

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Investigação de metabólitos secundários de folhas de *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbr. com atividades biológicas úteis.

Lívia Trindade Lôbo*

Monografia de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de **DOUTOR EM QUÍMICA**, área de concentração QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientadora: Prof. Dra. Mara Silvia Pinheiro Arruda. Co-orientador: Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva.

* Bolsista CAPES

FICHA CATALOGRÁFICA

Lobo, Lívia Trindade

Investigação de metabólitos secundários de folhas de *Derris urucu* (Killip *et* Smith) Macbr. com atividades biológicas./ Lívia Trindade Lobo – Belém: UFPA / Labcrol, 2009.

xxii, 267f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Mara Silvia Pinheiro Arruda

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-graduação em Química, 2009.

Bibliografia p. 251 – 264

1. *Derris urucu*. 2. estilbenos. 3. diidroflavonóis. 4. alelopatia. 5. antioxidantes. 6. Produtos Naturais – Tese. I. Arruda, Mara Silvia Pinheiro. II. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Universidade Federal do Pará Instituto de Ciências Exatas e Naturais Programa de Pós-Graduação em Química

Membros da comissão examinadora para avaliação da defesa de doutorado da candidata Lívia Trindade Lôbo.

Prof. Dra. Mara Silvia Pinheiro Arruda Orientadora PPGQ-ICEN-UFPA

Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva Co-orientador PPGQ-ICEN-UFPA

Prof. Dr. Alberto Cardoso Arruda PPGQ-ICEN-UFPA

Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges Faculdade de Farmácia – ICS - UFPA

Prof. Dr. Adolfo Henrique Müller Centro Universitário do Pará - CESUPA

Prof. Dr. Antonio Pedro da Silva Souza Filho Embrapa Amazônia Oriental

Belém, 30 de Junho de 2009





Dedico este trabalho aos meus alicerces durante a realização dele:

A Deus Pela sua luz e força

A minha mãe Liduina de Jesus Trindade Lôbo Pelo amor incondicional e eterno apoio.

> A meu pai Vicemiro Santos Lôbo Pelo amor e eterno apoio.

Aos meus irmãos Vitor Trindade Lôbo e Allan Rodrigo Santos Diniz. Pelo amor, companhia, ajuda crucial e pelo meu eterno amor por eles.

A minha psicóloga e amiga Lurdes Marinho e aos meus amigos especiais: Luis Adriano Nascimento, Ana Cristina Baetas, Geilson Alcântara da Silva, Fernando Gomes da Silva, José Carlos Gaia Furtado e principalmente a Kelly Christina Ferreira Castro.

Por não terem deixado eu desistir.

Em especial ao Dr Milton Nascimento da Silva, o qual fez seu brilhante papel não só como co-orientador mais principalmente como amigo. A Restation

а

AGRADECIMENTOS

A *Deus* e ao *Divino Espírito Santo*, que nunca me deixou faltar fé e luz para vencer os obstáculos na busca do saber.

A meus tios, tias, primos e primas, pelo apoio total.

A professora *Dra. Mara Sílvia Pinheiro Arruda* pela orientação e incentivo dados durante estes dez anos de minha vida e pelos ensinamentos tão importantes para meu crescimento profissional e principalmente pessoal.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química: Adolfo Henrique Müller, Alberdan Santos Silva, Antonio Pedro da S. Souza Filho, Cláudio Nahum Alves, Giselle Maria Skelding P. Guilhon, Lênio, José Guilherme S. Maia e Milton Nascimento da Silva, pelos ensinamentos prestados durante as disciplinas ministradas os quais estão aqui demonstrados e pelo incentivo e ajuda que estiveram dispostos a me oferecer.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Pará*, pela estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao *Dr. Antônio Pedro da Silva Souza Filho*, pelos valiosos ensinamentos e pela colaboração na realização dos bioensaios alelopáticos.

A *EMBRAPA Amazônia Oriental - Laboratório de Agroindústria*, onde foram realizados os bioensaios alelopáticos.

Ao *Dr. Rosivaldo dos Santos Borges*, pelo ensinamento e pela colaboração na realização dos ensaios antioxidantes.

A *Faculdade de Farmácia – UFPA - Laboratório de Química Farmacêutica*, onde foram realizados os ensaios antioxidantes.

Ao **Prof. Dr. Edilberto Silveira – DQOI – CC – UFC**, pela colaboração na obtenção dos espectros.

Aos funcionários da Faculdade de Química, pelo auxílio durante os trabalhos de laboratório, em especial ao *Marçal de Souza Luna* pela preparação dos espectros.

Ao *Dr. Alberto Cardoso Arruda*, pelos ensinamentos e pela colaboração na preparação dos extratos.

A Central de Extração, onde foram preparados os extratos, em especial: Malaquias Amaral, Jammerson Faro, Manolo Freitas, Elinaldo Sampaio, Almir Ribeiro e Kátia Fontelei. A todos os amigos do Laboratório de Química Pesquisa: Fabiola Fernandes Costa, Geiso Rafael, João Carneiro, Mariana Sarkis Müller, Miguel Braga, Sávyo Castro, Rafael Okada Yasunori Moreira (in memorian), Ruth da Conceição do Espírito Santo, pelo imenso apoio e pela amizade que nos unem em especial aos amigos Luís Adriano Santos do Nascimento e Marcelo Lobato Fonseca.

A todos os amigos do Laboratório de Cromatografia Líquida - LABCROL, um grande exemplo de família, com alegrias e tristezas que competem a uma família de verdade e que sempre estiveram próximos em especial: *Allan Jones Ayres, Consuelo Yumiko Y. e Silva, Danila Valeriano, Débora Pinheiro Arruda, Emanuelle Silva Vieira, Geilson Alcântara da Silva, Leandro Santos de Carvalho, Nathália Siso Ferreira, Raimundo Negrão Neto, Roseane Brasil, Sonia das Graças S. R. Pamplona, Thalita Negrão, William Arthur dos Santos de Lima* em especial a minhas irmãs de coração Daniele Rodrigues Monteiro da *Costa, Kelly Christina Ferreira Castro e Marilene Nunes Oliveira.*

A amiga, Doutora em Neurociências, *Ana Cristina Baetas* pelo apoio, incentivo e ensinamentos muito bem absorvidos durante essa caminhada e principalmente pela sua amizade.

As amigas Ingrid Brito Urquiola, Naíra de Nazaré Barros Santos, Michelli Caroline Bahia de Matos e Vivian Garcia da Cunha; as eternas companheiras Fernanda Camarão Pinto, Luciana Santos Serrão de Castro, Nathália Santos Serrão de Castro e Renata Santos Souza; a cunhada Brena Renata Marciel e em especial José Carlos Gaia Furtado, pessoas muito importantes e meu eterno apoio na busca de meus sonhos.

Aos meus amigos: Fabrício Rodrigues Alves, Fernando Gomes da Silva, Laíse Araújo Nascimento, Raimundo Nonato Costa Alves, Ricardo Pontes Teixeira e Rosimery Castro Costa, pelos importantes e indispensáveis conselhos durante esses quatro anos.

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!!!





"É melhor tentar e falhar que preocupar-se e ver a vida passar.

É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora pouco, que em conformidade viver."

Martin Luther King

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."

A Restand

Chico Xavier

а

RESUMO

Derris urucu, pertencente à família Leguminosae/Fabaceae, é conhecida popularmente como "timbó". As raízes desta espécie são utilizadas comumente como pesticidas e veneno para peixe. Do gênero Derris foram relatados muitos estudos fitoquímicos, sendo as raízes a parte mais estudada das plantas desse gênero. A denominação "timbó" é mais generalizada para as espécies Derris urucu e Derris nicou que são as espécies que produzem, nas raízes, substâncias da classe dos rotenóides como a rotenona e a deguelina, de onde deriva a importância dessas plantas. Os extratos, bem como, as substâncias isoladas deste gênero são responsáveis por um vasto conjunto de atividades biológicas, principalmente a atividade inseticida. Do extrato etanólico das folhas de D. urucu, doze substâncias foram isoladas e purificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: cinco estilbenos, seis diidroflavonóis e uma flavanona. A identificação estrutural foi feita com base na análise espectrométrica de massas, de RMN ¹H e ¹³C e técnicas de RMN bidimensionais, além de comparação com dados encontrados na literatura. O extrato etanólico das folhas de D. urucu foi submetido a bioensaios para avaliação do seu potencial alelopático, tendo exibido relevantes percentuais de inibição da germinação de sementes e do desenvolvimento de plantas invasoras de pastagens. Com o objetivo de detectar as substâncias responsáveis pela atividade alelopática, três estilbenos e três diidroflavonóis foram selecionados e submetidos a bioensaios de inibição de germinação e de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo de plantas daninhas. Os ensaios alelopáticos foram realizados com as substâncias isoladas e com a combinação delas, visando também avaliar o sinergismo entre elas, no entanto, as inibições observadas foram de magnitudes muito baixas. Por outro lado, quando as substâncias foram testadas em misturas observou-se um aumento significativo dos percentuais de inibição, por isso essas substâncias em misturas, podem ser consideradas promissoras para futuros estudos, envolvendo atividade alelopática. Foram realizados, também, bioensaios de atividade antioxidante com oito substâncias, sendo três estilbenos e cinco diidroflavonóis frente ao radical DPPH. Neste bioensaio, não foi observada uma atividade antioxidante relevante, justificada pela presença de poucas hidroxilas fenólicas nas estruturas das substâncias testadas.

Palavra-chave: Derris urucu, estilbenos, diidroflavonóis, alelopatia, antioxidante.

ABSTRACT

Derris urucu, belonging to the family Leguminosae / Fabaceae, is popularly known as "timbó". The roots of this species are commonly used as pesticides and poison to fish. From Derris genus many phytochemical studies have been reported, the roots being of the most studied part from the plants of this genus. The name "timbó" is most general for the species Derris urucu and Derris nicou, which are the species that produce, in their roots, rotenoids such as rotenone and deguelin, from which derives the importance of these plants. The extracts, and the substances isolated from this genus are responsible for a wide range of biological activities, mainly the insecticidal activity. From the ethanolic extract of leaves of D. urucu, twelve compounds were isolated and purified by High Performance Liquid Chromatography: five stilbenes, six dihydroflavonols and one flavanone. The structural identification was based on the mass, 1H and 13C NMR spectrometric analysis and two dimensional NMR, beyond comparison with literature data . The ethanolic extract of leaves of D. urucu was submitted to bioassays to avaluate the allelophatic potential, presenting relevant percentage of inhibition of seed germination and development of weeds in pastures. Aiming to detect the substances responsible for allelophatic activity, three stilbenes and three dihydroflavonols were selected and submitted to bioassays of inhibition of germination and development of the radicle and hypocotyl of weeds. The allelophatic tests were performed with the substances isolated and with the combination of them, aiming to assess the synergism between them, but the magnitude of inhibition observed was very low. By other side, when the substances were tested in mixtures there was a significant increase in the percentage of inhibition, so these substances in mixtures, can be considered promising for future studies involving allelophatic activity. An other test was carried out with the isolated compounds. Three stilbenes and five dihydroflavonols were evaluated for DPPH radical scavenging activity (antioxidant activity). In this bioassay, was not observed a significant antioxidant activity, justified by the analysis in the structures of the substances tested.

Key Word: Derris urucu, stilbenes, dihydroflavonols, allelopaty, radical scavenging activity.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CAPÍTULO I (Introdução)

1- INTRODUÇÃO	23
1.1- OBJETIVOS	26
1.2- A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DAS PLANTAS	27
1.3- OS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	28
1.4- DERRIS URUCU: FAMÍLIA, GÊNERO E ESPÉCIES RELACIONADAS	30
1.4.1- Família Leguminosae (Fabaceae)	30
1.4.2- Gênero <i>Derris</i>	31
1.4.3- Espécies do Genero <i>Derris</i> Estudadas Biológica e Químicamente	33
1.4.4- Espécie <i>Derris urucu</i> 5	54
1.5-PROPRIEDADE BIOLOGICA ESTUDADA I: ALELOPATIA	56
1.5.1- Produção dos Aleloquímicos pelas Plantas	56
1.5.2- Mecanismos de Liberação de um Aleloquímico	57
1.5.3- Alelopatia e Suas Perspectivas Futuras	59
1.6- PROPRIEDADE BIOLÓGICA ESTUDADA II: ANTIOXIDANTE	60
1.6.1- Histórico	50
1.6.2- Radicais Livres	51
1.6.3- Estresse oxidativo	52
1.6.4- Peroxidação Lipídica6	57
1.6.5- Atividade Antioxidante de Derivados Fenólicos	68
1.6.6- Avaliação de Atividade Antioxidante	70

CAPÍTULO II (Parte Experimental)

2- ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE Derris urucu71
2.1- COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO PARA ANÁLISE
FITOQUÍMICA71
2.2- OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

2.3- F	RACIONA	MENTO DC	EXTRAT	O ETAN	ÓLICO	DE Derris	urucu.	71
2.4-	PRÉ-TRA	TAMENTO	USADO	PARA	AS F	FRAÇÕES	DA	COLUNA
FILTRANTE	5						•••••	72
2.5- IS	SOLAMEN	NTO DAS SU	BSTÂNCI	AS				74
2.6- N	1ETODOL	OGIA UTIL	IZADA NO	DS BIOE	NSAIO	S PARA DI	ETER	MINAÇÃO
DO POTENO	CIAL ALE	LOPÁTICO I	DA PLANI	[•] A	•••••			
	2.6.1- Ge	erminação de	Semente					82
	2.6.2- De	esenvolvimen	to da Radí	cula e do	Hipoc	ótilo		82
	2.6.3- Av	aliação dos l	Efeitos Sin	érgicos e	ntre as	Substância	s	83
2.7-M	ETODOLO	ogia do e	NSAIO PA	ARA DE	TERMI	INAÇÃO E	DA A'	TIVIDADE
ANTIOXIDA	NTE						•••••	
2.8- T	ÉCNICAS	DE SEPARA	ĄÇÃO					84
	2.8.1- Ma	aterial utiliza	ido na Cro	matogra	fia			84
	2.8.2- Co	oluna Croma	tográfica F	or Via Ú	mida (CCVU)		84
	2.8.3-	Cromatogra	afia em	a Can	nada	Delgada	Co	omparativa
(CCDC)					•••••		•••••	
	2.8.4- Re	eveladores de	placas					84
2.9- N	IATERIAI	IS UTILIZAD	OS					85
	2.9.1- Eq	uipamentos.						85
	2.9.2- So	lventes			•••••		•••••	85
2.10-	INSTRU	MENTOS E	E MATER	IAIS U	TILIZA	DOS NOS	S BIO	DENSAIOS
ALELOPÁT	ICOS							86

CAPÍTULO III (Resultados)

3- RE	SULT	ADOS E DISCUSS	ÕES		•••••			87
	3.1-	CONSTITUINTES	QUÍMICOS	ISOLADOS	DAS	FOLHAS	DE	Derris
urucu.								87
		3.1.1- Estrutura d	as Substância	s Isoladas de A	Derris	Urucu		87
		3.1.2- Determinaç	ão Estrutural	do Estilbeno	S1			90
		3.1.3- Determinaç	ão Estrutural	do Estilbeno	S2			102
		3.1.4- Determinaç	ão Estrutural	do Estilbeno	S3			115

3.1.6- Determinação Estrutural do Estilbeno S5 139
3.1.7- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S6 142
3.1.8- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S7 152
3.1.9- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S8164
3.1.10- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S9 173
3.1.11- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S10 184
3.1.12- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S11195
3.1.13- Determinação Estrutural da Flavanona S12 207
3.2- ROTA BIOSSINTÉTICA220
3.2.1- Os Estilbenos
3.2.2- Os Flavonóides
3.3 –BIOENSAIOS ALELOPÁTICOS228
3.3.1- Extrato Etanólico das folhas de <i>Derris urucu</i> 228
3.3.2- Substâncias isoladas de <i>Derris urucu</i>
3.3.2.1- Avaliação da inibição da Germinação de
sementes
3.3.2.2- Avaliação da inibição do desenvolvimento da
Radícula
3323- Avaliação da inihição do desenvolvimento do
5.5.2.5- Availação da minição do desenvolvimento do
Hipocótilo
Hipocótilo.
Hipocótilo. 232 3.3.3- Resultados dos bioensaios com as substâncias aos pares. 233 3.3.3.1- Avaliação da inibição da Germinação de sementes frente às misturas dos estilbenos. 234 3.3.3.2- Avaliação da inibição da Germinação de sementes frente às misturas dos diidroflavonois. 236 3.3.3.3- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula frente às mistura dos estilbenos. 236 3.3.3.3- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula frente às mistura dos estilbenos. 238
Hipocótilo 232 3.3.3- Resultados dos bioensaios com as substâncias aos pares 233 3.3.3.1- Avaliação da inibição da Germinação de sementes frente às misturas dos estilbenos 234 3.3.3.2- Avaliação da inibição da Germinação de sementes frente às misturas dos diidroflavonois 236 3.3.3.3- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula frente às mistura dos estilbenos 236 3.3.3.4- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula 3.3.3.4- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula
Hipocótilo. 232 3.3.3- Resultados dos bioensaios com as substâncias aos pares. 233 3.3.3.1- Avaliação da inibição da Germinação de sementes frente às misturas dos estilbenos. 234 3.3.3.2- Avaliação da inibição da Germinação de sementes frente às misturas dos diidroflavonois. 236 3.3.3.3- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula frente às mistura dos estilbenos. 238 3.3.3.4- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula frente às mistura dos diidroflavonois. 238 3.3.3.4- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula 240
Hipocótilo 232 3.3.3- Resultados dos bioensaios com as substâncias aos pares 233 3.3.3.1- Avaliação da inibição da Germinação de sementes frente às misturas dos estilbenos 234 3.3.3.2- Avaliação da inibição da Germinação de sementes frente às misturas dos diidroflavonois 236 3.3.3.3- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula frente às mistura dos estilbenos 238 3.3.3.4- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula frente às mistura dos diidroflavonois 238 3.3.3.5- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula frente às mistura dos diidroflavonois 240 3.3.3.5- Avaliação da inibição do desenvolvimento do
Hipocótilo 232 3.3.3- Resultados dos bioensaios com as substâncias aos pares 233 3.3.3- Resultados dos bioensaios com as substâncias aos pares 233 3.3.3.1- Avaliação da inibição da Germinação de sementes 234 3.3.3.2- Avaliação da inibição da Germinação de sementes 234 3.3.3.2- Avaliação da inibição da Germinação de sementes 236 frente às misturas dos diidroflavonois 236 3.3.3.3- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula 238 frente às mistura dos estilbenos 238 3.3.3.4- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula 240 3.3.3.5- Avaliação da inibição do desenvolvimento do 240 3.3.3.5- Avaliação da inibição do desenvolvimento do 242
Hipocótilo 232 3.3.3- Resultados dos bioensaios com as substâncias aos pares 233 3.3.3- Resultados dos bioensaios com as substâncias aos pares 233 3.3.3- Resultados dos bioensaios com as substâncias aos pares 233 3.3.3- Resultados dos bioensaios com as substâncias aos pares 233 3.3.3- Avaliação da inibição da Germinação de sementes 234 3.3.3.2- Avaliação da inibição da Germinação de sementes 236 frente às misturas dos diidroflavonois 236 3.3.3.4- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula 238 frente às mistura dos estilbenos 238 3.3.3.5- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula 240 J.3.3.6- Avaliação da inibição do desenvolvimento do 242 3.3.3.6- Avaliação da inibição do desenvolvimento do 242

3.4 –ENSAIOS ANTIOXIDANTES	
CAPÍTULO IV (Conclusões)	
4- CONCLUSÕES	249
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Timbó sendo utilizado na pescaria por nativos	32
FIGURA 2- A espécie Derris urucu	55
FIGURA 3- Cromatograma do isolamento dos constituintes majoritários da f	ração DU-2
(Hex/AcOEt 30%)	75
FIGURA 4- Cromatograma do isolamento dos constituintes majoritários da f	ração DU-3
(Hex/AcOEt 50%)	76
FIGURA 5- Cromatograma do isolamento dos constituintes majoritários da f	ração DU-4
(AcOEt 100%)	77
FIGURA 6- Espectro de massa de S1	90
FIGURA 7- Esqueleto carbônico dos estilbenos	90
FIGURA 8- Espectro de RMN ¹ H de S1	92
FIGURA 9- Espectro de RMN ¹ H de S1, Expansão	92
FIGURA 10- Espectro de RMN ¹ H de S1 Expansão-2	93
FIGURA 11- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S1	93
FIGURA 12- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S1, Expansão	94
FIGURA 13- Espectro de ¹³ C de S1	95
FIGURA 14- Espectro de ¹³ C de S1, Expansão	96
FIGURA 15- Espectro de DEPT de S1	96
FIGURA 16- Mapa de correlação HETCOR de S1	97
FIGURA 17- Mapa de correlação HETCOR de S1, Expansão	97
FIGURA 18- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação	HMBC de
S1	99
FIGURA 19- Estrutura de S1	99
FIGURA 20- Mapa de correlação HMBC de S1	100
FIGURA 21- Mapa de correlação HMBC de S1, Expansão	
FIGURA 22- Estrutura sugerida para S2	103
FIGURA 23- Espectro de RMN ¹ H de S2	
FIGURA 24- Espectro de RMN de ¹ H de S2, Expansão	104
FIGURA 25- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S2	105
FIGURA 26- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S2, Expansão	105
FIGURA 27- Espectro de RMN ¹³ C de S2	
FIGURA 28- Espectro de RMN ¹³ C de S2-Expansão	

FIGURA 29- Espectro de DEPT de S2	107
FIGURA 30- Mapa de correlação HETCOR de S2	
FIGURA 31- Mapa de correlação HETCOR de S2-Expansão	
FIGURA 32- Mapa de correlação HMBC de S2	110
FIGURA 33- Mapa de correlação HMBC de S2-Expansão	110
FIGURA 34- Mapa de correlação HMBC de S2-Expansão-2	111
FIGURA 35- Mapa de correlação HMBC de S2-Expansão-3	111
FIGURA 36- Mapa de correlação HMBC de S2 (Expansão em CDCl ₃)	112
FIGURA 37- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação	HMBC de
S2	113
FIGURA 38- Estrutura de S2	113
FIGURA 39- Espectro de RMN ¹ H de S3	116
FIGURA 40- Espectro de RMN de ¹ H de S3-Expansão	116
FIGURA 41- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S3	117
FIGURA 42- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S3-Expansão	117
FIGURA 43- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S3-Expansão-2	
FIGURA 44- Espectro de RMN ¹³ C de S3	
FIGURA 45- Espectro de RMN ¹³ C de S3-Expansão	
FIGURA 46- Espectro de DEPT de S3	120
FIGURA 47- Mapa de correlação HETCOR de S3	
FIGURA 48- Mapa de correlação HETCOR de S3-Expansão	
FIGURA 49- Mapa de correlação HMBC de S3	
FIGURA 50- Mapa de correlação HMBC de S3-Expansão	
FIGURA 51- Mapa de correlação HMBC de S3-Expansão-2	123
FIGURA 52- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação	HMBC de
\$3	124
FIGURA 53- Estrutura de S3	124
FIGURA 54- Espectro de massa de S4	126
FIGURA 55- Espectro de RMN ¹ H de S4	128
FIGURA 56- Espectro de RMN de ¹ H de S4-Expansão	128
FIGURA 57- Espectro de RMN de ¹ H de S4-Expansão-2	129
FIGURA 58- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S4	129
FIGURA 59- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S4-Expansão	130
FIGURA 60- Espectro de RMN ¹³ C de S4	131

FIGURA 61- Espectro de RMN ¹³ C de S4-Expansão	131
FIGURA 62- Espectro de DEPT de S4	132
FIGURA 63- Mapa de correlação HETCOR de S4	
FIGURA 64- Mapa de correlação HETCOR de S4-Expansão	
FIGURA 65- Mapa de correlação HMBC de S4	134
FIGURA 66- Mapa de correlação HMBC de S4-Expansão	135
FIGURA 67- Mapa de correlação HMBC de S4-Expansão-2	135
FIGURA 68- Mapa de correlação HMBC de S4-Expansão-3	136
FIGURA 69- Mapa de correlação HMBC de S4-Expansão-4	136
FIGURA 70- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação	HMBC de
S4	137
FIGURA 71- Estrutura de S4	137
FIGURA 72- Estrutura de S5	140
FIGURA 73- Espectro de RMN ¹ H de S5	141
FIGURA 74- Espectro de RMN de ¹ H de S5-Expansão	141
FIGURA 75- Espectro de massa de S6	142
FIGURA 76- Espectro de RMN ¹ H de S6	143
FIGURA 77- Espectro de RMN ¹ H de S6-Expansão	144
FIGURA 78- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S6	144
FIGURA 79- Espectro de ¹³ C de S6	146
FIGURA 80- Espectro de ¹³ C de S6-Expansão	146
FIGURA 81- Espectro de DEPT de S6	147
FIGURA 82- Mapa de correlação HETCOR de S6	147
FIGURA 83- Estruturas possíveis para o diidroflavonol S6	148
FIGURA 84- Mapa de correlação HMBC de S6	149
FIGURA 85- Mapa de correlação HMBC de S6-Expansão	149
FIGURA 86- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação	HMBC de
S6	150
FIGURA 87- Estrutura de S6	150
FIGURA 88- Espectro de massa de S7	152
FIGURA 89- Espectro de RMN ¹ H de S7	153
FIGURA 90- Espectro de RMN ¹ H de S7-Expansão	153
FIGURA 91- Espectro de RMN ¹ H de S7-Expansão-2	154
FIGURA 92- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S7	154

FIGURA 93- Espectro de ¹³ C de S7	155
FIGURA 94- Espectro de ¹³ C de S7-Expansão	156
FIGURA 95- Espectro de DEPT de S7	156
FIGURA 96- Mapa de correlação HETCOR de S7	157
FIGURA 97- Estruturas possíveis para o diidroflavonol S7	158
FIGURA 98- Mapa de correlação HMBC de S7	160
FIGURA 99- Mapa de correlação HMBC de S7-Expansão	160
FIGURA 100- Mapa de correlação HMBC de S7-Expansão-2	161
FIGURA 101- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação	HMBC de
S7	161
FIGURA 102- Estrutura de S7	162
FIGURA 103- Espectro de massa de S8	164
FIGURA 104- Espectro de RMN ¹ H de S8	
FIGURA 105- Espectro de RMN ¹ H de S8-Expansão	
FIGURA 106- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S8	
FIGURA 107- Espectro de ¹³ C de S8	167
FIGURA 108- Espectro de DEPT de S8	167
FIGURA 109- Mapa de correlação HETCOR de S8	168
FIGURA 110- Estrutura possíveis para o diidroflavonol S8	
FIGURA 111- Mapa de correlação HMBC de S8	169
FIGURA 112- Mapa de correlação HMBC de S8-Expansão	170
FIGURA 113- Mapa de correlação HMBC de S8-Expansão-2	170
FIGURA 114- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação	HMBC de
S8	171
FIGURA 115- Estrutura de S8	171
FIGURA 116- Espectro de massa de S9	173
FIGURA 117- Espectro de RMN ¹ H de S9	174
FIGURA 118- Espectro de RMN ¹ H de S9-Expansão	
FIGURA 119- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S9	
FIGURA 120- Espectro de ¹³ C de S9	176
FIGURA 121- Espectro de ¹³ C de S9-Expansão	176
FIGURA 122- Espectro de DEPT de S9	177
FIGURA 123- Mapa de correlação HETCOR de S9	177
FIGURA 124- Estruturas possíveis para o diidroflavonol S9	178

FIGURA 125- Mapa de correlação HMBC de S9	
FIGURA 126- Mapa de correlação HMBC de S9-Expansão	180
FIGURA 127- Mapa de correlação HMBC de S9-Expansão-2	181
FIGURA 128- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação	HMBC de
89	181
FIGURA 129- Estrutura de S9	182
FIGURA 130- Espectro de massa de S10	184
FIGURA 131- Espectro de RMN ¹ H de S10	
FIGURA 132- Espectro de RMN ¹ H de S10-Expansão	
FIGURA 133- Espectro de RMN ¹ H de S10-Expansão-2	186
FIGURA 134- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S10	
FIGURA 135- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S10-Expansão	
FIGURA 136- Espectro de ¹³ C de S10	188
FIGURA 137- Espectro de ¹³ C de S10-Expansão	188
FIGURA 138- Espectro de DEPT de S10	189
FIGURA 139- Mapa de correlação HETCOR de S10	189
FIGURA 140- Proposta estrutural para S10	190
FIGURA 141- Mapa de correlação HMBC de S10	192
FIGURA 142- Mapa de correlação HMBC de S10-Expansão	192
FIGURA 143- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação	HMBC de
S10	193
FIGURA 144- Estrutura de S10	193
FIGURA 145- Espectro de RMN ¹ H de S11	
FIGURA 146- Espectro de RMN ¹ H de S11-Expansão	
FIGURA 147- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S11	197
FIGURA 148- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S11-Expansão	
FIGURA 149- Espectro de ¹³ C de S11	198
FIGURA 150- Espectro de DEPT de S11	199
FIGURA 151- Mapa de correlação HETCOR de S11	199
FIGURA 152- Possibilidades estruturais para S11	
FIGURA 153- Mapa de correlação HMBC de S11	202
FIGURA 154- Mapa de correlação HMBC de S11-Expansão	
FIGURA 155- Mapa de correlação HMBC de S11-Expansão-2	
FIGURA 156- Mapa de correlação HMBC de S11-Expansão-3	204

FIGURA 157- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação	HMBC de
S11	
FIGURA 158- Estrutura de S11	
FIGURA 159- Esqueleto carbônico das flavanonas	207
FIGURA 160- Espectro de RMN ¹ H de S12	
FIGURA 161- Espectro de RMN ¹ H de S12-Expansão	
FIGURA 162- Espectro de RMN ¹ H de S12-Expansão-2	209
FIGURA 163- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S12	
FIGURA 164- Mapa de correlação COSY ¹ H x ¹ H de S12-Expansão	
FIGURA 165- Espectro de ¹³ C de S12	211
FIGURA 166- Espectro de ¹³ C de S12-Expansão	212
FIGURA 167- Espectro de ¹³ C de S12-Expansão-2	
FIGURA 168 Espectro de DEPT de S12	213
FIGURA 169- Mapa de correlação HETCOR de S12	213
FIGURA 170- Possibilidades estruturais para S12	214
FIGURA 171- Mapa de correlação HMBC de S12	216
FIGURA 172- Mapa de correlação HMBC de S12-Expansão	216
FIGURA 173- Mapa de correlação HMBC de S12-Expansão-2	217
FIGURA 174- Mapa de correlação HMBC de S12-Expansão-3	217
FIGURA 175- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação	HMBC de
S12	
FIGURA 176- Estrutura de S12	
FIGURA 177- Estrutura básica dos Estilbenos	220
FIGURA 178- Estrutura básica dos Flavonóides	224
FIGURA 179- Reação entre o DPPH e os derivados fenólicos	
FIGURA 180- Estrutura e influencia dos grupos substituídos próximos d	as hidroxilas
fanólicas dos diidroflavonois e BHT	
FLUXOGRAMA I – Obtenção do extrato e das frações das folha	s de <i>Derris</i>
urucu	78
FLUXOGRAMA II – Fracionamento da fração DU-2	79
FLUXOGRAMA III – Fracionamento da fração DU-3	80
FLUXOGRAMA IV – Fracionamento da fração DU-4	81
TABELA I - Estimativa do % do solvente B para eluição isocrática	73
TABELA II – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de S1	101

TABELA III - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de S2114
TABELA IV - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de S3125
TABELA V - Dados de RMN de ¹H e ¹³C de S4 138
TABELA VI - Dados de RMN ¹ H de S5140
TABELA VII - Dados de RMN de ¹H e ¹³C de S6 151
TABELA VIII - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de S7163
TABELA IX - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de S8172
TABELA X - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de S9183
TABELA XI - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de S10194
TABELA XII - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de S11206
TABELA XIII - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de S12219
GRÁFICO 1 - Efeitos alelopáticos de S1, S2 e S4 sobre a inibição da germinação de
sementes de plantas invasoras de pastagens229
GRÁFICO 2 - Efeitos alelopáticos de S6, S7 e S9 sobre a inibição da germinação de
sementes de plantas invasoras de pastagens
GRÁFICO 3 - Efeitos alelopáticos de S1, S2 e S4 sobre a inibição do desenvolvimento da
radícula de plantas invasoras de pastagens231
GRÁFICO 4 - Efeitos alelopáticos de S6, S7 e S9 sobre a inibição do desenvolvimento da
radícula de plantas invasoras de pastagens231
GRÁFICO 5 - Efeitos alelopáticos de S1, S2 e S4 sobre a inibição do desenvolvimento do
hipocótilo de plantas invasoras de pastagens232
GRÁFICO 6 - Efeitos alelopáticos de S6, S7 e S9 sobre a inibição do desenvolvimento do
hipocótilo de plantas invasoras de pastagens233
GRÁFICO 7 - Efeitos alelopáticos das misturas dos estilbenos S1 e S2; S1 e S4; S2 e S4
sobre a inibição da germinação de plantas invasoras de pastagens235
GRÁFICO 8 - Efeitos alelopáticos das misturas de S6 e S7; S6 e S9; S7 e S9 sobre a
inibição da germinação de sementes de plantas invasoras de pastagens237
GRÁFICO 9 - Efeitos alelopáticos das misturas dos estilbenos S1 e S2; S1 e S4; S2 e S4
sobre a inibição do desenvolvimento da radícula de plantas invasoras de
pastagens
GRÁFICO 10 - Efeitos alelopáticos das misturas dos estilbenos S6 e S7; S6 e S9; S7 e S9
sobre a inibição do desenvolvimento da radícula de plantas invasoras de
pastagens

GRÁFICO 11 - Efeitos alelopáticos das misturas dos estilbenos S1 e S2; S1 e S4;	S2 e S4
sobre a inibição do desenvolvimento do hipocótilo de plantas invaso	oras de
pastagens	
GRÁFICO 12 - Efeitos alelopáticos das misturas dos estilbenos S6 e S7; S6 e S9;	S7 e S9
sobre a inibição do desenvolvimento do hipocótilo de plantas invaso	oras de
pastagens	
GRÁFICO 13 - Curva de avaliação do potencial de inibição antioxidante das sub	stâncias
isoladas de Derris urucu frente ao DPPH, em diferentes concentrações. Como pa	ıdrão de
comparação foi usado o butil-hidroxitolueno (BHT). (-◊-) BHT: (-□-) urucuol B	S6; (-o-)
urucuol A S7; (-∆-) urucuol C S8; (-•-) Isotirumalina S9	247
ESQUEMA 1- Reação da 2,2-difenil-1-picrilhidrazil com derivados fenólicos	70
ESQUEMA 2- Proposta Biossintética para formação dos Estilbenos	222
ESQUEMA 3- Proposta Biossintética para formação dos Flavonoides	226

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

AcOEt	Acetato de Etila
CAT	Catalase
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCVU	Coluna Cromatográfica por Via Úmida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY ¹ H x ¹ H	¹ H, ¹ H Correlated Spectroscopy
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAPP	Difosfato de Dimetil Arila
DPPH	Difenilpicril-hidrazil radical
DU	Derris urucu
SPE	Extração em Fase Sólida
ER	Espécies Reativas
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
GPx	Se-glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa
gts.	Gotas
g	Grama
HPODE	Ácido Hidroperoxido
HETCOR	Heteronuclear Correlation
Hex.	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
Hz	Hertz
IPP	Isopentenil Piro Fosfato
J	Constante de acoplamento em Hertz
Kg	Kilograma
L	Litro
MeOH	Metanol

mg	Miligrama
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
MVA	Ácido mevalônico
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídio Pirofosfato
nm	Nanômetro
pág.	Página
págs.	Páginas
P.A.	Para Análise
ppm	Parte por milhão
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio –1
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono –13
S	Simpleto
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento Químico
μL	Microlitro

Dihydroflavonols from the leaves of *Derris urucu* (Leguminosae): Structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity

Lívia T. Lôbo, Geilson A. da Silva, Malisson Ferreira, Milton N. da Silva, Alberdan S. Santos, Alberto C. Arruda, Giselle M.S.P. Guilhon, Lourivaldo S. Santos, Rosivaldo dos Santos Borges and Mara Silvia P. Arruda



Dihydroflavonols from the leaves of *Derris urucu* (Leguminosae): Structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity

Lívia T. Lôbo,^a Geilson A. da Silva,^a Malisson Ferreira,^a Milton N. da Silva,^a Alberdan S. Santos,^a Alberto C. Arruda,^a Giselle M.S.P. Guilhon,^a Lourivaldo S. Santos,^a Rosivaldo dos Santos Borges^b and Mara Silvia P. Arruda^{*,a}

^aPrograma de Pós-Graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário do Guamá, 66075-970 Belém-PA, Brasil

^bFaculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário do Guamá, 66075-970 Belém-PA, Brasil

Dihydroflavonols from the leaves of *Derris urucu* (Leguminosae): Structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity

Derris urucu é uma planta da Amazônia com propriedades inseticida e ictiotóxica. Estudos com esta espécie reportam a presença de flavonóides, principalmente rotenóides, bem como de estilbenos. A partir do extrato etanólico das folhas de *Derris urucu* (Leguminosae), quatro novos dihidroflavonois, denominados urucuol A (1), B (2), C (3) e D (4), foram isolados e identificados. As estruturas destes compostos foram elucidadas por uma extensiva análise espectroscópica de RMN uni e bidimensional, UV, IV e dados de EM. Os compostos isolados (1-4) foram avaliados quanto ao seu potencial sequestrador do radical DPPH[•] e apresentaram baixo poder antioxidante quando comparados ao antioxidante comercial *trans*-resveratrol.

Derris urucu is an Amazon plant with insecticide and ichthyotoxic properties. Studies with this species shown the presence of flavonoids, mainly rotenoids, as well as stilbenes. The ethanol extract of the leaves of *Derris urucu* (Leguminosae) afforded four new dihydroflavonols named urucuol A (1), B (2), C (3), and D (4). The structures of these compounds were elucidated by extensive analysis of 1D and 2D NMR, UV and IR spectra and MS data. The isolated compounds (1-4) were evaluated for DPPH[•] radical scavenging activity and showed a relatively lower antioxidant ability compared to the commercial antioxidant *tans*-resveratrol.

Keywords: Derris urucu, Leguminosae, dihydroflavonols, radical scavenging activity, antioxidant.

^{*}e-mail: mspa@ufpa.br

Introduction

The Amazon ecosystems are rich in plants with insecticide and piscicide properties, and those belonging to the *Derris* genus are the most used.¹ These plants, in the Amazon area, are called "timbó". Some studies carried out on roots of Derris urucu extracts related the presence of rotenoids, especially rotenone, that show insecticide and ichthyotoxic activity.²⁻⁵ Additionally to rotenoids, others minor flavonoids, such as flavanones, isoflavanones and chalcones, together with stilbenes have been also described from the roots of *Derris urucu*.⁶ Flavonoids belong to a group of naturally occurring compounds with a number of biological activities, such as antibacterial, antimutagenic, cytotoxic and anticarcinogenic⁷⁻¹⁰, together with antioxidant activity, which is one of the most studied.^{11,12} Antioxidant activity arises from the flavonoids ability to scavenge free radicals and thus eliminate reactive oxygen species.^{13,14} These phenolic compounds are known to possess an antioxidant character at various extents.¹⁵⁻¹⁷ Therefore, the antioxidant activity of these natural compounds is related to a number of different mechanisms such as free radical scavenging, hydrogen donation, singlet oxygen quenching, metal ion chelation, and acting as a substrate for radicals such as superoxide and hydroxide.¹⁸ Because the oxidative stress is known to cause many diseases, scientists have become more interested in natural sources to fight it, looking for active components from plants in this respect in recent years. Nevertheless, some phenolic compounds increase oxidative stress and toxicity because of their prooxidant properties.¹⁹ The balance between antioxidant or prooxidant properties can be determined by scavenge capacity of radical oxygen or nitrogen species using spectrophotometric methods, such as DPPH, which has been applied to the phenolic compounds commonly present in natural products. The spectrophotometric technique employs the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH'), which shows a

characteristic UV–VIS spectrum with a maximum of absorbance close to 517 nm in methanol. The addition of an antioxidant compound results in a decrease of absorbance proportional to the concentration and antioxidant activity of the compound itself .²⁰ This method presents the advantage of the use of a stable and commercially available free radical and has been extensively applied on the study of antioxidant activity of food items, such as olive oil, fruits, juices and wines .²¹⁻²⁶ It is easy to perform, highly reproducible and comparable with other methods such as ABTS, reduction of superoxide anion and inhibition of lipid peroxidation .^{27,28} In particular, DPPH[•] free radical has been used to assess the ability of phenolic compounds to transfer labile H atoms to radicals.²⁹ Total H atom donating capacities are evaluated in the EC₅₀ index, defined as the concentration needed to reduce 50% of DPPH[•] free radical.

