

**ESTUDO FITOQUÍMICO-BIOLÓGICO DA MADEIRA DA ESPÉCIE**  
***Dalbergia glaucescens* (Mart. ex Benth.) Benth.**

**GRAZIELLA PENHA CLAUDINO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY**

**RIBEIRO - UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ**

**FEVEREIRO-2011**

**ESTUDO FITOQUÍMICO-BIOLÓGICO DA MADEIRA DA ESPÉCIE**  
***Dalbergia glaucescens* (Mart. ex Benth.) Benth.**

**GRAZIELLA PENHA CLAUDINO**

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.

Orientadora: Professora Doutora Leda Mathias

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ  
FEVEREIRO-2011

**ESTUDO FITOQUÍMICO-BIOLÓGICO DA MADEIRA DA ESPÉCIE**  
***Dalbergia glaucescens* (Mart. ex Benth.) Benth.**

**GRAZIELLA PENHA CLAUDINO**

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.

Tese aprovada em 01 de fevereiro de 2011.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Olney Vieira da Motta (Doutor, Biociências e Biotecnologia) - UENF

---

Prof. Carlos Roberto Ribeiro Matos (Doutor, Química Orgânica) - UENF

---

Prof. Roberto Pereira Santos (Doutor, Química Orgânica) - IFES

---

Prof<sup>a</sup>. Leda Mathias (Doutora, Química de Produtos Naturais) - UENF  
(Orientadora)

Pedi, e dar-se-vos-à; buscai, e encontrareis; batei, e abrir-se-vos-à.

(Mateus,7:7)

Dedico este trabalho a minha família, especialmente aos meus pais, meu irmão e ao meu marido que sempre apóiam e confiam nos meus projetos.

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus em primeiro lugar.

Aos meus pais e meu irmão por todo incentivo e paciência.

Ao Ildomar por todo apoio, paciência e pelas palavras de encorajamento e incentivo.

Á professora Dra. Leda Mathias pelos valiosos ensinamentos, orientações, sugestões, apoio, confiança e principalmente pela amizade.

Ao professor Dr. Raimundo Braz-Filho pela co-orientação.

Ao professor Dr. Olney Vieira da Motta por toda a orientação no desenvolvimento dos testes antimicrobianos que foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal.

Aos professores Carlos Roberto Ribeiro Matos, Edimilson José Maria, Walter Luis Brasil Medeiros e Rosana Aparecida Giacomini pelas contribuições e sugestões.

Aos técnicos Tânia Virginia de Souza e Silva, Maristela de Lima Dias e Roberto Ottoni Portela Couto pela gentileza e atenção.

Aos demais professores do curso de pós-graduação em Ciências Naturais que contribuíram para o trabalho desta tese.

A Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Centro de Ciência e Tecnologia (CCT) pelo oferecimento do curso de Doutorado em Ciências Naturais e pela bolsa concedida.

A todos os colegas de laboratório, Fernanda Mendes de Azevedo, Roberta Ferreira Nagipe da Silva, Leonardo João Ferreira, Rennê Costa Duarte e outros que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, pelas sugestões e pelo ótimo convívio no laboratório.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos.....	ix
Lista de esquemas.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Lista de tabelas.....	xvii
Resumo.....	xix
Abstract.....	xx
1.0 - Introdução.....	1
1.1 - Revisão de literatura.....	3
1.1.1 - Considerações sobre as infecções.....	3
1.1.2 - Considerações sobre os agentes de infecções.....	5
1.1.2.1- Micróbios.....	5
1.1.2.2 - Fungos.....	5
1.1.2.2.1 - O gênero <i>Candida</i> .....	6
1.1.3 - Algumas considerações a respeito dos antifúngicos .....	7
1.1.4 - Bactérias.....	10
1.1.4.1- O gênero <i>Staphylococcus</i> .....	10
1.1.4.2 - O gênero <i>Escherichia</i> .....	11
1.2 - Atividade biológica.....	12
1.2.1 - Avaliação da atividade citotóxica frente a larvas de <i>Artemia salina</i> .....	12
1.2.2 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	14
1.3 - Atividade antioxidante.....	14
1.3.1 - Substâncias fenólicas como agente antioxidante.....	16
1.3.2 - Biossíntese de substâncias fenólicas.....	17
1.3.3 - Características gerais dos flavonóides.....	18
1.3.4 - Os ensaios antioxidantes.....	22
1.3.4.1 - Redução do radical livre 2,2- difenilpicrilidrazil.....	22
1.3.4.2 - Ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteau (RFC).....	23
1.4 - A espécie <i>Dalbergia glaucescens</i> (Mart. ex Benth.) Benth.....	23
1.4.1 - A família Fabaceae.....	23
1.4.1.2 - Gênero <i>Dalbergia</i> .....	24

1.4.1.3 - A fitoquímica do gênero <i>Dalbergia</i> .....	26
2.0 - Objetivos gerais.....	46
2.1 - Objetivos específicos.....	46
3.0 - Materiais e métodos.....	47
3.1 - Equipamentos utilizados.....	47
3.2 - Reagentes e material de consumo.....	47
3.3 - Soluções reveladoras cromogênicas utilizadas nos procedimentos cromatográficos.....	48
3.4 - Experimental.....	49
3.4.1 - Coleta do material vegetal.....	49
3.4.2 - Secagem do material vegetal e preparação dos extratos brutos.....	49
3.4.2.1 - Fracionamento cromatográfico do extrato em hexano de <i>D. glaucescens</i> .....	50
3.4.2.2 - Fracionamento cromatográfico do extrato em diclorometano de <i>D. glaucescens</i> .....	52
3.4.2.3 - Fracionamento cromatográfico do extrato em metanol de <i>D. glaucescens</i> .....	54
3.5 - Atividade biológica.....	58
3.5.1 - Avaliação da atividade citotóxica frente a larvas de <i>Artemia salina</i> .....	58
3.5.2 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	60
3.6 - Teste químico para fenólicos.....	62
3.7 - Avaliação da atividade antioxidante.....	63
3.7.1 - Avaliação do teor de fenólicos totais.....	63
3.7.2 - Avaliação da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.....	64
3.8 - Avaliação do teor de flavonóides totais .....	64
4.0 - Resultados e discussões.....	66
4.1 - Constituintes químicos isolados da espécie <i>D. glaucescens</i> (Mart. ex Benth.) Benth.....	66
4.2 - Determinação estrutural de DG -1.....	70
4.3 - Determinação estrutural de DG-2.....	76
4.4 - Determinação estrutural de DG-3, DG-4 e DG-5.....	84
4.5 - Determinação estrutural de DG-6.....	90
4.6 - Determinação estrutural de DG-7.....	100
4.7 - Determinação estrutural de DG-8.....	108
4.8 - Determinação estrutural de DG-9.....	119



4.9 - Determinação estrutural de DG-10.....	125
4.10 - Determinação estrutural de DG-11.....	132
4.11 - Determinação estrutural de DG-12.....	143
4.12 - Determinação estrutural da mistura DG-13 e DG-10.....	158
4.13 - Determinação estrutural de DG-14.....	164
4.14 - Ensaios biológicos .....	172
4.14.1 - Introdução.....	172
4.14.2 - Avaliação da atividade citotóxica frente a larvas de <i>Artemia salina</i> .....	172
4.14.3 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	173
4.15 - Teste químico para fenólicos .....	174
4.15.1 - Avaliação do teor de flavonóides totais.....	175
4.16 - Atividade Antioxidante .....	178
4.16.1 - Avaliação do teor de fenólicos totais.....	178
4.16.2 - Avaliação da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.....	180
5.0 - Conclusões.....	182
6.0 - Constantes físicas e dados espectrométricos.....	183
7.0 - Referências bibliográficas.....	190
Apêndice A.....	208

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico (ppm)
$\lambda$	Comprimento de Onda no Máximo de Absorção
AA	Atividade antioxidante
AcOEt	Acetato de etila
Api	Apiose
APT	Attached Proton Test
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	Butilidroxii-anisol
BHT	Butilidroxii-tolueno
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CCCG	Cromatografia contracorrente de gotas
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de Massas
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
$\text{CD}_3\text{OD}$	Metanol deuterado
COSY	COrrrelation SpectroscopY
$\text{CE}_{50}$	Concentração efetiva responsável por 50% da atividade
<i>d</i>	senal duplo
<i>dd</i>	Duplo sinal duplo
<i>ddd</i>	Duplo duplo sinal duplo
$\text{DL}_{50}$	Dose letal mínima responsável pela morte de 50% dos espécimes testados
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	2-2-difenilpicrilhidrazil
EM	Espectro de massas
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET	Etil
Gal	Galactose

Glic	Glicose
GP	Galato de propila
GSH	Glutaciona
HBBD	Hidrogen Broad Bond Decoupled
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMF	Hidroximetilfurfural
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento (medida em Hertz)
<i>m</i>	Sinal multiplo
Man	Manose
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Correlation spectroscopy
OMe	Metoxila
pf	Ponto de fusão
ppm	Parte por milhão
Ram	Raminose
RDA	Rearranjo do tipo Diels-Alder
Rf	Fator de Retenção
RFC	Reagente de Folin-Ciocalteau
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H
<i>s</i>	Sinal simples
<i>s/</i>	Sinal simples largo
<i>t</i>	Sinal triplo
UV	Ultravioleta
Xil	Xilose

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Rota biossintética de algumas substâncias fenólicas.....	18
Esquema 2 - Preparação dos extratos brutos de <i>D. glaucescens</i> .....	50
Esquema 3 - Fracionamento do extrato em hexano de <i>D. glaucescens</i> .....	51
Esquema 4 - Fracionamento cromatográfico do extrato em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	53
Esquema 5 - Refracionamento cromatográfico de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	54
Esquema 6 - Fracionamento do extrato em MeOH de <i>D. glaucescens</i> .....	56
Esquema 7- Partição do resíduo do extrato em MeOH de <i>D. glaucescens</i> .....	57
Esquema 8 - Proposta de alguns fragmentos de massas para DG-1.....	73
Esquema 9 - Proposta de alguns fragmentos de massas para DG-2.....	82
Esquema 10 - Proposta de alguns fragmentos de massas para DG-6.....	98
Esquema 11 - Proposta para alguns fragmentos de massas de DG-7.....	106
Esquema 12 - Proposta de fragmentos de massas para DG-8.....	116
Esquema 13- Proposta para alguns fragmentos de massas para DG-9.....	124
Esquema 14 - Proposta de alguns fragmentos de massas para DG-10.....	131
Esquema 15 - Complexação de flavonóides com Cloreto de alumínio.....	134
Esquema 16 - Proposta para alguns fragmentos de massas para DG-12.....	147
Esquema 17 - Proposta de alguns fragmentos de massas para DG-14.....	170

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anel imidazol e oantifúngicocetoconazol.....	8
Figura 2 - Estrutura da Anfotericina B.....	10
Figura 3 - Estruturas básicas de flavonóides.....	19
Figura 4 - Classificação de flavonóides.....	20
Figura 5 - Estrutura do flavonol quercetina com características que a torna um antioxidante.....	22
Figura 6 - Calofilolido.....	27
Figura 7 - Estruturas bases dos neoflavonóides. ....	27
Figura 8 - Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Dalbergia</i> .....	28
Figura 9 - Posicionamento sistemático de <i>Dalbergia glaucescens</i> .....	45
Figura 10 - Espectro de massas da substância DG-1.....	70
Figura 11 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG -1.....	71
Figura 12 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - APT (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-1.....	72
Figura 13 - Espectro na região do IV da substância DG-1.....	74
Figura 14 - Espectro na região do IV da substância DG-2.....	76
Figura 15 - Espectro de massas da substância DG-2.....	77
Figura 16 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-2.....	78
Figura 17- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - HBBD (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-2.....	78
Figura 18 - Comparação de alguns deslocamentos químicos dos triterpenos de esqueleto lupano (a), (b) e (c).....	79
Figura 19 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-2.....	80
Figura 20 - Ampliação do mapa de correlação heteronuclear (HMQC) de DG-2.....	80
Figura 21 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-2.....	81
Figura 22 - Cromatograma da mistura esteroidal: DG-3, DG-4 e DG-5.....	84
Figura 23 - Espectro de massas a 70 eV de DG-3.....	85
Figura 24 - Espectro de massas a 70 eV de DG-4.....	85
Figura 25 - Espectros de massas a 70 eV de DG-5.....	86
Figura 26 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de esteróides.....	87
Figura 27 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -APT (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura esteroidal.....	87
Figura 28 - Alguns deslocamentos químicos característicos de esteróides.....	88
Figura 29 - Espectro na região do IV da substância DG-6.....	90
Figura 30 - Espectro de massas a 70 eV de DG-6.....	91
Figura 31 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-6.....	92

Figura 32 - Ampliação das regiões entre (7,0-7,7 ppm) do espectro de RMN $^1\text{H}$ de DG-6.....	92
Figura 33 - Ampliação da regiões entre (4,50-8,50 ppm) do espectro de RMN $^1\text{H}$ de DG-6.....	93
Figura 34 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -APT (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-6.....	94
Figura 35 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de DG-6.....	94
Figura 36 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-6.....	95
Figura 37 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) ampliação (2,5-6,0 ppm) e (128-184 ppm) de DG-6.....	96
Figura 38 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) ampliação (6,0-7,0 ppm) e (130-165 ppm) de DG-6.....	96
Figura 39 - Algumas correlações observáveis pelo (HMBC) de DG-7.....	97
Figura 40 - Espectro na região do IV ( $4000\text{-}300\text{ cm}^{-1}$ ) de DG-7.....	100
Figura 41 - Espectro de massas de DG-7 a 70 eV.....	101
Figura 42 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-7.....	102
Figura 43 - Ampliação da região entre (4,1-5,3 ppm) espectro de RMN $^1\text{H}$ de DG-7.....	102
Figura 44 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -HBBD (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-7.....	103
Figura 45 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de DG-7.....	103
Figura 46 - Similaridades e diferenças entre DG-7 e modelos da literatura.....	104
Figura 47 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-7.....	105
Figura 48 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-7.....	105
Figura 49 - Espectro na região do IV da substância DG-8.....	108
Figura 50 - Espectro de massas a 70 eV de DG-8.....	109
Figura 51 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-8.....	110
Figura 52 - Ampliação da região entre (3,50 e 4,50 ppm) do espectro de RMN $^1\text{H}$ de DG-8.....	110
Figura 53 - Ampliação da região entre (5,50 á 8,0 ppm) do espectro de RMN $^1\text{H}$ de DG-8.....	111
Figura 54 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de DG-8.....	112
Figura 55 - Ampliação do Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY) de DG-8.....	112
Figura 56 - Ampliação do Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de DG-8.....	113
Figura 57 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -PENDANT (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-8.....	114
Figura 58 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-8.....	115
Figura 59 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-8.....	115
Figura 60 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-8.....	116
Figura 61 - Espectro na região do IV da substância DG-9.....	119

Figura 62 - Espectro de massas 70 eV de DG- 9.....	120
Figura 63 - Espectro na região do IV da substância DG-10.....	120
Figura 64 - Espectro de massas a 70 eV de DG-10.....	121
Figura 65 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-10.....	121
Figura 66 - Ampliação da região entre (5,0-9,5 ppm) do espectro RMN $^1\text{H}$ de DG-10.....	122
Figura 67 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -HBBD (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-10.....	123
Figura 68 - Espectro na região do IV da substância DG-10.....	125
Figura 69 - Espectro de massas a 70 eV de DG-10.....	126
Figura 70 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-10.....	126
Figura 71 - Ampliação da região entre (5,0 e 9,5 ppm) do espectro RMN $^1\text{H}$ de DG-10.....	127
Figura 72 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -HBBD (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-10.....	128
Figura 73 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-10.....	129
Figura 74 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-10.....	130
Figura 75- Correlações observáveis no HMBC de DG-10.....	130
Figura 76 - Espectro na região do IV da substância DG-11.....	133
Figura 77 - Espectro na região do ultravioleta de DG-11.....	135
Figura 78 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 Hz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )de DG-11.....	135
Figura 79 - Ampliação da região entre (3,0-4,5 ppm) do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 400 Hz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DG-11.....	136
Figura 80 - Ampliação da região entre (6,0-9,0 ppm) do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 400 Hz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DG-11.....	136
Figura 81 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DG-11.....	137
Figura 82 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ (COSY) de DG-11.....	138
Figura 83 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-11.....	139
Figura 84 Ampliação do mapa HMQC dos sinais referentes a parte glicosídica de DG-11.....	139
Figura 85 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-11.....	140
Figura 86 - Correlação entre C-6 da aglicona com o H-1" do glicosídeo.....	140
Figura 87 - Comparação de alguns sinais observados por RMN $^{13}\text{C}$ para as substâncias: DG-11, vitexina*, Isovitexina** e glepidotina***.....	142
Figura 88 - Espectro na região do IV da substância DG-12.....	144
Figura 89 - Espectro na região do ultravioleta de DG-12.....	145
Figura 90 - Espectro MS/MS da substância DG-12.....	146
Figura 91 - Espectro MS/MS da substância DG-12.....	146
Figura 92 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DG-12.....	148

Figura 93 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DG-12.....	149
Figura 94 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -HBBD (100 Hz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DG-12.....	149
Figura 95 - Ampliação da região entre (62,00-62,80 ppm) do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -HBBD de DG-12.....	150
Figura 96 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-12.....	151
Figura 97 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-12.....	151
Figura 98 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de DG-12.....	152
Figura 99 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-12.....	153
Figura 100 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-12.....	153
Figura 101 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-12.....	154
Figura 102 - Algumas interações espaciais observadas através do NOESY de DG-12.....	155
Figura 103 - Comparação de alguns sinais observados por RMN $^{13}\text{C}$ para: DG-12, 6,8-D-C-glicosilorobol*, Wighteona* e Genisteina*.....	157
Figura 104 - Espectro de Massas a 70 eV de DG-10.....	159
Figura 105 - Espectro de Massas a 70 eV de DG-13.....	159
Figura 106 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura DG-10 e DG-13....	160
Figura 107 - Ampliação entre (0,0 -2,3 ppm) do espectro de RMN $^1\text{H}$ da mistura DG-10 e DG-13.....	161
Figura 108 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) mistura de DG-10 e DG-13...	161
Figura 109 - Comparação de alguns deslocamentos químicos do ácido oleanólico (1) e de DG-13.....	162
Figura 110 - Substâncias identificadas DG-10 e DG-13.....	163
Figura 111 - Espectro na região do IV da substância DG-14.....	165
Figura 112 - Espectro de massas 70 eV da substância DG-14.....	166
Figura 113 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-14.....	166
Figura 114 - Ampliação da região entre (6,4 -7,7 ppm) do espectro de RMN $^1\text{H}$ de DG-14.....	167
Figura 115 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -HBBD (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DG-14.....	167
Figura 116 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-14.....	169
Figura 117 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-14.....	169
Figura 118 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-14.....	170
Figura 119 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-14.....	170
Figura 120 - Correlações observáveis através do mapa (HMBC) de DG-14.....	171
Figura 121 - Diferenças entre os flavonóides quercetina e rutina.....	177
Figura 122 - Curva padrão do flavonóide rutina.....	177



Figura 123 - Substâncias flavonoídicas isoladas do extrato em metanol.....	179
Figura 124 - Curva padrão do ácido gálico.....	180
Figura 125 - CE <sub>50</sub> dos extratos testados.....	182

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de espécies de <i>Candida</i> identificadas em casos de candidemia em vários países do mundo.....	4
Tabela 2 - Frequências das espécies de <i>Candida</i> observadas em casos de candidemia no Brasil.....	5
Tabela 3 - Indicações dos antifúngicos mais utilizados em animais.....	9
Tabela 4 - Atividades biológicas atribuídas a espécies do gênero <i>Dalbergia</i> .....	26
Tabela 5 - Microorganismos utilizados nos ensaios antimicrobianos.....	61
Tabela 6 - Extratos brutos da madeira de <i>D. glaucescens</i> .....	61
Tabela 7 - Atribuição do espectro de RMN <sup>13</sup> C obtido para a substância DG-1 e comparação com dados da literatura.....	75
Tabela 8 - Algumas atividades biológicas atribuídas ao lupeol .....	74
Tabela 9 - Atribuição do espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância DG-2 e comparação com dados da literatura.....	83
Tabela 10 - Atribuição do espectro de RMN <sup>13</sup> C para as substâncias: DG-3, DG-4 e DG-5 comparados com dados da literatura.....	89
Tabela 11 - Dados de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância: DG-6 e dados da literatura.....	99
Tabela 12 - Dados de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substância DG-7 e dados da literatura.....	107
Tabela 13 - Dados de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância DG-8 e comparação com dados da literatura.....	118
Tabela 14 - Dados de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substância DG-9 e comparação com dados da Literatura.....	123
Tabela 15 - Dados de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substâncias DG-10 e comparação com dados da literatura.....	132
Tabela 16 - Dados de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) e RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância DG-11.....	141
Tabela 17 - Dados de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substância: DG-11 comparação com modelos descritos na literatura.....	143
Tabela 18 - Dados de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância DG-12 e comparação com dados da literatura.....	156
Tabela 19 - Dados de RMN <sup>13</sup> C das substância: DG-12, Wighteona, 6,8-Di-C-glicosilobol e genisteina.....	158
Tabela 20 - Dados de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substância DG-13 e comparação com dados da literatura.....	164
Tabela 21 - Dados de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substância DG-14 e comparação com dados da literatura.....	172
Tabela 22 - Dose Letal (DL <sub>50</sub> ) mínima responsável pela morte de 50% das larvas de <i>A. salina</i> analisadas .....	173
Tabela 23 - Resultados obtidos da avaliação antifúngica dos extratos brutos de <i>Dalbergia glaucescens</i> , sobre diferentes espécies microbianas.....	174

Tabela 24 - Halo de inibição obtido no teste contra <i>Candida parapsilosis</i> para o extrato de <i>Dalbergia glaucescens</i> em metanol.....	175
Tabela 25 - Teor de flavonóides totais em extratos brutos de <i>D. glaucescens</i> .....	179
Tabela 26 - Resultados obtidos do doseamento de fenólicos totais (FT) por grama de madeira seca de <i>D. glaucescens</i> .....	181
Tabela 27 - EC <sub>50</sub> dos extratos testados de <i>D. glaucescens</i> .....	182

## RESUMO

O presente trabalho relata o estudo fitoquímico-biológico da madeira da espécie *Dalbergia glaucescens*. O espécime foi coletado na Reserva Florestal da Vale (ES) Mata Atlântica em julho de 1996. O isolamento dos metabólitos especiais dos extratos em hexano, diclorometano, metanol e metanol-água (8:2) da madeira foi realizado através de técnicas cromatográficas tradicionais e de cromatografia contra corrente de gotas, resultando na identificação de três triterpenos: lupeol, lupenona e acetato do ácido oleanólico. Três esteróides: campesterol,  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol; três neoflavonóides: 9-hidroxi-6,7-dimetoxidalbergifenol e 6,7-diidroxi-9-metoxidalbergifenol e dalbergina; um pterocarpanóide, medicarpina; um derivado da benzofenona: 2,5-diidroxi-4-metoxibenzofenona; uma flavona: 6-(C- $\beta$ -D-glicopiranosil)-4',5,7-triidroxiflavonol; um isoflavonóide: 6,8-di-(C- $\beta$ -D-glicopiranosil)-4',5,7-triidroxiflavona e um metabólito da classe dos furanos: 5-hidroximetilfurfural. Pelo melhor do nosso conhecimento o estudo fitoquímico-biológico de *Dalbergia glaucescens* está sendo citada pela primeira vez na literatura. A determinação estrutural das substâncias foi realizada através da obtenção e interpretação de espectros na região do infravermelho (IV), espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (RMN) a uma (1D) e duas (2D) dimensões bem como através de informações obtidas no espectro de massas dos produtos detectados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) e por comparação com dados da literatura. Os extratos brutos foram avaliados quanto a citotoxicidade (ensaio contra larvas de *Artemia salina* Leach) apresentando resultados positivos; atividade antimicrobiana (ensaio contra espécies de *Candida*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) no qual o extrato em metanol apresentou-se ativo contra *Candida parapsilosis*; o potencial antioxidante dos extratos também foram avaliados através do método do radical livre DPPH verificou-se que todos os extratos apresentaram-se promissores quanto as atividades testadas.

## ABSTRACT

The present work reports a phytochemical and biological studies of the wood of *Dalbergia glaucescens*. The specimen was collected in Reserva florestal da Vale (E.S) in July 1996. The isolation of special metabolites from the wood was carried out from hexane extracts, dichloromethane, methanol and methanol-water (8:2) extracts. Traditional chromatography techniques and droplet counter-current chromatography that resulted in the identification of three triterpenes: lupeol; lupanone and oleanolic acid acetate; three steroids: campesterol,  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, three neoflavonoids: 9-hydroxy-6,7-dimethoxydalbergifenol and 6,7-dihydroxy-9-methoxydalbergiphenol and dalbergin; one pterocarpanoid, medicarpin; a benzophenone derived: 2,5-dihydroxy-4-methoxybenzophenone; one flavone: 6-(C- $\beta$ -D-glicopiranosil)-4',5,7-trihydroxyflavonol; one isoflavonoid: 6,8-di-(C- $\beta$ -D-glucopiranosyl)-4',5,7-trihydroxyisoflavone and a metabolite to class of furans: 5-hydroxymethylfurfural. For the best of our knowledge the phytochemical-biological studies of *Dalbergia glaucescens* is the first time in the literature. The structure of the compounds were determined using infrared data, one-and-two-dimensional  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, as well from information gathered from the mass spectra recorded using a spectrometer coupled to a gas chromatograph, which were compared with the literature data. The crude extracts were assessed as cytotoxicity (assays with *Artemia salina* Leach) and showed positive results; antimicrobial activity (assays with *Candida* species, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) that methanolic extract give positive results assays with *Candida parapsilosis*; the antioxidant potential was evaluated using the DPPH free radical method and all extracts were considered promising as the activities tested.

# *1.0 - Introdução*

## 1.0 - Introdução

Diferentes culturas dos mais distintos lugares, desenvolvidas ou não, conhecem e utilizam o potencial terapêutico dos vegetais no tratamento de doenças, práticas essas que acompanham o homem desde a pré-história e que evoluíram com ele ao longo dos anos (Coutinho *et. al.*, 2004).

As plantas são os principais componentes da medicina tradicional, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a medicina tradicional consiste em práticas saudáveis, baseadas no conhecimento de substâncias existentes em plantas, animais e minerais, utilizadas como misturas ou não com o objetivo de tratar ou prevenir doenças.

Ao longo dos anos, as observações populares conduziram ao acúmulo de informações relevantes sobre a eficácia e os efeitos medicinais das plantas, todo esse conhecimento continua sendo válido para estimular o uso dos vegetais como medicamentos e assim promover a perpetuação desta cultura. Além de despertar grande interesse por pesquisas que conduzam a identificação de substâncias naturais bioativas, tanto é verdade que a sociedade ocidental passou a reconsiderar as virtudes terapêuticas de plantas e outros produtos naturais derivados destes organismos. Nesse contexto, as pesquisas sobre a atividade de plantas e a bioprospecção de seus respectivos princípios ativos foram intensificados (Scheuermann & Cunha, 2006).

As plantas apresentam a capacidade de biossintetizar os mais variados tipos de estruturas moleculares (Scheuermann & Cunha, 2006). Esse potencial químico estimula o interesse das indústrias farmacêuticas (como fonte de fármacos), agroquímica (pelo fornecimento de inseticidas e fungicidas naturais), alimentícia (para a obtenção de substâncias naturais utilizadas para dar cor e sabor aos alimentos) e cosmética.

Vale ainda destacar que as propriedades terapêuticas dos vegetais são pouco exploradas para fins veterinários. No entanto, recentes restrições ao uso de antibióticos promotores de crescimento na produção animal, têm incentivado a busca por novos aditivos alternativos. Sendo assim, cresce em importância a possibilidade de exploração do potencial antimicrobiano de plantas e seus metabólitos secundários (Scheuermann & Cunha, 2006).

Porém, um dos principais problemas do mundo moderno é a destruição do meio-ambiente, principalmente, dos ecossistemas florestais, o que resulta numa grande perda de toda riqueza que esses ecossistemas constituem (Silva, 2001). As florestas tropicais, embora ocupem apenas 7% da superfície da Terra, provavelmente sustentam mais da metade da vida do planeta (Laurance *et. al*,1997). Estudos recentes demonstram que a megadiversidade de países como: Brasil, Austrália, Colômbia, Equador, Madagascar, China, Índia, Malásia, México, Peru e Zaire encontra-se seriamente ameaçada, justificando a utilização das plantas de modo sustentável para conservação e reparação de áreas degradadas (Nodari & Guerra, 2003).

O Brasil é o principal país dentre aqueles detentores de megadiversidade, possuindo de 15 a 20% do número total de espécies da Terra. A Mata Atlântica e os ecossistemas associados a ela ocupavam, no Brasil, originalmente uma área de 1.360.000 Km<sup>2</sup>, distribuídos por 17 estados e aproximadamente 50% dos municípios brasileiros (Brasil, 2000).

Atualmente o bioma está reduzido a fragmentos dispostos de modo esparso ao longo da costa brasileira e no interior do país, e representam menos de 8% de sua extensão original. Em conjunto, os mamíferos, aves, répteis e anfíbios que ocorrem na Mata Atlântica, somam 1807 espécies, sendo 389 endêmicas. Isso significa que a Mata Atlântica abriga, aproximadamente, 7% das espécies conhecidas no mundo nesses grupos de vertebrados. Nesse cenário de riqueza e endemismo observa-se, por outro lado, elevado número de espécies ameaçadas de extinção (Brasil, 2000).

A fragmentação, processo nos quais grandes blocos de *habitat* são quebrados em blocos pequenos e isolados, é uma das maiores ameaças à biodiversidade (Laurance *et. al.*, 1997).

Assim, a destruição acelerada das florestas tropicais e o intenso processo de exploração extrativista, têm inserido muitas espécies de interesse econômico e conservacionista no grupo de espécimes ameaçadas de extinção, dentre elas algumas espécies do gênero *Dalbergia* (Varty, 1998). A espécie *Dalbergia glaucescens* (Mart. ex Benth.) Benth. foi objeto de estudo deste trabalho.



## 1.1 - Revisão de Literatura

Os metabólitos especiais presentes em plantas, frequentemente, apresentam atividades biológicas interessantes. Do ponto de vista farmacêutico, há um grande interesse na descoberta por novas substâncias farmacologicamente importantes, com diferentes finalidades terapêuticas. Entre as atividades biológicas das plantas medicinais, podemos citar: antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, antiinflamatória, toxicológica, alelopática, antioxidante, entre outras (Simões *et. al*, 2001).

As doenças infecciosas continuam a ocupar posição de destaque como causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, apesar dos avanços técnico-científicos. Um dos principais fatores que explicam essa liderança é a capacidade que os microorganismos possuem para a aquisição de mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Essa habilidade impõe a necessidade permanente de pesquisas e o desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no combate e/ou controle dos microorganismos (Ayres *et. al*, 2008).

Muitas plantas brasileiras pertencentes a biomas como, mata-atlântica, cerrado e floresta amazônica têm sido utilizadas como fármacos naturais pela população no tratamento de várias doenças tropicais como a malária, esquistossomose, infecções bacterianas e fúngicas (Alves *et. al.*, 2000).

O conhecimento das atividades biológicas de plantas, assim como, o da sua composição química pode contribuir positivamente no controle de fitoterápicos. Pois, somente com estas informações pode-se avaliar tecnicamente, desde o início do processo, na elaboração dos extratos vegetais até a obtenção do produto final (Trevisan, 2010).

### 1.1.1. - Considerações sobre as Infecções

Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2000) infecção consiste na penetração, alojamento e, em geral, multiplicação de um agente etiológico animado no organismo de um hospedeiro. Esse mecanismo produz danos com ou sem o aparecimento de sintomas clinicamente reconhecíveis. Outra definição para infecção é a ação exercida no organismo animal ou vegetal por agentes patogênicos (fungos, bactérias, vírus e protozoários) (Pasquale, 2009).

As infecções hospitalares ou nosocomiais compreendem as infecções causadas por fungos e bactérias que são adquiridas pelos pacientes ou mesmo pelos profissionais da saúde, dentro do ambiente hospitalar, constituindo uma causa crescente de mortes em todo o mundo, podendo ser responsável por até 30% de mortalidade dependendo do grupo de pacientes acometidos pela infecção (Craven *et. al*, 1998).

Vários processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos podem facilitar a colonização e posterior infecção hospitalar por fungos do gênero *Candida*. Dentre os mais comuns citamos: imunossupressão por várias causas, neutropenia, desnutrição, quimioterapia antineoplásica, entre outras causas (Jarvis, 1995). Outros fatores facilitam a entrada do microorganismo no hospedeiro: o uso contínuo de cateteres, queimaduras, cirurgias intensas e, ainda, fatores combinados à antibioticoterapia, nos quais a levedura possa se multiplicar e, a partir daí, entrar na corrente sanguínea levando a um processo grave chamado candidemia (Colombo *et. al.*, 2006).

As infecções hospitalares causadas por fungos constituem um problema crescente de saúde pública em muitos países, estudos da etiologia dessas infecções mostraram que a espécie *C. albicans* é a principal responsável por candidemia Tabela 1.

**Tabela 1** - Porcentagem de espécies de *Candida* identificadas em casos de candidemia em vários países do mundo.

<b>Espécimes de <i>Cândida</i></b>	(Rex <i>et. al</i> , 1994)	(Wingard, 1995)	(Pfaller, 1996)
<i>C. albicans</i>	56%	54%	59%
<i>C. glabrata</i>	17%	25%	12%
<i>C. tropicalis</i>	13%	8%	11%
<i>C. parapsilosis</i>	10%	7%	10%
<i>C. krusei</i>	2%	4%	3%

Fonte: Maluche & Santos, 2008.

Pesquisas realizadas no Brasil mostram que a espécie *C. parapsilosis* destaca-se como o segundo maior causador de candidemias (Tabela 2, p. 5).

**Tabela 2** - Frequências das espécies de *candida* observadas em casos de candidemia no Brasil, de acordo com vários autores.

Espécimes de <i>cândida</i>	(Colombo <i>et. al.</i> , 1999)	(Godoy <i>et. al.</i> , 2003)	(Antunes <i>et. al.</i> , 2004)
<i>C. albicans</i>	37%	42%	48,3%
<i>C. parapsilosis</i>	25%	21,3%	25,8%
<i>C. tropicalis</i>	24%	24,2%	13,3%
<i>C. glabrata</i>	4%	7,7%	3,3%
<i>C. krusei</i>	2%	2,9%	1,7%

Fonte: Maluche & Santos, 2008.

## 1.1.2 - Considerações sobre os agentes de infecções

### 1.1.2.1- Micróbios

O universo microbiano é extremamente complexo, sabe-se que existem milhares de diferentes tipos de micróbios vivendo em nosso corpo, dentro dele e à sua volta, centenas dos quais produzindo graves doenças ao homem. Os micróbios podem ser subdivididos em quatro grupos: vírus, bactérias, fungos e protozoários, cada um deles apresentando seu próprio nível de complexidade (Murray *et. al.*, 1994). Estudos sobre as atividades antimicrobianas de produtos naturais têm sido enfatizados, isso se deve ao fato de que, a cada dia as drogas existentes se tornam menos eficazes devido aos mecanismos de resistência desenvolvidos por esses microorganismos através de mutações (Coutinho *et. al.*, 2004). Nesse sentido, a descoberta de novas fontes de substâncias obtidas de espécimes vegetais que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade pode ser uma alternativa viável para o tratamento de infecções provocadas por micróbios.

### 1.1.2.2 - Fungos

Os fungos são extremamente comuns na natureza, onde levam uma existência como sapróbios de vida livre. Constituem importantes patógenos de plantas, e com frequência, causam deterioração dos alimentos e outros produtos (Murray *et. al.*, 1994).

São seres eucariontes, e em seu núcleo observam-se DNA cromossômico e um nucléolo ricos em RNA, ambos envoltos por membrana nuclear. Podendo apresentar reprodução assexuada ou sexuada (Spicer, 2000).

As infecções fúngicas podem ser classificadas como: infecções superficiais (que abrangem as infecções limitadas às camadas mais externas da pele e pêlos), as infecções cutâneas (infecções que estendem mais profundamente na epiderme, incluindo doenças invasivas dos pelos e unhas), as infecções subcutâneas (afetam a derme, tecidos subcutâneos, músculos e fáscia) e as infecções sistêmicas que atingem as áreas mais profundas do organismo (Murray *et. al.*, 1994).

Nos últimos vinte e cinco anos, a frequência nas infecções fúngicas sistêmicas tem aumentado de forma muito significativa, tanto em incidência como em gravidade associada à mortalidade, o que torna os fungos um dos principais causadores de morte de indivíduos imunocomprometidos, principalmente em recém-nascidos pré-maturos e em doentes com câncer. O que acompanha esse crescimento é a disseminação de espécies de *Candida não-albicans* e a explicação para esse fato é terapêutica, uma vez que espécimes *não-albicans*, em geral, apresentam menor sensibilidade e/ou resistência aos antimicrobianos usuais (Pigatto *et. al.*, 2009).

#### 1.1.2.2.1 - O gênero *Candida*

*Candidas* são fungos microscópicos e unicelulares de forma redonda que se reproduzem de forma assexuada, por brotamento. São classificados de acordo com a assimilação e fermentação dos carboidratos (Spicer, 2000). Podem ser denominados, ainda, como microorganismos eucariotos classificados como bolores e leveduras (Pigatto *et. al.*, 2009).

Do ponto de vista taxonômico, cerca de 200 espécies de *Candida* são conhecidas, sendo que destas aproximadamente 10% podem provocar infecções em seres humanos, sem contar o potencial para infectar os demais animais (Yarrow, 1998).

Várias espécies de *Candida* estão implicadas na candidíase: *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondi*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. viswanathii* e *C. lusitaniae*. Os órgãos mais frequentemente

afetados incluem pulmões, baço, rins, fígado, coração e cérebro (Murray *et. al.*, 1994). As espécies de *Candida* têm a habilidade de produzir uma variedade de enzimas hidrolíticas, como proteases, lipases, esterases, fosfolipases e fosfatases que facilitam a invasão de hifas e disseminação de candidíase. No passado estas substâncias receberam atenção especial, pois sua presença facilitava a identificação de patogenias causadas por *Candida* (Luo *et. al.*, 2001).

A espécie *C. albicans* é a que tem sido frequentemente relatada em diversos países do mundo como a principal causadora de candidíase. É uma espécie habitual do trato gastrointestinal, genital e cutâneo dos seres humanos e, em geral, é transmitida de forma endógena (Maluche & Santos, 2008).

A espécie *C. parapsilosis* recentemente tem sido apontada como a segunda principal causa de candidíase principalmente em países da América Latina, entre eles o Brasil. É encontrada frequentemente na pele, sendo de transmissão frequentemente exógena, sua incidência também é alta em recém-nascidos pré-maturos em unidades de terapia intensiva (Maluche & Santos, 2008).

A espécie *C. glabrata* é a quarta principal causa de infecções fúngicas no Brasil (Tabela 2, p. 5). Embora seja relatada com menos freqüência que em países da Europa, Estados Unidos e Canadá, ela está associada tanto a casos de candidemia em pacientes idosos, como em casos de candidúria (Antunes, 2004).

A espécie *C. tropicalis* apresenta forma de transmissão essencialmente endógena. Esse espécime acomete, em geral, pacientes neutropênicos que apresentam doenças neoplásicas, doenças hematológicas, ou que sejam receptores de medula óssea (Maluche & Santos, 2008).

### **1.1.3 - Algumas considerações a respeito dos antifúngicos**

A lista de substâncias químicas com atividade antifúngica é bastante extensa, mas ainda muito restrita ao ser comparada com o número de drogas antibacterianas disponíveis (Alves, *et. al.*, 1999).

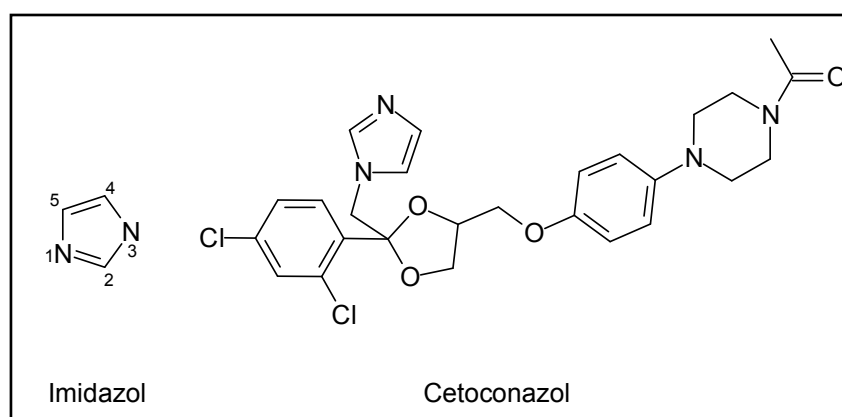
As drogas antifúngicas exercem papel fungistáticos ou fungicidas direta ou indiretamente. Os antifúngicos possuem características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração e quanto a sua ação em infecções sistêmicas e/ou superficiais, e podem ser classificadas de acordo com o sítio de

ação ou de acordo com a estrutura química que a substância apresenta. Atuam em sua maioria na membrana celular (azóis, anfotericina, nistatina), outros como a fluocitosina e a grisefluovina, atuam na síntese do ácido nucléico (Nobre *et. al.*, 2002).

Segundo Lacaz & Negro (1991) dentre os agentes químicos utilizados como antifúngicos, destacam-se :

- Sais de metais pesados (mercúrio, prata, zinco, cobre);
- Substâncias contendo íons oxidantes (permanganato de potássio, água oxigenada, cromatos);
- Sais quaternários de amônio,
- Ácidos graxos,
- Tintura de iodo a 1%;
- Tinturas a base de funcina e cloroiodoidroquinoleína;
- Substâncias sulfuradas e halogenadas, e seus derivados.

Dentre os diversos antifúngicos destacam-se as drogas imidazólicas, descobertas em 1949, porém sua utilização só aconteceu a partir de 1967. Apresentam anel imidazólico unido a outros anéis através de ligação N-C, em geral na posição 1 (Figura 1) (Alves *et.al.*, 1999).



**Figura 1** - Anel imidazol e o antifúngico cetoconazol.

Atualmente há um grande número de drogas imidazólicas (Tabela 3, p. 9). O principal mecanismo de ação dos azóis é a inibição da biossíntese do ergosterol (esteróide importante para a manutenção da função da membrana

celular dos fungos), interferindo no citocromo P<sub>450</sub> da levedura, trazendo como consequência a permeabilidade e fluidez da membrana citoplasmática do fungo, prejudicando a captação de nutrientes, o que se traduz na inibição do crescimento fúngico, originando alterações morfológicas que causam a necrose celular (Alves *et.al.*, 1999).

**Tabela 3** - Indicações dos antifúngicos mais utilizados em animais.

Antifúngicos	Indicações
Captan	Dermatofitose
Clotrimazol	Dermatofitoses, otites, aspergilose nasal, candidíase, Malasseziose.
Econazol	Dermatofitoses, Malasseziose, candidíase.
Miconazol	Malasseziose, candidíase, mastite fúngica bovina, queratomicoses de eqüinos.
Cetoconazol	Micoses superficiais e sistêmicas.
Itraconazol	Micoses superficiais e sistêmicas.
Fluconazol	Micoses superficiais e sistêmicas.
Nistatina	Micoses superficiais, otites e metrites, principalmente candidoses.
Nistatina lipossomal	Micoses sistêmicas, principalmente na candidose, criptococose e aspergilose em pacientes debilitados, imunossuprimidos ou quando houver resistência a outro antifúngico
Natamicina	Mastites fúngicas bovinas e queratomicose de eqüinos
Griseoflúvina	Dermatofitose

**Fonte:** Nobre *et. al.*, 2002.

Os antibióticos poliênicos possuem um anel lactônico macrocíclico e semelhante aos macrolídios antibacterianos como a eritromicina, e são chamados de macrolídios poliênicos sendo a estrutura ativa o anel macrolídico com sua parte rígida lipofílica e a parte flexível hidrofílica. A anfotericina B (Figura 2, p. 10) é um exemplo desse tipo de estrutura. Ela atua na ligação dos esteróis da membrana celular, provocando uma alteração funcional com a saída de metabolitos essenciais levando a morte celular (Nobre *et. al.*, 2002).





semelhantes a "cachos de uva" foram descritos por Robert Koch em 1878 e cultivados por Louis Paster em 1880 (Spicer, 2000).

Os cocos Gram-positivos formam um grupo heterogêneo de aproximadamente 16 gêneros que colonizam os seres humanos. Esses microorganismos são encontrados na pele e nas mucosas dos seres humanos, bem como na pele e mucosas de outros mamíferos e aves. *Staphylococcus* é um importante patógeno no ser humano que pode provocar uma ampla gama de doenças incluindo doenças sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, infecções oportunistas e doenças das vias urinárias. A espécie mais associada a doenças humanas e mais conhecida do gênero é a *S. aureus* (Murray *et. al.*, 1994).

A infecção estafilocócica apresenta-se como uma ampla variedade de síndromes afetando muitos tecidos e é causada por três mecanismos: destruição local, disseminação pela corrente sanguínea e produção de toxina (Spicer, 2000).

*Staphylococcus aureus* é reconhecida mundialmente como a principal causa de infecção intramamária em vacas leiteiras. Esse espécime produz uma gama de toxinas extracelulares, fato que contribui para sua virulência e patogenicidade (Akineden *et. al.*, 2001).

#### 1.1.4.2 - O gênero *Escherichia*

O gênero *Escherichia* consiste em cinco espécies de bactérias Gram-negativas. A *Escherichia coli* é a mais comum e clinicamente importante, é uma bactéria anaeróbia facultativa, pertencente a microbiota normal do trato intestinal de animais e homens (Bonten *et. al.*, 1990). Este microorganismo está associado a uma variedade de doenças incluindo gastroenterite, meningite neonatal, infecções das vias urinárias (sendo responsável por 80% de todas as infecções das vias urinárias adquiridas e pela maioria das infecções hospitalares) (Murray *et. al.*, 1994).

A resistência à ampicilina e cotrimoxazol é comum atualmente, sendo assim, novas substâncias devem ser testadas com o objetivo de se encontrar novas drogas mais eficientes (Spicer, 2000).

A infecção por *E. coli* (colibacilose) é uma das principais doenças da avicultura industrial moderna, devido aos grandes prejuízos econômicos causados

no mundo inteiro, por perdas com septicemia, pericardite e salpingite entre outros (Ferreira & Knobl, 2000).

Segundo Zanatta e colaboradores (2004) a resistência a drogas antimicrobianas é uma ameaça à saúde pública mundial, pois, *E. coli* é um dos patógeno transmitidos pelo consumo de alimentos contaminados. Desta forma, essa bactéria é alvo de estudo de novas substâncias antibacterianas para aplicação na área médica humana e veterinária.

## **1.2 - Atividade biológica**

Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido uma grande variedade de diferentes medicamentos nos últimos tempos, cada vez mais tem se observado a necessidade de novos fármacos com eficácia no combate a diversas doenças. Nesse contexto, tem-se procurado substâncias que sejam capazes de atuar contra doenças associadas a radicais livres, queda de imunidade e também na habilidade genética que algumas espécimes de bactérias e fungos possuem em adquirir resistência a drogas utilizadas como agentes terapêuticos.

### **1.2.1 - Avaliação da atividade citotóxica frente a larvas de *Artemia salina***

A grande necessidade de encontrar substâncias anticancerígenas tem estimulado o uso sistemático do bioensaio de citotoxicidade frente a larvas de *Artemia salina* Leach na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais, e as frações ativas podem ser posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação entre sua atividade citotóxica e antitumoral (McLaughlin *et. al.*, 1982; Siqueira, *et. al.*, 1998).

O ensaio de citotoxicidade frente às larvas de *Artemia salina* foi proposto por McLaughlin e colaboradores, 1982 ,como um ensaio simples para determinar a DL<sub>50</sub> (µg/mL) de substâncias puras e extratos brutos sendo considerados ativos os extratos que apresentarem DL<sub>50</sub> inferior a 1000 ppm e as substâncias puras que apresentarem DL<sub>50</sub> inferior a 20 ppm.

Testes biológicos mais específicos, por exemplo, contra células cancerígenas, são caros e mais elaborados necessitando de uma infra-estrutura

apropriada para sua realização. Por outro lado, instituições que dispõem de tais condições, requerem algum indício de que a substância possa ter alguma atividade biológica para a realização de testes mais específicos, principalmente devido o alto custo das análises. Testes biológicos que utilizam culturas de células *in vitro*, são extremamente importantes na pesquisa de anticancerígenos (Hostettmann *et al.*, 2003).

Uma das primeiras etapas na busca de moléculas anticancerígenas consiste em encontrar moléculas citotóxicas ou que inibem o crescimento de células tumorais de origem humana. Há um grande número de substâncias ativas *in vitro* que agem sobre células cancerosas isoladas, porém não se tornam medicamentos utilizáveis em quimioterapia. De um modo geral, essas substâncias ou são bastante tóxicas para as células sadias ou não atingem o local onde deveriam agir, no caso o tumor (Hostettmann *et al.*, 2003).

A literatura cita que várias substâncias bioativas foram testadas com *A. salina*, mostrando boa correlação entre citotoxicidade larval e atividade biológica (Holmans *et al.*, 1970; Siqueira *et al.*, 1998; Citó *et al.*, 2003). Por exemplo, atividades fungicida, viruscida e antibacteriana, (Macrae *et al.* 1998); parasiticida (Sahpaz *et al.*, 1994; Zani *et al.*, 1995) e antitumoral ( Citó *et al.*, 2003).

O ensaio de citotoxicidade frente às larvas de *Artemia salina* é de baixo custo, rápido e não exige técnicas assépticas. A praticidade e simplicidade que o envolvem favorece sua utilização sistemática dentro de um laboratório de pesquisa e vem sendo utilizado por diversos pesquisadores para a avaliação da citotoxicidade de extratos ou substâncias puras isoladas.

O microcrustáceo de água salgada, *A. salina*, pertence a classe *Anostracea*, é utilizado como alimento para peixes e cujos ovos podem ser facilmente encontrados em lojas de piscicultura.

A técnica baseia-se no princípio da toxicidade que as substâncias bioativas apresentam em altas doses. Deste modo, a mortalidade *in vivo* de organismo de maior simplicidade na escala zoológica pode indicar a bioatividade de novas substâncias. O resultado funciona como uma avaliação preliminar de possível atividade biológica.

### **1.2.2 - Avaliação da atividade antimicrobiana**

Vários trabalhos têm sido publicados relatando a atividade antimicrobiana de diversos extratos de plantas e óleos essenciais, o que tem confirmado o grande potencial de plantas nativas de diversas regiões do mundo.

Recentemente um trabalho publicado por Duarte e colaboradores, 2004, mostrou que várias plantas estudadas são eficientes no combate de fungos que provocam infecções superficiais, bactérias que provocam infecções bucais, uma série de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No Brasil, estudos com a mesma finalidade são de grande importância uma vez que plantas medicinais têm sido utilizadas como uma alternativa de tratamento.

Dentre as metodologias utilizadas para se detectar a atividade antimicrobiana de plantas medicinais, destacam-se: método da difusão em disco e método da difusão em ágar.

No método da difusão em disco avalia-se o resultado da atividade antimicrobiana pela medida do tamanho do halo de inibição de crescimento formado ao redor de um disco de papel impregnado com extrato ou com a substância a qual se deseja testar. Assim, o microorganismo padronizado é inoculado sobre uma placa de petri contendo o meio de cultura sólido, nesta placa são acondicionados os discos impregnados com as diferentes amostras a serem avaliadas (Romeiro, 2001).

No método de difusão em ágar são produzidos poços no próprio meio de cultura sólido nos quais são colocados diversos extratos a serem avaliados (Romeiro, 2001).

### **1.3 - Atividade antioxidante**

Atualmente tem-se evidenciado um aumento significativo no uso e na avaliação da capacidade antioxidante, tanto de fármacos e cosméticos quanto de alimentos e produtos naturais. Esse interesse começou a se expandir em meados da década de 90, quando começou a ser amplamente conhecida a influência benéfica de muitos produtos naturais na saúde humana associados ao decréscimo da atividade oxidante. Huang e colaboradores (2005) relataram que o

número de publicações sobre antioxidantes e estresse oxidativo quase quadruplicou na última década.

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante são capazes de adiar, retardar ou prevenir o processo de oxidação lipídica (Sies, 1993). Essa característica permite a aplicação de antioxidantes em diversas áreas. Por exemplo, o armazenamento de produtos alimentícios por longos períodos sem os danos nutricionais, organolépticos e tóxicos, com aplicabilidade na indústria alimentícia possibilitando aumentar a vida útil destes em até 200% (Schirch *et. al.*, 2000, Mc Carthy *et al*, 2001).

Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica é inibida por seqüestradores de radicais livres. As substâncias mais utilizadas para este fim são: butilidroxianisol (BHA), butilidroxitolueno (BHT), *terc*butilidroxiquinona (TBHQ), triidroxibutilfenona (THBP) e o galato de propila (GP). Estudos têm mostrado a possibilidade destes antioxidantes sintéticos apresentarem algum efeito tóxico, e por este motivo, várias pesquisas tem se voltado para o estudo de antioxidantes naturais para substituição aos sintéticos atualmente utilizados (Souza *et. al.*; 2007).

O oxigênio molecular tem um significado fundamental para os organismos aeróbios, pois participa na obtenção de energia na forma de ATP através da cadeia respiratória como acceptor final de elétrons. E ainda, participa de várias reações metabólicas como a biossíntese de prostaglandinas, esteróides e na oxidação de muitas substâncias aromáticas entre outras reações (Fleschin *et. al.*, 2000).

Os radicais livres são definidos como moléculas que contêm elétrons desemparelhados são geralmente instáveis e altamente reativos: superóxidos, hidroxila, peroxil ( $RO_2\cdot$ ), alcóxil ( $RO\cdot$ ), hidroxiperoxil ( $HO_2\cdot$ ), óxido e dióxido de nitrogênio (Zhong *et al.*, 2002); e outros derivados ativos do oxigênio são inevitavelmente coproduzidos nessas reações biológicas e exercem papel fisiológico importante. No entanto, estão envolvidos em vários processos deletérios ao organismo humano como o câncer, arteriosclerose, *diabetes mellitus*, artrite reumatóide, distrofia muscular, catarata, desordens neurológicas e processo de envelhecimento (Nordberg & Arner; 2001).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) podem reagir com lipídios, proteínas e com o DNA, conduzindo a um dano estrutural e/ou funcional nas células, enzimas e material genético (Barreiros *et. al.*; 2006).

A presença de radicais livres tem sido correlacionada com um grande número de doenças, mas não como agentes etiológicos e sim como fatores que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos, os quais determinam a continuidade e as complicações de diversos estados patológicos (Rover *et. al.*; 2001).

Os organismos aeróbios, desde as cianobactérias até o homem, desenvolveram uma série de mecanismos fisiológicos e biomoleculares de defesa contra os efeitos das EROs. As células de organismos fotossintetizantes são alvos primários para efeitos deletérios oxidativos por possuírem lipídios não saturados como elementos estruturais majoritários. Portanto, vários mecanismos de proteção são desenvolvidos nestas células (Rocha *et. al.*; 2007). Deste modo, organismos fotossintetizantes têm sido extremamente pesquisados quanto ao seu potencial antioxidante.

Muitos antioxidantes naturais já foram isolados de diferentes tipos de materiais provenientes de plantas, e são considerados como uma fonte promissora de novas substâncias com atividade antioxidante, e de fato, nos últimos anos pesquisas realizadas tem mostrado que o enriquecimento dos sistemas orgânicos com antioxidante naturais pode corrigir a homeostasia viciada (Tiwari, 2002).

Algumas propriedades biológicas como antimicrobiana, antiinflamatória e antinociceptiva, estão diretamente relacionadas à atividade antioxidante desempenhado por substâncias fenólicas (Rice-Evans *et. al.*, 1997).

### **1.3.1 - Substâncias fenólicas como agente antioxidante**

As substâncias fenólicas de plantas enquandram-se em diversas categorias, como: fenóis simples; ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Naczk & Shahidi, 2004).

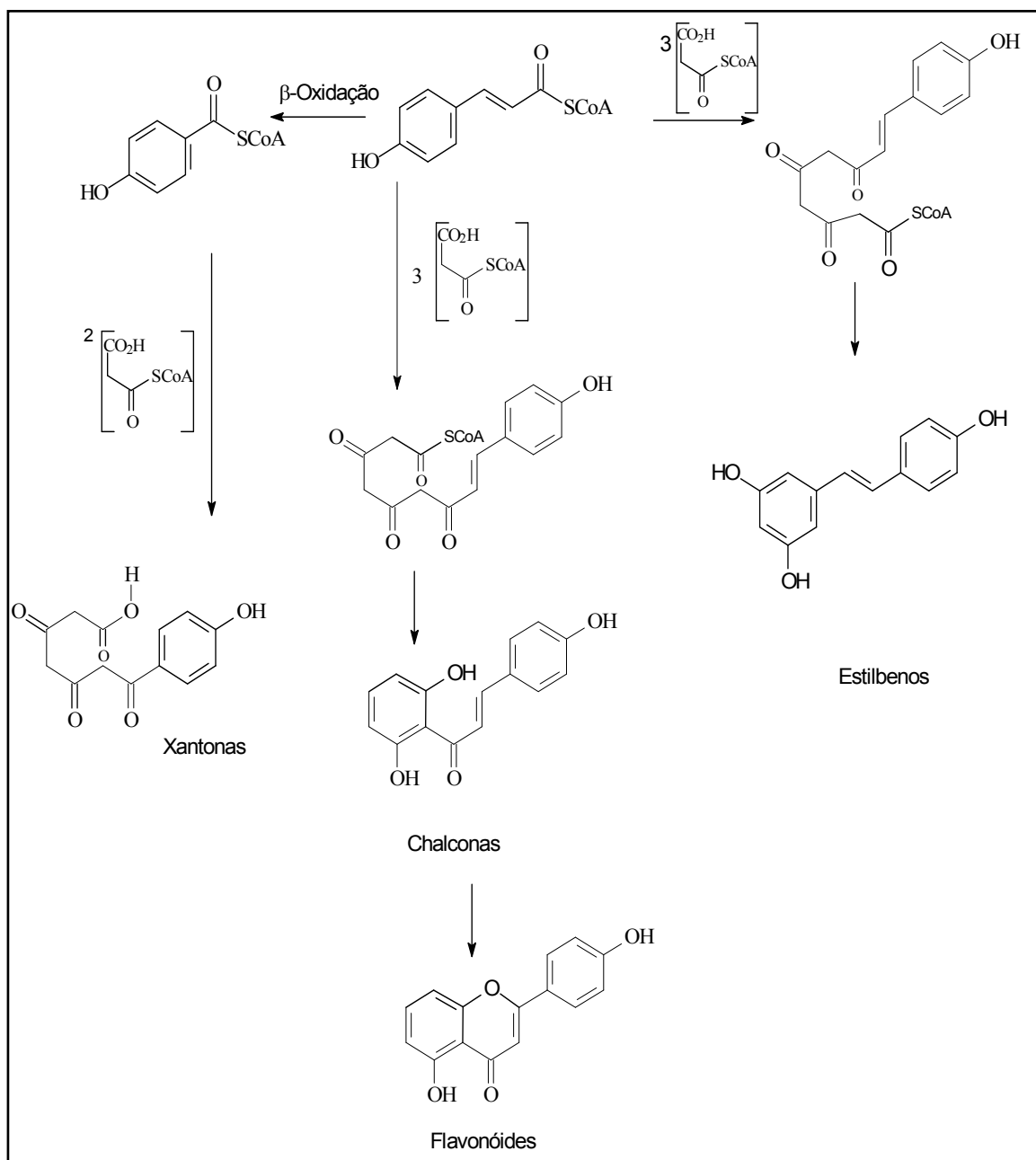
Segundo Shon e colaboradores, 2003, foi observado que compostos fenólicos têm neutralizado radicais livres em vários sistemas modelos, incluindo vitaminas, pigmentos e flavonóides, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (Haslam, 1996). Entre os antioxidantes naturais os flavonóides merecem destaque, pois, eles são capazes de destruir radicais livres oxigenados pela doação de hidrogênio ao elétron livre do radical (Wanasundara & Shahidi, 1996).

A atividade antioxidante de fenólicos deve-se principalmente a suas propriedades redutoras e a sua estrutura química. Essas características possuem um papel fundamental na neutralização dos radicais livres e na quelação de metais de transição, podendo agir em diversas etapas do processo oxidativo. Os intermediários que se formam pela ação de antioxidantes são em geral, relativamente estáveis devido à ressonância no anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Souza *et.al.*; 2007).

Estudos com animais têm mostrado que uma dieta com fitoquímicos antioxidantes são capazes de remover radicais livres. Dentre as substâncias fenólicas testadas, os flavonóides são as que têm exibido maior potencial. Os flavonóides atuam inicialmente ligando-se às células vermelhas do sangue tornando-as resistentes ao estresse oxidativo eficientemente, como sequestrante de radicais livres do tipo superóxido e hidroxil, inibindo modificações nas lipoproteínas de baixa densidade (Decker, 1995).

### 1.3.2 - Biossíntese de substâncias fenólicas

Substâncias fenólicas são geralmente biossintetizados pela via do chiquimato e parte pela via do acetato. O alongamento das substâncias C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> ocorrem em cada etapa pela adição de duas unidades de carbono o que é um procedimento comum em plantas, originando as estilpironas (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> + 2x malonil-CoA), estilbenóides, flavonóides e isoflavonóides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> + 3x malonil-CoA). Em alguns casos ocorre inicialmente uma  $\beta$ -oxidação formando (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) seguido da adição de (3x malonil-CoA), o que ocorre com as xantonas (Bruneton, 1995; Dewick, 2006) (Esquema 1, p. 18).



**Esquema 1** - Rota biossintética de algumas substâncias fenólicas.

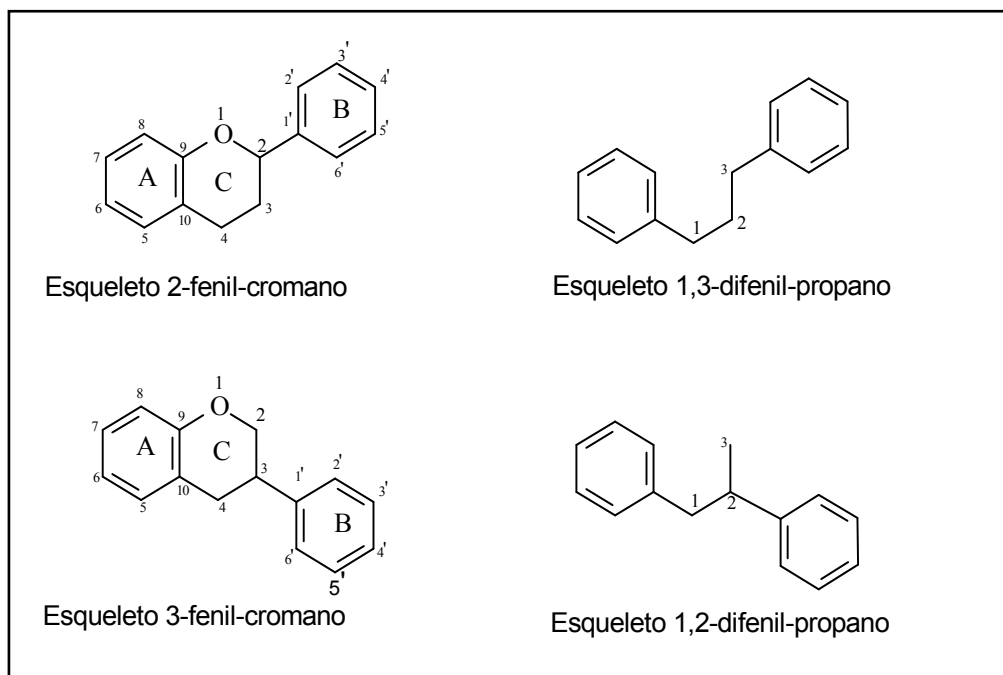
Fonte: Dewick (2006) & Brutenon (1995).

### 1.3.3 - Características gerais dos Flavonóides

Os flavonóides são substâncias fenólicas isoladas de um grande número de plantas vasculares com cerca de 10000 compostos conhecidos e uma grande diversidade de atividades biológicas (Tahara, 2007). A estrutura básica de um flavonóide compreende o núcleo flavano, que consiste em 15 átomos de carbono



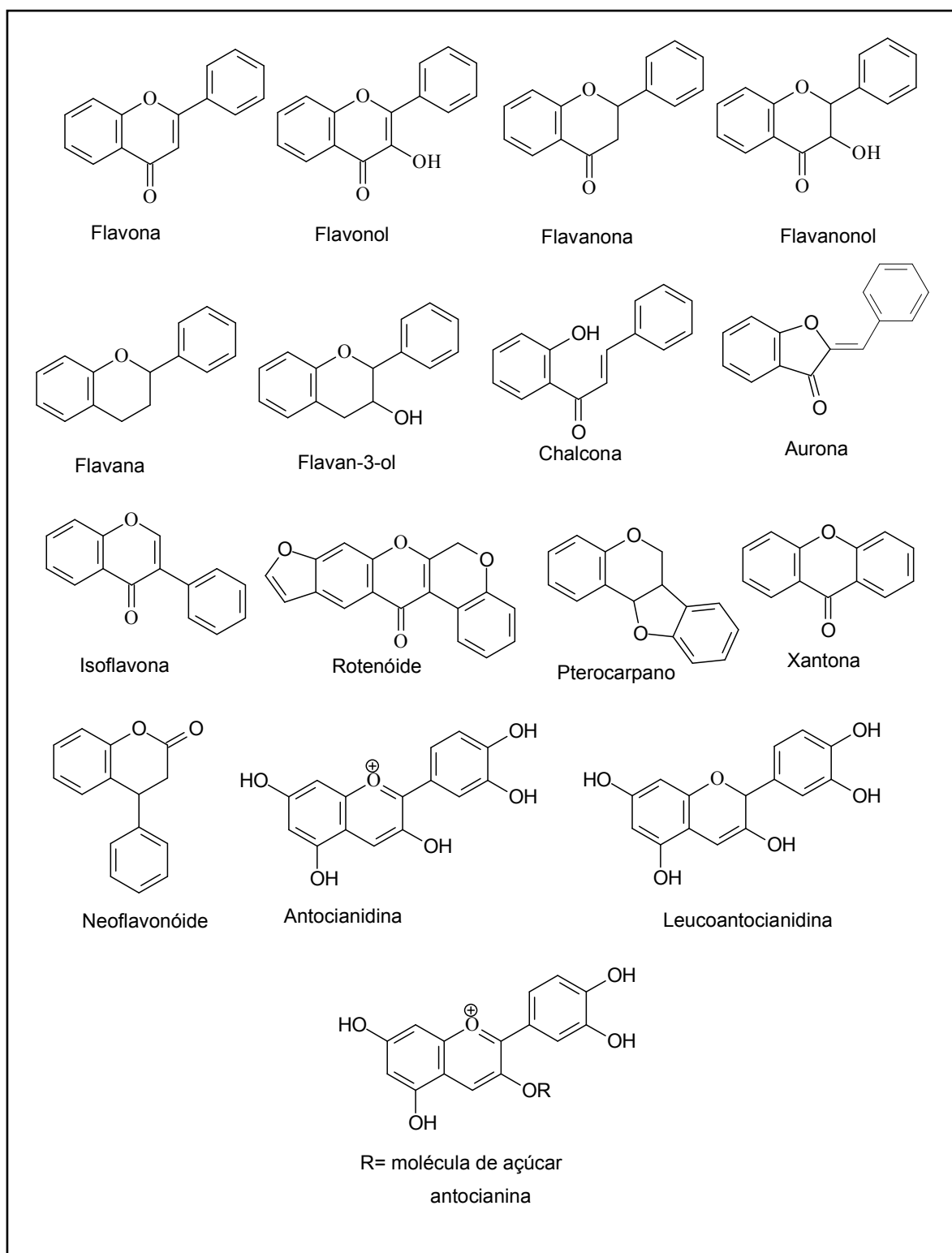
arranjado em três anéis ( $C_6-C_3-C_6$ ) que são designados como A B e C. Algumas estruturas básicas enumeradas são apresentadas na Figura 3.



**Figura 3** - Estruturas básicas de flavonóides. Fonte: Tahara, 2007.

A grande quantidade de flavonóides no reino vegetal não ocorre acidentalmente, eles não agem apenas como atrativos para polinizadores, mas agem como inibidores enzimáticos, precursores de substâncias tóxicas, defensivos contra a radiação ultravioleta, quelante de metais nocivos às plantas e como agentes redutores. Além disso, os flavonóides estão envolvidos nos processos de fotossensibilização, transferência de energia, determinação morfogênica e sexual, níveis de respiração e fotossíntese, podem agir como hormônio ou regulador hormonal (Di Carlo *et. al.*, 1999).

Flavonóides são derivados de benzo- $\gamma$ -pirona e podem ser classificados de acordo com a presença de diferentes substituintes nos anéis A e B ou de acordo com o grau de saturação do anel benzo- $\gamma$ -pirona (Figura 4, p. 20).



**Figura 4** - Classificação de flavonóides. Fonte: Agrawal, 1989.

Pesquisas com flavonóides têm mostrado que eles exercem efeitos benéficos a uma variedade de doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas aos flavonóides a atividade que mais tem sido estudada

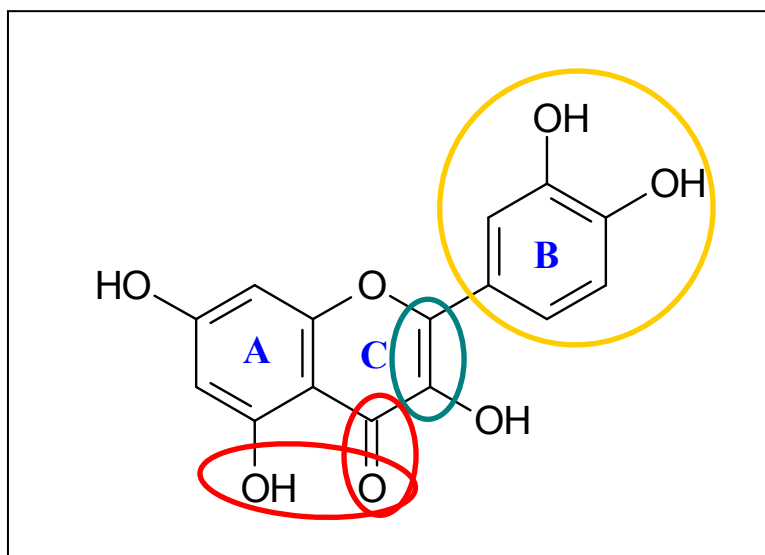
atualmente é antioxidante, devido à habilidade que os flavonóides têm de reduzir a formação de radicais livres ou agirem como sequestrantes de radicais livres (Pietta, 2000).

Muitas das suas atividades biológicas têm sido atribuída ao seu potencial antioxidante e sua capacidade de influenciar nas reações oxidativas que ocorrem em nível intracelular. O mecanismo de proteção com que os flavonóides agem ainda não é completamente conhecido. No entanto, estudos recentes mostram que a explicação clássica de que a doação de hidrogênio seria o principal responsável pela atividade antioxidante, ao contrário do que se pensava, não é o principal responsável pelo seu efeito na célula. Essa premissa é baseada em diversas razões, dentre elas, pode-se citar que os flavonóides são extensivamente metabolizados *in vivo*, resultando em uma significativa alteração no seu potencial redox. Esse fato pode ser explicado observando que a forma bioativa do flavonóide é diferente da forma com que ele é encontrado na planta (Williams *et. al.*; 2004).

Segundo William e colaboradores (2004) o mecanismo com que o flavonóide atua *in vivo* é dependente do tipo de célula onde ele irá atuar. Geralmente alguns grupos presentes em anéis flavonoídicos são extremamente importantes para que a reação se desenvolva com eficiência, entre elas, destacam-se:

- A presença de conjugação em sua estrutura, o que intensifica a sua atuação *in vivo* ao se ligar com moléculas como GSH formando adutos e conjugação com grupos tióis entre outros;
- A presença de dois grupos hidroxila (em posição *orto*) no anel B do flavonóide, conhecido como grupo catecol; capaz de doar elétron rapidamente para a estabilização de radicais;
- A presença de insaturação entre os carbonos 2 e 3 em conjugação com a função 4-oxo;
- A presença de grupos funcionais no anel C que sejam capazes de complexar com íons de metais de transição.

Na Figura 5, p. 22, apresentam-se as principais características que podem definir um flavonóide com potencial antioxidante.



**Figura 5** - Estrutura do flavonol quercetina com as características que o torna um antioxidante. Fonte: Spencer *et. al.*; 2003.

### 1.3.4 - Os ensaios antioxidantes

Os testes antioxidantes disponíveis podem ser classificados basicamente em duas categorias: os métodos diretos (ensaios baseados em estudos da cinética química das reações) e os métodos indiretos (ensaios mediados pela transferência de elétrons) (Tomei & Salvador, 2007).

#### 1.3.4.1 - Redução do Radical livre 2,2- difenilpicrilidrazil

O teste de redução do radical livre DPPH surgiu em meados de 1950, após algum tempo ele foi utilizado para determinar atividade antioxidante de fenóis, alimentos e amostras biológicas. O método se baseia na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio, na presença de antioxidantes o DPPH recebe  $H^+$  sendo então reduzido. O radical DPPH é um radical estável e de coloração púrpura, porém, quando reduzido passa a ter coloração amarela. (Bondet *et. al.*; 1997).

### 1.3.4.2 - Ensaio com o Reagente de Folin-Ciocalteu (RFC)

O ensaio com RFC, segundo Tomei & Salvador (2007), foi desenvolvido em 1965 por Singleton e colaboradores e em 1999 o ensaio foi delineado e padronizado para quantificação de fenóis totais. Atualmente é utilizado para mensurar a capacidade antioxidante de uma amostra a partir de similaridades químicas existentes entre as substâncias antioxidantes presentes na amostra testada e o ácido gálico, utilizado como padrão (Tomei & Salvador, 2007).

O reagente RFC consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação (+6). Porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, mudam seu estado de oxidação, em geral, para (+5) o que é acompanhado de mudança de coloração permitindo a determinação da concentração de substâncias redutoras presentes através de análise por espectrometria de ultravioleta-visível (Naczki, 2004)

## 1.4 - A espécie *Dalbergia glaucescens* (Mart. ex Benth.) Benth.

A espécie *Dalbergia glaucescens* (Mart. ex Benth.) Benth. é conhecida popularmente como mussutaíba, nativa de mata atlântica e pertencente à família Fabaceae.

### 1.4.1- A família Fabaceae

A família Fabaceae Lindl. (antiga Leguminosae Juss.) é a terceira maior família de angiospermas compreendendo aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies (Lewis *et. al.*; 2005). É inferior em número de espécies apenas das famílias Orchidaceae e Asteraceae (Doyle & Luckow, 2003). O esquema de classificação de Cronquist (1981, 1988) considerou as leguminosas como três famílias independentes, as subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Faboideae) (Judd, *et. al.*; 1999).

A subfamília Papilionoideae é a maior das três, onde estão descritos aproximadamente 482 gêneros e cerca de 12000 espécies de ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais (Barrozo, 1991). Os principais gêneros estão

distribuídos em 31 tribos, das quais, algumas possuem importância medicinal (Di Stasi & Huruma-Lima; 2002). A subfamília Papilionoideae representa o grupo mais evoluído dentro da família Fabaceae e é de distribuição mundial. A maioria dos seus representantes arbóreos são encontrados nos trópicos e hemisfério sul, e os arbustivos e herbáceos em regiões temperadas do globo (Heywood, 1971). Em Mimosaceae encontram-se 77 gêneros com aproximadamente 3.000 espécies (Doyle & Luckow, 2003). Caesalpinioideae apresenta cerca de 170 gêneros e cerca de 3.000 espécies (Doyle, 1995). Entre as três subfamílias observa-se grande diversidade em sua morfologia, compartilhando alguma similaridade apenas entre Papilionoideae e Mimosoideae (Tucker, 2003).

A riqueza das leguminosas não pode ser resumida apenas à sua importância ecológica ou ao grande número e a distribuição das suas espécies, pois, economicamente seu potencial é bastante elevado uma vez que contêm espécimes alimentícias, medicinais, madeireiras, ornamentais, produtoras de fibras e óleos, além de promover a fixação de nitrogênio ao solo (Wojciechowski, *et. al.*, 2004).

Do ponto de vista fitoquímico, a subfamília Papilionoideae caracteriza-se por conter cerca de 90% dos isoflavonóides de origem vegetal até hoje identificados (Ingham, 1979). Apesar da distribuição restrita dos isoflavonóides dentro do reino vegetal, a variação estrutural encontrada nessa subfamília é grande, e isso se deve tanto ao número e complexidade de substituintes no sistema 3-fenilbenzopirano, como também aos diferentes níveis de oxidação, assim como a presença de anéis heterocíclicos extras nesse esqueleto básico (Dewick, 2006).

#### **1.4.1.2 - Gênero *Dalbergia***

O gênero *Dalbergia* compreende árvores de pequeno a médio porte, arbustos e lianas com larga distribuição nas regiões tropicais da América Central e do Sul. Muitas espécies de *Dalbergia* são usadas para decoração, fragrância e óleos aromáticos. As espécies do gênero são conhecidas por possuírem pigmentos de várias cores (Blanca, *et. al.*, 2004). Algumas espécies de *Dalbergia* são importantes árvores tropicais de madeira de lei, que apresentam modo de dispersão de sementes principalmente pelo vento. Algumas espécies do gênero

*Dalbergia* são conhecidas como jacarandás, suas valiosas madeiras são conhecidas desde o Brasil colonial e sua importância já vem sendo descrita na literatura desde o início daquele período (Rouet, *et. al.*, 2003).

Esse gênero distribui-se dentro de duas séries específicas: *Dalbergiae pantropicales* que ocorre nos continentes Asiático, Africano e Americano, e está caracterizada pela presença de neoflavonóides, e *Dalbergiae brasilianae* que ocorre apenas no continente Americano e está caracterizada pela produção de isoflavonóides e neoflavonóides em menor proporção (Seshadri, 1972).

O gênero *Dalbergia* possui cerca de 100 espécies de distribuição pantropical, sendo considerado o segundo maior da tribo Dalbergiae. No Brasil existem 40 espécies de *Dalbergia* distribuídas em áreas representativas dos diferentes ecossistemas brasileiros. É possível encontrar espécies de *Dalbergia* nos mais variados tipos de vegetação, como: Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Campos Rupestres. O gênero é ainda dividido em cinco seções: *Pseudoecasthapillum*, *Triptolemea*, *Ecasthapillum*, *Selenolobium* e *Dalbergia* (Carvalho, 1997).

A madeira de algumas das suas espécies são duras e resistentes ao ataque de insetos sendo, portanto, usadas para manufatura de instrumentos musicais e na carpintaria em geral (Blanca, *et al.*, 2004). Devido à necessidade crescente da indústria naval em minimizar seus gastos causados pela bioincrustação e/ou perfuração causadas por organismos marinhos em cascos de navios, foram testados um total de 150 corpos de prova de árvores submetidos por um período de 90 meses a águas tropicais no canal do Panamá, região onde ocorre muitas correntes e diversos organismos marinhos. Dentre as espécies testadas, as que apresentaram melhores resultados contra os organismos dos gêneros *Limnoria*, *Teredo* e *Pholad* foi a espécie *Dalbergia retusa* (Bultman & Southwell, 1972). Outros experimentos foram realizados com a madeira de *Dalbergia retusa* e *D. latifolia* onde foi possível observar que as mesmas apresentaram atividade contra incrustação por organismos marinhos, mais especificamente contra as espécies do gênero *Limnoria* (Cragg, *et.al.*, 1999). Esse conjunto de dados coloca algumas madeiras do gênero *Dalbergia* e/ou substâncias bioproduzidas pelo seu metabolismo especial como possível inibidor de bioincrustação marinha. Ainda aliado ao fato de que algumas madeiras de árvores do gênero são resistentes ao apodrecimento, mesmo em áreas quentes e úmidas de regiões tropicais, podendo

de alguma forma, após realização de estudos mais específicos, ser possível sua utilização pela indústria naval (Almeida, 2001).

Muitas espécies do gênero são utilizadas na medicina chinesa para o tratamento de distúrbios sanguíneos, outras são úteis no tratamento de artrite, gonorréia e reumatismo (Singh, 1966; Hajare, *et. al.*; 2001). Outras espécies podem ser utilizadas devido ao seu efeito antibiótico ou devido sua atividade citotóxica (Yahara *et al.*, 1985; Ansari *et al.*, 2000; Hamburger *et. al.*, 1988), como pode ser visto na Tabela 4.

