

3. Experimental

3.1. Materiais e Métodos

Nas separações por CC foram empregadas como fases estacionárias gel de sílica 60 da Merck com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm e gel de sílica 60H da Merck com diâmetro de partícula aproximado de 15 µm para CC, sob pressão de N₂, poliamida 6 e 11 da Baker com diâmetro de 50 µm, e Sephadex LH-20 da Pharmacia para permeação.

Nas CCDC foram utilizadas placas preparadas com gel de sílica 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ da Merck, as quais foram ativadas em estufa a 100°C por 1h. Também foram utilizadas placas pré-preparadas de gel de sílica 60 F₂₅₄ da Merck e de gel de sílica IB2-F₂₅₄ da J. T. Baker-Chemical Co.

Nas CCDP foram utilizadas placas de gel de sílica 60 F₂₅₄ de 1mm de espessura da Merck, e placas cromatográficas de alta resolução de gel de sílica fluorescente a 254 nm de 200 µm de espessura da Whatman.

Os solventes utilizados foram hexano, éter de petróleo, benzeno, clorofórmio, diclorometano, éter etílico, acetato de etila, acetona, etanol, metanol, ácido acético e butanol das marcas Merck, QUIMEX e Synth, todos grau P.A.

A evaporação dos solventes foi realizada à pressão reduzida utilizando evaporadores rotatórios, a temperaturas em geral entre 35°C e 60°C.

As placas de CCDP foram reveladas por irradiação com luz UV (254 e 366 nm), enquanto que as placas de CCDC foram reveladas com luz UV (254 e 365 nm), vapores de iodo e/ou reveladores químicos. Dentre estes, os mais utilizados foram o reagente de Liberman-Burchard, e FeCl₃ (STAHL, 1969).

Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho GEMINI 2000 da Varian operando a 300 MHz para ¹H e 75 MHz para ¹³C e utilizando CDCl₃, CD₃OD, (CD₃)₂CO, Pyr-d₅, DMSO-d₆ e D₂O como solventes e o sinal do hidrogênio ou do ¹³C dos solventes, como referência interna. Os espectros HMBC e HMQC foram obtidos em aparelho BRUKER ADVANCE DRX-500 operando a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C.

Os espectros de massas da técnica FAB foram registrados em espectrômetros de massas Finnigan MAT 90, e da técnica IE em espectrômetros HP modelo 5988-A e modelo 5973 através do método de inserção direta ou CG/EM com CG HP modelo 6890.

Os espectros de infravermelho foram registrados em aparelho da JASCO modelo VALOR-III em filme ou em pastilha de KBr.

Os espectros de UV foram registrados em espectrofotômetro Varian modelos Cary I.

Os $[\alpha]_D$ foram obtidos em polarímetro da marca CARL ZEISS modelo 135047.

A curva de DC foi obtida num espectro polarímetro da JASCO.

3.2. Coleta e Identificação

Partes aéreas de um espécime de *Dioclea violacea* Mart, (ex. Benth.) foram coletadas no município de Umburanas, Bahia, a 20 Km na estrada para Umburanas 10°36'S e 41°17'W, em área de vegetação de caatinga, em relevo de tabuleiro sobre solo arenoso, sob número de coleta L. P. Queiroz 5471. O espécime foi identificado pelo Prof. Dr. Luciano Paganucci de Queiroz, e a exsicata da planta foi catalogada sob o número 37040 e encontra-se depositada no Herbário de Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) (Figura 20).



Figura 20 – Exsicata de *Dioclea violacea*

3.3. Extração dos componentes do caule de *Dioclea violacea*

As partes aéreas coletadas da planta foram secas em estufa a 40°C com ventilação. Após a secagem, as folhas foram separadas do caule. As folhas não foram trabalhadas devido à pequena quantidade coletada. O caule seco foi moído, obtendo-se 843,40g de material, que foi então submetido à maceração com MeOH por três vezes consecutivas durante uma semana cada, seguida de concentração e secagem, obtendo-se assim 69,61g de extrato metanólico. Este por sua vez foi redissolvido em MeOH/H₂O (9/1) e particionado entre Hexano:MeOH/H₂O (9/1), CHCl₃:MeOH/H₂O (6/4), AcOEt:H₂O e BuOH:H₂O, conforme esquema proposto na Figura 21.

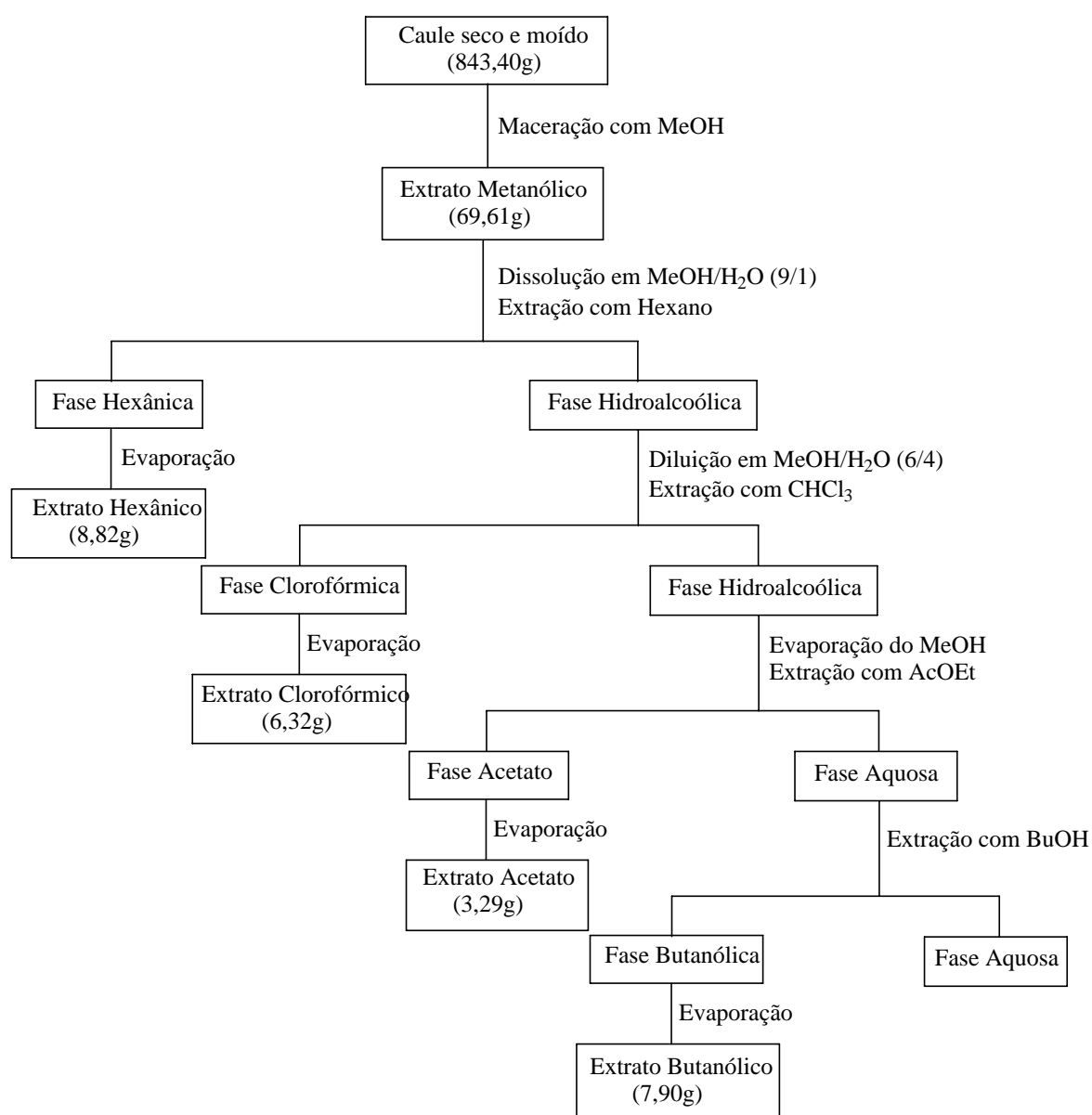


Figura 21 – Obtenção dos extratos orgânicos do caule de *Dioclea violacea*

3.4. Purificação do extrato hexânico do caule

Parte do extrato hexânico do caule (8,82g) foi inicialmente avaliado por RMN ^1H , o que indicou presença de triterpenos, esteróides e material graxo. Em seguida foi fracionado através de cromatografia em coluna sob gel de sílica 60, utilizando como fase móvel o sistema hexano/AcOEt em grau crescente de polaridade. Desta coluna principal foram recolhidas 53 frações de 50 ml, que foram reunidas posteriormente em 12 frações após análise em CCD e revelação com reagente de Lieberman-Burchard (Tabela 1).

Tabela 1 – Frações obtidas da CC principal do extrato hexânico do caule

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (Hex.:AcOEt)	Substâncias Isoladas
CDVH11	1-11	74,2	99:1	Desprezada
CDVH15	12-15	1123,0	95:5	DV1
CDVH20	16-20	430,8	95:5 e 9:1	DV2
CDVH28	21-28	1632,0	9:1 e 8:2	DV3, DV4 e DV5
CDVH30	29-30	400,2	8:2	DV3, DV4 e DV5
CDVH34	31-34	276,7	8:2	CCDC: DV3, DV4 e DV5
CDVH38	35-38	147,1	7:3	CCDC: DV3, DV4 e DV5
CDVH40	39-40	156,9	7:3	CCDC: DV5 e DV6
CDVH44	41-44	272,9	6:4	CCDC: DV5 e DV6
CDVH48	45-48	395,2	1:1	DV6
CDVH50	49-50	19,5	AcOEt	Não trabalhada
CDVH53	51-53	766,5	MeOH	Não trabalhada

3.4.1. Purificação da fração CDVH15

A fração CDVH15 (1123,0 mg) foi submetida à CC sob gel de sílica 60 eluída com sistema hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 47 frações de 20 ml que foram posteriormente reunidas por CCDC revelada com reagente de Lieberman-Burchard em 6 novas subfrações (Tabela 2).

Tabela 2 – Frações obtidas da CC de CDVH15

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (Hex.:AcOEt)
CDVH15-8	1-8	25,7	98:2
CDVH15-16	9-16	661,1	98:2
CDVH15- 34	17-34	455,7	98:2 e 95:5
CDVH15-41	35-41	31,5	95:5 e 9:1
CDVH15-43	42-43	10,1	9:1
CDVH15-47	44-47	10,5	9:1

A subfração CDVH15-8 não apresentou revelação na CCDC utilizando-se UV e reagente de Lieberman-Burchard, deste modo a fração não foi estudada. As subfrações CDVH15-16 e CDVH15-34 apresentaram perfil cromatográfico similar em CCDC, sendo, porém a primeira com maior variedade de substâncias reveladas, tendo sido escolhida para ser analisada. Esta fração foi então submetida à CC em gel de sílica 60H sob pressão de N₂, utilizando-se mesma mistura de solventes em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 52 subfrações que foram posteriormente reunidas em 3 através de CCDC utilizando-se reagente de Lieberman-Burchard como revelador (Tabela 3).

Tabela 3 - Frações obtidas da CC sob pressão de N₂ de CDVH15-16

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (Hex.:AcOEt)
CDVH15-16-17	1-17	9,3	99:1
CDVH15-16-20	18-20	409,0	98:2
CDVH15-16-52	21-52	48,7	9:1

A subfração CDVH15-16-17 mostrou-se pura tratando-se de α -tocoferol (**DV1**). A subfração CDVH15-16-52 tratava-se de material de natureza graxa. A subfração CDVH15-16-20 foi submetida a novo fracionamento através de CC em gel de sílica 60H sob pressão de N₂ no mesmo sistema, tendo sido recolhidas 87 subfrações, que foram posteriormente reunidas em 4 através de CCDC com revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 4).

Tabela 4 – Frações obtidas da CC sob pressão de N₂ de CDVH15-16-20

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (Hex.:AcOEt)
CDVH15-16-20-24	1-24	3,2	99:1
CDVH15-16-20-65	25-65	15,9	98:2
CDVH15-16-20-79	66-79	163,2	98:2
CDVH15-16-20-87	80-87	10,0	9:1

As subfrações CDVH15-16-20-24, CDVH15-16-20-65 e CDVH15-16-20-87 tratavam-se de material de natureza graxa, enquanto que a subfração CDVH15-16-20-79 era constituída de α -tocoferol (**DV1**).

3.4.2. Purificação da fração CDVH20

A fração CDVH20 (430,8 mg) foi inicialmente analisada por EM, o que revelou a presença do esteróide estigmast-4-en-3-ona (**DV2**), em conjunto com material de natureza graxa. Esta fração foi então submetida a uma CC em gel de sílica 60 eluindo com sistema hexano/AcOEt, no intuito de purificar **DV2**. Foram recolhidas 64 subfrações de 20 ml, que foram reunidas através de CCDC com revelador químico de Lieberman-Burchard em 7 novas subfrações (Tabela 5).

Tabela 5 – Frações obtidas da CC de CDVH20

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (Hex.:AcOEt)
CDVH20-14	1-14	71,6	Hex. e 99:1
CDVH20-15	15	23,0	99:1
CDVH20-21	16-21	101,2	98:2, 96:4 e 95:5
CDVH20-44	22-44	51,0	95:5, 93:7 e 9:1
CDVH20-54	45-54	52,1	88:12, 85:15 e 8:2
CDVH20-62	55-62	49,5	7:3 e 6:4
CDVH20-64	63-64	46,5	AcOEt e MeOH

Como resultado desta coluna conseguiu-se a obtenção de **DV2** puro na fração CDVH20-21, e impuro nas frações CDVH20-15 e CDVH20-44. As demais frações eram constituídas de material graxo.

3.4.3. Purificação da fração CDVH28

A fração CDVH28 (1632,0 mg) foi submetida à CC em gel de sílica 60 eluindo com sistema hexano/éter etílico em ordem crescente de polaridade. Desta maneira foram recolhidas 72 subfrações, que posteriormente foram reunidas em 11 subfrações através de análise de CCDC (Tabela 6).

Tabela 6 – Frações obtidas da CC de CDVH28

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (Hex.:Éter)
CDVH28-12	1-12	19,6	93:7 e 9:1
CDVH28-31	13-31	380,9	9:1
CDVH28-35	32-35	83,8	8:2
CDVH28-45	43-45	158,2	8:2
CDVH28-51	40-51	500,0	8:2
CDVH28-56	52-56	60,3	7:3
CDVH28-61	57-61	25,3	7:3 e 1:1
CDVH28-72	62-72	181,5	1:1 e Éter

A subfração CDVH28-51 (500,0 mg) foi submetida a novo fracionamento em CC em gel de sílica 60H sob pressão de N₂, tendo sido recolhidas 58 subfrações que foram posteriormente reunidas em 5 através de CCDC com revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 7).

Tabela 7 – Frações obtidas da CC sob pressão de N₂ de CDVH28-51

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (Hex.:AcOEt)
CDVH28-51-14	1-14	48,2	98:2, 95:5 e 97:3
CDVH28-51-24	15-24	106,1	9:1
CDVH28-51-33	25-33	127,9	9:1
CDVH28-51-44	34-44	28,3	85:15
CDVH28-51-58	45-58	43,6	8:2 e 7:3

A subfração CDVH28-51-24 foi submetida a novo fracionamento por permeação em gel de Sephadex LH-20, eluindo com sistema hexano/DCM 1:4. Foram recolhidas 36 subfrações, que foram reunidas em 3 novas subfrações após análise por CCDC com revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 8).

Tabela 8 – Frações obtidas da Permeação em Sephadex LH-20 de CDVH28-51-24

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema
CDVH28-51-24-02	1-2	22,5	Hex./DCM 1:4
CDVH28-51-24-04	3-4	75,1	Hex. DCM 1:4
CDVH28-51-24-09	5-9	8,4	Hex./DCM 1:4

As subfrações CDVH28-51-24-02 e CDVH28-51-24-04 foram então identificadas como uma mistura de lupeol (**DV3**) e β -amirina (**DV4**), enquanto que CDVH28-51-24-09 era constituída da mistura lupeol (**DV3**) e β -amirina (**DV4**) e β -sitosterol (**DV5**).

A subfração CDVH28-51-33 foi submetida à CC em gel de sílica 60H sob pressão de N₂, eluindo em sistema CHCl₃/AcOEt em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 40 frações de 20 ml, as quais foram reunidas em 5 novas subfrações após análise em CCDC com revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 9).

Tabela 9 – Frações obtidas da CC sob pressão de N₂ de CDVH28-51-33

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ :AcOEt)
CDVH28-51-33-03	1-3	86,0	CHCl ₃
CDVH28-51-33-10	4-10	29,4	CHCl ₃
CDVH28-51-33-14	11-14	2,8	95:5
CDVH28-51-33-30	15-30	6,1	9:1 e 8:2
CDVH28-51-33-40	31-33	1,7	7:3 e 1:1

A subfração CDVH28-51-33-03 era constituída da mistura lupeol (**DV3**) e β -amirina (**DV4**) e β -sitosterol (**DV5**), a subfração CDVH28-51-33-10 era constituída de β -sitosterol (**DV5**), a subfração CDVH28-51-33-14 continha β -sitosterol (**DV5**) em mistura e a fração CDVH28-51-33-30 era constituída de material graxo.

As demais subfrações de CDCH28 foram submetidas a CCDC junto com padrões de lupeol, β -amirina e β -sitosterol provaram tratar-se de misturas desses mesmos componentes.

3.4.4. Purificação da fração CDVH30

A fração CDVH30 foi submetida a fracionamento em CC em gel de sílica 60, eluindo com sistema hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 36 subfrações de 20 ml, que foram em seguida reunidas em 4 subfrações com base em seu perfil cromatográfico em CCDC reveladas com reagente de Lieberman-Burchard (Tabela 10).

Tabela 10 – Frações obtidas da CC de CDVH30

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (Hex.:AcOEt)
CDVH30-13	1-13	215,1	9:1
CDVH30-23	14-23	60,7	85:15 e 8:2
CDVH30-34	24-34	45,4	7:3 e 6:4
CDVH30-36	35-36	58,1	1:1 e AcOEt

A fração CDVH30-13 é constituída da mistura de lupeol (**DV3**) e β -amirina (**DV4**), a fração CDVH30-23 é constituída de β -sitosterol (**DV5**), e as demais frações são constituídas de β -sitosterol (**DV5**) e material graxo.

3.4.5. Purificação da fração CDVH38

A fração CDVH38 foi submetida à CC em gel de sílica 60 utilizando-se como sistema eluente misturas de hexano/AcOEt em grau crescente de polaridade. Foram recolhidas 78 subfrações de 20 ml, que foram posteriormente reunidas em 6 subfrações após análise por CCDC reveladas com reagente de Lieberman-Burchard (Tabela 11).

Tabela 11 – Frações obtidas da CC de CDVH38

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (Hex.:AcOEt)
CDVH38-28	1-28	8,6	95:5, 9:1 e 85:15
CDVH38-37	29-37	26,4	8:2
CDVH38-47	38-47	30,9	8:2
CDVH38-71	48-71	61,4	7:3, 6:4 e 1:1
CDVH38-75	72-75	5,5	AcOEt
CDVH38-78	76-78	7,7	MeOH

A subfração CDVH38-28 não apresentou nada, as subfrações CDVH38-37 e CDVH38-47 eram constituídas de mistura de lupeol (**DV3**) e β -amirina (**DV4**), a subfração CDVH38-71 era constituída da mistura de lupeol (**DV3**), β -amirina (**DV4**) e β -sitosterol (**DV5**).

3.4.6. Estudo das frações restantes do extrato hexânico

A fração CDVH11 não foi estudada por apresentar composição graxa evidenciada por RMN ^1H e ^{13}C . A fração CDVH34 apresentou perfil cromatográfico semelhante a CDVH30 e CDVH38, contendo **DV3**, **DV4** e **DV5**. As frações CDVH40 e CDVH44 são constituídas de mistura de β -sitosterol (**DV5**) e estigmasterol (**DV6**). A fração CDVH48 é constituída de estigmasterol (**DV6**) e material graxo. Todas estas frações foram estudadas por EM e tiveram seus perfis cromatográficos comparados a padrões de substâncias isoladas de outras fontes vegetais. As frações CDVH50 e CDVH53 não foram trabalhadas.

As estruturas das substâncias isoladas do extrato hexânico estão representadas na figura 22, página 79.

3.5. Purificação do extrato clorofórmico do caule

O extrato clorofórmico do caule (6,32g) foi submetido à CC em gel de sílica 60, eluindo com sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 125 frações de 30 ml, que foram posteriormente reunidas em 15 após análise por CCDC reveladas com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 12).

Tabela 12 – Frações obtidas da CC principal do extrato clorofórmico do caule

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$)	Substâncias Isoladas
CDVC18	1-18	43,2	CHCl_3	Não trabalhada
CDVC21	19-21	106,8	CHCl_3	DV7 e DV8
CDVC25	22-25	321,6	CHCl_3	DV7, DV8, DV9, DV10, DV11, DV12, DV13 e DV14
CDVC39	26-39	114,6	95:5	Não trabalhada
CDVC48	40-48	645,7	9:1	DV15, DV16 e DV17
CDVC53	49-53	904,4	9:1	DV14 e DV18
CDVC58	54-58	618,1	9:1	DV19 e DV20
CDVC60	59-60	201,7	9:1	DV19 e DV20
CDVC64	61-64	642,5	9:1	DV19 e DV20
CDVC68	65-68	363,4	9:1	DV19 e DV20
CDVC77	69-77	525,3	9:1 e 8:2	Não trabalhada
CDVC81	78-81	78,2	8:2	Não trabalhada
CDVC96	82-96	357,1	8:2 e 7:3	Não trabalhada
CDVC111	97-111	218,8	7:3 e 6:4	Não trabalhada
CDVC125	112-125	339,0	6:4 e 1:1	Não trabalhada

3.5.1. Purificação da fração CDVC21

A fração CDVC21 (106,8 mg) foi submetida a CC em gel de sílica 60, eluindo com mistura de $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ em grau crescente de polaridade. Foram recolhidas 18 subfrações, que em seguida foram reunidas em 4 subfrações após análise por CCDC reveladas com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 13).

Tabela 13 – Frações obtidas da CC de CDVC21

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ :AcOEt)
CDVC21-5	1-5	37,0	CHCl ₃
CDVC21-12	6-12	31,0	CHCl ₃
CDVC21-17	13-17	9,8	CHCl ₃ e 9:1
CDVC21-18	18	7,8	AcOEt

A subfração CDVC21-5 foi submetida a novo fracionamento através de CCDP em gel de sílica 60PF, eluindo três vezes consecutivas com sistema hexano/AcOEt (8:2), sendo recolhidas 4 subfrações (Tabela 14).

Tabela 14 – Frações obtidas da CCDP de CDVC21-5

Código	Massa (mg)
CDVC21-5A	3,1
CDVC21-5B	12,1
CDVC21-5C	3,7
CDVC21-5D	4,3

A substância CDVC21-5B teve sua estrutura determinada com sendo a nova flavanona 7-hidroxi-6-metoxiflavanona (**DV7**). As demais subfrações não foram analisadas devido a sua pequena massa.

A subfração CDVC21-12 foi submetida a novo fracionamento através de CC em gel de sílica 60H sob pressão de N₂, eluindo com CHCl₃ e CHCl₃/AcOEt 9:1. Foram recolhidas 17 subfrações de 20 ml, que foram reunidas em 6 novas subfrações após análise por CCDC reveladas com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 15).

Tabela 15 – Frações obtidas da CC sob pressão de N₂ de CDVC21-12

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ :AcOEt)
CDVC21-12-3	1-3	4,8	CHCl ₃
CDVC21-12-4	4	1,4	CHCl ₃
CDVC21-12-5	5	3,5	CHCl ₃
CDVC21-12-8	6-8	4,2	CHCl ₃
CDVC21-12-13	9-13	6,9	CHCl ₃
CDVC21-12-17	14-17	0,0	9:1

A subfração CDVC21-12-3 foi identificada como 7-hidroxi-6-metoxiflavanona (**DV7**), a fração CDVC21-12-13 foi identificada como 7-hidroxi-6-metoxiflavanonol (**DV8**), a fração CDVC21-12-8 consiste em mistura de **DV7** e **DV8**, e as subfrações CDVC21-12-4, CDVC21-12-5 e CDVC21-12-17 não foram analisadas devido à pequena massa.

As demais subfrações CDVC21-17 e CDVC21-18 continham apenas substâncias de natureza graxa.

3.5.2. Purificação da fração CDVC25

A fração CDVC25 (321,6 mg) foi fracionada por CC em gel de sílica 60H sob pressão de N₂, e eluída com sistema hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 53 subfrações, que foram reunidas em 12 após análise por CCDC reveladas com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 16).

Tabela 16 – Frações obtidas da CC sob pressão de N₂ de CDVC25

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (Hex.:AcOEt)
CDVC25-5	1-5	5,5	8:2
CDVC25-9	6-9	6,0	8:2
CDVC25-10	10	0,3	8:2
CDVC25-16	11-16	8,1	8:2
CDVC25-17	17	2,3	8:2
CDVC25-22	18-22	56,4	8:2
CDVC25-26	23-26	19,4	8:2
CDVC25-28	27-28	3,9	8:2
CDVC25-34	29-34	29,9	8:2
CDVC25-43	35-43	30,9	7:3
CDVC25-44	44	3,8	7:3
CDVC25-53	45-53	14,2	7:3

A subfração CDVC25-5 (5,5 mg) foi identificada como pertencente à classe das feoftinas, compostos derivados da clorofila.

A subfração CDVC25-9 (10,2 mg) foi purificada através de CCDP em gel de sílica 60PF, eluindo com sistema CHCl₃/AcOEt 9:1, sendo recolhidas 5 subfrações (Tabela 17).

Tabela 17 – Frações obtidas da CCDP de CDVC25-9

Código	Massa (mg)
CDVC25-9A	2,2
CDVC25-9B	3,2
CDVC25-9C	1,5
CDVC25-9D	1,5
CDVC25-9E	1,8

A subfração CDVC25-9B foi identificada como sendo a 5,7-diidroxiflavanona (**DV9**), enquanto que CDVC25-9C foi identificada como 5,7-diidroxí-8-metoxiflavanona (**DV10**). As demais subfrações nada continham. A subfração CDVC25-10 (0,3 mg) foi desprezada devido à sua pequena massa. A subfração CDVC25-16 (8,1 mg) foi identificada como sendo a 2',4'-diidroxichalcona (**DV11**). A subfração CDVC25-17 (2,3 mg) foi identificada por CCDC como mistura de **DV11** e **DV12**. A subfração CDVC25-22 (56,4 mg) foi identificada como lasiodiplodina (**DV12**). A subfração CDVC25-26 (19,4 mg) foi identificada como sendo a 7-hidroxiflavanona (**DV13**). A subfração CDVC25-28 (3,9 mg) foi analisada por CCDC e apresentou a substância **DV13** em mistura com outra não identificada.

A subfração CDVC25-34 (29,9 mg) foi submetida à permeação em gel de Sephadex LH-20, eluindo com 50 ml de sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:3. Foram recolhidas 7 subfrações, sendo que as duas últimas não apresentaram massa após concentração, sendo as demais reunidas em 3 subfrações após análise por CCDC revelada com luz UV (Tabela 18).

Tabela 18 – Frações obtidas da Permeação em Sephadex LH-20 de CDVC25-34

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$)
CDVC25-34-1	1	3,8	4:6
CDVC25-34-2	2	5,7	4:6
CDVC25-34-5	3-5	18,0	4:6

A subfração CDVC25-34-1 foi desprezada por apresentar apenas material de natureza graxa. A subfração CDVC25-34-2 foi identificada como ácido oleanólico (**DV14**).

A subfração CDVC25-34-5 (18,0 mg) foi submetida a CCDP em gel de sílica 60PF, eluindo com sistema $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 9:1, sendo recolhidas 4 subfrações (Tabela 19).

Tabela 19 – Frações obtidas por CCDP de CDVC25-34-5

Código	Massa (mg)
CDVC25-34-5A	9,7
CDVC25-34-5B	3,7
CDVC25-34-5C	6,6
CDVC25-34-5D	1,3

A subfração CDVC25-34-5B continha **DV7** em mistura, não tendo sido trabalhada devido à pequena massa. A subfração CDVC25-34-5C foi identificada como sendo a 7-hidroxi-6-metoxiflavanona (**DV7**). A subfração CDVC25-34-5D continha apenas material graxo e foi desprezada.

A subfração CDVC25-43 (30,9 mg) foi submetida à permeação em gel de Sephadex LH-20, eluindo com 50 ml de sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1, sendo recolhidas 3 subfrações (Tabela 20).

Tabela 20 – Frações obtidas da permeação em Sephadex LH-20 de CDVC25-43

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$)
CDVC25-43-1	1	2,9	1:1
CDVC25-43-2	2	5,1	1:1
CDVC25-43-3	3	20,7	1:1

As frações CDVC25-43-1 e CDVC25-43-2 não foram identificadas devido à pequena massa. A fração CDVC25-43-3 foi identificada como sendo a 7-hidroxi-6-metoxiflavanonol (**DV8**).

As frações CDVC25-44 (3,8 mg) e CDVC25-53 (14,2 mg) não foram estudadas devido as suas pequenas massas.

3.5.5. Purificação da fração CDVC48

A fração CDVC48 (645,7 mg) foi submetida à CC em gel de sílica 60H sob pressão de N_2 , eluindo com sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 28 subfrações, as quais foram reunidas em 10 após análise por CCDC reveladas com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 21).

Tabela 21 – Frações obtidas da CC sob pressão de N₂ de CDVC48

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ :AcOEt)
CDVC48-3	1-3	4,6	CHCl ₃
CDVC48-5	4-5	8,8	CHCl ₃
CDVC48-8	6-8	8,4	9:1
CDVC48-11	9-11	10,4	9:1
CDVC48-13	12-13	6,2	9:1
CDVC48-15	14-15	9,9	9:1
CDVC48-23	16-23	53,5	9:1 e 8:2
CDVC48-26	24-26	87,4	8:2
CDVC48-27	27	124,2	AcOEt
CDVC48-28	28	108,1	MeOH

Análise dos espectros de RMN ¹H das subfrações CDVC48-3, CDVC48-5, CDVC48-8 e CDVC48-11 indicaram que estas apresentam apenas material de natureza graxa, e portanto foram desprezadas. A subfração CDVC48-13 possuía material graxo e pequena quantidade de **DV15**, enquanto que CDVC48-15 era constituída da substância 2',4,4'-trihidroxi-3-metoxichalcona (**DV15**) pura.

A fração CDVC48-23 foi submetida a CCDP em gel de sílica 60PF e eluída por cinco vezes consecutivas em sistema CHCl₃/AcOEt (9:1), tendo sido recolhidas 3 subfrações mais 1 referente ao intervalo entre as frações (Tabela 22).

Tabela 22 – Frações obtidas por CCDP de CDVC48-23

Código	Massa (mg)
CDVC48-23A	11,5
CDVC48-23B	14,4
CDVC48-23C	21,3
CDVC48-23D	4,5

A subfração CDVC48-23A foi submetida a nova CCDP em gel de sílica 60PF eluindo por oito vezes consecutivas em sistema CHCl₃/AcOEt (9:1), tendo sido recolhidas 3 subfrações. Deste modo foi isolado 5,3 mg da 7,4'-diidroxii-6-metoxiflavanona (**DV16**).

A subfração CDVC48-23B foi submetida à nova CCDP em gel de sílica 60PF eluindo por quatro vezes consecutivas em sistema $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 9:1, tendo sido recolhidas 4 subfrações isolando-se assim o biflavonóide **DV17** (5,0 mg).

3.5.6. Purificação da fração CDVC53

A fração CDVC53 (904,4 mg) foi submetida à CC em gel de sílica 60, eluindo com sistema $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 53 subfrações, que foram reunidas em 9 após análise por CCDC reveladas com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 23).

