

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Constituintes Químicos Bioativos de *Dioclea violacea*

André Luís Bacelar Silva Barreiros

Tese submetida ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química da UFBA para a obtenção do título de Doutor em Química.

Salvador
2005

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Constituintes Químicos Bioativos de *Dioclea violacea*

André Luís Bacelar Silva Barreiros

Tese submetida ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química da UFBA para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David

Salvador
2005

A Minha esposa Marizeth Libório Barreiros

Pelo apoio, companheirismo e paciência nestes
sete anos de casados.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto aqui a minha sincera gratidão:

A minha amada companheira, Marizeth Libório Barreiros pelo suporte emocional, paciência e valiosas contribuições em forma de discussão.

Aos meus pais: Geraldo Silva Barreiros e Lêda Maria Bacelar Silva Barreiros pela educação que me proporcionaram, sem a qual não chegaria tão longe, e pelo amor recebido.

Ao Prof. Dr. Jorge Maurício David, por ter acreditado em mim, e que sem a orientação eu não teria chegado tão longe.

A Prof.^a Dr.^a Juceni Pereira de Lima David, por ter acreditado em mim, e pela maravilhosa co-orientação e suporte.

Aos alunos de iniciação que me auxiliaram durante o mestrado e o doutorado: Tatiana, Edlene, Ilton, Aline e Simplícia.

Aos meus professores de graduação e pós-graduação que tanto contribuíram para minha formação.

Aos meus colegas de laboratório, Suzimone, Débora, Marcos, Everaldo, Manuela, Larissa, e todos os outros que tiveram passagem pelo LPPN pelo companheirismo e apoio e valiosas discussões.

Aos meus colegas de pós-graduação, Josanaide pela ajuda na obtenção de espectros, Vânia Rastely, Pedro, entre outros pela paciência e opiniões.

Aos bibliotecários, em especial a Ana Hilda Freitas e Alice Ribeiro pela cooperação e eficiência durante a pesquisa bibliográfica.

Ao técnico Josemário pela obtenção do espectro de IV.

A Prof.^a Dr.^a Zênis Novais da Rocha pelos espectros no UV.

Ao Prof. Dr. Luciano P. de Queiroz da Universidade Estadual de Feira de Santana pela coleta do material vegetal.

A Prof.^a Dr.^a Adelaide F. Alario pelas curvas de DC, ao Prof. Dr. Massayoshi Yoshida pela análise elementar.

Ao Dr. Geoffrey A. Cordell pelos espectros de FABMS.

Ao Prof. Dr. Edilberto da R. Silveira e Daniel Uchoa da CENAURENN-UFC, pelos espectros de RMN bidimensionais.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e ao IMSEAR pelos financiamentos.

A todos os demais que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE QUADROS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVII
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXI
1. Introdução	1
1.1. Levantamento Botânico	2
1.2. Levantamento Fitoquímico	7
1.3. Atividade antioxidante	15
1.3.1. O Estresse Oxidativo	16
1.3.2. A Proteção ao Organismo Contra o Estresse Oxidativo	26
1.3.3. Flavonóides Como Antioxidantes	42
1.4. Atividade Imunomoduladora	46
2. Objetivos	47
3. Experimental	48
3.1. Materiais Métodos	48
3.2. Coleta e Identificação	49
3.3. Extração dos componentes do caule de <i>Dioclea violacea</i>	51
3.4. Purificação do extrato hexânico do caule	52
3.5. Purificação do extrato clorofórmico do caule	59
3.6. Purificação do extrato acetato de etila do caule	71
3.7. Testes de atividade	74
3.7.1. Inibição da autooxidação do β -caroteno	74
3.7.2. Sequestro do radical livre DPPH	76
3.7.3. Atividade imunomoduladora	76
3.8. Síntese das substâncias bioativas	77
4. Estruturas das substâncias isoladas de <i>Dioclea violacea</i>	79
5. Dados físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas	83
6. Identificação e determinação estrutural	92
6.1. Identificação do α -Tocoferol	92

