

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DE *Diplotropis*  
*purpurea* E *Deguelia duckeana*

LORENA MAYARA DE CARVALHO CURSINO

MANAUS  
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LORENA MAYARA DE CARVALHO CURSINO

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DE *Diplotropis*  
*purpurea* E *Deguelia duckeana*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de doutora em química, área de concentração Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez

MANAUS  
2015

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C977e Cursino, Lorena Mayara de Carvalho  
Estudo Fitoquímico e Bioatividade de *Diplotropis purpurea* e  
*Deguelia duckeana* / Lorena Mayara de Carvalho Cursino. 2015  
188 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do  
Amazonas.

1. *Deguelia duckeana*. 2. *Diplotropis purpurea*. 3. Fabaceae. 4.  
Potencial anticâncer. 5. Atividade antibacteriana. I. Nunez, Cecilia  
Veronica II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DE  
*Diploptropis purpurea* e *Deguelia duckeana*

Lorena Mayara de Carvalho Cursino

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada em 22 de Julho de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cecilia Verónica Nunez  
Universidade Federal do Amazonas  
Orientadora

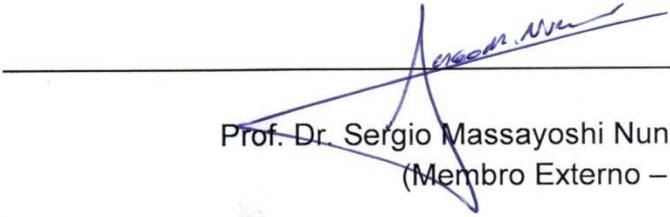
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Rodrigues Garcez  
(Membro Externo - UFMS)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érica Simplício de Souza  
(Membro Externo - UEA)

Prof. Dr. Emerson Silva Lima  
(Membro – Farmácia)

Universidade Federal do Amazonas

---



Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura  
(Membro Externo – INPA)

Universidade Federal do Amazonas  
Manaus, 22 de Julho de 2015

## **DEDICATÓRIA**

**A Deus pela vida e amor infinito,  
Aos meus pais Afonso e Silvia pelo amor, carinho e compreensão,  
Às minhas avós queridas Rute e Maria pelas orações,  
À toda minha linda família pelos momentos de descontração.**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Cecilia Nunez, pela amizade, confiança, incentivo, conselhos e também pela oportunidade de fazer o doutorado sanduíche como etapa importante na minha carreira profissional e também pelas participações em diversos congressos no Brasil e no exterior.

À Profa. Dra. Irmgard Merfort pela orientação no doutorado sanduíche. Foram grandes aprendizados durante um ano de trabalho no seu laboratório na Universidade de Freiburg, Alemanha.

Ao Dr. Matjaz Humar, não só pela constante orientação e paciência durante os ensaios com células tumorais realizados na Universidade de Freiburg, mas também pelo incentivo dado a todo instante.

Ao Prof. Dr. Renato Murillo, da Universidade de Costa Rica, pela colaboração e longas discussões sobre a determinação estrutural das substâncias de *Deguelia duckena*.

Ao Haldor pelo amor, incentivo e enorme apoio, principalmente, durante o ano em que morei na Alemanha. Muito obrigada pelos diversos momentos de alegrias ao seu lado. *Ich liebe dich und vielen Dank mein Liebling!* Também agradeço à Rosi, Dieter, Sabeth, Michael, Ely, Hagen e querida Oma Margot. *Vielen Dank für eure Unterstützung!*

A toda minha família, principalmente à minha querida tia Loretta Ennes que esteve sempre ao meu lado, destacando a preparação para a seleção do doutorado. Aprendemos muito durante esses anos.

Às minhas amigas queridas que tenho como irmãs: Carmen, Gisele, Glenda Nivea, Priscila, Scarlat e Talita. Vocês são peças fundamentais na minha vida. Muito obrigada por serem muito prestativas e terem sempre conselhos valiosos.

Ao Manoel Jeffreys pela amizade, companhia e, por termos encarado grandes desafios na Alemanha e, principalmente por ter me incentivado a acreditar que daria tudo certo no final.

À minha amiga Maria Tereza, conhecida como Maitê, por todo o apoio durante esses anos. Quero agradecer a cada ajuda, destacando os ensaios antibacterianos. Agradeço também pelos momentos de descontração.

À minha amiga Raquel Lorenzetti pelos grandes ensinamentos sobre citologia, e principalmente pela amizade e momentos alegres durante os meses em Freiburg.

À minha amiga Daiane Martins pela amizade e momentos de descontração.

Aos amigos Carromberth, Adriana e Denny por estarem sempre em contato e me apoiando.

À minha querida aluna de iniciação científica, Juliana Nascimento, pela dedicação e organização durante o último ano de doutorado.

Ao Nerilson Lima pela amizade e organização do material de *Deguelia duckeana*, permitindo a obtenção de novos resultados. Agradeço também a Jane, Francislane e André.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB) do INPA, em especial a Izabel, Laila, Rodrigo e Jéssica por terem organizado algumas amostras e claro também a Laís e Mariana, pois também contribuíram para o fracionamento fitoquímico. Agradeço também aos demais amigos: Carol, Vanessa, David, Jaciara, Juliana, Luana, Taís, Kissinara, Fabiele, Weison, Fabianne, Fabiana, Yuri, Sabrina, Júlio, Cristine, Felipe e Priscila.

Aos amigos do laboratório da Profa. Dra. Irmgard Merfort que tanto me ajudaram durante todas as análises na Universidade de Freiburg. Agradeço ao Christoph pela incessante ajuda, destacando o *Camag*, nas análises de fitoquímica; Christian pelo apoio nas análises de citotoxicidade e no uso do citômetro; Regina pela amizade e muitas risadas nos momentos de descontração; Bárbara pela orientação das normas do laboratório e também aos amigos Betina, Susan, Tina, Philip, Ana, Hitesh e Katharina.

Ao S. Ferlaino pelas análises de RMN e também ao Dr. Wörth e C. Warth pelas análises de EM na Universidade de Freiburg.

Ao Magno Muniz pelas análises de RMN e EM realizadas no Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais do INPA.

Ao Prof. Dr. Andersson Barison da Universidade Federal do Paraná pela colaboração nas análises de RMN, em especial ao Kahlil Salomé pela realização dessas análises.

Ao mateiro Lucas Mergulhão pela coleta de *Diplotropis purpurea* e ao Prof. Dr. Valdely Kinupp pela identificação e depósito da exsicata de *D. purpurea* no herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (EAFM).

Ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pelo total apoio dado quando necessário.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa Ciência sem Fronteiras (CsF) financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas.

A todos que puderam contribuir para a realização desse trabalho.

## RESUMO

O presente estudo fitoquímico descreve o isolamento e a identificação de nove substâncias obtidas dos extratos diclorometânico das raízes e hexânico dos galhos de *Deguelia duckeana* e três substâncias identificadas do extrato hexânico das folhas de *Diploptropis purpurea*, ambas pertencentes à família Fabaceae. O estudo fitoquímico de *Deguelia duckeana* permitiu a identificação de estilbeno (3,5,4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno), chalconas (4-metoxilonchocarpina e 4-metoxiderricidina), flavanonas (5-hidroxi-4',7-dimetoxi-6-prenilflavanona e 5-hidroxi-4'-metoxi-isolonchocarpina), flavonas (3',4'-metilenodioxi-7-metoxiflavona, 3',4',7-trimetoxiflavona e racemoflavona) e uma lignana (iangambina). A flavanona 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-6-prenilflavanona merece destaque, pois está sendo descrita pela primeira vez na literatura, isolada de fonte natural. A chalcona 4-metoxilonchocarpina, a flavona racemoflavona e a lignana também estão sendo descritas pela primeira vez em *Deguelia*. Do estudo fitoquímico de *Diploptropis purpurea* foram identificados três triterpenos lupeol, taraxerol e  $\beta$ -amirina. Com exceção do lupeol, os demais triterpenos estão sendo descritos pela primeira vez em *Diploptropis*. As substâncias foram identificadas por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e CLAE/EM. Visando encontrar substâncias e extratos ativos, os mesmos foram analisados quanto ao potencial anticâncer e atividade antibacteriana. Quanto ao potencial anticâncer, o ensaio foi realizado em células de neuroblastoma humano (SK-N-SH) e verificou que a chalcona 4-hidroxilonchocarpina e a flavanona 4-hidroxi-isolonchocarpina apresentaram citotoxicidade pelo teste da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) bem como a ativação da enzima caspase-3, o que infere dizer que essas duas substâncias possuem um mecanismo de necrose e posterior apoptose. Os demais flavonoides induziram a fosforilação do fator de alongamento eucariótico (eEF2) e uma flavona também induziu a fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Estes resultados sugerem que os flavonoides apresentam potencial anticâncer por apresentar atividade na síntese de proteínas. Quanto à atividade antibacteriana dos extratos de *Diploptropis purpurea* foi observado que o extrato metanólico das folhas mostrou-se mais ativo contra três bactérias: *Serratia marcescens* com CIM de 250  $\mu\text{g/mL}$ , *Bacillus cereus* (CIM de 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) com 66% de inibição em comparação ao controle positivo e *Providencia rettgeri* (CIM de 250  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentando 69,5% de inibição em comparação ao controle positivo. O presente estudo destaca-se por contribuir significativamente para o conhecimento científico das espécies *Deguelia duckeana* e *Diploptropis purpurea*, pois os estudos das atividades biológicas dessas espécies e a descrição de seis substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez nos gêneros, sendo uma descrita pela primeira vez como produto natural.

**Palavras-chave:** *Deguelia duckeana*, *Diploptropis purpurea*, Fabaceae, potencial anticâncer, atividade antibacteriana.

## ABSTRACT

The present phytochemical study describes the isolation and identification of nine compounds from the roots dichloromethanic and branches hexanic extracts of *Deguelia duckeana* and three compounds from the leaves of *Diplotropis purpurea* hexanic extract, both species belonging to the Fabaceae family. The compounds from *Deguelia duckeana* were identified as stilbene (3,5,4'-trimethoxy-4-prenylstilbene), chalcones (4-methoxylonchocarpin and 4-methoxyderricidin), flavanones (5-hydroxy-4',7-dimethoxy-6-prenylflavanone, 5-hydroxy-4'-methoxyisolonchocarpin), flavones (3',4'-methylenedioxy-7-methoxyflavone, 3',4',7-trimethoxyflavone, racemoflavone) and one lignan (yangambin). Unprecedentedly, this study describes flavanone 5-hydroxy-4',7-dimethoxy-6-prenylflavanone as a natural product at the literature. Other compounds as chalcone 4-methoxylonchocarpin, flavone racemoflavone and the lignan are also described by *Deguelia* without have been reported so far. The compounds of *Diplotropis purpurea* were identified as triterpenes lupeol, taraxerol and  $\beta$ -amirin which are also first reported by *Diplotropis*, except lupeol. All the compounds were identified using  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR and LC/MS. In order to find active compounds, the extracts and isolated compounds from *Deguelia duckeana* were assayed for anticancer potential in neuroblastoma cells (SK-N-SH), among them one chalcone 4-hydroxylonchocarpin and one flavanone 4-hydroxyisolonchocarpin showed cytotoxicity by lactate dehydrogenase (LDH) assay. These two compounds also activated caspase-3, which indicate cell death via necrose and apoptosis. The other flavonoids induced phosphorylation of the eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) and one flavone also induced AMP-activated protein kinase (AMPK). These results suggest that flavonoids have anticancer potential due to their effect on protein synthesis. Another biological activity examined in the present study was antibacterial activity of *Diplotropis purpurea* extracts and the most active was the methanolic extract from leaves, against three bacterial strains: *Serratia marcescens* (MIC at 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), *Bacillus cereus* (MIC at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inhibiting 66% of bacterial growth in comparison with positive control and *Providencia rettgeri* (MIC at 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) with 69.5% of inhibition in comparison with positive control. The present study contributes to *Deguelia duckeana* and *Diplotropis purpurea* species chemical studies, due to their biological activities and description of six compounds on the genus are described by the first time at the literature. Among those compounds, one of them is also reported by the first time as a natural product.

**Keywords:** *Deguelia duckeana*, *Diplotropis purpurea*, Fabaceae, anticancer activity, antibacterial activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da rodomirtona	03
Figura 2. Flavonoides testados para o potencial anticancer em linhagem de células cancerígenas do tecido glandular	08
Figura 3. Fisentina, flavonol que apresentou indução de morte celular (apoptose)	09
Figura 4. Estruturas das antocianidinas que apresentam colorações vermelho, rosa e azul	10
Figura 5. Esqueleto básico dos flavonoides proveniente da via mista (chiquimito e acetato)	11
Figura 6. Subclasses dos flavonoides mais comuns	12
Figura 7. Fluxograma geral da preparação dos extratos	43
Figura 8. Fluxograma do extrato hexânico das folhas de <i>Diplotropis purpurea</i>	49
Figura 9. Fluxograma do extrato metanólico das folhas de <i>Diplotropis purpurea</i>	52
Figura 10. CCD das frações 1 a 14, sendo A: antes de borrifar sob luz UV 254, UV 365 e visível; B: após borrifar com NP-PEG. Sistema de eluição: CHCl <sub>3</sub> /MeOH 75:5	54
Figura 11. CCD das frações 15 a 21, sendo A: antes de borrifar sob luz UV 254, UV 365 e visível; B: após borrifar com NP-PEG. Sistema de eluição: CHCl <sub>3</sub> /MeOH 75:5	54
Figura 12. CCD das frações 22 a 34, sendo A: antes de borrifar sob luz UV 254, UV 365 e visível; B: após borrifar com NP-PEG. Sistema de eluição: CHCl <sub>3</sub> /MeOH 75:5	55
Figura 13. CCD das frações 35 a 48, sendo A: antes de borrifar sob luz UV 254, UV 365 e visível; B: após borrifar com NP-PEG. Sistema de eluição: CHCl <sub>3</sub> /MeOH 75:5	55
Figura 14. Fluxograma do fracionamento do extrato CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> das raízes de <i>Deguelia duckeana</i>	59
Figura 15. Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico dos galhos de <i>Deguelia duckeana</i>	61
Figura 16. Substâncias identificadas da fração 12-13 obtida do extrato hexânico das folhas de <i>Diplotropis purpurea</i>	67
Figura 17. Substâncias identificadas das raízes e galhos de <i>Deguelia duckeana</i>	68
Figura 18. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H das substâncias I, II e III (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	73
Figura 19. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H das substâncias I, II e III (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	74
Figura 20. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H das substâncias I, II e III (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	75
Figura 21. Mapa de contorno HSQC da mistura das substâncias I, II e III	76
Figura 22. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da mistura das substâncias I, II e III (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	77
Figura 23. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da mistura das substâncias I, II e III (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	78
Figura 24. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C/DEPT da mistura das substâncias I, II e III (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	79

Figura 25. CCD do estilbeno 3,5,4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno ( <b>IV</b> )	80
Figura 26. Espectro de massas a 70 eV (modo positivo) da substância <b>IV</b>	83
Figura 27. (A) Cromatograma mostrando os picos dos quatro flavonoides por tempo de retenção; (B) Espectro de massas de alta resolução (modo positivo) referente à substância <b>VI</b> com íon de $m/z$ 353,138015 $[M + H]^+$	84
Figura 28. Espectro de massas de alta resolução mostrando o íon de $m/z$ 369,169512 $[M + H]^+$ referente a substância <b>V</b>	85
Figura 29. Espectro de RMN de $^1H$ das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b> (400 MHz, em $CDCl_3$ )	91
Figura 30. Expansão do espectro de RMN de $^1H$ das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b> (400 MHz, em $CDCl_3$ )	92
Figura 31. Expansão do espectro de RMN de $^1H$ das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b> (400 MHz, em $CDCl_3$ )	93
Figura 32. Expansão do espectro de RMN de $^1H$ das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b> (400 MHz, em $CDCl_3$ )	94
Figura 33. Expansão do espectro de RMN de $^1H$ das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b> (400 MHz, em $CDCl_3$ )	95
Figura 34. Expansão do espectro de RMN de $^1H$ das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b> (400 MHz, em $CDCl_3$ )	96
Figura 35. Expansão do espectro de RMN de $^1H$ das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b> (400 MHz, em $CDCl_3$ )	97
Figura 36. Espectro de RMN de $^{13}C$ das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b> (100 MHz, em $CDCl_3$ )	98
Figura 37. Expansão do espectro de RMN de $^{13}C$ das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b> (100 MHz, em $CDCl_3$ )	99
Figura 38. Expansão do espectro de RMN de $^{13}C$ das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b> (100 MHz, em $CDCl_3$ )	100
Figura 39. Mapa de contorno COSY das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b>	101
Figura 40. Espectro NOESY das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b>	102
Figura 41. Mapa de contorno HMBC das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b>	103
Figura 42. Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b>	104
Figura 43. Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b>	105
Figura 44. Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b>	106
Figura 45. Mapa de contorno HSQC das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b>	107
Figura 46. Expansão do contorno HSQC das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b>	108
Figura 47. (A) Cromatograma do tipo <i>base peak</i> mostrando o pico do flavonoide <b>VII</b> 5,7 min; (B) Cromatograma mostrando o pico a UV 366 nm	110
Figura 48. Espectro de massas de alta resolução, obtido via ESI no modo positivo, mostrando o íon de $m/z$ 297,076289 $[M + H]^+$ referente ao pico em 5,7min	111
Figura 49. Espectro de RMN de $^1H$ da substância <b>VII</b> (400 MHz, em $CDCl_3$ )	114
Figura 50. Expansão do espectro de RMN de $^1H$ da substância <b>VII</b> (400 MHz, em $CDCl_3$ )	115
Figura 51. Expansão do espectro de RMN de $^1H$ da substância <b>VII</b> (400 MHz, em $CDCl_3$ )	116
Figura 52. Cromatograma mostrando os picos com tempo de retenção em 5,8 min da substância <b>VIII</b> e em 6,0 min da substância <b>IX</b>	118
Figura 53. Espectro mostrando o íon a $m/z$ 313,106989 $[M + H]^+$ referente a substância <b>VIII</b> e (B) e o íon a $m/z$ 469,182066 $[M + Na]^+$ referente a	119

substância <b>IX</b>	
Figura 54. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b> (400 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	124
Figura 55. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b> (400 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	125
Figura 56. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b> (400 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	126
Figura 57. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b> (100 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	127
Figura 58. Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b> (100 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	128
Figura 59. Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b>	129
Figura 60. Mapa de contorno COSY das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b>	130
Figura 61. Expansão do mapa de contorno COSY das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b>	131
Figura 62. Mapa de contorno HSQC das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b>	132
Figura 63. Expansão do mapa de contorno HSQC das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b>	133
Figura 64. Expansão do mapa de contorno HSQC das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b>	134
Figura 65. Mapa de contorno HMBC das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b>	135
Figura 66. Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b>	136
Figura 67. Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b>	137
Figura 68. Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b>	138
Figura 69. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>X</b> (400 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	141
Figura 70. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>X</b> (400 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	142
Figura 71. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>X</b> (400 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	143
Figura 72. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>X</b> (400 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	144
Figura 73. Mapa de contorno de COSY da substância <b>X</b>	145
Figura 74. Cromatograma do tipo <i>base peak</i> obtido das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b>	147
Figura 75. <b>(A)</b> Espectro mostrando $m/z$ 337,143185 $[\text{M} + \text{H}]^+$ referente a substância <b>XI</b> . <b>(B)</b> Espectro com $m/z$ 339,158686 $[\text{M} + \text{H}]^+$ referente a substância <b>XII</b>	148
Figura 76. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b> (400 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	151
Figura 77. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b> (400 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	152
Figura 78. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b> (400 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	153
Figura 79. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b> (400 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	154
Figura 80. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b> (100 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	155
Figura 81. Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b> (100 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	156
Figura 82. Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b> (100 MHz, em $\text{CDCl}_3$ )	157
Figura 83. Mapa de contorno de COSY das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b>	158
Figura 84. Mapa de contorno de HSQC das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b>	159
Figura 85. Mapa de contorno de HMBC das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b>	160

Figura 86. CCD da flavona (IX) sob luz UV 254 (A) e 365 nm (B). Eluente: CHCl <sub>3</sub> /MeOH 75:5	161
Figura 87. Espectro de massas a 70 eV (modo positivo) da substância IX	162
Figura 88. Substâncias isoladas nessa tese e analisadas quanto à atividade anticâncer	164
Figura 89. Substâncias isoladas anteriormente (LIMA, 2011) e analisadas nessa tese quanto ao potencial anticâncer	164
Figura 90. (A) Gráficos mostrando a citotoxicidade dos flavonoides de <i>D. duckeana</i> medida pelo dano celular através da liberação de LDH após a incubação dos flavonoides com células neurais SK-N-SH na concentração de 50 µM; (B) gráfico mostrando as substâncias 4-hidroxi-lonchocarpina e 4'-hidroxisolonchocarpina em concentrações entre 0,1 – 50 µM for 24 h	166
Figura 91. <i>Western blotting</i> mostrando a detecção de pro-caspase-3 e caspase-3 clivada após a incubação com 4-hidroxi-lonchocarpina (A) e 4'-hidroxisolonchocarpina (B)	168
Figura 92. <i>Western blotting</i> mostrando o tratamento da linhagem SK-N-SH com a flavona 3',4'-metilenodioxo-7-metoxiflavona (VII) nas concentrações de 1 – 50 µM por 6 h para analisar a fosforilação da enzima AMPK ( <i>blotting</i> de cima).	169
Figura 93. (A – C) <i>Western blotting</i> mostrando a inibição da síntese de proteínas pela fosforilação de e-EF-2 (95 kDa) após incubação das substâncias com a linhagem SK-N-SH cells tratadas nas concentrações de 1 – 50 µM por incubação durante 6 h	171
Figura 94. Potencial antibacteriano dos extratos metanólicos das folhas e galhos frente a <i>Serratia marcescens</i> .	175
Figura 95. Potencial antibacteriano do extrato metanólico das folhas frente a <i>Bacillus cereus</i>	176
Figura 96. Potencial antibacteriano dos extratos metanólicos das folhas e galhos frente a <i>Providencia rettgeri</i>	177

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações dos extratos obtidos de <i>Diplotropis purpurea</i>	43
Tabela 2. Sistema de eluição do fracionamento do extrato hexânico de <i>D. purpurea</i>	45
Tabela 3. Massas das frações reunidas do fracionamento de <i>D. purpurea</i>	45
Tabela 4. Sistema de eluição do fracionamento da amostra 1 obtida do extrato hexânico de <i>D. purpurea</i>	46
Tabela 5. Sistema de eluição do fracionamento da amostra 2 obtida do extrato hexânico de <i>D. purpurea</i>	47
Tabela 6. Sistema de eluição do fracionamento da amostra 7-14 obtida do extrato hexânico de <i>D. purpurea</i>	47
Tabela 7. Sistema de eluição do fracionamento da amostra 22-24 obtida do extrato hexânico de <i>D. purpurea</i>	48
Tabela 8. Sistema de eluição do fracionamento da fase CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> obtida do extrato metanólico das folhas de <i>D. purpurea</i>	50
Tabela 9. Sistema de eluição do fracionamento da fase AcOEt obtida do extrato metanólico das folhas de <i>D. purpurea</i>	51
Tabela 10. Condição de gradiente utilizada nas análises por CLAE/EM	58
Tabela 11. Dados de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>I</b> (lupeol)	70
Tabela 12. Dados de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>II</b> (taraxerol)	71
Tabela 13. Dados de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>III</b> (β-amirina)	72
Tabela 14. Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) e de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>V</b>	87
Tabela 15. Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>VI</b>	89
Tabela 16. Dados de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>VI</b>	90
Tabela 17. Dados de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>VII</b>	113
Tabela 18. Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>VIII</b>	121
Tabela 19. Dados de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>VIII</b>	121
Tabela 20. Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>IX</b>	123
Tabela 21. Dados de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>IX</b>	123
Tabela 22. Dados de <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>X</b>	140
Tabela 23. Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) e de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>XI</b>	149
Tabela 24. Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) e de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>XII</b>	150

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Chalconas de <i>Deguelia nitidula</i>	16
Quadro 2. Flavonoides e isoflavonoide de espécies de <i>Deguelia</i>	17
Quadro 3. Estilbenos de espécies de <i>Deguelia</i>	25
Quadro 4. Rotenoides de <i>Deguelia utilis</i>	27
Quadro 5. Triterpenos de <i>Derris amazonica</i> , sinóníma de <i>Deguelia amazonica</i>	30
Quadro 6. Estilbenos e chalconas de <i>Deguelia duckeana</i>	32
Quadro 7. Alcaloides quinolizidínicos de <i>Diploctropis martiusii</i>	34
Quadro 8. Derivado fenólico de <i>Diploctropis ferruginea</i>	34
Quadro 9. Flavonoides de <i>Diploctropis ferruginea</i>	35
Quadro 10. Triterpeno de espécies de <i>Diploctropis ferruginea</i>	35
Quadro 11. Flavonoides de <i>Diploctropis purpurea</i>	37
Quadro 12. Esteroides e triterpeno de <i>Diploctropis purpurea</i>	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

ANOVA - Análise de variância

AcOEt - Acetato de etila

APCI - *Atmosphere pressure*

ATP - Adenosina trifosfato

CC - Cromatografia em Coluna

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

$\text{CDCl}_3$  - Clorofórmio deuterado

CIM - Concentração Mínima Inibitória

CLAE/EM - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Espectrometria de massas

COSY - *Correlated Spectroscopy*

*d* - *dubleto*

*dd* - *duplo dubleto*

DCM - Diclorometano

DEPT - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

DMSO - Dimetilsulfóxido

eEF2 - Fator de alongamento 2

EM - Espectrometria de massas

EMEM - *Eagle's Minimum Essential Medium*

ESI - *Electrospray ionization*

FBS - *Fetal bovine serum*

Hex - Hexano

HMBC - *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*

HSQC - *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*

*J* - Constante de acoplamento

LDH - *Lactate Dehydrogenase*

*m* – *multiplete*

MeOH - Metanol

*m/z* - Relação massa/carga

NOESY - *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

NP-PEG - *Natural product* – polietileno glicol

PBS - *Phosphate buffer solution* (tampão fosfato)

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

RMN de  $^1\text{H}$  - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de  $^{13}\text{C}$  - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

*s* - *singleto*

SK-N-SH - linhagem celular de neuroblastoma

TLC - *Thin Layer Chromatography*

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TRIS - *Tris buffer solution* (Tampão de tris)

UV - Ultravioleta

$\delta$  - Deslocamento químico

## SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1 Atividade antibacteriana	01
1.2 Potencial anticâncer	03
1.3 Flavonoides: estrutura e biossíntese	09
1.4 Fabaceae	13
1.4.1 <i>Deguelia</i>	15
1.4.1.1 <i>Deguelia duckeana</i>	31
1.4.2 <i>Diplo tropis</i>	33
1.4.2.1 <i>Diplo tropis purpurea</i>	36
2. Objetivos	39
2.1 Geral	39
2.2 Específicos	39
3. Material e Métodos	40
3.1 Materiais utilizados	40
3.1.1 <i>Softwares</i> utilizados	41
3.2 Coleta	42
3.3 Preparação dos extratos vegetais	42
3.4 Fracionamento	44
3.4.1 Fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>Diplo tropis purpurea</i>	44
3.4.2 Fracionamento do extrato MeOH das folhas de <i>Diplo tropis purpurea</i>	50
3.4.3 Fracionamento do extrato CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> das raízes de <i>Deguelia duckeana</i>	53
3.4.4 Fracionamento do extrato hexânico dos galhos de <i>Deguelia duckeana</i>	60
3.5 Potencial anticâncer	62
3.5.1 Linhagem tumoral e cultivo celular	62
3.5.2 Teste de citotoxicidade	63
3.5.2.1 Análise estatística	64
3.5.3 Mecanismo de indução de apoptose	64
3.6 Atividade antibacteriana	65
3.6.1 Análise estatística	66
4. Resultados e Discussão	67
4.1 Identificação das substâncias obtidas das folhas de <i>Diplo tropis purpurea</i>	69
4.1.1 Identificação das substâncias I, II e III	69
4.2 Identificação das substâncias obtidas das raízes de <i>Deguelia duckeana</i>	80

4.2.1 Identificação da substância <b>IV</b>	80
4.2.2 Identificação das substâncias <b>V</b> e <b>VI</b>	83
4.2.3 Identificação da substância <b>VII</b>	109
4.2.4 Identificação das substâncias <b>VIII</b> e <b>IX</b>	117
4.2.5 Identificação da substância <b>X</b>	139
4.2.6 Identificação das substâncias <b>XI</b> e <b>XII</b>	146
4.4 Confirmação da estrutura química da substância <b>IX</b> obtida do extrato dos galhos de <i>Deguelia duckeana</i>	161
4.5 Potencial anticâncer	163
4.5.1 Análise de citotoxicidade	165
4.5.2 Mecanismo de indução de apoptose	167
4.6 Atividade antibacteriana	172
5. Conclusão	178
6. Referências	180

## **1. Introdução**

A Floresta Amazônica possui uma extensa biodiversidade e para conhecer o seu potencial, muitos estudos de espécies vegetais pouco estudadas ou sem estudos prévios são necessários a fim de encontrar substâncias ativas que, além de combater certas enfermidades, possam contribuir para o conhecimento da composição química da rica flora Amazônica (BARREIRO; BOLZANI, 2009; FACUNDO et al., 2015; STEVENSON, 1999).

### **1.1 Atividade Antibacteriana**

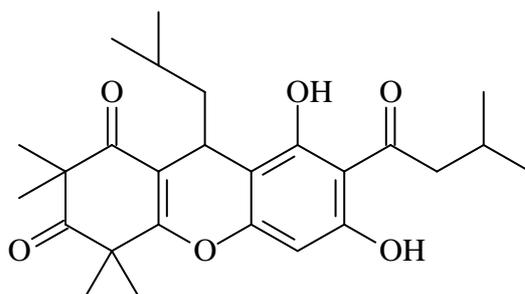
As infecções mais graves que acometem os seres humanos são causadas por bactérias que desencadeiam quadros patológicos graves ou até mesmo ao óbito. Para eliminar ou impedir a multiplicação de bactérias são administrados os antibióticos, que são substâncias químicas obtidas de origem natural ou sintética. Entretanto, o uso inadequado dos antibióticos, principalmente os de amplo espectro, contribuiu para que algumas bactérias desenvolvessem resistência a esses medicamentos (SINGER et al., 2003).

A penicilina, um dos antibióticos mais conhecidos, foi descoberta pelo biólogo e farmacologista Alexander Fleming (1881-1955). Este antibiótico possui um anel  $\beta$ -lactâmico que inibe a enzima transpeptidase atuante na construção da camada peptidoglicana, desprotegendo a membrana e causando a morte da bactéria (DAVIES, 1994; PETROSINO; CANTU; PALZKILL, 1998). No entanto, foi comprovado que a desativação do anel  $\beta$ -lactâmico pela enzima  $\beta$ -lactamase, produzida por algumas bactérias, desencadeia resistência bacteriana (KUMAR; SINGH, 2013; PANDEY et al., 2014).

Além desses mecanismos bioquímicos, há também mecanismos genéticos que podem causar a resistência aos antibióticos e esses envolvem a transferência de genes entre as bactérias ou entre os elementos genéticos no interior das bactérias. A transferência dos genes acontece pelo mecanismo de conjugação que envolve o contato célula-célula para que ocorra a transferência do DNA cromossômico, mas outros mecanismos ainda estão sendo descobertos para o entendimento dessa transferência genética (BEARSON; BRUNELLE, 2015; RANG et al., 2011; SLAGER et al., 2014).

Entre os anos de 1909 a 1987, diversos antibióticos foram descobertos, principalmente entre 1950 a 1980 onde ocorreu a ampliação no desenvolvimento da pesquisa por antibióticos, como a eritromicina. Esta foi isolada da bactéria *Streptomyces erythreus* que inibe a síntese proteica bacteriana (SILVER, 2011).

Nesse contexto, estudos mais avançados mostram que substâncias obtidas de plantas também podem se tornar futuros fármacos antibacterianos. Recentes estudos com a rodomirtona (Figura 1), substância isolada da planta *Rhodomyrtus tomentosa*, revelaram que essa substância é uma forte candidata a um novo fármaco antibacteriano por apresentar atividade contra cepas de bactérias com um valor de concentração inibitória mínima (CIM) de 0,5 µg/mL contra *Staphylococcus epidermidis* (SAISING et al., 2015), *S. aureus* resistente à meticilina, *S. aureus* resistente à vancomicina e cepas de enterococcus resistentes à vancomicina (LEEJAE; TAYLOR; VORAVUTHIKUNCHAI, 2013) e também apresentou CIM entre 1 e 4 µg/mL contra *Bacillus cereus* (LEEJAE et al., 2012).



**Figura 1.** Estrutura da rodomirtona

Embora, cada vez mais uma triagem de extratos de plantas visando os estudos fitoquímicos na região Amazônica é concretizada na busca de novos fármacos com atividade antibacteriana (SILVA et al., 2015; SUFFREDINI et al., 2006), outras pesquisas em destaque envolvem a avaliação do potencial anticâncer dessas plantas.

### **1.2 Potencial Anticâncer**

O câncer é uma doença de degeneração crônica, considerada a segunda maior causa de morte em países economicamente desenvolvidos (JEMAL et al., 2011).

Para uma célula tornar-se tumoral, existem mecanismos que podem explicar esse processo. A evolução de uma célula ocorre a partir do ciclo celular que possui etapas denominadas de G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M. Cada fase é responsável por um processo importante no que diz respeito à nutrição, preparação para multiplicação celular e produção de constituintes essenciais à célula. Para que as células continuem saudáveis, há a necessidade de fechar o ciclo, porém quando uma célula não retorna à sequência de fases do ciclo, essa se torna uma célula tumoral (ALMEIDA et al., 2005a; LOPEZ-MEJIA; FAJAS, 2014; MOLINARO; CAPUTO;

AMENDOEIRA, 2010). Com isso, pode ocorrer um acúmulo de falhas genéticas ou mutações, o que torna as células anormais, que se multiplicam rapidamente, causando o rompimento da organização normal dos tecidos e, assim levando ao câncer (ALBERTS et al., 2006). Estudos posteriores mostram que, não só o acúmulo de mutações pode causar essa anormalidade, já que apenas uma falha no DNA poderia causar o câncer, mas também outro fator dominante: o microambiente celular (BISSELL; HINES, 2011).

Infelizmente, as células malignas são menos propensas a morrerem por apoptose, principalmente por ocorrer uma mutação no gene *p53* que contribui para a replicação do DNA com danos (KASTAN et al., 1991). Apoptose consiste na morte programada de uma célula, inclusive células normais, já que as mesmas precisam morrer para originar uma célula nova (ALBERTS et al., 2006).

Os estudos mais realizados na determinação do potencial anticâncer são os que objetivam encontrar um bloqueio na multiplicação das células malignas, pois substâncias apenas citotóxicas podem também afetar as células normais. Neste sentido, a química de produtos naturais, envolvendo o isolamento de substâncias obtidas de plantas e posterior realização do potencial anticâncer tem sido uma área de estudos promissora para o desenvolvimento de novos fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Um levantamento realizado sobre os medicamentos produzidos a partir de produtos naturais mostra uma preponderância de medicamentos anticâncer, tendo um total de 129 medicamentos produzidos durante os anos de 1981 a 2010. Esse número é seguido pelo de medicamentos antibacterianos (118) e antivirais (110) (NEWMAN; CRAGG, 2012). Apesar de muitos fármacos anticâncer serem derivados

de plantas, esses também apresentam efeitos colaterais fortes como os fármacos sintéticos provenientes de plantas, tais como a: vincristina, alcaloide que causa alterações sensoriais; o etoposídeo semi-sintético e derivado da raiz de *Podophyllum peltatum*, atuante na inibição da função mitocondrial que causa náuseas e alopecia (perda de cabelo); o paclitaxel derivado da planta *Taxus brevifolia*, utilizado contra câncer de ovário que causa efeitos adversos graves com supressão na medula óssea e, por fim o irinotecano que inibe a topoisomerase, mas também apresenta efeitos tóxicos (RANG et al., 2011).

Como parte do processo de descoberta de um novo fármaco, primeiramente, realiza-se um estudo *in vitro* com linhagens de células cancerígenas com o objetivo de determinar o potencial anticâncer de certa substância, seja obtida de plantas, micro-organismos ou síntese orgânica. Algumas substâncias com atividade anticâncer podem bloquear o mecanismo de divisão da célula tumoral, especialmente as que mostram indução de apoptose (morte celular programada) ou também fosforilação de proteínas presentes em etapas correspondentes à síntese de proteínas (LOPEZ-MEJIA; FAJAS, 2014; RANG et al., 2011).

O mecanismo de indução de apoptose pode ser determinado por vários fatores complexos. Dentre esses, destaca-se a via correspondente a uma cascata de enzimas, denominadas de caspases. Essas enzimas estão presentes nas células, mas inativadas e podem ser ativadas a fim de clivar e inativar constituintes celulares. Nesse caso, a enzima responsável por esse processo é a caspase-3, denominada de caspase executora que pode ser ativada por membros do fator de necrose tumoral (TNF) a fim de estimular o processo de ativação da caspase-8. A caspase-3 também pode ser ativada pela via mitocondrial que se inicia pela lesão do DNA e

através da ativação da proteína p53 é capaz de induzir a mitocôndria a ativar a caspase iniciadora, caspase-9 (ALBERTS et al., 2006; LOPEZ-MEJIA; FAJAS, 2014; RANG et al., 2011).

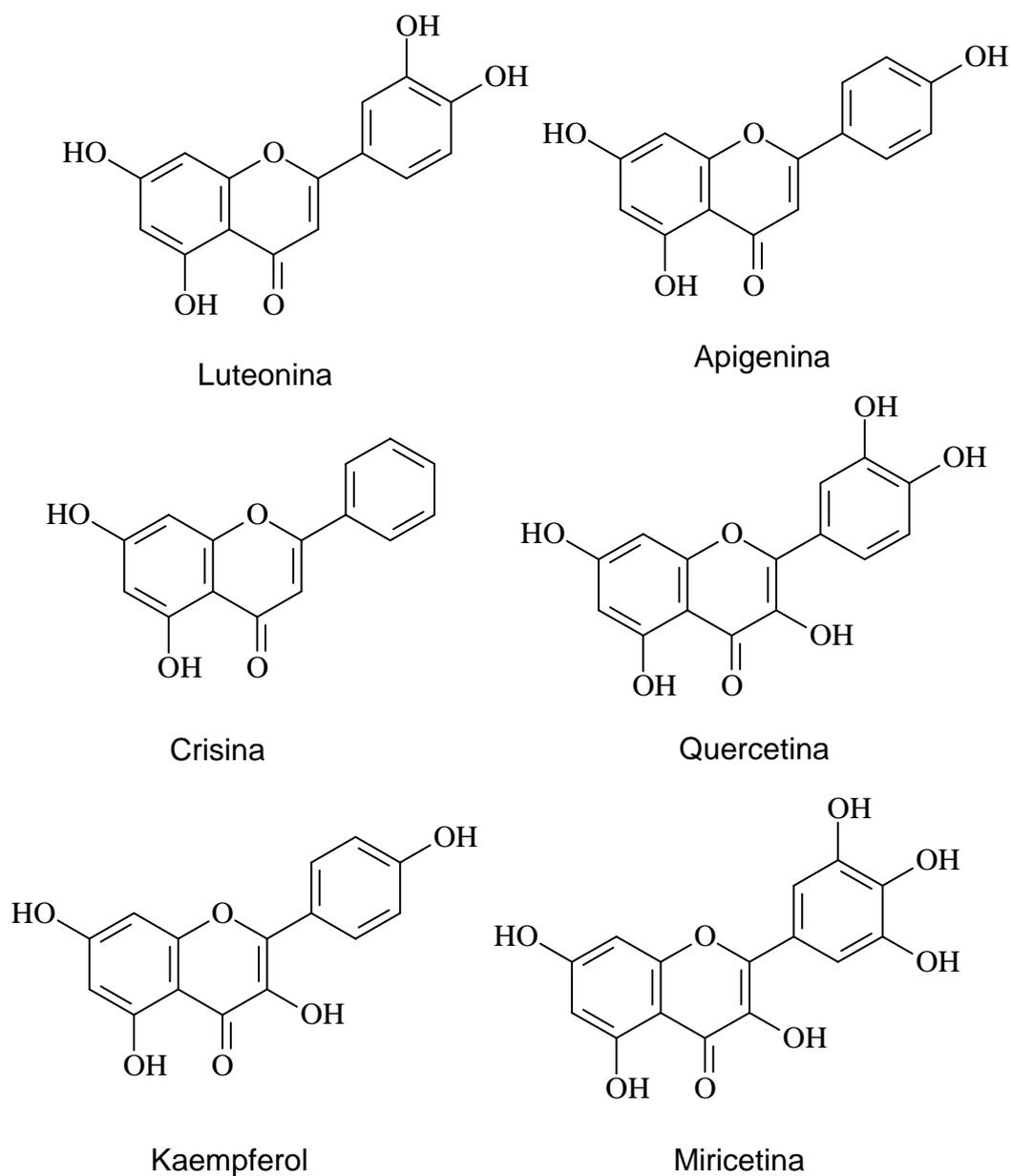
Muitos estudos com substâncias isoladas de plantas têm relatado a capacidade de ativarem esse tipo de enzima (caspase-3) e assim desencadeando o mecanismo responsável pela morte celular (KUETE et al., 2015; PEREIRA et al., 2014; SHOJA et al., 2015; XU et al., 2014). Atualmente, uma das análises mais utilizadas para detectar essa e outras enzimas é a técnica de *Western blotting* que consiste em detectar proteínas específicas após realização da análise de eletroforese (BURNETTE, 1981).

Além de análises visando identificar e quantificar as caspases, também há análises de outros tipos de proteínas, como a enzima AMPK, responsável pela adequação dos níveis de energia nas células (HORMAN et al., 2002), e a proteína chamada de fator de alongamento 2 (e-EF2), atuante na catálise do movimento no ribossomo (alongamento) correspondente à segunda etapa da síntese de proteínas. Essa proteína (e-EF2), quando fosforilada, é catalisada por diversas enzimas que inclui a quinase e-EF2K que conseqüentemente inibe a etapa de alongamento e causa o bloqueio da divisão da célula tumoral (CARLBERG; NILSSON; NYGARD, 1990; SCHWER et al., 2013).

Na literatura é precariamente documentado o efeito de extratos de plantas com atividade antitumoral, especificamente no mecanismo de atuação de e-EF2. Visto a importância desta como via de crescimento celular, há um destaque em esclarecer essa possível interação, sendo relevante na pesquisa de outros mecanismos de substâncias antitumorais. Entre as linhagens de câncer mais estudadas, destaca-se

a linhagem celular de neuroblastoma (SK-N-SH) que teve nome divulgado pela primeira vez em 1910 atribuída às crianças com tumor de origem neural (WRIGHT, 1910). Este tipo de câncer apresenta maior número de casos nos Estados Unidos em bebês e até crianças de cinco anos de idade (JEMAL et al., 2010).

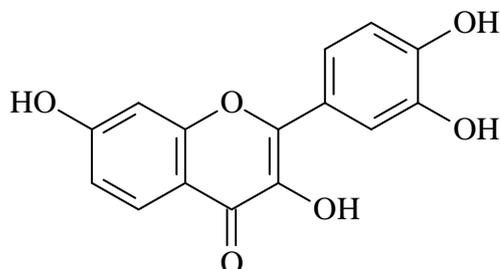
Dentre as substâncias mais estudadas com enfoque diretamente na morte celular ou em mecanismos que busquem bloquear a sua multiplicação estão os flavonoides. Na literatura encontram-se diversos trabalhos relatando a atividade anticâncer de flavonoides visando à morte celular. Os mais estudados (Figura 2) apresentam atividade anticâncer com citotoxicidade em linhagem de adenocarcinoma (câncer no tecido glandular) e indução de apoptose através da ativação de caspase-3 e 9 por análise de *Western blotting* comparados com Fluorouracil, droga anticâncer que apresenta graves problemas no coração sendo um dos seus piores efeitos colaterais (ZHANG; ZHAO; WANG, 2008). Um recente estudo mostrou que a quercetina em mistura com chá verde e docetaxel inibiram a formação de tumor de câncer de próstata (WANG et al., 2015).



**Figura 2.** Flavonoides ativos quanto ao potencial anticâncer em linhagem de células cancerígenas do tecido glandular

Outro flavonoide que possui atividade anticâncer é a fisentina (Figura 3), um flavonol isolado das folhas de *Rhus verniciflua*, e que foi ativo em linhagem neuronal HT22 (CHO et al., 2012). Posteriormente, outro estudo deste flavonol mostrou

indução de apoptose em linhagem de câncer de cólon (KIM et al., 2015). Esses estudos demonstram uma substância promissora na terapia do câncer.



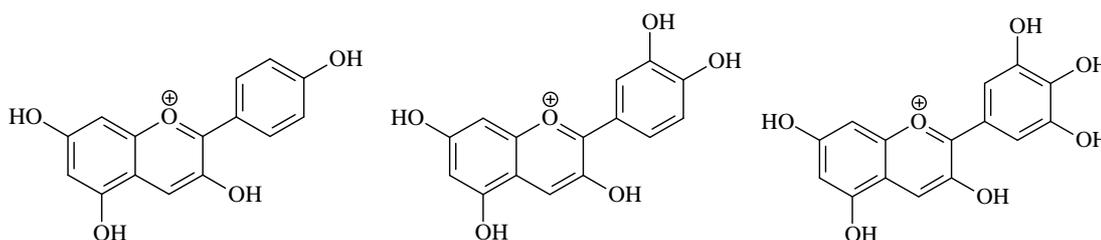
**Figura 3.** Fisetina, flavonol que apresentou indução de morte celular (apoptose)

As flavonas apigenina e luteonina (Figura 2) também apresentaram atividade na linhagem de neuroblastoma. A luteonina induziu apoptose com a ativação das caspases 12, 9 e 3 em 10  $\mu\text{M}$  (CHOI et al., 2011), mostrando que os flavonoides possuem atividade anticâncer seja por citotoxicidade ou por mecanismos que desencadeiam apoptose.

### 1.3 Flavonoides: estrutura e biossíntese

Os flavonoides são metabólitos secundários de fundamental importância, não só pela atividade anticâncer, visto no item anterior, mas por possuírem diversas funções nas plantas, destacando a proteção contra herbívoros. Eles são encontrados em diversas partes das plantas como: raízes, galhos, folhas, flores, frutos e troncos. Contudo, alguns desses metabólitos são encontrados em apenas algumas partes vegetais, por exemplo, nas flores, onde são encontradas as antocianidinas, responsáveis pelas colorações vermelha, rosa e azul (Figura 4)

(BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000) e também as chalconas e os flavonóis que contribuem para a coloração amarela (DEWICK, 2009). Vale ressaltar que estudos também mostram que os flavonoides podem estar em grande concentração nas raízes (WESTON; MATHESIUS, 2013).

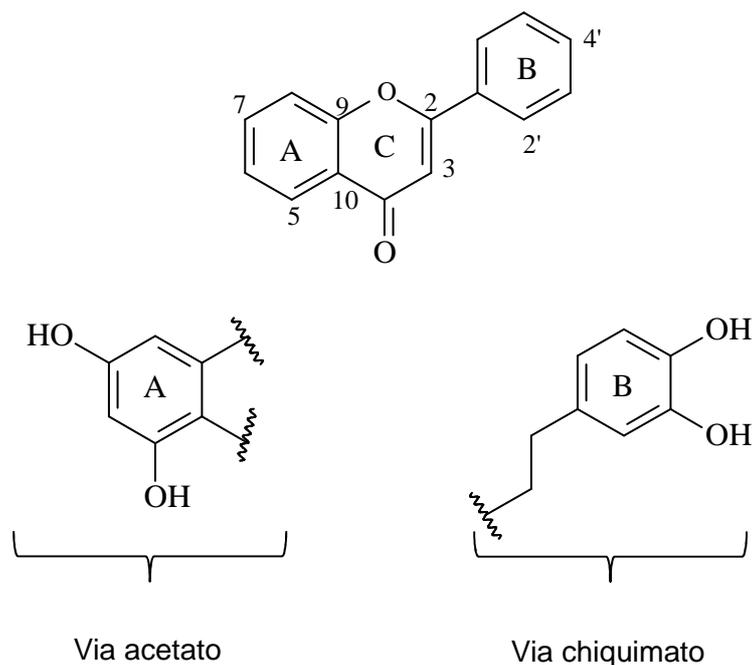


**Figura 4.** Estruturas das antocianidinas que apresentam colorações vermelho, rosa e azul

Biossinteticamente, os flavonoides são obtidos pela via mista:

1. Via do chiquimato com um fragmento  $C_6C_3$  (Anel B);
2. Via do acetato com um fragmento  $C_6$  (Anel A) (DEWICK, 2009).

As substâncias provenientes do chiquimato são reconhecidas pelo padrão de oxigenação do anel aromático B. Enquanto as substâncias originadas do acetato possuem oxigenações alternadas no anel A como mostradas na Figura 5.



**Figura 5.** Esqueleto básico dos flavonoides proveniente da via mista (chiquimato e acetato)

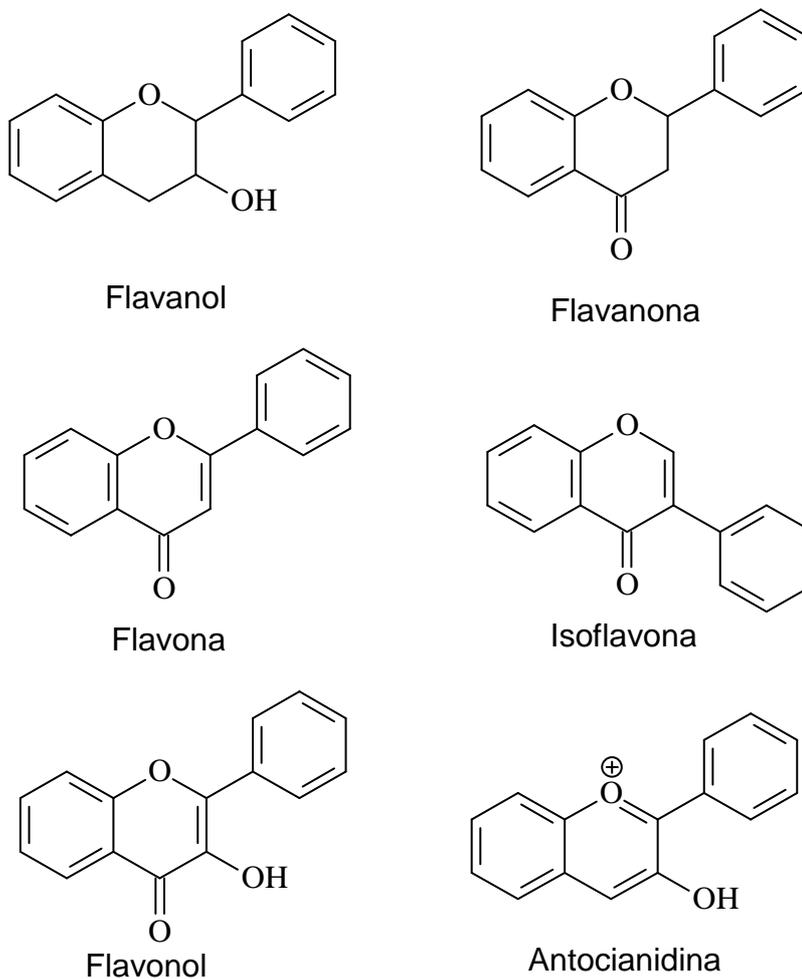
Os flavonoides são provenientes da reação de condensação de uma unidade de 4-hidroxi-cinamoil-CoA e três unidades de malonil-CoA originando o estilbeno através da reação *Aldol* ou a chalcona pela reação de *Claisen*, a qual apresenta um sistema de três carbonos de uma cetona  $\alpha$ - $\beta$ -insaturada. Após, acontecem reações sucessivas catalisadas por enzimas específicas originando as flavanonas (DEWICK, 2009).

As reações posteriores à flavanona narigenina originam as flavonas, os flavonóis e derivados como, por exemplo: catequinas (*trans*), epicatequinas (*cis*) e seus dímeros, as proantocianidinas (LOBO; LOURENÇO, 2007).

Os flavonoides podem apresentar grupos hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e/ou 5' podendo ser metilados, acetilados, prenilados e sulfonados. Outra

característica desta classe é serem glicosilados, sendo chamados de heterosídeos e geralmente com substituição nas posições 3 e 7. Quando não se apresentam glicosilados são chamados de aglicona ou genina (SIMÕES et al., 2004).

As subclasses mais frequentes são: flavanol, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianidinas (Figura 6) (BEECHER, 2003).



**Figura 6.** Subclasses dos flavonoides mais comuns

## 1.4 Fabaceae

A família Fabaceae apresenta principalmente a descrição de flavonoides, contribuindo para a caracterização taxonômica (BRAZ FILHO et al., 1973; HEGNAUER; J. GPAYER-BARKMEIJER, 1993). Antigamente, conhecida como Leguminosae, essa família apresenta 650 gêneros e 19000 espécies, dos quais 200 gêneros e 2700 espécies ocorrem no Brasil (SOUZA; LORENZI, 2012). É uma das principais famílias que apresenta um maior número de espécies na Reserva Ducke, localizada na estrada AM-010 (km 26).

As subfamílias correspondentes de Fabaceae são: Papilionoideae ou Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (RIBEIRO et al., 1999).

A subfamília Papilionoideae tem distribuição nas zonas tropicais e subtropicais (RIBEIRO et al., 1999). Alguns gêneros dessa subfamília mostram destaque pelo uso medicinal como *Tephrosia*, *Derris* e *Lonchocarpus* que apresentam efeitos inseticidas no combate de pragas de lavouras e de parasitas em animais (STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Outros gêneros de Papilionoideae como *Swartzia*, *Sophora*, *Dalbergia*, *Dioclea*, *Andira*, *Abrus* e *Tephrosia* também apresentam atividades biológicas. Extratos e substâncias isoladas de espécies desses gêneros mostraram-se ativos: o extrato metanólico de *Swartzia madagascariensis* apresentou atividade antimalárica (OUATTARA et al., 2006); alcaloides isolados de *Sophora tonkinensis* mostraram atividade anti-HBV (vírus da hepatite) (DING et al., 2006); flavonoide apresentou atividade anti-inflamatória de *Dalbergia odorifera* (LEE et al., 2013); extrato hidroalcoólico de *Dioclea glandiflora* mostrou atividade analgésica (ALMEDIA et al., 2013a); flavonoides de *Andira humilis* apresentaram atividade antifúngica frente as

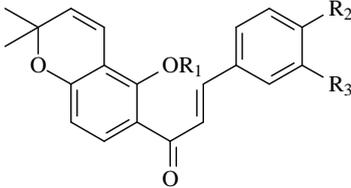
cepas *Candida krusei*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* (GARCEZ et al., 2010); isoflavonoides de *Andira inermis* mostraram atividade antiplasmódica (KRAFT et al., 2000); flavonoides de *Abrus molis* apresentaram atividade anti-inflamatória e efeito hepatoprotetor (CHEN et al., 2014); flavonoides de *Tephrosia apollinea* mostraram atividade antifúngica (AMMAR et al., 2013) e o extrato aquoso de *Tephrosia vogelli* apresentou atividade contra as larvas de *Aedes albopictus* (LI et al., 2015).

### 1.4.1 *Deguelia*

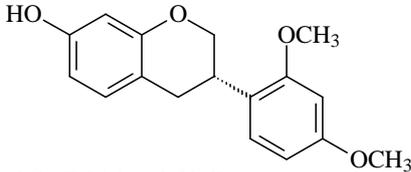
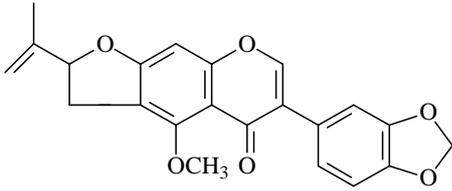
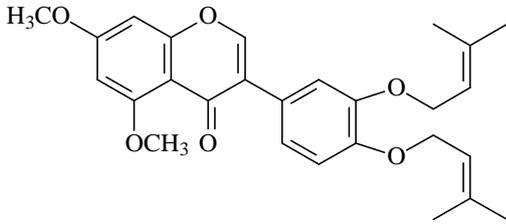
Quimicamente, o gênero *Deguelia*, pertencente à família Fabaceae e subfamília papilionoideae, é uma fonte promissora de flavonoides e apresenta cerca de 80 espécies no site Tropicos (TROPICOS, 2015a), destacando 20 espécies divididas em duas seções *Deguelia* sect. *Multiovulis* e *Deguelia* sect. *Deguelia* (MAGALHÃES et al., 2001).

De acordo com a literatura, são descritos em espécies de *Deguelia*: chalconas (Quadro 1), flavonoides e isoflavonoides (Quadro 2), sendo também relatada a ocorrência de estilbenos (Quadro 3), rotenoides (Quadro 4) e triterpenos (Quadro 5).

