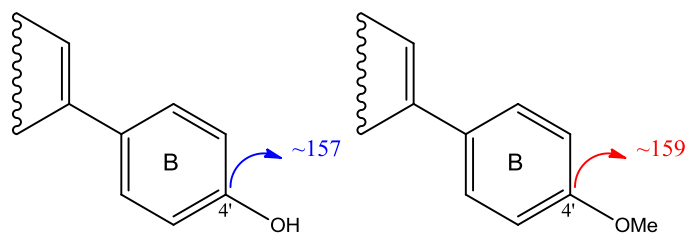


O espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO) (Figura 30) apresentou um singlete em δ_{H} 8,33 característico de H-2 de isoflavonas, corroborando com a proposta dos espectros de RMN ^{13}C .

A expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO) (Figura 31) apresentaram deslocamentos químicos que sugeriram a presença de um esqueleto flavonoídico com o seguinte padrão de substituição: dois dubletos com integral para dois hidrogênios cada, acoplando orto entre si, em δ_{H} 7,50 ($J = 8,8$ Hz) e 6,98 ($J = 9$ Hz) compatíveis com os hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5', respectivamente, do sistema AA'BB' do anel B; e outro dubleto para um hidrogênio, acoplando *orto*, em δ_{H} 7,96 ($J = 8,6$ Hz) com um duplo dubleto em δ_{H} 6,93 ($J = 9,0$ e $2,0$ Hz), e este acoplando *meta* com o dubleto em 6,86 ($J = 2,0$ Hz) característicos de flavonoides que possuem anel A com o sistema ABX, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios H-5, H-6 e H-8, respectivamente.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 32), os sinais para carbonos não hidrogenados oxigenado em δ_{C} 162,6 e 158,9, além da presença do sinal em δ_{C} 55,0, característico de metoxila; corroboraram com a presença de um sistema ABX para o anel A e AA'BB' para o anel B. De acordo com JAH et al., (1980), os carbonos C-7 e C-4' quando substituídos por hidroxila ou metoxila apresentam os deslocamentos mostrados abaixo, sendo assim os carbonos C-7 e C-4' de *De-6* encontram-se substituídos por OH e OMe, respectivamente.





Assim, os espectros de RMN ^1H e ^{13}C e comparações com dados da literatura (Tabela 8) permitiram identificar *De-6* como o isoflavonoide formononetina.

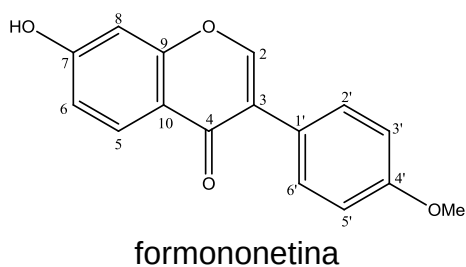


Tabela 8 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *De-6* em DMSO (200 e 50 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C do formononetina em DMSO, segundo Zielinska et al. (2008).

C	Mo	<i>De-6</i>	
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
2	153,1	153,1	8,33 (1H, s)
3	124,2	124,2	-
4	174,6	174,6	-
5	127,2	127,3	7,96 (1H, d, $J = 8,6$ Hz)
6	115,1	115,3	6,93 (1H, dd, $J = 2,4$ e $9,0$ Hz)
7	162,5	162,6	-
8	101,8	102,1	6,86 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
9	157,4	157,4	-
10	116,6	116,6	-
1'	123,1	123,1	-
2'	129,9	130,1	7,50 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)
3'	113,3	113,5	6,98 (2H, d, $J = 9,0$ Hz)
4'	158,8	158,9	-
5'	113,3	113,5	6,98 (2H, d, $J = 9,0$ Hz)
6'	129,9	130,1	7,50 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)
OMe	55,1	55,0	3,78 (3H, s)

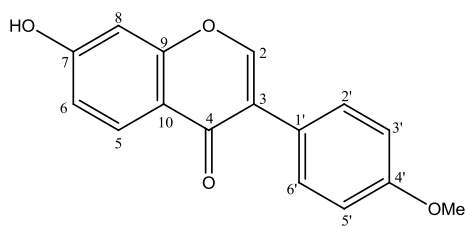


Figura 30 – Espectro de RMN ^1H (DMSO, 200 MHz) de De-6.

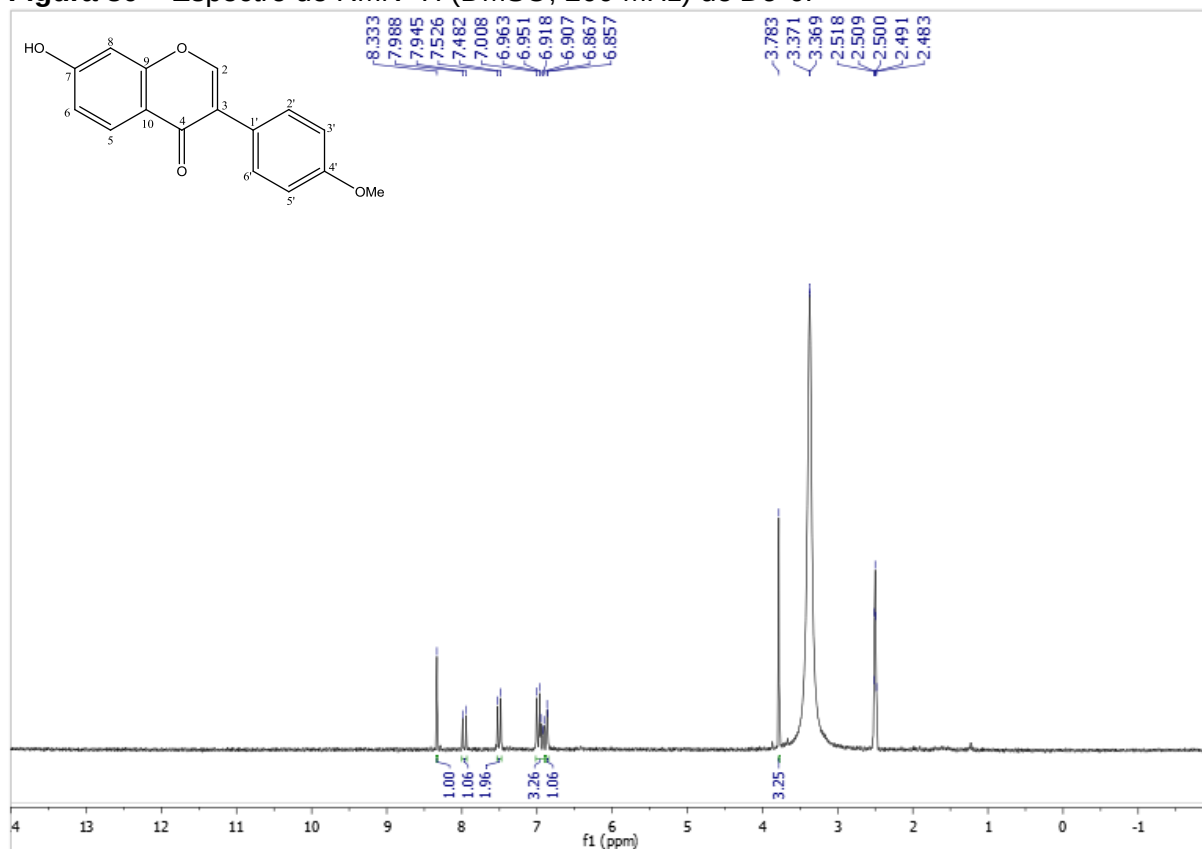


Figura 31 – Expansão do espectro de RMN ^1H (DMSO, 200 MHz) de De-6 (δ 6,7 – 8,5).

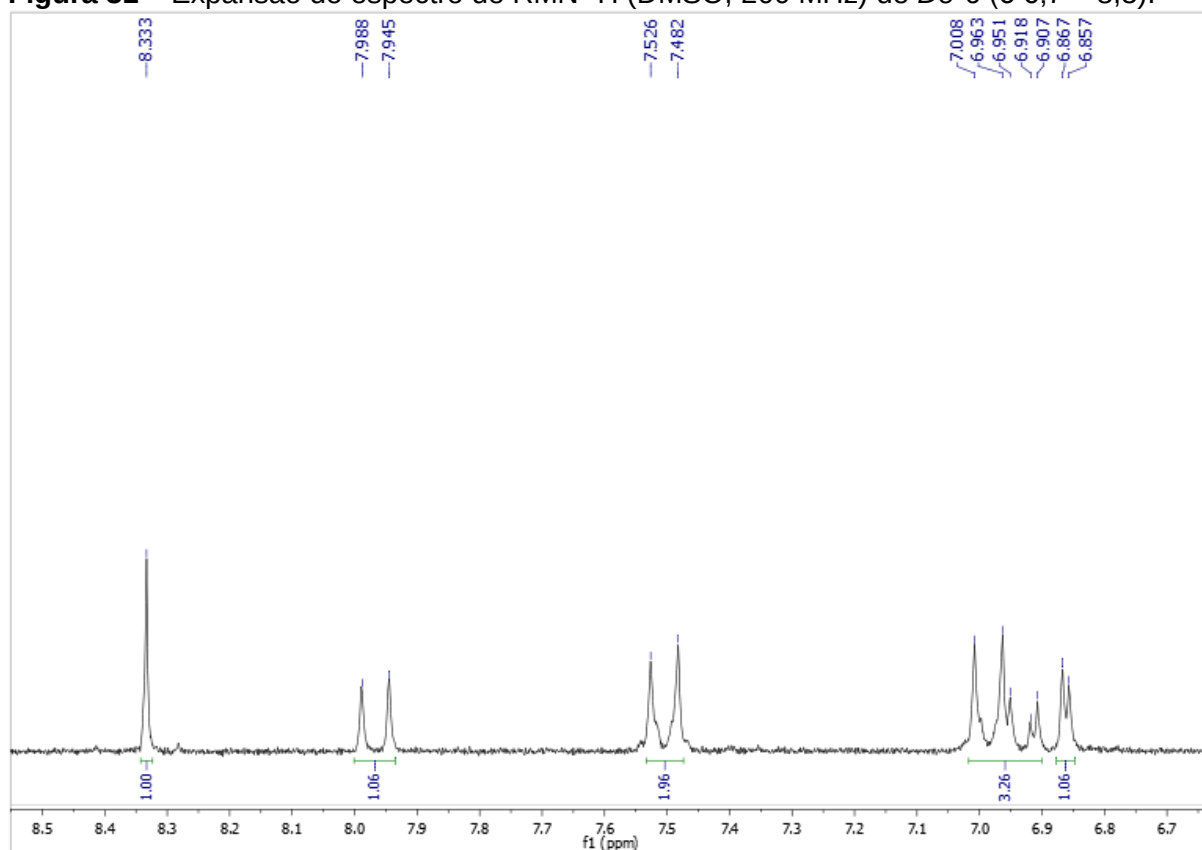
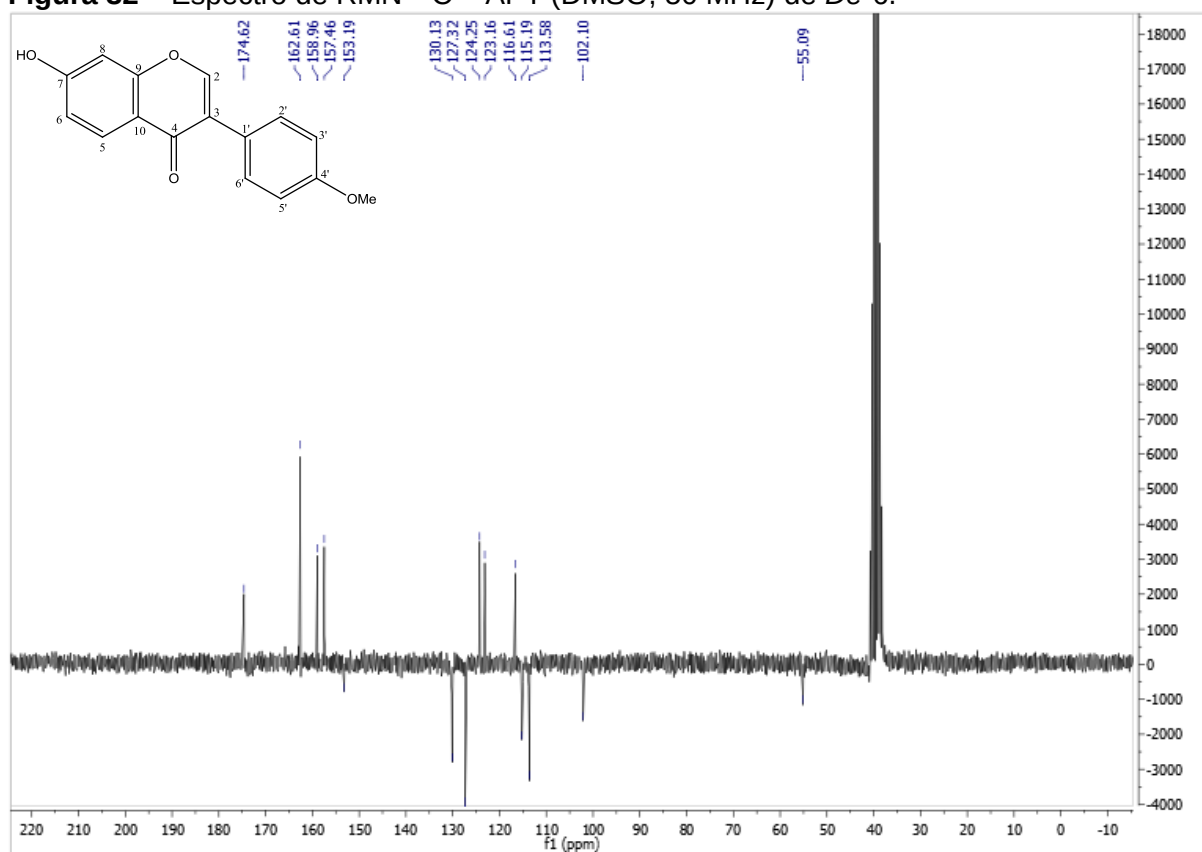


Figura 32 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (DMSO, 50 MHz) de De-6.



5.5.2 Identificação estrutural de *De-7*

O espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, DMSO) (Figura 36) de *De-7* e suas expansões apresentaram 13 sinais para carbonos sp^2 que são compatíveis com a unidade $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ característicos de flavonoides (TANAKA et al., 2014).

Características físico-químicas de <i>De-7</i>	
Estado físico	Sólido
Forma/cor	Pó amarelo
Solubilidade	CH_3OH
Massa/Rendimento	22 mg / 0,05%

Assim como demonstrado em *De-6*, o tipo de flavonoide foi determinado por análise dos dados de RMN ^{13}C , onde o sinal em δ_{C} 175,8 indicativo de carbonila não quelada em C-4, bem como os sinais para carbonos sp^2 em δ_{C} 153,6 e 123,2 sugeriram a presença de dupla ligação entre C-2 e C-3, indicaram que a substância correspondia a um flavonoide do tipo isoflavona.

Ainda foram vistos, sinais para carbonos não hidrogenados oxigenado em δ_{C} 163,4 e 157,5, que sugeriram a presença de substituições em C-7 e C-4', assim como *De-6*, porém de hidroxilas, devido a ausência de sinal em δ_{C} ~55, característico de metoxila.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO) (Figura 33) e suas expansões exibiram deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta do espectro de RMN ^{13}C para a presença de um esqueleto flavonoídico com o mesmo padrão de substituição de *De-6*: anel A com sistema ABX e anel B com sistema AA'BB'. Foi observado um dubleto para um hidrogênio, acoplando *orto* em δ_{H} 7,90 ($J = 8,8$ Hz) com um duplo dubleto em δ_{H} 6,86 (1H, $J = 8,8$ e 2,2 Hz), e este acoplando *meta* com um dubleto em δ_{H} 6,78 (1H, $J = 2,0$ Hz) característicos de flavonoides que possuem anel A 7-substituído, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios H-5, H-6 e H-8, respectivamente (TANAKA et al., 2014).

Na expansão do espectro de RMN ^1H (Figura 34), dois dubletos para dois hidrogênios cada em δ_{H} 7,32 ($J = 8,6$ Hz) e δ_{H} 6,75 ($J = 8,8$ Hz), acoplavam *orto* entre si, compatíveis com os hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5' respectivamente, do anel B 4'-substituído. O singlete em δ_{H} 8,29, característico de H-2, confirmou que o flavonoide se tratava de uma isoflavona.

A análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C citados por Tanaka et al. (2014) permitiu atribuir os demais sinais apresentados por *De-7* (Tabela 9), identificando-o assim como daidzeína.

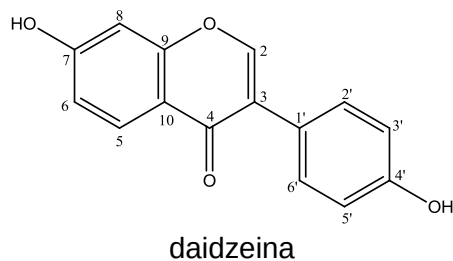


Tabela 9 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *De-7* em DMSO (200 e 50 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C do daidzeina em DMSO, segundo Tanaka et al. (2014).

C	<i>De-7</i>	Mo	<i>De-7</i>	Mo
	δ_{C}		δ_{H}	
2	153,6	152,7	8,23 (1H, s)	8,29
3	123,2	122,5	-	-
4	175,8	174,6	-	-
5	127,9	127,2	7,90 (1H, d, $J = 8,8$ Hz)	7,97
6	116,1	114,9	6,86 (1H, dd, $J = 2,2$ e $8,8$ Hz)	6,94
7	163,4	162,4	-	-
8	102,8	102,0	6,78 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	6,86
9	158,2	157,4	-	-
10	117,0	116,6	-	-
1'	124,1	123,4	-	-
2'	130,8	130,0	7,32 (2H, d, $J = 8,6$ Hz)	7,39
3'	115,7	115,0	6,75 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	6,81
4'	157,5	157,1	-	-
5'	115,7	115,0	6,75 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	6,81
6'	130,8	130,0	7,32 (2H, d, $J = 8,6$ Hz)	7,39
7-OH	-	-	-	10,76
4'-OH	-	-	-	9,52

Figura 33 – Espectro de RMN ^1H (DMSO, 200 MHz) de *De-7*.

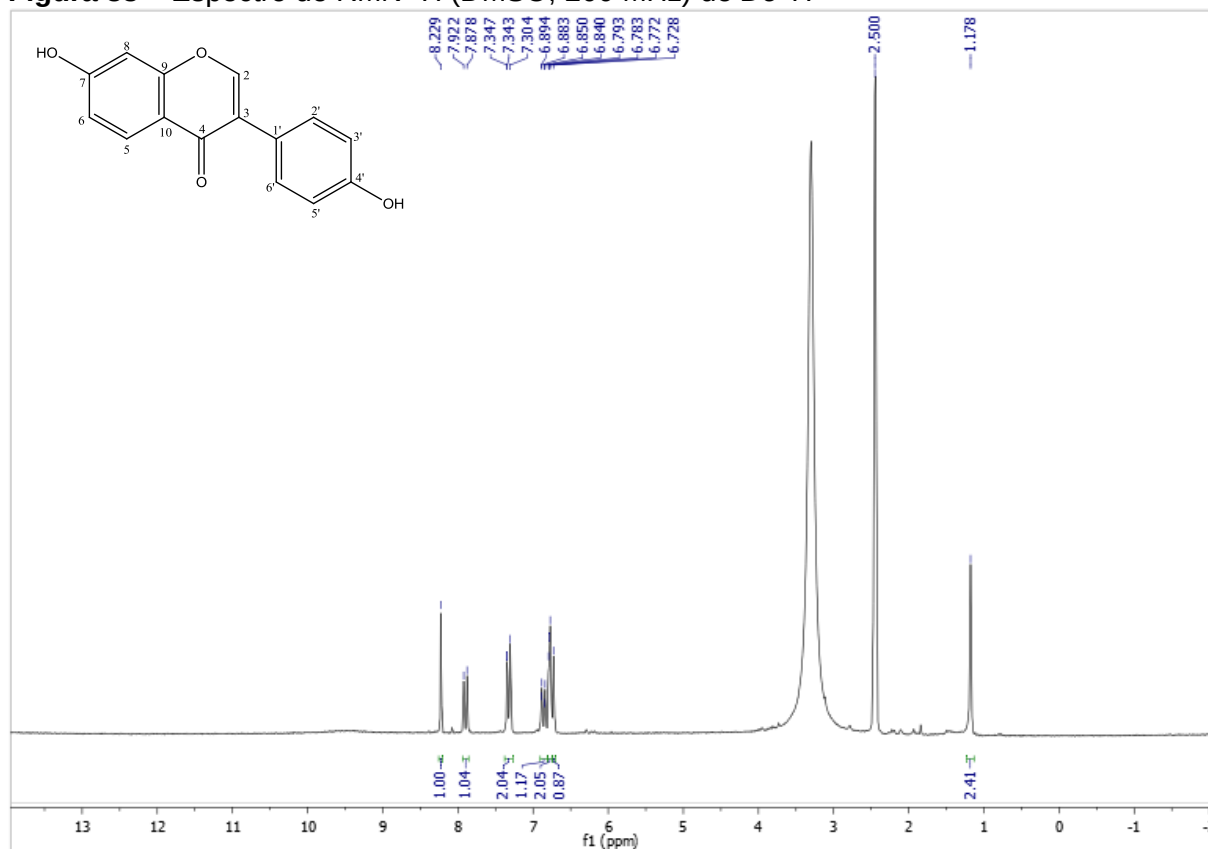


Figura 34 – Expansão do espectro de RMN ^1H (DMSO, 200 MHz) de *De-7* (δ 7,2 – 8,5).

