

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS
FLAVONOIDES ISOLADOS DE *Clitoria fairchildiana* R. A.
HOWARD**

RAULDENIS ALMEIDA FONSECA SANTOS

**Salvador
2014**

RAULDENIS ALMEIDA FONSECA SANTOS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS
FLAVONOIDES ISOLADOS DE *Clitoria fairchildiana* R. A.
HOWARD**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Mauricio David.

**Salvador
2014**

RAULDENIS ALMEIDA FONSECA SANTOS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS
FLAVONOIDES ISOLADOS DE *Clitoria fairchildiana* R. A.
HOWARD**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química Orgânica, programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal da Bahia.

Aprovado em ____ de _____ de 2014.

Banca examinadora

Jorge Mauricio David – Orientador _____
Doutor em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo
Universidade Federal da Bahia

Clayton Queiroz Alves _____
Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal da Bahia
Universidade Estadual de Feira de Santana

Juceni Pereira de Lima David _____
Doutora em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo
Universidade Federal da Bahia

Marcus Vinicius Bahia _____
Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal da Bahia
Instituto Federal da Bahia

Ademir Evangelista do Vale _____
Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal da Bahia
Universidade Federal da Bahia

Agradeço minha família e à todas pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. DSc. Jorge Mauricio David, pela orientação e auxílio, um exemplo de professor e orientador que usarei como modelo.

Ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Bahia (UFBA) pelo espaço físico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos, fundamental para realização desse trabalho.

Aos Professores de graduação que marcaram a minha formação profissional e pessoal, especialmente Reinaldo da S. Gramacho, Edson J. Wartha e a Raildo Mota de Jesus pelo seu fundamental apoio.

Aos alunos de iniciação científica (IC) Elisvan e Amanda que ajudaram no isolamento dos metabólitos secundários.

A todos colegas e ex-colegas de laboratório de produtos naturais (GPPN): José Candido, Darlan Coutinho, Eliezer, Larissa Cavalcante, Clayton Queiroz, Larissa Santos, Patrícia, André, Fábio, Vanessa e tantos outros colegas que passaram pelo laboratório 110.

A Juliana pelo companheirismo.

Ao colega de laboratório, Prof. Bruno Moreira, pelas análises de CG-EM, realizadas na UFBA, campus Vitória da Conquista.

A central analítica da USP, pelas análise de RMN e EM.

"Todas as batalhas na vida servem para ensinar-nos algo,
inclusive aquelas que perdemos."

(Paulo Coelho)

RESUMO

A espécie *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard., sinonímia *Clitoria racemosa* Benth., é popularmente conhecida como sombreiro e utilizada na arborização urbana, apresentando diversos relatos de isolamento de flavonoides com atividades antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e alelopática. O presente trabalho descreve o estudo químico das raízes e pétalas da *Clitoria fairchildiana*, permitindo o isolamento dos flavonoides clitoriactal (2), 6-desoxiclitoriactal (3), stemonal (4), stemonona (5), canferol (6), quercetina (7), vitexina (8), astragalina (9) e dos fitoesteroides β -sitosterol (1) e estigmasterol (1a), além da identificação por CG-EM de ácidos graxos e fitol. Também foram realizados ensaios biológicos, dos extratos e substâncias isoladas, tais como de atividade frente *Artemia salina*, antioxidante e de inibição da enzima acetilcolinesterase. As substâncias clitoriactal (2) e 6-desoxiclitoriactal (3) apresentaram moderada atividade frente *Artemia salina*, com valores de $DL_{50}=515,3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $DL_{50}=260,5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Enquanto que a astragalina (9) apresentou uma maior atividade ($DL_{50}=77,1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). No teste antioxidante de sequestro do radical livre DPPH, a quercetina (6) e o canferol (5) apresentaram as maiores atividades antioxidante. Diferentes extratos da espécie vegetal foram analisados por CLAE-DAD, determinando que os rotenoides clitoriactal (2) e o 6-desoxiclitoriactal (3), são encontrados em maior quantidade nas raízes, contudo não são encontrados nas folhas e pétalas da espécie. As substâncias isoladas foram identificadas por métodos espectrométricos (IV, UV/Vis, EM, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C) e por comparação com dados da literatura. Dessa forma, este trabalho contribui para a taxonomia da espécie *Clitoria fairchildiana*, descrevendo o primeiro estudo fitoquímico das pétalas dessa espécie, além de relatar o primeiro isolamento da stemonona (5), obtido anteriormente apenas por modificação estrutural.

Palavras-chave: Flavonoides, rotenoides, *Clitoria fairchildiana*, teste biológico.

ABSTRACT

The species *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard., Synonymy *Clitoria racemosa* Benth., is popularly known as sombrero and used in urban forestry, with several reports of isolation of flavonoids with antioxidant, cytotoxic, anti-inflammatory and allelopathic activities. This work describes the chemical study of the roots and petals of *Clitoria fairchildiana*, allowing the isolation of flavonoids clitoriactal (**2**), 6-deoxyclitoriactal (**3**), stemonal (**4**), stemonone (**5**), kaempferol (**6**), quercetin (**7**), vitexin (**8**), astragalina (**9**) and fitoesteroides β -sitosterol (**1**) and stigmasterol (**1a**), besides the identification by GC-MS of fatty acids and phytol. Biological assays of the extracts and isolated substances, such as activity against, *Brine shrimp*, antioxidant and inhibition of acetylcholinesterase were also conducted. Biological assays of extracts and pure compounds such as facing activity *Brine shrimp*, antioxidant and inhibiting acetylcholinesterase enzyme were also performed. The substances clitoriactal (**2**) and 6-deoxyclitoriactal (**3**) showed moderate activity against *Brine shrimp*, with values $LD_{50}=515.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $LD_{50}=260.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. While astragalina (**9**) showed increased activity ($LD_{50}=77.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). In antioxidant test kidnapping of free radical DPPH, quercetin (**6**) and kaempferol (**5**) showed the highest antioxidant activities. Different extracts of the plant species were analyzed by HPLC-DAD, determining that the rotenoids clitoriactal (**2**) and 6-deoxyclitoriactal (**3**), are found in greater amounts in the roots, but are not found in the leaves and petals of the species. The compounds were identified by spectroscopic methods (IR, UV/Vis, MS, ^1H NMR and ^{13}C NMR) and by comparison with the literature data. Thus, this work contributes to the taxonomy of species *Clitoria fairchildiana*, describing the first phytochemical study of the petals of this species, in addition to reporting the first isolation of stemonone (**5**), obtained previously only by structural modification.

Keywords: Flavonoids, rotenoids, *Clitoria fairchildiana*, biological test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fotos das flores de <i>Clitoria: laurifolia, ternatea, macrophylla, simplicata, falcata, nana, fairchildiana</i> e <i>amazonum</i> (esquerda para direita).....	19
Figura 2- Levantamento dos trabalhos científicos envolvendo o gênero <i>Clitoria</i>	20
Figura 3- Fotos das flores, vagens e folhas de uma espécimen de <i>C. fairchildiana</i>	21
Figura 4- Exemplo de exsicata da espécie botânica <i>C. fairchildiana</i>	22
Figura 5- Distribuição da espécie <i>C. fairchildiana</i> no mundo.....	23
Figura 6- Esqueleto das principais classes de flavonoides.....	28
Figura 7- Estrutura da rotenona.....	29
Figura 8- Variação estrutural de alguns rotenoides.....	30
Figura 9- Biossíntese da etapa de conversão da fenilalanina à flavanona.....	32
Figura 10- Biossíntese da etapa de conversão da flavanona à isoflavona.....	32
Figura 11- Biossíntese da etapa de hidroxilações seguida de metilações seletivas.....	33
Figura 12- Biossíntese da etapa de formação do esqueleto rotenoide seguido da prenilação e ciclização.....	33
Figura 13- Nauplius de <i>A. salina</i>	34
Figura 14- Fórmula para cálculo da porcentagem de inibição.....	62
Figura 15- Fórmula para cálculo da porcentagem de inibição da enzima AChE.....	63
Figura 16- Espectro de RMN ¹ H do β-sitosterol e estigmasterol [300 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)]	65
Figura 17- Espectro de IV do β-sitosterol e estigmasterol em pastilha de KBr.....	65
Figura 18- Cromatograma do clitoriactal	66
Figura 19- Espectro no UV/Vis do clitoriactal.....	67
Figura 20- Espectro de RMN de ¹ H do clitoriactal [300 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)].....	69
Figura 21- Ampliação do espectro de RMN de ¹ H do clitoriactal [300 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)].....	69
Figura 22- Espectro de RMN de ¹³ C do clitoriactal [75 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)].....	70
Figura 23- Espectro de IV do clitoriactal em pastilha de KBr.....	70
Figura 24- Cromatograma do 6-desoxiclitoriactal.....	71
Figura 25- Espectro no UV/Vis do 6-desoxiclitoriactal.....	72
Figura 26- Espectro de RMN de ¹ H do 6-desoxiclitoriactal [300 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)].....	73
Figura 27- Ampliação do espectro de RMN de ¹ H do 6-desoxiclitoriactal [300 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)].....	74
Figura 28- Espectro de RMN de ¹³ C do 6-desoxiclitoriactal [75 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)].....	74
Figura 29- Espectro no IV do 6-desoxiclitoriactal em pastilha de KBr.....	75
Figura 30- Proposta de fragmentos no espectro de massa do 6-desoxiclitoriactal.....	75
Figura 31- Espectro de massa do 6-desoxiclitoriactal.....	76
Figura 32- Espectro no UV/Vis do stemonal.....	78
Figura 33- Espectro de RMN de ¹ H do stemonal [300 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)].....	78
Figura 34- Espectro no UV/Vis do stemonona.....	80
Figura 35- Espectro de RMN de ¹ H do stemonona [300 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)].....	80
Figura 36- Ampliação do espectro de RMN de ¹ H do stemonona [300 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)].....	81
Figura 37- Cromatograma do canferol.....	84
Figura 38- Espectro no UV/Vis do canferol.....	84
Figura 39- Espectro de RMN de ¹ H do canferol [300 MHz, Metanol-d ₆ , δ(ppm)].....	85
Figura 40- Ampliação do espectro de RMN de ¹ H do canferol [300 MHz, Metanol-d ₆ ,	

$\delta(\text{ppm})]$	86
Figura 41- Espectro de RMN de ^{13}C do canferol [75 MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	87
Figura 42- Espectro DEPT 135° do canferol [75 MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	88
Figura 43- Correlações do canferol [Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	88
Figura 44- Espectro de COSY do canferol [300 MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	89
Figura 45- Espectro no IV do canferol em pastilha de KBr.....	90
Figura 46- Cromatograma da quercetina.....	91
Figura 47- Espectro no UV/Vis da quercetina.....	92
Figura 48- Espectro de RMN de ^1H da quercetina [500 MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	93
Figura 49- Ampliação do espectro de RMN de ^1H da quercetina [500 MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	93
Figura 50- Espectro de COSY da quercetina [500 MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	94
Figura 51- Correlações da quercetina [DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	94
Figura 52- Espectro de IV da quercetina em pastilha de KBr.....	95
Figura 53- Cromatograma do vitexina	96
Figura 54- Espectro no UV/Vis da vitexina.....	97
Figura 55- Espectro de RMN de ^1H da vitexina [500 MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	98
Figura 56- Ampliação do espectro de RMN de ^1H do vitexina [500 MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	99
Figura 57- Espectro de RMN de ^{13}C do vitexina [125MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	100
Figura 58- Espectro de COSY da vitexina [DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	101
Figura 59- Espectro de COSY da vitexina [DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	102
Figura 60- Correlações da vitexina [DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	102
Figura 61- Espectro no IV da vitexina em pastilha de KBr.....	103
Figura 62- Cromatograma da astragalina.....	104
Figura 63- Espectro no UV/Vis da astragalina.....	105
Figura 64- Espectro de RMN de ^1H da astragalina [500 MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	106
Figura 65- Ampliação do espectro de RMN de ^1H da astragalina [500 MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	106
Figura 66- Espectro de RMN de ^{13}C da astragalina [125MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	107
Figura 67- Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da astragalina [125MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	107
Figura 68- Espectro de HSQC da astragalina [Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})]$	108
Figura 69- Cromatograma de íons totais da fração PeCH 4 das pétalas da <i>C. fairchildiana</i>	111
Figura 70- Cromatograma de íons totais da fração PeCH5 das pétalas da <i>C. fairchildiana</i>	111
Figura 71- Cromatograma de íons totais da fração PeCH 6 das pétalas da <i>C. fairchildiana</i>	112
Figura 72- Estruturas dos constituintes químicos identificados por CG-EM.....	113
Figura 73- Cromatograma da mistura de clitoriacetal e 6-desoxiclitoriacetal.....	114
Figura 74- Espectro de UV da clitoriacetal e da 6-desoxiclitoriacetal.....	114
Figura 75- Cromatograma do extrato bruto MeOH da raíz da <i>C. fairchildiana</i>	115
Figura 76- Espectro de UV da clitoriacetal e da 6-desoxiclitoriacetal.....	115
Figura 77- Cromatograma do extrato bruto MeOH da caule da <i>C. fairchildiana</i>	115
Figura 78- Espectro de UV da clitoriacetal e da 6-desoxiclitoriacetal.....	116
Figura 79- Cromatograma do extrato bruto MeOH da folhas da <i>C. fairchildiana</i>	116
Figura 80- Espectro de UV/Vis de dois picos do cromatograma do extrato das folhas...	116
Figura 81- Cromatograma do extrato bruto MeOH da pétalas da <i>C. fairchildiana</i>	117
Figura 82- Espectro de UV/Vis de dois picos do cromatograma do extrato das pétalas..	117

Figura 83- Cromatograma do extrato bruto MeOH da sementes da <i>C. fairchildiana</i>	117
Figura 84- Espectro de UV da clitoriacetal e da 6-desoxiclitoriacetal.....	118
Figura 85- Curva de calibração obtida com o padrão de clitoriacetal (2).....	121
Figura 86- Curva de calibração obtida com o padrão de 6-desoxiclitoriacetal (3).....	121
Figura 87- Representação geral da reação de captura do radical DPPH.....	125
Figura 88- Imagem da cromatoplaca do teste antioxidante utilizando DPPH.....	125
Figura 89- Gráfico do percentual de sequestro do radical livre DPPH.....	126
Figura 90- Gráfico do percentual de inibição da enzima AChE.....	127

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1- Fluxograma geral do desenvolvimento da obtenção dos extratos da raiz da <i>C. fairchildiana</i>	42
Esquema 2- Fluxograma geral do desenvolvimento da obtenção dos extratos das pétalas da <i>C. fairchildiana</i>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Substâncias isoladas de <i>C. fairchildiana</i> no mundo.....	24
Tabela 2- Toxicidade de rotenoides mais comuns.....	30
Tabela 3- Massas dos extratos da <i>C. fairchildiana</i>	41
Tabela 4 - Frações obtidas da CC de RCC.....	44
Tabela 5- Frações obtidas da CC de RCC1.....	44
Tabela 6- Frações obtidas da CC de RCC1D.....	45
Tabela 7- Frações obtidas da CC de RCC1D5.....	45
Tabela 8- Frações obtidas por CCDP de RCC1D5D-F.....	46
Tabela 9- Frações obtidas da CC de RCC1D5L.....	46
Tabela 10- Frações obtidas da CC de RCC1D5L6-7.....	47
Tabela 11- Frações obtidas por CCDP de RCC1D5L6-7F-S.....	47
Tabela12- Frações obtidas da CCDP de RCC1D5L9.....	47
Tabela 13- Frações obtidas da CC de RCC1F.....	47
Tabela 14- Frações obtidas da CC de RCAc.....	48
Tabela 15- Frações obtidas da CC de RCAc22-26.....	48
Tabela 16- Frações obtidas da CC de PeCC.....	49
Tabela 17- Frações obtidas da CC de PeCC3.....	50
Tabela18- Frações obtidas da CC de PeCC3C1.....	50
Tabela 19- Frações obtidas da CC de PeCC4.....	51
Tabela 20- Frações obtidas da CC de PeCH.....	52
Tabela 21- Frações obtidas da CC de PeCMe.....	53
Tabela 22- Frações obtidas da CCDP de PeCMe6-10.....	53
Tabela 23- Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H para o clitoriactal (2), 6-desoxiclitoriactal (3), stemonal (4) e stemonona (5) [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm), <i>J</i> (Hz)].....	82
Tabela 24- Dados espectroscópicos de RMN de ¹³ C para clitoriactal (2) e 6-desoxiclitoriactal (3) [75 MHz, CDCl ₃ , δ(ppm)].....	83
Tabela 25- Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H para canferol (6), quercetina (7), vitexina (8) e astragalina (9)[300-500 MHz, δ (ppm), <i>J</i> (Hz)].....	109
Tabela 26- Dados espectroscópicos de RMN de ¹³ C para canferol (6) e vitexina (8) e astragalina (9) [75-125 MHz, δ (ppm)]	110
Tabela 27- Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração PeCH 4.....	112
Tabela 28- Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração PeCH 5.....	112
Tabela 29- Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração PeCH 6.....	113
Tabela 30- Massas do material vegetal e dos extratos obtidos pelo ASE.....	119
Tabela 31- Parâmetros de validação do método da curva de calibração da clitoriactal..	120
Tabela 32- Parâmetros de validação do método da curva de calibração do 6-desoxiclitoriactal.....	121
Tabela 33- Teor de clitoriactal e 6-desoxiclitoriactal nos extratos obtidos pelo ASE..	122
Tabela 34- Resultados do Teste de Letalidade de <i>A. salina</i> com extratos da <i>C. fairchildiana</i>	123
Tabela 35- Resultados do Teste de Letalidade de <i>A. salina</i> com compostos isolados.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABS	Absorbância
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de etila
ASE	Extração acelerada com solvente
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CL ₅₀	Concentração letal média
DL ₅₀	Dose Letal Mínima ou eficiente em 50%
CI ₅₀	Concentração inibitória para decrescer em 50%
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i> (Correlação para o mesmo núcleo)
DAD	<i>Detector Diode Array</i> (detector fotodiodo)
DEPT	<i>Distortionless Enhancement Polarization Transfer</i> (intensificação da distorção por transferência de polarização)
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EM	Espectrometria de massas
eV	Elétron-volt
Hex.	Hexano
IV	Espectroscopia de Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
Sb	Desvio padrão do coeficiente linear da curva de calibração
R ²	Curva de linearidade
MeOH	Metanol
ButOH	Butanol
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Relação massa carga
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
PF	Ponto de fusão
R _f	Índice de retenção
%SRL	Percentual de sequestro do radical livre
[M ⁺]	Massa molecular com carga positiva
ppm	Partes por milhão
TMS	Trimetilsilano
t _R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
$\lambda_{\text{máx}}$	Absorção máxima
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
TMCS	Trimetilclorosilano
RCC	Extrato clorofórmico das raízes

RCAc	Extrato acetato de etila das raízes
PeCC	Extrato clorofórmico das pétalas
PeCH	Extrato hexânico das pétalas
PeCMe	Extrato metanólico das pétalas

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	IX
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIII
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 FAMÍLIA LEGUMINOSAE.....	18
2.2 GÊNERO CLITORIA.....	18
2.3 A ESPÉCIE <i>Clitoria fairchildiana</i>	21
2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ESPÉCIE <i>Clitoria fairchildiana</i>	24
2.5 FLAVONOIDES.....	27
2.6 ROTENOIDES.....	29
2.7 BIOSÍNTESE DE ROTENOIDES.....	31
2.8 TESTES BIOLÓGICOS.....	34
2.8.1 Teste de letalidade frente <i>Artemia salina</i>	34
2.8.2 Teste de atividade antioxidante.....	35
2.8.3 Teste de atividade anticolinesterásica.....	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	37
4 PARTE EXPERIMENTAL	38
4.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS.....	38
4.2 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS.....	39
4.3 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE.....	40
4.4 ISOLAMENTO DE METABÓLITOS DA <i>Clitoria fairchildiana</i>	41
4.4.1 Purificação do extrato CHCl ₃ da raiz.....	44
4.4.2 Purificação do extrato AcOEt da raiz.....	48
4.4.3 Purificação do extrato CHCl ₃ das pétalas.....	49
4.4.4 Purificação do extrato Hexânico das pétalas.....	52
4.4.5 Purificação do extrato MeOH das pétalas.....	53
4.4.6 Identificação das substâncias do extrato Hexânico das pétalas por CG-EM....	54
4.5 DETERMINAÇÃO DE ROTENOIDES POR CLAE.....	60
4.5.1 Identificação de rotenoides em diferentes partes da <i>Clitoria fairchildiana</i>	60
4.5.2 Obtenção dos extratos da <i>Clitoria fairchildiana</i> por Extração Acelerada com Solventes (ASE).....	60
4.5.3 Quantificação de clitoriactal e 6-desoxiclitoriactal por CLAE-DAD.....	61
4.6 TESTES BIOLÓGICOS.....	61
4.6.1 Teste de atividade frente <i>Artemia salina</i>	61
4.6.2 Teste de atividade antioxidante.....	62
4.6.3 Teste de inibição da acetilcolinesterase.....	63
5 CONCLUSÃO	64
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS FITOESTEROIDES.....	64
5.2 IDENTIFICAÇÃO DO CLITORIACETAL.....	66
5.3 IDENTIFICAÇÃO DO 6-DESOXICLITORIACETAL.....	71

5.4 IDENTIFICAÇÃO DO STEMONAL.....	77
5.5 IDENTIFICAÇÃO DO STEMONONA.....	79
5.6 IDENTIFICAÇÃO DO CANFEROL.....	84
5.7 IDENTIFICAÇÃO DA QUERCETINA.....	91
5.8 IDENTIFICAÇÃO DA VITEXINA.....	96
5.9 IDENTIFICAÇÃO DO ASTRAGALINA.....	104
5.10 IDENTIFICAÇÃO USANDO CG-EM DO EXTRATO HEXÂNICO DAS PÉTALAS DA <i>Clitoria fairchildiana</i>	111
5.11 IDENTIFICAÇÃO DE ROTENOIDES EM DIFERENTES PARTES DA <i>Clitoria fairchildiana</i>	114
5.12 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA <i>Clitoria fairchildiana</i> POR EXTRAÇÃO ACELERADA (ASE)	119
5.13 QUANTIFICAÇÃO DO CLITORIACETAL E 6-DESOXICLITORIACETAL POR CLEA-DAD.....	120
5.14 TESTE DE LETALIDADE FRENTE <i>Artemia salina</i>	123
5.15 TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	125
5.16 TESTE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE.....	127
6 CONCLUSÃO.....	128
REFERÊNCIAS.....	130

1 INTRODUÇÃO

Devido à sua elevada biodiversidade, as zonas tropicais e subtropicais do planeta, especialmente o Brasil, apresentam grande potencial para exploração de novas substâncias bioativas (PINTO, 2002).

O reino vegetal vem contribuindo de forma significativa para o fornecimento de metabólitos para tratamento de doenças, desenvolvimento de cosméticos e agroquímicos de complexidade estrutural única (SERAFIN, 2006; FILHO, 1998).

Através do conhecimento da composição química de plantas, e atividades biológicas de extratos, muitas substâncias responsáveis pelas atividades são isoladas, identificadas e testadas do ponto de vista biológico/farmacológico, podendo-se transformar em novos fármacos (YUNES, 2001).

Devido à necessidade no desenvolvimento de fármacos mais eficientes ou que combatam patologias sem tratamento, ainda hoje, existe um interesse, por parte da indústria farmacêutica e órgãos de pesquisa, na busca de novas substâncias bioativas de fontes vegetais.

Apesar de existirem estratégias de pesquisa elaboradas, que usam a modelagem computacional e a síntese de novos compostos bioativos de forma específica, a fitoquímica ainda constitui uma ótima estratégia na busca desses compostos, pois pode-se considerar como pontos positivos a diversidade de compostos ainda desconhecidos e a evolução biológica, responsável pela síntese específica de várias substâncias bioativas complexas (ALVES, 2012).

No Brasil, espécies da família Leguminosae figuram entre as principais espécies que compõem sua flora (SOUZA, 2005). Além da importância alimentícia, espécies dessa família possuem relatos de isolamento de substâncias com diversas atividades biológicas como antioxidantes (BARREIROS, 2004), anti-hipertensivas (CORREIA Jr, 2007) e anticolinesterásica (SILVA, 2010), apresentando potencial para isolamento de compostos candidatos a fármacos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FAMÍLIA LEGUMINOSAE

A família Leguminosae (Fabaceae) pertence a divisão das Angiospermas, sendo a terceira maior família dessa divisão, compreendendo cerca de 727 gêneros e mais de 19000 espécies que se estendem por várias partes do mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Apresentam três importantes subfamílias, Caesalpinoideae com 5 tribos, 152 gêneros, Mimosideae com 5 tribos, 63 gêneros e Faboideae (Papilionoideae) com 31 tribos e 443 gêneros (GUNN, 1984; LEWIS, 2005).

Apesar do termo Fabaceae também ser utilizado para descrever a Família, muitos botânicos consideram mais correto o uso do termo Leguminosae, a fim de evitar ambiguidades com a classificação da subfamília (LEWIS, 2003).

São plantas de aspecto muito variado, desde grandes árvores a arbustos, subarbustos, ervas (anuais ou perenes) e trepadeiras, além de viverem em diversos ambientes. Apresenta como características marcantes o fruto (Legume) em forma de vagem, além da possibilidade de fixar nitrogênio atmosférico, por meio de uma relação simbiótica com bactérias do gênero *Rhizobium*, que se fixam na raiz do vegetal. Isto permite a muitos legumes sobreviver e competir efetivamente com outros vegetais em solos pobres em nitrogênio (JOLY, 1985; SASAKI, 2008).

2.2 GÊNERO *CLITORIA*

O gênero *Clitoria*, pertence a família Leguminosae e subfamília Faboideae, contemplando aproximadamente 40 espécies (GUIMARÃES, 2009). Seu nome deriva do formato de suas flores semelhantes ao clitóris, sendo uma característica marcante das espécies do gênero (BARROSO, 1991), (Figura 1, página 19). São encontradas em sua maioria em regiões tropicais e subtropicais (SILVA, 2002), se destacam como arbóreas, arbustivas ou herbáceas, eretas ou volúveis, de flores róseas, brancas ou violáceas (SILVA, 2008, COSTA, 2011).

Diversas espécies de Leguminosae são conhecidas pelo emprego na medicina popular, contudo no gênero *Clitoria*, apenas as espécies *C. macrophylla* e *C. ternatea* possuem relatos, como no combate a doença de pele, anti-inflamatório e infecções pulmonares. No Brasil, a *C. fairchildiana* é utilizada na arborização urbana, sem uso na medicina popular.

Contudo, rotenoides isolados das raízes dessa espécie, apresentaram notáveis atividades anti-inflamatória, citotóxica, além de atividade alelopática (SILVA, 2002, SHYAMKUMAR, 2012).

Figura 1- Fotos das flores de *C. laurifolia*, *C. ternatea*, *C. macrophylla*, *C. simplificada*, *C. falcata*, *C. nana*, e *C. amazonum* (esquerda para direita)



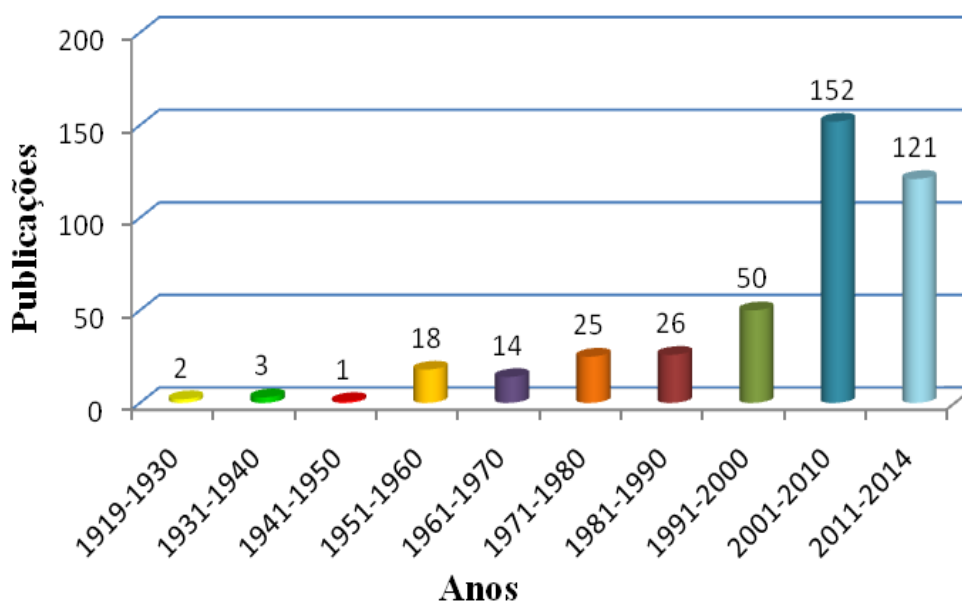
Fonte: *C. laurifolia* e *ternatea* (Foto: Kwan), *C. macrophylla* (Foto: Jov Viola), *C. simplificada* (Foto: Henrique Moreira), *C. falcata* (Foto: Marcelo Pedron), *C. nana* (Foto: Angelo A. Schneider), *C. fairchildiana* (Foto: Barroso), *C. amazonum* (Foto: Voucher)

Utilizando como ferramenta de pesquisa o *SciFinder Scholar*® (*American Chemical Society*) e como termo de busca a palavra *Clitoria*, foi verificado que existem mais de 412 publicações envolvendo esse gênero, registrados entre 1919 até 2014. Enquanto que a busca de dissertações e teses defendidas no país foi realizada no Banco de Teses da CAPES, indicando um crescente número de publicações.

A maioria das publicações que levam em consideração estudo fitoquímico do gênero, referem-se às espécies *C. ternatea*, *C. fairchildiana*, *C. macrophylla* e *C. mariana*. No Brasil são encontradas aproximadamente 29 espécies das quase 40 existentes, onde apenas 2 espécies (*C. ternatea* e *C. fairchildiana*) apresentam estudo fitoquímico (RANDO, 2014).

A figura 2 mostra um gráfico onde é observado um aumento significativo da quantidade de publicações nas últimas décadas para o gênero *Clitoria*, fato atribuído à grande variedade de flavonoides encontrados e suas diversas atividades biológicas. O mesmo é percebido com o alto e crescente número de trabalhos de pós-graduação nas instituições de pesquisa no país.

Figura 2- Levantamento dos trabalhos científicos envolvendo o gênero *Clitoria*



2.3 A ESPÉCIE *Clitoria fairchildiana*

A espécie *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard tem como sinonímia *Clitoria racemosa* Benth. (Figura 4, página 22), é popularmente conhecida como faveira, sombreiro ou palheteira, caracteriza-se como uma espécie arbórea de médio a grande porte, com copafrondosa e flores violáceas em ráceros pêndulos e fruto um legume deiscente. Por apresentar essas características, além de rústica, de crescimento rápido e flores atraentes (floração no verão), é muito usada para arborização urbana e rural de parques, jardins e estradas (SILVA, 2008, COSTA, 2011) (Figura 3).

Está distribuída principalmente em países tropicais da América do sul e Caribe, não é endêmica do Brasil, mas sua origem também não é conhecida (RANDO, 2014) (Figura 5, página 23).

Relatos sobre estudos fitoquímico da espécie *C. fairchildiana*, descrevem isolamento de flavonoides, especialmente rotenoides, e as descrições de suas propriedades biológicas nos levou a dar continuidade ao seu estudo (SILVA, 1998a; SILVA, 1998b; SILVA, 1998c, SILVA, 2002).

Figura 3- Fotos das flores, vagens e folhas de uma espécimen de *C. fairchildiana*



<http://gardeningwithwilson.com/tag/clitorea-fairchildiana%E2%80%8F/>
acesso em 20/09/2013

Figura 4- Exemplo de exsicata da espécie botânica *C. fairchildiana*



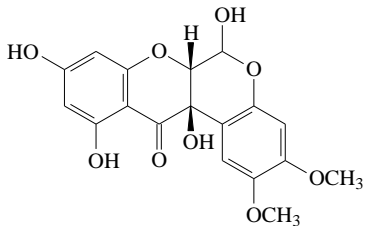
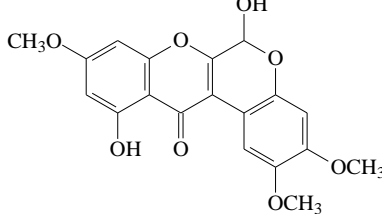
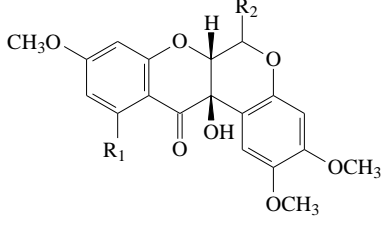
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29540>
acesso em 20/12/2013

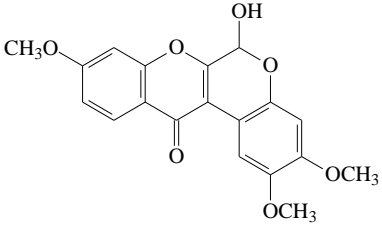
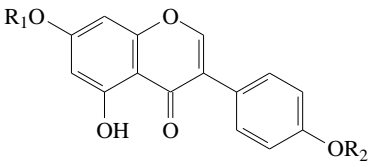
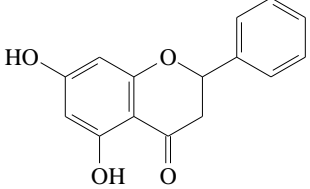
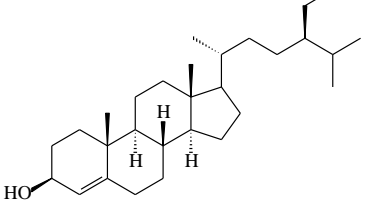
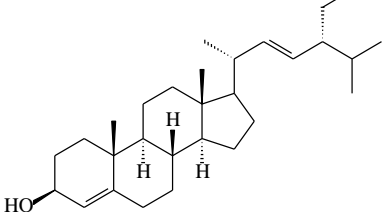
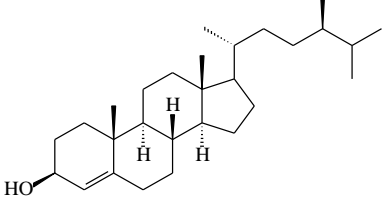
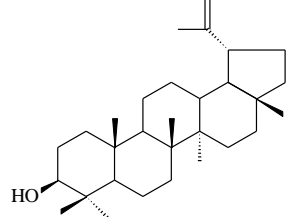
2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ESPÉCIE *Clitoria fairchildiana*

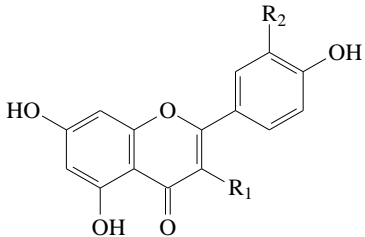
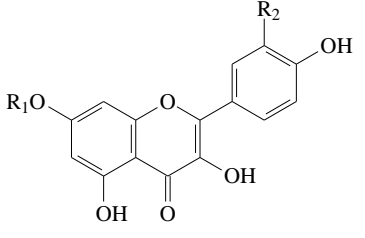
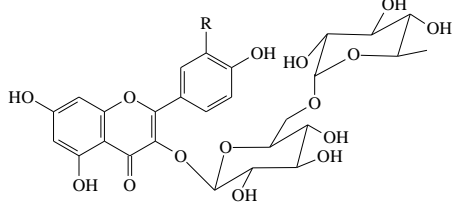
Considerando o número de espécies do gênero *Clitoria*, poucas delas foram estudadas quimicamente até o momento.

Da espécie *C. mariana* encontra-se referências de isolamento apenas de α -sitosterol, β -sitosterol e δ -lactona (SINHA, 1960a e b). Na *C. macrophylla*, encontra-se relatos de isolamento dos rotenoides clitoriactal, 6-desoxiclitoriactal e stemonactal (TAGUCHI, 1977; LIN, 1992). Enquanto que na *C. ternatea* apresenta diversos relatos de isolamento de diferentes flavonoides, sendo a espécie mais estudada fitoquimicamente (KOGAWA, 2007; KAZUMA 2003a e b; YADAVA, 2003). Esses resultados revelam que as espécies do gênero são ricas em flavonoides, uma vez que estudos fitoquímicos da espécie *C. fairchildiana* também descrevem isolamento de flavonoides, além de outros metabólitos tais como fitoesteroides e triterpenos, em diferentes partes da espécie (Tabela 1).

Tabela 1- Substâncias isoladas de *C. fairchildiana*

	<p>6a,12a-dihidro-6,9,11,12a-tetrahydroxi-2,3-dimetoxi-[1]benzopirano[3,4-b][1]benzopiran-12(6H)-ona</p>	<p>Raízes (SILVA, 1998a; SILVA, 1998b)</p>
	<p>stemonal</p>	<p>Raízes (SILVA, 1998a; SILVA, 1998b)</p>
 <p>R₁=OH R₂=H R₁=H R₂=OH R₁=OH R₂=OH R₁=O-D-glicopiranosil R₂=OH</p>	<p>6-desoxiclitoriactal 11-desoxiclitoriactal clitoriactal clitoriactal 11-O-D-glicopiranosideo</p>	<p>Raízes (SILVA, 1998a; SILVA, 1998b; SILVA, 1998c)</p> <p>Sementes (MATHIAS, 1998)</p>

	<p>6-hidroxi-2,3,9-trimetoxi-[1]- benzopirano[3,4- b][1]benzopiran-12(6H)-ona</p>	<p>Sementes (MATHIAS, 2005)</p>
 <p>R₁O R₂CH₃ R₁CH₃ R₂H R₁H R₂H</p>	<p>biochanina A genisteína prunetina</p>	<p>Galhos (GOMES, 2005)</p>
	<p>naringenina</p>	<p>Galhos (GOMES, 2005)</p>
	<p>β-sitosterol</p>	<p>Folhas (QUEROZ, 2009)</p>
	<p>estigmasterol</p>	<p>Folhas (QUEROZ, 2009)</p>
	<p>campesterol</p>	<p>Folhas (QUEROZ, 2009)</p>
	<p>lupeol</p>	<p>Folhas (QUEROZ, 2009)</p>

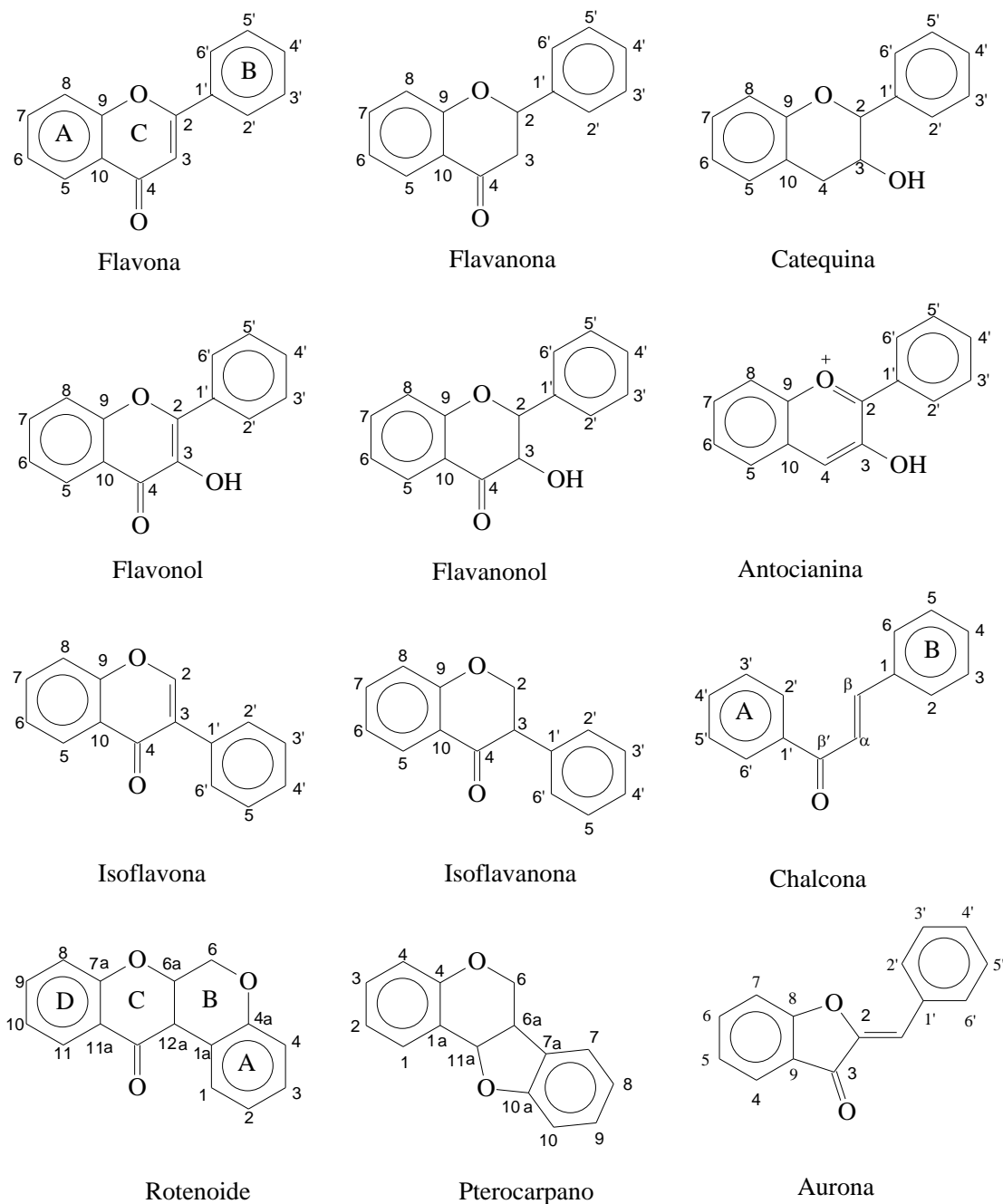
 <p> $R_1=OH$ $R_2=OH$ $R_1=O-D\text{-glucose}$ $R_2=OH$ $R_1=O-D\text{-glucose}$ $R_2=H$ </p>	<p> Folhas (QUEROZ, 2009) </p> <p> quercetina isoquercitrina astragalina </p>	
 <p> $R_1=D\text{-glucose}$ $R_2=H$ $R_1=D\text{-glucose}$ $R_2=OH$ </p>	<p> Folhas (QUEROZ, 2009) </p> <p> canferol 7-O-D-glicopiranosideo quercetina 7-O-D-glicopiranosideo </p>	
 <p> $R=H$ $R=OH$ </p>	<p> Folhas (QUEROZ, 2009) </p> <p> nicotiflorina rutina </p>	

Foi encontrado um único relato sobre componentes químicos voláteis das flores da *C. fairchildiana*, determinando que os sesquiterpenos são os voláteis majoritários (BÉZ, 2011). Dessa forma, existe um interesse no estudo fitoquímico, mais completo, das flores da *C. fairchildiana*, uma vez que a literatura descreve presença de metabólitos bioativos na espécie (SILVA, 2002; SHYAMKUMAR, 2012).

2.5 FLAVONOIDES

Os flavonoides compreendem uma grande classe de metabolitos secundários com estrutura fenólica variável, encontrados em frutas, legumes, cereais, cascas, raízes, caules, flores, chá e vinho (MIDDLETON, 1998; ALCARAZ & CARVALHO, 2004). Geralmente apresenta-se como um sólido amarelo, porém podem ser encontrados com coloração vermelha, laranja ou branco (SIMÕES, 1999). Esses metabólitos são muito úteis como marcadores taxonômicos na classificação de plantas, devido ao fato de sua biosíntese estar relacionada com o metabolismo específico de cada espécie vegetal (AGRAWAL, 1989). Estima-se que mais de 9000 variedades de flavonoides já foram identificados, muitos dos quais são responsáveis pelas cores atraentes de flores, frutas e folhas (De GROOT, 1998, WILLIAMS, 2004).

Estas substâncias demonstram possuir diversos efeitos, tais como, anti-inflamatório, antialérgico, antiviral, antioxidante, vasodilatador e até mesmo mutagênico em vários sistemas experimentais. Além disso, algumas investigações demonstraram que esses compostos afetam a atividade de muitos sistemas enzimáticos (De GROOT, 1998, COSTA, 2011). As intensidades dessas atividades, por sua vez, dependem de vários fatores estruturais. Os flavonoides podem ser classificados em subclasses (Figura 6, página 28), de forma que cada subclasse possui uma atividade biológica predominante, de acordo com o seu esqueleto carbônico básico.

Figura 6- Esqueleto das principais classes de flavonoides

A principal diferença entre os grupos de flavonoides decorre da mudança da posição do anel-B que pode estar ligado aos carbonos 2 ou 3 ou ainda condensado com outros anéis, bem como a presença ou ausência de insaturação no anel-C, além de apresentarem diferentes substituintes como hidroxilas, metoxilas e glicosídeos (RIJE, 2006; ALVES, 2007). No caso de rotenoides e pterocarpanas (fitoalexinas) existe a presença de um quarto anel heterocíclico (anel-B) condensado ao esqueleto da isoflavanona (Figura 6).