**Quadro 1.** Chalconas de *Derris rariflora*, sinóníma de *Deguelia nitidula*

PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIA
Raízes	 <p>(1) lonchocarpina (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = H)</p> <p>(2) 4-hidroxilochocarpina (R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH)</p> <p>(3) 4,5-dihidroxilochocarpina (R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH)</p> <p>(4) 4,2'-diacetato-lonchocarpina (R<sub>1</sub> = Ac, R<sub>2</sub> = OAc, R<sub>3</sub> = H)</p>	(BRAZ FILHO et al., 1975)

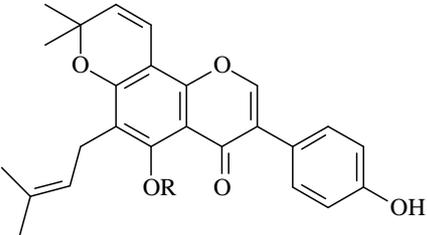
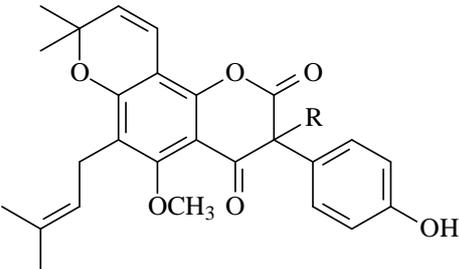
**Quadro 2.** Flavonoides e isoflavonoides de espécies de *Deguelia*

ESPÉCIE	PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. amazônica*</i>	Raízes	 <p><b>(5)</b> (3S)-7-hidroxi-2',4'-dimetoxiisoflavanona</p>	(BRAZ FILHO et al., 1975)
<i>D. densiflora**</i>	Sementes	 <p><b>(6)</b> glabresciona A</p>	(DELLE MONACHE et al., 1977)
		 <p><b>(7)</b> glabresciona B</p>	

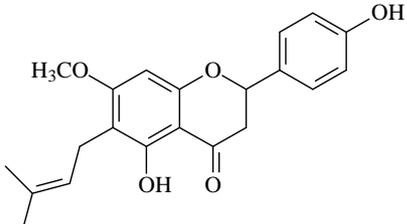
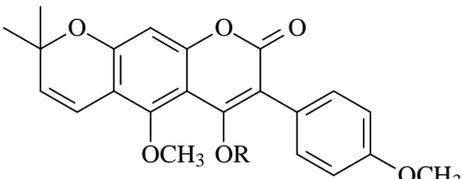
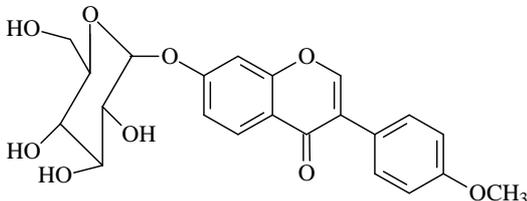
\**Derris amazonica*, sinonímia de *Deguelia amazonica*

\*\**Derris glabrescens*, sinonímia de *Deguelia densiflora*

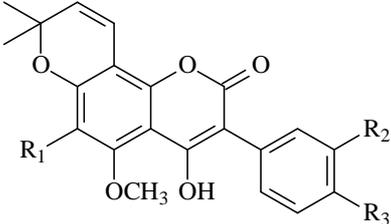
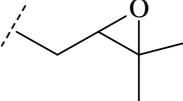
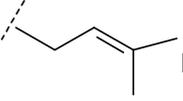
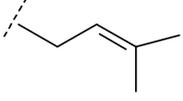
**Quadro 2.** Flavonoides e isoflavonoides de espécies de *Deguelia* (Continuação)

ESPÉCIE	PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. hatschbachii</i>	Raízes	 <p data-bbox="719 779 1037 846"><b>(8)</b> osajina (R = H) <b>(9)</b> escandinona (R = CH<sub>3</sub>)</p>	(MAGALHÃES et al., 2001)
		 <p data-bbox="719 1377 1177 1550"><b>(10)</b> 3-(4'-hidroxifenil)-5-metoxi-6-(3,3-dimetilalil)-2'',2''-dimetilcromeno-(5,''6'':8,7)-3-(propil-2-ona)-4H-1-benzo-2,3-dihidopiran-2,4-diona (R = CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>)</p>	

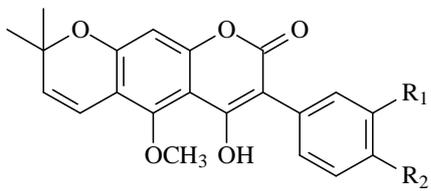
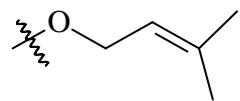
**Quadro 2.** Flavonoides e isoflavonoides de espécies de *Deguelia* (Continuação)

ESPÉCIE	PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. hatschbachii</i>	Raízes	 <p>(11) 5,4'-dihidroxi-6-(3,3-dimetilalil)-7-metoxi-flavanona</p>	(MAGALHÃES et al., 2003)
		 <p>(12) escandenina (R = H) (13) robustato de metila (R = CH<sub>3</sub>)</p>	
<i>D. longeracemosa</i>	Raízes	 <p>(14) ononina</p>	(MAGALHÃES et al., 2006)

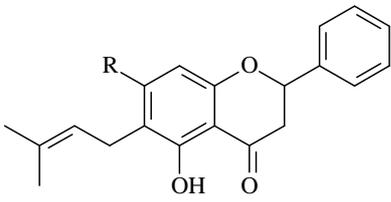
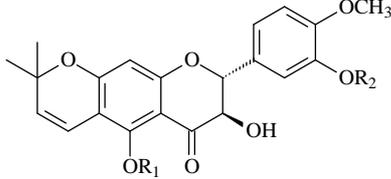
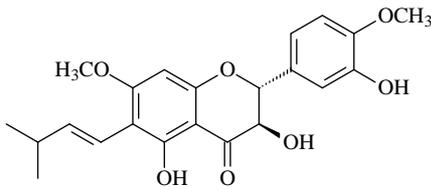
**Quadro 2.** Flavonoides e isoflavonoides de espécies de *Deguelia* (Continuação)

ESPÉCIE	PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. longiracemosa</i>	Raízes	 <p>R1=  R2 = H, R3 = OH</p> <p><b>(15)</b> 4-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)-5-metoxi-6-(8',9'-epoxi-9'-metilbutil)-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6'':8,7)-cumarina</p> <p>R1=  R2, R3 = OCH<sub>2</sub>O</p> <p><b>(16)</b> 4-hidroxi-3-(3',4'-metilenodioxifenil)-5-metoxi-6-(3,3-dimetilalil)-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6'':8,7)-cumarina</p> <p>R1=  R2 = OH, R3=OCH<sub>3</sub></p> <p><b>(17)</b> 4-hidroxi-3-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil)-5-metoxi-6-(3,3-dimetilalil)-2'',2''-dimetilirano-(5'',6'':8,7)-cumarina</p> <p><b>(18)</b> isorobustina (R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = OCH<sub>2</sub>O)</p>	(MAGALHÃES et al., 2006)

**Quadro 2.** Flavonoides e isoflavonoides de espécies de *Deguelia* (Continuação)

ESPÉCIE	PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. longiracemosa</i>	Raízes	 <p><b>(19)</b> 4-hidroxi-3-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil)-5-metóxi-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6'':6,7)-cumarina (R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>)</p> <p><b>(20)</b> 4-hidróxi-3-[4'-O-(3,3-dimetilalila)fenil]-5-metóxi-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6'':6,7)-cumarina (R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub>)</p>  <p><b>(21)</b> robustina (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = OCH<sub>2</sub>O)</p> <p><b>(22)</b> ácido robústico (R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>)</p>	(MAGALHÃES et al., 2006)

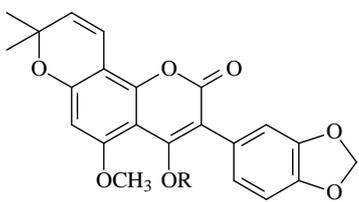
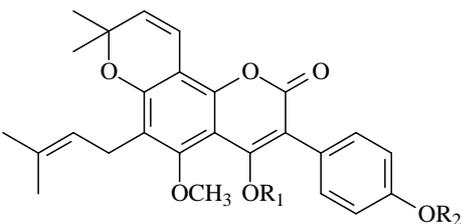
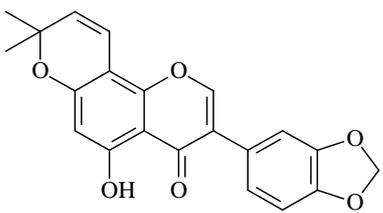
**Quadro 2.** Flavonoides e isoflavonoides de espécies de *Deguelia* (Continuação)

ESPÉCIE	SUBSTÂNCIAS	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. rariflora</i> *	Raízes	 <p>(23) 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (R = OH)</p> <p>(24) 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona (R = OCH<sub>3</sub>)</p>	(BRAZ FILHO et al., 1975)
<i>D. rufescens</i> var. <i>rufescens</i> **	Folhas	 <p>(25) urucuol A (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H)</p> <p>(26) urucuol B (R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H)</p> <p>(27) urucuol C (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>)</p>	(LÔBO et al., 2009)
	Folhas	 <p>(28) isotirumalin</p>	

\* *Derris rariflora*, sinonímia de *Deguelia rariflora*

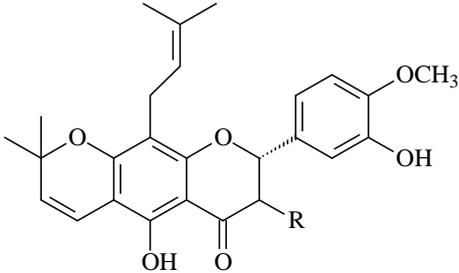
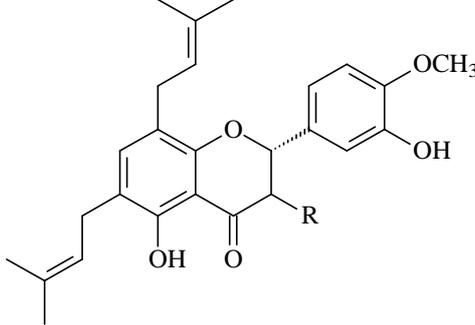
\*\* *Derris urucu*, sinonímia de *Deguelia rufescens* var. *rufescens*

**Quadro 2.** Flavonoides e isoflavonoides de espécies de *Deguelia* (Continuação)

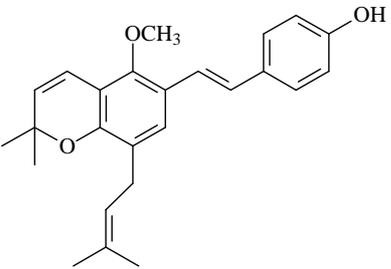
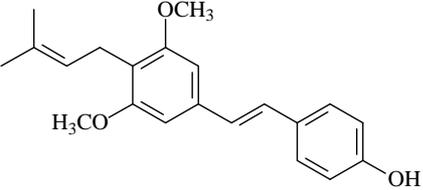
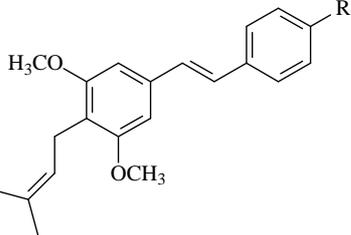
ESPÉCIE	SUBSTÂNCIAS	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. spruceana</i> *	Raízes	 <p><b>(29)</b> 3-metilenodioxi-(3',4')fenil-4-hidroxi-5-metoxi-2'',2''-dimetilcromeno(5'',6'',7,8)-cumarina (R = H)</p> <p><b>(30)</b> 3-metilenodioxi-(3',4')fenil-4,5-dimetoxi-2'',2''-dimetilcromeno(5'',6'',7,8)-cumarina (R = CH<sub>3</sub>)</p>	(GARCIA et al., 1986)
		 <p><b>(31)</b> escandenina (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H)  <b>(32)</b> 4'-acetato-escandenina (R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = Ac)  <b>(33)</b> diacetato- escandenina (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = Ac)</p>	
		 <p><b>(33)</b> 3',4'-metilenodioxi-5-hidroxi-2'',2''-dimetilcromeno (5'',6'',7,8)-isoflavona</p>	

\**Derris spruceana*, sinonímia de *Deguelia spruceana*

**Quadro 2.** Flavonoides e isoflavonoides de espécies de *Deguelia* (Continuação)

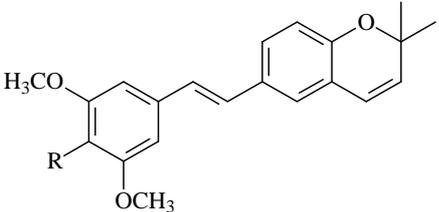
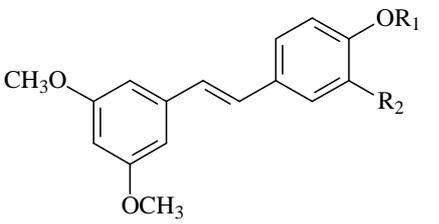
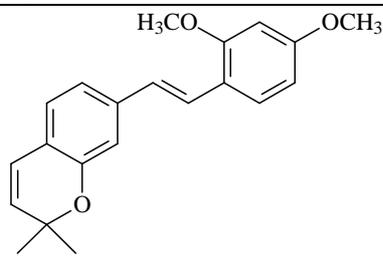
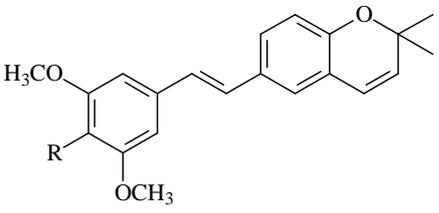
ESPÉCIE	PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. utilis</i>	Folhas	 <p data-bbox="608 808 1102 902"><b>(34)</b> 5,3'-dihidroxi-4'-metoxi-2'',2''-dimetilcromeno-(5'',6'':6,7)-dihidroflavonol (R = 3βOH)</p> <p data-bbox="608 931 1129 992"><b>(35)</b> 5,3'-dihidroxi-4'-metoxi-8-alil-2'',2''-dimetilcromeno-(6,7:5'',6'')flavanona (R = H)</p>	(DE OLIVEIRA et al., 2012)
		 <p data-bbox="608 1424 1050 1485"><b>(36)</b> 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-6,8-dimetilalil-dihidroflavonol (R = 3βOH)</p> <p data-bbox="608 1496 1034 1556"><b>(37)</b> 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-6,8-dimetilalil-flavanona (R = H)</p> <p data-bbox="608 1568 1058 1628"><b>(38)</b> 3,5,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxi-6,8-dimetilalil-flavonol (R = OH)</p>	

**Quadro 3.** Estilbenos de espécies de *Deguelia*

ESPÉCIE	PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. hatschbachii</i>	Raízes	 <p><b>(39)</b> 2'-(3,3-dimetilalil),2'',2''-dimetilcromeno (5'', 6'':4',3')-4-hidroxi-5-metoxi-estibeno</p>	(MAGALHÃES et al., 2001)
		 <p><b>(40)</b> 3',5'-dimetoxi-4-hidroxi-4'-(3,3-dimetilalil)-estilbeno</p>	
<i>D. rariflora</i> *	Raízes	 <p><b>(41)</b> 3,5-dimetoxi-4-prenilestilbeno (R=H)  <b>(42)</b> 3,5,4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno (R = OCH<sub>3</sub>)</p>	(BRAZ FILHO et al., 1975)

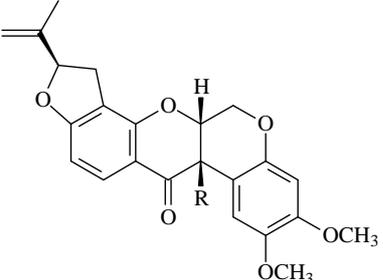
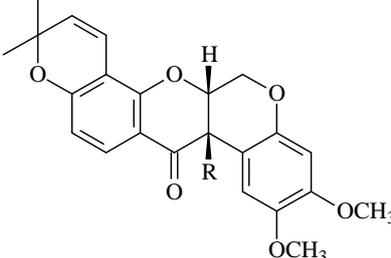
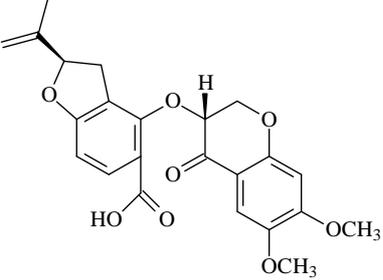
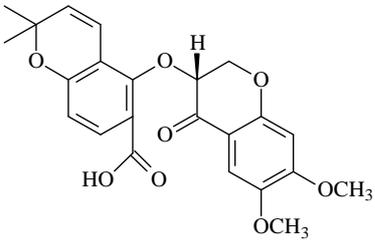
\**Derris rariflora*, sinonímia de *Deguelia rariflora*

Quadro 3. Estilbenos de espécies de *Deguelia* (Continuação)

ESPÉCIE	SUBSTÂNCIAS	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. rufescens</i> var. <i>urucu</i>	Folhas	 <p>(43) lonchocarpeno (R = H) (44) 4-metoxilonchocarpeno (R = OCH<sub>3</sub>)</p>	(LOBO et al., 2010) (PEREIRA et al., 2012)
		 <p>(45) 3,5-dimetoxi-4'-hidroxi-3'-prenil-<i>trans</i>-estilbeno [R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (46) 3,5-dimetóxi-4'-O-prenil-<i>trans</i>-estilbeno (R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H) (47) pterostilbeno (R<sub>1</sub> = H<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = H)</p>	(LOBO et al., 2010)
<i>D. spruceana</i> *	Raízes	 <p>(48) 2,4-dimetoxi-2'',2''-dimetilcromeno(5'',6'',3',4')-estilbeno</p>	(GARCIA et al., 1986)
<i>D. utilis</i>	Raízes	 <p>(49) 4-metoxi-lonchocarpeno (R = OCH<sub>3</sub>) (50) lonchocarpeno (R = H)</p>	(DE OLIVEIRA et al., 2012)

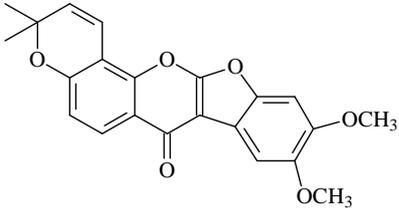
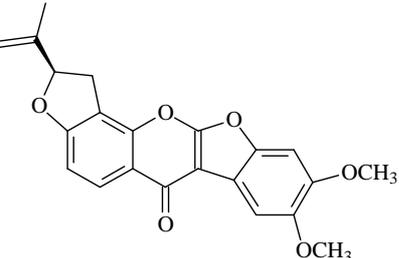
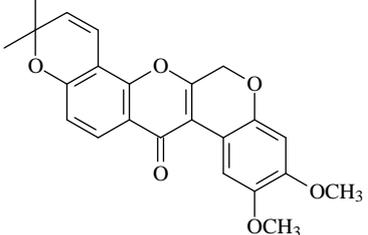
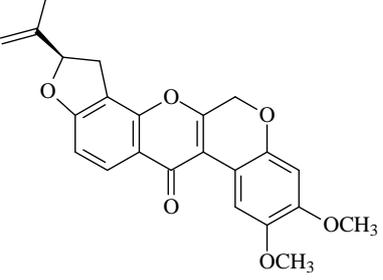
\*\**Derris spruceana*, sinónimo de *Deguelia spruceana*

**Quadro 4.** Rotenoides e derivados de *Deguelia utilis*

ESPÉCIE	PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. utilis</i>	Raízes	 <p data-bbox="657 683 1133 750"><b>(51)</b> (-)-rotenona (R = H) <b>(52)</b> (-)-12αβ-hidroxi-rotenona (R = OH)</p>	(LAWSON et al., 2006)
		 <p data-bbox="657 1030 1133 1097"><b>(53)</b> (-)-deguelina (R = H) <b>(54)</b> (-)-12αβ-hidroxi-deguelin (R = OH)</p>	
		 <p data-bbox="657 1433 1133 1489"><b>(55)</b> 4-(6,7-dimetoxi-2,3-dihidrocromona-3-oxi) ácido tubaico</p>	
		 <p data-bbox="657 1803 1133 1859"><b>(56)</b> 5-(6,7-dimetoxi-2,3-dihidroxicromeno-3-oxi) β-ácido tubaico</p>	

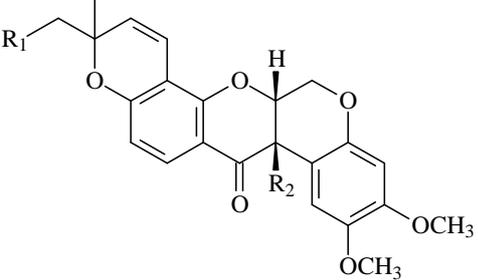
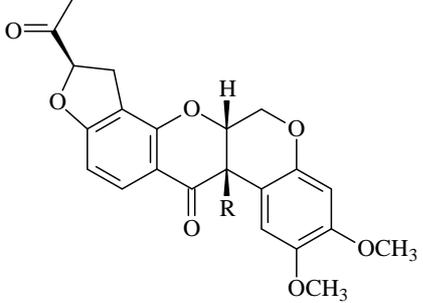
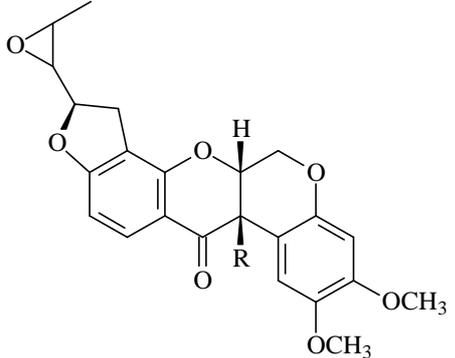
\**Lonchocarpus nicou* var. *languidos*, sinonímia de *Deguelia utilis*

**Quadro 4.** Rotenoides e derivados de *Deguelia utilis* (Continuação)

ESPÉCIE	PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. utilis</i> *	Raízes	 <p><b>(57)</b> 2',2'-dimetilpirano(5',6':8,7)-cromona</p>	(LAWSON; KAOUADJI; CHULIA, 2008)
		 <p><b>(58)</b> 4',5'-dimetoxicumarina-2''-isopropenil-2'',3''-dihidrofurano(4'',5'':8,7)cromona</p>	
		 <p><b>(59)</b> dihidrodeguelina</p>	
		 <p><b>(60)</b> (-)-dihidrorotenona</p>	

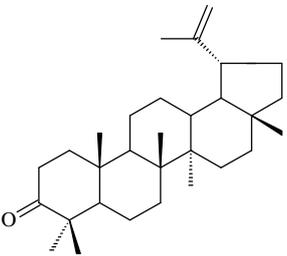
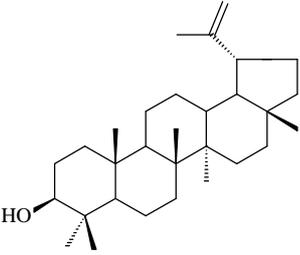
\**Lonchocarpus nicou* var. *languidos*, sinónimo de *Deguelia utilis*

**Quadro 4.** Rotenoides e derivados de *Deguelia utilis* (Continuação)

ESPÉCIE	PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>D. utilis</i> *	Raízes	 <p>(61) deguelina (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H)            (62) tefrosina (R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH)            (63) ácido 4'-hidroxi-rot-2'-enônico (R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H)            (64) 7'-hidroxitefrosina (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = OH)</p>	(LAWSON; KAOUADJI; CHULIA, 2010)
		 <p>(65) 7'-nor-6'-oxo-2',3'-dehidrorotenona (R = H)            (66) 7'-nor-6'-oxo-2',3'-dehidro-12aβ-hidróxirottenona (R = OH)</p>	
		 <p>(67) (6'<i>S</i>)-6',7'-epoxirottenona [R = H (6'<i>S</i>)]            (68) (6'<i>R</i>)-6',7'-epoxi-12aβ-hidróxirottenona (R = OH (6'<i>R</i>))</p>	

\**Lonchocarpus nicou* var. *languidos*, sinónimo de *Deguelia utilis*

**Quadro 5.** Triterpenos de *Derris amazonica*, sinonímia de *Deguelia amazonica*

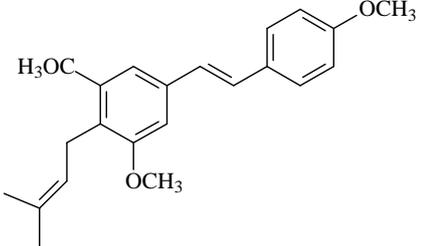
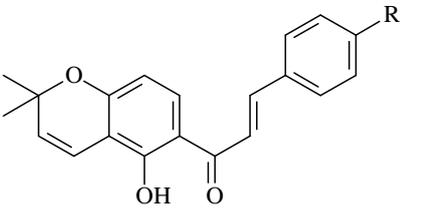
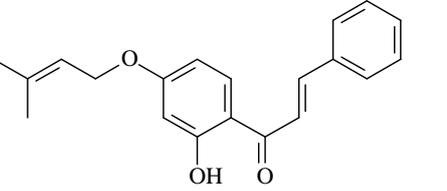
PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
Raízes	 <p data-bbox="639 725 807 763"><b>(69)</b> lupenona</p>	(BRAZ FILHO et al., 1975)
	 <p data-bbox="639 1122 767 1160"><b>(70)</b> lupeol</p>	

#### **1.4.1.1 *Deguelia duckeana***

A espécie *D. duckeana* A.M.G. Azevedo, conhecida como cipó-cururu ou timbó (TOZZI, 1989), é uma liana com ramos cilíndricos e lenhosos que ocorre em matas ou capoeiras densas.

De acordo com a literatura, verificaram-se apenas dois estudos de *Deguelia duckeana* sendo ambos do nosso grupo de pesquisa. Foram identificadas nessa espécie: estilbenos e chalconas (Quadro 6) (LIMA et al., 2012) e relatada a atividade antimicobacteriana dos extratos das folhas, galhos e raízes frente a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* com CIM > 200 µg/mL (CARRION et al., 2013).

**Quadro 6.** Estilbenos e chalconas de *Deguelia duckeana*

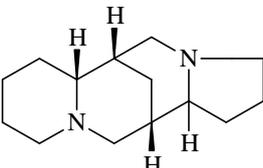
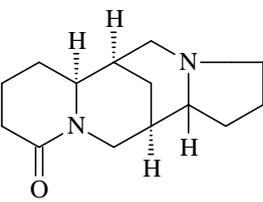
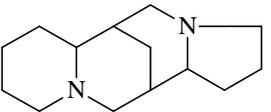
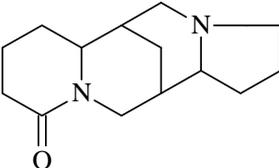
PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
	 <p>(71)-5-4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno</p>	
Galhos	 <p>(72) lonchocarpina (R = H)            (73) 4-hidroxilonchocarpina (R = OH)</p>	(LIMA et al., 2012)
	 <p>(74) derricidina</p>	

### 1.4.2 *Diploptropis*

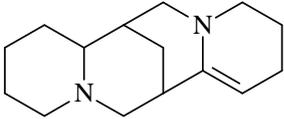
O gênero *Diploptropis*, pertencente à subfamília Papilionoideae, distribui-se em zonas tropicais e apresenta 39 espécies descritas no Tropicós (TROPICOS, 2015b).

Espécies de *Diploptropis* apresentam alcaloides (Quadro 7), derivado fenólico (Quadro 8), flavonoides (Quadro 9) e um triterpeno (Quadro 10).

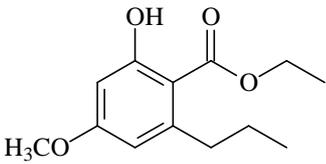
**Quadro 7.** Alcaloides quinolizidínicos de *Diploptropis martiusii*

PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
Sementes	 <b>(75)</b> 11-epileontidana	(KINGHORN; BALANDRIN; LIN, 1982)
	 <b>(76)</b> camoensidina	
	 <b>(77)</b> leontidana	
	 <b>(78)</b> tetrahidrorombifolina	

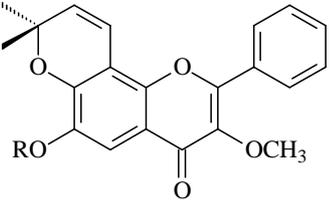
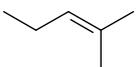
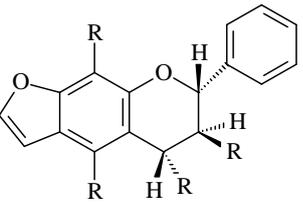
**Quadro 7.** Alcaloides quinolizidínicos de *Diploptropis martiusii* (Continuação)

PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
Sementes	 (79) 11,12-dihidrosparteina	(KINGHORN; BALANDRIN; LIN, 1982)

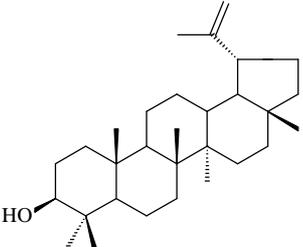
**Quadro 8.** Derivado fenólico de *Diploptropis ferruginea*

PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
Cascas do caule	 (80) 2-hidroxi-4-metoxi-6-propil-benzoato de etila	(ALMEIDA et al., 2003b)

**Quadro 9.** Flavonoides de *Diploptropis ferruginea*

PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
Cascas do caule	 <p>(81) diploflavona R = </p> <p>(82) 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetilcromeno-(7,8,2'',3'')-flavona (R = CH<sub>3</sub>)</p>	(ALMEIDA et al., 2005b)
Cascas do caule	 <p>(83) (2,3-<i>trans</i>-3,4-<i>trans</i>)-3,4,5,8-tetrametoxi-(6,7,2'',3'')-furanoflavana (R = OMe)</p>	(LIMA et al., 2005)

**Quadro 10.** Triterpeno de espécies de *Diploptropis ferruginea*

PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
Cascas do caule	 <p>(70) lupeol</p>	(ALMEIDA et al., 2003b)

#### 1.4.2.1 *Diplotropis purpurea*

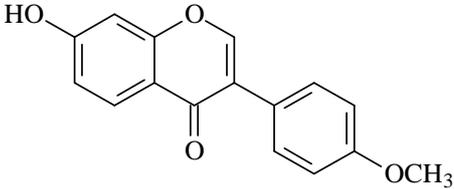
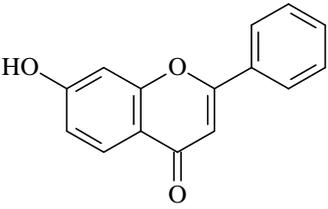
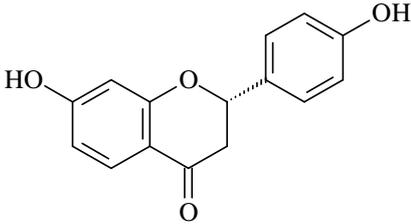
A espécie *D. purpurea* (Rich.) Amshoff. var *leptophylla* (Kleinh.) Amshoff é conhecida como fava, sucupira, sucupira-preta, sebipira entre outros (STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

No Brasil, é amplamente distribuída na Amazônia em habitat Campinarana (FERREIRA, 2003), mas também pode ser encontrada em Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela (TROPICOS, 2015c). Sua madeira possui resistência a certos fungos e são duráveis permitindo ser utilizada em construção de estruturas e de revestimentos (CARNEIRO et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2007). Seu uso terapêutico é conhecido por tratar impingem devido as suas sementes raladas terem efeito quando misturada com enxofre (STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

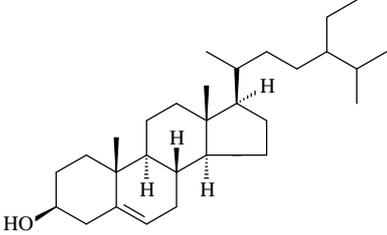
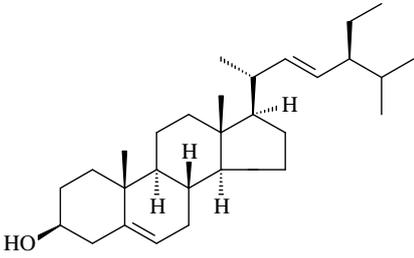
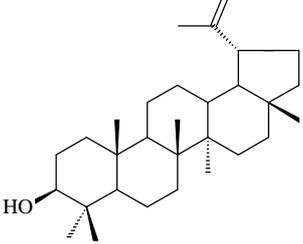
As sinónímias encontradas são: *Bowdichia brasiliensis* var. *belemnensis* Ducke, *Diplotropis leptophylla* Kleinhoonte e *Diplotropis purpurea* var. *belemnensis* (Ducke) Amshoff (TROPICOS, 2015d).

Desta espécie foram isolados das cascas do tronco: flavonoides (Quadro 11), esteroides e triterpeno (Quadro 12).

**Quadro 11.** Flavonoides de *Diplotropis purpurea*

PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
Troncos	 <p><b>(84)</b> formononetina</p>	(BRAZ FILHO et al., 1973)
	 <p><b>(85)</b> 7-hidroxi flavona</p>	
	 <p><b>(86)</b> liquiritigenina</p>	

Quadro 12. Esteroides e triterpeno de *Diploporis purpurea*

PARTE VEGETAL	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
	 <p data-bbox="579 680 767 712"><b>(87)</b> <math>\beta</math>-sitosterol</p>	
Troncos	 <p data-bbox="579 1068 799 1099"><b>(88)</b> stigmasterol</p>	(BRAZ FILHO et al., 1973)
	 <p data-bbox="579 1397 708 1429"><b>(70)</b> lupeol</p>	

## 2. Objetivos

### 2.1 Geral

Realizar o estudo fitoquímico e avaliar a atividade antibacteriana dos extratos da espécie de *Diplotropis purpurea* e purificar frações em mistura de *Deguelia duckeana* bem como realizar o potencial anticâncer das substâncias isoladas.

### 2.2 Específicos

- Purificar as substâncias dos extratos das folhas de *Diplotropis purpurea*;
- Purificar as substâncias das frações em mistura obtidas das raízes e galhos de *Deguelia duckeana*;
- Realizar ensaios de atividade antibacteriana dos extratos de *Diplotropis purpurea*;
- Realizar ensaios do potencial anticâncer das substâncias isoladas de *Deguelia duckeana*;
- Identificar ou elucidar a estrutura química das substâncias isoladas.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Materiais utilizados

Os extratos foram extraídos com banho de ultra-som (Unique, Brasil) e concentrados em evaporador rotativo (Fisatom, Brasil).

Para a Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) foram utilizadas cromatofolhas de SiO<sub>2</sub> com indicador fluorescência UV 254 (Marcherey-Nagel e Merck, Alemanha) e analisadas através do equipamento Camag. Este equipamento era composto por *Camag TLC autosampler ATS 4* (para aplicação da amostra), *Camag TLC Scanner* e *Camag TLC Scanner reprostar 3 photo documentation* (para o registro de imagens sob luz UV 254 nm e 365 nm). As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL.

A identificação dos flavonoides de *Deguelia duckeana* foi realizada por RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) e <sup>13</sup>C (100 MHz) da Bruker DRX disponível na Universidade de Freiburg.

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no equipamento *Thermo Q Exactive mass spectrometrer* com *Orbitrap-Analyzer* (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA). As análises foram obtidas via ionização por elétrons a 70 eV e fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI). Este equipamento foi utilizado no período do doutorado sanduíche na Universidade de Freiburg, Alemanha.

Outras amostras também foram analisadas por CLAE/EM no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus, Brasil. O espectrômetro de massas utilizado foi o *MicroTOF-QII* (Brucker Daltonics), fonte de ionização ESI em modo positivo, 17500 FWHM e o cromatógrafo utilizado foi o Prominence UFLC

(Shimadzu) com detector de arranjo de diodos (DAD) SPDM-20A operando na faixa 190 a 400 nm, injetor automático SIL-20A e coluna *Shim-pack XR-ODS* 2 µm x 50 µm).

A identificação das substâncias de *Diploptropis purpurea* foi realizada por RMN (Modelo Bruker Avance III) de <sup>1</sup>H (400 MHz) e <sup>13</sup>C (100 MHz) da Universidade Federal do Paraná.

Para a determinação do potencial anticâncer, foram utilizados os seguintes materiais: leitora para microplaca (Modelo 680, BIO-RAD), *Trans-Blot SD Semi-dry Tranfer Cell* (BIO-RAD) usado para a transferência da membrana; I-Block<sup>tm</sup> (Life Technologies) para a incubação da membrana; reagente quimioluminescente (ECL Plus, Lumigen PS-3, Munique, Alemanha) para a revelação do *blotting*.

Os equipamentos utilizados para a atividade antibacteriana foram: leitora para microplaca (modelo multiscan 60, Thermo) para obter a leitura em 600 nm e espectrofotômetro (Femto, Cirrus 80 ST) para medir a absorbância do inóculo.

### **3.1.1 Softwares utilizados**

Foram usados os *softwares*: ChemWindow 6.0 (BIO-RAD), ACD Labs 12.01, Hystar 3.2, OriginPro 8.0, WinCats (CAMAG), SkanIt 3.2, Scifinder, ISI web of knowledge, Science Direct e PubChem.

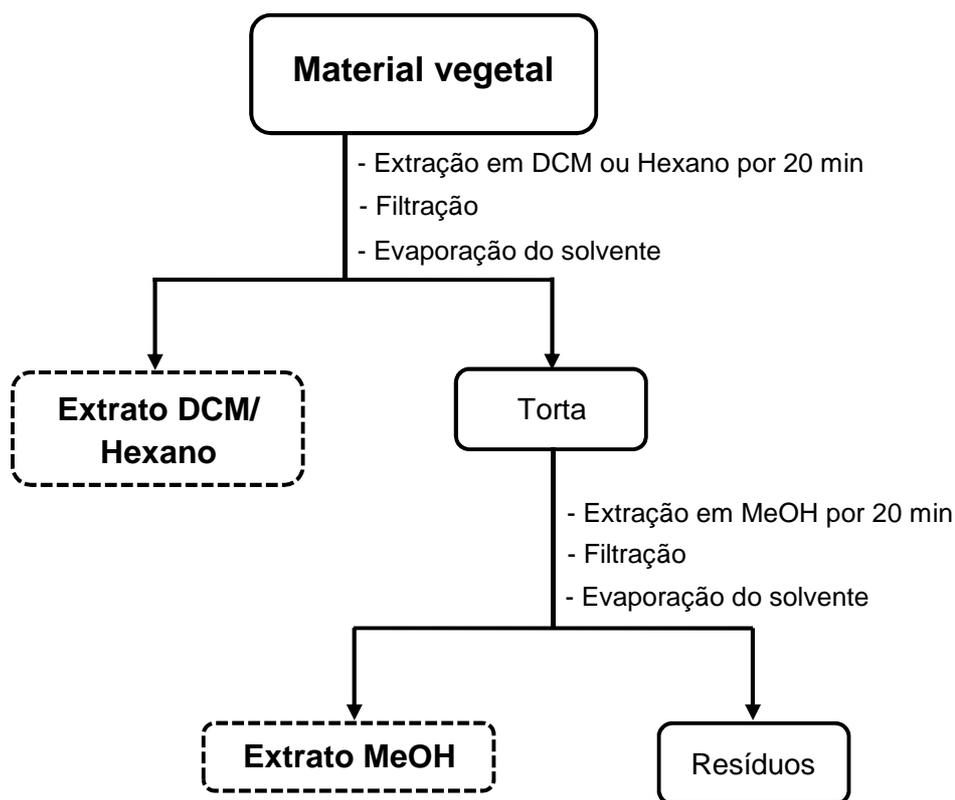
### **3.2 Coleta**

Folhas e galhos de *Diploptropis purpurea* foram coletados na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) no município de Presidente Figueiredo, AM em junho de 2012. A exsicata foi identificada pelo Prof. Dr. Valdely Kinupp e depositada no Herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (EAFM) sob o número 11230.

Raízes e galhos de *Deguelia duckeana* foram coletados na Praia Dourada, Manaus, AM. As raízes foram coletadas em abril de 2006 e os galhos em agosto de 2009 e identificadas pela MSc. Ieda Leão do Amaral. As duas exsicatas foram depositadas no EAFM sob os números 10606 e 10613, respectivamente.

### **3.3 Preparação dos extratos vegetais**

Os materiais vegetais foram secos à temperatura ambiente, moídos e extraídos com hexano ou diclorometano usando ultrassom por 20 min. Após, foram filtrados e extraídos novamente até a extração exaustiva do material vegetal. Os resíduos foram secos em temperatura ambiente e extraídos com metanol da mesma forma. Por fim, os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório (Figura 7). As massas e os rendimentos obtidos de cada extrato bruto estão mostrados na Tabela 1.



**Figura 7.** Fluxograma geral da preparação dos extratos

**Tabela 1.** Informações dos extratos obtidos de *Diploptropis purpurea*

Parte vegetal	Solvente extraído	Massa do material vegetal (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Folhas	Hexano	809,6	1,4	0,17
	Metanol	789,1	9,5	1,20
Galhos	Hexano	500,1	2,2	0,43
	Metanol	494,3	36,2	7,32

Vale ressaltar que o extrato diclorometânico das raízes e hexânico dos galhos de *Deguelia duckeana* foram obtidos previamente por outro projeto do mesmo grupo de pesquisa (LIMA, 2011).

### **3.4 Fracionamento**

Os extratos das folhas de *Diplotropis purpurea* foram fracionados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB), do INPA sob a orientação da Profa. Dra. Cecilia Nunez.

A purificação das frações obtidas das raízes e galhos de *Deguelia duckeana* foi realizada no Laboratório do grupo da Profa. Dra. Irmgard Merfort na Universidade de Freiburg, Alemanha.

#### **3.4.1 Fracionamento do extrato hexânico das folhas de *Diplotropis purpurea***

Visando purificar as substâncias presentes no extrato das folhas, foi realizado o fracionamento do extrato hexânico (1,05 g) de *D. purpurea* (Figura 8) em coluna aberta (43 x 2 cm) de sílica gel 60 (200-400 Mesh), usando gradiente de DCM em hexano, DCM 100%, AcOEt em DCM, AcOEt 100%, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sistema de eluição do fracionamento do extrato hexânico de *D. purpurea*

Frações coletadas	Sistema de eluição
0-1	Hex/DCM (95:5)
2-8	Hex/DCM (9:1)
9-11	Hex/DCM (8:2)
12-14	Hex/DCM (7:3)
15-18	Hex/DCM (6:4)
19-20	Hex/DCM (1:1)
21-22	DCM 100%
23-28	DCM/AcOEt (9:1)
29-30	DCM/AcOEt (8:2)
31-33	DCM/AcOEt (7:3)
34-36	DCM/AcOEt (1:1)
37-38	AcOEt 100%
39-40	AcOEt/MeOH (9:1)
41-42	AcOEt/MeOH (1:1)
43-44	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna cromatográfica foi de 100 a 200 mL e o volume das frações recolhidas variou de 20 a 70 mL. Foram obtidas 44 frações, as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Massas das frações reunidas do fracionamento de *D. purpurea*

Frações reunidas	Massa (mg)
0	98,2
1	135,3
2	19,0
3-6	15,5
7-14	135,0
15	7,5
16-20	65,8
21	3,6
22-24	180,0
25	138,6
26-34	178,7
35	4,9
36-40	20,5
41-44	15,7

A partir das frações reunidas da primeira coluna do extrato bruto foram escolhidas algumas para continuar o fracionamento, tais como a fração 1 (135,3 mg), 2 (19,0 mg), 7-14 (135,0 mg) e 22-24 (180,0 mg). Essas frações apresentaram indícios de terpenos por CCD quando reveladas com  $Ce(SO_4)_2$ , anisaldeído.

O processo de purificação da fração 1 (135,3 mg) foi realizado em coluna (27 x 1 cm) aberta de sílica gel (230-400 mesh) com um volume de 50 mL para cada sistema de eluição  $CHCl_3$  em hexano,  $CHCl_3$  100%, MeOH em  $CHCl_3$  até MeOH 100%(Tabela 4). Foram obtidas 64 frações e reunidas após CCD.

**Tabela 4.** Sistema de eluição do fracionamento da amostra 1 obtida do extrato hexânico de *D. purpurea*

Frações coletadas	Sistema de eluição
0-9	Hex 100%
10-14	Hex/ $CHCl_3$ (9:1)
15-19	Hex/ $CHCl_3$ (8:2)
20-24	Hex/ $CHCl_3$ (7:3)
25-29	Hex/ $CHCl_3$ (6:4)
30-34	Hex/ $CHCl_3$ (1:1)
35-39	$CHCl_3$ 100%
40-44	$CHCl_3$ /MeOH (9:1)
45-49	$CHCl_3$ /MeOH (8:2)
50-54	$CHCl_3$ /MeOH (6:4)
55-59	$CHCl_3$ /MeOH (1:1)
60-64	MeOH 100%

A fração 2 (19,0 mg) também submetida a um fracionamento, apresentou características químicas de substâncias aromáticas sob luz UV 254 nm. Esta foi fracionada em coluna de 8 cm de altura e 1,5 cm com sistema de eluição acetona em hexano, acetona 100%, MeOH em acetona até MeOH 100% (Tabela 5). O

volume das frações recolhidas foi entre 7 a 15 mL. Foram obtidas 46 frações que após análise por CCD foram reunidas.

**Tabela 5.** Sistema de eluição do fracionamento da amostra 2 obtida do extrato hexânico de *D. purpurea*

Frações coletadas	Sistema de eluição
0-4	Hex/Acetona (98:2)
5-9	Hex/ Acetona (95:5)
10-14	Hex/ Acetona (9:1)
15-19	Hex/ Acetona (8:2)
20-24	Hex/Acetona (7:3)
25-29	Hex/ Acetona (6:4)
30-34	Hex/ Acetona (1:1)
35-38	Acetona 100%
39-41	Acetona/MeOH (9:1)
42-44	Acetona/MeOH (7:3)
45-46	MeOH 100%

Outra fração submetida à cromatografia em coluna de SiO<sub>2</sub> (23,5 x 1 cm) foi a 7-14 (135,0 mg) visando isolar as substâncias que apresentaram fluorescência. Esse fracionamento resultou em 40 frações e o sistema de eluição foi acetona em hexano até acetona 100% (Tabela 6).

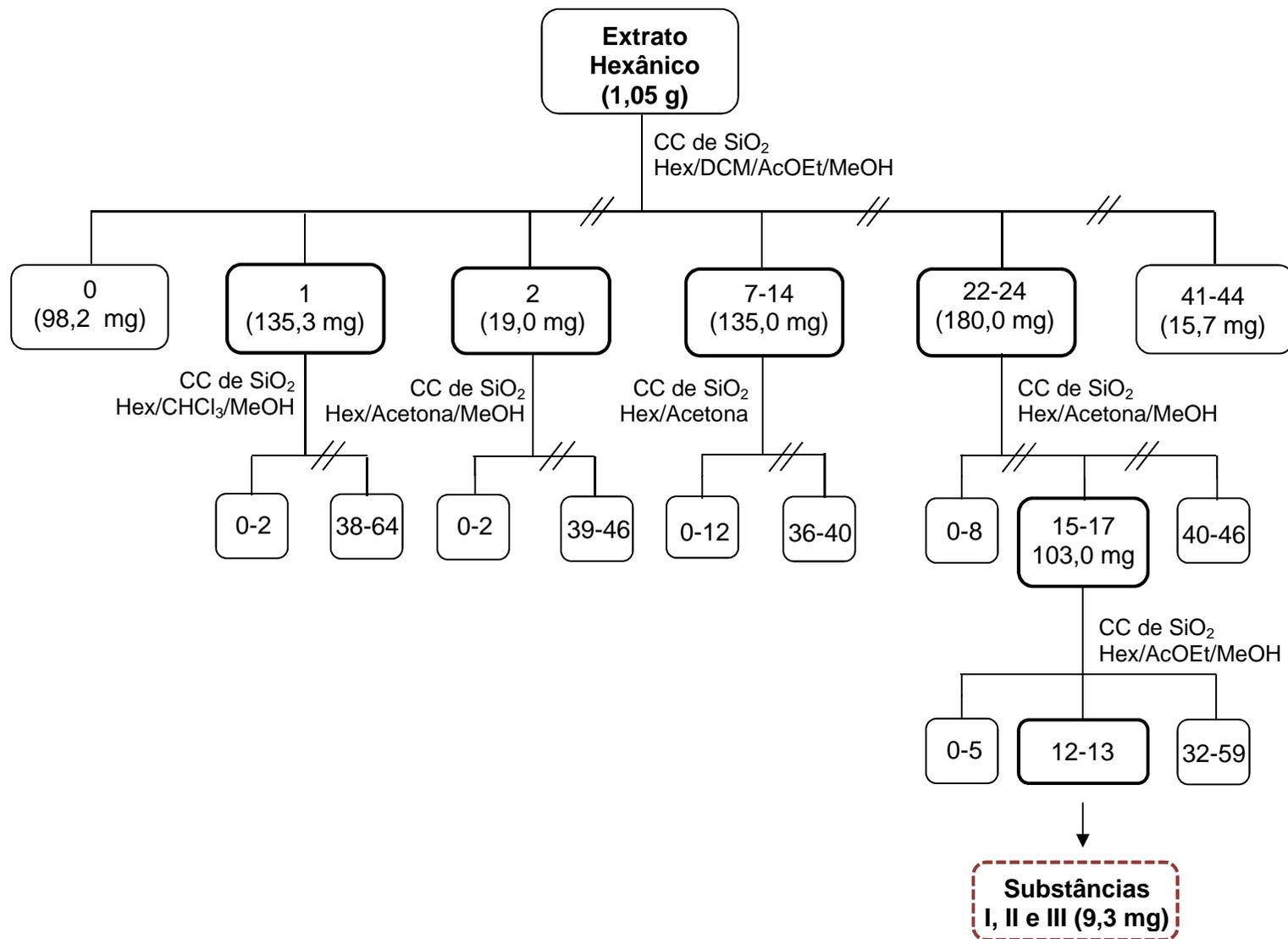
**Tabela 6.** Sistema de eluição do fracionamento da amostra 7-14 obtida do extrato hexânico de *D. purpurea*

Frações coletadas	Sistema de eluição
0-5	Hex 100%
6-12	Hex/ Acetona (9:1)
13-19	Hex/ Acetona (8:2)
20-26	Hex/ Acetona (7:3)
27-32	Hex/Acetona (6:4)
33-37	Hex/ Acetona (1:1)
38-40	Acetona 100%

Por fim, a fração 22-24 também resultante do primeiro fracionamento do extrato hexânico, foi submetida à separação em coluna aberta (32 x 1 cm) de SiO<sub>2</sub> utilizando o sistema de eluição acetona em hexano, acetona 100%, MeOH em acetona até MeOH 100% (Tabela 7). As 49 frações obtidas foram reunidas após análise por CCD, mas todas ainda apresentavam uma mistura de substâncias. Então, foi escolhida a fração 15-17, dentre estas, para continuar o fracionamento. A cromatografia em coluna (21 x 1 cm) aberta de SiO<sub>2</sub> resultou em 59 frações e dentre essas, a fração 12-13 (denominada de substâncias I, II e III), foi analisada por RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz). Os espectros foram obtidos na UFPR em colaboração com o Prof. Anderson Barison. Essa fração apresentou características de terpenos e cor vermelha ao revelar com Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. O fracionamento completo está mostrado na Figura 8.

**Tabela 7.** Sistema de eluição do fracionamento da amostra 22-24 obtida do extrato hexânico de *D. purpurea*

Frações coletadas	Sistema de eluição
0-4	Hex 100%
5-9	Hex/ Acetona (9:1)
10-14	Hex/ Acetona (9:1)
15-17	Hex/ Acetona (7:3)
18-21	Hex/ Acetona (6:4)
22-25	Hex/ Acetona (1:1)
26-29	Acetona 100%
30-33	Acetona/MeOH (9:1)
34-37	Acetona/MeOH (8:2)
38-41	Acetona/MeOH (7:3)
42-45	Acetona/MeOH (6:4)
46-47	Acetona/MeOH (1:1)
48-49	MeOH 100%



**Figura 8.** Fluxograma do extrato hexânico das folhas de *Diplotropis purpurea*

### 3.4.2 Fracionamento do extrato MeOH das folhas de *Diploptropis purpurea*

O extrato metanólico (4,0 g) das folhas de *Diploptropis purpurea* (Figura 9) foi, primeiramente, submetido a uma partição resultando em três fases: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (187,6 mg), AcOEt (650,0 mg) e MeOH/H<sub>2</sub>O (1,6 g). A fase CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (187,6 mg) foi submetida a cromatografia em coluna aberta (28 x 1,5 cm) de SiO<sub>2</sub> sob sistema de eluição (Tabela 8). Foram obtidas 33 frações e por ter observado em CCD que as frações apresentavam características de terpenos em mistura muito complexa com pouco rendimento, optou-se por dar início ao fracionamento da fase AcOEt.

**Tabela 8.** Sistema de eluição do fracionamento da fase CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> obtida do extrato metanólico das folhas de *D. purpurea*

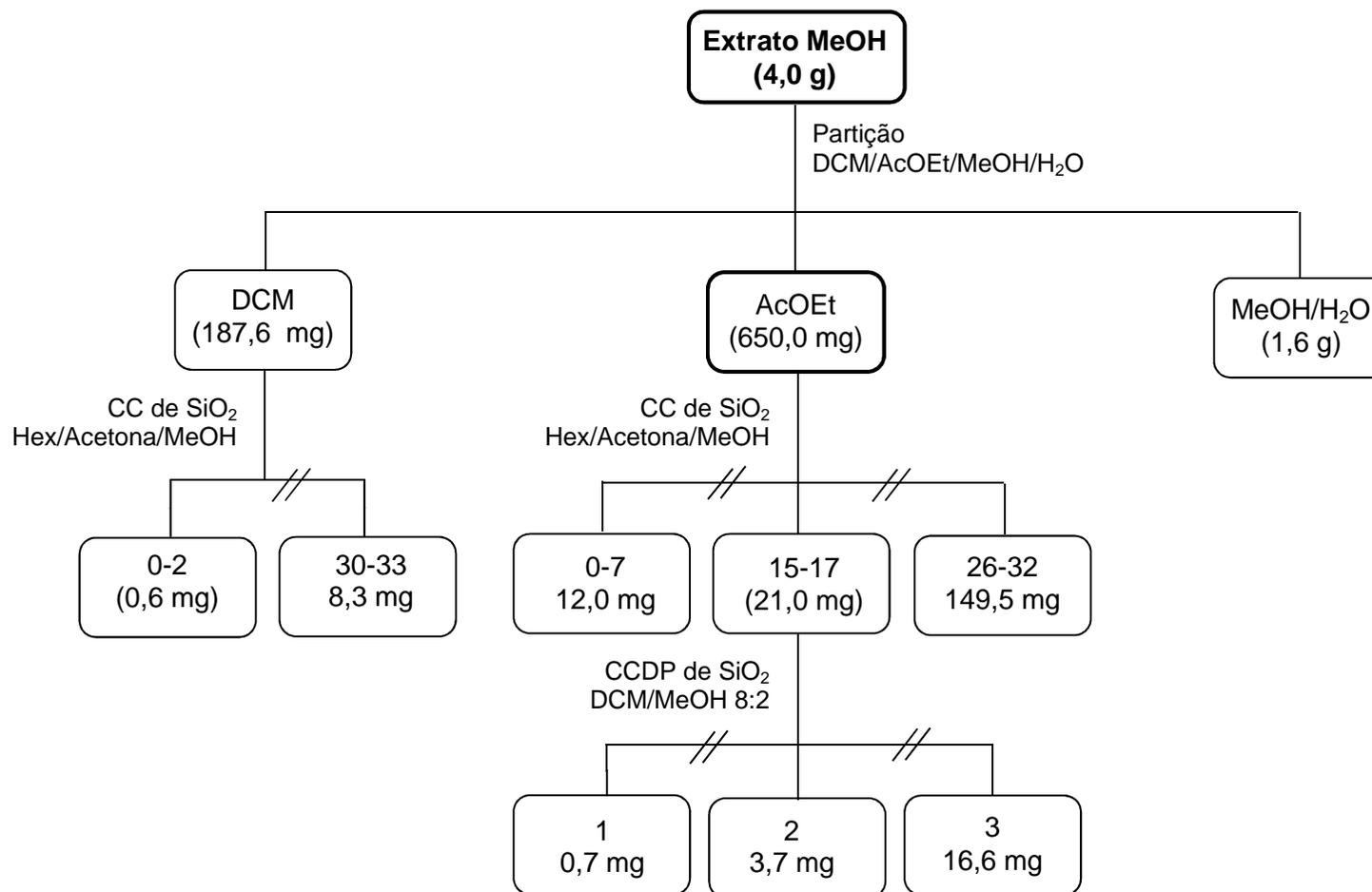
Frações coletadas	Sistema de eluição
1-7	Hexano/ Acetona 8:2
8-13	Hexano/ Acetona 7:3
14-15	Hexano/ Acetona 6:4
16-17	Hexano/ Acetona 1:1
18-19	Acetona 100%
20-21	Acetona/MeOH 8:2
22-25	Acetona/MeOH 7:3
26-29	Acetona/MeOH 6:4
30-33	MeOH 100%

O fracionamento da fase AcOEt (650,0 mg) foi iniciado por cromatografia em coluna aberta (22 x 1,5 cm) de Florisil com sistema de eluição gradiente AcOEt em DCM, AcOEt 100%, MeOH em AcOEt e MeOH 100% (Tabela 9).

**Tabela 9.** Sistema de eluição do fracionamento da fase AcOEt obtida do extrato metanólico das folhas de *D. purpurea*

<b>Frações coletadas</b>	<b>Sistema de eluição</b>
0-2	DCM 100%
3-5	DCM/AcOEt 9:1
6-8	DCM/AcOEt 8:2
9-10	DCM/AcOEt 6:4
11-12	DCM/AcOEt 1:1
13-15	AcOEt 100%
16-17	AcOEt/MeOH 9:1
18-20	AcOEt/MeOH 8:2
21-22	AcOEt/MeOH 7:3
23-27	AcOEt/MeOH 6:4
28-30	AcOEt/MeOH 1:1
31-32	MeOH 100%

A maioria dessas frações apresentou coloração avermelhada ao revelar com anisaldeído sulfúrico por CCD e fluorescência sob luz UV 365, indicando a presença de flavonoides. Com isso, a fração 15-17 (21,0 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) com sistema de eluição DCM/MeOH 8:2. Pela complexidade da mistura dessas substâncias não foi possível continuar o fracionamento (Figura 9).

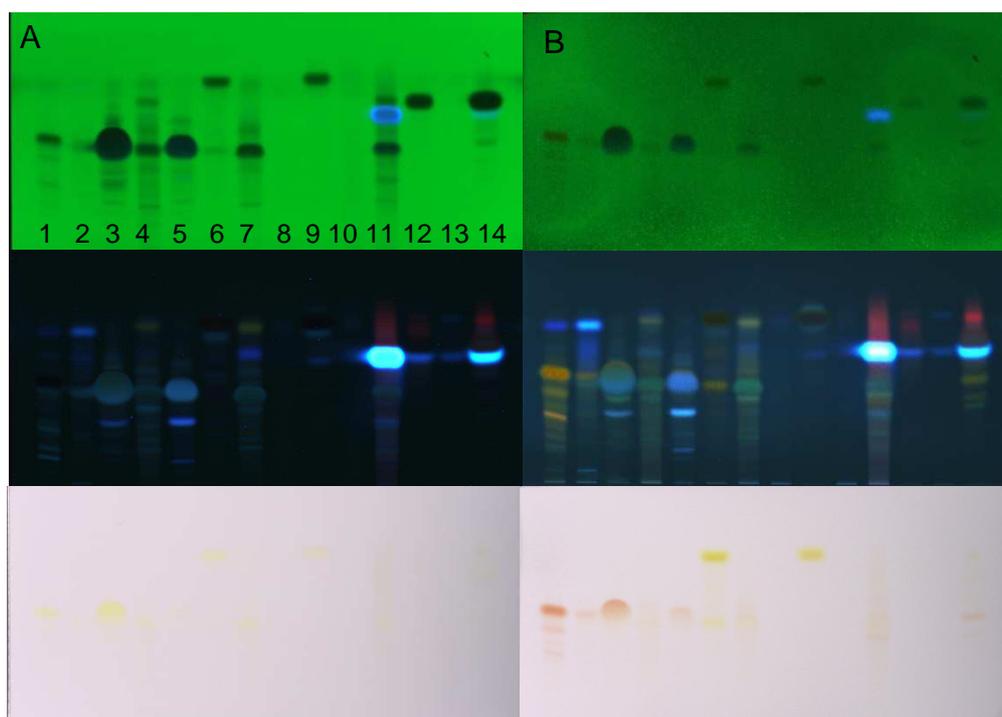


**Figura 9.** Fluxograma do extrato metanólico das folhas de *Diplotropis purpurea*

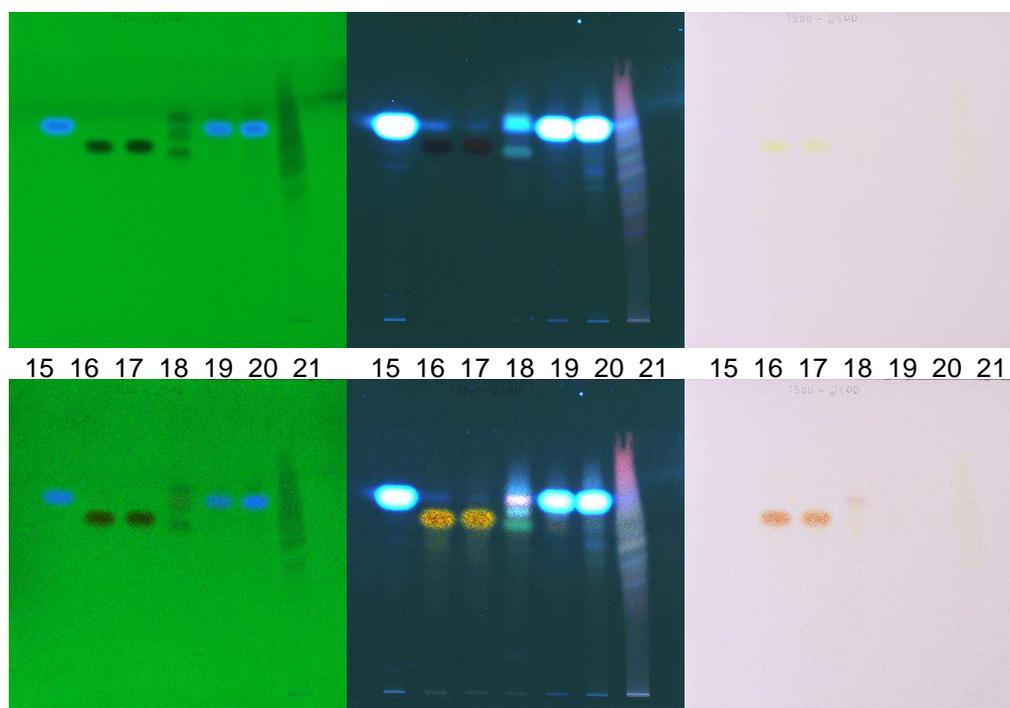
### 3.4.3 Fracionamento do extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> das raízes de *Deguelia duckeana*

Sabendo que esta espécie é rica em flavonoides, pois alguns foram previamente identificados no extrato diclorometânico (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (LIMA, 2011), nesta tese foi dada continuidade ao processo de purificação das frações.