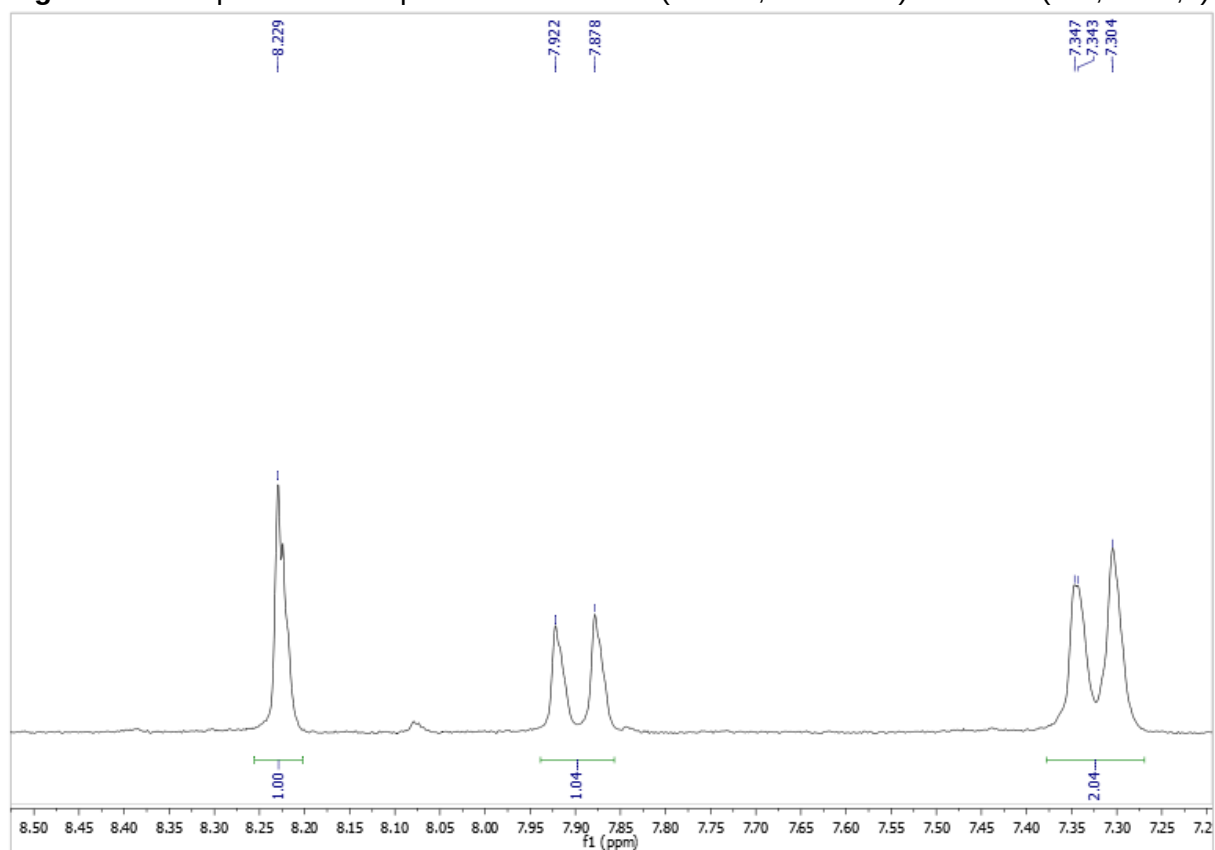


Figura 35 – Expansão do espectro de RMN ^1H (DMSO, 200 MHz) de De-7 (δ 6,45 – 7,15).

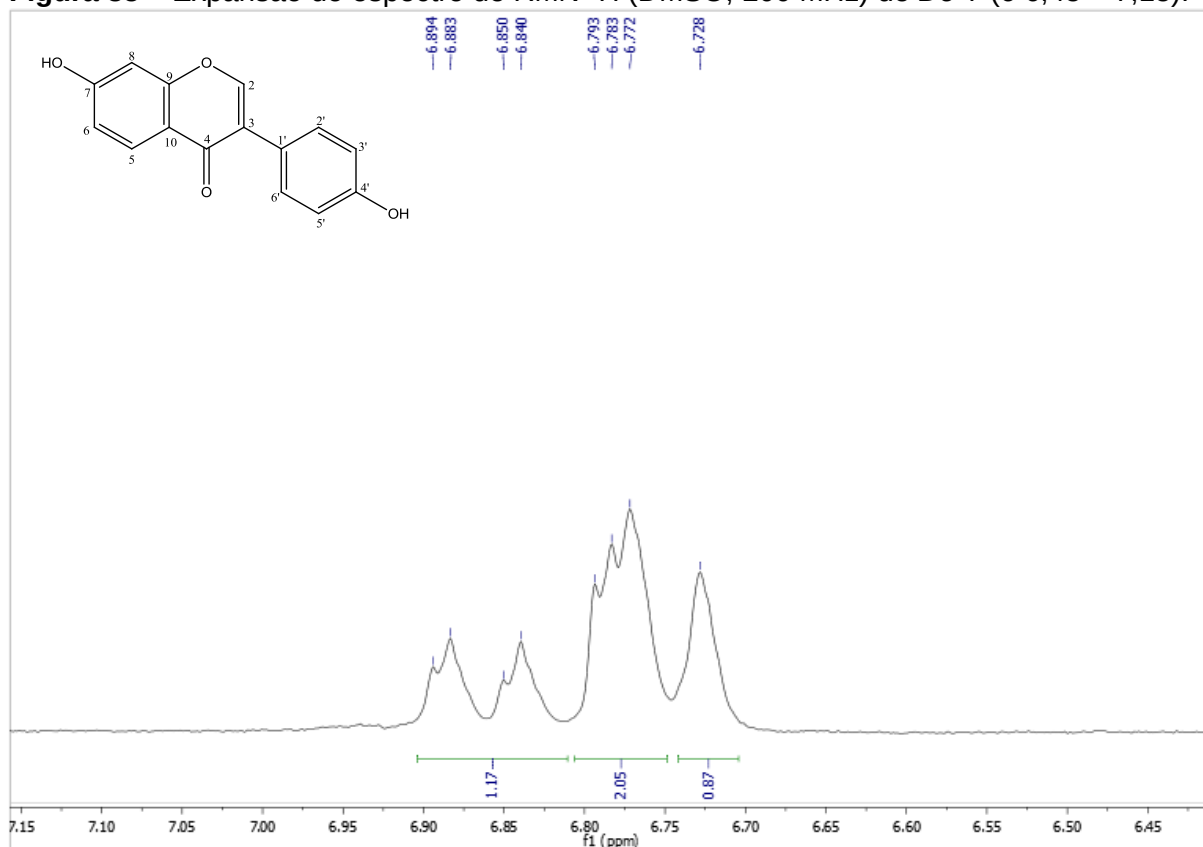


Figura 36 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (DMSO, 50 MHz) de De-7.

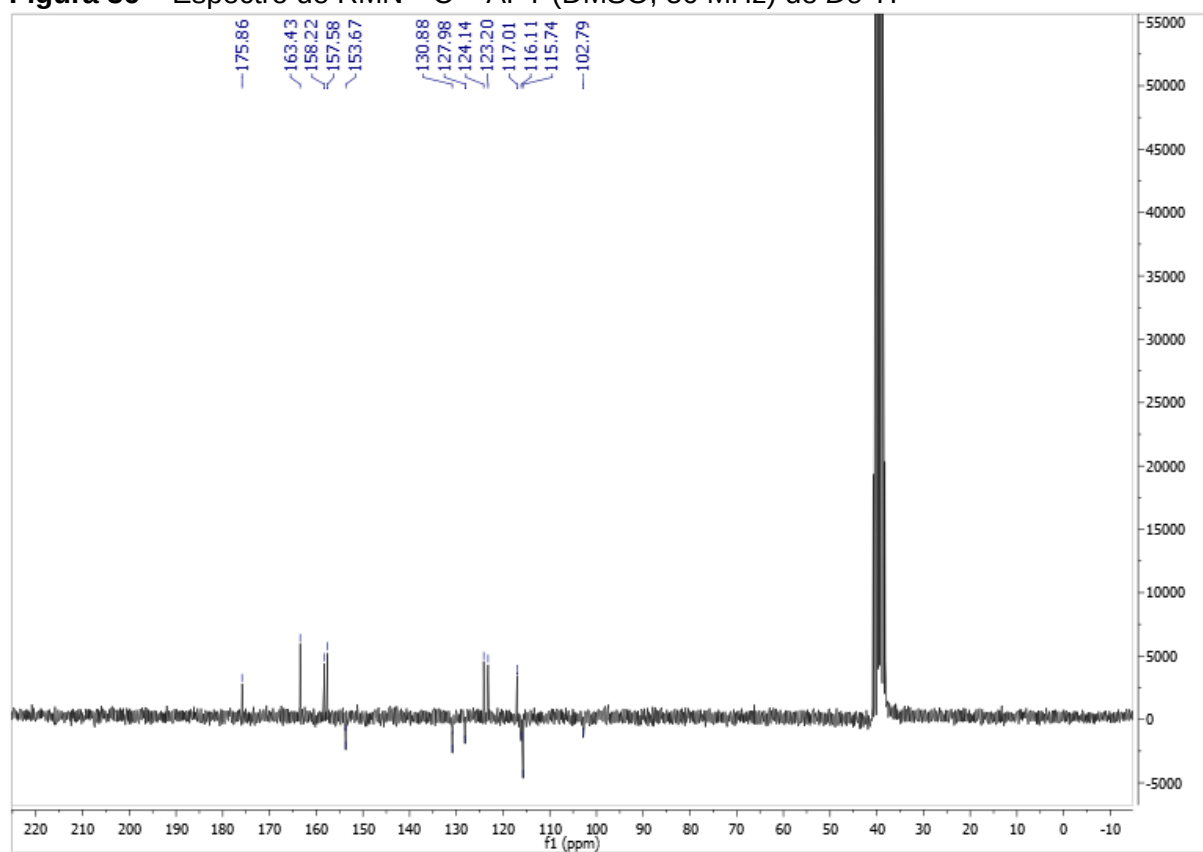


Figura 37 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (DMSO, 50 MHz) de *De-7* (δ 153-80)

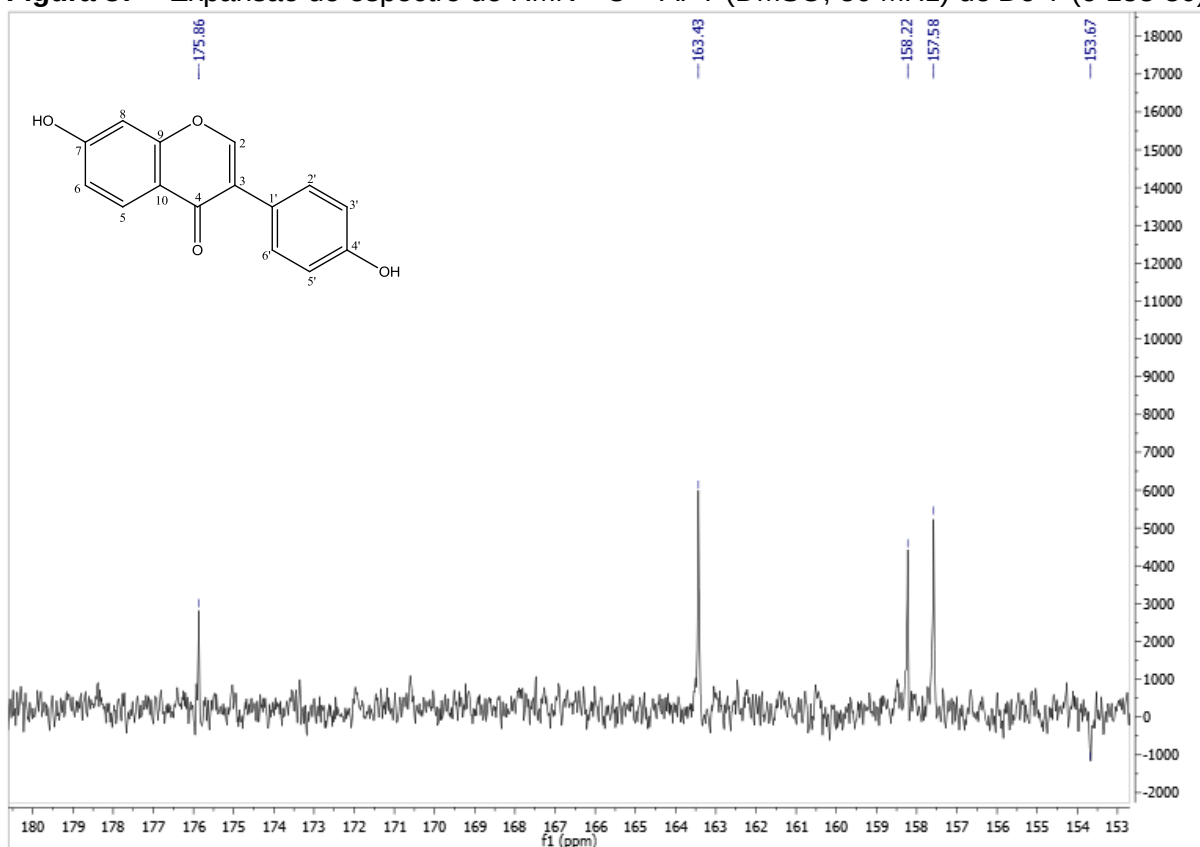
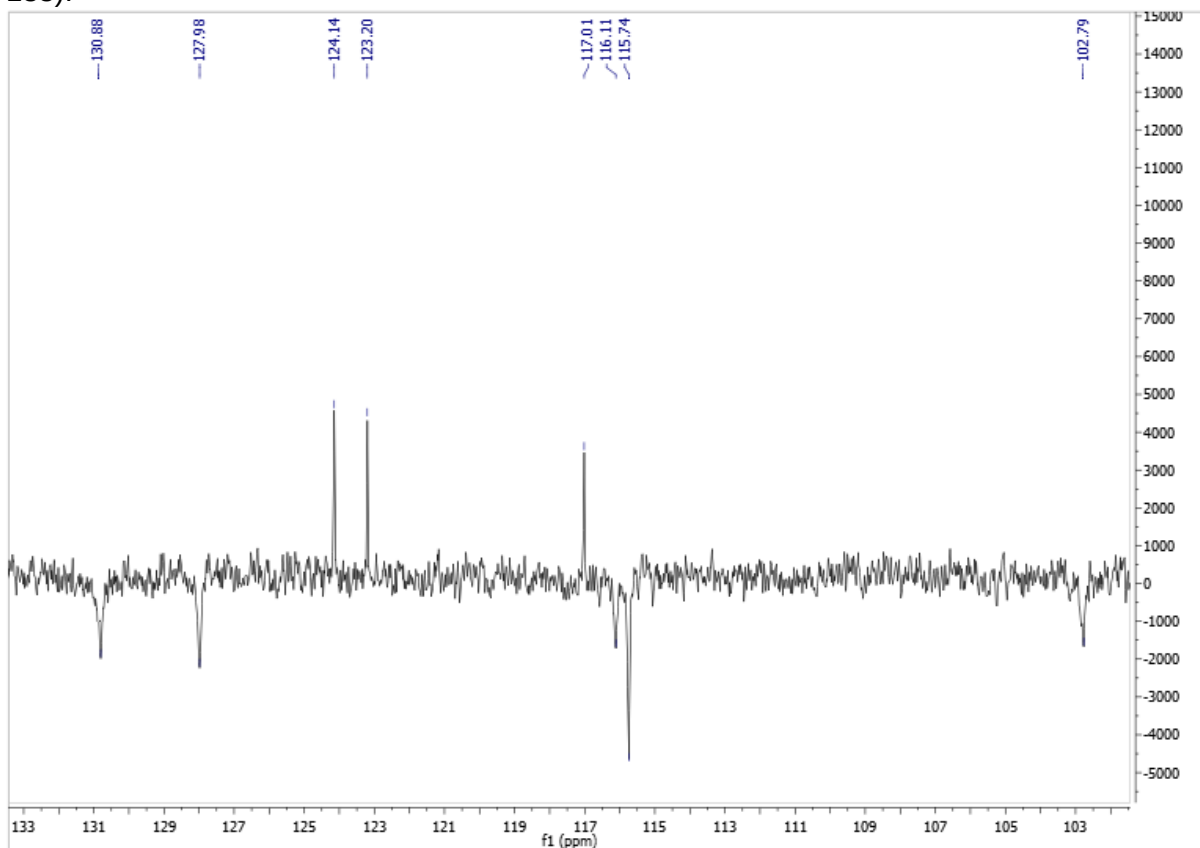


Figura 38 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (DMSO, 50 MHz) de *De-7* (δ 102-133).



5.5.3 Identificação estrutural de De-8

Assim como *De-6* e *De-7*, *De-8* também mostrou 15 sinais para carbonos sp^2 que são compatíveis com a unidade $C_6-C_3-C_6$ característica de flavonoides.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO) (Figura 39) e suas expansões exibiram deslocamentos químicos que corroboraram com essa proposta, porém a ausência do singlete em $\delta_H \sim 8,00$, característico de H-2 de isoflavonas, descartou a possibilidade desta classe.

Características físico-químicas de <i>De-8</i>	
Estado físico	Sólido
Forma/cor	Pó amarelo
Solubilidade	CH ₃ OH
Massa/Rendimento	14 mg / 0,07%

Observando o espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, DMSO) (Figura 43) e suas expansões notou-se a ausência de um carbono metínico em $\delta_C \sim 153,00$, característico de C-2 de isoflavonas, e a presença de sinal para carbono não hidrogenado em δ_C 158,7 e para carbono não hidrogenado e oxigenado em δ_C 135,7, foram condizentes com C-2 e C-3 de flavonoides do tipo flavonol. Conforme visto anteriormente na análise dos dados por Agrawal (1989) e Pelter et al. (1976) na página 83.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 43), o sinal em δ_C 179,5 (C-4), indicativo de carbonila quelada, inferiu a presença de um substituinte 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 174 ppm (TANAKA et al., 2014).

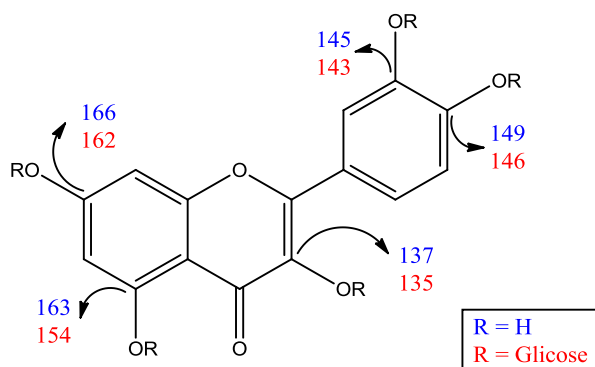
Ainda no espectro de RMN ^{13}C (Figura 44), sinais para carbonos metínicos sp^2 em δ_C 99,9 (C-6) e 94,7 (C-8), bem como, sinais em δ_C 117,7 (C-2'), 116,0 (C-5') e 122,9 (C-6') permitiram sugerir a presença de um anel A 5,7-dissubstituído e um sistema ABX de anel B, respectivamente (COSTA et al., 2007).

Nas expansões do espectro de RMN ^1H (Figura 40 e 41) os deslocamentos químicos corroboraram com a proposta dos espectros de RMN ^{13}C para o padrão de substituição descrito acima. Um dubleto com integral para um hidrogênio, acoplando *meta* em δ_H 6,20 ($J = 1,5$ Hz) e um singlete largo em δ_H 6,40, característicos de flavonoides que possuem anel A 5,7-dissubstituído, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente. Este espectro revelou ainda sinais referentes ao anel B, ao apresentar um duplo dubleto em δ_H 7,58 ($J = 8,5$ e 2 Hz),

atribuído ao H-6', acoplando *orto* e *meta* com H-5' e H-2', respectivamente; um dubleto em δ_H 6,86 ($J = 8,5$ Hz), conferido ao H-5', acoplando *orto* com H-6' e outro dubleto em δ_H 7,84 ($J = 2$ Hz), atribuído ao H-2', correlacionando-se *meta* com H-6', caracterizando, deste modo, um sistema ABX (COSTA et al., 2007).

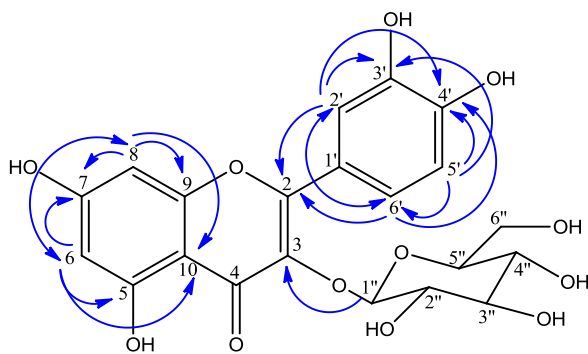
A presença de uma unidade osídica foi sugerida por um conjunto de absorções em δ_H 3,47 – 3,86, típicos de hidrogênios oximetínicos da referida unidade, além de um dubleto em δ_H 5,16 ($J = 8$ Hz) referente ao hidrogênio anomérico, vistos na expansão do espectro de RMN ^1H (Figura 42).

A figura abaixo mostra as absorções aproximadas dos carbonos C-3, C-5, C-7, C-3' e C-4' substituídos, por unidade osídica ou hidroxilas, em esqueletos do tipo flavonol, de acordo com a literatura (SHILOVA et al., 2009; DUEÑAS et al., 2012).



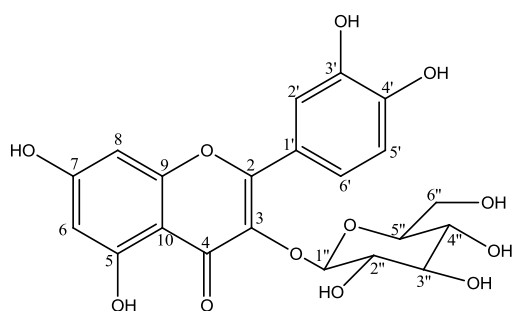
A proposta foi reforçada no espectro de RMN ^{13}C (Figura 44) que permitiu sugerir a existência de glicose no C-3. Visto que, dados da literatura mostram flavonoides substituídos por hidroxilas no C-3 com deslocamentos em aproximadamente δ_C 137, enquanto que substituídos por unidade osídica o C-3 torna-se mais protegido, corroborando com absorção de De-8 em δ_C 135,7 no espectro de RMN ^{13}C .

O espectro bidimensional HMBC (Figura 48) mostrou correlação entre o H-1'' (δ_H 5,16) e o C-3 (δ_C 135,7) confirmando que unidade osídica estava ligada ao esqueleto flavonoídico pelo anel C.



Correlações de HMBC

Desta forma, os dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C bem como, comparação com os dados apresentados por Costa et al., (2007) permitiram identificar *De-4* como sendo quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo, mais conhecida como isoquercitrina (Tabela 10).



Isoquercitrina

Tabela 10 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *De-8* em CD_3OD (200 e 50 MHz, respectivamente) e de RMN ^{13}C de isoquercitrina em CD_3OD , segundo Costa et al. (2007).

