



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE
PLANTAS DO NORDESTE DO BRASIL: Avaliação biológica e
estudo fitoquímico de *Tephrosia cinerea* Pers. (Fabaceae)

GRAZIELLE TAVARES MALCHER

Fortaleza-CE

2007

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE PLANTAS
DO NORDESTE DO BRASIL: Avaliação biológica e estudo fitoquímico
de *Tephrosia cinerea* Pers. (Fabaceae)**

**Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em
Química Orgânica, como requisito para obtenção do título de Doutor.**

GRAZIELLE TAVARES MALCHER

Fortaleza-CE

2007

M199c Malcher, Grazielle Tavares

Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil
[manuscrito] : avaliação biológica e estudo fitoquímico de *Tephrosia cinerea*
Pers. (Fabaceae) / Grazielle Tavares Malcher
208 f. : il. ; enc.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007

Orientadora: Ângela Martha Campos Arriaga

Co-orientadora: Maria da Conceição Ferreira de Oliveira

Área de Concentração: Química de Produtos Naturais

1. Flavonóides 2. Óleos essenciais I. Arriaga, Ângela Martha Campos (orient.)

II. Universidade Federal do Ceará – Doutorado em Química Orgânica III.

Título

CDD 547

Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Grazielle Tavares Malcher

TESE APROVADA EM: 17/09/2007

EXAMINADORES:

Profa. Dra. ~~Ângela~~ ~~Martha~~ Campos Arriaga (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Aurea Echevarria
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Este trabalho foi realizado sob orientação da **Profa. Ângela Martha Campos Arriaga** do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará e co-orientação da **Profa. Maria da Conceição F. de Oliveira** do mesmo departamento.

A Deus por guiar meus passos.

Aos meus pais Alberto e Dóris, ao meu
esposo Bartolomeu e meu filho Guilherme.

AGRADECIMENTOS

A elaboração desta tese teve a contribuição direta ou indireta de algumas pessoas, as quais quero registrar minha imensa gratidão:

À profa. Ângela Martha C. Arriaga pela orientação, amizade e pela compreensão nos momentos difíceis pelos quais passei no período final da elaboração desta tese, além da confiança depositada em meu trabalho.

À profa. Maria da Conceição F. de Oliveira pelas sugestões dadas para a elaboração deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos nestes quatro anos de doutorado e pelas valiosas correções na determinação estrutural das substâncias inéditas; e, ao prof. Jair Mafezoli pela orientação inicial na bancada.

Ao prof. Raimundo Braz-Filho (UENF-RJ) pela colaboração na elucidação das estruturas dos compostos isolados, indispensável para a elaboração desta tese.

Ao prof. Edilberto Rocha Silveira pela oportunidade concedida em operar os equipamentos de Ressonância Magnética Nuclear e aos operadores Daniel, Renata, Nirla e Glauber, pelo empenho na obtenção dos espectros.

À profa. Gilvandete Maria P. Santiago, Gustavo e Yana pelos testes biológicos de atividade larvicida realizados; e, à profa. Telma Leda G. Lemos, Aluizio e Luciana pela realização dos testes de atividade antioxidante.

Ao prof. Manoel Andrade Neto pela coleta da planta estudada e ao Professor Edson P. Nunes pela identificação botânica da espécie.

Ao professor Marcos Eberlin (UNICAMP) pela realização dos espectros de massas de alta resolução das substâncias inéditas.

Ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Química Orgânica pelos conhecimentos transmitidos ao longo destes anos, especialmente a profa. Mary Anne S. Lima pela sua disponibilidade irrestrita sempre que precisei.

Aos amigos Geraldo e Cristina que de alguma forma deram a sua contribuição durante a minha vida acadêmica.

À Mônica, Jacqueline, Renata Paiva, Renata Mendonça, Rosa e Antônia, por todos os momentos divertidos que passamos juntas, pela amizade e companheirismo.

Ao Hernani, Walber Henrique e aos amigos do Laboratório de Síntese: Michele, Diego, Elenicy, Yana, Rafael, Patrícia e Eduardo pela agradável convivência, especialmente à Tathilene pela ajuda direta na bancada, ao Jackson e Jefferson pelas sugestões essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do curso de pós-graduação pela convivência agradável.

Aos funcionários Sr. Paulo, Lana, Mundinha, Célia e Orlando.

Ao meu esposo Bartolomeu Berto, por suportar pacientemente a minha ausência na vida familiar nesse último estágio de elaboração de tese, além do amor e companheirismo, e, ao nosso filho Guilherme Berto que veio alegrar nossas vidas.

A toda minha família, especialmente à minha mãe, uma grande amiga, por ter “segurado a barra” para que eu pudesse finalizar esta tese, além do amor e dedicação gratuitos.

Ao CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro.

E, finalmente, a Deus por sempre me iluminar e me guiar...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	XVIII
LISTA DE QUADROS.....	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIX
RESUMO.....	XX
ABSTRACT.....	XXII

INTRODUÇÃO.....	01
1. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	03
1.1. Considerações Botânicas sobre a Família Fabaceae.....	03
1.2. Considerações Botânicas sobre a Subfamília Papilionoideae.....	03
1.3. Considerações Botânicas sobre a Espécie <i>Tephrosia cinerea</i> Pers.....	04
2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	05
2.1. Revisão da Literatura da Ocorrência de Chalconas e Flavonas em Plantas do Gênero <i>Tephrosia</i>	05
2.1.1. Aspectos Químicos do Gênero <i>Tephrosia</i>	06
3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL.....	16
3.1. Determinação Estrutural dos Constituintes Voláteis de <i>Tephrosia cinerea</i>	16
3.1.1. Determinação Estrutural dos Constituintes Voláteis das Folhas e Talos de <i>T. cinerea</i>	17
3.2. Determinação Estrutural dos Constituintes não Voláteis de <i>Tephrosia cinerea</i>	24
3.2.1. Determinação Estrutural de TC-1.....	24
3.2.2. Determinação Estrutural de TC-2.....	34
3.2.3. Determinação Estrutural de TC-3.....	45
3.2.4. Determinação Estrutural de TC-4.....	49
3.2.5. Determinação Estrutural de TC-5.....	54
3.2.6. Determinação Estrutural de TC-6.....	65
3.2.7. Determinação Estrutural de TC-7.....	78

3.2.8. Determinação Estrutural de TC-8.....	89
3.2.9. Determinação Estrutural de TC-9.....	99
3.2.10. Determinação Estrutural de TC-10.....	111
3.2.11. Determinação Estrutural de TC-11.....	122
3.2.12. Determinação Estrutural de TC-12.....	130
3.3. Identificação dos Componentes Químicos dos Óleos não Voláteis de <i>T. cinerea</i>	139
4. ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	146
4.1. Atividade Larvicida Frente às Larvas de <i>Aedes aegypti</i>	146
4.2. Teste de Atividade Antioxidante.....	148
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	150
5.1. Material vegetal (<i>Tephrosia cinerea</i> Pers.).....	150
5.2. Métodos Cromatográficos.....	150
5.2.1. Cromatografia de Adsorção em Coluna (CC).....	150
5.2.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	150
5.3. Métodos Físicos de Análises.....	151
5.3.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)	151
5.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	151
5.3.3. Espectrometria de Massas e FID.....	152
5.3.4. Ponto de Fusão.....	152
5.4. Estudo dos Constituintes Voláteis de <i>Tephrosia cinerea</i>	153
5.4.1. Obtenção dos óleos essenciais das folhas e talos de <i>T. cinerea</i>	153
5.5. Estudo dos Constituintes não Voláteis de <i>Tephrosia cinerea</i>	153
5.5.1. Obtenção dos extratos das folhas, talos, vagens e raízes de <i>T. cinerea</i>	153
5.5.1.1. Partição Líquido-líquido dos Extratos Obtidos de <i>T. cinerea</i>	154
5.5.2. Obtenção dos Óleos não Voláteis de <i>Tephrosia cinerea</i>	155
5.5.2.1. Obtenção dos Ácidos Graxos Livres de <i>T. cinerea</i>	155
5.5.2.2. Obtenção dos Ésteres Metílicos de <i>T. cinerea</i>	156
5.5.3. Fracionamento Cromatográfico das Frações Obtidas dos Extratos de <i>Tephrosia cinerea</i>	159
5.5.3.1. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-H-insap.	159
5.5.3.1.1. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-H-insap. (29-47): isolamento de TC-1.....	159
5.5.3.1.2. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-H-insap. (88-128): isolamento	

de TC-2.....	160
5.5.3.1.3. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-H-insap. (146-181): isolamento de TC-3.....	161
5.5.3.2. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D: isolamento de TC-1 e TC-4.....	162
5.5.3.2.1. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D (4-5): isolamento de TC-5.....	163
5.5.3.2.2. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D (7-8): isolamento de TC-6.....	164
5.5.3.2.3. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D (10-23).....	165
5.5.3.2.4. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D (10-23)ppt: isolamento de TC-7 e TC-8.....	167
5.5.3.2.5. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D (10-23)sol (152-163): isolamento de TC-9.....	168
5.5.3.3. Tratamento Cromatográfico de TCTE-AE: isolamento de TC-10.....	170
5.5.3.4. Fracionamento Cromatográfico de TCVAE-H-insap: isolamento de TC-1 e TC-11.....	171
5.5.3.5. Fracionamento Cromatográfico de TCVAE-D.....	172
5.5.3.5.1. Fracionamento Cromatográfico de TCVAE-D (8): isolamento de TC-12.....	173
5.6. Teste de atividade larvívica sobre o mosquito <i>Aedes aegypti</i>	175
5.7. Teste de atividade antioxidante.....	175
6. CONCLUSÃO.....	176
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	177

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -Estrutura da Rotenona.....	01
Figura 02 – Espécime de <i>T. cinerea</i> em seu habitat natural (Foto: Prof. Manoel Andrade Neto).....	05
Figura 03 -Rota Biossintética dos flavonóides.....	08
Figura 04 -Esqueleto básico de flavonas (I) e chalconas (II).....	08
Figura 05 -Cromatograma de OEFTC.....	21
Figura 06 -Cromatograma de OETTC.....	21
Figura 07 -Espectro de massas do (E)-cariofileno (69).....	22
Figura 08 -Espectro de massas do α -humuleno (70).....	22
Figura 09 -Espectro de massas da (E)- β -ionona (71).....	22
Figura 10 -Espectro de massas do (E)-nerolidol (72).....	23
Figura 11 -Espectro de massas do óxido de cariofileno (73).....	23
Figura 12 -Espectro de massas do epóxido de humuleno II (74).....	23
Figura 13 -Espectro de massas do (2E,6E)- farnesol (75).....	24
Figura 14 -Espectro de massas do fitol (76).....	24
Figura 15 -Espectro de massas do isofitol (77).....	24
Figura 16 -Estrutura de lanceolatina B (78) (furano [7,8:2'',3''] flavona).....	28
Figura 17 -Espectro de massas de TC-1 (IE, 70eV).....	30
Figura 18 -Espectro de absorção na região do IV de TC-1.....	30
Figura 19 -Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-1.....	31
Figura 20 -Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-1.....	31
Figura 21 -Espectro de RMN ^{13}C -HBBB (125 MHz, CDCl_3) de TC-1.....	32
Figura 22 -Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TC-1.....	32
Figura 23 -Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-1.....	33
Figura 24 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-1.....	33

Figura 25 –Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C –HMBC de TC-1.....	34
Figura 26 -Equilíbrio ceto-enólico de β -hidroxichalconas.....	37
Figura 27 -Estrutura do pongamol (79) (furano [3',4':2'',3'']-2'-metoxi-7-chalconol). ..	38
Figura 28 -Espectro de massas de TC-2 (IE, 70eV).....	41
Figura 29 -Espectro de absorção na região do IV de TC-2.....	41
Figura 30 -Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-2.....	42
Figura 31 -Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-2.....	42
Figura 32 -Espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, CDCl_3) de TC-2.....	43
Figura 33 -Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TC-2.....	43
Figura 34 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-2.....	44
Figura 35 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-2.....	44
Figura 36 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C –HMBC de TC-2.....	45
Figura 37 -Expansão-01 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-2.....	45
Figura 38 -Estrutura de β -sitosterol (80) e estigmasterol (81).....	47
Figura 39 -Espectro de absorção na região do IV de TC-3.....	48
Figura 40 -Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-3.....	48
Figura 41 -Espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, CDCl_3) de TC-3.....	49
Figura 42 -Estrutura de Flemichapparin B (82) (3-Metoxi-8,9-metilenodioxi-6',11'-desidroptero-carpano).....	52
Figura 43 -Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-4.....	53
Figura 44 -Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-4.....	53
Figura 45 -Espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, CDCl_3) de TC-4.....	54
Figura 46 -Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TC-4.....	54
Figura 47 -Esqueleto flavanônico básico evidenciando os hidrogênios do sistema ABX.....	55
Figura 48 -Sistema dimetilcromeno, evidenciando o acoplamento dos hidrogênios olefínicos com o carbono C-2''.....	57
Figura 49 -Estrutura de isolonchocarpina (83) (2'',2''- imetilcromeno[5'',6'':7,8]-2S-isoflavona).....	58

Figura 50 -Representação da conformação do anel B de TC-5.....	59
Figura 51 -Espectro de massas de TC-5 (IE, 70eV).....	61
Figura 52 -Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-5.....	62
Figura 53 -Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-5.....	62
Figura 54 -Espectro de RMN ^{13}C -HBBB (125 MHz, CDCl_3) de TC-5.....	63
Figura 55 -Expansão do espectro de RMN ^{13}C -HBBB (125 MHz, CDCl_3) de TC-5...	63
Figura 56 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-5.....	64
Figura 57 -Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-5.....	64
Figura 58 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C –HMBC de TC-5.....	65
Figura 59 -Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-5.....	65
Figura 60 -Esqueleto básico dos rotenóides.....	69
Figura 61 -Subestrutura sugerida para TC-6.....	70
Figura 62 -Estrutura da rotenona (84).....	71
Figura 63 -Espectro de massas de TC-6 (IE, 70eV).....	73
Figura 64 -Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-6.....	74
Figura 65 -Espectro de RMN ^{13}C -HBBB (125 MHz, CDCl_3) de TC-6.....	74
Figura 66 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TC-6.....	75
Figura 67 -Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-6.....	75
Figura 68 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-6.....	76
Figura 69 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-6.....	76
Figura 70 -Expansão-01 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-6.....	77
Figura 71 -Expansão-02 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-6.....	77
Figura 72 -Expansão-03 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-6.....	78
Figura 73 -Expansão-04 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-6.....	78
Figura 74 -Estrutura de anhidrolanceolata A (85) (7-metil-8-(γ -metil- <i>trans</i> - α , γ -dienila)-flavona).....	82

Figura 75 -Espectro de massas de TC-7 (IE, 70eV).....	84
Figura 76 -Espectro de absorção na região do IV de TC-7.....	84
Figura 77 -Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-7.....	85
Figura 78 -Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-7.....	85
Figura 79 -Espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, CDCl_3) de TC-7.....	86
Figura 80 -Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TC-7.....	86
Figura 81 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-7.....	87
Figura 82 -Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-7.....	87
Figura 83 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C –HMBC de TC-7.....	88
Figura 84 -Expansão-01 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-7.....	88
Figura 85 -Expansão-02 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-7.....	89
Figura 86 -Expansão-03 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-7.....	89
Figura 87 -Estruturas de (I) lanceolata A (86) e (II) TC-8 (8-(3''-metoxi-dimetilalila)-7-metoxi-flavona) (87).....	93
Figura 88 -Espectro de massas de TC-8 (IE, 70eV).....	95
Figura 89 - Espectro de massas de alta resolução de TC-8.....	95
Figura 90 -Espectro de absorção na região do IV de TC-8.....	95
Figura 91 -Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-8.....	96
Figura 92 -Espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, CDCl_3) de TC-8.....	96
Figura 93 -Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-8.....	97
Figura 94 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-8.....	97
Figura 95 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C –HMBC de TC-8.....	98
Figura 96 -Expansão-01 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-8.....	98
Figura 97 -Expansão-02 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-8.....	99
Figura 98 -Expansão-03 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-8.....	99
Figura 99 -Possibilidades de estruturas isoméricas para TC-9.....	102

Figura 100- Comparação dos valores de deslocamento químico (δ) dos carbonos das metoxilas com e sem compressão estérica.....	103
Figura 101- Estrutura de 4',4''-dimetoxi-2'',2'',2''''-bis-dimetilcromeno [2',3':7,8;2'',3''':7'',8''']-7 \rightarrow O \rightarrow 7''-bichalcona (88).....	104
Figura 102- Proposta de fragmentação de TC-9 no espectro de massas de alta resolução.....	104
Figura 103- Espectro de massas de alta resolução TC-9.....	106
Figura 104- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de TC-9.....	107
Figura 105- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de TC-9.....	107
Figura 106- Espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de TC-9.....	108
Figura 107- Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-9.....	108
Figura 108- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-9.....	109
Figura 109- Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-9.....	109
Figura 110- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-9.....	110
Figura 111- Esqueleto flavônico com sistema quelatogênico e posição C-3 oxigenada.....	112
Figura 112- Representação dos acoplamentos observados no espectro de HMBC caracterizando a interação entre as duas unidades glicosídicas de TC-10..	114
Figura 113- Estrutura da rutina (89) (quercetina 3-O- α -L-rhamnopiranosose (1 \rightarrow 6) glucopiranosose).....	114
Figura 114- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-10.....	116
Figura 115- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-10.....	116
Figura 116- Espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, CDCl_3) de TC-10.....	117
Figura 117- Expansão do espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, CDCl_3) de TC-10.....	117
Figura 118- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^\circ$ (125 MHz, CDCl_3) de TC-10.....	118
Figura 119- Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-10.....	118
Figura 120- Expansão do espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-10.....	119
Figura 121- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-10.....	119
Figura 122- Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-10.....	120
Figura 123- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-10.....	120

Figura 124 -Expansões do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HMBC de TC-10.....	121
Figura 125 -Acoplamentos entre os hidrogênios dos anéis aromáticos da estrutura de TC-11.....	124
Figura 126 -Estrutura de medicarpina (90) ((-)-6aR,11aR-diidro-3-hidroxi-9-metoxi-6h-benzofuro[3,2,-C](1)benzopirano).....	125
Figura 127 -Espectro de massas de TC-11 (IE, 70eV).....	127
Figura 128 -Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-11.....	127
Figura 129 -Espectro de RMN ^{13}C -HBBDD (125 MHz, CDCl_3) de TC-11.....	128
Figura 130 -Espectro de RMN ^{13}C -DEPT $^\circ$ (125 MHz, CDCl_3) de TC-11.....	128
Figura 131 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC de TC-11.....	129
Figura 132 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HMBC de TC-11.....	129
Figura 133 -Estrutura de pongachalcona (91).....	131
Figura 134 -Espectro de massas de TC-12 (IE, 70eV).....	134
Figura 135 -Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-12.....	135
Figura 136 -Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-12.....	135
Figura 137 -Espectro de RMN ^{13}C -HBBDD (125 MHz, CDCl_3) de TC-12.....	136
Figura 138 -Expansão do espectro de RMN ^{13}C -HBBDD (125 MHz, CDCl_3) de TC-12.....	136
Figura 139 -Espectro de RMN ^{13}C -DEPT $^\circ$ (125 MHz, CDCl_3) de TC-12.....	137
Figura 140 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC de TC-12.....	137
Figura 141 -Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HMBC de TC-12.....	138
Figura 142 -Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HMBC de TC-12.....	138
Figura 143 -Cromatograma de TCFE-H-EM.....	141
Figura 144 -Cromatograma de TCTE-H-EM.....	141
Figura 145 -Cromatograma de TCVE-H-EM.....	142
Figura 146 -Cromatograma de TCRE-H-EM.....	142
Figura 147 -Espectro de massas do éster metílico do ácido mirístico (92).....	143
Figura 148 -Espectro de massas do éster metílico do ácido palmítico (93).....	143

Figura 149 -Espectro de massas do éster metílico do ácido margarítico (94).....	143
Figura 150 -Espectro de massas do éster metílico do ácido linolênico (95).....	143
Figura 151 -Espectro de massas do éster metílico do ácido linoleico (96).....	143
Figura 152 -Espectro de massas do éster metílico do ácido oleico (97).....	144
Figura 153 -Espectro de massas do éster metílico do ácido esteárico (98).....	144
Figura 154 -Espectro de massas do éster metílico do ácido gôndico (99).....	144
Figura 155 -Espectro de massas do éster metílico do ácido araquídico (100).....	144
Figura 156 -Espectro de massas do éster metílico do ácido behênico (101).....	144
Figura 157 -Espectro de massas do éster metílico do ácido tricosanóico (102).....	145
Figura 158 -Espectro de massas do éster metílico do ácido lignocérico (103).....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Chalconas e flavonas isoladas de plantas do gênero <i>Tephrosia</i>	10
Tabela 02- Estruturas das chalconas e flavonas isoladas de plantas do gênero <i>Tephrosia</i>	12
Tabela 03- Composição do óleo essencial das folhas e talos de <i>Tephrosia cinerea</i>	19
Tabela 04- Deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 500MHz) de TC-1 com padrão de Hidrogenação.....	26
Tabela 05- Dados espectroscópicos de TC-1 comparados com dados da literatura para lanceolatina B (MBAFOR <i>et al.</i> , 995)/CDCl ₃	29
Tabela 06- Deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 500MHz) de TC-2 com padrão de hidrogenação.....	36
Tabela 07- Dados espectroscópicos de TC-2 comparados com dados da literatura para pongamol (PARMAR <i>et al.</i> , 1989)/ *CDCl ₃	40
Tabela 08- Dados comparativos dos deslocamentos químicos (δ) de RMN de ¹³ C de TC-3 com dados da literatura para β -sitosterol e estigmasterol (MOREIRA, 2001)/CDCl ₃	47
Tabela 09- Deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 300MHz) de TC-4 com padrão de hidrogenação.....	51
Tabela 10- Dados espectroscópicos de TC-4 comparados com dados da literatura para flemichapparin B (DAGNE <i>et al.</i> , 1989)/ *CDCl ₃	52
Tabela 11- Dados espectroscópicos de TC-5 comparados com dados da literatura para isolonchocarpina (RAO <i>et al.</i> , 1979)/ *CDCl ₃	60
Tabela 12- Valores de deslocamento químico (δ) dos carbonos de TC-9 com padrão de hidrogenação.....	67
Tabela 13- Dados espectroscópicos de TC-6 comparados com dados da literatura para rotenona (ANDREI <i>et al.</i> , 2002)/CDCl ₃	72
Tabela 14- Dados espectroscópicos de TC-7 comparados com dados da literatura para anhidrolanceolatin A (RAO, 1984)/ *CDCl ₃	83
Tabela 15- Dados espectroscópicos de TC-8 comparados com dados da literatura para lanceolatina A (WATERMAN & KHALID, 1980)/ *CDCl ₃	94
Tabela 16- Valores de deslocamento químico (δ) dos carbonos de TC-9 com padrão de hidrogenação.....	101
Tabela 17- Dados espectroscópicos uni e bidimensionais de TC-9.....	105
Tabela 18- Dados espectroscópicos de TC-10 comparados com dados da literatura para rutina (NIASSY <i>et al.</i> , 2004)/.....	115
Tabela 19- Deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 500MHz) de TC-11 com padrão de hidrogenação.....	123
Tabela 20- Dados espectroscópicos de TC-11 comparados com dados da literatura para medicarpina (CHALMERS, 1977)/*CDCl ₃	126
Tabela 21- Deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 500MHz) de TC-12 com padrão de hidrogenação.....	131
Tabela 22- Dados espectroscópicos de TC-12 comparados com dados da literatura para pongachalcona (MAGALHÃES, 2002)/CDCl ₃	133

Tabela 23- Composição do óleo não volátil das folhas, talos, vagens e raízes de <i>T. cinerea</i>	140
Tabela 24- Resultados dos testes larvicida sobre ao <i>Aedes aegypti</i>	147
Tabela 25- Resultados do teste antioxidante.....	149
Tabela 26- Dados da obtenção dos extratos de <i>T. cinerea</i>	153
Tabela 27- Dados da obtenção das frações das partições dos extratos de <i>T. cinerea</i>	154
Tabela 28- Quantidades de material utilizado para saponificação das porções lipídicas de <i>Tephrosia cinerea</i>	157
Tabela 29- Dados dos rendimentos dos insaponificáveis e dos ésteres metílicos obtidos das frações hexânicas dos extratos de <i>Tephrosia cinerea</i>	157
Tabela 30- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-H-insap.....	159
Tabela 31- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-H-insap (29-47).....	160
Tabela 32- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-H-insap. (88-128).....	161
Tabela 33- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-H-insap. (146-181)	162
Tabela 34- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D.....	163
Tabela 35- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (4-5).....	164
Tabela 36- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (7-8).....	165
Tabela 37- Dados referentes aos eluentes utilizados no fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (10-23)	166
Tabela 38- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (10-23)..	167
Tabela 39- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (10-23)ppt.....	168
Tabela 40- Dados referentes aos eluentes utilizados no fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (10-23)sol (152-163).....	169
Tabela 41- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (10-23)sol (152-163).....	169
Tabela 42- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCVAE-H-insap.....	171
Tabela 43- Dados referentes aos eluentes utilizados no fracionamento cromatográfico de TCVAE-D.....	172
Tabela 44- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCVAE-D.....	173
Tabela 45- Dados referentes aos eluentes utilizados no fracionamento cromatográfico de TCVAE-D (8).....	173
Tabela 46- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCVAE-D (8).....	174

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Procedimento das partições líquido-líquido dos extratos de <i>T. cinerea</i>	155
Fluxograma 2 – Técnica de obtenção dos ácidos graxos livres dos de <i>T. cinerea</i>	158
Fluxograma 3 – Técnica de obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos <i>T. cinerea</i>	158
Fluxograma 4 – Isolamento dos constituintes não voláteis do extrato acetato de etila das raízes de <i>T. cinerea</i>	170
Fluxograma 5 – Isolamento dos constituintes não voláteis do extrato acetato de etila das vagens de <i>T. cinerea</i>	174

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Principais substituintes observados nos flavonóides isolados do gênero <i>Tephrosia</i>	09
Quadro 02 - Constituintes isolados do óleo essencial de <i>T. egregia</i> e <i>T. toxicaria</i>	17
Quadro 03 - Constituintes isolados do óleo essencial das folhas (OEFTC) e talos (OETTC) de <i>T. cinerea</i>	20

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CERAUREMN	Centro Nordestino da Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CGL/EM	Cromatografia Gás-Líquido acoplada a Espectrometria de Massas
CL₅₀	Concentração Letal capaz de matar 50% da população
COSY	CORrelation SpectroscopY
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EM	Espectrometria de Massas
HBBD	Hydrogen Broad-Band Decoupling
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IV	Infravermelho
OEFTC	Óleo essencial das folhas de <i>Tephrosia cinerea</i>
OETTC	Óleo essencial dos talos de <i>Tephrosia cinerea</i>
Pf	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TCRAE	Extrato acetato de etila das raízes de <i>Tephrosia cinerea</i>
TCTE	Extrato etanólico dos talos de <i>Tephrosia cinerea</i>
TCTF	Extrato etanólico das folhas de <i>Tephrosia cinerea</i>
TCVAE	Extrato acetato de etila das vagens de <i>Tephrosia cinerea</i>
UV	Ultravioleta

RESUMO

Este trabalho relata o estudo fitoquímico da espécie *Tephrosia cinerea* Pers. (Fabaceae), conhecida popularmente como “anil bravo”. Esta planta é utilizada principalmente para imobilizar os peixes nos rios e lagoas para facilitar a pescaria, devido sua atividade ictiotóxica. O estudo químico dos constituintes voláteis das suas folhas e talos revelou a presença de sesquiterpenos e diterpenos lineares. No óleo proveniente das folhas, foi possível a identificação de 96,7% de sua composição, sendo o óxido de cariofileno o majoritário. Nos talos foram identificados 83,8% dos seus constituintes, predominando o (2*E*,6*E*)- farnesol (42,1%). Além disso, foram testadas as atividades larvicidas destes óleos sobre o mosquito *Aedes aegypti*. O estudo dos constituintes não voláteis de *T. cinerea* foi iniciado por determinação da composição dos ácidos graxos dos extrato apolares das folhas, talos, vagens e raízes. O ácido palmítico foi o constituinte majoritário nos óleos dos talos, vagens e raízes e o ácido linolênico no óleo das folhas. O fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila das raízes conduziu ao isolamento de três flavonas (lanceolatina B, anhidrolanceolatina A e 8-(3''-metoxi-dimetilalila)-7-metoxiflavona), duas chalconas (pongamol e 4',4'''-dimetoxi-2'',2'',2''',2'''' bis-dimetilcromeno [2',3':7,8;2''',3''':7''',8''']-7→O→7''-bichalcona), uma flavanona (isolonchocarpina), um pterocarpano (flemichapparina B), um rotenóide (rotenona) e uma mistura de esteróides (β -sitosterol e estigmasterol). Do extrato acetato de etila das vagens foram isolados um pterocarpano (medicarpina) e uma chalcona (pongachalcona), e, do extrato etanólico dos talos foi isolada uma flavona glicosilada (rutina) (Quaro 01). Dentre estas substâncias a 8-(3''-metoxi-dimetilalila)-7-metoxiflavona e a 4',4'''-dimetoxi-2'',2'',2''',2'''' bis-dimetilcromeno [2',3':7,8;2''',3''':7''',8''']-7→O→7''-bichalcona estão sendo descritas pela primeira vez como produtos naturais. Avaliação da atividade antioxidante foi realizada com os flavonóides lanceolatina B e pongamol, na qual o primeiro composto apresentou atividade moderada a uma concentração de 1,0 ppm. Os componentes voláteis foram identificados através de análise por CG e CG/MS e comparação do índice Kovats e espectros de massas com os da literatura. Nenhuma atividade foi observada para pongamol. Todas as substâncias isoladas tiveram suas estruturas determinadas através de métodos espectrométricos (IV, EM, RMN ¹H, RMN

^{13}C), incluindo RMN bidimensional (HMBC, HMQC, HSQC e COSY), e por comparação com dados da literatura.

ABSTRACT

This work reports the phytochemical study of *Tephrosia cinerea* Pers., Fabaceae, popularly known as "anil bravo". This plant is used to paralyze fish due to its ictiotoxic activity. The chemical study of the essential oil from their leaves and stems revealed the presence of sesquiterpenes and linear diterpenes. A total of 96.7% and 83.8% of constituents were identified in the oil from leaves and stems, which provided caryophyllene oxide and (2*E*,6*E*)-farnesol, respectively, as major constituents. Furthermore, the oils were examined with respect to their larvicidal properties against the third stage larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. The study of non-volatile constituents from *T. cinerea* was initiated by determining the fatty acids composition of non polar extracts from leaves, stems, beans and roots. Palmitic acid was identified as the major compound in the stems, beans and roots, whereas the linolenic acid was the major compound in the leaves. Phytochemical investigation of non-lipid constituents from roots ethyl acetate extract allowed the isolation of three flavones: (lanceolatin B, anhydrolanceolatin A and 8-(3''-methoxy-dimethylalil)-7-methoxyflavone), two chalcones (pongamol and the 4',4''-dimethoxy-2'',2'',2''',2'''' bis-dimethylchromene [2',3':7,8;2'',3''':7''',8''']-7→O→7''-bichalcone), one flavanone (isolonchocarpin), one pterocarpan (flemichapparin B), one rotenoid (rotenone) and one esteroidal mixture of (β-sitosterol and stigmasterol). From its beans ethyl acetate extract was isolated one pterocarpan (medicarpin) and one chalcone (pongachalcone). From the ethanol extract of stems it was isolated the glycosilated flavone rutin. Compounds 8-(3''-methoxy-dimethylalil)-7-methoxyflavone and 4',4''-dimethoxy-2'',2'',2''',2'''' bis-dimethylchromene [2',3':7,8;2'',3''':7''',8''']-7→O→7''-bichalcone) were related by the first time as natural products. The antioxidant activities of lanceolatin B and pongamol were also investigated and the first compound showed moderate activity at 1.0 ppm whereas no activity was found for pongamol. The volatile components were identified by CG and CG/MS analysis and comparison of the Kovats Indices and mass spectra from a computer library, as well as, by visual comparison of literature data. The structures of all isolated substances were established through spectrometric methods (IR, MS, ¹H and ¹³C NMR), including bidimensional NMR techniques (HMBC, HMQC, HSQC and COSY), and by comparison with literature data.

Introdução



INTRODUÇÃO

O gênero *Tephrosia* (Fabaceae - Papilionoideae) compreende cerca de quatrocentas espécies (TARUS *et al.*, 2002) distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na Índia e na África do Sul (CHANG *et al.*, 2000). As plantas deste gênero apresentam em sua composição química uma grande diversidade de flavonóides, destacando-se as chalconas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, pterocarpanos e rotenóides. Estes últimos são considerados como marcadores quimiotaxonômicos destas espécies. Muitos destes metabólitos possuem atividades biológicas. Dentre eles podemos citar a rotenona, um rotenóide isolado de muitas espécies de *Tephrosia* (MORING e McCHESNEY, 1979; KAMAL e JAIN, 1980; VENKATARATNAM *ET al.*, 1987), que possui considerável atividade ictiotóxica, matando os peixes em doses relativamente baixas sem apresentar toxicidade aos organismos que deles se alimentam. Além de atividade ictiotóxica, os rotenóides apresentam atividade inseticida e, por serem biodegradáveis e pouco tóxicos, têm se mostrado como alternativas quando comparados com outros inseticidas como o DDT (ANDEL, 2000).

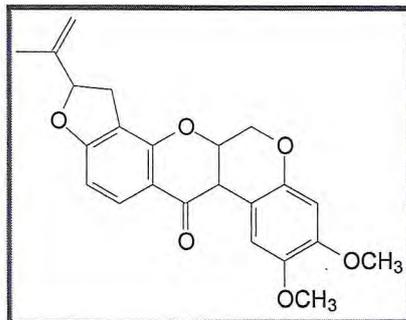


Figura 01 - Estrutura da rotenona

As propriedades biológicas das tephrosias não se limitam apenas às substâncias isoladas, visto que muitas plantas deste gênero são usadas em medicina popular na Índia e na África do Sul. As cascas das raízes de *T. purpurea*, por exemplo, são utilizadas como antiflatulentas e suas raízes no tratamento de dispepsia e diarreia crônica (PARMAR *et al.*, 1989). As raízes de *T. lupinifolia* foram empregadas por membros de sociedades primitivas da África do Sul como abortífero e para cometer suicídio (SMALBERGER *et al.*, 1974). O extrato aquoso das raízes moídas de *T. toxicaria* é utilizado, no município de Guaraciaba do Norte - CE, como defensivo agrícola natural nas lavouras.

A espécie *Tephrosia cinerea* Pers. (sinonímia: anil bravo) foi escolhida como tema deste trabalho tendo como objetivo o isolamento, a purificação e determinação da estrutura molecular de seus metabólitos especiais, bem como a avaliação de algumas atividades biológicas dos seus extratos e das substâncias isoladas e assim contribuir com o estudo químico de plantas do Nordeste do Brasil. Esta espécie tem somente um relato descrito na literatura feito em 1942 que refere-se à atividade inseticida de suas raízes (GIOVAMBATTISTA, 1942).

Este trabalho encontra-se dividido em seis capítulos: Considerações botânicas (Capítulo 1), Levantamento bibliográfico (Capítulo 2), Determinação estrutural (Capítulo 3), Ensaios biológicos (Capítulo 4), Parte experimental (Capítulo 5) e Conclusão (Capítulo 6).

Capítulo 1



Considerações Botânicas

1. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

1.1. Considerações Botânicas sobre a Família Fabaceae

A família Fabaceae ou Leguminosae, uma das maiores dentre as dicotiledôneas pertencentes à ordem Fabales, é representada por 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies encontradas em regiões temperadas (tropicais e subtropicais). Alguns autores costumam dividi-la em três subfamílias: Mimosoideae (56 gêneros), Caesalpinioideae (150 gêneros) e Papilionoideae (440 gêneros) (BARROSO, 1986), estando incluída nesta última a espécie estudada neste trabalho, *Tephrosia cinerea* Pers. (MARTÍN, 2005; JOLY, 1985). Esta família é economicamente a mais importante dentre as dicotiledôneas devido principalmente a sua rica fonte de proteínas, proporcionando a população uma alimentação básica balanceada, além do seu uso na fabricação de fibras e resinas e também devido à grande quantidade de substâncias com atividades biológicas (HARBONE, 1994). As plantas desta família apresentam-se como grandes árvores nas matas tropicais, arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e também como trepadeiras, vivendo nos mais variados ambientes, em diferentes latitudes e altitudes (JOLY, 1985).

1.2. Considerações Botânicas sobre a Subfamília Papilionoideae

Esta subfamília compreende cerca de quatrocentos e quarenta gêneros, sendo, portanto, a maior entre as Leguminosae (BARROSO, 1986). As folhas são em geral trifolioladas (exceto as primárias que são simples), sendo raras com um ou mais do que três folíolos, excepcionalmente afilas. São as que têm flor fortemente zigomorfa com uma grande pétala, superior, externa. A flor é pentâmera, diclamídea, hermafrodita, com cálice gamossépalo, em geral com dois dentes. O fruto é em geral legume, raramente indeiscente (JOLY, 1985).

Muitos dos nossos legumes pertencem a esta subfamília, a maioria é constituída por plantas cultivadas pertencentes aos gêneros *Phaseolus* (feijão), *Psium* (ervilha), *Lens* (lentilha), *Vicia* (grão-de-bico), *Lupinus* (tremoço), *Glycine* (soja), *Cajanus* (ervilha-de-árvore), *Arachis* (amendoim).

São variadas as utilizações de espécies desta subfamília. Dentre elas, algumas são empregadas como forrageiras (*Melilotus e Medicago*, ambas conhecidas como alfafa), outras são destinadas à recuperação de solos empobrecidos (espécies de *Crotalaria*, *Glycine* e de *Dolichos*) por sua característica de fixarem o nitrogênio pela presença de bactérias nitrificantes em simbiose.

Têm-se ainda gêneros produtores de substâncias utilizadas na indústria como, por exemplo, *Indigofera* (anil) e os produtores de resinas, tais como a goma-arábica. Como madeiras importantes destacam-se a cabriúva (*Myroxylon*) e o jacarandá (*Dalbergia, Machaerium*) (WATSON e WITZ, 2005).

1.3. Considerações Botânicas sobre a Espécie *Tephrosia cinerea* Pers.

Tephrosia cinerea Pers. (Figura 2, p. 05), conhecida popularmente por Anil Bravo, é pertencente à família Leguminosae e à subfamília Papilionoideae. É uma planta narcótica, vermífuga e venenosa, sendo útil contra inflamações das glândulas, úlceras e afecções nervosas. É utilizada principalmente para imobilizar os peixes nos rios e lagoas para facilitar a pescaria (CORRÊA, 1984).

Segundo Corrêa (1984), as características morfológicas desta espécie podem ser descritas como:

“Arbusto de ramos róseos ou roxos, pubescentes, em touceiras. Folhas imparipinadas, com folíolos linear-oblongos, glabros no ventre e cinzento-seríceos no dorso. Flores grandes violáceas ou roxas, em racemos opostos. Vagem reta ou ligeiramente curvada, com 5-9 sementes pardas.”

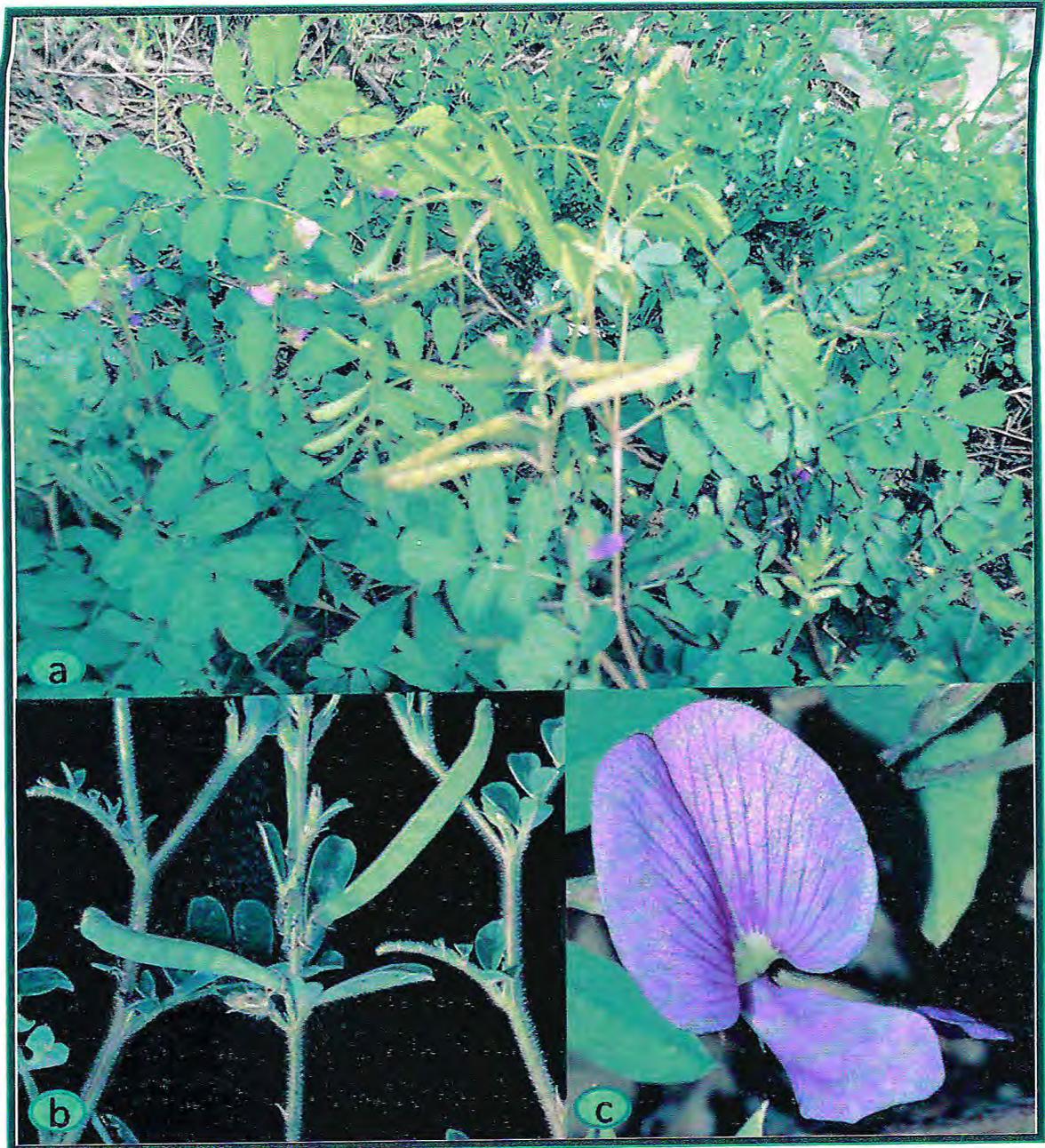


Figura 02 – *Tephrosia cinerea*, a) em seu habitat natural (Foto: Prof. Manoel Andrade Neto); b) evidenciando o fruto; e c) flor

Capítulo 2



Levantamento Bibliográfico

2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1. Revisão da Literatura da Ocorrência de Chalconas e Flavonas em Plantas do Gênero *Tephrosia*

A pesquisa bibliográfica realizada no *Chemical Abstract* (SciFinder Scholar) e nos periódicos disponíveis nos endereços eletrônicos da CAPES (<http://www.periodicos.capes.gov.br>) e Science Direct (<http://www.sciencedirect.com>), revelou que das quatrocentas espécies de *Tephrosia* existentes, apenas cerca de sessenta e três foram estudadas quimicamente. Tal pesquisa indicou que os estudos fitoquímicos acerca do gênero *Tephrosia* tiveram início em 1907 com o isolamento de dois rotenóides das folhas de *T. vogelli* (HANRIOT, 1907), desde então muitos outros metabólitos foram isolados de várias espécies deste gênero. Hoje, encontram-se registrados na literatura mais de duzentos trabalhos de estudo fitoquímico, envolvendo cerca de sessenta e três espécies do referido gênero, relatando o isolamento de mais de cento e sessenta metabólitos especiais, incluindo flavonóides (ABOU-DOUH *et al.*, 2005) e esteróides (BASU, 1977).

O crescente interesse no estudo químico de plantas do gênero *Tephrosia* deve-se a grande variedade de substâncias com atividades biológicas e farmacológicas (ANDEL, 2000). Certos compostos, principalmente pterocarpanos e isoflavonas, são tóxicos a microorganismos. Suas biossínteses em tecidos de plantas freqüentemente ocorrem como consequência de invasão de fungos e bactérias (INGHAM e MARKHAM, 1982). Muitas espécies deste gênero possuem pronunciadas atividades inseticida e ictiotóxica, as quais são atribuídas à presença de rotenóides (ANDREI *et al.*, 2002).

2.1.1. Aspectos Químicos do Gênero *Tephrosia*

Como mencionado anteriormente, as espécies do gênero *Tephrosia* são ricas em flavonóides, dentre os quais destacam-se as chalconas, flavonas, isoflavonas flavanonas, pterocarpanos e rotenóides.

Neste trabalho estão sendo relatados treze metabólitos secundários isolados de *Tephrosia cinerea*: quatro flavonas, três chalconas, dois pterocarpanos, uma flavanona, um rotenóide e uma mistura de esteróides. Devido ao maior número de flavonas e chalconas isoladas desta espécie, aliado ao fato de que os dois metabólitos especiais que são inéditos na literatura pertencem a estas subclasses (Itens 3.2.8. e 3.2.9), foi realizada uma investigação da ocorrência de substâncias pertencentes às mesmas subclasses em outras espécies do gênero *Tephrosia*. O resultado desta pesquisa encontra-se na Tabela 01 (p. 9).

2.1.2. Biossíntese de Flavonóides

A Figura 03 (p. 8) mostra a biossíntese desses metabólitos envolvendo a incorporação de unidades de acetato e de fenilpropanóides (C₆-C₃), via uma rota mista tipo acetato-chiquimato (MANN, 1987). Estes são derivados diretamente de chalconas, presentes com relativa abundância entre os metabólitos especiais de plantas deste gênero (TARUS, *et al.*, 2002; GÓMEZ-GARIBAY *et al.*, 1999; RAO e PRASAD, 1993).

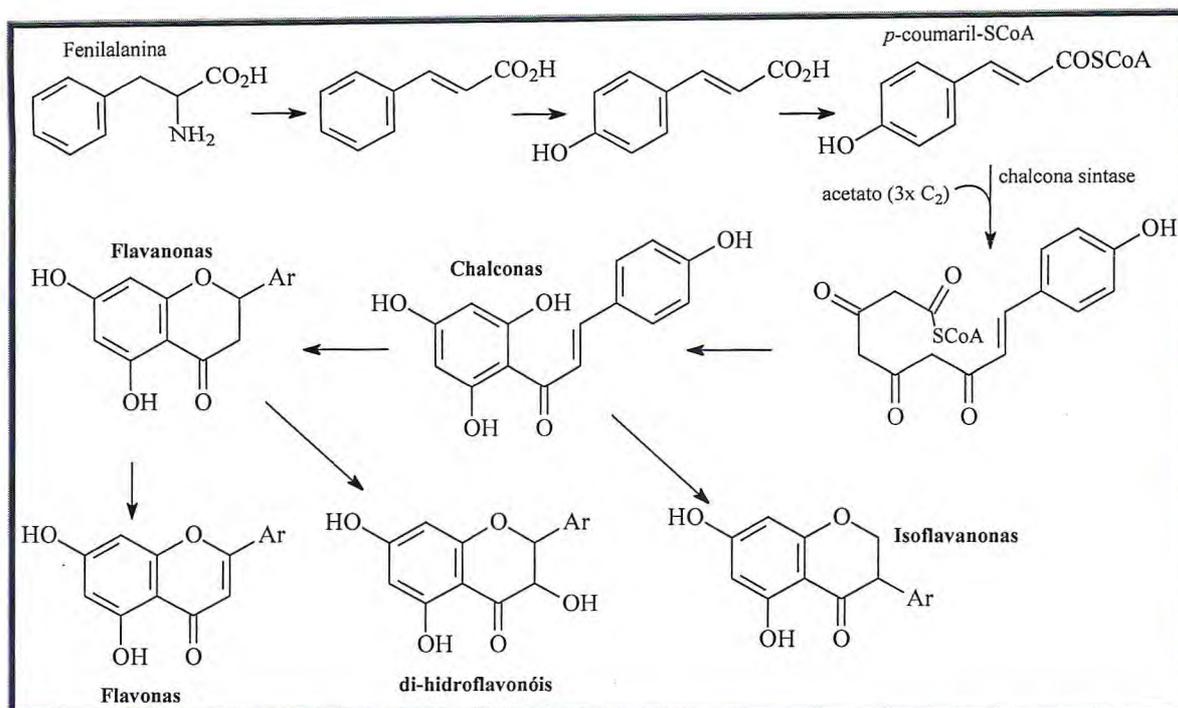


Figura 03 - Rota Biossintética dos Flavonóides

Para ilustrar as considerações, a seguir apresentam-se os esqueletos básicos de flavonas I e chalconas II (Figura 04). Tais esqueletos são constituídos por quinze átomos de carbono arranjados na configuração C₆-C₃-C₆ em seu núcleo básico, possuindo um grupo ceto na posição C-4 nas flavonas e C-9 nas chalconas, respectivamente. Os anéis aromáticos, representados por C₆, são unidos por três unidades de carbono (C₃), e, no caso das flavonas, formam um anel heterocíclico condensado em um dos anéis (AGRAWAL, 1989).

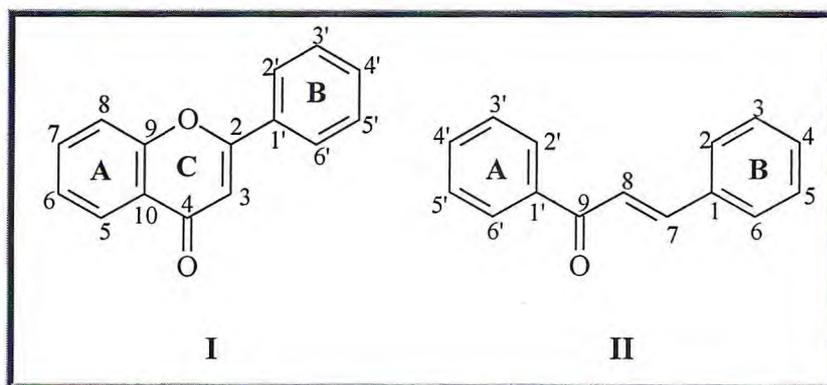
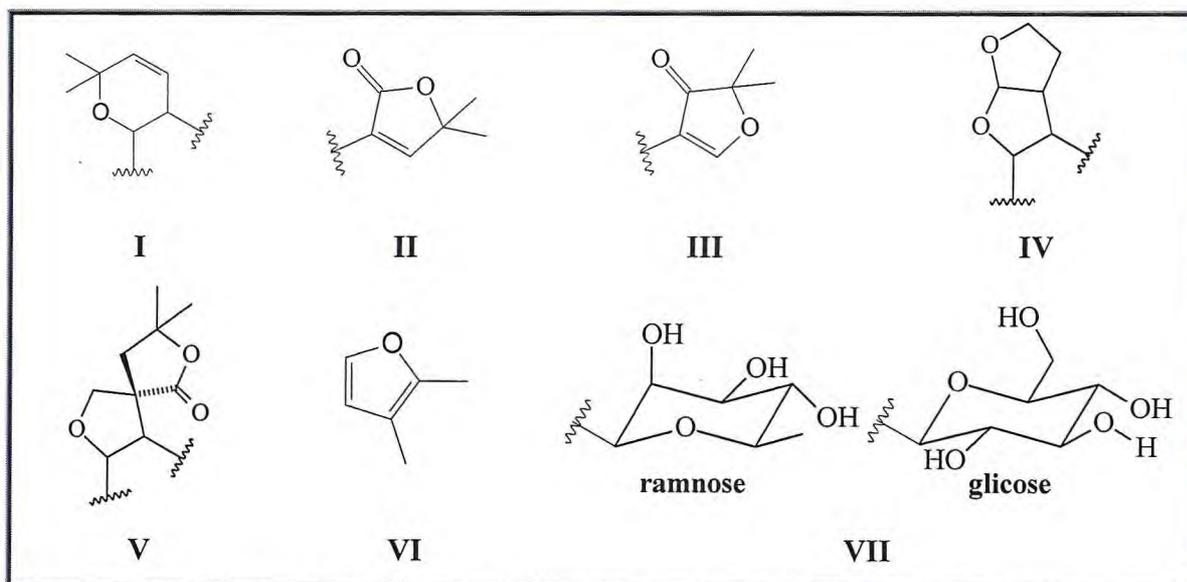


Figura 04 - Esqueleto básico de flavonas (I) e chalconas (II)

A ocorrência marcante de flavonas (1-39) e chalconas (40-62) em *Tephrosia* foi evidente ao analisar as Tabelas 01 (p. 10) e 02 (p. 12). Dentre estas subclasses há uma predominância de compostos flavônicos possuindo esqueletos *O*-substituídos nas posições C-5 e C-7. Muitas destas flavonas e algumas chalconas possuem a posição C-8 prenilada, e, em muitos casos, este grupo prenila sofre ciclização conduzindo à formação de substituintes cíclicos, tais como o grupo 2'',2''-dimetilcromeno ilustrado no Quadro 01 (I).

Há ainda uma grande ocorrência de flavonas em que o grupo prenila sofre outras modificações além de ciclização, como nos substituintes 2'',5''-diidro-5'',5''-dimetil-2''-oxo-3''-fúril (II), 2'',3''-diidro-2'',2''-dimetil-3''-oxo-4''-fúril (III), bis-diidrofurano condensado (IV) ou em forma de espiro (V). Além destes, muitos apresentam substituintes furânicos (VI) e glicosídicos (VII) (Quadro 01).



Quadro 01 - Principais substituintes observados nos flavonóides isolados do gênero *Tephrosia*

Tabela 01 - Chalconas e flavonas isoladas de plantas do gênero *Tephrosia*

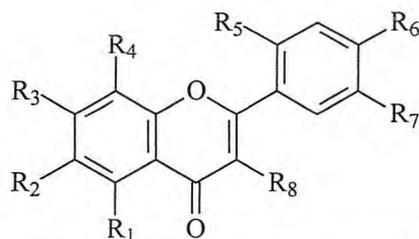
Espécie	Substâncias	Referências Bibliográficas
<i>T. aequilata</i>	Praecansona A (61) Praecansona B (49) Desmetilpraecansona A (48) Desmetilpraecansona B (45)	Tarus <i>et al.</i> , 2002* Tarus <i>et al.</i> , 2002* Tarus <i>et al.</i> , 2002* Tarus <i>et al.</i> , 2002
<i>T. albifoliolis</i>	Morina (5) Rutina (6)	Niassy <i>et al.</i> , 2004*
<i>T. apollinea</i>	Lanceolatina A (13) Tephroglabrina (15) Apolinina (17) Semiglabinol (27) Semiglabrina (28) Pseudosemiglabrina (30) Glbratephrina (35) Glbratephrinol (36)	Watterman. e Khalid, 1980 Watterman. e Khalid, 1980* Watterman. e Khalid, 1980* Watterman. e Khalid, 1980 Watterman. e Khalid, 1980* Watterman. e Khalid, 1980* Watterman. e Khalid, 1980* Watterman e Khalid, 1980*
<i>T. bracteolata</i>	<i>trans</i> anhidrotephrostachina (12) <i>trans</i> tephrostachina (14) Isopongaflavona (24)	Khalid e Waterman, 1981 Khalid e Waterman, 1981* Khalid e Waterman, 1981*
<i>T. calophylla</i>	Canferol 3-O-β-D-glicopiranosídeo (10)	Kishore <i>et al.</i> , 2003
<i>T. cândida</i>	Candinona (2) Penduletina (3) Tephrona (56)	Horie <i>et al.</i> , 1994 Horie <i>et al.</i> , 1994 Chibber <i>et al.</i> , 1982
<i>T. carrillii</i>	Epoxiobovatachalcona (57)	Gómez-Garibay <i>et al.</i> , 2001
<i>T. crassifolia</i>	Oaxacacina (44) Crassichalcona (60)	Gómez-Garibay <i>et al.</i> , 1999
<i>T. deflexa</i>	Morina (5)	Niassy <i>et al.</i> , 2004*
<i>T. falciforme</i>	Lanceolatina B (19) Pongamol (41)	Ghanim e Jayaraman, 1978 Ghanim e Jayaraman, 1979
<i>T. fulvinervis</i>	Fulvinervina B (25) Fulvinervina C (26)	Rao <i>et al.</i> , 1985
<i>T. hamiltonii</i>	Pongamol (41)	Rajani e Sarma, 1988
<i>T. hookeriana</i>	Lanceolatina A (13) Hookerianina (18) Semiglabrina (28) Tephrorianina (39)	Prabhakar <i>et al.</i> , 1996 Prabhakar <i>et al.</i> , 1996 Prabhakar <i>et al.</i> , 1996 Vanangamudi <i>et al.</i> , 1997
<i>T. interrupta</i>	Pongachalcona I (47)	Were <i>et al.</i> , 1990
<i>T. major</i>	2'6'-diidroxi-3'-prenil-4'-metoxi-β-hidroxicalcona (54)	Gómez-Garibay <i>et al.</i> , 2002*
<i>T. multijuga</i>	Multijugina (31) Multijuginol (32)	Vleggaar <i>et al.</i> , 1975
<i>T. nubica</i>	Quercetina 3,7-O-dirhamnonídeo (7) Canferol 3,7-O-dirhamnosídeo (8) Quercetina 3-O-galactosil-,7-O-rhamnonídeo (9)	Ammar <i>et al.</i> , 1995
<i>T. polystachya</i>	Polistachina (38)	Vleggaar <i>et al.</i> , 1978
<i>T. olystachyoides</i>	Tachrosina (16) Stachiodina (33) Tephrodina (34)	Vleggaar <i>et al.</i> , 1972
<i>T. praecans</i>	Praecansona B (49) Praecansona A (61)	Ghanim e Jayaraman, 1979 Camele <i>et al.</i> , 1980

* Referências que possuem os dados de RMN ¹³C das substâncias

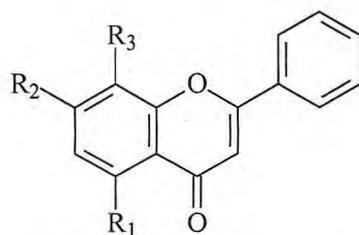
Espécie	Substâncias	Referências Bibliográficas
<i>T. procumbens</i>	7-Etil-éter-fisetina (4) Praecansona B (49) Praecansona A (61)	Vencatarantnam <i>et al.</i> , 1987 Venkataratnam e Rao, 1987* Venkataratnam e Rao, 1987*
<i>T. pumila</i>	Praecansona A (61)	Dagne <i>et al.</i> , 1988*
<i>T. purpurea</i>	Anhidrolanceolatina A (11) Lanceolatina A (13) Tephroglabrina (15) Tachrosina (16) Apolinina (17) Lanceolatina B (19) Karanjina (20) Pongaglabol (21) Semiglabinol (27) Semiglabrina (28) Purpuretina (40) Pongamol (41) O-Metilpongamol (42) Purpurenona (50) Tephrosina (58) Tephropurpurina (59)	Rao <i>et al.</i> , 1984 Pelter <i>et al.</i> , 1981 Pelter <i>et al.</i> , 1981* Pelter <i>et al.</i> , 1981* Pelter <i>et al.</i> , 1981* Rao e Raju, 1984* Sinha <i>et al.</i> , 1982 Ahmad <i>et al.</i> , 1999* Pelter <i>et al.</i> , 1981* Ahmad <i>et al.</i> , 1999* Sinha <i>et al.</i> , 1982 Parmar <i>et al.</i> , 1989* Pelter <i>et al.</i> , 1981 Venkata e Raju, 1984 Chang <i>et al.</i> , 2000* Chang <i>et al.</i> , 2000*
<i>T. sanagana</i>	Kanjona (22) 5-Metoxifurano [7,8:4'',5''] (23) Sanaganona (37)	Mbafor <i>et al.</i> , 1995
<i>T. semiglabra</i>	Semiglabinol (27) Semiglabrina (28) Glabratephrina (35)	Smalberger <i>et al.</i> , 1973 Vleggaar <i>et al.</i> , 1978 Vleggaar <i>et al.</i> , 1978
<i>T. spinosa</i>	Spinochalcona C (43) Spinochalcona D (46) Spinochalcona A (52) Tephrospinosina (53)	Rao and Prasad, 1993 Rajendra <i>et al.</i> , 2006 Rao e Prasad, 1992 Sharma e Rao, 1992*
<i>T. toxicaria</i>	Chrisoeriol (1) Isoliquirigenina (51)	Jang <i>et al.</i> , 2003 Jang <i>et al.</i> , 2003
<i>T. tuitoensis</i>	Ovalichalcona (55)	Calderón <i>et al.</i> , 2001
<i>T. tunicata</i>	Desmetilpraecansona A (48)	Andrei <i>et al.</i> , 2000*
<i>T. viciodes</i>	Enantiomultijugina (29)	Gómez-Garibay <i>et al.</i> , 1992*
<i>T. woodii</i>	Oaxacacina (44)	Dominguez <i>et al.</i> , 1983

* Referências que possuem os dados de RMN ¹³C das substâncias

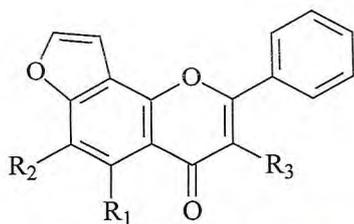
Tabela 02 - Estruturas das Chalconas e flavonas isoladas de plantas do gênero *Tephrosia*



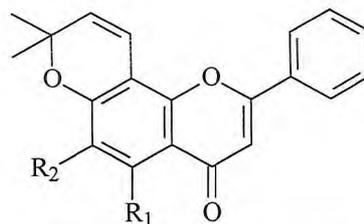
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
1	OH	H	OH	H	H	OH	OCH ₃	H
2	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃
3	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H	OCH ₃
4	H	H	OCH ₂ CH ₃	H	H	OH	OH	OH
5	OH	H	OH	H	OH	H	OH	OH
6	OH	H	OH	H	H	OH	OH	Glic.- Ramn.
7	OH	H	Ramn.	H	H	OH	OH	Ramn.
8	OH	H	Ramn.	H	H	OH	OH	Ramn.
9	OH	H	Ramn.	H	H	OH	OH	Galac.
10	OH	H	OH	H	H	OH	OH	Glic.



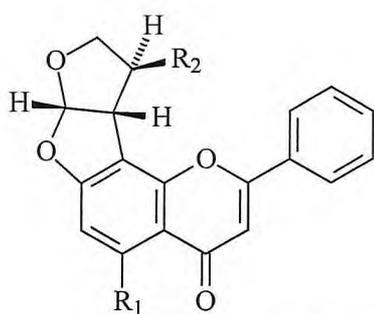
	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃
11	H	OCH ₃		15	H	OCH ₃	
12	OCH ₃	OCH ₃		16	OCH ₃	OCH ₃	
13	H	OCH ₃		17	H	OCH ₃	
14	OCH ₃	H		18	OCH ₃	H	



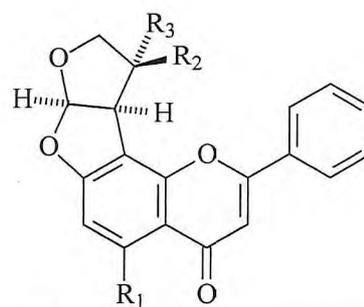
	R ₁	R ₂	R ₃
19	H	H	H
20	OH	H	H
21	H	H	OCH ₃
22	H	OCH ₃	H
23	OCH ₃	H	H



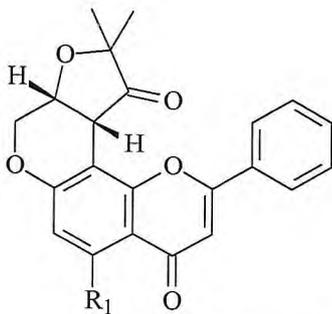
	R ₁	R ₂
24	OCH ₃	H
25	OCH ₃	
26	OH	



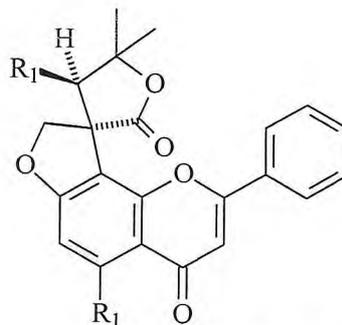
	R ₁	R ₂
27	H	OH
28	H	OCOCH ₃
29	OCH ₃	OCOCH ₃



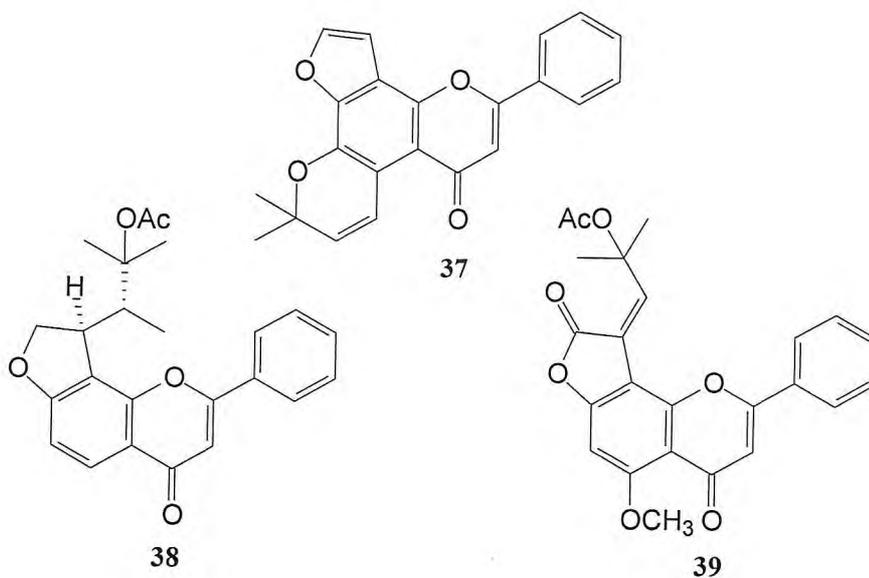
	R ₁	R ₂	R ₃
30	H	OCOCH ₃	H
31	OCH ₃	H	OCOCH ₃
32	OCH ₃	H	OH

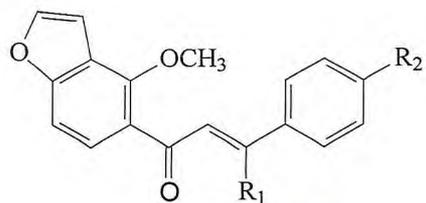


	R ₁
33	H
34	OH

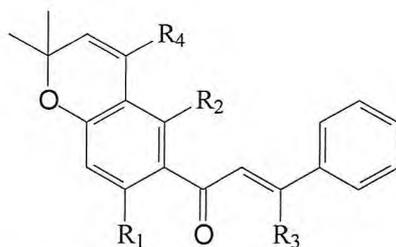


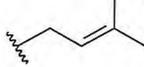
	R ₁
35	OCH ₃
36	OH

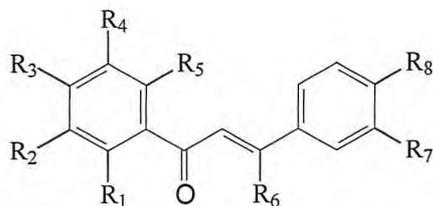




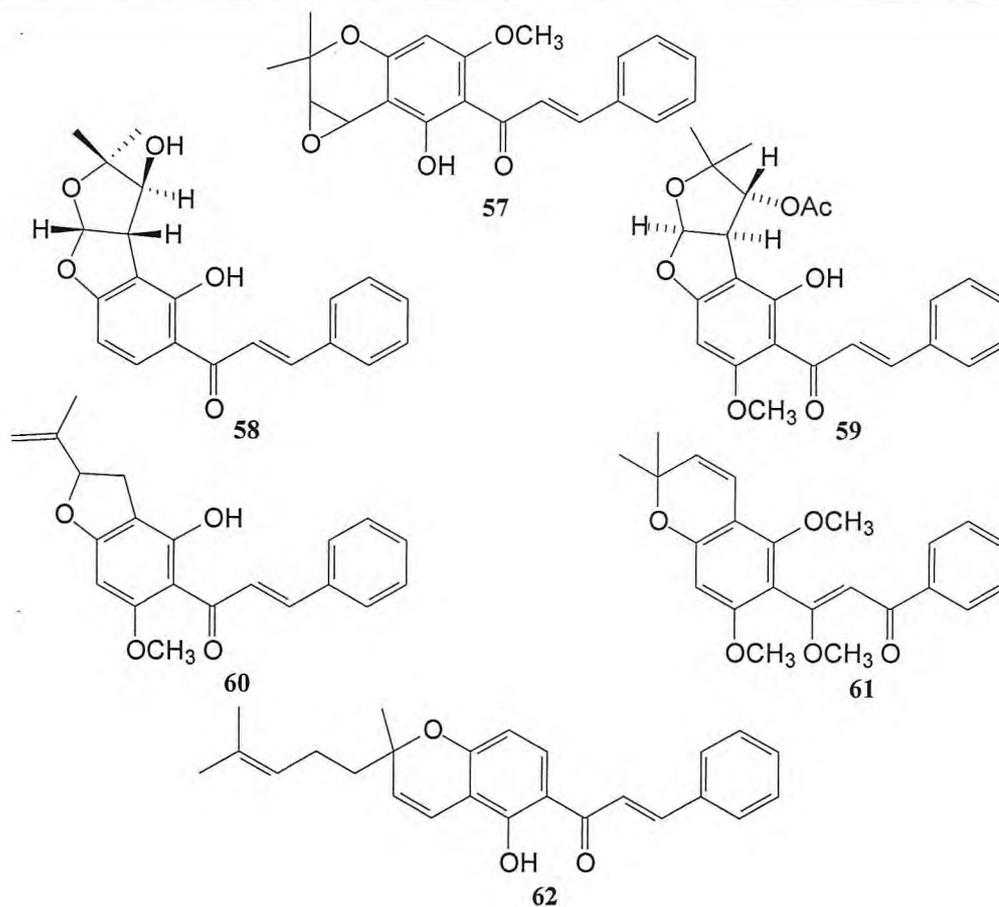
	R ₁	R ₂
40	H	CH ₃
41	OH	H
42	OCH ₃	H



	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
43	OH		H	47	OCH ₃	OH	H	H
44	OH	OCH ₃	H	48	OCH ₃	OH	OH	H
45	OH	OCH ₃	OH	49	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
46	H	OCH ₃	H	50	H	H	OH	OCH ₃



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8
51	OH	H	OH	H	H	H	H	OH
52	OH		OH		H	H	H	H
53	H		OH		OH	H	H	H
54	OH	H	OCH ₃		OH	OH	H	H
55	OCH ₃	H	OCH ₃		OH	H	H	H
56	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₂ O	



Capítulo 3



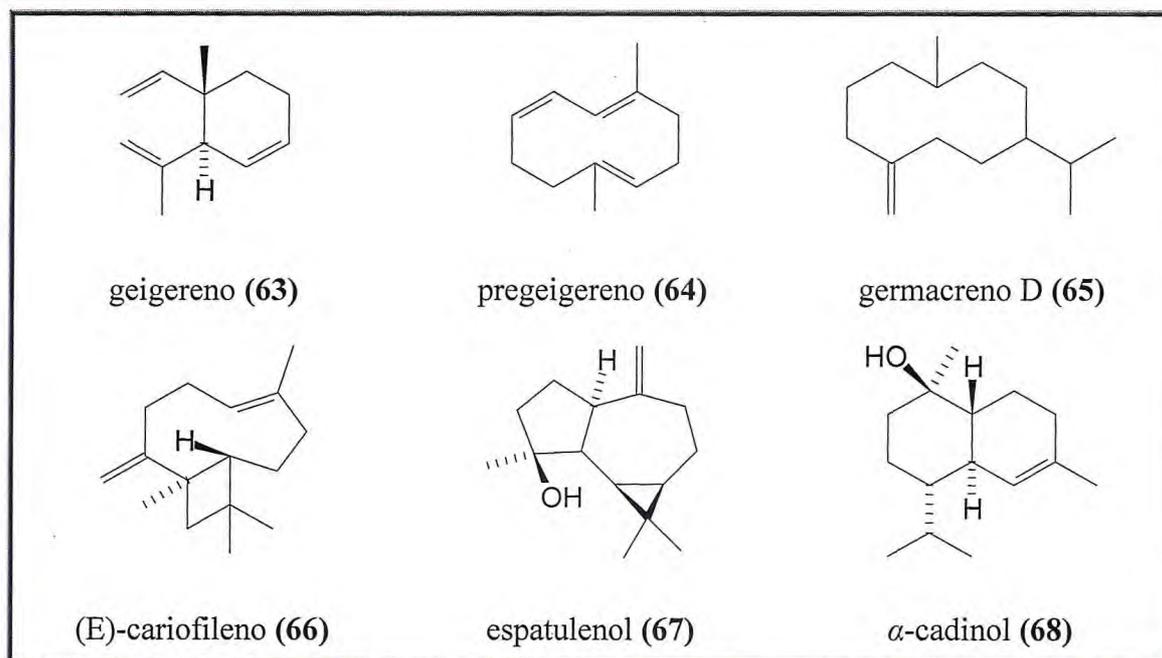
Determinação Estrutural

3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

3.1. Determinação Estrutural dos Constituintes Voláteis de *Tephrosia cinerea*

Óleos essenciais são misturas complexas de mono e sesquiterpenos, além de compostos aromáticos, ácidos, ésteres e outros terpenos que também ocorrem com menor frequência são responsáveis pelo odor característico das plantas. Os óleos essenciais obtidos de plantas nos últimos anos, além de conferirem aroma e sabor e produzirem matéria prima para produção de medicamentos, têm sido considerados como fontes potenciais de substâncias biologicamente ativas; e estes óleos ou seus constituintes isolados são relatados na literatura como antiinflamatórios, antiespasmódicos, inseticidas, antimicrobianos, antioxidantes, etc (MORAIS *et al.*, 2007; OMIDBEYGI *et al.*, 2007).

Relatos de estudos químicos de óleos essenciais de espécies do gênero *Tephrosia* são escassos na literatura, só sendo encontrados dados da composição química de *T. egregia* (ARRIAGA *et al.*, 2005) e de *T. toxicaria* (RIBEIRO *et al.*, 2006). Em *T. egregia* foram relatados o geigereno (63) e o pregeigereno (64) como constituintes majoritários das folhas e talos; em *T. toxicaria* o (E)-cariofileno (66) e o germacreno D (65) predominante nas folhas e vagens; o espatulenol (67) e o α -cadinol (68) foram encontrados nas folhas desta planta (Quadro 02).



Quadro 02 - Constituintes isolados do óleo essencial de *T. egregia* e *T. toxicaria*

O objetivo deste trabalho é dar continuidade ao estudo da constituição química de óleos essenciais de espécies deste gênero e observar a diversidade estrutural dos metabólitos especiais que compõe seus óleos voláteis.

3.1.1. Determinação Estrutural dos Constituintes Voláteis das Folhas e Talos de

T. cinerea

Os constituintes voláteis das folhas e talos de *Tephrosia cinerea* foram identificados nos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação em aparelho doseador do tipo Cleavenger, modificado por Gottlieb (GOTTLIEB e MAGALHÃES, 1960). Os dados referentes à sua obtenção encontram-se no Item 5.4.1 (p. 153).

A análise qualitativa dos seus constituintes químicos foi realizada por cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e a análise quantitativa por cromatografia gás-líquido acoplada a detector por ionização por chama (FID).

A identificação dos compostos presentes nestes óleos foi realizada pela análise de seus espectros de massas, comparação com dados de espectroteca padrão (banco de dados), combinada com os tempos de retenção e os índices de Kovats (ADAMS, 2001; CRAVEIRO *et al.*, 1984) e, quando possível com dados da literatura (STENHAGEM *et al.*, 1974).

Do óleo essencial das folhas de *T. cinerea* foram identificados oito constituintes correspondendo a 96,7% de sua composição química; no óleo obtido dos talos foram identificados dois compostos, correspondendo a 83,8% de sua constituição.