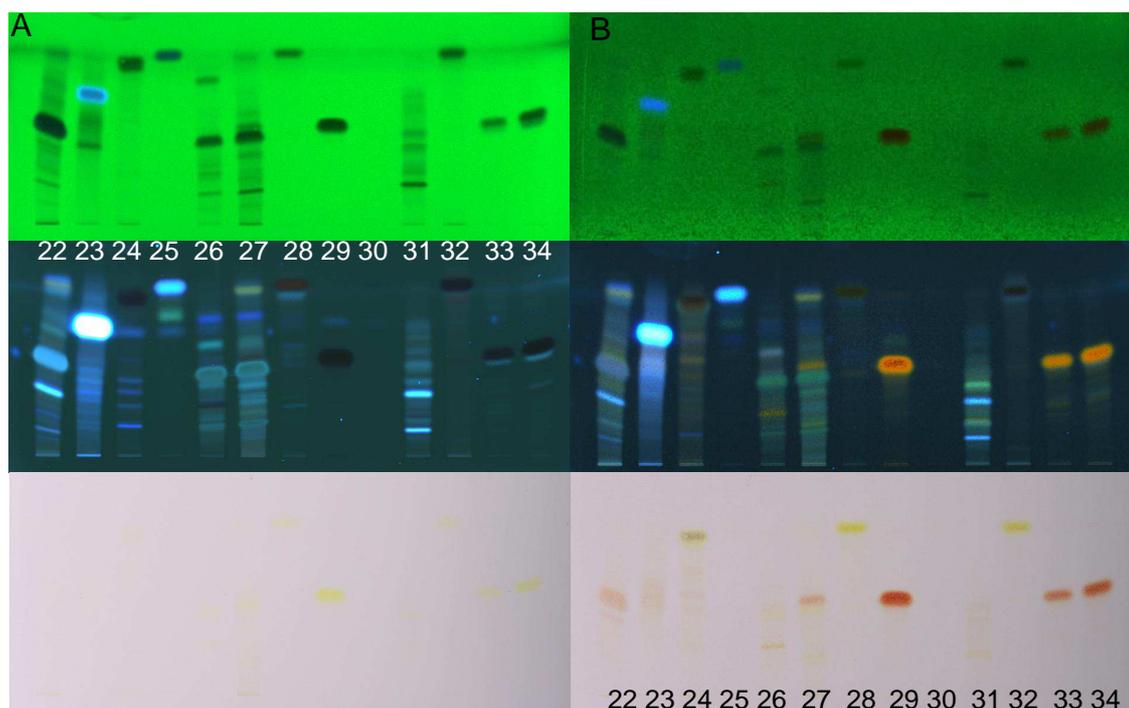
Foram selecionadas 48 frações (Figuras 10 a 13), obtidas de diversos fracionamentos (LIMA, 2011) e analisadas por CCD utilizando o revelador *Natural product* – polietileno glicol (NP-PEG) que consiste em difenilboriloxietilamina em 1% de MeOH e polietilenoglicol em 5% de MeOH. Esse revelador indica a presença de flavonoides após aquecimento em torno de 90 °C. Para a escolha do sistema de eluição, foram testados diversos sistemas de eluição e apenas um apresentou melhor resolução para os flavonoides, sendo o sistema CHCl<sub>3</sub>/MeOH 75:5. Foram realizados dois registros, um antes e outro depois de borrifar os reveladores.



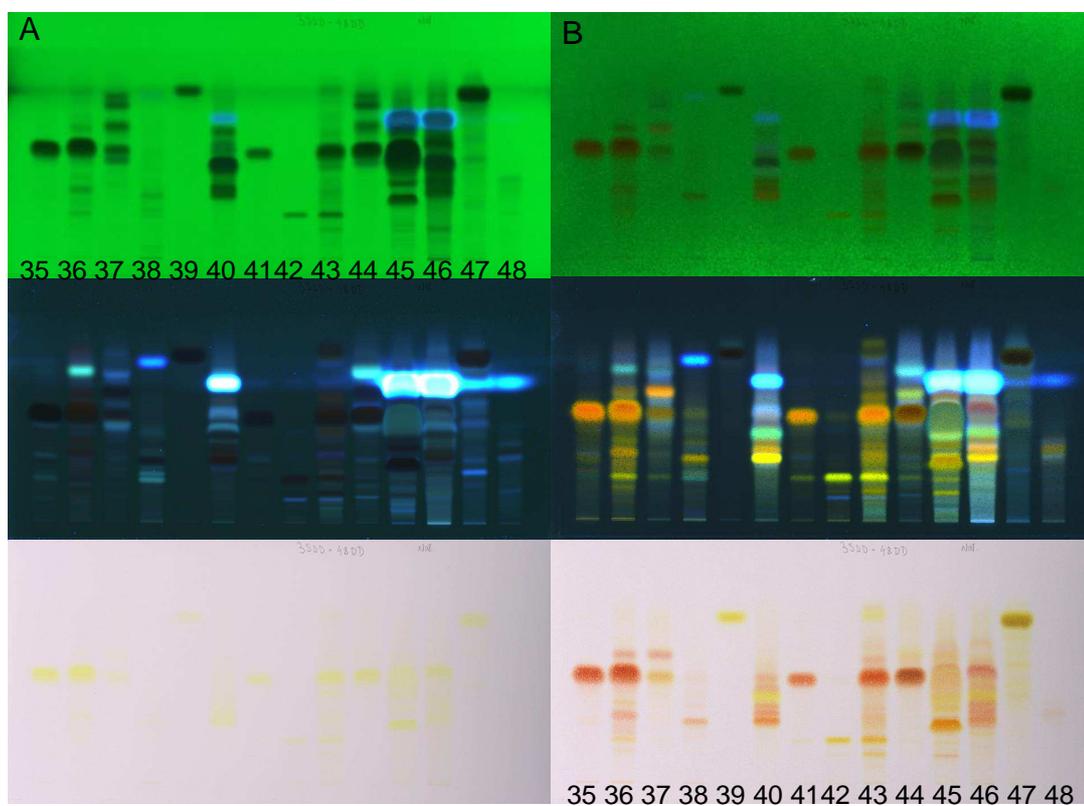
**Figura 10.** CCD das frações 1 a 14, sendo A: antes de borrifar sob luz UV 254, UV 365 e visível; B: após borrifar com NP-PEG. Sistema de eluição:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  75:5



**Figura 11.** CCD das frações 15 a 21, sendo A: antes de borrifar sob luz UV 254, UV 365 e visível; B: após borrifar com NP-PEG. Sistema de eluição:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  75:5



**Figura 12.** CCD das frações 22 a 34, sendo A: antes de borrifar sob luz UV 254, UV 365 e visível; B: após borrifar com NP-PEG. Sistema de eluição:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  75:5



**Figura 13.** CCD das frações 35 a 48, sendo A: antes de borrifar sob luz UV 254, UV 365 e visível; B: após borrifar com NP-PEG. Sistema de eluição:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  75:5

Após análise de todas as frações por CCD mostradas anteriormente (Figuras 10 a 13), foram escolhidas para serem fracionadas as amostras que apresentaram massa acima de 30 mg, pois o objetivo era ter massa suficiente para, posterior realização de ensaios biológicos. As amostras que revelaram colorações entre vermelho, rosa, laranja e amarelo, após borrifar com NP-PEG, também foram escolhidas para serem fracionadas.

A primeira fração a ser fracionada foi a fração 6 (a qual pode ser visualizada na Figura 12 sob o número 25), obtida do fracionamento do extrato diclorometânico, cujo principal constituinte havia sido identificado como 3,5,4'-trimetóxi-4-prenilestilbeno (133 mg) no projeto anterior (LIMA, 2011), mas precisava ser purificada. Portanto, o fracionamento foi iniciado com uma coluna aberta de sílica gel 60 (70 – 230 Mesh, 26 x 1 cm, 20 g) e com sistema de eluição  $\text{CHCl}_3$  100% e  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  75:5 obtendo um total de 60 frações. Após análise dessas frações por CCD, a reunião da fração 2 a 8 resultou na identificação da substância **IV** (2,7 mg) (Figura 14).

Dentre as 42 frações obtidas da primeira coluna cromatográfica do extrato diclorometânico, a fração 8 (30,2 mg) (a qual pode ser visualizada na Figura 13 sob o número 47) foi escolhida para continuar a purificação por apresentar fluorescência sob luz UV 254 nm e uma coloração de coloração amarela escura com NP-PEG. Com isso, esta fração foi submetida à cromatografia em coluna aberta de sílica gel 60 (70-230 MESH, 20 x 1 cm) com sistema de eluição  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  78:2, 75:5 e MeOH 100%. A fração 6-13 (codificada de 47DD 6-13) mostrou melhor resolução por CCD e foi identificada como uma mistura (**V e VI**) (8,4 mg) (Figura 15). Não foi possível continuar o fracionamento devido a pouca quantidade de massa.

Outras frações escolhidas a partir deste estudo previamente iniciado do extrato DCM das raízes foram: 19, 27 e 39 (as quais podem ser visualizadas na Figura 11 sob os números 18, 19 e 20) por apresentarem boa resolução por CCD e características de flavonoides pela fluorescência sob luz UV 365 nm. Dentre estas, as frações 27 (codificada 19DD) e 39 (codificada 20DD) apresentaram manchas majoritárias o que favoreceu a enviar diretamente ao RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  resultando, respectivamente, na identificação das substâncias **VII** (15,0 mg), **VIII** e **IX** (35,0 mg) (Figura 14). Já a fração 19 (codificada 18DD) foi fracionada como mostrado a seguir.

O fracionamento da amostra 19 (31,0 mg) foi, primeiramente, dividida em duas partes: uma parte foi recristalizada utilizando MeOH resultando em cristais (1,0 mg) e denominou-se de substância **X** (codificada 18DD-A) (Figura 14). Outra parte da fração 19 (30,0 mg) foi fracionada usando Sephadex LH-20 (10,5 x 2 cm) com MeOH, rendendo 40 frações. A fração 3-5 (10,0 mg) foi escolhida para continuar o fracionamento, pois apresentou apenas 3 manchas. Assim, a mesma foi fracionada em Sephadex LH-20 (10,5 x 2 cm) obtendo 46 frações. Dentre estas, a reunião da fração 18 a 24 (6,5 mg) mostrou uma mancha escura no UV 254 nm e colorações amarela e cinza após revelar com anisaldeído sulfúrico. Posteriormente, foi realizada uma cromatografia em camada delgada preparativa de  $\text{SiO}_2$  utilizando o sistema de eluição  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  75:5. A fração 1 foi submetida ao processo de separação por cromatografia em coluna aberta de Sephadex LH-20 (12,5 x 0,5 cm). Logo, as frações reunidas de 2 a 5 (codificada 18DD1PC), foram identificadas por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  como uma mistura das substâncias **XI** e **XII** (1,6 mg) (Figura 14).

As substâncias **V**, **VI**, **VII**, **VIII**, **IX**, **XI** e **XII** foram analisadas por CLAE/EM e solubilizadas em ACN/MeOH 75:25 com concentração de 0,5 mg/mL e fluxo de 0,4

mL/min. O sistema de gradiente foi baseado na porcentagem do solvente da bomba B (Tabela 10). Na bomba A utilizou-se H<sub>2</sub>O acidificada (0,1% ácido fórmico). Os espectros de massas foram obtidos em fonte de ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo.

**Tabela 10.** Condição de gradiente utilizada nas análises por CLAE/EM

<b>Tempo (min)</b>	<b>Bomba B (%) de ACN</b>
0 - 11	20
11 - 12	100
12 - 15	20

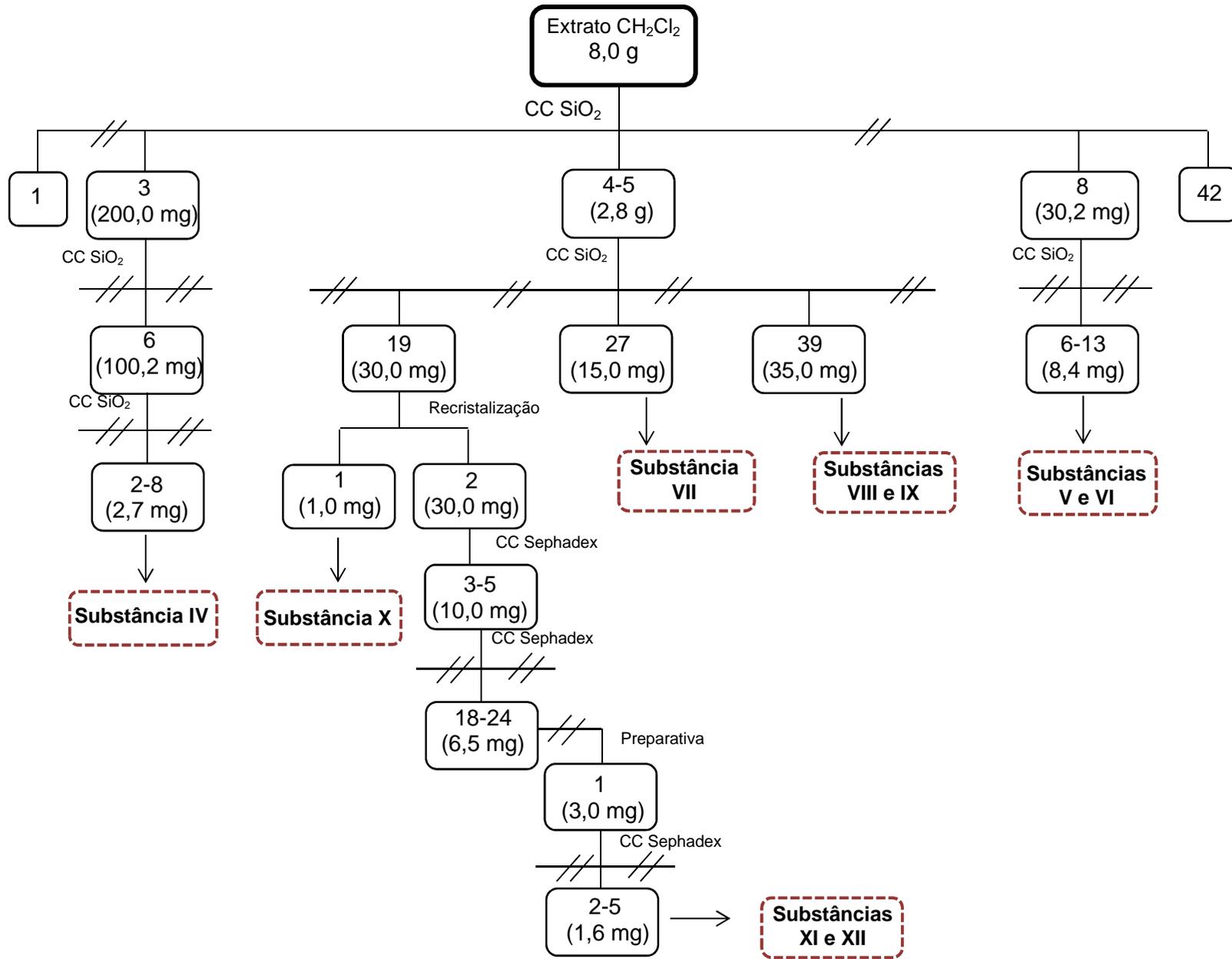
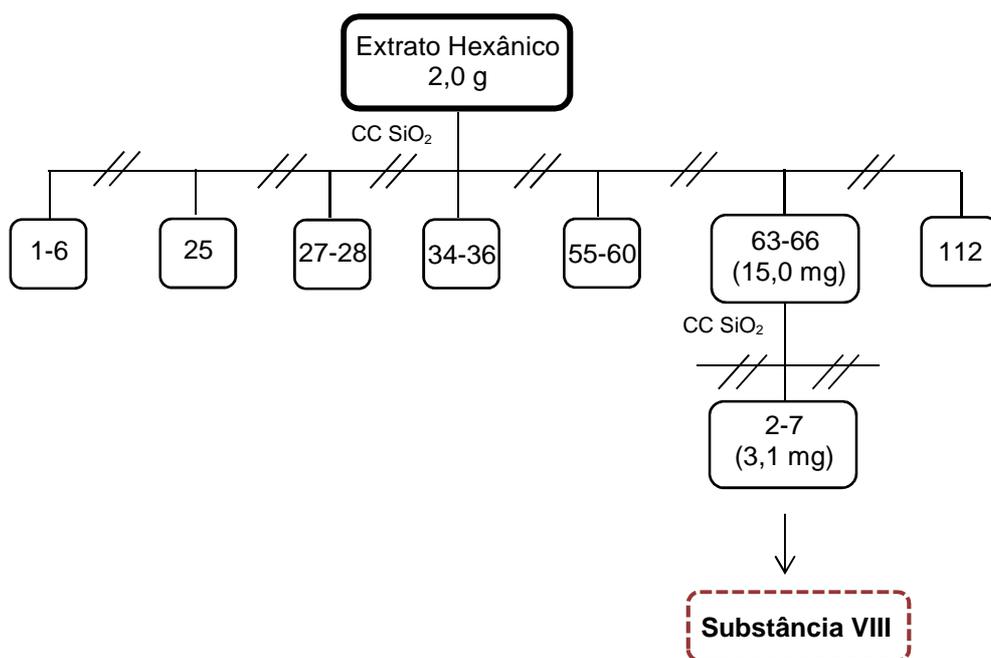


Figura 14. Fluxograma do fracionamento do extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> das raízes de *Deguelia duckeana*

#### 3.4.4 Fracionamento do extrato hexânico dos galhos de *Deguelia duckeana*

O extrato hexânico dos galhos (2,0 g) também teve seu fracionamento iniciado no projeto anterior (LIMA, 2011). Dentre as frações obtidas desse fracionamento, foi escolhida a fração 63 a 66 (15,0 mg) (Figura 15) por mostrar-se interessante quimicamente por CCD com a possível presença de flavonoides após revelação com NP-PEG. Com isso, essa fração foi submetida ao processo de separação por cromatografia em coluna aberta de SiO<sub>2</sub> (20 x 0,5 cm) com sistema de eluição: CHCl<sub>3</sub>/MeOH (78:2/75:5/MeOH 100%). Foram obtidas 78 frações e a reunião de 2 à 7 (codificada 46DD 2-7B), foi identificada como substância **VIII** (3,1 mg), isolada também das raízes de *Deguelia duckeana* (item 3.4.3).



**Figura 15.** Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico dos galhos de *Deguelia duckeana*

### **3.5 Potencial anticâncer**

As substâncias isoladas de *Deguelia duckeana* foram incubadas em células neurais para determinar a citotoxicidade através da detecção da enzima lactato desidrogenase (LDH) e também para determinar o mecanismo de indução de apoptose, através da inibição de proteínas específicas (fator de alongamento-2, AMP quinase e caspase-3).

As análises foram supervisionadas pelo Dr. Matjaz Humar e realizadas no Laboratório da Profa. Dra. Irmgard Merfort da Universidade de Freiburg, Alemanha.

#### **3.5.1 Linhagem tumoral e cultivo celular**

A linhagem de neuroblastoma testada, ATCC HTB-11, foi cultivada em meio EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*, Manassas, USA) com suplemento de 10% FBS (soro fetal bovino) e de 1 mL de PS (*Penicillium* e *Streptomyces*). Para a contagem das células foi utilizada a solução de Tripsina (0,25 % EDTA, GILBO).

A análise iniciou pela adição do meio de cultura contendo células tumorais (SK-N-SH,  $5 \times 10^4$  por poço) em uma placa de 96 poços e, em seguida, a placa foi transferida para a incubadora contendo 5% de CO<sub>2</sub> com temperatura de 37 °C por 48 horas. Após, o meio foi removido e foram adicionados 100 µL do meio novo. Após 24 h, as substâncias foram adicionadas. O controle negativo das células consistiu em 0,1 % de DMSO.

### 3.5.2 Teste de citotoxicidade

As análises de citotoxicidade foram realizadas utilizando o teste da lactato desidrogenase (LDH), enzima responsável por detectar possíveis danos na membrana celular. A liberação da mesma ao ambiente extracelular favorece a redução de  $\text{NAD}^+$  a NADH e essa redução é detectada pela absorvância medida em 490 nm na leitora de microplacas.

A análise foi realizada com base no kit Roche (KIT ROCHE APPLIED SCIENCE, 2011) que possui duas etapas: a primeira etapa ocorre com a reação de redução de  $\text{NAD}^+$  a NADH através da enzima LDH que converte piruvato a lactato; na segunda etapa, através de 2H o tetrazólio de cor amarela pálida é transformado no sal de coloração vermelha. Essas etapas consistiram em remover o sobrenadante celular contendo a lactato desidrogenase liberada das células SK-N-SH. Após, foi adicionada a solução Triton-X (2%) e as células foram transferidas para uma nova microplaca e submetidas ao processo de centrifugação. A leitura foi realizada com absorvância de 490 nm.

As substâncias isoladas foram testadas em uma concentração de 50  $\mu\text{M}$  por 24 h e as que mostraram citotoxicidade foram analisadas em concentrações mais baixas (0,1 a 50  $\mu\text{M}$ ). A liberação total de LDH, a qual está relacionada com a necrose celular, foi definida através da média de LDH liberada pelas células intactas.

### 3.5.2.1 Análise estatística

Para a análise estatística dos experimentos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) *one way* e *two way* (Software: GraphPad Prisma 5.0) apresentando significância quando  $p < 0,05$ .

### 3.5.3 Mecanismo de indução de apoptose

A análise visando encontrar a proteína específica, capaz de atuar no mecanismo causando a morte celular por apoptose, foi determinada pela metodologia conhecida como *Western blotting*. Após a incubação das substâncias, foi realizado o procedimento de rompimento das células através de uma solução tampão (Tris-HCl, pH = 6,8, glicerol, 1,4-ditiotreitol (DTT), SDS Ultra puro, azul de bromofenol) pela adição de 30  $\mu$ L. Essa placa foi submetida ao banho ultrassom por 5 minutos, e cada solução foi transferida para microtubos sob aquecimento (94 °C) e submetida ao processo de centrifugação. Depois as amostras foram adicionadas no gel de poliacrilamida para serem separadas por eletroforese (SDS-PAGE). Após, foi realizada a transferência da proteína para a membrana [fluoreto de polivinilideno (PVDF) Immobilion]. Essa membrana foi incubada com solução de 0,2 % de I-Block<sup>tm</sup> e com solução tampão (5 M de NaCl, 1 M de Tris pH 7,5 a 10% tween 20). Após, foram adicionados os anticorpos a fim de detectar as proteínas específicas: fator de alongamento-2 fosforilado (treonina 56) (95 KDa), fator de alongamento-2 (total), caspase -3, AMPK fosforilada (62 kDa) e alfa-tubulina (52 KDa). O primeiro anticorpo foi incubado por 24 h a 4 °C. No dia seguinte, o mesmo foi removido para a adição da solução de TBST e logo foi aplicado o segundo anticorpo (anti-coelho,

IgGs) por 30 minutos. E, por fim foi adicionado o reagente quimioluminescente (GE, Healthcare) para realizar o *blotting* que consiste em revelar o filme correspondente a membrana que contém a proteína específica.

### **3.6 Atividade antibacteriana**

Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB), do INPA sob a orientação da Profa. Dra. Cecilia Nunez.

Os extratos de *Diplotropis purpurea* foram testados para determinar a atividade antibacteriana. As cepas utilizadas foram: *Bacillus cereus* (ATCC 6051), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 13883), *Providencia rettgeri* (ATCC 29944), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e *Serratia marcescens* (ATCC 13880).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em meio líquido através da técnica de microdiluição (CLSI, 2002). Foram realizadas diluições sucessivas dos extratos em concentrações de 1000 a 15,6 µg/mL em tubos de ensaio, e em seguida, 95 µL de cada diluição foram transferidos para cada poço da placa de 96 poços. Após, foi realizada a inoculação do micro-organismo-teste (5 µL), preparado na concentração de 0,5 da escala de McFarland ( $1$  a  $2 \times 10^8$  UFC/mL) e medido no espectrofotômetro com absorvância de 0,100. As placas foram, primeiramente, analisadas na leitora de microplaca para obter a 1ª leitura e em seguida, foram incubadas em temperatura de 18 a 24 horas, de acordo com a necessidade de cada micro-organismo. Após esse período foi realizada a segunda leitura na leitora de microplacas para poder verificar se a coloração do extrato

influenciou na inibição da bactéria e também para poder determinar a porcentagem de atividade antibacteriana do extrato.

Também foi realizado o método colorimétrico, onde foi inoculado 40 µL de revelador (cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio) preparado em uma concentração de 2 mg/mL. Em seguida, as placas foram incubadas novamente por 30 minutos. Onde houve crescimento bacteriano, significou que o extrato não foi ativo revelando coloração vermelha e onde não revelou coloração significou que não houve crescimento bacteriano indicando a atividade do extrato. A CIM é considerada a menor concentração do extrato ou substância onde não apresentou crescimento bacteriano. O teste foi realizado em triplicata.

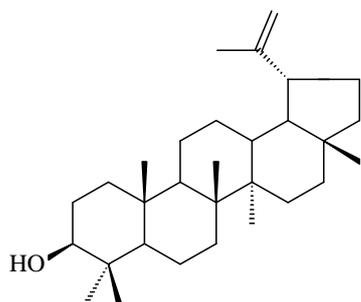
Foram realizados três controles, sendo o controle negativo (DMSO), controle positivo (oxitetraciclina a 125 µg/mL) e o controle de esterilidade do caldo (contendo apenas o caldo).

### **3.6.1 Análise estatística**

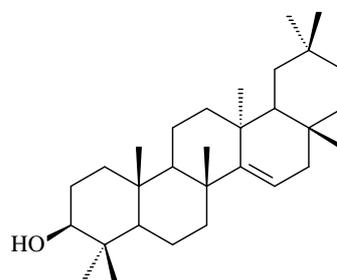
Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) *one way* (Software: Origin 8,0) para obter os valores de desvio padrão das amostras em triplicata. Os valores com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

#### 4. Resultados e Discussão

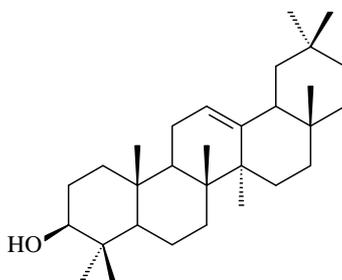
Após análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foram identificados três triterpenos do extrato hexânico das folhas de *Diploptropis purpurea* (Figura 16) e nove substâncias das raízes de *Deguelia duckeana* (Figura 17).



lupeol (I)

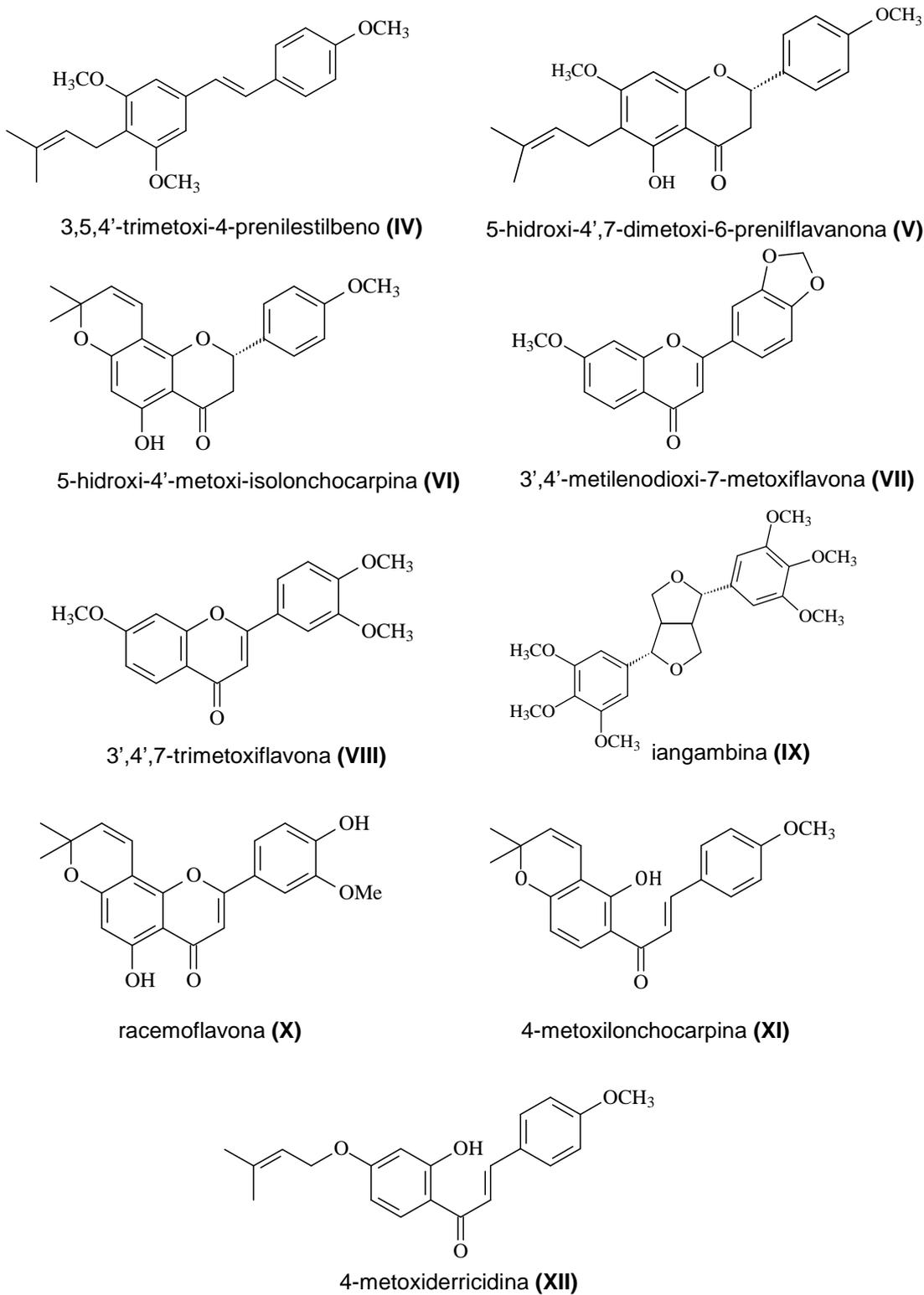


taraxerol (II)



$\beta$ -amirina (III)

**Figura 16.** Substâncias identificadas da fração 12-13 obtida do extrato hexânico das folhas de *Diploptropis purpurea*



**Figura 17.** Substâncias identificadas nas raízes de *Deguelia duckeana*

## 4.1 Identificação das substâncias obtidas das folhas de *Diplotropis purpurea*

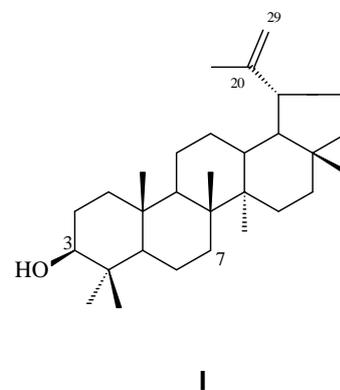
### 4.1.1 Identificação das substâncias I, II e III

As frações reunidas de 12 a 13 obtidas do extrato hexânico das folhas de *Diplotropis purpurea* apresentaram colorações avermelhadas quando reveladas com  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ . Quando analisada por RMN de  $^1\text{H}$  mostrou a presença de sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  0,7 e 1,14 ppm indicando a presença de metilas de triterpenos. Sinais de hidrogênios desprotegidos em  $\delta_{\text{H}}$  4,50 (*dd*,  $J = 2,4$  e  $1,4$  Hz) e 4,62 (*d*,  $J = 2,4$  Hz) indicaram se tratar dos dois hidrogênios do C-29 do triterpeno lupeol (CURSINO et al., 2012) (Figuras 18 a 20) confirmados pelo mapa de contorno de HSQC com as correlações entre  $\delta_{\text{C}}$  109,1 e  $\delta_{\text{H}}$  4,50 e também entre  $\delta_{\text{C}}$  109,1 e  $\delta_{\text{H}}$  4,62. Outro hidrogênio desprotegido foi observado em 5,12 (*t*,  $J = 4,0$  Hz) pertencente ao C-12 do triterpeno  $\beta$ -amirina também confirmado pelo mapa de contorno de HSQC com acoplamento entre  $\delta_{\text{C}}$  121,6 e  $\delta_{\text{H}}$  5,12 (Figura 24) e com dados da literatura (VÁZQUEZ; PALAZON; NAVARRO-OCAÑA, 2012).

Após análise dos sinais de hidrogênios, partiu-se para a análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 22 e 23) que apresentou 6 sinais característicos de três triterpenos. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  150,1 e 109,1 confirmaram a presença do lupeol,  $\delta_{\text{C}}$  158,0 e 116,7 sugeriram a estrutura do taraxerol e os sinais  $\delta_{\text{C}}$  145,0 e 121,6 indicaram a presença da  $\beta$ -amirina confirmados pelo mapa de contorno HSQC (Figura 21). Os tipos de carbonos foram confirmados pelo espectro de RMN de  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (Figura 24). Os dados dos três triterpenos lupeol (I), taraxerol (II) e  $\beta$ -amirina (III) identificados apresentando boa correlação com a literatura (MAHATO; KUNDU, 1994) (Tabelas 11, 12 e 13).

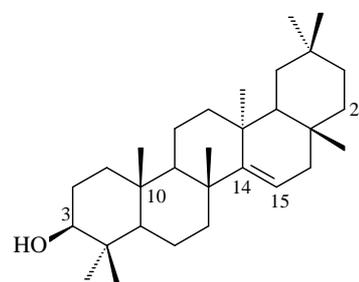
**Tabela 11.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da substância I (lupeol)

Posição	$\delta_{\text{C}}$ Observado	$\delta_{\text{C}}$ (MAHATO; KUNDU, 1994)	Carbono
1	38,6	38,7	$\text{CH}_2$
2	27,0	27,4	$\text{CH}_2$
3	78,7	78,9	CH
4	38,5	38,8	C
5	55,2	55,3	CH
6	18,2	18,3	$\text{CH}_2$
7	34,1	34,2	$\text{CH}_2$
8	41,6	40,8	C
9	50,3	50,4	CH
10	37,0	37,1	C
11	20,2	20,9	$\text{CH}_2$
12	25,6	25,1	$\text{CH}_2$
13	37,9	38,0	CH
14	42,7	42,8	C
15	27,3	27,4	$\text{CH}_2$
16	35,4	35,5	$\text{CH}_2$
17	42,8	43,0	C
18	48,6	48,2	CH
19	48,2	47,9	CH
20	150,1	150,9	C
21	29,7	29,8	$\text{CH}_2$
22	40,7	40,0	$\text{CH}_2$
23	28,2	28,0	$\text{CH}_3$
24	15,9	15,4	$\text{CH}_3$
25	16,6	16,1	$\text{CH}_3$
26	15,8	15,9	$\text{CH}_3$
27	14,4	14,5	$\text{CH}_3$
28	17,8	18,0	$\text{CH}_3$
29	109,1	109,3	$\text{CH}_2$
30	19,1	19,3	$\text{CH}_3$



**Tabela 12.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da substância II (taraxerol)

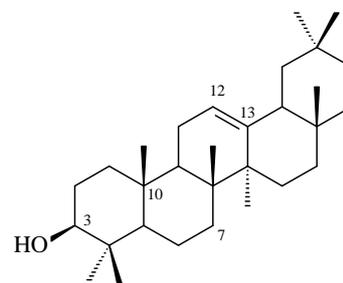
Posição	$\delta_{\text{C}}$ Observado	$\delta_{\text{C}}$ (MAHATO; KUNDU, 1994)	Carbono
1	38,7	38,1	$\text{CH}_2$
2	27,3	27,3	$\text{CH}_2$
3	78,7	79,2	CH
4	38,5	39,1	C
5	55,7	55,7	CH
6	18,2	19,0	$\text{CH}_2$
7	35,0	35,3	$\text{CH}_2$
8	39,2	38,9	C
9	48,9	48,9	CH
10	38,6	37,9	C
11	17,3	17,7	$\text{CH}_2$
12	36,5	35,9	$\text{CH}_2$
13	37,5	37,9	C
14	158,0	158,1	C
15	116,7	117,0	CH
16	37,8	36,9	$\text{CH}_2$
17	37,9	38,1	C
18	49,1	49,4	CH
19	40,7	41,4	$\text{CH}_2$
20	28,6	29,0	C
21	33,6	33,9	$\text{CH}_2$
22	32,6	33,2	$\text{CH}_2$
23	28,2	28,1	$\text{CH}_3$
24	15,4	15,6	$\text{CH}_3$
25	15,3	15,6	$\text{CH}_3$
26	29,7	30,1	$\text{CH}_3$
27	26,0	26,0	$\text{CH}_3$
28	29,5	30,1	$\text{CH}_3$
29	33,6	33,5	$\text{CH}_3$
30	21,1	21,5	$\text{CH}_3$



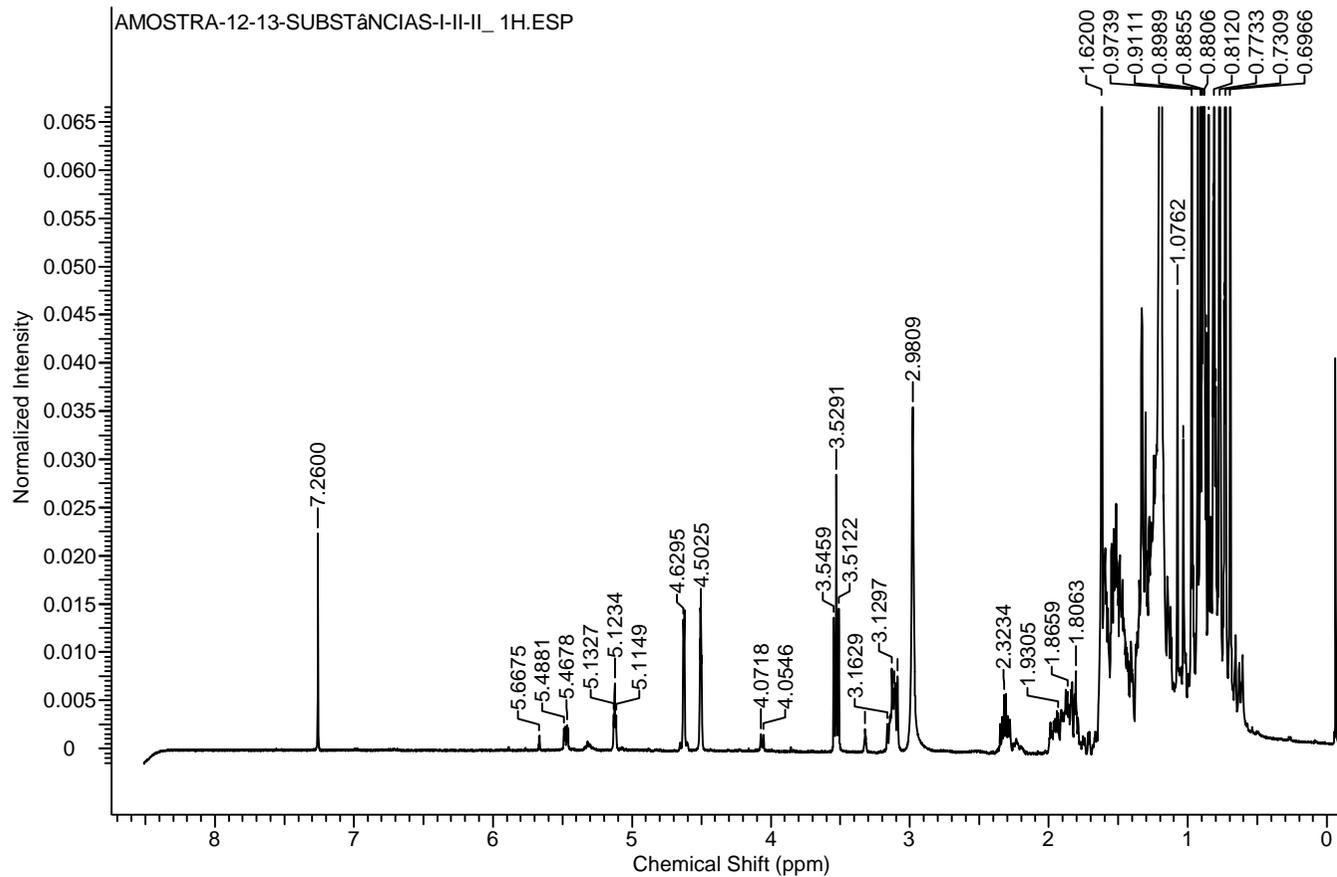
II

**Tabela 13.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da substância III ( $\beta$ -amirina)

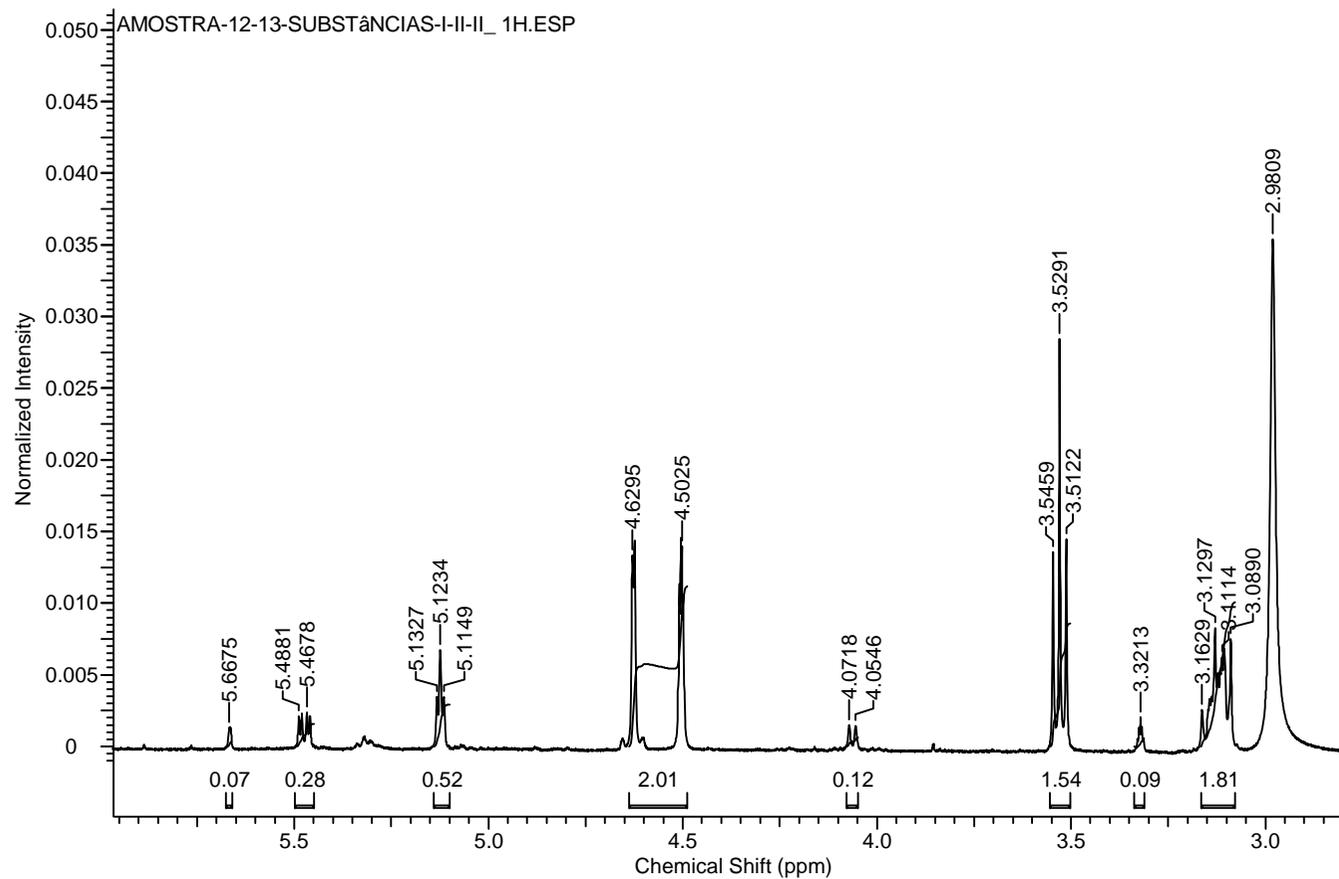
Posição	$\delta_c$ Observado	$\delta_c$ (MAHATO; KUNDU, 1994)	Carbono
1	38,5	38,7	CH <sub>2</sub>
2	27,3	27,3	CH <sub>2</sub>
3	78,7	79,0	CH
4	39,6	38,8	C
5	55,1	55,3	CH
6	18,2	18,5	CH <sub>2</sub>
7	32,5	32,8	CH <sub>2</sub>
8	38,5	38,8	C
9	47,1	47,7	CH
10	37,2	37,6	C
11	22,5	23,6	CH <sub>2</sub>
12	121,6	121,8	CH
13	145,0	145,1	C
14	41,2	41,8	C
15	26,0	26,2	CH <sub>2</sub>
16	26,8	27,0	CH <sub>2</sub>
17	32,6	32,5	C
18	46,7	47,4	CH
19	45,7	46,9	CH <sub>2</sub>
20	32,5	31,1	C
21	34,6	34,8	CH <sub>2</sub>
22	37,8	37,2	CH <sub>2</sub>
23	28,6	28,2	CH <sub>3</sub>
24	15,4	15,5	CH <sub>3</sub>
25	15,2	15,6	CH <sub>3</sub>
26	16,7	16,9	CH <sub>3</sub>
27	26,0	26,0	CH <sub>3</sub>
28	28,6	28,4	CH <sub>3</sub>
29	33,1	33,3	CH <sub>3</sub>
30	23,4	23,7	CH <sub>3</sub>



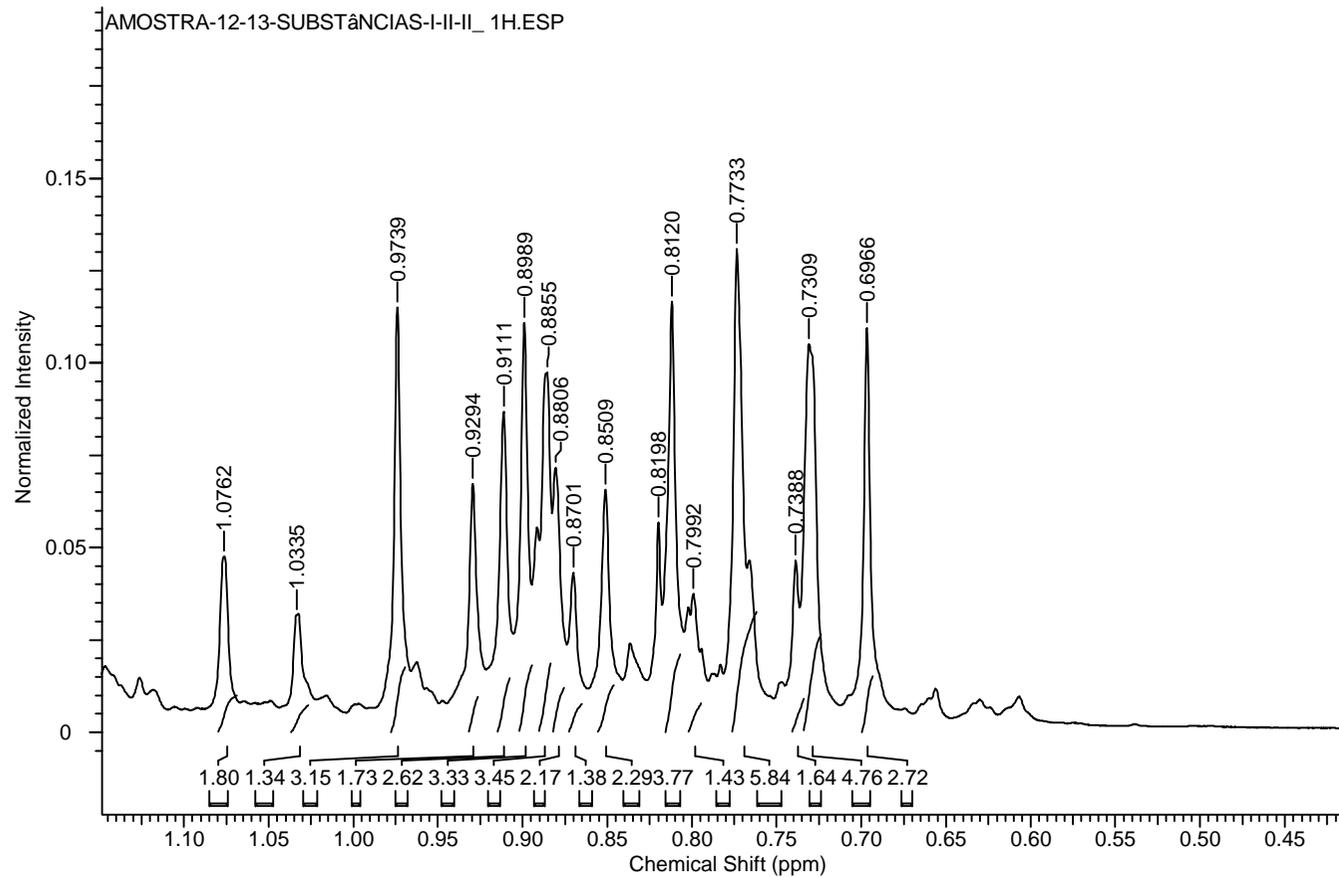
**III**



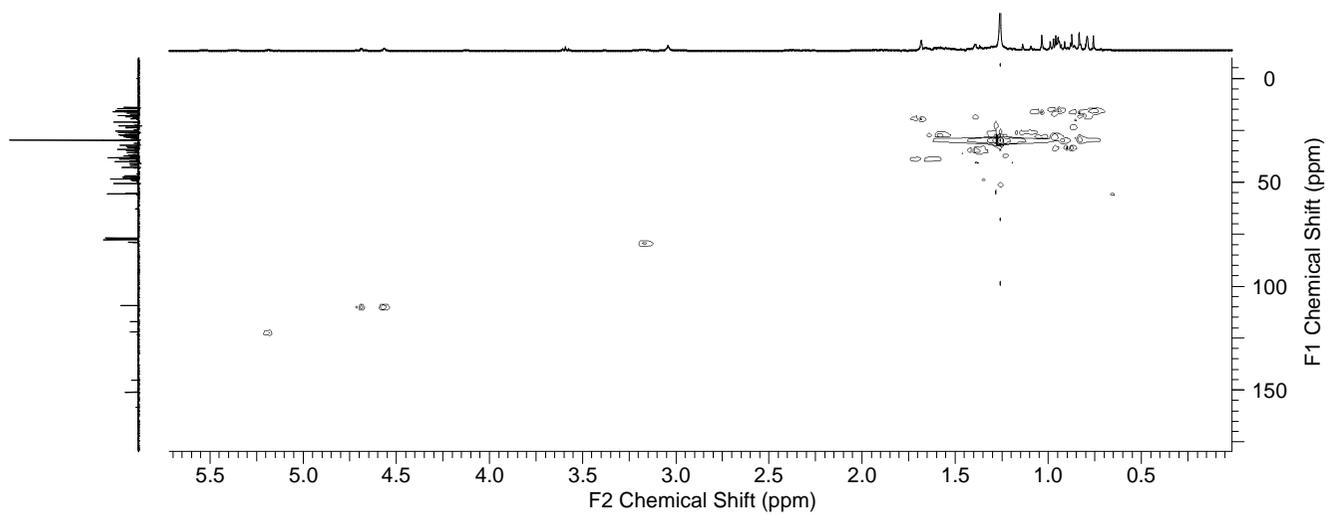
**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias I, II e III (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 19.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias **I**, **II** e **III** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 20.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias **I**, **II** e **III** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 21.** Mapa de contorno HSQC da mistura das substâncias I, II e III

Figura 22. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura das substâncias I, II e III (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

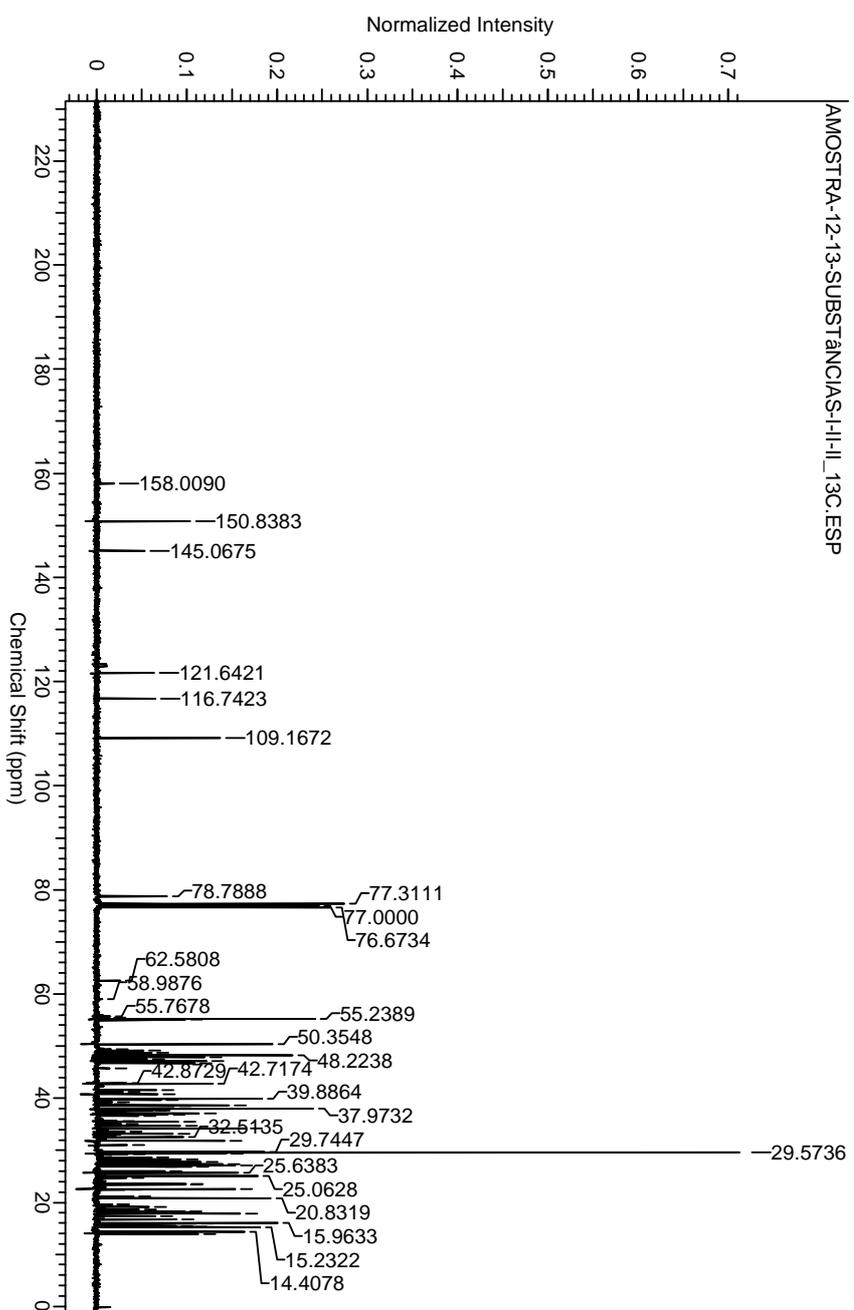
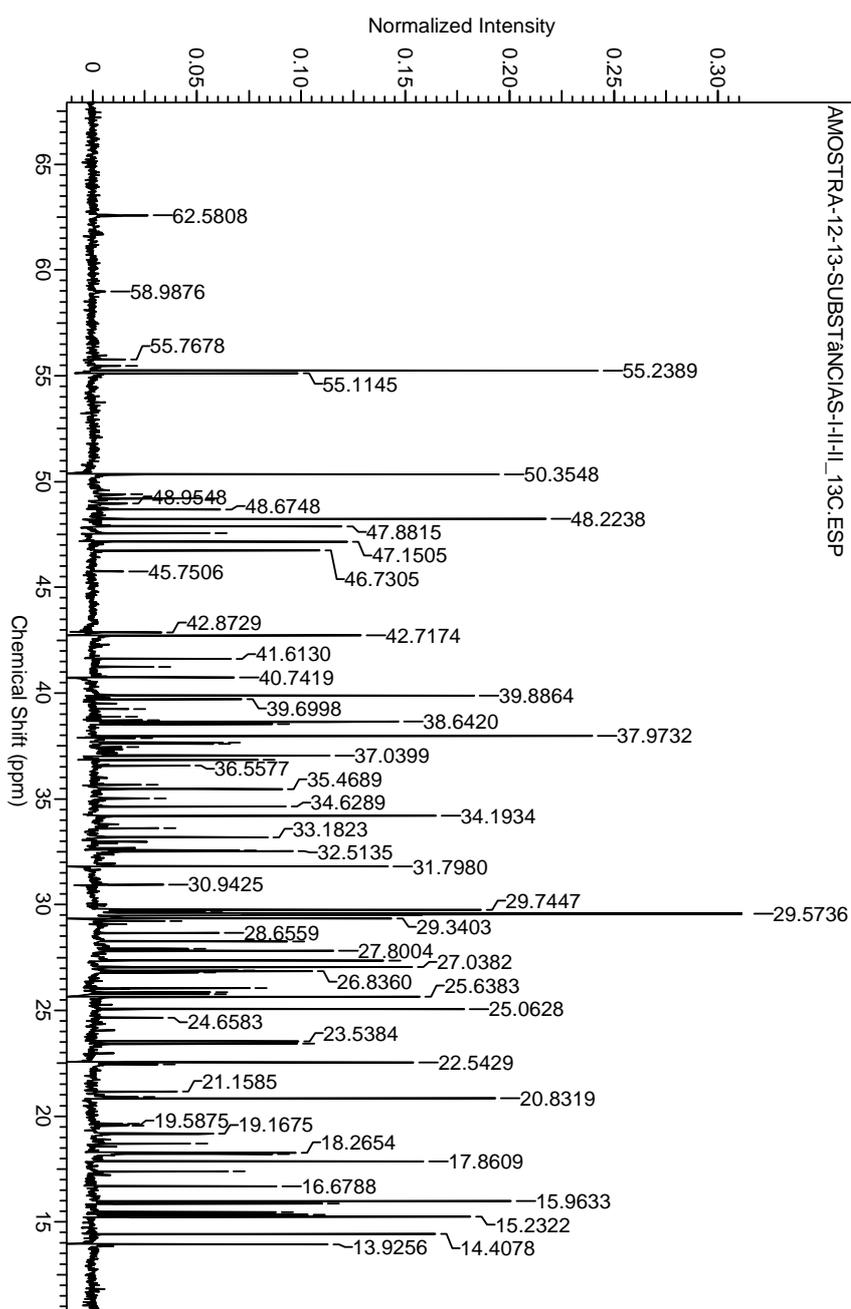
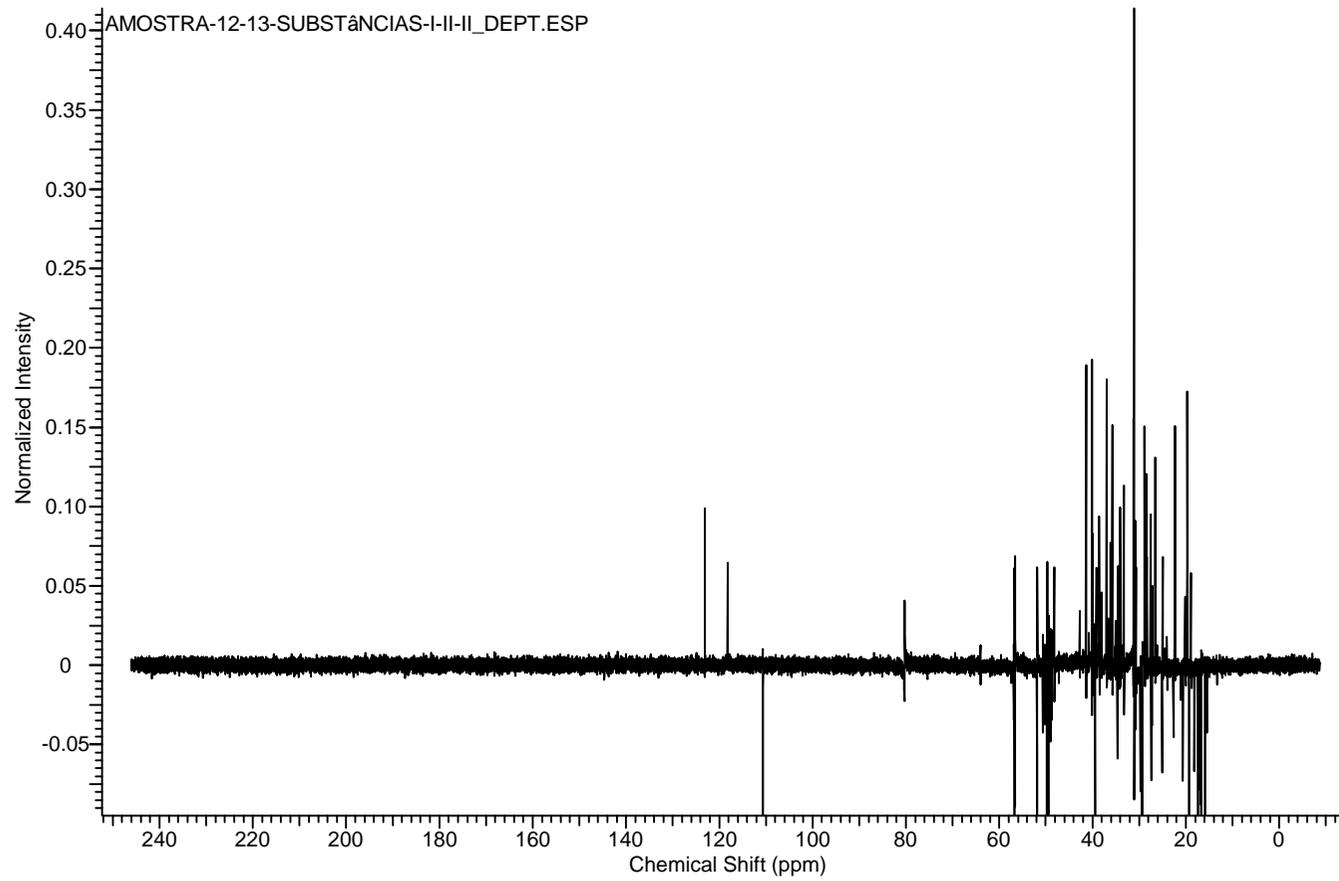


Figura 23. Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura das substâncias I, II e III (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



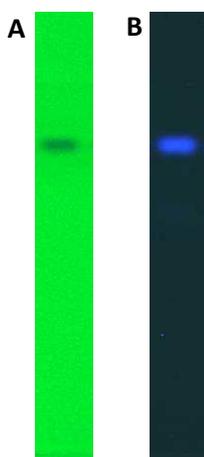


**Figura 24.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  da mistura das substâncias **I**, **II** e **III** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

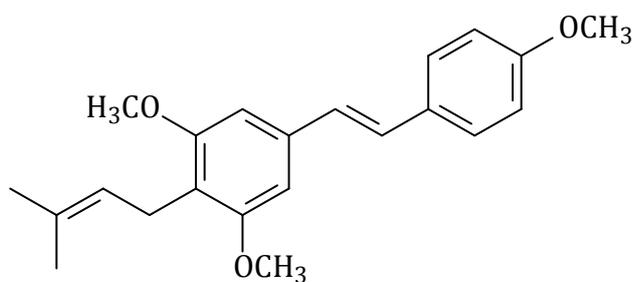
## 4.2 Identificação das substâncias obtidas das raízes de *Deguelia duckeana*

### 4.2.1 Identificação da substância IV

As frações reunidas 2 a 8 (codificada como 25DD 2-8) (2,7 mg) apresentaram  $R_f$  0,83 identificada como 3,5,4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno (**IV**) já havia sido anteriormente identificada (LIMA, 2011), porém não estava com elevado grau de pureza para ser testada e portanto foi purificada neste projeto. Para identificação foram realizadas análises por CCD (Figura 25) apresentando fluorescência sob luz UV 254 e 365 nm e também por espectrometria de massas, já que esta substância já havia sido analisada e identificada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . No espectro de massas obtido por ionização via impacto de elétrons a 70 eV, o estilbeno apresentou o íon molecular a  $m/z$  338 compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_3$  (Figura 26).