6.2. Esteróides	94
6.2.1. Identificação da estigmast-4-en-3-ona	94
6.2.2. Identificação do estigmast-5-en-3 β -ol (β -sitosterol)	96
6.2.3. Identificação do estigmast-5,22-dien-3 β -ol (estigmasterol)	98
6.3. Triterpenos	101
6.3.1. Identificação do lupeol e β -amirina em mistura	102
6.3.2. Identificação do ácido oleanólico	105
6.4. Flavanonas	108
6.4.1. Identificação da 6-metoxi-7-hidroxi-flavanona	111
6.4.2. Identificação da 5,7-diidroxi-flavanona	117
6.4.3. Identificação da 5,7-diidroxi-8-metoxi-flavanona	120
6.4.4. Identificação da 7-hidroxi-flavanona	123
6.4.5. Determinação estrutural da 7,4'-diidroxi-6-metoxi-flavanona	129
6.4.6. Identificação da 4',7-diidroxi-flavanona	136
6.4.7. Identificação da 7,3',4'-triidroxi-flavanona	142
6.5. Diidroflavonóis	150
6.5.1. Identificação do 7-hidroxi-6-metoxi-flavanonol	152
6.6. Chalconas	160
6.6.1. Identificação da 2',4'-diidroxi-chalcona	163
6.6.2. Identificação da 2',4,4'-triidroxi-3-metoxi-chalcona	169
6.6.3. Identificação da 2',3,4,4'-tetraidroxi-chalcona	175
6.7. Flavan-3-ol	182
6.7.1. Identificação da <i>epicatequina</i>	185
6.8. Proantocianidinas	192
6.8.1. Determinação estrutural da 3',4',7-triidroxi-flavana-(2 β →7,4 β →8)-3-prenil-fustina	194
6.8.2. Identificação da <i>epicatequina</i> -(2 β →7,4 β →8)- <i>epicatequina</i>	208
6.8.3. Identificação da <i>epigallocatequina</i> -(2 β →7,4 β →8)- <i>epicatequina</i>	212
6.9. Biflavonóide	226
6.9.1. Determinação estrutural da α,β' -epoxi,-2,2',4'-triidroxi-chalcona-(β →4')-7,4'-diidroxi-6-metoxi-flavanona	226
6.10. Lactona	246
6.10.1. Identificação da lasiodiplodina	246

6.11. Resultados dos testes de atividade	253
6.11.1. Atividade antioxidante	253
6.11.2. Atividade Imunomoduladora	255
6.12. Síntese de Flavonóides	256
7. Considerações Finais	265
8. Referências Bibliográficas	267
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	284

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto de um espécime de <i>Dioclea violacea</i> , detalhe da flor, autoria do Prof. Jorge M. David.	6
Figura 2 – Substâncias isoladas de <i>Dioclea grandiflora</i>	8
Figura 3 – Exsicata de <i>Dioclea grandiflora</i>	9
Figura 4 – Substâncias isoladas do extrato acetato de etila de <i>Dioclea lasiophylla</i>	11
Figura 5 – Substâncias isoladas do extrato clorofórmico de <i>Dioclea lasiophylla</i>	12
Figura 6 – Substâncias isoladas do extrato hexânico de <i>Dioclea lasiophylla</i>	13
Figura 7 – Exsicata de <i>Dioclea lasiophylla</i>	14
Figura 8 – Principais produtos da oxidação do DNA por ERO e ERN	18
Figura 9 – Principais produtos da oxidação dos aminoácidos e proteínas por ERO e ERN	20
Figura 10 – Aldeídos genotóxicos produzidos pela da oxidação dos lipídios por ERO e ERN, e produtos resultantes de seu ataque ao DNA	21
Figura 11 – Ciclo oxidativo do ascorbato	29
Figura 12 – Ataque à membrana celular e proteção pelo tocoferol e ascorbato	31
Figura 13 – Representação das estruturas dos radicais 4-metoxifenoxil, TMMP e PMHC com os orbitais dos átomos de oxigênio	33
Figura 14 – Principais produtos do ciclo oxidativo do β -caroteno	36
Figura 15 – Regeneração do tocoferol pelo ubiquinol	38
Figura 16 – Sumário das reações envolvendo a atividade antioxidante do ácido úrico	40
Figura 17 – Deslocalização do elétron desemparelhado na 7-hidroxi flavanona	43
Figura 18 – Flavonóides antioxidantes	43
Figura 19 - Mecanismo da estabilização elétron desemparelhado nos flavonóides	44
Figura 20 – Exsicata de <i>Dioclea violacea</i>	50
Figura 21 – Obtenção dos extratos orgânicos do caule de <i>Dioclea violacea</i>	51
Figura 22 – Substâncias isoladas do extrato hexânico de <i>Dioclea violacea</i>	79
Figura 23 – Substâncias isoladas do extrato clorofórmico de <i>Dioclea violacea</i>	80
Figura 24 – Substâncias isoladas do extrato clorofórmico de <i>Dioclea violacea</i> (continuação).	81
Figura 25 – Substâncias isoladas do extrato acetato de etila de <i>Dioclea violacea</i>	82
Figura 26 – EMIE 70 eV de DV1	93
Figura 27 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV1	93
Figura 28 – EMIE 70 eV de DV2	95
Figura 29 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV2	95
Figura 30 – EMIE 70 eV de DV5	97
Figura 31 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV5	97