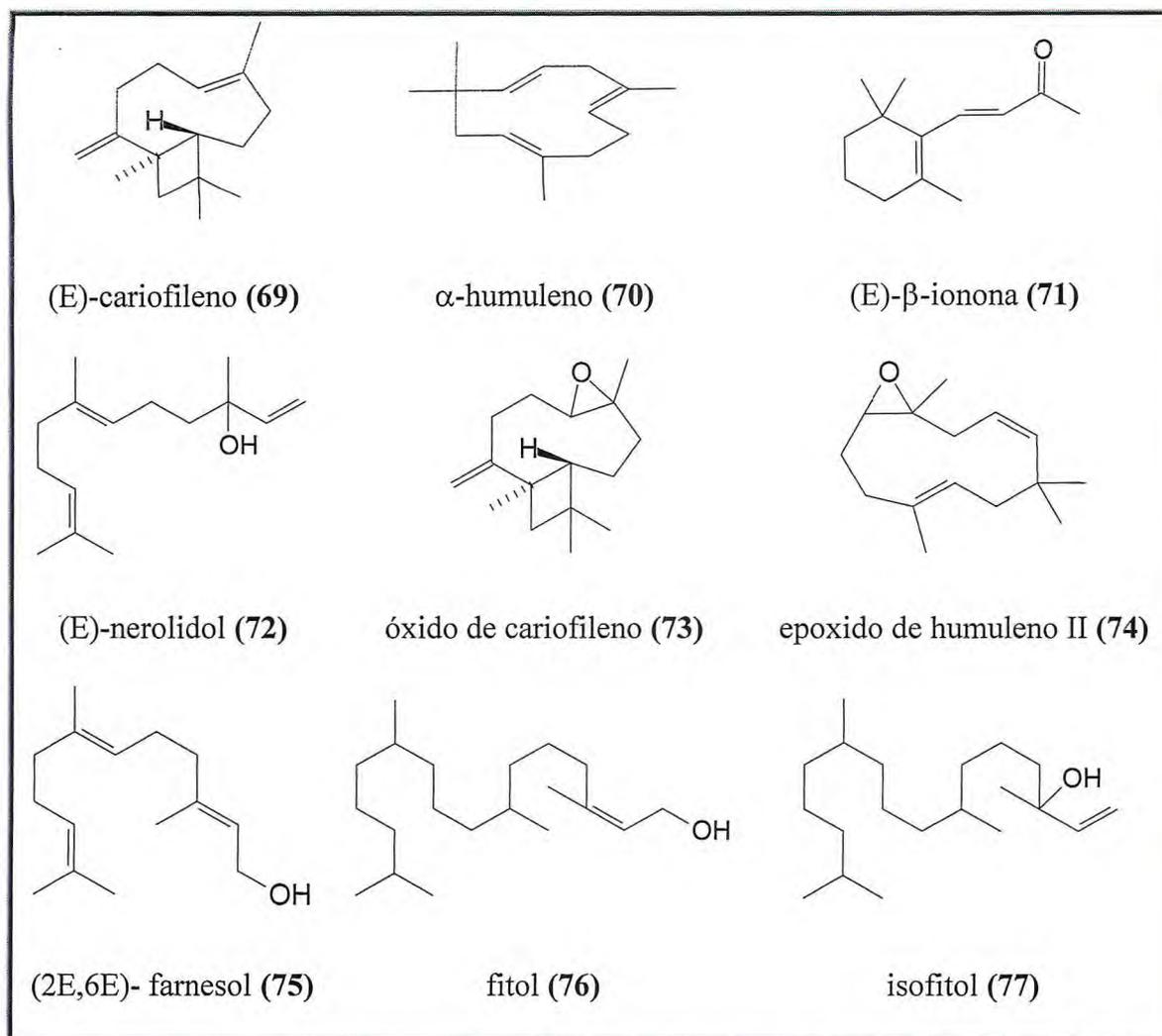
Nas folhas de *T. cinerea* ocorre a predominância de terpenos oxigenados, sendo o óxido de cariofileno (**73**) (63,9%) e o epóxido de humuleno II (**74**) (12,6%) os majoritários, além da ocorrência de diterpenos como o isofitol (**77**) (8,6%) e do fitol (**76**) (2,2%). Nos talos obteve-se predominantemente um sesquiterpeno oxigenado, o (2E,6E)-farnesol (**75**) (42,1%). Estes constituintes e seus percentuais são mostrados na Tabela 03 (p. 19) seguindo sua ordem de eluição em coluna DB-5.

Comparando-se a constituição dos óleos essenciais das folhas e talos obtidos de *T. cinerea* (Quadro 03, p. 20) com as dos óleos de *T. egregia* e *T. toxicaria* citadas na literatura, observa-se que os três óleos têm composição química distinta, principalmente quanto ao grau de oxidação e a classe de compostos que constituem o óleo volátil de cada espécie. Em *T. egregia* observou-se predominantemente a presença de sesquiterpenos hidrocarbônicos (94,2% nas folhas e 63,9% nos talos); já em *T. toxicaria* a ocorrência de compostos oxigenados foi minoritária nas folhas (7,7%) e vagens (35,3%), ocorrendo predominantemente nos talos (73,2%). Como constituintes dos óleos voláteis de *T. cinerea* (Quadro 03, p. 20) observou-se uma predominância de compostos oxigenados em todas as partes analisadas. Nas folhas desta planta observou-se 90,3% de sesquiterpenos oxigenados e ainda a ocorrência de fitol e isofitol (10,8%), além de diterpenos lineares que são usados na preparação de vitaminas E e K. Nos talos, os dois constituintes majoritários também são oxigenados (20,2% de óxido de cariofileno e 42,1% de (2E,6E)- farnesol). Os cromatogramas e espectros de massas dos respectivos óleos encontram-se ilustrados nas Figuras 05 e 06 (p. 21) e 07-15 (p. 22- 24), respectivamente.

Tabela 03 - Composição do óleo essencial das folhas (OEFTC) e talos (OETTC) de *Tephrosia cinerea*

Constituintes	IR*	Oleo das folhas (%)	Oleo dos talos (%)
(E)-cariofileno (69)	1419	3,9	9,0
α -humuleno (70)	1455	2,5	12,5
(E)- β -ionona (71)	1489	1,0	-
(E)-nerolidol (72)	1563	2,0	-
óxido de cariofileno (73)	1583	63,9	20,2
epoxido de humuleno II (74)	1608	12,6	-
(2E,6E)- farnesol (75)	1725	-	42,1
fitol (76)	1943	2,2	-
isofitol (77)	1948	8,6	-
Total identificado		97,7	83,8

*Índice de retenção



Quadro 03 - Constituintes isolados do óleo essencial das folhas (OEFTC) e talos (OETTC) de *T. cinerea*

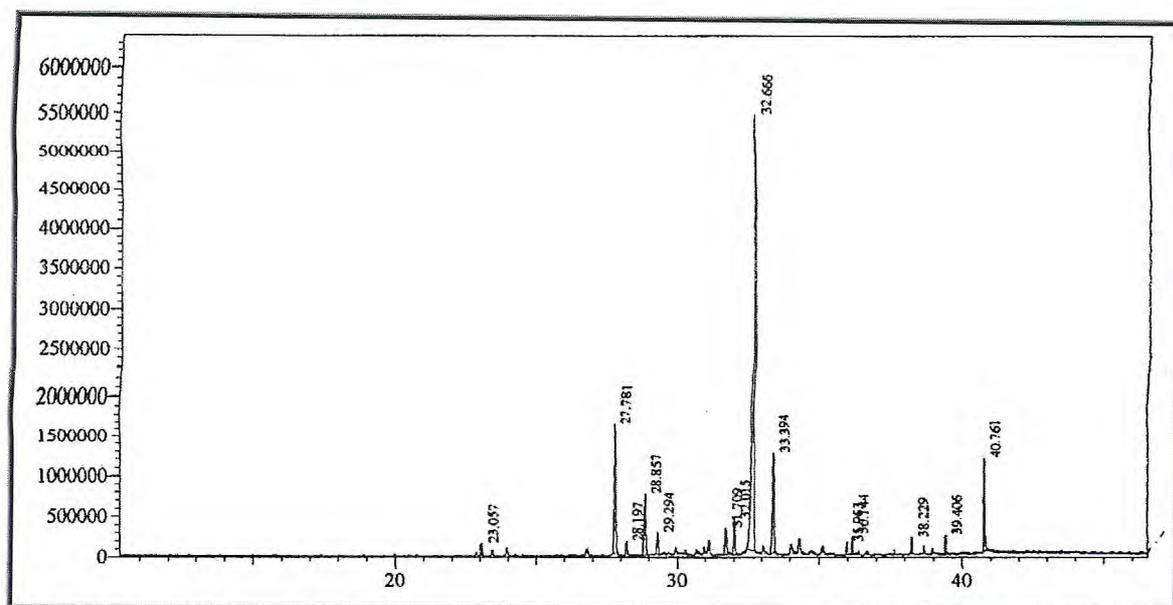


Figura 05 - Cromatograma de OEFTC

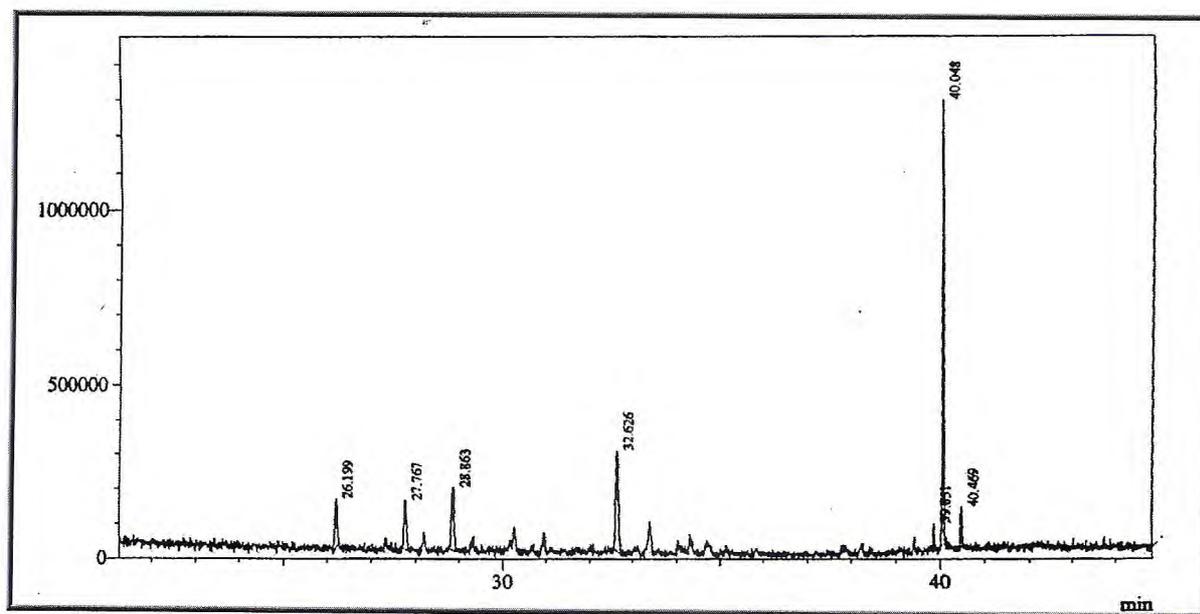


Figura 06 - Cromatograma de OETTC

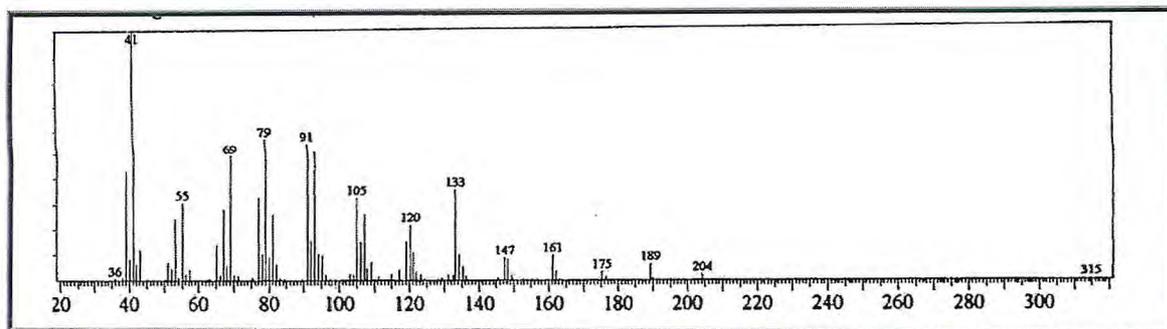


Figura 07 - Espectro de massas do (E)-Cariofileno (69)

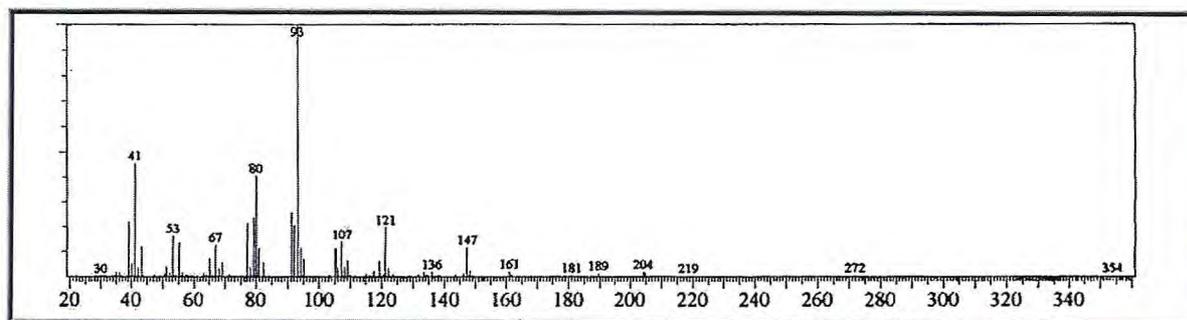


Figura 08 - Espectro de massas do α -Humuleno (70)

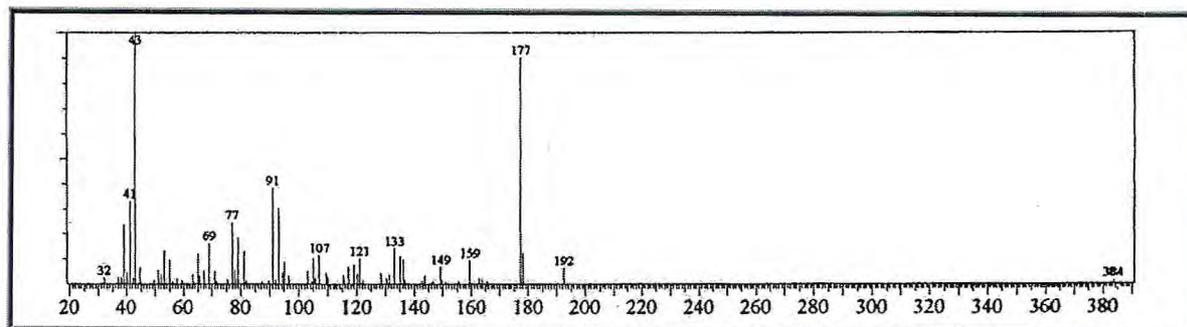


Figura 09 - Espectro de massas da (E)- β -Ionona (71)

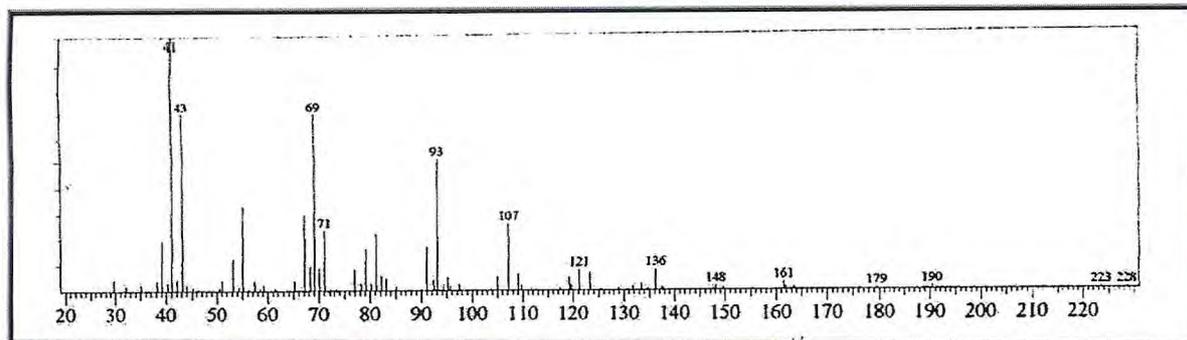


Figura 10 - Espectro de massas do (E)-Nerolidol (72)

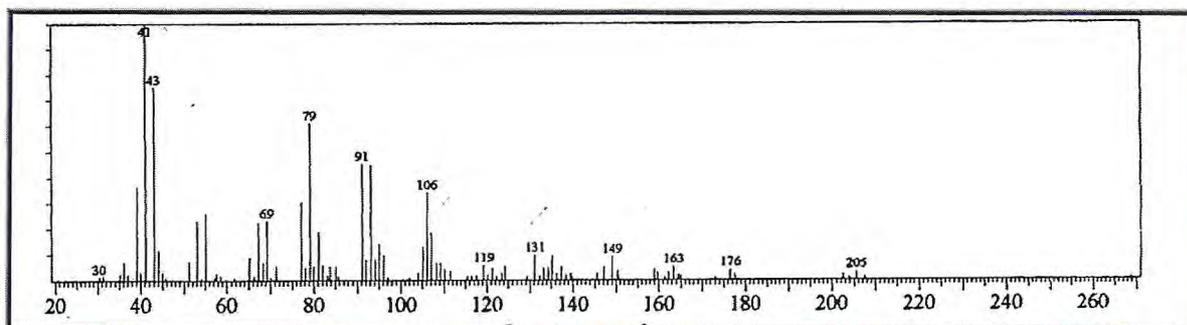


Figura 11 - Espectro de massas do Óxido de cariofileno (73)

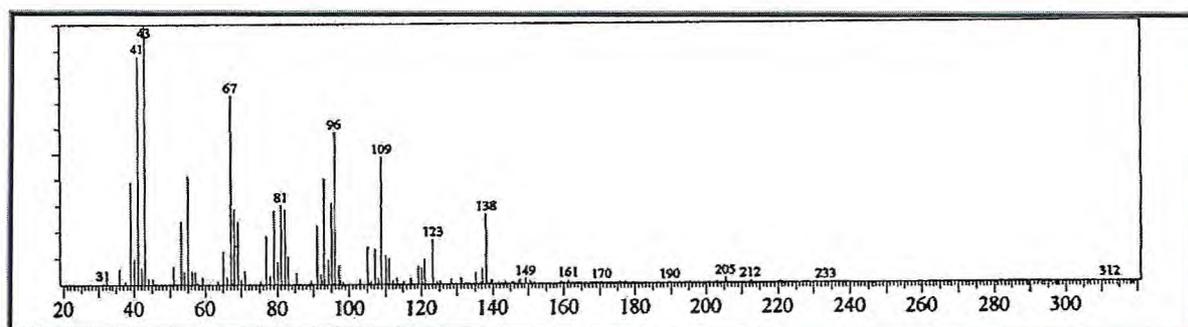


Figura 12 - Espectro de massas do Epóxido de humuleno II (74)

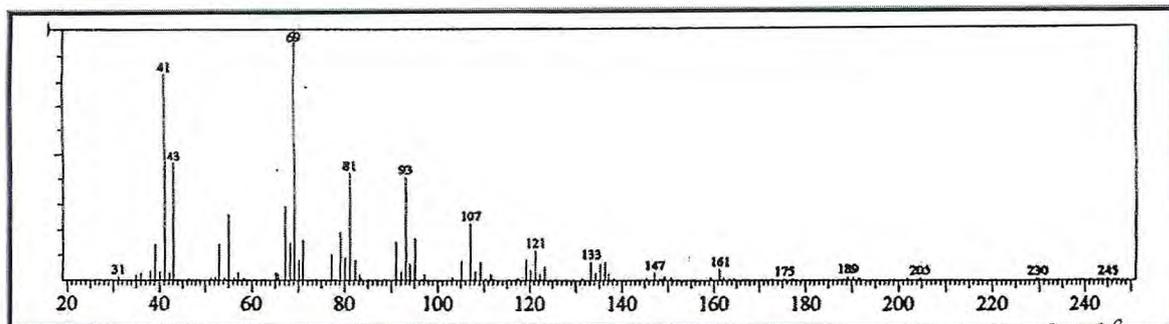


Figura 13 - Espectro de massas do (2E,6E)- Farnesol (75)

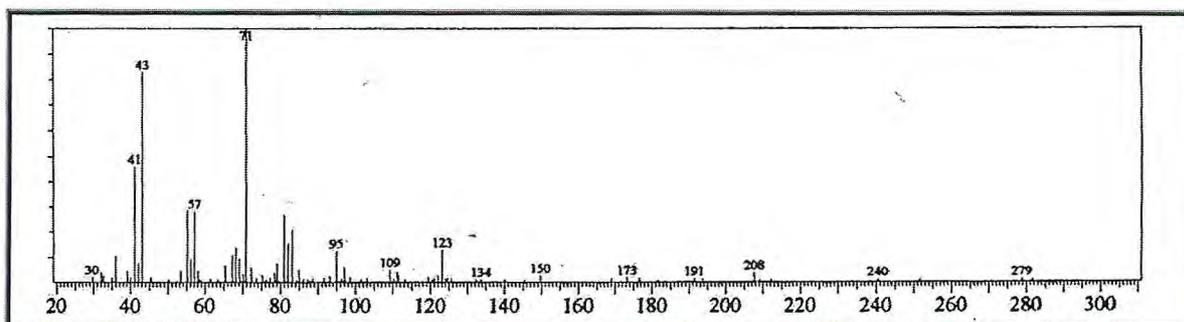


Figura 14 - Espectro de massas do Fitol (76)

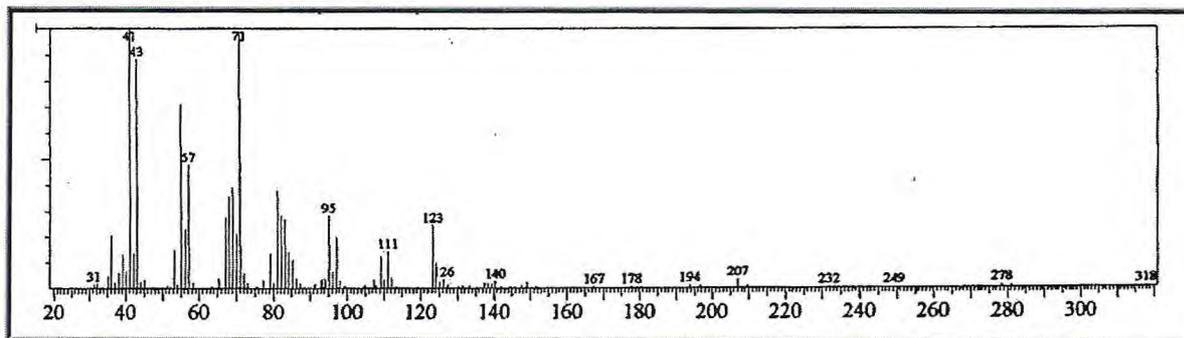


Figura 15 - Espectro de massas do Isofitol (77)

3.2. Determinação Estrutural dos Constituintes não Voláteis de *Tephrosia cinerea*

3.2.1. Determinação Estrutural de TC-1

A fração diclorometano do extrato acetato de etila das raízes de *T. cinerea* (TCRAE-D) (Item 5.5.3.1.1, p. 159) após fracionamento cromatográfico em coluna tipo “flash”, apresentou em uma das frações um sólido amorfo amarelado que, após precipitação em MeOH a frio, forneceu um sólido branco em forma de cristais, solúvel em clorofórmio, o qual foi denominado TC-1. O sólido foi analisado em CCD, mostrando-se homogêneo, visível na luz U.V. (254 e 365 nm) e incolor após pulverização com solução de vanilina e posterior aquecimento. TC-1 apresentou faixa de fusão entre 136,1 e 137,5 °C e pico íon molecular em m/z 262 no seu espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EMIE) (Figura 17, p. 30).

O espectro de absorção na região do IV de TC-1 (Figura 18, p. 30) mostrou um sinal forte de absorção em 1643 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C=O, sugerindo a presença de carbonila α,β -insaturada ($\nu_{\text{C=O}}$); e um sinal fino de absorção em 1250 cm^{-1} correspondente a deformação axial de ligação C–O ($\nu_{\text{C-O}}$).

O espectro de RMN ^{13}C -HBBD de TC-1 (125 MHz, CDCl_3) (Figura 21, p. 32) mostrou um total de quinze sinais, todos centrados na região de carbonos insaturados. Cinco destes carbonos (δ 146,04; 151,05; 158,59; 162,92 e 178,48) têm seu deslocamento químico indicativo de carbono sp^2 oxigenado, um dos quais em δ 178,48 foi relacionado a carbono carbonílico α,β -insaturado, confirmando a absorção observada no espectro de I.V.

Análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -HBBD e DEPT 135° (Figura 22, p. 30) permitiu deduzir o padrão de hidrogenação de cada carbono (Tabela 04), onde pôde-se inferir a presença de sete carbonos sp^2 não hidrogenados e oito sp^2 monohidrogenados. A ausência de bandas de absorção referentes a estiramento OH livre ou associado à ligação de hidrogênio no espectro de IV, bem como a de sinais em região de hidrogênios desprotegidos no seu espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 19, p. 31) que revelariam hidroxilas fenólicas, permitiram sugerir que TC-1 possuía dois sistemas heterocíclicos e uma fórmula molecular parcial $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_4$.

Tabela 04 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500MHz) de TC-1 com padrão de Hidrogenação

C	CH	TOTAL
**178,48	*146,04	
*162,92	131,80	
*158,59	129,34	
*151,05	126,40	
131,96	122,00	
119,55	110,43	
117,37	108,21	
	104,40	
C_7O_4	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}$	$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_4$

*C-O; **C=O

O espectro de RMN ^1H de TC-1 revelou dois sinais em δ 7,21 (1H, d, $J = 1,9$ Hz) e δ 7,77 (1H, d, $J = 1,9$ Hz) que estão associados aos sinais em δ 104,40 e 146,04 no espectro de RMN ^{13}C -HBBD indicando a presença de anel furânico. Esta dedução foi confirmada através de correlação entre os referidos sinais no espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação (^1H , ^{13}C – HSQC) (Figura 24, p. 33). Observaram-se ainda três sinais em δ 8,16 (1H, d, $J = 8,8$ Hz); 7,96 (2H, m) e 7,56 (4H, m) característicos de hidrogênios ligados a anel aromático e um singlete em δ 6,89 (1H, s) referente a um hidrogênio olefínico.

O acoplamento entre o hidrogênio em δ 8,16 ($J = 8,8$ Hz) e um dos hidrogênios em δ 7,56 (m) observados no espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (Figura 23, p. 33), associado ao valor da constante de acoplamento observado no espectro de RMN ^1H , permitiu detectar a presença de um anel aromático tetrassubstituído com hidrogênios em posição *orto*.

No mapa de contorno do espectro de HSQC um acoplamento entre o hidrogênio olefínico em δ 6,89 com o carbono em δ 108,21 sugerindo tratar-se de um hidrogênio (H-3) do anel C do sistema flavonoídico.

Todas essas observações aliadas à presença de mais cinco hidrogênios ligados a anel aromático, mencionadas anteriormente na análise do espectro de RMN ^1H , além da presença da carbonila α,β -insaturada observada no espectro de absorção na região do I.V. e confirmada no espectro de RMN ^{13}C -HBBD, permitiu sugerir a estrutura de uma flavona com anel furânico para TC-1.

A análise detalhada do diagrama de contorno do espectro de HSQC, assegurada pela ocorrência freqüente desta classe de compostos no gênero *Tephrosia* (SINHA *et al.*, 1982), permitiu associar o sinal em δ 7,56 (m) integrado para quatro hidrogênios, aos sinais de carbono em δ 110,43; 129,34 e 131,80, sugerindo que um destes era relativo a dois carbonos. Esta análise permitiu também observar o acoplamento dos hidrogênios em δ 7,96 (2H, m) com o carbono em δ 126,40 e relacionar este sinal a dois carbonos.

Uma vez sugerida a presença de mais dois carbonos na estrutura de TC-1, sua fórmula molecular pôde ser corrigida ($\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{O}_3$), o que permitiu calcular o índice de deficiência de hidrogênio igual a 13. Este grau de insaturação sugeriu que sua fórmula estrutural fosse constituída pelos dois anéis heterocíclicos além de dois anéis aromáticos, confirmando a estrutura de uma furanoflavona.

Todos os dados descritos até aqui, além da comparação com os da literatura (MBAFOR *et al.*, 1995), apontam para TC-1 a estrutura da flavona furânica conhecida como lanceolatina B (**78**) (Figura 16). Esta flavona foi isolada anteriormente de *Tephrosia purpurea* (SINHA *et al.*, 1982).

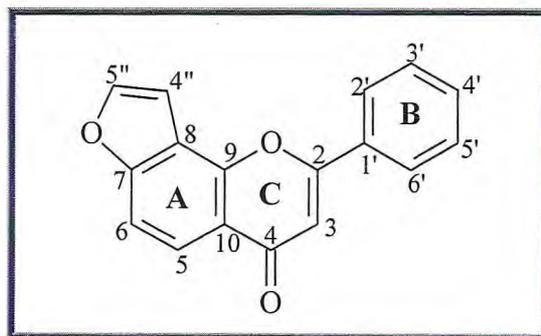
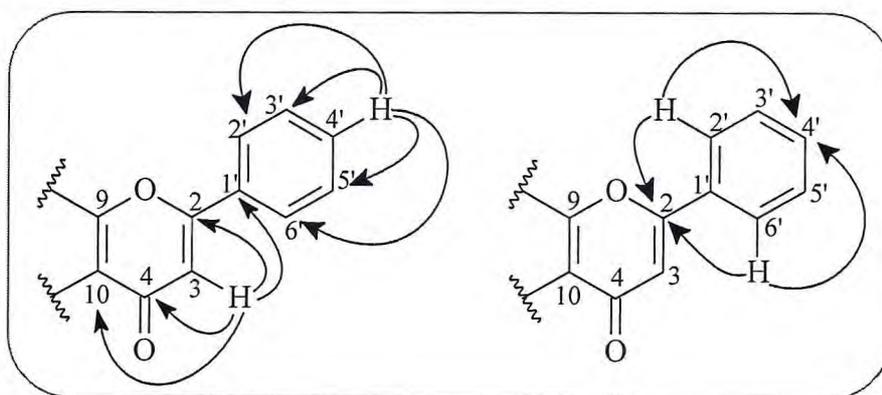


Figura 16 - Estrutura de lanceolatina B (**78**)
(furano [7,8:2'',3''] flavona)

O mapa de contorno do espectro de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C – HMBC) (Figura 25, p. 34) permitiu confirmar a estrutura de TC-1. Verificou-se acoplamentos entre o hidrogênio em δ 6,89 (H-3) com os carbonos em δ 119,55 (C-10, $^3J_{\text{CH}}$); 131,96 (C-1', $^3J_{\text{CH}}$); 162,92 (C-2, $^2J_{\text{CH}}$) e 178,48 (C-4, $^2J_{\text{CH}}$). Foi possível também verificar a interação de um hidrogênio em δ 7,56 (H-4') com o sinal de carbono em δ 126,40 ($^3J_{\text{CH}}$) estabelecendo inequivocamente, que este sinal é referente a dois átomos de carbonos (C-2' e C-6'), e com o sinal em δ 129,34 ($^2J_{\text{CH}}$) também correspondente a dois átomos de carbono (C-3' e C-5'). O sinal em δ 7,96 referente a dois hidrogênios (H-2' e H-6') interage com os sinais de carbono em δ 131,80 (C-4', $^3J_{\text{CH}}$) e 162,92 (C-2, $^3J_{\text{CH}}$). Estes acoplamentos são ilustrados nas subestruturas abaixo.



A análise adicional do diagrama de contorno do espectro HMBC possibilitou observar o acoplamento de um dos hidrogênios em 7,56 (H-6) com os carbonos em δ 117,37 (C-8, $^3J_{CH}$); 119,55 (C-10, $^3J_{CH}$) e 158,59 (C-7, $^2J_{CH}$). O acoplamento do hidrogênio em δ 8,16 (H-5) com os carbonos em δ 151,05 (C-9, $^3J_{CH}$) e 178,48 (C-4, $^3J_{CH}$) também foi observado. A correlação do hidrogênio em δ 7,77 (H-5'') com os carbonos em δ 158,59 (C-7, $^3J_{CH}$) e 146,04 (C-8, $^3J_{CH}$) e do hidrogênio em δ 7,21 (H-4'') também com o carbono em δ 158,59 (C-7, $^3J_{CH}$), definiu claramente a posição do anel furânico, garantindo para TC-1 a identidade com a Lanceolatina B., cuja atividade citotóxica em tumores hepáticos de ratos é descrita na literatura (CHANG *et al.*, 1997).

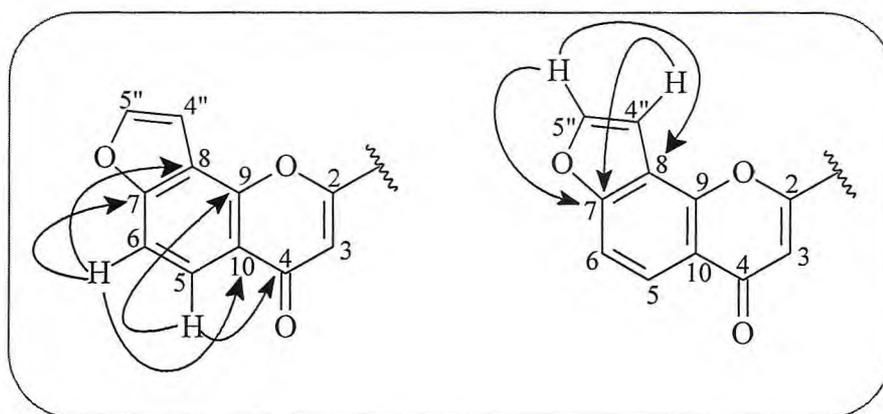


Tabela 05 - Dados espectroscópicos de TC-1 (CDCl₃) comparados com dados da literatura para lanceolatina B (MBAFOR *et al.*, 1995)

C	δ_H (mult., J em Hz)	δ_C		HMBC	
	TC-1	lanceolatina B	TC-1	$^2J_{C-H}$	$^3J_{C-H}$
2	--	162,7	162,92	H-3	H-2'/H-6'
3	6,89 (s)	108,1	108,21	--	--
4	--	178,2	178,48	H-3	H-5
5	8,16 (d; 8,8)	121,8	122,00	--	--
6	7,56 (m)	110,2	110,43	--	--
7	--	158,4	158,59	H-6	H-4''/H-5''
8	--	117,2	117,37	--	H-6/H-5''/H-4''
9	--	150,9	151,05	--	H-5
10	--	119,4	119,55	--	H-3/H-6
1'	--	131,8	131,96	--	H-3/H-3'/H-5'
2',6'	7,96 (m)	126,2	126,40	--	H-4'
3',5'	7,56 (m)	129,1	129,34	H-4'	--
4'	7,56 (m)	131,5	131,80	--	H-2'/H-6'
4''	7,21 (d; 2,2)	104,2	104,40	--	--
5''	7,77 (d, 2,2)	145,8	146,04	--	--

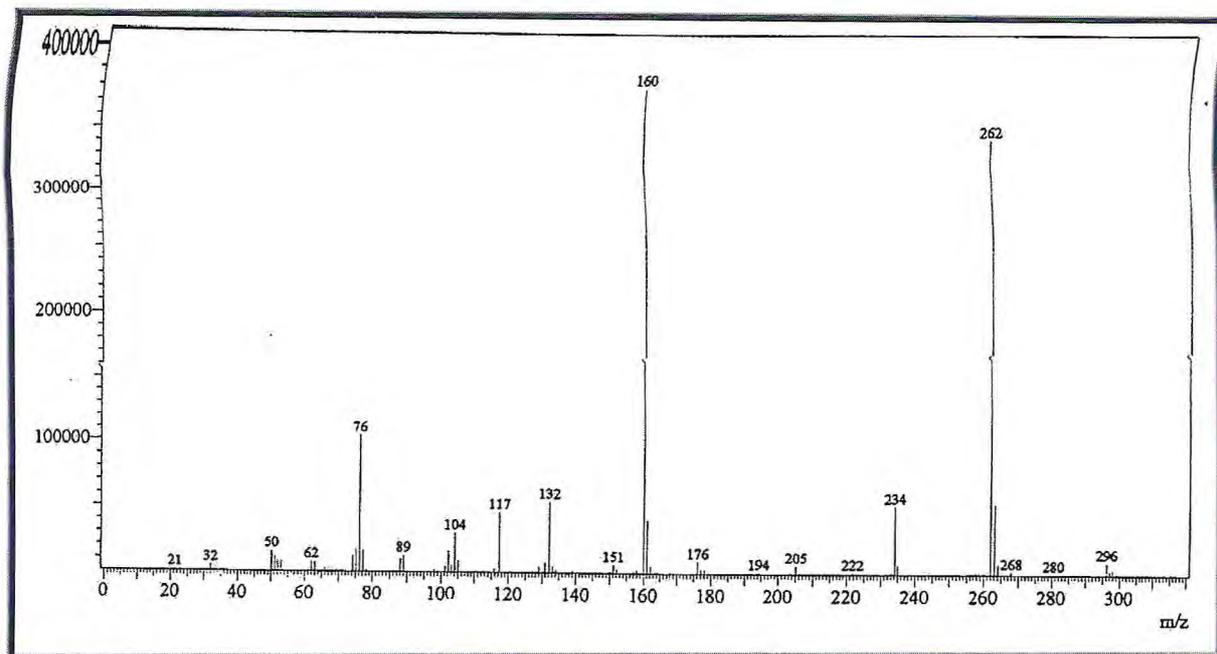


Figura 17 - Espectro de massas de TC-1 (IE, 70eV)

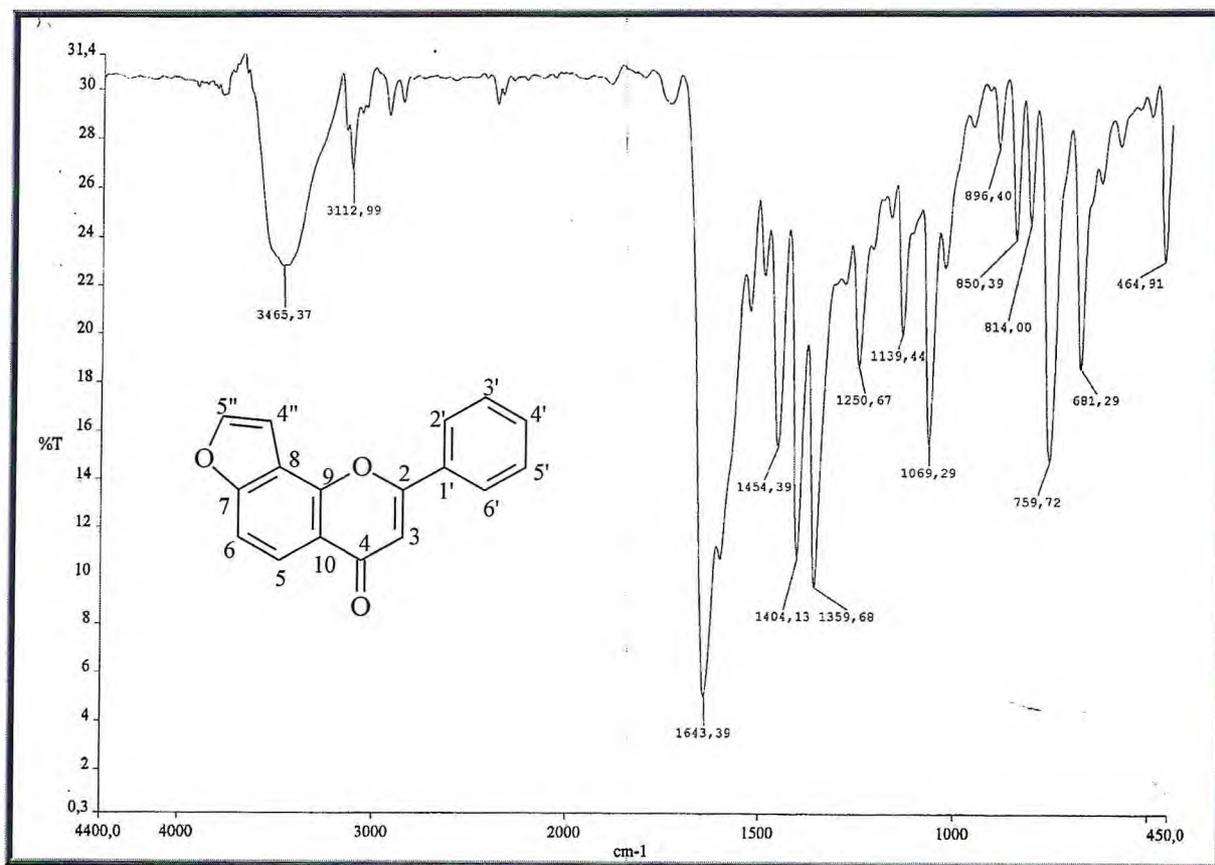


Figura 18 - Espectro de absorção na região do IV de TC-1

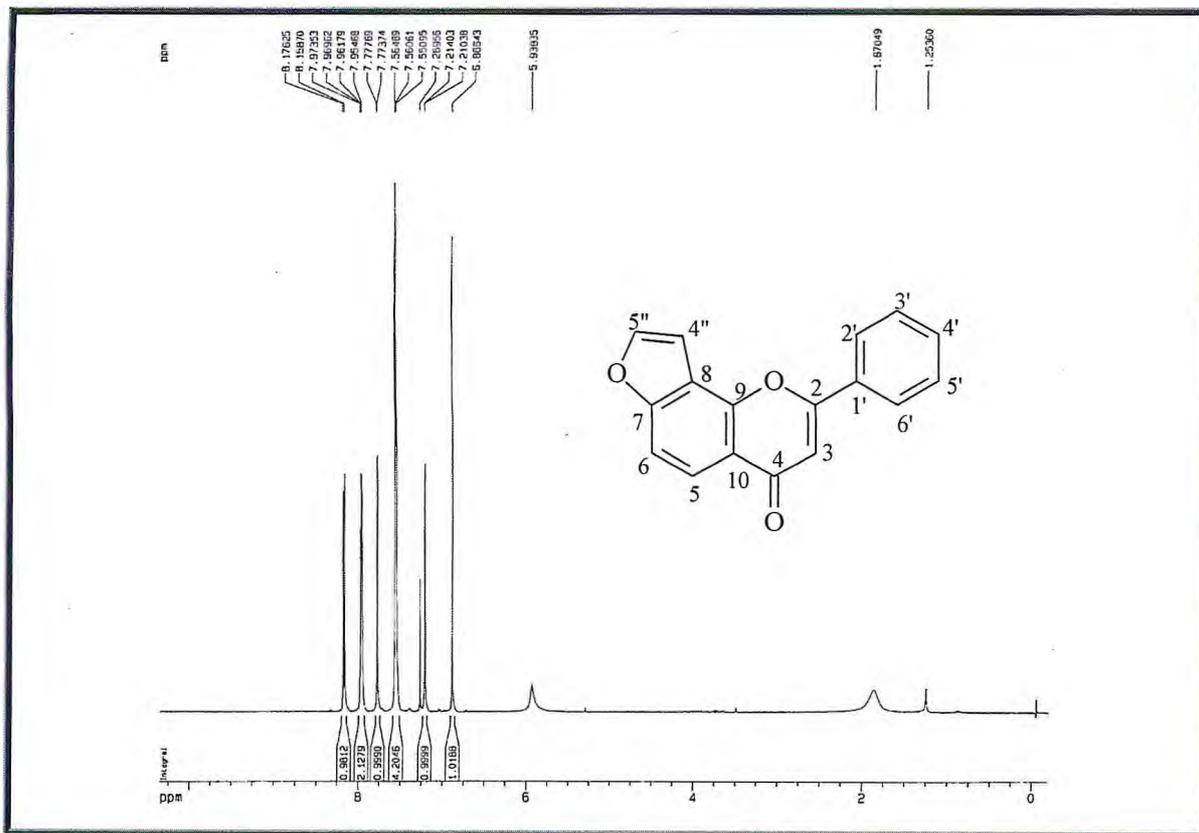


Figura 19 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de TC-1

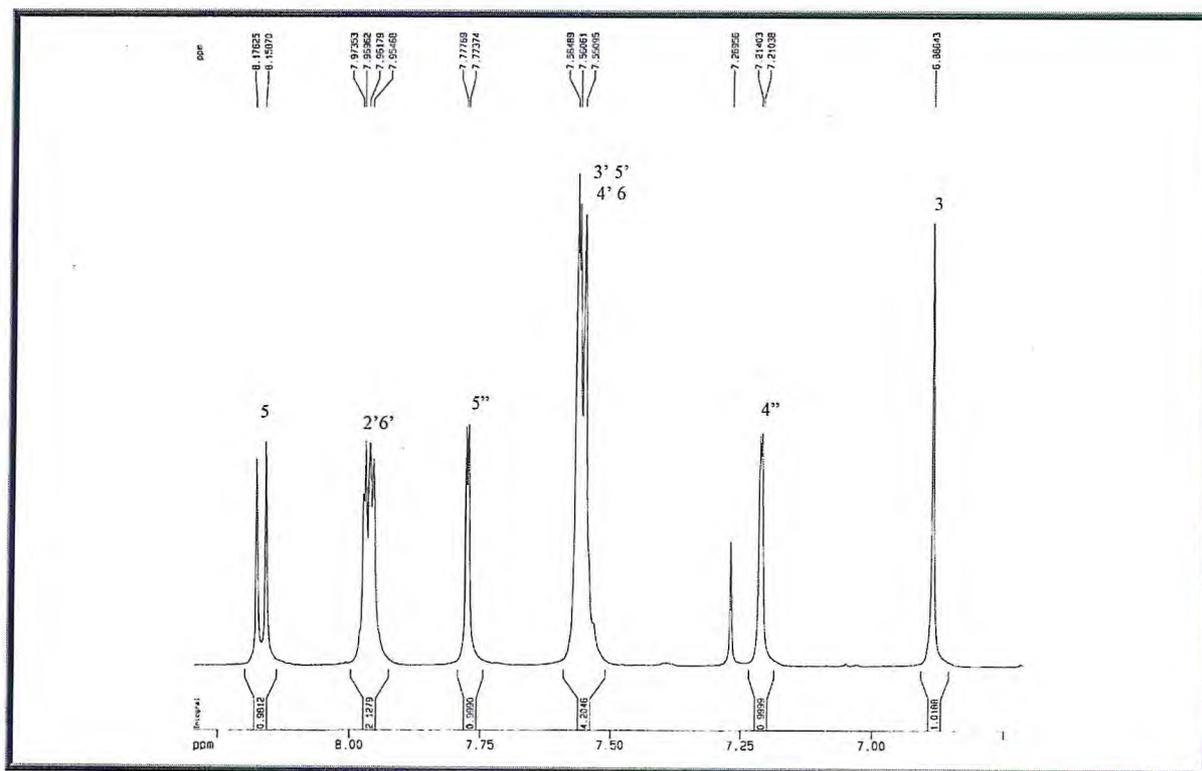


Figura 20 - Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de TC-1

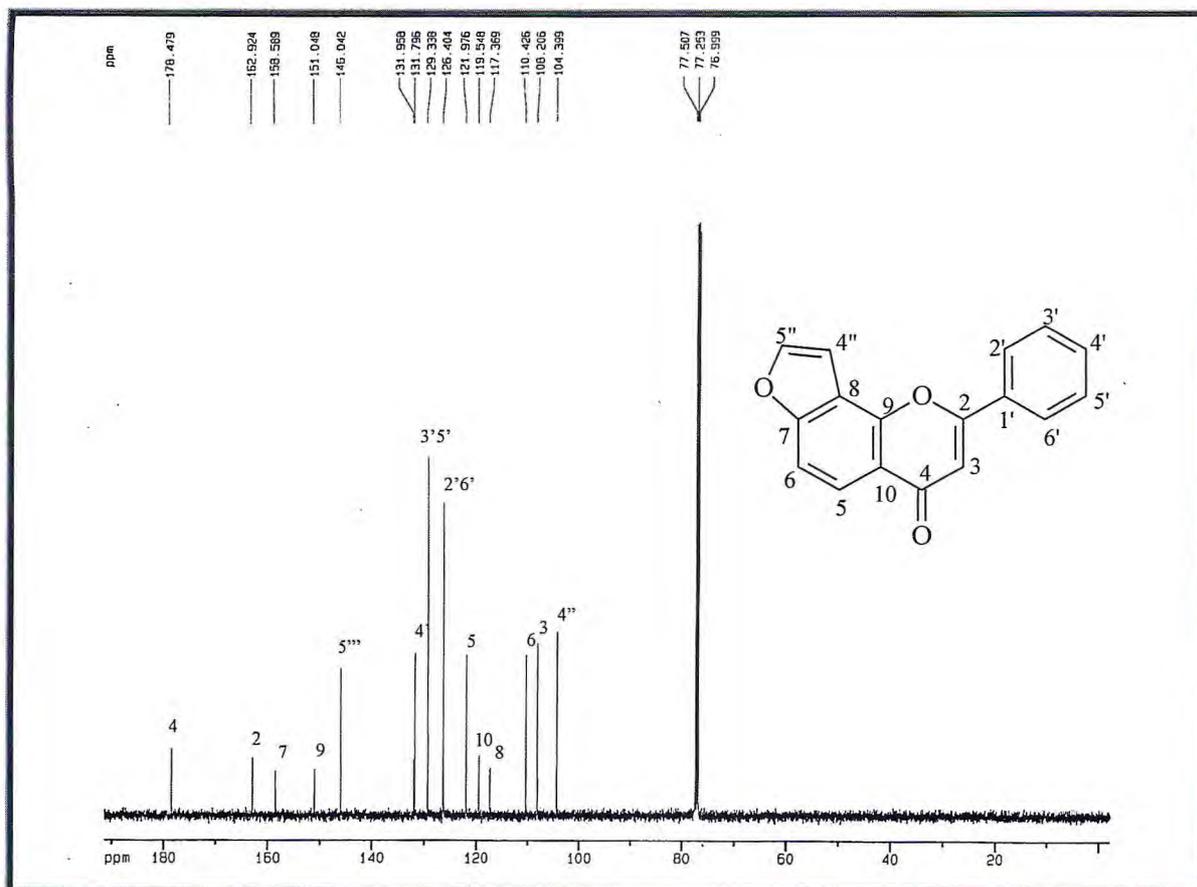


Figura 21 - Espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, CDCl_3) de TC-1

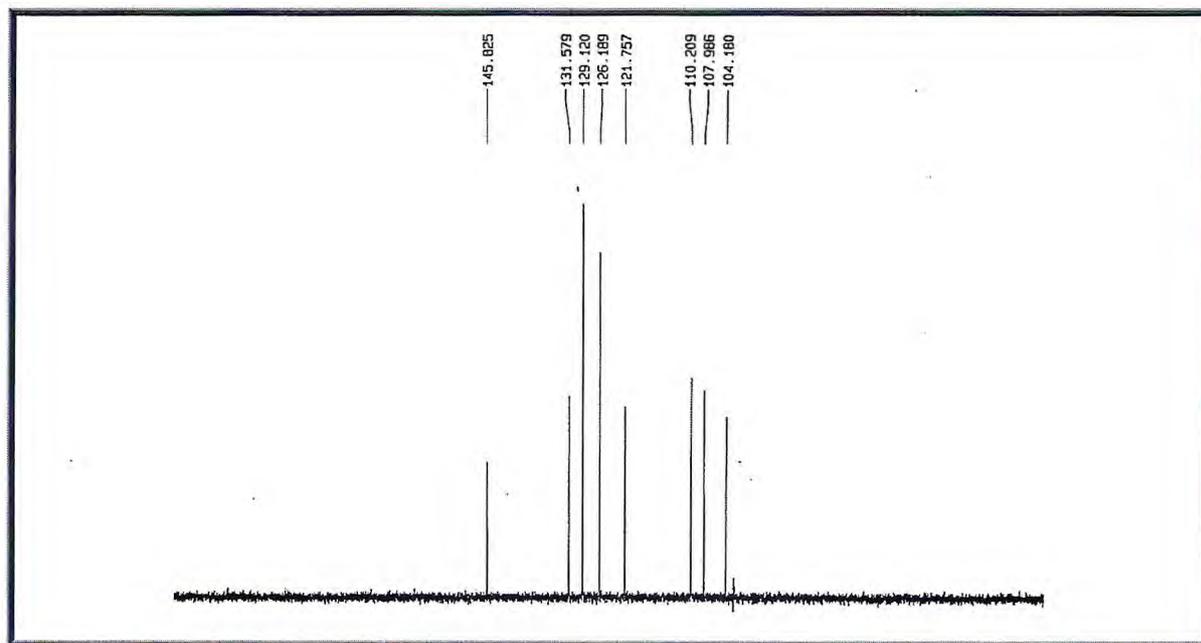


Figura 22 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TC-1

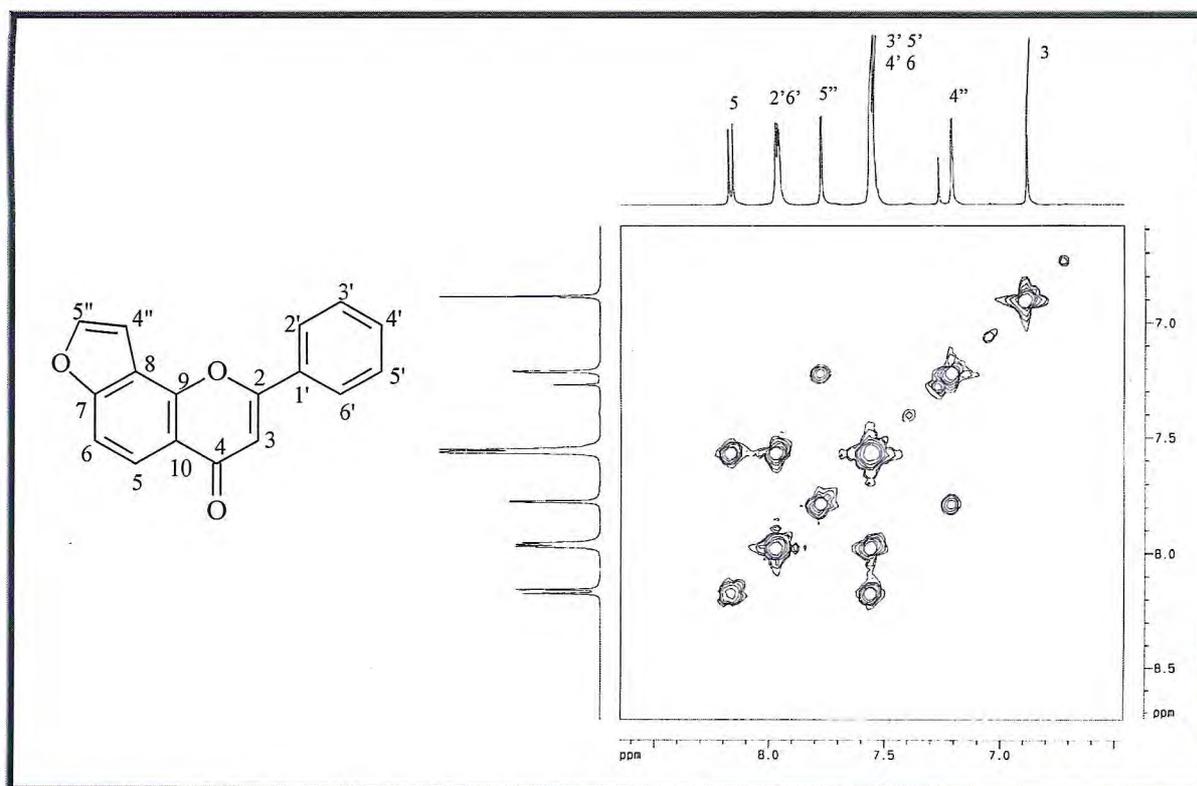


Figura 23 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-1

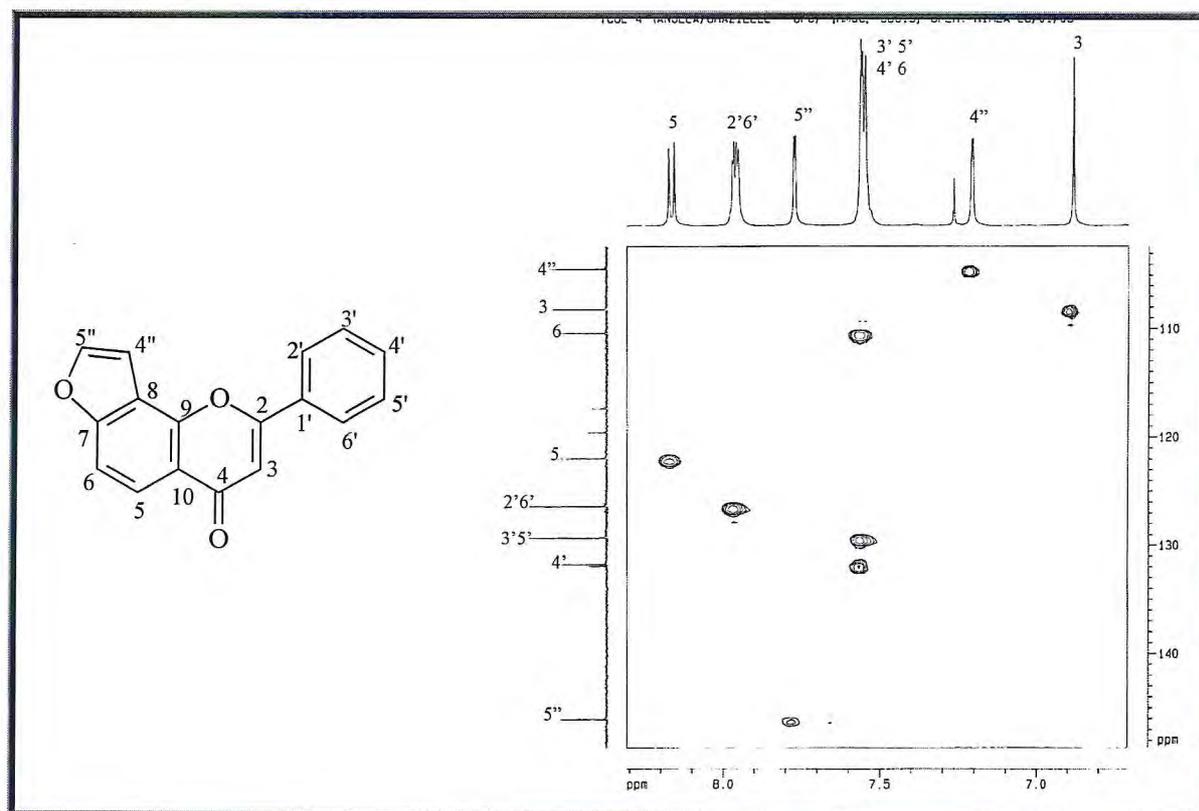


Figura 24 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-1

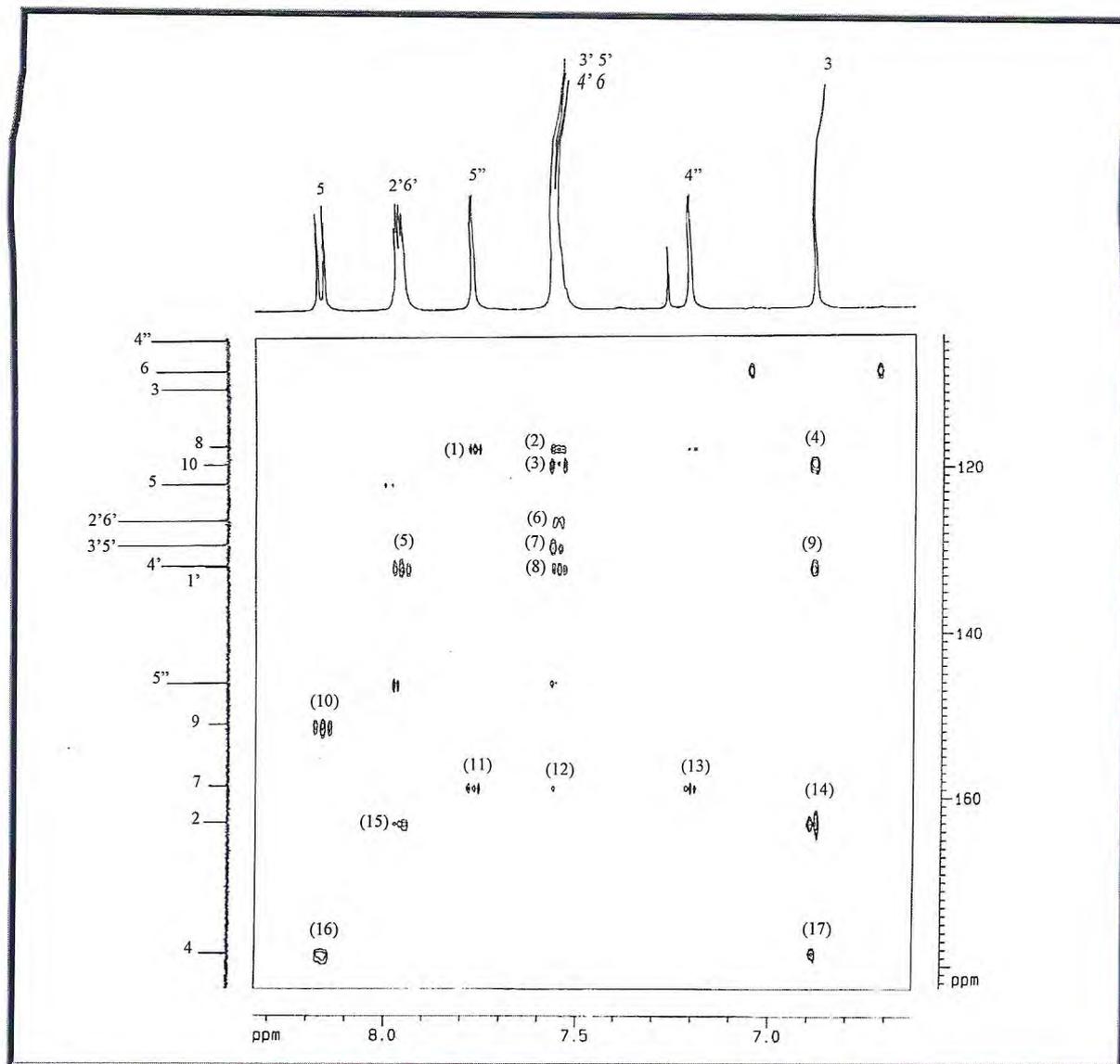
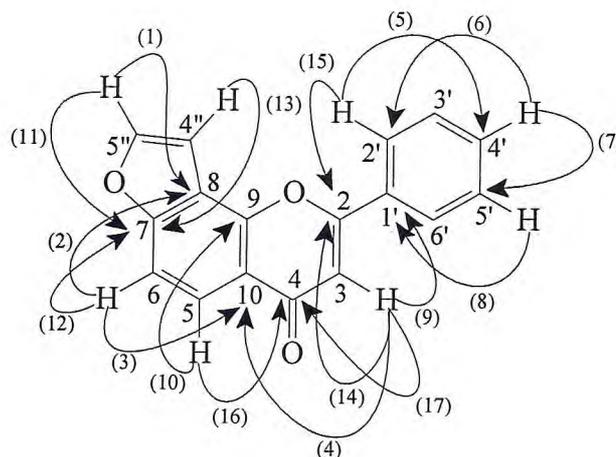


Figura 25 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C –HMBC de TC-1



3.2.2. Determinação Estrutural de TC-2

Um sólido amorfo de cor laranja foi obtido após fracionamento cromatográfico da fração diclorometano do extrato acetato de etila das raízes de *T. cinerea* (TCRAE-D), (Item 5.5.3.1.2, p. 160). Análise em CCD revelou que a substância mostrou-se homogênea através da presença de uma única mancha na cromatoplaça, visível na luz U.V. (254 e 365 nm) e coloração laranja após ser revelada com solução de vanilina. O sólido, denominado TC-2, solúvel em clorofórmio, apresentou ponto de fusão entre 120,9 – 122,6 °C e pico íon molecular EM m/z 294, no seu espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EMIE) (Figura 28, p. 41).

Seu espectro de absorção na região do IV (Figura 29, p. 41) permitiu sugerir a presença de uma carbonila α,β -insaturada ($\nu_{C=O}$) através do sinal intenso em 1598 cm^{-1} característico de deformação axial da ligação C=O. Permitiu sugerir também a presença de carbono saturado através do sinal em 2931 cm^{-1} . O sinal em 1220 cm^{-1} foi relacionado à deformação axial da ligação C-O.

O seu espectro de RMN ^{13}C -HBB (125 MHz, CDCl_3) (Figura 32, p. 43) evidenciou quinze sinais com deslocamentos químicos característicos de carbonos sp^2 (δ 186,32 – 98,12) e um de carbono sp^3 (δ 61,40). A atribuição do padrão de hidrogenação de cada carbono foi feita com base na comparação dos espectros de RMN ^{13}C -HBB e DEPT 135° (Figura 33, p. 43). Assim, foi possível identificar sete sinais referentes a carbonos sp^2 não hidrogenados (δ 186,32; 184,47; 158,91; 153,95; 135,90; 122,45 e 119,83), oito a carbonos sp^2 monohidrogenados (δ 145,04; 132,34; 128,93; 127,31; 126,68; 107,26; 105,46 e 98,12) e um a carbono sp^3 em δ 61,36, característico de carbono metoxílico. Dos sinais relacionados a carbono sp^2 , dois (δ 186,32 e 184,47) são característicos de carbonos carbonílicos e outros dois (δ 158,91 e 153,95) característicos de carbonos não hidrogenados e oxigenados. Em δ 145,04 observou-se um sinal que pôde ser atribuído a carbono monohidrogenado e oxigenado.

Esta análise preliminar permitiu construir a Tabela 06 (p. 36) e atribuir uma fórmula molecular parcial $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{O}_4$ para TC-2.

Tabela 06 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500MHz) de TC-2 com padrão de Hidrogenação

C	CH	CH ₃	TOTAL
**186,32	*145,04	*61,63	
**184,47	132,34		
*158,91	128,03		
*153,95	127,31		
135,90	126,68		
122,45	107,26		
119,83	105,46		
	98,12		
C ₇ O ₄	C ₈ H ₈	CH ₃	C ₁₆ H ₈ O ₄

*C-O; **C=O

Foram observados no espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-2 (Figuras 30 e 31, p. 42) dois sinais duplos em δ 7,88 (1H, d, $J = 8,6$ Hz) e 7,32 (1H, d, $J = 8,6$ Hz) característicos de hidrogênios de anel aromático acoplados em posição *orto*; o sinais em δ 7,99 (2H, d, $J = 8,2$ Hz), 7,52 (1H, m) e 7,49 (2H, m) indicaram a presença de anel aromático monossustituído. Os dois dubletos em δ 7,63 (1H; sl) e 7,01 (1H; sl) que estão relacionados aos sinais de carbono em δ 145,04 e 105,46 no espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação (^1H , ^{13}C – HSQC) (Figura 35, p. 44), são referentes a hidrogênios de um anel furânico dissustituído. Ainda no espectro de RMN ^1H foi observado um sinal simples em δ 4,16 (3H, s) referente a hidrogênios metoxílicos; outro singlete largo em δ 16,92, cujo valor de deslocamento químico é compatível com hidroxila quelatogênica ligada ao carbono β à carbonila de um sistema chalcônico (PARMAR *et al.*, 1989). Esta dedução pode ser confirmada pelo valor do deslocamento químico do singlete em δ 7,18 (1H, s) do hidrogênio pertencente ao carbono C-8 de esqueleto chalcônico.

Baseado nas informações já mencionadas foi possível propor para TC-2 a estrutura de uma β -hidroxibenzofuranochalcona, tendo sido este tipo de composto relatado pela primeira vez como produto natural em 1989 (PARMAR *et al.*, 1989).

A existência de duas formas tautoméricas em equilíbrio na estrutura de TC-2 foi inferida pela presença de duas absorções atribuídas a carbonos carbonílicos (δ 186,32 e 184,47), bem como da absorção característica do β -OH em δ 16,92.

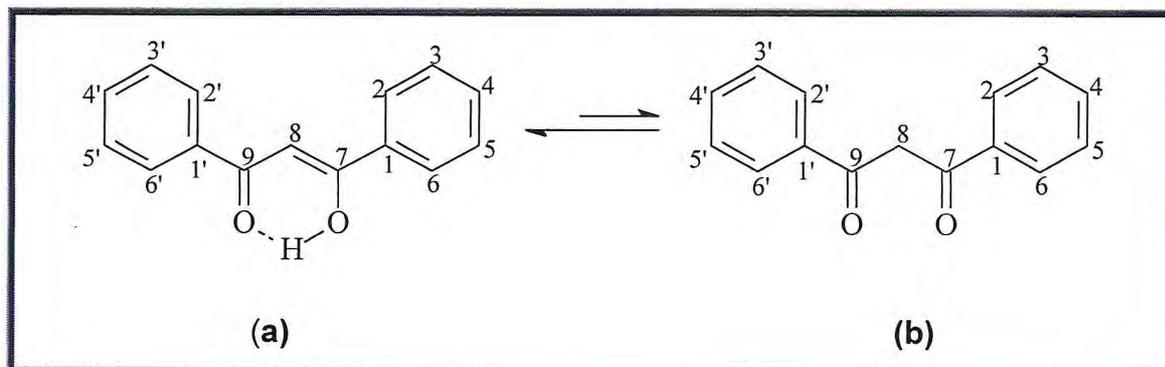


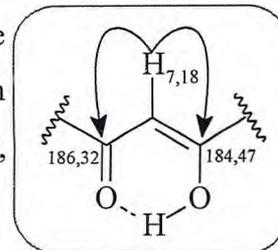
Figura 26 - Equilíbrio ceto-enólico de β -hidroxichalconas

A forma dicetônica é também garantida, embora em pequena proporção, pela presença do sinal em δ 54,28 no espectro de RMN ^{13}C DEPT 135°, que apareceu em fase oposta aos demais sinais, e, do sinal em δ 4,66 no espectro de RMN ^1H , característicos de grupamento metilênico.

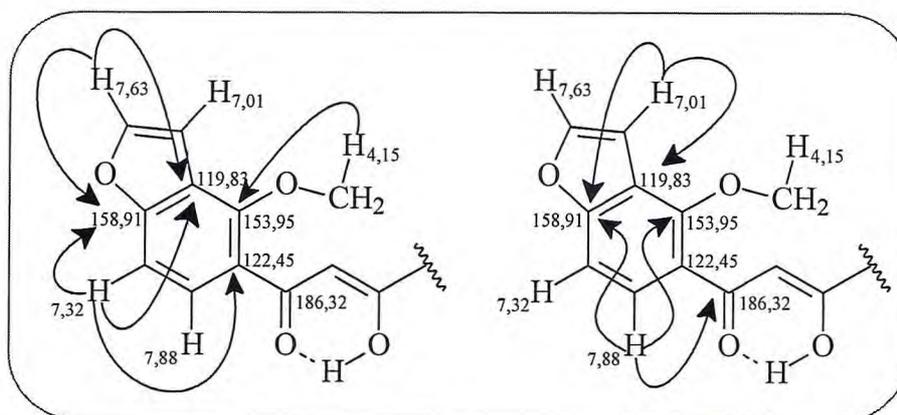
Devido ao seu alto grau de enolização provocado pela ligação de hidrogênio entre a hidroxila e a carbonila, as formas dicetônicas, chamadas de dibenzoilmetanos (**b**), são raramente encontradas como fonte natural, tendo registro em apenas algumas espécies de *Lonchocarpus* (MAGALHÃES, 1997).

Análise do mapa de contorno do espectro HSQC, permitiu associar os hidrogênios em δ 7,99 (2H, d, $J = 8,2$ Hz) ao carbono em δ 127,31 e dos hidrogênios em δ 7,49 (2H, m) ao carbono em δ 128,93, indicando que estes sinais devam ser referentes a dois átomos de carbono cada. Isto tornou possível propor para TC-2 uma nova fórmula molecular ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_4$), estando de acordo com o pico íon molecular m/z 294, observado no espectro de massas.

No diagrama de contorno do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C – HMBC) (Figuras 36 e 37, p. 45) foi possível observar o acoplamento do hidrogênio em δ 7,18 (1H, s) com os carbonos em δ 184,47 ($^2J_{\text{CH}}$) e 186,32 ($^2J_{\text{CH}}$), corroborando para a existência do sistema ceto-enólico já proposto.



Foi possível observar também o acoplamento do hidrogênio em δ 7,88 (1H, d, $J = 8,6$ Hz) com os carbonos em δ 186,32 ($^3J_{\text{CH}}$); 159,1 ($^3J_{\text{CH}}$) e 153,95 ($^3J_{\text{CH}}$); do hidrogênio em δ 7,32 (1H, d, $J = 8,6$ Hz) com os carbonos em δ 158,91 ($^2J_{\text{CH}}$); 122,45 ($^3J_{\text{CH}}$) e 119,83 (3J); do hidrogênio em δ 7,63 (1H; sl) e 7,01 (1H; sl) com os carbonos em δ 158,91 ($^3J_{\text{CH}}$ e $^2J_{\text{CH}}$) e 119,83 ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$), o que definiu a porção benzofurânica do composto. A interação do hidrogênio em δ 4,15 (3H, s) com o carbono em δ 153,95, possibilitou determinar a posição do grupo metoxila.



A confirmação da estrutura foi feita através comparação dos dados de TC-2 com os da benzofuranochalcona pongamol (79, Figura 27) descrita na literatura (PARMAR *et al.*, 1989) para *T. purpurea*.

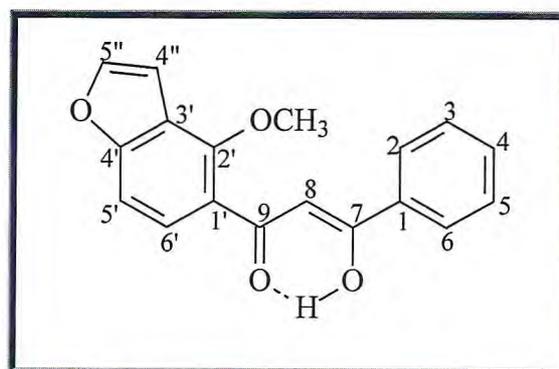


Figura 27 - Estrutura do pongamol (79)
(furano [3',4':2'',3'']-2'-metoxi-7-chalconol)

A comparação dos dados de RMN ^{13}C e análise dos espectros bidimensionais permitiram fazer a correção dos deslocamentos químicos dos carbonos C-1' a C-5' e C-4'' de pongamol.