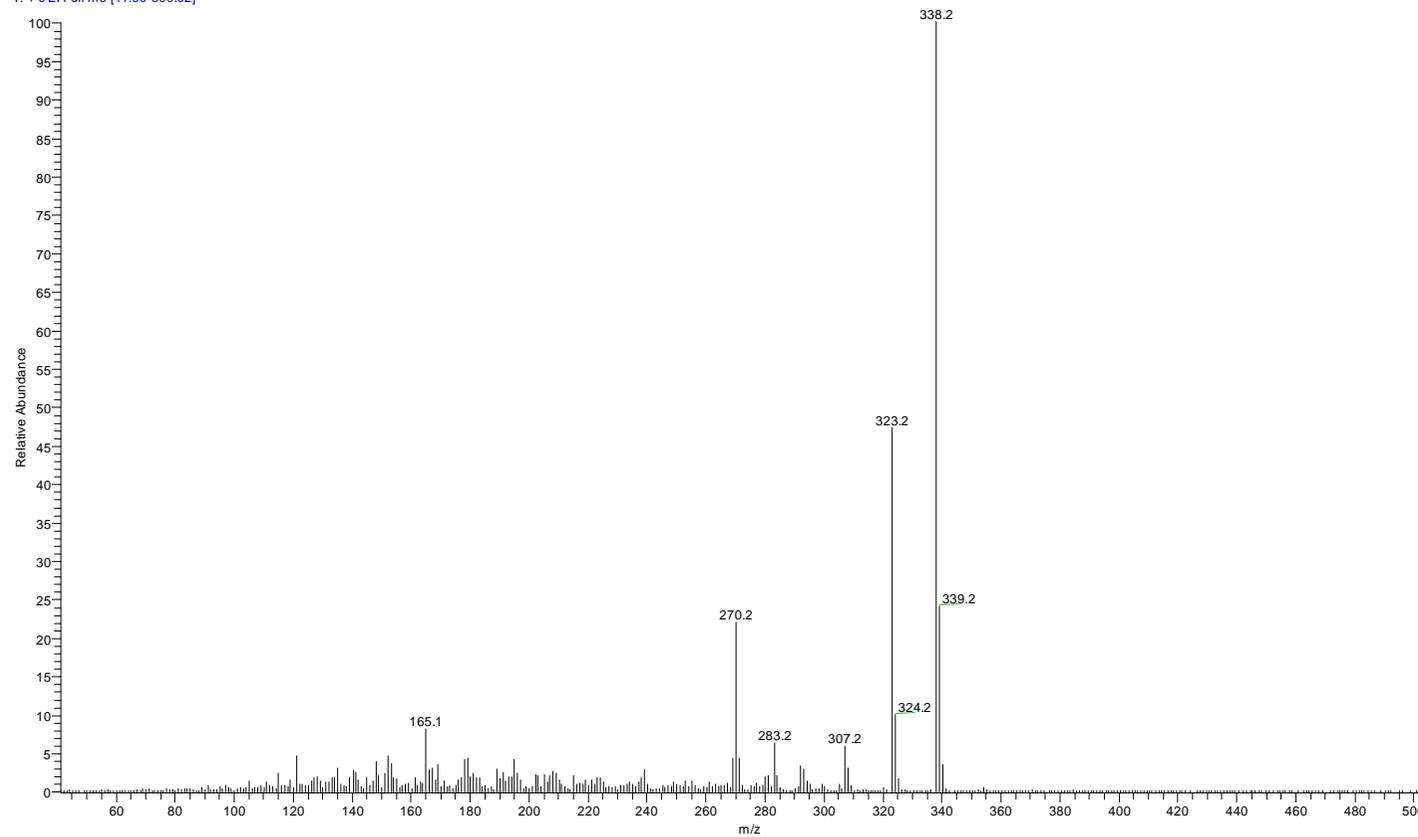
**Figura 25.** CCD do estilbeno 3,5,4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno (**IV**). A - sob luz UV 254 nm; B – sob luz UV 365 nm. Eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  75:5



**IV**

Esse estilbeno foi anteriormente descrito na literatura (BRAZ FILHO; GOTTLIEB; MOURÃO, 1975), porém não havia sido testado em células tumorais o que incentivou a purificação do mesmo.

mpbg08b #1 RT: 2.62 AV: 1 NL: 1.03E7  
T: + c EI Full ms [41.00-800.02]



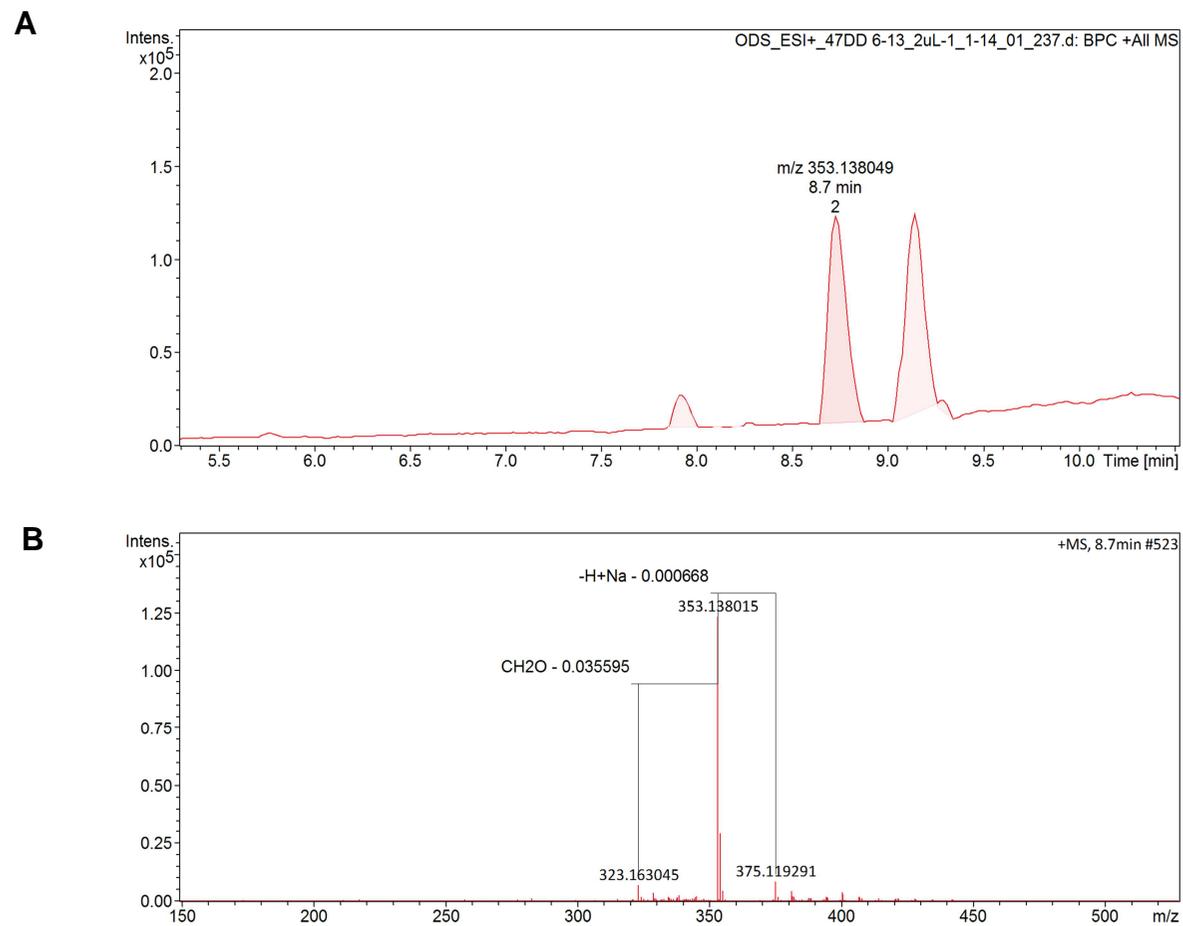
**Figura 26.** Espectro de massas a 70 eV (modo positivo) da substância **IV**

#### 4.2.2 Identificação das substâncias V e VI

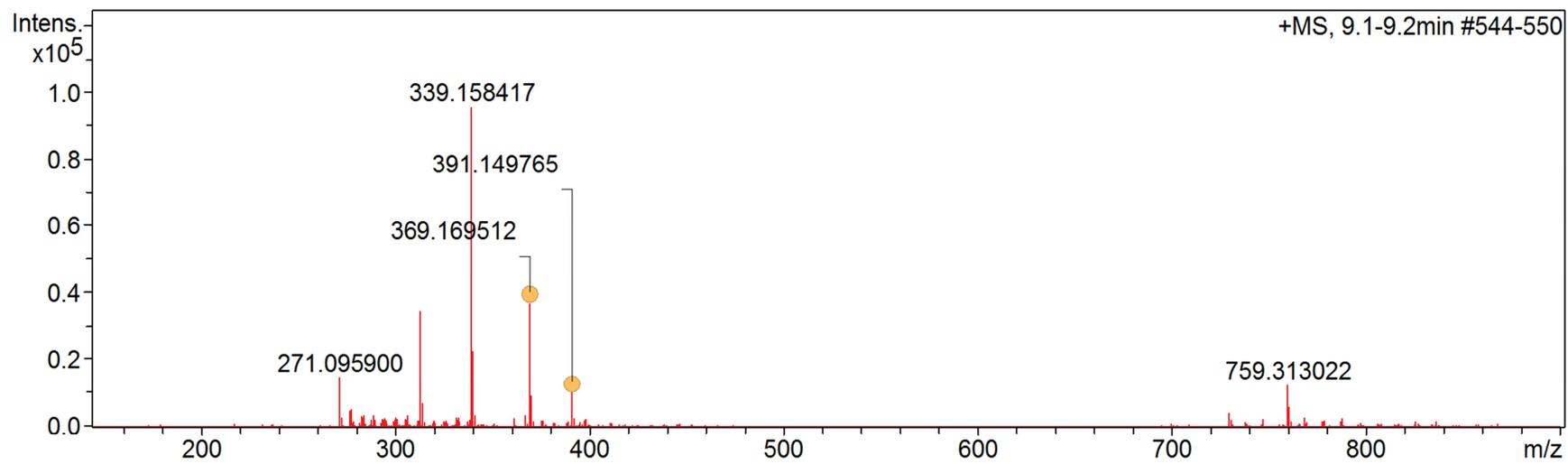
As frações 6-13, denominadas de substâncias **V** e **VI** (codificadas 47DD 6-13) (8,4 mg) apresentaram coloração amarelada quando revelada com NP-PEG indicando a presença de flavonoides.

O espectro de RMN de hidrogênio (Figuras 32 a 38) mostra a presença de 4 sinais entre 12,0 e 13,8 ppm, indicativos da presença de 4 flavonoides com hidroxilas na posição 5, queladas com a carbonila na posição 4 (SANTOS et al., 2015). Os sinais de hidrogênios presentes na região entre 6 e 8 ppm confirmam a presença de substâncias aromáticas.

A análise do cromatograma obtido ao injetar a amostra no equipamento de CLAE/EM de alta resolução confirma que a fração continha quatro flavonoides (Figura 27A), sendo possível identificar apenas dois flavonoides com tempos de retenção de 8,7 min e 9,1 min, respectivamente. O primeiro apresentou um íon molecular de alta resolução de  $m/z$  353,138015  $[M + H]^+$  correspondendo à fórmula molecular de  $C_{21}H_{20}O_5$  (**VI**) (Figura 27B). O segundo flavonoide apresentou um íon de  $m/z$  369,169512  $[M + H]^+$  correspondendo à fórmula molecular de  $C_{22}H_{24}O_5$  (**V**) (Figura 28).



**Figura 27 (A)** Cromatograma mostrando os picos dos quatro flavonoides por tempo de retenção; **(B)** Espectro de massas de alta resolução (modo positivo) referente à substância **VI** com íon de  $m/z$  353,138015  $[M + H]^+$



**Figura 28.** Espectro de massas de alta resolução mostrando o íon de  $m/z$  369,169512  $[M + H]^+$  referente a substância **V**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 29 a 35) apresentou sinais em  $\delta$  5,34 (1H, *dd*,  $J = 13,0$  e  $3,0$  Hz), 2,76 (1H, *dd*,  $J = 17,2$  e  $3,0$  Hz) e 3,09 (*dd*,  $J = 17,2$  e  $13,0$  Hz) caracterizando o anel C de flavanonas (Tabela 14).

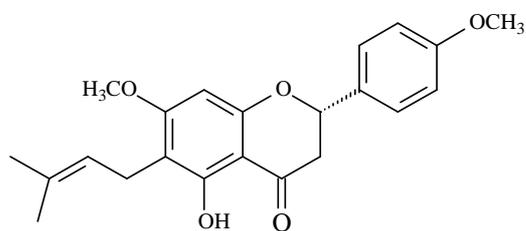
Foram verificados dois *dubletos* em  $\delta$  7,38 ( $J = 8,5$  Hz) e  $\delta$  6,95 ( $J = 8,5$  Hz), acoplado entre si no mapa de contorno COSY (Figura 39), referentes a hidrogênios de aromáticos de um anel B *para*-substituído. O substituinte em *para* foi determinado como sendo uma metoxila em 3,83 (s).

A fim de atribuir os deslocamentos químicos (Tabela 14) dos hidrogênios ligados ao anel A, foram analisados os outros sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Primeiramente, foram observados sinais característicos de uma prenila [ $\delta$  1,76 (3H, s), 1,81 (3H, s), 5,19 (1H, *m*), 3,25 (2H, *d*,  $J = 6,8$ )] e depois verificou a presença de um grupo hidroxila em  $\delta$  12,06 (s) e de uma metoxila em  $\delta$  3,83 (3H, s). Para confirmar a presença da hidroxila na posição 5 já confirmada pelo RMN de  $^1\text{H}$  e a prenila na posição 6, analisou-se o espectro de NOESY que apresenta a correlação entre  $\delta_{\text{H}}$  12,06 e  $\delta_{\text{H}}$  3,25 (Figura 40), inferindo que ambos devem estar próximos espacialmente já que o espectro NOESY mostra interação espacial de até  $5\text{\AA}$  de distância um átomo ao outro (PAVIA et al., 2010).

A presença das seguintes correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figuras 41 a 44)  $\delta_{\text{C}}$  131,6 e  $\delta_{\text{H}}$  3,25;  $\delta_{\text{C}}$  131,6 e  $\delta_{\text{H}}$  1,76;  $\delta_{\text{C}}$  165,4 e  $\delta_{\text{H}}$  3,25, no mapa de contorno HSQC (Figuras 45 e 46)  $\delta_{\text{C}}$  20,9 e  $\delta_{\text{H}}$  3,25 (C-1" / H-1");  $\delta_{\text{C}}$  122,2 e  $\delta_{\text{H}}$  5,19 (C-2" / H-2"), assim como também os deslocamentos químicos (Tabela 14) de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 39 a 41) confirmaram a presença da substância 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-6-prenilflavanona (**V**), sendo uma descrição inédita como produto natural na literatura.

**Tabela 14.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) da substância **V**

<b>C</b>	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), multiplicidade e $J$ (Hz)
<b>2</b>	79,1	5,34 ( <i>dd</i> , $J = 13,0$ e $3,0$ )
<b>3</b>	43,2	2,76 ( <i>dd</i> , $J = 17,2$ e $3,0$ ) 3,09 ( <i>dd</i> , $J = 17,2$ e $13,0$ )
<b>4</b>	196,0	-
<b>5</b>	160,0	-
<b>6</b>	109,9	-
<b>7</b>	165,4	-
<b>8</b>	90,9	6,07 (1H, <i>s</i> )
<b>9</b>	161,4	-
<b>10</b>	102,9	-
<b>1'</b>	130,3	-
<b>2' e 6'</b>	127,7	7,38 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ )
<b>3' e 5'</b>	114,2	6,95 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ )
<b>4'</b>	160,2	-
<b>1''</b>	21,0	3,25 (2H, <i>d</i> , $J = 6,8$ )
<b>2''</b>	122,2	5,19 (1H, <i>m</i> )
<b>3''</b>	131,6	-
<b>4''</b>	25,8	1,76 (3H, <i>s</i> )
<b>5''</b>	17,7	1,81 (3H, <i>s</i> )
<b>5OH</b>	160,2	12,06 (1H, <i>s</i> )
<b>7 OCH<sub>3</sub></b>		
<b>4'OCH<sub>3</sub></b>	55,3	3,83 (6H, <i>s</i> )



**V**

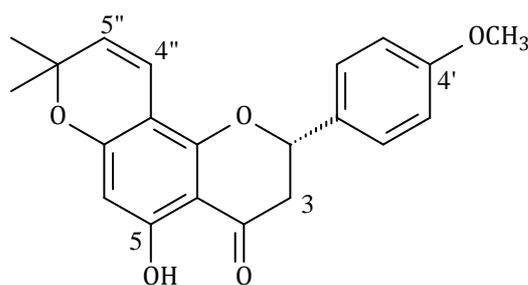
Por se tratar de uma mistura, a outra flavanona (**VI**) também apresentou no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 29 a 35), os deslocamentos químicos muito semelhantes ao anel B *para*-substituído. Contudo, apresentou diferenças nos valores para os hidrogênios do anel A, pois foram observados um *dublete* em  $\delta_{\text{H}}$  5,95 ( $J = 0,5$  Hz) e um *singlete* em  $\delta_{\text{H}}$  12,30 relativo à hidroxila quelada em C-5 e também sinais em  $\delta$  1,45 (3H, s), 1,46 (3H, s), 5,49 (1H, *d*,  $J = 10,0$  Hz), 6,61 (1H, *d*,  $J = 10,0$  Hz) (Tabela 15) que sinalizam a presença do grupo 2,2-dimetilcromeno, indicando que essa flavanona possui um anel A monossubstituído. No mapa de contorno COSY (Figura 39) foi possível observar o acoplamento dos hidrogênios a  $\delta$  5,49 e 6,61 o que confirma a presença do grupo 2,2-dimetilcromeno.

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 36 a 38) também foram analisados (Tabela 16). Estes dados em comparação com a literatura (JANG et al., 2002) confirmam a presença da flavanona 5-hidroxi-4'-metoxi-isolonchocarpina (**VI**). Essa substância está sendo descrita pela primeira vez em *Deguelia*.

**Tabela 15.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **VI**

H	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), multiplicidade e $J$ (Hz) Observado	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), multiplicidade e $J$ (Hz) Literatura*
2' e 6'	7,38 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ )	7,38 ( <i>d</i> , $J = 8,7$ )
3' e 5'	6,95 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ )	6,95 ( <i>d</i> , $J = 8,7$ )
2	5,34 ( <i>dd</i> , $J = 13,0$ e $3,0$ )	5,36 ( <i>dd</i> , $J = 13,0$ , $3,0$ )
3	2,76 ( <i>dd</i> , $J = 17,2$ e $3,0$ )	2,78 ( <i>dd</i> , $J = 17,2$ e $3,0$ )
	3,09 ( <i>dd</i> , $J = 17,2$ e $13,0$ )	3,04 ( <i>dd</i> , $J = 17,2$ e $13,0$ )
5 OH	12,30 (s)	12,1 (s)
6	5,95 ( <i>d</i> , $J = 0,5$ Hz)	6,0 (s)
4''	6,61 ( <i>dd</i> , $J = 10,0$ e $0,5$ Hz)	6,52 ( <i>d</i> , $J = 10,1$ )
5''	5,49 ( <i>d</i> , $J = 10,0$ )	5,45 ( <i>d</i> , $J = 10,1$ )
7''	1,46 (s)	1,42 (s)
8''	1,45 (s)	1,44 (s)
4' OCH <sub>3</sub>	3,86 (s)	3,84 (s)

\*(JANG et al., 2002) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

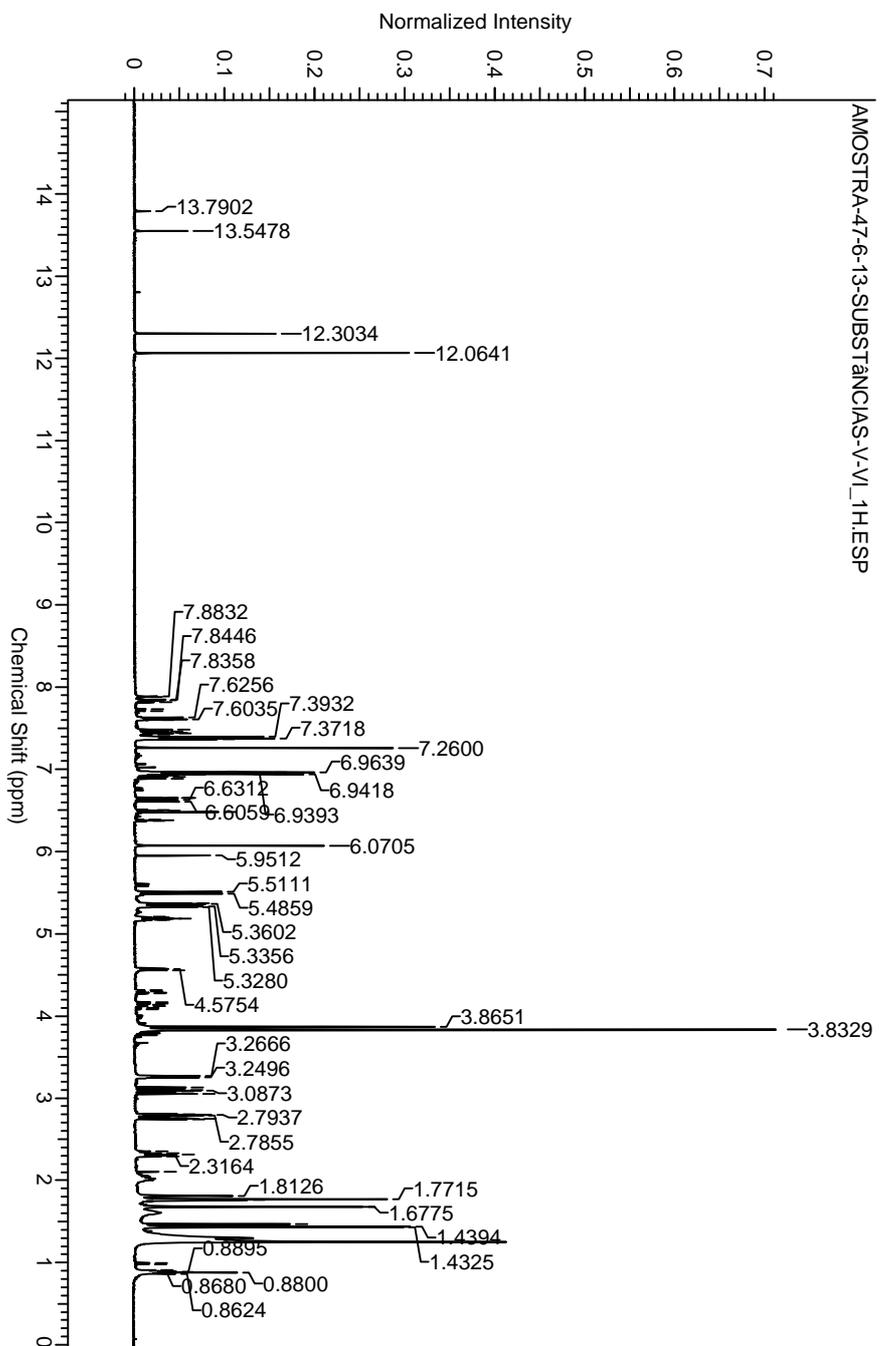


**VI**

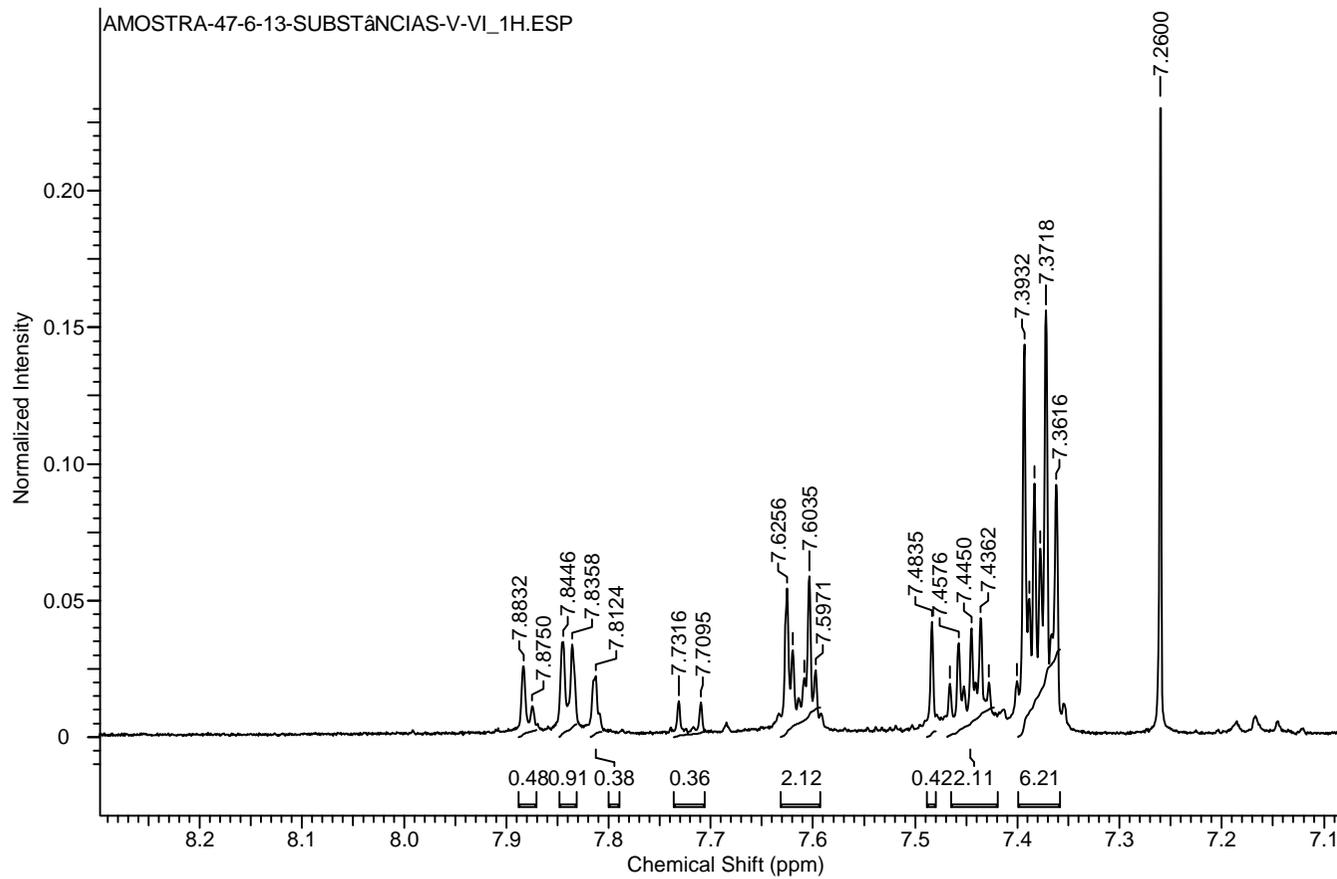
**Tabela 16.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **VI**

<b>C</b>	<b><math>^{13}\text{C}</math> RMN - Observado</b>	<b><math>^{13}\text{C}</math> RMN - Literatura</b>
<b>1'</b>	130,4	130,5
<b>2' e 6'</b>	127,7	127,6
<b>3' e 5'</b>	114,8	114,1
<b>4'</b>	160,2	160,0
<b>2</b>	78,8	78,9
<b>3</b>	43,2	43,2
<b>4</b>	195,9	196,0
<b>5</b>	162,3	163,8
<b>6</b>	96,2	97,6
<b>7</b>	162,0	162,3
<b>8</b>	102,8	102,0
<b>9</b>	158,3	156,9
<b>10</b>	102,8	102,9
<b>4''</b>	114,1	115,6
<b>5''</b>	126,2	126,4
<b>6''</b>	79,0	78,1
<b>7''</b>	28,3	28,3
<b>8''</b>	28,4	28,5
<b>4' OCH<sub>3</sub></b>	55,3	55,4

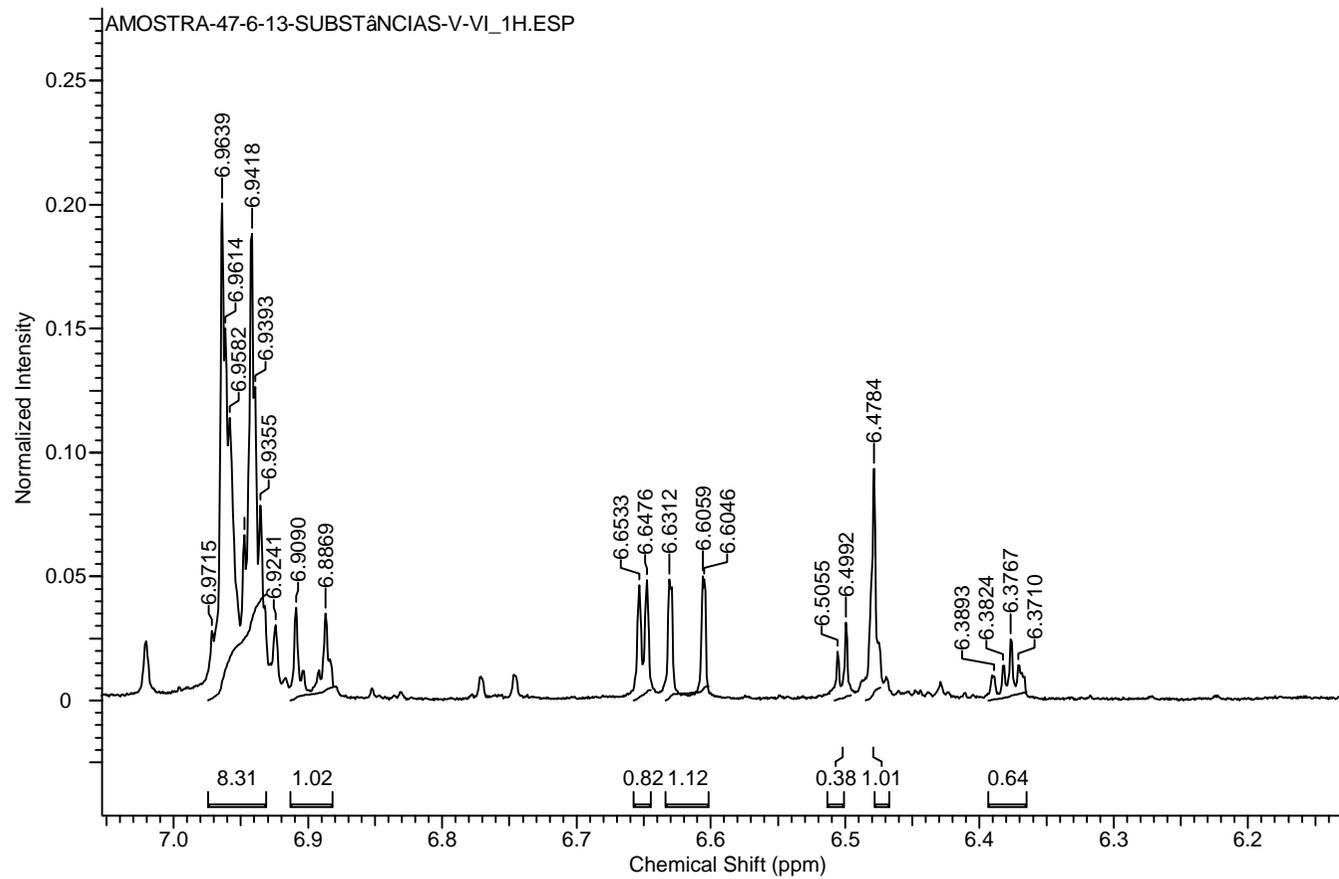
\*Jang et al 2002 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



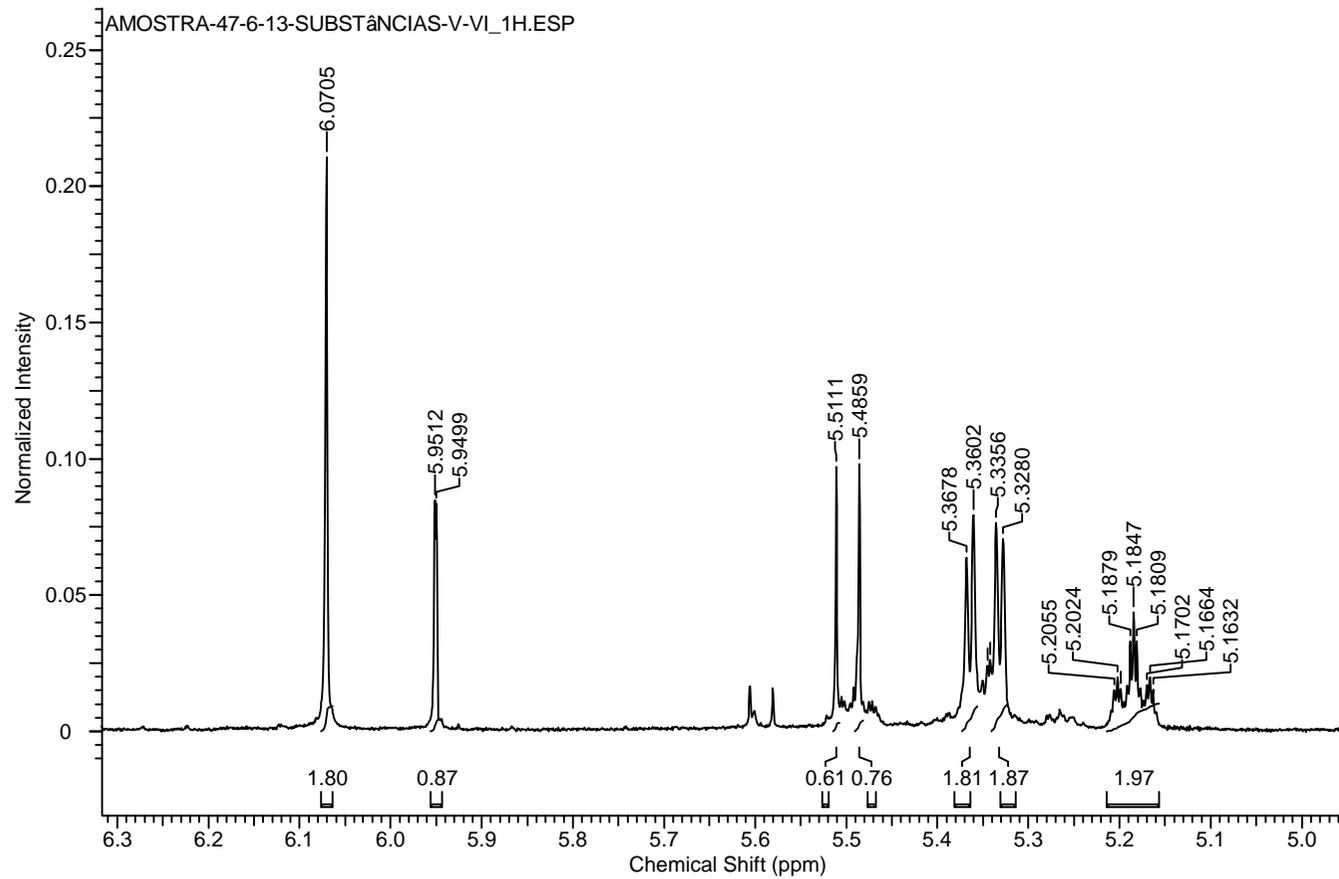
**Figura 29.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias V e VI (400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ )



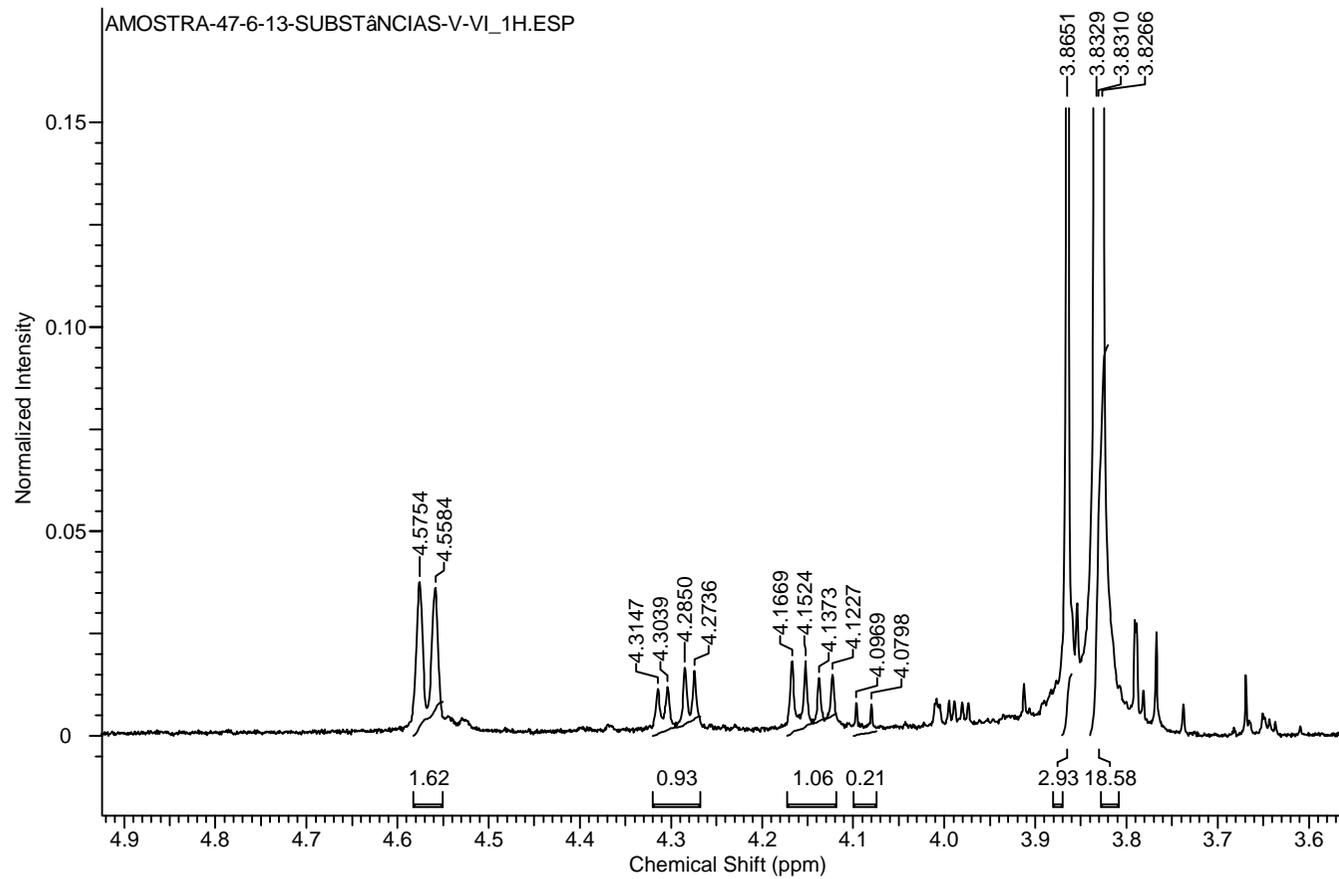
**Figura 30.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **V** e **VI** (400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ )



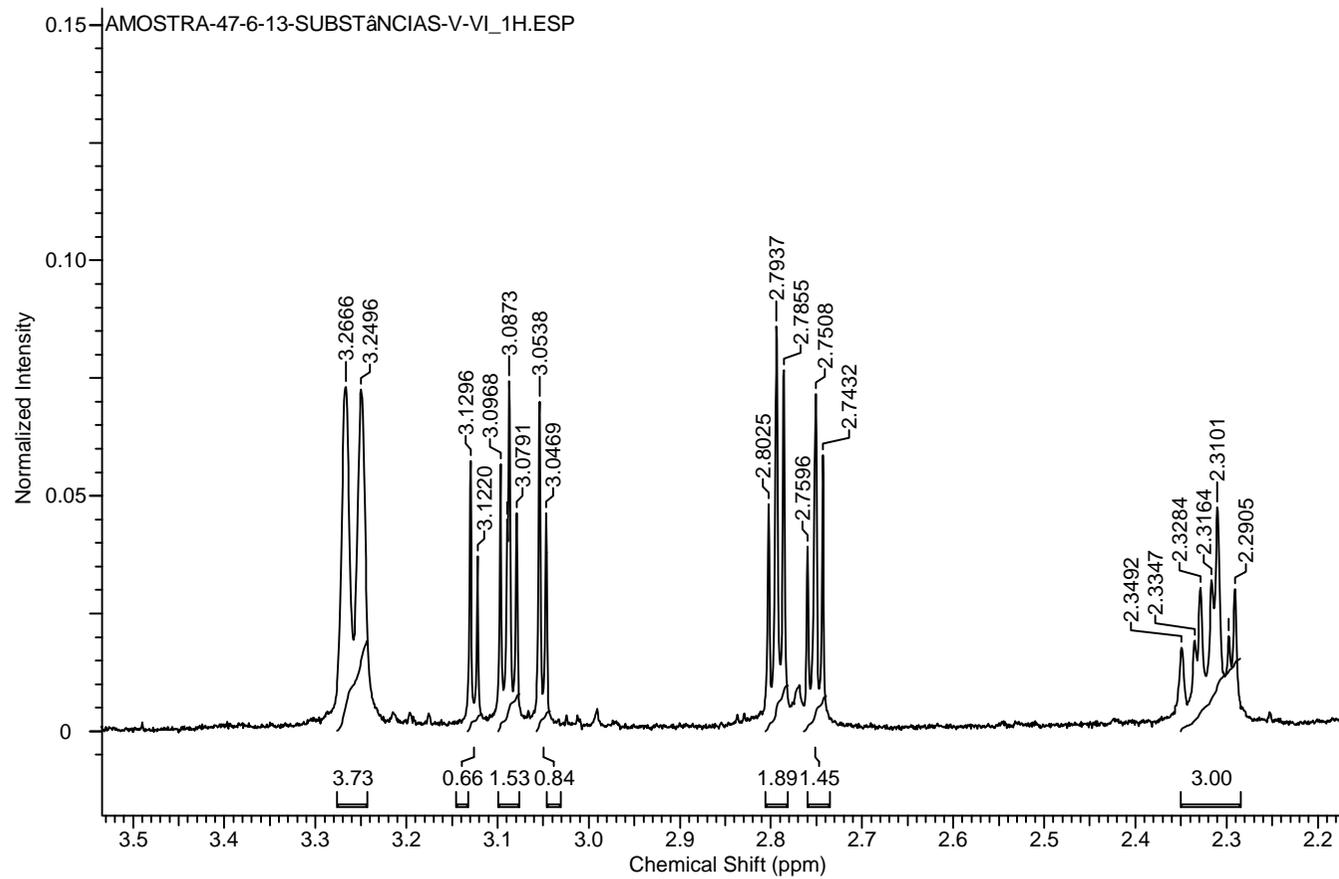
**Figura 31.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **V** e **VI** (400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ )



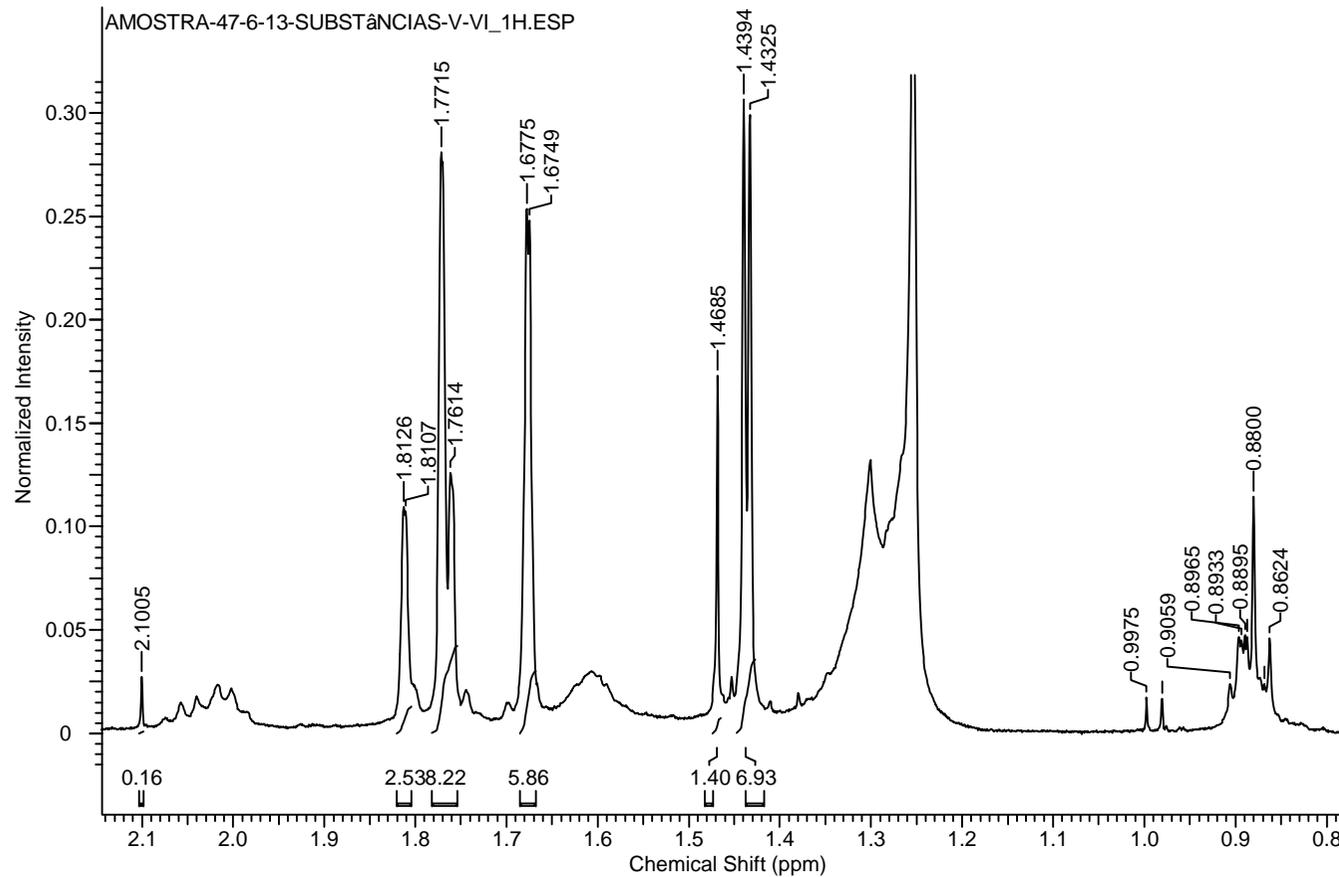
**Figura 32.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **V** e **VI** (400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 33.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **V** e **VI** (400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 34.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **V** e **VI** (400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 35.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **V** e **VI** (400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ )

