

**MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE DE ROTENÓIDES ISOLADOS E MODIFICADOS
DA ESPÉCIE *DERRIS URUCU***

MÁRCIA VERÔNICA DE SOUZA INÁCIO

Dissertação apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais

Orientadora: Doutora Leda Mathias

Co-Orientador: Carlos Roberto Ribeiro Matos

Campos dos Goytacazes-RJ

Março - 2007

**MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE DE ROTENÓIDES ISOLADOS E MODIFICADOS
DA ESPÉCIE *DERRIS URUCU***

MÁRCIA VERÔNICA DE SOUZA INÁCIO

Dissertação apresentada ao Centro de Ciência e
Tecnologia da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre em
Ciências Naturais

Aprovada em 07 de Março de 2007

Comissão Examinadora:

Prof^a. Rosana Aparecida Giacomini (Doutora, Ciências) – UENF

Prof. Edmilson José Maria (Doutor, Química Orgânica) – UENF

Prof^a. Laura Jane Moreira Santiago (Doutora, Ciências Biológicas) – UNIRIO

Prof^a. Leda Mathias (Doutora, Química de Produtos Naturais) – UENF (Orientadora)

Prof. Carlos Roberto Ribeiro Matos (Doutor, Química Orgânica) – UENF (Co-orientador)

Tudo posso naquele que me fortalece.

(Filipenses, 4:13)

Dedico este trabalho a minha avó Adelina (“in memoriam”), a minha mãe Alcinéa e as minhas irmãs Maria Rita e Margarida, pois sem o amor e o carinho desmedidos destas mulheres maravilhosas nada seria possível em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda força que me deu na conclusão deste trabalho e por sua presença diária em minha vida.

A minha mãe Alcinéa e minhas irmãs Maria Rita e Margarida pelos esforços jamais medidos com objetivo de me auxiliar.

A professora Dra. Leda Mathias por ter me acolhido na sua equipe e passado todos os conhecimentos necessários ao desenvolvimento do trabalho sem medir esforços.

Ao professor Dr. Carlos Roberto Ribeiro Matos pela orientação e pelas valiosas sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

As professoras Laura Jane Moreira Santiago e Rosana Aparecida Giacomini por aceitar participar da banca examinadora, e assim contribuir para o melhoramento deste trabalho.

Ao professor Ivo José Curcino Vieira pelas contribuições oferecidas.

Ao professor Edmilsom José Maria pelas sugestões, e pela colaboração oferecida com a revisão deste trabalho.

Ao professor Luis César Passoni por ter auxiliado no trabalho de revisão.

Ao professor Antônio Gilberto Ferreira “Giba” do Departamento de Química/Laboratório de RMN da UFScar pelos espectros de RMN (Brucker)

Aos técnicos Maristela e Roberto pela disponibilidade de sempre ajudar nas análises.

A Tânia por toda gentileza dispensada.

Aos indispensáveis e inesquecíveis colegas de laboratório (Débora, Elaine, Graziela, Ildomar, Lara, Marcelo e Vinicius), que me mostraram o verdadeiro sentido da palavra companheirismo.

As amigas Cecília, Débora, Elaine e Regina Angélica por toda ajuda e carinho.

A Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Centro de Ciência e Tecnologia (CCT) por ter oferecido o curso de mestrado em Ciências Naturais e ter disponibilizado todos os aparatos necessários ao bom desenvolvimento deste trabalho.