C	De-8	Mo	De-8	Mo	HMBC	
	δ_{C}		δ_{H}		$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	158,7	159,0	-	-	-	-
3	135,7	135,6	-	-	-	-
4	179,5	179,4	-	-	-	-
5	162,9	163,0	-	-	-	-
6	99,9	99,8	6,20 (d, $J=1,5$)	6,21 (d, $J=1,8$)	C-5 e C-7	C-8 e C10
7	166,1	166,0	-	-	-	-
8	94,7	94,6	6,40 (s)	6,40 (d, $J=1,8$)	C-7 e C-9	C-6 e C-10
9	158,4	158,4	-	-	-	-
10	105,5	105,7	-	-	-	-
1'	122,8	123,0	-	-	-	-
2'	117,7	117,5	7,84 (d, $J=2$)	7,71 (d, $J=1,8$)	C-3'	C-2; C-4' e C-6'
3'	145,8	145,9	-	-	-	-
4'	149,9	149,8	-	-	-	-
5'	116,0	116,0	6,86 (d, $J=8,5$)	6,86 (d, $J=8,5$)	C-4' e C-6'	C-3'
6'	122,9	123,1	7,58 (dd, $J=8,5$ e 2)	7,58 (dd, $J=8,5$ e 1,8)	-	C-2; C-2' e C-4'
1''	105,3	104,2	5,16 (d, $J=8$)	5,24 (d, $J=7,9$)	-	C-3
2''	73,1	75,7	3,54 (m)	-	-	-
3''	77,1	78,4	3,54 (m)	-	-	-
4''	70,0	71,1	3,64 (m)	-	-	-
5''	75,0	78,1	3,47 (m)	-	-	-
6''	61,9	62,5	3,83 (m)	-	-	-

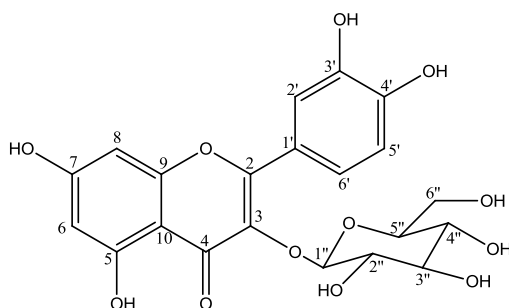


Figura 39 – Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de *De-8*.

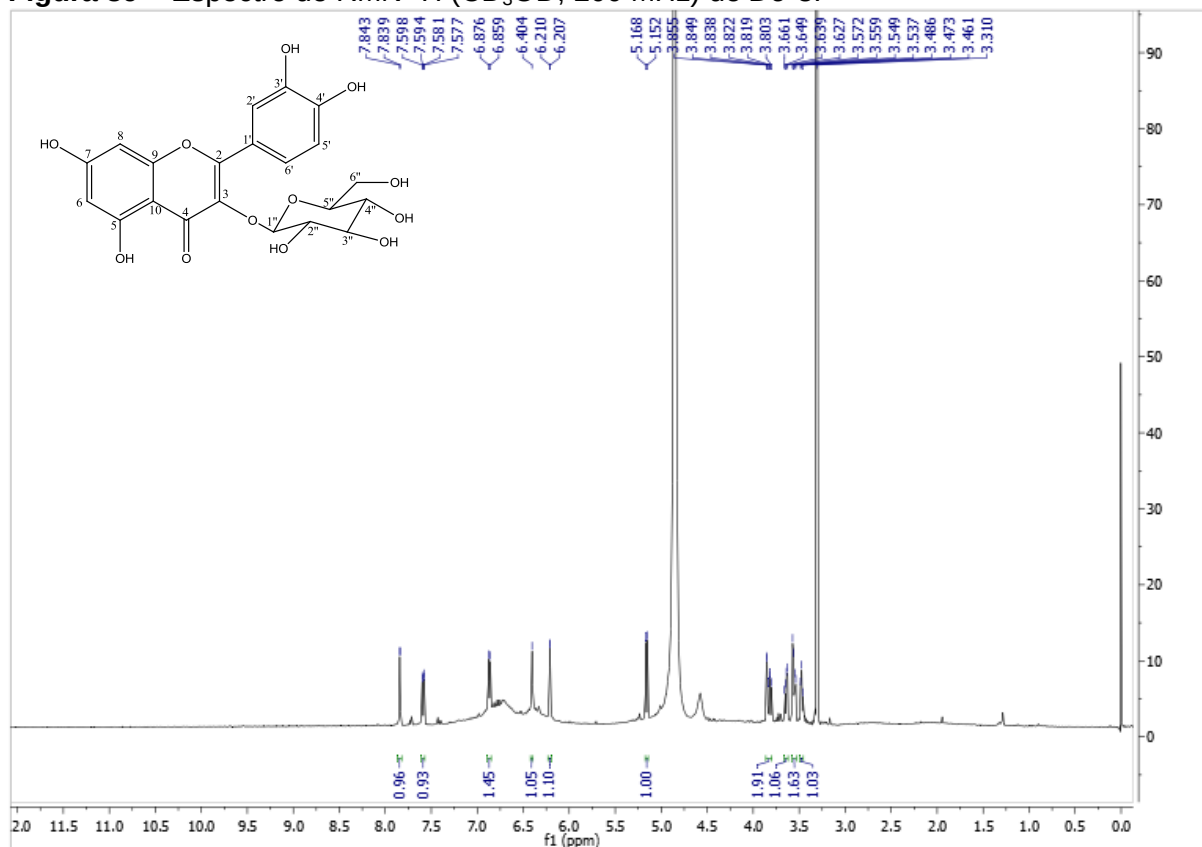


Figura 40 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de *De-8* (δ 7,56 – 7,9).

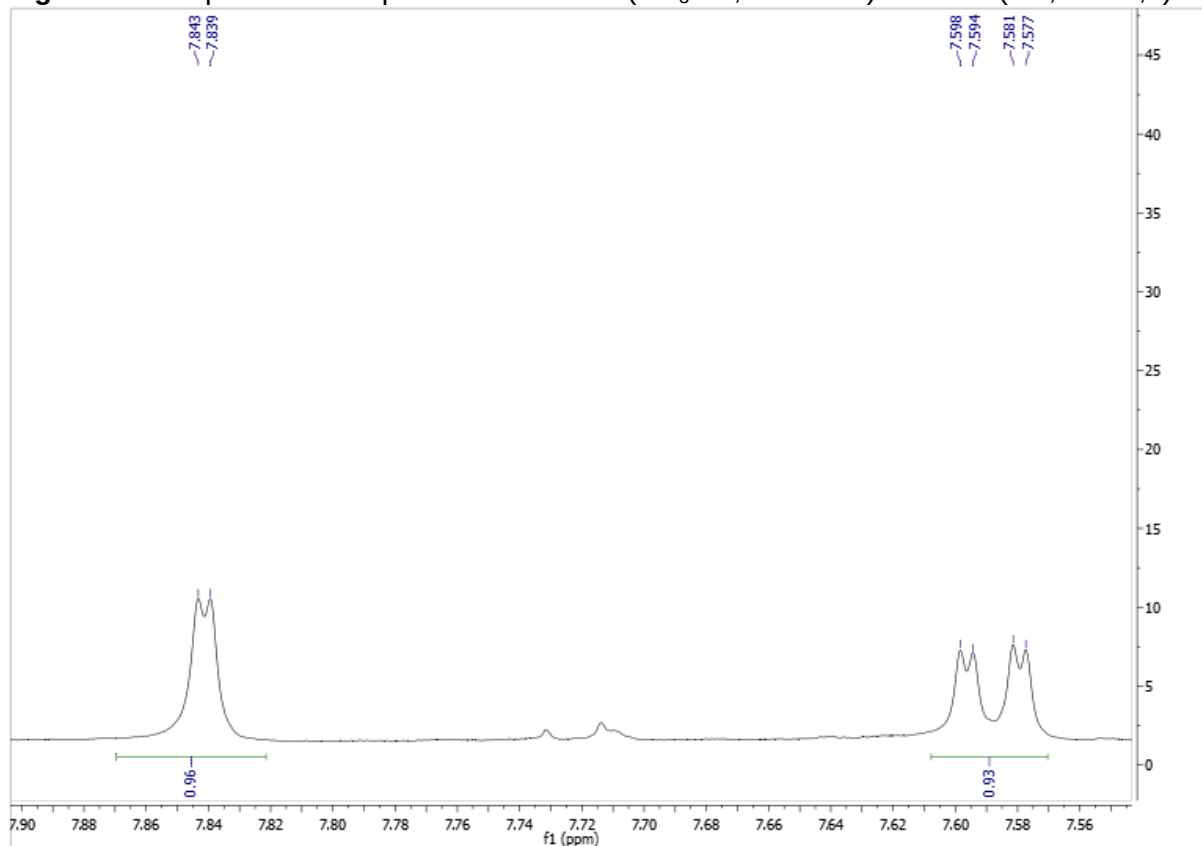


Figura 41 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de *De-8* (δ 6,15 – 6,95).

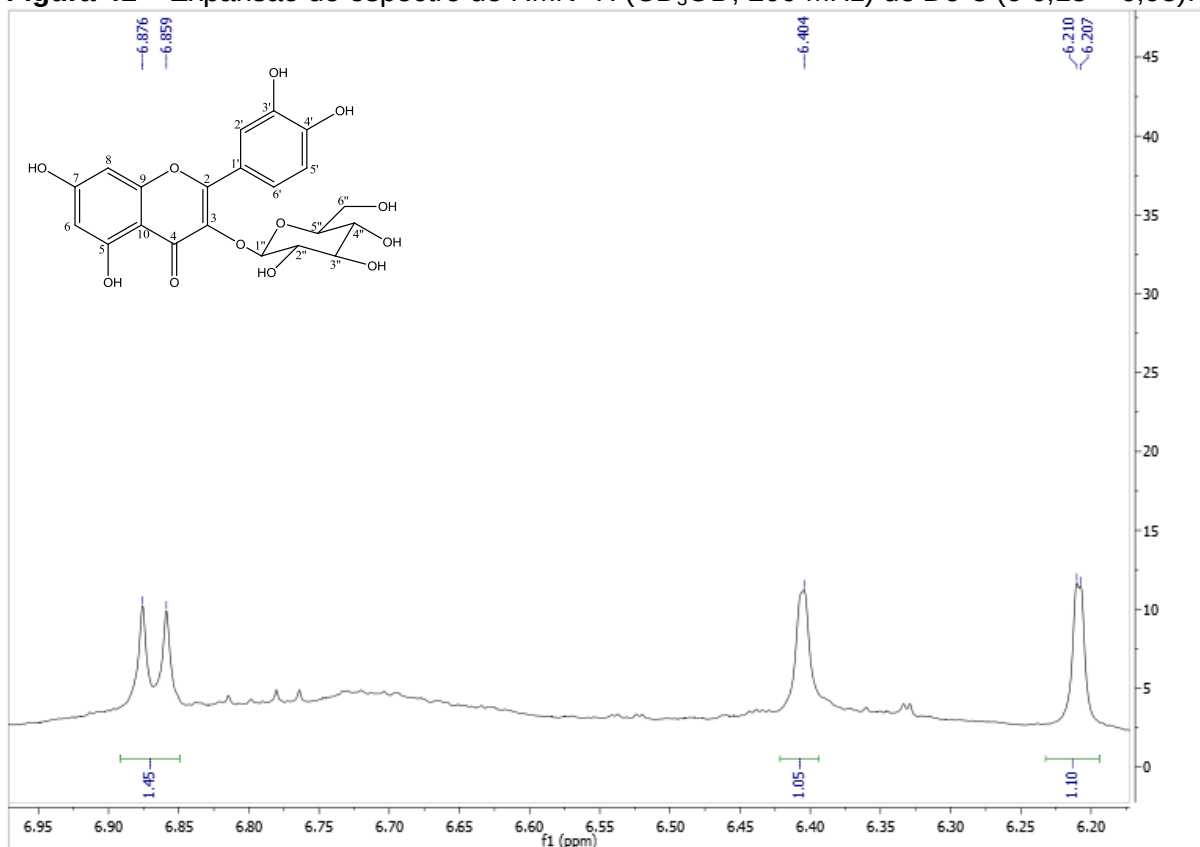


Figura 42 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de *De-8* (δ 3,2 – 5,2).

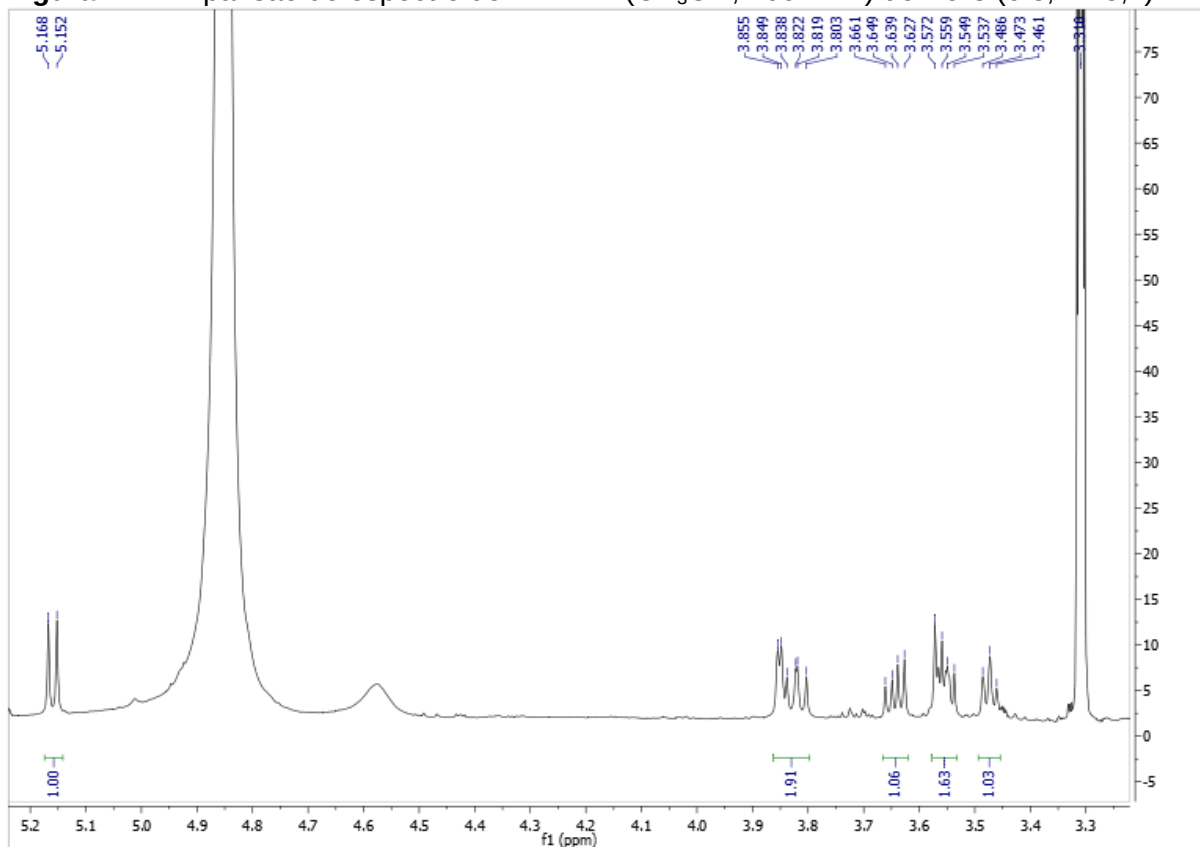


Figura 43 – Espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de *De*-8.

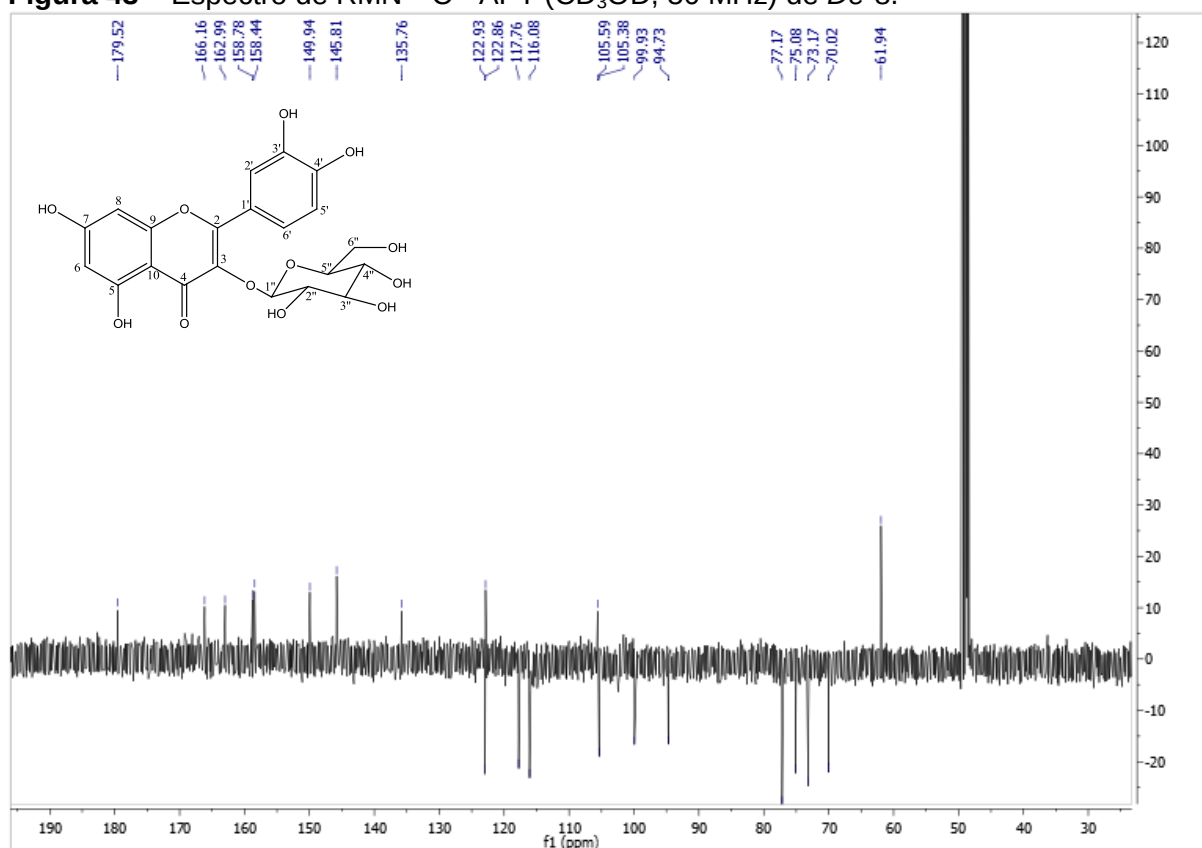


Figura 44 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de *De*-8 (δ 90 – 185).

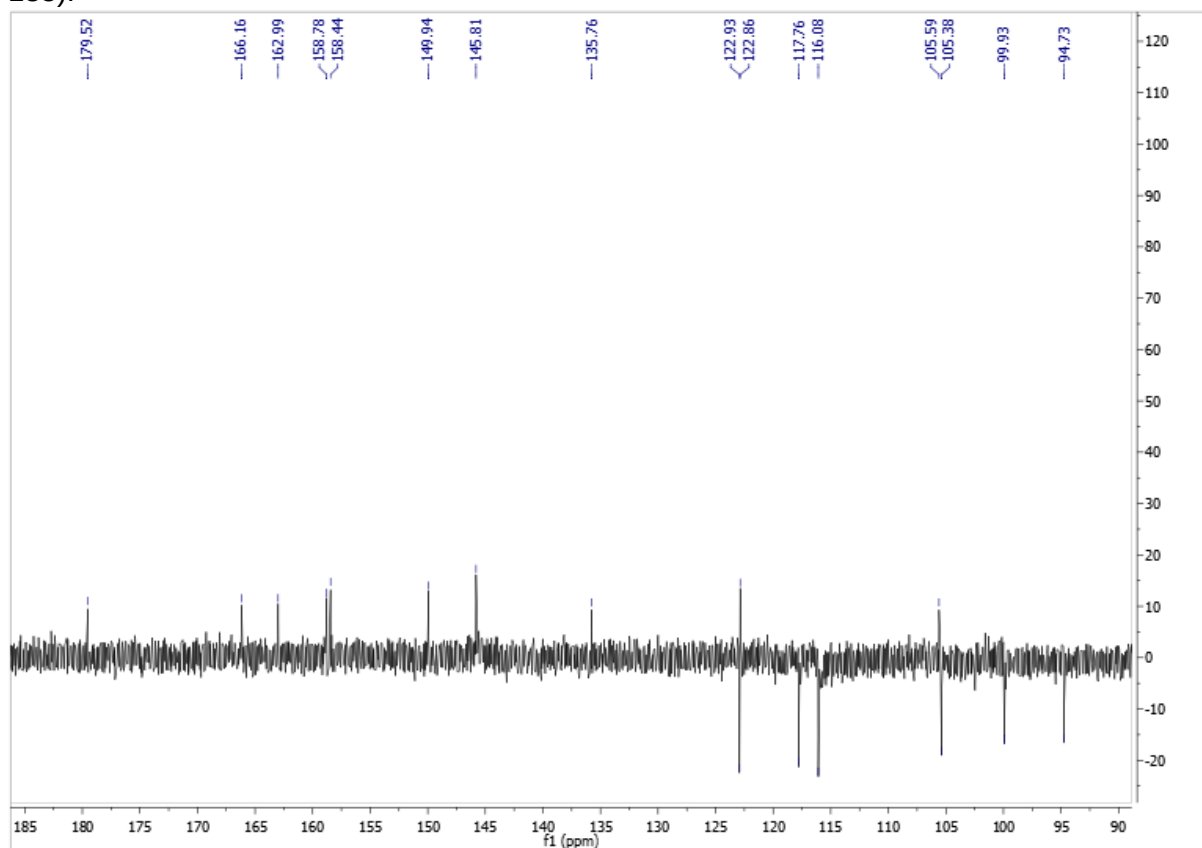


Figura 45 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de De-8 (δ 60 – 79).