Figura 32 – Espectro de RMN ¹³ C da mistura DV5 e DV6 [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	99
Figura 33 – EMIE 70 eV de DV5 e DV6	99
Figura 34 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV6	100
Figura 35 – Espectro de RMN ¹ H de DV3 + DV4 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	102
Figura 36 – Espectro de RMN ¹³ C de DV3 + DV4 [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	103
Figura 37 – EMIE 70 eV de DV3 e DV4	103
Figura 38 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV4	104
Figura 39 – Principal fragmentação de massa de DV3	104
Figura 40 – Espectro de RMN ¹ H de DV14 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	105
Figura 41 – Espectro de RMN ¹³ C de DV14 [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	106
Figura 42 – EMIE 70 eV de DV14	106
Figura 43 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV14	107
Figura 44 – Espectro de RMN ¹ H de DV7 (Integração) [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	112
Figura 45 – Espectro de RMN ¹³ C de DV7 [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	112
Figura 46 – Experimento DEPT 135° de DV7 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	113
Figura 47 – Experimento DEPT 90° de DV7 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	113
Figura 48 – Experimento nOe diff de DV7 irradiando em δ = 7,35 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	113
Figura 49 – Experimento nOe diff de DV7 irradiando em δ = 3,93 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	114
Figura 50 – EMIE 70 eV de DV7	114
Figura 51 – Espectros no UV de DV7 em CH ₃ OH com: a) AlCl ₃ , AlCl ₃ + HCl, b) MeONa, c) AcONa.	115
Figura 52 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV7	116
Figura 53 – Espectro de RMN ¹ H de DV9 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	118
Figura 54 – EMIE 70 eV de DV9	118
Figura 55 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV9	119
Figura 56 – Espectro de RMN ¹ H de DV10 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	121
Figura 57 – EMIE 70 eV de DV10	121
Figura 58 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV10	122
Figura 59 – Espectro de RMN ¹ H de DV13 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	124
Figura 60 – Espectro de RMN ¹ H de DV13 (ampliação) [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	124
Figura 61 – Espectro de RMN ¹³ C de DV13 [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	125
Figura 62 – Experimento DEPT 135° de DV13 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	125
Figura 63 – Experimento DEPT 135° de DV13 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	126

Figura 64 – EMIE 70 eV de DV13	126
Figura 65 – Espectro no UV de DV13 em CH ₃ OH com: a) AlCl ₃ e AlCl ₃ + HCl, b) MeONa c) AcONa	127
Figura 66 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV13	128
Figura 67 – Espectro de RMN ¹ H de DV16 [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	130
Figura 68 – Espectro de RMN ¹ H de DV16 (integração) [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	131
Figura 69 – Espectro de RMN ¹ H de DV16 (ampliação) [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	131
Figura 70 – Espectro de RMN ¹³ C de DV16 [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	132
Figura 71 – Experimento DEPT 135° de DV16 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	132
Figura 72 – EMIE 70 eV de DV16	133
Figura 73 – Espectro no UV de DV16 em CH ₃ OH com: a) AlCl ₃ e AlCl ₃ + HCl, b) MeONa, c) AcONa	134
Figura 74 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV16	135
Figura 75 – Espectro de RMN ¹ H de DV18 [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	137
Figura 76 – Espectro de RMN ¹ H de DV18 (integração) [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	137
Figura 77 – Espectro de RMN ¹ H de DV18 (ampliação) [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	138
Figura 78 – Espectro de RMN ¹ H de DV18 (ampliação) [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	138
Figura 79 – Espectro de RMN ¹³ C de DV18 [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	138
Figura 80 – Experimento DEPT 135° de DV18 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	139
Figura 81 – EMIE 70 eV de DV18	139
Figura 82 – Espectro no UV de DV18 em CH ₃ OH com: a) AlCl ₃ e AlCl ₃ + HCl, b) MeONa, c) AcONa	140
Figura 83 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV18	141
Figura 84 – Espectro de RMN ¹ H de DV19 [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	143
Figura 85 – Espectro de RMN ¹ H de DV19 (ampliação) [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	144
Figura 86 – Espectro de RMN ¹ H de DV19 (ampliação) [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	144
Figura 87 – Espectro de RMN ¹³ C de DV19 [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	144
Figura 88 – Experimento DEPT 135° de DV19 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	145
Figura 89 – EMIE 70 eV de DV19	145
Figura 90 – Espectro no UV de DV19 em CH ₃ OH com: a) AlCl ₃ e AlCl ₃ + HCl, b) MeONa, c) AcONa	146
Figura 91 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV19	147
Figura 92 – Espectro de RMN ¹ H de DV8 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	153
Figura 93 – Espectro de RMN ¹ H de DV8 (integração) [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	153
Figura 94 – Espectro de RMN ¹³ C de DV8 [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	154