As minhas queridas amigas “Ruralinas” Claudia Andreia, Gabriela Bomfim, Marcela Monteiro e Vânia Carapiá pelas palavras de incentivo.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	lii
Lista de Esquemas	lv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
1.0 - Capítulo I: Introdução	1
2.0 - Capítulo II: Revisão de literatura	3
2.1 - Utilização de inseticidas no combate a pragas	3
2.2 - Algumas considerações sobre rotenóides	13
2.3 - Biossíntese de rotenóides	16
2.3.1 - Atividade biológica dos rotenóides	18
2.3.3.1 - Efeito sobre mamíferos	18
2.3.3.2 - Efeito sobre insetos	19
2.3.3.3 - Efeito sobre bactérias	19
2.3.3.4 - Efeito anticarcinogênico	20
2.4 - Síntese da rotenona	21
2.5 - Modo e ação dos rotenóides	24
2.6 - Considerações sobre a família Fabaceae	25
2.7 - Considerações sobre o gênero <i>Derris</i>	29
2.8 - Espécie <i>Derris urucu</i>	30
3.0 - Capítulo III: Objetivos	32
3.1 - Objetivos Gerais	32
3.2 - Objetivos Específicos	32
4.0 - Capítulo IV: Experimental	33
4.1 - Material Botânico	33
4.2 - Métodos cromatográficos	33
4.3 - Reações de Derivatizações	33
4.4 - Métodos Físicos	34
4.4.1 - Espectrometria na região do Infravermelho	34
4.4.2 - Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C	34
4.4.3 - Espectrometria de Massa (EM)	35
4.4.4 - Ponto de Fusão	35
4.5 - Avaliação Fitoquímica	35
4.5.1 - Isolamento da rotenona e da mistura binária 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodequelina	35
4.5.2 - Secagem, moagem e pesagem do material vegetal	35
4.5.3 - Preparação do extrato bruto	35
4.5.3.1 - Obtenção da rotenona	36
4.5.3.2 - Obtenção da mistura binária 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodequelina	36
4.6 - Modificações Estruturais	36
4.6.1 - Obtenção da 12-hidroxirottenona	36
4.6.2 - Obtenção da 6',7'-diidrorotenona.	37
4.6.3 - Obtenção da 6',7'-diidro-12-desidrorotenona	37
4.6.4 - Obtenção da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	37
4.6.5 - Reação de da rotenona com ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico	38

5.0 - Capítulo V: Resultados e Discussão	39
5.1-Isolamento e Identificação de rotenóides das raízes de <i>D. urucu</i>	39
5.1.2 - Determinação estrutural da rotenona	39
5.1.3 - Determinação estrutural da mistura de rotenóides	74
5.2 - Determinação estrutural dos derivados reacionais a partir da rotenona e da mistura binária desidrorotenona/desidrodeguelina	105
5.2.1-Reação de redução da rotenona com NaBH ₄	106
5.2.2 - Determinação estrutural 12-hidroxirottenona	107
5.2.3 - Reação de hidrogenação catalítica da rotenona	136
5.2.4 - Determinação estrutural da 6',7'-diidrorotenona	137
5.2.5 - Reação de redução da 6',7'-diidrorotenona com NaBH ₄	167
5.2.6 - Determinação estrutural da 6',7'-diidro-12,12a-desidrorotenona	167
5.2.7 - Reação de oxidação da mistura binária 6a,12a-desidrorotenona/6a,12a-desidrodeguelina.	185
5.2.8 - Determinação estrutural da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona.	185
5.2.9 - Reação da rotenona com ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico	223
5.2.9.1 - Determinação estrutural do produto da oxidação da rotenona com AMCPB	225
5.2.9.2 - Tentativas de reações com a mistura binária 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina	226
6.0 - Capítulo VI: Atividade Biológica	228
6.1 - Avaliação da atividade citotóxica frente as larvas de <i>Artemia salina</i> Leach	228
6.1.2 - Materiais e métodos	228
6.1.2.1 - Obtenção do extrato bruto de raízes de <i>D. urucu</i> e substâncias puras	228
6.1.2.2 - Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	229
7.0 - Capítulo VII: Conclusões	232
8.0 - Capítulo VIII: Constantes físicas e dados espectrométricos	233
8.1 - Constantes físicas e dados espectrométricos das substâncias puras e das modificadas	233
9.0 - Capítulo IX: Bibliografia	235