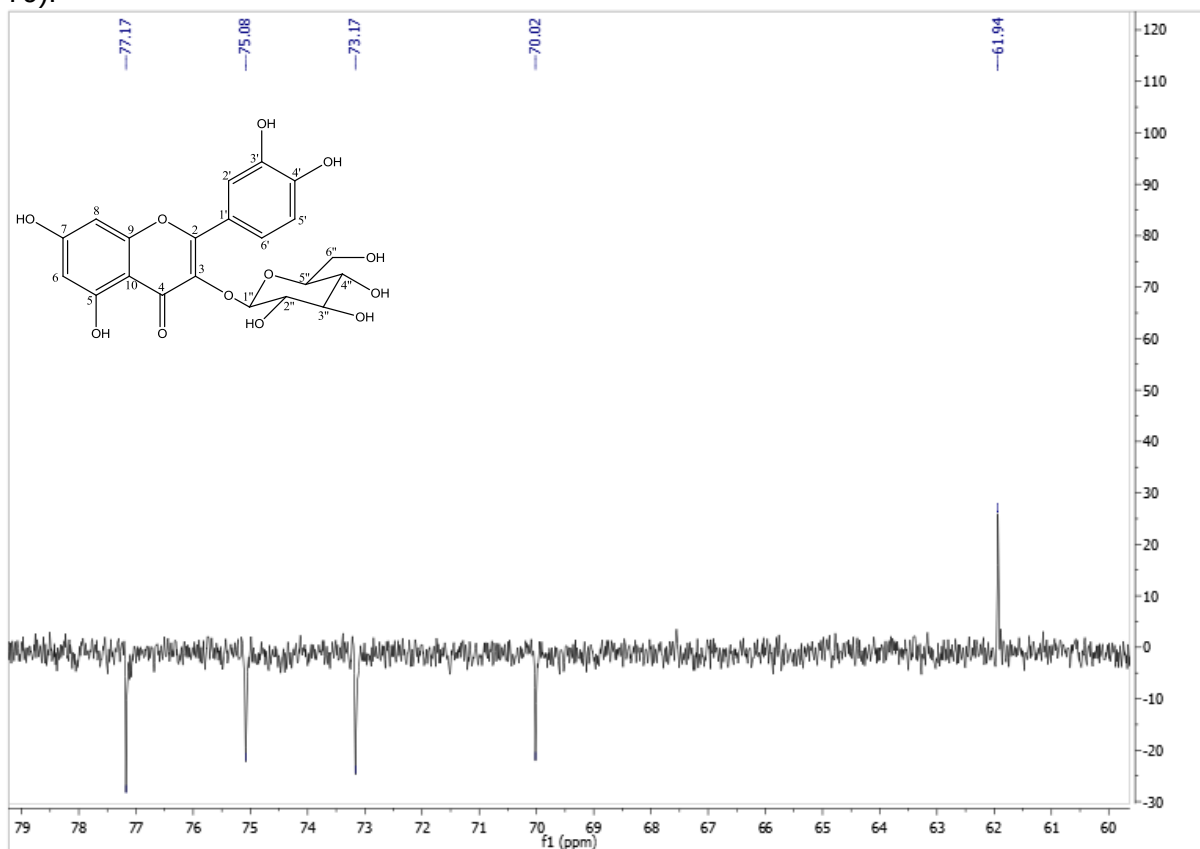


Figura 46 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de De-8 na região de (7,45 – 8,1) x (110 – 165).

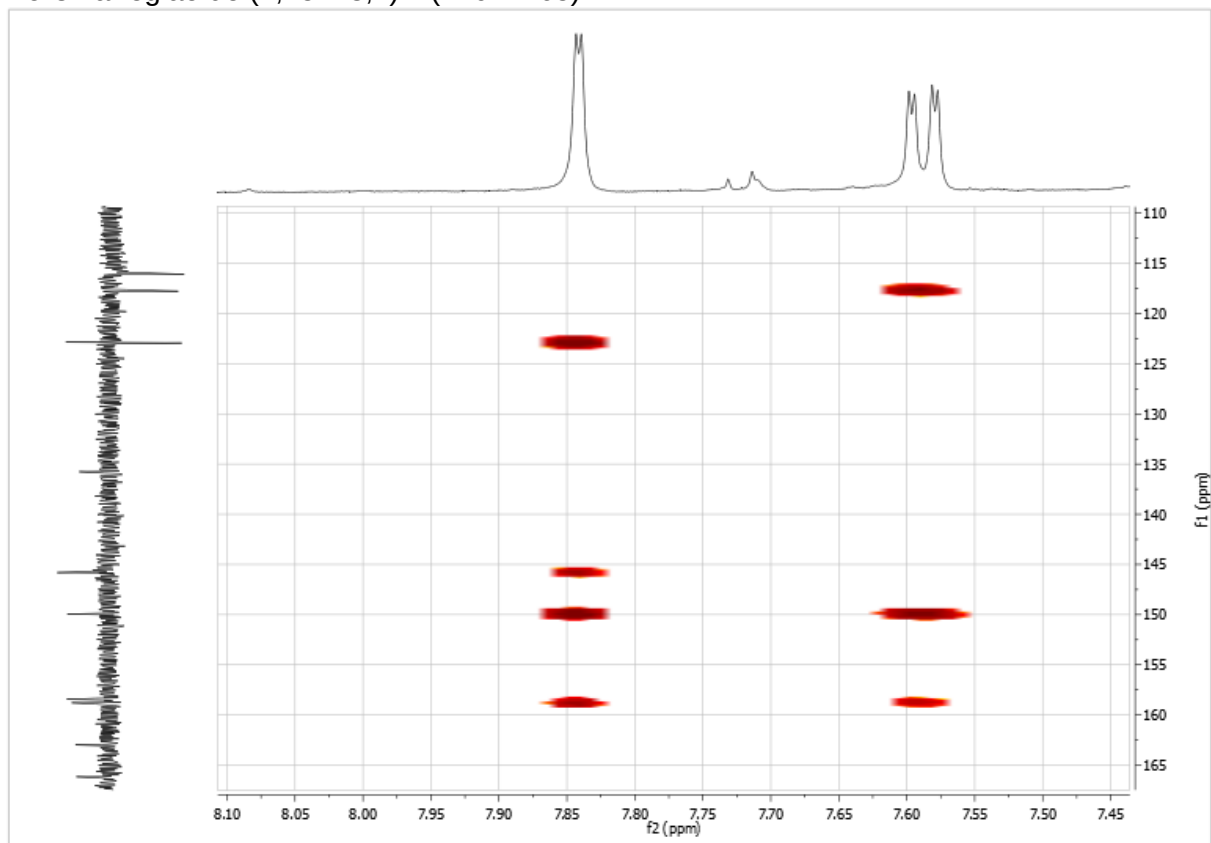


Figura 47 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de De-8 na região de (6,15 – 7,0) x (90 – 180).

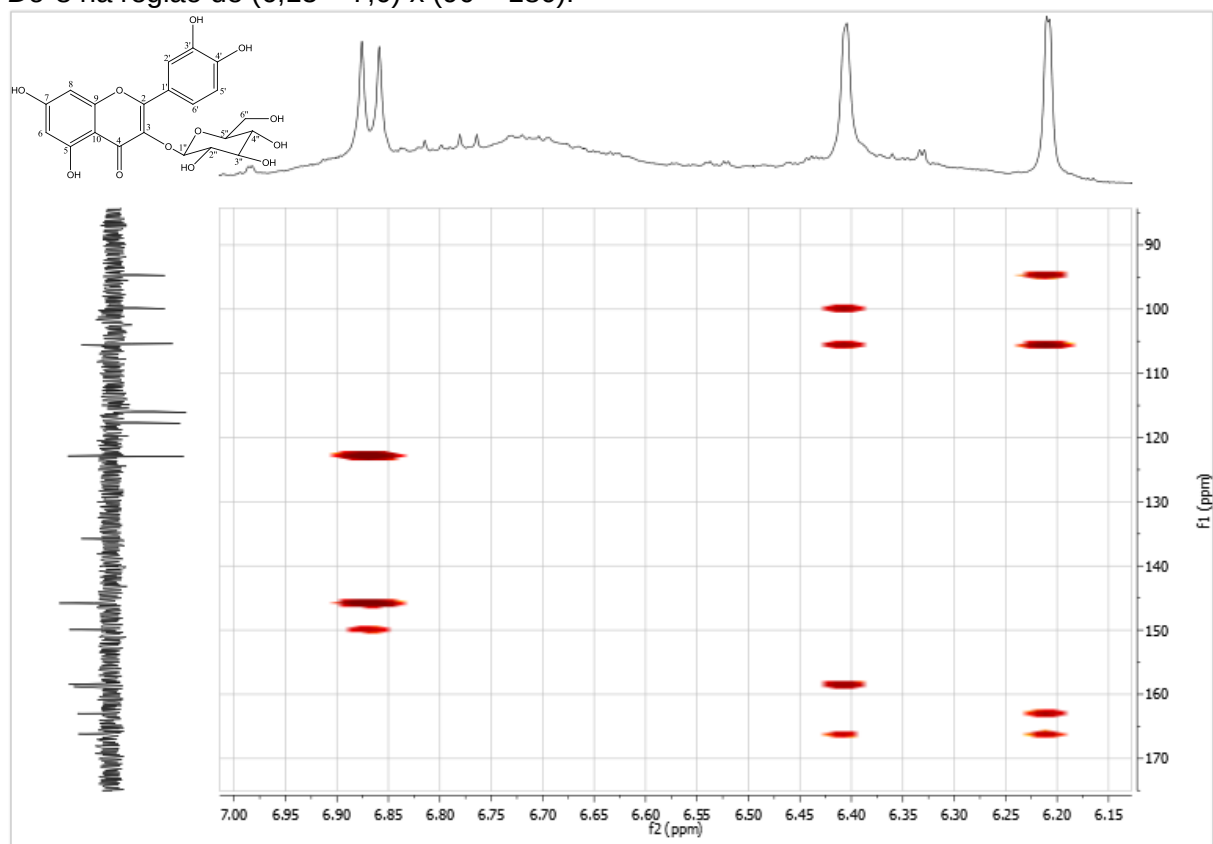
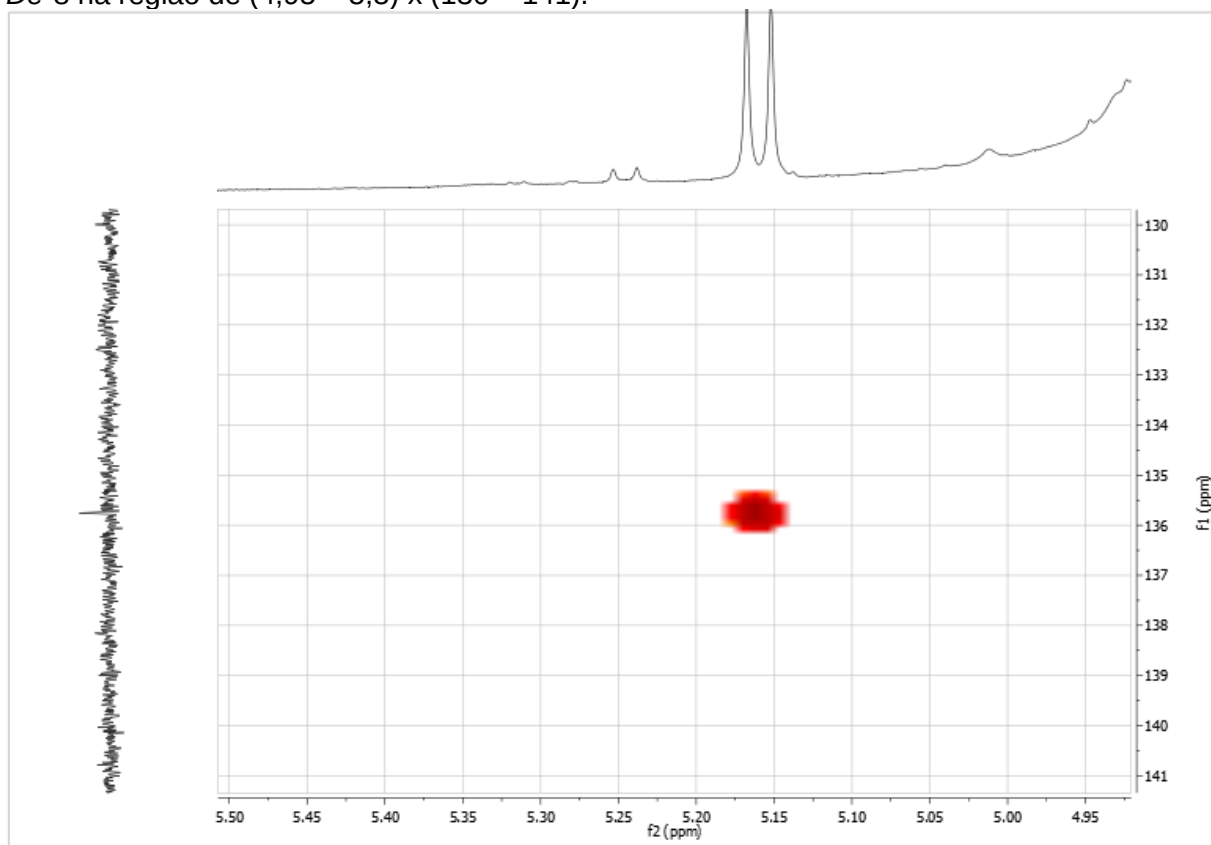


Figura 48 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de De-8 na região de (4,95 – 5,5) x (130 – 141).



5.6 Identificação estrutural de substâncias com esqueleto esteroidal

5.6.1 Identificação estrutural de *De-9*

A substância codificada como *De-9* apresentou no espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 49) e suas expansões, um conjunto de deslocamentos químicos simples e de alta multiplicidade, característicos de

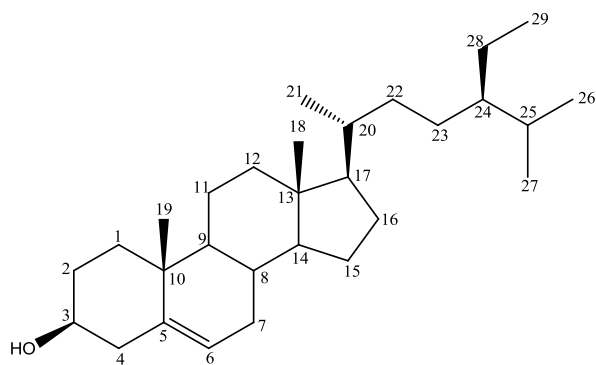
Características físico-químicas de <i>De-9</i>	
Estado físico	Sólido
Forma/cor	Cristal branco
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	17 mg / 0,13%

hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, em δ_{H} 0,6 - 2,3 que aliado a presença de sinais intensos e outros duplicados, no espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, CDCl_3) (Figura 51), indicaram que *De-9* tratava-se de uma mistura de duas substâncias, ambas apresentando o mesmo esqueleto carbônico: núcleo esteroidal do tipo estigmasteno.

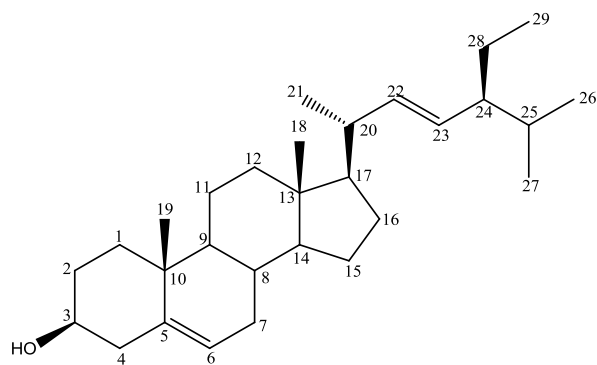
Um multiplete em δ_{H} 3,50 mostrou-se característico de hidrogênio oximetínico, corroborando o sinal em δ_{C} 71,7 referente a presença de função álcool na posição 3 desse tipo de esqueleto. Um dublete largo em δ_{H} 5,34 ($J = 4,6$ Hz) e dois outros dubletos largos, em δ_{H} 5,03 ($J = 8,0$ Hz) e 5,11 ($J = 7,8$ Hz) permitiram sugerir duas unidades olefínicas para *De-6*, trissubstituída na posição C-6 e dissubstituída na posição C-22-C-23 (TOMAZ, 2008).

Sinais intensos para carbonos metínicos em δ_{C} 121,7 e não hidrogenado em δ_{C} 140,7, bem como, sinais em δ_{C} 138,3 (1C) e 129,2 (1C) ambos para carbonos metínicos, são compatíveis com dupla ligação localizada em C-5 e C-6 (para as duas substâncias da mistura) e em C-22 e C-23 (para apenas uma delas), respectivamente, além dos demais dados espectrais, permitiram identificar *De-9* como sendo uma mistura de β -sitosterol (*De-9a*) e estigmasterol (*De-9b*).

Esta afirmação está fundamentada em comparações dos dados espectrais de *De-9* observados em RMN de ^1H e ^{13}C com os dados apresentados por Tomaz et al. (2008) para as mesmas substâncias (Tabela 11).



β -sitosterol



stigmasterol

Tabela 11 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *De-9* em CDCl_3 (200 e 50 MHz, respectivamente) β -sitosterol (Mo1) e estigmasterol (Mo2) em CDCl_3 , segundo Tomaz et al. (2008).

C	Mo1	<i>De-9(a)</i>		Mo2	<i>De-9(b)</i>	
	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	3,50 (m, 1H)	71,7	71,7	3,50 (m, 1H)
4	42,1	42,1	-	42,1	42,1	-
5	140,7	140,7	-	140,7	140,7	-
6	121,6	121,7	5,34 (dl, $J=4,6$ Hz, 1H)	121,6	121,7	5,34 (dl, $J=4,6$ Hz, 1H)
7	31,9	31,9	-	31,9	31,9	-
8	31,8	31,8	-	31,8	31,8	-
9	50,1	50,0	-	50,1	50,0	-
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	42,2	-	42,2	42,2	-
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	18,7	-	21,2	21,2	-
22	34,0	33,9	-	138,3	138,3	5,03 (dl $J=8$ Hz, 1H)
23	26,0	26,0	-	129,2	129,2	5,11 (dl, $J=7,8$ Hz, 1H)
24	45,7	45,7	-	51,2	51,2	-
25	29,0	29,1	-	29,0	29,1	-
26	19,8	19,8	-	20,1	21,1	-
27	19,0	19,0	-	18,9	18,9	-
28	23,0	23,0	-	25,4	25,4	-
29	12,0	12,0	-	12,2	12,2	-

Figura 49 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *De-9*.

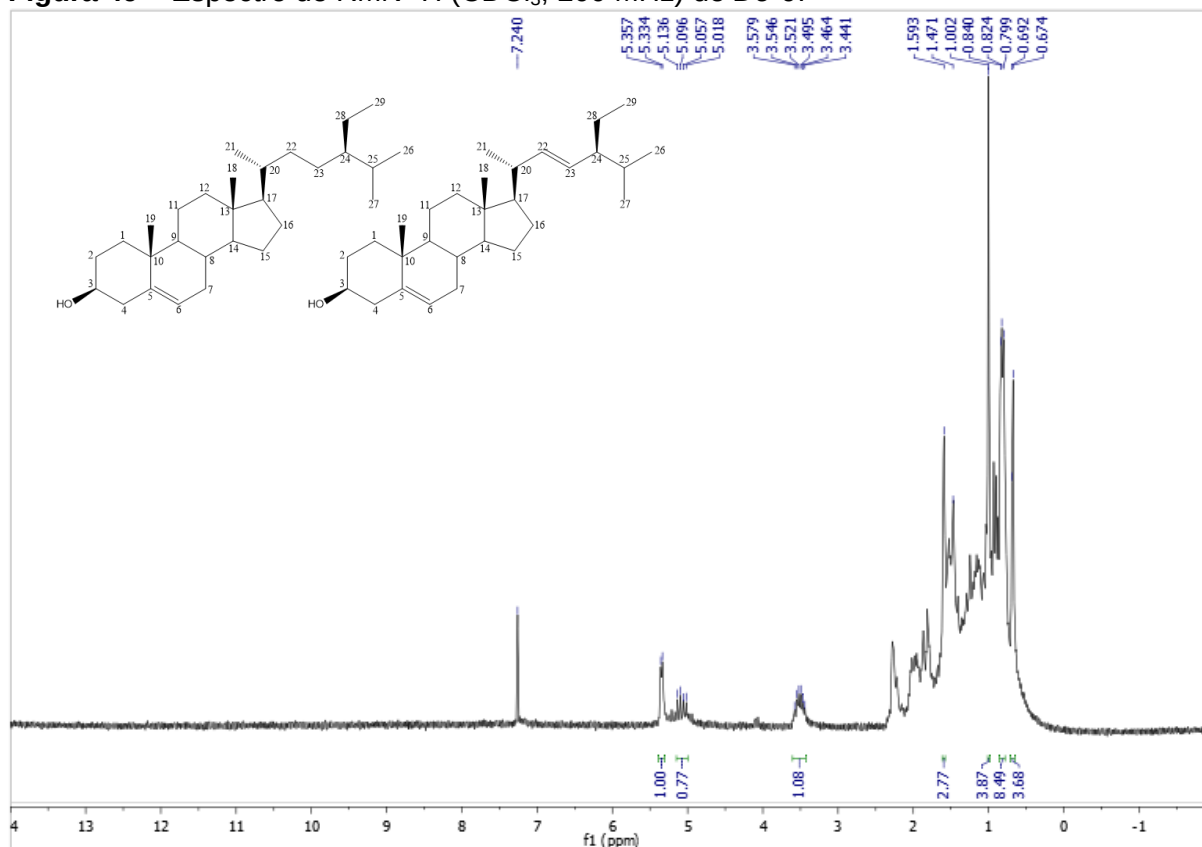


Figura 50 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *De-9* (δ 0,4 – 2,7) e (δ 3,0 – 5,5).

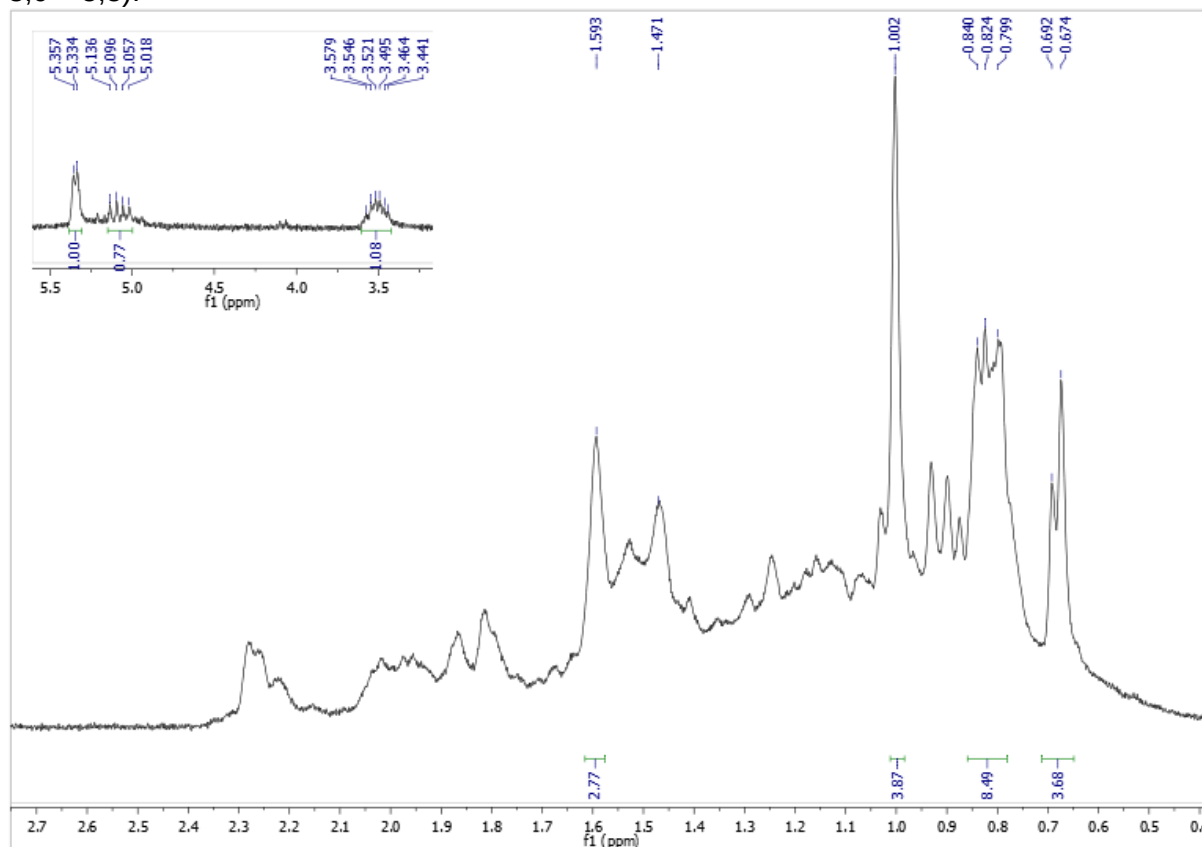


Figura 51 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de De-9.

