



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**FRANCISCA RENATA LOPES DA SILVA**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE *Tephrosia toxicaria* Pers. (Fabaceae) E  
*Stemodia maritima* Linn. (Scrophulariaceae).**

**FORTALEZA**

**2013**

FRANCISCA RENATA LOPES DA SILVA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE *Tephrosia toxicaria* Pers. (Fabaceae) E  
*Stemodia maritima* Linn. (Scrophulariaceae).

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Martha Campos Arriaga.

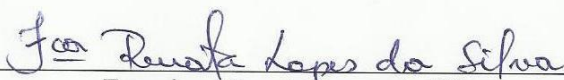
FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

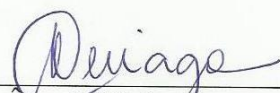
- 
- S58c Silva, Francisca Renata Lopes da.  
Contribuição ao estudo de *Tephrosia toxicaria* Pers. (fabaceae) E *Stemodia maritima* Linn.  
(Scrophulariaceae). / Francisca Renata Lopes da Silva. – 2013.  
105 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de  
Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2013.  
Orientação: Profa. Dra. Angela Martha Campos Arriaga.  
Área de concentração: Química orgânica
1. Plantas tropicais. 2. Plantas – ação antiinflamatória. 3. Plantas medicinais I. Título.
-

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

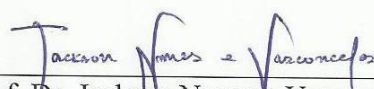
  
Francisca Renata Lopes da Silva

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: . 02/08/2013

EXAMINADORES:

  
Prof. Dra. Angela Matha Campos Arriaga  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
Prof. Dr. Jackson Nunes e Vasconcelos  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE

A Deus pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos meus pais, Luís Ferreira da Silva e Maria Dalvanor Lopes da Silva.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar forças para não desistir e superar os momentos mais difíceis.

À minha família pelo apoio e incentivo nos estudos.

Ao Helano por sempre estar ao meu lado, em todos os momentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Angela Arriaga pela dedicação e empenho na orientação da elaboração deste trabalho e pela confiança dedicada a mim.

Ao Jackson por todo ensinamento nesta área e paciência no laboratório.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Química pela contribuição teórica essencial para minha formação.

Aos colegas do laboratório: Eduardo, Roberto, Erivaldo, Gizele, Felipe, Aldênia e Valdeline.

Aos operadores responsáveis pela obtenção dos espectros de RMN, IV e EM: Elton, Chaguinha, Regivaldo, Elis, Isabel, Conceição e Pedro. E à Antonia pelo uso do aparelho de CLAE.

À professora Telma Leda e à Cleane pela realização dos testes de atividade antioxidante.

Ao professor José Galberto Martins da Costa (URCA) pelos testes de atividade antibacteriana e à professora Mirna Marques Bezerra (UFC-Sobral) pelos ensaios em atividades analgésica e anti-inflamatória.

Aos funcionários do curso: Lana, Célia e Orlando.

Ao CNPq pelo suporte financeiro e bolsa concedida durante minha iniciação científica e mestrado.

*“Se fui capaz de ver mais longe, é porque me  
apoiei em ombros de gigantes”*

(Isaac Newton)

## RESUMO

*Tephrosia toxicaria* Pers. (sin. *Tephrosia sinapou* (Buc'hoz) A. Chev), Fabaceae, é uma planta tropical ictiotóxica, popularmente conhecida como “timbó” e utilizada como defensivo agrícola natural. *Stemodia maritima* Linn. (Scrophulariaceae) é conhecida no Nordeste brasileiro como “melosa” e também encontrada nas ilhas do Caribe onde é usada para tratar vários tipos de doenças. O estudo químico das raízes de *T. toxicaria* permitiu o isolamento da flavanona obovatina que sofreu reação de hidrogenação para gerar um derivado hidrogenado TTR-1H. O estudo químico das folhas de *S. maritima* forneceu dois diterpenos do tipo estemodanos, sendo eles a estemodina e estemodinol, além da flavona jaceidina. O extrato etanólico das folhas de *S. maritima* apresentou atividade antioxidante comparável à da vitamina C. A obovatina reduziu o infiltrado inflamatório e a hiperalgisia facial em articulação temporomandibular de ratos nas concentrações de 1 e 10 mg/Kg, exercendo atividades anti-inflamatória e analgésica em um modelo experimental de artrite induzida por zymosan. A estemodina, o extrato SMFE e obovatina foram submetidos a ensaios de atividade antibacteriana e demonstraram ação moderada frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (12692), *Staphylococcus aureus* (358), *Bacillus cereus* (33018), *Pseudomonas aeruginosa* (15442) e *Escherichia coli* (27). As substâncias isoladas foram identificadas por métodos espectrométricos e espectroscópicos (IV, EM, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ), incluindo RMN bidimensional (HMBC, HSQC, NOESY e COSY) e por comparação com dados da literatura.

**Palavras-chave:** *Tephrosia toxicaria*. *Stemodia maritima*. Diterpeno. Flavonoide.

## ABSTRACT

*Tephrosia toxicaria* Pers. (*Tephrosia sinapou* (Buc'hoz) A. Chev), Fabaceae, is a tropical fish-poisoning plant, popularly known as “timbó” and used as pesticide natural. *Stemodia maritima* Linn. (Scrophulariaceae) is known in northeastern Brazil as “melosa” and also found on the Caribbean islands, this plant is used to treat various types of diseases. The chemical study of roots of *T. toxicaria* allowed the isolation of flavanone obovatina, which suffered hydrogenation reaction to produce a hydrogenated derivative TTR-1H. The chemical study of *S. maritima* leaves provided two types of diterpenes, estemodanos, and they estemodina and estemodinol, beyond flavone jaceidina. The ethanol extract of its leaves showed antioxidant activity comparable to that of vitamin C. The obovatin reduced the inflammatory infiltrate and facial hyperalgesia in the rat temporomandibular joint in concentrations of 1 and 10 mg/Kg, showing antiinflammatory and analgesic activities in an experimental model of zymosan-induced arthritis. Tests of antibacterial activity demonstrated that stemodin, the extract SMFE and obovatin exhibited moderate bacterial activity against the *Staphylococcus aureus* (12692), *Staphylococcus aureus* (358), *Bacillus cereus* (33018), *Pseudomonas aeruginosa* (15442) and *Escherichia coli* (27) strains. The substances isolated were identified by spectroscopic and spectrometric methods (IR, ME,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR), including two-dimensional NMR (HMBC, HSQC, NOESY and COSY) and by comparison with literature data.

**Keywords:** *Tephrosia toxicaria*. *Stemodia maritima*. Diterpene. Flavonoid.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 01 – Alguns rotenoides isolados de <i>T. toxicaria</i> com atividade larvícida. (I) Deguelina; (II) Tephrosina e (III) 12a-hidroxi- $\alpha$ -toxicarol ..... | 18 |
| Figura 02 – Estrutura do esqueleto estemodano (IV) e aphidicolina (V) .....                                                                                          | 18 |
| Figura 03 – Estrutura da Rotenona .....                                                                                                                              | 21 |
| Figura 04 – Foto de cultivo de <i>Teprosia toxicaria</i> em Guaraciaba do Norte – CE e desenho técnico de ramo com flor .....                                        | 22 |
| Figura 05 – Foto de <i>Stemodia maritima</i> .....                                                                                                                   | 24 |
| Figura 06 – Gráfico das publicações encontradas para espécies do gênero <i>Stemodia</i> no período de 1973 a 2013.....                                               | 26 |
| Figura 07 – Estrutura dos esqueletos estemodano (IV), estemarano (VI), labdano (VII), bisepóxido (VIII) e abietano (IX) .....                                        | 27 |
| Figura 08 – Diterpenos isolados de espécies do gênero <i>Stemodia</i> , agrupados de acordo com seus esqueletos básicos .....                                        | 31 |
| Figura 09 – Sistema 6'',6''-dimetilcromeno .....                                                                                                                     | 37 |
| Figura 10 – Acoplamento da hidroxila fenólica nas estruturas angular e linear .....                                                                                  | 38 |
| Figura 11 – Unidade estrutural 1 de TTR-1 .....                                                                                                                      | 38 |
| Figura 12 – Unidade estrutural 2 de TTR-1 .....                                                                                                                      | 38 |
| Figura 13 – Estrutura de TTR-1 (obovatina) .....                                                                                                                     | 39 |
| Figura 14 – Representação conformacional de TTR-1 .....                                                                                                              | 39 |
| Figura 15 – Espectro de massa IE de TTR-1 .....                                                                                                                      | 41 |
| Figura 16 – Espectro de absorção na região do infravermelho de TTR-1 (KBr) .....                                                                                     | 41 |
| Figura 17 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1 .....                                                                                  | 42 |
| Figura 18 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1 .....                                                                               | 42 |
| Figura 19 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ – DEPT 135° (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1 .....                                                                   | 43 |
| Figura 20 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ – COSY de TTR-1 .....                                                                                        | 43 |
| Figura 21 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ – HSQC de TTR-1 .....                                                                                     | 44 |
| Figura 22 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ – HMBC de TTR-1 .....                                                                                     | 44 |
| Figura 23 – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ – HMBC de TTR-1 .....                                                                         | 45 |
| Figura 24 – Estruturas de TTR-1 (X), TTR-1H (XI) e de 5,7-dihidroxi-8-(3',3'-dimetilalil)-flavanona (XII).....                                                       | 47 |
| Figura 25 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1H .....                                                                                 | 48 |

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 26 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1H .....                                                                       | 48 |
| Figura 27 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ – DEPT 135° (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1H .....                                                           | 49 |
| Figura 28 – Unidade estrutural 1 de SMF-1 .....                                                                                                               | 51 |
| Figura 29 – Unidades estruturais de SMF-1 .....                                                                                                               | 51 |
| Figura 30 – Unidade estrutural 2 de SMF-1 .....                                                                                                               | 52 |
| Figura 31 – Estrutura de SMF-1 (Estemodina) .....                                                                                                             | 52 |
| Figura 32 – Interações espaciais entre os átomos de hidrogênios em SMF-1 .....                                                                                | 52 |
| Figura 33 – Espectro de massa IES de SMF-1 .....                                                                                                              | 54 |
| Figura 34 – Espectro de absorção na região do infravermelho de SMF-1 (KBr) .....                                                                              | 54 |
| Figura 35 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-1 .....                                                                           | 55 |
| Figura 36 – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-1 .....                                                               | 55 |
| Figura 37 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-1 .....                                                                         | 56 |
| Figura 38 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ – DEPT 135° (75 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-1 .....                                                             | 56 |
| Figura 39 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ COSY– de SMF-1 .....                                                                                  | 57 |
| Figura 40 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ – NOESY de SMF-1 .....                                                                                | 57 |
| Figura 41 – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ – NOESY de SMF-1 .....                                                                    | 58 |
| Figura 42 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ – HSQC de SMF-1 .....                                                                              | 58 |
| Figura 43 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ – HMBC (500 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-1.....                                                   | 59 |
| Figura 44 – Unidade estrutural de SMF-2 .....                                                                                                                 | 61 |
| Figura 45 – Unidades estruturais de SMF-2 .....                                                                                                               | 61 |
| Figura 46 – Esquema reacional de estemodinol / SMF-2 (XIII), seu respectivo tosilato (XIV) e<br>2-desoxiestemodinona (XV) (KELLY, <i>et al.</i> , 1982) ..... | 62 |
| Figura 47 – Interações espaciais entre os átomos de hidrogênios em SMF-2 .....                                                                                | 62 |
| Figura 48 – Espectro de massa IES de SMF-2 .....                                                                                                              | 63 |
| Figura 49 – Espectro de absorção na região do infravermelho de SMF-2 .....                                                                                    | 64 |
| Figura 50 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2 .....                                                                           | 64 |
| Figura 51 – Expansão - 1 do espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2 .....                                                           | 65 |
| Figura 52 – Expansão - 2 do espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2 .....                                                           | 65 |
| Figura 53 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2 .....                                                                         | 66 |
| Figura 54 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ – DEPT 135° (75 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2 .....                                                             | 66 |
| Figura 55 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ COSY– de SMF-2 .....                                                                                  | 67 |
| Figura 56 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ – NOESY (500 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2 .....                                                    | 67 |
| Figura 57 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ – HSQC de SMF-2 .....                                                                              | 68 |

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 58 – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de SMF-2 .....                          | 68 |
| Figura 59 – Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de SMF-2 .....                                      | 69 |
| Figura 60 – Expansão - 1 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de SMF-2 .....                      | 69 |
| Figura 61 – Expansão - 2 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de SMF-2 .....                      | 70 |
| Figura 62 – Expansão - 3 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de SMF-2 .....                      | 70 |
| Figura 63 – Esqueleto básico de uma Flavona .....                                                                        | 72 |
| Figura 64 – Unidade estrutural de SMF-3 .....                                                                            | 72 |
| Figura 65 – Unidades estruturais de SMF-3 .....                                                                          | 73 |
| Figura 66 – Estrutura de SMF-3 (5,7,4'-trihidróxi-3,6,3'-trimetóxi-flavona / Jaceidina) .....                            | 73 |
| Figura 67 – Espectro de massa ESI de SMF-3 .....                                                                         | 74 |
| Figura 68 – Espectro de absorção na região do infravermelho de SMF-3 .....                                               | 75 |
| Figura 69 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, acetona- $d_6$ ) de SMF-3 .....                                       | 75 |
| Figura 70 – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, acetona- $d_6$ ) de SMF-3 .....                           | 76 |
| Figura 71 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, acetona- $d_6$ ) de SMF-3 .....                                    | 76 |
| Figura 72 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ – DEPT 135° (125 MHz, acetona- $d_6$ ) de SMF-3 .....                        | 77 |
| Figura 73 – Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de SMF-3 .....                                      | 77 |
| Figura 74 – Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de SMF-3 .....                                      | 78 |
| Figura 75 – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de SMF-3 .....                          | 78 |
| Figura 76 – Sistema da reação de hidrogenação .....                                                                      | 86 |
| Figura 77 – Cromatograma de CLAE da mistura reacional de TTR-1 .....                                                     | 86 |
| Figura 78 – Estruturas do Trolox <sup>®</sup> , DPPH e vitamina C .....                                                  | 94 |
| Figura 79 – Número de leucócitos totais no lavado sinovial de ratos submetidos à indução de<br>artrite por zymosan ..... | 95 |
| Figura 80 – Efeito da indução de zymosan no limiar de hiperalgesia facial .....                                          | 96 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 01 – Diterpenos isolados de espécies do gênero <i>Stemodia</i> e referências .....                                                                                                    | 29 |
| Tabela 02 – Dados de RMN <sup>13</sup> C de diterpenos isolados de espécies do gênero <i>Stemodia</i> .<br>Dados obtidos em CDCl <sub>3</sub> , exceto quando especificado o contrário ..... | 33 |
| Tabela 03 – Dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de TTR-1 comparados com dados da literatura (ARRIAGA, <i>et al.</i> , 2009) .....                                 | 40 |
| Tabela 04 – Dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CHCl <sub>3</sub> ) de TTR-1H comparados com os dados de TTR-1 .....                                             | 47 |
| Tabela 05 – Dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de SMF-1 comparados com a literatura (HUFFORD, 1998) .....                                                        | 53 |
| Tabela 06 – Dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de SMF-2 em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N .....                                                                 | 63 |
| Tabela 07 – Dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de SMF-3 comparados com a literatura (ROITMAN; JAMES, 1985) .....                                                 | 74 |
| Tabela 08 – Dados do fracionamento cromatográfico de TTRE .....                                                                                                                              | 84 |
| Tabela 09 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de TTRE .....                                                                                                                | 84 |
| Tabela 10 – Dados para o fracionamento cromatográfico de TTRE (4) .....                                                                                                                      | 85 |
| Tabela 11 – Dados referentes ao fracionamento de SMFE por partição líquido-líquido .....                                                                                                     | 87 |
| Tabela 12 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de SMFED .....                                                                                                               | 88 |
| Tabela 13 – Dados para o fracionamento cromatográfico de SMFED (126-147) .....                                                                                                               | 88 |
| Tabela 14 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de SMFED (99-125) .....                                                                                                      | 89 |
| Tabela 15 – Resultados do teste antioxidante utilizando DPPH .....                                                                                                                           | 94 |
| Tabela 16 – Resultados do teste antibacteriano em valores de concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias TTR-1, SMF-1 e do extrato SMFE .....                                       | 97 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                     |                                                                               |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| AINE                | Anti-inflamatórios não esteroidais                                            |
| ATM                 | Articulação temporomandibular                                                 |
| BBD                 | Broadband Decoupled                                                           |
| CAC                 | Cromatografia de Adsorção em Coluna                                           |
| CCD                 | Cromatografia em Camada Delgada                                               |
| CENAUREMN           | Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear           |
| CI <sub>50</sub>    | Concentração Inibitória 50%                                                   |
| CIM                 | Concentração Inibitória Mínima                                                |
| CLAE                | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                                      |
| COSY                | Correlation Spectroscopy                                                      |
| DEPT                | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer                           |
| DL <sub>50</sub>    | Dose Letal 50%                                                                |
| EM-IE               | Espectrometria de Massas com Ionização Eletrônica                             |
| EM-IES              | Espectrometria de Massas com Ionização por <i>electrospray</i>                |
| HMBC                | Heteronuclear Multiple Bond Connectivity                                      |
| HSQC                | Heteronuclear Single Quantum Coherence                                        |
| IDH                 | Índice de Deficiência de Hidrogênio                                           |
| IV                  | Infravermelho                                                                 |
| NOESY               | Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy                                   |
| RMN <sup>13</sup> C | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13                                 |
| RMN <sup>1</sup> H  | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio - 1                               |
| SMF-1               | Estemodina                                                                    |
| SMF-2               | Estemodinol                                                                   |
| SMF-3               | Jaceidina                                                                     |
| SMFE                | Extrato Etanólico das Folhas de <i>S. maritima</i>                            |
| SMFEA               | Fração Acetato de etila do extrato Etanólico das Folhas de <i>S. maritima</i> |
| SMFED               | Fração Diclorometano do extrato Etanólico das Folhas de <i>S. maritima</i>    |
| SMFEH               | Fração Hexano do extrato Etanólico das Folhas de <i>S. maritima</i>           |
| TTR-1               | Obovatina                                                                     |
| TTR-1H              | Obovatina hidrogenada                                                         |
| TTRE                | Extrato Etanólico das Raízes de <i>T. toxicaria</i>                           |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                   |                           |
|-------------------|---------------------------|
| $[\alpha]^{25}_D$ | Rotação óptica específica |
| d                 | Dubleto                   |
| Da                | Dalton                    |
| dd                | Duplo dubleto             |
| $\delta$          | Deslocamento químico      |
| eV                | Eletrovolt                |
| °C                | Graus Celsius             |
| Hz                | Hertz                     |
| $J$               | Constante de acoplamento  |
| L                 | Comprimento               |
| m                 | Multipleto                |
| MHz               | Megahertz                 |
| $m/z$             | Razão massa carga         |
| pf                | Ponto de fusão            |
| $\Phi$            | Diâmetro                  |
| ppm               | Partes por milhão         |
| s                 | Singleto                  |
| td                | Dubleto de tripleto       |

## SUMÁRIO

|       |                                                                     |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | INTRODUÇÃO .....                                                    | 17 |
| 2     | CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS .....                                       | 20 |
| 2.1   | <i>Tephrosia toxicaria</i> Pers. ....                               | 20 |
| 2.1.1 | Considerações sobre a família Fabaceae .....                        | 20 |
| 2.1.2 | Considerações sobre a subfamília Papilionoideae .....               | 20 |
| 2.1.3 | Considerações sobre o gênero <i>Tephrosia</i> .....                 | 20 |
| 2.1.4 | Considerações sobre a espécie <i>Tephrosia toxicaria</i> Pers. .... | 21 |
| 2.2   | <i>Stemodia marítima</i> Linn. ....                                 | 23 |
| 2.2.1 | Considerações sobre a família Scrophulariaceae .....                | 23 |
| 2.2.2 | Considerações sobre o gênero <i>Stemodia</i> .....                  | 23 |
| 2.2.3 | Considerações sobre a espécie <i>Stemodia maritima</i> Linn. ....   | 23 |
| 3     | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                         | 26 |
| 3.1   | Gênero <i>Stemodia</i> .....                                        | 26 |
| 3.2   | Diterpenos .....                                                    | 27 |
| 4     | DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL .....                                       | 36 |
| 4.1   | Determinação estrutural de TTR-1 .....                              | 36 |
| 4.2   | Determinação estrutural de TTR-1H .....                             | 46 |
| 4.3   | Determinação estrutural de SMF-1 .....                              | 50 |
| 4.4   | Determinação estrutural de SMF-2 .....                              | 60 |
| 4.5   | Determinação estrutural de SMF-3 .....                              | 71 |
| 5     | PARTE EXPERIMENTAL .....                                            | 80 |
| 5.1   | Material botânico .....                                             | 80 |
| 5.1.1 | <i>Tephrosia toxicaria</i> Pers. ....                               | 80 |
| 5.1.2 | <i>Stemodia marítima</i> Linn. ....                                 | 80 |
| 5.2   | Métodos cromatográficos .....                                       | 81 |
| 5.2.1 | Cromatografia de adsorção .....                                     | 81 |
| 5.2.2 | Cromatografia de exclusão .....                                     | 81 |
| 5.2.3 | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....               | 82 |
| 5.3   | Métodos Físicos de Análises .....                                   | 82 |
| 5.3.1 | Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) .....    | 82 |
| 5.3.2 | Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....         | 82 |

|         |                                                                                                             |     |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3.3   | <b><i>Espectrometria de massas (EM)</i></b> .....                                                           | 83  |
| 5.3.4   | <b><i>Ponto de fusão (pf)</i></b> .....                                                                     | 83  |
| 5.3.5   | <b><i>Rotação óptica</i></b> .....                                                                          | 83  |
| 5.4     | <b>Estudo químico de <i>Tephrosia toxicaria</i> Pers.</b> .....                                             | 84  |
| 5.4.1   | <b><i>Obtenção do extrato etanólico das raízes de T. toxicaria</i></b> .....                                | 84  |
| 5.4.2   | <b><i>Fracionamento cromatográfico de TTRE</i></b> .....                                                    | 84  |
| 5.4.2.1 | <i>Fracionamento cromatográfico de TTRE (4) e isolamento de TTR-1</i> .....                                 | 85  |
| 5.4.2.2 | <i>Reação de hidrogenação de TTR-1</i> .....                                                                | 86  |
| 5.5     | <b>Estudo químico de <i>Stemodia maritima</i> Linn.</b> .....                                               | 87  |
| 5.5.1   | <b><i>Obtenção do extrato etanólico das folhas de S. maritima</i></b> .....                                 | 87  |
| 5.5.2   | <b><i>Obtenção das frações hexano, diclorometano e acetato de etila das folhas de S. maritima</i></b> ..... | 87  |
| 5.5.3   | <b><i>Fracionamento cromatográfico de SMFED e isolamento de SMF-1</i></b> .....                             | 87  |
| 5.5.3.1 | <i>Fracionamento cromatográfico de SMFED (126-147) e isolamento de SMF-2</i> .....                          | 88  |
| 5.5.3.2 | <i>Fracionamento cromatográfico de SMFED (99-125) e isolamento de SMF-3</i> .....                           | 89  |
| 5.7     | <b>Estudos biológicos</b> .....                                                                             | 90  |
| 5.7.1   | <b><i>Teste de atividade antioxidante</i></b> .....                                                         | 90  |
| 5.7.2   | <b><i>Teste de atividade analgésica e anti-inflamatória</i></b> .....                                       | 90  |
| 5.7.3   | <b><i>Teste de atividade antibacteriana</i></b> .....                                                       | 91  |
| 6       | <b>ENSAIOS BIOLÓGICOS</b> .....                                                                             | 93  |
| 6.1     | <b>Teste de atividade antioxidante</b> .....                                                                | 93  |
| 6.2     | <b>Teste de atividade analgésica e anti-inflamatória</b> .....                                              | 94  |
| 6.3     | <b>Teste de atividade antibacteriana</b> .....                                                              | 96  |
| 7       | <b>CONCLUSÃO</b> .....                                                                                      | 99  |
|         | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                                                                    | 100 |

Capítulo 1

# Introdução

## 1 INTRODUÇÃO

Durante séculos, as fontes de medicamentos eram inteiramente de origem natural, preparados, principalmente, a partir de ervas e plantas medicinais, constituindo a fonte mais antiga para o tratamento e a cura de doenças. Atualmente, com técnicas de separação e de identificação mais modernas, estes constituintes químicos são isolados, caracterizados, podendo ser muitas vezes modificados estruturalmente para alterar ou potencializar suas atividades biológicas (BRAZ-FILHO 2010; GOTTLIEB; BORIN, 2012).

Cresce a cada dia o interesse em descobrir novos produtos naturais biologicamente ativos, sejam eles de plantas, microorganismos ou animais, na busca de novos medicamentos ou substâncias alternativas para os produtos químicos sintéticos. A maioria dos constituintes fitoquímicos bioativos relatados são alcaloides, taninos, flavonoides e compostos fenólicos (RAO *et al.*, 2011).

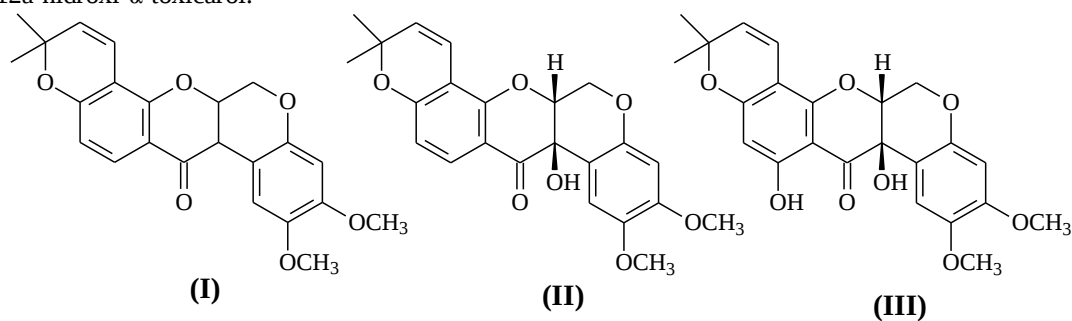
Neste contexto, *Tephrosia* é um extenso gênero distribuído em regiões tropicais e subtropicais do mundo, tendo sido relatadas cerca de 679 espécies. Plantas desse gênero têm sido usadas em preparações fitoterápicas, inseticidas, veneno para ratos e peixes por vários povos indígenas, possui baixa toxicidade em mamíferos e o valor de sua DL<sub>50</sub> em ratos, é de 132 mg/Kg (ZIPCODEZOO, 2012; TARUS *et al.*, 2002; YU, 2008).

Em nosso grupo de pesquisa, *Tephrosia toxicaria* Pers. (sinonímia *Tephrosia sinapou*, MARTINEZ *et al.*, 2012) já havia sido objeto de estudo e mostrou ser uma rica fonte de rotenoides. Vasconcelos *et al.* (2012), demonstrou que os extratos dessa planta e rotenoides isolados (Fig. 01, p. 18), mostraram atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*, justificando o uso de suas raízes como defensivo agrícola. Além disso, os extratos também apresentaram atividade antioxidante, reforçando a presença de substâncias flavonoídicas (VASCONCELOS *et al.*, 2009).

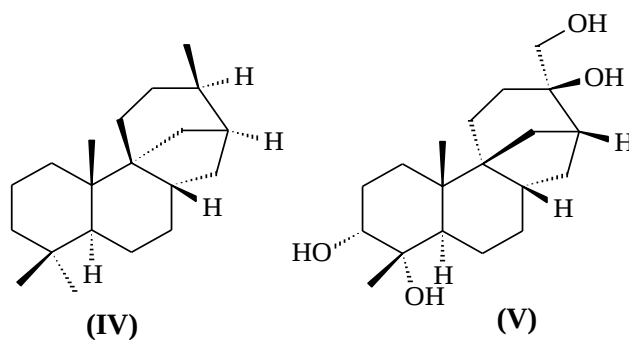
Espécies do gênero *Stemodia* tem sido usadas na medicina tradicional no tratamento de doenças. A literatura relata o uso de *Stemodia durantifolia* para o tratamento de infertilidade e *Stemodia maritima* para o tratamento de doenças venéreas (ALLEN *et al.*, 2006; CHAMY *et al.*, 1991). Embora metabólitos secundários, tais como, cucurbitacinas, derivados do ácido esteárico e flavonoides tenham sido isolados, os diterpenos contendo um esqueleto tetracíclico incomum, conhecido como estemodano (IV) (Fig. 02, p. 18), são os

compostos que caracterizam quimicamente as plantas desse gênero (SILVA *et al.*, 2009). Os estemodanos tem atraído interesse, principalmente por apresentarem uma estreita semelhança com a aphidicolina (V) (Fig. 02), um conhecido agente citotóxico e antiviral isolado de culturas do fungo *Cephalosporium aphidicola* e por esta razão, tem sido submetidos a inúmeras biotransformações (CHAMY *et al.*, 1991). A Estemodina (Fig. 29, p. 51), diterpeno estemodano mais relatado de *S. maritima*, possui vários análogos hidroxilados obtidos por biotransformações microbianas, e alguns têm apresentado atividade antiviral (HANSON *et al.*, 1994; BUCHANAN; REESE, 2001; CHEN *et al.*, 2005).

**Figura 01** – Alguns rotenoides isolados de *T. toxicaria* com atividade larvídica. (I) Deguelina; (II) Tephrosina e (III) 12a-hidroxi- $\alpha$ -toxicarol.



**Figura 02** – Estrutura do esqueleto estemodano (IV) e aphidicolina (V).



Este trabalho teve como objetivo dar continuidade ao estudo químico de *T. toxicaria* e *S. maritima*, utilizando técnicas cromatográficas para o isolamento e purificação dos metabólitos secundários, bem como, a identificação e caracterização estrutural das substâncias isoladas, através de técnicas espectrométricas e espectroscópicas. Investigou-se a ação biológica de alguns extratos e substâncias isoladas destas plantas, como a avaliação das atividades antioxidante, analgésica, anti-inflamatória e antibacteriana. Além disso, um derivado hydrogenado da obovatina, isolada de *T. toxicaria*, também foi obtido.

## Capítulo 2

# Considerações Botânicas



## 2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

### 2.1 *Tephrosia toxicaria* Pers.

#### 2.1.1 Considerações sobre a família Fabaceae

Fabaceae é também conhecida por família das leguminosas, em função dos frutos do tipo legume presente na maioria das espécies. É a terceira maior do mundo e um grupo economicamente importante, com cerca de 730 gêneros e mais de 19.400 espécies. Os maiores gêneros são *Astragalus* (mais de 2.400 espécies), *Acacia* (mais de 950 espécies), *Indigofera* (cerca de 700 espécies), *Crotalaria* (cerca de 700 espécies) e *Mimosa* (cerca de 500 espécies) (ZIPCODEZOO, 2012).

Nesta família há pelo menos três subfamílias importantes: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae, sendo que esta última inclui a espécie *Tephrosia toxicaria* Pers. (JOLY, 1993).

#### 2.1.2 Considerações sobre a subfamília Papilionoideae

Esta subfamília compreende cerca de 400 gêneros, sendo portanto, a maior entre as leguminosas. Possui folhas trifolioladas, sendo raras com um ou mais de três folíolos, possuem flores zigomorfas com uma grande pétala. A flor é pentâmera, diclamídea, hermafrodita, com cálice gamossépalo, em geral com dois dentes. O fruto é em geral legume, raramente indeiscente (JOLY, 1993)

Pertencem a esta subfamília todos os legumes, a maioria constituída por plantas cultivadas, tais como os gêneros, *Phaseolus* (feijão), *Pisum* (ervilha), *Lens* (lentilha), *Vicia* (fava), *Cicer* (grão-de-bico), *Glycine* (soja), *Arachis* (amendoim) dentre outros (JOLY, 1993).

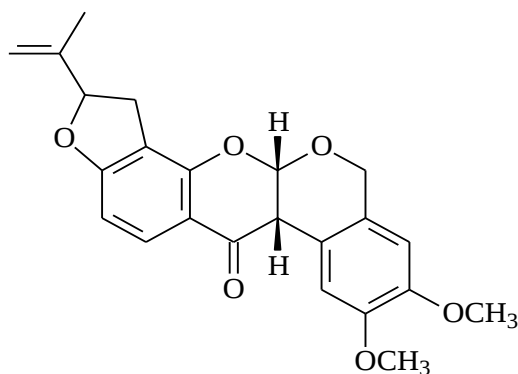
#### 2.1.3 Considerações sobre o gênero *Tephrosia*

O gênero *Tephrosia* é constituído por cerca de 679 espécies, subespécies e variedades. O nome genérico é derivado da palavra grega *tephros*, que significa

"cor-de-cinzas", referindo-se à tonalidade acinzentada dada às folhas por seus tricomas densos (ZIPCODEZOO, 2012).

As espécies do gênero são distribuídas por todas as regiões quentes de ambos os hemisférios, principalmente na América, África, Austrália e Ásia, onde cerca de vinte e quatro espécies são registradas na Índia. Muitas dessas são venenosas, especialmente para os peixes, por sua alta concentração de rotenona (Fig. 03) (JANG *et al.*, 2003; RAJARAM; KUMAR, 2011; ZIPCODEZOO, 2012).

**Figura 03** – Estrutura da Rotenona



#### 2.1.4 Considerações sobre a espécie *Tephrosia toxicaria* Pers.

*Tephrosia toxicaria* Pers. (Fig. 04, p. 22) pertence à família Fabaceae e à subfamília Papilionoideae, é uma planta tropical ictiotóxica e bem conhecida como uma fonte de rotenoides (JANG *et al.*, 2003). Apresenta-se como arbusto com folhas imparipinadas, folíolos de dez a vinte jugos, peciolados, oblongos e seríceos. Suas flores são brancas ou amareladas com a base lilás e dispostas em racemos axilares ou terminais. Seu fruto apresenta-se na forma de vagem, curva ou reta (CORRÊA, 1974).

É cultivada na localidade de Guaraciaba do Norte - CE, onde foi feita a coleta do espécime estudado neste trabalho; e o extrato aquoso de suas raízes maceradas é utilizado como defensivo agrícola natural.

**Figura 04** – Foto de cultivo de *Tephrosia toxicaria* em Guaraciaba do Norte – CE e desenho técnico de ramo com flor.



Fonte: Profa. Telma L. G. de Lemos



Fonte: (JOLY, 1993)

## 2.2 *Stemodia maritima* Linn.

### 2.2.1 Considerações sobre a família Scrophulariaceae

Esta família compreende 200 gêneros com aproximadamente 3.000 espécies, distribuídas principalmente nas regiões temperadas do hemisfério norte, sendo relativamente rara na nossa flora. As espécies possuem porte herbáceo, são acaules ou com caules aéreos eretos, folhas simples, curto-pecioladas. Flores em geral vistosas, diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras e de simetria zigomorfa. Produzem frutos secos do tipo cápsula. (JOLY, 1993; MOREIRA; BRAGANÇA, 2011).

### 2.2.2 Considerações sobre o gênero *Stemodia*

O gênero *Stemodia* é representado por cerca de 40 espécies distribuídas na Ásia, África, Austrália e América. É um gênero de plantas de florescência, perenes com folhas dentadas e racemos de flores coloridas, que são geralmente, em tom roxo. Este gênero é por vezes, colocado na família Plantaginaceae (CHAMY *et al.*, 1991; ZIPCODEZOO, 2012).

### 2.2.3 Considerações sobre a espécie *Stemodia maritima* Linn.

*Stemodia maritima* Linn. (Fig. 05, p. 24) é encontrada na parte norte da América do Sul e na maioria das ilhas do Caribe, onde é conhecida como “a força do homem pobre”, por ser usada como remédio para tratar vários tipos de doenças do corpo, como dor de estômago, edema e inchaço (HUFFORD *et al.*, 1991; MARTIN; REYNOLDS; REESE, 2004a).

No Nordeste brasileiro é conhecida popularmente como “mastruz-bravo, melosa” e ocorre principalmente em áreas salinizadas. É uma planta herbácea perene, apresenta caule ramificado desde a base, ramos eretos e decumbentes, quadráticos e revestidos por intensa pilosidade branca. Folhas simples, opostas cruzadas, sésseis, pouco anisofilas entre os pares, as folhas inserem-se de forma oblíqua em relação ao ramo. Fruto seco do tipo capsular. Pode ser identificada em campo pelo porte ereto e pelas folhas piloso-glandulosas de margens ondulado-serreadas. As flores de *S. maritima* são axilares e suas sementes são numerosas e

muito pequenas, a propagação é feita por meio de sementes (SILVA *et al.*, 2006; MOREIRA; BRAGANÇA, 2011).

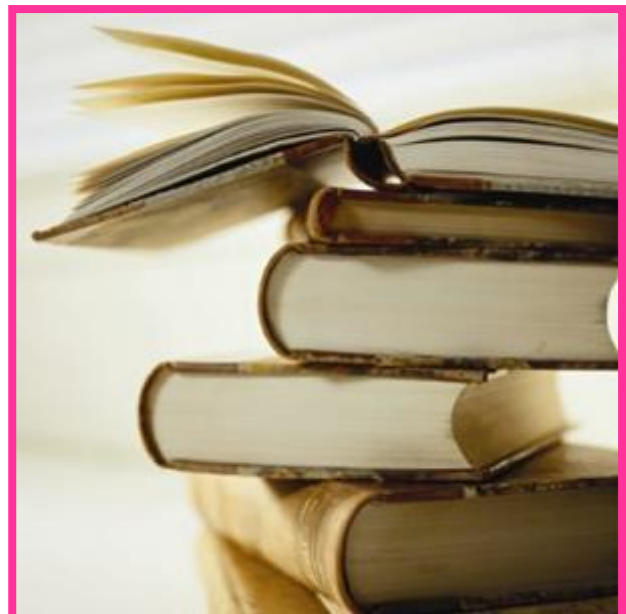
**Figura 05** – Foto de *Stemodia maritima*.



Fonte: MOREIRA; BRAGANÇA, 2011.