Tabela 23 – Frações obtidas da CC de CDVC53

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$)
CDVC53-6	1-6	14,8	9:1
CDVC53-16	7-16	121,3	9:1
CDVC53-19	17-19	60,5	9:1
CDVC53-25	20-25	44,2	8:2
CDVC53-32	26-32	44,0	8:2
CDVC53-40	33-40	13,7	8:2 e 7:3
CDVC53-44	41-44	11,2	7:3 e 6:4
CDVC53-48	45-48	19,0	6:4
CDVC53-53	49-53	527,9	6:4 e AcOEt

A subfração CDVC53-6 (14,0 mg) não revelou em UV ou com revelador químico, tratando-se de material graxo. A subfração CDVC53-16 (121,3 mg) foi submetida a CCDP em gel de sílica 60PF, eluindo quatro vezes consecutivas com sistema $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 obtendo-se assim 3 subfrações (Tabela 24).

Tabela 24 – Frações obtidas da CCDP de CDVC53-16

Código	Massa (mg)
CDVC53-16A	24,7
CDVC53-16B	42,9
CDVC53-16C	28,7

A subfração CDVC53-16A foi submetida a permeação em gel de Sephadex LH-20, eluindo com sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1. Foram recolhidas 8 subfrações, que foram reunidas em 3 após análise por CCDC reveladas com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 25).

Tabela 25 – Frações obtidas por permeação em sephadex LH-20 de CDVC53-16A

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)
CDVC53-16A-3	1-3	6,7	1:1
CDVC53-16A-6	4-6	4,9	1:1
CDVC53-16A-8	7-8	7,8	1:1

A fração CDVC53-16A-3 era constituída de material graxo. A fração CDVC53-16A-6 continha material graxo e a substância **DV18**. A fração CDVC53-16A-8 foi identificada como sendo a 4',7-diidroxiflavanona (**DV18**).

A fração CDVC53-16B foi submetida a CCDP em gel de sílica 60PF, eluindo 4 vezes com sistema $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 7:3, obtendo-se 4 subfrações (Tabela 26).

Tabela 26 – Frações obtidas da CCDP de CDVC53-16B

Código	Massa (mg)
CDVC53-16BA	2,0
CDVC53-16BB	6,7
CDVC53-16BC	18,7
CDVC53-16BD	8,7

As subfrações CDVC53-16BA e CDVC53-16BD tratavam-se de material graxo. A subfração CDVC53-16BB foi identificada com sendo a 4',7-diidroxiflavanona (**DV18**). A subfração CDVC53-16BC continha **DV18** em mistura.

As demais subfrações foram analisadas por CCDC e EM, tendo revelado em CDVC53-19 a presença de **DV18** em mistura com material graxo, a nas frações CDVC53-25, CDVC53-32, CDVC53-40, CDVC53-44 e CDVC53-48 a presença de ácido oleanólico (**DV14**) em mistura com material graxo.

3.5.7. Purificação da fração CDVC60

A fração CDVC60 (201,7 mg) foi fracionada através de CC em gel de sílica 60H, sob pressão de N₂, eluindo em sistema CHCl₃/AcOEt em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 43 subfrações de 20 ml, que foram reunidas em 10 após análise por CCDC revelando com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 27). Desta maneira a substância 7,3',4'-triidroxiflavanona (**DV19**) foi isolada (subfração CDVC60-6). As subfrações CDVC60-8, CDVC60-10, CDVC60-13 e CDVC60-20 continham mistura de **DV19** e 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona (**DV20**). As demais subfrações apresentaram apenas material de natureza graxa, tendo sido desprezadas.

Tabela 27 – Frações obtidas por CC sob pressão de N₂ CDVC60

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /AcOEt)
CDVC60-2	1-2	3,6	7:3
CDVC60-6	3-6	4,6	7:3
CDVC60-8	7-8	7,1	7:3
CDVC60-10	9-10	5,6	7:3
CDVC60-13	11-13	4,7	7:3
CDVC60-20	14-20	29,0	7:3
CDVC60-31	21-31	41,7	1:1
CDVC60-34	32-34	10,0	1:1
CDVC60-36	35-36	18,4	1:1

3.5.8. Purificação da fração CDVC64

A fração CDVC64 (642,5 mg) apresentava um material amorfo, branco predominante, que foi então removido por recristalização em MeOH, seguida de lavagem com CHCl₃. A fração branca amorfa (CDVC64A e CDVC64B) era constituída de mistura de triglicerídeos, não tendo sido estudada. A água-mãe CDVC64C (80,0 mg) foi submetida a fracionamento em CC em gel de sílica 60, eluindo com sistema CHCl₃/AcOEt 1:1 e AcOEt puro. Foram recolhidas 23 subfrações de 20 ml, que em seguida foram reunidas em 6 após análise por CCDC revelando com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 28).

Tabela 28 – Frações obtidas da CC de CDVC64C

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /AcOEt)
CDVC64C-1	1	5,9	1:1
CDVC64C-5	2-5	25,3	1:1
CDVC64C-9	6-9	12,1	1:1
CDVC64C-14	10-14	5,2	1:1
CDVC64C-18	15-18	8,4	1:1
CDVC64C-23	19-23	6,2	AcOEt

A subfração CDVC64C-1 apresentou material de natureza graxa. A subfração CDVC64C-5 foi submetida a permeação em gel de Sephadex LH-20, eluindo com sistema CHCl₃/MeOH 4:6. Foram recolhidas 7 subfrações, posteriormente reunidas em 3 após análise por CCDC revelando com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 29).

Tabela 29 – Frações obtidas da permeação em gel de Sephadex LH-20 de CDVC64C-5

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /MeOH)
CDVC64C-5-2	1-2	5,7	4:6
CDVC64C-5-4	3-4	8,8	4:6
CDVC64C-5-7	5-7	9,2	4:6

A subfração CDVC64C-5-2 continha material graxo. A subfração CDVC64C-5-4 era constituída de 7,3',4'-triidroxiflavanona (**DV19**) pura.

A subfração CDVC64C-5-7 foi submetida a nova permeação em gel de Sephadex LH-20, eluindo com sistema CHCl₃/MeOH 4:6. Foram recolhidas 10 subfrações, posteriormente reunidas em 3 após análise por CCDC revelando com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 30).

Tabela 30 – Frações obtidas da permeação em gel de Sephadex LH-20 de CDVC64C-5-7

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /MeOH)
CDVC64C-5-7-5	1-5	4,7	4:6
CDVC64C-5-7-8	6-8	0,7	4:6
CDVC64C-5-7-10	9-10	3,8	4:6

A subfração CDVC64C-5-7-5 era constituída de 7,3',4'-trihidroflavanona (**DV19**) pura. A subfração CDVC64C-5-7-8 continha mistura de **DV19** e **DV20**. E a fração CDVC64C-5-7-10 era constituída de 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona (**DV20**) pura.

As demais frações CDVC64C-9, CDVC64C-14 e CDVC64C-18 continham misturas de **DV19** e **DV20** em diferentes proporções, enquanto que CDVC64C-23 continha triglicerídeos.

3.5.9. Purificação da fração CDVC68

A fração CDVC68 (363,4 mg) continha em sua maioria material insolúvel constituído de triglicerídeos. A parte solúvel foi submetida à CC em gel de sílica 60, eluindo com sistema CHCl₃/MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 13 subfrações (Tabela 31).

Tabela 31 – Frações obtidas da CC de CDVC68

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /MeOH)
CDVC68-1	1	3,7	9:1
CDVC68-2	2	2,8	9:1
CDVC68-3	3	22,8	9:1
CDVC68-4	4	26,4	9:1
CDVC68-5	5	15,9	85:15
CDVC68-6	6	2,1	85:15
CDVC68-7	7	2,5	8:2
CDVC68-8	8	1,4	8:2
CDVC68-9	9	0,7	7:3
CDVC68-10	10	9,1	7:3
CDVC68-11	11	7,4	7:3
CDVC68-12	12	7,8	1:1
CDVC68-13	13	5,2	1:1

Foi feito um estudo por CCDC destas subfrações junto com as substâncias **DV19** e **DV20**, constatando-se a presença de mistura das mesmas nas subfrações CDVC68-3, CDVC68-4 e CDVC68-5. As demais frações não foram estudadas devido à pequena massa.

As frações CDVC77, CDVC81, CDVC96, CDVC111 e CDVC125 não foram trabalhadas.

As substâncias isoladas do extrato clorofórmico estão representadas nas figuras 23 e 24, páginas 80 e 81.

3.6. Purificação do extrato acetato de etila do caule

O extrato acetato de etila do caule (3,29g) foi submetido à CC em gel de sílica 60, eluindo em sistemas $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$, AcOEt e AcOEt/MeOH em grau crescente de polaridade. Foram recolhidas 31 frações, as quais foram reunidas em 5 após análise por CCDC revelando com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 32).

Tabela 32 – Frações obtidas da CC principal do extrato acetato de etila do caule

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$)	Substâncias Isoladas
CDVA2	1-2	31,7	1:1	DV21
CDVA4	3-4	61,5	AcOEt	DV21
CDVA8	5-8	678,7	($\text{AcOEt}:\text{MeOH}$) 95:5	DV22, DV23 e DV24
CDVA15	9-15	1106,2	9:1 e 85:15	
CDVA31	16-31	725,3	6:4, 1:1 e MeOH	

3.6.1. Purificação das frações CDVA2 e CDVA4

A fração CDVA2 (31,7 mg) foi submetida a CCDP em gel de sílica 60PF, eluindo por duas vezes em sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5), tendo sido obtidas 6 subfrações (Tabela 33).

Tabela 33 – Frações obtidas da CCDP de CDVA2

Código	Massa (mg)
CDVA2-A	14,9
CDVA2-B	2,9
CDVA2-C	3,3
CDVA2-D	3,1
CDVA2-E	2,6
CDVA2-F	2,2

A subfração CDVA4 (61,5 mg) foi submetida a CCDP em gel de sílica 60PF, eluindo 5 vezes em sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5), tendo sido recolhidas 6 subfrações, sendo então reunidas as subfrações correspondentes de CDVA2 após análise por CCDC revelando com luz UV (Tabela 34).

Tabela 34 – Frações obtidas da CCDP de CDVA4

Código	Massa (mg)	Massa Reunida (mg)
CDVA4-A	3,4	18,3
CDVA4-B	6,8	9,7
CDVA4-C	10,0	13,3
CDVA4-D	11,3	14,4
CDVA4-E	11,0	13,6
CDVA4-F	12,4	14,6

A subfração CDVA4-E apresentou uma nova proantocianidina do tipo A-2 denominada 3',4',7-triidroxi-flavana-(2 β →7,4 β →8)-3-prenil-fustina (**DV21**). A subfração CDVA4-D também apresentou **DV21** em menor quantidade. As demais subfrações apresentaram substância aromática em pequena quantidade, em conjunto com material graxo predominante.

3.6.2. Purificação da fração CDVA8

A fração CDVA8 (678,7 mg) foi submetida a fracionamento em CC em gel de sílica 60, eluindo com sistema CHCl₃/MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 34 subfrações de 50 ml, as quais foram reunidas em 8 após análise por CCDC revelando com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 35).

Tabela 35 – Frações obtidas da CC de CDVA8

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /MeOH)
CDVA8-2	1-2	24,5	9:1
CDVA8-7	3-7	21,7	9:1 e 8:2
CDVA8-8	8	73,2	8:2
CDVA8-12	9-12	94,5	8:2
CDVA8-24	13-24	278,2	7:3 e 6:4
CDVA8-27	25-27	11,6	6:4
CDVA8-32	28-32	55,7	1:1
CDVA8-34	33-34	35,7	MeOH

As subfrações CDVA8-2 e CDVA8-7 continham a *epicatequina* (**DV22**) impura. A subfração CDVA8-8 era constituída de *epicatequina* (**DV22**) pura. A subfração CDVA8-12 foi identificada como *epicatequina-(2 β →7,4 β →8)-epicatequina* (**DV23**) pura.

A subfração CDVA8-24 foi submetida à fracionamento em CC em gel de sílica 60H, sob pressão de N₂, eluindo com sistema CHCl₃/MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 20 subfrações de 50 ml, as quais foram reunidas em 8 após análise por CCDC revelando com luz UV e revelador químico de Lieberman-Burchard (Tabela 36).

Tabela 36 – Frações obtidas da CC sob pressão de N₂ de CDVA8-24

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /MeOH)
CDVA8-24-1	1	5,5	9:1
CDVA8-24-2	2	36,9	9:1
CDVA8-24-4	3-4	9,9	9:1 e 8:2
CDVA8-24-5	5	54,8	8:2
CDVA8-24-7	6-7	56,5	8:2
CDVA8-24-11	8-11	33,3	7:3
CDVA8-24-16	12-16	38,6	6:4 e 1:1
CDVA8-24-20	17-20	36,9	MeOH

A subfração CDVA8-24-1 não revelava na CCDC e não pode ser estudada devido a pequena massa. A subfração CDVA8-24-2 era constituída de **DV23**. A subfração CDVA8-24-4 continha **DV23** e **DV24** em mistura. A subfração CDVA8-24-5 foi identificada como *epigalocatequina-(2 β →7,4 β →8)-epicatequina* (**DV24**) pura. A subfração CDVA8-24-7 apresentou **DV24** impura, e as demais subfrações nada apresentaram.

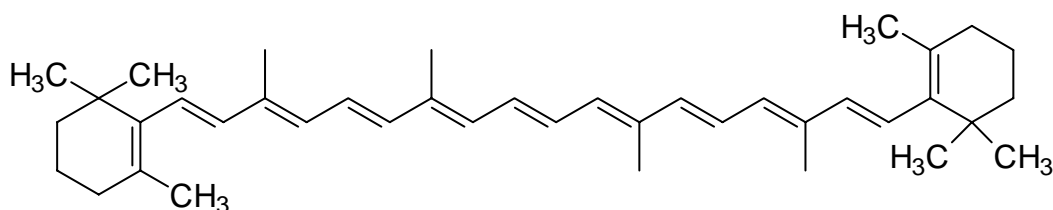
As substâncias isoladas do extrato acetato de etila encontram-se representadas na figura 25, página 82.

3.7. Testes de atividade

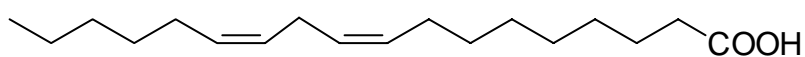
As substâncias puras isoladas de *Dioclea violacea* foram submetidas a testes de atividade antioxidante usando as metodologias de inibição da autooxidação do β -caroteno e do sequestro do radical DPPH (difenilpicrilhidrazil) no LPPN no Instituto de Química e na Faculdade de Farmácia da UFBA. As substâncias também foram encaminhadas a FIOCRUZ, onde foram efetuados testes de atividade imunomoduladora pelos métodos de redução da biossíntese de NO e inibição de proliferação de linfócitos-T ativados.

3.7.1. Inibição da autooxidação do β -caroteno

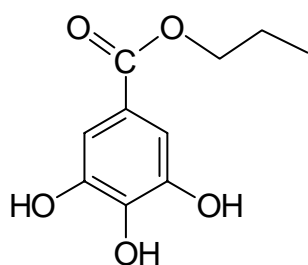
Este método de avaliação da atividade antioxidante é baseado na inibição da reação de autooxidação do β -caroteno (**116**), que é provocada pela adição de ácido linoléico (**117**) e aeração do meio levando à formação de agente oxidante radicalar. A reação foi acompanhada por espectrofotometria no visível em $\lambda = 470$ nm, tendo sido utilizadas soluções de 1mg/ml em MeOH tanto dos padrões quanto das substâncias testadas. Os padrões foram os antioxidantes comerciais galato de *n*-propila (**118**) e BHT (**119**) e o α -tocoferol. A percentagem de atividade foi calculada em relação ao galato de *n*-propila, considerando a atividade deste como 100%. A metodologia utilizada foi adaptada daquela descrita por HIDALGO *et al.* (1994).



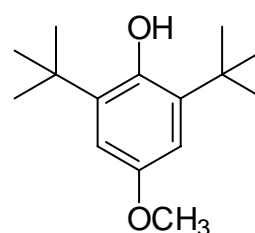
116



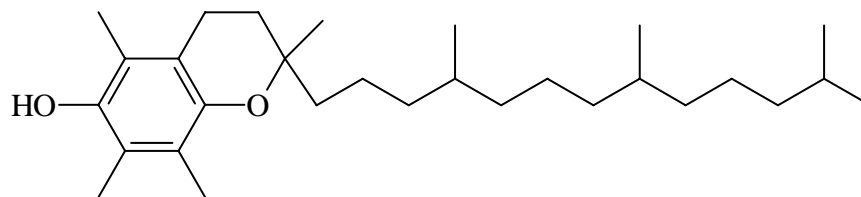
117



118



119



78

Metodologia:

Preparação do meio oxidante do β -caroteno. Tomou-se 2 mg do β -caroteno cristalino e dissolveu-se em 10 ml de CHCl_3 (0,2 mg/ml). Adicionou-se uma alíquota de 1 ml dessa solução a 20 mg de ácido linoléico purificado e 200 mg de emulsificador Tween 40 em balão de fundo redondo de 100 ml com boca de vidro esmerilhado. O CHCl_3 foi então removido em evaporador rotatório e então adicionados 50 ml de água destilada sob agitação rigorosa para promover a aeração.

Preparação das amostras e padrões. Foram preparadas soluções de 1 mg/ml em EtOH tanto dos antioxidantes conhecidos quanto as substâncias puras a serem testadas.

Procedimento: Uma alíquota de 5 ml do meio oxidante foi adicionada a cada tubo de espectrofotômetro contendo 0,2 ml do padrão ou da amostra a ser testada. Os tubos foram fechados, foi efetuada uma leitura de cada, em espectrofotômetro UV/VIS em $\lambda = 470 \text{ nm}$ e foram colocados em banho de H_2O a 50°C . As leituras foram realizadas de 10 em 10 min até completar-se 1h. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

Branco: O branco foi preparado com 5 ml da solução oxidante e 0,2 ml de EtOH 99,5% e tratado da mesma maneira que as amostras. O branco do aparelho foi o próprio etanol.

Cálculo da Atividade Antioxidante (AA): A AA foi avaliada pelo efeito do aditivo em relação ao branco seguindo a fórmula abaixo.

$$AA = 100 [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)]$$

Onde:

A_0 = Absorbância inicial da amostra

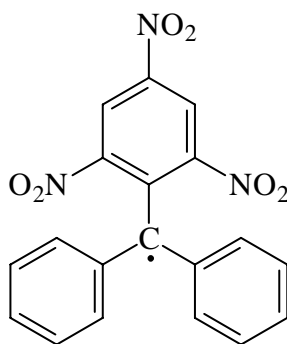
A_t = Absorbância final da amostra

A_0^0 = Absorbância inicial do branco

A_t^0 = Absorbância final do branco

3.7.2. Sequestro do radical livre DPPH

O segundo teste desenvolvido avalia a habilidade da substância testada de sequestrar o radical livre estável DPPH (Difenilpicrilhidrazil) (**120**). Para sua realização foram preparadas soluções de DPPH 45 µg/ml e soluções com as substâncias testes e padrões em 4 concentrações diferentes (240, 120, 60 e 30 µmol/L) em MeOH. Neste ensaio utilizou-se pirogalo (0,5% em MeOH) como substância referência com poder de sequestrar 100% dos radicais. As atividades antioxidantes das substâncias testadas foram comparadas com aquelas dos padrões galato de *n*-propila, BHT e α -tocoferol e o declínio da concentração do radical foi monitorado por espectrofotometria no visível em $\lambda = 517$ nm, após 15 min (MALTERUD, 1993).



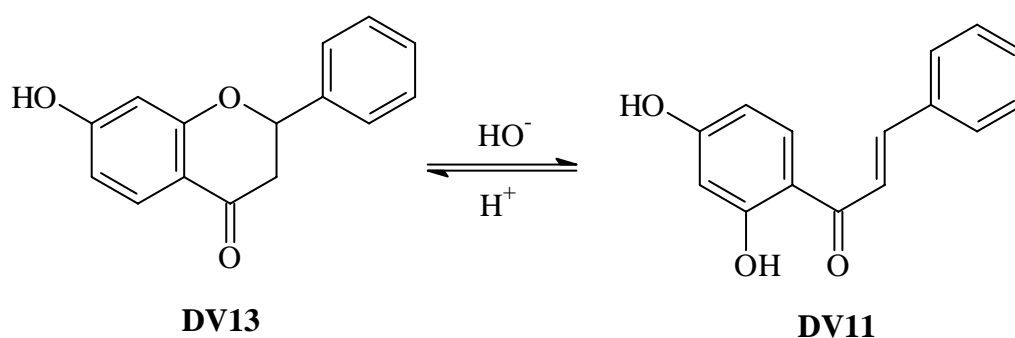
120

3.7.3. Atividade imunomoduladora

Os testes de atividade imunomoduladora foram efetuados em convênio com a FICRUZ e, não nos foi permitido acesso ao protocolo. Todavia, os testes de inibição de proliferação de linfócitos-T em geral quantificam a proliferação destas células pelo aumento ou decréscimo na síntese do DNA em resposta à mitose, na presença das substâncias que se deseja avaliar. Os linfócitos-T obtidos a partir de amostras de sangue ou de outras partes do organismo são incubados em meio contendo precursores do DNA radioativamente marcados e a quantidade de radiação incorporada nas células é medida por métodos cintilométricos. Quanto maior a incorporação dos precursores radioativos, maior terá sido a proliferação dos linfócitos-T (WAGNER, 1991).

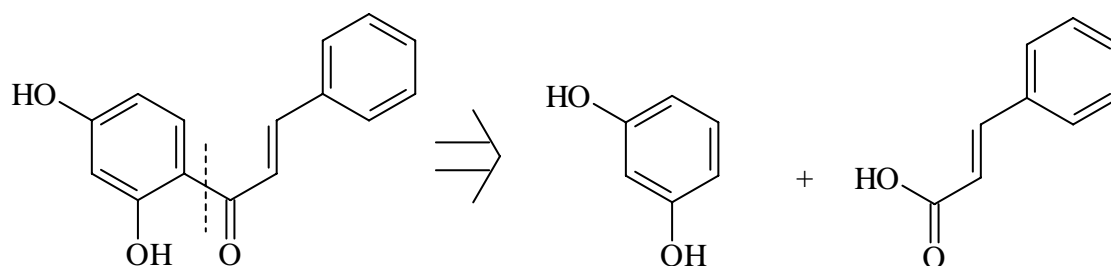
3.8. Síntese das substâncias bioativas

A substância que apresentou maior atividade imunomoduladora foi a 7-hidroxi flavanona (**DV13**), que por apresentar uma estrutura simples teve sua síntese efetuada em nossos laboratórios, juntamente com a 2',4'-diidroxichalcona (**DV11**), que pode ser utilizada como precursora. A síntese das duas pode ser feita em conjunto, pois elas são interconvertíveis a depender das condições ácidas ou básicas utilizadas.

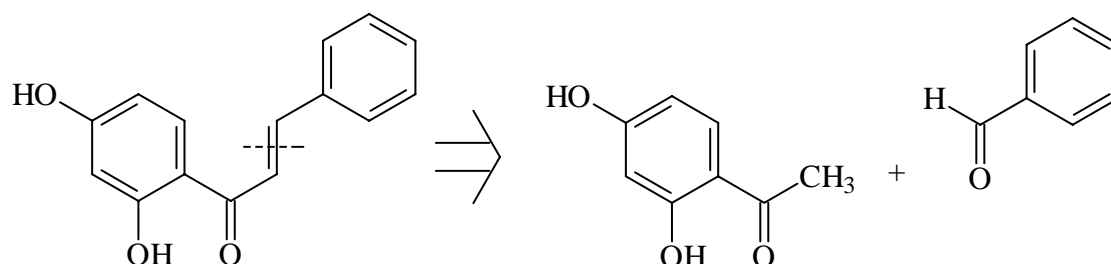


A chalcona **DV11** foi selecionada como alvo de nossa síntese por ser mais simples que a flavanona ao apresentar apenas 2 anéis aromáticos e não possuir o anel pirano. Aplicando-se os princípios da retrosíntese, foram sugeridas duas rotas para a sua obtenção:

ROTA I



ROTA II



3.8.1. Síntese pela Rota I

A Rota I foi escolhida pela disponibilidade de reagentes. Nesta rota os precursores utilizados para obtenção da chalcona foram o resorcinol e o ácido cinâmico. Não é possível efetuar a acilação de Friedel-Crafts direta a partir do cloreto de ácido e do resorcinol, pois nestas condições a esterificação de uma das hidroxilas fenólicas é favorecida, sendo necessário recorrer a esterificação do ácido cinâmico com o resorcinol, seguida de rearranjo de Fries. Uma sugestão é preparar o cloreto de ácido a partir do ácido cinâmico e do cloreto de tionila (SOCl_2), efetuar a esterificação, e submeter o éster a refluxo em presença de AlCl_3 para promover o rearranjo. Um outro caminho é utilizar o ácido polifosfórico para promover a esterificação seguida de rearranjo.

Para efetuar esta síntese adaptaram-se os procedimentos descritos por ADITYACHAUDHURY (1971) e por TALAPATRA (1986), por serem efetuados em uma única etapa, sem necessidade de purificação do intermediário. O ácido polifosfórico foi sintetizado a partir de 30 g de P_2O_5 e 50 ml de H_3PO_4 concentrado, que foram misturados e aquecidos em erlenmeyer de 250 ml por 3 horas à 100°C . O ácido polifosfórico recém obtido foi resfriado à 60°C e, foram adicionados 5,05 g (0,046 mol) de resorcinol e 5,6 g (0,038 mol) de ácido cinâmico, aos poucos e com agitação até total dissolução. A mistura reacional foi mantida a 60°C , sendo acompanhada por CCDC em sistema hexano/acetato 6:4 a cada 1 hora, até que completadas 3 horas constatou-se que todo o ácido cinâmico havia sido consumido. Em seguida a mistura reacional foi resfriada e vertida em um béquer com 100 ml de água gelada. O produto foi extraído com CHCl_3 e purificado através de CC em gel de sílica 60, eluindo com sistema $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ em ordem crescente de polaridade. Alternativamente repetiu-se o procedimento anterior por 3 horas à 100°C e mais 24 horas a temperatura ambiente.

4. Estruturas das substâncias isoladas de *D. violacea*

Encontram-se representadas na figura 22 as substâncias isoladas do extrato hexânico de *Dioclea violacea*. Enquanto que nas figuras 23 (p. 80) e 24 (p. 81) estão representadas as substâncias isoladas do extrato clorofórmico e na figura 25 (p. 82) as substâncias isoladas do extrato acetato de etila.

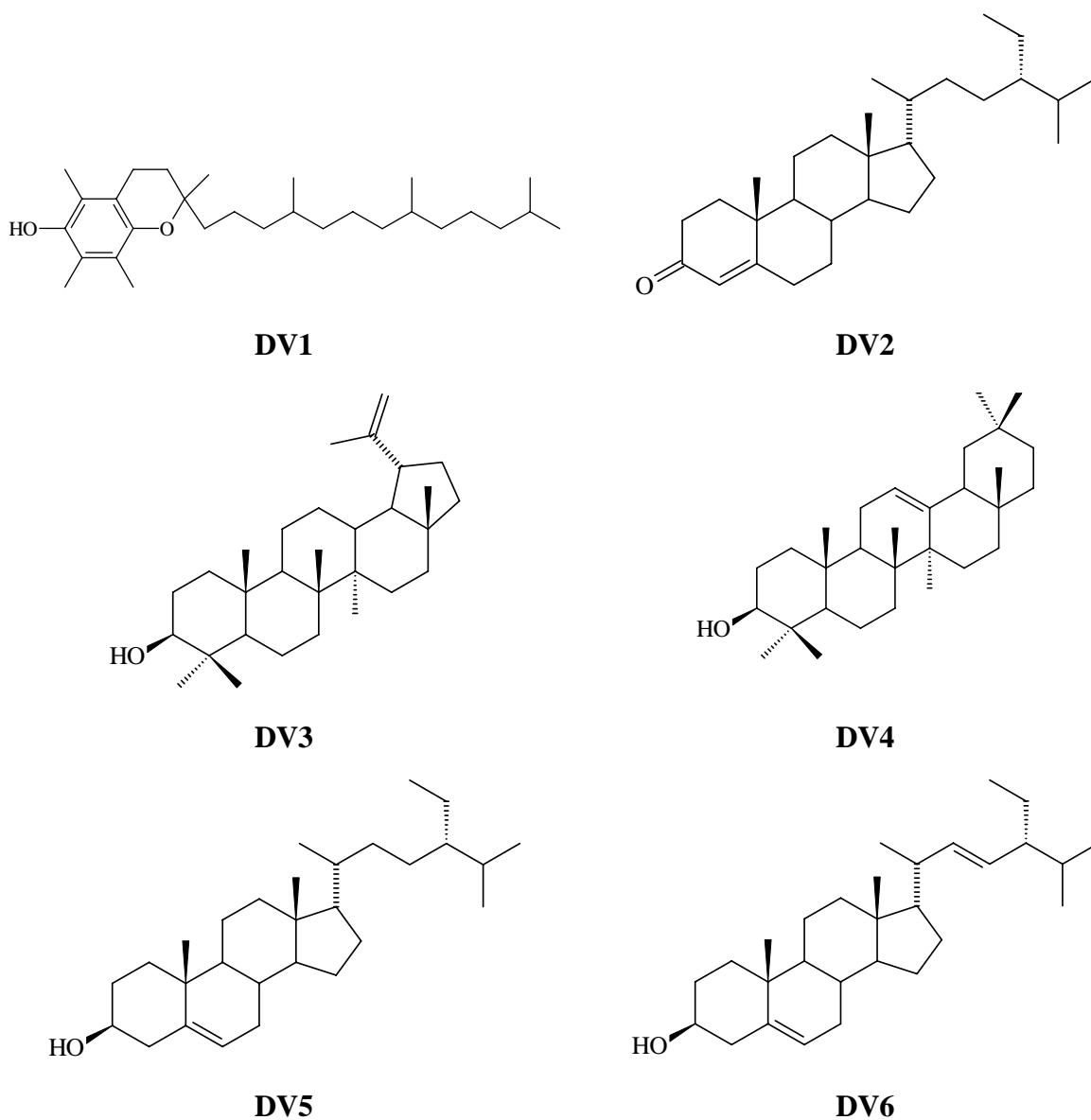


Figura 22 – Substâncias isoladas do extrato hexânico de *Dioclea violacea*.

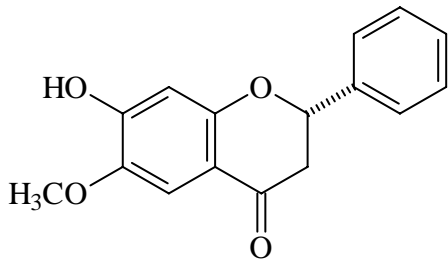
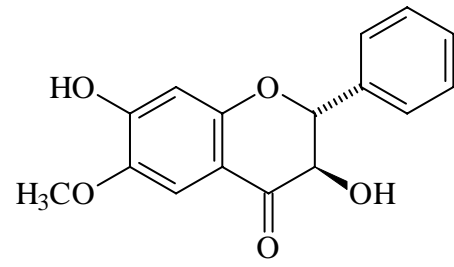
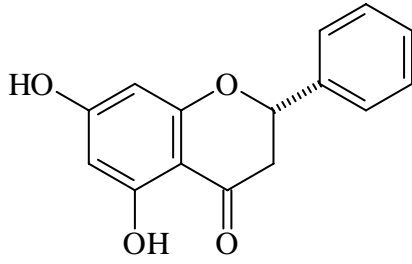
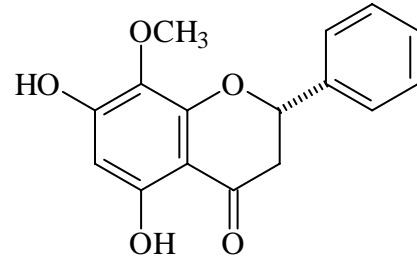
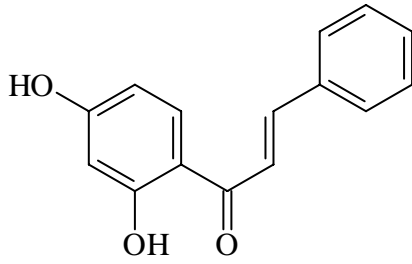
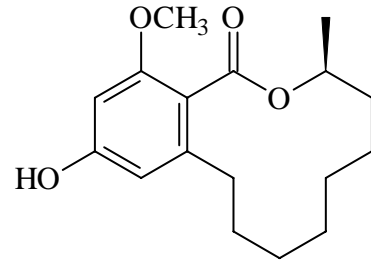
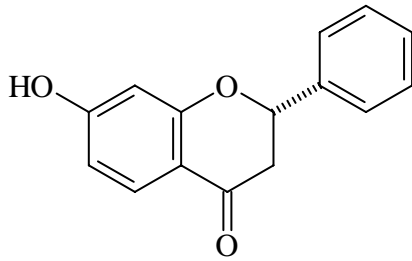
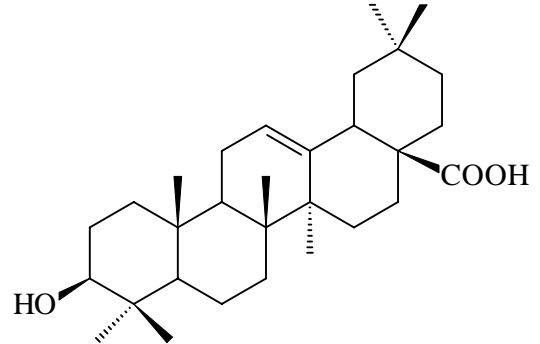
**DV7****DV8****DV9****DV10****DV11****DV12****DV13****DV14**

Figura 23 – Substâncias isoladas do extrato clorofórmico de *Dioclea violacea*.