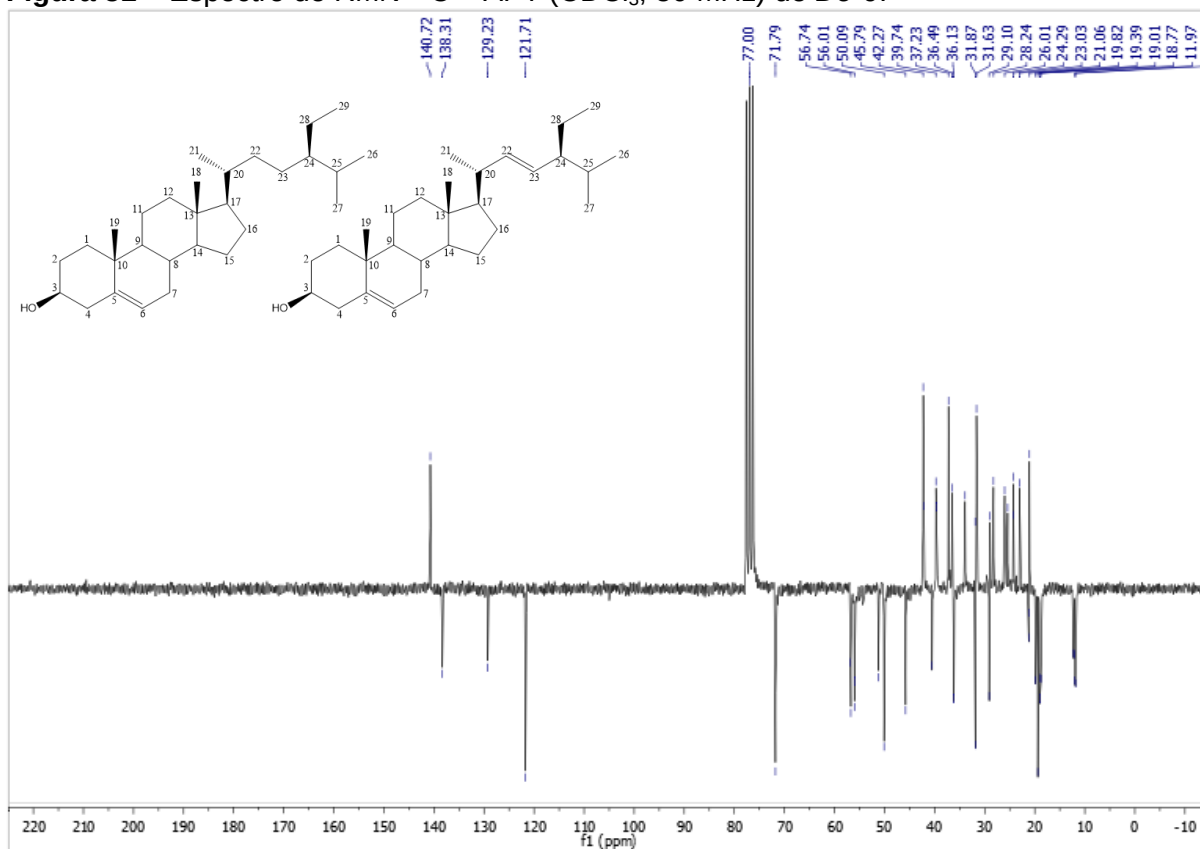


Figura 52 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de De-9 (δ 28 – 58).

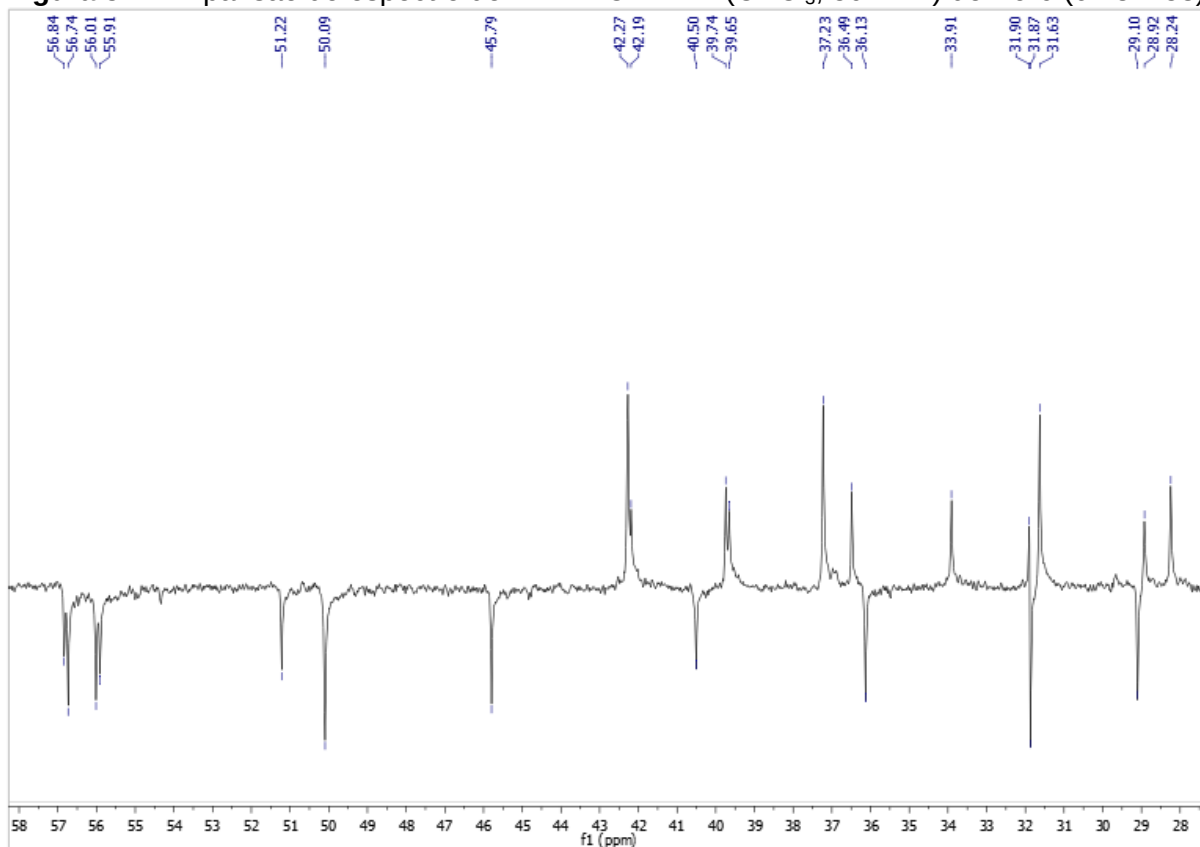
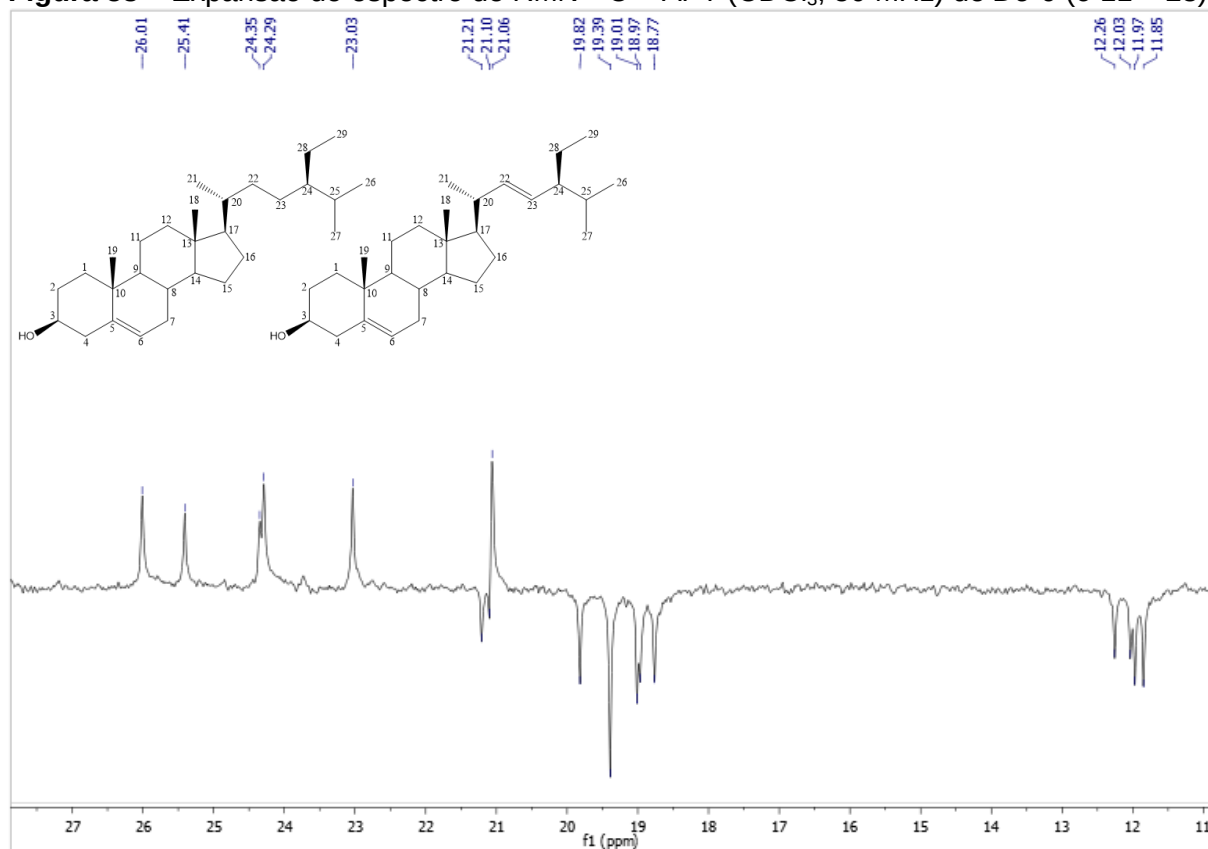


Figura 53 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de De-9 (δ 11 – 28).



5.7 Determinação estrutural de substância com esqueleto stilbeno

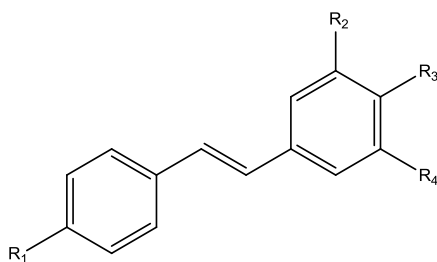
5.7.1 Determinação estrutural de *De-10*

A substância codificada como *De-10* apresentou no espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, CDCl_3) (Figura 58), 21 sinais, nos quais 7 correspondiam a carbonos não hidrogenados e destes 2 oxigenados, além de 7 carbonos metínicos, 3 metilênicos, 3 metilas e 1 característico de metoxila em δ_{C} 55,3.

Características físico-químicas de <i>De-10</i>	
Estado físico	Sólido
Forma/cor	Amorfo branco
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	16 mg / 0,04%

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 54) e suas expansões exibiram deslocamentos químicos entre δ_{H} 6,54 – 7,40 característicos de hidrogênios aromáticos.

Na expansão do espectro de RMN ^1H (Figura 55), dois dubletos para dois hidrogênios cada em δ_{H} 7,39 ($J = 9$ Hz) e δ_{H} 6,86 ($J = 8,5$ Hz), acoplam *orto* entre si, foram compatíveis com os hidrogênios de um anel do tipo AA'BB'. Observou-se ainda um singlete integrando para dois hidrogênios em δ_{H} 6,59, condizente com os hidrogênios de um anel tetra-substituído. Estes deslocamentos em adição a presença de mais dois dubletos acoplando *trans* em δ_{H} 6,93 ($J = 16,5$ Hz) e 6,77 ($J = 16$ Hz), sugeriram a presença do núcleo estilbeno, conforme mostrado abaixo:



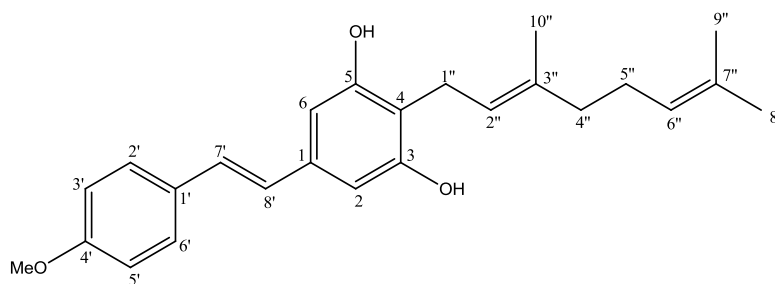
Na expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (Figura 59), os sinais para carbonos metínicos dobrados na região de aromático em δ_{C} 114,0 e 127,6, corroboram com a presença do anel AA'BB'. Outros sinais dobrados em δ_{C} 106,2 (metínico) e 155,1 (não hidrogenado oxigenado), confirmaram a presença do anel tetra-substituído do núcleo estilbeno em *De-10*.

Na expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (Figura 59), ainda foi observado sinais para carbonos metilênicos em δ_{C} 22,4, 26,3 e 39,6, assim como três metilas em δ_{C} 12,8, 16,2 e 25,7 e carbonos não hidrogenados em δ_{C} 132,1 e 139,3.

A presença de um grupo geranil foi sugerido a partir dos sinais característicos na expansão do espectro de RMN ^1H (Figura 56 e 57), pelos três singletos de metila δ_{H} 1,57, 1,66 e 1,80, dois hidrogênios olefínicos δ_{H} 5,04 (t, $J = 6,5$ Hz) e 5,26 (t, $J = 7,0$ Hz), e três hidrogênios metilênicos δ_{H} 2,01 (m) e 3,40 (d, $J = 7,0$ Hz) (ARAÚJO et al., 2009).

A expansão do espectro bidimensional HMBC (Figura 65) mostrou correlação entre o δ_{H} 3,80 e o δ_{C} 159,2 (^3J), confirmando que a metoxila encontrava-se *para* substituída ao anel A do estilbeno, além da correlação entre o dubleto δ_{H} 3,40 e o δ_{C} 112,7 (^2J), confirmando que o radical geranil encontrava-se *para* substituído ao anel B do estilbeno.

Desta forma, os dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) bem como, comparação com os dados apresentados por Chistensen et al. (1988) permitiram identificar *De-10* como sendo 4-geranil-3,5-dihidroxi-4'-metoxi-*trans*-stilbeno. Substância descrita pela primeira vez na literatura (Tabela 12).



4-geranil-3,5-dihidroxi-4'-metoxi-*trans*-stilbeno

Tabela 12 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *De-10* em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais e RMN ^1H e ^{13}C de 4-geranil-3,5,4'-trihidroxil-*trans*-stilbeno em CD_3CN , segundo Chistensen et al. (1988).

C	Mo	<i>De-10</i>			
		δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
		HMQC		HMBC	
1	134,3	137,1	-	-	-
2	104,4	106,2	6,59 (s, 2H)	C3	C8'
3	155,1	155,1	-	-	-
4	113,6	112,7	-	-	-
5	155,1	155,1	-	-	-
6	104,4	106,2	6,59 (s, 2H)	C5	C8'
1'	128,8	129,9	-	-	-
2'	127,2	127,6	7,39 (d, $J=9$)	-	C6', C4'
3'	114,9	114,0	6,86 (d, $J=8,5$)	C4'	C5', C1'
4'	156,1	159,2	-	-	-
5'	114,9	114,9	6,86 (d, $J=8,5$)	C4'	C3', C1'
6'	127,2	127,6	7,39 (d, $J=9$)	-	C2', C4'
7'	125,2	128,1	6,93 (d, $J=16,5$)	C8'	C2', C6', C1
8'	126,9	125,9	6,77 (d, $J=16$)	C7'	C1'
1''	21,3	22,4	3,40 (d, $J=7$)	-	-
2''	122,1	121,2	5,26 (t, $J=7$)	C4, C2''	C5
3''	136,0	139,3	-	-	-
4''	38,8	39,6	2,01 (m)	-	-
5''	25,8	26,3	2,01 (m)	C6''	-
6''	123,6	123,6	5,04 (t, $J=7$)	-	-
7''	130,6	132,1	-	-	-
8''	24,2	25,7	1,66 (s)	C7''	C6''
9''	16,2	16,2	1,57 (s)	C7''	C6'', C8''
10''	14,7	12,8	1,80 (s)	-	C2''
4'-OMe	-	55,3	3,80 (s)	-	C4'

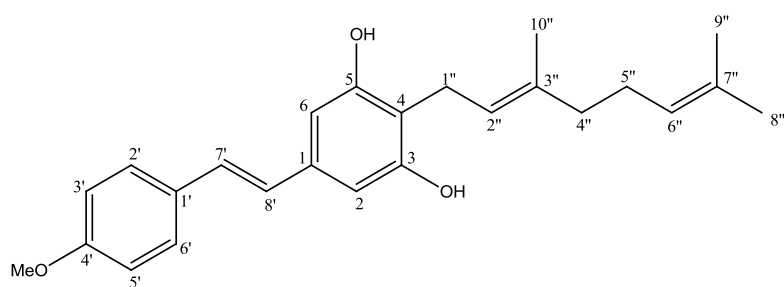


Figura 54 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De*-10.

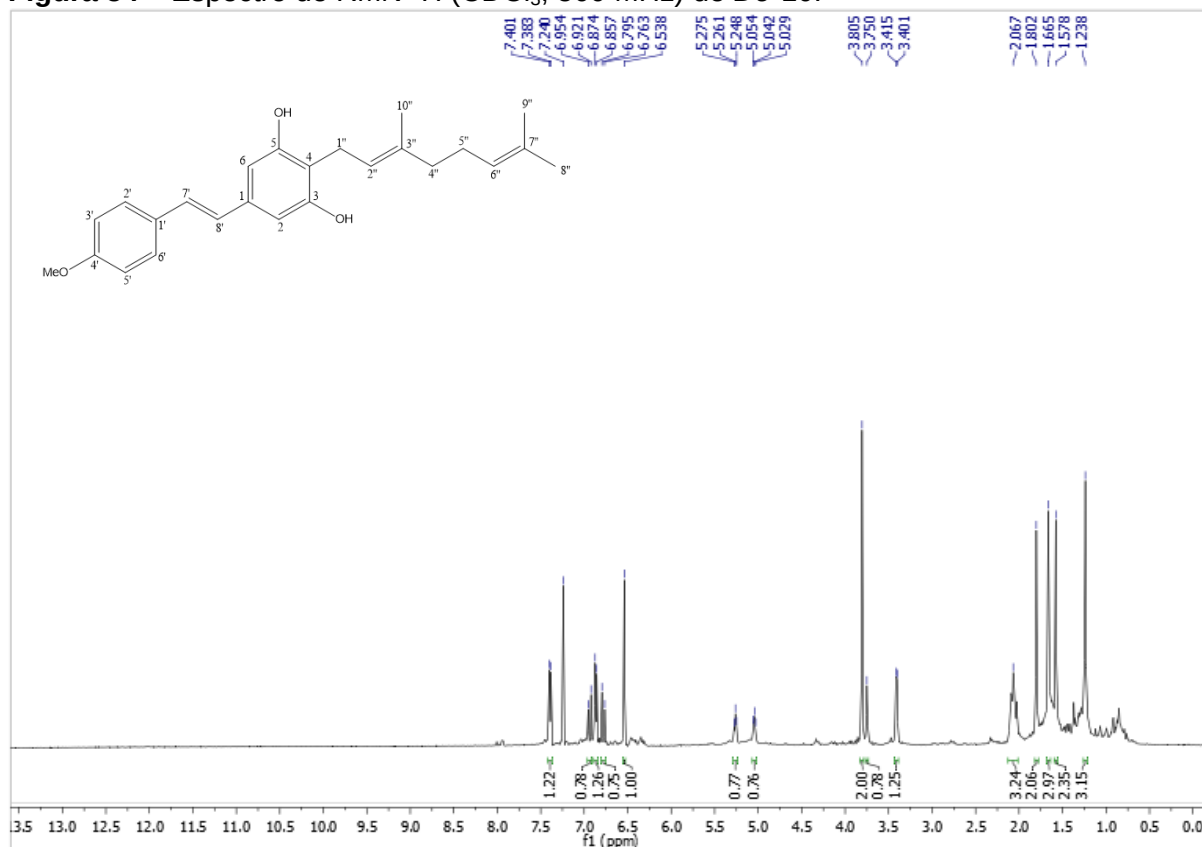


Figura 55 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De*-10 (δ 6,2 – 7,6).