Capítulo 3

# Revisão Bibliográfica



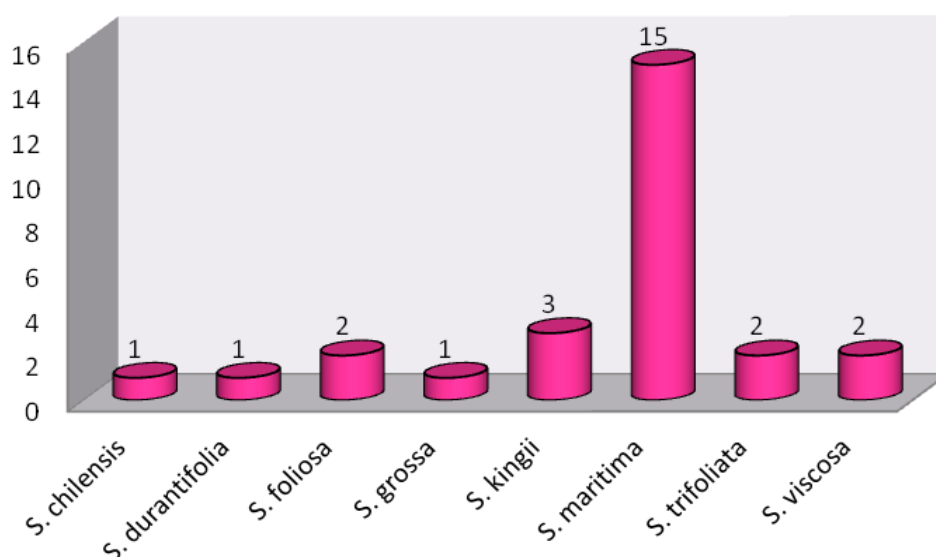
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Gênero *Stemodia*

O gênero *Stemodia* é representado por cerca de 40 espécies distribuídas na Ásia, África, Austrália e Américas. Destas espécies, apenas oito tem sido previamente estudadas (Fig. 06): *S. chilensis*, *S. durantifolia*, *S. foliosa*, *S. grossa*, *S. kingii*, *S. maritima*, *S. trifoliata* e *S. viscosa* (CHAMY *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 2009).

O levantamento bibliográfico realizado utilizou como ferramenta de pesquisa o SciFinder® Scholar<sup>TM</sup> (American Chemical Society) e o site de busca Science direct, observando a ocorrência de publicações para o gênero entre os anos de 1973 e 2013. O estudo químico destas espécies tem apresentado diversas classes de metabólitos secundários, como flavonoides, triterpenos esteroidais e curcubitacinas, geralmente glicosilados, e como predominância de diterpenos com esqueletos estemodano, labdano, abietano e bisepóxido (RODRIGUES *et al.*, 2010; RAMESH; NAIR; SUBRAMANIAN, 1979; ALLEN *et al.*, 2006; SILVA; SILVEIRA; PESSOA, 2010; SILVA *et al.*, 2008; MARTIN; REINOLDS; REESE, 2004a; MANCHAND; BLOUNT, 1976).

**Figura 06** – Gráfico das publicações encontradas para espécies do gênero *Stemodia* no período de 1973 a 2013.

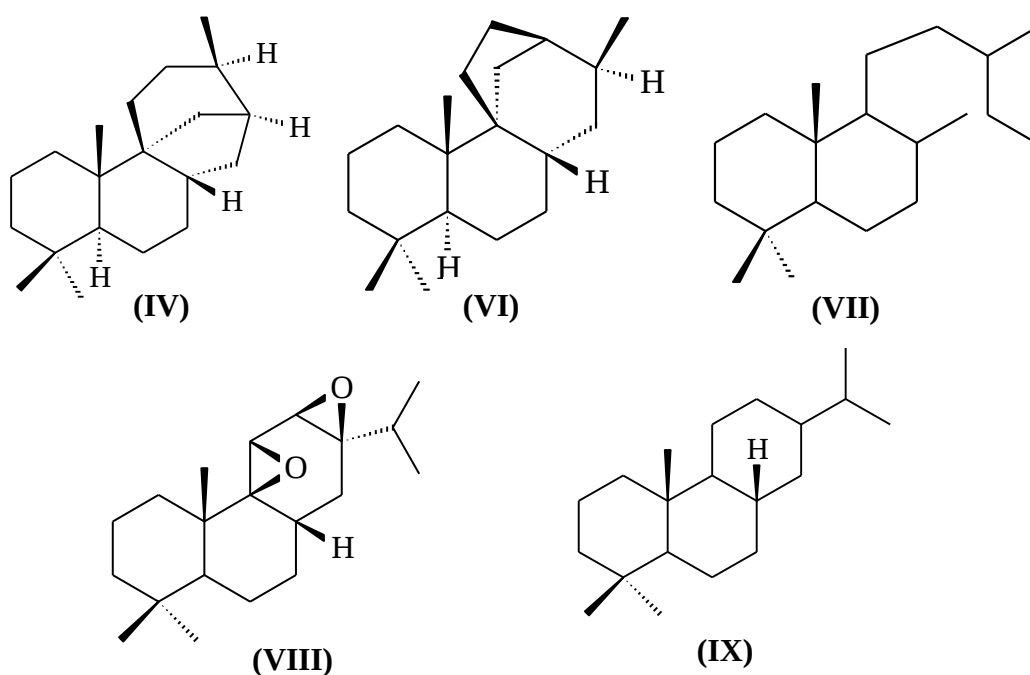


O estudo químico de *S. maritima* resultou no isolamento de diterpenos com esqueleto do tipo estemodano. Este fato motivou a realização de um levantamento bibliográfico sobre a ocorrência destes metabólitos secundários em espécies do gênero *Stemodia*. Como resultados foram encontrados vinte e quatro diterpenos isolados de quatro espécies do gênero.

### 3.2 Diterpenos

Os diterpenos foram os compostos encontrados com maior frequência no gênero *Stemodia*, indicando que esta classe possa ser de importância quimiotaxonômica para o gênero. Segundo o levantamento realizado para os diterpenos, foram catalogadas vinte e quatro estruturas diferentes, sendo 13 com esqueleto estemodano; 6 labdano; 3 bisepóxido; 1 estemarano e 1 abietano.

**Figura 07** – Estrutura dos esqueletos estemodano (IV), estemarano (VI), labdano (VII), bisepóxido (VIII) e abietano (IX).



Os diterpenos estemodanos foram predominantes nas espécies *S. maritima* e *S. chilensis* e apresentaram como característica um esqueleto com o C-13  $\alpha$ -oxigenado, apresentando como substituinte, geralmente, uma hidroxila ou um açúcar, podendo ser:

L-arabinopirranose, D-glicopirranose ou L-arabinofuranose. Os compostos com esqueleto labdano foram derivados do óxido de manóila, sendo substituídos no C-6 em posição  $\alpha$ , e foram encontrados apenas nas espécies *S. trifoliata* e *S. foliosa*.

A Tabela 01 (p. 29) apresenta os diterpenos do gênero *Stemodia* e as respectivas espécies das quais foram isolados, enquanto a Figura 08 (p. 30) contém as estruturas desses compostos, dispostos pela semelhança entre suas estruturas. De acordo com a literatura, a determinação estrutural desses compostos é realizada utilizando-se principalmente, RMN  $^{13}\text{C}$ , o que motivou a busca de dados de  $^{13}\text{C}$  na literatura para respaldar a determinação estrutural dos compostos isolados. A Tabela 02 (p. 33) contém os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para os compostos da Figura 08, identificando o solvente deuterado, utilizado na obtenção dos espectros.

**Tabela 01** – Diterpenos isolados de espécies do gênero *Stemodia* e referências.

| SUBST. | NOME                                       | ESPÉCIE                                   | REFERÊNCIA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 01     | Estemodina                                 | <i>S. maritima</i>                        | MANCHAND; WHITE; CLARDY, 1973.<br>HUFFORD, 1988*.<br>HUFFORD; OGUNTINEIN;<br>MUHAMMAD, 1992.<br>BUCHANAN; REESE, 2001.<br>RODRIGUES <i>et al.</i> , 2010.<br>CHEN; REESE, 2002.<br>MARTIN; REYNOLDS; REESE, 2004a.<br>MARTIN; REYNOLDS; REESE, 2004b.<br>CHEN <i>et al.</i> , 2005.<br>MARTIN; REYNOLDS; REESE, 2005.<br>LAMM; REYNOLDS; REESE, 2006. |
| .02    | Estemarina                                 | <i>S. maritima</i>                        | MANCHAND; BLOUNT, 1975.<br>BUCHANAN; REESE, 2001*.<br>CHEN; REESE, 2002.<br>MARTIN; REYNOLDS; REESE, 2004a.<br>CHEN <i>et al.</i> , 2005.<br>LAMM; REYNOLDS; REESE, 2006.                                                                                                                                                                             |
| 03     | Maritimol                                  | <i>S. maritima</i>                        | HUFFORD, 1988*.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 04     | Estemodinona                               | <i>S. maritima</i>                        | MANCHAND; WHITE; CLARDY, 1973.<br>HUFFORD, 1988*.                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 05     | Maristeminol                               | <i>S. maritima</i>                        | HUFFORD; OGUNTINEIN;<br>MUHAMMAD, 1992*.                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 06     | Estemodinosídeo A                          | <i>S. maritima</i>                        | HUFFORD; OGUNTINEIN;<br>MUHAMMAD, 1992*.<br>MARTIN; REYNOLDS; REESE, 2004a.                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 07     | Estemodinosídeo B                          | <i>S. maritima</i>                        | HUFFORD; OGUNTINEIN;<br>MUHAMMAD, 1992*.<br>MARTIN; REYNOLDS; REESE, 2004a.                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 08     | Estemodinosídeo C                          | <i>S. maritima</i>                        | HUFFORD; OGUNTINEIN;<br>MUHAMMAD, 1992*.                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 09     | Estemodina- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo | <i>S. maritima</i>                        | MARTIN; REYNOLDS; REESE, 2004a*.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 10     | 2-desoxi-estemodinona                      | <i>S. maritima</i><br><i>S. chilensis</i> | KELLY <i>et al.</i> , 1983.<br>CHAMY <i>et al.</i> , 1991*.                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 11     | 19-acetiloxi-estemodan-13 $\alpha$ -ol     | <i>S. chilensis</i>                       | CHAMY <i>et al.</i> , 1991*.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 12     | 17-acetiloxi-estemodan-13 $\alpha$ -ol     | <i>S. chilensis</i>                       | CHAMY <i>et al.</i> , 1991*.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

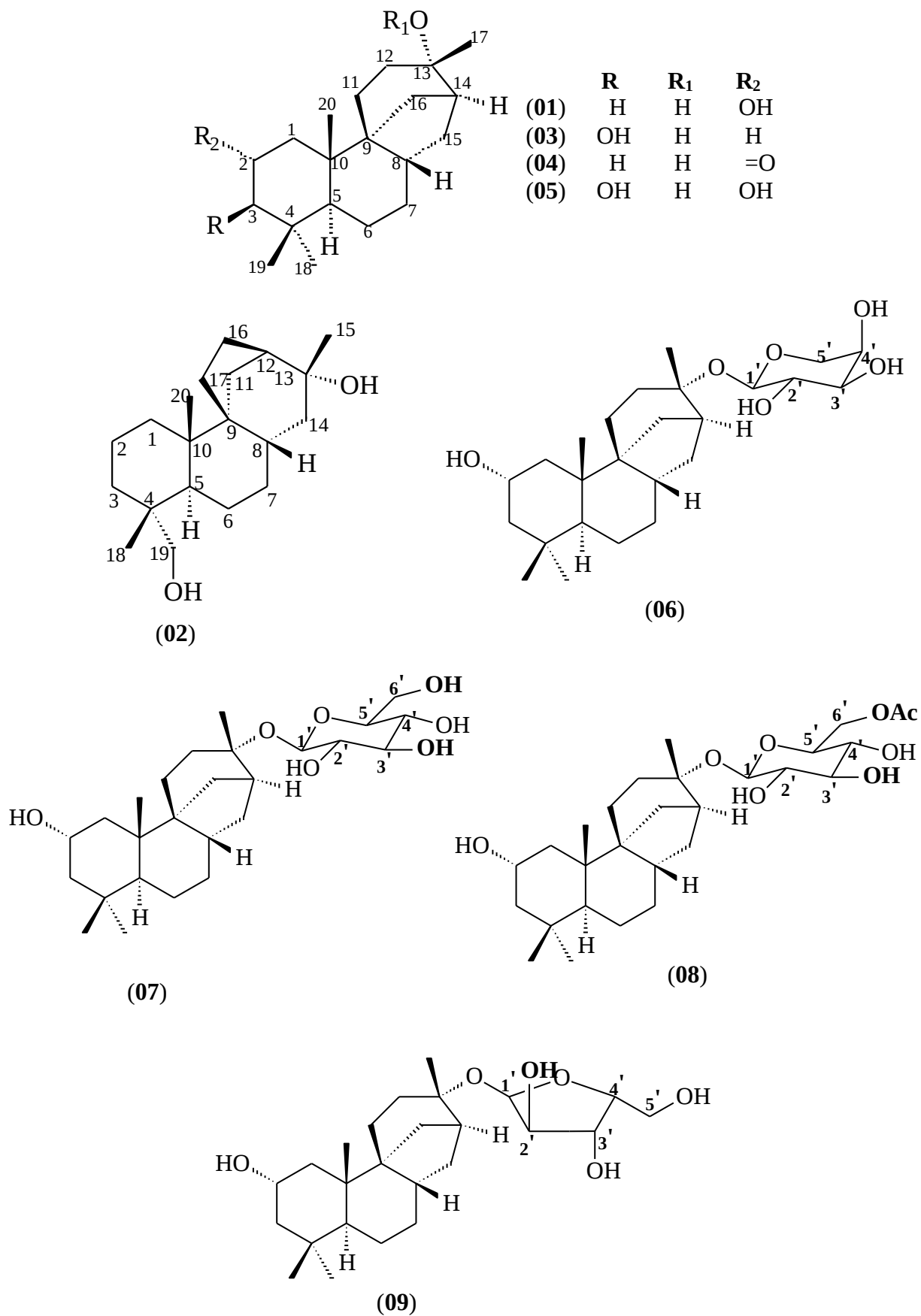
\* Referência onde foram encontrados os dados de RMN <sup>13</sup>C descritos na Tabela 02 (p. 33).

**Tabela 01** – Diterpenos isolados de espécies do gênero *Stemodia* e referências (continuação).

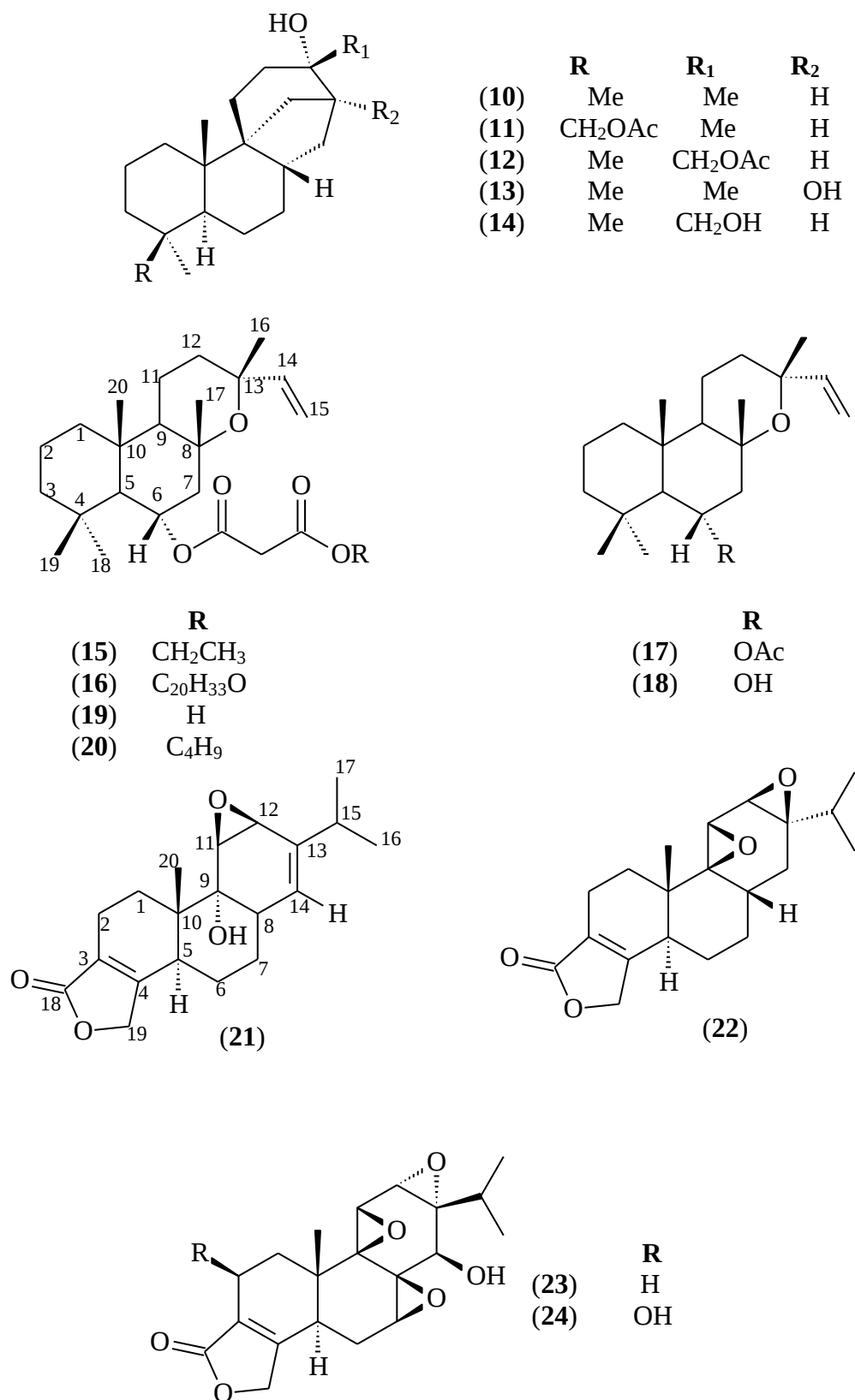
| SUBST. | NOME                                                                                                                                   | ESPÉCIE                                   | REFERÊNCIA                                                 |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 13     | Estemodan-13 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -diol                                                                                               | <i>S. chilensis</i>                       | CHAMY <i>et al.</i> , 1991*.                               |
| 14     | Estemodan-13 $\alpha$ ,17-diol                                                                                                         | <i>S. chilensis</i>                       | CHAMY <i>et al.</i> , 1991*.                               |
| 15     | 6 $\alpha$ -ester etil-maloniloxi-óxido de manóila                                                                                     | <i>S. trifoliata</i>                      | SILVA; SILVEIRA; PESSOA, 2010*.                            |
| 16     | bis-6 $\alpha$ -dioximalonato de manóila                                                                                               | <i>S. trifoliata</i>                      | SILVA; SILVEIRA; PESSOA, 2010*.                            |
| 17     | 6 $\alpha$ -acetoxi-óxido de manóila                                                                                                   | <i>S. trifoliata</i><br><i>S. foliosa</i> | SILVA <i>et al.</i> , 2008<br>SILVA <i>et al.</i> , 2009*. |
| 18     | 6 $\alpha$ -hidróxi-óxido de manóila                                                                                                   | <i>S. trifoliata</i>                      | SILVA <i>et al.</i> , 2009*.                               |
| 19     | 6 $\alpha$ -maloniloxi-óxido de manóila                                                                                                | <i>S. foliosa</i>                         | SILVA <i>et al.</i> , 2008*.                               |
| 20     | 6 $\alpha$ -maloniloxi-óxido <i>n</i> -butil ester de manóila                                                                          | <i>S. foliosa</i>                         | SILVA <i>et al.</i> , 2008*.                               |
| 21     | (5S*,8S*,9R*,10S*)-11 $\beta$ ,12 $\beta$ -epóxi-9 $\alpha$ -hidróxi-19(4 $\rightarrow$ 3) <i>abeo</i> -abieta-3,13-dieno-19,18-olídeo | <i>S. maritima</i>                        | RODRIGUES <i>et al.</i> , 2010*.                           |
| 22     | Estemolídeo                                                                                                                            | <i>S. maritima</i>                        | MANCHAND;<br>BLOUNT, 1976*.                                |
| 23     | Triptolídeo                                                                                                                            | <i>S. maritima</i>                        | MANCHAND;<br>BLOUNT, 1976*.<br>SHEN; HE, 2010*.            |
| 24     | Tripdiolídeo                                                                                                                           | <i>S. maritima</i>                        | MANCHAND;<br>BLOUNT, 1976*.<br>ZHOU <i>et al.</i> , 2011*. |

\* Referência onde foram encontrados os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  descritos na Tabela 02 (p. 33).

**Figura 08** – Diterpenos isolados de espécies do gênero *Stemodia*, agrupados de acordo com seus esqueletos básicos.



**Figura 08** – Diterpenos isolados de espécies do gênero *Stemodia*, agrupados de acordo com seus esqueletos básicos (continuação).



**Tabela 02:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de diterpenos isolados de espécies do gênero *Stemodia*. Dados obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , exceto quando especificado o contrário.

| C    | 1 <sup>1</sup> | 2    | 3 <sup>1</sup> | 4 <sup>1</sup> | 5 <sup>1</sup> | 6 <sup>1</sup> | 7 <sup>1</sup> | 8 <sup>1</sup> | 9     | 10   | 11    | 12    |
|------|----------------|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|------|-------|-------|
| 1    | 46,5           | 31,8 | 28,1           | 51,5           | 43,6           | 46,4           | 46,4           | 47,0           | 45,6  | 36,3 | 36,2  | 36,4  |
| 2    | 64,1           | 18,3 | 34,7           | 210,4          | 68,3           | 64,1           | 64,1           | 64,1           | 65,5  | 18,9 | 18,6  | 18,9  |
| 3    | 51,5           | 35,3 | 71,2           | 55,7           | 83,6           | 51,9           | 51,8           | 52,0           | 50,9  | 42,0 | 36,3  | 42,1  |
| 4    | 34,7           | 38,0 | 39,4           | 38,7           | 39,7           | 34,8           | 34,8           | 34,8           | 34,8  | 33,5 | 37,2  | 33,3  |
| 5    | 47,0           | 40,9 | 47,4           | 47,1           | 46,9           | 47,0           | 46,9           | 47,0           | 46,7  | 47,4 | 48,9  | 47,5  |
| 6    | 22,4           | 22,3 | 22,5           | 22,6           | 22,5           | 22,4           | 22,5           | 22,5           | 22,1  | 22,4 | 22,4  | 22,4  |
| 7    | 36,8           | 30,8 | 37,1           | 36,0           | 37,0           | 36,8           | 36,8           | 36,8           | 36,5  | 36,7 | 37,0  | 36,7  |
| 8    | 37,4           | 38,9 | 37,6           | 37,5           | 37,4           | 37,7           | 37,8           | 37,9           | 37,3  | 37,4 | 37,4  | 37,5  |
| 9    | 50,5           | 51,6 | 50,5           | 50,2           | 50,6           | 50,1           | 50,2           | 50,1           | 49,9  | 50,4 | 50,4  | 50,8  |
| 10   | 40,2           | 38,6 | 38,6           | 44,6           | 39,7           | 40,3           | 40,3           | 40,4           | 40,3  | 38,6 | 38,5  | 38,7  |
| 11   | 28,3           | 29,4 | 28,2           | 28,2           | 28,3           | 28,3           | 28,2           | 28,2           | 27,9  | 27,8 | 28,0  | 28,4  |
| 12   | 33,3           | 47,9 | 33,3           | 33,0           | 33,4           | 31,3           | 31,9           | 31,0           | 31,2  | 33,0 | 33,1  | 27,2  |
| 13   | 71,1           | 73,9 | 71,2           | 70,6           | 71,0           | 79,2           | 79,2           | 79,4           | 79,7  | 72,5 | 72,5  | 73,2  |
| 14   | 46,9           | 39,9 | 46,8           | 46,5           | 47,4           | 44,8           | 44,5           | 45,1           | 43,9  | 46,4 | 46,4  | 41,3  |
| 15   | 38,3           | 29,4 | 38,2           | 38,2           | 38,2           | 38,1           | 38,1           | 38,0           | 37,7  | 38,2 | 38,2  | 37,6  |
| 16   | 30,4           | 26,7 | 30,2           | 30,5           | 30,5           | 30,0           | 29,9           | 29,9           | 30,3  | 30,1 | 30,2  | 29,6  |
| 17   | 28,6           | 27,4 | 28,6           | 28,3           | 28,7           | 25,1           | 25,3           | 25,1           | 24,2  | 28,2 | 28,2  | 70,2  |
| 18   | 34,8           | 18,1 | 30,0           | 34,0           | 30,4           | 34,9           | 34,8           | 34,8           | 34,7  | 34,6 | 28,3  | 34,7  |
| 19   | 23,8           | 70,8 | 17,2           | 23,7           | 19,9           | 23,9           | 23,9           | 23,9           | 23,8  | 22,9 | 67,6  | 22,9  |
| 20   | 19,8           | 16,9 | 19,0           | 18,7           | 18,3           | 19,9           | 19,9           | 19,9           | 19,6  | 18,9 | 21,0  | 18,9  |
| 1'   |                |      |                |                |                | 99,4           | 99,0           | 99,9           | 103,5 |      |       |       |
| 2'   |                |      |                |                |                | 72,7           | 75,4           | 74,8           | 79,5  |      |       |       |
| 3'   |                |      |                |                |                | 74,8           | 79,0           | 78,7           | 78,6  |      |       |       |
| 4'   |                |      |                |                |                | 69,3           | 72,2           | 71,8           | 87,2  |      |       |       |
| 5'   |                |      |                |                |                | 66,5           | 77,9           | 75,2           | 62,3  |      |       |       |
| 6'   |                |      |                |                |                |                | 63,3           | 64,8           |       |      |       |       |
| COMe |                |      |                |                |                |                |                | 20,9           |       |      | 20,4  | 20,9  |
| COMe |                |      |                |                |                |                |                | 170,8          |       |      | 171,4 | 171,2 |

<sup>1</sup> -  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

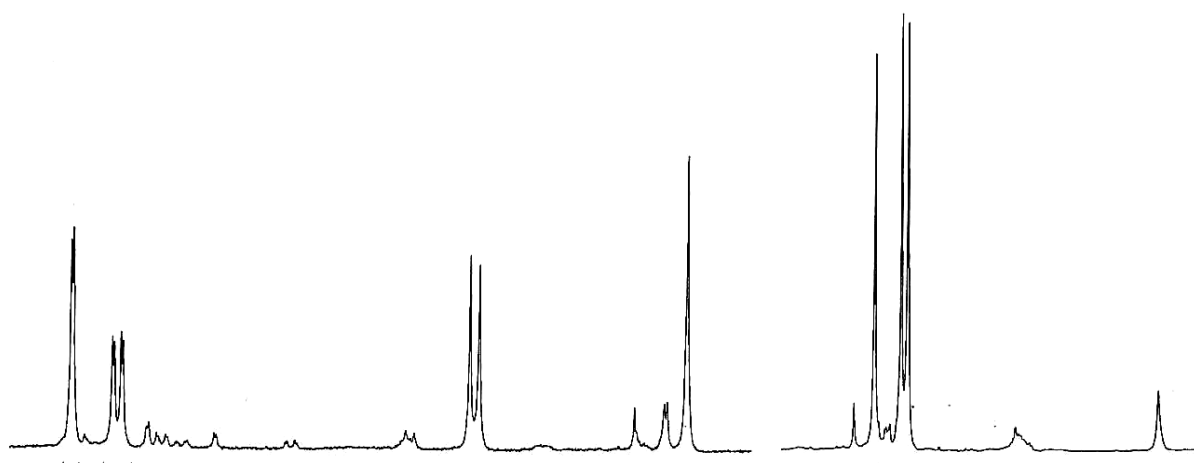
**Tabela 02:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de diterpenos isolados de espécies do gênero *Stemodia*. Dados obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , exceto quando especificado o contrário (continuação).

| C    | 13   | 14   | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    | 22    | 23    | 24    |
|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1    | 36,3 | 36,3 | 38,9  | 38,9  | 39,0  | 39,2  | 38,7  | 38,7  | 28,4  | 27,6  | 29,7  | 57,4  |
| 2    | 18,8 | 18,8 | 18,3  | 18,3  | 18,4  | 18,5  | 18,0  | 18,3  | 17,7  | 32,0  | 56,7  | 59,3  |
| 3    | 41,9 | 42,0 | 43,5  | 43,2  | 43,6  | 43,8  | 43,3  | 43,7  | 125,3 | 124,3 | 125,5 | 126,9 |
| 4    | 33,3 | 33,2 | 33,4  | 33,4  | 33,5  | 33,9  | 33,2  | 33,0  | 162,0 | 162,0 | 159,8 | 162,0 |
| 5    | 47,5 | 47,3 | 58,9  | 58,9  | 59,1  | 61,9  | 58,6  | 58,6  | 44,2  | 44,3  | 35,7  | 35,9  |
| 6    | 22,3 | 22,3 | 72,7  | 72,6  | 71,1  | 69,4  | 72,4  | 72,4  | 22,7  | 17,6  | 23,6  | 38,1  |
| 7    | 37,2 | 36,6 | 49,7  | 49,8  | 50,1  | 54,8  | 49,2  | 49,5  | 32,9  | 27,6  | 60,0  | 60,0  |
| 8    | 37,9 | 37,4 | 74,1  | 74,2  | 74,3  | 74,5  | 74,3  | 73,9  | 34,6  | 34,3  | 60,7  | 60,8  |
| 9    | 51,7 | 50,8 | 54,4  | 54,3  | 54,3  | 54,4  | 54,0  | 54,7  | 67,9  | 66,1  | 65,7  | 65,7  |
| 10   | 38,6 | 38,6 | 38,1  | 38,1  | 38,1  | 37,9  | 37,9  | 37,8  | 37,0  | 37,0  | 28,1  | 28,2  |
| 11   | 27,7 | 28,2 | 15,6  | 15,6  | 15,7  | 15,7  | 15,4  | 15,6  | 59,7  | 49,7  | 54,5  | 54,5  |
| 12   | 34,1 | 27,3 | 34,8  | 34,9  | 34,8  | 34,9  | 34,6  | 34,6  | 66,6  | 54,4  | 40,4  | 40,8  |
| 13   | 75,1 | 74,3 | 73,7  | 73,7  | 73,7  | 73,3  | 73,5  | 73,4  | 140,1 | 57,1  | 66,2  | 66,3  |
| 14   | 83,4 | 40,6 | 147,7 | 147,7 | 147,8 | 147,9 | 147,5 | 147,4 | 121,8 | 23,1  | 73,4  | 73,4  |
| 15   | 44,9 | 37,4 | 110,6 | 110,6 | 110,7 | 110,6 | 110,9 | 110,3 | 28,6  | 31,6  | 17,0  | 23,3  |
| 16   | 37,5 | 29,7 | 29,3  | 29,3  | 29,4  | 29,5  | 29,3  | 29,4  | 22,9  | 17,1  | 13,5  | 15,3  |
| 17   | 23,0 | 68,1 | 27,1  | 27,1  | 27,1  | 27,3  | 25,9  | 27,0  | 20,9  | 18,3  | 16,8  | 16,8  |
| 18   | 34,5 | 34,5 | 36,1  | 36,2  | 36,2  | 36,6  | 36,2  | 36,1  | 173,9 | 173,5 | 173,1 | 172,7 |
| 19   | 22,8 | 22,8 | 22,1  | 22,2  | 22,2  | 22,1  | 22,7  | 22,1  | 70,4  | 70,2  | 69,9  | 70,1  |
| 20   | 18,2 | 18,7 | 16,6  | 16,6  | 16,6  | 16,7  | 16,5  | 16,6  | 14,0  | 13,7  | 17,6  | 17,7  |
| 21   |      |      | 166,5 | 165,7 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 22   |      |      | 42,6  | 43,5  |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 23   |      |      | 165,9 | -     |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 24   |      |      | 61,6  | -     |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 25   |      |      | 14,2  | -     |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 1'   |      |      |       |       |       |       | 173,9 | 166,9 |       |       |       |       |
| 2'   |      |      |       |       |       |       | 43,6  | 42,5  |       |       |       |       |
| 3'   |      |      |       |       |       |       | 171,1 | 165,6 |       |       |       |       |
| 1''  |      |      |       |       |       |       |       | 65,6  |       |       |       |       |
| 2''  |      |      |       |       |       |       |       | 36,1  |       |       |       |       |
| 3''  |      |      |       |       |       |       |       | 19,9  |       |       |       |       |
| 4''  |      |      |       |       |       |       |       | 13,8  |       |       |       |       |
| COMe |      |      |       |       | 22,1  |       |       |       |       |       |       |       |
| COMe |      |      |       |       | 170,3 |       |       |       |       |       |       |       |



## Capítulo 4

# Determinação Estrutural



## 4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

### 4.1 Determinação estrutural de TTR-1

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das raízes de *T. toxicaria* (item 5.4.2.1, p. 85) conduziu à obtenção de um sólido amarelo de aspecto cristalino, com faixa de fusão de 119,8-121,2 °C e  $[\alpha]^{20}_D -105,06$  (c. 0,05, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]^{25}_D - 40$  (c. 0,09, MeOH), (PERALTA *et al.*, 2011) denominado TTR-1. Seu espectro de massa obtido por impacto eletrônico (EM-IE), mostrou pico do íon molecular com  $m/z$  de 322 Da.

O espectro de absorção na região do infravermelho IV (Fig. 16, p. 40) apresentou uma banda em 2923 cm<sup>-1</sup> relacionada à deformação axial de ligação C-H; uma banda de absorção em 3740 cm<sup>-1</sup> para deformação axial de ligação O-H; uma banda de absorção forte em 1630 cm<sup>-1</sup>, associada à deformação axial de ligação C=O, sugerindo a presença de carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada; uma banda em 1590 cm<sup>-1</sup> referente à deformação axial de ligação C=C de anel aromático; uma absorção em 1375 cm<sup>-1</sup> associada à absorção de deformação angular característica de CH<sub>3</sub>; e em 1160 e 1110 cm<sup>-1</sup> bandas características de deformação axial de ligação C-O, uma absorção em 690 cm<sup>-1</sup> de deformação angular de ligação C-H caracteriza um anel aromático monossustituído.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C – BBD, obtido em CDCl<sub>3</sub> (Fig. 18, p. 41), apresentou dezoito sinais espectrais. O sinal em  $\delta$  195,84 confirmou a presença da carbonila sugerida no espectro de IV. De acordo com a teoria do deslocamento químico os sinais em  $\delta$  156,97 (C-9); 162,53 (C-7) e 164,02 (C-5) puderam ser atribuídos a carbonos  $sp^2$  oxigenados. Observaram-se ainda nove sinais em  $\delta$  97,88 (C-6); 102,20 (C-8); 103,11 (C-10); 115,80 (C-4''); 126,20 (C-2', C-6'); 126,71 (C-5''); 128,96 (C-4'); 129,04 (C-3', C-5') e 138,76 (C-1') relacionados a carbonos  $sp^2$  não oxigenados. O sinal em  $\delta$  43,55 (C-3) foi observado no espectro de RMN <sup>13</sup>C – DEPT 135° com amplitude negativa. Portanto, podendo ser atribuído a um carbono metilênico.

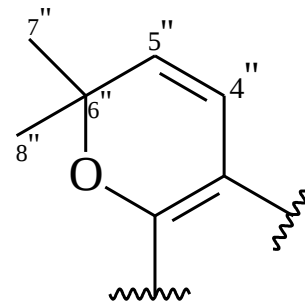
O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Fig. 17, p. 41) mostrou sinais em  $\delta$  1,44 e 1,46 (3H, s), os quais foram atribuídos a grupos metila geminais; observou-se também sinais característicos de um sistema ABX em  $\delta$  2,84 (1H, dd,  $J = 17,0$  e  $3,0$  Hz), 3,07 (1H, dd,  $J = 17,0$  e  $13,0$  Hz) e 5,45 (1H, dd,  $J = 13,0$  e  $3,0$  Hz); sinais em  $\delta$  5,48 (1H, d,  $J = 10,1$  Hz) e 6,56 (1H, d,  $J = 10,1$  Hz), cujos acoplamentos foram confirmados pelo espectro bidimensional de correlação homonuclear <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H – COSY (Fig. 20, p. 42). Evidenciou-se também um sinal em  $\delta$  6,02

(1H, s). Sinais múltiplos integrados para cinco hidrogênios, compatíveis com a ocorrência de anel aromático monossustituído, foram observados entre  $\delta$  7,40 e  $\delta$  7,48. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou ainda, em região desblindada, um sinal em  $\delta$  12,10 (1H, s), atribuído à hidroxila fenólica quelatogênica.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  – HSQC (Fig.18, p. 43), permitiu associar os sinais de carbonos em  $\delta$  28,49 (C-7'') e 28,73 (C-8'') aos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  1,44 e 1,46 (3H, s), respectivamente. Foram observadas também correlações dos sinais de hidrogênio em  $\delta$  2,84 (1H, dd,  $J = 17,0$  e  $3,0$  Hz), 3,07 (1H, dd,  $J = 17,0$  e  $13,0$  Hz) com o carbono em  $\delta$  43,55 (C-3) sugerindo tratar-se de hidrogênios diastereotópicos, confirmando o padrão de hidrogenação sugerido anteriormente para este carbono. Observou-se ainda a correlação do hidrogênio em  $\delta$  6,02 (s) com o carbono em  $\delta$  97,88 (C-6).

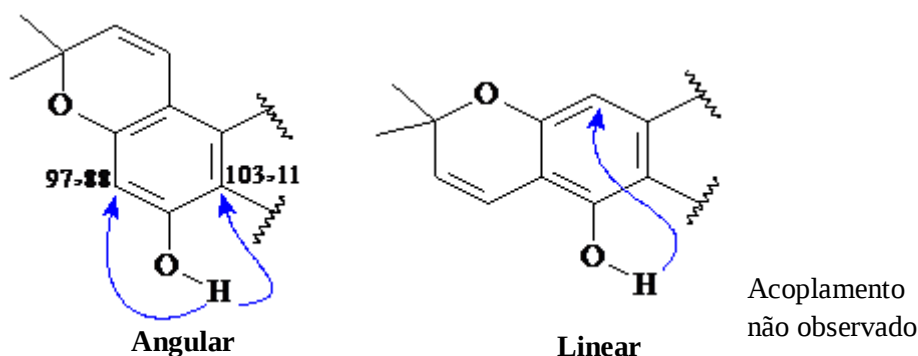
Sinais em  $\delta$  28,49 (C-7''); 28,73 (C-8''); 78,37 (C-6''); 126,71 (C-5'') e 115,80 (C-4'') vistos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , associados às observações feitas no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , permitiram sugerir na estrutura de TTR-1, a presença do esqueleto 6'',6''-dimetilcromeno (Fig. 09), como substituinte prenílico, frequentemente, encontrado em compostos flavonoídicos que ocorrem em plantas do gênero *Tephrosia* (TARUS *et al.*, 2002).