Thus, in this work we have investigated leaves of *D. urucu* for the first time, searching compounds with potential antioxidant activity, resulting in the isolation of four new dihydroflavonols named urucuol A (1), B (2), C(3) and D(4) (Fig. 1), which were evaluated for the ability of DPPH[•] radical-scavenging. Our purpose in this work was also contribute to a better understanding of the mechanistic features of antioxidant processes of the dihydroflavonols isolated from *Derris urucu*.

Results and Discussion

Phytochemical investigation

The dried leaves of *Derris urucu* were extracted with EtOH. The ethanolic extract was fractionated on silica gel column chromatography affording 6 fractions. Chromatographic

separation of the EtOAc-soluble fraction by semi-preparative HPLC led to the purification of pure substances **1-4** (Figure 1).

The UV spectra of these compounds showed similar behavior, with maxima as λ 229-235, 261-291, and 309-342 (sh) nm, corresponding to the $\pi \Rightarrow \pi *$ and $n \Rightarrow \pi *$ transitions, that matched the dihydroflavonol skeletons.³⁰ The IR spectra of the isolated compounds showed a similar series of absorption bands at v_{max} 3458-3206 cm⁻¹, corresponding to OH vibrations; 2974-2933 cm⁻¹, corresponding to CH vibrations; 1633-1597 cm⁻¹, corresponding to C=O vibrations and 1574-1434 cm⁻¹, corresponding to C=C vibrations of the aromatic ring.³⁰

Insert the Figure 1

Compound **1** was obtained as a pale yellow powder. Its ESI mass spectrum in positive mode exhibited a high intensity *quasi*-molecular ion at m/z 407 [M+Na]⁺ and smaller ion peaks at m/z 385 [M+H]⁺, 325 [M+Na-58(C₃H₆O)-H]⁺, 284 [M+H-58(C₃H₆O)-28(CO)-15(CH₃)]⁺ and 236. These data, in conjunction with the ¹H and ¹³C NMR spectra analysis, were consistent with the molecular formula C₂₁H₂₀O₇. Its ¹H NMR spectrum (Table 1) exhibited a typical AB system due to H-2 and H-3 of a dihydroflavonol³¹ at $\delta_{\rm H}$ 4.96 (d, J = 12.0 Hz) and 4.51 (d, J = 12.0 Hz), respectively. These assignments were confirmed by the ¹³C NMR spectrum (Table 2), which showed three C-ring carbon signals at $\delta_{\rm C}$ 83.1 (C-2), 72.3 (C-3) and 195.9 (C-4). Besides that, the ¹H NMR spectrum exhibited signals in the aromatic region at $\delta_{\rm H}$ 7.13 (1H, d, J = 1.8 Hz), 7.02 (1H, dd, J = 8.1 erg) and 6.91 (1H, d, J = 8.1 Hz), which indicated a AMX spin system of a 1,3,4-trisubstituted phenyl group, as well as one singlet at $\delta_{\rm H}$ 6.62 and 5.62 (1H each, d, J = 10.2 Hz) and 1.44 (6H, s)

revealed a 2,2-dimethylchromeno ring attached to an aromatic ring, and the singlets at $\delta_{\rm H}$ 11.45 and 3.92 indicated the presence of a quelated hydroxyl to carbonyl and one OMe groups connected to aromatic ring, respectively. All the couplings were confirmed through the analysis of ¹H-¹H COSY spectrum. Beyond the signals related to C-ring carbons, the ¹³C NMR spectrum of **1** exhibited other 17 signals attributed to eighteen carbons with aid of the HETCOR and HMBC (Table 2) experiments. The 2,2-dimethylchromene ring attached to A ring at C-6 and C-7 was deduced by ${}^{3}J_{C,H}$ correlations from H-3", H-8 and OH-5 to C-6. The location of the OMe and OH groups at C-4' and C-3' of the aromatic Bring, respectively, was supported by the combination of the substitution pattern on the phenyl ring (1,3,4-trisubstituted) observed in the ¹H NMR spectrum with the ${}^{2,3}J_{C,H}$ correlations from H-6', H-5', H-2' and OMe-4' to oxidized aromatic carbon C-4' ($\delta_{\rm C}$ 147.4) and from both H-5' and H-2' to other oxidized aromatic carbon C-3' ($\delta_{\rm C}$ 145.8). The configuration at C₂.C₃ was determined to be *trans* on the basis of the magnitude of ${}^{3}J_{\text{H2-H3}}$ = 12 Hz.³² Therefore, the structure of **1** was determined as (2R,3R)-5,3'-dihydroxy-4'methoxy-6'', 6''-dimethylpyrano[2'', 3'':7,6]dihydroflavonol, which we named urucuol A. Compound 2 was obtained as yellow amorphous powder. Its positive ESIMS fragmentation pattern is similar to that urucuol A (1), exhibiting ion peaks at m/z 421 [M+Na]⁺, 399 [M+H]⁺, 325 [M+Na-58 (C₃H₆O)-(CH₃)15]⁺, 284 [M+H-58 (C₃H₆O)-28(CO)-28(CO)-H⁺ and 236. The ion peaks at m/z 421 and 399 are 14 mass units more than the corresponding peaks to 1, suggesting one additional Me group. These data additionally with the ¹H and ¹³C NMR data have allowed us to consider a molecular formula of $C_{22}H_{22}O_7$ for 2. The ¹H NMR spectrum of 2, which was similar to that of 1, also exhibited four aromatic methine signals at $\delta_{\rm H}$ 7.14, 7.02, 6.91 and 6.21, as showed in Table 1, assignable to a 1,3,4-trisubstituted and a pentasubstituted aromatic rings, two *cis*coupled olefinic doublets at $\delta_{\rm H}$ 6.61 (H-4", J = 10.2 Hz) and 5.62 (H-3", J = 10.2 Hz) and

one six-proton singlet at $\delta_{\rm H}$ 1.44 (2Me-2") indicating the presence of a gem-

dimethylchromene ring, and still, instead one OMe singlet as in **1**, were observed two OMe signals at $\delta_{\rm H}$ 3.91 and 3.88, which showed correlations with the OMe signals at $\delta_{\rm C}$ 56.0 and 62.6, respectively, in the HETCOR spectrum. The last value is typical of a di-*ortho*-substituted OMe group³³ suggesting an OMe group located at C-5 and substitution at the 6-position. Thus, the *gem*-dimethylchromene moiety was placed at C-6/C-7, which was confirmed by HMBC correlations between H-8 and two oxidized aromatic carbons (C-7 and C-9) and two fully substituted aromatic carbons (C-6 and C-10), as well the correlations between both H-3" and H-4" and C-6. Analogous to compound **1**, **2** possess a 4'-OMe and 3'-OH substituted B-ring. This was confirmed by the ${}^{2.3}J_{\rm C,H}$ correlations from H-6' and H-2' to C-4' ($\delta_{\rm C}$ 147.2) and from H-5' and H-2' to C-3' ($\delta_{\rm C}$ 145.8). Moreover, the chemical shifts of the B-ring carbons in the 13 C NMR spectra of **1** and **2** are coincident (Table 2). The *trans* configuration at C₂-C₃ was deduced from the coupling constant between H-2 and H-3. On this basis **2** was unambiguously identified as (2*R*,3*R*)-3'- hydroxy-5,4'-dimethoxy-6",6"-dimethylpyrano[2",3":7,6]dihydroflavonol, namely urucuol B.

Compound **3** was also isolated as a yellow amorphous powder and showed spectral characters similar to urucuol A (**1**) and urucuol B (**2**). The ESI-MS in mode positive of **3** presented a fragmentation pattern analogous to both **1** and **2**, exhibiting a *quasi*-molecular ion at m/z 435 [M+Na]⁺ and a pseudo molecular ion at m/z 413 [M+H]⁺, which are 28 and 14 mass units bigger than the respective peaks of **1** and **2**, indicating two and one additional OMe groups from **1** and **2**, respectively, as well as the molecular formula $(C_{23}H_{24}O_7)$ for **3**. The ¹H NMR spectrum of **3** (Table 1) confirmed the presence of three methoxyl groups and in the same way that **1** and **2** ¹H NMR spectra, **3** revealed four aromatic protons, with three forming an AMX system and the other being a single A-ring

proton, together with signals corresponding to a 2,2-dimethylpyran ring. The chemical shifts values of the three OMe group signals observed in the ¹³C NMR spectrum of **3** (Table 2) at $\delta_{\rm C}$ 55.9, 55.8 and 62.6 (the last one requiring both *ortho* positions are substituted), associated with the ³J_{C,H} correlations from both H-4" and OMe-5 to C-5, as well as from both H-6' and OMe-4' to C-4', and from both H-5 and OMe-3' to C-3', established the three OMe groups must be assigned to C-5, C-3' and C-4'. Likewise to **1** and **2**, the configuration at C₂-C₃ of **3** was determined to be *trans* by the H2-H3 coupling constant. This allowed the identification of **3** as (2*R*,3*R*)-5,3',4'-trimethoxy-6",6"-dimethylpyrano[2",3":7,6]dihydroflavonol, named urucuol C.

Compound 4 was also isolated as a white amorphous powder and its molecular formula was considered to be $C_{22}H_{24}O_7$ based on its spectrometric data. Its positive ESIMS showed a quasi-molecular ion peak at m/z 423 [M+Na]⁺ and small peaks at m/z 401[M+H]⁺, 345 $[M+H-55(C_4H_7)]^+$, 325 $[M+H-32(CH_3OH)-42(C_3H_6)-H]^+$, 284 $[M+H-32(CH_3OH) 42(C_3H_6)-28(CO)-15(CH_3)$]⁺. The presence of a γ,γ -dimethylallyl group was evidenced by ¹H NMR signals at $\delta_{\rm H}$ 3.26 (*d*, *J* = 7.2 Hz, 2H-1"), 5.17 (*t*, *J* = 7.2 Hz, H-2"), 1.68 (*s*, 3H-4") and 1.77 (s, 3H-5").^{31,34} It was also observed an OH-5 quelated signal at $\delta_{\rm H}$ 11.23. The aromatic and the C-ring proton signals of 4 (Table 1), as well as B and C-ring carbon signals of 4 (Table 2) were very similar to those of 1. Thus, the difference between 1 and 4 is in the ring A. The γ,γ -dimethylallyl moiety and one OMe group were confirmed to be attached at C-6 and C-7 (A-ring), respectively, based on the long-range correlations from 2H-1", H-8 and OH-5 to C-6, and 2H-1" and OMe-7 to C-7. The other OMe and OH groups were also confirmed at 4' and 3' positions, respectively from the $^{2,3}J$ correlations from H-6' and OMe-4' to C-4', and from both H-2' and H-5' to C-3'. Equally to 1, 2 and 3, the configuration at C_2 - C_3 of **4** was decided to be *trans* by the H2-H3 coupling constant.

From these results, the structure of **4** was identified as (2R,3R)-5,3'-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)-7,4'-dimethoxy-dihydroflavonol, namely urucuol D.

Insert the tables 1 and 2

Free-radical (DPPH) scavenging activity

The radical scavenging activity of compounds **1-4** has been evaluated towards the stable free radical DPPH, which exhibits an absorption maximum at 517 nm, evidencing poor activities for compounds **1-4** compared with the positive control *trans*-resveratrol (Figure 2). Urucuol A (**1**) showed IC₅₀ 124.09 µg/mL, followed by urucuol D (**4**) (IC₅₀ 142.31 µg/mL), urucuol B (**2**) (IC₅₀ 154.62 µg/mL) and urucuol C (**3**) (IC₅₀ 405.86 µg/mL). These results showed that compounds **1-4** were 7-23 times less active than positive control *trans*-resveratrol (IC₅₀ value of 17.69 µg/mL).

The free radical scavenging activity of flavonoids and other phenols is mostly due to their aromatic hydroxyl groups, which afford greater stability to the phenolic radical as soon as it is formed, after one hydrogen radical donation to DPPH³⁵, so the dihydroxylated dihydroflavanols **1** and **4** were more effective in promoting DPPH reduction, compared with the monohydroxylated **2** and the not hydroxylated **3**, the less active.

Dihydroflavonols show a different behavior compared with flavones or flavonols. The methylation in hydroxyl group at the *para*-position decreased DPPH scavenging activity. Other studies show that a C_2 - C_3 double bond and the catechol absence decrease scavenging activity³⁶⁻³⁸. An additional methylation in *meta*-position decreased significantly DPPH scavenging capacity. Based on all information cited, it is possible to justify the lesser

antioxidant activity of the compounds tested compared to the resveratrol, whose structure presents trihydroxilation in *para-* and *meta-*positions and an all conjugated system.

Insert the Figure 2

Experimental

General

IR spectra were obtained in a BOMEM MB-102 spectrophotometer, using thin solid film method. UV spectra were obtained from LC equipped with DAD Prominence 20A Shimadzu. NMR spectra, including ¹H-¹H COSY, HETCOR, HMBC experiments, were recorded on a Varian Mercury-300 spectrometer, operating at 300 MHz at ¹H and 75 MHz at ¹³C, using d-chloroform as solvent and internal standard. Mass spectral analyses were performed at low resolution on a Quattro-LC instrument (Micromass, Manchester, UK) provided with an ESI ion source and a triple quadrupole mass analyzer. HPLC was carried out using a preparative LC-8A Shimadzu sysNem with SPD-10AV Shimadzu UV detector (Tokyo, Japan); the experimental conditions were a Phenomenex Gemini C18 column (250 x†10 mm, 5µ), an isocratic system of water/acetonitrile (4:60) and a flow rate of 4.7 mL *per* mim. Detection was performed at 270 and 320 nm. All solvents were filtered through a 0.45 µm membrane filter prior to analysis. Absorbance measurements were recorded on a Spectrum UV SP-220® spectrophotometer.

Plant material

Plant material

The leaves of *Derris urucu* were collected in forest reserve of EMBRAPA – Amazônia Oriental in Belém, Pará State, Brazil. A voucher specimen (IAN 179599) has been deposited at the herbarium of this institution.

Extraction and isolation

The dried and powdered leaves of *Derris urucu* (300 g) were extracted with ethanol at room temperature. The solvent was removed under vacuum furnishing a residue (50 g). The crude ethanol residue (30 g) was filtered on a silica gel column with gradient elution with hexane-ethyl acetate (9:1, 7:3, 5:5 and 0:10) and ethyl acetate-methanol (5:5 and 0:10), yielding, after removal of the organic solvent, six fractions named DU-1 (1,28g), DU-2 (2,37g), DU-3 (5,17g), DU-4 (5,36g), DU-5 (3,53g) and DU-6 (3,75g), respectively. The ¹H NMR and HPLC analysis of these fractions showed that the DU-4 was the most interesting that had the aromatic proton signals and a chromatogram with intense peaks, suggesting the presence of the aromatic compounds. Fraction DU-4 (1 g) was further refractioned by semi-preparative HPLC yielding four purified dihydroflavonols: **1** (20 mg), **2** (28 mg), **3** (80 mg) and **4** (20 mg).

DPPH assays

A methanolic solution (25 mg L^{-1}) of the radical DPPH[•] was prepared daily and protected from light. Absorbance was recorded to check the stability of the radical throughout the
time of analysis. The effect of phenolic compounds on the DPPH• absorbance was estimated by using the procedure described in literature.²⁰ Different sample concentrations dissolved in methanol were added to DPPH[•] methanolic solution. Absorbance at 517 nm was recorded at different time intervals until the reaction reached an equilibrium. The initial absorbance was close to 1.100-1.150 in all cases. The blank reference cuvette contained methanol. All measurements were performed in duplicate. Six different concentrations of each phenolic compound studied have been assayed in order to check the linearity of response and to establish the antioxidant activity values in the adequate linear range. All phenolic compounds were properly dissolved in methanol.

Data analysis

Reaction kinetics of phenols with DPPH[•] were registered for each antioxidant concentration tested. From these plots, the percentage of DPPH[•] remaining at the steady state (DPPH[•] rem) was determined as %DPPH[•] rem = $(A_f / A_0) \times 100$. A_0 and A_f correspond to the absorbances at 517 nm of the radical at the beginning and at steady state, respectively. Time at steady state was used in order to ensure that reaction did not progress further. Concentrations of the phenolic compounds in the reaction medium were plotted against the percentages of the remanent DPPH[•] at the end of the reaction in order to obtain the EC₅₀ index, defined as the amount of antioxidant needed to decrease the initial DPPH[•] concentration by 50%. Analysis of variance and linear correlations tests were performed using the BIOSTAT® version software package.

Urucuol A(1)

Pale yellow powder; IR (thin solid film) v_{max} cm⁻¹: 3345, 2974, 1633, 1514, 1434, 1282,

1129, 1016. UV λ_{max} (water/acetonitrile): 229, 272, 309 (*sh*) nm; ESIMS *m/z*: 407, 385 [M+H]⁺, 325 [M+Na-58 (C₃H₆O)-H]⁺, 284 [M+H-58(C₃H₆O)-28-15]⁺, 236; ¹H and ¹³C NMR spectral data: see Tables 1 and 2.

Urucuol B(2)

Yellow amorphous powder; IR (thin solid film) v_{max} cm⁻¹: 3397, 2933, 1597, 1511, 1445, 1266, 1127, 1028. UV λ_{max} (water/acetonitrile): 235, 261, 342 (*sh*) nm; ESIMS *m/z*: 421 [M+Na]⁺, 399 [M+H]⁺, 325 [M+Na-58 (C₃H₆O)-15(CH₃)]⁺, 284 [M+H-58 (C₃H₆O)-28(CO)-28(CO)-H]⁺, 236; ¹H and ¹³C NMR spectral data: see Tables 1 and 2.

Urucuol C(3)

Yellow amorphous powder; IR (thin solid film) v_{max} cm⁻¹: 3418, 2934, 1606, 1529, 1467, 1261, 1129, 1082, 1022; UV λ_{max} (water/acetonitrile): 235, 261, 342 (*sh*) nm; ESIMS *m/z*: 435 [M+Na]⁺, 413 [M+H]⁺, 325 [M+Na-58(C₃H₆O)-28(CO)-H]⁺, 284 [M+H-58 (C₃H₆O)-28(CO)-15(CH₃)-28(CO)]⁺, 236; ¹H and ¹³C NMR spectral data: see Tables 1 and 2.

Urucuol D(4)

White amorphous powder; IR (thin solid film) v_{max} cm⁻¹: 3458, 3206, 2934, 1632, 1574, 1434, 1248, 1129, 1095, 1016; UV λ_{max} (water/acetonitrile): 233, 291, 335 (*sh*) nm; ESIMS *m/z*: 423 [M+Na]⁺, 401[M+H]⁺, 345 [M+H-55(C₄H₇)]⁺, 325 [M+H-32(CH₃OH)-42(C₃H₆)-H]⁺, 284 [M+H-32(CH₃OH)-42(C₃H₆)-28(CO)-15(CH₃)]⁺, 236; ¹H and ¹³C NMR spectral data: see Tables 1 and 2.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for scholarship. We are also thankful to Dr. Norberto P. Lopes of Faculdade de Farmácia-USP-Ribeirão Preto for the ESIMS.

References

- Conceição, H. E. O.; Pinto, J. E. B. P.; Santiago, E. J. A.; Gonçalves, A. A. S.; *Ciênc. Agrotec.*,
 2002, 26, 472.
- 2. Da Costa, J. P.; Alves, S. M.; Belo, M.; Acta Amazon., 1999, 29, 563.
- Gusmão, S. D.; Páscoa, V.; Mathias, L.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; Lemos, F. J. A.; *Mems. Inst. Oswaldo Cruz*, 2002, 97, 371.
- Mors, W. B.; Do Nascimento, M. C.; Ribeiro do Valle, J.; Aragão, J. A.; *Ciênc. Cult.*, **1973**, 25, 647.
- 5. Fang, N.; Casida, J. E.; J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 2130.
- 6. Fang, N.; Casida, J. E.; J. Nat. Prod., 1999, 62, 205.
- Russo, A.; Acquaviva, R.; Campisi, A.; Sorrentini, V.; Di Giacomo, C.; *Cell Biol. Toxicol.*, 2000, *63*, 1035.
- 8. Hirono, I.; Biol. Pharm. Bull., 1987, 2, 120.
- 9. Alldrick, A.; Flynn, J.; Rowland, I.; Mutat. Res., 1986, 163, 225.
- Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M.; Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63, 896.
- 11. Sakihama, Y.; Cohen, M.; Grace, S.; Yamasaki, H.; Toxicology, 2002, 177, 67.

- Vaya, J.; Mahmood, S.; Goldblum, A.; Aviram, M.; Volkova, N.; Salan, A.; Musa, M.; Tamir,
 S.; *Phytochemistry*, **2003**, *62*, 89.
- 13. Pietta, P.; J. Nat. Products, 2000, 63, 1035.
- Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Sergent, O.; Pasdeloup, N.; Brissot, P.; Cillard, P.; *Biochem. Pharmacol.*, 1993, 45, 13.
- Teguo, P. W.; Fauconneau, B.; Deffieux, G.; Huguet, F.; Vercauteren, J.; Mérillon, J. M.; J. Nat. Prod., 1998, 61, 655.
- 16. Escobar, C. L. M.; Braga, A.; Tommasi, N. D.; J. Nat. Prod., 2003, 66, 1061.
- Nakamura, Y.; Watanabe, S.; Miyake, N.; Kohno, H.; Osawa, T.; J. Agric. Food Chem., 2003, 51, 3309.
- Robards, K.; Prenzlere, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W.; *Food Chem.*, **1999**, *66*, 401.
- 19. Galati, G.; Sabzevari, O.; Wilson, J. X.; O'Brien, P. J.; Toxicology, 2002, 177, 91.
- 20. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; LMT- Food Sci. Technol., 1995, 28, 25.
- 21. Arnous, A.; Makris, D. P.; Kefalas, P.; J. Agric. Food Chem., 2001, 49, 5736.
- 22. Da Porto, C.; Calligaris, S.; Celotti, E.; Nicoli, M. C.; J. Agric. Food Chem., 2000, 48, 4241.
- Gorinstein, S.; Martin-Belloso, O.; Katrich, E.; Lojak, A.; Ciz, M.; Gligelmo-Miguel, N.;
 Haruenkit, R.; Park, Y.-S.; Jung, S.-T.; Trakhtenberg, S.; *J. Nutr. Biochem.*, 2003, 14, 154.
- 24. Heinonen, I. M.; Lehtonen, P. J.; Hopia, A. I.; J. Agric. Food Chem., 1998, 46, 25.
- 25. Llorach, R.; Espín, J. C.; Tom´as-Barberán, F.A.; Ferreres, F.; *J. Agric. Food Chem.*, 2003, *51*, 2181.
- 26. S´anchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, M. P.; *J. Sci. Food Agric.*, 2003, 83, 430.
- 27. Gil, M. I.; Tom´as-Barber´an, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M.; Kader, A. A.; J. Agric. Food Chem., 2000, 48, 4581.
- 28. Lu, Y.; Foo, L.Y.; Food Chem., 2000, 68, 81.
- 29. Goupy, P.; Dufour, C.; Loonis, M., Dangles, O.; J. Agric. Food Chem., 2003, 51, 615.

- Mabry, T.; Markham, K. R.; Thomas, M. B.; *The Systematic Identification of flavonoids*; Springer-Verlag; New York, 1970, p. 166.
- 31. Rao, K. V.; GunaseKar, D.; Phytochemistry, 1998, 48, 1453.
- Mbwambo, Z. H.; Kapingu, M. C.; Moshi, M. J.; Machumi, F.; Apers, S; Cors, P.; Ferreira, D.; Marais, J. P. J.; Vanden Berghe, D.; Maes, L.; Vlietinck, A.; Pieters, L.; *J. Nat. Prod.*, 2006, 69, 369.
- 33. Agrawal, P. K.; Rastogi, R. P.; Heterocycles, 1981, 16, 2181.
- 34. Carvalho, M. G.; Suzart, L. R.; Cavatti, L. C.; Kaplan, M. A.; J. Braz. Chem. Soc., 2008, 19, 1423.
- Ribeiro, A. B.; Bolazani, V. S., Yoshida, M.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Silva, D.H.S.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2005**, *16*, 526.
- 36. Trouillas, P.; Marsal, P; Siri, D.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.-L.; Food Chem., 2006, 97, 679.
- 37. Van Acker, S. A. B. E.; Van Den Berg, D.-J.; Tromp, M. N. J. L.; Griffioen, D. H.; Van Bennekom, W. P.; Van Der Vijgh, W. J. F.; Bast. A.; *Free Rad. Biol. & Med.*, **1996**, *20*, 331.
- 38. Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M.; J. Agric. Food Chem., 2006, 54, 3078.

	1	2	3	4 δ _H	
Н	$\delta_{\! m H}$	$\delta_{ m H}$	$\delta_{\! m H}$		
2	4.96 (<i>d</i> , 12.0)	4.93 (<i>d</i> , 12.0) ^b	4.97 (<i>d</i> , 12.0)	4.97 (<i>d</i> , 12.0)	
3	4.51 (<i>d</i> , 12.0)	4.42 (<i>d</i> , 12.0)	4.46 (<i>d</i> , 12.0)	4.53 (d, 12.0)	
8	5.96 (s)	6.21 (<i>s</i>)	6.23 (s)	6.08 (s)	
2′	7.14 (<i>d</i> , 1.8)	7.14 (<i>d</i> , 2.1)	7.07 (<i>d</i> , 2.4)	7.15 (<i>d</i> , 1.8)	
5'	6.91 (<i>d</i> , 8.1)	6.90 (<i>d</i> , 8.1)	6.93 (<i>d</i> , 8.7)	6.91 (<i>d</i> , 8.1)	
6'	7.02 (<i>dd</i> , 8.1 and 1.8)	7.02 (<i>dd</i> , 8.1 and 2.1)	7.09 (<i>dd</i> , 8.7 and 2.4)	7.03 (<i>dd</i> , 8.1 and 1.8)	
1″				3.6 (<i>d</i> , 7.2)	
2‴				5.17 (<i>t</i> , 7.2)	
3″	5.52 (<i>d</i> , 10.2)	5.62 (<i>d</i> , 10.2)	5.62 (<i>d</i> , 10.0)		
4‴	6.62 (<i>d</i> , 10.2)	6.61 (<i>d</i> , 10.2)	6.61 1H, (<i>d</i> , 10.0)	1.68 (s)	
5″				1.77 (s)	
2Me-2"	1.44 (s)	1.44 (s)	1.44 (s)		
OMe-5			3.89 (s)		
OMe-6		3.88 (s)			
OMe-7		3.90 (s)		3.83 (s)	
OMe-3'			3.90 (s)		
OMe-4'	3.92 (s)		3.92 (s)	3.91(<i>s</i>)	
OH-3		11.40 (s)			
OH-5	11.45 (s)			11.23 (s)	
OH-3'	5.73 (br s)				

Table 1. ¹H NMR Chemical Shifts ($\delta_{\rm H}$ in ppm) and Coupling Constants (*J* in Hz) of Compounds 1-4 in CDCl₃^a.

^{a 1}H NMR data were recorded at 300 MHz. ^bMultiplicity and coupling constant (J = Hz) are in parenthesis.

		1		2		3		4
С	$\delta_{ m C}$	HMBC ^a	$\delta_{ m C}$	HMBC ^a	$\delta_{ m C}$	HMBC ^a	$\delta_{ m C}$	HMBC ^a
2	83.1	3, 2', 6'	82.9	3, 2', 6'	83.0	3, 2'	83.5	3, 2', 6'
3	72.3		72.9		72.9	2	72.5	
4	195.9		190,8	2	190.7	2	196.1	2
5	157.7		156.8	OMe-5	156.8	4", OMe-5	159.8	OH-5
6	103.2	8, 3", OH-5	110.8	8, 3″, 4″	110.1	8, 3″	110.7	8, 1″
7	162.3 ^b	8	161.3 ^b	8	161.3 ^b	8,4″	166.5	OMe-7
8	96.7		101.1		101.1		91.7	
9	162.9 ^b	8	163.7 ^b	8	163.6 ^b	8	161.7	8
10	100.4	8, OH-5	106.3	8	106.3	8	100.7	8, OH-5
1′	129.1	2, 5'	129.5	2, 3, 5'	128.7	2, 3, 5'	129.5	2, 3, 5'
2′	113.5	2, 6'	113.6	2, 6'	110.2	6′	113.7	2, 6'
3′	145.8	2', 5'	145.8	2′, 5′	149.1	5', OMe-3'	146.1	2', 5'
4′	147.3	2', 5',6', OMe-4'	147.2	2′, 6′	149.7	2', 6', OMe-4'	147.6	2', 6', OMe-4'
5′	110.5		110.5		111.0		110.8	
6′	119.7	2, 2'	119.7	2	120.3	2, 2'	119.9	2, 2'
1″							21.2	
2‴	78.6	3", 4", 2Me-2"	78.1	3″	78.1	3", 4", 2Me-2"	122.2	1″, 4″
3‴	126.6	2Me-2"	129.0		129.0	2Me-2"	132.1	1", 4", 5"
4‴	114.9		115.6		115.6		26.1	5″
5″							17.9	4‴
2Me-2"	28.4	Me-2"	28.4		28.3	Me-2"		
OMe-5			62.6		62.6			
OMe-7							56.3	
OMe-3'					55.8			
OMe-4'	55.9		55.9		55.9		56.2	

Table 2. ¹³C NMR Chemical Shifts ($\delta_{\rm C}$ in ppm) of Compounds 1-4 in CDCl₃^a.

^{a 13}C NMR data were recorded at 75 MHz. ^bThe values can be exchanged. ^{c 1}H-¹³C HMBC correlations are from the carbon(s) specified to the protons indicated.



Figure 1. Structures of the new dihydroflavonols isolated from leaves of the *Derris urucu*: urucuol A (1), urucuol B (2), urucuol C (3) and urucuol D (4).



Figure 2. Dose-response curve for radical scavenging activity of the dihydroflavonols **1-4** isolated from leaves of the *Derris urucu* by DPPH method at different concentrations. *Trans*-resveratol (RESV) was used as reference compound.

Table 1. ¹H NMR Chemical Shifts ($\delta_{\rm H}$ in ppm) and Coupling Constants (*J* in Hz) of Compounds 1-4 in CDCl₃^a.

Table 2. ¹³C NMR Chemical Shifts ($\delta_{\rm C}$ in ppm) of Compounds 1-4 in CDCl₃^a.

Figure 1. Structures of the new dihydroflavonols isolated from leaves of the *Derris urucu*: urucuol A (1), urucuol B (2), urucuol C (3) and urucuol D (4).

Figure 2. Dose-response curve for radical scavenging activity of the dihydroflavonols **1-4** isolated from leaves of the *Derris urucu* by DPPH method at different concentrations. *Trans*-resveratol (RESV) was used as reference compound.

Capítulo I

Introdução



1- INTRODUÇÃO.

O aumento contínuo da população mundial e o impacto da globalização da economia promoveram aumento de produção de alimentos, cada vez mais eficientes e competitivos. Satisfazer essas demandas depende do desenvolvimento da agricultura com base na geração de tecnologia que promova aumentos da produtividade das culturas.

Nesse propósito, desde da década de 60, com a chamada Revolução Verde, os sistemas de produção agrícola caracterizam-se pelas monoculturas extensivas, e ocorreu um aumento no uso de fertilizantes químicos sintéticos e de agrotóxicos.

Apesar da utilização dos inseticidas sintéticos ter contribuído para incremento significativo na produção de alimentos (FLINT & VAN DEN BOSCH, 1981 apud MENEZES, 2005), a falta de conhecimento ou acompanhamento técnico sobre o seu manuseio adequado, com conseqüente aumento no número de pulverizações, doses acima das recomendadas e não obedecendo ao período de carência, tem contribuído para proporcionar efeitos maléficos sobre o ambiente e ao próprio homem, tais como: ressurgimento das pragas-alvo; surgimento de pragas secundárias, em função dos efeitos tóxicos sobre os inimigos naturais dessas pragas; desenvolvimento de resistências das pragas a esses produtos; intoxicação dos produtores rurais; contaminação de água e do solo e presença de resíduos tóxicos nos alimentos (VAN DEN BOSCH, 1978; FLINT & VAN DEN BOSCH, 1981 apud MENEZES, 2005).

Na primeira metade do século 20, o Brasil foi um grande produtor e exportador de inseticidas botânicos, especialmente aqueles a base de rotenona e a nicotina. Os gêneros: *Tephrosia, Derris* e *Lonchocarpus*, dentre outros, apresentam inúmeras espécies vegetais que possuem importantes efeitos inseticidas, sendo amplamente utilizadas *in natura* no combate a inúmeras pragas de lavouras e de ectoparasitas de animais (BARROZO, 1978).

Um exemplo disso é o "timbó", usado por indígenas da América do Sul, particularmente da Amazônia, que utilizam aquela espécie em suas pescas (CORBETT, 1940). Essas plantas são cipós trepadores que atingem a copa das árvores. A denominação "timbó" é mais generalizada para as espécies *Derris urucu* e *Derris nicou*, que segundo Lima (1987), são as espécies que produzem, nas raízes, a substância rotenona. Já antes de 1939, a rotenona era utilizada como inseticida (COSTA *et al.*, 1999), propriedade esta, que é responsável pelo valor econômico dessas espécies.

As exportações de raízes de timbó, do Estado do Pará para os Estados Unidos, iniciaram-se em 1933 e até o final da década de 1960, o Pará foi o maior produtor do Brasil. O

produto exportável era o pó das raízes e havia vários moinhos em operação em Manaus (AM) e Belém (PA), o que ocasionou a exploração sem controle da espécie (PIRES, 1978). No entanto, Lima (1947), já anunciava a decadência da indústria do timbó. É interessante mencionar que esta queda não decorria, ainda, do avanço do inseticida sintético DDT, mas da extração predatória das raízes do timbó, daí a recomendação pelo seu plantio racional. Porém, nas décadas seguintes (1950 e 1960) ocorreu a perda de importância do timbó face à entrada dos inseticidas sintéticos. Isto ocasionou o declínio do extrativismo do timbó e o desinteresse pelo seu plantio racional.

Nos dias de hoje, principalmente em função do desenvolvimento da agricultura orgânica, há uma retomada da importância do timbó e de outras plantas que apresentam caráter inseticida. Dessa forma, nichos de mercado estão surgindo, como na piscicultura e na agricultura orgânica, com a importação desse produto do Peru, África e Ásia.

Derris urucu, conhecida popularmente como "timbó" ou "timbó vermelho" pertencente à família Leguminosae/Fabaceae e subfamília Papilionoideae ou Faboideae. Para esta subfamília estão descritos aproximadamente 482 gêneros e cerca de doze mil espécies de ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais (BARROZO, 1978).

Um dado importante a ser ressaltado é que as folhas de *D. urucu* não são utilizadas comercialmente, mesmo porque não há estudos químicos com esta parte da planta, a qual é tratada como resíduo da obtenção do pó das raízes. Porém, este quadro pode ser modificado, com a valorização das folhas do timbó.

Em estudo preliminar foi testado o extrato etanólico das folhas de *Derris urucu* para avaliação de seu potencial como espécie alelopática, utilizando-se como parâmetros de avaliação a inibição da germinação de sementes e do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo de plantas invasoras de pastagens. Os níveis de inibição observados, em torno de 50% (SANTOS, *et al.*, 2007), foram bastante expressivos o que despertou o interesse, neste trabalho, pela busca das substâncias responsáveis pela atividade alelopática exibida pelas folhas de *D. urucu*.

De modo geral, os polifenóis e em particular os flavonóides possuem estrutura ideal para o seqüestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A atividade de seqüestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonóides e das espécies a serem seqüestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonóide, maior é sua atividade como seqüestrador de radicais livres (BARREIROS & DAVID, 2006). Dentre os aproximados 4000 flavonóides já descritos, as classes mais representativas são: flavonóis, catequinas ou flavonas, antocianidinas e isoflavonas (CERQUEIRA, *et al.*, 2007).

Em levantamento bibliográfico realizado com espécies do gênero *Derris*, foram encontrados relatos de diversas classes de substâncias, tais como os triterpenos, os esteróides, os estilbenos, as 3-aril-cumarinas, porém, principalmente, os rotenóides, as isoflavonas, as flavonas, as flavanonas, os flavonóis e as auronas. Assim, com a expectativa de serem encontradas nas folhas de *D. urucu*, substâncias pertencentes à classe dos flavonóides, os quais são potencialmente antioxidantes, objetivou-se, neste trabalho, também a avaliação da atividade antioxidante das substâncias isoladas de folhas de *D. urucu*, através da medição do poder de seqüestrar os radicais livres DPPH.

1.1- OBJETIVOS.

* GERAL.

✓ O estudo químico de folhas de *Derris urucu* na busca de substâncias com propriedades biológicas úteis, de maneira a tornar as folhas dessa espécie tão valiosas quanto suas raízes, despertando interesses para o desenvolvimento de produto comercial a partir das folhas.

* ESPECÍFICOS.

✓ O estudo químico do extrato etanólico das folhas de *D.urucu*, com objetivo de isolar e identificar os principais constituintes químicos, utilizando técnicas cromatográficas clássicas e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);

✓ A identificação das estruturas das substâncias isoladas utilizando-se técnicas espectrométricas de RMN (uni e bidimensionais) e de massas;

 \checkmark A avaliação da atividade alelopática das substâncias, bem como, das misturas isoladas das folhas de *D. urucu*, contra diferentes espécies invasoras de pastagens, avaliando-se a germinação de sementes e o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo das plantas daninhas;

✓ A avaliação da atividade antioxidante do extrato, bem como, das substâncias isoladas das folhas de *D. urucu* frente ao radical DPPH.

1.2- A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DAS PLANTAS.

A biodiversidade vegetal Amazônica constitui grande riqueza, em potencial, para as mais variadas atividades humanas. Várias espécies estão desaparecendo do planeta num ritmo sem precedentes, principalmente devido aos desmatamentos intencionais para a agricultura extensiva, extração de madeira, criação de gado em áreas que antes eram constituídas por vegetação nativa, além do constante aumento do nível de poluição das águas, solos e ar. Com a redução progressiva de grande parte desta biodiversidade, ocorrerá também enorme perda científica e econômica, principalmente para os países menos desenvolvidos que são os detentores da maior parte das reservas vegetais do mundo (BARATA, 2000).

A etnobotânica é citada na literatura como sendo um dos caminhos alternativos, que mais evoluiu, nos últimos anos, para a descoberta de produtos naturais bioativos (BRUHN, 1989 & KING, 1994). Esta área de pesquisa enfoca dois fatores fundamentais: coleta e utilização medicinal da planta. O primeiro fator implica na região, época e estágio de desenvolvimento preferidos para coleta, envolve também, procedimentos especiais como preparação de exsicatas.

Várias abordagens para a seleção de espécies vegetais estão na literatura (BRUHNS, 1994), dentre elas, três tipos são alvo de maiores investigações: a) abordagem randômica - escolha da planta sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta; b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética – seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família; c) abordagem etnofarmacológica - seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico. De acordo com a abordagem randômica 10000 diferentes tipos de plantas simbolizam 50000 - 100000 possibilidades estruturais de produtos naturais (CORDELL, 1995 & MALONE, 1983).