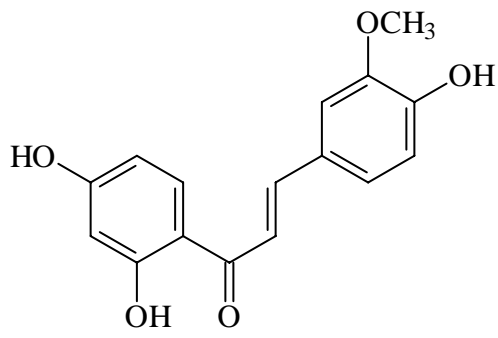
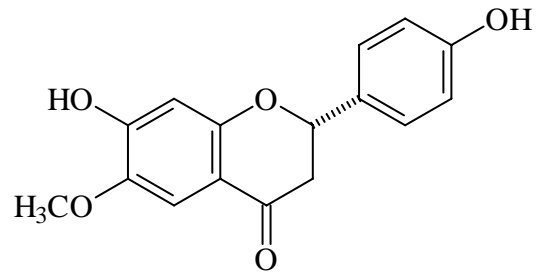
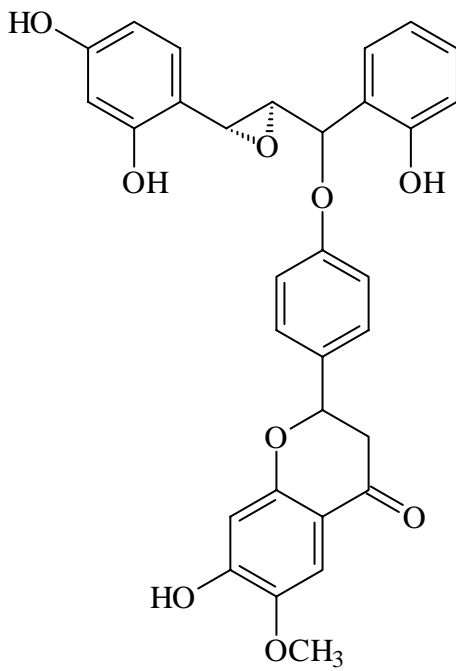
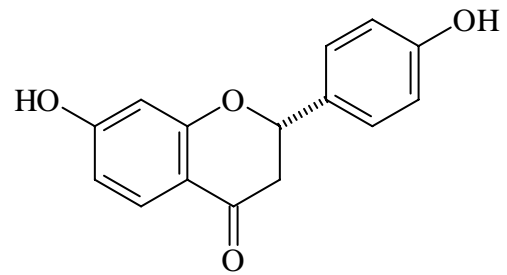
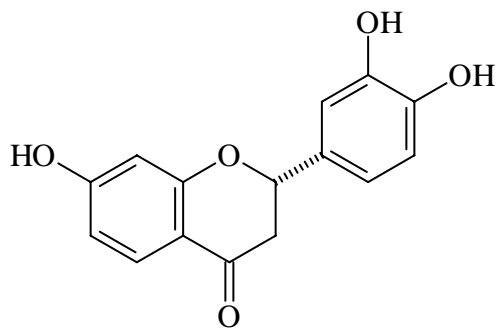
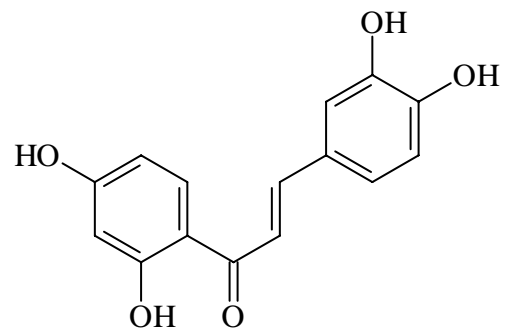
**DV15****DV16****DV17****DV18****DV19****DV20**

Figura 24 – Substâncias isoladas do extrato clorofórmico de *Dioclea violacea* (continuação).

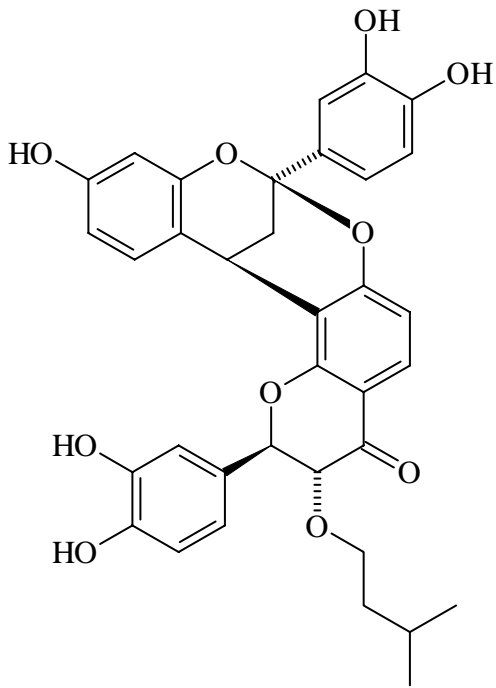
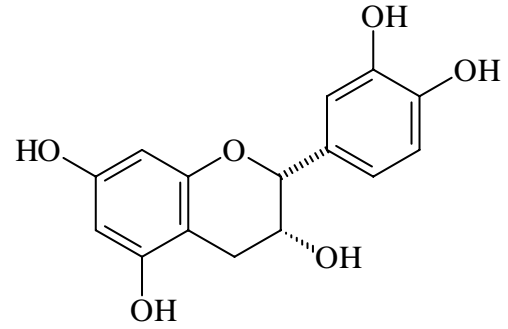
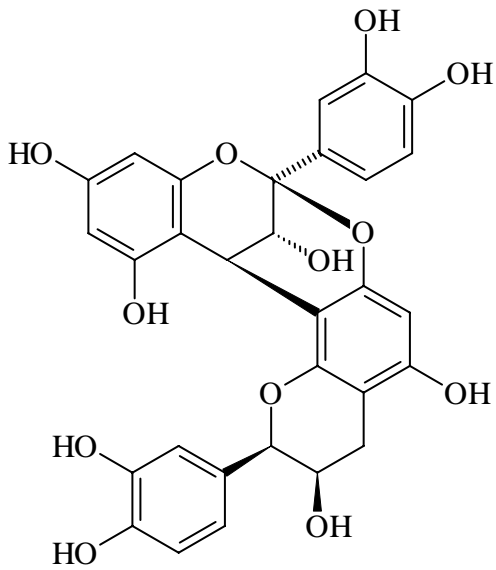
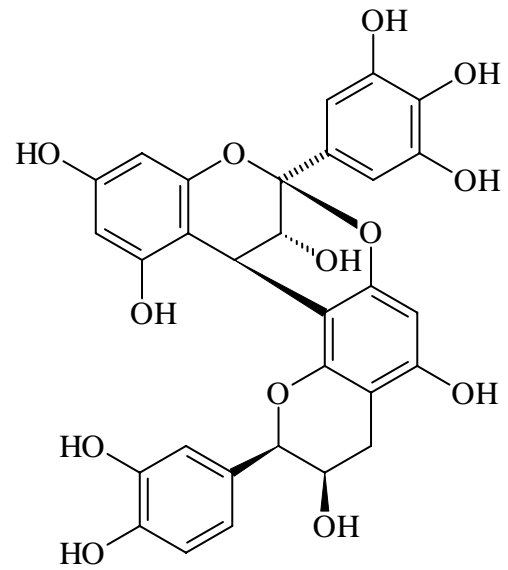
**DV21****DV22****DV23****DV24**

Figura 25 – Substâncias isoladas do extrato acetato de etila de *Dioclea violacea*.

5. Dados físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas

DV1 - α -Tocoferol

Sólido amorfo alaranjado, $C_{29}H_{50}O_2$, MM = 430

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^{+\bullet}]$ 430 (100), 396 (12), 218 (6), 165 (16).

DV2 - Estigmast-4-en-3-ona

Sólido amorfo branco, $C_{29}H_{48}O$, MM = 412

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^{+\bullet}]$ 412 (43), 397 (8), 370 (15), 289 (21), 271 (19), 257 (8), 245 (10), 230 (14), 229 (51), 161 (20), 124 (100), 109 (42).

DV3 - 20(29)-Lupen-3 β -ol (Lupeol)

Sólido cristalino branco, $C_{30}H_{50}O$, MM= 426

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): 3,22 (1H, *t*, H-3), 1,01 (3H, *s*, H-23), 0,94 (3H, *s*, H-24), 0,92 (3H, *s*, H-25), 0,80 (3H, *s*, H-26), 0,78 (3H, *s*, H-27), 0,74 (3H, *s*, H-28), δ 4,69 (1H, *d*, $J=1,1$ Hz, H-29), 4,57 (1H, *d*, $J=1,1$ Hz, H-29), 1,68 (3H, *s*, H-30).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ 38,7 (CH_2 , C-1), δ 27,4 (CH_2 , C-2), δ 79,0 (CH, C-3), δ 38,8 (C, C-4), δ 55,2 (CH, C-5), δ 18,3 (CH_2 , C-6), δ 34,3 (CH_2 , C-7), δ 40,8 (C, C-8), δ 50,4 (CH, C-9), δ 36,9 (C, C-10), δ 20,9 (CH_2 , C-11), δ 25,1 (CH_2 , C-12), δ 38,0 (CH, C-13), δ 42,8 (CH, C-14), δ 27,4 (CH_2 , C-15), δ 35,6 (CH_2 , C-16), δ 43,0 (C, C-17), δ 48,3 (CH, C-18), δ 48,0 (CH, C-19), δ 151,0 (C, C-20), δ 29,8 (CH_2 , C-21), δ 40,0 (CH_2 , C-22), δ 28,0 (CH_3 , C-23), δ 15,4 (CH_3 , C-24), δ 16,0 (CH_3 , C-25), δ 16,1 (CH_3 , C-26), δ 14,5 (CH_3 , C-27), δ 18,0 (CH_3 , C-28), δ 109,3 (CH_2 , C-29), δ 19,3 (CH_3 , C-30).

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa) mistura com DV4: $[M^{+\bullet}]$ 426 (24), 412 (35), 397 (35), 396 (100), 382 (21), 368 (63), 218 (56), 208 (6), 207 (17), 189 (22), 133 (13).

DV4 - 3 β -Hidroxi-olean-12-eno (β -amirina)

Sólido cristalino branco; C₃₀H₅₀O; MM= 426

RMN ¹H (CDCl₃): δ 3,20 (1H, *m*, H-3), δ 5,19 (1H, *t*, H-12), δ 1,0 (3H, *s*, H-23), δ 0,86 (3H, *s*, H-24), δ 1,03 (3H, *s*, H-25), δ 0,97 (3H, *s*, H-26), δ 1,14 (3H, *s*, H-27), δ 0,76 (3H, *s*, H-28), δ 0,94 (3H, *s*, H-29), δ 0,95 (3H, *s*, H-30).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 38,6 (CH₂, C-1), δ 27,2 (CH₂, C-2), δ 79,0 (CH, C-3), δ 38,8 (C, C-4), δ 55,3 (CH, C-5), δ 18,4 (CH₂, C-6), δ 32,6 (CH₂, C-7), δ 39,8 (C, C-8), δ 47,6 (CH, C-9), δ 38,7 (C, C-10), δ 23,5 (CH₂, C-11), δ 121,7 (CH, C-12), δ 145,1 (C, C-13), δ 41,7 (CH, C-14), δ 26,1 (CH₂, C-15), δ 27,0 (CH₂, C-16), δ 32,5 (C, C-17), δ 47,2 (CH, C-18), δ 46,8 (CH₂, C-19), δ 31,1 (C, C-20), δ 34,7 (CH₂, C-21), δ 37,1 (CH₂, C-22), δ 28,1 (CH₃, C-23), δ 15,5 (CH₃, C-24), δ 15,6 (CH₃, C-25), δ 16,8 (CH₃, C-26), δ 26,0 (CH₃, C-27), δ 28,4 (CH₃, C-28), δ 33,3 (CH₃, C-29), δ 23,7 (CH₃, C-30).

EMIE (70 eV) *m/z* (intensidade relativa) mistura com **DV3**: [M⁺] 426 (24), 412 (35), 397 (35), 396 (100), 382 (21), 368 (63), 218 (56), 208 (6), 207 (17), 189 (22), 133 (13).

DV5 - Estigmast-5-en-3- β -ol (β - Sitosterol)

Cristais brancos, C₂₉H₅₀O, MM= 414

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 37,2 (CH₂, C-1), δ 31,6 (CH₂, C-2), δ 71,8 (CH, C-3), δ 42,3 (CH₂, C-4), δ 140,7 (C, C-5), δ 121,7 (CH, C-6), δ 31,9 (CH₂, C-7), δ 31,9 (CH, C-8), δ 50,1 (CH, C-9), δ 36,5 (C, C-10), δ 21,1 (CH₂, C-11), δ 39,7 (CH₂, C-12), δ 42,2 (C, C-13), δ 56,7 (CH, C-14), δ 24,4 (CH₂, C-15), δ 28,2 (CH₂, C-16), δ 55,9 (C, C-17), δ 11,9 (CH₃, C-18), δ 19,4 (CH₃, C-19), δ 36,1 (CH, C-20), δ 18,8 (CH₃, C-21), δ 33,9 (CH₂, C-22), δ 26,1 (CH₂, C-23), δ 45,8 (CH, C-24), δ 29,1 (CH, C-25), δ 19,8 (CH₃, C-26), δ 19,0 (CH₃, C-27), δ 23,0 (CH₂, C-28), δ 11,8 (CH₃, C-29).

EMIE (70 eV) *m/z* (intensidade relativa): [M⁺] 414 (100), 412 (36), 399 (35), 396 (45), 381 (30), 329 (45), 314 (13), 303 (42), 276 (3), 273 (32), 255 (44), 246 (13), 232 (8), 231 (26), 213 (42), 163 (26), 161 (31), 145 (45), 138 (6), 137 (14), 121 (29), 120 (19).

DV6 - Estigmast-5,22-dien-3- β -ol (estigmasterol)

Cristais brancos, C₂₉H₄₈O, MM= 412

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 37,2 (CH₂, C-1), δ 31,6 (CH₂, C-2), δ 71,8 (CH, C-3), δ 42,2 (CH₂, C-4), δ 140,7 (C, C-5), δ 121,7 (CH, C-6), δ 31,9 (CH₂, C-7), δ 31,9 (CH, C-8), δ 50,1 (CH, C-9), δ 36,1 (C, C-10), δ 19,8 (CH₂, C-11), δ 39,7 (CH₂, C-12), δ 42,2 (C, C-13), δ 56,0 (CH, C-14), δ 24,3 (CH₂, C-15), δ 28,9 (CH₂, C-16), δ 56,8 (C, C-17), δ 12,0 (CH₃, C-18), δ 19,4 (CH₃, C-19), δ 40,5 (CH, C-20), δ 21,1 (CH₃, C-21), δ 138,3 (CH, C-22), δ 129,2 (CH, C-23), δ 51,2 (CH, C-24), δ 31,9 (CH, C-25), δ 21,2 (CH₃, C-26), δ 18,9 (CH₃, C-27), δ 25,4 (CH₂, C-28), δ 12,2 (CH₃, C-29).

EMIE (70 eV) *m/z* (intensidade relativa) em mistura com **DV5**: [M^{+•}] 414 (100), [M⁺] 412 (48), 399 (34), 397 (20), 396 (45), 394 (4), 381 (34), 351 (16), 329 (57), 315 (12), 303 (53), 276 (4), 273 (43), 255 (73), 246 (6), 232 (10), 231 (32), 213 (58), 163 (34), 161 (39), 145 (52), 138 (5), 137 (13), 121 (26), 120 (19).

DV7 - 7-hidroxi-6-metoxiflavanona

Cristais amarelo-pálidos, PF = 164,6°C, C₁₆H₁₄O₄, MM = 270, [α]_D²⁵ = - 68,5.

RMN ¹H: Tabela 37, p. 147

RMN ¹³C: Tabela 38, p. 148

nOe *diff*: Figuras 48 e 49, p. 112 e 113

EMIE (70 eV) *m/z* (intensidade relativa): [M⁺] 270 (84), 269 (29), 255 (21), 193 (41), 167 (17), 166 (100), 151 (26), 138 (8), 123 (21), 104 (8), 103 (11), 77 (11).

UV λ_{Max} (MeOH) nm: 238, 279, 345; λ_{Max} (MeOH + AlCl₃) nm: 239, 278, 342; λ_{Max} (MeOH + AlCl₃ + HCl) nm: 239, 278, 342; λ_{Max} (MeOH + CH₃ONa) nm: 258, 277, 351; λ_{Max} (MeOH + CH₃ONa + 5min) nm: 258, 277, 351; λ_{Max} (MeOH + CH₃COONa) nm: 255, 307, 352.

DV8 - 7-hidroxi-6-metoxiflavanonol

Cristais amarelo-pálidos, C₁₆H₁₄O₅, MM = 286, [α]_D²⁵ = - 50,5.

RMN ¹H: Tabela 39, p. 158

RMN ¹³C: Tabela 39, p. 158

nOe *diff*: Figuras 97, 98 e 99, p. 153 e 154

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^{+\bullet}]$ 286 (22), 271 (5), 257 (46), 209 (2), 179 (10), 167 (100), 166 (23), 151 (12), 138 (5), 123 (11), 92 (3), 91 (24).

UV λ_{Max} (MeOH) nm: 239, 280, 344; λ_{Max} (MeOH + AlCl₃) nm: 239, 280, 337; λ_{Max} (MeOH + AlCl₃ + HCl) nm: 239, 280, 337; λ_{Max} (MeOH + CH₃ONa) nm: 258, 300, 354; λ_{Max} (MeOH + CH₃ONa + 5min) nm: 258, 300, 354; λ_{Max} (MeOH + CH₃COONa) nm: 258, 300, 353.

DV9 - 5,7-Diidroxiflavanona (Pinocembrina)

Sólido amorfo branco, C₁₅H₁₂O₄, MM = 256.

RMN ¹H: Tabela 37, p. 147

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^+]$ 256 (77), 255 (53), 179 (67), 153 (25), 152 (79), 137 (49), 124 (66), 104 (39), 103 (40), 78 (45), 77 (51), 69 (100).

DV10 - 5,7-diidroxi-8-metoxiflavanona

Sólido amorfo amarelo-pálido, C₁₆H₁₄O₅, MM = 286

RMN ¹H: Tabela 37, p. 147

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^{+\bullet}]$ 286 (55), 285 (5), 271 (7), 256 (3), 209 (7), 183 (4), 182 (30), 168 (7), 167 (67), 155 (3), 154 (10), 153 (11), 139 (9), 104 (13), 103 (15), 69 (100).

DV11 - 2',4'-Diidroxichalcona

Cristais amarelos, PF = 90,1 °C, C₁₅H₁₂O₃, MM = 240

RMN ¹H: Tabela 40, p. 180

RMN ¹³C: Tabela 40, p. 180

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^{+\bullet}]$ 240 (80), 239 (77), 212 (5), 163 (100), 137 (55), 136 (30), 131 (10), 108 (13), 104 (15), 103 (27), 91 (9), 77 (31).

UV λ_{Max} (MeOH) nm: 265, 316, 340; λ_{Max} (MeOH + AlCl₃) nm: 325, 350, 408; λ_{Max} (MeOH + AlCl₃ + HCl) nm: 325, 350, 408; λ_{Max} (MeOH + CH₃ONa) nm: 278, 392; λ_{Max} (MeOH + CH₃ONa + 5min) nm: 278, 392; λ_{Max} (MeOH + CH₃COONa) nm: 279, 300, 387.

DV12- Lasiodiplodina

Substância amorfa branca, PF = 186,1, $C_{17}H_{24}O_4$, MM = 292, $[\alpha]_D^{25} = -66,0$.

RMN 1H : Tabela 45, p. 251

RMN ^{13}C : Tabela 45, p. 251

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^{+\bullet}]$ 292 (34), 277 (5), 275 (4), 205 (10), 193 (20), 192 (17), 191 (23), 182 (100), 181 (22), 177 (68), 164 (28), 163 (20), 150 (11), 149 (21), 138 (82), 137 (28), 123 (10), 121 (13).

UV λ_{Max} (MeOH) nm: 244, 283; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$) nm: 244, 283; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$ + HCl) nm: 244, 283; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa) nm: 275, 285; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa + 5min) nm: 275, 285; λ_{Max} (MeOH + CH_3COONa) nm: 244, 283.

IV ν^{KBr} (cm^{-1}): 3394, 2919, 2850, 1692, 1607, 1470, 1435, 1344, 1259, 1197, 1166, 1096, 843.

DV13 - 7-Hidroxiflavanona

Cristais brancos, PF = 168,8°C, $C_{15}H_{12}O_3$, MM = 240, $[\alpha]_D^{25} = -51,0$.

RMN 1H : Tabela 37, p. 147

RMN ^{13}C : Tabela 38, p.148

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^{+\bullet}]$ 240 (100), 239 (76), 163 (94), 137 (44), 136 (82), 108 (51), 104 (36), 78 (20).

UV λ_{Max} (MeOH) nm: 232, 275, 311; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$) nm: 232, 275, 311; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$ + HCl) nm: 232, 275, 311; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa) nm: 257, 282, 336; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa + 5min) nm: 257, 282, 336; λ_{Max} (MeOH + CH_3COONa) nm: 258, 277, 335.

DV14 - Ácido 3- β -hidroxi-olean-12-en-28-óico (ácido oleanólico)

Sólido amorfo branco, $C_{30}H_{48}O_3$, MM= 456

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3,22 (1H, *t*, J= 5,2 Hz, H-3), δ 2,82 (1H, *dd*, J= 4,23 e 13,89 Hz, H-11), δ 5,28 (1H, *t*, H-12), δ 0,93 (3H, *s*, H-23), δ 0,78 (3H, *s*, H-24), δ 0,98 (3H, *s*, H-25), δ 0,76 (3H, *s*, H-26), δ 1,14 (3H, *s*, H-27), δ 0,90 (3H, *s*, H-29), δ 0,91 (3H, *s*, H-30).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ 38,4 (CH_2 , C-1), δ 27,1 (CH_2 , C-2), δ 79,1 (CH, C-3), δ 38,7 (C, C-4), δ 55,2 (CH, C-5), δ 18,3 (CH_2 , C-6), δ 32,6 (CH_2 , C-7), δ

39,2 (C, C-8), δ 47,6 (CH, C-9), δ 37,1 (C, C-10), δ 22,75 (CH₂, C-11), δ 122,6 (CH, C-12), δ 143,5 (C, C-13), δ 41,6 (CH, C-14), δ 27,7 (CH₂, C-15), δ 23,4 (CH₂, C-16), δ 46,5 (C, C-17), δ 41,0 (CH, C-18), δ 45,8 (CH₂, C-19), δ 30,7 (C, C-20), δ 33,6 (CH₂, C-21), δ 31,9 (CH₂, C-22), δ 28,1 (CH₃, C-23), δ 15,6 (CH₃, C-24), δ 15,3 (CH₃, C-25), δ 17,0 (CH₃, C-26), δ 25,9 (CH₃, C-27), δ 183,1 (COOH, C-28), δ 33,1 (CH₃, C-29), δ 23,6 (CH₃, C-30).

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): [M⁺] 456 (3), 438 (2), 424 (1), 248 (100), 208 (5), 207 (19), 203 (56), 189 (11), 133 (21).

DV15- 2',4,4'-triidroxi-3-metoxichalcona (homobuteína)

Cristais amarelo-intensos, C₁₆H₁₄O₅, MM = 286.

RMN ¹H: Tabela 40, p. 180

RMN ¹³C: Tabela 40, p.180

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): [M⁺] 286 (59), 285 (26), 271 (5), 259 (13), 258 (5), 185 (36), 177 (7), 163 (37), 150 (57), 149 (54), 137 (100), 136 (21), 124 (19), 123 (15), 109 (20).

UV λ_{Max} (MeOH) nm: 230, 306, 374; λ_{Max} (MeOH + AlCl₃) nm: 300, 370, 424; λ_{Max} (MeOH + AlCl₃ + HCl) nm: 300, 370, 424; λ_{Max} (MeOH + CH₃ONa) nm: 278, 320, 444; λ_{Max} (MeOH + CH₃ONa + 5min) nm: 278, 320, 444; λ_{Max} (MeOH + CH₃COONa) nm: 280, 335, 410.

DV16 - 7,4'-Diidroxi-6-metoxiflavanona

Cristais amarelo-pálidos, C₁₆H₁₄O₅, MM = 286, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -62,2$

RMN ¹H: Tabela 37, p. 147

RMN ¹³C: Tabela 38, p.148

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): [M⁺] 286 (72), 285 (21), 271 (4), 258 (9), 193 (12), 167 (100), 166 (54), 163 (30), 151 (23), 150 (38), 137 (30), 123 (23), 120 (29), 107 (13), 95 (15), 91 (18), 77 (12).

UV λ_{Max} (MeOH) nm: 274, 345; λ_{Max} (MeOH + AlCl₃) nm: 274, 335, 425; λ_{Max} (MeOH + AlCl₃ + HCl) nm: 274, 335, 425; λ_{Max} (MeOH + CH₃ONa) nm: 250, 302, 350, 440; λ_{Max} (MeOH + CH₃ONa + 5min) nm: 250, 302, 350, 440; λ_{Max} (MeOH + CH₃COONa) nm: 220, 311, 350, 421.

DV17 - α,β' -Epoxi,-2,2',4'-triidroxichalcona-($\beta\rightarrow 4'$)-7,4'-diidroxiflavanona

Sólido amorfo amarelo, $C_{31}H_{26}O_9$, MM = 542

RMN 1H : Tabela 44, p. 244

RMN ^{13}C : Tabela 44, p. 244

HMQC: Figuras 181, 182 e 183, p. 235, 236 e 237; Tabela 44, p. 234

HMBC: Figuras 184, 185 e 186, p. 238, 239 e 240; Tabela 44, p. 234

NOESY: Figuras 187, 188, 189, p. 241, 242 e 243

DV18 – 4',7-Diidroxiflavanona (liquiritigenina)

Cristais amarelo-pálidos, PF = 93,4°C, $C_{15}H_{12}O_4$, MM = 256, , $[\alpha]_D^{25} = - 62,2$

RMN 1H : Tabela 37, p. 147

RMN ^{13}C : Tabela 38, p.148

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^{+\bullet}]$ 256 (89), 255 (52), 163 (28), 137 (100), 136 (2), 120 (75), 108 (15), 107 (19), 94 (8).

UV λ_{Max} (MeOH) nm: 228, 275, 311, 381; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$) nm: 228, 275, 311, 381; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$ + HCl) nm: 228, 275, 311, 381; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa) nm: 249, 283, 335, 421; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa + 5min) nm: 249, 283, 335, 421; λ_{Max} (MeOH + CH_3COONa) nm: 252, 283, 335, 397.

DV19 - 7,3',4'-Triidroxiflavanona

Cristais amarelo-pálidos, PF = 119,2°C, $C_{15}H_{12}O_5$, MM = 272, , $[\alpha]_D^{25} = - 69,2$

RMN 1H : Tabela 37, p. 147

RMN ^{13}C : Tabela 38, p. 148

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^{+\bullet}]$ 272 (76), 271 (35), 255 (12), 167 (30), 163 (40), 149 (93), 137 (100), 136 (64), 110 (10), 108 (17).

UV λ_{Max} (MeOH) nm: 233, 278, 311, 392; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$) nm: 233, 278, 311, 392; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$ + HCl) nm: 233, 278, 311, 392; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa) nm: 251, 302, 335, 421; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa + 5min) nm: 251, 302, 335, 421; λ_{Max} (MeOH + CH_3COONa) nm: 253, 289, 335, 421.

DV20 - 2',3,4,4'-Tetraidroxichalcona (buteína)

Cristais amarelo-intensos, $C_{15}H_{12}O_5$, MM = 272

RMN 1H : Tabela 40, p. 180

RMN ^{13}C : Tabela 40, p. 180

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^{+\bullet}]$ 272 (99), 271 (49), 255 (16), 244 (5), 163 (36), 150 (30), 137 (100), 136 (52), 135 (8), 110 (8), 109 (3).

UV λ_{Max} (MeOH) nm: 262, 306, 383; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$) nm: 295, 325, 457; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$ + HCl) nm: 271, 326, 427; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa) nm: 278, 353, 441; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa + 5min) nm: 278, 353, 441; λ_{Max} (MeOH + CH_3COONa) nm: 281, 358, 441.

DV21- 3',4',7-Triidroxiflavana-(2 β →7,4 β →8)-3-prenil-fustina

Cristais marrons, $C_{35}H_{32}O_{10}$, MM = 612

RMN 1H : Tabela 42, p. 223

RMN ^{13}C : Tabela 42, p.223

nOe diff: Figura 141 e 142, p. 201

HMQC: Figuras 143 e 144, p. 202 e 203; Tabela 42, p. 223

HMBC: Figuras 145 e 146, p. 204 e 205; Tabela 42, p. 223

DV22- 3,3',4',5,7-Pentahidroxiflavana (*epicatequina*)

Cristais amarelos, PF = 242-245°C, $C_{15}H_{14}O_6$, MM = 290, $[\alpha]_D = -16$

RMN 1H : Tabela 41, p. 190

RMN ^{13}C : Tabela 41, p. 190

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M^{+\bullet}]$ 290 (14), 272 (1), 271 (1), 167 (4), 163 (3), 152 (35), 139 (100), 123 (36).

UV λ_{Max} (MeOH) nm: 240, 280, 370; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$) nm: 230, 380, 424; λ_{Max} (MeOH + $AlCl_3$ + HCl) nm: 235, 275, 424; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa) nm: 255, 285, 434; λ_{Max} (MeOH + CH_3ONa + 5min) nm: 250, 260, 285, 295, 434; λ_{Max} (MeOH + CH_3COONa) nm: 235, 280, 434.