**Tabela 4** - Atividades biológicas atribuídas a espécies do gênero *Dalbergia*

<b>Espécie</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Referência</b>
<i>D. odorífera</i>	Antioxidante.	(Wang <i>et. al.</i> , 2000; Cheng, <i>et. al.</i> , 1998 e (Yu <i>et. al.</i> , 2007).
<i>D. sissoo</i>	Antimicrobiana; antiinflamatória; larvicida e repelente de mosquitos (vetor da malária);	(Hajare, <i>et. al.</i> , 2001) ( Ansari, <i>et. al.</i> , 2000) (Mujumdar, <i>et al.</i> , 2005)
<i>D. lanceolaria</i>	distúrbios intestinais.	e (Mujumdar, <i>et al.</i> , 2005)
<i>D. peniculata</i>	Distúrbios intestinais.	(Mujumdar, <i>et al.</i> , 2005)
<i>D. stipulacea</i>	Distúrbios intestinais.	(Mujumdar, <i>et al.</i> , 2005)
<i>D. volubilis</i>	Distúrbios intestinais.	(Mujumdar, <i>et al.</i> , 2005)
<i>D. louvelii</i>	Antiplasmódico.	(Beldjoudi, <i>et. al.</i> , 2003)
<i>D. cochinchinensis</i>	Anti-androgênica	(Patak <i>et. al.</i> , 1997)
<i>D. retusa</i>	Antimicrobiana Antiincrustante	(Gary & Jurd, 1977) (Bultman & Southwell, 1972 e Cragg, <i>et. al.</i> , 1999)
<i>D. latifolia</i>	Antiincrustante	(Cragg, <i>et. al.</i> , 1999)
<i>D. louvelii</i>	Antiplasmódica	(Beldjoudi <i>et. al.</i> , 2003)
<i>D. lanceolaria</i>	Antidiarréica	(Mujundar <i>et. al.</i> , 2005)
<i>D. frutescens</i>	Antigiárdia	(Hajare, <i>et. al.</i> , 2001)

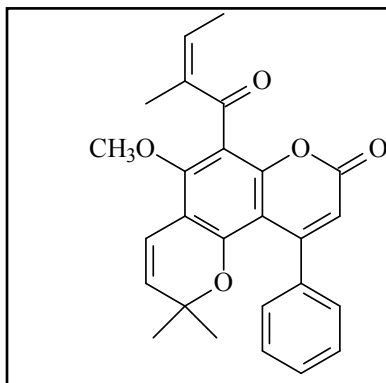
#### 1.4.1.3 - A fitoquímica do gênero *Dalbergia*

Investigações fitoquímicas do gênero *Dalbergia* têm mostrado a ocorrência de isoflavonóides, neoflavonóides e cinamoilfenóis (Mathias *et al.*, 1998; Gregson *et. al.*, 1978), e ainda um limitado número de oligômeros com uma mistura de



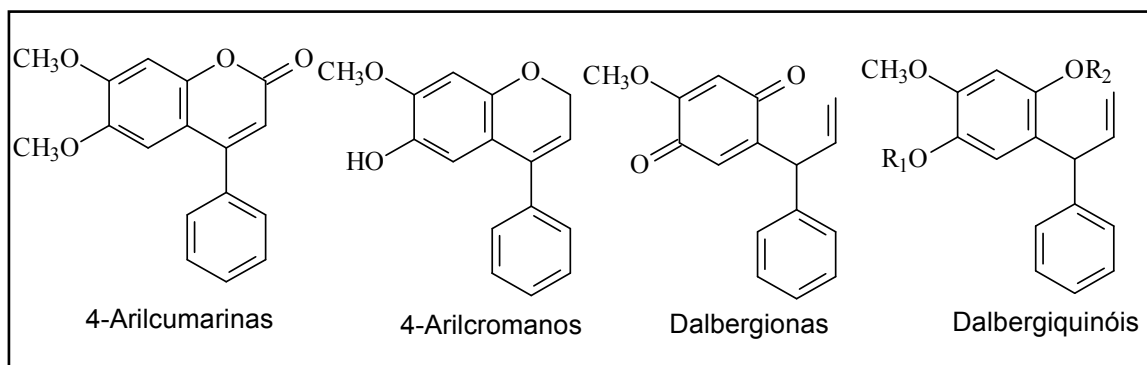
monômeros de isoflavonóides-neoflavonóides e isoflavonóides-cinamoilfenóis (Bekker, *et.al.*, 2002; Hambúrguer, *et. al.*, 1988), furanos, benzofenonas, estirenos e triterpenóides (Hajare, *et. al.*, 2001), rotenóides (Pathak, *et. al.*, 1997).

Dentro da classe geral de flavonóides destacam-se os neoflavonóides que devido a sua ocorrência no gênero foram denominados dalberginóides (Chawla &Chibber, 1981). O primeiro neoflavonóide isolado de fonte natural foi o calofilolido (Figura 6), no ano de 1951 de um extrato de sementes de *Calophyllum inophyllum* sua estrutura só foi totalmente elucidada em 1957 (Garazd. *et. al.*; 2003). Porém, o termo neoflavonóide foi sugerido pela primeira vez por Swain e empregado em 1965 por Ollis para descrever uma classe de produtos naturais com o esqueleto 4-arilcromano (Harbone *et. al.*; 1975).



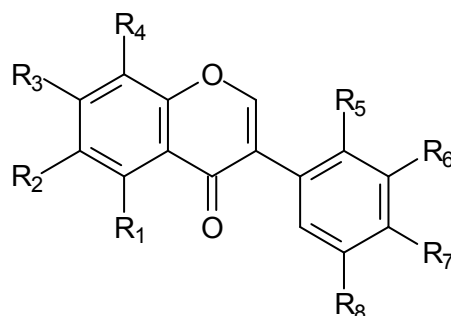
**Figura 6** - Calofilolido.

A estrutura única, a distribuição em diversas plantas medicinais e as propriedades farmacológicas fazem dos neoflavonóides substâncias de grande interesse. Representam um grupo de flavonóides cuja estrutura baseia-se no esqueleto 4-arilcumarina e compreendem quatro subclasses: 4-arilcumarinas, 4-arilcromanos, dalbergionas e dalbergiquinóis (Figura 7).



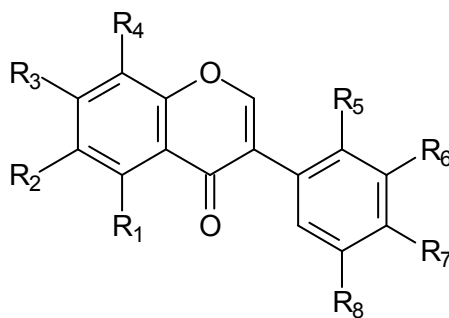
**Figura 7** - Estruturas bases dos neoflavonóides. Fonte: Chawla &Chibber, 1981.

Na Figura 8 apresentam-se algumas substâncias que foram isoladas de plantas do gênero *Dalbergia*.



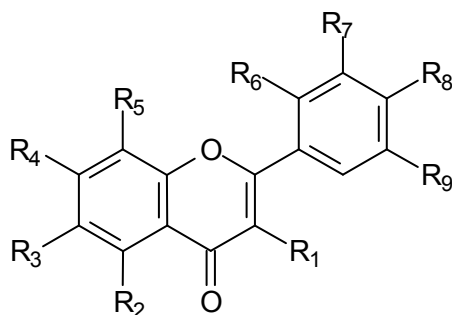
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>	<b>R<sub>8</sub></b>
1	OH	H	OH	O-Glic	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
2	OH	H	H	H	H	H	OH	H
3	OH	H	O-Glic-Apio	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
4	H	H	OH	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
5	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
6	H	H	OH	H	H	H	OH	H
7	H	H	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
8	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	O-Glic	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
9	H	H	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
10	OH	H	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
11	H	H	OCH <sub>3</sub>	Ram	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
12	H	Ram	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
13	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
14	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	O-Glic-Apio	H
15	OH	O-Glic	H	O-Glic	H	H	OH	H
16	H	H	OH	H	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	H
17	H	H	OH	H	H	H	OH	H
18	H	H	OH	H	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
19	H	H	OH	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H
20	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
21	OH	H	OH	O-Glic	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
22	OH	O-Glic	OH	H	H	OH	OH	H
23	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH	O-Glic-Apio	H
24	OH	O-Glic	OH	O-Glic	H	H	OH	H
25	OH	O-Glic	OH	O-Glic	H	OH	OH	H
26	OH	H	OCH <sub>3</sub>	O-Glic	H	H	OH	H
27	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
28	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	OGlic(6→1)Api	H
29	OH	H	OCH <sub>3</sub>	O-Glic	H	H	OH	H
30	OCOCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	O-Glic	H	H	OCOCH <sub>3</sub>	H
31	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	O-Glic	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
32	OEt	H	OCH <sub>3</sub>	O-Glic	H	H	OEt	H
33	OH	H	O-Glic(→1)O-Glic	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
34	H	H	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH
35	H	H	OEt	OEt	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
36	OH	OCH <sub>3</sub>	O-Ram-Glic	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
37	H	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
38	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	H	OH	H
39	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH	H

Figura 8 - Substâncias isoladas de espécies do gênero *Dalbergia*.

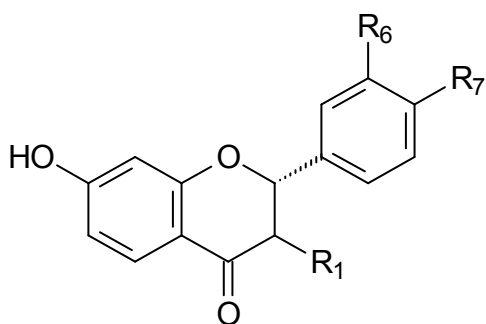


	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>	<b>R<sub>8</sub></b>
<b>40</b>	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH	H
<b>41</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>
<b>42</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OH	H
<b>43</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>44</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OEt	H
<b>45</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OGlic(6→1)Api	H
<b>46</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	H	OH	H
<b>47</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>48</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>49</b>	OAc	OCH <sub>3</sub>	OAc	H	H	H	OAc	H
<b>50</b>	OAc	OCH <sub>3</sub>	OAc	H	H	H	OAc	H
<b>51</b>	OAc	H	OAc	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>52</b>	OEt	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OEt	H
<b>53</b>	OEt	OCH <sub>3</sub>	EtO	H	H	H	OEt	H
<b>54</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>55</b>	OH	H	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>56</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	O-Glic	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>57</b>	OH	H	O-Glic(6 →1)O-Glic	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>58</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	O- Glic(6→1)O- Glic	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>59</b>	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	O-Glic	OCH <sub>3</sub>
<b>60</b>	OH	H	O- Glic(1→1)Api	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>61</b>	OH	H	OH	O-Glic	H	H	OH	H
<b>62</b>	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	Glic(6→1)Api	H
<b>63</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	Glic(6→1)Api	H
<b>64</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	Glic	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>65</b>	OH	H	OCH <sub>3</sub>	Glic	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>66</b>	OH	Man	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>67</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Tetracetil-Glic	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>68</b>	OH	H	OGlic	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>69</b>	OAc	H0	O-tetracetil- Glic	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>70</b>	OH	H	O-Glic	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>71</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	O-Glic	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>72</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	O-Gal	H
<b>73</b>	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	O-Gal	H
<b>74</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	O- Glic(6→1)Glic	H

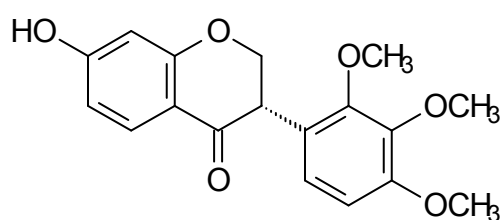
Figura 8 - Continuação

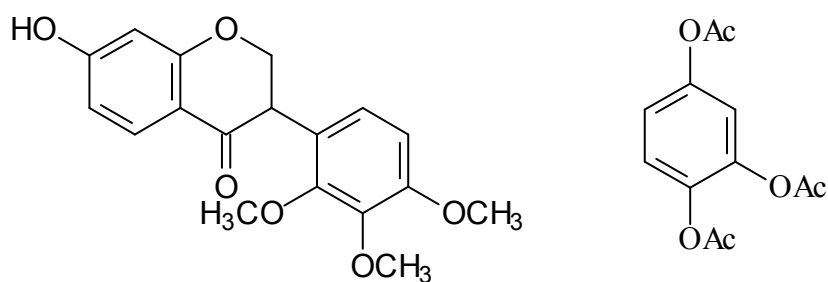


	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>	<b>R<sub>8</sub></b>	<b>R<sub>9</sub></b>
<b>75</b>	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH	OH	H
<b>76</b>	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	OH	OH	H
<b>77</b>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	H	H	H
<b>78</b>	H	H	H	H	H	H	H	OH	H
<b>79</b>	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>
<b>80</b>	H	O	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	OH	OH	H
<b>81</b>	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
<b>82</b>	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
<b>83</b>	OH	OH	H	OH	H	H	OH	H	H
<b>84</b>	H	OH	OH	OH	H	H	OH	OH	H
<b>85</b>	H	OH	H	OH	H	H	OH	O-Glic(6→1) Man	H
<b>86</b>	H	OH	H	O-Glic	H	H	H	O-Glic	H
<b>87</b>	O-Gal	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
<b>88</b>	O-Gal(4→1) Gal	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
<b>89</b>	H	OH	H	O-Glic(2→1) Api	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
<b>90</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	O-Glic(6→1) O-Man	H



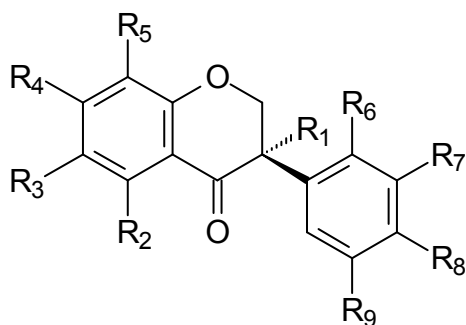
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>
<b>91</b>	H	H	OH
<b>92</b>	H	OH	OH
<b>93</b>	OH	H	O-Glic(1→6)Xil

**94****Figura 8 - Continuação**

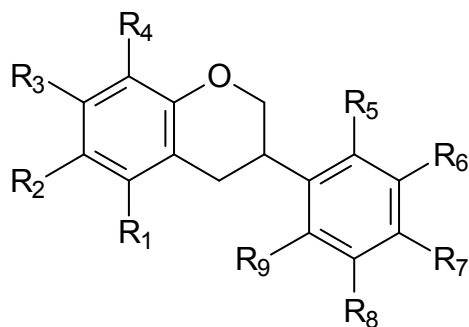


95

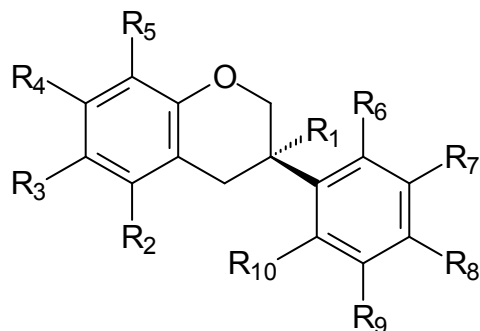
96



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
97	H	H	H	H	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H
98	H	H	H	H	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
99	H	H	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
100	OH	H	H	OH	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H

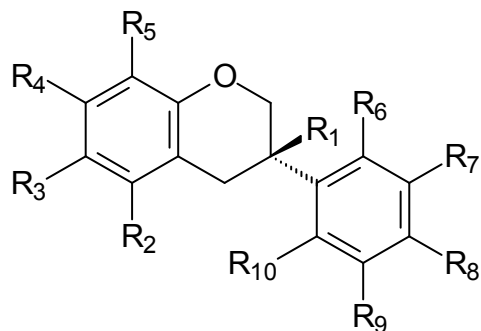


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
101	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H
102	H	H	OH	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
103	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
104	H	H	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

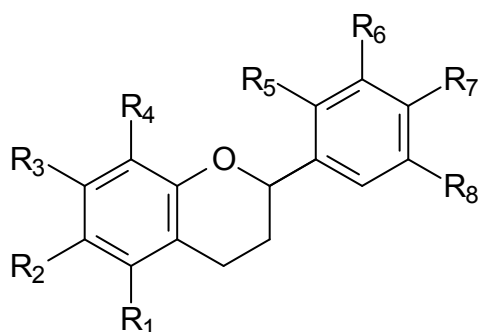


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	R <sub>10</sub>
105	H	H	H	OH	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
106	H	H	H	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

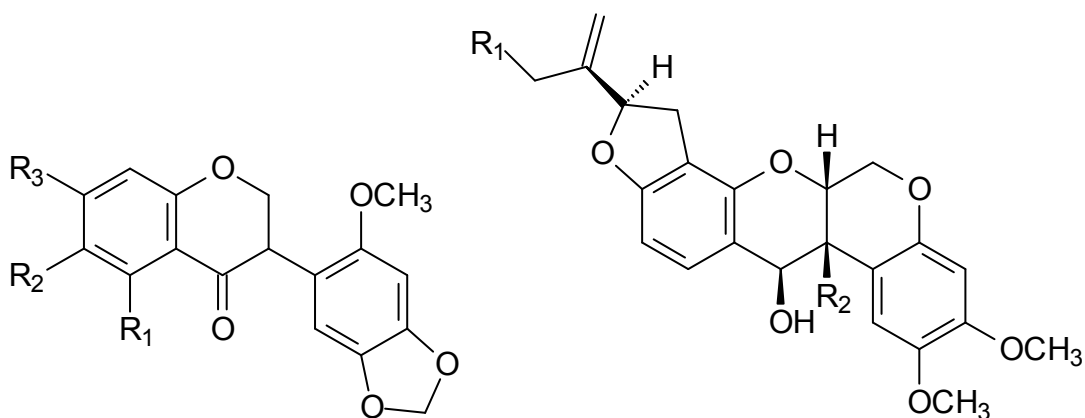
Figura 8 - Continuação



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	R <sub>10</sub>
<b>107</b>	H	H	H	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>108</b>	H	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H

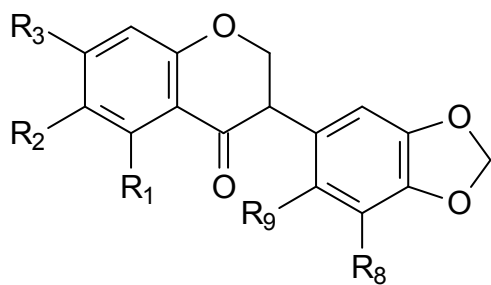


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
<b>109</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OH	H
<b>110</b>	H	H	OH	H	H	H	OH	H

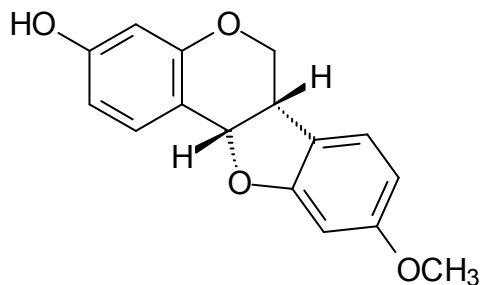
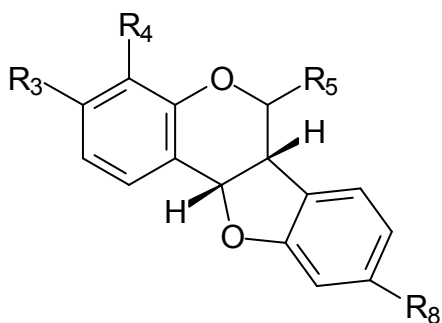


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
<b>111</b>	H	OCH <sub>3</sub>	GlicO		<b>113</b>	H	H
<b>112</b>	H	H	OH		<b>114</b>	H	OH
					<b>115</b>	O-Glic	H

Figura 8 - Continuação

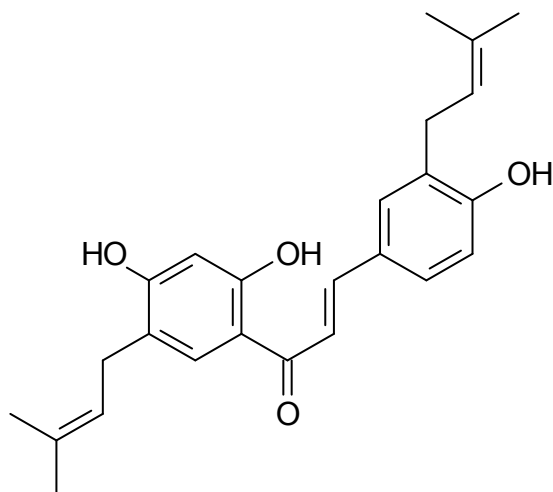
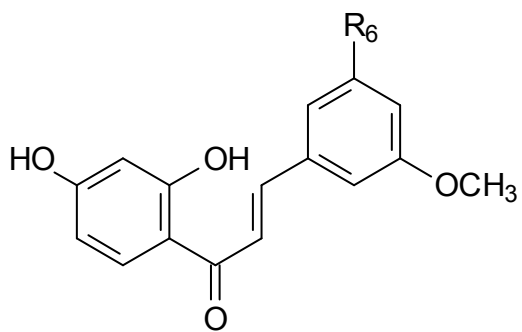


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
116	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OCH <sub>3</sub>
117	H	H	OH	H	H
118	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H
119	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H
120	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H



124

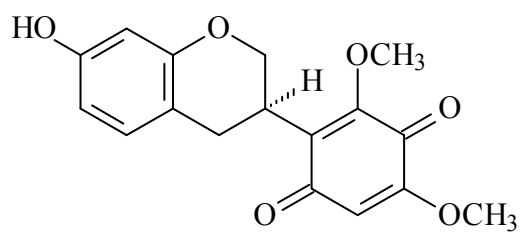
	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>8</sub>
121	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>
122	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OCH <sub>3</sub>
123	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>



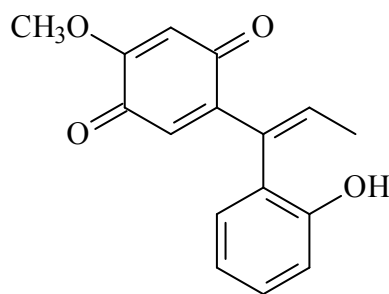
	R <sub>6</sub>
125	H
126	OCH <sub>3</sub>

127

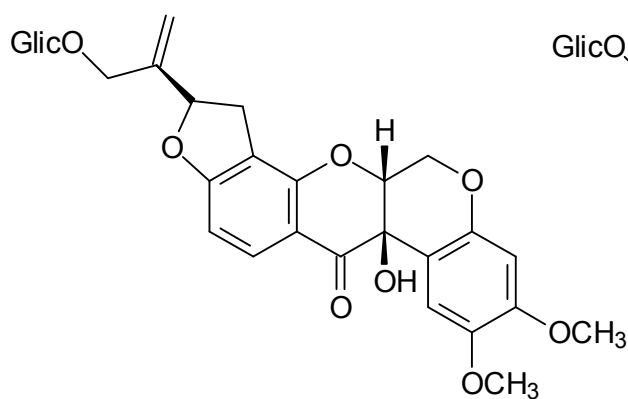
Figura 8 - Continuação



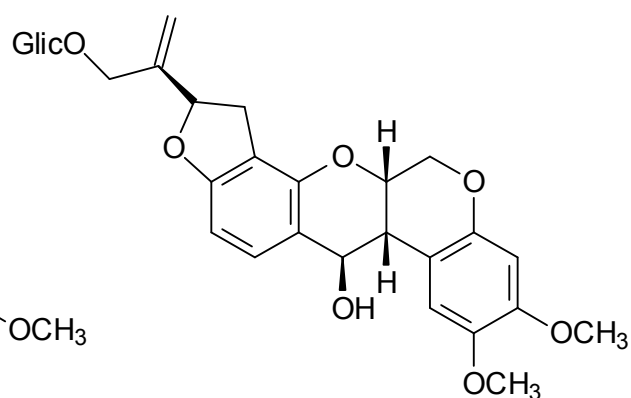
128



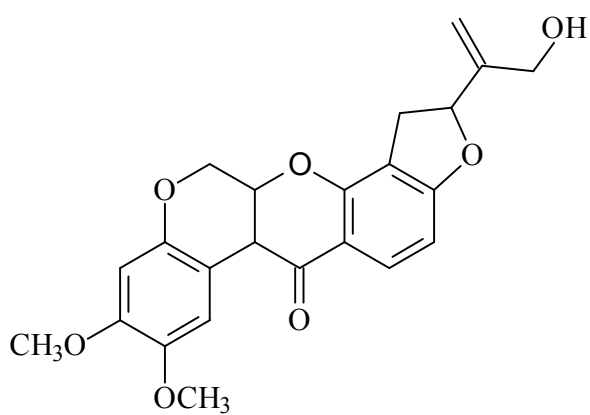
129



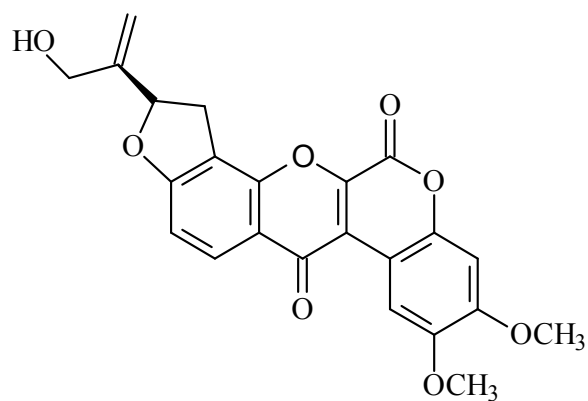
130



131



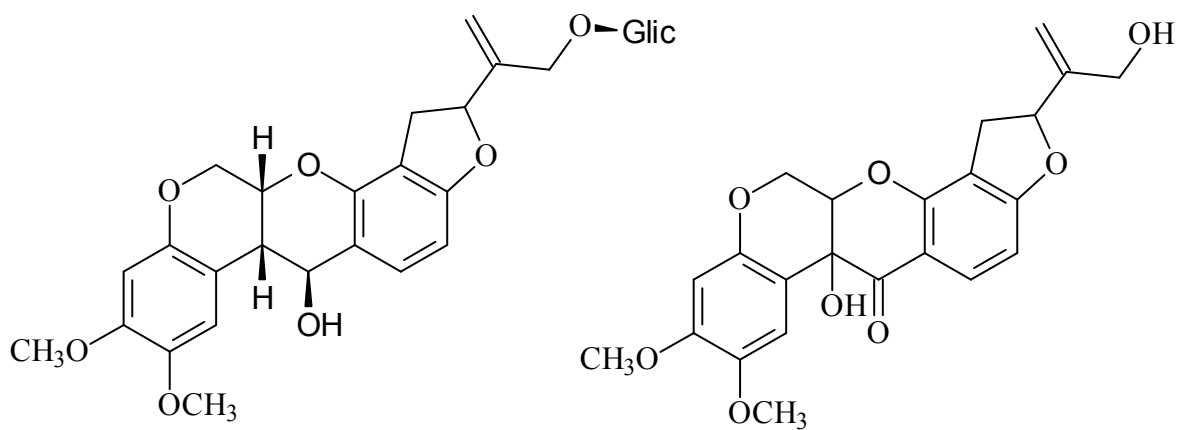
132



133

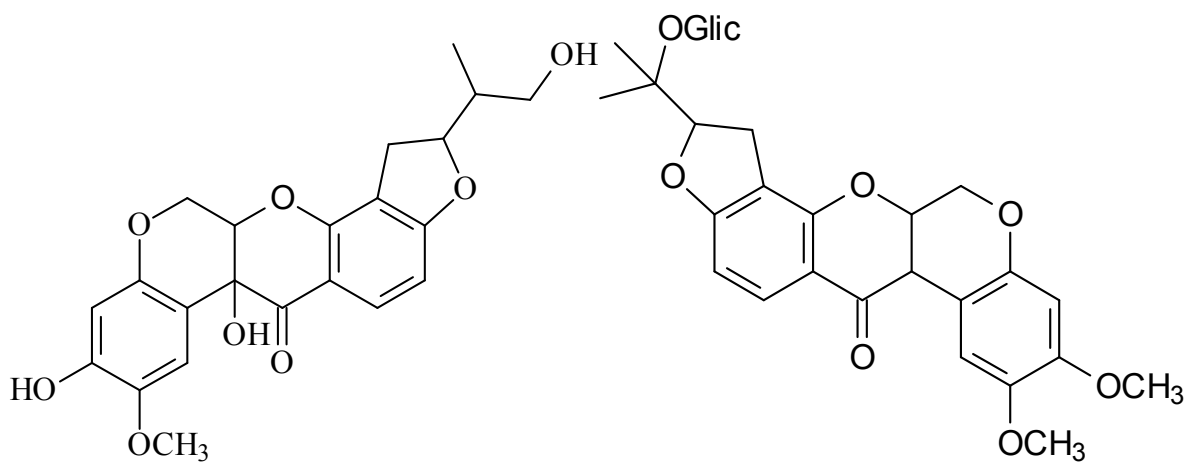
Figura 8 - Continuação





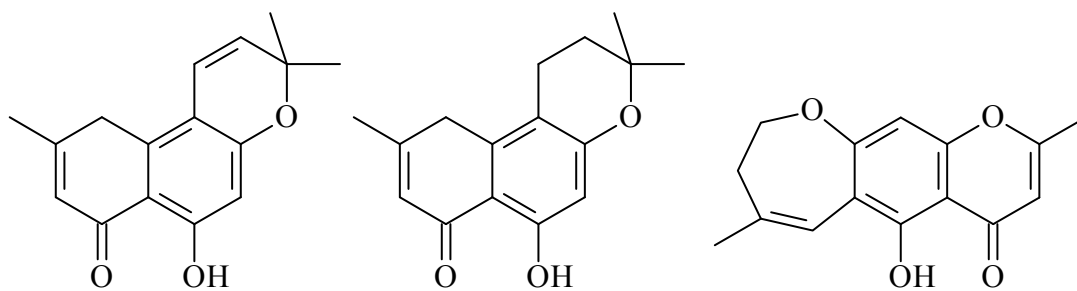
134

135



136

137



138

139

140

Figura 8 - Continuação

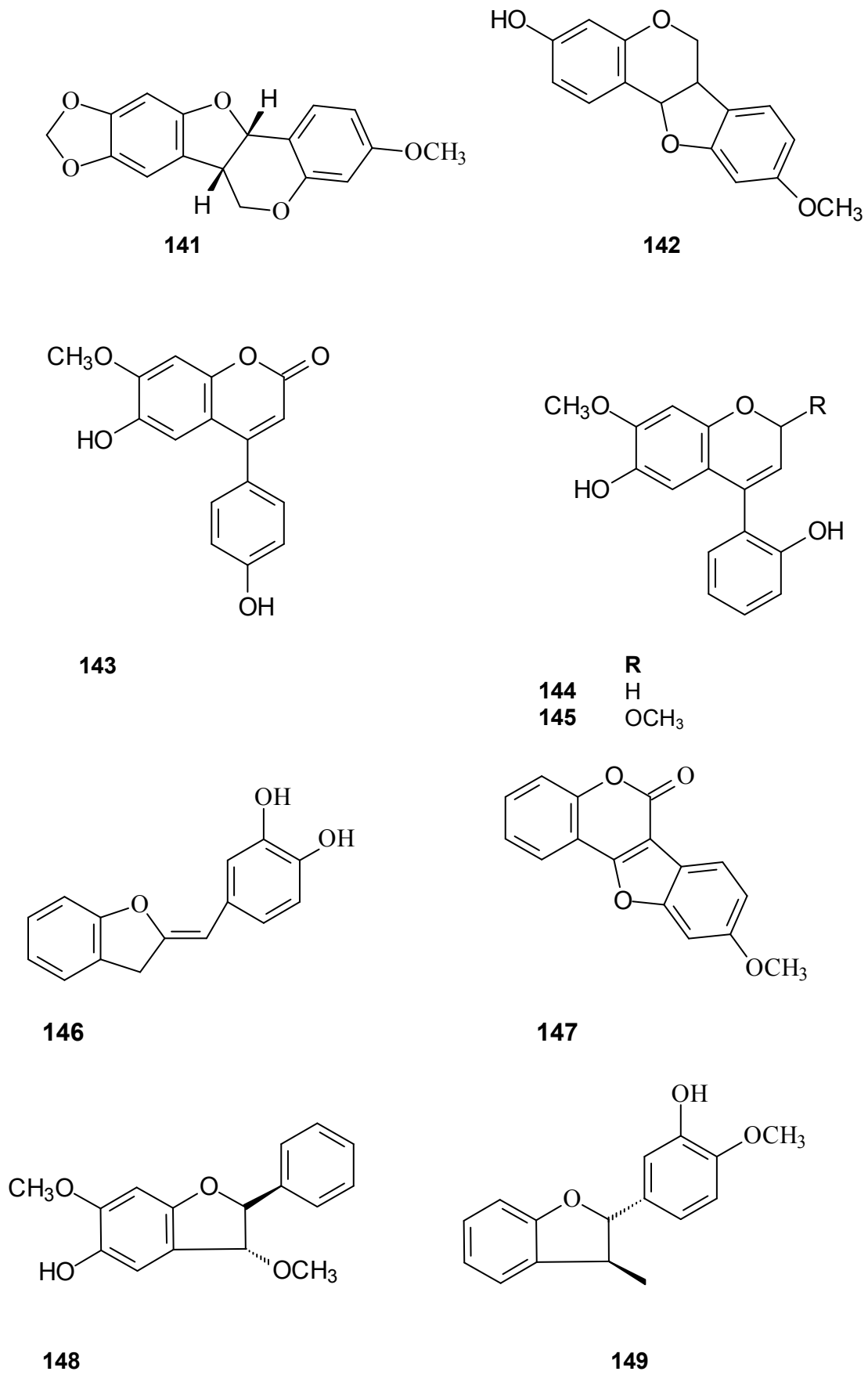


Figura 8 - Continuação

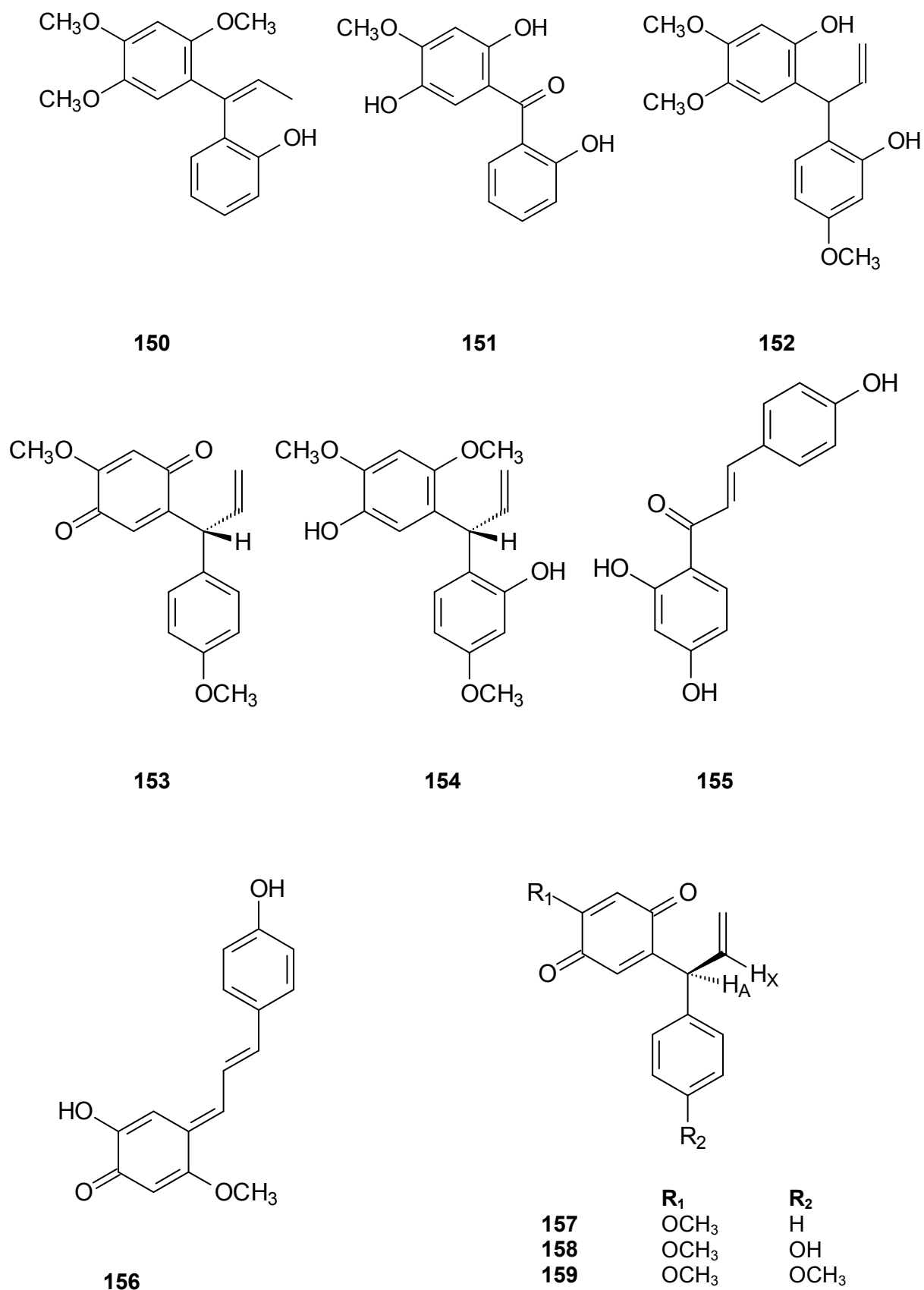
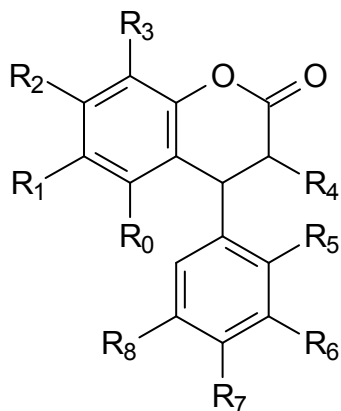
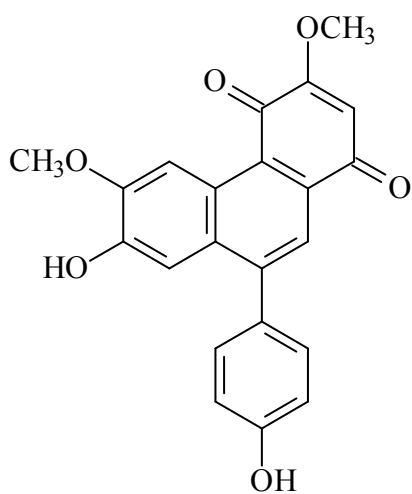
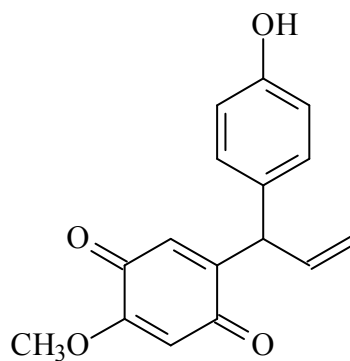
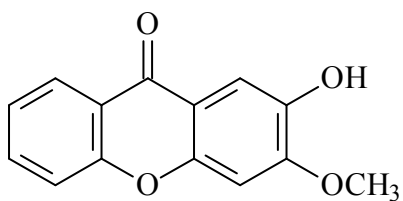


Figura 8 - Continuação

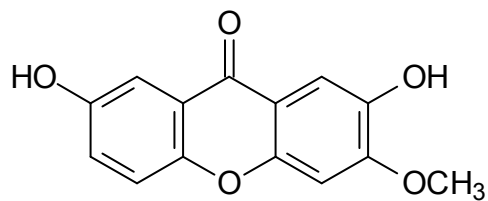


	R <sub>0</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
<b>160</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	OH	H
<b>161</b>	OH	CHO	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H
<b>162</b>	H	H	H	H	H	H	H	OH	H
<b>163</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	OH	H
<b>164</b>	H	OH	OH	H	H	H	H	OH	H
<b>165</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	H	H	OH	H
<b>166</b>	OCH <sub>3</sub>	CHO	OH	H	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
<b>167</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
<b>168</b>	H	H	H	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
<b>169</b>	H	H	H	OH	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
<b>170</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	H
<b>171</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	H
<b>172</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	OH	H
<b>173</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OH	H	H
<b>174</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OH	OH	H
<b>175</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	H	H	H	H
<b>176</b>	H	OH	OH	H	H	H	H	H	H
<b>177</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OH	OH	H

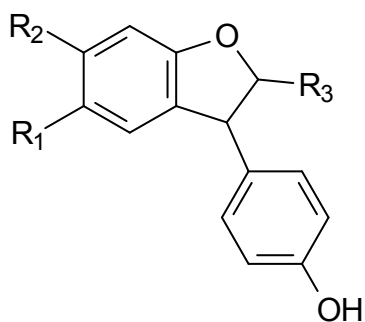
**178****179****Figura 8 - Continuação**



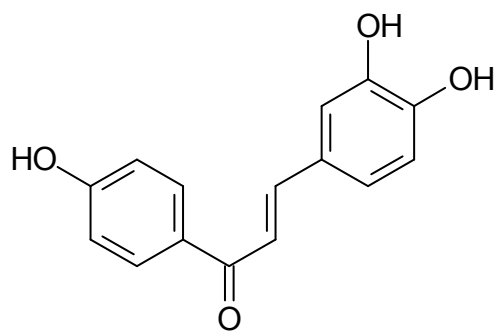
180



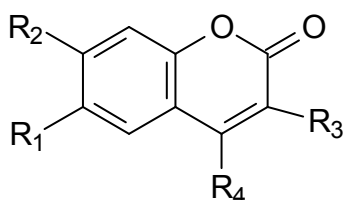
181



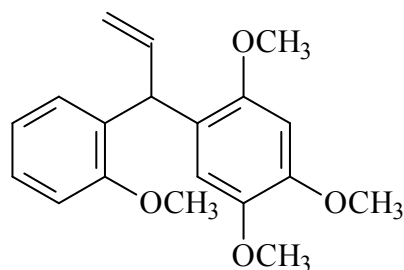
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
182	OH	OCH <sub>3</sub>	CHO
183	OH	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH
184	OH	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
185	H	H	CH <sub>2</sub> OH



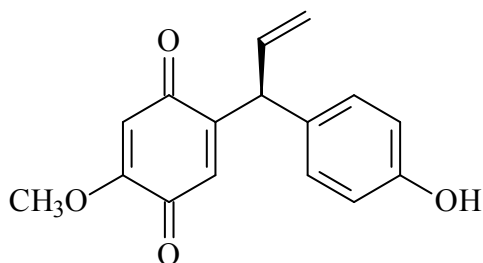
186



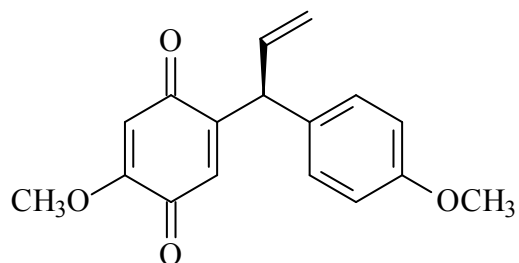
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
187	H	OH	H	CH <sub>3</sub>
188	H	OH	H	H
189	H	H	OH	CH <sub>3</sub>



190

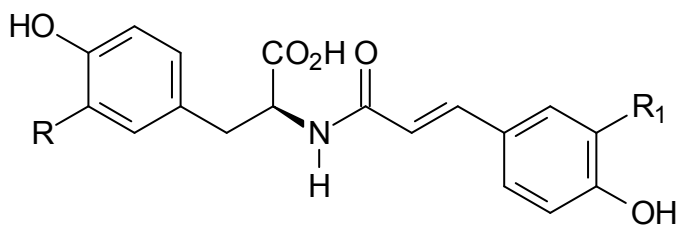
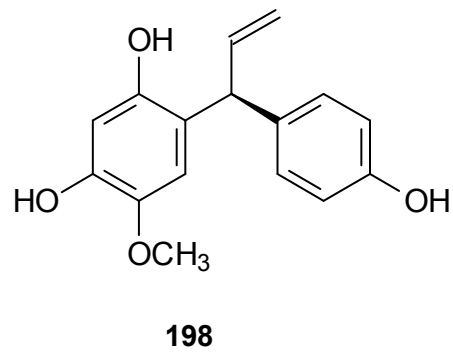
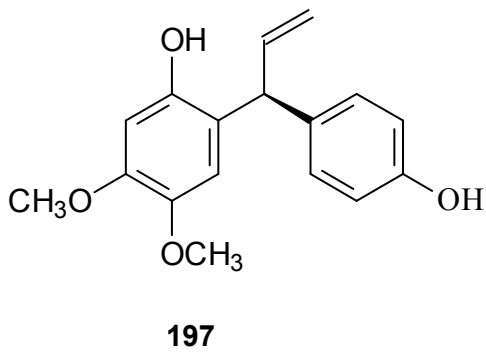
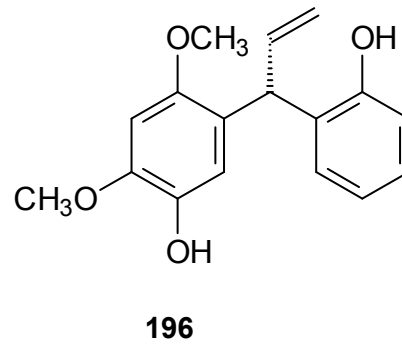
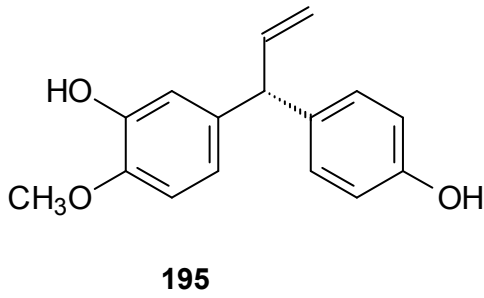
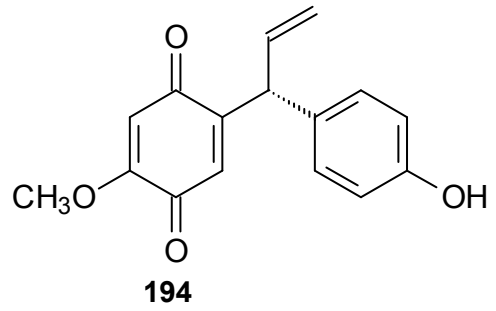
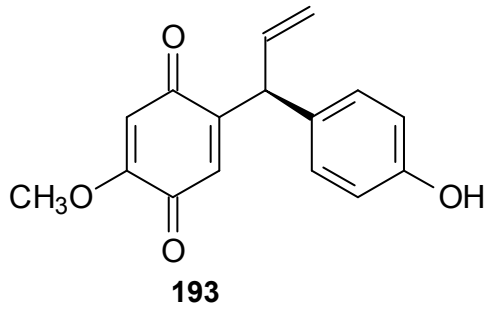


191



192

Figura 8 - Continuação



	<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>
<b>199</b>	OH	OH
<b>200</b>	OH	H

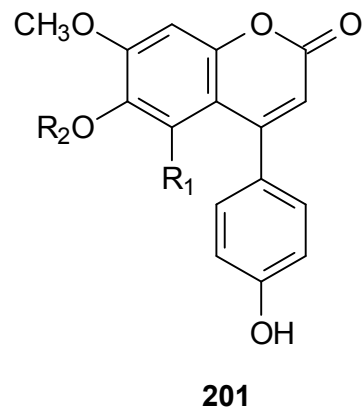


Figura 8 - Continuação

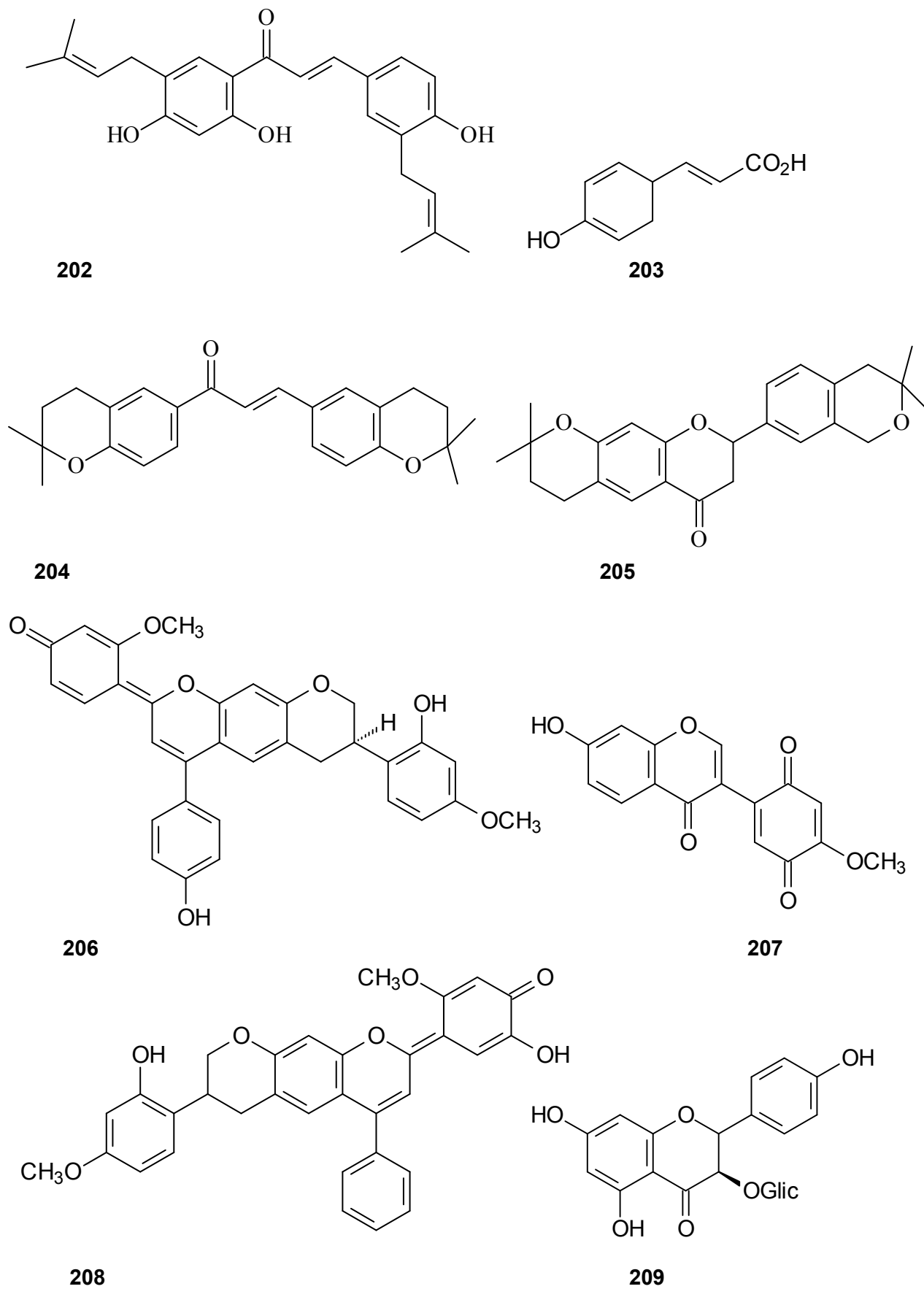
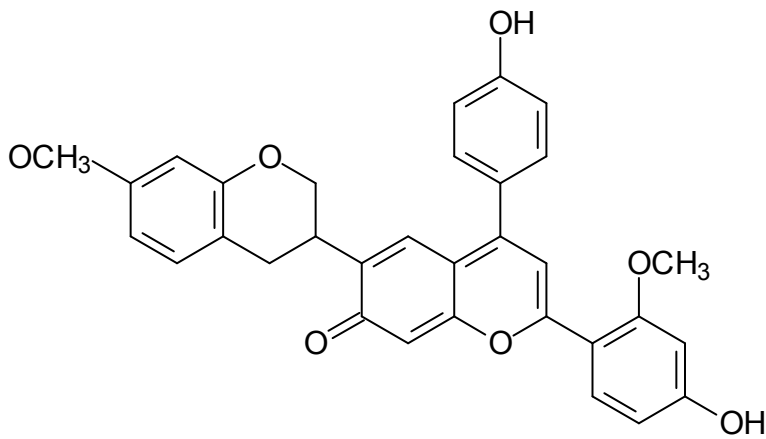
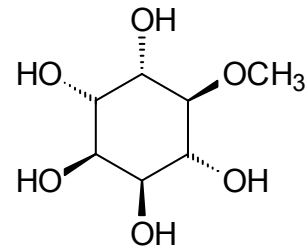


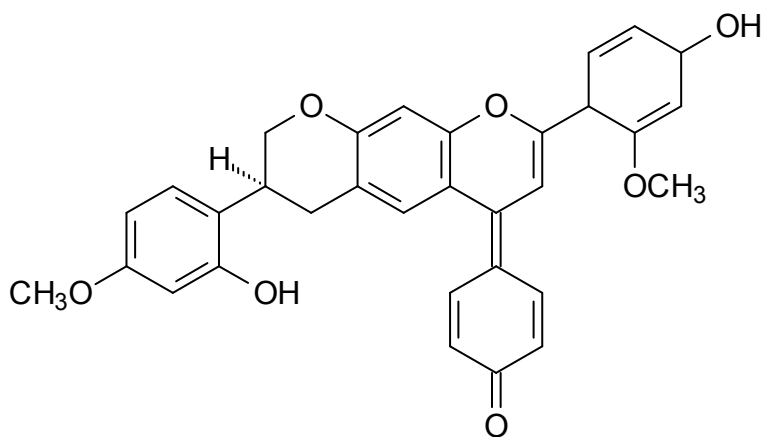
Figura 8 - Continuação



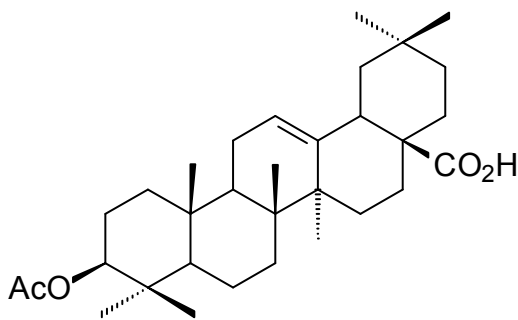
210



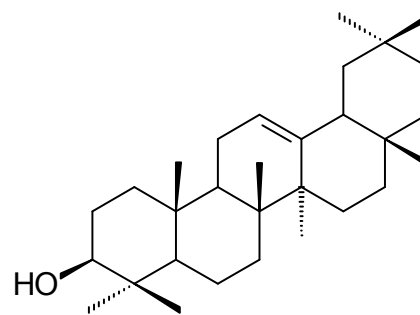
211



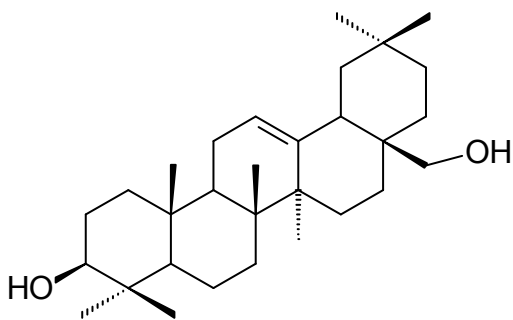
212



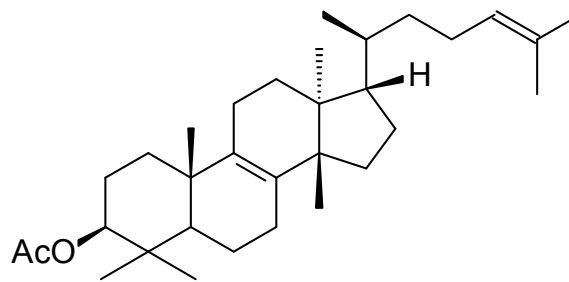
213



214



215



216

Figura 8 - Continuação



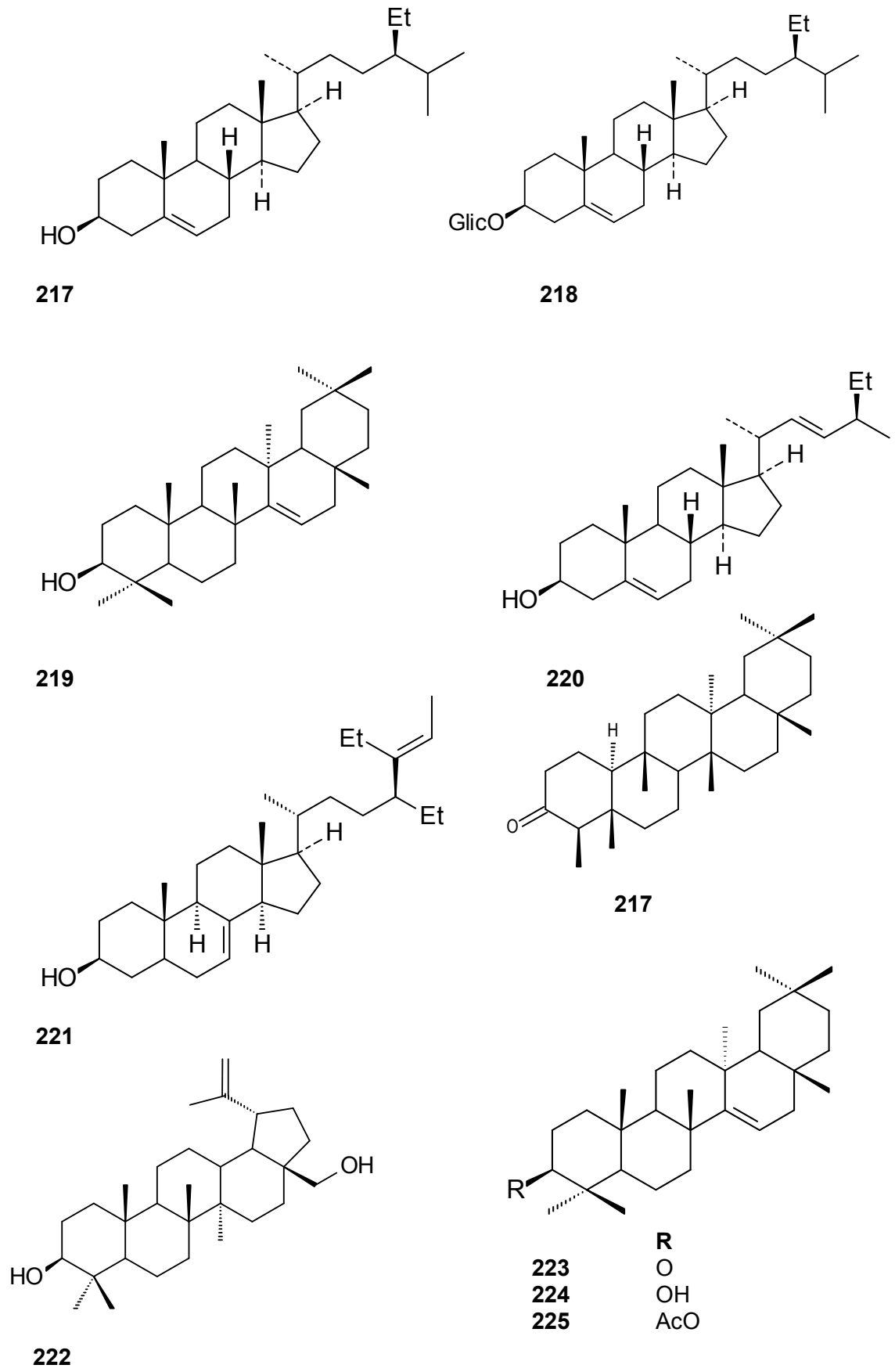


Figura 8 - Continuação

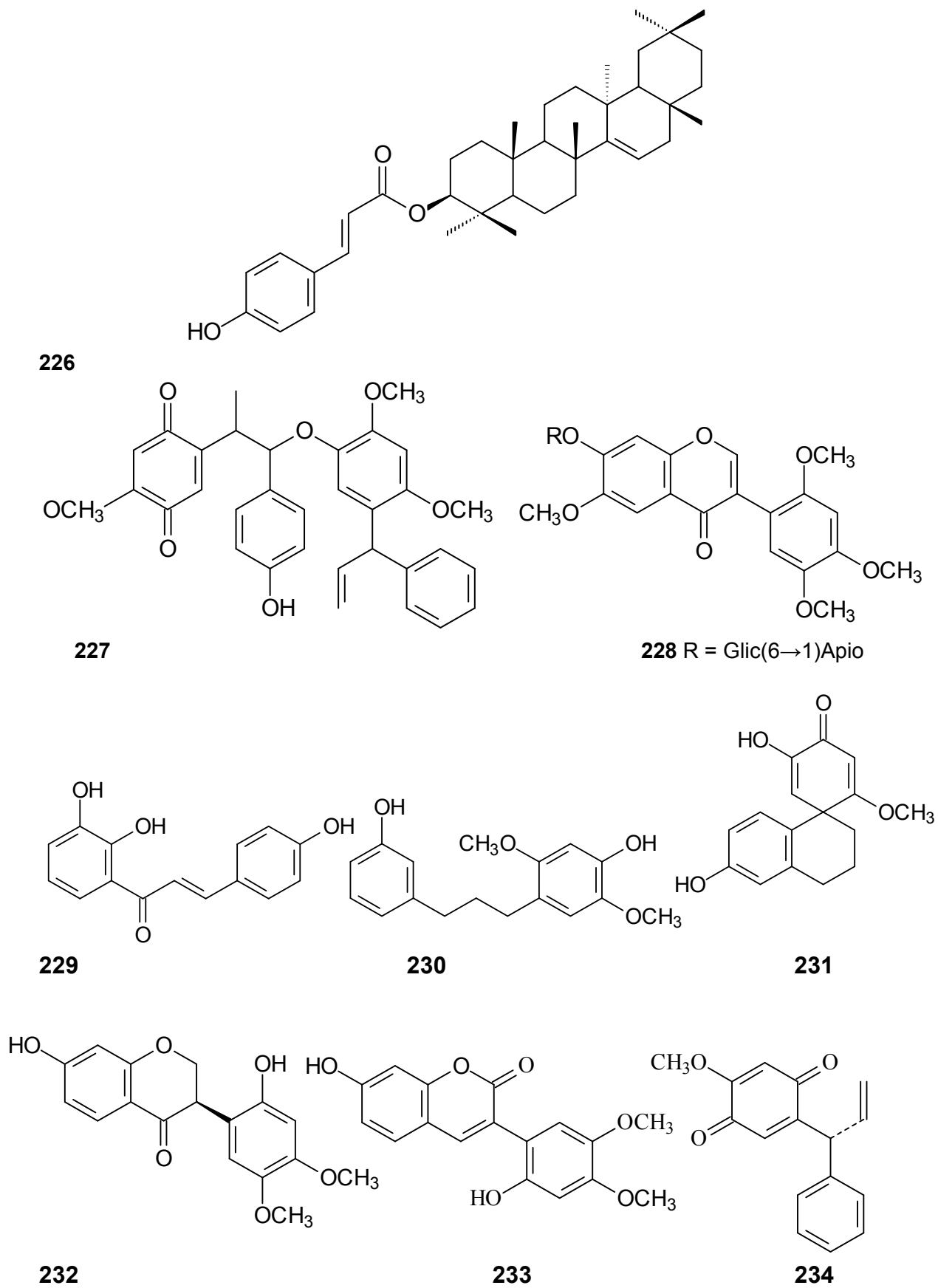


Figura 8 - Continuação

**Posicionamento sistemático da espécie estudada**

**Super-Reino:** Eucariota

**Reino:** Plantae

**Sub-Reino:** Viridiplantae

**Filo:** Estreptofita

**Classe:** Equisetopsidae

**Sub-Classe:** Magnoliidae

**Superordem:** Rosanae

**Ordem:** Fabales

**Familia:** Fabaceae

**Subfamilia:** Papilionoideae

**Tribo:** Dalbergieae

**Gênero:** *Dalbergia*

**Espécie:** *Dalbergia glaucescens*

(Mart. ex Benth.) Benth

**Basionimo:** *Miscolobium glaucescens* Mart. ex  
Benth.

**Figura 9** - Posicionamento sistemático de *Dalbergia glaucescens*.

**Fonte:** (Sayers, *et. al.*; 2009).

## *2.0 - OBjetivos*

## 2.0 - Objetivos Gerais

O principal objetivo deste trabalho visou o isolamento, purificação e identificação estrutural dos constituintes químicos bioproduzidos pelo metabolismo especial de um espécime de *Dalbergia glaucescens* (Mart. ex Benth.) Benth.

### 2.1 - Objetivos específicos

- Isolar metabolitos especiais dos extratos brutos da madeira de um espécime de *D. glaucescens* através de técnicas cromatográficas clássicas;
- Elucidar as estruturas dos metabólitos especiais isolados de *D. glaucescens* por meio de análise de espectros obtidos por técnicas espectrométricas usuais (IV, CGEM, UV e RMN);
- Avaliar a atividade citotóxica frente a larvas de *Artemia salina* dos extratos brutos;
- Avaliar a atividade antifúngica e antibacteriana dos extratos brutos;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos brutos;
- Quantificar o teor de fenólicos totais e flavonóides totais presentes nos extratos brutos de *D. glaucescens*.

## *3.0 - Materiais e Métodos*

---

---

### 3.0 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Equipamentos Utilizados

- Aparelho de ponto de fusão, MQAPF - 301, Microquímica;
- Balança analítica, AG-2000, Gehaka;
- Câmara escura com lâmpada de luz ultravioleta (254 e 365nm), Cienlab;
- Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas CG/MS-QP-5050, Shimadzu. Diâmetro da coluna 0,25 mm, comprimento da coluna 30 m. Temperatura de injeção 350 °C, temperatura da coluna 350 °C, gás carreador Hélio, fluxo 3 mL/min;
- Cromatógrafo contra-corrente de gota DCC-3000, EYELA. 300 colunas de 3,4 mm de diâmetro conectadas por tubos de teflon (2, 5x 1,5 mm), loop de 20mL;
- Evaporadores rotativos, Buchi B-480 e Fisatom 802;
- Espectrômetro Perkin Elmer FT-IR 1600;
- Espectrômetro de massas de alta resolução LCMS-IT-TOF equipado com fonte de ionização por *electronspray*, Shimadzu;
- Ressonância Magnética Nuclear operando a 400 MHz, Bruker Avance operando a uma frequência de 400 MHz para hidrogênio e 100 MHz para carbono;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear, operando a uma frequência de 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C, Jeol Eclipse;
- Espectrofotômetro na região do ultravioleta, Bel Photoonics 1105;
- Micropipetas de volume ajustável de 10 - 100 µL – LABMATE;
- Moinho tipo Wiley;
- Vortex QL-901, Biomixer.

#### 3.2 - Reagentes e material de consumo

- Acetato de etila P.A., Synth e Vetec;
- Ágar Sabouraud dextrose, Acumedia, EUA;
- Ágar Muller-Hinton, Acumedia, EUA;
- Álcool etílico PA, Synth e Vetec;

- 
- Amberlite XAD 2, Supelco, Sigma-Aldrich;
  - Anidrido acético P.A., Vetec;
  - Cloreto de alumínio hexaidratado, 99,5%; Vetec;
  - Cloreto férrico hexaidratado, 99,0 %; Vetec;
  - Clorofórmio P.A., Synth e Vetec;
  - Clorofórmio deuterado, CIL - Cambridge Isotope Laboratories, Inc;
  - Cromatofolhas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, Merck;
  - Cromatofolhas de sílica RP-18 F<sub>254</sub>, Merck;
  - Cromatofolhas de Celulose, Merck;
  - Diclorometano P.A., Synth e Vetec;
  - 2,2-difenilpicrilidrazil (DPPH), Sigma-Aldrich;
  - Éter etílico P.A., Synth e Vetec;
  - Éter de petróleo P.A., Synth e Vetec;
  - Hidróxido de potássio, 85%; Vetec;
  - Hexano P.A., Synth e Vetec;
  - Metanol P.A., Synth e Vetec;
  - Metanol deuterado, CIL - Cambridge Isotope Laboratories, Inc.;
  - *N*-butanol P.A., Synth e Vetec;
  - Papel de filtro qualitativo de 3 micras, Nalgon Equipamentos científicos LTDA;
  - Pipetas de pasteur (vidro);
  - Piridina P.A., Control Tec;
  - Reagente de Folin-Ciocateau, Merck;
  - Sephadex LH-20, Pharmacia;
  - Sílica gel 60G (0,063-0,200mm; 70-230 mesh ASTM), Merck);
  - Sílica gel 60G (0,04-0,063mm; 230-400 mesh ASTM), Merck;
  - Sulfato de sódio anidro, 99,0 %; nuclear.

### **3.3 - Soluções reveladoras cromogênicas empregadas nos procedimentos cromatográficos em camada delgada**

- Vanilina sulfúrica;
- Solução alcoólica de Cloreto de alumínio;
- Solução alcoólica de Cloreto férrico.



---

---

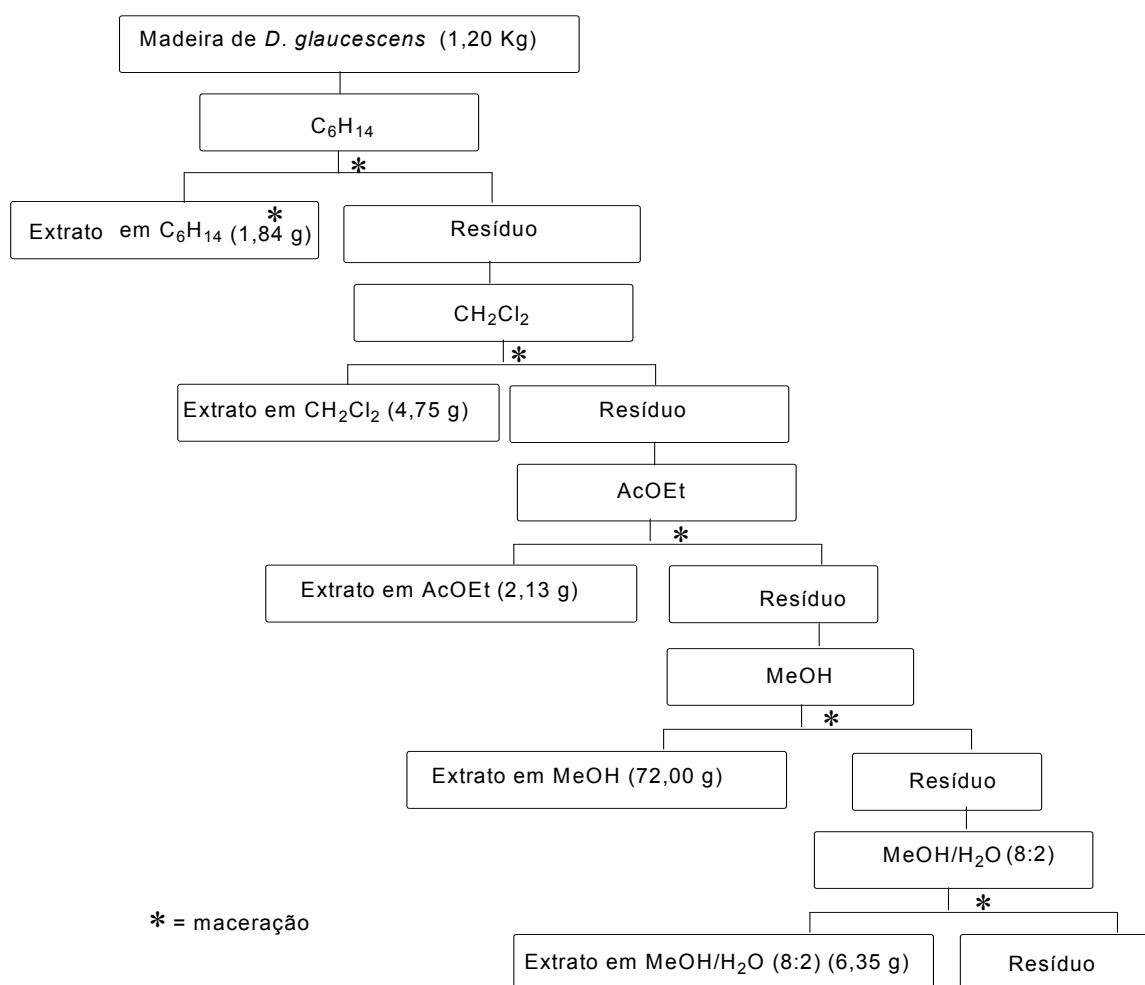
### **3.4 - Experimental**

#### **3.4.1 - Coleta do material vegetal**

A madeira do espécime *D. glaucescens* foi coletado na Reserva Florestal Vale do Rio Doce - Linhares (ES) (herbário da CVRD), em região de mata atlântica, em julho de 1996 onde sua exsicata encontra-se depositada com o código 259.

#### **3.4.2 - Secagem do material vegetal e preparação dos extratos brutos**

O caule de *D. glaucescens* foi seco à temperatura ambiente, moído em moinho de martelo e pesado. Subsequentemente o material pulverizado foi submetido a maceração exaustiva com hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e metanol-água (8:2). Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O resumo de todo o procedimento experimental realizado para a obtenção dos extratos brutos encontra-se no Esquema 2, p. 50.



**Esquema 2** - Preparação dos extratos brutos de *D. glaucescens*.

### 3.4.2.1 - Fracionamento cromatográfico do extrato em hexano de *D. glaucescens*

O fracionamento cromatográfico do extrato hexânico (Esquema 3, p. 51) de *D. glaucescens* produziu as seguintes substâncias: DG-1, DG-3, DG-4 e DG-5.

Uma alíquota de 1,50 g do extrato bruto foi submetido a Cromatografia em Coluna (CC) em gel de sílica utilizando como eluente (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH) em gradiente crescente de polaridade. Todas as frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato em hexano foram monitoradas através de Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) de sílica gel, as cromatofolhas foram observadas sob luz

visível e ultravioleta (254 e 365 nm) antes e após revelação com vanilina sulfúrica e reunidas de acordo com a semelhança de Rf. As frações reunidas foram evaporadas e transferidas para frascos previamente pesados.

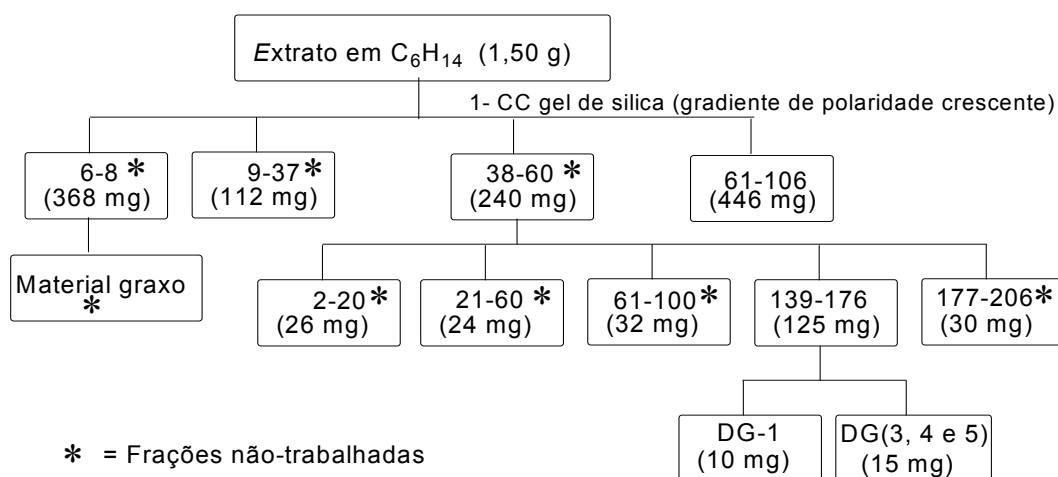
As frações de nº 6-8 (368 mg) apresentaram grande quantidade de material graxo e não foram trabalhadas.

As frações de nº 9-37 (112 mg) mostraram-se como uma mistura rica em antracenos e hidrocarbonetos aromáticos após análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CGEM) e consulta da biblioteca do equipamento, portanto, tal fração não foi purificada.

As frações de nº 38-60 (240 mg) foram submetidas a CC em gel de sílica utilizando como eluente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  em gradiente crescente de polaridade com ACoEt e MeOH, resultando num total de 206 subfrações. As subfrações foram analisadas através de CCDA (em gel de sílica) e reunidas de acordo com a semelhança de Rf.

A subfração nº 139-176 (125 mg) foi submetida a CC tipo flash utilizando como solvente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :  $\text{C}_6\text{H}_6$  (3:1) resultando nas substâncias DG-1 e DG-3, DG-4 e DG-5 que após analisadas por CCDA e eluídas com vanilina sulfúrica revelaram-se como uma única mancha de coloração azulada.

A subfração nº 61-106 (446 mg) apresentou quantidades adicionais de DG-3, DG-4 e DG-5.



**Esquema 3** - Fracionamento do extrato em hexano de *D. glaucescens*.

---

---

### 3.4.2.2 - Fracionamento cromatográfico do extrato em diclorometano de *D. glaucescens*

O fracionamento do extrato em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi realizado através de técnicas cromatográficas usuais e resultou no isolamento e purificação das seguintes substâncias DG-2, DG-6, DG-7, DG-8, DG-9 e DG-13 (Esquema 4, p. 53), DG-2 e DG-7 (Esquema 5, p. 54).

Uma alíquota de 2,82 g do extrato (Esquema 4, p. 53) foi submetido a CC aberta em gel de sílica utilizando como eluente C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e CH<sub>3</sub>OH em gradiente crescente de polaridade. Todas as frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato em diclorometano foram monitoradas através de (CCDA) de sílica gel, as cromatofolhas foram observadas sob luz visível e ultravioleta (254 e 365 nm) antes e após revelação com vanilina sulfúrica e reunidas de acordo com a semelhança de R<sub>f</sub>. As frações reunidas foram evaporadas e transferidas para frascos previamente pesados.

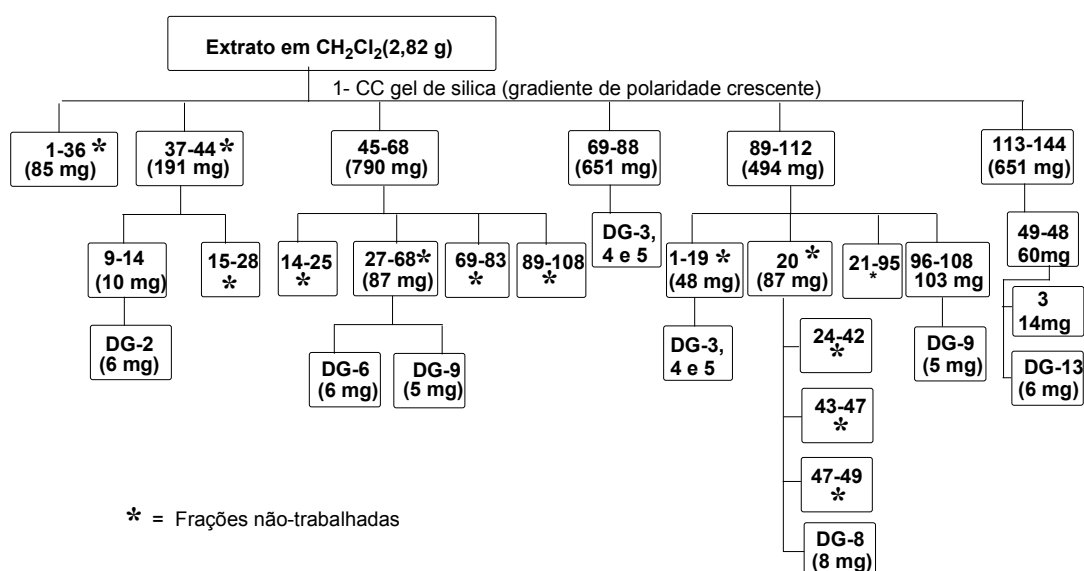
A subfração n° 37-44 (191 mg) foi submetida a CC aberta utilizando (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e CH<sub>3</sub>OH) em gradiente crescente de polaridade obtendo-se um total de 28 subfrações que foram reunidas de acordo com a semelhança de R<sub>f</sub> em CCDA. A subfração de n° 9 -14, resultou no isolamento de DG-2 (6 mg).

As frações de n° 45 - 68 (790 mg) foram reunidas e submetida a coluna CC em gel de sílica eluída com (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e CH<sub>3</sub>OH) em ordem crescente de polaridade resultando um total de 108 frações. A fração de n° 27-68 (87 mg) foi submetida a uma coluna em sílica gel eluída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para permitir o isolamento das duas substâncias DG-6 (6 mg) e DG-9 (5 mg).

As frações de n° 69-88 (651 mg) apresentaram quantidades adicionais de DG-3, DG-4 e DG-5.

As frações de n° 89 -112 (494 mg) foram reunidas e submetidas a CC em gel de sílica utilizando (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e CH<sub>3</sub>OH) como eluente. A subfração 1-19 (48 mg) apresentou-se como quantidade adicional de DG-3, DG-4 e DG-5. A subfração de n° 20 (101 mg) foi submetida a uma

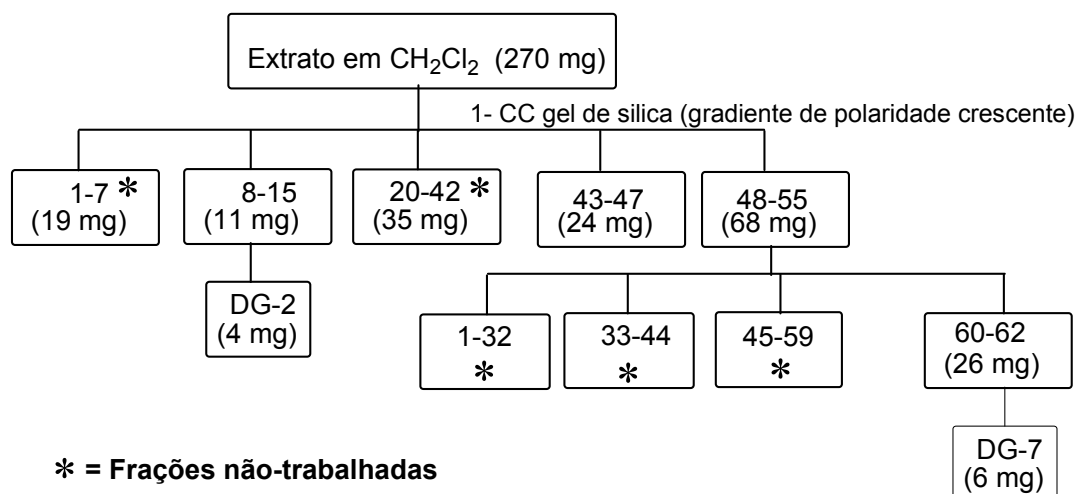
cromatografia em coluna tipo flash utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  (4:0,5) no isolamento de DG-8 (8 mg). A subfração de nº 96-108 (103 mg) foi submetida a CC flash utilizando a mistura  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  (5:1) resultando no isolamento adicional da substância DG-9 (5 mg). As frações de nº 113-144 (615 mg) foram reunidas e submetidas a CC em gel de sílica utilizando como eluente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  (4:1) resultando em 48 subfrações (Esquema 4). subfrações de 40-48 (32 mg) foram reunidas e submetidas a filtração em gel de Sephadex LH-20 eluída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  (2:8) resultando em quatro subfrações. A subfração de nº 3 (14 mg) foi submetida a CC de gel de sílica utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como eluente o que permitiu o isolamento da substância DG-13 (6 mg).