Tabela 07 - Dados espectroscópicos de TC-2 (CDCl₃) comparados com dados da literatura para pongamol (PARMAR *et al.*, 1989)

C	δ_H (mult., J em Hz)		δ_C		HMBC	
	pongamol	TC-2	pongamol	TC-2	$^2J_{C-H}$	$^3j_{C-H}$
1	--	--	135,70	135,90	--	H-3/H-5
2,6	7,94 (m)	7,99 (d; 7,9)	128,62	127,31	--	H-4
3,5	7,48 (m)	7,49 (m)	127,16	128,93	--	--
4	7,48 (m)	7,52 (m)	132,08	132,34	--	H-2/H-6
7	--	--	184,32	184,47	H-8	H-2/H-6
8	7,16 (s)	7,18 (s)	97,97	98,12	--	--
9	--	--	186,14	186,32	H-8	H-6'
1'	--	--	119,60	122,45	--	H-5'
2'	--	--	158,78	153,95	--	H-6'/CH ₃ O-2'
3'	--	--	122,18	119,83	H-4''	H-5'/H-5''
4'	--	--	152,78	159,91	H-5'	H-6'/H-4''/H-5''
5'	7,28 (d; 9)	7,32 (d; 8,6)	105,25	107,26	--	--
6'	7,85 (d; 9)	7,88 (d; 8,6)	126,59	126,68	--	--
4''	6,96 (d; 2)	7,01 (sl)	107,09	105,46	H-5''	--
5''	7,60 (d; 2)	7,63 (sl)	144,85	145,04	--	--
CH ₃ O-2'	4,12 (s)	4,15 (s)	61,76	61,59	--	--
OH	--	16,92 (sl)	--	--	--	--

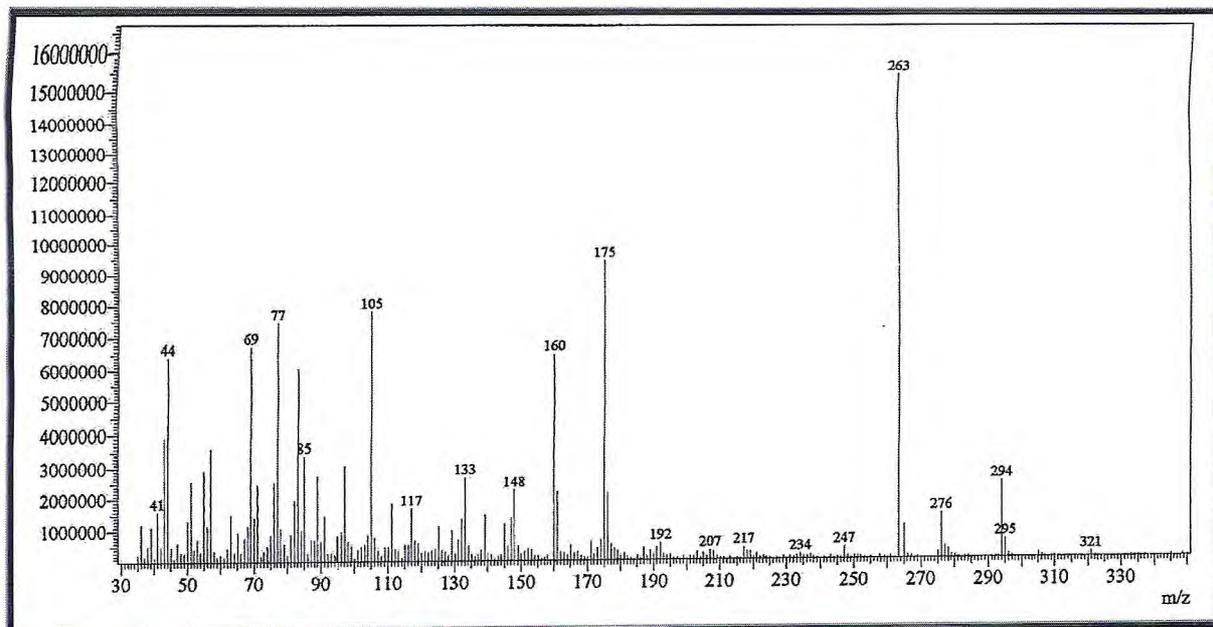


Figura 28 - Espectro de massas de TC-2 (IE, 70eV)

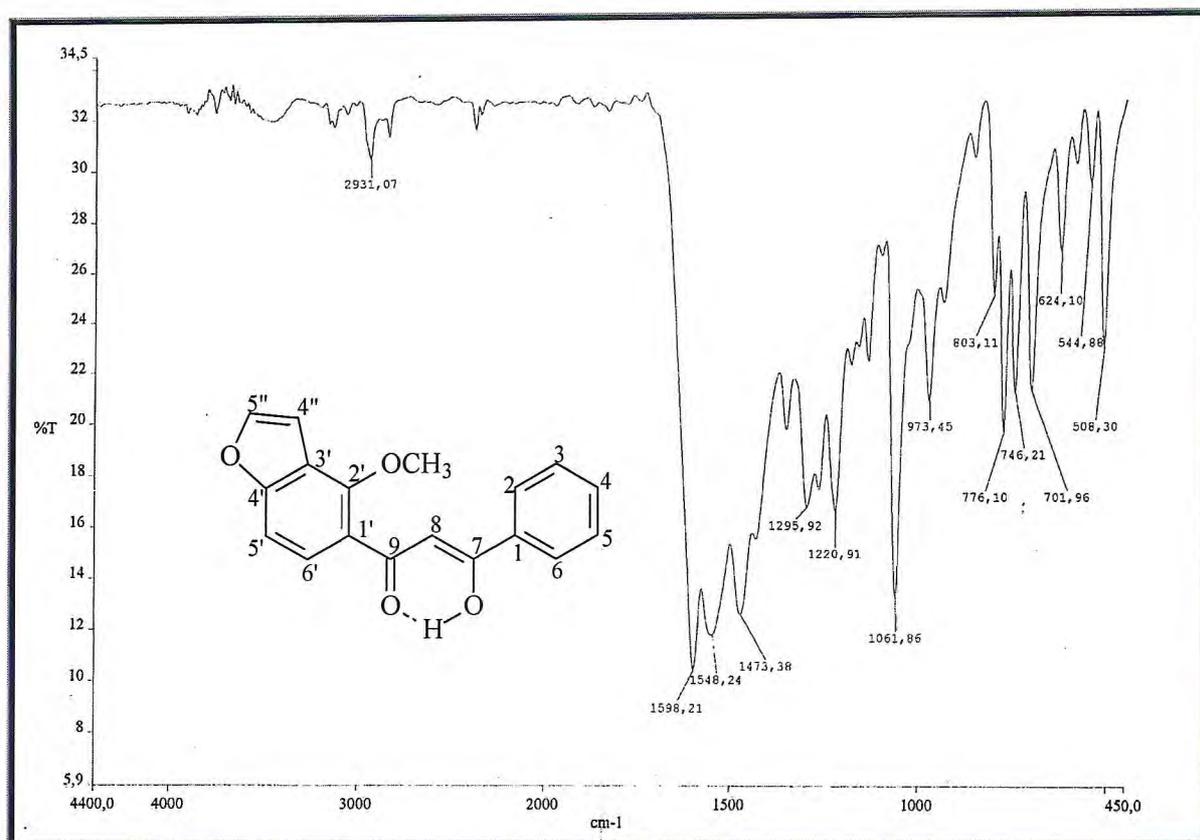


Figura 29 - Espectro de absorção na região do IV de TC-2

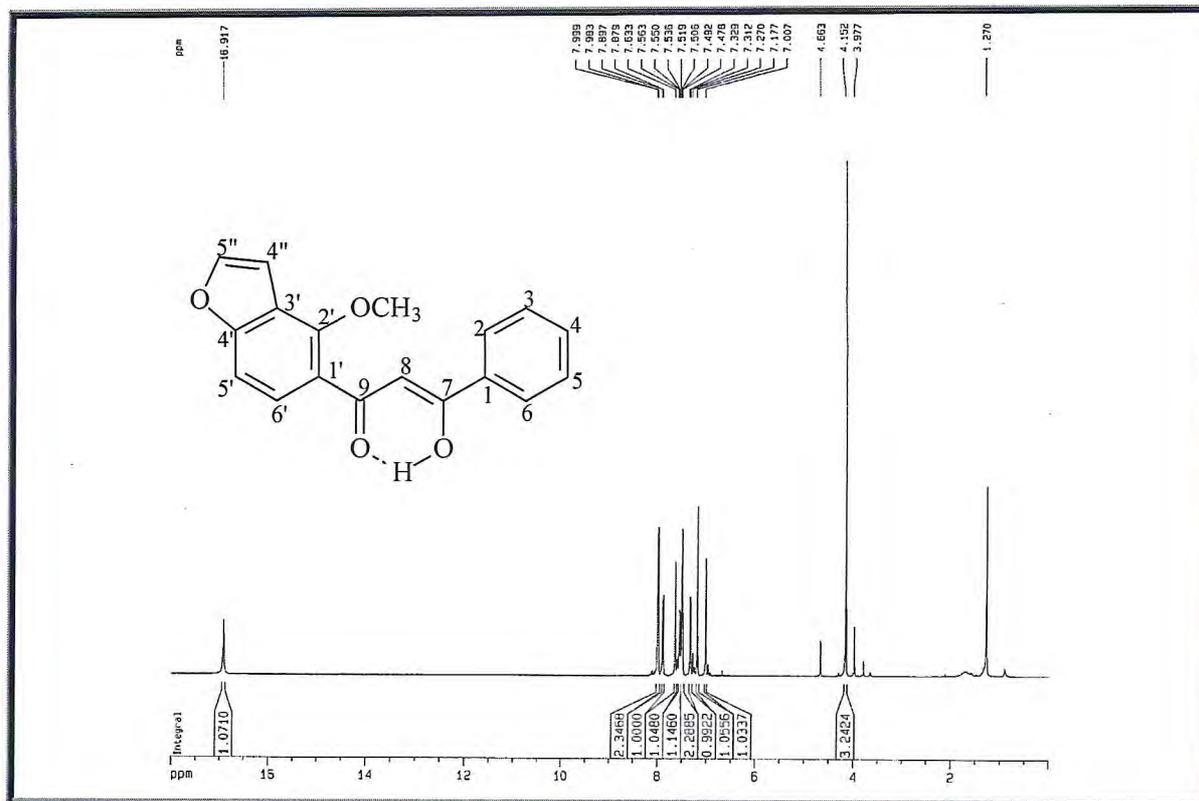


Figura 30 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-2

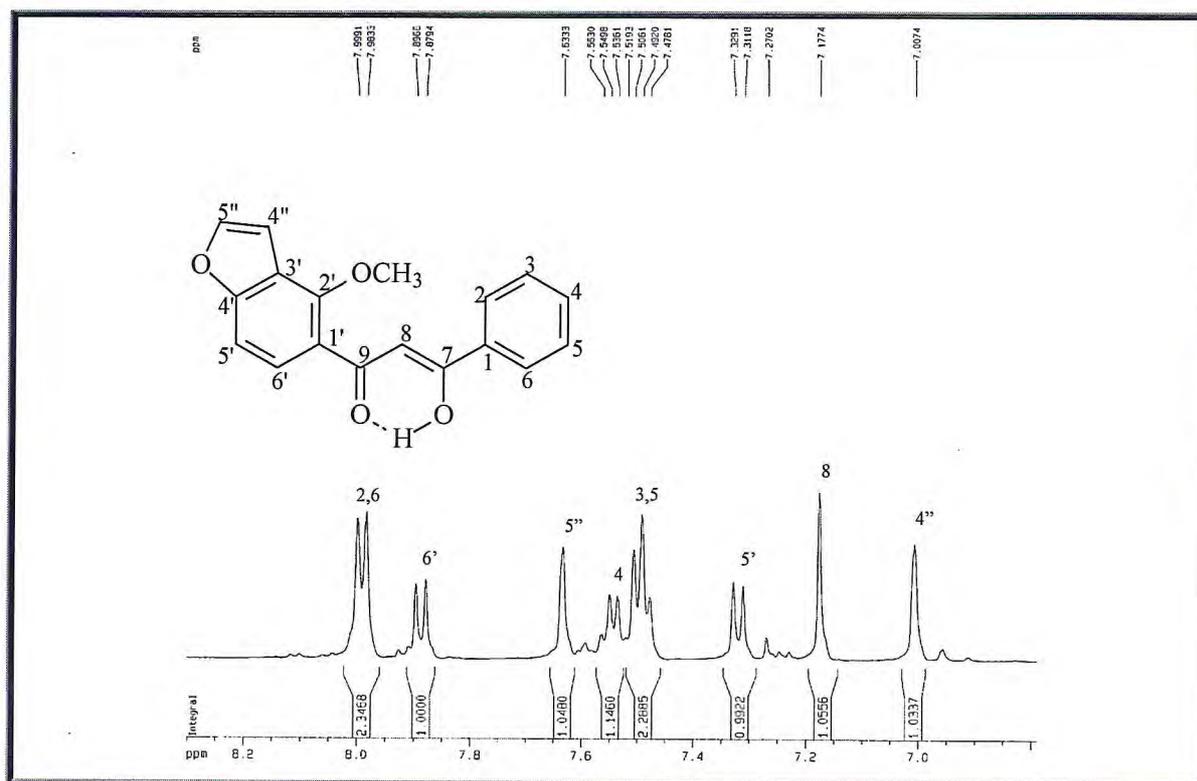


Figura 31 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-2

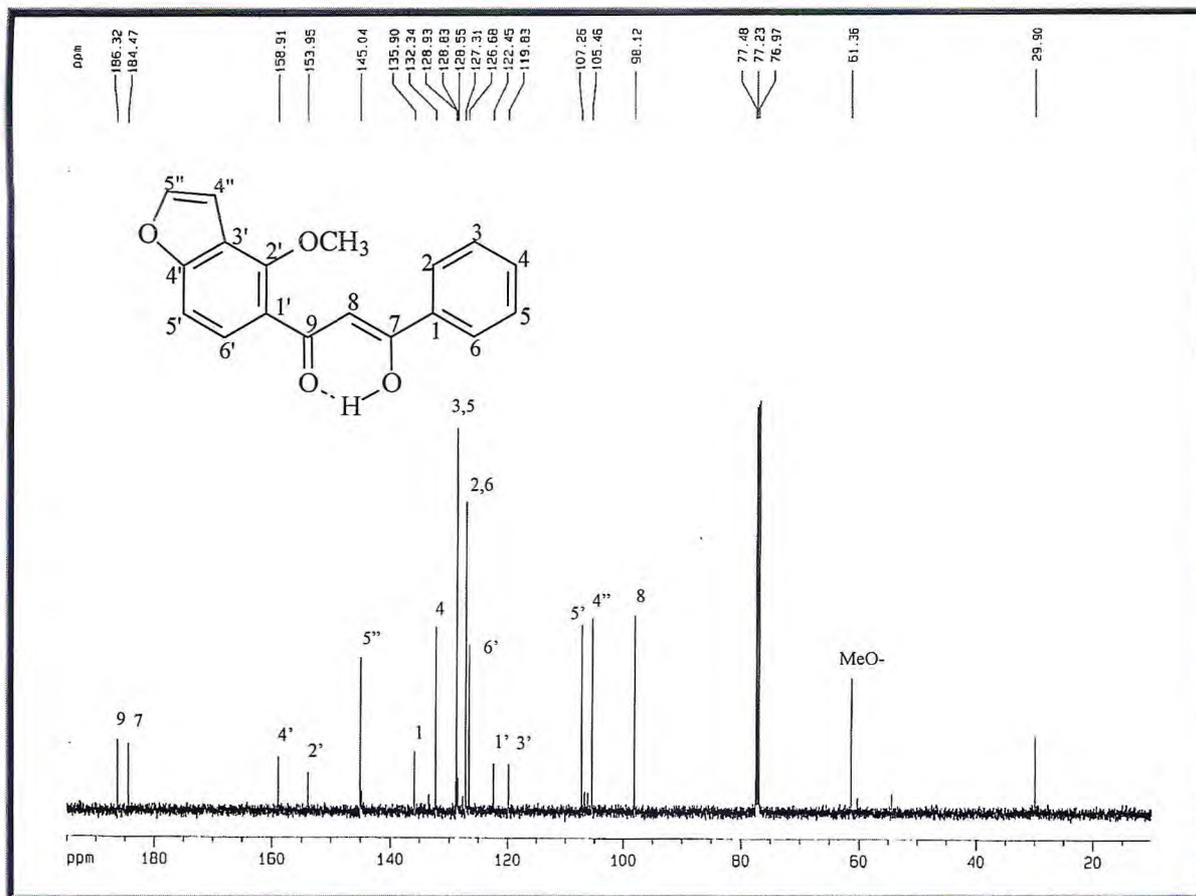


Figura 32 - Espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, CDCl_3) de TC-2

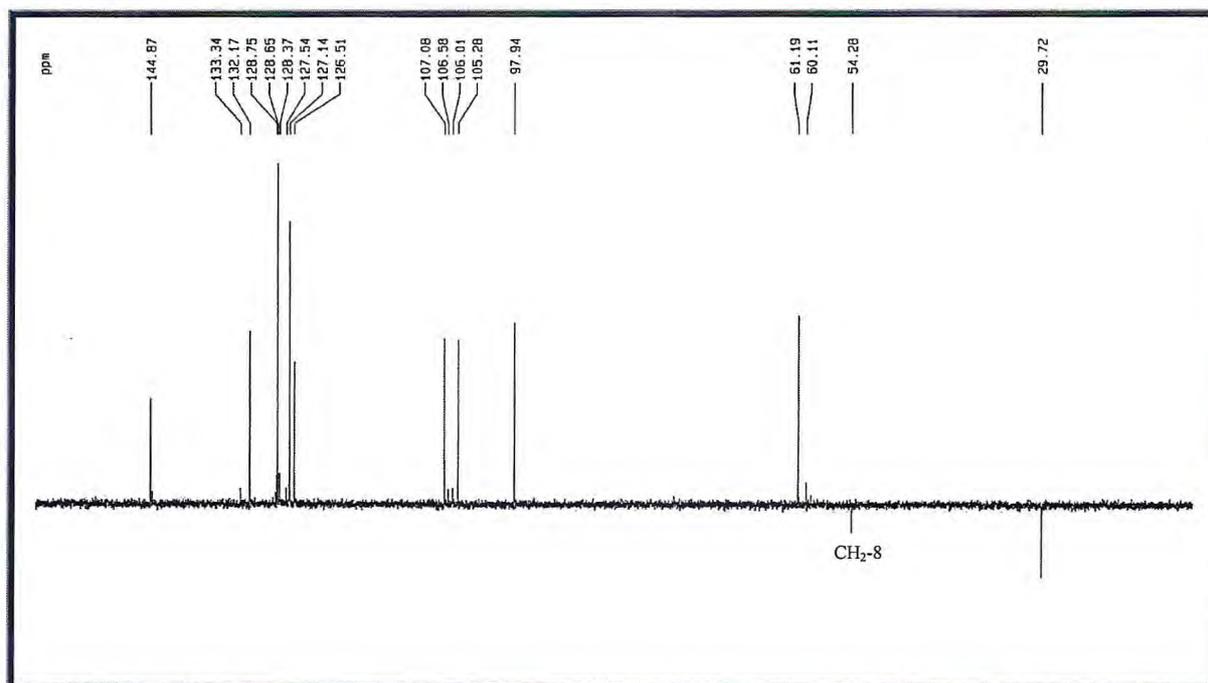


Figura 33 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TC-2

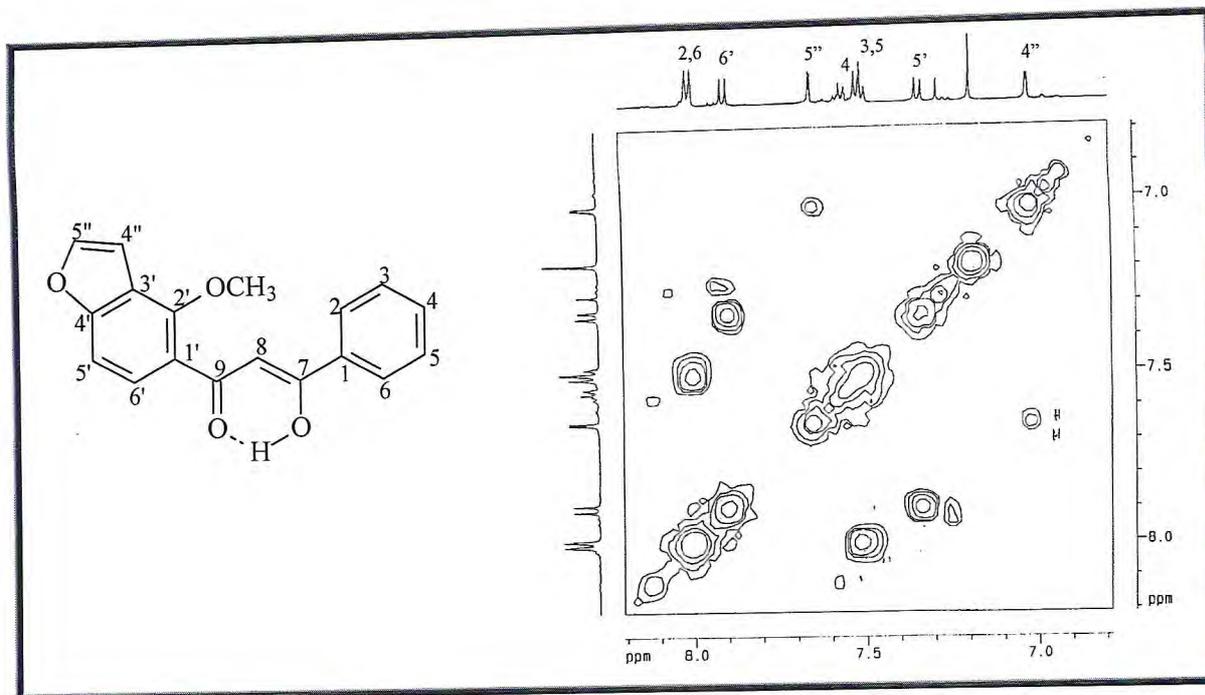


Figura 34 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-2



Figura 35 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-2

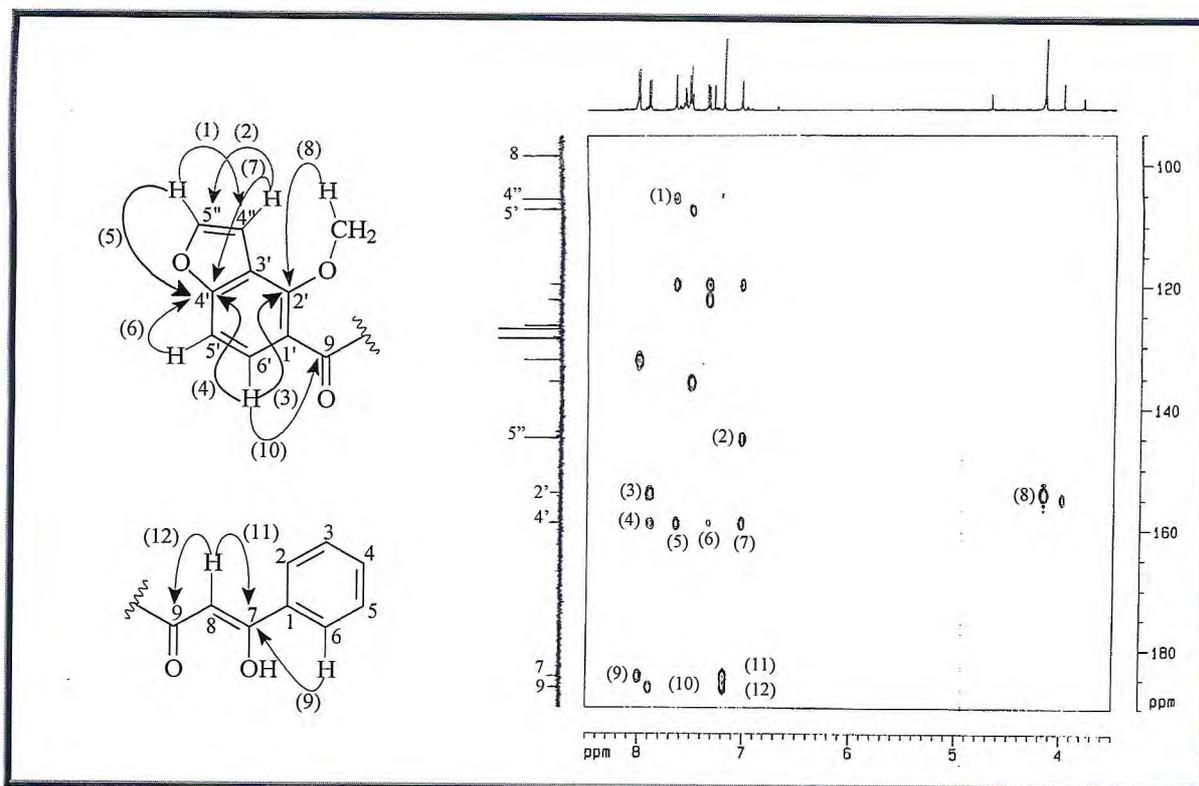


Figura 36 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C –HMBC de TC-2

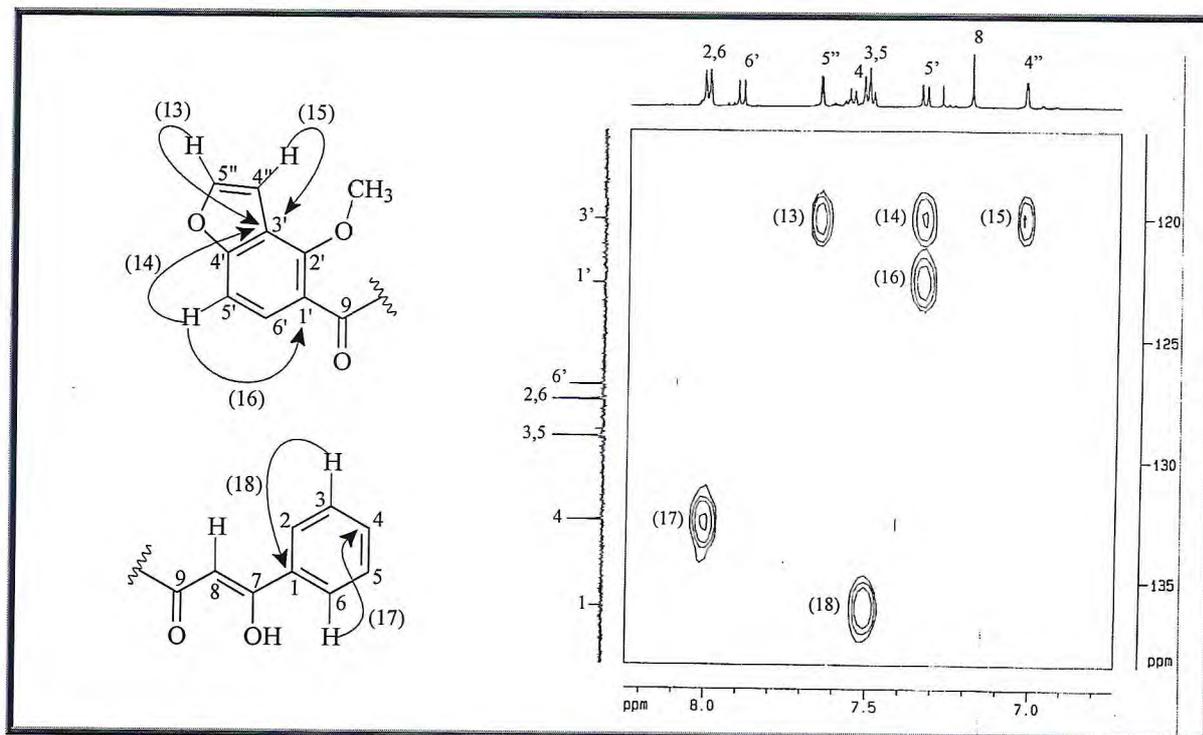


Figura 37 - Expansão-01 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C –HMBC de TC-2

3.2.3. Determinação Estrutural de TC-3

Fracionamento cromatográfico da fração TCRAE-H-insap. (146-181) obtida do extrato acetato de etila das raízes de *T. cinerea* (Item 5.5.3.1.3, 161), possibilitou o isolamento de um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio e homogêneo em CCD. Esta fração foi denominada TC-3, com ponto de fusão entre 141,7-145,9 °C. A comparação em CCD de TC-3 e o padrão de β -sitosterol sugeriram que os mesmos apresentavam a mesma identidade.

No espectro de absorção na região do IV de TC-3 (Figura 39, p. 48), foram observadas bandas em 2940 e 2867 cm^{-1} relacionadas à $\nu_{\text{C-H}}$ de carbonos metilênicos e metílicos; uma banda larga e pouco intensa em 3431 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$), característica de estiramento O-H; outra banda em 1053 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$) característico de deformação axial de ligação C-O; além de uma banda de absorção fraca em 1636 cm^{-1} associada a estiramento de ligação C=C (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 40, p. 49) apresentou vários sinais na faixa de δ 0,68 a δ 2,23, representativos de grupos metila, metilênicos e metínicos existentes na estrutura de esteróides. Apresentou também sinais múltiplos característicos de hidrogênios olefínicos em δ 5,30, 5,15 e 5,03, e, um outro multiplete em δ 3,52 referente a um hidrogênio ligado a carbono carbinólico, indicando para TC-3 uma mistura esteroidal.

A confirmação de que TC-3 correspondia a uma mistura de esteróides foi feita através da comparação dos seus dados de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, CDCl_3) (Figura 41, p. 49) com dados encontrados na literatura (MOREIRA, 2001) para a mistura de β -sitosterol e estigmasterol (Figura 38, p. 47). Estes dados estão reunidos na Tabela 08 (p. 47). O espectro de RMN ^{13}C -HBBD apresentou quarenta e cinco linhas espectrais, onde se destacam os sinais em δ 14,98 e 138,45 característicos de carbonos sp^2 não hidrogenados, os sinais em δ 129,40 e 121,63, relacionados a carbonos sp^2 monohidrogenados, e o sinal em δ 71,42 referente ao carbono carbinólico (C-3) presentes em ambos os esteróides.

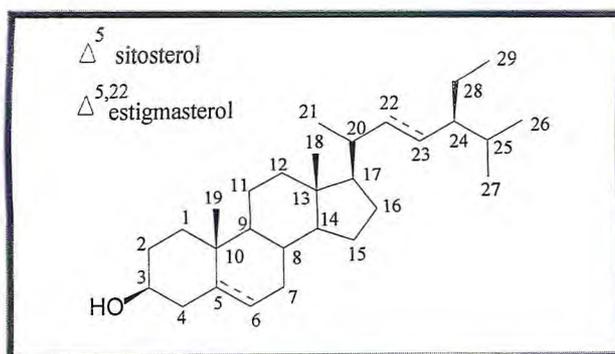


Figura 38 - Estrutura de β -sitosterol (80) e estigmasterol (81)

Tabela 08 - Dados comparativos dos deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^{13}C de TC-3 (CDCl_3) com dados da literatura para β -sitosterol (80) e estigmasterol (81) (MOREIRA, 2001)

C	δ_{C}		δ_{C}	
	β -sitosterol	TC-3	estigmasterol	TC-3
1	37,3	37,41	37,3	37,41
2	29,8	31,30	29,8	31,30
3	71,7	71,42	71,7	71,72
4	42,3	42,43	42,3	42,43
5	140,7	140,98	140,7	140,98
6	121,7	121,63	121,7	121,63
7	31,6	31,30	31,6	31,30
8	31,9	32,02	31,9	32,02
9	50,1	50,32	50,1	50,32
10	36,5	36,62	36,5	36,62
11	21,1	21,19	21,1	21,19
12	39,8	39,92	39,8	39,92
13	42,3	42,43	42,3	42,43
14	56,8	56,91	56,8	56,91
15	24,3	24,40	24,3	24,30
16	28,3	28,35	28,3	28,35
17	56,1	56,23	56,1	56,13
18	11,9	11,91	11,9	11,91
19	19,4	19,40	19,4	19,40
20	36,1	36,27	36,1	36,27
21	19,1	19,83	19,1	19,09
22	33,9	34,07	138,4	138,45
23	26,1	26,23	129,3	129,40
24	45,8	45,97	45,8	45,97
25	29,1	29,29	29,1	29,29
26	18,8	18,85	18,8	18,85
27	19,9	19,83	19,9	19,83
28	23,1	23,18	23,1	23,18
29	12,0	11,91	12,0	11,91

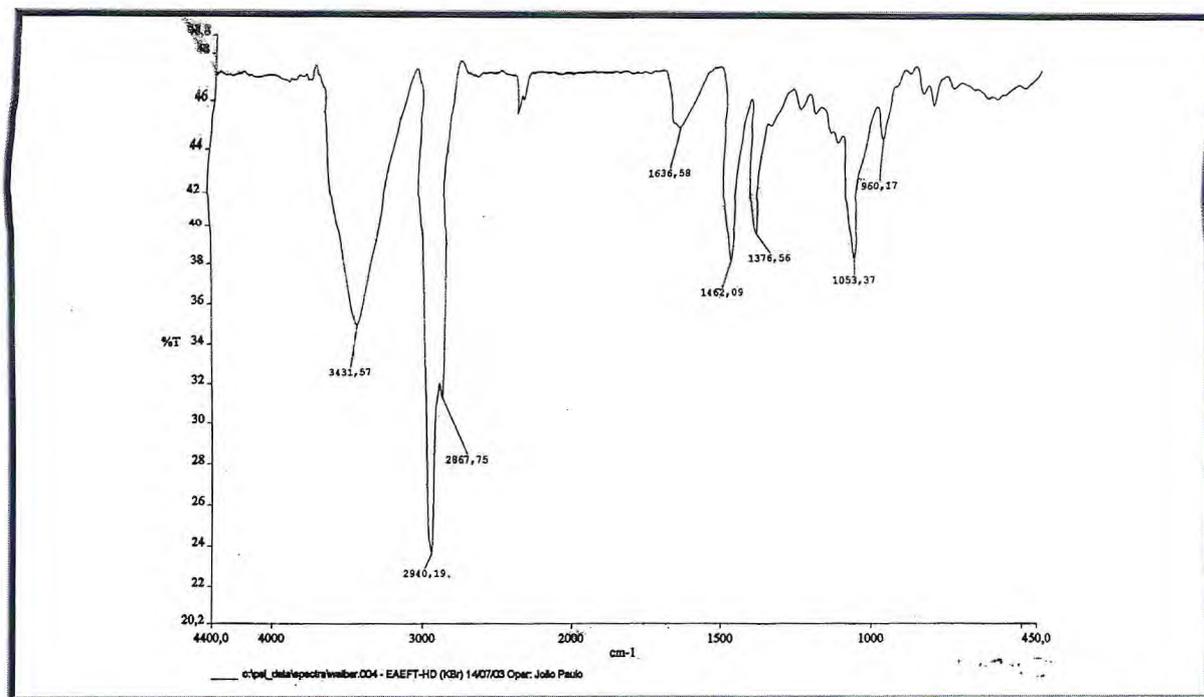


Figura 39 - Espectro de absorção na região do IV de TC-3

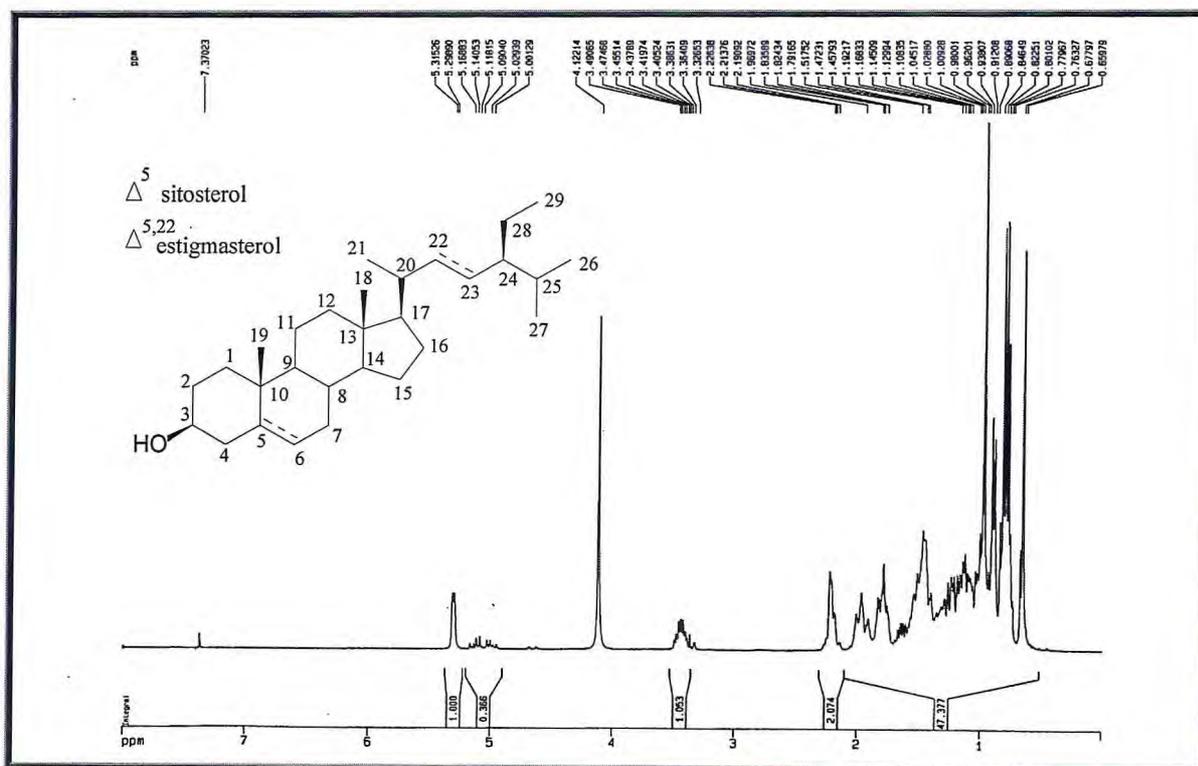


Figura 40 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de TC-3

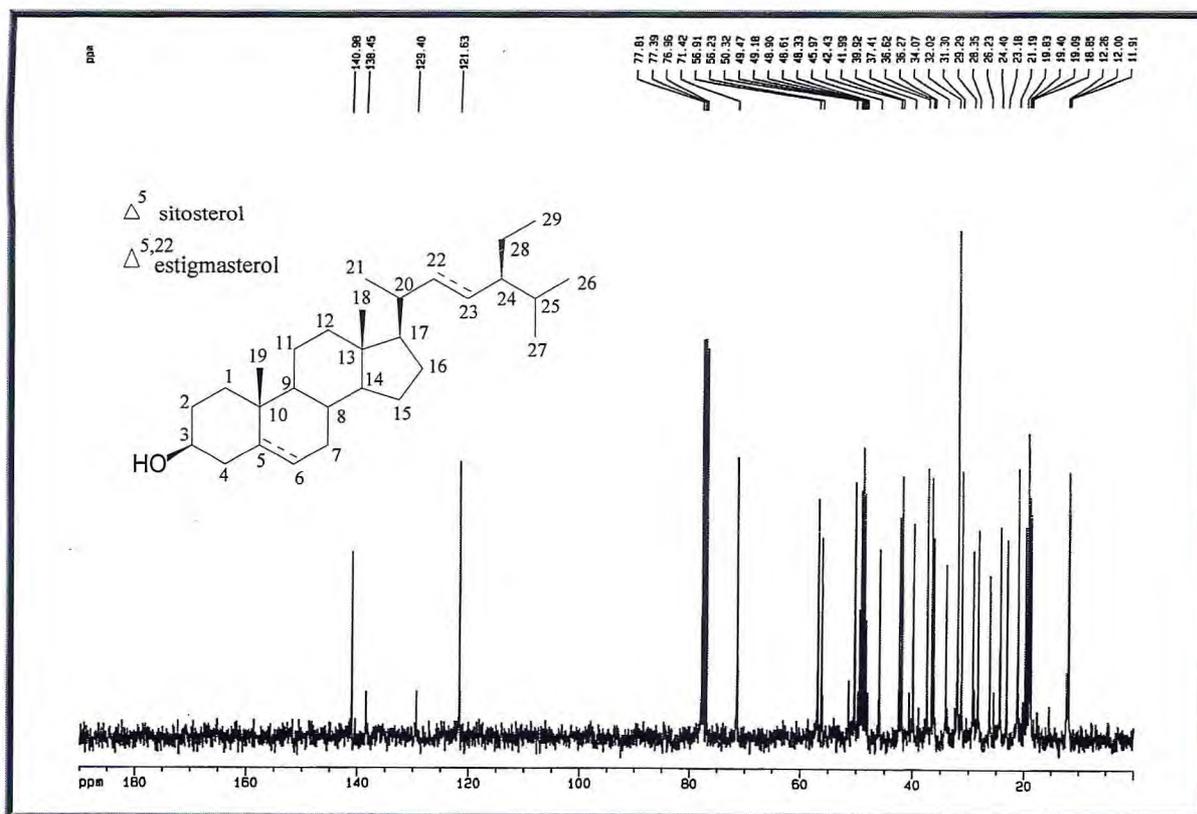


Figura 41 - Espectro de RMN ¹³C-HBBD (125 MHz, CDCl₃) de TC-3

3.2.4. Determinação Estrutural de TC-4

Fracionamento cromatográfico da fração diclorometânica do extrato acetato de etila das raízes de *T. cinerea* (TCRAE-D) (Item 5.5.3.2, p. 162) forneceu um sólido laranja, solúvel em clorofórmio, homogêneo em CCD, visível na luz U.V. (254 e 365 nm) e de coloração vermelha após pulverização com solução de vanilina e posterior aquecimento. A fração foi denominada TC-4 e apresentou ponto de fusão entre 177,1 – 179,9 °C.

Seu espectro de RMN ¹³C-HBBD (75 MHz, CDCl₃) (Figura 45, p. 54) revelou a presença de dezessete linhas espectrais, quatorze das quais estão centradas na região de carbono sp² e as demais na região de carbono sp³. Análise comparativa com espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° (Figura 46, p. 54) possibilitou distinguir os carbonos não hidrogenados (C), monohidrogenados (CH), metilênico (CH₂) e o metílico (CH₃), como a seguir: nove carbonos sp² não hidrogenados em δ 161,02, 155,11, 150,66, 147,90, 145,82 e 144,92, 119,35, 110,08 e 106,54; cinco carbonos sp² monohidrogenados em δ 121,11, 107,41, 102,67, 97,45 e 94,26; dois carbonos metilênicos em 101,58 e 65,65 e um carbono metoxílico em δ 55,61, possibilitando elaborar a Tabela 09 (p. 51).

De acordo com os deslocamentos químicos observados, relacionados com valores teóricos (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000), foi possível atribuir os sinais em δ 161,02, 155,11, 150,66, 147,90, 145,82 e 144,92 a carbonos sp² não hidrogenados e oxigenados; o sinal em δ 101,58 a carbono de grupamento metileno dióxido; o sinal em δ 65,65 a carbono metilênico oxigenado; e o sinal em δ 55,61 a carbono de grupamento metoxila localizado em posição estericamente desimpedida (CARVALHO e BRAZ-FLHO, 1993). Análise desses dados conduziu a uma fórmula molecular de C₁₇H₁₂O₅ para TC-4 e, portanto, índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 12.

Tabela 09 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) de TC-4 com padrão de Hidrogenação

C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
*161,02	121,11	*101,58	55,61	
*155,11	107,41	65,65		
*150,66	102,67			
*147,90	97,45			
*145,82	94,26			
*144,92				
119,35				
110,08				
106,54				
C ₉ O ₆	C ₅ H ₅	C ₂ H ₄ O	CH ₃ O	C ₁₇ H ₁₂ O ₅

*C-O

No espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura 43, p. 53) foi verificado um dubleto em δ 7,37 (1H, d, $J = 8,3$ Hz), um duplo dubleto em δ 6,54 (1H, dd, $J = 8,3$ e 2,3 Hz) e um outro dubleto em δ 6,50 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), indicando a presença de hidrogênios ligados a anel aromático com acoplamentos *orto*, *orto-meta* e *meta*, respectivamente. A presença de outro sistema aromático foi evidenciada através de mais dois sinais simples na região de hidrogênio ligado a carbono sp^2 em δ 7,02 (1H, s) e 6,73 (1H, s). O grupamento metileno dioxi também foi sugerido através do singlete em δ 6,00 (2H, s). O grupamento metilênico oxigenado foi confirmado no espectro de RMN ^1H , através do singlete em δ 5,52 (2H, s).

A análise dos espectros unidimensionais discutidos acima, obtenção do ponto de fusão e comparação com dados da literatura (DAGNE *et al.*, 1989) permitiram identificar TC-4 como sendo o pterocarpeno conhecido como flemichapparina B (**82**, Figura 42, p. 52). Esta substância foi isolada anteriormente de outras espécies de *Tephrosia* (RAJANI e SARMA, 1988).

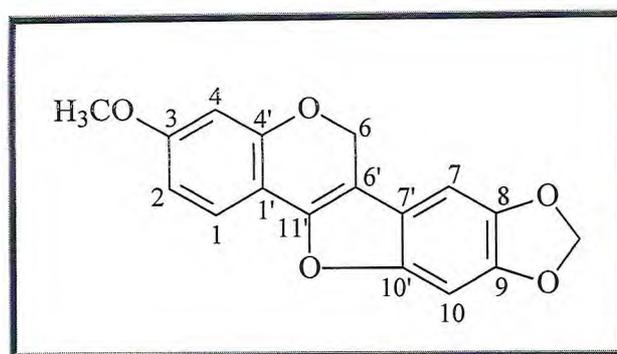


Figura 42 - Estrutura de flemichapparina B (82)
(3-metoxi-8,9-metilenodioxo-6',11'-desidropterocarpano)

Na Tabela 10 encontram-se listados os valores de RMN ^1H e ^{13}C -HBBD de TC-4 comparativos com os relatados na literatura para flemichapparina B (DAGNE *et al.*, 1989).

Tabela 10 - Dados espectroscópicos de TC-4 (CDCl_3) comparados com dados da literatura para flemichapparina B (DAGNE *et al.*, 1989)

C	δ_{H} (mult., J em Hz)		δ_{C}	
	flemichapparina-B	TC-4	flemichapparina-B	TC-4
1	7,37 (d; 8,2)	7,37 (d; 8,3)	120,7	121,11
2	6,53 (m)	6,54 (dd; 8,3;2,3)	107,1	107,41
3	--	--	160,7	161,02
4	6,53 (m)	6,50 (d; 2,3)	97,1	97,45
4'	--	--	154,8	155,11
6	5,52 (s)	5,52 (s)	65,3	65,65
6'	--	--	106,3	106,54
7'	--	--	119,0	119,35
7	7,02 (s)	7,02 (s)	102,4	102,67
8	--	--	145,6	145,82
9	--	--	144,8	144,92
10	6,73 (s)	6,73 (s)	93,9	94,26
10'	--	--	150,4	150,66
11'	--	--	147,6	147,90
1'	--	--	109,8	110,08
CH ₃ O-3	3,81 (s)	3,81 (s)	55,3	55,61
O-CH ₂ -O	6,00 (s)	6,00 (s)	101,3	101,58

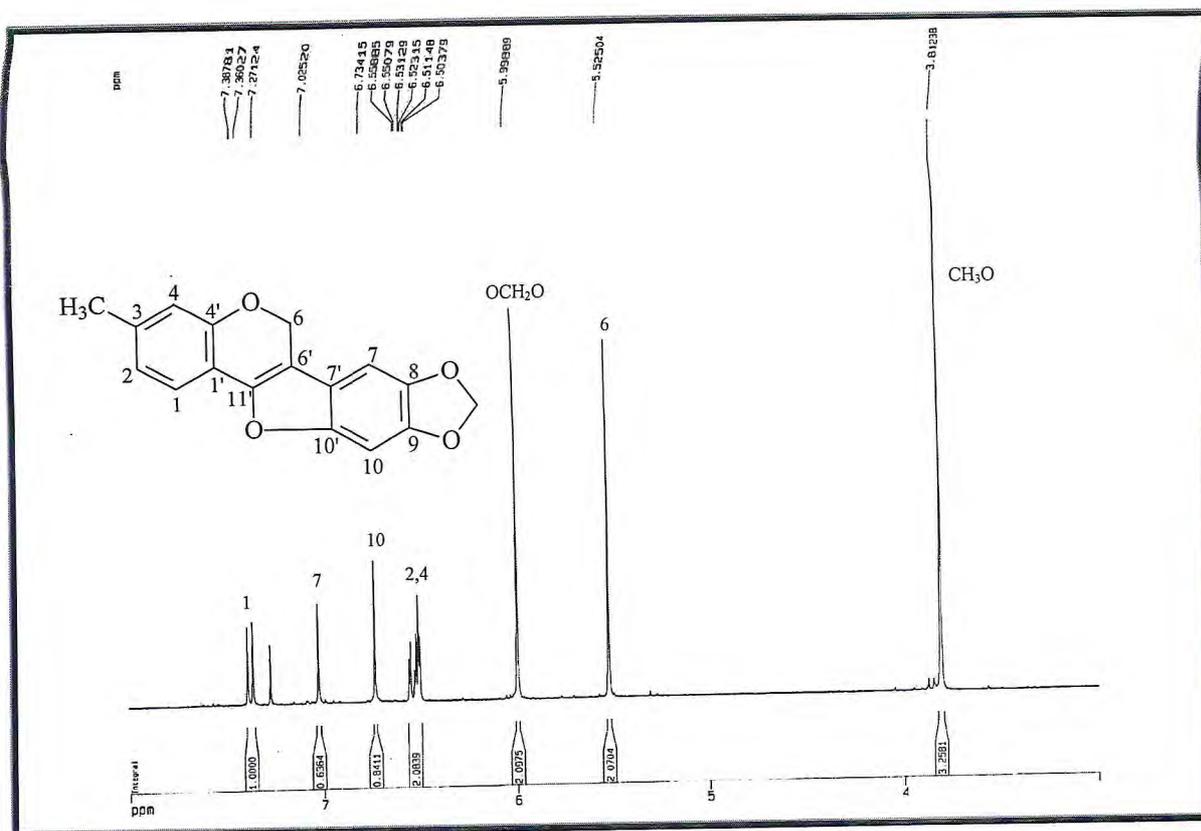


Figura 43 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de TC-4

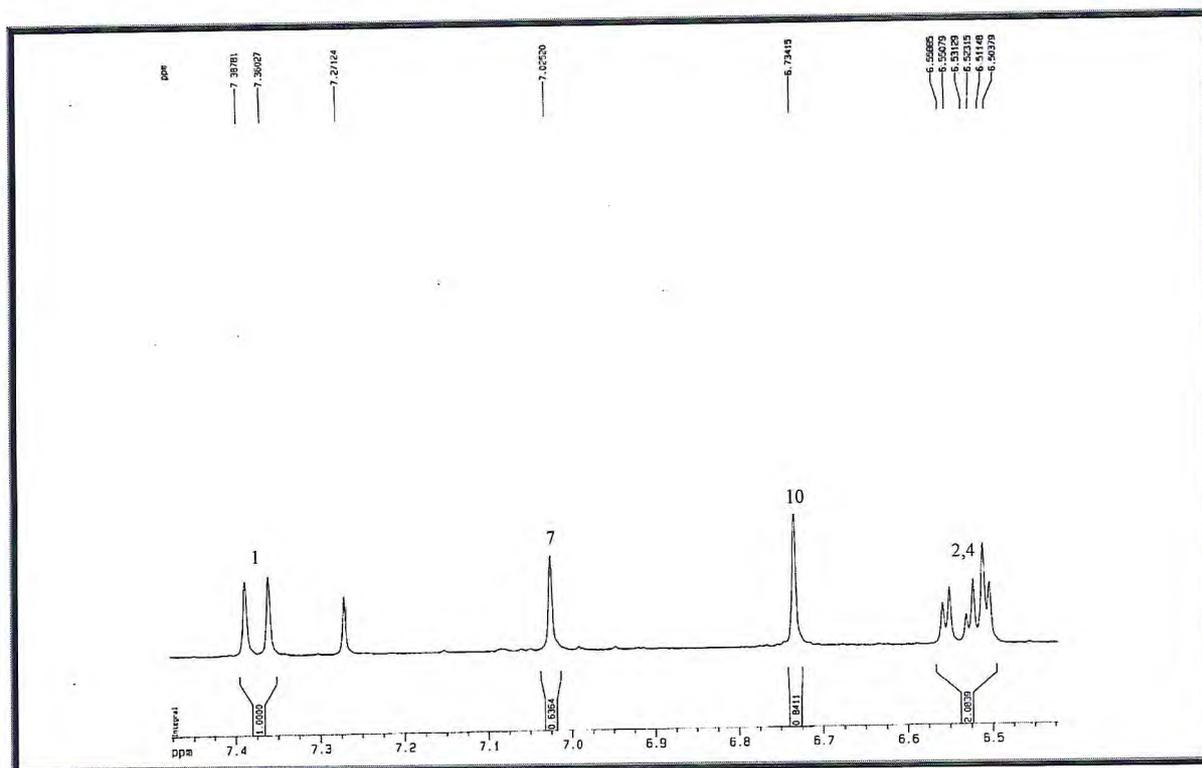


Figura 44 - Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de TC-4

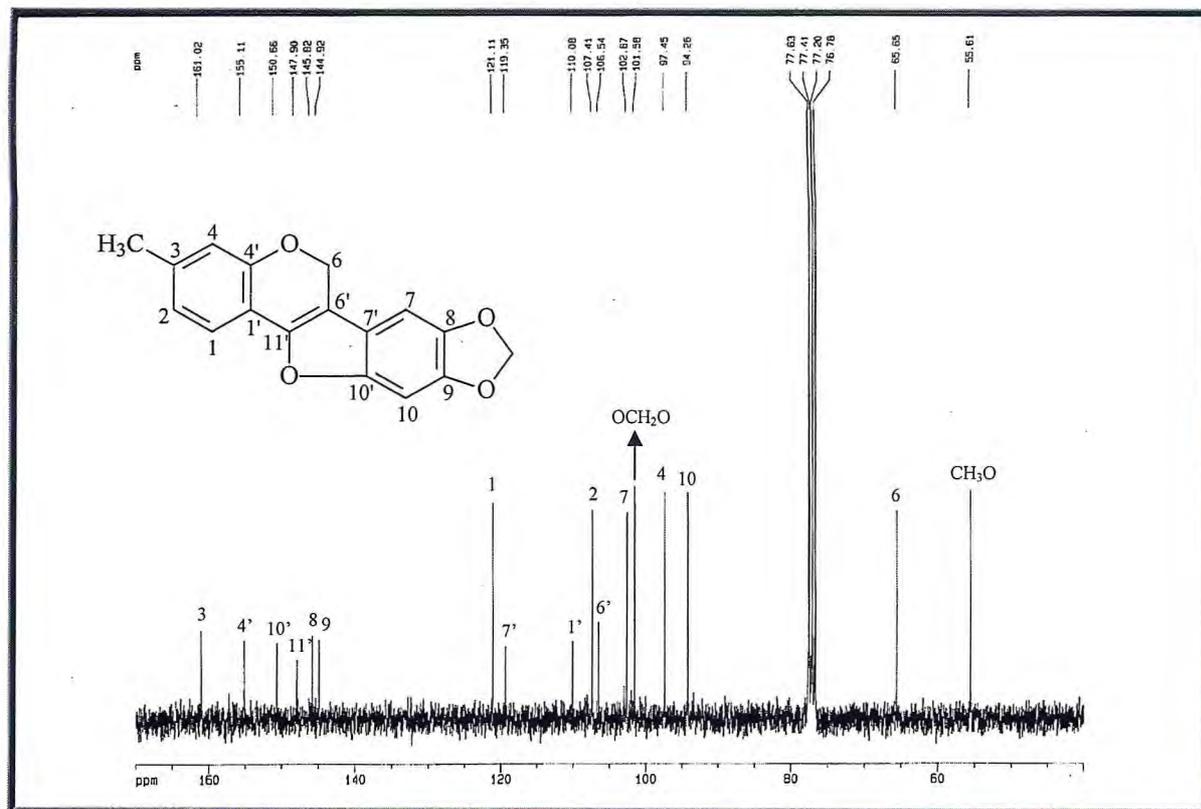


Figura 45 - Espectro de RMN ¹³C-HBBD (125 MHz, CDCl₃) de TC-4

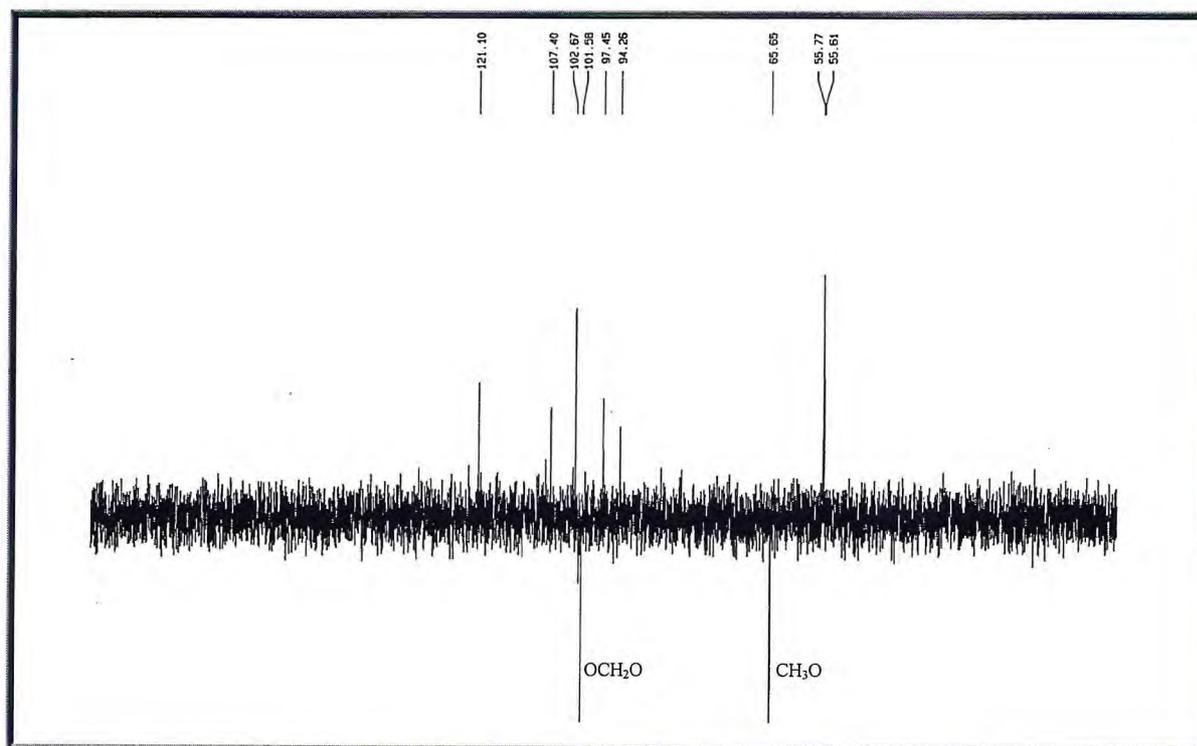


Figura 46 - Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl₃) de TC-4

3.2.5. Determinação Estrutural de TC-5

Tratamentos cromatográficos sucessivos em sílica gel da fração TCRAE-D (Item 5.5.3.2.1, p. 163), forneceram um sólido amarelado, amorfo, solúvel em clorofórmio, com ponto de fusão entre 90,0 e 92,2 °C, que foi denominado de TC-5. A substância, homogênea em CCD, apresentou fluorescência na luz U.V. (254 e 365 nm) e coloração azul após ser revelada com solução de vanilina. O seu espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EMIE) (Figura 51, p. 61) apresentou um em m/z 306 que pode ser atribuído ao M^+ de TC-5.

A análise do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 52 e 53, p. 62) revelou a presença de dois sinais simples em δ 1,44 (3H, s) e 1,48 (3H, s), os quais foram atribuídos a dois grupos metila. O sistema ABX característico de um núcleo flavanônico (Figura 47) foi evidenciado pelos sinais de hidrogênio observados como duplo dubleto em δ 5,48 (1H, $J_{AX} = 13,2$ Hz e $J_{BX} = 2,9$ Hz) que pôde ser atribuído ao hidrogênio ligado a C-2; os hidrogênios ligados ao C-3, correspondentes a um sistema AB foram vistos em δ 3,01 e 2,85 (2H, $J_{AB} = 16,8$ Hz, $J_{AX} = 13,2$ Hz e $J_{BX} = 2,9$ Hz). O alto valor da constante de acoplamento J_{AX} indica o acoplamento axial-axial de H-3 com o H-2 do carbono oxibenzílico (C-2).

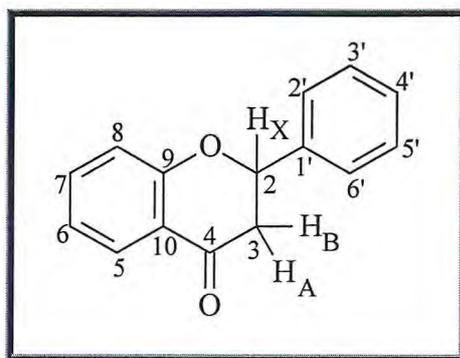


Figura 47 - Esqueleto flavanônico básico evidenciando os hidrogênios do sistema ABX

O espectro de RMN ^1H apresentou também dois dubletos em δ 5,58 (1H, d, $J = 10,0$ Hz) e 6,66 (1H, d, $J = 10,0$ Hz), referentes a hidrogênios olefínicos que acoplam entre si em posição cis que, associados a presença dos grupamentos metila mencionados anteriormente, sugeriram a presença de um sistema 2'',2''-dimetilcromeno na estrutura de TC-5, estando de acordo com a ocorrência de flavonóides prenilados na família Leguminosae (RAO, et al., 1985'). Foram evidenciados ainda dois dubletos em δ 6,52

(1H, d, $J = 8,8$ Hz) e 7,75 (1H, d, $J = 8,8$ Hz) referentes a hidrogênios ligados a anel aromático em posição orto; além de multipletos entre δ 7,40 e 7,50 (5H, m), os quais foram relacionados a hidrogênios ligados a anel aromático monossustituído.

O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (BB ^1H D) (125 MHz, CDCl_3) (Figura 54 e 55, p. 63) e a comparação com o espectro bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação (^1H , ^{13}C – HSQC) (Figura 56 e 57, p. 62), permitiram atribuir o padrão de hidrogenação de cada carbono. Assim, foram detectados sete carbonos não hidrogenados, cujos deslocamentos químicos apontaram que três são oxigenados, um sp^3 (δ 77,79) e dois sp^2 (δ 159,90 e 190,81), sendo o mais desprotegido referente a uma carbonila; onze carbonos monohidrogenados sendo um com hibridação sp^3 e dez com hibridação sp^2 , um carbono metilênico (δ 44,58) e dois metílicos (δ 28,33 e 28,64).

O espectro HSQC permitiu também associar os sinais de hidrogênios em δ 2,85 (1H, dd, $J = 13,2$ e 16,8 Hz) e 3,01 (1H, dd, $J = 13,2$ e 16,8 Hz) ao sinal de carbono em δ 44,58, indicando tratar-se de hidrogênios diastereotópicos, corroborando para o sistema flavanônico.

A presença de dois hidrogênios olefínicos acoplando entre si em posição cis em δ 5,58 (1H, d, $J = 10,0$ Hz) e 6,66 (1H, d, $J = 10,0$ Hz) observados no espectro de RMN ^1H , com sua correlação com os sinais de carbono em δ 28,33; 28,44; 77,79; 116,12 e 129,11, confirmaram a presença de um sistema 2'',2''-dimetilcromeno (Figura 48, p. 56), como substituinte do composto em questão. No diagrama de contorno do espectro de HSQC observou-se a associação dos hidrogênios em δ 5,58 (1H, d, $J = 10,0$ Hz) e 6,66 (1H, $J = 10,0$ Hz) com os carbonos em δ 129,11 e 116,12, respectivamente; além do acoplamento desses hidrogênios olefínicos com o carbono não hidrogenado e oxigenado em δ 77,79, observados no espectro bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C – HMBC) (Figura 59 e 60, p. 65).

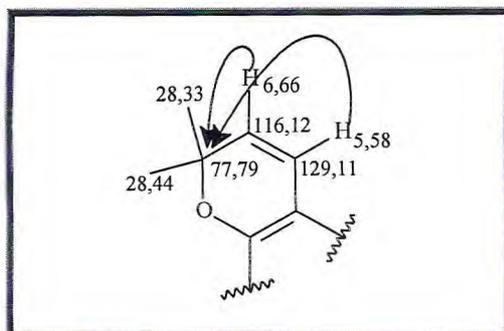
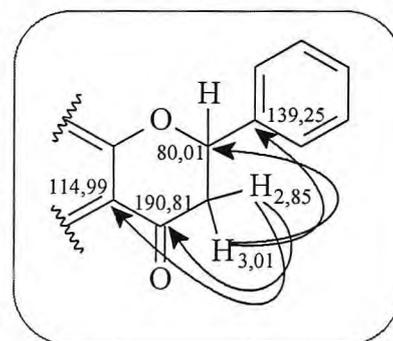
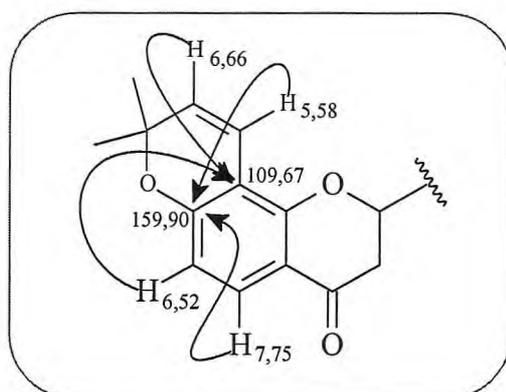


Figura 48 - Sistema 2",2"-dimetilcromeno, evidenciando o acoplamento dos hidrogênios olefinicos com o carbono C-2"

Os acoplamentos dos hidrogênios do sistema ABX observados no espectro de HMBC foram importantes na elucidação estrutural de TC-5. Foram observadas correlações entre o hidrogênio em δ 2,85 (dd; $J = 2,9$ e $16,8$ Hz) com os carbonos centrados em δ 114,99 ($^3J_{CH}$) e 190,81 ($^2J_{CH}$), e, do hidrogênio em δ 3,01 (dd; $J = 13,2$ e $16,8$ Hz) com os carbonos em δ 80,01 ($^2J_{CH}$), 114,99 ($^3J_{CH}$) e 139,25 ($^3J_{CH}$), sugerindo a estrutura de uma flavanona para TC-5.



A análise do diagrama de contorno do espectro de HMBC, também permitiu determinar a posição do grupamento 2",2"-dimetilcromeno na estrutura de TC-5, e observou-se acoplamentos dos hidrogênios em δ 6,66 (1H, d, $J = 10$ Hz) e 7,75 (1H, d, $J = 8,8$ Hz) com o carbono em δ 159,9 ($^3J_{CH}$) e 158,00 ($^3J_{CH}$) e dos hidrogênios em δ 6,52 (1H, d, $J = 8,8$ Hz) e 5,58 (1H, d, $J = 10$ Hz) com o carbono em δ 109,67.



A análise de todos os dados obtidos, além da comparação com dados da literatura, permitiu identificar TC-5 como sendo a isolonchocarpina (**83**) (Figura 49), isolada anteriormente de *Tephrosia purpurea* (RAO e RAJU, 1979).

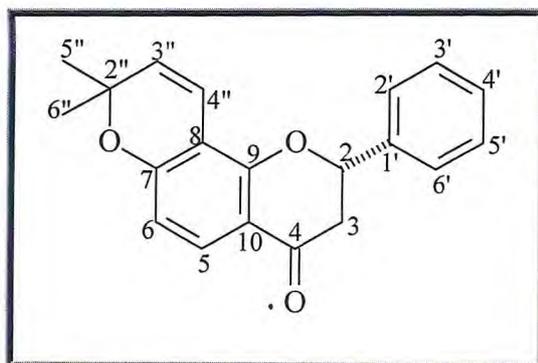


Figura 49 - Estrutura de isolonchocarpina (**83**)
(2'',2''-dimetilcromeno [7,8:5'',6'']-flavanona)

A estereoquímica relativa do carbono C-2 e a orientação α do grupo fenila ligado a este carbono foi assegurada através da análise dos valores das constantes de acoplamento do hidrogênio do carbono C-2 com os hidrogênios do carbono C-3. As constantes de acoplamento (J) calculadas para H-2 foram 2,9 e 13,2 Hz. Esses valores são compatíveis com acoplamentos do tipo axial-equatorial e axial-axial, respectivamente, indicando assim que H-2 deve estar em uma posição pseudo-axial no anel B, como ilustrado na Figura 50.

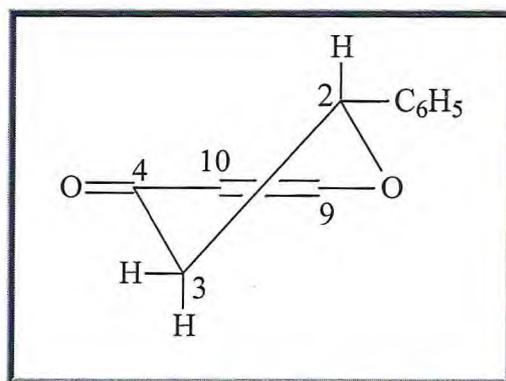


Figura 50 - Representação da conformação do anel B de TC-5

Tabela 11 - Dados espectroscópicos de TC-5 (CDCl₃) comparados com dados da literatura para isolonchocarpina (RAO *et al.*, 1979)

C	δ_H (mult., J em Hz)		δ_C	HMBC	
	isolonchocarpina	TC-5		$^2J_{C-H}$	$^3J_{C-H}$
2	5,48 (q)	5,48 (dd; 13,2;2,9)	80,01	H-3	H-2'/H-6'
3	2,84-3,04 (m)	2,85 (dd; 2,9;16,8) 3,01 (dd; 13,2;16,9)	44,58	--	--
4	--	--	190,81	H-3	H-5
5	7,75 (d; 8,0)	7,75 (d; 8,8)	128,16	--	--
6	6,50 (d; 8,0)	6,52 (d; 8,8)	111,44	--	--
7	--	--	159,90	H-6	H-5/H-7'
8	--	--	109,67	--	H-6/H-3'
9	--	--	158,00	--	H-5/H-4'
10	--	--	114,99	--	H-3/H-6
1'	--	--	139,25	--	H-3/H-3'/H-5'
2',6'	7,30-7,54 (m)	7,50-7,46 (m)	126,23	--	H-2
3',5'	7,30-7,54 (m)	7,46-7,44 (m)	129,01	--	--
4'	7,30-7,54 (m)	7,44-7,40 (m)	128,83	--	H-2'
2''	--	--	77,79	H-3''/3H-5''/3H-6''	--
3''	5,57 (d; 10,5)	5,58 (d; 10,0)	129,11	--	--
4''	6,67 (d; 10,5)	6,66 (d; 10,0)	116,12	--	--
5''	1,50 (s)	1,48 (s)	28,64	--	--
6''	1,50 (s)	1,46 (s)	28,33	--	--

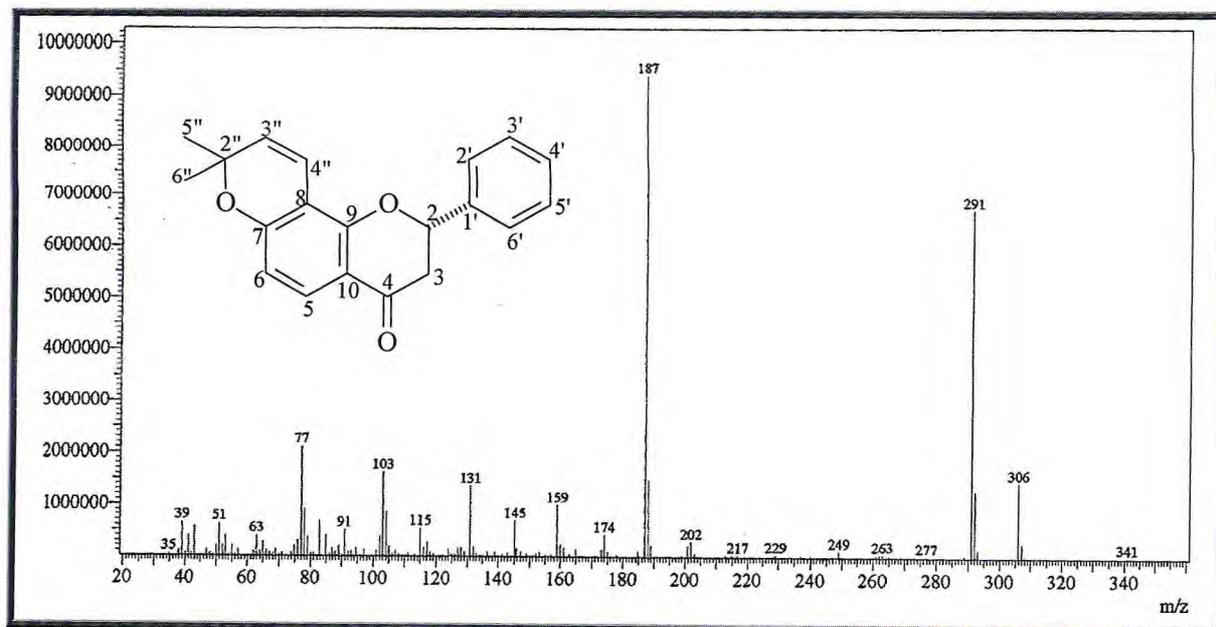


Figura 51 - Espectro de massas de TC-5 (IE, 70eV)

