



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUIZ CÉSAR PORTO DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE ROTENÓIDES POR CG-EM E
AVALIAÇÃO INSETICIDA DE *Tefrosia vogelii* Hook. f.**

LUIZ CÉSAR PORTO DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE ROTENÓIDES POR CG-EM E
AVALIAÇÃO INSETICIDA DE *Tefrosia vogelii* Hook. f.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Química da Universidade
Estadual de Londrina.
Orientador: Prof. Dr. César Cornélio Andrei

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48i	<p>Oliveira, Luiz César Porto de. Identificação de rotenóides por CG-EM e avaliação inseticida de Tefrosia vogelii Hook. f. / Luiz César Porto de Oliveira. – Londrina, 2011. 80 f. il.</p> <p>Orientador: César Cornélio Andrei. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós- Graduação em Química, 2011. Inclui bibliografia: f. 101-107</p> <p>1. Química orgânica experimental – Teses. 2. Inseticidas vegetais – Teses. 3. Rotenóide – Teses. 4. Tephrosia vogelii – Teses. I. Andrei, César Cornélio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.</p> <p>CDU 547.08</p>
------	--

LUIZ CÉSAR PORTO DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE ROTENÓIDES POR CG-EM E AVALIAÇÃO
INSETICIDA DE *TEFROSIA VOGELII* HOOK. F.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Química da Universidade
Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. César Cornélio Andrei
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes
FFCLRP – Ribeirão Preto – SP

Prof. Dr. Fernando César de Macedo Jr.
UEL – Londrina – PR

Londrina, 05 de agosto de 2011.

Aos meus pais Luiz Carlos e Adinaura e aos meus irmãos Luiz Henrique e Caroline.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador César Andrei pela amizade e aprendizado;

Ao Jurandir pela amizade, pelos chás das cinco e é claro, pelos conhecimentos passados sobre cromatografia;

Aos Professores Fernando Macedo e Juliana F. de Souza Daniel pelas idéias e sugestões passadas na qualificação;

Ao Prof. Mauricio, Adriana e Camila pela doação do material vegetal e pelos bioensaios realizados;

Aos meus amigos que contribuíram direta e indiretamente, a minha namorada Priscila, Ismael, André, Brenda, Lucas, Juliana Liporacci, Fábio, Karine, Mariele, Emanuele, Sandy, Jeseke, Camila, Bruna, Sandra, Mauro, Nelson e Sérgio;

Ao professor Cristiano Cardoso pela exsicata depositada;

À Ivânia Schuquel – DQI/UEM pelos espectros de RMN;

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Mestrado em Química por viabilizarem o trabalho;

À CAPES pelo apoio financeiro.

O real eu atinjo através do sonho.

Clarice Lispector

OLIVEIRA, Luiz César Porto de. **Identificação de rotenóides por CG-EM e avaliação inseticida de *Tefrosia vogelii* Hook. f.** 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

No estudo químico de *Tephrosia vogelii* Hook. f. foi feita a comparação de dois métodos de extração, por Soxhlet e maceração. Os extratos obtidos pelos dois métodos foram analisados por cromatografia com fase gasosa, apresentaram grande semelhança na sua constituição. A identificação de rotenóides no extrato hexânico e nas frações, foi feita mediante a análise dos espectros de massas. Foram isolados e purificados por técnicas cromatográficas preparativas, 4 rotenóides dimetilcromênicos, deguelina, 6a,12a-desidrodeguelina, 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina e tefrosina, além de uma flavanona, a obovatina metil éter. Após o isolamento dos rotenóides, foi feita a identificação e monitoramento dos mesmos no extrato hexânico bruto, pelo método SIM (Selective Ion Monitoring), observando três rotenóides: deguelina, 6a,12a-desidrodeguelina, e a tefrosina. A confirmação estrutural das substâncias, em relação ao anel extra E nos rotenóides foi feita com base na análise de espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. O extrato hexânico mostrou atividade inseticida na faixa de concentração de 2 a 5% contra o percevejo *Euschistus heros*, apresentando mortalidade acima de 60% a partir do 4º dia de aplicação. Foi observada uma concentração em torno de 20% do extrato hexânico do rotenóide tefrosina e a aplicação desta substância em concentrações de 0,25 a 1% também mostrou atividade inseticida contra o mesmo inseto teste.

Palavras-chave: *Tefrosia vogelii*. Rotenóides. Atividade inseticida. CG-EM.

OLIVEIRA, Luiz César Porto de. **Identificação de rotenóides por CG-EM e avaliação inseticida de *Tephrosia vogelii* Hook.** f. 2011. 80 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

In the chemical study of *Tephrosia vogelii* Hook. f. the comparison of two methods of extraction, Soxhlet and maceration, was made. The extracts obtained in these two methods had been analyzed by gas chromatography, have presented great similarity in its constitution. The identification of rotenoids in the hexanic extract and in the fractions was made by analysis of mass spectrometry. The compounds, four dimethylchromenic rotenoids, deguelin, 6a,12a-dehydrodeguelin, 6-oxo-6a,12a-dehydrodeguelin and tephrosin beyond the flavanone obovatol methylether were isolated and purified by preparative chromatographic techniques. After the rotenoids isolation, it was made the identification and monitoring of the same ones in the crude hexanic extract, with the method SIM (Selective Ion Monitoring). It was observed three rotenoids, deguelin, 6a,12a-dehydrodeguelin and tephrosin. The structural confirmation of substance structures, in relation to the E rotenoids extra ring was made on the basis of the analysis of spectra of hydrogen nuclear magnetic resonance. The crude hexanic extract showed great insecticidal activity in the range of concentration between 2 to 5% against the chinch-bug *Euschistus heros*, presenting mortality above of 60% after 4^o day of application. A concentration around 20% in the hexanic extract of the rotenoid tephrosin was observed and the application of this substance in range concentrations between 0,25 to 1% also showed high insecticidal activity against insect has the same tested.

Key words: *Tephrosia vogelii*. Rotenoids. Insecticidal activity. CG-EM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rota biossintética do ácido chiquímico.....	16
Figura 2 – Rota biossintética para a formação do ácido corísmico.....	16
Figura 3 – Rearranjo de Claisen no ácido corísmico para a formação do ácido prefénico	17
Figura 4 – Rota biossintética para a formação da L-fenilalanina a partir do ácido prefénico	17
Figura 5 – Formação do ácido cinâmico	18
Figura 6 – Biossíntese do 4-hidroxicinamonil-CoA	18
Figura 7 – Rota biossintética para a formação da naringenina.....	19
Figura 8 – Rota biossintética para formação da genisteína	19
Figura 9 – Rota biossintética para a formação do ácido rotenóico	20
Figura 10 – Fechamento do anel E para a formação da rotenona (22) ou da deguelina (23).....	20
Figura 11 – Estruturas de rotenóides dimetilcromênicos isolados de <i>Tefrosia vogelii</i>	21
Figura 12 – Estrutura de rotenóides isopropenil diidrofurânicos isolados em <i>Tefrosia vogelii</i>	22
Figura 13 – Estruturas de rotenóides isolados em <i>Tefrosia vogelii</i>	23
Figura 14 – Estruturas de substâncias isoladas em <i>Tefrosia vogelii</i>	23
Figura 15 – Estruturas da rotenona e da deguelina.....	24
Figura 16 – Estrutura da desidrorrotenóide e diidrorrotenóide.....	25
Figura 17 – Proposta de estruturas de diidrorrotenóides	26
Figura 18 – Fragmentação “Retro Diels-Alder” na deguelina.....	27
Figura 19 – Proposta de estruturas de desidrorrotenóides.....	28
Figura 20 – Comparação de cromatogramas dos extratos obtidos por soxhlet e por maceração.....	47
Figura 21 – Substâncias isoladas do extrato hexânico das raízes de <i>Tefrosia vogelii</i>	49
Figura 22 – Estrutura da deguelina.....	50
Figura 23 – Espectro de massas da deguelina.....	50
Figura 24 – Proposta de origem de m/z 379 e m/z 192	50
Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H da deguelina	51

Figura 26 – Configuração absoluta da rotenona determinada por raio X	52
Figura 27 – Ampliação da região de 3,7 a 4,3 ppm do espectro de RMN de ¹ H da deguelina	53
Figura 28 – Ampliação da região de 4,6 a 5,0 ppm do espectro de RMN de ¹ H da deguelina	53
Figura 29 – Ampliação da região de 6,4 a 6,9 ppm do espectro de RMN de ¹ H da deguelina	54
Figura 30 – Espectro de RMN ¹³ C da deguelina.....	54
Figura 31 – DEPT 90 e 135 para deguelina.....	54
Figura 32 – Espectro de HSQC da deguelina.....	55
Figura 33 – Ampliação da região de 5,5 ppm a 7,8 ppm do espectro de HSQC da deguelina.....	56
Figura 34 – Estrutura da 6a,12a-desidrodeguelina.....	56
Figura 35 – Espectro de massas da 6a,12a-desidrodeguelina	57
Figura 36 – Proposta mecanística de fragmentações da tefrosina	57
Figura 37 – Estrutura de ressonância da 6a,12a-desidrodeguelina.....	58
Figura 38 – Espectro de HSQC da 6a,12a-desidrodeguelina	60
Figura 39 – Ampliação na região de 74 ppm a 132 ppm do espectro de HSQC da 6a,12a-desidrodeguelina	60
Figura 40 – Estrutura da 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina.....	61
Figura 41 – Espectro de massas da 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina.....	61
Figura 42 – Estrutura da tefrosina	63
Figura 43 – Espectros de massas da tefrosina.....	63
Figura 44 – Proposta de fragmentação da tefrosina.....	63
Figura 45 – Espectro de RMN de ¹ H da tefrosina.....	64
Figura 46 – Ampliação da região de 4,4 ppm a 4,7 ppm do espectro de RMN de ¹ H da tefrosina	65
Figura 47 – Conformação da tefrosina	66
Figura 48 – Espectro de RMN de ¹³ C da tefrosina.....	67
Figura 49 – DEPT 90 e 135 da tefrosina	67
Figura 50 – Estrutura da obovatinaetil éter	68
Figura 51 – Espectro de massas da obovatinaetil éter	68
Figura 52 – Proposta de fragmentação da obovatinaetil éter	69
Figura 53 – Espectro de RMN de ¹ H da obovatinaetil éter	69

Figura 54 – Ampliação na região de 6,0 ppm a 6,7 ppm do espectro de RMN de ^1H da obovatinaetil éter.....	70
Figura 55 – Conformação da obovatinaetil éter.....	70
Figura 56 – Experimento de NOE para obovatinaetil éter	71
Figura 57 – Ampliação do espectro de massas do extrato hexânico.....	72
Figura 58 – Espectros de massas da deguelina (SIM)	72
Figura 59 – Espectro de massas 6a,12a-Desidroguelina (SIM).....	73
Figura 60 – Espectros de massas da tefrosina (SIM).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frações obtidas da elaboração cromatográfica do extrato bruto hexânico das raízes.....	48
Tabela 2 – Valores de deslocamentos químicos de hidrogênio, e constantes de acoplamento (J) para a deguelina, 300 MHz, em CDCl ₃	52
Tabela 3 – Valores de deslocamentos químicos de carbono, para deguelina, 75 MHz, em CDCl ₃	55
Tabela 4 – Valores de deslocamentos químicos de hidrogênio, e constantes de acoplamento (J) para 6a,12a-desidrodeguelina de 300 MHz, em CDCl ₃	58
Tabela 5 – Dados comparativos de deslocamentos químicos de hidrogênio para 6a,12a-desidrodeguelina e deguelina.....	58
Tabela 6 – Valores de deslocamentos químicos de carbonos para 6a,12a-desidrodeguelina, 75 MHz, em CDCl ₃	59
Tabela 7 – Valores de deslocamentos químicos de hidrogênio, e constantes de acoplamento (J) para 6-oxo-desidrodeguelina, 300 MHz, em CDCl ₃	62
Tabela 8 – Valores de deslocamentos químicos de hidrogênios e constante de acoplamento para a tefrosina, 300 MHz, em CDCl ₃	64
Tabela 9 – Valores comparativos de deslocamentos químicos de hidrogênio para a tefrosina e deguelina.	66
Tabela 10 –Valores comparativos de deslocamentos químicos (δ -C), para tefrosina e deguelina, 75 MHz, em CDCl ₃	67
Tabela 11 –Valores de deslocamentos químicos de hidrogênios e constantes de acoplamento (J) para tefrosina, 300 MHz, em CDCl ₃	70

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Mortalidade em percentagem de percevejos *Euschistus heros* adultos, pulverizados com extrato hexânico das raízes de *Tefrosia vogelii*.....74
- Gráfico 2** – Mortalidade em percentagem de percevejos *Euschistus heros* adultos, pulverizados com a tefrosina, isolada do extrato hexânico das raízes de *Tefrosia vogelii*.....75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.2	BIOSSÍNTESE DE ROTENÓIDES.....	15
1.3	SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NA <i>TEFROSIA VOGELII</i> HOOK. F	21
1.3.1	Rotenóides.....	21
1.3.1.1	Dimetilcromênicos.....	21
1.3.1.2	Isopropenil diidrofurânicos	22
1.3.2	Flavonóides	22
1.3.3	Substâncias Inéditas.....	23
1.4	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE ROTENÓIDES POR EM	24
1.5	REVISÃO DE ROTENÓIDES	28
2	OBJETIVOS	40
2.1	OBJETIVOS GERAIS	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	EQUIPAMENTOS	41
3.1.1	Solventes e Reagentes.....	41
3.1.2	Material Vegetal.....	42
3.1.3	Insetos	42
3.1.4	Solução Estoque de Extrato	42
3.2	MÉTODOS.....	43
3.2.1	Preparação do Material Vegetal	43
3.2.2	Obtenção dos Extratos	43
3.2.2.1	Extração por soxhlet.....	43
3.2.2.2	Extração por maceração.....	43
3.3	DESENVOLVIMENTOS DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	44
3.3.1	Fracionamento Primário do Extrato Hexânico Obtido por Soxhlet.....	44
3.3.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	44
3.3.3	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas.....	44
3.3.4	Cromatografia Gasosa (CG).....	45
3.4	ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	45

3.5	TESTE BIOLÓGICO	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	COMPARAÇÃO DOS DOIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	47
4.2	OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES PRIMÁRIAS	47
4.3	SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	48
4.4	DETERMINAÇÕES ESTRUTURAIS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	49
4.4.1	Deguelina.....	49
4.4.2	Desidrodeguelina	56
4.4.3	6 oxo-6a,12a-desidrodeguelina	61
4.4.4	Tefrosina.....	62
4.4.5	Flavonona	68
4.5	MONITORAMENTO DE ROTENÓIDES EM EXTRATO HEXÂNICO BRUTO	71
4.6	TESTE BIOLÓGICO	73
5	CONCLUSÃO.....	76
6	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

O metabolismo secundário é descrito por vários autores como um conjunto de reações químicas que contribui para manutenção do organismo, não sendo essencial a vida como o metabolismo primário, na produção de proteínas, carboidratos e lipídeos, embora ajudem na sua sobrevivência.

A concentração de metabólitos secundários na planta não se mostra constante e pode sofrer interferência de temperatura, sazonalidade, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes (macro e micro), poluição atmosférica, altitude e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

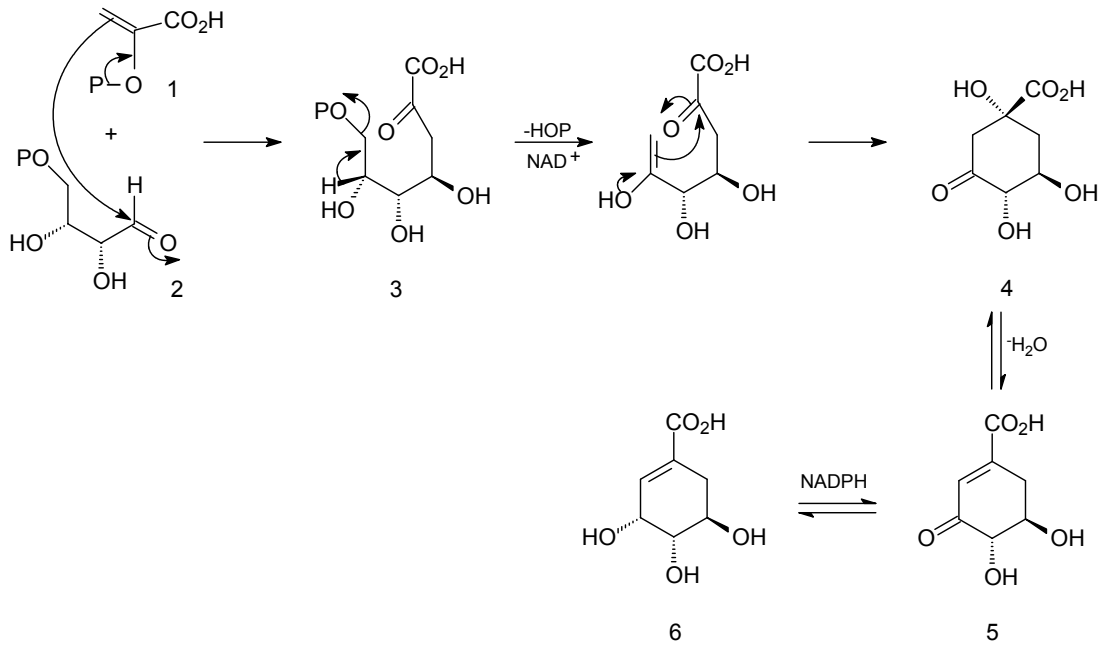
Os produtos do metabolismo secundário são restritos a um grupo taxonômico, tais como família e gênero. Citamos como exemplo a classe dos rotenóides, conhecidos como inseticidas naturais e produzidos por algumas espécies como a *Lonchocarpus*, *Derris*, *Munduella* e *Tefrosia*. (BRAZ-FILHO, 1994). O mecanismo de ação dos rotenóides se dá pela inibição de transporte de elétrons na cadeia respiratória, levando ao organismo morte por asfixia (CROMBIE, 1999).

Trabalhos sobre a espécie *Tefrosia vogelii* descreve sobre a toxicidade em *Tilapia nilotica* (IMBRAHIM et. al., 2000), e como inibidor muito potente do crescimento (ARNASON et. al., 1988). É relatada também pelo seu poder inseticida, sendo utilizados no controle de insetos, na proteção de grãos, animais domésticos e como medicamento para o tratamento de doenças de pele e de vermes internos (TEPHROSIA VOGELII).

1.2 BIOSÍNTESE DE ROTENÓIDES

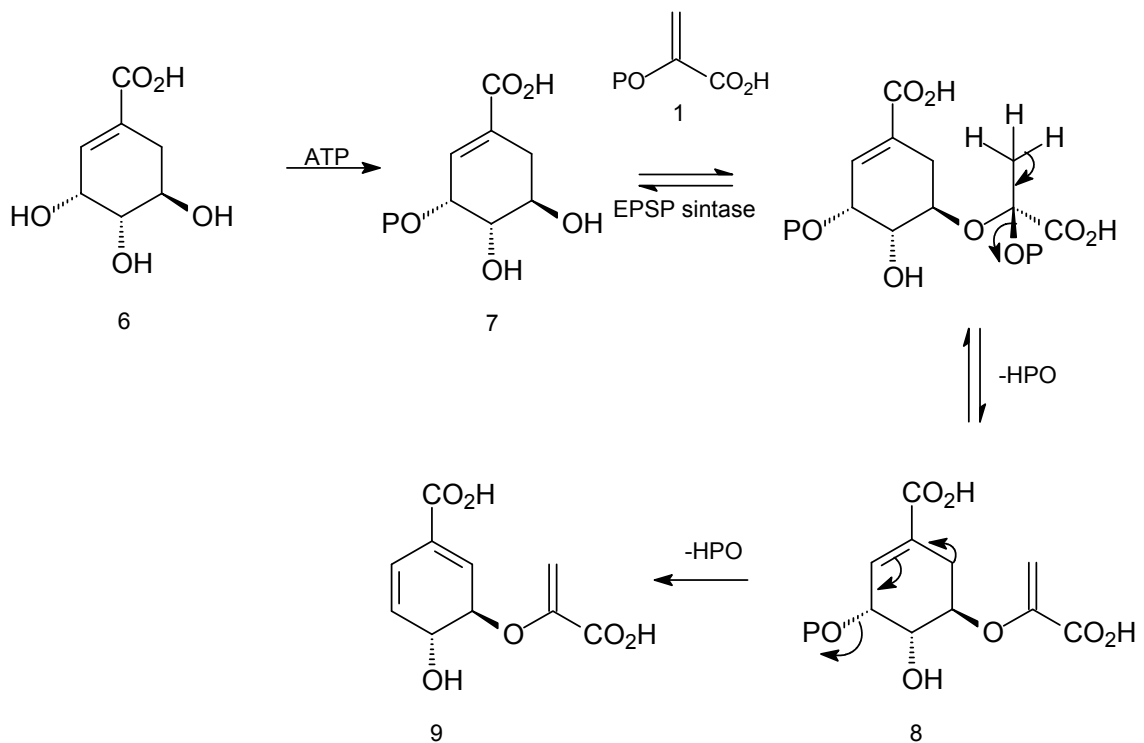
A biossíntese dos rotenóides via chiquimato é discutida por vários autores e esta rota se baseia em capítulos do livro Medicinal Natural Products (DEWICK, 2001). A via chiquimato inicia-se pela condensação aldólica do fosfoenolpiruvato (1) com a D-eritrose 4-fosfato (2). A eliminação de ácido fosfórico seguido de uma reação intramolecular, forma o primeiro intermediário, o ácido 3-diidroquímico (4). Após uma desidratação forma o ácido 3-desidrochiquímico (5), seguida de uma redução para formar o ácido chiquímico (6).

Figura 1 – Rota biossintética do ácido chiquímico.



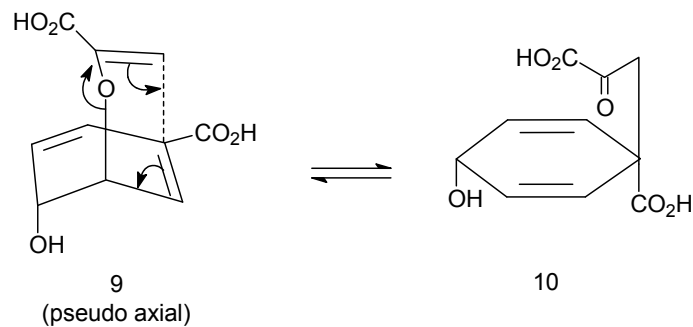
A próxima etapa é a formação do ácido corísmico (9), com a incorporação de fosfoenolpiruvato (1) pelo ácido 3-fosfo chiquímico (7), catalisada enzimaticamente. Em seguida ocorrem duas eliminações (1,2 e 1,4) de ácido fosfórico, para a formação do ácido corísmico (9).

Figura 2 – Rota biossintética para a formação do ácido corísmico.



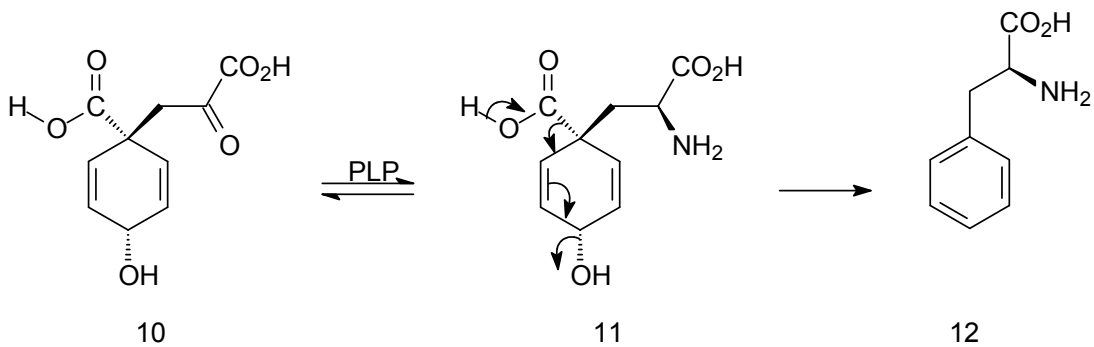
O ácido corísmico (9) sofre um rearranjo de Claisen, quando está na conformação pseudoaxial, possibilitando assim a transferência da cadeia lateral enzimaticamente (corismato mutase) para formar o ácido prefênico (10). Este por sua vez, possui o esqueleto carbônico básico para a biossíntese da fenilalanina e da tirosina.

Figura 3 – Rearranjo de Claisen no ácido corísmico para a formação do ácido prefênico.



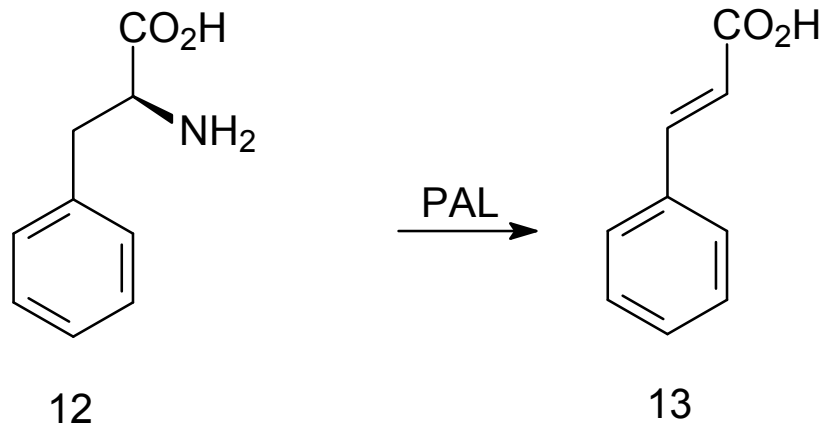
O ácido prefênico (10) sofre uma aminação formando o aminoácido (11), seguida de uma aromatização com a descarboxilação para formar a L-fenilalanina (12).