Figura 95 – Experimento DEPT 135° de DV8 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	154
Figura 96 – Experimento DEPT 90° de DV8 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	154
Figura 97 – Experimento nOe diff de DV8 irradiando em δ = 6,57 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	155
Figura 98 – Experimento nOe diff de DV8 irradiando em δ = 3,31 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	155
Figura 99 – Experimento nOe diff de DV8 irradiando em δ = 3,98 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	156
Figura 100 – EMIE 70 eV de DV8	156
Figura 101 – Espectro no UV de DV8 em CH ₃ OH com: a) AlCl ₃ e AlCl ₃ + HCl, b) MeONa, c) AcONa	157
Figura 102 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV8	158
Figura 103 – Espectro de RMN ¹ H de DV11 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	164
Figura 104 – Espectro de RMN ¹ H de DV11 (integração) [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	164
Figura 105 – Espectro de RMN ¹³ C de DV11 [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	165
Figura 106 – Experimento DEPT 135° de DV11 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	165
Figura 107 – EMIE 70 eV de DV11	166
Figura 108 – Espectro no UV de DV11 em CH ₃ OH com: a) AlCl ₃ e AlAl ₃ + HCl, b) MeONa, c) AcONa	167
Figura 109 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV11	168
Figura 110 – Espectro de RMN ¹ H de DV15 [300 MHz, CD ₃ OD, δ (ppm)]	170
Figura 111 – Espectro de RMN ¹³ C de DV15 [75 MHz, CD ₃ OD, δ (ppm)]	171
Figura 112 – Experimento DEPT 135° de DV15 (ampliação) [75 MHz, CD ₃ OD, δ (ppm)]	171
Figura 113 – EMIE 70 eV de DV15	172
Figura 114 – Espectro no UV de DV15 em CH ₃ OH com: a) AlCl ₃ e AlCl ₃ + HCl, b) MeONa, c) AcONa	173
Figura 115 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV15	174
Figura 116 – Espectro de RMN ¹ H de DV20 [300 MHz, CD ₃ OD, δ (ppm)]	176
Figura 117 – Espectro de RMN ¹ H de DV20 (integração) [300 MHz, CD ₃ OD, δ (ppm)]	176
Figura 118 – Espectro de RMN ¹³ C de DV20 + DV19 [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	177
Figura 119 – Experimento DEPT 135° de DV20 + DV19 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	177
Figura 120 – EMIE 70 eV de DV20	178
Figura 121 – Espectro no UV de DV20 em CH ₃ OH com: a) AlCl ₃ e AlCl ₃ + HCl, b) MeONa, c) AcONa	179

Figura 122 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV20	180
Figura 123 – Espectro de RMN ^1H de DV22 [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	186
Figura 124 – Espectro de RMN ^1H de DV22 (integração) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	186
Figura 125 – Espectro de RMN ^{13}C de DV22 [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	187
Figura 126 – Experimento DEPT 135° de DV22 (ampliação) [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	187
Figura 127 – EMIE 70 eV de DV22	188
Figura 128 – Espectro no UV de DV22 em CH_3OH com: a) AlCl_3 e $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$, b) MeONa , c) AcONa	189
Figura 129 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV22	190
Figura 130 – Espectro de RMN ^1H de DV21 [300 MHz, DMSO, δ (ppm)]	197
Figura 131 – Espectro de RMN ^1H de DV21 (integração) [300 MHz, DMSO, δ (ppm)]	197
Figura 132 – Espectro de RMN ^1H de DV21 (ampliação) [300 MHz, DMSO, δ (ppm)]	198
Figura 133 – Espectro de RMN ^1H de DV21 (ampliação) [300 MHz, DMSO, δ (ppm)]	198
Figura 134 – Espectro de RMN ^1H de DV21 (ampliação) [300 MHz, DMSO, δ (ppm)]	199
Figura 135 – Espectro de RMN ^{13}C de DV21 [75 MHz, DMSO, δ (ppm)]	199
Figura 136 – Espectro de RMN ^{13}C de DV21 (ampliação) [75 MHz, DMSO, δ (ppm)]	199
Figura 137 – Espectro de RMN ^{13}C de DV21 (ampliação) [75 MHz, DMSO, δ (ppm)]	200
Figura 138 – Espectro de RMN ^{13}C de DV21 (ampliação) [75 MHz, DMSO, δ (ppm)]	200
Figura 139 – Experimento DEPT 135 de DV21 (ampliação) [75 MHz, DMSO, δ (ppm)]	201
Figura 140 – Experimento DEPT 135 de DV21 (ampliação) [75 MHz, DMSO, δ (ppm)]	201
Figura 141 – Experimento nOe irradiando em δ 4,13 ppm de DV21 [300 MHz, DMSO, δ (ppm)]	202
Figura 142 – Experimento nOe irradiando em δ 3,35 ppm de DV21 [300 MHz, DMSO, δ (ppm)]	202
Figura 143 – Experimento HMQC de DV21 [500 MHz, DMSO, δ (ppm)]	203
Figura 144 – Experimento HMQC de DV21 (ampliação) [500 MHz, DMSO, δ (ppm)]	204
Figura 145 – Experimento HMBC de DV21 [500 MHz, DMSO, δ (ppm)]	205
Figura 146 – Experimento HMBC de DV21 (ampliação) [500 MHz, DMSO, δ (ppm)]	206
Figura 147 – Correlações observadas no espectro HMBC e incrementos de “nOe diff” de DV21	207
Figura 148 – Espectro de RMN ^1H de DV23 [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	208
Figura 149 – Espectro de RMN ^1H de DV23 (integração) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	209
Figura 150 – Espectro de RMN ^1H de DV23 (ampliação) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	210
Figura 151 – Espectro de RMN ^{13}C de DV23 [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	210
Figura 152 – Experimento DEPT 135° de DV23 (ampliação) [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	210