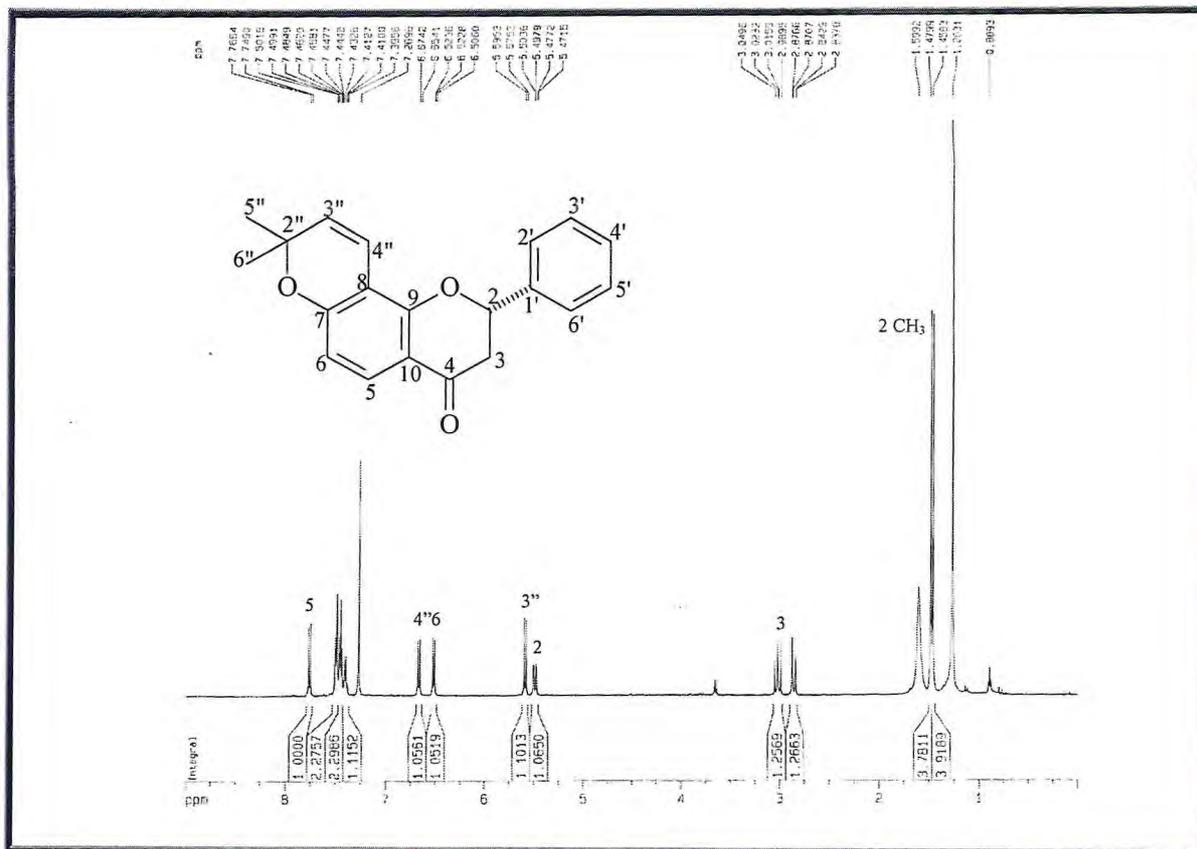


Figura 52 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-5

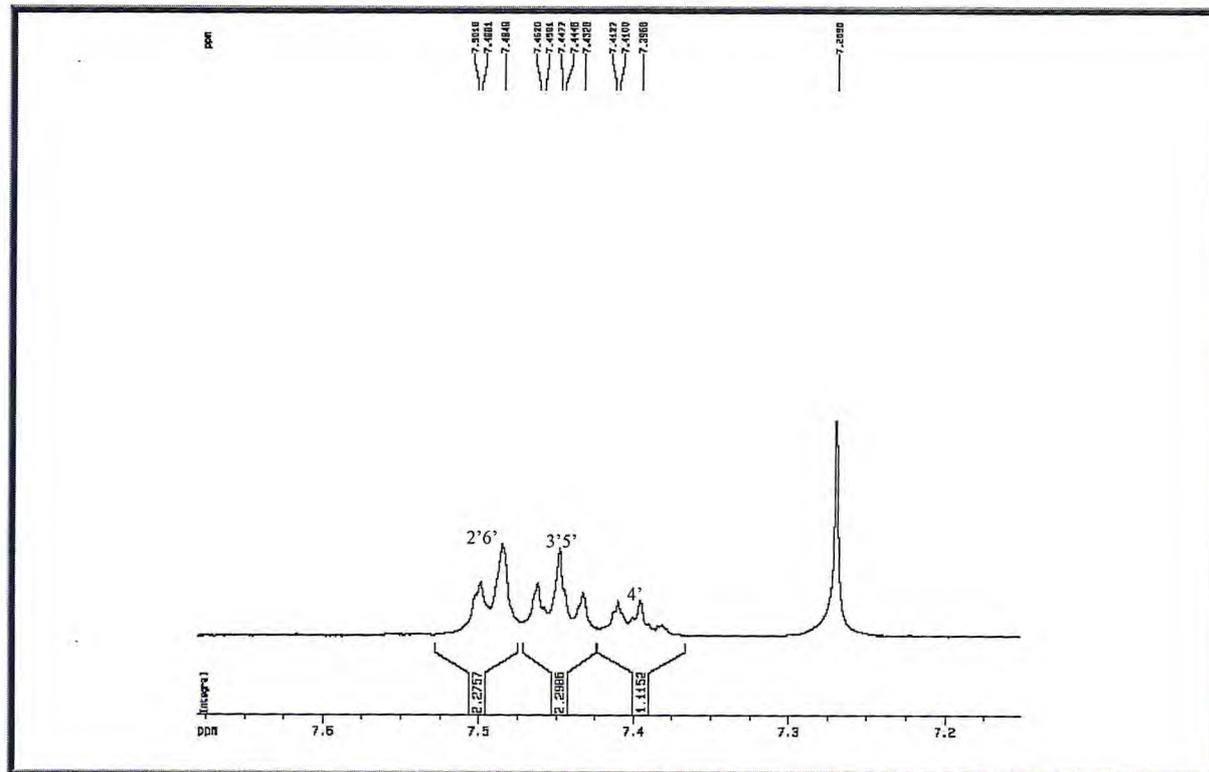


Figura 53 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-5

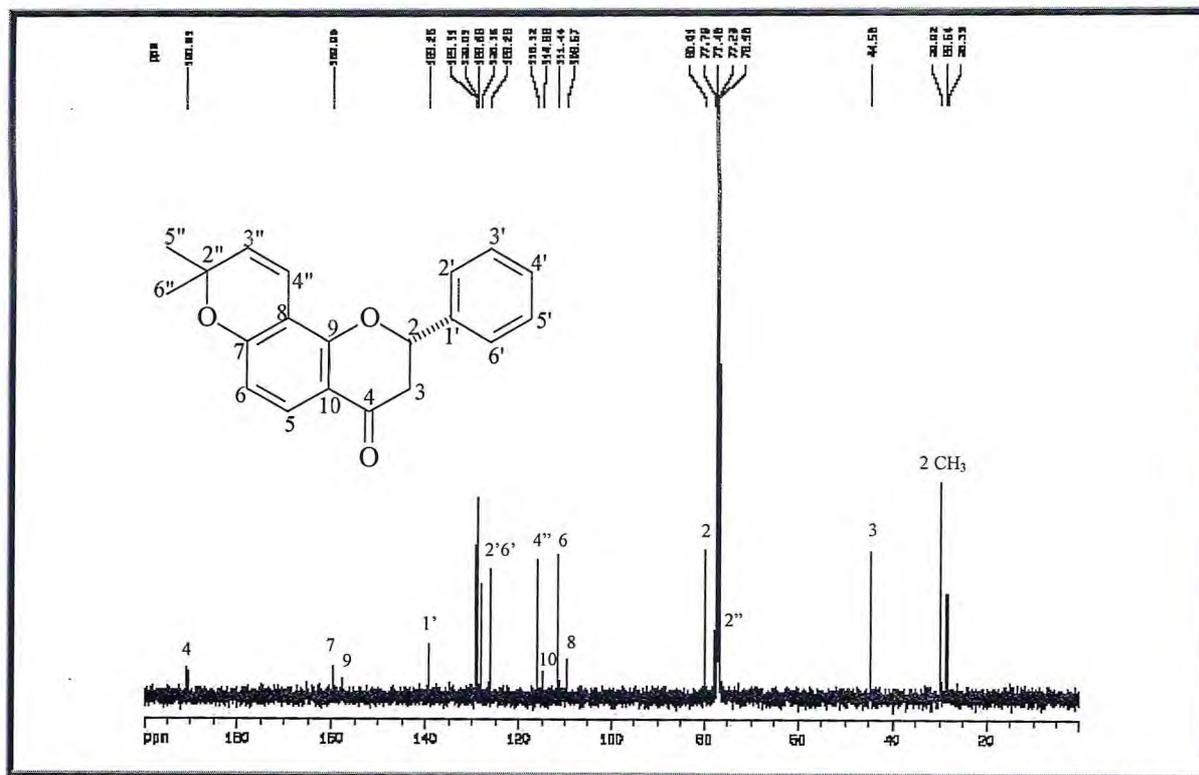


Figura 54 - Espectro de RMN ¹³C-HBBD (125 MHz, CDCl₃) de TC-5

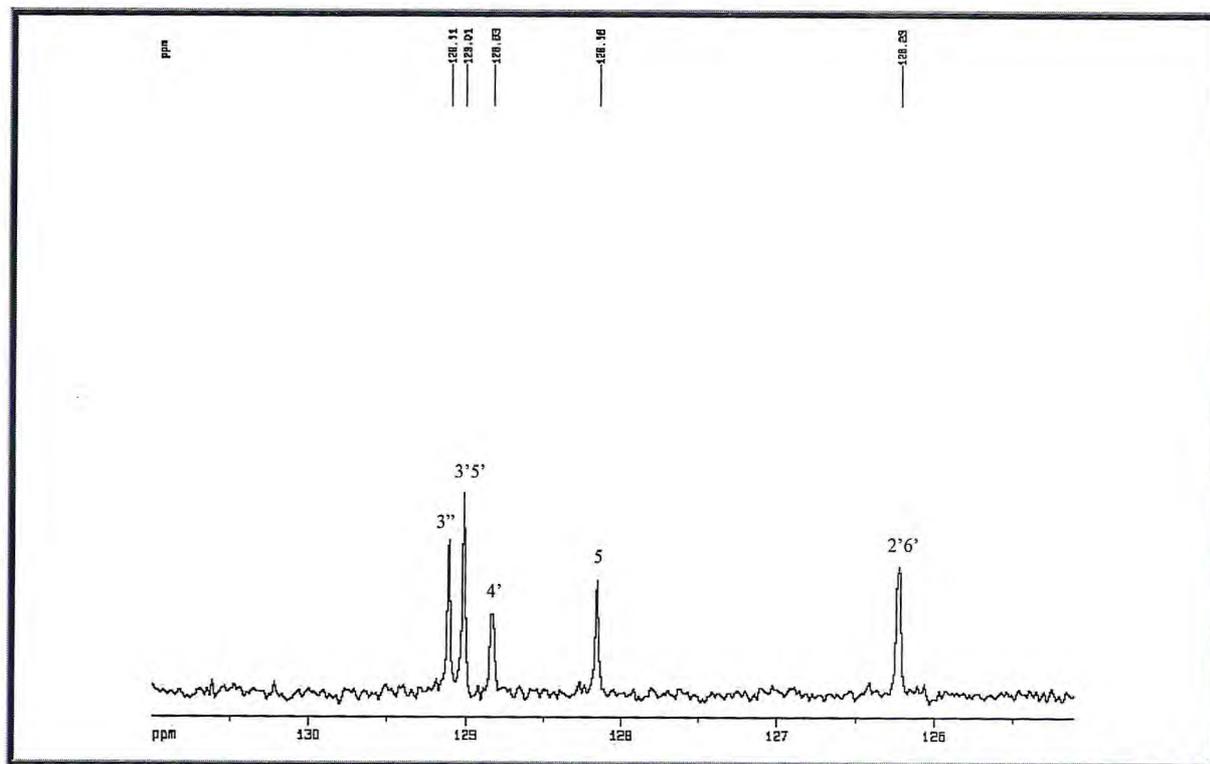


Figura 55 - Expansão do espectro de RMN ¹³C-HBBD (125 MHz, CDCl₃) de TC-5

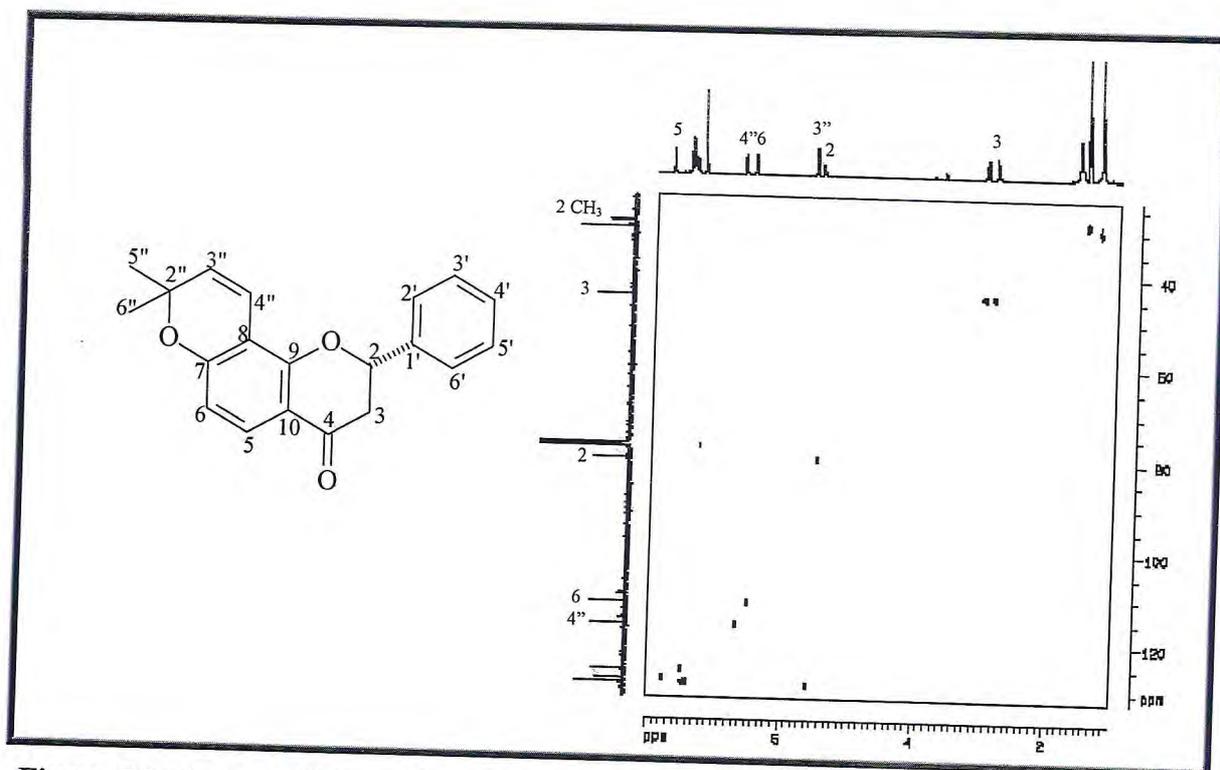


Figura 56 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-5

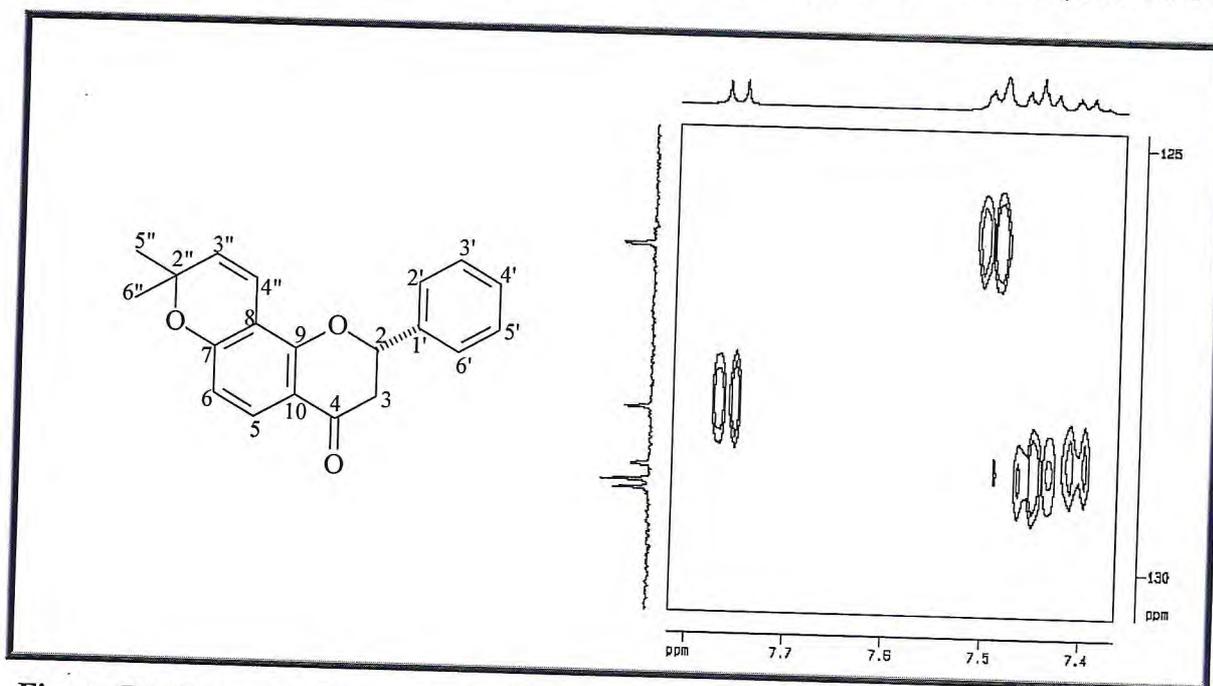


Figura 57 - Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-5

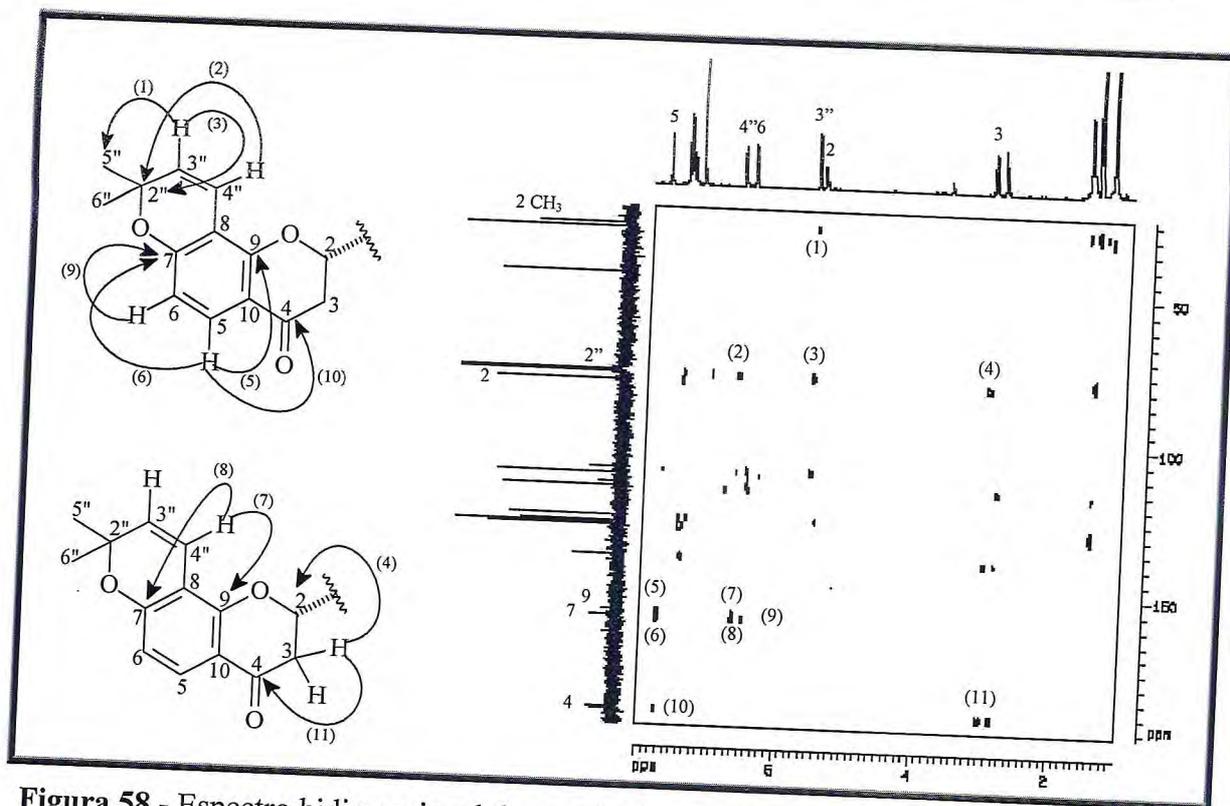


Figura 58 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HMBC de TC-5

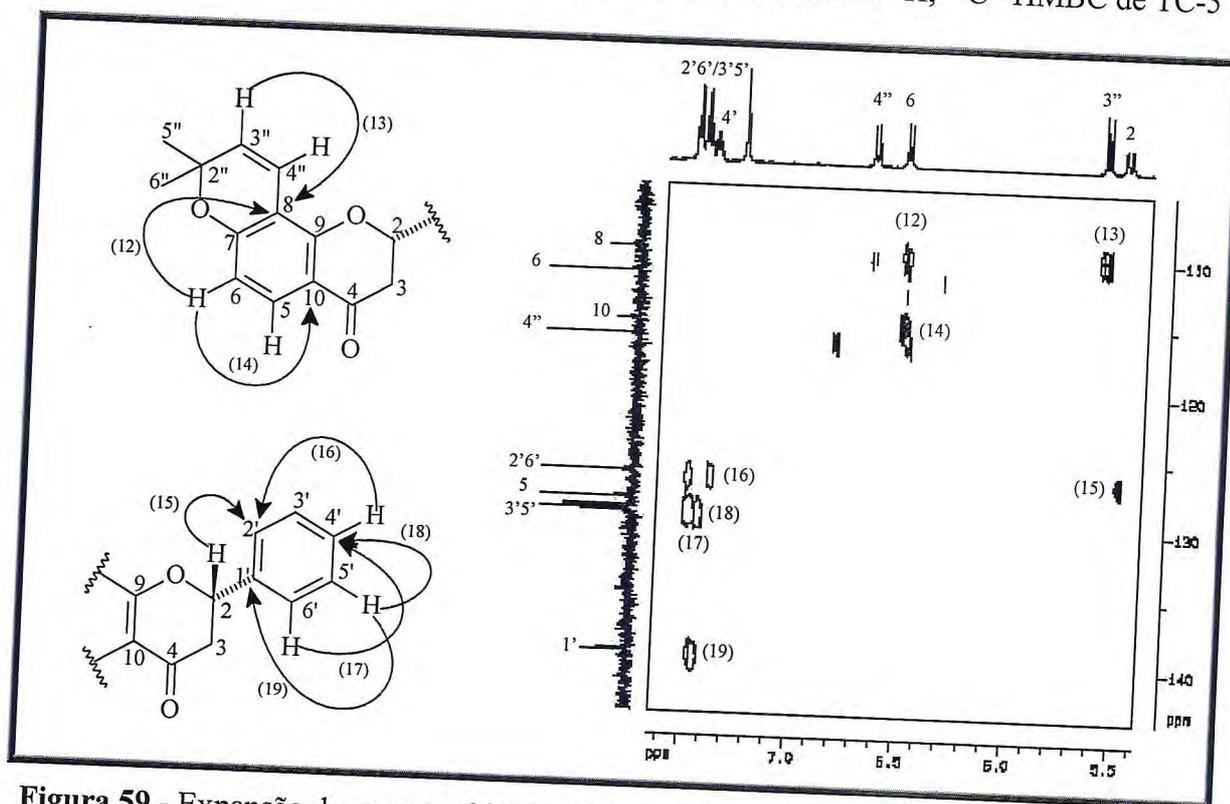


Figura 59 - Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HMBC de TC-5

3.2.6. Determinação Estrutural de TC-6

A fração TCRAE-D (7-8) obtida do fracionamento cromatográfico da fração diclorometânica do extrato acetato de etila das raízes de *T. cinerea* (Item 5.5.3.2.2, p. 164), forneceu um sólido amorfo amarelo, solúvel em clorofórmio, uniforme em CCD, visível na luz U.V. (254 e 365 nm), apresentando coloração laranja após pulverização com solução de vanilina e posterior aquecimento. O sólido foi denominado de TC-6 e apresentou ponto de fusão entre 180,9 e 183,3 °C.

Análise dos dados de RMN ^{13}C -HBB (125 MHz, CDCl_3) (Figura 65, p. 74) permitiu evidenciar a presença de vinte e duas linhas, das quais doze foram associadas a carbonos de sistema aromático. A análise comparativa com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 66, p. 75) permitiu identificar quinze carbonos sp^2 , sendo nove não hidrogenados, quatro monohidrogenados e um dihidrogenado; e, sete carbonos sp^3 , sendo três metínicos, dois metilênicos e três metílicos. Baseado na teoria do deslocamento químico (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000) foi possível detectar a presença da carbonila através do sinal em δ 189,17 e também associar os sinais em δ 56,08 e 56,57 a duas metoxilas, e, o sinal em δ 17,34 a um grupamento metila. Além das metoxilas, mais oito sinais observados foram inferidos a carbonos oxigenados. Destes, cinco são sp^2 não hidrogenados em δ 167,61, 158,17, 147,63 144,15 e 149,00; dois metínicos em δ 88,07 e 72,47 e um metilênico em δ 66,51.

A análise do espectro de RMN ^1H de TC-6 (500 MHz, CDCl_3) (Figura 64, p. 74) apresentou dois dubletos em δ 6,51 (1H, d, $J = 8,6$ Hz) e 7,84 (1H, d, $J = 8,6$ Hz) característicos de hidrogênios ligados a anel aromático com acoplamento *orto* e dois singletos em δ 6,78 (1H, s) e 6,46 (1H, s) relativos a hidrogênios também ligados ao mesmo tipo de anel, sugerindo assim a presença de dois anéis aromáticos tetrassubstituídos.

Os sinais em δ 1,77 (3H, s), 3,77 (3H, s) e 3,81 (3H, s), ainda observados no referido espectro e correlacionados aos sinais de carbono em δ 17,34, 56,57 e 56,08 no espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação (^1H , ^{13}C – HSQC) (Figura 68, p. 76), confirmaram a presença de uma metila e duas metoxilas, respectivamente. A correlação do hidrogênio centrado em δ 5,08 (1H, s) e de um dos hidrogênios em δ 4,94 (2H, m) com o carbono em δ 112,76 evidenciou a presença de carbono vinílico terminal.

Dois grupamentos metilênicos também foram confirmados através das correlações dos hidrogênios em δ 2,96 (1H; dd; $J = 15,8$ e $8,8$ Hz) e 3,33 (1H; dd; $J = 15,8$ e $9,8$ Hz) com o carbono em δ 31,52, e, dos hidrogênios em δ 4,19 (1H; d; $J = 12,0$ Hz) e 4,61 (1H; d; $J = 12,0$ e $3,0$ Hz) com o carbono em δ 66,51, no espectro de HSQC.

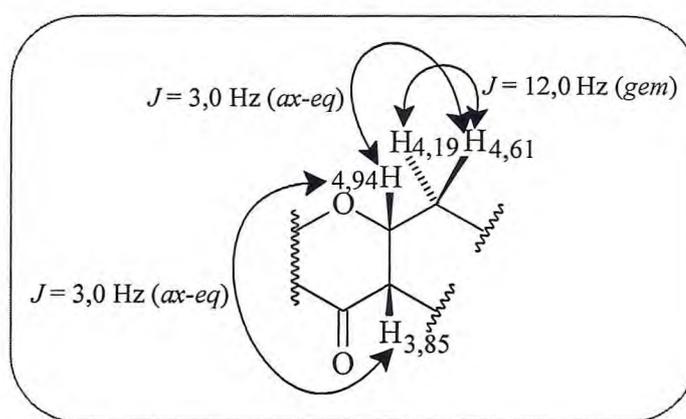
A análise de todos os dados permitiu sugerir para TC-6 a fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$, cujo índice de deficiência de hidrogênio é igual a 13 (Tabela 12). O seu espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EMIE) (Figura 63, p.73) apresentou um pico em m/z 394 que pode ser atribuído ao M^+ de TC-6.

Tabela 12 - Valores de deslocamento químico (δ) dos carbonos de TC-9 com padrão de hidrogenação

C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
*189,17	130,22	112,76	*56,57	
*167,61	110,70	66,51	*56,08	
*158,17	105,12	31,52	17,36	
*149,00	101,18			
*147,63	*88,07			
*144,15	*72,47			
143,27	44,85			
113,58				
113,19				
105,12				
C_{10}O_6	C_7H_7	C_3H_6	C_3H_9	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$

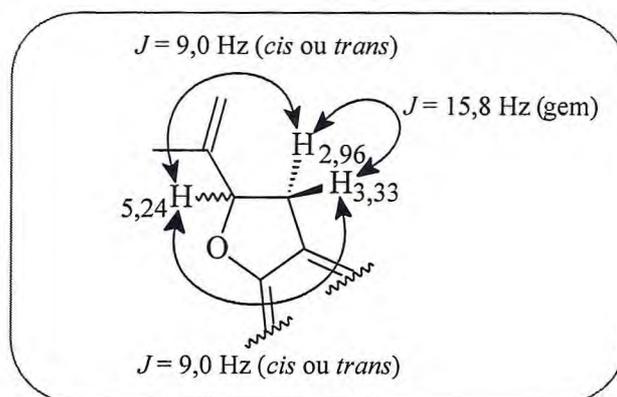
*C-O; **C=O

No espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (Figura 67, p. 75), foi possível observar acoplamento do hidrogênio centrado em δ 4,19 (1H; d; $J = 12,0$ Hz) com o hidrogênio em δ 4,61 (1H; d; $J = 12,0$ e $3,0$ Hz), cujo valor da constante de acoplamento ($J = 12,0$ Hz), e corroborado pela associação destes hidrogênios a um único carbono no espectro de HSQC, caracterizam um acoplamento geminal. Observou-se também acoplamento do hidrogênio em δ 4,94 (1H, t, $J = 3,0$ Hz) com os hidrogênios em 3,85 (1H, d; $J = 3,0$ Hz) e 4,61 (1H; d; $J = 12,0$ e $3,0$ Hz). O valor da constante de acoplamento ($J = 3,0$ Hz) caracteriza um acoplamento axial-equatorial entre eles. Essas informações sugeriram a presença do **Sistema-1** na estrutura de TC-6.



Sistema-1

Foi possível observar ainda neste diagrama de contorno do espectro COSY a correlação do hidrogênio em δ 2,96 (1H; dd; $J = 15,8$ e $8,8$ Hz) com o hidrogênio em δ 3,33 (1H; dd; $J = 15,8$ e $9,8$ Hz), caracterizando outro acoplamento geminal. Observou-se também o acoplamento destes com o hidrogênio em 5,24 (1H, t, $J = 9,0$ Hz), como ilustrado no **Sistema-2**.



Sistema-2

A análise dos dados espectrais descritos até o momento permitiu sugerir a estrutura de um rotenóide (Figura 60) para TC-6, classe de substância comumente encontrada em espécies do gênero *Tephrosia* (ANDREI *et al.*, 1997).

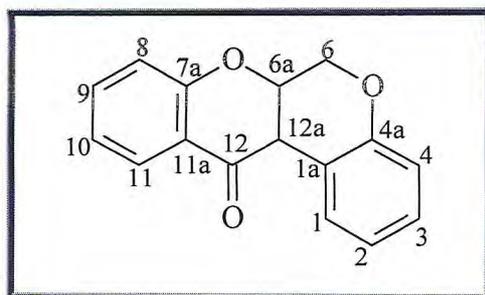
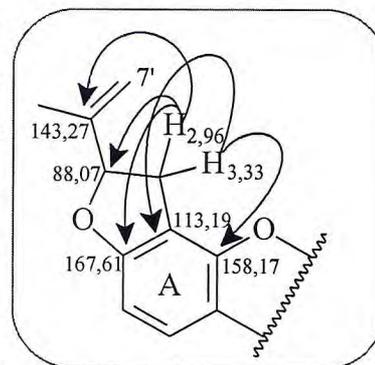


Figura 60 - Esqueleto básico dos rotenóides

A análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C – HMBC), (Figuras 69-72, p. 76-78) nos levou a observar acoplamentos entre os hidrogênios metilênicos do **Sistema-2** em δ 2,96 (1H; dd; $J = 15,8$ e $9,8$ Hz) e 3,33 (1H; dd; $J = 15,8$ e $9,8$ Hz) com os carbonos em δ 88,07 ($^2J_{\text{CH}}$), 113,19 ($^2J_{\text{CH}}$), 143,27 ($^3J_{\text{CH}}$) 158,17 ($^3J_{\text{CH}}$) e 167,61 ($^3J_{\text{CH}}$). Tais acoplamentos sugeriram a presença de um anel isoprenilfurânico condensado ao anel A do rotenóide, como ilustrado ao lado.



Foram observados ainda no espectro de HMBC as correlações observadas entre o hidrogênio em δ 6,51 (1H, d, $J = 8,6$ Hz) e os carbonos em δ 113,19 ($^3J_{\text{CH}}$), 113,58 ($^3J_{\text{CH}}$), e 167,61 ($^2J_{\text{CH}}$); do hidrogênio em δ 7,84 (1H, d, $J = 8,6$ Hz) e os carbonos em δ 113,58 ($^2J_{\text{CH}}$), 158,17 ($^3J_{\text{CH}}$) e 189,17 ($^3J_{\text{CH}}$). O hidrogênio em δ 1,78 (3H, s) também acopla com o carbono em δ 88,07 ($^3J_{\text{CH}}$) e 143,27 ($^2J_{\text{CH}}$), acoplado ainda com o carbono em δ 112,76 ($^3J_{\text{CH}}$). Estas informações permitiram montar parte da estrutura de TC-6, representada na Figura 61, p. 70.

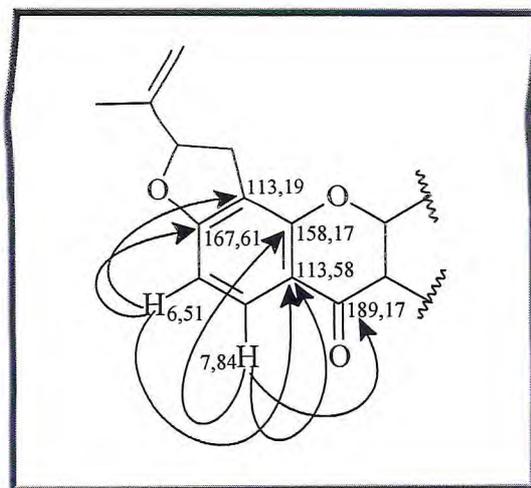
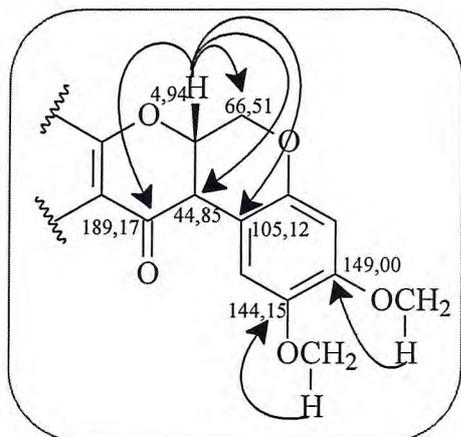
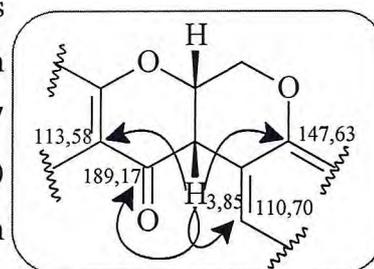


Figura 61 - Subestrutura sugerida para TC-6

Ainda no espectro de HMBC foram observados acoplamentos do hidrogênio metínico do **Sistema-1** em δ 3,85 (1H, d, $J = 3,0$ Hz) com os carbonos em δ 189,17 ($^2J_{CH}$), 105,12 ($^2J_{CH}$), 113,58 ($^3J_{CH}$), 147,63 ($^3J_{CH}$) e 110,70 ($^3J_{CH}$); e do outro hidrogênio metínico do **Sistema-1** em



δ 4,94 (1H, d, $J = 3,0$ Hz) com os carbonos em δ 189,17 ($^3J_{CH}$), 105,12 ($^3J_{CH}$), 66,51 ($^2J_{CH}$) e 44,85 ($^2J_{CH}$), o que corroborou para a elucidação da outra parte da molécula de TC-6. A posição das metoxilas foi determinada através do acoplamento dos hidrogênios em δ 3,77 (3H, s) com o carbono em δ 56,57 ($^3J_{CH}$) e dos hidrogênios em δ 3,82 (3H, s) com o carbono em δ 56,08 ($^3J_{CH}$).

A análise dos dados, aliada a comparação com dados da literatura (ANDREI *et al.*, 2002), permitiu identificar TC-6 como sendo a rotenona (**84**, Figura 62), substância isolada anteriormente de *T. candida*.

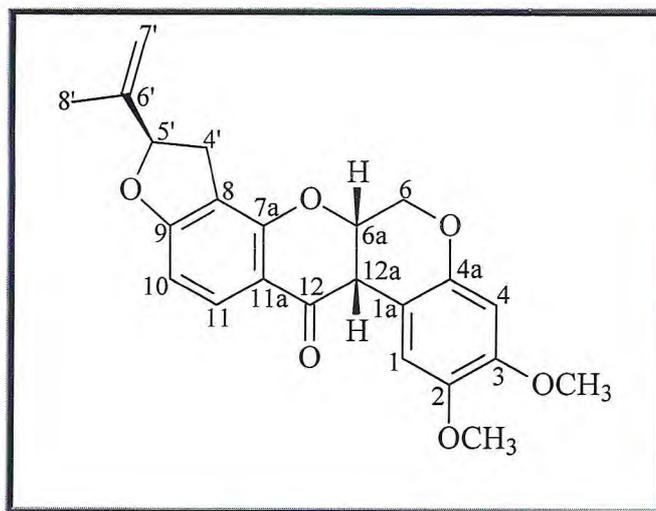


Figura 62 - Estrutura da rotenona (84)

Tabela 13 - Dados espectroscópicos de TC-6 (CDCl₃) comparados com dados da literatura para rotenona (ANDREI *et al.*, 2002)

C	δ_H (mult., J em Hz)		δ_C		HMBC	
	rotenona	TC-6	rotenona	TC-6	$^2J_{C-H}$	$^3J_{C-H}$
1a	--	--	104,7	105,12	H-12a/H-1	H-6a/H-4
1	6,77 (s)	6,78 (s)	110,4	110,70	--	H-12a
2	--	--	143,9	144,15	H-1	H-4/MeO-2
3	--	--	149,5	149,00	H-4	H-1/MeO-3
4	6,46 (s)	6,46 (s)	100,9	101,18	--	--
4a	--	--	147,4	147,63	H-4	H-6/H-1/H-12a
6	4,19 (d; 12) 4,62 (dd; 12,0;3,0)	4,19 (d; 12,0) 4,61 (dd; 12,0;3,0)	66,3	66,51	H-6a	--
6a	--	4,94 (s)	72,2	72,47	--	H-6
7a	--	--	156,1	158,17	--	H-4'/H-11
8	--	--	113,0	113,19	--	H-10
9	--	--	167,4	167,61	H-10	H-4'
10	6,52 (d; 8,6)	6,51 (d; 8,6)	104,7	105,12	--	--
11	7,84 (d; 8,6)	7,84 (d; 8,6)	130,0	130,22	--	--
11a	--	--	114,7	113,58	H-11	H-10/H-12a
12	--	--	188,9	189,17	H-12a	H-11/H-6a
12a	--	3,85 (d; 3,9)	44,6	44,85	H-6a	H-1/H-6
4'	2,95 (dd; 15,8;8,0) 3,33 (dd; 15,8;9,8)	2,96 (dd; 15,8;8,0) 3,33 (dd; 15,8;9,8)	31,3	31,52	H-5	--
5'	5,25 (t; 8,8)	5,24 (t; 8,8)	87,8	88,07	H-4'	H-7'/3H-8'
6'	--	--	143,0	143,27	3H-8'/H-5'/H-7'	H-4'
7'	4,94 (s) 5,08 (s)	4,94 (s) 5,08 (s)	112,6	112,76	--	3H-8'/H-5'
8'	1,77 (s)	1,78 (s)	17,2	17,36	H-7'	H-5'
CH ₃ O- 2	3,77 (s)	3,77 (s)	55,8	56,57	--	--
CH ₃ O - 3	3,81 (s)	3,82 (s)	56,3	56,08	--	--

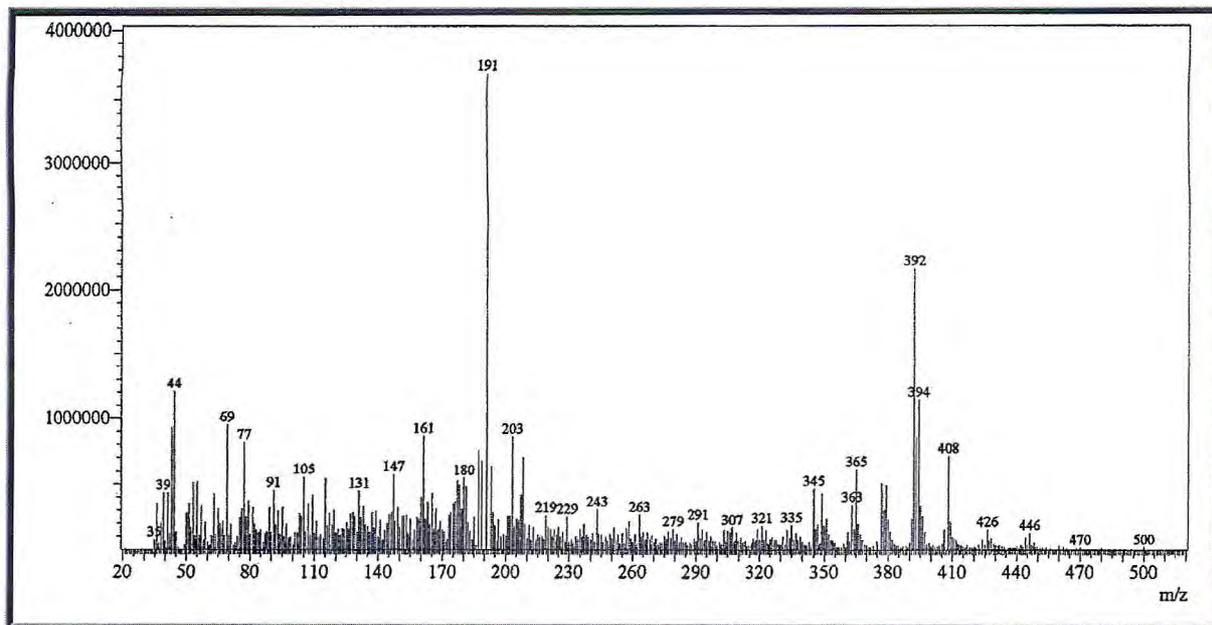


Figura 63 - Espectro de massas de TC-6 (IE, 70 eV)

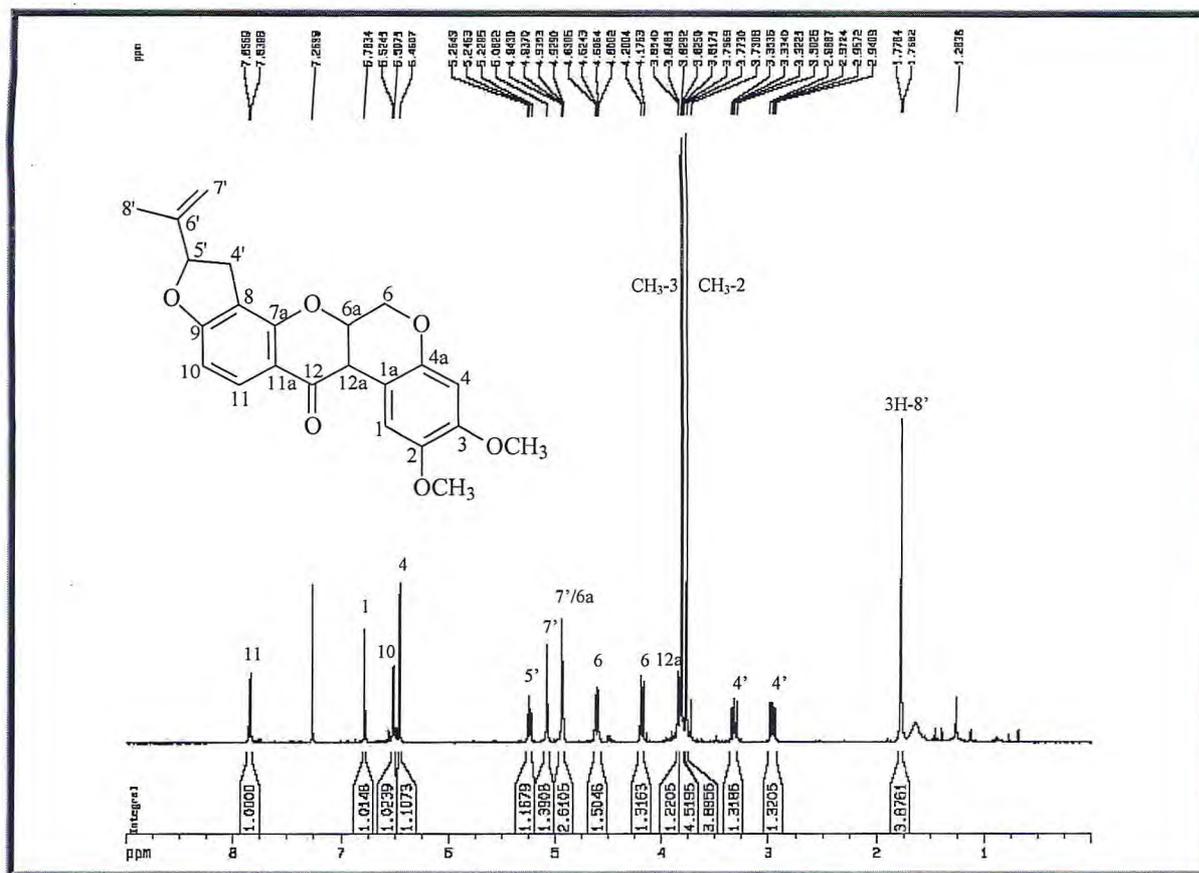
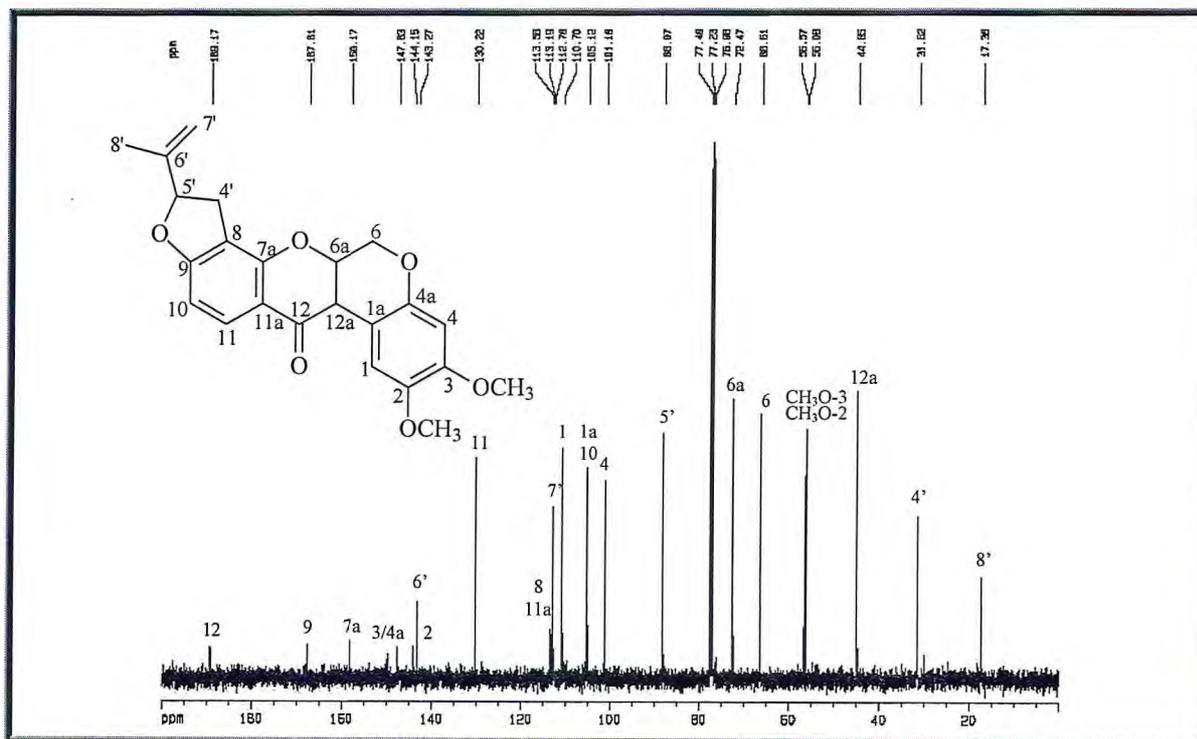


Figura 64 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de TC-6



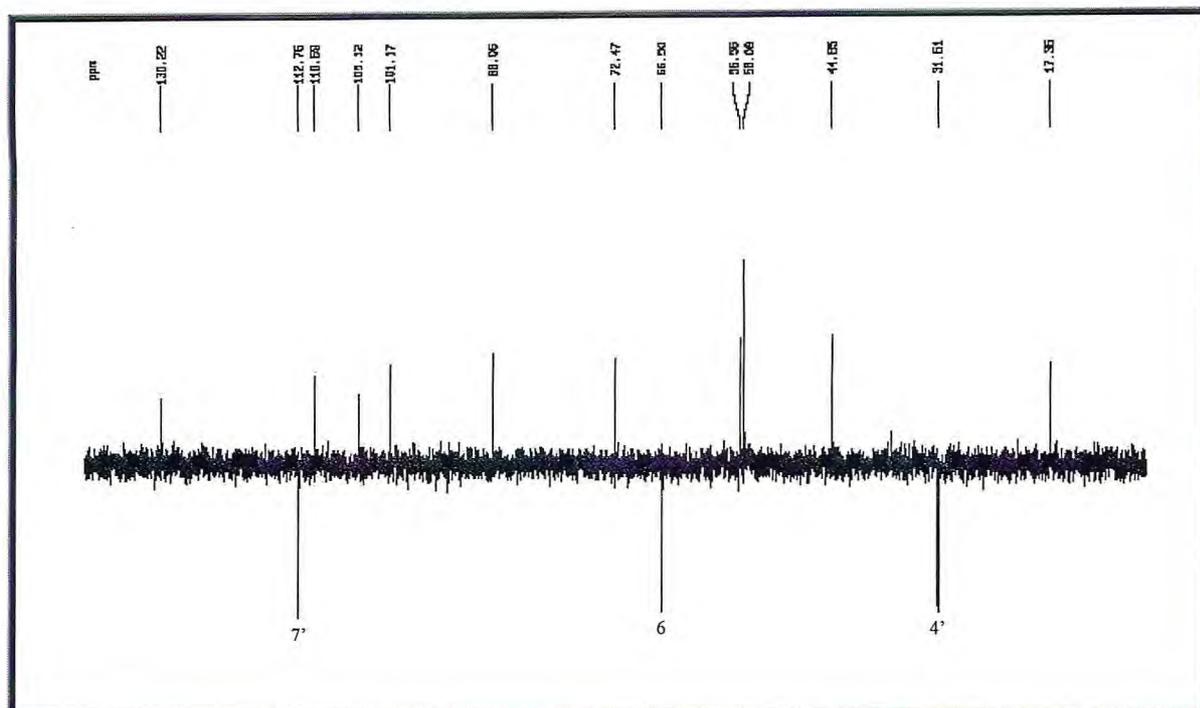


Figura 66 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TC-6

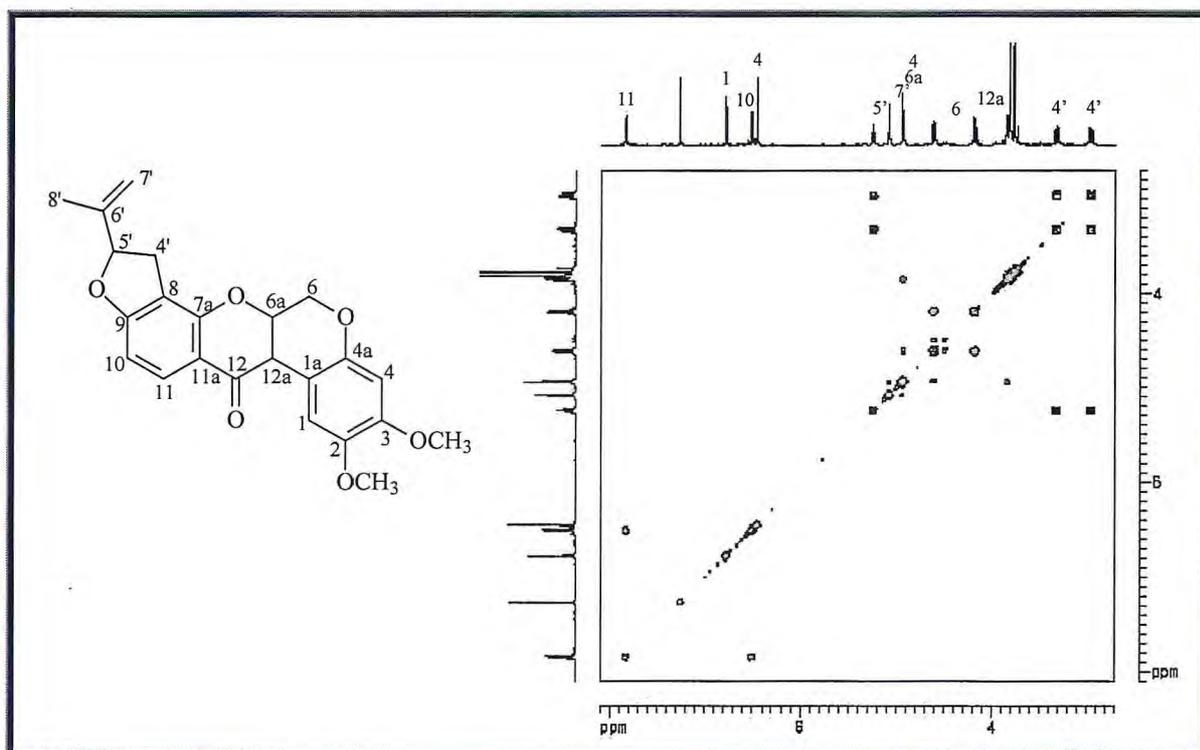


Figura 67 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-6

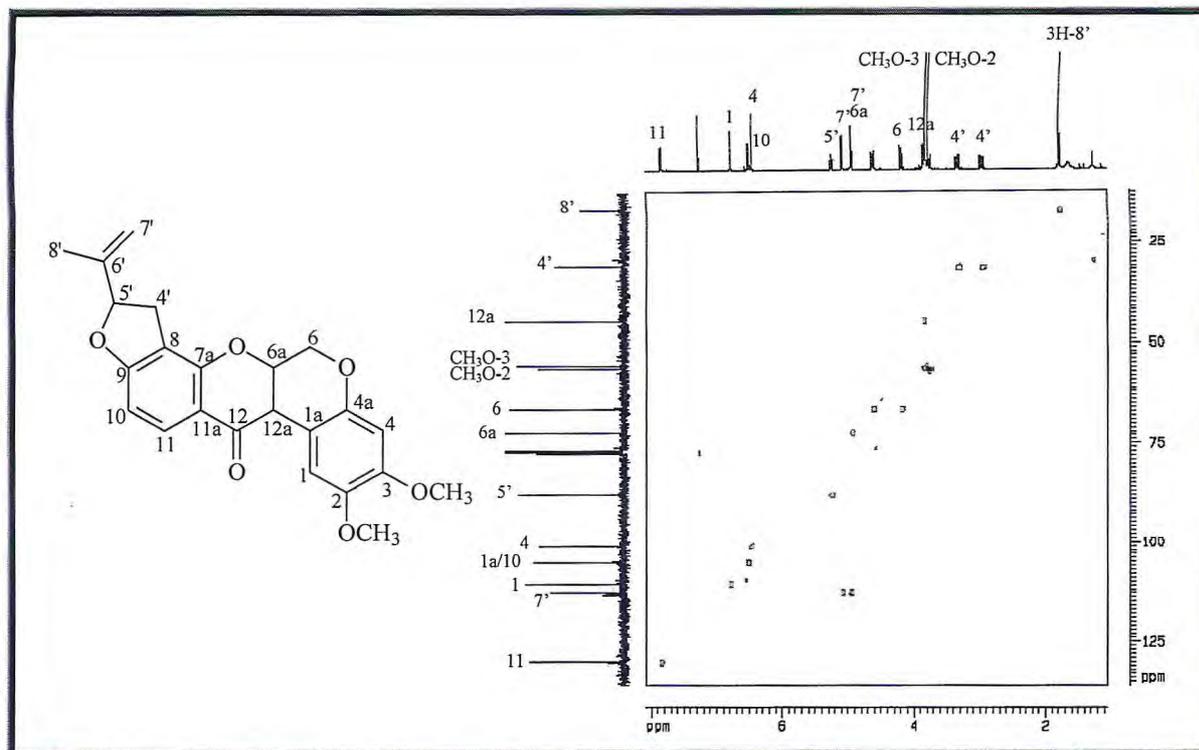


Figura 68 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-6

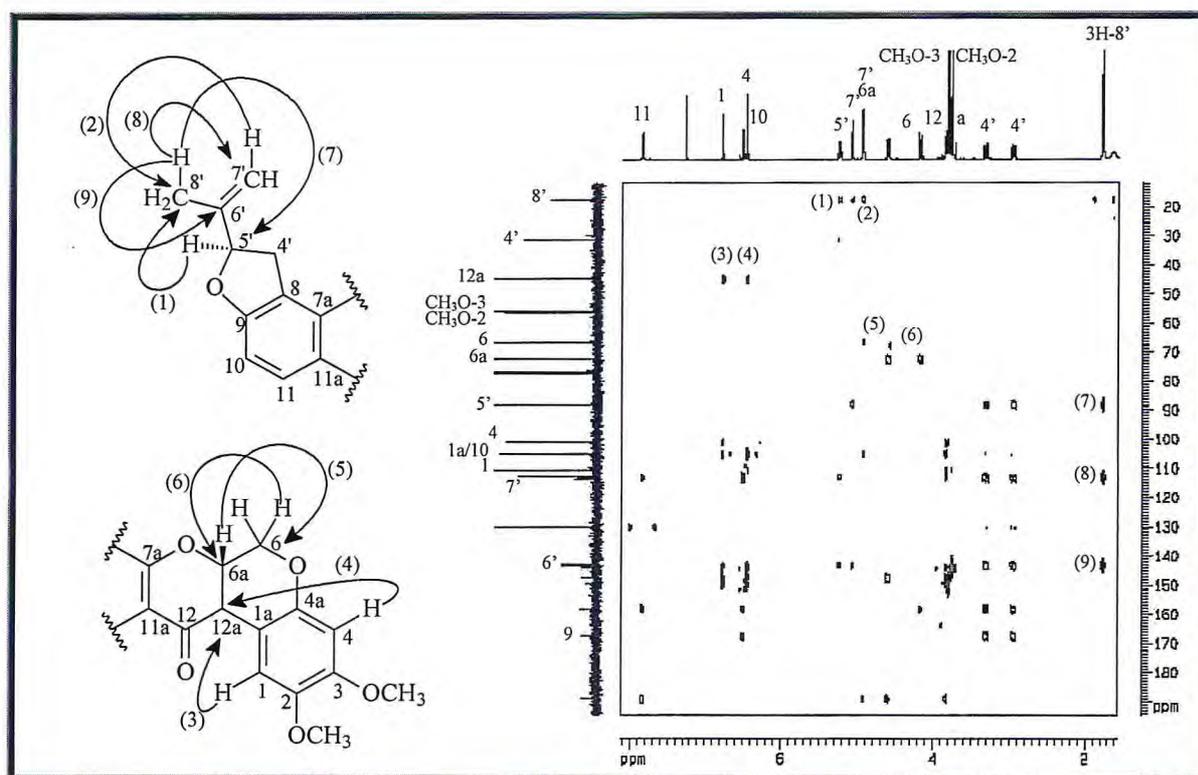


Figura 69 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-6

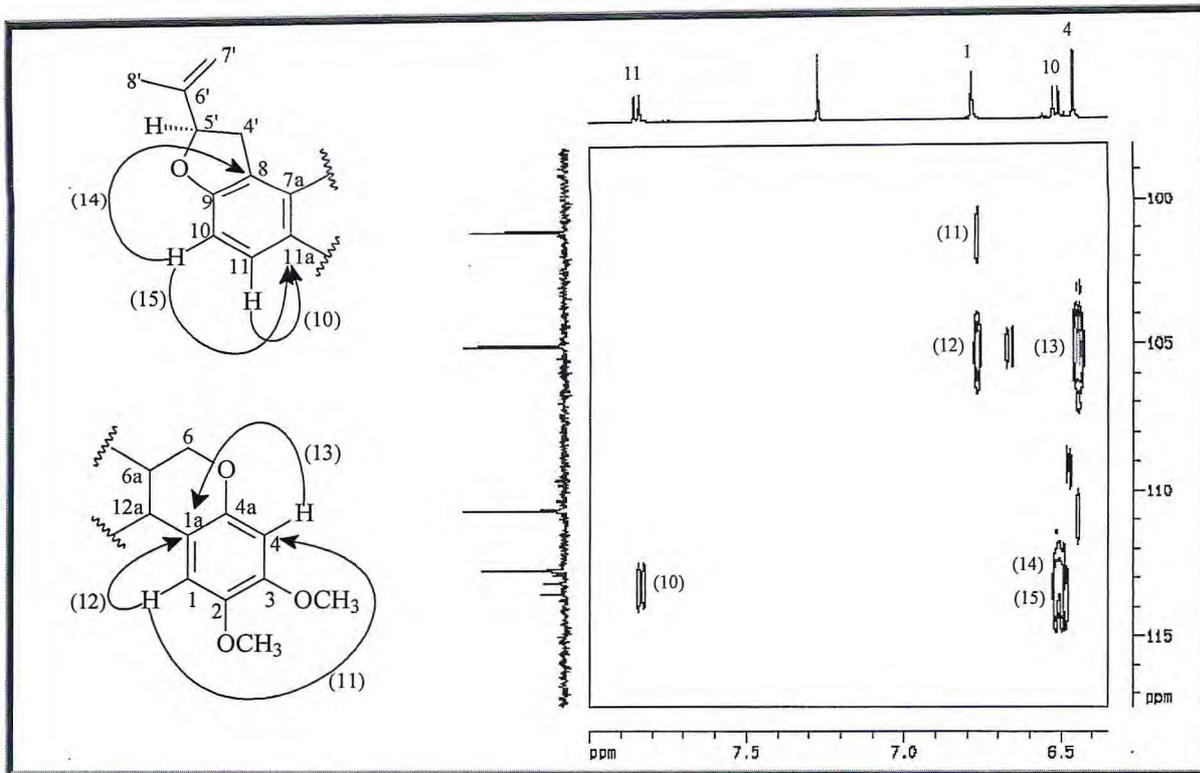


Figura 70 - Expansão-01 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-6

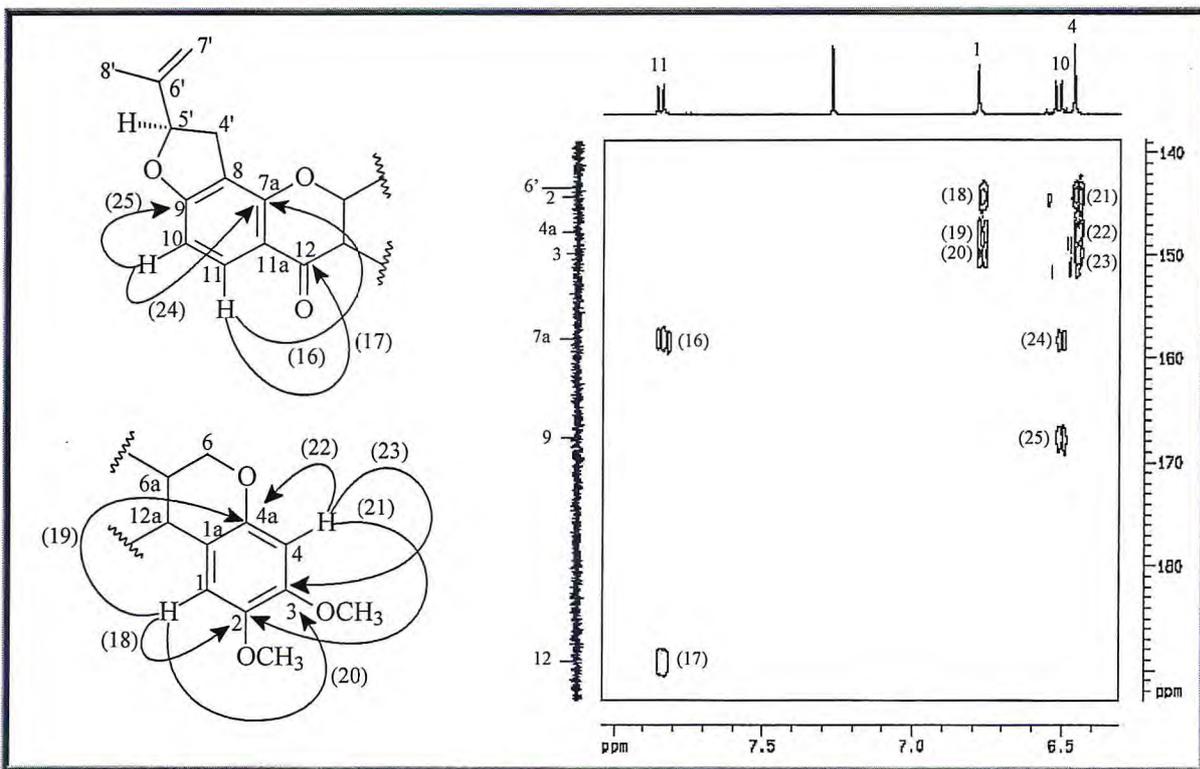


Figura 71 - Expansão-02 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-6

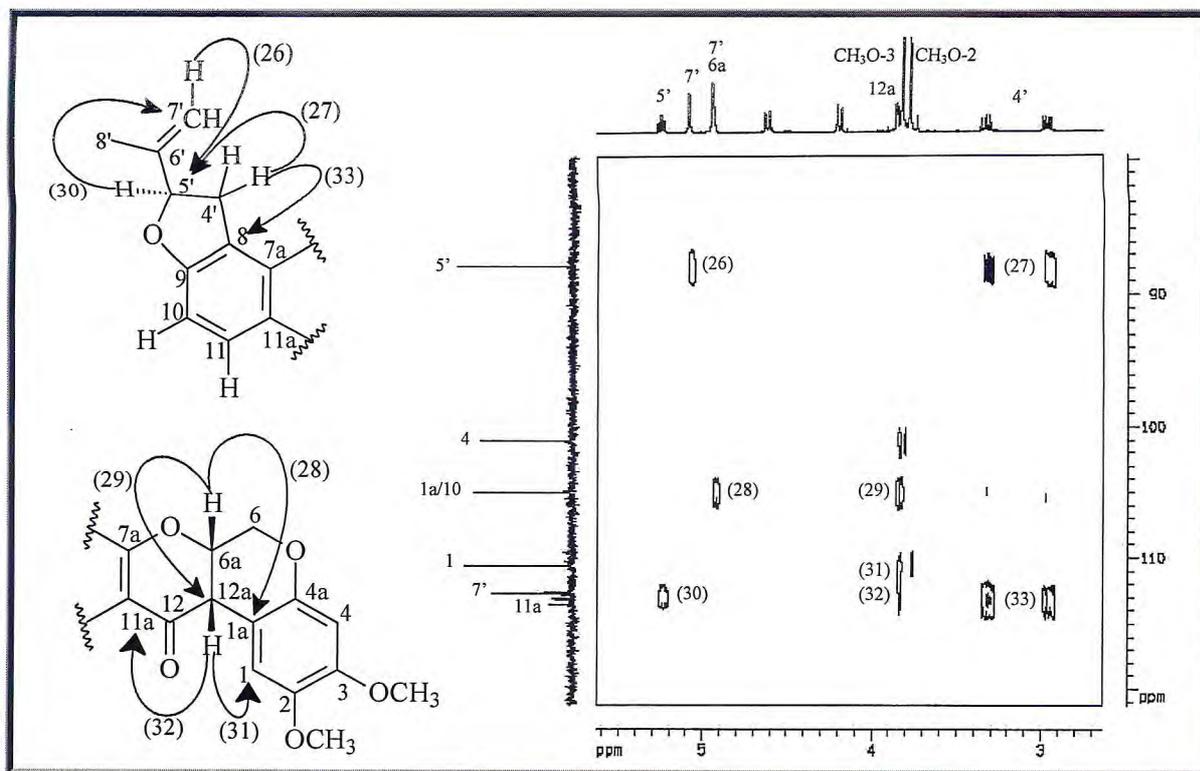


Figura 72 - Expansão-03 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-6

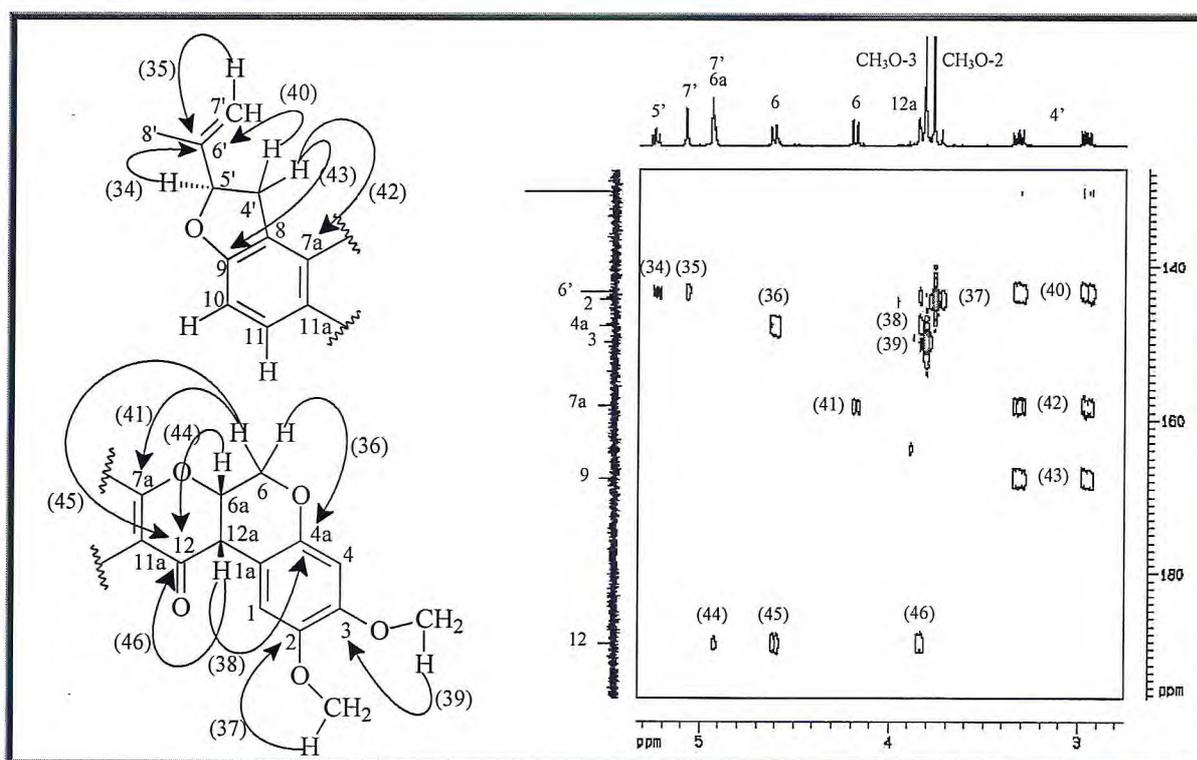


Figura 73 - Expansão-04 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-6

3.2.7. Determinação Estrutural de TC-7

Fracionamento cromatográfico em gel de sílica da fração TCRAE-D proveniente do extrato acetato de etila das raízes de *T. cinerea* (Item 5.5.3.2.4, p. 167), forneceu um sólido amorfo, amarelo, que após lavado com MeOH, mostrou-se uniforme na análise em CCD. A substância, denominada TC-7, apresentou fluorescência na luz U.V. (254 e 365 nm) e coloração verde após revelação com solução de vanilina. TC-7 apresentou um ponto de fusão entre 112,6 e 114,4 °C e seu espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EMIE) (Figura 75, p. 84) apresentou pico íon molecular com m/z igual em 318 Daltons.

O espectro de absorção na região do IV de TC-7 (Figura 76, p. 84) mostrou uma banda característica de deformação axial de ligação Csp^3-H em $2.927cm^{-1}$ que foram relacionadas à presença de grupamentos metilílicos ou metilênicos; bandas referentes à deformação axial de ligação $C=O$ em $1625 cm^{-1}$, sugerindo a presença de carbonila α,β -insaturada ($\nu_{C=O}$); e uma banda fina e intensa em torno de $1250 cm^{-1}$ correspondente a deformação axial de ligação $C-O$ (ν_{C-O}).

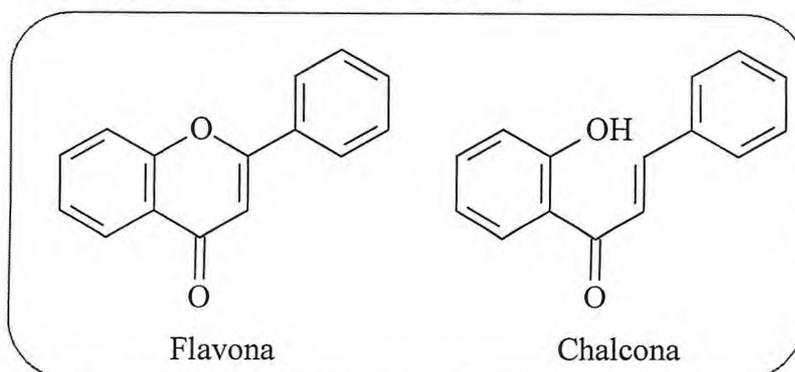
O espectro de RMN ^{13}C -HBBD de TC-7 obtido em $CDCl_3$ (125 MHz) (Figura 79, p. 86) revelou a presença de dezoito linhas espectrais. A teoria do deslocamento químico (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000) permitiu referenciá-las como sendo dezesseis absorções (entre δ 178,44 e 107,23) referentes a carbonos insaturados sp^2 e duas absorções em δ 56,53 e 18,41 a carbonos saturados. As absorções em δ 178,44, 163,69, 161,61, 154,95 e 56,53 puderam ser atribuídas a carbonos oxigenados, dentre os quais o mais desprotegido (δ 178,44) corresponde a carbono carbonílico.

A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C -HBBD com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 80, p. 86) possibilitou atribuir os sinais em δ 178,44; 163,69; 161,61; 154,95; 143,10; 132,45 e 115,22 a carbonos sp^2 não hidrogenados, os sinais em δ 138,39; 131,73; 129,34; 126,67; 125,68; 117,95; 109,40 e 107,23 a carbonos sp^2 monohidrogenados, o sinal em δ 118,26 a carbono metilênico e os sinais em δ 56,53 e 18,41 foram atribuídos a uma metoxila e uma metila, respectivamente.

No espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) (Figura 77 e 78, p. 85) verificou-se a presença de dois dubletos em δ 8,14 (1H, d, $J = 8,9$ Hz) e δ 7,07 (1H, d, $J = 8,9$ Hz), característicos de hidrogênios ligados a anel aromático acoplado entre si em posição *orto*.

Seu espectro de RMN ^1H confirmou também a presença dos grupamentos metila através dos sinais de hidrogênio em δ 2,10 (3H, s) e metoxila em δ 4,04 (3H, s), sugeridos na análise do espectro de RMN ^{13}C -HBBDD que, segundo a teoria do deslocamento químico (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000), devem estar ligados a carbono sp^2 . Foi observado ainda um sinal simples em δ 6,91 (1H, s) referente a hidrogênio ligado a carbono olefínico e dois sinais múltiplos em δ 7,95 (2H, m) e 7,65 (3H, m) que foram relacionados a hidrogênios pertencentes a anel aromático monossustituído.

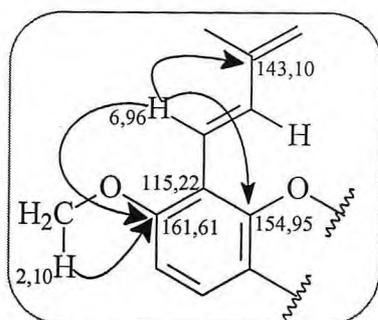
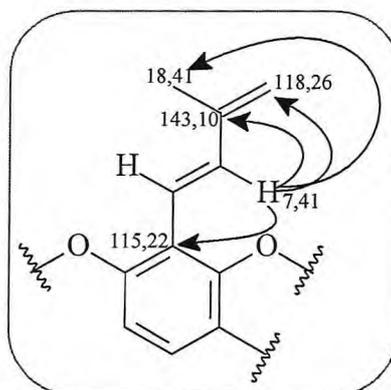
A evidência de dois anéis aromáticos, um deles monossustituído, além da presença da carbonila α,β -insaturada, sugeriu que TC-7 poderia ser de uma flavona ou uma chalcona, apoiado pelo fato de que as duas classes de compostos estarem presentes em várias espécies deste gênero (SINHA *et al.*, 1982).



Apesar dos valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios olefínicos em δ 7,41 (1H, d, $J = 16,5$ Hz) e 6,69 (1H, d, $J = 16,5$ Hz) se aproximarem dos valores observados na literatura para chalconas (RAO, 1993), não são observados qualquer acoplamento de um desses hidrogênios com o carbono carbonílico em δ 178,44, no espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C -HMBC) (Figuras 83-86, p. 88-89). Além disso, o sinal simples em δ 6,91 (1H) é típico do hidrogênio H-3 do anel heterocíclico de um sistema flavônico (AGRAWAL, 1989).

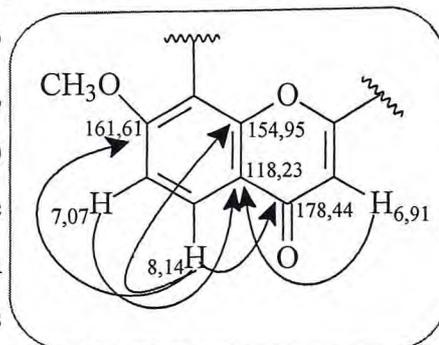
Analisando ainda seu espectro de RMN ^1H , depois da conclusão de TC-7 possuir um esqueleto flavônico, pôde-se verificar que os dois dubletos largos referidos anteriormente (δ 7,41 e 6,95) são característicos de sistema olefinico, cujo valor da constante de acoplamento ($J = 16,5$ Hz) caracteriza geometria *trans*. O sinal simples centrado em δ 5,18 (2H, s), integrado para dois hidrogênios, foi atribuído a hidrogênios ligados a carbonos vinílicos. No diagrama de contorno do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C – HMBC) observou-se a interação destes hidrogênios, seus carbonos e dos hidrogênios do carbono metílico já referidos em δ 2,10 (3H, s), o que permitiu elucidar a estrutura de TC-7.

A análise detalhada do diagrama de contorno do espectro de HMBC evidenciou o acoplamento do hidrogênio em δ 7,41 (1H, d, $J = 16,5$ Hz) com o carbono metílico em δ 18,41 ($^3J_{\text{CH}}$), com o carbono metilênico em δ 118,26 ($^3J_{\text{CH}}$) e com os carbonos sp^2 não hidrogenados em δ 143,10 ($^2J_{\text{CH}}$) e 115,22 ($^3J_{\text{CH}}$). Esses acoplamentos são coerentes com a presença de um sistema γ -metil-*trans*- α,γ -dienila (ilustrado ao lado) que, embora raro, é descrito para algumas espécies de *Tephrosia* (RAO e RAJU, 1984; RAO e PRASAD, 1993). Esta



análise evidenciou ainda que o outro hidrogênio olefinico em δ 6,96 (1H, d, $J = 16,5$ Hz) também acopla com o carbono sp^2 não hidrogenado em δ 143,10 ($^3J_{\text{CH}}$), além de acoplar com os carbonos sp^2 não hidrogenados e oxigenados em δ 161,61 ($^3J_{\text{CH}}$) e 154,95 ($^3J_{\text{CH}}$). A posição da metoxila também foi evidenciada através do acoplamento de seus hidrogênios (δ 4,04) com o carbono em δ 161,95 ($^3J_{\text{CH}}$). Estas interações levaram a propor que os dois substituintes citados acima (γ -metil-*trans*- α,γ -dienila e metoxila) devam estar ligados ao anel A do esqueleto flavônico, uma vez que o anel B foi caracterizado como monossustituído.

A posição do grupamento γ -metil-*trans*- α,γ -dienila no anel A pôde ser definida ainda pela análise do mapa de contorno do espectro de HMBC, que nos permitiu verificar o acoplamento do hidrogênio de sistema aromático em δ 8,14 (1H, d, $J = 8,9$ Hz) com os carbonos sp^2 oxigenados em δ 161,61 ($^3J_{CH}$), 154,95 ($^3J_{CH}$) e com o carbono carbonílico em δ 178,44 ($^3J_{CH}$). Foi observada também a correlação do outro hidrogênio de sistema aromático em 7,07 (1H, d, $J = 8,9$ Hz) e do hidrogênio olefínico em δ 6,91 (1H, s) com o carbono em 118,23 ($^3J_{CH}$), concluindo assim que este último sinal está relacionado a dois carbonos, um metilênico, como observado pela amplitude contrária aos outros sinais no espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° e o outro sp^2 não hydrogenado, como ilustrado ao lado. Esses e outros acoplamentos estão descritos na Tabela 14, p. 83.



Os dados descritos até aqui, aliados a comparação com os dados de RMN 1H da literatura (RAO e RAJU, 1984) permitiu inferir para TC-7 a estrutura de anidrolanceolatina A (**85**, Figura 74), anteriormente isolada de *T. purpurea*. A partir da construção da tabela de comparação (Tabela 14, p. 83), foi observado que as absorções atribuídas para os hidrogênios H-1'' e H-2'' em δ 6,84 e 7,35, respectivamente, encontram-se trocados. Desta forma os dados relativos a estes hidrogênios foram devidamente corrigidos para δ 6,96 e 7,41; e os dados de RMN ^{13}C estão sendo relatados pela primeira vez.