**Figura 09** – Sistema 6'',6''-dimetilcromeno

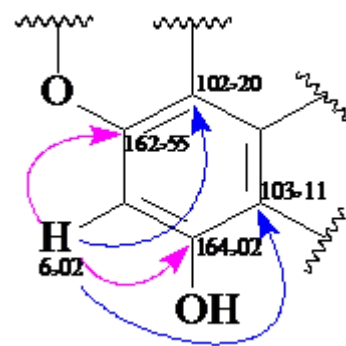


O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  – HSQC permitiu associar os átomos de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,48 (1H, d,  $J = 10,1$  Hz) e 6,56 (1H, d,  $J = 10,1$  Hz) com os átomos de carbonos em  $\delta$  126,71 (C-5'') e 115,80 (C-4''), respectivamente, confirmando a presença do sistema 6'',6''-dimetilcromeno. Todos os dados até aqui descritos permitiram sugerir duas estruturas isoméricas para TTR-1, onde o substituinte prenílico estaria em posição angular ou linear (Fig. 10, p. 37).

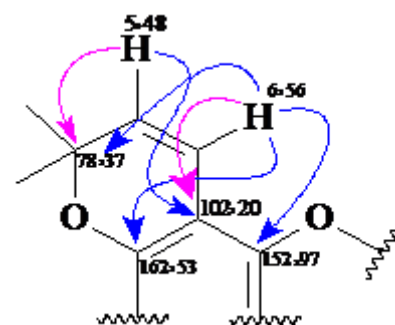
A determinação inequívoca da estrutura de TTR-1 foi feita através da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  – HMBC (Fig. 19, p. 43), no qual foram observadas correlações a três ligações ( $^3J$ ) do hidrogênio da hidroxila fenólica ( $\delta$  12,10) com os carbonos em  $\delta$  97,88 (C-6) e 103,11 (C-10), conforme é apresentado na Figura 10 (p. 38). Estas correlações apontam para a estrutura angular de TTR-1.

**Figura 10** – Acoplamento da hidroxila fenólica nas estruturas angular e linear.

Também foram observados no mesmo espectro correlações a duas ligações ( $^2J$ ) entre o sinal em  $\delta$  6,02 (1H, s) com os carbonos em  $\delta$  162,55 (C-7) e 164,02 (C-5); e a três ligações ( $^3J$ ) com os carbonos em  $\delta$  103,11 (C-10) e 102,20 (C-8), permitindo sugerir a seguinte unidade estrutural (Fig. 11).

**Figura 11** – Unidade estrutural 1 de TTR-1

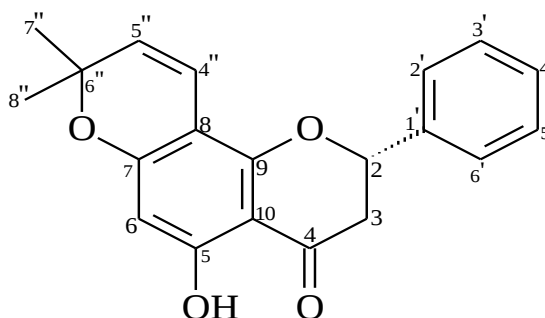
O mesmo experimento mostrou correlações entre o sinal em  $\delta$  5,48 (1H, d,  $J = 10,1$  Hz) com o carbono em  $\delta$  78,37 (C-6'') a duas ligações ( $^2J$ ) e com o carbono em  $\delta$  102,20 (C-8) a três ligações ( $^3J$ ). Também correlações ( $^3J$ ) entre o sinal em  $\delta$  6,56 (1H, d,  $J = 10,1$  Hz) e os carbonos em  $\delta$  78,37 (C-6''); 162,53 (C-7) e 152,97 (C-9); o mesmo hidrogênio correlaciona ( $^2J$ ) com o sinal em  $\delta$  102,20 (C-8), conforme é apresentado na unidade estrutural da Figura 12.

**Figura 12** – Unidade estrutural 2 de TTR-1

As correlações observadas no experimento HMBC corroboraram para a estrutura de uma flavanona, que de acordo com os dados obtidos e em comparação com os descritos na literatura (ARRIAGA, *et al.*, 2009), foi possível identificar TTR-1 como (-)-(2S)-5-hidroxi-6'',6''-dimetilcromeno-(7,8:2'',3'')-flavanona (obovatina) (Fig. 13, p. 39), cujos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são apresentados na Tabela 03 (p. 40). Esta substância foi isolada anteriormente também de outras espécies do gênero *Tephrosia*, como *T. procumbens*

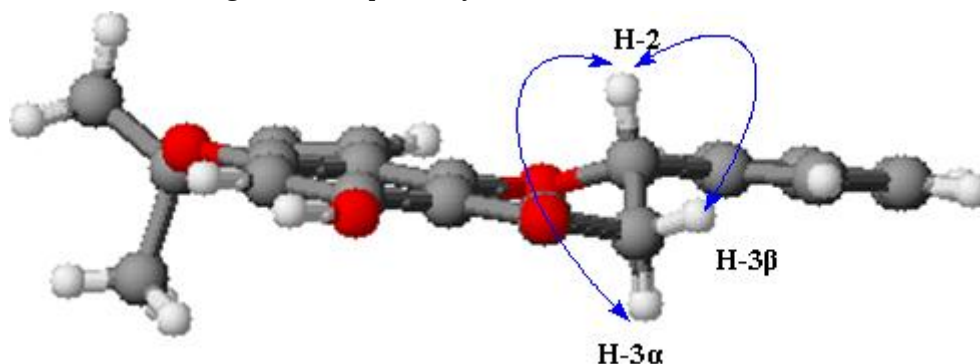
(VENKATARATNAM; RAO; VILAIN, 1987), *T. pentaphylla* (DAGNE; YENESEW; WATERMAN, 1989), *T. tunicata* (ANDREI *et al.*, 2000) e *T. elata* (MUIVA *et al.*, 2009) e no gênero *Dalea*, na espécie *Dalea boliviana* (PERALTA *et al.*, 2011).

**Figura 13** – Estrutura de TTR-1 (obovatina)



A confirmação da estereoquímica do carbono C-2 pode ser obtida através dos valores das constantes de acoplamento ( $J$ ) observadas entre o hidrogênio deste carbono e os hidrogênios do carbono C-3. A multiplicidade do sinal para o H-2 indicou valores de  $J$  de 13,0 Hz, para o acoplamento com o H-3 $\alpha$ , e  $J$  igual a 3,0 Hz para o acoplamento com o H-3 $\beta$ , sugerindo que o H-2 esteja localizado em uma posição pseudoaxial, ou acima do plano, diante disso, o grupo fenila deve estar em posição pseudoequatorial, ou abaixo do plano, conforme é mostrado na Figura 14 abaixo.

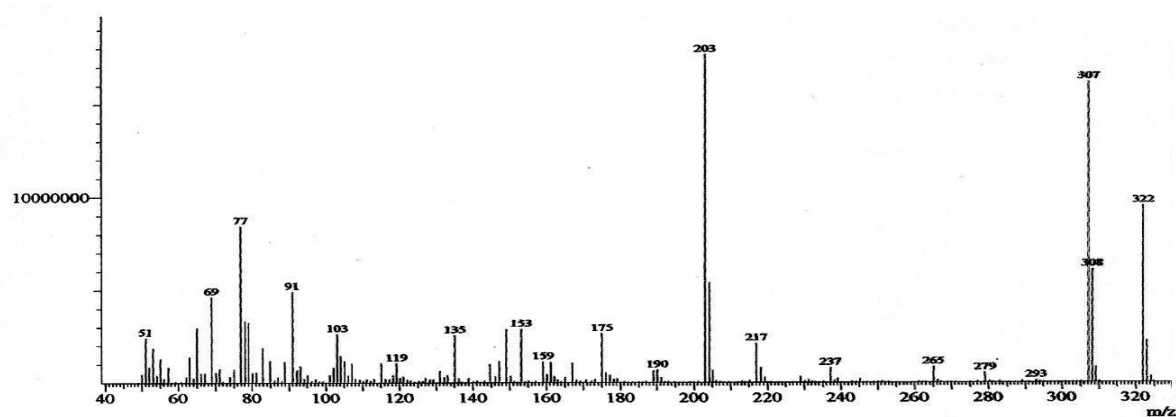
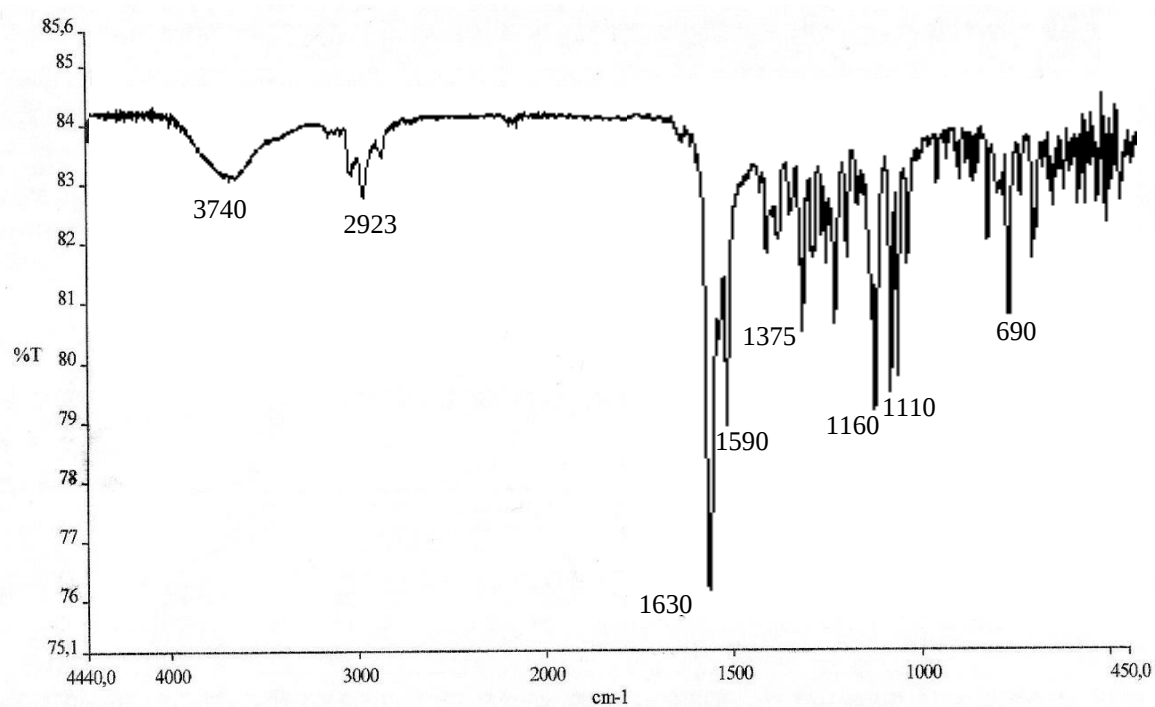
**Figura 14** – Representação conformacional de TTR-1.

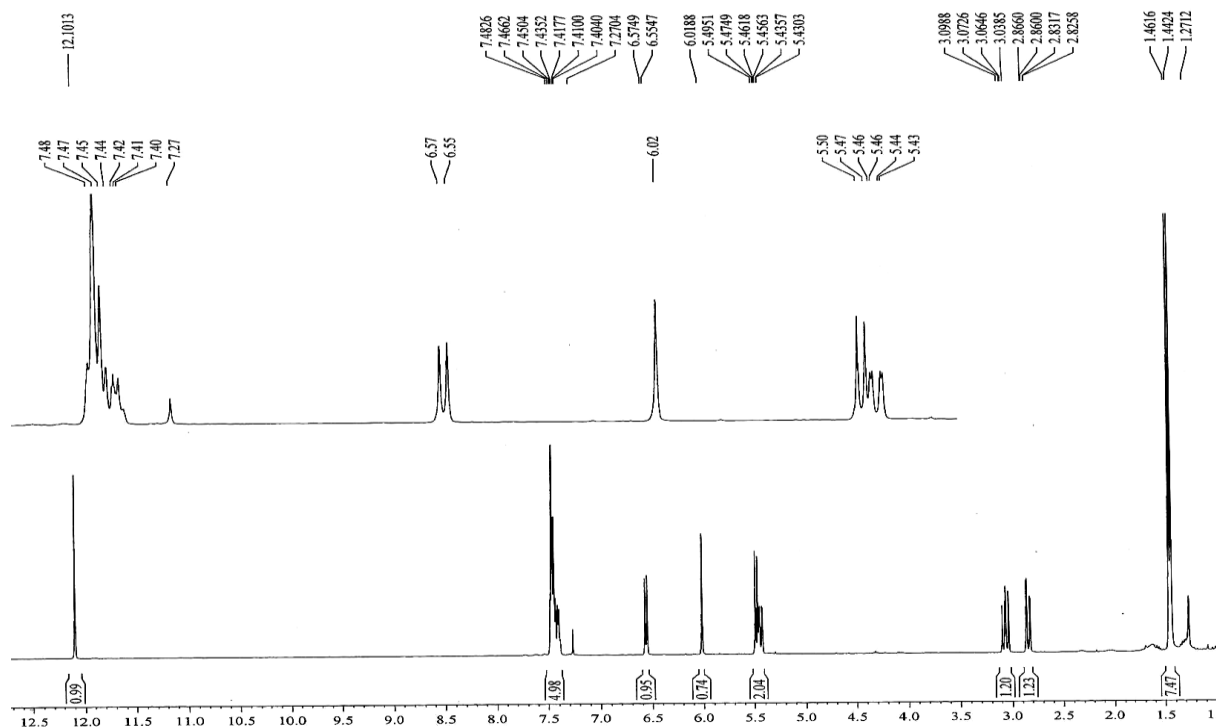
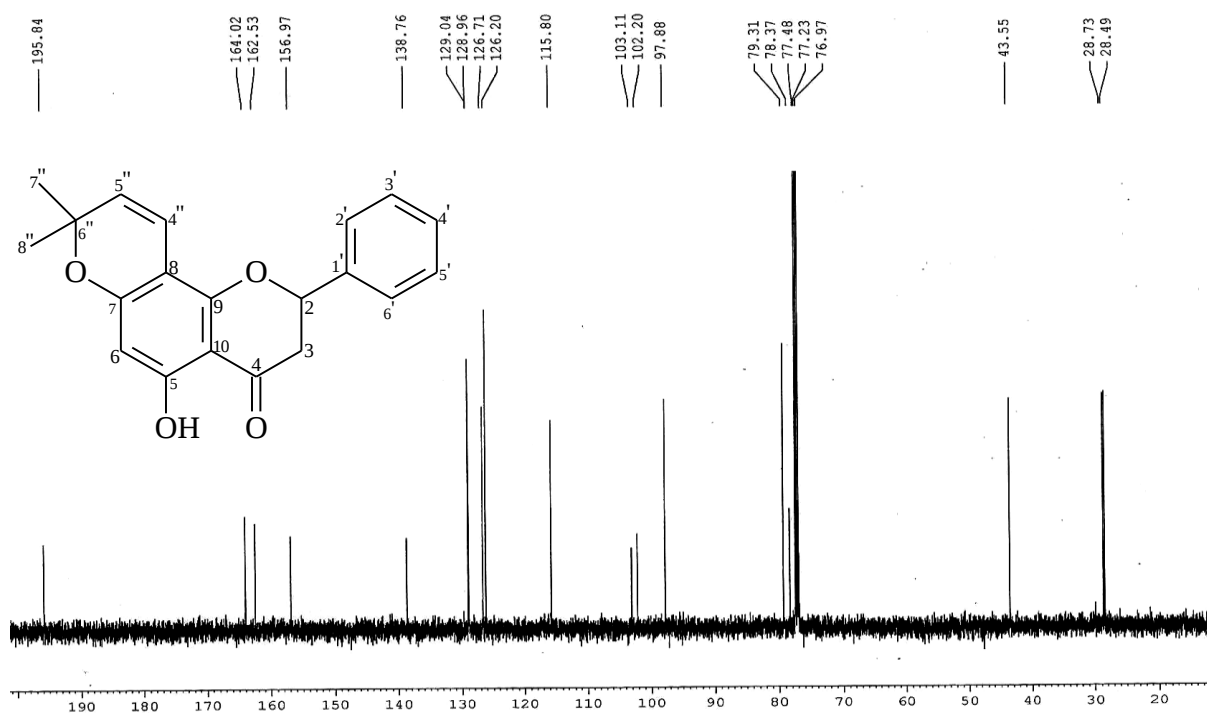


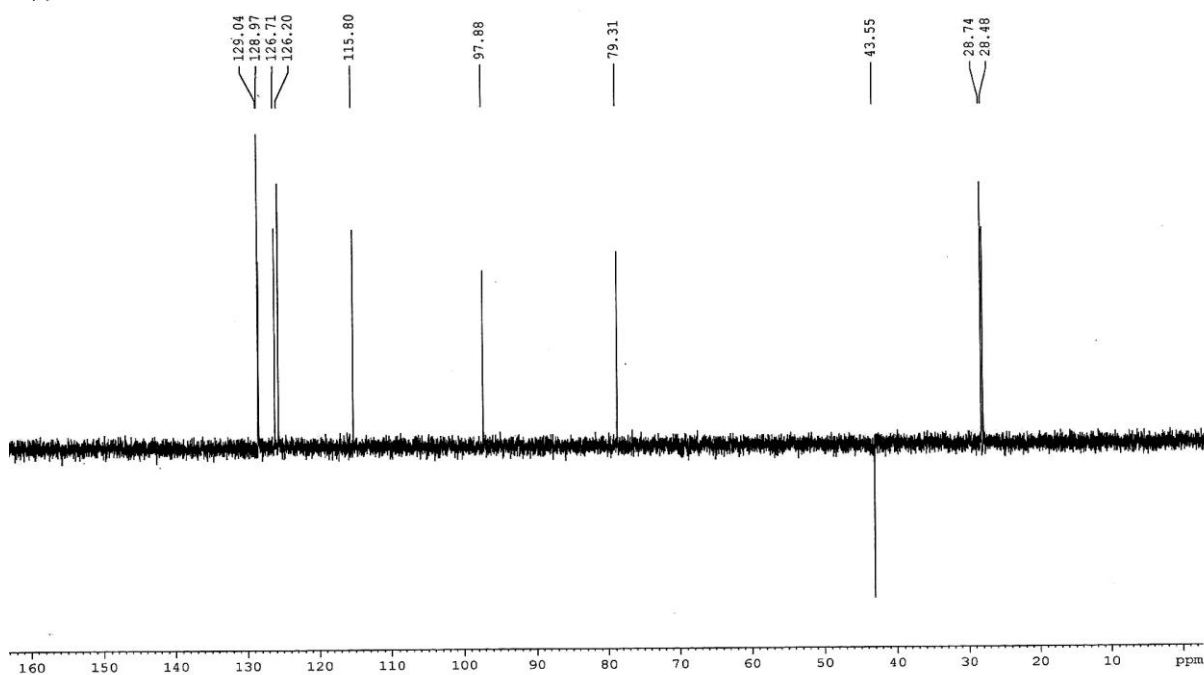
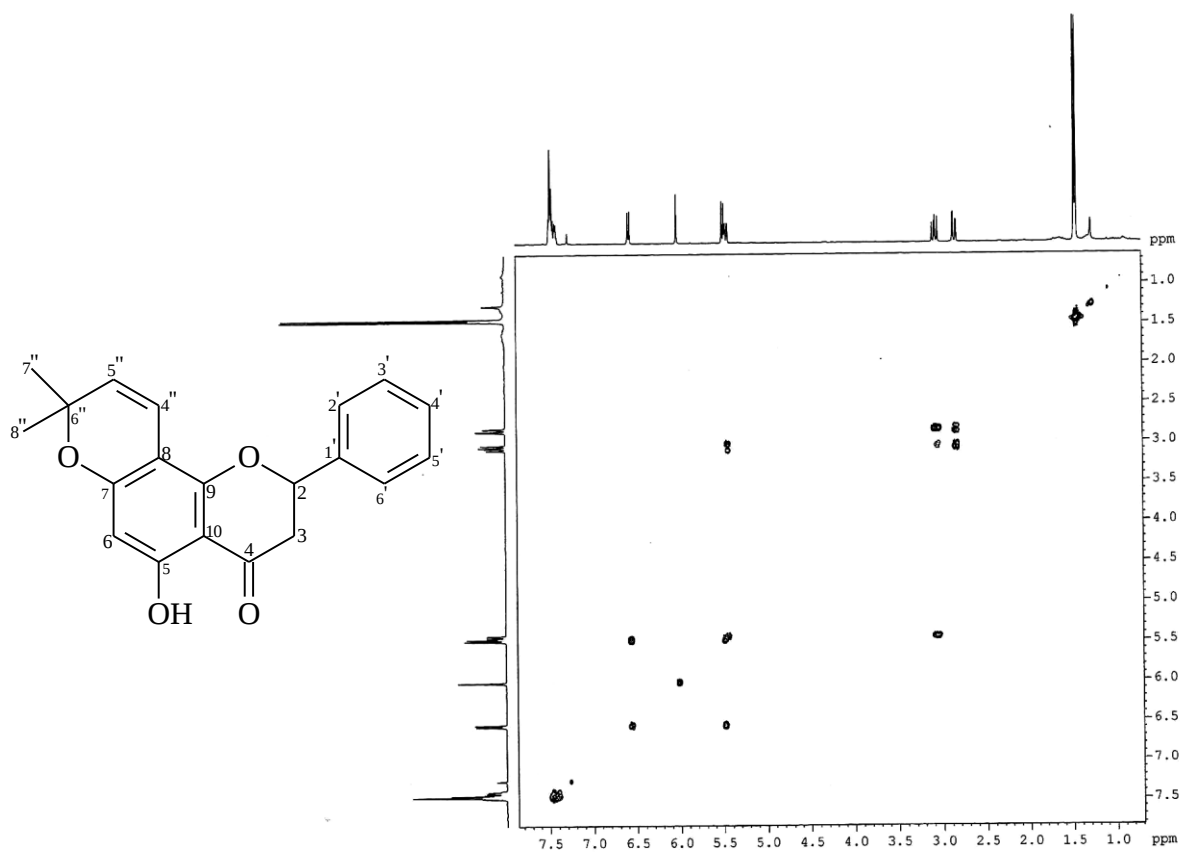
**Tabela 03** – Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de TTR-1 comparados com dados da literatura (ARRIAGA *et al.*, 2009).

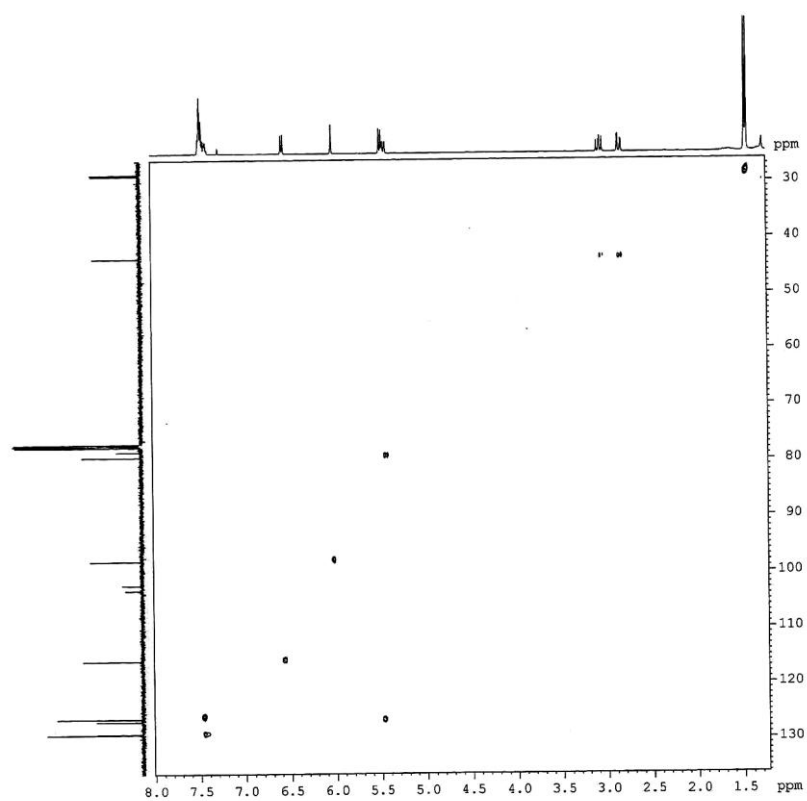
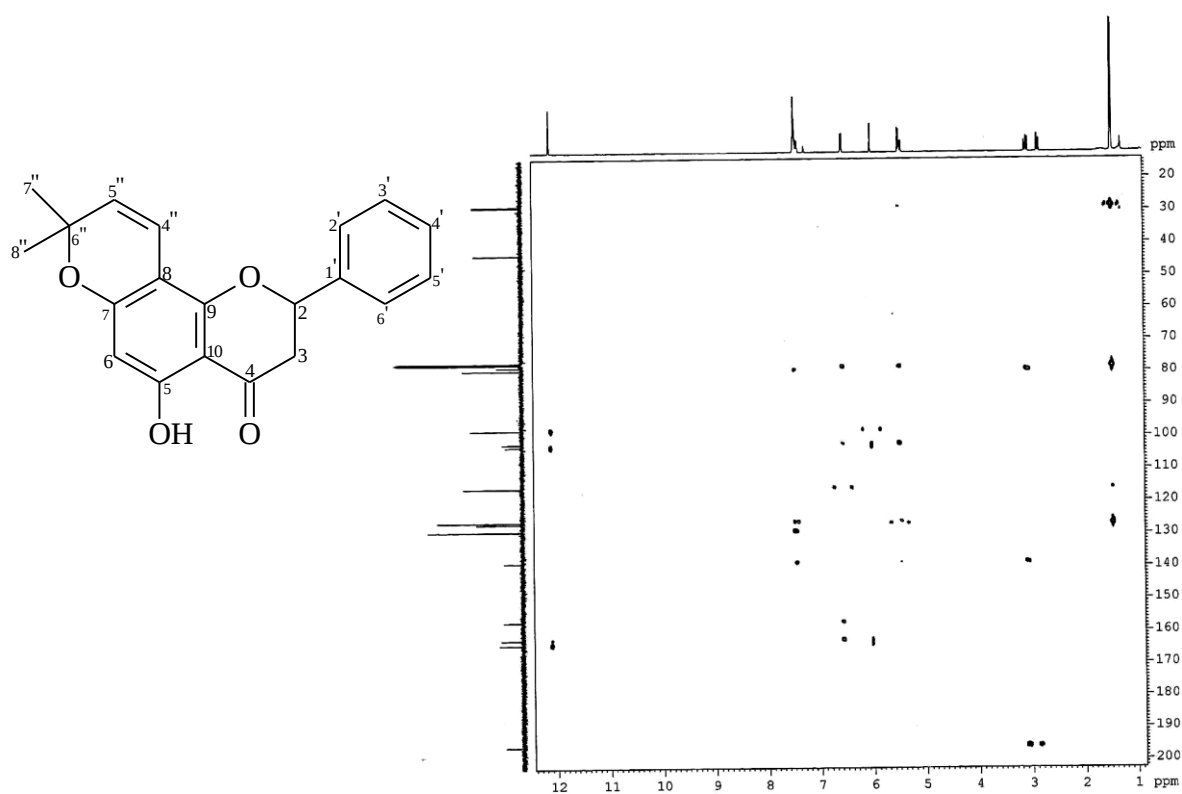
| TTR-1 <sup>a</sup> |                                                                        |                       | HMBC                          |                           | LIT. <sup>a</sup>                                                     |                       |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| C                  | $\delta^1\text{H}$ (mult., J/Hz)                                       | $\delta^{13}\text{C}$ | $^2J_{\text{C-H}}$            | $^3J_{\text{C-H}}$        | $\delta^1\text{H}$                                                    | $\delta^{13}\text{C}$ |
| 2                  | 5,45 (dd; 13,0; 3,0)                                                   | 79,31                 | H-3 $\alpha$                  | H-2'-6'                   | 5,44 (dd; 13,0; 3,0)                                                  | 79,2                  |
| 3                  | 3,07 (H $\alpha$ ; dd; 17,0; 13,0)<br>2,84 (H $\beta$ ; dd; 17,0; 3,0) | 43,55                 |                               |                           | 3,06 (dd; 7,1; 13,0; H $\alpha$ )<br>2,85 (dd; 17,1; 3,0; H $\beta$ ) | 43,5                  |
| 4                  | -                                                                      | 195,84                | H-3 $\alpha$ ;<br>H-3 $\beta$ |                           | -                                                                     | 195,8                 |
| 5                  | OH - 12,10 (s)                                                         | 164,02                | OH-5; H-6                     |                           | OH - 12,09 (s)                                                        | 164,0                 |
| 6                  | 6,02 (s)                                                               | 97,88                 |                               | OH-5                      | 6,02 (s)                                                              | 97,8                  |
| 7                  | -                                                                      | 162,53                | H-6                           | H-4''                     | -                                                                     | 162,5                 |
| 8                  | -                                                                      | 102,20                | H-4''                         | H-5''; H-6                | -                                                                     | 102,1                 |
| 9                  | -                                                                      | 156,97                |                               | H-4''                     | -                                                                     | 156,9                 |
| 10                 | -                                                                      | 103,11                |                               | OH-5; H-6                 | -                                                                     | 103,1                 |
| 1'                 | -                                                                      | 138,76                |                               | H-3 $\alpha$ ;<br>H-3'-5' | -                                                                     | 138,7                 |
| 2', 6'             | 7,40 - 7,48 (m)                                                        | 126,20                |                               | H-2                       | 7,40 - 7,48 (m)                                                       | 126,2                 |
| 3', 5'             | 7,40 - 7,48 (m)                                                        | 129,04                |                               |                           | 7,40 - 7,48 (m)                                                       | 129,0                 |
| 4'                 | 7,40 - 7,48 (m)                                                        | 128,96                |                               |                           | 7,40 - 7,48 (m)                                                       | 129,0                 |
| 4''                | 6,56 (d; 10,1)                                                         | 115,80                |                               |                           | 6,56 (d; 10,0)                                                        | 115,8                 |
| 5''                | 5,48 (d; 10,1)                                                         | 126,71                |                               | H-7'';<br>H-8''           | 5,48 (d; 10,0)                                                        | 126,7                 |
| 6''                | -                                                                      | 78,37                 | H-5''; H-7''; H-8''           | H-4''                     | -                                                                     | 78,3                  |
| 7''                | 1,44 (3H, s)                                                           | 28,49                 |                               | H-8''                     | 1,44 (3H, s)                                                          | 28,4                  |
| 8''                | 1,46 (3H, s)                                                           | 28,73                 |                               | H-7''                     | 1,46 (3H, s)                                                          | 28,7                  |

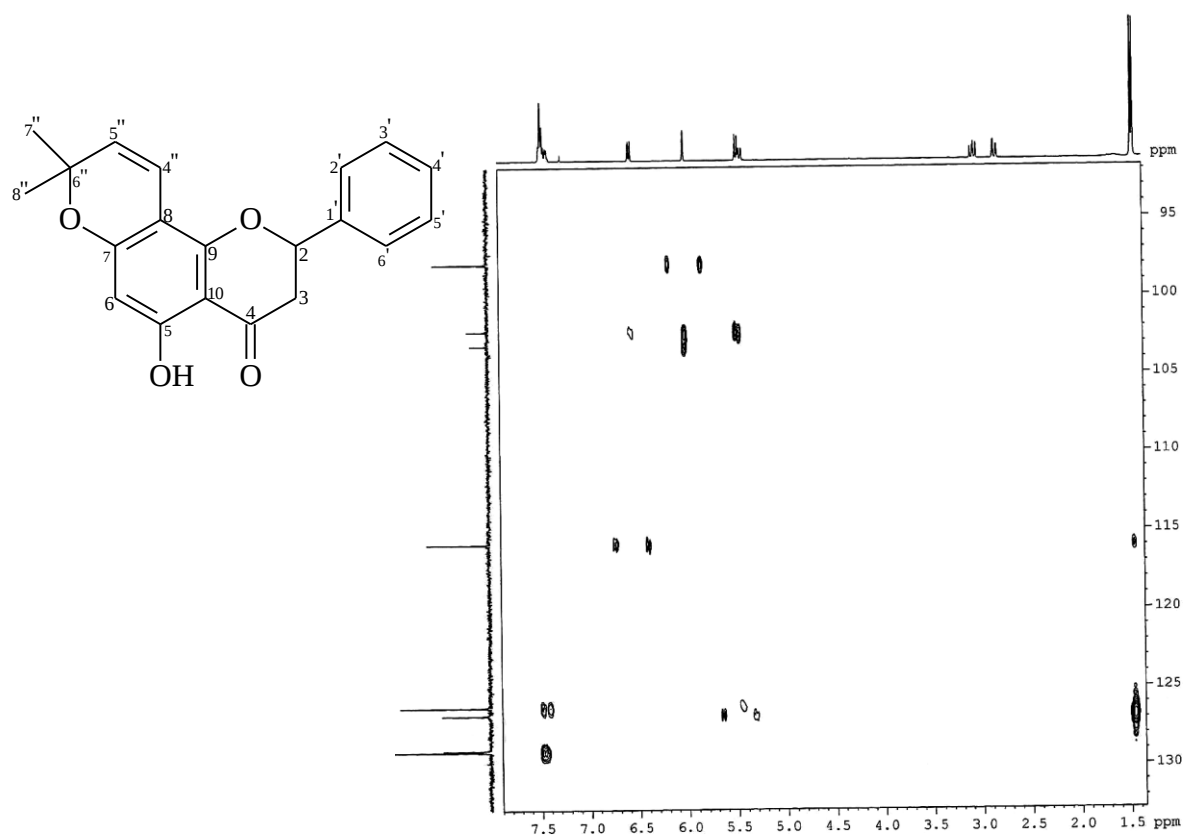
<sup>a</sup> –  $\text{CDCl}_3$

**Figura 15** – Espectro de massa IE (70 eV) de TTR-1**Figura 16** – Espectro de absorção na região do infravermelho de TTR-1 (KBr)

**Figura 17** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1**Figura 18** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1

**Figura 19** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – DEPT 135° (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1**Figura 20** – Espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  – COSY de TTR-1

**Figura 21** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  – HSQC de TTR-1**Figura 22** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  – HMBC de TTR-1

**Figura 23** – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  – HMBC de TTR-1

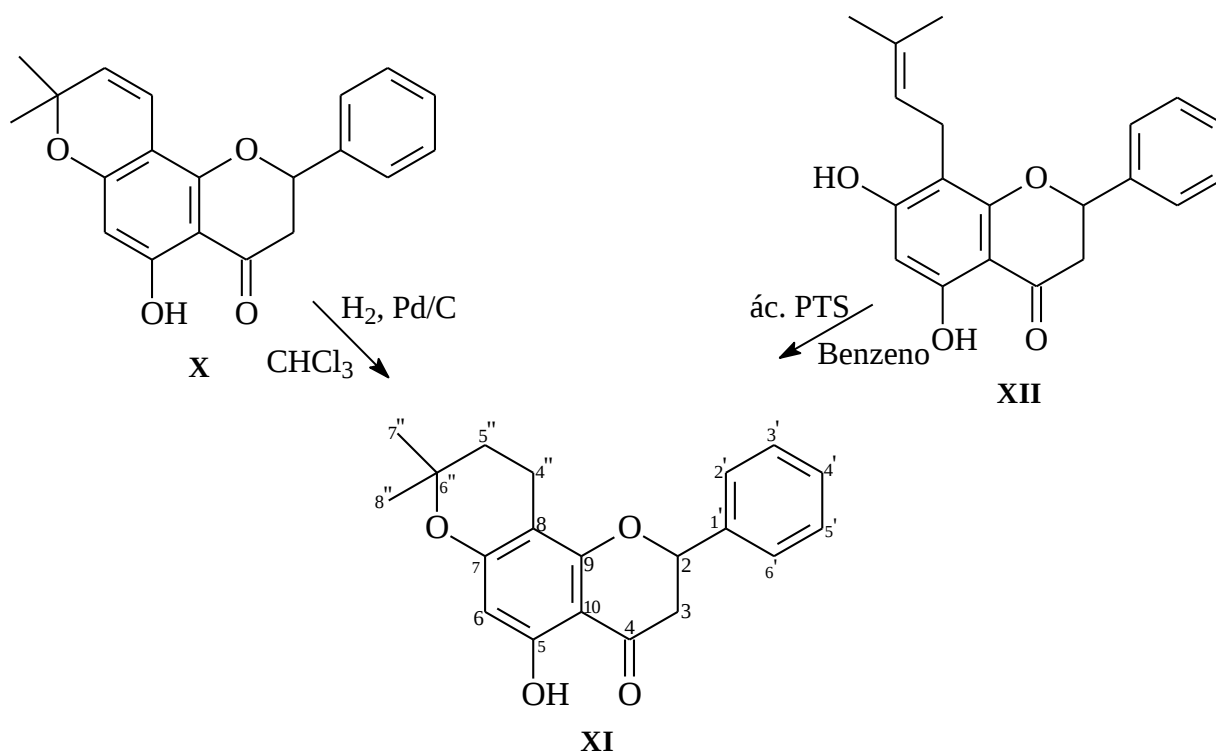
## 4.2 Determinação estrutural de TTR-1H

A reação de hidrogenação do composto TTR-1 (item 5.4.2.2, p. 86) forneceu um produto sólido branco, de aspecto cristalino com ponto de fusão de 113,6 °C e  $[\alpha]_D^{20} - 65,86$  (c. 0,05, CHCl<sub>3</sub>) denominado TTR-1H.