Figura 153 – Experimento DEPT 90° de DV23 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	211
Figura 154 – Experimento DEPT 90° de DV23 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	211
Figura 155 – Espectro de RMN ¹ H de DV24 (integração) [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	215
Figura 156 – Espectro de RMN ¹ H de DV24 (ampliação) [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	216
Figura 157 – Espectro de RMN ¹³ C de DV24 [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	216
Figura 158 – Espectro de RMN ¹³ C de DV24 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	217
Figura 159 – Espectro de RMN ¹³ C de DV24 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	217
Figura 160 – Experimento DEPT 135° de DV24 (Ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	218
Figura 161 – Experimento DEPT 135° de DV24 (Ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	218
Figura 162 – Experimento DEPT 90° de DV24 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	218
Figura 163 – Experimento HETCOR ¹ H- ¹³ C de DV24 (J= 140 Hz) [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	219
Figura 164 – Experimento HETCOR ¹ H- ¹³ C (J= 9Hz) de DV24 [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	219
Figura 165 – Experimento HETCOR ¹ H- ¹³ C (J= 11Hz) de DV24 [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	220
Figura 166 – Experimento COSY ¹ H- ¹ H de DV24 [300 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	220
Figura 167 – Dicroísmo Circular de DV24	221
Figura 168 – EM no modo FAB negativo de DV24	222
Figura 169 – EM no modo FAB positivo de DV24	222
Figura 170 – Correlações observadas nos espectros bidimensionais de DV24	223
Figura 171 – Espectro de RMN ¹ H de DV17 (integração) [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	230
Figura 172 – Espectro de RMN ¹ H de DV17 (ampliação) [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	231
Figura 173 – Espectro de RMN ¹ H de DV17 (ampliação) [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	231
Figura 174 – Espectro de RMN ¹³ C de DV17 [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	232
Figura 175 – Espectro de RMN ¹³ C de DV17 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	232
Figura 176 – Espectro de RMN ¹³ C de DV17 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	232
Figura 177 – Espectro de RMN ¹³ C de DV17 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	233
Figura 178 – Espectro de RMN ¹³ C de DV17 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	233
Figura 179 – Experimento DEPT 135° de DV17 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	234
Figura 180 – Experimento DEPT 135° de DV17 (ampliação) [75 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	234
Figura 181 – Experimento HMQC de DV17 [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	235
Figura 182 – Experimento HMQC de DV17 (ampliação) [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	236
Figura 183 – Experimento HMQC de DV17 (ampliação) [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	237
Figura 184 – Experimento HMBC de DV17 [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	238

Figura 185 – Experimento HMBC de DV17 (ampliação) [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	239
Figura 186 – Experimento HMBC de DV17 (ampliação) [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	240
Figura 187 – Experimento NOESY de DV17 [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	241
Figura 188 – Experimento NOESY de DV17 (ampliação) [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	242
Figura 189 – Experimento NOESY de DV17 (ampliação) [500 MHz, (CD ₃) ₂ CO, δ (ppm)]	243
Figura 190 – Correlações observadas nos espectros bidimensionais de DV17	244
Figura 191 – Espectro de RMN ¹ H de DV12 (integração) [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	247
Figura 192 – Espectro de RMN ¹³ C de DV12 [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	248
Figura 193 – Experimento DEPT 135° de DV12 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	248
Figura 194 – Experimento DEPT 135° de DV12 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	248
Figura 195 – Experimento DEPT 90° de DV12 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	249
Figura 196 – EMIE 70 eV de DV12	249
Figura 197 – Espectro no UV de DV12 em CH ₃ OH com: a) AlCl ₃ e AlCl ₃ + HCl, b) MeONa, c) AcONa	250
Figura 198 – Espectro IV de DV12 em KBr	251
Figura 199 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV12	251
Figura 200 – Atividade antioxidante pelo método da inibição da autooxidação do β-caroteno	254
Figura 201 – Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH	254
Figura 202 – Atividades citotóxica, inibição da síntese de NO e inibição da proliferação de linfócitos	255
Figura 203 – Espectro de RMN ¹ H de S1 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	259
Figura 204 – Espectro de RMN ¹ H de S1 (ampliação) [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	259
Figura 205 – Espectro de RMN ¹ H de S1 (ampliação) [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	260
Figura 206 – Espectro de RMN ¹³ C de S1 [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	260
Figura 207 – Espectro de RMN ¹³ C de S1 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	261
Figura 208 – Espectro de RMN ¹³ C de S1 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	261
Figura 209 – Experimento DEPT 135° de S1 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	262
Figura 210 – Espectro de RMN ¹ H da mistura S2 e S1 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	262
Figura 211 – Espectro de RMN ¹³ C da mistura S2 e S1 [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	263
Figura 212 – Espectro de RMN ¹³ C da mistura S2 e S1 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	263
Figura 213 – Espectro de RMN ¹³ C da mistura S2 e S1 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	264
Figura 214 – Experimento DEPT 135° da mistura S2 e S1 (ampliação) [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)]	264