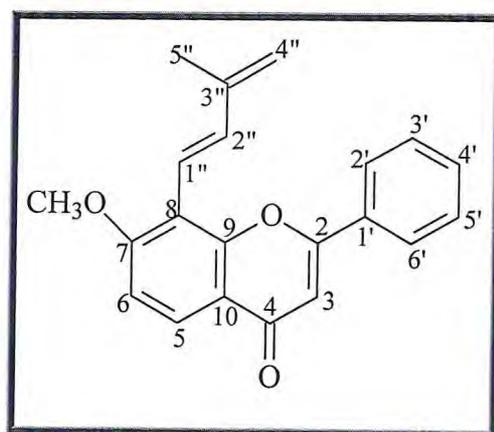


Figura 74 - Estrutura de anidrolanceolatina A (**85**)
(7-metoxi-8-(γ -metil-*trans*- α,γ -dienila)-flavona)

Tabela 14 - Dados espectroscópicos de TC-7 (CDCl₃) comparados com dados da literatura para anhidrolanceolatin A (RAO, 1984)

C	δ_H (mult., <i>J</i> em Hz)		δ_C	HMBC	
	anhidrolanceolatin A	TC-7		$^2J_{C-H}$	$^3j_{C-H}$
2	--	--	163,69	H-3	H-2/H-6'
3	6,70 (s)	6,91 (s)	107,23	--	--
4	--	--	178,44	--	H-5
5	8,02 (d; 8,0)	8,14 (d; 8,9)	125,68	--	--
6	6,96 (d; 8,0)	7,07 (d; 8,9)	109,40	--	--
7	--	--	161,61	--	H-1''/H-5/CH ₃ O-7
8	--	--	115,22	--	H-2'/H-6
9	--	--	154,95	--	H-1'/H-5
10	--	--	118,26	--	H-3/H-6
1'	--	--	132,45	--	H-3'/H-5'
2',6'	7,85 (m)	7,95 (m)	126,67	--	--
3',5'	7,40 (m)	7,65 (m)	129,34	--	--
4'	7,40 (m)	7,65 (m)	131,73	--	H-2''/H-6'
1''	7,35 (d; 16,0)	6,96 (d; 16,5)	117,95	--	--
2''	6,84 (d; 16,0)	7,41 (d; 16,5)	138,39	--	2H-4''/3H-5''
3''	--	--	143,10	H-2''/3H-5''	H-1''
4''	5,12 (s)	5,18 (s)	118,26	--	H-2''/3H-5''
5''	2,02 (s)	2,09 (s)	18,41	--	H-2''/H-4''
CH ₃ O-7	3,94 (s)	4,04 (s)	56,53	--	--

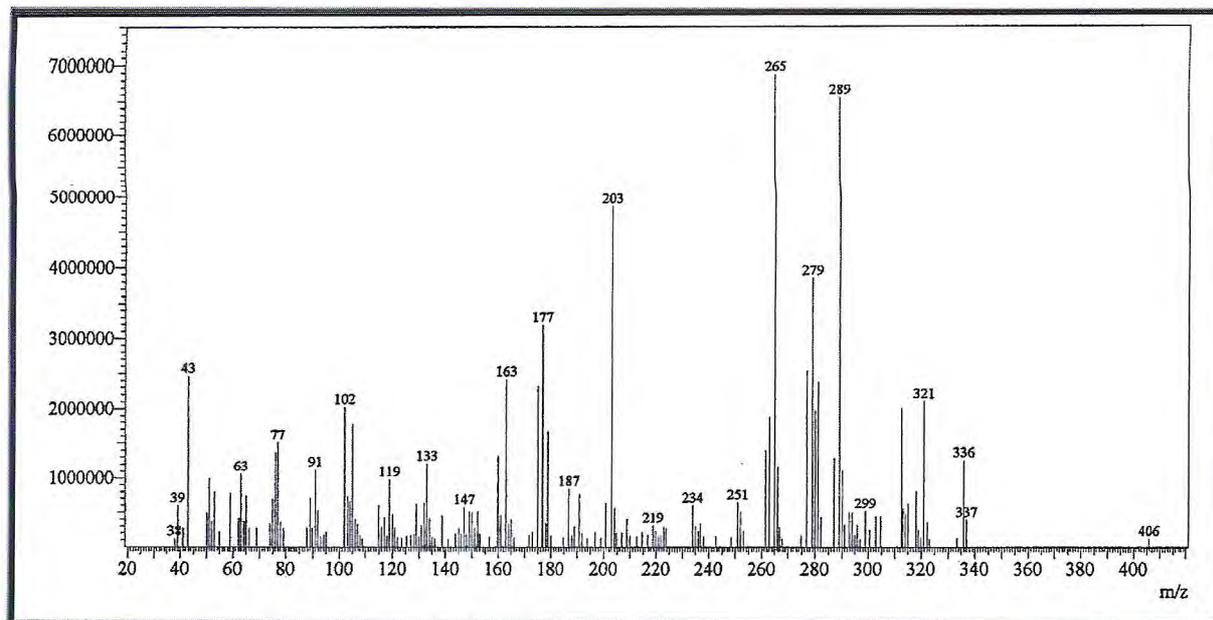


Figura 75 - Espectro de massas de TC-7 (IE, 70 eV)

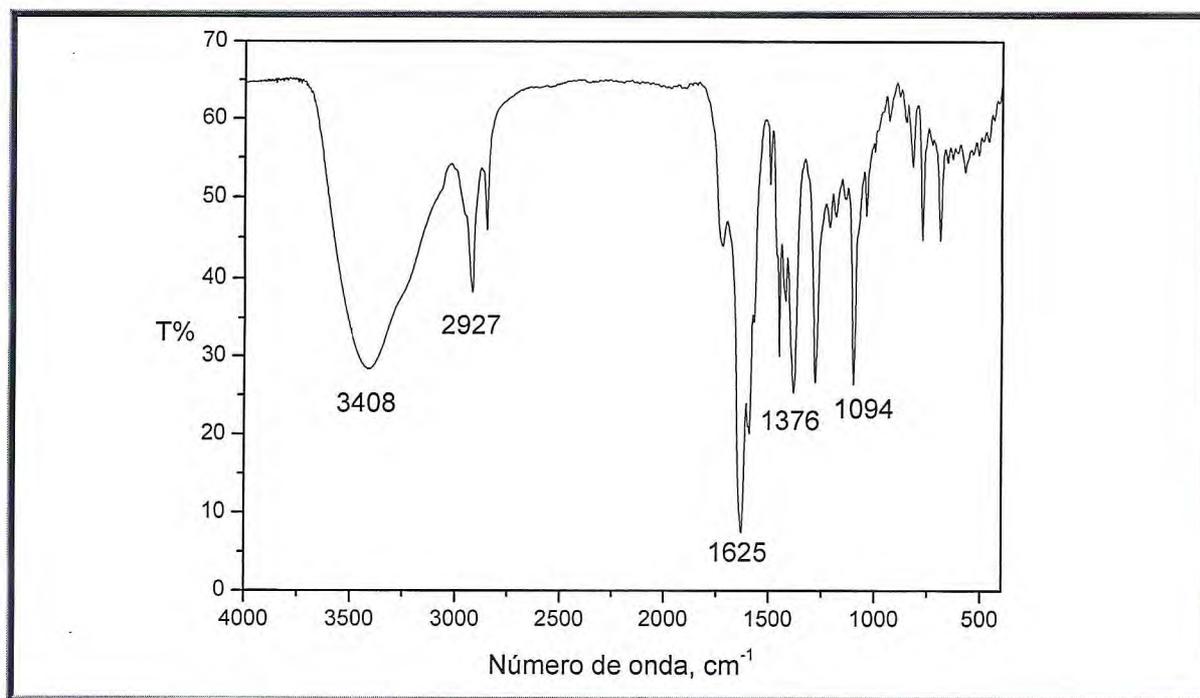


Figura 76 - Espectro de absorção na região do IV de TC-7

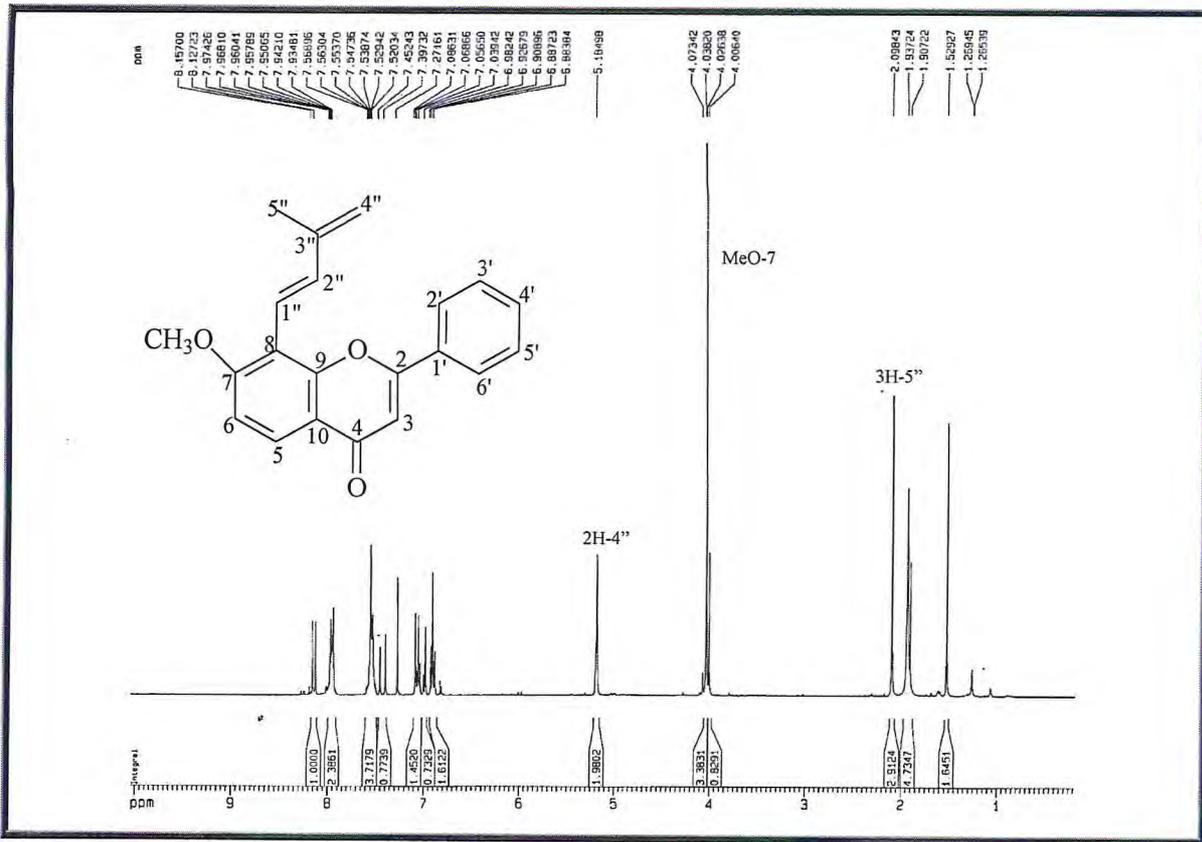


Figura 77 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de TC-7

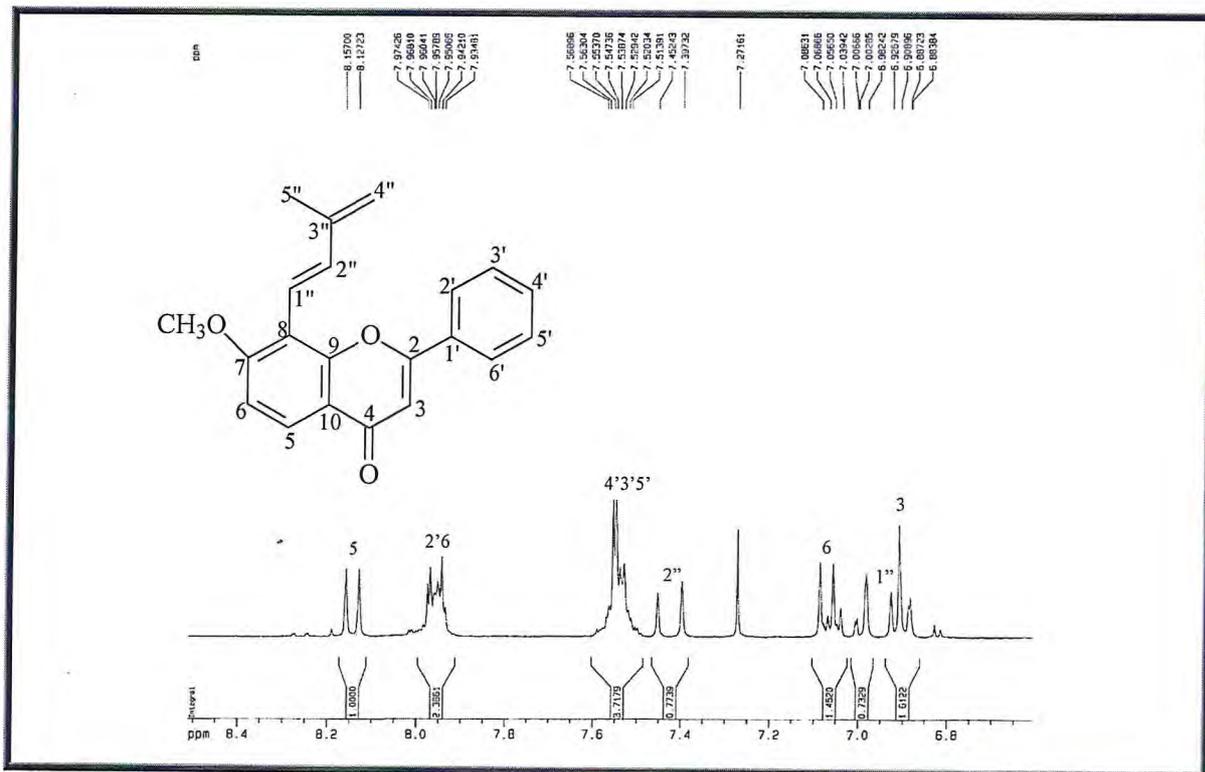


Figura 78 - Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de TC-7

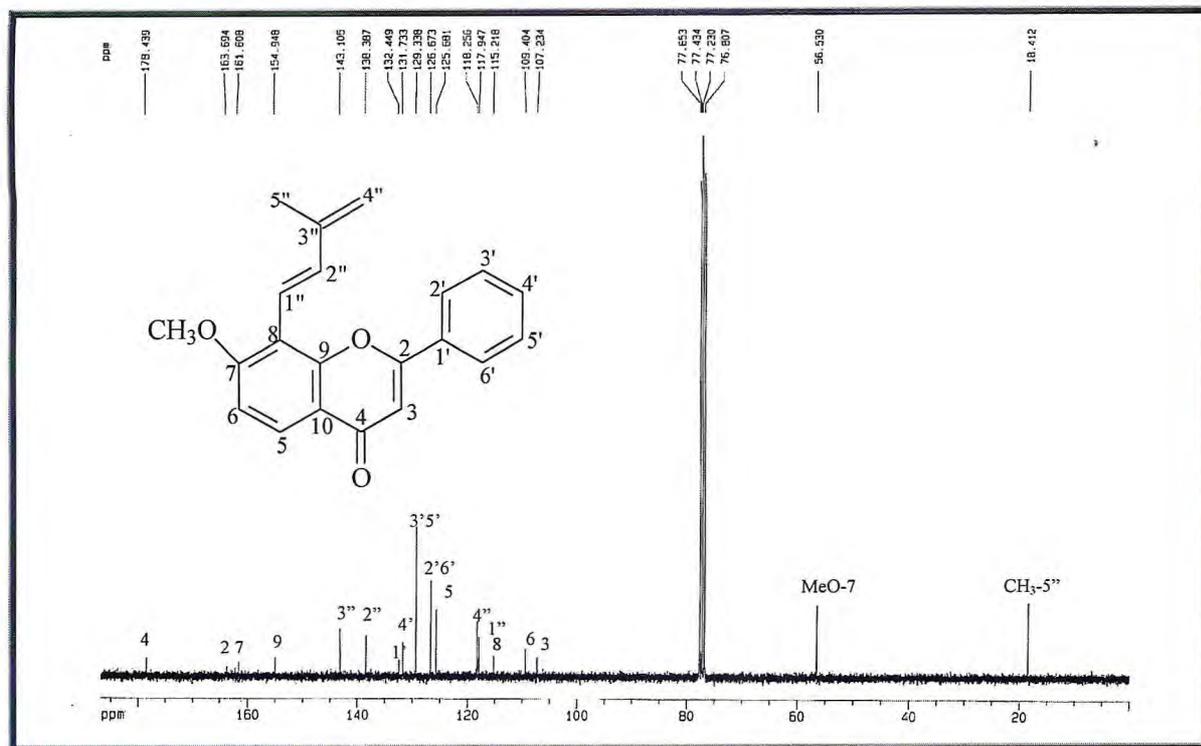


Figura 79 - Espectro de RMN ¹³C-HBBD (125 MHz, CDCl₃) de TC-7

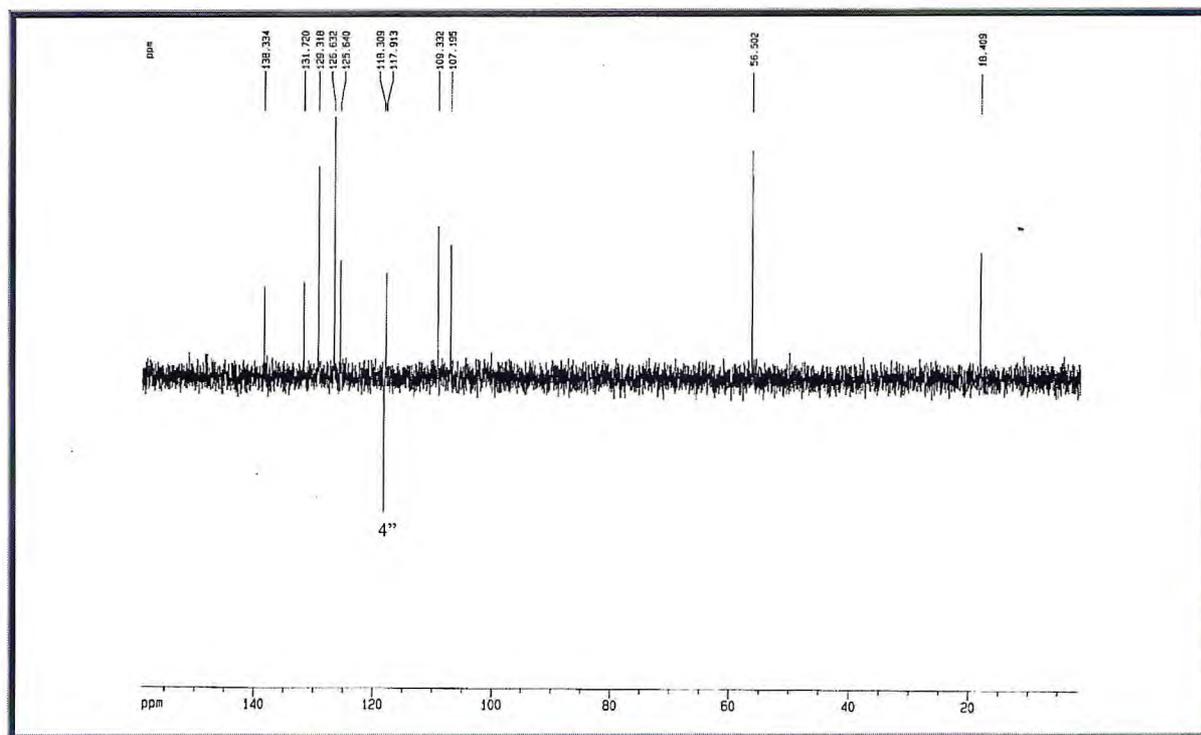


Figura 80 - Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl₃) de TC-7

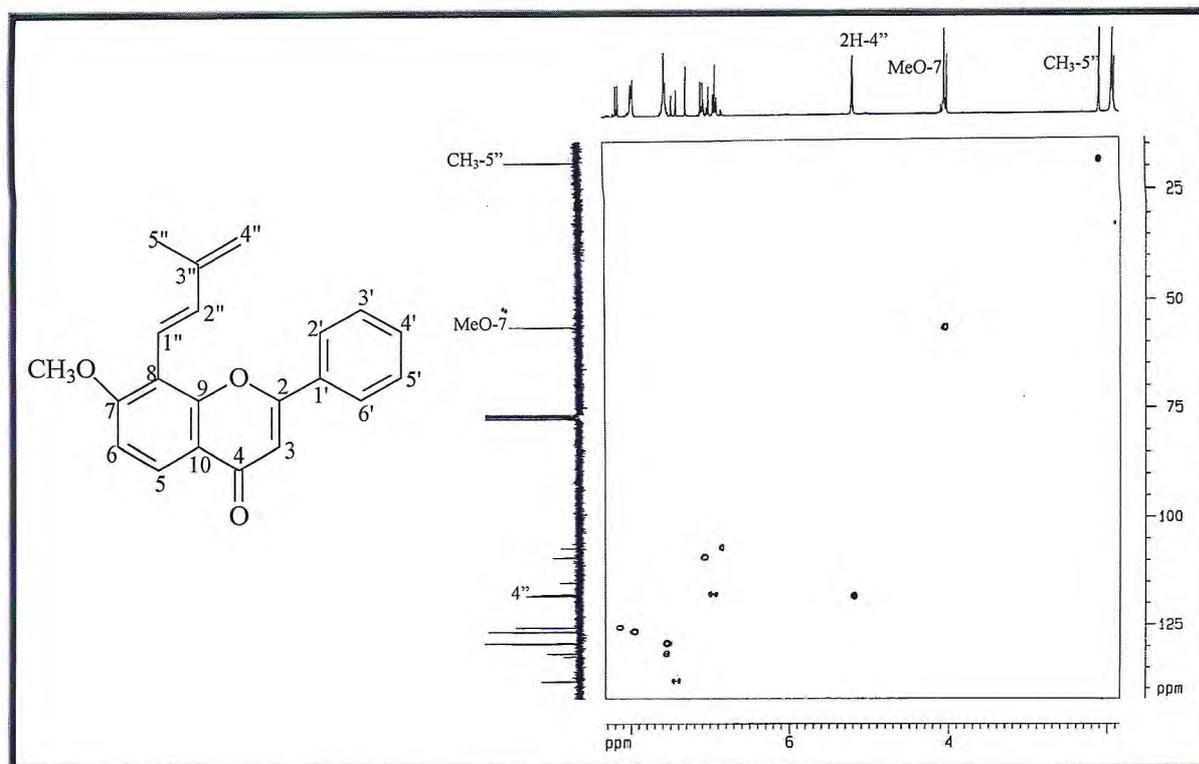


Figura 81 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-7

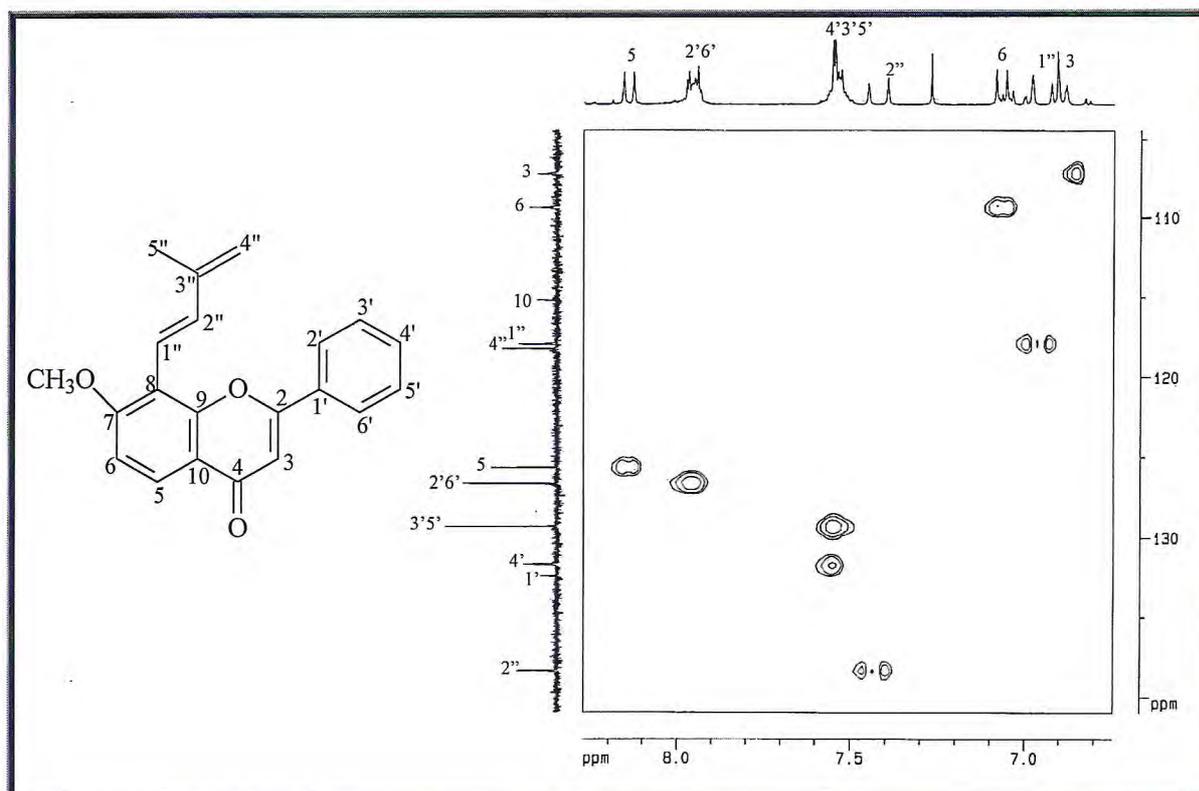


Figura 82 - Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-7

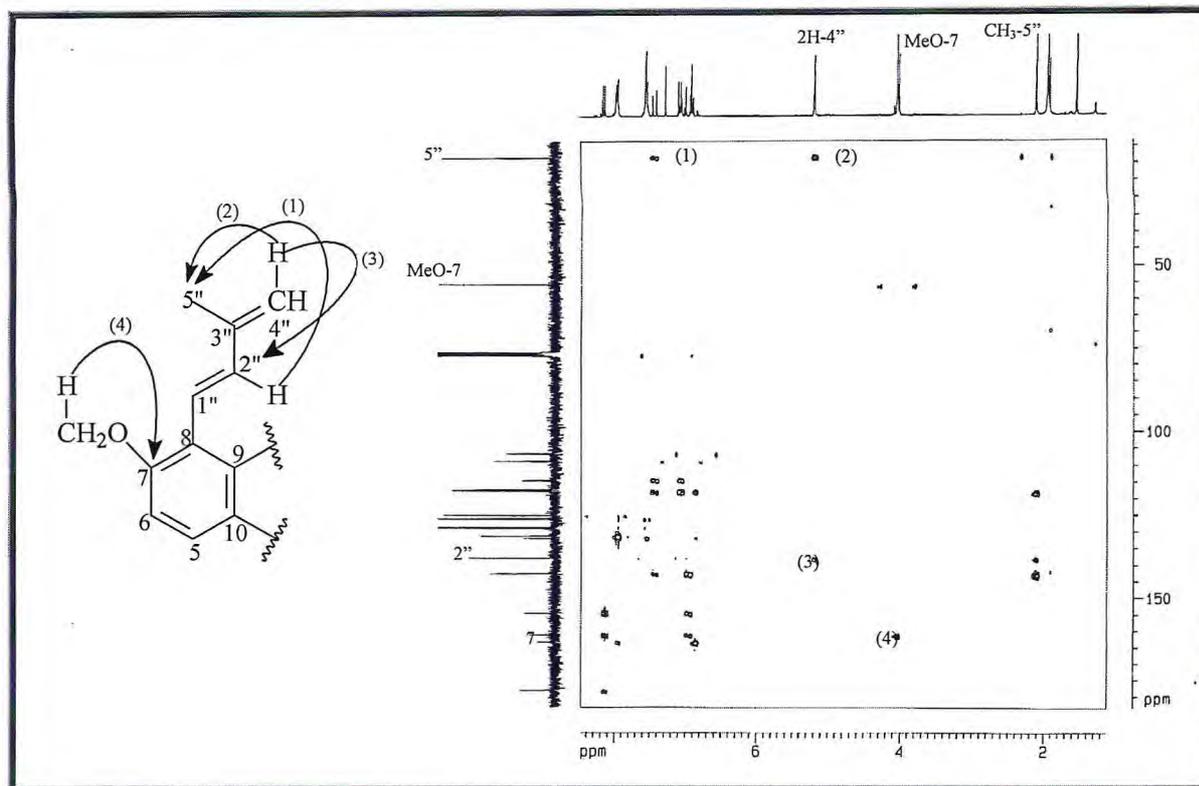


Figura 83 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HMBC de TC-7

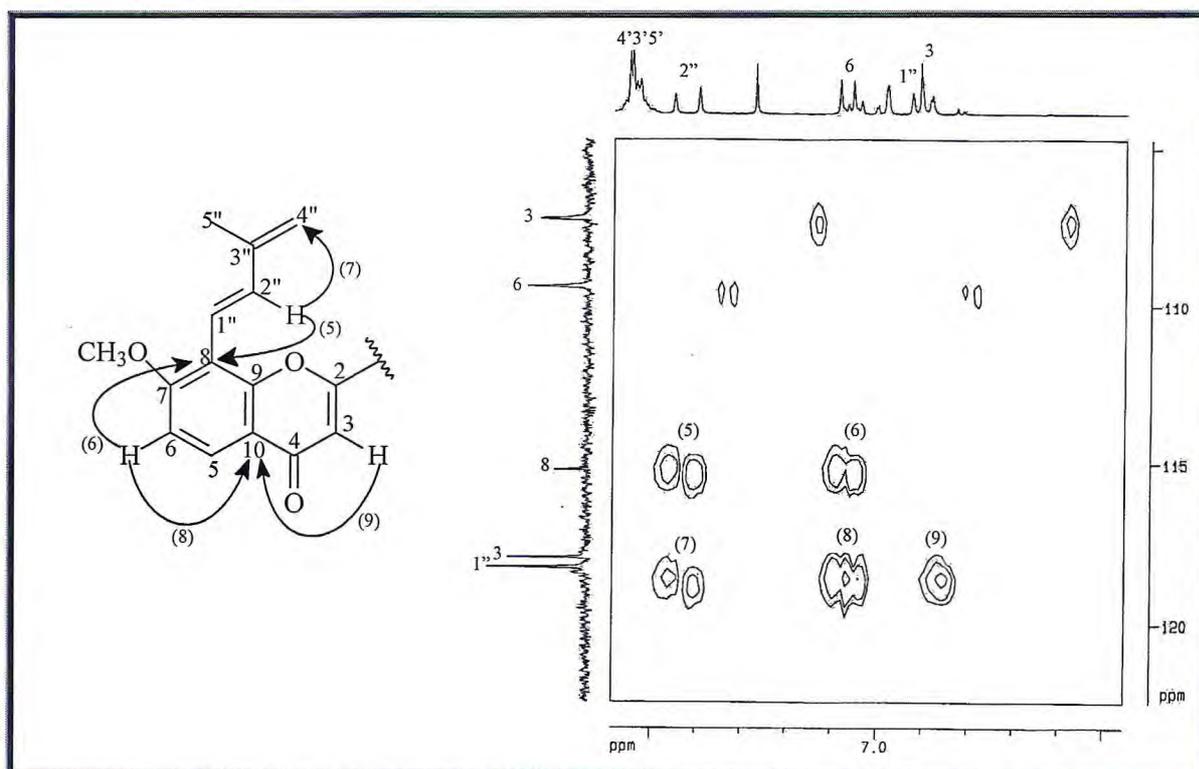


Figura 84 - Expansão-01 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HMBC de TC-7

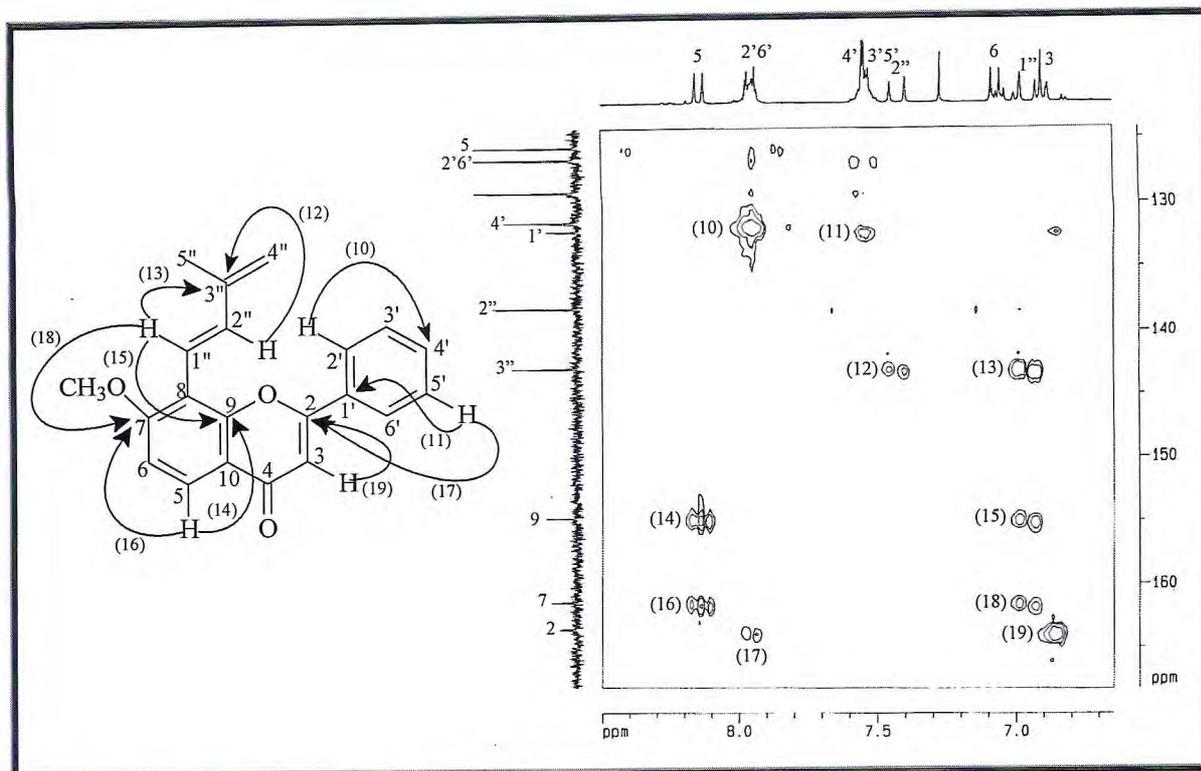


Figura 85 - Expansão-02 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-7

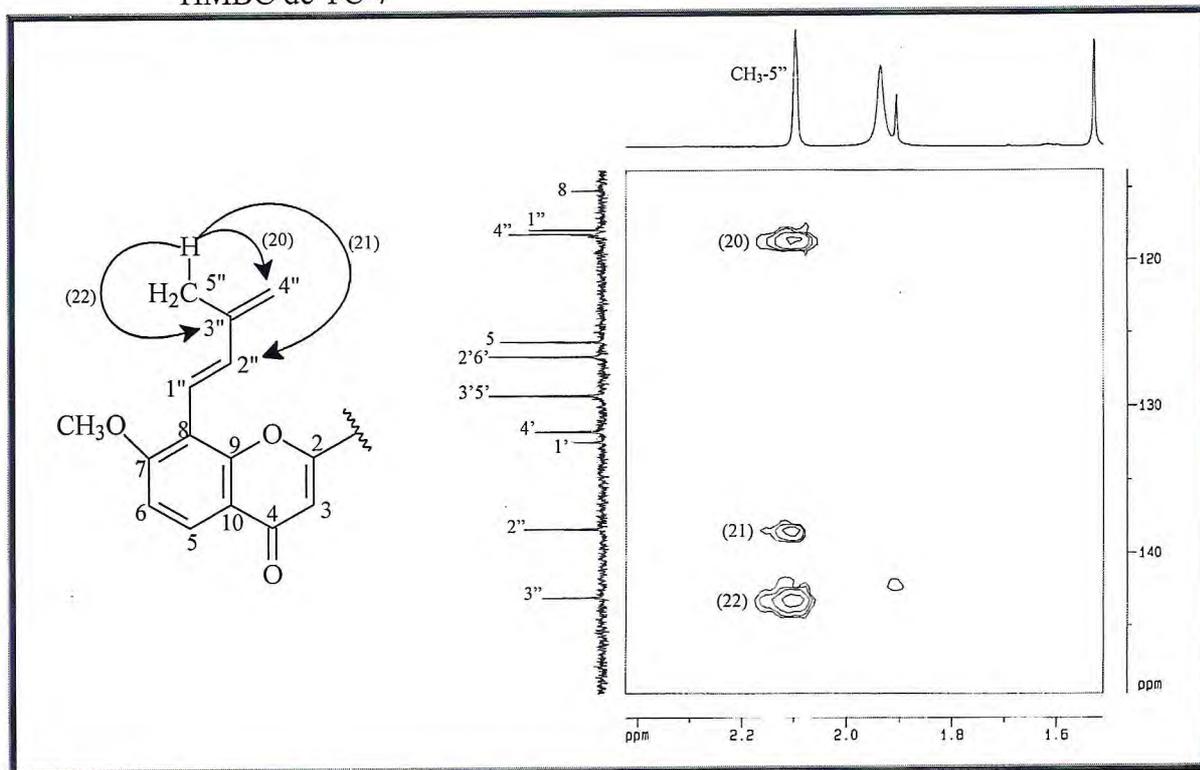


Figura 86 - Expansão-03 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-7

3.2.8. Determinação Estrutural de TC-8

Tratamento cromatográfico da fração TCRAE-D (10-23) (Item 5.5.3.2.4, p. 167) em gel de sílica, forneceu um sólido amorfo de coloração amarelada e solúvel em clorofórmio. Análise em CCD revelou tratar-se de uma substância pura, visível na luz U.V. (254 e 365 nm), que apresentou cor verde após pulverização com vanilina e aquecimento. O sólido, denominado TC-8, apresentou faixa de fusão de 74,9 – 76,9 °C e pico íon molecular m/z igual a 350 Daltons no espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EMIE) (Figura 89, p. 95).

O espectro de absorção na região do IV (Figura 90, p. 95) mostrou bandas características de deformação axial de ligação Csp^3-H em torno de 2.900 cm^{-1} ; uma banda fina e intensa em 1625 cm^{-1} , sugerindo a presença de carbonila α,β -insaturada ($\nu_{C=O}$) sem sistema quelatogênico; e uma banda em 1.276 cm^{-1} , característica de deformação axial de C-O (ν_{C-O}).

No espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) de TC-8 (Figura 91, p. 96) foi possível observar dois dubletos em δ 8,18 (1H, d, $J = 9,0$ Hz) e 7,04 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), característicos de hidrogênios ligados a anel aromático acoplando entre si em posição *orto*. Sinais múltiplos em δ 7,93 (2H) e 7,54 (3H) indicaram a presença de um anel aromático monossustituído. Os dados discutidos até o momento, juntamente com o sinal simples em δ 6,82 (1H, s), permitiram atribuir para TC-8 um esqueleto flavônico.

Observou-se ainda no espectro de RMN 1H a presença de dois dubletos centrados em δ 6,39 (1H, d, $J = 12,6$ Hz) e 6,02 (1H, d, $J = 12,6$ Hz) os quais foram atribuídos a hidrogênios vinílicos com geometria *trans*. Foram observados ainda dois sinais simples em δ 3,97 (3H, s) e 3,08 (3H, s), atribuídos a hidrogênios de metoxila, estando a mais desblindada ligada a carbono de anel aromático. O sinal em δ 1,10 (6H, s) foi atribuído a dois grupamentos metila ligados a carbono sp^3 .

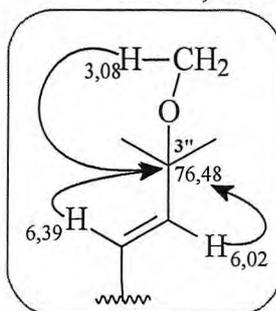
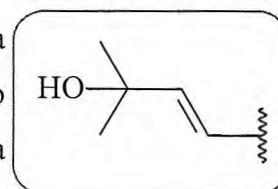
Todos os acoplamentos discutidos até o momento foram assegurados pelo espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1H, ^1H - COSY$ (Figura 93, p. 97).

No espectro de RMN ^{13}C -HBBB (125 MHz, CDCl_3) de TC-8 (Figura 92, p. 96) foram observadas dezenove linhas espectrais. A teoria do deslocamento químico (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000) permitiu associar quatro destes sinais a carbonos sp^3 e os demais a carbonos insaturados. O sinal em δ 178,52 confirmou a presença de carbonila de sistema flavônico; os sinais em δ 163,18, 160,69 e 154,42 foram associados a carbonos sp^2 oxigenados; e os sinais entre δ 141,88 e 106,87 foram relacionados a carbonos sp^2 não oxigenados. Os sinais característicos de carbono sp^3 (δ 56,24 e 50,84) confirmaram a presença das duas metoxilas, uma das quais (δ 56,24) ligada a sistema aromático sem compressão estérica (AGRAWAL, 1989); duas metilas geminais (δ 25,76), também sugeridas pelo espectro de RMN ^1H , além de um carbono saturado e oxigenado em δ 76,48.

A análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação (^1H , ^{13}C – HSQC) (Figura 94, p. 97) corroborou com o padrão de hidrogenação proposto para cada carbono, permitindo concluir que os sinais em δ 126,38 e 129,32 são referentes a dois átomos de carbono cada.

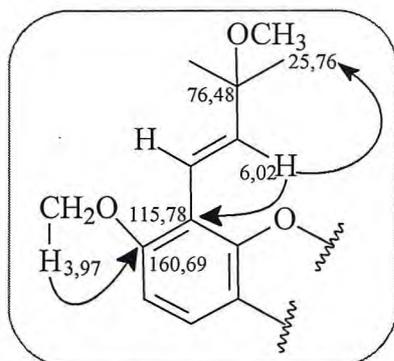
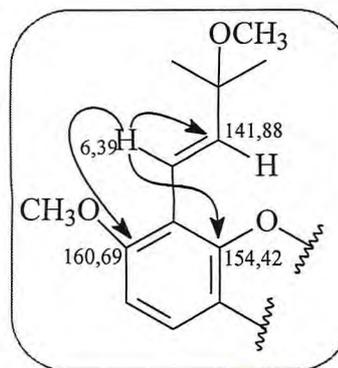
A presença de esqueleto flavônico, assegurada pelo sinal simples em δ 6,82, um anel aromático monossustituído e um grupo metoxila ligado a anel aromático com hidrogênios em posição *orto*, apontaram para TC-8 uma semelhança estrutural com TC-7 (Item 3.2.7, p. 78).

Comparação com dados publicados na literatura (WATERMAN & KHALID, 1980) para a lanceolatina A (86, Figura 87, p. 93), cuja estrutura apresenta um grupamento isoprênico com uma hidroxila ligada ao carbono terciário adjacente à dupla substituída, apontou para TC-8 a presença de uma cadeia lateral semelhante.



Assim, TC-8 teria, ao invés da hidroxila terciária, um grupamento metoxila em C-3''. A análise do seu espectro de RMN de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C – HMBC) (Figuras 95-98, p. 98-99) confirmou a posição desta metoxila através dos acoplamentos dos hidrogênios em δ 3,08 (3H, s), 6,39 (1H, d, $J = 12,6$ Hz) e 6,02 (1H, d, $J = 12,6$ Hz) com o carbono saturado em δ 76,48.

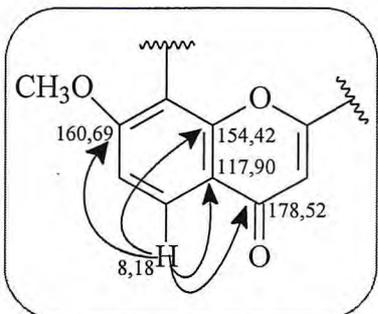
Ainda analisando o diagrama de contorno do espectro de HMBC, foi possível verificar os acoplamentos do hidrogênio olefínico em δ 6,39 (1H, d, $J = 12,6$ Hz) com os carbonos em δ 160,69 ($^3J_{CH}$), 154,52 ($^3J_{CH}$) e 141,88 ($^2J_{CH}$); e do hidrogênio em δ 6,02 (1H, d, $J = 12,6$ Hz) com os carbonos em δ 115,78 ($^3J_{CH}$) e 25,76 ($^3J_{CH}$). Esses dados confirmaram a



presença do grupamento

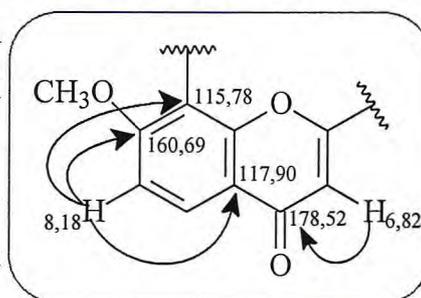
3''-metoxi-3'',3''-dimetilalila na estrutura de TC-8. A posição da outra metoxila foi determinada através da correlação dos seus hidrogênios em 3,91 (3H, s) com o sinal de carbono em δ 160,69.

O espectro HMBC também confirmou as similaridades entre as estruturas de TC-8 e TC-7 no que se refere ao esqueleto flavônico. Observou-se no diagrama de contorno que o hidrogênio em δ 8,18 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), pertencente ao anel aromático



tetrassubstituído (anel A), acopla a três ligações com os carbonos sp^2 não hidrogenados e oxigenados em δ 160,69 e 154,42 e com o carbono carbonílico em δ 178,42. Observou-se também o acoplamento a duas ligações desse hidrogênio com o carbono sp^2 não hidrogenado em δ 117,90.

Os acoplamentos do outro hidrogênio pertencente ao anel A (δ 7,04, 1H, d, $J = 9,0$ Hz) a três ligações com os carbonos sp^2 em δ 115,78 e 117,90 e a duas ligações com o carbono em δ 160,69 também foram observados. Adicionalmente, observou-se o acoplamento a duas ligações do hidrogênio olefínico em δ 6,82 com o carbono carbonílico em δ 178,42.



O espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EMIE) (Figura 88, p. 95) mostrou o pico íon molecular em M^+ 350 e confirmou a fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_4$. Os fragmentos com m/z : 335 ($M^+ - Me$, 100%), 319 e 251 Daltons foram atribuídos a produtos de fragmentação da cadeia lateral. O espectro de massas de alta resolução (Figura 89, p. 95) foi compatível com a fórmula molecular proposta, mostrando o pico íon pseudo-molecular $[M+1]^+$ a m/z 351,1489.

A comparação dos dados de RMN 1H obtidos com os da literatura para a Lanceolatina A (WATERMAN e KHALID, 1980), apontou para TC-8 a estrutura do éter metílico nomeado de 8-(3''-metoxi-3'',3''-dimetilalila)-7-metoxiflavona, substância ainda não relatada na literatura como produto natural.

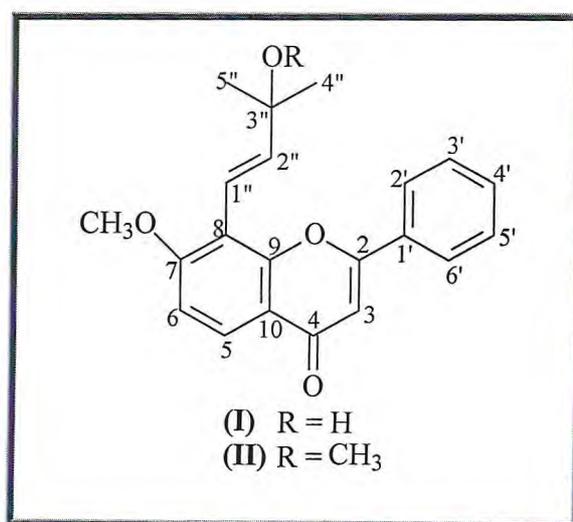


Figura 87 - Estruturas de (I) lanceolatina A (86) e (II) 8-(3''-metoxi-dimetilalila)-7-metoxiflavona (87)

Tabela 15 - Dados espectroscópicos de TC-8 (CDCl₃) comparados com dados da literatura para lanceolatin A (WATERMAN & KHALID, 1980)

C	δ_H (mult., J em Hz)		δ_C	HMBC	
	lanceolatin A	TC-8		TC-8	$^2J_{C-H}$
2	--	--	163,18	H-3	H-2'/H-6'
3	6,78 (s)	6,82 (s)	106,87	--	--
4	--	--	178,52	H-3	H-5
5	8,02 (d; 9,0)	8,18 (d; 9,0)	126,18	--	--
6	7,11 (d; 9,0)	7,04 (d; 9,0)	108,98	--	--
7	--	--	160,69	H-6	H-5/H-1''/CH ₃ O-7
8	--	--	115,78	--	H-6/H-2''
9	--	--	154,42	--	H-5/H-1''
10	--	--	117,90	H-5	H-3/H-6
1'	--	--	131,91	H-2'/H-6'	H-3/H-3''/H-5''
2',6'	7,55 (m)	7,93 (m)	126,38	--	--
3',5'	8,00 (m)	7,55 (m)	129,32	--	--
4'	7,55 (m)	7,55 (m)	131,78	--	H-2'/H-6'
1''	6,87	6,39 (d; 12,6)	118,75	--	--
2''	6,93 (d; 17,0)	6,02 (d; 12,6)	141,88	H-1''	3H-4''/3H-5''
3''	--	--	76,48	H-2''/3H-4''/3H-5''	H-1''/CH ₃ O-3''
4''/5''	1,53 (s)	1,10 (s)	25,76	--	H-2
CH ₃ O-7	3,99 (s)	3,97 (s)	56,24	--	--
CH ₃ O-3''	--	3,08 (s)	50,84	--	--

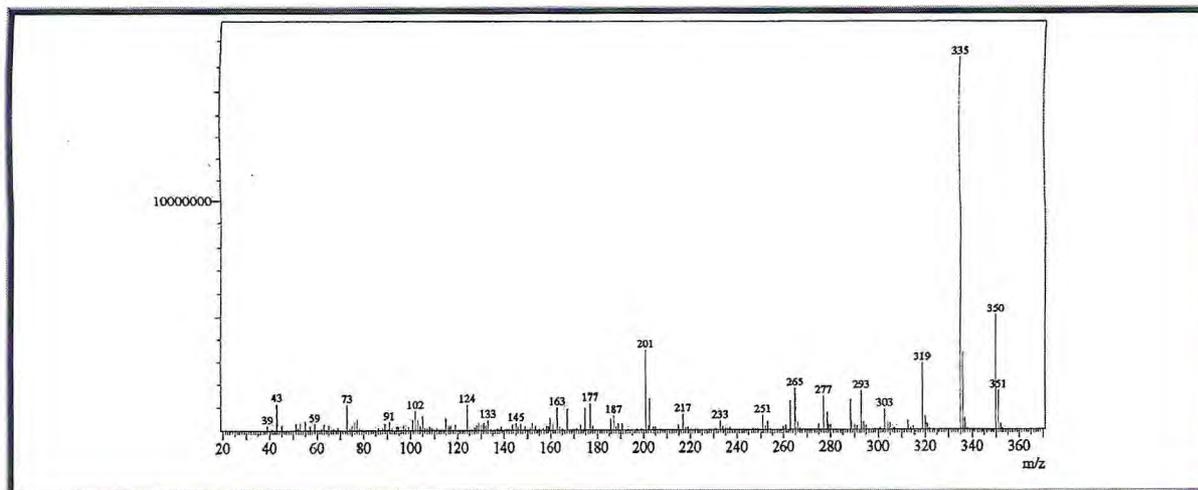


Figura 88 - Espectro de massas de TC-8 (IE, 70 eV)

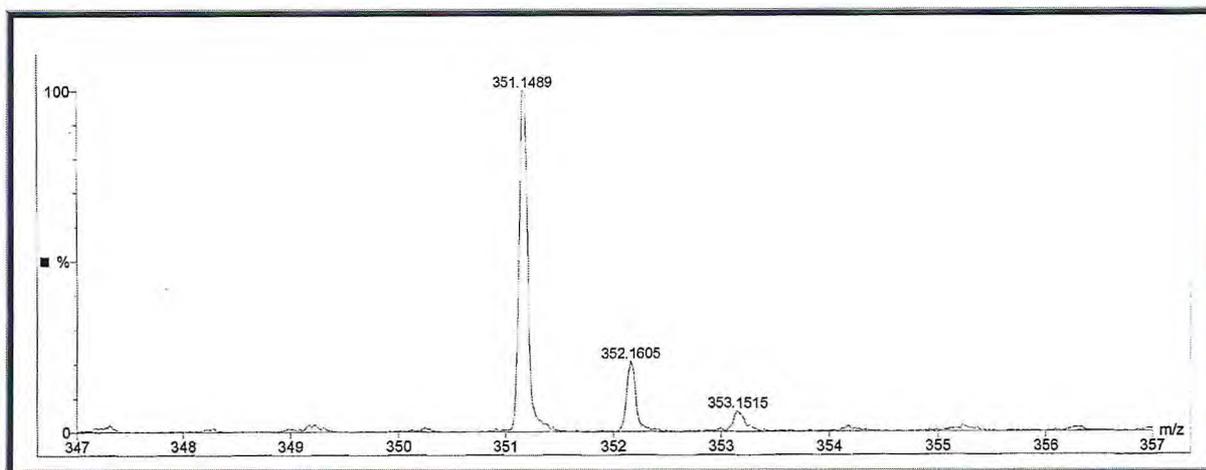


Figura 89 - Espectro de massas de alta resolução de TC-8

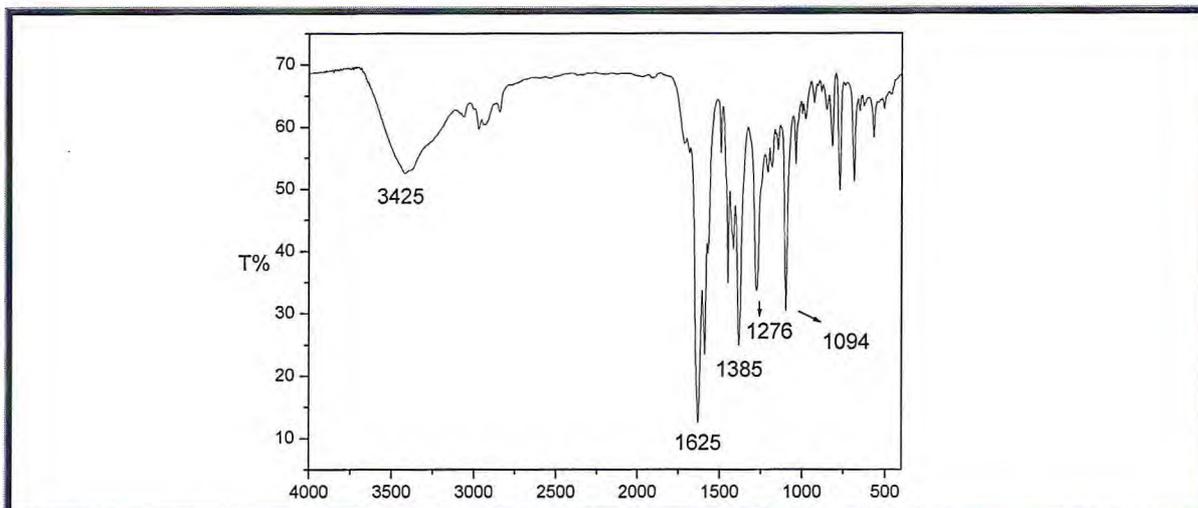


Figura 90 - Espectro de absorção na região do IV de TC-8

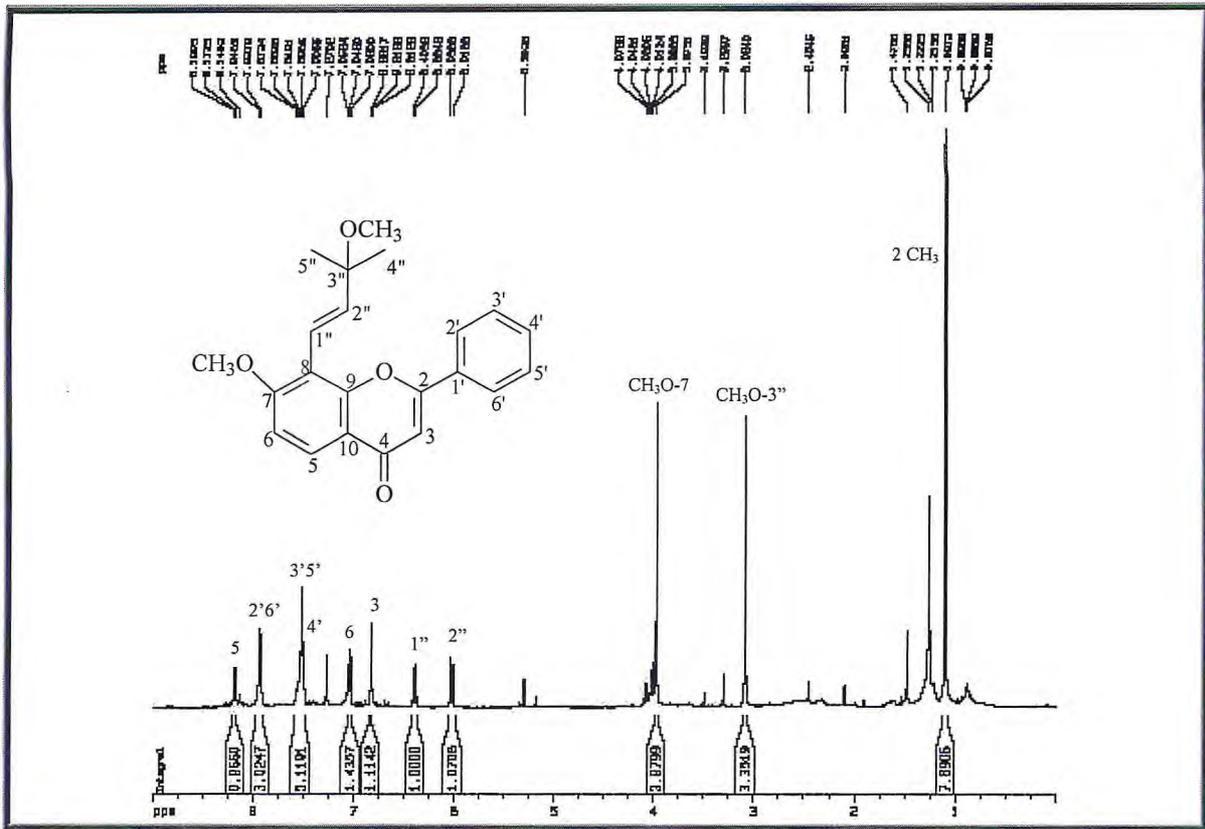


Figura 91 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de TC-8

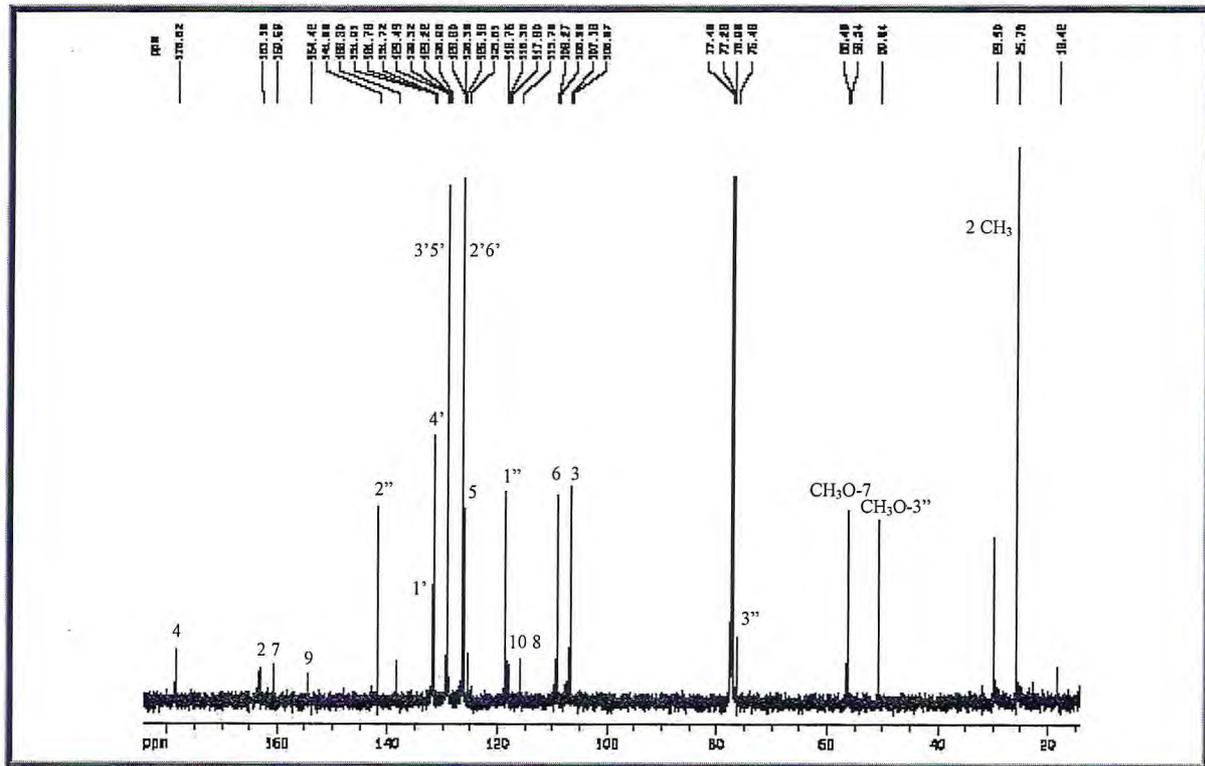


Figura 92 - Espectro de RMN ¹³C-HBBD (125 MHz, CDCl₃) de TC-8

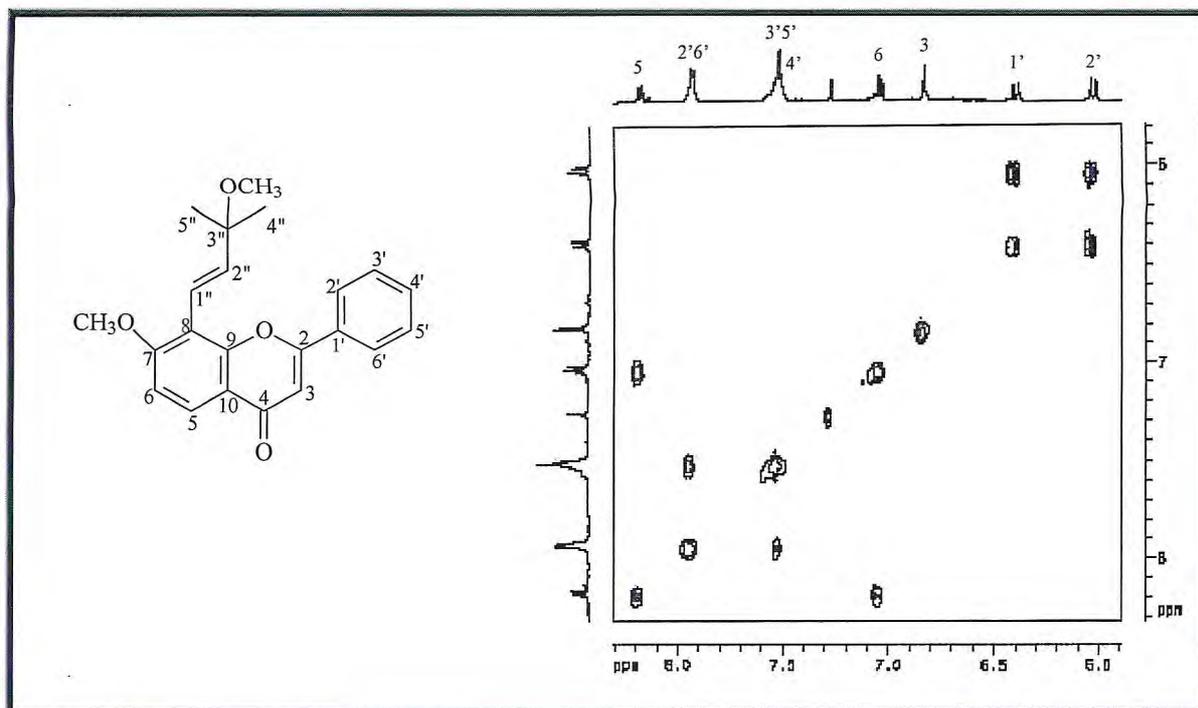


Figura 93 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-8

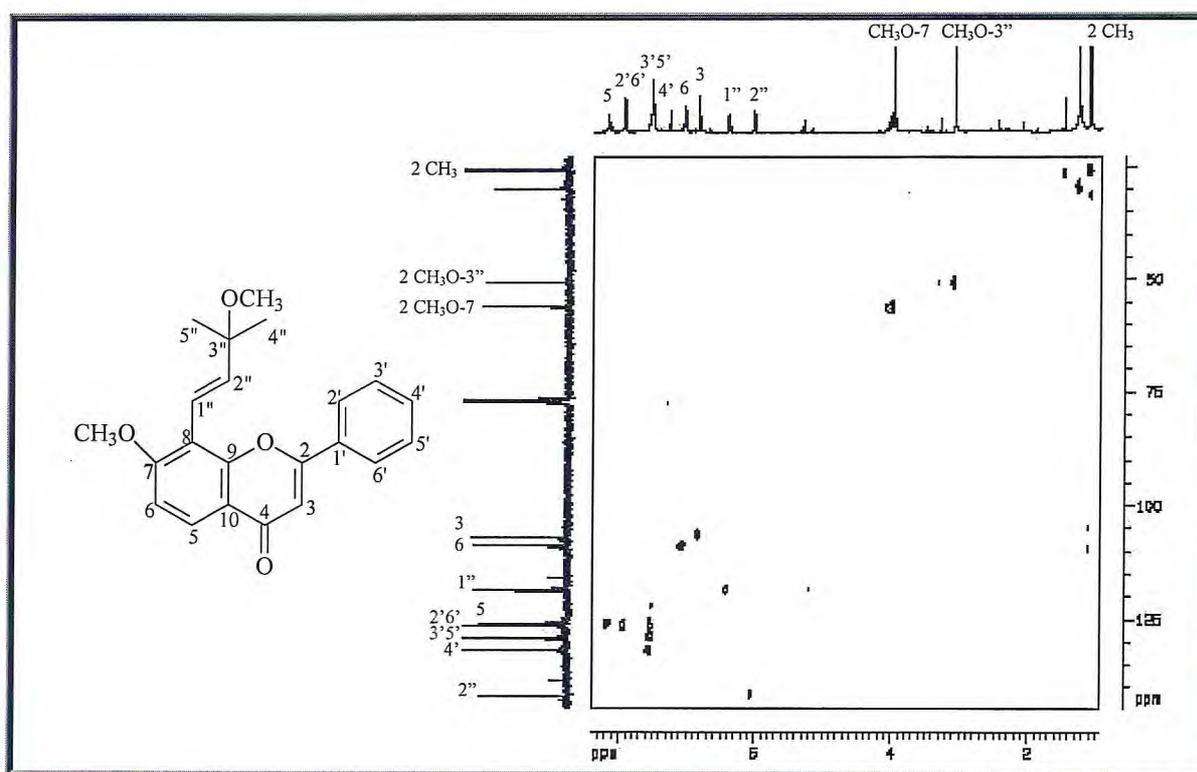


Figura 94 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-8

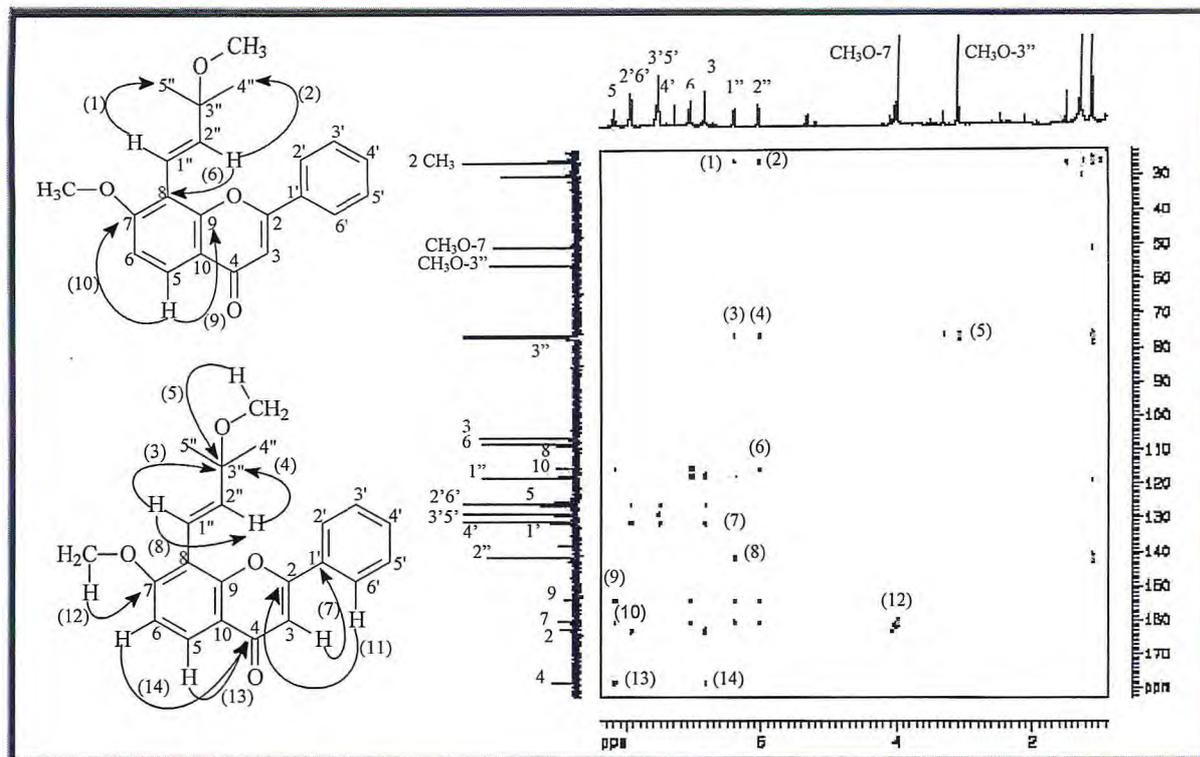


Figura 95 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HMBC de TC-8

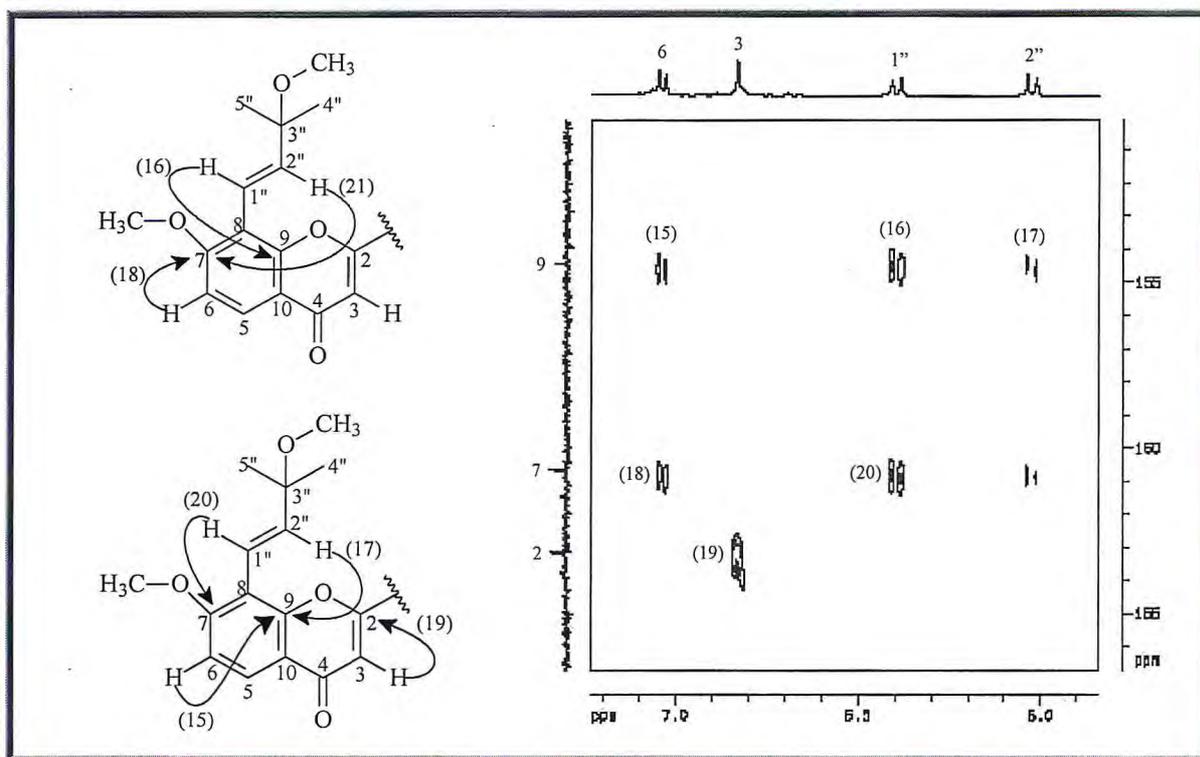


Figura 96 - Expansão-01 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HMBC de TC-8

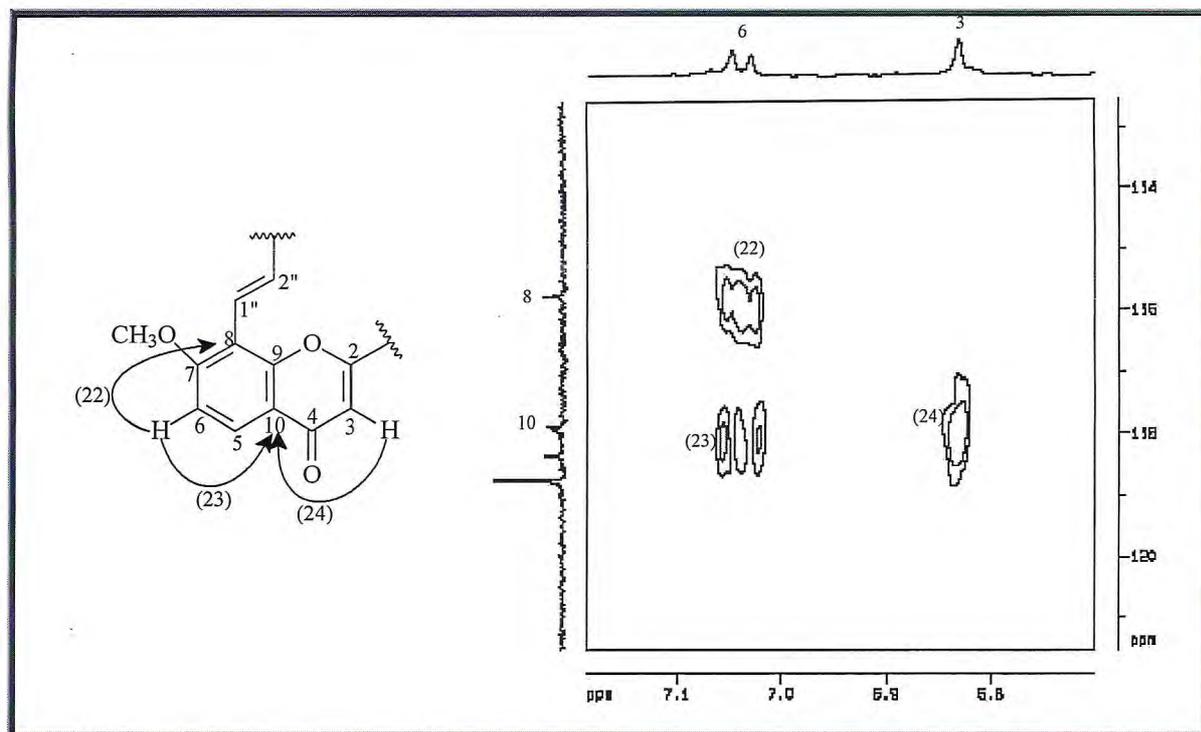


Figura 97 - Expansão-02 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HMBC de TC-8

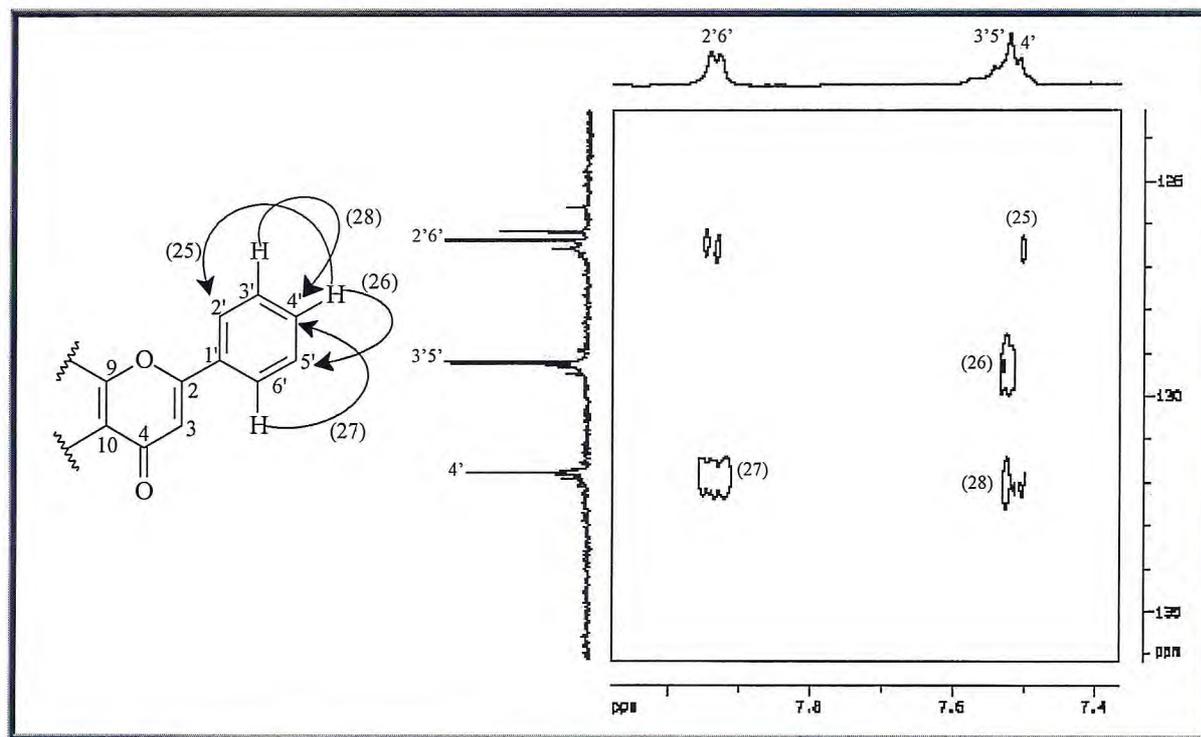


Figura 98 - Expansão-03 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HMBC de TC-8

3.2.9. Determinação Estrutural de TC-9

Após fracionamento cromatográfico da fração TCRAE-D (10-23) (152-163) (Item 5.5.3.2.5, p. 168) obtida do extrato acetato de etila de *T. cinerea*, foi possível o isolamento de um sólido cristalino em forma de agulha, solúvel em DMSO e piridina, denominado de TC-9 (p.f.=183,8-186,5 °C). Ao ser analisado em CCD, o composto apresentou fluorescência quando exposto à radiação U.V. (254 e 365 nm) e assumiu uma coloração verde após ser pulverizado com uma solução de vanilina com posterior aquecimento.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figuras 104 e 105, p. 107) de TC-9 foram observados dois sinais duplos, um em δ 7,09 (1H, d, $J = 8,8$ Hz) e outro em δ 8,38 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), os quais foram relacionados a hidrogênios de sistema aromático com acoplamento *orto* e indicaram a presença de um anel benzênico tetrassubstituído. Outros dois dubletos foram observados em δ 7,17 (1H, d, $J = 13,6$ Hz) e 7,50 (1H, d, $J = 13,6$ Hz), cuja constante de acoplamento é característica de hidrogênios olefínicos com geometria *cis*. Esses acoplamentos foram confirmados no espectro de correlação homonuclear ^1H , $^1\text{H} - \text{COSY}$ (Figura 107, p. 108). A presença de sinais múltiplos em δ 7,49 (2H, m) e 8,11 (3H, m) indicaram a existência de um anel aromático monossubstituído. Observou-se ainda no espectro de RMN ^1H , um singlete integrado para seis hidrogênios em δ 1,75 indicando a presença de dois grupos metila geminais; além de um outro sinal simples em δ 3,81 (3H, s) característico de hidrogênios de grupo metoxila.

Seu espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figura 106, p. 108) apresentou dezoito linhas espectrais, três na região de carbono sp^3 e as demais na região de carbonos sp^2 . O sinal em δ 178,07 foi relacionado a uma carbonila α,β -insaturada. Comparação com espectro de correlação heteronuclear a uma ligação (^1H , $^{13}\text{C} - \text{HSQC}$) (Figuras 108 e 109, p. 109), possibilitou atribuir o padrão de hidrogenação de cada carbono (Tabela 16, p. 101), indicando que os sinais em δ 127,30 e 129,66, os quais foram associados aos sinais de hidrogênio em δ 8,11 (2H, m), 7,49 (3H, m), são referentes a dois átomos de carbono.

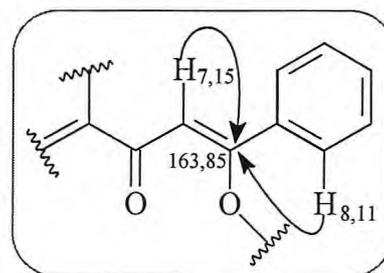
Tabela 16 - Valores de deslocamento químico (δ) dos carbonos de TC-9 com padrão de hidrogenação

C	CH	CH ₃	TOTAL
**178,07	146,87	*56,59	
*163,63	132,02	2 x 31,19	
*161,87	2 x 129,66		
*155,00	2 x 127,30		
133,02	125,57		
119,21	115,41		
115,83	109,97		
* 71,01	107,86		
C ₈ O ₄	C ₁₀ H ₁₀	C ₃ H ₉	C ₂₁ H ₁₉ O ₄

*C-O; **C=O

A existência do sistema 2'',2''-dimetilcromeno na estrutura de TC-9 foi sugerida através da presença de um carbono sp³ não hidrogenado e oxigenado em δ 71,01, de dois carbonos sp² em δ 146,87 e 115,41, associados aos hidrogênios em δ 7,17 (1H, d, $J = 13,6$ Hz) e 7,50 (1H, d, $J = 13,6$ Hz), além das metilas geminais em δ 31,19 ligadas a carbono sp³. A vasta ocorrência de flavonóides contendo o núcleo 2'',2''-dimetilcromeno em *Tephrosia* (VASCONCELOS, 2006), corrobora a proposição da presença do mesmo em TC-9.

Foi observado no diagrama de contorno do espectro RMN bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (¹H, ¹³C – HMBC) (Figura 110, p. 110) acoplamento entre os hidrogênios em δ 7,15 (1H, s) e 8,11 (2H, m) com o carbono não hidrogenado e oxigenado em δ 163,63 (²J_{CH}). Estes acoplamentos aliados ao valor do hidrogênio olefínico (δ 7,15) sugeriram para TC-9 um esqueleto chalcônico.