2.6 ROTENOIDES

Os rotenoides são flavonoides de polaridade média, muito solúveis em solventes orgânicos tais como clorofórmio, diclorometano e acetona e pouco solúveis em água, encontrados principalmente na família Leguminosae (DEWICK, 1982).

A rotenona ($C_{23}H_{22}O_6$) é o rotenoide mais representativo (Figura 7), foi extraída em pela primeira vez em 1848 das raízes de *Derris elliptica* (planta comum na Malásia e Indonésia) usado como inseticida natural. Na África e na América do Sul, por sua vez, a rotenona foi encontrada inicialmente em espécies do gênero *Lonchocarpus* (CORRÊA, 2007). Seu uso no controle de pragas iniciou-se em 1898, mas só em 1932 sua estrutura foi determinada. Dentre os rotenoides, a rotenona apresenta a maior capacidade inseticida (Tabela 2, página 30). Porém em condições de campo acaba sendo inativada pela degradação fotoquímica, térmica, quando em contato com o ar, de forma relativamente rápida. O período varia em torno de 2 a 3 dias no verão e 5 a 6 dias no inverno (CORRÊA, 2007; BARBOSA, 2004). A degradação acelerada é a principal desvantagem da utilização de produtos de origem natural, tais como, rotenoides, piretrinas, nicotinóides como inseticidas de campo.

Figura 7- Estrutura da rotenona

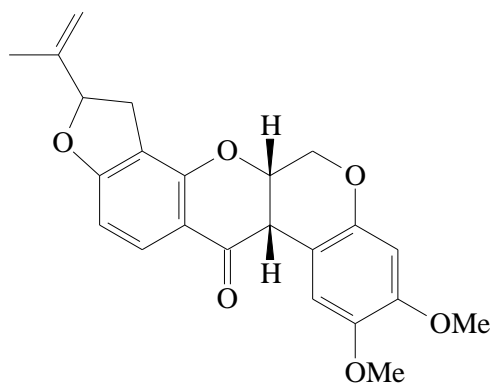
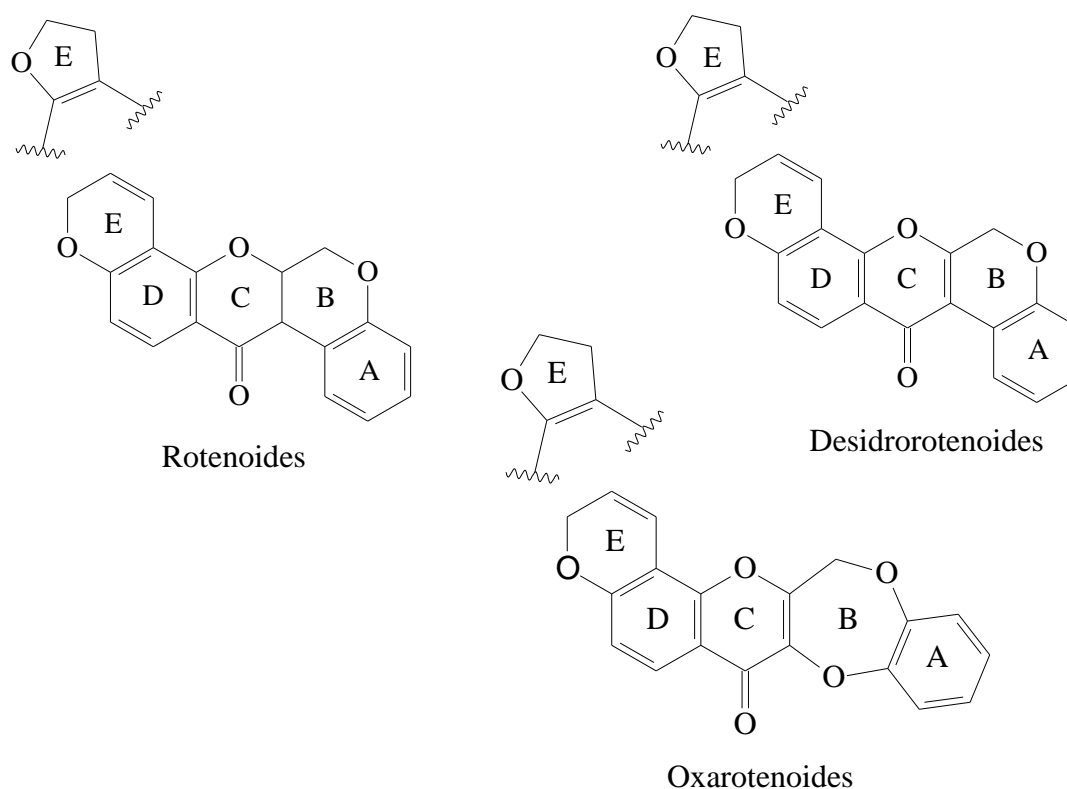


Tabela 2- Toxicidade de rotenoides mais comuns

Rotenoide	LC ₅₀ para o 4º estágio de <i>Bombyx mori</i> , mg.Kg ⁻¹	LC ₅₀ para <i>Musca domestica</i> , mg.mL ⁻¹	LC ₅₀ para <i>Aphis rumicis</i> , %
Rotenona	3	0,3	0,0005
Dihidrorotenona	10	0,43-0,71	-
Desidrorotenona	>400	-	-
Deguelina	10-12	2,8	0,005
Tefrosina	30-60	-	0,02
α-Toxicarol	>1540	-	0,2
Rotenol	>510	-	-

Fonte: Adaptado de Soloway (1976)

As estruturas dos rotenoides apresentam uma série de variações que podem ser originadas da mudança do anel-E, no grau de hidroxilação ou ainda devido à formação de anéis piranocromenos ou os furanocromenos, no grau de hidrogenação entre os anéis-B/C (rotenoides ou desidrorotenoïdes) ou ainda devido a presença um anel de sete membros (oxarotenoïdes) (FANG, 1997) (Figura 8).

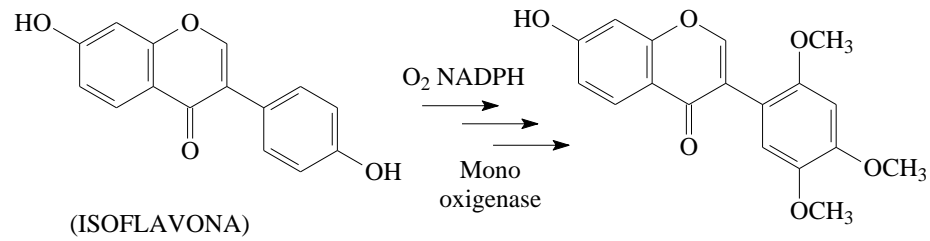
Figura 8- Variação estrutural de alguns rotenoides

2.7 BIOSÍNTESE DE ROTENOIDES

A biossíntese dos rotenoides pode ser dividida em etapas, sendo a primeira delas a formação da flavanona (Figura 9, página 32), seguida da formação da isoflavona (Figura 10, página 32), que por sua vez sofre uma série de reações até formar o rotenoide. O ponto de partida para biossíntese dos rotenoides é a transformação da l-fenilalanina em ácido cinâmico. O ácido cinâmico é subsequentemente hidroxilado por cinamato 4-hidroxilase gerando o derivado do ácido cumárico com coenzima-A. Esse derivado sofre condensação com 3 unidades de acetato do malonil coenzima-A que após ação catalítica da chalcona sintase, leva a formação das chalconas (Figura 9, página 32) (CROMBIE, 1998).

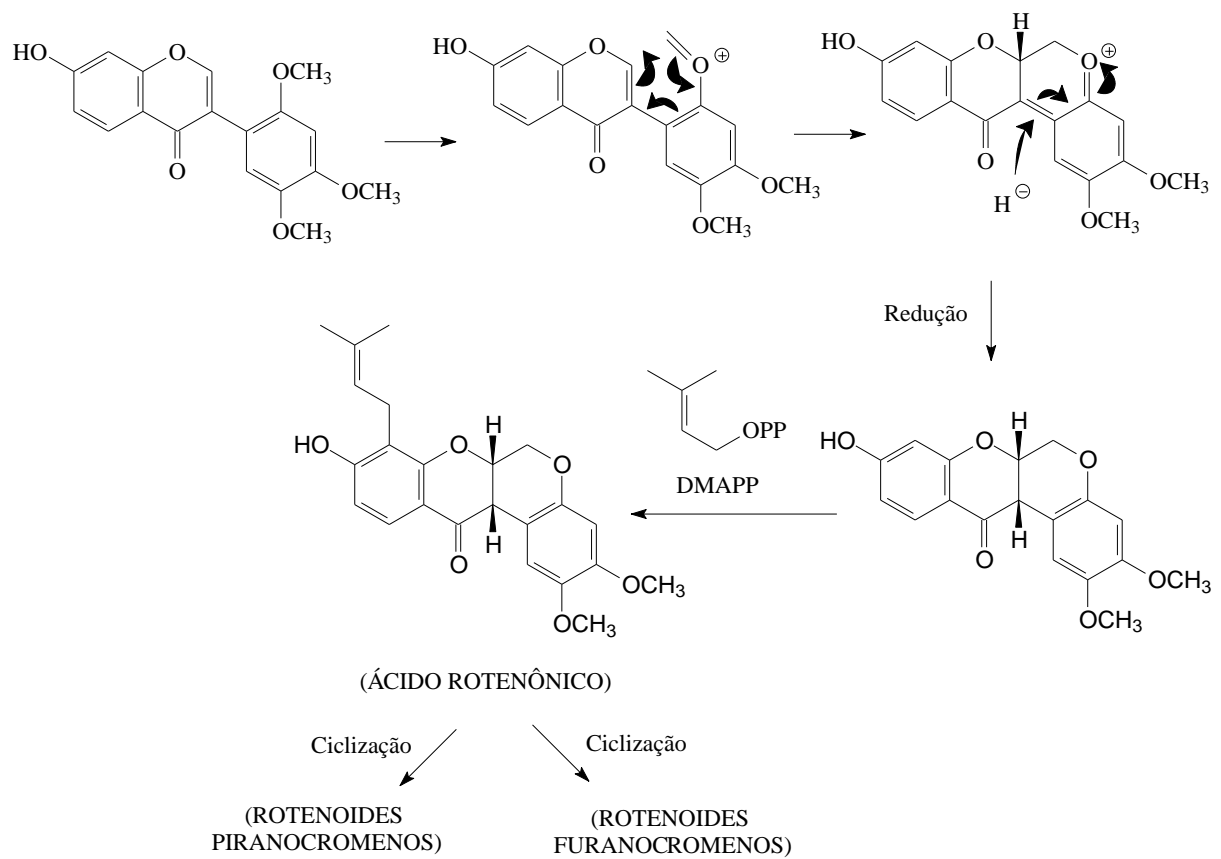
A chalcona, por meio da ação enzimática chalcona isomerase, é transformada em flavanona, que após sofrer oxidação e rearranjo do grupo aril, forma a isoflavona (Figura 10, página 32). Essa por sua vez pode sofrer hidroxilações, metilações e ciclização de umas das metilas com o anel, gerando o esqueleto carbônico comum de rotenoides (Figuras 11 e 12, página 33). Nessa fase o esqueleto do rotenoide pode sofrer uma série reações oxidativas gerando rotenoides de estruturas muito diferentes dos comuns. Os rotenoides mais comuns são formados finalmente após a etapa de prenilação e ciclização para formar o anel-E. Na etapa de prenilação, o esqueleto carbônico do rotenoide sofre uma série de introdução de grupos isoprênicos, por meio da prenil transferase, que leva a formação do ácido rotenônico (Figura 12, página 33). Por meio da ciclização, enzimática e estereoespecífica, das unidades isoprênicas o anel-E dos rotenoides é formado. Este anel que pode ser do tipo piranocromeno ou furanocromeno (anéis de 6 e 5 membros, respectivamente) (CROMBIE, 1998; DEWICK, 2009).

Figura 11- Biossintese da etapa de hidroxilações seguida de metilações seletivas



Fonte: Adaptado de Crombie (1998)

Figura 12- Biossintese da etapa de formação do esqueleto rotenoide seguido da prenilação e ciclização



Fonte: Adaptado de Crombie (1998)

2.8 TESTES BIOLÓGICOS

2.8.1 Teste de letalidade frente *Artemia salina*

Ovos de *Artemia salina* Leach podem ser empregados na análise e avaliação de resíduos de pesticidas, micotoxinas, poluentes, óleos tóxicos e intoxicação de ambiente marinho. Em meados de 1980, iniciou-se o emprego de *A. salina* no monitoramento de extratos de plantas ou substâncias puras, com objetivo de detecção da presença de compostos citotóxicos (MEYER, 1982). Os ovos desse camarão de água salgada, quando colocadas em solução salina, em 24-48 horas, eclodem dando origem a um grande número de larvas (nauplius) (Figura 13). Atualmente este organismo pode ser considerado como um indicador confiável quanto à toxicidade aguda de extratos orgânicos ou substâncias puras. Esta consideração encontra-se fundamentada em estudos de bioensaios comparativos, com diversas substâncias reconhecidamente citotóxicas, entre o teste de letalidade frente *A. salina* e testes *in vitro* com linhagens de células cancerígenas (ANDERSON, 1991). Ficou demonstrado que esse teste provou ser tão acurado quanto os testes realizados com células cancerígenas, proporcionando assim um teste preliminar para seleção de substâncias que podem apresentar atividade anticancerígena de forma simples, barata e confiável.

Figura 13- Nauplius de *A. salina*



Fonte: <http://www.portalpez.com/la-artemia-salina-vt2425.html> acessado em 22/12/2009

2.8.2 Teste de atividade antioxidante

Radicais livres são espécies químicas bastante reativas com elétrons desemparelhados. São muito importantes nos processos oxidativos celulares. Contudo, a presença excessiva de radicais apresenta uma série de efeitos prejudiciais, tais como peroxidação dos lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos, inativação de enzimas e até mesmo degradação do DNA, ocasionando várias doenças como, câncer, declínio do sistema imunológico, mal de Alzheimer e Parkinson, além do envelhecimento precoce (BARREIROS, 2003; BARREIROS, 2006).

A literatura está repleta de estudos que demonstram a atividade antioxidante de substâncias fenólicas de plantas, tais como flavonoides e lignanas (FAURÉ, 1990; KHANDUJA, 2003; ALVES, 2010). Essa pronunciada atividade deve-se principalmente às propriedades redutoras (perda de hidrogênio) e a fatores de estabilização estrutural dos intermediários formados (por conjugação), muito importante na neutralização do radical livre (ALVES, 2010).

Soluções com objetivo de minimizar os efeitos indesejáveis dos radicais livres em nível celular, levam em consideração o potencial das substâncias fenólicas de origem vegetal.

Existem na literatura vários testes para se determinar a eficiência, de extratos ou substâncias, no sequestro de radicais livres. Uma forma simples, rápida e reprodutiva, consiste na capacidade de sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Onde o sequestro do radical livre é determinado através da detecção da conversão do radical DPPH em 2,2-difenil-1-picril-hidrazina, de coloração amarelada, quando reage com uma substância de ação antioxidante. O ácido ascórbico, ácido gálico e a quercetina podem ser utilizadas como padrões positivos de origem natural para determinar a sensibilidade do método (ALVES, 2010).

2.8.3 Teste de atividade anticolinesterásica

A acetilcolina (ACh) é um dos neurotransmissores excitatórios mais importantes do sistemas nervoso central e periférico. A ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) envolve o controle do mecanismo colinérgico, catalisando a hidrólise do substrato ACh em ácido acético e colina. Por isto, a AChE tem sido alvo de estudo para o tratamento de doenças neurodegenerativas progressivas como o mal de Alzheimer e Parkinson, pela restauração da função colinérgica, através da elevação do nível de acetilcolina (VIEGAS, 2005; ROGERS, 2005; BRUNEAU, 2005).

Os mais modernos medicamentos utilizados para tratar os sintomas do mal de Alzheimer elevam os níveis de ACh pela inibição da AChE. O medicamento considerado mais efetivo no tratamento é a galantamina, um alcaloide anticolinesterásico, isolado de plantas da família Amaryllidaceae. Além de alcaloides, outras classes de metabólitos também possuem atividade anticolinesterásica (GIORDANI, 2008). Contudo, essa inibição não pode ser exagerada, pois pode causar uma elevada atividade dos receptores colinérgicos, causando possíveis efeitos tóxicos como: hiperatividade, asfixia e até morte (WALKER, 2001).

Existem na literatura várias formas de determinar a inibição da AChE, principalmente adaptações do método de Ellman (1961), onde a inibição da AChE é medida através da diminuição da coloração amarela decorrente da hidrólise da acetiltiocolina a acetato e tiocolina. A tiocolina reage com o íon 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoato] (DTNB), produzindo o íon 5-tio-2-nitro-benzoato de coloração amarela, cuja formação pode ser medida em 405 nm em um espectrofotômetro. Quando a AChE é inibida, não há formação da tiocolina, consequentemente não ocorre a formação do produto colorido.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo o estudo químico da espécie *C. fairchildiana*, conhecida popularmente como sombreiro, além de submeter seu extrato e substâncias isoladas a testes de atividade biológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar, através de métodos cromatográficos, os constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário presentes nos extratos das raízes e pétalas da *C. fairchildiana*;
- ✓ Determinar a estrutura das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos como RMN de ^1H , de ^{13}C e outros experimentos (DEPT, COSY), IV, UV/Vis, além de EM e comparação com dados da literatura;
- ✓ Determinar o perfil cromatográfico dos extratos de diferentes partes da *C. fairchildiana* e verificar presença de rotenoides por CLAE-DAD;
- ✓ Submeter os extratos e compostos isolados ao teste de letalidade frente à *A. salina*, antioxidantes e de inibição da enzima acetilcolinesterase;
- ✓ Determinar as concentrações citotóxica mínimas dos extratos e substâncias isoladas necessárias para inibir o crescimento da *A. salina*;
- ✓ Avaliar a influência dos compostos isolados em relação aos extratos, sobre sua atividade frente *A. salina*, de atividade antioxidante em relação ao DPPH e de inibição da enzima acetilcolinesterase.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

A pureza das amostras foram determinadas através da comparação do R_f , t_R e técnicas espectrométricas de RMN, IV, UV, EM e pelo PF, com dados da literatura, além de cromatogramas obtidos pelo CLAE-DAD e CG.

Como reveladores das CCDC, foram usadas a radiação com luz UV (254 e 365 nm) e reveladores químicos, como reagente de Lieberman-Burchard e $AlCl_3$.

A solução de Lieberman-Burchard foi preparada a partir da mistura, cuidadosa, de 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 mL de anidrido acético a 5 mL de etanol resfriado em banho de gelo (STAHL, 1969). Já o $AlCl_3$ foi usado como solução metanólica saturada.

Nas CCDC, foram utilizadas placas pré-preparadas com gel de sílica 60 F₂₅₄ da Fuckla e da Sigma[®].

As purificações foram realizadas por CC, tendo como fase estacionária sílica gel 60 da Acros, com diâmetro entre 0,063-0,200 mm e sílica RP - 18 da Merck[®] em diferentes eluentes como fase móvel.

Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho GEMINI 2000 da Varian[®] operando a 300MHz para ¹H e 75MHz para ¹³C, além do equipamento DRX 500 operando a 500 MHz para ¹H e 125MHz para ¹³C. Utilizando $CDCl_3$, metanol- d_6 e $DMSO-d_6$ como solvente e o sinal do ¹H e do ¹³C dos solventes (Isotech[®]), como referência interna.

O aparelho de PF foi do modelo MQAPF-302, da Microquímica Equipamentos[®], enquanto os espectros no IV, foram registrados em aparelho IRAffinity-1 da Shimadzu[®]. Placa de aquecimento e agitador magnético modelo (78HW-1) da BIOMIXER[®].

O moinho usado para triturar o material vegetal foi do tipo lâminas de faca da marca TECNAL[®].

As pesagens foram feitas em balança analítica (AND[®], modelo HR 200).

O evaporador rotatório utilizado para evaporação dos solventes à pressão reduzida, foi da marca IKA RV 10[®] digital (220V), com temperatura em geral entre 35°C e 50°C.

Nas análises por CLAE-DAD, foi utilizado um equipamento da DIONEX[®] modlo UltiMate 300 acoplado com detector por arranjo de diodos, injetor automático e controle de temperatura da coluna.

Os cromatogramas e espectros de massas obtidos pelo CG-EM, foram registrados no aparelho de massa de baixa resolução, modelo QP2010SE (GC2010 Plus) da marca

Shimadzu[®] usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 µm) e hélio como gás de arraste.

A água ultrapura utilizada na composição da fase móvel no CLAE foi obtida em um sistema NANOpure DiamondTM (Barnstead[®], Dubuque, Iowa, EUA).

Os extratos foram preparados no Extrator Acelerado com Solventes, modelo ASE 100 (Dionex[®], Sunnyvale, EUA).

As leituras das absorvâncias nas análises de atividade antioxidante foi em espectrofotômetro Varian[®], modelo Cary 50 Conc.

As leituras das absorvâncias do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase foram feitas em um leitor de ELISA (Biotek[®]), modelo EL800.

4.2 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS

- ✓ QUEMIS[®]: ácido acético glacial, ácido fórmico, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, etanol, metanol, hexano, todos P.A..
- ✓ TEDIA[®]: metanol (utilizado na análise cromatográfica por CLAE, grau CLAE, filtrado à vácuo em membrana de nylon de 0,45 µm de porosidade).
- ✓ SIGMA-ALDRICH[®]: *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), trimetilclorosilano (TMCS), radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (≥97%), tampão fosfato 0,1 M, albumina sérica bovina (≥96%), 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico] (DTNB), enzima acetilcolinesterase tipo VI-S obtida de *Electroparaus electricous* e eserina (≥99%).

4.3 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

As raízes, caules, folhas, pétalas e sementes foram coletadas de diferentes espécimes de *C. fairchildiana* em diferentes pontos do campus universitário da UFBA no bairro Ondina, localizado na cidade de Salvador – Bahia, em 16/04/2010. Um exemplo de exsicata pode ser encontrada no Herbário Alexandre Leal Costa, do Instituto de Biologia da UFBA, departamento de botânica, sob o número 70124, identificada pela Botânica Profa. Maria Lenise Guedes, coletada por Carvalho, G. M., em 24/11/2005.

O material vegetal da *C. fairchildiana* foi analisado por CLAE-DAD afim de identificar e quantificar, em seu perfil cromatográfico, 2 rotenoides (clitoriacetal e 6-desoxiclitoriacetal), enquanto que apenas as raízes e as pétalas foram usadas para estudo fitoquímico.

Vale ressaltar que este é o primeiro relato do estudo fitoquímico das pétalas dessa espécie.

4.4 ISOLAMENTO DE METABÓLITOS DA *Clitoria fairchildiana*

As raízes e pétalas foram secas em estufa a 40°C com ventilação e, em seguida, moídas, obtendo-se 250g de raiz e 89g de pétalas. Ambas as partes foram submetidas à maceração por 48 horas por quatro vezes consecutivas com MeOH à temperatura ambiente, e depois particionados entre CHCl₃:MeOH\H₂O 7\3 (raízes) e hexano:MeOH\H₂O 7\3 (pétalas), onde o procedimento realizado encontra-se ilustrado nos fluxogramas (Esquemas 1 e 2, páginas 42 e 43). As massas obtidas nestes procedimentos encontram-se descritas na tabela 3.

Tabela 3- Massas dos extratos da *C. fairchildiana*

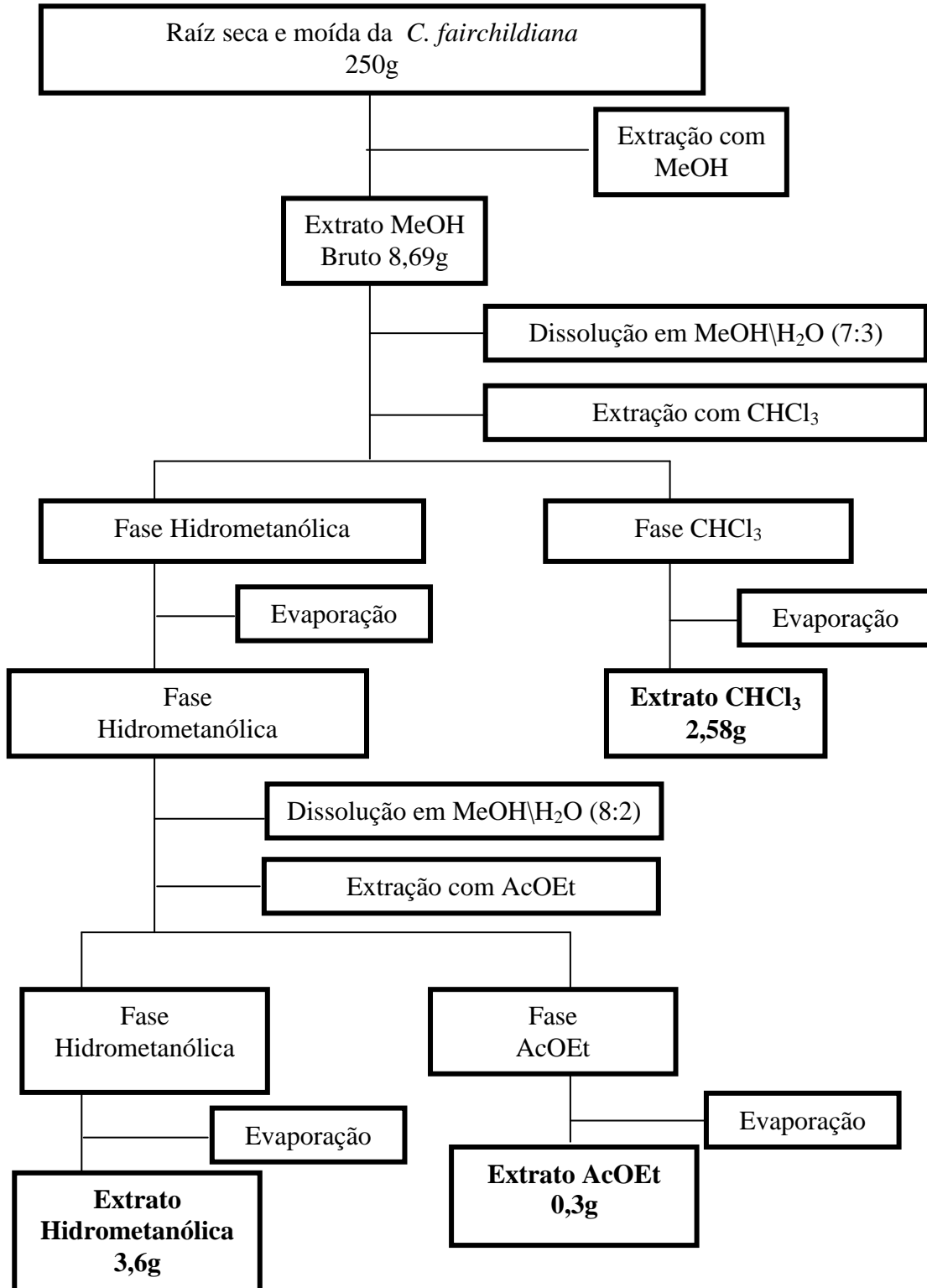
Extrato das raízes	Massa (g)	Extrato das pétalas	Massa (g)
MeOH Bruto	8,7	MeOH Bruto	20,7
CHCl ₃	2,6	Hexânico	1,5
AcOEt	0,3	CHCl ₃	1,1
-	-	ButOH	2,6
Hidrometanólico	3,6	Hidrometanólico	13,8

Os rotenoides clitoriacetal, 6-desoxiclitoriacetal, stemonal e stemonona, e os fitoesteróide β -sitosterol e estigmasterol foram isolados do extrato CHCl₃, enquanto o flavonoide glicosilado vitexina foi isolada do extrato AcOEt das raízes de *C. fairchildiana*.

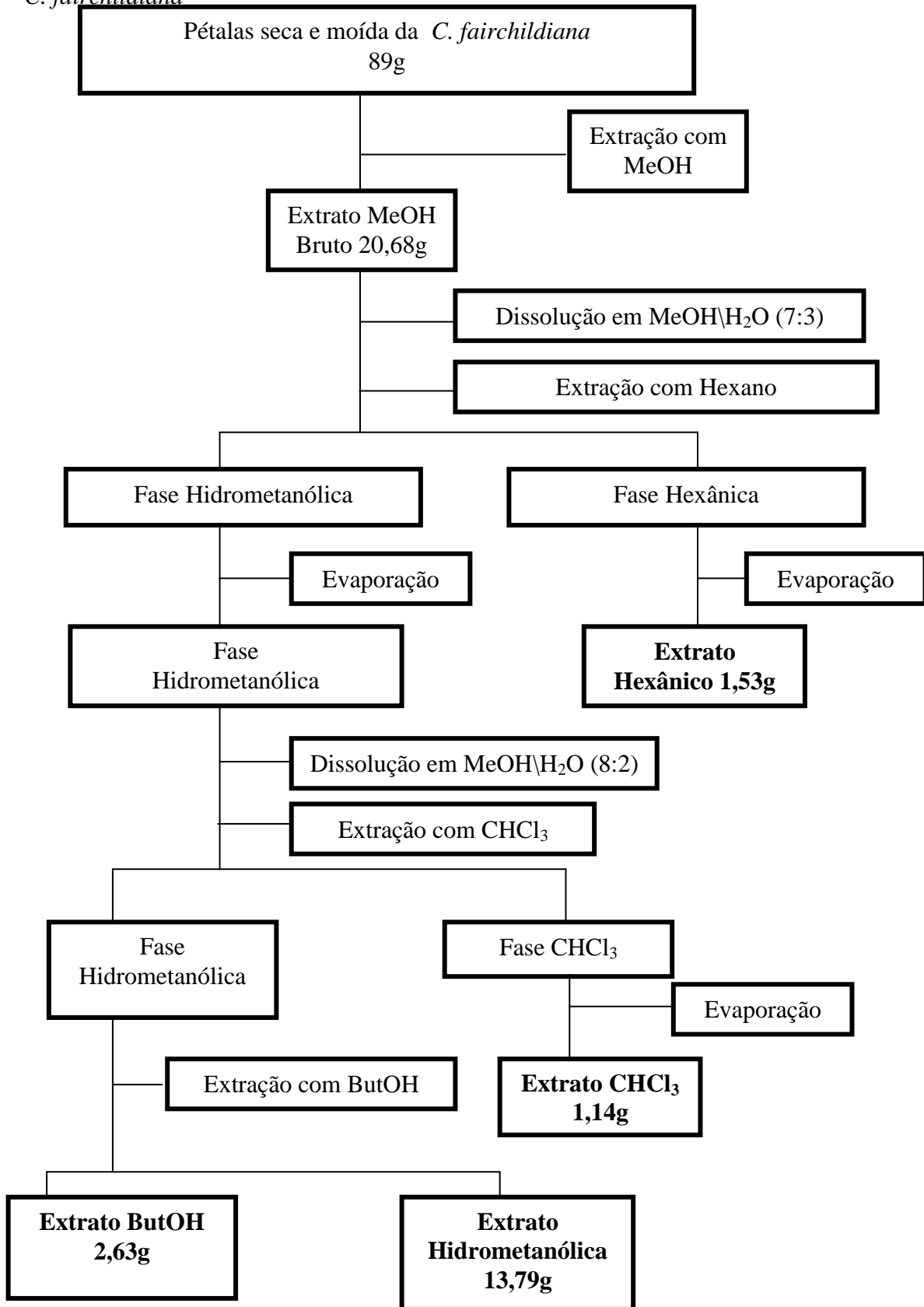
Das pétalas foram isolados os flavonoides canferol e quercetina do extrato CHCl₃. Do extrato Hidrometanólico foi isolado o astragalina, e no extrato Hexânico foram identificados ácidos graxos e fitoesteróides.

Os extratos após serem secos em capela e por secador, foram submetidos a fracionamento em coluna cromatográfica (CC) utilizando-se sílica gel 60 como adsorvente e como fase móvel, misturas de CHCl₃:MeOH em ordem crescente de polaridade. As frações obtidas pelas CC foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando-se luz UV como revelador geral, reagente de Liebermann-Buchard como revelador de fitoesteróides e solução de AlCl₃ como revelador de flavonoides. As frações que se mostraram puras neste procedimento, foram submetidas a análises de RMN, IV e UV. Desse modo, foram obtidos aproximadamente 7,6% de rendimento de clitoriacetal (**2**), 1,4% para o 6-desoxiclitoriacetal (**3**), 0,8% para o stemonal (**4**), 0,07% de stemonona (**5**) e 0,12% para a mistura de β -sitosterol e estigmasterol (**1** e **1a**), 0,1% de canferol (**6**), 1,4% de quercetina (**7**), 0,13% de vitexina (**8**) e 0,05% de astragalina (**9**) em relação aos extratos MeOH brutos.

Esquema 1- Fluxograma geral do desenvolvimento da obtenção dos extratos da raiz da *C. fairchildiana*



Esquema 2- Fluxograma geral do desenvolvimento da obtenção dos extratos das pétalas da *C. fairchildiana*



4.4.1 Purificação do extrato CHCl₃ da raiz

O extrato clorofórmico da raiz de *C. fairchildiana* foi fracionada através de cromatografia em coluna sob sílica gel 60, utilizando como fase móvel o sistema CHCl₃:MeOH em grau crescente de polaridade, recolhidas em frações de 500 mL, obtendo-se 3 grupos de frações (RCC1, RCC2 e RCC3), como pode ser visto na tabela 4.

Tabela 4 - Frações obtidas por CC de RCC

Código	Massa (g)	Sistema CHCl₃:MeOH
RCC1	1,6420	95:5
RCC2	0,3400	1:1
RCC3	0,0731	MeOH

A fração RCC1 (1,6420g) foi novamente submetida a fracionamento em coluna de sílica gel 60 utilizando CHCl₃:MeOH em grau crescente de polaridade. Formando 6 subfrações, que após análise da CCDC reveladas em UV (254 e 365nm) e solução de AlCl₃, verificou-se presença de flavonoide nas frações RCC1D, RCC1F e de natureza graxa nas outras (Tabela 5).

Tabela 5- Frações obtidas por CC de RCC1

Código	Massa(g)	Sistema CHCl₃:MeOH	Característica da fração
RCC1A	0,1623	CHCl ₃	material graxo
RCC1B	0,0420	8:2	não trabalhada
RCC1C	0,2756	8:2	não trabalhada
RCC1D	1,2632	8:2	flavonoide
RCC1E	0,0143	8:2	não trabalhada
RCC1F	0,1286	MeOH	clitoriactal impura (2)

A CC da fração RCC1D (1,2632g) usando sílica gel 60 e CHCl₃:MeOH em grau crescente de polaridade, forneceu mais 5 subfrações que após análise CCDC revelada com AlCl₃, indicou presença de flavonoide na fração RCC1D5 (Tabela 6).

Tabela 6- Frações obtidas por CC de RCC1D

Código	Massa(g)	Sistema CHCl₃:MeOH	Característica da fração
RCC1D2	0,0018	CHCl ₃	material graxo
RCC1D4	0,0024	8:2	material graxo
RCC1D5	0,7896	MeOH	flavonoide

A fração RCC1D5 (0,7896g) foi novamente subfracionada por CC, fornecendo mais 19 subfrações. As subfrações semelhantes, RCC1D5G até RCC1D5J, foram reunidas, e após análises dos dados de RMN de ¹H e ¹³C, revelou tratar-se do rotenoide 6-desoxiclitoriactal (**3**) (Tabela 7).

Tabela 7- Frações obtidas por CC de RCC1D5

Código	Massa(g)	Sistema CHCl₃:MeOH	Característica da fração
RCC1D5A	0,0025	CHCl ₃	material graxo
RCC1D5F	0,0257	9:1	fitoestero. + flavon.
RCC1D5J	0,1042	8:2	(3)
RCC1D5L	0,6460	8:2	flavonoide
RCC1D5T	0,0122	7:3 e MeOH	não trabalhada

A subfração RCC1D5F foi submetida à análise em CCDC, apresentando manchas de coloração amarela quando revelada com AlCl₃ e roxa quando revelada com reagente de Lieberman-Burchard, indicando presença de flavonoide em mistura com fitoesteroide. Após purificação por CCDP e análise dos dados de RMN de ¹H, possibilitou identificar as frações como sendo o rotenoide stemonona (**5**) e a mistura de β-sitosterol e estigmasterol (**1** e **1a**) (Tabela 8, página 46).

Tabela 8- Frações obtidas por CCDP de RCC1D5F

Código	Massa(g)	Sistema CHCl₃:MeOH	Característica da fração
RCC1D5F(A)	0,0110	9:1	fitoesteroides (1 e 1a)
RCC1D5F(B)	0,0011	9:1	material graxo
RCC1D5F(C)	0,0062	9:1	stemonona (5)

A subfração RCC1D5L (Tabela 7), também revelou a presença de manchas referentes a flavonoide, sendo submetida a purificação por CC em sílica gel 60, fornecendo mais 9 subfrações. As subfrações RCC1D5L6 e RCC1D5L7 foram reunidas e através dos dados de RMN de ¹H e ¹³C, foi possível identificar como uma mistura de 2 rotenoides, 6-desoxiclitoriactal (**3**) e clitoriactal (**2**). Enquanto a subfração RCC1D5L9 foi identificada como sendo o stemonal (**4**) (Tabela 9).

Tabela 9- Frações obtidas por CC de RCC1D5L

Código	Massa(g)	Sistema CHCl₃:MeOH	Característica da fração
RCC1D5L2	0,0031	CHCl ₃	não trabalhada
RCC1D5L3	0,0047	9:1	não trabalhada
RCC1D5L4	0,002	8:2	não trabalhada
RCC1D5L5	0,0114	8:2	não trabalhada
RCC1D5L7	0,5672	8:2	(2) + (3)
RCC1D5L8	0,0024	1:1	não trabalhada
RCC1D5L9	0,0552	MeOH	stemonal impura (4)

A fração RCC1D5L7 foi submetida a purificação por CC com o objetivo de separar a mistura dos rotenoides 6-desoxiclitoriactal e clitoriactal. Essa purificação forneceu 18 subfrações, sendo a fração RCC1D5L7B referente ao 6-desoxiclitoriactal (**3**) e as fração RCC1D5L7S, foi referente ao clitoriactal (**2**) (Tabela 10, página 47).

Para melhor qualidade dos dados de RMN de ¹H, devido a presença de material graxo, a fração RCC1D5L7S e a fração RCC1D5L9 foram purificadas por CCDP, sendo a fração RCC1D5L9(B), referente ao rotenoide stemonal (**4**) (Tabela 11 e 12, página 47).

Tabela10- Frações obtidas por CC de RCC1D5L7

Código	Massa(g)	Sistema	Característica da fração
		CHCl₃:MeOH	
RCC1D5L7A	0,0927	CHCl ₃	material graxo
RCC1D5L7B	0,0166	9:1	(3)
RCC1D5L7E	0,0294	9:1	não trabalhada
RCC1D5L7S	0,4833	8:2 e 7:3 e 1:1	clitoriactal (2)

Tabela 11- Frações obtidas por CCDP de RCC1D5L7S

Código	Massa(g)	Sistema	Característica da fração
		CHCl₃:MeOH	
RCC1D5L7S(A)	0,0043	9:1	material graxo
RCC1D5L7S(B)	0,0352	9:1	clitoriactal (2)
RCC1D5L7S(C)	0,0071	9:1	material graxo

Tabela12- Frações obtidas por CCDP de RCC1D5L9

Código	Massa(g)	Sistema	Característica da fração
		CHCl₃:MeOH	
RCC1D5L9(A)	0,0052	9:1	material graxo
RCC1D5L9(B)	0,0733	9:1	stemonal (4)
RCC1D5L9(C)	0,0054	9:1	material graxo

As frações restantes da primeira coluna, após refração por CC, indicaram presença dos mesmos rotenoides já isolados, como pode ser visto na tabela 13.

Tabela 13- Frações obtidas por CC de RCC1F

Código	Massa(g)	Sistema	Característica da fração
		CHCl₃:MeOH	
RCC1F2	0,0018	CHCl ₃ e 9:1	material graxo
RCC1F4	0,0026	9:1	material graxo
RCC1F6	0,1752	9:1	clitoriactal (2)
RCC1F8	0,0114	8:2	não trabalhada
RCC1F10	0,0084	8:2 e MeOH	não trabalhada

4.4.2 Purificação do extrato AcOEt da raiz

O extrato AcOEt da raiz foi fracionado utilizando-se cromatografia em coluna sob sílica gel 60, e como fase móvel o sistema CH₂Cl₂:MeOH em grau crescente de polaridade. Obtendo-se 29 frações de 500 mL, que foram analisadas por CCDC e agrupadas de acordo com a semelhança de perfil. A CCDC também foi revelada com solução saturada de AlCl₃, indicando que as frações RCac22 até RCac26 são semelhantes e ricas em flavonoide. Como se trata de um extrato muito polar, suspeitou-se tratar de flavonoide glicosilado (Tabela 14).

Tabela 14- Frações obtidas por CC de RCac

Código	Massa(g)	Sistema CH₂Cl₂:MeOH	Característica da fração
RCac12	0,001	CH ₂ Cl ₂	material graxo
RCac21	0,030	97:3	não trabalhada
RCac26	0,080	97:3	vitexina impura(8)
RCac29	0,164	97:3	não trabalhada

A CC da fração RCac26 (0,080g) com sílica gel 60 e CH₂Cl₂:MeOH em grau crescente de polaridade, forneceu 12 subfrações. Após análise por RMN de ¹H e ¹³C da subfração RCac26.4, descobriu-se tratar-se do flavonoide glicosilado vitexina (**8**) (Tabela 15).

Tabela 15- Frações obtidas por CC de RCac 22-26

Código	Massa(g)	Sistema CH₂Cl₂:MeOH	Característica da fração
RCac26.1	0,0019	CH ₂ Cl ₂	material graxo
RCac26.2	0,0030	9:1	não trabalhada
RCac26.4	0,0119	7:3	vitexina (8)
RCac26.7	0,0079	7:3	não trabalhada
RCac26.12	0,0092	1:1	não trabalhada

4.4.3 Purificação do extrato CHCl_3 das pétalas

O extrato CHCl_3 das pétalas foi fracionada através de cromatografia em coluna sob sílica gel 60, utilizando como fase móvel o sistema CHCl_3 :MeOH em grau crescente de polaridade. Obtendo-se 15 frações de 500 mL, que foram analisadas por CCDC e agrupadas de acordo com a semelhança de perfil. A CCDC foi revelada com UV (254 e 365nm) e solução de AlCl_3 , além do aspecto muito amarelado da subfração, indicaram que as frações PeCC3 e PeCC4 são ricas em flavonoides (Tabela 16).

Tabela 16- Frações obtidas por CC de PeCC

Código	Massa(g)	Sistema CHCl_3:MeOH	Característica da fração
PeCC1	0,0115	CHCl_3	não trabalhada
PeCC2	0,2168	8:2	não trabalhada
PeCC3	0,1746	8:2	canferol impura (6)
PeCC4	0,0829	8:2	(6) + (7)
PeCC6	0,0365	8:2	não trabalhada
PeCC7	0,0188	8:2	não trabalhada
PeCC8	0,0618	8:2	não trabalhada
PeCC11	0,0480	1:1	não trabalhada
PeCC15	0,1886	MeOH	não trabalhada

Após CC da fração PeCC3 e análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , essa fração foi identificada como sendo o flavonoide canferol (**6**) (Tabela 17). Contudo, para melhor visualização dos dados de RMN, por meio da retirada de grande quantidade material graxo, reveladas pelos sinais de hidrogênios sp^3 , optou-se pela realização de mais uma purificação por CC (Tabela 18).

Tabela 17- Frações obtidas por CC de PeCC3

Código	Massa(g)	Sistema CHCl₃:MeOH	Característica da fração
PeCC3A	0,001	CHCl ₃	material graxo
PeCC3B	0,0165	9:1	material graxo
PeCC3C	0,2122	9:1	flavonoide
PeCC3E	0,1483	8:2	não trabalhada
PeCC3G	0,0028	8:2	canferol impura (6)
PeCC3H	0,0044	1:1	não trabalhada
PeCC3L	0,0084	MeOH	não trabalhada

Tabela18- Frações obtidas por CC de PeCC3C

Código	Massa(g)	Sistema CHCl₃:MeOH	Característica da fração
PeCC3C1	0,0022	CHCl ₃	material graxo
PeCC3C2	0,0069	95:5	material graxo
PeCC3C3	0,0049	95:5	não trabalhada
PeCC3C 6	0,0102	95:5	canferol (6)
PeCC3C16	0,2748	95:5	não trabalhada
PeCC3C18	0,0811	9:1	não trabalhada
PeCC3C19	0,0273	MeOH	não trabalhada

A CC da fração PeCC4 (0,0829g) usando sílica gel 60 e CHCl₃:MeOH em grau crescente de polaridade, forneceu mais 28 subfrações. Após análise CCDC, reveladas por AlCl₃ e UV (254 e 365nm), foi possível verificar a presença de flavonoides, que após comparação dos dados de RMN de ¹H e ¹³C com dados da literatura, foi identificada como sendo os flavonoides canferol (**6**) e quercetina (**7**) (Tabela 19).