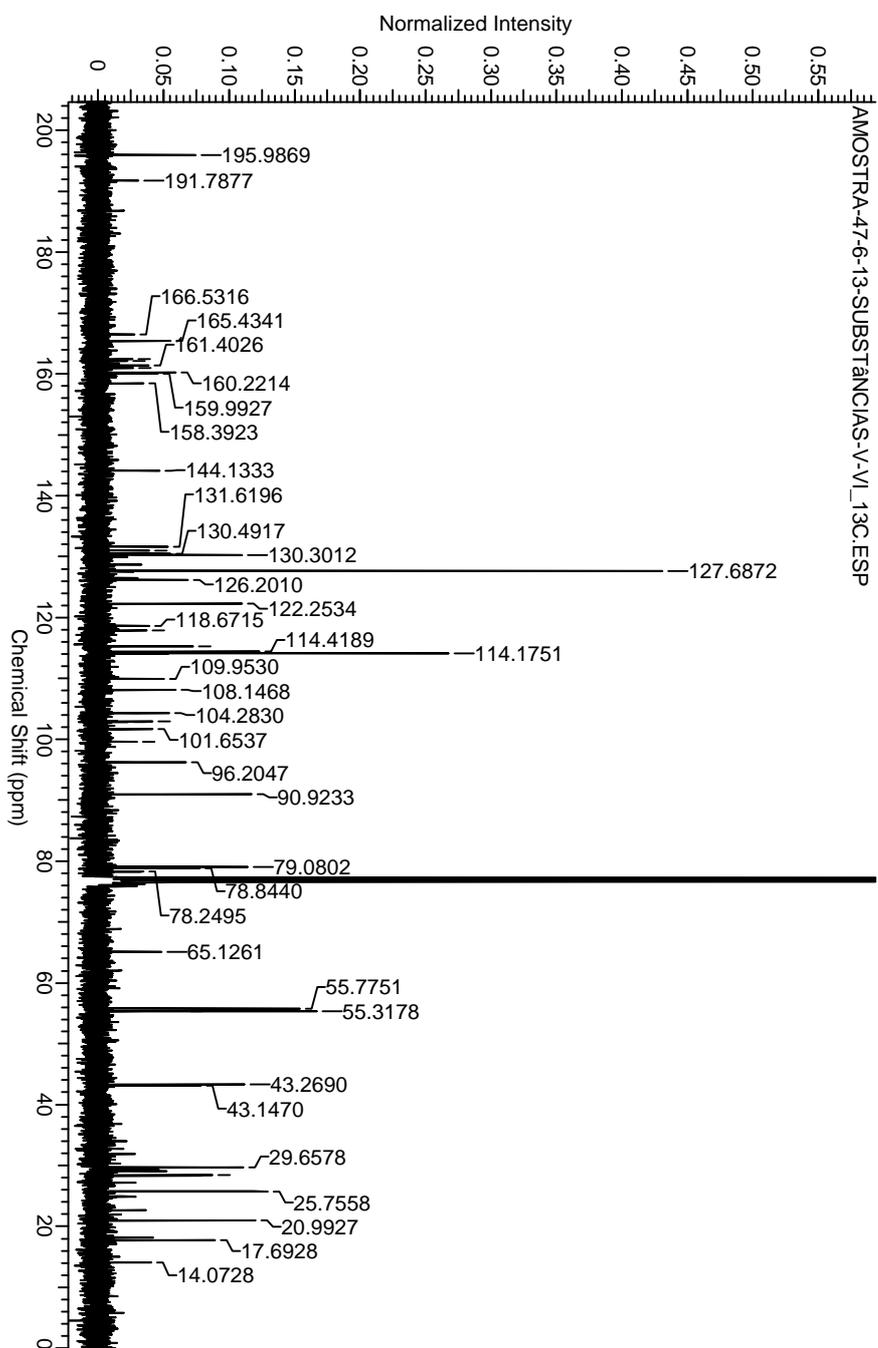
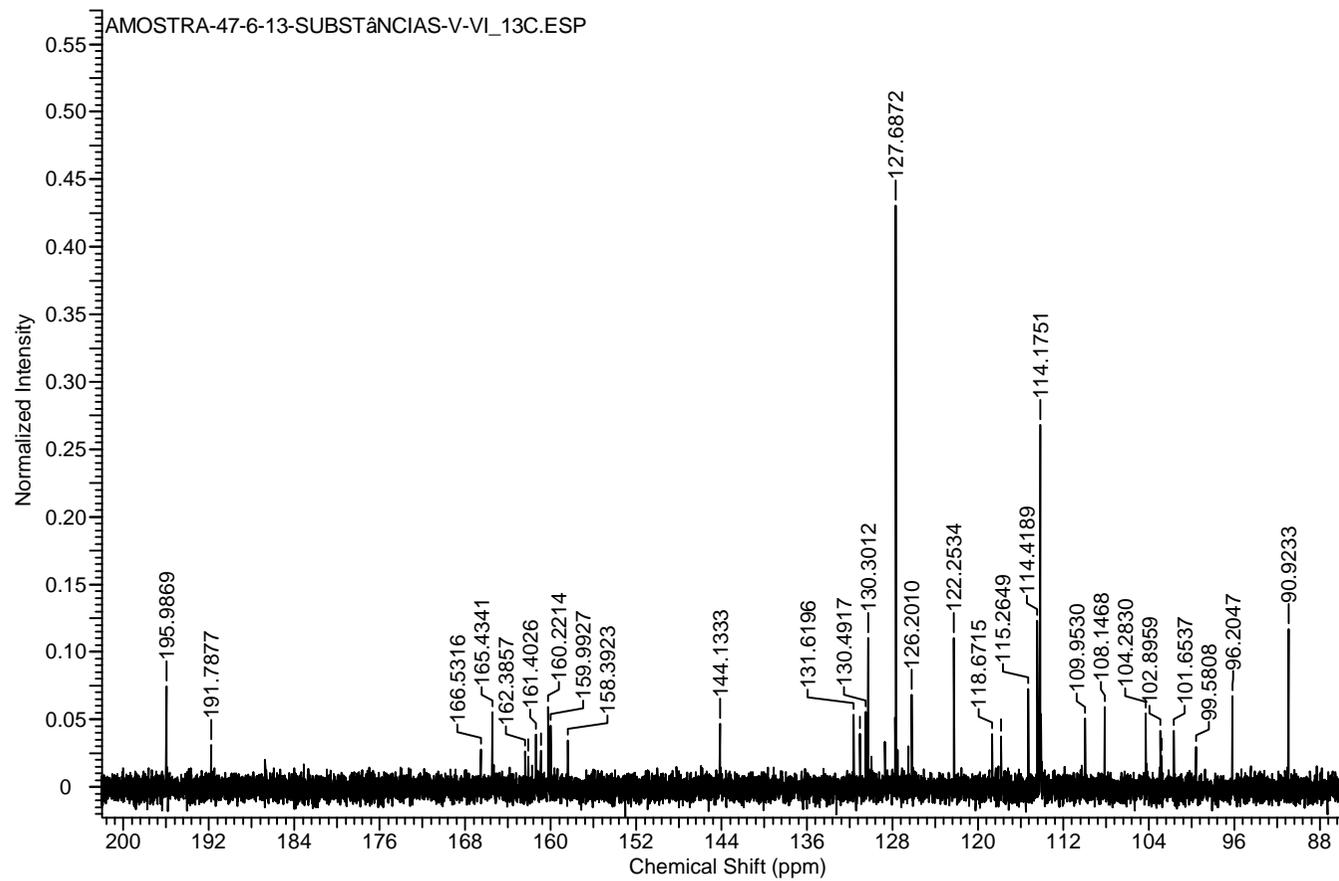
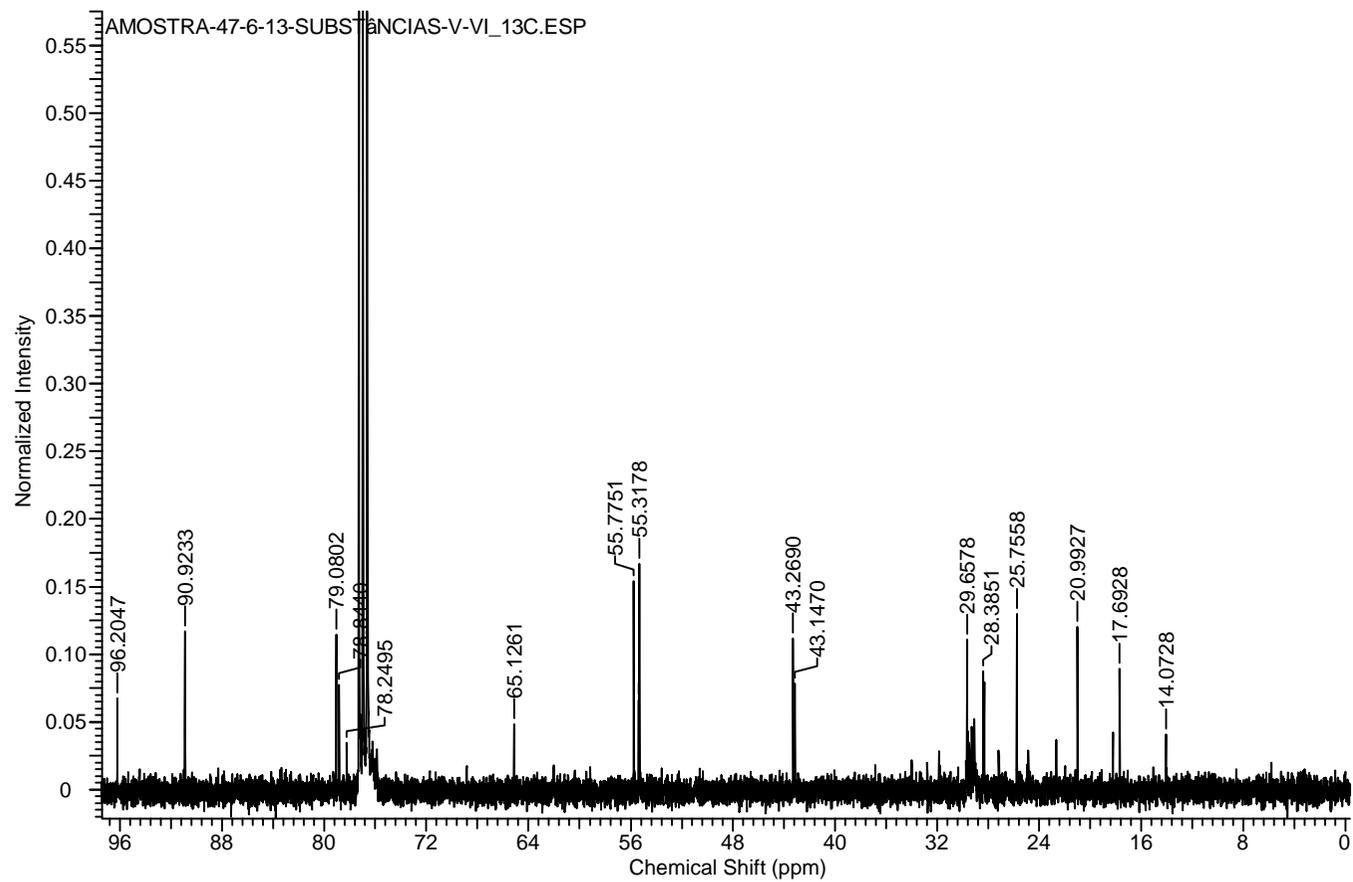


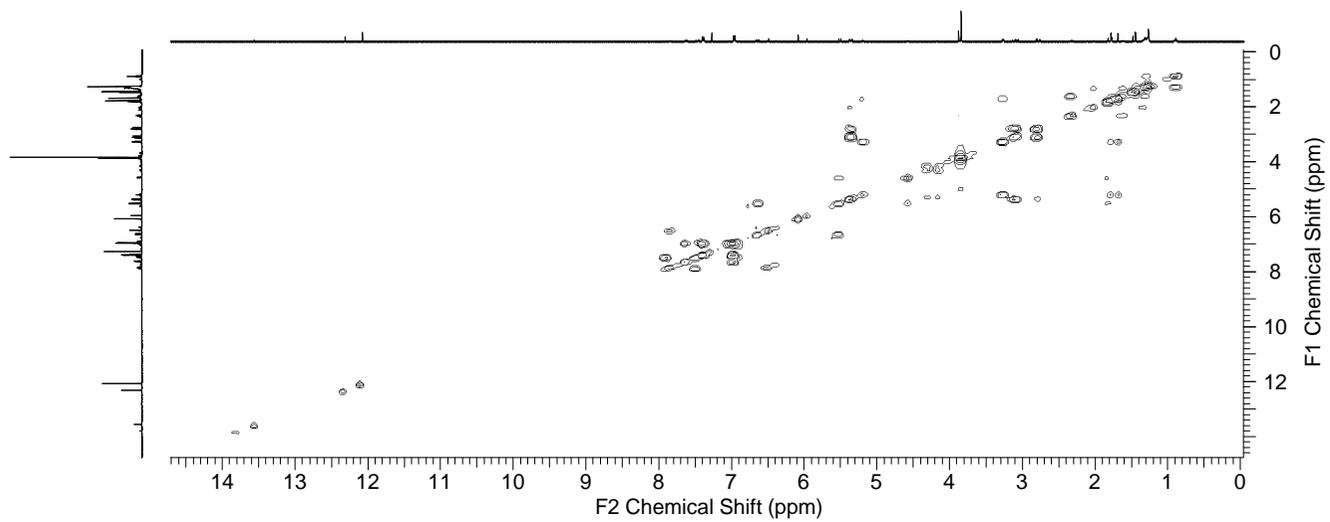
Figura 36. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias V e VI (100 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ )



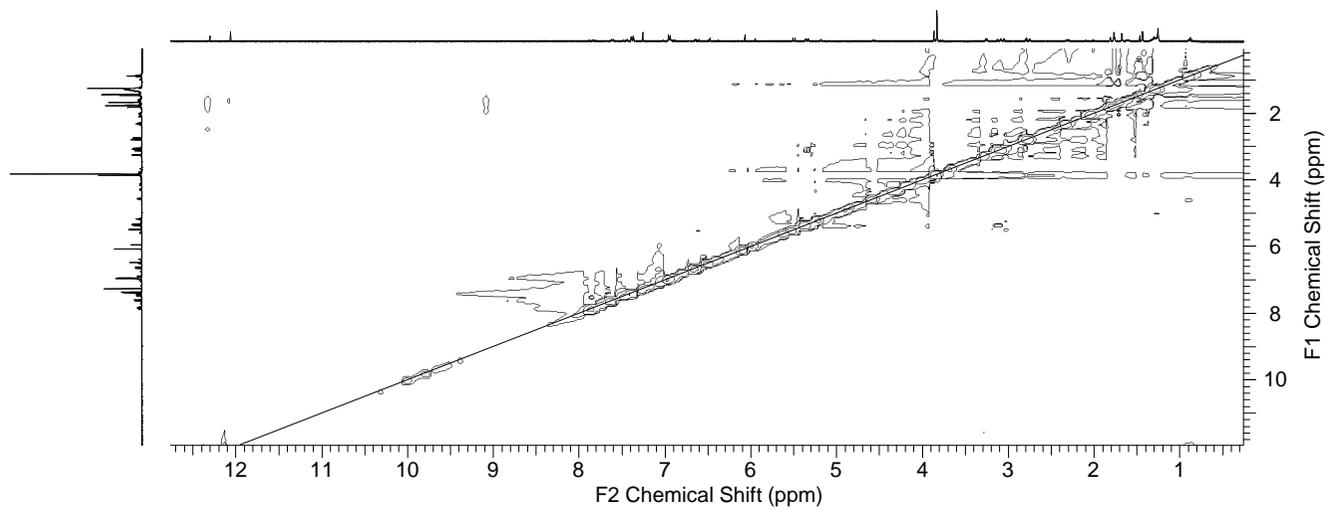
**Figura 37.** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **V** e **VI** (100 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ )



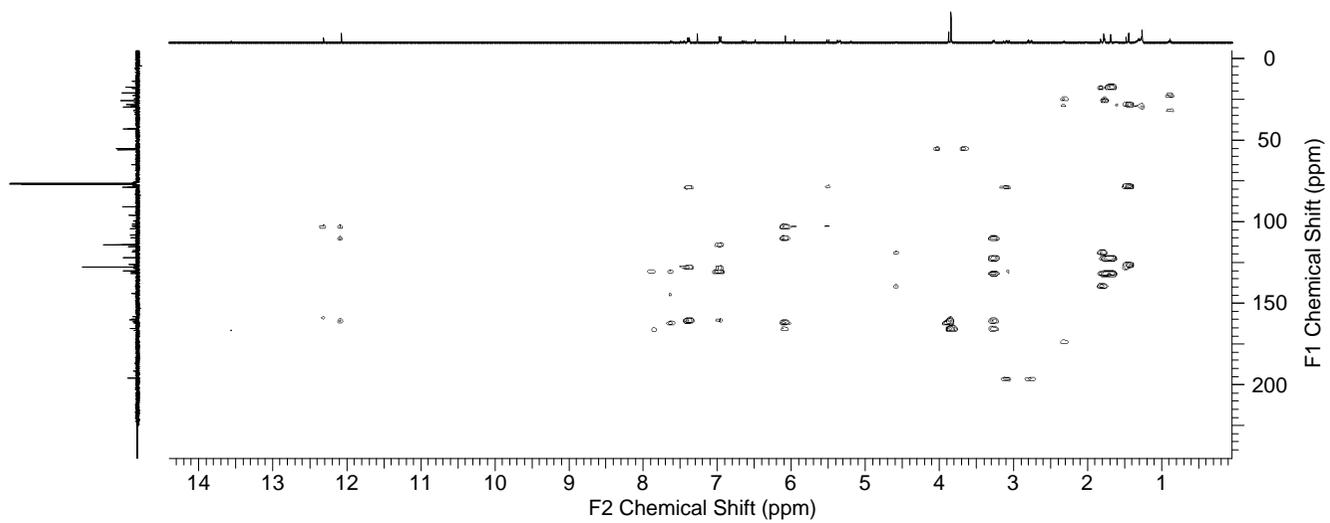
**Figura 38.** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **V** e **VI** (100 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ )



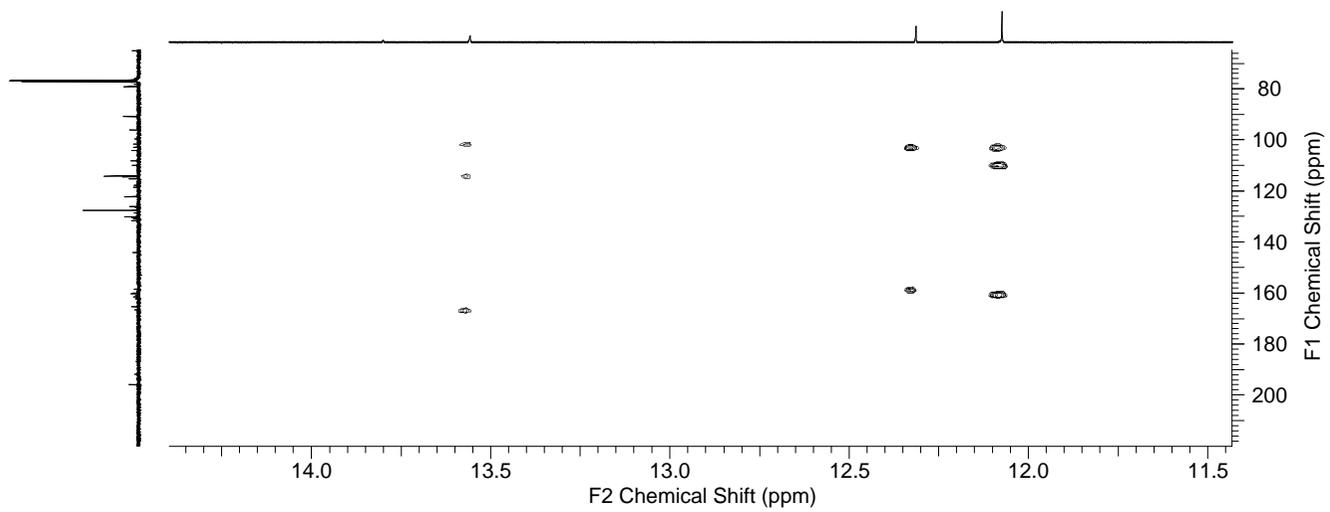
**Figura 39.** Mapa de contorno COSY das substâncias **V** e **VI**



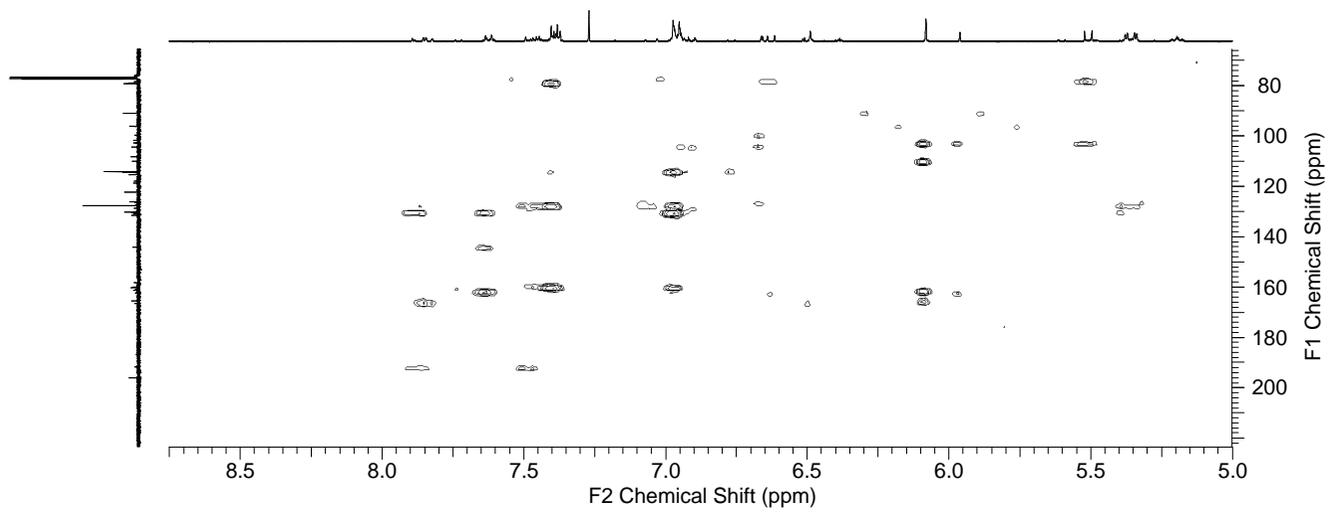
**Figura 40.** Espectro NOESY das substâncias **V** e **VI**



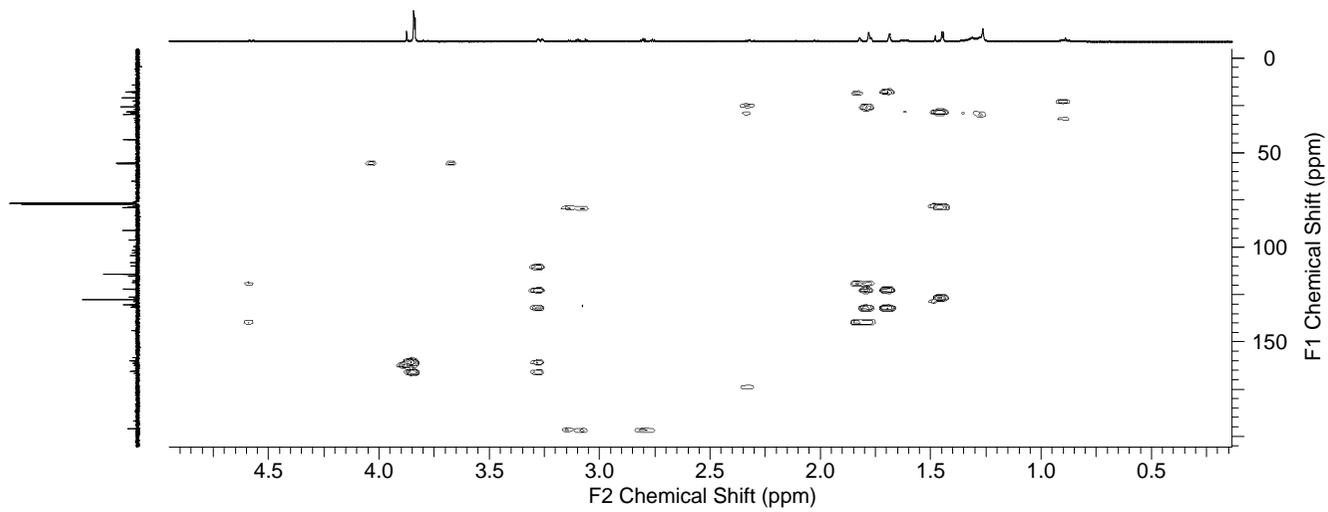
**Figura 41.** Mapa de contorno HMBC das substâncias **V** e **VI**



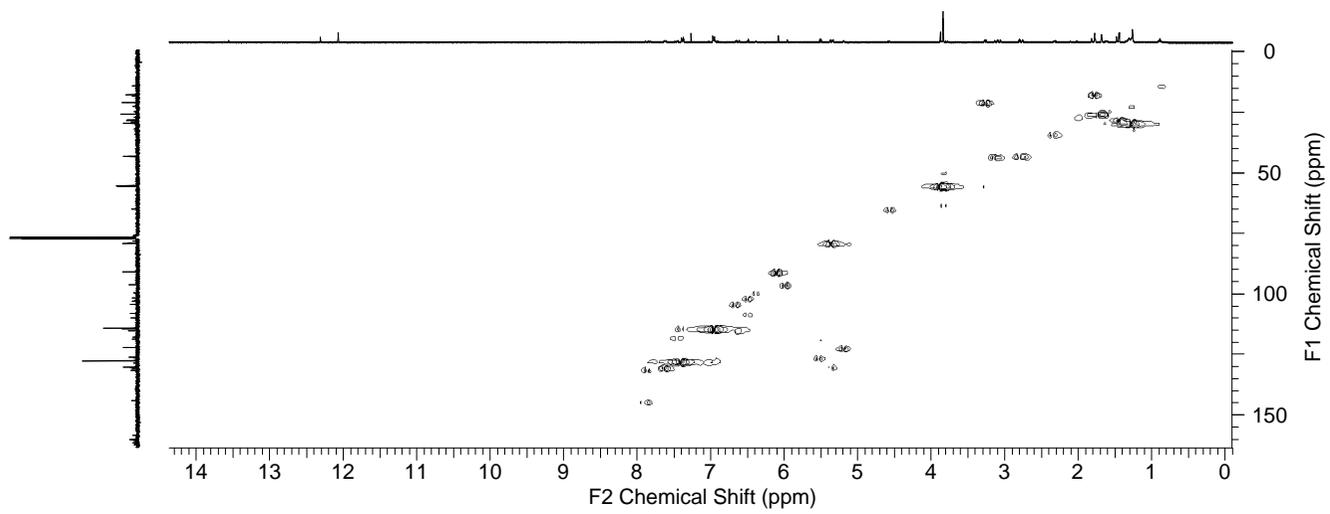
**Figura 42.** Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias **V** e **VI**



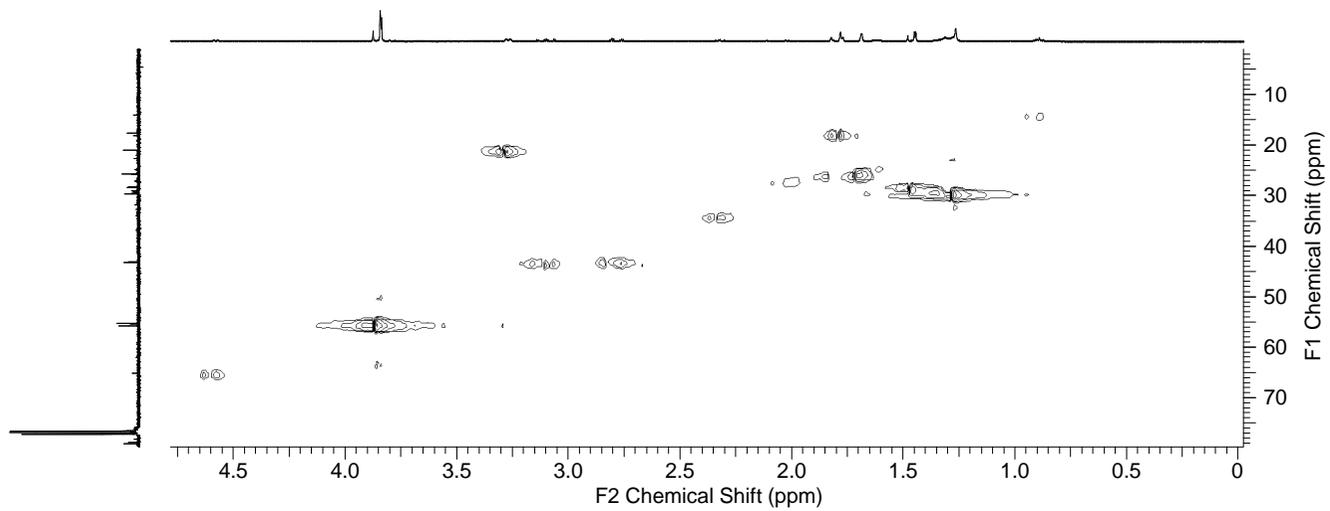
**Figura 43.** Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias **V** e **VI**



**Figura 44.** Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias **V** e **VI**



**Figura 45.** Mapa de contorno HSQC das substâncias **V** e **VI**

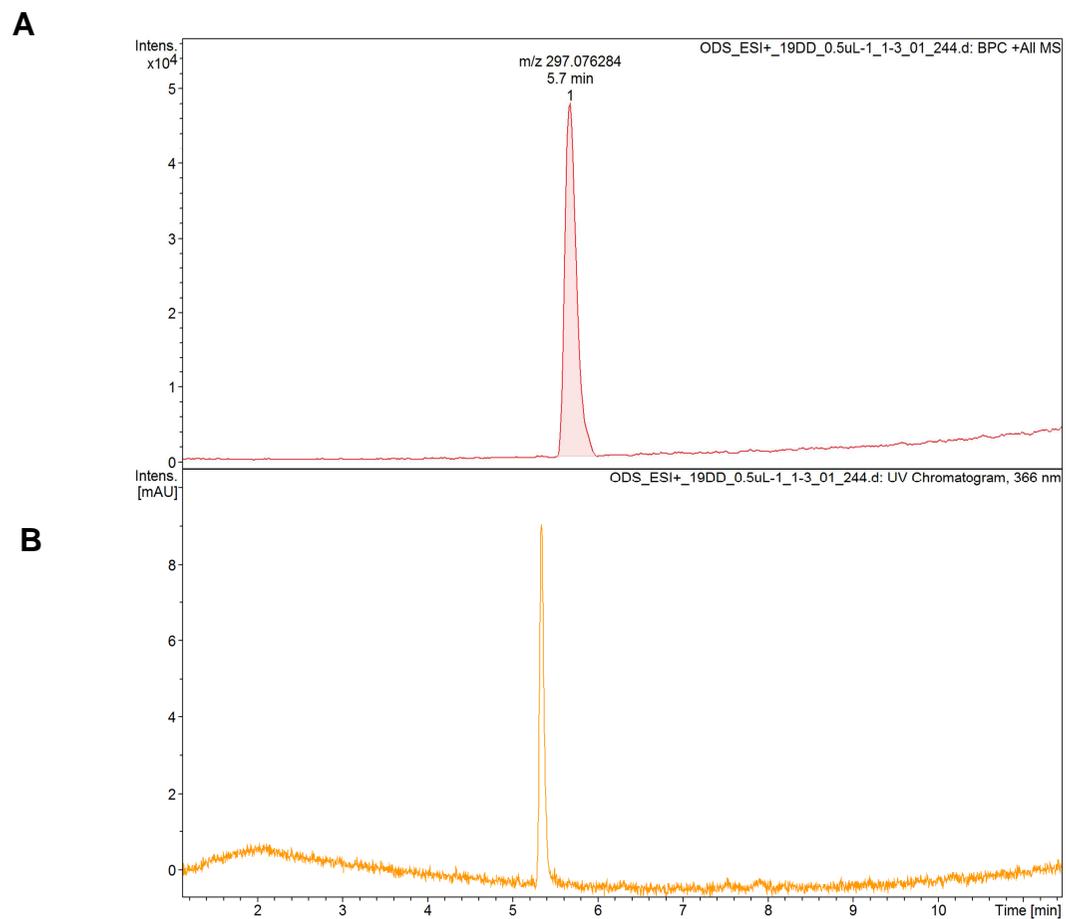


**Figura 46.** Expansão do mapa de contorno HSQC das substâncias **V** e **VI**

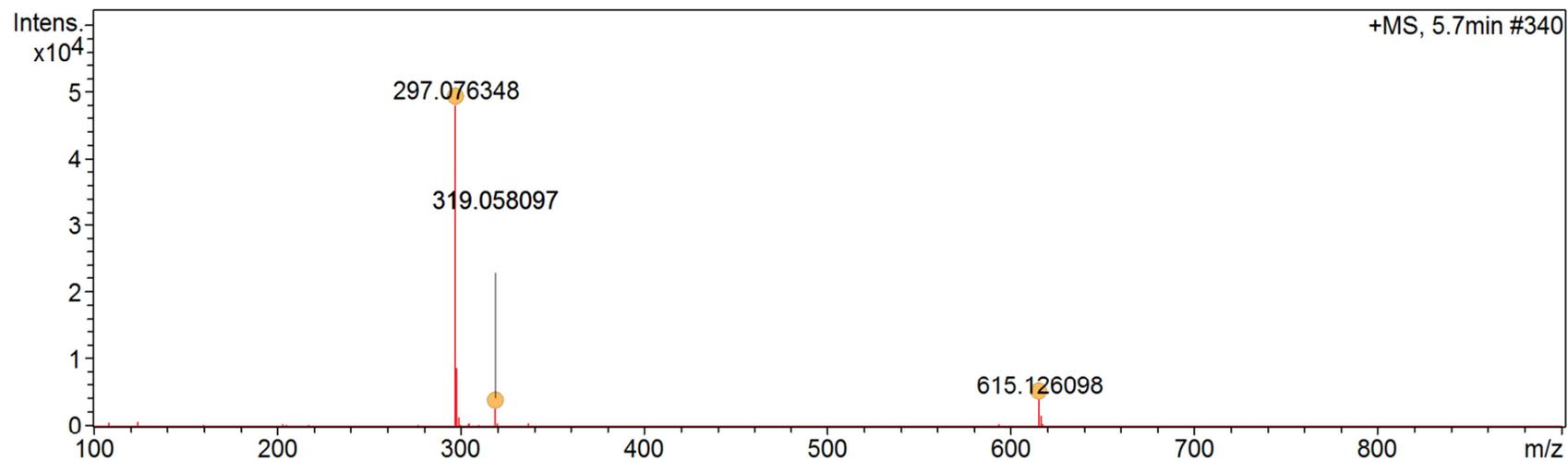
### 4.2.3 Identificação da substância VII

Por CCD, a fração 19 (15 mg) com  $R_f$  de 0,63 mostrou características de flavonoides por apresentar fluorescência no UV 254 e 365 nm.

Após análise dessa fração por espectrometria de massas de alta resolução via ionização por ESI, foi possível observar no cromatograma um pico em 5,7 min (Figura 47A) com absorção a UV 254 nm (Figura 47B). O espectro de massas de alta resolução (Figura 48) apresentou o íon de  $m/z$  297,076348  $[M + H]^+$ , compatível com fórmula molecular de  $C_{17}H_{12}O_5$  (Figura 48).



**Figura 47. (A)** Cromatograma do tipo *base peak* mostrando o pico do flavonoide **VII** 5,7 min; **(B)** Cromatograma mostrando o pico a UV 366 nm

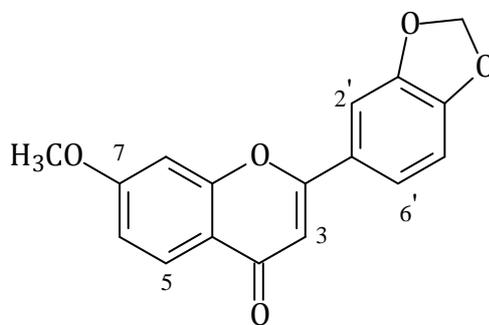


**Figura 48.** Espectro de massas de alta resolução, obtido via ESI no modo positivo, mostrando o íon de  $m/z$  297, 076348  $[M + H]^+$  referente ao pico em 5,7 min

As análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 49 a 51) da substância VII mostraram um *singleto* em  $\delta_{\text{H}}$  6,64 característico de hidrogênio do anel C de uma flavona (SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009). Outros sinais em  $\delta_{\text{H}}$  8,11 (1H, *d*,  $J = 8,8$  Hz, H-5), 6,97 (1H, *dd*,  $J = 8,8$  e 2,3, H-6) e 6,93 (1H, *d*,  $J = 2,3$  Hz, H-8) indicaram a presença do anel A com uma metoxila ( $\delta_{\text{H}}$  3,93, *s*) na posição 7.

Foram observados dois *singletos* em  $\delta_{\text{H}}$  6,06 integrando para dois hidrogênios característicos de um grupo metilenodioxí. Com a presença de dois *dubletos* em  $\delta_{\text{H}}$  7,33 (1H, *d*,  $J = 1,8$  Hz, H-2') e em 6,91 (1H, *d*,  $J = 8,3$  Hz, H-5') e um *duplo dubleto* em 7,46 (1H, *dd*,  $J = 8,3$  e 1,8, H-6') foi possível confirmar a presença do anel B.

De acordo com os dados analisados de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 17) em comparação com a literatura foi possível identificar a substância 3',4'-metilenodioxí-7-metoxiflavona (VII) já descrita por LIMA (2011).

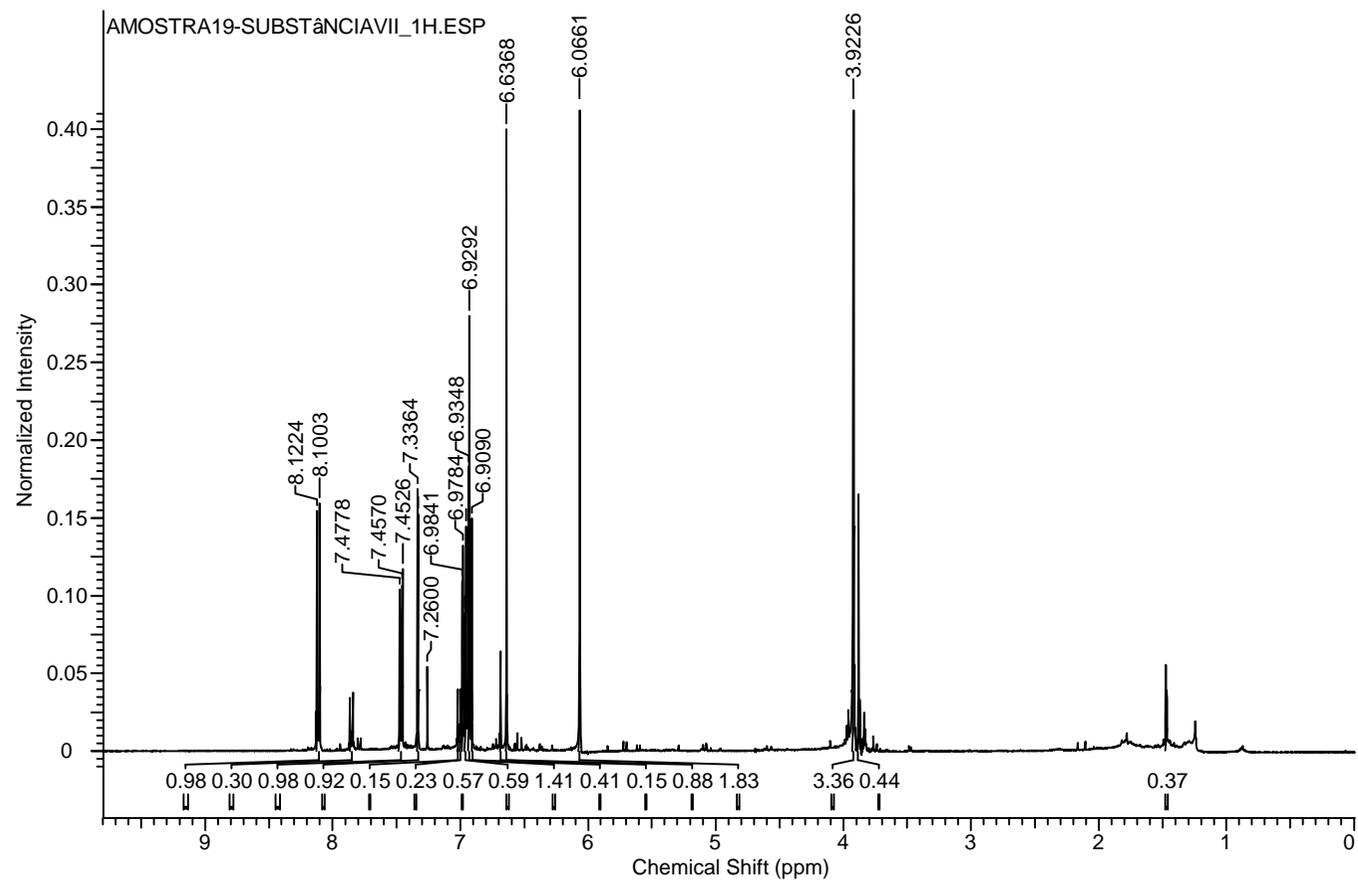


VII

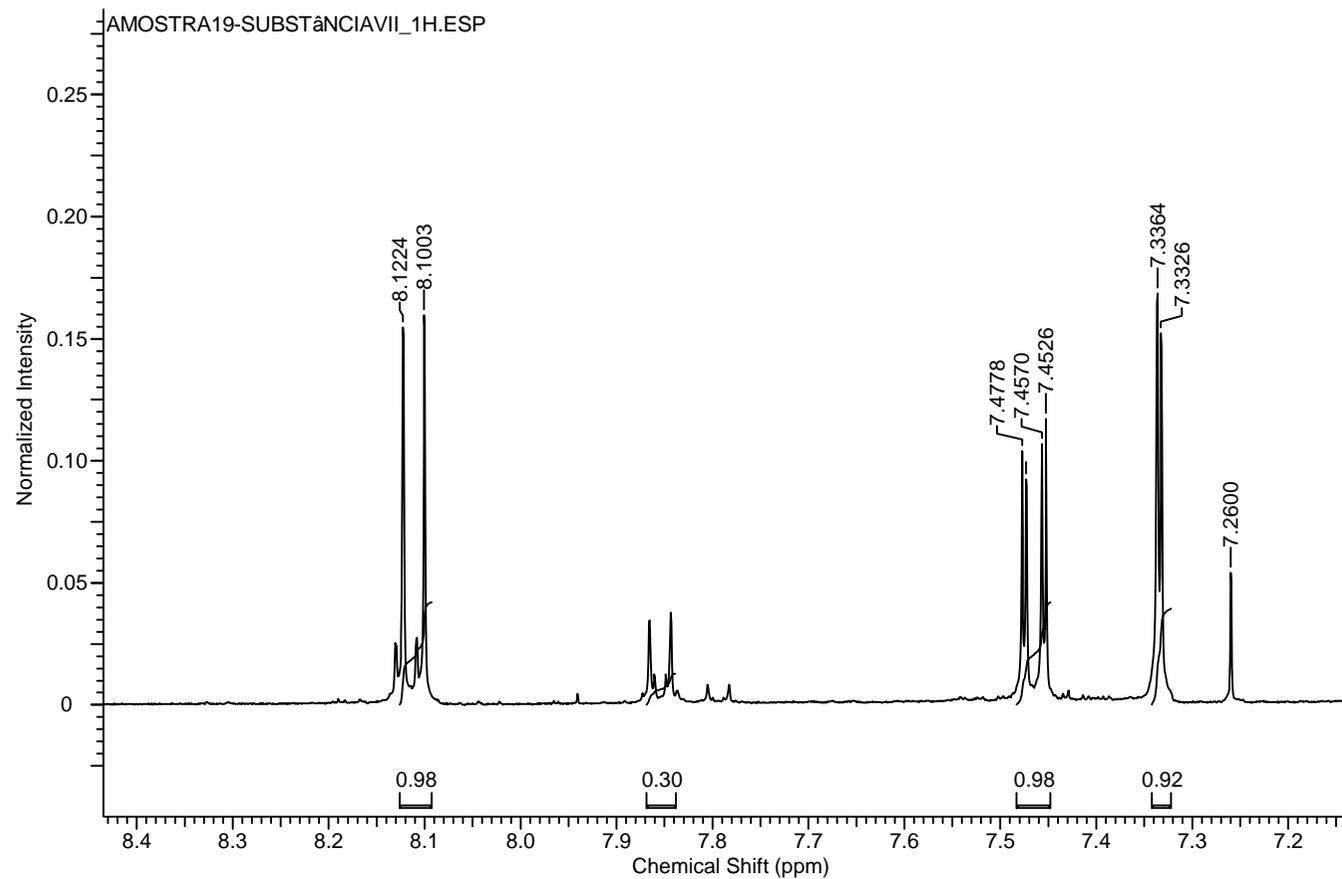
**Tabela 17.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da VII

H	$\delta$ (ppm) observado, multiplicidade e $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm) literatura*, multiplicidade e $J$ (Hz)
<b>3</b>	6,64 (1H, s)	7,08 (1H, s)
<b>5</b>	8,11 (1H, <i>d</i> , $J = 8,8$ )	8,35 (1H, <i>d</i> , $J = 9,0$ )
<b>6</b>	6,97 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,8$ e $2,3$ )	7,05 (1H, <i>dd</i> , $J = 9,0$ e $2,0$ )
<b>8</b>	6,93 (1H, <i>d</i> , $J = 2,3$ )	7,15 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ )
<b>2'</b>	7,33 (1H, <i>d</i> , $J = 1,8$ )	7,60 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ )
<b>5'</b>	6,91 (1H, <i>d</i> , $J = 8,3$ )	6,99 (1H, <i>d</i> , $J = 8,0$ )
<b>6'</b>	7,46 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,3$ e $1,8$ )	7,54 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,0$ e $2,0$ )
<b>7 OCH<sub>3</sub></b>	3,93 (3H, s)	3,80 (3H, s)
<b>CH<sub>2</sub></b>	6,06 (2H, s)	6,08 (2H, s)

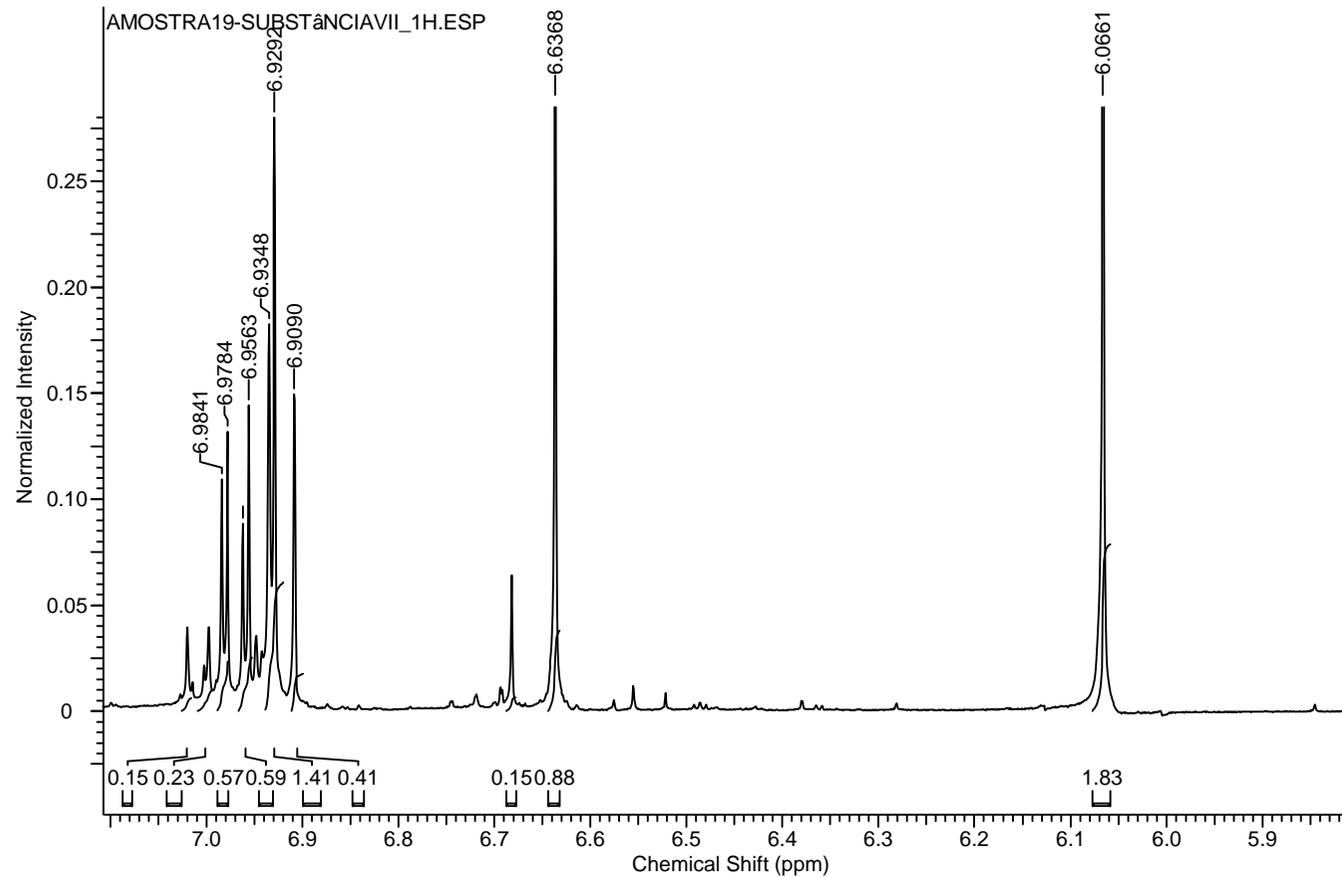
\*(MAHMOUD; WATERMAN, 1985) (250 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )



**Figura 49.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **VII** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



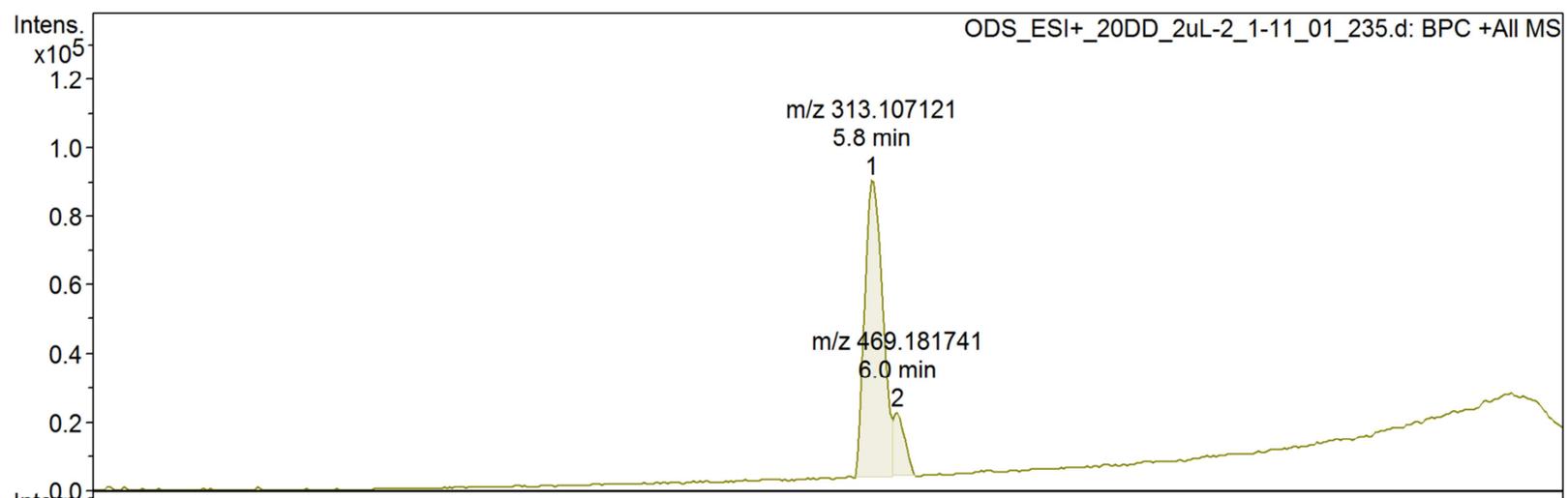
**Figura 50.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **VII** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



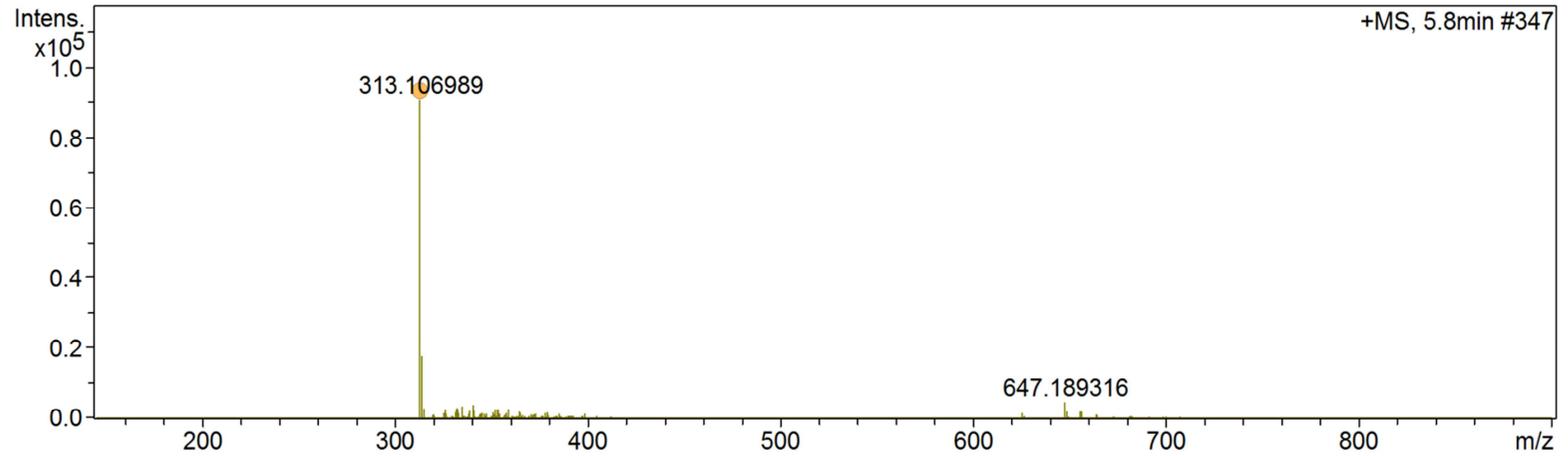
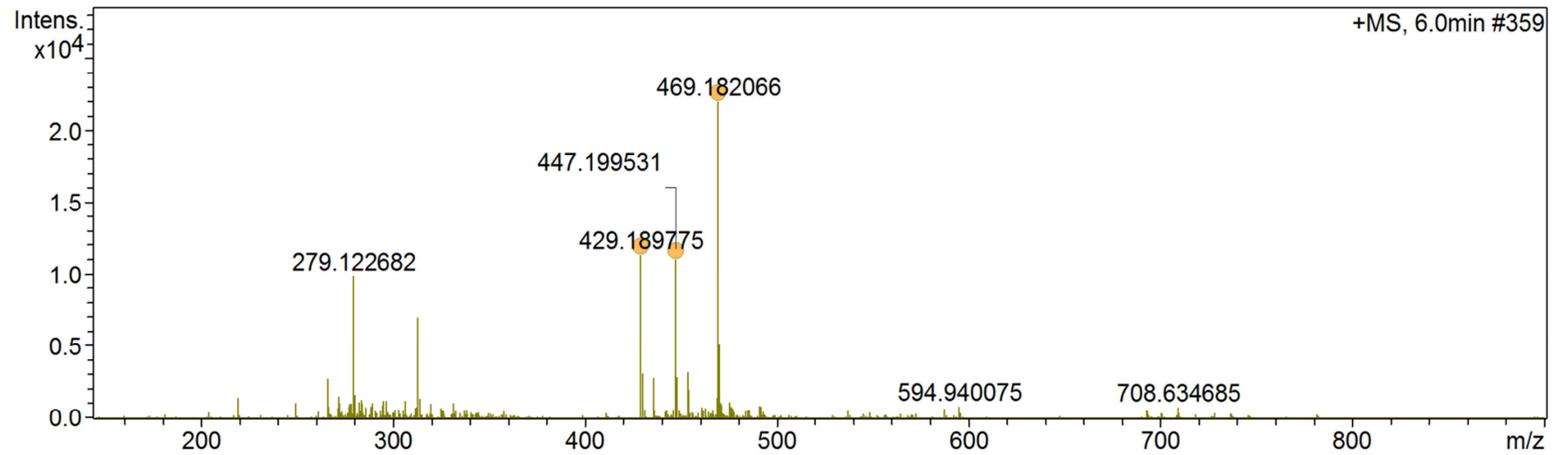
**Figura 51.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **VII** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

#### 4.2.4 Identificação das substâncias VIII e IX

As fração 20 (codificada como 20 DD) (35 mg) apresentou fluorescência sob luz UV 254 e 365 nm. Após análises por CLAE/EM, observaram-se dois picos majoritários nos tempos de retenções de 5,8 e 6,0 min (Figura 52) e o espectro de massas apresentou um íon de alta resolução a  $m/z$  313,106989  $[M + H]^+$  correspondendo a fórmula molecular de  $C_{18}H_{16}O_5$  (**VIII**) (Figura 53A) e o outro íon a  $m/z$  469,182066  $[M + Na]^+$  correspondendo à fórmula molecular de  $C_{24}H_{30}O_8$  (**IX**) (Figura 53B).



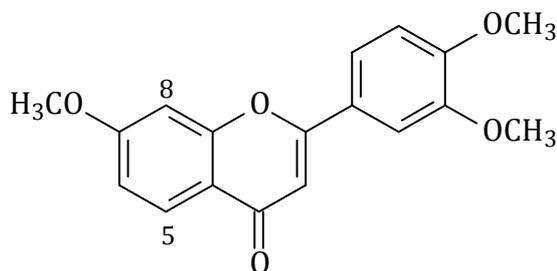
**Figura 52.** Cromatograma mostrando os picos com tempo de retenção em 5,8 min da substância **VIII** e em 6,0 min da substância **IX**

**A****B**

**Figura 53. (A)** Espectro mostrando o ion a  $m/z$  313,106989  $[M + H]^+$  referente a substância **VIII** e **(B)** e o ion a  $m/z$  469, 182066  $[M + Na]^+$  referente a substância **IX**

Após análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 54 a 56) verificou-se a presença de um *singleto* em  $\delta_{\text{H}}$  6,69 característico do anel C de flavona. Os outros sinais na região de aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  8,11 (1H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-5), 6,98 (1H, *dd*,  $J = 8,5$  e  $2,0$  Hz, H-6) e 6,96 (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-8) indicaram um total de 3 hidrogênios pertencentes ao anel A, principalmente pela presença do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  8,11, pois é comum de hidrogênio *peri*-carbonila (H-5) e esta atribuição é confirmada pela correlação no mapa de contorno COSY (Figuras 59 e 61):  $\delta_{\text{H}}$  8,11 e 6,98; e também correlação no mapa de contorno HMBC (Figuras 65 a 68):  $\delta_{\text{H}}$  8,11 e  $\delta_{\text{C}}$  177,8 (referente ao carbono da carbonila).

Os demais sinais observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 54 a 56) e  $^{13}\text{C}$  (Figuras 57 a 59) estão mostrados na Tabela 18 e 19, respectivamente. Também foram observadas as seguintes correlações no mapa de contorno de HMBC (Figuras 65 a 68):  $\delta_{\text{C}}$  164,0 e  $\delta_{\text{H}}$  6,98;  $\delta_{\text{C}}$  114,2 e  $\delta_{\text{H}}$  6,98;  $\delta_{\text{C}}$  177,8 e  $\delta_{\text{H}}$  6,69;  $\delta_{\text{C}}$  108,7 e  $\delta_{\text{H}}$  7,53;  $\delta_{\text{C}}$  119,8 e  $\delta_{\text{H}}$  7,35 e  $\delta_{\text{C}}$  151,8 e  $\delta_{\text{H}}$  7,53. Estes dados confirmam na identificação da flavona 3',4',7-trimetoxiflavona (**VIII**), isolada anteriormente em *Virola venosa* (KATO; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1992).



**VIII**

**Tabela 18.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **VIII**

<b>H</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (ppm), multiplicidade e <math>J</math> (Hz)</b>
<b>3</b>	6,69 (s)
<b>5</b>	8,11 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ )
<b>6</b>	6,98 ( <i>dd</i> , $J = 8,5$ e 2,0)
<b>8</b>	6,96 ( <i>d</i> , $J = 2,0$ )
<b>2'</b>	7,35 ( <i>d</i> , $J = 2,0$ )
<b>5'</b>	6,95 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ )
<b>6'</b>	7,53 ( <i>dd</i> , $J = 8,5$ e 2,0)
<b>3' OCH<sub>3</sub></b>	3,97 (s)
<b>4' OCH<sub>3</sub></b>	3,95 (s)
<b>7 OCH<sub>3</sub></b>	3,92 (s)

**Tabela 19.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **VIII**

<b>C</b>	<b><math>^{13}\text{C}</math> RMN <math>\delta</math> (ppm)</b>
<b>2</b>	163,0
<b>3</b>	106,3
<b>4</b>	177,8
<b>5</b>	126,9
<b>6</b>	114,2
<b>7</b>	164,0
<b>8</b>	111,0
<b>9</b>	157,8
<b>10</b>	117,6
<b>1'</b>	124,2
<b>2'</b>	108,7
<b>3'</b>	149,2
<b>4'</b>	151,8
<b>5'</b>	100,3
<b>6'</b>	119,8
<b>3' OCH<sub>3</sub></b>	56,1
<b>4' OCH<sub>3</sub></b>	56,0
<b>7 OCH<sub>3</sub></b>	55,8

Como essa substância estava em mistura, então foi dada a continuação na identificação da outra substância. Primeiramente foi iniciada a análise dos outros sinais presentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 54 a 56) e foram observados sinais em  $\delta$  6,57 (4H, s),  $\delta$  4,75 (2H, d,  $J = 4,0$  Hz),  $\delta$  4,31 (2H, dd,  $J = 9,0$  e 6,9 Hz), 3,92 (2H, dd,  $J = 9,0$  e 4,0) e  $\delta$  3,09 (2H, m) indicando a presença de uma lignana. Esses sinais apresentaram correlação no mapa de contorno de HSQC (Figuras 62 a 64):  $\delta_{\text{C}}$  102,7 e  $\delta_{\text{H}}$  6,57;  $\delta_{\text{C}}$  85,9 e  $\delta_{\text{H}}$  4,75;  $\delta_{\text{C}}$  54,3 e  $\delta_{\text{H}}$  3,09 bem como as correlações observadas também no HMBC (Figuras 66 a 69):  $\delta_{\text{C}}$  137,4 e  $\delta_{\text{H}}$  6,57 ( $^3\text{J}$ );  $\delta_{\text{C}}$  137,4 e  $\delta_{\text{H}}$  3,82 ( $^3\text{J}$ );  $\delta_{\text{C}}$  85,9 e  $\delta_{\text{H}}$  6,57 ( $^3\text{J}$ );  $\delta_{\text{C}}$  85,9 e  $\delta_{\text{H}}$  4,31 ( $^3\text{J}$ );  $\delta_{\text{C}}$  54,3 e  $\delta_{\text{H}}$  4,75 ( $^2\text{J}$ ).