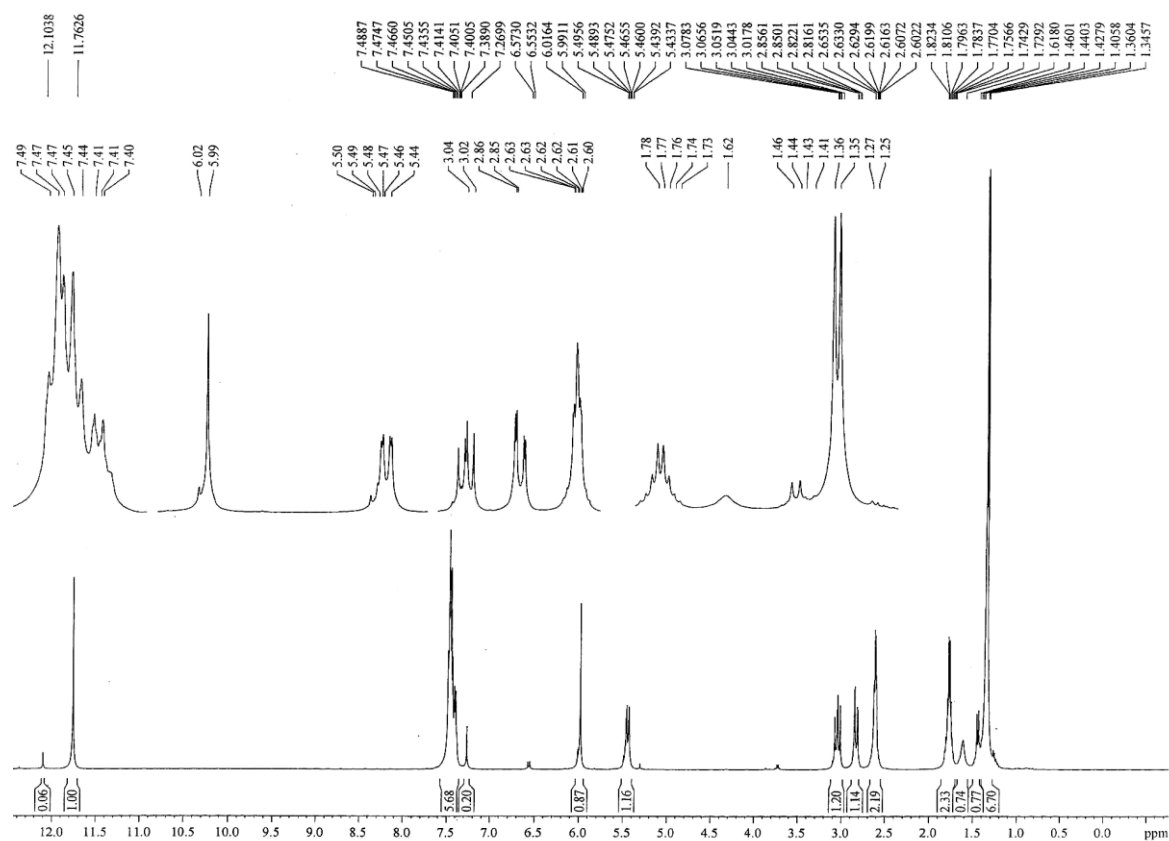
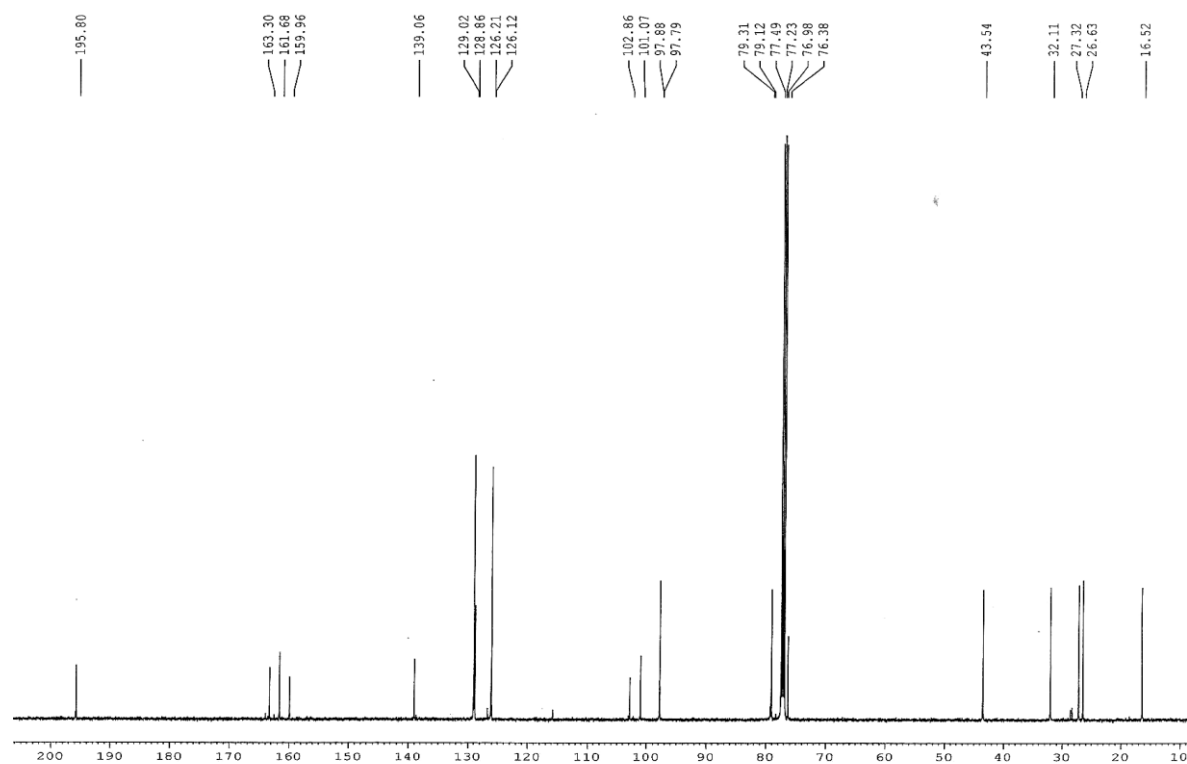
O espectro de RMN <sup>13</sup>C – BBD, obtido em CDCl<sub>3</sub> (Fig. 26, p. 48), apresentou dezoito sinais espectrais. O sinal em  $\delta$  195,80 indicou a presença de carbonila. Três sinais em  $\delta$  159,96 (C-9); 161,68 (C-7) e 163,30 (C-5) foram atribuídos a carbonos  $sp^2$  oxigenados. Observaram-se ainda sete sinais para  $\delta$  97,79 (C-6); 101,07 (C-8); 102,86 (C-10); 126,12 (C-2', C-6'); 128,86 (C-4'); 129,02 (C-3', C-5') e 139,06 (C-1') relacionados a carbonos  $sp^2$  não oxigenados. O sinal em  $\delta$  43,54 (C-3) foi atribuído a um carbono metilênico. Não foram observados os sinais para os carbonos olefínicos em  $\delta$  115,80 (C-4'') e 126,71 (C-5''), presentes no espectro de TTR-1 (item 4.1, Fig. 13, p. 39), indicando que a dupla ligação do anel cromeno foi hidrogenada. Portanto, os sinais observados no espectro de RMN <sup>13</sup>C – DEPT 135° (Fig. 27, p. 49) em  $\delta$  32,11 e 16,52 foram atribuídos a dois carbonos metilênicos, C-5'' e C-4'', respectivamente.

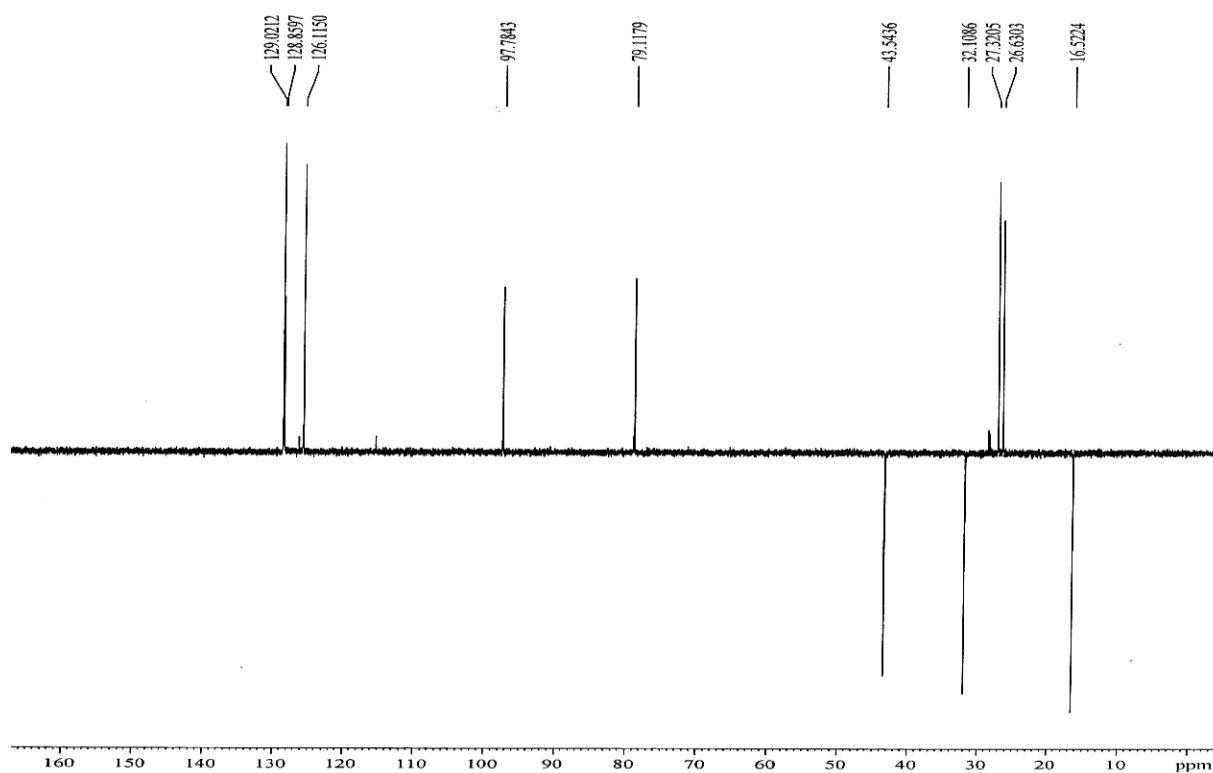
O espectro de RMN <sup>1</sup>H 500 MHz (Fig. 25, p. 48) mostrou sinais em  $\delta$  1,35 e  $\delta$  1,36 (3H, s), os quais foram atribuídos a grupos metila geminais; apresentou também sinais característicos de um sistema ABX em  $\delta$  2,86 (1H, dd,  $J = 17,0$  e  $3,0$  Hz), 3,04 (1H, dd,  $J = 17,0$  e  $13,0$  Hz) e 5,47 (1H, dd,  $J = 13,0$  e  $3,0$  Hz); observaram-se dois multipletos em  $\delta$  2,61 (2H, m) e 1,76 (2H, m) correspondentes a hidrogênios metilênicos, confirmando a ausência da insaturação entre os carbonos 5'' e 4''. Evidenciou-se também um sinal em  $\delta$  5,99 (1H, s). Sinais múltiplos integrados para cinco hidrogênios, compatíveis com a ocorrência de anel aromático monossustituído foram observados entre  $\delta$  7,40 e 7,48. O espectro de RMN <sup>1</sup>H mostrou ainda, em região desblindada, um sinal em  $\delta$  11,76 (1H, s), atribuído à hidroxila fenólica quelatogênica.

Após a comparação dos dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de TTR-1H com TTR-1, Tabela 04 (p. 47), foi possível caracterizar TTR-1H como sendo o composto XI (Fig. 24). Na literatura este composto encontra-se descrito por Bholmann e Abraham (1979) como sendo um derivado obtido a partir de 5,7-dihidroxi-8-(3',3'-dimetilalil)-flavanona (composto XII, Fig. 21) isolado de *Helichrysum hypocephalum* pela reação com ácido *p*-toluenossulfônico (ác. PTS).

**Figura 24** – Estruturas de TTR-1 (X), TTR-1H (XI) e de 5,7-dihidroxi-8-(3',3'-dimetilalil)-flavanona (XII).**Tabela 04** – Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) de TTR-1H comparados com os dados de TTR-1.

| TTR-1H |                                                                        |                        | TTR-1                                                                  |                        |
|--------|------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| C      | $\delta \text{ H (mult.; J/Hz)}$                                       | $\delta ^{13}\text{C}$ | $\delta \text{ H (mult.; J/Hz)}$                                       | $\delta ^{13}\text{C}$ |
| 2      | 5,47 (dd; 13,0; 3,0)                                                   | 79,12                  | 5,45 (dd; 13,0; 3,0)                                                   | 79,31                  |
| 3      | 3,07 (H $\alpha$ ; dd; 17,0; 13,0)<br>2,86 (H $\beta$ ; dd; 17,0; 3,0) | 43,54                  | 3,07 (H $\alpha$ ; dd; 17,0; 13,0)<br>2,84 (H $\beta$ ; dd; 17,0; 3,0) | 43,55                  |
| 4      | -                                                                      | 195,80                 | -                                                                      | 195,84                 |
| 5      | OH - 11,76 (s)                                                         | 163,30                 | OH - 12,10 (s)                                                         | 164,02                 |
| 6      | 5,99 (s)                                                               | 97,79                  | 6,02 (s)                                                               | 97,88                  |
| 7      | -                                                                      | 161,68                 | -                                                                      | 162,53                 |
| 8      | -                                                                      | 101,07                 | -                                                                      | 102,20                 |
| 9      | -                                                                      | 159,96                 | -                                                                      | 156,97                 |
| 10     | -                                                                      | 102,86                 | -                                                                      | 103,11                 |
| 1'     | -                                                                      | 139,06                 | -                                                                      | 138,76                 |
| 2', 6' | 7,40 - 7,48 (m)                                                        | 126,12                 | 7,40 - 7,48 (m)                                                        | 126,20                 |
| 3', 5' | 7,40 - 7,48 (m)                                                        | 129,02                 | 7,40 - 7,48 (m)                                                        | 129,04                 |
| 4'     | 7,40 - 7,48 (m)                                                        | 128,86                 | 7,40 - 7,48 (m)                                                        | 128,96                 |
| 4''    | <b>1,76 (2H, m)</b>                                                    | <b>16,52</b>           | <b>6,56 (d; 10,1)</b>                                                  | <b>115,80</b>          |
| 5''    | <b>2,61 (2H, m)</b>                                                    | <b>32,11</b>           | <b>5,48 (d; 10,1)</b>                                                  | <b>126,71</b>          |
| 6''    | -                                                                      | 76,38                  | -                                                                      | 78,37                  |
| 7''    | 1,35 (3H, s)                                                           | 26,63                  | 1,44 (3H, s)                                                           | 28,49                  |
| 8''    | 1,36 (3H, s)                                                           | 27,32                  | 1,46 (3H, s)                                                           | 28,73                  |

**Figura 25** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1H**Figura 26** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1H

**Figura 27** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – DEPT 135° (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TTR-1H

### 4.3 Determinação estrutural de SMF-1

O fracionamento cromatográfico de SMFED de *S. maritima* (item 5.5.3, p. 87) conduziu à obtenção de um sólido branco cristalino, com faixa de fusão de 189,9-192,4 °C e  $[\alpha]_D^{21} -5,33$  (c. 0,10, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D -2,6$  (c. 1,07, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N), (MANCHAND; WHITE; CLARDY, 1973), denominado SMF-1. Seu espectro de massa (Fig. 33, p. 54) obtido por ionização por *electrospray* (EM-IES) no modo positivo, mostrou um pico referente ao aduto de sódio da molécula  $[M+Na]^+$  com  $m/z$  de 329,2447 Da.

Seu espectro de absorção na região do infravermelho IV (Fig. 34, p. 54) apresentou uma banda em 3313 cm<sup>-1</sup> relacionada à deformação axial de ligação O–H, sugerindo a presença de hidroxila; apresentou também uma absorção em 2953 cm<sup>-1</sup> relacionada a deformação axial de ligação C–H de carbonos saturados  $sp^3$ ; o espectro mostrou ainda bandas em 1465 e 1365 cm<sup>-1</sup> referentes a deformações angulares de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, respectivamente; uma absorção em 1033 cm<sup>-1</sup> associada à deformação axial de ligação C–O.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C – BBD, obtido em piridina-*d*<sub>5</sub> (Fig. 37, p. 56), apresentou vinte linhas espectrais. Observaram-se dois sinais em  $\delta$  71,43 (C-13) e 64,47 (C-2) atribuídos a carbonos  $sp^3$  oxigenados. A comparação com o espectro de RMN <sup>13</sup>C – DEPT 135° (Fig. 38, p. 56), possibilitou atribuir os sinais em  $\delta$  71,43 (C-13); 51,00 (C-9); 40,69 (C-10) e 35,13 (C-4) a carbonos não hidrogenados; o espectro permitiu identificar quatro carbonos metínicos em  $\delta$  64,47 (C-2); 47,40 (C-5); 47,29 (C-14) e 37,78 (C-8); foram observados também oito sinais com amplitude negativa no espectro DEPT 135° para os carbonos em  $\delta$  52,17 (C-3); 47,15 (C-1); 38,76 (C-15); 37,20 (C-7); 33,80 (C-12); 30,79 (C-16); 28,73 (C-11) e 22,85 (C-6). O experimento também permitiu verificar a presença de quatro carbonos metílicos em  $\delta$  35,21 (C-18); 29,12 (C-17); 24,26 (C-19) e 20,32 (C-20).

A análise dos resultados gerou a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a quatro. Como não foram observados sinais para carbonos  $sp^2$ , os graus de insaturação foram atribuídos a anéis, sugerindo uma estrutura tetracíclica para SMF-1. A presença de vinte carbonos  $sp^3$ , dois dos quais são oxigenados, também sugeriu que SMF-1 tratava-se de um diterpeno dihidroxilado.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de SMF-1 (Fig. 35, p. 55) apresentou quatro singletos em  $\delta$  0,95; 0,99; 1,02 e 1,31 integrados cada um para três hidrogênios, característicos de

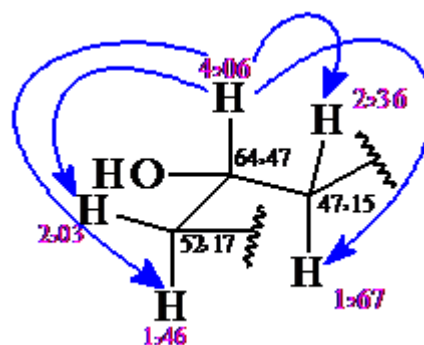
Silva, F. R. L. \_\_\_\_\_

grupamentos metila. O espectro mostrou também um tripleto em  $\delta$  4,06 (1H), atribuído a um hidrogênio metínico carbinólico.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HSQC (Fig. 42, p. 58) permitiu relacionar, de forma inequívoca, cada sinal de hidrogênio ao seu carbono Tabela 05 (p. 53).

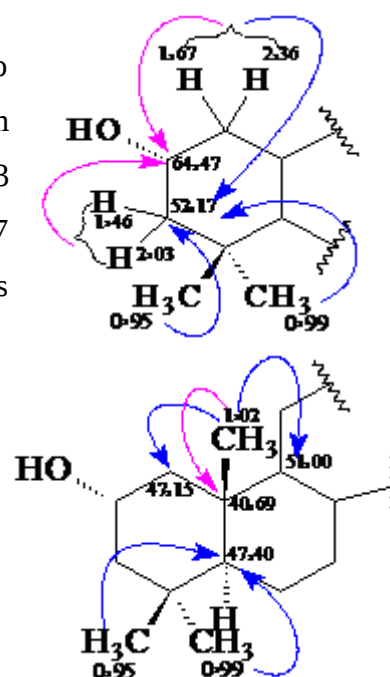
No espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  – COSY (Fig. 39, p. 57), o hidrogênio em  $\delta$  4,06 (1H, t), o qual mostrou correlação com o carbono em  $\delta$  64,47 (C-2) no espectro HSQC, acopla com os hidrogênios em  $\delta$  2,36 (1H, td,  $J = 12,0$  Hz) e 1,67 (1H, m), ambos ligados ao carbono em  $\delta$  47,15 (C-1), e também com os hidrogênios em  $\delta$  2,03 (1H, m) e 1,46 (1H, m) conectados ao carbono em  $\delta$  52,17 (C-3), sugerindo que o carbono em  $\delta$  64,47 (C-2) está conectado a dois carbonos metilênicos, conforme apresentado na Figura 28. A atribuição dos hidrogênios axiais e equatoriais foi realizada pelas correlações observadas no espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  – NOESY (Fig. 40, p. 57).

Figura 28 – Unidade estrutural 1 de SMF-1



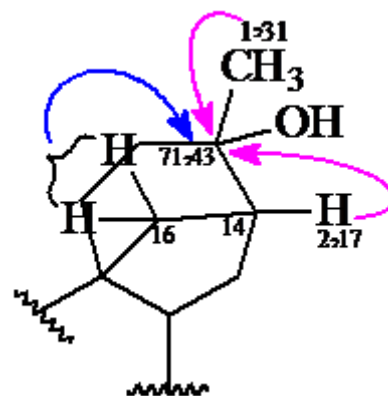
O espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC (Fig. 43, p. 59) mostrou correlações a duas ligações ( $^2J$ ), entre os hidrogênios em  $\delta$  1,67 e 2,36 (2H-1) com o carbono oxigenado em  $\delta$  64,47 (C-2), e a três ligações ( $^3J$ ) com o carbono em  $\delta$  52,17 (C-3); os hidrogênios em  $\delta$  1,46 e 2,03 (2H-3), também correlacionam ( $^2J$ ) com o carbono em  $\delta$  64,47 (C-2). Observaram-se correlações ( $^3J$ ) dos hidrogênios metílicos em  $\delta$  0,95 (3H-19) e 0,99 (3H-18) com os carbonos em  $\delta$  52,17 (C-3) e 47,40 (C-5) (Fig. 29).

Figura 29 – Unidades estruturais de SMF-1



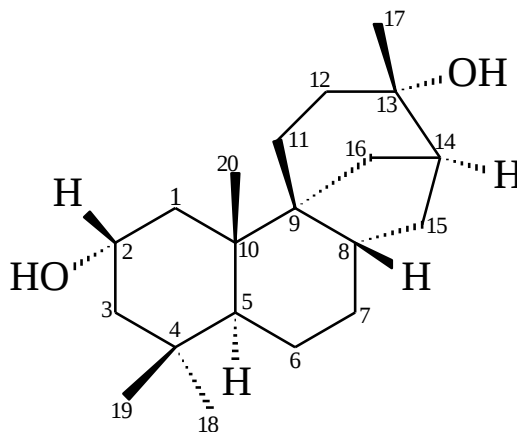
Os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,02 (3H-20) correlacionam a duas ligações ( $^2J$ ) com o carbono em  $\delta$  40,69 (C-10) e a três ligações ( $^3J$ ) com os carbonos em  $\delta$  47,15 (C-1) e 51,00 (C-9), confirmando a localização do grupo metila (C-20). Estas correlações sugerem as posições dos substituintes no anel A do diterpeno, conforme ilustrado na Figura 29.

O mesmo experimento mostrou correlações ( $^3J$ ) dos hidrogênios em  $\delta$  1,79 e 2,43 (2H-16) e a  $^2J$  com os hidrogênios em  $\delta$  1,31 (3H-20) e 2,17 (H-14) com o carbono oxigenado em  $\delta$  71,43 (C-13), permitindo sugerir a posição para a segunda hidroxila (Fig. 30).



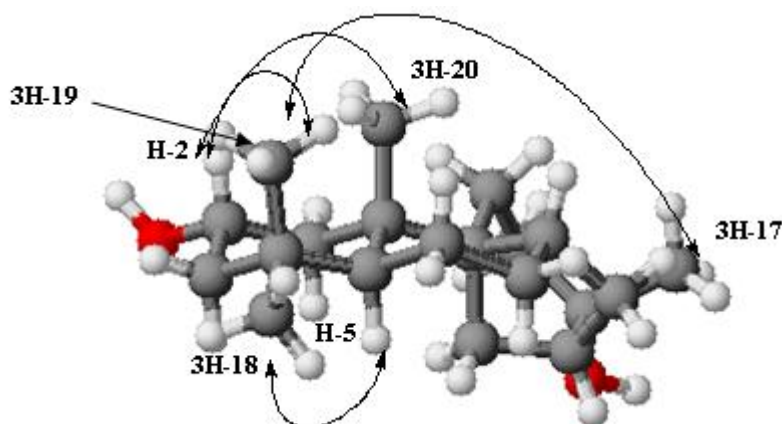
Os dados obtidos, aliados a comparação com a literatura (HUFFORD, 1988), permitiram sugerir para SMF-1 a estrutura do diterpeno estemodina (Fig. 31), já isolada anteriormente de *S. marítima* (LAMM; REYNOLDS; REESE, 2006; MARTIN; REYNOLDS; REESE, 2004; BUCHANAN; REESE, 2001; CHEN *et al.*, 2005). Os dados espectroscópicos de SMF-1 e da literatura são apresentados na Tabela 05 (p. 53).

Figura 31 – Estrutura de SMF-1 (Estemodina)



A determinação da estereoquímica relativa do composto foi obtida a partir da análise do espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  – NOESY (Fig. 40, p. 57). Observaram-se interações espaciais entre o hidrogênio em  $\delta$  4,06 (H-2) com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  0,95 (3H-19) e 1,02 (3H-20), assim como entre o sinal em  $\delta$  0,95 (3H-19) com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,31 (3H-17), estas interações sugerem que os hidrogênios dos grupos metila encontram-se no mesmo plano no espaço. Também foi observada a correlação entre os hidrogênios em  $\delta$  0,99 (3H-18) e o hidrogênio em  $\delta$  1,36 (H-5), posicionados abaixo do plano da molécula (Fig. 32).

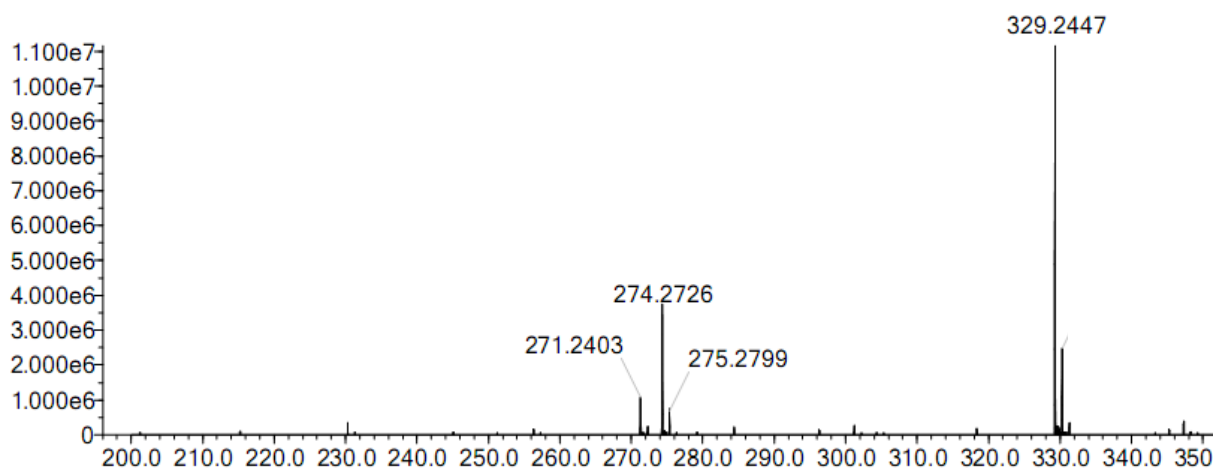
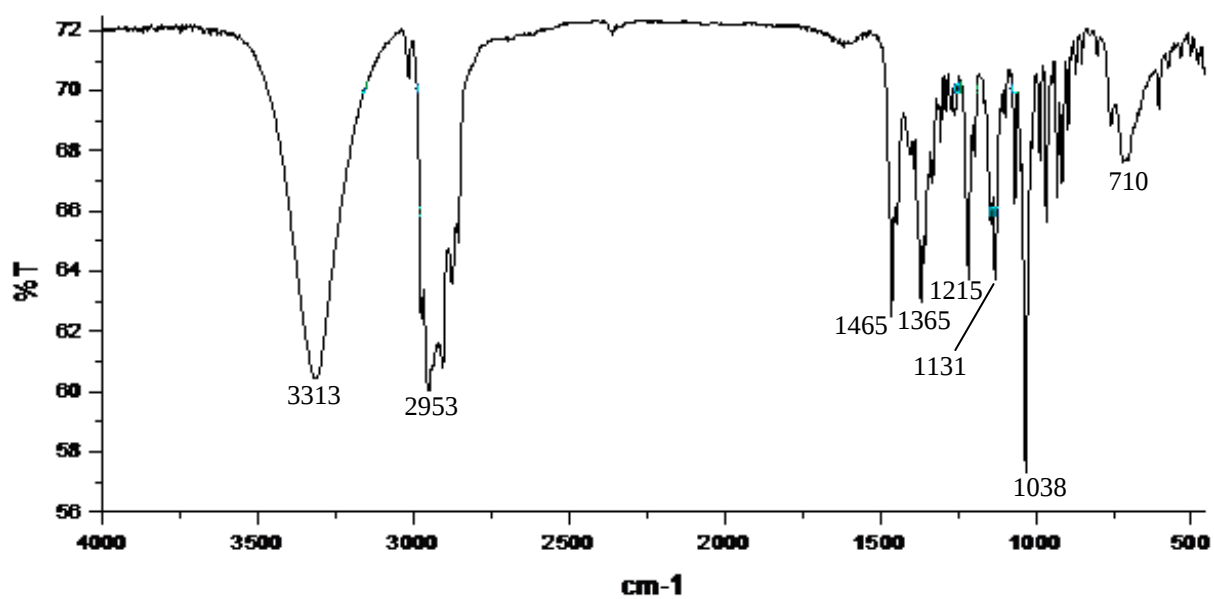
Figura 32 – Interações espaciais entre os átomos de hidrogênio em SMF-1

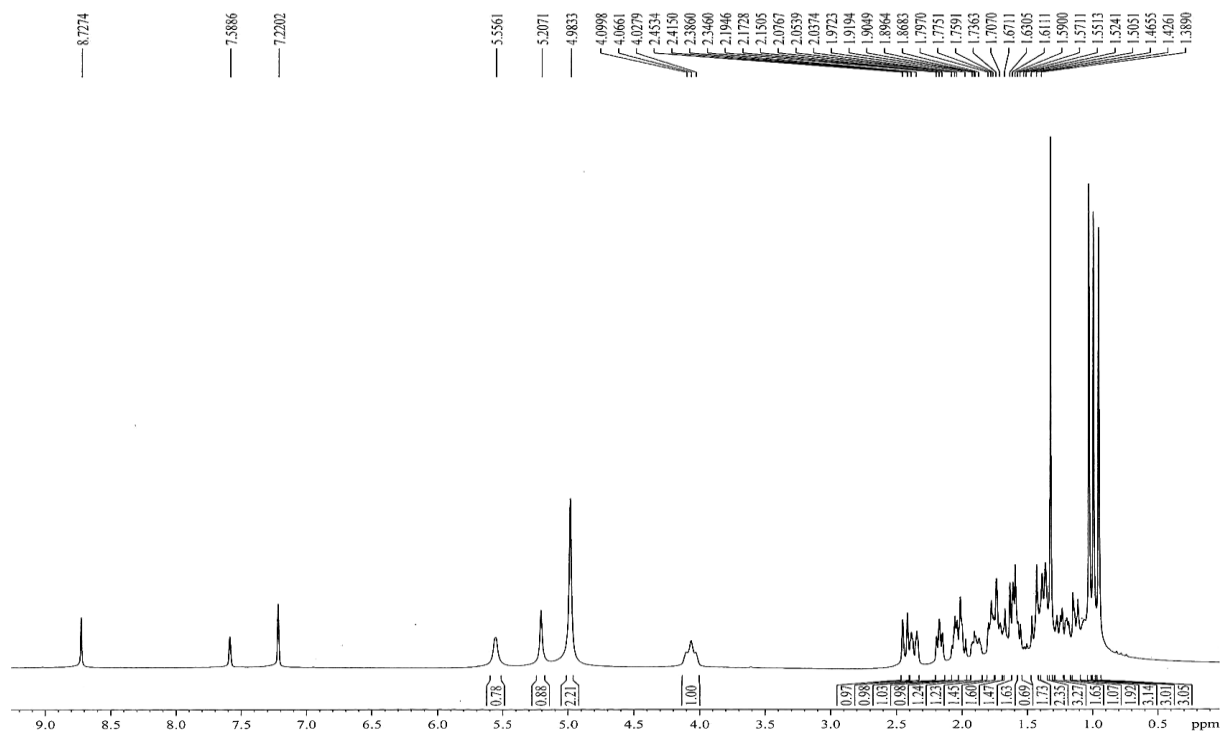
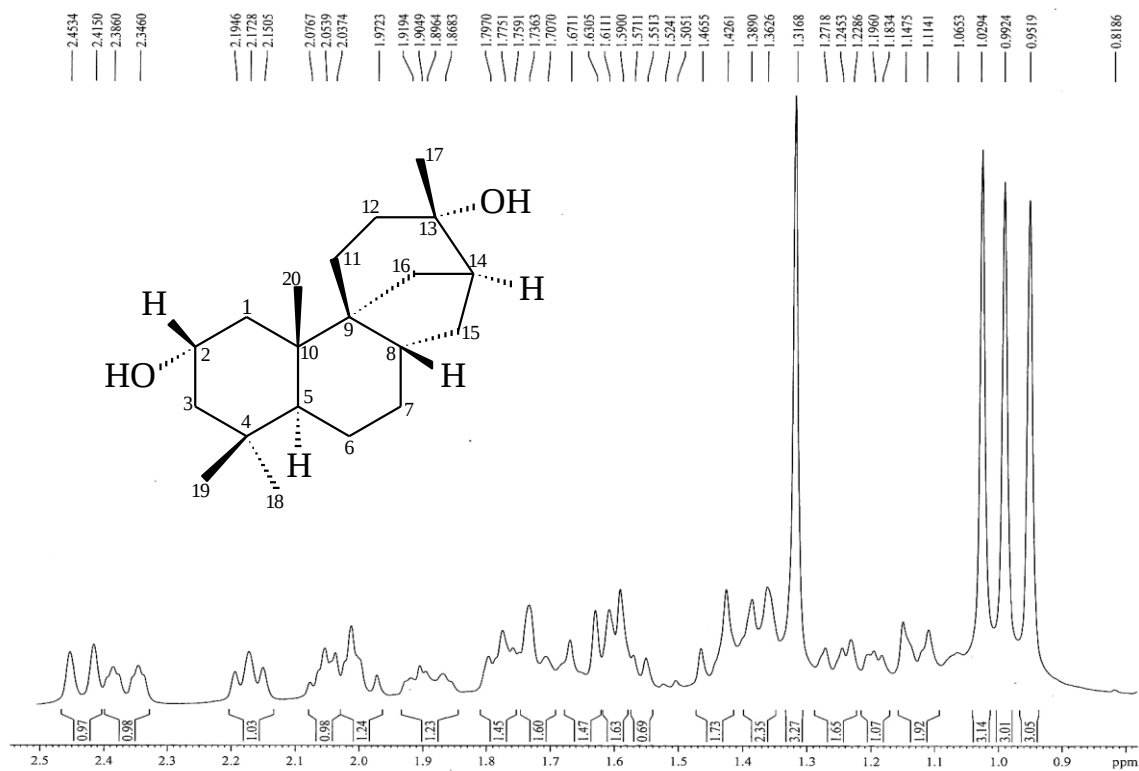


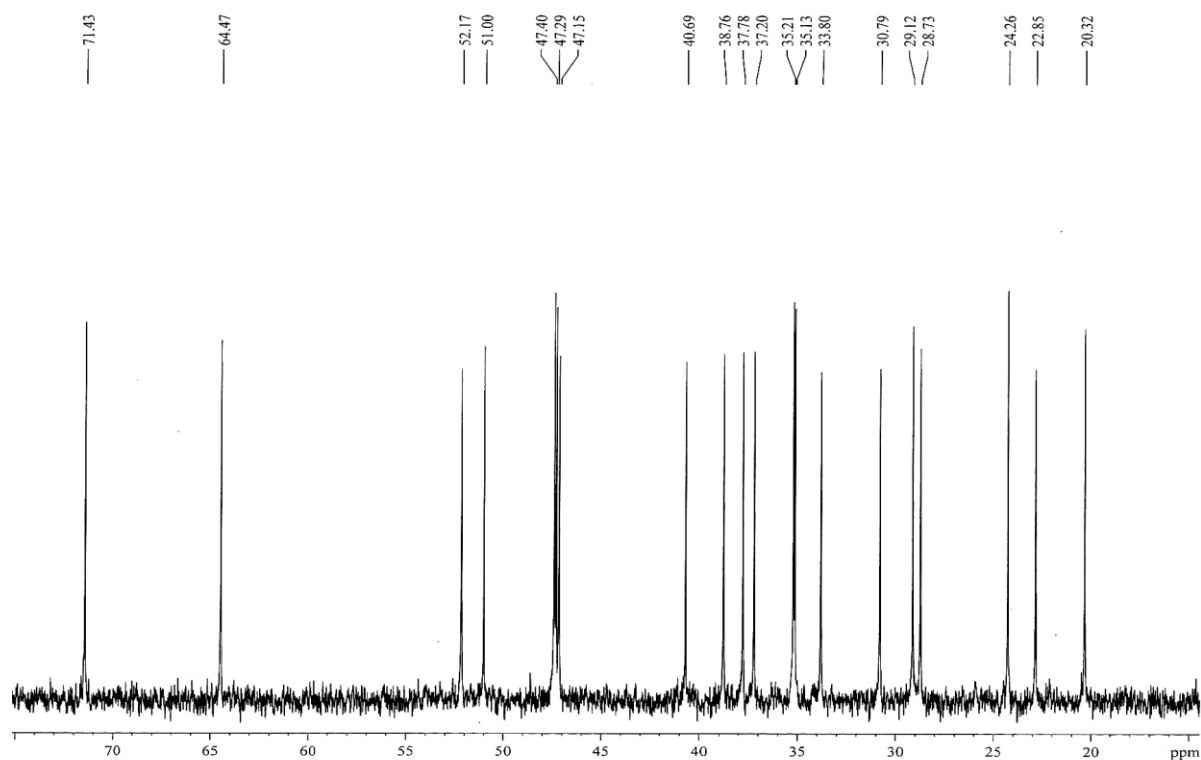
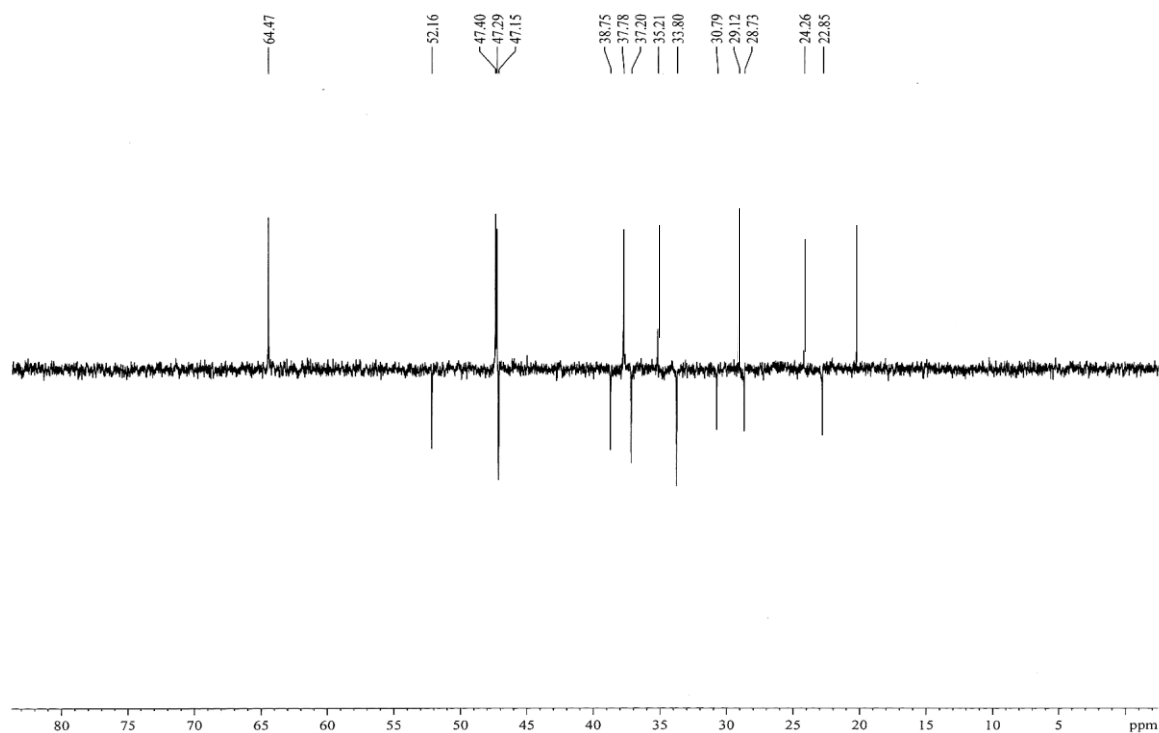
**Tabela 05** – Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de SMF-1 comparados com a literatura (HUFFORD, 1998).