**Esquema 4** - Fracionamento cromatográfico do extrato em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Após ter trabalhado as frações do extrato diclorometânico, as frações que não resultaram em substâncias isoladas foram reunidas e incorporadas a cerca de 200 mg de extrato bruto em diclorometano. Esse novo material, 270 mg foi submetido a um novo procedimento cromatográfico com o objetivo de isolar outras substâncias que poderiam estar contidas em menor quantidade nas frações inicialmente trabalhadas. Para tanto, foi utilizado como eluente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt e  $\text{CH}_3\text{OH}$  em

gradiente de polaridade crescente, resultando no isolamento de mais duas substâncias DG-2 (4 mg) e DG-7 (6 mg) (Esquema 5).



**Esquema 5** - Refracionamento cromatográfico de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

### 3.4.2.3 - Fracionamento cromatográfico do extrato em metanol de *D. glaucescens*

O extrato em metanol foi redissolvido em uma pequena quantidade de MeOH, posteriormente adicionou-se  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  até a formação de um precipitado. Este foi separado do sobrenadante através de filtração simples. A este precipitado foi adicionado AcOEt e em seguida efetuou-se nova filtração, onde obteve-se duas frações uma solúvel em AcOEt (sobrenadante) e outra insolúvel (precipitado). Procedeu-se em seguida solubilização deste outro precipitado com n-BuOH possibilitando a formação de duas fases uma solúvel em n-BuOH e outro precipitado de acordo com o Esquema 6, p. 56.

A fração em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (sobrenadante - 1,19 g) foi parcionada em éter de petróleo resultando em duas subfrações: uma fração solúvel e outra insolúvel em éter de petróleo (Esquema 6, p. 56). Esta fração foi submetida a cromatografia contracorrente de gotas utilizando como fase estacionária a fase aquosa do sistema de eluente, éter de petróleo: acetato de etila: álcool etílico:água (10:4:8:2), e como fase móvel a fase orgânica.

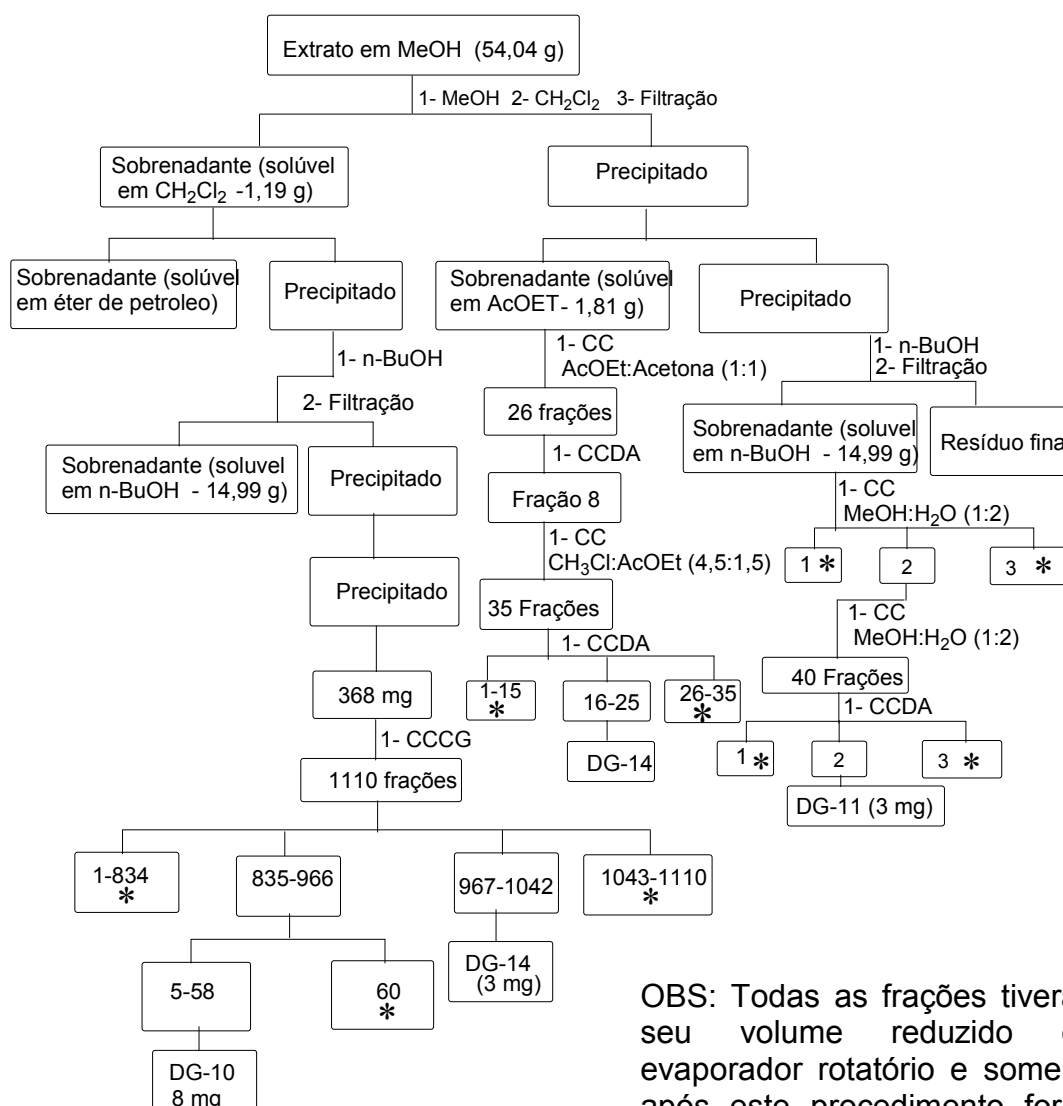
---

O cromatógrafo contracorrente de gotas foi preenchido inicialmente com a fase estacionária seguida da injeção da fração insolúvel em éter de petróleo (Esquema 6, p. 56) e posterior introdução da fase móvel sob o modo ascendente. O fluxo escolhido foi de 0,70 mL/min, foram recolhidas um total 1110 frações de 5 mL cada. A similaridade das frações foi verificada através de CCDA, após observação de similaridade de Rf.

As frações de nº 835-966 foram submetidas a filtração em Sephadex LH-20 usando MeOH como eluente o que resultou em 70 frações, destas, as frações de nº 5-58 quando resubmetidas a filtração em Sephadex LH-20 utilizando o mesmo eluente permitiu o isolamento da substância DG-10 (8 mg). As frações de nº 967-1042 foram submetidas ao mesmo procedimento anterior resultando no isolamento da substância DG-14 (3 mg) (Esquema 6, p.56).

A fração solúvel em AcOEt (1,81 g) (Esquema 6, p. 56) foi então solubilizada em AcOEt e submetida a CC de sílica utilizando como eluente acetona:acetato de etila (1:1) totalizando 26 frações que foram analisadas através de CCDA. A fração de nº 8 foi novamente submetida a CC em sílica utilizando como eluente CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (4,5:1,5), obtendo-se um total de 35 frações. As frações de nº 16-25 foram submetidas a CC de Sephadex LH-20 utilizando como eluente CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1) resultando no isolamento de quantidade adicional de DG-14 (3 mg).

Uma alíquota da partição do extrato metanólico solúvel em *n*-BuOH (1,8 g) foi submetida a CC em celulose eluída com o sistema MeOH:H<sub>2</sub>O (1:2) resultando em 3 frações. A subfração 2 (381,0 mg) foi submetida a CC de celulose com o mesmo sistema de eluente obtendo-se 40 frações. A fração 29 - 34 após filtração em gel Sephadex LH-20 resultou no isolamento da substância DG-11 (3,0 mg) (Esquema 6, p.56).

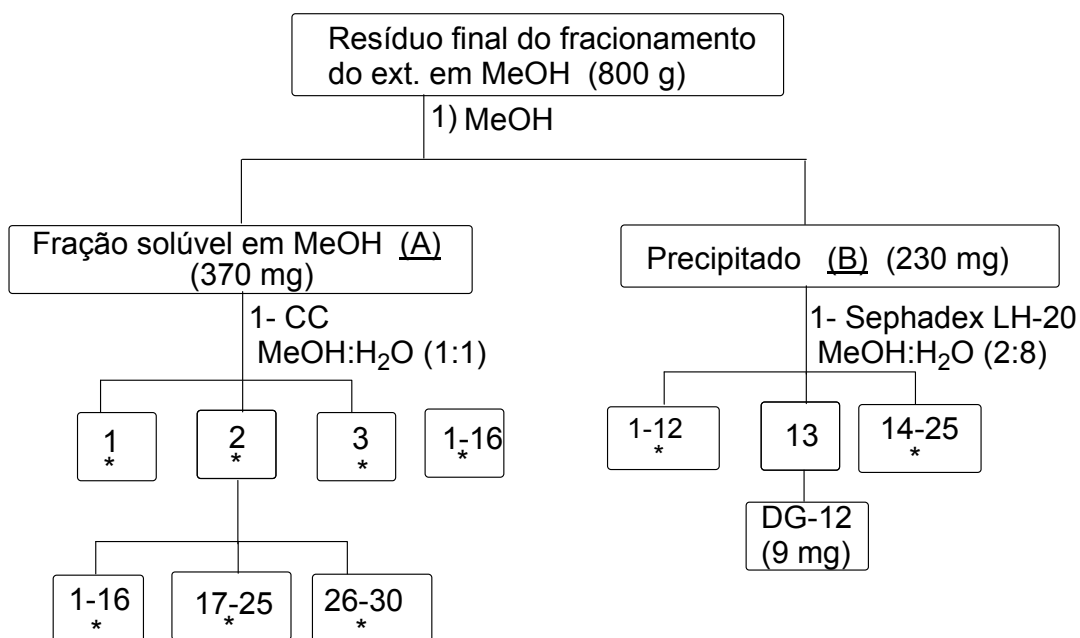


**Esquema 6** - Fracionamento do extrato em MeOH de *D. glaucescens*.



Do resíduo final (Esquema 7) obtido do processo de partição do extrato metanólico retirou-se uma alíquota de 800 g e procedeu-se a solubilização utilizando MeOH, o que resultou em 2 frações uma solúvel e outra insolúvel em MeOH (Esquema 10).

Cerca de 350 mg da fração solúvel em MeOH (**A**) 58) foi solubilizado em MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2) e submetido a CC em celulose utilizando como eluente, MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) resultando num total de 3 frações. A fração de nº 2 foi novamente submetida a CC em celulose utilizando como eluente a fase superior da mistura [*n*-butanol - acetato de etila - água (4:1:5)] produzindo um total de 30 frações. A subfração de nº 17-25 foi reunida e posteriormente submetida a filtração em gel de Sephadex LH-20 utilizando metanol como eluente. Uma alíquota de 250 mg do precipitado (**B**) (Esquema 11, p. 58) foi solubilizado em água e submetido a filtração em Sephadex LH-20 utilizando MeOH:H<sub>2</sub>O (2:8) como eluente. Este procedimento resultou em 25 frações. A fração 13 depois de um período de repouso apresentou cristais, que foram submetidos a nova filtração com sephadex LH-20 com o mesmo sistema de eluente resultando no isolamento da substância DG-12 (9 mg).



**Esquema 7-** Fracionamento do resíduo do extrato em metanol de *D. glaucescens*.

---

---

### 3.5 - Atividade Biológica

#### 3.5.1 - Avaliação da atividade citotóxica frente a larvas de *Artemia salina*

##### 3.5.1.1 - Materiais

- Balões volumétricos de 5 e 1000 mL;
- Béqueres;
- Estantes de tubo de ensaio;
- 28 Tubos de ensaio;
- Micropipeta automática de 10 -100 µL, LABMATE;
- Pipeta Pasteur;
- Um mini-aquário de acrílico (7,5 x 14,0 x 9,0 cm);
- Luminária de lâmpada fria;
- Ovos de *Artemia salina*, Zooloja, Campos dos Goytacazes -RJ.

##### 3.5.1.2 - Reagentes

- Brometo de potássio, 99,0%; Vetec;
- Cloreto de sódio, 99,0%; Rio Lab
- Cloreto de cálcio diidratado, 99,0%; Vetec;
- Cloreto de magnésio hexaidratado, 99,0 %; Vetec;
- Cloreto de potássio, 99,0%; Vetec;
- Dicromato de potássio, 99,0%; Control Tec;
- Dimetilsulfóxido P.A., Vetec;
- Hidrogenocarbonato de sódio, 99,7 %; Vetec;
- Sulfato de sódio anidro P.A.; Nuclear.
- Tween 80, fornecido pela farmácia de manipulação Nascente em Campos dos Goytacazes - RJ.

---

---

### 3.5.1.3 - Protocolo Experimental

A metodologia utilizada no bioensaio consistiu em diluir as amostras e o controle positivo e negativo pelo método de diluições aritméticas em solução aquosa de sal marinho artificial com 1% de DMSO (V/V).

- Para o preparo de 2L de água do mar artificial foram utilizados os seguintes reagentes: NaCl (48,0 g), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (3,0 g), KBr (0,2 g), KCl (1,4 g); Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (8,0 g), NaHCO<sub>3</sub> (0,4 g), MgCl.6H<sub>2</sub>O (22,0 g) e água destilada.
- Para o controle positivo utilizou-se K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.
- Para o controle negativo utilizou-se a mistura de solventes H<sub>2</sub>O:DMSO (3:2).
- Utilizou-se para eclosão dos ovos de *A. salina* um mini-aquário de acrílico (7,5 x 14,0 x 9,0 cm).

Para a realização do teste os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em água do mar artificial por um período de 48 horas. Utilizou-se um total de 28 tubos de ensaio contendo um volume total de 5,0 mL onde foram acondicionados a solução aquosa de sal marinho artificial, 15 larvas de *A. salina* e os extratos brutos solubilizados em H<sub>2</sub>O:DMSO (3:2). Os extratos brutos foram analisados nas seguintes concentrações: 50, 100, 200, 300 e 500 ppm.

Após 24 horas de contato com os extratos brutos a temperatura ambiente, o número de organismos mortos e sobreviventes foi contabilizado e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística através do programa Probit para obtenção da DL<sub>50</sub> (µg/mL).

---

---

### 3.5.2 - Avaliação da atividade antimicrobiana

#### 3.5.2.1 - Materiais

- Alça de Drigalsky;
- Capela de Fluxo laminar;
- Densitômetro, densimat, Biomérieux;
- Estufa bacteriológica, Quimis;
- Paquímetro;
- Suabe;
- Placas de Petri;
- Tubos de ensaio;

#### 3.5.2.2 - Reagentes

- Cloreto de Sódio, 90 %, Vetec;
- Ágar Saboraud dextrose, Acumedia, EUA;
- Ágar Muller-Hinton, Acumedia, EUA;
- Nitrato de Miconazol (Vodol<sup>®</sup>) lote 606401, União Química, Brasil;
- Gentamicina, Sigma-Aldrich, (EUA).

#### 3.5.2.3 - Protocolo Experimental

Os testes foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal LSA-UENF. Foi empregada a técnica de difusão em *ágar* (Hadecek & Greger, 2000), utilizando os microorganismos apresentados na Tabela 5, p.61, que foram submetidos a extratos brutos da madeira de *D. glaucescens* conforme a Tabela 6, p. 61.

**Tabela 5** - Microorganismos utilizados nos ensaios.

<b>Espécies</b>	<b>Descrição</b>
<i>Candida albicans</i>	ATCC 36802
<i>Candida inconspícua</i>	ATCC 16783
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803
<i>Candida krusei</i>	ATCC 34135
<i>Candida guilliermondii</i>	ATCC 6260
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Candida lusitaniae</i>	ATCC 34449
<i>Candida spp.</i>	ATCC 34147
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923
<i>Escherichia Coli</i>	ATCC 25922

**Tabela 6** - Extratos brutos da madeira de *D. glaucescens*.

<b>Código</b>	<b>Extrato bruto em</b>
DGD	Diclorometano
DGA	Acetato de etila
DGM	Metanol
DGMH	Metanol-água (8:2)

O meio de cultura utilizado foi o ágar sabouraud dextrose para o teste com fungos e para bactérias foi ágar Muller-Hinton que foram adicionados a placas de Petri de 15 cm de diâmetro até atingir uma espessura de 5 mm de ágar.

Com o auxílio de um suabe foi semeada sobre o meio de cultura uma alíquota de 100 µL do inóculo dos microorganismos (Tabela 5) previamente preparado com uma suspensão de células em solução salina. A padronização da solução foi realizada pela escala de McFarland nº 0,2 ( $0,6 \times 10^8$  células/mL) para as cepas de fungos e 0,3 McFarland para as

---

cepas das bactérias, que foram obtidas por meio da leitura de densidade óptica de 550 nm no densitômetro. Após a semeadura do microrganismo, foram feitas perfurações (poços no meio de cultura), que receberam um volume de 30 µL das amostras (extratos brutos na concentração de 10 mg/mL). Uma distância de aproximadamente 1,5 cm foi mantida para que não ocorresse sobreposição dos halos. Como controle positivo foi utilizado uma solução 20 µg/mL de Nitrato de Miconazol (Vodol<sup>®</sup>) para fungos e Gentamicina 0,5 mg/mL para as bactérias, como controle negativo foi utilizado cada um dos solventes em que foram solubilizados os extratos brutos testados.

Após aplicação das amostras e do controle as placas foram incubadas em estufa por um período de 24-36 h a 37 °C.

A leitura dos resultados foi realizada medindo-se o diâmetro dos halos de inibição, considerando-se ativa as amostras que apresentaram um halo de inibição  $\geq 10,0$  mm de diâmetro (Lima *et al.*, 2006). O ensaio foi realizado com três repetições e em triplicata.

### **3.6 - Teste Químico para Fenólicos**

#### **3.6.1 - Materiais**

- Béqueres;
- Câmara com lâmpada de luz ultravioleta;
- Estantes com tubos de ensaios;

#### **3.6.2 - Reagentes**

- Cloreto férrico hexaidratado, Vetec;
- Álcool etílico P.A., (Vetec);

#### **3.6.3 - Protocolo Experimental**

Preparou-se uma solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> 5% e procedeu-se a CCDA. As amostras (DGM e DGMA) foram eluídas com CHCl<sub>3</sub>:MeOH

---

(1:9), após a eluição a cromatofolha foi revelada com o uso da solução recém-preparada de  $\text{FeCl}_3$  5%.

### **3.7 - Avaliação da atividade antioxidante**

#### **3.7.1 - Avaliação do teor de fenólicos totais**

##### **3.7.1.1 - Materiais**

- Béqueres;
- Espectrofotômetro de luz Ultravioleta 482 FEMTO faixa espectral (240 -1000 nm);
- Estantes com tubos de ensaios.

##### **3.7.1.2 - Reagentes**

- Ácido gálico P.A., Vetec;
- Reagente de Folin-Ciocalteu; Sigma-Aldrich;
- Carbonato de sódio, 99,0 %; Vetec.

##### **3.7.1.3 - Protocolo Experimental**

Foi elaborada uma curva padrão com a solução de ácido gálico nas concentrações de 10 a 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , medindo-se as absorvâncias da solução de ácido gálico em metanol após reação com 500 $\mu\text{L}$  de RFC, e realização do seguinte procedimento: adicionou-se 6 mL de água destilada seguida de agitação em vortex por um minuto; adicionou-se 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15% seguido de agitação por 30 segundos. Completou-se o volume para 10 mL com água destilada deixou-se o sistema em repouso por duas horas. Após este período efetuou-se as medidas das absorvâncias a 750 nm.

Os extratos brutos a uma concentração de 0,15 mg/mL foram solubilizados em metanol e o procedimento do teste foi realizado da mesma forma que foi feito para a construção da curva padrão.

---

---

### **3.7.2 - Avaliação da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH**

#### **3.7.2.1 - Materiais**

- Béqueres;
- Estantes com tubos de ensaios;
- Espectrofotômetro de luz Ultravioleta 482 FEMTO faixa espectral (240 -1000 nm);
- Pipeta automática; 10 - 100 µL, LABMATE.

#### **3.7.2.2 - Reagentes**

- DPPH (2,2-difenilpicrilidrazil), Sigma-Aldrich;
- Álcool etílico PA (Vetec);
- Rutina (Sigma-Aldrich)

#### **3.7.2.3 - Protocolo Experimental**

As análises foram realizadas reagindo-se 1 mL de solução etanólica de DPPH 0,3 mM com 2,5 mL da amostra solubilizada em etanol nas seguintes concentrações 25, 50, 125 e 250 µg/mL. Após 30 minutos mediu-se as da absorbância a 518 nm.

Todas as análises foram realizadas em triplicata. O controle negativo foi feito com 1,0 mL de solução de DPPH e 2,5 mL de etanol. A leitura do branco foi realizada com 2,5 mL de solução das amostras mais 1,0 mL de etanol. Como padrão foi utilizado a substância rutina, efetuando-se o mesmo procedimento realizado para os extratos brutos.

### **3.8 - Avaliação do teor de flavonóides totais**

#### **3.8.1 - Materiais**

- Béqueres;
- Espectrofotômetro de luz Ultravioleta 482 FEMTO faixa espectral (240 - 1000 nm);
- Estantes com tubos de ensaios;



---

---

### 3.8.2 - Reagentes

- Álcool etílico PA, Vetec;
- Cloreto de alumínio hexaidratado, 99,5 %, Vetec
- Metanol, P.A., Synth;
- Rutina, Sigma-Aldrich.

### 3.8.3 - Protocolo Experimental

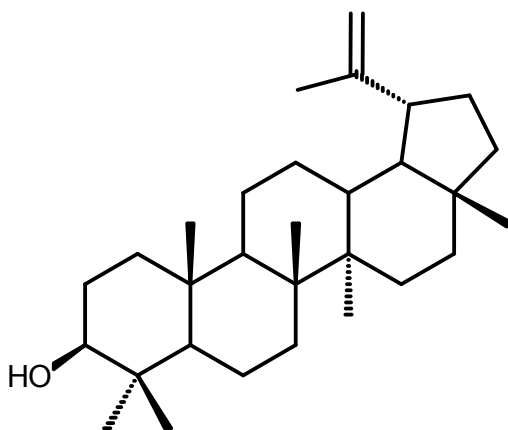
Os extratos foram submetidos à dosagem de flavonóides totais de acordo com a metodologia proposta por Rio modificada (Rio, 1996) onde se utilizou a rutina (7,5-15  $\mu\text{g/mL}$ ) em solução de  $\text{AlCl}_3$  como padrão. Uma concentração de 12  $\mu\text{g/mL}$  dos extratos solubilizados em metanol/água 70% foram acrescidos de 1mL de solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  5%. Após repouso de 30 minutos fez-se a leitura a 425 nm. Os dados de absorbância foram comparados com uma curva padrão feita a partir de concentrações crescentes de rutina. A análise foi realizada em triplicata.

## *4.0 - Resultados e Discussões*

#### 4.0 - Resultados e Discussões

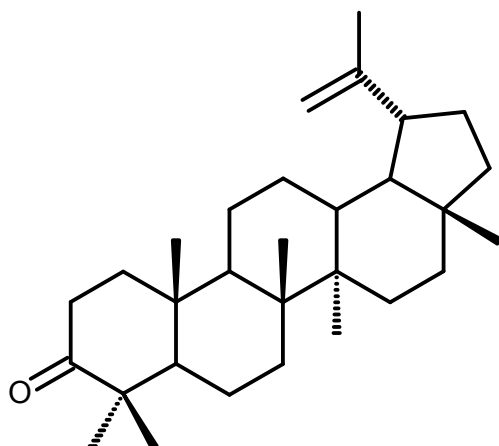
##### 4.1 - Constituintes Químicos isolados da espécie *D. glaucescens* (Mart. ex Benth.) Benth.

O estudo fitoquímico da madeira de um espécime de *D. glaucescens* resultou no isolamento e/ou identificação de quatorze substâncias.



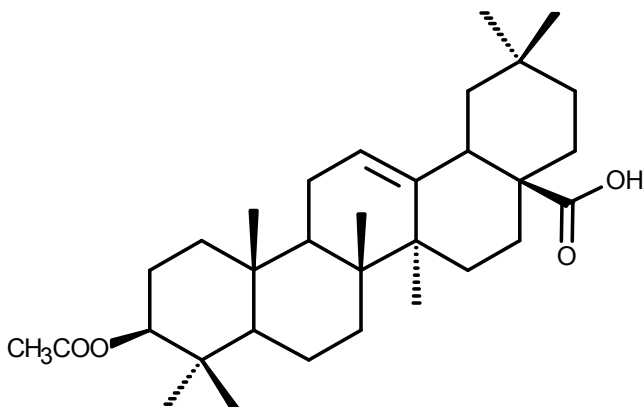
##### Lupeol

Massa: 10 mg  
Procedência: Ext. em hexano  
Isolamento: p. 50 e 51  
Identificação: 70 á 75



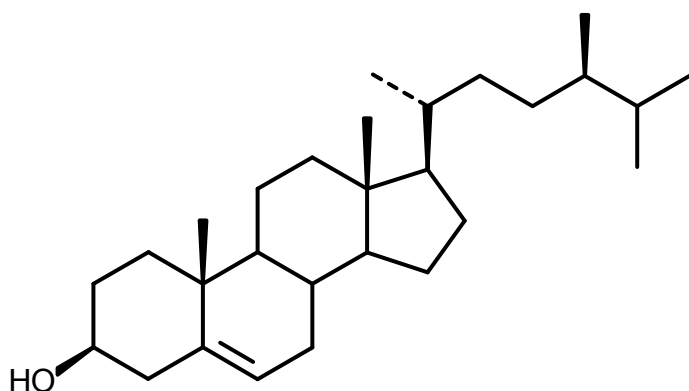
##### Lupenona

Massa: 10 mg  
Procedência: Ext. em diclorometano  
Isolamento: p. 52 e 54  
Identificação: p. 76 á 83

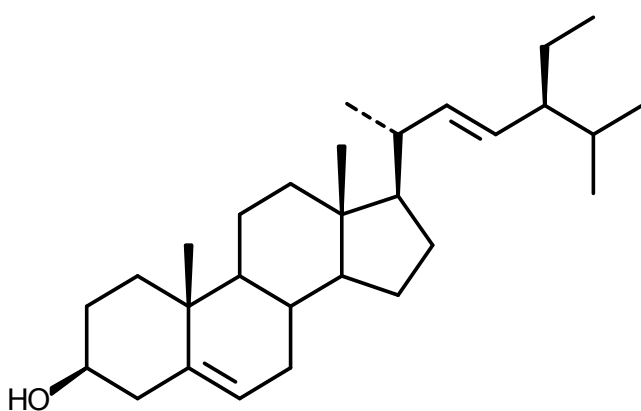


##### Acetato do ácido oleanólico

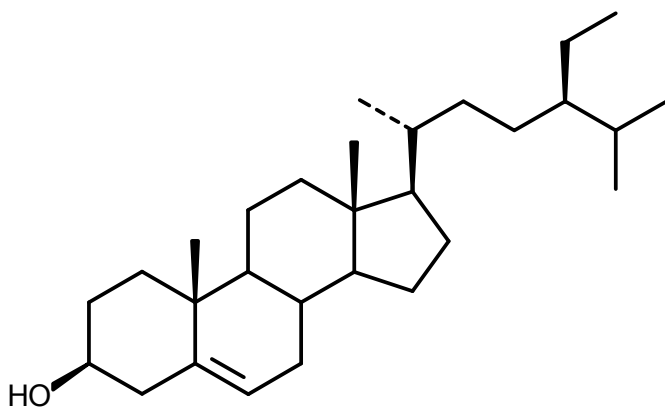
Massa: 6 mg  
Procedência: Ext. em diclorometano  
Isolamento: p. 52 e 53  
Identificação: 158 á 163

**Campesterol**

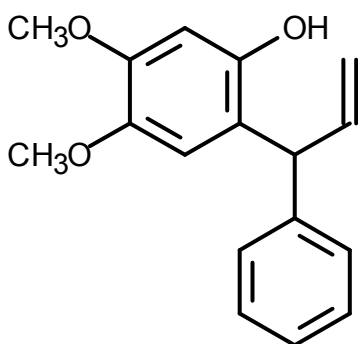
Procedência: Ext. em hexano  
Isolamento: p. 50 e 51  
Identificação: p. 84 á 89

**Estigmasterol**

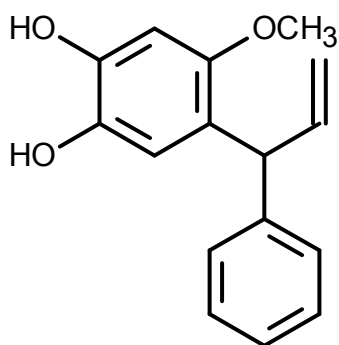
Procedência: Ext. em hexano  
Isolamento: p.50 e 51  
Identificação: p. 84 á 89

 **$\beta$ -sitosterol**

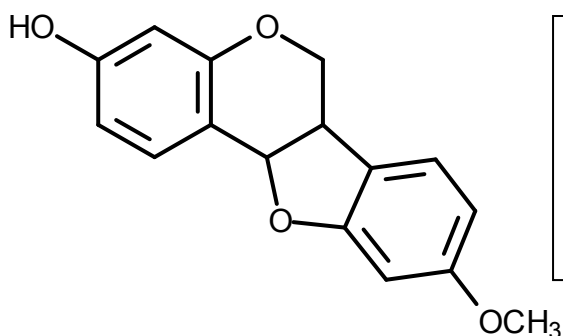
Procedência: Ext. em hexano  
Isolamento: p. 50 e 51  
Identificação: p. 84 á 89

**9-hidroxi-6,7-dimetoxidalbergifenol**

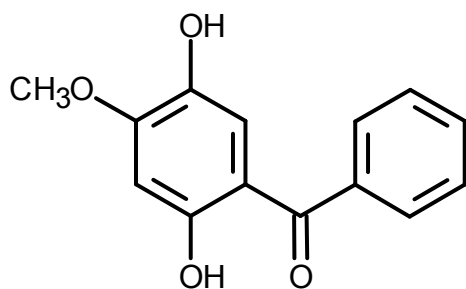
Massa: 6 mg  
Procedência: Ext. em diclorometano  
Isolamento: p. 52 e 53  
Identificação: p. 90 á 99

**6,7-diidroxi-9-metoxidalbergifenol**

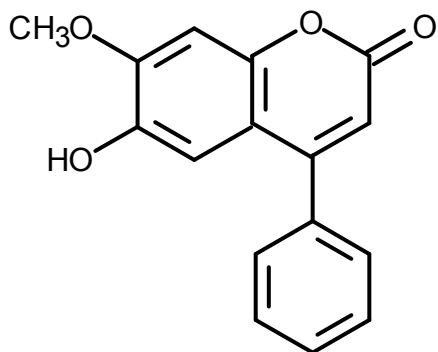
Massa: 6 mg  
Procedência: Ext. em diclorometano  
Isolamento: p. 52 e 54  
Identificação: p. 100 á 107

**Medicarpina**

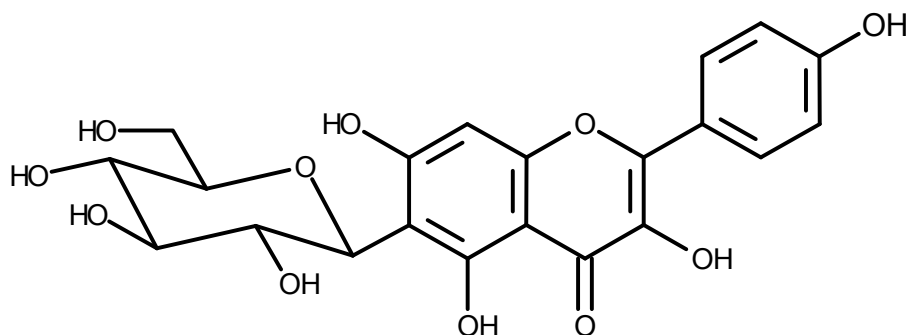
Massa: 8 mg  
Procedência: Ext. em diclorometano  
Isolamento: p. 52 e 53  
Identificação: 108 á 117

**2,5-diidroxi-4-metoxibenzofenona**

Massa: 5 mg  
Procedência: Ext. em diclorometano  
Isolamento: p. 52 e 53  
Identificação: 118 á 124

**Dalbergina**

Massa: 8 mg  
Procedência: Ext. em metanol  
Isolamento: p. 55 á 56  
Identificação: p. 125 - 131

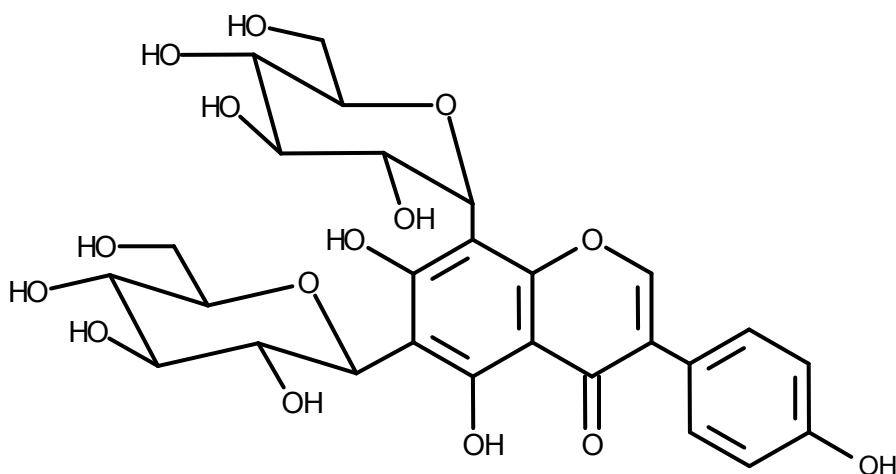
**6-(C- $\beta$ -D-glicopiranosil)-4',5,7-triidroxiflavonol**

Massa: 3 mg

Procedência: Ext. em metanol

Isolamento: p. 56 e 57

Identificação: p. 132 á 142

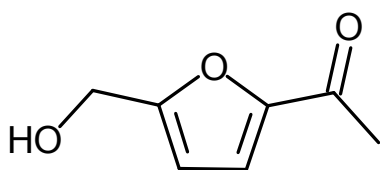
**6,8-di-(C- $\beta$ -D-glicopiranosil)-4',5,7-triidroxiflavona**

Massa: 9 mg

Procedência: Ext. em metanol

Isolamento: p. 57 e 58

Identificação: 143 á 157

**5-hidroximetilfurfural**

Massa: 6 mg

Procedência: Ext. em metanol

Isolamento: p. 56

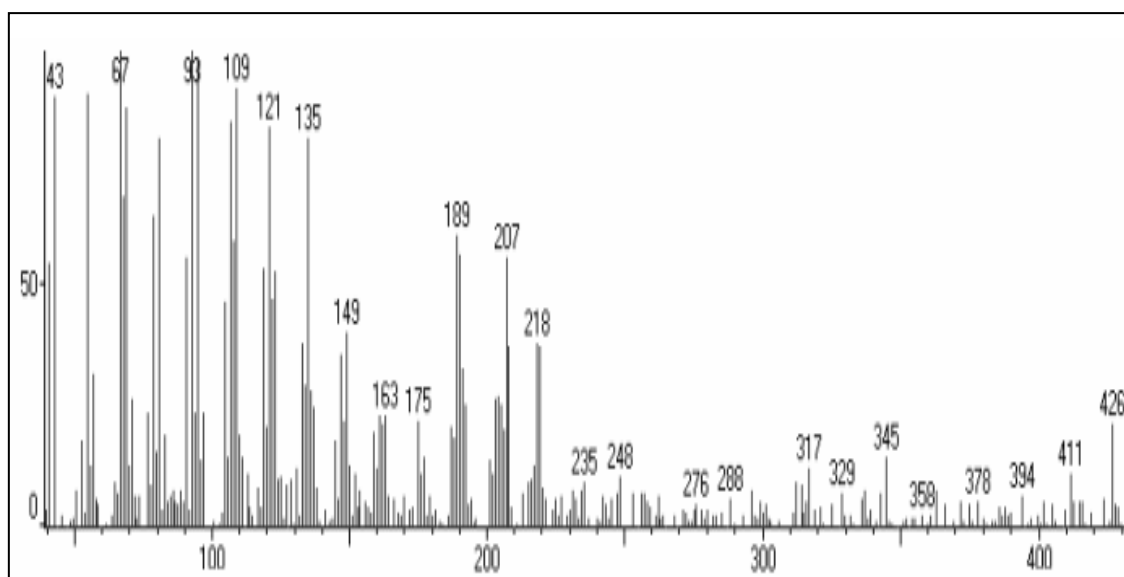
Identificação: p. 166 á 171

## 4.2 - Determinação Estrutural de DG-1

A partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico do caule de *D. glaucescens* foi possível o isolamento e a purificação da substância DG-1, que foi obtida na forma de cristais brancos solúveis em clorofórmio e que apresentou uma boa resolução ao ser analisada através de CCDA. DG-1 apresentou ponto de fusão 209 °C, o critério de pureza adotado foi a observação de uma única mancha com vários eluentes, ao ser revelada com vanilina sulfúrica seguido de aquecimento, observando-se uma única mancha de coloração azulada que sugeriu tratar-se de uma substância triterpenoídica (Wagner *et. al.*, 1983).

A fórmula estrutural  $C_{30}H_{50}O$  foi deduzida por análise dos espectros obtidos por: CG/EM, RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  e pode ser confirmada com a análise do espectro de IV, da amostra e análise comparativa com dados da literatura.

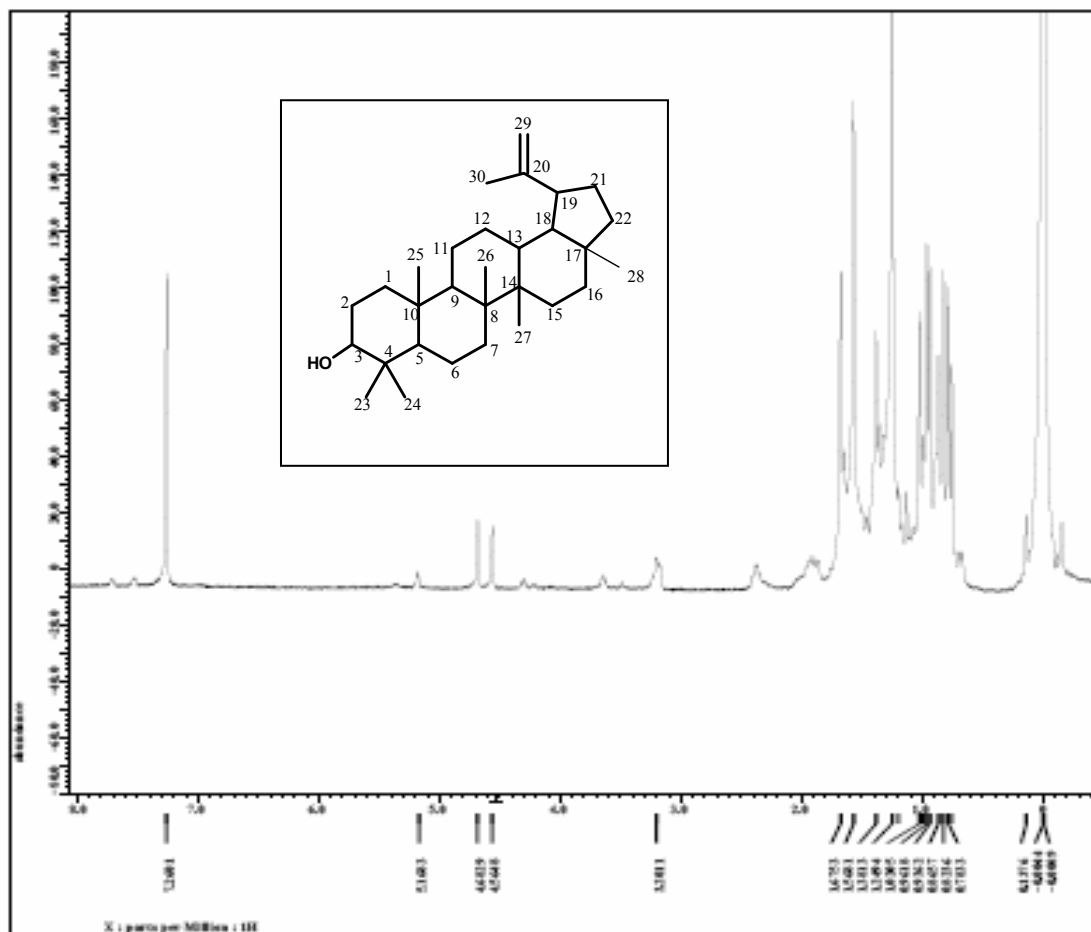
Através da análise por CG/EM obteve-se o espectro de massas da amostra DG-1 (Figura 10) obtido por IE (70eV) foi possível observar o pico do íon-molecular em  $m/z$  426, e fragmentos a  $m/z$  218,  $m/z$  207 e  $m/z$  189 u.m.a



**Figura 10** - Espectro de massas da substância DG-1.

O espectro de RMN  $^1H$  (Figura 11, p. 71) mostrou sete sinais simples entre  $\delta_H$  (0,76-1,68) correspondentes aos grupos metilas, sendo que o sinal em

foi atribuído aos hidrogênios da metila 30, uma vez que esta se encontra mais desprotegida devido ao grupo estar ligado a carbono  $sp^2$ . Na região de hidrogênios olefínicos observou-se dois sinais em  $\delta_H$  4,57 e 4,69 referente aos hidrogênios H-29. Foi observado também um sinal centrado em  $\delta_H$  3,19 referente ao hidrogênio carbinólico.



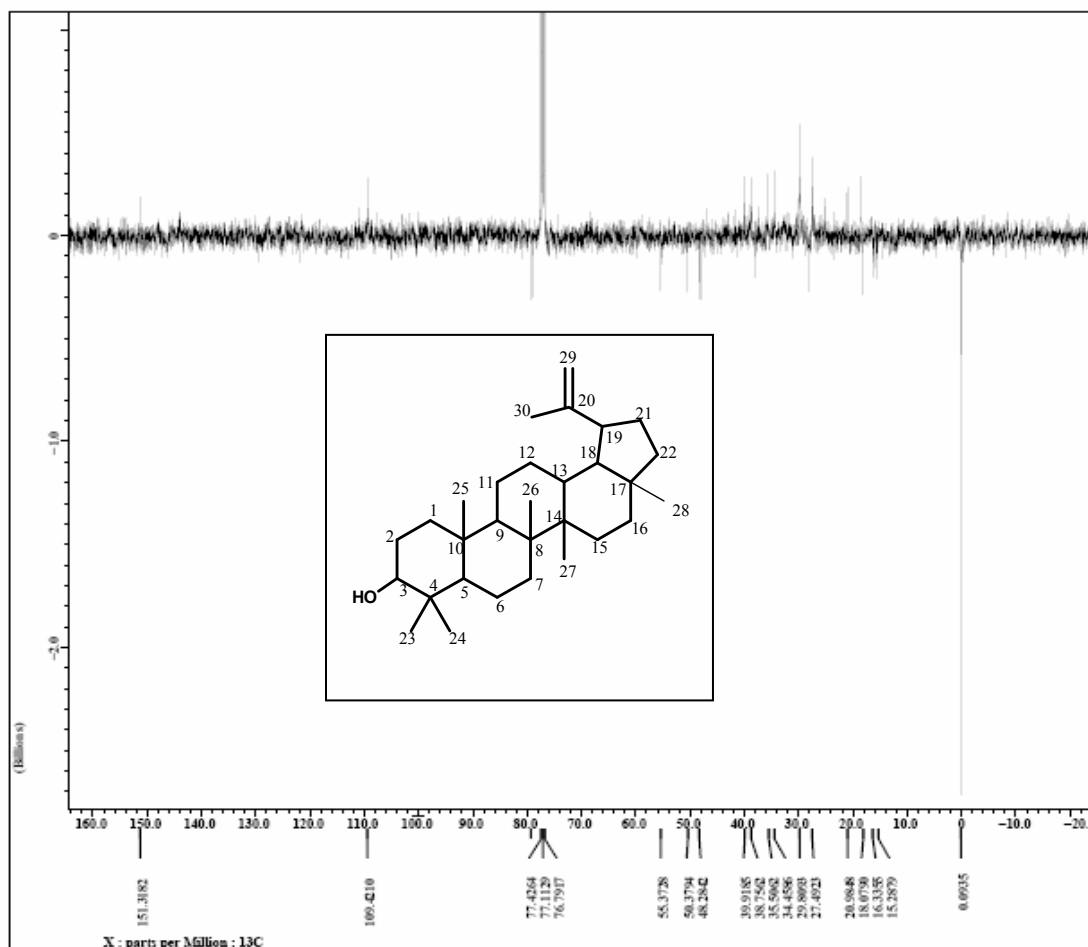
**Figura 11** - Espectro de RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ) de DG-1.

O espectro de RMN  $^{13}C$ -APT (Figura 12, p. 73) apresenta sinais característicos de triterpeno pentacíclico de esqueleto lupânico, por exemplo, os sinais em  $\delta_C$ : 79,01; 109,3 e 150,99 atribuídos ao carbono carbinólico C-3 e ao C-29 e C-20 respectivamente, os sinais em 109,3 e a 150,99 ppm são característicos da presença de dupla ligação dissustituída. A posição da hidroxila presente na estrutura foi estabelecida a partir de comparação com dados da literatura, onde se verifica que hidroxilas com estereoquímica ( $\alpha$ ) apresentam de deslocamento químico em torno de 76,0 ppm enquanto que as



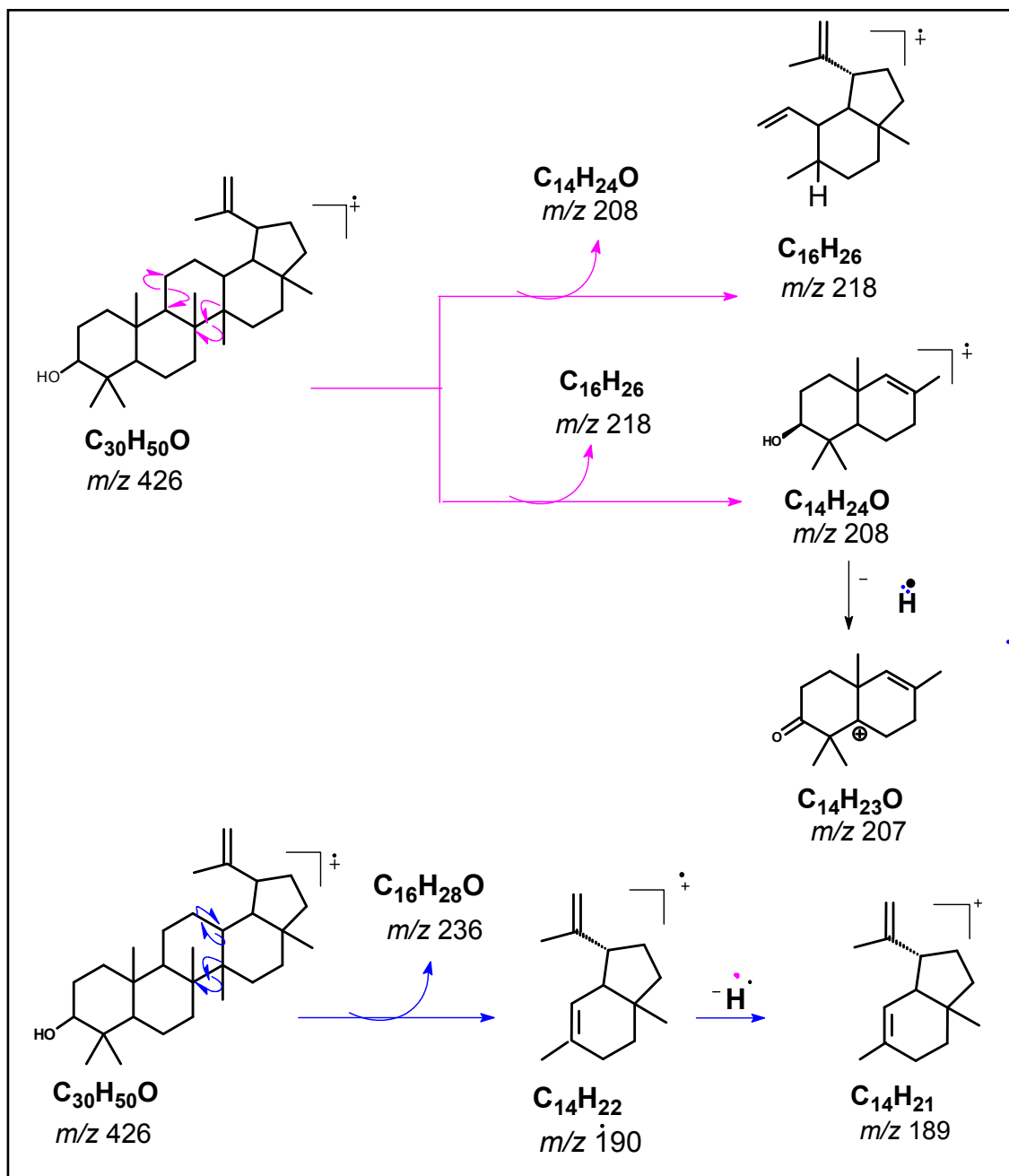
hidroxilas com estereoquímica ( $\beta$ ) apresentam deslocamento químico acima de 78,0 ppm (Mahato & Kundu, 1994). O Esquema 12, p. 73 apresenta uma proposta para a fragmentação da substância DG-1, que é coeferente com a proposta estrutural .

O grupamento hidroxila foi confirmado através do espectro de infravermelho ( Figura 13, p. 74) onde se observou a presença da banda em 3419  $\text{cm}^{-1}$  referente a estiramento de OH, em 2852  $\text{cm}^{-1}$  e 2926  $\text{cm}^{-1}$  observa-se o estiramento de  $\text{CH}_2$  acíclico,  $\text{CH}_3$  e CH em hibridização  $\text{sp}^3$  (Crews, *et. al.*, 1998). Em 1641  $\text{cm}^{-1}$  observa-se o estiramento C=C em 1456  $\text{cm}^{-1}$  e 1383  $\text{cm}^{-1}$  bandas referentes a deformação angular assimétrica e simétrica de  $\text{CH}_3$  respectivamente. Em 1099  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar o estiramento de C-OH e em 798  $\text{cm}^{-1}$  a deformação angular fora do plano de C-H (Silverstein & Webster, 2006), o que veio a confirmar a presença de uma dupla terminal (Carrazoni, 2003).

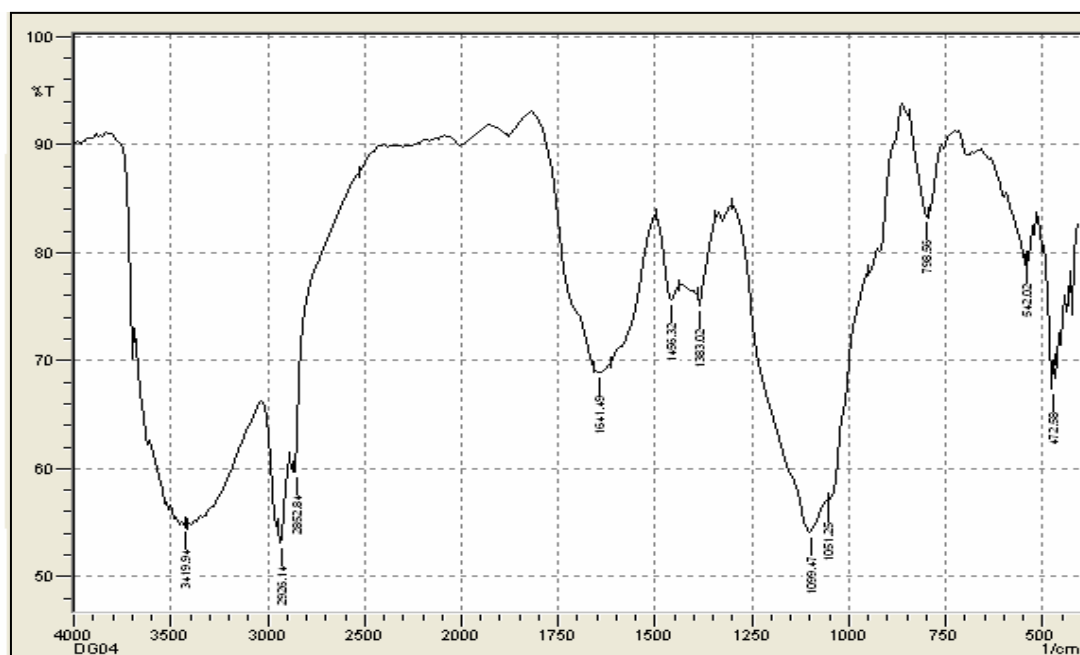


**Figura 12** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-1.

O Esquema 8 apresenta a proposta para alguns fragmentos de massas de DG-1.



**Esquema 8** - Proposta de alguns fragmentos de massas para DG-1.

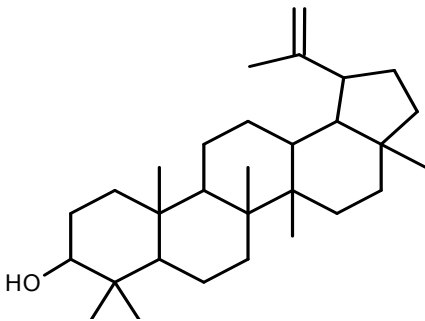


**Figura 13** - Espectro na região do IV da substância DG-1.

O resumo dos deslocamentos químicos atribuídos aos carbonos da substância DG-1 encontram-se na (Tabela 7, p. 75).

Na Tabela 8 apresentam-se algumas atividades biológicas atribuídas ao lupeol de acordo com artigos publicados na literatura nos últimos anos. Estudos farmacobotânicos realizados com lupeol e com alguns derivados tem demonstrado atividades biológicas bastante interessantes (Freire, *et. al.*, 2004).

**Tabela 8** - Algumas atividades biológicas atribuídas ao lupeol

	Atividade biológica	Literatura
	Citotóxica	(Noldin, <i>et. al.</i> , 2003)
	Diurética	(Noldin, <i>et. al.</i> , 2003)
	Antibacteriana	(Virtuoso, <i>et. al.</i> , 2005)
	Tripanomicida	(Ambrozini, 2004)
	Antiviral	(Flekhter, 2004)

**Tabela 7** - Atribuição do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  obtido para a substância DG-1 e comparação com dados da literatura.

<b>C</b>	<b>DG-1</b> $\delta_c$	<b>*Lupeol</b> $\delta_c$
4	38,7	38,8
8	40,0	40,7
10	37,3	37,1
14	41,9	42,7
17	42,8	42,9
20	150,9	150,8
<b>CH</b>		
3	79,0	78,9
5	55,3	55,2
9	50,4	50,3
13	38,0	38,0
18	48,2	48,2
19	47,9	47,9
<b>CH<sub>2</sub></b>		
1	38,6	38,6
2	27,3	27,3
6	18,3	18,2
7	34,2	34,2
11	20,9	20,9
12	25,0	25,0
15	27,4	27,4
16	35,5	35,5
21	29,7	29,8
22	39,9	39,9
29	109,3	109,3
<b>CH<sub>3</sub></b>		
23	14,6	27,9
24	15,4	15,3
25	16,2	16,1
26	15,9	15,9
27	27,4	14,5
28	17,9	17,9
30	18,3	19,2

Fonte:\* Mahato & Kundu, 1994.

### 4.3 - Determinação Estrutural de DG-2

Do extrato diclorometânico do caule de *D. glaucescens* foi isolada a substância DG-2 na forma de cristais brancos que ao serem analisados por CCDA seguida de revelação com vanilina sulfúrica observou-se uma única mancha de coloração azul. DG-2 apresentou ponto de fusão de  $203 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

A amostra foi submetida as espectrometrias de: IV, CG/EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , obtendo-se assim espectros compatíveis com a substância (Lupenona) de fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$ .

Pela análise e interpretação do espectro na região do infravermelho (Figura 14), observa-se as bandas em  $2856\text{ cm}^{-1}$  e  $2925\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos de  $\text{CH}_2$  acíclico,  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}$  em hibridização  $\text{sp}^3$  (Crews, *et. al.*, 1998). A banda de absorção em  $1650\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento  $\text{C}=\text{C}$ , uma banda em  $1725\text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$  de cetona e as bandas em  $1458$  e  $1380\text{ cm}^{-1}$  correspondentes das deformações angular assimétrica e simétrica de  $\text{CH}_3$  respectivamente (Pavia *et. al.*,1995). A existência de uma dupla ligação terminal pode ser confirmada com a presença do sinal em  $881\text{ cm}^{-1}$  (Carrazzoni, 2003).

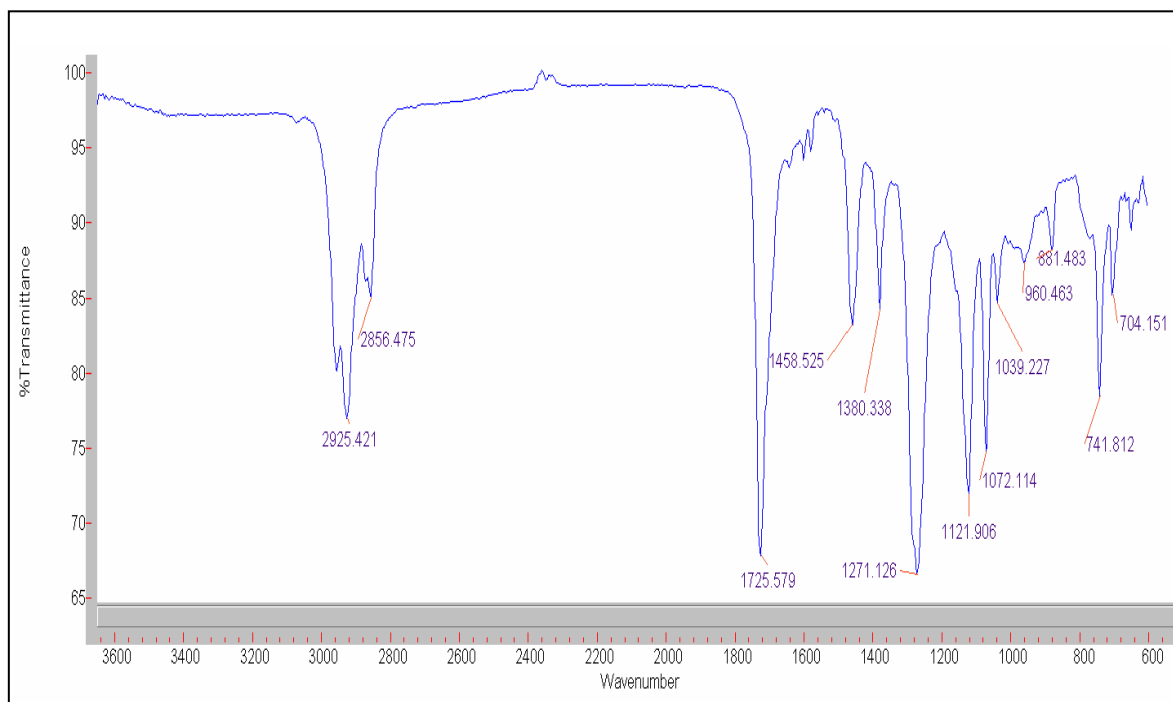
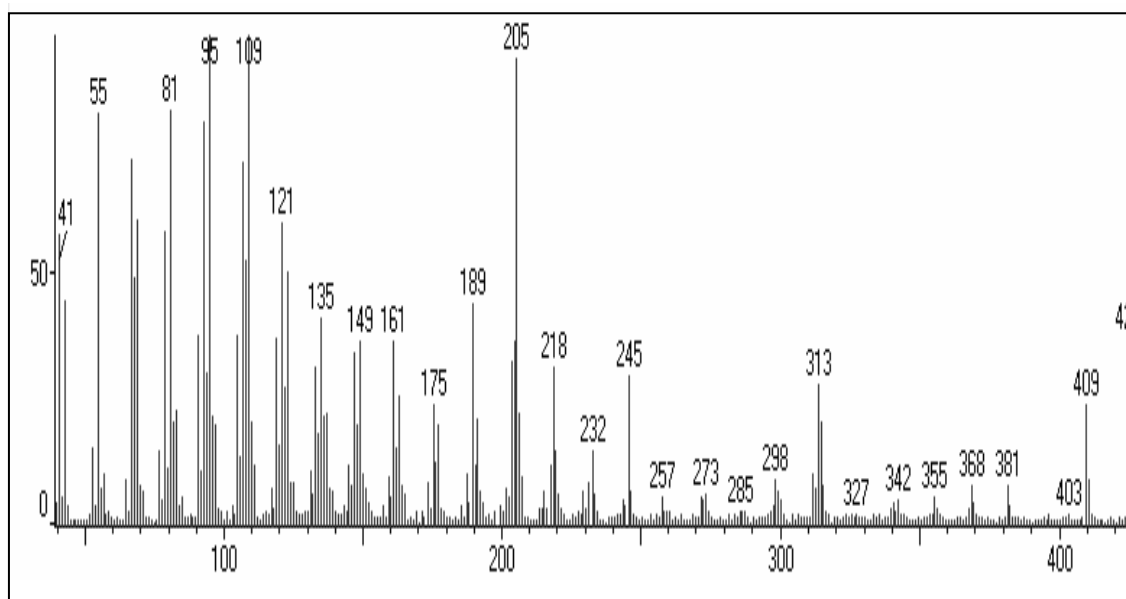


Figura 14 - Espectro na região do IV da substância DG-2.

Através da análise por CG/EM obteve-se o espectro de massas onde se observa o pico do íon molecular em  $m/z$  42.



**Figura 15** - Espectro de massas da substância DG-2.

Através da análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 16, p. 78) foi possível identificar sinais simples para sete grupos metílicos  $\delta_{\text{H}}$  (0,81-1,69), o que sugere o isolamento de uma substância triterpênica. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  1,69 foi atribuída ao grupo metila ligado a carbono  $sp^2$ . Observa-se ainda, os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,58 e 4,70 de hidrogênios olefínicos, indicativo que o triterpeno em questão apresenta uma dupla ligação. Ao comparar com dados apresentados na literatura observa-se que tais sinais são característicos de esqueleto triterpênico pentacíclico do tipo lupânico, porém, não se observou a presença do sinal de hidrogênio carbinólico em  $\delta_{\text{H}}$  3,19, portanto DG-2 trata-se de uma estrutura similar ao lupeol, porém, com posição 3 não hidrogenada.

Pela análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 17, p. 78) foi possível observar quarenta e três sinais distribuídos entre 11,04-218,32 ppm. Analisando o espectro observa-se alguns sinais que confirmam o esqueleto triterpênico pentacíclico lupano: os sinais de carbono  $sp^2$  em 109,5 e 150,9 atribuídos respectivamente à C-29 e C-20, o sinal  $\delta_{\text{C}}$  (218,8) característico de cetona cíclica.

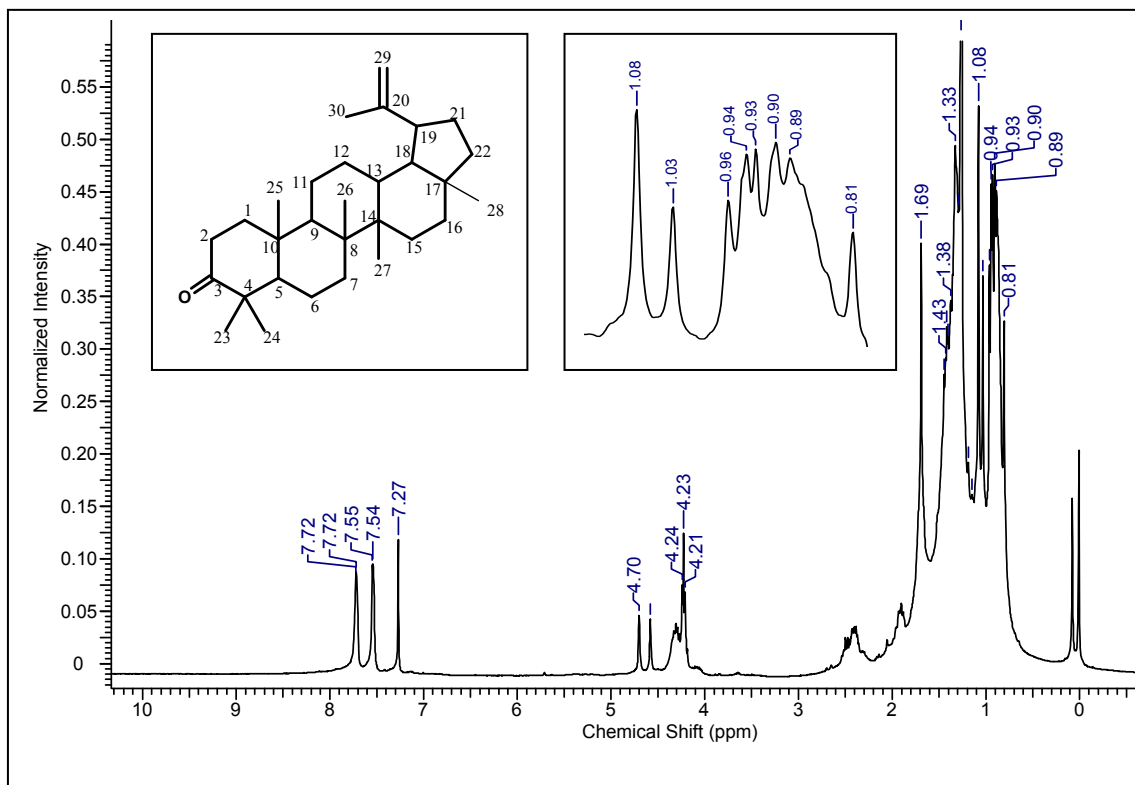


Figura 16 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-2.

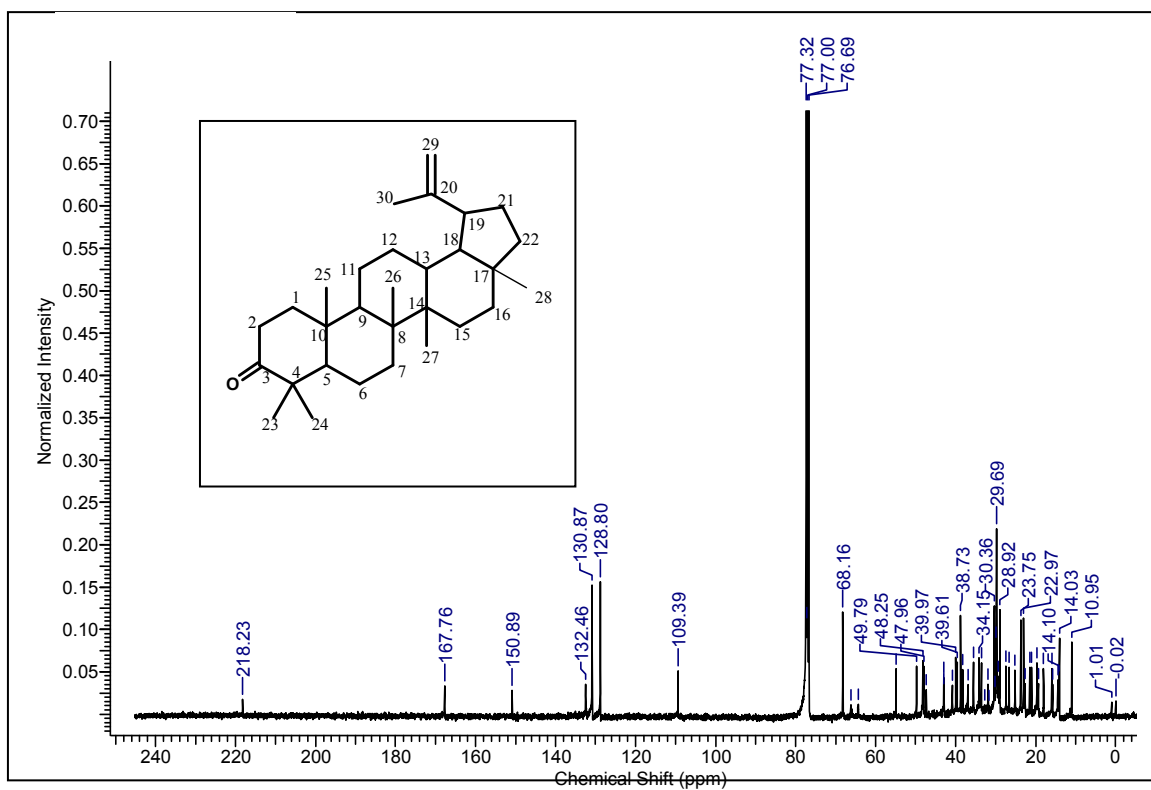
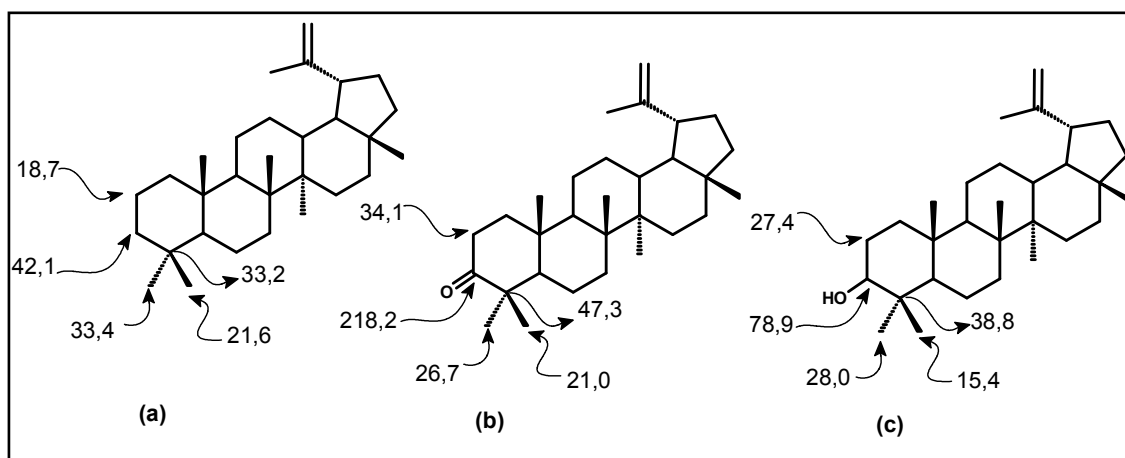


Figura 17 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -HBB (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-2.

O deslocamento químico de C-3 (218,2 ppm) mostra uma grande diferença em relação ao deslocamento químico de C-3 (78,9 ppm) da molécula anterior, DG-1. A presença da carbonila em C-3 é responsável pela diferença nos deslocamentos químicos dos carbonos adjacentes C-2 e C-4, além de influenciar também no deslocamento químico do grupamento metílico C-23. Isto se deve ao efeito desprotetor da carbonila aos carbonos  $\alpha$ -posicionados e ao efeito protetor aos grupos  $\beta$ -posicionados, (Garcez *et. al.*, 1981), conforme pode ser verificado na Figura 18.

Pelo mapa de correlação heteronuclear HMQC (Figura 19, p. 80) assim como pela ampliação do mapa HMQC (Figura 20, p. 80) foi possível correlacionar alguns sinais de carbono aos átomos de hidrogênio ligados diretamente a ele, tais como: o sinal em 109,5 ppm está correlacionando com dois átomos de hidrogênios em  $\delta_H$  4,58 (H-30a) e  $\delta_H$  4,70 (H-30b). Observa-se a correlação dos grupamentos metilas em  $\delta_H$  1,06 (H-23) com  $\delta_C$  26,6 (C-23); a correlação direta do sinal  $\delta_H$  1,68 (H-30) com  $\delta_C$  19,3 (C-30),  $\delta_H$  0,89 com  $\delta_C$  14,1 (C-23).



**Figura 18** - Comparação de alguns deslocamentos químicos dos triterpenos de esqueleto lupano (a), (b) e (c). Fonte: (Mahato & Kundu, 1994).

Pelo mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 21, p. 81) pode-se observar que o sinal em 150,9 ppm está correlacionando a duas ligações com  $\delta_H$  1,68 confirmando o posicionamento C-20 e da metila C-30. Observa-se a correlação do sinal em 109,5 ppm com o sinal em torno de  $\delta_H$  1,68 a três ligações. E finalmente, a correlação a três ligações do sinal 218,32 ppm com  $\delta_H$  1,06, o que indica a correlação do C-3 com o H-23.



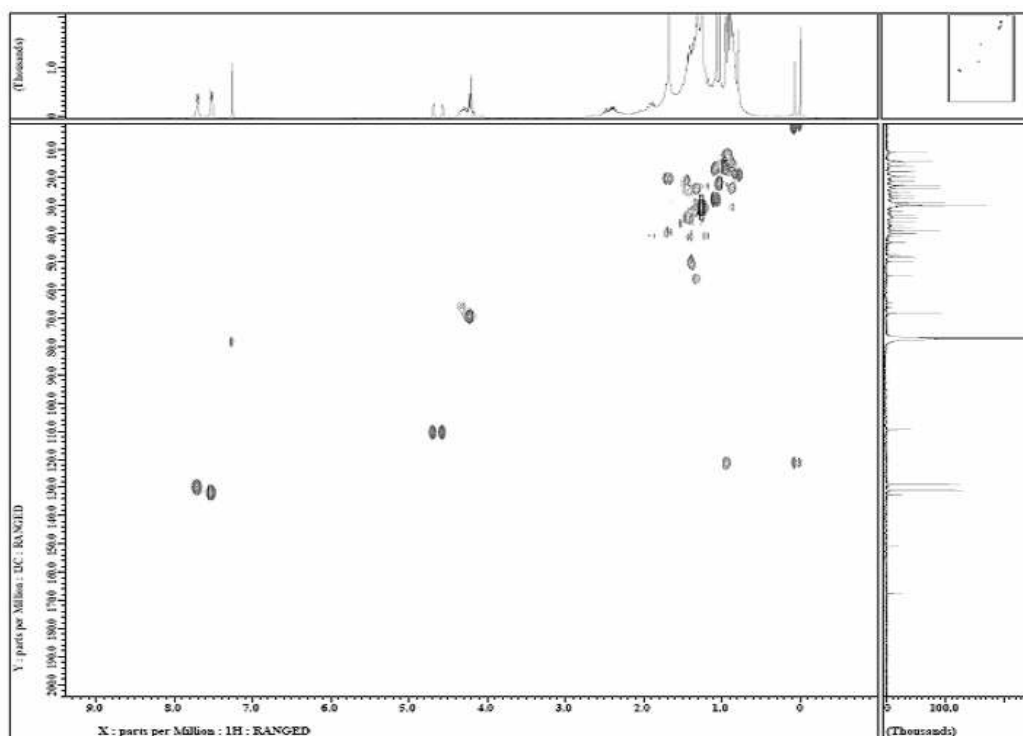


Figura 19 - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMQC) de DG-2.

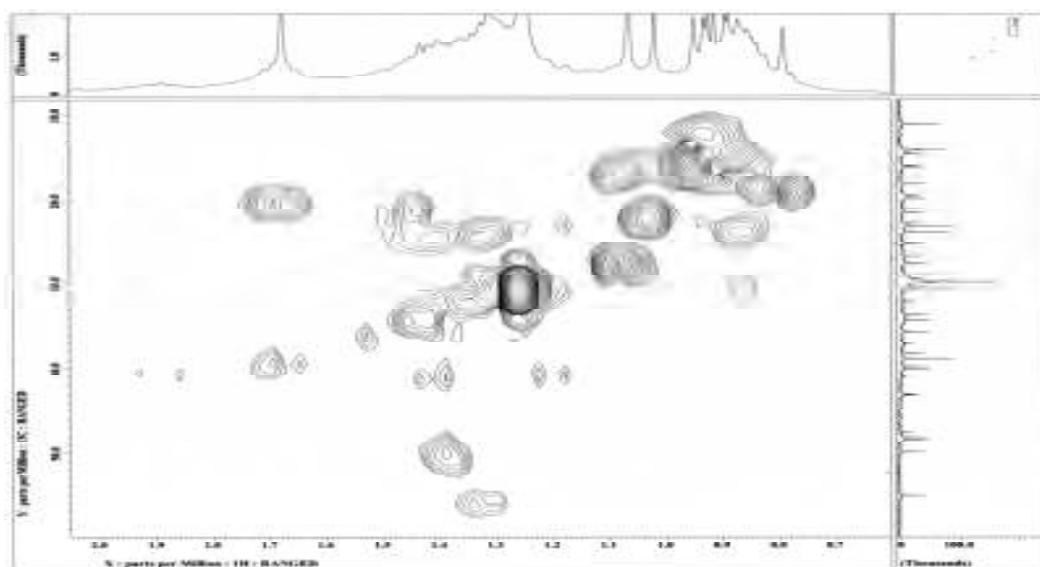
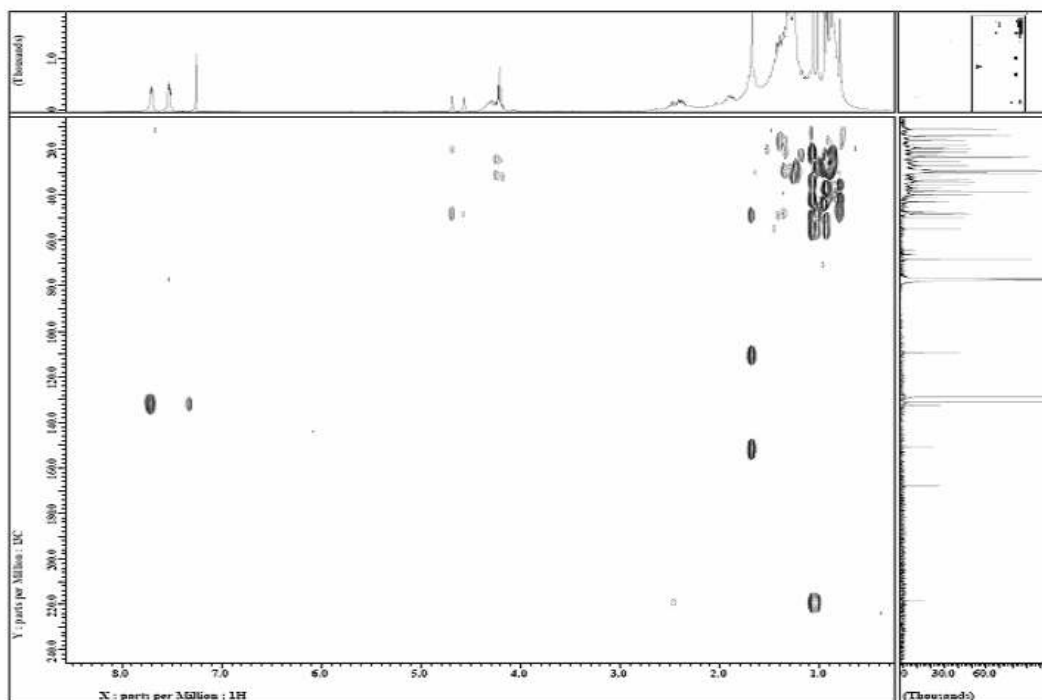


Figura 20 - Ampliação do mapa de correlação heteronuclear (HMQC) de DG-2.

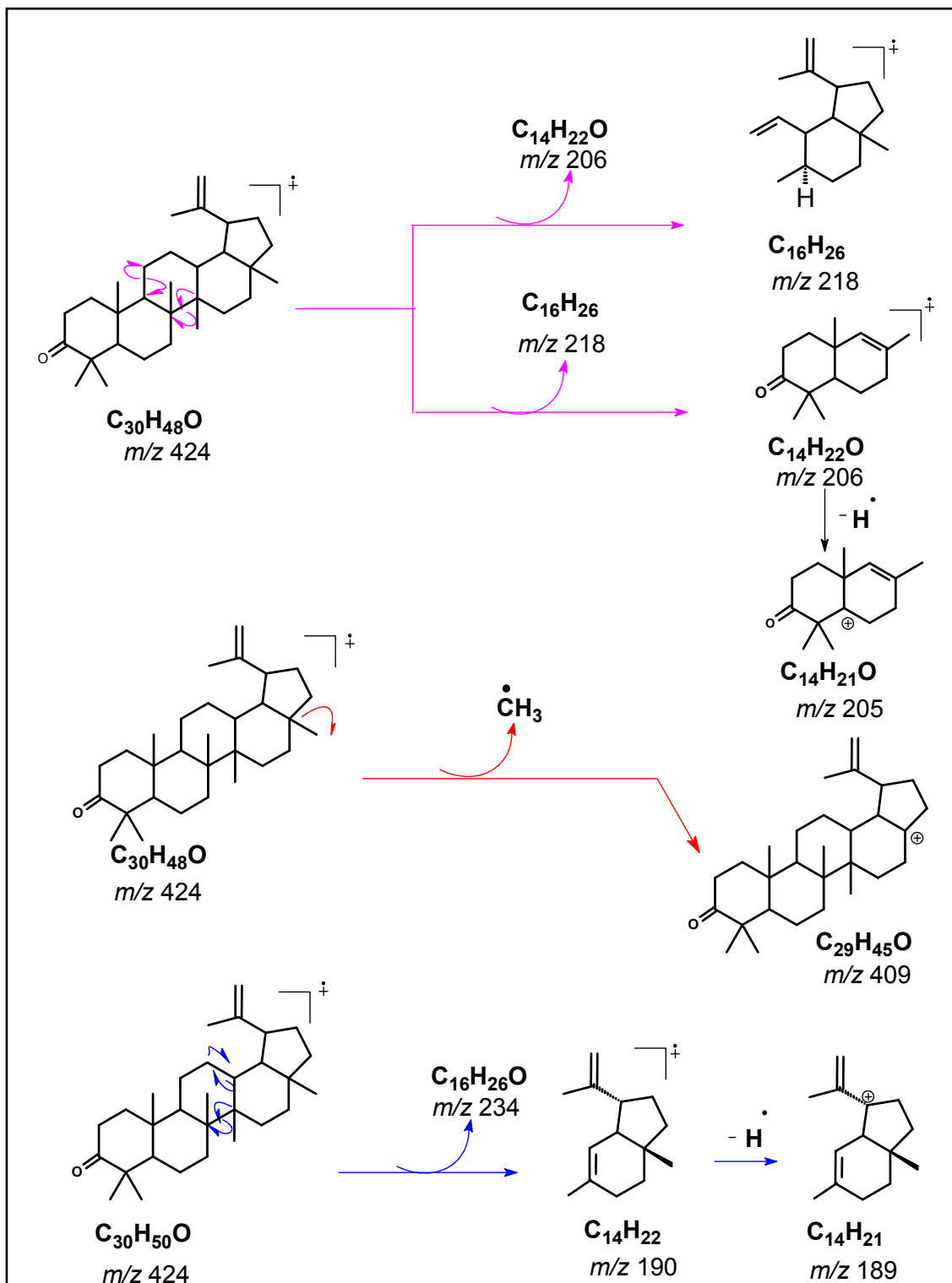


**Figura 21** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-2.

Pelo espectro de massas foi possível observar o pico do íon molecular de DG-2 que é coerente com a estrutura química proposta como pode ser observado no Esquema 9, p. 82.