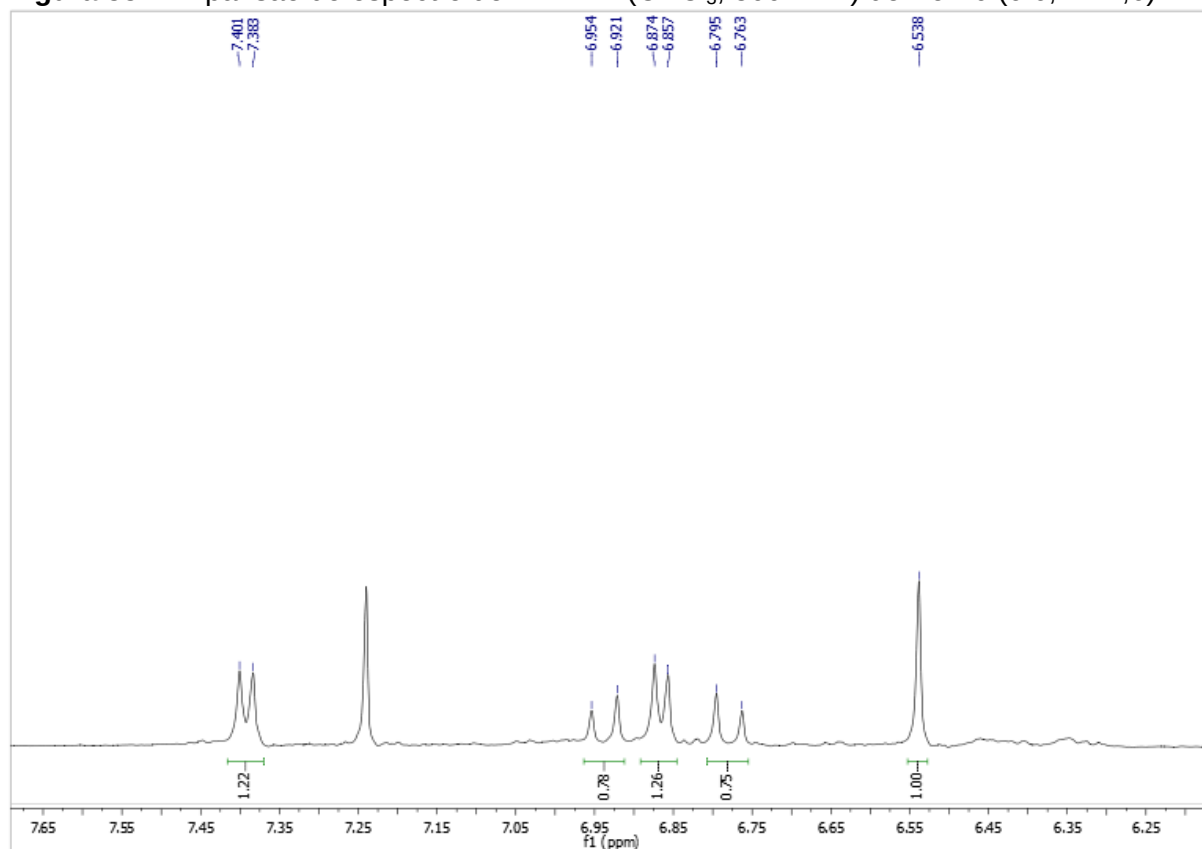


Figura 56 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De*-10 (δ 3,0 – 5,5).

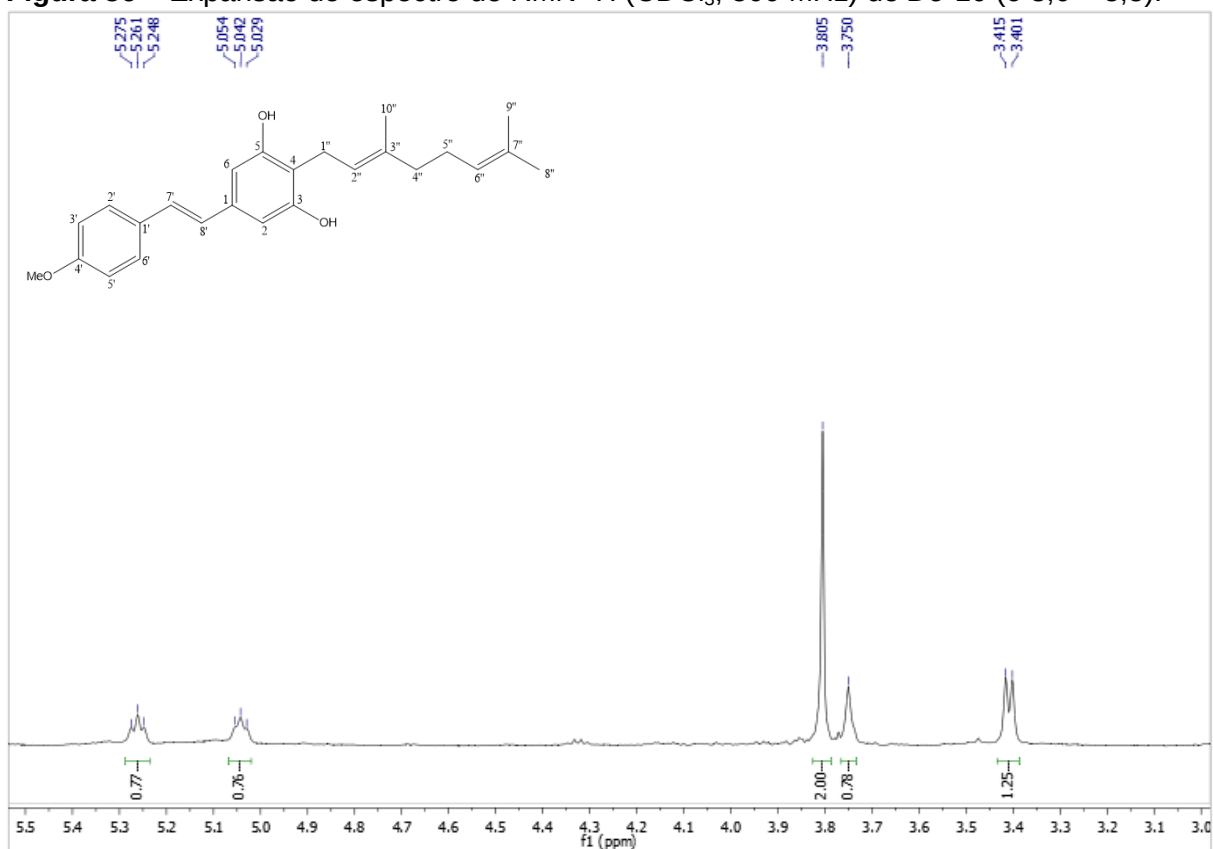


Figura 57 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *De*-10 (δ 0,8 – 2,3).

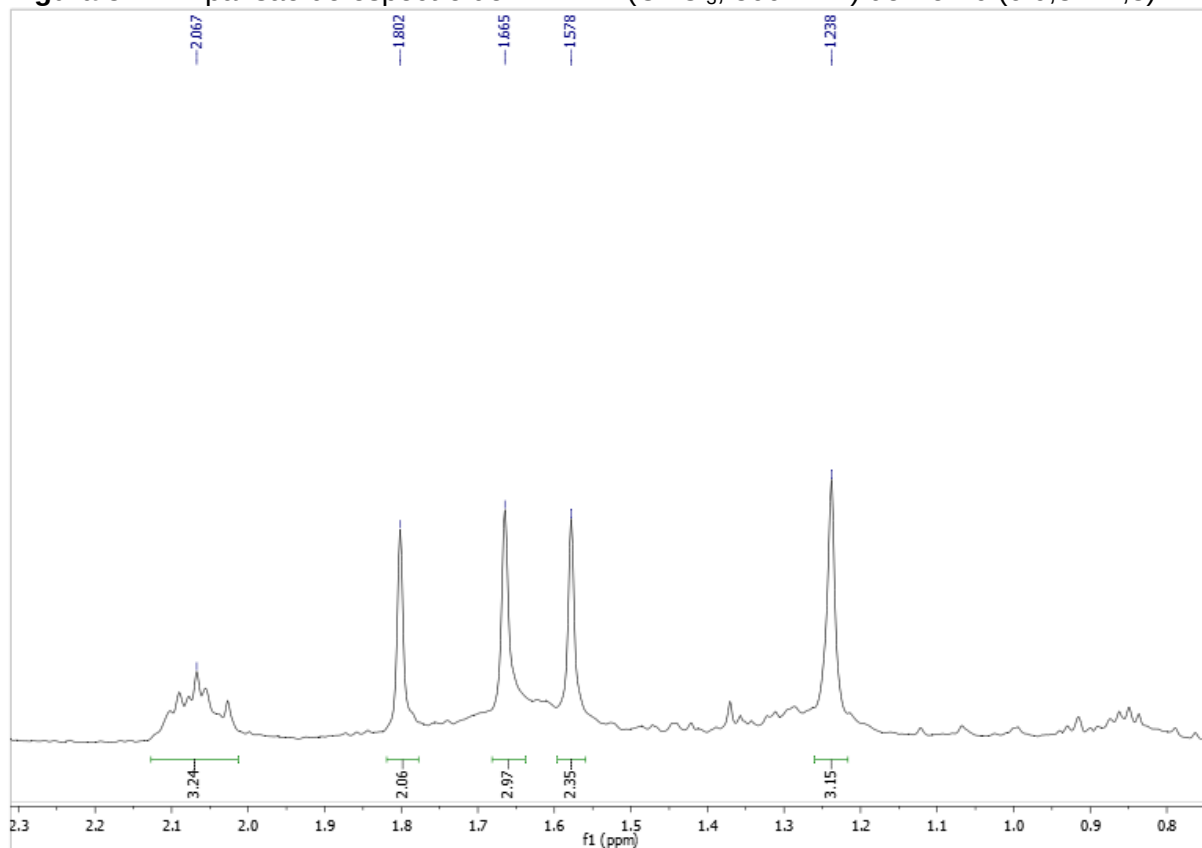


Figura 58 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *De*-10.

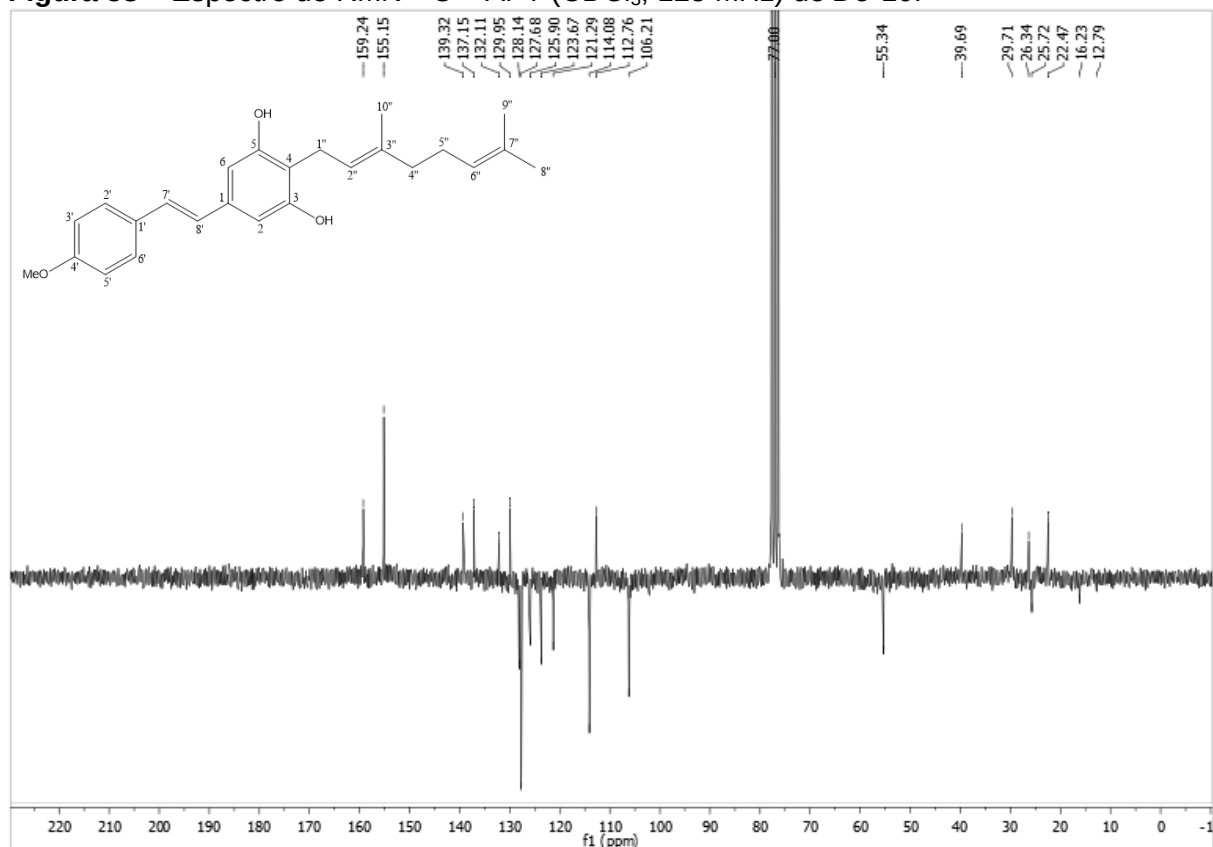


Figura 59 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *De*-10 (δ 102 – 144).

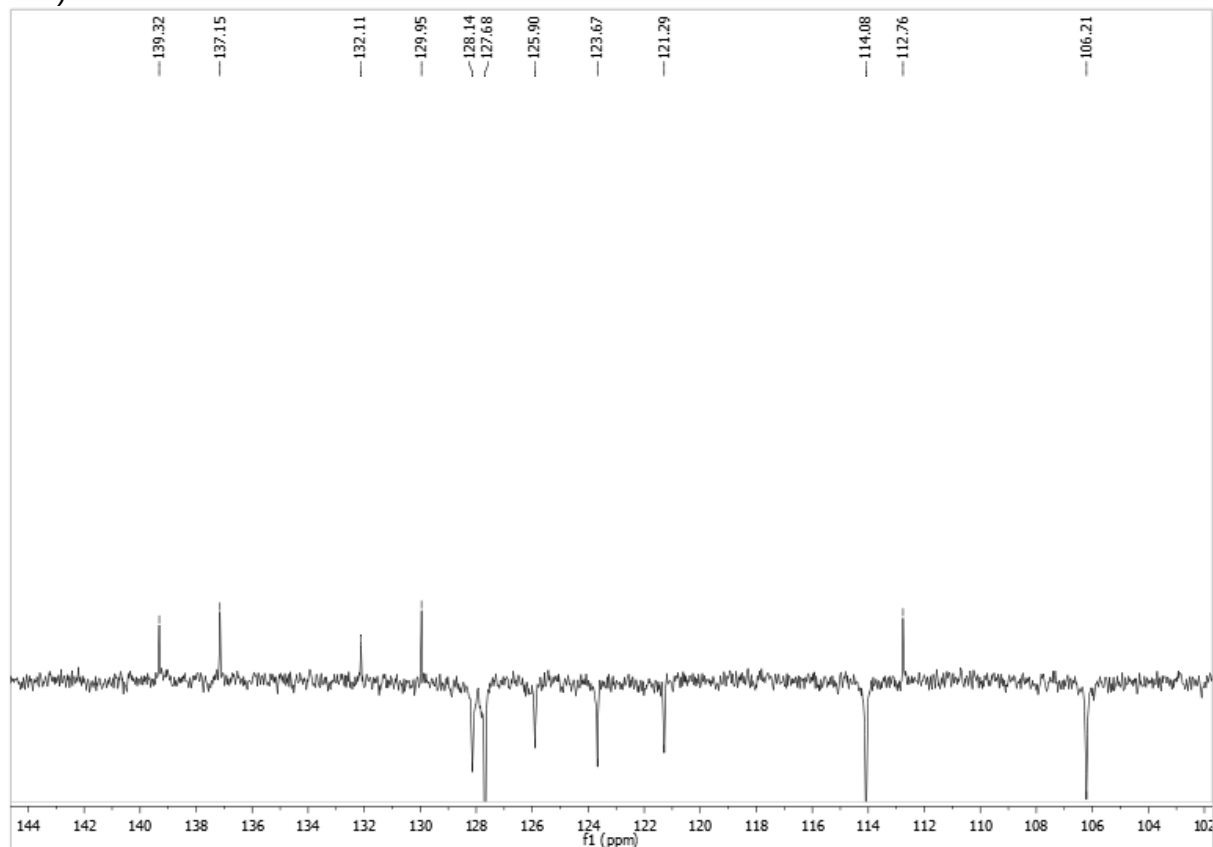


Figura 60 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de De-10.

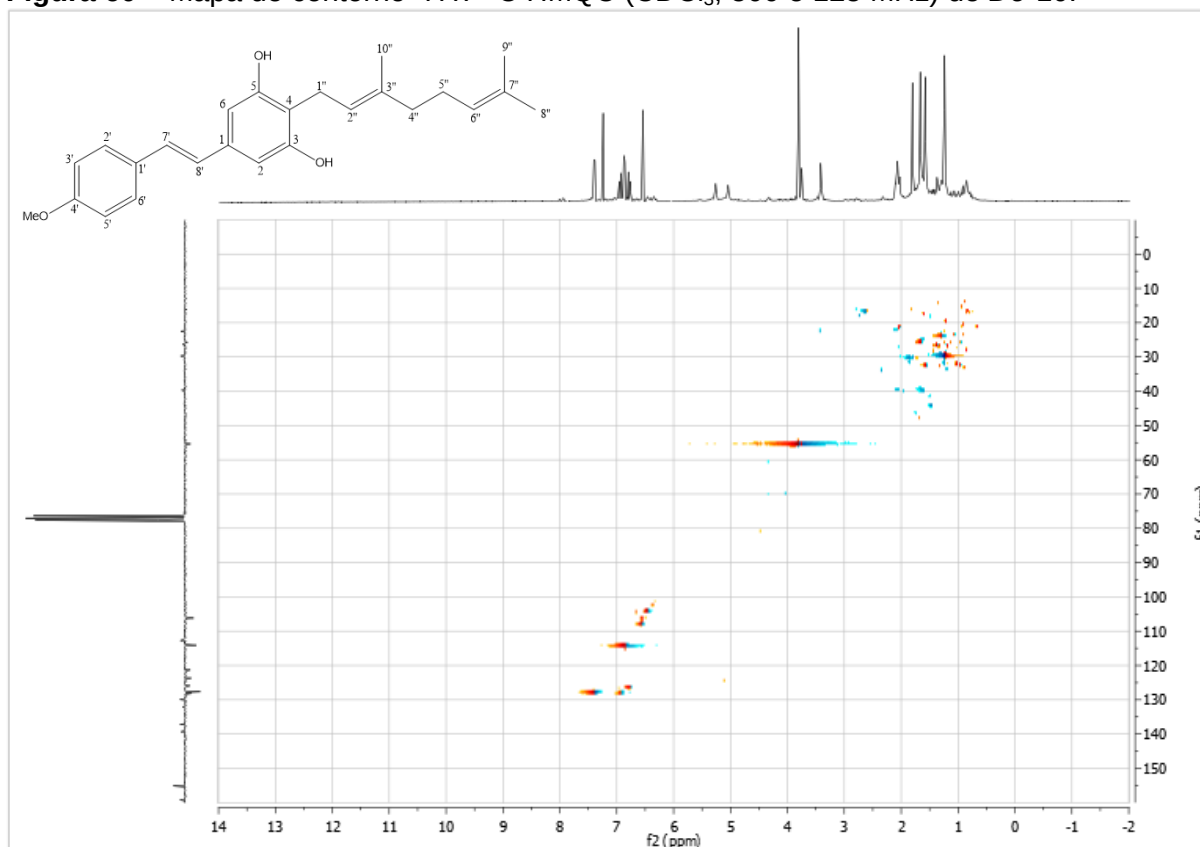


Figura 61 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de De-10 nas regiões de (6,0 – 7,9) x (100 – 140).

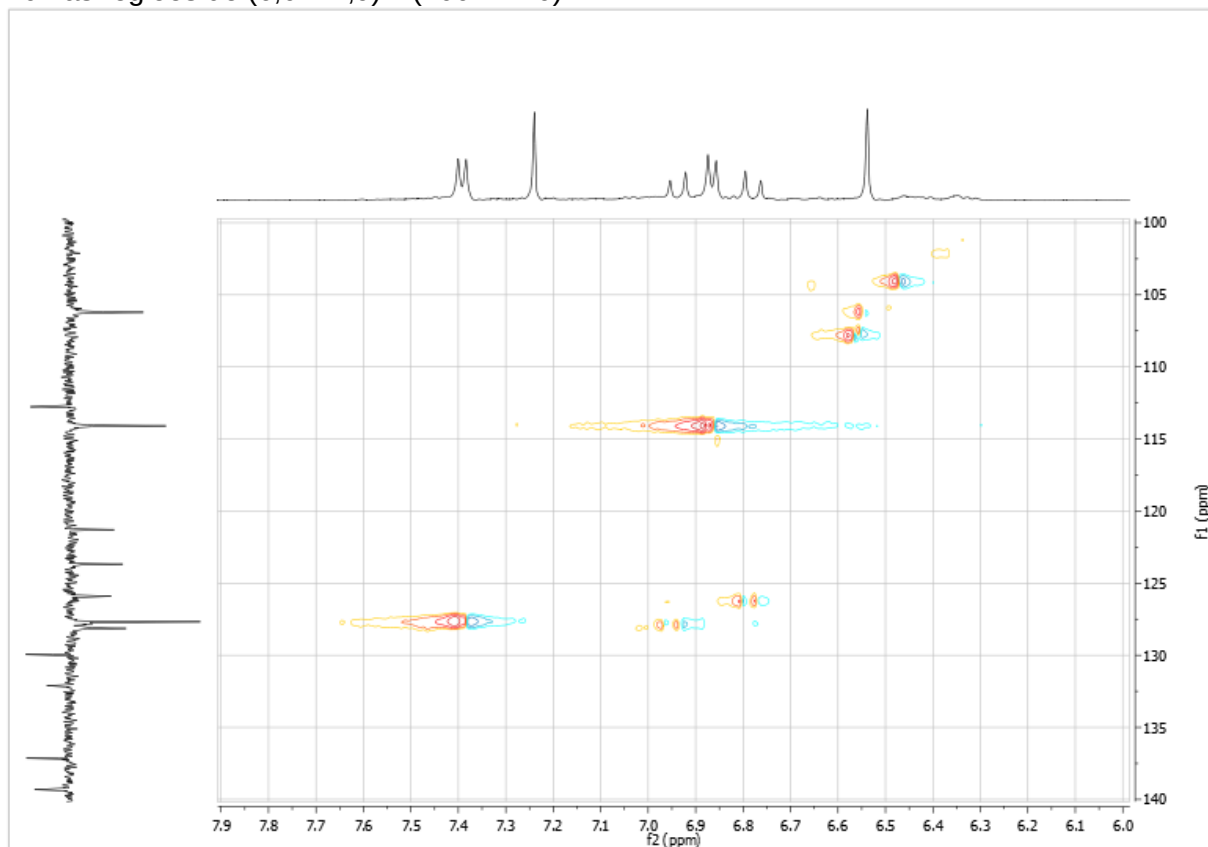


Figura 62 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de De-10 nas regiões de (0,4 – 3,0) x (10 – 60).