Tabela 19- Frações obtidas por CC de PeCC4

Código	Massa(g)	Sistema CHCl₃:MeOH	Característica da fração
PeCC4E	0,0115	CHCl ₃	canferol (6)
PeCC4G	0,2168	95:5	não trabalhada
PeCC4I	0,1746	95:5	quercetina impura (7)
PeCC4N	0,0829	9:1	quercetina (7)
PeCC4S	0,0365	9:1	quercetina impura (7)
PeCC4U	0,0188	8:2	não trabalhada
PeCC4V	0,0618	8:2	não trabalhada
PeCC4Z	0,0480	MeOH	não trabalhada

4.4.4 Purificação do extrato Hexânico das pétalas

O extrato hexânico foi purificado por CC usando sílica gel 60 e Hex.:AcOEt como fase móvel, em grau crescente de polaridade, gerando 10 frações (Tabela 20). Por tratar-se de um extrato rico em compostos pouco polares como ácidos graxos, ésteres, fitoesteroides e triterpenos, optou-se pela análise das frações em CG-EM.

As frações foram analisadas por CCDC, reveladas com solução de reagente de Lieberman-Burchard, sugeriram presença de fitoesteroides ou triterpenos. O CG-EM das primeiras frações indicaram presença de ácidos graxos e fitoesteroides em menor quantidade.

Tabela 20- Frações obtidas por CC de PeCH

Código	Massa(g)	Sistema Hex.:AcOEt	Característica da fração
PeCH3	0,0165	Hex.	não trabalhada
PeCH4	0,6017	95:5	CG (Tabela 27)
PeCH5	0,0647	9:1	CG (Tabela 28)
PeCH6	0,7257	8:2	CG (Tabela 29)
PeCH7	0,1273	8:2	não trabalhada
PeCH8	0,0479	8:2	não trabalhada
PeCH9	0,0420	8:2	não trabalhada
PeCH10	0,2845	1:1	não trabalhada

4.4.5 Purificação do extrato MeOH das pétalas

O extrato Metanólico é rico em substâncias polares, optando-se pelo uso da sílica do tipo RP-18. O extrato MeOH das pétalas foi fracionado através de CC com sílica RP-18, utilizando como fase móvel o sistema H₂O:MeOH em grau decrescente de polaridade. Após análise das CCDC impreguinada com sílica RP-18, verificou-se que as frações PeCMe6 até PeCMe10, são semelhantes e são ricas em flavonoide (Tabela 21).

Tabela 21- Frações obtidas por CC de PeCMe

Código	Massa(g)	Sistema H₂O:MeOH	Característica da fração
PeCMe2	0,0084	9:1	não trabalhada
PeCMe3	0,0276	8:2	não trabalhada
PeCMe5	0,2186	8:2	não trabalhada
PeCMe10	0,9524	7:3	astragalina impura (9)
PeCMe12	0,7179	7:3	não trabalhada
PeCMe14	0,8742	1:1	não trabalhada
PeCMe18		MeOH	não trabalhada

As frações PeCMe6 até PeCMe10 foram reunidas e submetida a CCDP, onde foi obtido o flavonoide glicosilado astragalina (**9**) (Tabela 22).

Tabela 22- Frações obtidas por CCDP de PeCMe6-10

Código	Massa(g)	Sistema H₂O:MeOH	Característica da fração
PeCMe 6-10(A)	0,0081	9:1	material graxo
PeCMe 6-10(B)	0,0111	9:1	astragalina (9)

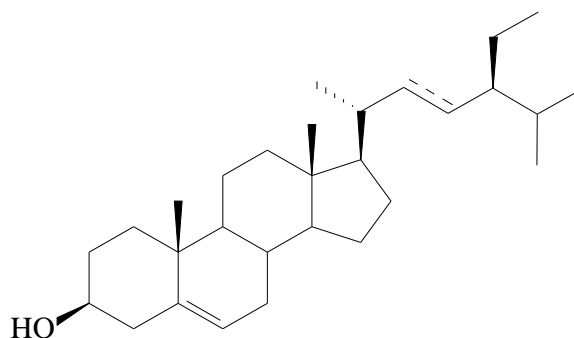
É importante frisar que foram realizadas muitas outras CC, tanto dos extratos das raízes quanto das pétalas, contudo, após análises em CCDC e RMN de ¹H, revelaram frações ricas em material graxo ou ainda indicaram substâncias já isoladas, por isso optou-se por não registrar os fracionamentos.

4.4.6 Identificação das substâncias do extrato Hexânico das pétalas por CG-EM

As frações obtidas do extrato hexânico das pétalas foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

Antes de serem analisadas por CG-EM, as amostras foram submetidas a derivatização por sililação. Por meio da mistura de 3mg da amostra em 60 μ L de piridina, com 100 μ L de *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorosilano (TMCS), em *vial*. Essa mistura foi aquecida a 70°C por 30 minutos e 1 μ L da mistura foi injetado no CG-EM (CRUZ, 2013).

A temperatura do injetor foi de 290°C com temperatura inicial de 80°C por 5 min., aumentando de 80°C a 285°C na razão de 4°C.min⁻¹, permanecendo em 285°C por 40 minutos. A temperatura do detector foi de 290 °C e a temperatura na interface do sistema CG-EM foi de 290°C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 30 a 600Da. A escolha do método ocorreu através de metodologias descritas na literatura, ideais para identificação de ácidos graxos e fitoesteroides (CRUZ, 2013). Sendo que a identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras, com aqueles existentes no banco de dados do aparelho (WILEY229).

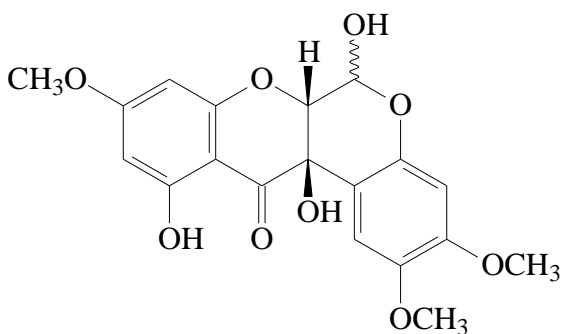
β-sitosterol e estigmasterol (1 e 1a)

IV (KBr, cm^{-1}): 3417 (OH), 2866 (C-H), 1000 (=C-H)

RMN ^1H (300 MHz), δ : 5,05 e 5,17 (2H, *m*, H-22 e 23); 5,35 (1H, *J*= 5, *d*, H-6); 3,5(1H, *m*, H-3)

R_f: 0,16 (hexano: acetato de etila 8:2 v/v)

Clitoriacetal (2)



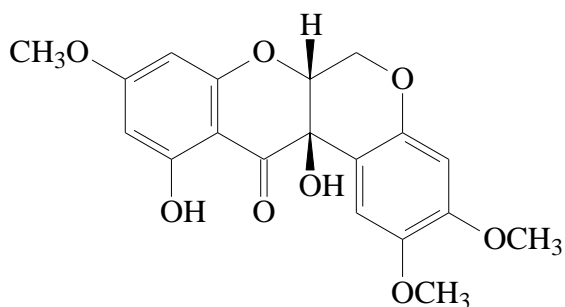
UV/Vis (MeOH, nm): 200 e 295

IV (KBr, cm^{-1}): 2933 (C-H), 1641 (C=O)

RMN ^1H (300 MHz), δ : 6,7 (1H, *s*, H-1); 6,5 (1H, *s*, H-4); 5,74 (1H, *J*= 2,1, *d*, H-6); 4,57 (1H, *J*= 2,4, *d*, H-6a); 5,98 (1H, *J*= 2,4, *d*, H-8); 6,07 (1H, *J*= 2,1, *d*, H-10); 6,07 (1H, *s*, OH-11)

RMN ^{13}C (75 MHz): Tabela-24, página 83

R_f: 0,38 (CH_2Cl_2 : MeOH 95:5 v/v)

6-desoxiclitoriacetal (**3**)

UV/Vis (MeOH, nm): 200 e 295

IV (KBr, cm^{-1}): 2848 (C-H), 1709 (C=O)

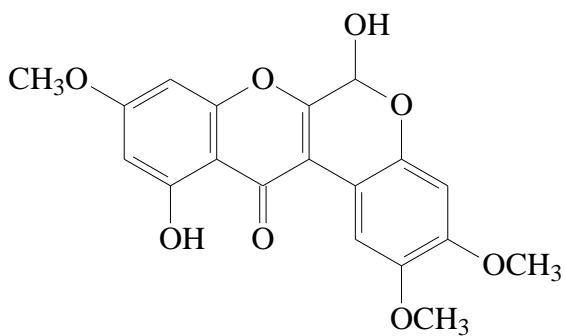
RMN ^1H (300 MHz), δ : 6,69 (1H, *s*, H-1); 6,49 (1H, *s*, H-4); 4,56 (1H, *J*= 2,1, *d*, H-6); 4,48 (1H, *J*= 2,4, *d*, H-6a); 5,97 (1H, *J*= 2,5, *d*, H-8); 6,05 (1H, *J*= 2,5, *d*, H-10); 11,51 (1H, *s*, OH-11)

RMN ^{13}C (75 MHz): Tabela-24, página 83

R_f: 0,64 (CH_2Cl_2 : MeOH 95:5 v/v)

PF: 129-130°C **PF:** 130-131°C teórico (LIN, L. J.; 1992)

***m/z*:** 374

Stemonal (**4**)

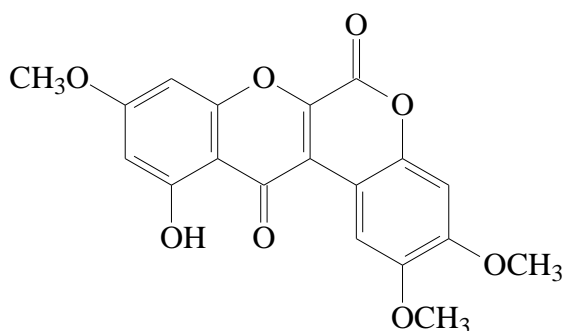
UV/Vis (MeOH, nm): 200, 273 e 321

RMN ^1H (300 MHz), δ : 8,43 (1H, *s*, H-1); 6,72 (1H, *s*, H-4); 6,48 (1H, *J*= 2,1, *d*, H-6); 6,44 (1H, *J*= 2,4, *d*, H-8); 6,4 (1H, *J*= 2,4, *d*, H-10); 12,83 (1H, *s*, OH-11); 6,07 (1H, *s*, OH-6)

R_f: 0,54 (CH_2Cl_2 : MeOH 95:5 v/v)

PF: 110-112 °C **PF:** 215-216°C teórico (SHIENGTHONG, D.; 1974)

Stemonona (5)

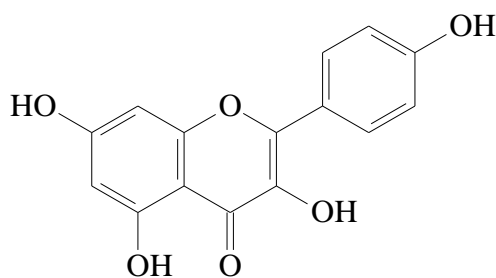


UV/Vis (MeOH, nm): 254, 281 e 334

RMN ^1H (300 M Hz), δ : 8,9 (1H, *s*, H-1); 6,9 (1H, *s*, H-4); 6,4 (1H, *J*= 2,1, *d*, H-8); 6,6 (1H, *J*= 2,1, *d*, H-10); 12,4 (1H, *s*, OH-11)

R_f: 0,86 (CH₂Cl₂: MeOH 95:5 v/v)

Canferol (6)



UV/Vis (MeOH, nm): 266,9 e 364,9

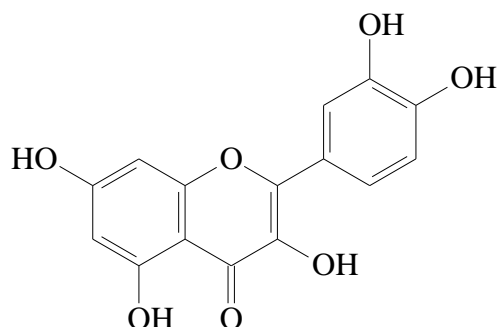
IV (KBr, cm⁻¹): 3416 (OH), 3237-3162 (C-H), 1661 (C=O), 1507e 1383 (C=C)

RMN ^1H (300 M Hz), δ : 6,19 (1H, *J*=2,1, *d*, H-8); 6,41 (1H, *J*=2,1 *d*, H-6); 6,93 (2H, *J*= 6,8 e 6,9, *d*, H-2',6'); 8,09 (2H, *J*= 8 e 8,3, *d*, H-3',5'); 3,64 (1H, *s*, OH-3)

RMN ^{13}C (75 M Hz): Tabela-26, página 110

R_f: 0,65 (CH₂Cl₂: MeOH 8:2 v/v)

Quercetina (7)



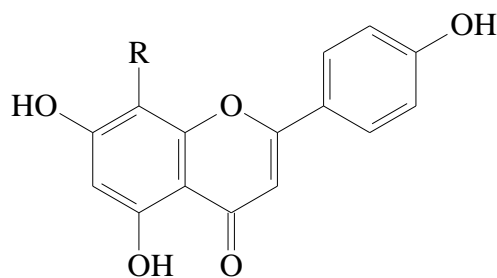
UV/Vis (MeOH, nm): 255,9 e 271

IV (KBr, cm^{-1}): 3416 (OH), 2965-2926 (C-H), 1664 (C=O), 1612-1562 (C=C), 750(=C-H)

RMN ^1H (500 M Hz) , δ : 6,18 (1H, $J=2$, d , H-8); 6,4 (1H, $J=2$, d , H-6); 6,88 (2H, $J= 8,5$, d , H-5'); 7,67 (2H, $J= 2,2$, d , H-2'); 7,53 (1H, $J=2,2$ e $8,5$, d , H-6'); 12,48 (1H, s , OH-5)

Rf: 0,53 (CH_2Cl_2 : MeOH 8:2 v/v)

Vitexina (8)



R= β -D-glicose

UV/Vis (MeOH, nm): 215, 270 e 338

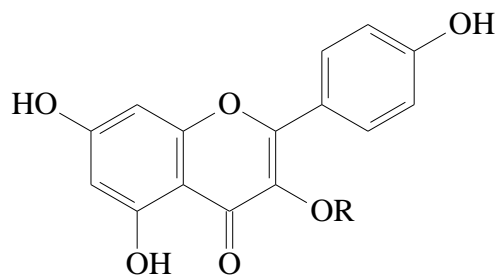
IV (KBr, cm^{-1}): 3421 (OH), 2920-2854 (C-H), 1654 (C=O), 1616-1570 (C=C)

RMN ^1H (500 M Hz) , δ : 6,72 (1H, s , H-3); 6,23 (1H, s , H-6); 6,9 (2H, $J= 11$, d , H-2',6'); 7,99 (2H, $J= 87$, d , H-3',5'); 13,14 (1H, s , OH-5); 4,7(1H, $J=10$, d , H-1"), 3-3,9(5H, m , H-2",3",4",5",6")

RMN ^{13}C (125 M Hz): Tabela-26, página 110

Rf: 0,25 (CH_2Cl_2 : MeOH 8:2 v/v)

Astragalina (9)



R= β-D-glucose

UV/Vis (MeOH, nm): 220, 267 e 348

RMN ¹H (500 M Hz) , δ: 6,35 (1H, *J*= 2, *d*, H-6); 6,89 (2H, *J*= 8,4 e 6,4, *dd*, H-2',6'); 8,05 (2H, *J*=9 e 8,3, *dd*, H-3',5'); 5,2 (1H, *J*=7,4, *d*, H-1"), 3,4-3,9 (5H, *m*, H-2",3",4",5",6")

RMN ¹³C (125 M Hz): Tabela-26, página 10

R_f: 0,43 (CH₂Cl₂: MeOH 8:2 v/v)

4.5 DETERMINAÇÃO DE ROTENOIDES POR CLAE

4.5.1 Identificação de rotenoides em diferentes partes da *C. fairchildiana*

Os rotenoides clitoriactal (2) e 6-desoxiclitoriactal (3) isolados da raiz da *C. fairchildiana* (com 80% e 94,8% de pureza, respectivamente), foram identificados e quantificados em diferentes partes (raízes, caules, folhas, pétalas e sementes) empregando-se CLAE-DAD (Tabela 33, página 121). Os rotenoides utilizados como padrão foram previamente purificados pela metodologia já descrita no esquema 1, página 42 e pela seção 4.4.1, páginas 44 até 47.

A melhor resolução cromatográfica foi obtida pelo sistema em gradiente 30-85% de metanol/ácido acético 0,1%, volume de injeção de 5 μ L, fluxo 0,8 mL.min⁻¹. A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo DIONEX C18, 5 μ m, 120Å, 2.1X 100mm e espectro no UV/Vis em $\lambda_{\text{máx.}} = 295\text{nm}$. O clitoriactal foi separado com tempo de retenção (t_R) de 4,9 minutos e o 6-desoxiclitoriactal em 6,6 minutos.

Em cada parte vegetal foi feita a determinação da presença desses dois rotenoides, com objetivo de quantificar-los, utilizando o t_R e a absorção no UV/Vis em $\lambda_{\text{máx.}} = 295\text{nm}$ como referência.

4.5.2 Obtenção dos extratos da *C. fairchildiana* por Extração Acelerada com Solventes (ASE)

Os extratos usados na quantificação por CLAE-DAD foram obtidos por extração acelerada. Empregou-se um equipamento de extração acelerada com solvente do tipo ASE 100, DIONEX[®], célula extrativa de aço inoxidável com capacidade de 34mL e frascos coletores de vidro com 250 mL de capacidade. A extração foi realizada utilizando MeOH como solvente extrator, tempo de extração de 10 minutos e temperatura de 75°C, 2 ciclos, pressão variando de até 1300 PSI e 3g, aproximadamente, de amostras (raíz, caule e semente da *C. fairchildiana*). Essas condições foram escolhidas devido a trabalho anterior, que otimizado a extração em outra espécie (MELECCHI, 2005).

4.5.3 Quantificação de clitoriacetal e 6-desoxiclitoriacetal por CLAE-DAD

Os padrões dos rotenoides (clitoriacetal (2) e 6-desoxiclitoriacetal (3)), foram preparados em metanol (80mg.L^{-1}) e submetidos a uma série de diluições (64mg.L^{-1} , 48mg.L^{-1} , 32mg.L^{-1} , 16mg.L^{-1} , 8mg.L^{-1}). A melhor resolução foi obtida pelo sistema de gradiente iniciando com proporção 30-85% de MeOH/ácido acético 0,1%, volume de injeção de $5\mu\text{L}$, fluxo $0,8\text{mL.min}^{-1}$. A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo DIONEX Acclaim[®] RSLC 120 C₁₈, $5\mu\text{m}$, 120Å , 2.1X 100mm, combinada com uma pré-coluna LiChrospher 100RP18 LiChroCART 4-4 ($3\mu\text{m}$). O comprimento de onda característico de absorção desses tipos de rotenoides em $\lambda_{\text{máx.}} = 295\text{nm}$.

4.6 TESTES BIOLÓGICOS

4.6.1 Teste de atividade frente *A. salina*

Em um aquário de vidro com divisória escura, contendo pequenas aberturas (para migração das larvas), os cistos (ovos) de *A. salina* (400 mg) do fabricante Miramar[®], foram incubados em água do mar, sob iluminação artificial (lâmpada de 60w), temperatura ambiente de 28°C e estado de saturação de oxigênio obtido através de uma bomba de ar conectada ao fundo do aquário. O aquário foi recoberto deixando-se um pequeno espaço para penetração da iluminação. Como as larvas (nauplius) têm afinidade pela luz, foi possível separá-las dos cistos de forma manual através do uso de pipeta de Pasteur.

Este bioensaio, consiste em avaliar a exposição do crustáceo a uma determinada substância. A análise é feita mediante o cálculo da Dose Letal Média (DL_{50}) (DOLABELA, 1997). O efeito tóxico das substâncias foi testado pelo método de Meyer (1982) modificado. Após 24 horas de incubação no claro, 10 larvas foram transferidas para os frascos contendo as amostras (substâncias isoladas e extratos) em triplicata e completado o volume até 5mL com a água do mar. Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, foi realizada a contagem dos indivíduos mortos após 24 horas de contato com as amostras em iluminação a 28°C . As amostras foram testadas nas concentrações de 50, 100, 150, 200 e $250\mu\text{g.mL}^{-1}$, preparadas com 3 gotas de DMSO para facilitar a dissolução das amostras em solução salina. Para o teste, foi feito um controle contendo somente a água do mar e as 10 larvas. Os nauplius foram considerados mortos caso não exibissem nenhum movimento durante dez segundos de observação.

4.6.2 Teste de atividade antioxidante

As amostras isoladas da *C. fairchiliana* foram submetidas ao teste de atividade antioxidante *in vitro*, utilizando metodologia adaptada do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (BRAND-WILLIAMS,1995; HAIDA, 2011).

O teste foi dividido em qualitativo e quantitativo. No teste qualitativo, uma cromatoplaça de sílica gel com oito amostras (clitoriacetal (2), 6-desoxiclitoriacetal (3), stemonal (4), stemonona (5), canferol (5), quercetina (6), vitexina (7) e astragalina (9)), foi nebulizada com solução etanólica de DPPH, 1mg.mL⁻¹. A autobiografia foi realizada em duplicata, usando ácido gálico como referência positiva.

Amostras ativas no teste antioxidante qualitativo foram submetidos ao teste quantitativo de sequestro do radical DPPH, usando espectrofotômetro no UV/Vis, $\lambda_{\text{máx.}} = 517\text{nm}$, e soluções etanólicas nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As amostras (2,7mL) foram adicionadas em cubetas, misturadas com 0,3mL de solução 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de DPPH. Após 15 minutos de repouso, em temperatura ambiente (aproximadamente 28°C) e protegido da luz, procedeu-se leitura em espectrofotômetro. O branco foi utilizado com adição de 2,7mL de EtOH em 0,3mL de DPPH.

O percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL), corresponde à quantidade de DPPH consumida. A medida que o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (roxo) se transforma em 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (amarelado), a absorvância diminui, dessa forma, foi possível correlacionar a absorvância do DPPH com a capacidade inibitória da amostra. Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas foram convertidos em %SRL pela equação da figura 14.

Figura 14- Fórmula para cálculo da porcentagem de inibição

$$\%SRL = \frac{(ABS_{\text{controle}} - ABS_{\text{amostra}}) \times 100}{ABS_{\text{controle}}}$$

Onde ABS_{controle} é a absorvância inicial da solução etanólica de DPPH e ABS_{amostra} é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra).

4.6.3 Teste de inibição da acetilcolinesterase

Para a realização do teste, usando metodologia adaptada de Ellman (1961), foram depositadas em cavidades de microplacas, 13µL de iodeto de acetiltiocolina (15mM), 62µL de ácido 5-5'-ditiobis-[2-nitrobenzólico] (3mM) e 25µL de tampão fosfato pH 8 com 0,1% de soro de albumina bovina em poços de uma placa de ELISA. Em seguida, foram adicionados aos poços, 100µL das amostras a serem testadas (clitoriacetal, 6-desoxiclitoriacetal e stemonal), usando eserina como referência positiva.

As soluções das amostras foram feitas nas concentrações 500, 250, 125 e 62,5 µmol.L⁻¹. A placa foi então incubada em estufa a 37°C por 10 minutos, sendo em seguida realizada a leitura em λ_{máx}= 405nm. Posteriormente foram adicionados 12µL da enzima (0,22U/mL) e a absorvância foi novamente registrada após 10 minutos a λ_{máx}= 405nm.

Os valores de CI₅₀ foram calculados com o software ED50v10[®] (Fornecido gratuitamente na internet) e o percentual de inibição foi obtido através da fórmula apresentada na figura 15.

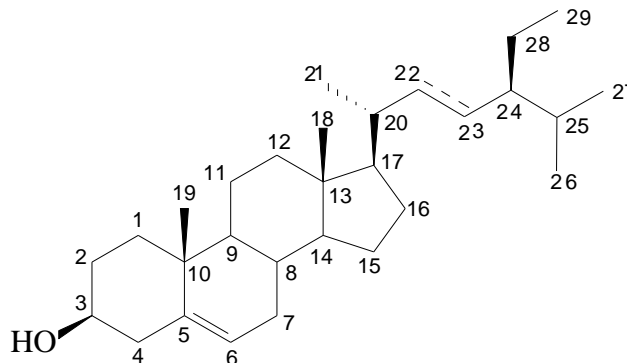
Figura 15- Fórmula para cálculo da porcentagem de inibição da enzima AChE

$$\%I = \frac{(AChE - AchI) \times 100}{AChE}$$

Onde AChI é a atividade obtida na presença do inibidor e AChE na ausência do inibidor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS FITOESTEROIDES



A subfração RCC1D5F(A), apresentou-se como um sólido branco, solúvel em CHCl_3 , apresentando resultado positivo para fitoesteroide quando testado com reagente Liebermann-Burchard.

A identificação foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e IV e por meio da comparação com dados da literatura (VASCONCELOS, 2010), que confirmaram presença de fitoesteroide. Analisando os sinais de RMN de ^1H (Figura 16, página 65) foi possível observar presença de um dubleto em δ 5,35 ($J= 4,4$, 1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-6, característico de fitoesteroide e um multiplete em δ 3,5 referente ao hidrogênio oximetínico H-3. Os dois duplos dubletos em δ 5,05 e 5,17 referentes aos hidrogênios olefínicos na posição H-22 e 23, indicam presença de estigmasterol. Dessa forma, a substância isolada consiste na mistura de β -sitosterol e estigmasterol (**1** e **1a**).

O espectro no IV da mistura (Figura 17, página 65) apresentou sinais em 3417cm^{-1} referente à deformação angular de O-H e em 2866cm^{-1} característicos de estiramento de C-H, além do sinal em 1000cm^{-1} , referente à deformação angular fora do plano ($\gamma=\text{C-H}$).

Figura 16- Espectro de RMN ^1H do β -sitosterol e estigmasterol [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

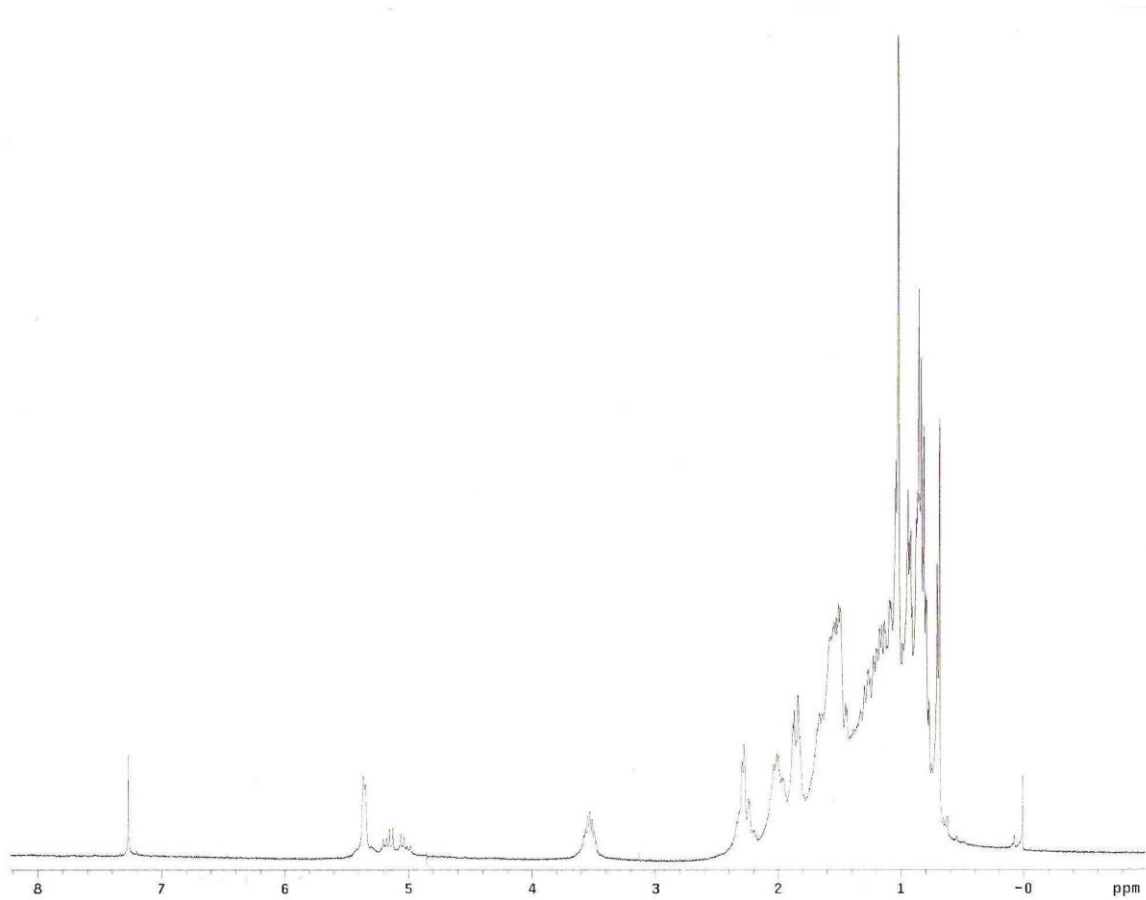
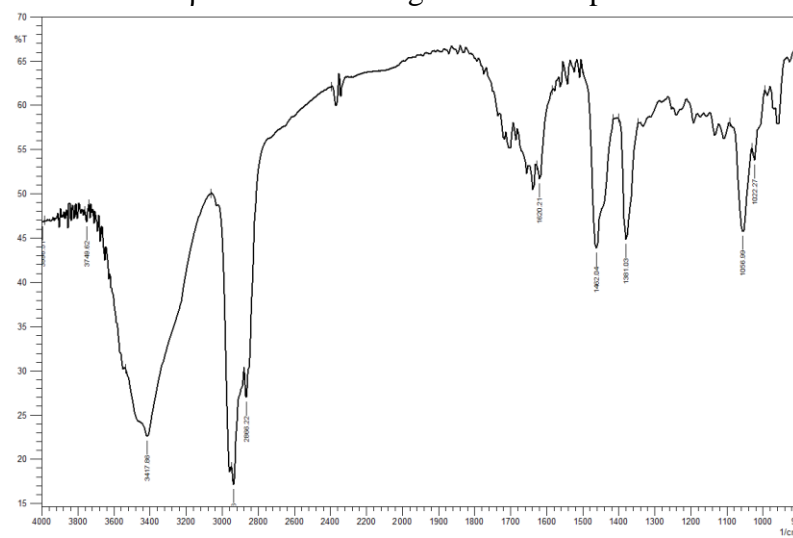
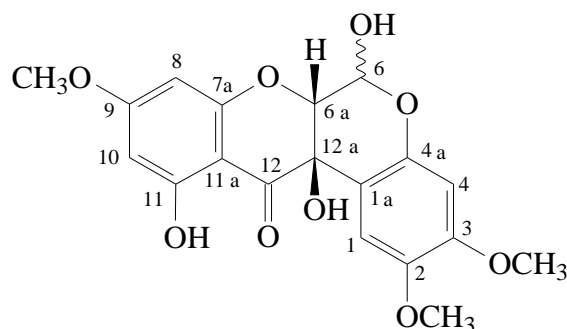


Figura 17- Espectro de IV do β -sitosterol e estigmasterol em pastilha de KBr



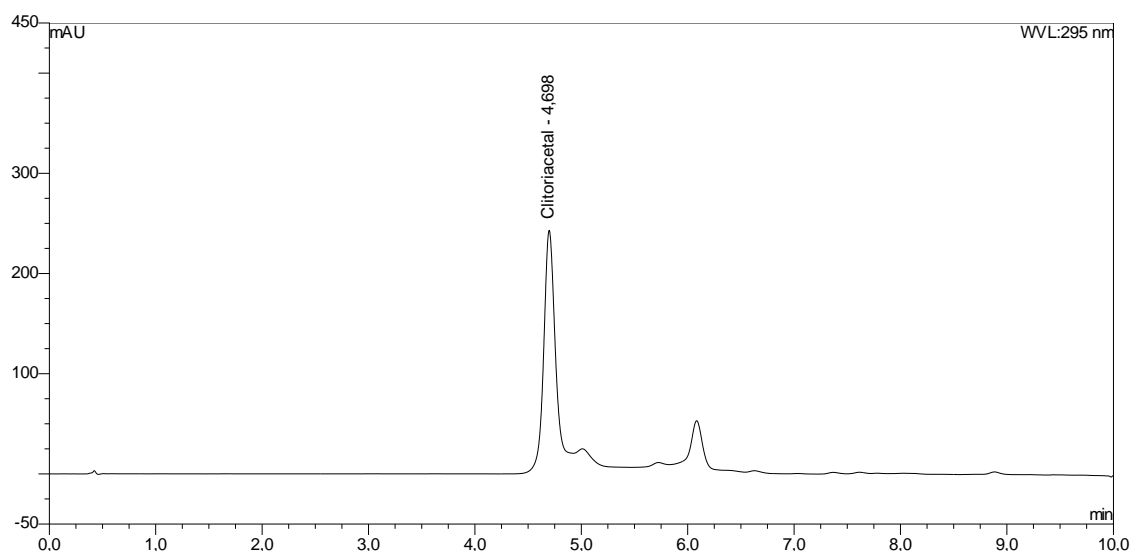
5.2 IDENTIFICAÇÃO DO CLITORIACETAL



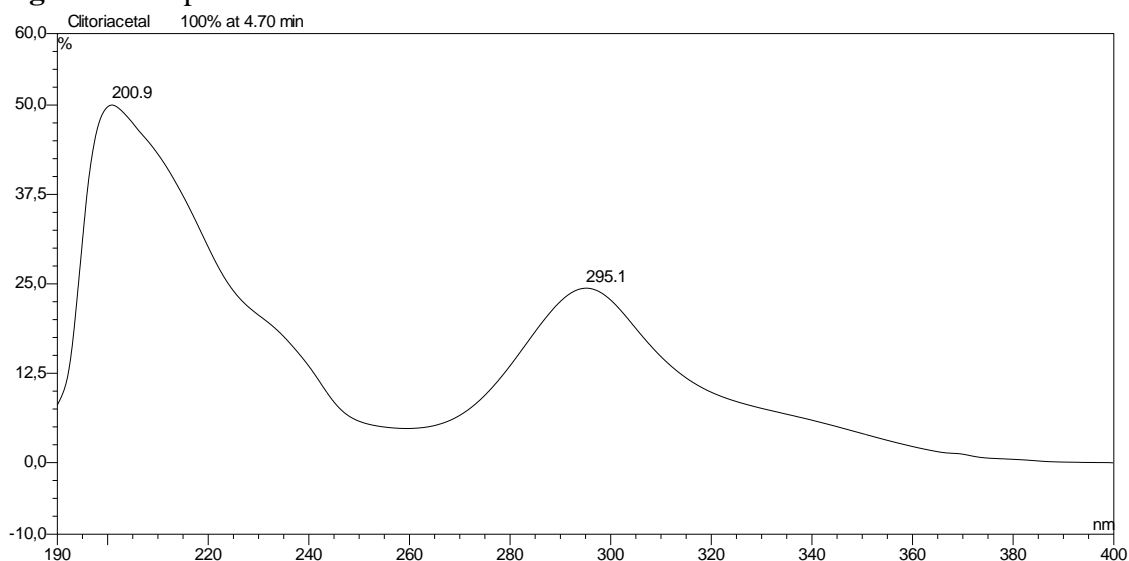
A subfração RCC1D5L7S(B), identificada como sendo o clitoriacetal (2), apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em CHCl_3 . Após análise em CCDC, revelada com solução de AlCl_3 , indicando presença de flavonoide (coloração amarela), a fração foi analisada em CLAE-DAD, revelando a presença de um pico majoritário e um outro minoritário (Figura 18).

O espectro no UV/Vis do pico majoritário, revelou $\lambda_{\text{máx}}$ em 200nm e 295nm, confirmando que trata-se de um flavonoide, assim como o pico minoritário. Por apresentarem uma diferença significativa na quantidade entres os dois componentes, considerou-se que na caracterização da fração por RMN de ^1H e ^{13}C , apenas o composto majoritário se destacaria (Figura 19, página 67).

Figura 18- Cromatograma do clitoriacetal



Sistema em gradiente de 30-85% MeOH e ácido acético 0,1%, 5 μL de injeção, fluxo 0,8mL.min⁻¹, coluna Dionex C₁₈ 5 μm , 120 Å, 2.1x100mm

Figura 19- Espectro no UV/Vis do clitoriactal

No espectro no IV da fração, apresentou bandas na região de 2933cm^{-1} e aproximadamente em 3100cm^{-1} relacionadas à presença de ligação $\text{Csp}^3\text{-H}$ e $\text{Csp}^2\text{-H}$ ($\nu_{\text{C-H}}$) respectivamente, banda em 1641cm^{-1} associada à deformação axial de ligação C=O , sugerindo que a carbonila é de cetona conjugada e quelada com uma hidroxila, devido a redução da frequência, também apresentou banda larga com máximo em 3420cm^{-1} característico OH, além de bandas em 1507 , 1451 e 1410cm^{-1} referentes à deformação axial de ligação C=C de anel aromático ($\nu_{\text{C=C}}$) (Figura 23, página 70).

A identificação do clitoriactal (**2**) foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN ^1H (Figura 20 e 21, página 69) apresentou sinais na região de δ 1,5 atribuídos a impurezas de material graxo. Os sinais referentes ao clitoriactal foram registrados a partir de três singletos integrados para três hidrogênios cada, em δ 3,74; 3,75 e 3,78 atribuídos aos grupos metoxílicos, além de 2 dubletos em δ 4,57 ($J=1,1\text{Hz}$) e δ 5,74 ($J=1,1\text{Hz}$), referentes aos H-6a e H-6, respectivamente. Próximo dos dubletos citados anteriormente, existe presença de outros dois dubletos em δ 4,72 ($J=2,1\text{Hz}$) e 5,63 ($J=2,1\text{Hz}$), que foram atribuídos a outra estrutura isomérica presente. Essa observação sugere que o clitoriactal encontra-se em uma mistura de 2 epímeros, onde, em uma estrutura o H-6 encontra-se na posição equatorial (H-6 $_{eq}$) e na outra estrutura, o H-6 encontra-se na posição axial (H-6 $_{ax}$). Comparando os sinais do hidrogênio H-6a e de RMN de ^{13}C da hidroxila em C-12a, com dados da literatura (SILVA, 1998a), foi observado que a configuração relativa do carbono C-6a e da hidroxila C-12a, é do tipo *S* e *S* (6a-*S* e 12a-*S*), sugerindo que esses grupos estão orientados em β .

Ainda no espectro de RMN ^1H , foram também observadas presença de hidrogênios na região de aromáticos, como dois dubletos em δ 5,98 (1H, $J=2,4$ Hz, H-8) e 6,07 (1H, $J=2,4$ Hz, H-10), cuja constante de acoplamento permite indicar relação *meta* entre estes hidrogênios (SILVERSTEIN, 2007). Por estar localizado entre uma hidroxila (grupo eletronegativo) e uma metoxila no anel-D, o hidrogênio H-10 apresenta próton menos blindado que o H-8, localizado entre dois grupos OR (menos eletronegativo), dessa forma, esse próton apresenta menor densidade eletrônica ao seu redor, aumentando seu deslocamento químico.

No outro anel aromático (anel-A de rotenoide), os hidrogênios (H-4 e H-1) estão registrados como singletos em δ 6,55 e 6,70, respectivamente.

Comprovando a existência da mistura de dois epímeros na fração, observa-se no espectro de RMN de ^1H dois singletos bem próximos um do outro em δ 11,45 e δ 11,43, característico de hidroxilas queladas com carbonila cetônica, referentes às hidroxilas na posição OH-11.

Baseado no deslocamento do H-1 pode-se chegar a conclusão que a junção dos anéis B\C é do tipo *Cis* (SILVA, 1998a, COMBRIE, 1961).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 22, página 70) apresentou sinais, que foram comparadas com dados já descritos na literatura indicando núcleo de rotenoide (Tabela 23 e 24, página 82 e 83). Foram observados 19 carbonos (além de sinais atribuídos a material graxo). Os sinais apresentados foram δ 91,45 (C-6), 69,56 (C-12a) e 74,5 (C-6a). Os sinais em δ 55,7, 55,7 e 56,24 foram atribuídos a carbonos de metoxilas. Além dos sinais na região de carbono aromático em δ 94,59 (C-8), 95,75 (C-10), 101,0 (C-11a), 101,7 (C-4), 108,7 (C-1a), 109,1 (C-1), 144,2 (C-2), 147,9 (C-4a), 151,7 (C-3), 160,8 (C-7a), 164,3 (C-11) e 169,0 (C-9) e em 193,3 referente a carbonila C-12.