A Tabela 9, p. 83, apresenta os demais dados obtidos pela análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados apresentados na literatura.

A literatura não cita nenhuma atividade específica a lupenona, mas, foram publicados nos últimos anos alguns trabalhos que comprovam a atividades biológicas do lupeol, que apresenta como diferença a posição C-3 contém um grupo hidroxila no lugar do grupo carbonila como em DG-2. Segundo Geetha, & Varalakshmi (2001), o lupeol e alguns derivados apresentam atividades antiinflamatória.



Esquema 9 - Proposta de alguns fragmentos de massa substância DG-2.

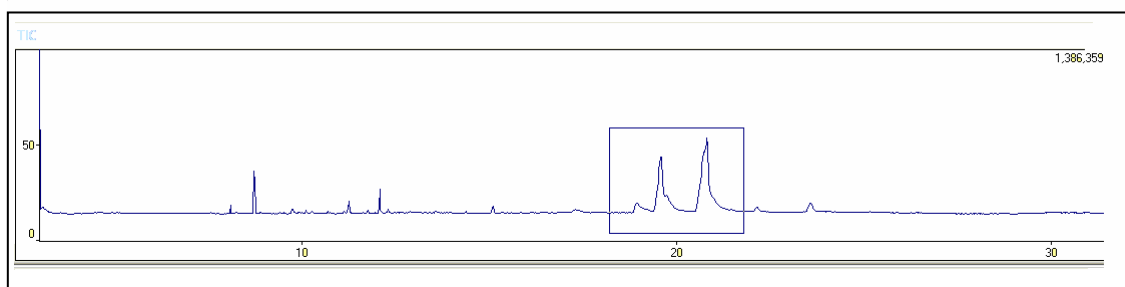
**Tabela 09** - Atribuição do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância DG-2 e comparação com dados da literatura.

C	$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMQC}$		$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$		Lupenona*
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$
3	218,8	-	-	1,06	217,9
4	47,4	-	-	-	47,3
8	41,0	-	-	-	40,9
10	37,0	-	-	-	36,9
14	43,1	-	-	-	42,9
17	43,0	-	-	-	42,9
20	150,9	-	1,68	-	150,7
<b>CH</b>					
5	55,0	-	-	-	55,3
9	49,9	-	-	-	49,8
13	38,8	-	-	-	38,2
18	48,3	4,5	-	-	48,3
19	48,0	4,7	-	-	47,9
<b>CH<sub>2</sub></b>					
1	39,7	-	-	-	39,6
2	34,4	-	-	-	34,1
6	19,8	4,58e 4,7	-	-	19,6
7	33,7	-	-	-	33,6
11	21,6	-	-	-	21,5
12	25,2	-	-	-	25,2
15	27,5	-	-	-	27,4
16	35,6	-	-	-	35,6
21	30,4	-	-	-	29,9
22	40,1	-	-	-	40,0
30	109,5	1,68	-	1,68	109,7
<b>CH<sub>3</sub></b>					
23	26,6	1,06	-	-	26,6
24	21,1	-	-	-	21,0
25	16,0	-	-	-	15,8
26	16,1	-	-	-	15,9
27	14,1	0,89	-	-	14,4
28	18,1	-	-	-	18,0
29	19,3	4,58 e 4,70	-	-	19,3

Fonte:\* Ahmad &amp; Rahman, 1994.

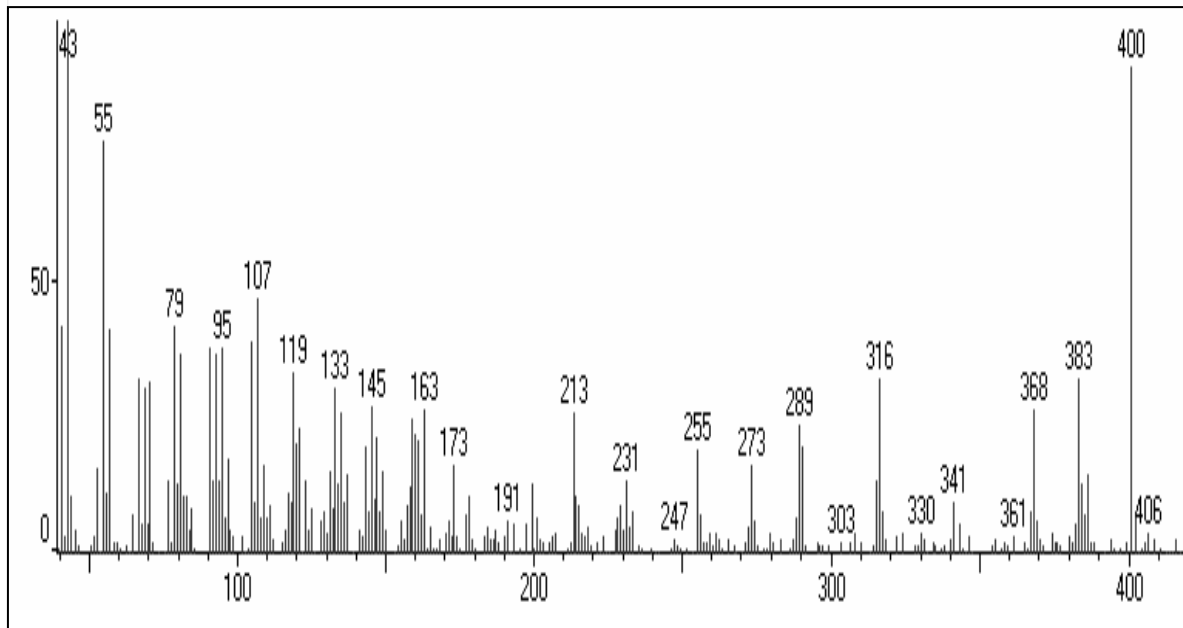
#### 4.4 - Determinação Estrutural de DG-3, DG-4 e DG-5

As substâncias DG-3, DG-4 e DG-5 foram isoladas do extrato hexânico como um material sólido cristalino, que após várias análises por CCDA com sistemas de eluentes diferentes, revelou-se como uma única mancha de coloração azulada, que após ser analisada por CG verificou tratar-se da mistura de substâncias esteroidais. Observou-se os seguintes tempos de retenção: 18,94 minutos para a substância DG-3; 19,59 minutos para a substância DG-4 e 20,83 minutos para a substância DG-5 (Figura 22). Esses esteróides são frequentemente encontrados no reino vegetal, e quase sempre são encontrados na forma de misturas devido sua grande semelhança estrutural (Budzikiewiez, *et. al.*, 1964) o que não permite o seu isolamento com o uso de técnicas cromatográficas clássicas como cromatografia em coluna aberta de sílica, mas é possível sua separação e identificação com o uso de técnicas mais modernas como CG por exemplo.

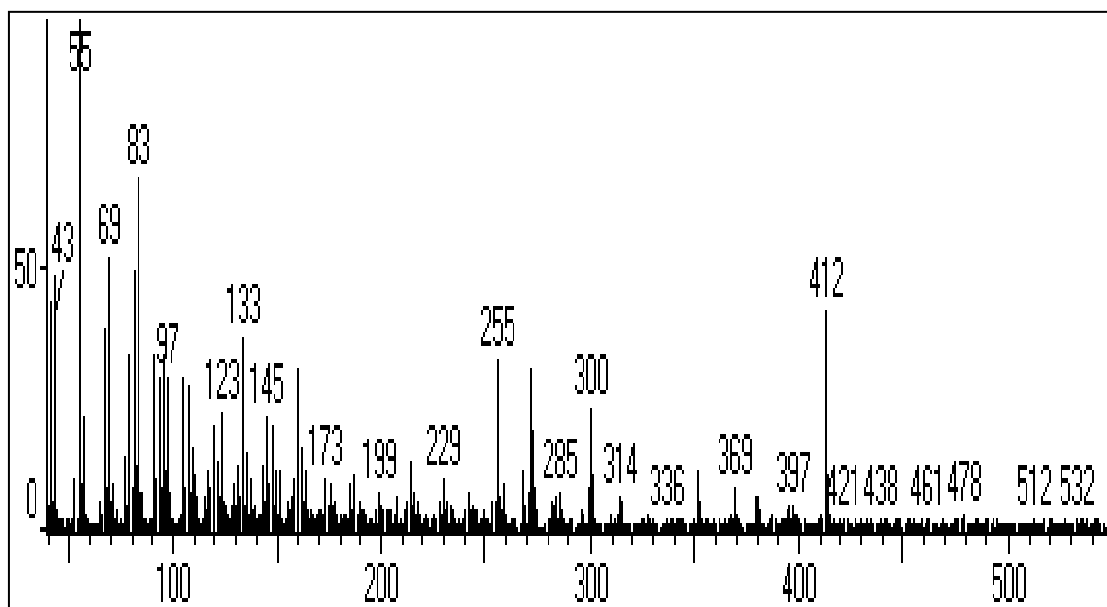


**Figura 22** - Cromatograma da mistura esteroidal: DG-3, DG-4 e DG-5.

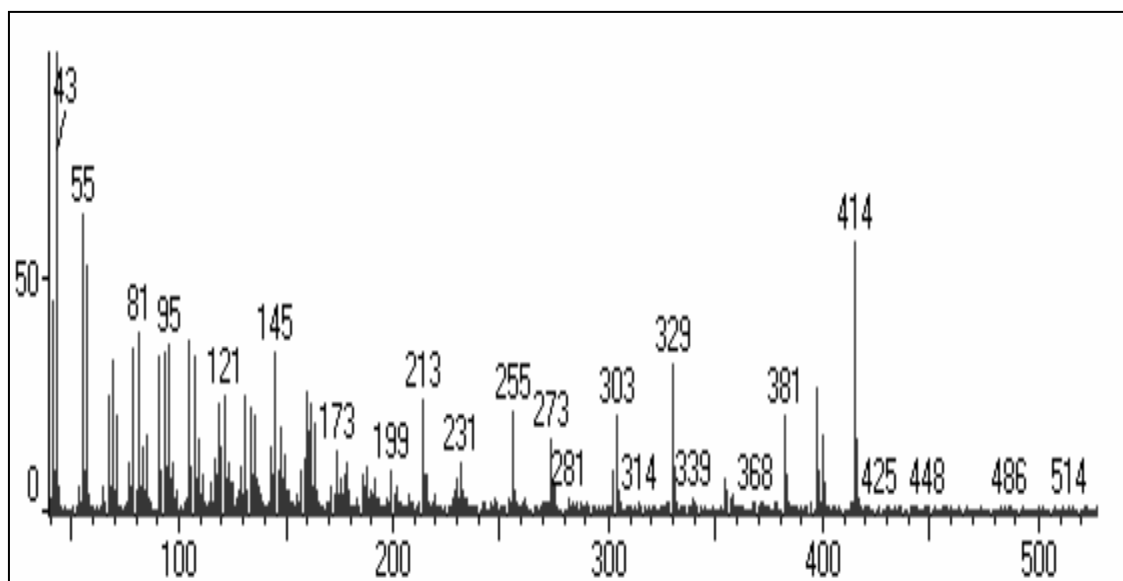
Através da análise dos espectros de massas foi possível identificar o pico do íon-molecular dos três esteróides: DG-3  $m/z = 400$  referente ao esteróide campesterol ( $C_{28}H_{48}O$ ) Figura 23, p. 85; DG-4  $m/z = 412$  referente ao esteróide estigmasterol ( $C_{29}H_{48}O$ ) Figura 24, p.85 e DG-5  $m/z = 414$  referente ao esteróide  $\beta$ -sitosterol ( $C_{29}H_{50}O$ ) Figura 25 p. 86.



**Figura 23** - Espectro de massas a 70 eV de DG-3.



**Figura 24** - Espectro de massas a 70 eV de DG-4.



**Figura 25** - Espectros de massas a 70 eV de DG-5.

Pela observação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 26 p. 87) da mistura esteroideal, foi possível verificar um sinal largo em  $\delta_{\text{H}}$  5,35 indicativo de hidrogênio olefínico. A presença de dois sinais referentes a hidrogênios vinílicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,03 e  $\delta_{\text{H}}$  5,13. Observa-se também um sinal múltiplo em  $\delta_{\text{H}}$  3,51 referente á hidrogênio carbinólico, um acúmulo de sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  (0,68-1,03) que se referem aos hidrogênios metílicos e  $\delta_{\text{H}}$  (1,03-2,28) referente a hidrogênios metilênicos e metínicos.

A análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (Figura 27, p. 87) permitiu identificar sinais característicos dos esteróides de esqueleto estigmastano e campestano em  $\delta_{\text{C}}$  121,73 referente a C-6 e  $\delta_{\text{C}}$  140,74 referente a C-5 e para o estigmasterol e campesterol os sinais de carbono  $sp^2$  em 129,30 ppm e 138,29 ppm pertencentes aos C-23 e C-22 respectivamente, conforme pode ser visto na (Figura 28, p. 88). Os demais sinais atribuídos a cada um dos esteróides identificados estão apresentados na Tabela 10, p. 89; assim como os dados da literatura para estes três esteróides identificados, o que corroboram para a confirmação das propostas estruturais apresentadas.

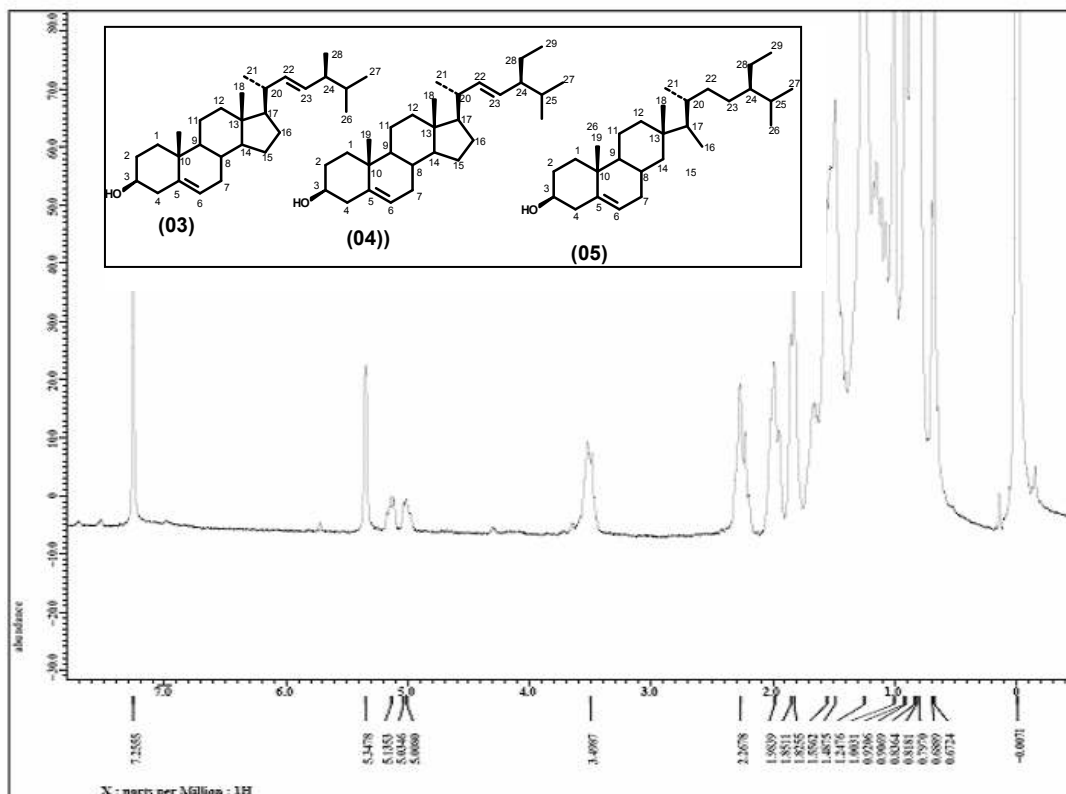


Figura 26 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H ( 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura de esteróides.

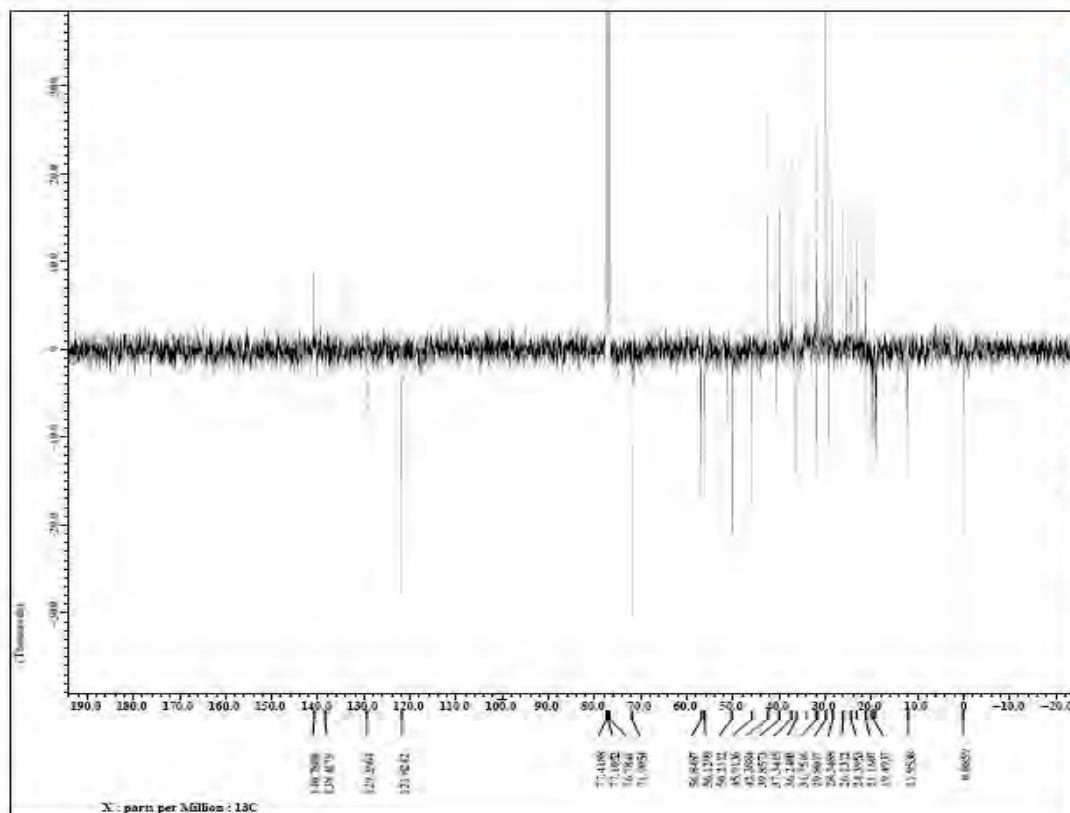
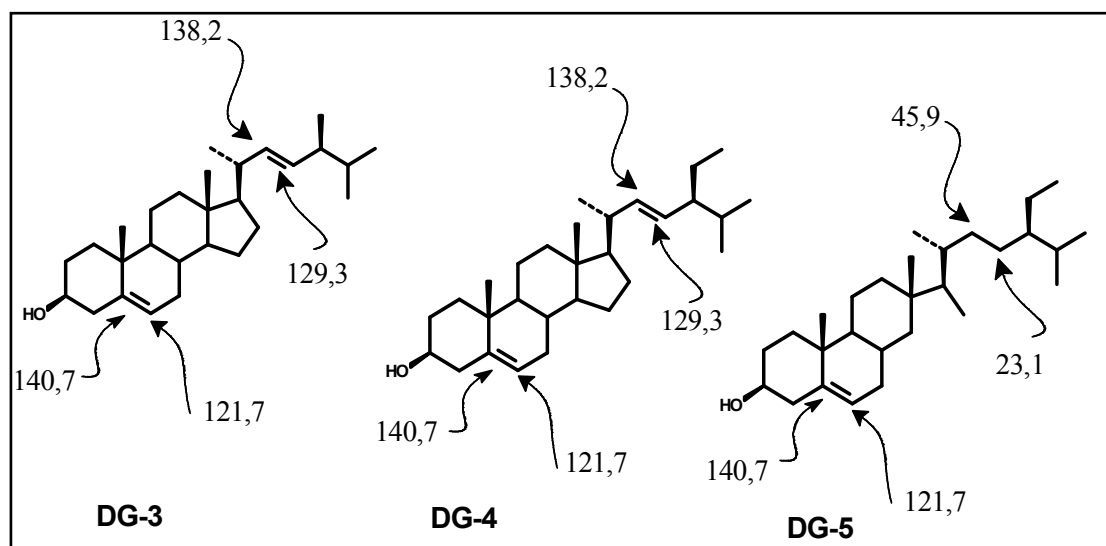


Figura 27 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C - APT (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura esteroidal.





**Figura 28** - Alguns deslocamentos químicos característicos.

Sendo assim, DG-3, DG-4 e DG-5 é uma mistura contendo os esteróides: campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol.

Segundo Cechinel-Filho (1999) esteróides como estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e campesterol foram relatados como substâncias que apresentaram importantes atividades antiinflamatórias, e estudos tem mostrado que a associação destes com outros esteróides apresentam efeito positivo na hiperplasia benigna de próstata, doença que atinge acima de 50% dos homens com idade superior a 50 anos.

**Tabela 10** - Atribuição do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para as substâncias: DG-3, DG-4 e DG-5 comparados com dados da literatura.

	DG-3	Campesterol *	DG-4	Estigmasterol**	DG-5	$\beta$ -Sitosterol **
C	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$
5	140,75	140,73	140,75	140,80	140,75	140,80
10	36,50	36,40	36,50	36,16	36,50	36,54
13	42,29	42,29	42,29	42,35	42,29	42,35
<b>CH</b>						
3	71,81	71,89	71,81	71,83	71,81	71,83
6	121,73	121,72	121,73	121,70	121,73	121,70
8	31,88	31,82	31,88	31,94	31,88	31,94
9	50,11	50,12	50,11	50,20	50,11	50,20
14	56,75	56,75	56,85	56,81	56,85	56,81
17	56,03	56,05	55,93	56,12	55,93	56,12
20	36,14	36,16	40,50	39,82	40,50	39,82
22	33,93	33,94	138,93	138,29	33,93	33,93
24	45,82	45,83	51,23	50,20	51,23	45,90
25	26,03	26,03	31,88	31,70	29,70	29,68
<b>CH<sub>2</sub></b>						
1	37,25	37,25	37,25	37,29	37,25	37,29
2	31,65	31,64	31,65	31,94	31,65	31,94
4	42,29	42,29	42,29	42,35	42,29	42,35
7	31,92	31,89	31,92	34,00	31,92	34,00
11	21,06	21,08	21,06	21,10	21,06	21,10
12	39,76	39,78	39,68	39,82	39,76	39,82
15	24,30	24,38	24,38	24,32	24,30	24,32
16	28,24	28,24	28,24	28,90	28,24	28,90
23	39,12	39,12	129,26	129,30	28,92	26,19
28	-	-	25,41	25,40	23,04	23,12
<b>CH<sub>3</sub></b>						
18	11,86	11,87	11,86	11,99	11,86	11,99
19	19,38	19,38	19,38	19,39	19,38	19,39
21	19,01	19,03	19,01	19,06	18,77	18,79
26	18,77	18,76	21,20	21,20	19,81	19,80
27	19,81	19,81	19,01	19,80	19,01	19,80
28	23,04	23,06	-	-	-	-
29	-	-	11,99	11,99	12,25	11,87

Fonte: \* Goulard, *et. al.*,(1993); \*\* Breitmaier *et al.*, (1987).

#### 4.5 - Determinação Estrutural de DG-6

A substância DG-6 foi isolada do extrato diclorometânico como um sólido amarelo avermelhado, solúvel em clorofórmio, que ao ser analisada por CCDA se apresentou como uma única mancha de coloração avermelhada após ter sido revelada com vanilina sulfúrica.

Pela análise do espectro na região do infravermelho (Figura 29) observou-se uma banda referente a estiramento de O-H em ligação de hidrogênio intermolecular em torno de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , o estiramento referente a C-H em torno de  $2917\text{ cm}^{-1}$ , os estiramentos referentes a C=C do anel aromático em  $1601$ ,  $1508$  e  $1462\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1377\text{ cm}^{-1}$  observa-se a deformação angular no plano de O-H. Em torno de  $1260\text{ cm}^{-1}$  verifica-se o estiramento assimétrico C-O-C (Crewis, *et. al.*, 1998).

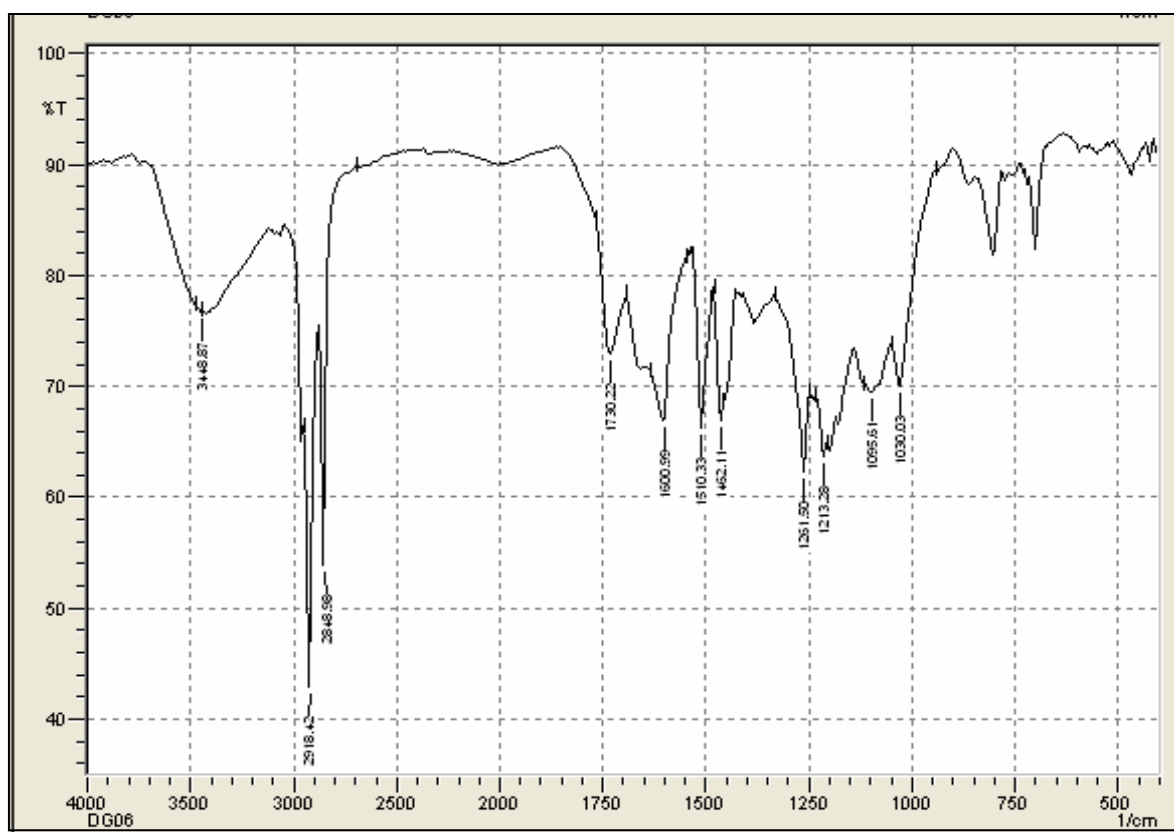
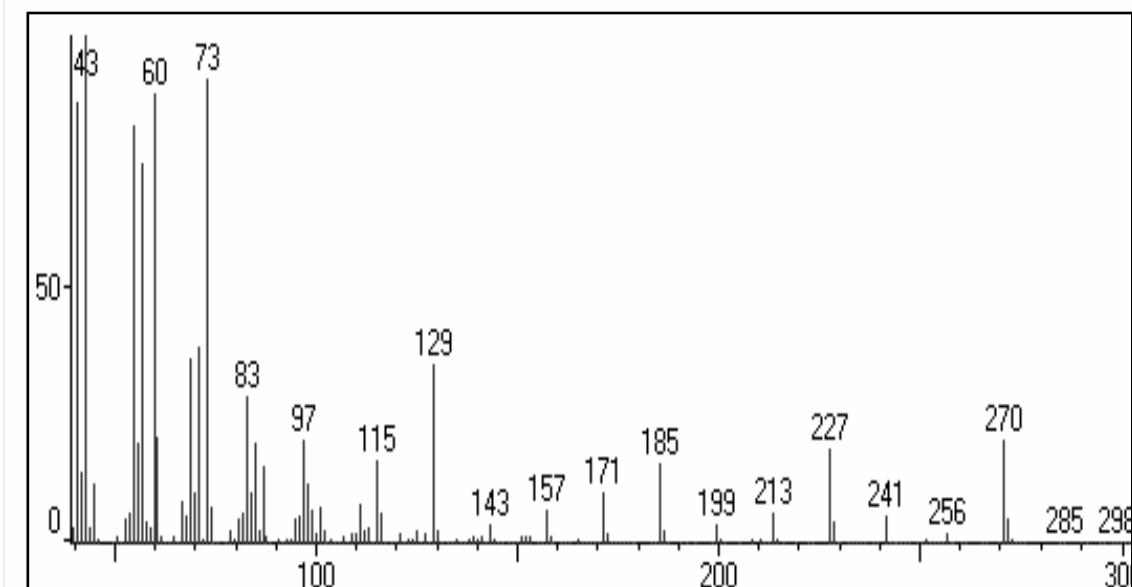


Figura 29 - Espectro na região do IV da substância DG-6.

Através de CGEM obteve-se o espectro de massas de DG-06 (Figura 30, p. 91) e a observação do pico do íon molecular em  $m/z$  270.



**Figura 30** - Espectro de massas a 70 eV de DG-6.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 31, p. 92), apresentou dois sinais múltiplos centrados em  $\delta_{\text{H}}$  7,31 e 7,21 equivalente a dois (H-2' e H-6') e três hidrogênios (H-3', H-5' e H-4') que são sinais característicos de anel aromático não-substituído. Dois sinais simples em  $\delta_{\text{H}}$  6,57 e 6,48 ppm de hidrogênios para-posicionados H-5 e H-8 respectivamente. Além destes sinais, há sinais de hidrogênios olefínicos, para o sinal centrado em  $\delta_{\text{H}}$  5,02 referente ao H-2a foi possível calcular as constantes de acoplamento  $J=12$  Hz; indicando acoplamentos de hidrogênios vicinais. O sinal múltiplo centrado em  $\delta_{\text{H}}$  5,02 com  $J = 12$  Hz e  $J = 8$  Hz, e para o sinal múltiplo centrado em  $\delta_{\text{H}}$  6,31 ppm, referente ao H-3 observa-se as constantes de acoplamento ( $J=12$  Hz;  $J = 8$  Hz e  $J = 4$  Hz) indicando os acoplamentos com hidrogênios vicinal *trans*, vicinal *cis* e geminais (Figura 33, p. 93). O sinal em 4,85 ppm, referente ao H-4, cujas constantes de acoplamento observadas foram  $J = 8$  Hz e  $J = 4$  Hz). A presença de dois grupos metoxilas foram deduzidos a partir dos sinais  $\delta_{\text{H}}$  3,75 e 3,83 ppm.

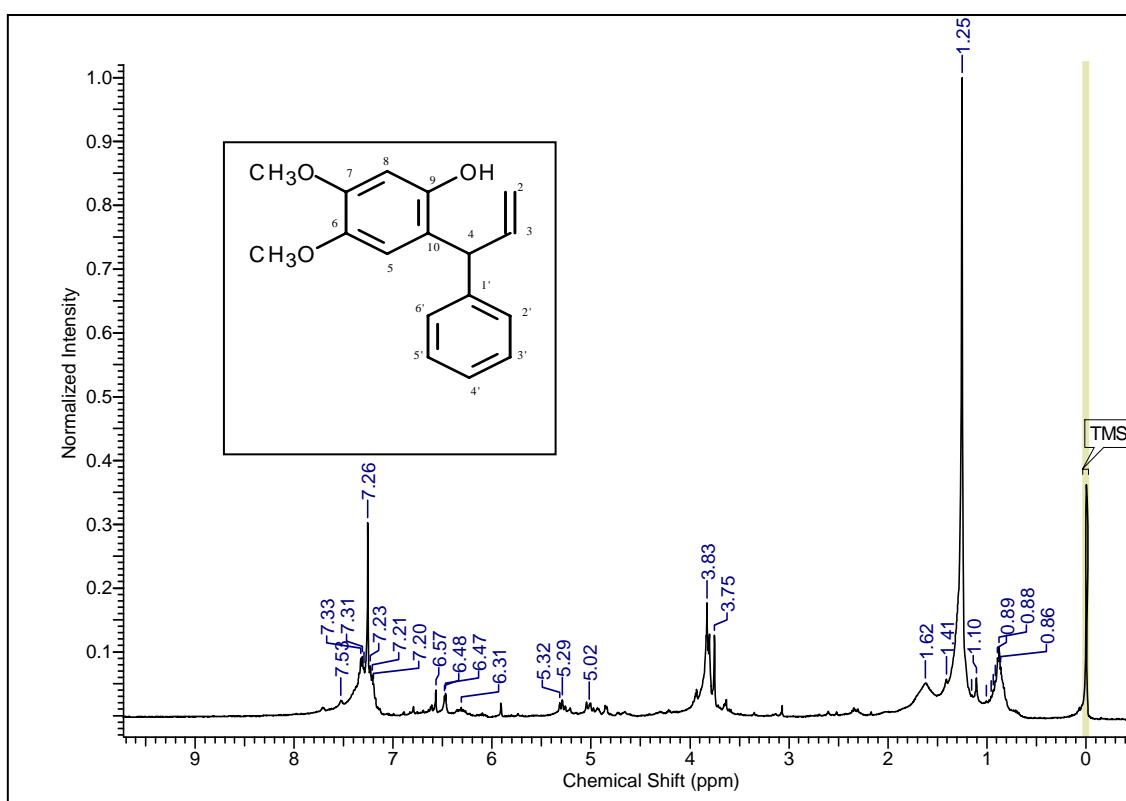


Figura 31 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-6.

Os espectros apresentados nas Figuras 32 e 33 (p. 92 e 93) são ampliações de regiões do espectro de RMN $^1\text{H}$  da substância DG-6 que permite observar com maior clareza os sinais que foram discutidos.

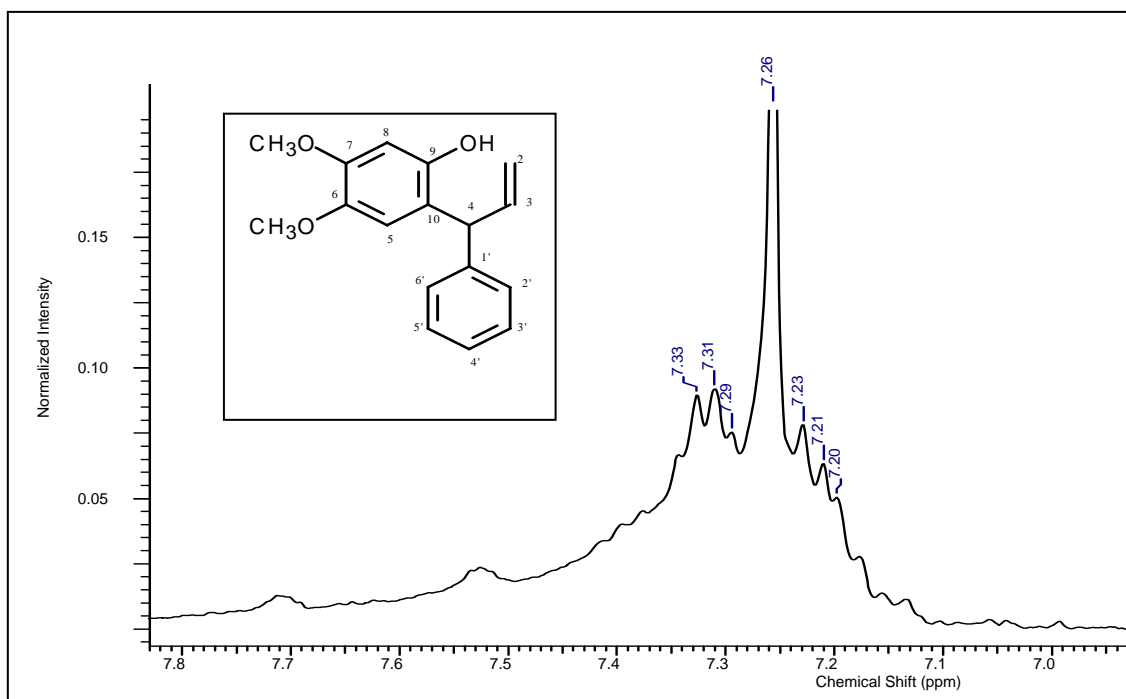
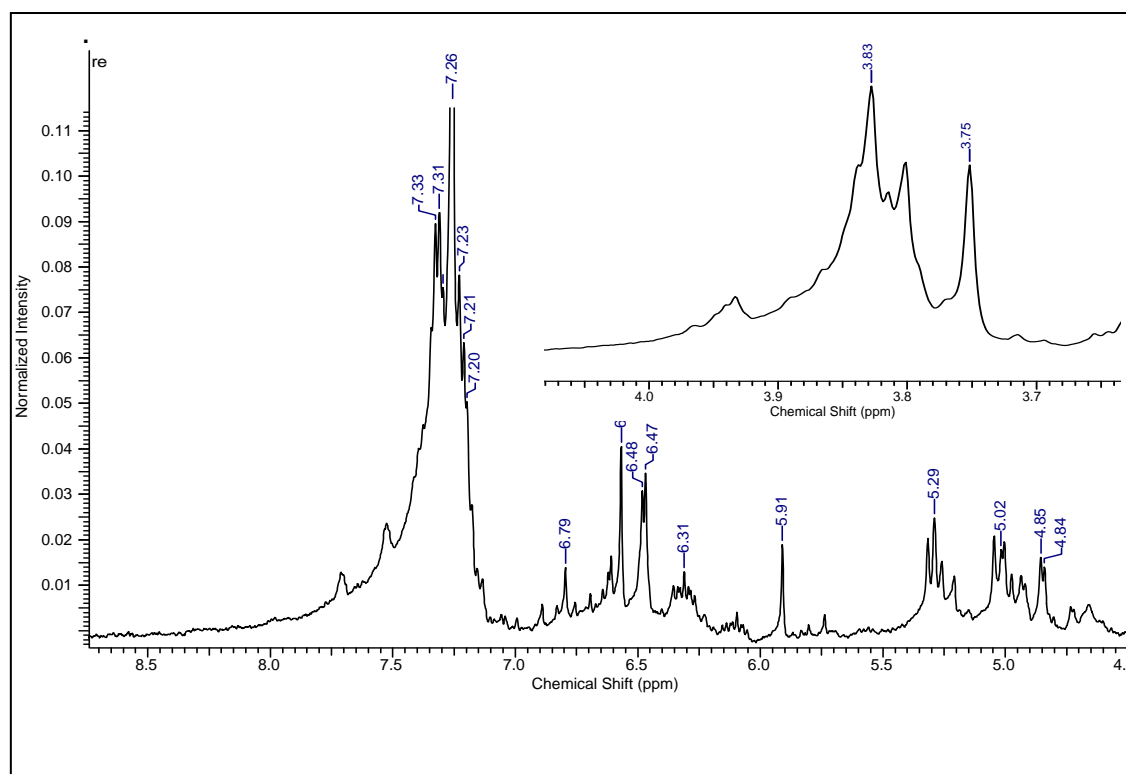


Figura 32 - Ampliação das regiões entre (7,0-7,7 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de DG-6.



**Figura 33** - Ampliação das regiões entre (4,50-8,50 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de DG-6.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -PENDANT (Figura 34, p. 94) verifica-se sinais de carbonos olefínicos  $\delta_{\text{C}}$  139,45 (C-3) e  $\delta_{\text{C}}$  117,07 (C-2) e o sinal C-4 que faz a junção entre os anéis aromáticos em  $\delta_{\text{C}}$  49,23. Ainda, observa-se a presença de dois grupos metoxilas em  $\delta_{\text{C}}$  55,92 (OCH<sub>3</sub>-6) e  $\delta_{\text{C}}$  56,60 (OCH<sub>3</sub>-5). Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  113,35 (C-5) e 101,68 (C-8) são coerentes para CH de anel aromático trissubstituído. Para o anel B os sinais referentes a CH de (C-2' e C-6') apresentaram deslocamento químico em 128,69 ppm enquanto que (C-3' e C-5') apresentaram-se com deslocamentos químicos em 128,51 ppm e para C-4' o deslocamento químico em 126,86 ppm.

Ao observar o Mapa de correlação homonuclear COSY (Figura 35, p. 94) foi possível perceber o acoplamento do sinal em 5,29 ppm com o sinal em torno de 6,31 ppm, além dos acoplamentos entre o sinal em torno de 5,02 ppm e 6,31 ppm.

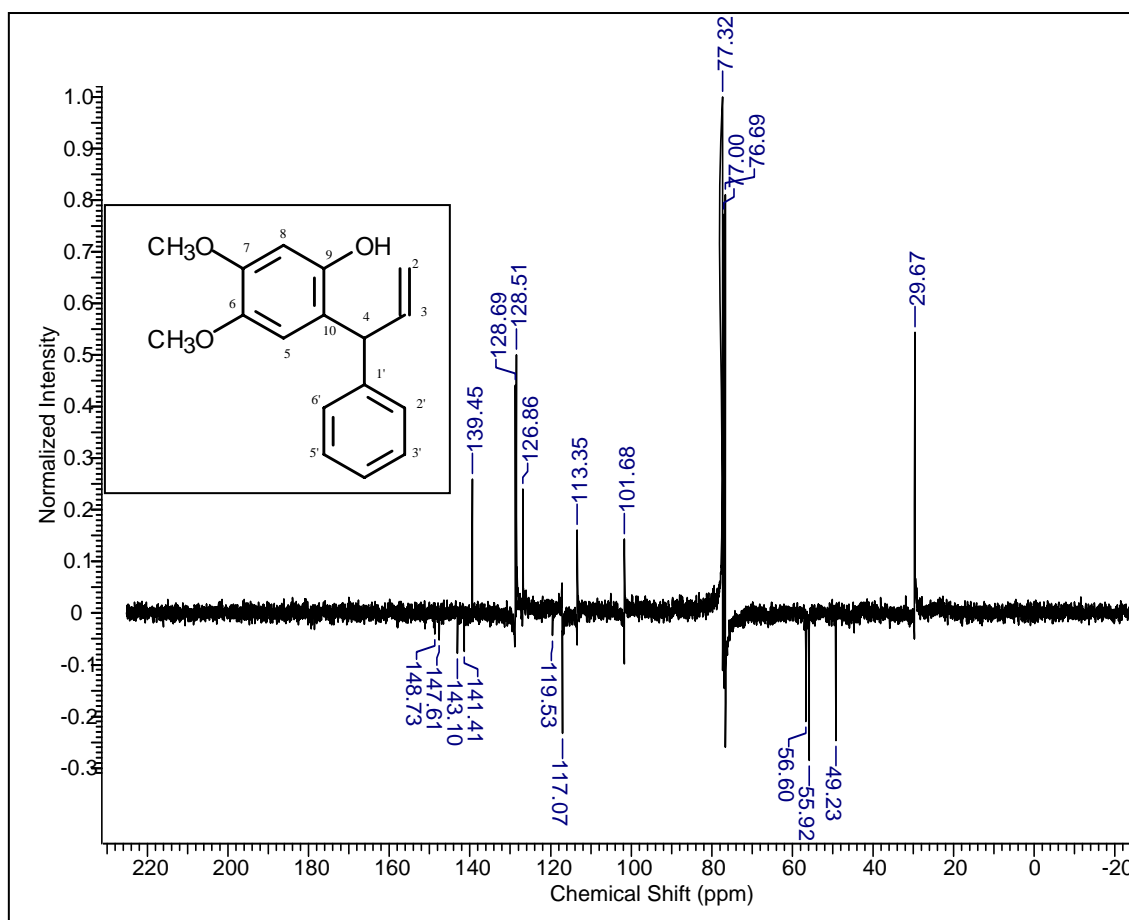


Figura 34 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -PENDANT (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-6.

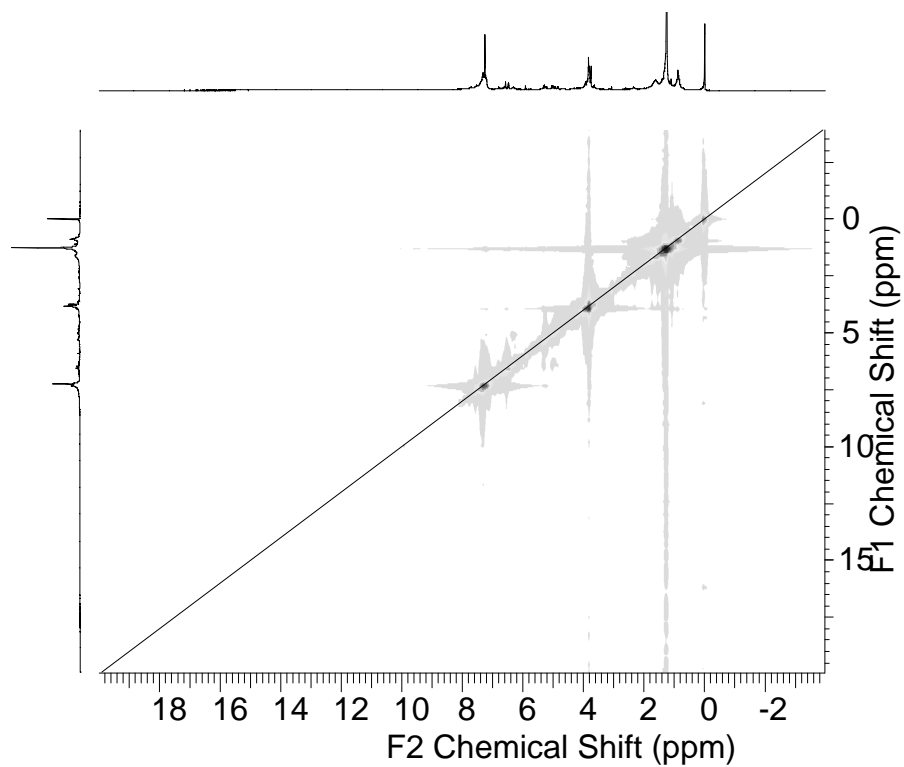
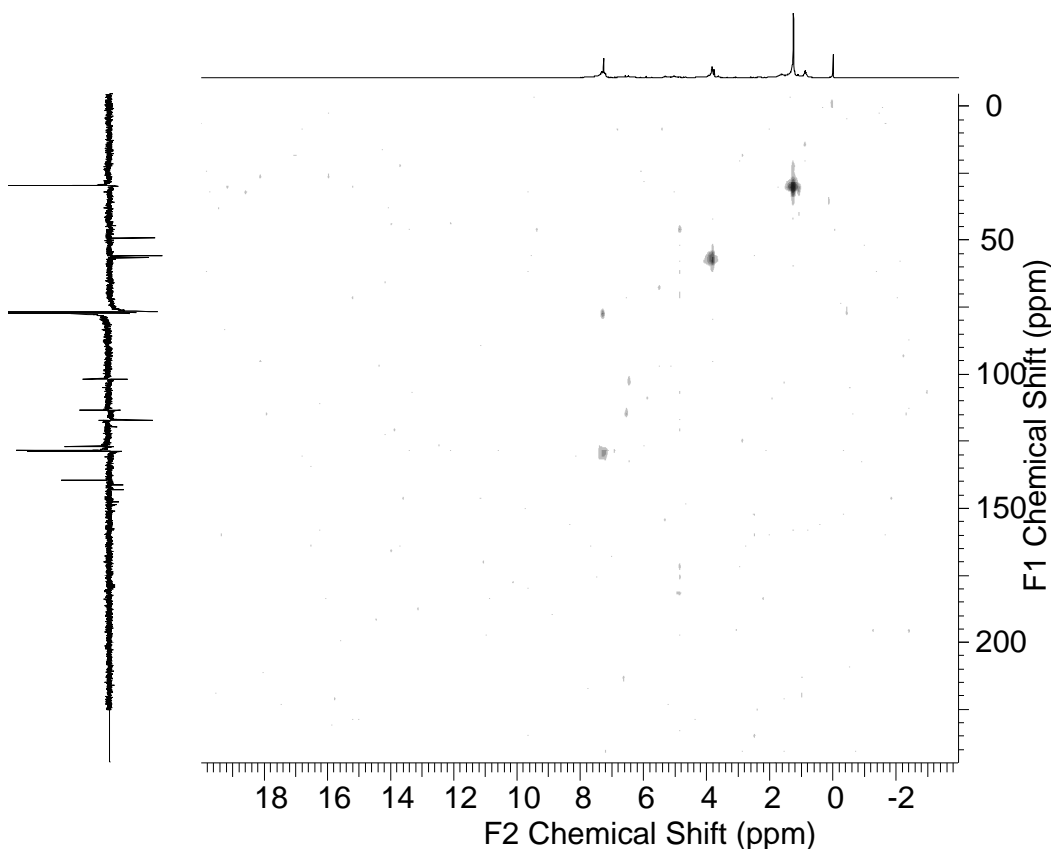


Figura 35 - Mapa de correlação homonuclear  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (COSY) de DG-6.

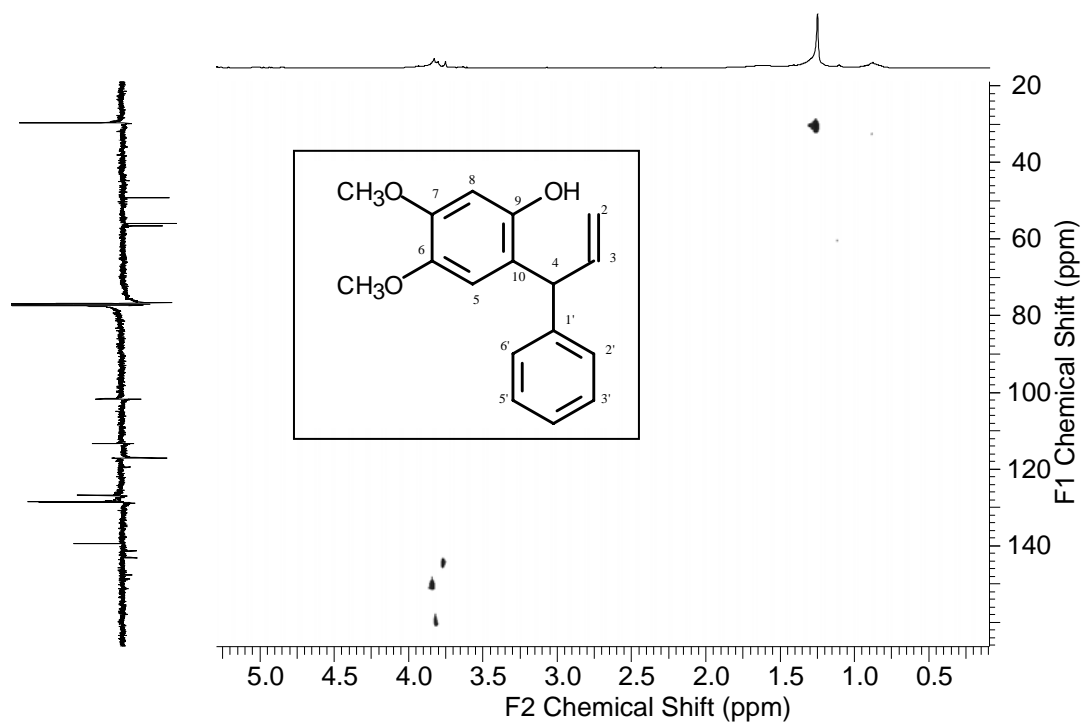
Pela interpretação do Mapa de correlação heteronuclear HMQC (Figura 36) foi possível observar os acoplamentos  $^{13}\text{C}-\text{H}^1$  em uma ligação ( $^1J_{\text{CH}}$ ) para: (C-2' e C-6') - (H-2' e H-6'), (C-3', e C-5') com (H-3' e H-5') e C-4' com o H-4' os hidrogênios dos grupos metoxilas e o átomo de carbono ligado diretamente a ele, e finalmente a correlação entre o átomo C-5 e H-5, e a correlação entre C-8 e H-8 (Tabela 11, p. 99).

Pela análise do mapa de correlação HMBC (Figura 37, p. 96) e sua ampliação (Figura 38, p. 96) foi possível observar os acoplamentos  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$  a mais de uma ligação ( $^nJ_{\text{CH}}$ ), o que tornou possível o posicionamento dos grupos metoxilas que estariam diretamente ligado aos C-6 e C-7 na estrutura da molécula o que pode ser comprovado através das marcas de correlação observadas dos hidrogênios dos grupos metoxilas 3,75 ppm com o carbono aromático C-6 em 143,21 ppm e também a correlação do dos hidrogênios do segundo grupo de metoxila em 3,83 ppm com o carbono aromático C-7 em 147,61 ppm conforme Figura 39, p. 97. Todos os dados obtidos dos espectros de RMN encontram-se na Tabela 11, p. 99.

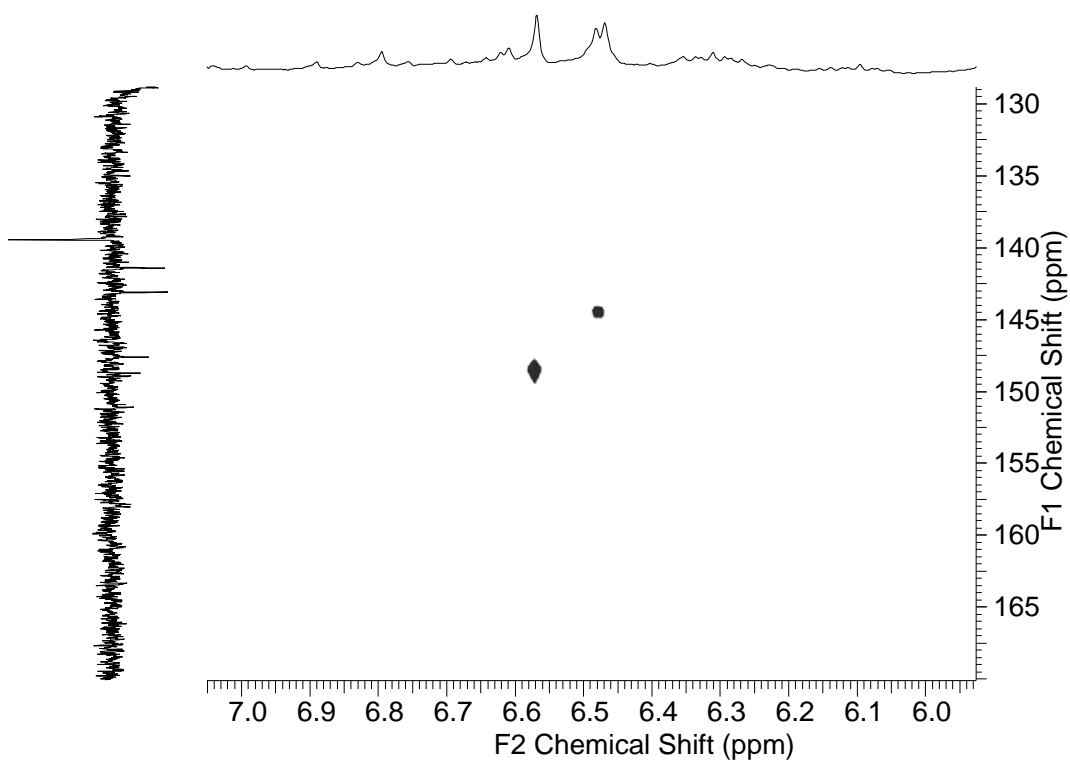


**Figura 36** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMQC) de DG-6.

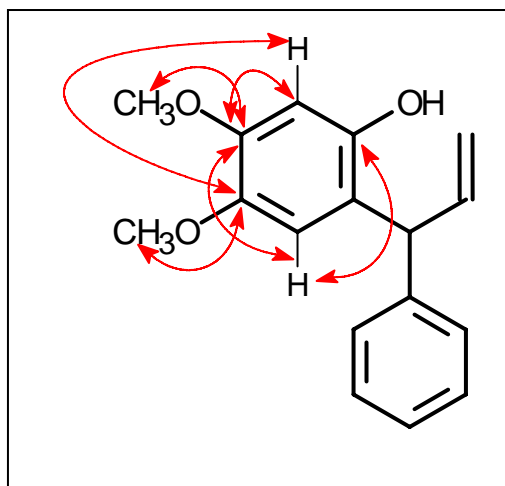




**Figura 37** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) ampliação (2,5-6,0 ppm) e (128-184 ppm) de DG-6.

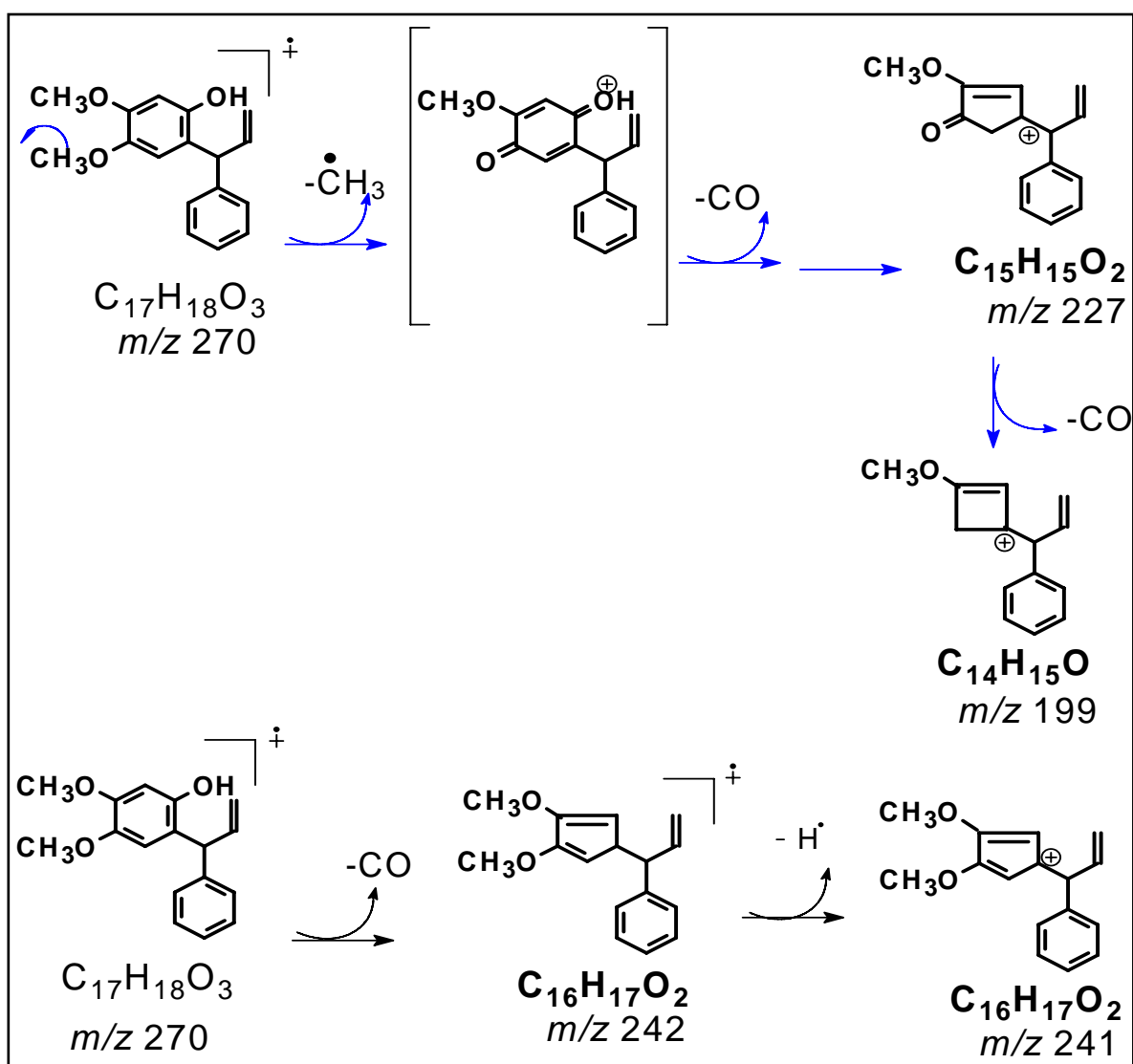


**Figura 38** - Ampliação do Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) região entre (6,0 - 7,0 ppm) e (130-165 ppm) de DG-6.



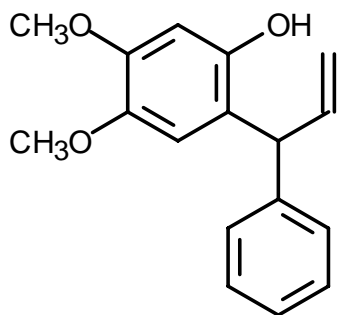
**Figura 39** - Algumas correlações observáveis pelo (HMBC).

Pela fragmentação apresentada no espectro de massas possível determinar o pico do íon molecular em  $m/z$  270, e alguns fragmentos característicos para estruturas neoflavonoídicas como, por exemplo, a perda de CO e de radical metila como pode ser observado no Esquema 10, p.98 que apresenta uma proposta para alguns fragmentos observados para DG-6.



**Esquema 10** - Proposta de alguns fragmentos de massas para DG-6.

De acordo com a literatura, a substância isolada possui atividade antiandrogênica. Segundo Patak, e colaboradores (1997) essa substância apresentou potencial atividade inibitória de 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT). Isso porque esta substância se combina com um receptor androgênio para formar o complexo DHT-receptor que bloqueia este receptor inibindo assim o desenvolvimento de doenças androgênicas dependentes. Apresenta ainda potente efeito protetor contra injúrias oxidativas em células HT22 (células do hipocampo de ratos), podendo ter atividade neuroprotetora (Ren-Bo-Na, *et. al.*;2008).



**Tabela 11** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância DG-6 e dados da literatura.

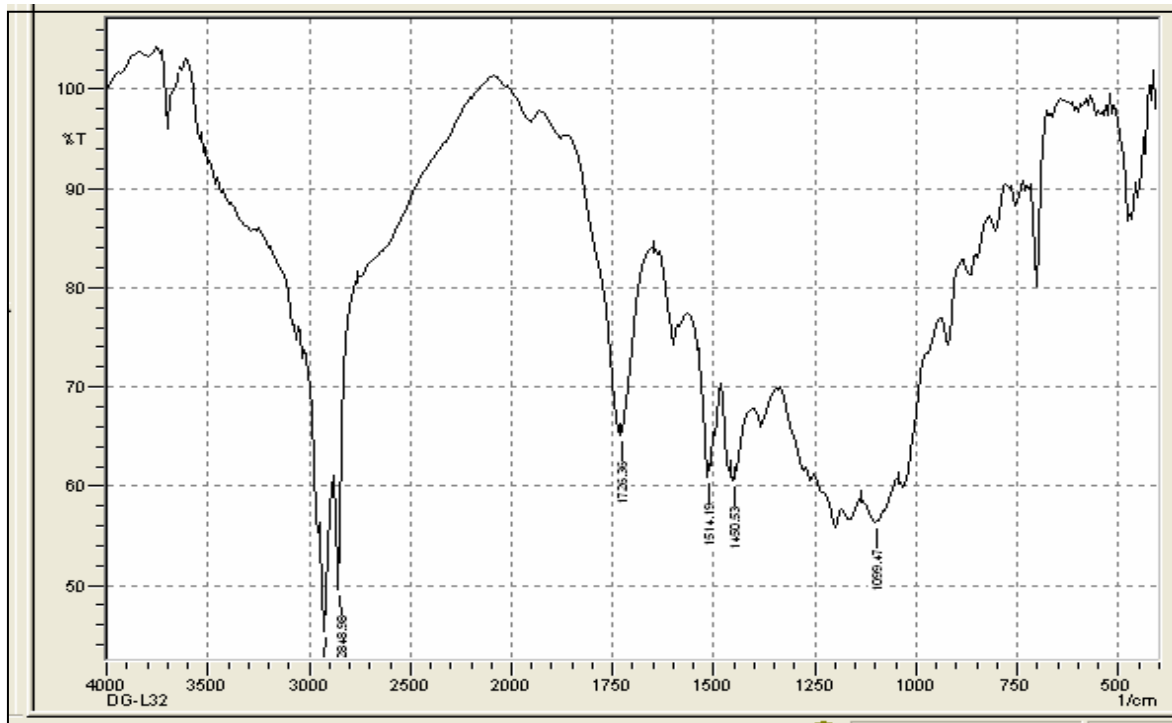
C	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$		9-hidroxi-6,7-dimetoxidalbergifenol*
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$
6	143,10	-	-	OCH <sub>3</sub> -6, H-8	142,5
7	147,61	-	H-8	OCH <sub>3</sub> -7	148,1
9	148,73	-	H-8	H-5	147,5
10	119,53	-	-	-	120,1
1'	141,41	-	-	-	141,9
<b>CH</b>					
3	139,45	6,31 (m)	-	-	139,5
4	49,23	4,84 (d, $J = 4$ Hz)	-	-	48,2
5	113,35	6,57	-	-	113,4
8	101,68	6,48	-	-	101,3
2'	128,69	7,31	-	-	128,3
3'	128,51	7,21	-	-	128,2
4'	126,86	7,21	-	-	128,3
5'	128,51	7,21	-	-	126,3
6'	128,69	7,31	-	-	128,2
<b>CH<sub>2</sub></b>					
2	117,07	5,02 e 5,31	-	-	128,3 116,5
<b>CH<sub>3</sub></b>					
OCH <sub>3</sub> -6	55,92	3,75	-	-	55,4
OCH <sub>3</sub> -7	56,60	3,83	-	-	56,4
<b>OH</b>					
9	-	-	-	-	-

Fonte: \* Patak, *et. al*, 1997.

#### 4.6 - Determinação Estrutural de DG-7.

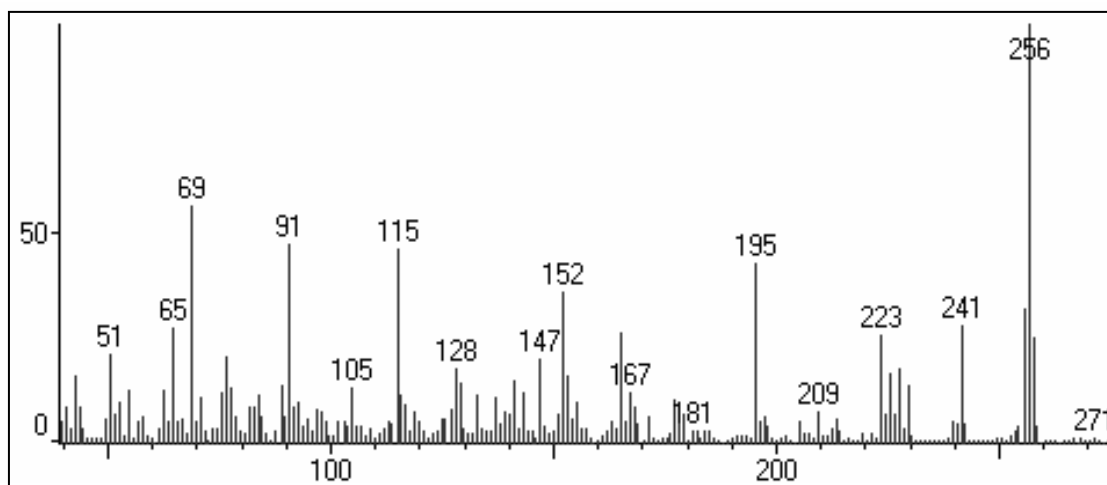
Da partição diclorometânica do extrato metanólico em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  foi possível o isolamento de 4,0 mg de um cristal amarelado (DG-7) por CCCG, ao ser analisado por CCDA apresentou-se como uma única mancha de coloração avermelhada após ter sido revelada com vanilina sulfúrica. Este cristal foi inicialmente submetido a espectrometria de RMN a uma dimensão a duas dimensões que permitiram em conjunto com o espectro de massas obtido por CGEM e IV deduzir a estrutura de DG-7.

Através do espectro na região do Infravermelho foi possível observar alguns sinais característicos para a estrutura da substância (Figura 40): uma banda larga referente ao estiramento de O-H em torno de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , estiramentos de C-H em  $2918$  e  $2848\text{ cm}^{-1}$ , observa-se ainda os estiramentos C=C do anel em  $1726$ ,  $1514$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1378\text{ cm}^{-1}$  observa-se a deformação angular no plano de O-H. Em torno de  $1099\text{ cm}^{-1}$  há a absorção de estiramento assimétrica de C-O-C.



**Figura 40** - Espectro na região do IV ( $4000 - 300\text{ cm}^{-1}$ ) da substância DG-7.

Através da técnica de CGEM foi possível obter o espectro de massas para a substância DG-7 (Figura 41).



**Figura 41** - Espectro de massas de DG-7 a 70 eV.

Pela observação de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 42, p. 102) foi possível verificar sinais simples em  $\delta_{\text{H}}$  6,48 (H-8) e  $\delta_{\text{H}}$  6,58 (H-5). Um sinal múltiplo centrado em 6,31 ppm (H-3); três sinais duplos centrados em 5,29 ppm (H-2b); 5,02 ppm (H-2a) e 4,89 ppm (H-4) que apresentaram os seguintes acoplamentos ( $J = 12$ ; 16,0 e 8,0 Hz) respectivamente. Observou-se um sinal simples em  $\delta_{\text{H}}$  3,78 indicativo dos três hidrogênios de um grupo metoxila.

Pela análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 43, p. 103), observando ampliações de regiões específicas, foi possível calcular algumas constantes de acoplamento( $J$ ): o sinal centrado em 7,21 ppm (H-5')  $J = 4,0$  Hz ; o sinal centrado em 7,32 ppm (H-6')  $J = 8$  Hz; o sinal centrado em 5,29 ppm com  $J = 12,0$  Hz ; o sinal centrado em 5,02 com  $J = 16,0$  Hz; o sinal centrado em 4,89 ppm com  $J = 8,0$  Hz e por fim o duplo sinal duplo centrado em 4,13 ppm com  $J = 8,0$  Hz.

Pela análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  HBBD (Figura 44, p. 104) observa-se doze sinais pouco intensos. Desses pode-se destacar  $\delta_{\text{C}}$  49,05; sinal característico referente ao C-4 de neoflavonóide .

Pelo mapa de correlação homonuclear COSY (Figura 45, p. 104) foi possível verificar acoplamento a uma ligação dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,29 (H-2b) com o sinal em aproximadamente  $\delta_{\text{H}}$  6,31 ppm (H-3).

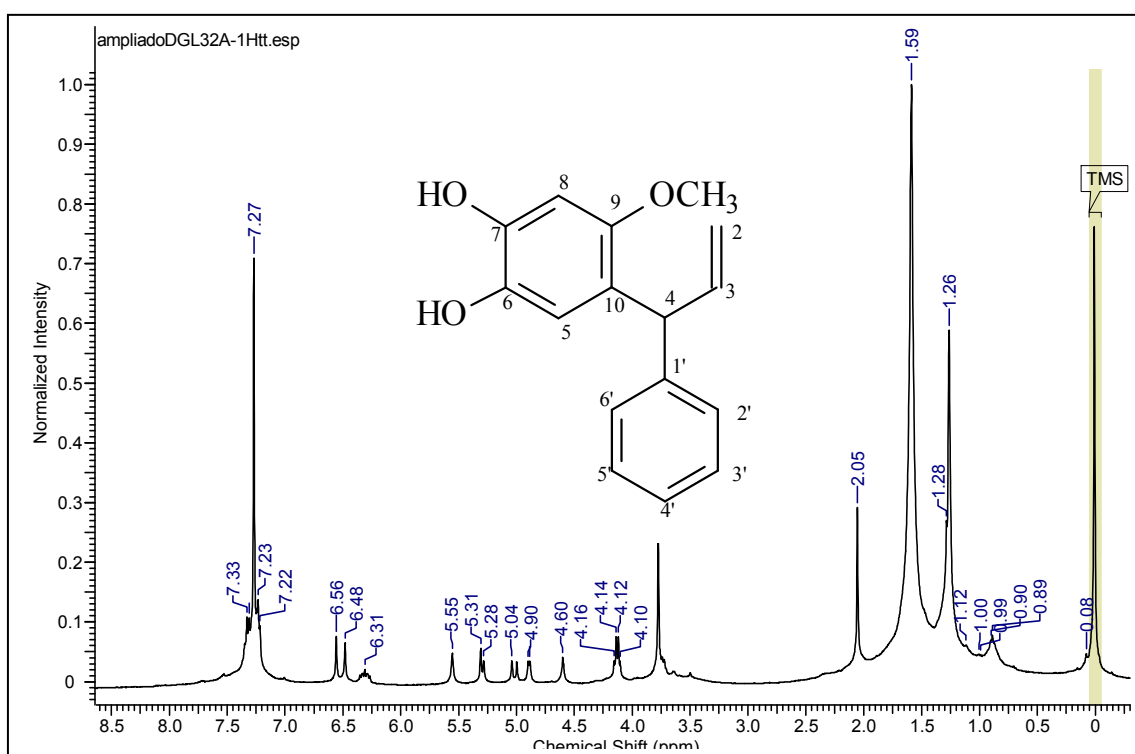


Figura 42 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de DG-7.

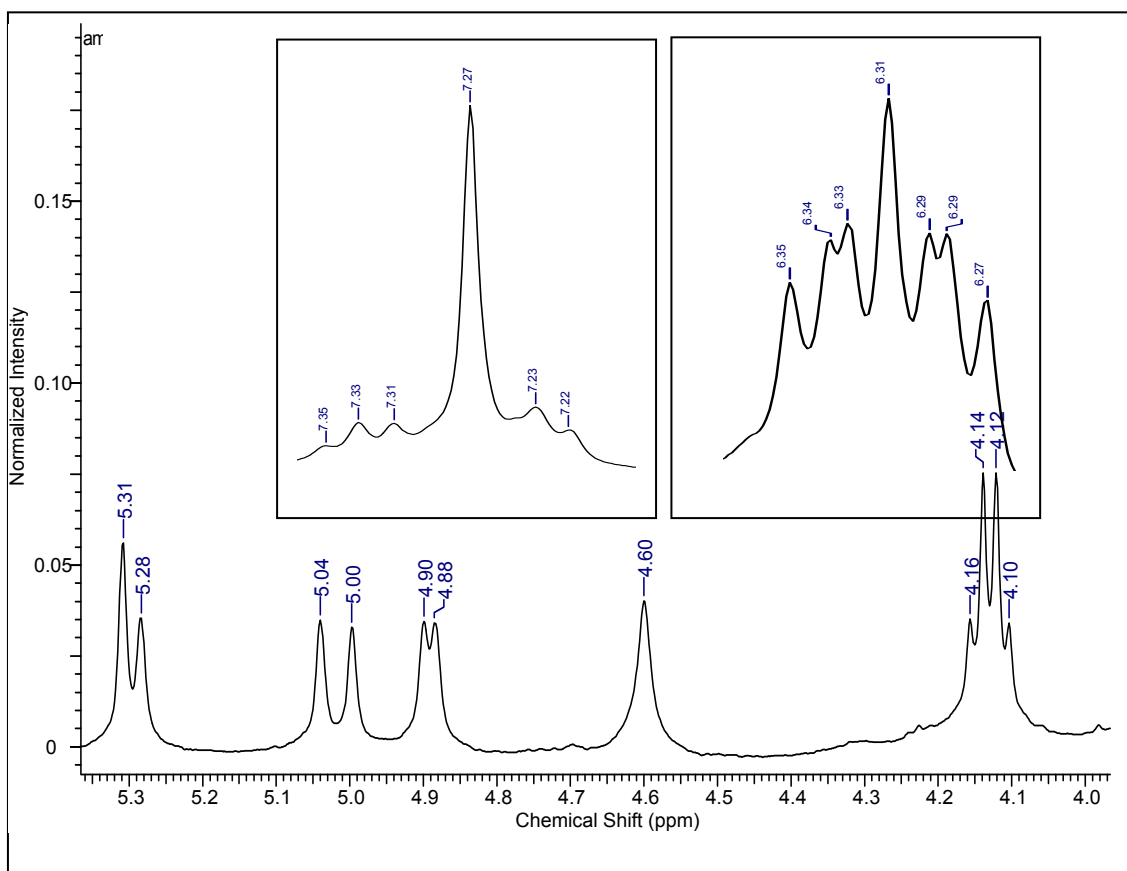
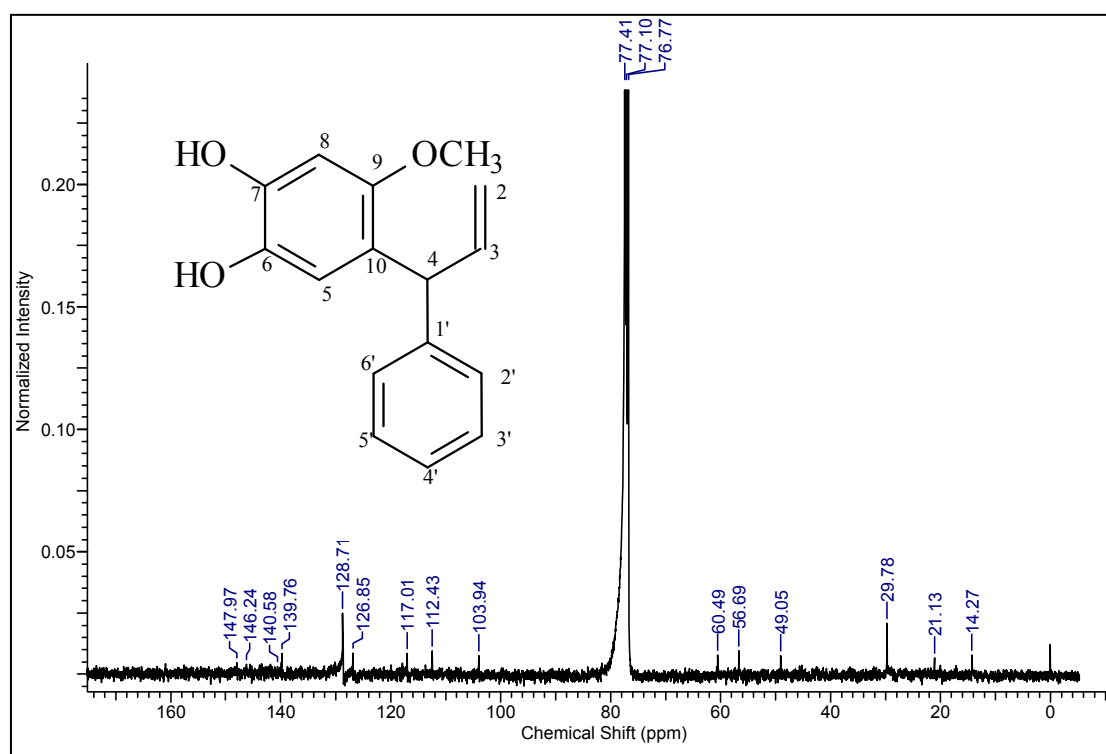
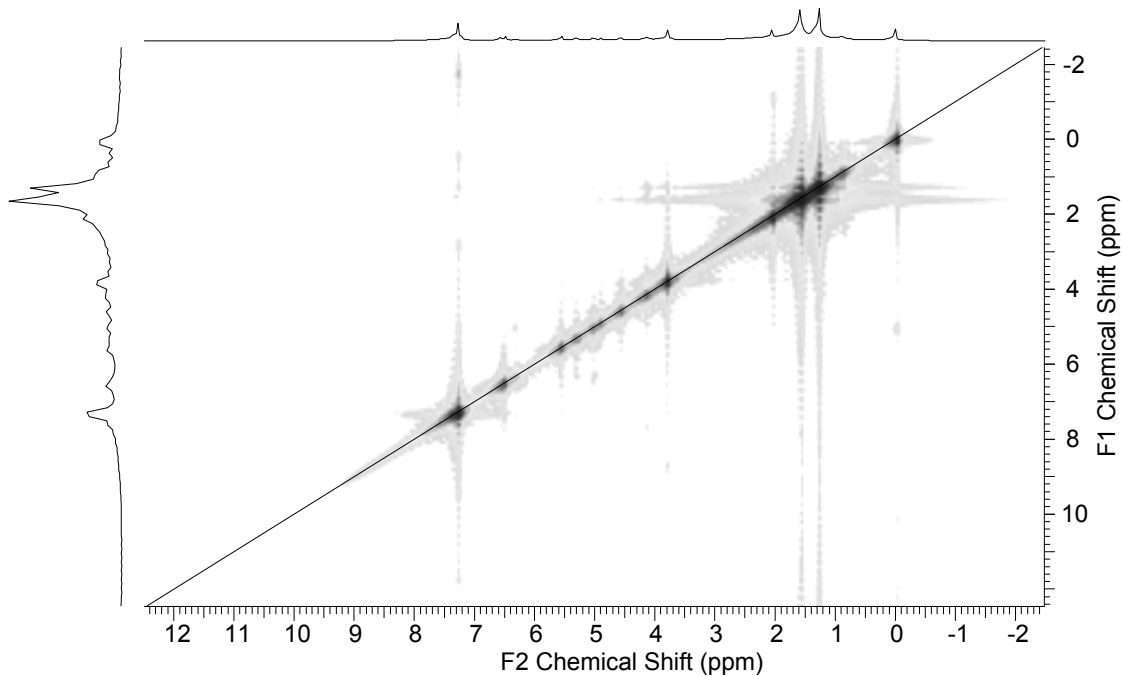


Figura 43 - Ampliação da região entre (4,1-5,3 ppm) espectro de RMN <sup>1</sup>H de DG-7.