Estes acoplamentos, associados à presença de dois anéis aromáticos (mono- e tetrassubstituído), de um grupamento metoxila e de um sistema 2'',2''-dimetilcromeno, apontaram para TC-9 a proposta de três chalconas isoméricas com a posição β oxigenada e possuindo um sistema 2'',2''-dimetilcromeno em posição angular ou linear (Figura 99, p. 102).

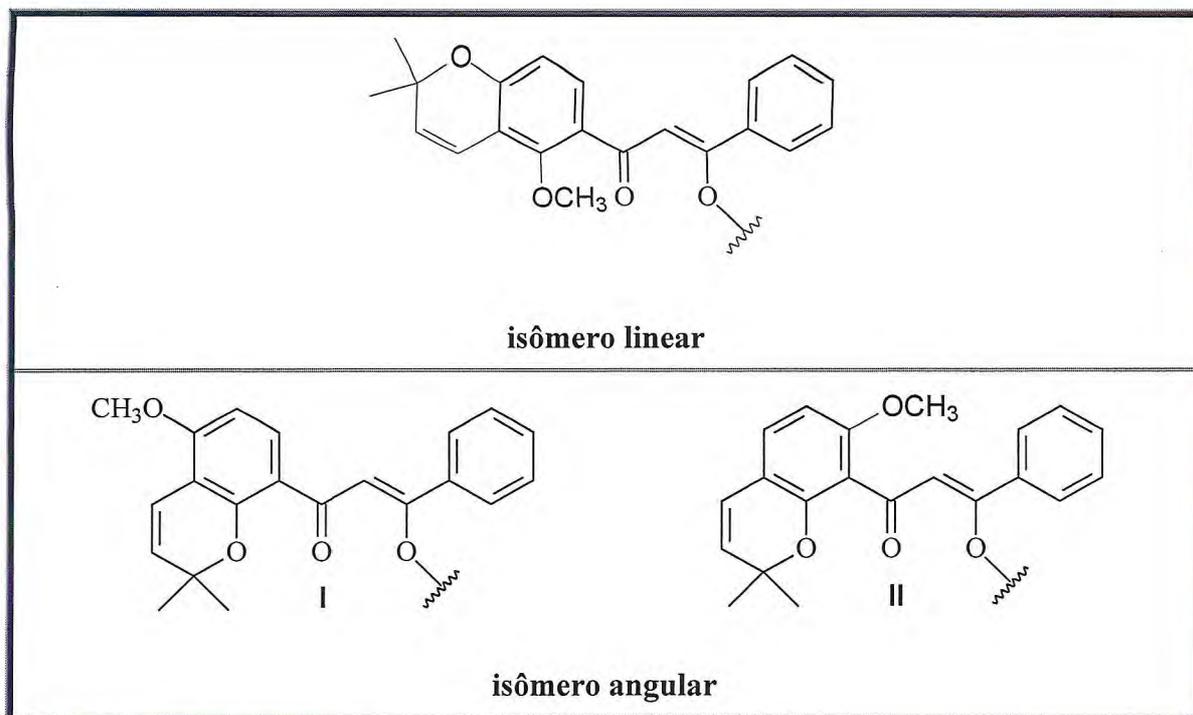


Figura 99 - Possibilidades de estruturas isoméricas para TC-9

Pesquisa na literatura (MAGALHÃES *et al.*, 1996; TOMAZELA *et al.*, 2000) revela que as metoxilas em posições estericamente impedidas, como no isômero linear, são mais desblindadas em comparação com as metoxilas sem compressão estérica. Como exemplo, pode-se citar a 2'-metoxi-6'',6''-dimetilcromeno-[2'',3'':4',3']- β -hidroxichalcona (Figura 100 (a)) (MAGALHÃES *et al.*, 1996) e 2'-hidroxi-3,4,4',5-tetrametoxi-5',6'-(2'',2''-dimetilpirano)chalcona (Figura 100 (b)) (TOMAZELA *et al.*, 2000).

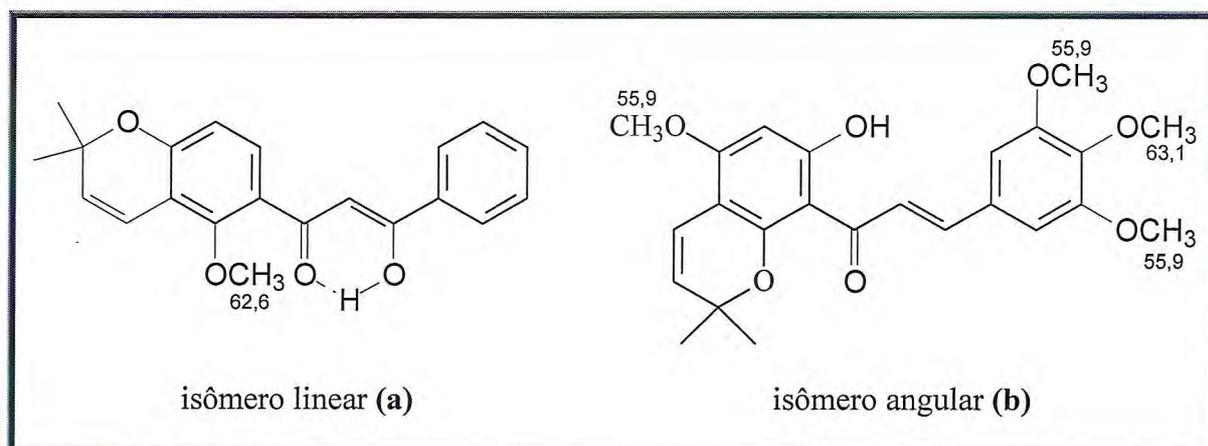
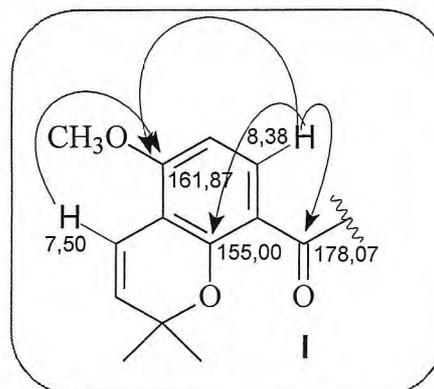


Figura 100 - Comparação dos valores de deslocamento químico (δ) dos carbonos das metoxilas com e sem compressão estérica

Assim, o deslocamento químico (δ 56,59) do carbono metoxílico existente em TC-9, possibilitou eliminar a hipótese do isômero linear. Análise do diagrama de contorno do espectro de HMBC corroborou para a elucidação da estrutura de TC-9, uma vez que é observada claramente uma correlação entre o hidrogênio em δ 8,38 (1H, d, $J = 8,8$ Hz) com os carbonos em δ 178,07 ($^3J_{CH}$), 155,00 ($^3J_{CH}$) e 161,87 ($^3J_{CH}$). Observou-se também o acoplamento do hidrogênio do sistema 2'',2''-dimetilcromeno em δ 7,50 (1H, d, $J = 13,6$ Hz) com o carbono metoxilado em δ 161,87 ($^3J_{CH}$). Essas observações são coerentes com o isômero angular I, o que não seria possível na estrutura do isômero angular II.



A partir do espectro de massas de alta resolução (HRMS) por ionização química (Figura 103, p. 106), o qual apresentou o pico íon pseudo-molecular $[M+1]^+$ com m/z 655,4360, foi possível sugerir para TC-9 a fórmula molecular $C_{42}H_{39}O_7$. Desta forma, pode-se concluir que TC-9 tratava-se de uma bichalcona tendo como monômero o isômero angular I. Os picos de m/z 337,2230 (100%) e 319,1824 (67%) foram associados a produtos de fragmentação de TC-9 através de um rearranjo de McLafferty (Figura 102, p. 104).

A conexão entre as duas unidades monoméricas foi conduzida com base na presença de um carbono olefínico oxigenado na posição C-7, observado no espectro de RMN ^{13}C -HBBDD, e na ausência de hidroxila de sistema quelatogênico ou de grupos fenóis, que deveriam ser evidenciados no espectro de RMN 1H . Os dados espectrais obtidos, aliados à ocorrência de flavonóides diméricos no gênero *Tephrosia* (GÓMEZ-GARIBAY *et al.*, 1999), possibilitaram concluir que o composto isolado tratava-se de 4',4''-dimetoxi-2'',2''-dimetilcromeno [2',3':7,8; 2''',3''':7''',8''']-7 \rightarrow O \rightarrow 7'''-bichalcona (**88**) (Figura 101, p. 104), que no melhor dos nossos conhecimentos está sendo registrada pela primeira vez na literatura.

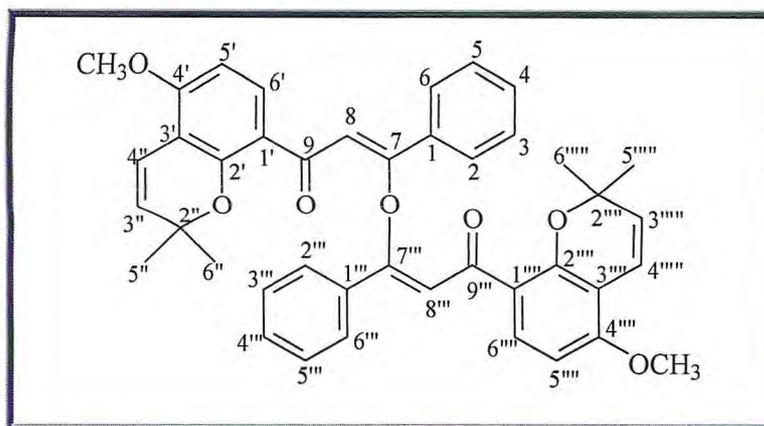


Figura 101 - Estrutura de 4',4''''-dimetoxi-2'',2'',2''',2'''' bis-dimetilcromeno [2',3':7,8;2''',3''':7''',8''']-7->O->7''''-bichalcona (88)

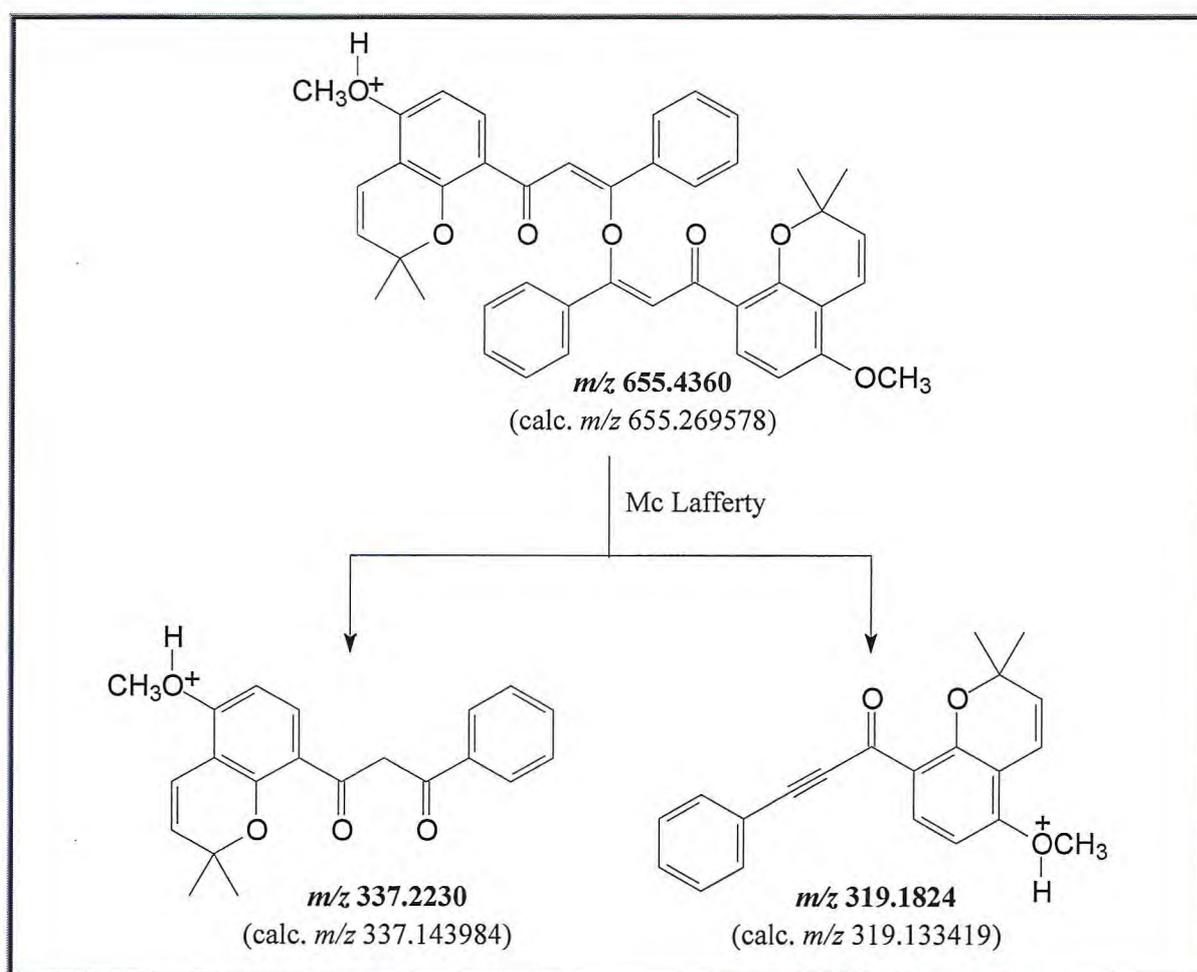


Figura 102 - Proposta de fragmentação de TC-9 no espectro de massas de alta resolução

Tabela 17 - Dados espectroscópicos uni e bidimensionais de TC-9 (C₅D₅N)

C	δ_H (mult., J em Hz)	δ_C	HMBC	
	TC-9	TC-9	$^2J_{C-H}$	$^3j_{C-H}$
1	--	133,02	--	H-3/H-5
2,6	8,11 (m)	127,30	--	H-7
3,5	7,49 (m)	129,66	--	--
4	7,50 (m)	132,02	H-3/H-5	H-2/H-6
7	--	163,63	H-8	H-2/H-6
8	7,15 (s)	107,86	--	--
9	--	178,07	--	H-6'
1'	--	119,21	--	H-5'
2'	--	155,00	--	H-6'/H-2''
3'	--	115,83	--	H-5'/H-3''
4'	--	161,87	--	H-6'/H-2''/CH ₃ O-4'
5'	7,09 (d; 8,8)	109,97	--	--
6'	8,38 (d; 8,8)	125,57	--	--
2''	--	71,01	--	--
3''	7,17 (d; 13,6)	146,87	--	3H-5''/3H-6''
4''	7,50 (d; 13,6)	115,41	H-3''/3H-5''/3H-6''	H-2''
5''	1,75 (s)	31,19	--	--
6''	1,75 (s)	31,19	--	--
CH ₃ O-4'	3,81 (s)	56,59	--	--

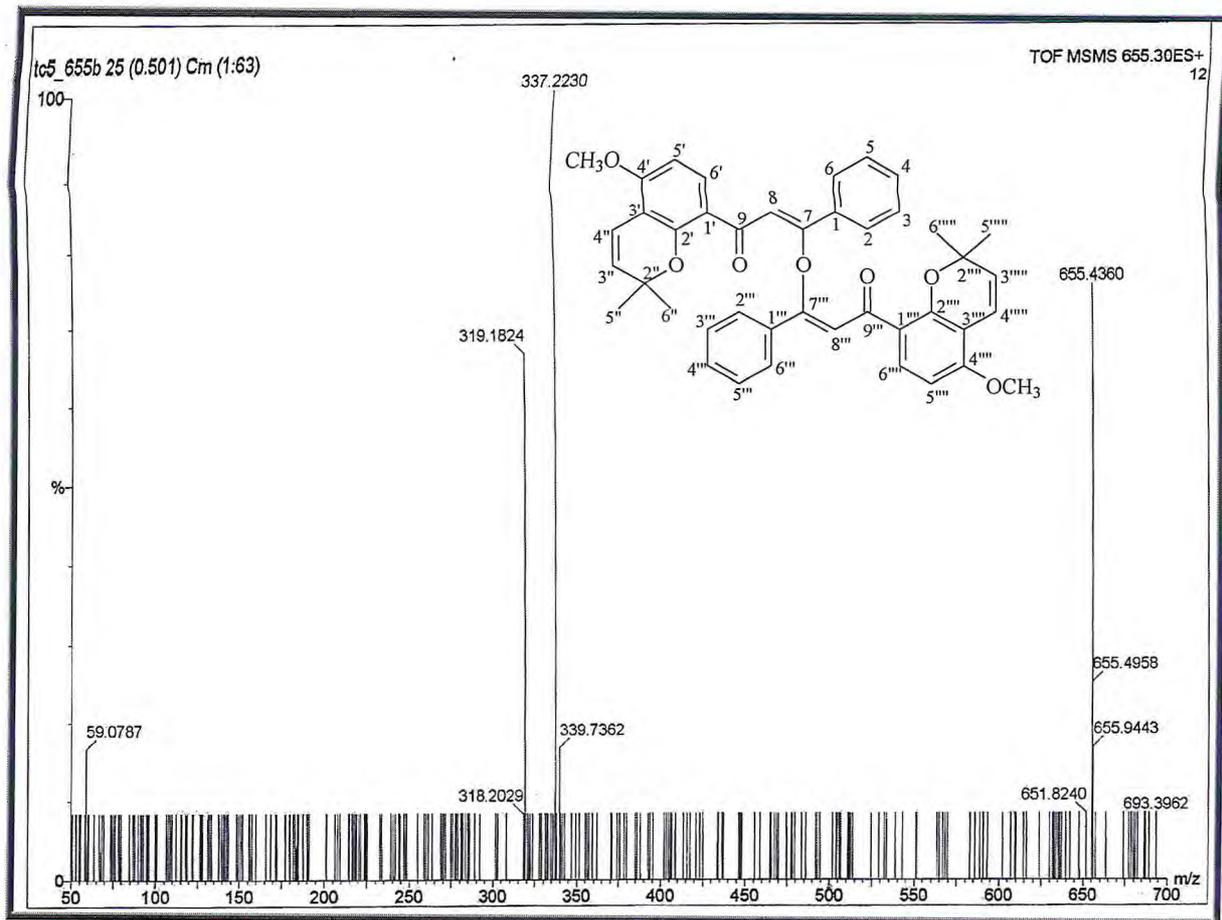


Figura 103 - Espectro de massas de alta resolução de TC-9

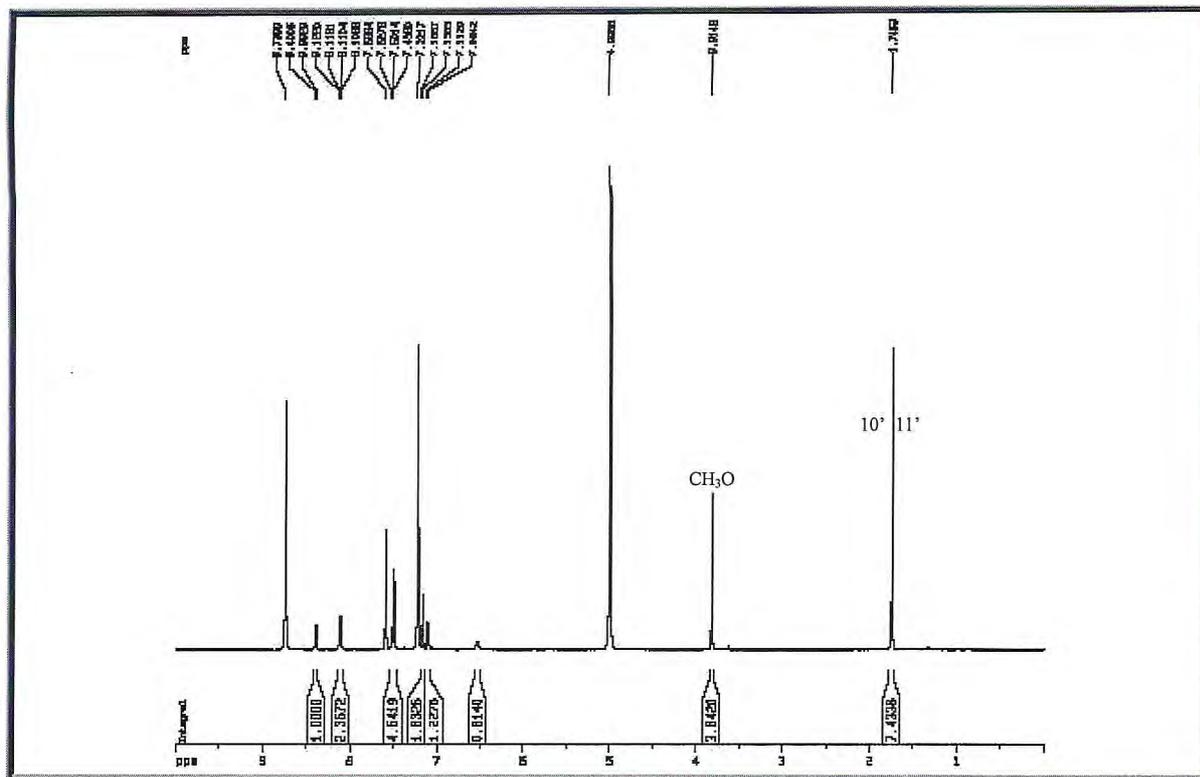


Figura 104 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de TC-9

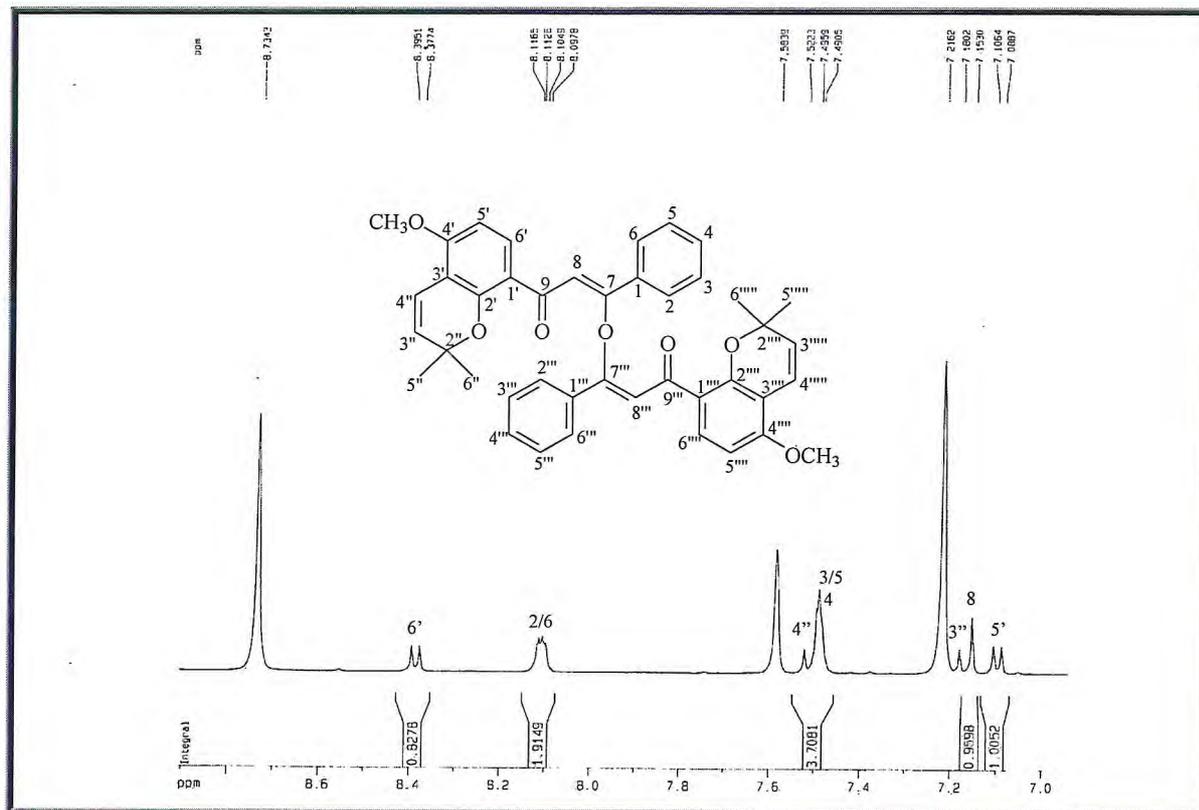


Figura 105 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de TC-9

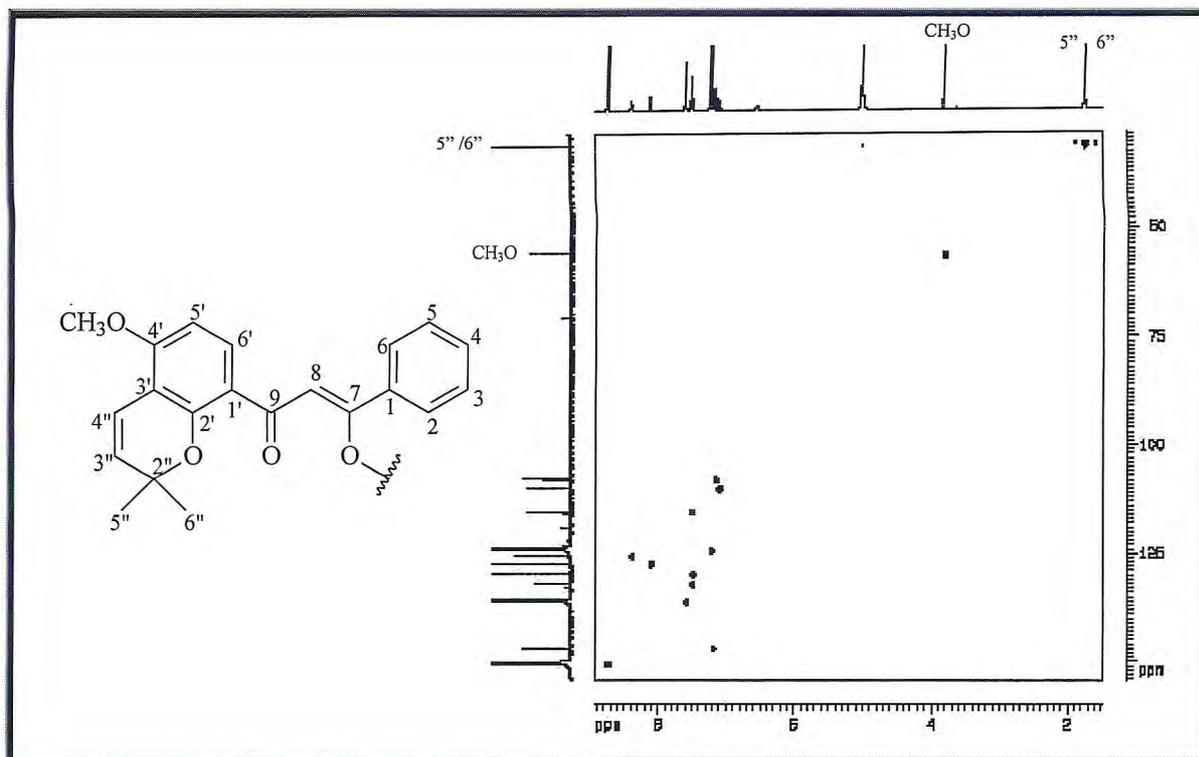


Figura 108 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-9

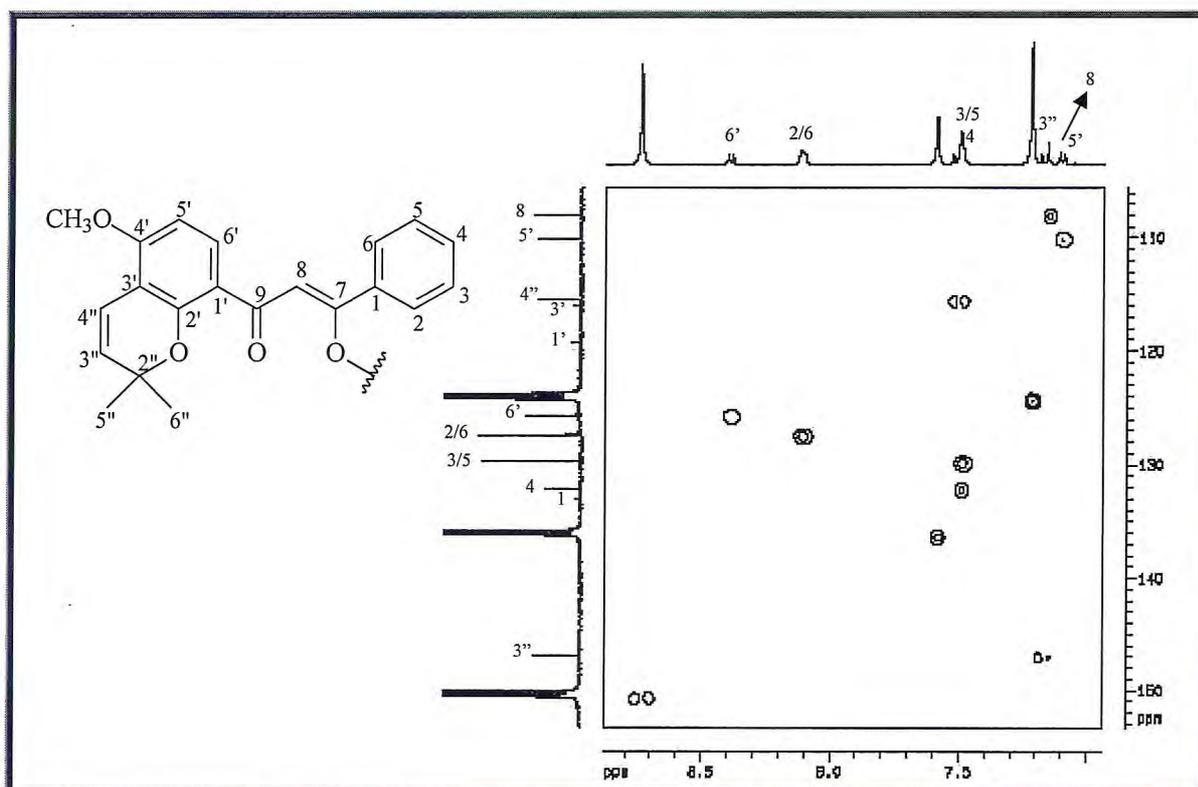


Figura 109 - Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-9

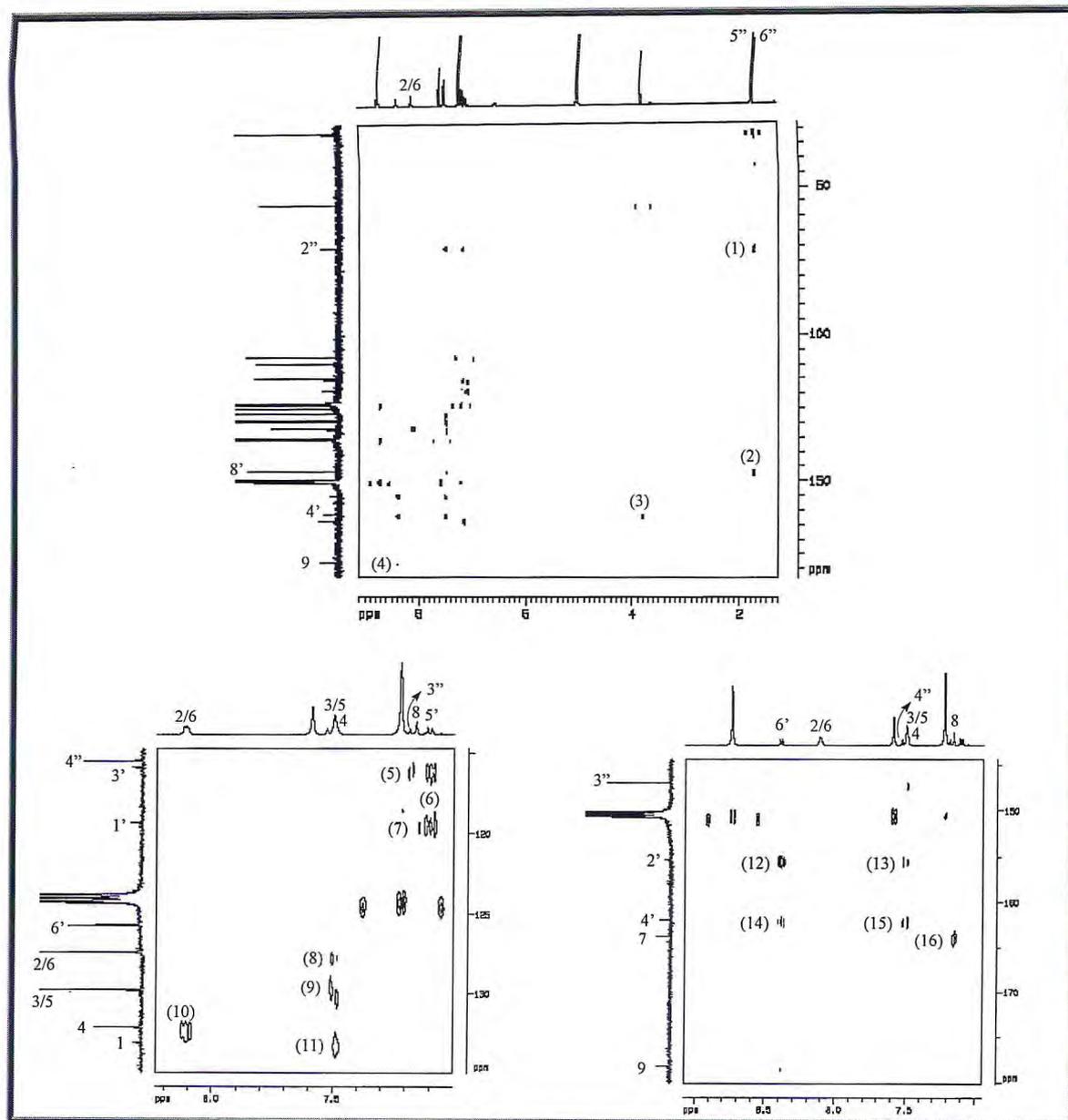
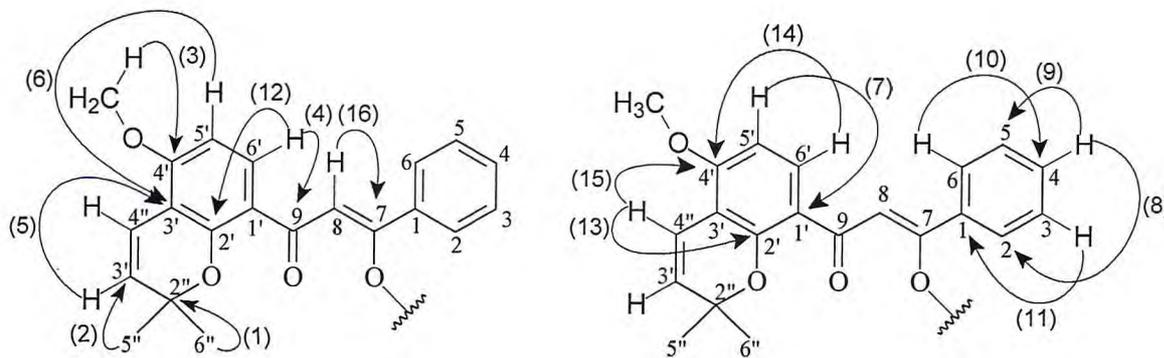


Figura 110 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-9



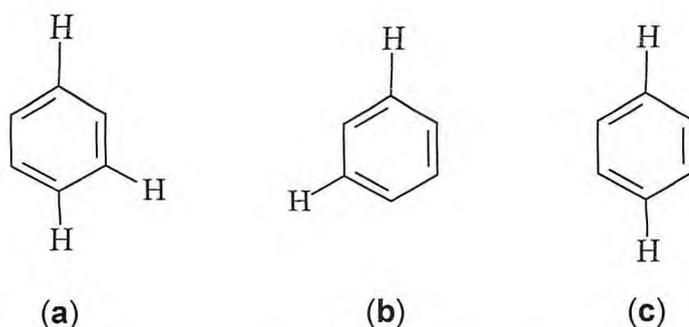
3.2.10. Determinação Estrutural de TC-10

O extrato etanólico dos galhos de *T. cinerea* (TCGE) apresentou um precipitado escuro que, após ser lavado com MeOH, levou ao isolamento de um sólido amarelo intenso, solúvel em piridina e DMSO, denominado TC-10. O sólido, homogêneo em CCD, apresentou fluorescência na luz U.V. (254 e 365 nm) e coloração azul após ser revelada com solução de vanilina.

A análise do espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) (Figuras 116 e 117, p. 117) apresentou vinte e sete linhas espectrais. O sinal em δ 178,98 permitiu sugerir a presença de uma carbonila conjugada. Comparação dos dados obtidos no espectro de RMN ^{13}C -HBBD com os de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Figura 118, p. 118) possibilitou reconhecer o padrão de hidrogenação de cada carbono e atribuir os sinais em δ 105,45, 122,66, 135,72, 147,00, 150,93, 158,45, 157,93, 162,91 e 166,19 a carbonos não hidrogenados; os sinais em δ 94,90, 100,06, 116,56 e 123,20, além dos sinais entre δ 69,86 e 78,92 a carbonos monohidrogenados; o sinal em δ 68,76 a carbono metilênico e o sinal em δ 18,78 a carbono metílico.

De acordo com a teoria do deslocamento químico (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000), foi possível afirmar que, dos sinais observados, aqueles em δ 166,19; 162,91; 157,93; 158,45; 150,93; 147,00; 135,20; 122,66 e 105,45 indicam a presença de carbonos sp^2 , dentre os quais sete são oxigenados; e aqueles entre δ 78,92 e 69,86 a de carbonos sp^3 também oxigenados.

Foram observados, no espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) (Figuras 114 e 115, p. 116), três dubletos referentes a hidrogênios ligados a anel aromático em δ 7,38 (1H, d, $J = 8,4$ Hz); 8,14 (1H, dd, $J = 8,4$ e 1,3 Hz) e 8,36 (1H, d, $J = 1,3$ Hz), cujos valores de J caracterizam hidrogênios de sistema aromático acoplado entre si em posições *orto*, *orto-meta* e *meta* (**a**), respectivamente, e, mais dois hidrogênios em δ 6,67 (1H, sl) e 6,71 (1H, sl), também referentes a hidrogênios ligados a anel aromático em posição *meta* (**b**) ou *para* (**c**), como representado abaixo.



Estes dados sugeriram que TC-10 deva apresentar em sua estrutura dois anéis aromáticos, um tri- (a) e o outro tetrassubstituído (b ou c).

A presença destes dois anéis aromáticos mencionados acima, da carbonila α,β -insaturada, confirmada pelo espectro de RMN ^{13}C -HBBD, bem como a ausência de hidrogênios olefínicos, além da ocorrência de flavonóides neste gênero, sugeriram para TC-10 a estrutura de uma flavona com a posição C-3 oxigenada. O sinal em δ 13,09 (sl) característico de hidrogênio hidroxílico de um sistema quelatogênico em hexanel e as observações feitas anteriormente, evidenciaram que o anel aromático trissubstituído deva possuir hidrogênios em posição *meta* (b), e propor para TC-10 o esqueleto flavônico da Figura 111.

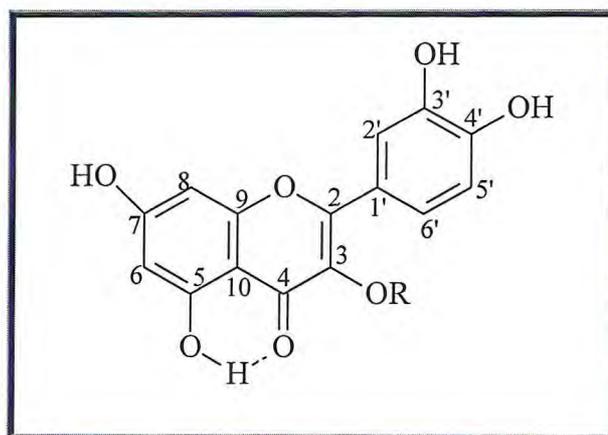


Figura 111 - Esqueleto flavônico com sistema quelatogênico e posição C-3 oxigenada

O espectro de RMN ^1H apresentou ainda sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 oxigenados, sugerindo a presença de unidades de açúcar, o que foi confirmado pelos sinais em δ 6,01 (d, $J = 7,3$ Hz) e 5,36 (sl) característicos de hidrogênios ligados a carbonos anoméricos.

O valor elevado da constante de acoplamento para o hidrogênio centrado em δ 6,01 ($J = 7,3$ Hz) permitiu sugerir que um dos açúcares é o β -D-glicopirranose, e que a outra unidade de açúcar revelada pelo sinal largo centrado em δ 5,36 ligado ao CH em δ 102 são compatíveis com a α -L-ramnopirranose.

A proposta destas unidades glicosídicas foi realizada através da observação de alguns sinais característicos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C -HBBD, além das associações observadas no diagrama de contorno do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação (^1H , ^{13}C – HSQC) (Figuras 121 e 122, p. 119 e 120). O dubleto em δ 1,53 (3H, d, $J = 5,7$ Hz) referente a um grupamento metila ligado a carbono sp^3 e associado ao sinal de carbono em δ 17,78 confirmou a ramnose como uma das unidades de açúcar presentes na estrutura de TC-10. A associação dos hidrogênios em δ 4,53 (1H, d, $J = 10,6$ Hz) e 4,02 (m) com o carbono em δ 68,75, corroborou com a presença de um grupamento metilênico da unidade de glicose. A atribuição dos hidrogênios de cada unidade de açúcar foi baseada na análise do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (Figuras 119 e 120, p. 118 e 119), através dos acoplamentos entre os sinais dos respectivos hidrogênios.

Os acoplamentos dos hidrogênios ligados a carbonos anoméricos observados no diagrama de contorno do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C – HMBC) (Figuras 123 e 124, p. 120 e 121) permitiram determinar as posições de cada unidade de açúcar. Observou-se um acoplamento a três ligações do hidrogênio ligado ao carbono anomérico da ramnose em δ 5,36 com o carbono metilênico da glicose em δ 68,75, cujo deslocamento químico indica que a ramnose está ligada na posição C-6'' da glicose. Igualmente os hidrogênios metilênicos da glicose em δ 4,53 e 4,02 acoplam a três ligações com carbono anomérico da ramnose em δ 102,83, como ilustrado na Figura 112, p. 114.

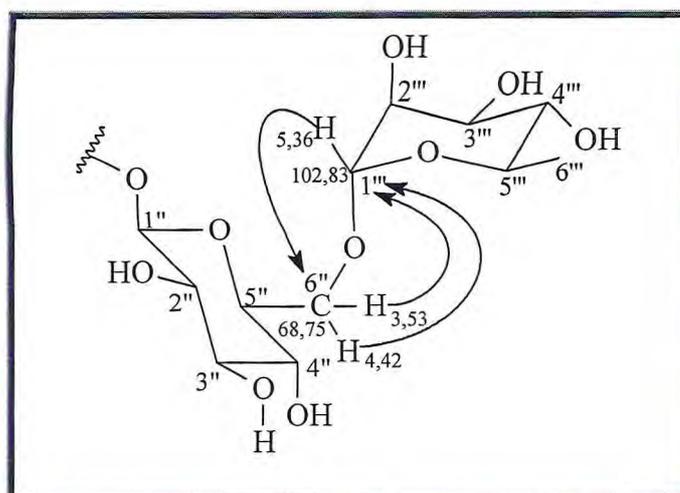


Figura 112 - Representação dos acoplamentos observados no espectro de HMBC caracterizando a interação entre as duas unidades glicosídicas de TC-10

O acoplamento a três ligações do hidrogênio ligado ao carbono anomérico da glicose em δ 6,01 com o carbono em δ 135,72 (C-3), permitiu confirmar a posição da unidade glicosídica neste carbono.

A análise completa de todos os espectros obtidos conduziu a identificação inequívoca de TC-10 como sendo a rutina (**89**) (quercetina 3-O- α -L-rhamnopiranosil (1 \rightarrow 6)-glicopiranosídeo) (Figura 113), cuja estrutura foi confirmada através da comparação com dados da literatura para esta, já descrita para várias espécies vegetais, dentre elas *T. deflexa* e *T. albifoliolis* (NIASSY *et al.*, 2004).

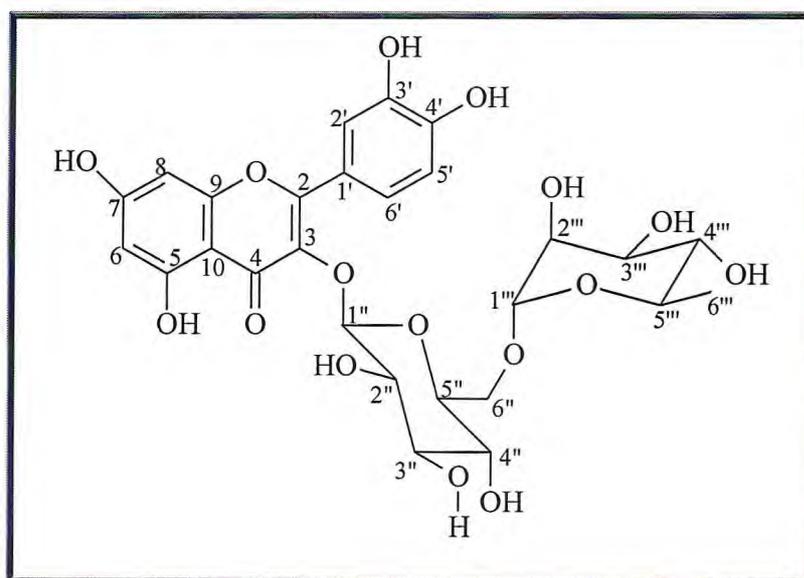


Figura 113 - Estrutura da rutina (**89**) (quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosídeo (1 \rightarrow 6) glicopiranosídeo)

Tabela 18 - Dados espectroscópicos de TC-10 (C₅D₅N) comparados com dados da literatura para rutina (NIASSY *et al.*, 2004)

C	δ_H (mult., J em Hz)		δ_C		HMBC	
	rutina	TC-10	rutina	TC-10	$^2J_{C-H}$	$^3J_{C-H}$
2	--	--	156,7	158,45	--	H-2'/H-6'
3	--	--	133,4	135,72	--	H-1''
4	--	--	177,4	178,89	--	--
5	--	--	161,3	162,91	H-6	--
6	6,19 (d; 1,9)	6,71 (sl)	98,7	100,06	--	H-8
7	--	--	164,1	166,19	H-6/H-8	--
8	6,38 (d; 1,9)	6,67 (sl)	93,7	94,90	--	H-8
9	--	--	156,5	157,93	H-8	--
10	--	--	104,0	105,45	--	H-6/H-8
1'	--	--	121,3	122,66	--	H-5'
2'	7,52 (d; 2,2)	8,36 (d; 1,3)	116,4	118,14	--	H-6'
3'	--	--	144,8	147,00	H-2'	--
4'	--	--	148,4	150,93	--	H-2'/H-6'
5'	6,83 (d; 9,0)	7,38 (d; 8,4)	115,2	116,56	--	--
6'	7,53 (dd; 9,0; 2,2)	8,14 (dd; 8,4; 1,3)	121,7	123,20	--	H-2'
HO-5	--	13,09 (sl)	--	--	--	--
1''	5,34 (d; 7,1)	6,01 (d; 7,5)	102,0	105,07	H-2''	H-5''
2''	3,21 (s)	4,29 (s)	74,9	76,27	H-3''	--
3''	3,30 (s)	4,33 (s)	77,4	78,92	H-2''/H-4''	H-1''/H-5''
4''	3,31 (s)	4,03 (s)	70,5	71,58	H-3''/H-5''	H-6''a
5''	3,31 (s)	4,11 (m)	76,0	77,75	H-4''	H-1''
6''	3,70 (d; 9,8); 3,28	4,53 (d; 10,6); 4,02	69,3	68,75	H-5''	H-4''/H-1''
1'''	4,38 (d; 1,1)	5,36 (sl)	101,6	102,83	--	H-5'''/2H-6''
2'''	3,28 (d)	4,43 (sl)	70,7	72,41	H-1'''/H-3'''	--
3'''	3,28 (s)	4,42 (d)	70,5	72,80	H-4'''	H-1'''
4'''	3,08 (s)	4,18 (t)	71,9	74,25	H-3'''	3H-6'''
5'''	3,25 (s)	4,21 (m)	68,4	69,86	3H-6'''	H-1'''
6'''	0,98 (d)	1,53 (d; 5,7)	17,3	18,78	H-5'''	--

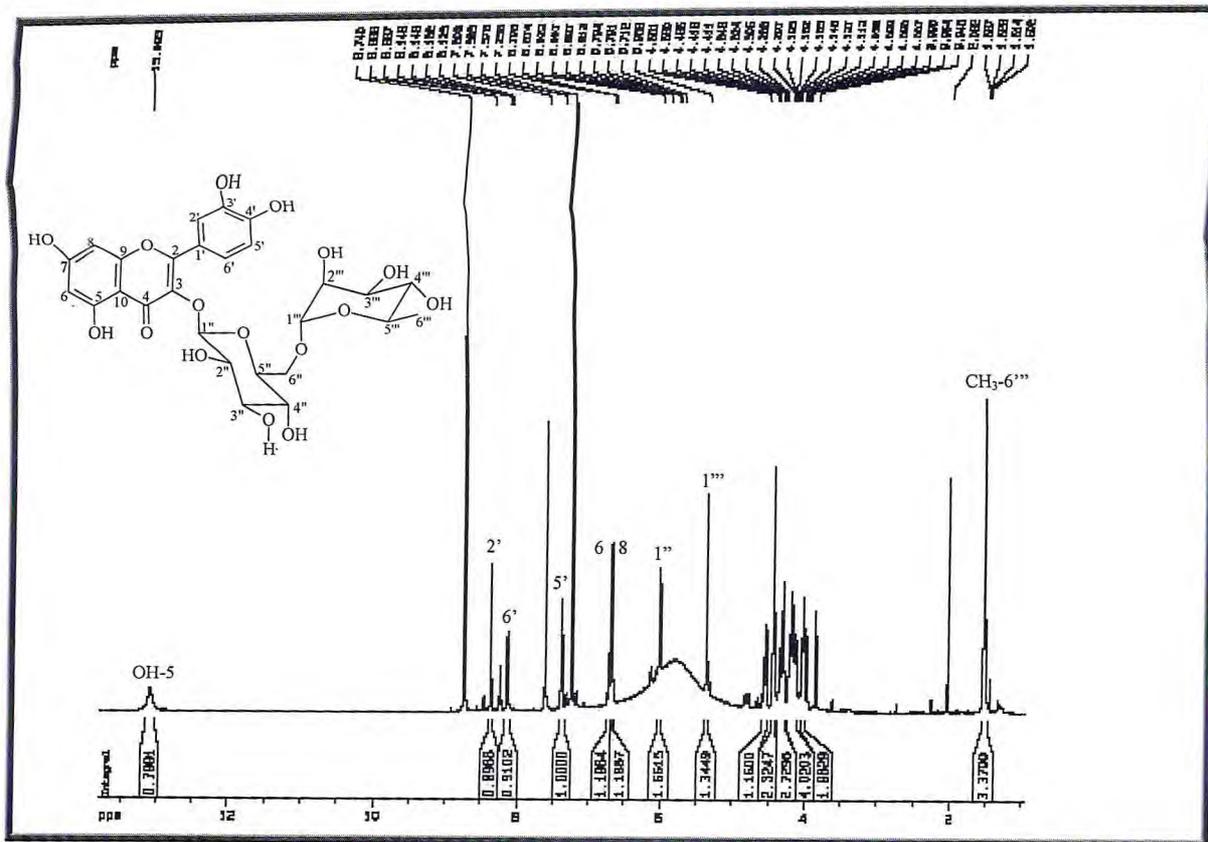


Figura 114 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de TC-10

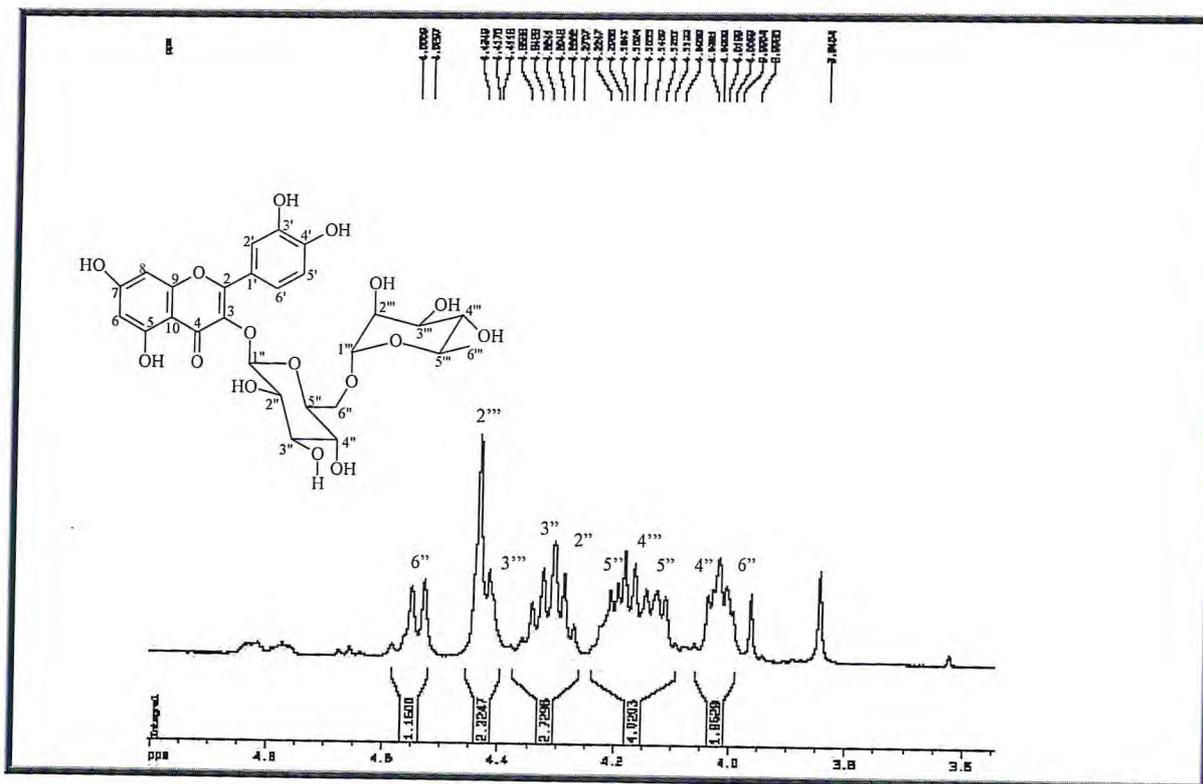


Figura 115 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de TC-10

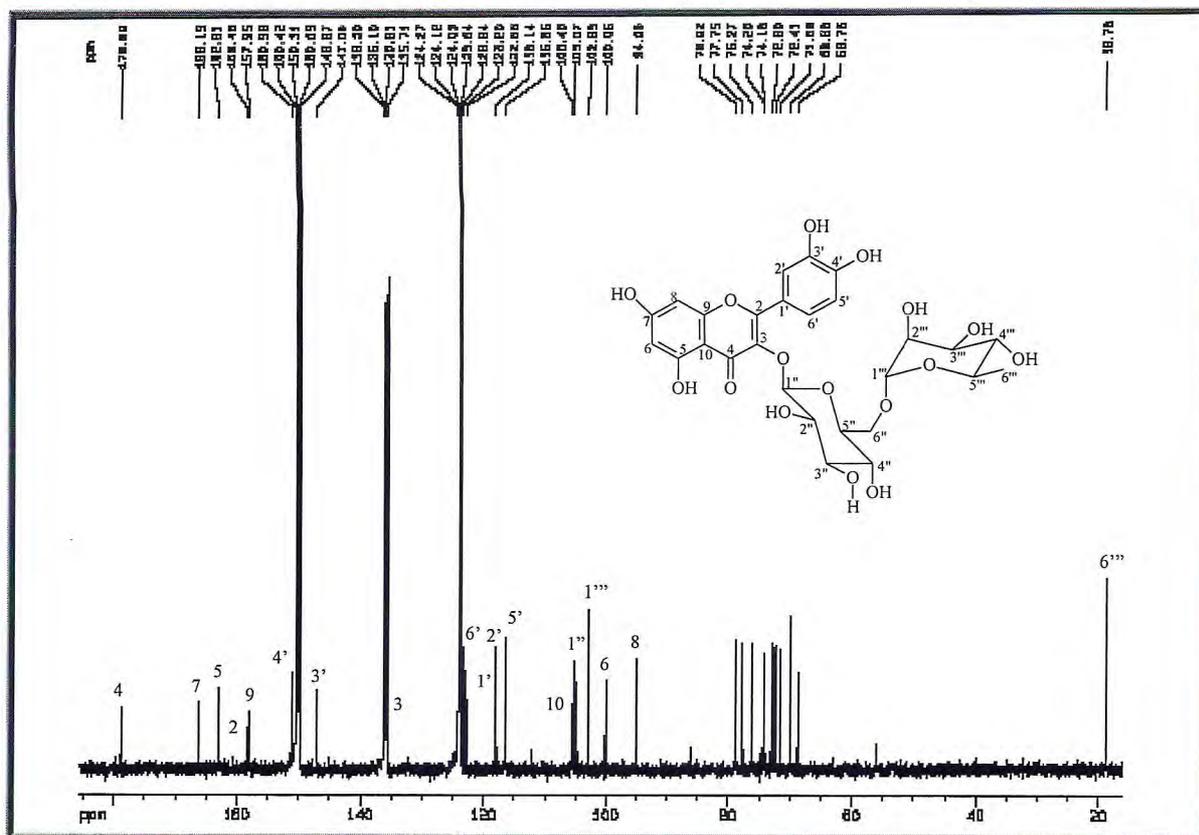


Figura 116 - Espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de TC-10

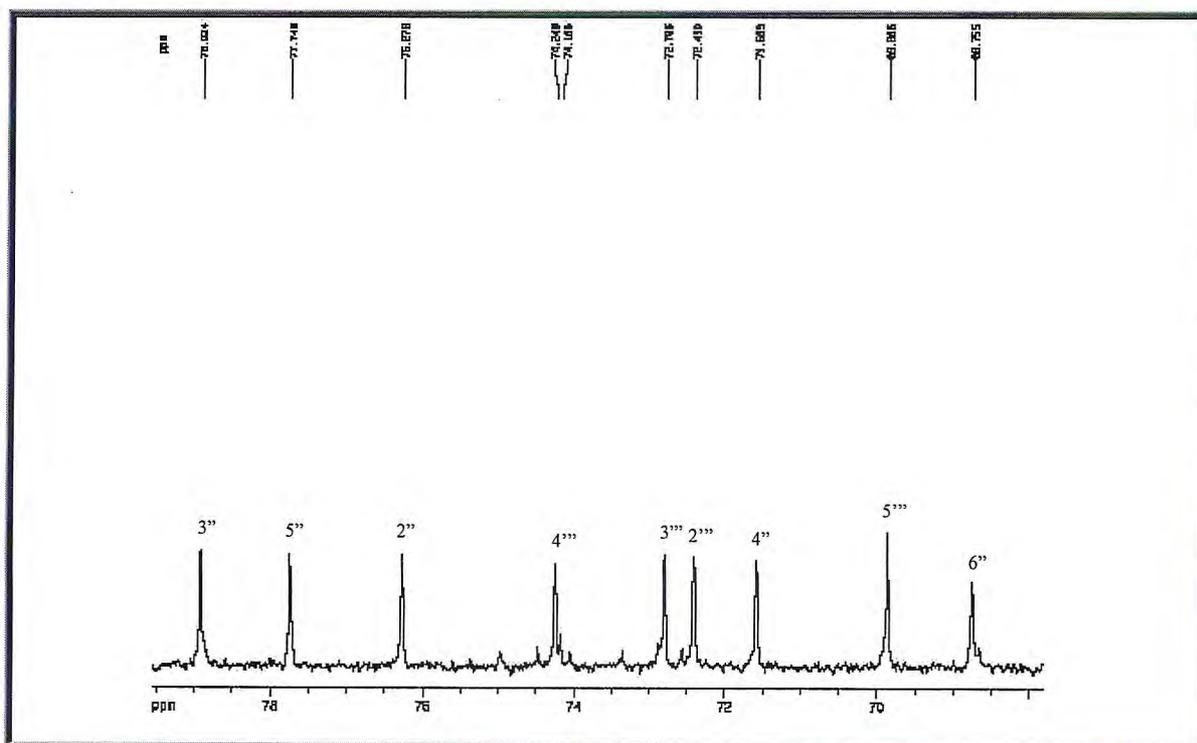


Figura 117 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de TC-10

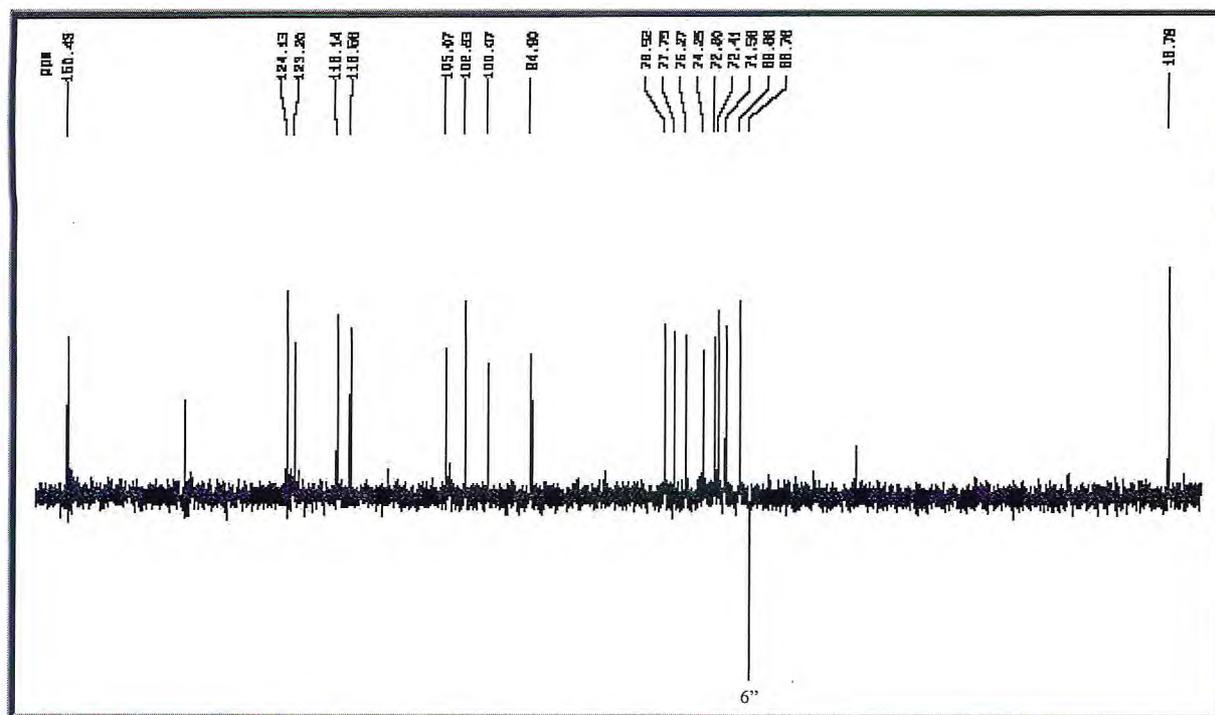


Figura 118 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de TC-10

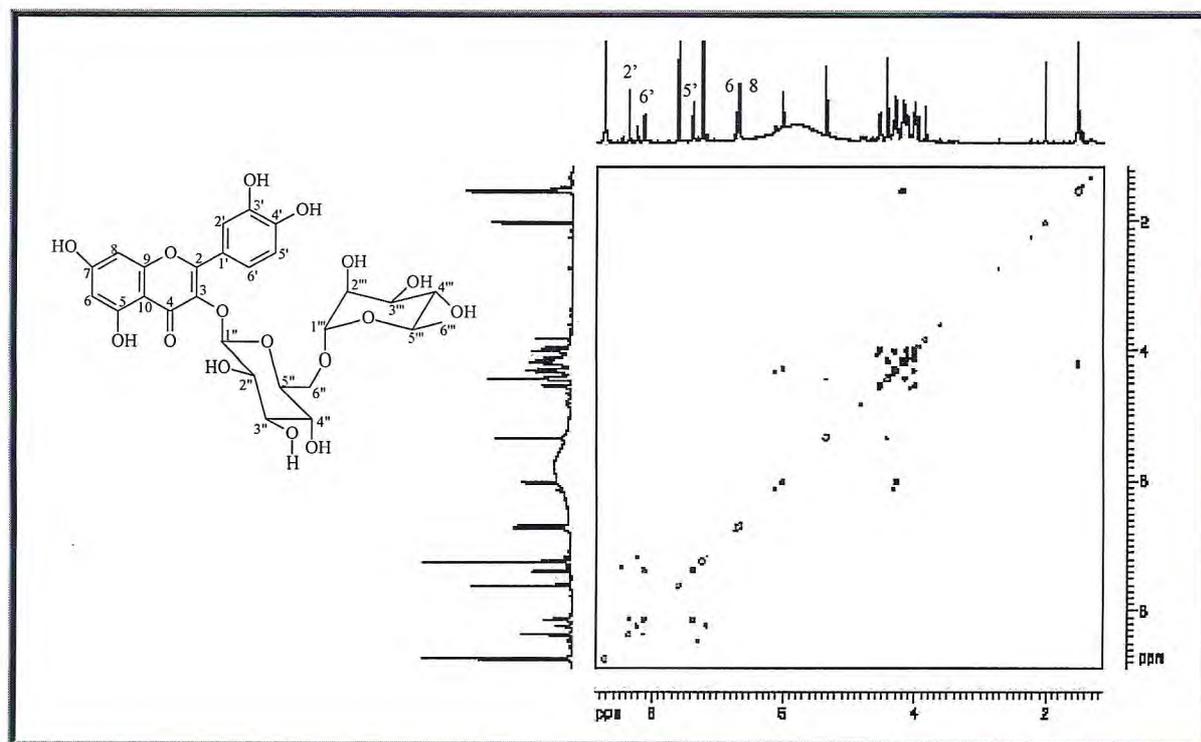


Figura 119 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de TC-10

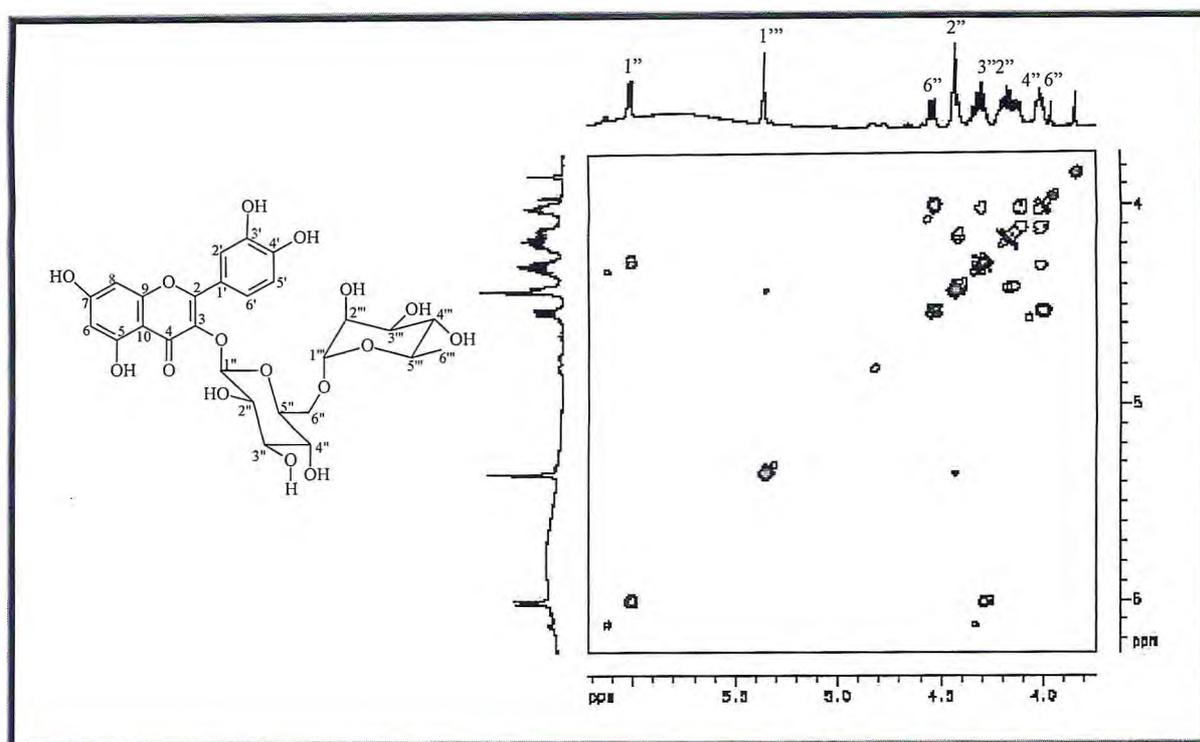


Figura 120 - Expansão do espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H - COSY de TC-10

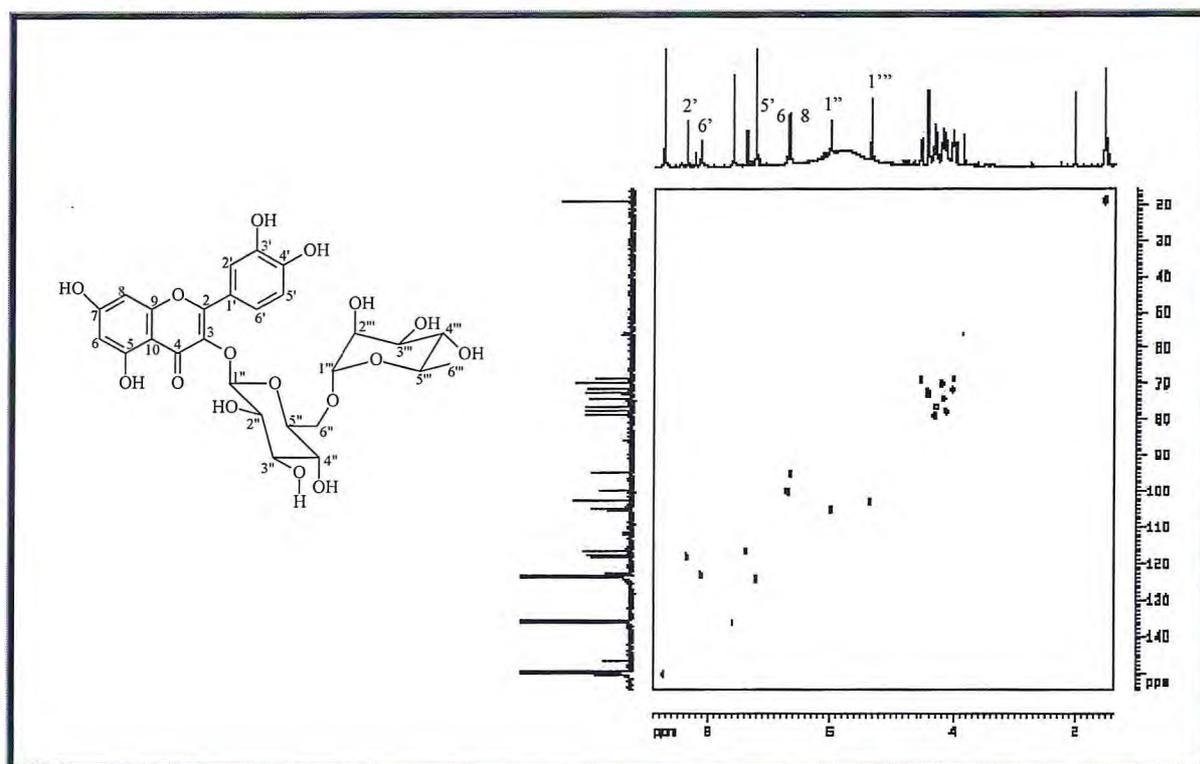


Figura 121 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC de TC-10

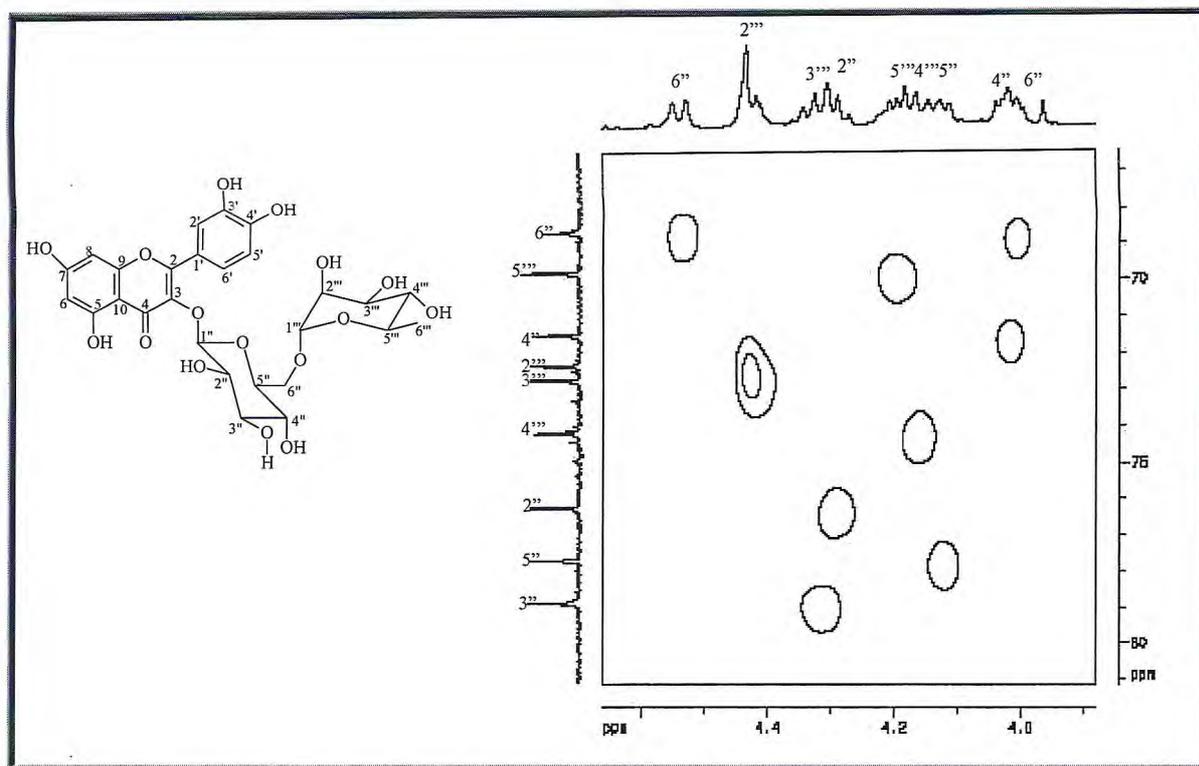


Figura 122 - Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-10

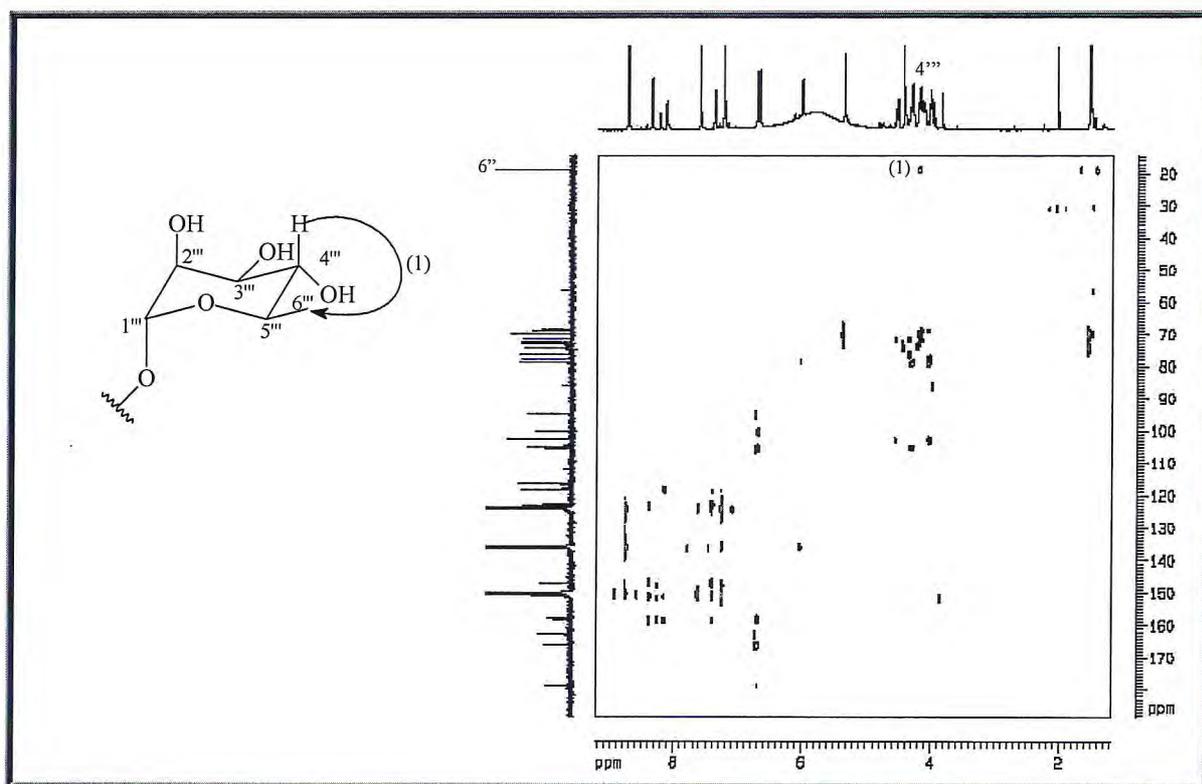


Figura 123 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de TC-10

3.2.11. Determinação Estrutural de TC-11

Cromatografia flash da fração TCVAE-H-insap (Item 5.5.3.4, p. 171) possibilitou o isolamento de um precipitado que, após lavagem com MeOH, forneceu 6,8 mg de um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio, com ponto de fusão entre 128,3 e 130,0 °C, que foi denominado de TC-11.