É importante ter em vista se a espécie vegetal, a ser estudada, é encontrada em regiões diferentes no país; se assim for torna-se importante avaliar as modificações químicas que possam ocorrer em decorrência de fatores ambientais variáveis, tais como: fertilidade do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura, herbivoria, poluição atmosférica e poluição do solo. Outros fatores como idade da planta e época de coleta, também poderão causar modificações nos teores dos constituintes químicos de espécies vegetais. Se a espécie vegetal medicinal estudada sofreu apenas investigação fitoquímica, deixando de lado a abordagem farmacológica, são válidos estudos que interliguem áreas multidiciplinares como etnobotânica, química e farmacologia, buscando resultados que possam validar ou não o uso

da planta como medicinal. Em quaisquer circunstâncias, a pesquisa bibliográfica da planta alvo deve ser realizada obedecendo-se os seguintes fatores: gênero, família e classes de substâncias predominantes.

Para o uso de princípios ativos botânicos, vários aspectos devem ser levados em consideração: extração, conservação dos extratos, dosagem eficaz, estabilidade, toxicidade e custo. Todos estes aspectos são compreendidos quando identificadas as principais substâncias contidas no extrato. Inicia-se com os extratos brutos de plantas preparados com diversos solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, etanol e água). Em seguida os extratos são fracionados via métodos cromatográficos usuais e as frações obtidas são retestadas, repetindo-se o processo até a obtenção do(s) princípio(s) ativo(s) (BEGNINI, 2001, LOBO, 2008).

A realização dos testes laboratoriais são essenciais no início da investigação, no sentido de estimar a possibilidade de uso de determinado fitoterápico. Deve-se levar em consideração também, o efeito sinérgico observado na constituição de alguns extratos vegetais, onde a atividade avaliada é provocada por vários constituintes do extrato e a união dos mesmos potencializa seu efeito, bem como, fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e pluviosidade, além de fatores inerentes ao hospedeiro, como o comportamento, irão influenciar diretamente nos resultados, provocando uma série de testes para se chegar ao ajuste final da fórmula (CHAGAS, 2004).

1.3- OS METABOLITOS SECUNDÁRIOS

Segundo Balandrin *et al.* (1985), muitas plantas acumulam substâncias orgânicas que podem ser extraídas em quantidade suficiente para serem economicamente utilizadas para as mais variadas aplicações científicas, tecnológicas e comerciais. As substâncias químicas extraídas das plantas são normalmente classificadas em metabólitos primários e secundários.

Os metabólitos secundários são compostos derivados biossinteticamente dos metabólitos primários, mas têm distribuição limitada a determinados grupos taxonômicos do Reino Vegetal. Eles não têm uma função aparente no metabolismo primário das plantas, mas freqüentemente têm um papel ecológico: atrativos para polinizadores, representam adaptações químicas à pressão ambiental ou servem como defensores químicos contra microorganismos, insetos e predadores superiores e até mesmo contra outras plantas (aleloquímicos). Os metabólitos secundários são freqüentemente armazenados pelas plantas em quantidades menores, além de tenderem a ser sintetizados em células especializadas e em estágios de

desenvolvimento distintos, e isto muitas vezes dificulta sua extração e purificação. Assim, muitos metabólitos secundários podem ser considerados como materiais especiais ou químicos refinados e são mais valorizados no mercado. Eles são usados comercialmente como compostos ativos biologicamente ou insumos farmacêuticos, conferindo sabor ou aroma.

Os produtos naturais secundários freqüentemente têm estruturas altamente complexas, que determinam sua atividade biológica e muitas vezes, não podem ser economicamente sintetizados. Um bom exemplo desta situação é a azadirachtina extraída da planta conhecida como Neem (Meliaceae), que possui estrutura bastante complexa e é utilizada como inseticida. Uma vantagem econômica, é que tanto os metabólitos primários quanto os secundários, podem ser obtidos através de processos relativamente simples, como a destilação a vapor ou por extração com solventes aquosos ou orgânicos (BALANDRIN *et al.*, 1985).

As substâncias que derivam do metabolismo têm sido amplamente discutidas quanto às seguintes funções: ecológicas (SEIGLER, 1977); alelopáticas (WHITTAKER & FEENY, 1971; HALLIGAN, 1975; FEENY, 1977; RICE, 1977); de atração de polinizadores (WILLIAMS, 1983); de defesa contra herbívoros (SMITH, 1965, 1966; REHR *et al.*, 1973; CATES, 1975; LANGENHEIM *et al.*, 1977, 1980); patógenas (LEVIN, 1976; FEENY, 1977; ARRHENIUS & LANGENHEIM, 1983), e algumas como reguladoras do desenvolvimento de plantas superiores (GROSS, 1975).

1.4- DERRIS URUCU: FAMÍLIA, GÊNERO E ESPÉCIES RELACIONADAS.

1.4.1- Família Leguminosae (Fabaceae).

A família Leguminosae, uma das maiores dentre as dicotiledôneas, compreende de 600 a 650 gêneros que reúnem 13000 a 18000 espécies espalhadas em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que 28 espécies se encontram na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção (MENDONÇA & LINS, 2000).

Esta família possui grande importância econômica, o que a torna uma família muito conhecida. Numerosas espécies são utilizadas como alimentos, forragem, corantes, algumas também são utilizadas na extração de madeira, gomas, resinas, óleos, como plantas medicinais e ainda como ornamentais. Podemos citar dentre os gêneros mais conhecidos: *Phaseolus* (feijão), *Glycine* (soja), *Arachis* (amendoim), *Pisum* (ervilhas e fava), *Cassia e Bauhinia* (ornamentais), dentre outros (LAWRENCE, 1977 E JOLY, 1966).

A família Leguminosae é considerada uma das três maiores famílias de Angiospermae, compreende três subfamílias, muitas vezes tratadas individualmente como famílias botânicas distintas, dependendo do arranjo sistemático adotado. De acordo com o arranjo de Kubitzki a partir do sistema de Cronquist (MABBERLEY, 1997), tem-se a divisão nas seguintes subfamílias:

• Caesalpinioideae (Leguminosae I) ou subfamília Caesalpiniaceae;

• Mimosoideae (Leguminosae II) ou subfamília Mimosaceae; e

• Papilionoideae (Leguminosae III) ou subfamília Fabaceae.

No Brasil são encontrados cerca de 190 gêneros nativos e 2100 espécies (LIMA, 2000).

Dentre os maiores gêneros da subfamília Caesalpinioideae destacam-se: *Bauhinia* L., *Chamaecrista* Moench. e *Senna* Mill., com cerca de 250 espécies cada, seguidos por *Caesalpinia* e *Swartzia*, com 125 espécies aproximadamente (CRONSQUIST, 1981).

Atualmente, a subfamília Papilionoideae ou Fabaceae ocupa a posição de segunda mais importante dentre as angiospermas, em importância econômica, destacando-se na alimentação humana (feijão e soja), espécies forrageiras (alfafa) e ornamentais (sibipiruna). Para a família Fabaceae estão descritos aproximadamente 482 gêneros e cerca de doze mil espécies de ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais, onde se encontram plantas (BARROZO, 1978). Considerações botânicas e fitoquímicas sobre a família Leguminosae foram revisadas e os dados demonstram que esta família é particularmente rica em flavonóides e compostos biogeneticamente relacionados como rotenóides e isoflavonóides, sendo que 95% dos isoflavonóides já identificados foram isolados de plantas desta família. Alcalóides, terpenóides e esteróides são exemplos de outras classes de metabólitos secundários presentes em muitos representantes da família. Os taninos, todavia, têm freqüência muito baixa se comparada aos flavonóides, tendo sido relatadas apenas três ocorrências em Caesalpinioideae (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

Do ponto de vista farmacológico, muitas plantas da família Leguminosae são utilizadas popularmente como antidiarréicas, laxativas e no tratamento de ferimentos, tendo sido comprovado em extratos brutos, diversas atividades entre as quais anti-úlcera, hipoglicemiante e antimicrobiana (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

O papel importante das leguminosas na composição das matas amazônicas já foi apreciado por HUBER. Cabe-lhes aí o primeiro lugar entre os vegetais lenhosos, quer pelo número de indivíduos quer pelo de espécies e gêneros botânicos: a elas pertencem a maioria das árvores gigantes e um grande número de árvores de notável beleza.

A distribuição das leguminosas dentro da Amazônia não é uniforme, sendo a parte mais rica uma faixa que atravessa o centro da região de Noroeste a Sudeste. Suas características botânicas compreendem plantas com os mais diversos hábitos, de minúsculas ervas a portentosas árvores (podendo alcançar até 60m), ou cipós enormes. Folhas geralmente simples por supressão. Inflorescências paniculiformes, racemosas ou glomeruladas, raro outros tipos, com flores diclomídeas a maioria zigmorfas, actinomorfas apenas nas Mimosoidae; cálice ganossépalo pentapartido, corola com 5 pétalas geralmente desiguais ou reduzidas a uma, livres sendo que geralmente duas são coalescentes na base (VAN DEN BERG, 1982).

1.4.2- Gênero Derris.

O gênero *Derris*, pertencente à subfamília Papilionoideae, é nativo dos trópicos, encontrado na Malásia, nas Índias Orientais Holandesas e nas Ilhas Filipinas, sendo considerado mais abundante no velho continente que na América Tropical. Suas espécies apresentam-se como trepadeiras (MCINDOO, 1919).

O principio ativo do timbó, a rotenona, encontrado na raízes, é especialmente eficaz no controle dos besouros e lagartas mastigadoras de folhas. A rotenona pode ser mais ou menos ativa, de acordo com a espécie de inseto, e sua ação pode demorar um pouco até se manifestar (SAITO & LUCHINI, 1998).

Timbó é o nome pelo qual são conhecidas, na Amazônia, inúmeras plantas de cultura pré-colombiana, sendo aquelas espécies que mesmo antes do descobrimento da América por Cristóvão Colombo, já eram cultivadas ou apenas exploradas pelos nativos. Há referências sobre o uso de plantas ictiotóxicas e inseticidas desde os tempos de Anchieta, Piso, Castelnau, Wallace, Spruce e Martius (PIRES, 1978).



FIGURA 1- Timbó sendo utilizado na pescaria por nativos. Fonte: Alécio, M. R. (2006).

Os timbós verdadeiros, plantas pertencentes ao gênero *Derris*, são os mais eficazes dentre um conjunto muito vasto de vegetais ictiotóxicos (PIRES 1973, ARAGÃO & VALE 1973). Três espécies do gênero *Derris (urucu, nicou e elíptica)* biosintetizam, pela via do metabolismo secundário, os compostos flavonoídicos rotenóides representados pela rotenona, toxiferol, deguelina e tefrosina (MORS 1973). A rotenona é o mais estudado destes princípios e o mais potente deles, causando a morte dos peixes, fundamentalmente, através da inibição da cadeia respiratória mitocondrial, revelando-se os peixes altamente susceptíveis. É interessante assinalar o fato dos peixes envenenados pelos princípios ativos das plantas citadas se prestarem ao consumo, sem que sua carne ofereça risco algum de intoxicação

alimentar ao consumidor (Figura 1, pág 32). Essa peculiaridade, mais o fato desses vegetais possuírem atividade praguicida, permitiram seu uso na agricultura e na pecuária (COSTA *et al.* 1989, JOHNSON *et al.* 1990, ROSSI *et al.* 1988). Possuem também emprego como agentes químicos controladores de organismos indesejáveis para a aquicultura, uso esse que está sendo difundido por vários países (HOWARD 1988, SCARNECCHIA 1988, REINERTAEN *et al.* 1987, MATLOCK *et al.* 1982, NEGHERBON, 1959).

Há muitas espécies de timbós, mas as de uso mais generalizado na Amazônia são o timbó-vermelho, *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbride, e o timbó branco, *Derris nicou* (Killip et Smith) Macbride. O primeiro apresenta produção de até quatro vezes mais raízes e melhor proteção ao solo com relação ao segundo (LIMA, 1987).

1.4.3- Espécies do Gênero Derris Estudadas Biológica e Quimicamente.

Muitas espécies deste gênero já foram estudadas fitoquimicamente, com vários destes estudos monitorados por bioensaios, utilizando os extratos brutos das folhas, raízes, galhos e com substâncias isoladas, como o objetivo de encontrar espécies que possam apresentar propriedades biológicas úteis. Dentre as espécies estudadas, 22 são relatadas neste trabalho e estão listadas a seguir:

Derris amazonica

Estudos com extrato aquoso das raízes desta espécie apresentaram efeito inseticida frente ao vetor da *leishimania*, *Lutzomyia longipalpis* (ALÉCIO, 2007).

Derris alborubra, D. marginata e D. glauca

Estas espécies foram estudadas buscando-se conhecer a variação de rotenona nos vários estágios de desenvolvimento da planta, bem como nas diferentes áreas de plantação das espécies, tendo sido encontrado que, de um modo geral, a proporção de rotenona nas raízes é maior do que nas demais partes, apresentando um rendimento de 3,13% de rotenona (ZHANG *et. al.*, 2006).

Derris atropurpureus

Estudo realizado com o extrato metanólico das raízes de *Derris atropurpureus*, levaram ao isolamento das flavanonas 5,2'-dihidróxi-3-metóxi-6,7-(2",2"-dimetilcromeno)-8-

(3^{**},3^{**}-dimetilalil)-flavanona e minimiforina (**1** e **2**) e três diidroflavonóides 2',3,5-triidróxi-6,7-(2^{*},2^{**}-dimetilcromeno)-8-(3^{**},3^{**}-dimetilalil)-flavanona, mundulina e mundulinol (**3** a **5**) (MAGALHÃES *et al.*, 1999).



Derris brevipes

Muitos estudos estão sendo realizados no sentido de se desenvolver um medicamento natural contraceptivo, testes realizados com o extrato etanólico das raízes de *Derris brevipes*, mostraram resultados significativos no controle de gestação realizado em linhagens de ratos (SHRISHAILAPPA *et al.*, 2003).

Derris cavaleriei

O extrato metanólico das raízes apresentou atividade inseticida e de deterrência alimentar frente às larvas de *Myzus persicae*, *Pieris rapae* (*L*.), *Aedes albopictus*, *Ostrinia furnacalis*, *Phyllotreta striolata* (Fabricius), *Aphis gossypii* Golver e *Herse convolvuli* (*L*.) e as substâncias rotenona (6), deguelina (7), tefrosina (8), isoloncarpina (9) e pongaflavona (10) foram os mais ativos com atividade inseticida. (Li & Xu, 2007).



Derris elliptica

Estudos realizados com extratos aquosos das raízes de *Derris elliptica* levaram ao isolamento dos rotenóides **6-8** além de outro rotenóide conhecido como ellitptnol (**11**) (AHMED *et al.*, 1989). Outros estudos com os rotenóides relatam ensaios de atividade larvicida (AMEEN *et al.*, 1983) e atividade moluscida (MAINI *et al.*, 1993).



Derris eriocarpa

O estudo fitoquímico das raízes levou ao isolamento de triterpenos do tipo oleano (**12**, **13**) e o triterpeno eriocarpino (**14**). (ZHANG *et. al.*, 2002).



Derris glabrescens

O estudo fitoquímico das sementes levou ao isolamento das isoflavonas glabresciona A e B (**15 e 16**) e duas 3-aril-cumarinas (**17 e 18**) (DELLE *et al.*, 1977).





Derris heyneana

O estudo fitoquímico das folhas desta espécie levou ao isolamento de prenilflavonóides. (GANAPATY et. al., 2006).

Derris indica

A espécie *Derris indica* são usadas na medicina popular no tratamento de bronquite, tosse convulsa, doenças reumáticas e nas articulações. Do extrato etanólico das raízes foram isolados dez flavonóides (**19** a **28**), o rotenóide (**29**) e o isoflavonóide (**30**) e submetidos a ensaios de atividade antimicrobiana e antifúngica (MATHUR *et al.*, 2007). Do extrato clorofórmico das folhas foi realizado bioensaio de atividade antiflamatória edema de pata de rato (NERKAR *et al.*, 2006). Os extratos hexânico e diclorometânico das cascas e raízes apresentaram moderada atividade antibacteriana à bactéria *Mycobacterium tuberculose* (SORWAPORN *et al.*, 2006).























Derris laxiflora

Poucos estudos foram realizados com a espécie *Derris laxiflora*. O estudo fitoquímico realizado com as folhas, deu origem a substâncias pertencentes à classe das flavanonas (**31** a **35**) (KIM *et al.*, 1995), enquanto que o estudo com as raízes originou uma chalcona (**36**) (LIN *et a.l*, 1993).

30





Derris malaccensis

A espécie *Derris malaccensis* é muito utilizado na medicina popular. Estudo fitoquímico das raízes levou ao isolamento de isoflavanona (**37**) (NAKAYAMA *et al.*, 1971) e chalcona (**38**), as quais foram submetidas a estudo cristalográfico (SIRIPAISARNPIPAT *et al.*, 2007). Do extrato metanólico das raízes, isolou-se a derrisina (**39**) e outro rotenóide (**40**), que apresentou atividade frente à bactéria *Helicobacter pylore* (TAKASHIMA *et al.*, 2002) e do caule isolou-se um novo rotenóide (**41**) (THASANA *et al.*, 2001).





Derris negrensis

Esta espécie é nativa da Amazônia, conhecida também como timbó, e estudo químico das raízes mostrou que a concentração de rotenona é cerca de 28%, sendo também encontrada nas raízes a desidrorotenona (**42**) (VASCONCELOS & MAIA, 1976).



Derris oblonga

O estudo fitoquímico das raízes levou ao isolamento de dois novos isoflavonóides oblongina (43) e oblonginol (44), além de dois rotenóides (45 e 46) (LIN, *et. al.*, 1993).





Derris obtusa

Existem poucos trabalhos realizados com a espécie *Derris obtusa*. Das cascas desta espécie foram isolados dois 3-O-metilauronol (**47** e **48**). (NASCIMENTO, *et. al.*, 1976)



Derris reticulata

A espécie *Derris reticulata* é comumente encontrada na Tailândia e utilizada na medicina popular como expectorante. O estudo fitoquímico realizado levou ao isolamento de flavanonas (**31**, **49-54**) (CHULABHORN *et al.*, 1997). As substâncias isoladas do caule apresentaram atividade citotóxica (MAHIDOL *et al.*, 2002).





Derris robusta

Estudos realizados com diferentes extratos de *Derris robusta* levaram ao isolamento de isoflavonas, flavona e chalcona. Do extrato hexânico das sementes foram isoladas as 3-arilcumarinaas (**55** a **59**), a flavona (**60**), enquanto que o extrato metanólico deu origem a uma chalcona (**61**) (CHIBBER *et al.*, 1979) e a partir do extrato etanólico foram isolados quatro isoflavonas (**62-65**), as quais foram submetidas a ensaios anticancerígenos (HADDEN *et al.*, 2007).



















Derris scandens

Os estudos fitoquímicos dos extratos do caule de *Derris scandens* levaram ao isolamento de isoflavonas preniladas (**66-82**) e de 3-aril-cumarinas preniladas (**83-85**), as quais apresentaram ação antioxidante (RAO *et al.*, 2007). Os isoflavonóides isolados dos talos (**86** a **97**) apresentaram atividade antioxidante e antiflamatória (LAUPATTARAKASEM *et al.*, 2004). Do extrato das folhas e raízes foram isolados flavonóides (**64** e **65**), que também apresentaram atividade antiflamatória (GANAPATY *et al.*, 2006). Do caule foram isolados isoflavonas (**66** e **67**) (CHUANKAMNERDKAM *et al.*, 2002). O estudo do extrato das folhas e do talo levou ao isolamento de isoflavonóides glicosilados (**86-99**) (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2002), flavanonas preniladas (**100** a **101**) isoflavonas (**74-75** e **102- 105**) (SEKINE *et al.*, 1999; MAHABUSAKARAM *et al.*, 2004) e do extrato clorofórmico foram isoladas uma isoflavona (**106**), uma cumarina (**107**) e uma 3-aril-cumarina (**108**) (RAO *et al.*, 1994).



















	R	R_1	R_2
83	CH ₃	CH ₃	CH ₃
84	CH ₃	Η	Н











OCH₃








	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
92	OH	Н	Н	OCH ₃
93	Н	Н	OCH ₃	OCH ₃
93	Н	OCH ₃	OCH ₃	OH
95	Н	Н	Н	OCH ₃
96	OCH ₃	OCH ₃	Н	Н
97	Н	Н	Н	OH
98	Н	Н	Н	OCH ₃
99	Н	Н	OH	OH















Derris sp.

Foi realizado um estudo fitoquímico com as raízes da referida espécie, da qual foram isoladas três isoflavonas (**109-111**) e que se diferenciam apenas pelo substituinte da posição C-4` (ROCHA *et al.*, 1982).



Derris spruceana

O estudo fitoquímico das raízes e cascas das raízes levou ao isolamento de quatro flavonóides (83, 112-115) e um estilbeno (116) (GARCIA *et al.*, 1986).



Derris trifoliata

A produção de um pesticida feito a partir da mistura de extratos de várias espécies, incluindo *Derris trifoliata*, mostrou-se eficaz no combate a insetos e ácaros que infestam plantações na China, prevenindo doenças causadas por bactérias e vírus. Das partes aéreas foram isolados 15 compostos glicosilados (**117-131**) (TAKEDA, *et al.*, 2008). Rotenóides (**132-138**), isolados das cascas, foram testados *in vivo* e mostraram eficiente atividade quimiopreventiva contra o crescimento de células tumorais em ratos. (YENESEW, *et al.*, 2005; YENESEW, *et al.*, 2006)





OR₂ .CH₃ H₃C. " R₁ Ó k3

	R_1	R ₂	R ₃
118	Н	Glc	OH
119	OH	Glc	Η
120	Η	Glc	Н
121	Н	Н	Glc



123

















CH₃(CH₂)₅OGlc 130





Derris uliginosa

Estudos biológicos com o extrato etanólico das folhas desta espécie mostraram significante atividade contraceptiva. (AHMED, *et. al.*, 2007)

1.4.4- Espécie Derris urucu

Segundo Tozzi (1998), esse vegetal é amplamente encontrado na região Amazônica, tanto em floresta primária como em áreas já devastadas. No timbó vermelho (*D. urucu*), as hastes se tornam escandentes, desde novas e entrelaçam-se formando um teto compacto que cobre o solo. Já o timbó branco (*D.nicou*) mantém suas hastes eretas e só depois de muitos anos estas se tornam escandentes.

Rossi em 1988 ressaltou que o estudo da natureza química de *D. urucu* estava ganhando ênfase, pois, a espécie emergia como promissor agente praguicida, bastante desejável sob o ponto de vista ecotoxicológico (ROSSI, *et. al.*, 1988). A importância dessa espécie também foi defendida por Howard (1988), citando que a espécie possuía pequena persistência no ambiente resultante de degradação físico-química (fotossensibilidade e susceptibilidade à oxidação).

Vários estudos foram realizados com as raízes de *D. urucu*. Um deles relata os bons resultados apresentado pelo extrato etanólico das raízes, quando submetido a ensaio de repelência frente o mosquito *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) (GUSMÃO, *et al.*, 2002). Os estudos fitoquímicos das raízes levaram ao isolamento da derrissaponina (**139**) (PARENTE, *et. al.*, 1980) e dos rotenóides tefrosina (**7**), rotenolona (**140**) e deguelina (**8**) (SANTOS, *et al.*, 2000).

Como não há relatos na literatura de estudos relacionados com as folhas da espécie *D. urucu* (Figura 2, pág. 55), neste trabalho, propôs-se a investigação química e biológica das folhas dessa espécie, envolvendo a avaliação das atividades alelopática e antioxidante, buscando-se contribuir com a valorização das folhas dessa espécie através do conhecimento de sua composição química e do seu potencial biológico.







FIGURA 2: A espécie Derris urucu. Fotos: Alécio, M. R. (2006).

1.5- PROPRIEDADE BIOLÓGICA ESTUDADA I: ALELOPATIA.

O termo alelopatia foi cunhado por Molish em 1937 (RICE, 1987) e a origem da palavra vem do latim onde "Allelon" significa mútuo e "Phatos" significa prejuízos.

O conceito sugere todo efeito direto ou indireto de uma planta sobre a outra, incluindo a participação de microorganismos, pela produção de substâncias químicas (aleloquímicos), que após serem liberadas para o ambiente, influenciam no crescimento e desenvolvimento de outras plantas vizinhas (RIZVI, *et al.*, 1992) alterando-lhes o padrão e a densidade (RICE, 1974; SMITH, 1989). O termo engloba tanto os efeitos deletérios como os estimulatórios. Os aleloquímicos são liberados por volatilização, exsudação radicular, lixiviação e decomposição dos resíduos de plantas (WHITTAKER, 1971; RICE, 1987).

Müller (1966) deu o nome de interferências. Esse termo interferência engloba vários mecanismos que Szczepanski em 1977, diferenciou em alelospolia, alelopatia e alelomediação (SZCZEPANSKI, 1977). Alelospolia ou competição é a interferência causada pelos diferentes componentes do ecossistema ao retirarem do ambiente elementos vitais como água, nutrientes e luz, baixando o seu teor a níveis que prejudiquem o desenvolvimento normal de outros. A alelopatia foi definida como a interferência provocada pela introdução de substâncias químicas produzidas por certos indivíduos e que, no ambiente, afetam os outros componentes da comunidade.

A interferência indireta ou alelomediação é definida como os efeitos que alteram o ambiente físico ou biológico, com reflexos nos seres vivos.(DURIGAN & ALMEIDA, 1993).

1.5.1- Produção dos Aleloquímicos pelas Plantas.

Todas as partes das plantas podem conter substâncias alelopáticas. Em diferentes bioensaios, esses compostos foram encontrados nas folhas, caules, flores, rizomas, raízes, frutos e sementes de diferentes espécies de plantas (HARBORE, 1972). Normalmente, as quantidades dos aleloquímicos são maiores nos tecidos da epiderme, quando esses exercem a função de defesa (MCKEY, 1974). Em estudos com gramíneas forrageiras, Souza Filho et al. (1997) observaram que as principais fontes de substâncias alelopáticas, solúveis em água, nas espécies estudadas foram, em ordem decrescente, partes aéreas, raízes e sementes.

A localização de um aleloquímico na planta, aparentemente está relacionada a dois aspectos: facilidade de liberação para o meio ambiente e função que desempenha na planta.

Aparentemente, quando os aleloquímicos estão envolvidos com processo de defesa contra herbívoros e patógenos, eles provavelmente estão nos tecidos mais externos da planta, constituindo uma barreira contra a invasão desses inimigos. Entretanto, quando os aleloquímicos estão relacionados com os processos de competição por fatores essenciais como água, nutrientes, luz e espaços físico, os aleloquímicos estariam localizados preferencialmente em tecidos mais internos, sendo então liberados para o meio ambiente quando a sobrevivência das plantas estivesse ameaçada (SOUZA FILHO & ALVES, 2002).

Fatores ambientais são responsáveis pela maior ou menor presença de várias substâncias alelopáticas. Entre eles podemos citar a temperatura, umidade de solo, intensidade, qualidade e duração de luz, ventos sazonais, disponibilidade de nutrientes, atividade microbiana da rizosfera, além de outros como a aplicação de herbicidas (CHOU & KUO, 1986; CHOU, 1986; CHENG, 1992).

Existe tendência para generalizar que o estresse aumenta a produção de aleloquímicos. Isso poderia ajudar a explicar determinados casos documentados de alelopatia mais expressivos em comunidades de plantas em condições de estresse elevado, com tendência de aumento de liberação de agentes alelopáticos por plantas submetidas a condições de estresses relacionados à deficiência de nutrientes (KOEPPE, *et al.* 1976; HALL, *et al.* 1983; TANG, *et al.*, 1995).

Há dois tipos de aleloquímicos produzidos por plantas, são as fitotoxinas e as fitoalexinas. As fitotoxinas são aleloquímicos continuamente produzidos pelas plantas, porém, quando esta é submetida a níveis altos de estresse sua produção é aumentada. Já as fitoalexinas somente são produzidas quando a planta é submetida a estresse.

1.5.2- Mecanismos de Liberação de um Aleloquímico.

A liberação de substâncias alelopáticas produzidas pelas plantas pode se dar de diferentes formas: volatilização, exsudação radicular, lixiviação (remoção de substâncias químicas das plantas, vivas ou mortas, pelas águas da chuva e do orvalho) e, também, através de decomposição dos resíduos das plantas (RICE, 1987; WHITTAKER, 1971).

A volatilização é uma via comumente usada por plantas aromáticas, no entanto, o fato destas serem aromáticas não significa que todos os produtos exalados por ela sejam substâncias alelopáticas. Os aleloquímicos volatilizados podem ser absorvidos diretamente pela cutícula das plantas circunvizinhas, condensados no orvalho, ao entrarem no ambiente do

solo, onde permanecem como voláteis, são adsorvidos pelas partículas ou se dissolvem na água. As substâncias alelopáticas expandem-se rapidamente no ar, fazendo sentir os seus efeitos a distâncias consideráveis. Este processo ocorre continuamente, mas pode ser acentuado em condições de alta temperatura.

Outra via de liberação dos aleloquímicos é a exsudação radicular, porém é difícil de identificar quais as substâncias alelopáticas presentes no solo que provém da exsudação das raízes, visto que estas substâncias também podem ser produzidas por microrganismos ou por decomposição dos resíduos orgânicos, nos quais se incluem as células mortas que se desprendem das raízes.

Lixiviação é um processo que consiste na remoção de substâncias químicas das plantas por ação da água. A quantidade de lixiviados depende da espécie, constituição e idade do tecido vegetal, condições edafoclimáticas e da intensidade da lavagem do solo. Para material morto, o estado de decomposição, a temperatura e as condições de umidade do solo são, também, importantes (ALMEIDA, 1988).

Ao serem liberadas para o meio ambiente, as substâncias químicas com potencial alelopático necessitam entrar em contato com as plantas invasoras de pastagens. Até que isso ocorra essas substâncias estão sujeitas às ações de diferentes fatores, tanto àqueles relacionados às condições ambientais como aqueles relativos à própria substância. Durante sua permanência no solo, as substâncias alelopáticas podem ser modificadas e os impactos de tais substâncias sobre a planta-alvo podem ser influenciados pelos fatores já citados (RODRIGUES & ALMEIDA, 1993).

Sabe-se que os aleloquímicos afetam principalmente os processos de germinação e crescimento, conseqüentemente a assimilação de nutrientes, fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, atividade enzimática e na permeabilidade da membrana celular (DURIGAN & ALMEIDA, 1993).

1.5.3- Alelopatia e suas Perspectivas Futuras.

Müller (1974), citado por Wardle (1987), listou cinco critérios, indispensáveis para se provar a existência de alelopatia, que são aceitos por uma considerável parcela da comunidade científica:

- 1. A planta sob investigação deve produzir uma toxina;
- 2. A planta deve ser capaz de liberar a toxina;
- 3. A concentração da toxina no solo deve estar em níveis inibitórios;
- 4. Outras plantas devem ser susceptíveis à toxina;
- 5. Outros fatores, que possam influenciar nas observações, devem ser eliminados.

Desta maneira, fica patente a necessidade do desenvolvimento de trabalhos científicos que atendam a esses critérios, implicando na interação entre a química, a botânica e a biologia.

É importante considerar que as técnicas usadas no controle de pastagens vem produzindo vários problemas, desde contaminação do meio ambiente, a altos custos de manutenção. Nesse contexto, a alelopatia apresenta um grande potencial para reduzir ou inibir os prejuízos das práticas atuais na agricultura (usos indiscriminados de pesticidas, herbicidas, inseticidas, nematicidas e fungicidas); manter o ambiente livre de poluição para as futuras gerações; e obter alimentos isentos de agentes tóxicos para os animais em geral, e em particular para humanos (SOUZA FILHO & ALVES, 1998).

1.6- PROPRIEDADE BIOLÓGICA ESTUDADA II: ANTIOXIDANTE.

1.6.1- Histórico.

O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados (MUKAI *et al.*, 1993). O retardamento das reações oxidativas por certos compostos foi primeiramente registrado por Berthollet, em 1797, e depois esclarecido por Davy, em 1817 (BAILEY, 1996).

O curso da rancificação de gorduras permaneceu desconhecido até Duclaux demonstrar que o oxigênio atmosférico era o maior agente causador de oxidação do ácido graxo livre. Vários anos mais tarde, Tsujimoto descobriu que a oxidação de triglicerídios altamente insaturados poderia provocar odor de ranço em óleo de peixe (BAILEY, 1996).

Wright, em 1852, observou que índios americanos do Vale de Ohio preservavam gordura de urso usando casca de omeiro. Esse produto foi patenteado como antioxidante 30 anos mais tarde (BAILEY, 1996).

O conhecimento atual das propriedades de vários produtos químicos para prevenir a oxidação de gorduras e alimentos gordurosos começou com estudos clássicos de Moureu e Dufraise. Durante a I Guerra Mundial e pouco depois, estes pesquisadores testaram a atividade antioxidante de mais de 500 compostos. Esta pesquisa básica, combinada com a vasta importância da oxidação em, praticamente, todas as operações de manufatura, desencadeou uma busca por aditivos químicos para controlar a oxidação, que ainda hoje está em curso (BAILEY, 1996).

Das centenas de compostos que têm sido propostos para inibir a deterioração oxidativa das substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados em produtos para consumo humano.

Na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento e o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muitos maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento (BAILEY, 1996).

Além disso, na escolha de um antioxidante deve-se considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (RAFECAS *et al.*, 1998).

1.6.2- Radicais Livres.

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como: envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação, Alzheimer, entre outros. Ao abrir-se um periódico, com freqüência, encontram-se temas relacionados a radicais livres que, por seu caráter multidisciplinar, têm atraído a atenção de pesquisadores de várias áreas. No entanto, os artigos desta linha de pesquisa, muitas vezes, causam desinteresse no leitor não-especializado, porque estão envolvidos num mundo bioquímico de difícil entendimento.

O termo radical livre é freqüentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Isto determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (HALLIWELL, 1994; POMPELLA, 1997).

Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1996).

A ação de radicais livres sobre as membranas biológicas tem sido relacionada com eventos citotóxicos primários, que desencadeiam lesões celulares, acarretando transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e de outras substâncias, perda da seletividade para a entrada ou saída de nutrientes, acúmulo de compostos tóxicos resultantes do metabolismo celular, alterações do DNA, oxidação da fração de ácidos graxos polinsaturados e comprometimento de substâncias que compõem a matriz extracelular, como proteoglicanos, colágeno e elastina (VACA *et al.*, 1988; BABER *et al.*, 1994).

O oxigênio no estado ativado é um iniciador da oxidação de ácidos graxos polinsaturados, pois no estado fundamental se encontra no estado triplete, com dois elétrons não pareados de mesmo spin, em diferentes orbitais. O estado singlete corresponde a um estado excitado e apresenta um par de elétrons na camada eletrônica externa ou um elétron em cada orbital com spins opostos e meia vida de 10^{-11} seg, enquanto que o estado triplete é de 10^{-6} seg. O estado singlete é menos estável, portanto mais reativo, restringindo a reação com o

ácido graxo, somente pelo estado do oxigênio ou quando não está na forma de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), anion superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxil (HO[•]), oxigênio complexado ao ferro ou na clivagem homolítica dos hidroperóxidos mediado por ferro ou metais de transição (HSIEH *et al.*, 1989; DI MASCIO & KINSELLA,1995).

1.6.3- Estresse oxidativo.

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados ERO ou ERN. No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como: artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (HALLIWELL, 1992).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell (2000), "Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo". Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da GPx, CAT e SOD² ou, não-enzimaticamente a exemplo de GSH, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH₂. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina "E"), β -caroteno (pro-vitamina "A"), ácido ascórbico (vitamina "C"), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (HALLIWELL, 1995). Dentre os aspectos preventivos, é interessante ressaltar a correlação existente entre atividade antioxidante de substâncias polares e capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral. Outro interesse ligado aos

antioxidantes é a sua aplicação na indústria, para a proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa desses pela ação da luz, temperatura e umidade.

O organismo humano sofre ação constante de ERO e ERN gerados em processos inflamatórios, por algumas disfunções biológicas ou provenientes dos alimentos. Os principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO[•]), superóxido $(O_2^{\bullet})^{-}$, peroxila (ROO[•]) e alcoxila (RO[•]); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO[•]), óxido nitroso (N₂O₃), ácido nitroso (HNO₂), nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻) e peroxinitritos (ONOO). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo, atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas (HALLIWELL, 1999).

O radical HO[•]é um dos mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser seqüestrado *in vivo*. Estes radicais freqüentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Nos experimentos de laboratório o HO[•] pode facilmente ser seqüestrado *in vitro* por inúmeras moléculas, devido a sua alta reatividade. No entanto, para que os resultados *in vitro* se reproduzam *in vivo*, é necessário ministrar alta concentração do antioxidante para que este alcance o local onde o radical HO[•] está presente em concentração suficiente para suprimi-lo. Existem duas maneiras de controlar a presença do radical HO[•]: reparar os danos causados por ele ou inibir sua formação.

O radical HO[•] é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H_2O_2 com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante (EQUAÇÃO 1). A incidência de radiação no ultravioleta, radiação G e raios X podem produzir o radical HO[•] nas células da pele. O ataque intensivo e freqüente deste radical pode originar mutações no DNA e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de câncer em seres humanos no período de 15 a 20 anos.

H₂O → 'OH + 'H (1)

O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inócuo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares, como exemplo na membrana nuclear. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical HO[•]em seu interior.

Em nosso organismo, os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são Cu^{2+} e Fe²⁺. Nesse sistema, a importância do ferro é mais pronunciada devido a sua maior biodisponibilidade e, no organismo, na maior parte do tempo ele encontra-se complexado com proteínas de transporte (transferrina), e armazenamento (ferritina e hemosiderina). A reação do Fe²⁺ com o H₂O₂ (reação de Fenton) pode ser representada de maneira simplificada na EQUAÇÃO 2.

$$Fe^{2^+} + H_2O_2 \longrightarrow OH + OH + Fe^{3^+}$$
 (2)

A forma mais deletéria do oxigênio ao organismo é o oxigênio singleto (¹O₂), pois é a causa ou o intermediário da toxicidade foto induzida do O2 em organismos vivos. O seu tempo de meia vida depende muito do meio onde se encontra. Em meio aquoso, sua meia-vida é muito pequena, pois ele se choca com as moléculas de H₂O transferindo sua energia, desativando-se e retornando à forma de oxigênio tripleto. Em meio orgânico é mais comum a ocorrência de choque com transferência de energia, sem reação química, seguida da dissipação dessa energia na forma de calor. Esse tipo de choque é denominado "quenching" colisional e representa a forma como a água desativa o ¹O₂. Porém, em meio orgânico, a meiavida do oxigênio singleto é maior e, portanto, pode causar algumas reações químicas com determinados aceptores por incorporação do O₂. O oxigênio singleto reage com algumas classes de biomoléculas. Os compostos naturais mais reativos frente ao ¹O₂ são os carotenóides, devido às múltiplas insaturações conjugadas. Assim, o ¹O₂ reage mais lentamente com os ácidos graxos que com o β-caroteno, e quanto maior o número de insaturações presentes nos ácidos graxos, mais rapidamente eles irão reagir. Essa reação se dá por incorporação do oxigênio à cadeia com consequente migração da ligação dupla, formando ácidos hidroperóxidos como os HPODE (ácidos graxos polinsaturados oxidados).