**Figura 44** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -HBBB (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-7.



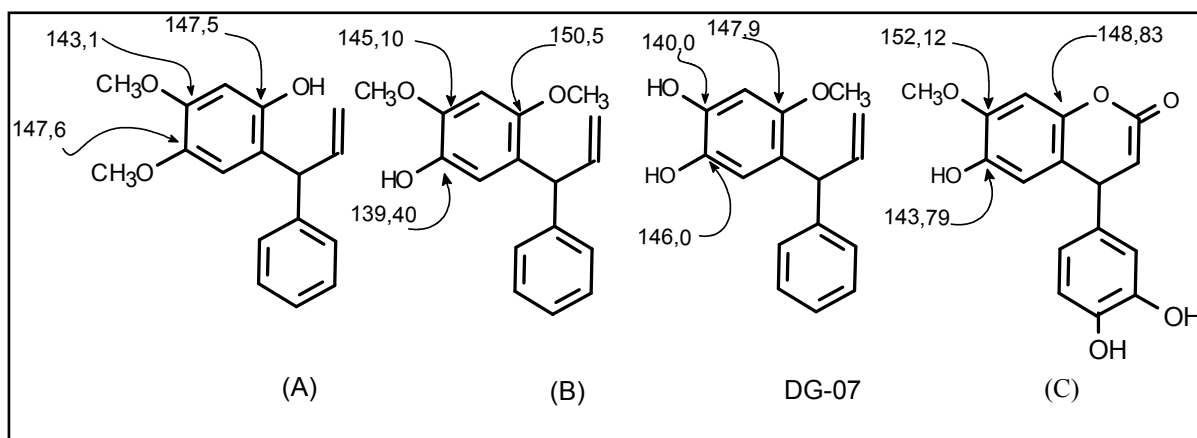
**Figura 45** - Mapa de correlação homonuclear  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (COSY) de DG-7.

O mapa de correlação heteronuclear (HMQC) (Figura 47, p. 106) e (HMBC) (Figura 48, p. 106) foram os de grande importância na determinação



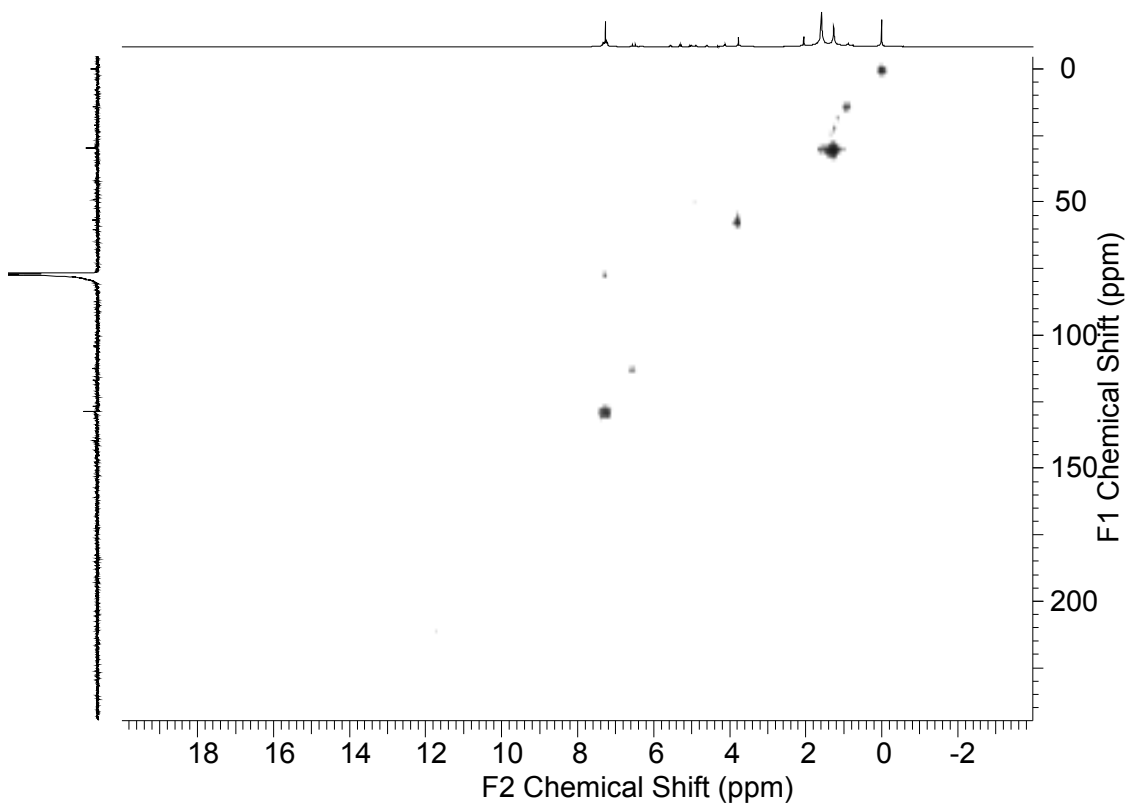
estrutural da substância. O posicionamento do grupo metoxila foi confirmado através da correlação heteronuclear a três ligações em que o sinal em  $\delta_C$  147,97 referente a (C-9) apresentou correlação com H-5 ( $\delta_H$  6,58), o sinal em  $\delta_H$  6,58 correlacionando a três ligações com  $\delta_C$  141,50 (C-1'), o sinal em  $\delta_C$  140,58 (C-6) correlacionando a duas ligações com H-5 ( $\delta_H$  6,58), o sinal em  $\delta_C$  140,58 (C-6) correlacionando a três ligações com H-5 ( $\delta_H$  6,58). Observando o conjunto dos dados (Tabela 12, p. 107) foi possível deduzir que a molécula em questão se trata de neoflavonóide do tipo dalbergifenol com fórmula molecular  $C_{16}H_{16}O_3$ .

A Figura 46 mostra similaridades e diferenças entre três substâncias com estruturas semelhantes a DG-7. Essas informações corroboram com a informação de que no espectro de RMN<sup>13</sup>C-HBBD (Figura 44, p. 104), onde só se observa um único sinal indicativo de metoxila, se houvesse outra metoxila na molécula deveria se observar um outro sinal nas proximidades do sinal em 56,50 ppm. Isso porque no grupo metoxila o átomo de carbono é trihidrogenado o espectro de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C apresentaria uma intensidade comparável ao sinal em 56,50 uma vez que os demais sinais de carbonos di, mono ou não hidrogenados apresentam intensidades menores. Ademais, se os sinal em 56,50 ppm fosse relativo a dois grupos metoxilas provavelmente sua intensidade seria ainda maior do que a apresentada no espectro de RMN<sup>13</sup>C-HBBD.

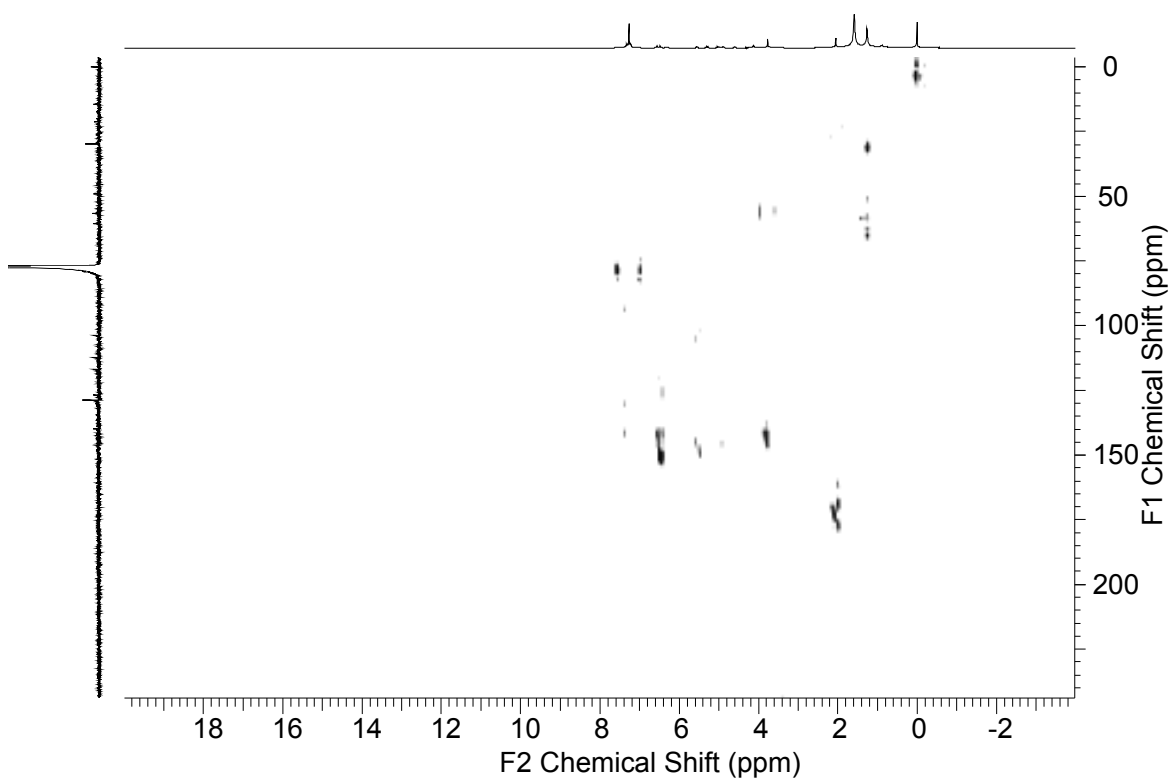


**Figura 46** - Similaridades e diferenças entre DG-7 e modelos da literatura:

Fonte: Agrawal, 1989; Garazd, *et. al.*; 2003.

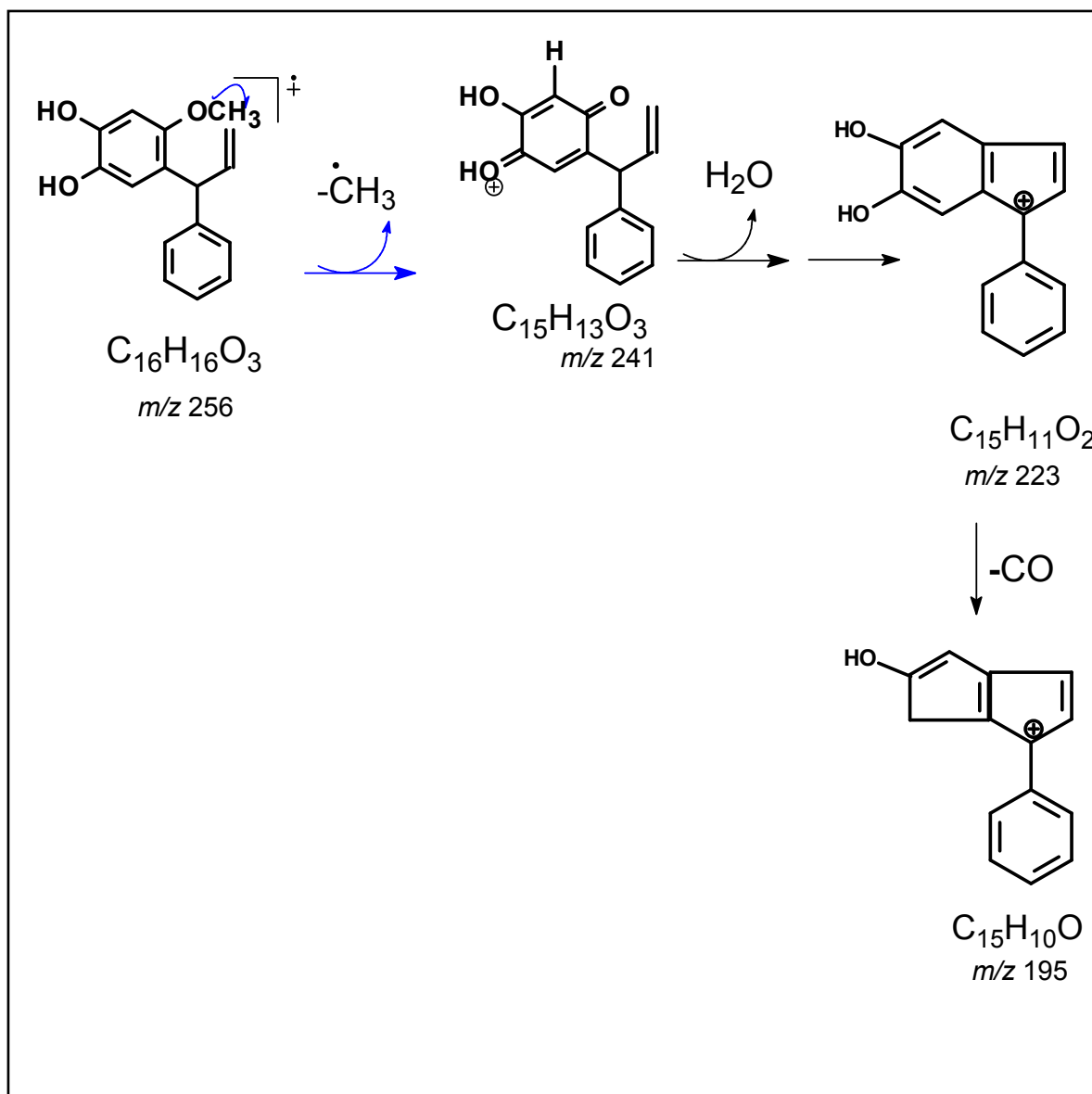


**Figura 47** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-7.



**Figura 48** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-7.

Pela análise do espectro de massas observou-se o pico molecular em  $m/z$  256. Observa-se ainda os fragmentos em  $m/z = 241$ ; 223; 195 relativo a perda de um grupo metila; a perda de  $H_2O$  e a perda de  $CO$  respectivamente. O Esquema 11, mostra a proposta para alguns fragmentos de massas para a estrutura proposta.



**Esquema 11** - Proposta para alguns fragmentos de massas de DG-7.

**Tabela 12** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substância DG-7 e dados da literatura.

C	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$		Dalbergifenol*
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$
6	140,58	-	-	-	139,40
7	146,24	-	H-5 <sup>a</sup>	-	145,10
9	147,97	-	-	OCH <sub>3</sub> -9, H-5	150,50
10	124,00	-	-	H-8	124,70
1'	141,5	-	-	-	143,30
<b>CH</b>					
3	139,76	6,31 (m)	-	H2' e H6'	140,40
4	49,05	4,89 (d, $J=8,0$ )	-	H-5	47,00
5	112,43	6,58	-	-	115,30
8	103,94	6,48	-	-	97,50
2'	128,71	7,32	-	-	128,00
3'	126,85	7,21	-	-	128,40
4'			-	-	125,80
5'	126,85	7,21	-	-	128,40
6'	128,71	7,32	-	-	128,00
<b>CH<sub>2</sub></b>					
2	117,01	5,02 e 5,29	-	-	115,7
<b>CH<sub>3</sub></b>					
OCH <sub>3</sub> -9	56,69	3,75	-	-	56,1 e 56,9

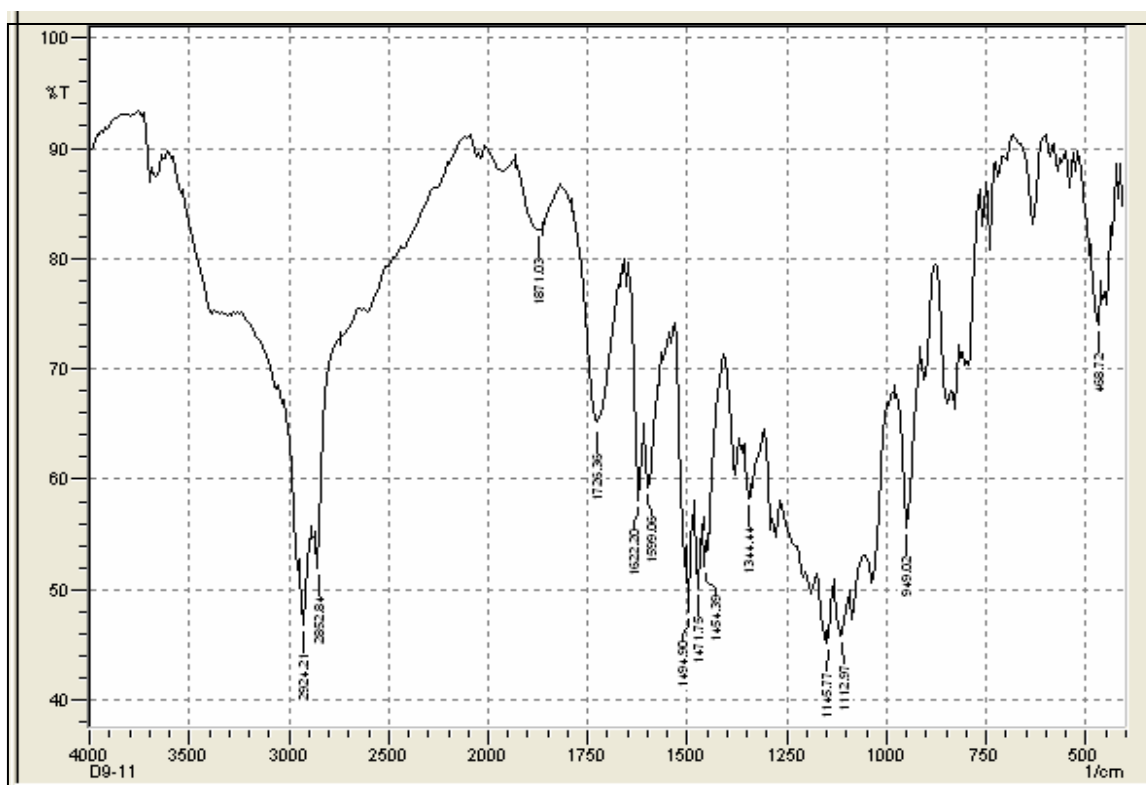
Fonte: \* (Agrawal, 1989).

Como relatado anteriormente, a substância DG-7 não foi descrita na literatura, porém, encontrou-se relatado em um artigo de de Sekine e colaboradores (2009) informações a respeito de atividades biológicas atribuídas a uma substância com esqueleto muito semelhante a DG-7, substância isolada de *D. latifolia* (6-hidroxi-7,9-dimetoxi-dalbergifenol, B, Figura 46, p. 105). O artigo citado indica que essa substância apresentou alta atividade antifúngica contra *Fomitopsis palustris*, fungo que causa podridão parda (doença de apodrecimento da madeira), *Rhizopus oryzae* e *Cladosporium cladosporioides*. Encontra-se descrito por (Ren-Bo-Na, et al.;2008) que a substância foi testada quanto a sua atividade antioxidante em células HT22 e esta se apresentou com um potente efeito protetor a injúrias oxidativas, podendo ter atividade neuroprotetora.

#### 4.7 - Determinação Estrutural de DG-8

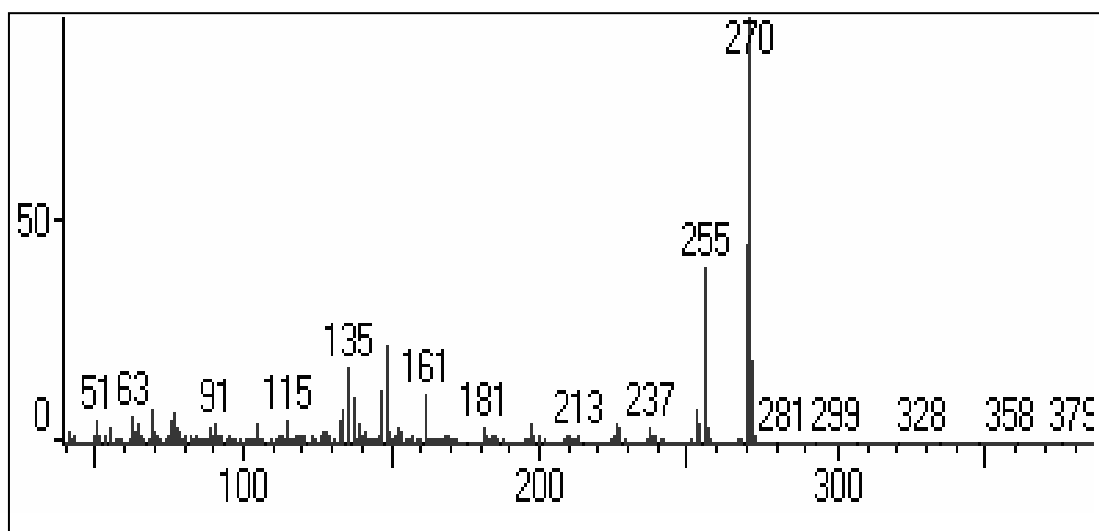
A substância DG-8 foi isolada do extrato diclorometânico na forma de um sólido esbranquiçado, que por CCDA apresentou-se como uma única mancha de coloração vermelha ao ser revelada com vanilina sulfúrica, com ponto de fusão em 99,5 °C.

Pela análise do espectro na região do infravermelho (Figura 49) foi possível observar alguns sinais característicos para a substância: uma banda larga de estiramento de O-H em torno de 3400  $\text{cm}^{-1}$ , estiramento de C-H em 2924 e 2852  $\text{cm}^{-1}$ , é possível observar as bandas referentes a estiramento C=C do anel em 1622, 1599, 1495 e 1471  $\text{cm}^{-1}$ . Em 1344  $\text{cm}^{-1}$  observa-se a deformação angular no plano de O-H. Em torno de 1145  $\text{cm}^{-1}$  verifica-se o estiramento assimétrico C-O-C (Crews, *et. al.*, 1998).



**Figura 49** - Espectro na região do IV da substância DG-8.

Pela análise através de CGEM foi possível registrar o espectro de massas da substância DG-8 (Figura 50, p. 109) foi possível a observação do pico do íon molecular em  $m/z = 270$ , além de alguns fragmentos de massas da amostra em questão.



**Figura 50** - Espectro de massas a 70 eV de DG-8.

Pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 51, p. 110) observa-se alguns sinais como: um sinal simples em  $\delta_{\text{H}}$  3,78 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>) indicativo da presença de um grupo metoxila. Um sinal múltiplo centrado em torno de  $\delta_{\text{H}}$  3,56  $J = 8,0$  Hz e 4Hz (H-3). O sinal múltiplo centrado em  $\delta_{\text{H}}$  3,63  $J = 12$  e 12 Hz referente ao (H-2 $\alpha$ ). Observou-se um sinal múltiplo centrado em  $\delta_{\text{H}}$  4,24 e ( $J = 8,0$  e 4,0 Hz) referente ao (H-2 $\beta$ ). Dois sinal duplos centrados em:  $\delta_{\text{H}}$  5,50 ( $J = 4,0$  Hz) referente ao (H-4) e 5,92 ( $J = 8,0$  Hz) referente a (H-3'). Além de quatro sinais duplos centrados: em  $\delta_{\text{H}}$  6,46 referente aos átomos (H-8 e H-5') com  $J = 8$  Hz e em  $\delta_{\text{H}}$  6,57 referente ao H-6 ( $J = 8$  Hz), em  $\delta_{\text{H}}$  7,14 ( $J = 8,0$  Hz) referente ao H-6' e em  $\delta_{\text{H}}$  7,40 ( $J = 8,0$  Hz) referente a H-5.

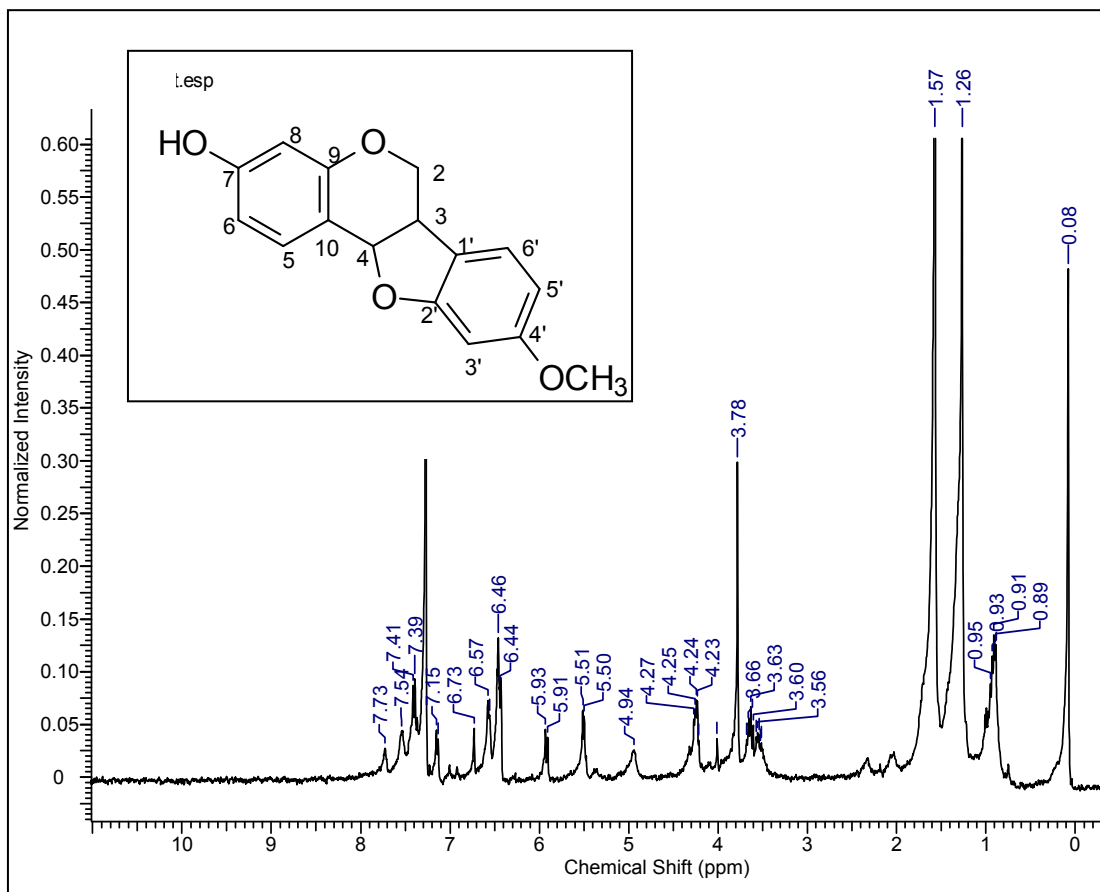


Figura 51 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-8.

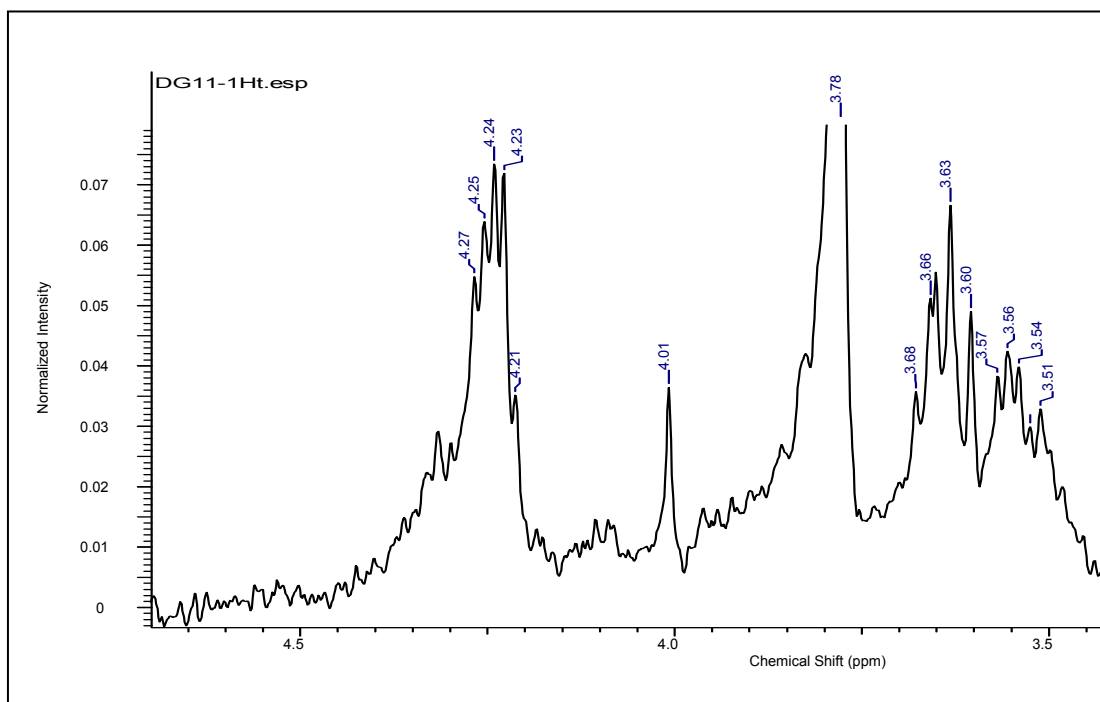
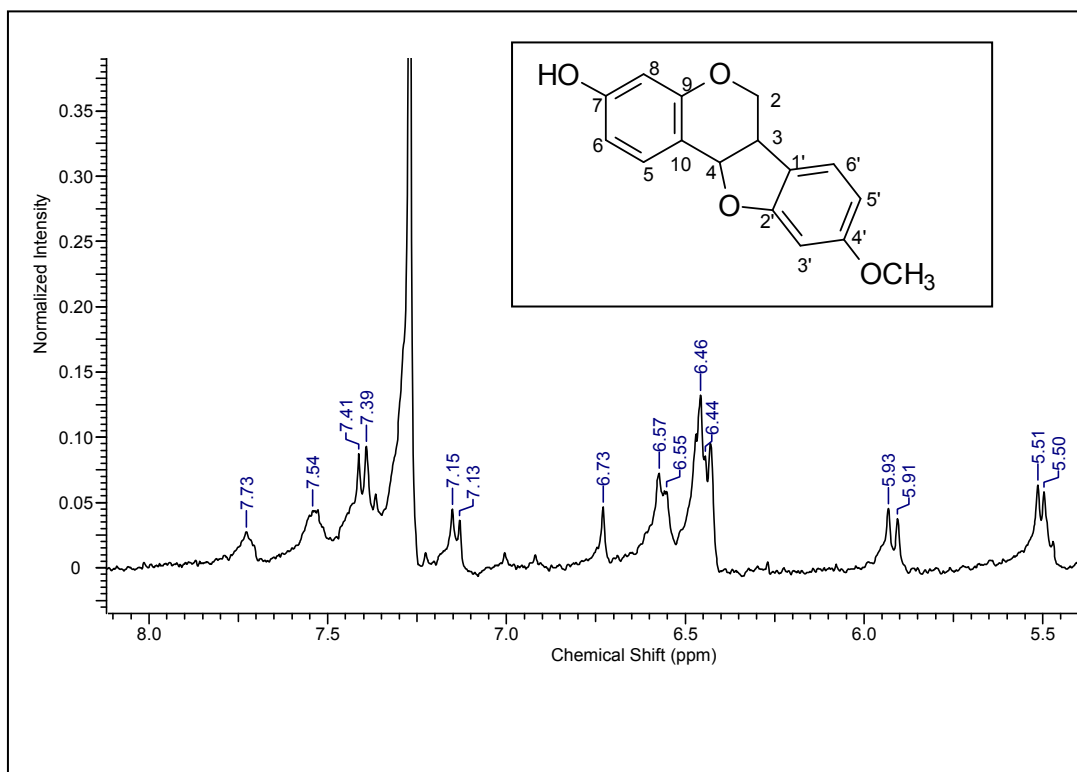


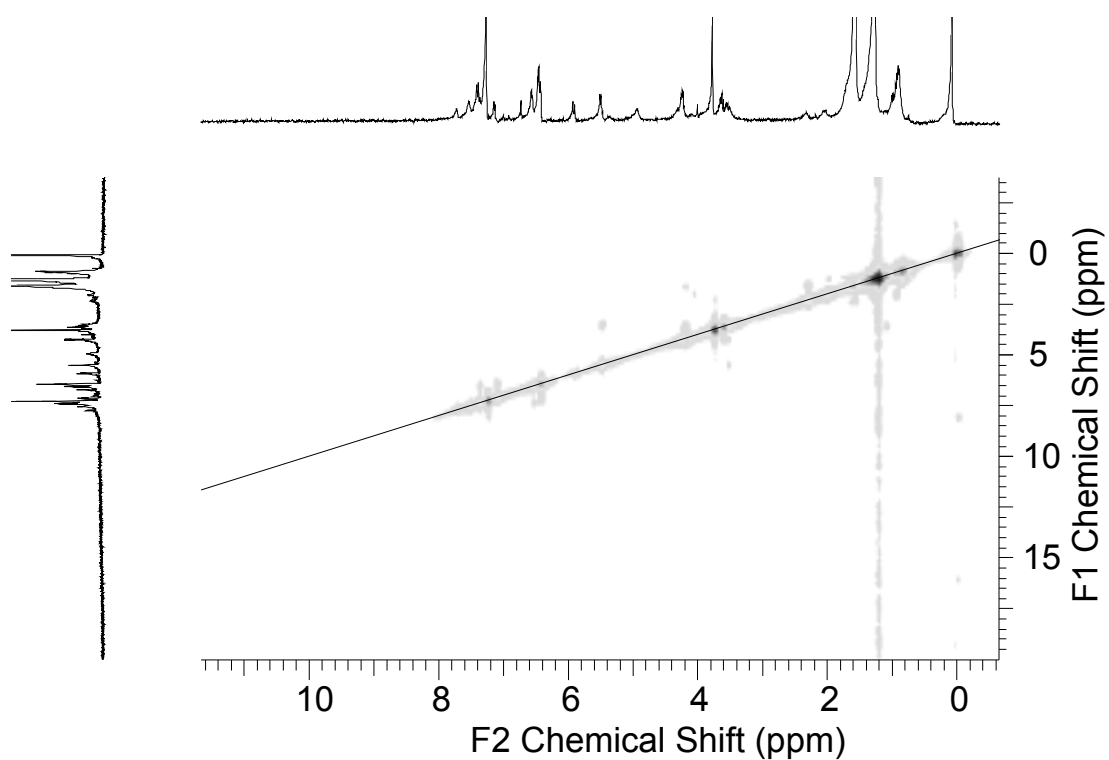
Figura 52 - Ampliação da região entre (3,50-4,50 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de DG-8.



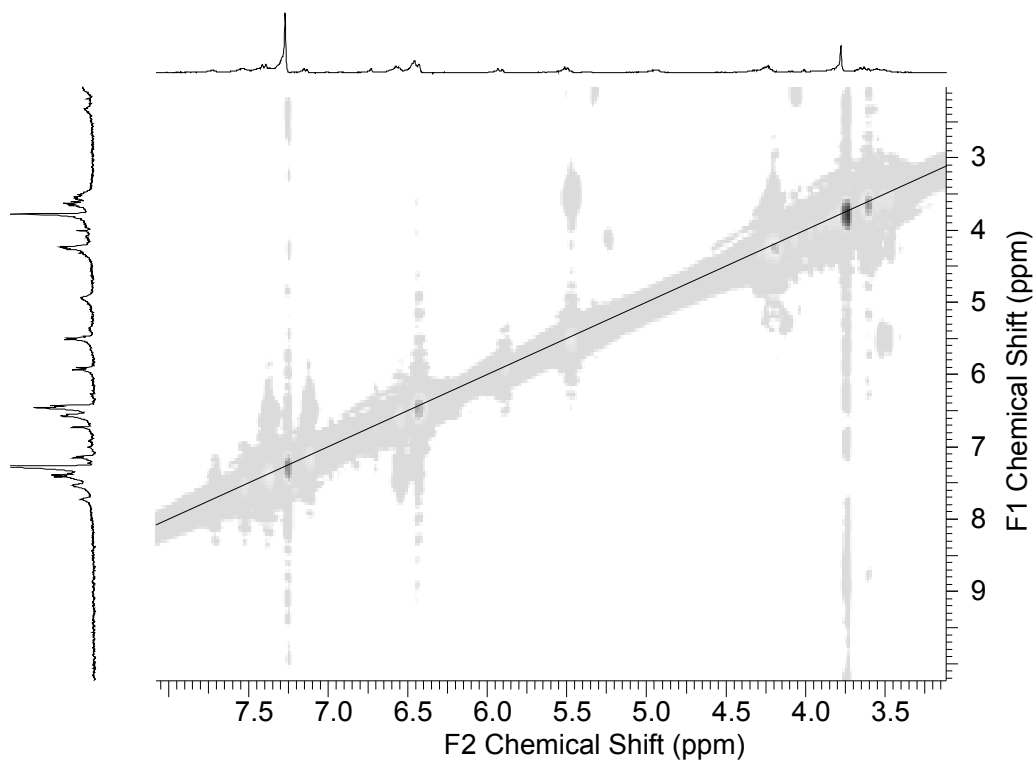
**Figura 53** - Ampliação da região entre (5,50-8,0 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de DG-8.

Pelo mapa de correlação homonuclear COSY (Figura 54, P. 112) e as ampliações de algumas regiões (Figura 51 e 52, p. 112 E 113) foi possível verificar a correlação entre os sinais  $\delta_{\text{H}}$  3,56 (H-3) com  $\delta_{\text{H}}$  4,24 (H-2 $\beta$ ) que segundo a literatura possuem deslocamentos químicos em torno de 3,40 ppm para H-3 e 4,10 ppm para H -2 ( $\alpha$  e  $\beta$ ) (Choei., *et. al.*; 2009). Observou-se as correlações indicativas do acoplamento dos sinais  $\delta_{\text{H}}$  3,56 (H-3) com  $\delta_{\text{H}}$  5,50 (H-4);  $\delta_{\text{H}}$  6,57 referente ao (H-6) com  $\delta_{\text{H}}$  7,40 (H-5) e finalmente  $\delta_{\text{H}}$  6,57 referente ao(H-5') com  $\delta_{\text{H}}$  7,14 (H-6').

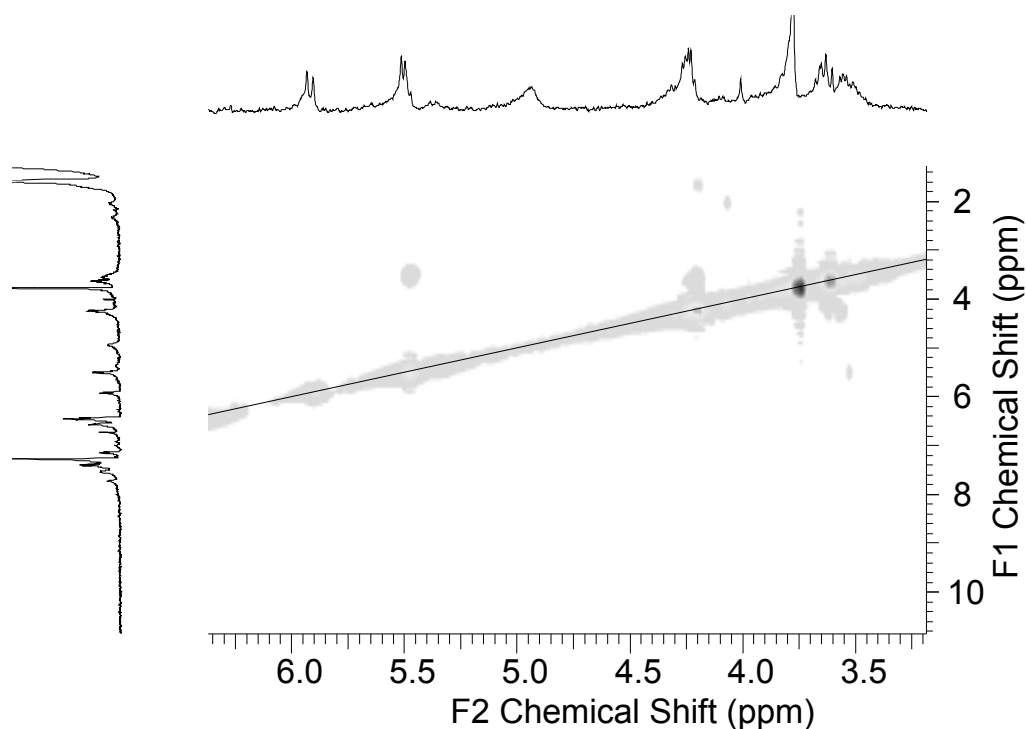




**Figura 54** - Mapa de correlação homonuclear <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H (COSY) de DG-8.

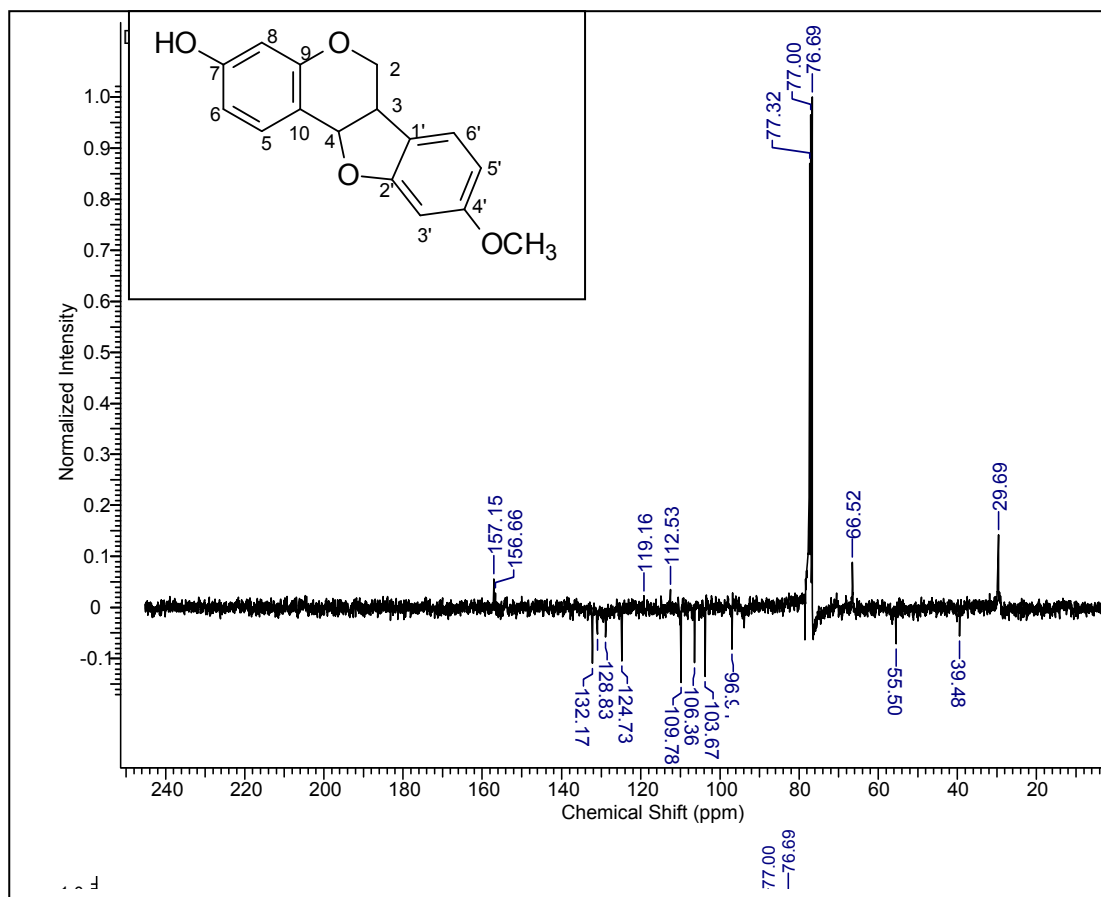


**Figura 55** - Ampliação do Mapa de correlação homonuclear <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H COSY) de DG-8.



**Figura 56** - Ampliação do Mapa de correlação homonuclear <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H (COSY) de DG-8.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C-PENDANT (Figura 57, p. 114) permitiu reconhecer alguns sinais correspondentes a átomos de carbono não hidrogenados  $\delta_C$  112,53 (C-10);  $\delta_C$  112,53 (C-1');  $\delta_C$  157,15 (C-7) e  $\delta_C$  156,66 (C-9). Além do sinal em  $\delta_C$  39,58 referente a carbono monoidrogenado (C-3), do sinal de carbono diidrogenado em  $\delta_C$  66,52 (C-2) e o sinal em  $\delta_C$  55,50 referente a grupo metoxila. Pelo mapa de correlação heteronuclear HMBC foi possível identificar mais um sinal referente a carbono não hidrogenado em  $\delta_C$  164,50 (C-4').



**Figura 57** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -PENDANT (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-8.

Pelo HMQC (Figura 58, p. 115) foi verificado os hidrogênios que estão diretamente ligados aos átomos de carbono: C-4  $\delta_{\text{C}}$  77,32 com H-4  $\delta_{\text{H}}$  5,50; C-5'  $\delta_{\text{C}}$  106,36 com H-5'. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  96,91 (C-3') com H-3'  $\delta_{\text{H}}$  6,41; o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  66,52 (C-3) com  $\delta_{\text{H}}$  3,56 (H-3), o sinal do carbono da metoxila  $\delta_{\text{C}}$  55,50 com os seus átomos de hidrogênios  $\delta_{\text{H}}$  3,78.

Pelo mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 59, p. 115) e a ampliação do espectro (Figura 60, p. 116) foi possível observar correlação do carbono não hydrogenado em  $\delta_{\text{C}}$  164,50 (C-4') com o sinal dos hidrogênios do grupamento metoxila em 3,78 ppm tratando-se de uma correlação a três ligações.

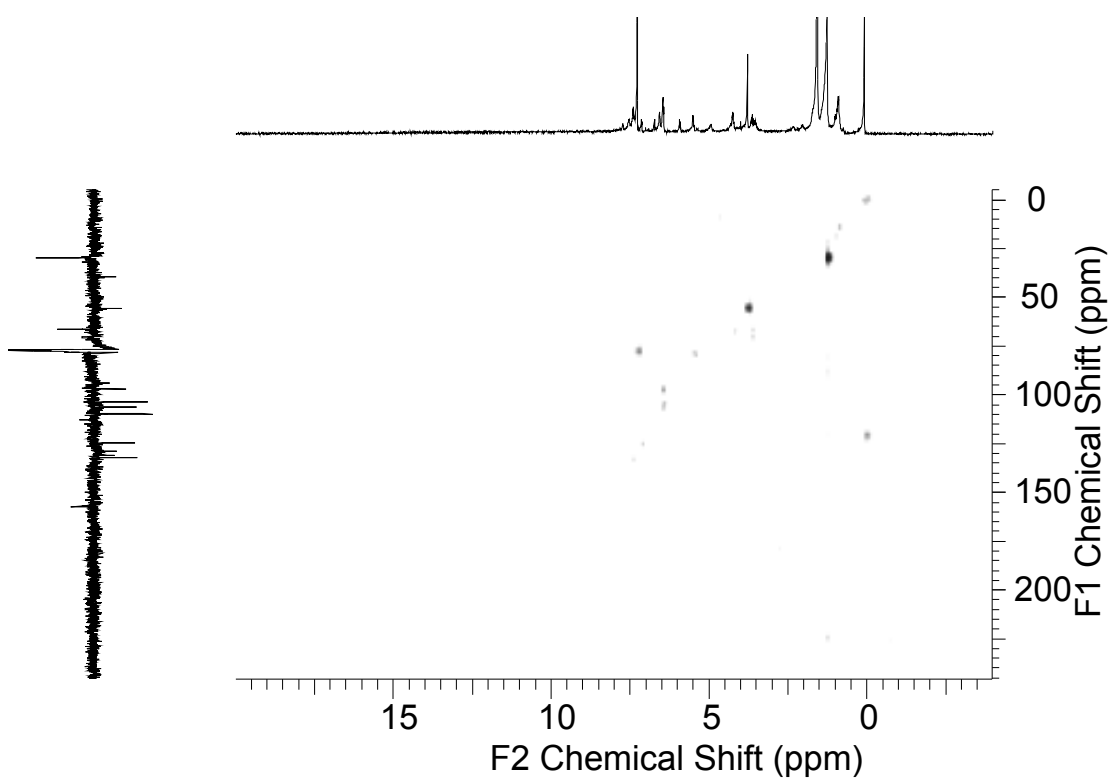


Figura 58 - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-8.

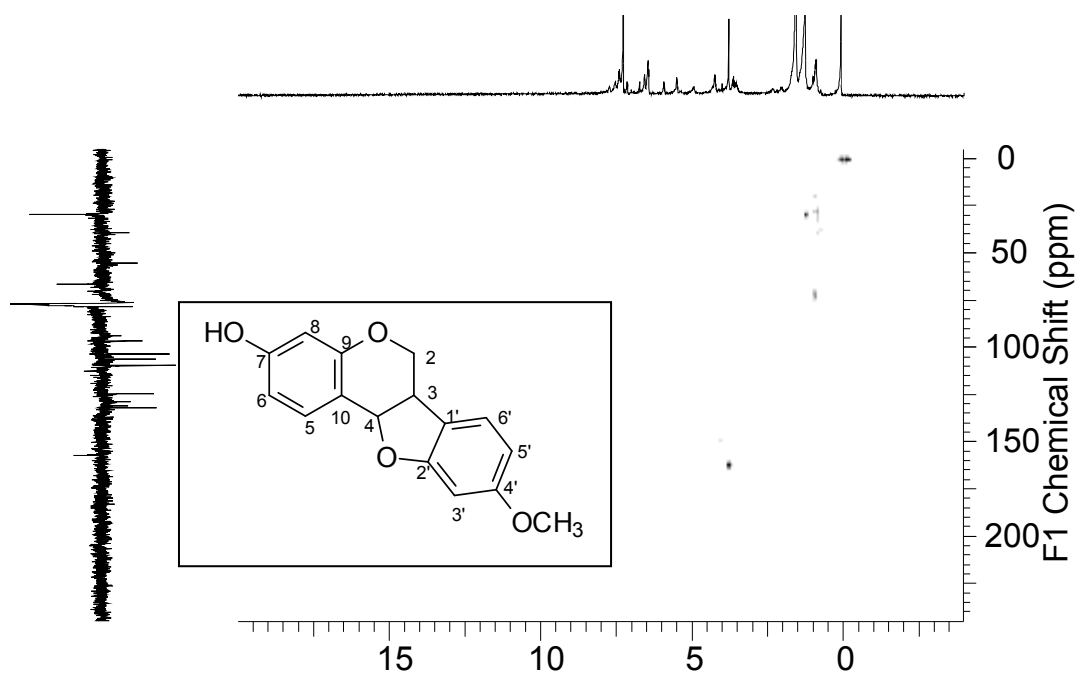
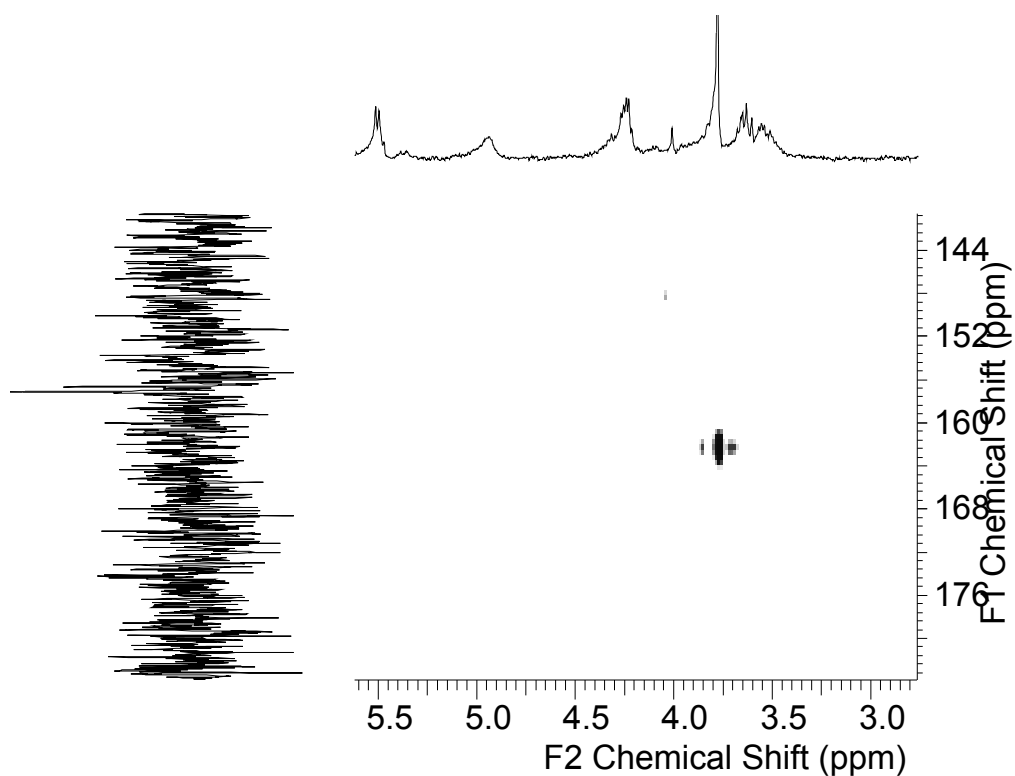
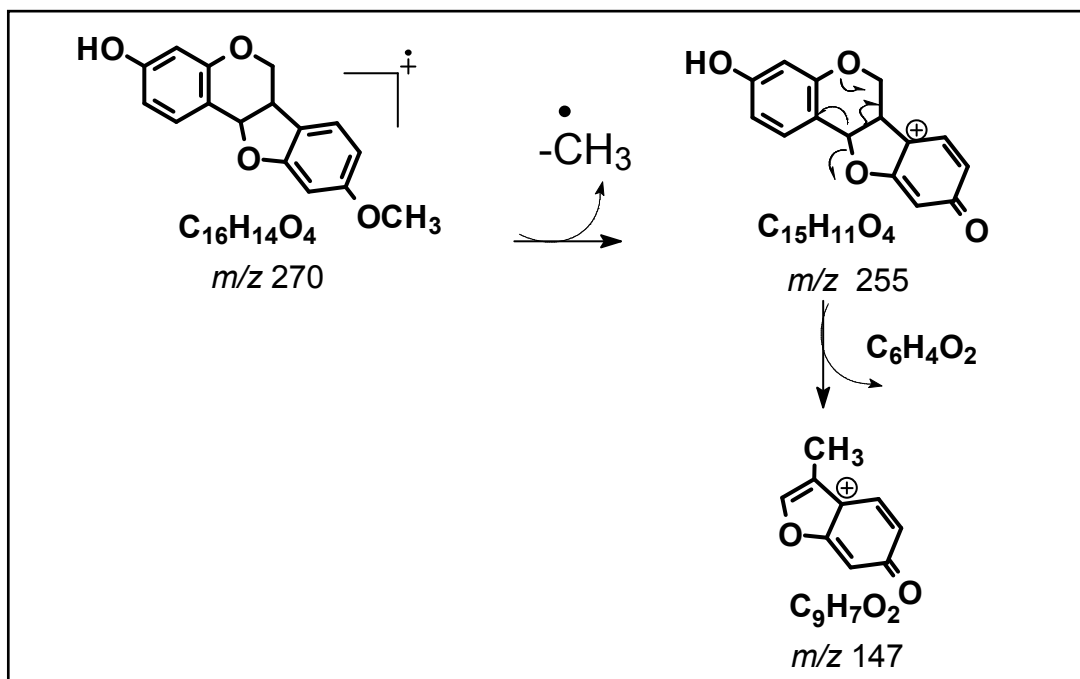


Figura 59 - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-8.



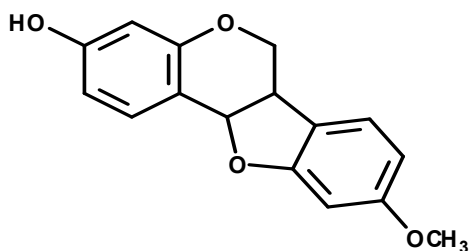
**Figura 60** - Ampliação do Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-8.

O Esquema 12 apresenta alguns fragmentos de massas característicos de DG-8.



**Esquema 12** - Proposta de fragmentos de massas para a substância DG-8.

Deste modo, os dados obtidos pelos espectros de RMN a uma e duas dimensões somado as informações do espectro de massas permitiram definir para DG-8 a estrutura do pterocarpano conhecido como medicarpina cuja formula estrutural é  $C_{16}H_{14}O_4$ .



A medicarpina segundo relatado na literatura (Demuner, *et. al.*, 2003) apresenta atividade nematicida contra *M. incógnita*. Pode induzir apoptose em fibroblastos de pulmão e células mononucleares de sangue periférico (Liu, *et. al.*, 2002) e também efeitos antimitóticos (Militão, *et. al.*, 2005).

Atividade antimicrobiana especialmente antifúngica e ainda atividade antioxidante (Trusheva, *et. al.*, 2004). Segundo Chun, *et. al.*, (2009) foram testados alguns flavonóides isolados de *Dalbergia odorifera*, entre eles a medicarpina, que apresentou alto potencial citotóxico contra linhagens de células tumorais.

**Tabela 13** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância DG-8 e comparação com dados da literatura.

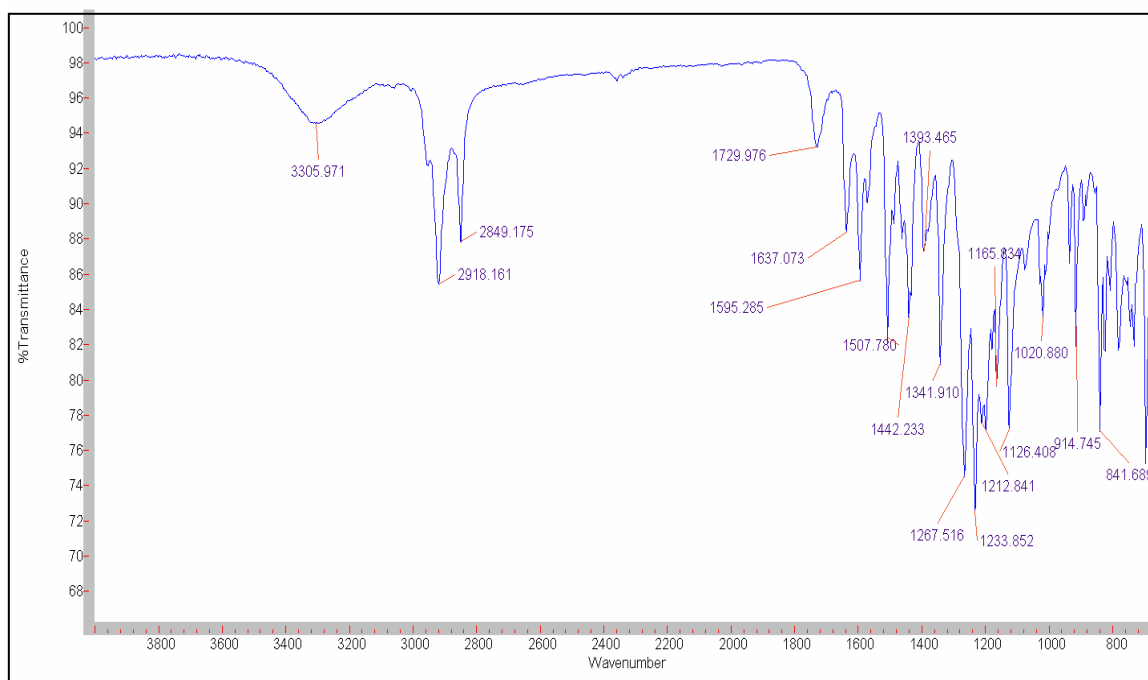
C	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$		Medicarpina *	
	$\delta_{\text{C}}$		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
7	157,15	-	-	-	156,90	-
9	156,66	-	-	-	156,50	-
10	112,53	-	-	-	112,50	-
1'	119,16	-	-	-	119,00	-
2'	-	-	-	-	160,50	-
4'	164,50	3,78	164,50	3,78	161,00	-
<b>CH</b>						
3	39,48	3,56	-	-	39,70	3,52
4	78,64	5,50	-	-	78,40	5,48
5	132,17	7,40	-	-	132,10	7,37
6	109,78	6,57	-	-	109,60	6,54
8	103,67	6,46	-	-	103,60	6,44
3'	96,91	6,41	-	-	96,80	6,40
5'	106,46	6,46	-	-	106,30	6,44
6'	124,73	7,14	-	-	124,60	7,12
<b>CH<sub>2</sub></b>						
2	66,62	3,63 e 4,24	-	-	66,40	3,61 e 4,23
<b>CH<sub>3</sub></b>						
OCH <sub>3</sub>	55,50	3,78	-	-	55,40	3,76

Fonte: \* Demuner, *et. al.*, (2003).

#### 4.8 - Determinação Estrutural de DG-9

A substância DG-9 foi isolada diretamente do extrato diclorometânico na forma de um pó amarelo solúvel em clorofórmio e que apresentou pureza confirmada através de análise por CCDA, a mancha se apresentou de coloração amarela ao ser revelada com vanilina sulfúrica. Esta substância apresentou ponto de fusão de  $174,8 \pm 0,9$  °C.

Pela análise do espectro na região do infravermelho (Figura 61) foi possível observar algumas absorções: um estiramento de O-H em  $3305\text{ cm}^{-1}$ , bandas referentes ao estiramento de C-H em  $2918$  e  $2849\text{ cm}^{-1}$ , é possível observar as bandas de formação axial de C=C do anel em  $1637$ ,  $1595$  e  $1507\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1393\text{ cm}^{-1}$  observa-se a deformação angular no plano de O-H. Em torno de  $1267\text{ cm}^{-1}$  verifica-se o estiramento assimétrica C-O-C.

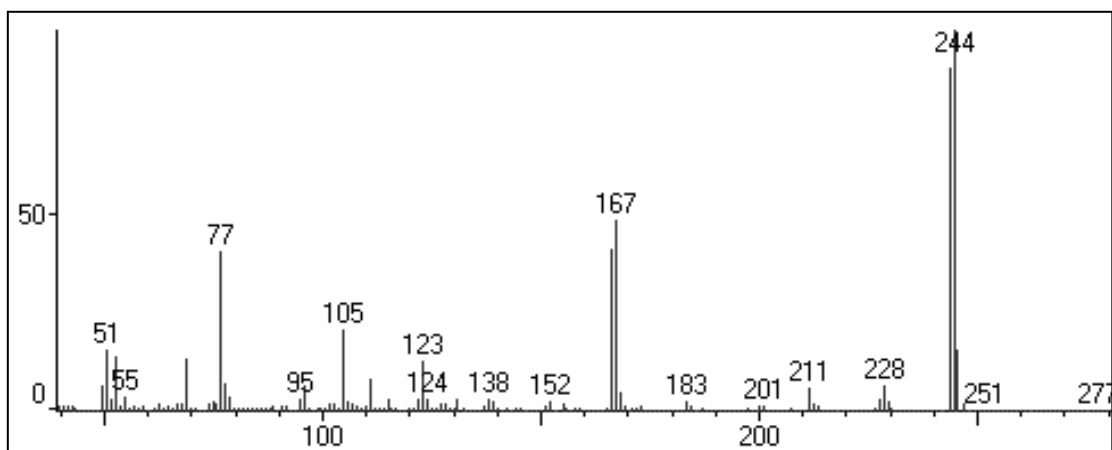


**Figura 61** - Espectro de IV da substância DG-9.

Através de CG/EM obtve-se o espectro de massas (Figura 62, p. 120) onde foi possível observar o pico do íon molecular  $m/z = 244$ .

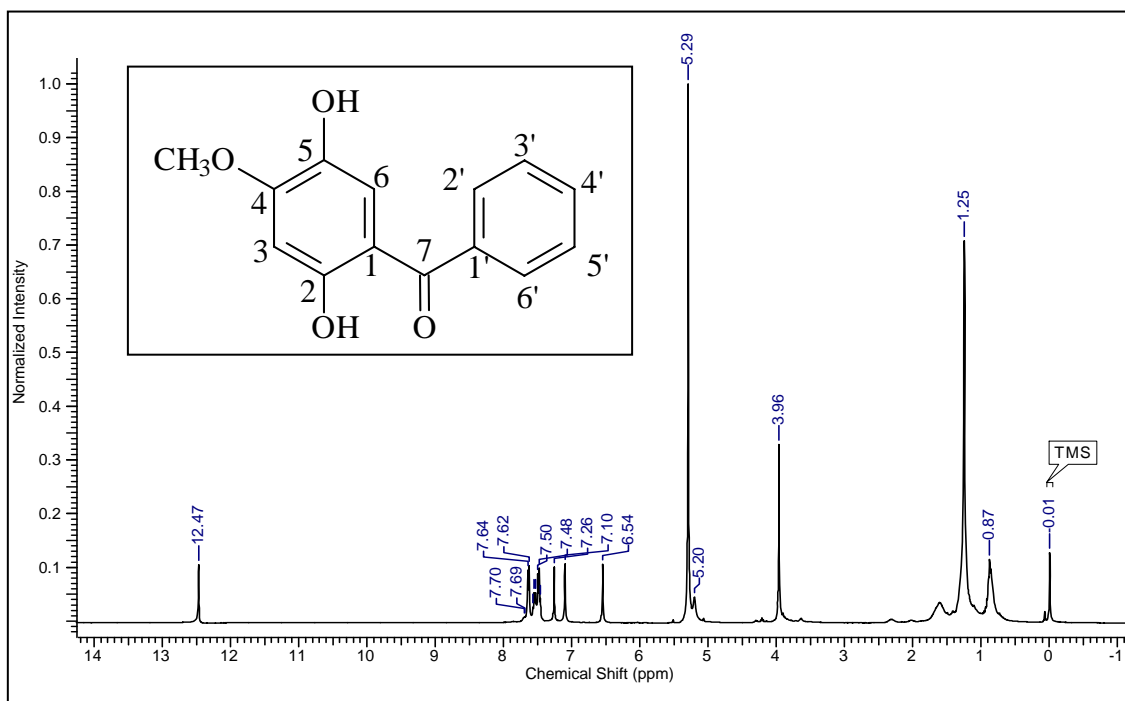


ponte com a carbonila.

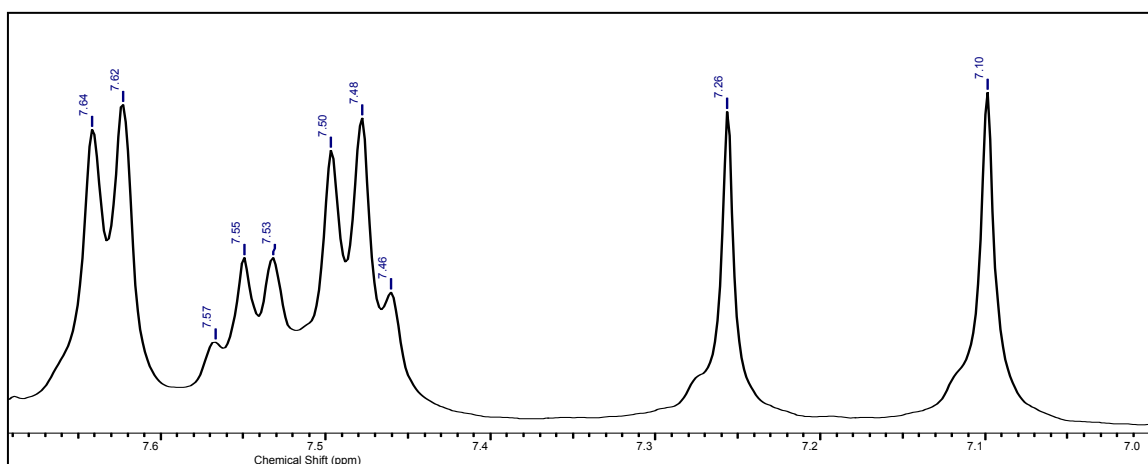


**Figura 62** - Espectro de massas 70 eV de DG-9.

Através da ampliação do espectro (Figura 64, p. 121) foi possível observar o sinal em  $\delta_H$  5,29 de hidrogênio carbinólico (5-OH). E ainda, foi possível observar sinais referentes ao anel B como os sinais múltiplos centrados em  $\delta_H$  7,63 ( $J = 20$  Hz) (H'-2 e H-6') e em  $\delta_H$  7,49 ( $J = 20$  Hz) referente aos hidrogênios (H-3', H-4' e H-5').

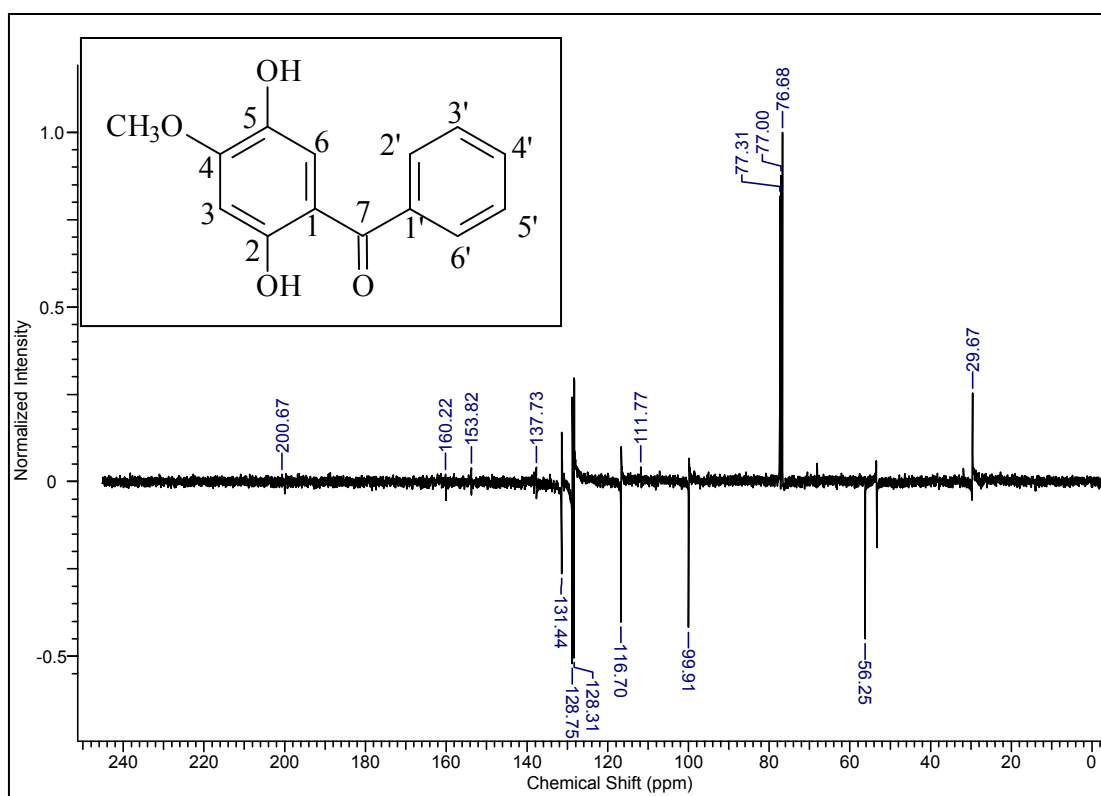


**Figura 63** - Espectro de RMN  $^1H$  ( 400 MHz,  $CDCl_3$ ) de DG-9.



**Figura 64** - Ampliação da região entre (7,0-7,70 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de DG-9.

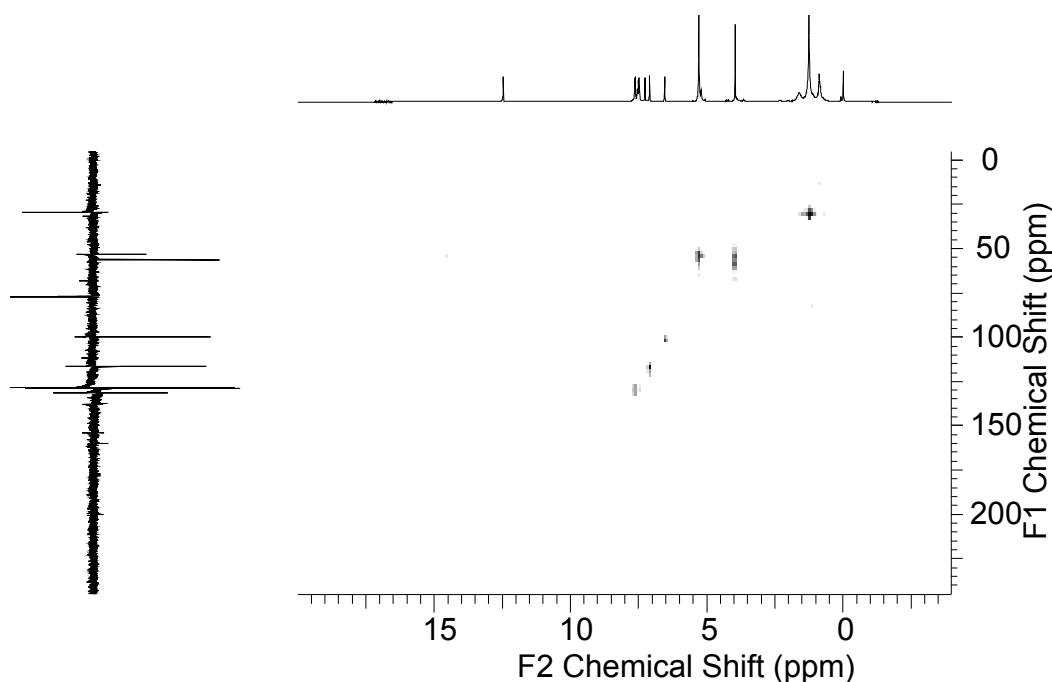
Pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -PENDANT (Figura 65) observou-se quinze sinais sendo oito deles representando sinais de carbonos dihidrogenados e carbonos não-hidrogenados e sete sinais representando sinais de carbonos monoidrogenados e carbonos trihidrogenados. Observou-se um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  56,25 referente a grupamento metoxila, e ainda os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  (128,31; 128,75 e 131,44) que são bem característicos de carbonos aromáticos de anel B não-substituído.



**Figura 65** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -PENDANT (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-9.

Pelo mapa de correlação heteronuclear (HMQC) (Figura 66), foi possível correlacionar os hidrogênios que estariam ligados diretamente a átomos de carbono: C-3 ( $\delta_C$  100) com H-3 ( $\delta_H$  6,54); C-6 ( $\delta_C$  99,91) com H-6 ( $\delta_H$  7,10); C-2' e C-6' ( $\delta_C$  128,31 e 128,75) com H-2' e H-6' ( $\delta_H$  7,63); C-3' e C5' correlacionando com H-3' e H-5' ( $\delta_H$  7,54); C-4' ( $\delta_C$  131,44) correlacionando com H-4' ( $\delta_H$  7,54).

As correlações entre átomos de hidrogênios e carbonos a mais de uma ligação foram obtidas através da observação do mapa de correlação heteronuclear (HMBC) (Figura 67, p. 123) cujos dados completos encontram-se na (Tabela 14). Através destes dados foi possível inferir que DG-9 se tratava da substância 2,5-diidroxi-4-metoxibenzofenona. A Tabela 14, p.125 apresenta os todos os dados obtidos das análises dos espectros de DG-9 a uma e duas dimensões além da comparação com dados da literatura.



**Figura 66** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMQC) de DG-9.

Os dados obtidos da interpretação dos espectros de RMN que nos permitiu deduzir a fórmula molecular  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$  condizem com o padrão de fragmentação observado no espectro de massas. O Esquema 13, p. 124 apresenta uma proposta para alguns fragmentos compatíveis com a estrutura identificada.

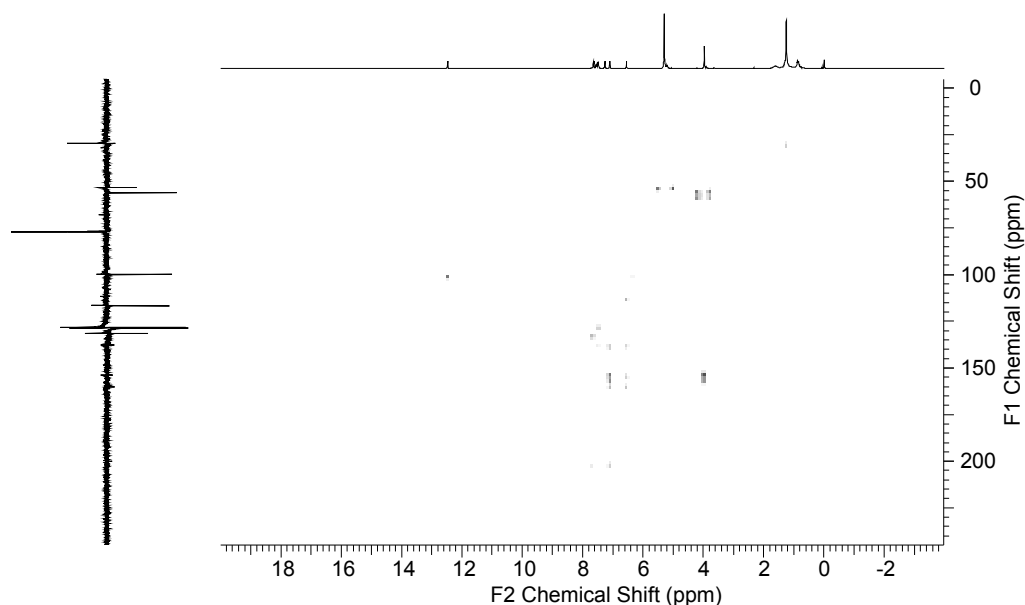
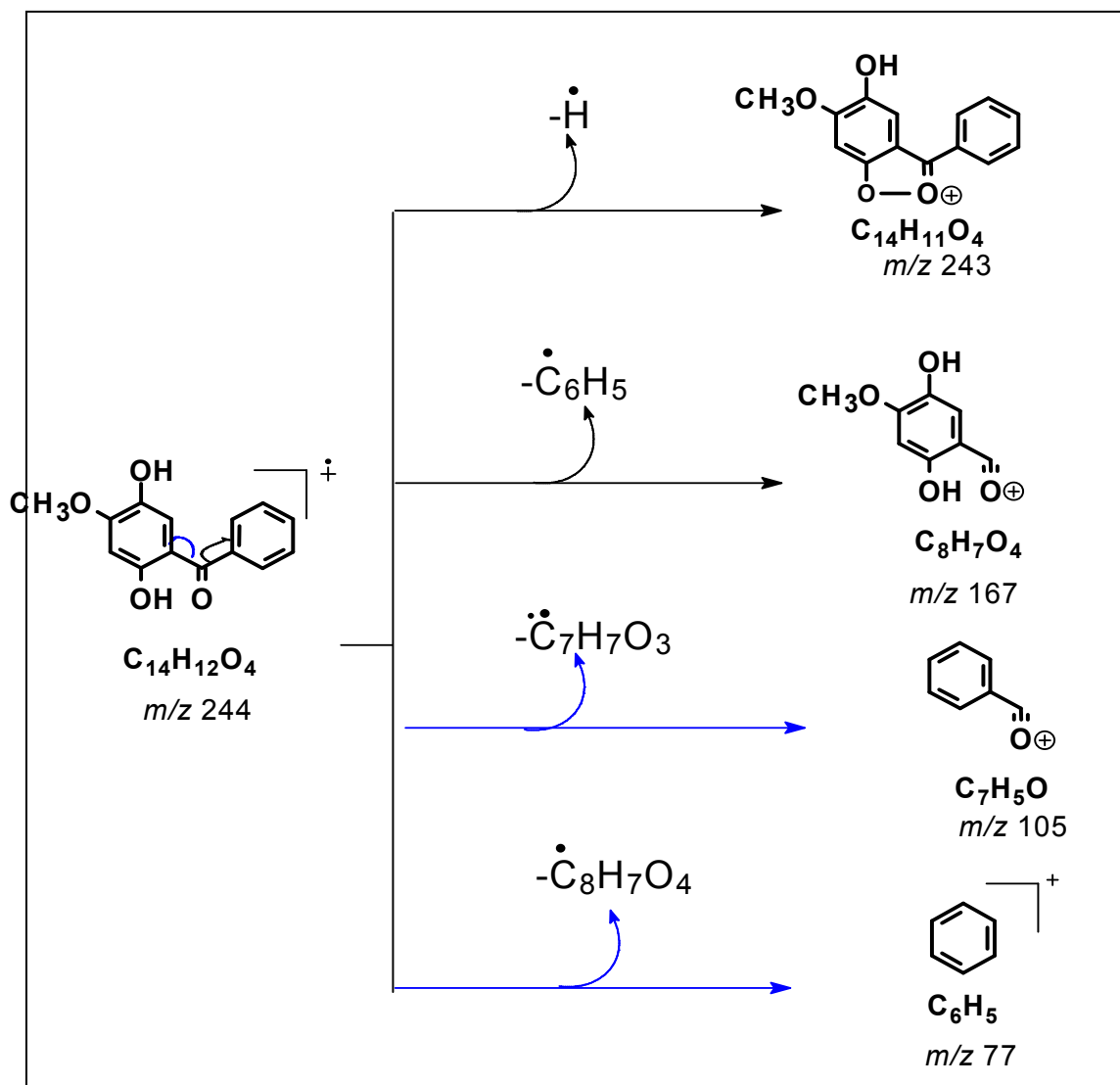


Figura 67 - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-9.