Figura 4 – Rota biossintética para a formação da L-fenilalanina a partir do ácido prefênico.



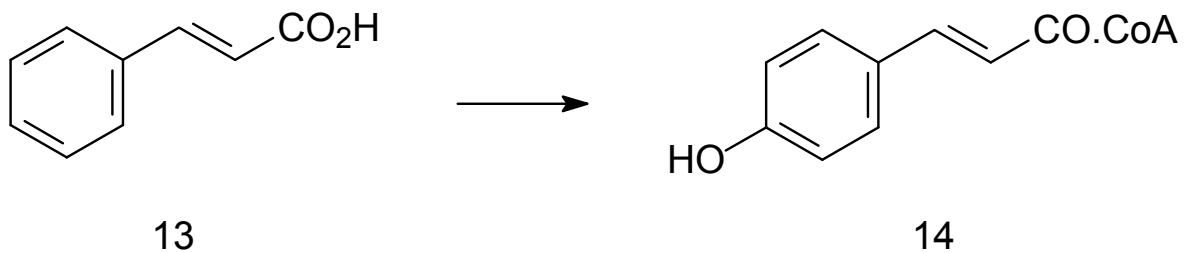
A eliminação de amônia da L-fenilalanina (12) ocorre de uma forma antiperiplanar, na presença da enzima fenilalanina amônia liase (PAL). O produto resultante de estereoquímica E, é o ácido cinâmico (13).

Figura 5 – Formação do ácido cinâmico.



A hidroxilação e a incorporação da Coenzima-A no ácido cinâmico (13) leva a formação do 4-hidroxicinamonil-CoA (14).

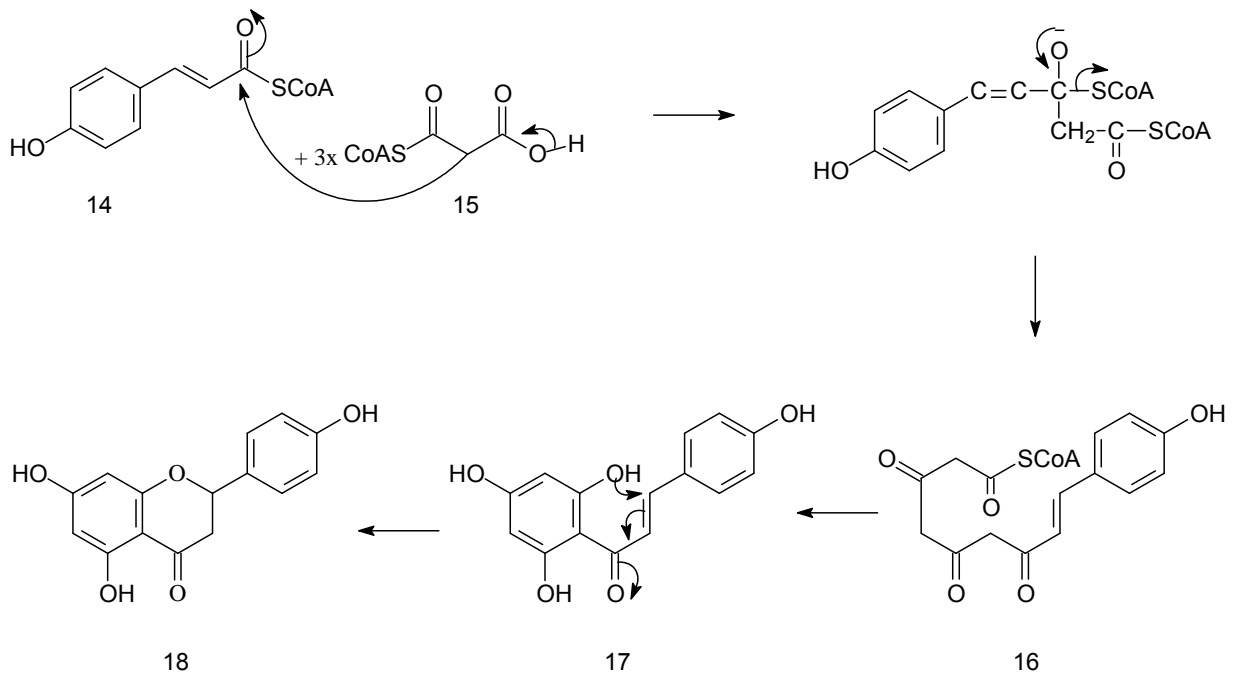
Figura 6 – Biossíntese do 4-hidroxicinamonil-CoA.



A condensação enzimática (chalcona sintetase) do 4-hidroxicinamonil-CoA (14) com três unidades de malonil-CoA (15), leva de início a formação de um policetídio (16), que cicliza para formar uma chalcona (17).

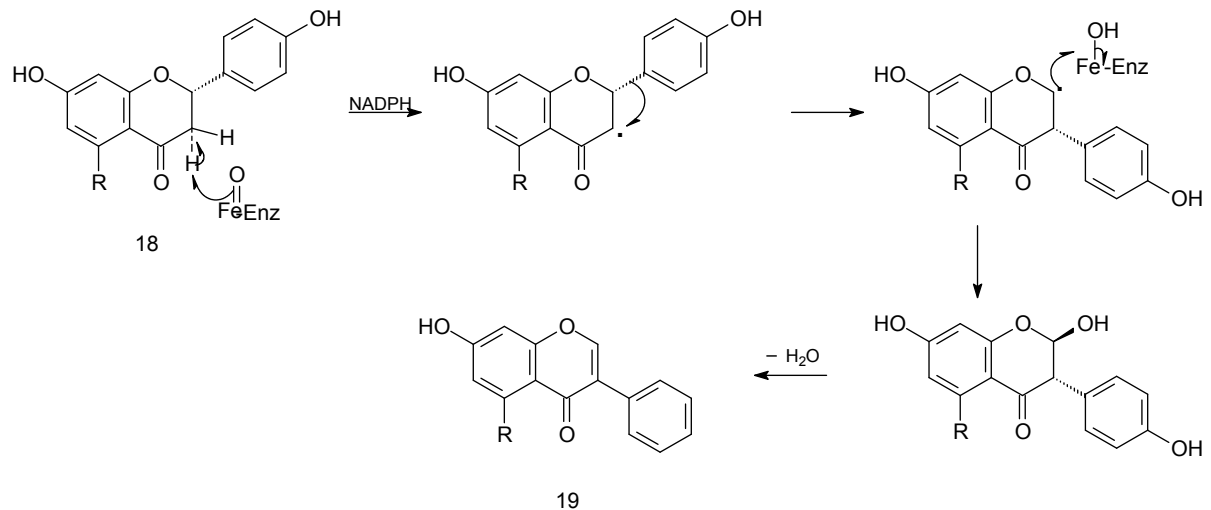
A ciclização da chalcona (17) com a hidroxila orto a carbonila resulta na formação de uma flavanona, a naringenina (18).

Figura 7 – Rota biossintética para a formação da naringenina.



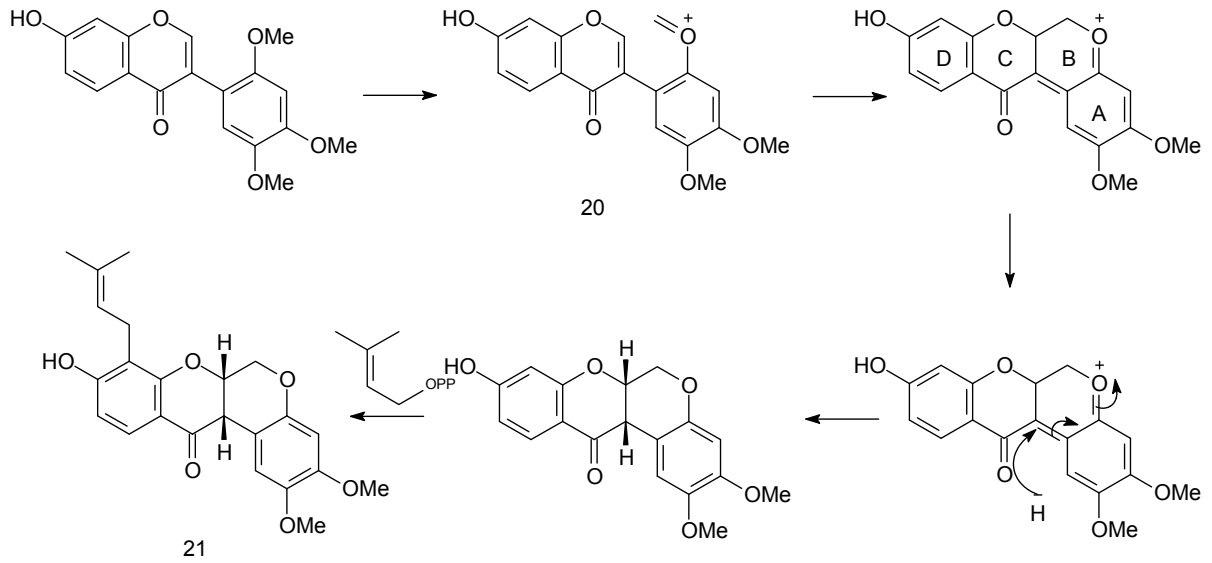
Sendo os rotenóides derivados de isoflavonóides, ocorre a migração da fenila na naringenina (18), para o carbono adjacente formando o genisteína (19).

Figura 8 – Rota biossintética para formação de genisteína.



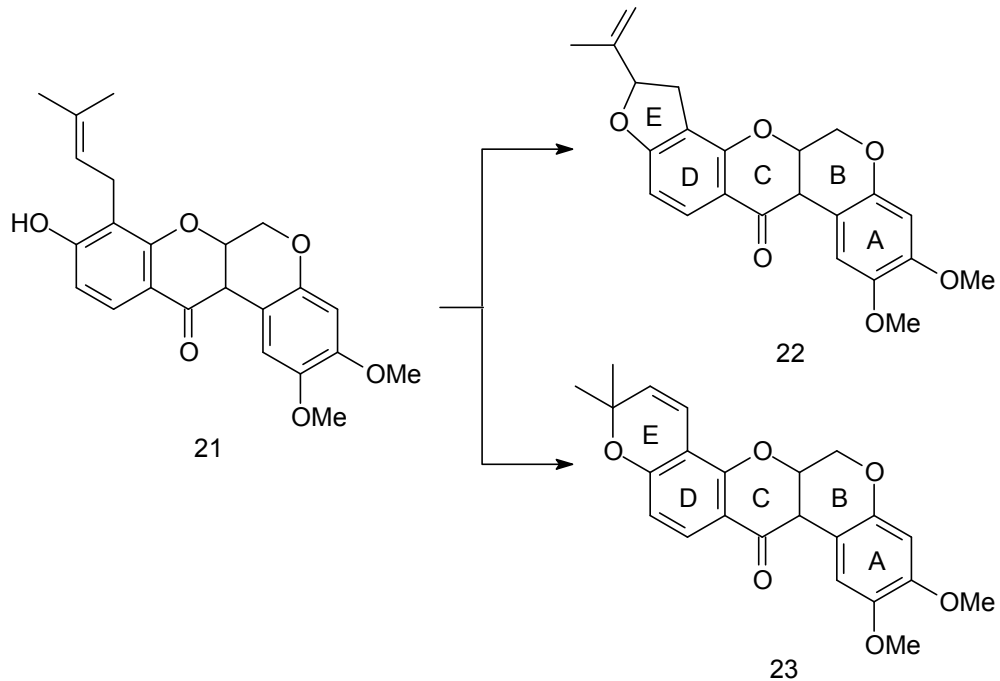
A próxima etapa é o fechamento do anel B a partir do intermediário metilenoóxênio (20), através de uma reação eletrocíclica seguida por um ataque nucleofílico do hidreto em C-12a. Em seguida ocorre a alquilação para a formação do ácido rotenóico.

Figura 9 – Rota biossintética para a formação do ácido rotenóico.



Finalmente C-prenilação seguida de ciclização via metoxilação, leva a origem dos possíveis anéis E, isopropenil diidrofurânicos, como a rotenona (**22**) ou dimetilcromênicos, como a deguelina (**23**).

Figura 10 – Fechamento do anel E para a formação da rotenona (**22**) ou da deguelina (**23**).



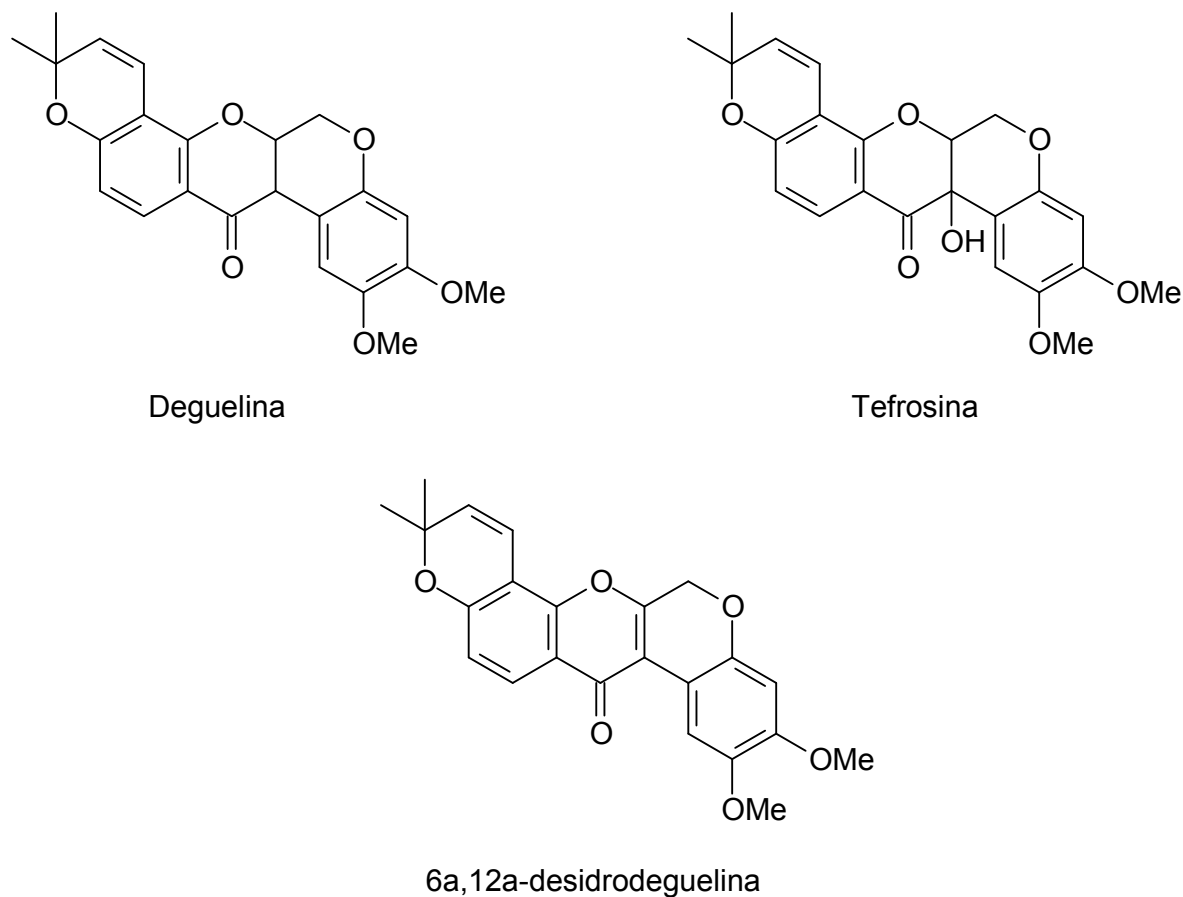
1.3 SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NA *TEFROSIA VOGELII* HOOK. F.

1.3.1 Rotenóides

A revisão bibliográfica no Chemical Abstracts realizado no mês 07/2011, relata 35 trabalhos na espécie *Tephrosia vogelii*, envolvendo produtos do metabolismo secundário. Observou-se o isolamento de sete rotenóides, distribuídos nas duas classes, dimetilcromênicos e isopropenil diidrofurânicos.

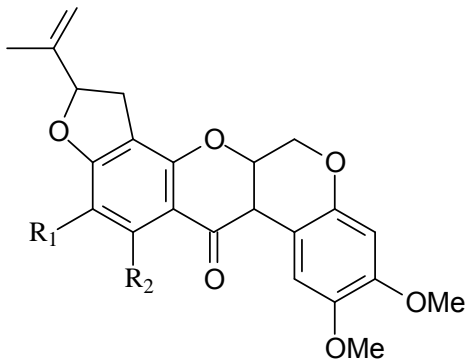
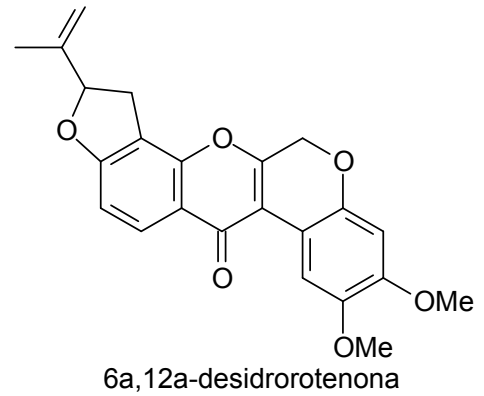
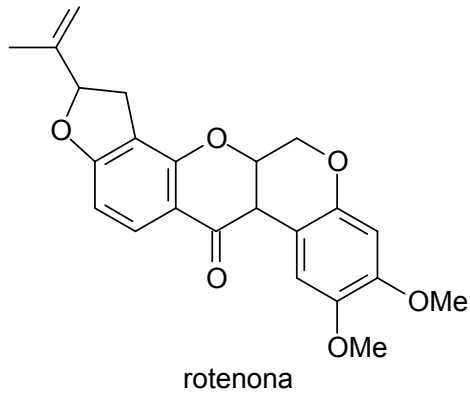
1.3.1.1 Dimetilcromênicos

Figura 11 – Estruturas de rotenóides dimetilcromênicos isolados de *Tephrosia vogelii*.

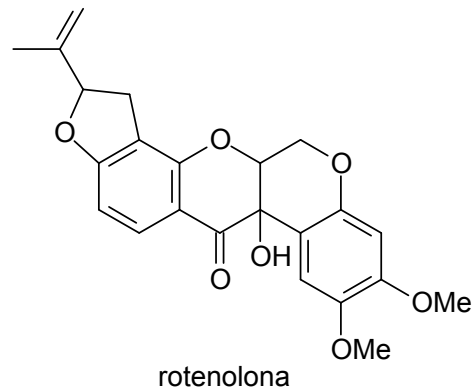


1.3.1.2 Isopropenil diidrofurânicos

Figura 12 – Estrutura de rotenóides isopropenil diidrofurânicos isolados de *Tefrosia vogelli*.



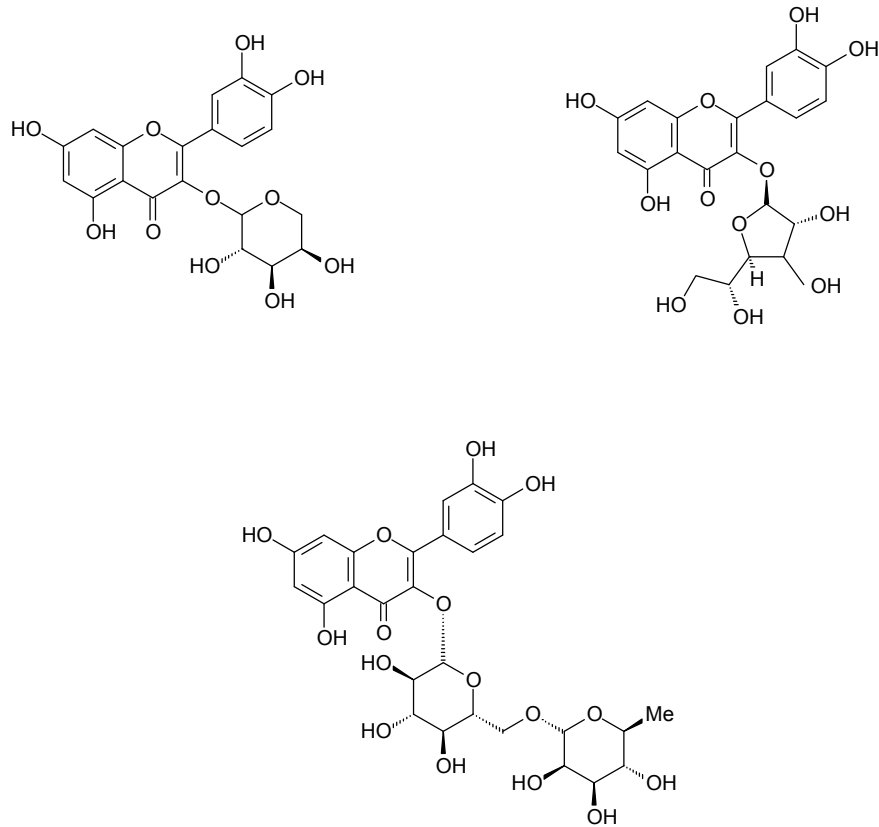
R1 = OH e R2 = H 10-hidroxi-amorfigenina
ou
R1 = H e R2 = OH 11-hidroxi-amorfigenina



1.3.2 Flavonóides

O único relato de isolamento de flavonóides da espécie em estudo, envolve três flavonas glicosiladas das partes aéreas da planta. (MARSTON, MSONTHI, HOSTETTMANN, 1984).

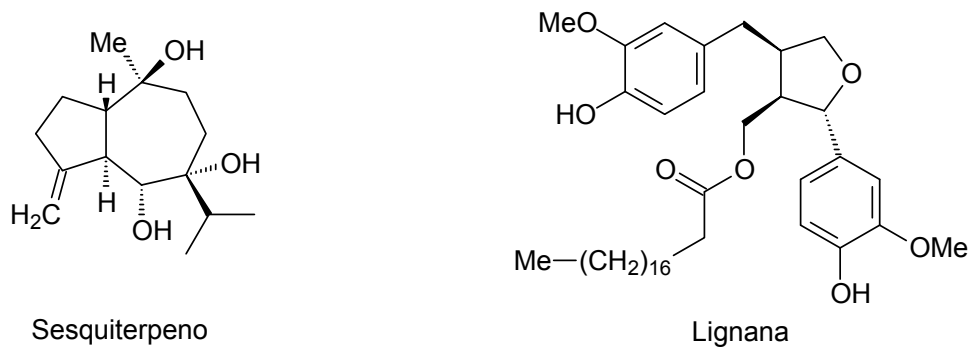
Figura 13 – Estruturas de flavonas isoladas de *Tefrosia vogelii*.

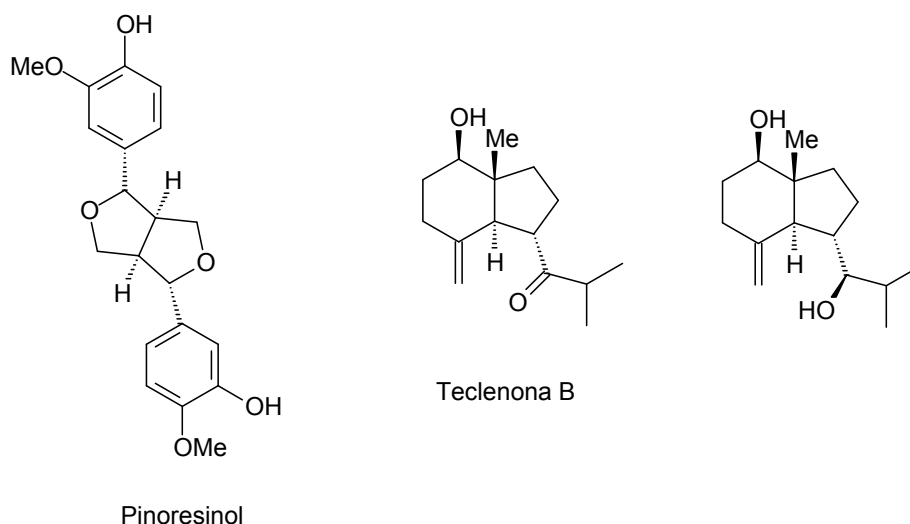


1.3.3 Substâncias Inéditas

Substâncias inéditas foram isoladas das partes aéreas da espécie *Tephrosia vogelii*, um sesquiterpeno e uma lignana, além de 3 compostos conhecidos (WEI, HUAN-HUAN, 2009).

Figura 14 – Estruturas de substâncias isoladas de *Tefrosia vogelii*.

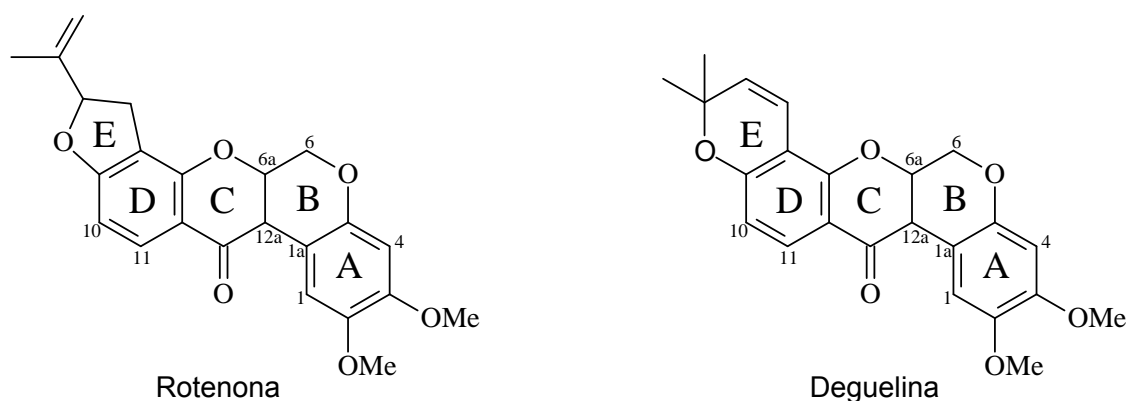




1.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE ROTENÓIDES POR EM

Na família Fabaceae a maior parte dos rotenóides apresentam funcionalização no anel **A** com duas metoxilas ou um metilindioxi ligados nos carbonos 2 e 3. Também é observado nos constituintes um anel extra **E** derivado da ciclização via prenila resultando nos anéis substituídos isopropenil diidrofuranos como na rotenona ou dimetilcromênico como na deguelina (Figura 15).