DV23- *Epicatequina-(2 β →7,4 β →8)-epicatequina*

Cristais marrons, C₃₀H₂₄O₁₂, MM = 576

RMN ¹H: Tabela 42, p. 223

RMN ¹³C: Tabela 42, p. 223

DV24- *Epigallocatequina-(2 β →7,4 β →8)-epicatequina*

Cristais marrons, PF = 223-225°C, C₃₀H₂₄O₁₃, MM = 592

RMN ¹H: Tabela 43, p. 224

RMN ¹³C: Tabela 43, p. 224

HOMOCOSY ¹H-¹H: Figura 166, p. 219

HETCOR H¹-¹³C: Figura 163, p. 218; Tabela 43, p. 224

HETCOR H¹-¹³C J= 9Hz: Figura 164, p. 218; Tabela 43, p. 224

HETCOR H¹-¹³C J= 11Hz: Figura 165, p. 219; Tabela 43, p. 224

“nOe diff”: Figura 170, p. 213

FAB positivo *m/z* (intensidade relativa): [M+H] 593 (5), 441 (4), 303 (10), 287 (8), 277 (8), 207 (31), 149 (9), 115 (100)

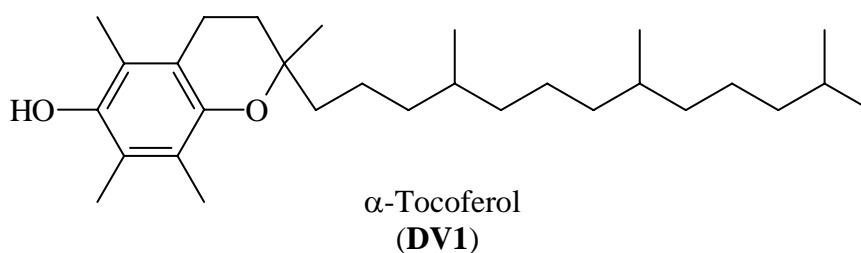
UV λ_{Max} (MeOH) nm (log ϵ): 210 (5,16), 225 (5,10), 277 (3,98)

DC: [Φ]₂₁₁ -79573, [Φ]₂₂₇ +119573

Análise Elementar: C, 54,1%; H, 5,0%. C₃₀H₂₄O₁₃.4H₂O requer C, 54,2%; H, 4,8%

6. Identificação e determinação estrutural

6.1. Identificação do α -Tocoferol



Análise EM de **DV1** apresentou seu íon molecular e pico base em m/z 430 (Figura 26, p. 93). O fragmento em m/z 218 sugeriu a presença de anel cromano (benzo-pirano), através da perda da cadeia lateral. A presença do anel aromático deste modo pode ser confirmada pelo fragmento estável em m/z 165 referente ao íon tropílio (Figura 27, p.93). Estes fragmentos e a ausência de outros fragmentos intensos nos levaram a propor que **DV1** é o α -tocoferol, cuja fórmula molecular é $C_{29}H_{50}O_2$ e a MM = 430. A diferenciação em relação aos demais tocoferóis foi feita pela massa do íon tropílio, já que estes apresentam substituição diferente no núcleo aromático. Esta proposta foi confirmada pela comparação do EM com a biblioteca de espectros do aparelho, que mostrou coincidência superior a 93%, além de análise por CCDC em comparação a um padrão de α -tocoferol isolado em nossos laboratórios a partir de *Moldnhalwera nutans*.

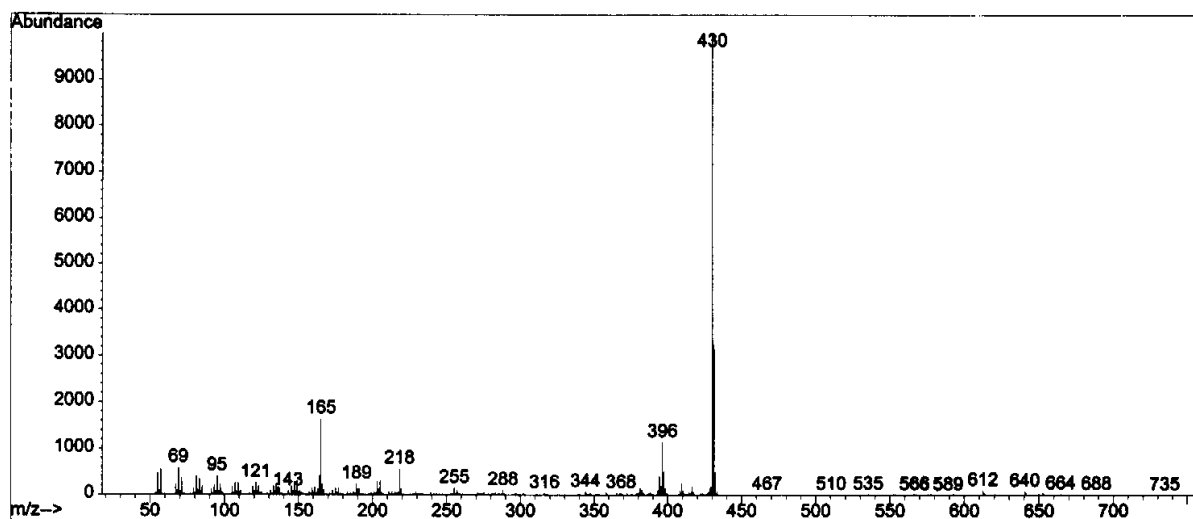


Figura 26 – EMIE 70 eV de DV1

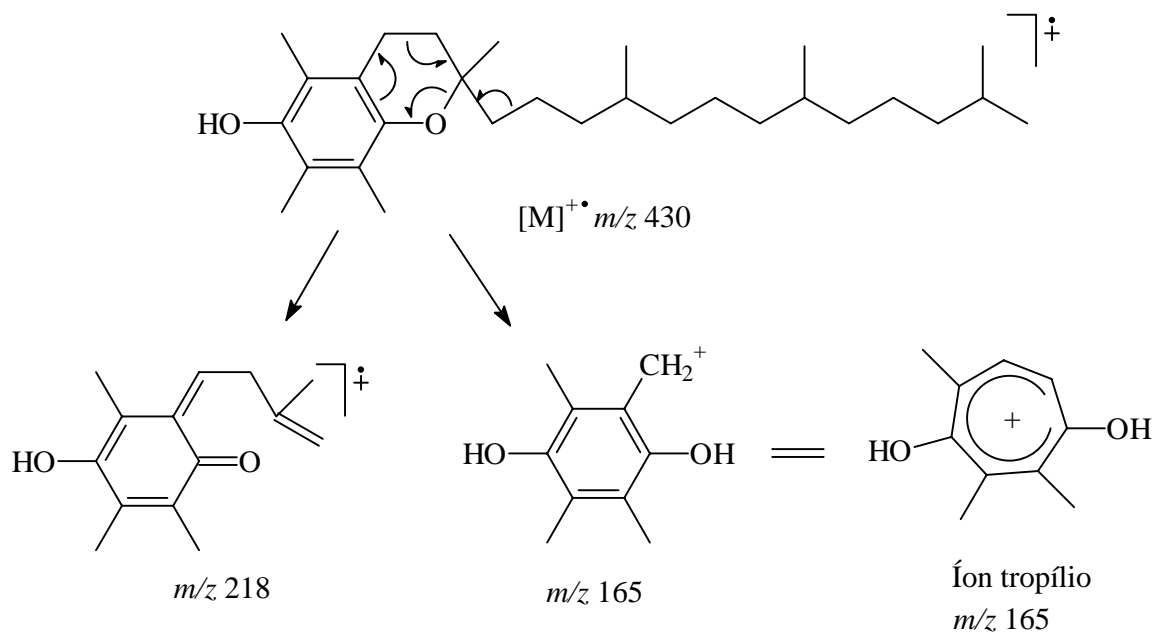
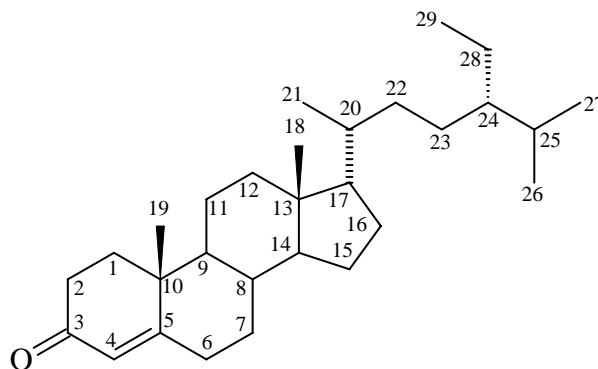


Figura 27 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV1

6.2. Esteróides

6.2.1. Identificação da estigmast-4-en-3-ona



Estigmast-4-en-3-ona
(**DV2**)

A substância **DV2** também foi identificada através dos dados de EM. O íon molecular em m/z 412 (Figura 28, p. 95) e o perfil de fragmentação no EM sugeriram tratar-se de um esteróide. Dentre os fragmentos característicos observa-se o pico em m/z 271, referente à perda da cadeia lateral, além dos outros fragmentos característicos tais como a perda de moléculas neutras referentes à cadeia lateral em conjunto com os carbonos do anel D (C-16 e C-17) em m/z 244 e (C-15, C-16 e C-17) em m/z 230 (Figura 29, p. 95). As massas destes fragmentos também confirmaram a ausência de insaturação na cadeia lateral. A ausência do fragmento RDA exclui a possibilidade da insaturação estar localizada entre C-5 e C-6. Este fato é corroborado pelos picos relativos as fragmentações entre C-5 e C-6 e entre C-6 e C-7 do anel B em m/z 109 e m/z 124, respectivamente. Este último, correspondendo ao pico base. A presença do íon estável em m/z 229 é um indicativo da presença da insaturação entre C-4 e C-5, pois este é estabilizado por conjugação. A ausência de perda de água exclui a presença de 3-OH, fato que em conjunto com o fragmento m/z 229 sugere um grupo C=O na posição C-3 (Figura 29, p.95). Estes dados nos levaram a sugerir que **DV2** é a estigmast-4-en-3-ona, cuja fórmula molecular é $C_{29}H_{48}O$ (MM = 412), e a comparação com a biblioteca de espectros do aparelho e dados da literatura confirmaram esta proposta. Destaca-se que o EM de **DV12** mostrou coincidência superior a 99% com o espectro da estigmast-4-en-3-ona (PARTRIDGE, 1977; FRIEDLAND, 1959; BUDZIKIEWICS, 1962).

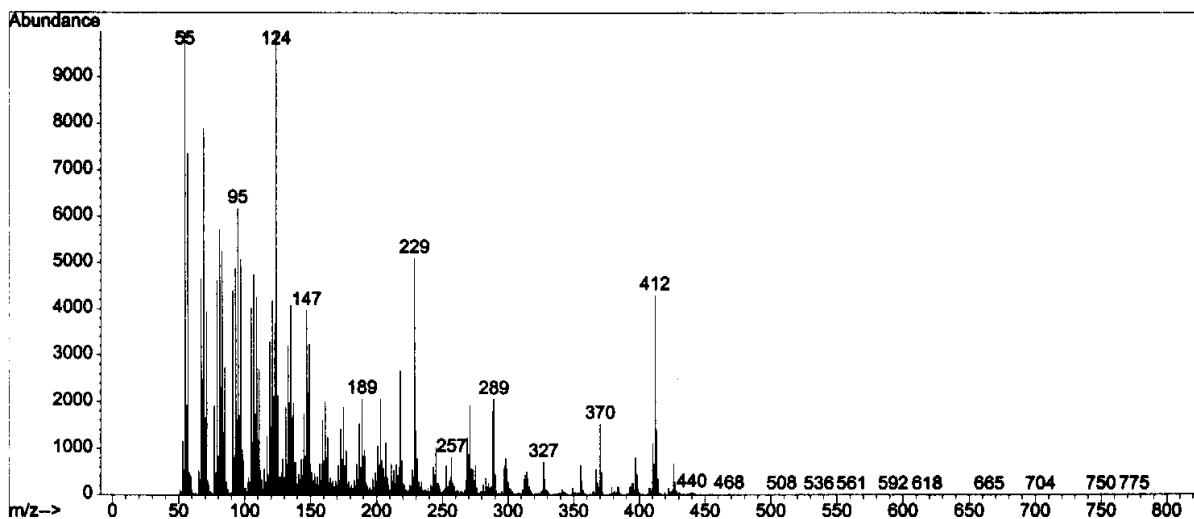


Figura 28 – EMIE 70 eV de DV2

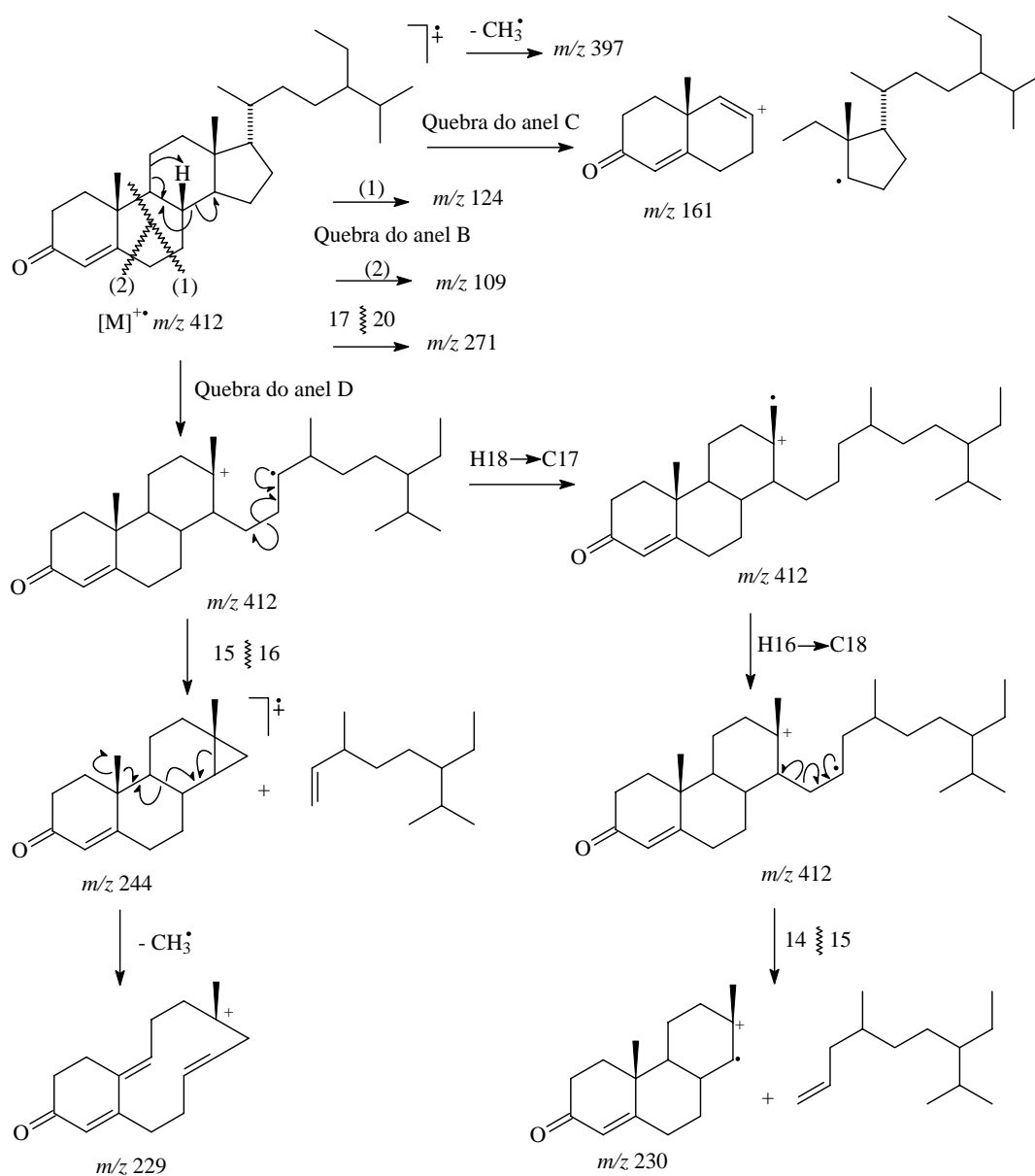
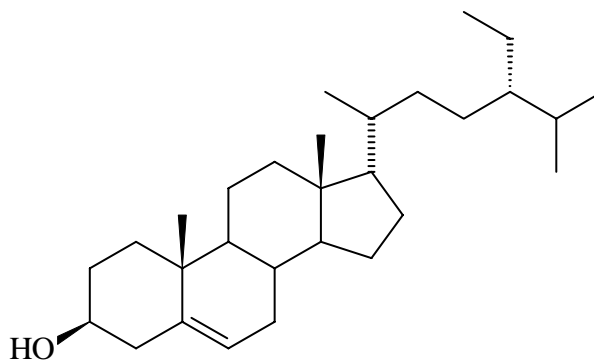


Figura 29 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV2

6.2.2. Identificação do estigmast-5-en-3 β -ol (β -sitosterol)



Estigmast-5-en-3 β -ol
(**DV5**)

O EM de **DV5** apresentou íon molecular em m/z 414 (pico base) (Figura 30, p. 97). Seu perfil no EM e a coloração rosa quando revelado com Lieberman-Burchard indicou tratar-se de um triterpeno ou um esteróide. Dentre os fragmentos, o íon em m/z 273 é referente à perda da cadeia lateral. Além deste, outros fragmentos característicos são a perda de moléculas neutras referentes à cadeia lateral em conjunto com os carbonos do anel D (C-16 e C-17) em m/z 246 e (C-15, C-16 e C-17) em m/z 232 (Figura 31, p. 97). Os valores de m/z destes fragmentos também confirmaram a ausência de insaturação na cadeia lateral. Os íons radicalares em m/z 138 e m/z 276 referentes aos fragmentos de RDA confirmam a presença da insaturação localizada entre C-5 e C-6. Esta informação é validada pela ausência de fragmentações do anel B entre C-5 e C-6 e C-6 e C-7. A presença do íon estável em m/z 231 indica a presença da insaturação entre C-5 e C-6, pois este é estabilizado por conjugação. A perda de água a partir do íon molecular m/z 396, e a partir de outros fragmentos onde o anel A está intacto em m/z 213, m/z 163 e m/z 120 confirma a presença do grupo hidroxílico em 3 (Figura 31, p. 97). Estes dados sugeriram que **DV5** é o estigmast-5-en-3-ol (β -sitosterol), cuja fórmula molecular é $C_{29}H_{50}O$ (MM = 414). Esta proposta foi confirmada por CCDC com padrão de β -sitosterol, e dados da literatura. A comparação com e a biblioteca de espectros do aparelho mostrou coincidência superior a 91% com o espectro do β -sitosterol (PARTRIDGE, 1977; FRIEDLAND, 1959; BUDZIKIEWICS, 1962).

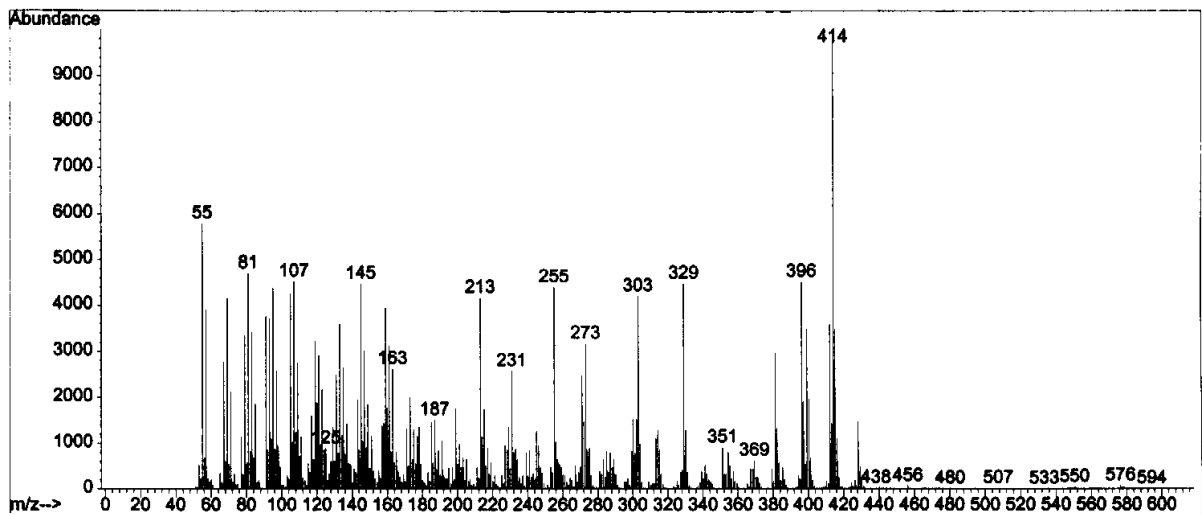


Figura 30 – EMIE 70 eV de DV5

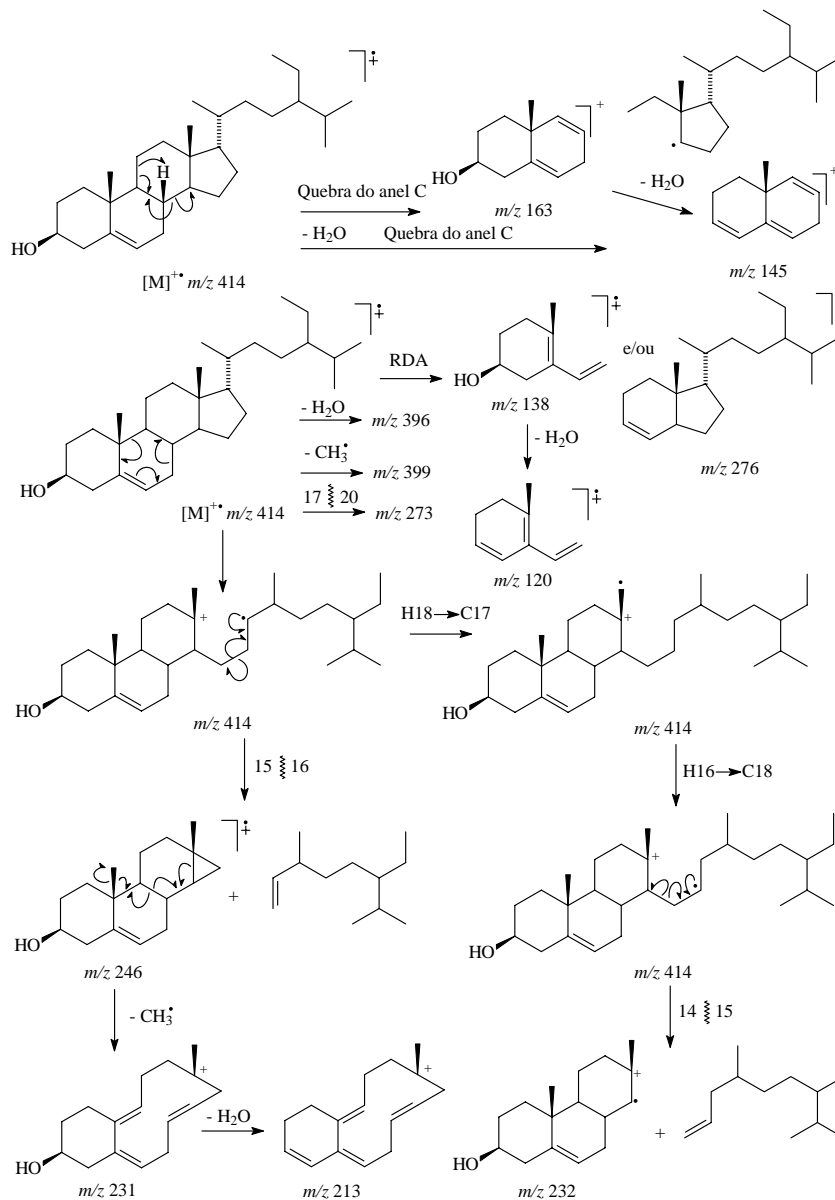
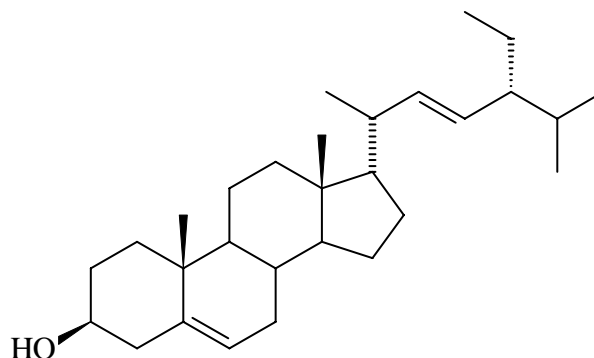


Figura 31 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV5

6.2.3. Identificação do estigmast-5,22-dien-3 β -ol (estigmasterol)



Estigmast-5,22-dien-3 β -ol
(**DV6**)

A substância **DV6** foi obtida em mistura com **DV5**, o que foi confirmado pela análise por CCDC revelada com reagente de Liberman-Burchard. Uma vez que **DV5** tratava-se do β -sitosterol, foi feita comparação por CCD com padrões de β -sitosterol e stigmasterol onde concluiu-se que **DV6** era o stigmasterol. Os fragmentos no EM (Figura 33, p. 99) são praticamente os mesmos de **DV5**, tendo em vista que a diferença entre **DV5** e **DV6** é apenas a insaturação entre C-22 e C-23. Pode-se notar o íon molecular em m/z 412, além dos fragmentos característicos de perda de água em m/z 394 e de perda de metila em m/z 397 (Figura 34, p. 100). Sendo estes fragmentos indicativos, mas não conclusivos da presença do stigmasterol, foi obtido o espectro de RMN ^{13}C da mistura (Figura 32, p. 99), onde se observou a presença de 56 sinais, uma vez que os deslocamentos da insaturação entre C-5 e C-6 coincidiram. Como **DV5** encontrava-se em quantidade superior a **DV6**, a atribuição dos sinais pode ser realizada, com a ajuda dos experimentos de DEPT 135 $^\circ$ e 90 $^\circ$. Comparação dos deslocamentos com dados da literatura confirmou que **DV6** é o estigmast-5,22-dien-3 β -ol (stigmasterol), cuja fórmula molecular é $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ (MM = 412) (RICCA, 1978; GRECA, 1990).

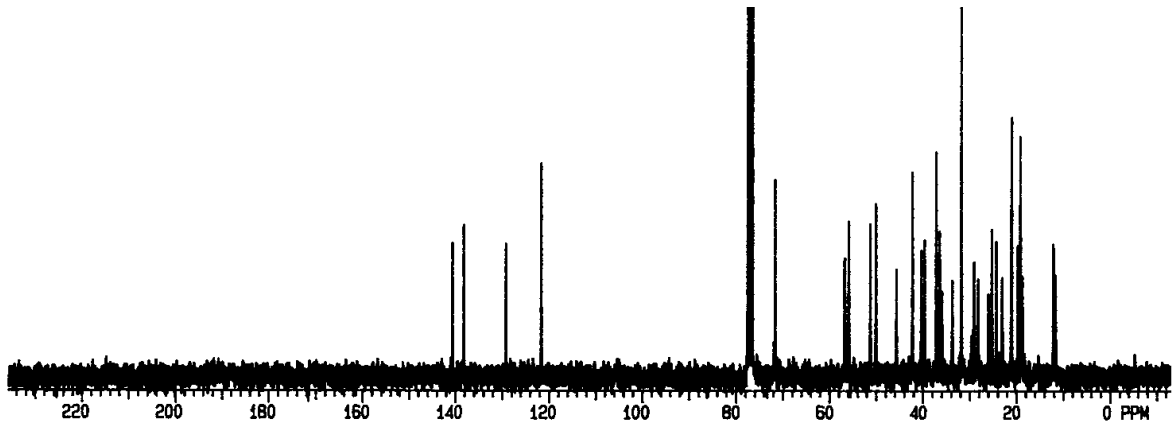


Figura 32 – Espectro de RMN ^{13}C da mistura DV5 e DV6 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

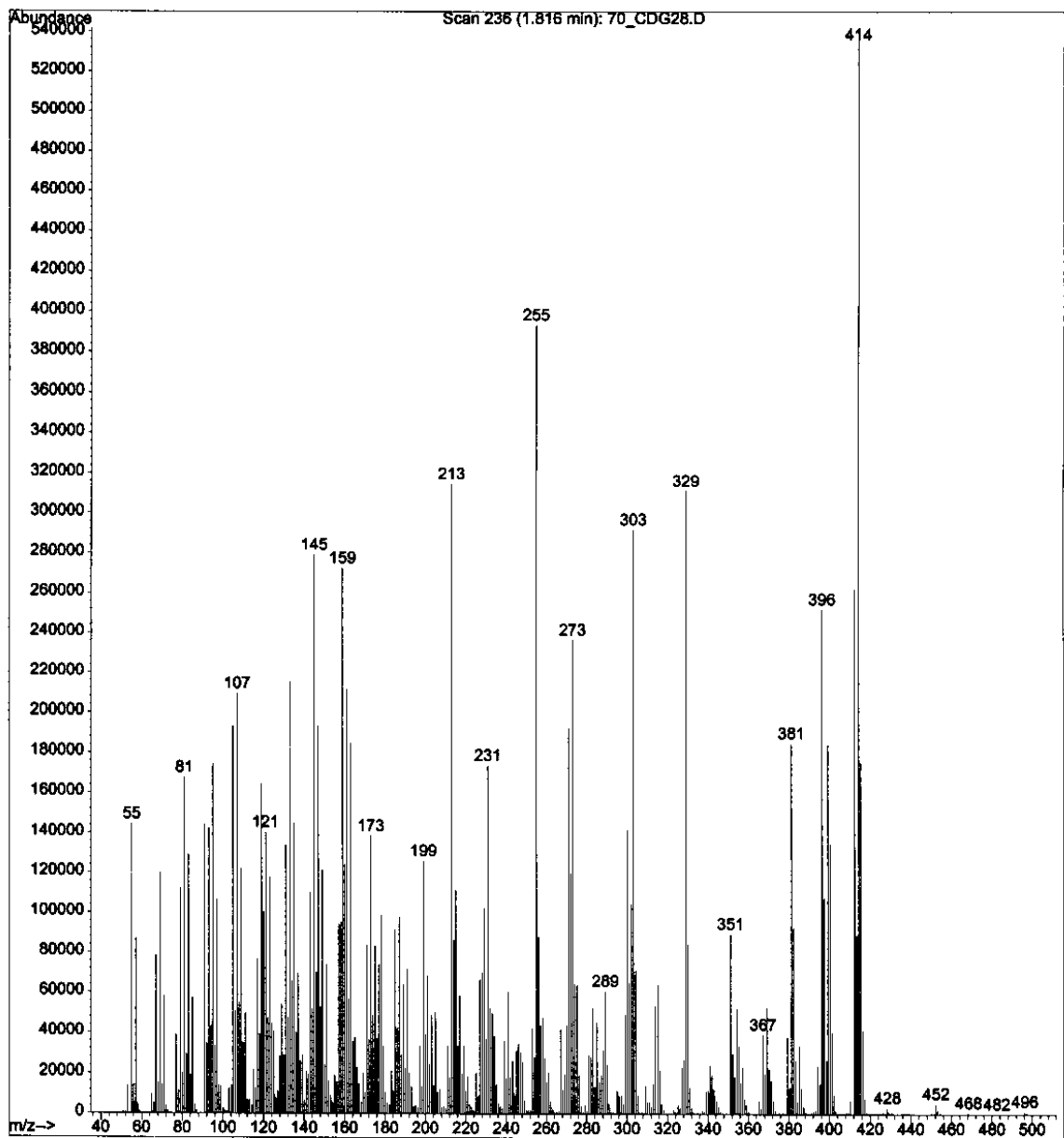


Figura 33 – EMIE 70 eV de DV5 e DV6

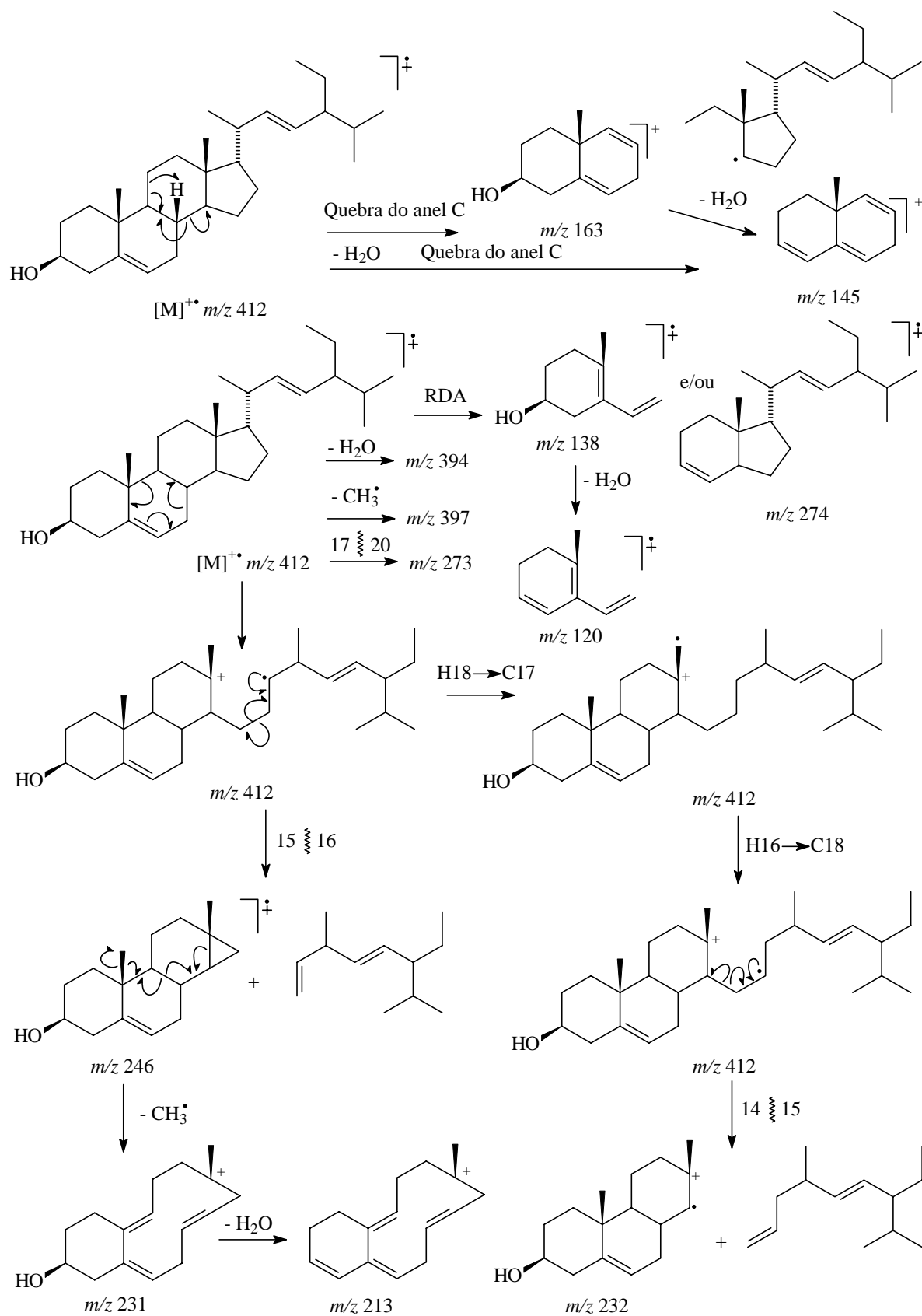


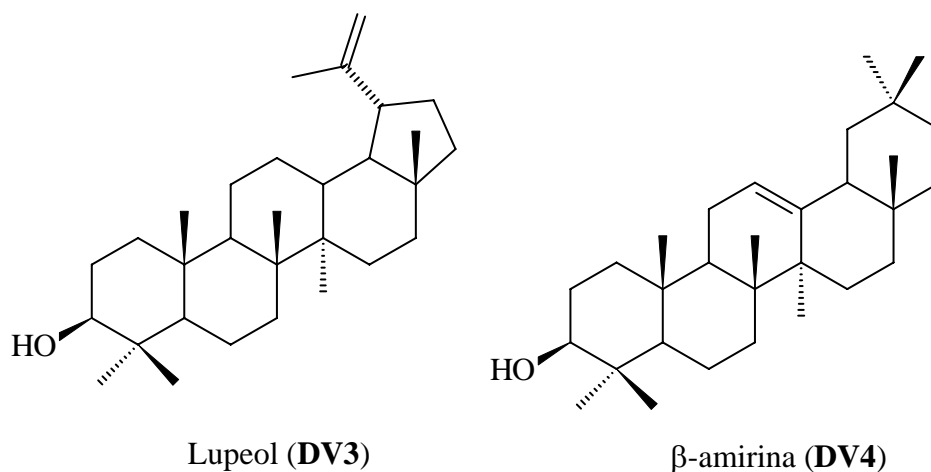
Figura 34 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV6