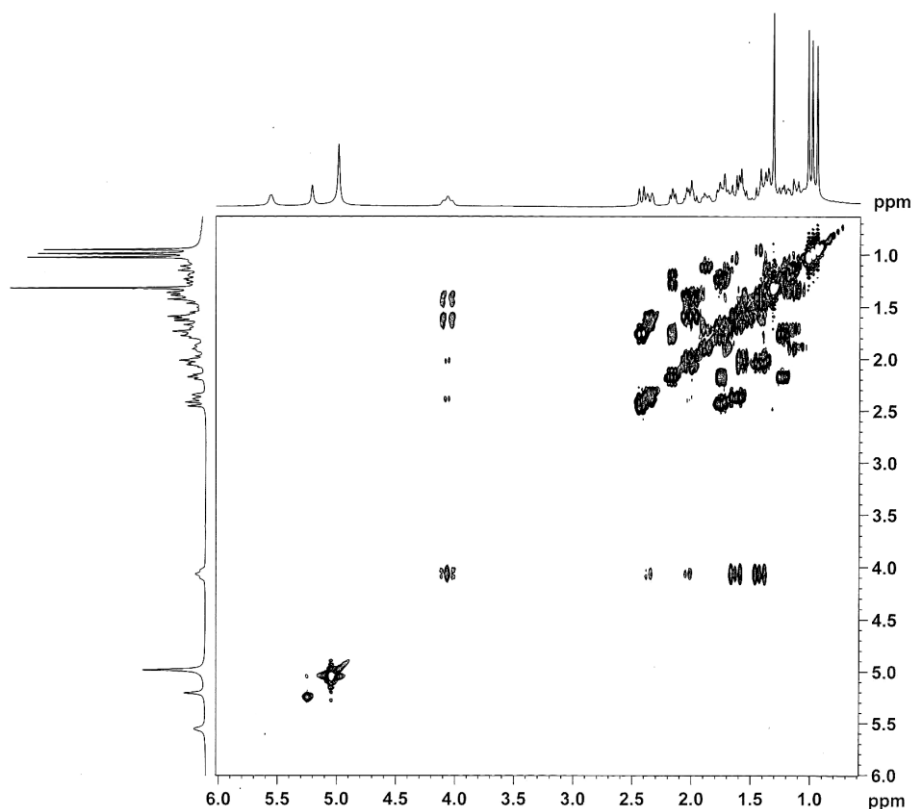
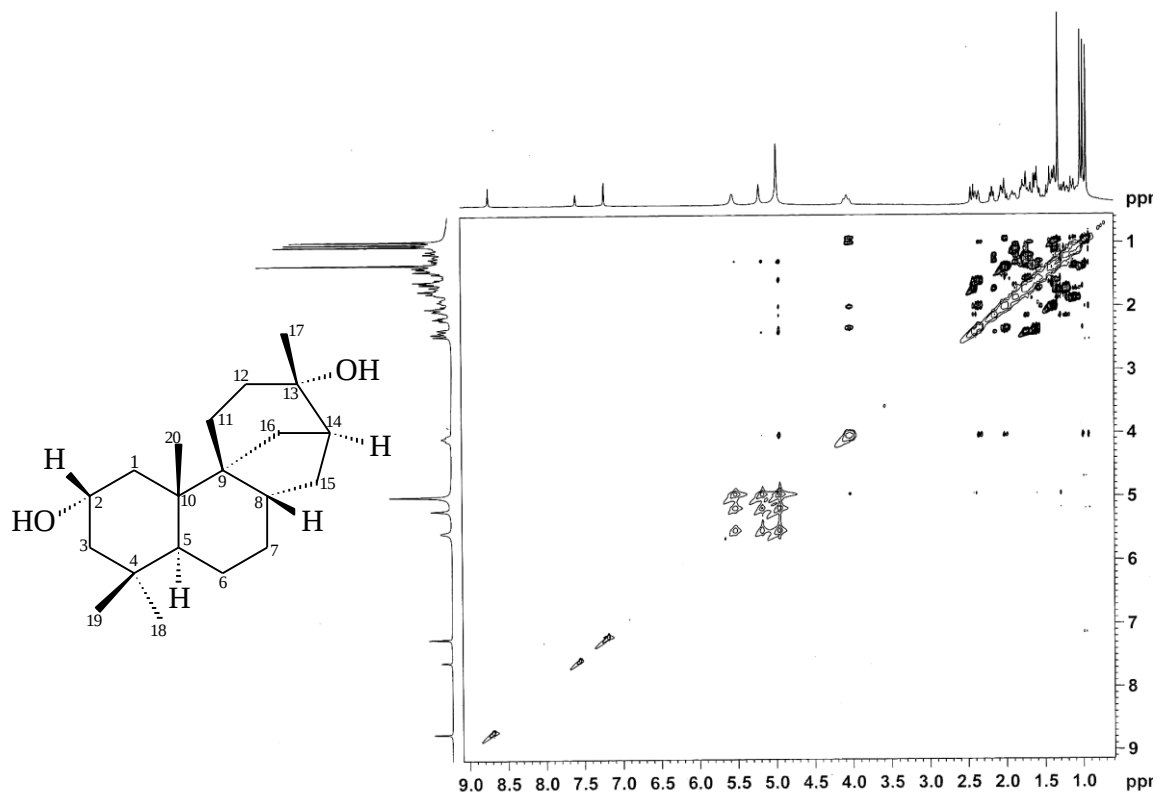
| SMF-1 <sup>a</sup> |                              |                          | HMBC                       |                                      | LIT. <sup>a</sup>        |                          |
|--------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| C                  | $\delta$ H (mult., J/Hz)     | $\delta$ $^{13}\text{C}$ | $^2J_{\text{C-H}}$         | $^3J_{\text{C-H}}$                   | $\delta$ H (mult., J/Hz) | $\delta$ $^{13}\text{C}$ |
| 1                  | 1,67 (m);<br>2,36 (dt; 12,0) | 47,15                    |                            | 2H-3; 3H-20                          | 1,60 (m); 2,35<br>(ddd)  | 46,5                     |
| 2                  | 4,06 (m)                     | 64,47                    | 2H-1; 2H-3                 |                                      | 4,05 (m)                 | 64,1                     |
| 3                  | 1,46 (m); 2,03 (m)           | 52,17                    |                            | 2H-1; 3H-18;<br>3H-19                | 1,35 (m); 2,00 (m)       | 51,5                     |
| 4                  | -                            | 35,13                    | 2H-3; H-5;<br>3H-18; 3H-19 |                                      | -                        | 34,7                     |
| 5                  | 1,36 (m)                     | 47,40                    | 2H-6                       | 2H-7; 3H-18;<br>3H-19; 3H-20         | 1,40 (m)                 | 47,0                     |
| 6                  | 1,14 (m); 1,38 (m)           | 22,85                    | 2H-7                       |                                      | 1,20 (m); 1,40 (m)       | 22,4                     |
| 7                  | 1,11 (m); 1,90 (m)           | 37,20                    |                            | 2H-15                                | 1,10 (m); 1,90 (m)       | 36,8                     |
| 8                  | 1,73 (m)                     | 37,78                    | 2H-7; 2H-15                | H-14; 2H-16                          | 1,75 (m)                 | 37,4                     |
| 9                  | -                            | 51,00                    | 2H-11; 2H-16               | H-7; 2H-12;<br>H-14; 2H-15;<br>3H-20 | -                        | 50,5                     |
| 10                 | -                            | 40,69                    | 2H-1; H-5;<br>3H-20        | 2H-6                                 | -                        | 40,2                     |
| 11                 | 1,42 (m); 2,05 (m)           | 28,73                    | 2H-12                      | H-8; 2H-16                           | 1,40 (m); 2,00 (m)       | 28,3                     |
| 12                 | 1,63 (m)                     | 33,80                    | 2H-11                      | H-14; 3H-17                          | 1,60 (m)                 | 33,3                     |
| 13                 | -                            | 71,43                    |                            |                                      | -                        | 71,1                     |
| 14                 | 2,17 (m)                     | 47,29                    | 2H-15; 2H-16               | 2H-12; 3H-17                         | 2,16 (dd)                | 46,9                     |
| 15                 | 1,24 (m); 1,75 (m)           | 38,76                    |                            | 2H-7                                 | 1,20 (m); 1,70 (m)       | 38,3                     |
| 16                 | 1,79 (m);<br>2,43 (d; 11,5)  | 30,79                    |                            | H-8; 2H-11;<br>H-15                  | 1,75 (m); 2,41 (d)       | 30,4                     |
| 17                 | 1,31 (s)                     | 29,12                    |                            | H-14                                 | 1,30 (s)                 | 28,6                     |
| 18                 | 0,99 (s)                     | 35,21                    |                            | 2H-3; 3H-19                          | 0,98 (s)                 | 34,8                     |
| 19                 | 0,95 (s)                     | 24,26                    |                            | 2H-3; 3H-18                          | 0,94 (s)                 | 23,8                     |
| 20                 | 1,02 (s)                     | 20,32                    |                            | 2H-1; H-5                            | 1,02 (s)                 | 19,8                     |

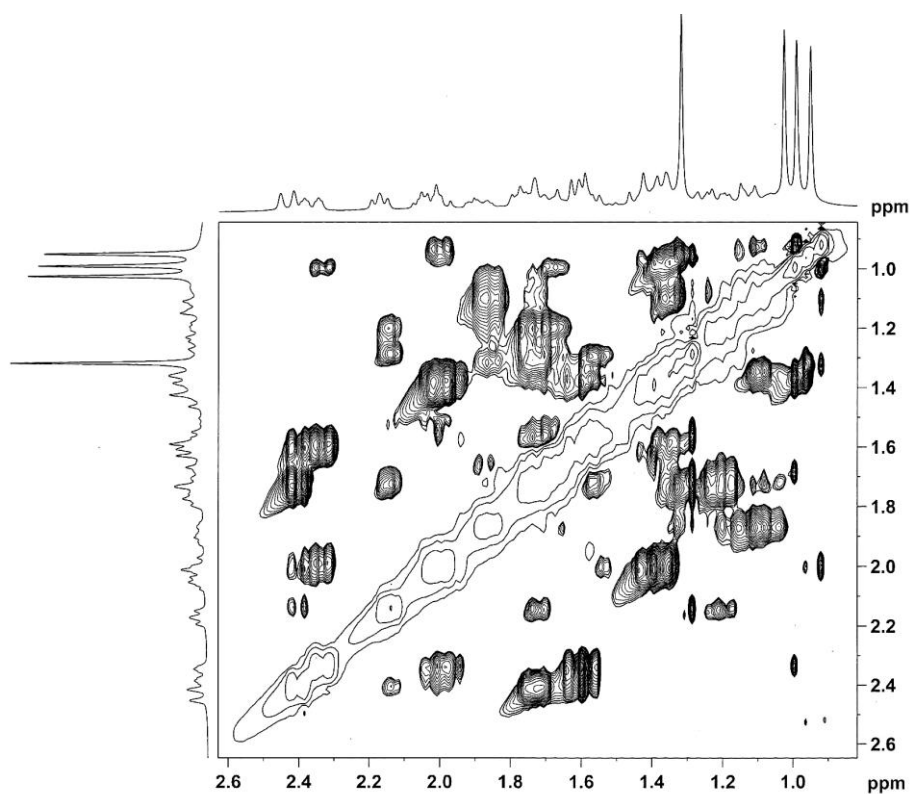
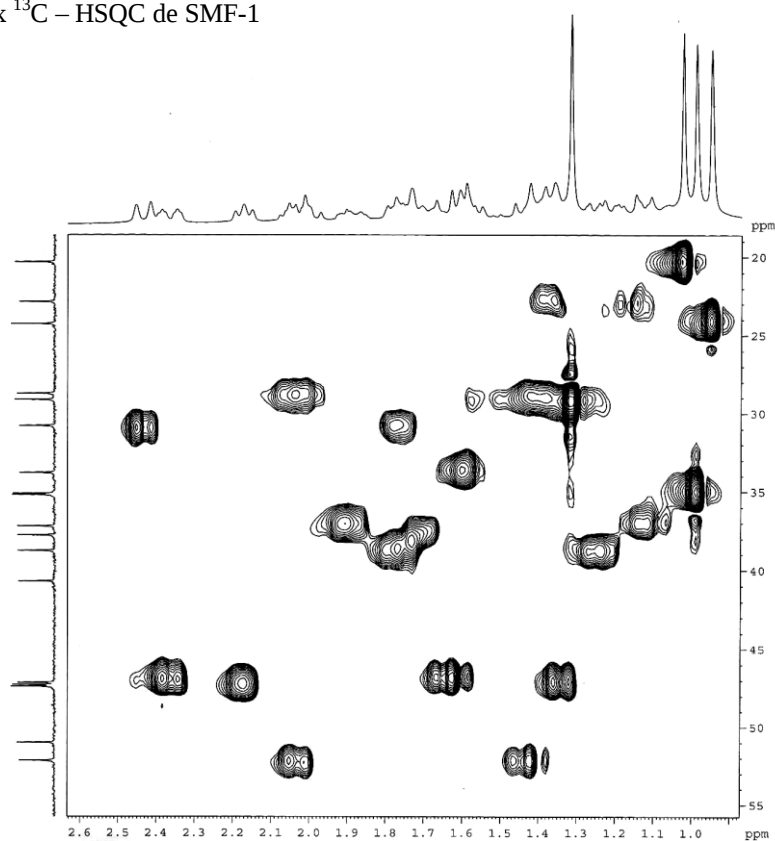
<sup>a</sup> – piridina- $d_5$

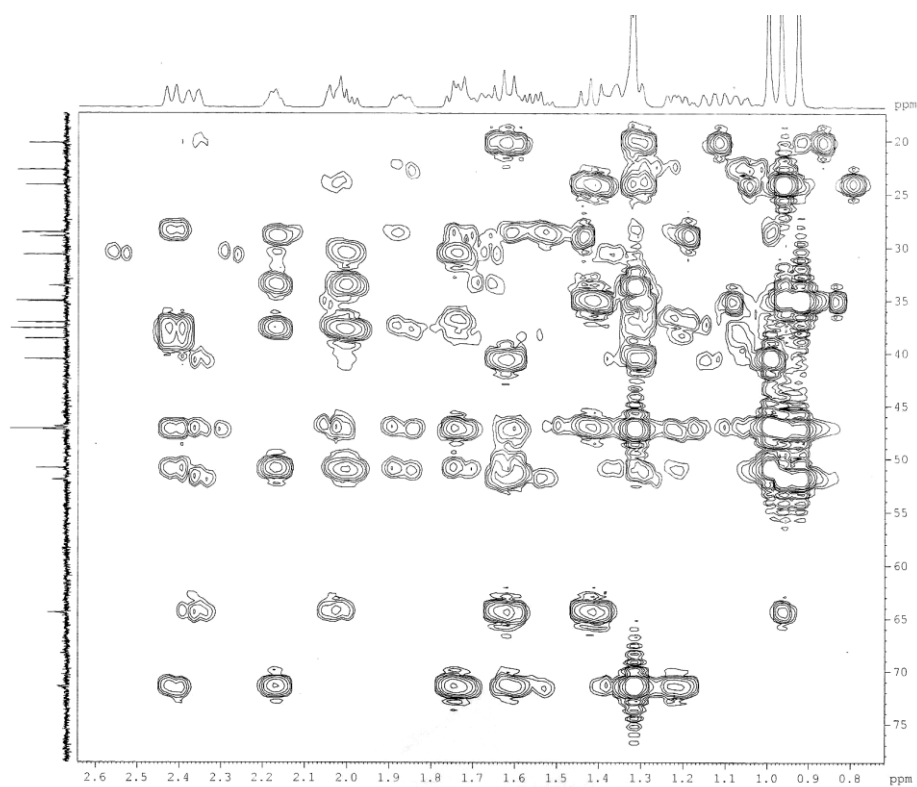
**Figura 33** – Espectro de massa IES de SMF-1**Figura 34** – Espectro de absorção na região do infravermelho de SMF-1 (KBr)

**Figura 35** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-1**Figura 36** – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-1

**Figura 37** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-1**Figura 38** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – DEPT 135° (75 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-1

**Figura 39** – Espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY– de SMF-1**Figura 40** – Espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  – NOESY de SMF-1

**Figura 41** – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  – NOESY de SMF-1**Figura 42** – Espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HSQC de SMF-1

**Figura 43** – Espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC (500 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-1

#### 4.4 Determinação estrutural de SMF-2

O fracionamento cromatográfico de SMFED de *S. maritima* (item 5.5.3.1, p. 88) conduziu à obtenção de um sólido branco amorfo, com ponto de fusão de 171,1 °C e  $[\alpha]_D^{21} + 32,08$  (c. 0,10, CHCl<sub>3</sub>) denominado SMF-2. Seu espectro de massa obtido por ionização por *electrospray* (EM-IES) mostrou pico para o íon  $[M+H]^+$  com  $m/z$  de 307,1910 Da.

Seu espectro de absorção na região do infravermelho IV (Fig. 49, p. 64) apresentou uma banda em 3370 cm<sup>-1</sup> relacionada à deformação axial de ligação O–H, sugerindo a presença de hidroxila; apresentou também uma absorção em 2932 cm<sup>-1</sup> relacionada a deformação axial de ligação C–H de carbonos saturados  $sp^3$ ; o espectro mostrou ainda bandas em 1463 e 1379 cm<sup>-1</sup> referentes a deformações angulares de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, respectivamente; uma absorção em 1045 cm<sup>-1</sup> associada à deformação axial de ligação C–O.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C – BBD, obtido em piridina-*d*<sub>5</sub> (Fig. 53, p. 66), apresentou vinte linhas espectrais. Observaram-se dois sinais em  $\delta$  72,59 (C-13) e 71,94 (C-18) atribuídos a carbonos  $sp^3$  oxigenados. A comparação com o espectro de RMN <sup>13</sup>C – DEPT 135° (Fig. 54, p. 66), possibilitou atribuir os sinais em  $\delta$  72,59 (C-13); 52,51 (C-9); 39,36 (C-10) e 38,88 (C-4) a carbonos não hidrogenados; o espectro permitiu identificar três carbonos metínicos em  $\delta$  49,64 (C-14); 42,74 (C-5) e 39,95 (C-8); foram observados também dez sinais com amplitude negativa no espectro DEPT 135° para os carbonos em  $\delta$  71,94 (C-18); 40,45 (C-12); 36,82 (C-3); 32,69 (C-1); 31,37 (C-7); 30,46 (C-15); 28,15 (C-16); 27,40 (C-11); 23,40 (C-6) e 19,32 (C-2). O experimento também permitiu verificar a presença de três carbonos metílicos em  $\delta$  30,34 (C-17); 18,89 (C-19) e 17,72 (C-20).

Este resultado gerou a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a quatro. Como não foram observados sinais para carbonos  $sp^2$ , os graus de insaturação foram atribuídos a anéis e analisando os dados discutidos até aqui, nota-se que existe grande semelhança com SMF-1, também sugerindo uma estrutura para SMF-2 de um diterpeno tetracíclico dihidroxilado.

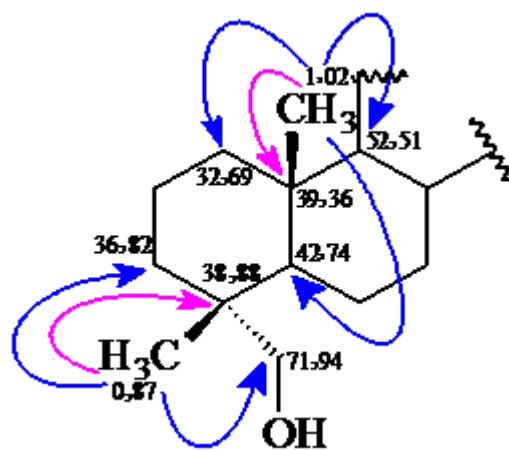
O espectro de RMN <sup>1</sup>H de SMF-2 (Fig. 50, p. 64) apresentou três singletos em  $\delta$  1,31; 1,02 e 0,87 integrados cada um para três hidrogênios, característicos de grupos metila. O

espectro mostrou também dois duplos dubletos centrados em  $\delta$  3,66 e 3,32 (dd,  $J = 12,0$  e  $3,0$  Hz), que de acordo com o espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY (Fig. 55, p. 67), estão acoplados entre si caracterizando dois hidrogênios metilênicos de carbono oxigenado.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HSQC (Fig. 57, p. 68) permitiu relacionar, de forma inequívoca, cada sinal de hidrogênio ao seu carbono Tabela 06 (p. 63).

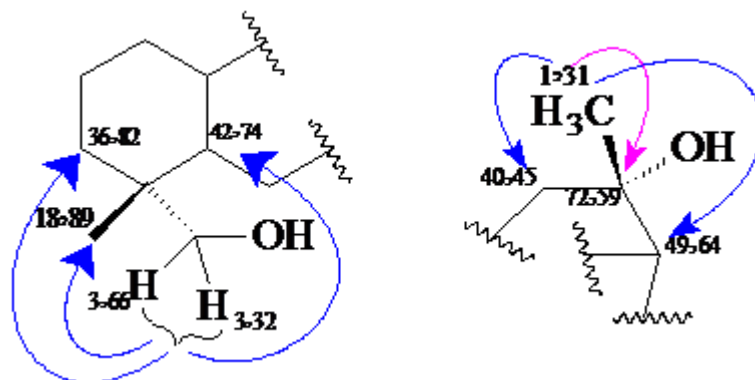
O espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC (Fig. 59, p. 69) mostrou correlações a duas ligações ( $^2J$ ), entre os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,02 (3H-20) e o carbono em  $\delta$  39,36 (C-10), e a três ligações ( $^3J$ ) com os carbonos em  $\delta$  32,69 (C-1); 42,74 (C-5) e 52,51 (C-9). Os hidrogênios metílicos em  $\delta$  0,87 (3H-19) correlacionam ( $^3J$ ) com os carbonos em  $\delta$  36,82 (C-3) e 71,94 (C-18) e a duas ligações ( $^2J$ ) com o carbono em  $\delta$  38,88 (C-4), permitindo sugerir a localização dos carbonos metílicos em  $\delta$  17,72 (C-20) e 18,89 (C-19) conforme Figura 44.

Figura 44 – Unidade estrutural de SMF-2



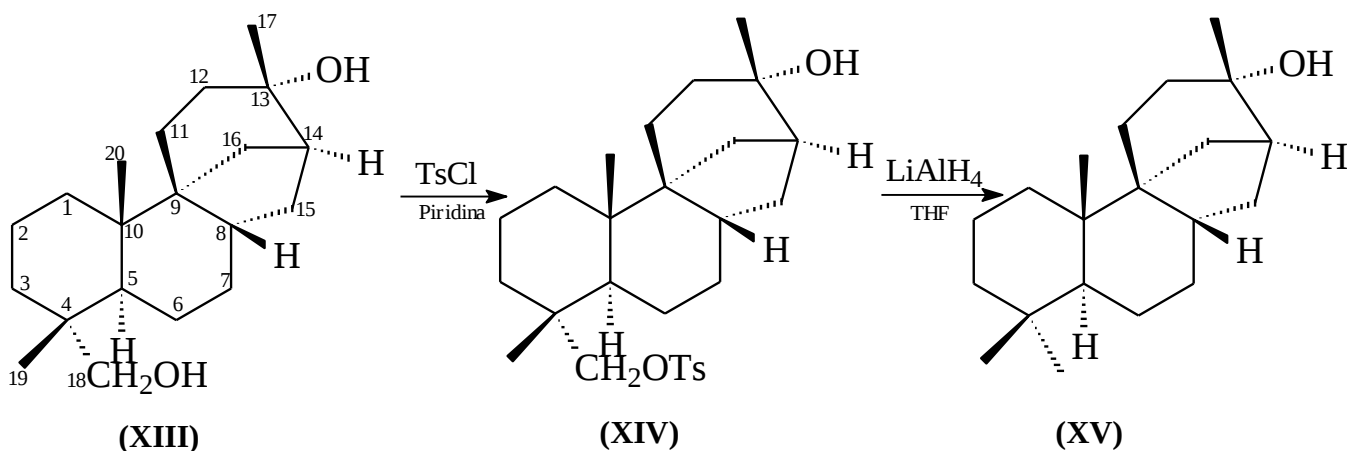
O mesmo experimento mostrou correlações a três ligações ( $^3J$ ) entre os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  3,66 e 3,32 (dd,  $J = 12,0$  e  $3,0$  Hz) com os carbonos em  $\delta$  18,89 (C-19); 36,82 (C-3) e 42,74 (C-5). Também observaram-se correlações entre o sinal para os hidrogênios em  $\delta$  1,31 (3H-17) com os carbonos em  $\delta$  40,45 (C-12) e 49,64 (C-14) a  $^3J$  e com o carbono em  $\delta$  72,59 (C-13) a  $^2J$  (Fig. 45).

Figura 45 – Unidades estruturais de SMF-2



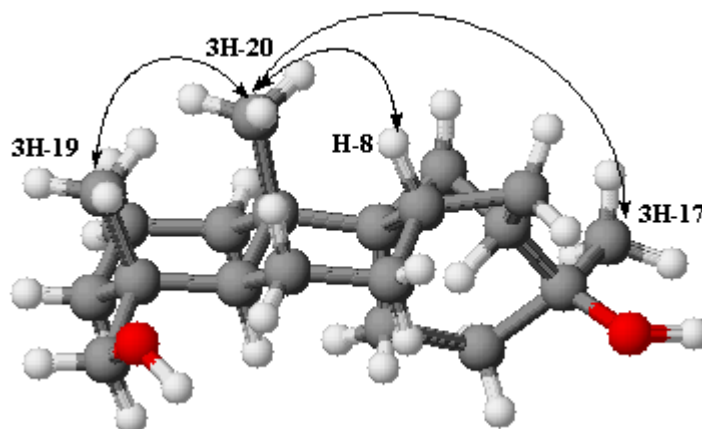
As correlações observadas no experimento HMBC e os dados até aqui obtidos, permitem sugerir para SMF-2 a estrutura do diterpeno estemodinol (composto XIII, Fig. 46). Este composto foi sintetizado por Kelly *et al.* (1982) e sua estrutura confirmada através de reações cujo produto mostrou-se idêntico ao composto XV por meio dos dados de IV, EM, RMN  $^1\text{H}$  e CCD em sílica gel (Fig. 46). Portanto, SMF-2 está sendo pela primeira vez obtido de fontes naturais, bem como os seus dados espectroscópicos relatados neste trabalho (Tab. 06, p. 63).

**Figura 46** – Esquema reacional de estemodinol / SMF-2 (XIII), seu respectivo tosilato (XIV) e 2-desoxiestemodinona (XV) (KELLY, *et al.*, 1982).



No espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  – NOESY (Fig. 56, p. 67), observaram-se interações espaciais entre o sinal para os hidrogênios em  $\delta$  0,87 (3H-19) com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,02 (3H-20), e estes com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,31 (3H-17) e o hidrogênio em  $\delta$  1,75 (H-8), indicando que os grupos metila encontram-se no mesmo lado do plano no espaço (Fig. 47)

**Figura 47** – Interações espaciais entre os átomos de hidrogênios em SMF-2



**Tabela 06** – Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de SMF-2 em piridina- $d_5$ .

| SMF-2 |                                                 |                        | HMBC               |                                     |
|-------|-------------------------------------------------|------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| C     | $\delta \text{H}$ (mult., J/Hz)                 | $\delta ^{13}\text{C}$ | $^2J_{\text{C-H}}$ | $^3J_{\text{C-H}}$                  |
| 1     | 1,43 (m)                                        | 32,69                  | H-2                | 3H-20                               |
| 2     | 1,72 (m); 1,56 (m)                              | 19,32                  | 2H-1               |                                     |
| 3     | 1,84 (m); 1,45 (m)                              | 36,82                  |                    | 2H-18; 3H-19                        |
| 4     | -                                               | 38,88                  | H-3; H-5; 3H-19    |                                     |
| 5     | 2,05 (m)                                        | 42,74                  | H-6                | H-3; H-7;<br>2H-18; 3H-19;<br>3H-20 |
| 6     | 1,73 (m); 1,34 (m)                              | 23,40                  | H-5; H-7           |                                     |
| 7     | 2,62 (m); 1,54 (m)                              | 31,37                  | 2H-6; H-8          | H-15                                |
| 8     | 1,75 (m)                                        | 39,95                  | 2H-7; 2H-15        | 2H-16                               |
| 9     | -                                               | 52,51                  | H-8; 2H-16         | H-5; 2H-7;<br>H-14; 2H-15;<br>3H-20 |
| 10    | -                                               | 39,36                  | 3H-20              |                                     |
| 11    | 1,58 (m); 1,49 (m)                              | 27,40                  |                    | H-16                                |
| 12    | 1,67 (m); 1,38 (m)                              | 40,45                  |                    | H-14; 3H-17                         |
| 13    | -                                               | 72,59                  | H-14; 3H-17        | H-11; 2H-16                         |
| 14    | 2,16 (m)                                        | 49,64                  | 2H-16              | 3H-17                               |
| 15    | 1,17 (m); 1,69 (m)                              | 30,46                  | H-14               | 2H-16                               |
| 16    | 2,75 (m); 1,42 (m)                              | 28,15                  |                    | H-8; 2H-15                          |
| 17    | 1,31 (s)                                        | 30,34                  |                    |                                     |
| 18    | 3,66 (dd; 12,0 e 3,0);<br>3,32 (dd; 12,0 e 3,0) | 71,94                  |                    | H-3; H-5; 3H-19                     |
| 19    | 0,87 (s)                                        | 18,89                  |                    | 2H-3; H-5;<br>2H-18                 |
| 20    | 1,02 (s)                                        | 17,72                  |                    | 2H-1; H-5                           |