Figura 20- Espectro de RMN de ^1H do clitoriactal [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

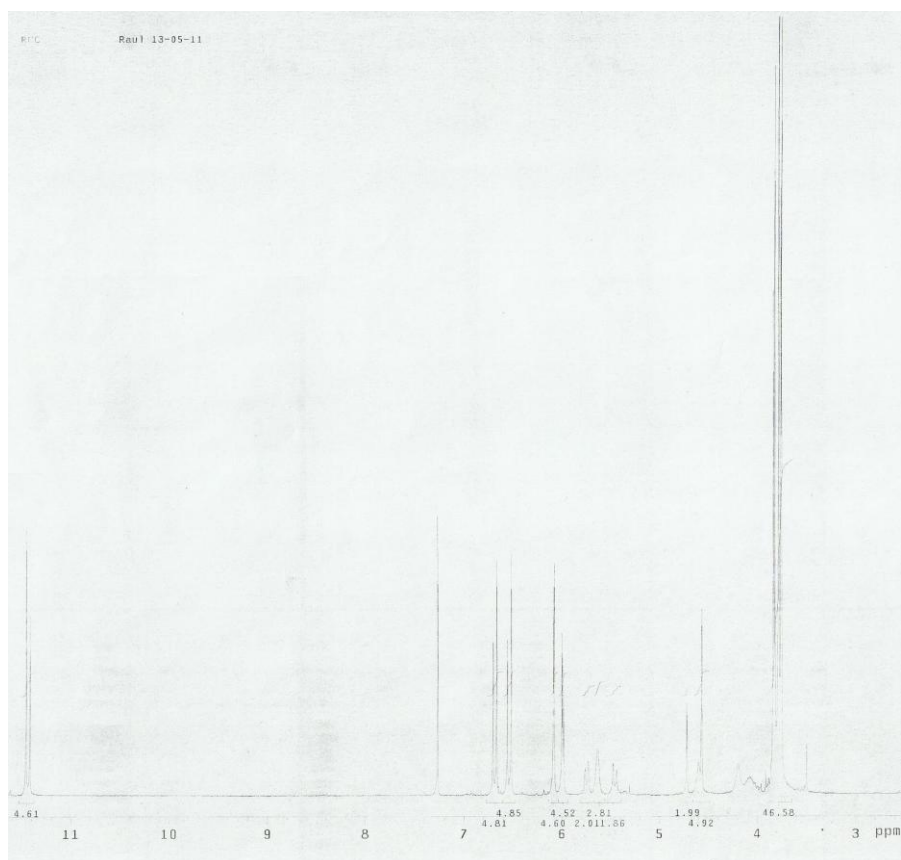


Figura 21- Ampliação do espectro de RMN de ^1H do clitoriactal [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

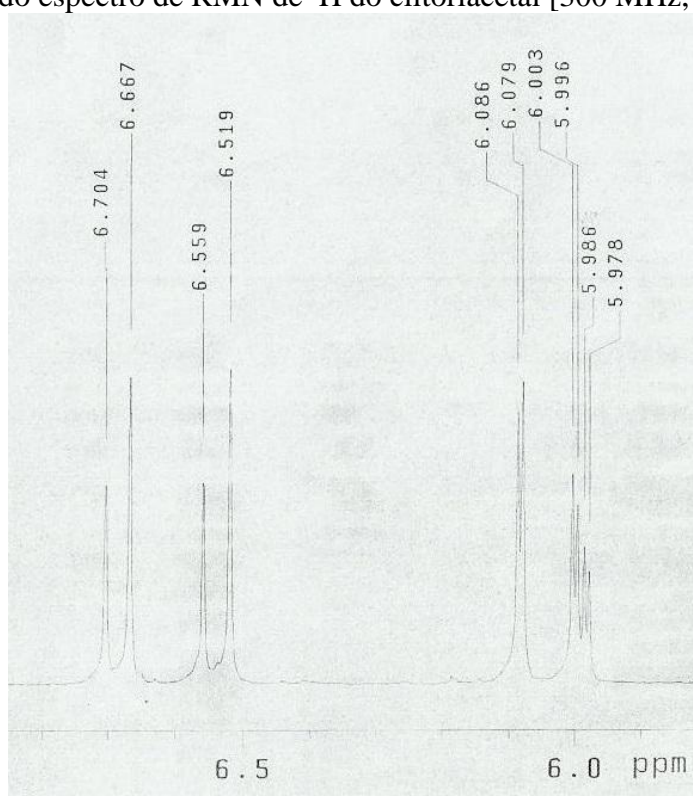


Figura 22- Espectro de RMN de ^{13}C do clitoriacetal [75 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

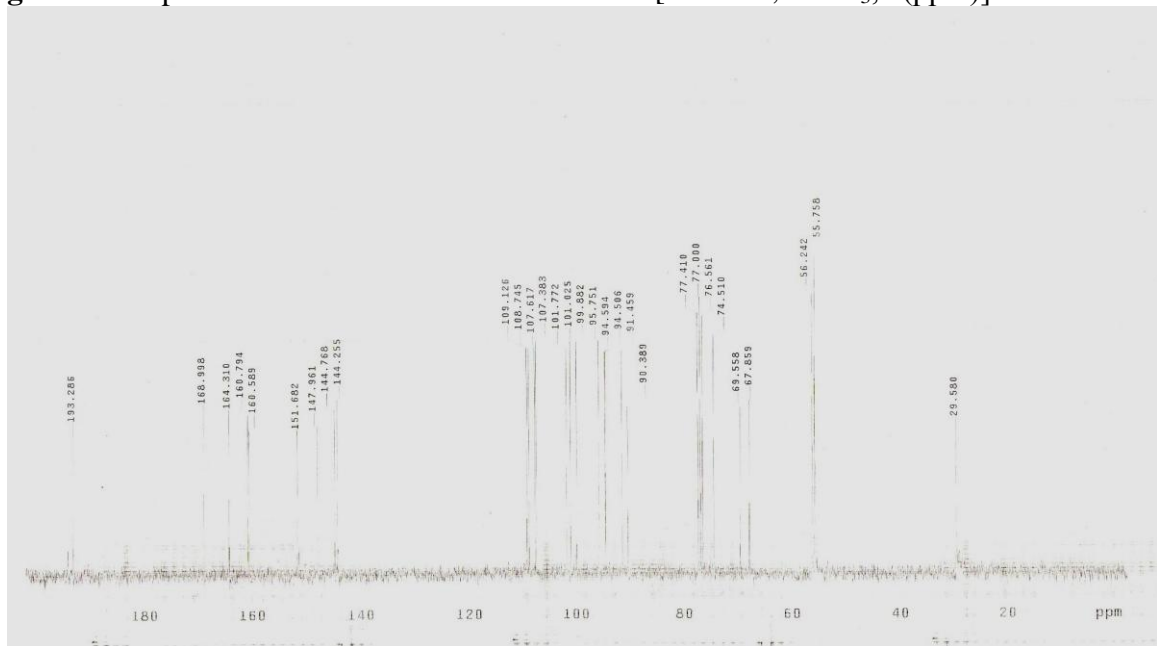
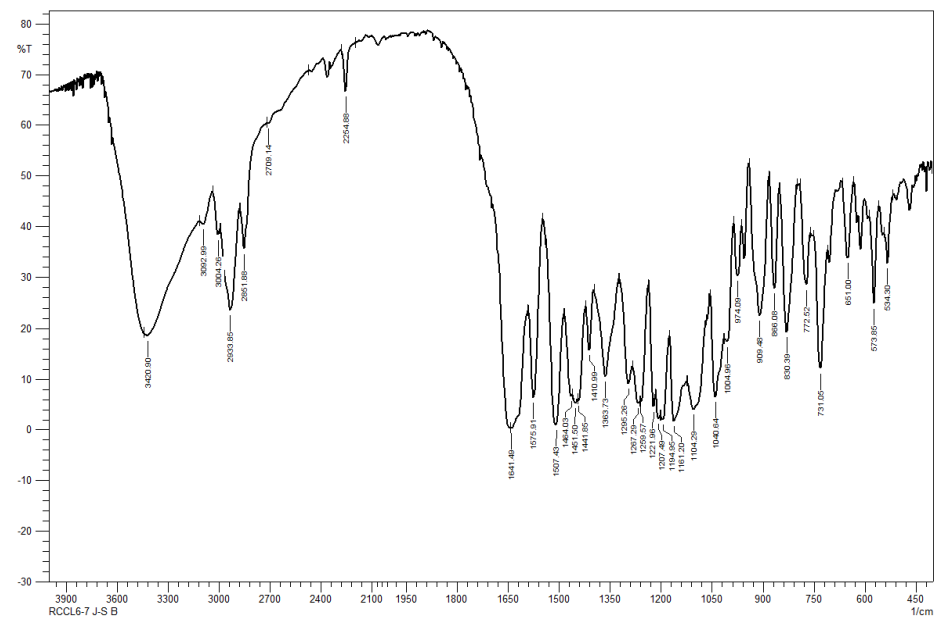
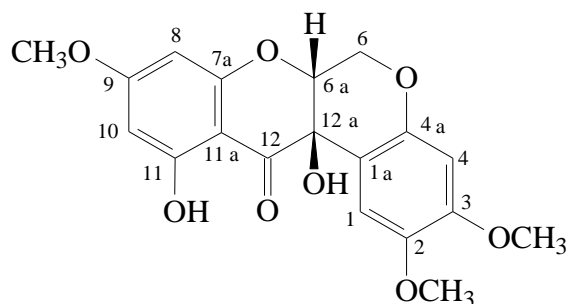


Figura 23- Espectro de IV do clitoriacetal em pastilha de KBr

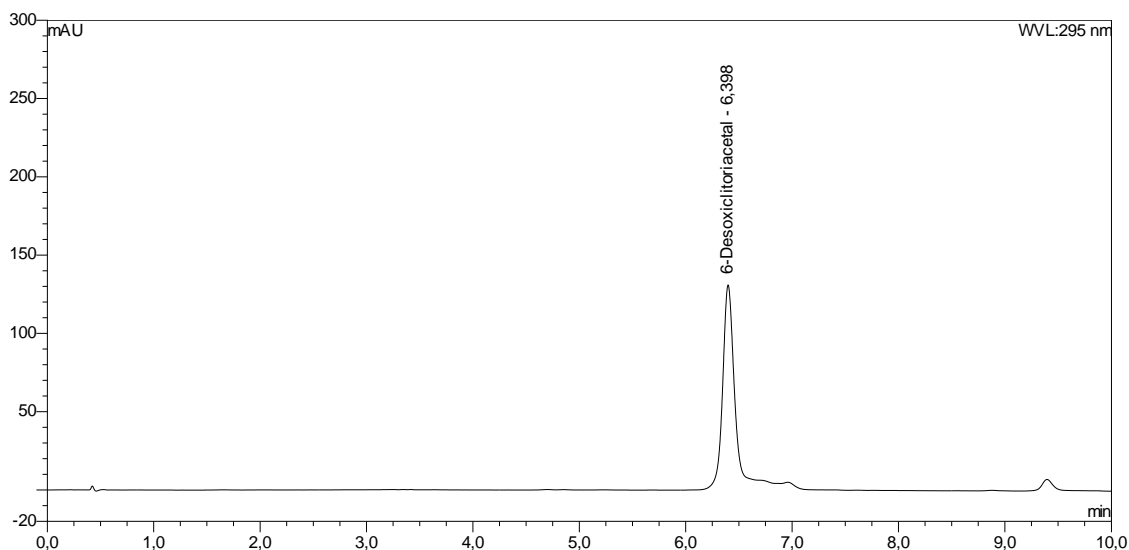


5.3 IDENTIFICAÇÃO DO 6-DESOXICLITORIACETAL

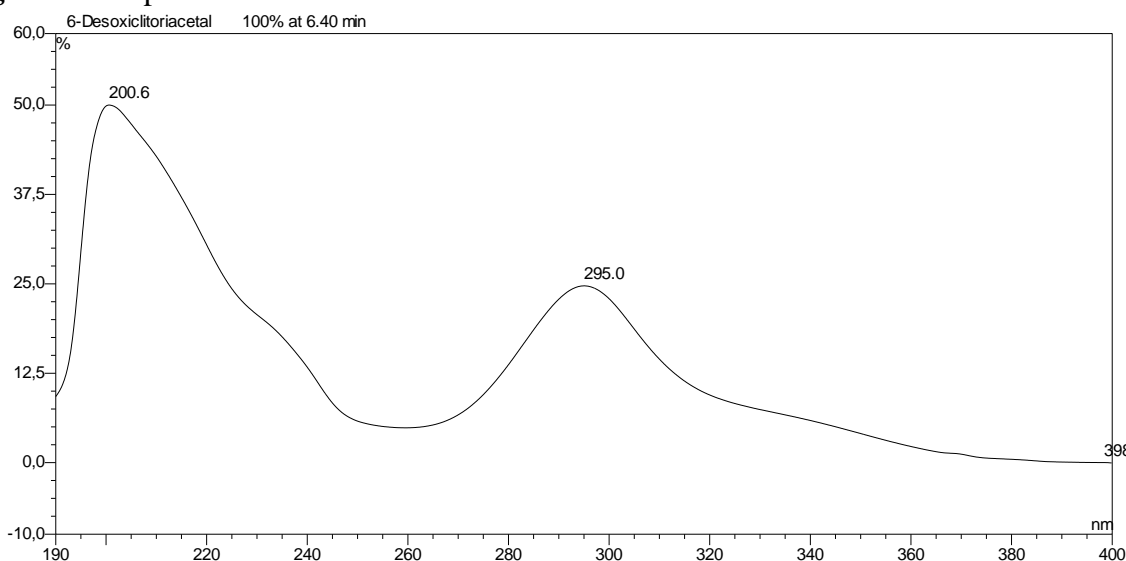


A subfração RCC1D5J, identificada como sendo 6-desoxiclitoriactal (**3**), apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em CHCl_3 , com faixa de fusão de 129-130°C. A análise por CCDC, revelada com solução de AlCl_3 , indicou a presença de flavonoide devido a coloração amarela da cromatoplaça. Após análise por CLAE-DAD, observou-se a presença de um único pico (Figura 24). O espectro no UV/Vis do pico, revelou $\lambda_{\text{máx.}}$ em 200nm e 295nm, confirmando presença de flavonoide que, após comparação de dados de RMN de ^1H com valores da literatura (SILVA, 1998a), confirmou tratar-se do rotenoide 6-desoxiclitoriactal (Figura 25, página 72).

Figura 24- Cromatograma do 6-desoxiclitoriactal



Sistema em gradiente de 30-85% MeOH e ácido acético 0,1 %, 5 μL de injeção, fluxo 0,8 mL.min $^{-1}$, coluna Dionex C $_{18}$ 5 μm , 120 Å, 2.1x100mm

Figura 25- Espectro no UV/Vis do 6-desoxiclitoriactal

O espectro no IV (Figura 29, página 75) apresentou bandas em 2848 cm^{-1} e aproximadamente em 3100 cm^{-1} relacionadas à presença de ligação $Csp^3\text{-H}$ e $Csp^2\text{-H}$ (ν_{C-H}) respectivamente, banda em 1709 cm^{-1} associada à deformação axial da ligação $C=O$, sugerindo que a carbonila é cetônica e que está quelada com uma hidroxila, também apresentou banda estreita em 3451 cm^{-1} característico do estiramento de OH, além de bandas em 1463 , 1511 e 1573 cm^{-1} referentes à deformação axial de ligação $C=C$ de anel aromático ($\nu_{C=C}$).

A identificação do 6-desoxiclitoriactal (**3**) foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C , IV, além de EM. O espectro de RMN de ^1H (Figura 26, 27, página 74) apresentou 3 singletos em δ 3,75; 3,77 e 3,8 atribuídos aos grupos metoxílicos (3H, s), além de dois duplos dubletos em δ 4,48 e δ 4,56, referentes aos hidrogênios em H-6 (2H, $J=12$ e 3 Hz). Sobreposto ao valor do H-6, observa-se outro sinal referente ao dubleto do hidrogênio H-6a, em δ 4,55 (1H, $J=3$ Hz). Esses valores foram comparados com dados da literatura (SILVA, 1998a) indicando que a fração isolada é diferente do rotenoide anterior. Foi também observada presença de hidrogênios na região de aromáticos, como dois dubletos em δ 5,9 (1H, $J=2,5$ Hz) e 6,05 (1H, $J=2,5$ Hz), (H-8 e H-10), orientados na posição *meta*, como pode ser visto pela constante de acoplamento, além de dois singletos referentes aos hidrogênios H-4 e H-1 em δ 6,4 e 6,6.

Dessa forma, devido a similaridade dos sinais de RMN de ^1H com o clitoriactal (**2**) e comparando com dados da literatura (SILVA, 1998a, SILVA, 1998 b), a fração analisada

identificada como sendo o 6-desoxiclitoriactal (**3**), apresenta junção dos anéis B\C do tipo *Cis*. Já o singlete em δ 11,52, característico de hidroxila quelada com carbonila, é atribuída á hidroxila OH-11.

O espectro de RMN de ^{13}C do 6-desoxiclitoriactal apresentou sinais, que foram comparadas com dados já descritos na literatura indicando núcleo de rotenoide (Tabela 24, página 83). Foram observados 19 sinais de carbono (além de sinais atribuídos a material graxo). Os sinais apresentados foram δ 63,61 (C-6), 66,93 (C-12a) e 75,55 (C-6a). Os sinais em δ 56,3 e 55, 8 foram atribuídos a carbonos de metoxilas. Além dos sinais na região de carbono aromático em δ 94,52 (C-8), 95,56 (C-10), 100,1 (C-11a), 101,1 (C-4), 108,2 (C-1a), 109, 2 (C-1), 144,0 (C-2), 148,3 (C-4a), 151,3 (C-3), 161,5 (C-7a), 164,3 (C-11) e 169,0 (C-9) e em 195,0 referente a carbonila C-12 (Figura 28, página 74).

O espectro de massa mostra um pico do íon molecular m/z igual a 374, confirmando, após comparação com dados da literatura (SILVA, 1998c), tratar-se do 6-desoxiclitoriactal (**2**) (Tabelas 30 e 31, página 75 e 76).

Figura 26- Espectro de RMN de ^1H do 6-desoxiclitoriactal [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

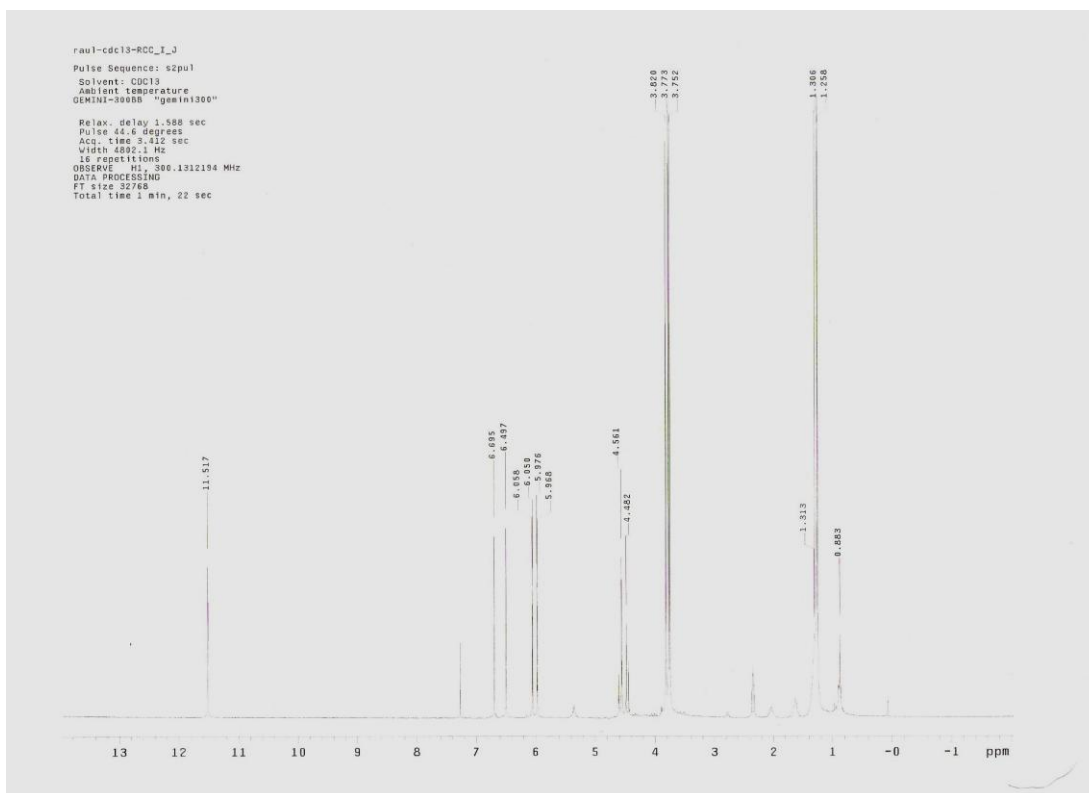


Figura 27- Ampliação do espectro de RMN de ^1H do 6-desoxiclitoriactal [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

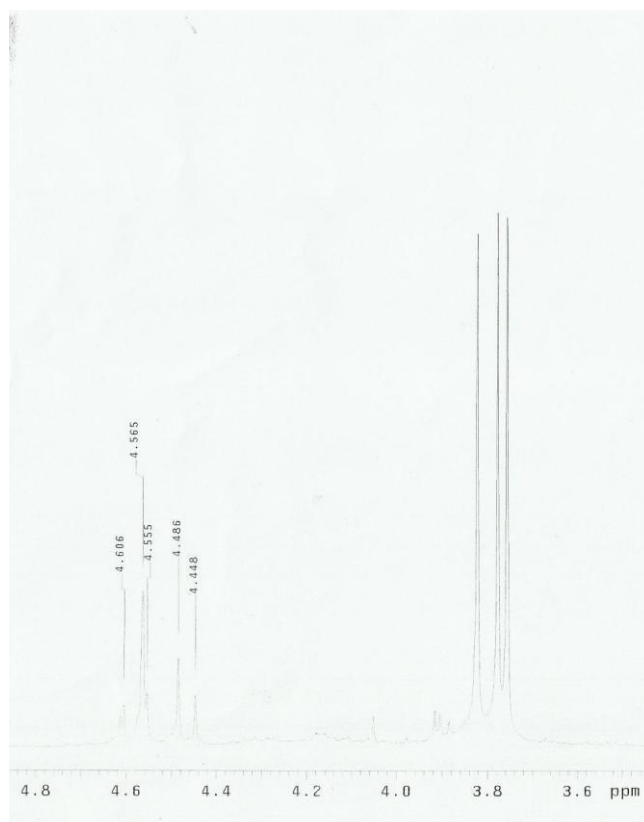


Figura 28- Espectro de RMN de ^{13}C do 6-desoxiclitoriactal [75 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

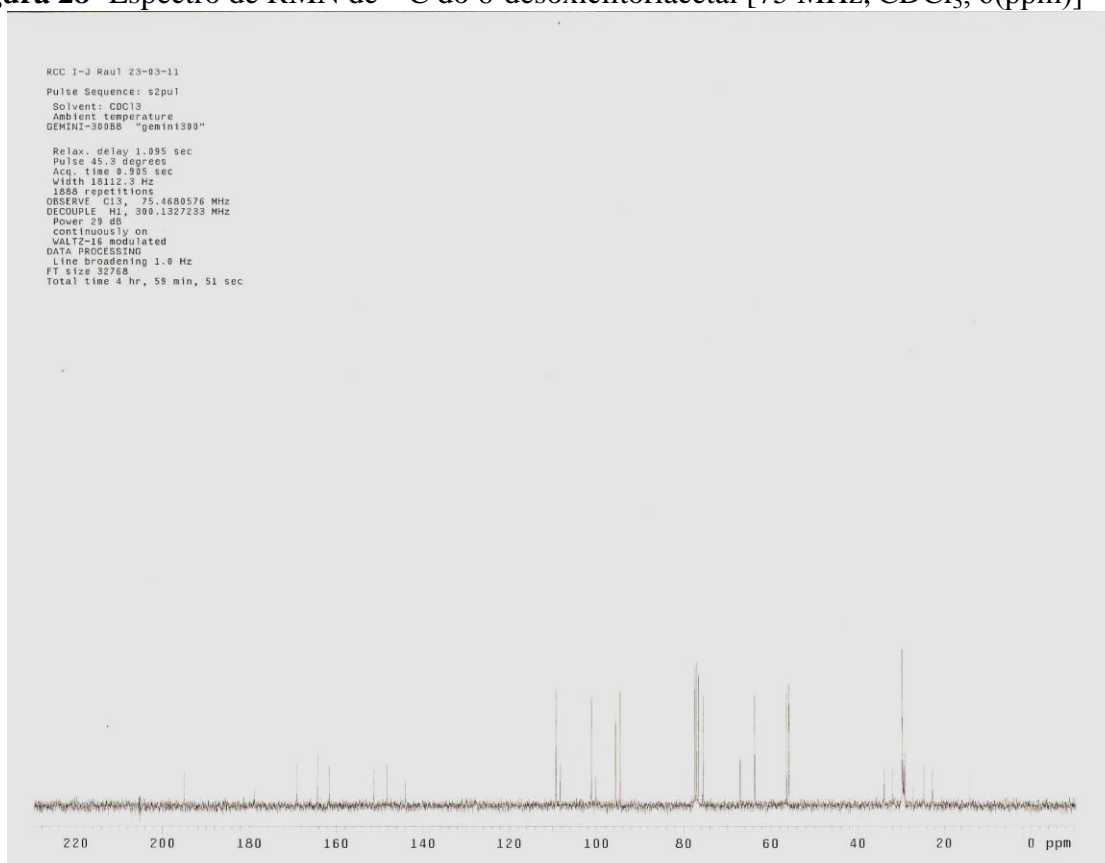


Figura 29- Espectro no IV do 6-desoxiclitoriactal em pastilha de KBr

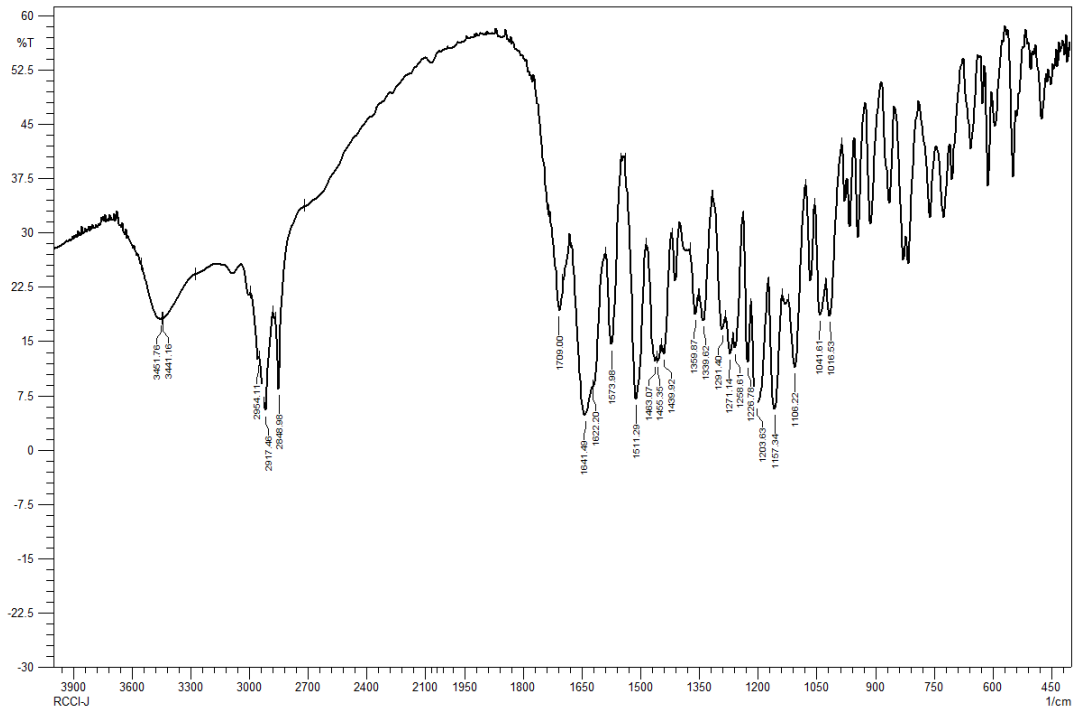


Figura 30- Proposta de fragmentos no espectro de massa do 6-desoxiclitoriactal

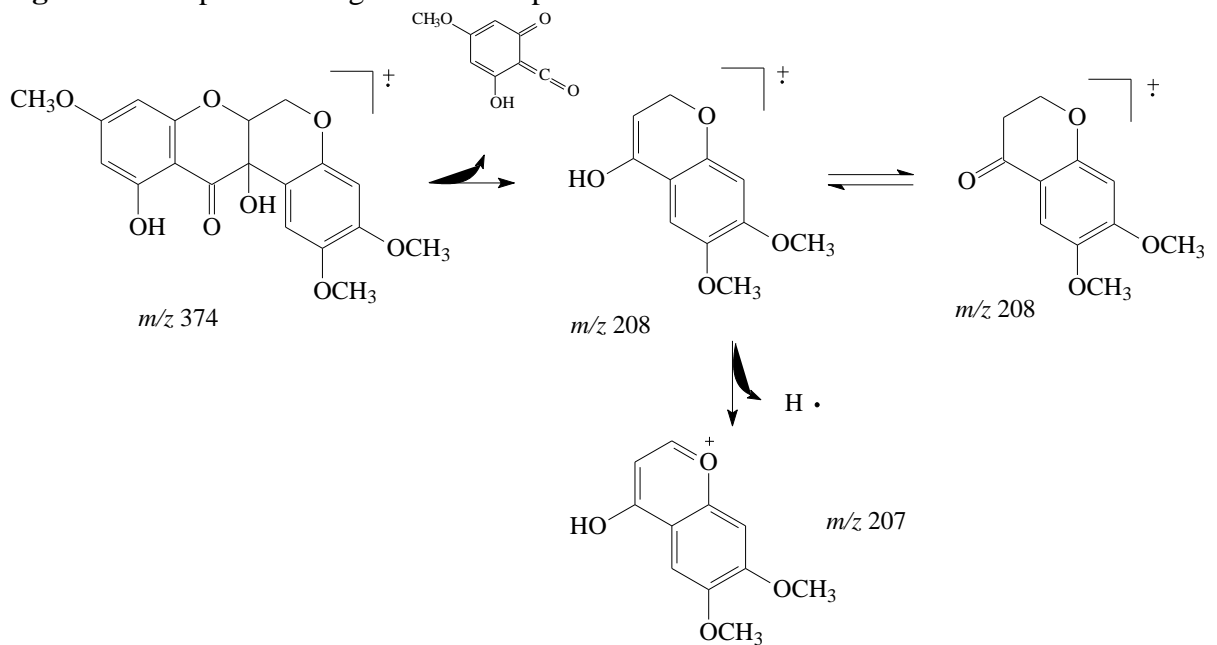
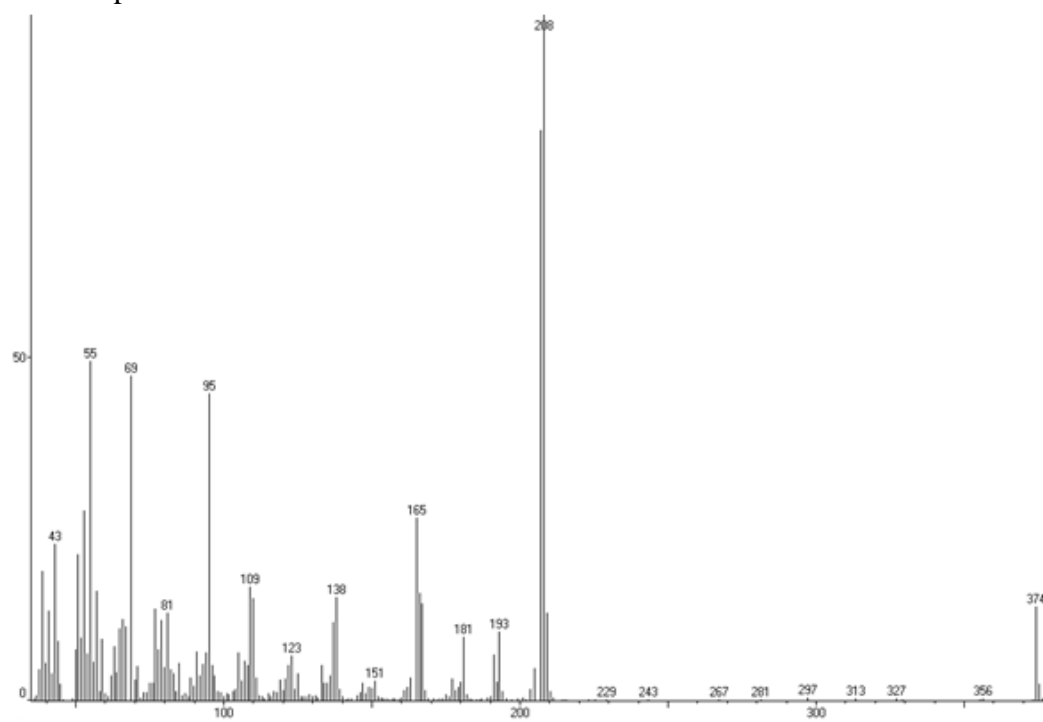
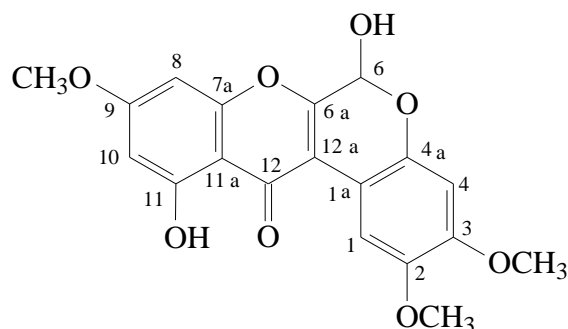


Figura 31- Espectro de massa do 6-desoxiclitoriacetal

5.4 IDENTIFICAÇÃO DO STEMONAL



A fração RCC1D5L9(B), identificada como stemonal (**4**), apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em CHCl_3 . A análise dos dados de RMN de ^1H indicaram elevada quantidade de material graxo. Dessa forma, percebeu-se que a quantidade de stemonal obtida foi inferior a massa da fração, sendo a caracterização realizada apenas por dados de RMN de ^1H e UV/Vis. A confirmação da presença de hidrocarbonetos proveniente do material graxo foi comprovada devido aos sinais na faixa entre δ 1-2, contudo, existe uma pequena quantidade de rotenoide, identificado através de comparação com dados da literatura (SILVA, 1998a).

O espectro no UV/Vis da fração RCC1D5L9(B), revelou $\lambda_{\text{máx}}$ em 200nm, 273nm e 321nm, diferente dos outros rotenoides isolados (**2** e **3**). Esses valores, após comparação com dados da literatura (SHIENGTHONG, 1979), confirmaram presença de rotenoide do tipo 6a,12a-desidrorotenoide.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 33, página 78), foram observados os singletos em δ 3,88; 3,91 e 3,97 atribuídos aos grupos metoxil (3H, *s*), além de sinais na região de hidrogênios aromáticos. Nessa região, foram observados 2 singletos em δ 8,44 e 6,72 (H-1 e H-4) indicando anel de flavonoide tetrasubstituído, revelando que esses prótons estão mais desprotegidos em relação aos rotenoides isolados anteriormente (**2** e **3**), sugerindo a presença de dupla ligação próxima desses prótons, como no caso de anéis aromáticos condensados por uma dupla ligação (anéis B/C do rotenoide) (Tabelas 23 e 24, páginas 82 e 83).

Ainda no espectro de RMN de ^1H , foi observada presença de dois dubletos em δ 6,45 (1H, $J=2,4$ Hz, H-8) e 6,41 (1H, $J=2,4$ Hz, H-10), cuja constante de acoplamento permite indicar relação *meta* entre estes hidrogênios (SILVERSTEIN, 2007) e que existe outro anel tetrasubstituído (anel-D de rotenoide). Além de um singlete em δ 6,18 de hidrogênio desprotegido, referente ao H-6.

Foram também observados dois sinais de hidroxilas, uma em δ 4,51, atribuída ao OH-6 e outra em δ 12,83 do OH-11, sendo essa última deslocada devido a interação intermolecular com a carbonila cetônica.

Figura 32- Espectro no UV/Vis do stemonal

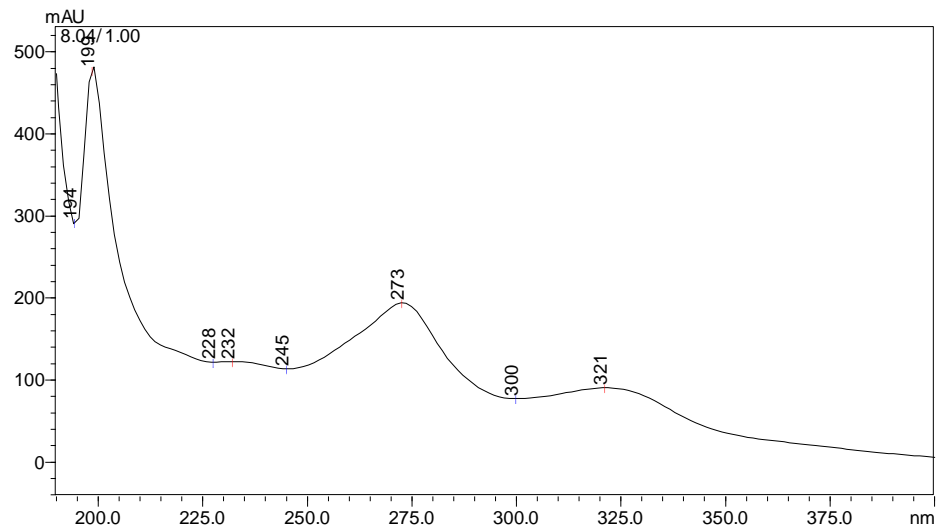
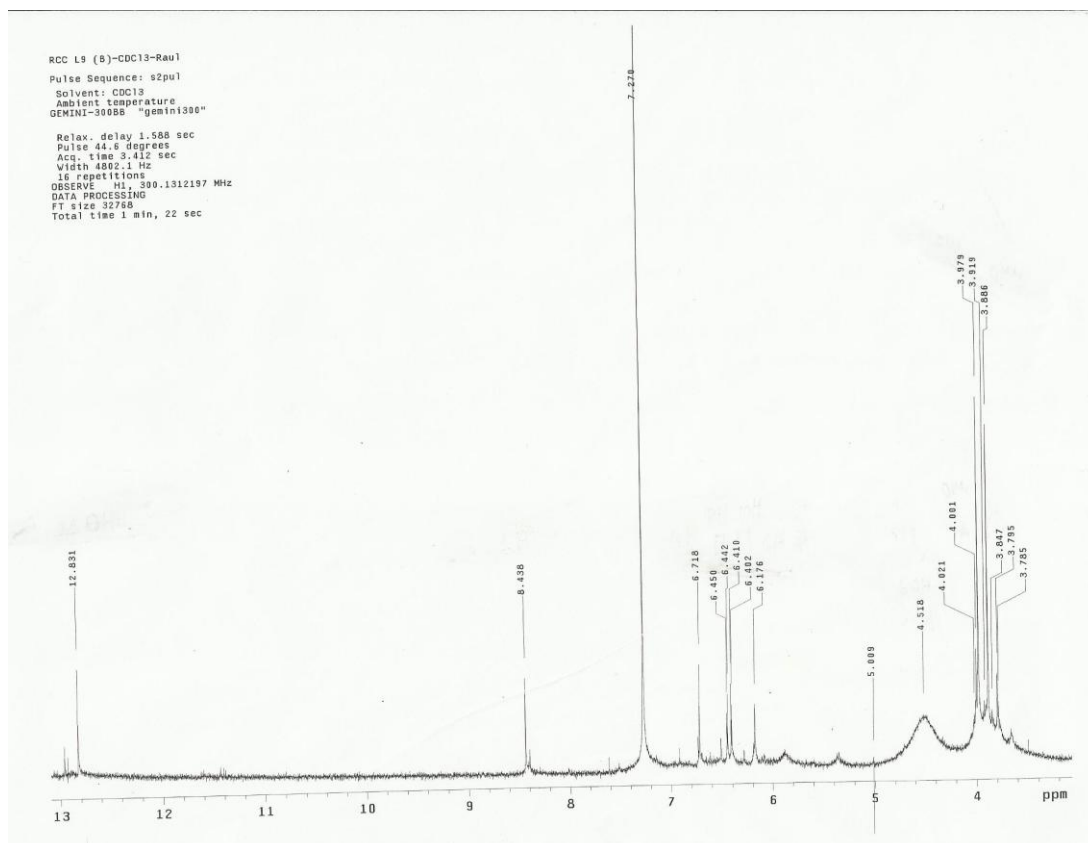
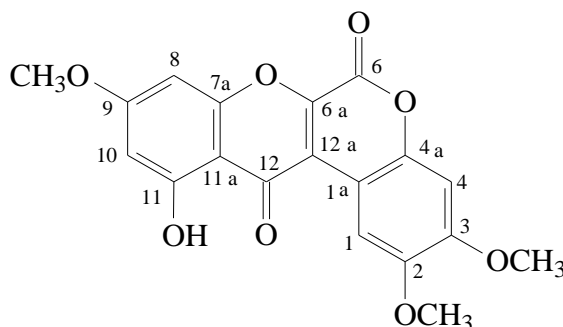


Figura 33- Espectro de RMN de ^1H do stemonal [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]



5.5 IDENTIFICAÇÃO DO STEMONONA



A fração RCC1D5F(C), identificada como stemonona (**5**), apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em CHCl_3 . A análise dos dados de RMN de ^1H indicaram a presença de material graxo e CH_2Cl_2 como resíduo, pelos sinais na faixa entre δ 1-2 e o singlete em δ 5,31, sendo a caracterização realizada apenas por dados de RMN de ^1H e UV/Vis. A confirmação da presença do rotenoide foi realizada através de comparação com dados da literatura (SHIENGTHONG, 1979).

O espectro no UV/Vis da fração RCC1D5D-F(C), revelou $\lambda_{\text{máx.}}$ em 254nm, 281nm e 334nm. Esses valores, após comparação com dados da literatura, em $\lambda_{\text{máx.}}$ em 274nm, 298nm e 322nm (SHIENGTHONG, 1979), confirmaram presença de rotenoide com esqueleto 6a,12a-desidrorotenoide, semelhante ao stemonal(**4**).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 35, página 80), foram observados os singletos em δ 3,99; 4,0 e 4,1 atribuídos aos grupos metoxilicos (3H, *s*). Também foram observados sinais na região de hidrogênios aromáticos, como dois singletos em δ 8,44 e 6,72 (H-1 e H-4), revelando presença de anel de flavonoide tetrasubstituído, além de dois dubletos em δ 6,45 (1H, $J=2,4$ Hz, H-8) e 6,41 (1H, $J=2,4$ Hz, H-10), com constantes de acoplamento indicando relação *meta* entre estes hidrogênios (Figura 36, página 81). Esses valores de RMN de ^1H são muito parecidos com os valores do stemonal (**4**), revelando que o esqueleto entre os dois rotenoides isolados são parecidos, do tipo 6a, 12a-desidrorotenoide.

O sinal em δ 12,4 foi atribuído, assim como os outros rotenoides descritos, à hidroxila OH-11 com interação intermolecular com carbonila cetônica.

A falta de sinal de RMN de ^1H , referente ao H-6 na região de δ 6,18 sugerem presença de carbonila em C-6, ou seja, trata-se do stemonona (**5**) (Tabela 23 e 24, página 82 e 83).