Vale ressaltar que os demais sinais de RMN de  $^1\text{H}$  (Tabela 20) e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 21) foram comparados com a literatura permitindo a caracterização completa da lignana iangambina **(IX)**.

Essa lignana foi, previamente, identificada em outras espécies como *Achillea holosericea* (Asteraceae) (AHMED et al., 2002), *Magnolia fargesii* (Magnoliaceae) (KIM et al., 2009) e *Ocotea duckei* (Lauraceae) (ANTUNES et al., 2006). Também apresenta descrição de atividades biológicas: analgésica, anticâncer (HAUSOTT; GREGER; MARIAN, 2003) e efeitos contra colapso cardiovascular (ARAÚJO et al., 2001). Entretanto, a lignana iangambina está sendo descrita pela primeira vez em *Deguelia*.

**Tabela 20.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância IX

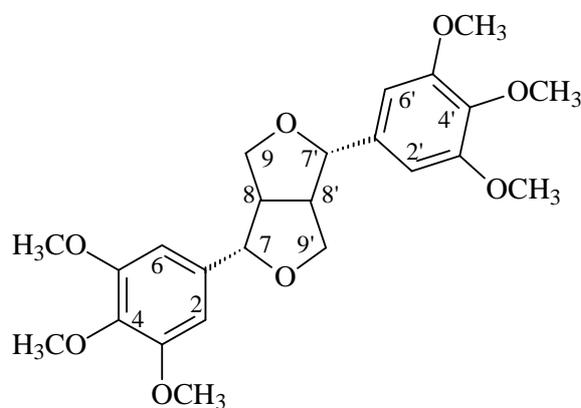
C	$\delta$ RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm)	
	Observado	Literatura*
1, 1'	136,6	137,0
2, 6, 2', 6'	102,7	103,1
3, 3', 5, 5'	153,3	153,7
4, 4'	137,4	-
7, 7'	85,9	86,2
8, 8'	54,3	54,6
9, 9'	71,9	72,2
3, 3', 5, 5'-OCH <sub>3</sub>	55,8	56,4
4, 4'-OCH <sub>3</sub>	60,8	61,1

\*(AHMED et al., 2002) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

**Tabela 21.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância IX

H	$\delta$ (ppm), multiplicidade e $J$ (Hz)	
	$^1\text{H}$ RMN - Observado	$^1\text{H}$ RMN-Literatura*
2, 6, 2', 6'	6,57 (4H, s)	6,58 (4H, s)
7, 7'	4,75 (2H, <i>d</i> , $J = 4,0$ )	4,76 (2H, <i>d</i> , $J = 4,0$ )
9 $\alpha$ , 9' $\alpha$	4,31 (2H, <i>dd</i> , $J = 9,0$ e 6,9)	4,32 (2H, <i>dd</i> , $J = 9,2$ e 6,9)
9 $\beta$ , 9' $\beta$	3,92 (2H, <i>dd</i> , $J = 9,0$ e 4,0)	3,95 (2H, <i>dd</i> , $J = 9,2$ e 3,6)
3, 3', 5, 5' -OCH <sub>3</sub>	3,86 (12H, s)	3,88 (12H, s)
4, 4' -OCH <sub>3</sub>	3,82 (6H, s)	3,85 (6H, s)
8, 8'	3,09 (2H, <i>m</i> )	3,11 (2H, <i>m</i> )

\*(AHMED et al., 2002) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**IX**

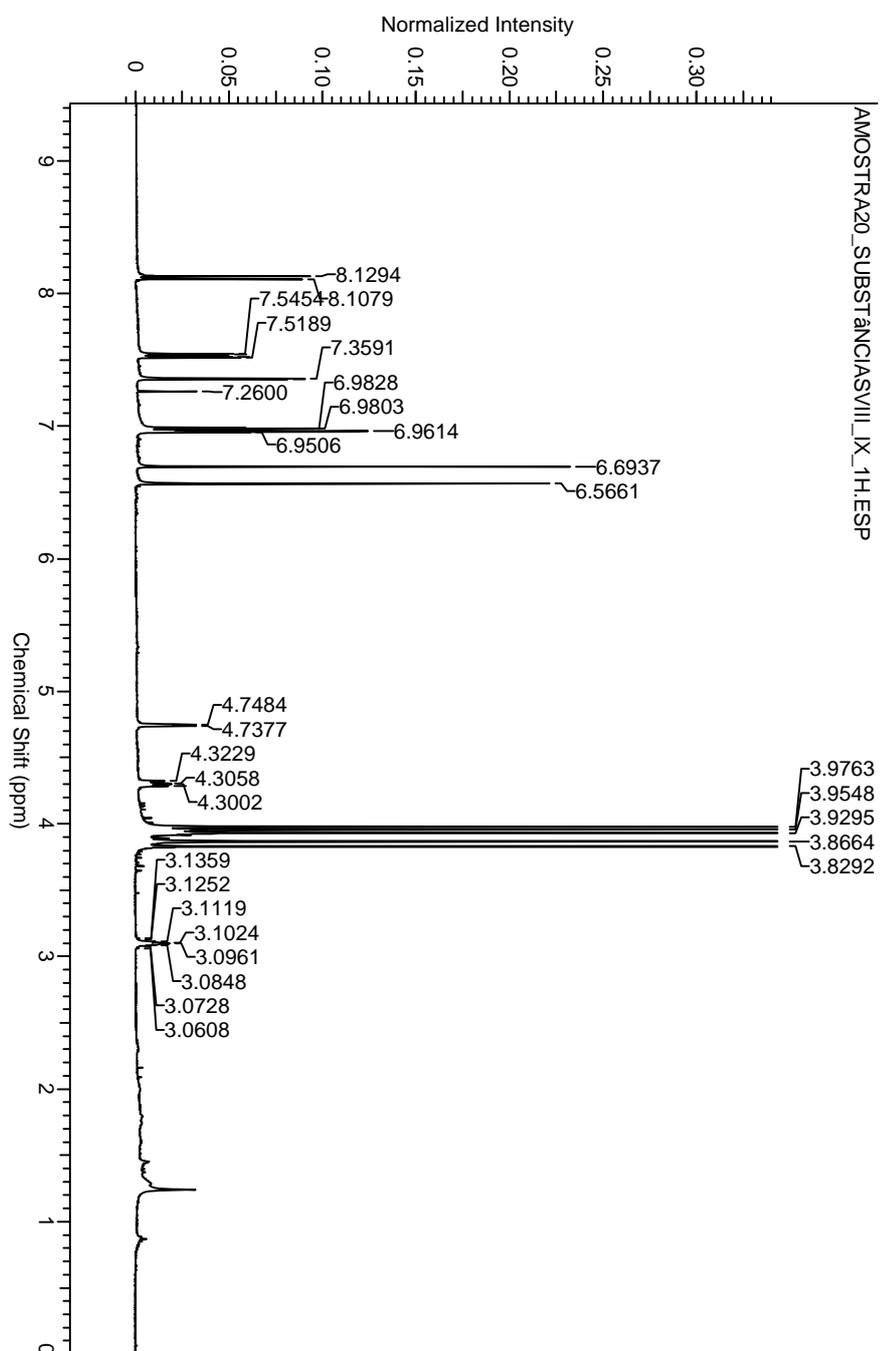
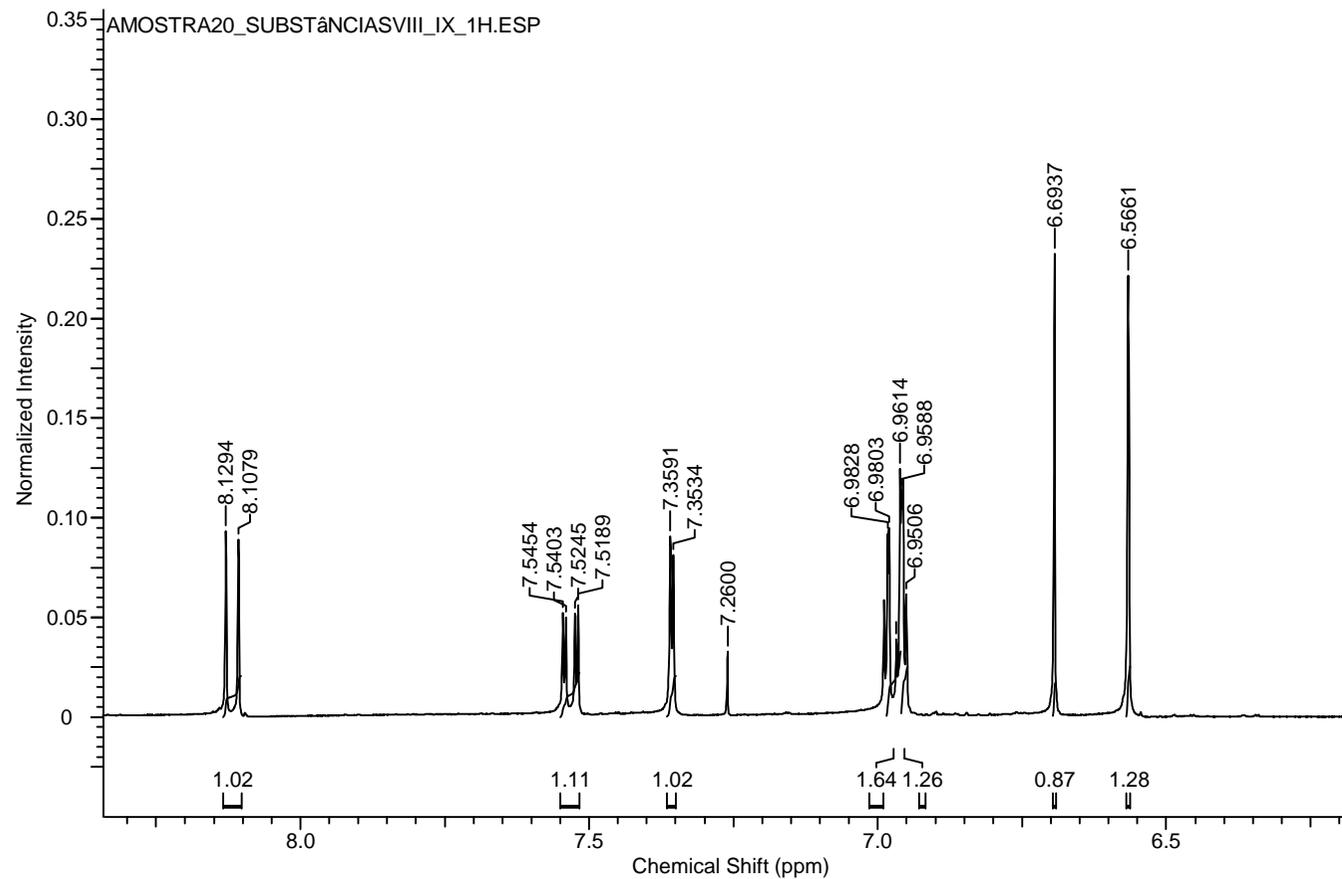


Figura 54. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias VIII e IX (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 55.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **VIII** e **IX** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

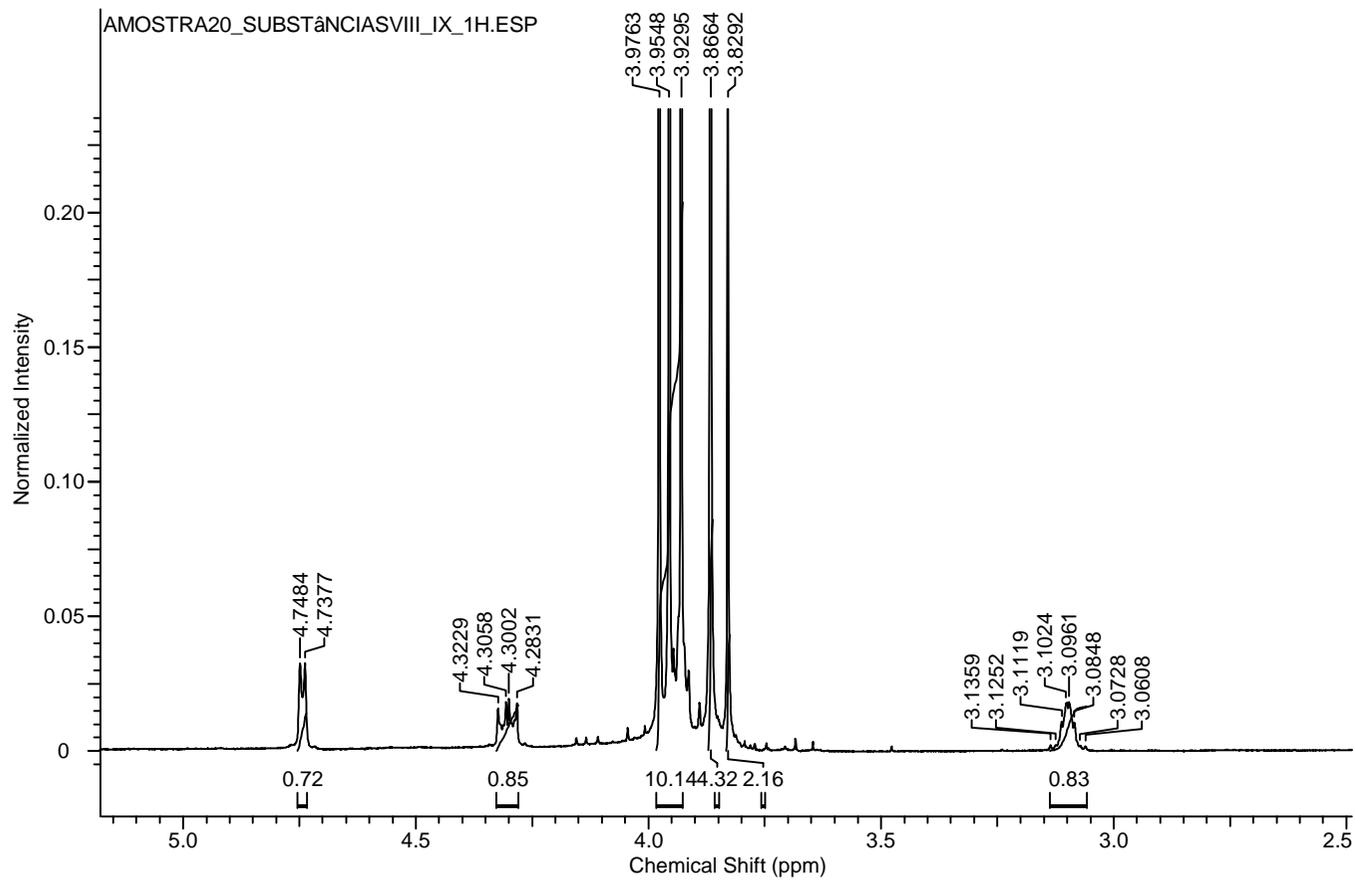


Figura 56. Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias VIII e IX (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

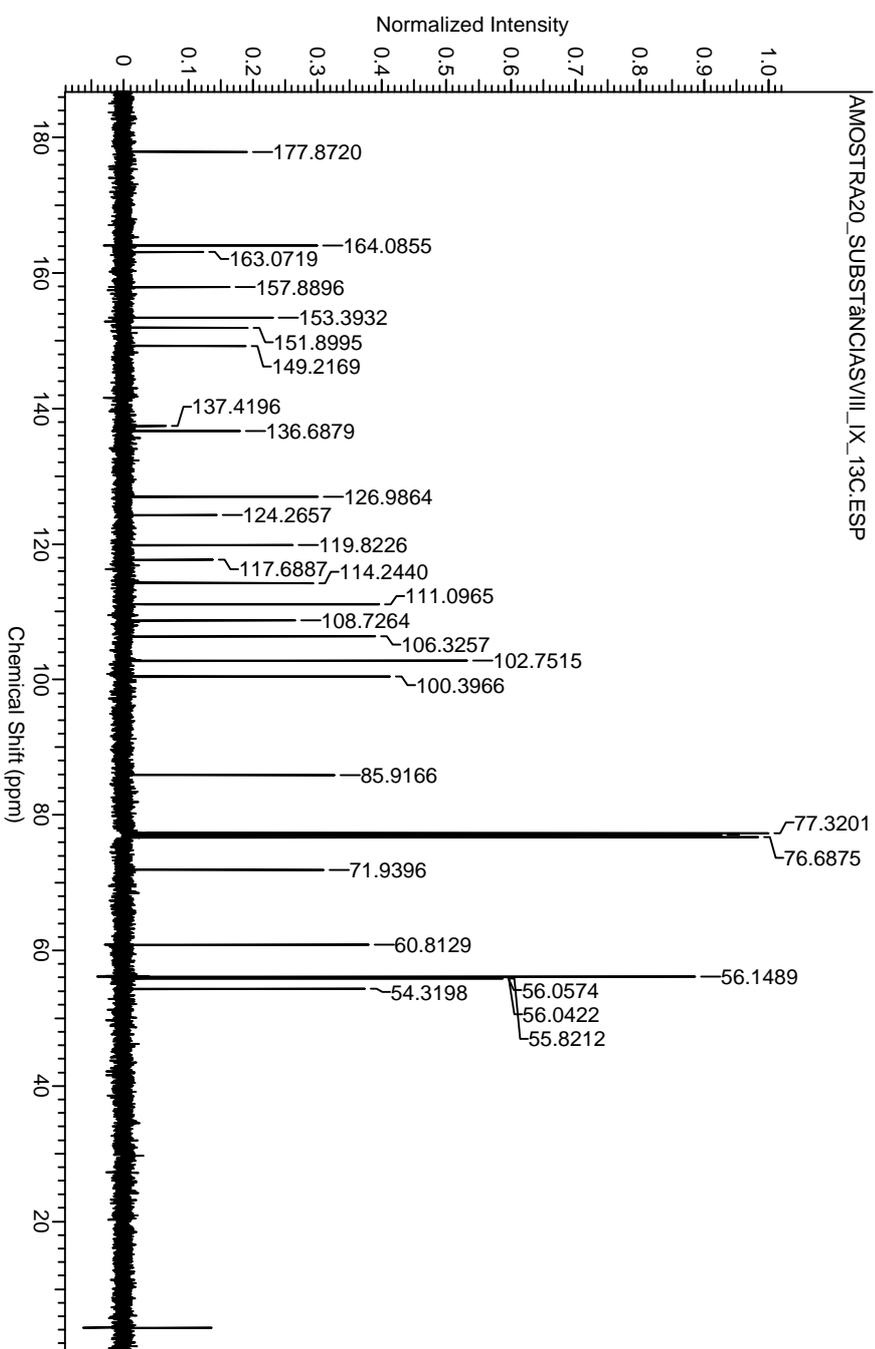
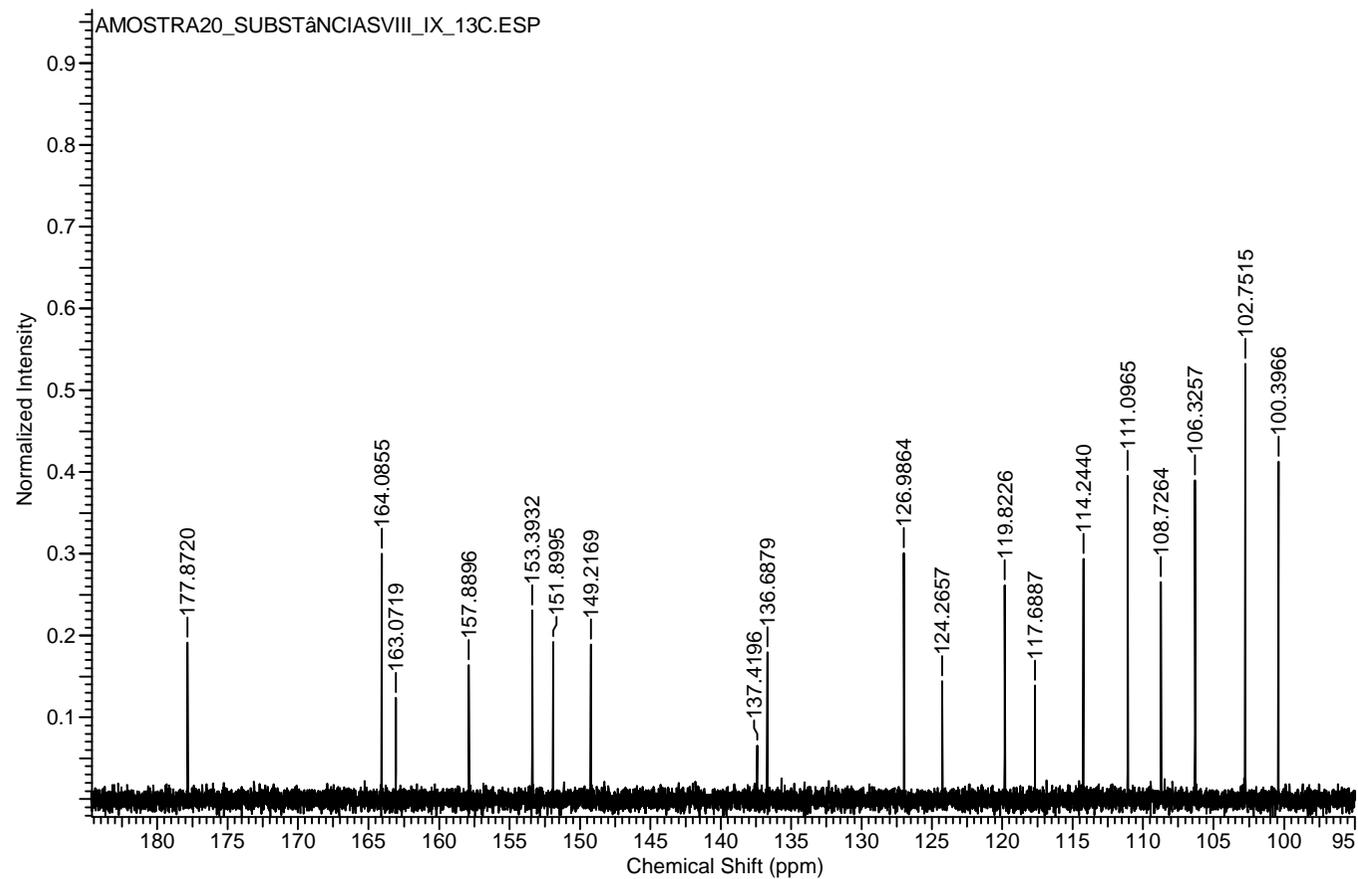
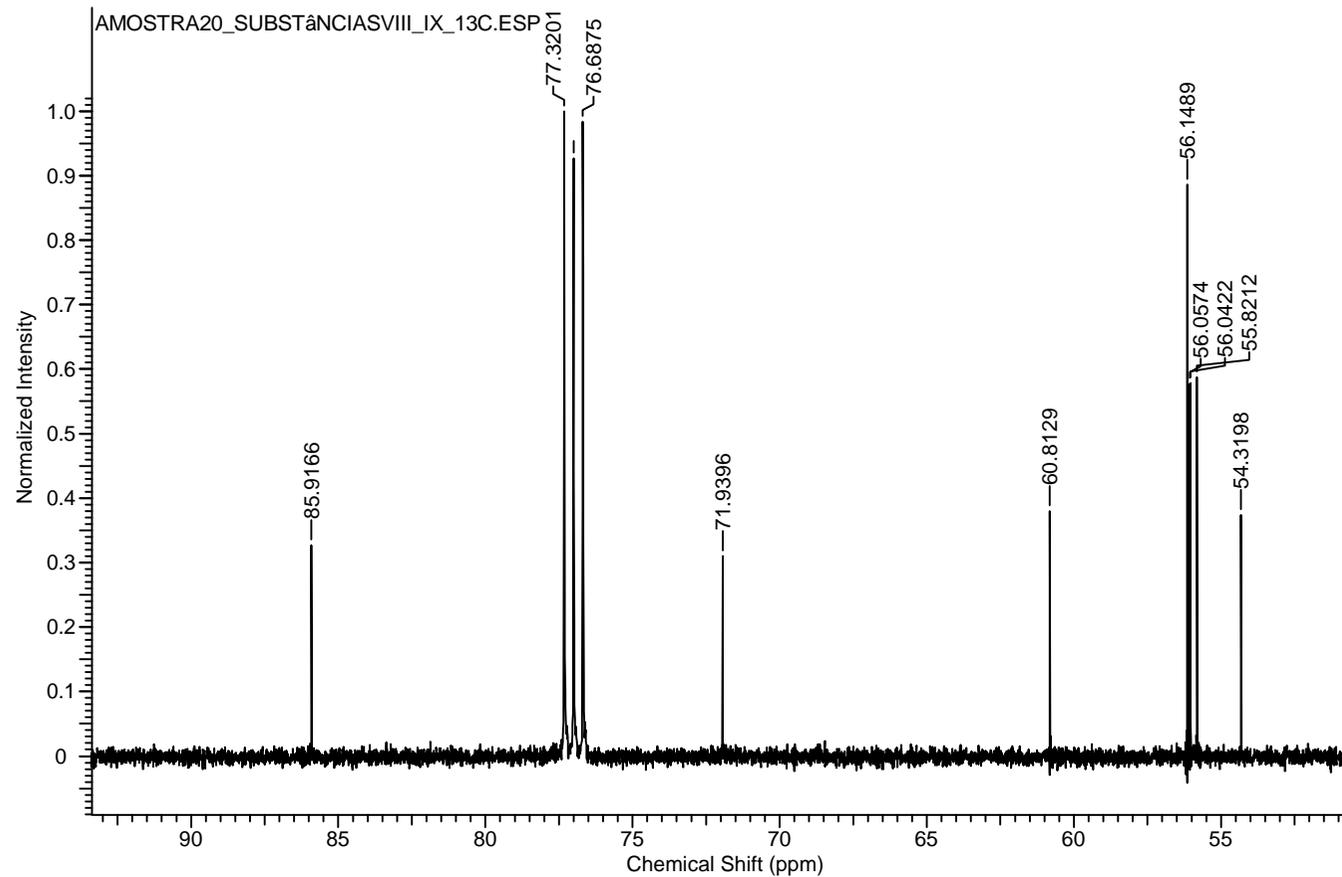


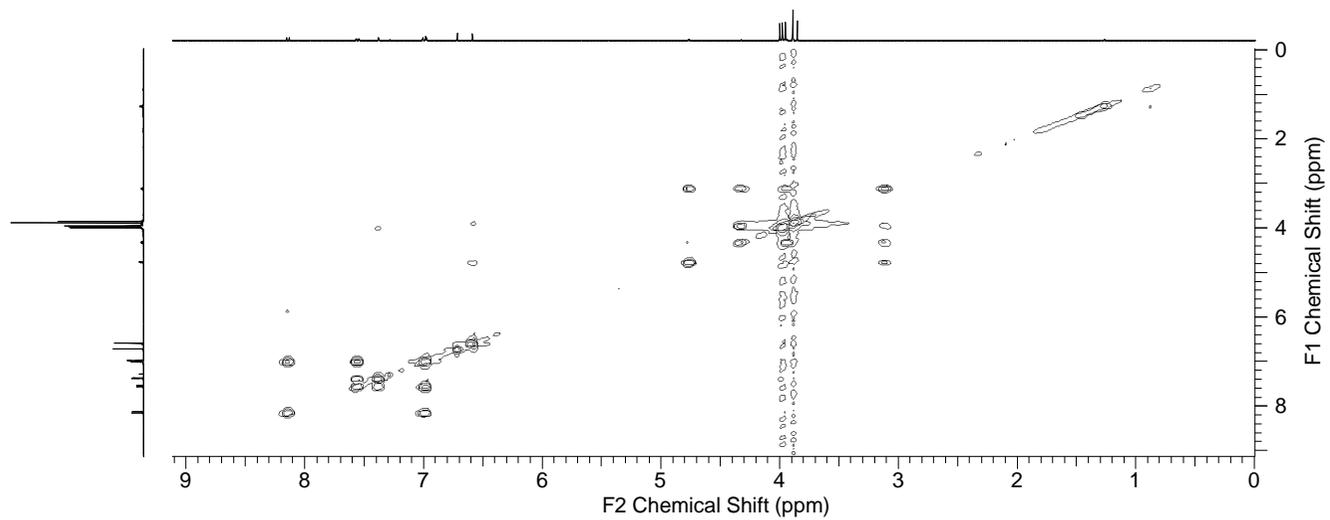
Figura 57. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C das substâncias VIII e IX (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



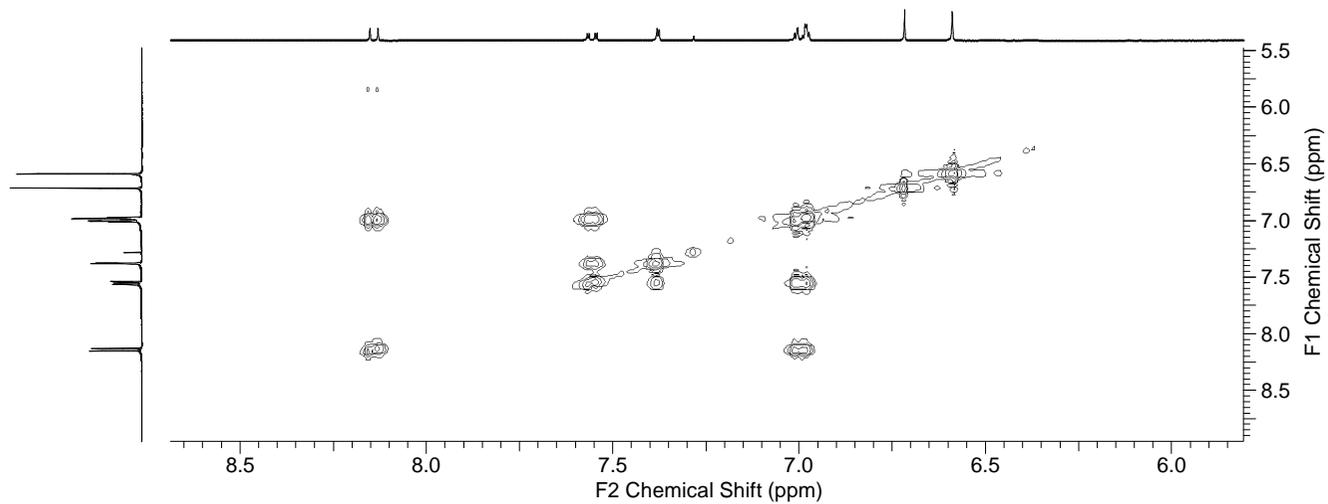
**Figura 58.** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **VIII** e **IX** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



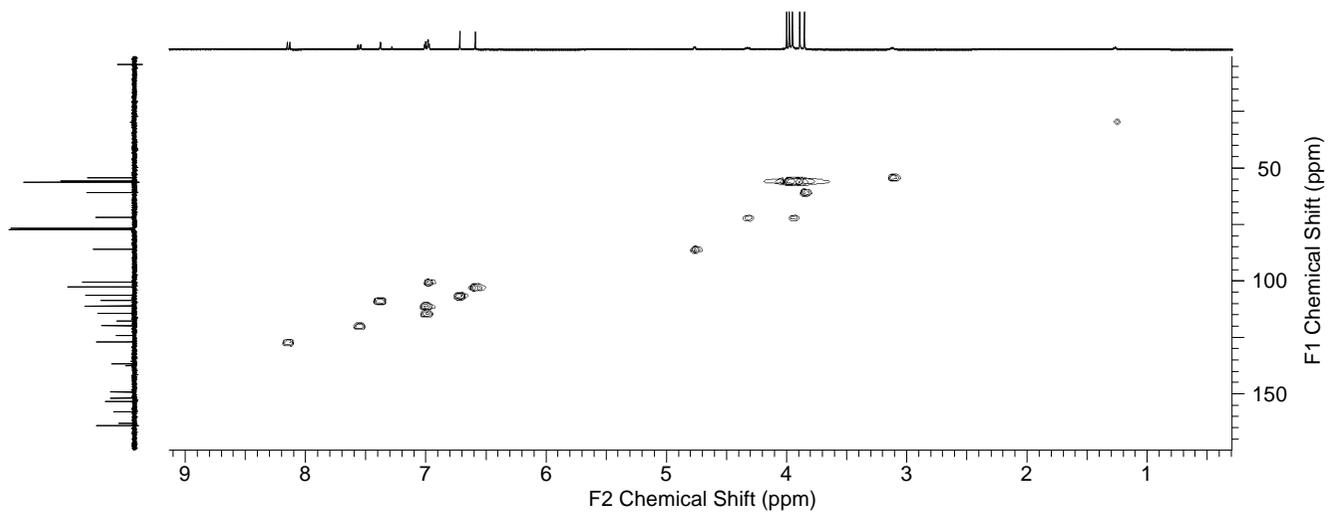
**Figura 59.** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **VIII** e **IX** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



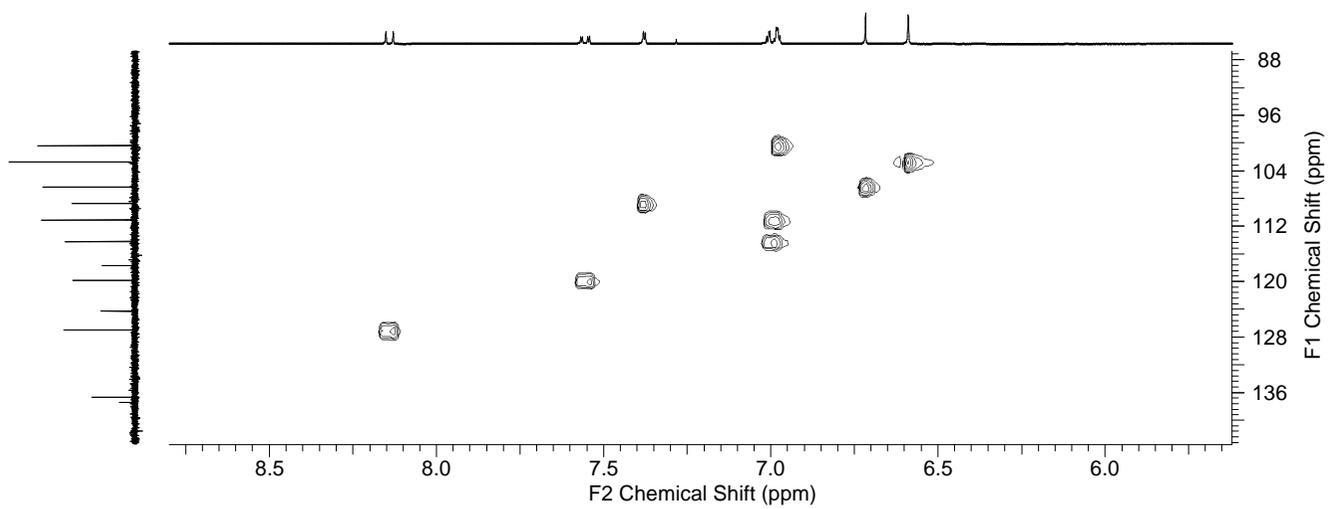
**Figura 60.** Mapa de contorno COSY das substâncias **VIII** e **IX**



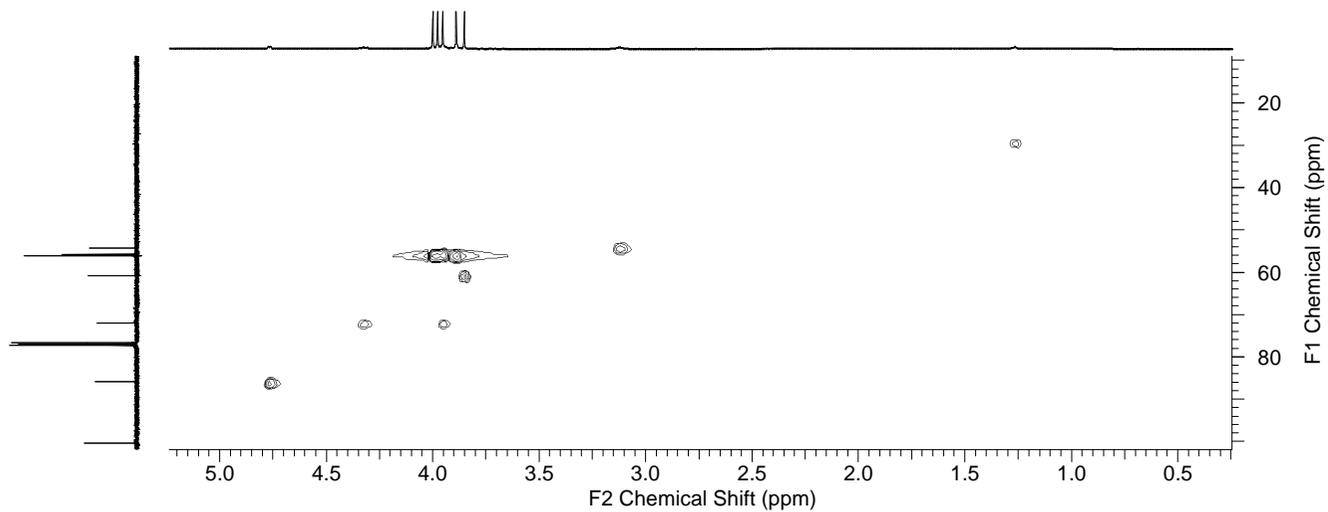
**Figura 61.** Expansão do mapa de contorno COSY das substâncias **VIII** e **IX**



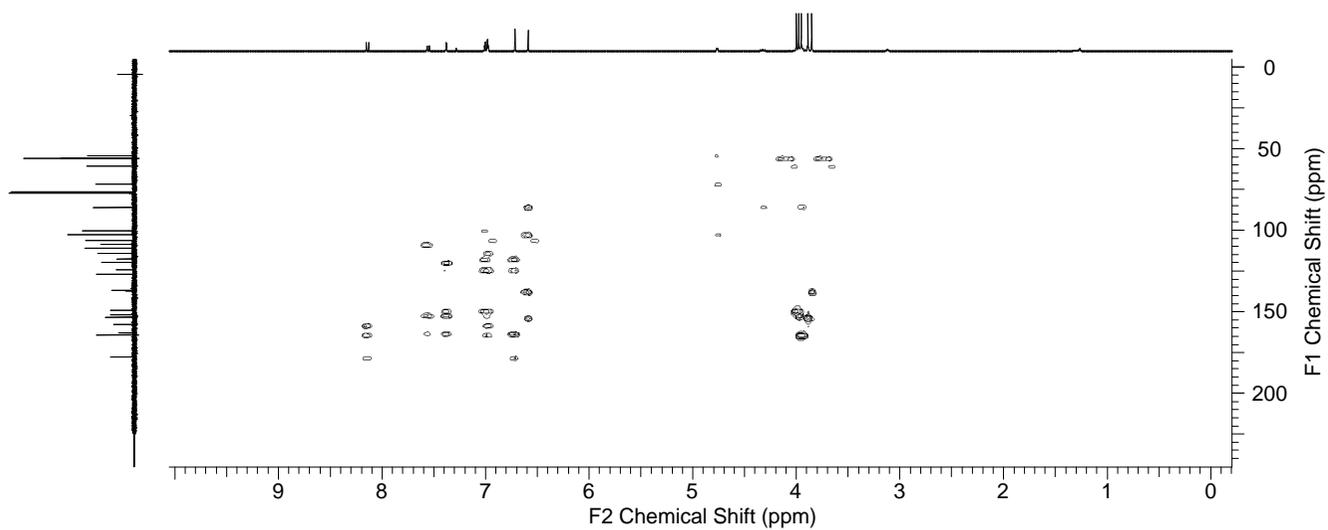
**Figura 62.** Mapa de contorno HSQC das substâncias **VIII** e **IX**



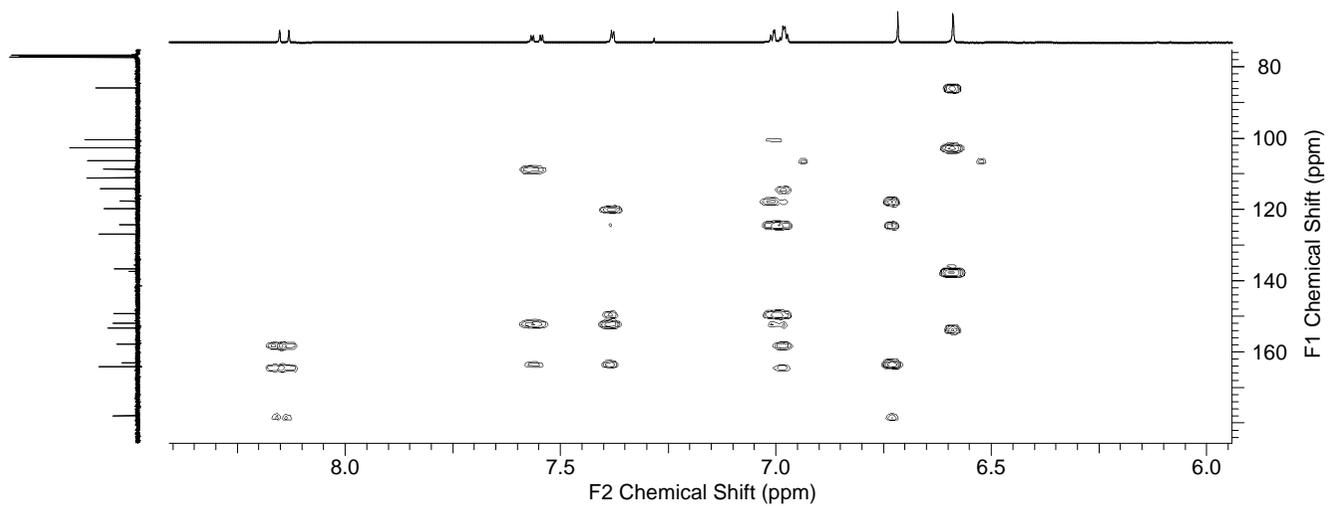
**Figura 63.** Expansão do mapa de contorno HSQC das substâncias **VIII** e **IX**



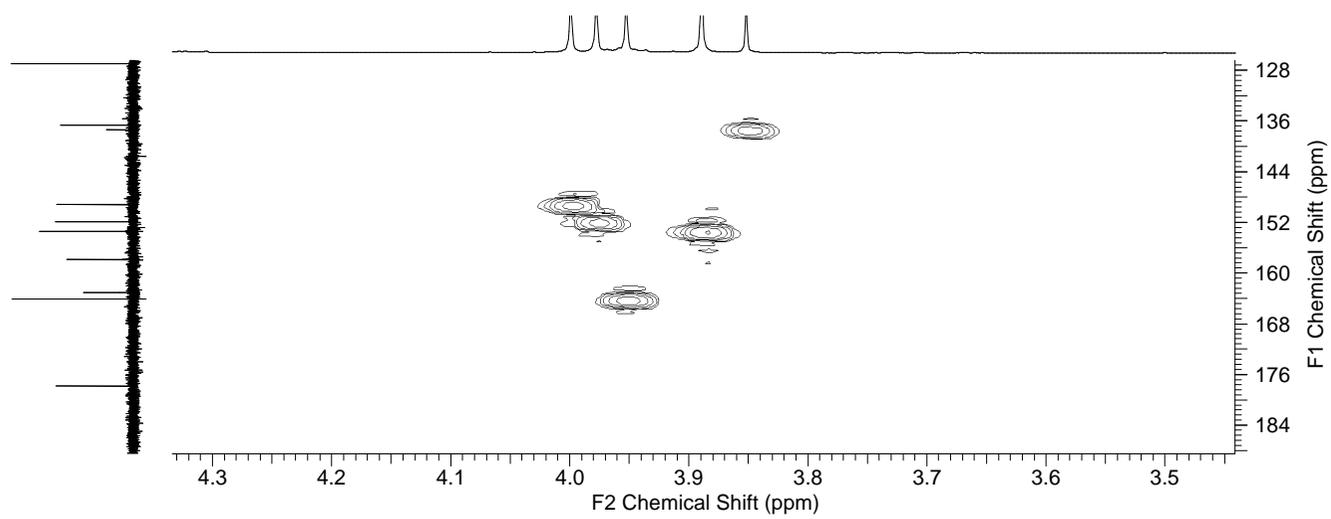
**Figura 64.** Expansão do mapa de contorno HSQC das substâncias **VIII** e **IX**



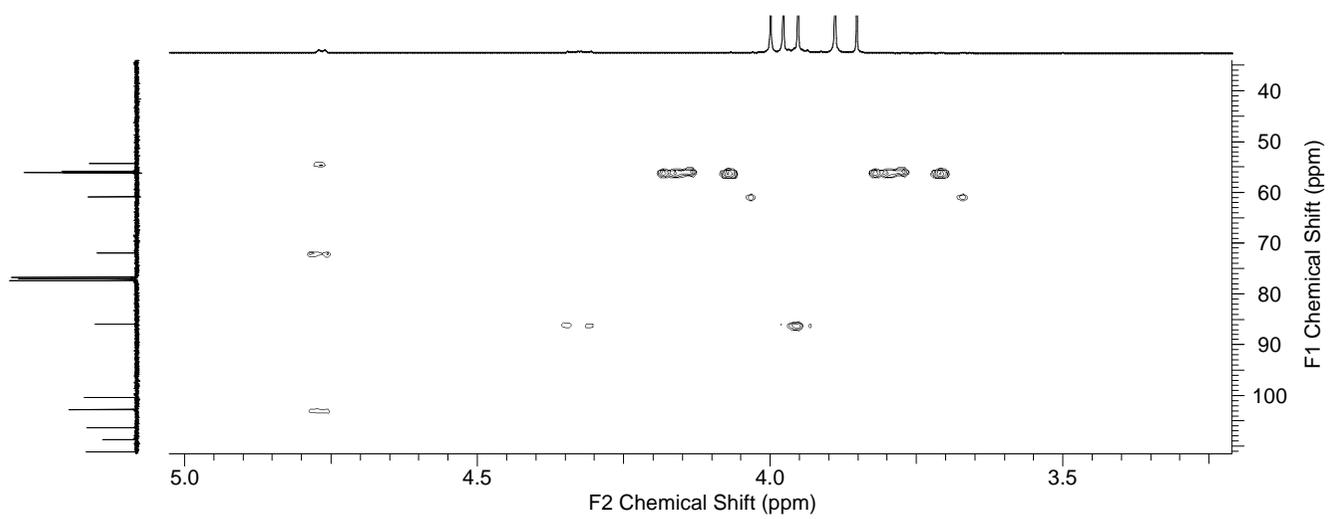
**Figura 65.** Mapa de contorno HMBC das substâncias **VIII** e **IX**



**Figura 66.** Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias **VIII** e **IX**



**Figura 67.** Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias **VIII** e **IX**



**Figura 68.** Expansão do mapa de contorno HMBC das substâncias **VIII** e **IX**

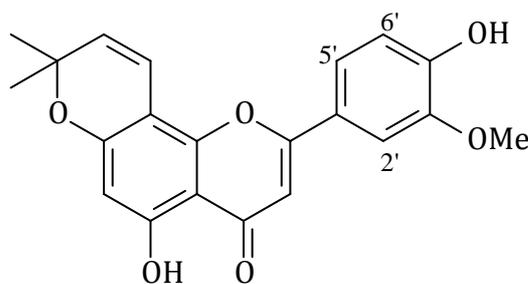
#### 4.2.5 Identificação da substância X

A fração 18 (codificada como 18DD-A) (1 mg) apresentou uma mancha majoritária de coloração amarelada após revelar com NP-PEG com  $R_f$  de 0,58. A análise por RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 69 a 72) mostrou um *singleto* em  $\delta$  6,54 (1H, s) caracterizando o H-3 de uma flavona. Outros sinais foram observados em  $\delta$  7,42 (2H, *d*,  $J = 8,1$  Hz) e em 6,95 (1H, *d*,  $J = 8,1$  Hz) totalizando em 3 hidrogênios pertencentes ao anel B. Também foram detectados os sinais em  $\delta$  5,72 (1H, s) e em 3,98 (3H, s) referentes, respectivamente, aos grupos hidroxila e metoxila. Já os dois *doubletos* em  $\delta_{\text{H}}$  6,71 (1H,  $J = 9,8$  Hz) e 5,61 (1H,  $J = 9,8$  Hz), e um intenso *singleto* em 1,47 integrando para 6 hidrogênios indicaram a presença do grupo 2,2-dimetilcromeno. Por fim, verificou-se a presença de dois *singletos* em 6,40 e outro em 13,09, cada um com integral para 1 hidrogênio, pertencentes ao anel A. No mapa de contorno COSY (Figura 73) foi possível observar dois acoplamentos:  $\delta$  6,71 (H-4'') e 5,61 (H-5'') e também entre  $\delta$  7,42 (H-6') e 6,95 (H-5'). A partir desses dados em comparação com a literatura (Tabela 22) permitiu a identificação da racemoflavona (**X**), a qual está sendo descrita pela primeira vez em *Deguelia*.

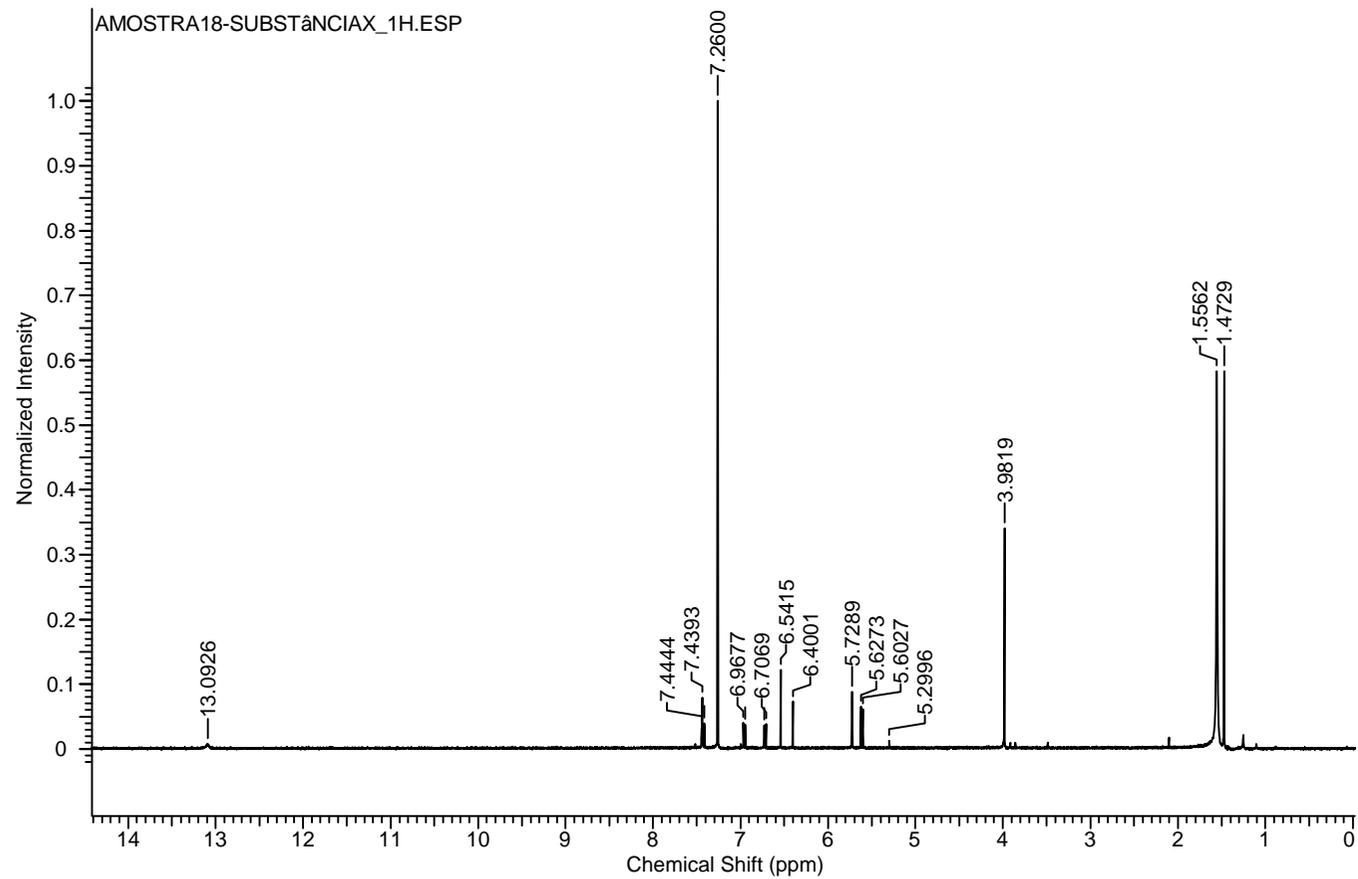
Tabela 22. Dados de  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância X

H	$\delta$ (ppm), multiplicidade e $J$ (Hz)	
	$^1\text{H}$ RMN - Observado	$^1\text{H}$ RMN-Literatura*
2'	7,44 (1H, s)	7,61 (1H, <i>br s</i> )
6'	7,42 (1H, <i>d</i> , $J = 8,1$ )	7,65 (1H, <i>d</i> , $J = 8,0$ )
5'	6,95 (1H, <i>d</i> , $J = 8,1$ )	7,03 (1H, <i>d</i> , $J = 8,0$ )
3	6,54 (1H, s)	6,74 (1H, s)
6	6,40 (1H, s)	6,18 (1H, s)
4''	6,71 (1H, <i>d</i> , $J = 9,8$ )	6,91 (1H, <i>d</i> , $J = 10,0$ )
5''	5,61 (1H, <i>d</i> , $J = 9,8$ )	5,79 (1H, <i>d</i> , $J = 10,0$ )
5 OH	13,09 (1H, s)	-
4' OH	5,72 (1H, s)	-
3' OCH <sub>3</sub>	3,98 (3H, s)	4,00 (3H, s)
7'', 8'' CH <sub>3</sub>	1,47 (6H, s)	1,48 (6H, s)

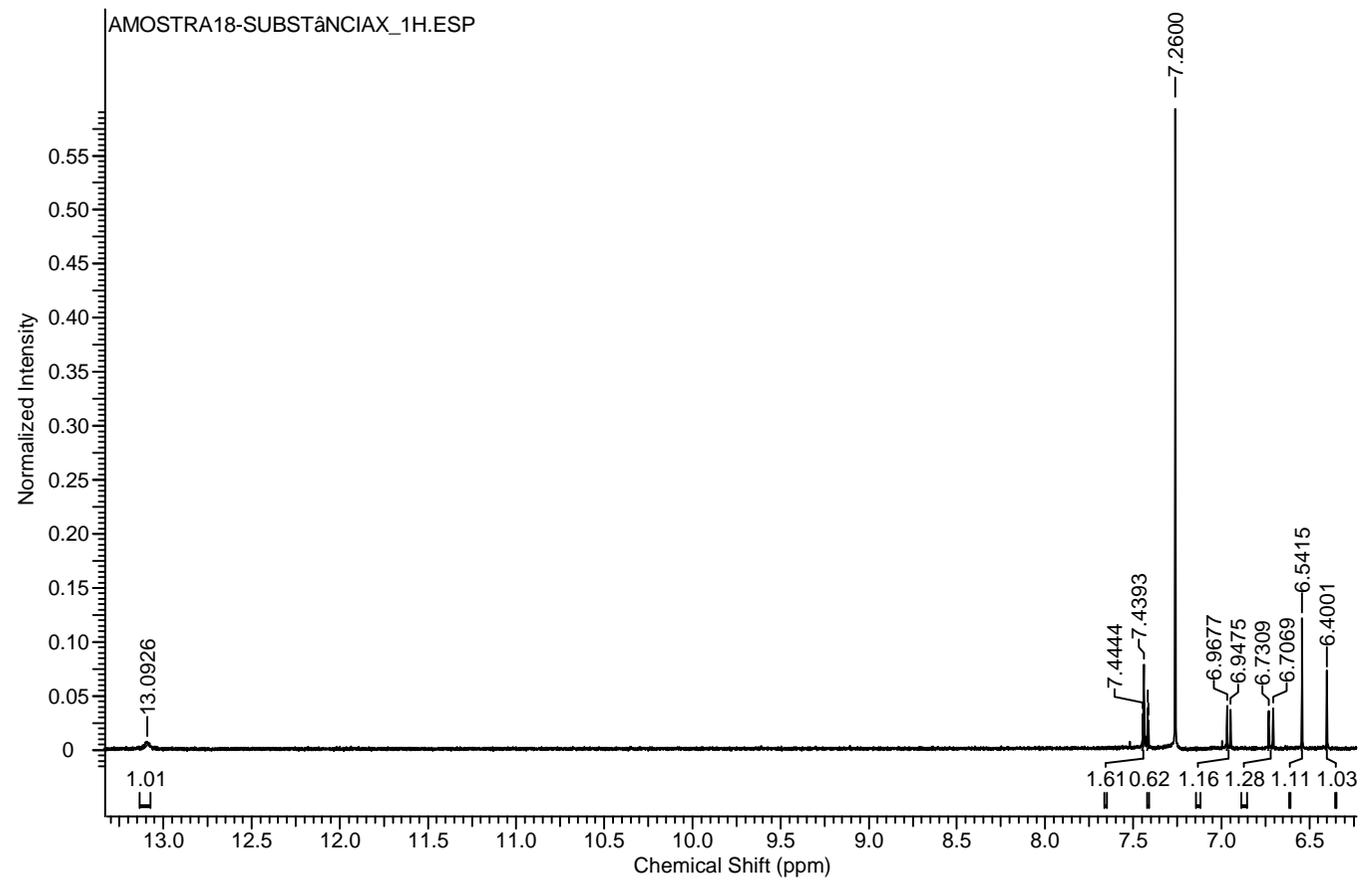
\*(BANERJI; LUTHRIA; PRABHU, 1988) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**X**



**Figura 69.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância X (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 70.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância X (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