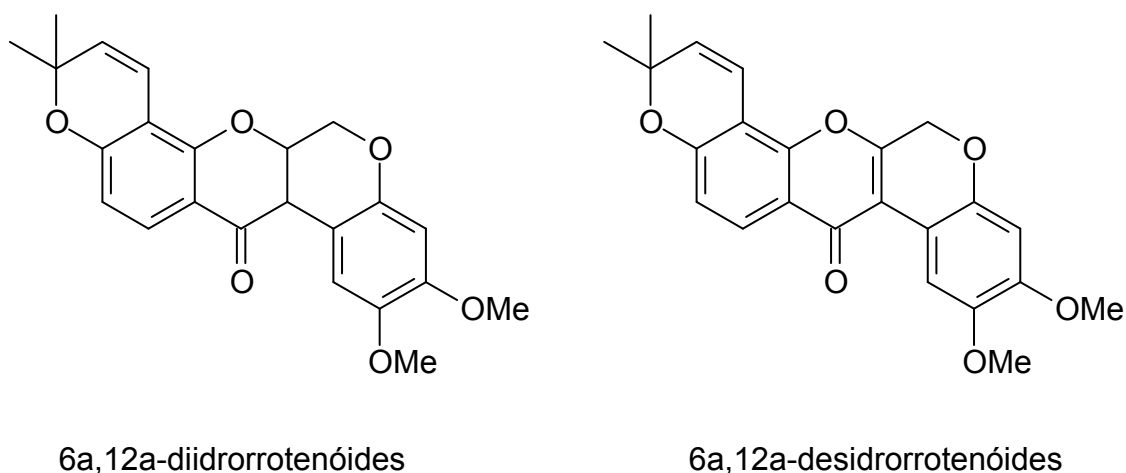
Figura 15 – Estruturas da rotenona e deguelina



No estudo da *T. vogelii* foram observados apenas rotenóides dimetoxilados e com anel **E** extra dimetilcromênico, ou seja, deguelina e seus derivados estruturais. A identificação dos rotenóides pela análise de espectros de massas foi sugerida tomando-se por base a estrutura da deguelina subdividindo-se em dois tipos estruturais derivados: 6a,12a-desidrorrotenóides e 6a,12a-

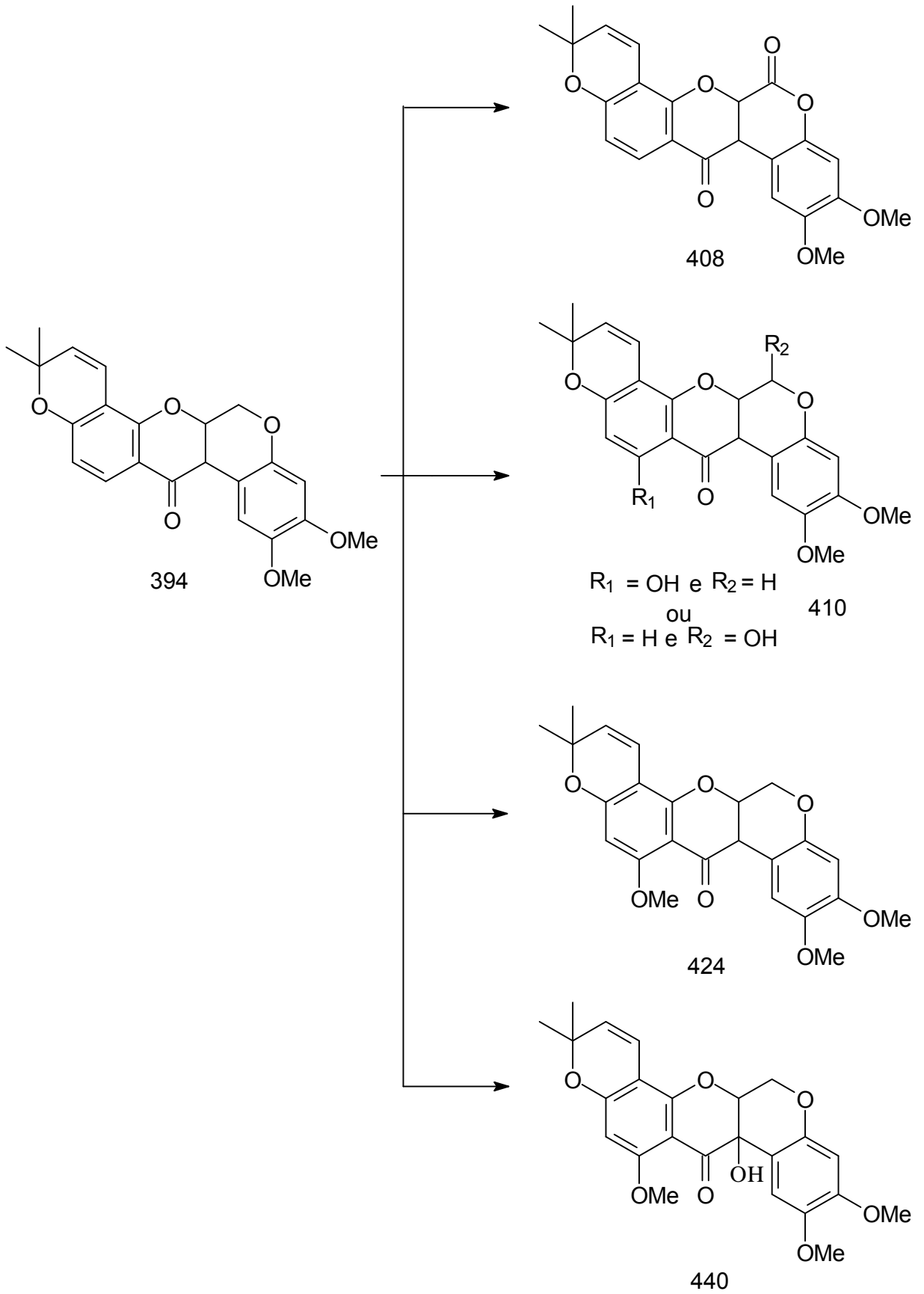
diidrorrotenóides (Figura 16). Este raciocínio em classes de espectros de massas definidos quanto às modificações derivadas de substituintes, foi empregado com sucesso no presente trabalho e pode ser estendido a outras espécies que biossintetizem rotenóides.

Figura 16 – Estrutura da 6a,12a-desidrorrotenóides e 6a,12a-diidrorrotenóides.



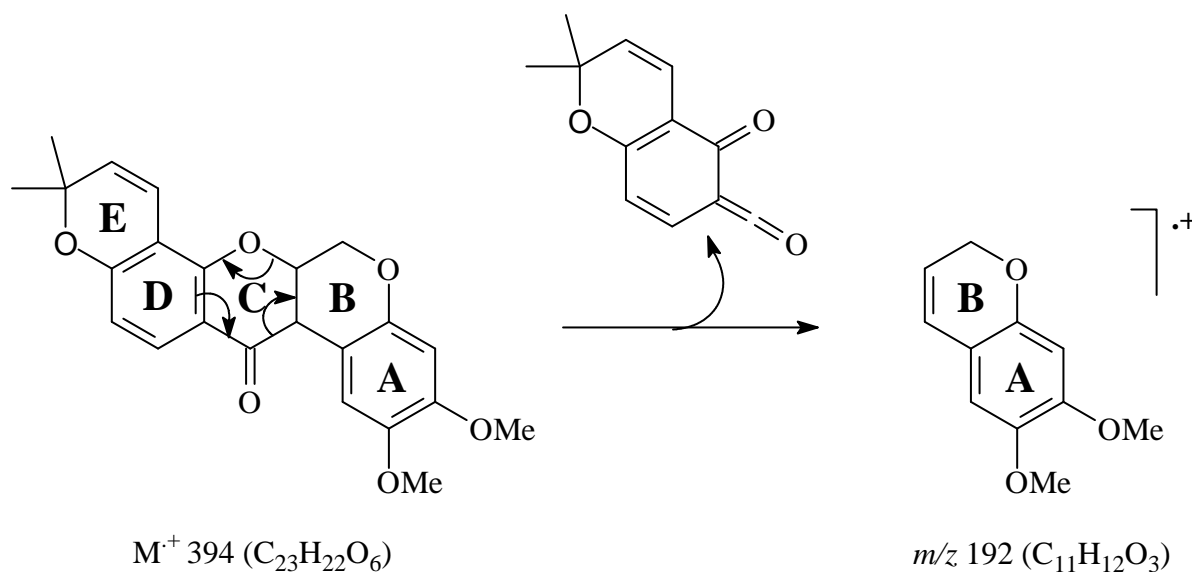
A massa da deguelina é de 394 D, que corresponde à fórmula molecular $C_{23}H_{22}O_6$. Os acréscimos a estrutura com funções oxigenadas em primeiro lugar somam-se simplesmente a massa de 394 D. Oxigênio carbonílico aumenta a massa em 14 unidades, dezesseis do átomo menos duas unidades da insaturação, o hidroxílico eleva a massa a 16 unidades, uma metoxila aumentará 30 e combinações de funções a soma das massa, por exemplo hidroxila e metoxila, com aumento de 46 unidades. Para estes respectivos casos deveremos esperar os íons moleculares de 408, 410, 424 e 440 (Figura 17).

Figura 17 – Proposta de estruturas de diidrorrotenóides.



Outro ponto de grande interesse analítico para os 6a,12a-diidrorotenóides é a fragmentação do tipo “Retro Diels-Alder” que consegue fixar o padrão de substituição nos anéis **A** e **B**. Esta fragmentação no caso sempre resulta no pico base do espectro. Na deguelina o íon/pico base gerado é o m/z 192 (Figura 18), mas para outros derivados 6a,12a-saturados é possível distribuir os demais substituintes nas moléculas.

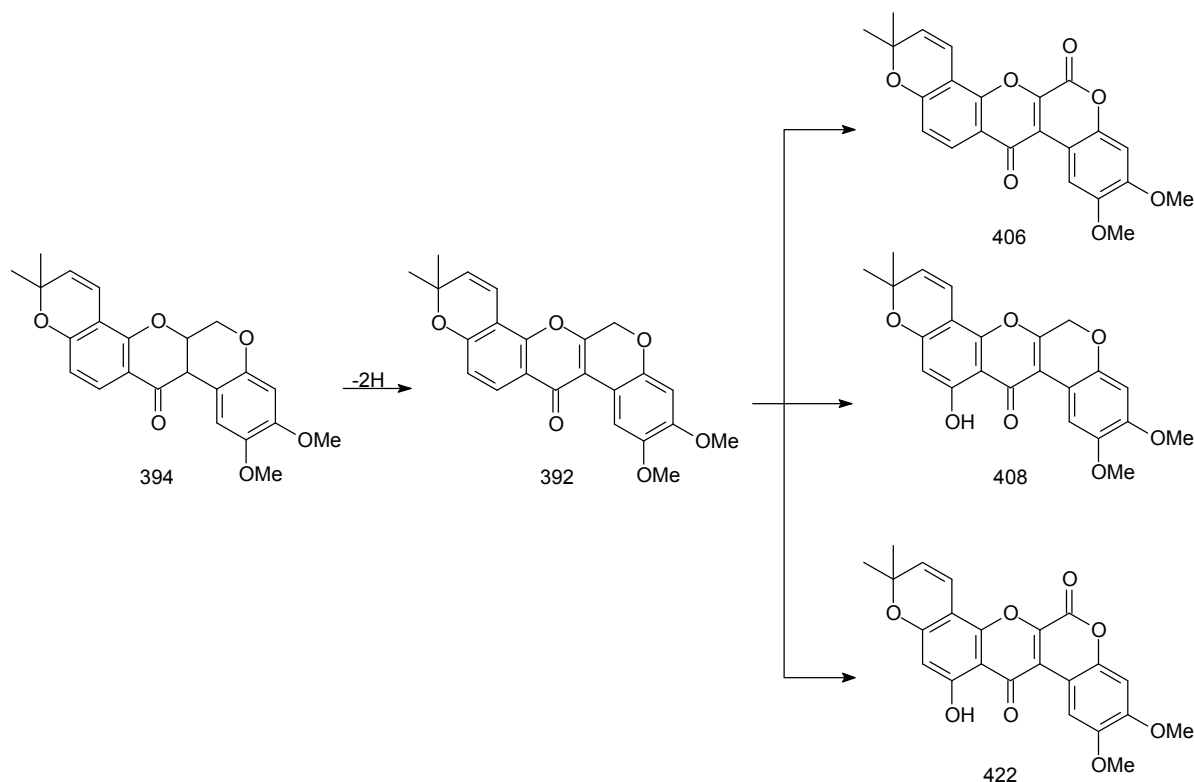
Figura 18 – Fragmentação “Retro Diels-Alder” na deguelina.



Em nosso trabalho a identificação dos rotenóides 6a,12a-saturados principalmente os íons moleculares e os picos-base derivados de “RetroDiels-Alder” foram decisivos para atribuição estrutural. Além destes dependendo das estruturas os picos M-15 ($\cdot CH_3$), M-17 ($\cdot OH$) e M-18 (HOH), também foram utilizados

No caso da 6a,12a-desidrodeguelina, tomando-a como tipo estrutural base, a única diferença de massa é a perda de dois hidrogênios que resulta em nova estrutura de massa 392 D. Qualquer outro acréscimo como por exemplo, oxigênio carbonílico, hidroxílico ou mesmo ambos repercutirá respectivamente nos incrementos de massa de 14, 16 e 30 unidades, levando automaticamente os novos íons moleculares também respectivamente a 406, 408 e 422 D (Figura 19).

Figura 19 – Proposta de estruturas de desidrorrotenóides.



Os espectros de massas em todos estes rotenóides apresentam como característica o pico do íon molecular ou o íon resultante da perda de metila (M-15) como pico base. Nestes casos a “Retro Diels-Alder” não é observada, portanto fora os picos do íon molecular e o M-15 estas substâncias não apresentam outros de maior intensidade.

1.5 REVISÃO DE ROTENÓIDES

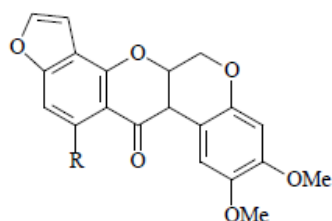
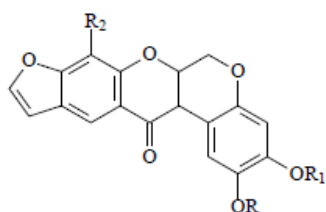
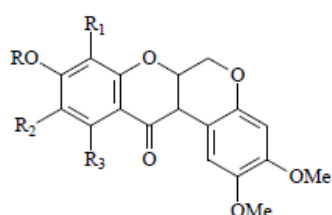
A revisão de rotenóides está contida em 3 partes: a primeira realizada no período de 1885 a 1981. Neste período foram relatados 61 rotenóides, e apenas 7 desses estavam ligados a heterosídeos. Estão distribuídos na família fabacea, pertencentes aos gêneros: *Clitoria*, *Crotalaria*, *Dalbergia*, *Derris*, *Lonchocarpus*, *Millettia*, *Mundulea*, *Neorantanenia*, *Ormocarpum*, *Ostryoderris*, *Pachyrrhizus*, *Piscidia*, *Poiretia*, *Tefrosia* e *Spatholobus*, e da família Scrophulariaceae do gênero *Verbascum*, da família Myricaceae do gênero *Myrica*, da família Stemonaceae do gênero *Stemona* (INGHAM, 1983).

A segunda parte da revisão realizada no período de 1981 a 1996, relatou 35 novas estrutura de rotenóides (ANDREI, 1998).

Com o objetivo de dar continuidade nestas revisões, foi realizada a terceira parte no Chemical Abstracts (Chemical Substance Index), no período de 1997 a 2010. Neste período foram relatadas 20 novas estruturas de rotenóides, entre elas um aminorotenóides.

Período de 1885 a 1981

6a,12a-diidrorrotenóides



Substituintes

R=Me, R₁=R₂=R₃=H

R=Me, R₁=R₂=H, R₃=OH

R=R₁=R₃=H, R₂=3,3'dimetilalil

R=R₂=R₃=H, R₁=3,3'dimetilalil

R/R₁=CH₂, R₂=H

R=R₁=Me, R₂=H

R/R₁=CH₂, R₂=OMe

R=H

R=OH

Nomenclatura

Munduserona

Semundona

Miriconol

Ac. Rot-2'-enônico

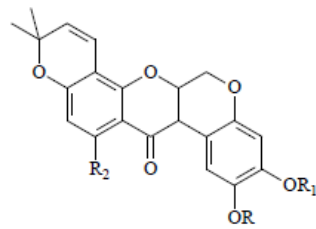
Dolineona

Erosoona

Pachirizona

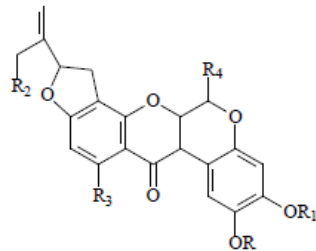
Eliptona

Malacol



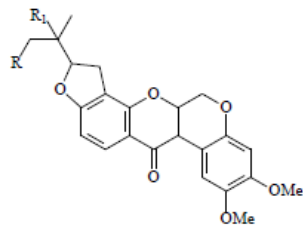
$R/R_1=CH_2$, $R_2=H$
 $R=R_1=Me$, $R_2=H$
 $R=R_1=Me$, $R_2=OH$

Miletona
 Deguelina
 α -toxicarol



$R/R_1=CH_2$, $R_2=R_3=R_4=H$
 $R=R_1=Me$, $R_2=R_3=R_4=H$
 $R=R_1=Me$, $R_2=OH$, $R_3=R_4=H$
 $R=R_1=Me$, $R_2=R_4=H$, $R_3=OH$
 $R=R_1=Me$, $R_2=H$, $R_3=R_4=OH$

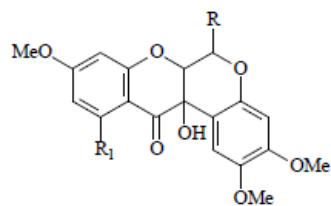
Isomiletona
 Rotenona
 Amorfigenina
 Sumatrol
 Vilosina



$R=OH$, $R_1=H$
 $R=H$, $R_1=OH$
 $R=R_1=OH$

Diidroamorfigenina
 Dalpanol
 Amorfigenol

12a-hidroxirotenóides

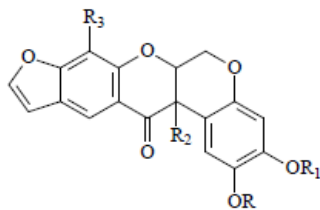


Substituintes

$R=R_1=H$
 $R=R_1=OH$

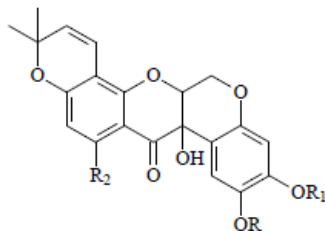
Nomenclatura

12a-hidroximunduserona
 clitoriacetal



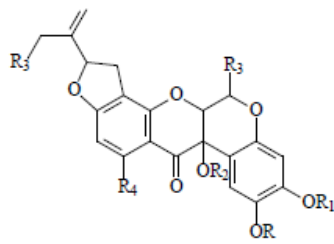
$R/R_1=CH_2$, $R_2=R_3=H$
 $R/R_1=CH_2$, $R_2=Me$, $R_3=H$
 $R=R_1=Me$, $R_2=R_3=H$
 $R=R_1=R_2=Me$, $R_3=H$
 $R/R_1=CH_2$, $R_2=H$, $R_3=OMe$

12a-hidroxi-dolineona
 12a-metoxidolineona
 12a-hidroxi-erosona
 neobananona
 12a-hidroxi-pachimizonona



$R/R_1=CH_2$, $R_2=H$
 $R=R_1=Me$, $R_2=H$
 $R=R_1=Me$, $R_2=OH$

Miletosina
 Tefrosina
 12a-hidroxi- α -toxicarol



R/R₁=CH₂, R₂=R₃=R₄=R₅=H

12a-hidroximiletona

R=R₁=Me, R₂=R₃=R₄=R₅=H

rotenolona

R=R₁=R₂=Me, R₃=R₄=R₅=H

12a-metoxirrotenona

R=R₁=Me, R₂=R₄=R₅=H, R₃=OH

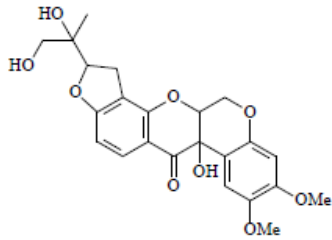
dalbinol

R=R₁=Me, R₂=R₃=R₅=H, R₄=OH

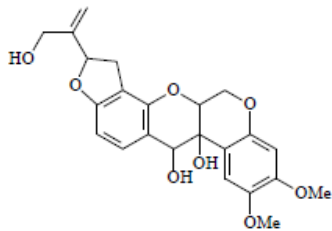
vilosinol

R=R₁=Me, R₂=R₃=H, R₄=R₅=OH

vilol

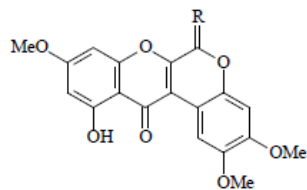


12a-hidroxiamorfigenol



12-hidroxiadalbinol

6a,12a-desidrorrotenóides



Substituintes

R=O

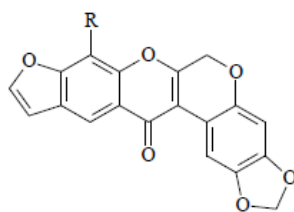
Estemonona

R=H/OH

Estemonal

R=H/OEt

Estemonoacetal

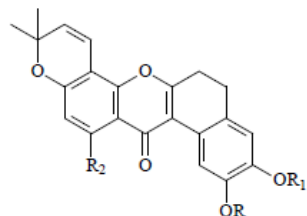


R=H

6a,12a-desidrodolineona

R=OMe

6a,12a-desidropachirrizona



R/R₁=CH₂, R₂=H

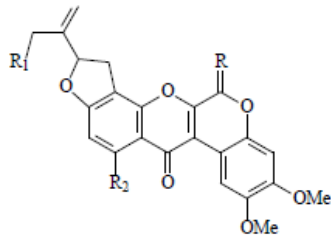
6a,12a-desidromiletona

R₂=H

6a,12a-desidrodeguelina

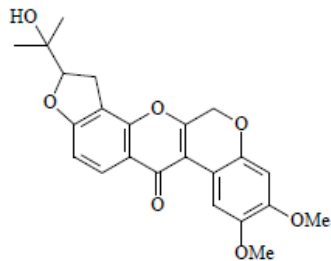
R/R₁=CH₂, R₂=OH

6a,12a-desidro-α-toxicarol



$R=H/H, R_1=R_2=H$
 $R=H/H, R_1=OH, R_2=H$
 $R=O, R_1=R_2=H$
 $R=H/OH, R_1=R_2=H$
 $R=H/H, R_1=H, R_2=OH$
 $R=O, R_1=R_2=OH$
 $R=H/OMe, R_1=H, R_2=OH$

6a,12a-desidorotenona
 6a,12a-amorfigenina
 rotenonona
 amorfolona
 vilosol
 vilosona
 vilinol

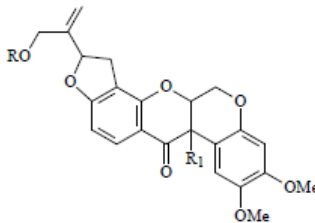


6a,12a-desidrodalpanol

Heterosídeos de rotenóides

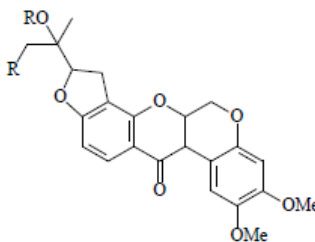
Substituintes

Nomenclatura



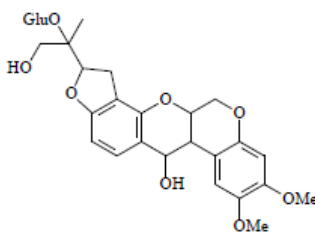
$R=Glu, R_1=H$
 $R=Vic^*, R_1=H$
 $R=Glu, R_1=OH$
 *vicianosídeo – O- α -L-arabinosil-D-glucose

Amorfigenina-O-glucosídeo
 Amorfinina
 Dalbina



$R=H, R_1=Glu$
 $R=OH, R_1=Glu$
 $R=OH, R_1=Vic$

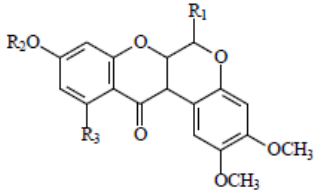
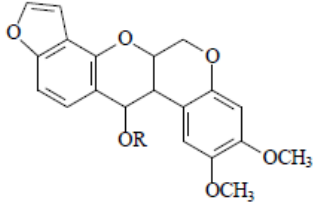
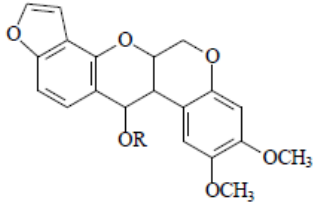
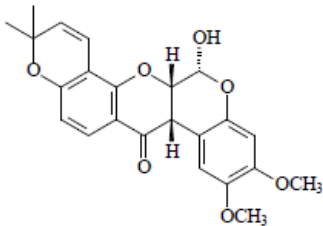
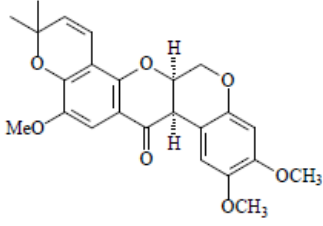
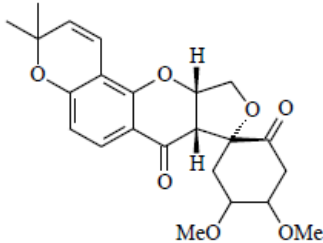
Dalpanol-O-glucosídeo
 Amorfigenol-O-glucosídeo
 Amorfol

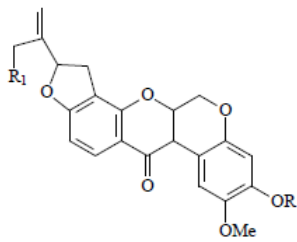


12-hidroxdalbina

Período de 1981 a 1996.