O H₂O₂ é gerado *in vivo* pela dismutação do ânion-radical superóxido O₂^{•-} por enzimas oxidases ou pela β -oxidação de ácidos graxos. As mitocôndrias são importantes fontes de O₂^{•-} e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em SOD que o converte em H₂O₂. O peróxido de hidrogênio gerado é então parcialmente eliminado por catalases, glutationa peroxidase e peroxidases ligadas à tioredoxina, mas como essa eliminação tem baixa eficiência, grande parte do H₂O₂ é liberado para a célula (HALLIWELL, 2000). O H₂O₂ também pode ser encontrado em bebidas como chás e principalmente café instantâneo e, rapidamente se difunde pelas células da cavidade oral e do trato gastrintestinal. Pode também ser produzido por bactérias presentes na boca, sendo utilizado pela peroxidase salivar para oxidar o tiocianeto (SCN⁻) em tiocianato (OSCN⁻), um produto tóxico para certas bactérias. Ele é utilizado pelos fagócitos na produção de ácidos hipoalogenosos, que são oxidantes muito efetivos no combate a vírus, bactérias e outros corpos estranhos, mas que por outro lado apresentam efeitos deletérios quando expostos às moléculas biológicas.

A maior fonte de energia para os organismos aeróbicos está na terceira etapa da respiração, que ocorre no interior da mitocôndria, onde uma molécula de O_2 é reduzida a duas moléculas de H₂O, com consumo de 4 elétrons (EQUAÇÃO 3). Nas equações seguintes (EQUAÇÕES 4-7) estão descritas as etapas da redução de O_2 , formação de radical hidroxila e a segunda molécula de água (EQUAÇÃO 7).

$$O_2 + 4e^- + 4H^+ \longrightarrow 2 H_2O$$
 (3)

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet}$$
 (4)

$$O_2 + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$
 (5)

$$H_2O_2 + e^- + H^+ \longrightarrow OH + H_2O$$
 (6)

 $^{-}OH + e^{-} + H^{+} \longrightarrow H_2O$ (7)

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), ao contrário da maioria dos radicais livres, é menos ativo. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (EQUAÇÃO 8). Ele também é uma base fraca cujo ácido conjugado, o radical hidroperóxido (HOO[•]) é mais reativo, como representado pela EQUAÇÃO 9.

$$O_2^{\bullet} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (8)$$
$$O_2^{\bullet} + H^+ \longleftrightarrow HOO^{\bullet} \quad (9)$$

O radical ânion superóxido $(O_2^{\bullet-})$ participa de certos processos químicos importantes no contexto biológico. O principal deles é auxiliar na produção de radical HO[•], através da redução de quelatos de Fe (III), formando Fe²⁺. Assim, o HO[•] pode ser obtido através da reação de Haber-Weiss (HALLIWELL, 1992).

Além disso, o radical ânion $O_2^{\bullet-}$ possui a habilidade de liberar Fe⁺² das proteínas de armazenamento e de ferro-sulfoproteínas, tais como ferritina e aconitase, respectivamente. O

radical ânion O_2^{\bullet} também reage com o radical HO[•] produzindo oxigênio singleto 1O_2 (EQUAÇÃO 10) e com o óxido nítrico (NO[•]) produzindo peroxinitrito (ONOO⁻), como representado pela EQUAÇÃO 11.

$$O_2^{\bullet} + O_1^{\bullet} \longrightarrow 1O_2 + O_1^{\bullet} (10)$$

NO $+ O_2^{\bullet} \longrightarrow O_1^{\bullet} (11)$

Apesar dos efeitos danosos, o radical O_2^{\bullet} ⁻ tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. O radical O_2^{\bullet} ⁻ é gerado *in vivo* por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos. Os fagócitos o produzem com auxílio da enzima NADPH oxidase, que catalisa a redução por um elétron do O_2 com gasto de uma molécula de NADPH, como representada pela EQUAÇÃO 12.

$$2 O_2^{-} + \text{NADPH} \longrightarrow 2 O_2^{-} + \text{NADP}^{+} + \text{H}^{+}$$
 (12)

O radical ânion superóxido formado é bactericida fraco, capaz de inativar proteínas ferro-sulfurosas das bactérias, porém gera alguns produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito (ONOO⁻) que são os principais responsáveis pelo combate a corpos estranhos.

Em alguns casos o radical ânion $O^{2\bullet-}$ age como antioxidante, reduzindo semiquinonas para que elas possam retomar suas atividades metabólicas na célula. Um exemplo é a redução da ubiquinona para ubiquinol, no interior da mitocôndria

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos, como medicamentos, dietas, cigarros, ozônio e raios ultravioleta. Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993).

A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, freqüentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996).

A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (DOROSHOW, 1983; HALLIWELL *et al.*, 1995; WEIJL *et al.*, 1997).

1.6.4- Peroxidação Lipídica.

A peroxidação lipídica resulta na desorganização estrutural das membranas biológicas, resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando a destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de trocas metabólicas e finalmente, em condições irreversíveis, a morte celular, sendo responsável, como já mencionado, por diversas patologias, tais como aterosclerose, câncer, processos inflamatórios, enfermidades neurodegenerativas e o processo de envelhecimento (BENZIE, 1996; HALLIWELL, 1992; MASUTANI, 2000).

Como toda reação radicalar, a peroxidação lipídica, pode ser dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação. As espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são os iniciadores do processo de peroxidação lipídica (BENZIE, 1996). O ataque da espécie reativa (ER[•]) sobre o ácido graxo polinsaturado leva a abstração homolítica de um átomo de hidrogênio do grupo metileno, formando um radical de carbono (L[•]) razoavelmente estável, devido o efeito de ressonância dos alcenos vizinhos ou por rearranjo sigmatrópico de hidrogênio. Em meio aeróbio, este composto se combina com o oxigênio (O₂) formando o radical peroxila (LOO[•]), o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical (L[•]), promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio forma o hidroperóxido lipídico (LOOH) (PORTER *et al.*, 1995).

Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com a dupla ligação. Íons e metais de transição podem participar do processo, catalisando a formação de radicais lipídicos alcoxila (LO[•]), peroxila (LOO[•]) e hidroxila (HO[•]) a partir dos hidroperóxidos. A última fase ocorre, quando os radicais livres são neutralizados por reação com a glutationa, dismutação ou clivagem, formando ligações covalentes com resíduos de aminoácidos ou rearranjos, formando grupos epóxidos (ROR), aldeídos (RCHO), cetonas (RCOR) e álcool (ROH). Estas reações fazem parte de um sistema de defesa celular contra a oxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.6.5- Atividade Antioxidante de Derivados Fenólicos.

Os compostos fenólicos 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 (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996 e SOARES, 2002).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002 e CHUN *et. al.*, 2005).

Embora as evidências sejam claras sobre a ação *in vitro* dos fenóis e polifenóis com espécies reativas de oxigênio, eles podem, em algumas circunstâncias, tal como o ascorbato e os carotenóides, mostrarem características pró-oxidantes (VALKO *et. al.*, 2004 e HASLAM, 1996).

Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica é inibida por seqüestradores de radicais livres. Os compostos mais utilizados com esta finalidade são o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), *terc*-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), tri-hidroxi-butil-fenona (THBP) e galato de propila (GP). Estudos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem alguns efeitos tóxicos. O galato de propila, por ex., quando em presença de peróxido de hidrogênio reage com íons ferrosos formando espécies reativas de oxigênio, as quais podem posteriormente atacar alvos biológicos (HASLAM, 1996 e SOARES, 2002).

Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com

atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles.

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de seqüestrar os radicais livres (DECKER, 1997). Os compostos fenólicos mais estudados são: o ácido caféico, o ácido gálico e o ácido elágico. Esses compostos, de considerável importância na dieta, podem inibir o processo de peroxidação lipídica (HARTMAN & SHANKEL, 1990; HALLIWELL *et al.*, 1995).

Os polifenóis constituem um numeroso e representativo grupo de metabólitos secundários das plantas, tendo participação na fisiologia e metabolismo celular, morfologia, crescimento, reprodução, defesa contra predadores e processos germinativos. A maioria dos produtos vegetais consumidos pelo homem demonstrou atividade antioxidante, evidenciando seu potencial benéfico à saúde humana (BRAVO, 1998; KAHKONEN *et al.*, 1999).

Compostos fenólicos, de origem natural, como derivados flavonóides, mostraram que sua propriedade antioxidante pode estar relacionada com sua atividade na cascata inflamatória (WEBER *et al.*, 2002). Porém, alguns compostos fenólicos naturais ou sintéticos estão envolvidos na toxidade hepática, renal, câncer e citotoxicidade, o que fomenta a pesquisa deste grupo de substância quanto aos seus parâmetros moleculares, farmacológico e toxicológico (BESSEMS & VERMEULEN, 2001; RIETJENS *et al.*, 2002).

Existe na literatura muita controvérsia sobre o mecanismo de ação dos flavonóides. Os flavonóides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (HARTMAN & SHANKEL,1990; ARORA *et al.*, 1998). Os flavonóides mais investigados são: a quercetina, a miricetina, a rutina e a naringenina (HARTMAN & SHANKEL,1990). A quercetina está presente nas frutas e vegetais, e é o flavonóide mais abundante encontrado no vinho tinto. Entretanto, esse antioxidante pode reagir com ferro e tornar-se um pró-oxidante (GASPAR *et al.*, 1993).

Os autores encontraram uma relação inversa entre o consumo de flavonóides na dieta e o desenvolvimento de tumores em indivíduos na faixa etária de 50 anos e não-fumantes. Os autores observaram que entre as muitas fontes de flavonóides da dieta, o consumo de maçãs apresentou os melhores resultados na prevenção do desenvolvimento de tumores no pulmão (KNEKT *et al.*, 1997)

1.6.6- Avaliação de Atividade Antioxidante

Os modelos químicos determinam a propriedade antioxidante de compostos, baseada na reação de um radical livre conhecido como 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH^{*+}) com os compostos a serem testados, em solução etanólica e tampão de fosfato, com pH 5,5 (Esquema 1, pág 70). A reação se processa pela mudança de cor, de púrpura para amarelo, e a atividade é avaliada pelo decréscimo da absorvância, medida em 517 nm, em relação ao correspondente solvente branco (BLOIS, 1958).

ESQUEMA 1: Reação da 2,2-difenil-1-picrilhidrazil com derivados fenólicos.



A análise da capacidade antioxidante total pode ser determinada com reagente de Folin-Ciocalteu usando o método de Spanos & Wrolstad (1990), modificado por Lister & Wilson (2001). A absorvância é mensurada em 756 nm e os resultados expressos em miligramas de ácido gálico equivalentes por grama de peso seco (mg GAE/g).

Capítulo II

Parte Experimental



2- ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE Derris urucu.

2.1-COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA.

A coleta do material botânico foi realizada na reserva florestal da EMBRAPA -Amazônia Oriental em Belém-PA, em janeiro de 2006, pelo Sr. Manoel Cordeiro, obedecendo ao protocolo de coleta reconhecido internacionalmente, tendo sido obtidos fotos digitais da espécie e do ramo fértil para compor a exsicata, bem como a localização da espécie por GPS e autorização do proprietário da área para proceder à coleta. A espécie foi identificada pela professora Dra. Silvani Tavares Rodrigues, estando uma exsicata depositada no Herbário da Instituição, sob registro de número IAN – 181062.

Foram coletados 2,0 kg de folhas da espécie. As amostras foram cuidadosamente escolhidas para composição das exsicatas e identificadas pelo código internacional de nomenclatura botânica.

2.2- OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.

O material botânico (folhas) foi seco em estufa com temperatura de 45 °C, posteriormente triturado em moinho de facas, resultando num total de 700 g do material seco e moído. Este material foi submetido a duas extrações por percolação com etanol, seguido de filtração e evaporação em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato etanólico (**FLUXOGRAMA I,** pág. 78).

2.3- FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE Derris urucu

Uma amostra do extrato etanólico das folhas de *Derris urucu* (30g) foi fracionada por CCVU filtrante, utilizando-se misturas de solventes com polaridade crescente, em um volume calculado de 700 mL de cada sistema: hexano/acetato de etila 10%; hexano/acetato de etila 30%; hexano/acetato de etila 50%; acetato de etila 100%: acetato de etila/metanol 50% e metanol 100%, obtendo-se, após evaporação dos solventes as respectivas frações: DU-1

(1,2763g); DU-2 (2,3731g); DU-3 (5,1738g); DU-4 (5,3629g); DU-5 (3,5315g) e DU-6 (3,7532g).

Através de análises de dados de RMN ¹H, nos quais procurou-se observar sinais na região de hidrogênios aromáticos na região entre $\delta_{\rm H}$ 6,0 até $\delta_{\rm H}$ 8,0 (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), bem como, a análise dos cromatogramas obtidos em injeções das frações em CLAE, foram escolhidas as frações DU-2, DU-3 e DU-4 para dar continuidade ao fracionamento e isolamento dos padrões de interesse (**FLUXOGRAMA I**, pág. 78).

2.4- PRÉ-TRATAMENTO USADO PARA AS FRAÇÕES DA COLUNA FILTRANTE.

O método de pré-tratamento empregado foi a Extração em Fase Sólida (SPE), objetivando-se reter as impurezas e/ou interferentes e deixando passar os componentes de interesse. A solução obtida foi posteriormente analisada por CLAE, na busca do melhor sistema para isolamento das substâncias.

Foram utilizados cartuchos Strata-C18 da Phenomenex, com 50 mg de fase estacionária e 1,0 mL de volume, e ainda alíquotas de 10 mg de cada fração: DU-2, DU-3 e DU-4. O cartucho Strata-C18 foi condicionado com 1,0 mL de acetonitrila e em seguida com 1,0 mL de H₂O. À alíquota do extrato, foram adicionados 0,9 mL de acetonitrila e levado ao ultra-som por um minuto. Após esse tempo foi adicionado 0,1 mL de H₂O e levado ao ultra-som, por mais um minuto. A solução foi aplicada no cartucho, recolhendo-se a solução de interesse e em seguida, o solvente foi evaporado na capela.

Após evaporação total do solvente, o resíduo foi ressuspendido em 1 ml de acetonitrila, de onde retirou-se uma alíquota de 20 μ L, injetando-a no cromatógrafo líquido. Com objetivo de se obter um perfil cromatográfico, posteriormente uma alíquota de cada uma das amostras foi injetada em gradiente, com fase móvel composta por solvente A = H₂O e solvente B = CH₃CN, variando-se de 5 a 100% do modificador orgânico, em 60 min de análise. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min, e o detector de absorbância na região do ultra-violeta operou com os comprimentos de onda de 270 e 320 nm.

Como fase estacionária, utilizou-se uma coluna analítica Gemini C18 (250 x 4,60 mm), 5 μ , e pré-coluna C18, usando-se um fluxo de 1 mL/min.

Com objetivo de otimizar o método para o isolamento das substâncias de interesse, realizou-se o gradiente, relatado anteriormente, para prever se seria possível realizar eluição no modo isocrático. Baseado na relação $(T_{rz}-T_{ra})/T_g$, que deve apresentar valor inferior a 0,4 segundo SNYDER e colaboradores (1997), foi realizado o cálculo e o resultado obtido para a

relação foi inferior a este valor, para todas frações analisadas, demonstrando que a separação podia ser realizada no modo isocrático.

O estudo de SNYDER e colaboradores (1997) propõem valores desejáveis pra o fator de retenção k (k=5, k=10, k=20), com base nos tempos de retenção da última banda. Para estimar-se um valor de percentual do modificador orgânico, optou-se por uma separação com k =20. Assim, foi sugerido um sistema isocrático e de acordo com a Tabela I, este seria composto por H₂O/CH₃CN: 30:70 para a fração DU-2, 38:62 para a fração DU-3 e 46:54 para a fração DU-4.

TABELA I: Estimativa do % do solvente B para eluição isocrática, baseada no tempo de retenção da última banda t_{rz} do gradiente inicial (SNYDER *et al.*, 1997).

T_{rz} (min)	K=5	K=10	K=20
	(% de ACN)	(% de ACN)	(% de ACN)
5	6	0	-
10	19	12	5
15	29	22	14
20	37	30	22
25	45	38	30
30	53	46	38
35	61	54	46
40	69	62	54
45	77	70	62
50	85	78	70
55	93	86	78
60	100	94	86
65	-	100	94

Condições: coluna 150 x 4,60 mm; gradiente 5-100% de CH₃CN em 60 mim; vazão 2 mL/min (SNYDER, 1997).

2.5- ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS.

Depois de determinado o melhor sistema de separação das substâncias no modo isocrático, retirou-se uma alíquota de 1 g das frações pré-selecionadas: DU-2, DU-3 e DU-4, e as submeteu a um pré-tratamento por Extração em Fase Sólida (SPE), utilizando cartucho C18 (5g/20 mL, Giga Tubes, Phenomenex).

O cartucho foi condicionado com 10 mL de CH₃CN e em seguida com 10 mL de água. À alíquota das frações, foram adicionados 18 ml de CH₃CN. Para facilitar a solubilização, a fração foi levada ao ultra-som por 1 min. Em seguida, foram adicionados 2 ml de água e novamente a fração foi levada ao ultra-som, por mais 1 min. Este processo foi repetido por duas vezes, em seguida, a solução foi inoculada no cartucho.

Foram coletados três volumes que, posteriormente, foram evaporados na capela, obtendo-se uma massa de 500 mg (DU-2), 700 mg (DU-3) e 800 mg (DU-4). Em seguida foram solubilizados em CH₃CN, passado em filtro de seringa e injetado em CLAE semipreparativo, utilizando-se um volume de 200 μ L, por injeção, para o isolamento das substâncias.

Para o isolamento das substâncias presentes nas frações, foi usado um cromatógrafo líquido como descrito no item 2.9.1 (pág. 85).

Como fase estacionária, utilizou-se uma coluna semi-preparativa Gemini C18 5µ (250 x 10,0 mm)

Dos constituintes majoritários presentes na fração DU-2 (**Figura 3**, pág. 75), obtevese 5 subfrações codificadas como: DU 2-1 (2,9 mg), DU 2-2 (3,2 mg), DU 2-3 (43,0 mg), DU 2-4 (90,0 mg), DU 2-5 (41,0 mg) (**FLUXOGRAMA II**, pág. 79).

As substâncias isoladas nas subfrações **DU 2-1**; **DU 2-2**; **DU 2-3**, **DU 2-4** e **DU 2-5** tiveram suas estruturas completamente determinadas por métodos espectrométricos de análises e então receberam as seguintes denominações: **S5**, **S2**, **S1**, **S3** e **S4**, respectivamente.

Das cinco substâncias isoladas e identificadas, apenas três delas (**S1**, **S2**, e **S4**) foram submetidas a bioensaios para avaliação de atividades biológicas. A substância **S5** não foi submetida aos bioensaios devido sua massa ser insuficiente para realização dos bioensaios. E a substância **S3** não foi submetida aos bioensaios por ter sido a ultima substância a ter sua estrutura totalmente elucidada, assim a sua massa estava sendo usada para obtenção dos espectros durante a realização dos bioensaios.



Figura 3- Cromatograma obtido por CLAE, relativo ao isolamento dos constituintes majoritários da fração DU-2 (Hex/AcOEt 30%). Fase móvel composta por H₂O/CH₃CN 30:70 e vazão de 4,6 mL/min. Detecção de UV, $\lambda = 320$ e 280 nm.

Do fracionamento da fração DU-3 (**Figura 4**, pág. 76), foram obtidas 5 subfrações codificadas como: DU 3-1 (151,0 mg), DU 3-2 (7,0 mg), DU 3-3 (70,0 mg), DU 3-4 (11,0 mg), DU 3-5 (26,0 mg) (**FLUXOGRAMA III**, pág. 80).

Das substâncias isoladas a partir da fração DU-3, apenas duas (**DU 3-1** e **DU 3-4**) eram diferentes das isoladas da fração DU-2. Estas substâncias tiveram suas estruturas completamente determinadas por métodos espectrométricos de análises e então receberam as denominações: **S11** e **S12**, respectivamente. Pelo fato dessas substâncias serem as últimas a terem as estruturas identificadas, não foi possível a realização de bioensaios com essas substâncias.



Figura 4- Cromatograma obtido por CLAE, referente ao isolamento dos constituintes majoritários da fração DU-3 (Hex/AcOEt 50%). Fase móvel composta por H₂O/CH₃CN 38:62 e vazão de 4,6 mL/min. Detecção de UV, $\lambda = 320$ e 280 nm.

Por fim, da fração DU-4 (**Figura 5**, pág. 77), obteve-se 5 subfrações codificadas como: DU 4-1 (28,0 mg), DU 4-2 (80,0 mg), DU 4-3 (12,3 mg), DU 4-4 (51,0 mg), DU 4-5 (20,0 mg) (**FLUXOGRAMA IV**, pág. 81).

As substâncias presentes nas subfrações **DU 4-1**; **DU 4-2**; **DU 4-3**, **DU 4-4** e **DU 4-5** tiveram suas estruturas completamente determinadas por métodos espectrométricos de análises e então receberam as seguintes denominações, por ordem de identificação estrutural: **S6**, **S7**, **S10**, **S8** e **S9**, respectivamente.

Das cinco substâncias isoladas e identificadas, apenas quatro delas (S6, S7, S8 e S9) foram submetidas a bioensaios para avaliação de atividades biológicas. A substância S10 não foi submetida aos bioensaios devido à demora em sua elucidação estrutural, estando assim, toda sua massa ocupada para obtenção dos espectros durante a realização dos bioensaios.



Figura 5- Cromatograma referente ao isolamento dos constituintes majoritários da fração DU-4 (AcOEt 100%). Fase móvel composta por H₂O/CH₃CN 46:54 e vazão de 4,6 mL/min. Detecção de UV, $\lambda = 320$ e 280 nm.



FLUXOGRAMA I – Obtenção do extrato e das frações das folhas de Derris urucu.



FLUXOGRAMA II – Fracionamento da fração DU-2.

FLUXOGRAMA III – Fracionamento da fração DU-3.



FLUXOGRAMA IV – Fracionamento da fração DU-4.



2.6- METODOLOGIA UTILIZADA NOS BIOENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DA PLANTA.

2.6.1- Germinação de Semente.

O bioensaio para avaliação do potencial de inibição da germinação de sementes foi monitorado em período de 5 dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. Foram consideradas sementes germinadas, aquelas que apresentavam extensão radicular igual ou superior a 2 mm (JUNTILA, 1976 e DURAM & TORTOSA, 1985). O bioensaio foi desenvolvido em condições de 25⁰C de temperatura constante e fotoperíodo de 12 horas. Cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro recebeu 10 sementes.

Como plantas receptoras, foram utilizadas aquelas que ocorrem com maior freqüência nas áreas de pastagens cultivadas que são: *Mimosa pudica* L. (malícia) e *Senna obtusifolia* (L.) Irwing & Barneby (mata-pasto). As sementes foram coletadas em áreas de pastagens cultivadas no município de Castanhal, Estado do Pará. Estas passaram por processo de limpeza e expurgo e foram tratadas para obter-se a quebra da dormência (SOUZA FILHO *et al.*, 1988).

A solução do extrato foi preparada na concentração de 1,0 g/L de amostra em solvente apropriado (etanol). Já as soluções com as substâncias puras foram preparadas na concentração de 150 ppm, tendo como solvente o diclorometano. O tratamento 0,0 foi considerado testemunha e constou apenas de água destilada. Cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro recebeu 3,0 mL de solução a ser testada, quando do início de cada bioensaio, sendo adicionado a partir de então, apenas água destilada, sempre que preciso. Após evaporação do solvente, adicionava-se água destilada na mesma quantidade do solvente evaporado, mantendo-se, assim, a concentração original.

2.6.2- Desenvolvimento da Radícula e do Hipocótilo.

Os efeitos alelopáticos do extrato e das substâncias, sobre o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo foram avaliados nas mesmas condições do bioensaio de germinação, medindo-se, ao final de 5 dias de crescimento, o comprimento da radícula e do hipocótilo.

A solução do extrato foi preparada na concentração de 1,0 g/L de amostra em etanol. Já as soluções com as substâncias puras foram preparadas na concentração de 150 ppm, tendo
como solvente o diclorometano.

Nestes bioensaios foram utilizadas duas sementes pré-germinadas por placa de Petri. As soluções do extrato e das substâncias foram adicionadas apenas uma vez, quando do início do bioensaio, sendo adicionado a partir de então apenas água destilada quando necessário. Cada placa de Petri recebeu 3,0 mL das soluções. Após evaporação do solvente, adicionou-se volume igual de água destila, mantendo-se, dessa forma, a concentração original. Como tratamento testemunha utilizou-se a água destilada.

Todos os bioensaios, tanto o de germinação quanto os de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo, foram feitos e avaliados em triplicata, conforme metodologia disponível na literatura (ARRUDA *et. al.*, 2005, SOUZA FILHO *et. al.*, 2005 e LOBO *et. al.*, 2008).

2.6.3- Avaliação dos Efeitos Sinérgicos entre as Substâncias.

A metodologia utilizada nestes bioensaios foi à mesma usada para os bioensaios descritos anteriormente, com o diferencial de que as soluções testadas foram compostas de uma mistura de 50%, de cada substância, na mesma concentração de 150 ppm, sendo adicionado 1,5 mL de cada solução.

2.7- METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.

A atividade inibitória do radical livre difenilpicril-hidrazil (DPPH) foi utilizada para a determinação da atividade antioxidante dos diidroflavonóis S_6 (Urucuol B), S_7 (Urucuol A), S_8 (Urucuol C) e S_9 , em diferentes concentrações. O butil-hidroxitolueno (BHT) foi usado como controle positivo. A reação de inibição do DPPH foi realizada em solução metanólica com diferentes concentrações dos compostos testes. A mudança na absorvância foi medida em 517 nm após 5 minutos, adaptado do método de Blois (1958). A reação foi monitorada através da medida do decréscimo da absorbância a 517 nm, utilizando UV-visível, o ponto final da reação entre as amostras e DPPH foi determinado quando o valor da absorbância se manteve constante. O metanol foi utilizado como branco. Obtendo-se valores de inibição das diferentes concentrações para cada amostra. Estes valores foram utilizados na análise estatística e a CE_{50} foi calculada através do método de regressão linear (P<0,05). A atividade antioxidante foi comparada com o BHT.

2.8- TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO.

2.8.1- Material utilizado na Cromatografia (CCVU).

A fase estacionária utilizada na cromatografia foi sílica-gel 70-230 Mesh e na cromatografia em placa foi sílica-gel GF e PF. Na fase móvel foram utilizados os solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água.

2.8.2- Coluna Cromatográfica Por Via Úmida (CCVU).

Foi realizada em colunas de vidro, sendo que o diâmetro e a altura da coluna variavam em função da quantidade de amostra.

A sílica-gel (fase estacionária) foi colocada na coluna após ser misturada a um solvente de escolha prévia. A amostra escolhida foi fracionada com misturas de solventes em polaridade crescente (fase móvel).

2.8.3- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).

Foram utilizadas placas de vidro (plana) de 5x10 cm, preparadas com uma fina camada de sílica-gel 60GF- Tedia de 0,5 mm de espessura, usadas para monitorar o processo de separação dos extratos e frações.

2.8.4- Reveladores de placa.

Foram utilizados os seguintes reveladores de placa:

- Solução aquosa de Sulfato Cérico: revelou as substâncias exibindo coloração.
- Câmara de luz UV: revelou as substâncias que possuiam grupos cromóforos.

2.9- MATERIAIS UTILIZADOS.

2.9.1- Equipamentos.

 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Modelo MERCURY 300-Varian.

- Evaporador Rotativo - QUIMIS.

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu, composto por duas bombas, modelo LC-10AD, detector de ultravioleta, operando com comprimento de onda em 270 e 320 nm modelo SPD-10AV, degaseificador de membrana, modelo DGU-14A, injetor de amostras Rheodyne 7752i, com alça de amostragem de 20 μL, interface de comunicação Shimadzu, modelo CBM-10A acoplado a microcomputador Pentium II com software de integração Class LC-10A.

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Varian Polaris, composto por duas bombas modelo Prostar 210-215, detector com duplo canal de absorbância na região do ultravioleta e do visível, operando com comprimento de onda 280 e 320 nm, modelo Prostar 325, injetor de amostras Rheodyne 7752i, com alça de amostragem de 20 μ L para o analítico e 200 μ L para semi-preparativo; interface de comunicação Varian, modelo RS-485/422 LCs acoplado a microcomputador Pentium IV com software de integração Star WS WinXP.

- As colunas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência usadas foram: Gemini C18 analítica (250 x 4,60 mm, 5 μ) e semipreparativa (250 x 10 mm, 5 μ), ambas da Phenomenex.

- Cartuchos Strata C18, 50 mg/1 mL (analítico) e cartucho Giga Tubes C18 5g/5 ml (preparativo). Todos da marca Phenomenex.

- Seringas Hamilton com capacidade de 20 e 200 μ L.

- Balança analítica Sartorius.

- Ultra-som Branson 2200.

2.9.2- Solventes.

- Para o isolamento e purificação de amostras foram utilizados: hexano, acetato de etila, metanol e acetonitrila, todos grau HPLC (TEDIA).

- Os solventes deuterados usados em espectroscopia de RMN foram da marca TEDIA.

- Para análise e isolamento de amostras com o cromatógrafo líquido analítico e semipreparativo: acetonitrila grau HPLC (TEDIA), água purificada em um sistema de água Milipore (Direct - $Q^{\mbox{\tiny (\ensuremath{\mathbb{R}})}}$). A fase móvel foi filtrada em membrana de nylon com 0,45 µm de tamanho do poro.

2.10- INSTRUMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS NOS BIOENSAIOS ALELOPÁTICOS

OBS: Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, sobre orientação do Dr. Antônio Pedro da Silva Souza Filho.

- Placas de Petri com diâmetro de 9 cm.
- Pipetador automático eppendorf.
- Papel de Filtro qualitativo.
- Estufa de Germinação de fotoperíodo Eletrolab.
- Sementes de espécies de ervas daninhas invasoras de pastagens: Mimosa pudica Mill.

(malícia) e Senna obtusifolia (L.) Irwing & Barneby (mata-pasto)

- Solução de Nistantina® 0,2%.

Capítulo III

Resultados e Discussões



3- RESULTADOS E DISCUSSÕES.

3.1- CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE Derris urucu.

Na investigação química das folhas de *Derris urucu* foram isoladas doze substâncias: cinco destas foram identificadas como da classe dos estilbenos **S1** a **S5**, os quais foram obtidos das frações DU-2 e DU-3, oriundas do extrato etanólico das folhas de *D. urucu*; outras duas, as quais foram isoladas da fração DU-3 e identificadas como um diidroflavonol (**S11**) e uma flavanona (**S12**); e ainda outras cinco, **S6** a **S10**, que foram isolados da fração DU-4 e identificados como diidroflavonóis.

A determinação estrutural das substâncias isoladas foi feita com base na análise dos dados espectrométricos de RMN de ¹H, ¹³C, DEPT, COSY ¹H x ¹H, HETCOR e HMBC e em alguns casos por comparação com informações encontradas na literatura.



3.1.1- Estrutura das Substâncias Isoladas de Folhas de Derris Urucu.





3.1.2- Determinação Estrutural do Estilbeno S1.

As substâncias **S1** a **S12** foram isoladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, oriundas das frações obtidas do extrato hidroalcóolico de *Derris urucu*, como descrito no item 2.5 (pág 74)

A substância **S1** (25 mg) foi isolada na forma de cristais amarelos e solúvel em clorofórmio.

O espectro de massas com ionização por eletrospray (IES-MS) da substância **S1** (Figura 6), apresentou um pico em m/z 375 [M+Na]⁺, o que permite sugerir a fórmula molecular C₂₂H₂₄O₄ para **S1**. Esta fórmula molecular foi confirmada pela análise do espectro de massas de alta resolução que exibiu pico observado em m/z 375,1594 (C₂₂H₂₄O₄Na⁺), calculado em m/z 375,1572, com erro de massa calculado para 5,86 ppm.



FIGURA 6 – Espectro de massa de S1.

Na análise do espectro de RMN ¹H de **S1** (Figuras 8, 9 e 10, págs 92 e 93, Tabela II, pág 101), foram observados vários sinais em diferentes regiões do espectro, destacando-se dois sinais na região de hidrogênios olefínicos, os quais caracterizam **S1** como sendo da classe dos estilbenos. Estes sinais foram: dois dupletos centrados em $\delta_{\rm H}$ 6,86 e 6,93, com J = 16,0 Hz (1H, cada), típico de acoplamento *trans*, atribuídos aos hidrogênios 7 e 8 de estilbenos (FIGURA 7) (KAOUADJI *et al.*, 1986).



FIGURA 7- Esqueleto carbônico dos estilbenos.

Na região de hidrogênios aromáticos, observam-se três sinais que caracterizam um sistema de acoplamento AMX em $\delta_{\rm H}$ 7,14 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,26 (dd, J = 8,1 e 1,5 Hz, 1H) e 6,76 (d, J = 8,1 Hz, 1H), atribuídos aos hidrôgenios de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, que para estilbeno, podem ser assinalados, respectivamente, aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5' de um dos anéis aromáticos, nomeado como anel B.



Ainda na região de aromáticos observa-se um simpleto, integrando dois hidrogênios, em $\delta_{\rm H}$ 6,70, atribuído a dois hidrogênios equivalentes, H-2 e H-6, do outro anel do estilbeno (Anel A).



Foram observados ainda, dois dupletos em $\delta_{\rm H}$ 5,64 e 6,34, (J = 9,9 Hz, 1H) e um simpleto em $\delta_{\rm H}$ 1,45 (6H). Esse conjunto de sinais é característico de um anel 2,2-dimetilpirano, o qual foi definido estar ligado ao anel aromático 1,3,4-trissubstituido com base no padrão de acoplamento observado para este anel.





FIGURA 8- Espectro de RMN ¹H de S1 (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 9- Espectro de RMN ¹H de S1, Expansão (CDCl₃ 300 MHz).

Os sinais observados em $\delta_{\rm H}$ 3,91 (6H) e 3,86 (3H) caracterizam a presença de três metoxilas ligadas a anel aromático, portanto ligadas ao outro anel do estilbeno (anel A).



FIGURA 10- Espectro de RMN ¹H de S1 (Sinais das metoxilas aromáticas).

Todos os acoplamentos citados foram confirmados através da análise do mapa de correlação COSY ¹H x ¹H (Figuras 11 e 12, págs. 93 e 94).



FIGURA 11- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S1 (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 12- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S1, Expansão (CDCl₃, 300 MHz).

A análise do espectro de RMN ¹³C de **S1** obtido a 75 MHz em CDCl₃ (Figuras 13 e 14, págs 95 e 96, Tabela II, pág 101), revelou a presença de 18 sinais, os quais foram atribuídos aos 22 átomos de carbono da estrutura. Respaldados pela análise dos espectros de DEPT (Figura 15, pág 96) e de HETCOR (Figuras 16 e 17, pág 97), foram identificados os seguintes sinais:

* Em $\delta_{\rm C}$ 126,3 e 127,8, atribuídos aos carbonos olefínicos C-7 e C-8, típicos dos estilbenos (KAOUADJI *et al.*, 1986).

* Em $\delta_{\rm C}$ 153,3, 152,7 e 137,5, característicos de carbonos aromáticos oxidados, sendo o primeiro atribuído aos carbonos equivalentes C-3/5, devido apresentar intensidade bem maior que os outros dois. O sinal em $\delta_{\rm C}$ 137,5 foi atribuído ao carbono aromático oxidado C-4 devido apresentar maior blindagem eletrônica em função da vizinhança de duas metoxilas em posição *orto*. Logo o sinal $\delta_{\rm C}$ 152,7 foi atribuído a C-4'.

* Em $\delta_{\rm C}$ 133,4, 129,9 e 121,3, relacionados a três carbonos aromáticos totalmente substituídos. * Em $\delta_{\rm C}$ 127,3, 124,2 e 116,5, atribuídos aos carbonos CH do Anel B 1,3,4-trissubstituido C- 6', C-2' e C-5', respectivamente.

* Em $\delta_{\rm C}$ 103,2, atribuído aos carbonos CH aromáticos equivalentes C-2/6 do anel A.

* Em $\delta_{\rm C}$ 131,1 e 122,1, atribuídos aos dois carbonos CH olefínicos do anel 2,2- dimetilpirano C-3" e C-4", respectivamente.

* Em $\delta_{\rm C}$ 76,5, característico de carbono sp³ oxidado e totalmente substituído.

* Em $\delta_{\rm C}$ 60,9 e 56,0, atribuídos a grupos metoxilas aromáticos. O sinal em $\delta_{\rm C}$ 60,9 é típico de metoxila di-*orto*-substituída, portanto, relacionado a OMe-4 e o sinal em $\delta_{\rm C}$ 56,0, que possui, aproximadamente, o dobro da intensidade do outro sinal, foi atribuído às duas metoxilas equivalentes OMe-3/5.

* Em $\delta_{\rm C}$ 28,0, atribuído às duas metilas do anel 2, 2-dimetilpirano.



FIGURA 13- Espectro de ¹³C de S1 (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 14- Espectro de ¹³C de S1 Expansão (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 15- Espectro de DEPT de S1 (CDCl₃, 75 MHz)



FIGURA 16- Mapa de correlação HETCOR de S1 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 17- Mapa de correlação HETCOR de S1, Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).

A análise do mapa de correlação HMBC de **S1** (Figuras 20 e 21, pág 100) foi importante para confirmar as localizações dos substituintes dos anéis A e B e fazer atribuições, com precisão, dos sinais dos carbonos olefínicos, aromáticos oxidados, aromáticos totalmente substituídos, bem como, dos sinais dos hidrogênios olefínicos H-7 e H-8.

O sinal relativo ao carbono aromático oxidado C-4' foi confirmado em δ c 152,7 com base nas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ observadas entre esse sinal e os sinais relativos a H-4" (δ_{H} 6,34) e H-2' (δ_{H} 7,14).

As correlações ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ 121,3 de um carbono aromático totalmente substituído com os sinais de H-3" ($\delta_{\rm H}$ 5,64) e de H-5' ($\delta_{\rm H}$ 6,76), permitiu atribuir este sinal a C-3'.

A ligação do anel 2, 2-dimetilpirano nas posições 4' e 3' foi confirmada com base nas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ observadas entre os sinais de H-4" (δ_{H} 6,34) e o de C-2' (δ_{C} 124,2), bem como entre os sinais de H-2' (δ_{H} 7,14) e o de C-4" (δ_{C} 122,1).

A atribuição do sinal em $\delta_{\rm C}$ 76,5 para o carbono C-2" do anel 2, 2-dimetilpirano foi confirmada pela correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre esse sinal e o de H-4" ($\delta_{\rm H}$ 6,34), bem como, correlações ${}^{2}J_{\rm C,H}$ entre o sinal em $\delta_{\rm C}$ 76,5 com os sinais de H-3" ($\delta_{\rm H}$ 5,64) e o das 2xMe ligadas ao anel pirano ($\delta_{\rm H}$ 1,45).

A atribuição do sinal de C-1' foi confirmada com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{C} 129,9, de um carbono aromático totalmente substituído, com o sinal de H-5' (δ_{H} 6,76).

A correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre o sinal relativo aos hidrogênios H-2/6 em δ_{H} 6,70 e o sinal em δ_{C} 126,3 permitiu atribuir esse sinal ao carbono C-7, diferenciando portanto do sinal de C-8, o qual foi confirmado em δ_{C} 127,8, respaldado pela correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre esse último e o sinal de H-2' (δ_{H} 7,14). Como os sinais de C-7 e C-8 foram definidos, pode-se fazer as atribuições dos sinais relativos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente, em δ_{H} 6,86 e 6,93, com base nas correlações ${}^{1}J_{C,H}$ observados no mapa de correlação HETCOR.

A atribuição do sinal de C-1 em $\delta_{\rm C}$ 133,4 foi confirmada pela observação de uma correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre esse sinal e o sinal do hidrogênio H-8 ($\delta_{\rm H}$ 6,93).

As atribuições dos sinais dos carbonos C-3/5, bem como a localização das metoxilas aromáticas ligadas a estes carbonos foram confirmadas com a observação da correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{C} 153,3, de carbono aromático oxidado, com o sinal de duas metoxilas aromáticas equivalentes MeO-3/5 (δ_{H} 3,91), bem como, uma correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre este sinal e o de H-2/6 (δ_{H} 6,70).

Observa-se também uma correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{H} 6,70 (H-2/6) com um outro sinal de um carbono aromático oxidado em δ_{C} 137,5 atribuído a C-4, confirmando assim

este sinal para C-4.