LISTA DE ABREVIATURAS DE SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico (ppm)
AA	Atividade Antioxidante
AMCPB	Ácido <i>meta</i> - cloroperbenzóico
APT	Attached Próton Test
ATP	Adenosina trifosfato
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CoA	Co-enzima A
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
COSY	Correlation Spectroscopy
<i>d</i>	Sinal duplo
<i>dd</i>	Duplo sinal duplo
DL ₅₀	Dose letal mínima responsável pela morte de 50% dos indivíduos testados
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC ₅₀	Concentração efetiva responsável pela morte de 50% dos indivíduos testados
EM	Espectro de massas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento (medida em

<i>m</i>	Hertz)
Me	Sinal múltiplo
<i>m/z</i>	Metil
OMe	Relação massa/carga
Pf	Metoxila
ppm	Ponto de fusão
RDA	Parte por milhão
RMN ¹³ C	Retro Diels-Alder
	Ressonância Magnética Nuclear de
	carbono – 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de
	Hidrogênio
<i>s</i>	Sinal simples
<i>t</i>	Sinal triplo
THF	Tetraidrofurano

Esquema 01 - Biossíntese de rotenóides	17
Esquema 02 - Síntese do ácido derrísico	21
Esquema 03 - Síntese da 6a,12a-desidrorotenona a partir do ácido tubálico	22
Esquema 04 - Síntese da 6a,12a-desidrorotenona a partir do ácido derrísico	22
Esquema 05 - Síntese da 6a,12a-desidrodeguelina a partir do ácido derrísico.	23
Esquema 06 - Síntese da isorotenona	23
Esquema 07 - Afinidades biossintéticas entre os flavonóides	29
Esquema 08 - Principais fragmentos de massas proposto para o espectro de	75
massa da mistura binária	
Esquema 09 - Propostas de modificações estruturais para obtenção de	106
derivados	
Esquema 10 - Principais fragmentos de massas proposto para a 12-	107
hidroxirotenona	
Esquema 11 - Reação de hidrogenação da rotenona	136
Esquema 12 - Representação do mecanismo proposto para hidrogenação	137
Esquema 13 - Principais fragmentos de massas proposto para a 6',7'-	138
diidrorotenona	
Esquema 14 - Produto de desidratação	167
Esquema 15 - Representação do mecanismo proposto para oxidação da	185
mistura binária	
Esquema 16 - Mecanismo de epoxidação	223
Esquema 17 - Mecanismo da reação de Baeyer-Villiger	224
Esquema 18 - Reação de oxidação da rotenona com AMCPB	224
Esquema 19 - Proposta de fragmentação da rotenona com AMCPB	225
Esquema 20 - Estrutura de ressonância do anel pirânico C	227

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Exemplos de inseticidas naturais da primeira metade do século	4
XX	
Figura 02 - Piretróides naturais e sintéticos	6
Figura 03 - Inseticidas naturais: Quassina, rianodina , sabadilla e veratridina	7
Figura 04 - Exemplos de inseticidas sintéticos da segunda metade do século	9
XX	

Figura 05 - Estrutura dos hormônios Juvenilizantes e ecdisona	11
Figura 06 - Estrutura dos hormônios Juvenóides	12
Figura 07 - Antagonistas de hormônios Juvenilizantes	13
Figura 08 - Rotenóides isolados do gênero <i>Derris urucu</i>	15
Figura 09 - Sistema Fenilbenzeno pirano	28
Figura 10 - Estrutura da rotenona	39
Figura 11 - Espectro de Infravermelho da rotenona	42
Figura 12 - Espectro de Massas da rotenona	43
Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da rotenona	44
Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 1,1-2,00 ppm) da rotenona	45
Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 2,8 -4,0 ppm) da rotenona	46
Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 3,94 -5,6ppm) da rotenona	47
Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 6,1-8,2 ppm) da rotenona	48
Figura 18 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da rotenona	49
Figura 19 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da rotenona	50
Figura 20 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da rotenona	51
Figura 21 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da rotenona	52
Figura 22 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da rotenona.	53
Figura 23 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 130,0 -190,0 ppm) da rotenona	54
Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região	55

entre 140,0 -190,0 ppm) da rotenona

Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 20,0 - 60,0ppm) da rotenona 56

Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 70,0 - 89,0 ppm) da rotenona 57

Figura 27 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 100,0 -105,0 ppm) da rotenona 58

Figura 28 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 110,0 -114,0 ppm) da rotenona 59

Figura 29 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da rotenona 60

Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C -APT(100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 20,0 -70,0 ppm) da rotenona 61

Figura 31 - Espectro de RMN ^{13}C -APT(100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 90,0 -130,0 ppm) da rotenona 62

Figura 32 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da rotenona. 63

Figura 33 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da rotenona 64

Figura 34 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da rotenona 65

Figura 35 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da rotenona 66

Figura 36 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da rotenona 67

Figura 37 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da rotenona 68

Figura 38 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da rotenona 69

Figura 39 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da rotenona 70

Figura 40 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da rotenona 71

Figura 41 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da rotenona 72

Figura 42 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da rotenona 73

Figura 43 - Estrutura da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 74

Figura 44 - Espectro de Infravermelho da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a- 79

desidrodeguelina

- Figura 45 - Espectro de Massas da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a- desidrodeguelina 80
- Figura 46 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 81
- Figura 47 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (expansão da região entre 1,24 - 8,44 ppm) da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 82
- Figura 48 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)(Expansão da região entre 1,1- 4,34 ppm) da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 83
- Figura 49 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)(Expansão da região entre 4,80 -5,90 ppm) da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 84
- Figura 50 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)(Expansão da região entre 1,0 - 4,5 ppm) da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 85
- Figura 51 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)(Expansão da região entre 6,3 - 8,8 ppm) da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 86
- Figura 52 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 87
- Figura 53 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 88
- Figura 54 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 89
- Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 90
- Figura 56 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 20,0 - 60,0 ppm) da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 91
- Figura 57 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 83,0-105,0 ppm) da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 92
- Figura 58 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 100,0-109,0 ppm) da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 93
- Figura 59 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 100,0-120,0 ppm) da 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina 94

Figura 60 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 124,0-154,0 ppm) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina	95
Figura 61 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 155,0-176,0 ppm) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina	96
Figura 62 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina	97
Figura 63 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina	98
Figura 64 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina	99
Figura 65 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina	100
Figura 66 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina	101
Figura 67 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina	102
Figura 68 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina	103
Figura 69 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina	104
Figura 70 - Estrutura da 12-hidroxirottenona	109
Figura 71 - Espectro de Infravermelho da 12-hidroxirottenona	111
Figura 72 - Espectro de massa da 12-hidroxirottenona.	112
Figura 73 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 12-hidroxirottenona	113
Figura 74 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 1,1-2,00 ppm) da 12-hidroxirottenona	114
Figura 75 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 2,8-3,6 ppm) da 12-hidroxirottenona	115
Figura 76 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região	116

entre 3,72-3,94 ppm) da 12-hidroxirotenona

Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 4,02-4,64 ppm) da 12-hidroxirotenona 117

Figura 78 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 4,80-5,23 ppm) da 12-hidroxirotenona 118

Figura 79 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 6,45-7,26 ppm) da 12-hidroxirotenona 119

Figura 80 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 12-hidroxirotenona. 120

Figura 81 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 12-hidroxirotenona 121

Figura 82 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 12-hidroxirotenona 122

Figura 83 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da 12-hidroxirotenona 123

Figura 84 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 20,0-70,0 ppm) da 12-hidroxirotenona 124

Figura 85 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 83,0-105,0 ppm) da 12-hidroxirotenona 125

Figura 86 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 108,0-131,0 ppm) da 12-hidroxirotenona 126

Figura 87 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 143,1-144,5 ppm) da 12-hidroxirotenona 127

Figura 88 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 148,9-150,1 ppm) da 12-hidroxirotenona 128

Figura 89 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 147,0-165,0 ppm) da 12-hidroxirotenona 129

Figura 90 - Mapa de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C (HMQC) da 12-hidroxirotenona 130

Figura 91 - Mapa de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C (HMQC) da 12-hidroxirotenona 131