6.3. Triterpenos

Dentre os triterpenos conhecidos, os pentacíclicos são os mais largamente distribuídos, principalmente os de esqueletos oleanano, lupano e ursano. Os espectros de RMN de ^1H de triterpenos de esqueleto oleanano apresentam como deslocamentos característicos um sinal em aproximadamente δ 5,27 pertencente ao hidrogênio olefínico em C-12, além de 8 simpletos referentes as metilas na faixa de δ 0,5 a δ 1,5. Nos triterpenos de esqueleto lupano destacam-se a presença de dois dupletos para hidrogênios olefínicos na região de δ 4,69 e δ 4,57 num sistema AX de acoplamento de hidrogênios geminados ($J= 2,1$ Hz). Além desses a presença de 7 metilas todas como simpletos, sendo 6 delas entre δ 0,5 a δ 1,5 e uma delas bem característica em aproximadamente δ 1,68, ligada a Csp^2 .

No espectro de RMN ^{13}C dos oleananos destacam-se os sinais referentes a carbonos olefínicos da insaturação em δ $140,00 \pm 3,00$ (C-13) e em δ $120,00 \pm 3,00$ (C-12), além dos 8 carbonos metílicos e do carbono oximetínico em δ $78,00 \pm 3,00$ para 3-OH. Já nos lupoanos, destacam-se os sinais de Csp^2 em cerca de δ $150,00 \pm 3,00$ (C-20) e em cerca de δ $109,00 \pm 3,00$ (C-29), bastante característicos da insaturação do lupano. O carbono metílico ligado a Csp^2 em cerca de δ $19,00 \pm 3,00$ também é um outro sinal característico desse tipo de esqueleto, que, além desse, apresenta seis outros carbonos metílicos e, no caso de 3 hidroxí o carbono oximetílico em δ 78-81 (MAHATO, 1994).

Os EM dos triterpenos oleananos apresentam em geral íon molecular pouco intenso e os fragmentos principais característicos, derivados da RDA do anel C, que confirmam a presença da insaturação entre C-12 e C-13. Em geral o fragmento que retém a carga é o superior, dos anéis D e E, enquanto que o inferior, dos anéis A e B, é menos intenso. O fragmento superior também apresenta perda de C-28, que é mais pronunciada para COOH , COOCH_3 , CH_2OH e CH_2OAc para triterpenos derivados do ácido oleanólico. No caso do C-28 ser uma metila, a perda é menos pronunciada. Ocorre também perda posterior de C-17, ou perda conjunta de C-17 ligado a C-28 como por exemplo $\text{CH}_2\text{-COOH}$, o que leva à abertura dos anéis D e E. Outra fragmentação do anel C que não envolve RDA, e sim transferência de H^\bullet ocorre em menor intensidade, sendo porém a fragmentação principal dos triterpenos que não apresentam insaturação entre C-12 e C-13, em particular os lupoanos. Destaca-se ainda a perda de H_2O e a perda de CH_3OH para ambos (BUDZIKIEWICS, 1963).

6.3.1. Identificação do lupeol e β -amirina em mistura

A partir das considerações anteriores, foi possível identificar através de RMN ^1H e ^{13}C as substâncias **DV3** e **DV4** em mistura. Análise de seu EM revelou íon molecular em m/z 426 condizente para as duas estruturas, além dos fragmentos de RDA de **DV4** em m/z 218 e m/z 208 e do fragmento principal de **DV3** em m/z 207 (Figuras 37, 38 e 39).

Análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Figuras 35 e 36) e experimentos DEPT 135° e 90° permitiram identificar que a mistura era formada por lupeol e β -amirina. Uma vez que, **DV3** está em maior quantidade do que **DV4** foi possível atribuir todos os deslocamentos de carbono. Comparação com dados da literatura levou à confirmação de que **DV3** é a lupenona e que **DV4** é a β -amirina, cujas fórmulas moleculares coincidem sendo $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ (MM = 426) (MAHATO, 1994).

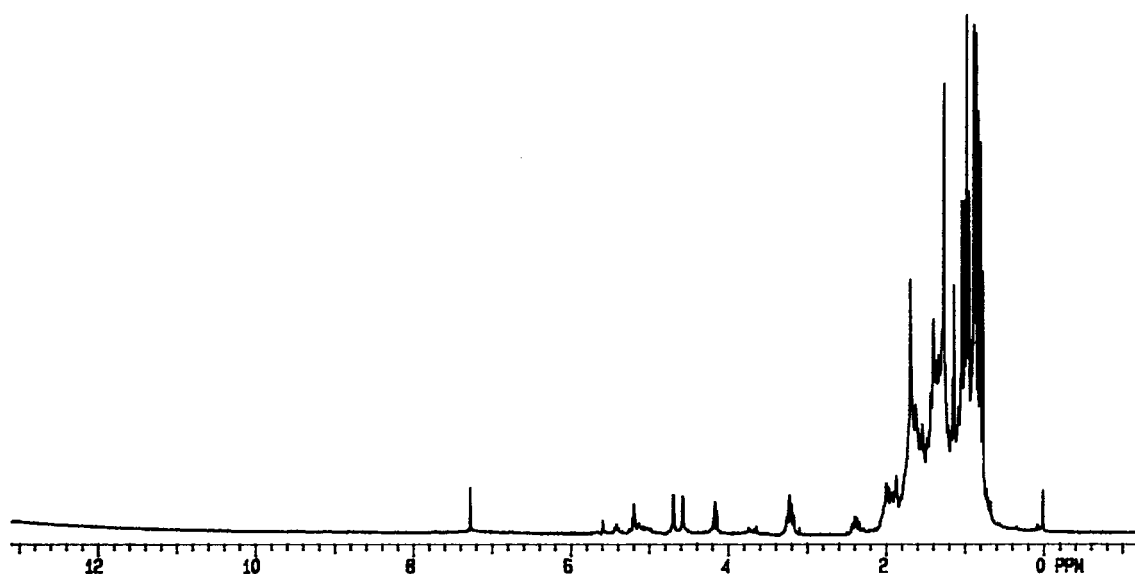


Figura 35 – Espectro de RMN ^1H de **DV3** + **DV4** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

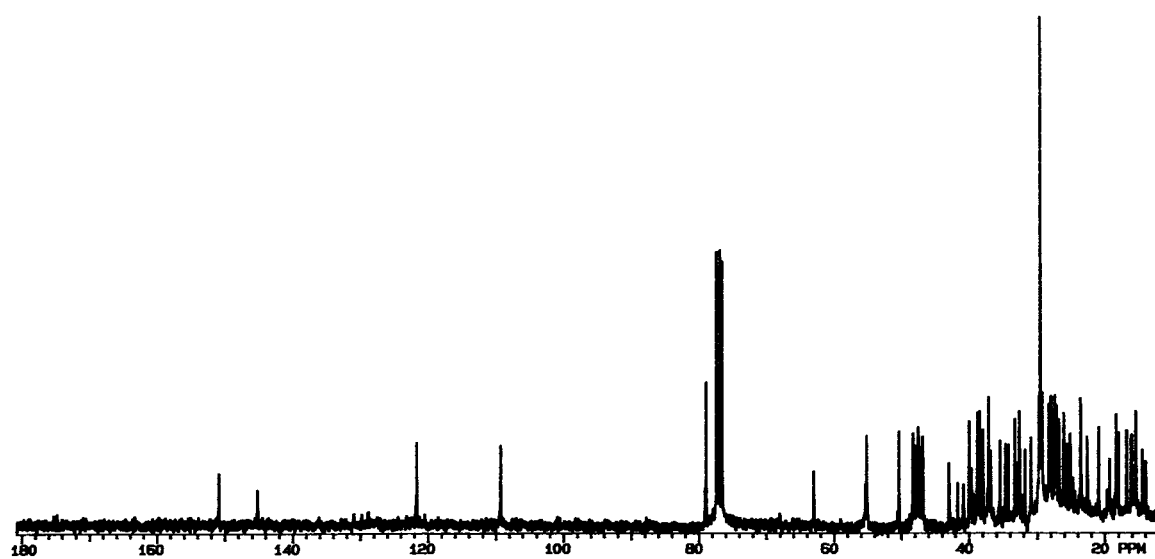


Figura 36 – Espectro de RMN ^{13}C de DV3 + DV4 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

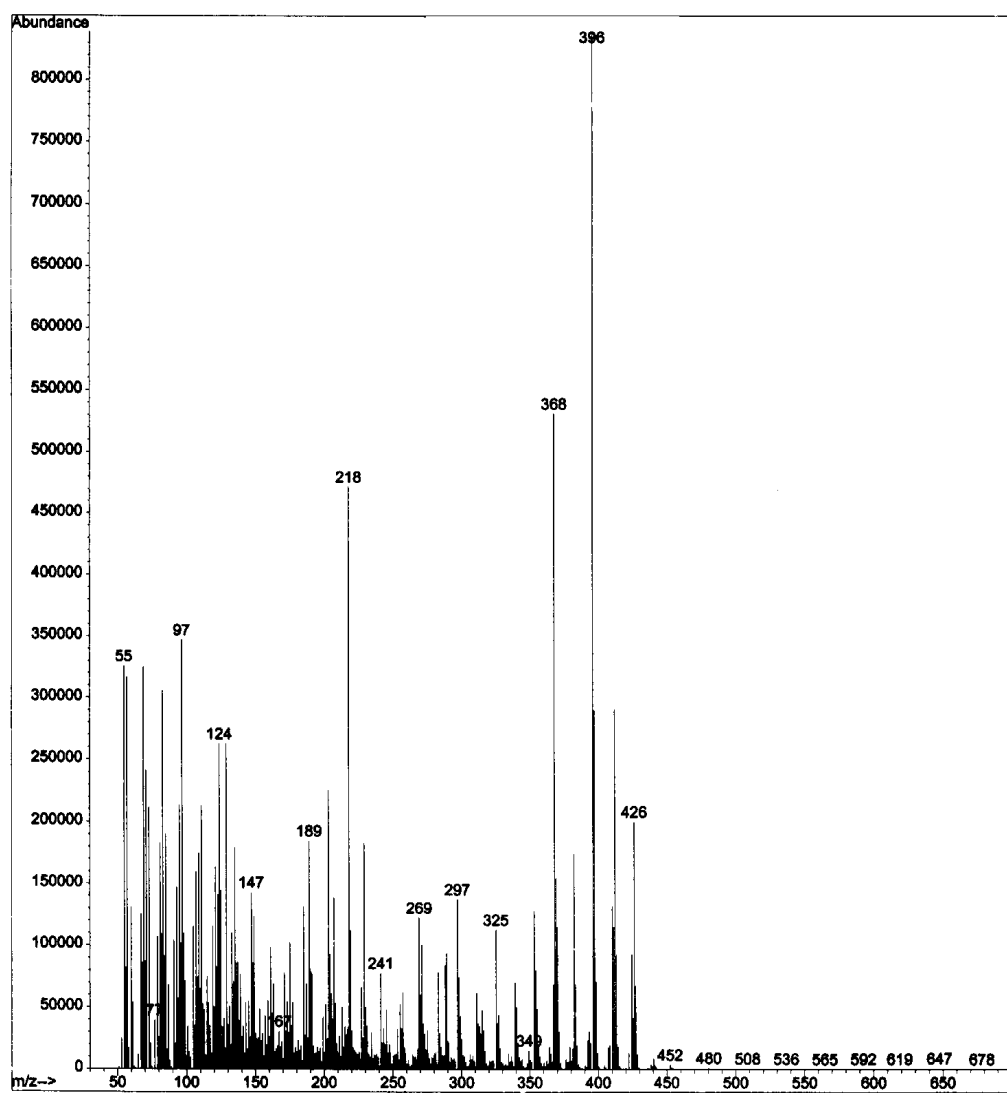


Figura 37 – EMIE 70 eV de DV3 e DV4

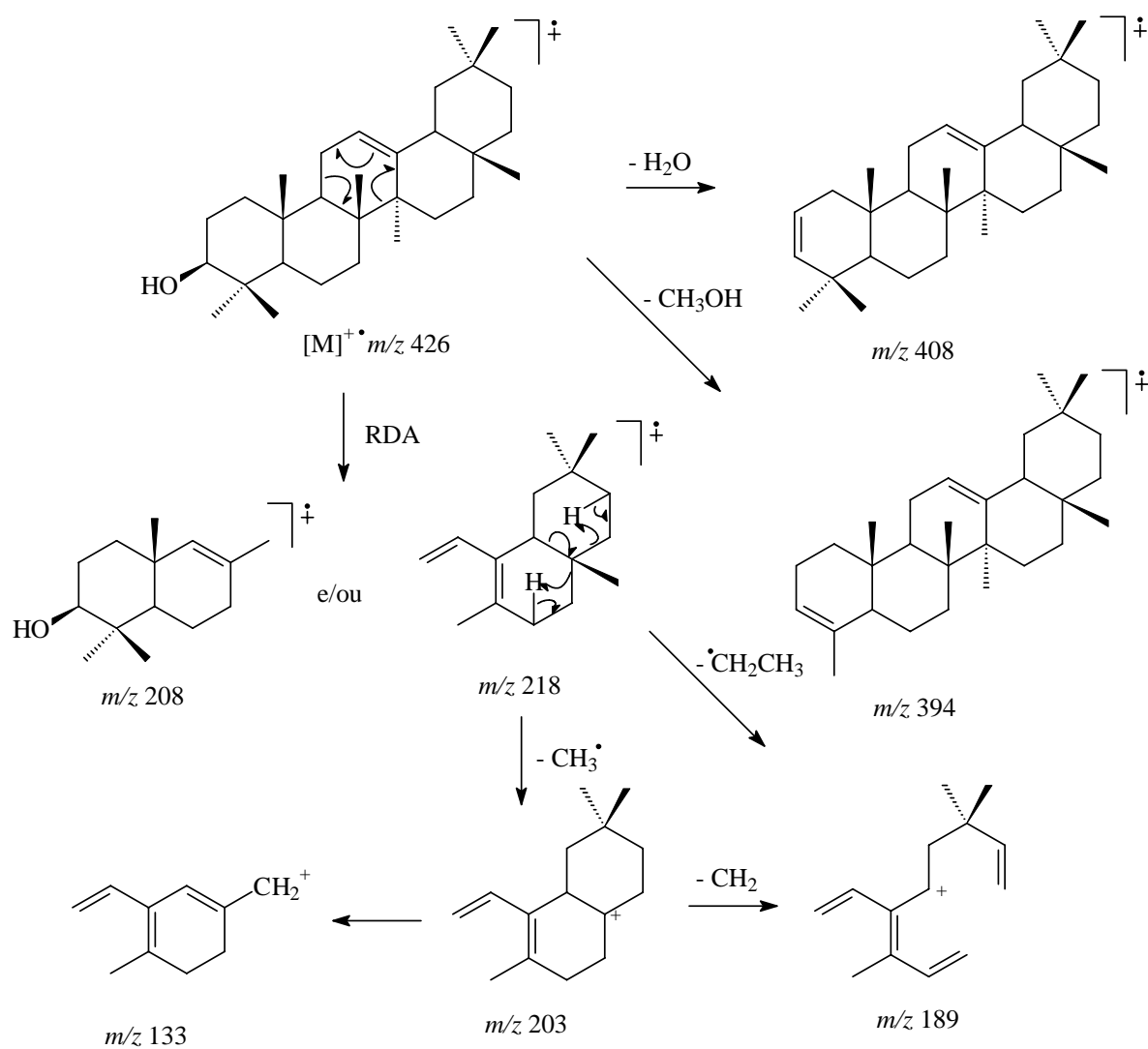


Figura 38 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV4

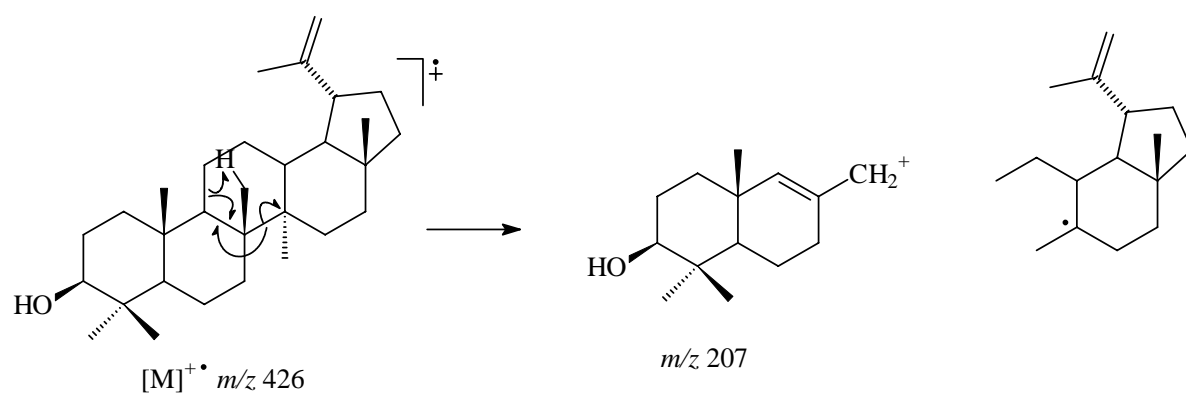
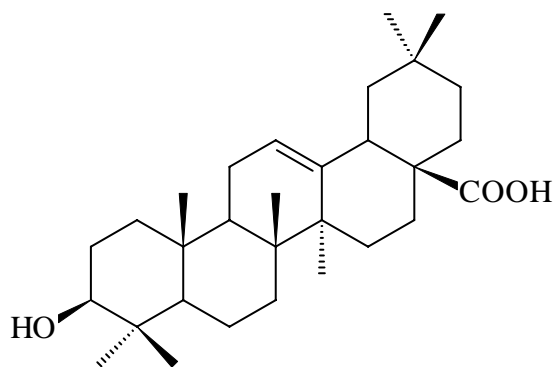


Figura 39 – Principal fragmentação de massa de DV3

6.3.2. Identificação do ácido oleanólico



Ácido oleanólico
(DV14)

A substância **DV14** apresentou no EM o íon molecular em m/z 456 (Figura 42, p. 106), o que em conjunto com os 30 sinais de RMN ^{13}C e dados de DEPT sugeriu uma fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$.

Análise de seu espectro de RMN ^1H e ^{13}C (Figuras 40 e 41, p. 105 e 106) (PND e DEPT) em conjunto com EM (Figuras 42 e 43, p. 106 e 107) permitiram identificar a substância como ácido oleanólico.

Comparação dos valores de deslocamento com dados da literatura (MAHATO, 1994) confirmaram que **DV14** trata-se do ácido oleanólico.

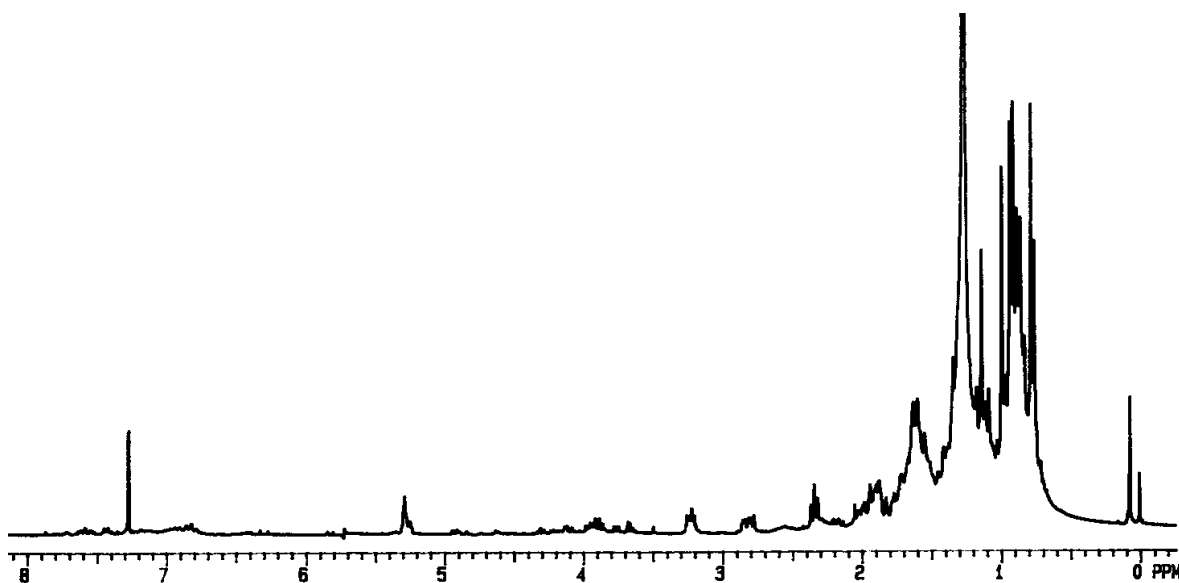
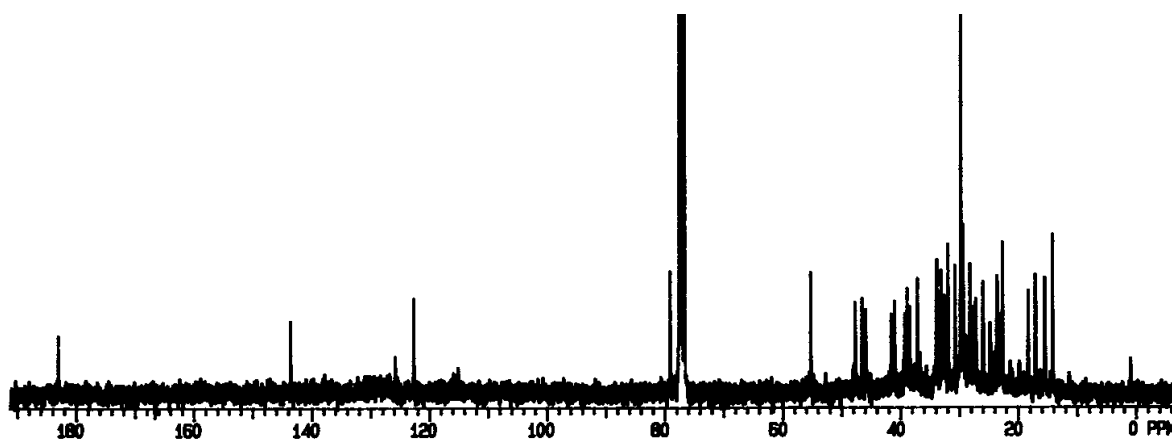
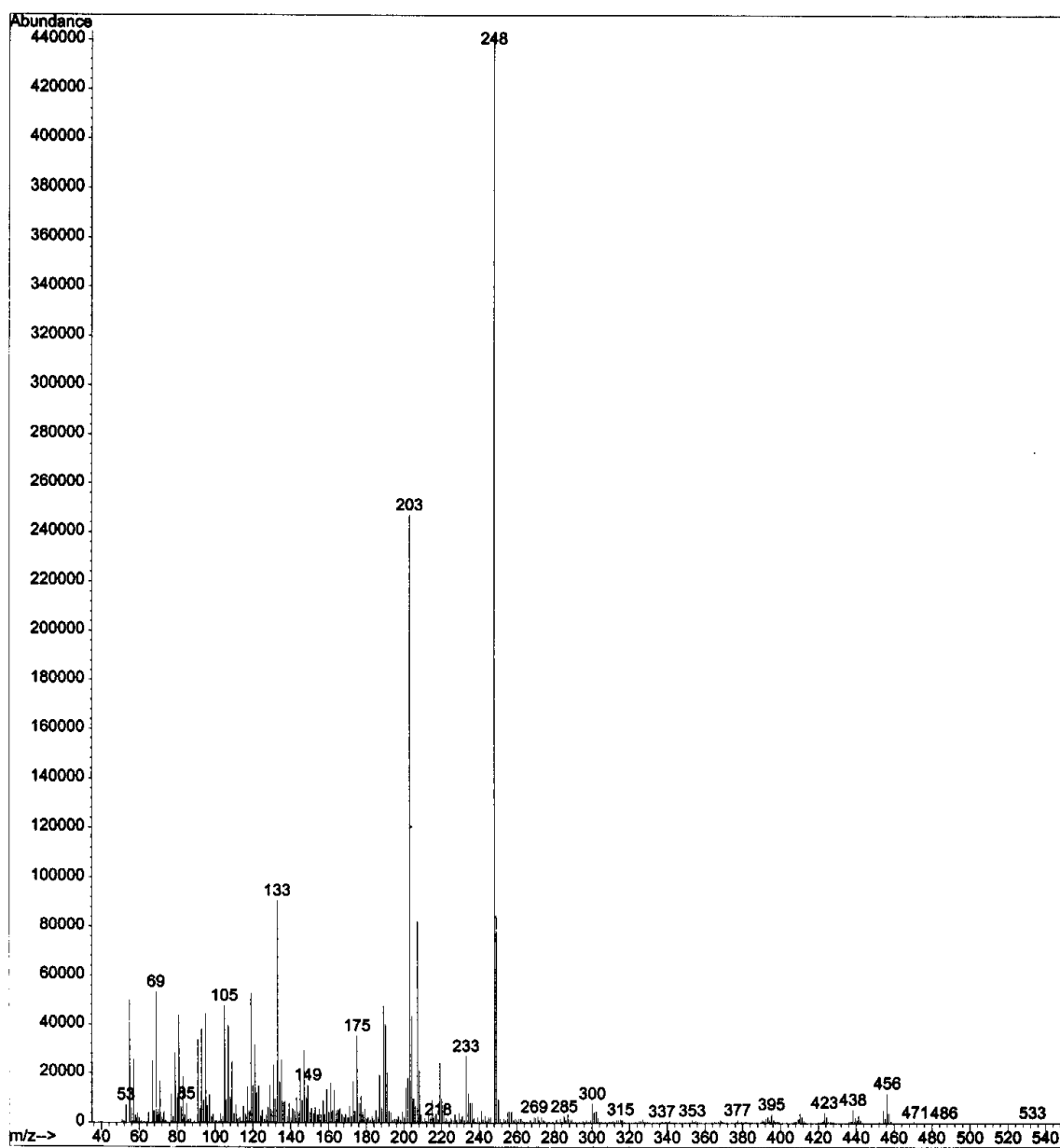


Figura 40 – Espectro de RMN ^1H de **DV14** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

Figura 41 – Espectro de RMN ^{13}C de **DV14** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]Figura 42 – EMIE 70 eV de **DV14**

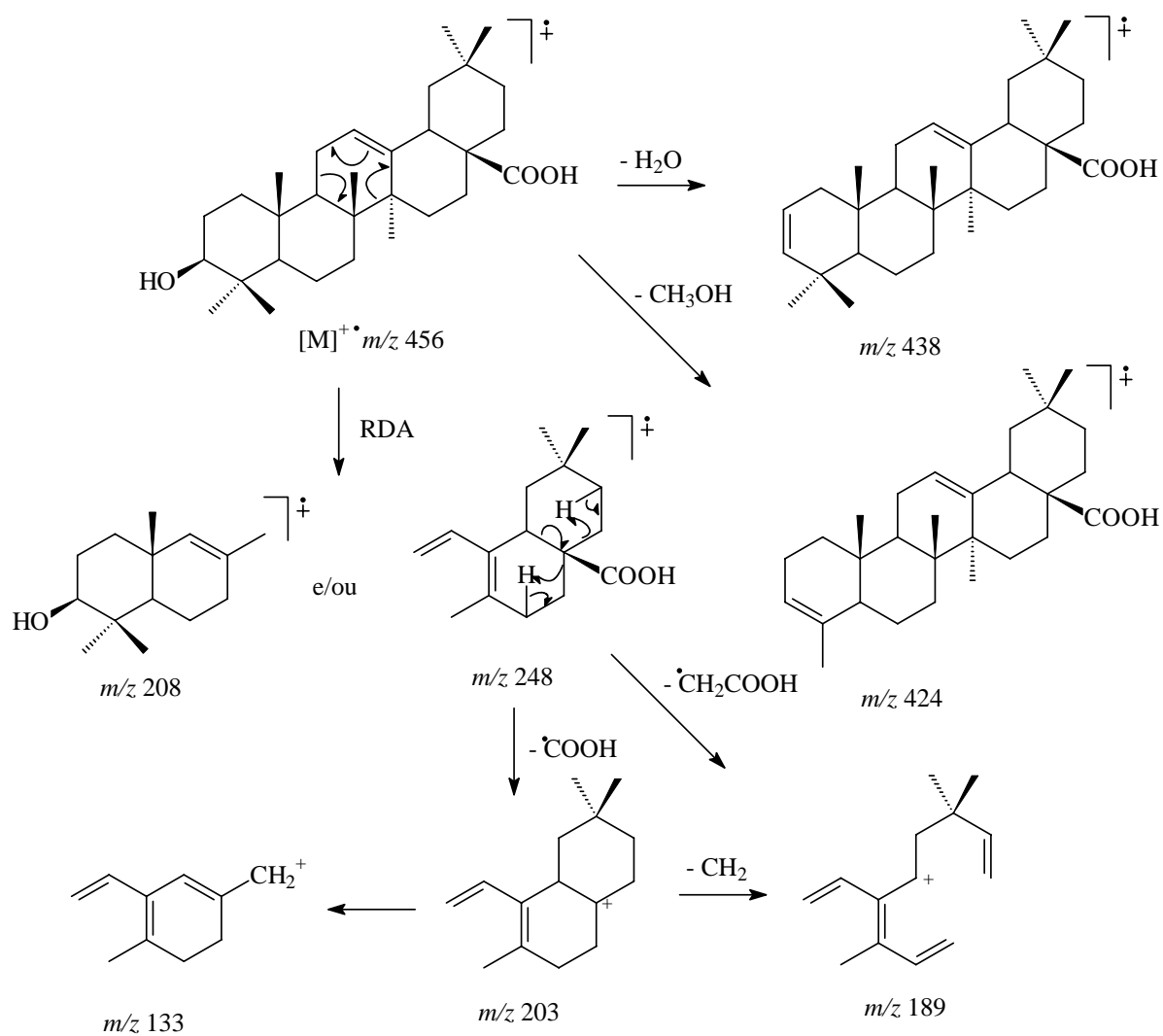
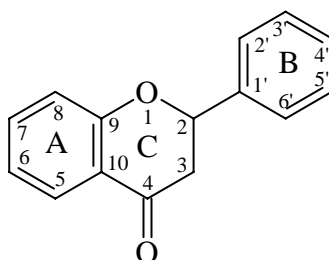
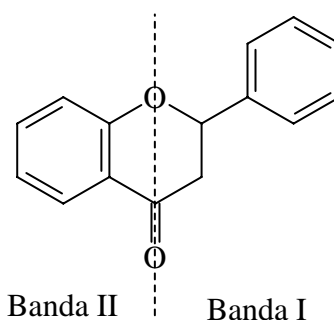


Figura 43 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de **DV14**

6.4.Flavanonas



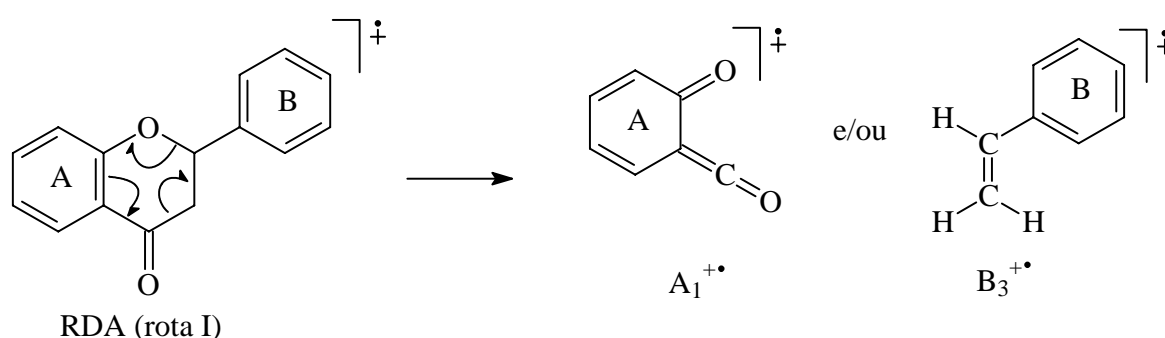
As flavanonas ou 2-fenil-benzopiran-4-onas são uma classe de flavonóides que possuem como esqueleto o núcleo 2-fenilcromanona, tendo como características a carbonila cetônica na posição 4 e a ausência de insaturação no anel C. A sua ausência de coloração deve-se a falta de conjugação entre os anéis A e B, o que faz com que sua absorção máxima de luz ocorra em comprimentos de onda menores que o visível, na região do UV. São biossintetizadas diretamente a partir das chalconas, sendo que as flavanonas com ausência de hidroxila na posição 5 em geral ocorrem associadas as suas respectivas chalconas (HARBORNE, 1967).