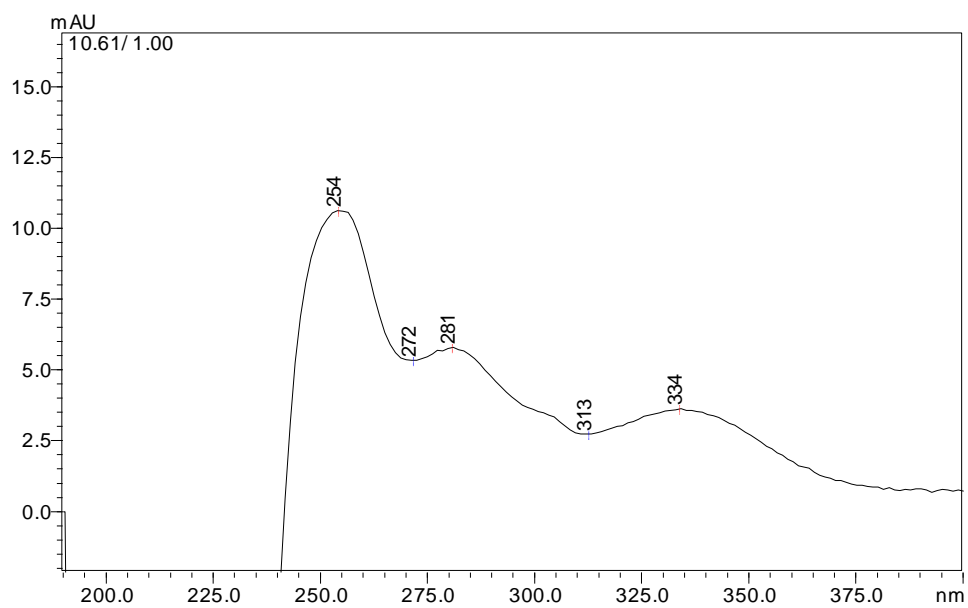
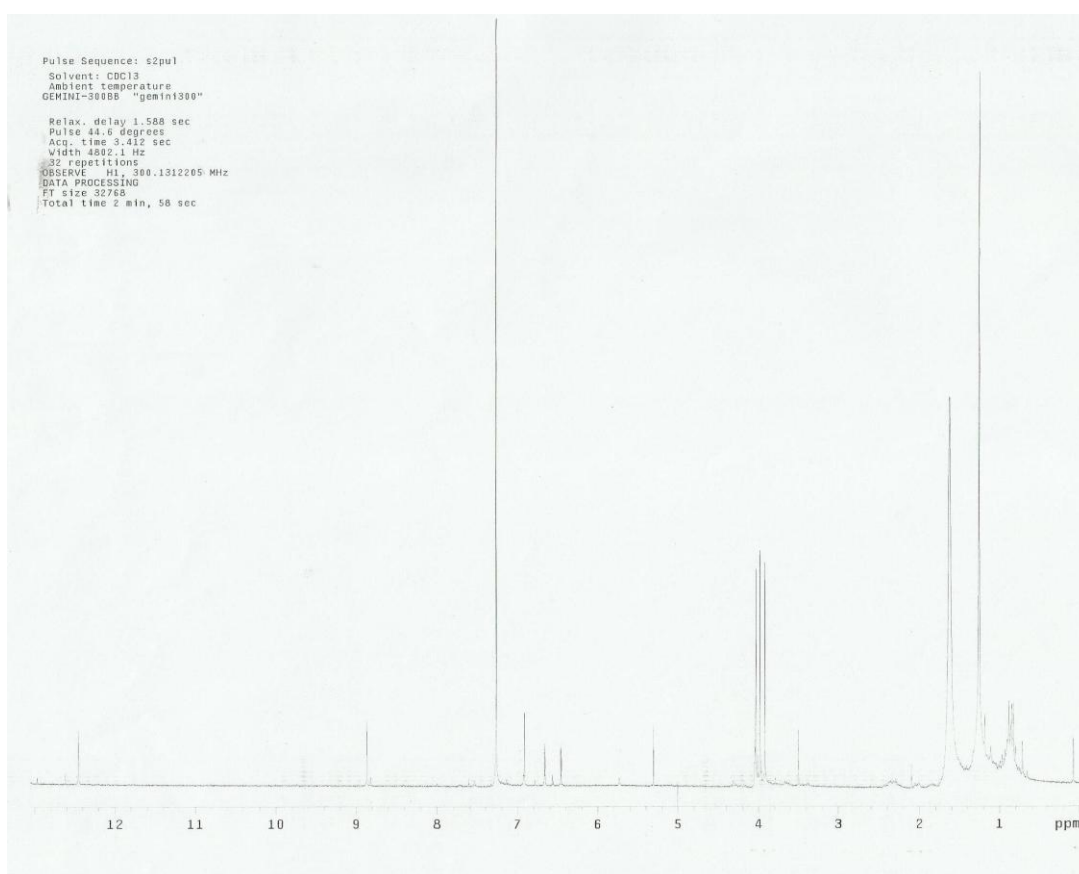
Figura 34- Espectro no UV/Vis do stemonona**Figura 35-** Espectro de RMN de ^1H do stemonona [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 36- Ampliação do espectro de RMN de ^1H do stemonona [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

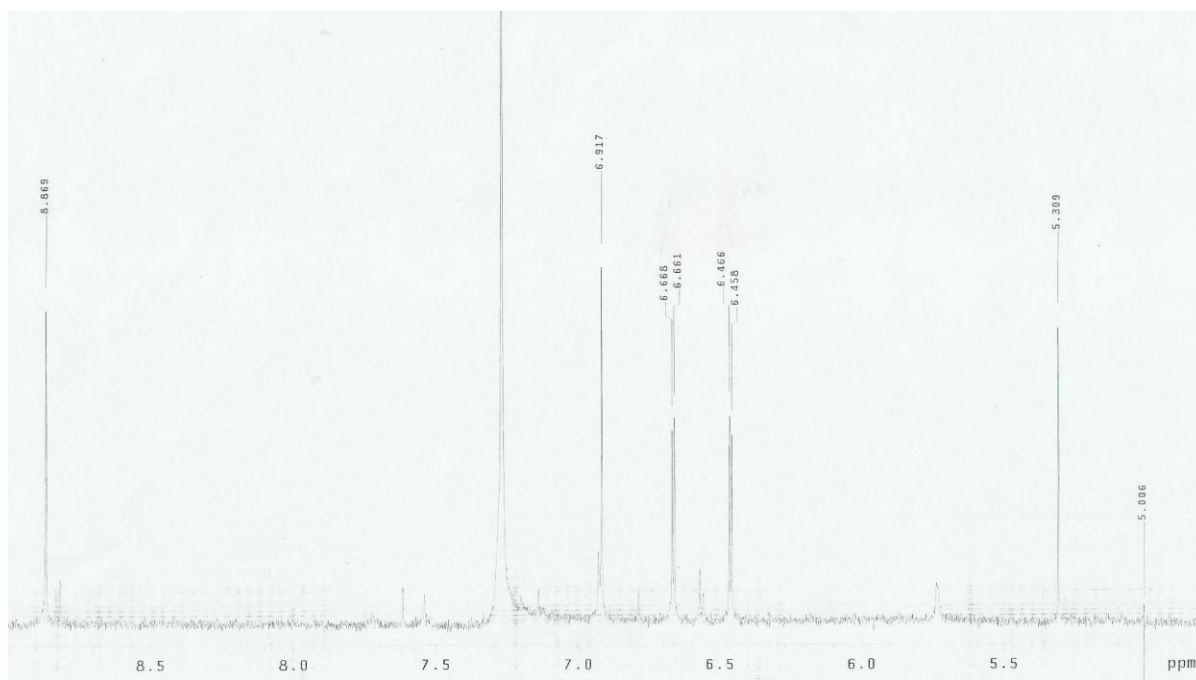


Tabela 23- Dados espectroscópicos de RMN de ^1H para o clitoriactal (**2**), 6-desoxiclitoriactal (**3**), stemonal (**4**) e stemonona (**5**) [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)]

H	Rotenoides isolados				Dados da literatura*		
	(2)	(3)	(4)	(5)	(2)	(3)	(4)
1	6,70 (s)	6,69 (s)	8,44 (s)	8,86 (s)	6,68 (s)	6,66 (s)	8,42 (s)
4	6,55 (s)	6,49 (s)	6,72 (s)	6,91(s)	6,48 (s)	6,41 (s)	6,70 (s)
6	5,74 (d, 1,1)	4,48-4,56 (dd, 1,1 e 12)	6,18 (s)	-	5,54 5,75 (d, 2)	4,39 (dd, 2 e 12) 4,51 (dd, 2,5 e 12)	6,20 <i>sl</i>
6a	4,57 (d, 1,1)	4,55 (d, 3)	-	-	4,56 <i>sl</i> 4,72 (d, 2,0)	4,49 (d, 2,0)	-
8	5,98 (d, 2,4)	5,97 (d, 2,5)	6,45 (d, 2,4)	6,46 (d, 2,1)	5,96 (d, 2,3)	5,88 (d, 2,3)	6,40 (d, 2,2)
10	6,07 (d, 2,1)	6,05 (d, 2,5)	6,41 (d, 2,4)	6,60 (d, 2,1)	6,06 (d, 2,3)	6,04 (d, 2,3)	6,50 (d, 2,2)
2-OMe	3,78 (s)	3,82 (s)	3,97 (s)	3,99 (s)	3,72 (s)	3,66 (s)	3,92 (s)
3-OMe	3,75 (s)	3,77 (s)	3,91 (s)	4,00 (s)	3,76 (s)	3,75 (s)	3,95 (s)
9-OMe	3,74 (s)	3,75 (s)	3,88 (s)	4,10 (s)	3,80 (s)	3,75 (s)	4,00 (s)
11-OH	11,45 (s)	11,51 (s)	12,83 (s)	12,40 (s)	11,45 (s)	11,50 (s)	12,80 (s)
6-OH	-	-	4,52	-	4,40 <i>sl</i>	-	4,95 <i>sl</i>

*SILVA, 1998a (CDCl_3 , 200 MHz)

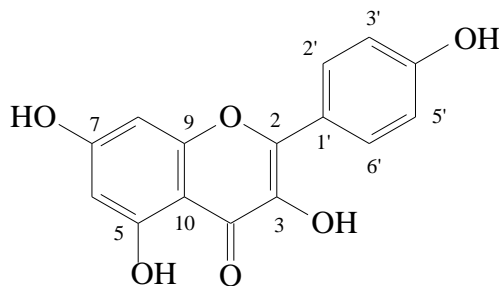
sl=singleto largo

Tabela 24- Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C para clitoriacetal (**2**) e 6-desoxiclitoriacetal (**3**) [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

C	Rotenoides isolados		Dados da literatura*	
	(2)	(3)	(2)	(3)
1	109,1	109,2	108,9	109,4
1a	108,7	108,2	107,6	108,3
2	144,2	144,0	144,8	143,9
3	151,7	151,3	151,8	151,3
4	101,8	101,1	101,8	101,1
4a	148,0	148,3	147,9	148,3
6	91,4	63,6	91,4	63,6
6a	74,5	75,5	76,9	75,5
7a	160,8	161,6	160,8	161,5
8	94,6	94,5	94,5	94,2
9	169,0	169,0	169,0	168,9
10	95,7	95,6	95,8	95,4
11	164,3	164,3	164,2	164,2
11a	101,0	100,1	99,9	100,0
12	193,3	195,0	194,1	194,9
12a	69,6	66,9	69,5	66,9
2-OMe	56,2	56,3	55,8	56,3
3-OMe	55,7	55,8	56,3	55,6
9-OMe	55,7	55,8	55,8	55,6

*SILVA, 1998a (CDCl_3 , 50MHz)

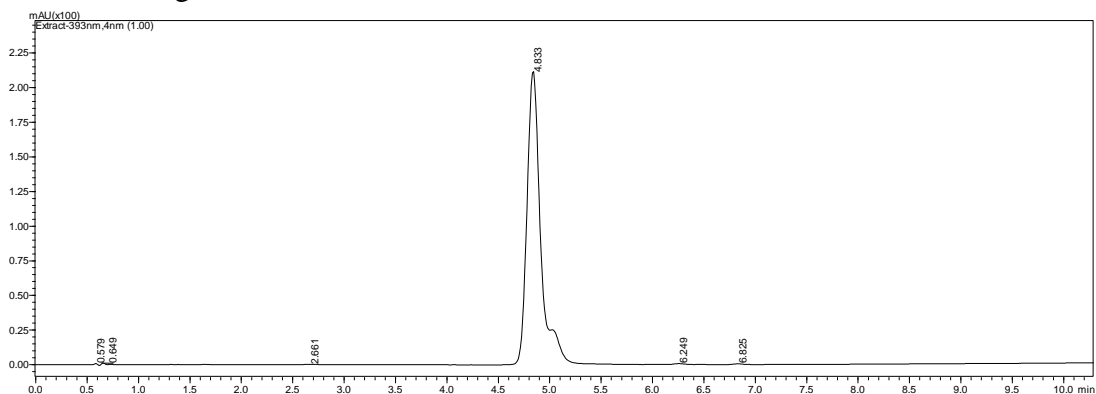
5.6 IDENTIFICAÇÃO DO CANFEROL



A fração PeCC3C, caracterizada como sendo o canferol (6), apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em MeOH. Apresentando uma única mancha na CCDC e um único pico no cromatograma obtido pela análise por CLAE-DAD (Figura 37).

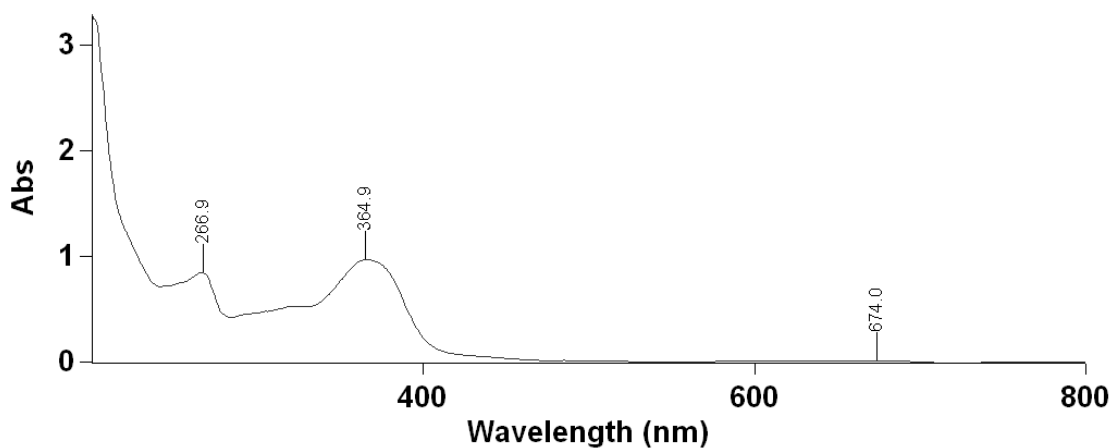
O espectro de UV/Vis da fração dissolvida em MeOH, com $\lambda_{\text{máx.}} = 266,9\text{nm}$ e $364,9\text{nm}$, sugere a presença de flavonoide (Figura 38).

Figura 37- Cromatograma do canferol



Sistema em gradiente de 45-100% MeOH e ácido fórmico 0,2 %, 5 μL de injeção, fluxo 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna Dionex C_{18} 5 μm , 120 \AA , 2.1x100mm

Figura 38- Espectro no UV/Vis do canferol



No espectro de RMN de ^1H da fração (Figura 39), foi possível observar sinais em δ 1-2,5 referentes aos hidrogênios alquílicos presentes como impurezas, além de um multipletto em δ 3,3 referente ao solvente deuterado.

Observa-se presença de sinais na região de hidrogênios ligado a carbonos aromáticos, onde pode-se destacar dois dubletos em δ 6,19 (1H, $J=2,1$ Hz) e δ 6,41 (1H, $J=2,1$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, com acoplado em *meta*, indicando anel tetrasubstituído nas posições 5,7,9,10, característico de anel-A de flavonoide. Os duplos dubletos em δ 6,93(2H, $J=6,8$ e $6,9\text{Hz}$) e 8,09 (2H, $J=8,0$ e $8,3\text{Hz}$) são referentes aos hidrogênios equivalentes H-3',5' e H-2',6', com intensidade maior, revelando anel-B, característico de flavonoide 1',4'-dissubstituído. Já o singlete presente em δ 3,64 é característico de hidrogênio de OH-3 típico de flavonol, que após comparação com dados da literatura (ITOH, 2009), sugere tratar-se do canferol.

A presença da dupla ligação (entre C-2 e C-3) e átomos de oxigênios próximos, torna os hidrogênios H-2',6' mais desprotegidos que os H-3',5' (Figura 40, página 86).

Figura 39- Espectro de RMN de ^1H do canferol [300 MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})$]

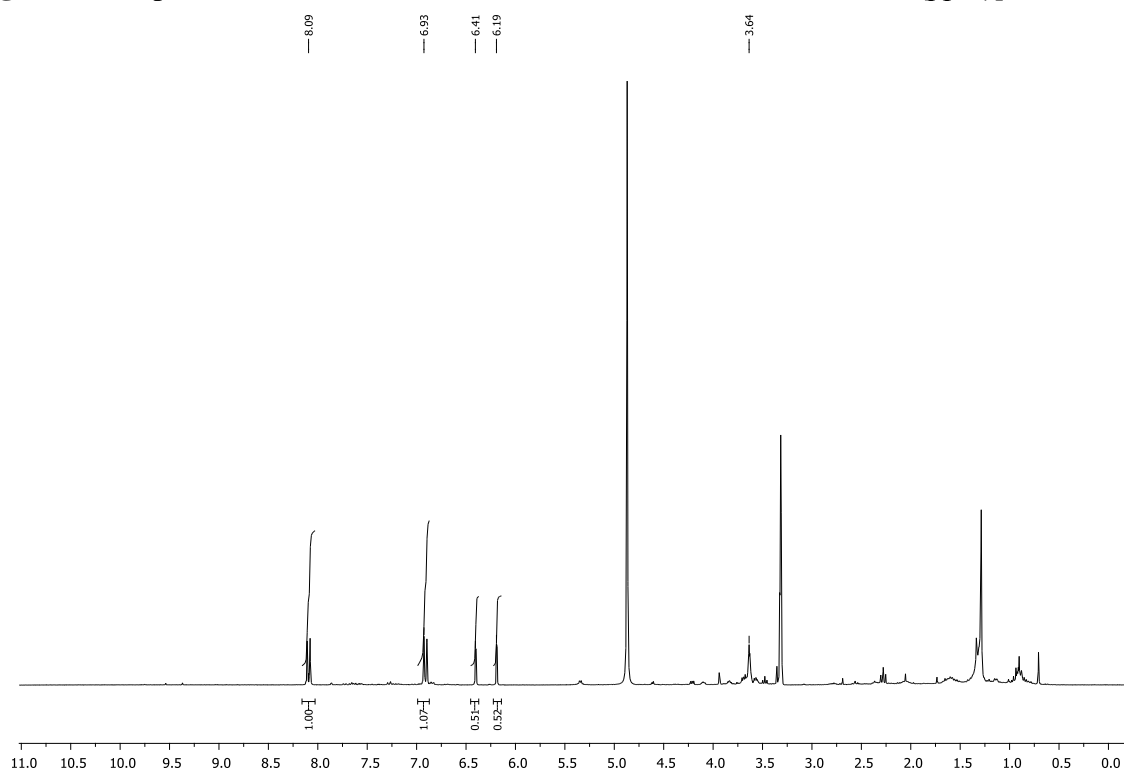
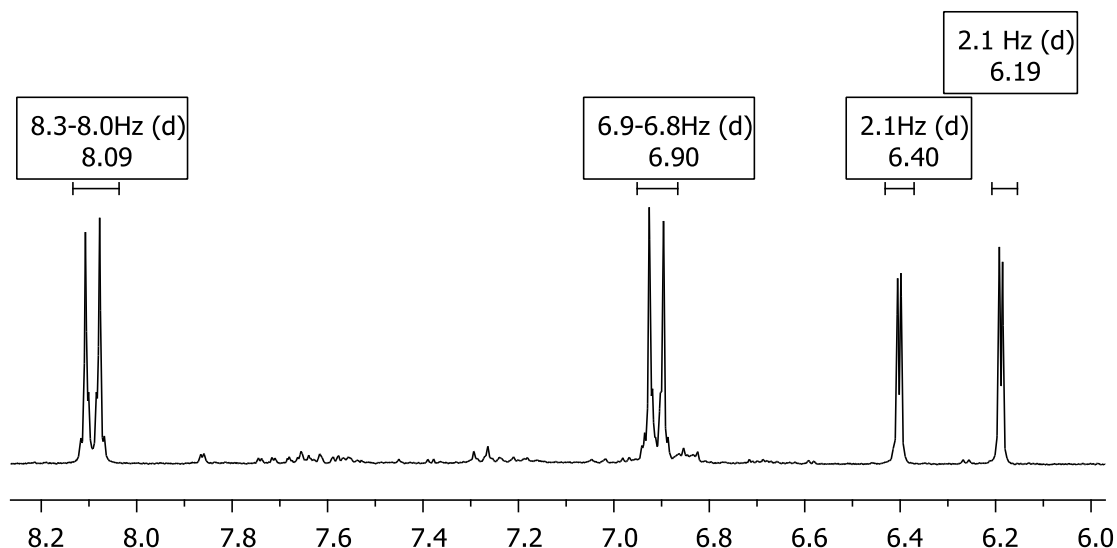


Figura 40- Ampliação do espectro de RMN de ^1H do canferol [300 MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})$]

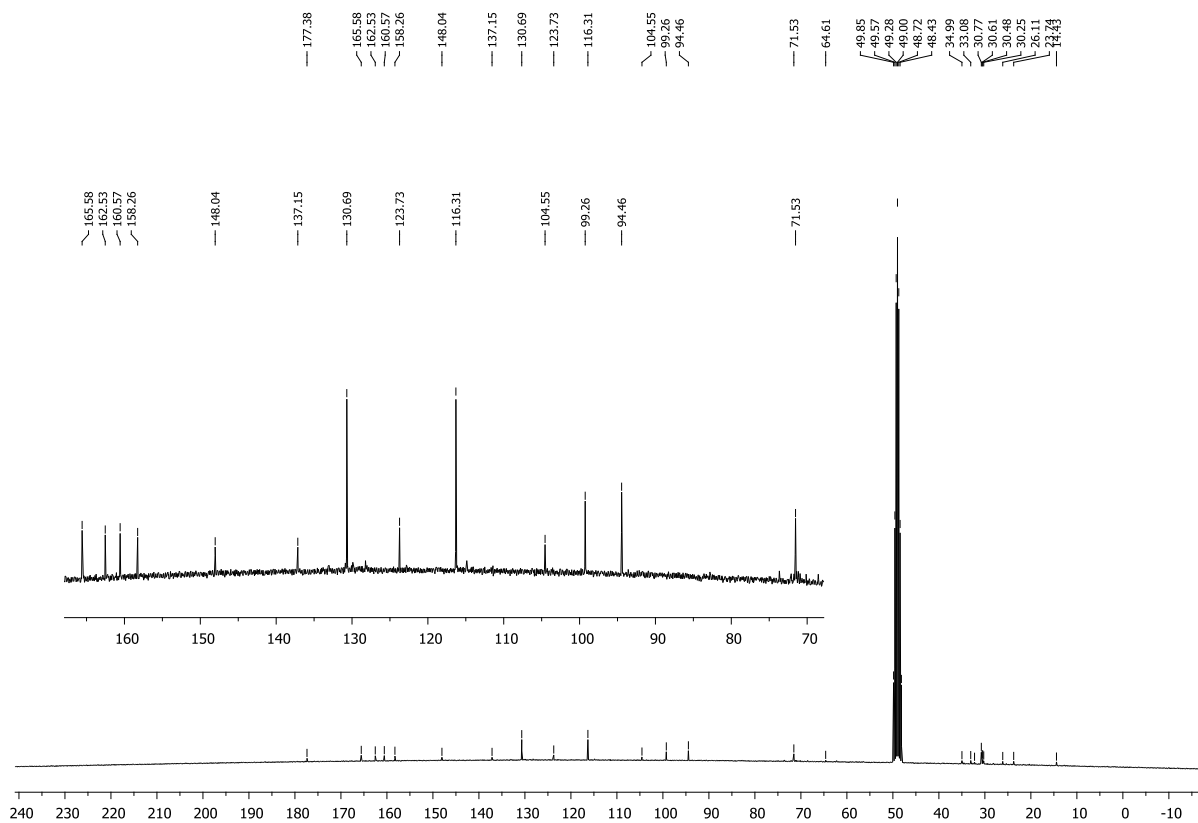


O espectro RMN de ^{13}C (Figura 41, página 87) apresentou 13 sinais, sendo dois deles referentes às sobreposições de carbonos equivalentes. Através de comparação dos dados obtidos com os dados de RMN ^{13}C da literatura (AGRAWAL, 1989), confirmando esqueleto carbônico semelhante ao canferol. O esqueleto do flavonol pode ser diferenciado dos outros esqueletos de flavonoides, pelo deslocamento dos carbonos no anel-C, que são distintos. No flavonoide do tipo flavonol, os sinais no espectro de RMN de ^{13}C dos carbonos C-2, C-3 e C-4 apresentam deslocamentos característicos de flavonol após comparação com dados da literatura, apresentando sinais em δ 148,04, δ 137,15 e δ 177,38 (AGRAWAL, 1989).

Através das análises dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° , foi possível confirmar que os valores δ 130,69 e 116,31 apresentam maior intensidade, indicando sinais equivalentes, na região de carbonos aromático não oxigenados C-2',6' e C-3',5'. E em δ 94,46, δ 99,26, δ 104,55 e 123,73 correspondentes aos carbonos C-8, C-6, C-10 e C-1'

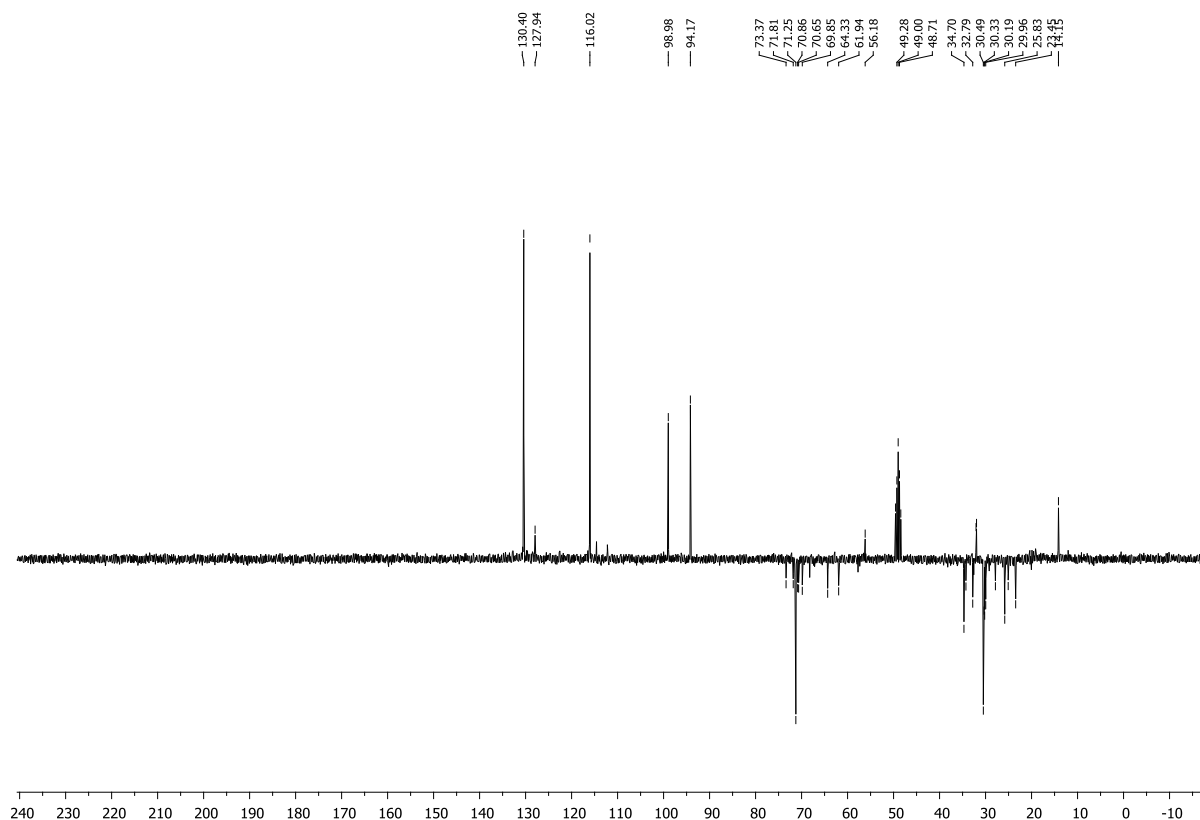
Enquanto que os carbonos aromáticos oxigenados C-5, C-4', C-7 e C-9, são encontrados em δ 158,26, δ 160,57, δ 165,58 e δ 162,53 (Figura 41, página 87).

Figura 41- Espectro de RMN de ^{13}C do canferol [75 MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})$]



No espectro de DEPT 135° da fração PeCC3C, foi possível observar apenas sinais positivo de CH em δ 130,69 , δ 116,31, δ 94,46 e 99,26. Os sinais em negativo são referentes aos sinais CH_2 dos hidrocarbonetos presentes como impureza (Figura 42, página 88).

Figura 42- Espectro DEPT 135° do canferol [75 MHz, Metanol-d₆, δ(ppm)]



Pelo espectro de ^1H - ^1H COSY, foi possível observar as correlações entre os hidrogênios mais próximos. Onde o H-6 acopla com o H-8 e os hidrogênios H-2',6' acoplam com os hidrogênios H-3',5', respectivamente. Essas informações comprovam que a fração estudada trata-se do flavonol canferol (Figuras 43 e 44, página 89).

Figura 43- Correlações do canferol [Metanol-d₆, δ(ppm)]

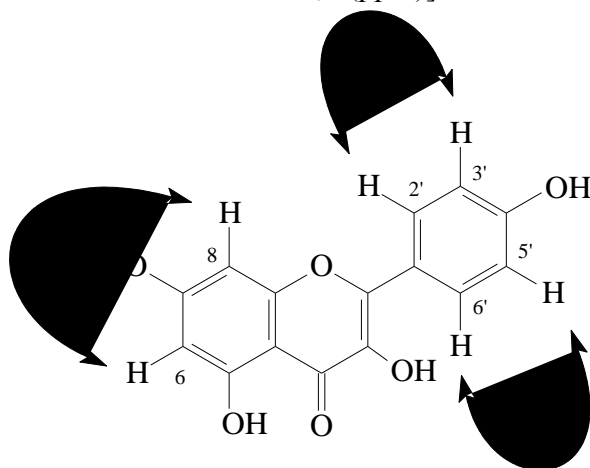
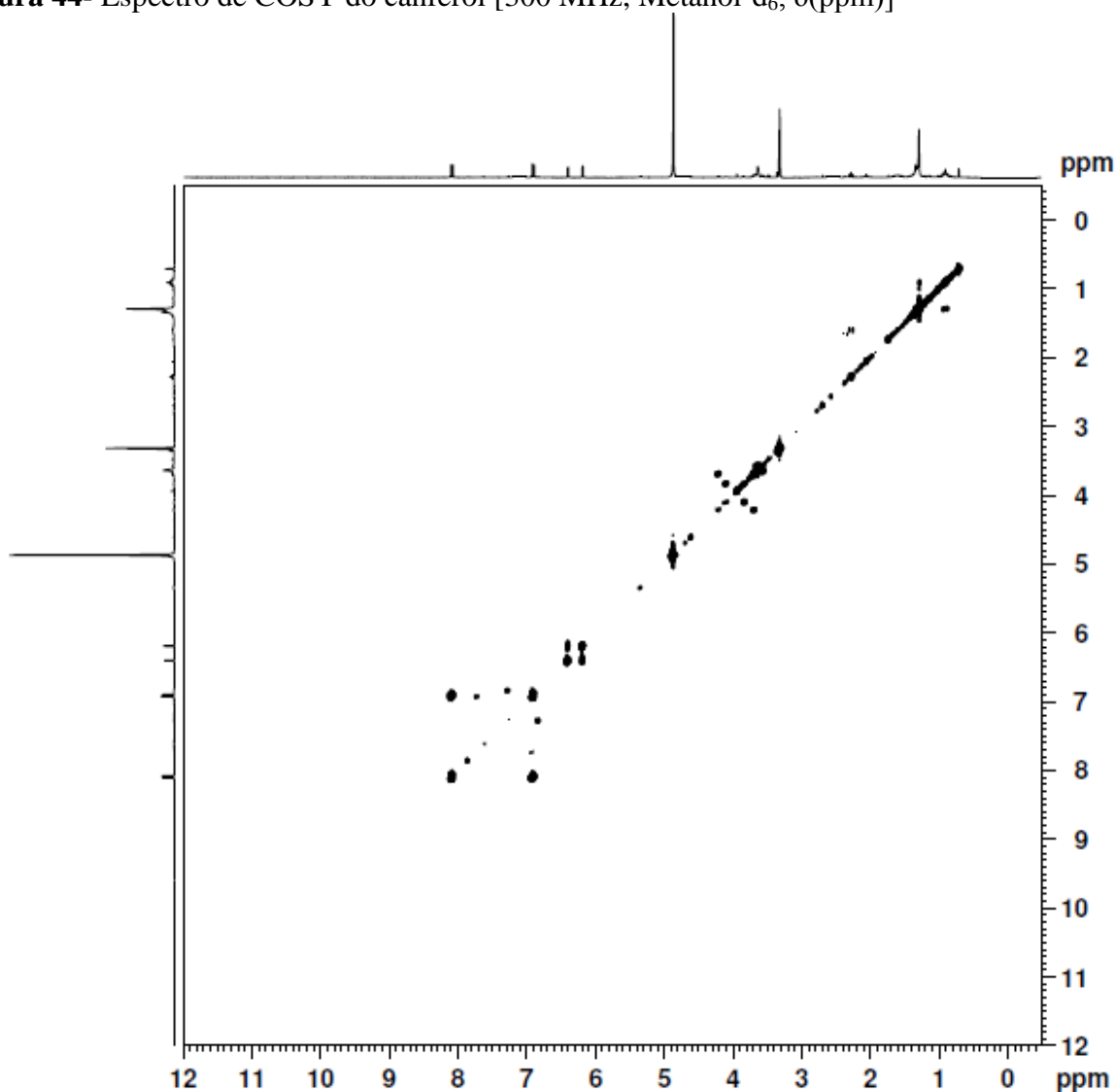
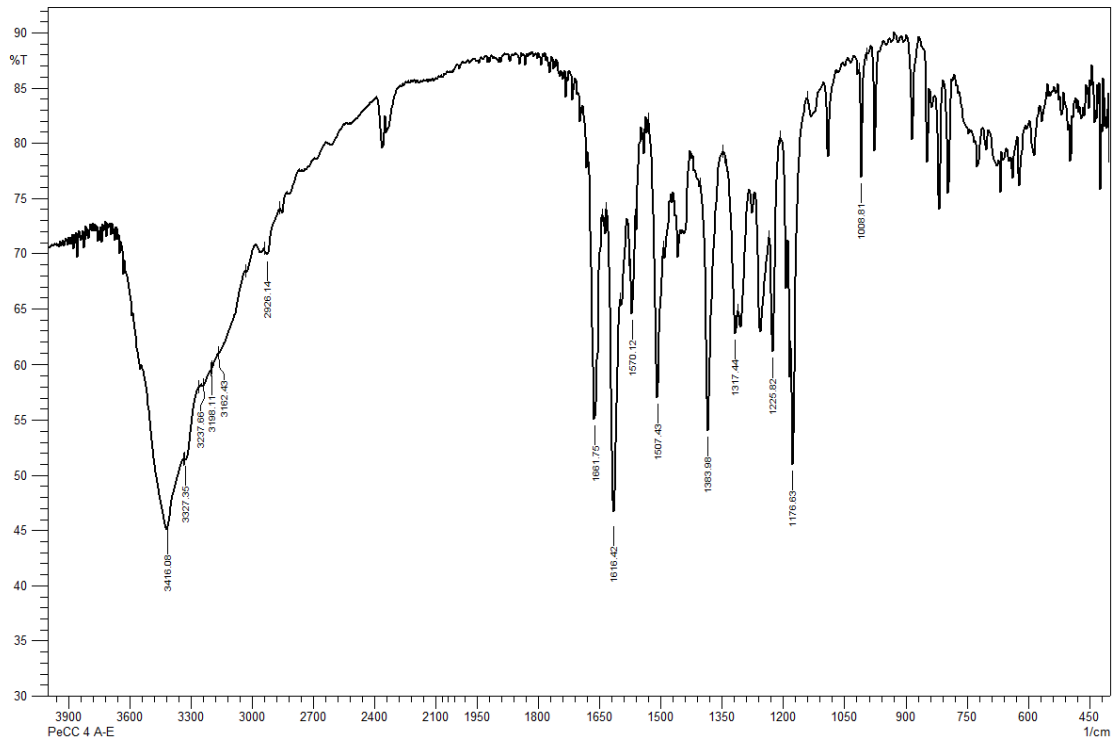
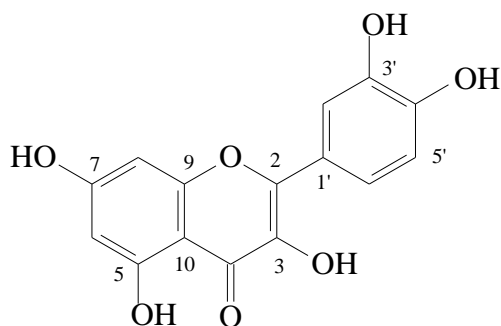


Figura 44- Espectro de COSY do canferol [300 MHz, Metanol-d₆, δ(ppm)]

Analisando os dados no IV da fração PeCC3C (Figura 45, página 90), é possível destacar bandas de estiramento em 3416cm^{-1} relacionadas a presença de ligação OH fenólico que pode ser diferenciada das dos alcoóis devido a intensidade aguda, banda em $3237\text{-}3162\text{cm}^{-1}$ relacionadas a presença de ligação C-H ($\nu_{\text{C-H}}$), banda intensa em 1661cm^{-1} associada a deformação axial de ligação C=O, sugerindo que a carbonila é de cetona, com interação intramolecular, devido a redução da frequência observada. Além de bandas em $1507, 1383\text{ cm}^{-1}$ referentes a deformação axial de ligação C=C de anel aromático ($\nu_{\text{C=C}}$).

Figura 45- Espectro no IV do canferol em pastilha de KBr

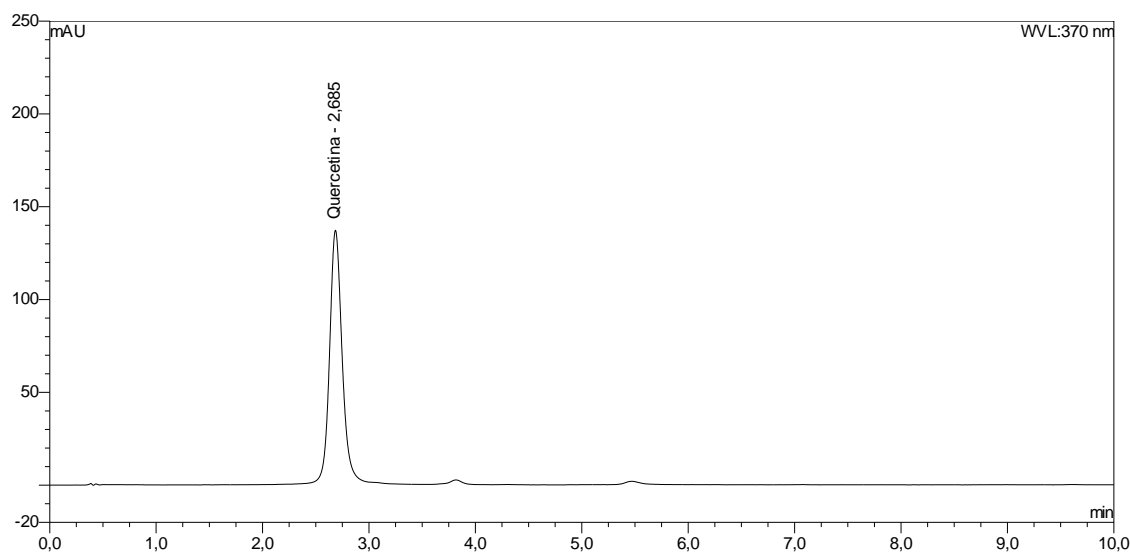
5.7 IDENTIFICAÇÃO DA QUERCETINA



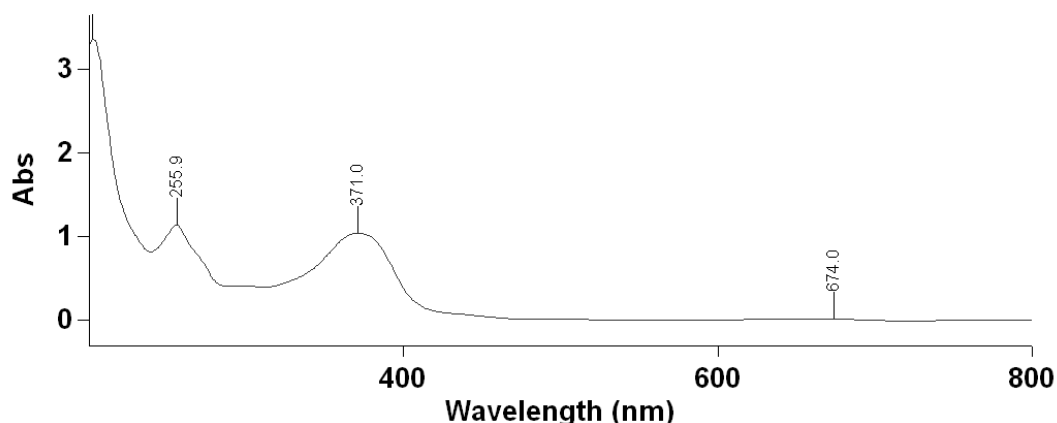
A fração PeCC4N, identificada como sendo a quercetina (7), apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em MeOH, a fração revelou uma única mancha na CCDC e um único pico na análise por CLAE-DAD (Figura 46).

O espectro no UV/Vis da fração dissolvida em MeOH, indicou $\lambda_{\text{máx.}} = 255,9\text{nm}$ e 371nm , característico de flavonol (Figura 47, página 92).

Figura 46- Cromatograma da quercetina



Sistema em gradiente de 45-85% MeOH e ácido fórmico 0,2 %, 5 μ L de injeção, fluxo 0,8 mL.min⁻¹, coluna Dionex C₁₈ 5 μ m, 120Å, 2.1x100mm

Figura 47- Espectro no UV/Vis da quercetina

O espectro de RMN de ^1H (Figura 48, página 93) da fração PeCC4N, apresentou sinais entre δ 1-1,5, referentes aos hidrogênios alquílicos presentes como impurezas, além de um multipletto em δ 2,5 referente ao solvente deuterado e em δ 3,2 como da água.

Observa-se uma grande quantidade de sinais na região de hidrogênios aromáticos, assim como dois singletos em δ 12,48, referente ao OH fenólico com interação intramolecular com carbonila (OH-5), e outros hidrogênios de hidroxilas, entre δ 9-9,5 referentes às OH-7, OH-5' ou OH-3'.

Pode-se destacar sinais aromáticos, como dois dubletos referentes aos hidrogênios H-8 e H-6, em δ 6,18 (1H, $J=2$ Hz) e δ 6,4 (1H, $J=2$ Hz), acoplados na posição *meta*, indicando que o anel aromático é tetrasubstituído, característico de anel-A de flavonoides. Além desses sinais, foram observados outros, atribuídos aos hidrogênios aromáticos do anel B trissubstituído. A distribuição dos hidrogênios no anel-B, pode ser entendida pelo forma de desdobramento dos hidrogênios. Foram observados dois dubletos, um em δ 6,88 (1H, $J=8,5$ Hz), referente a um hidrogênio H-5' acoplado na posição *orto*, e outro em δ 7,67 (1H, $J=2,2$ Hz) acoplado na posição *meta*, referente ao H-2', além do duplo dubleto em δ 7,53 (1H, $J=2,2$ e 8,5Hz) do H-6', indicando que o anel-B é substituído nas posições 1',3' e 4' (Figura 49, página 93).

Comparando esses valores nos deslocamentos químicos do espectro de RMN ^1H com dados da literatura, foi possível confirmar que a fração PeCC4N trata-se do flavonol quercetina (Tabelas 25 e 26, páginas 109 e 110).

Figura 48- Espectro de RMN de ^1H da quercetina [500 MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})$]

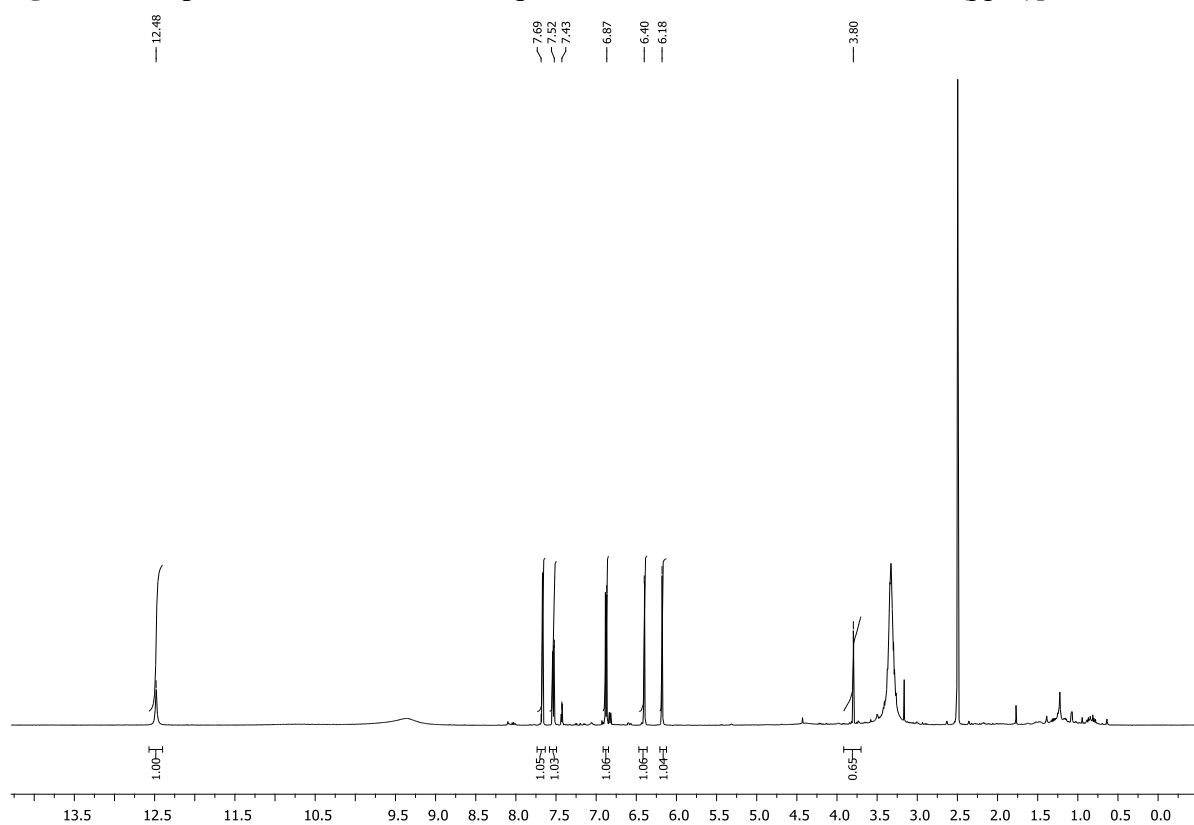
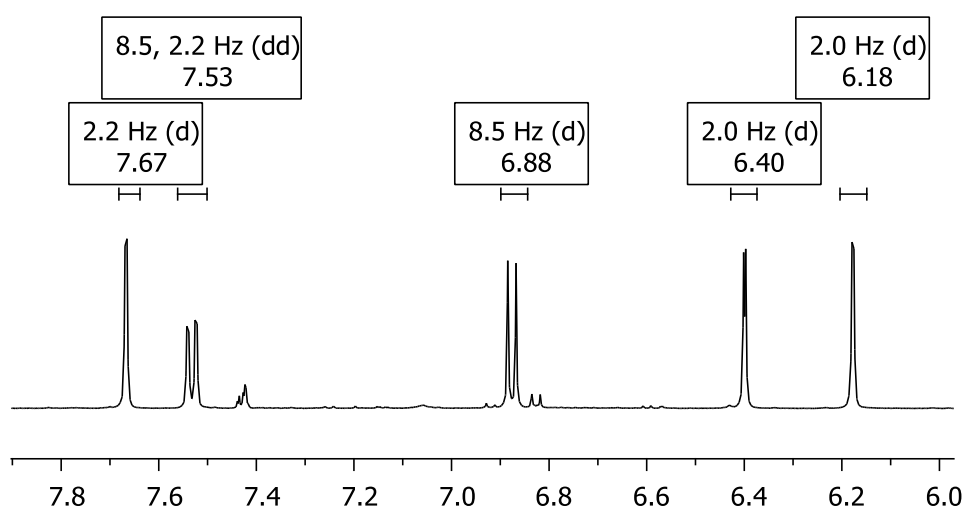


Figura 49- Ampliação do espectro de RMN de ^1H da quercetina [500 MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})$]



Pelo espectro de ^1H - ^1H COSY, foi possível observar as correlações entre os hidrogênios mais próximos, onde o H-6 acopla com o H-8, os hidrogênio H-5' acopla com os hidrogênio H-6' e em menor escala, o H-2' com o H-6' (Figura 50 e 51).