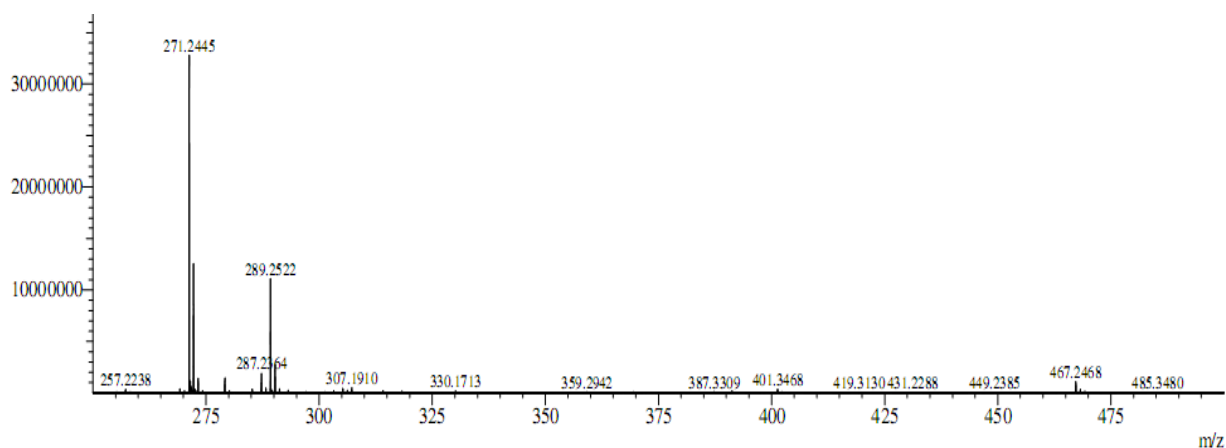
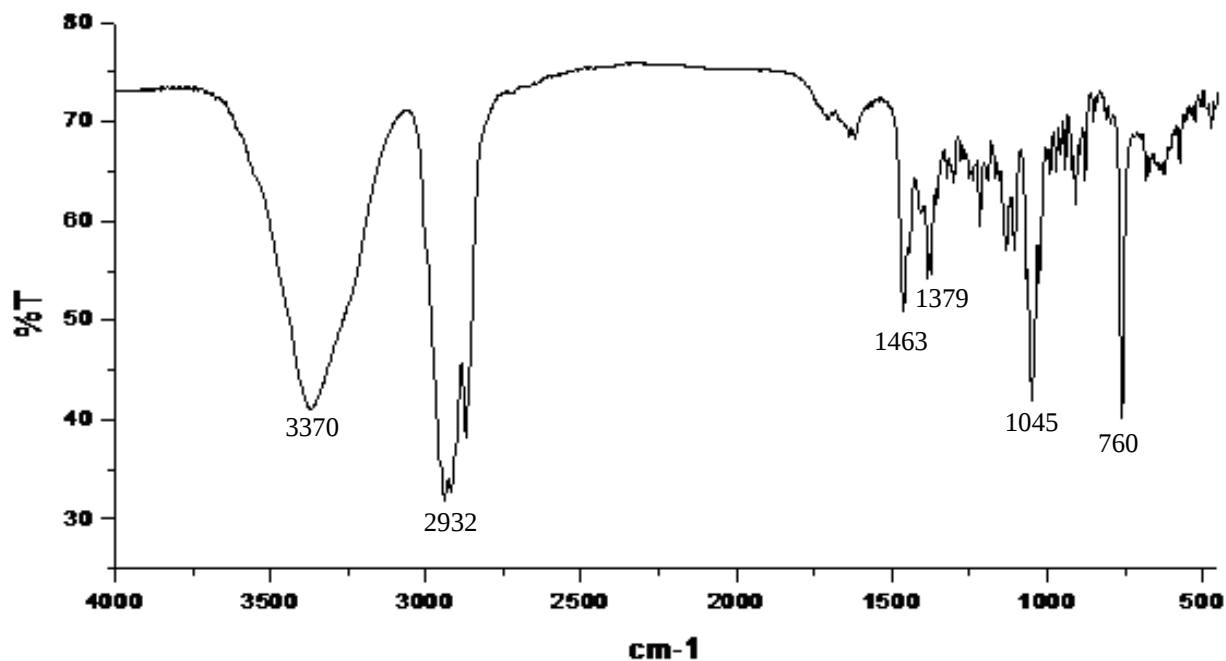
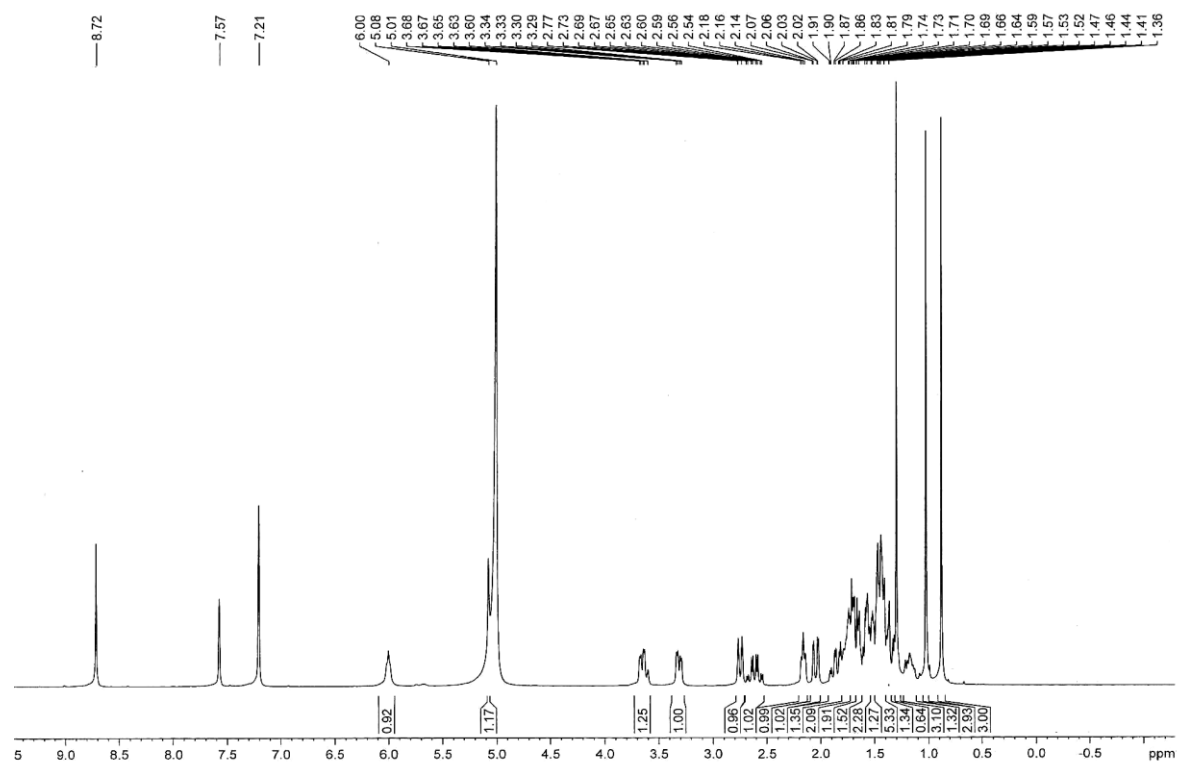
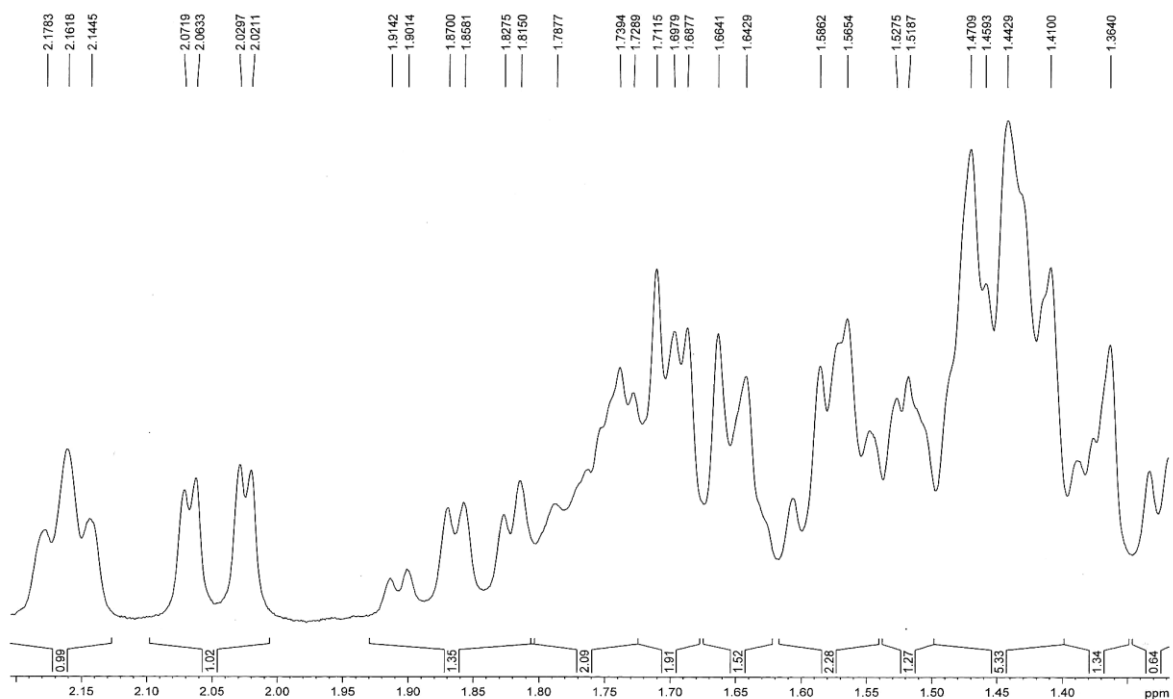
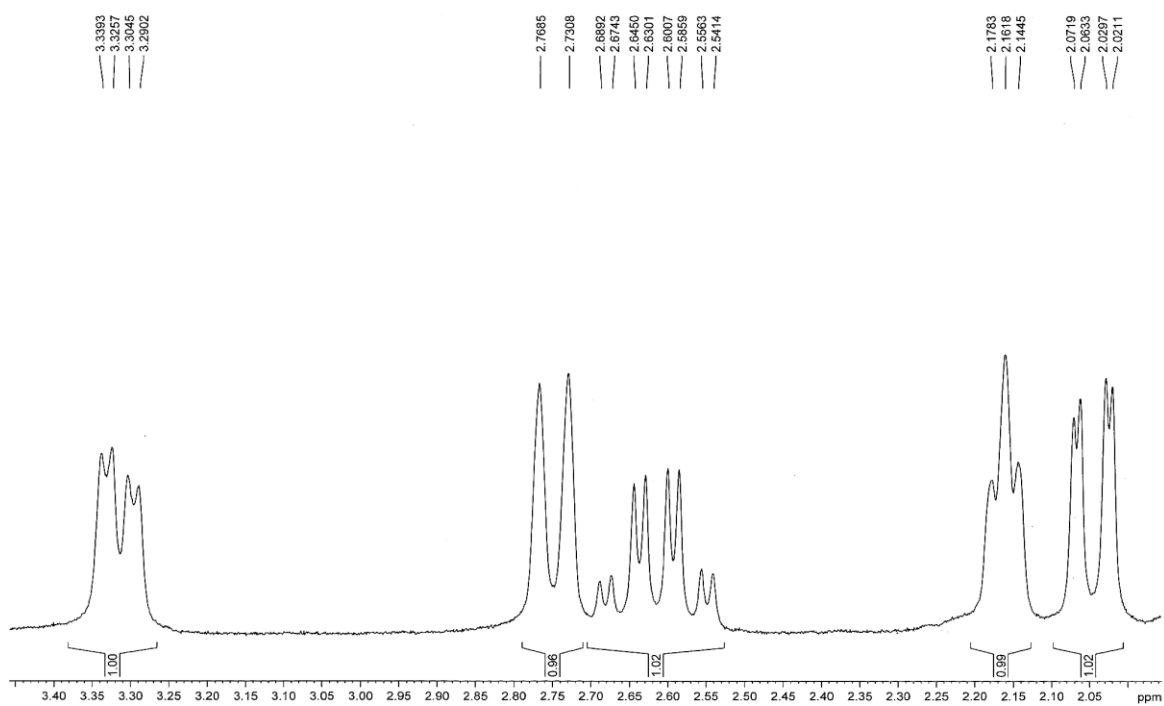
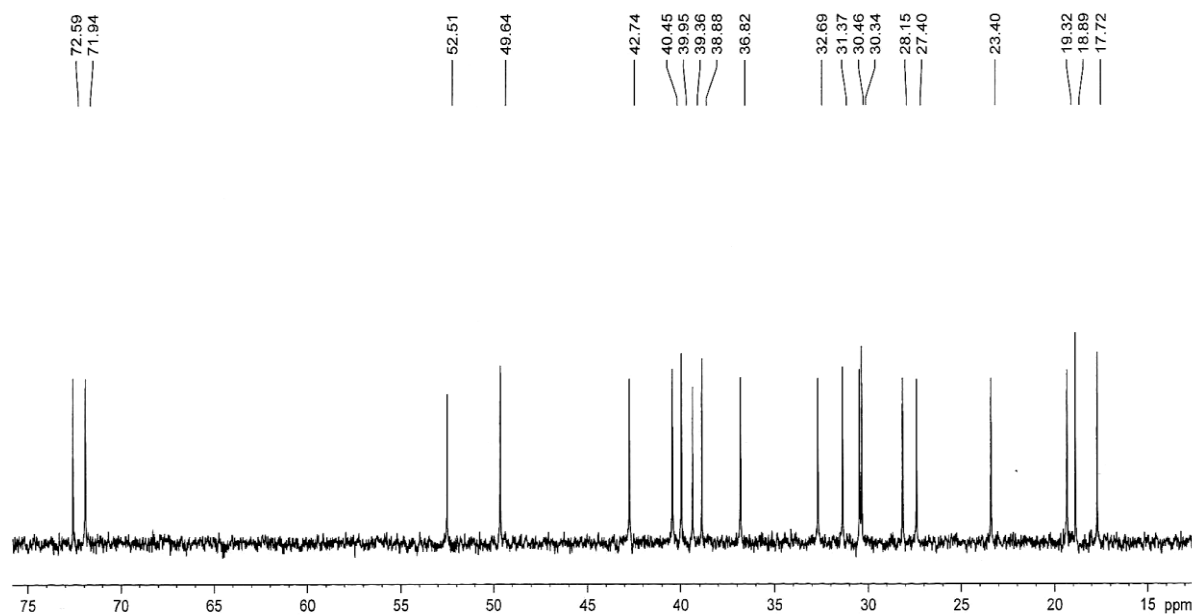
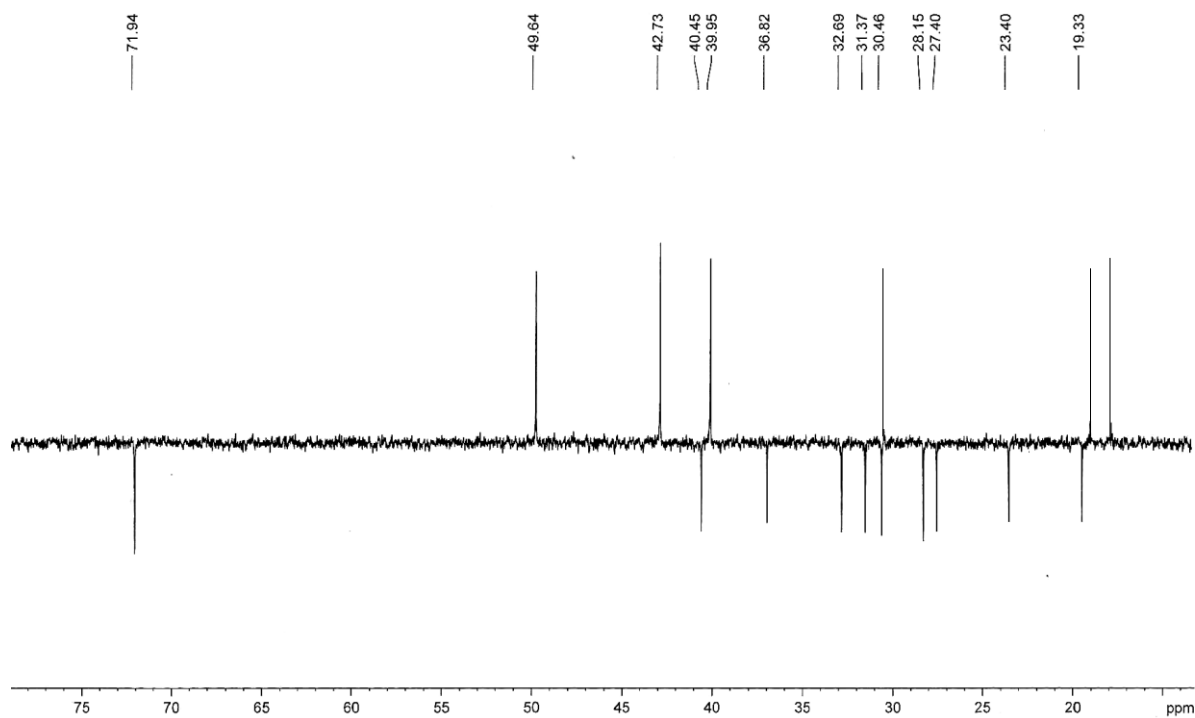
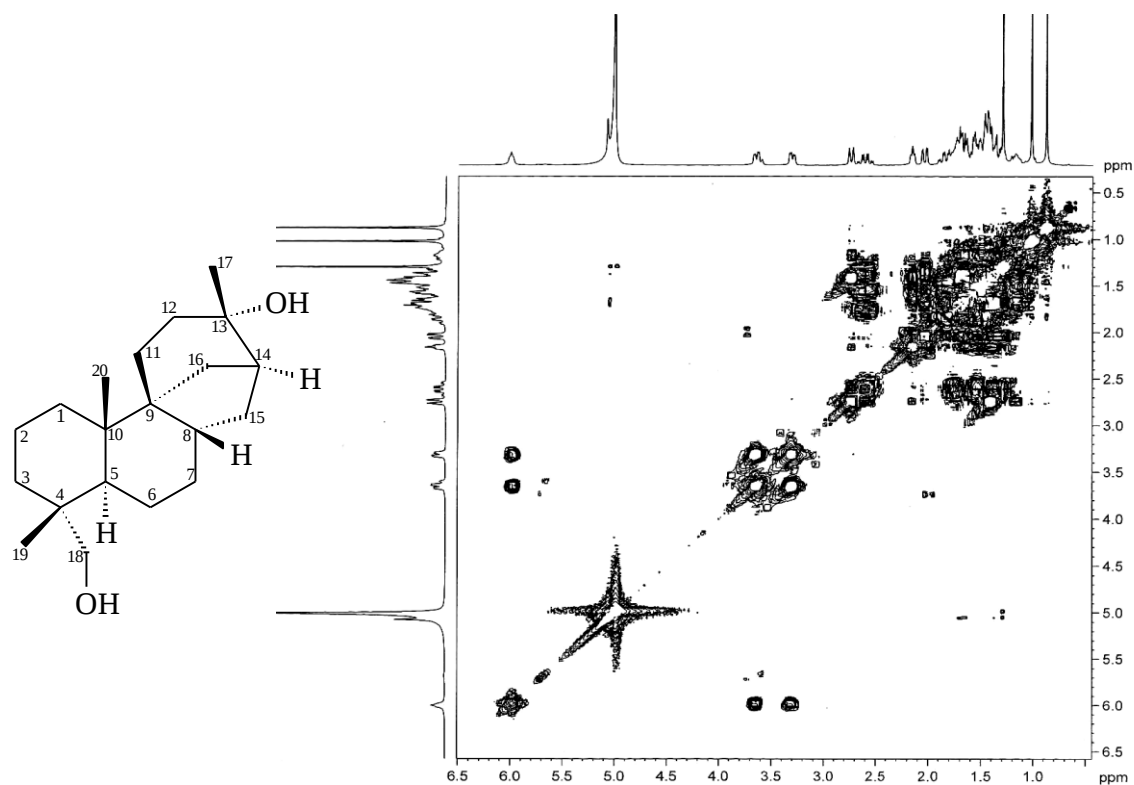
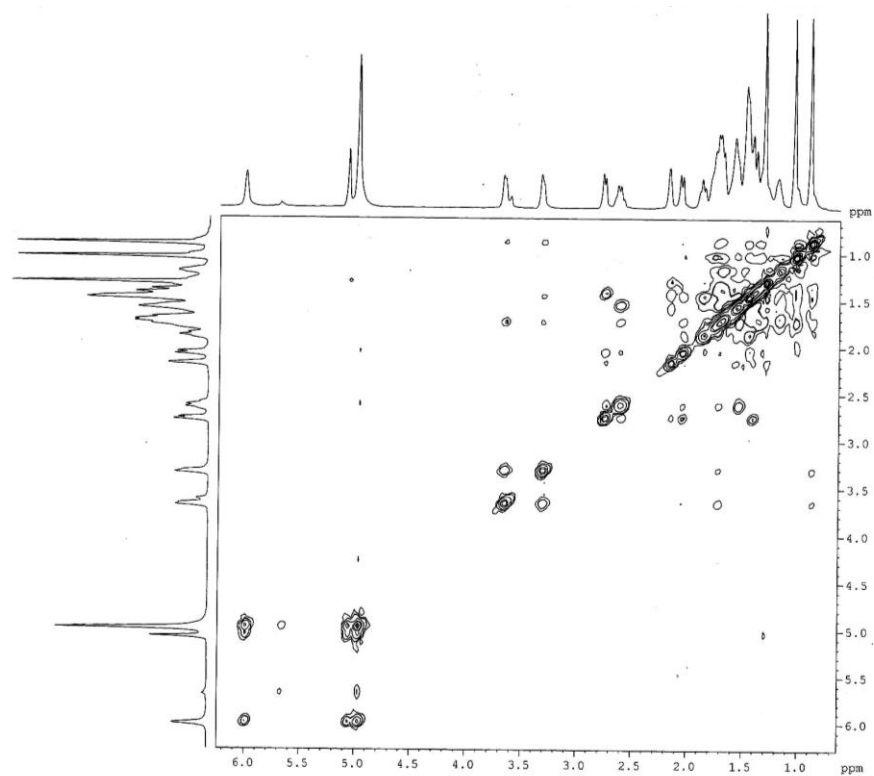
**Figura 48** – Espectro de massa IES de SMF-2

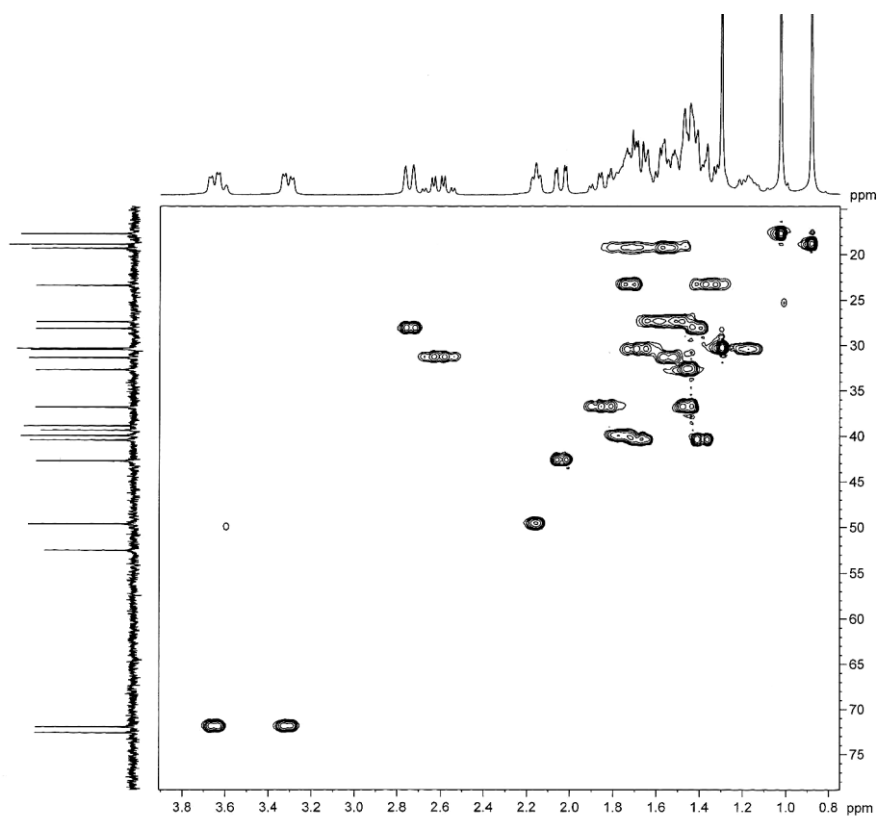
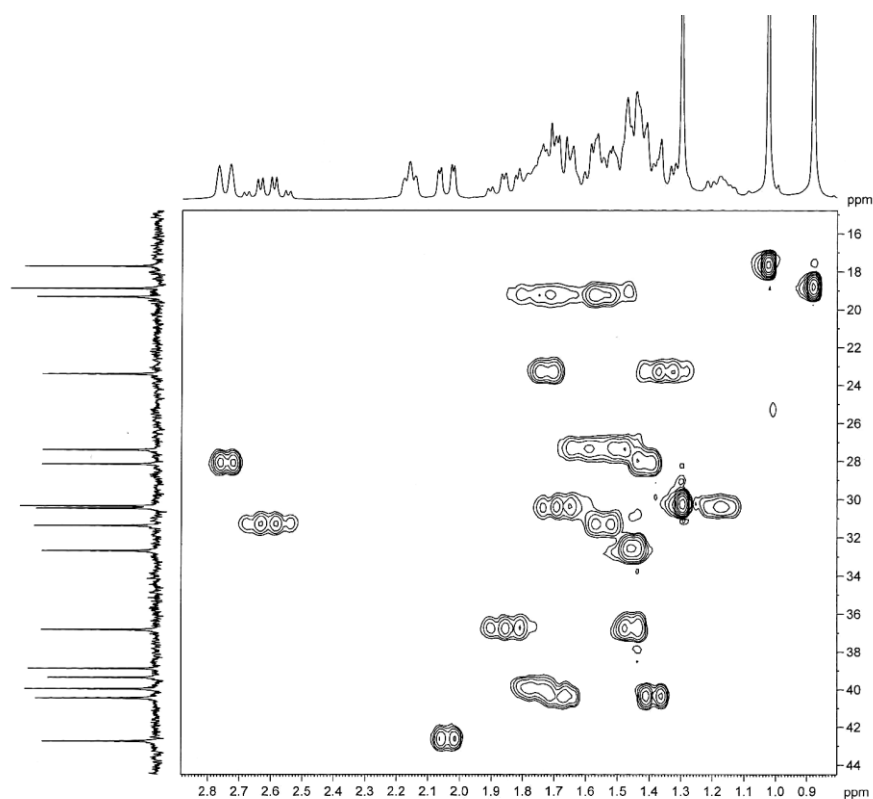
Figura 49 – Espectro de absorção na região do infravermelho de SMF-2 (KBr).

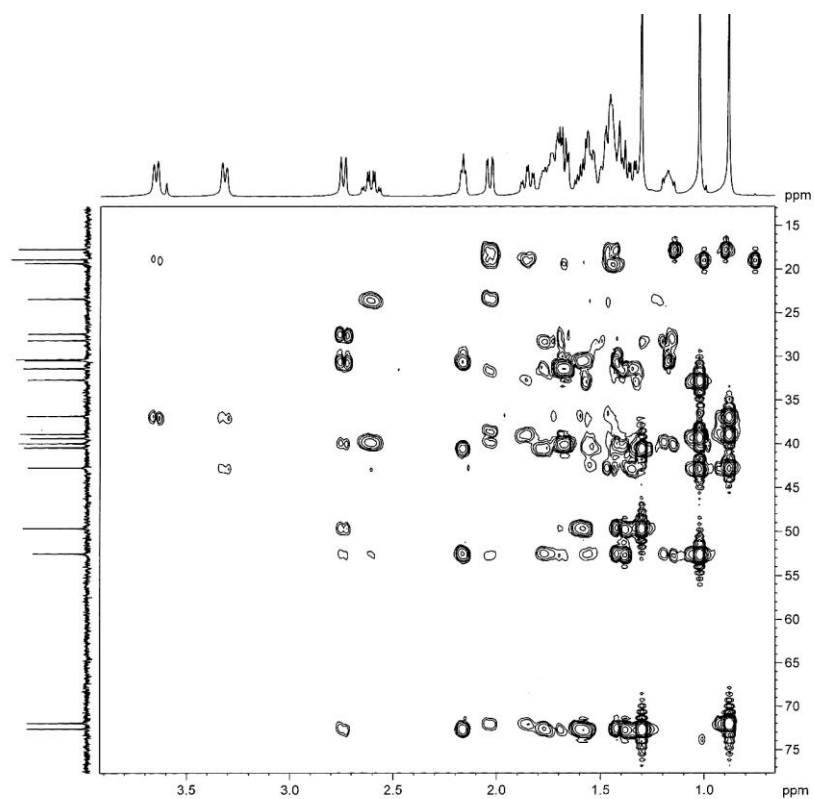
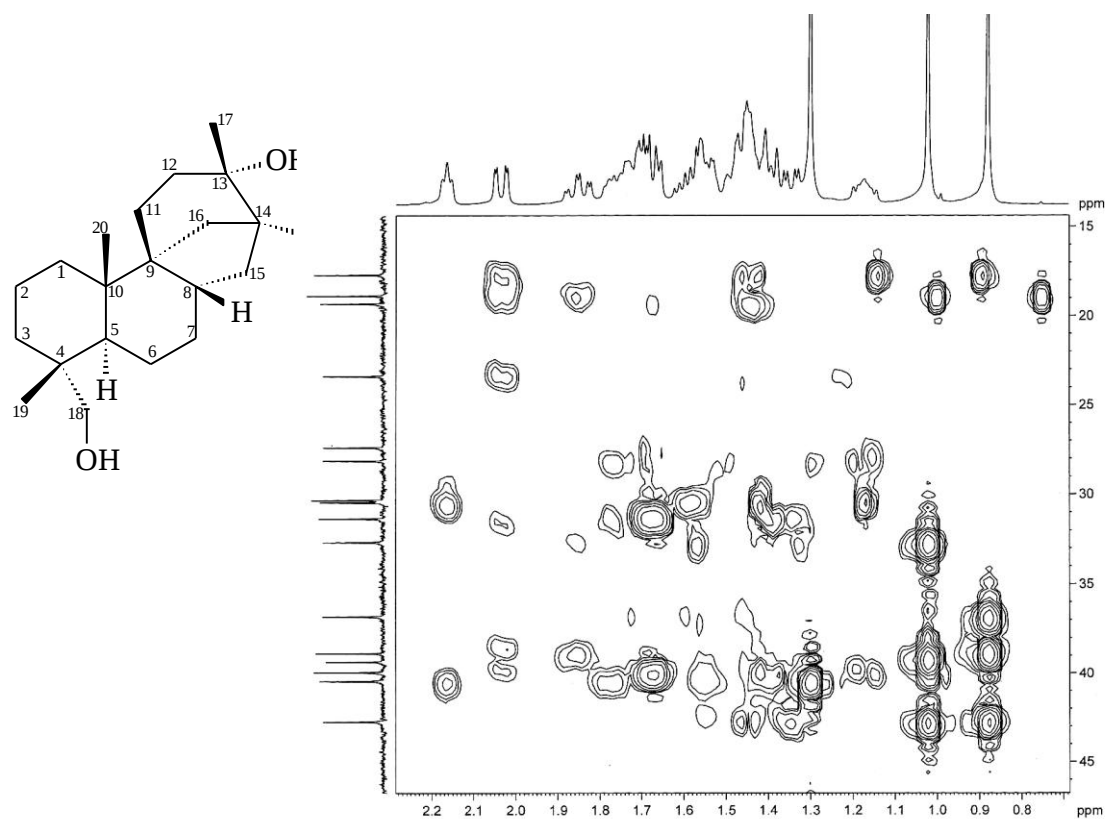
Figura 50 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2

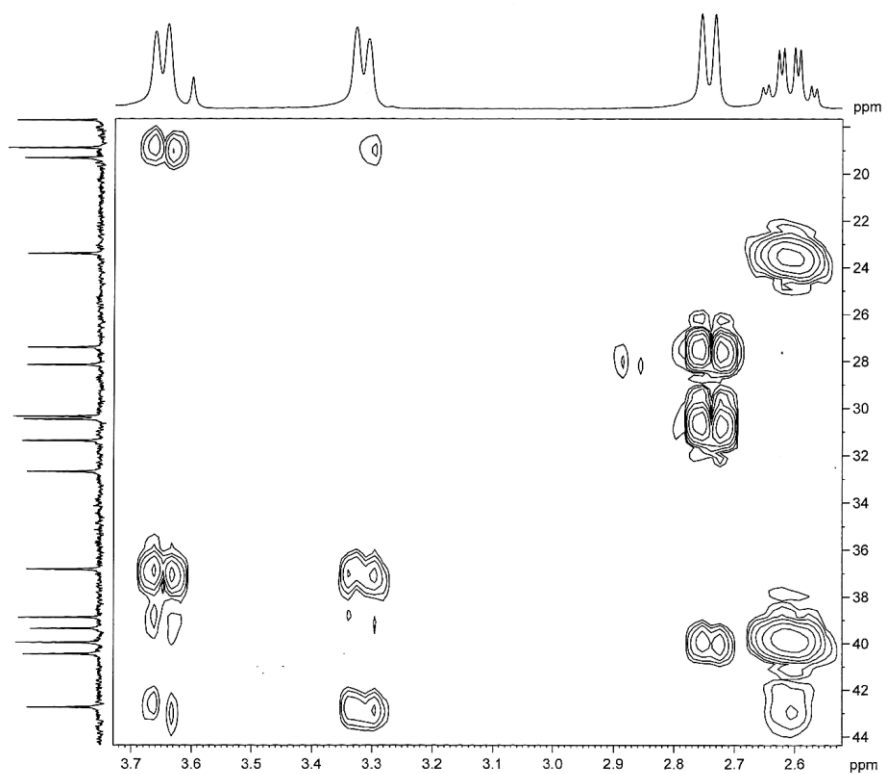
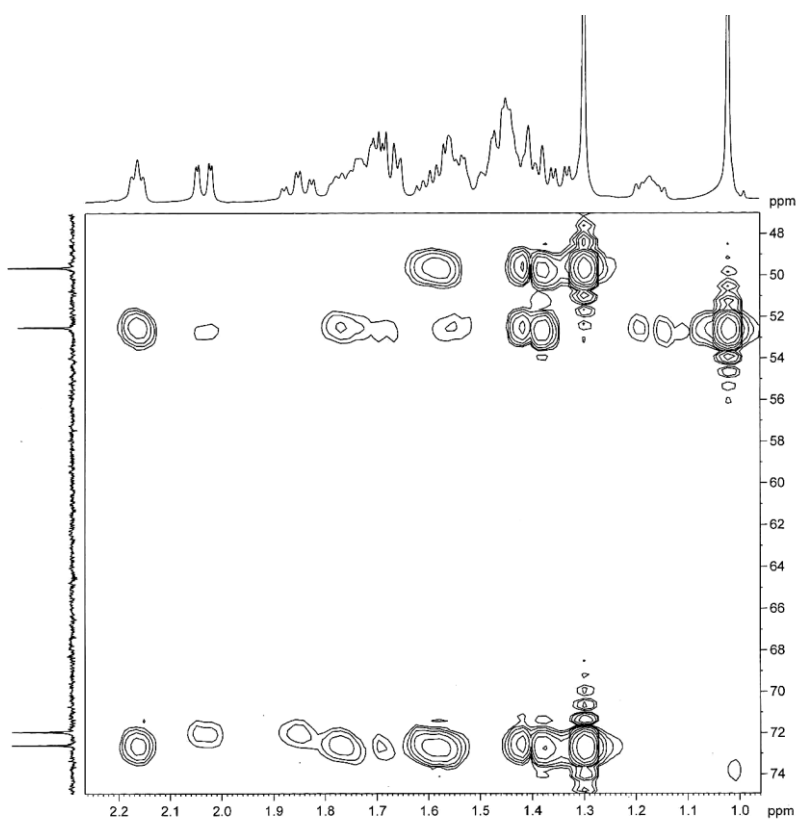
**Figura 51** – Expansão - 1 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2**Figura 52** – Expansão - 2 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2

**Figura 53** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2**Figura 54** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – DEPT 135° (75 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2

**Figura 55** – Espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY– de SMF-2**Figura 56** – Espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  – NOESY (500 MHz, piridina- $d_5$ ) de SMF-2

**Figura 57** – Espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HSQC de SMF-2**Figura 58** – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HSQC de SMF-2

**Figura 59** – Espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC de SMF-2**Figura 60** – Expansão - 1 do espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC de SMF-2

**Figura 61** – Expansão - 2 do espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC de SMF-2**Figura 62** – Expansão - 3 do espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC de SMF-2

#### 4.5 Determinação estrutural de SMF-3

O fracionamento cromatográfico de SMFED de *S. marítima* (item 5.5.3.2, p. 89) conduziu à obtenção de um sólido amarelo de aspecto amorfo, com faixa de fusão de 92-93 °C (ARITOMI; KAWASAKI, 1984) denominado SMF-3. Seu espectro de massa obtido por ionização por *electrospray* (EM-IES) mostrou pico íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  de 360,0865 Da.

Seu espectro de absorção na região do infravermelho IV (Fig. 68, p. 75) apresentou uma banda em  $3420\text{ cm}^{-1}$  relacionada à deformação axial de ligação O–H, evidenciando a presença de hidroxila; uma banda de absorção em  $1660\text{ cm}^{-1}$ , associada à deformação axial da ligação C=O, sugerindo a presença de carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada, a baixa intensidade do sinal é devido à alta conjugação da carbonila, aumentando o seu caráter de ligação simples C–O; o espectro mostrou ainda bandas em 1598, 1515 e  $1465\text{ cm}^{-1}$  referentes à deformação axial de ligação C=C de anel aromático; uma banda em  $1364\text{ cm}^{-1}$  associada à absorção de deformação angular de  $\text{CH}_3$ ; e em 1280 e  $1210\text{ cm}^{-1}$  bandas características de deformação axial de ligação C–O.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – BBD, obtido em acetona- $d_6$  (Fig. 71, p. 76), apresentou dezoito linhas espectrais. Um sinal em  $\delta$  179,90 indicou a presença de carbonila de cetona duplamente conjugada, já sugerida pelo espectro IV. Observaram-se oito sinais em  $\delta$  132,50 (C-6); 139,18 (C-3); 148,53 (C-3'); 151,00 (C-4'); 153,00 (C-9); 153,85 (C-5); 157,00 (C-2) e 158,00 (C-7) atribuídos a carbonos  $sp^2$  oxigenados; seis sinais em  $\delta$  94,76 (C-8); 106,47 (C-10); 112,83 (C-2'); 116,32 (C-5'); 122,97 (C-1') e 123,55 (C-6') relacionados a carbonos  $sp^2$  não oxigenados; e três absorções em  $\delta$  56,60; 60,44 e 60,89 que foram atribuídos a carbonos  $sp^3$  oxigenados de grupos metoxila.

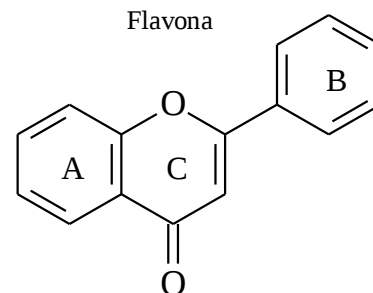
A comparação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  com o de RMN  $^{13}\text{C}$  – DEPT 135° (Fig. 72, p. 77) possibilitou a atribuição dos carbonos em  $\delta$  94,76 (C-8); 112,83 (C-2'); 116,32 (C-5') e 123,55 (C-6') a carbonos metínicos aromáticos. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  – HSQC (Fig. 73, p. 77) permitiu relacionar, de forma inequívoca, cada sinal de hidrogênio a seu carbono Tabela 07 (p. 74).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SMF-3 (Fig. 69, p.75) mostrou sinais em  $\delta$  7,00 (1H, d,  $J = 8,45\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,68 (1H, dd,  $J = 8,45$  e  $1,95\text{ Hz}$ ) e  $\delta$  7,77 (1H, d,  $J = 1,95\text{ Hz}$ ) evidenciando um sistema aromático trissubstituído; um sinal simples em  $\delta$  6,59 (1H, s); e

apresentou ainda singletos em  $\delta$  3,86; 3,88 e 3,94 integrados, cada um, para três hidrogênios, atribuídos a grupos metílicos pertencentes à metoxilas aromáticas. O espectro também apresentou um sinal em  $\delta$  12,96, confirmando a presença do hidrogênio do grupo hidroxila (C-5), envolvido em ligação intramolecular com a carbonila em C-4.

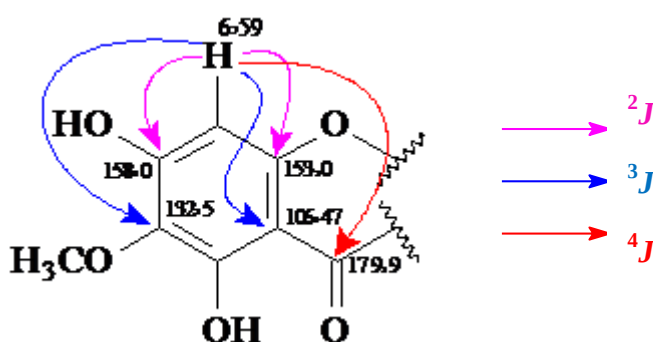
A existência de quinze sinais na região de carbonos  $sp^2$  é compatível com a unidade  $C_6-C_3-C_6$  característica de flavonoides, o que, aliado a presença do sinal em  $\delta$  179,9 indicativo de carbonila de cetona duplamente conjugada, sugerem um esqueleto do tipo flavona (Fig. 63).

**Figura 63** – Esqueleto básico de uma Flavona



O espectro de RMN de  $^1H$  x  $^{13}C$  – HMBC (Fig. 74, p. 78) mostrou correlações a três ligações ( $^3J$ ), entre o sinal em  $\delta$  3,86 (3H, s) com o sinal de carbono em  $\delta$  132,50 (C-6); o sinal em  $\delta$  3,88 (3H, s) com o carbono em  $\delta$  139,18 (C-3) e entre o sinal em  $\delta$  3,94 (3H, s) com o carbono em  $\delta$  148,53 (C-3') permitindo confirmar as posições dos carbonos ligados aos grupos metoxila. Observaram-se correlações entre o sinal em  $\delta$  6,59 (1H, s) com os sinais de carbonos em  $\delta$  158,00 (C-7) e 153,00 (C-9) a duas ligações ( $^2J$ ) e a três ligações ( $^3J$ ) com os carbonos em  $\delta$  132,50 (C-6) e 106,47 (C-10), mostrou ainda uma correlação em w com o carbono em  $\delta$  179,90 ( $^4J$ ), permitindo sugerir a unidade estrutural (Fig. 64) para o anel A da flavona

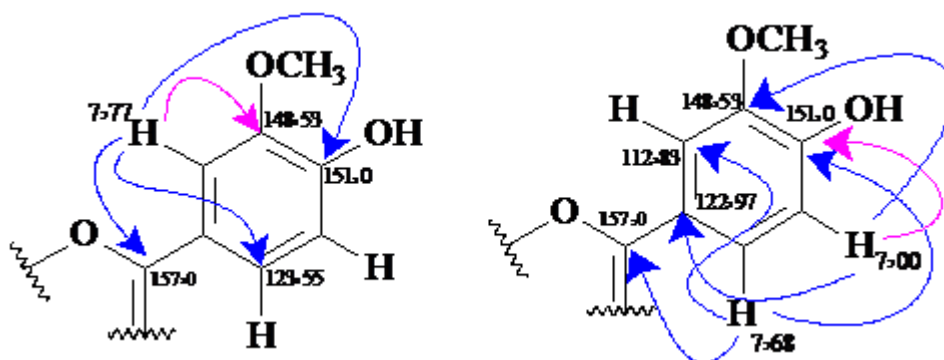
**Figura 64** – Unidade estrutural de SMF-3



O mesmo experimento mostrou correlações entre o sinal em  $\delta$  7,77 (1H, d,  $J$  = 1,95 Hz) com o carbono em  $\delta$  148,53 (C-3') a duas ligações ( $^2J$ ) e com os carbonos em  $\delta$  157,00 (C-2); 151,00 (C-4') e 123,55 (C-6') a três ligações ( $^3J$ ). Foram evidenciadas também correlações ( $^3J$ ) entre o sinal em  $\delta$  7,68 (1H, dd,  $J$  = 8,45 e 1,95 Hz) e os carbonos em  $\delta$  112,83 (C-2'); 151,00 (C-4') e 157,00 (C-2). O hidrogênio em  $\delta$  7,00 (1H, d,  $J$  = 8,45 Hz)

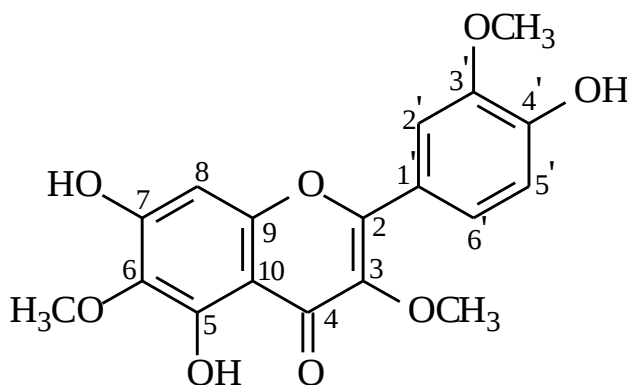
mostrou correlações com os carbonos em  $\delta$  151,00 (C-4') a duas ligações ( $^2J$ ) e em  $\delta$  122,97 (C-1') e 148,53 (C-3') a três ligações ( $^3J$ ), conforme sugerido nas unidades estruturais da Figura 65 abaixo:

Figura 65 – Unidades estruturais de SMF-3



Os dados obtidos, aliados a comparação com os dados da literatura (ROITMAN; JAMES, 1985; LONG *et al.*, 2003) permitiram sugerir para SMF-3 a estrutura da flavona jaceidina (Fig. 66). Os dados espectroscópicos de SMF-3 e literatura são apresentados na Tabela 07 (p. 74). Jaceidina foi isolada de espécies do gênero *Centaurea* (FARKAS *et al.*, 1964; CHRISTENSEN; LAM, 1991; FLAMINI; ANTOGNOLI; MORELLI, 2001; SEGUIRI *et al.*, 2009) e é pela primeira vez relatada em uma espécie do gênero *Stemodia*.