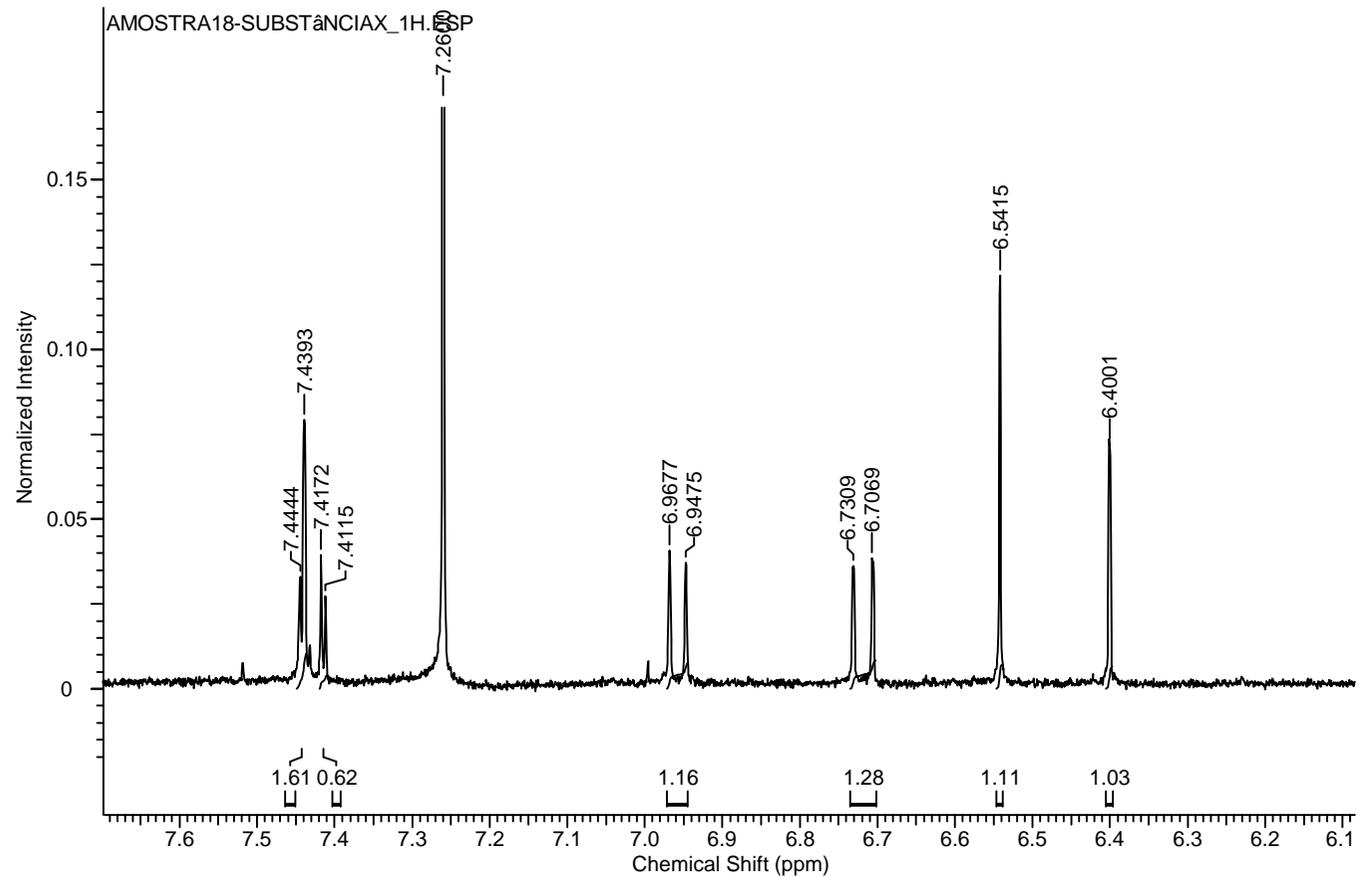
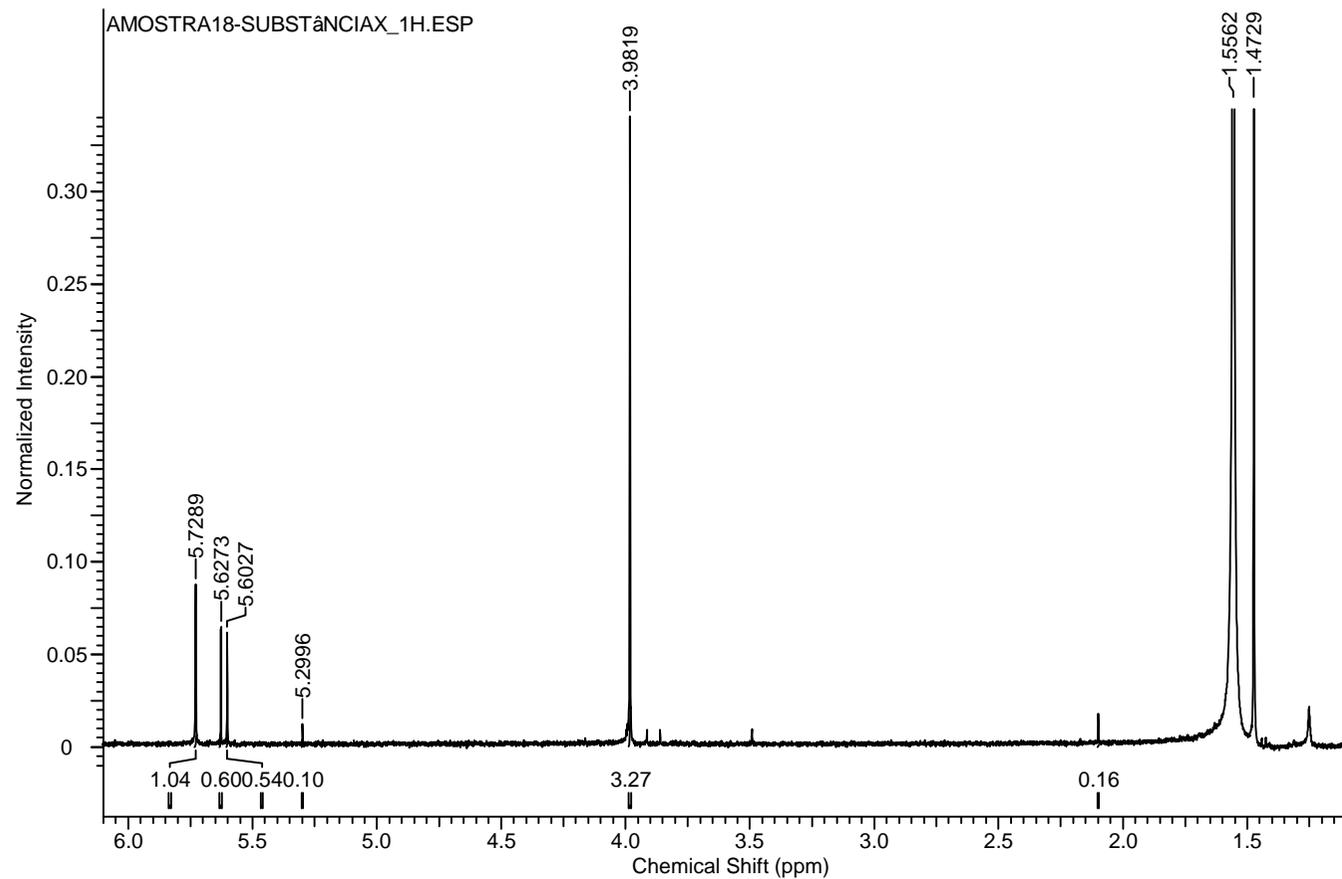
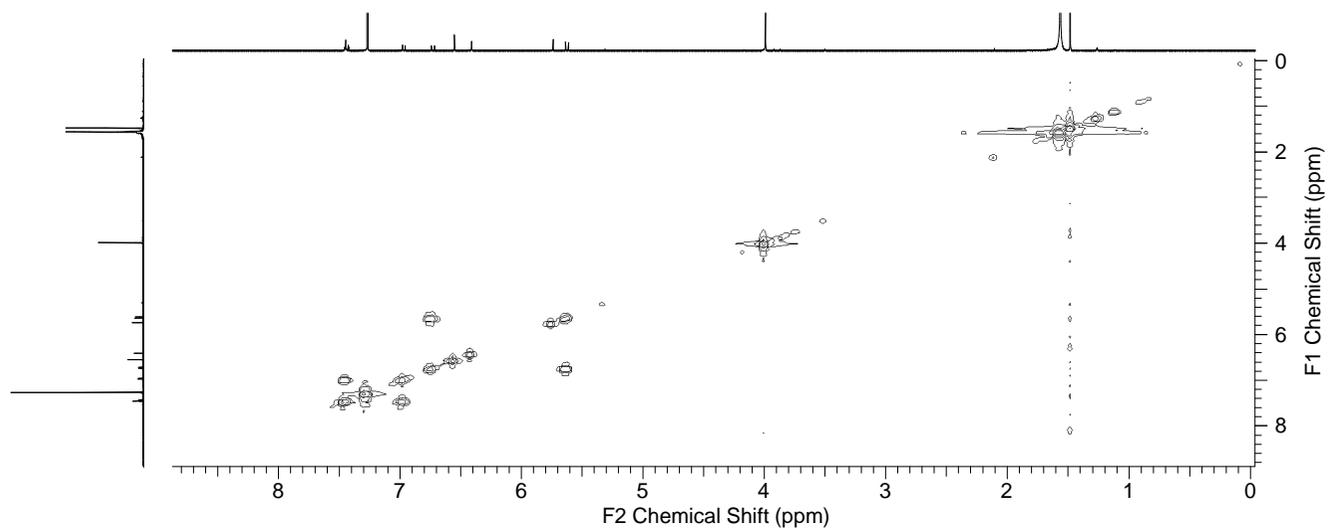


Figura 71. Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância X (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 72.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância X (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

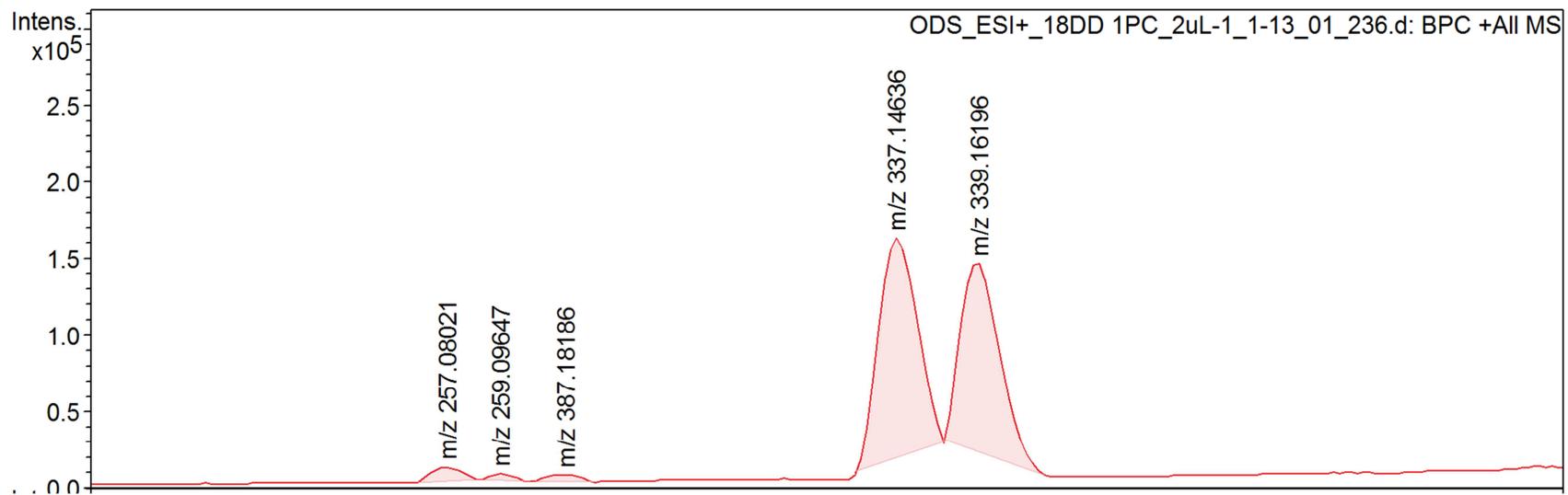


**Figura 73.** Mapa de contorno de COSY da substância **X**

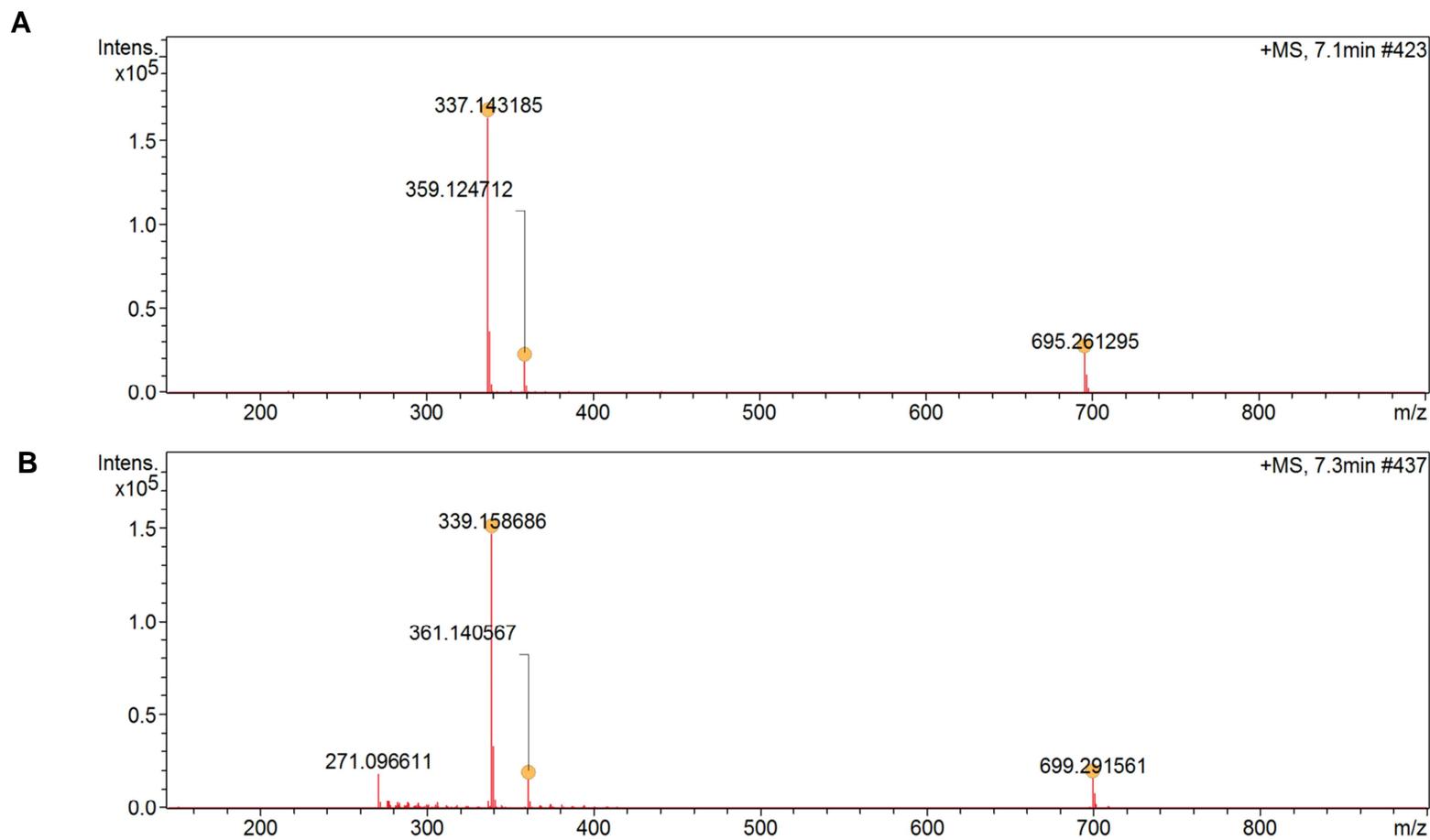
#### 4.2.6 Identificação das substâncias XI e XII

A fração 18 (codificada como 18DD1PC) (1,6 mg) apresentou fluorescência sob luz UV 254 nm e manchas de coloração amarelada após revelar com NP-PEG.

Ao analisar os espectros de massas, foi possível observar dois picos majoritários no cromatograma com tempo de retenção de 7,1 e 7,3 min (Figura 74). Os espectros de massas obtidos mostraram um íon a  $m/z$  337,143185  $[M + H]^+$  correspondendo à fórmula molecular de  $C_{21}H_{20}O_4$  (**XI**) (Figura 75A). O outro íon obtido foi de  $m/z$  339,158686  $[M + H]^+$  correspondendo à fórmula molecular de  $C_{21}H_{22}O_4$  (**XII**) (Figura 75B).



**Figura 74.** Cromatograma do tipo *base peak* obtido das substâncias **XI** e **XII**

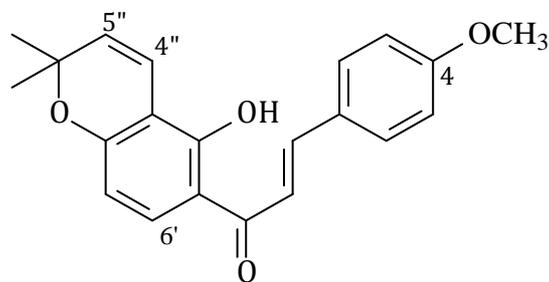


**Figura 75. (A)** Espectro mostrando  $m/z$  337,143185  $[M + H]^+$  referente a substância **XI**. **(B)** Espectro com  $m/z$  339,158686  $[M + H]^+$  referente a substância **XII**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 76 a 79) revelou dois *dubletos* em  $\delta_{\text{H}}$  7,38 (1H,  $J = 15,6$  Hz) e 7,63 (1H,  $J = 15,6$  Hz) referentes aos hidrogênios *trans* olefínicos  $\alpha$  e  $\beta$  do esqueleto de uma chalcona, respectivamente. Um *singlete* em  $\delta_{\text{H}}$  1,50 (6H) e dois *dubletos* em  $\delta_{\text{H}}$  5,63 (1H,  $J = 10,0$  Hz) e 6,69 (1H,  $J = 10,0$  Hz) sinalizaram a presença de um anel 2,2-dimetilcromeno. Outros sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,51 (1H,  $d$ ,  $J = 8,6$  Hz) e 7,70 (1H,  $d$ ,  $J = 8,6$  Hz) acoplado entre si no espectro de COSY (Figura 83) corresponderam ao anel A da chalcona. Sendo assim, essa chalcona foi identificada como sendo a 4-metoxilonchocarpina (**XI**) de acordo com os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 23). Essa chalcona é inédita em *Deguelia*.

**Tabela 23.** Dados de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **XI**

C	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), multiplicidade e $J$ (Hz)
2 e 6	130,0	7,50 (2H, $d$ , $J = 8,6$ )
3 e 5	115,8	6,85 (2H, $d$ , $J = 8,6$ )
$\alpha$	125,1	7,38 ( $d$ , $J = 15,6$ )
$\beta$	141,9	7,63 ( $d$ , $J = 15,6$ )
5'	103,4	6,51 (1H, $d$ , $J = 8,6$ )
6'	131,6	7,70 (1H, $d$ , $J = 8,6$ )
4''	115,8	6,69 (1H, $d$ , $J = 10,0$ )
5''	128,6	5,63 (1H, $d$ , $J = 10,0$ )
7'' e 8''	28,0	1,50 (6H, $s$ )
C=O	190,1	-
OCH <sub>3</sub>	55,7	3,80 (3H, $s$ )

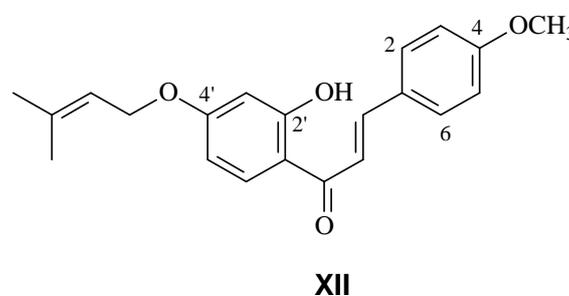


**XI**

Como se tratava de uma mistura pela presença de mais de um íon nas análises por CLAE/EM, continuou-se a análise dos outros sinais observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 76 a 79). A presença dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,58 (1H,  $J = 15,6$  Hz) e 7,67 (1H,  $J = 15,6$  Hz) confirmou a presença de outra chalcona por apresentar os hidrogênios *trans* olefínicos  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente. Porém essa chalcona mostrou pequena diferença estrutural em relação a XI, devido à presença do grupo preniloxi ligados ao anel A [ $\delta_{\text{H}}$  1,81 (3H, s), 1,76 (3H, s), 5,49 (1H, *m*), 4,57 (2H, *m*)]. Esses e os demais sinais (Tabela 24) permitiram a identificação da 4-metoxiderricidina (**XII**) que está sendo descrita pela primeira vez em *Deguelia*.

**Tabela 24.** Dados de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **XII**

C	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), multiplicidade e $J$ (Hz)
2 e 6	130,1	7,50 (2H, <i>d</i> , $J = 8,6$ )
3 e 5	115,8	6,85 (2H, <i>d</i> , $J = 8,6$ )
$\alpha$	125,3	7,58 ( <i>d</i> , $J = 15,6$ )
$\beta$	141,2	7,67 ( <i>d</i> , $J = 15,6$ )
3'	99,3	6,51 (1H, <i>d</i> , $J = 2,2$ )
5'	105,6	6,55 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,5$ e $2,2$ )
6'	132,7	7,73 (1H, <i>d</i> , $J = 8,5$ )
2''	65,0	4,57 (2H, <i>m</i> )
3''	119,0	5,49 (1H, <i>m</i> )
5''	18,2	1,76 (3H, s)
6''	25,8	1,81 (3H, s)
C=O	190,1	-
OCH <sub>3</sub>	55,7	3,88 (3H, s)



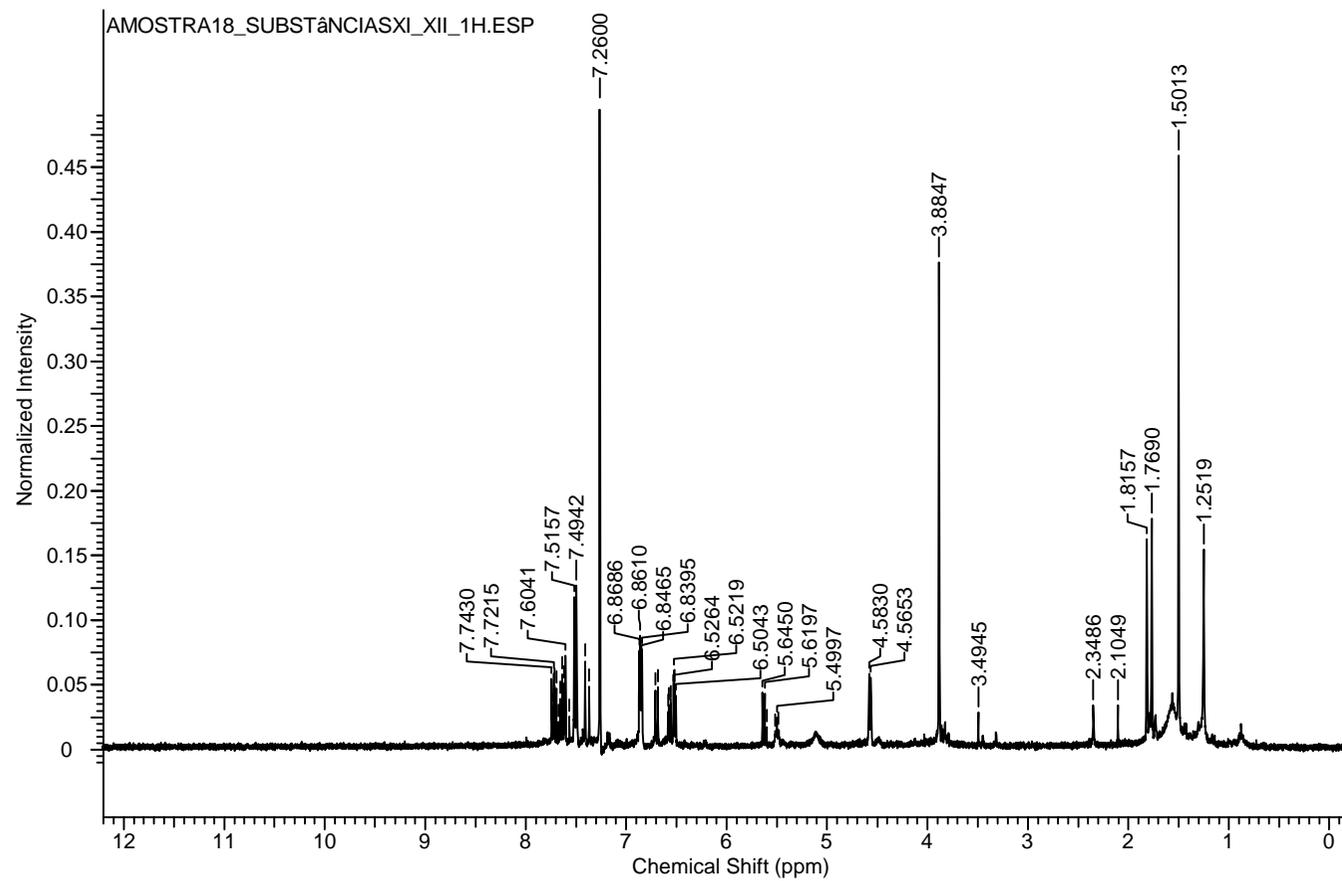


Figura 76. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias XI e XII (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

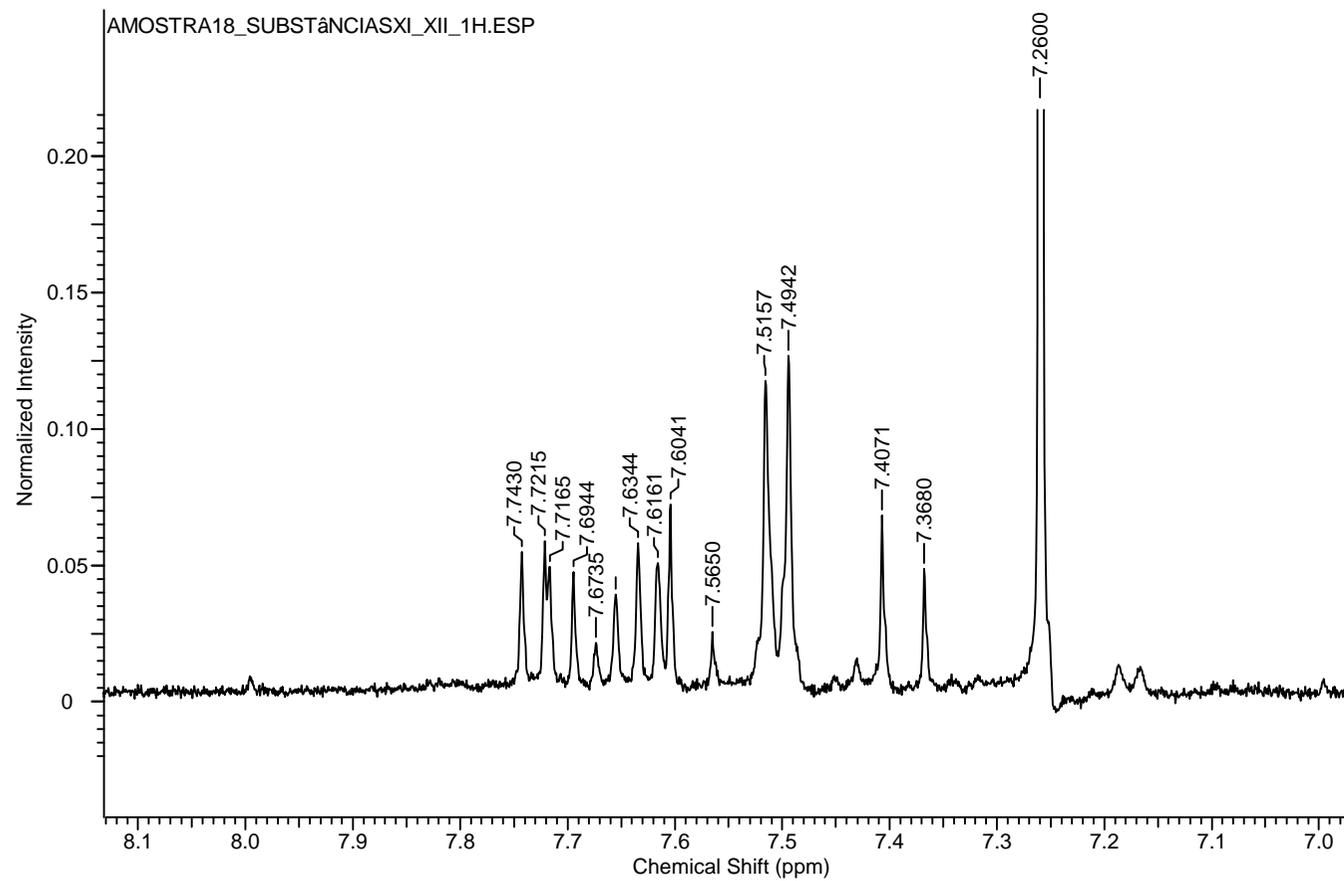
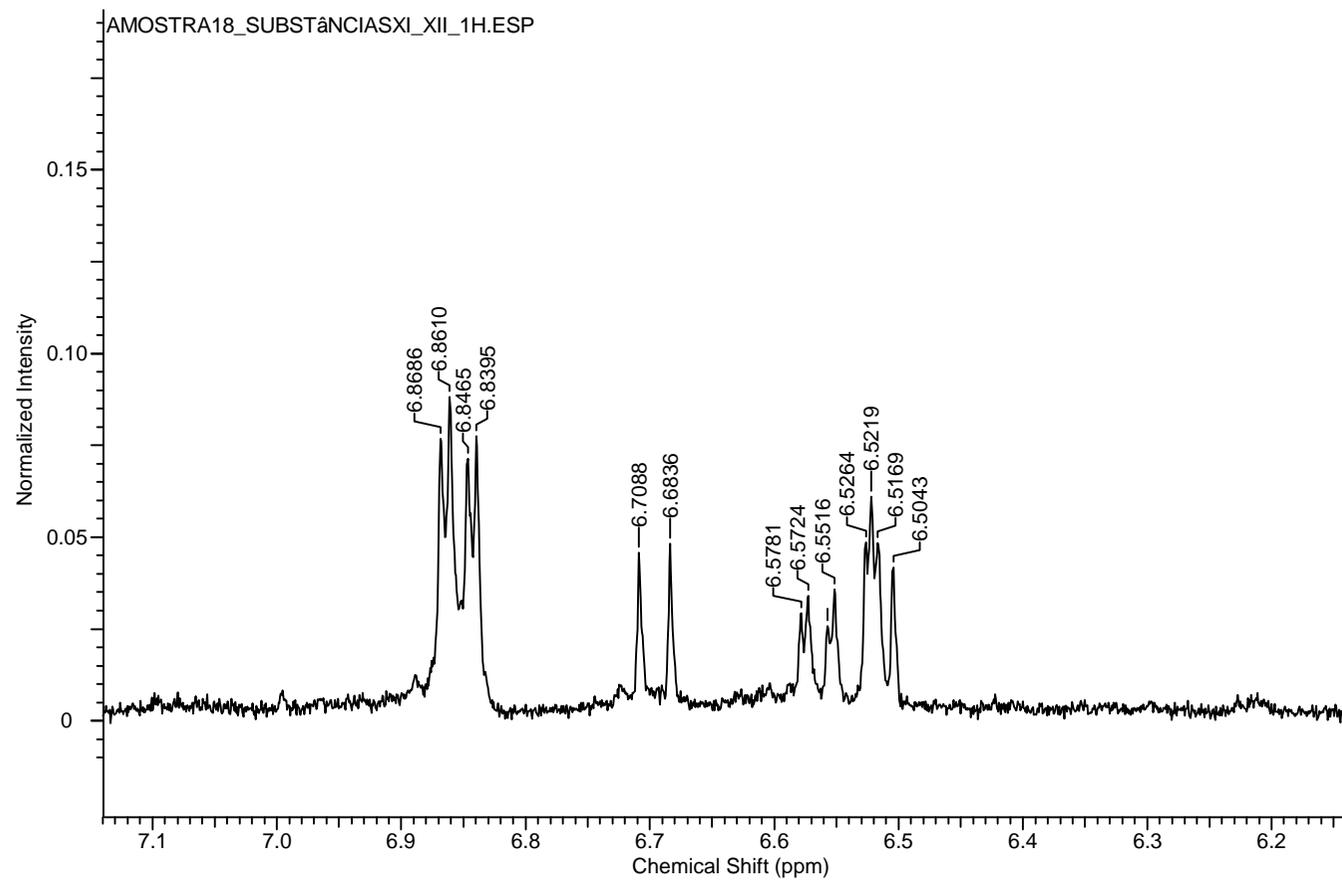
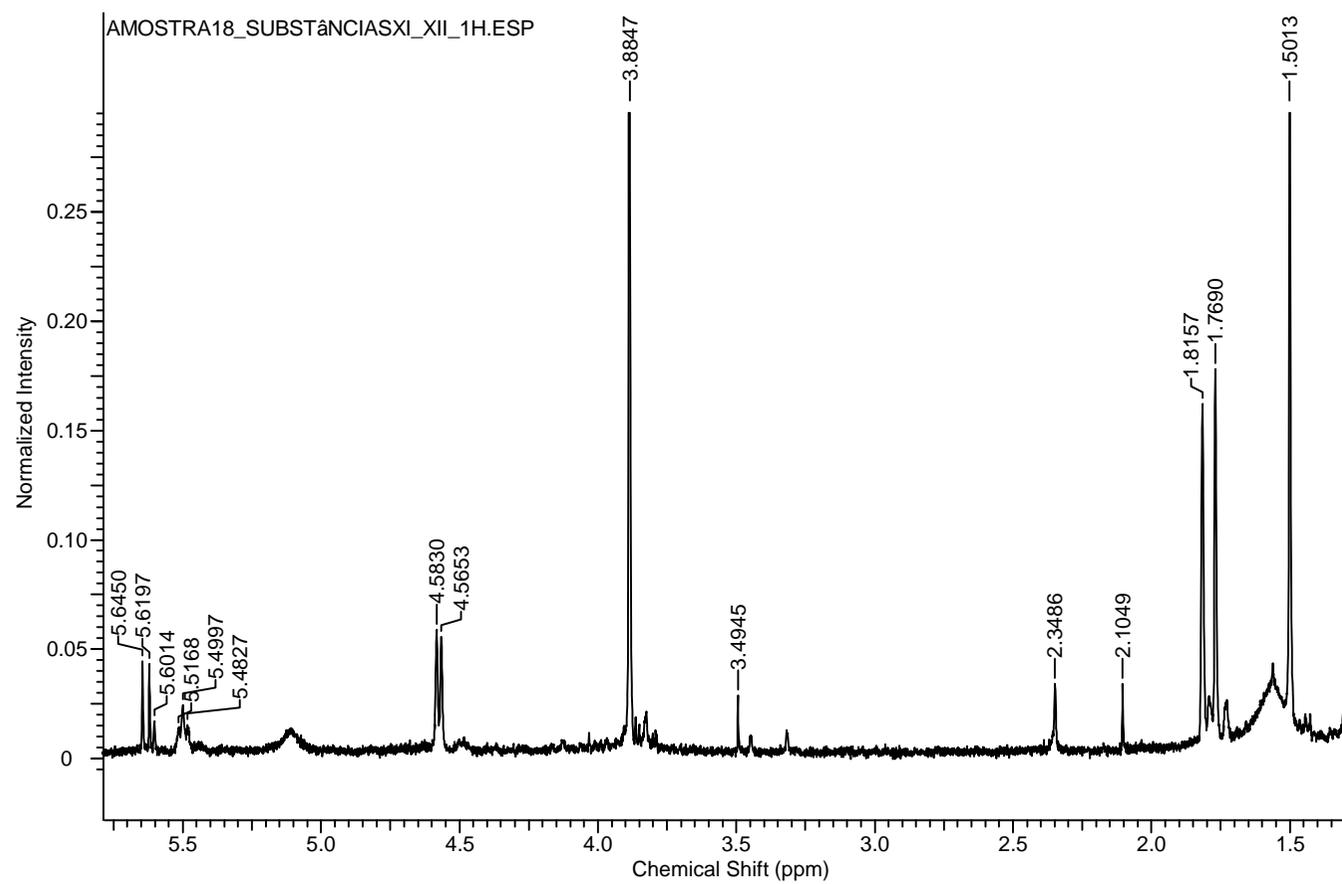


Figura 77. Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **XI** e **XII** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 78.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **XI** e **XII** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 79.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **XI** e **XII** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

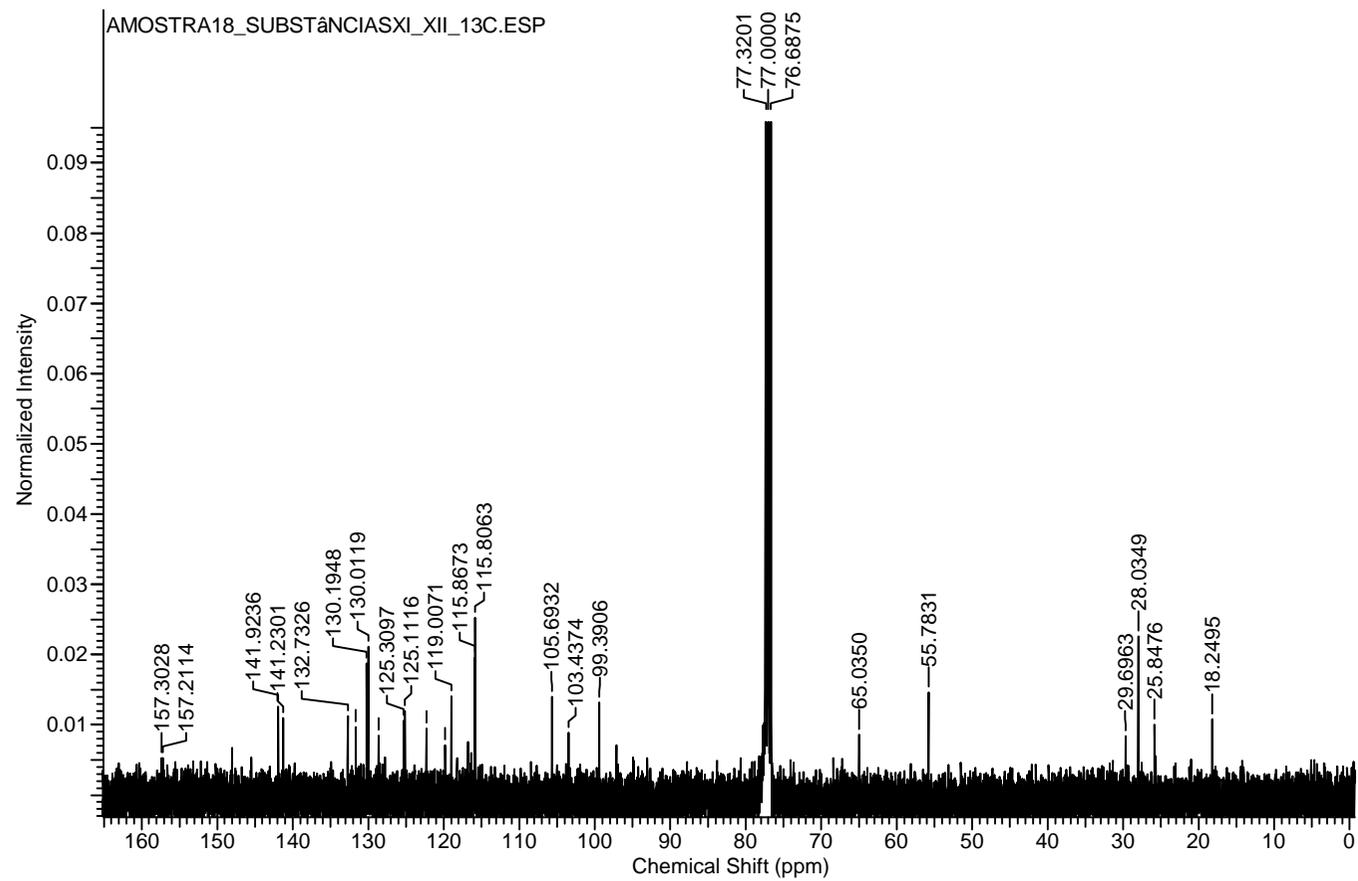
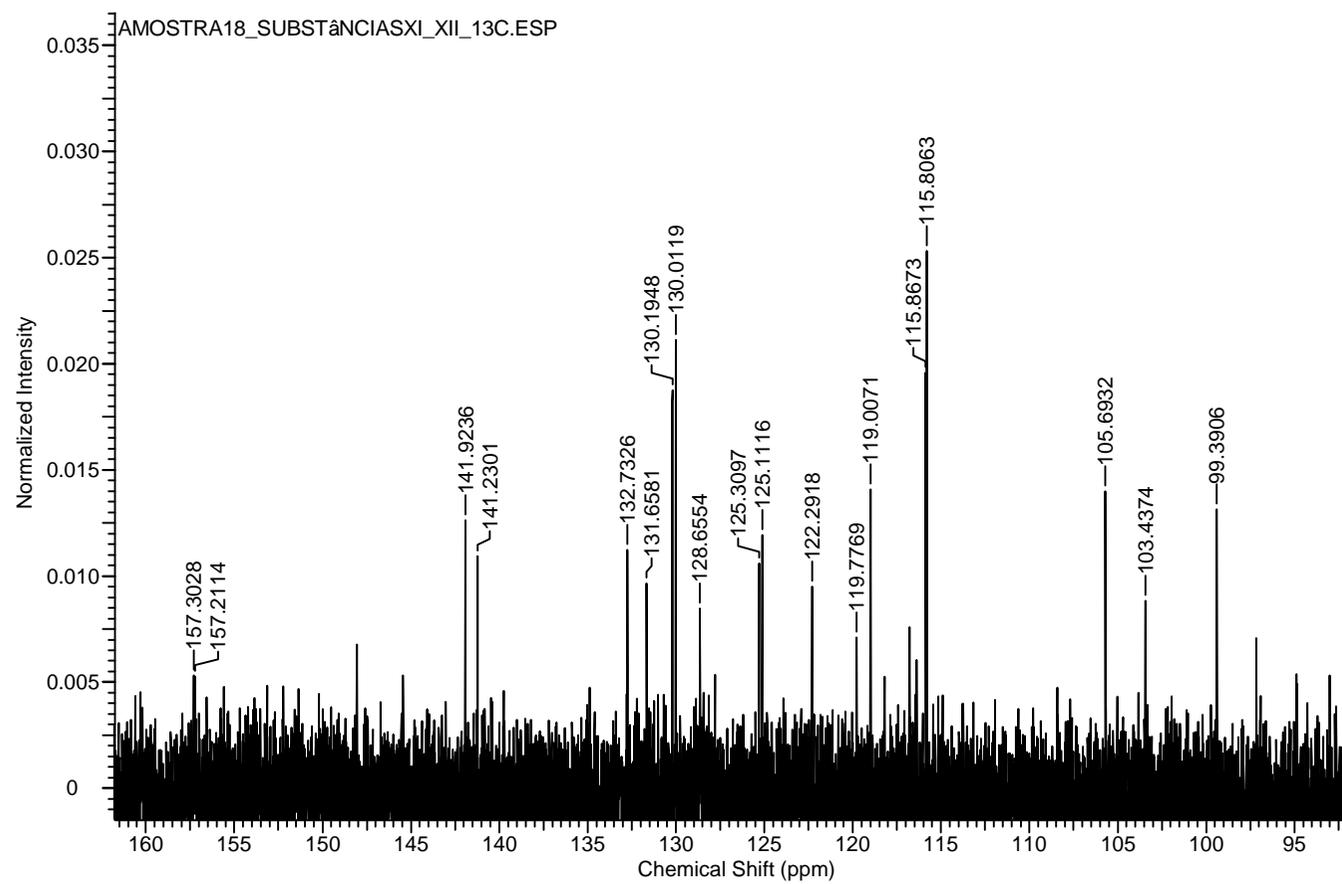
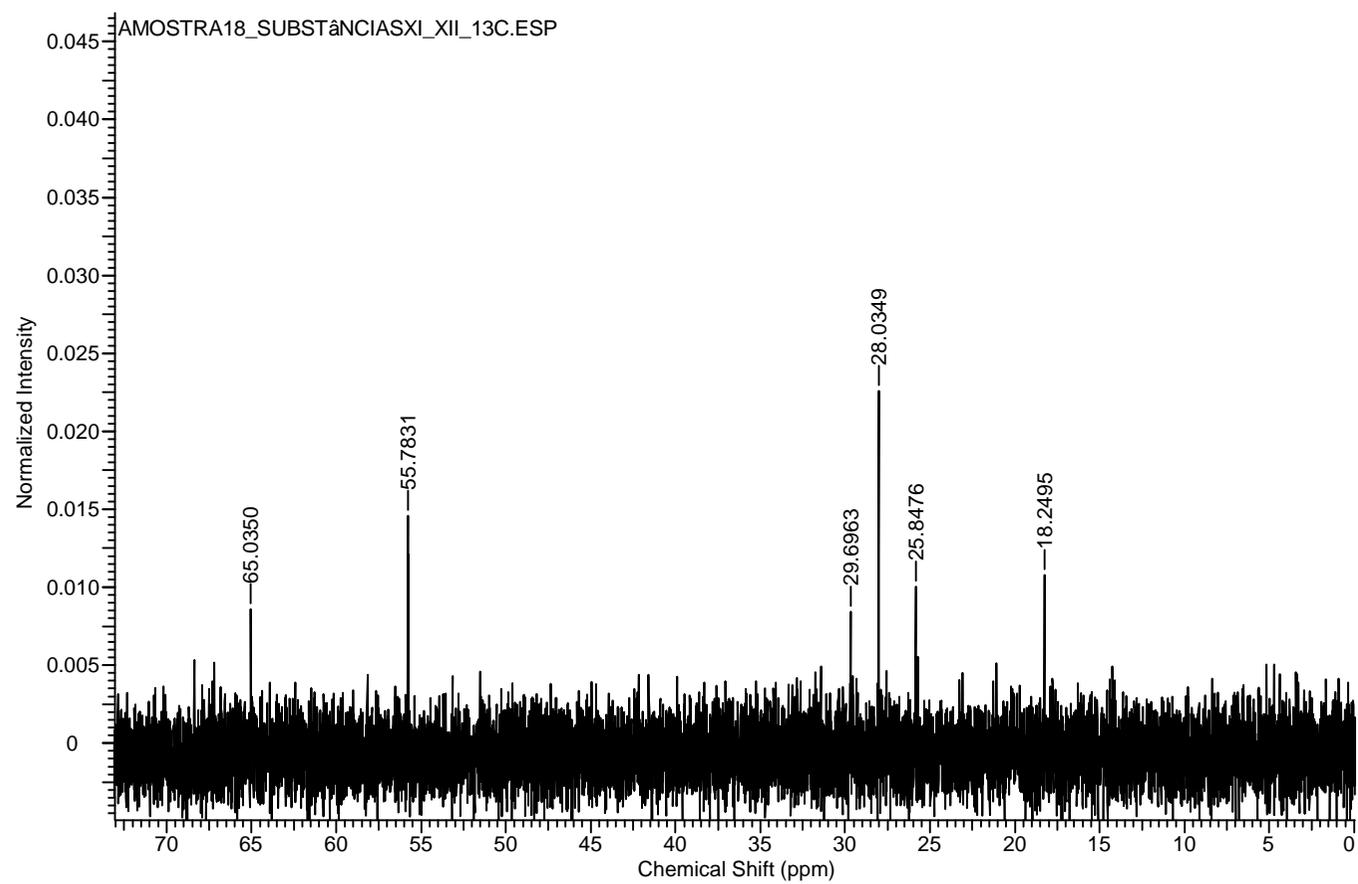


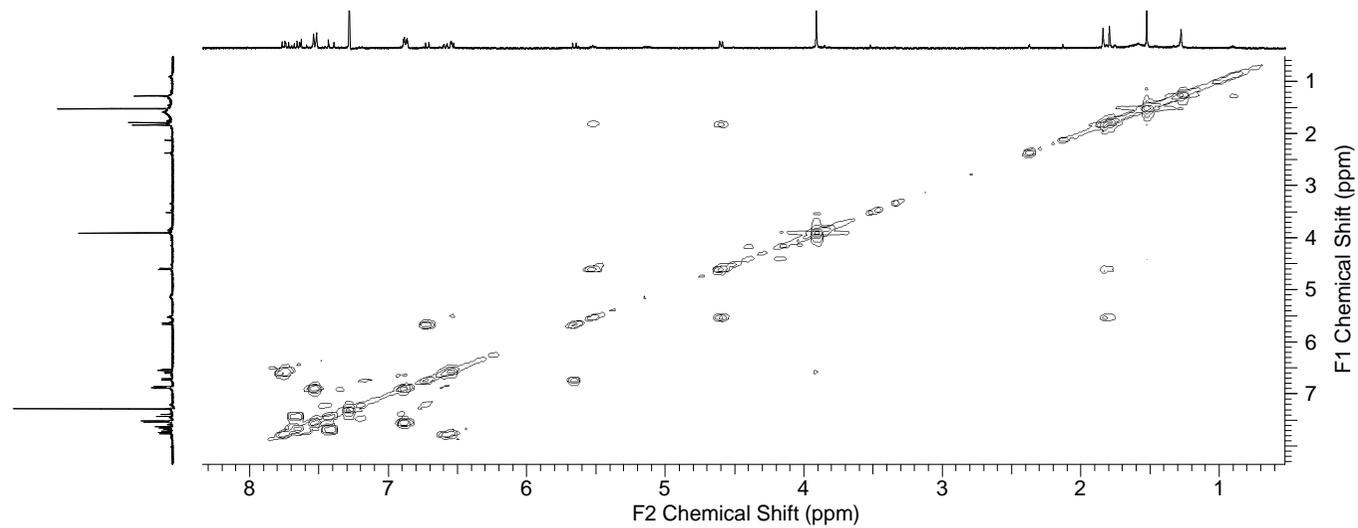
Figura 80. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **XI** e **XII** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



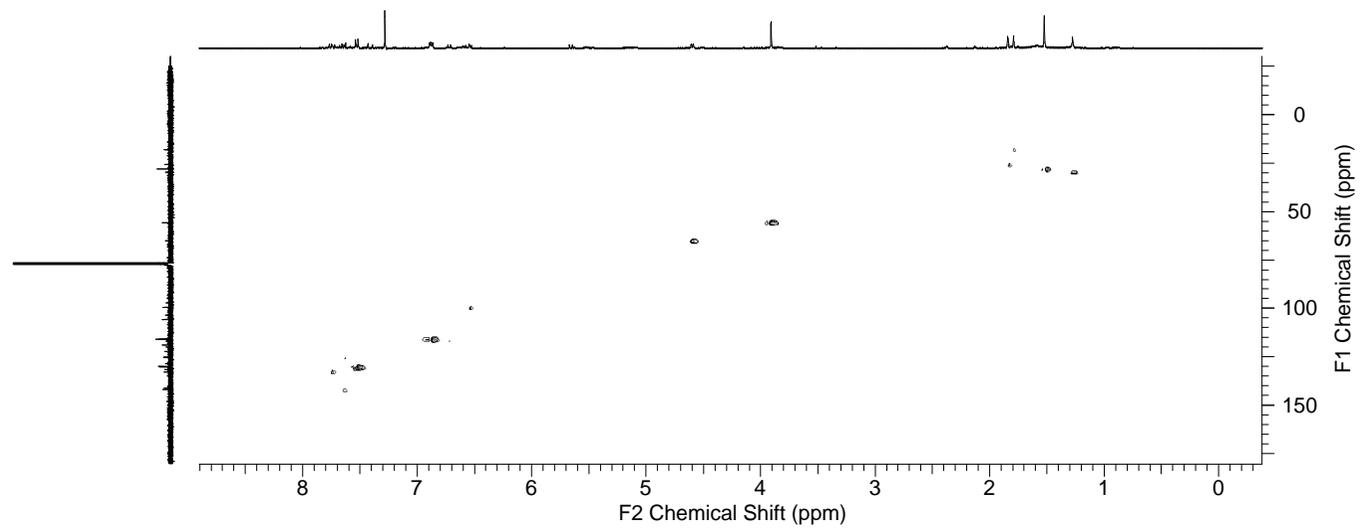
**Figura 81.** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **XI** e **XII** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



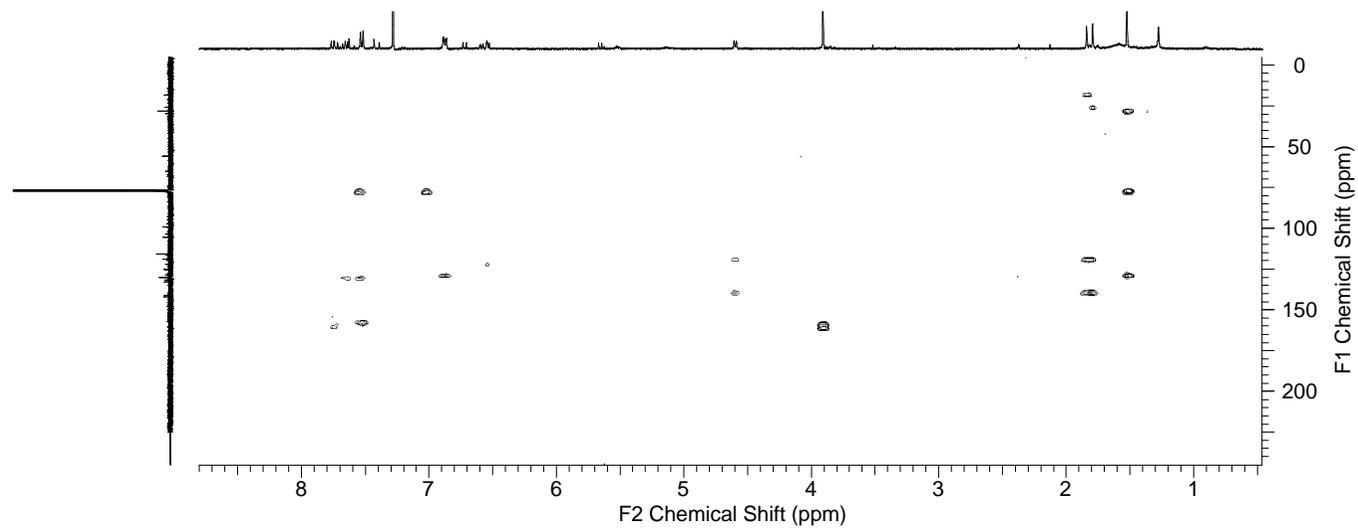
**Figura 82.** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **XI** e **XII** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 83.** Mapa de contorno COSY das substâncias **XI** e **XII**



**Figura 84.** Mapa de contorno HSQC das substâncias **XI** e **XII**

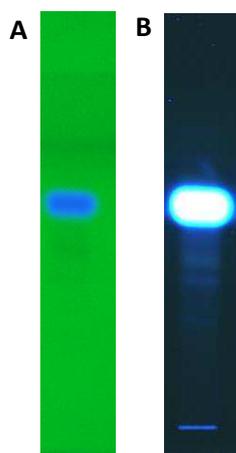


**Figura 85.** Mapa de contorno HMBC das substâncias **XI** e **XII**

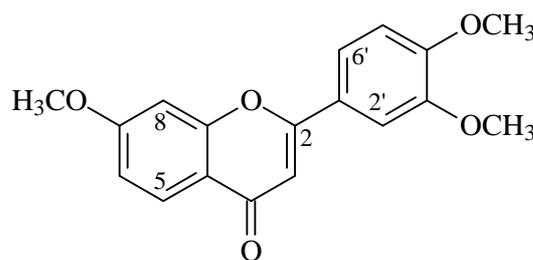
#### 4.4 Confirmação da estrutura química da substância IX obtida do extrato hexânico dos galhos de *Deguelia duckeana*

As frações reunidas 2 a 7 (codificada como 46DD 2-7B) apresentaram apenas uma mancha majoritária com  $R_f$  de 0,63 e foi identificada como 3',4',7-trimetoxiflavona, flavona que já havia sido identificada por RMN trabalhado no projeto anterior (LIMA, 2011). Nesta tese foi realizada apenas a purificação e identificação por CCD (Figura 86) e espectro de massas a 70 eV (Figura 87).

Foi observado no espectro de massas o íon  $m/z$  313,1  $[M + H]^+$  (Figura 87) coerente com a fórmula molecular  $C_{18}H_{16}O_5$ . Sendo assim, foi confirmada a presença da substância 3',4',7-trimetoxiflavona (**IX**), também identificada nas raízes de *D. duckeana*.