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frações obtidas da CC principal do extrato hexânico do caule	52
Tabela 2 – Frações obtidas da CC de CDVH15	53
Tabela 3 - Frações obtidas da CC sob pressão de N ₂ de CDVH15-16	53
Tabela 4 – Frações obtidas da CC sob pressão de N ₂ de CDVH15-16-20	54
Tabela 5 – Frações obtidas da CC de CDVH20	54
Tabela 6 – Frações obtidas da CC de CDVH28	55
Tabela 7 – Frações obtidas da CC sob pressão de N ₂ de CDVH28-51	56
Tabela 8 – Frações obtidas da Permeação em Sephadex LH-20 de CDVH28-51-24	56
Tabela 9 – Frações obtidas da CC sob pressão de N ₂ de CDVH28-51-33	59
Tabela 10 – Frações obtidas da CC de CDVH30	57
Tabela 11 – Frações obtidas da CC de CDVH38	58
Tabela 12 – Frações obtidas da CC principal do extrato clorofórmico do caule	59
Tabela 13 – Frações obtidas da CC de CDVC21	60
Tabela 14 – Frações obtidas da CCDP de CDVC21-5	60
Tabela 15 – Frações obtidas da CC sob pressão de N ₂ de CDVC21-12	61
Tabela 16 – Frações obtidas da CC sob pressão de N ₂ de CDVC25	62
Tabela 17 – Frações obtidas da CCDP de CDVC25-9	62
Tabela 18 – Frações obtidas da Permeação em Sephadex LH-20 de CDVC25-34	63
Tabela 19 – Frações obtidas por CCDP de CDVC25-34-5	63
Tabela 20 – Frações obtidas da permeação em Sephadex LH-20 de CDVC25-43	64
Tabela 21 – Frações obtidas da CC sob pressão de N ₂ de CDVC48	65
Tabela 22 – Frações obtidas por CCDP de CDVC48-23	65
Tabela 23 – Frações obtidas da CC de CDVC53	66
Tabela 24 – Frações obtidas da CCDP de CDVC53-16	66
Tabela 25 – Frações obtidas por permeação em sephadex LH-20 de CDVC53-16A	67
Tabela 26 – Frações obtidas da CCDP de CDVC53-16B	67
Tabela 27 – Frações obtidas por CC sob pressão de N ₂ CDVC60	68
Tabela 28 – Frações obtidas da CC de CDVC64C	69
Tabela 29 – Frações obtidas da permeação em gel de Sephadex LH-20 de CDVC64C-5	69
Tabela 30 – Frações obtidas da permeação em gel de Sephadex LH-20 de CDVC64C-5-7	69
Tabela 31 – Frações obtidas da CC de CDVC68	70
Tabela 32 – Frações obtidas da CC principal do extrato acetato de etila do caule	71
Tabela 33 – Frações obtidas da CCDP de CDVA2	71
Tabela 34 – Frações obtidas da CCDP de CDVA4	72

Tabela 35 – Frações obtidas da CC de CDVA8	72
Tabela 36 – Frações obtidas da CC sob pressão de N ₂ de CDVA8-24	73
Tabela 37 – Dados de RMN ¹ H das flavanonas [300 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)]	148
Tabela 38 – Dados de RMN ¹³ C das flavanonas [75 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)]*	149
Tabela 39 – Dados de RMN ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) do diidroflavonol [CDCl ₃ , δ (ppm)]	159
Tabela 40 – Dados de RMN ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) das chalconas [CDCl ₃ , δ(ppm)]	181
Tabela 41 – Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do flavan-3-ol [(CD ₃) ₂ CO]	191
Tabela 42 – Dados de RMN ¹ H e ¹³ C, HMQC e HMBC de DV21 e DV23	224
Tabela 43 – ¹ H NMR* , ¹³ C NMR** , HETCOR e correlações ¹ H- ¹³ C a longa distância de DV24	225
Tabela 44 – Dados de RMN ¹³ C (75 MHz), ¹ H (500 MHz), HMQC e HMBC de DV17 [(CD ₃) ₂ CO]	245
Tabela 45 – Dados de RMN ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) de DV12 [CDCl ₃ , δ (ppm)]	252

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –Espécies de <i>Dioclea</i> de ocorrência no Brasil	4
--	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