Figura 50- Espectro de COSY da quercetina [500 MHz ,DMSO- d_6 , δ (ppm)]

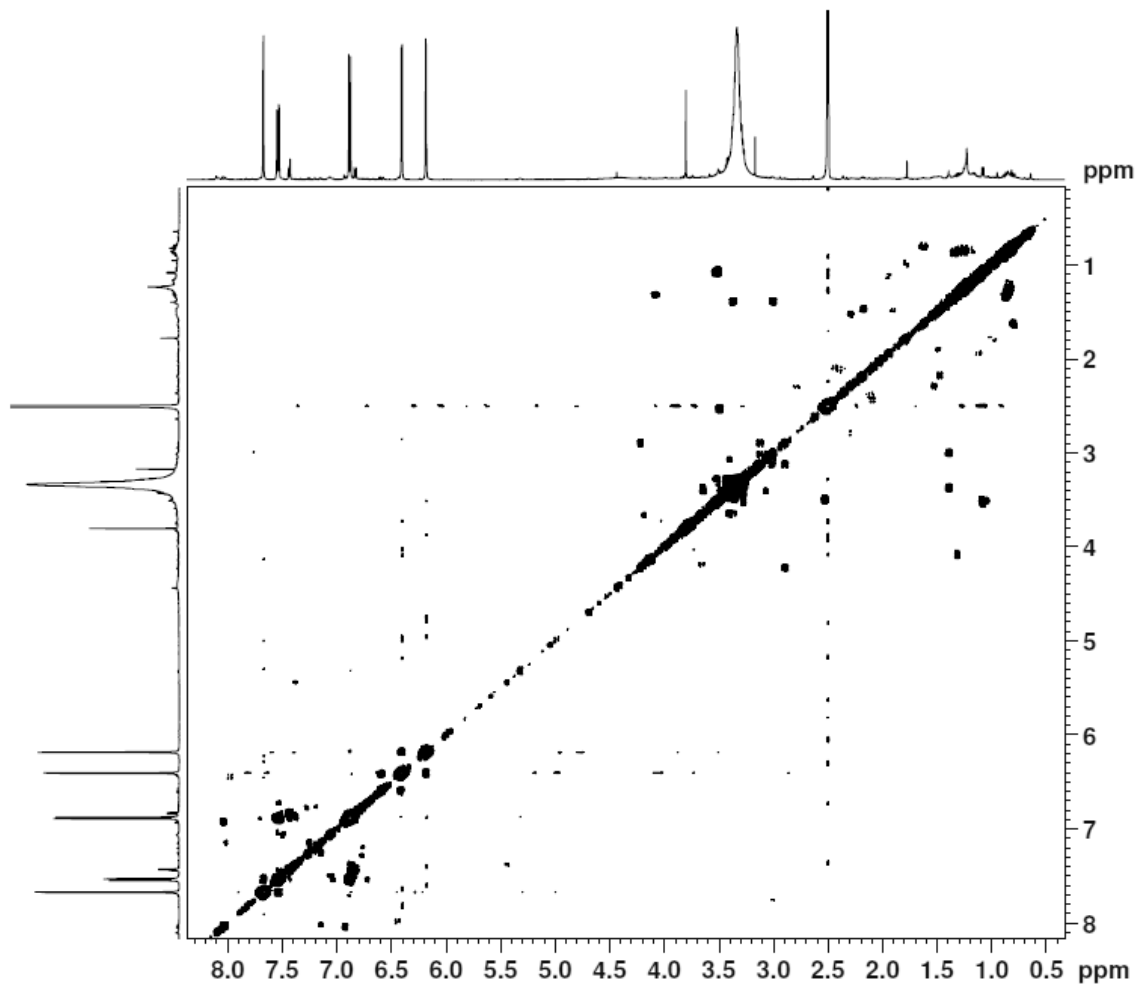
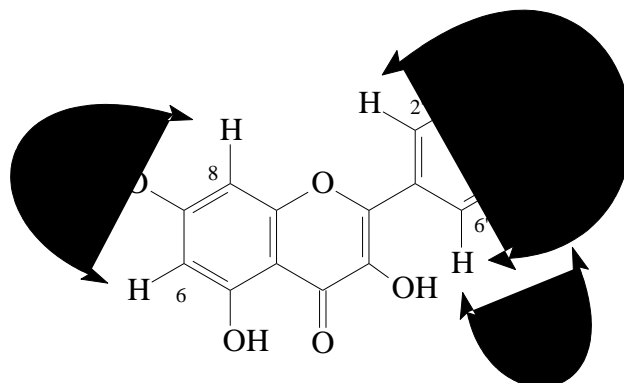
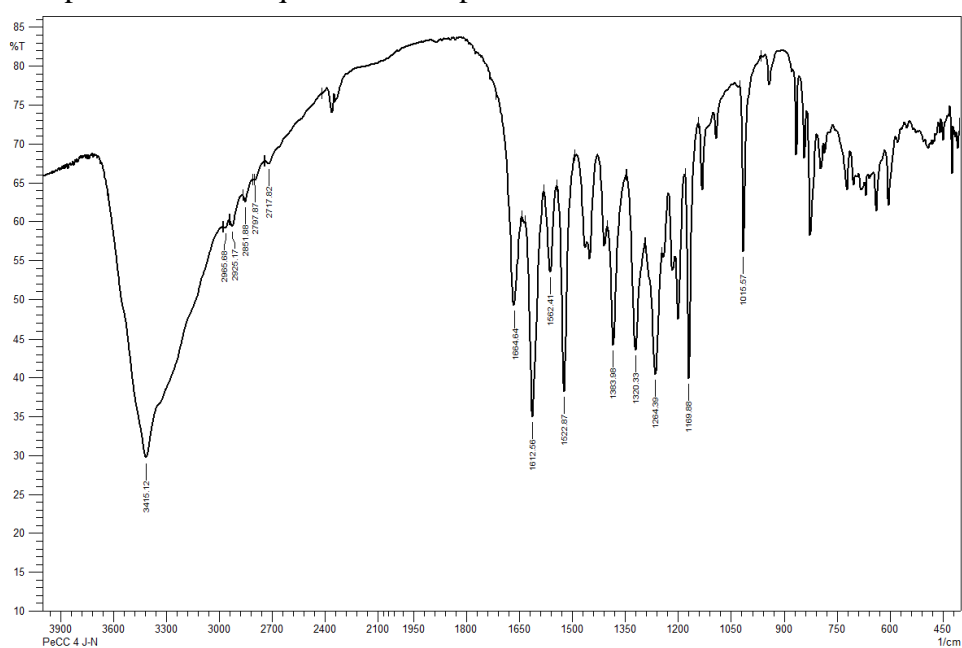


Figura 51- Correlações da quercetina [DMSO- d_6 , δ (ppm)]

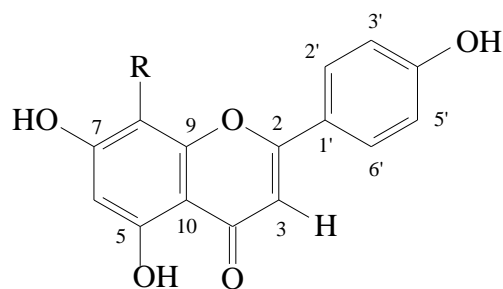


No espectro de IV da fração PeCC4N (Figura 52), foi possível destacar bandas de estiramento em 3415cm^{-1} relacionadas à presença de ligação O-H de fenólico, banda em $2965\text{-}2926\text{cm}^{-1}$ relacionadas à presença de ligação C-H ($\nu_{\text{C-H}}$), banda em 1664cm^{-1} associada à deformação axial de ligação C=O, sugerindo que a carbonila é de cetona, com interação intramolecular, devido à redução da frequência observada. Deformação angular fora do plano de hidrogênios aromáticos em 750cm^{-1} ($\nu_{\text{C-H}}$), além de bandas em 1612cm^{-1} , 1562cm^{-1} referentes à deformação axial de ligação C=C de anel aromático ($\nu_{\text{C=C}}$).

Figura 52- Espectro de IV da quercetina em pastilha de KBr



5.8 IDENTIFICAÇÃO DA VITEXINA

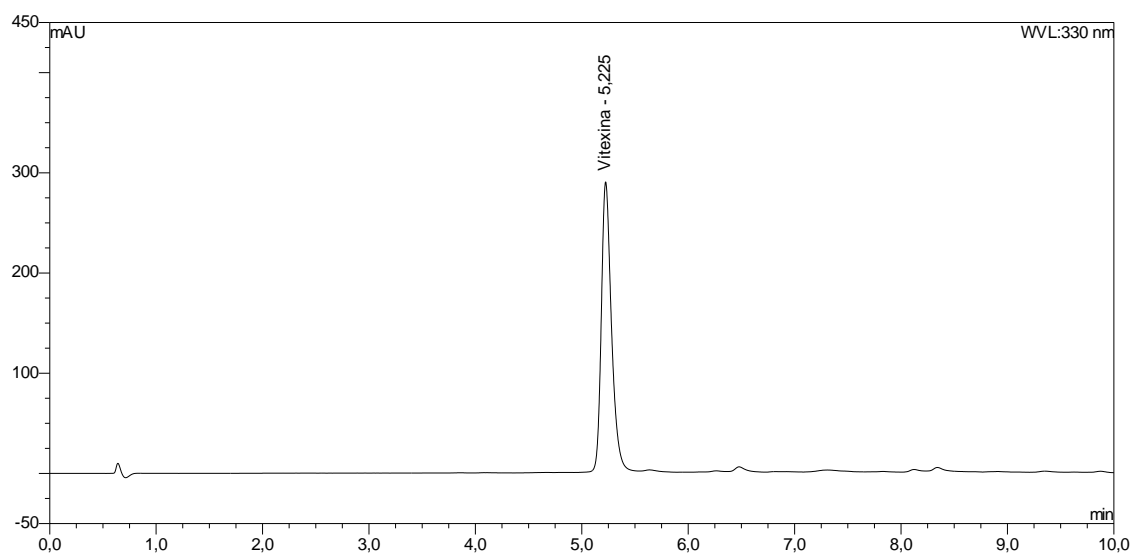


R= β -D-glicose

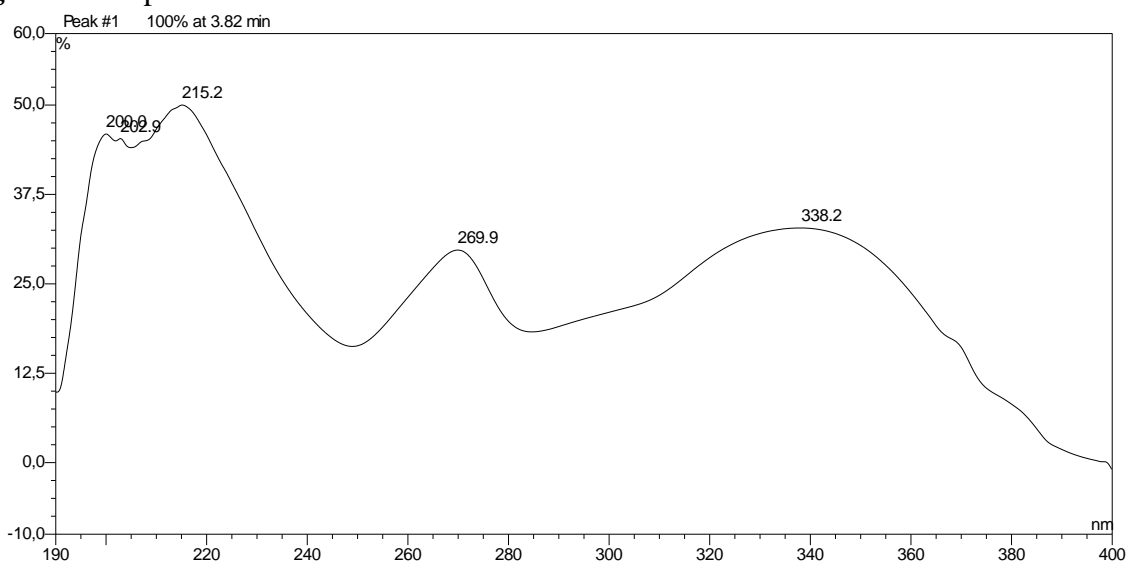
A fração RCAC26.4, identificada como sendo o flavonoide glicosilado vitexina (**8**), apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em MeOH. A fração foi analisada por CCDC, indicando uma única mancha e um único pico no cromatograma obtido por CLAE-DAD (Figura 53).

O respectivo espectro no UV/Vis da fração dissolvida em MeOH, indicou $\lambda_{\text{máx.}}$ = 215nm, 270nm e 338nm, característico de flavona (Figura 54, página 97).

Figura 53- Cromatograma do vitexina



Sistema em gradiente de 20-85% MeOH e ácido fórmico 0,2 %, 5 μ L de injeção, fluxo 0,8 mL.min⁻¹, coluna Dionex C₁₈ 5 μ m, 120Å, 2.1x100mm

Figura 54- Espectro no UV/Vis da vitexina

No espectro de RMN de ^1H (Figura 55, página 98), observa-se sinais entre δ 1-1,5 de hidrogênios alquílicos presentes como impurezas, além de um multipletto em δ 2,5 do solvente deuterado. Observa-se que o flavonoide é do tipo glicosilado, devidos aos sinais na faixa entre δ 6-8,5 e de sinais do glicosídeo entre δ 3-5. O singletto em δ 13,14 foi indicativo da presença de hidrogênio de OH com interação intramolecular com carbonila, característico de flavonoides hidroxilado na posição 5. Também foram observados dois singlettos em δ 6,23 e 6,72, atribuído aos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente, indicando que o anel-A do flavonoide é pentasubstituído e que o anel-C é típico de flavona (ALVES, 2012).

Os dubletos em δ 6,9 (2H, $J=11\text{Hz}$) e 7,99 (2H, $J=7\text{Hz}$) são referentes, respectivamente, aos hidrogênios H-3',5' e H-2',6', de intensidades maiores. A presença desses sinais equivalentes indicam presença de anel-B, 1',4'-dissubstituído.

Para a identificação da unidade glicosídica, observou-se a faixa de deslocamento em δ 3-3,9 além do dubletto em δ 4,7 (1H, $J=10\text{Hz}$) atribuído ao hidrogênio anomérico H-1", β -glicosídeo (Figura 56, página 99).

Ainda referente ao espectro de RMN de ^1H , observa-se que o valor de deslocamento do hidrogênio em δ 6,23 (atribuído ao H-6), indica que o glicosídeo encontra-se na posição C-8, uma vez que para o glicosídeo encontrar-se na posição C-6, o deslocamento do hidrogênio H-8 deveria ser maior, próximo de δ 6,6 (TANAKA, 2005; ALVES, 2012).

Através da análise dos dados de RMN de ^{13}C (Figura 57, página 100), foi possível diferenciar a ligação do açúcar como sendo C-glicosídica, devido ao sinal do carbono anomérico em δ 69 característico de ligação C-glicosídica que fica na região entre δ 60-82,

diferentemente dos *O*-glicosídeos, onde este carbono fica na região entre δ 98-112 (ALVES, 2012).

A posição do glicosídeo em C-8 no anel-A, pode ser confirmada pelo seu deslocamento característico em δ 104,4 e do C-6 em δ 98,5 (ALVES, 2012).

Os sinais restantes no espectro de RMN de ^{13}C confirmam o esqueleto de flavonol 1',4'disubstituído no anel-B, através dos valores em δ 115,85 e 128,8 com intensidade maior, indicando que são equivalentes, atribuídos aos carbonos C-3',5' e C-2',6', respectivamente. Além dos sinais em δ 121,57 e em δ 161,22 correspondentes aos carbonos C-1' e C-4'. E sinais em δ 102,29, δ 156, δ 160,36 e δ 181,8 atribuídos aos carbonos C-3, C-9, C-5 e C-4 (ALVES, 2012).

O C-glicosídeo foi caracterizado como glicose, devido aos sinais em δ 61,27, δ 63,07, δ 70,92, δ 70, δ 78,71 e δ 81,77 atribuídos aos carbonos C-6", C4", C-2", C"-1, C-3" e C-5". A atribuição foi realizada através de comparação dos dados com os descritos na literatura (AGRAWAL, 1989), dessa forma, a substância foi identificada como vitexina (8) (Tabelas 25 e 26, páginas 109 e 110).

Figura 55- Espectro de RMN de ^1H da vitexina [500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]

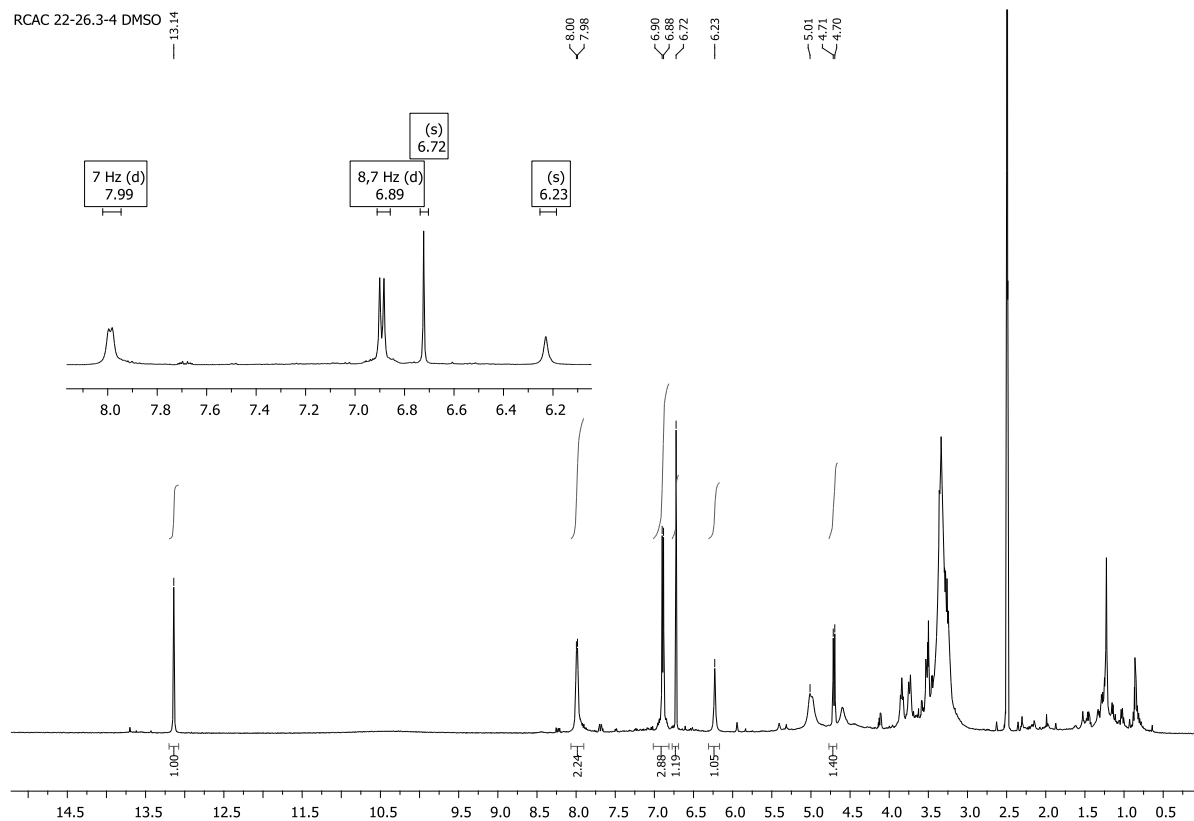
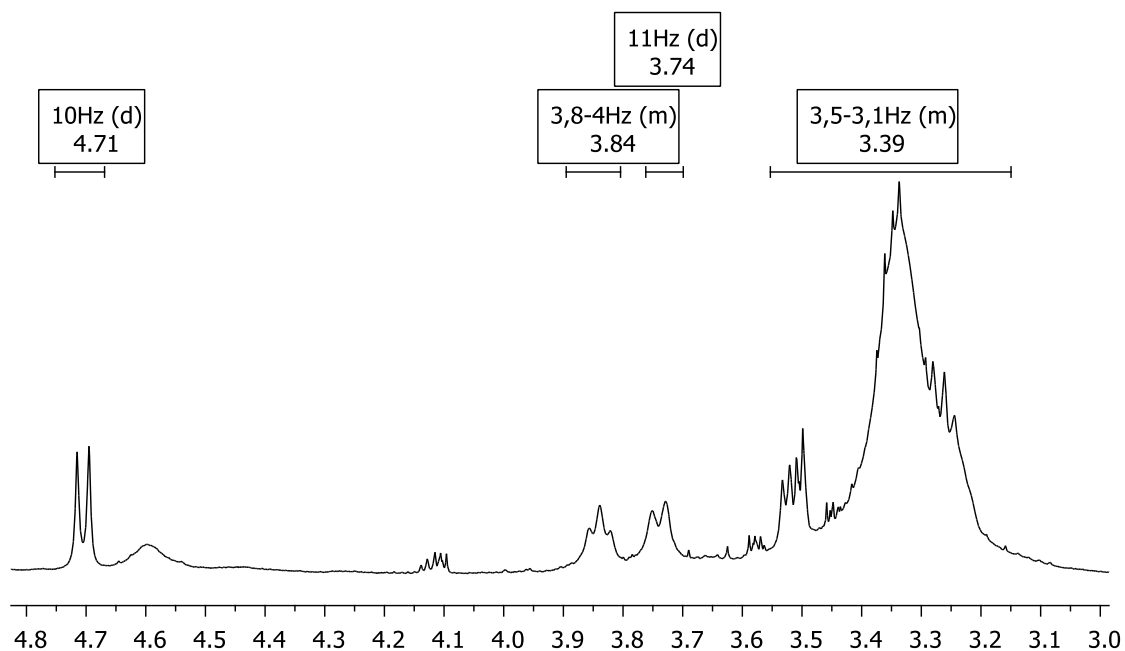


Figura 56- Ampliação do espectro de RMN de ^1H do vitexina [500 MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})$]



No espectro de ^1H - ^1H COSY, foi possível observar poucas correlações, como os acoplamentos dos hidrogênios H-2',6' com os hidrogênios H-3',5'. Essas informações comprovam o esqueleto de flavona, semelhante a apigenina (Figuras 58, 59 e 60, páginas 101, 102 e 103).

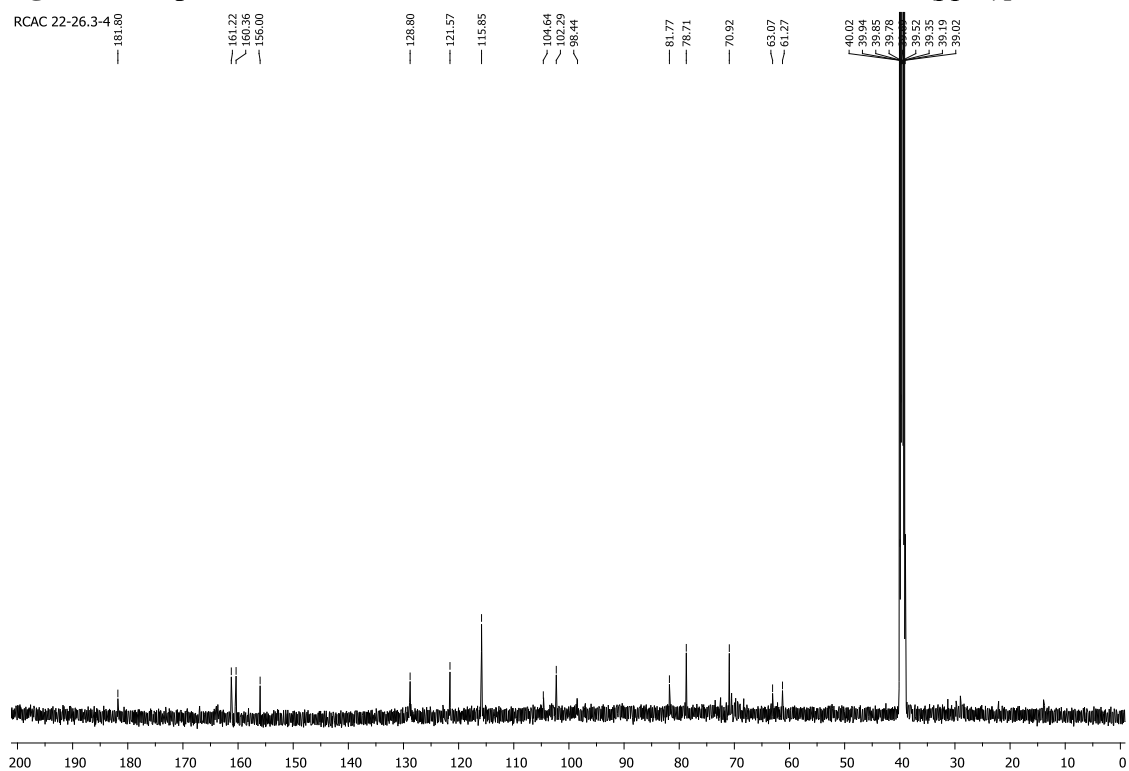
Figura 57-Espectro de RMN de ^{13}C do vitexina [125MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]

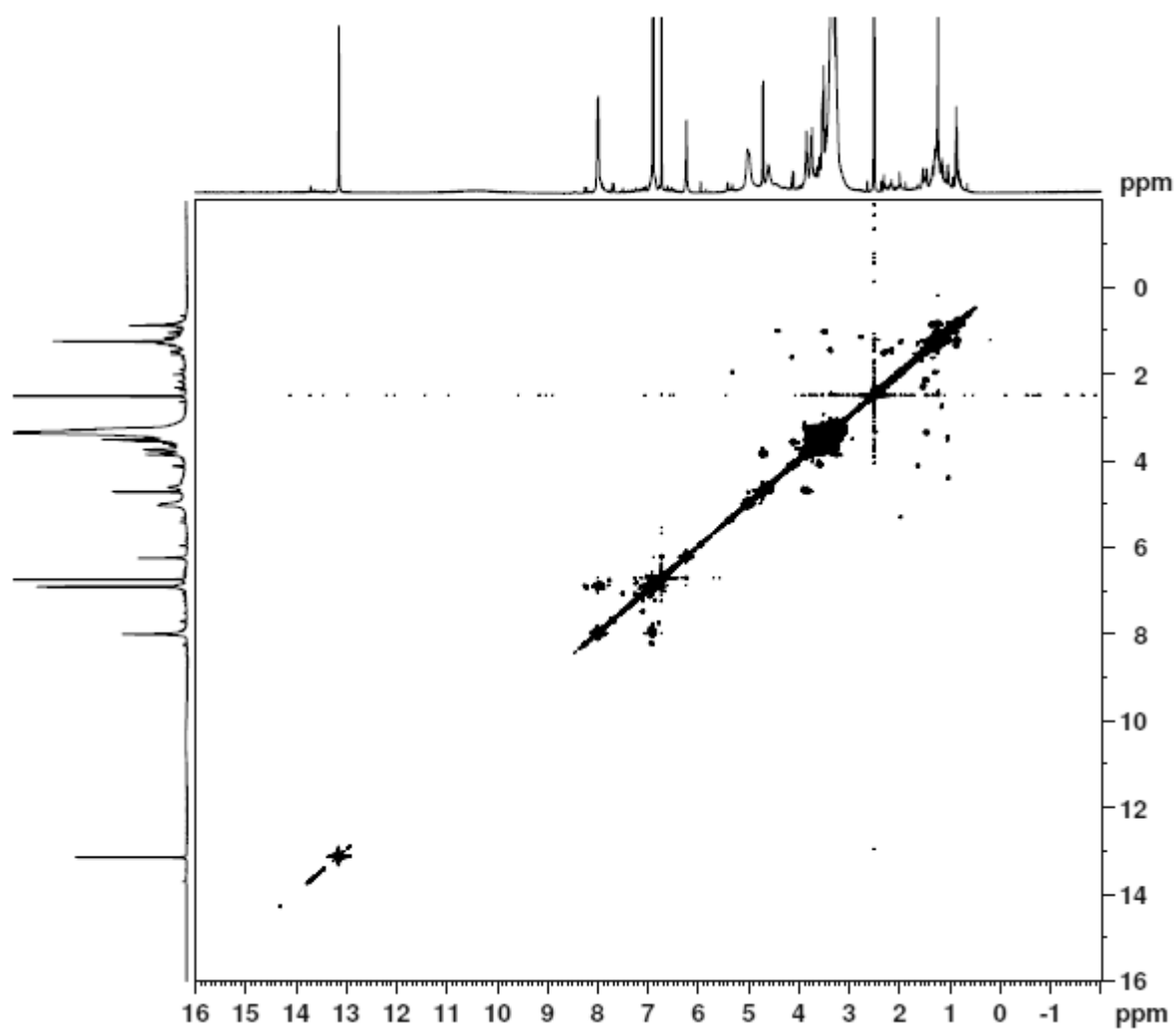
Figura 58- Espectro de COSY da vitexina [DMSO-d₆, δ (ppm)]

Figura 59- Espectro de COSY da vitexina [DMSO-d₆, δ(ppm)]

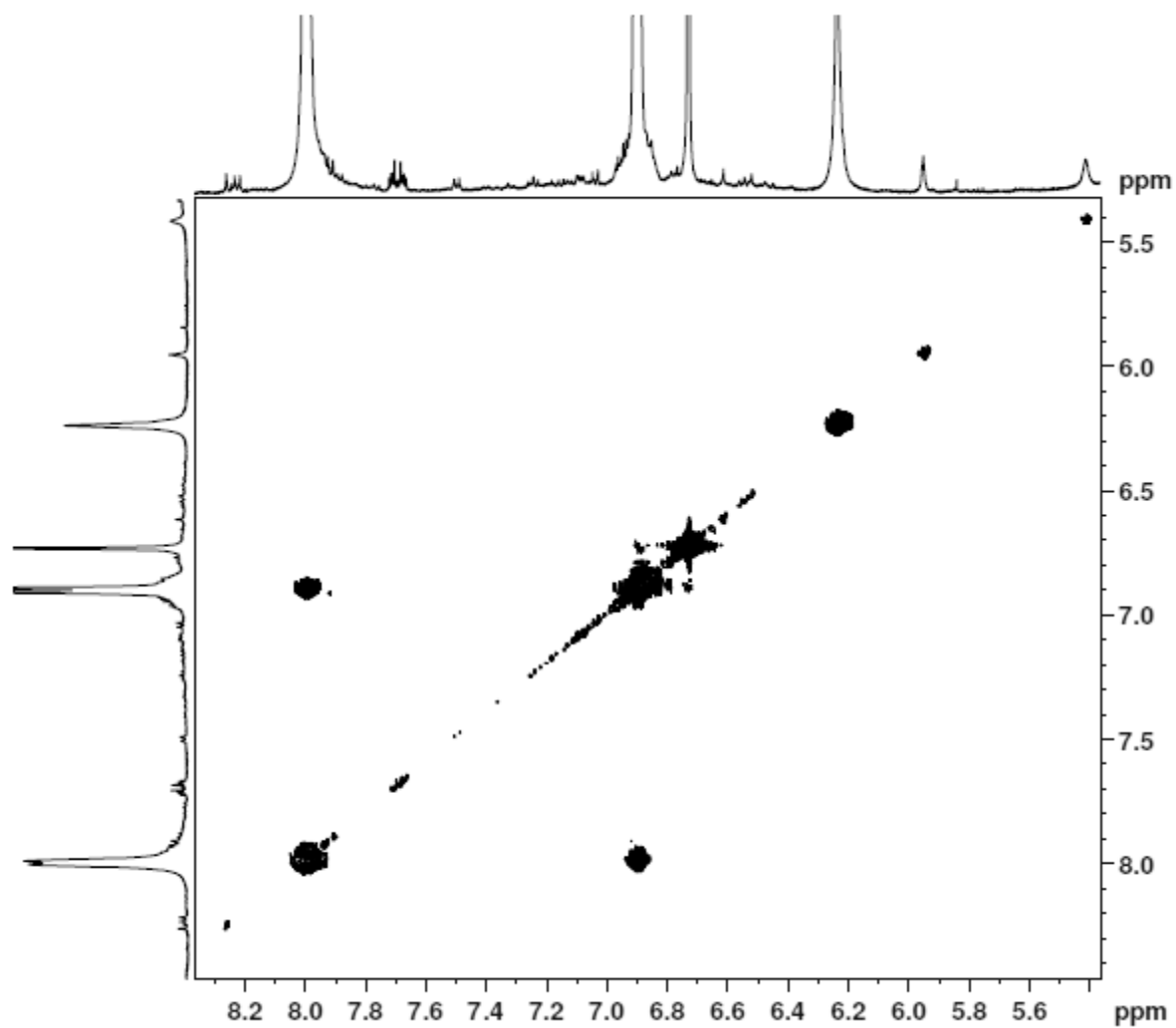
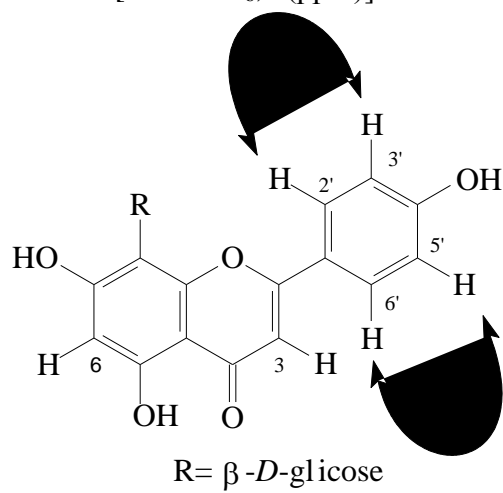
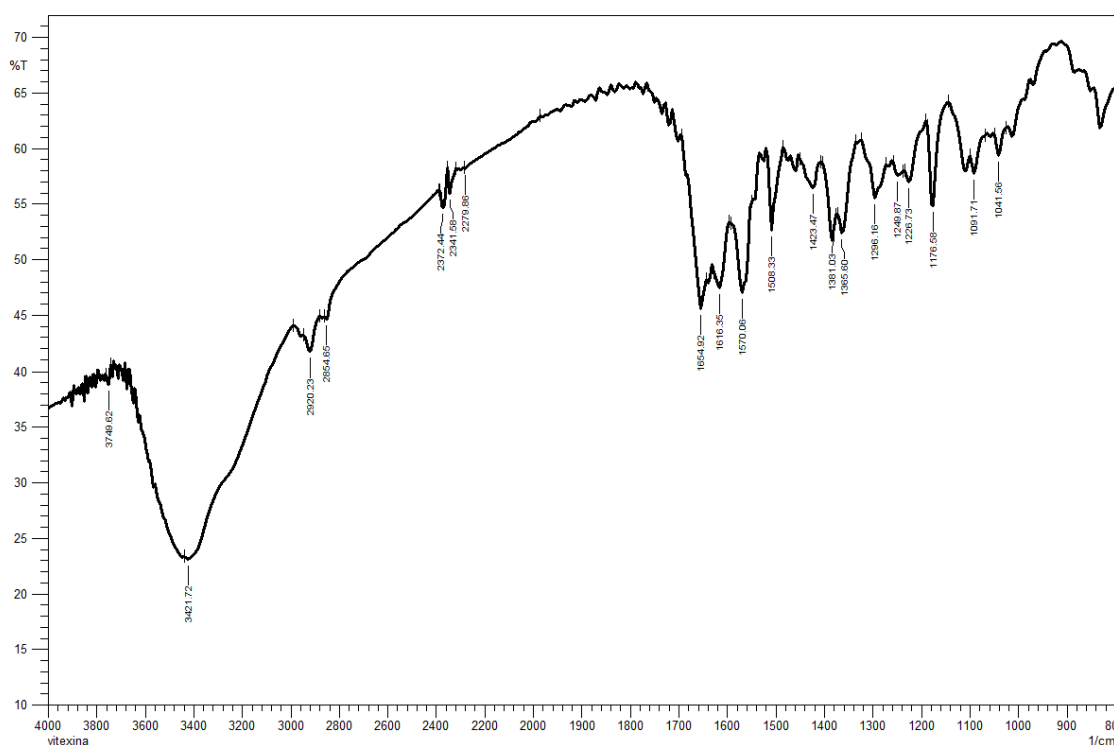


Figura 60- Correlações da vitexina [DMSO-d₆, δ(ppm)]

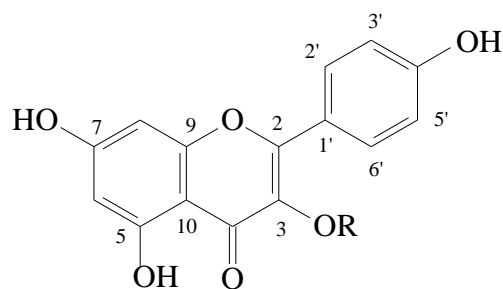


No espectro de IV da fração RAc26.4 (Figura 61), foi possível destacar bandas de estiramento em 3421cm^{-1} relacionadas à presença de estiramento da ligação O-H fenólico, bandas em $2920\text{-}2854\text{cm}^{-1}$ relacionadas à presença de ligação C-H ($\nu_{\text{C-H}}$), banda em 1654 cm^{-1} associada à deformação axial de ligação C=O, sugerindo que a carbonila é de cetona, com interação intramolecular, devido a redução da frequência observada. Além de bandas em $1616, 1570\text{cm}^{-1}$ referentes à deformação axial de ligação C=C de anel aromático ($\nu_{\text{C=C}}$).

Figura 61- Espectro no IV da vitexina em pastilha de KBr



5.9 IDENTIFICAÇÃO DA ASTRAGALINA

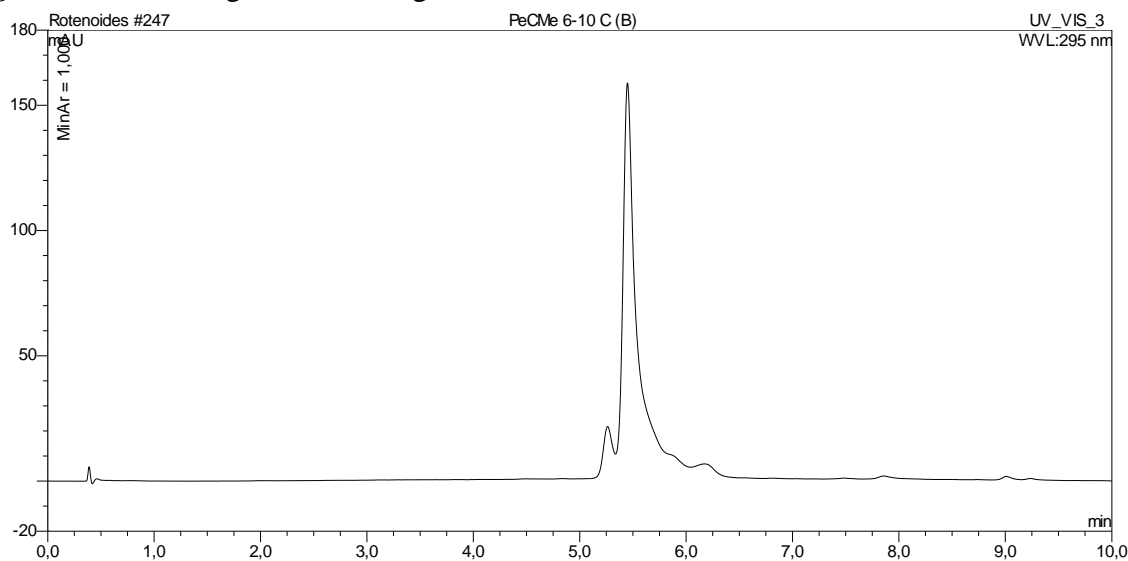


R= β -D-glicose

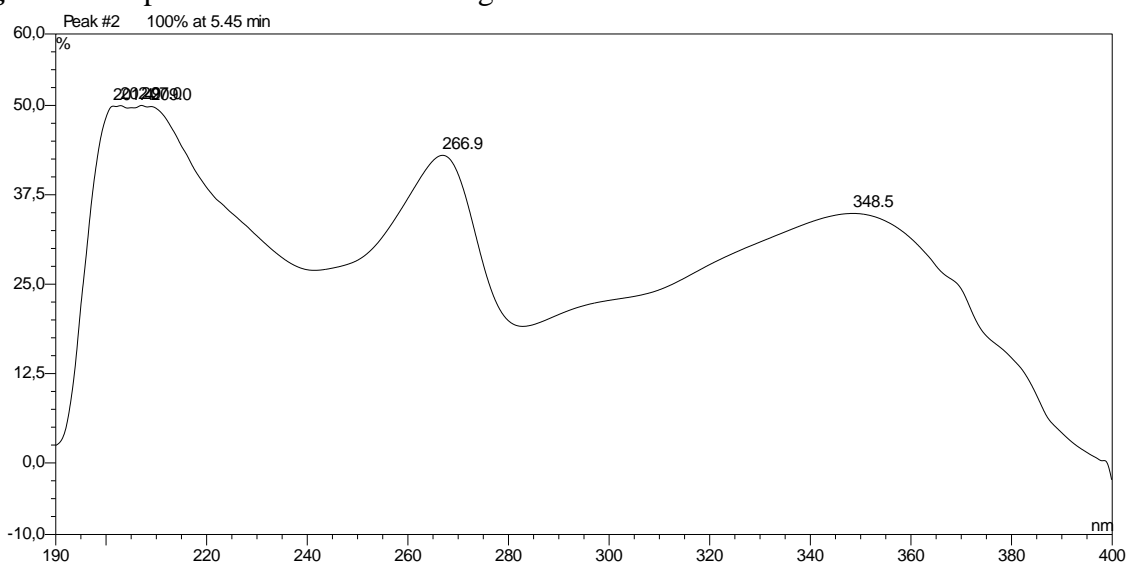
A fração PeCCMe10(B), identificada como sendo astragalina (**9**), apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em MeOH, indicando uma única mancha na CCDC e um único pico na análise por CLAE-DAD (Figura 62).

O respectivo espectro no UV/Vis da fração dissolvida em MeOH, indicou $\lambda_{\text{máx.}}$ = 220nm, 267nm e 348nm, característico de flavonoide (Figura 63, página 105).

Figura 62- Cromatograma da astragalina



Sistema em gradiente de 20-85% MeOH e ácido fórmico 0,2 %, 5 μ L vol. de injeção, fluxo 0,8 mL.min⁻¹, coluna Dionex C₁₈ 5 μ m, 120 Å, 2.1x100mm

Figura 63- Espectro no UV/Vis da astragalina

No espectro de RMN de ^1H da astragalina (**9**) (Figura 64, página 106), apresentou sinais em δ 1-2,5 referentes aos hidrogênios alquílicos presentes como impurezas.

Foram observados sinais na região de hidrogênios aromáticos, como dois dubletos referentes aos hidrogênios H-8 e H-6 em δ 6,16 (1H, $J=2$ Hz) e δ 6,35 (1H, $J=2$ Hz), indicando que o anel aromático é tetrasubstituído, característico de anel-A de flavonoide. Os duplos dubletos em δ 6,89 (2H, $J=8,4$ e $6,4\text{Hz}$) e 8,05 (2H, $J=9$ e $8,3\text{Hz}$) são referentes aos hidrogênios equivalentes H-2',6' e os hidrogênios H-3',5', devido a integração dos sinais, indicarem dois hidrogênios. A presença desses sinais equivalentes indica que o anel-B é 1',4'-dissubstituído. Dessa forma, devido as características dos sinais de RMN de ^1H , comprovam esqueleto carbônico semelhante ao esqueleto do canferol (**6**).

Além dos sinais de RMN de ^1H na região de aromáticos, observa-se também sinais de hidrogênios glicosídicos, na faixa de deslocamento entre δ 3,4-3,9, sendo o dubleto em δ 5,2 (1H, $J=7,4\text{Hz}$) atribuído ao hidrogênio anomérico H-1" do β -glicosídeo (Figura 65, página 106).

O espectro RMN de ^{13}C (Figuras 66 e 67, página 107) apresentou 21 sinais que, através de comparação com dados de RMN de ^{13}C da literatura (LEE, 2007; AGRAWAL, 1989), tornou possível a identificação da fração PeCCMe10(B) como um flavonol glicosilado. A unidade glicosídica foi identificada como sendo a glicose, pela presença do carbono oximetilênico em δ 62,64 atribuído ao C-6'', característico deste glicosídeo. Nesse espectro, ainda observa-se dois sinais referentes a sobreposições de carbonos equivalentes em δ 132,29 e 116,24 (carbonos aromático não oxigenados C-2',6' e C-3',5'), semelhante ao canferol, sinais

em δ 149,49, δ 135,39 e δ 179,37, dos carbonos C-2, C-3 e carbonila C-4, indicando que o C-3 é oxigenado. Sinais em δ 96,34, δ 101,06, δ 105,1 e 122,95 correspondentes aos carbonos C-8, C-6, C-10 e C-1'. E sinais referentes aos carbonos aromáticos oxigenados C-5, C-4', C-7 e C-9 em δ 158, 87, δ 161, 64, δ 164,45 e 162,41. Enquanto os sinais de RMN de ^{13}C referentes a unidade glicosídica pode ser observada nas tabelas 25 e 26, páginas 109 e 110.