Figura 66 – Estrutura de SMF-3 (5,7,4'-trihidróxi-3,6,3'-trimetóxi-flavona / Jaceidina)

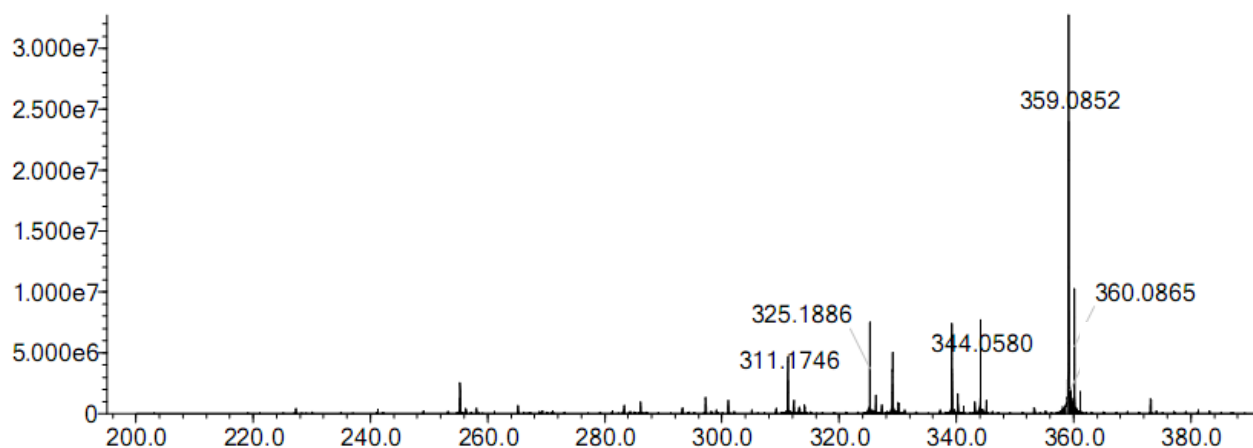


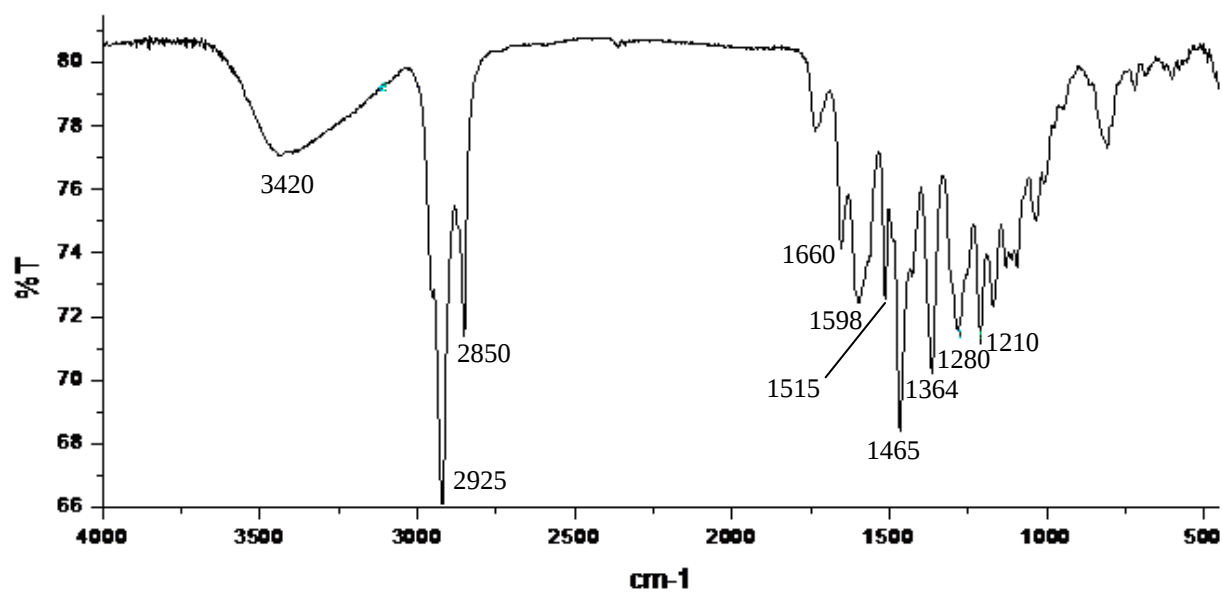
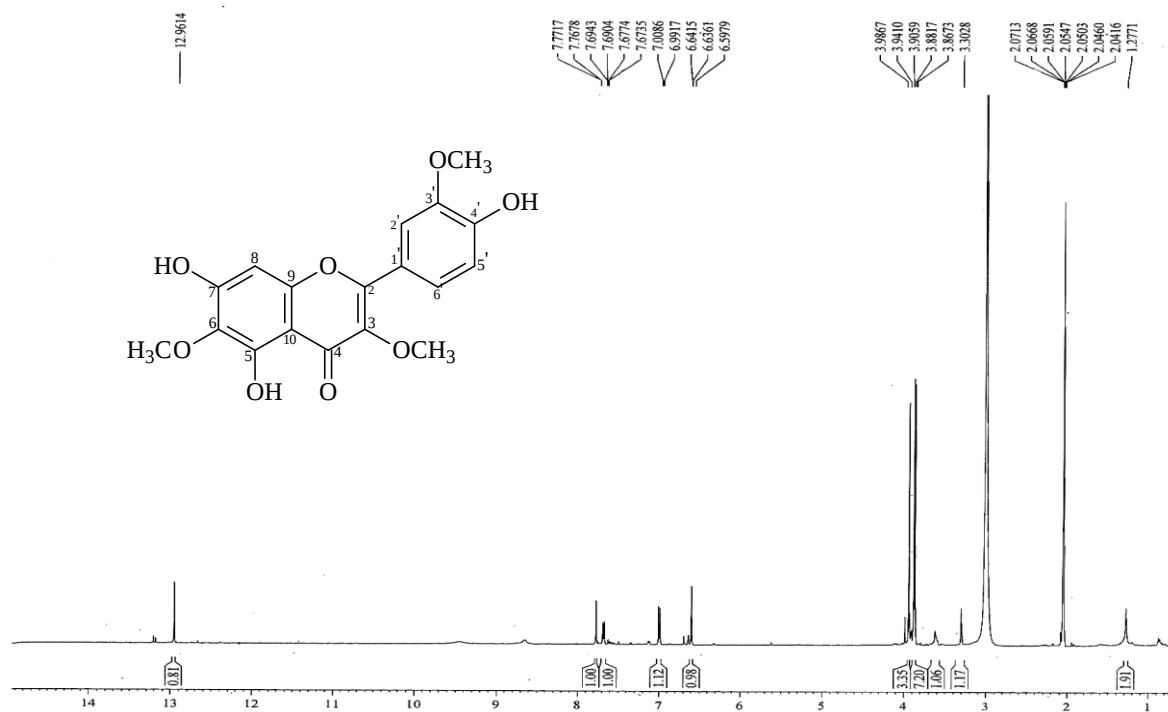
**Tabela 07** – Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de SMF-3 comparados com a literatura (ROITMAN; JAMES, 1985).

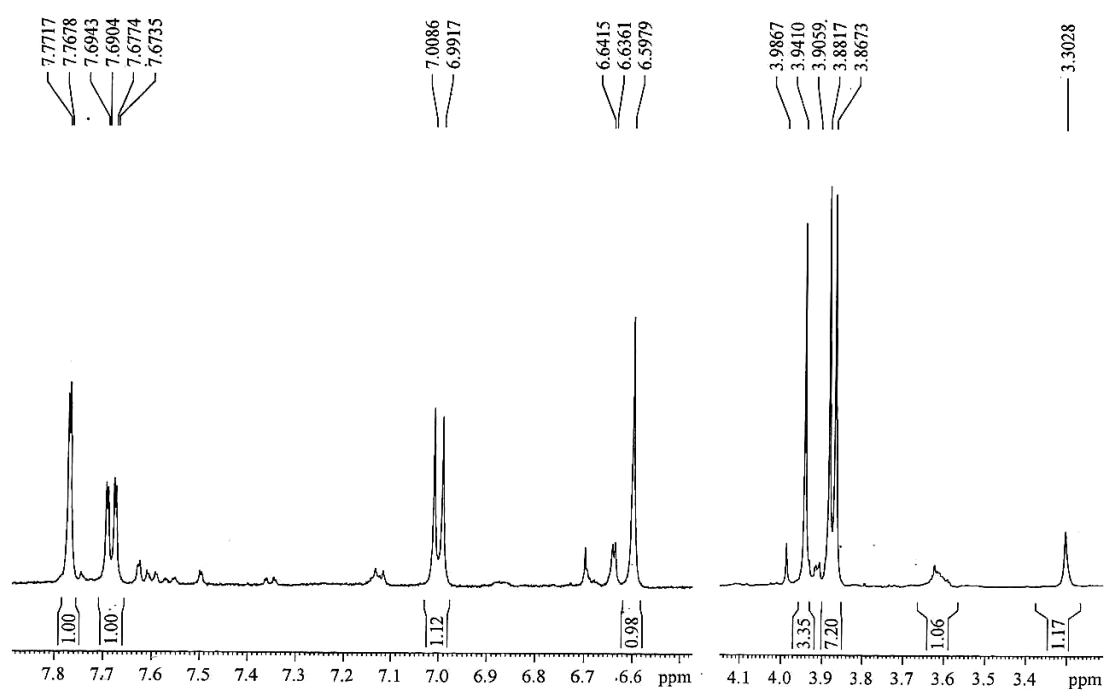
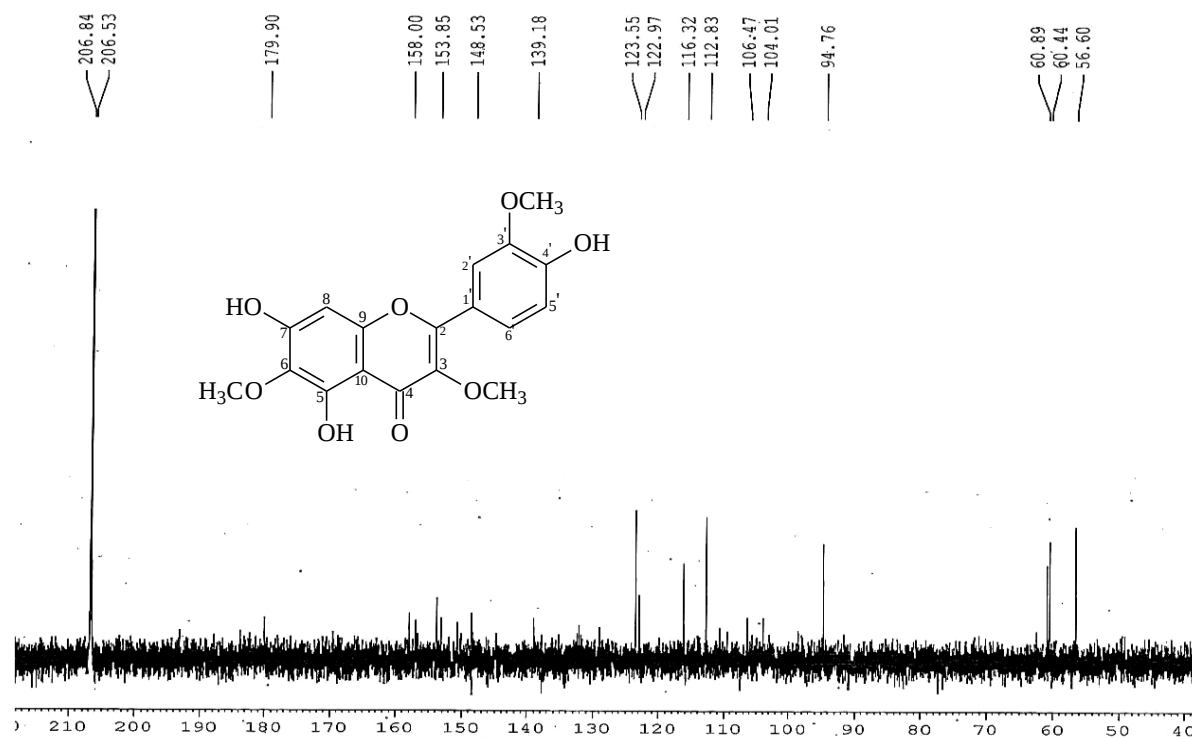
| SMF-3 <sup>a</sup>   |                          |                          | HMBC               |                                   |                    | LIT.                                  |                                       |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| C                    | $\delta$ H (mult., J/Hz) | $\delta$ $^{13}\text{C}$ | $^2J_{\text{C-H}}$ | $^3J_{\text{C-H}}$                | $^4J_{\text{C-H}}$ | $\delta$ H <sup>b</sup> (mult., J/Hz) | $\delta$ $^{13}\text{C}$ <sup>c</sup> |
| 2                    | -                        | 157,00                   |                    | H-2'; H-6'                        |                    | -                                     | 155,3                                 |
| 3                    | -                        | 139,18                   |                    | OCH <sub>3</sub> -3               |                    | -                                     | 137,3                                 |
| 4                    | -                        | 179,90                   |                    |                                   | H-8                | -                                     | 178,0                                 |
| 5                    | OH - 12,96 (s)           | 153,85                   | OH-5               |                                   |                    | OH - 12,98 (s)                        | 152,2                                 |
| 6                    | -                        | 132,50                   |                    | H-8; OH-5;<br>OCH <sub>3</sub> -6 |                    | -                                     | 131,1                                 |
| 7                    | -                        | 158,00                   | H-8                |                                   |                    | -                                     | 157,8                                 |
| 8                    | 6,59 (s)                 | 94,76                    |                    |                                   |                    | 6,62 (s)                              | 94,1                                  |
| 9                    | -                        | 153,00                   | H-8                |                                   |                    | -                                     | 151,5                                 |
| 10                   | -                        | 106,47                   |                    | H-8; OH-5                         |                    | -                                     | 104,3                                 |
| 1'                   | -                        | 122,97                   |                    | H-5'                              |                    | -                                     | 120,8                                 |
| 2'                   | 7,77 (d; 1,95)           | 112,83                   |                    | H-6'                              |                    | 7,80 (d; 2,0)                         | 112,0                                 |
| 3'                   | -                        | 148,53                   | H-2'               | H-5';<br>OCH <sub>3</sub> -3'     |                    | -                                     | 147,4                                 |
| 4'                   | -                        | 151,00                   | H-5'               | H-2'; H-6'                        |                    | -                                     | 149,7                                 |
| 5'                   | 7,00 (d; 8,45)           | 116,32                   |                    |                                   |                    | 7,02 (d; 8,5)                         | 115,6                                 |
| 6'                   | 7,68<br>(dd; 8,45; 1,95) | 123,55                   |                    | H-2'                              |                    | 7,71 (dd; 8,5; 2,0)                   | 122,1                                 |
| OCH <sub>3</sub> -3  | 3,88 (s)                 | 60,44                    |                    |                                   |                    | 3,88 (s)                              | 59,6                                  |
| OCH <sub>3</sub> -6  | 3,86 (s)                 | 60,89                    |                    |                                   |                    | 3,89 (s)                              | 59,9                                  |
| OCH <sub>3</sub> -3' | 3,94 (s)                 | 56,60                    |                    |                                   |                    | 3,95 (s)                              | 55,7                                  |

<sup>a</sup> – acetona- $d_6$ , <sup>b</sup> –  $\text{CD}_3\text{OD}$ , <sup>c</sup> –  $\text{DMSO}-d_6$ .

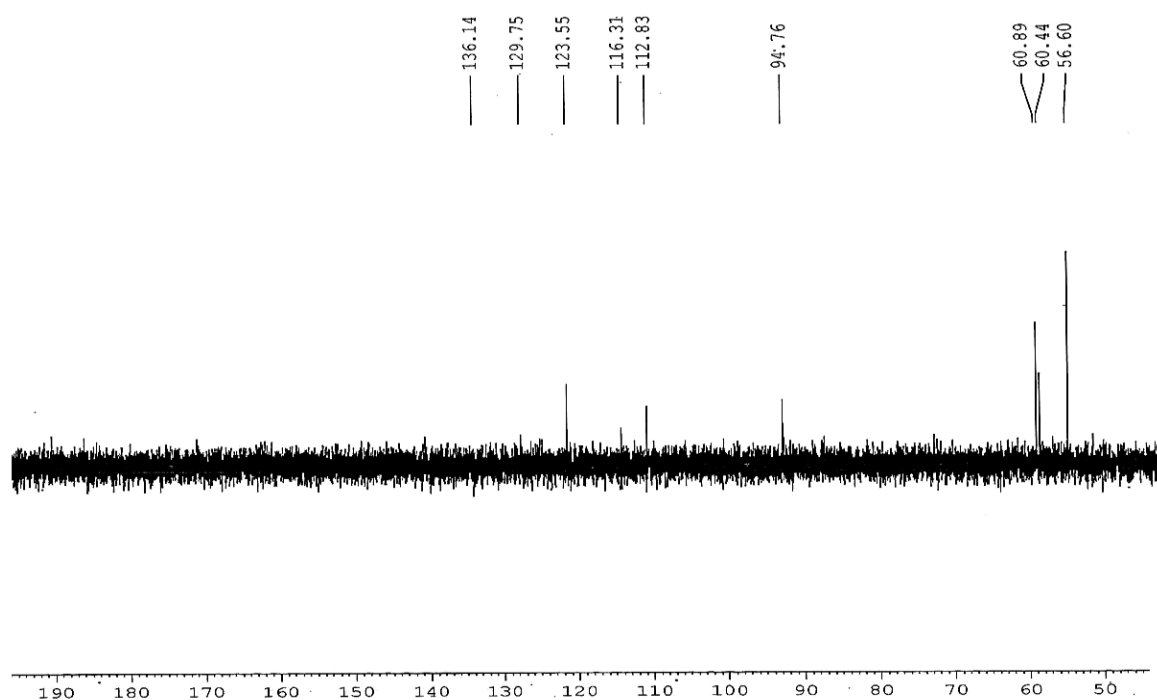
**Figura 67** – Espectro de massa IES de SMF-3



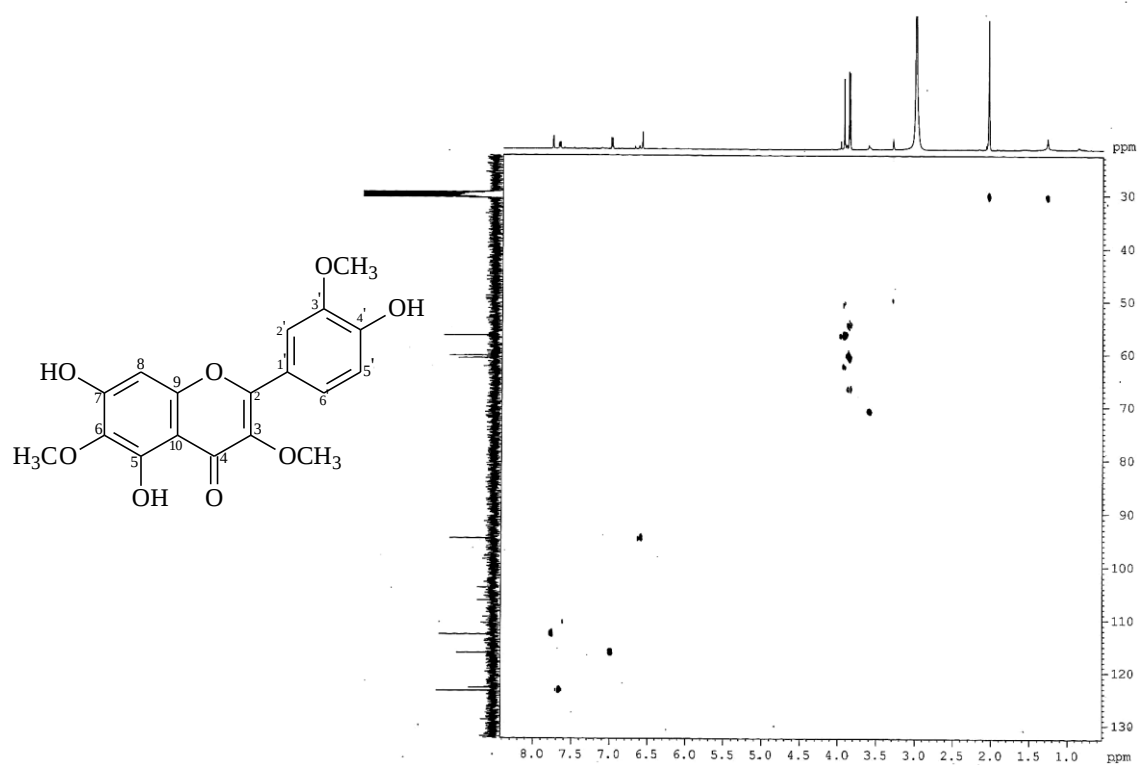
**Figura 68** – Espectro de absorção na região do infravermelho de SMF-3 (KBr)**Figura 69** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, acetona- $d_6$ ) de SMF-3

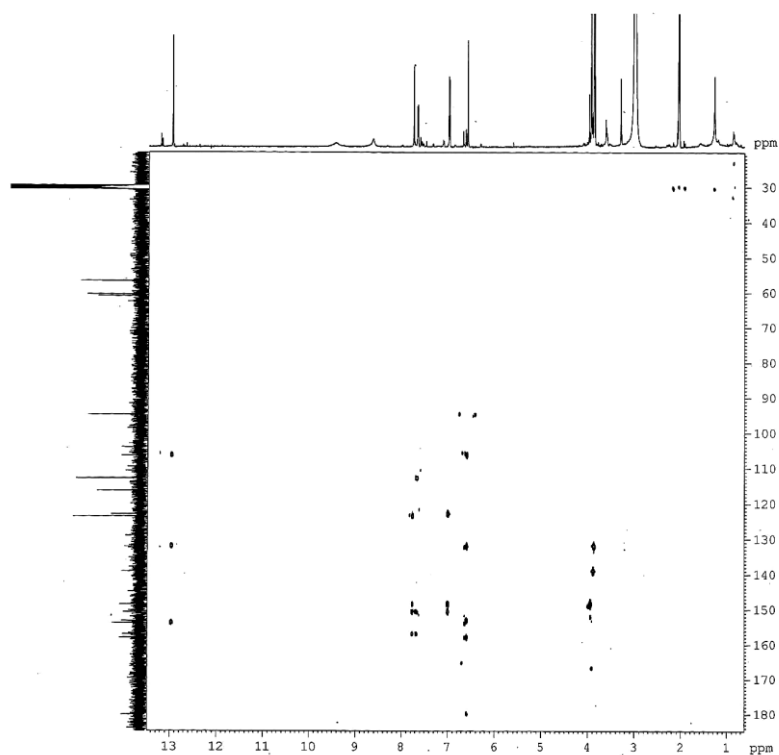
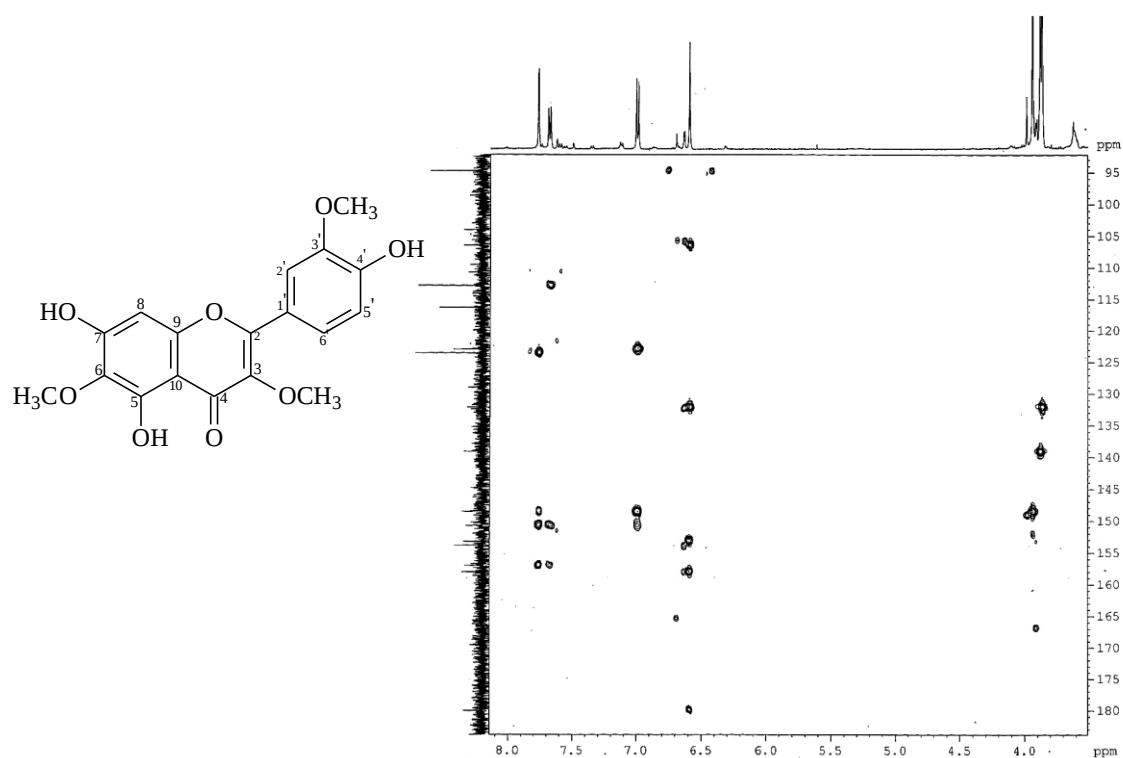
**Figura 70** – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, acetona- $d_6$ ) de SMF-3**Figura 71** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, acetona- $d_6$ ) de SMF-3

**Figura 72** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – DEPT 135° (125 MHz, acetona- $d_6$ ) de SMF-3



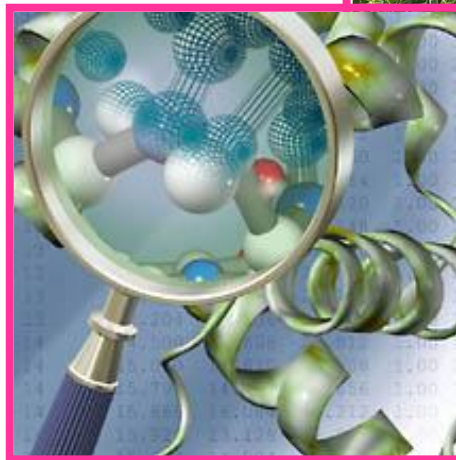
**Figura 73** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  – HSQC de SMF-3



**Figura 74** – Espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC de SMF-3**Figura 75** – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC de SMF-3

## Capítulo 5

# Parte Experimental



## 5 PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Material botânico

#### 5.1.1 *Tephrosia toxicaria* Pers.

As raízes de *Tephrosia toxicaria* Pers. foram coletadas no município de Guaraciaba do Norte – CE, em 09 de maio de 2008, pela Professora Ângela Martha Campos Arriaga do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI/UFC).

A espécie estudada foi identificada pelo Professor Edson P. Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do mesmo Departamento, sob o número de registro 32.139.

#### 5.1.2 *Stemodia maritima* Linn.

As folhas de *Stemodia maritima* Linn. foram coletadas no município de Flexeiras – CE, em 14 de janeiro de 2006, pela Professora Ângela Martha Campos Arriaga, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará.

A identificação botânica desta espécie foi realizada pelo Professor Edson P. Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do mesmo Departamento, sob o número de registro de 38.483.

## 5.2 Métodos cromatográficos

### 5.2.1 Cromatografia de adsorção

Para cromatografia de adsorção em coluna (CAC) foram empregados gel de sílica 60 ( $\Phi$  0,063 – 0,200 mm) da VETEC<sup>®</sup>; e sílica 60 para cromatografia *flash* ( $\Phi$  0,040 – 0,063 mm) da MERCK<sup>®</sup>. Os tamanhos das colunas (altura e diâmetro) variaram de acordo com a massa das amostras que foram cromatografadas. As colunas utilizadas na cromatografia sob pressão média (cromatografia *flash*) continham bulbos de volume variável no ápice, para armazenamento do solvente. Nesta técnica foi empregada bomba de ar comprimido modelo Inalatec Plus (Ref.: 6600) da NEVONI<sup>®</sup>.

Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se gel de sílica 60 para cromatografia em camada fina da VETEC<sup>®</sup>; e cromatoplasas de plástico e/ou de alumínio de gel de sílica 60 F<sub>254</sub>, da MERCK<sup>®</sup>.

As revelações das substâncias nas cromatoplasas analíticas foram realizadas através da exposição à irradiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), emitidos por lâmpada modelo VL-4.LC da VILBER LOURMAT<sup>®</sup> e/ou por imersão em solução de vanilina (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) 5g / 100 mL de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 0,75 M/100 mL de etanol, seguido de aquecimento em soprador térmico HL-500, da STEINEL<sup>®</sup> à aproximadamente 150 °C por alguns segundos.

Os solventes utilizados nas eluições foram *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, de qualidade PA (SYNTH<sup>®</sup>) puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade.

### 5.2.2 Cromatografia de exclusão

Os fracionamentos realizados por cromatografia de exclusão molecular foram realizados em gel de Sephadex LH-20 da PHARMACIA FINE CHEMICALS<sup>®</sup>, utilizando-se metanol como fase móvel.

### 5.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A fração reacional de *T. toxicaria* foi analisada em aparelho de CLAE, constituído de uma bomba ternária SHIMADZU<sup>®</sup> LC-20AT e um detector SHIMADZU<sup>®</sup> SPD-M20A. As separações foram realizadas em uma coluna Luna 5 $\mu$  Sílica 100 A (150 x 10 mm).

As eluições foram realizadas empregando solventes com grau de pureza recomendado para CLAE e foram adequadamente filtrados em membranas de nylon com poros de 0,45  $\mu$ m e degaseificados por sonicação a vácuo durante 5 min. A amostra foi dissolvida na fase móvel empregada e filtrada através de membrana de teflon com poros de 0,45  $\mu$ m.

## 5.3 Métodos Físicos de Análises

### 5.3.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em Espectrômetro PERKIN ELMER<sup>®</sup>, modelo FT-IR Spectrum 1000 da Central Analítica do DQOI/UFC, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) para análise das amostras.

### 5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e carbono - 13 (RMN <sup>13</sup>C) uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker<sup>®</sup>, modelo DRX - 500, operando nas frequências de 500 e 300 MHz para hidrogênio-1 e 125 e 75 MHz para carbono-13.

Foram utilizados solventes deuterados (CDCl<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N e (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) na dissolução das amostras e seus deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm), os espectros de RMN <sup>1</sup>H foram referenciados pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio ( $\delta$  7,27), piridina ( $\delta$  8,74; 7,58; 7,22) e acetona ( $\delta$  2,05). Nos espectros de RMN <sup>13</sup>C, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio ( $\delta$  77,23), piridina ( $\delta$  150,35; 135,91; 123,87) e acetona ( $\delta$  206,68).

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: singlete (s), dubleto (d), duplo dubleto (dd) 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  $135^\circ$  (CH e CH<sub>3</sub> com amplitude positiva e CH<sub>2</sub> com negativa). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais espectrais observados no espectro BBD / <sup>1</sup>H (Broadband Decoupled).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em aparelhos do Centro Nordestino de Aplicação de Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN – UFC).

### 5.3.3 Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massa de baixa resolução (EM-IE) foram obtidos em espectrômetro de massa SHIMADZU<sup>®</sup>, modelo QP 5000, DI-50, por impacto eletrônico a 70 eV. Enquanto os espectros de alta resolução foram obtidos em espectrômetro de massa modelo LCMS-IT-TOF (225-07100-34) - SHIMADZU<sup>®</sup>, com ionização por *electrospray* (EM-IES), pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste (LEMANOR – DQOI/UFC).

### 5.3.4 Ponto de fusão (pf)

Os pontos de fusão foram determinados em equipamento de Microquímica<sup>®</sup> modelo MQAPF, a uma taxa de aquecimento de 3°C/mim, e em aparelho digital METTLER-TOLEDO modelo FP62, também a uma taxa de aquecimento de 3°C/mim.

### 5.3.5 Rotação óptica

As rotações ópticas específicas  $[\alpha]_D^{20}$  foram realizadas em Polarímetro digital da PERKIN ELMER<sup>®</sup> modelo P-2000.

## 5.4 Estudo químico de *Tephrosia toxicaria* Pers.

### 5.4.1 Obtenção do extrato etanólico das raízes de *T. toxicaria*

As raízes (710 g) de *T. toxicaria* foram trituradas, secas e submetidas à extração com etanol à temperatura ambiente. A solução obtida foi filtrada e evaporada à pressão reduzida em rota-evaporador, resultando no extrato denominado TTRE (78,9 g) com 11,11% de rendimento.

### 5.4.2 Fracionamento cromatográfico de TTRE

TTRE (22,01 g), um material sólido de coloração marrom, foi adsorvido em gel de sílica e pulverizado em gral de porcelana, posteriormente foi submetido à cromatografia em gel de sílica comum, em coluna cromatográfica (L = 7 cm e  $\Phi$  = 6 cm). A série de eluentes utilizada e suas respectivas frações são apresentadas na Tabela 08.

**Tabela 08** – Dados do fracionamento cromatográfico de TTRE.

| ELUENTE                              | FRAÇÕES | V/ mL |
|--------------------------------------|---------|-------|
| Hexano                               | 1 – 2   | 50    |
| Hexano / diclorometano 50%           | 3 – 8   | 50    |
| Diclorometano                        | 9 – 16  | 50    |
| Diclorometano / acetato de etila 50% | 17      | 125   |
| Acetato de etila                     | 18 – 19 | 125   |
| Metanol                              | 20 – 27 | 125   |

Após análise por CCD as frações foram reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico, resultando em onze novas frações, como mostrado na Tabela 09 (p. 85).

**Tabela 09** – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de TTRE.

| FRAÇÕES | MASSA / mg | FRAÇÕES | MASSA / mg |
|---------|------------|---------|------------|
| 3       | 194,5      | 13 – 16 | 1.053      |
| 4       | 493,5      | 17      | 81,1       |
| 5       | 1.530      | 18      | 555,4      |
| 6       | 731,4      | 19      | 275,1      |
| 7 – 9   | 1.143      | 20      | 493,0      |
| 10 – 12 | 2.637      | 21 – 27 | -          |

### 5.4.2.1 Fracionamento cromatográfico de TTRE (4) e isolamento de TTR-1

A fração TTRE - 4 (493,5 mg) foi cromatografada em gel de sílica comum (L = 17 cm e  $\Phi$  = 3 cm). O fracionamento cromatográfico foi realizado com a série de eluentes e respectivas frações descritas na Tabela 10, onde foram coletadas frações de aproximadamete 10 mL.

**Tabela 10** – Dados do fracionamento cromatográfico de TTRE (4)

| ELUENTE                              | FRAÇÕES   |
|--------------------------------------|-----------|
| Hexano / diclorometano 5%            | 1 – 14    |
| Hexano / diclorometano 10%           | 15 – 39   |
| Hexano / diclorometano 15%           | 40 – 71   |
| Hexano / diclorometano 20%           | 72 – 77   |
| Hexano / diclorometano 30%           | 78 – 88   |
| Hexano / diclorometano 40%           | 89 – 93   |
| Hexano / diclorometano 50%           | 94 – 101  |
| Hexano / diclorometano 60%           | 102 – 112 |
| Hexano / diclorometano 80%           | 113 – 120 |
| Diclorometano                        | 121 – 126 |
| Diclorometano / acetato de etila 50% | 127 – 135 |

Após análise das frações por CCD e reunião de acordo com seu perfil cromatográfico, a fração 84-94 (136,7 mg), continha um sólido amarelo de aspecto cristalino, solúvel em clorofórmio, denominado **TTR-1**.

#### 5.4.2.2 Reação de hidrogenação de TTR-1

O composto denominado TTR-1 (80,0 mg) foi dissolvido em clorofórmio (30 mL) e em seguida adicionado 10,0 mg do catalisador de paládio adsorvido em carvão ativo (Pd/C). Gás  $H_2$  foi borbulhado na solução e em seguida uma bexiga de borracha contendo o gás foi conectada ao balão da mistura reacional, conforme mostrado na Figura 76. A solução permaneceu sob agitação magnética por 45 horas, sendo a reação monitorada por CCD (fase móvel: hexano/diclorometano 60%). Após decorrido este período, a solução resultante foi filtrada e concentrada à temperatura ambiente.