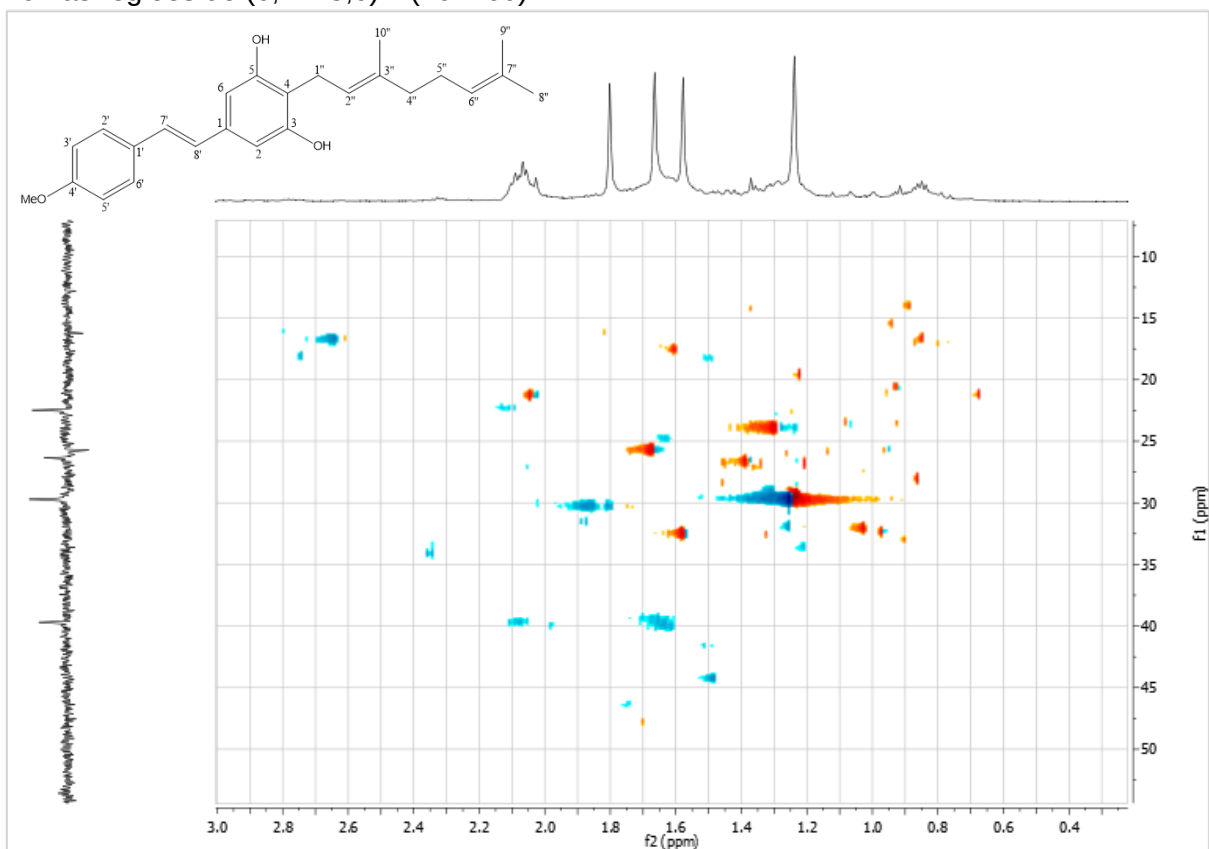


Figura 63 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de De-10.

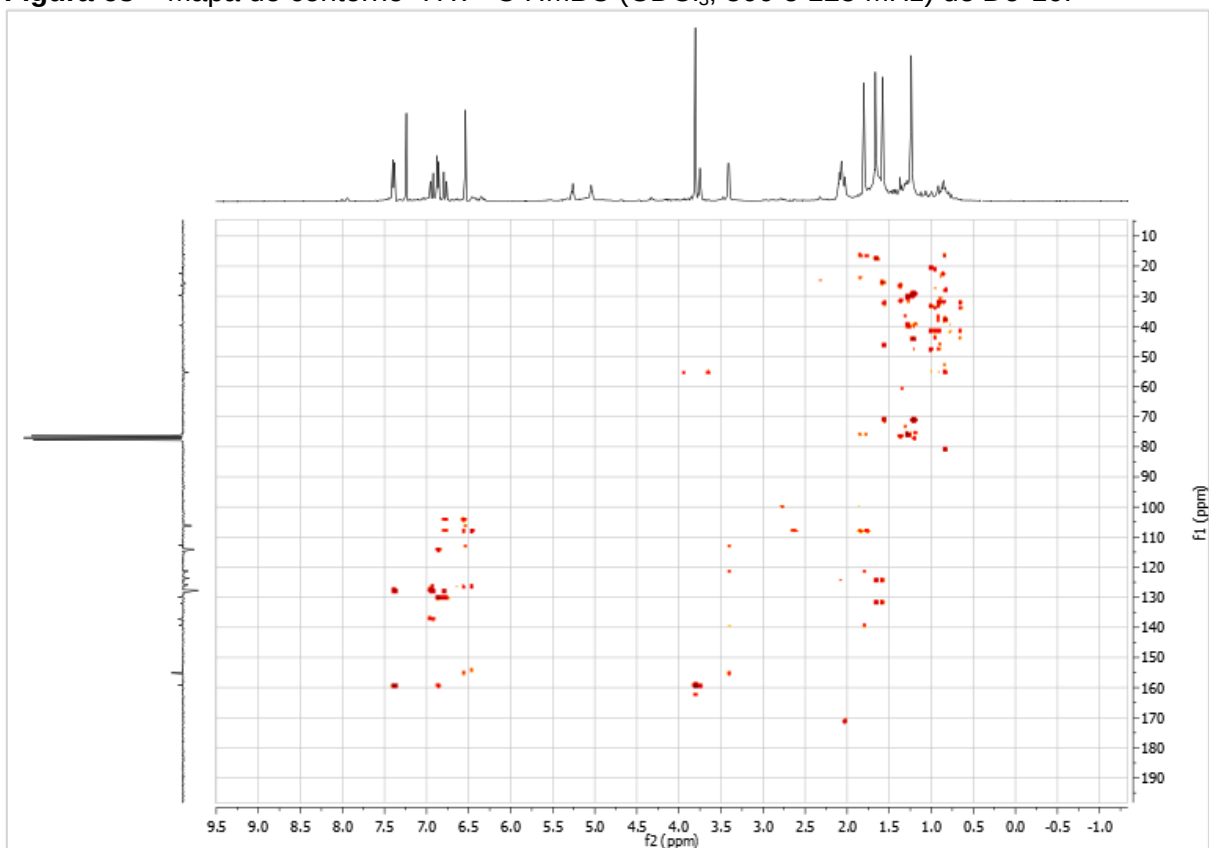


Figura 64 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de De-10 nas regiões de (6,1 – 7,7) x (100 – 165).

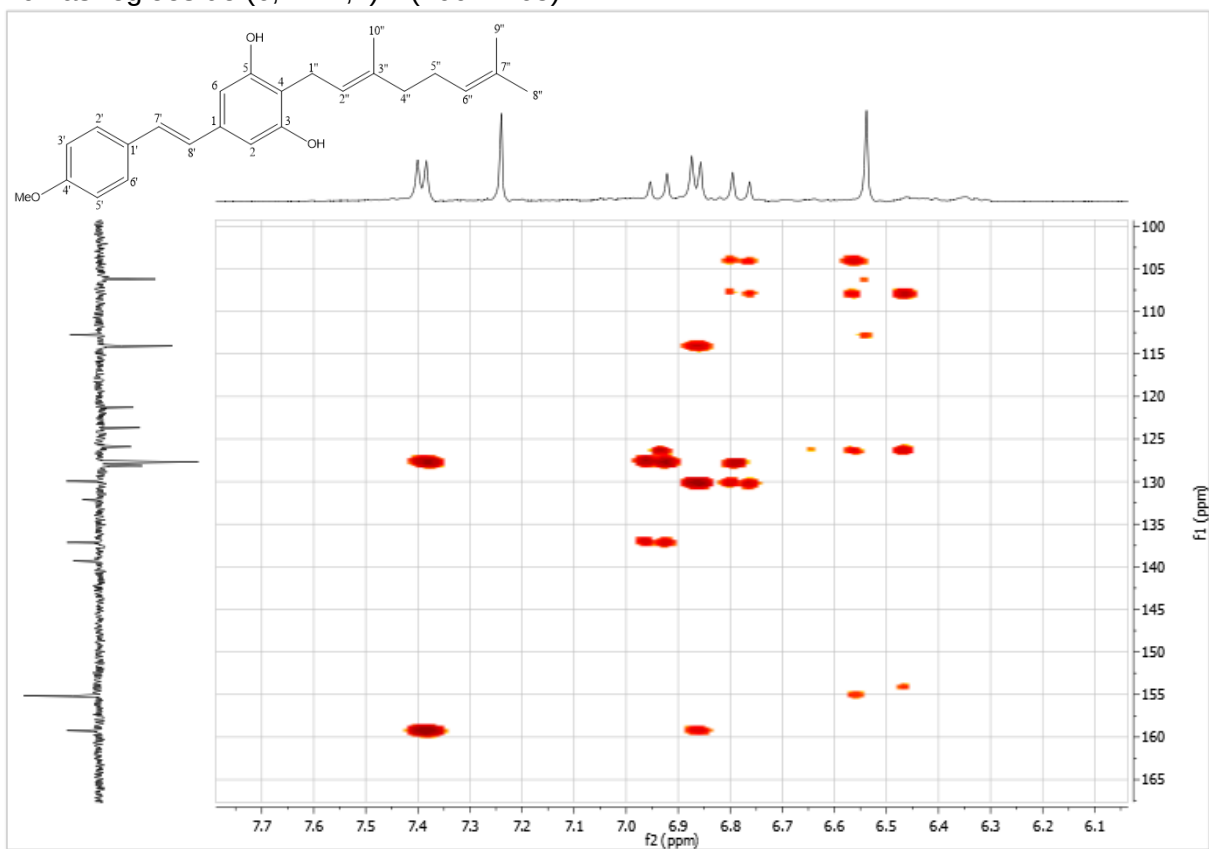
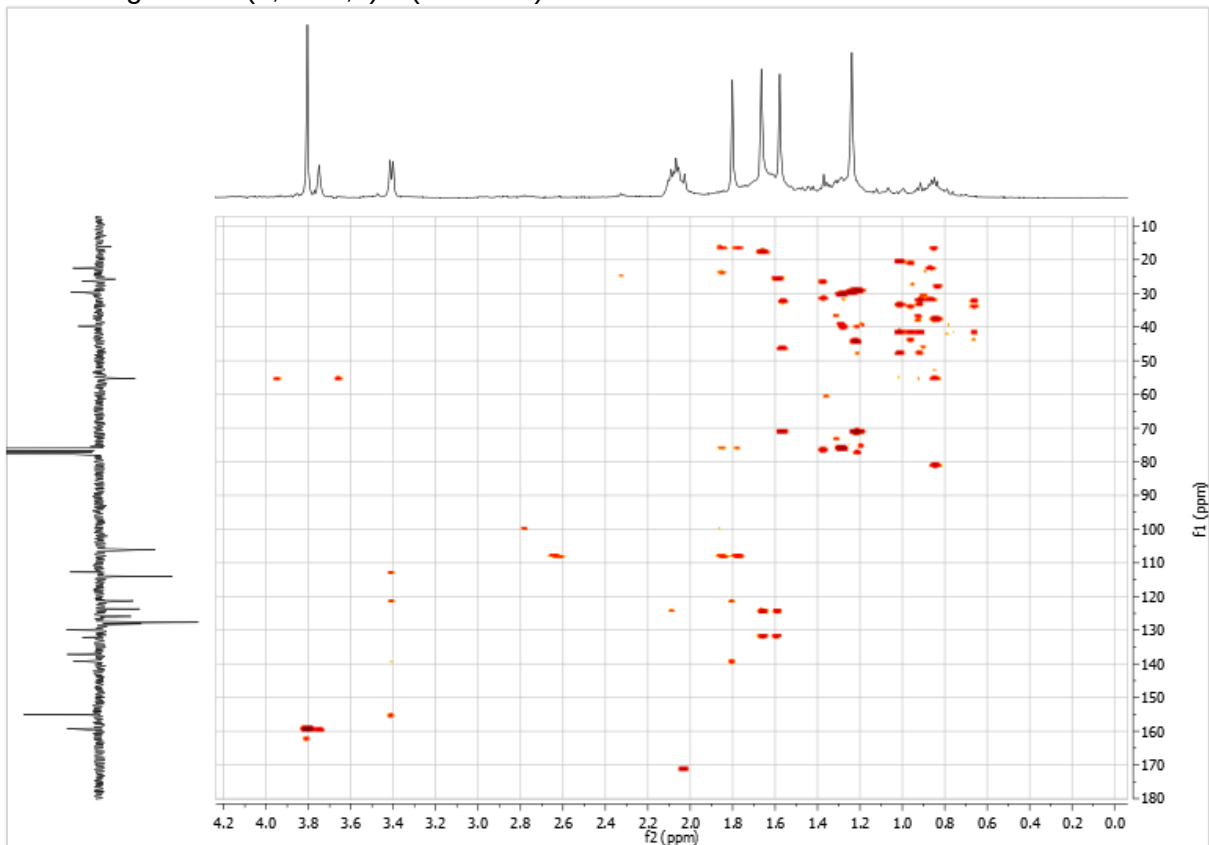


Figura 65 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de De-10 nas regiões de (0,0 – 4,2) x (10 – 180).



5.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

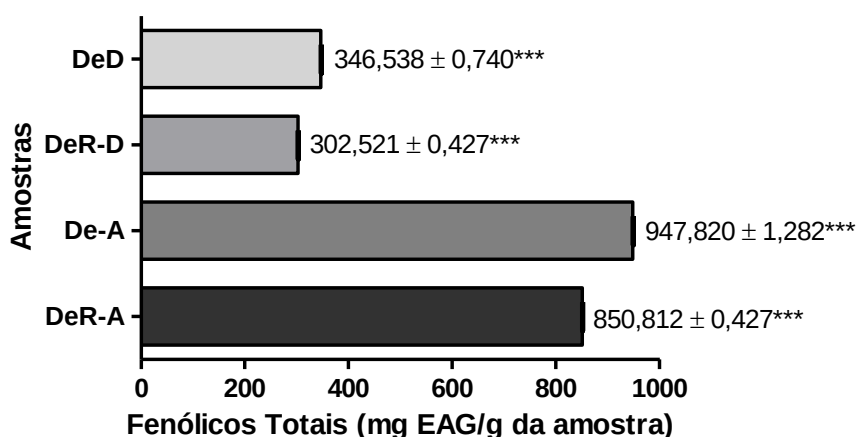
Os testes foram realizados utilizando as frações acetato de etila (AcEOt) e diclorometano (CH_2Cl_2) das partes aéreas e raízes de *Dalbergia ecastophyllum*. A quantificação de fenólicos e flavonoides totais pode estar relacionada com as propriedades bioativas da amostra, como a atividade antioxidante, para tanto, foi realizado também o teste de DPPH.

5.8.1 Teor de fenólicos totais

A identificação do teor de fenólicos totais das frações de *Dalbergia ecastophyllum* encontra-se no Gráfico 1 expressa em mg de ácido gálico/g de fração $\pm$ erro padrão.

As frações AcOEt, tanto das folhas (De-A $947,82 \pm 1,282$ mg EAG/g) quanto das raízes (DeR-A $850,812 \pm 0,427$ mg EAG/g), apresentaram um alto teor de fenólicos totais em relação as frações CH_2Cl_2 (De-D $346,538 \pm 0,74$ e DeR-D $302,521 \pm 0,427$ mg EAG/g), o que pode estar relacionado a uma grande concentração de flavonoides e compostos polifenóis, que, segundo Jiménez (2009), contribuem significativamente para a atividade antioxidante total de muitos vegetais.

Gráfico 1 – Teor de fenólicos totais das frações CH_2Cl_2 e AcOEt das partes aéreas e raízes de *Dalbergia ecastophyllum*.



*** $p < 0,0001$, ANOVA one way, pós teste de Bonferroni

De-D (Fração CH_2Cl_2 das folhas), DeR-D (Fração CH_2Cl_2 das raízes), De-A (Fração AcOEt das folhas) e DeR-A (Fração AcOEt das raízes)

De acordo com Moreira et al. (2012) os extratos dos galhos de *Dalbergia pecipularis*, apresentaram o teor de fenólicos totais da fração clorofórmica (445,65 mg EAG/g extrato) próximo ao da fase diclorometano do nosso estudo. Todavia a fração AcOEt (270,5 mg EAG/g extrato) apresentou um valor bem menor do que o encontrado na mesma polaridade tanto das folhas quanto raízes de *D. ecastophyllum*.

Contudo a espécie *Cassia australis* da família Fabaceae também apresentou um elevado teor de fenólicos totais na fração AcOEt das folhas (620,0 mg EAG/g extrato) (WALDHELM, 2010).

5.8.2 Teor de flavonoides totais

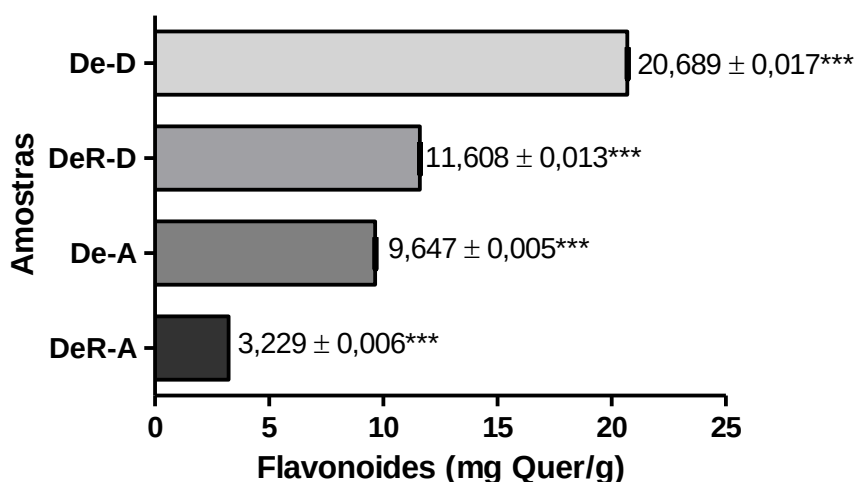
O teor de flavonoides totais das partes aéreas e raízes (frações AcOEt e CH_2Cl_2) de *D. ecastophyllum* encontra-se no Gráfico 2, expresso em mg de ácido gálico/g de fração $\pm$ erro padrão.

A fração CH_2Cl_2 das folhas apresentou o maior teor de flavonoides dentre as frações estudadas, com $20,689 \pm 0,017$ mg quercetina/g da fração, enquanto que a menor concentração foi encontrada na fração AcOEt das raízes, $3,229 \pm 0,006$ mg quercetina/g. Divergindo assim, do teste anterior onde as frações AcOEt apresentavam uma maior concentração de fenólicos totais, justificando que outros compostos fenólicos podem estar presentes nesta polaridade.

O estudo de Moreira et al. (2012) com os galhos de *D. decipularis*, apresentou uma concentração de flavonoides totais na fração clorofórmica (53,26 mg quer/g) próxima a fração AcOEt (66,53 mg quer/g). Porém testes para Taninos, revelaram sua presença apenas na fração AcOEt.

Análise realizada em outra espécie do gênero, a *D. sisso*, também mostrou-se positiva para taninos ao teste de cloreto férrico (ASIF e KUMAR, 2009), corroborando com Zampiér (2012), que no extrato bruto da folha da *Dalbergia ecastophyllum*, quatro testes para taninos deram positivos (cloreto férrico, sulfato de quinino, acetato de chumbo e solução de gelatina 2,5%). Sugerindo assim que as frações AcOEt apesar de apresentarem altas concentrações de fenólicos totais, pode-se propor que além dos flavonoides presentes, outros metabólitos fenólicos de maior polaridade, como os taninos, poderiam estar contidos na fração.

Gráfico 2 – Teor de flavonoides totais das frações CH₂Cl₂ e AcOEt das partes aéreas e raízes de *Dalbergia ecastophyllum*.



***p<0,0001, ANOVA one way, pós teste de Bonferroni

De-D (Fração CH₂Cl₂ das folhas), DeR-D (Fração CH₂Cl₂ das raízes), De-A (Fração AcOEt das folhas) e DeR-A (Fração AcOEt das raízes)

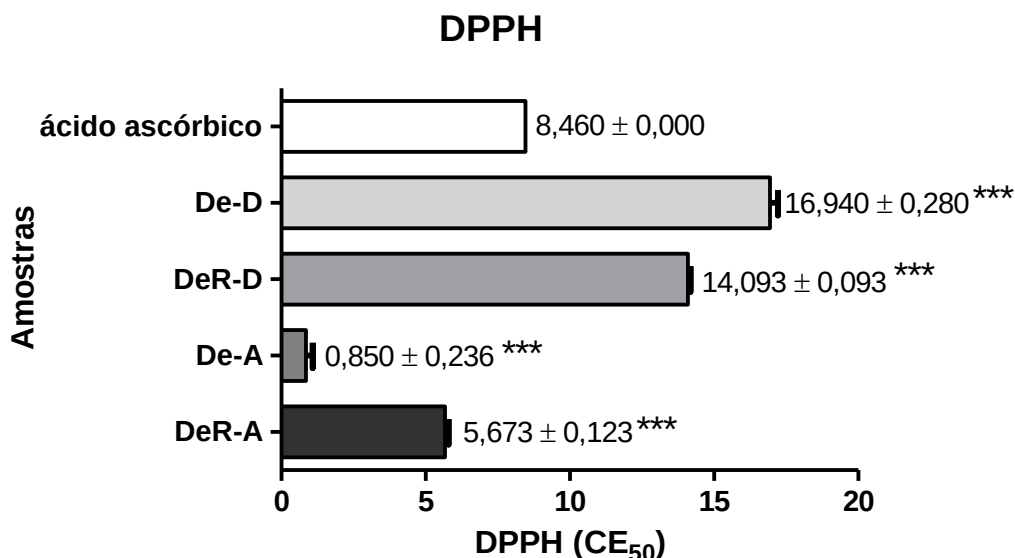
5.8.3 Atividade antioxidante pelo método de DPPH

O potencial antioxidante dos fenólicos tem sido correlacionado com a capacidade de doar radicais hidrogênio. O número e a configuração do grupo hidroxila doador, são características estruturais importantes que influenciam na capacidade antioxidante dos compostos fenólicos (SOOBRATTEE, et. al. 2005). O DPPH, um radical livre estável, recebe um elétron na presença de um sequestrador de radical livre, a absorção diminui e a resultante descoloração do meio é relatada para o número de elétron recebidos (SILVA et al. 2005).