O espectro de RMN ^{13}C -HBBD (125 MHz, CDCl_3) (Figura 1129, p. 128) mostrou dezesseis linhas espectrais. Baseado na teoria do deslocamento químico (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000), doze sinais observados entre δ 97,13 e 161,30 foram correlacionados com a presença de dois anéis aromáticos com quatro posições oxigenadas (δ 156,82; 157,38; 160,83 e 161,30). Sinal característico de carbono metilênico saturado e oxigenado foi observado em δ 66,74, cuja presença foi assegurada pela sua associação com os hidrogênios centrados em δ 3,63 (1H, t, $J = 10,9$ Hz); 4,25 (1H, dd, $J = 4,9$ e 10,9 Hz) no espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação (^1H , ^{13}C , HSQC) (Figura 131, p. 129). Este espectro permitiu identificar também a presença de um carbono metínico oxigenado (δ_{C} 78,75) e de um carbono metoxílico em δ 55,73. Além destes, mais um carbono metínico saturado foi identificado em δ 39,69. Estas informações aliadas à comparação dos espectros de RMN ^{13}C -HBBD e DEPT 135° (Figura 130, p. 128) possibilitou estabelecer o padrão de hidrogenação de cada átomo de carbono (Tabela 19, p. 123).

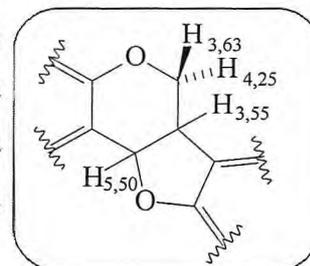
O espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EMIE) (Figura 127, p. 127) indicou o pico íon-molecular com a razão massa/carga (m/z) igual a 270 Daltons. Este dado, aliado aos já descritos, permitiu deduzir a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ cujo índice de deficiência de hidrogênio (IDH) é igual a 10.

Tabela 19 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500MHz) de TC-11 com padrão de Hidrogenação

C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
*161,30	132,40	*66,74	*55,73	
*160,83	124,97			
*157,38	110,05			
*156,82	106,66			
119,35	103,87			
112,35	97,13			
	78,79			
	39,69			
6C	8CH	1CH ₂	1CH ₃	C ₁₆ H ₁₃ O ₄

*C-O

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 128, p. 127) de TC-11 mostrou um conjunto de quatro absorções centradas em δ 3,55 (1H, H_{6a}, m); 3,63 (1H, H_{6 β} , t, $J = 10,9$ Hz); 4,25 (H_{6 α} , dd, $J = 4,9$ e 10,9 Hz) e 5,50 (H_{11a}, d, $J = 6,8$ Hz) características de um sistema ABMX, integradas cada uma para um hidrogênio. Estes sinais são condizentes com a presença de um esqueleto pterocarpânico, corroborada pela ocorrência desta classe de compostos no gênero *Tephrosia*.



No espectro de RMN ^1H observou-se um pico simples e intenso, integrado para três hidrogênios em δ 3,78, confirmando a presença do grupamento metoxila, já referido anteriormente. Cinco sinais em δ 6,42 (1H, d, $J = 2,3$ Hz); 6,47 (2H, m); 6,55 (1H, dd, $J = 2,3$ e 8,3 Hz); 7,14 (1H, d, $J = 8,8$ Hz) e 7,39 (1H, d, $J = 8,4$ Hz) evidenciaram a existência de hidrogênios de sistema aromático, cujos valores das constantes de acoplamento, J , caracterizam interações *orto* e *meta*, apontando para a presença de dois anéis aromáticos com este padrão de substituição, como ilustrado na Figura 125 (p. 124).

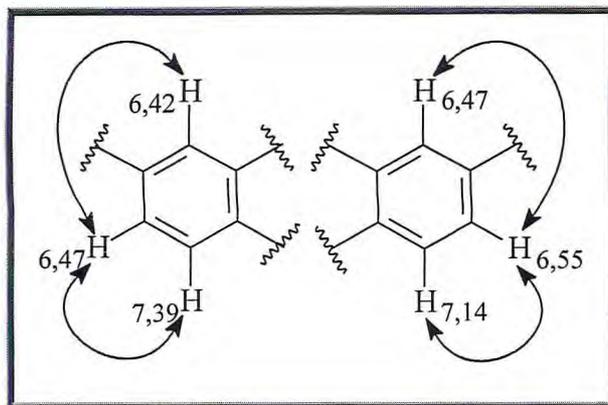
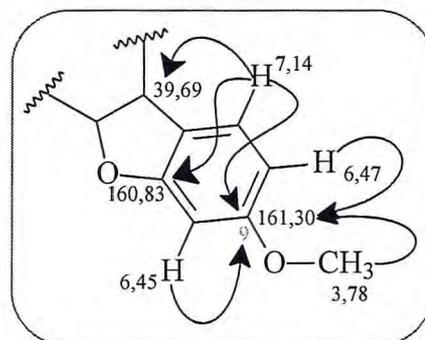


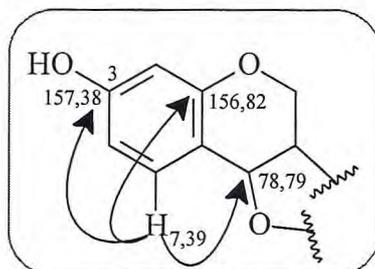
Figura 125 - Acoplamentos entre os hidrogênios dos anéis aromáticos da estrutura de TC-11

As correlações dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C obtidas através dos experimentos de RMN bidimensionais auxiliaram a elucidação estrutural de TC-11.

Assim o espectro bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C , HMBC) mostrou correlação a três ligações (3J) entre os sinais dos hidrogênios em δ 3,78 (3H, s) e 7,14 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), e, a duas ligações (2J) dos hidrogênios em δ 6,45 (1H, m) e 6,47 (1H, m) com o carbono oxigenado pertencente a anel aromático em δ 161,30. Observou-se também interação do sinal do hidrogênio em δ 7,14 (1H, d, $J = 8,8$ Hz) a três ligações, (3J) com o carbono oxigenado de anel aromático em δ 160,83 e com o carbono metínico em δ 39,69, estabelecendo assim a posição do grupo metoxila em C-9 do esqueleto pterocarpânico.



A localização da segunda posição oxigenada, neste caso da hidroxila, deveria estar em C-3 o que foi confirmado pelas interações do hidrogênio em δ 7,39 (1H, d, $J = 8,4$ Hz) a três ligações com os carbonos em δ 157,38; 156,82 e 78,79.



De acordo com a análise de todos estes dados espectrais foi possível inferir para TC-11 a estrutura da medicarpina (**90**) (Figura 126, p. 125) isolada anteriormente de

T. purpurea (CHANG *et al.*, 1997), o que foi confirmado através da comparação com dados de RMN ^{13}C -HBBD e p.f. obtidos da literatura para a referida substância.

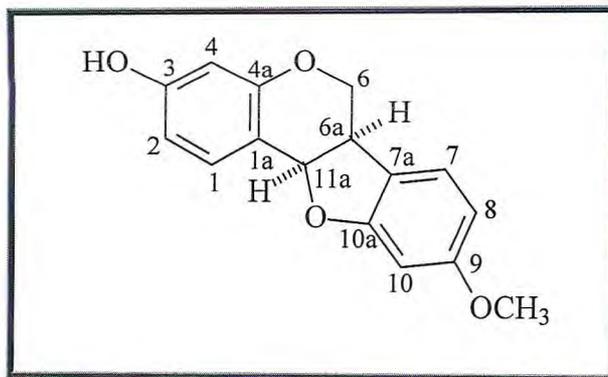


Figura 126 - Estrutura de medicarpina (**90**) ((-)-6aR,11aR-diidro-3-hidroxi-9-metoxi-6h-benzofuro[3,2,-C](1)benzopirano)

Tabela 20 - Dados espectroscópicos de TC-11 (CDCl₃) comparados com dados da literatura para medicarpina (CHALMERS, 1977)

C	δ_H (mult., <i>J</i> em Hz)		δ_C		HMBC	
	medicarpina	TC-11	medicarpina	TC-11	$^2J_{C-H}$	$^3J_{C-H}$
1a	--	--	112,2	112,71	H-11a	H-2/H-4
1	7,93 (d, 8,5)	7,39 (d; 8,4)	131,8	132,40	--	H-11a
2	6,55 (d, 8,5)	6,56 (dd; 2,3;8,4)	109,4	110,05	--	H-10
3	--	--	156,7	157,38	H-2/H-4	H-1
4	6,43 (s)	6,42 (d; 2,3)	103,3	103,87	--	H-2
4a	--	--	156,2	156,82	H-4	H-1
6	3,63 (t, 11,0) 4,24 (dd, 5,0;11,0)	3,63 (t; 10,9) 4,25 (dd; 4,9;10,9)	66,1	66,74	H-6a	H-11a
6a	3,53 (m)	3,55 (m)	39,8	39,69	H-6ax/H-6eq	H-7
7a	--	--	118,7	119,35	H-6a	H-6x/H-6eq/H-8/H-10
7	7,13 (d, 8,1)	7,14 (8,8)	124,3	124,97	--	--
8	6,34	6,47 (d; 8,8)	106,0	106,66	--	H-10
9	--	--	160,7	161,30	H-8	H-7/CH ₃ O
10	6,47 (s)	6,46 (s)	96,5	97,13	--	H-8
10a	--	--	160,2	160,83	H-10	H-6a/H-7
11a	5,50 (d, 6,9)	5,50 (d; 6,8)	78,1	78,79	--	H-1/H-6ax/H-6eq
OCH ₃	3,77 (s)	3,78 (s)	55,1	55,73	--	--
OH	5,30 (s)	--	--	--	--	--

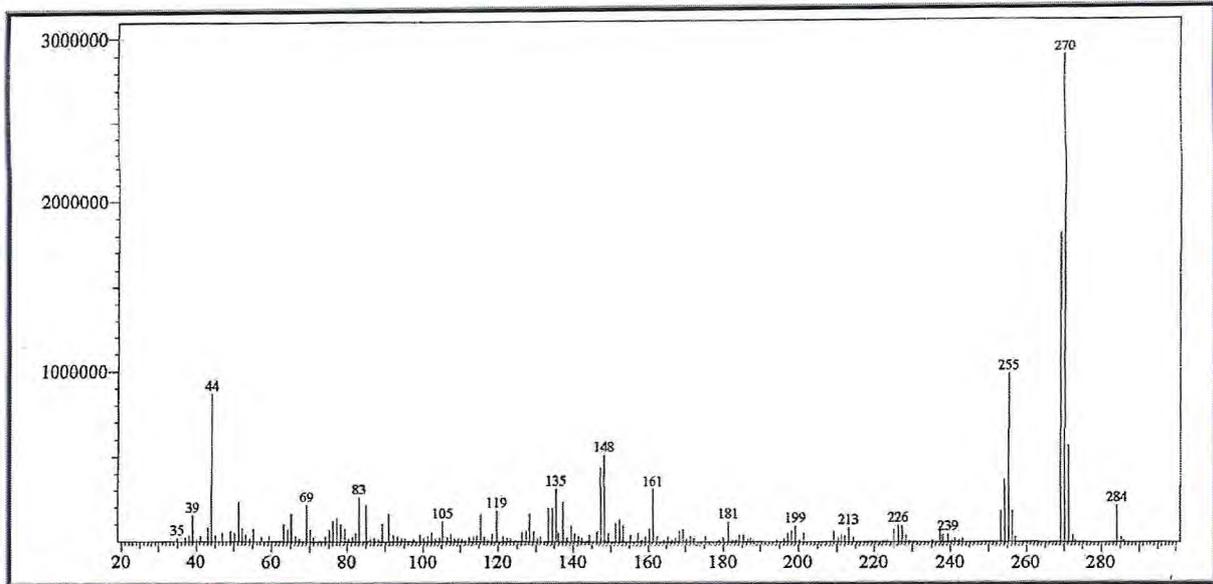


Figura 127 - Espectro de massas de TC-11 (IE, 70eV)

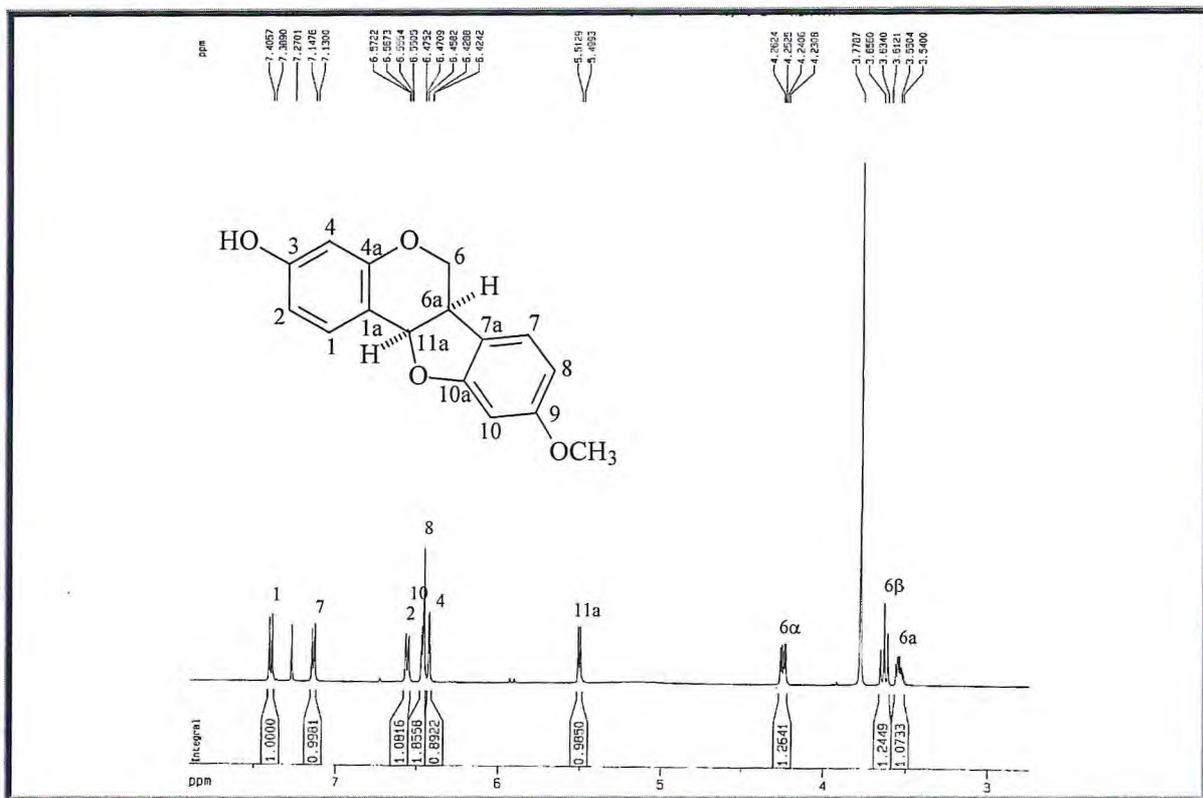


Figura 128 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de TC-11

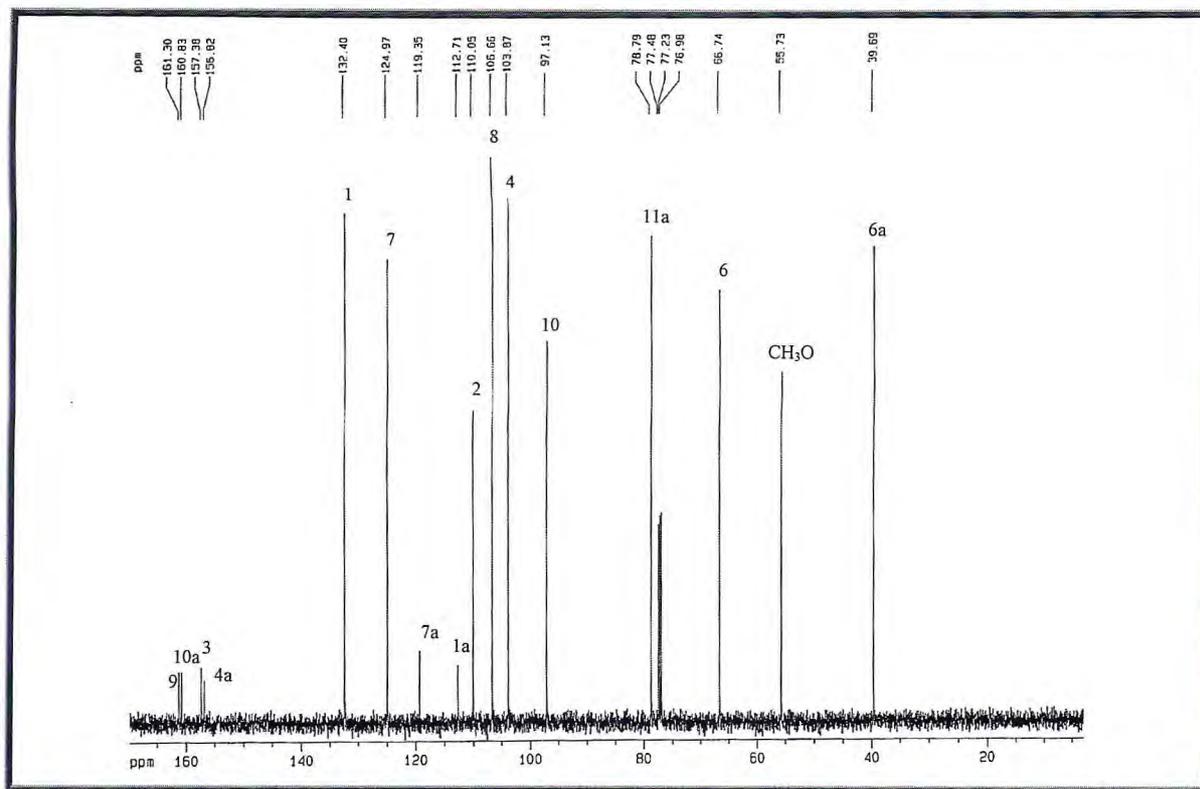


Figura 129 - Espectro de RMN ^{13}C -HBD (125 MHz, CDCl₃) de TC-11

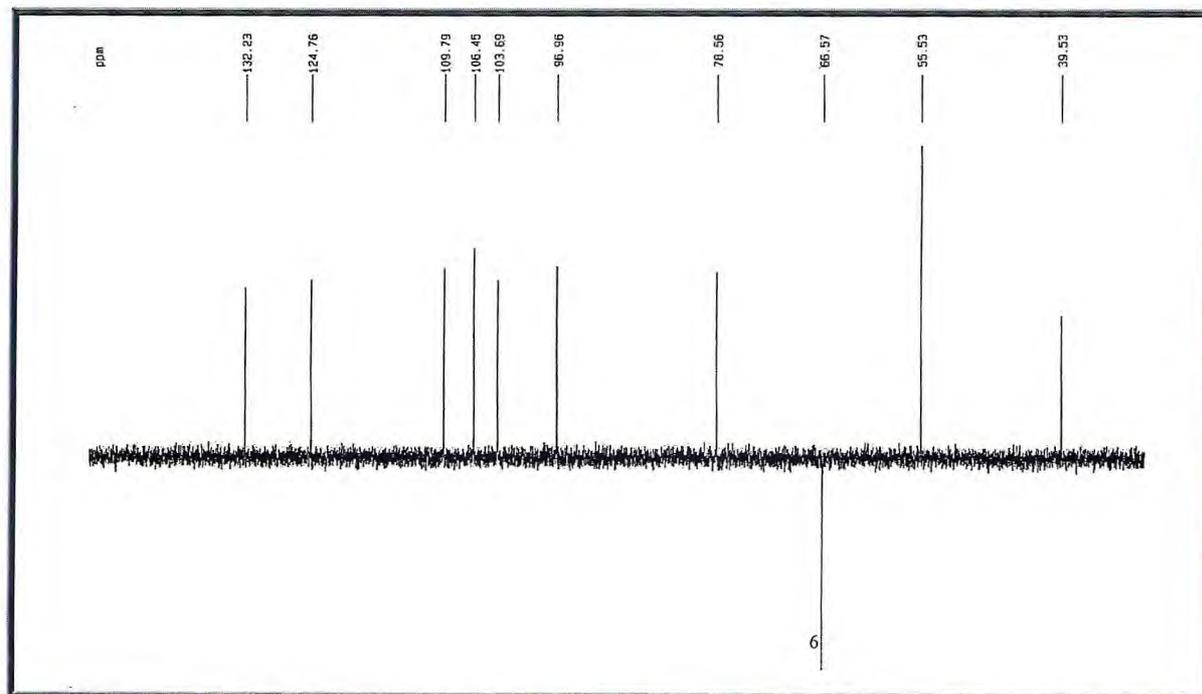


Figura 130 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl₃) de TC-11

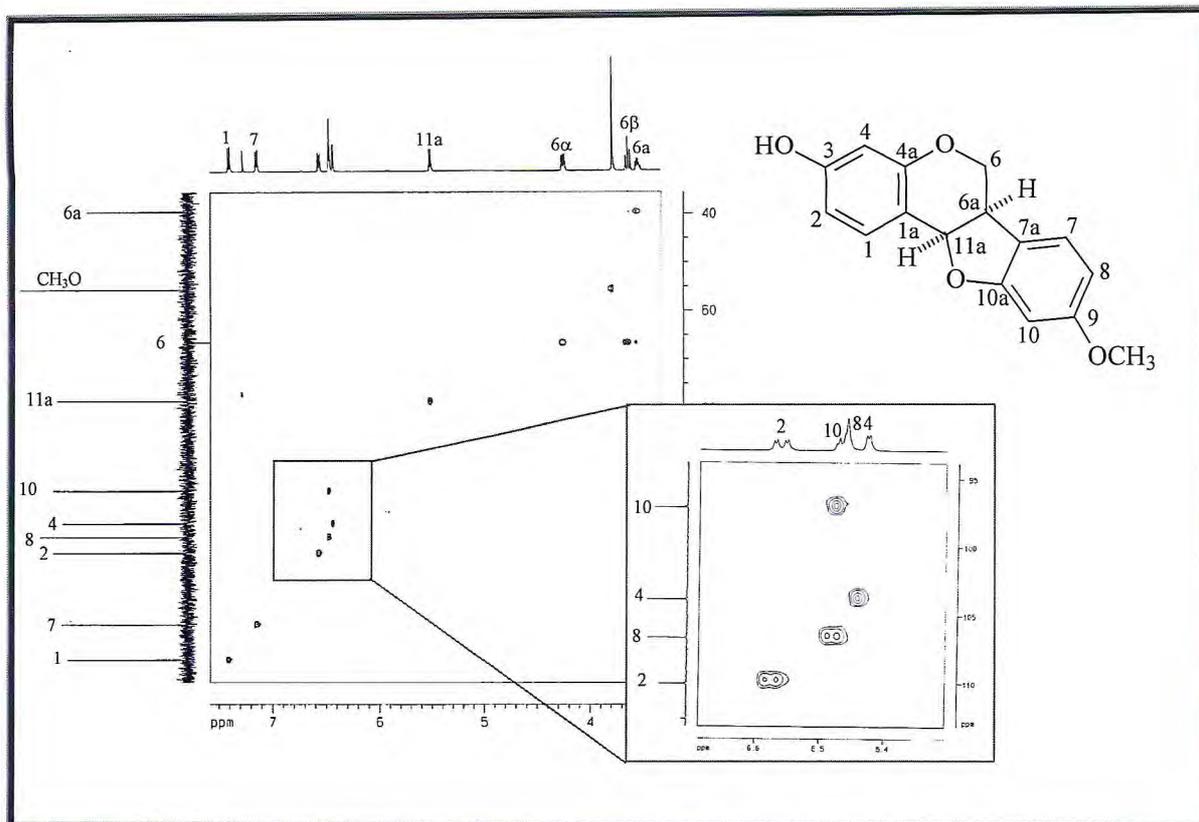


Figura 131 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC de TC-11

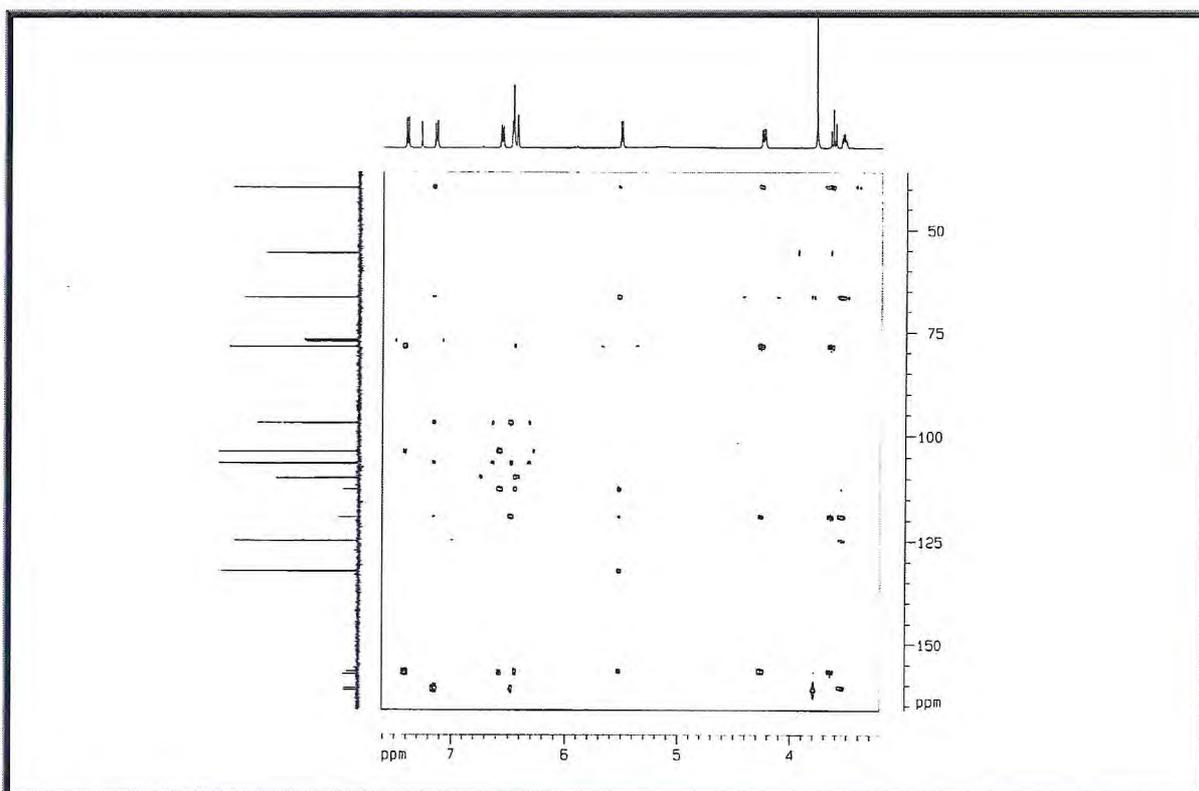


Figura 132 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HMBC de TC-11

3.2.12. Determinação Estrutural de TC-12

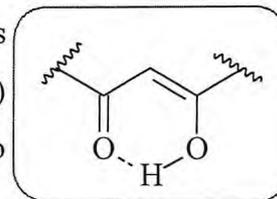
A fração TCVAE-D (8) (20-29) (Item 5.5.3.5.1, p. 173), após lavagem com metanol, forneceu um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio. O sólido foi analisado em CCD, mostrando-se homogêneo, visível na luz U.V. (254 e 365 nm) e de coloração amarela intensa após pulverização com solução de vanilina e posterior aquecimento. TC-12 apresentou faixa de fusão de 106,9-108,8 °C e pico íon molecular com m/z igual a 336 Daltons no seu espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EMIE) (Figura 134, p. 134).

O espectro de RMN ^{13}C -HBB (125 MHz, CDCl_3) (Figuras 137 e 138, p. 136) de TC-12 mostrou um total de dezesseis linhas espectrais. A teoria do deslocamento químico permitiu associar o sinal em δ 193,16 a um carbono carbonílico e os sinais em δ 163,0, 162,94 e 160,76 a carbonos sp^2 não hidrogenados e oxigenados. Comparação com o espectro bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação (^1H , ^{13}C – HSQC) (Figura 140, p. 137) permitiu identificar mais três carbonos sp^2 não hidrogenados em δ 136,42, 106,82 e 104,0 e dez carbonos sp^2 hidrogenados (δ 142,27, 130,10, 129,14, 128,58, 128,46, 125,65, 116,59 e 92,20), uma vez que os sinais em δ 128,58 e 129,14 são referentes a dois átomos de carbono cada, sugerido pela correlação destes com os hidrogênios em δ 7,60 (2H, d, $J = 6,6$ Hz) e 7,39 (3H, m). O sinal em δ 56,19 foi relacionado a uma metoxila e o sinal em δ 29,97 a grupamento metila. A presença do sistema 2'',2''-dimetilcromeno foi sugerida pelo carbono sp^3 não hidrogenado em δ 78,53, pelos carbonos sp^2 em δ 125,65 e 116,59, além do sinal de metila já mencionado.

Análise do espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 136, p. 135) permitiu a confirmação do sistema 2'',2''-dimetilcromeno através da presença de dois dubletos em δ 5,46 (1H, d, $J = 10,0$ Hz) e 6,72 (1H, d, $J = 10,0$ Hz) referentes a hidrogênios olefínicos com acoplamento *cis*, os quais foram relacionados aos sinais de carbono em 125,65 e 116,59 no espectro de HSQC. Ainda analisando o espectro RMN ^1H de TC-12, foi possível verificar a presença de mais dois dubletos em δ 7,85 (1H, d, $J = 15,5$ Hz) e 7,77 (1H, d, $J = 15,5$ Hz) característicos de hidrogênios olefínicos com acoplamento *trans*. Foi possível ainda observar um singlete em δ 1,48 (6H, s) e 3,93 (3H, s) os quais foram

atribuídos, respectivamente, as duas metilas e à metoxila, respectivamente, anteriormente citados na análise do espectro RMN ^{13}C .

O sinal observado no espectro de RMN ^1H em δ 14,28 (1H, s) é característico de hidroxila em sistema quelatogênico ligada a carbono insaturado; e os hidrogênios em δ 7,60 (2H, d, $J = 6,6$ Hz) e 7,39 (3H, m) caracterizam um anel aromático monossustituído



A análise do espectro HSQC permitiu determinar o padrão de hidrogenação de cada carbono e sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_4$ (Tabela 21).

Tabela 21 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) de TC-12 com padrão de Hidrogenação

C	CH	CH ₃
**193,16	142,27	*55,73
*163,00	130,10	
*162,94	129,14	
*160,76	128,58	
136,42	128,46	
106,82	125,65	
104,00	116,59	
*78,53	92,20	

*C-O; **C=O

Os dados discutidos acima, juntamente com análise dos dados descritos na literatura para metabólitos secundários isolados de *Tephrosia* (LIMA, 2005) permitiu sugerir para TC-12 a estrutura da pongachalcona (**91**) (Figura 133) isolada de *T. egregia* (MAGALHÃES, 2002).

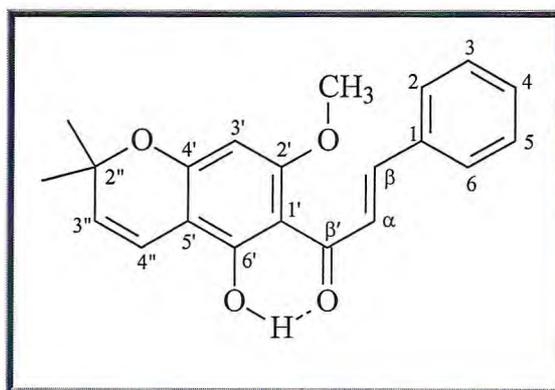
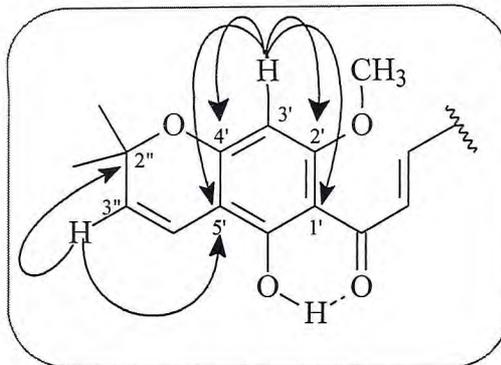
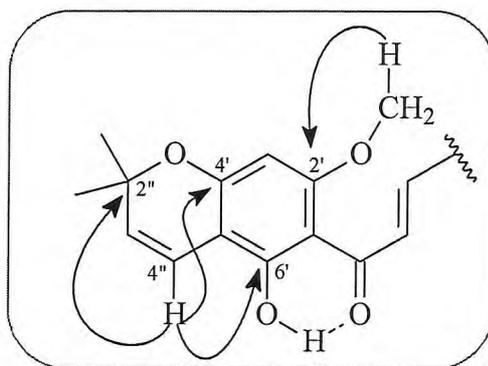


Figura 133 - Estrutura de pongachalcona (**91**)

A estrutura de TC-12 foi confirmada através da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C – HMBC) (Figuras 141 e 142, p. 138). Dentre as correlações observadas, podemos citar o acoplamento entre o hidrogênio em δ 5,95 (H-3') a três ligações com os carbonos em δ 104,0 (C-5') e 106,82 (C-1'), e, a duas ligações com os carbonos em δ 160,76 (C-4') e 162,94 (C-2'); o acoplamento entre o hidrogênio em δ 5,46 (H-3'') a duas ligações com o carbono em δ 78,53 (C-2'') e a três ligações com o carbono em δ 104,00 (C-5').



Podemos citar também o acoplamento do hidrogênio em δ 6,72 (H-4'') a três ligações com os carbonos em δ 78,53 (C-2''), 160,76 (C-4'), 163,00 (C-6'); além dos acoplamentos dos hidrogênios em δ 7,77 (H- β) e 7,85 (H- α) com o carbono carbonílico (δ 193,16). A posição da metoxila foi confirmada através do acoplamento do hidrogênio em δ 3,93 (3H) com o carbono em δ 162,94, como ilustrado abaixo.



Estas e outras correlações permitiram confirmar a estrutura da pongachalcona (Figura 133, p. 131) para TC-12. Os dados referentes aos valores de deslocamento químicos de todos os carbonos e hidrogênios, bem como seus acoplamentos encontram-se na Tabela 22 (p. 133).

Tabela 22 - Dados espectroscópicos de TC-12 (CDCl₃) comparados com dados da literatura para pongachalcona (MAGALHÃES, 2002)

C	δ_H (mult., J em Hz)		δ_C		HMBC	
	pongachalcona	TC-12	pongachalcona	TC-12	$^2J_{C-H}$	$^3J_{C-H}$
1	--	--	135,6	136,42	--	H- α
2,6	7,6 (d, 9,0)	7,60 (d, 6,6)	128,3	128,58	--	H- β
3,5	7,4 (m)	7,40 (d, 7,2)	128,9	129,14	H-3,5	--
4	7,4 (m)	7,40 (m)	130,0	130,10	--	H-2,6
1'	--	--	106,1	106,82	--	H-3'
2'	--	--	162,7	162,94	H-3'	H-4''
3'	5,9 (s)	5,95 (s)	91,6	92,20	--	--
4'	--	--	160,4	160,76	H-3'	H-4''
5'	--	--	103,0	104,0	--	H-3'/H-3''
6'	--	--	162,6	163,0	--	--
2''	--	--	78,3	78,53	H-3''	H-4''
3''	5,5 (d, 10,0)	5,46 (d, 10,0)	125,4	125,65	--	--
4''	6,7 (d, 10,0)	6,72 (d, 10,0)	116,0	116,59	--	--
α	7,9 (d, 15,6)	7,85 (d, 15,5)	127,7	128,46	--	--
β	7,8 (d, 15,6)	7,77 (d, 15,5)	142,1	142,27	H- α	H-2,6
β'	--	--	192,7	193,16	H- α	H- β
CH ₃ -	1,5 (s)	1,48 (s)	28,4	29,97	--	--
CH ₃ O-	3,9 (s)	3,93 (s)	55,9	56,19	--	H-3''
OH	14,5 (s)	14,28 (s)	--	--	--	--

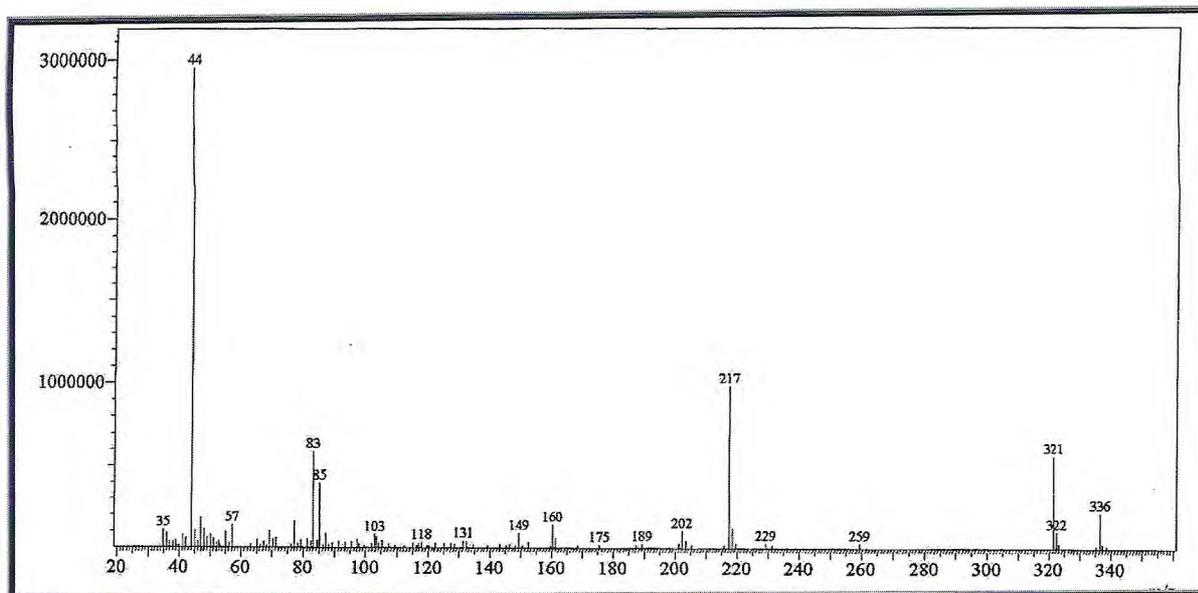


Figura 134 - Espectro de massas de TC-12 (IE, 70eV)

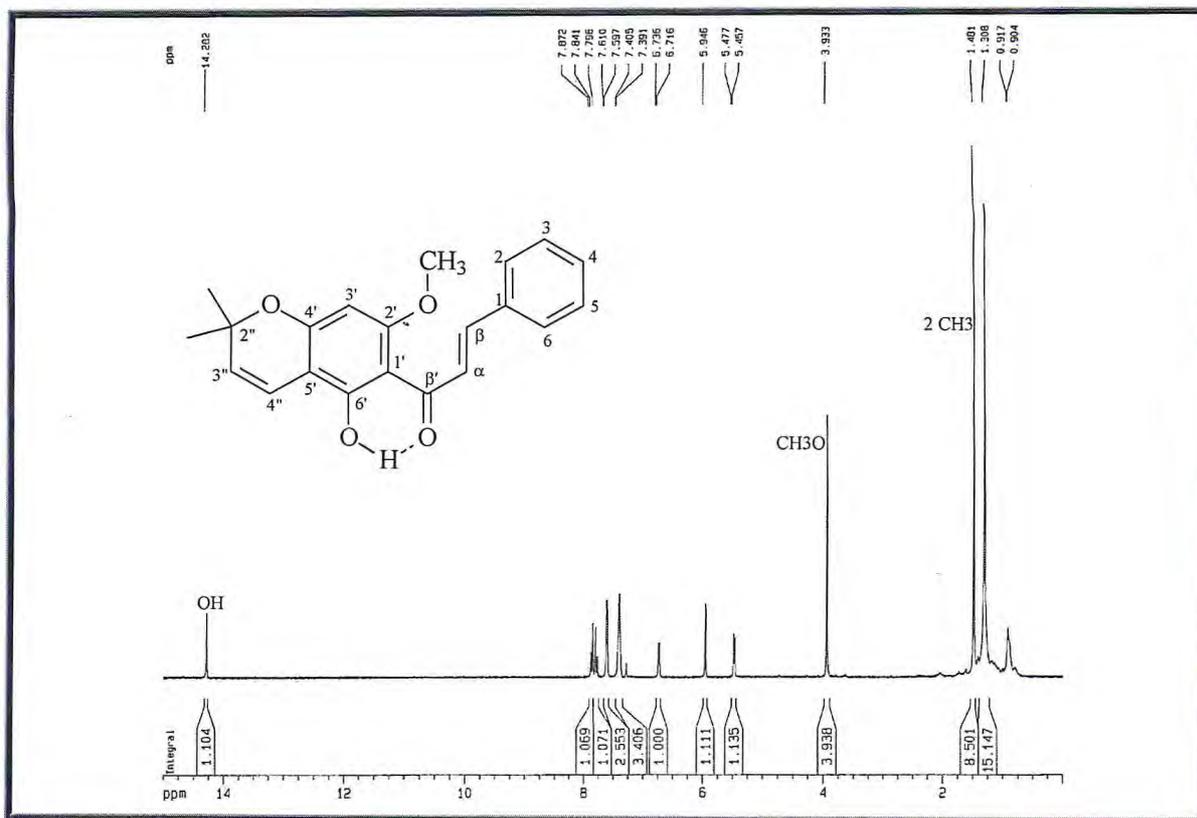


Figura 135 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-12

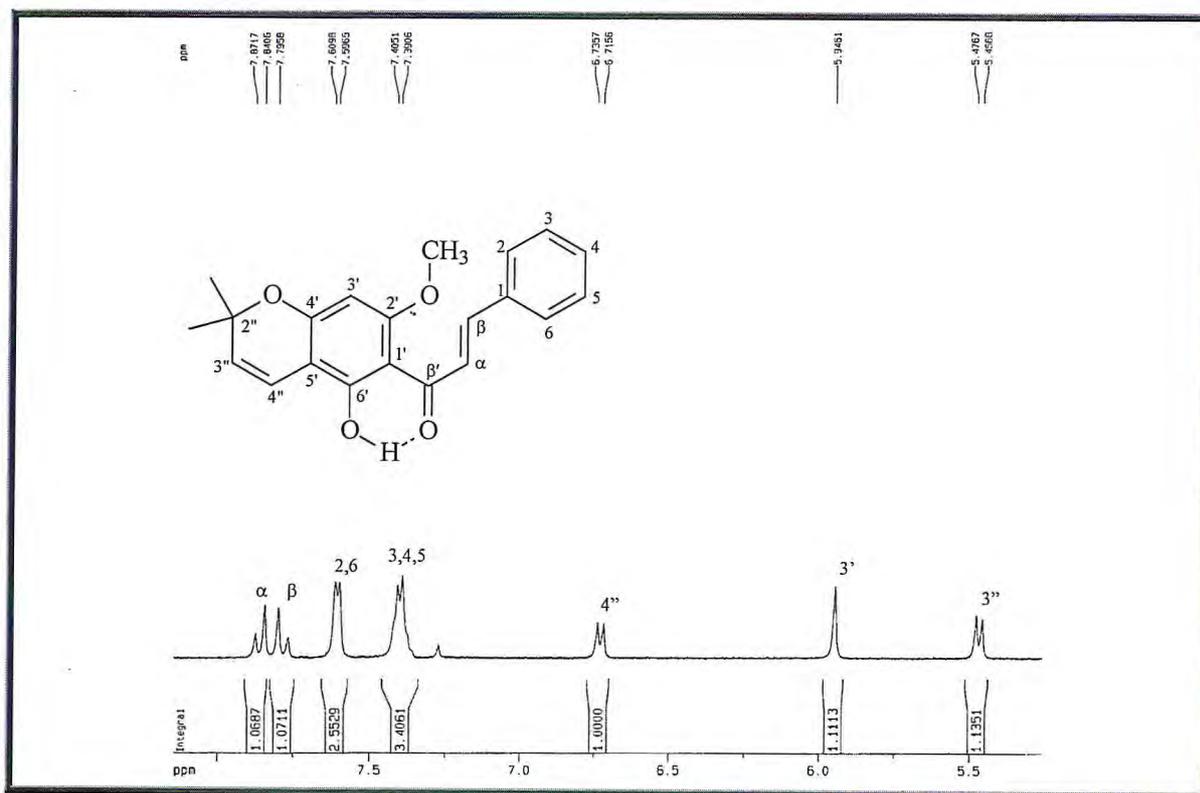


Figura 136 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TC-12

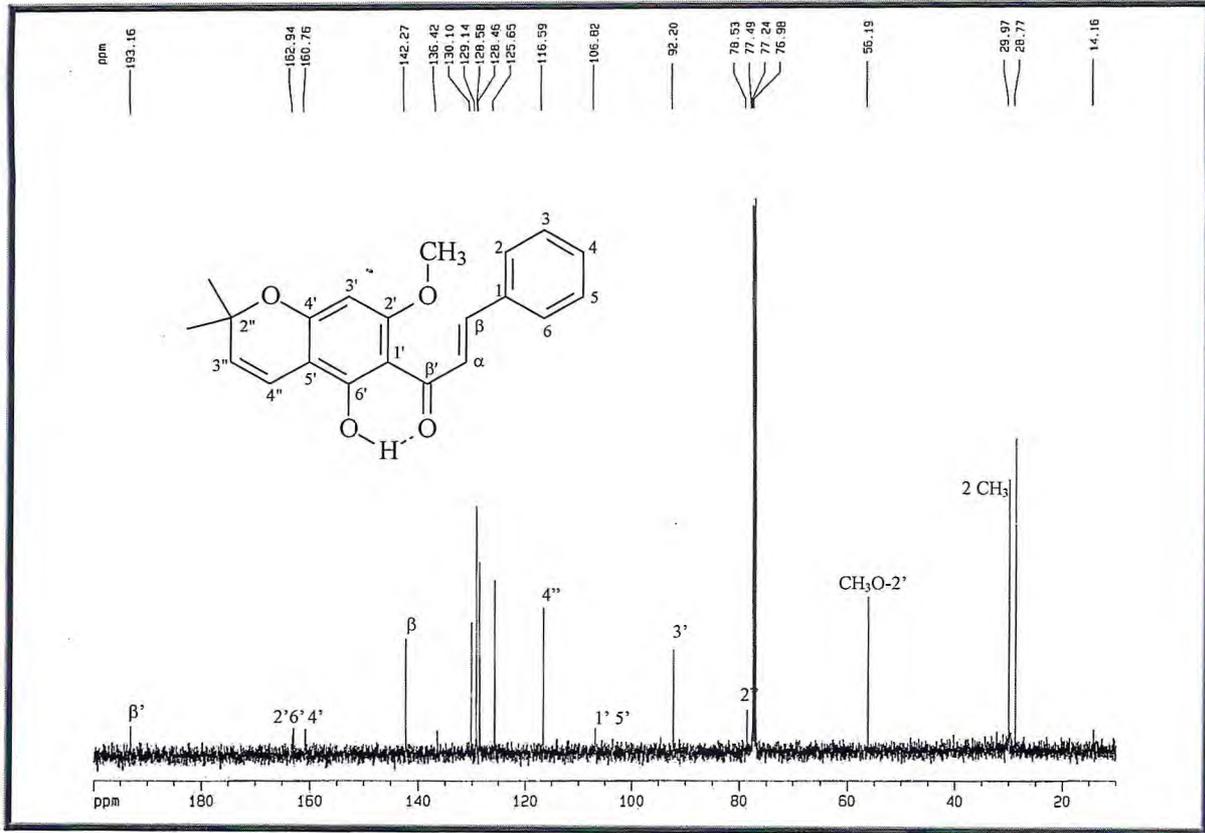


Figura 137 - Espectro de RMN ¹³C-HBBD (125 MHz, CDCl₃) de TC-12

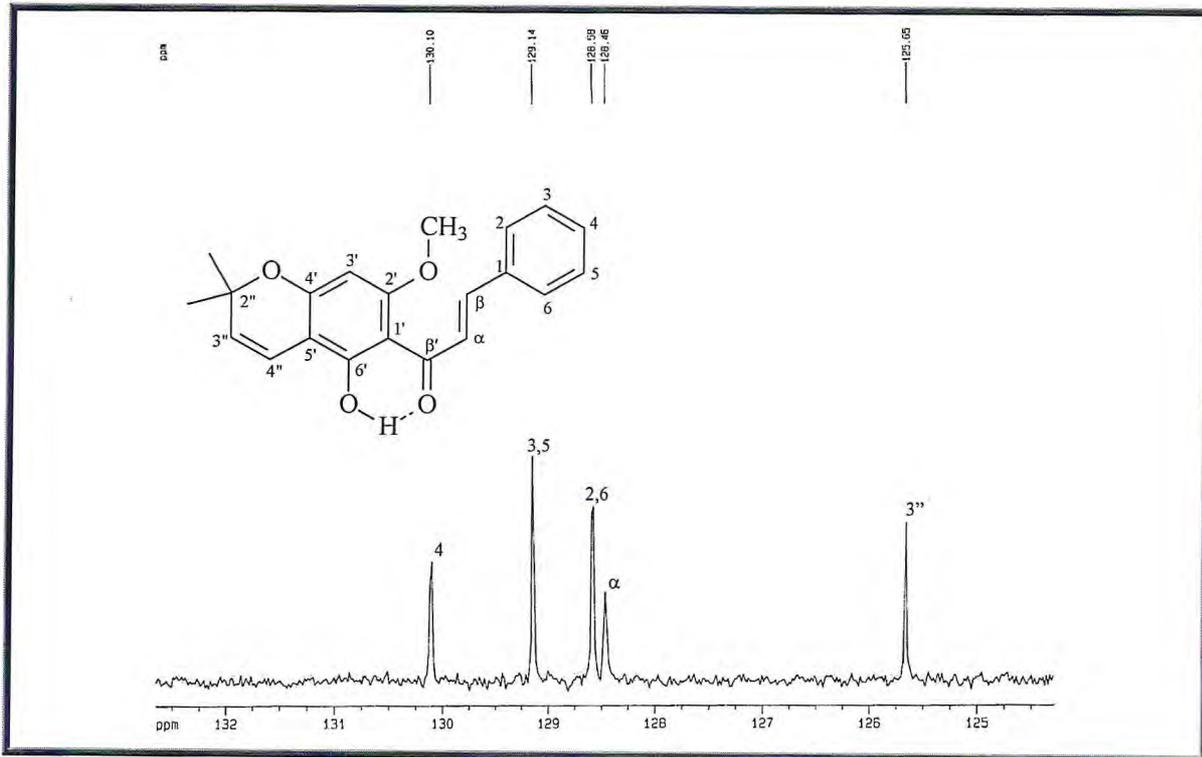


Figura 138 - Expansão do espectro de RMN ¹³C-HBBD (125 MHz, CDCl₃) de TC-12

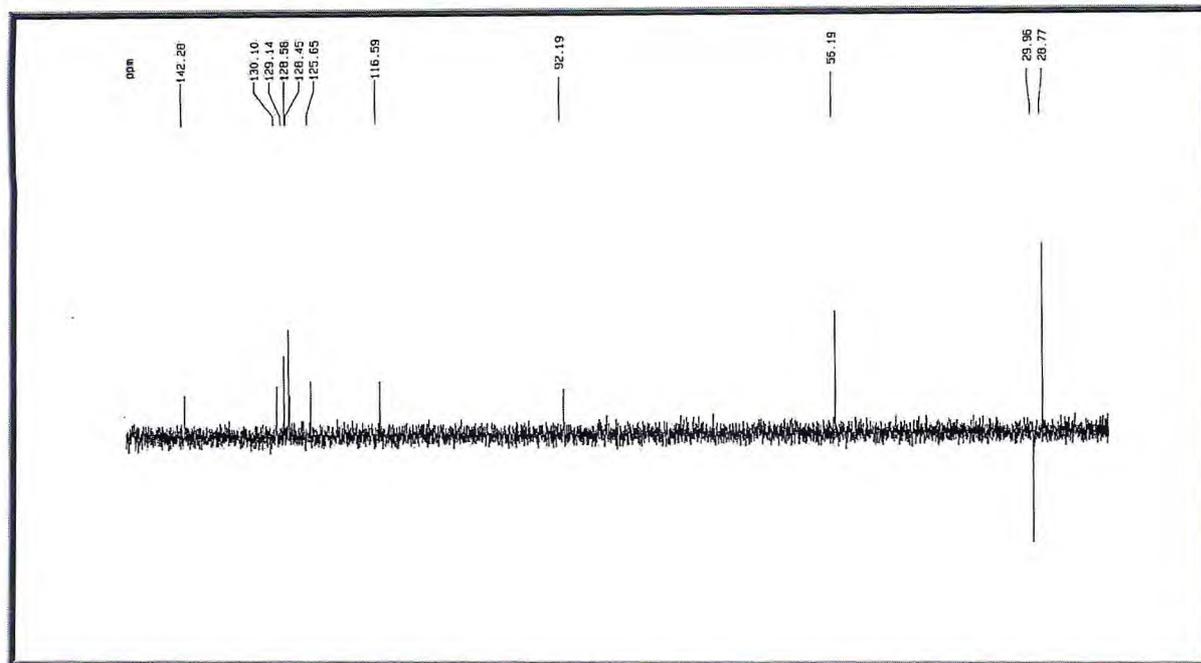


Figura 139 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TC-12

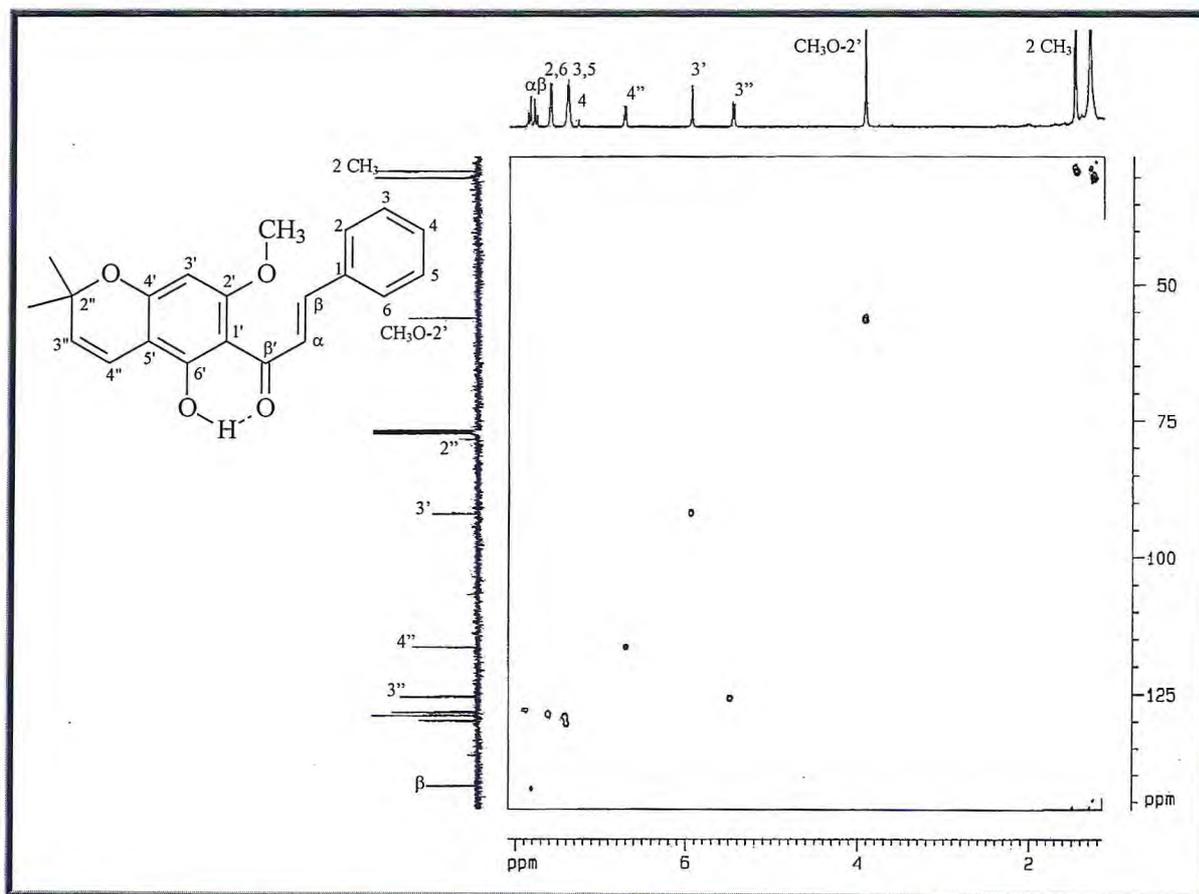


Figura 140 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de TC-12

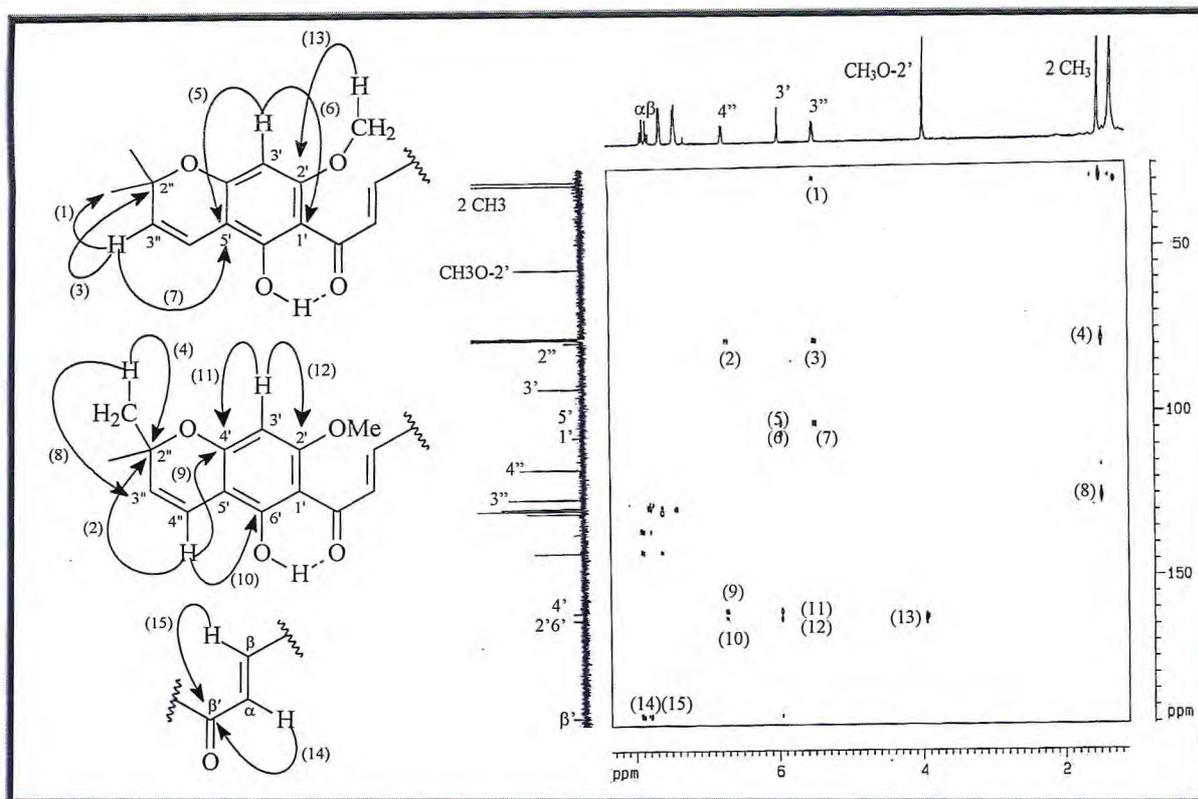


Figura 141 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HMBC de TC-12

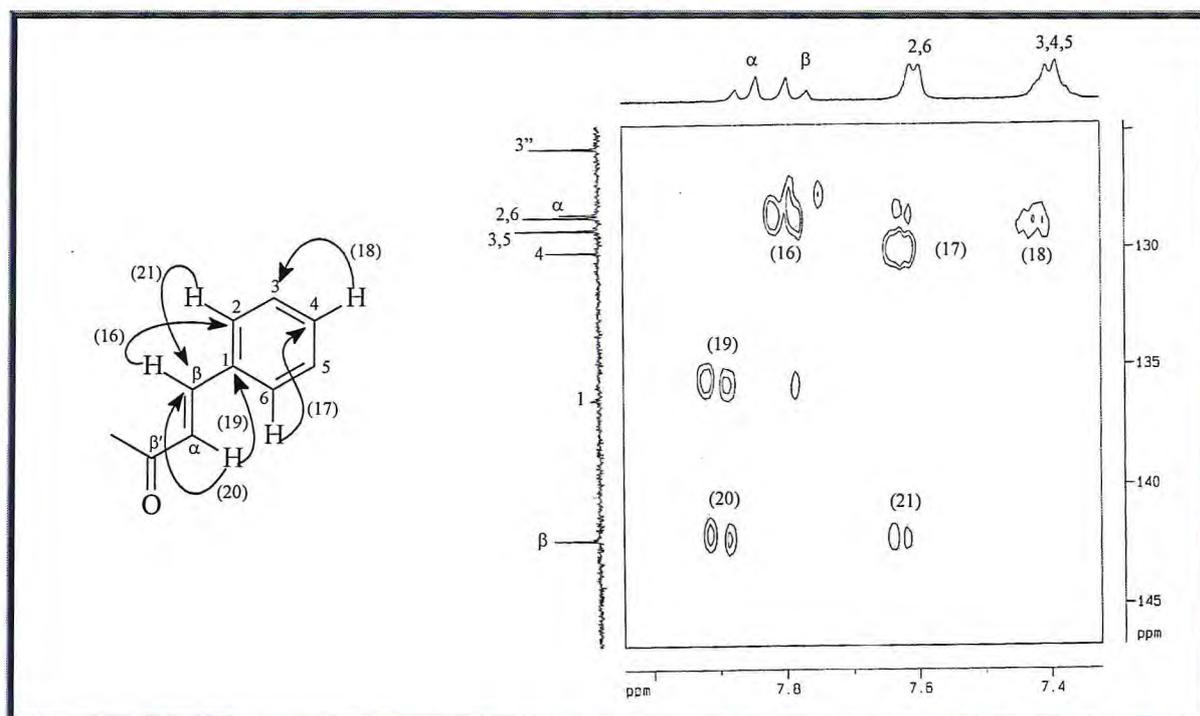


Figura 142 - Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HMBC de TC-12

3.3. Identificação dos Componentes Químicos dos Óleos não Voláteis de *T. cinerea*

O estudo da composição lipídica de *T. cinerea* foi realizado com as frações hexânicas dos extratos etanólicos das suas folhas, galhos, vagens e raízes da seguinte forma: após a obtenção de seus extratos etanólicos, as frações hexânicas das partições líquido-líquido de cada extrato, obtidas nos Item 5.5.1.1 (p. 154), foram submetidas, separadamente, a uma reação de saponificação (MATOS, 1988) seguida de metilação, seguindo a técnica usual – Itens 5.5.2.1 e 5.5.2.2 (p. 155 e 156). Os produtos Dessas reações foram denominados TCFE-H-EM, TCTE-H-EM, TCVE-H-EM e TCRE-H-EM para os ésteres metílicos das folhas, talos, vagens e raízes, respectivamente. As análises dos óleos obtidos foram feitas por Cromatografia Gás-Líquido acoplada a Espectrometria de Massas (CGL/EM) (Item 5.3.3, p. 152) fornecendo seus respectivos cromatogramas (Figuras 143-146, p. 141-142).

A identificação dos constituintes presentes nos óleos foi realizada por comparação do espectro de massas referente a cada pico do cromatograma com espectros de massas em banco de dados da literatura (STENHAGEM *et al.*, 1974).

A partir destes dados foi possível caracterizar os ésteres metílicos referentes a quatro ácidos graxos no cromatograma das folhas, num total de 92,7% da composição do óleo, dez no cromatograma dos talos (90,1%), nove no cromatograma das vagens (100%) e seis no cromatograma das raízes (100%). Os componentes identificados de cada óleo encontram-se listados na Tabela 23 (p. 140).

Analisando a Tabela 23, foi possível observar uma significativa variação na composição e no teor dos ácidos graxos presentes em cada óleo. Verificou-se assim que o ácido palmítico (79) apresentou-se como constituinte majoritário nos óleos dos talos, vagens e raízes e que ácido linolênico (81) apresentou-se majoritariamente nas folhas. O ácido esteárico (84) está presente em todos os óleos, embora em menor concentração. Os ácidos mirístico (78) e tricosanóico (88) estão presentes apenas no óleo dos talos, enquanto que os ácidos oléico (83), araquídico (86) e behênico (87) não apresentou-se no óleo das folhas, estando presente nas demais partes da planta. As Figuras 147-158 (p. 143-145) mostram os espectros de massas dos ésteres metílicos correspondentes dos ácidos graxos identificados.

Tabela 23 - Composição do óleo não volátil das folhas, talos, vagens e raízes de *T. cinerea*

NOME SISTEMÁTICO	NOME COMUM	TCFH-EM (%)	TCTH-EM (%)	TCVH-EM (%)	TCRH-EM (%)
Ác. tetradecanóico (C 14:0) (92)	Ac. mirístico	--	1,1	--	--
Ác. hexadecanóico (C 16:0) (93)	Ac. palmítico	29,3	44,2	44,2	32,7
Ác. heptadecanóico (C 17:0) (94)	Ac. margarítico	--	2,7	2,1	--
Ác. 9,12,15-octatrienóico (C 18:3) (95)	Ac. linolênico	35,0	1,9	--	--
Ác. 9,12-octadienóico (C 18:2) (96)	Ac. linoleico	--	--	8,3	31,0
Ác. 9-octadecenóico (C 18:1) (97)	Ác. oléico	--	10,3	12,2	16,0
Ác. 9-octadecanóico (C 18:0) (98)	Ác. esteárico	19,4	18,4	17,4	8,8
Ác. 11-eicosenóico (C 20:1) (99)	Ac. gôndico	--	--	2,7	--
Ác. eicosanóico (C 20:0) (100)	Ác. araquídico	--	2,1	4,3	6,7
Ac. docosanóico (C 22:0) (101)	Ác. behênico	--	3,2	5,1	4,8
Ac.tricosanóico (C 23:0) (102)	--	--	2,6	--	--
Ac. tetracosanóico (C 24:0) (103)	Ác. lignocérico	9,0	3,6	3,7	--
Total		92,7	90,1	100	100

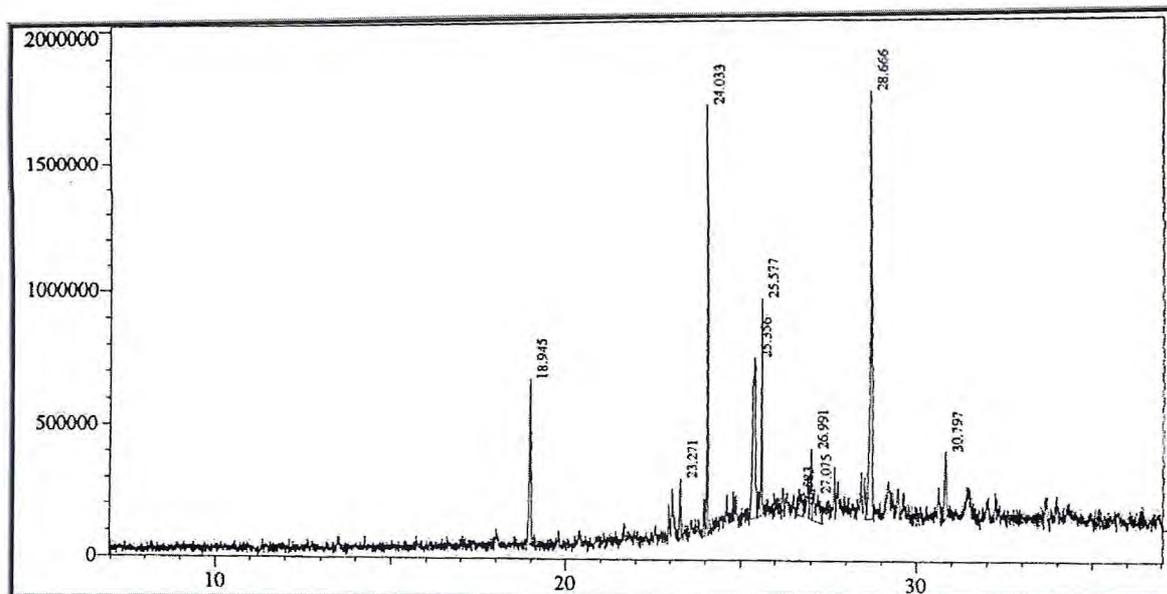


Figura 143 - Cromatograma de TCFE-H-EM

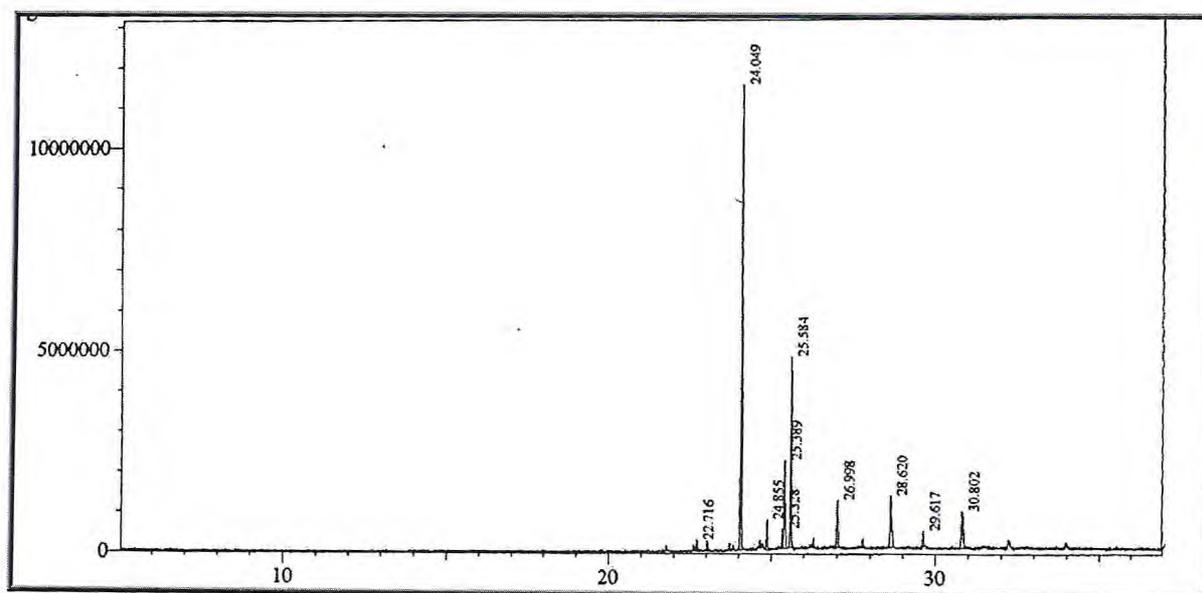


Figura 144 - Cromatograma de TCTE-H-EM

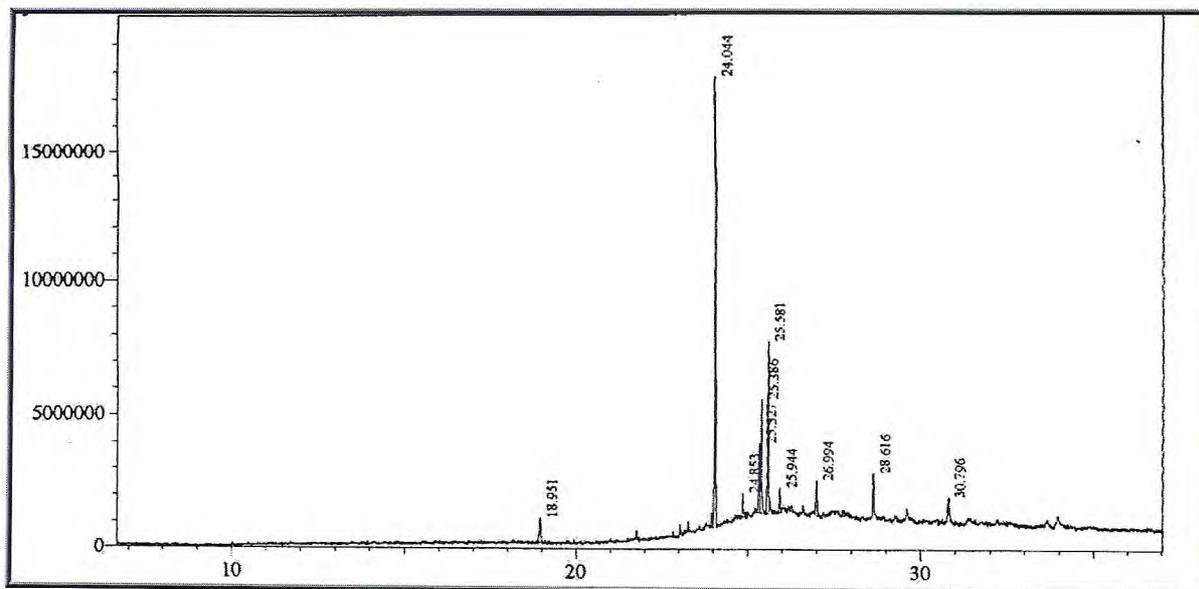


Figura 145 - Cromatograma de TCVE-H-EM

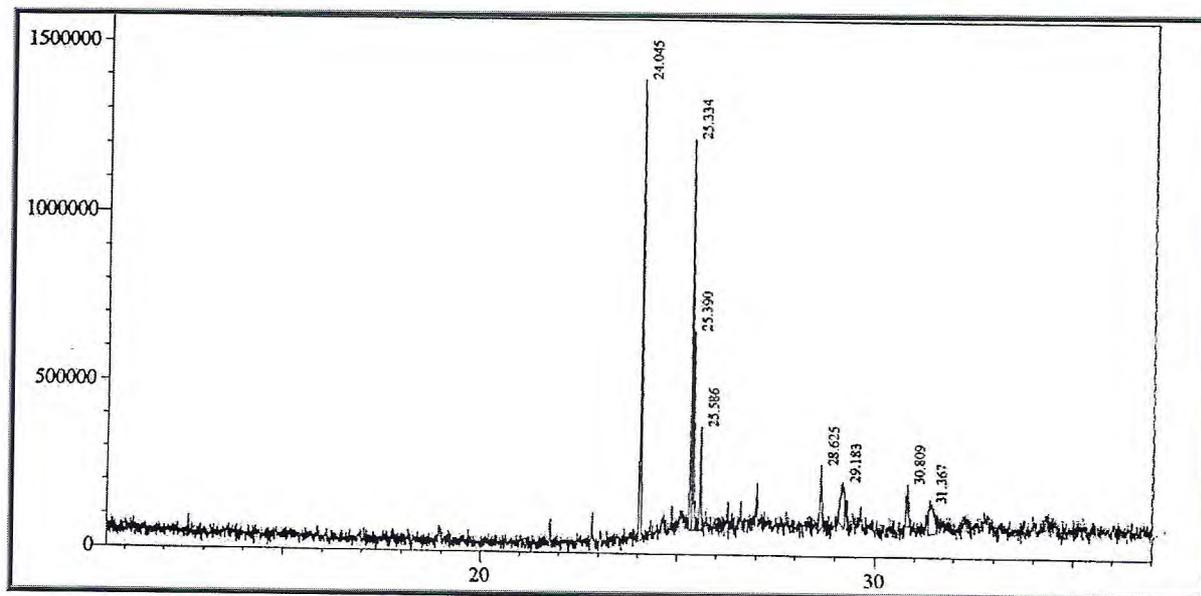


Figura 146 - Cromatograma de TCRE-H-EM

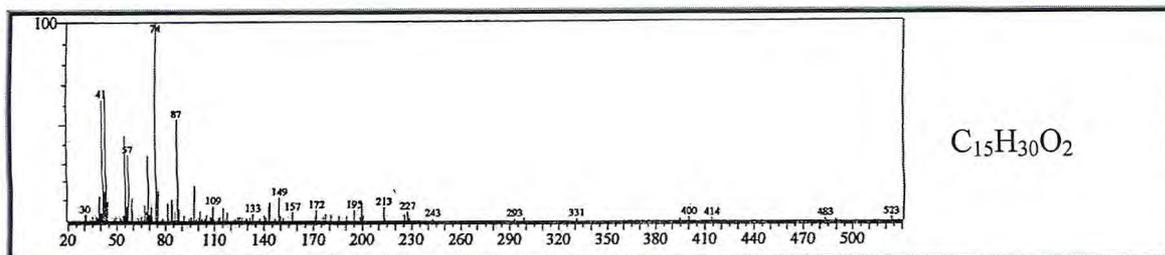


Figura 147 - Espectro de massas do éster metílico do ácido mirístico (92)

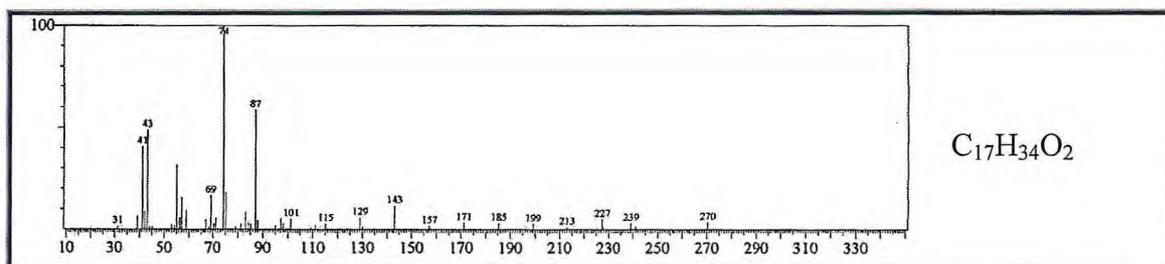


Figura 148 - Espectro de massas do éster metílico do ácido palmítico (93)

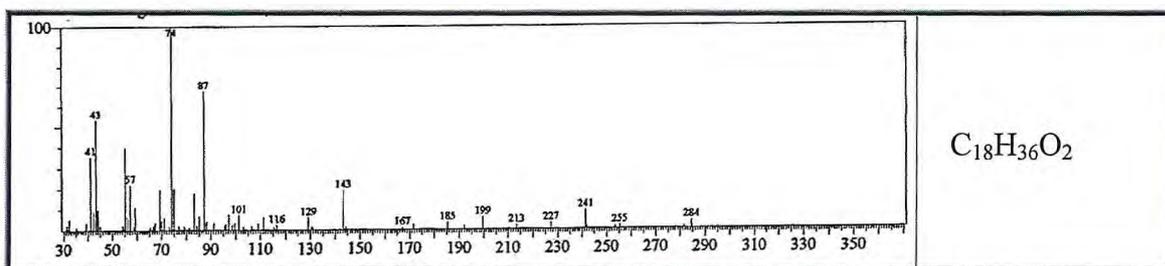


Figura 149 - Espectro de massas do éster metílico do ácido margarítico (94)

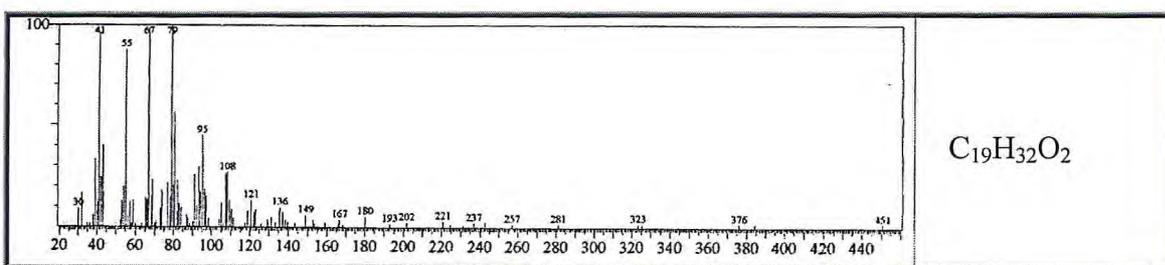


Figura 150 - Espectro de massas do éster metílico do ácido linolênico (95)

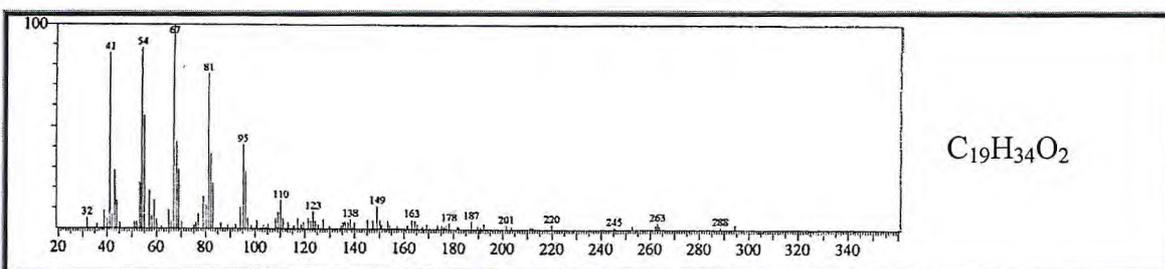


Figura 151 - Espectro de massas do éster metílico do ácido linoleico (96)

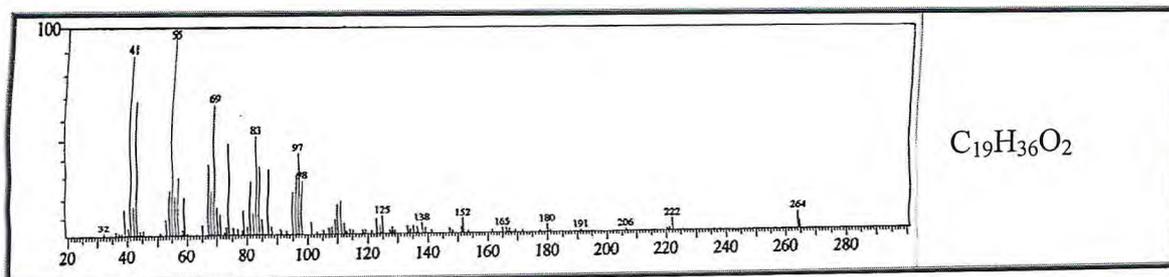


Figura 152 - Espectro de massas do éster metílico do ácido oleico (97)

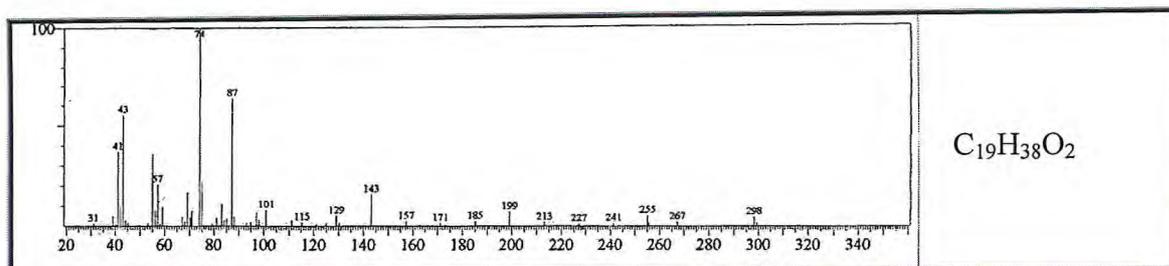


Figura 153 - Espectro de massas do éster metílico do ácido esteárico (98)

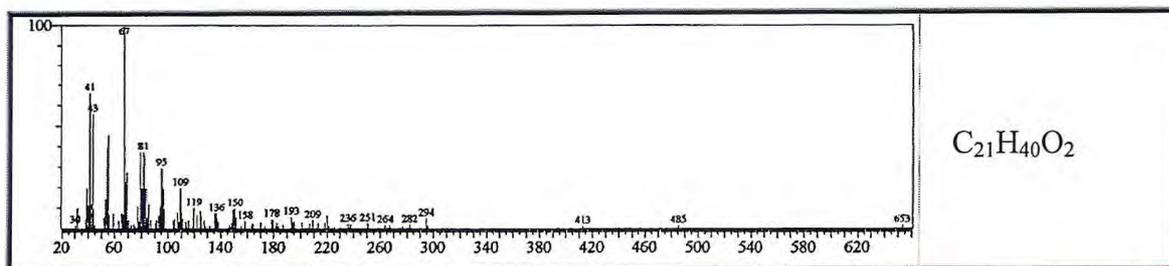


Figura 154 - Espectro de massas do éster metílico do ácido gôndico (99)

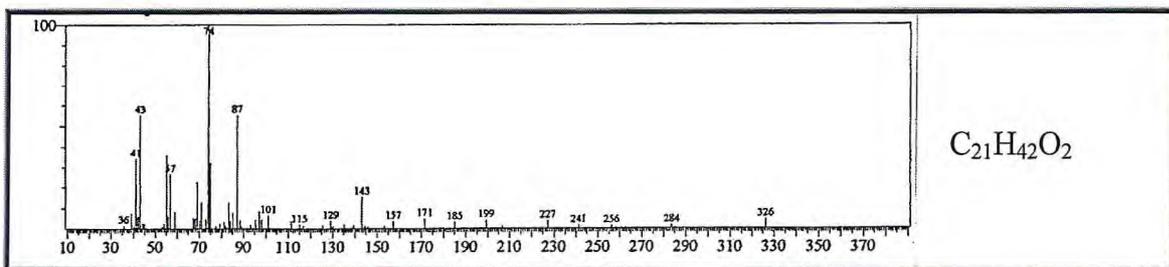


Figura 155 - Espectro de massas do éster metílico do ácido araquídico (100)

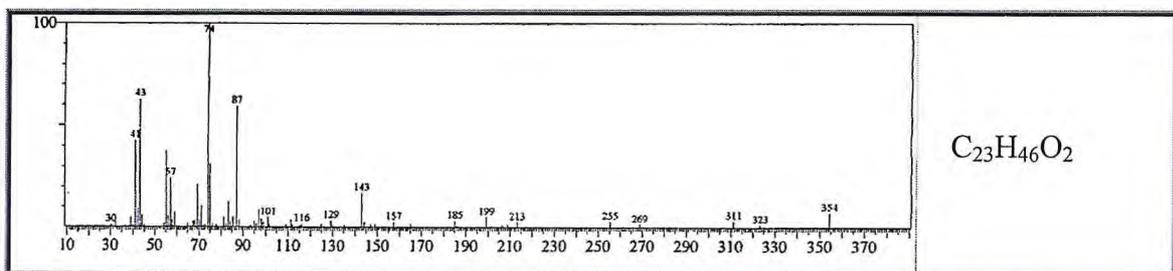


Figura 156 - Espectro de massas do éster metílico do ácido behênico (101)

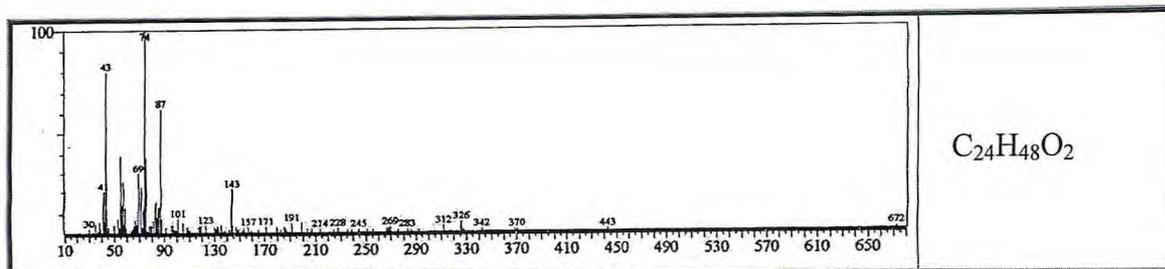


Figura 157 - Espectro de massas do éster metílico do ácido tricosanóico (102)

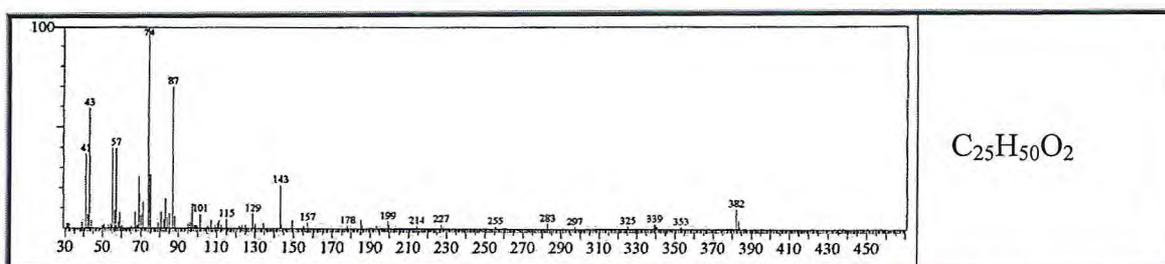


Figura 158 - Espectro de massas do éster metílico do ácido lignocérico (103)

Capítulo 4



Ensaio Biológico

4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.1. Atividade Larvicida dos Óleos Essenciais Sobre às Larvas de *Aedes aegypti*

Muitas espécies de mosquitos são vetores de importantes doenças endêmicas e apresentam hoje resistência a várias classes de inseticidas químicos. O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de transmissão do vírus causador da febre amarela urbana, dengue, inclusive a dengue hemorrágica causadora de 50 a 100 milhões de mortes por ano (HUBER *et al.*, 2004).