8OHdA	5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina
8OhdG	5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina
8-oxoA	8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiadenosídeo
8-oxoG	8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosídeo
AA	atividade antioxidante
AcOEt	acetato de etila
AG-CoA	ácido graxo coenzima A
AVC	acidente vascular cerebral
BuOH	butanol
CAT	catalase
CC	cromatografia em coluna
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CDVA	extrato acetato de etila do caule
CDVC	extrato clorofórmico do caule
CDVH	extrato hexânico do caule
CE	cromatografia por exclusão
CG	cromatografia gasosa
CG/EM	cromatografia gasosa/espectrometria de massas
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>d</i>	dubleto
δ	deslocamento químico
DC	dicroísmo circular
DCM	diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement Polarization Transfer
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	difenilpicrilhidrazil
<i>dt</i>	duplo tripleto
EM	espectrometria de massas
EMIE	espectrometria de massas por impacto de elétrons
ERN	espécies reativas de nitrogênio

ERO	espécies reativas de oxigênio
EtOH	etanol
FABMS	espectrometria de massas por bombardeamento de átomos rápidos
F ₂₅₄	fluoresceína
FapyA	4,6-diamino-5-formamido-pirimidina
FapyG	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
FM	fórmula molecular
GPx	Se-glutationa peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa
Hex.	hexano
HETCOR	Espectroscopia de Correlação Heteronuclear
HMBC	Heteronuclear Multi Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPODE	Ácido hidroperoxioctadecadienóico
HUEFS	Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana
IE	impacto de elétrons
J	constante de acoplamento
λ	comprimento de onda
LPPN	Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais
[M] ^{+•}	íon molecular
MeOH	metanol
MHz	megahertz
<i>m/z</i>	relação massa/carga
<i>m</i>	multiplete
MM	massa molecular
“ <i>nOe diff</i> ”	Nuclear Overhauser Effect difference
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PMHC	2,2,5,7,8-pentametil-6-hidroxicromano
PND	“proton-noise-decoupled”
Pyr-d ₅	piridina deuterada
<i>q</i>	quarteto

RDA	Retro Diels-Alder
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
<i>s</i>	singleto
S _H i	Substituição Homolítica Intramolecular
SOD	Superóxido dismutase
<i>t</i>	tripleto
TMMP	2,3,5,6-tetrametil-4-metoxifenol
UV	ultra violeta

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico de *Dioclea violacea* Mart. além da avaliação das atividades antioxidante e imunomoduladora das substâncias isoladas. *Dioclea violacea* é uma trepadeira pertencente à família Leguminosae (Fabaceae), subfamília Faboideae (Papilionoideae), tribo Phaseoleae, que ocorre no litoral desde a Guiana até o estado de São Paulo. O caule de um espécime foi coletado no município de Umburanas, Bahia, em área de vegetação de caatinga e relevo de tabuleiro. Após secagem e moagem o material foi submetido à maceração com metanol. O extrato metanólico obtido foi particionado fornecendo os extratos hexânico, clorofórmico e acetato de etila. Os extratos foram submetidos a purificação separadamente, sendo seus constituintes isolados e purificados através de técnicas de CC e CCDP em gel de sílica 60, 60H, 60PF, Poliamida 6 e 11 e permeação em gel de Sephadex LH20. Deste modo, as substâncias isoladas tiveram suas estruturas elucidadas através da análise de dados de RMN de ^1H , ^{13}C incluindo experimentos DEPT, “nOe diff”, além de técnicas bidimensionais como HETCOR, HOMO/COSY, HMQC, HMBC, NOESY, auxiliadas por EMIE, FAB, UV, IV, $[\alpha]_D^{25}$ e CD. Do extrato hexânico foram isolados e identificados α -tocoferol, estigmast-4-en-3-ona, β -sitosterol, estigmasterol, lupeol e β -amirina. Do extrato clorofórmico foram isolados ácido oleanólico, a nova flavanona 7,4'-diidroxí-6-metoxiflavanona, além das 7-hidroxi-6-metoxiflavanona, 5,7-diidroxiflavanona, 5,7-diidroxí-8-metoxiflavanona, 7-hidroxi-6-metoxiflavanona, 4',7-diidroxiflavanona, 7,3',4'-triidroxiflavanona já anteriormente isoladas de outras fontes. Além disso, foram também isolados deste extrato o 7-hidroxi-6-metoxiflavanonol, 2',4'-diidroxichalcona, 2',4,4'-triidroxí-3-metoxichalcona, 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona, além da lactona lasiodiplodina e de um novo biflavonóide α,β' -epoxi,-2,2',4'-triidroxichalcona-($\beta \rightarrow 4'$)-7,4'-diidroxí-6-metoxiflavanona. Enquanto que, do extrato acetato de etila foram isolados a epicatequina, a proantocianidina do tipo A denominada 3',4',7-triidroxiflavana-($2\beta \rightarrow 7,4\beta \rightarrow 8$)-3-prenil-fustina, e outras duas proantocianidinas do tipo A_2 ; epicatequina-($2\beta \rightarrow 7,4\beta \rightarrow 8$)-epicatequina e epigalocatequina-($2\beta \rightarrow 7,4\beta \rightarrow 8$)-epicatequina. As substâncias isoladas foram submetidas a testes de atividade antioxidante pelos métodos de inibição da autooxidação do β -caroteno, e seqüestro do radical livre DPPH, sendo que a epicatequina e as proantocianidinas epicatequina-($2\beta \rightarrow 7,4\beta \rightarrow 8$)-epicatequina e epigalocatequina-($2\beta \rightarrow 7,4\beta \rightarrow 8$)-epicatequina foram as mais ativas. Algumas das substâncias foram submetidas a testes de atividade imunomoduladora pelos métodos de inibição da proliferação de linfócitos e inibição da síntese de NO, onde a 7-hidroxi-6-metoxiflavanona demonstrou maior atividade. A substância mais ativa 7-hidroxi-6-metoxiflavanona foi sintetizada a partir da reação de esterificação do ácido cinâmico com o resorcinol em presença de ácido polifosfórico, seguida de rearranjo de Fries e ciclização, porém com baixo rendimento (1,6%). Os produtos principais da reação foram a 7-hidroxi-3,4-diidro-4-fenilcumarina (68,7%) e a 5-hidroxi-3,4-diidro-4-fenilcumarina (11,2%).