Estas substâncias apresentam espectro no UV característicos com uma banda de absorção intensa na região de 270-295 nm (Banda II) e uma inflexão de pequena intensidade entre 300-330 nm (Banda I). A ausência de OH na posição C-5 causa um deslocamento hipsocrômico da Banda II de 10-15 nm. Porém a oxigenação no anel B não produz efeito no espectro UV. Até hoje o uso de agentes de deslocamento é útil na determinação do padrão de hidroxilação e da substituição nas flavanonas. Por exemplo, adição de solução de CH_3ONa em flavanonas com hidroxilação no anel A produz um deslocamento batocrômico da Banda II de 35 nm para 5,7-diidroxiflavanonas e de 60 nm para 7-hidroxiflavanonas, o qual é acompanhado por um efeito hiperocrômico na intensidade da banda. Já adição de CH_3COONa sólido até saturação é útil na detecção de 7-OH livre, pois causa um deslocamento batocrômico de 34-37 nm observado em 5,7-diidroxiflavanonas e de 51-58 nm para 7-hidroxiflavanonas. O uso de solução de AlCl_3

não é útil na detecção de grupo catecol no anel B devido à falta de conjugação deste anel com o cromóforo principal. Porém, a presença de hidroxilas vizinhas no anel A excetuando 5-OH pode ser detectada através do efeito batocrômico na Banda II, que é revertido com adição de HCl. A presença de 5-OH causa um efeito batocrômico de 20-26 nm na Banda II com adição de AlCl_3 , que persiste com adição de HCl (MABRY, 1970; MARKHAM, 1982).

O EMIE das flavanonas apresenta pico do íon molecular $[\text{M}]^{+\bullet}$ intenso. Porém o pico base em geral é proveniente de um dos fragmentos da RDA pela rota I, que mantém intactos os anéis A e B.

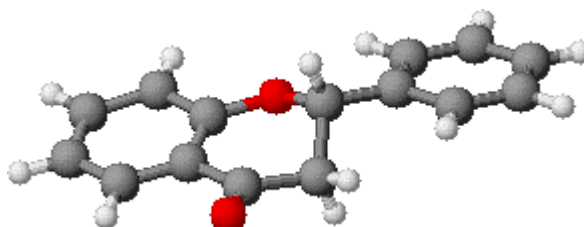


As intensidades de $\text{A}_1^{+\bullet}$ e de $\text{B}_3^{+\bullet}$ depende da substituição em A e B. Outros fragmentos intensos presentes no espectro são devidos a perda de H^\bullet $[\text{M}-\text{H}]^+$ e perda de radical arila $[\text{M}-(\text{anel B})]^\bullet$ e perda de $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ para as flavanonas metoxiladas (MABRY, 1975).

A classe das flavanonas é facilmente identificadas por RMN ^1H devido aos deslocamentos característicos do anel C num sistema de *spins* do tipo AMX. O H-2 encontra-se em conformação *pseudo*-axial e apresenta-se como um duplo duplete (*dd*) entre δ 5,0-5,7, com constantes de acoplamento características J_{cis} (3,0 Hz) e J_{trans} (13,0 Hz). O H-3 axial ocorre como um *dd* entre δ 3,1-3,4 ppm, com constantes de acoplamento J_{trans} (13,0 Hz) e J_{gem} (17,0 Hz), enquanto que o H-3 equatorial ocorre como um *dd* entre δ = 2,6-2,9, com constantes de acoplamento J_{cis} (3,0 Hz) e J_{gem} (17,0 Hz). Para as flavanonas que apresentam 5-OH e 7-OH os hidrogênios H-6 e H-8 do anel A podem não ser distinguíveis, pois podem apresentar-se como um simpleto, ou como dois dupletos muito próximos com constante de acoplamento J_{meta} (2,0 Hz). Na ausência de 5-OH o H-5 é desprotegido pela carbonila e o sinal apresenta-se como um duplete entre δ 7,0-8,0 com constante de acoplamento J_{orto} (8,7 Hz). Metilação ou glicosilação em 7-OH desprotege H-6 e H-8, enquanto que substituição em C-6 não afeta H-8 e vice-versa. No anel B os hidrogênios H-2' e H-6' encontram-se mais protegidos do que nas

flavonas por cerca de 0,6 ppm, enquanto H-3' e H-5' não são afetados, o que pode levar à sobreposição dos deslocamentos de H-5' e H-6' nas 3',4'-diidroxiflavanonas. Substituintes em C-8 podem desproteger H-2' e H-6' (MARKHAM, 1994).

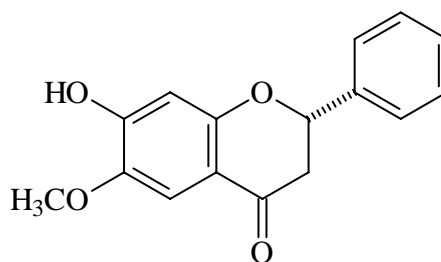
O espectro de RMN ^{13}C apresenta deslocamentos do carbono oximetínico C-2 entre δ 71,3-80,5, do carbono metilênico C-3 entre δ 39,5-46,4 e da carbonila na região de δ 186,4-198,5. O valor de deslocamento para C-2 está intrinsecamente relacionado a presença de substituição em C-2' e C-6'. Na ausência de substituição nestas posições o sinal de C-2 é registrado em $\delta = 79,0 \pm 1,5$, enquanto que a substituição por um grupo oxigenado em C-2' ou C-6' protege C-2 para $\delta = 75,6 \pm 1,6$. Grupos oxigenados em C-2' e C-6' protegem C-2 ainda mais, podendo o deslocamento químico chegar a $\delta = 71,3$. O valor de deslocamento da carbonila em C-4 está relacionado com a presença ou não de hidroxilação em C-5. Na ausência de 5-OH, o deslocamento químico da carbonila encontra-se na faixa de δ 189,7-191,7, enquanto que na presença de 5-OH, C-4 é registrado em δ 195,6-198,5 devido à formação de ligação de hidrogênio intramolecular. No caso da presença de grupos metoxílicos ou glicosídicos no C-5, o sinal do C-4 retorna para campo de proteção. O deslocamento de C-3 não é afetado pela substituição nos anéis A e B, porém, sofre efeito de desproteção de 1-2 ppm devido à ligação de hidrogênio entre a carbonila e 5-OH (AGRAWAL, 1989).



2*S*-flavanona

As flavanonas apresentam conformação mais estável com o anel B em *pseudo*-equatorial. O carbono C-2 é assimétrico, logo as flavanonas exibem atividade óptica. A rotação da luz plano-polarizada está relacionada a estereoquímica absoluta, de forma que as (-)-flavanonas (levorrotatórias) possuem configuração 2*S*, enquanto que as (+)-flavanonas (dextrorrotatórias) possuem configuração 2*R*. Na natureza as flavanonas são comumente encontradas na forma *S* (MARKHAN, 1982).

6.4.1. Identificação da 7-hidroxi-6-metoxiflavanona



6-Metoxi-7-hidroxi-flavanona
(**DV7**)

Os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H de **DV7** em conjunto com experimentos DEPT apresentaram sinais para 16 átomos de carbono e 14 átomos de hidrogênio (Figuras 44, 45, 46 e 47, p. 112 e 113). Estes dados aliados ao íon molecular m/z 270 observado no EM (Figura 50, p. 114) permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$.

Análise detalhada do espectro de RMN ^1H (Figura 44, p. 112; Tabela 37, p. 148) permitiu concluir que esta substância era uma flavanona com um grupo metoxílico. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 45, p. 112; Tabela 38, p. 149) e experimentos DEPT 135° e 90° (Figuras 46 e 47, p. 113) mostraram sinais para carbonos oximetínico em δ 79,99, metilênico em δ 44,19 e uma carbonila em δ 190,63, que juntamente com o carbono oximetílico em δ 56,42 que confirmaram as informações obtidas no espectro de RMN ^1H .

O EMIE da substância apresentou os fragmentos de RDA $\text{A}_1^{+\bullet}$ em m/z 166 (pico base) e $\text{B}_3^{+\bullet}$ em m/z 104 que sugeriram ausência de substituição no anel B (Figuras 50 e 52, p. 114 e 116). Esta informação foi confirmada pelo multiplete registrado no espectro de RMN ^1H em δ 7,45 integrando para 5 átomos de hidrogênio (Figuras 44, p. 112).

O espectro no UV revelou banda II de absorção mais intensa em $\lambda_{\text{Max}} = 279$ nm o que sugere ausência de 5-OH. O uso de solução de MeONa provocou um deslocamento batocrômico de 72 nm da banda II para $\lambda_{\text{Max}} = 351$ nm acompanhada de efeito hiperacrômico, o que sugere hidroxilação no anel A. O deslocamento batocrômico de 73 nm da banda II em presença de CH_3COONa para $\lambda_{\text{Max}} = 352$ nm acompanhada de efeito hiperacrômico sugeriu um grupo OH na posição C-7 (Figura 51, p. 115). Os simpletos observados no espectro de RMN ^1H em δ 7,35 e δ 6,60 (Figura 44, p. 112) confirmaram presença de dois hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em posição *para* entre si, o que confirma o padrão de substituição em C-6 e C-7 no anel A, sendo que H-5 encontra-se

em campo mais baixo devido ao efeito de desproteção da carbonila. Experimentos de “nOe diff” mostraram transferência de polarização de 10% para OCH₃ quando H-5 foi irradiado (Figuras 48 e 49, p. 113 e 114), confirmando a localização da metoxila em C-6. Todos estes dados aliados a comparação direta com dados da literatura (YOON, 2004) confirmaram que a substância **DV7** trata-se da 7-hidroxi-6-metoxiflavanona, isolada recentemente, pela primeira vez, de *Spatholobus suberectus* (YOON, 2004). O sinal de $[\alpha]_D^{25} = -68,5$ confirmou a configuração absoluta como 2*S*, tratando-se portanto da (-)-(2*S*)-7-hidroxi-6-metoxiflavanona.

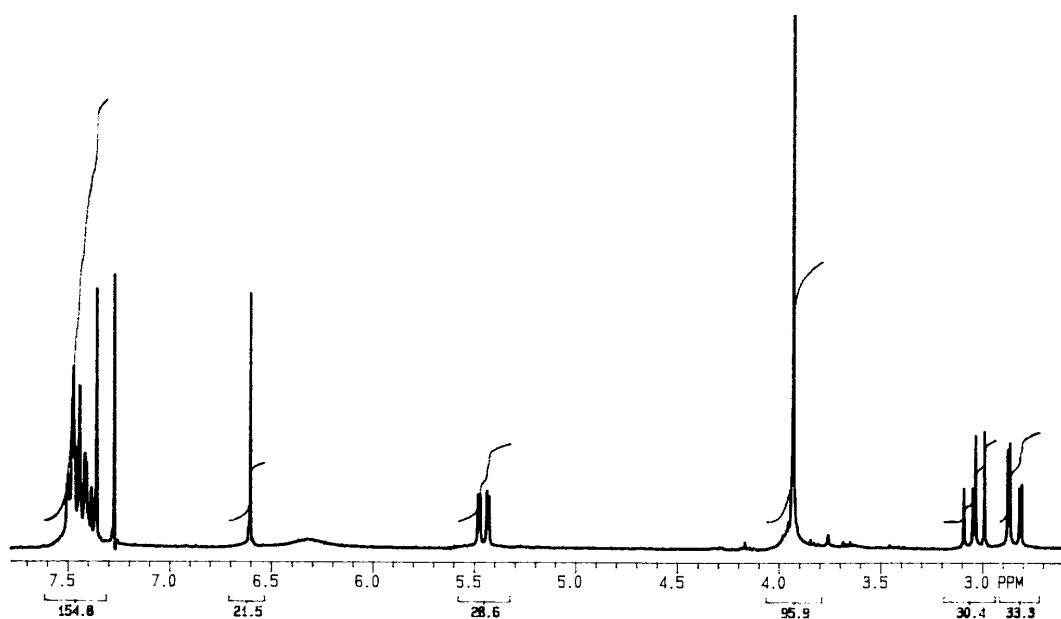


Figura 44 – Espectro de RMN ¹H de **DV7** (Integração) [300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

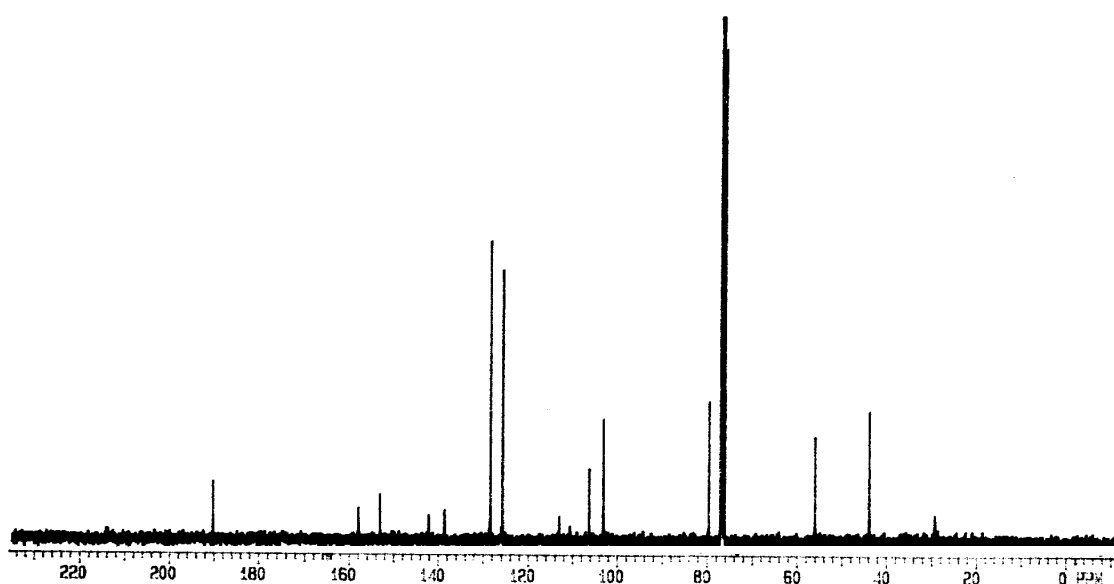


Figura 45 – Espectro de RMN ¹³C de **DV7** [75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

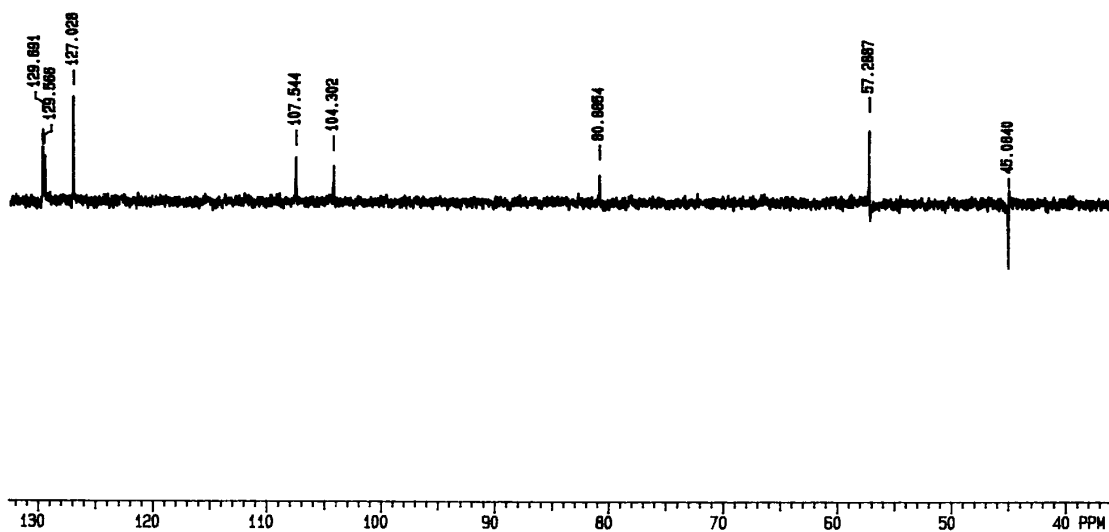


Figura 46 – Experimento DEPT 135° de **DV7** (ampliação) [75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

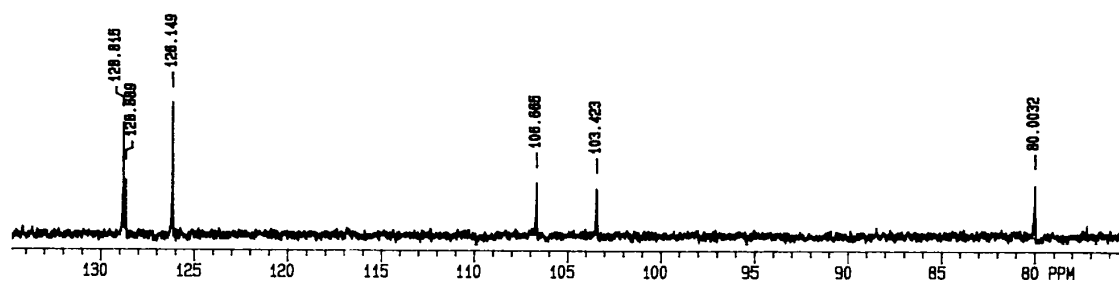


Figura 47 – Experimento DEPT 90° de **DV7** (ampliação) [75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

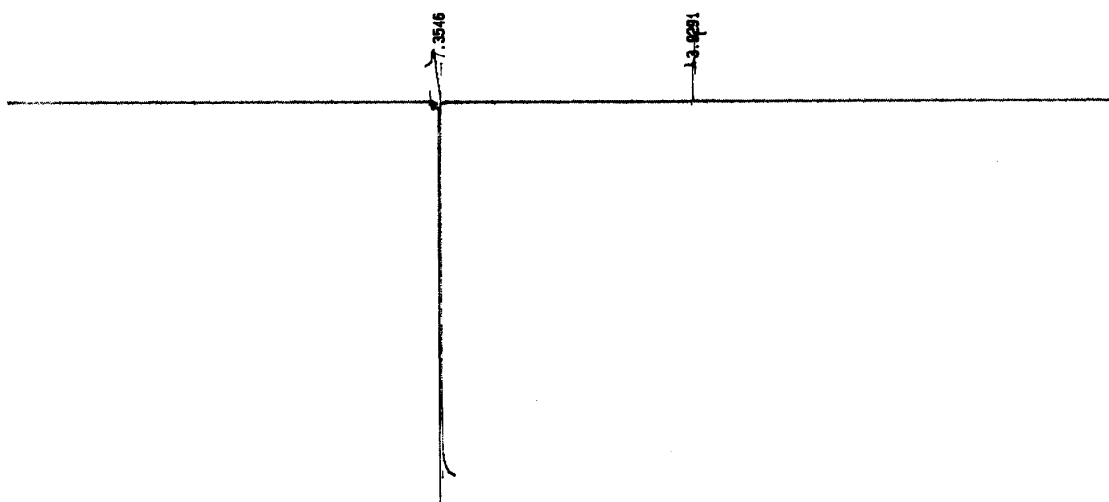


Figura 48 – Experimento nOe diff de **DV7** irradiando em $\delta = 7,35$ [300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

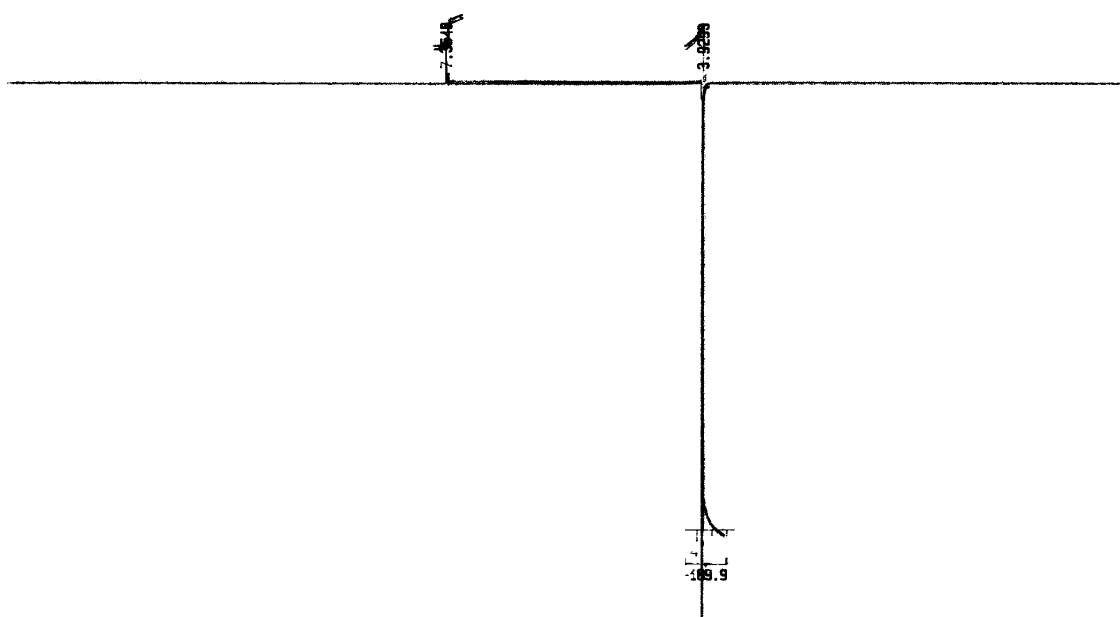


Figura 49 – Experimento nOe diff de **DV7** irradiando em $\delta = 3,93$ [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

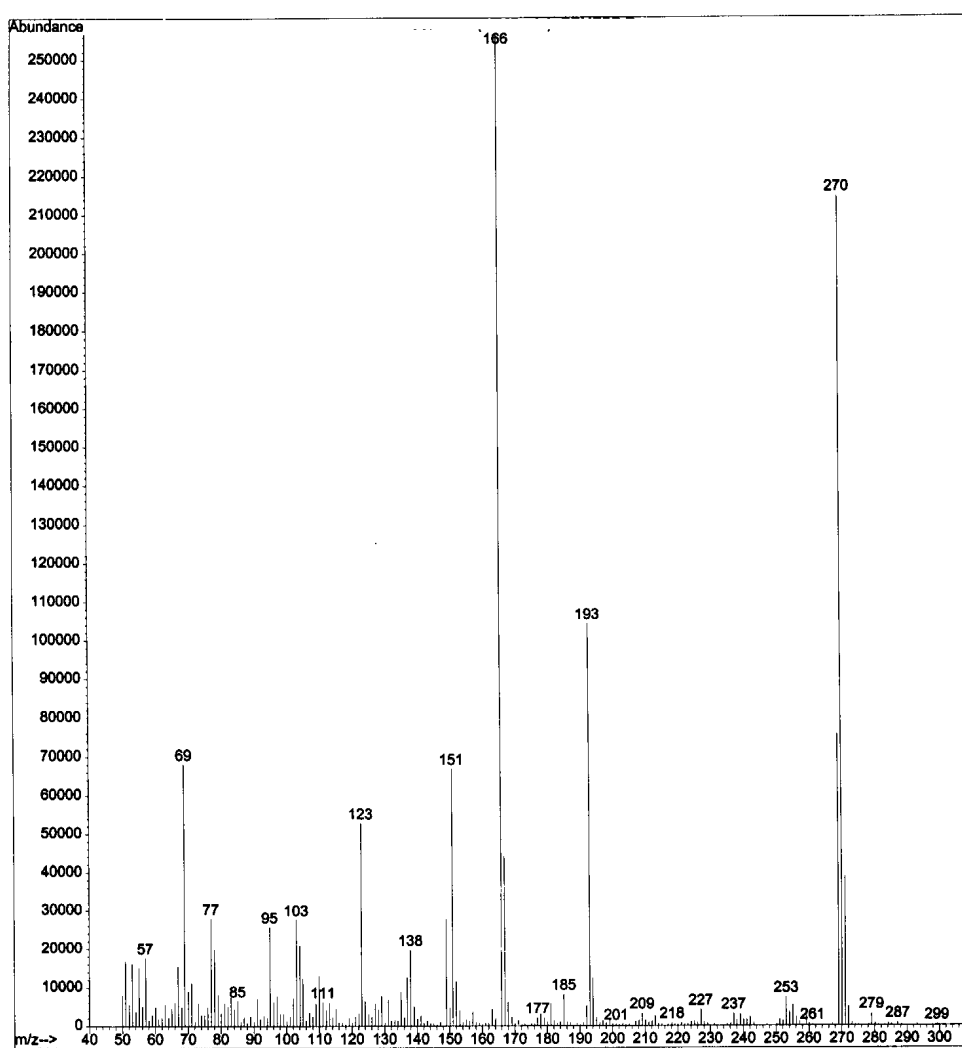


Figura 50 – EMIE 70 eV de **DV7**

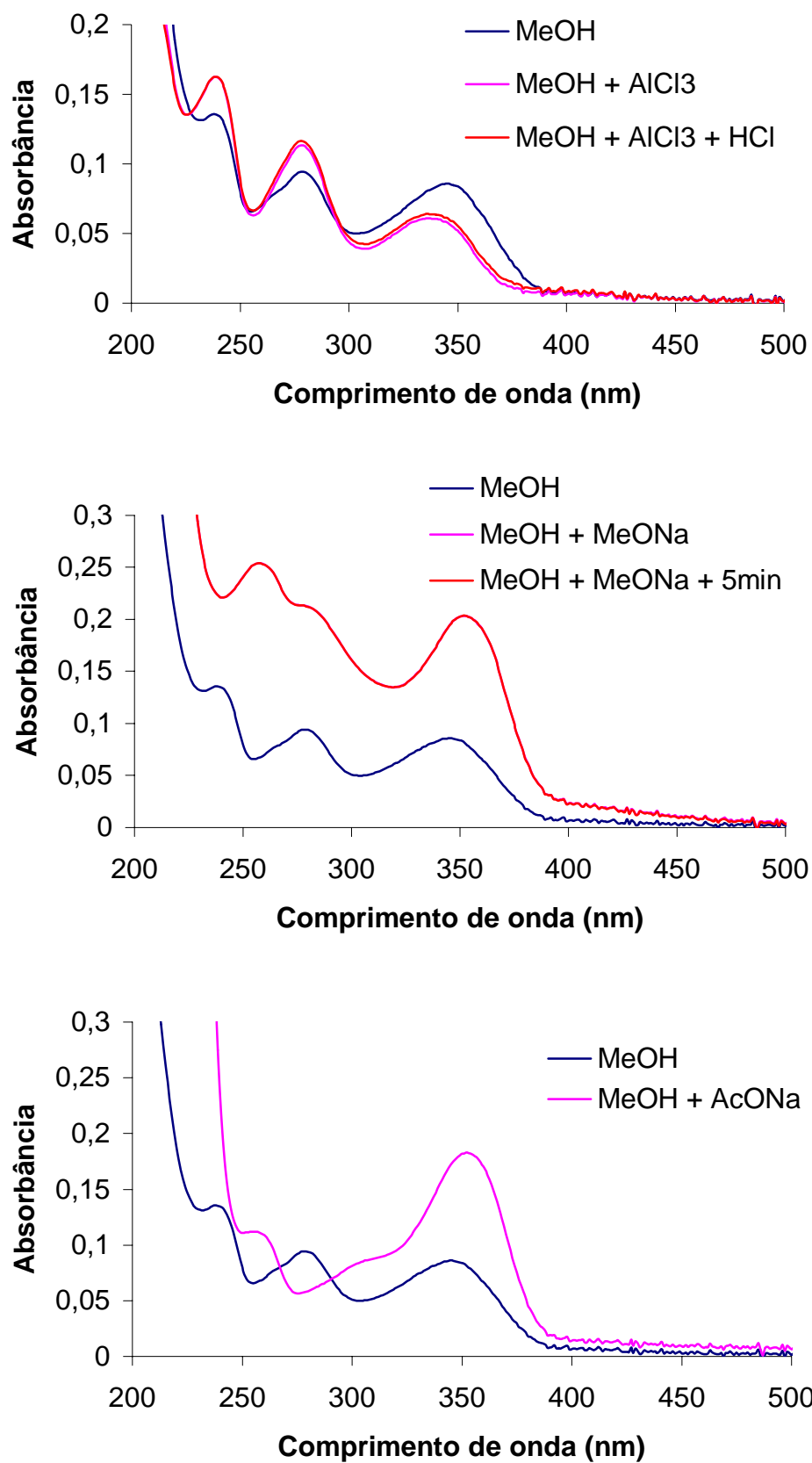


Figura 51 – Espectros no UV de **DV7** em CH₃OH com: a) AlCl₃, AlCl₃ + HCl, b) MeONa, c) AcONa.