6a, 12a – diidrorotenóides

	Espécie	Substituintes	Nomenclatura vulgar
	<i>Tephrosia pentaphylla</i>	$R_1=R_3=OH, R_2=CH_3$	diidroestemonal
	<i>Tephrosia pentaphylla</i>	$R_1=R_3=OH, R_2=H$	9-desmetildiidroestemonal
	<i>Tephrosia pentaphylla</i>	$R_1=OAc, R_2=CH_3, R_3=OH$	6-acetoxidiidroestemonal
	<i>Derris oblonga</i>	$R=Ac$	12-deoxo-12 α -acetoxieliptona
	<i>Derris elliptica</i>	$R=H$	eliptinol
	<i>Mundulea</i>	$R=OH, R_1=H$	6-hidroxi deguelina
	<i>Mundulea sericea</i>	$R=OH, R_1=H$	6-hidroxi deguelina
	<i>Piscidia erythrina</i>	$R=H, R_1=OCH_3$	Eritiona
	<i>Amorpha fruticosa</i>		Amorfoespirona



Amorfa fruticosa
Dalbergi volubis
Tephrosia wallichii

R=R₁=H
 R=H, R₁=OH
 R=R₁=Me

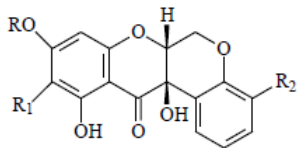
3-desmetilmorfigenina
 volubinol
 walichina

12a-hidroxirotenóides

Espécie

Substituintes

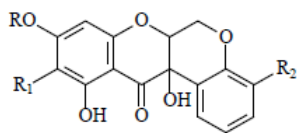
Nomenclatura vulgar



Boerhaavia diffusa

R=R₁=Me, R₂=OH

Boeravinona C



Íris crocea

R=Me, R₁=OMe, R₂=H

9-metil-inspurinol

Íris spurea

R=R₂=H, R₁=OMe

irispurinol

Boerhaavia coccinea

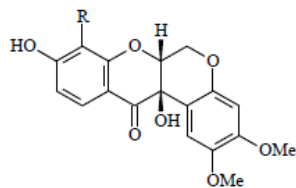
R=Me, R₁=H, R₂=OH

4,11,12a-triidroxi-9-etoxirotenóide

Boerhaavia coccinea

R=R₁=H, R₂=OH

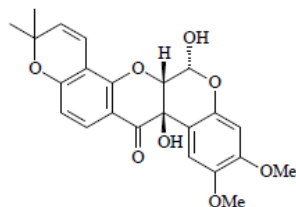
4,9,11,12a-tetraidroxirotenóide



Millettia pachycarpa

R=3,3'-dimetilalil

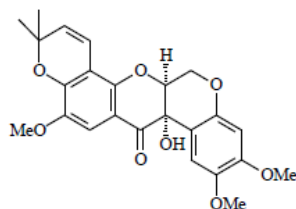
Ac. 12a-hidroxi-rot-2'-enónico



Mundulea sericea

R=OH, R₁=H

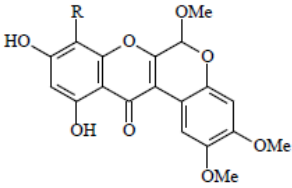
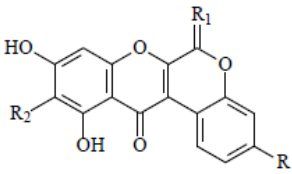
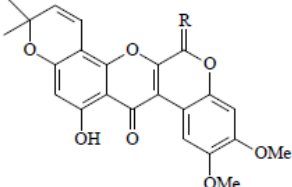
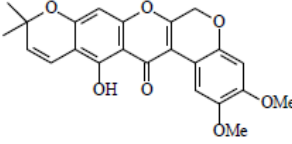
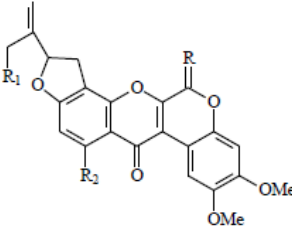
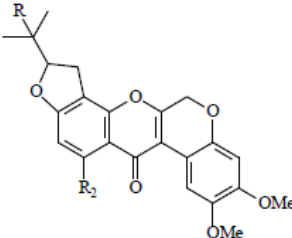
6-hidroxi-tefosina



Piscidia erythrina

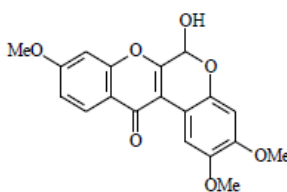
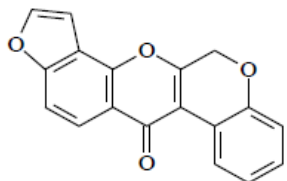
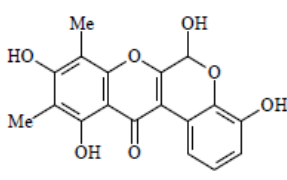
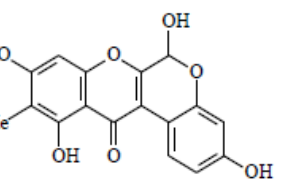
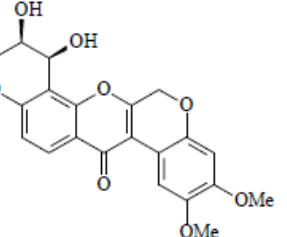
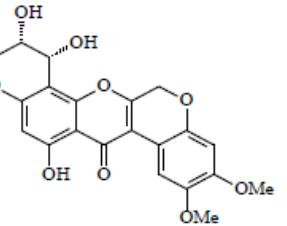
R=H, R₁=OMe

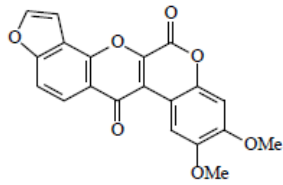
12a-hidroxi-eritona

6a,12a-desidorrotenóides	Espécie	Substituintes	Nomenclatura vulgar
	Tephrosia villosa	R=3,3'-dimetilalil	6-O-metil-desmetilestemonal
	Boerhaavia diffusa	R=OH, R ₁ =H/OMe, R ₂ =Me	Boeravinona D
	Boerhaavia diffusa	R=OH, R ₁ =H/OH, R ₂ =Me	Boeravinona E
	Boerhaavia diffusa	R=OH, R ₁ =O, R ₂ =Me	Boeravinona F
	Boerhaavia diffusa	R=H, R ₁ =H/OMe, R ₂ =Me	Boeravinona A
	Boerhaavia diffusa	R=H, R ₁ =H/OH, R ₂ =Me	Boeravinona B
	Boerhaavia repens	R=H, R ₁ =H/Ac, R ₂ =OH	Repenona
	Boerhaavia repens	R=R ₂ =OH, R ₁ =H/Oac	Repenol
	Derris oblonga	R=H/OH	6-hidroxi-6a,12a-desidro-α-toxicarol
	Amorpha fruticosa		
	Derris oblonga	R=O	6-oxo-6a,12a-desidro-α-toxicarol
	Derris oblonga		6a,12a-desidro-β-toxicarol
	Dalbergia sissooides	R=O, R ₁ =OH, R ₂ =H	6-oxo-6a,12a-desidroamorfigenina
	Tephrosia villosa	R=H/OH, R ₁ =H, R ₂ =OH	6-hidroxi-6a,12a-desidrosumatrol
	Tephrosia cândida	R=H	6a,12a-desidrodiidrotenona
	Dalbergia paniculata	R=OGli	6a,12a-desidroalpanol-O-glicosideo

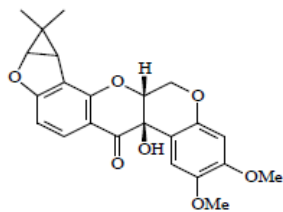
Período de 1997 a 2010

6a,12a-desidrorrotenóides

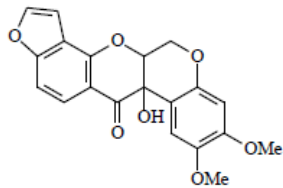
	Espécie	Nomenclatura	Referências
	<i>Clitoria fairchildiana</i>		MATHIAS et al., 2005.
	<i>Pongamia pinnata</i>	Pongarotene	SIMIN et al., 2002.
	<i>Mirabilis jalapa</i>	Mirabijalone B	WANG et al., 2002.
	<i>Mirabilis jalapa</i>	Mirabijalone D	WANG et al., 2002.
	<i>Derris elliptica</i>	4',5'-dihidroxi-6a,12a-desidrodeguelina	LU et al., 2008.
	<i>Derris elliptica</i>	4',5',11-trihidroxi-6a,12a-desidrodeguelina	LU et al., 2008.

*Derris malaccensis*

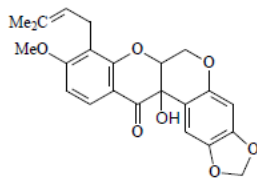
6-oxo-dihydroelliptona

WANGTEERAPRASERT;
LIKHITWITAYAWUID, 2008.**12a-hidroxirotenoides***Sarcolobus globosus*

WANGENSTEEN et al., 2005.

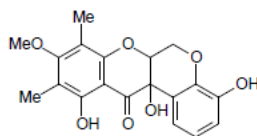
*Derris malaccensis*

12a-hidroxielliptona

THASANA; CHUANKAMNER;
RUCHIRAWAT, 2001.*Millettia usaramensis*

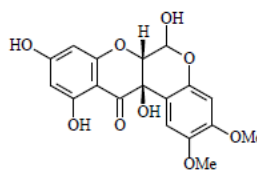
Usararotenoides C

YENESEW et al., 2003.

*Mirabilis jalapa*

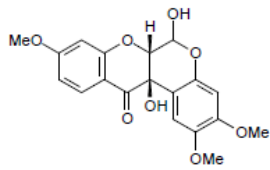
Mirabilone A

WANG et al., 2002.

*Clitoria fairchildiana*

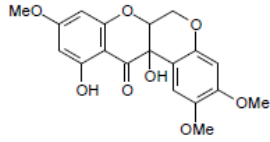
9-dimetilclitoriacetal

SILVA; BERNADO; PARENTE, 1998.

*Clitoria fairchildiana*

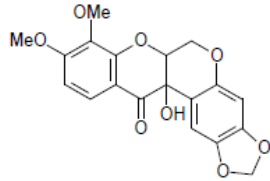
11-deoxiditoriacetal

MATHIAS; MORS; PARENTE, 1998.

*Clitoria fairchildiana*

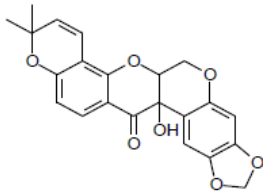
6-deoxiditoriacetal

PEREIRA; BERNADO; PAZ, 1998.

*Millettia usaramensis*

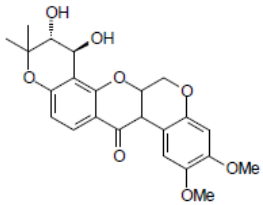
Usararotenóide B

YENESEW; MIDIWO; WATERMAN, 1998.

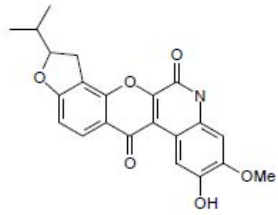
*Millettia usaramensis*

Usararotenóide C

YENESEW; MIDIWO; WATERMAN, 1998.

6a,12a-diidrorrrotenóides*Derris malaccensis*

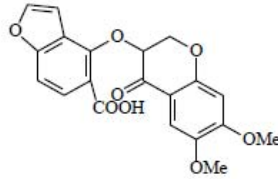
TAKASHIMA et al., 2002.

Aminorrotenóides**Espécie***Derris elliptica***Nomenclatura**

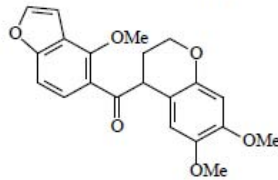
2-hidroxi-5-aminorotenona

Referências

LU; LIANG, 2009

Outros*Derris elliptica*

LU; LIANG, 2009

*Derris trifoliata*

CHEENPRACHA et al., 2007.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Aplicar a espectrometria de massas (EM) acoplada à cromatografia gasosa (CG), na identificação e na determinação estrutural de rotenóides das raízes de *Tefrosia vogelii* Hook. f.;
- Avaliar a atividade inseticida do extrato hexânico bruto e das substâncias isoladas;
- Contribuir para o estudo químico da espécie e gênero.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar rotenóides no extrato hexânico bruto e nas frações obtidas das raízes de *Tefrosia vogelii*, por CG-EM;
- Isolamento e purificação de rotenóides por cromatografia preparativa em placas, colunas e de alta eficiência;
- Utilização de RMN de ^1H e ^{13}C para confirmação das estruturas;
- Isolamento e determinação estrutural de demais constituintes da planta;
- Realizar bioensaios para avaliar o potencial inseticida do extrato hexânico e das substâncias isoladas em percevejos da espécie *Euschistus heros*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Scientech 5A-120;
- Balança semi analítica Marte A1000;
- Cromatógrafo gasoso CG 17 acoplado ao espectrômetro de massas CGMS-QP5000 da Shimadzu, e o software CLASS 5000 com as bibliotecas NIST12 e NIST62;
- Cromatógrafo gasoso CG17A Shimadzu acoplado com detector de ionização de chama (CG-DIC);
- Cromatógrafo líquido semi preparativo com detector UV-Vis SPD-10A Shimadzu;
- Espectrofotômetro de Ressonância Nuclear Multinuclear Varian 300 MHz, Magneton NMR 300 MHz (modelo Gemini);
- Rota evaporador Fisatom modelo 801;
- Lâmpada UV-Vis modelo UVGL-15;
- Extratores de soxhlet de capacidade de 2 L.
- Bomba a vácuo Primatec ¼ cv.

3.1.1 Solventes e Reagentes

- Cicloexano Merck P.A;
- Hexano P.A Synth P.A;
- Acetato de etila F. Maia P.A;
- Álcool metílico Synth P.A;
- Diclorometano QHEMIS P.A;
- Diclorometano grau HPLC para CLAE preparativa;
- Sílica-gel 60 (0,063 – 0,200 mm) Merck;
- Sílica-gel para cromatografia em camada fina MACHEREY-NAGEL;
- Vanilina sulfúrica;
- Monoestearato de sorbitan (SPAN 60) Sigma, validade: 03/11/2013;
- tensoativo tween 80.

3.1.2 Material Vegetal

A espécie *Tefrosia vogelii* Hook. f. foi coletada nas estufas do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, com a colaboração do Prof. Dr. Maurício Ursi Ventura, sendo a origem dos espécimes do IAPAR de Londrina.

Uma exsicata foi depositada no herbário no Centro Universitário Filadélfia – Unifil em Londrina – Paraná (UNIFIL 2279).

3.1.3 Insetos

Os percevejos foram obtidos da criação estoque do Laboratório de Entomologia da UEL, pela Adriana Mikami e Camila Marques ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% UR; Fotoperíodo de 14hs). A criação foi iniciada a partir de insetos doados pela EMBRAPA Soja e incrementada com insetos coletados em lavouras de soja, em Londrina - PR. Os percevejos foram alimentados com grãos de soja (*Glycine max* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.) e frutos verdes de ligustro (*Ligustrum lucidum* W. T. Aiton).

3.1.4 Solução Estoque de Extrato

No frasco de béquer, adicionou 8,5 mL de água destilada e 200 mg de tensoativo tween 80. Com auxílio de um banho maria, aqueceu-se a solução a 70°C para a dissolução completa. Após adicionou 300 mg de tensoativo SPAN 60 e 450 mg de extrato hexânico. Homogeneizou a solução com auxílio de um bastão de vidro até a formação da emulsão (Prof. Dr. Francisco de Assis Marques – UFPR).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação do Material Vegetal

O material vegetal separado em raízes, caules, casca dos caules e folhas, foi seco em temperatura ambiente e a sombra. Foram processados

individualmente em triturador de facas, e apenas a casca do caule foi processada em liquidificador industrial, devido à natureza do material.

3.2.2 Obtenção dos Extratos

Os extratos das raízes foram obtidos por dois métodos de extração, soxhlet e maceração, e com quatro solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade, hexano ou cicloexano, acetato de etila e por último metanol.

O objetivo das duas metodologias foi relacionar o tempo de obtenção dos extratos e verificar se existe algum efeito sobre os mesmos com o uso da temperatura que é observada pela extração com soxhlet.

Todos os extratos obtidos foram concentrados para a eliminação dos solventes orgânicos em evaporador rotatório a pressão reduzida.

3.2.2.1 Extração por soxhlet

Foram montados dois aparelhos de soxhlet com capacidade individual de aproximadamente 150 gramas de raízes trituradas e balão de 2 L por extração.

As extrações foram realizadas por batelada para o hexano e posteriormente para o acetato de etila. O total de raízes trituradas separadas para esse tipo de extração foi de 1,2 kg, e o tempo aproximadamente de 16 horas para cada etapa.

3.2.2.2 Extração por maceração

A extração exaustiva a temperatura ambiente, foi realizada com 1,8 kg de raízes trituradas para os três solventes orgânicos: cicloexano, acetato de etila e metanol. O tempo de extração foi aproximadamente de trinta dias para cada solvente. O volume de cada solvente utilizado foi de 6 litros para um recipiente de 20 litros.

3.3 DESENVOLVIMENTOS DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.3.1 Fracionamento Primário do Extrato Hexânico Obtido por Soxhlet

O fracionamento primário do extrato hexânico de peso 10,59 g, foi realizado em coluna sílica-gel em adsorção (CC), utilizando uma relação extrato e sílica 1:30.

Foi utilizada a série eluotrópica: hexano; diclorometano em hexano na percentagem de (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 75); diclorometano; metanol em diclorometano na percentagem de (2, 5, 10 e 50) e finalmente metanol. Para cada eluente, corresponde a uma fração, e o volume de solvente eluído na coluna foi de até 5 litros.

As frações obtidas do fracionamento primário, foram elaboradas por cromatografia preparativa em placas (1mm de sílica) e em coluna (relação fração sílica 1:20). O tamanho das placas variou de acordo com o peso da fração ou da amostra. Para uma fração de no máximo 80 mg, utilizou uma placa de dimensões 20 cm por 20 cm.

3.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A purificação das substâncias foi realizada por CLAE em coluna preparativa GS-310 2G Shodex (partição), com a fase móvel diclorometano a uma vazão de 5 mL/ min. O comprimento de onda utilizado no detector foi de 250 nm.

3.3.3 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

O extrato hexânico, as frações, e as substâncias isoladas foram dissolvidas em hexano ou em diclorometano para serem injetadas no CG-EM.

O equipamento consiste de:

- Injetor manual a temperatura de 320 °C.
- Coluna 100 % polidimetilsiloxano (DB-1), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura de filme;
- Forno com rampa programada de temperatura, iniciada em 60 °C por 4 min, subindo 10 °C/ min até 250 °C, e depois aumentada numa taxa de 15 °C/ min até 330 °C, que permaneceu nessa temperatura por 8 minutos;
- Gás hélio com fluxo de 0,5 mL/min;

- Modo split em 30 mL/min e a purga do septo fixado em 1 mL/min;
- Detector de massas com interface a 250 °C, no modo impacto de elétrons;
- Software CLASS 5000 para aquisição e tratamento dos dados via detector de massas.

3.3.4 Cromatografia Gasosa (CG)

As condições de operação do CG foram as mesmas descrita no tópico 3.3.3.

3.4 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As amostras foram analisadas pela Dra. Ivânia T. A. Schuquel da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

3.5 TESTE BIOLÓGICO

Para o teste biológico foram utilizados 10 percevejos adultos *Euschistus heros*, de idade de 7 a 20 dias e não sexados. A unidade experimental foram caixas gerbox com tampa de dimensões 11 cm por 11 cm e 3 cm de altura, contendo vagem verde de feijão de aproximadamente 10 cm de comprimento. Foram preparados a partir de uma solução estoque de extrato hexânico 5% (m/m), soluções de trabalho de concentração 1%, 2%, 3% e 4%. A pulverização das soluções (400 µL/ caixa) foi utilizando um aerógrafo acoplado a um compressor/aspirador, regulado para uma pressão de 10 bar. Após a pulverização das soluções, as placas foram mantidas tampadas em câmara climatizada (25 ± 2°C, 70% UR; Fotoperíodo de 14hs). O ensaio foi conduzido durante 10 dias para o teste com o extrato hexânico, registrando os insetos mortos a cada dois dias, e realizando também a troca do alimento. Para o teste biológico com a tefrosina, a solução estoque foi de 1% e as soluções de trabalho de 0,25% e 0,5%, tendo duração de 5 dias, registrando os insetos mortos diariamente.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Foram utilizadas cinco repetições para os percevejos, com o extrato hexânico e para a tefrosina, com 10 repetições. Os dados foram submetidos ao teste

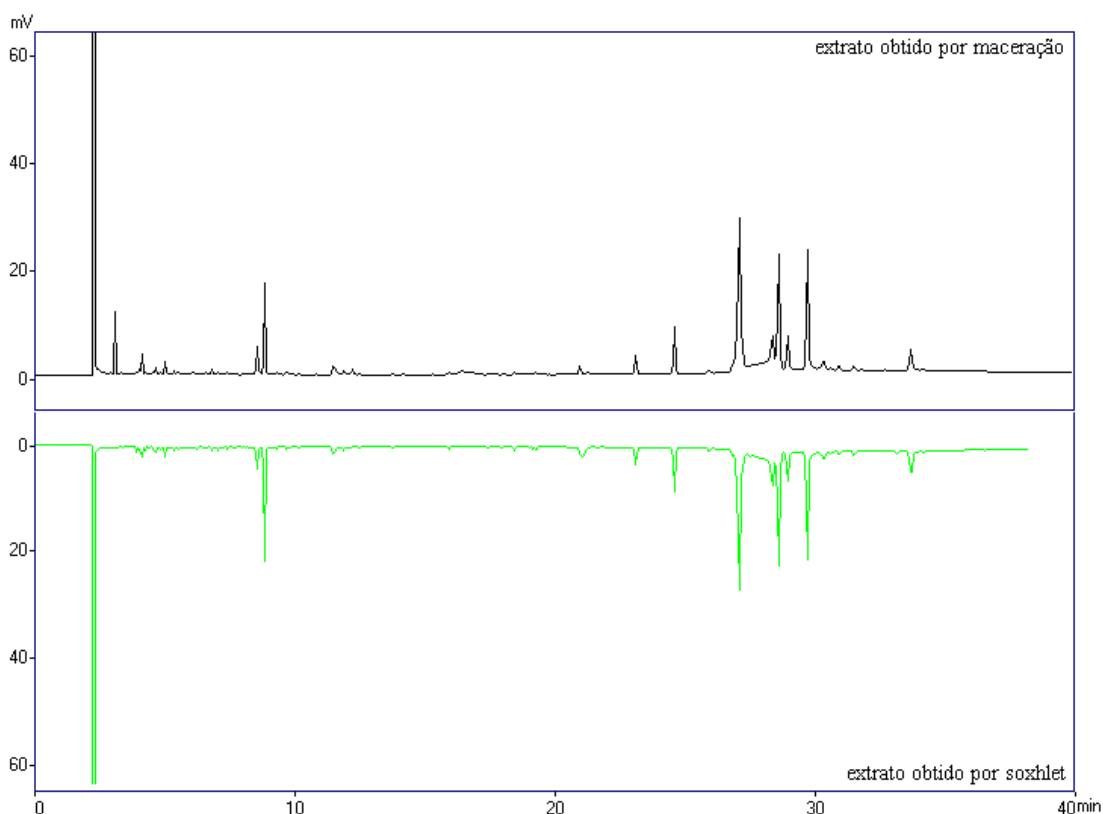
de Hartley e Shapiro-Wilk, para verificação de homocedasticidade e normalidade ($p < 0,05$). Como em algumas das avaliações tais testes foram significativos, optou-se pela realização do teste não-paramétrico em todas as avaliações. Deste modo, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls para comparação das médias ($p < 0,05$). O teste biológico foi realizado no Laboratório de Entomologia da Universidade Estadual de Londrina, pela Adriana Mikami e Camila Marques.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPARAÇÃO DOS DOIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A primeira etapa na avaliação dos resultados verificou que os extratos hexânico e cicloexânico obtidos pelos métodos de maceração e soxhlet, não tiveram nenhum efeito devido à utilização de temperatura no aparelho de soxhlet. A figura 20 confirma a semelhança para a comparação básica dos dois extratos.

Figura 20 – Comparação de cromatogramas dos extratos obtidos por soxhlet e por maceração.



4.2 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES PRIMÁRIAS

O fracionamento primário do extrato hexânico realizado em coluna sílica – gel em adsorção resultou em 14 frações. A tabela 1 mostra a fase móvel, sua composição, e o peso de cada fração obtida.