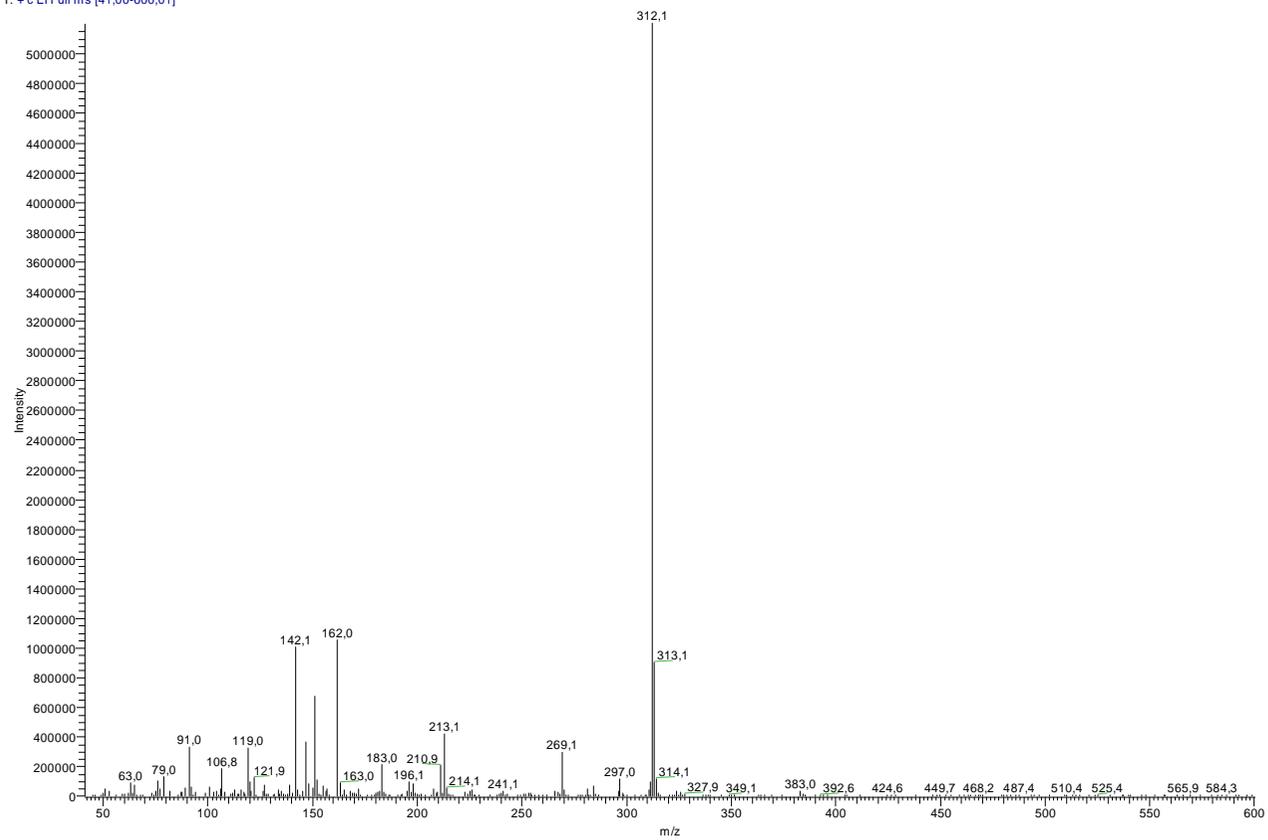


**Figura 86.** CCD da flavona (**IX**) sob luz UV 254 (A) e 365 nm (B). Eluente:  $CHCl_3/MeOH$  75:5



**IX**

mpbf92b #1 RT: 3.33 AV: 1 NL: 5,20E6  
T: + c EI Full ms [41,00-600,01]

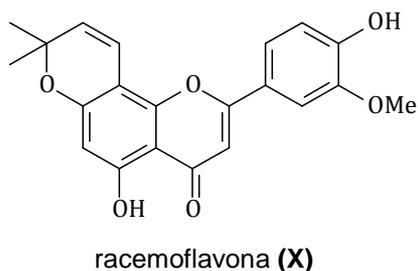
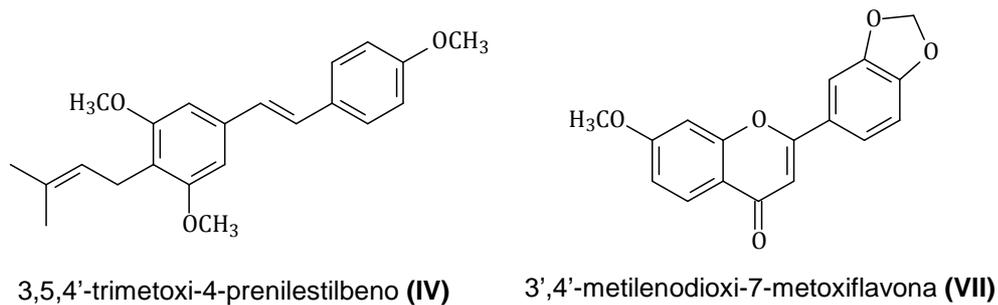


**Figura 87.** Espectro de massas a 70 eV (modo positivo) da substância **IX**

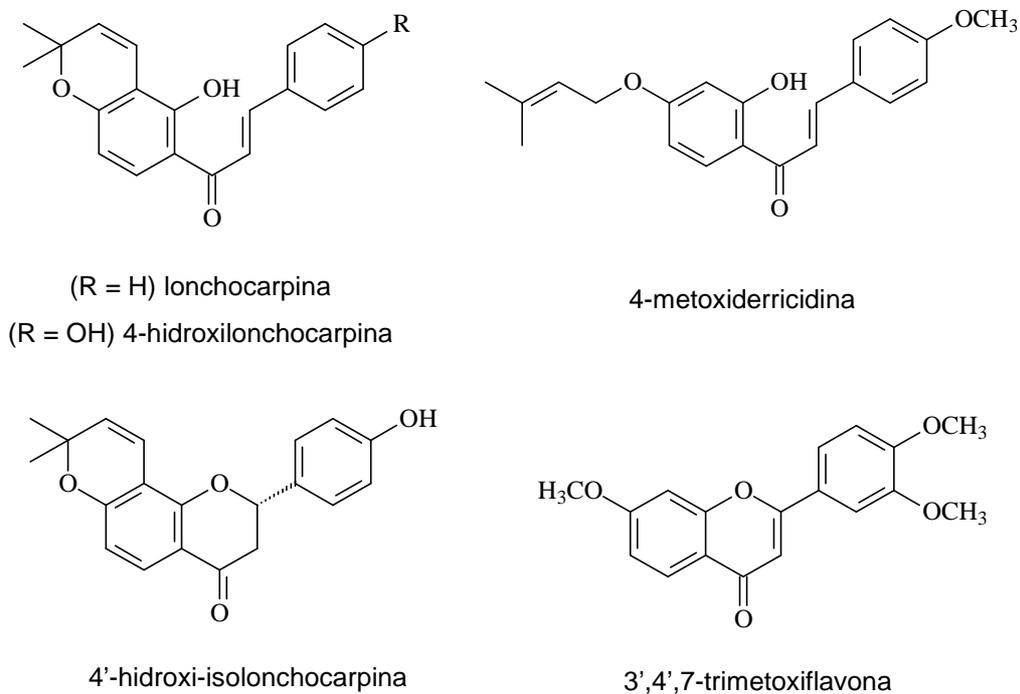
#### 4.5 Potencial anticâncer

Há diversos fatores que influenciam no processo de transformação de uma célula normal em uma célula cancerígena. Entre estas também está a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) que favorecem um desequilíbrio no organismo, desencadeando o processo rápido de reações radicalares. Estas reações acontecem pela quebra de uma ligação homolítica gerando intermediários de elétrons desemparelhados denominados de radicais livres. Quando estes radicais livres não são estabilizados, interferem diretamente no DNA, sobre as bases nitrogenadas purina e pirimidina causando mutações (HALLIWELL, 1994). Sabe-se que essas células que apresentam mutações e que se tornam cancerígenas por esse ou outros processos envolvidos, se proliferam rapidamente. Portanto buscam-se respostas para o potencial anticâncer através do processo de morte celular programada, a apoptose.

Esse trabalho descreve o potencial anticâncer das substâncias isoladas do extrato diclorometânico das raízes de *Deguelia duckeana*: 3,5,4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno (**IV**), 3',4'-metilenodioxo-7-metoxiflavona (**IX**) e racemoflavona (**X**) (Figura 88); assim como as previamente isoladas em um trabalho anterior (LIMA, 2011) do extrato das raízes de *Deguelia duckeana*: 4-hidroxi-lonchocarpina, 4-metoxi-derricidina, 4'-hidroxi-isolonchocarpina, lonchocarpina e 3',4',7-trimetoxiflavona (Figura 89). Vale ressaltar que esta última substância (3',4',7-trimetoxiflavona) também foi identificada no presente trabalho, porém em mistura.



**Figura 88.** Substâncias isoladas nessa tese e analisadas quanto à atividade anticâncer



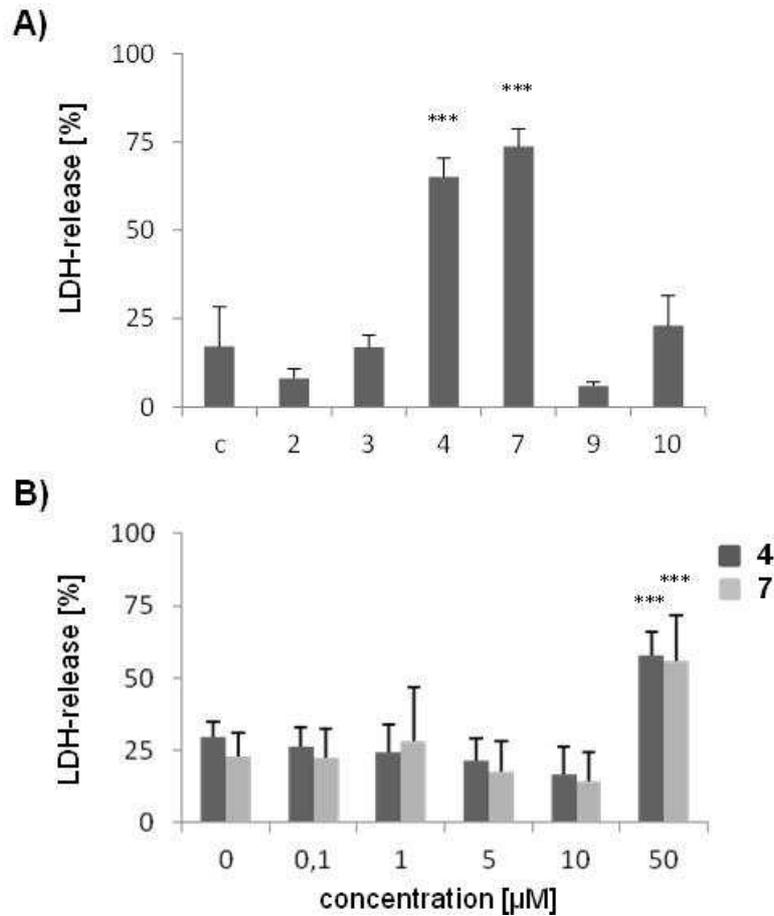
**Figura 89.** Substâncias isoladas anteriormente (LIMA, 2011) e analisadas nessa tese frente ao potencial anticâncer

#### 4.5.1 Análise de citotoxicidade

As substâncias isoladas foram analisadas quanto à citotoxicidade pela liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) ao meio extracelular. A substância citotóxica permitiu um rompimento da membrana celular liberando a enzima LDH e assim indicando que houve morte por necrose.

As chalconas: 4-metoxiderricidina, lonchocarpina e 4-hidroxi-lonchocarpina; bem como os flavonoides: 4'-hidroxi-isolonchocarpina, 3',4',7-trimetoxiflavona e 3',4'-metilenodioxo-7-metoxiflavona foram analisados quanto à citotoxicidade na concentração de 50  $\mu\text{M}$  por 24 h. A morte celular foi medida pela porcentagem de LDH liberada no meio sobrenadante obtido. Foi observado que a chalcona 4-hidroxi-lonchocarpina e a flavanona 4'-hidroxi-isolonchocarpina mostraram citotoxicidade frente às células SK-N-SH (Figura 90 A). Esses resultados corroboram com a literatura, pois as chalconas e flavonoides apresentam citotoxicidade (KUETE et al., 2014), especialmente a chalcona 4-hidroxi-lonchocarpina que possui citotoxicidade com concentração de 9,6  $\mu\text{M}$  em linhagem leucêmica (KUETE et al., 2011).

A partir desses resultados, novas análises foram realizadas com as duas substâncias citotóxicas (4-hidroxi-lonchocarpina e 4'-hidroxi-isolonchocarpina) em concentrações entre 0,1 a 50  $\mu\text{M}$ . Os resultados mostram que essas duas substâncias não apresentam citotoxicidade em baixas concentrações, apenas em 50  $\mu\text{M}$  (Figura 90 B).



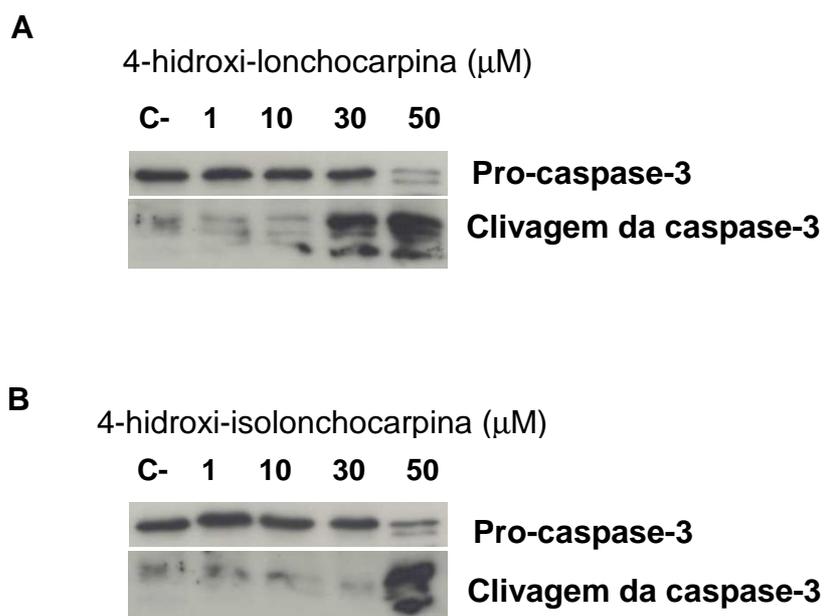
c: controle; 2: 4-metoxiderricidina; 3: lonchocarpina; 4: 4-hidroxi lonchocarpina; 7: 4-hidroxi-isolonchocarpina; 9: 3',4',7-trimetoxiflavona; 10: 3',4'-metilenodioxo-7-metoxiflavona

**Figura 90. (A)** Gráficos mostrando a citotoxicidade dos flavonoides de *D. duckeana* medida pelo dano celular através da liberação de LDH após a incubação dos flavonoides com células neurais SK-N-SH na concentração de 50 μM; **(B)** gráfico mostrando as substâncias 4-hidroxi lonchocarpina e 4'-hidroxi-isolonchocarpina em concentrações entre 0,1 – 50 μM for 24 h. Os valores ± s.d. representam os desvios padrão obtidos. A estatística utilizada foi ANOVA *one-way* **(A)** e ANOVA *two way* **(B)**.

#### 4.5.2 Mecanismo de indução de apoptose

Em busca de entender qual o mecanismo usado pelas duas substâncias (4-hidroxi-lonchocarpina e 4'-hidroxi-isolonchocarpina) para provocar a morte celular, ambas foram analisadas por *Western blotting* a fim de observar os fragmentos ativos de pro-caspase-3. Após as análises, observou-se que as duas substâncias apresentaram detecção da clivagem da pro-caspase-3, sendo a 4-hidroxi-lonchocarpina em 30  $\mu\text{M}$  (Figura 91 A) e a 4-hidroxi-isolonchocarpina em 50  $\mu\text{M}$  (Figura 91 B), o que sugere que estas substâncias possuam um mecanismo de necrose e posterior apoptose. Vale ressaltar que essas substâncias possuem grupos hidroxila na posição 4 no anel B e o grupo dimetilcromeno no anel A indicando que esses possam ser os grupos ativos da estrutura.

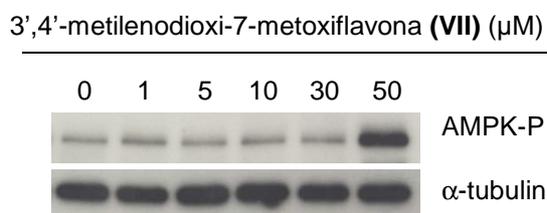
Como a chalcona 4-hidroxi-lonchocarpina mostrou clivagem da caspase, pode-se inferir que o fragmento propeno influencia na atividade. Esse resultado corrobora com ORGANESYAN e colaboradores (1991), onde descrevem essa classe de substâncias com ação biológica, principalmente devido à presença desse fragmento, pois há transferência de elétrons no sistema conjugado.



**Figura 91.** *Western Blotting* mostrando a detecção de pro-caspase-3 e caspase-3 clivada após a incubação com 4-hidroxi-lonchocarpina **(A)** e 4'-hidroxi-isolonchocarpina **(B)**

No item **4.5.1** onde descreve a análise de citotoxicidade, foi possível observar que a flavona 3',4'-metilenodioxo-7-metoxiflavona (Figura 90 A) apresentou-se como a terceira maior porcentagem de citotoxicidade, porém sem apresentar ativação da pro-caspase-3 (dados não mostrados). No entanto, essa flavona foi analisada frente à outra enzima (AMPK) e foi observada detecção na concentração de 50  $\mu\text{M}$  (Figura 92), indicando a presença de atividade em outro mecanismo de apoptose via fosforilação da AMPK. Na literatura, esse tipo de flavona com substituição pelo grupo metilenodioxo é conhecida por apresentar citotoxicidade em células tumorais

(ORLIKOVA et al., 2014), podendo inferir que talvez essa seja uma das possíveis razões da atividade.



**Figura 92.** *Western blotting* mostrando o tratamento da linhagem SK-N-SH com a flavona 3',4'-metilenodioxo-7-metoxiflavona (VII) nas concentrações de 1 – 30 μM por 6 h para analisar a fosforilação da enzima AMPK (*blotting* de cima). Os *blotting* foram reanalisados com α-tubulin para determinar a mesma quantidade de proteína em cada amostra (*blotting* de baixo)

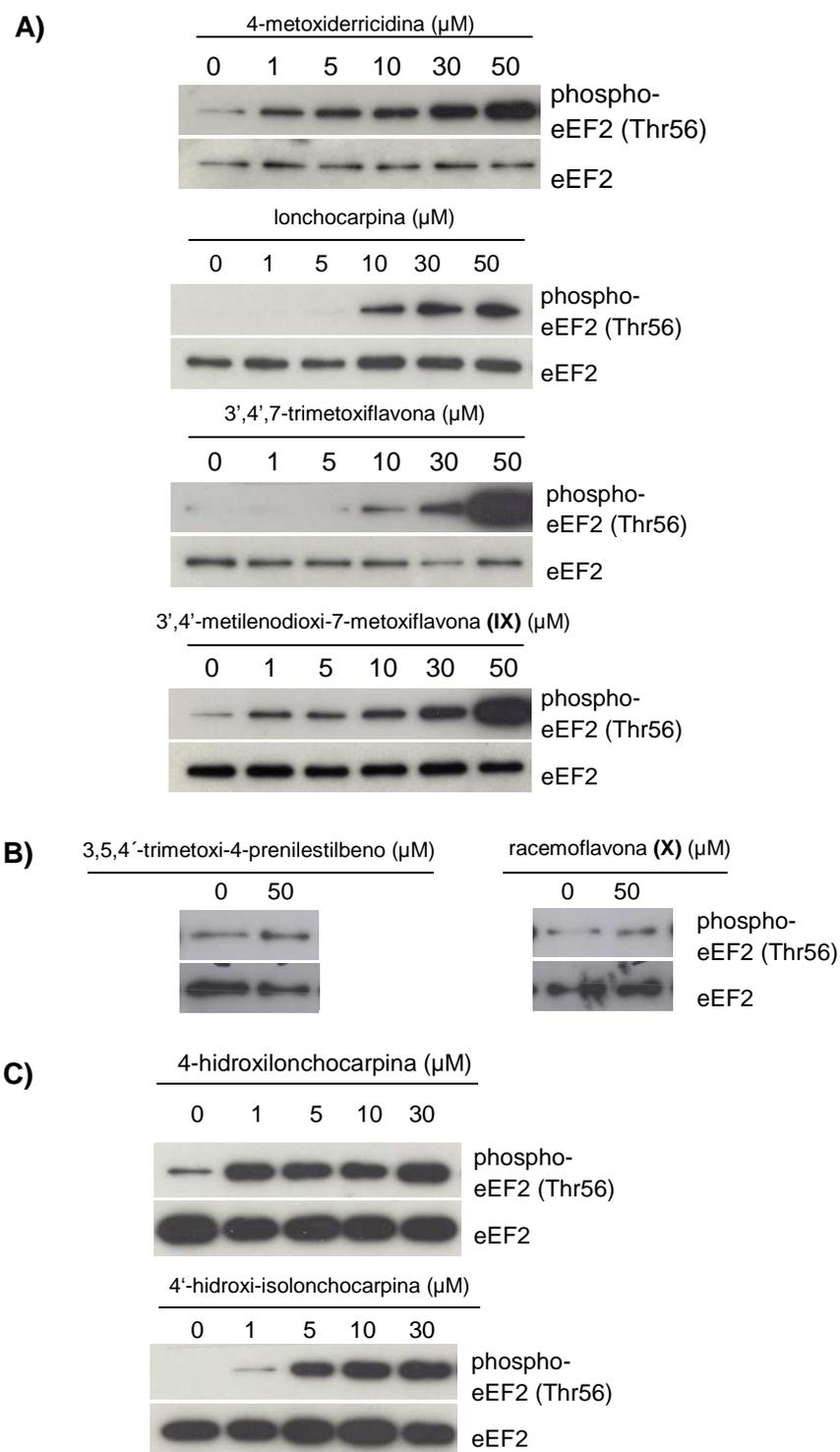
A detecção da AMPK indica a inibição da síntese de proteínas (HORMAN et al., 2002), portanto a flavona 3',4'-metilenodioxo-7-metoxiflavona (IX) também foi analisada frente a proteína de alongamento (eEF2). Os resultados confirmaram que essa flavona também está envolvida na tradução (segunda etapa da síntese de proteínas) já que influenciou na fosforilação da eEF2. Com isso, foi possível observar que a flavona não só inibe a tradução ativando a fosforilação da AMPK como também induz a fosforilação da eEF2 (Figura 93 A).

Além da flavona 3',4'-metilenodioxo-7-metoxiflavona (VII), as chalconas 4-metoxiderricina e lonchocarpina e outra flavona 3',4',7-trimetoxiflavona também apresentaram indução da eEF2 (Figura 93 A), mostrando ativação dessa proteína nas concentrações de 50 μM. O estilbeno 3,5,4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno (IV) e a

racemoflavona não mostraram inibição via eEF2 (Figura 93 B). No entanto, esses resultados dessa atividade com essas substâncias estão sendo descritos pela primeira vez.

A chalcona 4-hidroxilonchocarpina e flavanona 4-hidroxi-isolonchocarpina apresentaram inibição da síntese de proteínas (Figura 93 C). Contudo, essas substâncias diminuíram a fosforilação da eEF2 em 50  $\mu$ M (dados não mostrados). Esse resultado é provavelmente devido à alta citotoxicidade dessas substâncias.

O presente estudo mostra que os flavonoides de *Deguelia duckeana* tem um bom impacto na via de morte celular referente à linhagem SK-N-SH. Esse é o primeiro relato na literatura da ação de flavonoides sob a indução da inibição do fator de alongamento 2 (eEF2).



**Figura 93. (A – C)** *Western blotting* mostrando a inibição da síntese de proteínas pela fosforilação de eEF2 (95 kDa) após incubação das substâncias com a linhagem SK-N-SH cells tratadas nas concentrações de 1 – 50  $\mu\text{M}$  por incubação durante 6 h. Os *blotting* foram reanalisados com eEF2 total para confirmar se foi adicionado a mesma quantidade de proteínas em cada amostra

#### 4.6 Atividade antibacteriana

Pesquisas realizadas com extratos de plantas visando minimizar os casos de infecções e encontrar medicamentos eficazes se destacam por mostrarem alta potencialidade frente a cepas de bactérias (BROWN; LISTER; MAY-DRACKA, 2014; CRAGG; NEWMAN, 2013).

Nesse contexto os extratos das folhas e galhos de *Diploptropis purpurea* foram testados frente às bactérias: *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia rettgeri*, *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*.

Cabe salientar que os extratos metanólicos foram os mais ativos mostrando inibição da atividade antibacteriana frente às bactérias: *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus* e *Providencia rettgeri*.

*Serratia marcescens* compreende o grupo de bactérias gram-negativas pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo uma das cepas que causam infecção nosocomial, também chamada de infecção hospitalar. Em um levantamento da literatura sobre a história dessa bactéria, relata que o primeiro caso de infecção de *S. marcescens* foi em 1913 descrevendo um paciente com tosse crônica e com secreção avermelhada. A pneumonia e meningite também foram dois casos graves relatados nessa época causados por *S. marcescens* (ARONSON; ALDERMAN, 1943; MAHLEN, 2011). Outras doenças ocasionadas por esse tipo de bactéria também são descritas como: infecção urinária, doenças respiratórias, infecções na corrente sanguínea, entre outras mais graves (MAHLEN, 2011).

Os resultados obtidos mostraram que os extratos ativos frente à *Serratia marcescens* foram os metanólicos das folhas e galhos, sendo que o extrato das folhas apresentou uma inibição maior com concentração inibitória mínima (CIM) de 250 µg/mL enquanto que o extrato metanólico dos galhos apresentou CIM de 500 µg/mL (Figura 94). Isso indica que substâncias mais polares possuem efeitos antibacterianos mais evidenciados.

Outra cepa muito infecciosa é a *Bacillus cereus*, causadora de infecções intestinais como a diarreia (DROBNIIEWSKI, 1993; EHLING-SCHULZ; FRICKER; SCHERER, 2004).

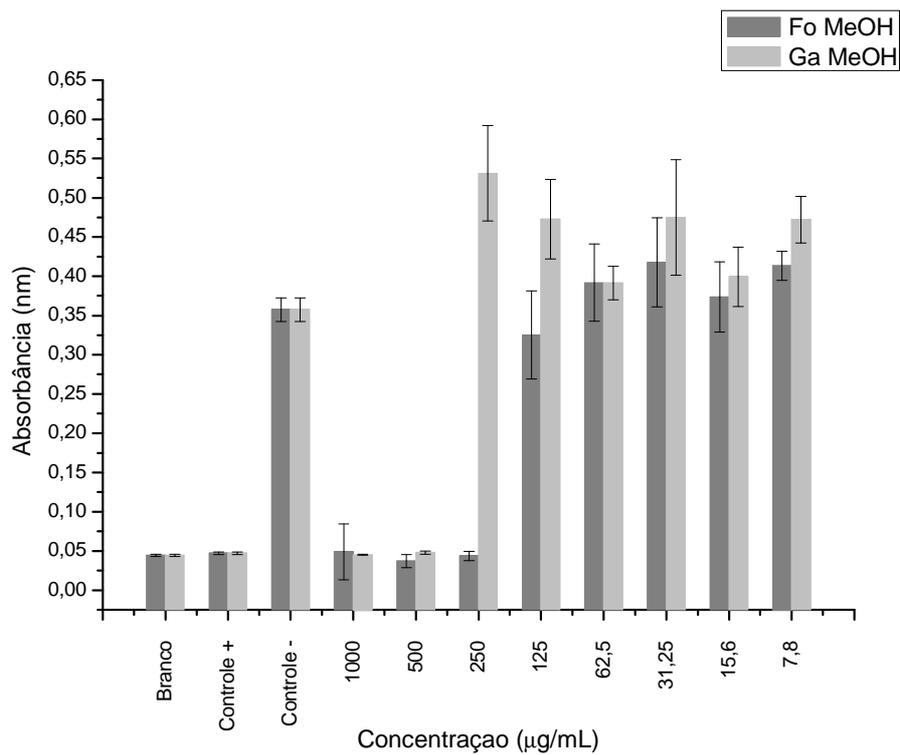
Frente a *Bacillus cereus*, o extrato que apresentou inibição foi o extrato metanólico das folhas com CIM de 1000 µg/mL comparado com o controle positivo (Figura 95). Mesmo que esse extrato tenha apresentado uma concentração inibitória de 1000 µg/mL, concentração de um extrato não muito ativo, é de caráter relevante considerar a atividade antibacteriana para o mesmo, pois apresentou uma porcentagem significativa (66% de inibição) da atividade através da técnica realizada pela leitora de microplacas. Essa técnica é mais sensível que a técnica colorimétrica, já que a coloração do extrato poderia também influenciar na atividade.

*Providencia rettgeri* também é outra cepa que afeta muitas pessoas apresentando, principalmente, doenças oculares (KOREISHI; SCHECHTER; KARP, 2006) e infecções urinárias levando diretamente a morte (PINTO et al., 1999).

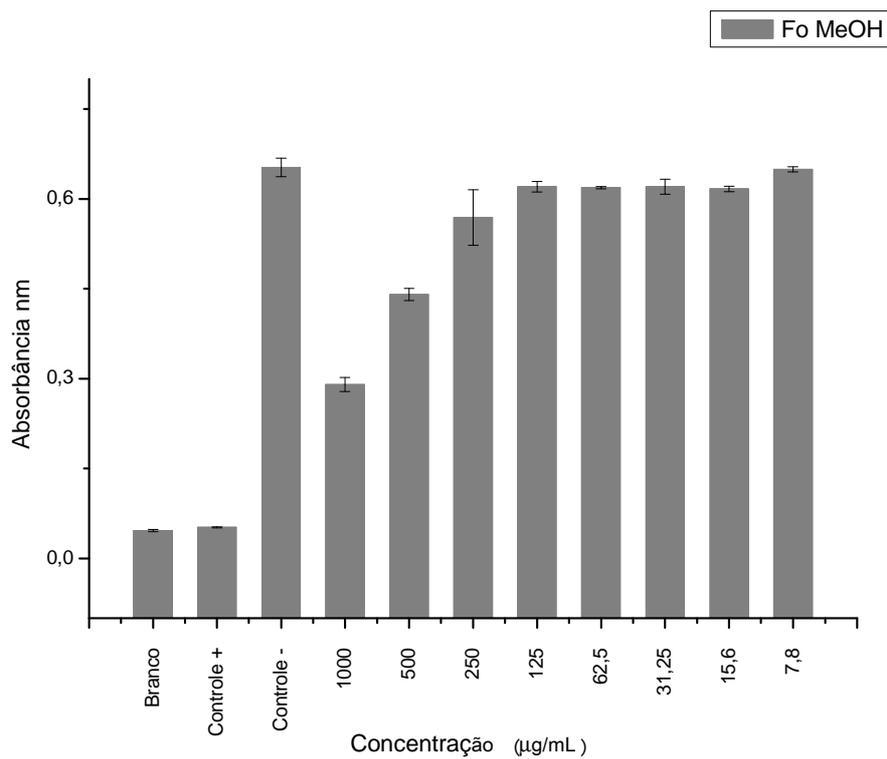
Os extratos metanólicos dos galhos e folhas testados contra *P. rettgeri*, apresentaram atividade antibacteriana com 100% de inibição na CIM de 500 µg/mL.

Para esses mesmos extratos, foi observada uma pequena discrepância entre a porcentagem de inibição destes dois extratos na CIM de 250 µg/mL. O extrato metanólico das folhas apresentou uma porcentagem de 69,5% de inibição enquanto que o extrato metanólico dos galhos apresentou 46,2% de inibição quando comparado ao controle positivo (Figura 96). Os demais extratos não mostraram atividade significativa.

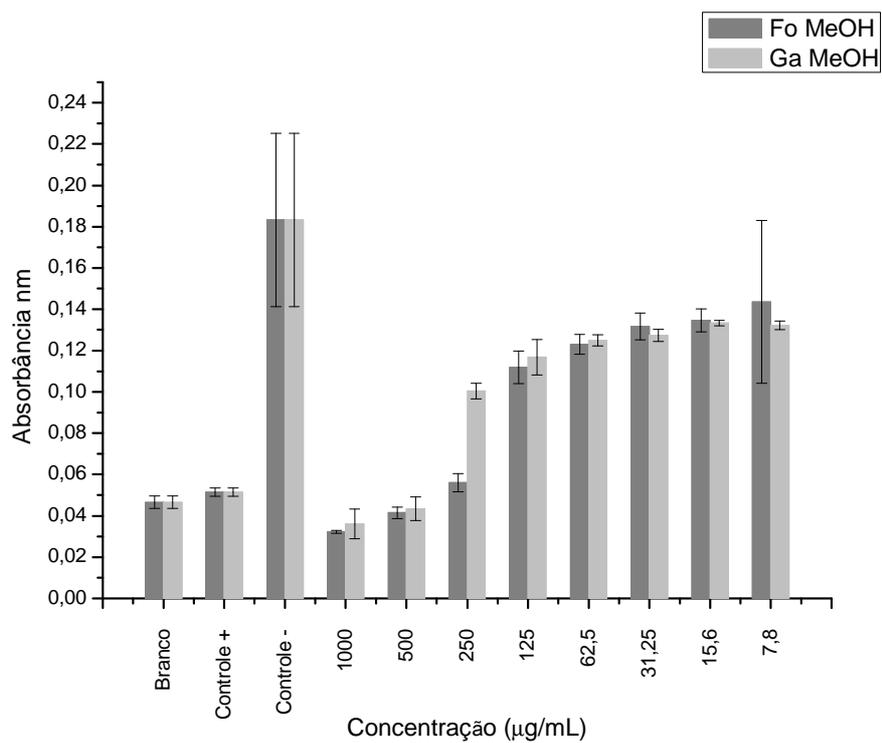
Os resultados da atividade antibacteriana descritos para *Diplotropis purpurea* são inéditos na literatura consultada, pois não foram encontrados relatos de atividade antibacteriana, apenas para a espécie *D. ferruginea* que mostrou atividade antibacteriana do extrato etanólico das cascas testadas para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (CERQUEIRA et al., 2011).



**Figura 94.** Potencial antibacteriano dos extratos metanólicos das folhas e galhos frente a *Serratia marcescens*.



**Figura 95.** Potencial antibacteriano do extrato metanólico das folhas frente a *Bacillus cereus*.



**Figura 96.** Potencial antibacteriano dos extratos metanólicos das folhas e galhos frente a *Providencia rettgeri*.

## 5. Conclusão

- O estudo fitoquímico de *Diplotropis purpurea* permitiu a identificação de 3 triterpenos (lupeol, taraxerol e  $\beta$ -amirina). Exceto o lupeol, os demais triterpenos estão sendo descritos pela primeira vez em *Diplotropis*;
- O extrato metanólico das folhas de *Diplotropis purpurea* apresentou maior atividade antibacteriana frente às cepas: *Serratia marcescens* (CIM de 250  $\mu\text{g/mL}$ ), *Bacillus cereus* (66 % de inibição na CIM 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) e *Providencia rettgeri* (69,5 % de inibição na CIM de 250  $\mu\text{g/mL}$ );
- O estudo fitoquímico de *Deguelia duckeana* permitiu a identificação de nove substâncias: 3,5,4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno, 4-metoxilonchocarpina, 4-metoxiderricidina, 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-6-prenilflavanona, 5-hidroxi-4'-metoxi-isolonchocarpina, 3',4'-metilenodioxo-7-metoxiflavona, 3',4',7-trimetoxiflavona, racemoflavona e iangambina.
- A chalcona 4-hidroxilonchocarpina e a flavanona 4-hidroxi-isolonchocarpina apresentaram citotoxicidade na detecção da enzima LDH liberada ao ambiente extracelular. Essas duas substâncias mostraram clivagem de pro-caspase-3 nas concentrações de 30  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Esses resultados indicaram que o mecanismo de morte celular foi necrose e, posterior indução de apoptose pela ativação da caspase-3;
- Dentre os oito flavonoides testados quanto ao potencial anticâncer, quatro mostraram ativação da proteína de alongamento fator-2 indicando que o mecanismo de morte das células foi pela inibição da segunda etapa da síntese de proteínas já que essa proteína está relacionada diretamente com essa etapa;

- A flavona 3',4'-metilenodioxo-7-metoxiflavona **(VII)** ativou a quinase AMP e eEF2 em 50 µM inferindo que essa substância atua no mecanismo de morte celular via AMPK e também via fosforilação da eEF2. Esses resultados são inéditos para a literatura, pois ainda não havia sido descrito nenhum estudo com essa substância visado esses mecanismos de morte celular em linhagem neuroblastoma (SK-N-SH).

- Os resultados desse presente estudo contribuem significativamente para o conhecimento químico e biológico de *Deguelia duckeana* e *Diplotropis purpurea*. Vale ressaltar que as substâncias ativas quanto ao potencial anticâncer isoladas de *Deguelia duckeana* e os extratos ativos frente à atividade antibacteriana de *Diplotropis purpurea* estão sendo descritos pela primeira vez na literatura.

## 6. Referências

- AHMED, A. A.; MAHMOUD, A. A.; ALI, E. T.; TZAKOU, O.; COULADIS, M.; MABRY, T. J.; GÁTI, T.; TÓTH, G. Two highly oxygenated eudesmanes and 10 lignans from *Achillea holosericea*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 8, p. 851–856, abr. 2002.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da biologia celular. Segunda ed. Porto Alegre, 2006.
- ALMEIDA, E. R., ALMEIDA, R. N., NAVARRO, D. S., BHATTACHARYYA, J., SILVA, B. A., BIRNBAUM, J. S. P. Central antinociceptive effect of a hydroalcoholic extract of *Dioclea grandiflora* seeds in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 1-4, 2003a.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; DA SILVA, M. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BRAZ-FILHO, R. BARBOSA-FILHO, J. M. Outros constituintes químicos de *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 44–46, 2003b.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, fev. 2005a.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CABRAL, A. G. S.; AGRA, M. F.; DA-CUNHA, E. V. L.; DA SILVA, M. S.; NASCIMENTO, S. C.; BRAZ-FILHO, R. Diploflavone, a new flavonoid from *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6b, p. 1454–1457, nov. 2005b.
- AMMAR, M. I., NENAAH, G. E., MOHAMED, A. H. Antifungal activity of prenylated flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi. **Crop protection**, v. 49, p. 21-25, 2013.
- ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517–524, dez. 2006.
- ARAÚJO, C. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; TIBIRIÇÁ, E. Protective effects of yangambin on cardiovascular hyporeactivity to catecholamines in rats with endotoxin-induced shock. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology**, v. 363, n. 3, p. 267–275, 14 fev. 2001.
- ARONSON, C. J. D.; ALDERMAN, S. I. THE OCCURRENCE AND BACTERIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *S. MARCESCENS* FROM A CASE OF MENINGITIS. **Journal of Bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 261–267, 1943.
- BANERJI, A.; LUTHRIA, D. L.; PRABHU, B. R. Prenylated compounds from *Atalantia racemosa*: isolation and synthesis of two pyranoflavones. **Phytochemistry**, v. 27, n. 11, p. 3637–3640, jan. 1988.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. DA S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BEARSON, B. L.; BRUNELLE, B. W. Fluoroquinolone induction of phage-mediated gene transfer in multidrug-resistant *Salmonella*. **International journal of antimicrobial agents**, n. IN PRESS, p. 8–11, 28 maio 2015.

- BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3248S–3254S, out. 2003.
- BISSELL, M. J.; HINES, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. **Nature medicine**, v. 17, n. 3, p. 320–9, mar. 2011.
- BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; VIEIRA, S. L.; PINHO, F. J. DA ROCHA, A. I. Flavonoids from Amazonian leguminosae. **Phytochemistry**, v. 12, n. 5, p. 1184–1186, maio 1973.
- BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; MOURÃO, A. P.; DA ROCHA, A. I.; OLIVEIRA, F. S. Flavonoids from Derris Species. **Phytochemistry**, v. 14, p. 1454–1456, 1975.
- BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; MOURÃO, A. P. A Stilbene and Two Flavanones from Derris rariflora. **Phytochemistry**, v. 14, p. 261–263, 1975.
- BROWN, D. G.; LISTER, T.; MAY-DRACKA, T. L. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 2, p. 413–418, jan. 2014.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2000.
- BURNETTE, W. N. Electrophoretic Transfer of Proteins from “ Western Blotting ”: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, p. 195–203, 1981.
- CARLBERG, U.; NILSSON, A.; NYGARD, O. Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. **European Journal of Biochemistry**, v. 191, n. 3, p. 639–645, 1990.
- CARNEIRO, J. S.; EMMERT, L.; STERNADT, G. H.; MENDES, J. C.; ALMEIDA, G. F. Decay susceptibility of Amazon wood species from Brazil against white rot and brown rot decay fungi 10th EWLP, Stockholm, Sweden, August 25–28, 2008. **Holzforschung**, v. 63, n. 6, p. 767–772, 1 jan. 2009.
- CARRION, L. L. RAMOS, D. F.; MARTINS, D.; OSÓRIO, M. I. C.; CURSINO, L. M. C.; MESQUITA, D. W. O.; NUNEZ, C. V.; SILVA, P. E. A. Antimycobacterial activity of Brazilian Amazon plants extracts. **International Journal of Phytomedicine**, v. 5, p. 479–485, 2013.
- CERQUEIRA, G. S.; ROCHA, N. F. M.; ALMEIDA, J. R. G. S. DE FREITAS, A. P. F.; LIMA, E. O.; FILHO, J. M. B.; DE FREITAS, R. M.; MELO, D. M. F. F. Antimicrobial activity of the extract of stem bark of diplotropis ferruginea benth. **Journal of young pharmacists : JYP**, v. 3, n. 4, p. 284–6, out. 2011.
- CHEN, M., WANG, T., JIANG, Z., SHAN, C., WANG, H., WU, M., ZHANG, S., ZHANG, Y., ZHANG, L. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects o total flavonoid C-glycosides from *Abrus mollis* extracts. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, p. 0590-0598, 2014.
- CHOI, N.; CHOI, J. H.; YANG, H.; JEONG, E. J.; LEE, K. Y.; KIM, Y. C.; SUNG, S.H. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of flavonoids isolated from Rhus verniciflua in neuronal HT22 and microglial BV2 cell lines. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 50, n. 6, p. 1940–5, jun. 2012.
- CHOI, A. Y.; CHOI, J. H.; YOON, H.; HWANG, K.; NOH, M. H.; CHOE, W.; YOON, K.; HA, J.; YEO, E.; KANG, I. Luteolin induces apoptosis through endoplasmic

- reticulum stress and mitochondrial dysfunction in Neuro-2a mouse neuroblastoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. 1-2, p. 115–126, 2011.
- CLSI, C. I. AND L. S. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição (M7-A6). In: **Approved Standart**. [s.l: s.n.]. v. 23.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–95, jun. 2013.
- CURSINO, L. M. C.; PAULA, R. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; SANTOS, P. A.; NUNEZ, C.V. Triterpenes from *Miquartia guianensis* (Olacaceae) and in vitro antimalarial activity. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2165–2168, 2012.
- DAVIES, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 375–382, 15 abr. 1994.
- DE OLIVEIRA, D. G.; ALMEIDA, C. M. C.; SILVA, C. Y. Y.; ARRUDA, M. S. P.; ARRUDA, A. C.; LOPES, D. C. F.; YAMADA, E. S.; DA COSTA, E. T.; DA SILVA, M. N. Flavonoids from the Leaves of *Deguelia utilis* (Leguminosae): Structural Elucidation and Neuroprotective Properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1933–1939, 2012.
- DELLE MONACHE, F. et al. 3-Aryl-4-methoxycoumarins and isoflavones from *Derris glabrescens*. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 107, p. 403–407, 1977.
- DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. In: 3rd. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2009. p. 539.
- DING, P., HUANG, H., ZHOU, P., CHEN, D. Quinolizidine Alkaloids with Anti-HBV Activity from *Sophora tonkinensis*. **Planta Medica**, v. 72, p. 854-856, 2006.
- DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and Related Species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 324–338, 1993.
- EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. **FEMS microbiology letters**, v. 232, n. 2, p. 189–95, 19 mar. 2004.
- FACUNDO, V. A.; MENEGUETTI, D. U. O.; MILITÃO, J. S. L. T.; LIMA, R. A.; HURTADO, F. B.; CASSEB, A. A.; TEIXEIRA, L. F.; DA SILVA, I. C.; DA SILVA, G. V. J.; LACERDA JÚNIOR, V. Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon rainforest. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 58, p. 270–273, fev. 2015.
- FERREIRA, C. A. C. **Reserva Ambiental da Cachoeira da Onça/Manaus: Fundação Rede Amazônica / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA**. Manaus: [s.n.]. p. 106
- GARCEZ, W. S., GARCEZ, F. R., TIEPPO, C., FREITAS, O. N., HAMERSKI, L. Isoflavones and flavonols from *Andira humilis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1242-1245, 2010.
- GARCIA, M.; KAND, M. H. C.; VIEIRA, D. M.; DO NASCIMENTO, M. C.; MORS, W. B. Isoflavonoids from *Derris spruceana*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 10, p. 2425–2427, 1986.
- HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The Lancet**, v. 344, n. 10, p. 721–724, 1994.
- HAUSOTT, B.; GREGER, H.; MARIAN, B. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 129, n. 10, p. 569–76, out. 2003.

- HEGNAUER, R.; J. GPAYER-BARKMEIJER, R. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 3–16, ago. 1993.
- HORMAN, S.; BROWNE, G. J.; KRAUSE, U.; PATEL, J. V.; VERTOMMEN, D.; BERTRAND, L.; LAVOINNE, A.; HUE, L.; PROUD, C. G.; RIDER, M. H. Activation of AMP-Activated Protein Kinase Leads to the Phosphorylation of Elongation Factor 2 and an Inhibition of Protein Synthesis. **Current Biology**, v. 12, n. 16, p. 1419–1423, ago. 2002.
- JANG, D. S.; CUENDET, M.; HAWTHORNE, M. E.; KARDONO, L. B. S.; KAWANISHI, K.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D.. Prenylated flavonoids of the leaves of *Macaranga conifera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. **Phytochemistry**, v. 61, n. 7, p. 867–872, dez. 2002.
- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; XU, J.; WARD, E. Cancer Statistics , 2010. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 60, p. 277–300, 2010.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.
- KASTAN, M. B.; ONYEKWERE, O.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; CRAIG, R. W. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. **Cancer Research**, v. 51, p. 6304–6311, 1991.
- KATO, M. J.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Flavones and lignans in flowers, fruits and seedlings of *Virola venosa*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 283–287, jan. 1992.
- KIM, J. A.; LEE, S.; KIM, D.; KIM, M.; KWON, B.; HAN, D. C. Fisetin, a dietary flavonoid, induces apoptosis of cancer cells by inhibiting HSF1 activity through blocking its binding to the hsp70 promoter. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 6, p. 696–706, jun. 2015.
- KIM, J. Y.; LIM, H. J.; LEE, D. Y.; KIM, J. S.; KIM, D. H.; LEE, H. J.; KIM, H. D. JEON, R.; RYU, J.. In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 3, p. 937–40, 1 fev. 2009.
- KINGHORN, A. D.; BALANDRIN, M. F.; LIN, L. Alkaloid distribution in some species of the papilionaceous tribes sophoreae, dalbergieae, loteae, brongniartieae and bossiaeeae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 9, p. 2269–2275, jan. 1982.
- KIT ROCHE APPLIED SCIENCE. Cytotoxicity Detection Kit ( LDH ). In: **Roche**. Mannheim: [s.n.]. v. version 8p. 1–20.
- KOREISHI, A. F.; SCHECHTER, B. A; KARP, C. L. Ocular infections caused by *Providencia rettgeri*. **Ophthalmology**, v. 113, n. 8, p. 1463–6, ago. 2006.
- KRAFT, C., JANETT-SIEMS, K., SIEMS, K., GUPTA, M. P., BIENZLE, U., EICH, E. Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 131-135, 2000.
- KUETE, V.; NGAMENI, B.; WIENCH, B.; KRUSCHE, B.; HORWEDEL, C.; NGADJUI, B. T.; EFFERTH, T. Cytotoxicity and mode of action of four naturally occurring flavonoids from the genus *Dorstenia*: gancaonin Q, 4-hydroxyonchocarpin, 6-prenylapigenin, and 6,8-diprenylerydiol. **Planta medica**, v. 77, n. 18, p. 1984–9, dez. 2011.
- KUETE, V.; NKUETE, A. H. L.; MBAVENG, A. T.; WIENCH, B.; WABO, H. K.; TANE, P.; EFFERTH, T. Cytotoxicity and modes of action of 4'-hydroxy-2',6'-

- dimethoxychalcone and other flavonoids toward drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cell lines. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 21, n. 12, p. 1651–7, 15 out. 2014.
- KUETE, V.; MBVENG, A. T.; ZEINO, M.; NGAMENI, B.; KAPCHE, G. D. W. F.; KOUAM, S. F.; NGADJUI, B. T.; EFFERTH, T. Cytotoxicity of two naturally occurring flavonoids (dorsmanin F and poinsettifolin B) towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 22, n. 7-8, p. 737–43, 15 jul. 2015.
- KUMAR, S.; SINGH, B. R. An Overview of Mechanisms and Emergence of Antimicrobials Drug. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 1, n. 2, p. 7–14, 2013.
- LAWSON, M. A.; KAOUADJI, M.; ALLAIS, D. P.; CHAMPAVIER, Y.; CHULIA, A. J. Substituted tubaic acids, new oxidative rotenoid metabolites from *Lonchocarpus nicou*. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 4, p. 451–454, jan. 2006.
- LAWSON, M. A.; KAOUADJI, M.; CHULIA, A. J. Nor-dehydrodeguelin and nor-dehydrorotenone, C22 coumaronochromones from *Lonchocarpus nicou*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 15, p. 2407–2409, abr. 2008.
- LAWSON, M. A.; KAOUADJI, M.; CHULIA, A. J. A single chalcone and additional rotenoids from *Lonchocarpus nicou*. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 47, p. 6116–6119, nov. 2010.
- LEE, D., LI, B., KEO, S., KIM, K., JEONG, G., OH, H., KIM, Y. Inhibitory effect of 9-hydroxy-6,7-dimethoxydalbergiquinol from *Dalbergia odorifera* on the NF- $\kappa$ B-related neuroinflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated mouse BV2 microglial cells is mediated by heme oxygenase-1. **International Immunopharmacology**, v. 17, p. 828-835, 2013.
- LEEJAE, S.; YINGYONGNARONGKUL, B.; SUKSAMRAIN, A.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Synthesis and structure–activity relationship of rhodomertone derivatives as antibacterial agent. **Chinese Chemical Letters**, v. 23, n. 9, p. 1011–1014, set. 2012.
- LEEJAE, S.; TAYLOR, P. W.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Antibacterial mechanisms of rhodomertone against important hospital-acquired antibiotic-resistant pathogenic bacteria. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. Pt 1, p. 78–85, jan. 2013.
- LI, W., HUANG, C., WANG, K., FU, J., CHENG, D., ZHANG, Z. Laboratory evaluation of aqueous leaf extract of *Tephrosia vogelli* against larvae of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and non-target aquatic organisms. **Acta Tropica**, v. 146, p. 36-41, 2015.
- LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ASSIS, T. S.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, B. A. Spasmolytic Action of Diplotropin, a Furanoflavan from *Diplotropis ferruginea* Benth., Involves Calcium Blockade in Guinea-Pig Ileum. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 60b, p. 1093–1100, 2005.
- LIMA, N. M. **CONSTITUINTES QUÍMICOS E POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Deguelia duckeana* A. M. G. AZEVEDO**. [Dissertação de mestrado] Universidade Federal do Amazonas, 2011.
- LIMA, N. M.; ANDRADE, J. I. A.; LIMA, K. C. S.; DOS SANTOS, F. N.; BARISON, A.; SALOMÉ, K. S.; MATSUURA, T.; NUNEZ, C. V. Chemical profile and biological

- activities of *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo (Fabaceae). **Natural product research**, v. 27, n. 4-5, p. 425–32, mar. 2012.
- LIMSUWAN, S.; TRIP, E. N.; KOUWEN, T. R. H. M.; PIERSMA, S.; HIRANRAT, A.; MAHABUSARAKAM, W.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P.; DIJL, J. M.; KAYSER, O. Rhodomyrton: a new candidate as natural antibacterial drug from *Rhodomyrton tomentosa*. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 16, n. 6-7, p. 645–51, jun. 2009.
- LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. Biossíntese de produtos naturais. In: [s.l: s.n.]. p. 271.
- LOBO, L. T.; SILVA, G. A.; FREITAS, M. C. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P. Stilbenes from *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) A. M. G. Azevedo leaves: effects on seed germination and plant growth. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1838–1844, 2010.
- LÔBO, L. T.; SILVA, G. A.; FERREIRA, M.; SILVA, M. N.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, A. C.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S.; BORGES, R. S.; ARRUDA, M. S. Dihydroflavonols from the leaves of *Derris urucu* (Leguminosae): structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1082–1088, 2009.
- LOPEZ-MEJIA, I. C.; FAJAS, L. Cell cycle regulation of mitochondrial function. **Current opinion in cell biology**, v. 33C, p. 19–25, 12 nov. 2014.
- MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; MORAES, V. R. S. Prenylated flavonoids from *Deguelia hatschbachii* and their systematic significance in *Deguelia*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 77–89, 2001.
- MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; MORAES, V. R. S. New Spectral Data of Some Flavonoids from *Deguelia hatschbachii* A.M.G. Azevedo. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 1, p. 133–137, 2003.
- MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; SOUZA-NETA, L.C. New prenylated metabolites of *Deguelia longeracemosa* and evaluation of their antimicrobial potential. **Planta medica**, v. 72, n. 4, p. 358–63, mar. 2006.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517–1575, dez. 1994.
- MAHLEN, S. D. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 755–91, out. 2011.
- MAHMOUD, E. N.; WATERMAN, P. . Flavonoids from the stem bark of *Millettia Hemsleyana*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 2, p. 369–371, 1985.
- MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde. In: Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 290.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311–35, 23 mar. 2012.
- NOGUEIRA, E. M. et al. Wood density in forests of Brazil's “arc of deforestation”: Implications for biomass and flux of carbon from land-use change in Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 248, n. 3, p. 119–135, set. 2007.

- ORGANESYAN, E. T.; SARAF, A. S.; SIMONYAN, A. V.; SHIRYAEV, I. N. STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP IN FLAVONOIDS. 9. ANTIALLERGIC ACTIVITY OF CHALCONES. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 25, n. 8, p. 18–22, 1991.
- ORLIKOVA, B.; MENEZES, J. C. J. M. D. S.; JI, S.; KAMAT, S. P.; CAVALEIRO, J. A. S.; DIEDERICH, M. Methylenedioxy flavonoids: Assessment of cytotoxic and anti-cancer potential in human leukemia cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 173-180, 2014.
- OUATTARA Y., SANONB, S., TRAORÉC, Y., MAHIOUD, V., AZASE, N., SAWADOGO, L. Antimalarial activity of *Swartzia madagascariensis* desv. (leguminosae), *Combretum glutinosum* guill. & perr. (combretaceae) and *Tinospora bakis* miers. (menispermaceae), burkina faso medicinal plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 3, n.1, p. 75-81.
- PANDEY, S.; AHMAD, T.; ARYAL, S.; RANA, B.; SAPKOTA, B. Penicillin production and history: an overview. **International Journal of Microbiology and Allied Sciences (IJOMAS)**, v. 1, n. 2, p. 103–108, 2014.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. In: 4. ed. São Paulo, 2010. p. 700.
- PEREIRA, A. C.; ARRUDA, M. S. P.; DA SILVA, E. A. S.; DA SILVA, M. N.; LEMOS, V. S.; CORTES, S. F. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and hypoglycemic effect of stilbenes from the Amazonian plant *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) A. M. G. Azevedo (Leguminosae). **Planta medica**, v. 78, n. 1, p. 36–8, jan. 2012.
- PEREIRA, C.; LOPES-RODRIGUES, V.; COUTINHO, I.; NEVES, M. P.; LIMA, R. T.; PINTO, M.; CIDADE, H.; VASCONCELOS, M. H.; SARAIVA, S. Potential small-molecule activators of caspase-7 identified using yeast-based caspase-3 and -7 screening assays. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p. 8–16, 11 abr. 2014.
- PETROSINO, J.; CANTU, C.; PALZKILL, T. B-Lactamases: protein evolution in real time. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 323–327, 1998.
- PINTO, V.; TELENTI, M.; QUIRÓS, J. F. B.; PALOMO, C. Two cases of fatal transfusion-associated bacterial sepsis provoked by *Providencia rettgeri*. **Haematologica**, v. 84, n. November, p. 1051–1052, 1999.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G.. **Farmacologia**. 7th. ed. Rio de Janeiro, 2011, p. 768
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. V.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Guia à Flora da Reserva Ducke – Identificando as plantas vasculares de uma floresta de terra-firma na Amazônia Central. In: Manaus: [s.n.]. p. 464.
- SAISING, J.; FRIEDRICH, G.; DUBE, L.; ZIEBANDT, A. K.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Inhibition of staphylococcal biofilm-related gene transcription by rhodomyrone, a new antibacterial agent. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 659–665, 2015.

- SANTOS, F. P.; ALVES, H. S.; LIMA, E. O.; CHAVES, M. C. O. FLAVONOIDS FROM *Piper glandulosissimum* Yuncker (Piperaceae). **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 172–177, 2015.
- SCHWER, C. I.; LEHANE, C.; GUELZOW, T.; ZENKER, S.; STROSING, K. M.; SPASSOV, S.; ERXLEBEN, A.; HEIMRICH, B.; BUERKLE, H.; HUMAR, M. Thiopental inhibits global protein synthesis by repression of eukaryotic elongation factor 2 and protects from hypoxic neuronal cell death. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77258, jan. 2013.
- SHOJA, M. H.; REDDY, N. D.; NAYAK, P. G.; SRINIVASAN, K. K.; RAO, C. M. *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC arrests cell cycle and induces apoptosis via caspase-3/7 activation in breast cancer cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 168, p. 50–60, 20 jun. 2015.
- SILVA, F. M. A.; LIMA, B. R.; SOARES, E.; ALMEIDA, R. A.; SILVA FILHO, F. A.; CORRÊA, W. R.; SALVADOR, M. J.; SOUZA, A. Q. L.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Polycarpol in *Unonopsis*, *Bocageopsis* and *Onychopetalum* Amazonian species: chemosystematical implications and antimicrobial evaluation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 11–15, jan. 2015.
- SILVA, T. M. S. DA; CARVALHO, M. G. DE; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119–1128, 2009.
- SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 71–109, jan. 2011.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. ed. [s.l.] UFRGS e UFSC, 2004.
- SINGER, R. S.; FINCH, R.; WEGENER, H. C.; BYWATER, R.; WALTER, J.; LIPSITCH, M. Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 47–51, jan. 2003.
- SLAGER, J.; KJOS, M.; ATTAIECH, L.; VEENING, J.. Antibiotic-induced replication stress triggers bacterial competence by increasing gene dosage near the origin. **Cell**, v. 157, n. 2, p. 395–406, 10 abr. 2014.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3rd. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2012.
- STASI, L. C. DI; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. In: UNESP (Ed.). . São Paulo: [s.n.]. p. 604.
- STEVENSON, P. Pharmaceutical companies target plant products for drugs of the future. **The Lancet**, v. 354, p. 490, 1999.
- SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L. B.; NEPOMUCENO, D. C.; YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts - Clusiaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 287–290, 2006.
- TOZZI, A. M. G. A. **Estudos taxonômicos dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil**. [s.l.: s.n.].

TROPICOS,2015a.

<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Deguelia&commonname=>,  
visualizado em julho de 2015.

TROPICOS, 2015b.

<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Deguelia&commonname=>

TROPICOS, 2015c.

<http://www.tropicos.org/Name/13000468?tab=distribution>

TROPICOS, 2015d.

<http://www.tropicos.org/Name/13000468?tab=synonyms>

VAUZOUR, D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: Biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects.

**Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 914273, jan. 2012.

VÁZQUEZ, L. H.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCAÑA, A. The Pentacyclic Triterpenes  $\alpha,\beta$ -amyriins: a Review of Sources and Biological Activities. In: **Phytochemicals - A global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. [s.l: s.n.]. p. 538.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D.; VADGAMA, J. V. Sensitization to docetaxel in prostate cancer cells by green tea and quercetin. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 408–15, abr. 2015.

WESTON, L. A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 2, p. 283–297, fev. 2013.

WRIGHT, J. H. Neurocytoma or Neuroblastoma, a Kind of Tumor Not Generally Recognized. **Journal of Experimental Medicine**, v. 12, n. 4, p. 556–561, 23 jul. 1910.

XU, M.; LEE, S. Y.; KANG, S. S.; KIM, Y. S. Antitumor activity of jujuboside B and the underlying mechanism via induction of apoptosis and autophagy. **Journal of natural products**, v. 77, n. 2, p. 370–6, 28 fev. 2014.

YANG, T.; KONG, B.; GU, J.; KUANG, Y.; CHENG, L.; YANG, W.; XIA, X.; SHU, H. Anti-apoptotic and anti-oxidative roles of quercetin after traumatic brain injury. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 34, n. 6, p. 797–804, ago. 2014.

ZHANG, Q.; ZHAO, X. H.; WANG, Z. J. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 2042–2053, jun. 2008.