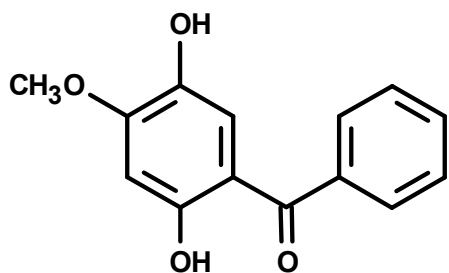
Tabela 14 - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substância DG-9 e comparação com dados da literatura.

	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$		Cearoína*
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	111,77	-	-	HO-2, H-3	111,8
2	160,22	-	HO-2, H-3	H-6	160,1
4	153,82	-	H-3	$\text{CH}_3\text{O}-4$ , H-6	137,8
5	137,8	-	H-6	H-3	153,6
7	200,67	-	-	H-6, H-2'/H-6'	200,0
1'	137,73	-	-	H-3'/H-5'	138,3
<b>CH</b>					
3	99,91	6,54	-	HO-2	99,9
6	116,70	7,10	-	-	116,7
2'	128,31	7,6 3(m)	-	H-4'	128,3
3'	128,75	7,48 (m)	-	-	128,7
4'	131,44	7,54 (m)	-	H-2'/H-6'	131,4
5'	128,75	7,48 (m)	-	-	128,7
6'	128,31	7,6 3(m)	-	H-4'	128,3
<b>CH<sub>3</sub></b>					
5	56,25	3,96	-	-	-
<b>OH</b>					
2	-	12,47	-	-	12,5
5	-	5,29	-	-	5,2

Fonte: \* Wang, e *t. al.*; 2000.



**Esquema 13-** Proposta para alguns fragmentos de massas para DG-9.

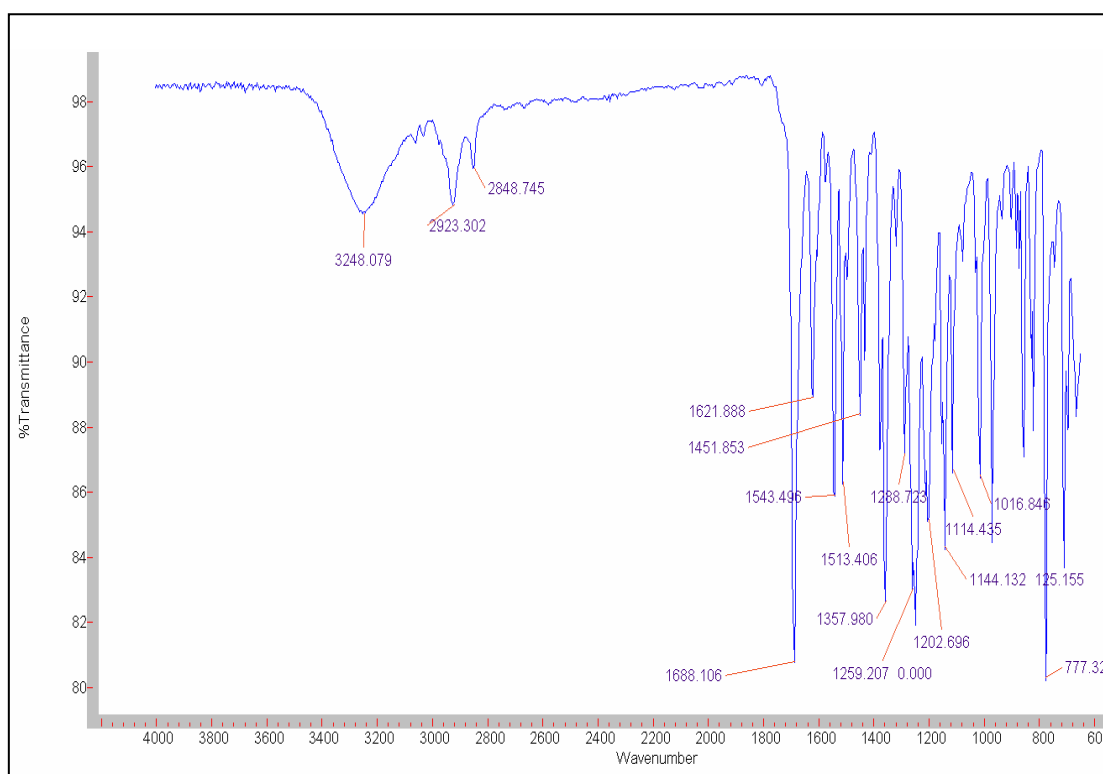


Segundo (Wang, *et. al.*, 2000) uma estrutura bem similar a esta foi isolada de *D. odorifera* (2,5-diidroxi-4-metoxibenzofenona) apresentou atividade antioxidante superior a atividade antioxidante do BHT e  $\alpha$ -tocoferol antioxidantes sintéticos utilizados na indústria alimentícia).

#### 4.9- Determinação Estrutural de DG-10

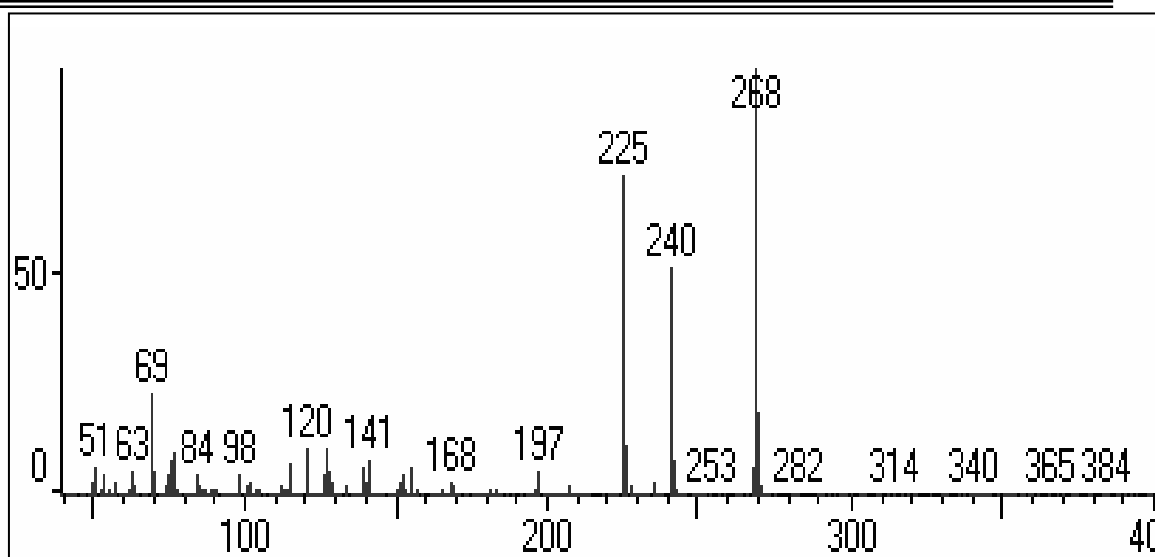
Do extrato diclorometânico foi isolada a substância DG-10 na forma de cristais amarelos solúveis em clorofórmio, com ponto de fusão  $203,6 \pm 1,1$  °C, ao ser analisada por CCDA observou-se uma única mancha indicativo de que os cristais encontravam-se puros, e após revelados com vanilina sulfúrica apresentou coloração avermelhada.

Submeteu-se os cristais a espectrometria de infravermelho cujo espectro (Figura 68) permitiu observar algumas absorções interessantes: uma banda larga referente ao estiramento de O-H em  $3248\text{ cm}^{-1}$ , os estiramentos de C-H em  $2923$  e  $2848\text{ cm}^{-1}$ , foi possível observar a banda de estiramento C=O em  $1688\text{ cm}^{-1}$ , as bandas de estiramento C=C do anel em  $1621$ ,  $1543$  e  $1513\text{ cm}^{-1}$ . Entre  $1288 - 1144\text{ cm}^{-1}$  observa-se as vibrações de deformação axial de C-O-C assimétrica.



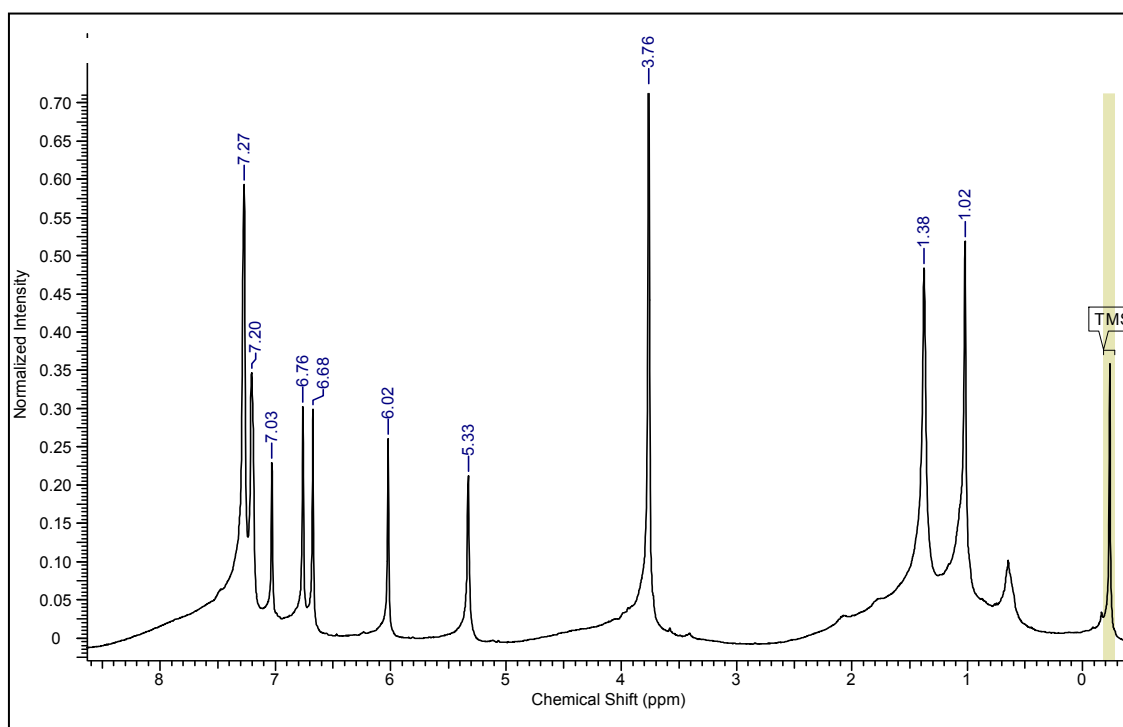
**Figura 68** - Espectro na região do IV da substância DG-10.

A análise por CG/EM permitiu a obtenção do espectro de massas (Figura 69, p. 126) observou-se o pico do íon molecular em  $m/z = 268$ .

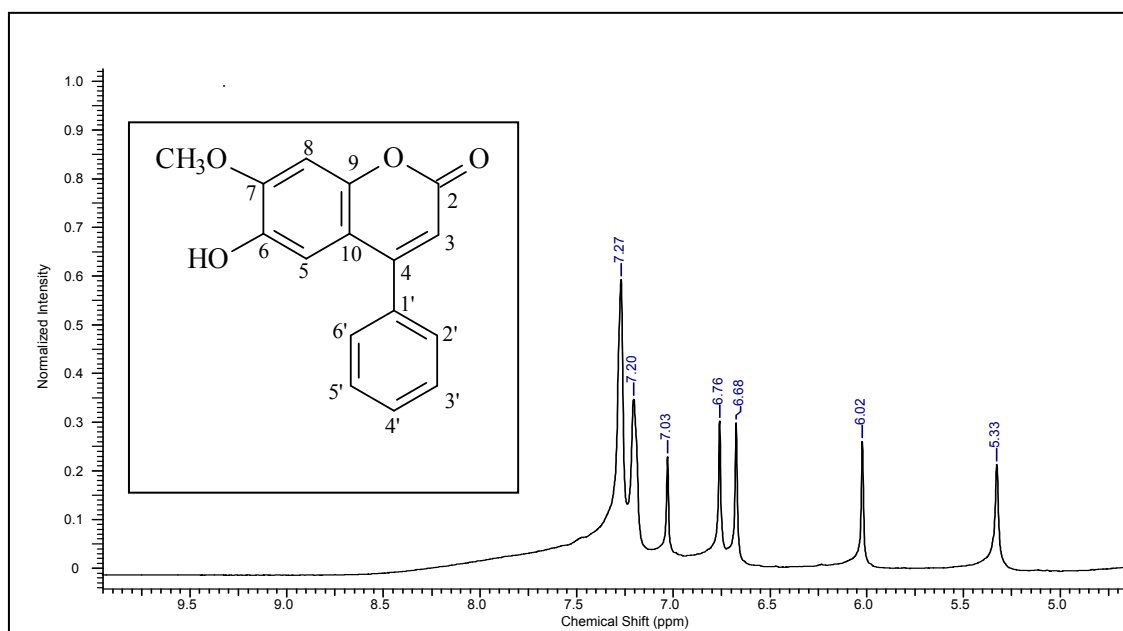


**Figura 69** - Espectro de massas a 70 eV de DG-10.

Pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 70) foi possível observar cinco sinais simples em:  $\delta_{\text{H}}$  3,76 referente a hidrogênios do grupo metoxila, em  $\delta_{\text{H}}$  5,33 referente a hidrogênio carbinólico (H-6), em  $\delta_{\text{H}}$  6,02 referente a hidrogênio vinílico (H-3). Os sinais simples característicos de hidrogênios aromáticos em 6,68; 6,76 e 7,03 ppm (H-8).



**Figura 70** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-10.



**Figura 71** - Ampliação da região entre (5,0 e 9,5 ppm) do espectro RMN <sup>1</sup>H de DG-10.

Pelo espectro de RMN <sup>13</sup>C-HBBD (Figura 72, p. 128) foi possível observar quatorze sinais, sendo um deles referente a um grupamento metoxila, sete sinais referentes a carbono monoidrogenado e seis sinais referentes a carbono não-hidrogenado. Através do mapa de correlação heteronuclear HMQC (Figura 73, p. 129) foi possível correlacionar cada um dos carbonos hidrogenados aos hidrogênios diretamente ligado a ele como: o carbono da metoxila  $\delta_C$  56,13 com  $\delta_H$  3,76; o sinal em  $\delta_C$  99,28 C-8 que acopla com  $\delta_H$  7,03 (s) (H-8) indicando que este carbono mono-hidrogenado não está acoplado com nenhum outro átomo de carbono e que pelo seu valor deve representar um hidrogênio de um anel aromático substituído. O sinal em 110,19 ppm (C-5) é observado acoplado diretamente com o sinal simples  $\delta_H$  6,68 (H-5) que também pode ser atribuído a um hidrogênio aromático de anel substituído, outro sinal em  $\delta_C$  112,28 (C-3) aparece acoplado com um sinal simples em 6,02 ppm (H-3) que está mais protegido quando comparado aos sinais (7,20 e 7,03) o que implica em ser um sinal de hidrogênio de dupla ligação nas proximidades de um grupo protetor, neste caso uma carbonila cujo sinal foi observado no espectro de <sup>13</sup>C-HBBD em 161,12 ppm. O sinal de grande intensidade em 128,51 atribuído aos carbonos (C-2' e C-6') pode ser confirmado através do acoplamento com os hidrogênios em  $\delta_H$  7,5 atribuído



aos hidrogênios (H-2' e H-6'), e ainda outro sinal intenso em 128,51 atribuído aos carbonos (C-3', C-4' e C-5') que também acoplam com o sinal em 7,5. Estes deslocamentos químicos ao serem comparados com informações constantes na literatura são sinais característicos de anéis aromáticos não substituídos de neoflavonóides.

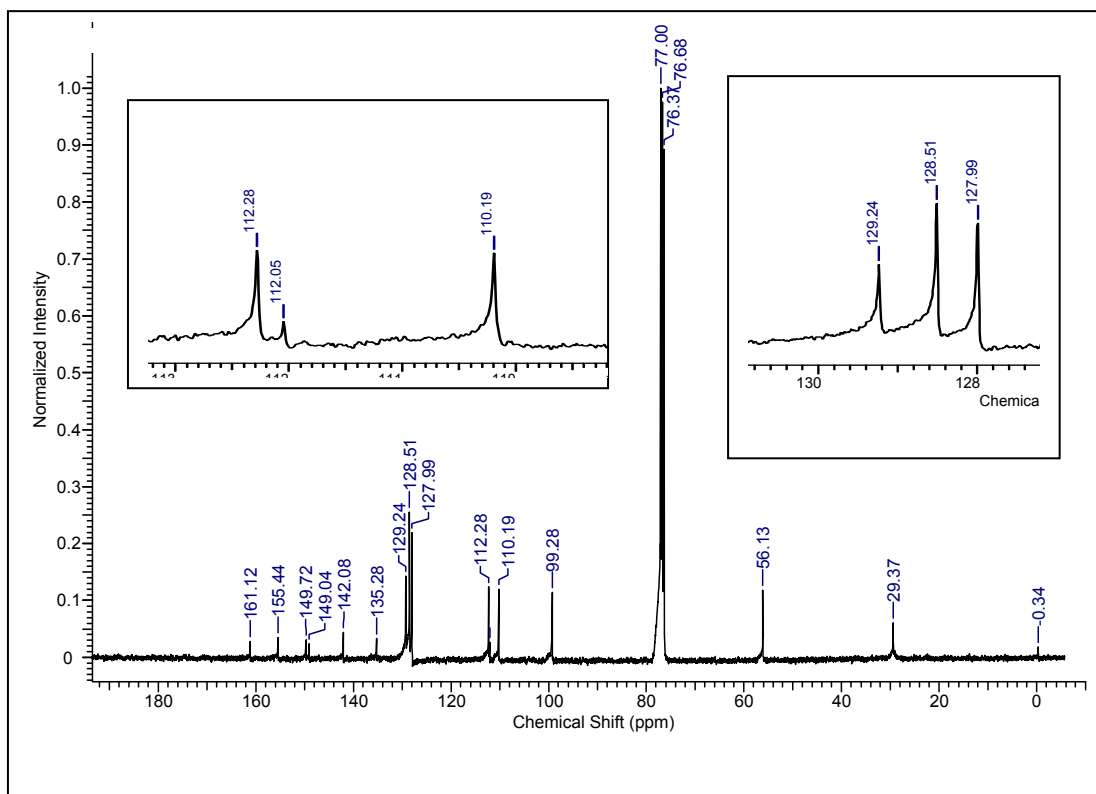
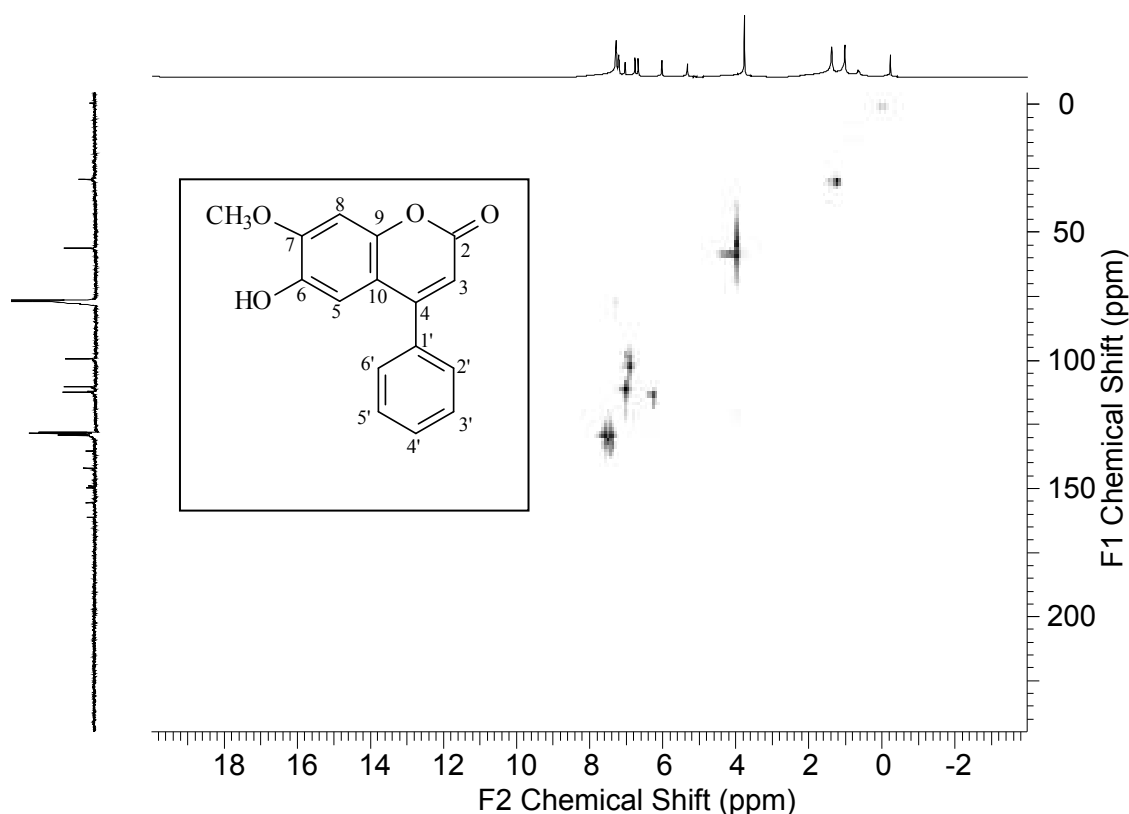


Figura 72 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -HBB (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-10.



**Figura 73** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-10.

O mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 74, p. 130) nos auxiliou nas atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono, principalmente os não hidrogenados, revelando o acoplamento entre os átomos de carbono não hidrogenado (C-6)  $\delta_{\text{C}}$  142,08 e ao hidrogênio (H-5)  $\delta_{\text{H}}$  6,68 a duas ligações com  $\delta_{\text{H}}$  7,03 (H-8) a três ligações. O C-7  $\delta_{\text{C}}$  149,72 correlacionado com H-5  $\delta_{\text{H}}$  6,68 e com  $\text{OCH}_3$ -7  $\delta_{\text{H}}$  3,76 em ambos os casos correlação a três ligações. O C-9  $\delta_{\text{C}}$  149,04 correlacionando a duas ligações com  $\delta_{\text{H}}$  7,03 (H-8). E ainda, a correlação de C-1'  $\delta_{\text{C}}$  135,28 com  $\delta_{\text{H}}$  7,5 (H-3'/H-5') a três ligações conforme pode ser visto na Figura 75, p. 130.

A Tabela 15 p. 132 mostra as atribuições completas para a estrutura proposta. O Esquema 14, p. 131 apresenta alguns fragmentos de massas.

Ao reunir todos estes dados foi possível deduzir para DG-10 a fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ , essa substância é conhecida como dalbergina que já foi isolada de *D. isso*; *D. melanoxyton*; *D. nigra*; *D. miscolobium*; *D. spinosa*; *D. coromandeliana*; *D. baroni*; *D. odorífera*, entre outras.

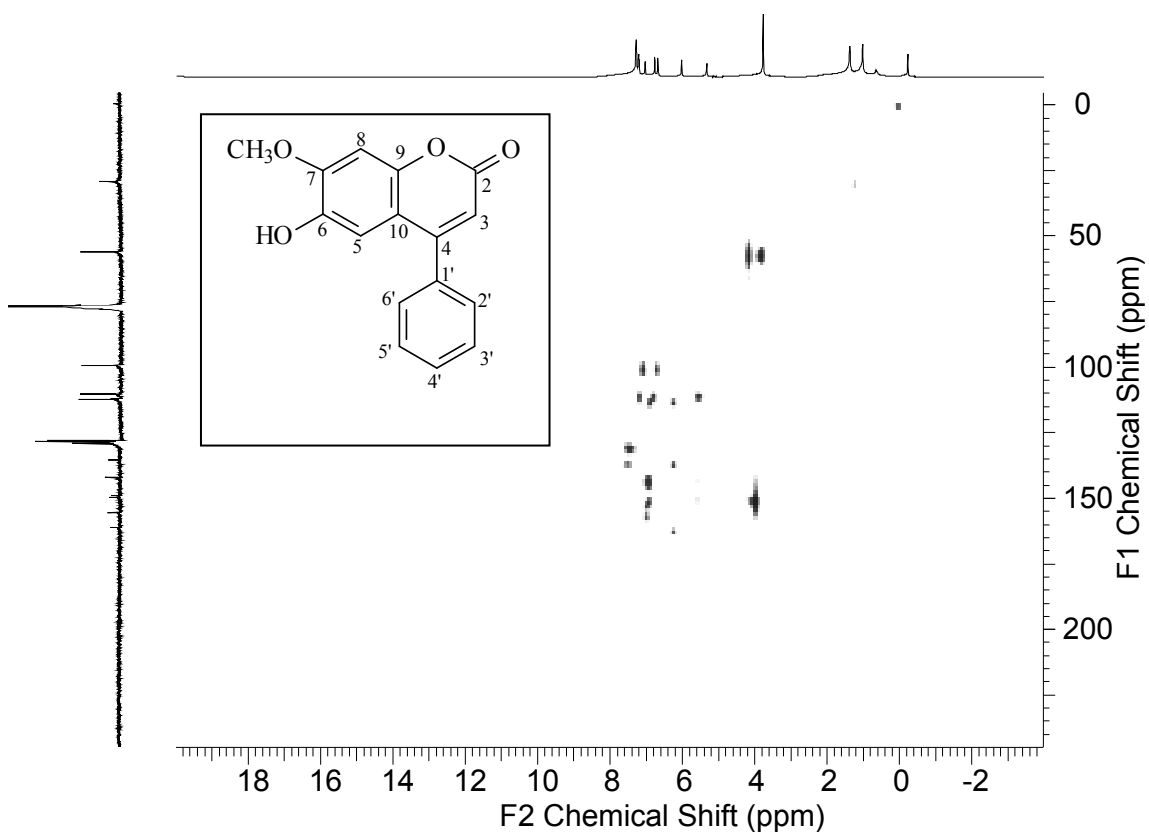


Figura 74 - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-10.

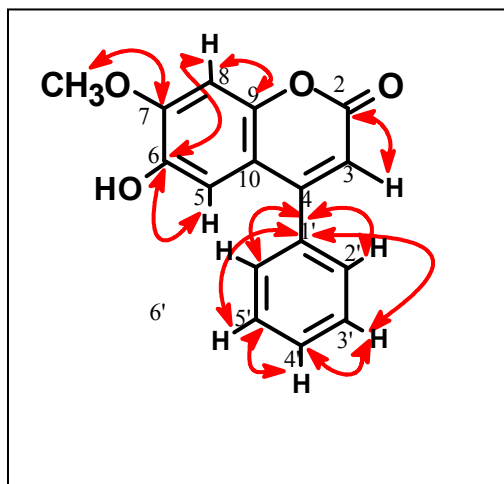
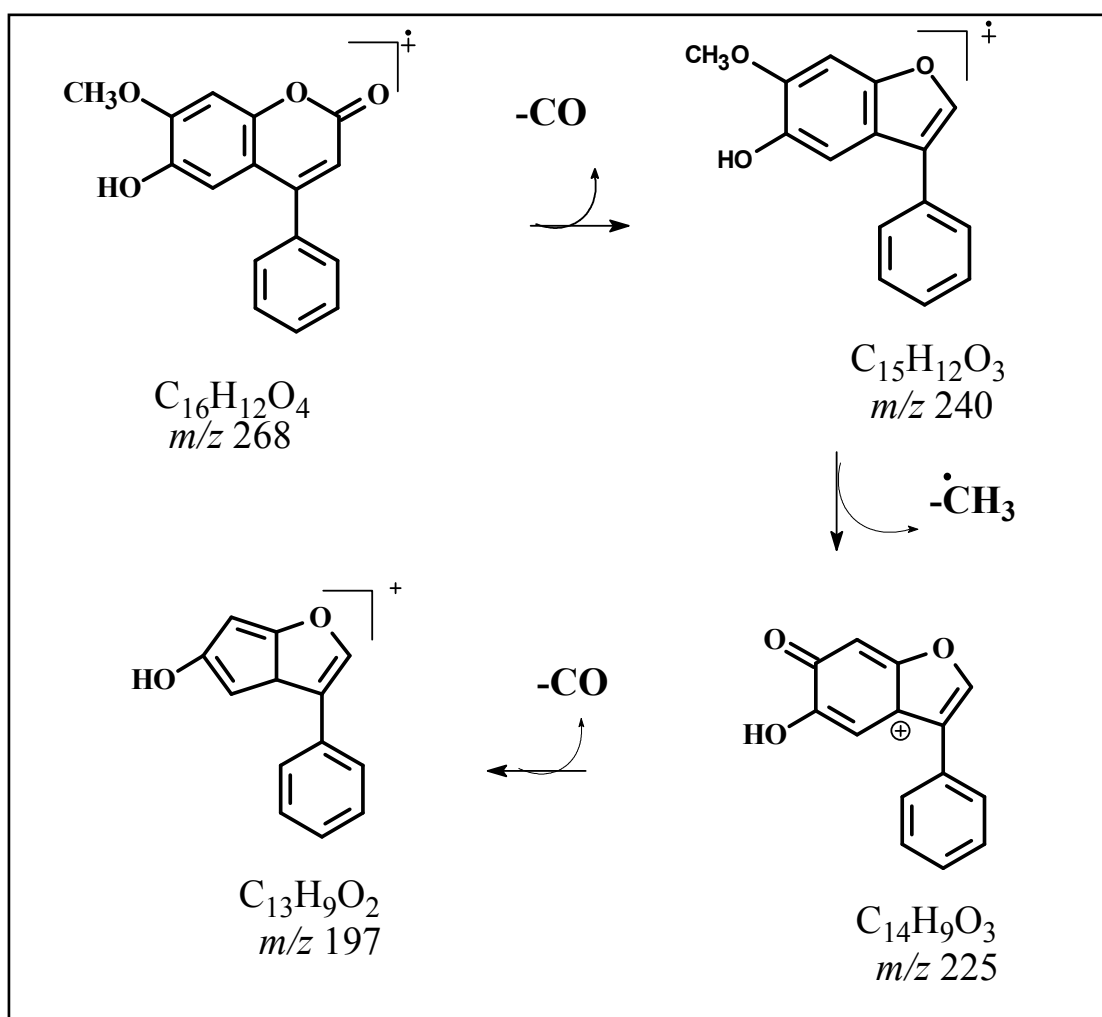


Figura 75 - Correlações observáveis pelo (HMBC) de DG-10.

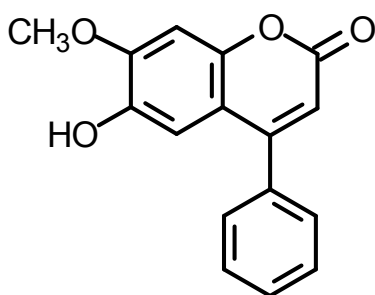


**Esquema 14** - Proposta de alguns fragmentos de massas para DG-10.

**Tabela 15** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias DG-10 e comparação com dados da literatura.

C	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$		Dalbergina*	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	161,12	-	H-3	-	160,85	-
4	155,44	-	-	H-8	155,55	-
6	142,08	-	H-5	H-8	143,96	-
7	149,72	-	H-8	H-5, $\text{OCH}_3$ -7	152,35	-
9	149,04	-	H-8	-	148,85	-
10	112,05	-	H-5	-	111,32	-
1'	135,28	-	-	H-3'/H-5'	135,72	-
<b>CH</b>						
3	112,28	6,02(s)	-	-	111,70	6,16
5	110,19	6,68(s)	-	-	110,75	6,79
8	99,28	7,03 (s)	6,68	-	100,91	7,08
2'	128,51	7,5	-	-	128,71	7,52
3'	127,99	7,5	-	-	128,24	7,52
4'	129,24	7,5	-	-	129,95	7,52
5'	127,99	7,5	-	-	128,24	7,52
6'	128,51	7,5	-	-	128,71	7,52
<b><math>\text{OCH}_3</math></b>						
7	56,13	3,76 (s)	-	-	-	3,86
<b>OH</b>						
6	-	-	-	-	-	9,76

Fonte: \* Garazd, *et. al.*; 2003.

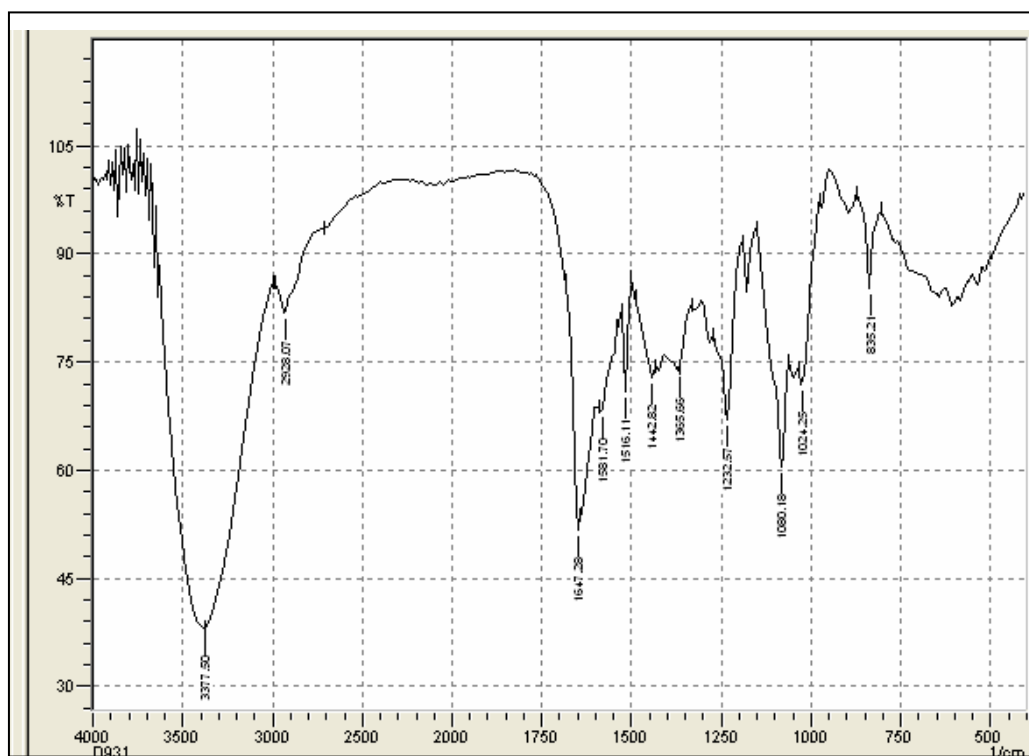


A substância dalbergina exibiu moderada atividade *antifeeding* para cupins dificultando no processo alimentar. Apresentou alta atividade antifúngica contra as espécies *Fomitopsis palustris*, (fungo causador da doença podridão parda, em que resulta da degradação da celulose da madeira), *Rhizopus oryzae* e *Cladosporium cladosporioides* (Sekine, *et. al.*, 2009).

#### 4.10 - Determinação Estrutural de DG-11

Da fração solúvel em n-butanol foi possível o isolamento e purificação da amostra DG-11 na forma de cristais amarelos que ao serem analisados por CCDA e revelados com vanilina sulfúrica apresentaram-se como uma única mancha de coloração amarela. Estes cristais não fundiram, mas carbonizaram a partir de 241 °C.

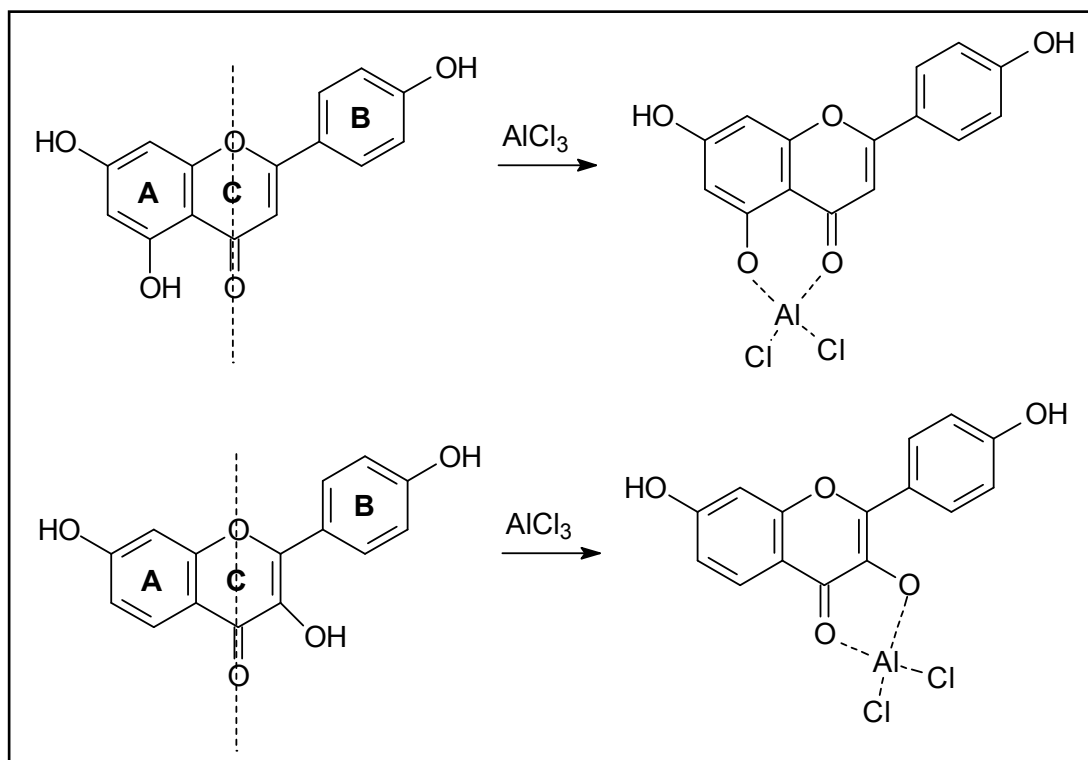
Pela análise dos dados espectrais obtidos do espectro na região do infravermelho (Figura 76) foi possível observar uma banda em 3334 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento do grupo hidroxila em ligação de Hidrogênio intermolecular, o estiramento em 1647 cm<sup>-1</sup> referente a C=O de cetona α-β insaturada, o caráter aromático da substância é observado pela presença de bandas de estiramento C=C do anel no intervalo de 1577 -1438 cm<sup>-1</sup> e em 1060 cm<sup>-1</sup> observa-se estiramento C-OH (Crews, *et. al.*, 1998)..



**Figura 76** - Espectro de IV da substância DG-11.

Pela análise do espectro em metanol na região do ultravioleta (Figura 77 p. 135) da substância DG-11 observa-se a presença de três bandas a aproximadamente: 204, 266 e 358 nm evidenciando um caráter aromático para

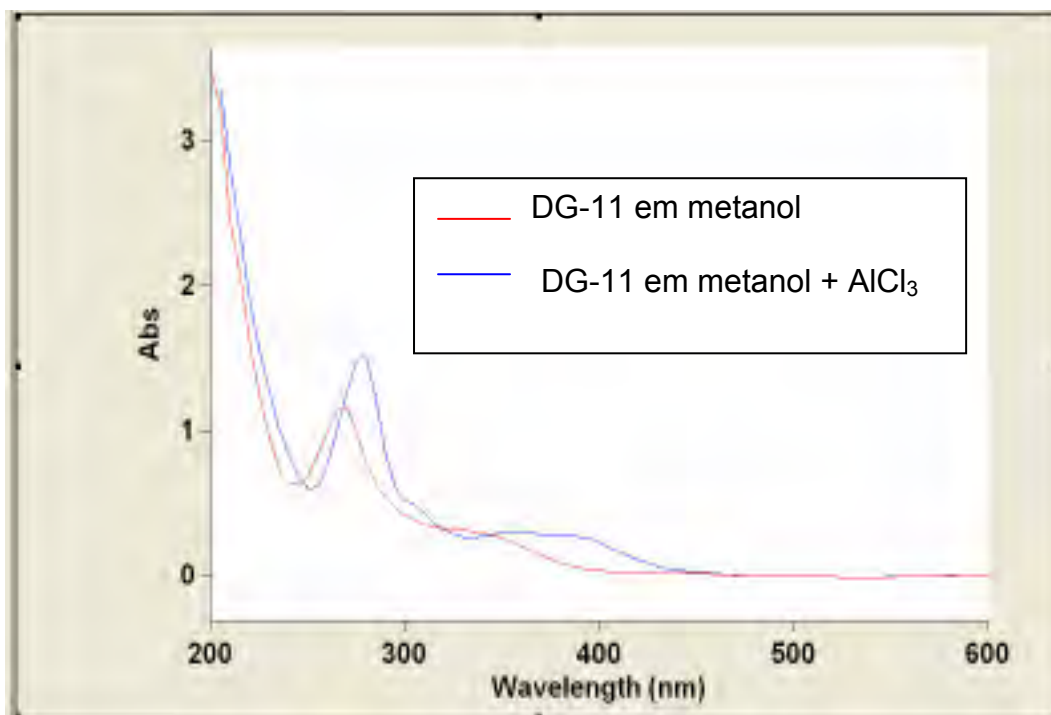
a substância (Pavia *et. al.*, 1995). A natureza fenólica da amostra foi confirmada pelo deslocamento batocrômico observado nos máximos de absorção após a adição de cloreto de alumínio (Esquema 15).



**Esquema 15** - Complexação de flavonóides com Cloreto de alumínio (Mabry, *et. al.*, 1970).

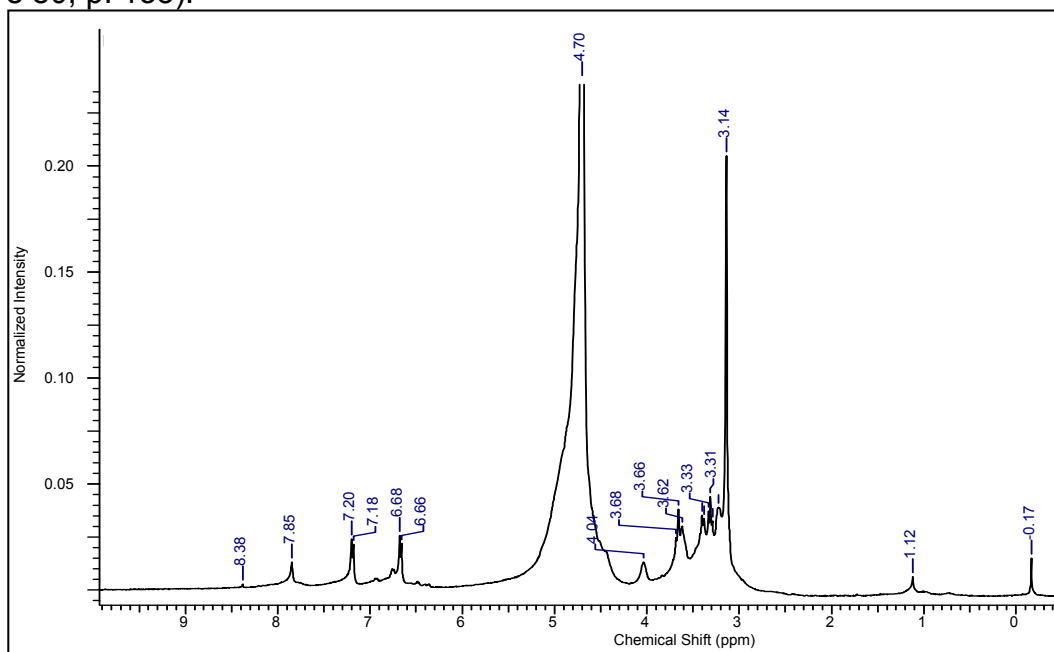
Esses dados aliados áqueles observados no espectro na região do infravermelho sugerem tratar-se de uma estrutura flavonoídica. Segundo Harbone *et. al.*, (1975) para flavonóis a Banda II apresenta-se entre 250 - 280 nm enquanto que a Banda I apresenta-se entre 350 - 385 nm.

Os espectros de flavonóides apresentam duas bandas da absorção na região do ultravioleta: Banda II (devido a absorção do anel A entre 240 - 285 nm), Banda I (devido a absorção do anel B entre 300 - 500 nm) (Figura 78, p. 135) as posições relativas das absorções máximas nos dá valiosas informações sobre a natureza do flavonóide (Harbone, *et. al.*, 1975). Deste modo, os máximos de absorção obtidos para a substância DG-11 sugerem tratar-se de um flavonol.



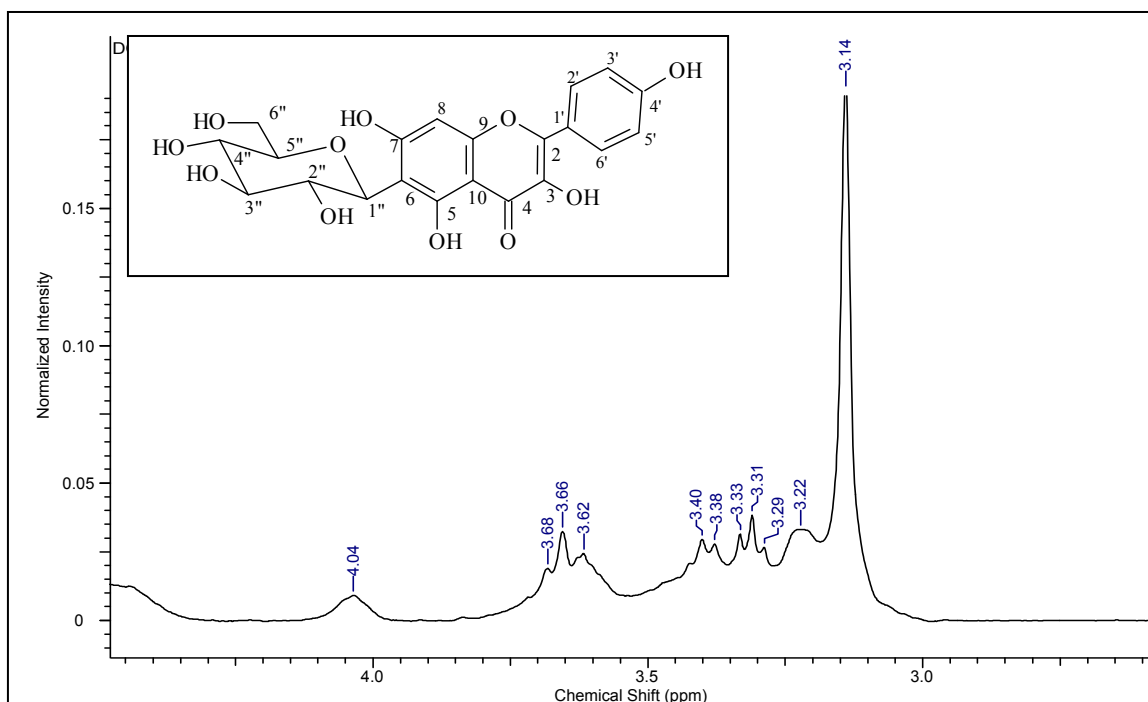
**Figura 77** - Espectro na região do ultravioleta de DG-11.

Pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 78) foi possível observar sinais múltiplos entre 3,4 - 3,6 ppm e outro entre 3,7 - 3,9 ppm; um sinal simples em  $\delta_{\text{H}}$  4,04; dois sinais duplos que acoplam entre si com  $J = 8$  Hz são eles  $\delta_{\text{H}}$  6,67 e  $\delta_{\text{H}}$  7,19, e ainda dois sinais simples em  $\delta_{\text{H}}$  7,85 e  $\delta_{\text{H}}$  8,38 referentes a grupo hidroxila, que podem ser melhor observados através das ampliações (Figuras 79 e 80, p. 135).

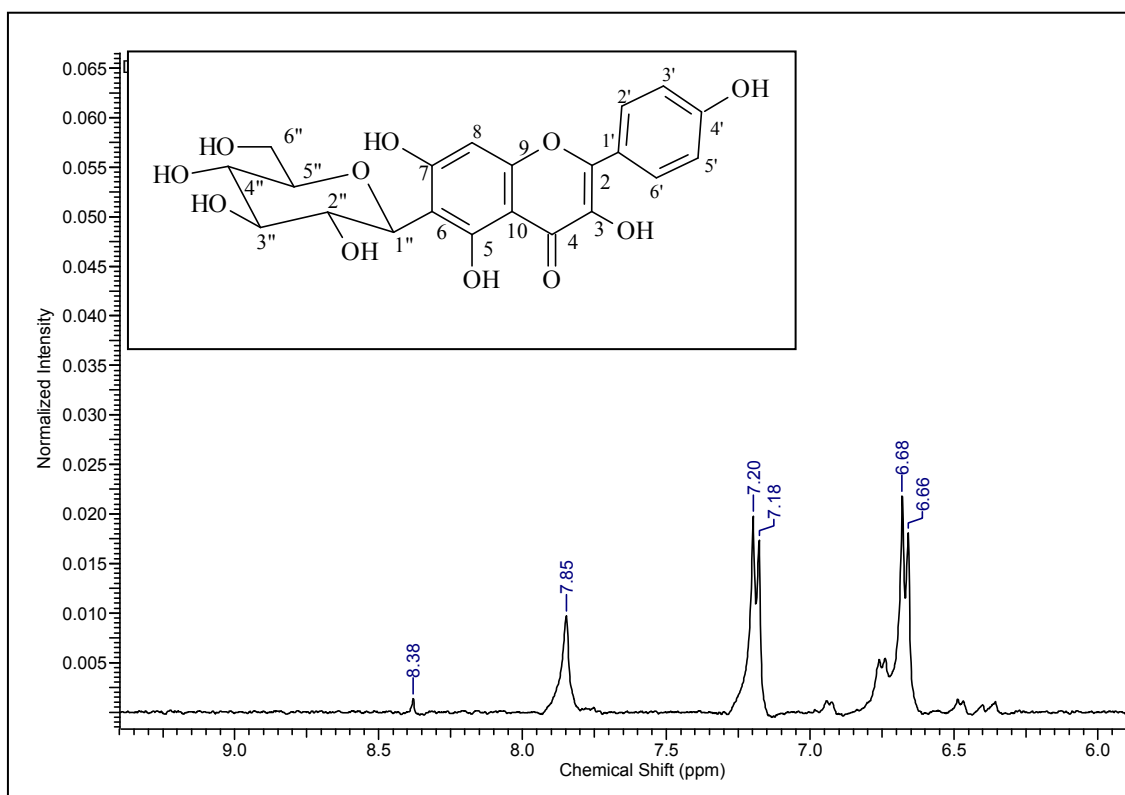


**Figura 78** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DG-11.



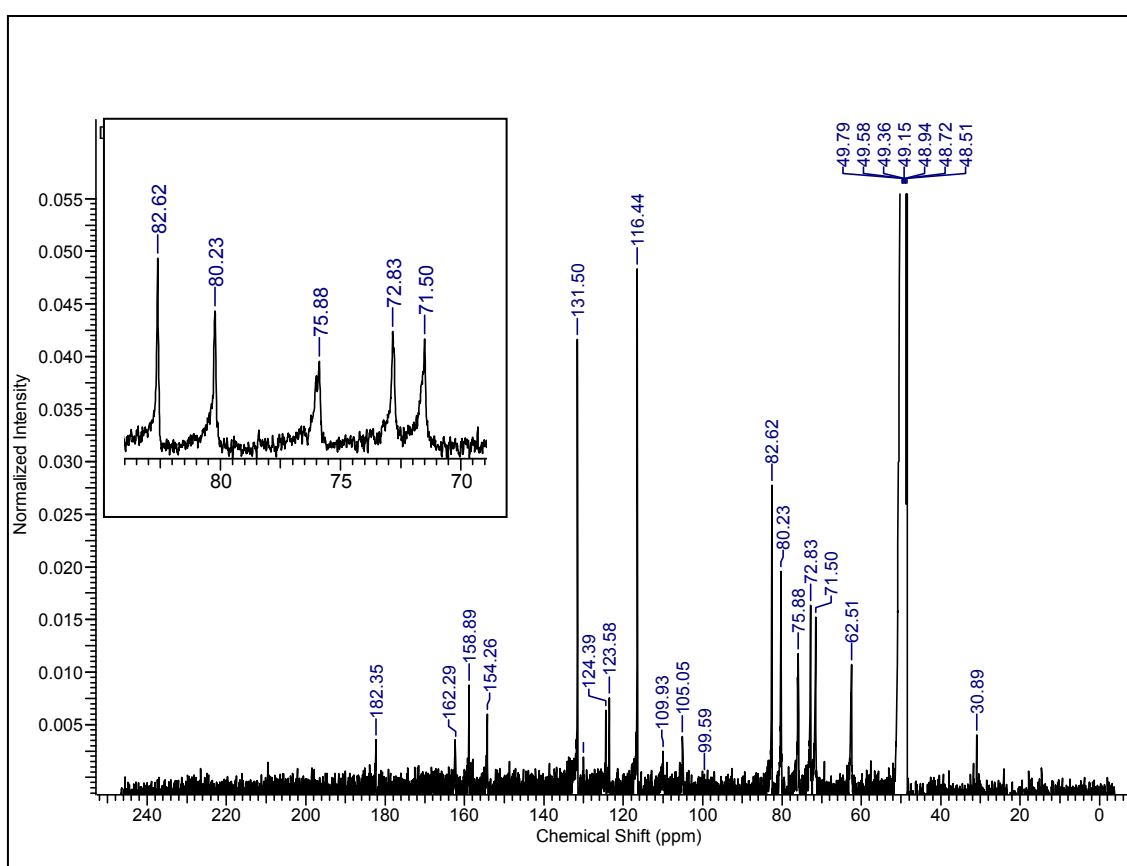


**Figura 79** - Ampliação da região entre (3,0-4,5 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DG-11.



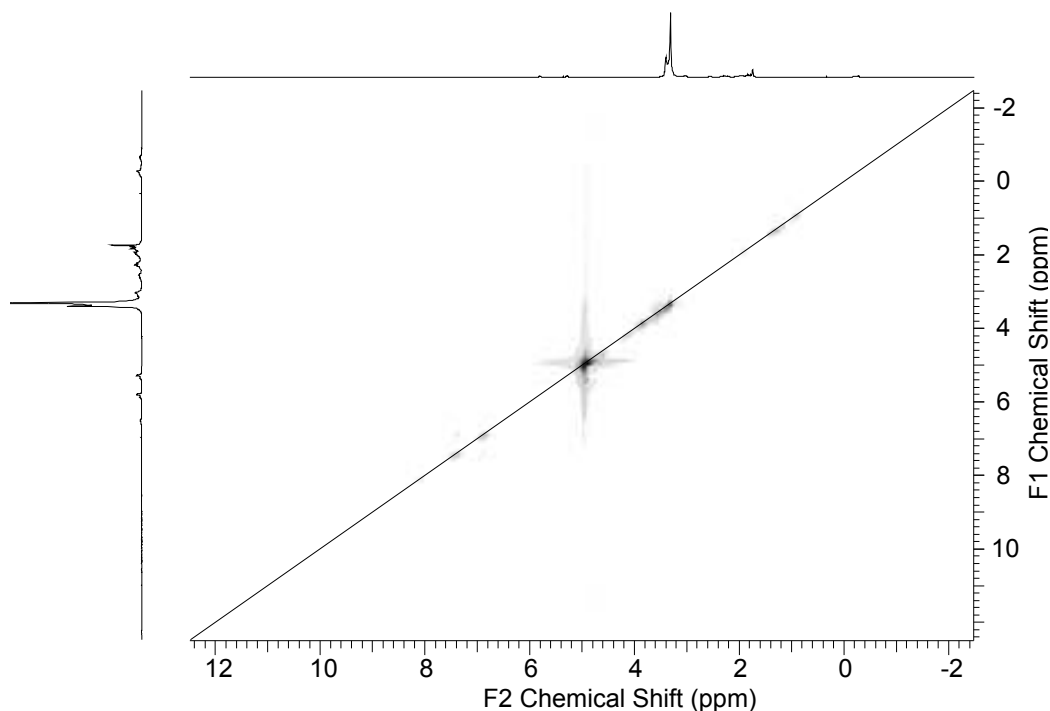
**Figura 80** - Ampliação da região entre (6,0-9,0 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DG-11.

Ao observar o espectro de  $^{13}\text{C}$ -HBB (Figura 81) foi possível observar sinais pertencentes a estrutura glicosídica bem como os sinais referentes a aglicona. Para a parte glicosídica foi possível observar sinais que podem ser atribuídos a glicose são eles  $\delta_{\text{C}}$ : 62,51 (C-6''); 71,50 (C-4''); 72,83 (C-2''); 75,88 (C-1''); 80,23 (C-3'') e um sinal em 82,62 (C-5''). Os sinais provavelmente relativos a carbonos mono hidrogenados  $\delta_{\text{C}}$ : 105,05 (C-10); 109,93 (C-6); 116,44 (C-3' e C-5'); 123,58 (C-1'); 131,50 (C-2' e C-6') e sinais de carbonos não hidrogenados em  $\delta_{\text{C}}$ : 154,26 (C-2); 158,89 (C-9); 162,29 (C-5) e 182,35 (C-4).



**Figura 81** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DG-11.

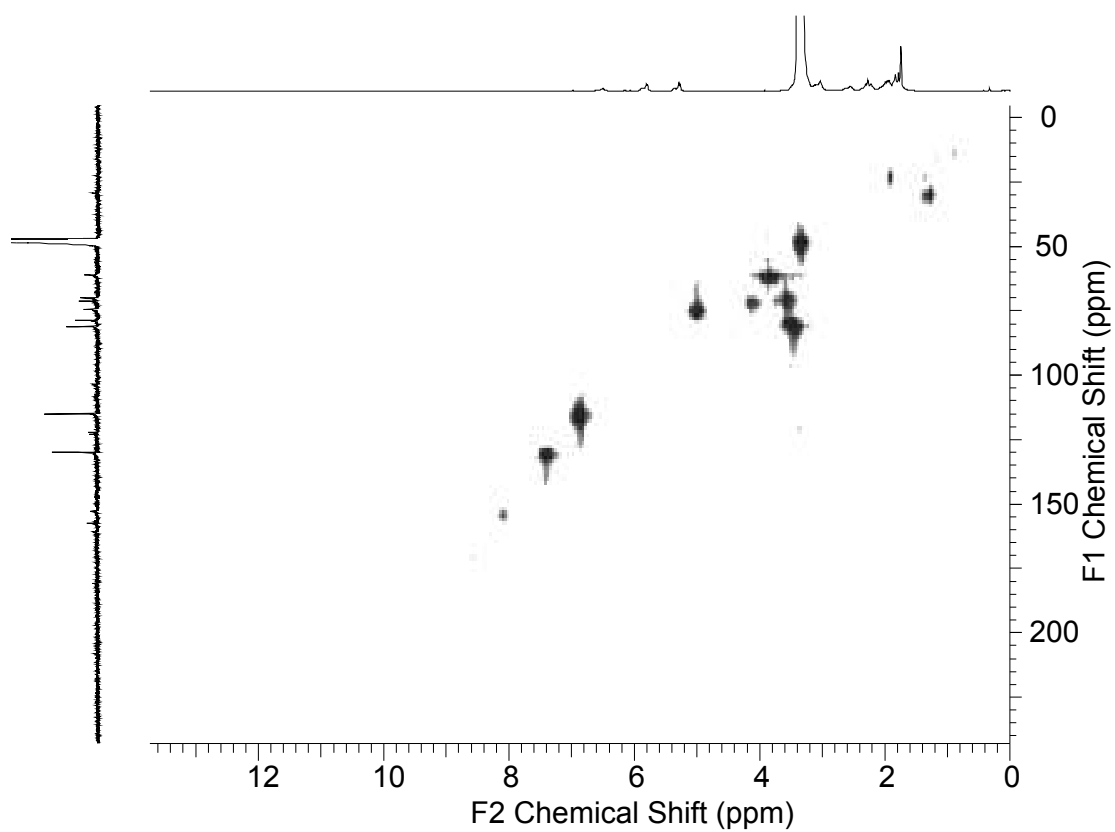
Pelo mapa de correlação homonuclear (COSY) (Figura 82, p. 138) foi possível verificar o acoplamento entre os grupos de hidrogênios H-3'/H5'  $\delta_{\text{H}}$  (6,67) com H-2'/H-6'  $\delta_{\text{H}}$  (7,19).



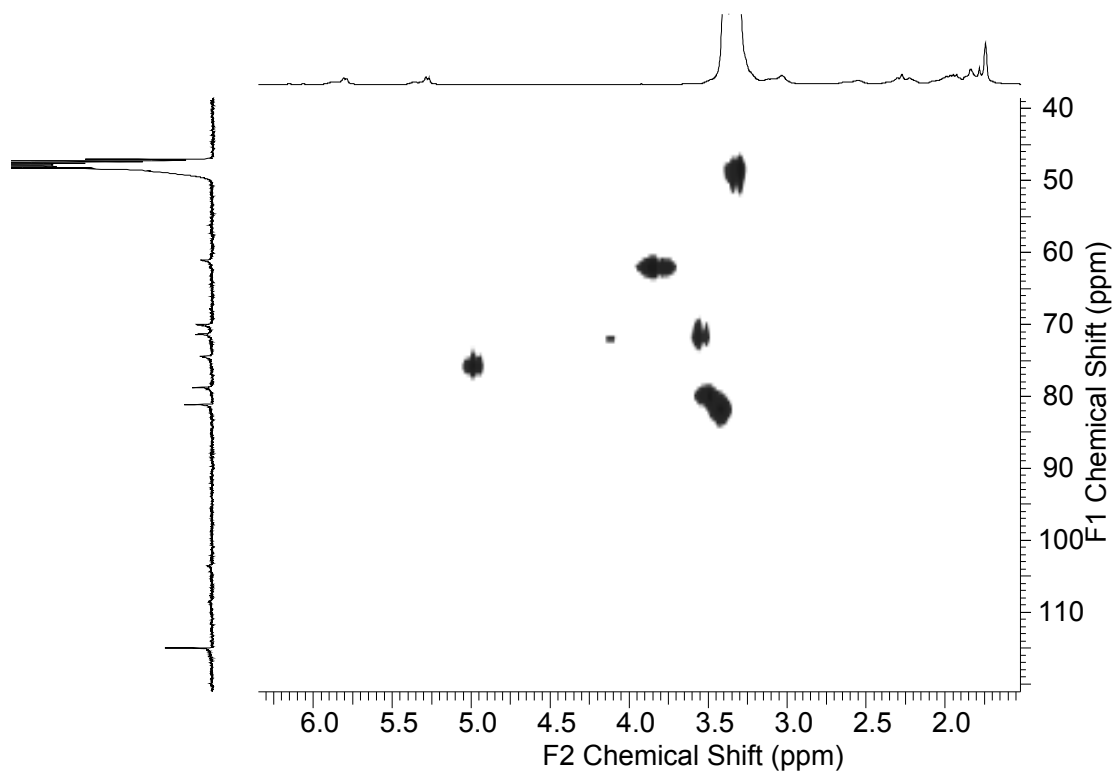
**Figura 82** - Mapa de correlação homonuclear  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (COSY) de DG-11.

Pelo mapa de correlação heteronuclear (HMQC) (Figura 83 e 84, p. 139) foi possível a confirmação das atribuições dos sinais de carbono atribuídos a parte glicosídica da molécula com seus respectivos átomos de hidrogênio (correlação a uma ligação): C-1''  $\delta_{\text{C}}$  (75,88) com H-1''  $\delta_{\text{H}}$  (4,98); C-2''  $\delta_{\text{C}}$  (72,83) com H-3''  $\delta_{\text{H}}$  (3,6); C-3''  $\delta_{\text{C}}$  (80,23) com H-3''  $\delta_{\text{H}}$  (3,47), C-4'' (71,50)  $\delta_{\text{H}}$  (3,50); C-5''  $\delta_{\text{C}}$  (82,62) com  $\delta_{\text{H}}$  (3,40) e C-6''  $\delta_{\text{C}}$  (62,51) com 2-H multiplete entre  $\delta_{\text{H}}$  (3,7 e 3,9); os monoidrogenados aos seus respectivos hidrogênios como: C-2'/C-6'  $\delta_{\text{C}}$  (131,50) com H-2' e H-6'  $\delta_{\text{H}}$  (7,19); os carbonos C-3' e C-5'  $\delta_{\text{C}}$  (116,44) com H-3' e H-5'  $\delta_{\text{H}}$  (6,67).

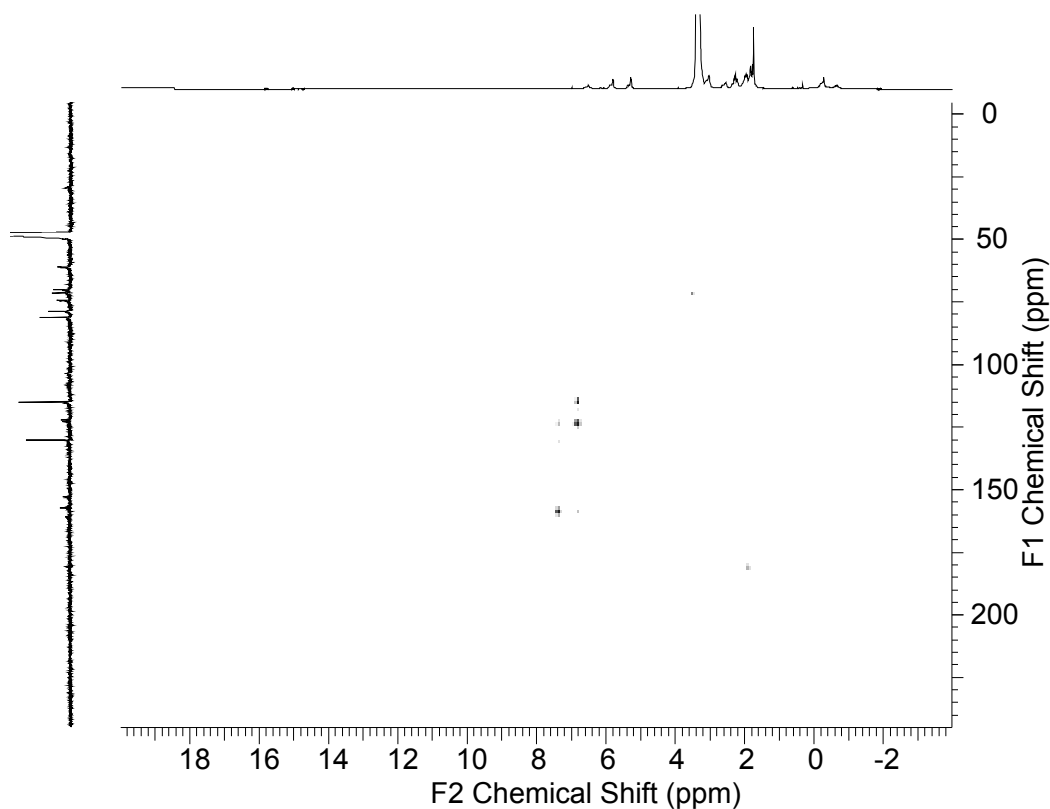
Pelo mapa de correlação heteronuclear (HMBC) (Figura 85, p. 140) foi possível observar correlações entre os átomos 109,93 (C-6) com 4,98 (H-1''), 162,29 (C-5) com 4,98 (H-1'').



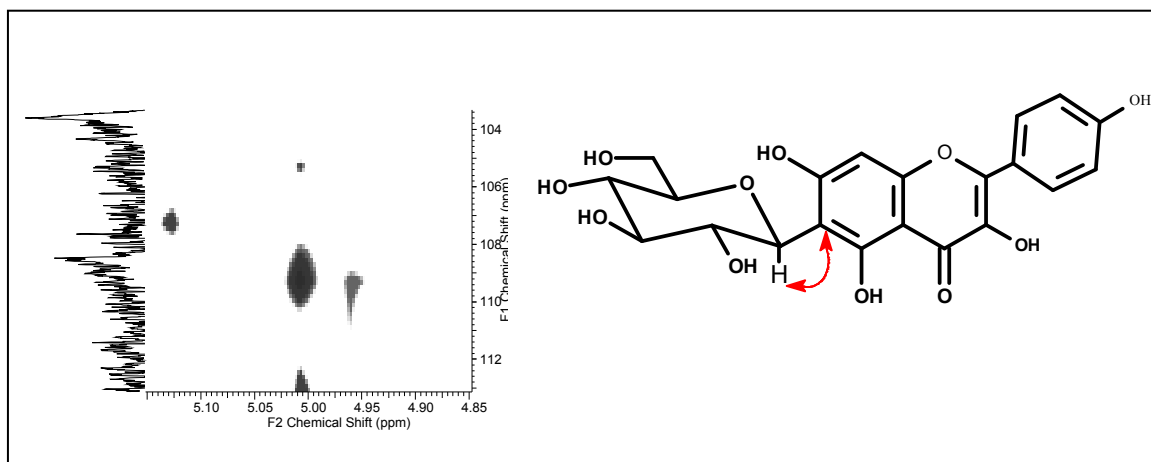
**Figura 83** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMQC) de DG-11.



**Figura 84** - Ampliação HMQC dos sinais referentes a parte glicosídica de DG-11.



**Figura 85** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-11.



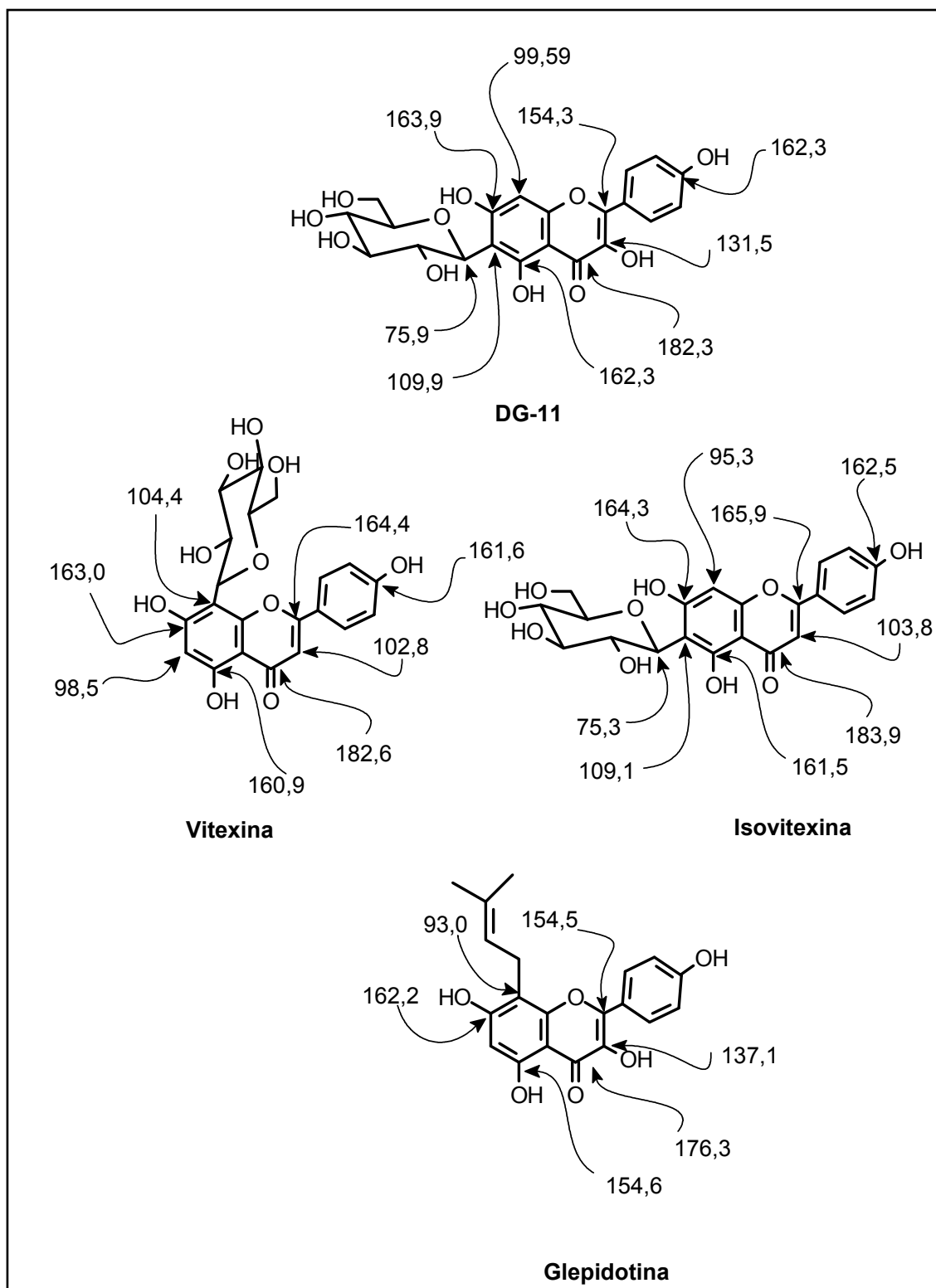
**Figura 86** - Correlação entre C-6 da aglicona com o H-1'' do glicosídeo.

A Tabela 16, p. 141 apresenta os dados completos de ressonância obtidos da substância DG-11. E a Tabela 17, p. 143 apresenta os dados de ressonância de DG-11 comparado com dados da literatura. Até o momento a substância DG-11 não foi relatada na literatura.

**Tabela 16** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substância DG-11.

C	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
2	154,26	-	-	H-2'/H-6'
3	130,00	-	-	-
4	182,35	-	-	-
5	162,29	-	-	-
6	109,93	-	-	H-1"
7	163,98	-	-	-
9	158,89	-	-	-
10	105,05	-	-	-
1'	123,58	-	H-2'/H-6'	-
4'	162,29	-	H-3'/H-5'	H-2'/H-6'
<b>CH</b>				
8	99,59	-	-	-
2'	131,50	7,19 (d, $J = 8,0$ )	-	-
3'	116,44	6,67 (d, $J = 8,0$ )	-	-
5'	116,44	6,67 (d, $J = 8,0$ )	-	-
6'	131,50	7,19 (d, $J = 8,0$ )	-	-
1"	75,88	4,98	-	-
2"	72,83	3,60	-	-
3"	80,23	3,47	-	-
4"	71,50	3,50	-	-
5"	82,62	3,40	-	-
<b>CH<sub>2</sub></b>				
6"	62,51	3,7-3,9 (m)	-	-

Ao comparar os dados da substância DG-11 com três modelos da literatura: vitexina, isovitexina e glepidotina pode-se observar algumas similaridades e diferenças, conforme (Figura 87, p. 142).



**Figura 87** - Comparação de alguns sinais observados por RMN  $^{13}\text{C}$  para as substâncias: DG-11, vitexina\*, Isovitexina\*\* e glepidotina\*\*\*

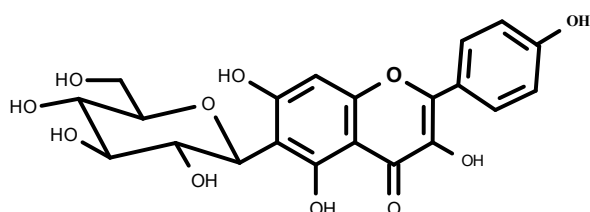
Fonte: \* Tanaka, *et. al.*, 2005; \*\* Ramarathnam, *et. al.*, 1989 e

\*\*\* Agrawal, 1989.

**Tabela 17** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substância: DG-11 comparação com modelos descritos na literatura.

C	DG-11		Vitexina*		Isovitexina**	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	154,26	-	164,4	-	165,9	-
3	130,00	-	102,8	6,77	103,8	6,49
4	182,35	-	182,6	-	183,9	-
5	162,29	-	160,9	-	161,5	-
6	109,93	-	98,5	6,27	109,1	-
7	163,98	-	163,0	-	164,6	-
9	158,89	-	156,5	-	158,4	-
10	105,05	-	105,0	-	105,1	-
1'	123,58	-	122,0	-	123,0	-
4'	162,29	-	161,6	-	162,5	-
<b>CH</b>						
8	99,59	-	104,4	-	95,3	6,56
2'	131,50	7,19	129,4	8,02	129,3	7,78
3'	116,44	6,67	116,2	6,88	116,9	6,95
5'	116,44	6,67	116,2	6,88	116,9	6,95
6'	131,50	7,19	129,4	8,02	129,3	7,78
1''	75,88	4,98	73,7	4,68	75,3	4,21
2''	72,83	3,60	71,1	3,79	72,7	3,78-3,93
3''	80,23	3,47	79,0	3,28	80,1	3,78-3,93
4''	71,50	3,50	70,3	3,46	71,8	3,78-3,93
5''	82,62	3,40	82,1	3,25	82,5	3,78-3,93
<b>CH<sub>2</sub></b>						
6''	62,51	3,7-3,9	61,6	3,74 /3,53	62,9	3,78-3,93

Fonte: \* Tanaka, *et. al.*, 2005; \*\* Ramarathnam, *et. al.*, 1989.



Estruturas similares a DG-11 apresentou potente ação analgésica sendo 16 vezes mais potente que a aspirina em modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos (Filho, 1999).



#### 4.11 - Determinação Estrutural de DG-12

Do resíduo do extrato metanólico solúvel em água foram isolados aproximadamente 9 mg de cristais amarelos solúveis em metanol, que ao serem submetidos a CCDA apresentaram-se como uma única coloração esverdeada ao ser revelados com vanilina sulfúrica, os mesmos também foram revelados com cloreto férrico apresentando coloração verde escuro. Esses cristais não fundiram mas, a partir de 210 °C ocorreu carbonização.

A análise dos dados espectrais na região do infravermelho confirmou a natureza aromática da substância DG-12, evidenciada pela presença dos estiramentos de C-H em 2922  $\text{cm}^{-1}$ , bem como, uma banda de estiramento de grupo O-H em 3313  $\text{cm}^{-1}$  destaca-se ainda, a absorção de deformação axial de C=O  $\alpha,\beta$ -insaturada cíclica em 1644  $\text{cm}^{-1}$ , aos estiramentos de C=C de anel aromático em 1514 e 1438  $\text{cm}^{-1}$ . Em 1271 e 1225  $\text{cm}^{-1}$ . Observa-se os estiramentos de C-O e em 1074 e 1024  $\text{cm}^{-1}$  as bandas de deformação angular no plano de C-H (Figura 88).

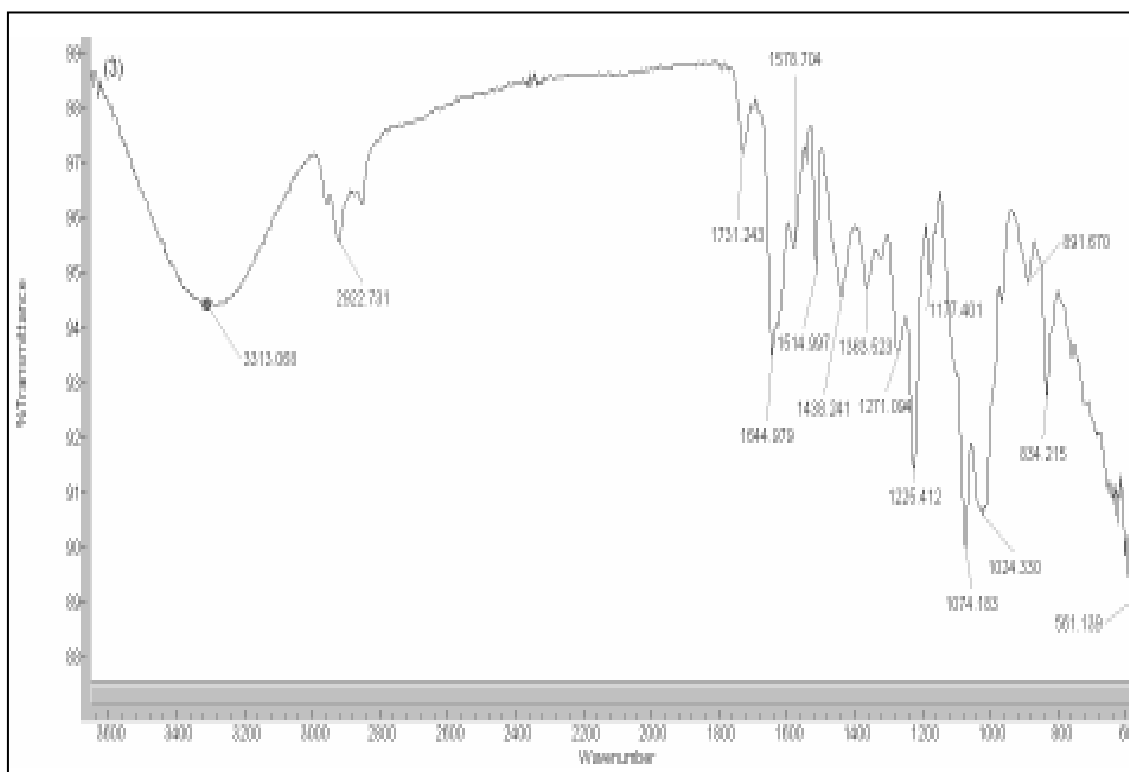
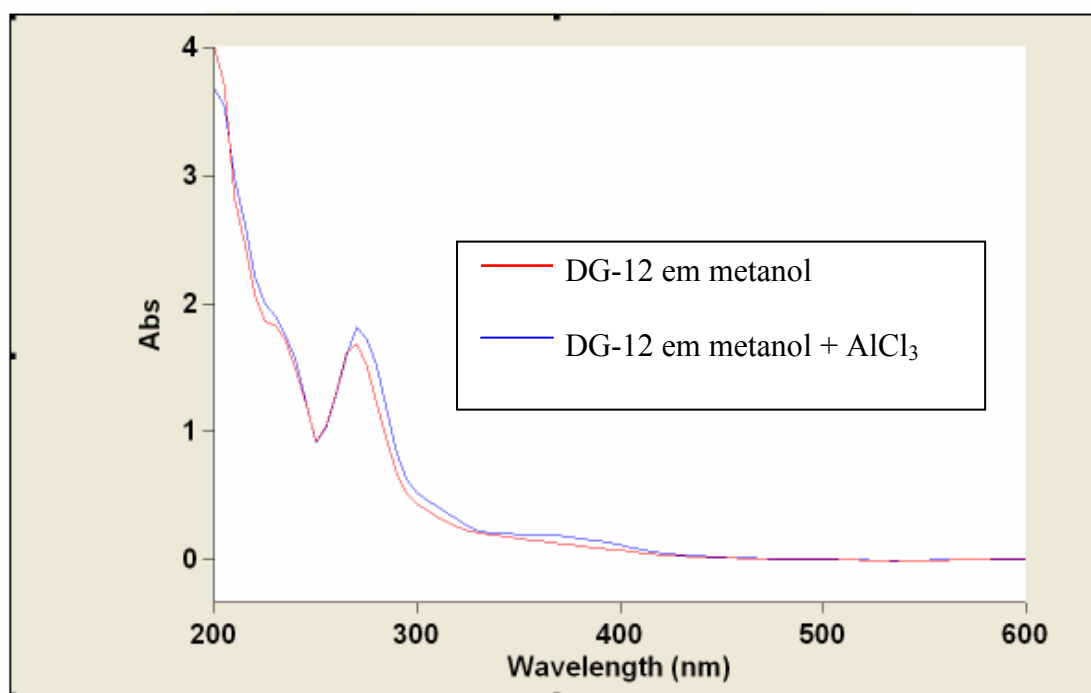


Figura 88 - Espectro na região do IV da substância DG-12.