Palavras Chave: *Dioclea*, Leguminosae, flavonóides, proantocianidinas, atividade antioxidante, atividade imunomoduladora

ABSTRACT

This work describes the phytochemical studies of *Dioclea violacea* Mart. and the antioxidant and immunomodulatory activities evaluation of the isolates. *Dioclea violacea* is a climber plant belonging to Leguminosae (Fabaceae) family, sub-family Faboideae (Papilionoideae), tribe Phaseoleae, and it occurs in the coast from Guianes to São Paulo State (Brazil). The stems of one specimen was collected in Umburanas city, Bahia, in the characteristic “caatinga” vegetation and tableland area. The material after drying and powdering was submitted to extraction with methanol. The methanolic extract was partitioned furnishing hexanic, chloroformic and ethyl acetate extracts. These extracts were submitted to purification separately and, their constituents were isolated and purified by CC and PTLC techniques in silica gel 60, 60H, 60PF, polyamide 6 and 11 and gel permeation on Sephadex LH20. In that way, the purified substances had its structures elucidated by ^1H and ^{13}C NMR including DEPT and nOe diff experiments, including two-dimensional techniques like HETCOR, HOMO/COSY, HMQC, HMBC, NOESY, and by EIMS, FAB, UV, IR, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ and DC data. From the hexanic extract were isolated and identified α -tocopherol, stigmast-4-en-3-one, β -sitosterol, stigmasterol, lupeol and β -amirin. From the chloroformic extract were isolated oleanolic acid, the new flavanone 7,4'-dihydroxy-6-methoxyflavanone, 7-hydroxy-6-methoxyflavanone, 5,7-dihydroxyflavanone, 5,7-dihydroxy-8-methoxyflavanone, 7-hydroxyflavanone, 4',7-dihydroxyflavanone, 7,3',4'-trihydroxyflavanone all previously isolated from other sources. It was also isolated from this extract 7-hydroxy-6-methoxyflavanonol, 2',4'-dihydroxychalcone, 2',4,4'-trihydroxy-3-methoxychalcone, 2',3,4,4'-tetrahydroxychalcone, besides the lactone lasiodiplodin and a new biflavonoid named α,β -epoxy,-2,2',4'-trihydroxychalcone-($\beta\rightarrow 4'$)-7,4'-dihydroxy-6-methoxyflavanone. From the ethyl acetate extract were isolated epicatechin, a new A-type proanthocyanidin named 3',4',7-trihydroxyflavan-($2\beta\rightarrow 7,4\beta\rightarrow 8$)-3-prenyl-fustin, besides epicatechin-($2\beta\rightarrow 7,4\beta\rightarrow 8$)-epicatechin and epigallocatechin-($2\beta\rightarrow 7,4\beta\rightarrow 8$)-epicatechin. The isolates were submitted to antioxidant evaluation employing the inhibition of β -carotene auto oxidation and DPPH scavenging methods, in which the more active substances were epicatechin, epicatechin-($2\beta\rightarrow 7,4\beta\rightarrow 8$)-epicatechin and epigallocatechin-($2\beta\rightarrow 7,4\beta\rightarrow 8$)-epicatechin. Some of the compounds were also submitted to immunomodulatory tests by the methods of inhibition of lymphocytes proliferation and inhibition of NO synthesis, where the most active compound was 7-hydroxyflavanone. Finally, the most active compound 7-hydroxyflavanone was synthesized from cinnamic acid and resorcinol by esterification reaction with polyphosphoric, followed by Fries rearrangement and cyclization, in lower yield (1,6%). The main products of reaction were 7-hydroxy-3,4-dihydro-4-phenylcumarin (68,7%) e a 5-hydroxy-3,4-dihydro-4-phenylcumarin (11,2%).

Keywords: *Dioclea*, Leguminosae, flavonoids, proanthocyanidins, antioxidant activity, immunomodulatory activity