A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista – Roraima, e, a partir de 1986 foram registradas epidemias em diversos outros estados. O Estado do Ceará apresenta um histórico de casos de dengue desde 1986, com três grandes epidemias nos anos de 1987, 1994 e 2001 onde foram confirmados 22.519, 47.789 e 34.390 casos, respectivamente. Destaca-se também o ano de 2005, com 22.817 casos confirmados (SESA-CE, 2006).

Como não existe vacina para a Dengue, a maneira de diminuir a incidência desta doença é a erradicação do mosquito. O desenvolvimento de resistência frente a inseticidas sintéticos e a problemática da poluição ambiental vêm impulsionando a busca por medidas alternativas de controle e eliminação desse mosquito. Os produtos naturais obtidos de plantas podem ser uma fonte alternativa de agentes inseticidas de baixa toxicidade, uma vez que, plantas podem produzir diferentes compostos bioativos (YANG *et al.*, 2002).

Muitos rotenóides, especialmente a rotenona, apresentam considerável atividade inseticida. As espécies do gênero *Tephrosia* são ricas em substâncias pertencentes a esta subclasse (ANDREI *et al.*, 2002; SINHA *et al.*, 1982) e, por este motivo, foram realizados testes com os extratos e óleos essenciais de *T. cinerea*.

Amostras apresentando valores de $CL_{50} < 100$ ppm foram consideradas ativas (CHENG *et al.*, 2003) e constituem-se em fortes candidatas ao combate do mosquito da febre amarela.

Os resultados do teste são descritos na Tabela 24 (p. 175). Verificou-se que os óleos essenciais das folhas e dos talos mostraram-se ativos e que o óleo dos talos apresentou o melhor resultado ($CL_{50} = 47,86 \pm 0,63$) quando comparado com o óleo das folhas ($CL_{50} = 66,07 \pm 0,74$ ppm). Os resultados sugerem que *T. cinerea* é uma promissora fonte de agentes larvicidas naturais biodegradáveis.

Um inseticida sintético, temephos®, foi utilizado como controle positivo deste teste. Para uma melhor comparação, também se inclui na Tabela 24 o CL_{50} do DDT (diclorodifeniltricloroetano), inseticida sintético mais conhecido dentre os organoclorados. Ele apresenta uma atividade larvicida elevada, mas é bastante tóxico, vindo a ser proibido pelo Governo Federal em 1985, juntamente com os demais produtos organoclorados, sendo permitidos somente em campanhas de saúde pública no combate à malária e leishmaniose, bem como em uso emergencial na agricultura, a critério do Ministério da Agricultura (D'AMATO *et al.*, 2002).

Tabela 24 - Resultados dos testes larvicida frente ao *Aedes aegypti*

Amostra	CL_{50} / ppm
OEFTC	$66,07 \pm 0,74$
OETTC	$47,86 \pm 0,63$
Temephos®	3,22
DDT	0,16

4.2. Teste de Atividade Antioxidante

A produção de radicais livres pelo metabolismo intracelular é um resultado regular das funções normais das células. Estes compostos são espécies químicas altamente reativas e podem danificar os lipídios, as proteínas e o DNA. Várias doenças estão associadas aos radicais livres, como por exemplo, o câncer, doenças cardiovasculares, declínio de sistema imunológico, catarata, deficiência orgânica do cérebro e a doença de Alzheimer (HUGON *et al.*, 1996).

Os flavonóides agem como capturadores de várias espécies oxidantes, como radicais hidroxila ou radicais peróxidos. Um grupo carbonila na posição C-4 e uma dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 são características importantes para atividade antioxidante elevada em flavonóides (DAS e PEREIRA, 1990). Alguns trabalhos também relatam que misturas de flavonóides agindo como sinergistas possam ser responsáveis pela alta atividade observada em extratos (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

Há muito tempo vêm se buscando soluções para minimizar os efeitos destes compostos. O teste de atividade antioxidante é baseado na capacidade de uma determinada substância capturar um radical livre, de forma que quanto maior a possibilidade de captura de radicais, maior será sua atividade antioxidante. Considerando-se que o uso de compostos com atividade antioxidante de origem sintética não é muito recomendado uma vez que podem promover efeitos colaterais diversos, observa-se uma tendência favorável pelo uso daqueles oriundos de fontes naturais.

Foram testados dois flavonóides isolados de *T. cinerea*, a lanceolatina B e o pongamol (Tabela 25, p. 149). A primeira apresentou capacidade de eliminar os radicais livres na concentração de $1,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ (65,13%) com percentual próximo ao do BHT (73,89%), composto já descrito como antioxidante efetivo.

Tabela 25-Resultados do teste antioxidante

Amostra	Concentração (mg.mL ⁻¹)					
	1.00		0.50		0,25	
	Atividade	%	Atividade	%	Atividade	%
Controle	0,310±0,0005	00,00	0,310±0,0005	00,00	0,310±0,0005	00,00
Trolox	0,0225±0,003	93,47	0,0285±0,001	92,68	0,041±0,001	95,86
BHT	0,100±0,000	73,89	0,1105±0,0005	71,27	0,1155±0,0005	69,97
Lanceolatina B	0,109±0,001	65,13	0,180±0,001	42,31	0,250±0,002	9,60
Pongamol	0,270±0,001	12,79	0,280±0,0005	9,62	0,310±0,001	0,0

Capítulo 5



Parte Experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Material vegetal (*Tephrosia cinerea* Pers.)

O espécime de *T. cinerea* utilizado para estudo fitoquímico foi coletado em junho de 2002 na localidade de Pentecoste–CE pelo Professor Manoel Andrade Neto do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará e identificada pelo Professor Edson P. Nunes do Departamento de Biologia da mesma Universidade. Sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra daquele Departamento, sob o número de registro 31.617.

5.2. Métodos Cromatográficos

5.2.1. Cromatografia de Adsorção em Coluna (CC)

As cromatografias de adsorção em coluna foram realizadas utilizando-se gel de sílica 60 (Φ μm 63-200) e de sílica 60 para cromatografia “flash” (Φ μm 40-63) da Merck. Os comprimentos e diâmetros das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas e adsorventes empregados. As colunas utilizadas na cromatografia de adsorção sob pressão média (cromatografia flash) foram de vidro resistente à pressão e continham bulbos no ápice, para armazenamento do solvente. Foi empregada, nesta técnica, bomba de ar comprimido modelo Inalatec Plus (Ref.: 6600) da Nevoni.

Os eluentes utilizados foram: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol, puros, em misturas binárias ou ternárias, de forma isocrática ou em ordem crescente de polaridade.

5.2.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Nas cromatografias de camada delgada (CCD) foi utilizado gel de sílica 60 (Φ μm 2-25), da Carlo Erba e cromatofolhas de plástico e/ou de alumínio AL TLC de gel de sílica 60 F₂₅₄, da Merck.

As análises foram feitas através da exposição das cromatoplasmas à radiação de luz ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), emitidos por lâmpada modelo VL-4.LC da Vilber Lourmat e/ou por imersão em solução de vanilina ($C_8H_8O_3$) 5g / 100 mL de ácido perclórico ($HClO_4$) 0,75M / 100 mL de etanol, seguido de aquecimento em soprador térmico HL-500, da Steinel à aproximadamente 150 °C, por alguns segundos.

Os eluentes utilizados foram: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol, puros, em misturas binárias ou ternárias.

5.3. Métodos Físicos de Análises

As análises de Espectroscopia de Infravermelho e Espectrometria de Massas foram realizadas nos equipamentos do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das substâncias isoladas foram obtidos em aparelhos pertencentes ao CENAUREMN (Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear) coordenado pelo Professor Dr. Edilberto Rocha Silveira do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

5.3.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em Espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000 da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, utilizando pastilhas de KBr para análise das amostras.

5.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DRX-500, operando na frequência de 125 MHz para carbono-13 e 500 MHz para hidrogênio, respectivamente.

Os solventes utilizados na dissolução das amostras foram clorofórmio (CDCl_3) e piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) deuterados.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN ^1H pelos picos referentes à fração não deuterada dos solventes: clorofórmio (δ 7,27) e piridina (δ 7,19; 7,55 e 8,71). Para RMN ^{13}C pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (δ 77,23) e piridina (δ 123,5; 135,5 e 149,9).

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: singlete (s), dubleto (d), duplodubleto (dd), tripleto (t) e multiplete (m).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de nutação de 135° (CH e CH_3 com amplitude em oposição aos CH_2). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais espectrais observados no espectro BB (Broad Band).

5.3.3. Espectrometria de Massas

Os espectros de massas dos óleos essenciais, dos ésteres metílicos dos ácidos graxos e das substâncias isoladas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV em espectrômetro de massas SHIMADZU, modelo QP 5000, DI-50, pertencente à Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Os fragmentos foram descritos de acordo com a relação entre a unidade de massa atômica e a carga (m/z), e a abundância relativa em percentagem (%).

5.3.4. Ponto de Fusão

O ponto de fusão de cada substância isolada foi determinado em aparelho METTLER Toledo, com placa aquecedora modelo FP82HT e central de processamento FP90, acoplada a um microscópio óptico monocular do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de $5^\circ\text{C} / \text{min}$.

5.4. Estudo dos Constituintes Voláteis de *Tephrosia cinerea*

5.4.1. Obtenção dos óleos essenciais das folhas e talos de *T. cinerea*

As folhas frescas (1000 g) e os talos (450 g) de *T. cinerea* foram submetidos, separadamente, à extração por arraste com vapor d'água, utilizando-se aparelho tipo Cleavenger modificado por Gottlieb (Gottlieb e Magalhães, 1960). Os óleos essenciais obtidos foram secos com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e renderam 1,5 g (0,15%) das folhas e 0,18 g (0,4%) dos talos, respectivamente. Estes óleos foram analisados em cromatógrafo gás-líquido acoplado a espectrômetro de massa (CGL/EM) e CGL/FID.

5.5. Estudo dos Constituintes não Voláteis de *Tephrosia cinerea*

5.5.1. Obtenção dos extratos das folhas, talos, vagens e raízes de *T. cinerea*

As partes do espécime coletado de *T. cinerea* foram separadas, secas e moídas. Suas folhas e talos foram submetidos, separadamente, à extração exaustiva com etanol em temperatura ambiente. Enquanto que suas vagens e raízes, também separadamente, foram submetidas à extração exaustiva com acetato de etila em sistema soxhlet. A solução resultante de cada um deles foi filtrada e evaporada em evaporador rotativo sob pressão reduzida.

A quantidade de material utilizado e extrato obtido de cada parte encontram-se listados na Tabela 26.

Tabela 26 - Dados da obtenção dos extratos de *T. cinerea*

Denominação	Qtde de Material Botânico / (g)	Qtde de extrato / (g)	Rendimento (%)
TCFE	1.390	172,36	12,4
TCTE	2.080	148,0	7,1
TCVAE	1.260	26,46	2,1
TCRAE	870	20,2	2,3

TCFE – extrato etanólico das folhas de *T. cinerea*.

TCTE – extrato etanólico dos talos de *T. cinerea*.

TCVAE – extrato acetato de etila das vagens de *T. cinerea*.

TCRAE – extrato acetato de etila das raízes de *T. cinerea*.

5.5.1.1. Partição Líquido-líquido dos Extratos Obtidos de *T. cinerea*

Conforme Fluxograma 1 (p. 155), os extratos de *T. cinerea*, obtidos no Item 5.5.1.1 (p. 154), foram dissolvidos, separadamente, em 100 mL de metanol e transferidos para um funil de separação. Em seguida, foram adicionados 100 mL de água destilada e a solução foi submetida à partição utilizando os seguintes solventes: hexano (5 X 50 mL), diclorometano (5 X 50 mL) e acetato de etila (5 X 50 mL), obtendo-se as frações descritas na Tabela 27. As frações hidroalcoólicas foram descartadas.

Tabela 27 - Dados da obtenção das frações das partições dos extratos de *T. cinerea*

Extrato	Qtde / (g)	Fração	Qtde / (g)
TCFE	30,1	TCFE-H	14,6
		TCFE-D	5,3
		TCFE-AE	2,3
TCTE	30,4	TCTE-H	13,2
		TCTE-D	1,9
		TCTE-AE	3,6
TCVAE	20,9	TCVAE-H	2,5
		TCVAE-D	4,1
		TCVAE-AE	3,8
TCRAE	20,2	TCRAE-H	4,2
		TCRAE-D	5,8
		TCRAE-AE	2,9

Legenda:

H – Fração hexânica

D – Fração diclorometânica

AE – Fração acetato de etila

Fluxograma 1 – Procedimento das partições líquido-líquido dos extratos de *T. cinerea*

5.5.2. Obtenção dos Óleos não Voláteis de *Tephrosia cinerea*

O estudo da porção lipídica de *T. cinerea* foi realizado com as frações hexânicas dos extratos da raiz, vagens, folhas e talos.

5.5.2.1. Obtenção dos Ácidos Graxos Livres de *T. cinerea*

Conforme Fluxograma 2 (p. 158), a fração hexânica foi transferida para um balão de 125 mL juntamente com uma solução etanólica de hidróxido de sódio (Tabela 28, p. 157). O sistema foi montado e a reação foi mantida sob agitação e refluxo durante 2 horas, conforme técnica usual (MATOS, 1988). À mistura reacional foram adicionados 50 mL de água destilada e, em seguida, os insaponificáveis foram extraídos com diclorometano (3 X 50 mL).

A fração hexânica, contendo os insaponificáveis, foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada por destilação do solvente, sob pressão reduzida, em evaporador rotativo. A fase hidroalcoólica alcalina foi acidificada com ácido clorídrico concentrado e os saponificáveis foram extraídos com diclorometano (3 X 50 mL). A fração hexânica, contendo os ácidos graxos livres, foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada por destilação do solvente, sob pressão reduzida, em evaporador rotativo.

As quantidades de materiais utilizados para a reação da fração hexânica de cada extrato encontram-se na Tabela 29, p. 157.

5.5.2.2. Obtenção dos Ésteres Metílicos de *T. cinerea*

A mistura dos ácidos graxos livres, juntamente com 5 mL de metanol e 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado foram acomodados em um balão de 125 mL e mantidos sob refluxo por 1 hora. Decorrido este período foi adicionado 10 mL de uma solução saturada de NaCl (MATOS, 1992). A mistura foi transferida para um funil de separação de 50 mL e os ésteres metílicos foram extraídos com diclorometano (3 X 15 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada por destilação do solvente, sob pressão reduzida, em evaporador rotativo. (Fluxograma 3, p. 158).

Os dados referentes aos rendimentos dos insaponificáveis e dos ésteres metílicos estão listados na Tabela 29, p. 157.

Tabela 28 - Quantidades de material utilizado para saponificação das porções lipídicas de *Tephrosia cinerea*

Fração	Qtde / (g)	KOH (g)	MeOH (mL)
TCFE-H	10,0	12,0	75,0
TCTE-H	10,0	12,0	75,0
TCVAE-H	1,5	1,9	12,0
TCRAE-H	1,5	1,9	12,0

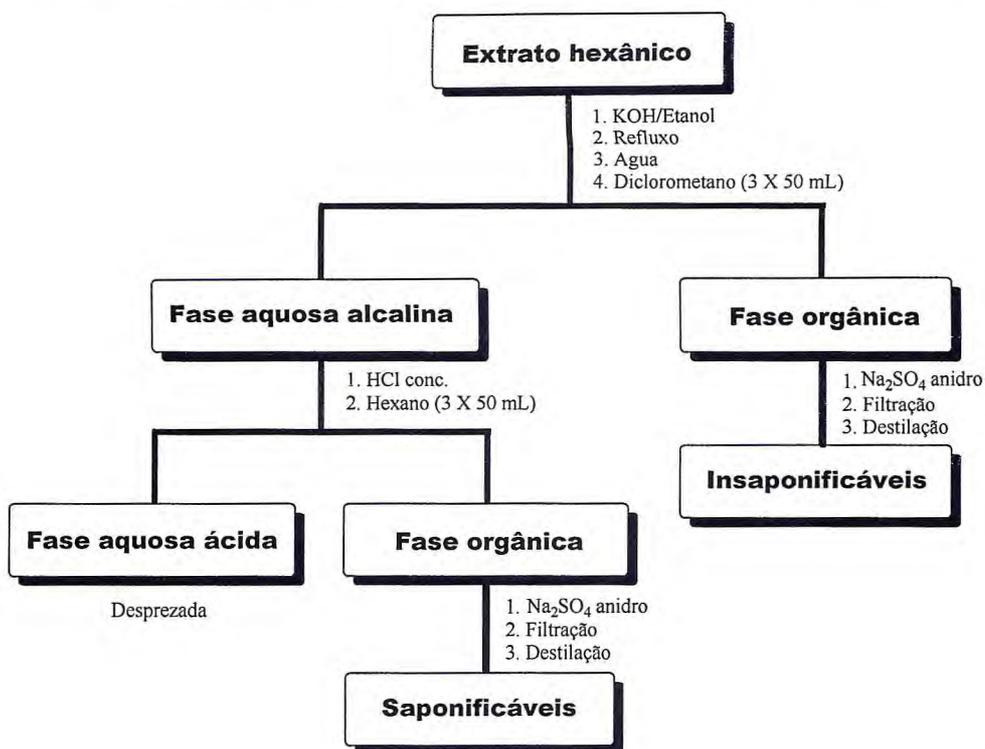
Tabela 29 - Dados dos rendimentos dos insaponificáveis e dos ésteres metílicos obtidos das frações hexânicas dos extratos de *Tephrosia cinerea*

Insaponificáveis	Qtde / (g)	Ésters Metílicos	Qtde / (g)
TCFE-H-insap	8,5	TCFE-H-EM	0,7
TCTE-H-insap	1,9	TCTE-H-EM	6,6
TCVAE-H-insap	1,1	TCVAE-H-EM	0,3
TCRAE-H-insap	0,9	TCRAE-H-EM	0,3

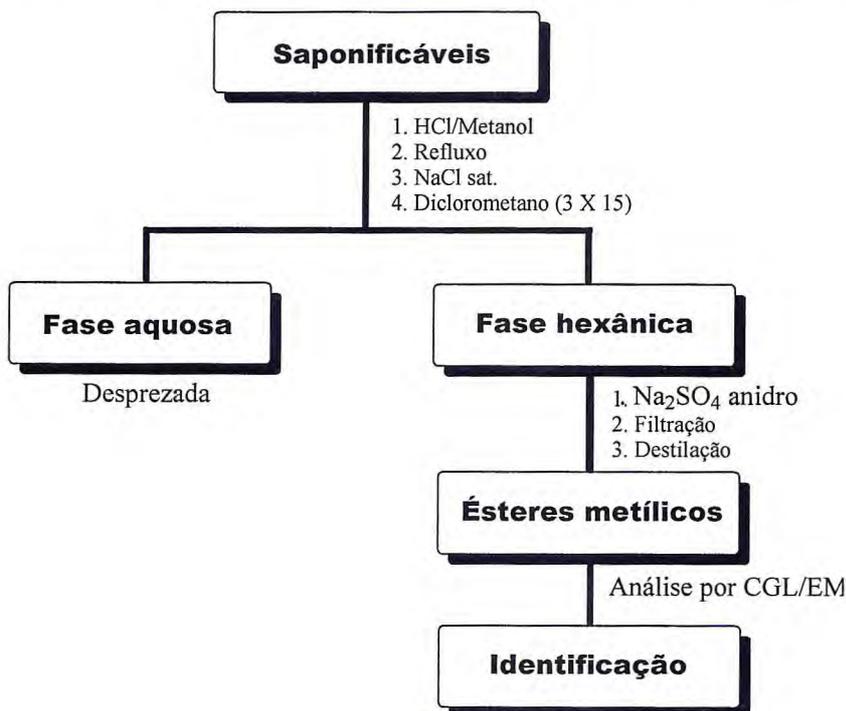
insap – insaponificável

EM – ésteres metílicos

Fluxograma 2 – Técnica de obtenção dos ácidos graxos livres dos de *T. cinerea*



Fluxograma 3 – Técnica de obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos *T. cinerea*



5.5.3. Fracionamento Cromatográfico das Frações Obtidas dos Extratos de *Tephrosia cinerea*

5.5.3.1. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-H-insap

A porção insaponificável da fração hexânica do extrato acetato de etila das raízes de *T. cinerea* (TCRAE-H-insap.) (0,9 g), obtida no Item 5.5.2.1 (p. 155) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando cromatografia “flash” (h = 47 cm e Φ = 3 cm). Para isso, o material foi dissolvido em diclorometano e acondicionado sobre uma camada de gel de sílica, eluída primeiramente com diclorometano (para as 159 primeiras frações) e posteriormente com acetato de etila (para as frações 160 a 181). As frações obtidas foram analisadas por CCD e reunida conforme sua semelhança, como ilustrado na Tabela 30.

Tabela 30 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-H-insap

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
1-11	22,0	48-72	26,8
12-14	10,4	73-87	21,3
15-18	26,7	88-128	71,5
19-23	39,8	129-145	10,3
24-28	17,0	146-181	423,3
29-47	57,3		
			Total = 726,4 mg
			Rendimento = 80,71%

5.5.3.1.1. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-H-insap (29-47): isolamento de TC-1

A fração 29-47 (57,3 mg) foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida à cromatografia “flash” em coluna cromatográfica (h = 43 cm e Φ = 2,0 cm). A eluição foi realizada com a mistura dos solventes Hexano/clorofórmio/metanol 9,0:0,8:0,2, em um sistema isocrático. As frações foram analisadas em CCD utilizando o mesmo eluente e reunidas de acordo com sua semelhança (Tabela 31, p. 160).

Tabela 31 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-H-insap (29-47)

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
1-81	1,7	90	2,3
82-87	2,8	91-101 (TC-1)	41,9
88	1,3	102-115	2,1
89	0,3		
			Total = 52,4 mg
			Rendimento = 91,4%

Foi observado que a fração 91-101 apresentava um sólido amorfo amarelado que após ser lavado com MeOH gelado, apresentou-se em forma de cristais brancos (15,8 mg), solúvel em clorofórmio, com ponto de fusão entre 136,15 e 137,50 °C que foi denominado de TC-1. O sólido foi analisado em CCD, mostrando-se homogêneo, visível na luz U.V. (254 e 365 nm) e incolor após pulverização com solução de vanilina e posterior aquecimento.

5.5.3.1.2. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-H-insap (88-128): isolamento de TC-2

A fração TCRAE-H-insap (88-128) (71,5 mg) foi submetida à cromatografia “flash”, utilizando o mesmo procedimento citado no Item 5.5.3.1.1. A eluição foi realizada com a mistura de solventes Hexano/clorofórmio/metanol 8,0:1,7:0,3. As frações obtidas foram analisadas por CCD, utilizando o mesmo eluente, e reunidas conforme sua semelhança (Tabela 32, p. 161).

Tabela 32 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-H-insap (88-128)

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
1-4	0,5	27-33 (TC-2)	12,8
5	2,4	34-45	48,1
6-10	0,4	46-47	3,2
11-19	0,8	58	1,2
20-26	0,2		
			Total = 69,6 mg
			Rendimento = 97,1%

Análise em CCD das frações reunidas revelou que a fração 27-33 apresentou-se homogênea, visível na luz U.V. (254 e 365 nm) e de coloração laranja após revelação com uma solução de vanilina. O sólido de aspecto laranja e solúvel em clorofórmio foi denominado TC-2 e apresentou ponto de fusão entre 120,9 – 122,6 °C.

5.5.3.1.3. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-H-insap (146-181): isolamento de TC-3

Submeteu-se a fração TCRAE-H-insap. (146-181) (Item 5.5.3.1., p. 159), contendo 423,3 mg, a um fracionamento cromatográfico utilizando cromatografia “flash” (h = 35 cm e Φ = 1,5 cm) e a mistura de solventes Hexano/acetato de etila 8:2 como eluente. As frações foram analisadas por CCD (eluente:hexano/acetato de etila 8:8) e as semelhantes foram reunidas conforme a Tabela 33, p. 162.

Tabela 33 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-H-insap (146-181)

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
1-4	3,2	34	6,0
5-10	4,1	35-39	1,4
11-19	2,1	40	4,8
20 (TC-3)	25,3	41-73	6,3
21-25	28,4	74	1,3
26	9,8	75-78	87,4
27-33	6,1	MeOH	213,2
			Total = 423,3 mg
			Rendimento = 75,7%

Um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio, foi observado na fração 20. A análise em CCD da mesma permitiu visualizar uma mancha homogênea que não apresentava fluorescência ao ser irradiada pela luz U.V. e de cor lilás após revelação com solução de vanilina. O sólido foi denominado de TC-3 e apresentou ponto de fusão entre 141,7-145,9 °C. A comparação em CCD de TC-3 e o padrão do esteróide sitosterol sugeriu que eles apresentavam a mesma identidade.

5.5.3.2. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D: isolamento de TC-1 e TC-4

A fração TCRAE-D (5,2 g), obtida no Item 5.5.1.1., foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida à cromatografia “flash” em coluna cromatográfica (h = 25 cm e Φ = 3 cm), utilizando um sistema de eluição isocrática com clorofórmio P.A. Análise comparativa em CCD das frações obtidas possibilitou a junção das frações semelhantes, cujo resultado encontra-se na Tabela 34 (p. 163).

Tabela 34 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
1	11,1	9 (TC-1)	54,5
2 (TC-4)	5,4	10-23	869,7
3	25,3	24-27	172,7
4-5	32,4	28-29	164,1
6	33,9	30-34	2.752,00
7-8	185,3		
			Total = 4.306,7 mg
			Rendimento = 82,82%

A fração 9 (54,5 mg) apresentou um precipitado amarelado que, após ser lavado com MeOH gelado, forneceu um sólido branco cristalino (12,6 mg) e solúvel em clorofórmio. O sólido foi analisado por CCD (eluente: hexano/clorofórmio 7:3) e comparado com TC-1, sugerindo ser a mesma substância. A confirmação foi possível após a constatação do seu ponto de fusão (136,1 - 137,5 °C).

Análise em CCD (eluente: hexano/clorofórmio 7:3 para as frações de 1 a 10-23 e hexano/clorofórmio 1:4 para as demais frações) das frações reunidas possibilitou observar que a fração 2 (5,4 mg) apresentava-se como uma mancha homogênea, visível na luz U.V. (254 e 365 nm) e de coloração vermelha após pulverização com uma solução de vanilina com posterior aquecimento. A fração, solúvel em clorofórmio, foi denominada de TC-4 e apresentou ponto de fusão entre 177,1 – 179,9 °C.

5.5.3.2.1. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D (4-5): isolamento de TC-5

Cromatografia “flash” ($h = 34$ cm e $\Phi = 1,5$ cm) da fração TCRAE-D (4-5) (32,4 mg), obtida no Item 5.5.3.2 (p. 162), utilizando uma eluição isocrática (Hexano/acetato de etila 9:1), rendeu 57 frações, as quais foram analisadas e reunidas conforme sua semelhança (Tabela 35, p. 164).

Tabela 35 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (4-5)

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
1-8	2,6	29-30	1,5
9-12 (TC-5)	5,8	31-33	1,3
13-15	3,9	34-36	1,2
16-20	3,1	37-39	1,9
21-24	1,1	40-55	2,5
25-28	5,3	56-57	0,5
			Total = 30,7 mg
			Rendimento = 94,7 %

Foi possível perceber, após análise em CCD das frações reunidas, que a fração 9-12 apresentava-se homogênea, fluorescente ao ser irradiada com luz U.V. nos comprimentos de onda 254 e 365 nm e coloração azul após revelação com uma solução de vanilina. O sólido de cor amarelada, denominado de TC-5, apresentou solubilidade em clorofórmio e ponto de fusão de 90,0 – 92,2 °C.

5.5.3.2.2. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D (7-8): isolamento de TC-6

Análise em CCD da fração TCRAE-D (Item 5.5.3.2, p. 162) possibilitou visualizar três componentes fluorescentes na fração (7-8) ao ser irradiada pela luz U.V. (254 e 365 nm) e revelada em solução de vanilina. Esta fração (185,3 mg) foi cromatografada sobre uma camada de gel de sílica para cromatografia “flash” (h = 30,0 cm e $\Phi = 1,5$ cm), utilizando como eluente a mistura hexano/clorofórmio/acetona 21:2:2, num sistema isocrático de eluição. Foram obtidas 98 frações que, após análise comparativa em CCD, foram reunidas conforme sua semelhança (Tabela 36, p. 165).

Tabela 36 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (7-8)

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
1	1,3	33-34	1,8
2	2,1	35-45	9,5
3	1,2	46	1,7
4	6,9	47-52	17,2
5-6	9,3	53-59	15,0
7-8	8,2	60-68	11,9
9-10	4,3	69-74	5,1
11-16	32,6	75-85	6,3
17-19	15,8	86-98	5,4
20-32	21,9	--	--
			Total = 177,5 mg
			Rendimento = 95,8 %

A cromatografia em questão conduziu ao isolamento de um sólido amorfo amarelo, solúvel em clorofórmio, uniforme em CCD, visível na luz U.V. (254 e 365 nm) e de coloração laranja ao ser revelada com solução de vanilina que foi denominada de TC-6.

5.5.3.2.3. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D (10-23)

A fração TCRAE-D (10-23) (869,1 mg), obtida no Item 5.5.3.2 (p. 162), apresentou um precipitado amarelo, o qual foi primeiramente separado do restante da fração resinosa e lavado com MeOH até a obtenção de um sólido amarelo pálido (41,0 mg), denominado de TCRAE-D (10-23)ppt (41,0 mg). Na análise em CCD (eluente: clorofórmio/metanol 99:1), foi possível verificar que o sólido apresentava quatro manchas com R.f. bem resolvidos, visíveis na luz U.V. (254 e 365 nm) e de coloração verde quando revelada com solução de vanilina. A fração foi reservada para posterior cromatografia.

A solução resultante de lavagem da fração mencionada acima, denominada de TCRAE-D (10-23)sol (753,6 mg), foi adsorvida em de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre uma camada de gel de sílica para cromatografia “flash” em coluna cromatográfica ($h = 18$ cm e $\Phi = 2,0$ cm), utilizando um gradiente de eluição segundo Tabela 37.

Tabela 37 - Dados referentes aos eluentes utilizados no fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (10-23)

Eluente	Fração
Hexano/Diclorometano 7:3	1-19
Hexano/Diclorometano 1:1	20-64
Hexano/Diclorometano 1:4	65-108
Diclorometano	109-143
Diclorometano/Metanol 49:1	144-175
Diclorometano/Metanol 9:1	176-196
Metanol	197

As 197 frações foram analisadas por CCD (eluentes: Hexano/Diclorometano 2:3 para as frações de 1 a 52; Hexano/Diclorometano 1:9 para as frações de 53 a 87; Diclorometano para as frações de 88 a 170 e Diclorometano/Metanol 98:2 para as demais frações) e reunidas conforme sua semelhança, dando origem a 30 novas frações, conforme Tabela 38, p. 167.

Tabela 38 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (10-23)

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
5-11	2,3	85-87	15,4
12-20	3,5	88-90	14,9
21-25	2,5	91-96	21,2
26-29	1,6	97-100	7,8
30	3,2	101-104	6,6
31-37	5,5	105-140	6,2
38-39	2,1	141-151	3,5
40-49	1,4	152-163	349,3
50-52	1,3	164-170	3,5
53-62	7,5	171-179	6,1
63-64	4,4	181-186	6,1
65-70	24,0	187-189	1,7
71-79	68,7	190	
80-83	31,5	191-196	2,1
84	7,5	197	86,4
			Total = 697,8 mg
			Rendimento = 92,6 %

5.5.3.2.4. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D (10-23)ppt: isolamento de TC-7 e TC-8

Os 41,0 mg de TCRAE-D (10-23)ppt foram submetidos a um fracionamento cromatográfico, utilizando sistema “flash” em coluna cromatográfica ($h = 31$ cm e $\Phi = 1,8$ cm) e uma mistura de Diclorometano/Metanol na proporção de 95,5:0,5. As 74 frações obtidas foram analisadas por CCD (eluentes: Diclorometano/Metanol 99:1) e reunidas conforme sua semelhança, dando origem a 7 novas frações (Tabela 39, p. 168).

Tabela 39 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (10-23)ppt.

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
20-83	1,6	64-65	2,1
39-47	2,7	66-74 (TC-8)	15,2
48-51	1,6	75-52	0,9
52-63 (TC-7)	15,1		
			Total = 39,2 mg
			Rendimento = 95,6 %

Após análise em CCD das frações reunidas, verificou-se que duas delas (52-63 e 66-74) apresentavam-se homogêneas, visíveis na luz U.V. (254 e 365 nm) e coloração verde após revelação com uma solução de vanilina. A fração 52-63, de aspecto sólido amarelado, foi denominada de TC-7 e apresentou ponto de fusão entre 112,6 e 114,4 °C, e, a fração 66-74, também de aspecto sólido amarelado, foi denominada de TC-8 e apresentou ponto de fusão entre 74,9 e 76,9 °C.

5.5.3.2.5. Fracionamento Cromatográfico de TCRAE-D (10-23)sol (152-163): isolamento de TC-9

Dando continuidade ao fracionamento cromatográfico da fração diclorometânica de TCRAE, a fração TCRAE-D (10-23)sol (152-163), obtida no Item 5.5.3.2.3 (p. 168), foi submetida à cromatografia “flash” em coluna cromatográfica (h = 16 cm e Φ = 1,5 cm), utilizando o gradiente de eluição segundo a Tabela 40 (p. 1690).

Tabela 40 - Dados referentes aos eluentes utilizados no fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (10-23)sol (152-163)

Eluente	Fração
Hexano/Diclorometano 3:7	1-14
Hexano/Diclorometano 2:8	15-71
Diclorometano	72-91
Diclorometano/Acetato de etila 8:2	92-105
Diclorometano/Acetato de etila 1:1	106-117
Acetato de etila	118-124
Metanol	125

As 124 frações obtidas foram analisadas por CCD (eluente: Diclorometano/Metanol 98:2) e as semelhantes foram reunidas. O resultado da reunião das frações encontra-se na Tabela 41.

Tabela 41 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCRAE-D (10-23)sol (152-163)

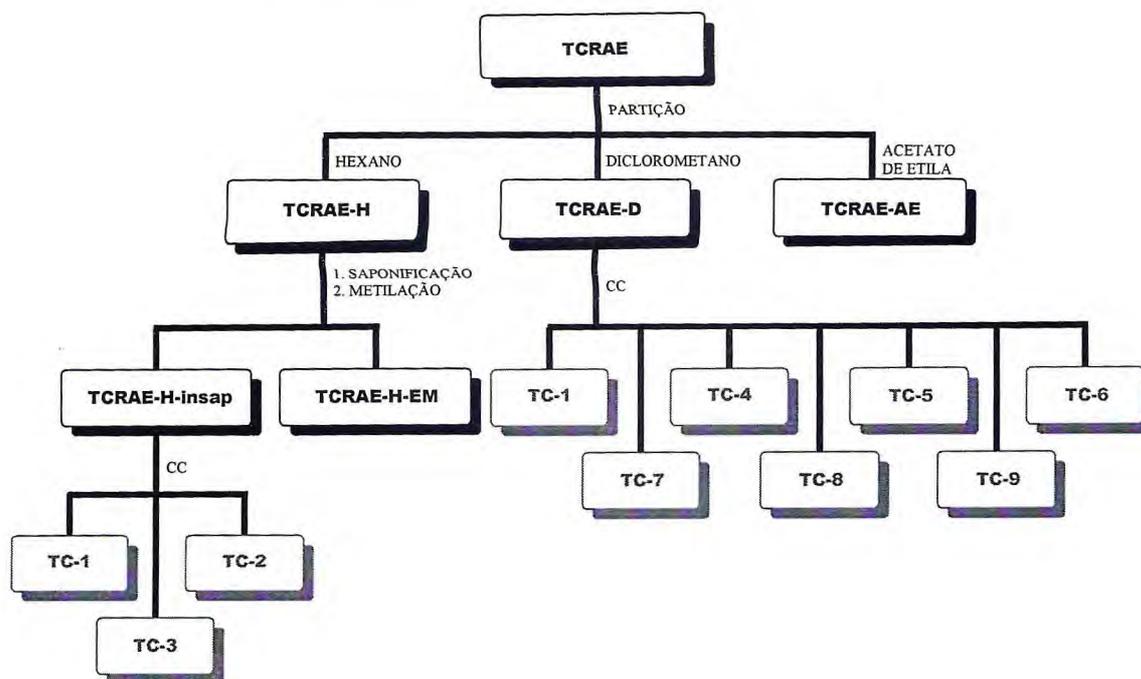
Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
5-21	0,9	70-81	18,8
22-24	2,8	82-93	5,0
25-26	2,0	94-106	104,9
27-32	7,5	107-111 (TC-9)	18,8
33-56	42,3	112-124	17,1
57-60	3,5	125	54,2
61-69	14,7		

Total = 292,5 mg
Rendimento = 83,7 %

Após a reunião das frações, foi possível visualizar alguns cristais na fração 107-111. Estes foram separados e lavados com MeOH até a obtenção de 4,2 mg de um sólido branco em forma de agulha, solúvel em DMSO e Piridina, que apresentou ponto de fusão entre 183,8 – 186,5 °C, o qual foi denominado TC-9.

O Fluxograma 4 ilustra o procedimento de isolamento das substâncias do extrato acetato de etila das raízes de *Tephrosia cinerea*.

Fluxograma 4 – Isolamento dos constituintes não voláteis do extrato acetato de etila das raízes de *T. cinerea*



5.5.3.3. Tratamento Cromatográfico de TCTE-AE: isolamento de TC-10

3,0 g da fração acetato de etila da partição do extrato etanólico dos talos de *Tephrosia cinerea* foram dissolvidos em 150 mL de MeOH. Tal procedimento conduziu a precipitação de um sólido castanho escuro, o qual foi filtrado a vácuo e lavado com MeOH (5 x 20 mL) em temperatura ambiente. O sólido resultante (9,2 mg), de coloração amarela e solúvel em DMSO e Piridina, foi denominado de TC-10 e apresentou ponto de fusão entre 128,3 e 130,0 °C.

A solução resultante da solubilização de TCTE-AE foi submetida a fracionamentos cromatográficos sucessivos, porém não conduziu ao isolamento de outras substâncias.

5.5.3.4. Fracionamento Cromatográfico de TCVAE-H-insap: isolamento de TC-1 e TC-11

A porção insaponificável da fração hexânica do extrato acetato de etila das vagens de *T. cinerea* (TCVAE-H-insap) (1,185 g), obtida no Item 5.5.2.1 (p. 155) foi dissolvida em diclorometano e submetida a fracionamento cromatográfico utilizando cromatografia “flash” (h = 25 cm e Φ = 3 cm). A coluna foi eluída com diclorometano e coletada em frações de 50,0 mL. As 30 frações obtidas foram analisadas por CCD (eluente: Hexano/Clorofórmio 1:1 para as frações de 1 a 15 e clorofórmio para as demais frações) e reunidas conforme Tabela 42.

Tabela 42 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCVAE-H-insap

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
1-4	12,2	16-20	255,7
5-6 (TC-11)	15,3	21	23,4
7-9	35,7	22-27	63,2
10	7,7	28	178,4
11-14	74,3	29 (TC-1)	250,4
15	18,1	30	140,2
			Total = 1074,3 mg
			Rendimento = 90,7 %

A fração 5-6 apresentou um precipitado que foi lavado com MeOH, fornecendo 6,8 mg de um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio, com ponto de fusão entre 128,3 – 130,0 °C, denominado de TC-11. Análise em CCD (eluente: Hexano/Diclorometano 7:3) do precipitado revelou uma única mancha, fluorescente ao ser irradiada pela luz U.V. nos comprimentos de onda 254 e 365 nm e de coloração vermelha ao ser revelada com solução de vanilina.

Foi observado que na fração 29 também havia um precipitado. Este foi lavado com MeOH gelado até a obtenção de um sólido branco cristalino (12,6 mg), solúvel em clorofórmio que, após análise por CCD (eluente: Hexano/Diclorometano 6:4), comparação com TC-1 e análise do ponto de fusão (136,1 – 137,5 °C), concluiu tratar-se da mesma substância.

5.5.3.5. Fracionamento Cromatográfico de TCVAE-D

3,6 g da fração TCVAE-D (5.5.1.1, p. 154), foram adsorvidos em gel de sílica, pulverizados em gral de porcelana e submetidos a fracionamento cromatográfico ($h = 12$ cm e $\Phi = 4$ cm). Foram coletadas 55 frações de 50,0 mL, segundo um gradiente de eluição descrito na Tabela 43.

Tabela 43 - Dados referentes aos eluentes utilizados no fracionamento cromatográfico de TCVAE-D

Eluente	Fração
Hexano	1-6
Hexano/Diclorometano 7:3	7-16
Hexano/Diclorometano 1:1	17-19
Hexano/Diclorometano 2:8	20-29
Diclorometano	30-34
Diclorometano/Acetato de etila 1:1	35-43
Acetato de etila	44-53
Metanol	54-55

As frações obtidas foram analisadas por CCD (eluentes: Hexano/Diclorometano 3:1 para as primeiras 16 frações; Hexano/Diclorometano 3:1 + 1 gota de MeOH em 10 mL da mistura para as frações 17 a 55 e Diclorometano 3:1 + 4 gotas de MeOH em 10 mL da mistura para as demais frações) e reunidas conforme sua semelhança, como ilustrado na Tabela 44 (p. 173).

Tabela 44 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCVAE-D

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
3-6	30,3	20	114,5
7	79,9	21-30	74,6
8	249,2	31-36	106,6
9-10	97,2	37-38	107,7
11-13	96,0	39-48	58,4
14-16	43,4	49-53	42,0
17-18	128,9	54-55	1.450,1
19	65,4		
			Total = 2.744,2 mg
			Rendimento = 76,2 %

5.5.3.5.1. Fracionamento Cromatográfico de TCVAE-D (8): isolamento de TC-12

A fração TCVAE-D (8) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando cromatografia “flash” ($h = 10$ cm e $\Phi = 3$ cm). As frações foram coletadas de acordo com o gradiente de eluição descrito na Tabela 45.

Tabela 45 - Dados referentes aos eluentes utilizados no fracionamento cromatográfico de TCVAE-D (8)

Eluente	Fração
Benzeno	1-35
Hexano/Clorofórmio/Metanol 8:1,9:0,1	36-51
Clorofórmio/Metanol 99:1	52-68
Metanol	69

As frações obtidas foram analisadas por CCD, utilizando Diclorometano como eluente, e as semelhantes foram reunidas. O resultado da reunião das frações encontra-se na Tabela 46, p. 174.

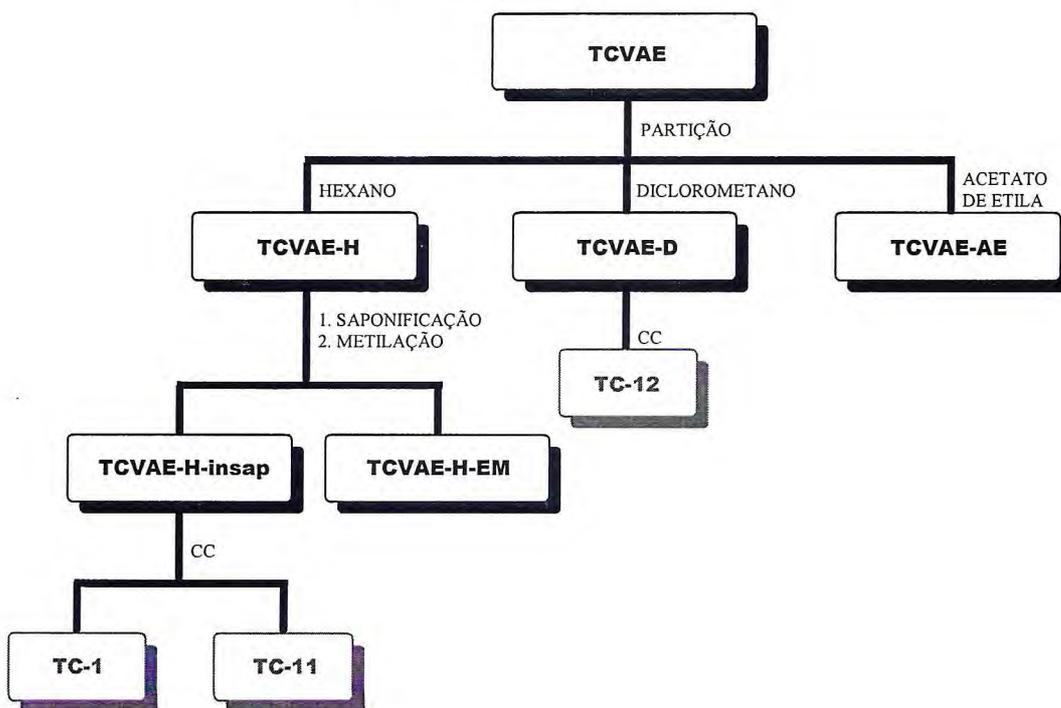
Tabela 46 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de TCVAE-D (8)

Fração	Qtde / (mg)	Fração	Qtde / (mg)
12-19	23,4	42-48	33,4
20-29 (TC-12)	47,5	49-68	18,9
30-34	13,9	69	35,7
35-41	47,8		
Total = 220,6 mg			
Rendimento = 88,5 %			

A fração 20-29 apresentou um sólido amarelado que foi submetido a uma lavagem com metanol, resultando em 8,9 mg de um material sólido branco e amorfo, solúvel em clorofórmio, denominado de TC-12. Análise em CCD (solvente: Hexano/Clorofórmio 7:3) revelou uma mancha homogênea, visível na luz U.V. (254 e 365 nm) e de cor amarela intensa ao ser revelada com solução de vanilina. TC-12 apresentou ponto de fusão entre 106,9 e 108,8 °C.

O Fluxograma 5 ilustra o procedimento de isolamento das substâncias do extrato acetato de etila das vagens de *Tephrosia cinerea*.

Fluxograma 5 – Isolamento dos constituintes não voláteis do extrato acetato de etila das vagens de *T. cinerea*



5.6. Teste de atividade larvicida dos óleos essenciais sobre o mosquito *Aedes aegypti*

Os testes de atividade larvicida foram feitos em parceria com o Laboratório de Entomologia do Núcleo de Endemias da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, em convênio com a Universidade Federal do Ceará, sob orientação da Profa. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago.

Alíquotas das amostras (10 a 1mg) foram inicialmente dissolvidas em 0,3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e transferidas para um béquer com capacidade para 50 mL. Posteriormente, foram adicionadas 50 larvas (estágio III) (GADELHA, & TODA, 1985) juntamente com aproximadamente 19,7 mL de água.

Após 24 horas, foi feita a contagem do número de larvas mortas. Os resultados são mostrados em concentração (ppm) da amostra capaz de matar 50% da população de larvas (CL₅₀) (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Os bioensaios foram realizados em triplicata e os resultados são mostrados na Tabela 24 (p. 147) juntamente com o cálculo de desvio padrão dos mesmos. Paralelamente foram realizados testes em branco, utilizando água e DMSO a 1,5 %.

5.7. Teste de atividade antioxidante

As atividades antioxidantes das substâncias foram averiguadas por testes específicos com DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), no Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais da Universidade Federal do Ceará. Foi utilizada metodologia do seqüestro de radicais livres (HEGAZI, 2002). Adicionou-se em uma cubeta 1mL de DPPH, previamente preparado na concentração de 60 mmol/L, 1mL de etanol e realizou-se leitura em espectrofotômetro UV com absorbância de 520 nm. Em seguida, foi feita uma leitura testando as amostras em diferentes concentrações. Realizou-se o mesmo procedimento com os padrões Trolox e BHT, compostos já descritos como antioxidantes efetivos. Os resultados são descritos na Tabela 25 (p. 149).

Capítulo 6



Conclusão

5. CONCLUSÃO

O estudo químico dos óleos essenciais de *Tephrosia cinerea* Pers. foi realizado com as folhas e talos, sendo identificados 97,7% e 83,8% dos seus constituintes, respectivamente. No óleo essencial dos talos observou-se exclusivamente a presença de sesquiterpenos, enquanto que no óleo das folhas foram encontrados, além de sesquiterpenos, os diterpenos lineares fitol (76) e isofitol (77) em pequena quantidade (10,8%). Testes de atividade larvicida sobre o *Aedes aegypti* mostraram resultados satisfatórios para as folhas ($CL_{50} = 66,07 \pm 0,74$ ppm) e talos ($CL_{50} = 47,86 \pm 0,63$), visto que amostras apresentando valores de CL_{50} menores que 100 ppm são consideradas ativas.

A análise da constituição lipídica das folhas, talos, vagens e raízes de *T. cinerea* permitiu a identificação de 92,7%, 90,1%, 100% e 100% dos constituintes, respectivamente. Foram identificados onze ácidos graxos, sendo o palmítico (93) o constituinte majoritário nos óleos dos talos, vagens e raízes e o linolênico (95) nas folhas.

O levantamento bibliográfico realizado, juntamente com o estudo químico de *Tephrosia cinerea* permitiu a confirmação do perfil quimiotaxonômico relatado para a família Fabaceae, através do isolamento de onze flavonóides: quatro flavonas (lanceolatina B (78), anhidrolanceolatina A (85), 8-(3"-metoxi-dimetilalila)-7-metoxiflavona (87) e rutina (89)), três chalconas (pongamol (79), 4',4"-dimetoxi-2",2",2"',2"' bis-dimetilcromeno [2',3':7,8;2"',3''':7'',8''']-7→O→7"-bichalcona (88) e pongachalcona (91)), uma flavanona (isolonchocarpina (83)), dois pterocarpanos (flemichapparina B (82) e medicarpina (90)) e um rotenóide (rotenona (84)). Dois destes compostos (87 e 88) estão sendo relatados pela primeira vez como produtos naturais.

Ensaio de atividade antioxidante, utilizando o DPPH, foram realizados com os flavonóides lanceolatina B (78) e pongamol (79). Os resultados com as amostras na concentração de $1,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ mostraram que a primeira apresentou poder antioxidante próximo (65,13%) ao do BHT (73,89%), composto já descrito como antioxidante efetivo. Este resultado aponta a espécie como uma provável fonte de agentes antioxidantes, motivando a continuidade da pesquisa.

Capítulo 7



Referências
Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-DOUH, A. M.; ITO, C.; TOSCANO, R. A. EL-BAGA, N. Y.; EL-KHRISY, E. E. D. A.; FURUKAWA, H. Prenylated flavonoids from the root of Egyptian *Tephrosia apollinea* - crystal structure analysis. **Zeitschrift Naturforschung, B: Chemical Sciences**, v. 60, n. 4, p.458-470, 2005.
- ADAMS, R. P. In *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*; Allured: Carol Stream, IL, 2001.
- AGRAWAL, P. K.; Carbon – 13 NMR of flavonoids; Elsevier, 1989.
- AHMAD, V. U.; HUSSAINI, S. R.; ZAHID, M.; ABBAS, M. and SABA, N. Flavonoids of *Tephrosia purpurea*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 443-445, 1999.
- ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L. Kovats índices simulation in essential oil analysis. **Quimica Nova**, v. 13, p. 282-283, 1990.
- AMMAR, N. M.; EL-SAYED, N. H.; MABRY and T. J. Flavanol glycosides of *Tephrosia nubica*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 23, n. 2, p. 60-61, 1995.
- ANDEL, T. V.; The Diverse Uses of Fish-poison Plants in Northwest Guyana. **Economic Botany**, v. 54, n. 4, p. 500-512, 2000.
- ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; MORAES, L. A. B.; CARVALHO, M. G. and BRAZ-FILHO, R. C-prenylflavonoids from roots of *Tephrosia tunicata*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 799-804, 2000.
- ANDREI, C. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. and FO, E. R. New spirorotenoids from *Tephrosia candida*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 57, n. 5-6, p. 418-422, 2002.
- ANDREI, C. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. and FO, E. R. Dimethylchromene rotenoids from *Tephrosia candida*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1081-1085, 1997.

- ARRIAGA, A. M. C.; MAGALHÃES, E. H. A.; FEITOSA E. M. A.; MALCHER, G. T.; ANDRADE-NETO, M. and NASCIMENTO, R. F. Composition of the essential oil of *Tephrosia egregia* Sandw. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 4, p. 451-542, 2005.
- BASU, P. K. Extractives from the leaves of *Tephrosia purpurea* (L) Pers. **Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry**, v. 15b, n. 10, p. 971, 1977.
- BARROSO, G. M. Sistemática DE Angiosperma do Brasil, v. 2, Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, MG, 15 e 17, 1986.
- CALDERÓN, J. S.; GÓMEZ-GARIBAY, F.; CÉSPEDES, C. L. Isoprenylated flavonoids from *Tephrosia tuitoensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 7, p. 763-764, 2001.
- CAMELE, G.; MONACHE, F. D.; MONACHE, G. D. and BETTOLO, G. B. M. Three new flavonoids from *Tephrosia praecans*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 707-709, 1980.
- CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 89-94, 1993.
- CHANG, L. C.; CHÁVEZ, D.; SONG, L. L.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M. and KINGHORN, A. D. Absolute configuration of novel bioactive flavonoids from *Tephrosia purpurea*. **Organic Letters**, v. 2, n. 4, p. 515-518, 2000.
- CHANG, L. C.; GERHÄUSER, C.; SONG, L. FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M. and KINGHORN, A. D. Activity-guided isolation of constituents of *Tephrosia purpurea* with the potential to induce the phase II enzyme, quinone reductase. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 869-873, 1997.
- CORRÊA, P. M.; **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. V. III**, p. 433, Imprensa Nacional, RJ, Rio de Janeiro, 1984.
- CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. Kovat's Indices as a Preselection Routine in Mass Spectra Library Search of Volatiles. **Journal Natural Products**, v. 47, p. 890-892, 1984.

- D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M. and MALM, O., DDT (Dicloro difenil tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental – Uma Revisão, **Química Nova**, v. 6, p. 995-1002, 2002.
- DAGNE, E.; DINKU, B.; GRAY, A. I. and WATERMAN, P. G. Flavonoids from the seed pods of *Tephrosia pumila*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 7, p. 1897-1900, 1989.
- DAGNE, E.; DINKU, B.; GRAY, A. I. and WATERMAN, P. G. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1503-1505, 1988.
- DAS, N. P.; PEREIRA, T. A., Effects of Flavonoids on Thermal Auto-oxidation of Palm oil: structure activity relationships. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 67, p. 255-258, 1990.
- DOMINGUEZ, X. A.; TELLEZ, O. and RAMIREZ G. Mixtecacin, a prenylated flavanone, and oaxacacin, its chalcone, from the roots of *Tephrosia woodii*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 9, p. 2047-2049, 1983.
- FALCÃO, M. J. C. “Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: *Platymiscium floribundum* VOG. (Leguminosae)”, 2003, 275f, Tese (Doutorado em Química Orgânica), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará.
- FURUKAWA, H.; YOGO, M.; WU, T. Acridone alkaloids. X. ¹³C- Nuclear magnetic resonance spectra of acridone alkaloids. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 9, p. 3084–3099, 1983.
- GADELHA, D.P.; TODA, A.T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Rev. Brasil. Malariol. D. trop.** v.37, p. 29-36, 1985.
- GHANIM, A. and JAYARAMAN, I. Chemical components of *Tephrosia falsiformis*. **Indian Journal Chemistry**, v. 17b, p. 648, 1979.
- GIOVAMBATTISTA, N. The value as insecticides of the roots of two species of Argentine *Tephrosia*. **Revista de la Facultad de Ciencias Químicas**, v. 17, p. 83-91, 1942.

- GÓMEZ-GARIBAY, F.; ARCINIEGA, M. L.O.; CÉSPEDES, C. L.; TABOADA, J.; and CALDERÓN, J. S. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 56, n. 11/12, p. 969-972, 2001.
- GÓMEZ-GARIBAY, F.; CALDERÓN, J. S.; ARCINIEGA, M. L.O.; CÉSPEDES, C. L.; TÉLLES-VALDÉS, O. and TABOADA, J. An unusual isopropenyldihydrofuran biflavanol from *Tephrosia crassifolia*. *Phytochemistry*, v. 52, n. 6, p. 1159-1163, 1999.
- GÓMEZ-GARIBAY, F.; QUIJANO, L.; HERNANDEZ, C. and RIOS, T. Enantiomultijugin, a flavone from *Tephrosia viciodes*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 8, p. 2925-2926, 1992.
- GÓMEZ-GARIBAY, F.; TÉLLEZ-VALDEZ, O.; MORENO-TORRES, G. and CALDERÓN, J. S. Flavonoids from *Tephrosia* species - part 11. Flavonoids from *Tephrosia major*. A new prenyl- β -hydroxychalcone. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, v. 57c, p. 579-583, 2002.
- GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T., Modified Distillation Trap. *Chemist Analyst*, v. 49, p. 144, 1960.
- HANRIOT, M. The Active Constituents of *Tephrosia Vogelii*. *Comptes Rendus*, v. 144, p. 150-152, 1907.
- HARBONE, J. B. Phytochemical de Leguminosae, In *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, London: Chapman & Hall, vol. 1., 1994.
- HARBORNE, J. B.; The flavonoids; Chapman and Hall Ltd, 1988.
- HEGAZI, A. G.; ABD EL HADY, F. K. Z., *Naturforsh*, v. 57 , p. 395, 2002.
- HORIE, T.; KAWAMURA, Y.; KOBAYASHI, T. and YAMASHITA, K. Revised Structure of a Natural Flavone from *Tephrosia candida*. *Phytochemistry*, v. 37, n. 4, p. 1189-1191, 1994.
- HUGON, J.; HUGON, F.; ESCLAIRE, F.; LESORT, M. ; DIOP, A. G., The Presence of Calbindin in Rat Cortical Neurons Protects in vitro from Oxydative Stress. *Brain Research*, v. 707, p. 288-292, 1996.

- INGHAM, J. L. and MARKHAM, K. R. Tephrocarpin, a Pterocarpan Phytoalexin from *Tephrosia* Bidwilli and a Structure Proposal for Acanthocarpan. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2969-2972, 1982.
- JANG, D. S.; PARK, E. J.; KANG, Y. H.; HAWTHORNE, M. E.; VIGO, J. S.; GRAHAN, J. G.; CABIESES, F.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M. and KINGHORN, A. D. Potential Cancer Chemopreventive Flavonoids from the Stems of *Tephrosia toxicaria*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1166-1170, 2003.
- JOLY, A. B., **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**, v. 4, 7ª Ed., 1985.
- KAMAL, R.; JAIN, S. C. Ocurrence of Rotenoids in *Tephrosia strigosa*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 2985, 1980.
- KHALID, S. A. and WATERMAN, P. G. 8-C-Prenylflavonoids from the seed of *Tephrosia bracteolata*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 7, p. 1719-1720, 1981.
- LIMA, J. Q. “Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste do Brasil: Estudo Químico e Biológico de *Tephrosia egregia* Sandw (Fabaceae). **2005**, 180f, Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará.
- MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; SALLS, B.H.L.N and MAGALHÃES, E. G. Twenty-three Flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1459-1471, 1996.
- MANN, J., **Secondary metabolism**, 2ª Ed., Oxford Science Publication, 1987.
- MARTÍN, C., **Princípios ativos**. Disponível em:
<http://personal.redestb.es/martin/activos.htm> . Acesso em 25/10/2005.
- MATOS, F. J., **Introdução à Fitoquímica Experimental**, 1ª edição, p. 110-111, Edições UFC, Fortaleza-Ceará, 1988.

- MBAFOR, J. T.; ATCHADE, A. T.; NKENGFACK, A. E.; FOMUM Z. T. and STERNER, O. Furanoflavones from root bark of *Millettia sanagana*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 3, p. 949-952, 1995.
- MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; JÚNIOR, J. F. A.; FERREIRA, S. A.; BRITO, E. S. and SOUZA-NETO, M. A. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils from *Piper* Species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 670-675, 2007.
- MORING, S. E.; McCHESNEY, J. D. High Pressure Liquid Chromatographic Separation of Rotenoids from Plant Extracts. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 62, n. 4, p. 774-781, 1979.
- NIASSY, B.; UM, B. H.; LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; KONÉ, M. and ANTON, R. Flavonoids of *Tephrosia deflexa* and *Tephrosia albifoliolis*. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, n. 10-11, p. 993-996, 2004.
- OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, T.L.G.; MATTOS, M.C.; SEGUNDO, T.A.; SANTIAGO, G.M.P.; FILHO, R.B.; New Enamine Derivatives of Lapachol and Biological Activity. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 74, n. 2, p. 211-221, 2002.
- OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z. and NAGHDIBADI, H. Antifungal Activity of Thyme, Summer Savory and Clove Essential oils Against *Aspergillus flavus* in Liquid Medium and Tomato Paste. **Food Control**, v. 18, p. 1518-1523, 2007.
- PACHLER, K. G. R and UNDERWOOD, W. G. E. Proton magnetic resonance study of some pterocarpan derivatives. Conformation of the 6a,11a-dihydro-6H-benzofuro[3,2-c][1]benzopyran Ring System. **Tetrahedron**, v. 23, p. 1817-1826, 1967.
- PARMAR, V. S.; RATHORE, J. S.; JAIN, R.; HENDERSON, D. A. and MALONE, J. F. Occurrence of Pongamol as the Enol Structure in *Tephrosia Purpurea*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 591-593, 1989.
- PELTER, A.; WARD, R. S.; Rao, E. V. and RAJU, N. R. **Journal of the Chemical Society, Perkin I**, p. 2491-2498, 1981.

- PRABHAKAR, P.; VANANGAMUDI, A.; GANDHIDASAN, R. and RAMAN, P. V. Hookerianin: a Flavone from *Tephrosia hookeriana*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 1, p. 315-316, 1996.
- RAJANI, P. and SARMA, P. N. A Coumestane from the Roots of *Tephrosia hamiltonii*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 2, p. 648-649, 1988.
- RAO, E. V. and PRASAD, Y. R. Prenylated Flavonoids from *Tephrosia spinosa*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 1, p. 183-185, 1993.
- RAO, E. V. and PRASAD, Y. R. Two Chalcones from *Tephrosia spinosa*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 2121-2122, 1992.
- RAO, E. V. and RAJU, N. R. Occurrence of (-)-Isolonchocarpin in the Roots of *Tephrosia purpurea*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1581-1582, 1979.
- RAO, E. V. and RAJU, N. R. Two Flavonoids from *Tephrosia purpurea*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 10, p. 2339-2342, 1984.
- RAO, E. V.; VENKATARATNAM, G. and VILAIN, C. Flavonoids from *Tephrosia fulvinervis*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2427-2430, 1985.
- RIBEIRO, W. H. F.; VASCONCELOS, J. N.; ARRIAGA, A. M. C.; MAFEZOLLI, J.; OLIVEIRA, M. C. F.; ANDRADE-NETO, M.; NASCIMENTO, R. F.; LEMOS, T. L. *Tephrosia toxicaria* Pers. Essential Oil: Chemical Composition and larvicidal Activity. **Natural Products Communications**, v. 1, p. 391-393, 2006.
- ROY, M.; BHATTACHARYA, P. K.; PAL, S. CHOWDHURI, A. and ADITYACHAUDHURY, N. Dehydrodihydrorotenone and Flemichappar-B in *Tephrosia candida*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2423-2424, 1987.
- SESA-CE, **Dengue no Ceará**. Disponível em: www.saude.ce.gov.br. Acesso em 14/08/2007.
- SHARMA, V. M. and RAO, P. S. A Prenylated Chalcone from the Roots of *Tephrosia spinosa*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2915-2916, 1992.

- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X., Identificação Espectroscópica de Compostos Orgânicos, 6ª Ed., Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 2000.
- SINHA, B.; NATU, A.A.; NANAVATI, D.D. Prenylated flavonoids from *Tephrosia purpurea* seeds. **Phytochemistry**, v. 21, n. 6, p. 1468-1470, 1982.
- SMALBERGER, T. M.; VAN DEN BERG, A. J. and VLEGGAR, R. Flavonoids from *Tephrosia*. VI. Structure of Semiglabin and Semiglabinol. **Tetrahedron**, v. 29, p. 3099-3104, 1973.
- SMALBERGER, T. M.; VLEGGAR, R. and WEBER, J. C. Flavonoids from *Tephrosia*. VII. Constitution and Absolute Configuration of Lupinifolin and Lupinifolinol, two Flavanones from *Tephrosia lupinifolia*. **Tetrahedron**, v. 30, p. 3927-3931, 1974.
- STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MCLAFFERTY, F. W. In *Registry of Mass Spectra Data Base*. Willey: New York, 1974.
- SUBRAMANIAN, M.; KUMARASWAMI, K.; PRASAD, K.J., A new synthesis of pongachalcone I, glabrachromene, mixtecacin, candidin, atalantoflavone dimethylether, racemoflavone dimethylether, dihydropyranoaurones and their analogues. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1212, 1992.
- TARUS, P. K.; MACHOCHO, A. K.; LANG'AT-THORUWA, C. C.; CHHABRA, S. C.; Flavonoids from *Tephrosia aequilata*; **Phytochemistry**, v. 60, p. 375-379, 2002.
- TOMAZELA, D. M.; PUPO, M. T.; PASSADOR, E. A. P.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; FO, E. R.; OLIVA, G. and PIRANI, J. R. Pyrano Chalcones and a Flavone from *Neoraputia Magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* Glycosomal Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase-inhibitory Activities. **Phytochemistry**, v. 55, p. 643-651, 2000.
- VASCONCELOS, J. N., Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: Estudo químico e biológico de *Tephrosia toxicaria* Pers. (Fabaceae). **Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)**, Departamento de Química

- Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2006.
- VENCATARANTNAM, G.; RAO, E. V. and VILAIN, C. Flavonoids of *Tephrosia procumbens*. Revised structure for praecansone A and conformation of praecansone B. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry**, v. 12, p. 1972-1999, 1987.
- VLEGGAR, R.; KRUGER, G. J.; SMALBERGER, T. M. and BERG, J. V. D. Flavonoids from *Tephrosia*. XI. The Structure of Glabratephrin. **Tetrahedron**, v. 34, p. 1405-1408, 1978.
- VLEGGAR, R.; KRUGER, G. J.; SMALBERGER, T. M. and BERG, J. V. D. Flavonoids from *Tephrosia*. IX. Structure of Multijugin and Multijuginol. **Tetrahedron**, v. 31, p. 2571-2573, 1975.
- VLEGGAR, R.; SMALBERGER, T. M. and VAN ASWEGER, J. L. Flavonoids from *Tephrosia*. Part X. The structure of Polystachin. **South African Journal of Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 47-50, 1978.
- VLEGGAR, R.; SMALBERGER, T. M. and WAAL, H. L. Two new Flavones from *Tephrosia polystachyoides*. II. **Tetrahedron Letters**, V. 6, p. 703-704, 1972.
- WATTERMAN, P. G. and KHALID, S. A. The Major Flavonoids of the seed of *Tephrosia*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 909-915, 1980.
- WERE, O.; MUNAVU, R. M.; LWANDE, W. and NYANDAT, E. Flavonoids from *Tephrosia interrupta* and *T. linearis*. **Fitoterapia**, v. 61, n. 2, p. 372, 1990.
- WATSON, L.; DALL WITZ, M.J., The families of flowering plants descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Disponível em <http://biodiversity.uno.edu/delta/angio/images/bmag60.jpg>. Acesso em 08/10/2005.
- YANG, Y. C.; LEE, S. G.; LEE, H. K.; KIM, M. K.; LEE, S. H. and LEE, H. S. A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against

Aedes aegypti mosquito larvae. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 13, 3765-3767, 2002.