Figura 64- Espectro de RMN de ^1H da astragalina [500 MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})$]

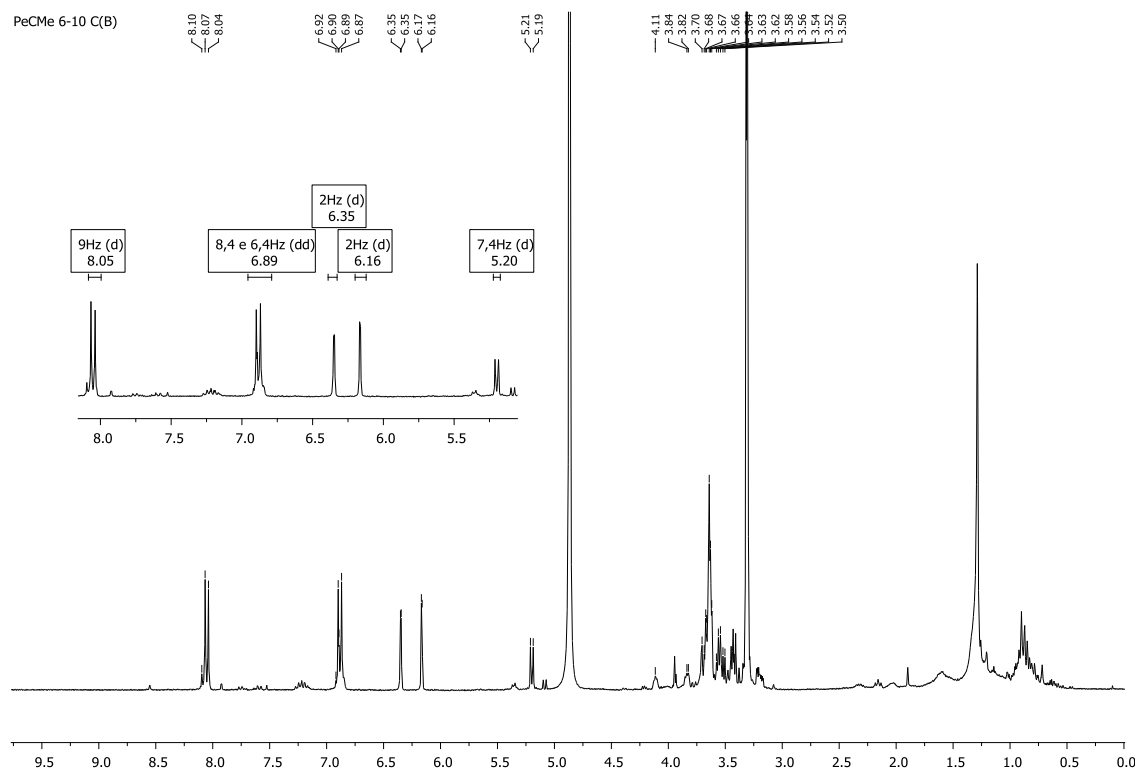


Figura 65- Ampliação do espectro de RMN de ^1H da astragalina [500 MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})$]

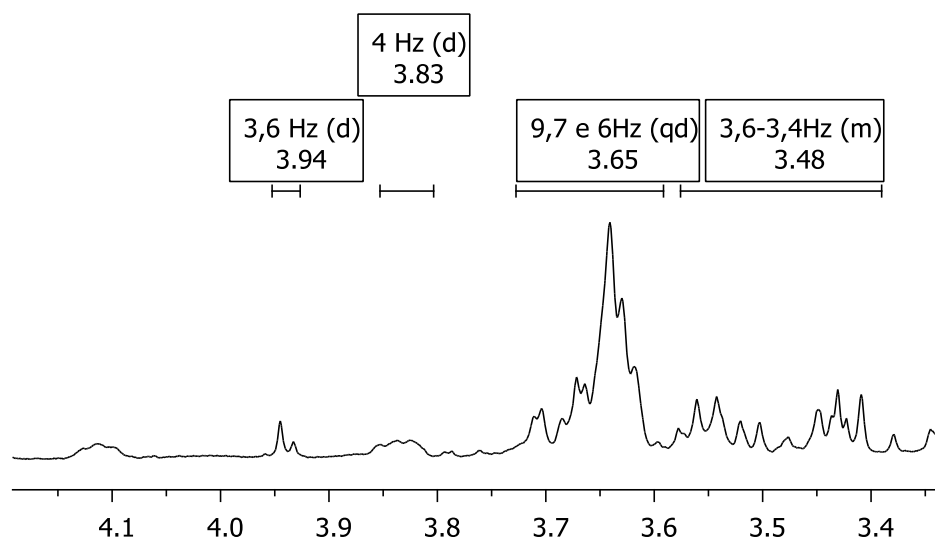


Figura 66-Espectro de RMN de ^{13}C da astragalina [125MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})$]

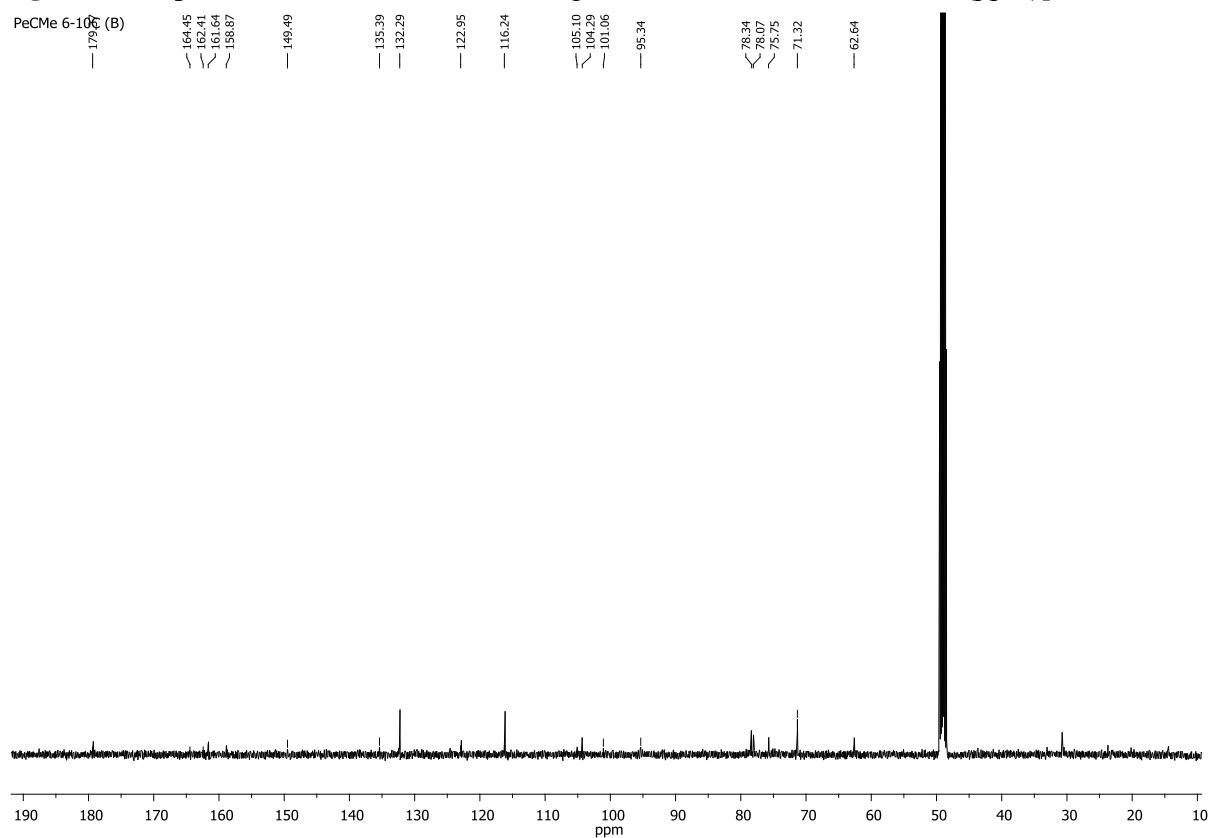
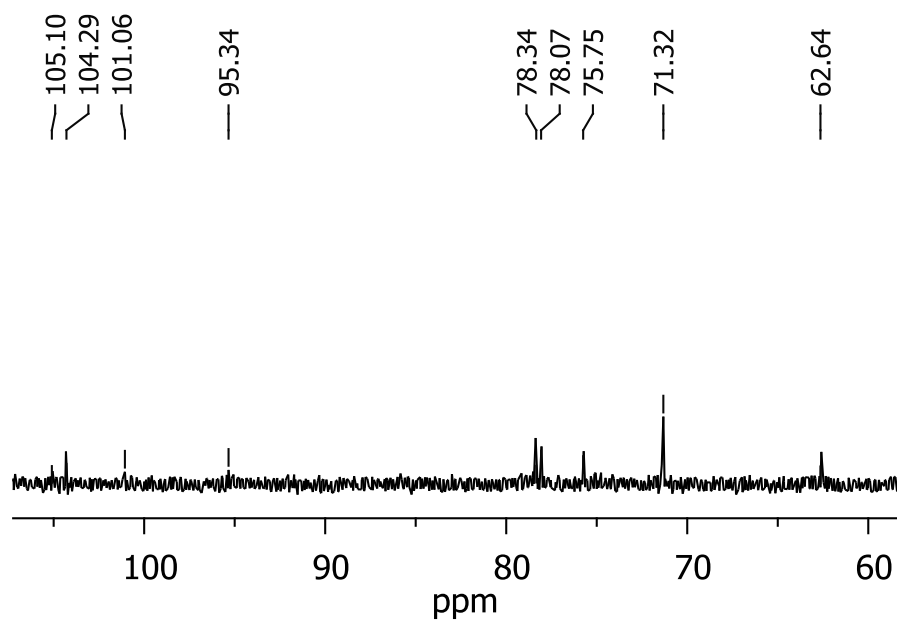


Figura 67-Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da astragalina [125MHz, Metanol- d_6 , $\delta(\text{ppm})$]



A atribuição dos carbonos com seu respectivo hidrogênio foi realizada com auxílio do espectro de Heterocorrelação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) (Figura 68). O espectro de HSQC corroborou com a proposta estrutural para a fração através das correlações observadas entre o H-1'' (δ 5,2) com o C-1'' (δ 104,29). A localização da ligação glicosídica ocorreu por meio de comparação com dados da literatura, pelo deslocamento do C-3, típico de carbono oxigenado (LEE, 2007; AGRAWAL, 1989).

Figura 68-Espectro de HSQC da astragalina [Metanol- d_6 , δ (ppm)]

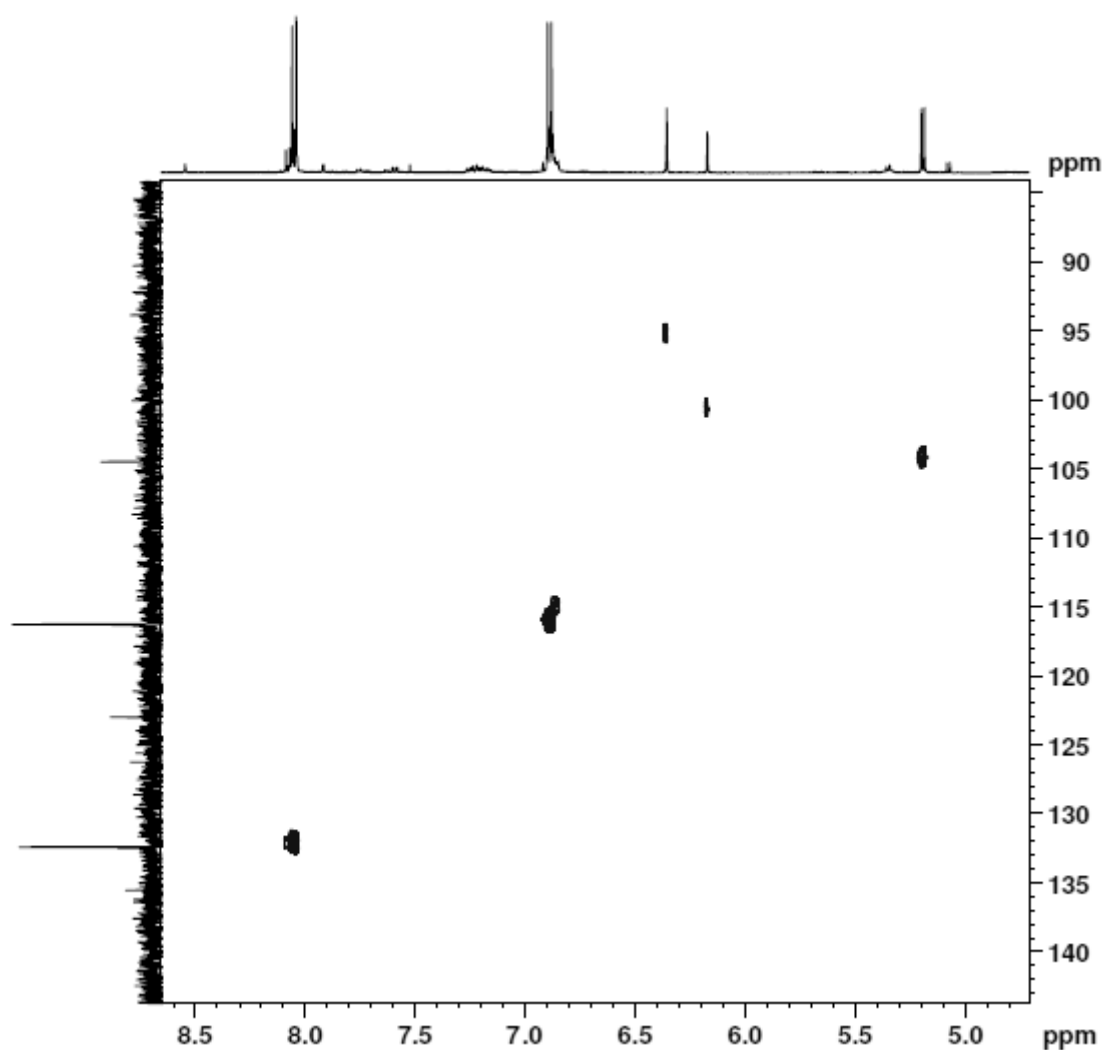


Tabela 25- Dados espectroscópicos de RMN de ^1H para canferol (**6**), quercetina (**7**), vitexina (**8**) e astragalina (**9**)[300-500 MHz, δ (ppm), J (Hz)]

H	Flavonoides isolados				Dados da literatura*			
	(6)	(7)	(8)	(9)	(6)	(7)	(8)	(9)
3	-	-	6,72 (s)	-	-	-	6,77 (s)	-
6	6,41 (d, 2,1)	6,4 (d, 2)	6,23 (s)	6,16 (d, 2)	6,34 (d, 2)	6,40 (d, 2)	6,27 (s)	6,19(s)
8	6,19 (d, 2,1)	6,18 (d, 2)	-	6,35 (d, 2)	6,27 (d, 2)	6,18 (d, 2)	-	6,38(s)
2'	8,09 (dd, 8 e 8,3)	7,67 (d, 2,2)	6,90 (d, 11)	8,05 (dd, 9 e 8,3)	7,98 (d, 8,3)	7,67 (d, 2,2)	8,02 (d, 8,4)	8,04 (d, 8,4)
3'	6,93 (dd, 6,8 e 6,9)	-	7,99 (d, 7)	6,89 (dd, 8,4 e 6,4)	6,96 (d, 8,3)	-	6,88 (d, 8,4)	6,87 (d, 8,4)
5'	6,93 (dd, 6,8 e 6,9)	6,88 (d, 8,5)	7,99 (d, 7)	6,89 (dd, 8,4 e 6,4)	6,96 (d, 8,3)	6,89 (d, 8,3)	6,88 (d, 8,4)	6,87 (d, 8,4)
6'	8,09 (dd, 8 e 8,3)	7,53 (dd, 2,2 e 8,5)	6,90 (d, 11)	8,05 (dd, 9 e 8,3)	7,98 (d, 8,3)	7,53 (dd, 8,6 e 2,2)	8,02 (d, 8,4)	8,04 (d, 8,4)
OH- 3	3,64 (s)	9,5 (s)	-	-	-	-	-	-
OH- 5	-	12,5 (s)	13,14 (s)	-	-	12,42 (s)	nd	-
1''	-	-	4,70 (d,5)	5,20 (d,7,4)	-	-	4,68 (d, 9,9)	5,23 (d, 7,2)
2''	-	-	3-3,9 (m)	3,4- 3,9(m)	-	-	3,79 (nd)	3,18- 3,7(m)
3''	-	-	3-3,9 (m)	3,4- 3,9(m)	-	-	3,28(nd)	3,18- 3,7(m)
4''	-	-	3-3,9 (m)	3,4- 3,9(m)	-	-	3,46(nd)	3,18- 3,7(m)
5''	-	-	3-3,9 (m)	3,4- 3,9(m)	-	-	3,25(nd)	3,18- 3,7(m)
6''	-	-	3-3,9 (m)	3,4- 3,9(m)	-	-	3,74- 3,35	3,18- 3,7(m)

* ITOH, 2009(canferol (**6**), acetona- d_6 , 600 Hz)*SHEN, 1993 (quercetina (**7**), DMSO- d_6 , 500 Hz)*TANAKA, 2005(vitexina (**8**), DMSO- d_6 , 500 Hz)*LEE, 2007(astragalina (**9**), metanol- d_6 , 400 Hz)

nd=não detectado

Tabela 26- Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C para canferol (**6**) e vitexina (**8**) e astragalina (**9**) [75-125 MHz, δ (ppm)]

C	Flavonoides isolados			Dados da literatura*		
	(6)	(8)	(9)	(6)	(8)	(9)
2	148,0	<i>nd</i>	149,5	146,1	164,4	158,3
3	137,1	102,3	135,4	135,5	102,8	135,3
4	177,4	181,8	179,4	175,7	182,6	178,3
5	158,3	160,4	158,9	156,0	160,9	162,8
6	99,26	<i>nd</i>	101,1	98,2	98,5	99,7
7	165,6	<i>nd</i>	164,4	163,8	163,0	165,7
8	94,46	<i>nd</i>	96,3	93,4	104,4	94,6
9	162,5	156	162,4	160,5	156,5	158,8
10	104,5	<i>nd</i>	105,1	102,9	105,0	104,9
1'	123,7	121,6	122,9	121,6	122,0	122,6
2'	130,7	128,8	132,3	129,3	129,4	132,1
3'	116,3	115,8	116,2	115,3	116,2	116,0
4'	160,6	161,2	161,6	159,0	161,6	161,4
5'	116,3	115,8	116,2	115,3	116,2	116,0
6'	130,7	128,8	132,3	129,3	129,4	132,1
1''	-	70	104,3	-	73,7	104,0
2''	-	70,9	75,7	-	71,1	75,6
3''	-	78,71	78,1	-	79,0	78,3
4''	-	63,1	71,3	-	70,3	71,2
5''	-	81,8	78,3	-	82,1	77,9
6''	-	61,27	62,6	-	61,6	62,5

*OKYAMA, 1978 (canferol (**6**), DMSO- d_6 , 300 Hz)

*TANAKA, 2005(vitexina (**8**), DMSO- d_6 , 500 Hz)

*LEE, 2007(astragalina (**9**), metanol- d_6 , 100 Hz)

nd=não detectado

5.10 CG-EM DO EXTRATO HEXÂNICO DAS PÉTALAS DA *Clitoria fairchildiana*

As frações PeCH4, PeCH5 e PeCH6 do extrato hexânico das pétalas da *C. fairchildiana*, foram analisadas em CCDC e reveladas com reagente de Liebermann-Buchard, com aquecimento em placa, indicando uma mistura complexa com presença de fitosteroides, pela coloração roxa da CCDC.

Dessa forma, as frações que revelaram resultados positivos para teste de presença de fitoesteroide, foram derivatizadas com trimetilsilil (TMS) para posterior análises via CG-EM. Em seguida, identificadas de acordo com as fragmentações observadas nos espectros de massas obtidos, em comparação com espectros existentes no banco de dados do aparelho (WILEY229), apresentando similaridade próximas de 80%.

Nas figuras 69, 70, 71 e 72, páginas 112 e 113, podem ser observados os cromatogramas de íons totais referente a análise das frações hexânicas da *C. fairchildiana*. Dentre os principais compostos identificados, encontram-se ácidos graxos e fitoesteroides todos descritos nas tabelas 27, 28 e 29, páginas 112 e 113.

Figura 69- .Cromatograma de íons totais da fração PeCH4 das pétalas da *C. fairchildiana*

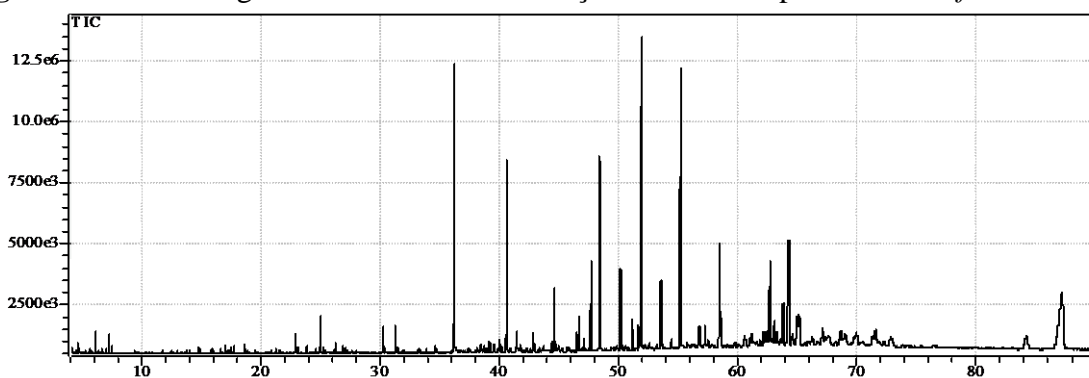


Figura 70- Cromatograma de íons totais da fração PeCH5 das pétalas da *C. fairchildiana*

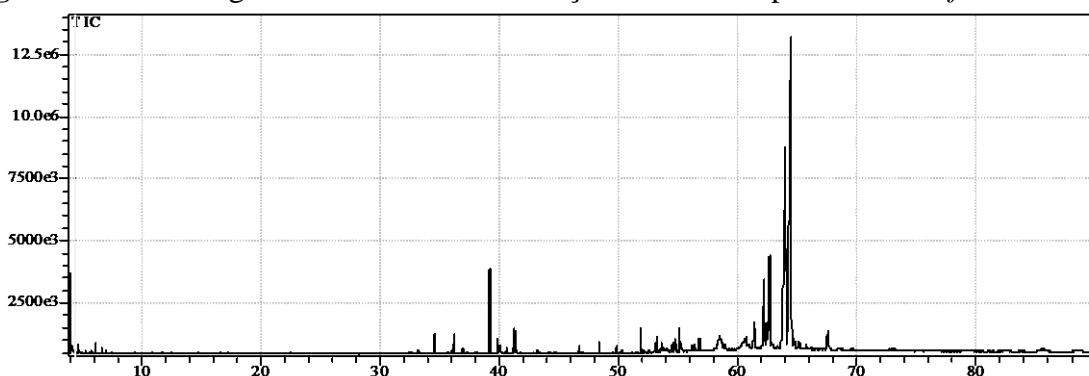
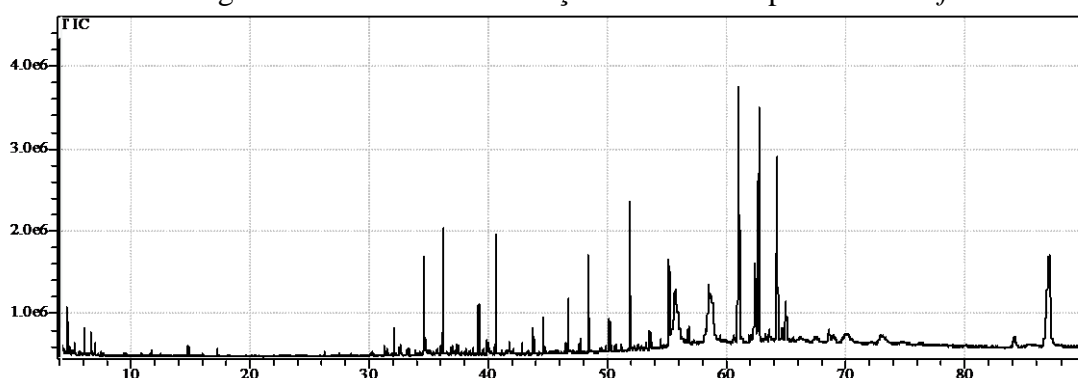


Figura 71- Cromatograma de íons totais da fração PeCH 6 das pétalas da *C. fairchildiana*

Apesar das CCDC reveladas por Liebermann-Buchard indicarem presença de apenas um ponto roxo, o CG-EM, comprova que as frações ainda estavam em misturas.

Tabela 27- Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração PeCH4

t_R	Similaridade	Identificação (ésteres trimetilsilil)	$[M^+]$	Fórmula
36.32	95%	Ácido hexadecanóico (A)	328	$C_{16}H_{31}O_2$
40.57	91%	Ácido octadecanóico (B)	356	$C_{18}H_{35}O_2$
48.43	92%	Ácido docosanóico (C)	412	$C_{22}H_{43}O_2$
55.17	90%	Ácido tetracosanóico (D)	440	$C_{24}H_{47}O_2$
62.66	78%	Lupenona (E)	440	$C_{31}H_{52}O$
87.00	78%	1,3-Dipalmitico (F)	641	$C_{35}H_{67}O_5$

t_R = Tempo de retenção

Tabela 28- Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração PeCH5

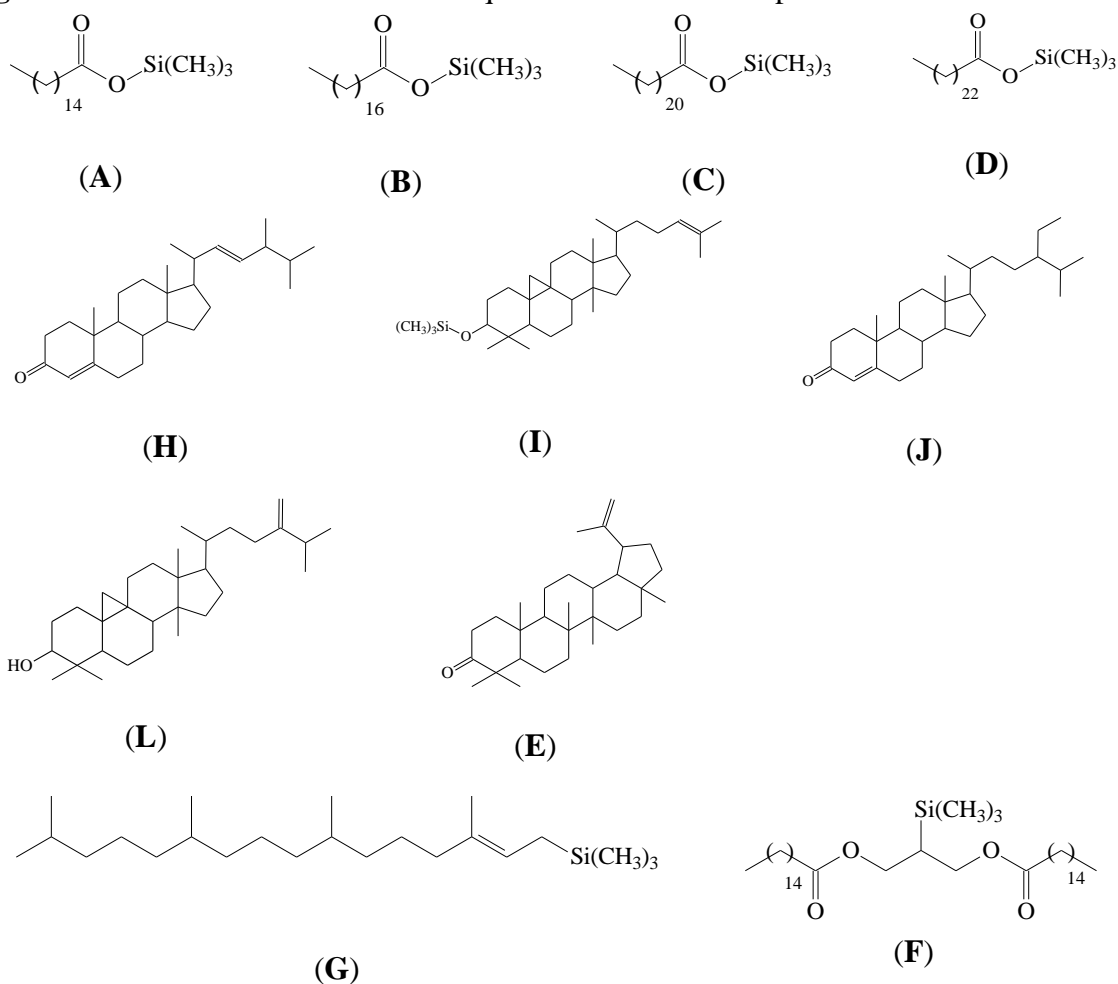
t_R	Similaridade	Identificação (ésteres trimetilsilil)	$[M^+]$	Fórmula
39.19	92%	Fitol (G)	368	$C_{20}H_{39}O$
62.19	81%	Brassicasterona (H)	396	$C_{28}H_{44}O$
62.66	85%	Cicloartenol (I)	498	$C_{30}H_{49}O$
63.91	89%	Estigmast-4-en-3-ona (J)	412	$C_{29}H_{48}O$
64.41	83%	24-metileno-cicloartanol (L)	440	$C_{31}H_{52}O$

t_R = Tempo de retenção

Tabela 29- Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração PeCH6

t_R	Similaridade	Identificação (ésteres trimetilsilil)	$[M^+]$	Fórmula
36,255	93%	Ácido hexadecanóico (A)	328	$C_{16}H_{31}O_2$
40,635	93%	Ácido octadecanóico (B)	356	$C_{18}H_{35}O_2$
48,41	93%	Ácido docosanóico (C)	412	$C_{22}H_{43}O_2$
51,92	91%	Ácido tetracosanóico (D)	440	$C_{24}H_{47}O_2$
62,66	78%	24-metileno-cicloartenol (L)	440	$C_{31}H_{52}O$
86,87	83%	1,3-dipalmitico (F)	641	$C_{35}H_{67}O_5$

t_R = Tempo de retenção

Figura 72- Estruturas dos constituintes químicos identificados por CG-EM

5.11 IDENTIFICAÇÃO DE ROTENOIDES EM DIFERENTES PARTES DA *Clitoria fairchildiana*

As substâncias clitoriactal (2) e 6-desoxiclitoriactal (3), são os rotenoides encontrados em maior quantidade em *C. fairchildiana*, além de apresentarem as maiores atividades biológicas (SILVA, 2002; SHYAMKUMAR, 2012), justificando suas escolhas como padrões para quantificação nos diferentes extratos.

Esses rotenoides foram determinados e quantificados em diferentes partes (raiz, caule, folhas, pétalas e sementes) da espécie vegetal por CLAE-DAD. O clitoriactal foi eluído com tempo de retenção (t_R) de 4,9 minutos e o 6-desoxiclitoriactal em 6,6 minutos e a absorção no UV/Vis $\lambda_{m\acute{a}x.}=295\text{nm}$ como referência (Figuras 73 e 74).

Figura 73- Cromatograma da mistura de clitoriactal e 6-desoxiclitoriactal

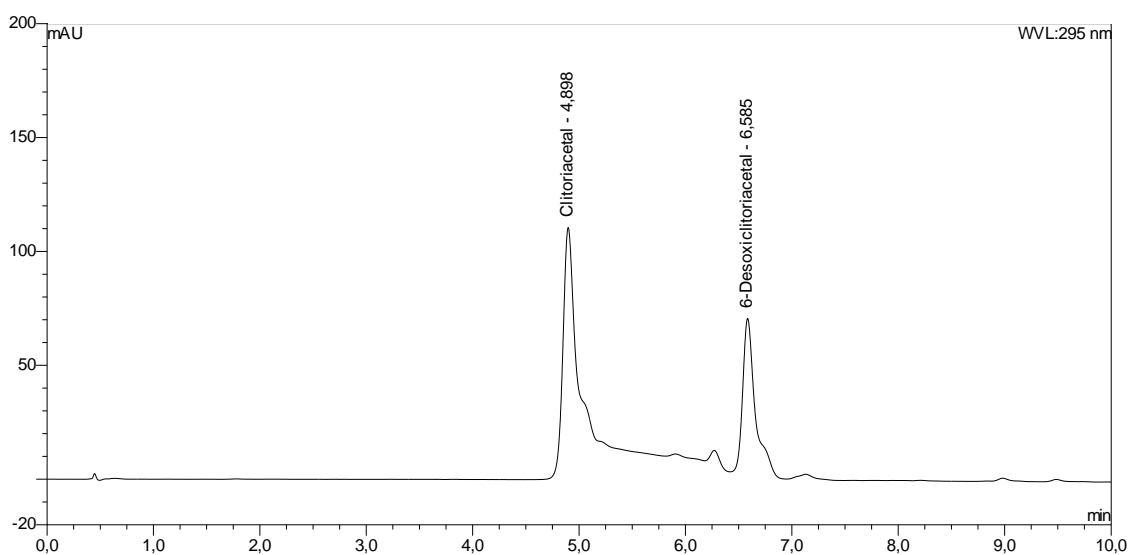


Figura 74- Espectro de UV/Vis da clitoriactal e da 6-desoxiclitoriactal

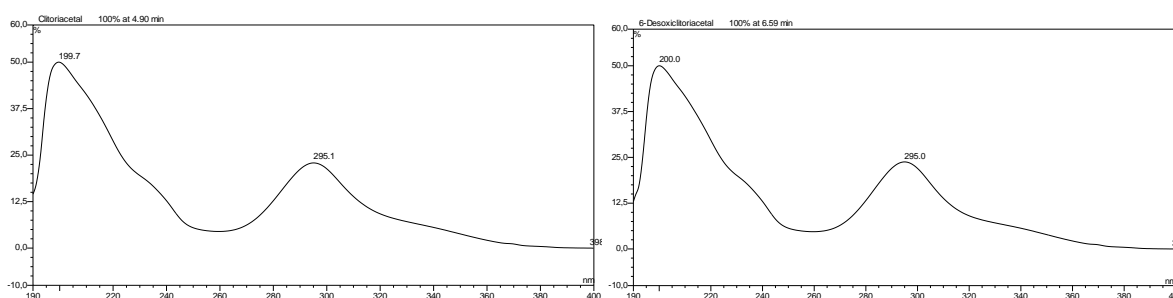


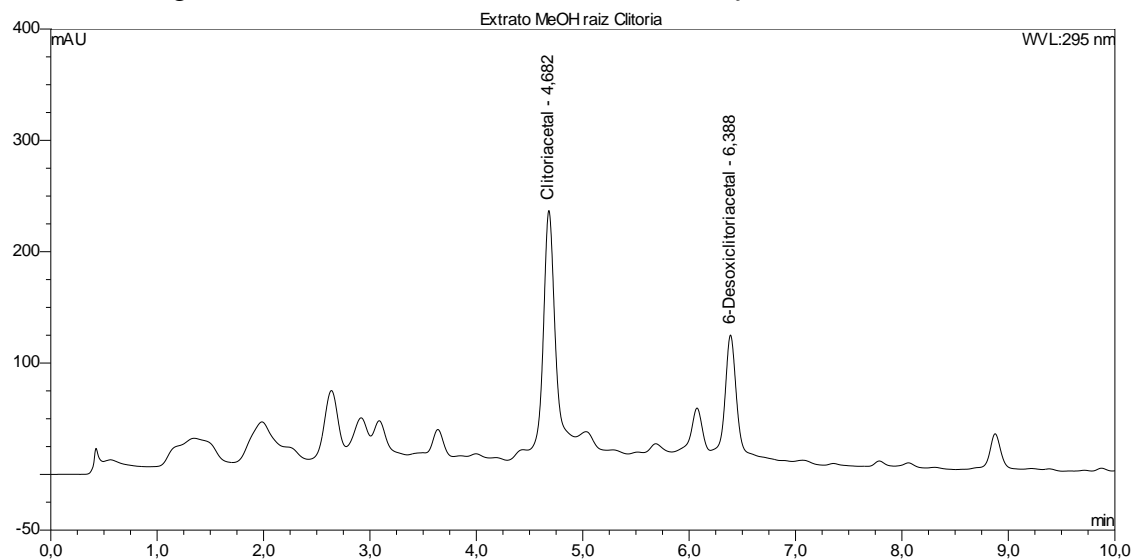
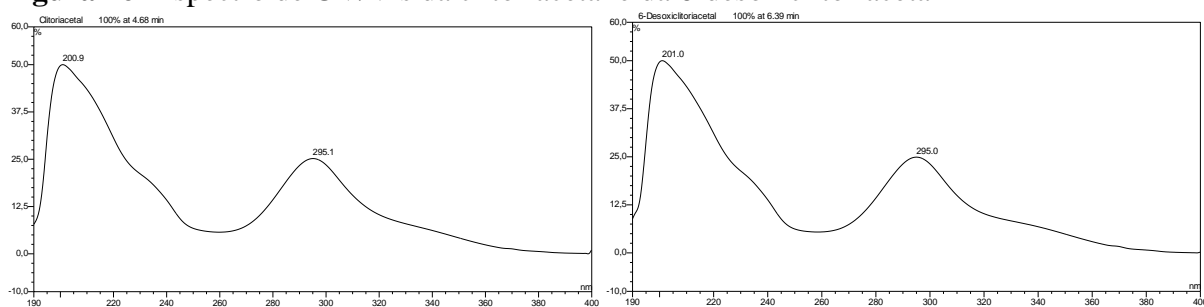
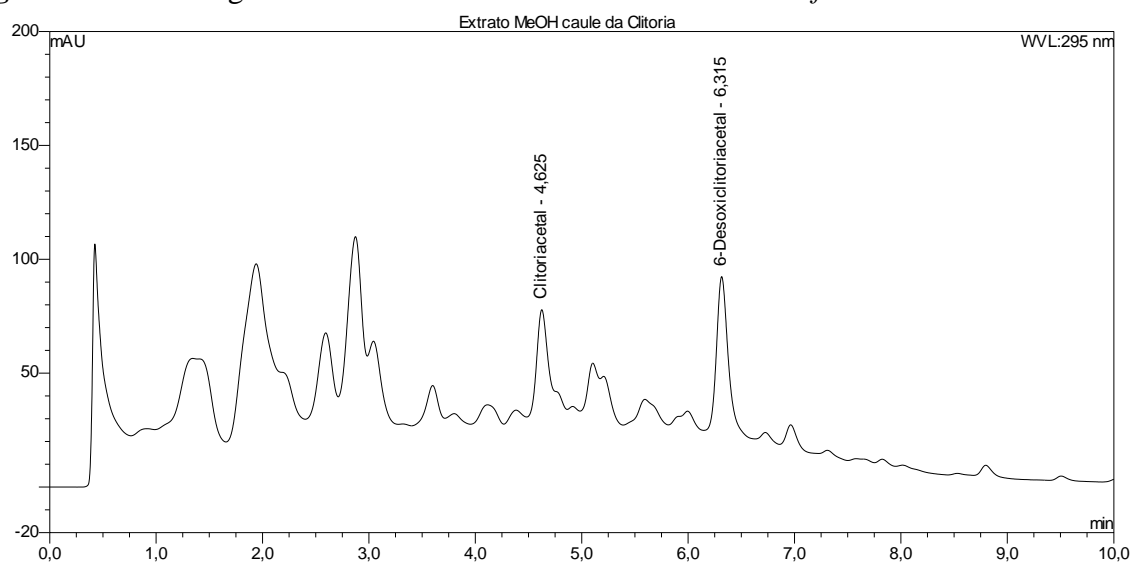
Figura 75- Cromatograma do extrato bruto MeOH da raiz da *C. fairchildiana***Figura 76-** Espectro de UV/Vis da clitoriacetal e da 6-desoxyclitoriacetal**Figura 77-** Cromatograma do extrato bruto MeOH da caule da *C. fairchildiana*

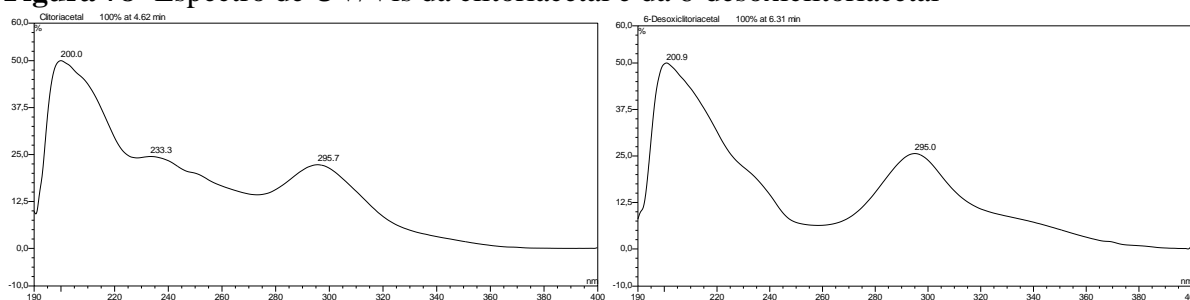
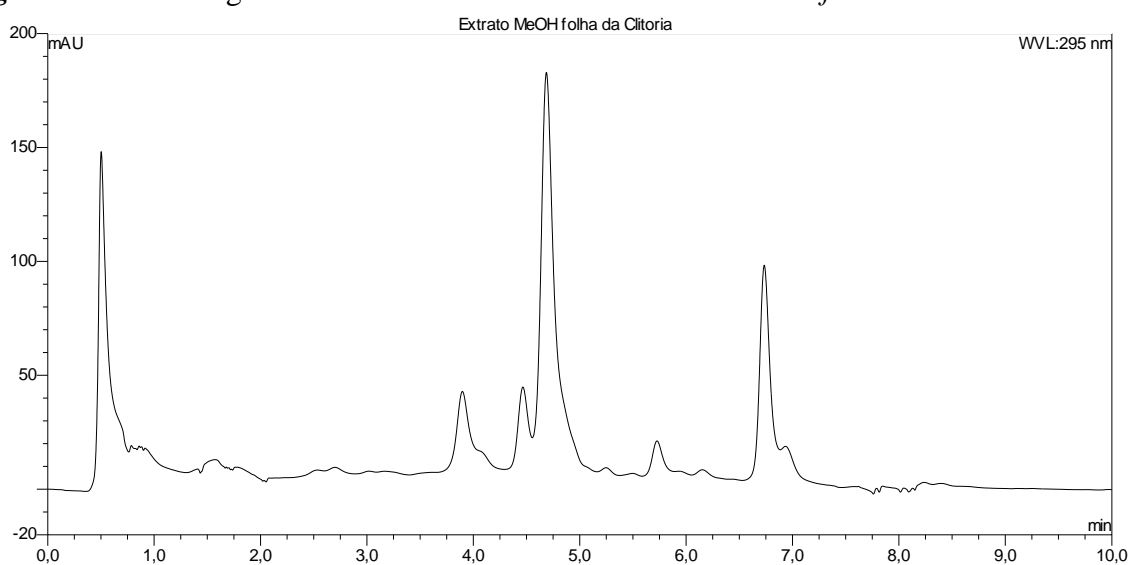
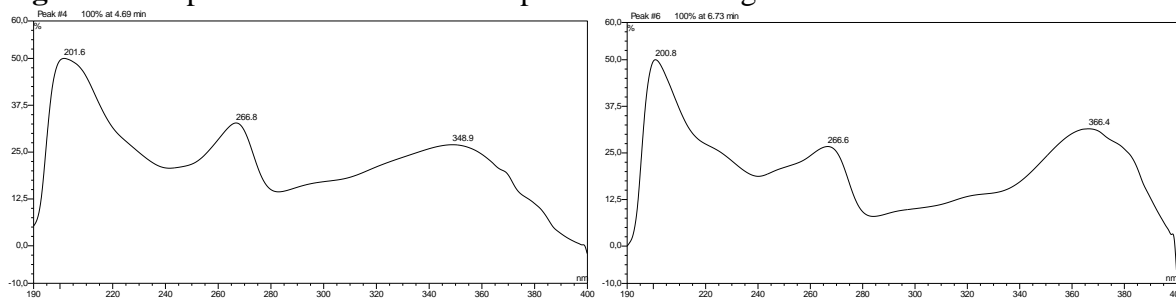
Figura 78- Espectro de UV/Vis da clitoriacetal e da 6-desoxiclitoriacetal**Figura 79-** Cromatograma do extrato bruto MeOH da folhas da *C. fairchildiana***Figura 80-** Espectro de UV/Vis de dois picos do cromatograma do extrato das folhas

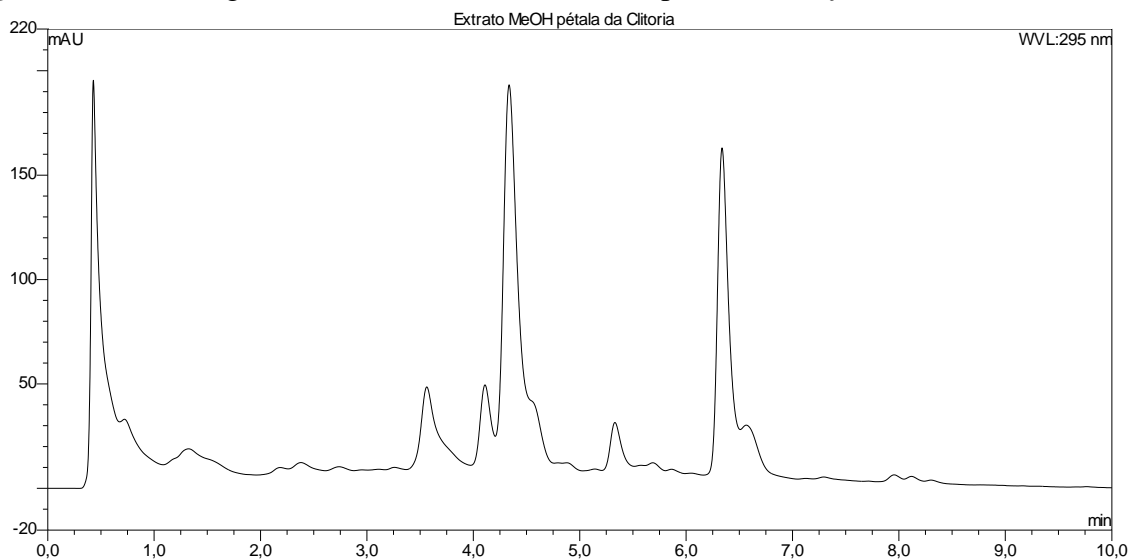
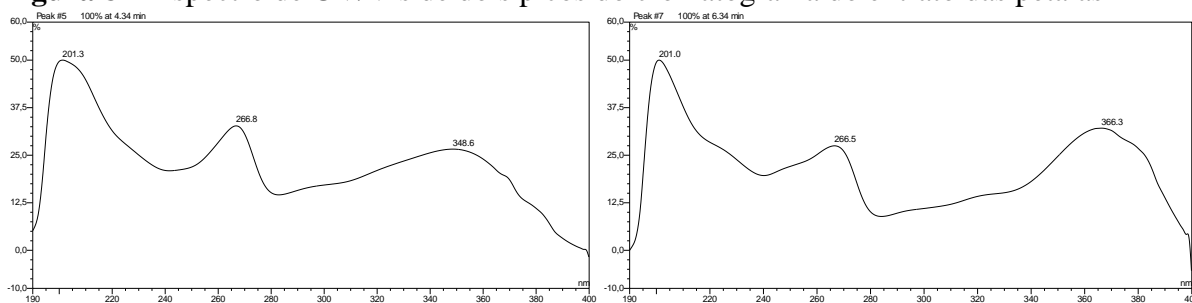
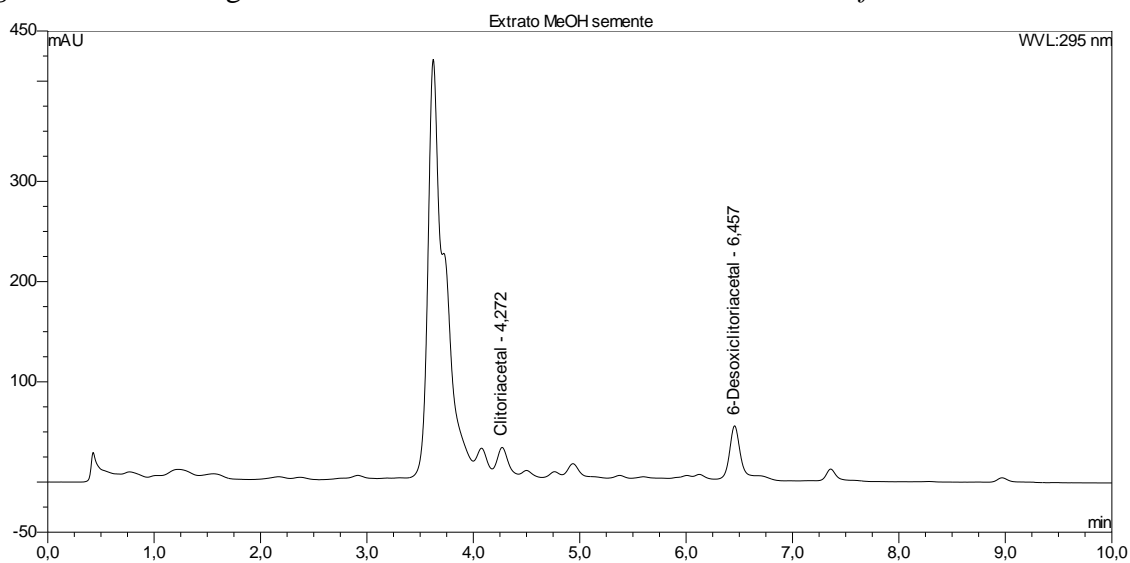
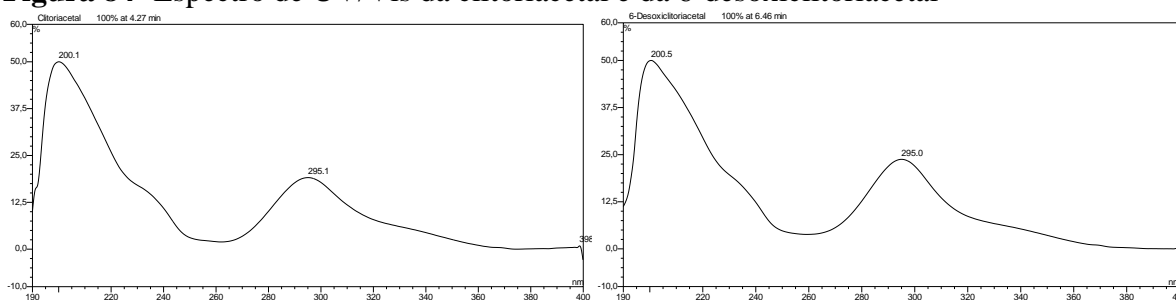
Figura 81- Cromatograma do extrato bruto MeOH da pétalas da *C. fairchildiana***Figura 82-** Espectro de UV/Vis de dois picos do cromatograma do extrato das pétalas**Figura 83-** Cromatograma do extrato bruto MeOH da sementes da *C. fairchildiana*

Figura 84- Espectro de UV/Vis da clitoriacetal e da 6-desoxiclitoriacetal

Comparando o cromatograma e UV/Vis do padrão (Figuras 73 e 74, páginas 114), com o dos extratos (Figuras 75 até 84, páginas 115 até 118), observou-se, que não foram detectadas presença significativas dos dois rotenoides nas folhas e pétalas da espécie. Os picos em $t_R = 4,7$ e $t_R = 6,7$ (figura 79, página 116) e $t_R = 4,3$ e $t_R = 6,3$ (Figura 81, página 117), apesar de estarem próximos dos t_R dos respectivos rotenoides, não são atribuídos aos rotenoides, devido a diferença no espectro de UV/Vis (Figuras 80 e 82, páginas 116 e 117).