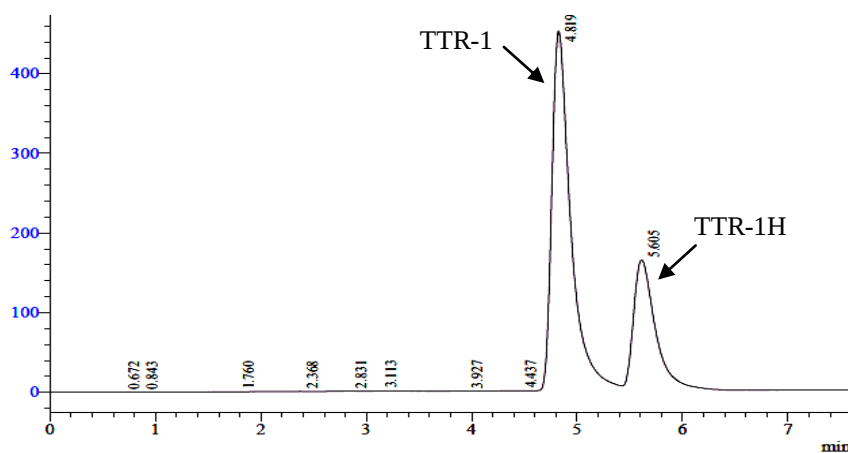
O sólido obtido (83,0 mg) continha o material de partida e um produto de hidrogenação. A mistura foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase normal de Sílica 100 Å e hexano/clorofórmio 30% como fase móvel.

O material foi dissolvido em cerca de 4 mL da fase móvel e as injeções realizadas em alíquotas de 200  $\mu$ L de solução previamente filtrada. A detecção foi realizada na região de 260 – 400 nm, a um fluxo de 3,0 mL/min onde foram coletados dois picos: o pico 1 identificado como o composto TTR-1 (36,5 mg), material de partida da reação, e o pico 2 denominado TTR-1H (18,5 mg), identificado como o produto da reação de hidrogenação, conforme o cromatograma na Figura 77.

**Figura 76** – Sistema da reação de hidrogenação.



**Figura 77** – Cromatograma de CLAE da mistura reacional de TTR-1.



## 5.5 Estudo químico de *Stemodia maritima* Linn.

### 5.5.1 Obtenção do extrato etanólico das folhas de *S. maritima*

As folhas (830 g) de *S. maritima* foram trituradas, secas e submetidas à extração com etanol à temperatura ambiente. A solução obtida foi filtrada e evaporada à pressão reduzida em rota-evaporador, resultando no extrato denominado SMFE (65,4 g) com 7,88% de rendimento.

### 5.5.2 Obtenção das frações hexano, diclorometano e acetato de etila das folhas de *S. maritima*

O extrato SMFE (59,6 g) foi solubilizado em uma solução metanol/água (4:1) sendo submetido à partição líquido-líquido com hexano (3x100 mL), diclorometano (3x100 mL) e acetato de etila (3x100 mL), a fim de extrair os metabólitos secundários com maior afinidade aos solventes selecionados. As fases orgânicas foram evaporadas à pressão reduzida, dando origem às frações relacionadas na Tabela 11.

**Tabela 11** – Dados referentes ao fracionamento de SMFE por partição líquido-líquido.

| ELUENTE          | FRAÇÃO | MASSA / g |
|------------------|--------|-----------|
| Hexano           | SMFEH  | 7,59      |
| Diclorometano    | SMFED* | 10,02     |
| Acetato de etila | SMFEA  | 0,31      |

### 5.5.3 Fracionamento cromatográfico de SMFED e isolamento de SMF-1

SMFED (9,914 g), um material sólido de coloração esverdeada, foi adsorvido em gel de sílica e pulverizado em gral de porcelana, posteriormente foi submetido à cromatografia em gel de sílica comum, em coluna cromatográfica (L = 14 cm e  $\Phi$  = 4,5 cm). Foram utilizados hexano, diclorometano e acetato de etila em misturas binárias e em gradiente de polaridade, tendo sido coletadas duzentas (200) frações com cerca de 10 mL cada.

Posterior análise das frações por CCD permitiu verificar os seus perfis cromatográficos e reuni-las, resultando em 06 novas frações, conforme apresentado na Tabela 12. A fração 148-173 (758,4 mg) foi lavada repetidas vezes com acetona, gerando um precipitado branco cristalino (128,2 mg) e solúvel em metanol, denominado **SMF-1**.

**Tabela 12** – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de SMFED.

| <b>FRAÇÕES</b>   | <b>MASSA / mg</b> |
|------------------|-------------------|
| 79 – 98          | 79,3              |
| <b>99 – 125</b>  | <b>384,4</b>      |
| <b>126 – 147</b> | <b>681,1</b>      |
| <b>148 – 173</b> | <b>758,4</b>      |
| 174 – 181        | 90,8              |
| 182 – 200        | 312,4             |

#### 5.5.3.1 Fracionamento cromatográfico de SMFED (126-147) e isolamento de SMF-2

A fração 126-147 (681,1 mg) foi cromatografada em gel de sílica comum ( $L = 28$  cm e  $\Phi = 2,5$  cm). A série de eluentes utilizada no fracionamento e as frações obtidas são apresentadas na Tabela 13.

**Tabela 13** – Dados do fracionamento cromatográfico de SMFED (126-147).

| <b>ELUENTE</b>              | <b>FRAÇÕES</b> | <b>V/ mL</b> |
|-----------------------------|----------------|--------------|
| Hexano/acetato de etila 5%  | 1 – 9          | 10           |
| Hexano/acetato de etila 10% | 10 – 22        | 10           |
| Hexano/acetato de etila 15% | 23 – 36        | 10           |
| Hexano/acetato de etila 20% | <b>37 – 51</b> | 10           |
| Hexano/acetato de etila 25% | 52 – 66        | 10           |
| Hexano/acetato de etila 30% | 67 – 81        | 10           |
| Hexano/acetato de etila 40% | 82 – 103       | 10           |
| Hexano/acetato de etila 60% | 104 – 114      | 10           |
| Hexano/acetato de etila 80% | 115 – 125      | 10           |
| Acetato de etila            | 126 – 132      | 10           |

Após analisar as frações por CCD e reuni-las de acordo com seu perfil cromatográfico, a fração 37-51 (123,0 mg) ao ser solubilizada em acetona, forneceu um precipitado branco que foi purificado após sucessivas lavagens. O sólido assim obtido (12,9 mg), de aspecto amorfo e solúvel em metanol foi denominado **SMF-2**.

#### 5.5.3.2 Fracionamento cromatográfico de SMFED (99-125) e isolamento de SMF-3

A fração 99-125 (384,4 mg) foi submetida ao fracionamento por exclusão molecular em Sephadex LH-20 numa coluna cromatográfica ( $L = 22$  cm e  $\Phi = 2,5$  cm), utilizando metanol como eluente, sendo coletadas setenta (70) frações com 10 mL cada.

Após análise por CCD foi possível verificar o perfil cromatográfico das frações obtidas e reuni-las em 03 novas frações, apresentadas na Tabela abaixo:

**Tabela 14** – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de SMFED (99-125).

| FRAÇÕES        | MASSA / mg   |
|----------------|--------------|
| 20 – 40        | 210,9        |
| 41 – 49        | 9,2          |
| <b>50 – 70</b> | <b>161,8</b> |

A fração 50-70 (161,8 mg) foi parcialmente solubilizada em diclorometano, dando origem a um precipitado amarelo que foi removido após várias lavagens com esse solvente. O sólido resultante (140,8 mg), solúvel em metanol, foi cromatografado em Sephadex LH-20 numa coluna ( $L = 18,5$  cm e  $\Phi = 1,5$  cm), utilizando metanol como eluente. Das frações obtidas, a fração 10-20 (16 mg) apresentou um sólido amarelo de aspecto amorfo, solúvel em metanol e denominado **SMF-3**.

## 5.7 Estudos biológicos

### 5.7.1 *Teste de atividade antioxidante*

Os testes de atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais (LBPN) da Universidade Federal do Ceará. Extrato e substâncias isoladas de *S. maritima* foram avaliados por testes utilizando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila). Adicionou-se em uma cubeta 1 mL de DPPH previamente preparado na concentração de 60  $\mu\text{mol/L}$ , 1 mL de metanol e realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV com absorvância de 520 nm. Em seguida, foi feita uma leitura utilizando as amostras em diferentes concentrações, bem como, com os padrões Trolox<sup>®</sup> e vitamina C, compostos já descritos com propriedades antioxidantes. Os resultados descritos em valores de  $\text{CI}_{50}$  (mg/mL) são apresentados na Tabela 15 (p. 93).

### 5.7.2 *Teste de atividade analgésica e anti-inflamatória*

As atividades analgésica e anti-inflamatória da obovatina (TTR-1, Fig. 10, p. 38) foram realizadas em modelo experimental de indução de artrite por zymosan na articulação temporomandibular (ATM) de ratos. Foram utilizados ratos *Wistar* machos com massa corpórea entre 170 a 220 g provenientes do Biotério Central do *Campus* do Pici e do Biotério Setorial do Curso de Medicina – UFC – *Campus* de Sobral. Os animais foram anestesiados com tribromo 1% por via intraperitoneal (0,1 mL/100 g) para proceder à injeção intra-articular na ATM de 2 mg de Zymosan (40  $\mu\text{L}$ ) dissolvido em solução salina.

Esse grupo de animais nomeados como grupo Zymosan, ainda recebeu salina por via oral (1 mL/200 g de peso). O grupo controle de animais, nomeado como grupo Sham, recebeu 40  $\mu\text{L}$  de solução salina por injeção intra-articular e ainda salina por via oral (1 mL/200 g de peso). Outros dois grupos de animais receberam sessenta minutos antes da injeção intra-articular de Zymosan, obovatina nas doses 1 e 10 mg/Kg por via oral, nomeados respectivamente, obovatina 1 mg/Kg e obovatina 10 mg/Kg. Outro grupo de animais recebeu uma dose de 5 mg/Kg de indometacina por via sub-cutânea, sendo este grupo usado como controle positivo. A intensidade de hiperalgesia (grau de sensibilidade ao estímulo mecânico)

foi medida antes e quatro horas após a injeção de 2 mg de Zymosan, os resultados são apresentados na Figura 78 (p. 95).

A eutanásia dos animais foi realizada sob anestesia com hidrato de cloral 10%, seis horas após a injeção de 2 mg de Zymosan. Os tecidos superficiais foram dissecados até atingir a ATM que em seguida foi lavada para coleta do líquido sinovial com 0,05 mL de uma solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e PBS (tampão fosfato salínico), este procedimento foi realizado duas vezes. Deste lavado foi retirada uma alíquota de 10 µL para contagem do número de leucócitos totais, conforme é apresentado na Figura 77 (p. 94).

### 5.7.3 Teste de atividade antibacteriana

Os testes de atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri. Foram avaliados o extrato SMFE e substâncias isoladas através do método de microdiluição, com base no documento M7-A6 (NCCLS, 2003). Previamente aos testes, as cepas bacterianas foram ativadas em meio Brain Haer Infusion Broth (BHI, 3,8 %) para o crescimento bacteriano durante 24 h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . As seguintes linhagens de microorganismos foram testadas: *Staphylococcus aureus* (ATCC-12692), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-15442), *Staphylococcus aureus* (358), *Bacillus cereus* (ATCC-33018), *Escherichia coli* (27) e *Escherichia coli* (ATCC-25922).

As amostras foram inicialmente solubilizadas em dimetilsufóxido (DMSO) e água destilada de forma a se obter uma solução a uma concentração de 1024 µg/mL. Outras diluições foram realizadas através da adição de caldo BHI 3,8 % para alcançar uma concentração final no intervalo de 512 a 8 µg/mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as placas de microdiluição foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 h. Como revelador foi utilizado 25 µL de solução de resazurina (0,01 %).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, conforme indicado pela coloração de resazurina. Os resultados descritos em valores de CIM (µg/mL) são apresentados na Tabela 16 (p. 96).

Capítulo 6

# Ensaaios Biológicos



## 6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 6.1 Teste de atividade antioxidante

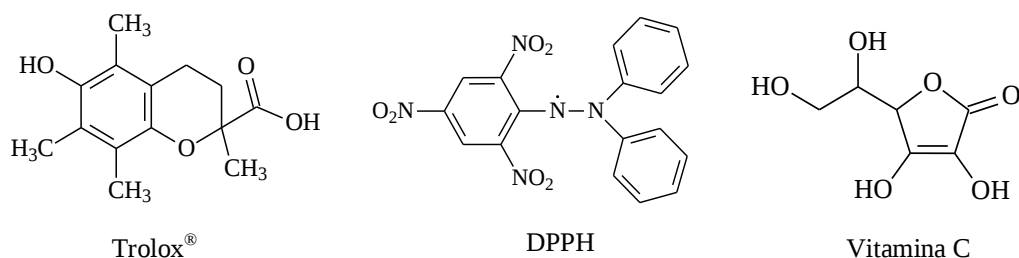
Antioxidantes são moléculas capazes de desacelerar ou prevenir a oxidação de outras moléculas através da inibição da iniciação/propagação de reações de oxidação em cadeia. Antioxidantes encerram estas reações por remoção dos radicais livres intermediários, e inibem outras reações de oxidação por serem elas mesmas oxidadas. Como um resultado, são frequentemente agentes redutores, tais como, ácido ascórbico e polifenóis (PATEL *et al.*, 2010).

Os processos metabólicos do corpo humano ou do sistema de alimentação podem produzir radicais livres altamente reativos, especialmente radicais derivados de oxigênio, quando um excesso dessas espécies é formado pode resultar em morte celular e danos nos tecidos, que implicam em várias doenças, incluindo câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e envelhecimento (SHAH *et al.*, 2010; XIN-BAO *et al.*, 2012).

Muitas plantas contêm substâncias antioxidantes e estes compostos protegem as células contra os efeitos nocivos de espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete, superóxido, os radicais peróxido e hidroxila (SHAH *et al.*, 2010).

O crescente interesse pelos antioxidantes de extratos de plantas é devido à sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos. Dessa forma, nosso objetivo é buscar novas fontes de substâncias e extratos com potencial antioxidante oriundos de plantas do Nordeste.

Uma amostra do extrato etanólico das folhas de *S. maritima* (SMFE) e os compostos SMF-1 e SMF-2 foram testados e a capacidade antioxidante foi determinada pela redução do radical estável DPPH. Embora os compostos não tenham apresentado atividade, o extrato SMFE mostrou-se ativo com valor de  $CI_{50}$  próximo ao da vitamina C, utilizada como padrão (Tab. 15, p. 94). O resultado obtido sugere *S. maritima* como uma potencial fonte de agentes antioxidantes.

**Figura 78** – Estruturas do Trolox®, DPPH e vitamina C.**Tabela 15** – Resultados do teste antioxidante utilizando DPPH.

| Amostra    | CI <sub>50</sub> (mg/mL)                   |
|------------|--------------------------------------------|
| SMFE       | $6,47 \cdot 10^{-2} \pm 2,1 \cdot 10^{-3}$ |
| SMF-1      | Não apresentou atividade                   |
| SMF-2      | Não apresentou atividade                   |
| Trolox®    | $2,60 \cdot 10^{-3} \pm 2,3 \cdot 10^{-4}$ |
| Vitamina C | $4,30 \cdot 10^{-2} \pm 1,9 \cdot 10^{-2}$ |

## 6.2 Teste de atividade analgésica e anti-inflamatória

O zymosan é um polissacarídeo extraído de paredes celulares de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, é largamente utilizado em estudos farmacológicos como um agudo e subagudo agente flogístico em várias espécies como ratos, camundongos e coelhos. Quando injetado na articulação induz a inflamação, tipicamente uma infiltração de células mononucleares em resposta à degranulação dos mastócitos (GEGOUT *et al.*, 1994). Administração intra-articular de zymosan em ratos promove parâmetros inflamatórios semelhantes àqueles em artrite reumatoide, doença inflamatória caracterizada por sinovite crônica e erosiva das articulações periféricas (PAIVA *et al.*, 2011).

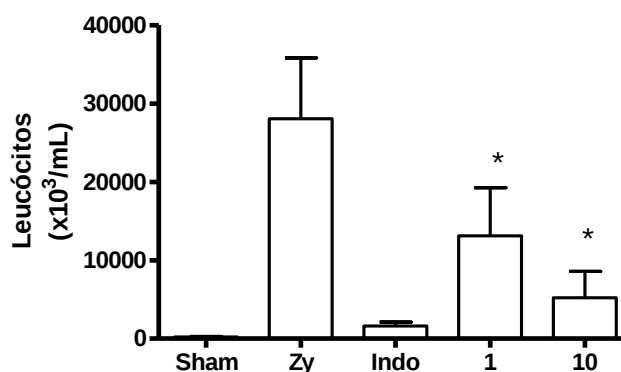
Os modelos de artrite experimental são formas de investigar alternativas terapêuticas, uma vez que a remissão completa da doença raramente é alcançada. Um dos tratamentos consiste no uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), fármacos que tem a capacidade de promover uma rápida supressão dos sintomas inflamatórios, tais como, a dor e a rigidez matinal. A terapêutica da artrite reumatoide limita-se praticamente a minimizar os sintomas flogísticos articulares (ALBERS *et al.*, 2001; XAVIER, 2005).

Os AINEs são largamente indicados, apesar do reconhecimento do potencial associado com toxicidade cardíaca, renal e vascular (GOODMAN; PAGET, 2012). Os produtos de origem natural poderiam representar uma alternativa para o tratamento dessa patologia.

Foi investigada a ação da obovatina em doses de 1 e 10 mg/Kg em um modelo experimental de artrite induzida por zymosan na articulação temporomandibular (ATM) de ratos. O grupo (Sham) representa animais que receberam salina intra-articular, o grupo (Zy) representa animais que receberam apenas zymosan e não foram tratados, os grupos (Indo), (1) e (10) representam animais que receberam zymosan e foram tratados com indometacina (5 mg/Kg) e obovatina nas concentrações 1 e 10 mg/Kg, respectivamente (Fig. 79).

A injeção intra-articular de Zymosan (2 mg/40  $\mu$ L de solução salina) na ATM de ratos produziu aumento significativo no número de leucócitos no lavado sinovial em relação ao grupo controle Sham, também observou-se a redução no número de leucócitos entre os grupos tratados com indometacina e obovatina, tendo a obovatina na dosagem de 10 mg/Kg apresentado melhor resposta em relação à dosagem inferior.

**Figura 79** – Número de leucócitos totais no lavado sinovial de ratos submetidos à indução de artrite por zymosan.

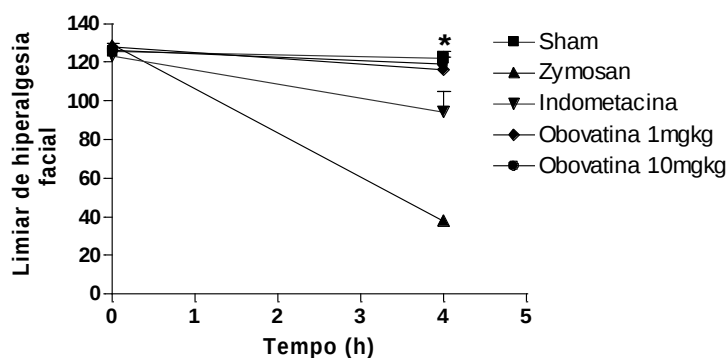


O zymosan induziu ao aumento da sensibilidade à dor nos animais, com redução do limiar de hiperalgesia (Fig. 80, p. 96). O tratamento com obovatina nas doses 1 e 10 mg/Kg diminuiu significativamente essa sensibilidade.

Desta forma, a obovatina apresentou atividade analgésica e anti-inflamatória, reduzindo a hiperalgesia facial e o infiltrado celular inflamatório, não sendo diferente

estatisticamente ( $p > 0,05$ ) da Indometacina, droga anti-inflamatória usada na dose de 5 mg/kg como controle positivo.

**Figura 80** – Efeito da indução de zymosan no limiar de hiperalgesia facial.



### 6.3 Teste de atividade antibacteriana

Em recentes anos, a emergência de bactérias resistentes a antibióticos, tais como a infecção nosocomial por bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, tem sido um problema grave e investigações de novas classes de antibióticos tornaram-se cada vez mais importantes (SAKUNPAK; PANICHAYUPAKARANANT, 2012).

A resistência pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente. As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutação, podendo trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes. São considerados micro-organismos de alta capacidade de adaptação a diversos fatores, como a exposição a agentes químicos potentes (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Nas últimas décadas, as plantas medicinais tem sido objeto de intensos estudos farmacológicos, podendo se tornar uma nova fonte para o desenvolvimento de drogas. As plantas possuem uma vasta variedade de metabólitos secundários, compostos orgânicos na maioria inexplorados como fonte de produtos farmacêuticos (RAO *et al.*, 2012).

Os compostos TTR-1, SMF-1 e o extrato SMFE foram avaliados para atividade antibacteriana frente a seis linhagens de bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692), *S. aureus* (358), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Bacillus cereus* (ATCC-33018), *Escherichia coli* (ATCC-25922) e *E. coli* (27).

A substância TTR-1 e o extrato SMFE apresentaram atividade moderada do ponto de vista clínico ( $\text{CIM} \leq 1024 \mu\text{g/mL}$ ) para quatro linhagens e o composto SMF-1 mostrou atividade para cinco linhagens avaliadas. Os resultados moderados apontam *S. maritima* e *T. toxicaria* como fontes de agentes bactericidas.

**Tabela 16** – Resultados do teste antibacteriano em valores de concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias TTR-1, SMF-1 e do extrato SMFE.

| Bactérias                                  | Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) |             |             |
|--------------------------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|
|                                            | TTR-1                               | SMF-1       | SMFE        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC-12692)  | 512                                 | 512         | 512         |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (358)         | 512                                 | 512         | 512         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC-15442) | 512                                 | 512         | $\geq 1024$ |
| <i>Bacillus cereus</i> (ATCC-33018)        | $\geq 1024$                         | 512         | $\geq 1024$ |
| <i>Escherichia coli</i> (27)               | 512                                 | 512         | 512         |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC-25922)       | $\geq 1024$                         | $\geq 1024$ | 512         |

Capítulo 7

# Conclusão

## 7 CONCLUSÃO

O estudo químico de *Tephrosia toxicaria* Pers., permitiu o isolamento da flavanona obovatina (**TTR-1**) a partir da qual foi obtido o derivado hidrogenado (**TTR-1H**).

O estudo químico de *Stemodia maritima* Linn., permitiu a confirmação do perfil quimiotaxonômico já observado no gênero *Stemodia*, pelo isolamento de dois diterpenos, estemodina (**SMF-1**) e estemodinol (**SMF-2**) e uma flavona, jaceidina (**SMF-3**), relatada pela primeira vez no gênero. O diterpeno estemodinol (**SMF-2**), embora já relatado como sintético, está sendo pela primeira vez obtido de fontes naturais, bem como os seus dados espectroscópicos.

No teste de atividade antioxidante, o extrato etanólico das folhas de *S. maritima* (SMFE) apresentou valor de  $CI_{50}$  próximo ao da vitamina C utilizada como padrão, enquanto as substâncias SMF-1 e SMF-2 isoladas desse extrato não apresentaram atividade, sugerindo a presença de outros constituintes com potencial antioxidante no extrato.

A obovatina (**TTR-1**) mostrou atividades analgésica e anti-inflamatória, em modelo experimental de artrite induzida por zymosan na articulação temporomandibular (ATM) de ratos, tendo reduzido o infiltrado celular inflamatório nas concentrações de 1 e 10 mg/Kg. A obovatina também reduziu em todas as doses a hiperalgesia facial, exercendo ação analgésica superior à indometacina, droga anti-inflamatória utilizada como padrão positivo. O produto obtido da reação de hidrogenação (**TTR-1H**) poderá ser submetido a essas atividades e o efeito da relação estrutura/atividade da obovatina será avaliado.

Nos ensaios de atividade antibacteriana, obovatina (**TTR-1**) e o extrato SMFE apresentaram uma atividade moderada do ponto de vista clínico, para quatro linhagens de bactérias e a estemodina (**SMF-1**) mostrou atividade para cinco linhagens avaliadas. Os resultados apontam *T. toxicaria* e *S. maritima* como fonte de agentes bactericidas.

## REFERÊNCIAS

- ALBERS, J. M. C.; PAIMELA, L.; KURKI, P.; EBERHARDT, K. B.; EMERY, P.; VAN'THOF, M. A.; SCHREUDER, F. H. J. M.; LEIRISALO-REPO, M.; VAN RIEL, P. L. C. M. Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 60, p. 453-458, 2011.
- ALLEN, J. G.; COLEGATE, S. M.; MITCHELL, A. A.; MULDER, R. J.; RAISBECK, M. F. The bioactivity-guided isolation and structural identification of toxic cucurbitacin steroidal glucosides from *Stemodia kingii*. **Phytochem. Anal.**, v. 17, p. 226-235, 2006.
- ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; MORAES, L. A. B.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. C-prenylflavonoids from roots of *Tephrosia tunicata*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 799-804, 2000.
- ARITOMI, M.; KAWASAKI, T. Three highly oxygenated flavone glucuronides in leaves of *Spinacia oleracea*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 9, p. 2043-2047, 1984.
- ARRIAGA, A. M. C.; LIMA, J. Q.; VASCONCELOS, J. N.; OLIVEIRA, M. C. F. ANDRADE-NETO, M.; SANTIAGO, G. M. P.; UCHOA, D. E. A.; MALCHER, G. T.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R. Unequivocal assignments of flavonoids from *Tephrosia* sp. (Fabaceae). **Mag. Reson. Chem.**, v. 47, p. 537-540, 2009.
- BOHLMANN, F.; ABRAHAM, W. Neue prenylflavanone aus *Helichrysum hypocephalum*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1851-1853, 1979.
- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quím. Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- BUCHANAN, G. O.; REESE, P. B. Biotransformation of diterpenes and diterpene derivatives by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Phytochemistry**, v. 56, p. 141-151, 2001.
- CHAMY, M. C.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; GAMBARO, V. Stemodane diterpenoids from *Stemodia chilensis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1719-1721, 1991.
- CHEN, A. R. M.; REESE, P. B. Biotransformation of terpenes from *Stemodia maritima* by *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Phytochemistry**, v. 59, p. 57-62, 2002.
- CHEN, A. R. M.; RUDDOCK, P. L. D.; LAMM, A. S.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Stemodane and stemarane diterpenoid hydroxylation by *Mucor plumbeus* and *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1898-1902, 2005.
- CHRISTENSEN, L. P.; LAM, J. Flavones and other constituents from *Centaurea* species. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2663-2665, 1991.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1974.

DAGNE, E.; YENESEW, A.; WATERMAN, P. G. Flavonoids and isoflavonoids from *Tephrosia fulvinervis* and *Tephrosia pentaphylla*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 11, p. 3207-3210, 1989.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**: A biosynthetic approach. 2 ed., University of Nottingham, UK: John Wiley & Sons, Ltd Editora, 2002.

FARKAS, L.; HÖRHAMMER, L.; WAGNER, H.; ROUSLER, H.; GURNIAK, R. Untersuchungen über die Glykoside von *Centaurea jacea* L., I. Die Struktur des Jaceins und dessen Synthese aus dem Aglucon und Acetobromglucose. **Chem. Ber.**, v. 97, n. 2, p. 610-615, 1964.

FLAMINI, G.; ANTOGNOLI, E.; MORELLI, I. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. **Phytochemistry**, v. 57, p. 559-564, 2001.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUINGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Characterization of Zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Pharmacol. Lett.**, v. 55, n. 17, p. 321-326, 1994.

GOODMAN, S. M.; PAGET, S. Perioperative drug safety in patients with rheumatoid arthritis. **Clin. Rheum. Dis.**, v. 38, p. 747-759, 2012.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Químico-biológica quantitativa: um novo paradigma? **Quím. Nova**, v. 35, n. 11, p. 2105-2114, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HANSON, J. R.; REESE, P. B.; TAKAHASHI, J. A.; WILSON, M. R. Biotransformation of some stemodane diterpenoids by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, p. 1391-1393, 1994.

HUFFORD, C. D. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR assignments for the *Stemodia* diterpenes, stemodin, stemodinone and maritimol. **J. Nat. Prod.**, v. 51, n. 2, p. 367-369, 1988.

HUFFORD, C. D.; BADRIA, F. A.; ABOU-KARAM, M.; SHIER, W. T.; ROGERS, R. D. Preparation, characterization and antiviral activity of microbial metabolites of stemodin. **J. Nat. Prod.**, v. 54, n. 6, p. 1543-1552, 1991.

HUFFORD, C. D.; OGUNTIMEIN, B. O.; MUHAMMAD, I. New stemodane diterpenes from *Stemodia maritima*. **J. Nat. Prod.**, v. 55, n. 1, p. 48-52, 1992.

JANG, D. S.; PARK, E. J.; KANG, Y.; HAWTHORNE, M. E.; VIGO, J. S.; GRAHAM, J.G.; CABIESES, F.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Potencial cancer chemopreventive flavonoids from the stems of *Tephrosia toxicaria*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1166-1170, 2003.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução à Taxonomia Vegetal. vol. 4, 11 ed., São Paulo: Editora Nacional, 1993.

KELLY, R. B.; HARLEY, M. L.; ALWARD, S. J.; MANCHAND, P. S. Total synthesis of racemic 2-desoxystemodinone and stemodinol; the identity of natural "stemodinol" with stemarin. **Can. J. Chem.**, v. 60, p. 675-677, 1982.

LAMM, A. S.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Bioconversion of Stemodia maritime diterpenes and derivatives by *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1088-1093, 2006.

LONG, C.; SAULEAU, P.; DAVID, B.; LAVAUD, C.; CASSABOIS, V.; AUSSEIL, F.; MASSIOT, G. Bioactive flavonoids of *Tanacetum parthenium* revisited. **Phytochemistry**, v. 64, p. 567-569, 2003.

MANCHAND, P. S.; WHITE, J. D.; CLARDY, H. W. J. Structures of stemodin and stemodinone. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 95, n. 8, p. 2705, 1973.

MANCHAND, P. S.; BLOUNT, J. F. X-ray structure and absolute stereochemistry of stemarin, a diterpene with a new skeleton. **J. C. S. Chem. Comm.**, p. 894-895, 1975.

MANCHAND, P. S.; BLOUNT, J. F. X-ray structure and absolute stereochemistry of stemolide, a novel diterpene bisepoxide. **Tetrahedron Lett.**, n. 29, p. 2489-2492, 1976.

MARTIN, G. D. A.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Investigation of the importance of the C-2 oxygen function in the transformation of stemodin analogues by *Rhizopus oryzae* ATCC 11145. **Phytochemistry**, v. 65, p. 701-710, 2004a.

MARTIN, G. D. A.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Investigation of the importance of the C-2 and C-13 oxygen functions in the transformation of stemodin analogues by *Rhizopus oryzae* ATCC 11145. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2211-2217, 2004b.

MARTIN, G. D. A.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Stemodane skeletal rearrangement: chemistry and microbial transformation. **Phytochemistry**, v. 66, p. 901-909, 2005.

MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; ZIMERMANN, V. V. M.; GEORGETTI, S. R.; BARACAT, M. M.; FONSECA, M. J. V.; VICENTINI, F. T. M. C.; MOREIRA, I. C.; ANDREI, C. C.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. Tephrosia sinapou extract reduces inflammatory leukocyte recruitment in mice: effect on oxidative stress, nitric oxide and cytokine production. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 22, n. 3, p. 587-597, 2012.

MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N. **Manual de identificação de plantas infestantes**: Hortifrúti. São Paulo: FMC Agricultural Products, 2011.

MUIVA, L. M.; YENESEW, A.; DERESE, S.; HEYDENREICH, M.; PETER, M. G.; AKALA, H. M.; EYASE, F.; WATERS, N. C.; MUTAI, C.; KERIKO, J. M.; WALSH, D. Antiplasmodial  $\beta$ -hydroxydihydrochalcone from seedpods of *Tephrosia elata*. **Phytochem. Lett.**, v. 2, p. 99-102, 2009.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, Approved Standard M7-A6, 6<sup>a</sup> ed., NCCLS: Wayne, 2003.

PAIVA, A. A. O.; CASTRO, A. J. G.; NASCIMENTO, M. S.; WILL, L. S. E. P.; SANTOS, N. D.; ARAÚJO, R. M.; XAVIER, C. A. C.; ROCHA, F. A.; LEITE, E. L. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. **Int. Immunopharmacol.**, v. 11, p. 1241-1250, 2011.

PATEL, A.; PATEL, A.; PATEL, A.; PATEL, N. M. Estimation of flavonoid, polyphenolic content and *in vitro* antioxidant capacity of leaves of *Tephrosia purpurea* Linn (Leguminosae). **Int. J. Pharma Sci. Res.**, v.1, n.1, p. 66-77, 2010.

PERALTA, M. A.; ORTEGA, M. G.; AGNESE, A. M.; CABRERA, J. L. Prenylated flavanones with anti-tyrosinase activity from *Dalea boliviana*. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 158-62, 2011.

RAJARAM, K.; KUMAR, P. S. *In-vitro* antioxidant and antidiabetic activity of *Tephrosia tinctoria* Pers.: an endemic medicinal plant of South India. **J. Pharm. Res.**, vol. 4, n. 3, p. 891-893, 2011.

RAMESH, P.; NAIR, A. G. R.; SUBRAMANIAN, S. S. Flavonoids of *Scoparia dulcis* and *Stemodia viscosa*. **Lett. to the Editor**, v. 48, n. 2, p. 67, 1979.

RAO, D. B.; RAO, P. K.; SUMITRA, D. J. RAO, T. R. Phytochemical screening and antioxidant evaluation of some Indian medicinal plants. **J. Pharm. Res.**, v. 4, n. 7, p. 2082-2084, 2011.

RAO, B. G.; RAO, P. U.; RAO, E. S.; RAO, T. M.; PRANEETH D, V. S. Evaluation of *in vitro* antibacterial activity and antiinflammatory activity for different extracts of *Rauvolfia tetraphylla* L. root bark. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.**, p. 818-821, 2012.

RODRIGUES, F. E. A.; LIMA, J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; VASCONCELOS, J. N.; SANTIAGO, G. M. P.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R.; ARRIAGA, A. M. C. Diterpene and other constituents from *Stemodia maritima* (Scrophulariaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 8, p. 1581-1586, 2010.

ROITMAN, J. N.; JAMES, L. F. Chemistry of toxic range plants. Highly oxygenated flavonol methyl ethers from *Gutierrezia microcephala*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 4, p. 835-848, 1985.

SAKUNPAK, A.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. **Food Chem.**, v. 130, p. 826-831, 2012.

- SEGHIRI, R.; BOUMAZA, O.; MEKKIOU, R.; BENAYACHE, S.; MOSSET, P.; QUINTANA, J.; ESTÉVEZ, F.; LÉON, F.; BERMEJO, J.; BENAYACHE, F. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. **Phytochem. Lett.**, v. 2, p. 114-118, 2009.
- SHAH, R.; KATHAD, H.; SHETH, R.; SHETH, N. *In vitro* antioxidant activity of roots of *Tephrosia purpurea* Linn. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 2, n. 3, p. 30-33, 2010.
- SHEN, J.; HE, C. Isolation and purification of triptolide from the leaves of *Tripterygium wilfordii* Hook F. **Chin. J. Chem. Eng.**, v. 18, n. 5, p. 750-754, 2010.
- SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 24, n. 4, p. 223-236, 2006.
- SILVA, L. L. D. da; NASCIMENTO, M. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Antibacterial activity o labdane diterpenoids from *Stemodia foliosa*. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1291-1293, 2008.
- SILVA, W. M. B. da; ASSUNÇÃO, J. C. C.; ARAÚJO, R. M.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. New volatile constituents from leaves of *Stemodia trifoliata* (Link.) Reichb. (Schrophulariaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 1, p. 37-41, 2009.
- SILVA, W. M. B. da; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Acylated manoyl oxide diterpenes of *Stemodia trifoliata*. **Magn. Reson. Chem.**, v. 48, p. 486-489, 2010.
- 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.
- VASCONCELOS, J. N.; LIMA, J. Q.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; ALMEIDA, M. M. B.; ANDRADE-NETO, M.; MAFEZOLI, J.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R. Estudo químico e biológico de *Tephrosia toxicaria* Pers. **Quím. Nova**, v. 32, n. 2, p. 382-386, 2009.
- VASCONCELOS, J. N.; SANTIAGO, M. P. S.; LIMA, J. Q.; MAFEZOLI, J.; LEMOS, T. L. G.; SILVA, F. R. L.; LIMA, M. A. S.; PIMENTA, A. T. A.; BRAZ-FILHO, R.; ARRIAGA, A. M. C.; CESARIN-SOBRINHO, D. Rotenoids from *Tephrosia toxicaria* with larvicidal activity against *Aedes aegypti*, the main vector of dengue fever. **Quím. Nova**, v. 35, n. 6, p. 1097-1100, 2012.
- VENKATARATNAM, G.; RAO, E. V.; VILAIN, C. Flavonoids of *Tephrosia procumbens* – Revised structure for praecansone A and conformation of Praecansone B. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. I**, p. 2723-2727, 1987.
- XAVIER, C. A. C. **Efeito do fucoidam de *Fucus vesiculosus* em um modelo experimental de artrite reumatoide**. 2005. Dissertação (Mestrado em bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN, 2005.

XIN-BAO, W.; FANG, M.; LE, Z.; MIAO, Z.; QUAN-LEI, H. *In vitro* antioxidant activity of *Parnassia wightiana* W. extracts. **Chin. J. Nat. Med.**, v. 10, n. 3, p. 190-195, 2012.

YU, S. J. *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. Taylor & Francis Group, LLC, p. 52, 2008.

ZHOU, B.; TANG, H.; FENG, H.; LI, Y. First total synthesis of triptolide. **Tetrahedron**, v. 67, p. 904-909, 2011.

ZIPCODEZOO. **Genus Tephrosia, Genus Stemodia**. Disponível em:  
<[http://zipcodezoo.com/Plants/T/Tephrosia\\_toxicaria/](http://zipcodezoo.com/Plants/T/Tephrosia_toxicaria/)> e  
<[http://zipcodezoo.com/Plants/S/Stemodia\\_martima/](http://zipcodezoo.com/Plants/S/Stemodia_martima/)>. Acesso em: 10 set. 2012.