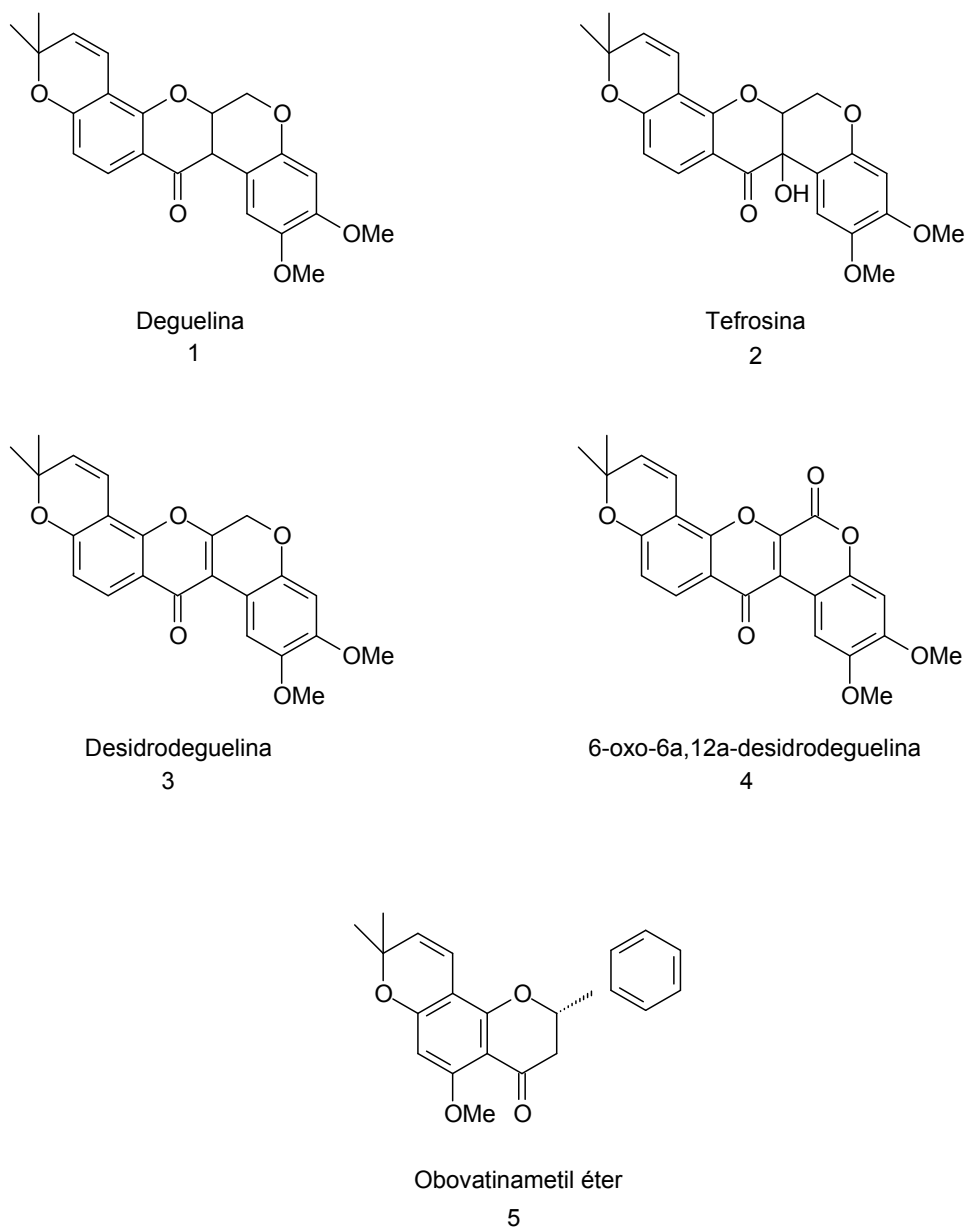
Tabela 1 – Frações obtidas do fracionamento primário do extrato bruto hexânico das raízes.

Fração	Eluente	%	Peso
1	Hexano	100	688 mg
2	Hexano - CH ₂ Cl ₂	95 - 5	274,4mg
3	Hexano - CH ₂ Cl ₂	90 - 10	-
4	Hexano - CH ₂ Cl ₂	80 - 20	212,5 mg
5	Hexano - CH ₂ Cl ₂	70 - 30	117,6 mg
6	Hexano - CH ₂ Cl ₂	60 - 40	225,4 mg
7	Hexano - CH ₂ Cl ₂	50 - 50	494,2 mg
8	Hexano - CH ₂ Cl ₂	25 - 75	572,8 mg
9	CH ₂ Cl ₂	100	1677,1 mg
10	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	98 - 2	1921,7 mg
11	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	95 - 5	1442,9 mg
12	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	90 - 10	415,3 mg
13	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	50 - 50	413,3 mg
14	MeOH	100	203,6 mg

4.3 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Foram isolados quatro rotenóides dimetilcromênicos pertencentes a 2 subclasses: 6a,12a-diidrorrotenóides (1 e 2) e 6a,12a-desidrorrotenóides (3 e 4), além de uma flavanona (5) (Figura 21). Entre os rotenóides a 6-oxo-6a,12a-desidrodequelina é inédito na espécie em estudo. Também não há nenhum relato de flavanona isolada em *Tefrosia vogelii*, e a obovatina metiléter é a primeira a ser relatada.

Figura 21 – Substâncias isoladas do extrato hexânico das raízes de *Tefrosia vogelli*.



4.4 DETERMINAÇÕES ESTRUTURAIS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

4.4.1 Deguelina

Na fração 8 (tabela 1) foi possível a identificação de quatro rotenóides pela análise de espectros de massas. A estrutura da deguelina (Figura 22) foi indicada pelos sinais presentes no espectro: M^+ 394, m/z 379 ($M-15$) e m/z 192 (pico base) (Figura 23).

Figura 22 – Estrutura da deguelina.

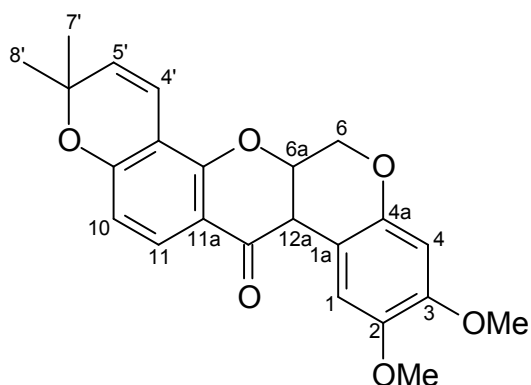
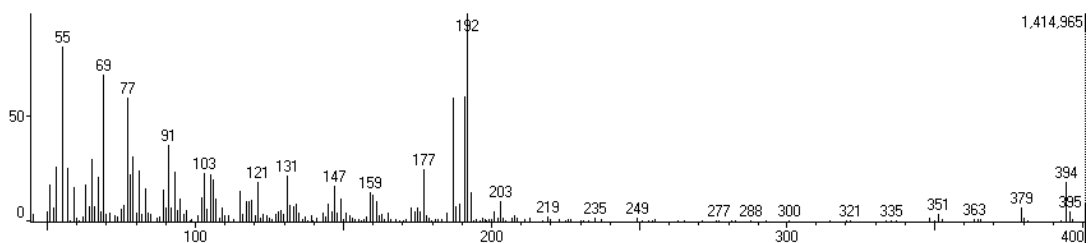


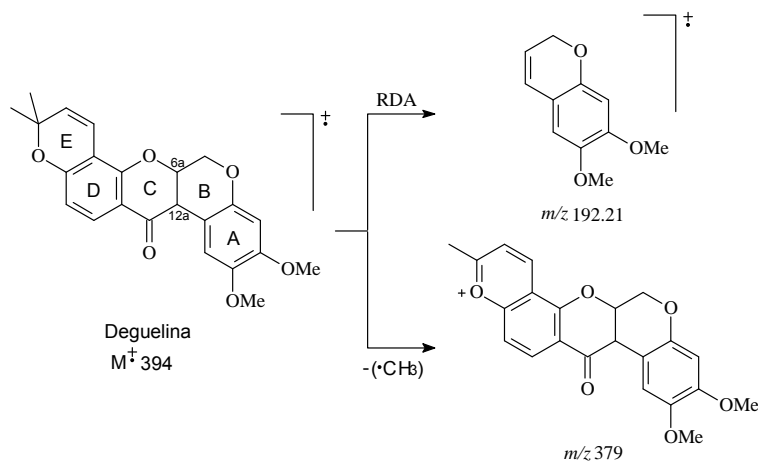
Figura 23 – Espectro de massas da deguelina.



O pico base é proveniente da fragmentação do tipo retro Diels-Alder (RDA), indicando que o rotenóide pertence à classe 6a,12a saturada. O íon m/z 192 revela a presença de um incremento $C_2H_6O_2$, neste caso atribuído a presença de duas metoxilas.

Os sinais m/z 379 sugere a presença do sistema dimetilcromênicos, referente à perda da metila do anel dimetilcromênico. A saída desta metila é favorecida, devido à formação do cátion pirílio. (Figura 24).

Figura 24 – Proposta de origem de m/z 379 e m/z 192.



A atribuição de um anel extra (E) dimetilcromênico ou isopropenil diidrofurânico, foi realizado pelos espectros de RMN de ^1H . A existência deste anel cromênico (E) é confirmada pelos deslocamentos químicos das duas metilas no espectro de RMN de ^1H (Figura 25), e a posição angular do anel cromênico pela presença de dois dubletos relativos à H-10 e H-11. A configuração relativa *cis* dos hidrogênios 6a e 12a é deduzida pela constante de acoplamento de 4,2 Hz, quando observado o dubleto relativo à H-12a (Tabela 2).

Os espectros de RMN de ^1H mostraram um acoplamento (J^5) evidenciada entre os hidrogênios C-4' e C-10 da deguelina (Tabela 2). Nos rotenóides isolados além de uma flavanona com o mesmo tipo de anel, foram observados esse tipo de acoplamento. Este acoplamento provavelmente deve-se a planaridade do sistema de anéis D e E, e a conjugação que permite o acoplamento escalar a longa distância.

Para a deguelina e os outros rotenóides isolados, os espectros de RMN foram utilizados principalmente para estabelecer se os mesmos eram dimetilcromênicos ou isopropenil diidrofurânicos.

Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H da deguelina.

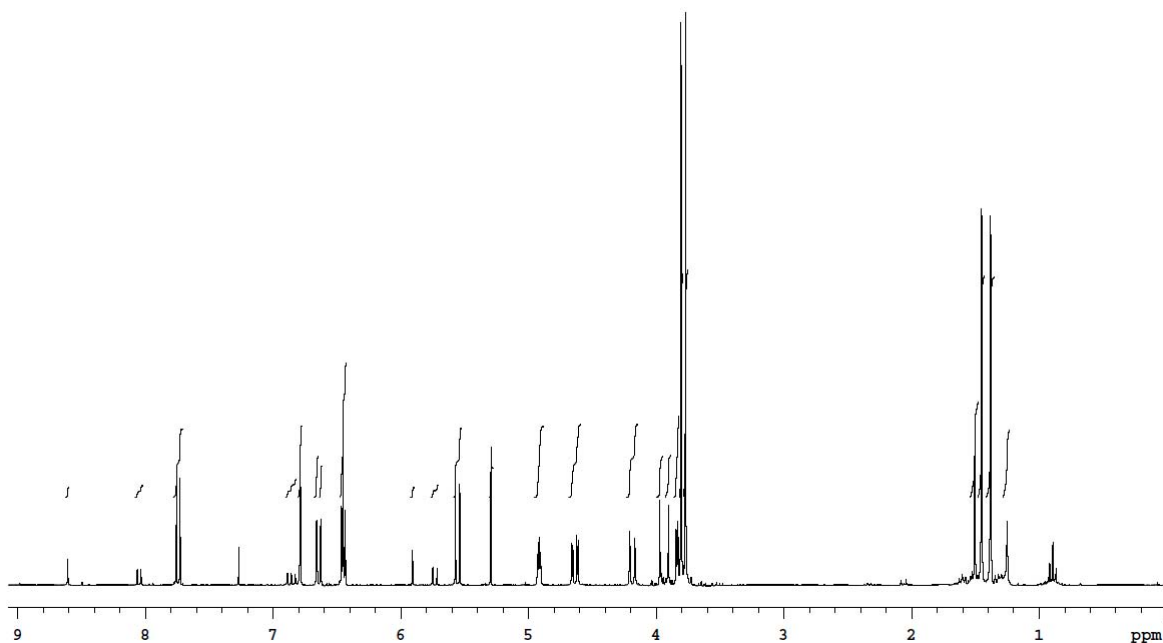
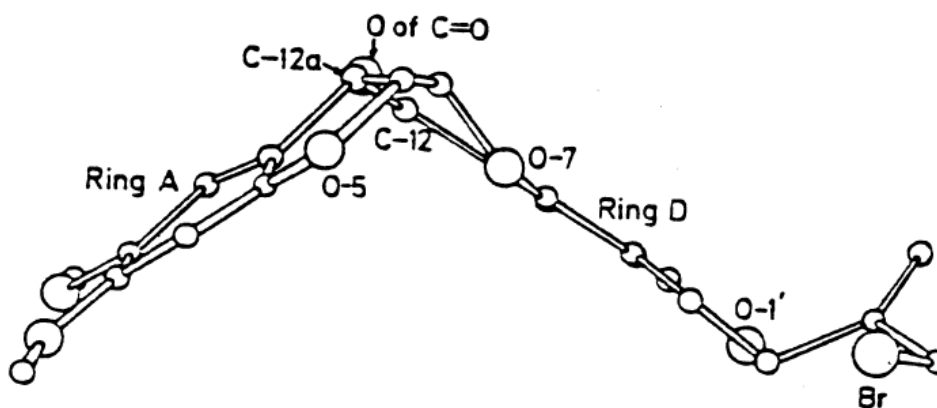


Tabela 2 – Valores de deslocamentos químicos de hidrogênio, e constantes de acoplamento (J) para a deguelina, 300 MHz, em CDCl₃.

H	δ (ppm)	J (Hz)
1	6,79	s
4	6,45	s
6 ax	4,19	dd (11,1; 0,9)
6 eq	4,64	dd (12; 3,0)
6a	4,92	ddd (4,2; 3,0; 0,9)
10	6,45	dd (8,7; 0,9)
11	7,74	d 9,0
12a	3,83	d 4,2
4'	6,64	dd (10; 0,6)
5'	5,56	d 10
7'/8'	1,38/ 1,45	S
OMe	3,77/ 3,80	S

A conformação dos 6a,12a-diidorrotenóides, foi estabelecida como mostra a figura 26, aplicada a determinação da configuração absoluta da molécula da rotenona (CROMBIE; WHITING 1998).

Figura 26 – Configuração absoluta da rotenona determinada por raio X.



O sistema dos hidrogênios 12a, 6a, 6 pseudo axial e 6 pseudo equatorial foi caracterizado pela análise de expansões dos espectros de RMN de ¹H. O hidrogênio 12a desprotegido pelo grupamento fenila e α -carbonila foi observado como um duplete largo com J 4,2 Hz em δ 3,83 (Figura 27).

O sinal do hidrogênio 6a foi o mais complexo devido aos acoplamentos com os hidrogênios 12a, 6 pseudo axial e 6 pseudo equatorial. O hidrogênio 6a foi observado como uma duplo-duplo duplete parcialmente

superposto, com as constantes de acoplamento 4,2 Hz para H-12a, 3,0 Hz para H-6ax e 0,9 Hz para H-6 (Figura 28). Por fim, os hidrogênios 6 pseudo axial e 6 pseudo equatorial, ambos duplos dupletos, apresentam as constantes de acoplamentos a duas ligações com H-6a de 3,0 Hz e 0,9 Hz respectivamente (Figura 29).

Figura 27 – Ampliação da região de 3,7 a 4,3 ppm do espectro de RMN de ^1H da deguelina.

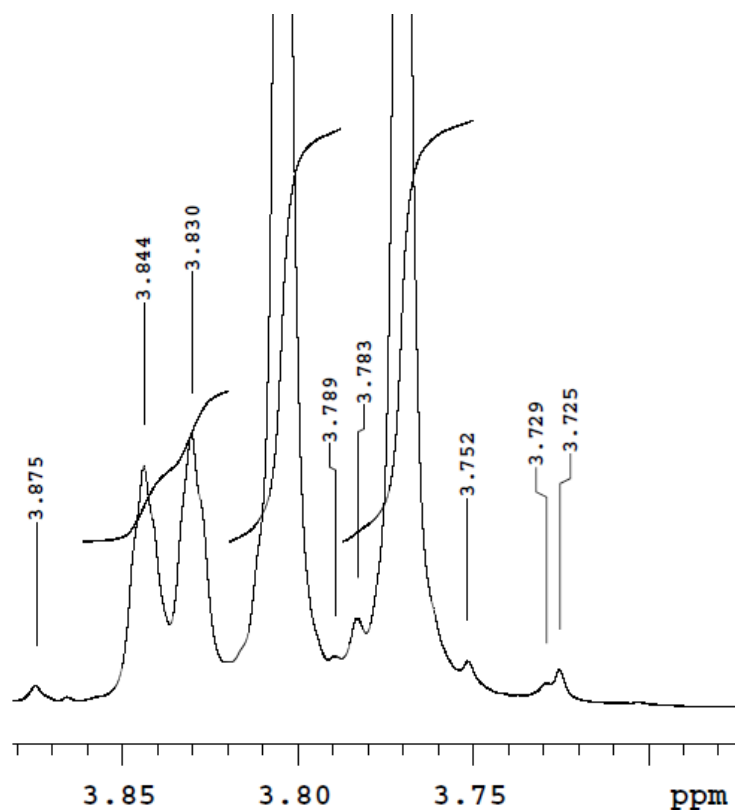


Figura 28 – Ampliação da região de 4,6 a 5,0 ppm do espectro de RMN de ^1H da deguelina.

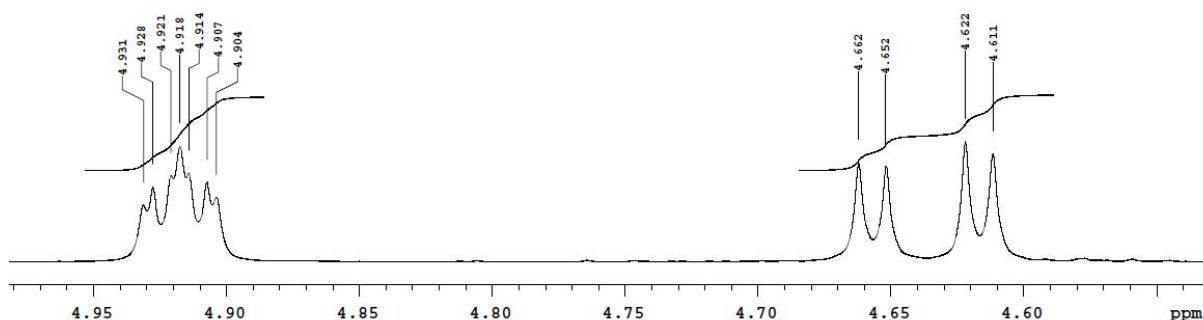
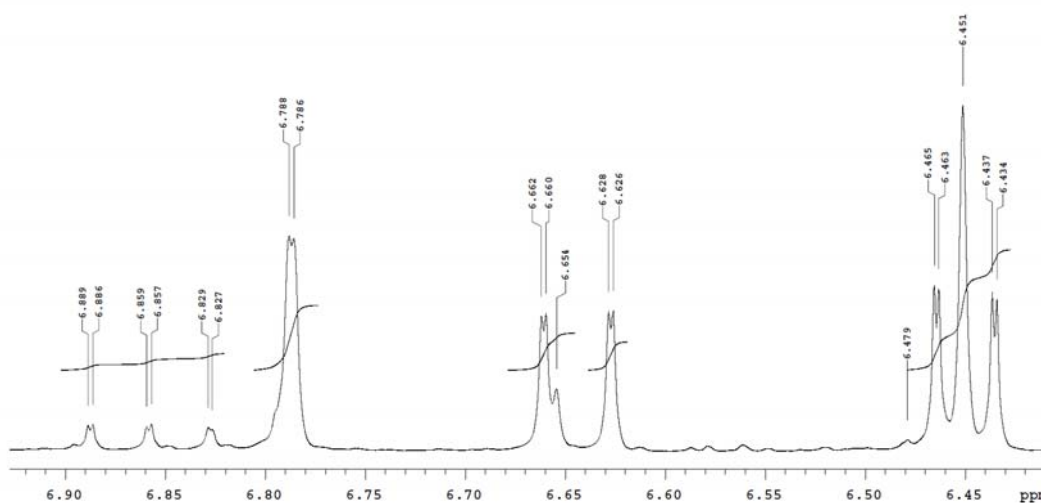


Figura 29 – Ampliação da região de 6,4 a 6,9 ppm do espectro de RMN de ^1H da deguelina.



O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 30) apresentou sinais para todos os 23 carbonos da deguelina e o DEPT 90 e 135 (Figura 31) permitiu identificar todos os tipos de carbonos hidrogenados. Os valores de deslocamentos químicos de carbono estão apresentados na tabela 3.

O espectro de HSQC da deguelina foi particularmente útil para definir os deslocamentos químicos dos pares de carbonos C1/C10 e C11/C5', que possuem valores muito próximos (Figura 32).

Figura 30 – Espectro de RMN ^{13}C da deguelina.

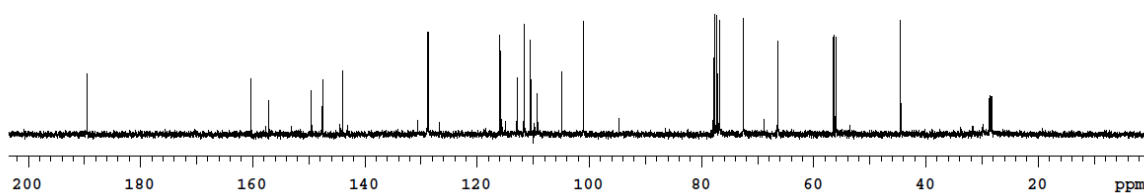


Figura 31 – DEPT 90 e 135 para deguelina.

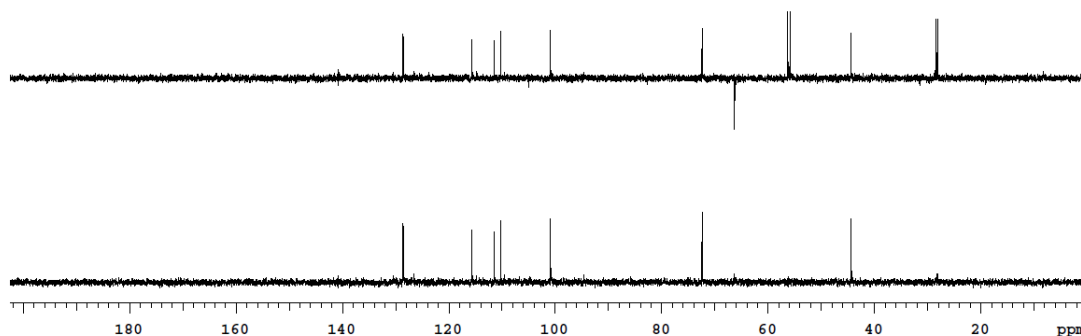


Tabela 3 – Valores de deslocamentos químicos de carbonos, para deguelina, 75 MHz, em CDCl₃.

C	δ (ppm)
1	110,5
1a	104,9
2	144
3	149,6
4	101,1
4a	147,6
6	66,5
6a	72,6
7a	149,6
8	109,2
9	160,3
10	111,6
11	128,7
11a	112,9
12	189,5
12a	44,5
4'	115,9
5'	128,8
6'	77,9
7'/8'	28,3/ 28,7
OMe	56,0/ 56,4

Figura 32 – Espectro de HSQC da deguelina.

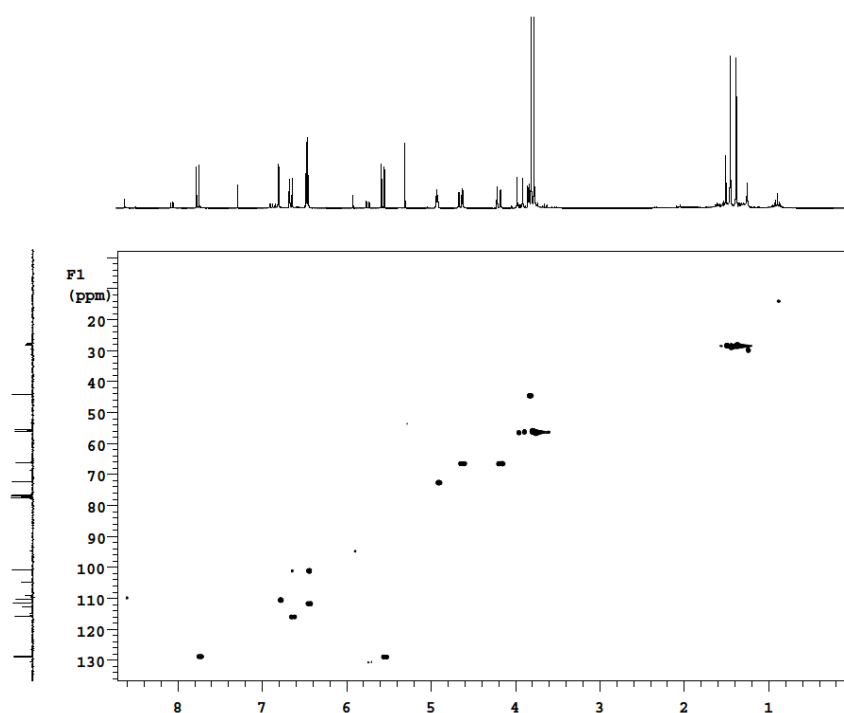
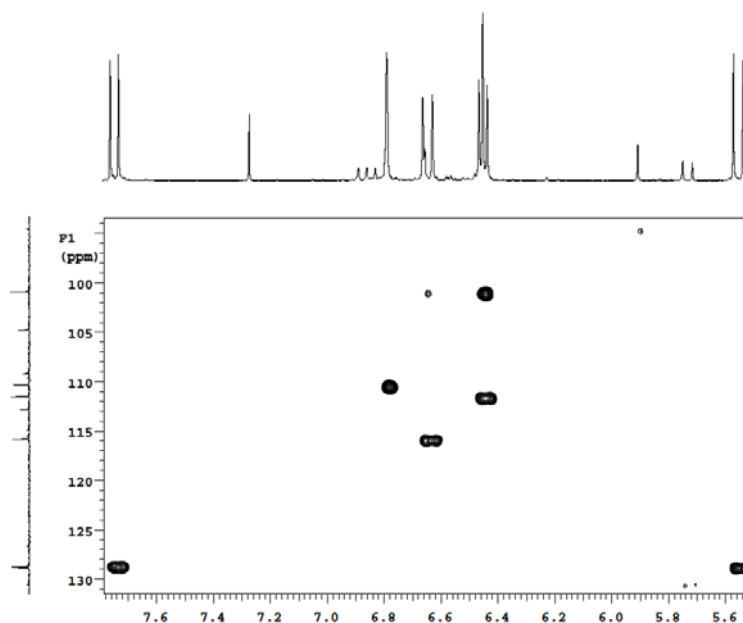


Figura 33 – Ampliação da região de 5,5 ppm a 7,8 ppm do espectro de HSQC da deguelina.