No Gráfico 3 estão expressos os valores da atividade antioxidante (atividade sequestradora do radical DPPH•) das partes aéreas e raízes (frações AcOEt e CH₂Cl₂) de *D. ecastophyllum*.

A fração AcOEt das folhas apresentou a CE₅₀ 0,85 ± 0,236 µg/ml, atividade sequestradora do radical DPPH•, maior do que o controle (CE₅₀ ácido ascórbico = 8,46 ± 0,0 µg/ml) corroborando com o teste de fenólicos que também mostrou uma maior concentração nessa fração, sugerindo que sua atividade antioxidante pode ser proveniente de outro metabólico fenólico, além dos flavonoides.

Gráfico 3 – CE_{50} frente a redução de DPPH das frações CH_2Cl_2 e AcOEt das partes aéreas e raízes de *Dalbergia ecastophyllum*.

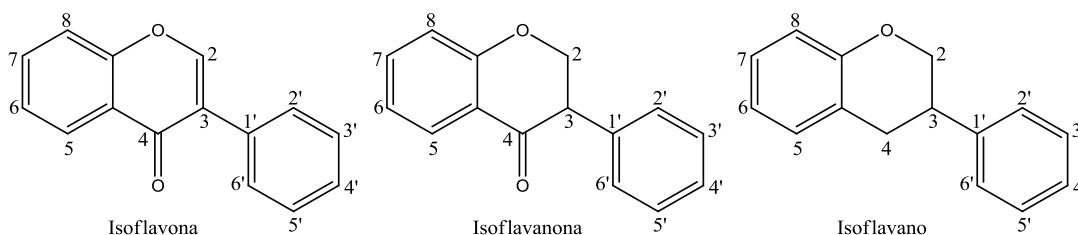


*** $p < 0,0001$, ANOVA one way, pós teste de Bonferroni

De-D (Fração CH_2Cl_2 das folhas), DeR-D (Fração CH_2Cl_2 das raízes), De-A (Fração AcOEt das folhas) e DeR-A (Fração AcOEt das raízes)

Outra espécie de *Dalbergia*, a *D. brasiliensis*, apresentou valores de CE_{50} bem maiores do que as *D. ecastophyllum*. O estudo realizado mostrou que as frações, clorofórmica e AcOEt das folhas e das cascas do caule, apresentaram resultados entre $47,31 \pm 0,13$ e $40,63 \pm 0,14$ $\mu g/ml$, sugerindo assim que a espécie *D. ecastophyllum* tem uma maior atividade antioxidante comparada à *D. brasiliensis* (DALARMIN, 2012).

Um estudo de relação estrutura atividade comparando os tipos de esqueletos flavonoídicos encontrados na espécie *D. parviflora*, com suas atividades antioxidantes frente ao ensaio de DPPH, mostrou a seguinte ordem: isoflavonas > isoflavanonas > isoflavanos (PROMDEN et al., 2014).



Estudos anteriores sobre a relação estrutura atividade de flavonoides naturais com base no ensaio de DPPH indicaram a importância de substituições di-hidroxi, isto é, uma estrutura *orto*-di-hidroxi (estrutura catecol) do anel B, o qual possui propriedades doadoras de elétrons e é um radical alvo (SILVA et al., 2002)

Contudo, a presença do impedimento estérico devido ao grupo *orto*-catecol por O-metilação afeta significativamente a atividade antioxidante. A O-metilação do grupo hidroxila na posição 4', por exemplo, também causa uma diminuição nas atividades de eliminação de radicais DPPH, como foi observado com formononetina e biochanina A, além da completa ausência de atividade de eliminação de DPPH encontrado para a genisteína sugerindo que a R4'-OH do anel B não é importante para a atividade eliminadora de radical, com este método de ensaio (PROMDEN et al., 2014).

Flavonoides com esqueleto isoflavônico 4'-metoxilados, como biochanina A e formononetina também foram isolados das frações CH₂Cl₂ de *D. ecastophyllum* e podem justificar uma menor atividade antioxidante quando comparada as frações AcOEt.

5.8.4 Correlação entre teor de fenólicos totais e flavonoides totais com a atividade antioxidante (DPPH)

A correlação entre o teor de fenólicos totais (Gráfico 1) e atividade sequestradora do radical livre DPPH, exibidas no Gráfico 3, ($R^2 = 0,934$) apresentou-se forte (Quadro 8). Corroborando com as sugestões anteriores que os fenólicos seriam responsáveis pela atividade antioxidante frente ao DPPH.

O teor de flavonoides totais, apresentado no Gráfico 2, pode não estar relacionado com a atividade antioxidante determinada pelo teste de sequestro do radical DPPH (Gráfico 3), pois apresentou uma fraca correlação ($R^2 = 0,524$) (Quadro 8). Esta correlação fortalece a ideia de que outros metabólitos fenólicos, podem ser responsáveis pela atividade antioxidante, mas certamente outros fatores também estão envolvidos.

Quadro 8 - Coeficiente de correlação (R^2) entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante e o teor de flavonoides totais e a atividade antioxidante.

Correlação	R^2
Teor de Fenólicos totais x DPPH	0,934
Teor de Flavonoides totais x DPPH	0,524

CONCLUSÃO

6.0 CONCLUSÃO

- A continuação do estudo das partes aéreas de *Dalbergia ecastophyllum* apresentou três classes metabólicas: um terpenoide (fitol), dois porfirínicos (^{13}C -hidroxi- ^{17}O -etoxifeoforbídeo A e feoftina A) e um flavonoide (isoquercitrina).
- O estudo com as raízes de *Dalbergia ecastophyllum* apresentou quatro classes metabólicas: dois terpenoides (cedrol e acetato de ácido morolique), dois flavonoides (daidzeina e formononetina), uma mistura de esteroide (β -sitosterol e estigmasterol) e um stilbeno (4-geranil-3,5-dihidroxi-4'-metoxi-*trans*-stilbeno).
- A substância 4-geranil-3,5-dihidroxi-4'-metoxi-*trans*-stilbeno foi isolada pela primeira vez na literatura.
- A fração acetato de etila das folhas (De-A) apresentou um maior teor de fenólicos totais ($947,82 \pm 1,282$ mg EAG/g) e menor CE_{50} ($0,85 \pm 0,236$ $\mu\text{g/ml}$), confirmando a correlação entre os testes ($R^2 = 0,934$).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989.

ALARIF, W.M.; AYYAD, S.N.; AL-LIHAIBI, S.S. Acyclic diterpenoid from the red alga *Gracilaria foliifera*. **Rev. Latinoamer. Quím.** v. 38, n. 1, p. 52-57, 2010.

ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, p. 1–15, 2008.

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, 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. Dissertação. Universidade Estadual de Santa Cruz. 2001.

AGETA, H.; ARAI, Y.; SUZUKI, H.; KIYOTANI, T.; KITABAYASHI, M. NMR Spectra of Triterpenoids. III. Oleanenes and Migrated Oleanenes. **Chem. Pharm. Bul.** v. 43, n. 2, p. 189-203, 1995.

ALARIF, W.M.; AYYAD, S.N.; AL-LIHAIBI, S.S. Acyclic diterpenoid from the red alga *Gracilaria foliifera*. **Rev. Latinoamer. Quím.** v. 38, n. 1, p 52-57, 2010.

ARAÚJO, R. M.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Pterocarpanes and a Novel Flavanone from *Harpalyce brasiliiana* Roots. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 5, p. 935-938, 2009.

ASIF, M.; KUMAR, A. Anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Dalbergia sissoo* (roxb.) Bark. **Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p.39–50, 2009.

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

BERNARDES, N. R. Estudo da Composição Química e dos Efeitos Imunofarmacológicos do Extrato dos Frutos da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) 2010. 131 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2010.

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

BREM, B.; SEGER, C.; PACHER, T.; HARTL, M.; HADACEK, F.; HOFER, O.; VAJRODAYA, S.; e GREGER, H. Antioxidant dehydrotocopherols as a new chemical character of *Stemona* species. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2719–2729, 2004.

BUCHANAN, M. S.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y. Phytol esters and phaeophytins from the hornwort *Megaceros flagellaris*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1373-1376, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 14 de maio de 2014.

BROWN, G.D.; LIANG, G.; SY, L. Terpenoids from the seeds of *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 64, p.303-323, 2003.

CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K.A.; DA CUNHA, A.P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p.742-745, 2003.

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

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.

CARRATU, E.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable. **Annali dell' Istituto Superiore di Sanità**, v. 41, n. 1, p. 7-16, 2005.

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

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

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.

CHEN, J.; LIU, J.; ZHANG, L.; WU, G.; HUA, W.; WU, X.; SUN, H. Pentacyclic triterpenes. Part 3: Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2915-2919, 2006.

CHENG, S.S.; CHUNG, M.J.; LIN, C.Y.; WANG, Y.N. e CHANG, S.T. Phytochemicals from *Cunninghamia konishii* Hayata Act as Antifungal Agents. *J. Agric. Food Chem.* v. 60, pp. 124–128, 2012.

CHRISTENSEN, L.P.; LAM, J.; SIGSGAARD, T. A novel stilbene from the wood of *Chlorophora excelsa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 3014 – 3016, 1988.

COLOMA, A. G.; BALBOA, C. L.; REINA, O. S. M.; FRAGA, B. M. Triterpene-based plant defenses. **Phytochemistry**, v. 10, p. 245-260, 2011.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Nat. Prod. Rep.**, v.17, p. 463-482, 2005.

COSTA, D.A.; SILVA, D.A.; CAVALCANTI, A.C.; MEDEIROS, M.A.A; LIMA, J.T; CAVALCANTE, J.M.S.; SILVA, B.A.; AGRA, M.F.; SOUZA, M.F.V. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-*o*- β -d-(6''-*e*-*p*-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p.901-903, 2007

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

DA CUNHA, A.P.M.A., 2003. *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian

DALARMI, L. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas da *Dalbergia brasiliensis*. Dissertação, Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 109 p. 2012.

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 Chem**, v. 99, p.431-435, 2006.

DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. Tese. Universidade Estadual de Campinas, p. 133, 2007.

DE SOUZA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; ALMEIDA, R.N. Influence of the chirality of (*R*)-(-)- and (*S*)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study. **Chirality**, v. 19, p. 264-268, 2007.

DALEPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 1, p. 1-8, 2013.

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

DUEÑAS, M.; GONZALEZ-MANZANO, S.; SURCO-LAOS, F.; GONZALEZ-PARAMAS, A.; SANTOS-BUELGA, C. Characterization of Sulfated Quercetin and Epicatechin Metabolites. **J. Agric. Food Chem**, v. 60, p. 3592–3598, 2012.

DZUBAK P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.D.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBANC, M. e SAREK, J. Previous review: **Natural Products Rep.**, v. 22, n. 487, 2005.

FANG, Y. N.; LIU, G. T. Effect of isorhapontigenin on respiratory burst of rat neutrophils. **Phytomedicine**, v. 9, p. 734-738, 2002.

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

FRANCIS, J.K., 2001. *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taubert. [online] **US Forest Service** Disponível em: <<http://www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/shrubs/Dalbergia>> [Acessado em: 30/05/2011].

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.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4^a ed. Oxford University Press: Oxford, 2007.

HARBORNE, J.B. *The Flavonoids: advances in research since 1986*. London: Chapman & Hall, 1994.

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. **J Ethnopharmacol**, v. 101, p.110-115, 2005.

HOSCH, W. L. Fabaceae. **Britannica Academic**. Disponível em: <<http://academic-eb.britannica.ez15.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/105203>> [Acessado em: 01/09/2016].

HOSU, A.; CRISTEA, V.M.; CIMPOIU, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 150, p. 113–118, 2014.

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. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p.276-283, 2005.

HUANG, X.; LI, M.; XU, B.; ZHU, X.; DENG, Z.; LIN, W. Proteasome and NF- κ B inhibiting phaeophytins from the green alga *Cladophora fascicularis*. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 582-592, 2007.

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. **J Nat Prod**. v. 66, p.1574-1577, 2003,

JAH, H.C.; ZILLIKEN, F.; BREITMAIER, E. Carbon-13 chemical shift assignments of chromones and isoflavones **Can. J. Chem.** v. 58, n. 121, p. 1211-1219, 1980.

JERZ, G.; ARREY, T. N.; WRAY, V.; DU, Q.; WINTERHALTER, P. Structural characterization of 13²-hydroxy-(13²-S)-phaeophytin-a from leaves and stems of *Amaranthus tricolor* isolated by high-speed countercurrent chromatography. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 413-413, 2007.

JIMÉNEZ C. I. E.; MARTÍNEZ, E. Y. C; FONSECA, J. G. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. **Rev Fac Med UNAM**, v. 52, n. 2, p. 73-75, 2009.

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

JOLY, C.A.; HADDAD, C.F.B.; VERDADE, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; BOLZANI, V.S.; BERLINCK, R.G.S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Rev. USP**, n. 89, p. 114-133, 2011.

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.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.

KAWANISHI, S.; HIRAKU, Y.; OIKAWA, S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. **Mutat Res.** v. 488, p. 65–76, 2001.

KHAN, M.A.; BASEER, A. Increased malondialdehyde levels in coronary heart disease. **J Pak Med Assoc.** v. 50, p. 261–264, 2000.

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*. Volume 3, Lalitmohan Basu Parkashan: Allahabad, 1991.

KOBAYASHI, M.; ISHIDA, K.; TERABAYASHI, S.; MITSUHASHI, H. 10-hydroxypheophytins and a new norlabdane diterpene from the leaves of *Cupressus fenubris*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 12, p. 3348-3349, 1991.

KORKINA, L.G.; AFANS'EV, I.B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. **Adv Pharmacol**, v. 38, p. 151–163, 1997.

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

LEITE, M.P.; FASSIN, J.R.J.; BAZILONI, E.M.F.; ALMEIDA, R.N.; MATTEI, R.; LEITE, J.R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18 (Supl.), p. 661-666, 2008.

LIANG, Z.; ZHANG, L.; LI, L.; LIU, J.; LI, H.; ZHANG, L.; CHEN, L.; CHENG, K.; ZHENG, M.; WEN, X.; ZHANG, P.; HAO, J.; GONG, Y.; ZHANG, X.; ZHU, X.; CHEN, J.; LIU, H.; JIANG, H.; LUO, C.; SUN, H. Identification of pentacyclic triterpenes derivatives as potent inhibitors against glycogen phosphorylase based on 3D-QSAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2011-2021, 2011.

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

LINARES, I.B.; ARROYO, S.F.; ROMAN, D.A.; SUÁREZ, P.A.P.; VAL-DÍAZ, R.D.; GONZÁLES, I.A.; GUTIÉRREZ, A.F.; LEYVA, J.F.G.; e CARRETERO, A.S. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). **Ind. Crops Prod.**, v. 69, p. 385–394, 2015.

LOPÉZ, C.A.A., Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v.1, n.1, p.19-27, 2006.

LOPEZ, B.G.C.; LOURENÇO, C.C.; ALVES, D.A.; MACHADO, D.; LANCELLOTTI, M. e SAWAYA, A.C.H.F. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: analert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, p. 677-687, 2015.

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

MARIOD, B. A.; IBRAHIM, R. M.; ISMAIL, M.; ISMAIL, N. Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. **Food Chemistry**, v. 118, p. 120–127, 2009.

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

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

MATSUDA, A.H.; MACHADO, L.B.; MASTRO, N.L. Thermal analysis applied to irradiated propolis. **Radiat Phys Chem**, v.63, p.353-355, 2002.

MATSUO, A.; ONO, K.; HAMASAKI, K.; NOZAKI, H. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p. 427-430, 1996.

MELOS, J. L. R.; SILVA, L. B.; PERES, M. T. L. P.; MAPELI, A. M.; FACCENDA, O.; ANJOS, H. H.; TORRES, T. G.; TIVIROLI, S. C.; BATISTA, A. L.; ALMEIDA, F. G. N.; FLAUZINO, N. S.; TIBANA, L. A.; HESS, S. C.; HONDA, N. K. Constituintes

químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* HUMB. & BONPL. EX. WILLD (PTERIDACEAE). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.292-297, 2007.

MOREIRA, A.X.; PELUCHI, E.C.; NASCIMENTO, I.A.; CLAUDINO, G.P. Avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de diferentes partes de *Dalbergia decipularis*. 35a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012.

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

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

NIELSEN, K.F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **J Chromatogr A**, v. 1002, n.1-2, p.111-136, 2003.

NOGUEIRA, T. B. S. S. Primeiras substâncias de *Cordia exaltata* Lam. - Uma contribuição para quimiotaxonomia da família Boraginaceae. 2009. 151 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

OMAR, R.M.K.; IGOLI, J.; GRAY, A.I.; EBILOMA, G.U.; CLEMENTS, C.; FEARNLEY, J.; EBEL, R.A.E.; ZHANG, T.; KONING, H.P. e WATSON, D.G. Chemical characterisation of Nigerian red propolis and its biological activity against *Trypanosoma Brucei*. **Phytochemical Analysis**. 2015

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.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. 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**, v. 23, p. 2475-2483, 1976.

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

PERAZZO, F.F.; LIMA, L.M.; MAISTRO, E.L.; CARVALHO, J.E.; REHDER, V.L.G.; CARVALHO, J.C.T. Effect of *Artemisia annua* L. leaves essential oil and ethanol extract on behavioral assays. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 686-689, 2008.

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.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANI, R.A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p.45-61, 2002.

PROMDEN, W.; MONTHAKANTIRAT, O.; UMEHARA, K.; NOGUCHI, H.; DE-EKNAMKUL, W. Structure and Antioxidant Activity Relationships of Isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*. **Molecules**, v. 19, p. 2226-2237, 2014.

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

RIBEIRO, D.R.; ALVES, A.V.F.; SANTOS, E.P.; PADILHA, F.F.; GOMES, M.Z.; RABELO, A.S.; CARDOSO, J.C.; MASSARIOLI, A.D.; ALENCAR, S.M. e ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C. Inhibition of DMBA-induced oral squamous cells carcinoma growth by brazilian red propolis in rodent model. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.117, n.2, p.85-95, 2015.

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. **Rev Bras Farmacogn**, v. 13, p.71-74, 2003.

ROCHA e SILVA, H.; SILVA, C.M.; CALAND NETO, L.B.; LOPES, J.A.D.; CITÓ, A.M. das G.; CHAVES, M.H. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.

RODRIGUES, M.V.N; REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA JR., S.; SANTOS, A.S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Rev. Multiciências**, v.7, 2006.

ROTHER, J.; WAKILEH, M.; DREIBIGER, K.; WEBER, H. The flavonoid beverage Haelan 951 induces growth arrest and apoptosis in pancreatic carcinoma cell lines *in vitro*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, p. 1-13, 2015.

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.

RUSSO, M.; DUGO, P.; MARZOCCO, S.; INFERRERA, V.; MONDELLO, L. Multidimensional preparative liquid chromatography to isolate flavonoids from bergamot juice and evaluation of their anti-inflammatory potential. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 24, p. 4196-4203, 2015.

SASTRE, J.; PALLARDO, F.V.; VINA, J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. **IUBMB Life**, v. 49, p. 427–435, 2000.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004.

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

SCHWIKKARD, S. L.; MULHOLLAND, D. A.; HUTCHINGS, A. Phaeophytins from *Tapura fisheri*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2391-2394, 1998.

SILVA, T.M.S.; CAMARA, C.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GIULIETTI, A.M. Feoforbídeo (etoxi-purpurina-18) isolado de *Gossypium mustelinum* (Malvaceae) **Química Nova**, v. 33, n. 3, p.571-573, 2010.

SILVA, B. B. Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica. (Tese), PPGO-FOP/UNICAMP, 2008.

SILVA, M. M.; SANTOS, M. R.; CAROCO, G.; ROCHA, R.; JUSTINO, G.; MIRA, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A re-examination. **Free Radic. Res.** v. 36, p. 1219–1227, 2002.

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

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 7. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2010.

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.

SHILOVA, I. V.; SEMENOV, A. A.; SUSLOV, N. I.; KOROTKOVA, E. I.; VTORUSHINA, A. N.; BELYAKOVA, V. V. Chemical composition and biological

activity of a fraction of meadowsweet extract. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. Vol. 43, No. 4, p.7-11, 2009.

SOARES, R. S. Estudo fitoquímico de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae) 2012. 126 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 170-175, 2007.

TAKABE, W.; NIKI, E.; UCHIDA, K.; YAMADA, S.; SATOH, K.; NOGUCHI, N. Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein. **Carcinogenesis**. v. 22, p. 935–941, 2001.

TANAKA, K.; OHGO, Y.; KATAYANAGI, I.; YASUI, K.; HIRAMOTO, S.; IKEMOTO, H.; NAKATA, Y.; MIYOSHI, N.; ISEMURA, M.; OHASHI, N.; IMAI, S. Anti-inflammatory effects of green soybean extract irradiated with visible light. **Scientific Reports**, v.4, n. 4732, 2014.

TELES, Y. C. F.; GOMES, R. A.; OLIVEIRA, M. S.; LUCENA, K. L.; NASCIMENTO, J. S.; AGRA, M. F.; IGOLI, J. O.; GRAY, A. I.; SOUZA, M. F. V. Phytochemical investigation of *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl and evaluation of its antibacterial activity. **Química Nova**, v. 37, n.9, 2014.

TEERASRIPREECHA, D. et al. In vitro antiproliferative/ cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 30, n. 1, p. 12-27, 2012.

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). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 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.; LOGUERCIO, 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.

VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p.519-528, 2005.

WALDHELM, K.C.V. FLAVONÓIDES e ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Cassia australis* (Fabaceae, Leguminosae). Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, 2010. 100 p. Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ NPPN/ Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, 2010.

WEN, X.; SUN, H.; LIU, J.; CHENG, K.; ZHANG, P.; ZHANG, L.; HAO, J.; ZHANG, L.; NI, P.; ZOGRAPHOS, S. E.; LEONIDAS, D. D.; ALEXACOU, K.M.; GIMISIS, T.; HAYES, J.M.; OIKONOMAKOS, N.G. Naturally Occurring Pentacyclic Triterpenes as Inhibitors of Glicogen Phosphorylase: Synthesis, Structure – Activity Relationships, and Xray Crystallographic Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3540-3554, 2008.

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.

ZIELINSKA, A.; PARADOWSKA, K.; JAKOWSKI, J.; WAWER, I. ¹³C CP MAS NMR and GIAO-CHF/DFT calculations of flavonoids: Morin, kaempferol, tricetin, genistein,

formononetin and 3,7-dihydroxyflavone. **Journal of Molecular Structure**, v. 873, p. 109–116, 2008.