FIGURA 18- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação HMBC de S1.

As reuniões dessas análises permitiram concluir que a substância **S1** trata-se da 3,4,5trimetóxi-2",2"-dimetilcromeno(3',4':5",6")-*trans*-estilbeno, que através de levantamento bibliográfico no ScieFinder Scholar e comparação com os dados espectroscópicos publicados, foi identificada como o estilbeno 4-metoxilochocarpeno.



FIGURA 19- Estrutura de S1.



FIGURA 20- Mapa de correlação HMBC de S1 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 21- Mapa de correlação HMBC de S1 Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).

	$\delta_{ m H}({ m multi.},J{ m Hz})$	$\delta_{ m C}$
1	-	133,4
2/6	6,70 (s)	103,2
3/5	-	153,3
4	_	137,5
7	6,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,0)	126,3
8	6,93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,0)	127,8
1'	-	129,9
2'	7,14 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,5)	124,2
3'	_	121,3
4'	-	152,7
5'	6,76 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)	116,5
6'	7,27 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 e 1,5)	127,3
2"	-	76,5
3"	5,64 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,9)	131,1
4"	6,34 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,9)	122,1
2xMe	1,45 (s)	28,0
2xOMe-3/5	3,91 (s)	56,0
OMe-4	3,86 (s)	60,9

TABELA II – Dados de RMN de ¹H e ¹³C para S1 (CDCl₃, 300 e 75 MHz).

3.1.11- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S10.

A substância **S10** (12,3 mg) foi isolada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Encontra-se na forma de cristais amarelos e é solúvel em clorofórmio.

O espectro de massas com ionização por eletrospray (IES-MS) da substância **S10** (Figura 130), apresentou um pico em m/z 407 [M+Na]⁺, compatível com a fórmula molecular C₂₁H₂₀O₇ para **S10**. Esta fórmula molecular foi confirmada pela análise do espectro de massas de alta resolução que exibiu pico observado em m/z 407,1128 (C₂₁H₂₀O₇Na⁺), calculado em m/z 407,1107, com erro de massa em 5,15 ppm.



FIGURA 130 – Espectro de massa de S10.

Ao analisar os sinais de RMN ¹H de **S10** (Figuras 131, 132 e 133, págs 185 e 186 e Tabela XI, pág 194), pode-se observar sinais muito semelhantes com os de **S7**, apresentando apenas pequenas diferenças. Dentre estas, pode-se destacar dois dupletos na região de hidrogênios alifáticos integrando um hidrogênio cada, centrados em $\delta_{\rm H}$ 5,54 e 4,67, com J = 4,5 Hz, característicos de hidrogênios olefínicos com acoplamento *cis*, atribuídos aos hidrogênios 2 e 3 de um diidroflavonol.

Na região de hidrogênios aromáticos, observam-se três sinais que caracterizam um sistema de acoplamento AMX em $\delta_{\rm H}$ 6,98 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,89 (dd, J = 8,1 e 2,0 Hz, 1H) e 6,79 (d, J = 8,1 Hz, 1H), atribuídos aos hidrôgenios de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, assinalados, respectivamente, aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5' do anel B.

Na região de aromáticos também observa-se um simpleto, integrando 1H, em $\delta_{\rm H}$ 5,97, atribuído a um hidrogênio do anel A (H-6 ou H-8).

Foram observados ainda, dois dupletos em $\delta_{\rm H}$ 6,57 e 5,49, com J = 10,0 Hz, integrando 1H cada, e um simpleto em $\delta_{\rm H}$ 1,44, integrando 6H. Esse conjunto de sinais é característico de um anel 2,2-dimetilpirano.

Observamos ainda um sinal em $\delta_{\rm H}$ 3,86 (3H), característico de uma metoxila ligada a anel aromático e um simpleto em $\delta_{\rm H}$ 11,45, característico de hidrogênio de uma hidroxila quelada.







1100KA 155- Espectro de Kiarv 11 de 510-Expansao-2 (CDCI3, 500 MHZ).

Todos os acoplamentos citados foram confirmados através da análise do espectro COSY 1 H x 1 H (Figura 134 e 135, págs. 186 e 187).



FIGURA 134- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S10 (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 135- Mapa de correlação COSY ¹Hx¹H de S10-Expansão (CDCl₃, 300 MHz).

A análise do espectro de RMN ¹³C de **S10** (Figuras 136 e 137, pág 188 e Tabela XI, pág 194), revelou a presença de 20 sinais, os quais foram atribuídos aos 21 átomos de carbono da estrutura. Com base na análise dos espectros de DEPT (Figura 138, pág 189) e de HETCOR (Figura 139, pág 189), estes sinais foram atribuídos conforme listados na Tabela XI (pág. 194).



FIGURA 137- Espectro de ¹³C de S10-Expansão (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 139- Mapa de correlação HETCOR de S10 (CDCl₃, 300X75 MHz).

A reunião dessas análises nos permite atribuir para **S10** quatro possibilidades estruturais (A - D) (Figura 140).



FIGURA 140- Propostas estruturais para S10.

A análise do mapa de correlação HMBC de **S10** (Figuras 141 e 142, pág 192), confirmou as localizações dos substituintes dos anéis aromáticos A e B e também foi importante para fazer atribuições, com precisão, dos sinais dos carbonos aromáticos totalmente substituídos.

O sinal relativo ao carbono aromático oxidado em δ c 145,5 foi confirmado para C-3' com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre esse sinal e o relativo a H-5' (δ_{H} 6,79).

O sinal relativo ao carbono aromático oxidado C-4' foi confirmado em δ c 146,7 com base nas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ observadas entre esse sinal e os relativos a H-2' (δ_{H} 6,98) e H-6' (δ_{H} 6,89).

As estruturas **B** e **D**, que possuem um grupo OH-4', foram descartadas com a localização da metoxila em C-4', confirmada com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre o sinal do grupo OMe ($\delta_{\rm H}$ 3,86) e o sinal relacionado a C-4' ($\delta_{\rm C}$ 146,7). Como foi definida a localização da metoxila aromática no anel B, então o anel 2,2-dimetilpirano só pode estar ligado ao anel A.

A atribuição do sinal de C-1' foi confirmada com base nas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{C} 127,6, de um carbono aromático substituído, com os sinais de H-5' (δ_{H} 6,79) e de H-3 (δ_{H} 4,67), bem como, uma correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre este sinal e o de H-2 (δ_{H} 5,54).

A correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal de H-2 (δ_{H} 5,54) e o sinal de um carbono aromático oxidado, em δ_{C} 161,3, nos permite atribuir este sinal ao carbono C-9. Foi observado também uma correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre este sinal de carbono e do hidrogênio aromático do anel A (δ_{H} 5,97), possibilitando então atribuir este sinal a H-8.

Observou-se ainda uma outra correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre o sinal de H-8 (δ_{H} 5,97) e um sinal de outro carbono aromático oxidado, em δ_{C} 162,8, o qual foi atribuído a C-7. Restando apenas um sinal de carbono aromático oxidado em δ_{C} 157,8, conseqüentemente atribuído a C-5.

A atribuição do sinal em $\delta_{\rm C}$ 103,0 para o carbono C-6 foi respaldada pelas correlações ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre este sinal de carbono aromático substituído com os sinais de H-8 ($\delta_{\rm H}$ 5,97) e de H-3" ($\delta_{\rm H}$ 5,49). Foi observada ainda uma outra correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre o sinal de H-8 ($\delta_{\rm H}$ 5,97) e outro sinal de carbono aromático substituído em $\delta_{\rm C}$ 101,0, atribuído a C-10.

A ligação do anel 2,2-dimetilpirano nas posições 6 e 7, estando este ligado de forma linear ao anel A, foi confirmada pelas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal de H-3" (δ_{H} 5,49) e o sinal atribuído a C-6 (δ_{H} 162,8) e entre o sinal de H-4" (δ_{H} 6,57) e o sinal atribuído a C-7 (δ_{C} 162,8). Eliminando assim, a estrutura **C**.

A atribuição do sinal em $\delta_{\rm C}$ 78,6 para o carbono C-2" do anel 2,2-dimetilpirano foi confirmada pela correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre este sinal com o de H-4" ($\delta_{\rm H}$ 6,57), bem como, correlações ${}^{2}J_{\rm C,H}$ entre o sinal em $\delta_{\rm C}$ 78,6 com os sinais de H-3" ($\delta_{\rm H}$ 5,49) e o do dois grupos Me ligados ao anel 2,2-dimetilpirano ($\delta_{\rm H}$ 1,44).



FIGURA 141- Mapa de correlação HMBC de S10 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 142- Mapa de correlação HMBC de S10-Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 143- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação HMBC de S10.

As reuniões de todas estas informações espectrais permitiram concluir que a substância **S10** trata-se do (2R,3S)-3',5-diidroxi-4`-metóxi-2``,2``-dimetil pirano(2'',3'':7,6)diidroflavonol, caracterizada como uma substância nova, segundo levantamento bibliográfico no ScieFinder Scholar, sendo denominada de **Urucuol D**.



FIGURA 144- Estrutura de S10.

	$\delta_{ m H}$ (mult., J Hz)	$\delta_{ m C}$
2	5,54 (<i>d</i> , <i>J</i> = 4,5)	80,1
3	4,67 (<i>d</i> , <i>J</i> = 4,5)	71,5
4	-	194,1
5	-	157,8
6	-	103,0
7	-	162,8
8	5,97 (s)	96,7
9	-	161,3
10	-	101,0
1'	_	127,6
2'	6,98 (<i>d</i> , <i>J</i> ~ 2,0)	113,7
3'	_	145,5
4'	-	146,7
5'	6,79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)	110,3
6'	6,89 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 e 2,0)	119,2
2"	-	78,6
3"	5,49 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	126,4
4"	6,57 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	114,9
2xMe	1,44 (s)	28,5
OMe-4'	3,86 (s)	55,9
OH-quelada	11,45 (s)	_

TABELA XI - Dados de RMN de ¹H e ¹³C de S10 (CDCl₃, 300 e 75 MHz).

3.1.3- Determinação Estrutural do Estilbeno S2.

A substância S2 (9 mg) foi isolada na forma de cristais amarelos e é solúvel em clorofórmio e em acetona.

Ao analisar os sinais de RMN ¹H de **S2** (Figuras 23 e 24, pág 104 e Tabela III, pág 114), podemos observar sinais similares aos de **S1**, destacando-se os dois dupletos na região de hidrogênios olefínicos em $\delta_{\rm H}$ 7,15 e 6,95 (J = 16,3 Hz, 1H, cada), característicos dos hidrogênios 7 e 8 de estilbenos (KAOUADJI *et al.*, 1986).

Na região de hidrogênios aromáticos, observam-se três sinais que caracterizam um sistema de acoplamento AMX em $\delta_{\rm H}$ 7,33 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,27 (dd, J = 8,1 e 1,8 Hz, 1H) e 6,84 (d, J = 8,1 Hz, 1H), atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5' (Anel B).

Destacam-se algumas diferenças nos espectros de RMN ¹H de **S2** em relação ao de **S1**, tanto no deslocamento químico como no padrão de acoplamento, principalmente com relação aos sinais na região de hidrogênios aromáticos: um tripleto, em $\delta_{\rm H}$ 6,37 (J = 2,1Hz, 1H), relacionado a um hidrogênio que acopla com dois hidrogênios com ambientes químicos semelhantes, os quais exibem um sinal dupleto em $\delta_{\rm H}$ 6,64 (J = 2,1Hz, 2H, cada). Esses dados confirmaram um novo arranjo para o anel A como sendo 1,3,5-trissubstituído. Assim, os sinais em $\delta_{\rm H}$ 6,37 e 6,64 podem ser assinalados, respectivamente, aos hidrogênios H-4 e H-2/6.



Foi observado ainda, um tripleto em $\delta_{\rm H}$ 5,35 (J = 7,5 Hz, 1H), relacionado a um hidrogênio olefinico; um dupleto em $\delta_{\rm H}$ 3,37 (J = 7,5 Hz, 2H, cada), atribuído ao metileno ligado a carbono alílico e dois simpletos em $\delta_{\rm H}$ 1,79 (3H) e 1,80 (3H), relacionados a duas metilas ligadas a Csp². Esse conjunto de sinais é característico de um grupo C-prenil, o qual foi definido estar ligado a um carbono aromático do anel B com base no padrão de acoplamento observado, no espectro de RMN ¹H de **S2**, para os hidrogênios dos anéis A e B, considerando-se ainda que não fosse possível o grupo prenila estar ligado ao anel A, pois exibe um sinal relacionado a dois hidrogênios aromáticos equivalentes (H-2/6), sendo os substituintes das posições 3 e 5, obrigatoriamente iguais.



O sinal observado em $\delta_{\rm H}$ 3,80, integrando seis hidrogênios, caracteriza a presença de duas metoxilas equivalentes ligadas a anel aromático, portanto ligado ao anel A.



Também se observa um sinal simpleto em $\delta_{\rm H}$ 5,61 que pode ser atribuído a um grupo OH fenólico e com base em considerações de biossíntese de estilbenos (Esquema 2, pág 222), pode-se localizar o grupo OH em C-4' e, por conseguinte, o grupo prenila em C-3', sugerindo a seguinte estrutura para o estilbeno **S2** (Figura 22):



FIGURA 22- Estrutura sugerida para S2.



FIGURA 23- Espectro de RMN ¹H de S2 [(CD₃)₂CO, 300 MHz].



Todos os acoplamentos citados no espectro de RMN ¹H de **S2** foram confirmados através da análise do mapa de correlação COSY ¹H x ¹H (Figuras 25 e 26).



FIGURA 25- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S2 [(CD₃)₂CO, 300 MHz].



FIGURA 26- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S2-Expansão [(CD₃)₂CO, 300 MHz].

Os dados espectrais de RMN ¹³C de **S2** (Figuras 27 e 28, pág 106 e 107), também são semelhantes aos de **S1**, observando-se a presença de 17 sinais, os quais foram atribuídos aos 21 átomos de carbono da estrutura. Com base na análise dos espectros de DEPT (Figura 29, pág 107) e de HETCOR (Figuras 30 e 31, pág. 108), foram identificados os sinais de carbono relacionados na Tabela III (pág. 114).



FIGURA 27- Espectro de RMN ¹³C de S2 [(CD₃)₂CO, 75 MHz].


107

FIGURA 28- Espectro de RMN ¹³C de S2-Expansão [(CD₃)₂CO, 75 MHz].





FIGURA 30- Mapa de correlação HETCOR de S2 [(CD₃)₂CO, 300x75 MHz].



FIGURA 31- Mapa de correlação HETCOR de S2-Expansão [(CD₃)₂CO, 300x75 MHz].

A análise do mapa de correlação HMBC de **S2** (Figuras 32, 33, 34 e 35, págs 110 e 111), confirmou as localizações dos substituintes dos anéis aromáticos A e B, bem como o padrão de oxidação da estrutura; também foi importante para fazer atribuições, com precisão, dos sinais dos carbonos aromáticos totalmente substituídos, e dos sinais dos carbonos olefínicos e dos respectivos hidrogênios H-7 e H-8.

O sinal relativo aos carbonos aromáticos oxidados C-3/5 foi confirmado em δ c 162,0 com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre esse sinal e o relativo a OMe-3/5 (δ_{H} 3,80), bem como, uma correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre este sinal e o de H-2/6 (δ_{H} 6,72).

A correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre o sinal relativo aos hidrogênios H-2/6 em δ_{H} 6,72 e o sinal em δ_{C} 126,2 permitiu atribuir esse sinal ao carbono C-7, diferenciando portanto do sinal de C-8, o qual foi confirmado em δ_{C} 130,0. Como os sinais de C-7 e C-8 foram definidos, pode-se fazer as atribuições dos sinais relativos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente, em δ_{H} 6,95 e 7,15, com base nas correlações ${}^{2}J_{C,H}$ observados no mapa de correlações HETCOR destes hidrogênios, H-7 e H-8, com os carbonos C-8 e C-7, respectivamente.

A atribuição do sinal de C-1' foi confirmada com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{C} 129,8, de um carbono aromático totalmente substituído, com o sinal de H-7 (δ_{H} 6,95), bem como, a correlação ${}^{3}J_{C,H}$ deste sinal de carbono com o sinal de H-5' (δ_{H} 6,84).

A atribuição do sinal de C-1 em $\delta_{\rm C}$ 140,9 confirmada pela observação de uma correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre esse sinal e o sinal do hidrogênio H-8 ($\delta_{\rm H}$ 7,15).

A atribuição do sinal em $\delta_{\rm C}$ 132,4 para o carbono C-3" da C-prenila foi confirmada pela correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre esse sinal e o de H-1" ($\delta_{\rm H}$ 3,33), bem como, correlação ${}^{2}J_{\rm C,H}$ entre o sinal em $\delta_{\rm C}$ 132,4 com os sinais das 2xMe características do grupo C-prenila ($\delta_{\rm H}$ 1,72 e 1,73).

A ligação do grupo C-prenila na posição 3' foi confirmada com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre o sinal de H-1" (δ_{H} 3,33) com o do carbono atribuido a C-2' (δ_{C} 128,9), bem como, uma correlação ${}^{3}J_{C,H}$ do hidrogênio H-5' (δ_{H} 6,84) com um sinal de um carbono aromático totalmente substituído em δ_{C} 129,0, atribuído a C-3'.

Observa-se também uma correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{H} 7,26 (H-6') com um sinal de um carbono aromático oxidado em δ_{C} 155,9 atribuído a C-4', bem como, a correlação deste sinal de carbono com sinal atribuído a H-2' (δ_{H} 7,32).



FIGURA 32- Mapa de correlação HMBC de S2 [(CD₃)₂CO, 300x75 MHz].



FIGURA 33- Mapa de correlação HMBC de S2-Expansão [(CD₃)₂CO, 300x75 MHz].



FIGURA 35- Mapa de correlação HMBC de S2-Expansão-3 [(CD₃)₂CO, 300x75 MHz].

A confirmação da presença do grupo hidroxila na posição 4', foi possível com a análise do espectro de HMBC de **S2** obtido em CDCl₃ (Figura 36), no qual observa-se uma correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{H} 5,19, atribuído ao OH, com o sinal de um carbono aromático oxidado em δ_{C} 155,9, assinalado a C-4', bem como, correlações ${}^{3}J_{C,H}$ deste sinal de OH com os sinais de C-5' (δ_{C} 115,9) e de C-3' (δ_{C} 129,0).



FIGURA 36- Mapa de correlação HMBC de S2-Expansão (CDCl₃, 300x75Hz).



FIGURA 37- Correlações ^{2,3} J_{C,H} observadas no mapa de correlação HMBC de S2.

A reunião de todos esses dados permitiu propor para **S2** a estrutura do estilbeno 3,5dimetóxi-4'-hidróxi-3'-prenil-*trans*-estilbeno (Figura 38). Segundo levantamentos bibliográficos realizados no ScieFinder Scholar, **S2** já teve sua estrutura sintetizada, mas é inédita como produto natural (LI *et. al.*, 2006).



FIGURA 38- Estrutura de S2.

	$\delta_{ m H}$ (mult., J Hz)	$\delta_{ m C}$
1	-	140,9
2/6	6,72 (d, J = 2,4)	104,8
3/5	-	162,0
4	6,36(t, J=2,4)	100,0
7	6,95 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,3)	126,2
8	7,15 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,3)	130,0
1'	-	129,8
2'	7,32 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,8)	128,9
3'	-	129,0
4'	_	155,9
5'	6,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)	115,9
6'	7,26 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 e 1,8)	126,1
1"	3,33 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,5)	29,0
2"	5,34 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,5)	123,7
3"	-	132,4
Me-4"	1,72 (s)	25,8
Me-5"	1,73 (s)	17,8
OMe-3/5	3,80 (s)	55,5

TABELA III - Dados de RMN de ¹H e ¹³C de S2 [(CD₃)₂CO, 300 e 75 MHz].

3.1.4- Determinação Estrutural do Estilbeno S3.

A substância S3 (15 mg) foi isolada na forma de cristais amarelos e solúveis em clorofórmio.

Ao analisar os sinais de RMN ¹H de **S3** (Figuras 39 e 40, pág 116 e Tabela IV, pág 125), podemos observar sinais, também, similares aos de **S1** e **S2**:

* Dois dupletos na região de hidrogênios olefínicos em $\delta_{\rm H}$ 7,00 e 6,88 (J = 16,2 Hz, 1H, cada), atribuídos aos hidrogênios 7 e 8 de estilbenos.

* Na região de hidrogênios aromáticos, observa-se um conjunto de sinais semelhantes aos já citados para **S1** e **S2** em $\delta_{\rm H}$ 7,26 (*dd*, *J* = 8,1 e 2,4 Hz, 1H), 7,14 (*d*, *J* = 2,4 Hz, 1H) e 6,77 (*d*, *J* = 8,1 Hz, 1H), atribuídos aos hidrogênios H-6', H-2' e H-5' do anel B.

* Da mesma forma são observados os sinais: tripleto em $\delta_{\rm H}$ 6,38 (J = 2,4Hz, 1H), e o dupleto em $\delta_{\rm H}$ 6,64 (J = 2,4Hz, 2H), os quais são, semelhantemente a **S2**, atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-2/6.

* Foram observados ainda, dois dupletos em $\delta_{\rm H}$ 5,64 e 6,35 (J = 10,0 Hz, 1H) e um simpleto em $\delta_{\rm H}$ 1,44 (1H). Característico de um anel 2,2-dimetilpirano, o qual foi definido estar ligado ao anel B com base no padrão de acoplamento observado, no espectro de RMN ¹H para os hidrogênios deste anel.

* Por fim, observa-se um sinal em $\delta_{\rm H}$ 3,82 (6H), que caracteriza a presença de duas metoxilas equivalentes ligadas ao anel aromático A.



FIGURA 39- Espectro de RMN ¹H de S3 (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 40- Espectro de RMN de ¹H de S3-Expansão (CDCl₃, 300 MHz).



Todos os acoplamentos citados foram confirmados através da análise do mapa de correlação COSY 1 H x 1 H (Figuras 41, 42 e 43, págs 117 e 118).

FIGURA 41- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S3 (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 42- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S3-Expansão (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 43- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S3-Expansão-2 (CDCl₃, 300 MHz).

Os dados espectrais de RMN ¹³C de **S3** (Figuras 44 e 45, pág. 119 e Tabela IV, pág 125), são também semelhantes aos de **S1** e **S2** e revelaram a presença de 17 sinais, os quais foram atribuídos aos 21 átomos de carbono da estrutura. Respaldados pela análise dos espectros de DEPT (Figura 46, pág 120) e de HETCOR (Figuras 47 e 48, págs 120 e 121). Os sinais atribuídos aos carbonos da estrutura estão listados na Tabela IV (pág. 125).



FIGURA 44- Espectro de RMN ¹³C de S3 (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 45- Espectro de RMN ¹³C de S3-Expansão (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 46- Espectro de DEPT de S3 (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 47- Mapa de correlação HETCOR de S3 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 48- Mapa de correlação HETCOR de S3-Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).

A análise do mapa de correlação HMBC de **S3** (Figuras 49, 50 e 51, págs 122 e 123), confirmou as localizações dos substituintes dos anéis aromáticos A e B. Também foi importante para fazer atribuições, com precisão, dos sinais dos carbonos aromáticos totalmente substituídos e dos sinais dos carbonos olefínicos e seus respectivos hidrogênios H-7 e H-8.

O sinal relativo aos carbonos aromáticos oxidados C-3/5 foi confirmado em δ c 160,9 com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre esse sinal e o relativo a OMe-3/5 (δ_{H} 3,82), bem como, uma correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre este sinal e o de H-2/6 (δ_{H} 6,64).

A correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre o sinal relativo aos hidrogênios H-2/6 em δ_{H} 6,64 e o sinal em δ_{C} 126,3 permitiu atribuir esse sinal ao carbono C-7, diferenciando portanto do sinal de C-8, o qual foi confirmado em δ_{C} 128,7. Como os sinais de C-7 e C-8 foram definidos, pode-se fazer as atribuições dos sinais relativos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente, em δ_{H} 6,88 e 7,00, com base nas correlações ${}^{1}J_{C,H}$ observados no mapa de correlação HETCOR.

A atribuição do sinal de C-1' foi confirmada com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{C} 129,9, de um carbono aromático totalmente substituído, com o sinal de H-5' (δ_{H} 6,77).

A atribuição do sinal de C-1 em $\delta_{\rm C}$ 139,6 foi confirmada pela observação de uma correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre esse sinal e o sinal do hidrogênio H-8 ($\delta_{\rm H}$ 7,00).

O sinal relativo ao carbono aromático oxidado C-4' foi confirmado em δ c 152,8 com base nas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ observadas entre esse sinal e os sinais relativos a H-4" (δ_{H} 6,35) e H-2' (δ_{H} 7,14).

As correlações ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{C} 121,2 de um carbono aromático totalmente substituído com, o sinal de H-3" (δ_{H} 5,64), bem como, correlação ${}^{2}J_{C,H}$ deste sinal de carbono com o sinal de H-5' (δ_{H} 6,77), permitiu atribuir este sinal a C-3'.

A ligação do anel 2, 2-dimetilpirano nas posições 4' e 3' foi confirmada com base nas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ observadas entre os sinais de H-4" (δ_{H} 6,35) e o de C-2' (δ_{C} 124,3) e entre os sinais de H-2' (δ_{H} 7,14) e o de C-4" (δ_{C} 122,1), bem como, a correlação já citada anteriormente entre H-3" (δ_{H} 5,64) e o sinal atribuído a C-3' (δ_{C} 121,2).

A atribuição do sinal em $\delta_{\rm C}$ 76,5 para o carbono C-2" do anel 2, 2-dimetilpirano foi confirmada pela correlação ${}^{2}J_{\rm C,H}$ entre este sinal e o das 2xMe ligadas ao anel 2, 2-dimetilpirano ($\delta_{\rm H}$ 1,44).

Observa-se também uma correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{H} 6,35 (H-4") com um sinal de um carbono aromático oxidado em δ_{C} 152,8 atribuído a C-4', bem como, a correlação deste sinal de carbono com sinal atribuído a H-2' (δ_{H} 7,14).



FIGURA 49- Mapa de correlação HMBC de S3 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 50- Mapa de correlação HMBC de S3-Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 51- Mapa de correlação HMBC de S3-Expansão-2 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 52- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação HMBC de S3.

As reuniões dessas análises permitiram concluir que a substância **S3** trata-se da 3,5dimetóxi-2",2"-dimetilcromeno(3',4':5",6")-*trans*-estilbeno, que através de levantamento bibliográfico no ScieFinder Scholar e comparação com os dados da literatura levaram à identificação da estrutura como o lonchocarpeno (KAOUADJI *et al.*, 1986).



FIGURA 53- Estrutura de S3.

	$\delta_{ m H}$ (multi., J Hz)	$\delta_{ m H}$ (KAOUADJI et al., 1986)	$\delta_{ m C}$
1	-	-	139,6
2/6	6,64 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,4)	6,63 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2)	104,2
3/5	-	-	160,9
4	6,38 (t, J = 2,4)	6,37 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2)	99,5
7	6,88 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,2)	6,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,0)	126,3
8	7,00 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,2)	7,03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,0)	128,7
1'	_	_	129,9
2'	7,14 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,4)	7,15 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	124,3
3'	-	_	121,2
4'	_	_	152,8
5'	6,77 (d, J = 8,1)	6,77 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,0)	116,5
6'	7,26 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 e 2,4)	7,26 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,0 e 2,0)	127,5
2"	_	-	76,5
3"	5,64 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	5,65 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	131,1
4"	6,35 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	6,35 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	122,1
2xMe	1,44 (s)	1,44 (s)	28,0
2xOMe-	3,82 (s)	3,82 (s)	55,3
3/5			

TABELA IV - Dados de RMN de ¹H e ¹³C de S3 (CDCl₃, 300 e 75 MHz).

3.1.5- Determinação Estrutural do Estilbeno S4.

A substância **S4** (30 mg), solúvel em clorofórmio, foi isolada na forma de cristais amarelos.

O espectro de massas com ionização por eletrospray (IES-MS) da substância S4 (Figura 54), apresentou um pico em m/z 347 [M+Na]⁺, o que permite sugerir a fórmula molecular C₂₁H₂₄O₃ para S4. Esta fórmula molecular foi confirmada pela análise do espectro de massas de alta resolução que exibiu pico observado em m/z 347,1657 (C₂₁H₂₄O₃Na⁺), calculado em m/z 347,1623, com erro de massa calculado para 9.71 ppm.



FIGURA 54 – Espectro de massa de S4.

Ao analisar os sinais de RMN ¹H de **S4** (Figuras 55, 56 e 57, pág 128 e 129 e Tabela V, pág 138), pode-se observar sinais, similares aos das outras substâncias discutidas anteriormente, portanto se tratando, também, de um estilbeno, o qual exibe os seguintes sinais:

* Dois dupletos na região de hidrogênios olefínicos em $\delta_{\rm H}$ 7,05 e 6,90 (J = 16,0 Hz, 1H cada), relacionado aos hidrogênios 7 e 8 dos estilbenos.

* Na região de hidrogênios aromáticos, observam-se dois sinais em $\delta_{\rm H}$ 7,44 (*d*, *J* = 8,7 Hz, 2H) e 6,91 (*d*, *J* = 8,7 Hz, 2H), atribuídos a dois pares de hidrogênios equivalentes, de um anel aromático 1,4-dissubstituído, sendo que um dos substituintes pode ser um grupo do tipo –OR, o que justificaria os deslocamentos químicos bastantes diferentes para os hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5'. Considerando uma ligação a oxigênio em C-4', isto causa um efeito de ressonância protetor sobre os hidrogênios "*orto*" relacionados (H-3'/5') e conseqüentemente, pode-se atribuir o sinal em região mais

protegida ($\delta_{\rm H}$ 6,91) a H-3'/5' e o sinal em $\delta_{\rm H}$ 7,44 a H-2'/6'.



Similarmente ao padrão de substituição encontrado, para o anel A das substâncias **S2** e **S3**, foi observado, também no espectro de RMN ¹H de **S4**, um tripleto na região de hidrogênio aromático em $\delta_{\rm H}$ 6,38 (J = 2,1 Hz, 1H), o qual acopla com dois hidrogênios com ambientes químicos semelhantes, os quais exibem um dupleto em $\delta_{\rm H}$ 6,65 (J = 2,1 Hz), que integra dois hidrogênios equivalentes. Esses dados confirmam o padrão 1,3,5-trissubstituído para o anel A e os sinais são, respectivamente, atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-2/6.

Foram observados ainda, neste espectro, um tripleto em $\delta_{\rm H}$ 5,51 (J = 6,9 Hz, 1H), um dupleto em $\delta_{\rm H}$ 4,53 (J = 6,9 Hz, 2H) e dois simpletos em $\delta_{\rm H}$ 1,76 (3H) e 1,81 (3H). Esse conjunto de sinais é característico da presença de um grupo O-prenila, visto que o sinal relacionado ao grupo metileno da prenila ($\delta_{\rm H}$ 4,53) exibe deslocamento químico típico de grupo oximetileno.

O grupo O-prenila foi definido estar ligado ao carbono C-4' do anel B, com base no padrão de substituição discutido para este anel.



O sinal observado em $\delta_{\rm H}$ 3,83, integrando seis hidrogênios, caracteriza a presença de duas metoxilas equivalentes, ligadas a anel aromático e que, conseqüentemente, devem estar ligadas aos carbonos 3 e 5 do anel A.



FIGURA 55- Espectro de RMN ¹H de S4 (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 56- Espectro de RMN de ¹H de S4-Expansão (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 57- Espectro de RMN de ¹H de S4-Expansão-2 (CDCl₃, 300 MHz).

Todos os acoplamentos citados foram confirmados através da análise do mapa de correlação COSY 1 H x 1 H (Figuras 58 e 59, págs 129 e 130).



FIGURA 58- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S4 (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 59- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S4-Expansão (CDCl₃, 300 MHz).

Os dados espectrais de RMN ¹³C de **S4** (Figuras 60 e 61, pág 131 e Tabela V, pág 138), também são semelhantes aos das substâncias já discutidas e revelaram a presença de 16 sinais, os quais foram atribuídos aos 21 átomos de carbono da estrutura. Com base na análise dos espectros de DEPT (Figura 62, pág 132) e de HETCOR (Figuras 63 e 64, págs 132 e 133). Os sinais de carbono da estrutura estão listados na Tabela V (pág. 138).



FIGURA 60- Espectro de RMN ¹³C de S4 (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 61- Espectro de RMN ¹³C de S4-Expansão (CDCl₃, 75 MHz).





FIGURA 63- Mapa de correlação HETCOR de S4 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 64- Mapa de correlação HETCOR de S4-Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).

A análise do mapa de correlação HMBC de **S4** (Figuras 65, 66, 67 68 e 69, págs 134 a 136), confirmou as localizações dos substituintes dos anéis aromáticos A e B e também foi importante para fazer atribuições, com precisão, dos sinais dos carbonos aromáticos totalmente substituídos e dos sinais dos carbonos olefínicos e seus respectivos hidrogênios H-7 e H-8.

A correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre o sinal relativo aos hidrogênios H-2/6 em δ_{H} 6,65 e o sinal em δ_{C} 126,4 permitiu atribuir esse sinal a C-7, diferenciando-se portanto, do sinal de C-8, o qual foi confirmado em δ_{C} 128,8, respaldado pela correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre esse último sinal e o sinal relativo aos hidrogênios H-2'/6' em δ_{H} 7,44. Como os sinais referentes a C-7 e C-8 foram definidos, pode-se fazer as atribuições dos sinais relativos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente, em δ_{H} 6,65 e 7,05, com base nas correlações ${}^{1}J_{C,H}$ observados no mapa de correlação HETCOR.

As atribuições dos sinais de H-7 e H-8 foram importantes para confirmação de outros sinais, tais como o sinal atribuído a C-2'/6' ($\delta_{\rm C}$ 127,7) com base na correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre esse sinal e o relativo a H-8 ($\delta_{\rm H}$ 7,05), e ainda a atribuição do sinal em $\delta_{\rm C}$ 129,8 a C-1' foi confirmada com base na correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre esse sinal, que é típico de carbono aromático totalmente substituído, com o sinal de H-7 ($\delta_{\rm H}$ 6,65). Por outro lado, a atribuição do sinal em $\delta_{\rm C}$ 139,7 a C-1 foi confirmada pela observação de uma

correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre esse sinal e o sinal do hidrogênio H-8 (δ_{H} 7,05).

O sinal relativo ao carbono aromático oxidado C-4' foi confirmado em δ c 158,6 com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre esse sinal e o relativo a H-2'/6' ($\delta_{\rm H}$ 7,44).

A correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{C} 138,3, de um carbono olefínico totalmente substituído, com o sinal de H-1" (δ_{H} 4,53), bem como, correlações ${}^{2}J_{C,H}$ deste sinal de carbono com os sinais das metilas Me-4" e Me-5" (δ_{H} 1,81 e 1,76), nos permitiu atribuir este sinal a C-3".

O sinal relativo aos carbonos aromáticos oxidados C-3/5 foi confirmado em δ c 160,9 com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre esse sinal e o relativo a OMe-3/5 (δ_{H} 3,83).

A confirmação da localização das metoxilas no anel A, bem como, o padrão dos sinais observados para os hidrogênios dos anéis aromáticos nos permitiu confirmar a ligação do grupo O-prenil na posição 4' do anel B.



FIGURA 65- Mapa de correlação HMBC de S4 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 66- Mapa de correlação HMBC de S4-Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 67- Mapa de correlação HMBC de S4-Expansão-2 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 68- Mapa de correlação HMBC de S4-Expansão-3 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 69- Mapa de correlação HMBC de S4-Expansão- 4 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 70- Correlações ^{2,3}J_{C,H} observadas no mapa de correlação HMBC de S4.

Estas análises em conjunto permitiram propor para **S4** a estrutura do estilbeno 3,5-dimetóxi-4'-*O*-prenil-*trans*-estilbeno (Figura 71). De acordo com levantamento bibliográfico realizado no ScieFinder Scholar, a substância **S4** é inédita.



FIGURA 71- Estrutura de S4.

	$\delta_{ m H}$ (mult., J Hz)	$\delta_{ m C}$
1	_	139,7
2/6	6,65 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1)	104,3
3/5	_	160,9
4	6,38 (<i>t</i> , <i>J</i> = 2,1)	99,5
7	6,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,0)	126,4
8	7,05 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,0)	128,8
1'	_	129,8
2'/6'	7,44 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7)	127,7
3'/5'	6,91 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7)	114,8
4'	-	158,6
1"	4,53 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,9)	64,7
2"	5,51 (<i>t</i> , <i>J</i> = 6,9)	119,5
3"	_	138,3
Me-4"	1,81 (s)	25,8
Me-5"	1,76 (<i>s</i>)	18,2
2xOMe-3/5	3,83 (s)	55,3

TABELA V - Dados de RMN de ¹H e ¹³C de S4 (CDCl₃, 300 e 75 MHz).

3.1.6- Determinação Estrutural do Estilbeno S5.

A substância **S5** (3 mg) foi isolada na forma de cristais amorfos amarelos e é solúvel em clorofórmio.

Ao analisar os sinais de RMN ¹H de **S5** (Figuras 73 e 74, pág 141 e Tabela VI, pág 140), podemos observar sinais similares aos de **S1**, **S2**, **S3** e **S4**, destacando-se os dois dupletos em $\delta_{\rm H}$ 7,04 e 6,90 (J = 16,0 Hz, 1H cada), relacionados aos hidrogênios olefínicos, em acoplamento *trans*, H-7 e H-8, confirmando, também, tratar-se de uma substância da classe dos estilbenos.

Na região de hidrogênios aromáticos, observam-se dois dupletos relacionados a dois hidrogênios que acoplam entre si, com uma constante *orto*, integrando um hidrogênio cada, em $\delta_{\rm H}$ 7,44 e 6,89 (J = 8,7 Hz), atribuídos a dois pares de hidrogênios equivalentes de um anel aromático 1,4-dissubstituído. Similarmente a **S4**, a posição C-4' do anel B deve estar ligada a átomo de oxigênio, justificando, assim, a grande diferença de deslocamento químico para os hidrogênios mencionados, sendo o sinal de menor valor ($\delta_{\rm H}$ 6,89) atribuído a H-3'/5', em função do efeito de ressonância protetor do oxigênio em posição *orto*, logo o sinal em $\delta_{\rm H}$ 7,44 é assinalado a H-2'/6'.

Ainda na região de hidrogênios aromáticos foram observados dois sinais: um tripleto $\delta_{\rm H}$ 6,37 ($J = 2,1{\rm Hz}$), integrando um hidrogênio, o qual acopla com dois hidrogênios com ambientes químicos semelhantes e um dupleto em $\delta_{\rm H}$ 6,65 ($J = 2,1{\rm Hz}$), que integra dois hidrogênios equivalentes. Estes dados confirmaram o arranjo para o anel aromático A como sendo 1,3,5-trissubstituído, e permitem assinalar esses deslocamentos químicos, respectivamente, aos hidrogênios H-4 e H-2/6 do anel A.

Foi observado, ainda, um sinal em $\delta_{\rm H}$ 3,83, integrando seis hidrogênios, caracterizando a presença de duas metoxilas ligadas a anel aromático, portanto ligadas ao anel A.

A junção de todos esses dados e ainda a comparação com os dados da literatura (GAO *et al.*, 2006), indicam para **S5** a estrutura do estilbeno 3,5-dimetóxi-4'-hidróxi-*trans*-estilbeno, com fórmula estrutural abaixo (Figura 72, pág 140).



FIGURA 72- Estrutura de S5.

TABELA VI - Dados de RMN ¹H de S5 (CDCl₃, 300 MHz).