4.4.2 Desidrodeguelina

A obtenção da 6a,12a-desidrodeguelina (Figura 34) na fração 8 foi feita em mistura com a 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina. A estrutura da 6a,12a-desidrodeguelina foi indicada pelos picos presentes no espectro de massas: M^+ 392, m/z 377 (M-15) e m/z 349 (Figura 35).

Figura 34 – Estrutura da 6a,12a-desidrodeguelina.

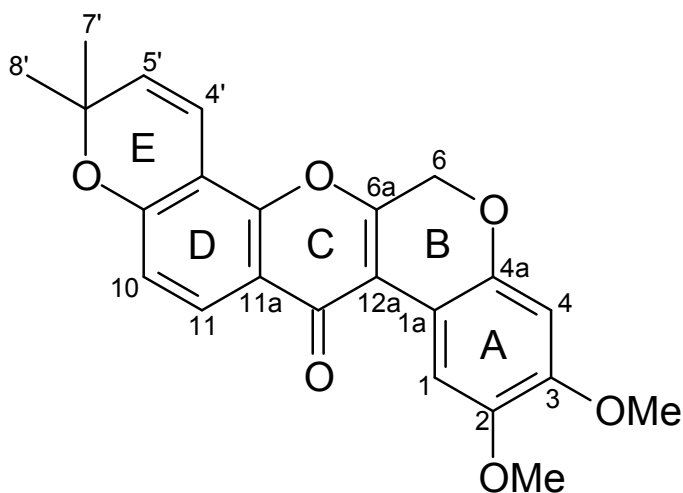
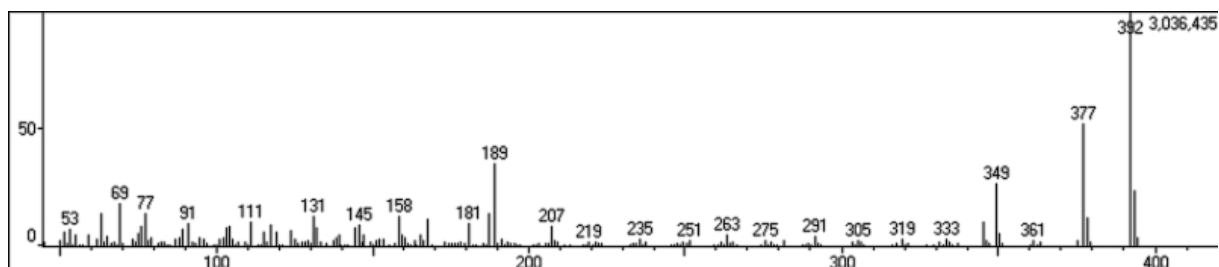
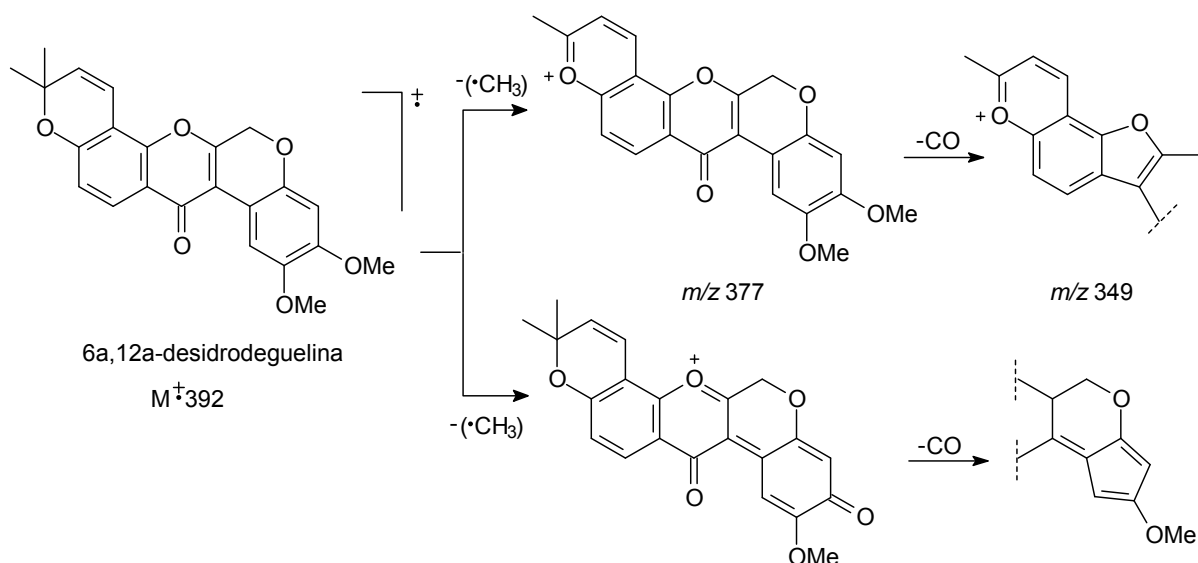


Figura 35 – Espectro de massas da 6a,12a-desidrodeguelina.

A 6a,12a-desidrodeguelina apresenta duas propostas de fragmentações para os picos em m/z 377 e 349. A primeira para íon m/z 379, sugere a presença do sistema dimetilcromênicos referente à perda da metila, e o íon de m/z 349 é a saída de CO no carbono 12. A segunda é a formação da carbonila com a saída de metila de uma das metoxilas (C2 ou C3), assistida pelos oxigênios do anel B ou C e posteriormente a saída de CO, como exemplificada na figura 31 com a metoxila C-2 (Figura 36).

Figura 36 – Proposta mecanística de fragmentações da 6a,12a-desidrodeguelina.

Para o espectro de RMN de ^1H o sinal mais evidente é do hidrogênio aromático H-1, que com o aumento da planaridade da molécula através da ligação dupla adicional, sofre uma desproteção por efeito anisotrópico da carbonila C-12, que se encontra no mesmo plano do hidrogênio desprotegido (Tabela 4).

Também foram observados desproteções para os hidrogênios dos anéis D e E em relação à deguelina, em menor extensão que H-1 (Tabela 5). A

desproteção desses hidrogênios dos anéis D e E pode ser sugerida pela conjugação extra estabelecida do oxigênio do anel C, com a carbonila em C-12, que deve diminuir o efeito de proteção por ressonância aos anéis, quando a dupla entre os carbonos 6a e 12a não existe (Figura 37).

Figura 37 – Estrutura de ressonância da 6a,12a-desidrodeguelina.

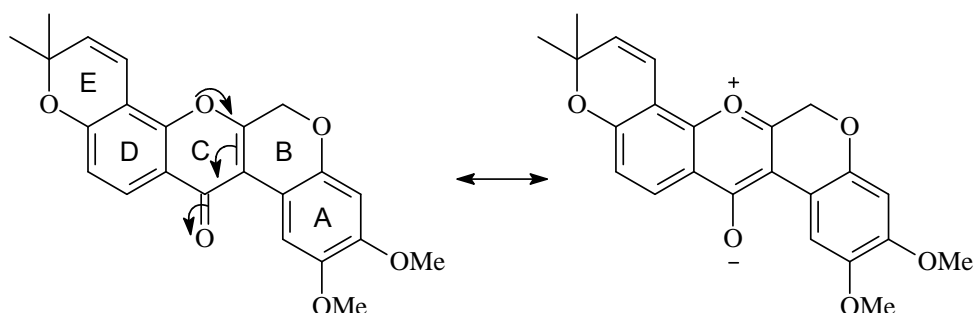


Tabela 4 – Valores de deslocamentos químicos de hidrogênio, e constantes de acoplamento (**J**) para 6a,12a-desidrodeguelina de 300 MHz, em CDCl₃.

H	δ (ppm)	J (Hz)
1	8,45	s
4	6,56	s
6	5,03	s
10	6,87	dd (8,7; 0,6 Hz)
11	8,04	d (8,7 Hz)
4'	6,78	dd (9,9; 0,6 Hz)
5'	5,74	d (9,9 Hz)
7'/ 8'	1,51	s
OMe	3,88/ 3,96	s

Tabela 5 – Dados comparativos de deslocamentos químicos de hidrogênio para 6a,12a-desidrodeguelina e deguelina.

H	Desidrodeguelina δ (ppm)	Deguelina δ (ppm)	Δ
1	8,45	6,79	1,66
4	6,56	6,45	0,11
10	6,87	6,45	0,42
11	8,04	7,74	0,3
4'	6,78	6,64	0,14
5'	5,74	5,56	0,18
7'/ 8'	1,51	1,38/ 1,45	0,13/ 0,06

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais para todos os 23 carbonos da 6a,12a-desidrodeguelina e os valores de deslocamentos de carbono estão na tabela 6.

O espectro de HSQC (Figura 38) da 6a,12a-desidrodeguelina foi útil para definir os deslocamentos químicos dos carbonos 10 e 4', que possuem valores muito próximos. No entanto não possibilitou atribuição inequívoca entre C-1a/C-8 e C-6a/C-9 por que diferentemente ao caso da deguelina, todos os carbonos não estão ligados a hidrogênio. A figura 39 apresenta a ampliação do espectro de HSQC.

Tabela 6 – Valores de deslocamentos químicos de carbono para 6a,12a-desidrodeguelina, 75 MHz, em CDCl_3 .

C	δ (ppm)
1a	109,7/110,7
1	110,1
2	144,2
3	149,1
4	100,6
4a	146,4
6	65,1
6a	156,4/157,4
7a	151,3
8	109,7/110,7
9	156,4/157,4
10	115,6
11	130,7
11a	118,6
12	174,6
12a	110,7
4'	115
5'	126,7
6'	78
7'/ 8'	28,3/ 28,5
OMe	56,1/ 56,5

Figura 38 – Espectro de HSQC da 6a,12a-desidrodeguelina.

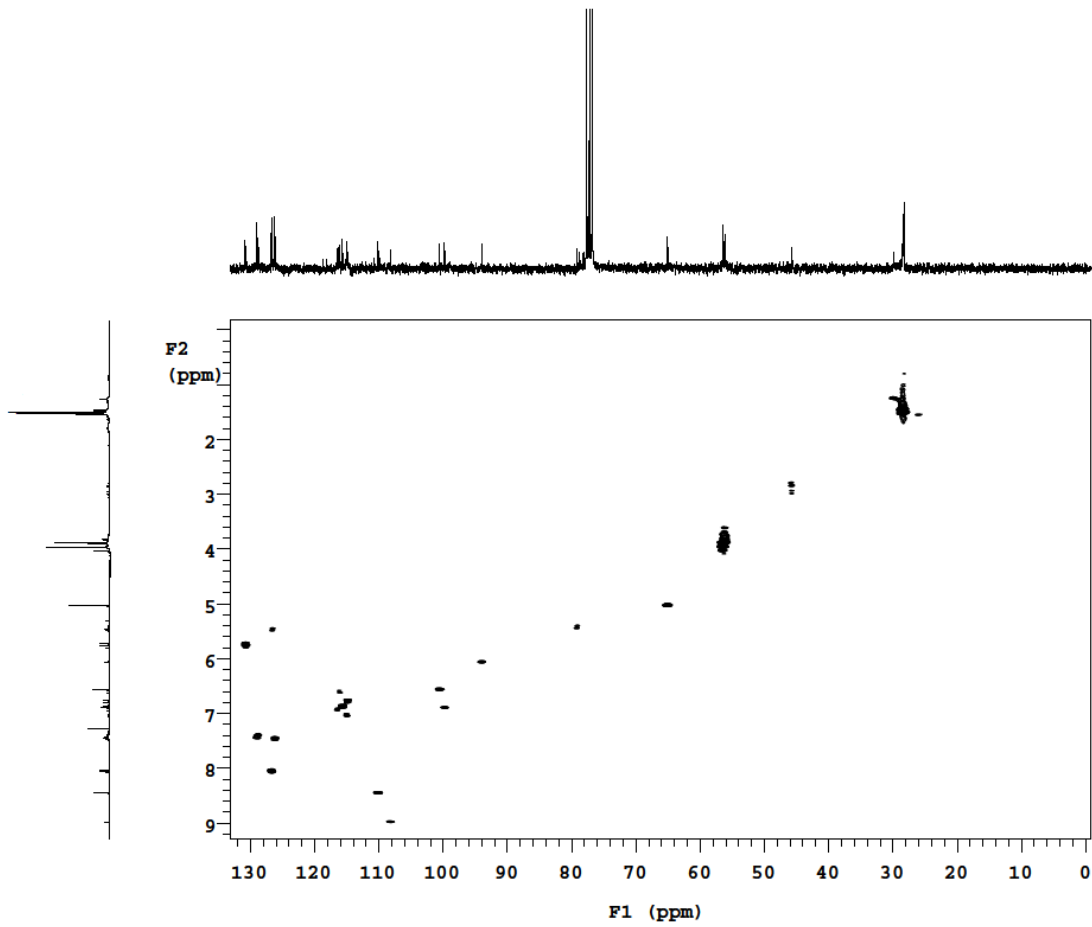
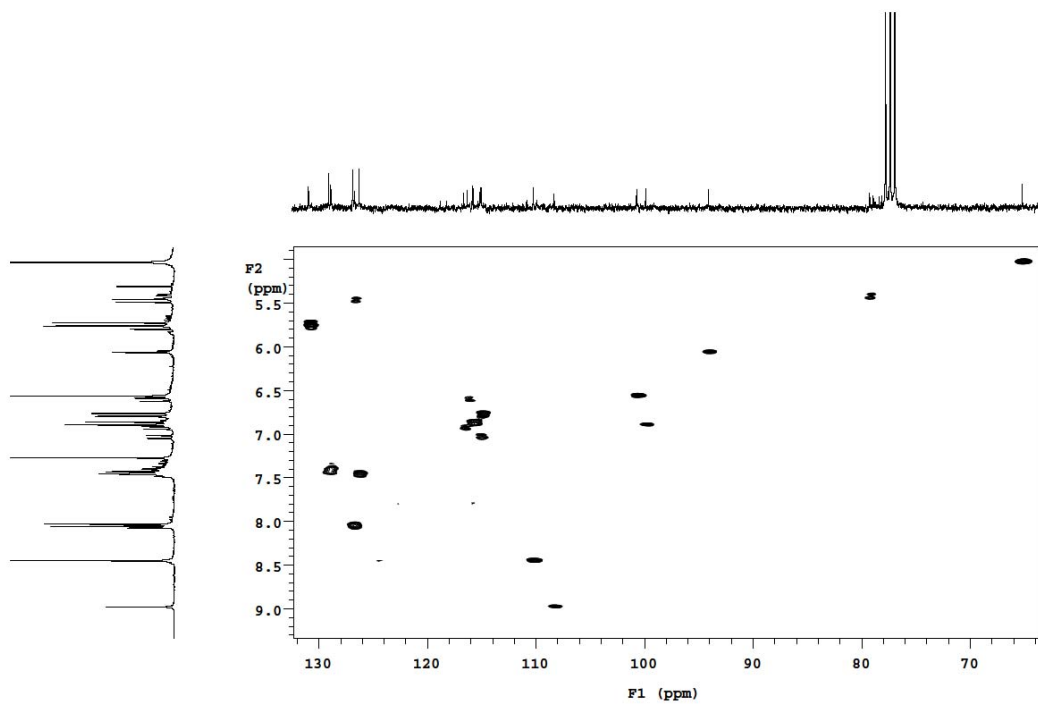


Figura 39 – Ampliação na região de 74 ppm a 132 ppm do espectro de HSQC da 6a,12a-desidrodeguelina.



4.4.3 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina

A 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina (Figura 40) presente em menor quantidade na mistura com a 6a,12a-desidrodeguelina, apresentou dois sinais principais no espectro de massas: M^+ 406 e m/z 391 (M-15) (Figura 41).

Em relação ao espectro de massas da 6a,12a-desidrodeguelina observamos um padrão semelhante, apenas com a diferença que o pico base no espectro de massas é resultante da saída de metila a partir do M^+ 406.

Figura 40 – Estrutura da 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina.

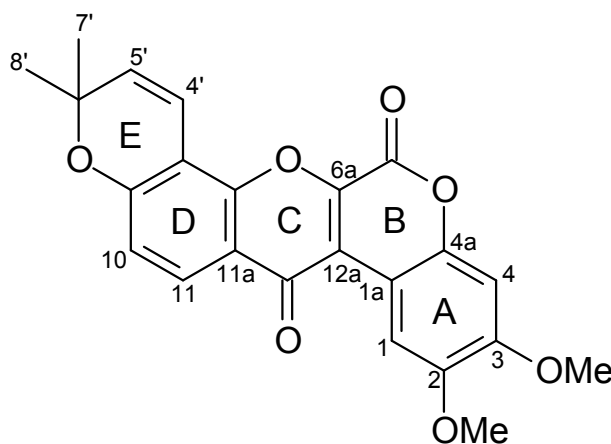
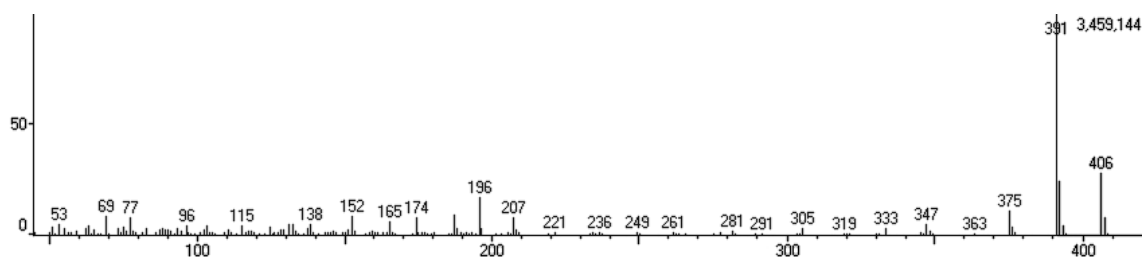


Figura 41 – Espectro de massas da 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina.



Com os espectros de RMN de ^1H foi possível confirmar a estrutura da 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina, sendo o sinal de maior evidência do hidrogênio aromático H-1, em 8,98 ppm (Tabela 7). Essa desproteção ocorre devido à insaturação nos carbonos 6a e 12a, somada ao efeito de ressonância da carbonila conjugada no carbono 6. Nota-se que o efeito de desproteção gerado pela insaturação entre os carbonos 6a e 12a é mais significativo que a conjugação da carbonila adicional no carbono 6, tendo em vista os valores de deslocamentos químicos de H-1 para a deguelina, 6a,12a-desidrodeguelina e 6-oxo-6a,12a-

desidrodeguelina são respectivamente: 6,79 ppm; 8,45 ppm ($\Delta\delta = 1,66$) e 8,98 ppm ($\Delta\delta = 0,53$).

Tabela 7 – Valores de deslocamentos químicos de hidrogênio, e constantes de acoplamento (J) para 6-oxo-desidrodeguelina, 300 MHz, em CDCl_3 .

H	δ (ppm)	J (Hz)
1	8,98	s
4	6,89	s
10	6,93	dd (8,7; 0,6 Hz)
11	8,06	d (8,7 Hz)
4'	7,03	dd (10,2; 0,6 Hz)
5'	5,78	d (10,2 Hz)
7'/8'	1,53	s
OMe	3,90/4,03	s

Os dados de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C não foram possíveis atribuições, já que estes eram de baixa intensidade no espectro da mistura.

4.4.4 Tefrosina

Na fração 9 (Tabela 1) analisada no CG-EM teve como constituinte principal a tefrosina, de acordo com o cromatograma.

Os principais picos no espectro de massas (Figura 42) são: M^+ 410; m/z 392 (M-18); m/z 349 (377 - 28); m/z 208 (pico base). O pico base m/z 208 proveniente da fragmentação retro Diels-Alder, difere de 16 unidades de massas atômicas do pico base da deguelina de m/z 192. Isso reforça a idéia que o grupamento OH se encontra substituído no carbono 12a e que o rotenóide é 6a,12a saturado. Esta hipótese é reforçada pela intensidade do pico m/z 392 (M-18), resultando na formação de ligação dupla conjugada que equivale à estrutura 6a,12a-desidrodeguelina (Figura 43 e 44).

Figura 42 – Estrutura da tefrosina.

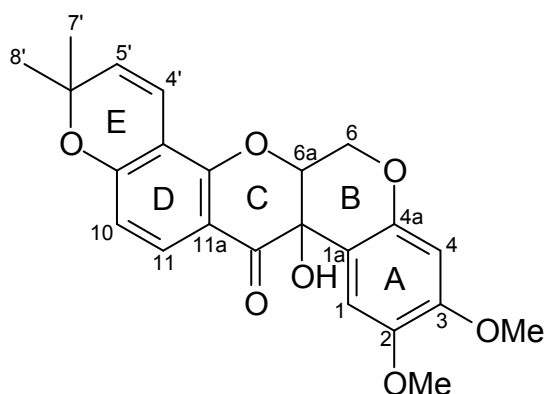


Figura 43 – Espectros de massas da tefrosina

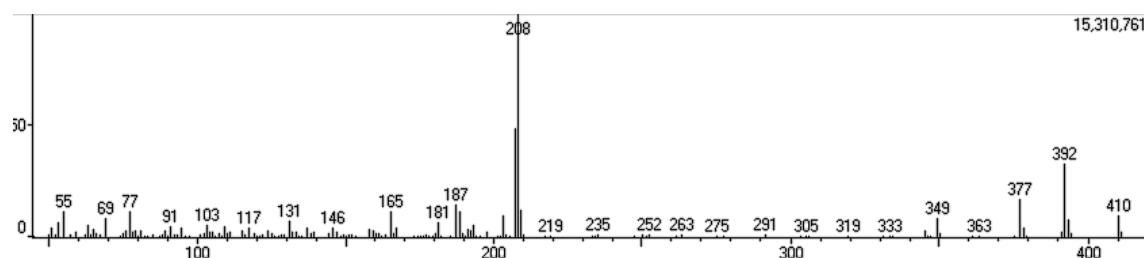
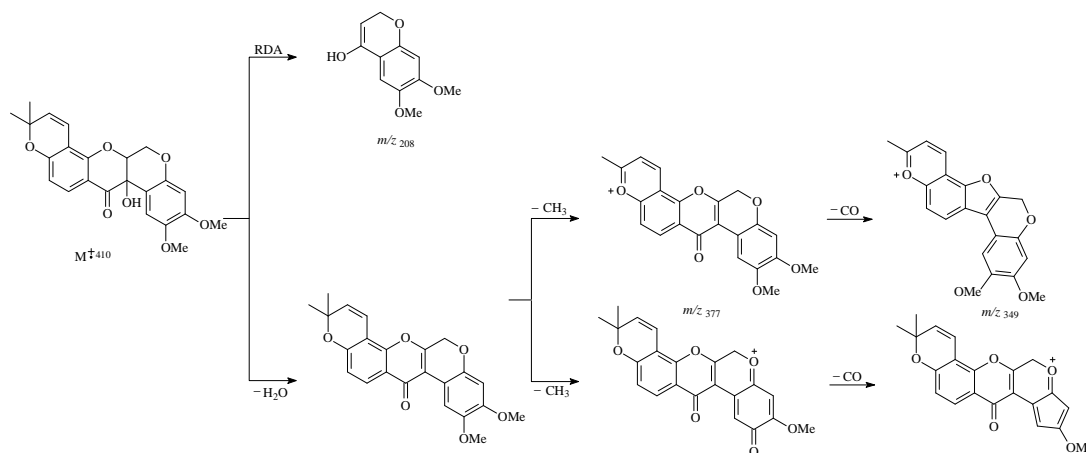


Figura 44 – Proposta de fragmentação da tefrosina.



A tefrosina foi purificada por cromatografia líquida tanto para a obtenção dos espectros para a realização de teste biológico de atividade inseticida. O espectro de RMN de ^1H mostra os deslocamentos químicos das duas metilas do anel cromênico (1,38 ppm e 1,45 ppm) e das duas metoxilas do anel A (3,72 ppm e 3,81 ppm) (Figuras 45 e 46). O sistemas dos hidrogênios 6a, 6 pseudo axial e 6 pseudo equatorial são observados como duplo duplete, com os valores de deslocamentos químicos e multiplicidades na tabela 8.

Figura 45 – Espectro de RMN de ^1H da tefrosina.