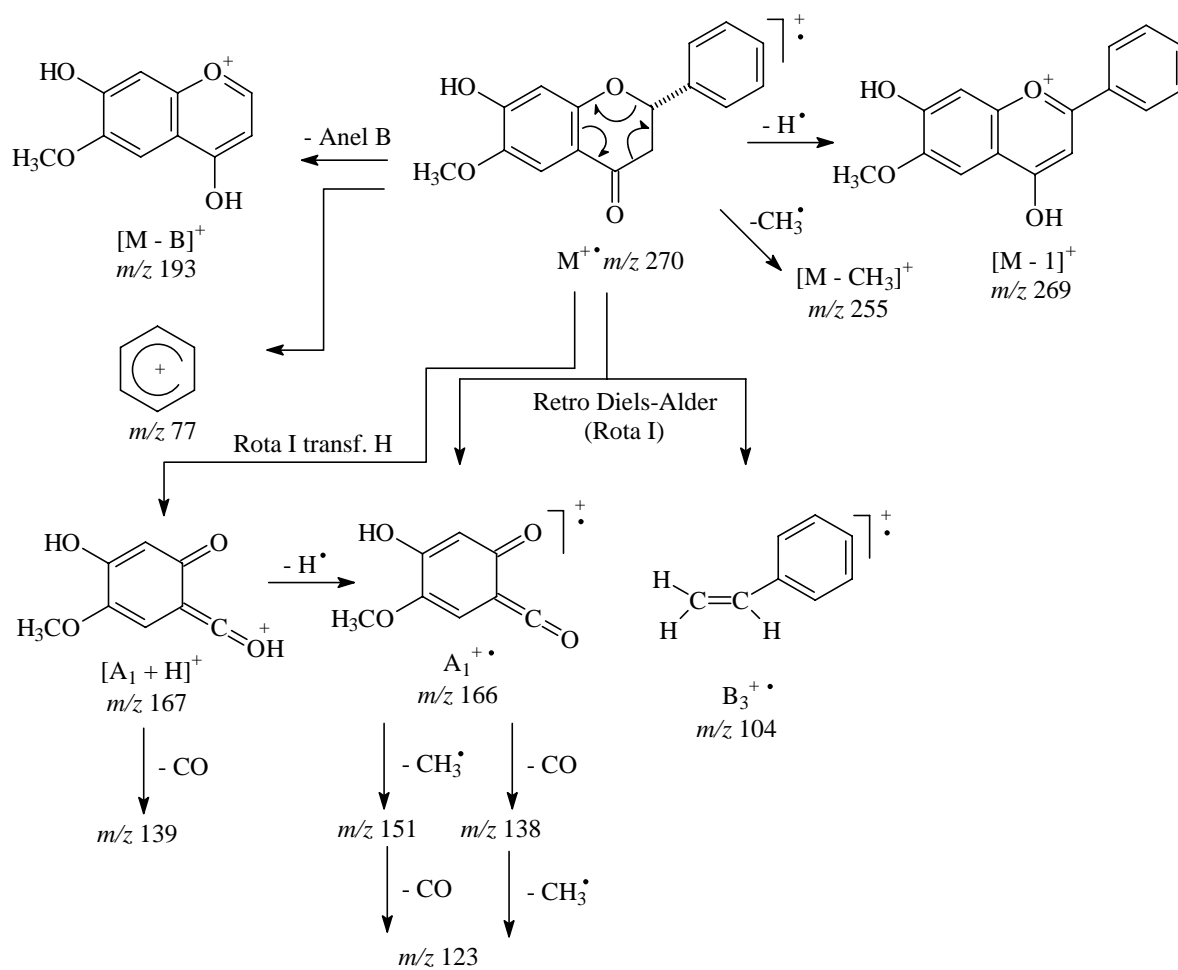
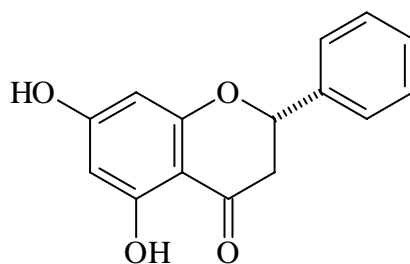


Figura 52 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV7

6.4.2. Identificação da 5,7-diidroxiflavanona



5,7-diidroxiflavanona
(**DV9**)

O espectro de RMN de ^1H de **DV9** apresentou sinais para 11 átomos de hidrogênio (Figura 53, p. 118), o que em conjunto com íon molecular m/z 256 observado no EM (Figura 54, p. 118) e os valores de deslocamento dos sinais levou a propor a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$.

Análise do espectro de RMN ^1H (Figura 53, p. 118; Tabela 37, p. 148) revelou a presença de deslocamentos químicos característicos para flavanonas.

O EMIE da substância mostrou a presença dos fragmentos de RDA $\text{A}_1^{+\bullet}$ em m/z 152 e $\text{B}_3^{+\bullet}$ em m/z 104 o que também sugeriu ausência de substituição no anel B (Figuras 54 e 55, p. 118 e 119). Este fato também foi confirmado pelo multiplete observado no espectro de RMN ^1H em δ 7,45 integrando para 5 átomos de hidrogênio (Figura 53, p. 118).

O sinal de RMN ^1H em δ 6,01 s (Figura 66) integrando para 2H sugeriu dois hidrogênios aromáticos em posição *meta*, com mesmo deslocamento químico, o que confirma a substituição em C-5 e C-7 no anel A. A presença de 5-OH também foi confirmada pelo simpleto em δ 12,05, registrado para hidroxila formando ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila (hidrogênio quelado). Estes dados juntamente com a comparação com dados da literatura (TANAKA, 1985) confirmaram que a substância **DV9** trata-se da 5,7-diidroxiflavanona (pinocembrina), que foi isolada pela primeira vez de *Pinus cembra* (LINDSTEDT, 1951) e de ocorrência comum em vegetais.

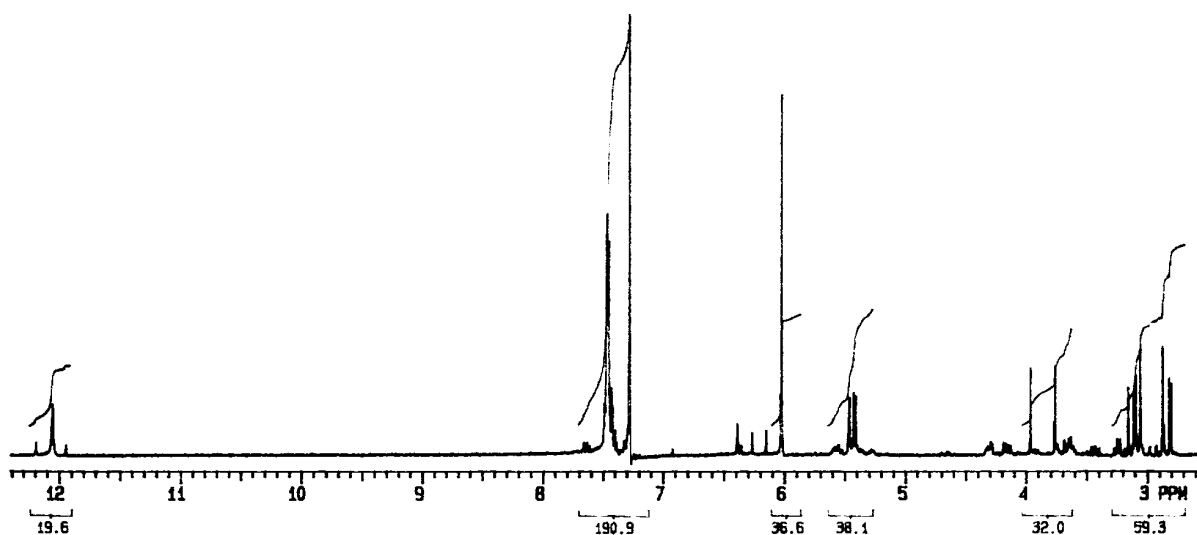


Figura 53 – Espectro de RMN ^1H de DV9 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

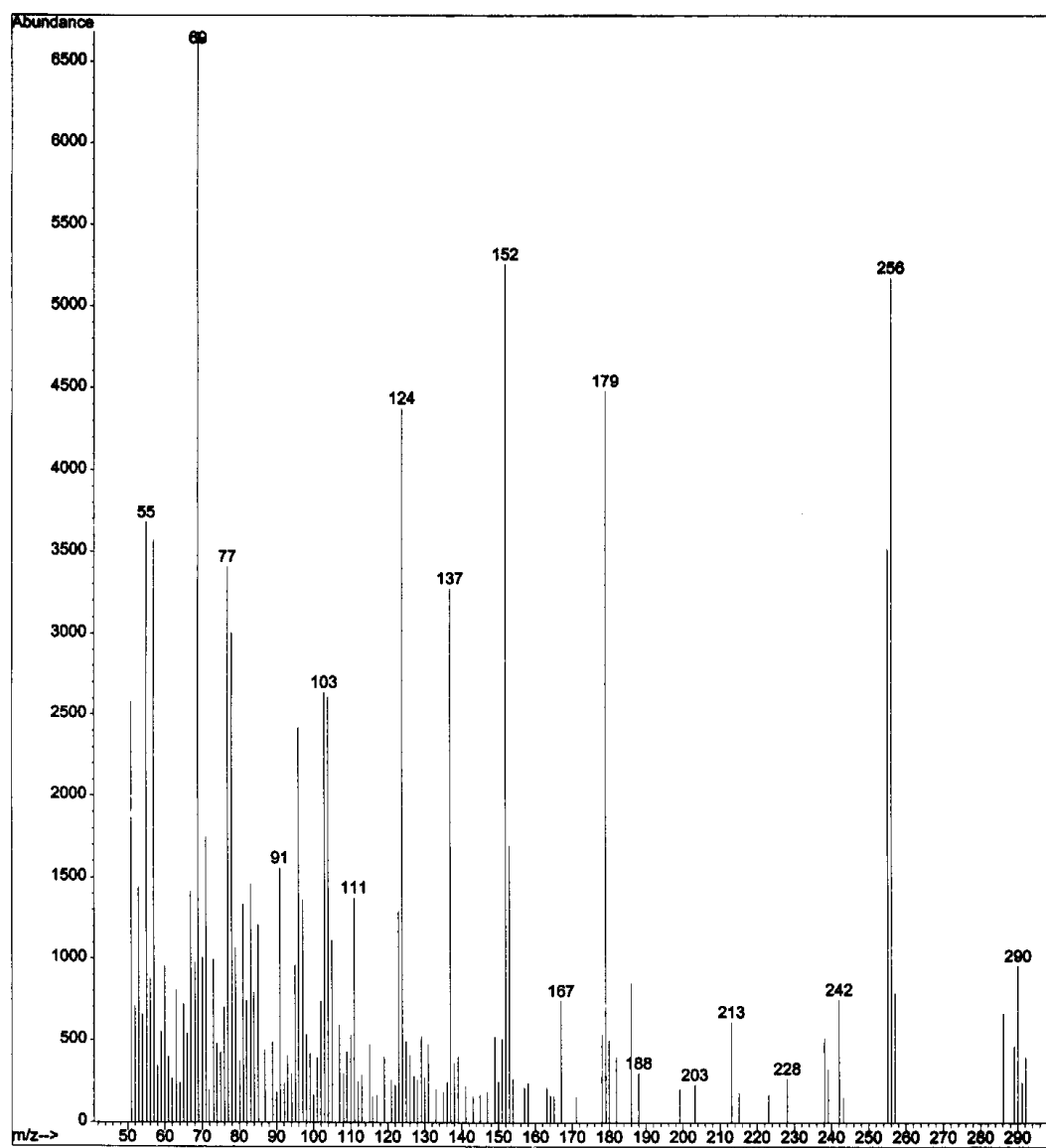


Figura 54 – EMIE 70 eV de DV9

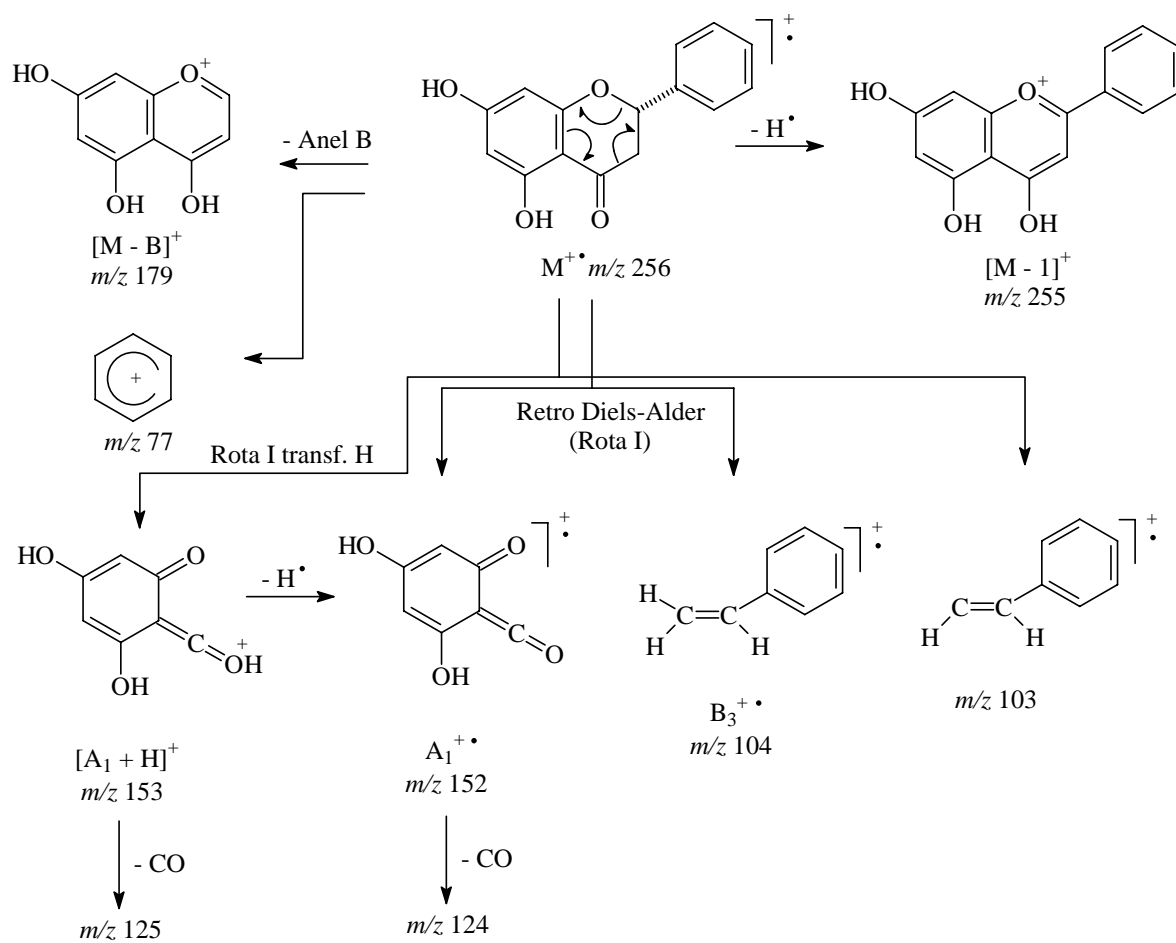
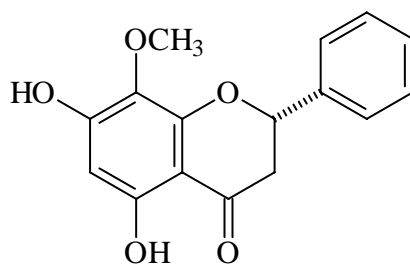


Figura 55 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV9

6.4.3. Identificação da 5,7-diidroxi-8-metoxiflavanona



8-Metoxi-5,7-diidroxiflavanona
(**DV10**)

O espectro de RMN ^1H (Figura 56, p. 121) de **DV10** apresentou sinais para 13 átomos de hidrogênio, o que em conjunto com íon molecular m/z 286 observado no EM (Figura 57, p. 121) e a natureza dos sinais registrados permitiu propor a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$.

Análise do espectro de RMN ^1H (Figura 56, p. 121; Tabela 37, p. 148) levou a proposição que a substância era uma flavanona metoxilada.

O EMIE da substância mostrou os fragmentos de RDA $\text{A}_1^{+\bullet}$ em m/z 182 e $\text{B}_3^{+\bullet}$ em m/z 104 o que sugeriu ausência de substituição no anel B (Figuras 57 e 58, p. 121 e 122). Esta proposição foi confirmada pelo multiplete registrado no espectro de RMN ^1H em δ 7,45 integrando para 5 átomos de hidrogênio. A presença do grupo metoxílico foi confirmada pelos fragmentos $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$ em m/z 271 e $[\text{A}_1 - \text{CH}_3]^+$ em m/z 167 (Figura 58, p. 122).

O simpleto observado no espectro de RMN ^1H em δ 6,15 (Figura 56, p. 121), integrando para 1H, sugeriu a presença de um hidrogênio ligado a carbono aromático livre na posição 6. Este fato confirma o padrão de substituição no anel A. A presença de 5-OH também foi confirmada pelo sinal em δ 12,19 (s) para hidroxila formando ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila (hidrogênio quelado). Estes dados juntamente com a comparação direta com dados da literatura (JAKUPOVIC, 1989) mostraram que a substância **DV10** tratava-se da 5,7-diidroxi-8-metoxiflavanona (diidrowogonina), que anteriormente foi isolada em *Prunus avium* (CHOPIN, 1957), *Prunus cerasus* (NAGARAJAN, 1977), *Chenopodium procerum* (BERGERON, 1995), *Isodon oresbius* (HAO, 1996) e *Pyracantha coccinea* (FICO, 2000).

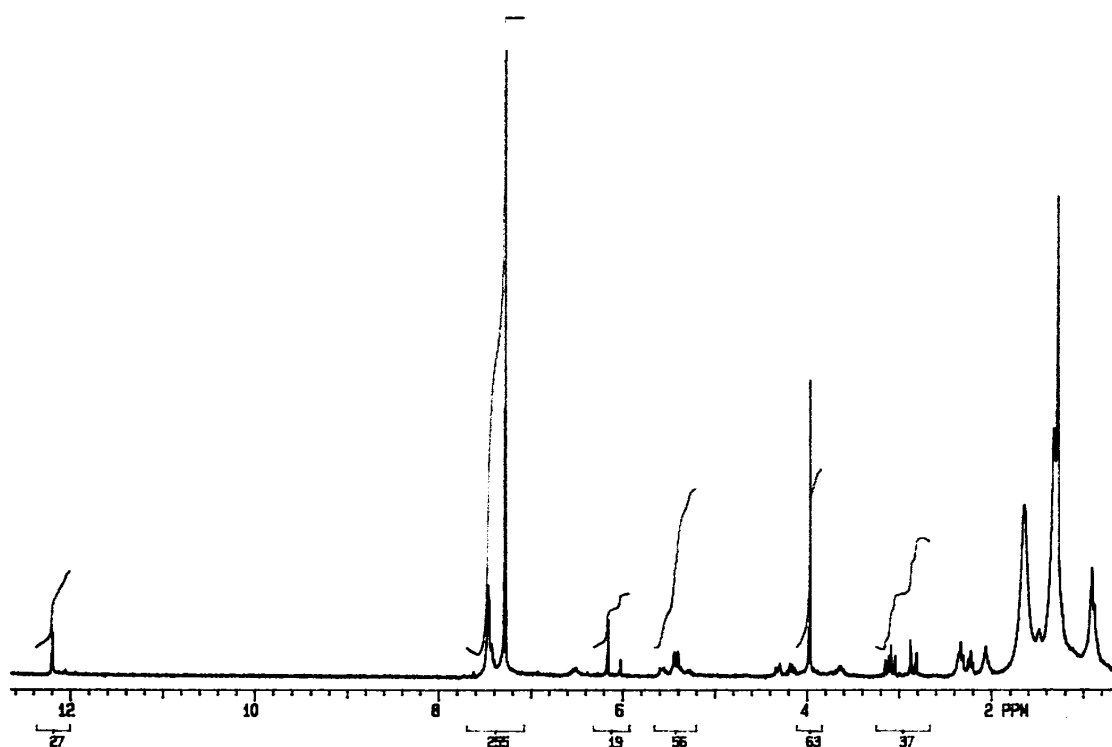


Figura 56 – Espectro de RMN ^1H de DV10 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

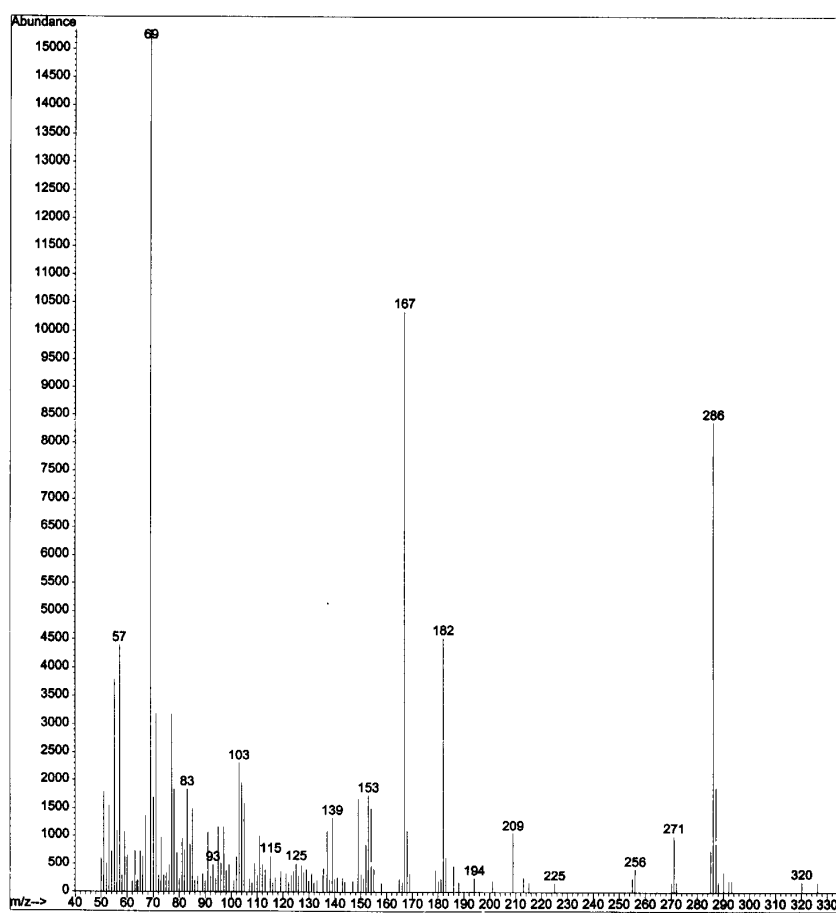


Figura 57 – EMIE 70 eV de DV10

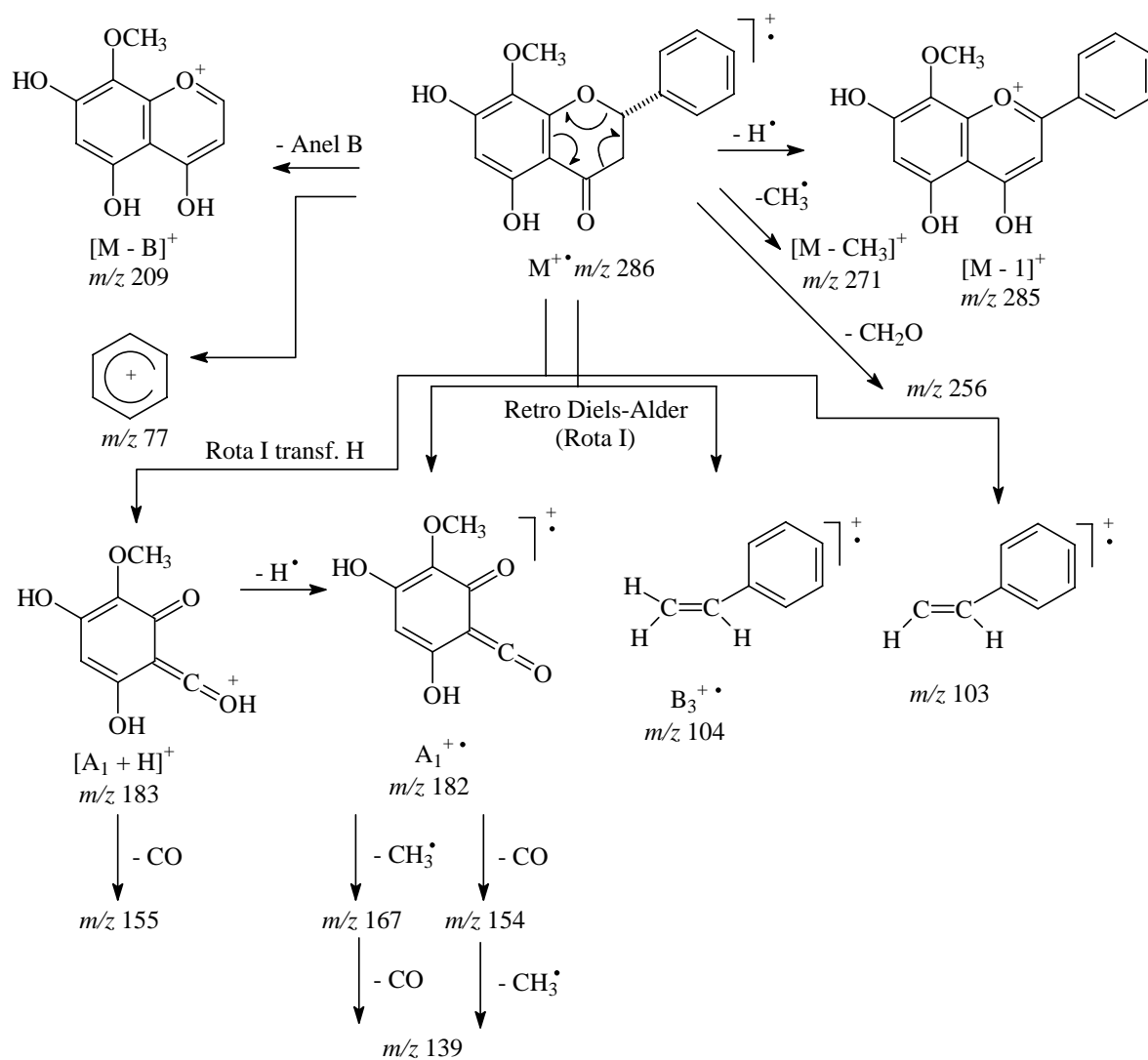
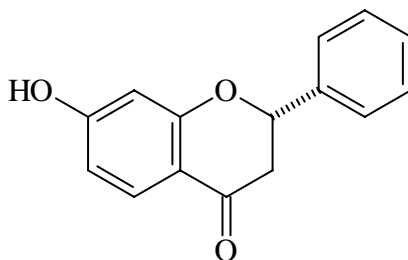


Figura 58 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de DV10

6.4.4. Identificação da 7-hidroxi-flavanona

7-Hidroxi-flavanona (**DV13**)

Os espectros de RMN de ^1H (Figuras 59 e 60, p. 124) e ^{13}C (Figura 61, p. 125) de **DV13** juntamente com os experimentos DEPT (Figura 62 e 63, p. 125 e 126) apresentaram sinais para 15 átomos de carbono e 11 átomos de hidrogênio. Estes dados em conjunto com íon molecular m/z 240 (pico base) observado no EM (Figura 64, p. 126) permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_3$.

Análise do espectro de RMN ^1H (Figura 59, p. 124; Tabela 37, p. 148) mostrou que a substância trata-se de uma flavanona. Os sinais para carbono oximetínico em δ 79,86, carbono metilênico em δ 44,26 e carbonila em δ 191,17 no espectro de RMN ^{13}C (Figura 61, p. 125) e experimentos DEPT 135° (Figuras 62 e 63, p. 125 e 126) confirmaram esta sugestão (Tabela 38, p. 149).

O EMIE da substância também apresentou os fragmentos de RDA $\text{A}_1^{+\bullet}$ em m/z 136 e $\text{B}_3^{+\bullet}$ em m/z 104 o que sugeriu ausência de substituição no anel B (Figuras 64, p. 126 e Figura 66, p. 128), o que foi confirmado pelo multiplete observado no espectro de RMN ^1H em δ 7,43 integrando para 5 átomos de hidrogênio (Figuras 59 e 60, p. 124).

O espectro no UV desta substância apresentou banda II de absorção mais intensa em $\lambda_{\text{Max}} = 275$ nm o que sugere ausência de 5-OH (Figura 65, p. 127). Além disto, a adição de solução de AlCl_3 não provocou deslocamento da banda. Este dado em conjunto com o sinal de deslocamento da carbonila no espectro de RMN ^{13}C em δ 191,17, que encontra-se protegido pela ausência de 5-OH, confirmou esta suposição (Figura 61, p. 125).

A adição de solução de MeONa provocou um deslocamento batocrômico no espectro no UV de 61 nm da banda II para $\lambda_{\text{Max}} = 336$ nm acompanhada de efeito hipercrômico, o que sugere hidroxilação no anel A (Figura 65, p. 127). O deslocamento batocrômico de 61 nm da banda II em presença de CH_3COONa para $\lambda_{\text{Max}} = 336$ nm acompanhada de efeito hipercrômico sugeriu que a posição 7-OH encontrava-se livre (Figura 65, p. 127). Os sinais e multiplicidades observados no espectro de RMN ^1H em δ 7,85 *d* ($J = 8,7$ Hz), δ 6,58 *dd* ($J =$

2,3 e 8,7 Hz) e δ 6,50 d ($J = 2,3$ Hz) (Figura 60, p. 124) confirmaram presença de três hidrogênios ligados a carbonos aromáticos nas posições C-5, C-6 e C-8, num sistema AMX de spins, o que confirma a substituição em C-7 no anel A. Como esperado o H-5 encontra-se em δ 7,85 devido ao efeito de desproteção da carbonila. Estes dados aliados à comparação direta com dados da literatura (TANRISEVER, 1987) confirmaram que a substância **DV13** trata-se da 7-hidroxi-flavanona, que foi isolada pela primeira vez de *Platymiscium praecox* (de OLIVEIRA, A. B., 1970). O valor do $[\alpha]_D^{25} = -51,0$ confirmou sua configuração absoluta como 2S, tratando-se da (-)-(2S)-7-hidroxi-flavanona, de ocorrência comum em vegetais.