	$\delta_{ m H}$ (multi., J Hz)	$\delta_{\rm H}$ Lit. (GAO <i>et al.</i> , 2006)
1	-	_
2/6	6,65 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1)	6,65 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)
3/5	-	_
4	6,37(t, J=2,1)	6,68 (<i>t</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)
7	6,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,0)	6,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,5 Hz)
8	7,04 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,0)	6,99 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,5 Hz)
1'	-	_
2'/6'	7,44 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7)	7,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)
3'/5'	6,89 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7)	6,81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)
4'	_	_
2xOMe-3/5	3,83 (s)	3,82 (s)



FIGURA 74- Espectro de RMN de ¹H de S5-Expansão (CDCl₃, 300 MHz).

3.1.7- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S6.

A substância **S6** (28 mg) foi isolada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, na forma de cristais amarelos e solúvel em clorofórmio.

O espectro de massas com ionização por eletrospray (IES-MS) da substância **S6** (Figura 75), apresentou um pico em m/z 421 [M+Na]⁺, compatível com a fórmula molecular C₂₂H₂₂O₇ para **S6**. Esta fórmula molecular foi confirmada pela análise do espectro de massas de alta resolução que exibiu pico observado em m/z 421,1285 (C₂₂H₂₂O₇Na⁺), calculado em m/z 421,1263, com valor de erro em massa de 5,22 ppm.



FIGURA 75 – Espectro de massa de S6.

No espectro de RMN ¹H de **S6** (Figuras 76 e 77, págs 143 e 144 e Tabela VII, pág 151), foram observados sinais em várias regiões do espectro, caracterizando a presença de vários grupos funcionais:

Na região alifática, observam-se dois dupletos integrando para um hidrogênio cada, com J=12 Hz, centrados em $\delta_{\rm H}$ 4,93 e 4,42, respectivamente, os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-3, com estereoquímica *trans*, característicos de Anel C do esqueleto de um diidroflavonol (HARBONE *et al.*, 1975).

Na região de hidrogênios aromáticos, observam-se três sinais em $\delta_{\rm H}$ 7,14 (*d*, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,02 (*dd*, *J* = 8,1 e 2,1 Hz, 1H) e 6,90 (*d*, *J* = 8,1 Hz, 1H), que caracterizam um sistema de acoplamento AMX, típicos de anel aromático 1,3,4-trissubstituído, comumente relacionado ao anel B, além de um simpleto centrado em $\delta_{\rm H}$ 6,21, integrando para um hidrogênio, que pode estar relacionado com o hidrogênio H-8 de um anel pentassubstituído, típico do anel A, pois a outra possibilidade seria atribuir este sinal a H-5, o qual exibiria deslocamento químico
em aproximadamente 8,0 ppm (SILVA et. al., 2007).

Foram observados ainda, dois dupletos em $\delta_{\rm H}$ 5,61 e 6,60, com J = 10,2 Hz (1H cada), e um simpleto em $\delta_{\rm H}$ 1,44, (6H). Esse conjunto de sinais é característico de um anel 2,2dimetilpirano.

Observam-se ainda dois sinais em $\delta_{\rm H}$ 3,90 (3H) e 3,88 (3H), que caracterizam a presença de duas metoxilas ligadas a anel aromático.

Os acoplamentos que ocorrem entre os hidrogênios citados acima foram confirmados através das correlações exibidas no espectro de COSY ¹H x ¹H de **S6** (Figura 78, pág 144).



FIGURA 76- Espectro de RMN ¹H de S6 (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 77- Espectro de RMN ¹H de S6 - Expansão (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 78- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S6 (CDCl₃, 300 MHz).

A análise do espectro de RMN ¹³C de **S6** (Figuras 79 e 80, pág 146 e Tabela VII, pág 151), revelou a presença de 21 sinais, que tiveram seu padrão de hidrogenação definido através da análise do espectro de DEPT (Figura 81, pág 147). A avaliação conjunta desses espectros, auxiliada ainda pelos sinais observados no mapa de correlação HETCOR (Figura 82, pág 147) permitiu atribuir 22 átomos de carbono a estrutura. Estes sinais são:

* Em $\delta_{\rm C}$ 82,8 e 72,9 atribuídos aos carbonos alifáticos e oxidados C-2 e C-3, respectivamente, característicos do anel C de diidroflavonóis (HARBONE *et al.*, 1975).

* Em $\delta_{\rm C}$ 190,8 característico de carbono carbonílico, atribuído ao carbono C-4.

* Em $\delta_{\rm C}$ 163,7, 161,3, 156,8, 147,2 e 145,7, característicos de carbonos aromáticos oxidados.

* Em $\delta_{\rm C}$ 129,5, 110,2 e 106,3, atribuídos a três carbonos aromáticos totalmente substituídos.

* Em $\delta_{\rm C}$ 119,7, 113,6 e 110,5, atribuídos aos carbonos CH do anel B C-6', C-2' e C-5', respectivamente.

* Em $\delta_{\rm C}$ 101,8, atribuído ao carbono CH aromático do anel A.

* Em $\delta_{\rm C}$ 129,0 e 115,6, atribuídos aos dois carbonos CH olefínicos do anel 2,2dimetilpirano, C-3" e C-4", respectivamente.

* Em $\delta_{\rm C}$ 78,1, característico de carbono sp³ oxidado e totalmente substituído.

* Em $\delta_{\rm C}$ 62,6 e 56,0, atribuídos a grupos metoxilas aromáticos. O sinal em $\delta_{\rm C}$ 60,9 é típico de metoxila *di-orto-substituída* (AGRAWAL & RASTOG, 1981).

* Um sinal de CH₃ em δ 28,4 atribuído a duas metilas, característico de metilas do anel 2,2-dimetilpirano.



FIGURA 80- Espectro de ¹³C de S6 - Expansão (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 81- Espectro de DEPT de S6 (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 82- Mapa de correlação HETCOR de S6 (CDCl₃, 300x75 MHz).

Com base nos dados espectrais discutidos e ainda levando-se em consideração a rota biossintética dos flavonóides (Esquema 3, págs 226 e 227), permitem propor para **S6** três possibilidades estruturais (**A-C**) (Figura 83).



FIGURA 83- Estruturas possíveis para o diidroflavonol S6.

A elucidação final da estrutura de **S6** foi obtida, principalmente, através das correlações observadas no mapa de correlação HMBC de **S6** (Figuras 84 e 85, pág 149) discutidas a seguir.

A estrutura **C**, que possui um grupo OH-6, foi descartada em função das correlações ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{H} 6,21 (H-8) e os sinais relativos a dois carbonos aromáticos não oxidados e totalmente substituídos em δ_{C} 106,3 e 110,8, atribuídos a C-6 e C-10. Sendo que o sinal em δ_{C} 106,3 foi atribuído a C-6 devido à correlação existente entre esse sinal de carbono e o sinal de H-3^{\circ} (δ_{H} 5,62), desta forma o sinal em δ_{C} 110,8, foi atribuído a C-10.

A estrutura **B** pode ser eliminada com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre o sinal *dd* em δ_{H} 6,21 (H-6[°]) com o sinal de carbono aromático oxidado em δ_{C} 147,2, verificando-se que esse último também correlaciona (${}^{3}J_{C,H}$) com o sinal singleto atribuído a um grupo OMe em δ_{H} 3,88, o que indica que na posição 4[°] está presente um grupo OMe e não OH.

Os deslocamentos químicos dos outros carbonos aromáticos oxidados, bem como dos não oxidados e totalmente substituídos foram definidos com base nas correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ exibidas pelo espectro de HMBC, como esquematizado na figura 86 (pág 150).



FIGURA 84- Mapa de correlação HMBC de S6 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 85- Mapa de correlação HMBC de S6-Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 86- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação HMBC de S6.

A reunião de todos os dados discutidos anteriormente levou à determinação da estrutura de **S6** como sendo a (2R,3R)-3`-hidroxi-5,4`-dimetoxi-2``,2``-dimetilpirano[2``,3``:7,6]diidroflavonol, denominado **urucuol B**, e que foi identificada como uma substância inédita, baseada em levantamento bibliográfico realizado no Scientific Scohlar.



FIGURA 87- Estrutura de S6.

	$\delta_{ m H}$ (mult., J Hz)	$\delta_{ m C}$
2	4,93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,0)	82,8
3	4,42 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,0)	72,9
4	-	190,8
5	-	156,8
6	-	110,2
7	-	161,3
8	6,20 (s)	101,8
9	-	163,7
10	-	106,3
1'	-	129,5
2'	7,14 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1)	113,6
3'	-	145,9
	_	147,3
5'	6,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)	110,5
6'	7,02 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 e 2,1)	119,7
2"	-	78,1
3"	5,61 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,2)	129,0
4"	6,60 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,2)	115,6
2xMe	1,44 (s)	28,4
OMe-4'	3,90 (s)	56,0
OMe-5	3,88 (s)	62,6

TABELA VII - Dados de RMN de ¹H e ¹³C para S6 (CDCl₃, 300 e 75 MHz).

3.1.8- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S7.

A substância **S7** (20 mg) foi isolada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, como cristais amarelos e é solúvel em clorofórmio.

O espectro de massas com ionização por eletrospray (IES-MS) da substância **S7** (Figura 88), apresentou um pico em m/z 407 [M+Na]⁺, compatível com a fórmula molecular C₂₁H₂₀O₇. Esta fórmula molecular foi confirmada pela análise do espectro de massas de alta resolução que exibiu pico observado em m/z 407,1126 (C₂₁H₂₀O₇Na⁺), calculado em m/z 407,1107, com erro de massa em 4,67 ppm.



FIGURA 88 - Espectro de massa de S7.

Ao analisar os sinais de RMN ¹H de **S7** (Figuras 89, 90 e 91, págs 153 e 154 e Tabela VIII, pág 163), podemos observar sinais similares aos de **S6**, destacando-se os dois dupletos na região de hidrogênios alifáticos, integrando para um hidrogênio cada, centrados em $\delta_{\rm H}$ 4,96 e 4,51 com J = 12,0 Hz, característicos de hidrogênios com acoplamento *trans*, atribuídos aos hidrogênios 2 e 3 de um diidroflavonol.

Na região de hidrogênios aromáticos, observam-se também três sinais que caracterizam um sistema de acoplamento AMX em $\delta_{\rm H}$ 7,13 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,02 (dd, J = 8,1 e 1,8 Hz, 1H) e 6,91 (d, J = 8,1 Hz, 1H), que podem ser atribuídos aos hidrogênios de um sistema aromático 1,3,4-trissubstituído característicos do anel B de um diidroflavonóide. Observa-se ainda um simpleto, integrando um hidrogênio, em $\delta_{\rm H}$ 5,96, atribuído a um hidrogênio do anel A, podendo estar relacionado à H-6 ou H-8.

Foram observados, dois dupletos em $\delta_{\rm H}$ 6,62 e 5,52, com J = 10,2 Hz, integrando um hidrogênio cada, e um simpleto em $\delta_{\rm H}$ 1,44, integrando para seis hidrogênios, esse conjunto de sinais é característico de um anel 2,2-dimetilpirano.

Verifica-se um sinal em $\delta_{\rm H}$ 3,92 (3H), característico de uma metoxila ligada a anel aromático e um simpleto em $\delta_{\rm H}$ 11,45, característico de hidrogênio de uma hidroxila quelada. Todos os acoplamentos de hidrogênios mencionados puderam ser confirmados através da análise do espectro de correlação homonuclear COSY ¹Hx¹H (Figura 92, pág 154).



FIGURA 89- Espectro de RMN ¹H de S7 (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 90- Espectro de RMN ¹H de S7 – Expansão (CDCl₃, 300 MHz).







FIGURA 92- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S7 (CDCl₃, 300 MHz).

154

A análise do espectro de RMN ¹³C de **S7**, obtido a 75 MHz em CDCl₃ (Figuras 93 e 94, págs. 155 e 156 e Tabela VIII, pág 163), revelou a presença de 20 sinais, os quais foram atribuídos aos 21 átomos de carbono da estrutura. Atribuições estas confirmadas pela análise dos espectros de DEPT (Figura 95, pág 156) e do mapa de correlação HETCOR (Figura 96, pág 157). Estes sinais estão listados na Tabela VIII (pág. 163).







FIGURA 94- Espectro de ¹³C de S7 – Expansão (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 95- Espectro de DEPT de S7 (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 96- Mapa de correlação HETCOR de S7 (CDCl₃, 300x75 MHz).

A reunião de todos os dados nos permite atribuir cinco possibilidades (**A-E**), levando em consideração tanto a disposição dos grupos, como o padrão de oxidação observado para os anéis A e B, principalmente em relação à localização do anel 2,2-dimetilpirano (Figura 97, pág 158).



FIGURA 97 - Estruturas possíveis para o diidroflavonol S7.

A análise do mapa de correlação HMBC de **S7** (Figuras 98, 99 e 100, págs 160 e 161), permitiu confirmar as posições dos grupos substituintes dos anéis aromáticos e os deslocamentos químicos, principalmente, dos carbonos aromáticos oxidados e os totalmente substituídos não oxidados.

Foram observados no mapa de correlação HMBC (Figura 98, pág 160), duas correlações a ${}^{3}J_{C,H}$, para o sinal de OH-5 (δ_{H} 11,45), com dois sinais típicos e confirmados por DEPT, de carbonos aromáticos totalmente substituídos e não oxidados em δ_{C} 104,3 e 100,5, portanto atribuídos aos carbonos C-6 e C-10 do anel A.

Essas correlações permitiram localizar o anel 2,2-dimetilpirano ligado ao anel A, fundido nas posições 6 e 7, bem como, eliminar as possibilidades estruturais **C**, **D** e **E** para a substância **S7**.

A definição do sinal em $\delta_{\rm C}$ 104,3 para o carbono C-6 se deu com base na correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ observada entre esse sinal e o relacionado a H-3^{\(\circ)} ($\delta_{\rm H}$ 5,52), logo o outro sinal de carbono aromático totalmente substituído e não oxidado em $\delta_{\rm C}$ 100,5 foi atribuído a C-10.

A confirmação de não substituição da posição 8, no anel aromático A, foi obtida pelas seguintes correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ no espectro de HMBC: duas correlações ${}^{2}J_{C,H}$ do singleto em δ_H 5,96 (H-8) com dois carbonos aromáticos oxidados, em δ_C 162,3 e 162,9, portanto relacionados aos carbonos C-7 e C9, bem como duas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ do sinal de H-8 com os dois carbonos aromáticos totalmente substituídos e não oxidados C-6 (δ_C 104,3) e C-10 (δ_C 100,5).

Como não foi observada uma correlação ${}^{3}J_{C,H}$ esperada entre o sinal relativo a H-4^{\\} (δ_{H} 6,62) e o sinal relativo a C-7 (δ_{C} 162,3 ou 162,9), não foi possível definir os sinais de C-7 e de C-9, permanecendo como permutáveis.

O sinal em $\delta_{\rm C}$ 78,6 foi confirmado para C-2^{\lefty} devido às correlações ²J_{C,H} entre esse sinal e os sinais relativos aos hidrogênios H-3^{\lefty} ($\delta_{\rm H}$ 5,52), H-4^{\lefty} ($\delta_{\rm H}$ 6,62) e aos hidrogênios das duas metilas do anel pirano ($\delta_{\rm H}$ 1,44).

A estrutura **B** foi eliminada como possibilidade estrutural para **S7**, com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada no mapa de contornos HMBC, entre o sinal duplo dubleto atribuído a H-6° (δ_{H} 7,02) e o sinal relativo ao carbono aromático oxidado C-4° (δ_{C} 147,4), visto que este também correlaciona com o sinal referente aos hidrogênios OMe em δ_{H} 3,92, fato este que define a localização do OMe na posição C-4°, consequentemente, a posição C-3° está substituída por grupo OH, resultando em um anel B 1,3,4-trissubstituído.

Outras correlações foram verificadas mapa de correlação HMBC para confirmação estrutural de **S7**. Uma entre o sinal relativo a H-2` ($\delta_{\rm H}$ 7,14) e os sinais em $\delta_{\rm C}$ 145,8 e 147,4, o último já atribuído a C-4`, portanto, o sinal em $\delta_{\rm C}$ 145,8 pode ser atribuído ao carbono aromático oxidado C-3`. Desta forma, restando apenas o sinal de carbono aromático oxidado em $\delta_{\rm C}$ 157,7 que deve ser atribuído a C-5.

Observa-se ainda correlações entre os sinais referentes aos hidrogênios H-5` ($\delta_{\rm H}$ 6,91) e H-2 ($\delta_{\rm H}$ 4,96) com o sinal típico de carbono aromático não hidrogenado e não oxidado em $\delta_{\rm C}$ 129,1, permitindo assim, atribuir este sinal a C-1`.



FIGURA 98- Mapa de correlação HMBC de S7 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 99- Mapa de correlação HMBC de S7 – Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 100- Mapa de correlação HMBC de S7 – Expansão-2(CDCl₃, 300x75 MHz).

Um esquema com todas as correlações observadas no mapa de contornos HMBC estão representadas por setas na figura 101.



FIGURA 101- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação HMBC de S7.

As reuniões de todas estas informações espectrais permitiram concluir que a substância **S7** trata-se do (2R,3R)-3'-hidroxi-5,4`-dimetoxi-2``,2``-dimetil pirano[2``,3``:7,6]diidroflavonol, denominada de **urucuol A** e caracterizada como uma substância nova, segundo levantamento bibliográfico no ScieFinder Scholar.



FIGURA 102- Estrutura de S7.

	$\delta_{ m H}$ (mult., J Hz)	$\delta_{ m C}$
2	4,96 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,0)	83,1
3	4,51 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,0)	72,3
4	-	195,9
5	-	157,7
6	-	104,3
7	-	162,3
8	5,96 (s)	96,7
9	-	162,9
10	-	100,5
1'	-	129,1
2'	7,13 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,8)	113,5
3'	-	145,8
4'	-	147,4
5'	6,91 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)	110,5
6'	7,02 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 e 1,8)	119,7
2"	-	78,6
3"	5,52 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,2)	126,6
4"	6,62 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,2)	114,9
2xMe	1,44 (s)	28,4
OMe-4'	3,92 (s)	55,9
OH-quelada	11,45 (s)	_

TABELA VIII - Dados de RMN de ¹H e ¹³C para S7 (CDCl₃, 300 e 75 MHz).

3.1.9- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S8.

A substância **S8** (28 mg), assim como as substâncias **S6** e **S7**, foi isolada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, como um cristal amarelo e solúvel em clorofórmio.

O espectro de massas com ionização por eletrospray (IES-MS) da substância **S8** (Figura 103), apresentou um pico em m/z 435 [M+Na]⁺, o que permite sugerir a fórmula molecular C₂₃H₂₄O₇ para **S8**. Esta fórmula molecular foi confirmada pela análise do espectro de massas de alta resolução que exibiu pico observado em m/z 435,1440 (C₂₃H₂₄O₇Na⁺), calculado em m/z 435,1420, com erro de calculo de massa em 4,59 ppm.



FIGURA 103 – Espectro de massa de S8.

Ao analisar os sinais de RMN ¹H de **S8** (Figuras 104 e 105, pág 165 e Tabela IX, pág 172), podemos observar sinais similares aos de **S6** e **S7**, destacando-se os dois dupletos na região de hidrogênios alifáticos integrando um hidrogênio cada, centrados, em $\delta_{\rm H}$ 4,97 e 4,46 com J = 12,0 Hz, característicos de hidrogênios olefínicos em acoplamento *trans*, atribuídos aos hidrogênios 2 e 3 do anel C de diidroflavonol. Verifica-se também, os mesmos sinais para a região aromática, tanto para o anel 1,3,4-trissubstituído, característico do anel B, e um simpleto centrado em $\delta_{\rm H}$ 6,21, integrando para um hidrogênio, que pode estar relacionado com o hidrogênio H-8 ou H-6 de um anel pentassubstituído (anel A), pois a outra possibilidade seria este sinal ser atribuído a H-5, porém apareceria em aproximadamente 8,0 ppm (SILVA *et. al.*, 2007).

Além do conjunto de sinais característicos do anel 2,2-dimetilcromeno, observou-se a presença de três sinais em $\delta_{\rm H}$ 3,92, 3,90 e 3,89, integrando três hidrogênios cada, característicos de metoxilas ligadas a anel aromático.





O espectro de COSY 1 H x 1 H de **S8** (Figura 106) confirma todos os acoplamentos citados anteriormente.



FIGURA 106- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S8 (CDCl₃, 300 MHz).

A análise do espectro de RMN ¹³C de **S8** obtido a 75 MHz, em CDCl₃ (Figura 107, pág 167 e Tabela IX, pág 172), revelou a presença de 22 sinais, os quais foram atribuídos aos 23 átomos de carbono da estrutura, respaldados pela análise dos espectros de DEPT (Figura 108, pág 167) e de HETCOR (Figura 109, pág 168). Estes sinais estão listados na Tabela IX (pág. 172).





FIGURA 109- Mapa de correlação HETCOR de S8 (CDCl₃, 300x75 MHz).

Com base no conjunto de dados discutidos para a substância **S8**, pode-se propor para essa substância, duas possibilidades estruturais (**A** e **B**) (Figura 110).



FIGURA 110 - Estruturas possíveis para o diidroflavonol S8.

Dentre as duas possibilidades estruturais (**A** e **B**) para **S8**, foi definida a estrutura **A**, com base nas considerações, discutidas a seguir, a respeito das correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação HMBC (Figuras 111, 112 e 113, págs 169 e 170). Correlações ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal dubleto atribuído a H-4^{\circ} (δ_{H} 6,61) com os sinais de carbono em δ_{C} 156,8 e 161,3,

os quais são típicos de carbonos aromáticos oxidados e, portanto, somente podem ser atribuídos aos carbonos C-5 e C-7 da estrutura **A**, visto que na estrutura **B**, somente há uma correlação possível do sinal de H-4[°] com um carbono aromático oxidado.

A fixação do anel pirano ligado às posições 6 e 7, bem como de um grupo OMe em C-5, é confirmada pela observação das correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ entre o sinal do OMe-5 (δ_H 3,89, sinal definido como de um grupo OMe di-*orto*-substituído) com o sinal do carbono C-5 (δ_C 156,8), bem como, do sinal relativo ao hidrogênio isolado do anel A (δ_H 6,23) com dois sinais de carbonos aromáticos oxidados, em δ_C 161,3 e 163,3, os quais puderam ser atribuídos a C-7 e C-9, respectivamente, visto que, como já mencionado, o sinal em δ_C 161,3 também correlaciona com o sinal de H-4^{**}. Esses dados, também permitem atribuir o sinal singleto em δ_H 6,23 a H-8.

Os assinalamentos dos deslocamentos químicos relativos aos sinais de carbonos aromáticos oxidados C-4` e C-3`, foram feitos com base nas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ observadas no espectro de HMBC, entre o sinal de H-6`(δ_{H} 7,09) com o sinal de carbono aromático oxidado C-4` (δ_{C} 149,7), e ainda, desse sinal de carbono com o sinal dos hidrogênios OMe-4` (δ_{H} 3,90). Também se observa correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal de H-5` (δ_{H} 6,93) com o sinal de carbono aromático oxidado C-3` (δ_{C} 149,1), que por sua vez exibiu correlação ${}^{3}J_{C,H}$ com o sinal relativo ao grupo OMe-3` (δ_{H} 3,92).



FIGURA 111- Mapa de correlação HMBC de S8 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 112- Mapa de correlação HMBC de S8 – Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 113- Mapa de correlação HMBC de S8 – Expansão-2 (CDCl₃, 300x75 MHz).

Os outros deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos oxidados, bem como dos não oxidados e totalmente substituídos de **S8** também foram definidos com base nas correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ exibidas pelo espectro de HMBC, como esquematizado na Figura 114.



FIGURA 114- Correlações ^{2,3}J_{C,H} observadas no mapa de correlação HMBC de S8.

A reunião de todas estas informações espectrais permitiu concluir que a substância S_8 trata-se do (2*R*,3*R*)-5,3`,4`-trimetoxi-2``,2``-dimetilpirano[2``,3``:7,6]diidroflavonol, denominado **urucuol C**, a qual foi estabelecida como uma substância nova, segundo pesquisa no Scinfinder Scholar.



FIGURA 115- Estrutura de S8.

	$\delta_{ m H}$ (mult., J Hz)	$\delta_{ m C}$
2	4,97 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,0)	83,1
3	4,46 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,0)	72,3
4	-	195,9
5	-	157,7
6	_	104,3
7	_	162,3
8	6,23 (s)	96,7
9	_	162,9
10	-	100,5
1'	-	129,1
2'	7,07 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,4)	113,5
3'	-	145,8
4'	-	147,4
5'	6,93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7)	110,5
6'	7,09 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,7 e 2,4)	119,7
2"	_	78,6
3"	5,62 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	126,6
4"	6,61 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	114,9
2xMe	1,44 (s)	28,3
OMe-3'	3,92 (s)	55,8
OMe-4'	3,90 (s)	55,9
OMe-5	3,89 (s)	62,6

TABELA IX - Dados de RMN de ¹H e ¹³C para S8 (CDCl₃, 300 e 75 MHz).

3.1.10- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S9.

A substância **S9** (71 mg) foi isolada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, encontra-se na forma de cristais amarelos e é solúvel em clorofórmio.

O espectro de massas com ionização por eletrospray (IES-MS) da substância **S9** (Figura 116), apresentou um pico em m/z 423 [M+Na]⁺, o que permite sugerir a fórmula molecular C₂₂H₂₄O₇ para **S9**. Esta fórmula molecular foi confirmada pela análise do espectro de massas de alta resolução que exibiu pico observado em m/z 423,1439 (C₂₂H₂₄O₇Na⁺), calculado em m/z 423,1420, com erro de massa calculado para 4,49 ppm.



FIGURA 116 – Espectro de massa de S9.

Ao analisar os sinais de RMN ¹H de **S9** (Figuras 117 e 118, págs 174 e 175 e Tabela X, pág 183), podemos observar que existem vários sinais semelhantes às substâncias **S6, S7 e S8**. Verifica-se dois dupletos na região de hidrogênios alifáticos, integrando 1H cada, centrados em $\delta_{\rm H}$ 4,97 e 4,53, com J = 12,0 Hz, característicos de hidrogênios olefínicos com acoplamento *trans*, atribuídos aos hidrogênios 2 e 3 do anel **C** de diidroflavonol.

Na região de hidrogênios aromáticos, observamos o mesmo padrão de acoplamento observado para o anel **B** dos outros flavonóides, discutidos anteriormente: são três sinais que caracterizam um sistema de acoplamento AMX, em $\delta_{\rm H}$ 7,15 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,02 (dd, J = 8,1 e 1,8 Hz, 1H) e 6,91 (d, J = 8,1 Hz, 1H), atribuídos aos hidrogênios de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, assinalados, respectivamente, aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5' do anel B e ainda, um simpleto, integrando 1H, em $\delta_{\rm H}$ 6,08, que pode ser atribuído ao hidrogênio H-8 ou H-6 do anel A.

Um conjunto de sinais que caracterizam a presença de um grupo prenila ligada a Csp²: um tripleto em $\delta_{\rm H}$ 5,17 (J = 7,2 Hz), integrando 1H, relacionado ao hidrogênio olefínico; um dupleto em $\delta_{\rm H}$ 3,26 (J = 7,2 Hz), integrando 2H, atribuído ao metileno ligado a Csp² e dois simpletos em $\delta_{\rm H}$ 1,68 e 1,77, integrando 3H cada, relacionados a duas metilas ligadas a Csp².

Observamos ainda dois sinais em $\delta_{\rm H}$ 3,91 e 3,83, integrando três hidrogênios cada, característicos de metoxilas ligadas a anel aromático. E um simpleto em $\delta_{\rm H}$ 11,23, característico de hidrogênio de uma hidroxila quelada.



FIGURA 117- Espectro de RMN ¹H de S9 (CDCl₃, 300 MHz).



Todos os acoplamentos citados foram confirmados através da análise do espectro COSY ¹H x ¹H (Figura 119).



A análise do espectro de RMN ¹³C de **S9** obtido a 75 MHz em CDCl₃ (Figuras 120 e 121 e Tabela X, pág 183), revelou a presença de 22 sinais, os quais foram atribuídos aos 22 átomos de carbono da estrutura. Os espectros de DEPT (Figura 122, pág 177) e de HETCOR (Figura 123, pág 177) auxiliaram nas atribuições dos carbonos listados na Tabela X (pág. 183).





FIGURA 123- Mapa de correlação HETCOR de S9 (CDCl₃, 300x75 MHz).



A reunião de todos os dados citados anteriormente e respeitando a biossíntese atribuída a esta classe de substância, nos leva a sete (**A-G**) possibilidades estruturais (Figura 124).

FIGURA 124 - Estruturas possíveis para o diidroflavonol S9.

A determinação estrutural completa de **S9** foi feita com base nas correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ exibidas no mapa de correlação HMBC (Figuras 125, 126 e 127, págs 180 e 181), as quais permitiram definir as posições dos substituintes nos anéis aromáticos, além de possibilitar assinalamentos precisos dos sinais de RMN ${}^{13}C$.

Em uma expansão do espectro de HMBC, observam-se três correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ do sinal de OH quelado (δ_H 11,23) com três sinais de carbonos aromáticos: sendo apenas um deles
oxidado ($\delta_{\rm C}$ 159,8) e os outros dois substituídos e não oxidados ($\delta_{\rm C}$ 100,7 e 110,7), isto indica que o sinal em $\delta_{\rm C}$ 159,8 deve ser atribuído à C-5 e que, os sinais em $\delta_{\rm C}$ 100,7 e 110,7 podem ser atribuídos à C-6 e C-10, implicando que a posição C-6 está substituída pelo grupo prenila, o que permite eliminar quatro possibilidades estruturais (**D**, **E**, **F** e **G**) para **S9**.

As correlações ${}^{3}J_{C,H}$ observadas no espectro de HMBC - Expansões (Figuras 126 e 127, págs 180 e 181), tanto entre o sinal de um grupo OMe (δ_{H} 3,83), quanto o sinal dos hidrogênios metilênicos (δ_{H} 3,26), com o sinal de carbono aromático oxidado [δ_{C} 166,5 (C-7)], permitem localizar um grupo OMe na posição C-7 e eliminar a estrutura **C**.

Outras importantes correlações ${}^{3}J_{C,H}$ exibidas no espectro de HMBC, foram aquelas entre o sinal de carbono aromático oxidado em δ_{C} 147,6 com o sinal do outro grupo OMe (δ_{H} 3,91), bem como com os sinais de hidrogênios aromáticos H-2` (δ_{H} 7,15) e H-6` (δ_{H} 7,03), devendo-se destacar que, esta última correlação somente é possível se o grupo OMe estiver ligado a C-4', o que exclui a estrutura **B** e define a estrutura de **S9**, como sendo a estrutura **A**.

Observa-se, ainda, outro sinal de carbono aromático oxidado em δ_C 146,1 que foi atribuído a C-3[°], visto que há correlação a ${}^2J_{C,H}$ com o sinal em δ_H 7,15 (H-2[°]) e com outro sinal de hidrogênio a ${}^3J_{C,H}$ em δ_H 6,91 (H-5[°]).

Podemos observar ainda, correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ do sinal de carbono aromático substituído em δ_C 129,5, com os sinais de hidrogênio em δ_H 6,91 (H-5`), 4,93 (H-2) e 4,53 (H-3), desta forma este sinal pode ser atribuído ao carbono C-1`.

Dentre os dois sinais de carbonos aromáticos substituídos e não oxidados em $\delta_{\rm C}$ 100,7 e 110,7, os quais foram relacionados a C-6 ou a C-10 do anel A, foi definido que o sinal em $\delta_{\rm C}$ 110,7 deve ser atribuído a C-6 devido a correlação ${}^{2}J_{\rm C,H}$ observada com o sinal de 2H-1`` ($\delta_{\rm H}$ 3,26), por conseguinte o sinal em $\delta_{\rm C}$ 100,7 foi atribuído a C-10.

Como o sinal em $\delta_{\rm C}$ 166,5 já foi atribuído a C-7, podemos atribuir o sinal em $\delta_{\rm C}$ 161,7 a C-9, devido à correlação ${}^{2}J_{\rm C,H}$ com o sinal do hidrogênio H-8 ($\delta_{\rm H}$ 6,08).



FIGURA 126- Mapa de correlação HMBC de S9-Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 127- Mapa de correlação HMBC de S9-Expansão-2 (CDCl₃, 300x75 MHz).

Um esquema com todas as correlações observadas no mapa de correlações de HMBC estão representadas por setas na Figura 128.



FIGURA 128- Correlações ^{2,3}J_{C,H} observadas no mapa de correlação HMBC de S9.

A reunião de todas estas informações espectrais permitiu concluir que a substância **S9** trata-se do (2R,3R)-5,3'-diidroxi-6-(3-metilbut-2-enil)-7,4'-dimetoxi-diidroflavonol, conhecida como **Isotirumalina** e isolada pela primeira vez de *Rhynchosia cyanosperma* (RAO & GUNASEKAR, 1988).



FIGURA 129- Estrutura de S9.

	$\delta_{ m H}$ (mult., J Hz)	$\delta_{ m C}$
2	4,97 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,0)	83,5
3	4,53 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,0)	72,5
4	-	196,2
5	-	159,8
6	_	110,7
7	_	166,5
8	6,08 (s)	91,7
9	_	161,7
10	-	100,7
1'	-	129,5
2'	7,15 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,8)	113,7
3'	-	146,1
4'	-	147,6
5'	6,91 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)	110,8
6'	7,02 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 e 1,8)	119,9
1"	3,26 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	21,3
2"	5,17 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,2)	122,2
3"	-	132,1
Me-4"	1,68 (s)	26,1
Me-5"	1,77 (s)	17,9
OMe-4'	3,91 (s)	56,2
OMe-7	3,83 (s)	56,2
OH-quelada	11,23 (s)	_

TARELA V	Dadas da DMN	10^{1} U 0^{13} C 10^{13}	ro SO (CDCL.	300 o 75 MHz)
IADELA A	- Dauos de Rivin (ie ne upa	1 a 59 (CDC13, .	300 C / S MIIIZ).

3.1.12- Determinação Estrutural do Diidroflavonol S11.

A substância **S11** (40 mg) foi isolada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, encontra-se na forma de cristais brancos e é solúvel em clorofórmio.

Analisando o espectro de RMN ¹H de **S11** (Figuras 145 e 146, pág 196, e Tabela XII, pág 206), podemos observar a presença de dois dupletos na região de hidrogênios alifáticos, integrando 1H cada, centrados em $\delta_{\rm H}$ 4,94 e 4,47 (J = 12,0 Hz), característicos de hidrogênios com acoplamento *trans*, atribuídos aos hidrogênios 2 e 3 do anel **C** de diidroflavonol.

Na região de hidrogênios aromáticos, observam-se três sinais que caracterizam um sistema de acoplamento AMX em $\delta_{\rm H}$ 7,14 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,02 (dd, J = 8,1 e 2,0 Hz, 1H) e 6,90 (d, J = 8,1 Hz, 1H), atribuídos aos hidrogênios de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, assinalados, respectivamente, aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5' do anel B.

Outros sinais presentes foram: dois dupletos em $\delta_{\rm H}$ 6,63 e 5,52 (J = 10,0 Hz), integrando 1H cada, e um simpleto em $\delta_{\rm H}$ 1,44, integrando seis hidrogênios. Esse conjunto de sinais é característico de um anel 2,2-dimetilpirano.

Foram identificados ainda, um tripleto em $\delta_{\rm H}$ 5,12 (J = 7,2 Hz), integrando 1H, um dupleto em $\delta_{\rm H}$ 3,17 (J = 7,2 Hz), integrando 2H e dois simpletos em $\delta_{\rm H}$ 1,64 e 1,62, integrando 3H cada. Estes sinais indicam a presença de um grupo C-prenil.

Observamos ainda um sinal em $\delta_{\rm H}$ 3,91 (3H), típico de metoxila ligada a anel aromático, bem como um simpleto, em $\delta_{\rm H}$ 11,40, característico de hidrogênio de hidroxila quelada.







Todos os acoplamentos citados foram confirmados através da análise do espectro COSY ¹H x ¹H (Figuras 147 e 148).

FIGURA 148- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S11-Expansão (CDCl₃, 300 MHz).

A análise do espectro de RMN ¹³C de **S11** (Figura 149 e Tabela XII, pág 206), revelou a presença de 25 sinais, os quais foram atribuídos aos 26 átomos de carbono da estrutura, com base na análise dos espectros de DEPT (Figura 150, pág 199) e de HETCOR (Figura 151, pág 199). Estes sinais estão listados na Tabela XII (pág. 206).



FIGURA 149- Espectro de ¹³C de S11 (CDCl₃, 75 MHz).





FIGURA 151- Mapa de correlação HETCOR de S11 (CDCl₃, 300x75 MHz).

A reunião dessas análises nos permitiu propor seis possibilidades estruturais para **S11** (**A-F**) (Figura 152), considerando-se as disposições dos grupos, o padrão de substituição dos anéis aromáticos A e B e as considerações de biossíntese dos flavonóides.



FIGURA 152- Possibilidades estruturais para S11.

A análise do mapa de correlações HMBC (Figuras 153, 154, 155 e 156, págs 202, 203 e 204) foi importante para confirmar as localizações dos substituintes dos anéis aromáticos A e B e, conseqüentemente, definir uma das seis estruturas possíveis para **S11**. Também foi importante para fazer atribuições, com precisão, dos sinais dos carbonos aromáticos oxidados e dos aromáticos substituídos não oxidados.

O sinal relativo ao carbono aromático oxidado C-4' foi confirmado em δ c 147,1 com base nas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ observadas entre esse sinal e os relativos a H-2' (δ_{H} 7,14) e H-6'(δ_{H} 7,02), bem como, com o sinal de OMe em δ_{H} 3,91. Estas atribuições permitem estabelecer um grupo OMe ligado a C-4', eliminando as possibilidades estruturais **A** e **C**.

O sinal relativo ao carbono aromático oxidado em δ c 145,6 foi confirmado para C-3', com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre esse sinal e o relativo a H-5' (δ_{H} 6,90), bem como, uma correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre este sinal e o de H-2' (δ_{H} 7,14). Logo, a posição C-3'está ligada a um grupo OH, descartando-se as possibilidades estruturais **E** e **F**.

Foram observadas duas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal de OH-quelado (δ_{H} 11,40) e dois sinais de carbonos aromáticos substituídos e não oxidados, em δ_{C} 103,1 e 100,2, que somente podem estar relacionados aos carbonos C-6 e C-10. A atribuição do sinal em δ_{C} 103,1 para C-6 foi feita com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre esse sinal de carbono e o sinal de H-3" (δ_{H} 5,52) do anel 2,2-dimetilpirano. Assim, pode-se estabelecer a ligação do anel 2,2-dimetilpirano aos carbonos C-6 e C-7 do anel A, conseqüentemente, definindo-se a estrutura **D** para **S11**. Estes dados também permitiram atribuir o sinal em δ_{C} 100,2 para C-10.

A correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre o sinal do OH-quelado (δ_{H} 11,40) e um sinal de um carbono aromático oxidado, em δ_{C} 155,8, nos permitiu atribuí-lo ao carbono C-5.

O sinal relativo a C-1' foi confirmado com base nas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{C} 129,6, de um carbono aromático totalmente substituído, com os sinais de H-5' (δ_{H} 6,90) e de H-3 (δ_{H} 4,47), bem como, uma correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre este sinal e o de H-2 (δ_{H} 4,94).

A atribuição do sinal em $\delta_{\rm C}$ 78,4, ao carbono C-2" do anel 2,2-dimetilpirano foi confirmada pela correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre este sinal com o sinal de H-4" ($\delta_{\rm H}$ 6,63), bem como, correlações ${}^{2}J_{\rm C,H}$ entre o sinal em $\delta_{\rm C}$ 78,6 com os sinais de H-3" ($\delta_{\rm H}$ 5,52) e o das duas metilas ligadas ao anel 2,2-dimetilpirano ($\delta_{\rm H}$ 1,44).

O sinal em $\delta_{\rm C}$ 160,6, referente a um carbono aromático oxidado, foi confirmado para C-7 com base na correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre esse sinal de carbono e o relacionado a H-4" ($\delta_{\rm H}$ 6,63). Por sua vez, o sinal de carbono aromático oxidado, em $\delta_{\rm C}$ 159,2, foi atribuído a C-9 com base na correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre esse sinal e o referente a H-1"" ($\delta_{\rm H}$ 3,17), o qual também exibe correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ com o sinal definido para C-7. Esses dados confirmaram o posicionamento do grupo C-prenil ligado a C-8.