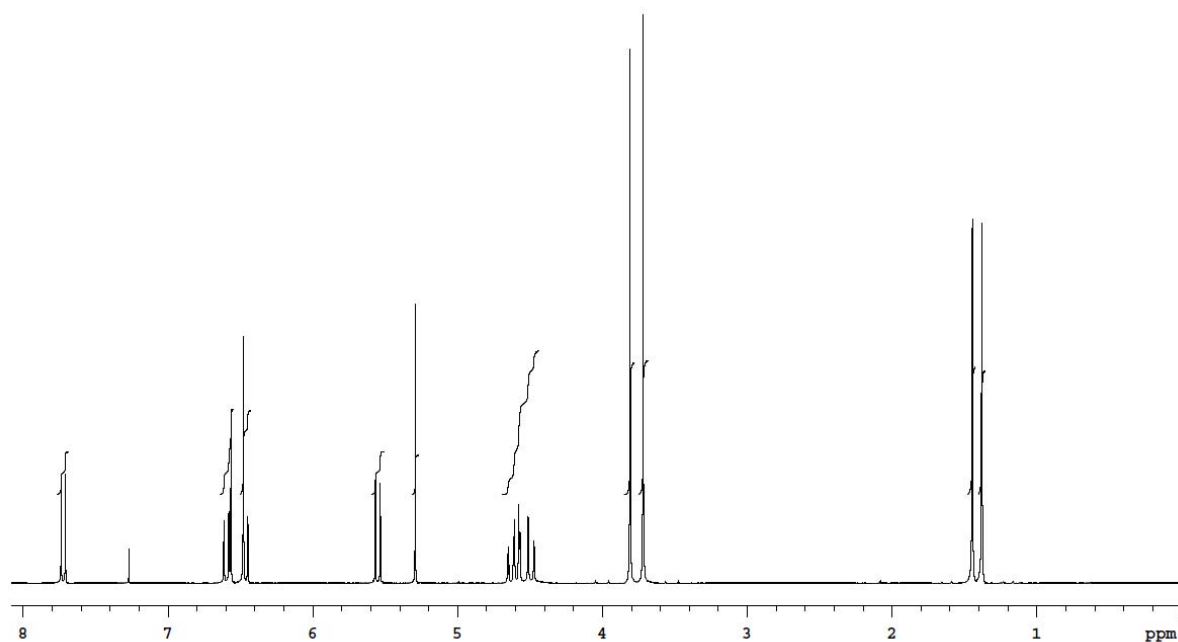
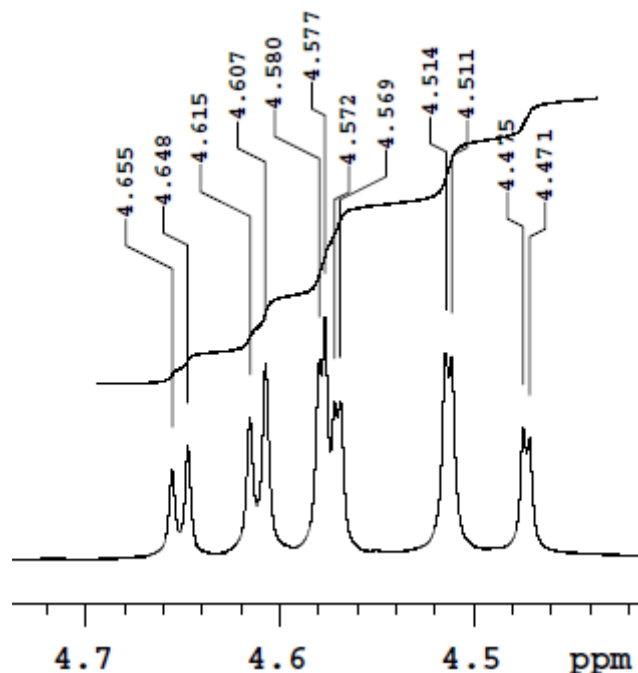


Tabela 8 – Valores de deslocamentos químicos de hidrogênio e constante de acoplamento para a tefrosina, 300 MHz, em CDCl_3 .

H	δ (ppm)	J (Hz)
1	6,48	s
4	6,57	s
6ax	4,63	dd (12; 2,4)
6eq	4,50	dd (12; 0,9)
6a	4,57	dd (2,4; 0,9)
10	6,47	dd (8,7; 0,6)
11	7,72	d (8,7)
4'	6,6	dd (10; 0,6)
5'	5,55	d (10)
7'/8'	1,38/1,45	s
OMe	3,72/3,81	s

Figura 46 – Ampliação da região de 4,4 ppm a 4,7 ppm do espectro de RMN de ^1H da tefrosina.



Os graus de proteção observados para H-1 e H-6_{ax} e desproteção para H-6_a sugerem a existência de efeito anisotrópico relacionado a presença da hidroxila em 12a. Considerando a conformação da tefrosina semelhante a deguelina ou da rotenona em relação a junção dos anéis B e C, que envolve os carbonos 6a e 12a, seria esperada a conformação relativa β -pseudo axial para a hidroxila e α -pseudo equatorial para o hidrogênio em 6a. Para os diversos rotenóides 12a-hidroxilados, tem-se observado uma proteção da ordem de 0,3 a 0,4 ppm para o H-6_a e a desproteção também em torno de 0,3 a 0,4 ppm para o H-6 β . Outra diferença significativa notada é a proteção de 0,31 ppm para H-1 com o mesmo padrão de substituição (Tabela 9).

A figura 47 foi obtida a partir de cálculos pelo para a molécula da tefrosina utilizando o programa PC GAMES que reforça a proposta de estereoquímica envolvendo os anéis B e C para a molécula. Os cálculos foram realizados pelo Prof. Dr. Fernando César de Macedo Junior da Universidade Estadual de Londrina –UEL.

Figura 47 – Conformação da tefrosina.

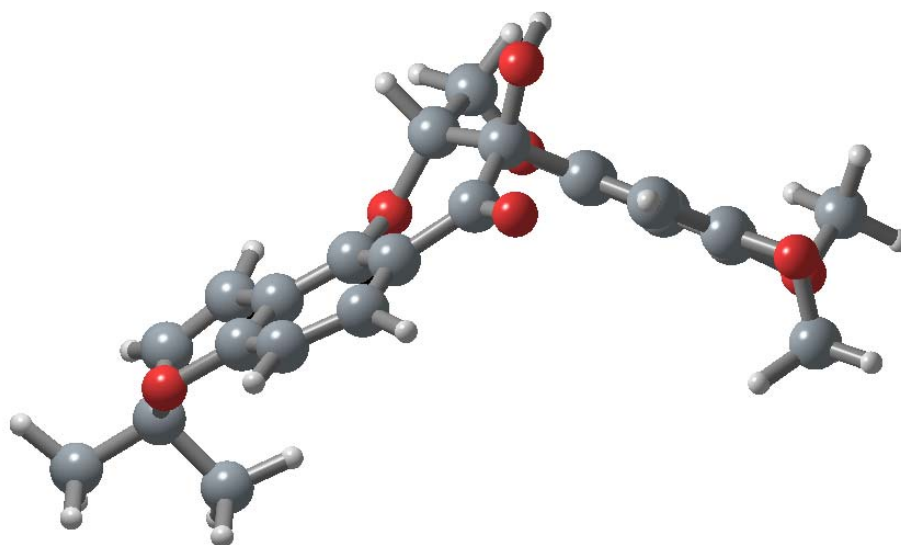


Tabela 9 – Valores comparativos de deslocamentos químicos de hidrogênio para a tefrosina e deguelina.

	Tefrosina	Deguelina	
H	δ (ppm)	δ (ppm)	Δ
1	6,48	6,79	0,31
4	6,57	6,45	0,12
6ax	4,63	4,19	0,44
6eq	4,5	4,64	0,14
6a	4,57	4,92	0,35
10	6,47	6,45	0,02
11	7,72	7,74	0,02
4'	6,6	6,64	0,04
5'	5,55	5,56	0,01
7'/8'	1,38/1,45	1,38/ 1,45	-
OMe	3,72/3,81	3,77/ 3,80	-

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou todos os sinais para os 23 carbonos da tefrosina (Figura 48) e o DEPT 90 e 135 todos os carbonos hidrogenados (Figura 49). Os valores de deslocamento de carbono estão na tabela 10.

Tabela 10 – Valores de deslocamentos químicos de carbono, para tefrosina e deguelina, 75 MHz, em CDCl_3 .

C	δ (ppm)
1a	108,8
1	109,5
2	144,1
3	148,5
4	101,2
4a	151,2
6	64
6a	76,4
7a	156,8
8	109,3
9	160,9
10	112
11	128,7
11a	111,3
12	191,5
12a	67,6
4'	115,6
5'	129
6'	78,2
7'/ 8'	28,4/ 28,7
OMe	56,0/ 56,5

Figura 48 – Espectro de RMN de ^{13}C da tefrosina.

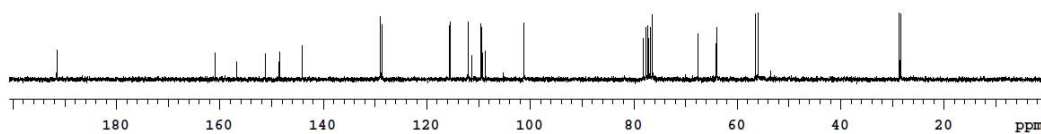
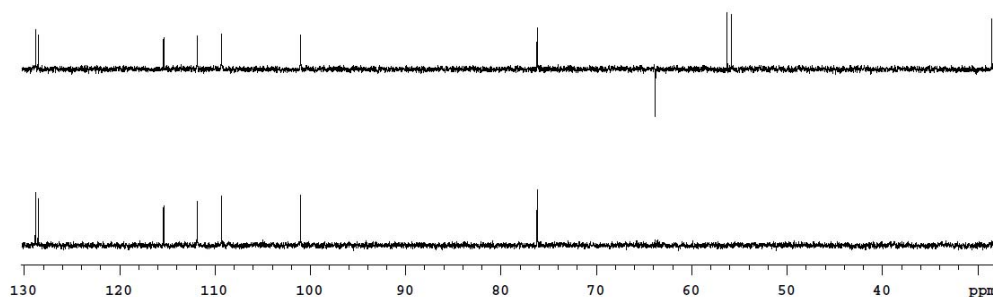


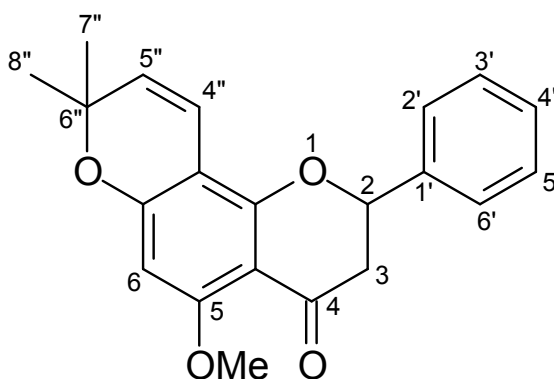
Figura 49 – DEPT 90 e 135 da tefrosina.



4.4.5 Flavanona

A obovatina metiléter (Figura 50) purificada por CLAE presente em maior quantidade na fração 7, foi isolada e identificada também nas frações 6 e 8 (Tabela 1), porém em menor quantidade. Os principais íons observados no espectro de massas são: M^+ 336, m/z 321 ($M-15$) e m/z 217 (pico base) (Figura 51).

Figura 50 – Estrutura da obovatina metiléter.



A proposta para o íon m/z 321 é da saída de metila do anel cromênico a partir do íon molecular. Isso é favorável devido ao deslocalização dos elétrons através do anel aromático. O pico base de m/z 217 é originado através da fragmentação retro Diels-Alder, dando evidencia que é um flavanona (Figura 51 e 52).

Figura 51 – Espectro de massas da obovatina metiléter.

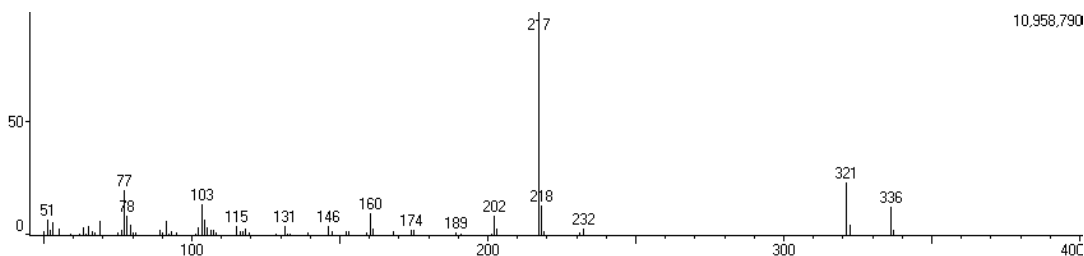
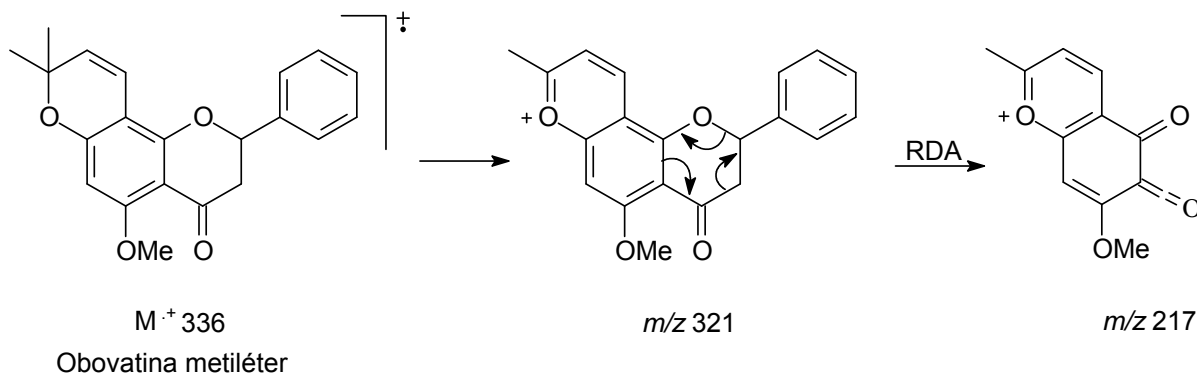


Figura 52 – Proposta de fragmentação da obovatina metiléter.



O espectro de RMN de ^1H confirma a existência do anel cromênico, pelos deslocamentos químicos das duas metilas e dos hidrogênios 4'' e 5'' (Figura 53). Foi observado o mesmo acoplamento a longa distância (J^5) descrito para os rotenóides isolados, desta vez entre H-6 e H-4'' (Figura 54). Os valores de deslocamentos químicos de hidrogênio e a constante de acoplamento estão apresentados na tabela 11.

Figura 53 – Espectro de RMN de ^1H da obovatina metiléter.

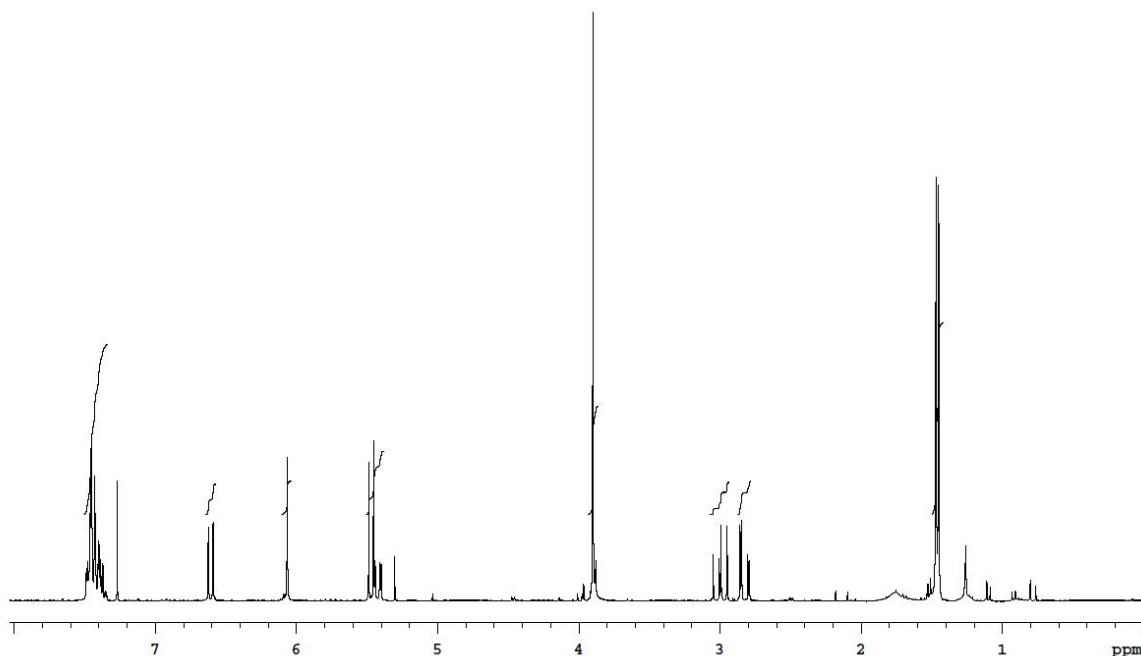
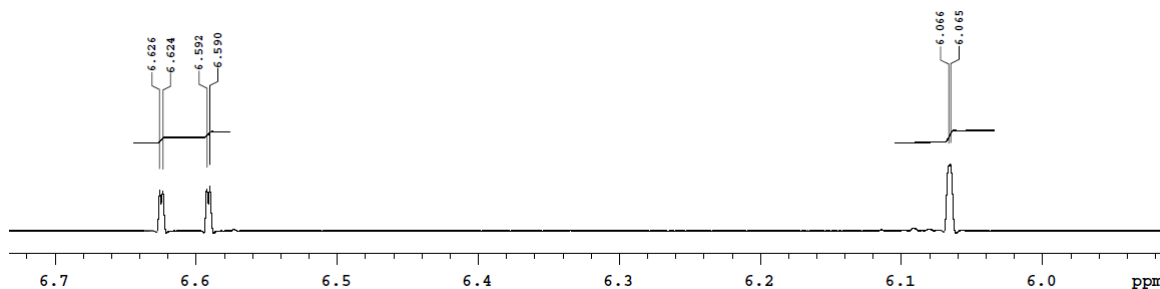


Tabela 11 – Valores de deslocamentos químicos de hidrogênio e constantes de acoplamento (**J**) para obovatina metil éter, 300 MHz, em CDCl_3 .

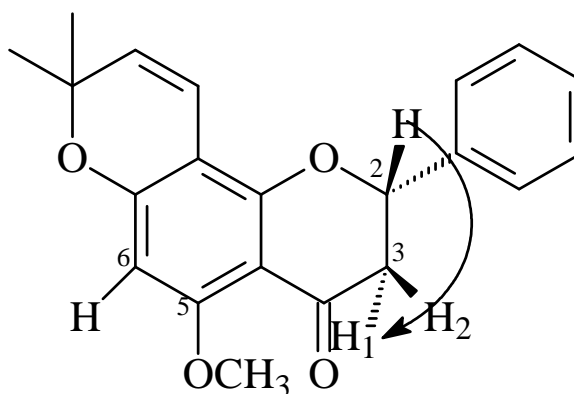
H	δ (ppm)	J (Hz)
2	5,43	dd (12,9; 3,0)Hz
3ax	3	dd (16,5; 12,9)Hz
3eq	2,83	dd (16,5; 3,0)Hz
6	6,07	d 0,3 Hz
4"	6,61	dd (9,9; 0,6)Hz
5"	5,47	d 9,9 Hz
7"	1,45	s
8"	1,47	s
OMe	3,9	s

Figura 54 – Ampliação na região de 6,0 ppm a 6,7 ppm do espectro de RMN de ^1H da obovatina metiléter.



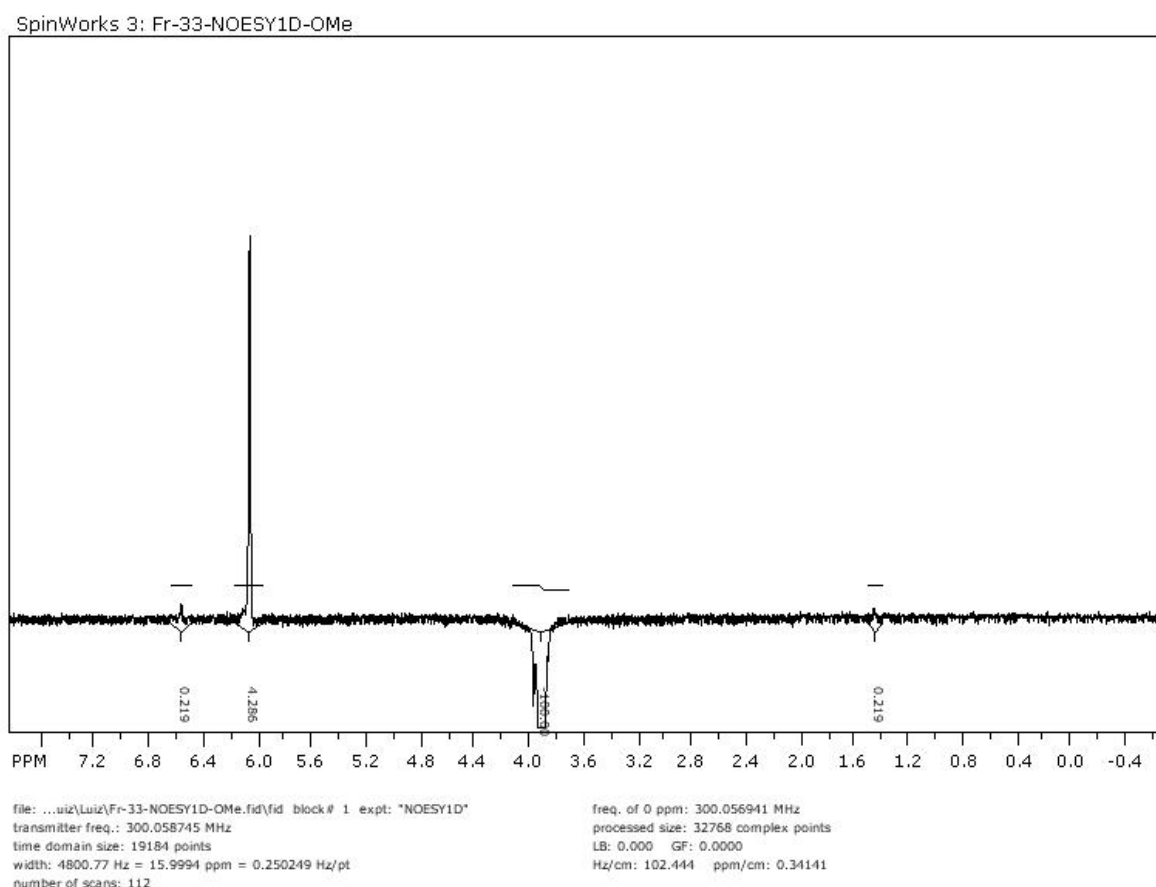
A conformação da flavanona é deduzida pela constante de acoplamento entre os hidrogênios H-2 e dos hidrogênios de H-3. O valor próximo de 12 Hz indica que pelos menos um acoplamento trans-diaxial ocorre entre o H-2 com um dos hidrogênios de H-3 (Figura 55).

Figura 55 – Conformação da obovatina metil éter.



Através do experimento de NOE - DIF foi confirmada a posição da metoxila no carbono 5 e a do anel cromênico. A irradiação em H-6 resultou em efeito NOE para a metoxila em C-5 (Figura 56).

Figura 56 – Experimento de NOE para obovatina metil éter.



4.5 MONITORAMENTO DE ROTENÓIDES EM EXTRATO HEXÂNICO BRUTO

O monitoramento de rotenóides no extrato hexânico foi realizado por CG-EM, utilizando como recurso do software, o método Selective Ion Monitoring (SIM). A figura 57 é a ampliação do cromatograma do extrato hexânico, na região que os rotenóides foram detectados. Para cada rotenóide foram selecionados os seguintes íons:

- ✓ Deguelina: m/z 394, m/z 379 e m/z 192;
- ✓ 6a,12a-desidrodeguelina: m/z 392, m/z 377 e m/z 349;
- ✓ 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina: m/z 406 e m/z 391;
- ✓ Tefrosina: m/z 410, m/z 392, m/z 377 e m/z 349.

A 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina como está presente em menor concentração no extrato bruto, não possível realizar o monitoramento. Os espectros de massas de cada rotenóide monitorado pelo SIM estão apresentados nas figuras 58, 59 e 60.

Figura 57 – Ampliação do espectro de massas do extrato hexânico.

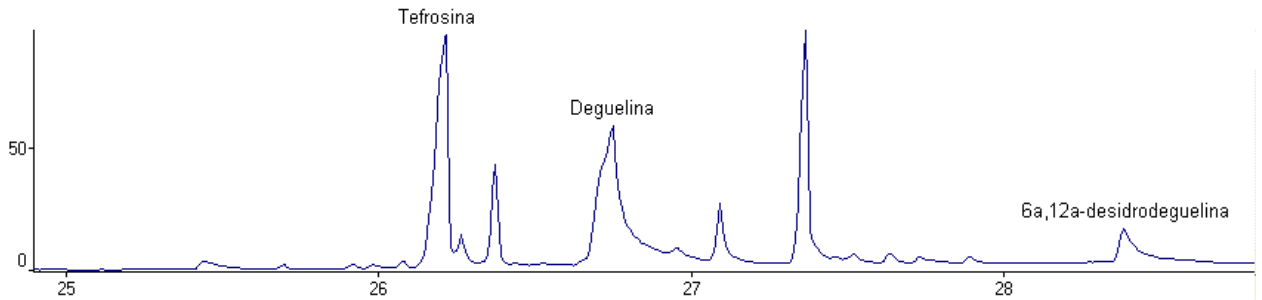


Figura 58 – Espectros de massas da deguelina (SIM).