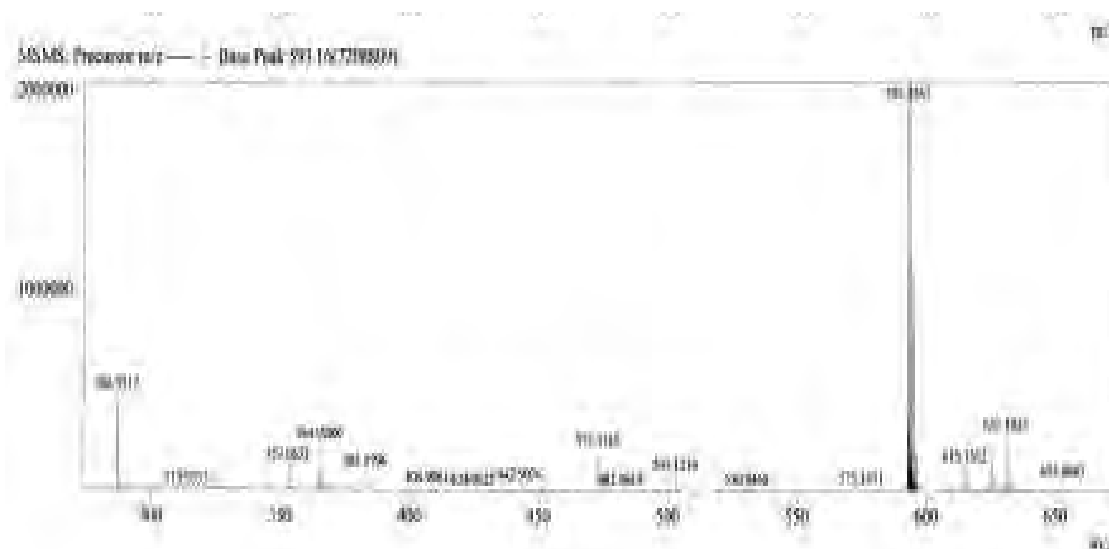
Pela análise do espectro em metanol na região do ultravioleta da substância DG-12 (Figura 89) observa-se a presença de três bandas a aproximadamente: 203, 268, um ombro em 317 nm e uma última banda em 365 nm evidenciando um caráter aromático para a substância (Pavia *et. al.*, 1995). Na Figura 89 a curva em vermelho apresenta DG-12 em metanol, enquanto que a curva em azul representa DG-12 em metanol com adição de  $\text{AlCl}_3$ , nessa segunda curva foi possível observar um pequeno deslocamento batocrômico nos máximos de absorção de 268 nm para 272 nm e no máximo de absorção em 365 nm para 380 nm. Esses dados aliados áqueles observados no espectro na região do infravermelho sugerem tratar-se de uma estrutura flavonoídica. Segundo Harbone *et. al.*,(1975) para isoflavonóides a Banda II apresenta-se entre 245 - 275 nm enquanto que a Banda I apresenta-se entre 310 - 335 nm (ombro), o uso de reagente de deslocamento como o  $\text{AlCl}_3$  provoca deslocamento batocrômico entre 10 - 15 nm. Deste modo, os máximos de absorção obtidos para a substância DG-12 sugerem tratar-se de um isoflavonóide.



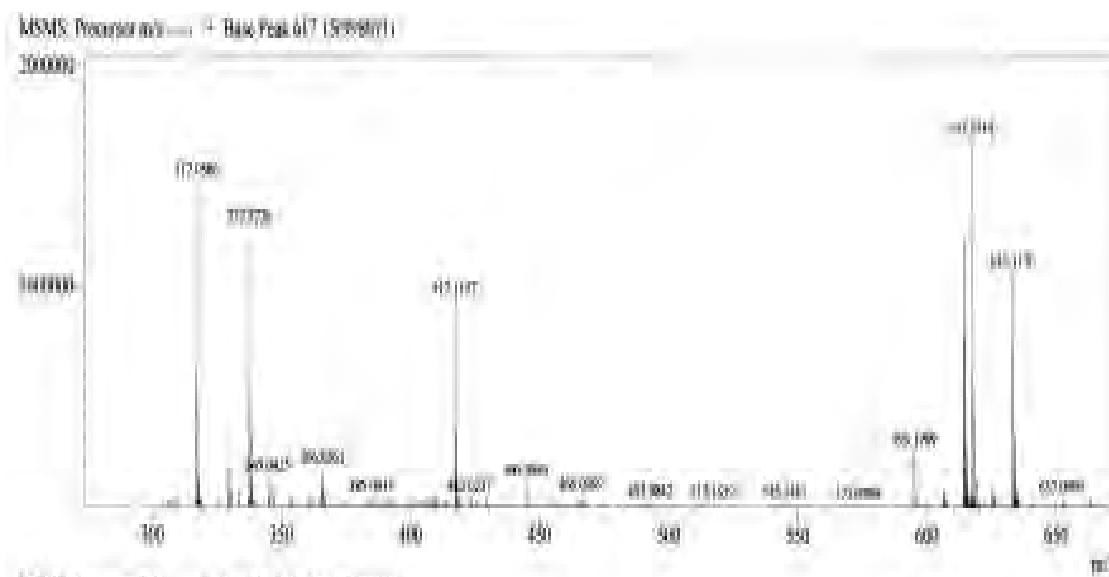
**Figura 89** - Espectro na região do ultravioleta de DG-12.

A substância DG-12 foi submetido ainda a Cromatografia da alta resolução equipada com fonte de ionização por *electrospray* que possibilitou

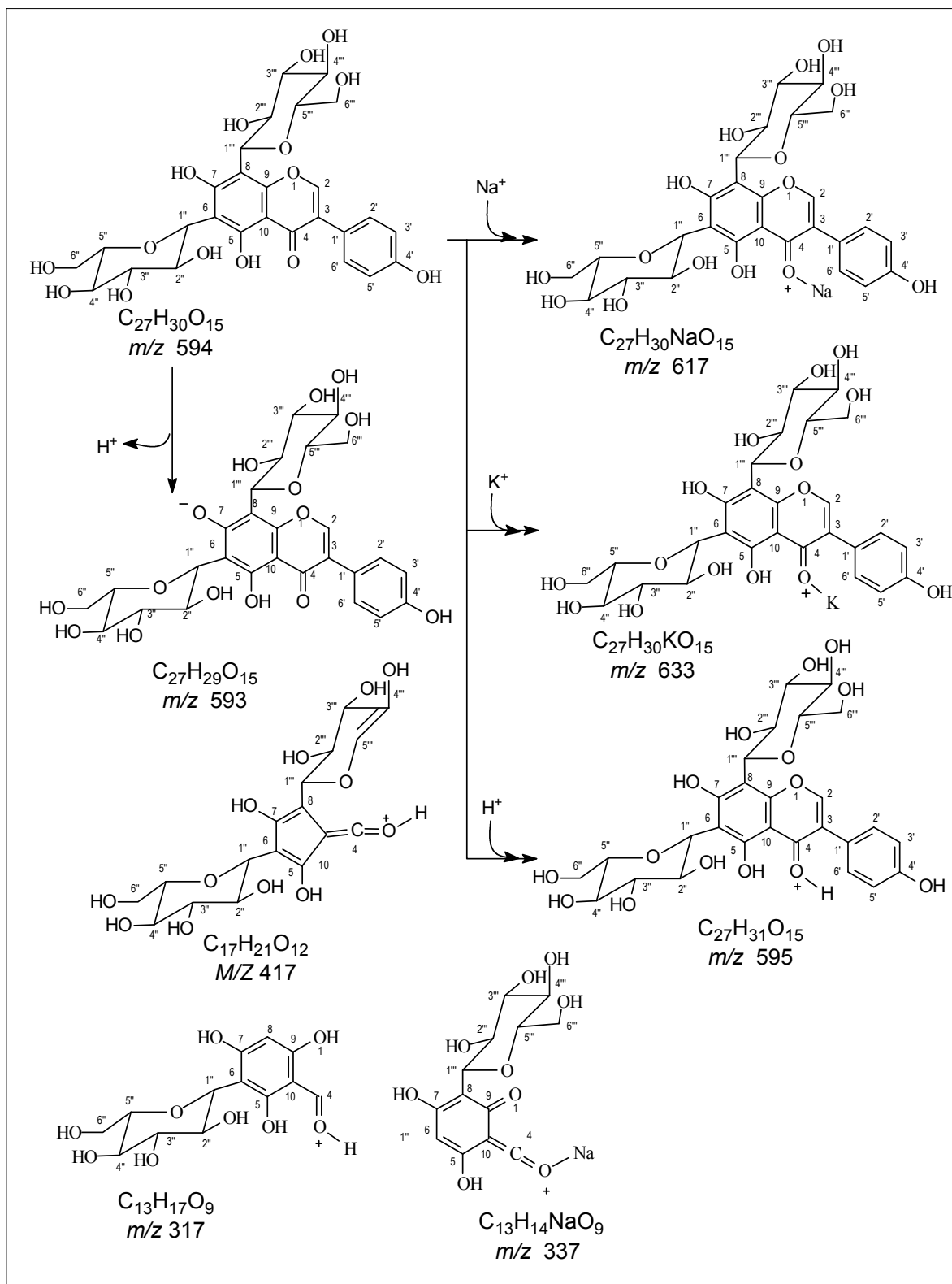
determinar a massa molecular exata da substância  $m/z = 594,1585$  que é compatível com a seguinte fórmula molecular:  $C_{27}H_{30}O_{15}$ , conforme pode ser observado no espectro de massas (MS/MS) (Figuras 90 e 91), foi possível verificar alguns fragmentos em  $417,1157$ ;  $m/z = 317,0872$ . O espectro de massas de DG-12 ligado ao átomo de sódio observou-se o pico do íon-molecular em  $m/z = 617,15$  e após a troca do cátion de sódio pelo de potássio foi possível observar  $m/z = 633,12$ , e a última troca, (do átomo de potássio pelo átomo de hidrogênio) observou-se  $m/z = 595,17$ . Esses fragmentos podem ser observados no Esquema 20, p. 147.



**Figura 90** - Espectro MS/MS da substância DG-12 apresentando o pico do íon-molecular.



**Figura 91** - Espectro MS/MS da substância DG-12.



**Esquema 16** - Proposta para alguns fragmentos de massas observáveis no espectro de DG-12.

Ao analisar os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 92) e a ampliação (Figura 93, p. 149)) observa-se a presença de um sinal simples em:  $\delta_{\text{H}}$  8,14 (H-2), além de sinais múltiplos centrados em:  $\delta_{\text{H}}$  3,46 referente a H-5'' e H-5''' ( $J = 8,0$ ; 4,0 e 4,0 Hz); em  $\delta_{\text{H}}$  3,87 referente aos H-6'' e H-6''' com ( $J = 12,0$  Hz) e finalmente sinais múltiplos centrados em:  $\delta_{\text{H}}$  5,00 e 5,01 ppm referente aos hidrogênios (H-1'' e H-1''') ambos apresentando ( $J = 9,2$  Hz);  $\delta_{\text{H}}$  6,84 referente aos átomos de hidrogênio (H-3' e H-5') com ( $J = 8,4$  Hz) e em  $\delta_{\text{H}}$  7,37 referente aos átomos de hidrogênios (H-2' e H-6') com ( $J = 8,4$  Hz).

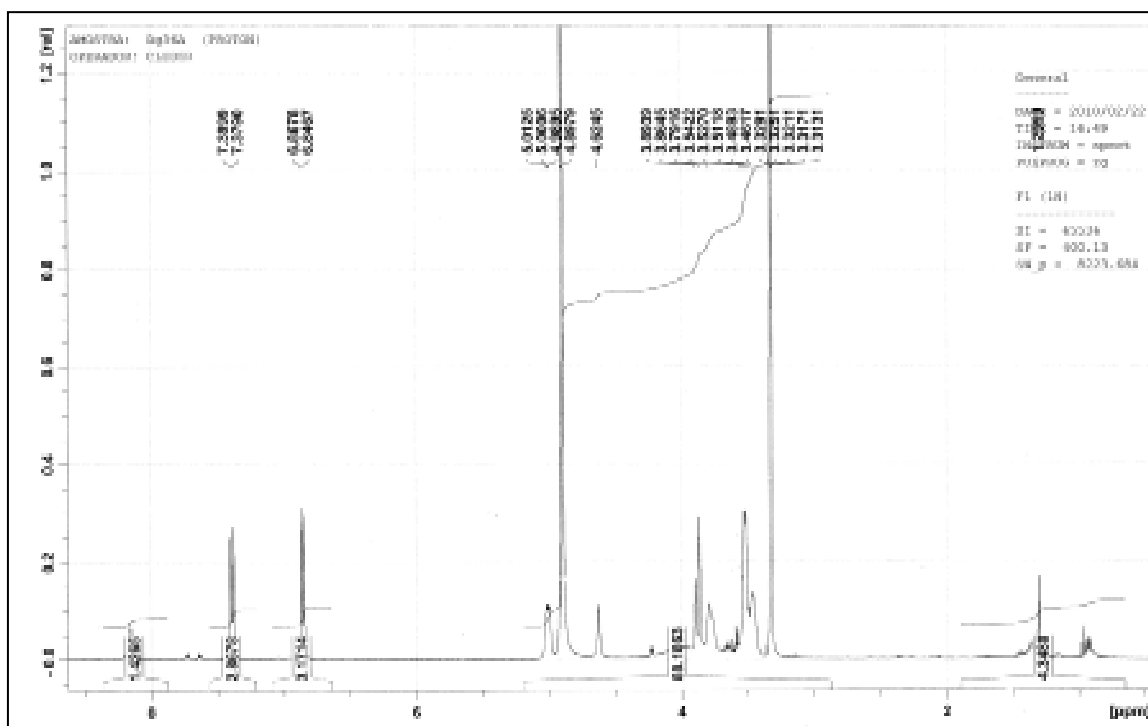
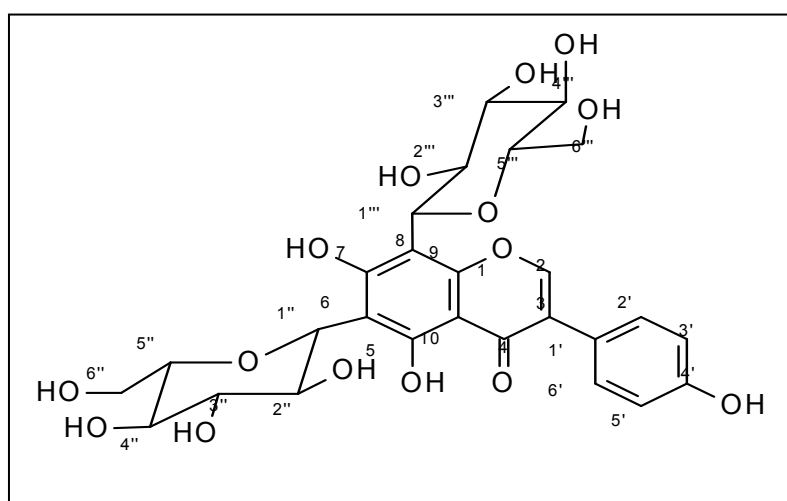
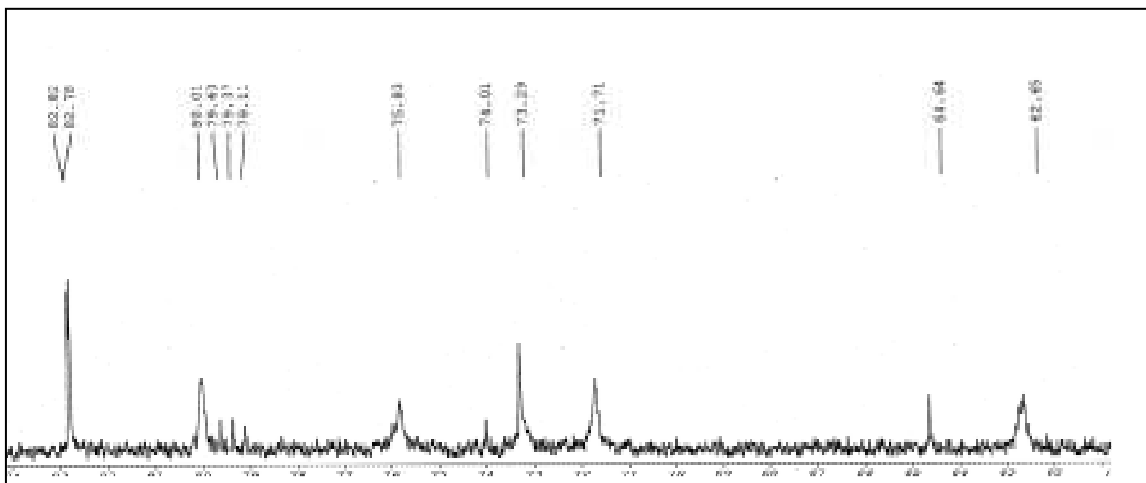


Figura 92 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DG-12.





**Figura 95** - Ampliação da região entre (62,00-62,80 ppm) do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -HBBD de DG-12.

Através da análise do mapa de correlação heteronuclear HMQC (Figura 96 e 97, p. 151) foi possível correlacionar de forma inequívoca os carbonos monoidrogenados e diidrogenados da molécula. Como os átomos: C-3'' e C-3'''  $\delta_{\text{C}}$  (80,01) com H-3''  $\delta_{\text{H}}$  (3,51), C-2'' e C-2'''  $\delta_{\text{C}}$  (73,29) com H-2''  $\delta_{\text{C}}$  (3,60); C-4'' e C-4'''  $\delta_{\text{C}}$  (71,71) com H-4''  $\delta_{\text{H}}$  (3,53); C-5''  $\delta_{\text{C}}$  (82,82) com H-5''  $\delta_{\text{H}}$  (3,46) e C-5'''  $\delta_{\text{C}}$  (82,78) com H-5'''  $\delta_{\text{H}}$  (3,46); C-1'' e C-1'''  $\delta_{\text{C}}$  (75,85) com H-1''  $\delta_{\text{H}}$  (5,01; *d*, *J* = 9,2 Hz) e H-1'''  $\delta_{\text{H}}$  (5,00, *d*, *J* = 9,2 Hz); C-6'' e C-6'''  $\delta_{\text{C}}$  (62,65) com os sinais centrados em  $\delta_{\text{H}}$  (3,87 e 3,79) H-6a'' e H-6b'' e H-6a''' e H-6b'''; o que tornou possível as deduções de cada um dos carbonos do dissacarídeo. E ainda na estrutura da aglicona foi possível observar  $\delta_{\text{C}}$  131,49 referente a C-2' e C-6' correlacionando com  $\delta_{\text{H}}$  7,38 referente aos hidrogênios (H-2' e H-6') e por fim em  $\delta_{\text{C}}$  116,50 referente a C-3' e C-5' com  $\delta_{\text{H}}$  6,85 (H-3' e H-5').

Pelo mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 98, p. 152) foi possível correlacionar os sinais dos carbonos do glicosídeo com os átomos de hidrogênio ligados diretamente a eles, assim como observado no HMQC, porém, além destes sinais foi possível observar uma correlação importante que não havia sido observada pelo HMQC:  $\delta_{\text{C}}$  154,79 (C-2') com  $\delta_{\text{H}}$  8,14 (H-2').

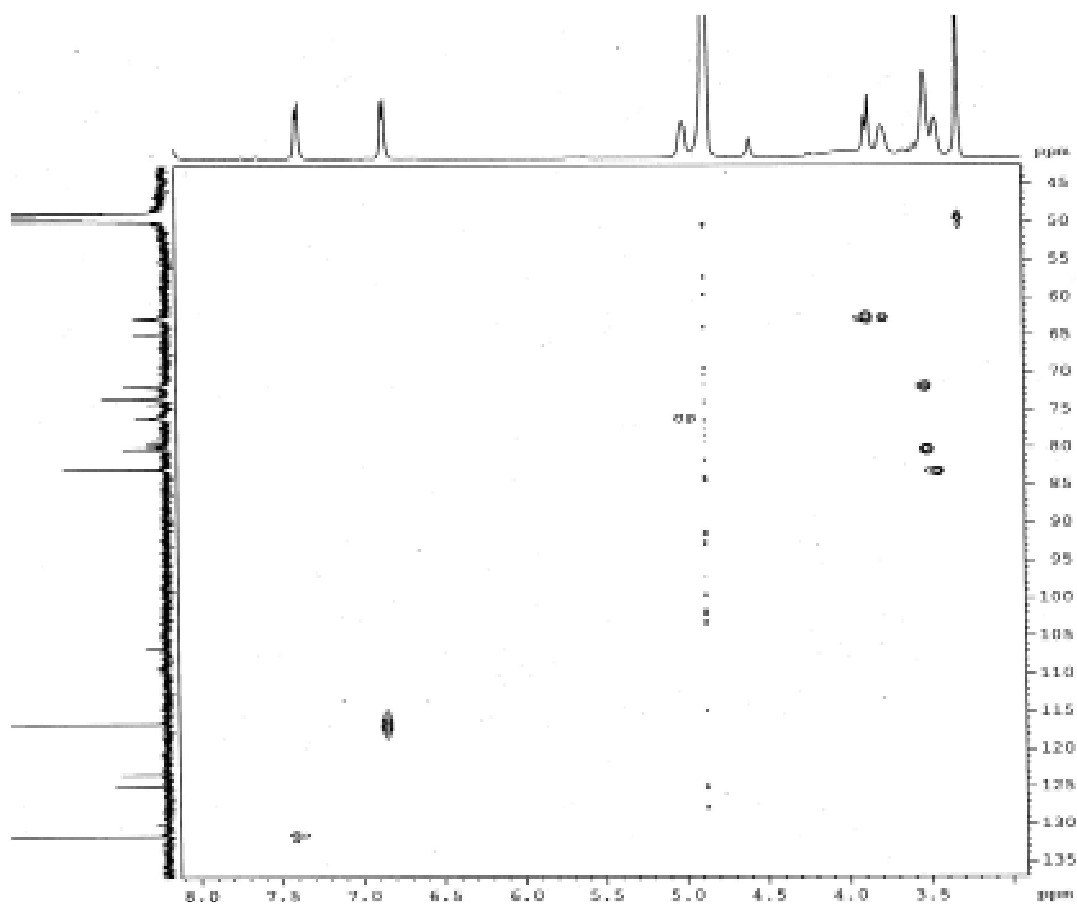


Figura 96 - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMQC) de DG-12.

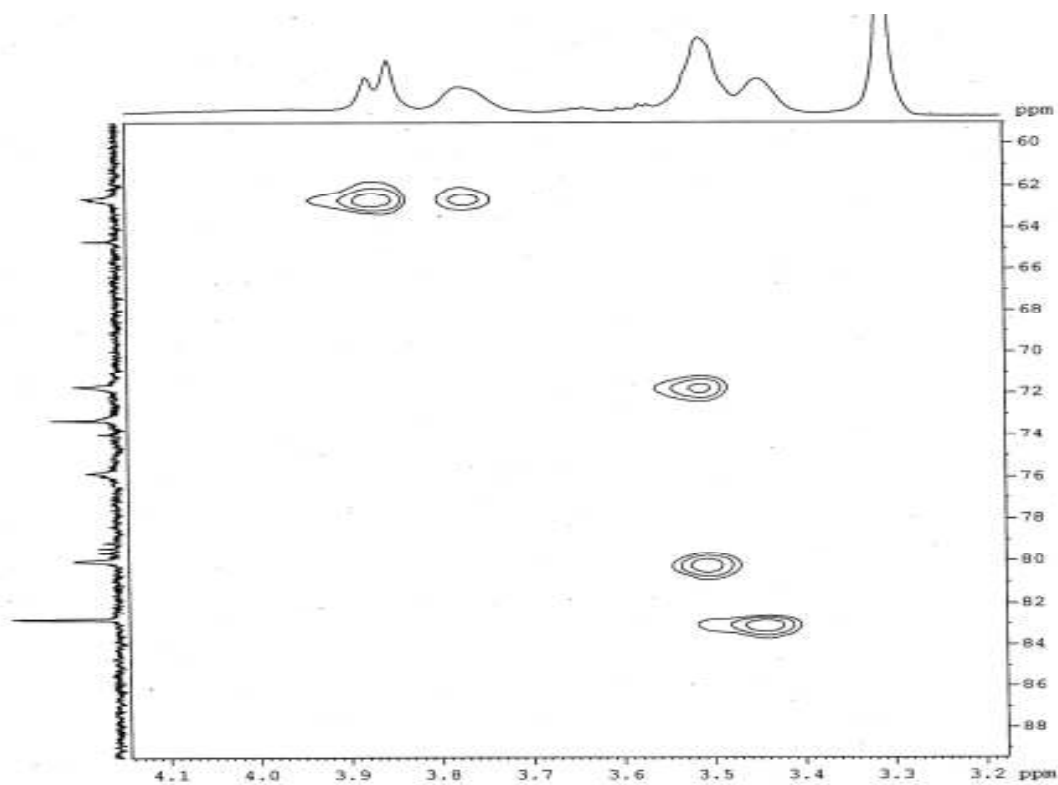
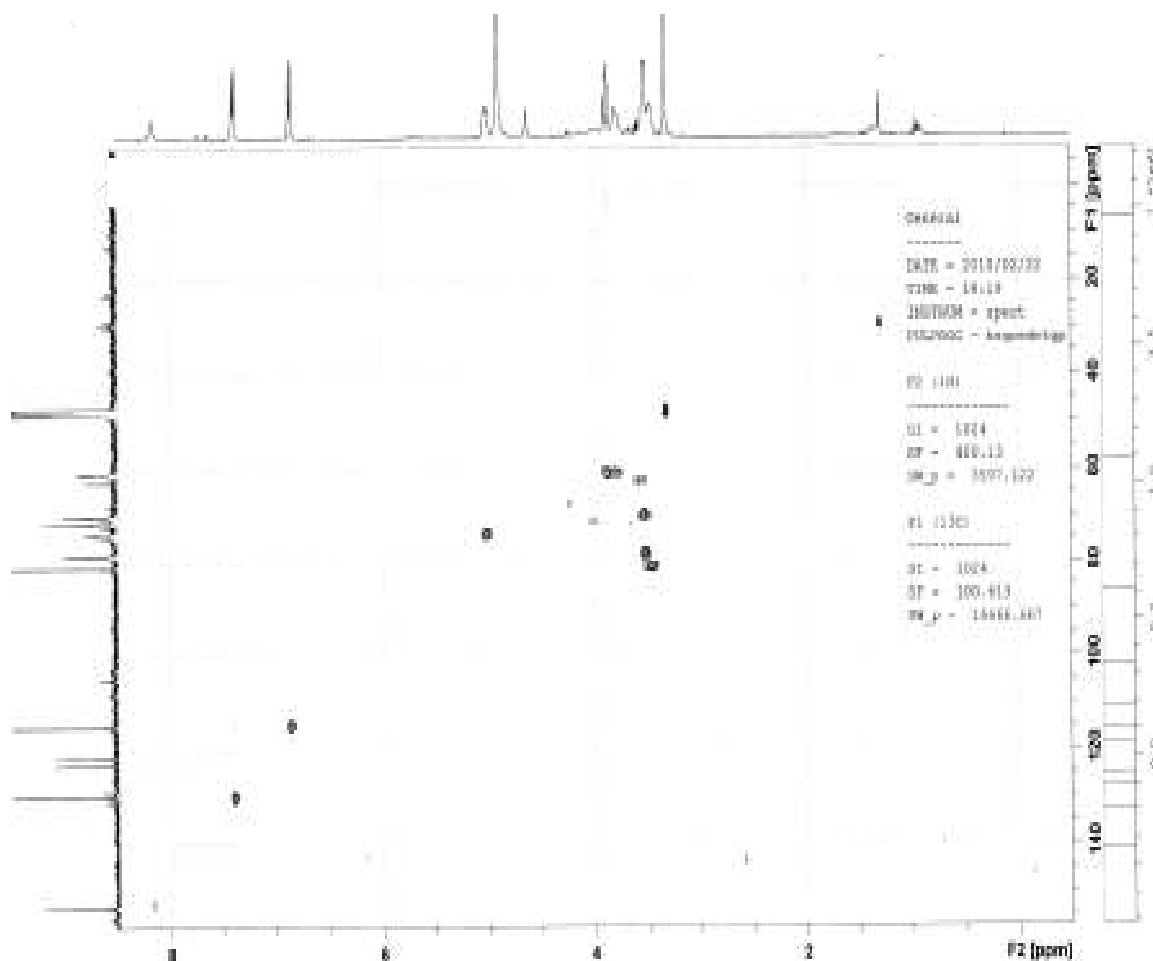


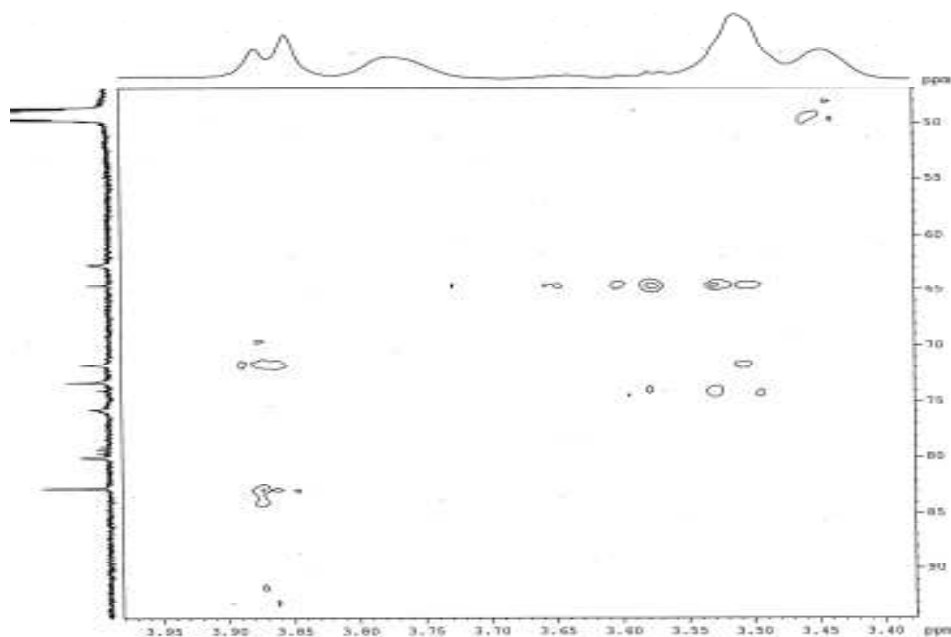
Figura 97 - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMQC) de DG-12.



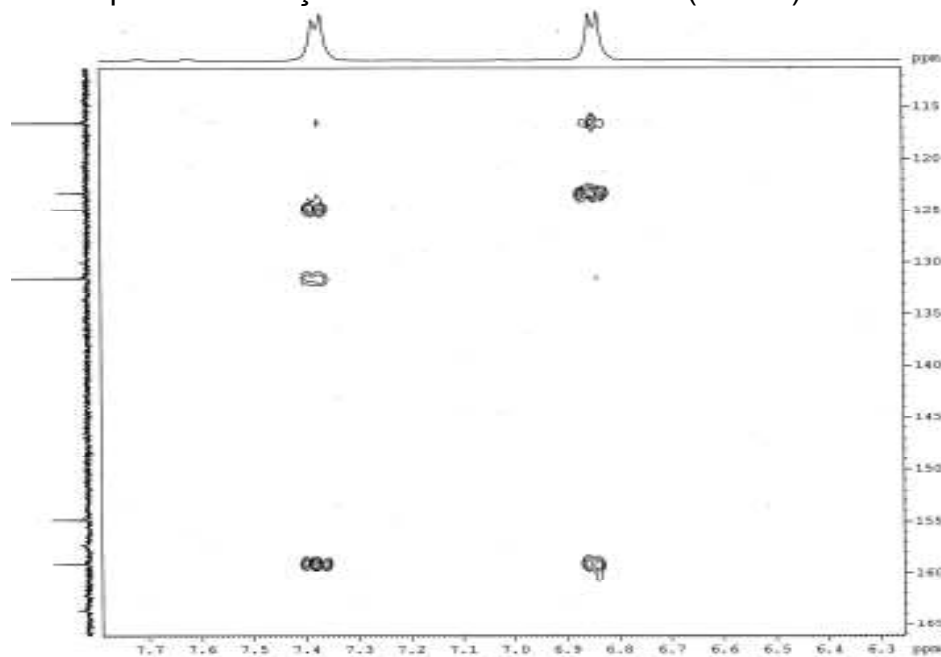


**Figura 98** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HSQC) de DG-12.

Pelo mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 99 e 100, p. 153) foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos átomos de carbono, principalmente o átomo de carbono não hidrogenado C-4'  $\delta_{\text{C}}$  (159,04) e os hidrogênios: H-3' e H-5'  $\delta_{\text{H}}$  (6,85) a duas ligações e a três ligações com H-2' e H-6'. O átomo C-1'  $\delta_{\text{C}}$  (124,83) correlacionando com os hidrogênios H-3' e H-5'  $\delta_{\text{H}}$  (6,85) a três ligações. Foi possível observar o acoplamento do carbono não-hidrogenado C-7  $\delta_{\text{C}}$  (161,9) e os hidrogênios H-1'' e H-1'''  $\delta_{\text{H}}$  (5,01) a três ligações. Uma avaliação mais rigorosa de um dos mapas de correlação HMBC com ampliação na região entre 3,0 e 4,0 ppm foi possível verificar o correlacionamento de C-2'' e C-2''' ( $\delta_{\text{C}}$  73,29) com H-4'' e H-4'''  $\delta_{\text{H}}$  (3,53) a três ligações e também com H-3'' e H-3'''  $\delta_{\text{H}}$  (3,51); o sinal de C-6'' e C-6''' correlacionando com H-5'' e H-5''' a duas ligações e correlacionando a três ligações com H-4'' e H-4'''.



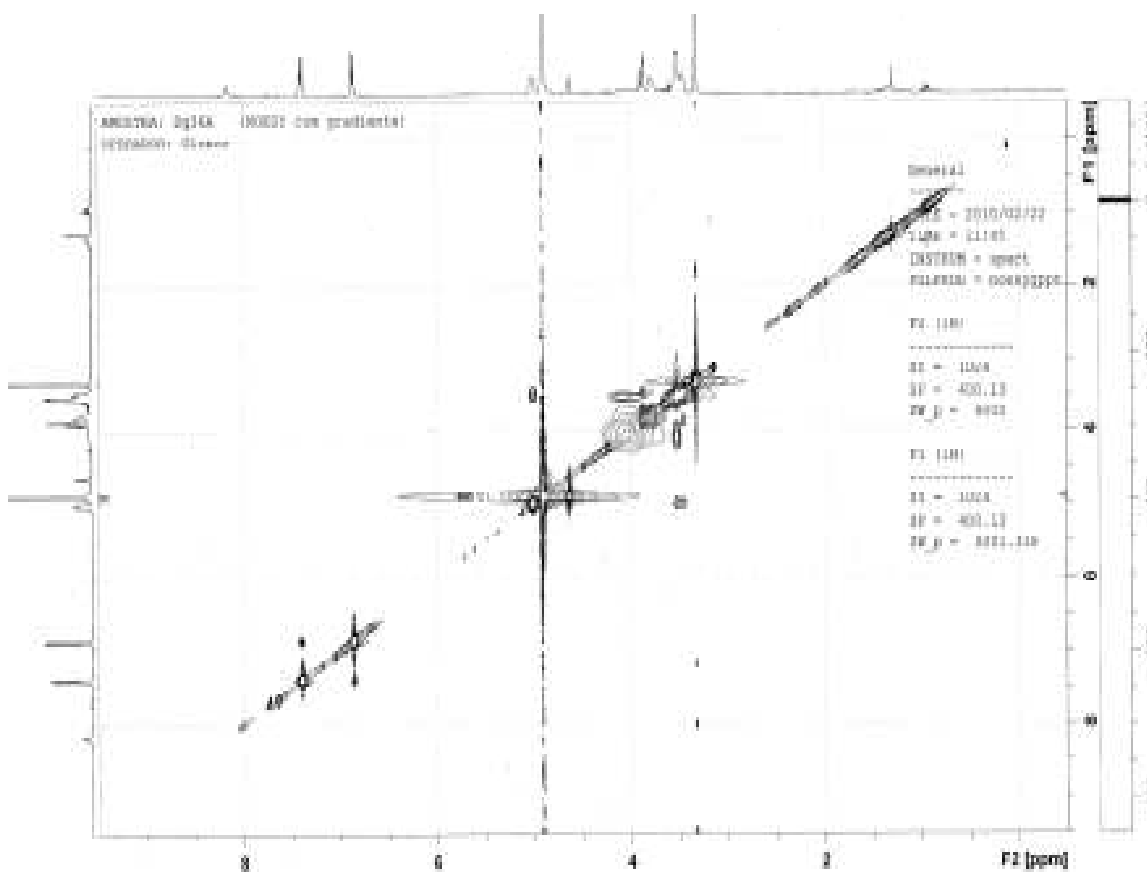
**Figura 99** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-12.



**Figura 100** - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-12.

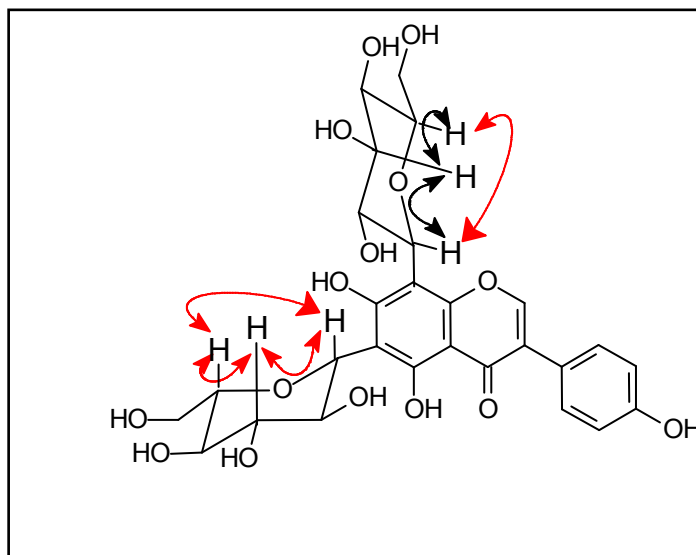
O Mapa de correlação espacial NOESY (Figura 101, p. 154) nos auxiliou nas atribuições resultantes da interação espacial existentes entre os diferentes átomos de hidrogênios da molécula, foi possível observar a interação espacial entre:  $\delta_{\text{H}}$  3,51 referente ao H-3'' com  $\delta_{\text{H}}$  5,01 referente a H-1'';  $\delta_{\text{H}}$  3,51 referente ao H-3'' com  $\delta_{\text{H}}$  5,00 referente a H-1'';  $\delta_{\text{H}}$  3,46 referente ao H-5'' com  $\delta_{\text{H}}$  5,01 referente a H-1'';  $\delta_{\text{H}}$  3,46 referente H-5'' com  $\delta_{\text{H}}$  5,00 referente a H-1''. Além das interações espaciais observadas entre os sinais:  $\delta_{\text{H}}$  3,51 referente a H-4''

e H-4''' com os sinais em  $\delta_H$  3,87 e 3,79 referente aos H-6a''/6b'' e H-6a'''/6b''' e por fim a interação espacial entre H-3' e H-5' representados pelo sinal em  $\delta_H$  6,85 com H-2' e H-6' representados pelo sinal em  $\delta_H$  7,38. Algumas destas interações espaciais podem ser visualizadas na Figura 102, p. 155.



**Figura 101** - Mapa de interação espacial NOESY de DG-12.

A atribuição completa dos dados espectrais de RMN a uma e duas dimensões encontram-se na (Tabela 18, p. 156). A Figura 103, p. 157 apresenta alguns dados de ressonância úteis na comparação de DG-12 com isoflavonóides relatados na literatura que juntamente com a Tabela 19, p. 158 permitiram sugerir uma proposta estrutural para DG-12. Até o momento a substância DG-12 não foi relatada na literatura.



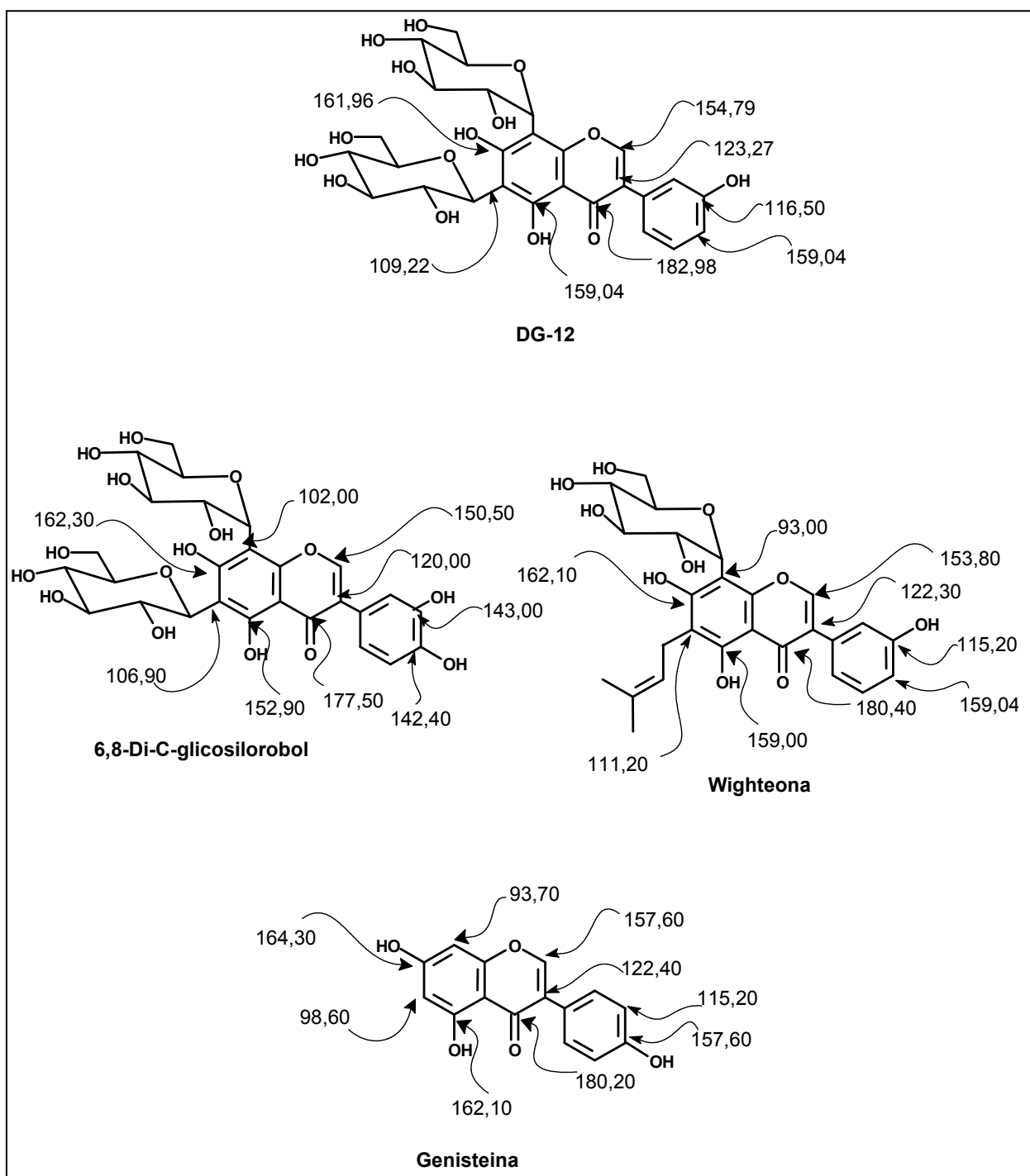
**Figura 102** - Algumas interações espaciais observadas pelo NOESY de DG-12.

Em relação as atividades biológicas, até o momento, não foi relatado na literatura nenhum teste específico que comprove atividades biológicas da substância DG-12, mas, pode-se citar o trabalho realizado por Umehara, e colaboradores, 2009, que testou isoflavonóides isolados de *Dalbergia parviflora* com estruturas semelhantes a DG-12 e publicou que as mesmas exibiram atividade contra linhagens de células de câncer mamário humano MCF-7 e T47D, responsivos a estrogênio. Em outro artigo, foram testados a atividade antimalária de um isoflavonóide semelhante a DG-12 observando resultados promissores (Songsiang, *et. al.*, 2009).

**Tabela 18** - Dados de RMN da substância DG-12.

C	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
3	123,27	-	-	H-2'/H-6'
4	182,98	-	-	-
5	159,04	-	-	-
6	109,22	-	-	-
7	161,96	-	-	H-1''/H-1'''
8	-	-	-	-
9	157,28	-	-	H-3'/H-5'
10	106,42	-	-	-
1'	124,83	-	-	H-3'/H-5'
4'	159,04	-	H-3'/H-5'	H-2'/H-6'
<b>CH</b>				
2	154,79	8,14 (s)	-	-
2'	131,49	7,38 (d, $J = 8,4$ )	-	-
3'	116,50	6,85 (d, $J = 8,4$ )	-	-
5'	116,50	6,85 (d, $J = 8,4$ )	-	-
6'	131,49	7,38 (d, $J = 8,4$ )	-	-
1''	75,85	5,01 (d, $J = 9,2$ )	-	-
2''	73,29	3,60	H-3''	H-4''
3''	80,01	3,51	H-4''	-
4''	71,71	3,53	H-3''	H-6''
5''	82,82	3,46	H-6''	-
1'''	75,85	5,00 (d, $J = 9,2$ )	-	-
2'''	73,29	3,60	H-3'''	H-4'''
3'''	80,01	3,51	H-4'''	-
4'''	71,71	3,53	H-3'''	H-6'''
5'''	82,78	3,46	H-6'''	-
<b>CH<sub>2</sub></b>				
6''	62,65	3,87 (d, $J = 11,8$ ) 3,79 (m)	H-5''	-
6'''	62,65	3,87 (d, $J = 11,8$ ) 3,79 (m)	H-5'''	-

Fonte: \* Agrawal, 1989.



**Figura 103** - Comparação de alguns sinais observados por RMN  $^{13}\text{C}$  para as substâncias: DG-12, 6,8-D-C-glicosilorobol\*, Wighteona\* e Genisteina\* . Fonte: \*Agrawal,1989.

**Tabela 19** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  das substâncias: DG-12, Wighteona, 6,8-Di-C-glicosilorobol e genisteína.

	DG-12	Wighteona *	6,8-di-C-glicosilorobol *	Genisteína *
C	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$
3	123,27	122,3	120,0	122,4
4	182,98	180,4	177,5	180,2
5	159,04	159,0	152,9	162,1
6	109,22	111,2	106,9	98,6
7	161,96	162,1	162,3	164,3
8	-	93,0	102,0	93,7
9	157,28	155,5	157,3	157,6
10	106,42	104,4	102,3	104,6
1'	124,83	121,5	120,0	121,4
4'	159,04	157,2	142,4	157,6
<b>CH</b>				
2	154,79	153,8	150,5	157,6
2'	131,49	130,3	114,7	130
3'	116,50	115,2	143,0	115,2
5'	116,50	115,2	113,8	115,2
6'	131,49	130,3	118,1	130
1''	75,85	-	77,1	-
2''	73,29	-	73,9	-
3''	80,01	-	70,3	-
4''	71,71	-	68,4	-
5''	82,82	-	80,8	-
1'''	75,85	-	75,8	-
2'''	73,29	-	71,5	-
3'''	80,01	-	68,4	-
4'''	71,71	-	68,4	-
5'''	82,78	-	79,6	-
<b>CH<sub>2</sub></b>				
6''	62,65	-	60,9	-
6'''	62,65	-	59,3	-

Fonte: \* Agrawal, 1989.

#### 4.12 - Determinação Estrutural da mistura DG-13 e DG-10

As substâncias DG-13 e DG-10 (6,0 mg) foram isoladas como uma mistura, do extrato diclorometânico na forma de cristais amarelados, que ao ser submetido a CCDA apresentaram-se como uma única mancha de coloração avermelhada ao serem revelados com vanilina sulfúrica, observou-se também que a mancha apresentada na cromatoplaça absorvia luz UV ao ser colocada na câmara escura. Esses cristais foram submetidos a CGEM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Por CG/EM foi possível obter espectros de massas de alta resolução para DG-10 (Figura 104) e DG-13 (Figura 105). Observou-se o pico do íon molecular em  $m/z = 268,05$  referente a massa molecular de DG-10 e fragmentações características do neoflavonóide dalbergina ( $m/z = 240$ ; 225) (Figura 105). Pelo espectro de massas de alta resolução (Figura 105) foi possível observar alguns fragmentos característicos de esqueleto triterpênico pentacíclico como os fragmentos de massas em:  $m/z = 218,15$ ;  $m/z = 203,15$  e  $175,15$ .

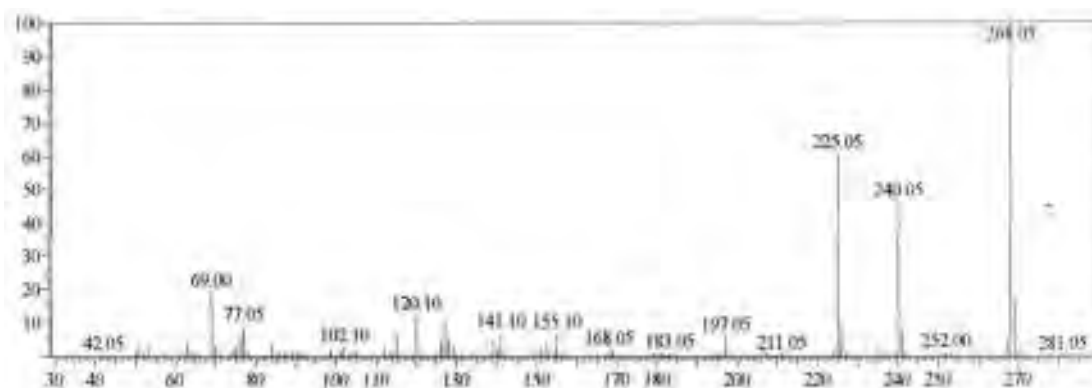


Figura 104 - Espectro de Massas a 70 eV de DG-10.

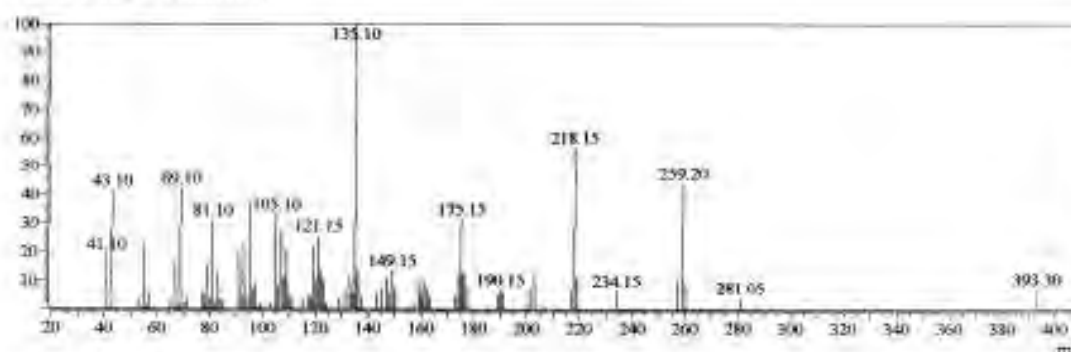
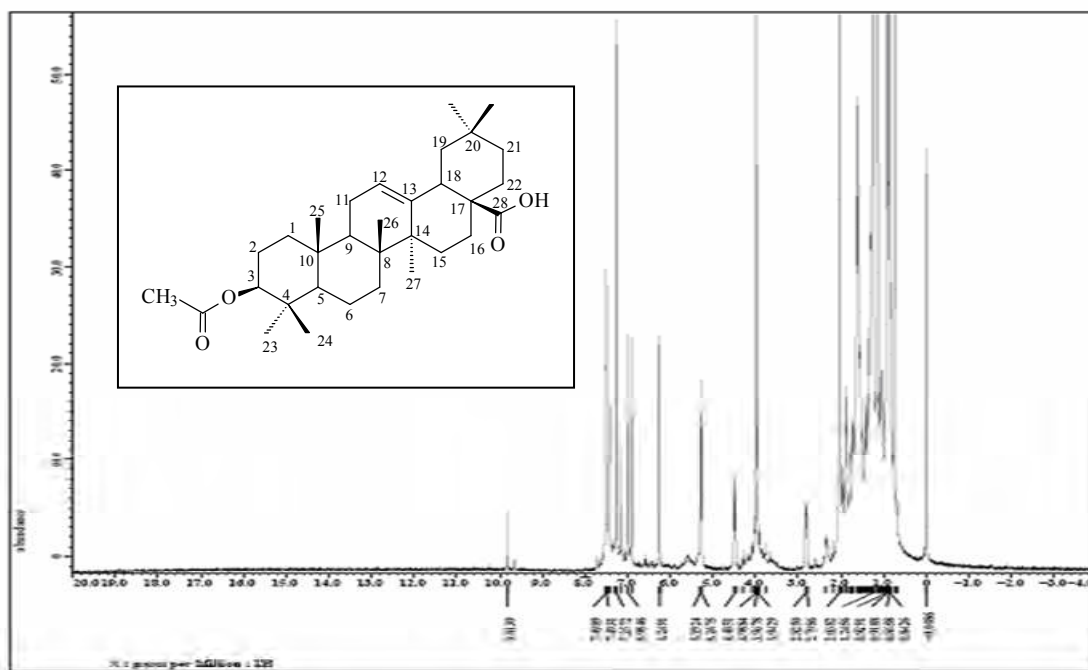


Figura 105 - Espectro de Massas a 70 eV de DG-13.

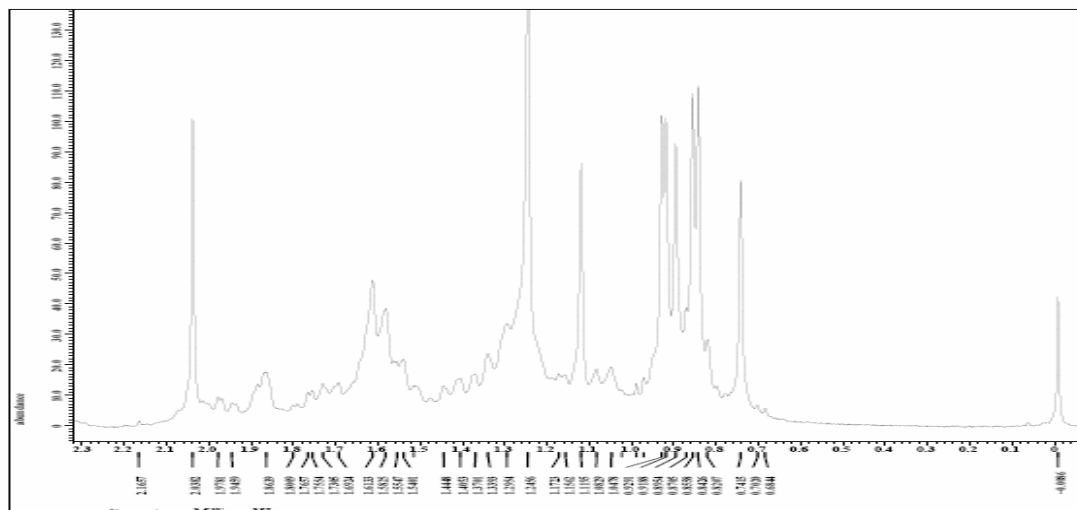


Pelos espectros de RMN<sup>1</sup>H foi possível observar sinais pertencentes as classes de substâncias de esqueleto triterpênico pentacíclico e também a esqueleto neoflavonoídico. A análise dos dados espectrais nos permitiu inferir que esta substância com características neoflavonoídicas e que apresentou massa molecular exata de 268,05 uma, trata-se de quantidade adicional da substância anteriormente isolada do extrato diclorometânico e já discutida, DG-10 . Porém, a substância triterpenoidal será aqui discutida.

Pelo espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 106) foi possível observar um grande numero de sinais entre 0,8 e 1,62 ppm (Figura 107, p. 161) o que nos indicou uma feição de espectro de triterpeno pentacíclico; e ainda foi possível observar um sinal em 3,99 ppm característico de hidrogênios metoxílicos; mostrou um sinal em  $\delta_H$  2,04 referente aos hidrogênios metílicos do grupo acetato; observa-se também um sinal largo em  $\delta_H$  4,49 referente ao H-3 e um sinal simples largo em  $\delta_H$  5,29 referente ao hidrogênio vinílico H-12.

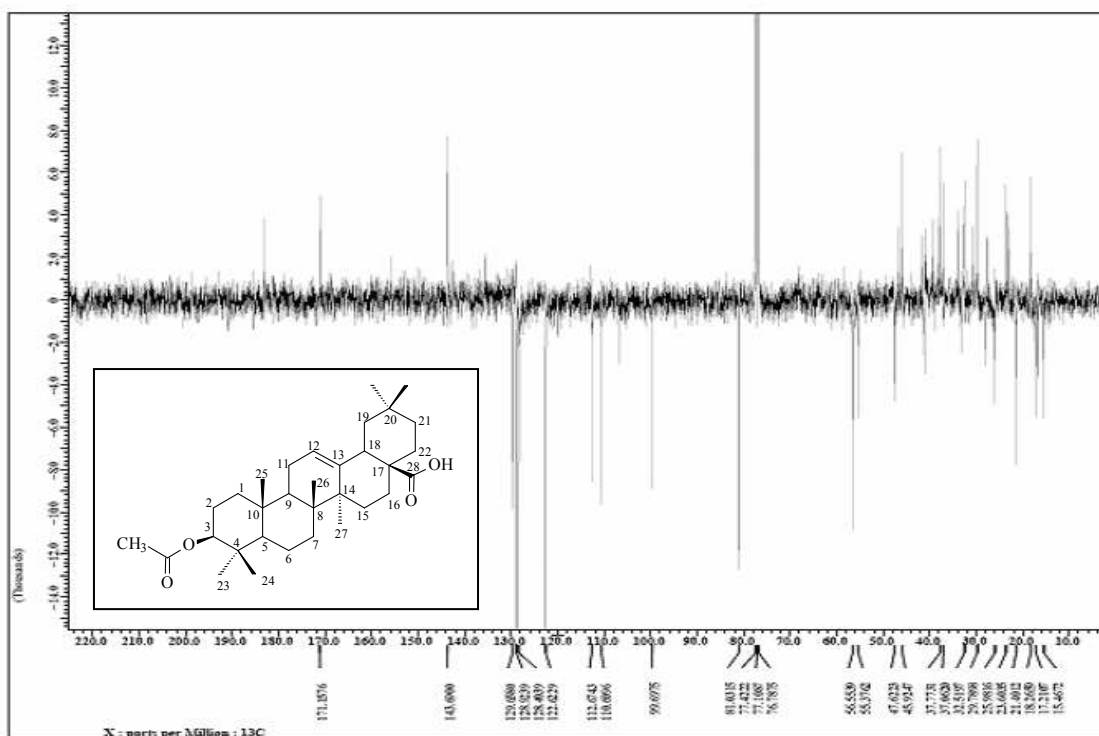


**Figura 106** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura DG-10 e DG-13.

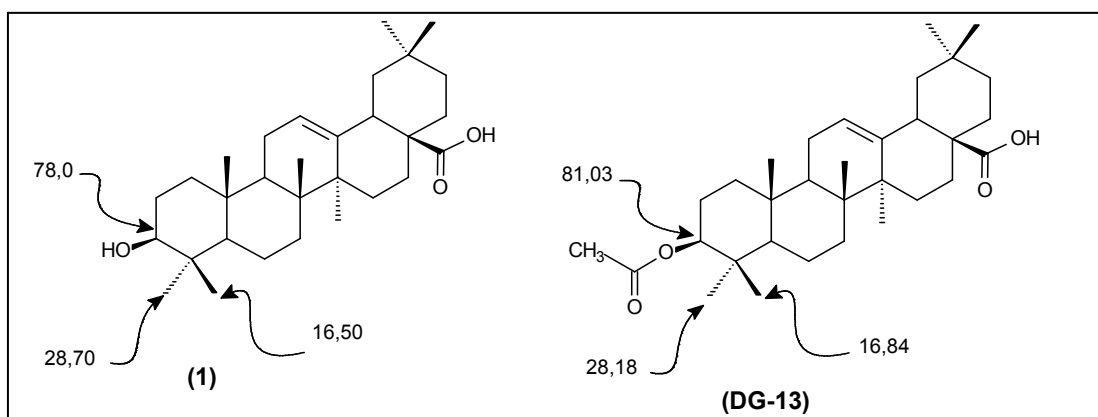


**Figura 107** - Ampliação entre (0,0 e 2,3 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura DG-10 e DG-13.

Pela interpretação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - PENDANT (Figura 108) foi possível observar sinais um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  81,03 atribuído a C-3, devido a presença do grupo acetato no anel triterpênico cujo deslocamento químico apresenta-se desprotegido cerca de 3 ppm quando comparado com o ácido oleanólico cujo  $\delta_{\text{C}}$  78,0 no qual se observa a presença de grupo hidroxila de acordo com a Figura 109, p. 162.



**Figura 108** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -PENDANT (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura DG-10 e DG-13.

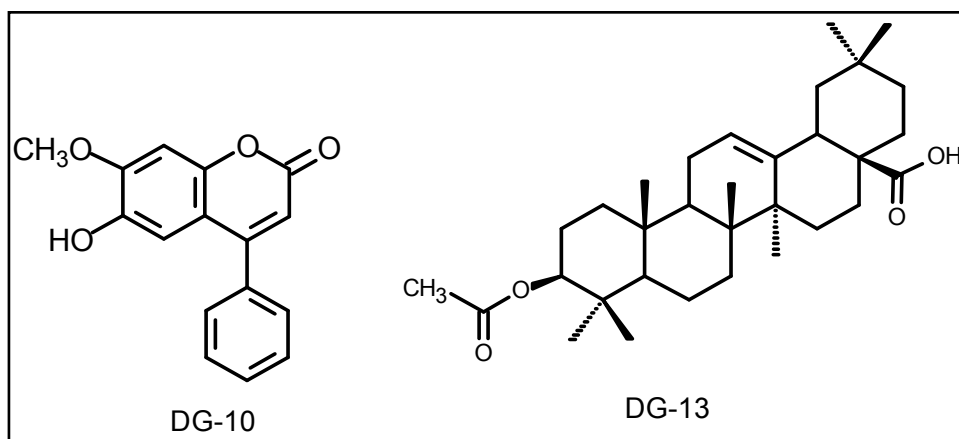


**Figura 109** - Comparação de alguns deslocamentos químicos do ácido oleanólico\* (1) e de DG-13. Fonte: \* Mahato & Kundu, 1994.

Os dados completos obtidos da interpretação dos espectros de RMN encontram-se registrados na Tabela 20, p. 164.

Segundo publicado por Kelecom, e colaboradores (2002) o ácido oleanólico apresenta no barbeiro *Rhodnius prolixus*, vetor da doença de Chagas, toxicidade dose-dependente e drástica a inibição da muda nas doses de 1,10 e 100 mg/mL. Neste mesmo artigo ainda é citada várias outras atividades biológicas atribuídas ao ácido oleanólico como por exemplo a inibição de lipases, glicerol fosfatodesidrogenases, DNA-ligases e quinases AMP-c dependentes; cita ainda atividades: anticolesterolêmica, antiepatotóxica, antioxidante, antiinflamatória, antibiótica e a inibição de crescimento de tumores e de patógenos orais. Protege a pele da ação da luz e finalmente inibe a dimerização da protease do HIV-1 (Liu, 1995). Em outro artigo foi relatada atividade inibidora da transcriptase reversa do vírus HIV-1 na concentração de 100 mg (Pereira, *et. al.*, 1998). Segundo Dos Santos, e colaboradores, 2007, ao testar os efeitos dos constituintes químicos isolados de *Rhedia gardineriana* observou que o ácido oleanólico foi o constituinte químico mais eficiente no controle de *in vitro* do fitonematóide *Meloidogyne incógnita*, sendo capaz de reduzir a população destes fitonematóides em 63,5% em 240 horas na concentração de 800 µg/mL, por um efeito nematostático.

Após análise de todos os dados obtidos por RMN e CGEM foi possível inferir que a amostra em questão se tratava da mistura de substância DG-10 e DG-13, cujas estruturas químicas podem ser vistas na Figura 110.



**Figura 110-** Substâncias identificadas DG-10 e DG-13.

**Tabela 20** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substância DG-13 e comparação com dados da literatura.

(10)		Dalbergina*	DG-13	Acetato do ácido oleanólico**	
C	$\delta_c$	$\delta_c$	C	$\delta_c$	$\delta_c$
1	-	-	1	39,42	38,00
2	-	160,85	2	23,60	27,70
3	112,67	111,70	3	81,03	80,90
4	155,00	155,55	4	37,77	39,00
5	110,61	110,75	5	55,38	55,30
6	142,00	143,96	6	18,27	18,10
7	152,00	152,35	7	32,52	32,80
8	99,70	100,91	8	40,97	-
9	-	148,85	9	47,62	48,00
10	-	111,32	10	38,20	37,70
1'	135,00	135,72	11	22,99	24,00
2'	128,93	128,71	12	122,62	122,50
3'	128,40	128,24	13	143,69	143,60
4'	129,66	129,95	14	41,67	41,50
5'	128,40	128,24	15	27,76	28,00
6'	128,93	128,71	16	23,45	23,40
OCH <sub>3</sub>	56,55	56,57	17	46,54	46,60
-	-	-	18	47,62	-
-	-	-	19	45,92	-
-	-	-	20	30,74	30,70
-	-	-	21	33,89	33,80
-	-	-	22	33,18	-
-	-	-	23	22,18	29,70
-	-	-	24	16,84	16,70
-	-	-	25	15,47	15,50
-	-	-	26	17,21	17,20
-	-	-	27	25,98	-
-	-	-	28	183,75	178,60
-	-	-	29	33,16	33,10
-	-	-	30	21,40	23,60
-	-	-	COCH	171,16	170,9

3

**Fonte:** \* Dalbergina (Agraal, 1989).

\*\*Acetato do ácido oleanólico (Hichri, *et. al.*, 2003).

#### 4.13 - Determinação Estrutural de DG-14

A substância DG-14 (3 mg) foi isolado da partição em diclorometano do extrato metanólico, após ter sido parcionado em éter de petróleo. Essa nova partição resultou numa fração insolúvel em diclorometano que foi submetido a CCGG resultando no isolamento de cristais alaranjados que ao serem analisados por CCDA apresentaram coloração amarelada ao serem revelados com vanilina sulfúrica. Quantidades adicionais de DG-14 foram isoladas do extrato em acetato de etila. DG-14 foi submetido a espectrometria de IV, CGEM e RMN a uma e duas dimensões.

Pela análise dos dados espectrais na região do infravermelho (Figura 111) da substância DG-14 é possível atribuir uma banda de absorção em torno de  $3400\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de O-H, observa-se duas bandas de estiramento de C-H e  $\text{CH}_2$  em hibridização  $\text{sp}^3$  em  $2917$  e  $2849\text{ cm}^{-1}$ , uma banda em  $1667\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de C=O de aldeído, as bandas de estiramento de C=C do anel furânico entre  $1514$  e  $1453\text{ cm}^{-1}$  e finalmente a banda de absorção em  $1023\text{ cm}^{-1}$  referente a C-O de grupamento éter. (Silverstain & Webster, 2006).

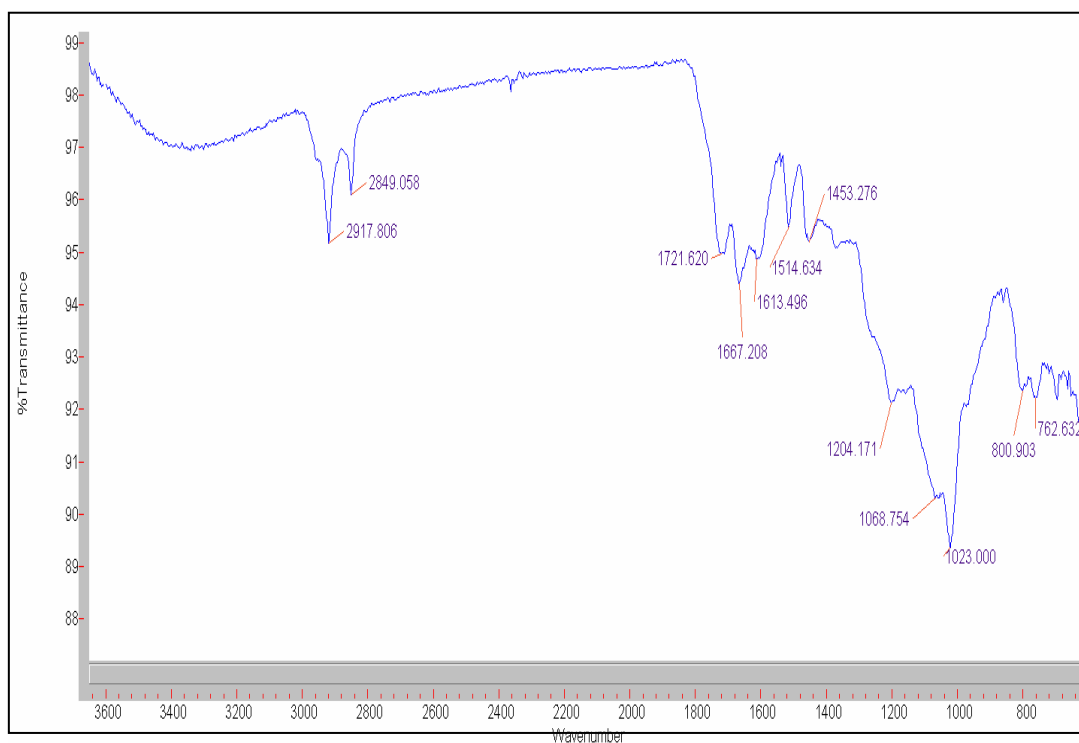
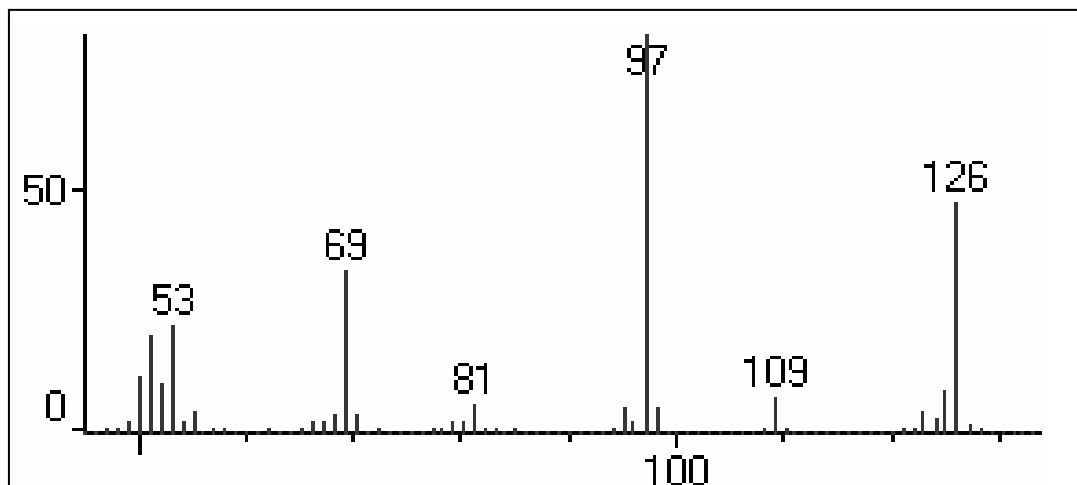


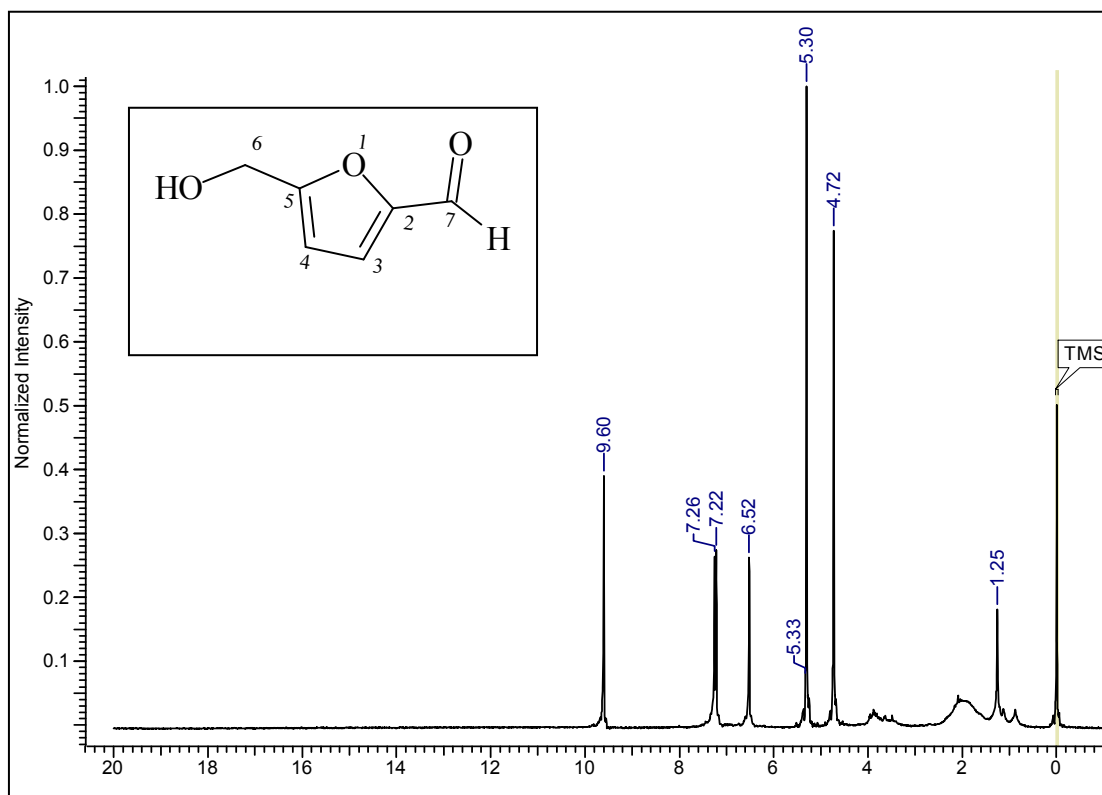
Figura 111 - Espectro de IV da substância DG-14.

No espectro de massas Figura 112 observou-se o pico do íon molecular em 126 uma.

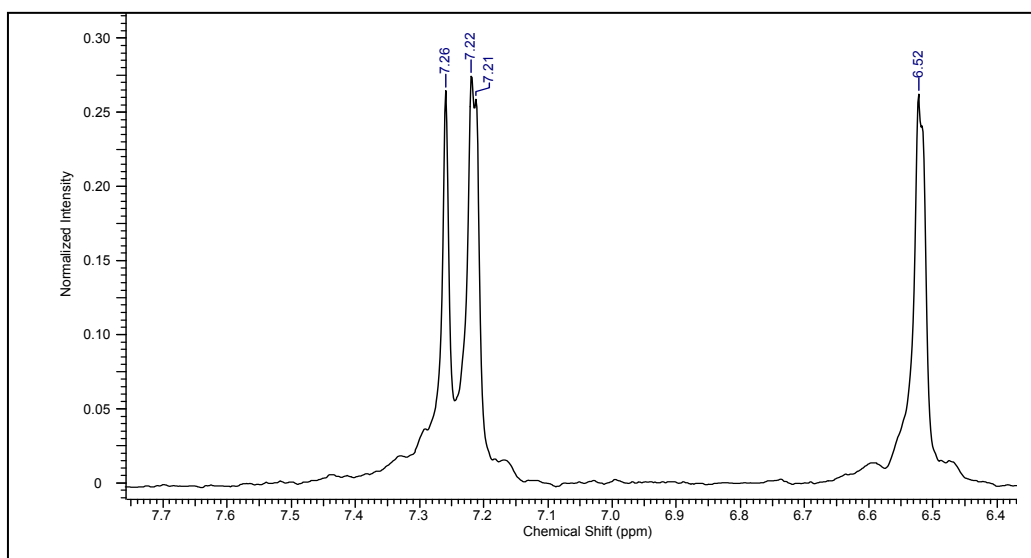


**Figura 112** - Espectro de massas 70 eV da substância DG-14.

Pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 113) observou-se cinco sinais simples destacando entre eles:  $\delta_{\text{H}}$  4,72 referente ao H-6 e  $\delta_{\text{H}}$  9,60 referente ao H-7; dois sinais duplos:  $\delta_{\text{C}}$  6,52 referente ao H-4 e  $\delta_{\text{C}}$  7,22 referente ao H-3 cujos valores das constantes de acoplamento ( $J = 4,0$  Hz).

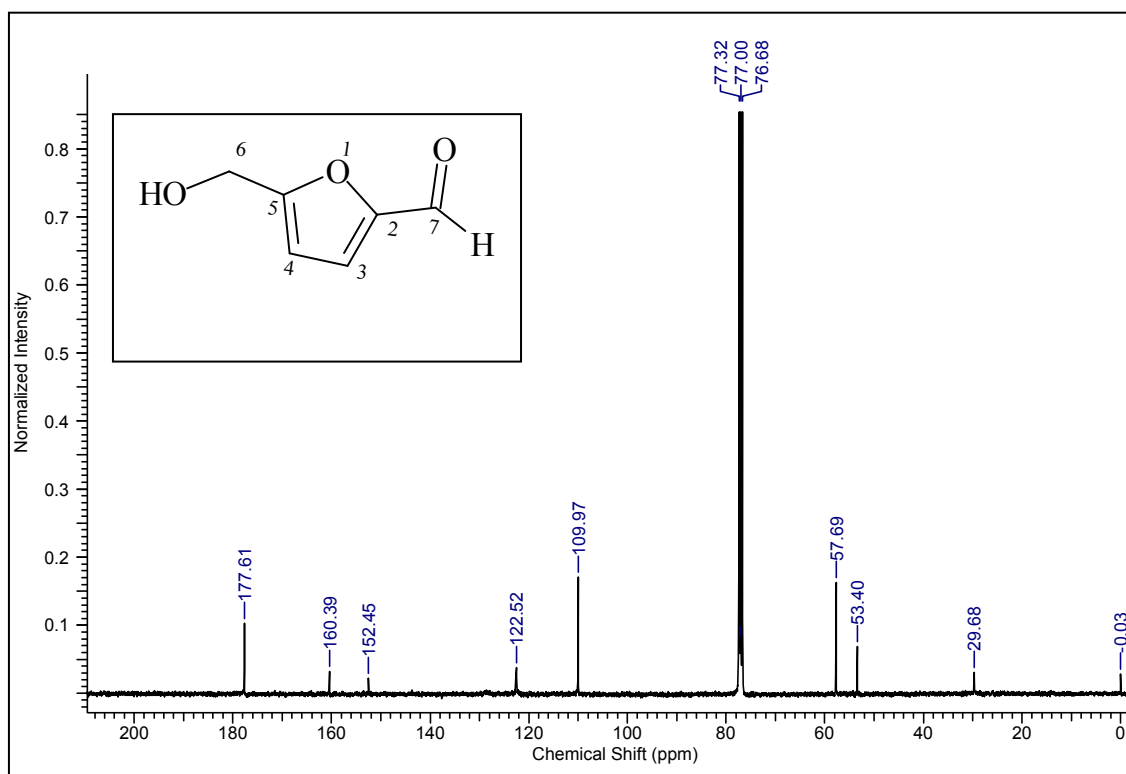


**Figura 113** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-14.



**Figura 114** - Ampliação do espectro região entre (6,4 á 7,7 ppm) de RMN  $^1\text{H}$  de DG-14.

Pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 115) observou-se oito sinais, sendo que dois deles se referem a carbonos não hidrogenados:  $\delta_{\text{C}}$  152,45 (C2) e  $\delta_{\text{C}}$  160,39 (C-5); três sinais são referentes a carbonos monoidrogenados:  $\delta_{\text{C}}$  109,97 (C-4);  $\delta_{\text{C}}$  122,52 (C-3) e  $\delta_{\text{C}}$  177,51 (C-7); e um sinal referente a carbono dihidrogenado  $\delta_{\text{C}}$  57,69 (C-6).