A correlação ${}^{3}J_{C,H}$ observada entre o sinal em δ_{C} 109,2, de um carbono olefínico totalmente substituído, com o sinal de H-1''' (δ_{H} 3,17), nos permitiu atribuir este sinal a C-3'''.



FIGURA 153- Mapa de correlação HMBC de S11 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 154- Mapa de correlação HMBC de S11-Expansão (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 155- Mapa de correlação HMBC de S11-Expansão-2 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 156- Mapa de correlação HMBC de S11-Expansão-3 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 157- Correlações ^{2,3}J_{C,H} observadas no mapa de correlação HMBC de S11.

A reunião de todos os dados discutidos acima levou à determinação da estrutura de **S11** como sendo a (2R,3R)-3`,5-diidroxi-4`-metóxi-8-prenil-2``,2``dimetilpirano(2'',3'':7,6)diidroflavonol, denominada de **Urucuol E**, que foi identificada como uma substância inédita com base em levantamento bibliográfico realizado no Scientific Scohlar.



FIGURA 158- Estrutura de S11.

	$\delta_{ m H}({ m mult.},J{ m Hz})$	$\delta_{ m C}$
2	4,94 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,0)	82,8
3	4,47 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,0)	72,4
4	_	196,2
5	-	155,8
6	-	103,1
7	-	160,6
8	-	131,3
9	-	159,2
10	-	100,2
1'	-	129,6
2'	7,14 (<i>d</i> , <i>J</i> ~ 2,0)	113,5
3'	-	145,6
4'	-	147,1
5'	6,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)	110,3
6'	7,02 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 e 2,0)	119,5
2"	-	78,4
3"	5,52 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	126,2
4"	6,63 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	115,4
2xMe	1,44 (s)	28,3
1""	3,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	21,2
2""	5,12 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,2)	122,1
3""	-	109,2
Me-4""	1,64 (s)	25,7
Me-5""	1,62 (s)	17,7
OMe-4'	3,91 (s)	55,9
OH-quelada	11,40 (s)	_

TABELA XII - Dados de RMN de ¹H e ¹³C de S11 (CDCl₃, 300 e 75 MHz).

3.1.13- Determinação Estrutural da Flavanona S12.

A substância **S12** (10,0 mg) foi isolada na forma de cristais brancos e é solúvel em clorofórmio.

Na análise do espectro de RMN ¹H de **S12** (Figuras 160, 161 e 162, págs 208 e 209 e Tabela XIII, pág 219), observou-se a presença de três duplos dupletos, integrando 1H cada, na região de hidrogênios alifáticos: em $\delta_{\rm H}$ 2,76 (J = 17,4 e 3,0 Hz), típico de hidrogênio em acoplamento *geminal* e *cis*; em $\delta_{\rm H}$ 3,05 (J = 17,4 e 12,6 Hz), referente a hidrogênio exibindo acoplamento *geminal* e *trans* e em $\delta_{\rm H}$ 5,30 (J = 12,6 e 3,0 Hz), característico de hidrogênio oximetínico em acoplamento *trans* e *cis*. Este conjunto de sinais e mais a presença de sinais na região de hidrogênios aromáticos indicaram para **S12**, o esqueleto de uma flavanona. Portanto, esses sinais podem ser atribuídos aos hidrogênios H-2, H-3 β e H-3 α (Figura 159).



FIGURA 159- Esqueleto carbônico de flavanonas.

Na região dos hidrogênios aromáticos, observam-se três sinais que caracterizam um sistema de acoplamento AMX [$\delta_{\rm H}$ 7,03 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 6,92 (dd, J = 8,1 e 1,8 Hz, 1H) e 6,87 (d, J = 8,1 Hz, 1H)], atribuídos aos hidrogênios de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, que devem ser assinalados, respectivamente, aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5' do anel B. Isto é confirmado, visto que no anel A está presente um grupo OH-quelado à carbonila ($\delta_{\rm H}$ 12,29), o que impossibilita um padrão de substituição do tipo AMX para este anel. Assim, o simpleto observado em $\delta_{\rm H}$ 5,95 (1H), pode ser atribuído ao hidrogênio H-6 ou H-8 do anel A, pois, segundo a biossíntese de flavonóides, a posição 7 corresponde a um carbono aromático oxidado.

Também são observados no espectro de RMN ¹H dois dupletos em $\delta_{\rm H}$ 6,61 e 5,49 (1 H cada, J = 9,9 Hz), e um simpleto em $\delta_{\rm H}$ 1,43 (6 H), os quais foram atribuídos aos sinais de um anel 2,2-dimetilpirano, fundido a anel aromático.





FIGURA 160- Espectro de RMN ¹H de S12 (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 161- Espectro de RMN ¹H de S12-Expansão (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 162- Espectro de RMN ¹H de S12-Expansão-2 (CDCl₃, 300 MHz).

Todos os acoplamentos citados foram confirmados através da análise do espectro COSY ¹H x ¹H (Figuras 163 e 164, págs. 209 e 210).



FIGURA 163- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S12 (CDCl₃, 300 MHz).



FIGURA 164- Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de S12-Expansão (CDCl₃, 300 MHz).

A análise do espectro de RMN ¹³C de **S12** (Figuras 165, 166 e 167, págs 211 e 212 e Tabela XIII, pág 219), revelou a presença de 21 sinais, os quais foram atribuídos aos 21 átomos de carbono da estrutura. Respaldados pela análise dos espectros de DEPT (Figura 168, pág 213) e de HETCOR (Figura 169, pág 213), pode-se identificar os seguintes sinais:

* Em δ_C 78,8 e 43,1, relacionados aos carbonos C-2 e C-3 do anel C de flavanonas, respectivamente.

* Em $\delta_{\rm C}$ 195,9, característico do carbono carbonílico C-4.

* Em $\delta_{\rm C}$ 56,0, relacionado a uma metoxila ligada a anel aromático, vizinha a carbono aromático CH.

* Em $\delta_{\rm C}$ 162,3, 162,0, 158,3, 146,9 e 145,8, que indicam a presença de cinco carbonos aromáticos oxidados, reforçando a presença de dois grupos OH, sendo um quelado e outro não.

* Em $\delta_{\rm C}$ 131,5, 103,1 e 102,9, relacionados a três carbonos aromáticos substituídos e não

oxidados.

* Em $\delta_{\rm C}$ 118,1, 112,6 e 110,5, atribuídos aos carbonos CH do anel B, C-6', C-2' e C-5', respectivamente.

* Em $\delta_{\rm C}$ 96,2, atribuído ao carbono CH aromático do anel A.

* Em δ_C 126,2 e 115,2, assinalados aos carbonos CH olefínicos do anel 2,2- dimetilpirano , C-3" e C-4", respectivamente.

* Em δ_C 78,2, relacionado ao carbono sp³ oxidado e totalmente substituído do anel 2,2-dimetilpirano .

* Em $\delta_{\rm C}$ 28,4 e 28,3 atribuídos a duas metilas ligadas a C-2'' do anel 2,2-dimetil
pirano.



FIGURA 165- Espectro de ¹³C de S12 (CDCl₃, 75 MHz).









FIGURA 168- Espectro de DEPT de S12 (CDCl₃, 75 MHz).



FIGURA 169- Mapa de correlação HETCOR de S12 (CDCl₃, 300x75 MHz).

A reunião dos dados analisados permitiu propor cinco possibilidades estruturais para **S12** (Figura 170), levando em consideração as questões biossintéticas das flavanonas e as disposições possíveis dos grupos substituintes.



FIGURA 170- Possibilidades estruturais para S12.

A análise do mapa de correlações HMBC de **S12** (Figuras 171, 172, 173 e 174, págs 216 e 217), confirmou as localizações dos substituintes dos anéis aromáticos A e B, também foi importante para fazer atribuições, com precisão, dos sinais dos carbonos aromáticos oxidados e dos substituídos e não oxidados.

Foi observado correlação ${}^{3}J_{C,H}$ no mapa de correlação de HMBC de **S12**, entre o sinal relativo aos hidrogênios OMe (δ_{H} 3,91) e um sinal de carbono aromático oxidado, em δ_{C} 146,9. Este sinal de carbono também correlaciona a ${}^{3}J_{C,H}$ com o sinal atribuído a H-2' (δ_{H} 7,03). Esta última correlação diferencia-se de uma outra que ocorre entre os sinais de H-2' (δ_{H} 7,03) e o de um outro carbono aromático oxidado em δ_{C} 145,8, sendo identificado como uma correlação a ${}^{2}J_{C,H}$ em função de sua menor intensidade. Assim o sinal em δ_{C} 146,9 é atribuído a C-4', o qual está substituído por OMe e, conseqüentemente, o sinal em δ_{C} 145,8 deve ser atribuído a C-3', o qual está substituído por um grupo OH. Esses dados permitem descartar as estruturas **A**, **C** e **E**.

A atribuição do sinal de C-1' foi confirmada com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal em δ_{C} 131,5, de um carbono aromático substituído e não oxidado, com o sinal de H-5' (δ_{H} 6,87), bem como, uma correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre este sinal e o de H-6' (δ_{H} 6,92).

A atribuição do sinal em $\delta_{\rm C}$ 78,2 para o carbono C-2" do anel 2,2-dimetilpirano foi confirmada pelas correlações ${}^{2}J_{\rm C,H}$ entre este sinal com os sinais de H-3" ($\delta_{\rm H}$ 5,49) e o das duas metilas ligadas a C-2" do anel 2, 2-dimetilpirano ($\delta_{\rm H}$ 1,43).

Foram observadas duas correlações ${}^{3}J_{C,H}$ entre o sinal do OH-quelado (δ_{H} 12,29) e dois sinais de carbonos aromáticos substituídos e não oxidados, em δ_{C} 103,1 e 102,9, atribuídos aos carbonos C-6 e C-10. A confirmação do sinal em δ_{C} 102,9 para C-6, foi feita com base na correlação ${}^{3}J_{C,H}$ entre esse sinal de carbono e o sinal de H-3" (δ_{H} 5,49). Logo, o sinal em δ_{C} 103,1 foi atribuído a C-10. Esses dados também comprovam que o anel 2,2-dimetilpirano é linear, portanto definindo a estrutura **D** para a substância **S12**.

A correlação ${}^{2}J_{C,H}$ entre o sinal da OH-quelado (δ_{H} 12,29) e um sinal de um carbono aromático oxidado em δ_{C} 158,3, nos permitiu atribuir este sinal ao carbono C-5.

O sinal em $\delta_{\rm C}$ 162,0 de um carbono aromático oxidado foi confirmado para C-7 com base na correlação ${}^{3}J_{\rm C,H}$ entre este sinal de carbono e o sinal de H-4" ($\delta_{\rm H}$ 6,61), bem como, uma correlação ${}^{2}J_{\rm C,H}$ entre esse sinal de carbono e o sinal de H-8 ($\delta_{\rm H}$ 5,95). Restando, desta forma, apenas um sinal de carbono aromático oxidado em $\delta_{\rm C}$ 162,3, que foi atribuído a C-9. Esta atribuição também foi respaldada pela correlação ${}^{2}J_{\rm C,H}$ entre esse sinal de carbono e o sinal de H-8 ($\delta_{\rm H}$ 5,95).



FIGURA 171- Mapa de correlação HMBC de S12 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 172- Mapa de correlação HMBC de S12 (CDCl₃, 300x75 MHz)





FIGURA 174- Mapa de correlação HMBC de S12-Expansão-3 (CDCl₃, 300x75 MHz).



FIGURA 175- Correlações ${}^{2,3}J_{C,H}$ observadas no mapa de correlação HMBC de S12.

A reunião de todos os dados discutidos levou à determinação da estrutura da substância **S12** como sendo a 3`,5-diidroxi-4`-metóxi-2``,2``-dimetilpirano(2'',3'':7,6)flavanona, que esta em fase de levantamento bibliográfico no Scientific Scohlar para confirmação de que se trata ou não de uma substância inedita.



FIGURA 176- Estrutura de S12.

	$\delta_{ m H}$ (mult., J Hz)	$\delta_{ m C}$
2	5,30 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 12,6 e 2,7)	78,8
3α	2,76 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 17,4 e 2,7)	43,1
3β	3,05 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 17,4 e 12,6)	
4	_	195,4
5	-	158,3
6	_	102,9
7	-	162,0
8	5,95 (s)	96,2
9	-	162,3
10	_	103,1
1'	_	131,5
2'	7,03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,8)	112,6
3'	_	146,9
4'	_	145,8
5'	6,87 (d, J = 8,1)	110,5
6'	6,92 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 e 1,8)	118,1
2"	_	78,2
3"	5,49 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,9)	126,2
4"	6,61 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,9)	115,2
2xMe	1,43 (s)	28,4 e 28,3
OMe-3'	3,91 (s)	56,0
OH-quelada	12,29 (s)	_
OH-3'	5,72 (s)	_

TABELA XIII - Dados de RMN de ¹H e ¹³C de S12 (CDCl₃, 300 e 75 MHz).

3.2- ROTA BIOSSINTÉTICA E PROPRIEDADES DOS ESTILBENOS E FLAVONÓIDES

3.2.1- Estilbenos.

Os estilbenos são uma classe de compostos com esqueleto C6-C2-C6 (Figura 177), que tem origem biossintética nos caminhos acetato e chiquimato, possuindo precursor comum aos dos flavonóides.



FIGURA 177- Estrutura básica dos Estilbenos.

Alguns estilbenos hidroxilados são fitoalexinas produzidas em resposta às infecções por fungos. Um dos estilbenos mais conhecido é o resveratrol, havendo sobre ele um enorme interesse nos últimos anos, devido à sua forte atividade antioxidante, relacionada à sua capacidade de redução da mortalidade por doenças coronariana e também por inibir a agregação plaquetária, além de suas propriedades estrôgenicas, que parecem contribuir à cardioproteção reportada pelo consumo de vinho (BADERSCHNEIDER & WINTERHALTER, 2000).

Estudos recentes afirmam a elevada capacidade de recuperação quanto ao dano isquêmico no miocárdio para ratos tratados com resveratrol, quando comparados aos grupos que não recebem tratamento com o mesmo. Segundo Dernek e colaboradores (2004), o resveratrol promove a defesa contra a injúria pós-isquemia e reperfusão, vasodilatação, proteção e manutenção do endotélio, além de ter propriedades antiaterosclerose, de inibir a oxidação do colesterol LDL e suprimir a agregação plaquetária (OLSON *et. al.*, 2004).

O resveratrol é um triidróxiestilbeno considerado ativo na inibição na proliferação da carcinogênese segundo um estudo realizado em Nova Jersey, EUA, o qual utilizou o resveratrol como protótipo, e com base nestes foram sintetizados vários poliidróxi e polimetóxiestilbenos, sendo testados seus efeitos anti-proliferativos em células humanas

normais e transformadas. O estudo mostrou que o estilbeno tetrahidroxilado apresentou inibição do crescimento celular e apoptose das células transformadas (LU *et. al.*, 2001).

Os estibenos são encontrados em diversas espécies que são utilizadas para diferentes finalidades, de acordo com sua indicação popular. Pacher e colaboradores (2002) isolaram 15 novos estilbenos das raízes de *Stemona collinsae*, dentre eles, 4 diidroestilbenos denominados de estilbosteminas, às quais foram atribuídas atividades antifúngica frente à 5 espécies: *Alternaria citri, Fusarium avenaceum, Pyriculata grisea, Bortrytis cinerea* e *Cladosporium herbarum*.

Estas plantas encontram-se largamente distribuídas no sudoeste da Ásia, sendo muito utilizada na China para o tratamento de bronquite, pneumonia, disfunções respiratórias e pulmonares em geral, além de sua aplicação como antimicrobiana.

A classe dos derivados diidroestibenos foi identificada, em *Cannabis sativa*, por Crombie e Crombie (1982) e sua importância consiste no potencial anticancerígeno, mais especificamente, como antimitóticos e agentes antileucêmicos (CUSHMAN *et. al.*, 1991).

Plantas do gênero *Artocarpus* são amplamente distribuídas na Tailândia sendo a espécie *A. chaplasha* empregada na medicina popular no tratamento da infecção provocada por *Taeniasis saginata*. Um estudo raalizado por Boonlaksiri e colaboradores (2000), identificou estilbenos ativos contra o *Plasmodium falciparum in vitro*, ou seja, possuem atividade anti-malarial. Essas substâncias foram isoladas a partir do extrato bruto das partes aéreas de *Artocarpus integer*.

Liu e colaboradores (2004) obtiveram novos estilbenos derivados do oxiresveratrol denominados de gnetumontaninas e ainda, uma investigação química da orquídea *Arundina gramnifolia* levou ao isolamento de um novo estilbenóide denominado arudina, sendo sua estrutura denominada como 2-(*p*-hidroxibenzil)-3-hidroxi-5-metoxibibenzilestilbeno (LIU *et. al.*, 2004).

A "resina cubana" é um extrato das raízes de *Lochocarpus utilis* e *L. urucu (Derris urucu)* utilizado como inseticida e piscicida, sendo seus principais componentes a rotenona, a deguelina, flavonóides e estilbenóides (FANG & CASIDA, 1999).

Os estilbenos são também muito encontrados nas orquidáceas (PACHER et. al., 2002).

A proposta biossintética para formação dos estilbenos (S_1 a S_5) está demonstrada no Esquema 2 (págs. 222-223).



ESQUEMA 2- Proposta Biossintética para formação dos Estilbenos.



ESQUEMA 2- Proposta Biossintética para formação dos Estilbenos (continuação).

3.2.2- Flavonóides.

Os flavonóides são compostos fenólicos que se caracterizam por conter um esqueleto básico C6-C3-C6 (Figura 178). A estrutura base consiste em dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel pirano (C). Assim, sua estrutura básica possui:

* Uma unidade C_{15} , invariável, onde a sub-unidade ArC_3 é derivada do chiquimato e o outro anel aromático (anel A) é de origem policetídica.

* O padrão de oxigenação do anel A, em carbonos alternados, é conseqüência da origem policetídica. Já o anel B pode ter um padrão de oxigenação de 4-hidroxi; 3,4-dihidroxi ou 3,4,5- trihidroxi.

* Além disso, posteriores oxidações, reduções e alquilações no esqueleto básico podem ocorrer para produção de características estruturais adicionais. Além disso, posteriores modificações no grau de oxidação do anel pirano, permitem a formação de diferentes classes de flavonóides.



FIGURA 178- Estrutura básica dos Flavonóides.

Esta classe de substâncias compreende um grande grupo que ocorrem, quase exclusivamente, em plantas superiores (geralmente na sua forma glicosilada) e são responsáveis pelos sabores de comidas e bebidas originadas de plantas, e pela coloração das flores.

Os flavonóides foram descobertos em 1930 pelo premio Nobel Szent-György, que extraiu a citrina da casca do limão, possuindo, esta substância, a capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares. Assim, esta classe de produtos naturais foi inicialmente denominada como vitamina P (de permeabilidade) e também por vitamina C2, visto que algumas das substâncias pertencentes a esta classe apresentavam propriedades semelhantes às

da vitamina C. Porém, dada a não confirmação desta substância como vitamina, esta classificação foi abandonada em 1950 (MARTINEZ-FLORES, 2002).

Estes compostos são pigmentos naturais presentes nos vegetais que desempenham um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, como por exemplo, os raios ultravioletas, a poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, dentre outros, e atuam também como agentes terapêuticos em um elevado número de patologias, tais como aterosclerose e cancro. Dado que não podem ser sintetizados pelo nosso organismo, sendo representativos da parte não energética da dieta humana, são obtidos através da ingestão de alimentos que os contenham ou através de suplementos nutritivos.

Flavonóides são compostos não nutritivos com potente atividade antioxidante, atribuída aos radicais fenólicos. São encontrados em diversos alimentos de origem vegetal, como maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicórea, aipo, chá e vinho tinto. A quercitina, principal flavonóide, é removedora dos radicais superóxido (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988), oxigênio *singlet* e peróxidos lipídicos (HUSAIN, *et al.*,1987) e inibe a oxidação das LDL e os efeitos citotóxicos das LDL-OX (NEGRE-SALVAGYRE & SALVAGYRE, 1992). O vinho tinto, que tem alto teor de flavonóides, reduz a oxidação de LDL *in vitro* (FRANKEL, *et al.*, 1993); ademais, a ingestão de vinho tinto aumenta a atividade antioxidante do soro (BATLOUNI, 1997).

Embora os flavonóides sejam quase ausentes em fungos, algas, briófitas e pteridófitas, sua importância nas angiospermas é muito grande. Esses compostos estão envolvidos principalmente na sinalização entre plantas e outros organismos e na proteção contra a luz UV. No que se refere à sinalização entre plantas e outros organismos, pode ser citado a coloração das flores um dos principais atrativos. Exemplos de flavonóides que as plantas utilizam para colorir suas flores são as antocianinas.

A rota biossintética da maioria das classes dos flavonóides é mostrada com a fenilalanina como precursor da sub-unidade p-cumárico (p-cumarilSCoA), a qual condensa com três unidades C₂ para a produção das chalconas.

A proposta biossintética para formação dos diidroflavonois, bem como, da flavanona é demonstrada no Esquema 3 (págs. 226-227).


ESQUEMA 3- Proposta Biossintética para formação dos Flavonoides.



ESQUEMA 3- Proposta Biossintética para formação dos Flavonoides (continuação).

3.3 – BIOENSAIOS ALELOPÁTICOS

O extrato, bem como, algumas substâncias isoladas das folhas de *Derris urucu* foram testados visando à avaliação de suas atividades alelopáticas. Através da medição do potencial de germinação de sementes, bem como do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo de plantas invasoras de pastagens.

3.3.1- Extrato etanólico das folhas de Derris urucu.

O extrato etanólico das folhas de *Derris urucu*, foi testado, obtendo-se resultados relevantes:

* Para o bioensaio de inibição da germinação de sementes de plantas invasoras de pastagens foi observado um percentual de 52% frente à *Mimosa pudica* (malícia) e de 45% frente a *Senna obtusifolia* (mata-pasto) (SANTOS *et. al.*, 2007).

* Para os bioensaios de desenvolvimento da radícula de plantas invasoras de pastagens, foi observado um percentual de inibição de 50% frente a malícia e de 43% frente ao matapasto (SANTOS *et. al.*, 2007).

* Para os bioensaios de desenvolvimento do hipocótilo de plantas invasoras de pastagens, foi observado percentual de inibição de 58% frente a malicia e de 25% frente ao mata-pasto (SANTOS *et. al.*, 2007).

Apresentando percentuais de inibição acima de 50% com relação à germinação de sementes e do desenvolvimento de plantas daninhas, principalmente frente à espécie malícia, o extrato de folhas de *Derris urucu* mostrou-se promissor na busca de um aleloquímico pré ou pós emergente, justificando-se, assim, um estudo mais aprofundado com o extrato etanólico, buscando-se a caracterização das substâncias responsáveis pela atividade.

3.3.2- Substâncias isoladas das folhas de Derris urucu.

Foram testados os estilbenos **S1**, **S2**, e **S4** e os flavonóides **S6**, **S7**, **S9**, escolhidos pela quantidade de material necessária para realização dos bioensaios e pela ordem de isolamento e determinação estrutural.

Inicialmente, cada uma das substâncias selecionadas foi testada, separadamente, para avaliação de sua atividade inibidora da germinação e do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo das plantas invasoras de pastagens malícia e mata-pasto.

3.3.2.1- Avaliação da inibição da Germinação de sementes.

Foram realizados bioensaios para determinação do potencial de inibição dos estilbenos e dos diidroflavonóis sobre a germinação de sementes de malícia e mata-pasto, utilizando-se uma concentração de 150ppm.

Para os estilbenos a espécie receptora malícia foi a que sofreu os maiores índices de inibição da germinação de suas sementes. Destacando-se a substância **S2**, com um potencial de inibição de 20% (Gráfico 1, pág 230). Já para espécie mata-pasto os índices de inibição não foram muito expressivos, tendo como maior índice de inibição novamente a substância **S2**, com apenas 10% de inibição da germinação das sementes de mata-pasto.

Para os diidroflavonóis observaram-se níveis de inibição muito maiores que os observados para os estilbenos. A espécie malícia foi a que sofreu os maiores índices de inibição. De todos os diidroflavonóis testados, **S6** foi o que apresentou os maiores índices, com 27% para malícia e 18% para o mata-pasto (Gráfico 2, pág. 231).

Dentre todas as substâncias testadas, $S2 \in S6$ foram as que apresentaram os maiores índices de inibição, podendo ser consideradas aleloquímicos pré-emergentes.



GRÁFICO 1 - Efeitos alelopáticos de S1, S2 e S4 sobre a inibição da germinação de sementes de plantas invasoras de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, H₂O destilada.



GRÁFICO 2 - Efeitos alelopáticos de S6, S7 e S9 sobre a inibição da germinação de sementes de plantas invasoras de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, H₂O destilada.

3.3.2.2- Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula.

Foram realizados, também, bioensaios para determinação do potencial de inibição do desenvolvimento da radícula de plantas invasoras de pastagens com os estilbenos **S1**, **S2** e **S4**, e com os diidroflavonóis **S6**, **S7** e **S9**.

Os efeitos causados pelos estilbenos frente à espécie mata-pasto foram de magnitudes muito superiores aos da germinação, com inibições de 47% para **S1**, 37% para **S2** e de 45% para **S4**. Esses resultados permitem classificar todos os estilbenos testados como aleloquímico pós-emergentes. Já para espécie malícia apenas **S4**, obteve um índice de inibição considerável, com 30% de inibição (Gráfico 3, pág. 232).

Para os diidroflavonois **S6** e **S7**, independente da espécie receptora (malícia e matapasto), não foram observados índices de inibição consideráveis, o maior índice foi de 15% de inibição para malícia frente a **S7**. A substância **S9** foi a que mais se destacou entre os didroflavonois, com índices de 14% para malícia e de 24% para o mata-pasto (Gráfico 4, pág. 232). Esses resultados indicam **S9** como um aleloquímico pós-emergente.



GRÁFICO 3 - Efeitos alelopáticos de S1, S2 e S4 sobre a inibição do desenvolvimento da Radícula de plantas invasoras de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, H₂O destilada.



GRÁFICO 4 - Efeitos alelopáticos de S6, S7 e S9 sobre a inibição do desenvolvimento da Radícula de plantas invasoras de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha. H₂O destilada.

3.3.2.3- Avaliação da inibição do desenvolvimento do Hipocótilo.

Foram efetuados bioensaios para avaliar a inibição do desenvolvimento do hipocótilo das espécies malícia e mata-pasto, frente aos dois grupos de substâncias testadas anteriormente

Para a espécie malícia, o estilbeno que apresentou o maior nível de inibição do desenvolvimento do hipocótilo foi **S4**, com inibição de 23%. De todos os estilbenos testados **S1**, foi o qual provocou a maior inibição do desenvolvimento do hipocótilo da espécie matapasto, com uma inibição de 33% (Gráfico 5, pág. 233).

Independente da espécie receptora (malícia ou mata-pasto), dentre aos diidroflavonois testados, **S9** foi o que provocou os maiores níveis de inibição do desenvolvimento do hipocótilo, com 25% para malícia e 28% para o mata-pasto (Gráfico 6, pág. 234). Analisando as inibições do desenvolvimento do hipocótilo de plantas invasoras de pastagens, frente aos dois grupos de substâncias testadas, destacam-se **S4** e **S9**, com inibições que nos permite classificá-las como aleloquímicos de pós-emergência.



GRÁFICO 5 - Efeitos alelopáticos de S1, S2 e S4 sobre a inibição do desenvolvimento do Hipocótilo de plantas invasoras de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, H₂O destilada.



GRÁFICO 6 - Efeitos alelopáticos de S6, S7 e S9 sobre a inibição do desenvolvimento do Hipocótilo de plantas invasoras de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, H₂O destilada.

3.3.3- Resultados dos ensaios com as substâncias aos pares.

Foram realizados, também, ensaios para avaliação de atividade alelopática com as substâncias, misturadas aos pares, objetivando-se investigar o efeito da interação entre elas sobre a atividade alelopática.

Os parâmetros avaliados foram os mesmo utilizados para as substâncias puras, ou seja, germinação de sementes e desenvolvimento da radícula e do hipocótilo das espécies invasoras de pastagens malícia e mata-pasto.

3.3.3.1- - Avaliação da inibição da Germinação de sementes frente às misturas dos estilbenos

Analisando o gráfico dos efeitos das misturas dos estilbenos sobre a germinação de sementes de plantas invasoras de pastagens (Gráfico 7, pág. 236), observamos que, independente da espécie receptora (malícia ou mata-pasto), o efeito foi reduzido em relação aos das substâncias analisadas individualmente, frente as misturas de **S1** e **S2**; **S2** e **S4**. Estes resultados indicam que houve um antagonismo entre as substâncias misturadas, não podendo classificar essas misturas como pré-emergentes.

A mistura de **S1** e **S4**, foi à única que apresentou um aumento nos níveis de inibição em relação às substâncias isoladas. Destacando-se a inibição de 18%, para espécie mata-pasto, quase três vezes maior do que as substâncias isoladas. Assim, a mistura de **S1** e **S4** pode ser classificada como pré-emergente.



GRÁFICO 7 - Efeitos alelopáticos das misturas dos estilbenos S1 e S2; S1 e S4; S2 e S4 sobre a inibição da germinação de plantas invasoras de pastagens Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, H₂O destilada.

3.3.3.2- - Avaliação da inibição da Germinação de sementes frente às misturas dos diidroflavonóis.

Foram realizados bioensaios para avaliar o potencial de inibição da germinação de sementes de plantas invasoras de pastagens, frente às misturas de diidroflavonóis. E independente da espécie receptora (malícia ou mata-pasto), foi observado que houve uma redução nos efeitos em relação aos das substâncias isoladas para todas as misturas testadas (Gráfico 8, pág. 238). Esses resultados indicam, para todas as misturas de diidroflavonóis testadas, que as misturas não favorecem a inibição do desenvolvimento do hipocótilo de plantas invasoras de pastagens.



GRÁFICO 8 - Efeitos alelopáticos das misturas dos diidroflavonóis S6 e S7; S6 e S9; S7 e S9 sobre a inibição da germinação de sementes de plantas invasoras de pastagens Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, H₂O destilada.

3.3.3.3- - Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula frente às misturas dos estilbenos

Analisando o gráfico dos efeitos da mistura dos estilbenos sobre o desenvolvimento da radícula da espécie mata-pasto (Gráfico 9, pág 240), foi observado que para todas as misturas testadas não houve aumento em relação aos efeitos das substâncias analisadas individualmente, observando então um efeito antagônico frente a todas as misturas testadas. Já para espécie malícia foi observado um aumento nos potenciais de inibição para as misturas de **S1** e **S2**; **S2** e **S4**. A mistura de **S1** e **S2**, provocou uma inibição de 45% quase duas vezes maior que a inibição exibida pelas substâncias isoladas. A mistura de **S2** e **S4** foi a que apresentou a maior inibição do desenvolvimento da radícula dentre todas as misturas testadas, com um potencial de quase 50%. Esses resultados permitem classificar essas misturas como pós-emergentes.



GRÁFICO 9 - Efeitos alelopáticos das misturas dos estilbenos S1 e S2; S1 e S4; S2 e S4 sobre a inibição do desenvolvimento da radícula de plantas invasoras de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, H₂O destilada.

3.3.3.4- - Avaliação da inibição do desenvolvimento da Radícula frente às misturas dos diidroflavonóis.

No gráfico dos efeitos da mistura dos diidroflavonóis sobre o desenvolvimento da radícula da espécie mata-pasto (Gráfico 10, pág 242), apenas a mistura de **S6** e **S7** apresentou um aumento na inibição do desenvolvimento da radícula desta espécie com um potencial de 20% de inibição.

Para espécie malícia foi observado um aumento nos potenciais de inibição em relação às substâncias isoladas, para todas as misturas testadas, os maiores potenciais foram provocados pelas misturas de **S6** e **S7** com 50% e de **S6** e **S9** com 60%.

A mistura de **S6** e **S7** foi à única que inibiu as duas espécies de invasoras testadas e a mistura de **S6** e **S9** foi a que provocou a maior inibição dentre todas as misturas testadas. Esses resultados classificam essas misturas como pós-emergentes.



GRÁFICO 10 - Efeitos alelopáticos das misturas dos diidroflavonóis S6 e S7; S6 e S9; S7 e S9 sobre a inibição do desenvolvimento da radícula de plantas invasoras de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, H₂O destilada.

3.3.3.5- - Avaliação da inibição do desenvolvimento do Hipocótilo frente às misturas dos estilbenos

Analisando o gráfico dos efeitos da mistura dos estilbenos sobre o desenvolvimento do hipocótilo da espécie malícia (Gráfico 11, pág 244), observamos que os efeitos foram aumentados para todas as misturas testadas em relação aos das substâncias analisadas individualmente. Destacando-se as misturas de **S1** e **S2** com uma inibição de 33% e de **S2** e **S4** com 34%. Já para a inibição do desenvolvimento do hipocótilo da espécie mata-pasto, apenas a mistura de **S2** e **S4** provocou uma inibição superior ao das substâncias isoladas, com uma inibição de 23%.

As misturas S1 e S4; S2 e S4 foram as que provocaram os maiores índices de inibição, sendo que apenas a mistura de S2 e S4 inibiu as duas espécies de invasoras. Essas misturas podem ser consideradas pós-emergentes.



GRÁFICO 11 - Efeitos alelopáticos das misturas dos estilbenos S1 e S2; S1 e S4; S2 e S4 sobre a inibição do desenvolvimento do hipocótilo de plantas invasoras de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, H₂O destilada.

3.3.3.6- - Avaliação da inibição do desenvolvimento do Hipocótilo frente às misturas dos diidroflavonóis.

Foi observado no gráfico dos efeitos da mistura dos diidroflavonóis sobre o desenvolvimento do hipocótilo da espécie mata-pasto, que só a mistura de **S6** e **S7** obteve uma magnitude superior aos das substâncias isoladas, com uma inibição de 16% (Gráfico 12, pág. 246).

Analisando o gráfico dos efeitos das misturas de diidroflavonóis sobre o desenvolvimento do hipocótilo da espécie malícia, frente a todas as misturas testadas (Gráfico 12, pág. 246), foi observado um aumento nas inibições em relação a as substâncias isoladas. A mistura de **S6** e **S9** foi a que provocou a maior inibição do desenvolvimento do hipocótilo, com 39%. Para mistura de **S6** e **S7**, foi observado uma inibição de 37%, cinco vezes maior que das substâncias isoladas. Assim, podemos classificar essas misturas como pós-emergentes.



GRÁFICO 12 - Efeitos alelopáticos das misturas dos diidroflavonóis S6 e S7; S6 e S9; S7 e S9 sobre a inibição do desenvolvimento do hipocótilo de plantas invasoras de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, H₂O destilada.

3.4 – ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante dos derivados diidroflavonóis, obtidos com base na medida do percentual de inibição da capacidade seqüestradora do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) está representado no Gráfico 13 (pág 248). Os diferentes valores de inibição, apresentados como IC₅₀ (concentração da amostra necessária para atingir 50% de atividade seqüestrante de radicais DPPH), mostram diferenças na reatividade das moléculas dos diidroflavonóis frente a este radical. No entanto, todos os compostos apresentaram uma menor atividade em relação ao BHT (butil-hidroxitolueno), o qual foi utilizado como controle positivo, tendo apresentado um valor de IC₅₀ 15,68 μ g/mL.

Os valores calculados de IC_{50} para os diidroflavonóis, quando comparados ao controle positivo BHT, foram, de um modo geral, baixos:

- ✓ Para a Isotirumalina (**S9**), o valor de IC₅₀ encontrado foi de 171,87 μ g/mL, o que representa uma capacidade de inibição quase onze vezes inferior ao do BHT.
- ✓ O Urucuol B (**S6**) exibiu valor de IC₅₀ = 187,50 µg/mL, apresentando uma capacidade de inibição quase doze vezes inferior ao do BHT.
- ✓ Para o Urucuol A (S7) observou-se IC₅₀ de 218,75 µg/mL, representando uma capacidade de inibição quase quatorze vezes inferior ao BHT.
- ✓ A substância Urucuol C (S8) exibiu IC₅₀ próximo de 500,00 µg/mL, representando uma capacidade de inibição muito baixa, o equivalente a quase trinta e duas vezes inferior ao do BHT.

Para todos os resultados dos bioensaios, os valores de p foram menores que 0,05 (p < 0,05).



GRÁFICO 13-. Curva de avaliação do potencial de inibição antioxidante das substâncias isoladas de *Derris urucu* frente ao DPPH, em diferentes concentrações. Como padrão de comparação foi usado o butil-hidroxitolueno (BHT). (- \diamond -) BHT: (- \Box -) urucuol B **S6**; (- \bullet -) urucuol A **S7**; (- Δ -) urucuol C **S8**; (- \bullet -) Isotirumalina **S9**.

A ordem decrescente de inibição dos radicais DPPH observada para as quatro substâncias testadas, em relação ao BHT, foi: BHT > Isotirumalina (S_9) > Urucuol B (S_6) > Urucuol A (S_7) >> Urucuol C (S_8) .

A reação entre a molécula de DPPH com os derivados fenólicos parece ocorrer conforme mostrada na Figura 179.



Figura 179- Reação entre o DPPH e os derivados fenólicos

Estes resultados mostram, claramente, que a presença das hidroxilas fenólicas é um aspecto estrutural muito importante para a atividade antioxidante. Portanto, as substâncias com um maior número de grupos hidroxilas fenólicas apresentaram maior atividade. Assim, as substâncias **S6** e **S9**, que possuem dois grupos OH fenólicos, são mais ativas que o composto contendo apenas um grupo OH (**S7**), porém, estes são muito mais ativos que a substância **S8**, a qual não possui grupo OH fenólico.

A presença de hidroxilas queladas nos anéis A e B dos diidroflavonóides **S6**, **S7** e **S9** são determinantes para a baixa atividade em relação ao butil-hidroxitolueno (BHT), que possui grupo hidroxila livre.

Outro aspecto importante é a presença de grupos elétron-retiradores nos diidroflavonóis, enquanto que na estrutura do BHT estão presentes grupos elétron-doadores como o *t*-butil e o metil, em posições *orto* e *para*, respectivamente (Figura 180), uma vez que este composto pode formar radicais semiquinonas mais estáveis, em função da presença destes grupos, os quais podem estabilizar a carga parcial positiva pelo efeito de ressonância. Por outro lado, a energia termodinâmica de dissociação da ligação OH de grupos fenólicos quelados deve ser muito maior, quando comparada com grupos fenólicos livres (URSO & CLARKSON, 2003).



Figura 180- Estrutura e influência dos grupos substituintes próximos das hidroxilas fenólicas dos diidroflavonóis e BHT.

Capítulo IV

Conclusões



4- CONCLUSÕES

Neste trabalho foram estudadas as folhas de *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbr., sob o ponto de vista químico e de atividade biológica, representando o primeiro estudo científico desta parte da planta.

O extrato etanólico das folhas de *D. urucu* foi submetido a bioensaios para avaliação de seu potencial alelopático, através da determinação dos potenciais de inibição de germinação de sementes e de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo de plantas daninhas, obtendo-se resultados expressivos, da ordem de 50% de inibição, o que permite afirmar que este extrato tem um grande potencial alelopático.

A partir do extrato etanólico das folhas de *D. urucu* foram isoladas 12 substâncias, cinco pertencentes à classe dos estilbenos (**S1, S2, S3, S4 e S5**), seis pertencentes à classe dos diidroflavonóis (**S6, S7, S8, S9, S10 e S11**) e uma flavanona (**S12**). Destas substâncias, foram identificadas oito como novas, sendo dois estilbenos (**S2 e S4**), cinco diidroflavonóis (**S6, S7, S8, S10 e S12**).