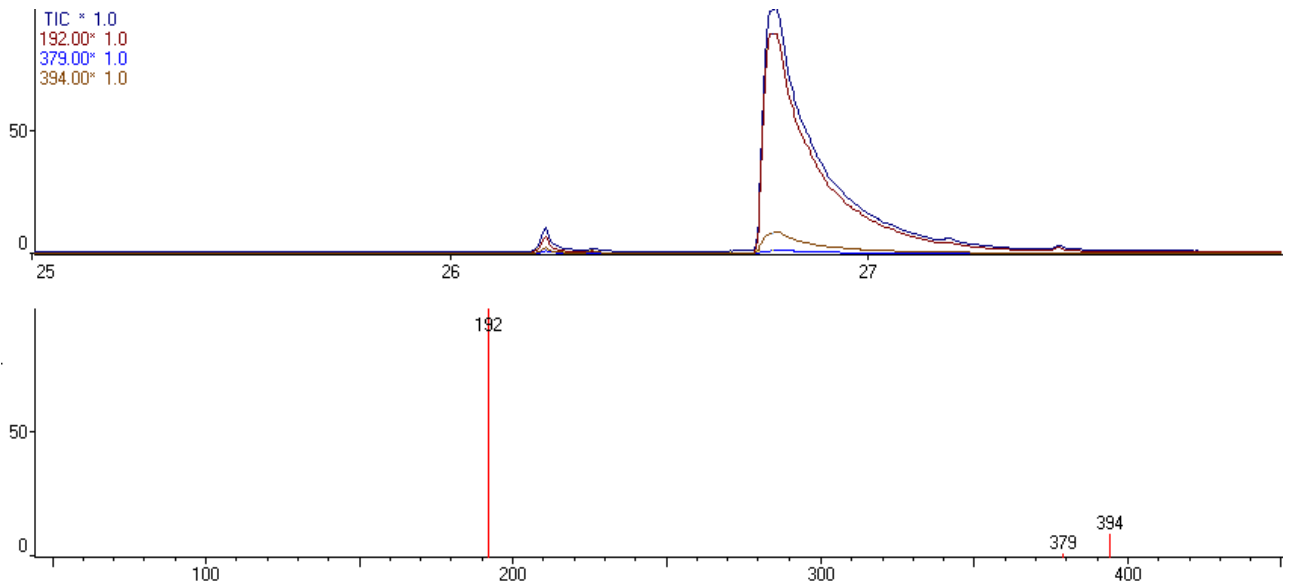


Figura 59 – Espectro de massas 6a,12a-Desidroguelina (SIM).

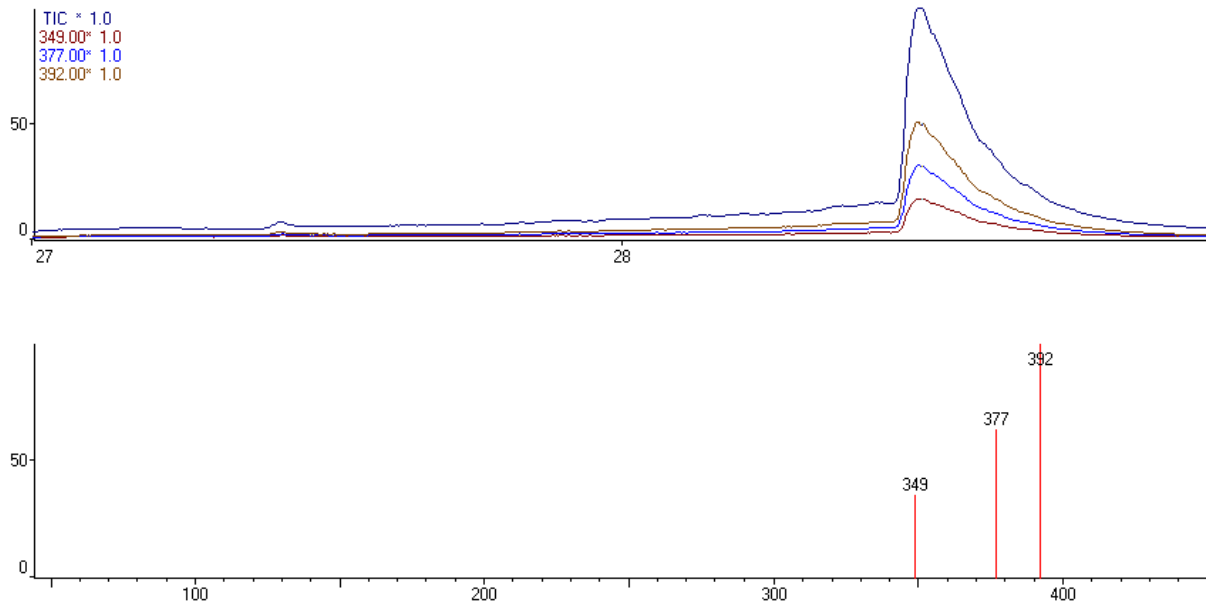
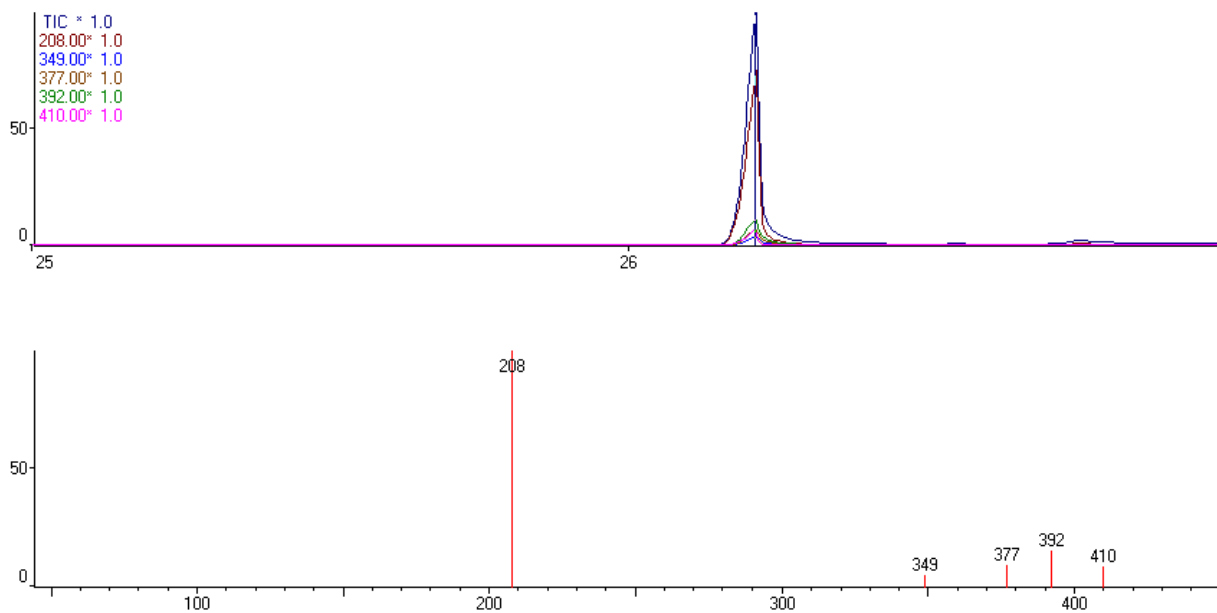


Figura 60 – Espectros de massas da tefrosina (SIM).

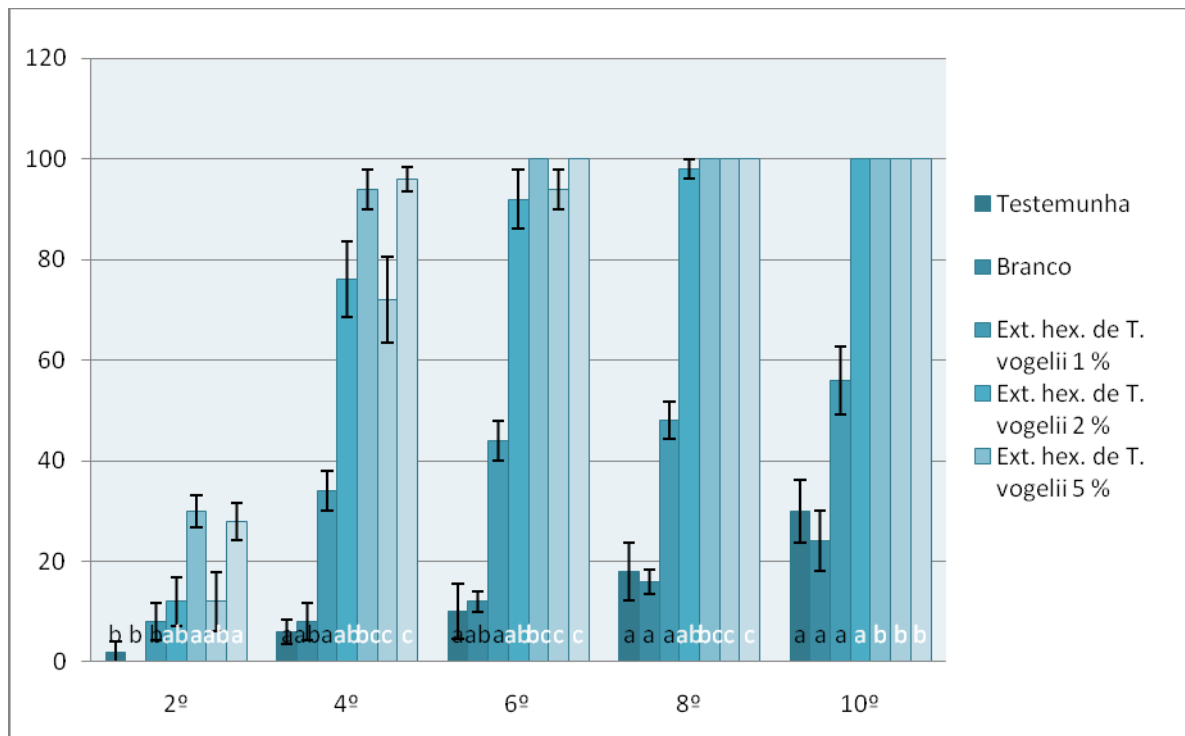


4.6 TESTE BIOLÓGICO

O teste biológico contra o percevejo confirmou o potencial inseticida atribuído aos rotenóides presentes no extrato hexânico. O gráfico mostra os resultados observados para o extrato hexânico bruto. A atividade inseticida foi considerada satisfatória a partir do 4º dia, onde aproximadamente 80% dos percevejos morreram em concentrações superiores a 2% de extrato. A concentração

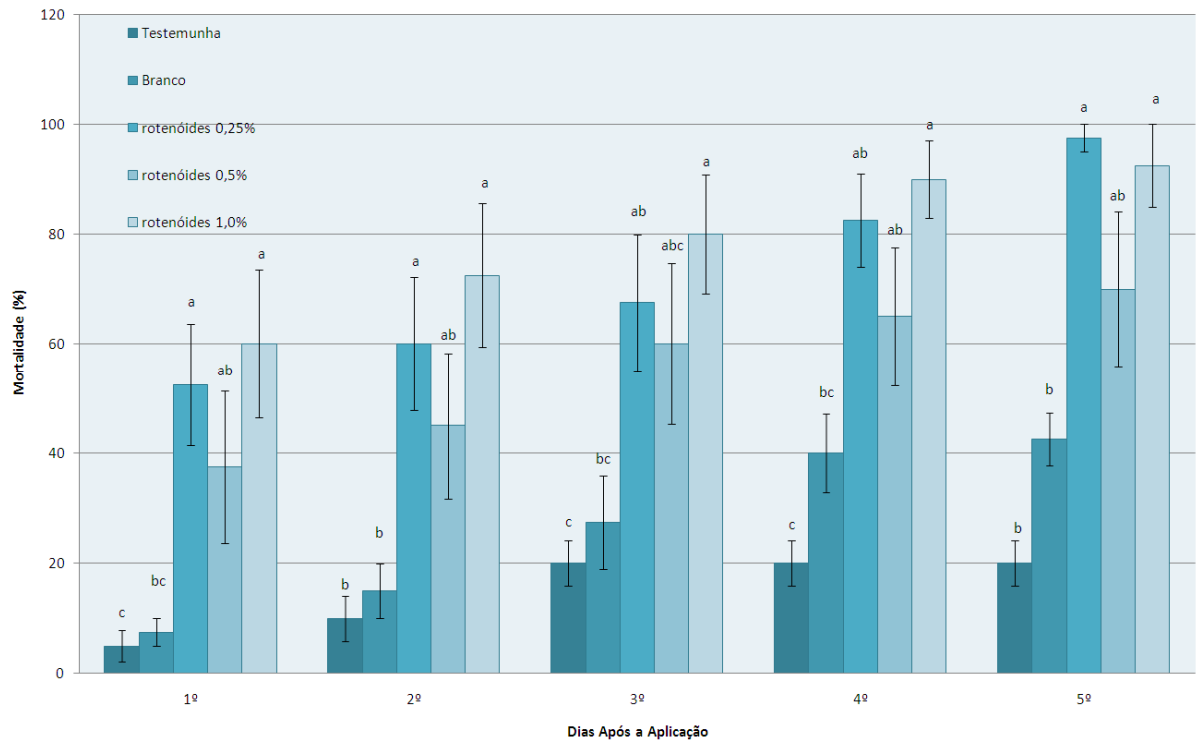
de 4% a mortalidade foi menor do que 3%, esse fato pode ser atribuído à baixa solubilidade do extrato, nesta concentração específica. Para o 6º dia nas concentrações acima de 2% a mortalidade foi em média próxima de 100%. A partir do 8º dia observou-se mortalidade completa nas concentrações acima de 2%, inclusive.

Gráfico 1 – Mortalidade em percentagem de percevejos *Euschistus heros* adultos, pulverizados com extrato hexânico das raízes de *Tefrosia vogelii*.



O teste biológico se estendeu a uma substância isolada do extrato hexânico, a tefrosina, que foi purificada por cromatografia líquida (CLAE). No primeiro dia de avaliação houve 60% de mortalidade dos percevejos para uma concentração de 1% (m/m), e para 0,25% (m/m) foi de aproximadamente 50%. Com o passar dos dias, a mortalidade foi crescendo linearmente, até que no 5º houve mortalidade próximo de 100% para as concentrações de 0,25% e 1%. O teste também apresentou problemas devido à solubilidade, como pode ver vista a mortalidade para 0,5%. Além disso, observamos altos percentuais de mortalidade para os tratamentos da testemunhas e do branco. Este evento foi atribuído a vitalidade dos insetos e/ou problemas com contaminação do material alimentar. Apesar de indesejado o teste foi considerado positivo para a atividade inseticida da substância.

Gráfico 2 – Mortalidade em porcentagem de percevejos *Euschistus heros* adultos, pulverizados com a tefrosina, isolada do extrato hexânico das raízes de *Tefrosia vogelii*.



5 CONCLUSÃO

- ✓ A extração por Soxhlet mostrou-se mais eficiente e versátil que o método por maceração, devido ao menor tempo utilizado e menor quantidade de solvente empregado, além de não ter sido observada alteração na constituição do extrato mesmo com a temperatura presente.
- ✓ A espectrometria de massas com fonte de ionização por elétrons resultou em fragmentos chave na determinação estrutural dos rotenóides, além de uma flavanona, podendo esta técnica espectrométrica sugerir com bastante segurança estruturas parciais e natureza para os constituintes em análise.
- ✓ Os espectros de RMN foram imprescindíveis para definições entre rotenóides com anéis E dimetilcromênicos e diidrofurânicos.
- ✓ O método selective ion monitoring (SIM) possibilitou o monitoramento dos rotenóides no extrato bruto: deguelina, 6a,12a-desidrodeguelina e tefrosina. A 6-oxo-6a,12a-desidrodeguelina não foi observada devida a baixa concentração do constituinte no extrato.
- ✓ O extrato bruto hexânico mostrou atividade inseticida significativa devido à presença de rotenóides. Tal fato baseou-se principalmente pela atividade inseticida também apresentada pelo rotenóide tefrosina quando testado de forma isolada.

REFERÊNCIAS

- ANDREI, C. C. ; VIEIRA, P. C. ; FERNANDES, P. C. ; DA SILVA, M.F.G.F. ; RODRIGUES E. F. Dimethylchromene rotenoids from *Tephrosia candida*, **Phytochemistry**, v. 46, p 1081-1085, 1997.
- ANDREI, César Cornélio. **Estudo químico de *Tephrosia cândida***. 1997. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.
- ANDREI, C. C., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B. et al. New spirorotenoids from *Tephrosia candida*, *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences*, 57(5/6), 418-422, 2002.
- ARNASON, J. T.; PHILOGÈNE, B. J .R.; MORAND, P., **Insecticides of Plant Origin: ACS SYMPOSIUM SERIES**. p 71, Jun 5-11, 1988.
- BRAZ-FILHO, R. Química dos produtos naturais: Importância, Interdisciplinidade, Dificuldades e Perspectivas. A peregrinação de um Pacatubano. **Química Nova**, v.17, n. 5, p 405-443, 1994.
- BOEKEA, S. J., BAUMGARTA, I. R., LOONA, J. J. A. et al. Toxicity and repellence of african plants traditionally used for the protection of stored cowpea against *Callosobruchus maculates*. **Journal of Stored Products Research**, v. 40, p 423–438, 2004.
- CABONI, P. ; SARAIS, G. ; ANGIIONI, A. ; VINCENZO, L. G. ; CABRAS, P. Fast and versatile multiresidue method for the analysis of botanical insecticides on fruits and vegetables by HPLC/DAD/MS. **J. Agric. Food Chem.** v. 53, p 8644-8649, 2005.
- CABONI, P.; SARAIS, G.; VARGIU, S.; DE LUCA, M. A.; GARAU, V. L.; IBBA. A.; CABRAS, P.; LC-MS-MS Determination of Rotenone, Deguelin, and Rotenolone in Human Serum. **Chromatographia**, v. 68, p 739-745, 2008.
- CABONI, P., SARAIS, G., VARGIU, S. **LC–MS–MS Determination of rotenone, deguelin, and rotenolone in human serum**. *Chromatographia*, 68(9/10), 739-745, 2008.
- CROMBIE, L.; WHITING, D. A.; Biosynthesis in the rotenoid group of natural products: Applications of isotope methodology. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6 p 1479-1507, 1998.
- CROMBIE, L.; ROSSITER, J.; WHITING, D. A. Biosynthetic Origin of the 2,2-dimethylchromen Ring: Formation of Deguelin by a Cyclase Enzyme from *Tephrosia vogelii*. **J. Chem. Soc.** 1986.
- CHEENPRACHA, S.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; CHANTRAPROMMA, K. Cytotoxic rotenoloids from the stems of *Derris trifoliata*, **Canadian Journal of Chemistry**, v. 85, n. 12, p. 0008-1022, 2007.
- DEL FEL, N. E. Gas-liquid chromatographic determination of rotenone and deguelin in plant extracts and commercial insecticides, **J. AOAC**, v.56 n.6, p.1343-9, 1973.

DELFEL, N. E.; Tallent W. H.; Carlson, D. G. Distribution of rotenone and deguelin in *Tephrosia vogelli* and separation of rotenoid-rich fractions. **J. Agr. Food Chem.**, v.18, n. 3, 1970.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2 ed. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, 2001.

FUKAMI, H, NAKAJIMA, M. em *Naturally Occurring Insecticides*. (Jacobson, M e Crosby, D. G. Eds) p. 71. Marcel Dekker Inc. New York, EUA, 1971.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.; Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p 374-381, 2007.

HUANG, Ji-guang; XU, Han-hong.; ZHOU, Li-juan.; YANG, Xiao-yun.; ZHANG, Ting-ying., Seasonal variations and analysis of rotenone content in *Tephrosia vogelii* hook f. **Huazhong Nongye Daxue Xuebao**, n. 26, v. 3, p. 313-315, 2007.

HUANG, J.; ZHOU, L.; XU, H. Effects of extraction of rotenone from *tephrosia vogelii* with supercritical fluid CO₂. **Huazhong Nongye Daxue Xuebao**, n. 25, v. 1 p. 43-45, 2006.

INGHAM, J. L. Naturally occurring isoflavonoids em **Prog. In Chem. Of Org Nat. Prod** vol. 31 (Herz, W.; Grisebach, H e Kirby, G. w. Eds), p 1, Springer-Verllag, EUA, 1983.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; KOJIMA, N.; TAN, H. T. W.; TAKAYASU, J.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemopreventive activity of rotenoids from *Derris trifoliata*, **Planta Medica**, v. 70, n. 1, p. 8-11, 2004.

IBRAHIM, B.; M'BATCHI, B.; MOUNZEO, H.; BOUROBOU BOUROBOU, H.P.; POSSO, P. Effect of *Tephrosia vogelii* and *justicia extensa* on *tilapia nilotica* in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p 99-104, 2000.

LAMI, N.; KADOTA, S.; TEZUKA, Y; KIKUCHI, T. Structure and stereochemistry of a new rotenoid, boeravinone C. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 6, p. 1558-1562, 1990.

LU, Hai Ying. ; LIANG, Jing Yu. ; ZHAO, Ling. Two new rotenoids from the root of *Derris elliptica*. **Chinese Chemical Letters**, n.19, v. 10, p. 1218-1220, 2008.

LU, Hai-Ying; LIANG, Jing-Yu. Novel N-containing rotenoid and seco-rotenoid from the root of *Derris elliptica*, **Journal of Asian Natural Products Research**, n. 11, v. 1, p. 58-62, 2009.

MATHIAS, L.; DA SILVA, B.; MORS, W. B.; PARENTE, J. P. Isolation and structural elucidation of a novel rotenoid from the seeds of *Clitoria Fairchildiana*. **Natural Product Research**, v. 19, p. 325-329, 2005.

MATHIAS, L.; MORS, W.; PARENTE, J. Rotenoids from seeds of *Clitoria fairchildiana*, **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1449-1451, 1998.

MARSTON, A.; MSONTHI, J. D.; HOSTETTMANN, K. On the reported molluscicidal activity from *Tephrosia vogelii* leaves, **Pytochemistry**, n. 23, v.8, p. 1824-1825, 1984.

MARICONI, F. A. M. Em *Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas. Vol. I, Defensivos*. p.122 (5ª ed.). Editora Nobel. São Paulo, Brasil, 1981.

MARZOUK, M. S. A.; Isoflavonoid glycosides and rotenoids from *Pongamia pinnata* leaves, **Journal Biosciences**, n. 63, p. 1-7, 2008.

NEUWINGER, H. D. Plants used for poison fishing in tropical Africa. **Toxicon**, n. 44 v. 4, p. 417-430, 2004.

PEREIRA, A. S.; PINTO, A. C.; CARDOSO, J. N.; NETO, F. R. A.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; Analysis of Rotenoids by High Temperature High Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **J. High Resol. Chromatogr**, v. 21, n. 9, p. 513–518, 1998.

PEREIRA, B. S.; BERNADO, R. R.; PAZ, J. P. A new rotenoid glucoside, 6-deoxyclitoriacetal 11-O-β-D-gluco-pyranoside, from the roots of *Clitoria fairchildiana*, **Planta Medica**, v. 54, n. 3, p. 285, 1998.

SANTOS, S. R. Dos espirros à morte: Agrotóxicos provocam mortes e danos irreversíveis à saúde humana. **Revista CREA/PR**, n.1 v.4, p. 22-23, 1999.

SIMIN, K.; ALI, Z.; KHALIQ-UZ-ZAMAN, S. M.; AHMAD, V. U. Structure and biological activity of a new rotenoid from *Pongamia pinnata*. **Natural Product Letters**, v. 16, n. 5, p. 351-357, 2002.

SILVA, B.; BERNADO, R.; PARENTE, J. Rotenoids from roots of *Clitoria fairchildiana*, **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, 1998.

TAKASHIMA, J. NORIKO, C.; YONEDA, K.; OHSAKI, A. Derrisin, a new rotenoid from *Derris malaccensis* Plain and anti-*Helicobacter pylori* activity of its related constituents. **Journal of Natural Products**, n. 65, v. 4, 2002.

THASANA, N.; CHUANKAMNERDKARN, M.; RUCHIRAWAT, S. A new 12a-hydroxyelliptone from the stems of *Derris malaccensis*, **Heterocycles**, v. 55, n. 6, 2001.

TEFROSIA VOGELII. **Action Sheet 53**. Disponível em <http://www.paceproject.net/UserFiles/File/Forests/Tephrosia%20vogelii.pdf>. Acesso em: 20 julho 2010.

VASCONCELOS, J. N.; LIMA, J. Q.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; ALMEIDA, M. M. B.; NETO, M. A.; MAFEZOLI, J.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R. Estudo químico e biológico de *Tephrosia tunicata* Pers. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, 382-386, 2009.

WANG, Yi-Fen. ; JI-JUN, Chen. ; YAN, Yang. ; YONG-TANG, Zheng, ; SHAO-ZONG, Tang. ; SHI-DE, Luo. New rotenoids from roots of *Mirabilis jalapa*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 85, n. 8, p. 2342-2348, 2002.

WEI, Huan-Huan.; XU, Han-Hong.; XIE, Hai-Hui.; XU, Liang-Xiong.; WEI, Xiao-Yi. Sesquiterpenes and lignans from *Tephrosia vogelii*. **Helvetica Chimica Acta**, n. 92, v. 2, p. 370-374, 2009.

WANGENSTEEN, H.; ALAMGIR, M.; RAJIA, S.; SAMUELSEN, A. B.; MALTERUD, K. E. Rotenoids and isoflavones from *Sarcolobus globosus*. **Planta medica**, v. 71, p. 754-758, 2005.

WANGTEERAPRASERT, R.; LIKHITWITAYAWUID, K. A new rotenoid from *Deriis malaccensis*, **Heterocycles**, v. 75, n. 2, p. 403-406, 2008.

YENESEW, A.; SOLOMON, D.; JACOB, O. M.; OKETCH-RABAH, H. A.; JOHN, L.; PALMER, R.; MATTHIAS, H.; MARTIN, G. P.; AKALA, H.; WANGUI, J.; PAMELA, L.; WATERS, N. C. Anti-plasmodial activities and X-ray crystal structures of rotenoids from *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 3, p. 773-779, 2003.

YENESEW, A.; MIDIWO, J. O.; WATERMAN, P. G. Rotenoids, isoflavones and chalcones from the stem bark of *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis*, **Phytochemistry**, v. 47, v. 2, n. 295-300, 1998.

ZHANG, Ting-Ying. XU, Han-Hong.; HUANG, Ji-Guang.; ZHAO, Jing-Li. Variation of rotenone in different growth stages of plants and regions. **Huanan Nongye Daxue Xuebao**, n. 27, v. 3, p. 48-50, 2006.

ZHANG, Y. et al. The main insecticidal components of *Tephrosia vogelii* Hook. **Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa**, n. 12, v. 6, p. 6-12, 2000.