Os extratos do caule e raiz apresentam as maiores quantidades dos dois rotenoides, e após confirmação de suas respectivas presenças, foi realizada sua quantificação por CLAE-DAD.

5.12 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *Clitoria fairchildiana* POR EXTRAÇÃO ACELERADA (ASE)

Por meio do perfil cromatográfico de várias partes da *C. fairchildiana*, foi verificado que os rotenoides mais abundantes (6-desoxiclitoriactal (3) e clitoriactal (2)) estão presentes apenas na raiz, caule e semente da espécie. Dessa forma, foi feito a quantificação dos dois rotenoides por CLAE-DAD nessas partes da espécie vegetal.

O material vegetal da *C. fairchildiana* (raiz, caule e semente), foi previamente seco e triturado, e em seguida, submetido a extração acelerada, gerando três extratos (triplicata) diferentes, obtendo-se as respectivas massas de material vegetal e seus extratos (Tabela 30).

Tabela 30- Massas do material vegetal e dos extratos obtidos pelo ASE

Material vegetal	Massa (g)	Extrato vegetal extraído por ASE	Massa (g)
Raiz	3,1625	Raiz	0,1268
	3,0035		0,0751
	3,0576		0,1363
Caule	3,0034	Caule	0,1287
	3,0541		0,1171
	3,0502		0,1185
Semente	3,0400	Semente	0,1736
	3,2500		0,1780
	3,1000		0,1940

5.13 QUANTIFICAÇÃO DO CLITORIACETAL E 6-DESOXICLITORIACETAL POR CLAE-DAD

A identificação do clitoriacetal (2) e do 6-desoxiclitoriacetal (3) foi por comparação dos tempos de retenção do padrão, a quantificação foi realizada por padronização externa. A curva foi construída com 6 pontos, cuja concentrações foram 8mg.L^{-1} , 16mg.L^{-1} , 32mg.L^{-1} , 48mg.L^{-1} , 64mg.L^{-1} e 80mg.L^{-1} . A partir de 2mg de clitoriacetal e 2mg de 6-desoxiclitoriacetal dissolvidos em 25mL de MeOH, sendo todas injetadas em triplicata. As curvas estão representadas nas figuras 85 e 86, página 121.

O limite de detecção (LD) que representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada e o limite quantificação (LQ) que representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (BILBAO, 2007), foram obtidos através das equações (1) e (2).

$$LD = 3,3 \times \frac{Sb}{a} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times \frac{Sb}{a} \quad (2)$$

Em que,

Sb –desvio padrão do coeficiente linear da curva de calibração

a-coeficiente angular da curva de calibração

Todos parâmetros para validação do método se encontram descrito na tabela 31 e 32.

Tabela 31- Parâmetros de validação do método da curva de calibração da clitoriacetal (2)

Parâmetros	Valores
LQ	$11,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$
LD	$3,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$
λ	295 nm
R^2	0,997
Vol. Injeção	5 μL

Tabela 32-Parâmetros de validação do método da curva de calibração do 6-desoxiclitoriactal (3)

Parâmetros	Valores
LQ	7,35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
LD	2,21 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
λ	295 nm
R^2	0,998
Vol. Injeção	5 μL

Figura 85- Curva de calibração obtida com o padrão de clitoriactal (2)

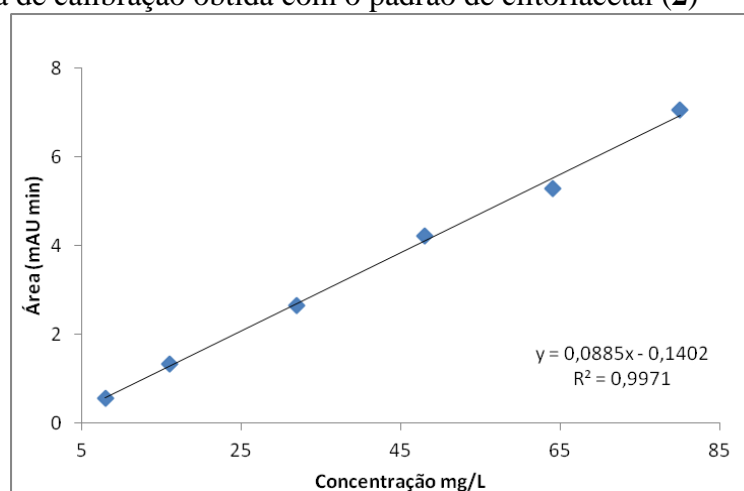
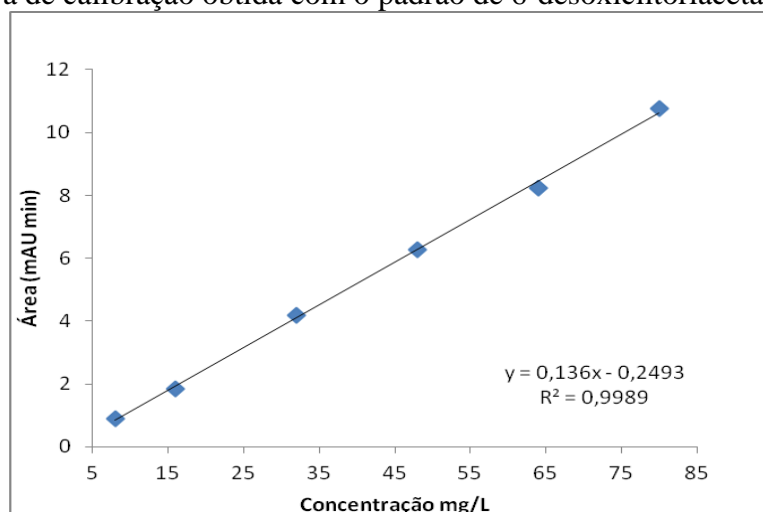


Figura 86- Curva de calibração obtida com o padrão de 6-desoxiclitoriactal (3)



Assim, através da curva de linearidade ($R^2=0,997$) e equação da reta ($y = 0,0885x - 0,1402$), foi possível quantificar o clitoriactal nos extratos MeOH de *C. fairchildiana* (raíz, caule e semente), que apresentaram teor de 4,56% na raíz, 0,13% no caule e 0,05% na semente.

Quanto ao 6-desoxiclitoriactal com curva de linearidade ($R^2=0,998$) e equação da reta ($y = 0,136x - 0,2493$), apresentou teor de 2,32% na raiz, 0,11% no caule e 0,46% na semente.

Tabela 33- Teor de clitoriactal (2) e 6-desoxiclitoriactal (3) nos extratos obtidos por ASE

Extrato vegetal extraído por ASE	Massa (g)	Clitoriactal (%)	6-desoxiclitoriactal (%)
Raiz	0,1268	4,42±0,23	2,46±0,11
	0,0751	4,89±0,17	1,85±0,18
	0,1363	4,39±0,38	2,65±0,35
Caule	0,1287	0,13±0,01	0,12±0,01
	0,1171	0,15±0,01	0,11±0,01
	0,1185	0,12±0,01	0,10±0,01
Semente	0,1736	0,05±0,04	0,45±0,03
	0,1780	0,06±0,05	0,53±0,03
	0,1940	0,042±0,01	0,41±0,02

Foi observado que os rotenoides clitoriactal (2) e 6-desoxiclitoriactal (3), são encontrados em maior quantidade na raiz, em comparação com as outras partes analisadas (caule e semente). Esses mesmos rotenoides não foram encontrados nas folhas nem nas pétalas.

Apenas na raiz o clitoriactal (2) é encontrado em maior quantidade em relação ao 6-desoxiclitoriactal (3). Já no caule, o 6-desoxiclitoriactal (3) apresenta uma leve predominância e na semente é o majoritário (Tabela 33). Essas infirmações são importantes para a extração em larga escala desses rotenoides, em uma possível aplicação medicinal.

Os rendimentos extrativos dos rotenoides clitoriactal (2) e 6-desoxiclitoriactal (3), entre os extratos obtidos pela maceração da raiz, comparada com o uso do extrator acelerado (ambas extrações em MeOH), percebeu-se que não houve melhora na quantidade de rotenoides extraídas quando se usa o extrator acelerado. Por ser uma forma de extração que usa temperatura e pressão maior que a ambiente, esperava-se um aumento significativo na quantidade extraída. Esse menor rendimento pode ter sido atribuído à falta de otimização das condições de extração. Contudo, não inviabiliza o uso dessa técnica de extração para se obter flavonoides, devido a vantagem de menor tempo de extração e uso de amostra em menor quantidade.

5.14 TESTE DE LETALIDADE FRENTE *Artemia salina*

A letalidade frente a larvas da *A. salina* é um indicador confiável da toxicidade de certas substâncias. O desenvolvimento das larvas depende muito do meio onde se encontram, permitindo a utilização dessas larvas em bioensaios e possibilitando desse modo, que se faça a correlação da atividade frente a larva com a atividade citotóxica dos compostos ou extratos testados (ANDERSON, 1991).

Os extratos da *C. fairchildiana* e os rotenoides isolados foram submetidos ao teste de letalidade frente *A. salina* em cinco concentrações distintas. Os resultados da letalidade podem ser observados nas tabelas 34 e 35, página 123.

Segundo dados da literatura (DAVID, 2001; ANDERSON, 1991; MEYER, 1982), substâncias que apresentam $DL_{50} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são consideradas inativas frente a *A. salina* e aquelas que apresentam $DL_{50} < 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são consideradas muito ativas. Substâncias que apresentam o DL_{50} entre 100 e $900 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são consideradas moderadamente ativas (MEYER, 1982).

Tabela 34- Resultados do teste de letalidade frente *A. salina* com extratos da *C. fairchildiana*

Extratos de <i>Clitoria fairchildiana</i>	Letalidade frente <i>A. salina</i>		
	$DL_{50}(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Desvio padrão*	Atividade citotóxica
Raiz (MeOH)	158	2,02	Ativo
Caule (MeOH)	>1000	-	Não ativo
Folhas (MeOH)	>1000	-	Não ativo
Pétalas (MeOH)	>1000	-	Não ativo
Semente (MeOH)	315	4,66	Ativo
Raiz (CHCl_3)	573,1	1,133	Ativo
Pétalas (CHCl_3)	>1000	-	Não ativo
Pétalas (Hex.)	>1000	-	Não ativo

* 95% intervalo de confiança ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Tabela 35- Resultados do teste de letalidade de *A. salina* para compostos isolados

Substâncias	Letalidade frente <i>A. salina</i>		
	DL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Desvio padrão**	Atividade citotóxica
Clitoriacetal (2)	515,3	2,44	Ativo
6-desoxiclitoriacetal (3)	260,5	2,16	Ativo
Stemonal (4)	>1000	-	Não ativo
Stemonona (5)	>1000	-	Não ativo
Canferol (6)	>1000*	-	Não ativo
Quercetina (7)	>1000*	-	Não ativo
Vitexina (8)	>1000*	-	Não ativo
Astragalina (9)	77,1	1,17	Ativo

*HIROTA, 2011(vitexina); HARADA, 2009(quercetina) ** 95% intervalo de confiança (µg.mL⁻¹)

Pode-se verificar pelas Tabelas 34 e 35, página 123, que a maioria das amostras testadas foram inativas ou moderadamente ativas. Percebe-se também que, com excessão da astragalina (9) isolada das pétalas, ocorreu pouca variação na atividade frente *A. salina* dos compostos isolados em comparação com a DL₅₀ dos seus respectivos extratos. Apenas os extratos MeOH brutos da semente e da raiz apresentaram atividade frente a *A. salina*. Após partição do extrato da raiz, verificou-se que o extrato mais ativo foi o clorofórmico, onde foram isolados os rotenoides mais ativos clitoriacetal (2) e 6-desoxiclitoriacetal (3).

Em trabalho anterior (QUEROZ, 2009) foi verificado que o extrato metanólico das folhas apresenta alta atividade (DL₅₀= 59,4µg.mL⁻¹) frente *A. salina*, atribuídas aos diversos flavonoides isolados. Contudo, verificou-se que os flavonoides presentes nas folhas não contribuem tanto quanto esperava para a atividade do extrato, como pode ser visto na Tabela 34. Em contrapartida, o extrato e os flavonoides isolados da raiz apresentaram moderada atividade frente a larvas de *A. salina* (Tabelas 34 e 35, página 122).

Rotenoides possuem comprovada atividade larvicida, percebeu-se que anéis B/C hidrogenados, presença de metoxilas nos carbonos C-2 e C-3 e anel-E furanocromeno, são fundamentais para a ampliação das atividades biológicas dos rotenoides. Isso explica o fato do 6-desoxiclitoriacetal (3) e clitoriacetal (2) serem mais ativos que o stemonal (4) e a estemonona (5) frente as larvas de *A. salina* (VASCONCELOS, 2010; VASCONCELOS, 2012; YENESEW, 2003; YAMAMOTO, 1970).

Esses resultados estimularam a realização de outros testes biológicos que dependem diretamente da característica fenólica das substâncias, como os testes antioxidante e de inibição da enzima acetilcolinesterase.

5.15 TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O DPPH é um radical livre estável, que forma solução de coloração roxa. Substâncias que apresentam atividade antioxidantes transferem elétrons ou átomos de hidrogênios, neutralizando seu caráter radicalar, proporcionando mudança da cor roxa para amarelada, indicando que a substância apresenta potencial antioxidante (Figura 87).

No teste qualitativo preliminar de atividade antioxidante, observou-se que apenas a quercetina, de comprovada ação antioxidante, possui atividade satisfatória, seguida do stemonal e canferol com atividades mais discretas (KHANDUJA, 2003), (Figura 88).

Figura 87- Representação geral da reação de captura do radical DPPH

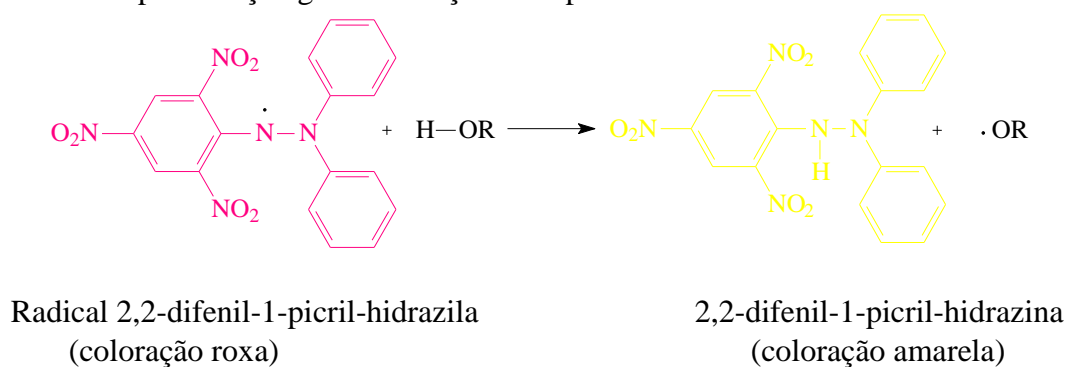


Figura 88- Imagem da cromatoplaca do teste antioxidante utilizando DPPH



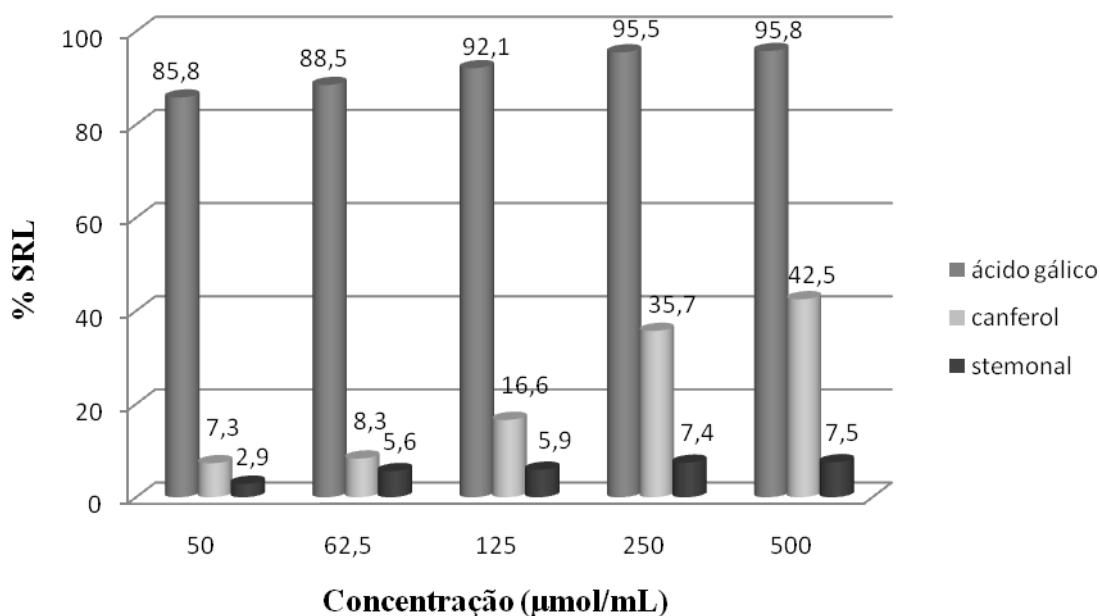
Compostos que demonstraram resultados positivos na avaliação qualitativa, foram submetidos ao teste quantitativo do sequestro do radical DPPH, utilizando método fotocolorímetro *in vitro*. O consumo do radical livre DPPH pelas amostras, foi monitorado através da medida do decréscimo da absorvância, como resultado da alteração da cor roxa para amarelo, tendo como controle positivo ácido gálico. Quanto maior o consumo de DPPH pelas amostras, maior será o percentual de sequestro do radical livre (%SRL), logo maior sua atividade antioxidante.

Nas condições experimentais, apenas três substâncias isoladas de *C. fairchildiana* apresentaram atividade antioxidante quando comparada com o controle ácido gálico, sendo a quercetina (7) a mais ativa, já utilizada como padrão antioxidante.

Percebe-se que o potencial antioxidante está diretamente relacionada com o maior número de hidroxilas fenólicas presentes na amostra e com a estabilidade do radical formado, fatores que explicam a maior atividade de flavonoides mais hidroxilados como a quercetina em relação ao canferol (6) e stemonal (4) (ALVES, 2010).

O teste de porcentagem de inibição do DPPH está indicado pela figura 89.

Figura 89- Gráfico do percentual de sequestro do radical livre DPPH



Em trabalhos anteriores (QUEROZ, 2009; ANNEGOWDA, 2013), verificou-se a atividade antioxidante do extrato MeOH das folhas ($CI_{50} = 42,2\text{ppm}$) e semente ($CI_{50} = 135\text{ppm}$) de *C. fairchildiana*, indicando elevada atividade antioxidante, atribuídas aos

diversos flavonoides isolados. Apesar dos rotenoides apresentarem baixa atividade, a existência de outros flavonoides conferem elevado potencial antioxidante à espécie.

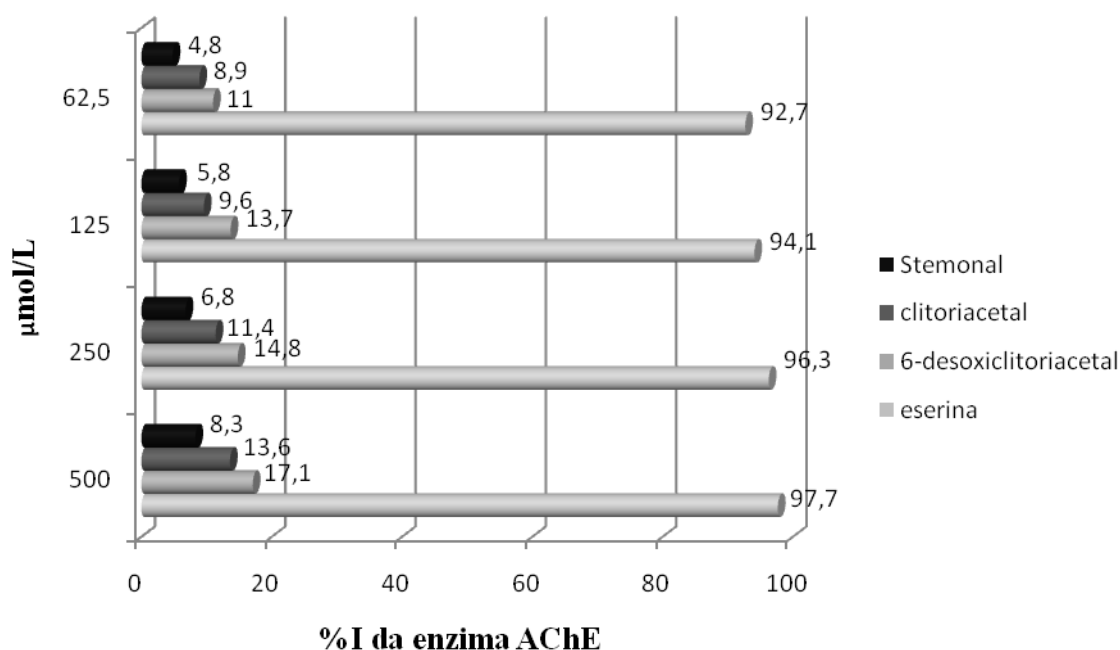
Dessa forma, a presença de flavonoides, especialmente nas pétalas, folhas e sementes da *C. fairchildiana*, confirma que a espécie é uma ótima fonte de substâncias com atividade antioxidante.

5.16 TESTE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

Para busca de novos inibidores da enzima AChE, testou-se a capacidade de inibição de três rotenoides isolados (clitoriacetla (**2**), 6-desoxiclitoriacetal (**3**) e stemonal (**4**)).

O gráfico da figura 90 sumariza os resultados obtidos para o percentual de inibição após 10 minutos de reação. Neste gráfico é mostrado que os compostos testados apresentam percentual de inibição muito baixo em comparação com o padrão utilizado em todas as concentrações testadas. No entanto, existe a necessidade de mais pesquisas para avaliar as ações destas substâncias, como uso de outras metodologias.

Figura 90- Gráfico do percentual de inibição da enzima AChE



6 CONCLUSÃO

A espécie *C. fairchildiana* confirmou ser uma ótima fonte de flavonoides, especialmente do tipo rotenoide, essa classe de substância apresenta diversas propriedades biológicas tais como: inseticida, piscicida, anti-inflamatória, citotóxica e atividade alelopática (SOLOWAY, 1976; SILVA, 2002; SHYAMKUMAR, 2012).

Os rotenoides predominantes na espécie, caracterizam-se pelo tipo que não apresenta o anel-E, como o clitoriacetal, 6-desoxiclitoriacetal, stemonal, 11-desoxiclitoriacetal, 9-hidroxiclitoriacetal e seus derivados glicosilados (SILVA, 1998a; SILVA, 1998b; GOMES, 2005; QUEROZ, 2009; MATHIAS, 1998) (Tabela 1, página 24).

A espécie *C. fairchildiana* pode ser considerada uma fonte natural para extração comercial de flavonoides, uma vez que foram isolados dessa espécie 8 flavonoides clitoriacetal (2), 6-desoxiclitoriacetal (3), stemonal (4) e stemonona (5), canferol (6), quercetina (7), vitexina (8) e astragalina (9) e 2 fitoesteroides β -sitosterol e estigmasterol (1 e 1a).

Os rotenoides clitoriacetal (2) e o 6-desoxiclitoriacetal (3) são encontrados em maior quantidade na raiz, em comparação com as outras partes, além de não serem encontrados nas folhas nem nas pétalas.

Comparando as duas formas de extração, entre maceração e extração ASE, observou-se que na extração dos rotenoides, o uso da extração ASE, não melhorou o rendimento extrativo dos clitoriacetal (2) e 6-desoxiclitoriacetal (3) quantificados.

Dos extratos e substâncias testadas quanto a letalidade frente a larvas de *A. salina*, somente as substâncias clitoriacetal (2) $DL_{50}=515,3\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 6-desoxiclitoriacetal (3) $DL_{50}=260,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ (provenientes do extrato CHCl_3 da raiz), apresentaram atividade moderada, enquanto que a astragalina (9) $DL_{50}=77,1\mu\text{g.mL}^{-1}$, isolada das pétalas, foi a mais ativa. Este teste pode ser considerado como uma avaliação preliminar para determinação de toxicidade geral para busca de substâncias anticancerígenas, sendo necessário que as substâncias testadas, sejam também submetidas a testes *in vitro* de atividade anticancerígena.

Quanto ao teste antioxidante de sequestro do radical DPPH, revelou que o stemonal (5), canferol (6) e a quercetina (7) apresentaram atividade satisfatória, sendo a quercetina a mais ativa, e no teste de inibição da enzima acetilcolinesterase, todos os rotenoides testados foram pouco ativos.

Dessa forma, este trabalho contribui para a taxonomia da espécie *C. fairchildiana*, pois é o primeiro relato do estudo fitoquímico das pétalas, e do isolamento da vitexina (8) obtida

das raízes, sendo também o primeiro relato de isolamento da stemonona (**5**), obtida anteriormente apenas por modificação estrutural (SHIENGTHONG, 1979).

Com base nos resultados dos testes *in vitro*, a espécie *C. fairchildiana* revela ser uma ótima fonte de substâncias bioativas, sendo o primeiro passo para busca de candidatos a fármacos.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S.; BANSAL, M. C. In **Carbon-13 NMR of flavonoids**, Agrawal, P.K., New York: Elsevier, 1989. p.564.

ALCARAZ, M. J.; CARVALHO, J. C. T. Flavonoides como agente anti-inflamatório. In: CARVALHO, J. C. T.; Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.; Ribeirão Preto, SP-Tecmedd, p 79-97, 2004

ALVES, C. Q. **Flavonoides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *Cenostigma Gardnerianum* TUL. (Leguminosae)**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2007.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, C. Q. **Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de leguminosae: *Dioclea virgata* e *macrophyllum***. 2012. 202 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2012.

ANDERSON, J. E.; GOETZ, A. blind comparasion of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities and antitumour prescreens. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 107-111, 1991.

ANNEGOWDA, H. V.; BHAT, R.; TZE, L. M.; KARIM, A. A.; MANSOR, S. M. The free radical scavenging and antioxidant activities of pod and seed extract of *Clitoria fairchildiana* (howard)- an underutilized legume. **Journal Food Science Technology**, v. 50, p. 535-541, 2013.

BARBOSA, L. C. de A. **Os Pesticidas, o Homem e o Meio Ambiente**. Viçosa: Editora UFV, 2004. p. 215.

BARREIROS, A. L. B. S. ; BARREIROS, M. L. ; DAVID, J. M. ; DAVID, J. P. ; QUEIROZ, L. P. Atividade antioxidante de substâncias presentes em *Dioclea violacea* e *Erythroxylum nummularia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 8-11, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Antioxidants pheypropanoid esters of triterpenes from *Dioclea lasiophylla*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 36-38, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S. ; DAVID, J. M. ; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração de Espécies Reativas e a Defesa do Organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 1991. p. 377

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. & Schieberle, P. **Unsaponifiable constituents Food Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. p. 182-197.

BÉZ, D.; PINO, J. A.; MORALES, D. Scent Composition in Some Cuban Flowers: *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard, *Brunfelsia nitida* Benth. and *Crinum oliganthum* Urban.. **Journal of essential oil-bearing plants**, v. 14, p. 383-386, 2011.

BILBAO, D. **Termo de Referência para a Confecção do Manual de Prevenção da Poluição Difusa em Meio Antrópico**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Engenharia Ambiental, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRUNEAU, E.; SUTTER, D.; HUME, R. I.; AKAABOUNE, M. Identification of Nicotinic Acetylcholine Receptor Recycling and Its Role in Maintaining Receptor Density at the Neuromuscular Junction *In Vivo*. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 9949-59, 2005.

BUCHI, G.; CROMBIE, L.; GODIN, J.; KALTENBRONN, S.; SIDDALINGAIA, K. S.; WHITING, D. A. The Absolute Configuration of Rotenone. By Published on 01 January 1961 on <http://pubs.rsc.org> | doi:10.1039/JR9610002843

CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**, (Série de textos da escola de verão em Química, vol.III), 2º edição, São Carlos: ed. EDUFSCar, 2007, p.69-72

CORREIA JÚNIOR, C. A. B.; SANTOS, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S. Mechanisms underlying the cardiovascular effects of a labdenic diterpene isolated from *Moldenhawera nutans* in normotensive rats. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 60-66, 2007.

COSTA, L. G. **Germinação e morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Clitoria fairchildiana* Howard**. 2011. 24 f. Monografia (Graduação em curso de Engenharia Florestal) - Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2011.

COSTA, S. M. O. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste: *Lippia sidoides***. 2001. ?f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2001.

CROMBIE, L.; WHITING, D. A. Biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1479-1507, 1998.

CRUZ, M. P. **Isolamento e identificação de compostos bioativos de *Mimosa hostilis* Benth.** 2013. 205f. Tese (Tese de Doutorado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2013.

DAVID, J. P.; SILVA, E. F.; de MOURA, D. L. Lignanas e Triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, 2001.

DEWICK, P. M. **The Flavonoids: Advances in Research**. ed. J. B. Harborne and T. J. Mabry. London: Chapman and Hall, 1982. p. 535.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach**. ed. John Wiley & Sons Ltd. 2ªedição, 2002. p.507.

DOLABELA, M. F. **Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e anti-Tripanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substancias sintéticas**. 1997. 128f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 1997.

De GROOT, H. Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundam Clin Pharmacol**, v.12, p. 249–55, 1998

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. J., FEATHERSTONNE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, 88, 1961.

FANG, N.; CASIDA, J. E. Novel bioactive cube insecticide constituents: isolation and preparation of 13-homo-13-oxa-6a,12a-dehydrorotenoids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 350–353, 1997.

FANG, N.; ROWLANDS, C.; CASIDA, J. E. Anomalous Structure-Activity Relationships of 13-homo-13-Oxarotenoids and 13-homo-13-Oxadehydrorotenoids. **Chemical Research of Toxicology**, v. 10, p. 853–858,1997.

FAURÉ, M.; LISSI, E.; TORRES, R.; VIDELA, L. A. Antioxidant activities of lignans and flavonoids. **Phytochemistry**, v 29, p. 3773-3775, 1990.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

GALOTTA, A. L. Q. De ASSIS; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes Químicos da raiz e do talo da folha do açai (*Euterpe precatoria* MART., Areaceae). **Química Nova**, v. 28, p. 610-613, 2005.

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (amaryllidaceae). **Química Nova**, v. 31, p. 2042-2046, 2008.

GOMES, M. S. R.; JUNIOR, J. G. R.; PEREIRA, A. H. F.; CARVALHO, M. G.; CARVALHO, A. G. In: 28ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRADE QUÍMICA. Flavonóides Isolados de *Clitoria fairchildiana* Howard(Leguminosae), PN-269, 2005, Poços de Caldas. **Anais...** São Paulo: 2005.

GUIMARÃES, D. M. **Ecologia reprodutiva de *Clitoria laurifolia* Poir. (Fabaceae: Faboideae): da floração à dispersão de sementes**. 2009. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, SP, 2009.

GUNN, C. R. 1984. **Fruits and seeds of genera in the subfamily Mimosoideae (Fabaceae)**. Technical Bulletin 1681:1-194.

Haida, K. S.; BARON, A.; SILVA, F. J. da; ARCELES, M. de L. FERNANDES, A.; ANDREAZZA, A. P.; JUCELAINE HAAS BARTH DA COSTA, J. H. B. da. Propriedade sequestrante de radicais livres e determinação do teor de fenólicos totais da sálvia e eucalipto. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, p. 61-66, 2011.

HARADA, T. N. **Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *A. salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais**. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento) - Programa de Pós-graduação em Saúde e desenvolvimento na região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, 2009.

HIROTA, B.C. K. **Estudo fitoquímico e das propriedades biológicas de *Jatropha multifida* L. (euphorbiaceae)**. 2011. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2011.

ITOH, T.; NINOMIYA, M. ;YASUDA, M. ; KOSHIKAWA, K.; DEYASHIKI, Y.; NOZAWA, Y.; AKAO, Y.; KOKETSU, M. Inhibitory effects of flavonoids isolated from fragaria ananassa duch on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 5374–5379, 2009.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução á taxonomia vegetal**. 7º Ed., Texas: Cia Nacional, 1985. p. 634

LEE, D. Y.; LYU, H. N.; KWAK, H. Y.; JUNG, L.; LEE, Y. H.; KIM, D. K.; CHUNG, I. S.; KIM, S. H.; BAEK, N. I. Isolation of Flavonoids from the Fruits of *Cornus kousa* Burg. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 50, p.144-147, 2007.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE B. D. **Leguminosae or Fabaceae?**. In: B. B. Klitgaard and A. Bruneau(editors). *Advances in Legume Systematics*, parte 10, Higher Level Systematics, editora: Royal Botanic Gardens, 2003. p. 1-3.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Eds.) **Legumes of the World**. England: Royal Botanic Gardens Kew, 2005. p. 1-7.

LIN, L. J.; RUANGRUNGSI, N.; CORDELL, A. G.; SHIEH, H. L.; YOU, M.; PEZZUTO, J. M. 6-deoxyclitoriacetal from *Clitoria macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 4329-4331, 1992.

MATHIAS, L.; MORS, W. B.; PARENTE, J. P. Rotenoides from seeds of *Clitoria fairchildiana*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 1449-1451, 1998.

MATHIAS, L.; SILVA, B. P.; 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.

MARSTON, A.; KISSILING, J. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MELECCHI M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus*: Estudo comparativo de métodos de extração**. 2005. 197f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2005.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E. ; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp- A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIDDLETON, E. J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Adv Exp Med Biol**, v. 439, p.175–82, 1998.

OKYAMA, T.; HOSOYAMA, K.; HIRAGA, Y.; KURONO, G.; TAKEMOTO, T. The constituents of *Osmunda* spp. II. A new Flavonol Glycoside of *Osmunda asiatica*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 26, p. 3071-3074, 1978.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

QUEROZ, D. C. de; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L. Constituintes químicos, Flavonóides Totais e Atividade Citotóxica e Antioxidante das Folhas de *Clitoria fairchildiana* Howard (Fabaceae). In: 32ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, PN-239, 2009, Fortaleza. **Anais 32ª RASQ**. São Paulo: 2009.

KAZUMA, K., NODA, N.; SUZUKI, M. Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, v. 64, p.1133–1139, 2003a.

KAZUMA, K., NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 229–237, 2003b.

KHANDUJA, K. L.; BHARDWAJ, A. Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared *in vitro* with some other bioflavonoids. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 40, p. 416-422, 2003.

KOGAWA, K.; KATO, N.; KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Purification and characterization of UDP-glucose: anthocyanin 3',5'-O-glucosyltransferase from *Clitoria ternatea*. **Planta**, v. 226, p.1501–1509, 2007.

RANDO, J. G.; SOUZA, V. C. *Clitoria* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29540>>. Acesso em: 20 Jan. 2014.

RIJE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER,.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1112, p. 31-63, 2006.

ROGERS, C. J.; HIXON, M. S.; YAMAMOTO N.; Xu Y.; OLSON A. J.; JANDA K. D. **Biochemistry**, v. 44, p. 4845-53, 2005.

SASAKI, M. **Lípidios, carboidratos e proteínas de sementes de Leguminosas do cerrado**. 2008 75f. Dissertação (Dissertação de mestrado). Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2008.

SERAFIN, C. **Estudo da composição químicas e das propriedades biológicas das partes aéreas de *Plinia glomerata***. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC, 2006.

SHEN, C. C.; CHANG, Y. S.; HO, L. K. Nuclear magnetic resonance studies of 5,7-dihydroxyflavonoids. **Phytochemistry**, v. 34, p. 843-845, 1993.

SHIENGTHONG, D.; DONAVANIK, T.; UAPRASERT, V.; ROENGSUMRAN, S. Constituents of thai medicinal plants - III new rotenoid compounds - stemonacetal, stemonal and stemonone. **Tetrahedron Letters**, v. 23, p. 2015-2018, 1974.

SHYAMKUMAR, ISHWAR, B. Anti inflammatory, analgesic, and phytochemical studies of *Clitoria ternatea* Linn flower extract. **International research journal of pharmacy**, v. 3, 2012.

SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. Rotenoids from roots of *Clitoria fairchildiana*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1787-1789, 1998a.

SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. Clitoriactal 11-O-beta-D-glucopyranoside from *Clitoria fairchildiana*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 121-124, 1998b.

SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. Rotenoids from seeds of *Clitoria fairchildiana*. **Phytochemistry**, v. 48, 1449-1451, 1998c.

SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Antiinflammatory Activity of Rotenoids from *Clitoria fairchildiana*. **Phytochemistry Res.**, v. 16, p. S87-S88, 2002.

SILVA, B. M. S.; MÔRO, F. V. Aspectos morfológicos do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal de faveira (*Clitoria fairchildiana* R. A. Howard. - FABACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, p. 195-201, 2008.

SILVA, D. H. S.; VIEGAS JR., C.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. DA S.; PIVATTO, M.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Espectralina, cassina e análogos semissintéticos como potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 38-46, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectroscópica de compostos orgânicos**, tradução: Ricardo Bicca de Alencastro, 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 488, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Porto Alegre/ Florianópolis, Ed. Universidade/ UFRGS/Ed. Da UFSC, p. 489-516/820, 1999.

SINHA, A. β and γ -sitosterols from the leaves and γ -sitosterol from the seeds of *Clitoria mariana*. **Indian Journal of Applied Chemistry**, v. 23, p. 40-42, 1960a.

SINHA, A. Chemical examination of the mucilage from the leaves and coloring matters from the flowers of *Clitoria mariana*. **Proceedings of the National Academy of Science, India, Section A: Physical Sciences**, v. 29, p. 42-46, 1960b.

SOLOWAY, S. B. Naturally Occurring Insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 14, p. 109-117, 1976.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005, p. 640

STAHL, E. **Thin-Layer Chromatography**: A Laboratory Handbook. 2^o Ed., New York: Heidelberg, 1969. p. 1041.

TAGUCHI, H.; KANCHANAPEE, P.; AMATAYAKUL, T. The constituents of *Clitoria macrophylla*, Thai medicine plant. The structure of a new Rotenoid Clitoriacetal. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1026-1030, 1977.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C. da, FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V., CARVALHO, J. E. de; FOGGIO, M. A. Constituintes Químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 28, p. 834-837, 2005.

VASCONCELOS, J. N. **Avaliação do potencial Químico e biológico *Tephrosia toxicaria* Pers. (Fabaceae)**. 2010 188f. Tese (Tese de doutorado), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2010.

VASCONCELOS, J. N.; SANTIAGO, G. M. P.; LIMA, J. Q.; MAFEZOLI, J.; LEMOS, T. L. G. de; SILVA, F. R. L. da; LIMA, M. A. S.; PIMENTA, A. T. A.; BRAZ-FILHO, R.; ARRIAGA, A. M. C.; CESARIN-SOBRINHO, D. Rotenoids from *Tephrosia toxicaria* with larvicidal activity against *Aedes aegypti*, the main vector of dengue. **Química Nova**, v. 35, p. 1097-1100, 2012.

VIEGAS, C. Jr.; BOLZANI V. da S.; BARREIRO E. J.; FRAGA C. A. New Anti-Alzheimer Drugs from Biodiversity: The Role of the Natural Acetylcholinesterase Inhibitors. **Mini Reviews Medicinal Chemistry**, v.10, p. 915-26, 2005.

WALKER, C. H. **Organophosphorous and carbamate insecticides. Organic Pollutants: An ecotoxicological Perspective**. New York: Taylor & Francis, 2001. p. 304

WILLIAMS, C. A.; GRAYER R. J. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural product reports**, v. 21, p. 539-573, 2004.

YADAVA, R. N.; VERMA, V. Antimicrobial activity of a novel flavonol glycoside isolated from the roots of *Clitoria ternatea* Linn. **Asian journal of Chemistry**, v. 15, p. 842-846, 2003.

YAMAMOTO, I. Mode of action of pyrethroids, nicotinoids and rotenoids. **Annual Review Entomology**, v.15, p. 257-272, 1970.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

YENESEW, A.; DERESE, S.; MIDIWO, J. O.; HEYDENREICH, M.; PETER, M. G. Effect of rotenoids from the seeds of *Millettia dura* on larvae of *Aedes aegypti*. **Pest. Manag. Sei.**, v.59, p. 1159-1161, 2003.