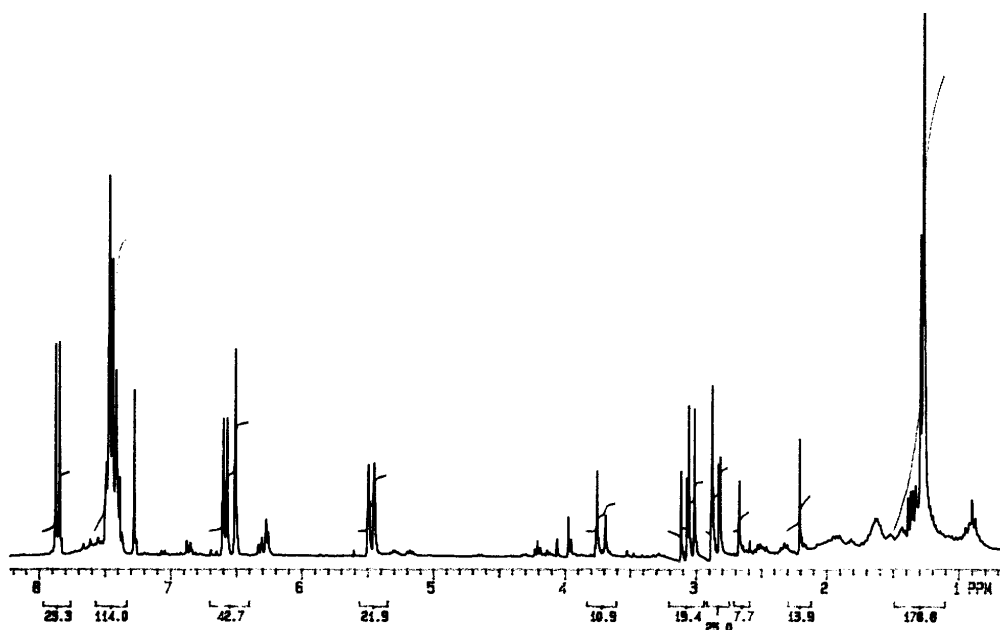


Figura 59 – Espectro de RMN ^1H de **DV13** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

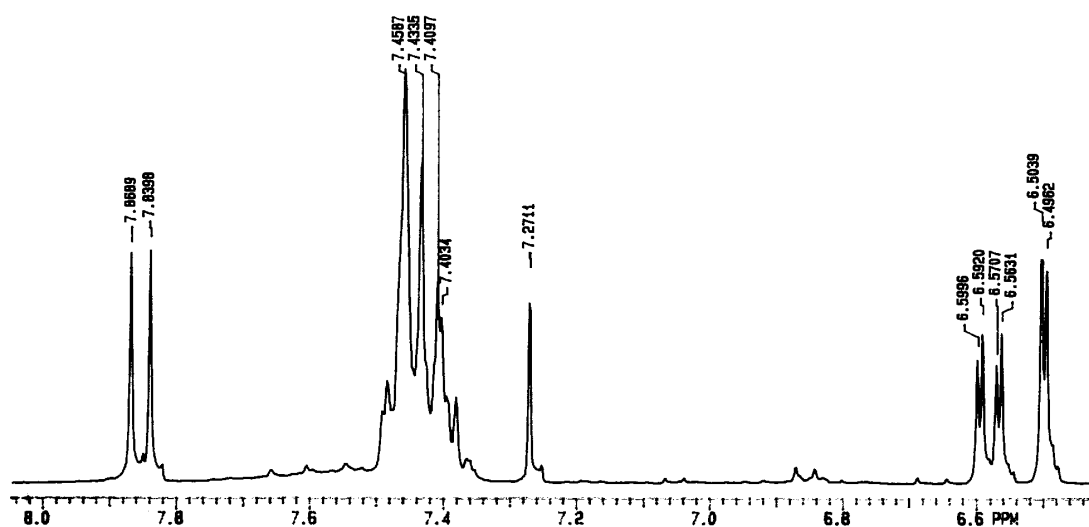


Figura 60 – Espectro de RMN ^1H de **DV13** (ampliação) [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

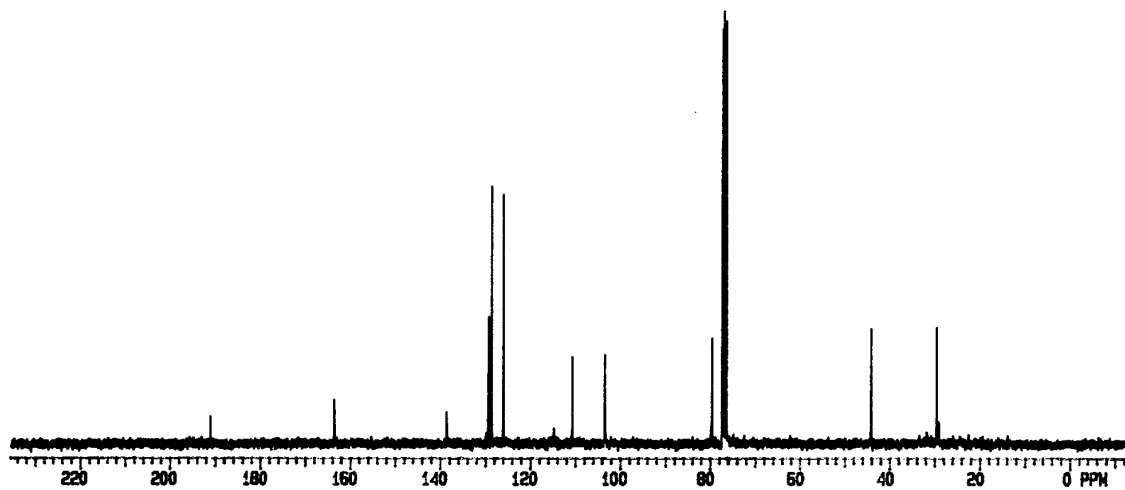


Figura 61 – Espectro de RMN ^{13}C de **DV13** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

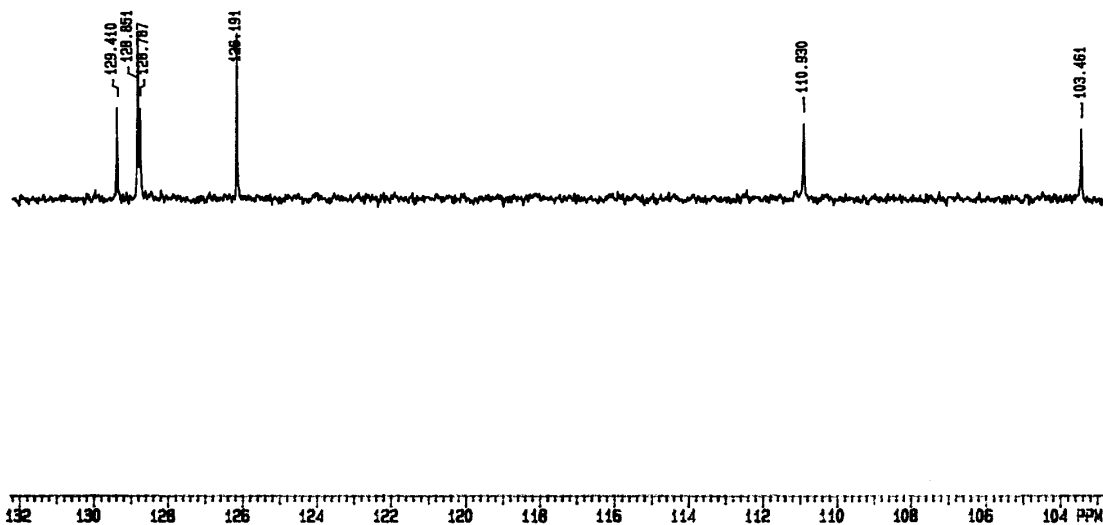


Figura 62 – Experimento DEPT 135° de **DV13** (ampliação) [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

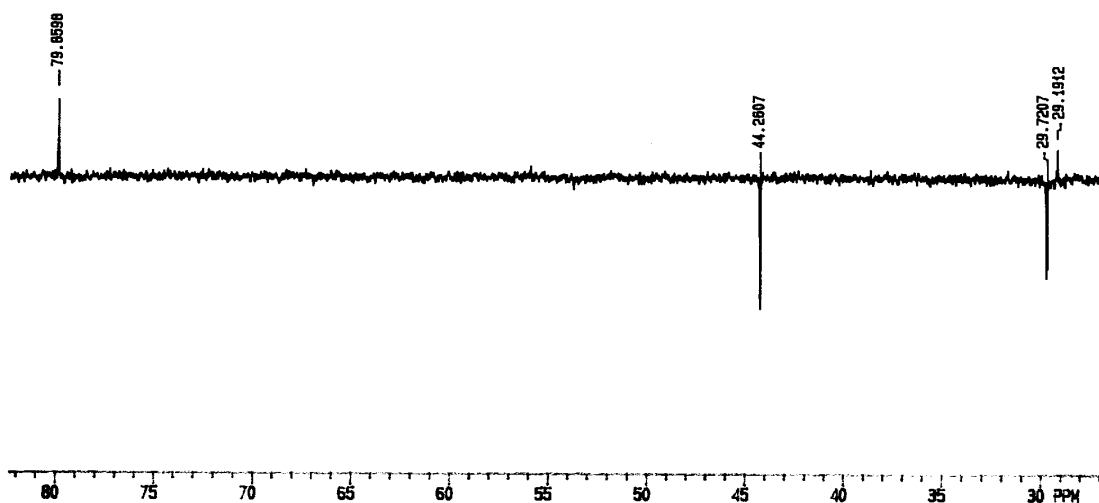


Figura 63 – Experimento DEPT 135° de **DV13** (ampliação) [75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

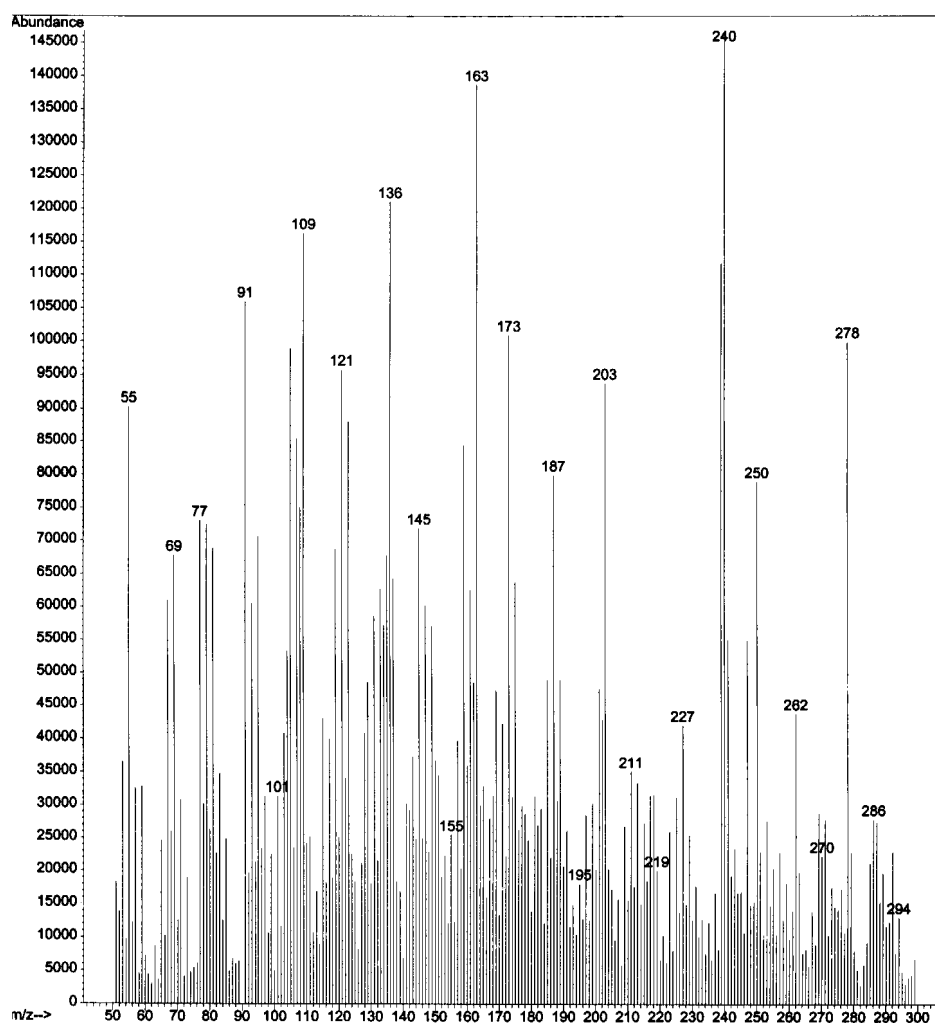


Figura 64 – EMIE 70 eV de **DV13**

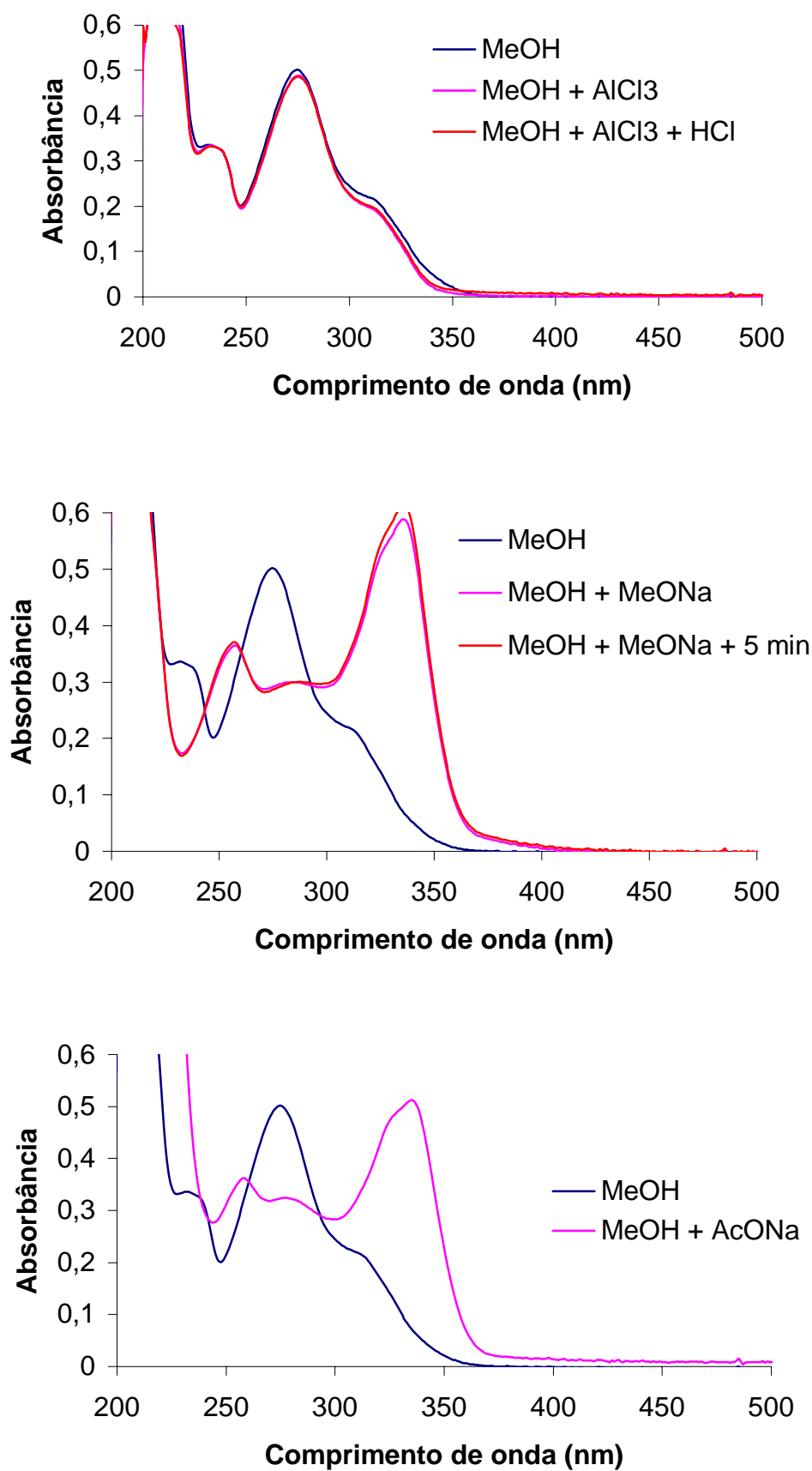


Figura 65 – Espectro no UV de **DV13** em CH₃OH com: a) AlCl₃ e AlCl₃ + HCl, b) MeONa c) AcONa

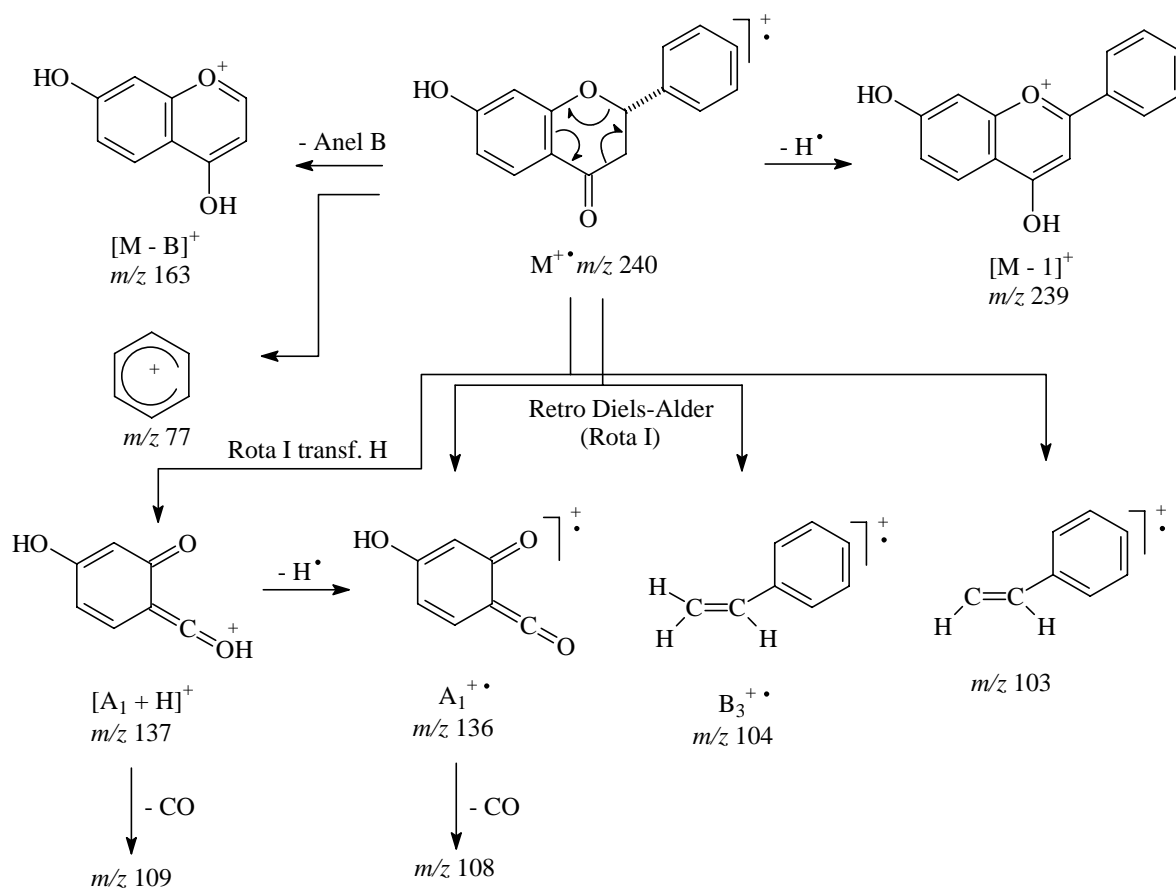
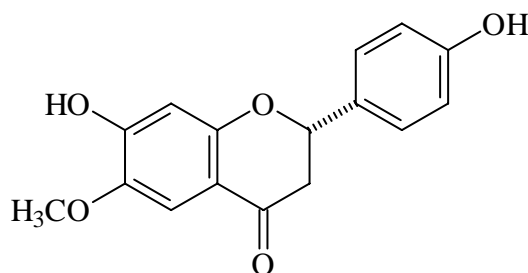


Figura 66 – Principais fragmentações de massa observadas no EMIE de **DV13**

6.4.5. Determinação estrutural da 7,4'-diidroxi-6-metoxiflavanona



6-Metoxi-7,4'-diidroxiflavanona
(**DV16**)

Os espectros de RMN ^{13}C (Figura 70, p. 132) e ^1H (Figuras 67 e 68, p. 130 e 131) de **DV16** em conjunto com experimentos de DEPT (Figura 71, p. 132) apresentaram sinais referentes a 16 átomos de carbono e 12 átomos de hidrogênio. Estes dados aliados aos sinais de carbonos aromáticos oxigenados observados no espectro de RMN ^{13}C em δ 144,31, δ 155,54, δ 159,02 e δ 158,50 e ao íon molecular em m/z 286 observado no EM (Figura 72, p. 133) permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$.

Análise do espectro de RMN ^1H (Figura 68 e 69, p. 130; Tabela 37, p. 148) sugeriu que a substância era uma flavanona metoxilada. Os deslocamentos no espectro de RMN ^{13}C (Figura 70, p. 132) e experimentos DEPT 135° (Figura 71, p. 132) mostraram sinais para carbono oximetínico em δ 80,57, carbono metilênico em δ 44,53 e carbonila em δ 190,47, juntamente com o carbono oximetílico em δ 56,47 que confirmaram esta sugestão (Tabela 38, p. 149).

O EMIE da substância apresentou os fragmentos de RDA $\text{A}_1^{+\bullet}$ em m/z 166, $[\text{A}_1 + \text{H}]^+$ em m/z 167 (pico base) e $\text{B}_3^{+\bullet}$ em m/z 104 que sugeriram a presença de uma hidroxila no anel B, e de hidroxila e metoxila no anel A (Figuras 72 e 74, p. 133 e 135). Esta informação foi confirmada pelos dois dupletos observados no espectro de RMN ^1H (δ 7,38 e 6,88), integrando para 2H, que indicaram a presença de sistema de *spins* A_2X_2 , o que confirma a oxigenação no anel B na posição C-4' (Figuras 68 e 69, p. 131; Tabela 37, p. 148). A proposição também é confirmada pela análise dos dados de RMN ^{13}C em δ 128,83 para C-2' e C-6' e em δ 116,04 para C-3' e C-5', além do carbono aromático oxigenado em δ 158,50 (Figura 70, 132; Tabela 38, p. 149).

O espectro de UV revelou banda II de absorção mais intensa em $\lambda_{\text{Max}} = 274$ nm, que sugere ausência de 5-OH. O uso de AlCl_3 não deslocou a banda II, e em conjunto com o

deslocamento em δ 190,47 para carbonila protegida confirmou a ausência de 5-OH (Figura 73, p. 134).

A adição de solução de MeONa provocou um deslocamento batocrômico no espectro no UV de 76 nm da banda II para $\lambda_{\text{Max}} = 350$ nm acompanhada de efeito hiperacrômico, que sugere hidroxilação no anel A. O deslocamento batocrômico de 76 nm da banda II em presença de CH_3COONa para $\lambda_{\text{Max}} = 350$ nm acompanhado de efeito hiperacrômico sugeriu que a posição 7-OH encontrava-se livre (Figura 73, p. 134). Os sinais de RMN ^1H em δ 7,25 s e δ 6,45 s (Figura 69, p. 131) confirmaram dois hidrogênios aromáticos em posição *para*, o que confirma a substituição em C-6 e C-7 no anel A, sendo que H-5 encontra-se em δ 7,25 devido ao efeito de desproteção da carbonila. A comparação dos valores de RMN ^{13}C de **DV7**, **DV8** e **DV16** (Tabela 38, p. 149) confirmou a presença da metoxila em C-6.

Todos estes dados e mais a comparação com dados de **DV7** e **DV8** e da literatura para outras flavanonas (YOON, 2004) confirmaram que a substância **DV16** trata-se da 7,4'-diidroxí-6-metoxiflavanona, sendo este seu primeiro registro na literatura. O sinal negativo do $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -62,2$ confirmou sua configuração absoluta como 2S, tratando-se da (-)-(2S)-7,4'-diidroxí-6-metoxiflavanona.

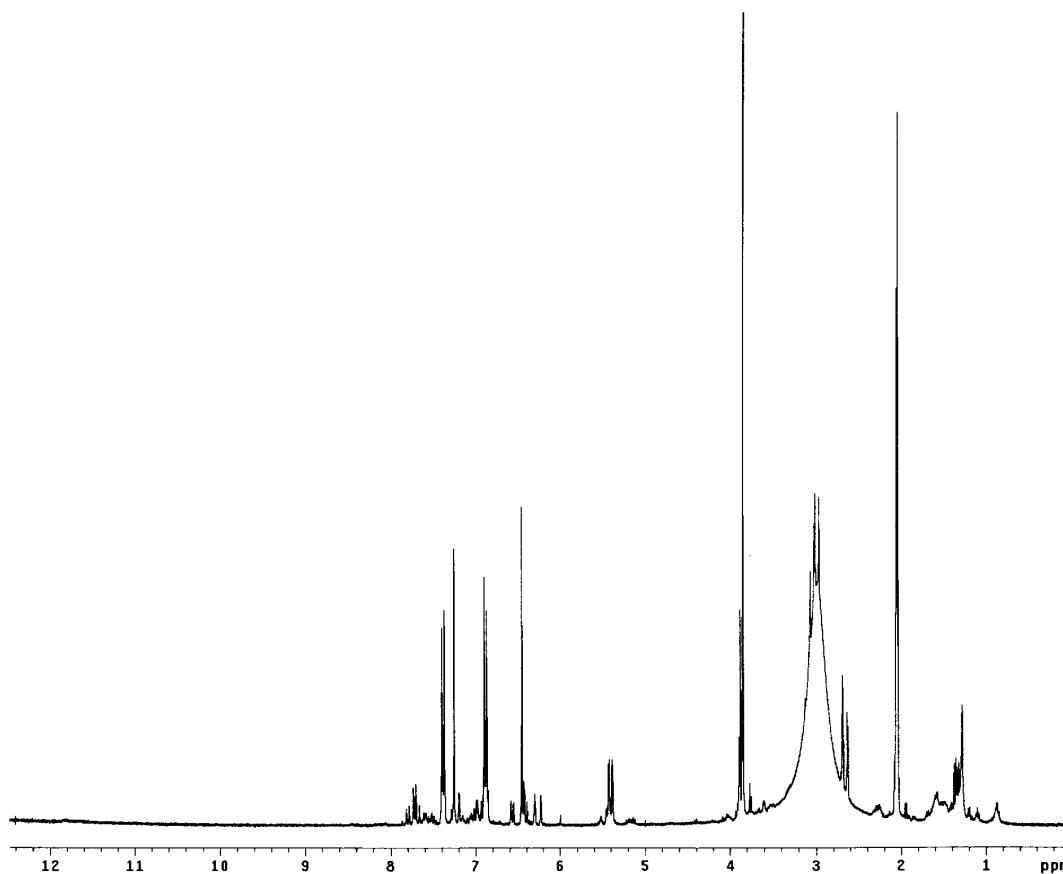


Figura 67 – Espectro de RMN ^1H de **DV16** [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

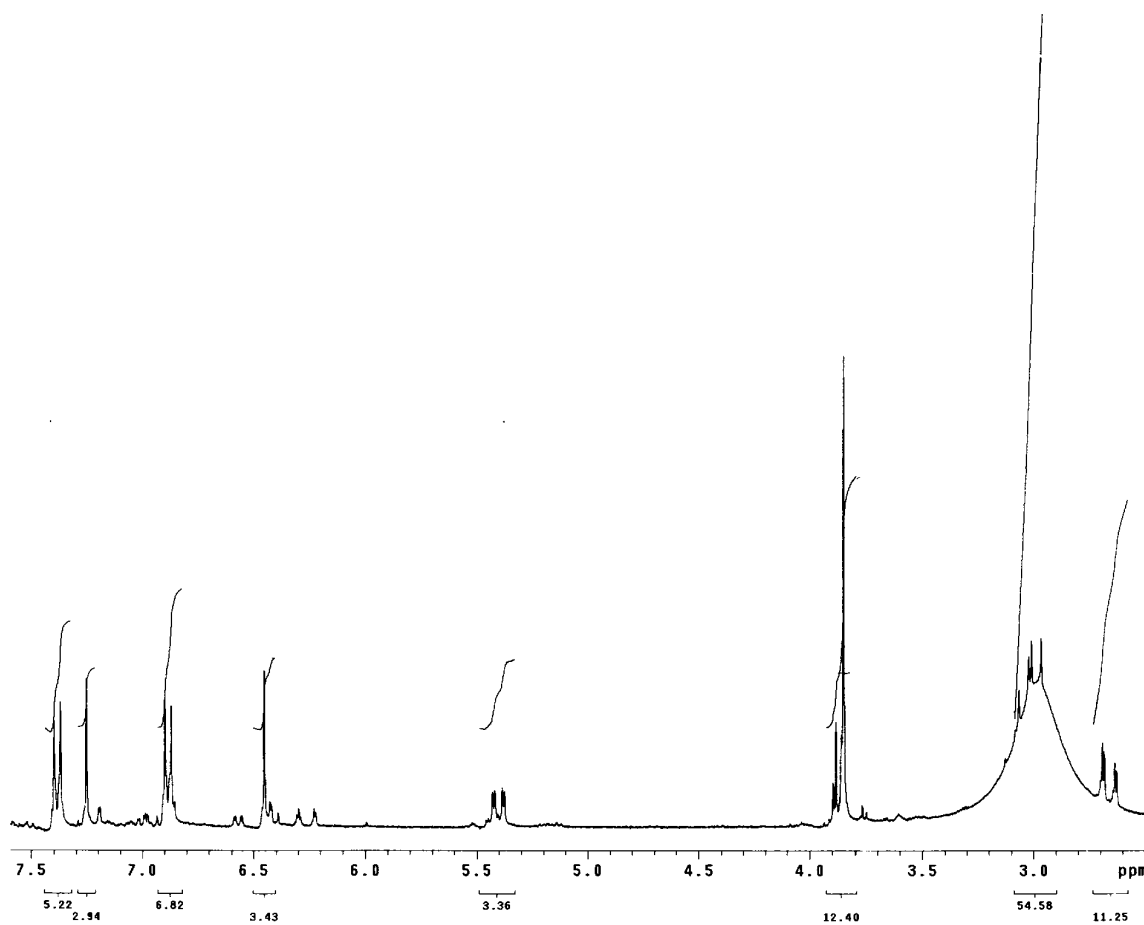


Figura 68 – Espectro de RMN ^1H de DV16 (integração) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

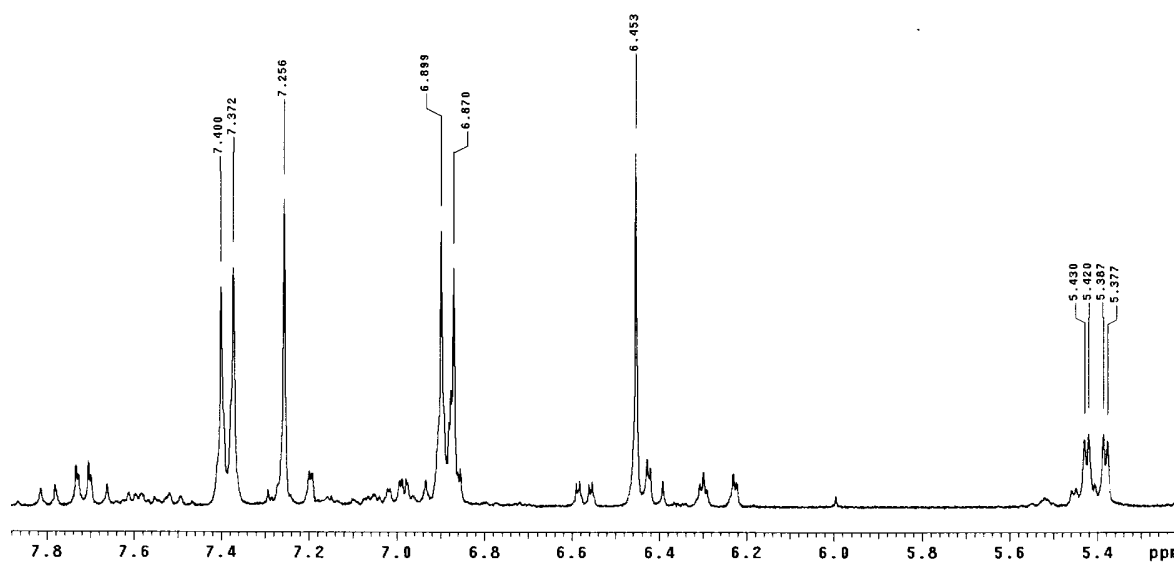


Figura 69 – Espectro de RMN ^1H de DV16 (ampliação) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]