**Figura 115** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -HBBD (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DG-14.



---

Através do mapa de correlação heteronuclear (HMQC) (Figura 116, p.169) e da ampliação (Figura 117, p. 169) foi possível confirmar as atribuições de deslocamentos químicos que permitiu associar de forma clara importantes correlações como:  $\delta_H$  4,72 (s) sinal referente a H-6 correlacionando diretamente com C-6 em  $\delta_C$  57,69 (carbono dihidrogenado), e os sinais de carbono monohidrogenados C-3  $\delta_C$  122,52 correlacionando com o sinal H-3 em  $\delta_H$  7,21. O sinal de C-4 em  $\delta_C$  109,97 com o  $\delta_H$  6,51 referente H-4 e finalmente o sinal de C-7 em  $\delta_C$  177,61 correlacionando com o sinal em  $\delta_H$  9,61 referente a H-7.

Pelo mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 118, p. 170) juntamente com a ampliação (Figura 119, p. 170) foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos átomos de carbono não hidrogenado C-2 através das correlações a duas ligações com H-3 e com H-7, do carbono não hidrogenado C-5 através de correlações a duas ligações com H-4 e H-6. Foi possível verificar ainda o acoplamento do carbono monohidrogenado C-4 ( $\delta_C$  109,97) a três ligações com H-6. A atribuição completa dos dados espectrais de RMN encontra-se na Tabela 20, p. 172) o que permitiu juntamente com o experimento de CGEM através do espectro de massas permitiu a proposição da fórmula molecular  $C_7H_6O_3$  para DG-14.

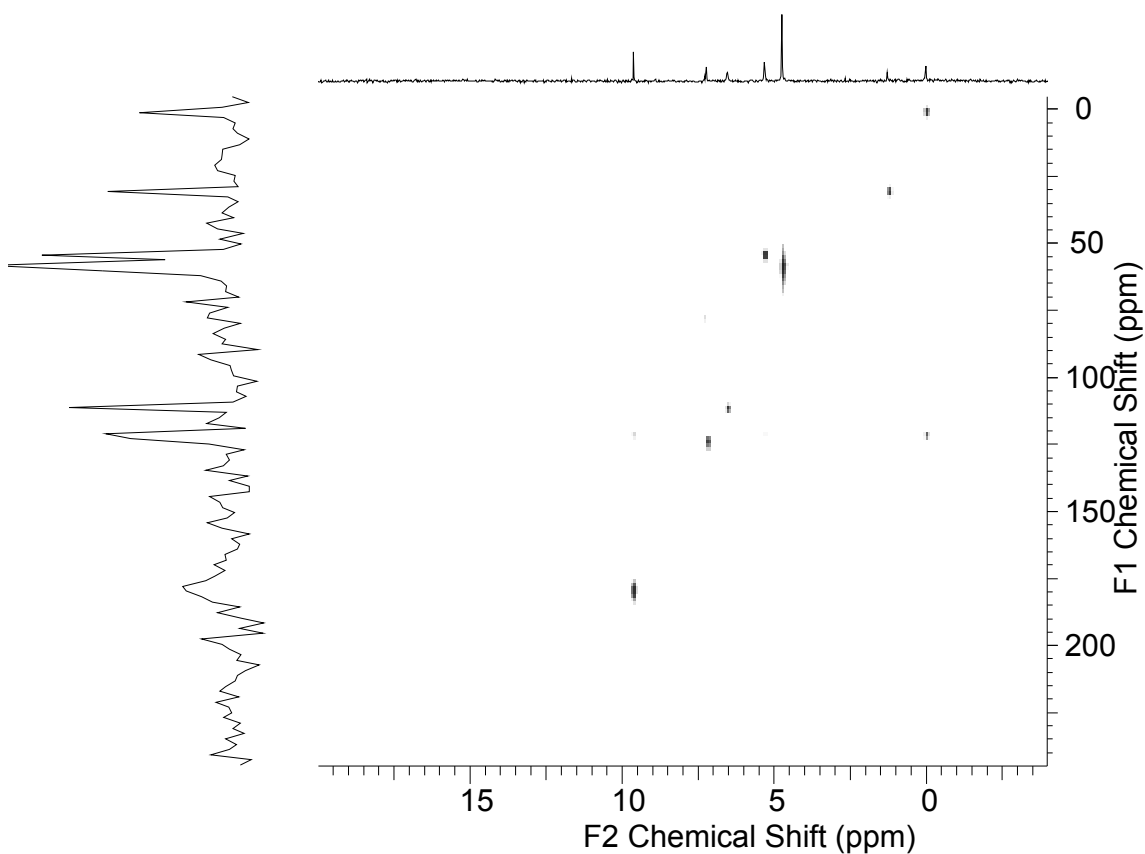


Figura 116 - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-14.

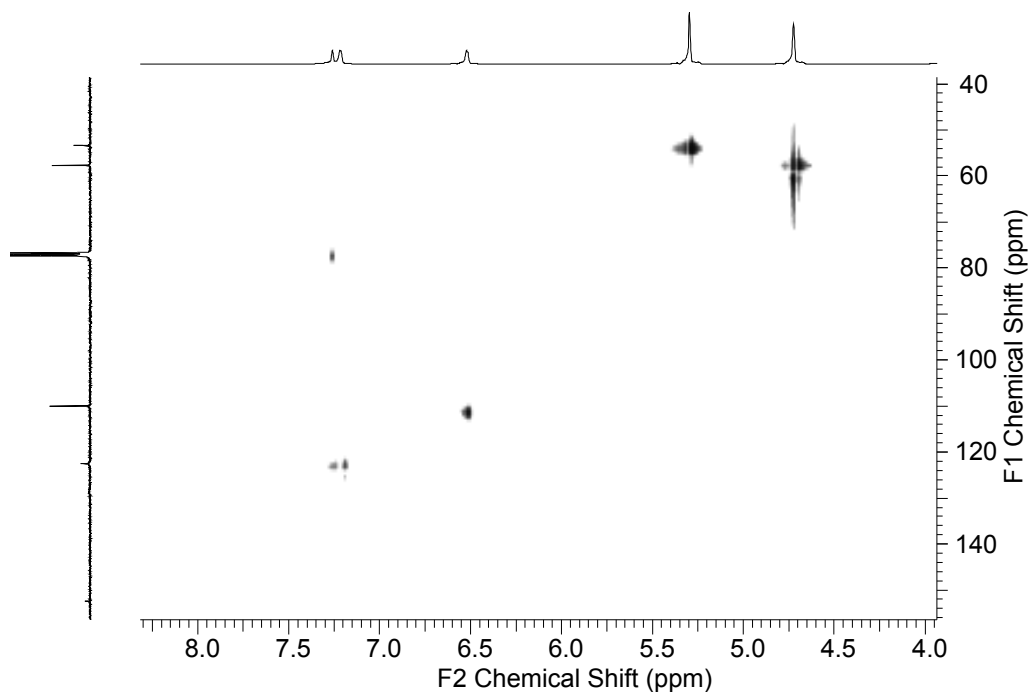


Figura 117 - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de DG-14.

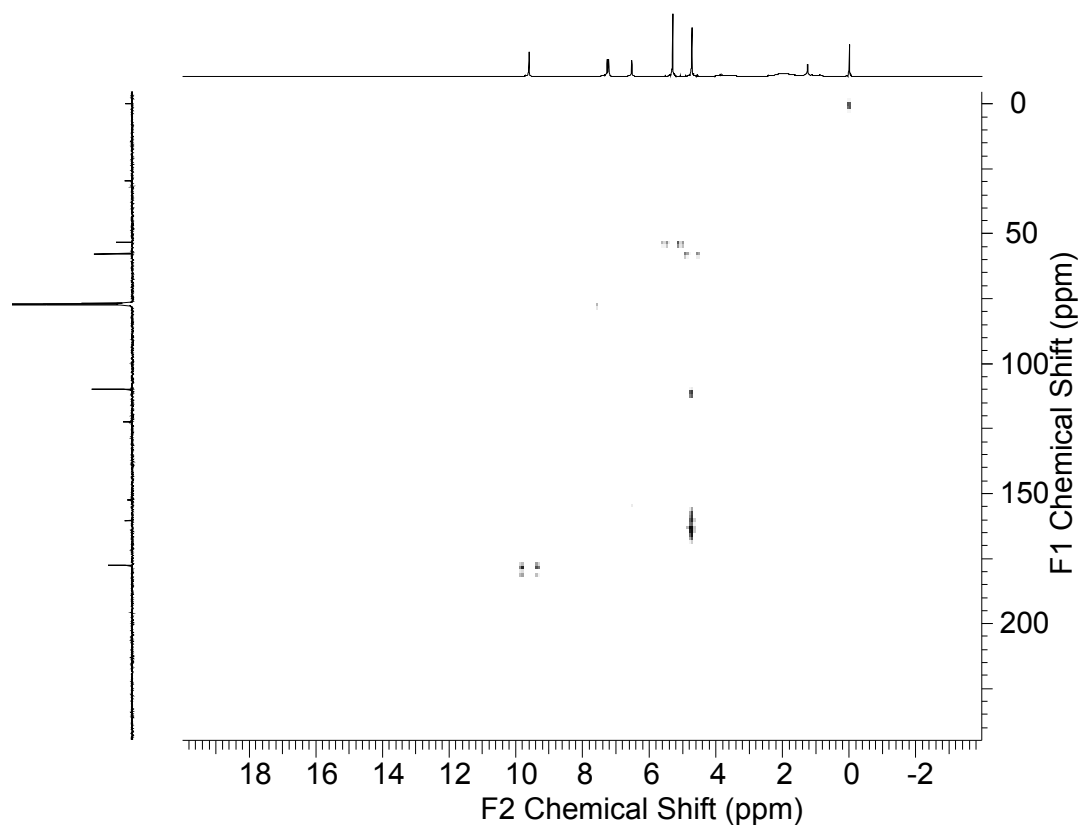


Figura 118 - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de DG-14.

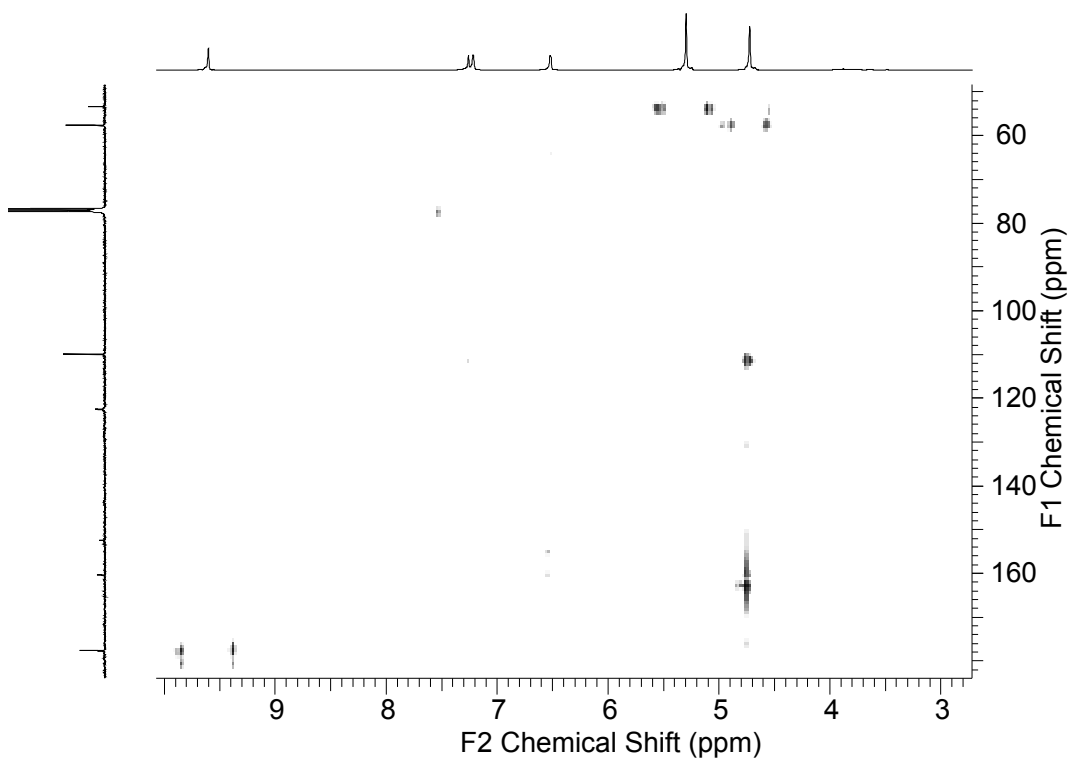
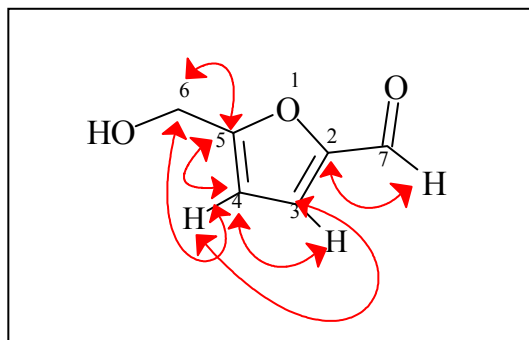
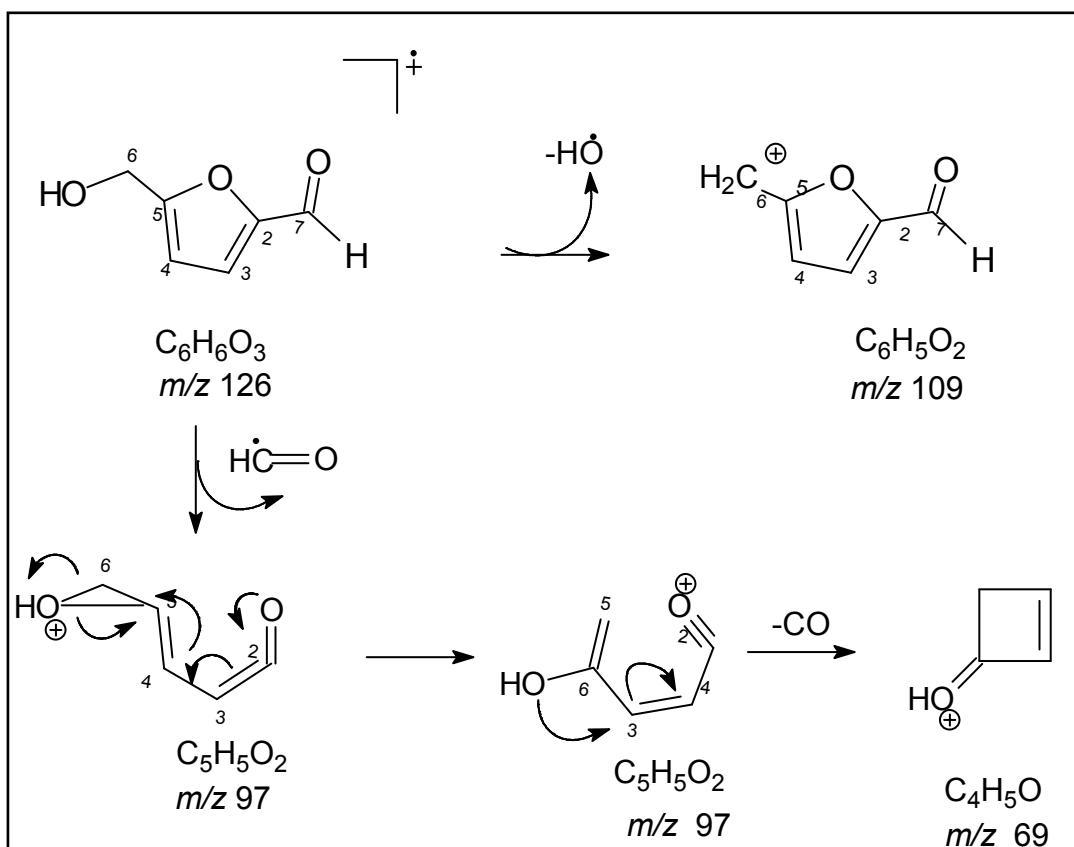


Figura 119 - Mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC) de DG-14.



**Figura 120** - Correlações observadas através do espectro de HMBC de DG-14.

O Esquema 17 apresenta alguns fragmentos de massas condizentes com a estrutura proposta para DG-14.

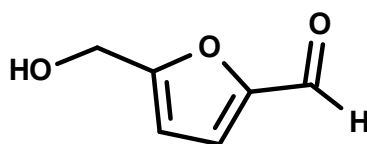


**Esquema 17** - Proposta de alguns fragmentos de massas para DG-14.

**Tabela 21** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substância DG-14 e comparação com dados da literatura.

C	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$		5-hidroximetilfurfural*	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	152,45 160,39	-	H-7	-	153,4	
5		-	H-4; 2H-6	-	162,9	
<b>CH</b>						
3	122,52	7,21 (d, $J = 3,5$ )	H-4	-	123,7	7,38 (d, $J = 3,5$ )
4	109,97 177,61	6,51 (d, $J = 3,5$ )	H-3	2H-6	110,2	6,58 (d, $J = 3,5$ )
7		9,61 (s)	-	-	178,1	9,59 (s)
<b>CH<sub>2</sub></b>						
6	57,69	4,72 (s)	-	-	57,5	4,63 (s)

Fonte: \* Silva, 2007.



Pelo melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro relato do isolamento da substância 5-hidroximetilfurfural no gênero *Dalbergia*, porém, outro derivado furânico já foi isolado de *D. obtusa* e *D. melanoxylon* (Chawla & Schibber, 1981). O HMF já foi isolado de outras plantas como: *Cirsium chlorolepis* (Asteraceae) e *Siphoneugema densiflora* (Myrtaceae); HMF é uma substância precursora de aminoácidos e proteínas (Silva, 2007). Foi relatado por Bosquesi, 2009, a utilização de HMF como reagente na síntese de substâncias nitrofurânicas para estudo de bioisosterismo, uma vez que compostos nitro-heterocíclicos são biologicamente ativos contra *Trypanossoma Cruzi*, incluindo várias substâncias: 5 e 2-nitroimidazóis e 5-nitrofuranos que podem atuar como agentes terapêuticos contra uma grande variedade de protozoários e bactérias anaeróbicas patogênicas em humanos e animais. Porém, a toxicidade de nitrofuranos é alta por via oral, o que tem estimulado vários trabalhos de modificação molecular na busca substâncias mais seguros e eficazes e que possam ser utilizadas como fármacos.

## 4.14 - Ensaios biológicos

### 4.14.1 Introdução

O estudo de metabólitos bioproduzidos por organismos vegetais é de tamanha importância que há muito vem sendo praticado por diversos grupos de pesquisa no Brasil e no mundo. Atualmente a abordagem fitoquímica alia estudo químico e biológico, visando um enfoque interdisciplinar.

### 4.14.2 - Avaliação da atividade citotóxica frente a larvas de *Artemia salina*

De acordo com McLaughlin e colaboradores (1982) valores de  $DL_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$  são considerados ativos para extratos brutos. Os resultados obtidos para o ensaio com *A. salina* estão resumidos na Tabela 22. Na análise estatística do cálculo do valor da  $DL_{50}$  utilizou-se o programa Probit Analysis e um intervalo de confiança de 95% conforme citado por (Favilla, *et. al.*; 2006).

Sendo assim, os extratos em diclorometano, em acetato de etila, em metanol e metanol-água do caule foram os mais promissores, pois apresentaram  $DL_{50}$  inferior a  $1000 \mu\text{g/mL}$ , o que pode estar associado a presença de triterpenos, esteróides e flavonóides encontradas nestes extratos.

**Tabela 22-** Dose Letal ( $DL_{50}$ ) mínima responsável pela morte de 50% das larvas de *A. salina* analisadas.

Extratos analisados	$DL_{50}$ (ppm)	Desvio padrão
Extrato em hexano	498,28	$\pm 0,31$
Extrato em diclorometano	35,00	$\pm 0,07$
Extrato em acetato de etila	17,53	$\pm 0,35$
Extrato em metanol	20,20	$\pm 0,38$
Extrato em metanol-água (8:2)	45,08	$\pm 0,36$

#### 4.14.3 - Avaliação da atividade antimicrobiana

Segundo Macrae e colaboradores (1998) existe uma correlação entre a atividade citotóxica e a atividade antimicrobiana. Então, na avaliação atividade antifúngica dos extratos brutos de *D. glaucescens* utilizou-se o antifúngico nitrato de miconazol (Vodol<sup>®</sup>) como controle positivo. Esse fármaco atua por inibição da síntese do ergosterol, na membrana celular do fungo. O ergosterol é uma substância de importância vital para o fungo uma vez que apresenta a mesma função do colesterol na célula animal. Para avaliação da atividade antibacteriana utilizou-se como o controle positivo a gentamicina, um antibacteriano aminoglicosídeo que age por inibição da síntese protéica na sub unidade 30S do ribossomo bacteriano.

A Tabela 23 apresenta os resultados obtidos na avaliação antimicrobiana .

**Tabela 23** - Resultados obtidos da avaliação antifúngica dos extratos brutos de *Dalbergia glaucescens*, sobre diferentes espécies microbianas.

Fungos	Extratos			
	DGD	DGA	DGM	DGMH
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-
<i>Candida inconspícua</i>	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	+	-
<i>Candida lusitaniae</i>	-	-	-	-
<i>Candida spp.</i>	-	-	-	-
<b>Bactérias</b>				
<i>Echerichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-

**Legenda:** DGD = extrato em diclorometano; DGA = extrato em ACOET; DGM = extrato em metanol, DGMH = extrato em metanol-água (8:2), (-) = sem atividade, (+) com atividade.

Segundo Lima *et al.* (2006), são consideradas ativas as amostras que apresentaram um halo de inibição  $\geq 10$  mm de diâmetro. Após realizar os testes com cepas padrões de espécies de fungos e também com espécimes de

bactérias, pode-se observar que um dos extratos (DGM) apresentou atividade antifúngica frente à espécie *Candida parapsilosis*, conforme a Tabela 23, p. 174. Os halos de inibição obtidos com o extrato bruto em metanol DGM encontram-se na Tabela 24. Novas drogas ativas contra *Candida parapsilosis* têm despertado grande interesse nos países da América Latina, uma vez que, essa espécie é responsável por um grande número de infecções hospitalares (Maluche & Santos, 2008).

**Tabela 24** - Halo de inibição obtido no teste contra *Candida parapsilosis* para o extrato de *Dalbergia glaucescens* em metanol.

Placa	Halo de inibição do extrato bruto (mm)	Halo de inibição do controle (mm)
1	21	36
2	17	33
3	15	33
4	18	34
5	16	32
6	17	31
7	18	32
8	16	31
9	18	32
Média	17,33 ± 1,73	32,67 ± 1,58

#### 4.15 - Teste Químico Para Fenólicos

Espécies do gênero *Dalbergia* podem apresentar uma variedade de metabólitos especiais, sendo que já foram isolados diversas classes de substâncias. Com o intuito de se verificar preliminarmente a presença de substâncias fenólicas, realizou-se um teste químico para fenólicos.

O teste químico para fenólicos foi realizado de acordo com o princípio de que substâncias fenólicas formam um complexo com cloreto férrico que pode ser observado na região visível do espectro eletromagnético. Sendo assim, ao se fazer o procedimento de CCDA seguida da revelação com solução



---

---

alcoólica de cloreto férrico 5%, observou-se uma intensa coloração esverdeada na placa cromatográfica indicativa da presença de substâncias fenólicas. Obteve-se resultado positivo para os extratos em metanol e em metanol-água (8:2), o que nos levou a realizar os testes de flavonóides totais e fenólicos totais para determinar a natureza fenólica dos extratos brutos.

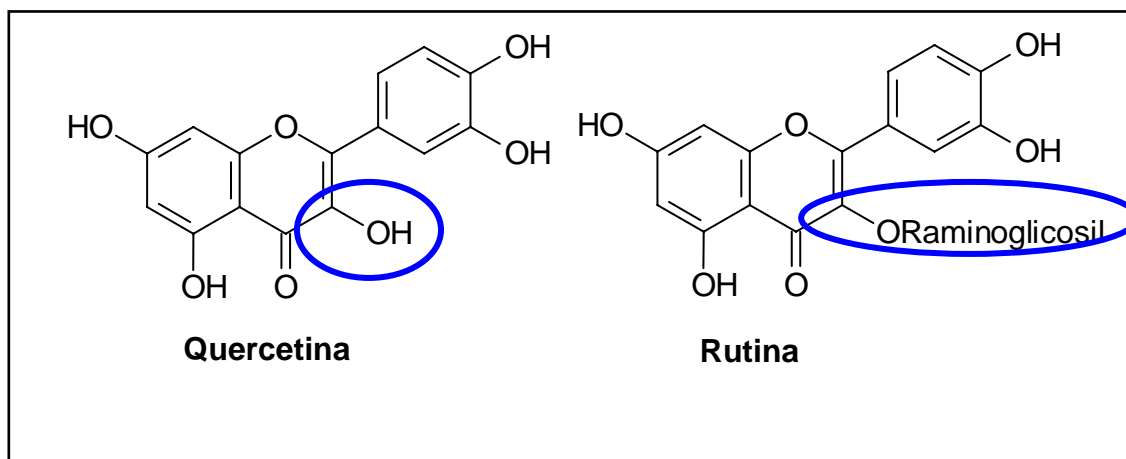
#### 4.15.1 - Avaliação do teor de Flavonóides Totais

A utilização de  $AlCl_3$  para detecção da presença de alguns grupamentos químicos foi realizada pela primeira vez para diagnosticar antocianidinas. Da década de 60 em diante, esse passou a ser largamente empregado como um reagente de desvios (*shift reagent*) em espectrometria no UV-visível para a determinação estrutural de flavonóides (Mabry *et al.*, 1970).

Em 1954, Harbone sugeriu o uso de cloreto de alumínio para a determinação espectrofotométrica da presença de certos grupamentos químicos em flavonóides (Mabry, *et. al.*, 1970). Nos últimos anos, o cloreto de alumínio tem sido utilizado largamente para a determinação e quantificação de flavonóides totais em plantas (Vennat, *et. al.*, 1992) utilizando como padrão de o flavonóide quercetina (Figura 121, p. 177).

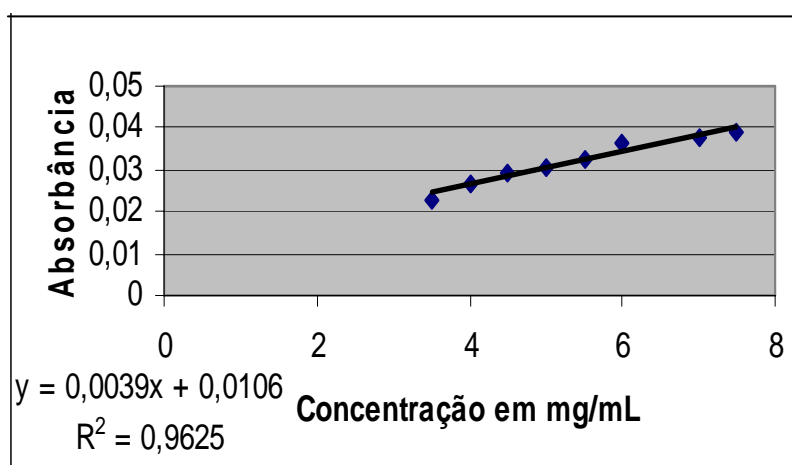
Uma vez que o cátion alumínio forma complexos estáveis com alguns flavonóides em metanol, ao realizar uma análise espectrofotométrica com tais substâncias, observa-se um desvio batocrômico e uma intensificação da absorção (Mabry, *et. al.*, 1970) o que torna possível a determinação do teor de flavonóides evitando a interferência de outras substâncias fenólicas. Isso porque, outras substâncias fenólicas como os ácidos fenólicos mesmo formando complexos com cloreto de alumínio absorvem em comprimento de ondas inferiores ao comprimento de onda utilizado na realização do teste. Porém, não é um método exato de determinação do teor de flavonóides totais, isso se deve ao fato de o comprimento de onda selecionado 425 nm corresponde a banda de absorção do complexo quercetina-alumínio. Assim, o valor medido e o valor real são mais próximos quanto maior a proporção de

flavonóis e menor a proporção de flavonas e isoflavonas existentes na planta (Marcucci, *et al.*, 1998).



**Figura 121** - Diferenças entre os flavonóides quercetina e rutina.

Os teores de flavonóides totais dos extratos testados foram calculadas a partir da (Equação 01, p. 178), obtida por regressão linear dos valores experimentais da solução padrão de rutina, sendo que no eixo da abscissa foram colocadas as concentrações da amostra e no eixo das ordenadas as absorbâncias medidas em 425 nm (Figura, 122). A equação obtida por regressão linear apresentou um bom coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,9625$ ). Os dados de no mínimo três experimentos independentes foram tratados estatisticamente onde a media obtida foi utilizada.



**Figura 122** - Curva padrão do flavonóide rutina.

---

---

$$\text{Equação 01: } y = 0,0039x + 0,0106$$

**Onde:**

Y - valor da absorbância encontrado experimentalmente.

X - permite o cálculo da concentração de flavonóides totais dos extratos brutos testados.

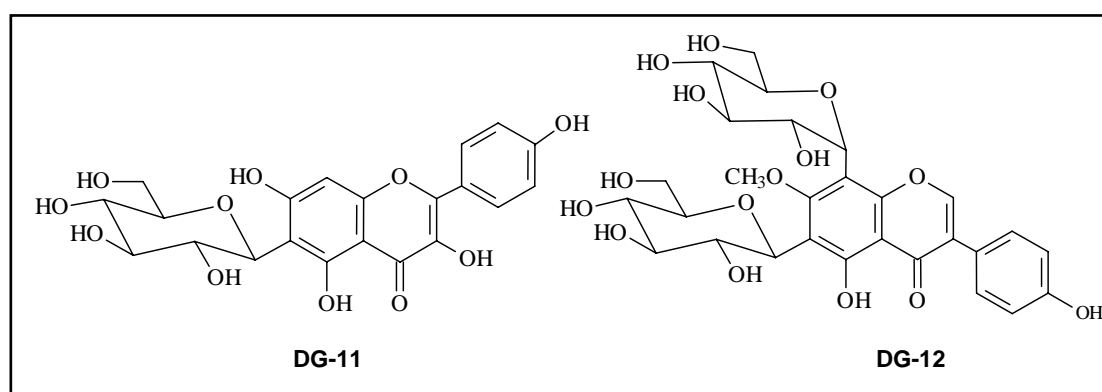
Para o extrato bruto em metanol, não foi possível quantificar flavonóides que reagissem com o  $\text{AlCl}_3$  em quantidades detectáveis. Uma hipótese para este resultado é que os flavonóides existentes em maior proporção no extrato metanólico da planta não apresentem características estruturais semelhantes ao padrão utilizado (rutina). Foram isolados em quantidade muito pequena um flavonol cuja estrutura apresenta grupos em posição diferente dos grupos apresentados na rutina (Figura 123, p. 179), e ainda uma isoflavona cuja estrutura química não se assemelha ao padrão. Possivelmente o conteúdo exato de flavonóides existentes no extrato em metanol da planta apresenta maior proporção de flavonas e isoflavonas o que explicaria a não quantificação do teor de flavonóides totais mediante a utilização de um flavonol como padrão. No entanto, se para esse extrato fosse utilizado um padrão de flavona ou isoflavona o resultado provavelmente teria sido diferente possibilitando a detecção e quantificação destes flavonóides no extrato em questão. Outro fator que corrobora com os resultados obtidos é o comprimento de onda escolhido para o teste, (425 nm), comprimento de onda do complexo quercetina-Al que não necessariamente é a região exata em que ocorre a absorção do complexo rutina-alumínio.

Para o extrato em metanol-água (8:2) a detecção e quantificação do teor de flavonóides totais foi possível, como pode ser observado na Tabela 25, p.179.

**Tabela 25** - Teor de flavonóides totais obtidos utilizando o padrão rutina em extratos brutos de *D. glaucescens*.

Extratos analisados	*TFT ( $\mu\text{g/mL}$ )
Extrato em metanol	ND
Extrato em metanol-água (8:2)	0,1087

\*TFT = Teor de Flavonóides Totais



**Figura 123** - Substâncias flavonoídicas isoladas do extrato em metanol.

#### 4.16 - Atividade Antioxidante

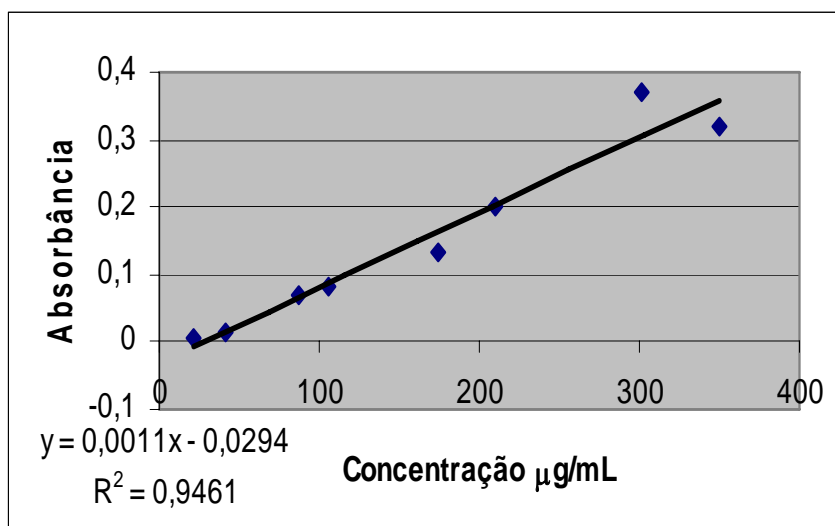
##### 4.16.1 - Avaliação do teor de Fenólicos totais

As substâncias fenólicas de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Naczka & Shahidi, 2004). Realizou-se um método indireto de determinação da atividade antioxidante, para determinação do teor de fenólicos totais para isso fez-se o ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu (realizada por meio de espectrometria na região do UV. O ensaio foi realizado através da comparação das absorbâncias dos extratos brutos após reação com (RFC), com o padrão ácido gálico (Souza, *et. al.*; 2007).

O teste de Folin-Ciocalteu baseia-se na reação de oxidação-redução em que os íons fenolatos são oxidados enquanto os reagentes fosfotungstístico e fosfomolibdídico são reduzidos. A produção de um cromóforo de cor azul é atribuída ao complexo fosfotungstístico-fosfomolibdídico de estrutura indefinida e o

mecanismo químico desta reação ainda não é bem compreendido, porém, a concentração destes compostos nas frações testadas é proporcional a intensidade da cor azul (Shofield *et. al.*, 2001).

Após a reação do ácido gálico com (RFC) foram feitas leituras das absorvâncias cujos valores permitiram traçar o gráfico Absorbância x Concentração de ácido gálico Figura 124. A quantidade de fenóis totais do extrato bruto de *D. glaucescens* foi calculada a partir da Equação 2 obtida por regressão linear dos valores experimentais da solução padrão do ácido gálico sendo no eixo da abcissa, colocadas as concentrações da amostra e no eixo das ordenadas as absorvâncias medidas. A equação obtida por regressão linear mostrou um bom coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,9641$ ). Os dados de no mínimo três experimentos independentes foram tratados estatisticamente, sendo que o valor médio obtido foi utilizado. A Tabela 26, p. 181 apresenta os resultados obtidos.



**Figura 124** - Curva padrão do ácido gálico.

**Equação 02:**  $y = 0,0011x - 0,0294$

**Onde:**

Y - é o valor da absorvância encontrado experimentalmente.

X - permite o cálculo da concentração de fenólicos totais dos extratos brutos testados.

**Tabela 26** - Resultados obtidos do doseamento (FT) por grama de madeira seca.

Extratos testados	Teor de FT (mg/g)
Extrato metanólico	1,95
Extrato em metanol-água (8:2)	168,0

FT = Fenólicos totais

#### 4.16.2 - Avaliação da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH

No presente trabalho resolveu-se aplicar o método indireto para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos de *D. glaucescens*, ensaio caracterizado por uma reação de oxiredução entre um oxidante (sonda para monitorar a reação) e o antioxidante, constituindo a seguinte reação (Tomei & Salvador, 2007).

No teste com DPPH a eficiência da atividade antioxidante é medida a temperatura ambiente o que elimina o risco de degradação térmica das moléculas testadas. Contudo, o mecanismo de reação entre o antioxidante e o DPPH depende da conformação estrutural do antioxidante. Alguns compostos reagem muito rápido com DPPH reduzindo um número de moléculas de DPPH igual ao número de grupos hidroxilas disponíveis. No entanto, a maioria das substâncias testadas, a reação é lenta e o mecanismo parece ser mais complexo (Bondet *et. al.*, 1997). Após realizadas as medidas das absorbâncias das amostras, efetuou-se o cálculo da porcentagem de atividade antioxidante de acordo com a Equação 03.

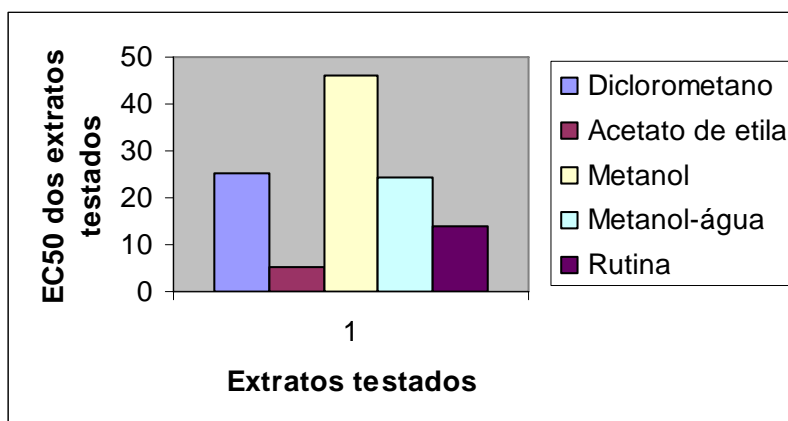
$$\text{Equação 03: } \text{AA\%} = \frac{100 - (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100}{\text{Abs controle}}$$

Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 27, p. 182. Pôde-se observar que os extratos em acetato de etila, metanol-água (8:2) e diclorometano são considerados ativos quando comparados ao padrão rutina.

**Tabela 27** - EC<sub>50</sub> dos extratos testados de *D. glaucescens*.

Extratos brutos de <i>Dalbergia glaucescens</i> analisados	EC <sub>50</sub> (ppm)	Desvio padrão
Diclorometano	25,07	± 0,08
Acetato de etila	5,26	± 0,02
Metanólico	46,26	± 0,89
Metanol-água (8:2)	24,39	± 0,21
Rutina	26,96	± 0,29

A Figura 125 faz uma comparação mais elucidativa dos valores da EC<sub>50</sub> para cada um dos extratos testados.

**Figura 125** - CE<sub>50</sub> dos extratos testados.

## *5.0 - Conclusões*



---

---

## 5.0 - Conclusões

O estudo fitoquímico da madeira da espécie *Dalbergia glaucescens* resultou no isolamento e/ou identificação de 14 substâncias, pertencentes as seguintes classes de substâncias: triterpenos pentacíclicos, esteróides, flavonóides (neoflavonóides, pterocarpano, flavonol e isoflavonóide), um derivado da benzofenona, um derivado furânico.

A revisão bibliográfica da espécie mostrou que a mesma não havia sido estudada fitoquimicamente, assim, o presente trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química do metabolismo especial do espécime. Pelo melhor do nosso conhecimento, três substâncias isoladas não foram relatadas na literatura; o neoflavonóide 6,7-diidroxí-9-metoxidalbergifenol; o flavonol 6-(C- $\beta$ -D-glicopiranosil)-4',5,7-triidroxiflavonol e o isoflavonóide 6,8-di-(C- $\beta$ -D-glicopiranosil)-4',5,7-triidroxiflavona.

Esse trabalho também permitiu a descoberta de que o espécime estudado apresenta atividades biológicas de interesse, como a citotoxicidade frente *A. salina* e atividade antifúngica. Dentre os fungos testados obteve-se atividade especificamente contra cepas de *Candida parapsilosis*, fungo responsável por infecções oportunistas. Observou-se em todos os extratos testados atividade antioxidante, que em alguns extratos pôde-se justificar pela presença de substâncias fenólicas e em outros casos devido a presença de flavonóides.

Assim, após o estudo fitoquímico-biológico da espécime *D. glaucescens* obteve-se resultados promissores que podem servir como um incentivo para estudos biológicos mais específicos, que possam levar a utilização desta planta como fonte de drogas que possam ser usadas na terapêutica.

*6.0 - Datos  
Espectrométricos*

---

---

**6.0 - Dados espectrométricos e algumas características físicas das substância isoladas.****Lupeol - (DG-1)****Fórmula Molecular:** C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O**Massa Molar:** 426 u.m.a.**Ponto de Fusão:** 209 °C**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (38,6; C-1); (27,3; C-2); (79,0; C-3); (38,7; C-4); (55,3; C-5); (18,3; C-6); (34,2; C-7); (40,0; C-8); (50,4; C-9); (37,3; C-10); (20,9; C-11); (25,0; C-12); (38,0; C-13); (41,9; C-14); (27,4; C-15); (35,5; C-16); (42,8; C-17); (48,2; C-18); (47,9; C-19); (150,9; C-20); (29,7; C-21); (39,9; C-22); (27,4; C-23); (15,4; C-24); (16,2; C-25); (15,9; C-26); (14,6; C-27); (17,9; C-28); (109,3; C-29); (18,3; C-30).**Espectrometria de Infravermelho(cm<sup>-1</sup>):** 3419; 2926; 2852; 1455; 1383; 1099; 798.**Espectrometria de massas (70 eV):** M<sup>+</sup> (426); m/z: (218; 207; 189; 175; 149).**Lupenona - (DG-2)****Fórmula Molecular:** C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O**Massa Molar:** 424 u.m.a.**Ponto de Fusão:** 203 ± 1 °C**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (39,7; C-1); (34,4; C-2); (218,8; C-3); (47,4; C-4); (55,0; C-5); (19,8; C-6); (33,73; C-7); (41,0; C-8); (49,9; C-9); (37,0; C-10); (21,6; C-11); (25,2; C-12); (38,8; C-13); (43,15; C-14); (27,5; C-15); (35,6; C-16); (43,0; C-17); (48,3; C-18); (48,0; C-19); (150,9; C-20); (30,4; C-21); (40,1; C-22); (14,1; C-23); (21,1; C-24); (16,0; C-25); (16,1; C-26); (26,6; C-27); (18,10; C-28); (19,3; C-29); (109,5; C-30).**Espectrometria de Infravermelho(cm<sup>-1</sup>):** 2925; 1725; 1650; 1458; 1380.**Espectrometria de massas (70 eV):** M<sup>+</sup> (424); m/z: (409; 218; 205; 189).

---

---

**Campesterol - (DG-3)****Fórmula Molecular:** C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O**Massa Molar** = 400 u.m.a.**Ponto de Fusão:** Não determinado.**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (37,25; C-1); (31,65; C-2); (71,81; C-3); (42,29; C-4); (140,75; C-5); (121,73; C-6); (31,92, C-7); (31,88; C-8); (50,11; C-9); (36,50; C-10); (21,06; C-11); (39,76; C-12); (42,29; C-13); (56,75; C-14); (24,30; C-15); (28,24; C-16); (56,03, C-17); (11,86; C-18); (19,38; C-19); (36,14; C-20); (19,01; C-21); (33,93; C-22); (39,12; C-23); (45,82; C-24); (26,03; C-25); (18,77; C-26); (19,81; C-27); (23,06; C-28).**Espectrometria de massas (70 eV):** M<sup>+</sup> (400); m/z: (383; 368; 316; 289; 213; 191).**Estigmasterol - (DG-4)****Fórmula Molecular:** C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O**Massa Molar:** 412 u.m.a.**Ponto de Fusão:** Não determinado.**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (37,25; C-1); (31,65; C-2); (71,81; C-3); (42,29; C-4); (140,75; C-5); (121,73; C-6); (31,92, C-7); (31,88; C-8); (50,11; C-9); (36,50; C-10); (21,06; C-11); (39,68; C-12); (42,29; C-13); (56,85; C-14); (24,38; C-15); (28,24; C-16); (55,93, C-17); (11,86; C-18); (19,38; C-19); (40,50; C-20); (19,01; C-21); (138,93; C-22); (129,26; C-23); (51,23; C-24); (31,88; C-25); (21,20; C-26); (19,01; C-27); (25,341; C-28); (11,99; C-29).**Espectrometria de massas (70 eV):** M<sup>+</sup> (412); m/z: (300; 285; 255).

**$\beta$ -sitosterol - (DG-5)****Fórmula Molecular:** C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O**Massa Molar:** 414 u.m.a.**Ponto de Fusão:** Não determinado.**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (37,25; C-1); (31,65; C-2); (71,81; C-3); (42,29; C-4); (140,75; C-5); (121,73; C-6); (31,92; C-7); (31,88; C-8); (50,11; C-9); (36,50; C-10); (21,06; C-11); (39,76; C-12); (42,29; C-13); (56,85; C-14); (24,30; C-15); (28,24; C-16); (55,93; C-17); (11,99; C-18); (19,38; C-19); (40,50; C-20); (18,77; C-21); (33,93; C-22); (28,92; C-23); (51,23; C-24); (29,70; C-25); (19,81; C-26); (19,01; C-27); (23,04; C-28); (12,25; C-29).**Espectrometria de massas (70 eV):** M<sup>+</sup> (414); m/z: (273; 255; 1215).**9- hidroxí-6,7-dimetoxídalbergífenol - (DG-6)****Fórmula Molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>**Massa Molar:** 270 u.m.a.**Ponto de Fusão:** Não determinado.**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (5,02; H-2a); (5,31; H-2b); (6,31; H-3); (4,84; H-4); (6,57; H-5); (6,48; H-8); (7,31; H-2'); (7,21; H-3'); (7,21; H-4'); (7,21; H-4'); (7,21; H-5'); (7,31; H-6'); (3,75; 6-OCH<sub>3</sub>); (3,83; 9-OCH<sub>3</sub>).**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (117,07; C-2); (139,45; C-3); (49,23; C-4); (113,35; C-5); (143,10; C-6); (147,61; C-7); (101,68; C-8); (148,73; C-9); (119,53; C-10); (141,41; C-1'); (117,07; C-2'); (128,51; C-3'); (126,86; C-4'); (128,51; C-5'); (128,69; C-6'); (55,92; 7-OCH<sub>3</sub>); (56,60; 7-OCH<sub>3</sub>).**Espectrometria de Infravermelho (cm<sup>-1</sup>):** 3440; 2917; 1601; 1508; 1412; 1377; 1260.**Espectrometria de massas (70 eV):** M<sup>+</sup> (270); m/z: (255; 241; 227; 199; 185).

**6,7- diidroxí-9-metoxidalbergifenol - (DG-7)****Fórmula Molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>**Massa Molar:** 256 u.m.a.**Ponto de Fusão:** Não determinado**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (5,02; H-2a); (5,29; H-2b); (6,31; H-3); (4,89; H-4); (6,58; H-5); (6,48; H-8); (7,32; H-2'); (7,21; H-3'); (7,21; H-5'); (7,32; H-6'); (3,75; 9-OCH<sub>3</sub>).**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (117,01; C-2); (139,76; C-3); (49,05; C-4); (112,43; C-5); (140,58; C-6); (146,24; C-7); (103,94; C-8); (147,97; C-9); (124,00; C-10); (141,50; C-1'); (128,71; C-2'); (126,85; C-3'); (126,85; C-5'); (128,71; C-6'); (56,69; 7-OCH<sub>3</sub>).**Espectrometria de Infravermelho(cm<sup>-1</sup>):** 3400; 3000; 2848; 1751; 1514; 1450; 1378; 1059.**Espectrometria de massas (70 eV):** M<sup>+</sup> (256); m/z: (241; 223; 195; 182; 115).**Medicarpina - (DG-8)****Fórmula Molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>**Massa Molar:** 270 u.m.a.**Ponto de Fusão:** 99,5 °C.**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (3,63; H-2a); (4,24; H-2b); (3,56; H-3); (5,50; H-4); (7,40; H-5); (6,57; H-6); (6,46; H-8); (6,41; H-3'); (6,46 H-5'); (7,14; H-6'); (3,78; 4'-OCH<sub>3</sub>).**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (66,62; C-2); (39,48; C-3); (78,64; C-4); (132,17; C-5); (109,78; C-6); (157,15; C-7); (103,67; C-8); (156,66; C-9); (112,53; C-10); (119,16; C-1'); (96,91; C-3'); (164,50; C-4'); (106,46; C-5'); (124,73; C-6'); (55,50; 4'-OCH<sub>3</sub>).**Espectrometria de Infravermelho(cm<sup>-1</sup>):** 3400; 2924; 1622; 1599; 1495; 1471; 1344; 1145; 1112.**Espectrometria de massas (70 eV):** M<sup>+</sup> (270); m/z: (255;161; 135).

**2,4-diidroxibenzofenona - (DG-9)****Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>**Massa Molar:** 244 u.m.a.**Ponto de Fusão:** 174,8 ± 0,9 °C**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (12,47; H-2); (6,54; H-3); (7,10; H-6); (7,63; H-2'); (7,54; H-3'); (7,54; H-4'); (7,54; H-5'); (7,63; H-6'); (3,96; 5-OCH<sub>3</sub>).**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (111,77; C-1); (161,16; C-2); (99,91; C-3); (153,82; C-4); (137,8; C-5); (116,65; C-6); (200,67; C-7); (137,73; C-1'); (128,31; C-2'); (128,75; C-3'); (131,44; C-4'); (128,75; C-5'); (128,31; C-6'); (56,25; 5-OCH<sub>3</sub>).**Espectrometria de Infravermelho(cm<sup>-1</sup>):** 3305; 2913; 2849; 1637; 1595; 1507; 1393; 1267; 1020.**Espectrometria de massas (70 eV):** M<sup>+</sup> (244); m/z: (243; 167; 105; 77).**Dalbergina - (DG-10)****Fórmula Molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>**Massa Molar:** 268 u.m.a.**Ponto de Fusão:** 203,6 ± 1,1 °C**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (6,02; H-3); (6,68; H-5); (7,03; H-8); (7,50; H-2'); (7,50; H-3'); (7,50; H-4'); (7,50; H-5'); (7,50; H-6'); (3,76; 7-OCH<sub>3</sub>).**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (161,12; C-2); (112,28; C-3); (155,44; C-4); (110,19; C-5); (142,08; C-6); (149,721; C-7); (99,28; C-8); (149,04; C-9); (112,05; C-10); (135,28; C-1'); (128,51; C-2'); (127,99; C-3'); (129,24; C-4'); (127,99; C-5'); (128,51; C-6'); (56,13; 7-OCH<sub>3</sub>).**Espectrometria de Infravermelho(cm<sup>-1</sup>):** 3248; 3002; 2848; 1688; 1621; 1543; 1513; 1288; 1144.**Espectrometria de massas (70 eV):** M<sup>+</sup> (268); m/z: (240; 225; 197).

**4',5,7-triidroxi-6-C-β-D- glicopiranosilflavonol - (DG-11)****Fórmula Molecular:** C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>**Massa Molar:** 460 u.m.a.**Ponto de Fusão:** Não determinado.**Solubilidade:** metanol**Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (7,19; H-2'); (6,67; H-3'); (6,67; H-5'); (7,19; H-6'); (4,98; H-1'"); (3,60; H-2'"); (3,47; H-3'"); (3,50; H-4'"); (3,40; H-5'"); (3,7-3,9 H-6'").**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (154,26; C-2); (131,50; C-3); (182,35; C-4); (162,29; C-5); (109,93; C-6); (163,98; C-7); (99,59; C-8); (157,95; C-9); (105,05; C-10); (123,58; C-1'); (1130,00; C-2'); (116,44; C-3'); (162,29; C-4'); (116,44; C-5'); (131,50; C-6'); (75,88; C-1'"); (72,83; C-2'"); (80,23; C-3'"); (71,50; C-4'"); (82,62; C-5'"); (62,51; C-6'").**Espectrometria de Infravermelho(cm<sup>-1</sup>):** 3334; 1647; 1581; 1546; 1222; 1060.**Espectrometria de ultravioleta (200 - 600 nm):** 204; 266; 358.**6,8-Di-C-β-D- glicopiranosil-4',5,7-triidroxiisoflavona - (DG-12)****Fórmula Molecular:** C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>**Massa Molar:** 594 u.m.a.**Ponto de Fusão:** Não determinado.**Solubilidade:** metanol**Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (8,14; H-2); (7,38; H-2'); (6,85; H-3'); (6,85; H-5'); (7,38; H-6'); (5,01; H-1'"); (3,60; H-2'"); (3,51; H-3'"); (3,53; H-4'"); (3,46; H-5'"); (3,87; H-6a'"); (3,79; H-6b'"); (5,0; H-1'"); (3,60; H-2'"); (3,51; H-3'"); (3,53; H-4'"); (3,46; H-5'"); (3,87; H-6a'"); (3,79; H-6b'").**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** (154,26; C-2); (131,50; C-3); (182,35; C-4); (162,29; C-5); (109,93; C-6); (163,98; C-7); (99,59; C-8); (157,95; C-9); (105,05; C-10); (123,58; C-1'); (130,00; C-2'); (116,44; C-3'); (162,29; C-4'); (116,44; C-5'); (131,50; C-6'); (75,88; C-1'"); (72,83; C-2'"); (80,23; C-3'"); (71,50; C-4'"); (82,62; C-5'"); (62,51; C-6'").**Espectrometria de Infravermelho(cm<sup>-1</sup>):** 3313; 2922; 1731; 1644; 1414.**Espectrometria de ultravioleta (200 - 600 nm):** 203; 268; 317 (ombro); 365.



---

---

**Acetato do ácido oleanólico - (DG-13)****Fórmula Molecular:**  $C_{32}H_{50}O_4$ **Massa Molar:** 498 u.m.a.**Ponto de Fusão:** Não determinado**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (39,42; C-1); (23,60; C-2); (81,03; C-3); (37,77; C-4); (55,38; C-5); (18,27; C-6); (32,52; C-7); (40,97; C-8); (47,62; C-9); (38,20; C-10); (22,99; C-11); (122,62; C-12); (143,69; C-13); (41,67; C-14); (27,76; C-15); (23,45; C-16); (46,54; C-17); (47,62; C-18); (45,92; C-19); (30,74; C-20); (33,89; C-21); (33,18; C-22); (22,18; C-23); (16,84; C-24); (15,47; C-25); (17,21; C-26); (25,98; C-27); (183,75; C-28); (33,16; C-29); (21,40; C-30).**5-hidroximetilfurfural - (DG-14)****Fórmula Molecular:**  $C_6H_6O_3$ **Massa Molar =** 126 u.m.a.**Ponto de Fusão:** 56,8 °C**Solubilidade:** metanol**Espectrometria de RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):** (7,21; H-3); (6,51; H-4); (4,72; H-6); (9,61; H-7).**Espectrometria de RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (152,45; C-2); (122,52; C-3); (109,97; C-4); (160,39; C-5); (57,69; C-6); (177,61; C-7).**Espectrometria de Infravermelho( $cm^{-1}$ ):**3400; 2917; 2849; 1667; 1514; 1453; 1204; 1068; 1023; 800.**Espectrometria de massas (70 eV):**  $M^+$  (126); m/z: (109; 97; 81; 169).

OBS: Os pontos de fusão onde estão descritos não determinados foram assim descritos, por que carbonizaram durante a determinação do ponto de fusão, não sendo possível a sua determinação.

## *7.0 - Referências Bibliográficas*

---

---

## 7.0 - Referências Bibliográficas

Agrawal, P. K. (1989). Carbon-13 NMR of flavonoids. *Elsevier*, Amsterdam - Oxford - New York -Tokyo.

Ahmad, V.U., Rahman, U. (1994). Pentacyclic triterpenoids. *Handbook of natural products data*. Amsterdam-London-NewYork-Tokyo, 2, 1556 p.

Akineden, O. C.; Annemuller, C.; Hassan, A. A.; Lammler, C.; Wolter, W.; Zschock, M. (2001). Toxin genes and other characteristics of staphylococcus aureus isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(5); 959-964.

Almeida, M. P. (2001). Avaliação da diversidade genética de acesso *ex situ* de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*. Velll. Alemão ex. Benth.) por meio de marcadores RAPD com subsídio para sua conservação. 56 f. (Dissertação: mestrado em desenvolvimento regional e meio-ambiente)- universidade estadual de santa Cruz-Ilhéus.

Alves, S. H.; Lopes, J. O.; Cury, A. E. (1999). Teste de suscetibilidade aos antifúngicos:por que quando e como realizar. Disponível em: <<http://www.newslab.com.br/antifung.html/>> acesso em 05/04/2009.

Alves, T. M. A; Silva, A., F.; Brandão, M.; Grandi, T. S. M.; Smânia, E. F. A.; Smânia Juniro, A.; Zani, C. L. (2000). Biological screening of Brazilian Medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*,Rio de Janeiro, 95,(3), 367 - 373.

Ambrozin, A. R. P. (2004). Estudo fitoquímico de plantas das famílias Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses. Tese, São Carlos, S.P. 241 p.

---

---

Ansari, M. A.; Razdan, R. K.; Tadon, M.; Vasudevan, P. (2000). Larvicidal and repellent actions of *dalbergia sissoo* Robxb. (F. Leguminosae) oil against mosquitoes. *Bioresource technology*, 73:207-211.

Antunes, A. G. V.; Pasqualotto, A. C.; Diaz, M. C.; D'Azevedo, P. A.; Severo, L. C. (2004). Candidemia in Brazilian Tertiary care Hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46(5), 239-241.

Ayres, M. C. C.; Brandão, M. S.; Vieira Junior, G. M.; Mensor, J. C. A. S.; Silva, H. B.; Soares, M. J. S.; Chaves, M. H. (2008). Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, (1), 90 - 97.

Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29, 113-126.

Barroso, G.M.; Peixoto, A.L.; Ichaso C.L.F.; Costa, C.G.; Guimarães E.F. (1991). *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa-Br:Universidade Federal de Viçosa, 1ª ed., 2, 377p.

Bekker, M.; Malan, E.; Steenkamp, J. A.; Brandt, V. E. (2002). An isoflavonoid-neoflavonoid and O-methylated isoflavone from the heartwood of *Dalbergia nitidula*. *Phytochemistry*, 59:415-418.

Beldjoudi, N.; Mambu, L.; Labaied, M.; Grellier, P.; Ramanitrahambola, D.; Rasoanaivo, P.; Martin, R. M.; Frappier, F. (2003). Flavonoids from *Dalbergia louvelii* and their antiplasmodial activity. *Journal of Natural Product*, 66:1447-1450.

---

---

Blanca, E. B.; Peralta-Cruz, J.; González-Laredo, R. F.; Karchesy, J. (2004). Neocaandentone, na isoflavan-cinnamylphenol quinone methide pigment from *Dalbergia congestiflora*. *Phytochemistry*, 65:925-928.

Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using DPPH free radical method. *Food Science and Technology*, 30, 609-615.

Bonten, M.; Stobberingh, E.; Houben, E. (1990). A high prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in faecal samples of students in the south-east of the Netherland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 26, 585-592.

Bosquesi, P. L. (2009). Avaliação da presença do grupo nitro na atividade antichagásica e mutagênica do candidato a fármaco hidroximetilnitrofurfural. Dissertação, Araraquara, SP. 123 p.

Brasil, 2000. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. Brasília. MMA/SBF.

Breitmaier, E.; Voelter, W. (1987). Carbon-13 NMR spectroscopy: High resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry. 3.ed. VCH: Weinheim.

Bruneton, J. (1995) *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 2.ed. Paris. Technique & Documentation. 895p.

Budzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Williams, D. H. (1964). Structure elucidation of natural products by mass spectrometry, v. II: Steroids, terpenoids, sugars and miscellaneous classes. *Holden-day*, Inc. San Francisco, London, Amsterdam.

Bultman, J. D.; Southwell, C. R. (1972). A Preliminary Investigation of the Marine Borer Resistance of the Tropical Wood *Dalbergia Retusa*. Biology, wood, paper and related forestry products.

---

Carvalho, A. M. de.(1997). A synopsis of the genus *Dalbergia* L. f. (Fabaceae: Dalbergiae) in Brazil. *Brittonia*. V. 49, n.1, p. 87-109.

Cechinel Filho, V. (2000). Principais avanços e perspectivas na area de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. *Quimica Nova*, 23 (5), 680-685.

Chan, S.; Chang, Y.; Kuo, S. (1997). Neoflavonoids from *Dalbergia odorifera*. *Phytochemistry*, 46 (5), 947-949.

Chawla, M. M.; Chibber, S. S. (1981). Chemistry of *Dalbergia* species. *Journal of Science and Industrial Research*, 40, 313 - 325.

Cheng, Z.; Kuo, S.; Chan, S.; Ko, F.; Teng, C. (1998). Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1392:291:299.

Choi, C. W.; Choi, Y. H.; Cha, M.; Kim, Y. S.; Yon, G. H.; Kim, Y. K.; Choi, S. U.; Kim, Y. H.; Ryu, S. Y. (2009). Antitumor components isolated from heartwood extract of *Dalbergia odorifera*. *Journal of Korean Society Applied Biology Chemistry*, 52(4), 375-379.

Citó A.M.G.L.; Souza, A.A.; Lopes J.A.D.; Chaves, M.H.; Costa, F.B.; Sousa, S.A.A.; Amaral M.P.M. (2003) Resina de *Protium heptaphyllum* March (Burceraceae): Composição Química do Óleo Essencial e Avaliação Citotóxica frente a *Artemia Salina* Leanch. *Anais da Associação Brasileira de .Química*, 52(2):74-76.

Colombo, A. L.; Nucci, M.; Salomão, R.(1999). High rate of non-albicans candidemia in Brazilian Tertiary Care Hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 34 (4), 281-286.

Colombo, A. L.; Nucci, M.; Park, B. J.; Nouer, S. A.; Arthington-skaggs, B.; Da Matta, D. A.; Warnock, D.; Morgan, J. (2006). Epidemiology of candidemia in

---

---

Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2816-2823.

Coutinho, H.D.M.; Bezerra, D.A.C.; Lobo, K.; Barbosa, I.J.F. (2004). Atividade Antimicrobiana de produtos naturais. *Conceitos* Julho 2003/Junho 2004.

Cragg, S.M.; Pitman, A. J.; Henderson, S.M. (1999). Developments in the understanding of the biology of marine wood boring crustaceans and in the methods of controlling them. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 43, 197-205.

Craven, D. E.; Kunches, L. M.; Lichtenberg, D. A.(1998). Nosocomial infection and fatality in medical and surgical intensive care unit patients. *Archives of Internal Medicine* 148(5), 1161-1168.

Crews, P.; Rodríguez, J.; Jaspars, M. (1998). *Organic Structure Analysis*. Oxford University Press. 552 p.

Decker, E. A. (1995). The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine and pyrroloquinoline as nonessential dietary antioxidants. *Nutrition Review*, 49-58.

Demuner, A., J.; Barbosa, L., C., de A.; do Nascimento, J., C.; Vieira, J.; J. (2003). Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinérea* contra *Meloidogyne incógnita* e *Heterodera glycines*. *Química nova*, 26 (3), 335-339.

Dewick, M. P. (2006). *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons, 2 ed., 507p.

Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F. (1999). *Life sciences*, 65 (4), 337-353.

---

---

Di Stasi, C. L.; Lima-Hiruma, C. (2002) Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Editora UNESP, 2 ed., 604p.

Dos Santos, M. H.; Corrêa, R. S.; Rocha, M. D.; Nagem, T. J.; Oliveira, T. T.; Lima, R. D.; Oliveira, J. R. (2007). Efeito de Constituintes Químicos isolados da casca do fruto de *Rheedia gardneriana* sobre a Eclosão de Juvenis de *Meloidogyne incógnita* Raça 3. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(5), 711 - 714.

Doyle, J. J.; Luckow, M. S. (2003). The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*, 131:900 - 910.

Duarte, M. C. T.; Figueira, G. M.; Pereira, B.; Magalhães, P. M. ; Delarmelina, C. (2004). Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14(1), 06-08.

Favilla, M.; Macchia, L.; Gallo, A.; Altomare, C. (2006). Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food and chemical toxicology*, 44, 1922-1931.

Ferreira, A. J. P.; Knobl, T. (2000). Colibacilose aviária In: Berchieri Junior, Macari, M. Doenças das aves. Campinas: Facta, 197-207.

Filho, C. V. (1999). Principais avanços e perspectivas na area de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. *Química Nova*, 23, (5), 680 - 685.

Flekhter, O. B.; Boreko, E. I.; Nigmatullina, L. R.; Pavlova, N. I.; Medvedeva, N. I.; Nikolaeva, S. N.; Ashavina, O. A.; Savinova, O. V.; Baltina, L. A.; Galin, F. Z.; Tolstikov, G. A. (2004). Synthesis and antiviral activity of lupane triterpenoids and their derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 38 ( 7), 355-358.



---

---

Fleschin, S.; Fleschin, M.; Nita, S.; Pavel, E.; Magearu, V. (2000). Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. *Rouman Biogech Lett*, 5, 470-495.

Freire, R. B.; Freire, m. F. I.; Berbara, R. L. (2004). Elisa de captura com IgY para quantificação de acetato de lupeol em *Vernonia scorpioides* lam. Pers (asteraceae). *Ciência Rural*, 34, (4), 1068-1074.

Garazd, M. M.; Garazazd, Ya. L.; Kihilya, V. P. (2003). *Chemistry of Natural Coumpouds*, 39(1), 54-121.

Garcez, W. S.; Pereira, A. L.; Queiroz, P. S.; Silva, R. S.; Valente, L. M. M.; Peixoto, E. M.; Pinto, A. C. (1981). RMN 13C de diterpenos com esqueleto primarano. *Quimica Nova*, 4, 116-127.

Gary, D. M.; Jurd, L. (1977). *Journal of Agricultural and food chemistry*, 25(4), 726-730.

Geetha, T., Varalakshmi, P. (2001). Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *Journal of Ethopharmacology*, 76:77-80

Godoy, P.; Tiraboschi, I. N.; Severo, L. C. (2003). Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Men. Inst. Oswaldo Cruz*, 98(3), 401-405.

Goulart, M. O. F.; Sant'ana, A. E. G.; Lima, R. A.V.; Cavalcante, S. H. Fitoconstituíntes químicos isolados de *Jatropha elliptica* atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatropolanos A e B. *Química nova*, 16 (2), 95-100.

Gregson, M.; Ollis, W. D.; Sutherland, I. S. O.; Gottlieb, O. R.; Magalhães, M. T. (1978). Violastyrene and isoviolastyrene, cinnamulphenols from *Dalbergia miscolobium*. *Phytochemistry*, 17(8):1375-1377.

---

---

Hadecek, F.; Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, 11, 137-147.

Hajare, S. W.; Chandra, S.J.; Tandan, S. K.; Lal, J.; Telang, A. G. (2001). Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo* leaves. *Fitoterapia*, 72:131-139.

Hamburger, M. O.; Mathias, O.; Cordell, G. A.; Ruangrunsi, N.; Tantivatana, P. (1988). Tradicional medicinal plants of Thailand. 10,. Candenatone, a novel purple pigment from *Dalbergia candenatensis*. *Journal of Organic Chemistry*, 53(18): 4161-4165.

Harbone, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H. (1975). *The flavonóides*. University of Texas at Austin, USA; Chapmannd hall,1204p.

Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (Vegetables tannins) as drug: Possible modes of action . *Journal of Natural Product*, 59,205 - 215.

Heywood, V. H. (1971). *The Biology and Chemistry of the Umbelliferae*, Academic. New York, Press, 438.

Hichri, F.; Jannet, H.B.; Cheria A. J.; Jegham, S.; Mighri, Z. (2003). Antibacterial activities of a few prepared derivative of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds. *Revista de .Chimie*, 6:473-483.

Holmans, A.L.; Fuchs, A. (1970). Direct Bioautography on Thin-Layer Chromatograms as a Method for Detecting Fungitoxic Substances. *Journal of Chromatography*, 51:327-329.

Hostettemann, K.; Queiroz, E.F.; Vieira, P.C. (2003). *Princípios ativos de plantas superiores*. EdUFSCAR. 152 p.

---

---

Huang, D.; OU, B.; Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1841-1856.

Ingham, J.L. (1979). Isoflavonoid phytoalexins from leaflets of *Dalbergia sericea*. *Journal of Biosciences*, 34C(7-8):6930-631.

Jarvis, W. R. (1995). Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clinical Infection Disease*, 20, 6, 1525-1530.

Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, C. S. (1999). Plant systematics a phylogenetic approach. Massachusetts, USA. Sinauer Associates, 464p.

Kelecom, A.; Rocha, M.; Majdalani, E. C.; Gonzalez, M. S.; Mello, C. B. (2002) Novas atividades biológicas em antigos metabólitos:ácido oleanólico e eugenol de *Eugenia caryophyllata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, supl., 70 - 71.

Lacaz, C. S.; Negro, G.(1991). Drogas antifúngicas terapêutica das micoses. In: Lacaz, C. S. Porto, E., Martins, J. E. C. Micologia médica acticomietos e algas de interesse médico.São Paulo, Savier.

Laurance, W. F.; Bierregaard, R.O.. Jr. (eds). 1997. Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities. Chicago,

Lewis, G. P.; Schrire, B. D.; Mackinder, B.; Lock, M. (2005). Legumes of the word. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 577p.

Lima, I.O.; Oliveira, R.A.G.; Lima, E.O.; Farias, N.M.P.; Souza, E.L. (2006). Atividade Antifúngica de Óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 197-201.

Liu, J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 49, 57-68.

---

---

Liu, Z., L.; Tanaka, S.; Horigome, H.; Hirano, T.; Kitaro, O. (2002). Induction of apoptosis in Human Lung Fibroblasts and Peripheral Lymphocytes in vitro by Shosaiko-to derived phenolic metabolites. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2591, 37-41.

Luo, G.; Samaranayake, L. P.; Yau, J. Y. Y. (2001). *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (8), 2971 - 2974.

Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B. (1970). The systematic identification of flavonoids. *Springer-Verlag*, Berlin - Heidelberg - New York.

Macrae, W.D.; Hudson, J.B.; Towers, G.H.N. (1998). *Journal of Ethnopharmacology*, 22:143.

Mahato, S.H.; Kundu, A. P. (1994). <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37(6):1517-1575.

Maluche, M. E.; Dos Santos, J. I. (2008). *Candida* sp e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 40(1), 65-67.

Marcucci, M.C.; Woisky, R.G.; Salatino, A. Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. Disponível em: <[www.roberg.com.br/PaginaTrabalhoCientifico06.htm](http://www.roberg.com.br/PaginaTrabalhoCientifico06.htm)>. Acesso em: 20 agosto de 2003. Mensagem doce, 46, maio de 1998.

Mathias, L.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; Rodriguez-Filho, E. (1998). A new isoflavone glycoside from *Dalbergia nigra*, 61, 1158-1161.

- 
- 
- McCarthy, T.L.; Kerry, J.F.; Lynch, P.; Buckley, D.J. (2001). Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties, meat. *Science*, 57:177-184.
- Mclaughlin, J.I.; Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E (1982) Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45:31-34.
- Militão, G., C.; G.; Jimenez, P.; C.; Wilke, D., V.; Falcão, M., J., C.; Lima, M., A. S.; Silveira, E., R.; Moraes, M., O.; Costa-Lotuf, L., V. (2005). Antimitotic Properties of Pterocarpans isolated from *Platymiscium floribundum* on Sea Urchin Eggs. *Planta Medica*, 71, 685-686.
- Mujumdar, A. M.; Misar, A. V.; Upadhye, A. S. (2005). Antidiarrhoeal activity of ethanol extract of the bark of *Dalbergia lanceolaria*. *Journal of ethnopharmacology*, 102:213-216.
- Murray, P. R.; Rosenthal, K.; Pfaller, M. A. (1994). *Microbiologia Médica*. Ed. Koogan.
- Nacz, M.; Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054, 95 - 111.
- Nobre, M. O.; Nascente, P. S.; Meireles, M. C.; Ferreiro, L. (2002). Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência Rural*, 32(1), 175- 184.
- Nodari, R.O.; Guerra, M.P. (2003). Biodiversidade: aspectos biológicos e geográficos legais e éticos. In: Simões C.M.O. et. al. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 5 ed. Florianópolis Porto Alegre. Editora UFSC/Editora da UFRGS.

---

---

Noldin, V. F.; Filho, V. C.; Manache, F. D.; Benassi, J. C.; Christmann, I. L.; Predrosa, R. C.; Yunes, R. A. (2003). Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (ALCACHOFRA) cultivada no Brasil. *Química Nova*, 26, ( 3), 331-334.

Nordberg, J.; Arner, S. J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287-1312.

Pasquale, C. N. Dicionário da Língua Portuguesa. Barueri, S.P. Gold Editora LTDA. 640 p.

Pathak, V.; Osamil, S.; Sekita, S.; Hirayama, Y.; Hakamata, Y.; Hayashi, T.; Yanagawa, T.; Satake, M. (1997). Antiandrogenic phenolic constituents from *dalbergia cochinchinensis*. *Phytochemistry*, 46(7):1219-1223.

Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S.(1995). *Introduction to Spectroscopy*. 2.ed., 509p.

Pereira, H. S.; Kelecom, A.; Oliveira, A. F.; Maciel, A.; Ferraz, n. V.; Moussatché, N., Frugulhetti, I. C. P. P. (1998). Evaluation of the effect of benzophenones on HIV-1 reverse transcriptase. *Virus: Reviews & Research*, supl. 1, 3:84.

Pfaller, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmissions.(1996). *Clinical Infectious Diseases*, 22, suppl. 2, 89-94.

Pietta, P. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Product*, 63, 1035-1042.

Pigatto, M. C.; Uchoa, F. T.; Costa, T. D. (2009). Farmacocinética dos novos antifúngicos de uso sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 90(1), 86-94.

---

---

Ramarathnam, N.; Osaka, T.; Namiki, M.; Kawakishi, S. (1989). Chemical studies on novel RiceHull antioxidants. 2 Identification of Isovitexin , A C-glycosyl flavonoid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 316-319.

Ren-Bo-Na, A.; Jeong, G.; Kim, Y. (2008). Flavonoids from the heartwood of *Dalbergia odorifera* and their protective effect on glutamate-induced oxidative injury in HT22 cells. *Chemical Pharmacology Bulletin*, 56(12), 1722-1724.

Rex, J. H.; Bennett, J. E.; Sugar, A. M. (1994). A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia of patients without neutropenia. *Journal of Medicine*, 331(20), 1325-1330.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. J.; Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152- 160.

Rocha, D. F.; Pereira, R. C.; Kaplan, M. A. C.; Teixeira, V. L. (2007). Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 4, 631-639.

Romeiro, R. de S. (2001). Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, editora UFV.

Rouet, G. R.; Bhattacharia, D.; Nanda, R.M.; Nayak, S. Das, P. (2003). Evaluation of genetic relationships in *Dalbergia* species using RAPD markers. *Biodiversity and conservation*, 12(2), 197-206.

Rover J. L.; Hoehr, N. F.; Vellasco, A. P. (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, 24, 112-119.

Saphaz, S., Bories, C., Loiseau, P.M., Cortès, D., Hocquemiller, R., Laurens A., Cavé, A. (1994). Citotoxic and Antiparasitic activity from *Annona Senegalensis* seeds. *Planta Medica*, 60, 538 - 540.

---

---

Sayers, E. W.; Barrett T.; Benson D. A.; Bryant S. H.; Canese K.; Chetvernin V.; Church D. M.; DiCuccio M.; Edgar R.; Federhen S.; Feolo M.; Geer L. Y.; Helmberg W.; Kapustin Y.; Landsman D.; Lipman D. J.; Madden T. L.; Maglott D. R.; Miller V.; Mizrachi I.; Ostell J.; Pruitt K. D.; Schuler G. D.; Sequeira E.; Sherry S. T.; Shumway M.; Sirotkin K.; Souvorov A.; Starchenko G.; Tatusova T. A.; Wagner L.; Yaschenko E.; Ye J. (2009). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37.

Scheuermann, G. N.; Cunha Jr. A. (2006). Perspectivas para a utilização de produtos de origem vegetal como aditivos alternativos na alimentação de aves. *Embrapa suínos e aves*. Disponível em <[http://www.engormix.com/perspectivas\\_a\\_utilizacao\\_produtos\\_p\\_artigos\\_16\\_AVG.htm/](http://www.engormix.com/perspectivas_a_utilizacao_produtos_p_artigos_16_AVG.htm/)> acesso em 02/03/2006.

Sekine, N.; Ashitani, T.; Murayama, T.; Ogiyama, K.; Takahashi, K. (2009). The Bioactive Extracts of Heartwood of *Dalbergia latifolia*. *International Symposium on Wood Science and Technology*, 55 (1), 29-36.

Seshadri, T. R. (1972). Review Article Polyphenols of *Pterocarpus* and *Dalbergia* woods. *Phytochemistry*, 11:811-898.

Schirch, D.T.; Mancini-Filho, J. (2000). Avaliação da atividade antioxidante em extratos de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*). *Anais XVII Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de alimentos*. 2:5-15.

Shofield, P.; Mbugua, D. M.; Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal feed Science and Technology*, 91, 21 - 40.

Shon, M.; Kim, T.; Sung, N. (2003). *Food chemistry*, 82, 593-597.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 215, 213-219.



---

---

Silva, J. N. M. 2001. Manejo Florestal. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica.

Silva, S. C. (2007). Estudo Químico de Microorganismos Associados a *Khaya ivorensis* (Meliaceae). Tese, S.P. São Carlos. 219 p.

Silverstein, R.M., Webster, F. X. (2006). Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Editora LTC. 6.ed.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (2001). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ed. Editora da UFSC.

Siqueira, J. M., Bomm, M. D., Pereira, N.F.G. (1998). Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanh* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia Salina* Lench. *Química Nova*, 21(5):557-559.

Songsiang, U.; Wanich, S.; Pitchuanom, S.; Netsopa, S.; Uanorn, K.; Yenjai, C. (2009). Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. *Fitoterapia*, 80, 427-431.

Souza, T. 2007 Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Journal of Biochemistry*. 372:173-181.

Souza, C. M. de M. e Silva, H. R.; Jr-Vieira, G. M.; Ayres, M. C. C.; da Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. de M.; Brandão, M. S.; Chaves, H. C. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*, 30 (2), 351-355.

Spicer, J. (2000). Bacteriologia, Micologia e Parasitologia clínicas. Editora Guanabara Koogan S.A., 224 p.

---

---

Tahara, S. (2007). A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Bioscience Biotechnology Biochemical*, 71 (6), 1387-1404.

Tanaka, J. C. A.; da Silva, C. C.; Filho, B. . D.; Nakamura, C. V.; de Carvalho, J. E.; Foglio, M. A. (2005). Constituintes Químicos de *Luehea divaricata*. *Quimica Nova*, 28 (5), 834-837.

Tiwari, A. K. (2002). Imbalance in antioxidant defense and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Currente Science*, 81, 1179-1187.

Tomei, R. R.; Salvador, M. J. (2007). Estresse oxidativo: Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante. *Revista UNIVAP*, 14, 26-31.

Trevisan, R. R. (2010). Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das cascas de *Celtis iguanaea*(Jacq) *sergeant Ulmaceae*. Dissertação, UFP, Curitiba, 108p.

Trusheva, B.; Popova, M., Naydenski, H.; Tsvetkova, I.; Rodriguez, J., G.; Bankova, . (2004). New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan própolis. *Fitoterapia*, 75, 683-689.

Umehara, K.; Nemoto, K.; Matsushita, A.; Tereda, E.; Monthakantirat, O.; De-Eknamkul, W.; Miyase, T.; Warashina, T.; Degawa, M.; Noguchi, H. (2009). Flavonoids from the heartwood of the Thai Medicinal plant *Dalbergia parviflora* and their effects on Estrogenic-responsive human breast cancer cells. *Journal of Natural Product*, 72, 2163-2168.

Varty, N. 1998. *Dalbergia nigra*. IUCN 2007. IUCN Red List of Threatened species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/>> acesso em 22/12/2007.

---

---

Virtuoso, S.; Davet, A.; Dias J. F. G.; Cunico, M. M.; Miguel, M.D.; Oliveira, A. B.; Miguel, O. G. (2005). Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15 (2), 137-142.

Wang, W.; Weng, X.; Chen, D. (2000). Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera*. *Food Chemistry*, 71:45-49.

Williams, R. J.; Spencer, J. P. E.; Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 36, No. 7, pp. 838 - 849.

Wingard, J. R. (1995). Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clinical Infectious Diseases*, 20 (1), 115-125.

WHO. World Health Organization. Traditional Medicine Strategies 2002-2005. Geneva: World Health Organization, 2002. 74 p.

Wojciechowski, M. F.; Lavin, M.; Sanderson, M.J. (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *Matk* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American journal of Botany*, 91(11), 1846-1862.

Yahara, S.; Saijo, R.; Nohara, T.; Konishi, R.; Yamahara, J.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1985). Novel bi-isoflavonoids from *Dalbergia odorifera*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 33(11):5130-5133.

Yarow, D. (1998). Methods for isolation, maintenance and identification of yeasts. IN: Kurtzman, C. P.; Fell, J. W. The yeasts a taxonomic study, New York, Elsevier.

Yu, X.; Wang, W.; Yang, M. (2007). *Food chemistry*, 104, 715-720.

---

---

Zanatta, G. F.; Kanashiro, A. M. I.; Castro, A. G. M.; Cardoso, A. L. S. P.; Tessari, E. N. C.; Pulici, S. C. P. (2004). Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 71(3), 283 - 286.

Zani, C. L.; Chaves, P. P. G.; Queiroz R.; Mendes, N. M.;Oliveira A. B.; Cardoso J. E.; Anjos, A. M. G.; Grandi, T.S. ( 1995) Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine*, 2:47-50.

Zhong-Yun, F.; Yang, S.; Wu, G. (2002). Regulation of physiological systems by nutrients: Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*:18:872-879.

# *Apêndice*

# APÊNDICE 1