Segundo pesquisa bibliográfica a respeito de estudos químicos realizados com espécies do gênero *Derris*, as classes de sustâncias encontradas com frequência são: rotenóides, 3-aril-cumarinas, estilbenos, isoflavonas, flavonas, flavanonas, flavonóis e auronas, podendo-se assim constatar que as classes de substâncias encontradas nas folhas de *D. urucu*, estão de acordo com o perfil químico do gênero *Derris*. Além disso, o presente estudo pode contribuir com uma informação adicional, visto ter sido encontrada, pela primeira vez, substâncias da classe dos diidroflavonóis. Outra contribuição é a constatação de que as folhas de *D. urucu* não biossintetizam as substâncias majoritárias presentes nas raízes de *D. urucu*, ou seja, rotenona e deguelina.

Das doze substâncias isoladas seis foram submetidas a bioensaios para avaliação de suas atividades alelopáticas frente a plantas invasoras de pastagens malícia e mata-pasto. Dentre os estilbenos foram selecionadas as substâncias **S1**, **S2** e **S4** e dentre os diidroflavonóis, foram as seguintes: **S6**, **S7** e **S9**.

Dentre todas as substâncias testadas **S2** e **S6**, foram as que apresentaram os maiores índices de inibição da germinação de sementes, podendo ser consideradas aleloquímicos préemergentes.

Os maiores níveis de inibição do desenvolvimento da radícula de plantas invasoras de pastagens foram provocados pelos estilbenos **S1**, **S2** e **S4** e pelo diidroflavonol **S9**. Esses resultados permitem classificar essas substâncias como aleloquímicos pós-emergentes.

Analisando os percentuais de inibição do desenvolvimento do hipocótilo de plantas invasoras de pastagens, frente aos dois grupos de substâncias testadas, destacam-se **S4** e **S9**, com inibições que nos permitem classificá-las como aleloquímicos de pós-emergência.

Dentre as misturas dos estilbenos, apenas a mistura **S1+S4** apresentou um aumento nos níveis de inibição da germinação de sementes em relação às substâncias isoladas. Apresentando uma inibição quase três vezes maior do que as substâncias isoladas. Assim, a mistura **S1+S4** pode ser classificada como pré-emergente.

Para o desenvolvimento da radícula de plantas invasoras de pastagens, a mistura S1+S2 provocou uma inibição de quase duas vezes maior que a inibição exibida pelas substâncias isoladas. A mistura S2+S4 foi a que apresentou a maior inibição do desenvolvimento da radícula dentre todas as misturas de estilbenos testadas. Já para as misturas dos diidroflavonóis, destacam-se as misturas S6+S7, que foi à única que inibiu as duas espécies de invasoras testadas, e a S6+S9, a qual provocou a maior inibição dentre todas as misturas de diidroflavonóis testadas. Esses resultados classificam essas misturas como pósemergentes.

Nas inibições do desenvolvimento do hipocótilo de plantas invasoras de pastagens, as misturas S1+S4 e S2+S4 foram as que provocaram os maiores índices de inibição, sendo que apenas a mistura S2+S4 inibiu as duas espécies de invasoras. Dentre os diidroflavonóis, a mistura S6+S9 foi a que provocou a maior inibição do desenvolvimento do hipocótilo e para a mistura S6+S7 foi observado uma inibição cinco vezes maior que das substâncias isoladas. Assim, podemos classificar essas misturas como pós-emergentes.

Esses resultados demonstram que essas misturas de substâncias devem ser mais estudadas para a confirmação da atividade alelopática desta espécie, e, talvez, chegar a um possível bioerbicida natural.

Os bioensaios realizados para avaliação da atividade antioxidante dos diidroflavonóis **S6**, **S7**, **S8** e **S9** foram analisados através da comparação dos valores obtidos de IC₅₀. Todas as substâncias apresentaram valores de IC₅₀ muito maiores do que aquele observado para o padrão BHT, significando que estes diidroflavonóis têm baixa atividade antioxidante.

A ordem crescente de inibição de radical DPPH observada para as quatro substâncias testadas, com base nos valores de IC_{50} , foi: (**S8**) < (**S7**) < (**S6**) < (**S9**). Resultado esperado em função da quantidade de grupos hidroxilas presentes em cada substância. Assim, as substâncias **S6** e **S9**, que possuem dois grupos OH fenólicos, são mais ativas que o composto contendo apenas um grupo OH (**S7**), porém, estes são muito mais ativos que a substância **S8**, a qual não possui grupo OH fenólico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M.; SHIREEN, K. F.; RASHID, M. A.; MAHMUD, A. A further rotenoid from *Derris elliptica*. **Planta Medica**, 55(2), 207-8, 1989.

AHMED, F.; SHAHID, I. Z.; RAHMAN, M. M.; MASUD, M. M.; SADHU, S. K. Antinociceptive activity of *Derris uliginosa*. **Fitoterapia**, n.78, p.377–378, 2007.

ALÉCIO, M. R. Toxicidade do extrato de *Derris amazônica* Killip a adultos de *Cerotoma arcuatus* Olivier, 1791 (Coleóptera: Chrysomelidae) **Dissertação de Mestrado**, Manaus – AM – Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais de Amazônia – UFAM/INPA, 2007.

ALMEIDA, F.S. Alelopatia e as plantas. Londrina: IAPAR, 68p. (IAPAR. Circular, 3), 1988.

AMEEN, M.; SHAHJAHAN, R. M.; KHAN, H. R.; CHOWDHURY, A. K. A. Toxicity of rotenone extracted from indigenous *Derris* roots on mosquito larvae. Journal of Bangladesh Academy of Sciences, v.7(1-2), p.39-47, 1983.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.

ARAGÃO, J. A.; VALLE, J. R. Ictiotoxicidade de timbós dos gêneros Serjana, Derris e Tephrosia. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.25, n.7, p.12-14, 1973.

ARORA, A.; MURALEEDHARAN, G. N.; STRASBURG, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.24, n.9, p.1355-1363, 1998.

ARRHENIUS, S.P. & LANGENHEIM, J.H. Inhibitory effects of *Hymenaea* and *Copaifera* leaf resins on the leaf fungus, *Pestalotia subcuticulares*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.11, n.4, p.361-366, 1983.

ARRUDA, M. S. P.; ARAÚJO, M. Q. de; LOBO, L. T.; SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M.; SANTOS, L. D.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C.; GUILHON, G. M. S. P.; Allelopathy Journal, v.15, 211p., 2005.

BABER, A.D.; HARRIS, S.R.; Oxygen free radicals and oxidants: a review. American Pharmacol. v.34, p.26-35, 1994.

BADERSCHNEIDER, B.; WINTERHALTER, P. Isolation and characterization of novel stilbene derivative from riesling wine. Journal of Agriculture Food and Chemistry, S.1, v.48, p.2681-2686, 2000.

BAETAS, A. C. Investigação Fitoquímica e Atividade Citotóxica de *Fícus citrifolia*. **Tese de Doutorado**, Belém – PA – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFPA, 2008.

BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 5^a ed., New York: John Wiley, v.3, 1996.

BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medical materials. **Science**, v.228, p.1154-1160, 1985.

BARATA, L. E. S. **Produtos da Biodiversidade Amazônica.** Campinas: Labjor, 2000. Disponível em : <<u>http://www.comciencia.br/reportagens/amazonia/amaz22.htm</u>>. Acesso em: fev. de 2009.

BARREIROS, A.; DAVID, J. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, n.1, p.113-123, 2006.

BARROZO, G. Sistemática de angiospermas do Brasil. São Paulo: Edusp, v.3, 1978.

BATLOUNI, M. Hipótese Oxidativa da Aterosclerose e Emprego dos Antioxidantes na Doença Arterial Coronária. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia** v.68, n.1, p.55-63, 1997.

BEGNINI, M.L. Potencial do uso, produção de extratos de plantas brasileiras e desenvolvimento de produtos para o controle de pragas e ectoparasitos em animais e seres humanos: plantas inseticidas. In: PRACTICE ORIENTED RESULTS ON USE AND PRODUCTION OF PLANT EXTRACTS ANDE PHEROMONES IN INTEGRATED AND BIOLOGICAL PEST CONTROL. 2001, Uberaba. **Proceddings of the 2. Workshop Neem & Pheromones**, Universidade de Uberaba, Uberaba: Reginerio S. de Faria e H. klebeergs Eds. p.59-61. 2001.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. Journal Food Science Nutrition v.47, p.233-261, 1996.

BESSEMS, J.G.M.; VERMEULEN, N.P.E. Paracetamol (Acetaminophen)-Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mehanisms, Analogues and Protective Approaches. **Critical Reviews in Toxicology**. v.31, n.1, p.55-138, 2001.

BOONLAKSIRI, C.; OONANANT, W.; KONGSAEREE, P.; KITTAKOOP, P.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. An antimalarial stilbene from *Artocarpus integer*. **Phytochemistry**, v.54, p.415-417, 2000.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**. v.181, 119901200, 1958.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Review**., v.56, p.317-333, 1998.

BRUHNS, A.; The Ottawa Citizen, April 16, A6, 1994.

BRUHN, J. G.; Acta Pharmacologi Nord., v.1, 117p., 1989.

CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CUTLER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical in Biological & Medicine,** v.14, n.3, p.303-311, 1993.

CATES, R.G. The interface between slugs and wild ginger: some evolutionary aspects. **Ecology**, v.56, p.391-400, 1975.

CERQUEIRA, F.; MEDEIROS, M.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, p.441-449, 2007

CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. Lancet, London, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, p.156-160, 2004. Palestra proferida no XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, setembro de 2004-Ouro Preto/MG

CHEMOFFICE, Manual. CambridgeSoft Corporation, 2005.

CHEN, W.; SONG, J.; GUO, P.; CAO, W.; BIAN, J. Exploring a possible way to synthesiza novel better antioxidants based n vitamin E: a DFT study. **Biorgarnic Medicine Chemical Lettres**, v.16, p.5874-5877, 2006.

CHENG, H.H. A conceptual framework for assissing allelochemicals in the soil environmental. In: RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. eds. **Allelopathy.** New York: Chapman & Hall, Cap.3, p.21-29, 1992.

CHOU, C.H.; KUO, Y.L. Allelopathic research of subtropical vegetation in Tawian. III-Allelopathic exclusion of understory by *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Journal Chemical Ecology**, v.12, n.6, p.1431-1448, 1986.

CHOU, C.H. The role of allelopathy in subtropical agroecosystems in Taiwan. In: PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. eds. **The science of allelopathy**. New York: Jonh Wiley & Sons, p.57-73, 1986.

CHULABHORN, M.; HUNSA, P.; SOMSAK, R.; KITTISAK, L.; LONG, L.; GEOFFREY, A. C. Prenylated Flavanones from *Derris reticulate*. **Phytochemistry**, n.45, p.825-829, 1997.

CHUN, S. S.; VATEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K.; **Process Biochemistry** v.40, p.809, 2005.

CLUTTON, P.; FOLTS, J. D.; FREEDMAN, J. E. Pharmacological control of platelet function. **Pharmacological Research**., v.44, p.4, 2001.

COBERTT, C. E. **Plantas Ictiotóxicas: farmacologia da rotenona**. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 157p.,

CORDELL, G. A.; Phytochemistry, v.40, 1585p., 1995.

COSTA, C. N. B.; CARVALHO, L. O. D. M.; DUTRA, S.; PIMENTEL, E. S. Uso do timbó Urucu (Derris urucu) no controle do piolho (Haematopinus tuberculatus) em bubalinos. **Boletim de Pesquisa 78**, IBAMA, Brasília, 1989.

COSTA, J. P. C.; ALVES, S. de M.; BELO, M. Teores de rotenona em clones de timbó (*Derris* spp.Fabaceae) de diferentes regiões da Amazônia e os seus efeitos na emergência de imagos em *Musca domestica* L. Acta Amazônica v.29, n.4, p.563-573, 1999.

CROMBIE, L.; CROMBIE, W. M. Natural products of thailand hight Δ^1 -THC-strain *Cannabis*. The bibenzyl-spiran-dihydrophenanthrene group: relations with cannabinoides and canniflavones. Journal of the Chemical Society Perkin transavtion, S.1, supl 1, p.1455-1466, 1982.

CRONQUIST A. **Na Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press. 1262p., 1981.

CUSHMAN, M.; NAGARATHNAM, D.; GOPAL, D.; CHAKRABORTI, A. K.; LIN, C. M.; HAMEL, E. Synthesis and evaluation of stilbene and dihydrostilbene derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization. **Journal of Medical Chemistry**, S. 1, v.34, n.8, p.2579-2588, 1991.

DECKER, S. **Inseticidas Vegetais**. São Paulo: Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo, p.1-18, 1942.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v.55, n.11, p.396-407, 1997.

DELLE, M.; FRANCO, V.; GLADYS, C.; SIALER de Z. D.; MARINI-BETTOLO, G. B. 3-Aryl-4-methoxycoumarins and isoflavones from *Derris glabrescens*. Gazzetta Chimica Italiana, 107 (7-8), p.403-7, 1977.

DERNEK, S.; IKIZLER, M.; ERKASAP, N.; ERGUN, B.; KOKEN, T.; YILMAZ, K.; SEVIN, B.; KAYGISIZ, Z.; KURAL, T. Cardioprotection with resveratrol pretreatment improved beneficial effects over standard tretment in rat hearts after global ischemia. **Scandinavian Cardiovascular Journal**, v.38, n.4, p.245-254, 2004.

DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G.; BECHARA, E.J.H.; CATALANI, L.H. Singlete molecular oxygen: Generation, reactivity, identification and biological effects. **Ciência e Cultura**, v.47, p.297-311, 1995.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, 2. ed.- São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, Baltimore, v.43, n.2, p.460-472, 1983.

DURAM, R. D.; TORTOSA, M. E.; Weed Science Technology, v.13, 155p., 1985.

DURIGAN, J.C.; ALMEIDA, F.L.S. Noções sobre alelopatia. Jaboticabal: FUNEP, 28p., 1993.

FANG, N.; CASIDA, J. E. New bioactive flavonoids and stilbenes in Cube resin inseticide. Journal of Natural Products, v.62, n.2, p.205-210, 1999.

FEENY, P. Defensive ecology of the Cruciferac. Annals of the Missouri Botanical Garden, v.64, p.221-234, 1977.

GANAPATY, S.; THOMAS, P. S.; J., J. S.; THAN, N.; LAATSCH, H. C-prenylflavonoids from *Derris heyneana*. **Natural Product Communications**, India, v.1, n.2, p.81-85, 2006.

GARCIA, M.; KANO, M. H. C.; VIEIRA, D.1 M.; CELIA, N. M.; MORS, W. B. Isoflavonoids from *Derris spruceana*. **Phytochemistry**, v.25, n.10, p.2425-7, 1986.

GASPAR, J.; LAIRES, A.; MONTEIRO, M.; LAUREANO, O.; RAMOS, E.; RUEFF, J. Quercetin and the mutagenicity of wines. **Mutagenesis**, v.8, n.1, p.51-55, 1993.

GROSS, D. Growth regulating substance of plant origin. **Phytochemistry**, v.14, p.2105-2112, 1975.

HADDEN, M. K.; LAKSHIMI, G.; JASON, E. G.; ROBERT, L. M.; BRIAN, S. J. B. Derrubone, an Inhibitor of the Hsp90 Protein Folding Machinery. **Journal of Natural Products**, n.70, p.2014–2018, 2007.

HALL, A.B.; BLUM, V.; FITES, R.C. Stress modifications of allelopathy of *Helianthus annus* L. debris on seed germination. **American Journal of Botany**, v.69, p.776-783, 1983.

HALLIGAN, J.R Toxic terpenes from Artemisia Californica. Ecology, v.56, p.999-1003, 1975.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemical**, v.59, p.1609-1623, 1992.

. Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutrition Reviews, New York, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.C. Free radicals in Biology and Medicine., 3 ed. New York: Oxford University, p.936, 1999.

_____. Free radicals in biology and medicine. 3 ed. Clarendon, Oxford, p.936, 2000.

HARBORE, J. B. Phytochemical ecology, 272p., 1972.

HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The Flavonoids**. Ed. Chapman e Hall, 376, London, 1975.

HARTMAN, P. E., SHANKEL, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.15, n.3, p.145-182, 1990.

HASLAM, E.; Journal Natural Product v.59, 205p., 1996.

HOWARD R. K. The structure of a nearshore fish community of westernAustralia: diet patterns and the habitat role of limestone reefs. **Environ. Biology of Fishes**, v.24, n.2, p.93-104, 1988.

HSIEH, R.J.; KINSELLA, J.E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Adv. Food Nutrition Res.**, v.33, p.233-241, 1989.

HUSAIN, S. R; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v.26, p.2489-2492, 1987.

JOHNSON, P. W.; PLANT, J. W.; BORAY, J. C.; BLUNT, S. C.; NICHOLIS, P. J. The prevalence of itchmite, Psorergates ovis, among sheep flocks with a history of fleece derangemant. **Australian Veterinary Journal**. V.67, p.117-120, 1990.

JOLY A. B. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo: Ed. Nacional 634p., 1966.

JUNTILA, O.; Physioogy Plant, v.29, p.264, 1976.

KAHKONEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plants extracts containing phenolic compounds., **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p.3954-3962, 1999.

KIM, Y. H.; LEE, E. S.; KOONCHANOK, N. M.; GEAHLEN, R. L.; ASHENDEL, C. L.; CHANG, C. J. Prenylated flavanones from *Derris laxiflora*. **Natural Product Letters**, v.6, n.3, p.223-231, 1995.

KING, S. R. Society for Applied Anthropology; ed; Oklahoma City, 69p., 1994.

KOEPPE, D.E.; SOUTHWICK, L.M.; BITTEL, J.E. The relationship of tissue chlorogenic acid concentratios and leaching of phenolics from samflowers grown under varying phosphorus nutrients conditions. **Canadian Journal of Botany**, v.54, p.593-599, 1976.

KNEKT P. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. **American Journal of Epidemiology**, v.146, n.3, p.223-230, 1997.

LANGENHEIM, I.H.; STUBBLEBINE, W.; FOSTER, C.; NASCIMENTO, J.C. Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvores parental e progênie de espécies selecionadas de *Hymenaea*. I. Comparação de populações amazônicas e venezuelanas. **Acta Amazônica**, v.7, n.3, p.335-354, 1977.

LANGENHEIM, J.H.; FOSTER, C.E.; McGINLEY, R.B. Inhibitory effects of different quantitative compositions of *Hymenaea* leaf resins on a generalist herbivore *Spodoptera exigua*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.8, p.385-396, 1980.

LAUPATTARAKASEM, P.; HOUGHTON, P. J.; HOULT, J. R. S. Anti-inflammatory isoflavonoids from the stems of *Derris scandens*. **Planta Médica**, v.70, n.6, p.496-501, 2004.

LAWRENCE G. H. M. **Taxonomia das Plantas Vasculares** Vol III Lisboa, Portugal Ed. Fundação Caloustre Gulbenkian 854p., 1977.

LEVIN, D.A. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. Annual Review of Ecologie and Systematics, v.7, p.21-159, 1976.

LEWIS G. P. Phylogenetic Relationships Within the Leguminosae- recent advances. In: **CD-Rom** 55° Congresso Nacional de Botânica Viçosa Alpha Mídia Assesoria Fonográfica Ltda, 2004.

LI, X. M.; LIN, M.; WANG, Y. M.; LIU, X. Four new stilbenoids from the lianas of *Gnetum montanum F*. **Planta Médica**, v.70, n.2, p.160-165, 2004.

LI, Y. Q.; SONG, Q. L.; CHEN, P. P.; ZHAO, W. J.; WANG, S. S. Synthesis of hydroxystilbene derivatives and their antioxidant activity by DPPH method. **Chemical Research in Chinese Universities**, v.22, n.6, p.742-746, 2006.

LI, Y.; XU, H. Insecticidal Activities and Active Compounds of *Derris cavaleriei*. Scientia Agricultura Sinica, v. 40, n.8, p. 1688-1696, 2007.

LIMA H. C. Leguminosae arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanecentes florestais do estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro – RJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro, **Tese de Doutorado**.

LIMA, R. R. Informações sobre duas espécies de timbó: *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbride e *Derris nicou* (Killip et Smith) Macbride, como plantas inseticidas. Belém: Embrapa-CPATU, **Documento 42**, 23p., 1987.

LIN, L.; LIN, C.; HSIUNG, K. A Novel 12-Deoxorotenone, 12-Deoxo-12a-Acetoxyelliftone, from the roots of *Derris oblonga*. Journal of Natural Products, n.56, p.1187-1189, 1993.

LISTER, E.; WILSON, P. Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity, Crop Research Institute, Lincoln, New Zealand, 2001.

LIU, M. F.; HAN, Y.; XING, D. M.; SHI, Y.; XU, L. Z.; DU, L. J.; DING, Y. A new stibenoids from *Arundina gramnifolia*. Journal of Asian Natural Products Research, v.6, n.3, p.229-232, 2004.

LU, J.; HO, C. T.; GHAI, G.; CHEN, K. Y. Resveratrol analog, 3,4,5,4'-tetrahydroxystilbene, differentially induces pro-apoptotic p53 / Bax gene expression and inhibits the growth of transformed cells but not their normal counterparts. **Carcinogenesis**, v.22, 2ed., p.321-328, 2001.

LOBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; **Química Nova**, v. 31, p.493-497, 2008.

MABBERLEY, D. J. **The plant book**. A portable dictionary of the vascular plants. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 858p., 1997.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F. Plantas Medicinais: a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Quimica Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAGALHÃES, A. F.; RUIZA, A. L. T. G.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES. E. G. Dihydroflavonols and flavanones from *Lonchocarpus atropurpureus* roots. **Phytochemistry**, 52, 1681-1685 (1999).

MAHABUSARAKAM, W.; DEACHATHAI, S.; PHONGPAICHIT, S.; JANSAKUL, C.; TAYLOR, W. C. A benzil and isoflavone derivatives from *Derris scandens*. **Phytochemistry**, n.60, p.827–834, 2002.

MAHIDOL, C.; PRAWAT, H.; KAWEETRIPOB, W.; RUCHIRAWAT, S. Two new pyranoflavanones from the stems of *Derris reticulata*. Japan Institute of Heterocyclic Chemistry, v.57,n.7, p.1287-1292, 2002.

MAINI, P. N.; MORALLO, B. Molluscicidal activity of *Derris elliptica* (Leguminosae). Journal of Science, v.122, n.1, 61-75,1993.

MALONE, M. H. Jornal Ethnopharmacol, v.8, 127p., 1983.

MARTINEZ-FLORES, S. **Nutr. Hosp.**; v.17, n.6, p.271-278. In: SILVA, M. B. S. Flavonóides com capacidade antioxidante. Química Aplicada, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Lisboa, 2002.

MASUTANI, H. Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. **Int. Journal Hematology,** v.71, p.25-32, 2000.

MATHUR, V.; VATS, S.; JAIN, M.; BHOJAK, J.; KAMAL, R. Antimicrobial activity of bioactive metabolites isolated from selected medicinal plants. Asian Journal of Experimental Sciences, v.21, n.2, p.267-272, 2007.

MATLOCK, G. C.; WEAVER, J. E.; GREEN, A. W. Sampling reashore estuarine fishes with rotenone. American Fisheries Society, v.111, p.326-331, 1982.

MCINDOO, N. E. Derris as na insecticide. Journal of Agricultura Reseach, V.17, n.5, p.177-200, 1919

MCKEY, D. Adaptive patterns in alkaloid physiology. American Naturalist, v.108, p. 305-320, 1974.

MENDONÇA M. P.; LINS L. V. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas de Extinção na flora de Minas Gerais. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte. 157p., 2000.

MENEZES, E. de L. A., Inseticidas Botânicos: Seus Princípios Ativos, Modo de Ação e Uso Agrícola, Documentos 205. **Seropédica:** Embrapa, p.58, 2005.

MICHAEL, S.L.; PUMFORD, N.R.; MAYEUS, P.R.; NIESMAN, M.R.; HINSON, J.A. Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity

and the formation of rective oxygen and nitrogen species. Hepatology., v.30, p.186-195, 1999.

MICHELSON, A.D. Platelets. San Diego: Academic Press; 2002.

MILLER, J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application for monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v.84, p.407–412, 1993.

MORS, W. B. Plantas ictiotóxicas: aspectos químicos (timbós). Ciência e Cultura, São Paulo, v.26, n.7, p.52-55, 1973.

MUKAI, K.; MORIMOTO, H.; OKAUCHI, Y.; NAGAOKA, S. Lipids. n.28, p.753, 1993.

MULLER, C. H. The role of Chemical Inhibition (Allelopathy) in Vegetation Composition. **Bulletin of Torrey Botanical Club**, v.39, n.4, p.322-351, 1966.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Journal Chromatographya A v.1054, 95p., 2004.

NAHUM, C.N.; BORGES, R.S.; DA SILVA, A.B.F. Density Functional Theory Study of Metabolic Derivatives of the Oxidation of Paracetamol **Journal Quantum Chemistry**., v.106, p.2617-2623, 2006.

NAKAYAMA, M.; NISHIMURA, S.; MATSUI, T.; HAYASHI, S.; FUKUI, K. Synthesis of toxicarol isoflavone. **Experientia**, v.27, n.8, p.875b-6, 1971.

NASCIMENTO, M. C.; DIAS, R. L. de V.; MORS, W. B. Flavonoids of *Derris obtusa*: aurones and auronols. **Phytochemistry**, v.15 n.10, p.1553-8, 1976.

NEGHERBON, W. O. Handbook of Toxicology. Insecticides. v.3. Saunders, Philadelphia, 1959.

NERKAR, A. G.; NARYAN, U. L. Antibacterial and pharmacological screening of the chloroform extract of the leaves of *Derris indica*. Journal of Chemical Sciences, v.4, n.3, p.649-654, 2006.

OLSON, E. R.; NAUGLE, J. E.; ZHANG, X.; BOMSER, J. A.; MESZAROS, J. G. Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. **American Journal of Physiologic Heart Circulation and Physiology**, v.21, n.3, p.590-599, 2004.

PACHER, T.; SEGER, C.; ENGELMEIER, D.; VAJRODAYA, S.; HOFER, O.; GREGER, H. Antifungal stilbenoids from *Stemona collinsae*. Journal of Natural Products, v.65, p.820-827, 2002.

PARENTE, J. P.; MORS, W. B. Derrissaponin, a new hydrophilic constituent of Timbo-urucu. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.52, n.3, p.503-14, 1980.

PIRES, J. M. Plantas ictiotóxicas, aspectos da Botânica Sistemática. Sessão Integrada (timbós). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.26, n.7, p.56-61, 1973.

PIRES, J. M. Plantas ictiotóxicas: aspecto da botânica sistemática. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 5., Campinas. Anais... São Paulo: SBPC, p.37-41, 1978.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.; STIRTON, C. H. Evolution and Systematics of the Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H., eds Advances in Legume Systematics part 1. Kew: Royal Botanical Gardens, p.1-26, 1981.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v.67, n.5, p.289-297, 1997.

PORTER, N.A.; CALDWELL, S.E.; MILLS, K.A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. Lipids, v.30, n.4, p.277-290, 1995.

PRIOR, R.L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical in Biology & Medicine, v.**27, p.1173–1181, 1999.

RAFECAS, M.; GUARDIOLA, F.; ILLERA, M.; CODONY, R.; BOATELLA, J.; J. Chromatogr. n.822, p.305, 1998.

RAO, C. V.; GUNASEKAR, D. Indian Journal of Chemistry, Section B, v.27-B, n.4, p.383-384, 1988.

RAO, M. N.; KRUPADANAM, G. L. D.; SRIMANNARAYANA, G. Four isoflavones and two 3-arylcoumarins from stems of *Derris scandens*. **Phytochemistry**, v.37, n.1, p.267-9, 1994.

RAO, S. A.; SRINIVAS, P. V.; TIWARI, A. K.; VANKA, U. M. S.; RAO, R. V. S.; DASARI, K. R.; RAO, M. J. Isolation, Characterization and chemobiological quantification of α-glucosidase enzyme inhibitory and free radical scavenging constituents from *Derris scandens* Benth. **Journal of Chromotography B**, n. 855, p.166-172, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical in Biology & Medicine**, v.26, p.1231–1237, 1999.

REHR, S.S.; JANZEN, D.H.; FEENY, P.P. L-Dopa in legumes seeds: a chemical barrier to insect attack. **Science**, v.181, p.81-82, 1973.

REINERTAEN, H.; JENSEN, A.; KOKSVIK, J. I.; OLSEN, Y. Effects of fish removal on the limnetic ecosystem of an eutrophic lake. **Journal Fishes Aquatic Science** v.47, p.166-173, 1987.

RIBEIRO, A. B.; BOLZANI, V. da S.; YOSHIDA, M. Journal Brasilian Chemical Society, v. 16, n.3, p. 526-530, 2005.

RICE, E.L. Allelopathy. New York: Academic Press, 353p., 1974.
RICE, E.L. Some roles of allelophathic coumpounds in plant communities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.5, n.3, p.201-206, 1977.

RICE, E.L. Allelopathy. New York: Academic Press, 422p., 1984.

RICE, E.L. Allelopathy: an overview. In: WALLER, G.R. Allelochemical, role in agriculture and forestry. Washington, D.C.: American Chemical Society, p.7-22. (ACS. Symposium Series, 330), 1987.

RIETJENS, I.V.M.; BOERSMA, M.G., DE HAAN, L.; SPENKELINK, B.; AWAD, H.M.; CNUBBEN, N.H.P.; VAN ZANDEN, J.J.; VAN DER WOUDE, H.; ALINK, G.M.; KOEMAN, J.H. The pro-oxidant chemistry of natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. Env. **Toxicology Pharmacological**, v.11, p.321-333, 2002.

RIZVI, S. J. H.; HAQUE, H.; SING, V. K.; RIZVI, V. Discipline Called Allelopathy. In: RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. (Ed.). Allelopathy. New York: Champman & Hall. cap. I, p. 1-10, 1992.

ROBAK, J; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anion. **Biochem Pharmacol**, v.37, p.83-88, 1988.

ROCHA, A. I da.; ZOGUHBI, M. G. B. Isoflavones in roots of *Derris species* (Leguminosae). Acta Amazonica, v.12, n.3, p.615-18, 1982.

RODRIGUES, L.R.A.; ALMEIDA, A.R.P.; RODRIGUES, T.J.D. Alelopatia em forrageiras e pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMAS DE PASTAGENS, v.2., 1993, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: FUNEP/FCAV, p.100-129, 1993.

ROSA, P. W. Perfil Fitoquímico, variação sazonal e atividade biológica de *Epidendrum mosenie*. **Dissertação de Mestrado**, Vale do Itajaí – SC – Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêutica – UNIVALI, 2006.

ROSSI, M.; FULE, P. Z.; TAYLOR, M. R. Conformational flexibility in the molecular structure of Rotenone, a naturally occurring insecticide. **Bioorganic Chemistry** v.16, p.376-387, 1988.

RUKAHAISIRIKUL, V.; SUKPODMA, Y.; JANSAKUL, C.; TAYLOR, W. C. Isoflavone glycosides from *Derris scandens*. **Phytochemistry**, v.60, n.8, p.827-834, 2002.

SAITO, M. L.; LUCHINI, F. Substâncias obtidas de Plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguras ao meio ambiente. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 46p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 12), 1998.

SANTOS, J. C. L.; LOBATO, M. P.; SOUZA, J. R. V.; SOUZA, K. M. R.; SOUZA FILHO, A. P.; ARRUDA, M. S. P.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, A. C.; SANTOS, L. S.; Potencial alelopático dos extratos etanólicos de duas espécies de *Derris*. IN: **Resumos**... da *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* (SBQ) 29^a, 2007, Águas de Lindóia-SP.

SANTOS, P. A.; SERRANO, M. A. A.; AQUINO, N.; FRANCISCO, R.; CUNHA, P. A.; TEXEIRA, D. F.; GILBERT, B. Analysis and quantitation of rotenoids and flavonoids in *Derris (Lonchocarpus urucu)* by high-temperature high-resolution gas chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v.38, n.4, p.174-180, 2000.

SCARNECCHIA, D. L. Evaluation of fish eradication and game-fish restocking in a central Iowa pond. **Journal Iowa Academic Science** v.95, n.2, p.55-59, 1988.

SCHULTES, R. E; Lloydia, v.2, 67p., 1963.

SEIGLER, D.S. Primary roles for secondary compounds. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.5, n.3, p.195-199, 1977.

SEKINE, T.; MIYUKI, I.; FUMIO, I.; YUICHI, F.; NIJSIRI, R. Six diprenylisoavones, derrisisoavones A-F, from *Derris scandens*. **Phytochemistry**, n.52, p.87-94, 1999.

SHRISHAILAPPA, B.; ANEESH, R.; SANKAR, S.; SATHISHKUMAR, M. N.; SURESH, B.; RAJAN, S. Antifertility activity of *Derris brevipes* variety coriácea. Journal of Ethnopharmacology, 84, 99-104. 2003.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. European Journal of Biochemistry, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SILVA ,D. H. S.; ZHANG, Y.; SANTOS, L. A.; BOLZANI, V. S.; NAIR, M. G. Lipoperoxidation and yclooxygenases 1 and 2 Inhibitory Compounds from *Iryanthera juruensis* **J. Agric. Food Chem.** 55, 2569-2574, 2007.

SILVA, M. N. Estudo Fitoquímico de *Swietenia macrophilla*: Uma Contribuição ao Controle da Broca do Mogno. **Tese de Doutorado**, São Carlos – SP – Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 2005.

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

SIRIPAISARNPIPAT, S.; KONGJINDA, V.; TECHASAKUL, S. Crystal Structure of New Prenylated Chalcone from *Derris Malaccensis*. Analytical Sciensis, v. 23, 2007.

SMITH, R.H. Effect of monoterpene vapors on the western pine beetle. Journal Economic Entomology, v.58, n.3, p.509-510, 1965.

SMITH, R.H. Resin quality as a factor in the resistance of pines to bark beetles. In: GERHOLD, H.D.; McDERMOTT, R.E.; SCHEINER, E.J. & WINI¬ESHEI, J.A., eds. **Breeding pest-resistant trees**, p.189-196, 1966.

SMITH, A.E. Allelopathic influence of certain pasture weeds. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 16., 1989, Nice. **Proceedings**...Nice, p. 744-748, 1989.

SNYDER, L. R.; KIKERLAND, J.; GLAJCH, J. L. **Pratical HPLC Method Development**. 2^a ed. Jonh Wiley & Sons, inc. p.282-287, 1997.

SOARES, S. E. Review Nutrition v.15, 71p., 2002.

SORWAPORN, K; IAN VAN, A; SHIGERU, K; KAN, C.; Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. **Phytochemistry**, 67, p.1034–1040, 2006.

SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S de M. Alelopatia Princípios Básicos e Aspectos Gerais. Belém: EMBRAPA - CPATU, 260p.,1988.

SOUZA FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, T. J. D.; RODRIGUES, L. R. A. Allelopathy interation among forage grasses and legumes IN: International Grassland Congress 18, 1997. Manitoba, Saskatoom. **Proceedings.**, p.61-62.

SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S de M. Alelopatia em ecossistema de pastagens cultivadas. Belém: EMBRAPA - CPATU, 72p., (EMBRAPA - CPATU. Documentos, 109), 1998.

_____. Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 159p., 2002.

SOUZA FILHO, A. P. S.; LÔBO, L. T.; ARRUDA, M. S. P.; Planta Daninha, , n.23, p.557, 2005.

SPANOS, G.A.; WROLSTAD, R.E. Influence of Variety, Maturity, Processing, and Storage on the Phenolic Composition of Pear Juice? **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.38, p.817-824, 1990.

SZCZEPANSKI, A.J. Allelopathy as a mean of biological of control of water weeds. Aquatic Botany, v.3, p.193-197, 1977.

TAKASHIMA, J.; CHIBA, N.; YONEDA, K.; OHSAKI, A. Derrisin, a New Rotenoid from *Derris malaccensis* Plain and Anti-Helicobacter pylori Activity of Its Related Constituents. **Journal of Natural Products**, n.65, p.611-613, 2002.

TAKEDA, Y.; YANO, K.; AYABE, H.; MASUDA, T.; OTSUKA, H.; SUEYOSHI, E.; SHINZATO, T.; ARAMOTO, M. Glycosidic constituents of the leaves of na Okinawan Leguminosae plant, *Derris trifoliata* Lour. **Natural. Medicinal,** n. 62, p. 476-478, 2008.

TANG, C. S.; CAI, W. F.; KOHL, K.; NISHIMOTO, R. K. Plant stress and allelopathy. IN: DAKSHINI, K. M. M.; EINRELLING, F. A. Allelopathy: organism, processes and adapplication. Washington, **American Chemical Society**, p.142-157, 1995.

THASANA, N.; CHUANKAMMERDKAN, M.; RUCHIRAWAT, S. A new 12ahydroxyelliptone from the stems of *Derris malaccensis*. Japan Institute of Heterocyclic Chemistry, v.55 n.6, p.1121-1125, 2001.

URSO M. L., CLARKSON P. M. Toxicology, v.189, p.41-54 2003.

VACA, C. E.; WILHEM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mutation Research.**, v.195, p.137-149, 1988.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J.; Molecular Cellular Biochemistry v.266, 37p., 2004.

VAN DEN BERG, M.E. Plantas Medicinais da Amazônia: Contribuição ao seu Estudo Sistemático. Belém-Pa : PTU/MPEG, 1982.

VASCONCELOS, M. N. L.; MAIA, J. G. S. Chemical study of Derris negrensis. Manaus. Acta Amazônica. v.6, n.1, p.59-61, 1976.

WARDLE, D.A. Allelopathic in New Zealand pasture grassland ecosystem. **New Zealand Journal Experimental Agriculture,** v.15, p.243-255, 1987.

WHITTAKER, R.H.; FENNY, P.P. Allelochemies: Chemical interation between species. Science, v.171, p.757-770, 1971.

WEBER, V.; COUDERT, P.; RUBAT, C.; DUROUX, E.; E-GOYET, D.V.; GARDETTE, D.; BRIA, M.; ALBUISSON, E.; LEAL, F.; GRAMAIN, J.C.; COUQUELET, J.; MADESCLAIRE, M. Novel 4,5-Diaryl-3-hydroxy-2(5H)-furanones as Anti-Oxidants and Anti-Inflammatory Agents. **Biorganic and Medicine Chemistry**., v.10, p.1647-1658, 2002.

WEIJL, N.I., CLETON, F.J., OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapyinduced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, London, v.23, n.4, p.209-240, 1997.

WILLIAMS, N. H. Floral fragrances as cues in animal behavior. In: JONES, C.E. & LITTLE, R.J., eds. **Handbook of experimental pollination biology**. New York, Scientific and Academic, p.50-72, 1983.

YENESEW, A.; MUSHIBE, E. K.; INDULI, M.; DERESE, S.; MIDIWO, J.O.; KABARU, J, M.; HEYDENREICH, M.; KOCH, A.; PETER, M. G. 7a-*O*-methyldeguelol, a modified rotenoid with an open ring-C from the roots of *Derris trifoliata*. **Phytochemistry**, n.67, p.988-991, 2006.

YENESEW, A.; KIPLAGAT, J. T.; DERESE, S.; MIDIWO, J.O.; KABARU, J, M.; HEYDENREICH, M.; PETER, M. G. Two unusual rotenoid derivatives, 7a-O-methyl-12ahydroxydeguelol and spiro-13-homo-13-oxaelliptone, from the seeds of *Derris trifoliata*. **Phytochemistry**, n.66, p.653-657, 2005.

YU, T-W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

ZHANG, X.; LI, Z.; QIU, M. Three new triterpenoids from *Derris eriocarpa*. Chinese Academy of Sciences, v.24, n.6, p.787-791, 2002.

ZHANG, T.; XU, H.; HUANG, J.; ZHANG, J.; ZHAO, Y. Variation of rotenone in different growth stages of plants and regions. **Huanan Nongye Daxue Xuebao**. v.27, n.3, p.48-50, 2006.

ANEXOS





FOLHAS DE DERRIS URUCU



RAIZES DE DERRIS URUCU



DERRIS URUCU