Figura 92 - Mapa de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C (HMQC) da 12-hidroxirotenona 132

Figura 93 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 12-hidroxirotenona	133
Figura 94 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 12-hidroxirotenona	134
Figura 95 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 12-hidroxirotenona	135
Figura 96 - Espectro de Infravermelho da 6',7'-diidrorotenona	140
Figura 97 - Espectro de massas do 6',7'-diidrorotenona	141
Figura 98 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 6',7'-diidrorotenona	142
Figura 99 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 0,91-1,05 ppm) da 6',7'-diidrorotenona	143
Figura 100 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 1,24-2,04 ppm) da 6',7'-diidrorotenona	144
Figura 101 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 2,81-3,19 ppm) da 6',7'-diidrorotenona	145
Figura 102 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 3,72-3,86 ppm) da 6',7'-diidrorotenona	146
Figura 103 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 4,09-4,92 ppm) da 6',7'-diidrorotenona	147
Figura 104 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 6,40-7,82 ppm) da 6',7'-diidrorotenona	148
Figura 105 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 7,69-9,22 ppm) da 6',7'-diidrorotenona	149
Figura 106 - Mapa de correlação homonuclear COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ da 6',7'-diidrorotenona	150
Figura 107 - Mapa de correlação homonuclear COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ da 6',7'-diidrorotenona	151
Figura 108 - Mapa de correlação homonuclear COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ da 6',7'-diidrorotenona.	152
Figura 109 - Mapa de correlação homonuclear COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ da 6',7'-diidrorotenona	153

Figura 110 - Mapa de correlação homonuclear COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ da 6',7'-diidrorotenona	154
Figura 111 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da 6',7'-diidrorotenona	155
Figura 112 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 20,0-72,0 ppm) da 6',7'-diidrorotenona	156
Figura 113 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 88,0-118,0 ppm) da 6',7'-diidrorotenona	157
Figura 114 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 130,0-190,0 ppm) da 6',7'-diidrorotenona	158
Figura 115 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6',7'-diidrorotenona	159
Figura 116 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6',7'-diidrorotenona	160
Figura 117 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6',7'-diidrorotenona	161
Figura 118 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6',7'-diidrorotenona	162
Figura 119 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6',7'-diidrorotenona	163
Figura 120 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6',7'-diidrorotenona	164
Figura 121 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6',7'-diidrorotenona	165
Figura 122 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6',7'-diidrorotenona	166
Figura 123 - Proposta de fragmentação de massa para 6',7'-diidro-12,12a-desidrorotenona	168
Figura 124 - Espectro de massas da 6',7'-diidro-12,12a-desidrorotenona	170
Figura 125 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 6',7'-diidro-12,12a-desidrorotenona	171
Figura 126 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 0,50- 2,0 ppm) da 6',7'-diidro-12,12a-desidrorotenona	172
Figura 127 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 0,50- 2,0 ppm) da 6',7'-diidro-12,12a-desidrorotenona	173
Figura 128 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região	174

entre 2,0- 3,5 ppm) da 6',7'-diidro-12,12a- desidrorotenona	
Figura 129 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região	175
entre 3,6- 3,9 ppm) da 6',7'-diidro-12,12a- desidrorotenona	
Figura 130 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região	176
entre 3,7- 3,9 ppm) da 6',7'-diidro-12,12a- desidrorotenona	
Figura 131 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 6',7'-diidro-12,12a-	177
desidrorotenona	
Figura 132 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região	178
entre 6,50- 7,0 ppm) da 6',7'-diidro-12,12a- desidrorotenona	
Figura 133 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6',7'-diidro-	179
12,12a- desidrorotenona	
Figura 134 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6',7'-diidro-	180
12,12a- desidrorotenona	
Figura 135 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da 6',7'-diidro-12,12a-	181
desidrorotenona	
Figura 136 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região	182
entre 17,6-70,9 ppm) da 6',7'-diidro-12,12a- desidrorotenona.	
Figura 137 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da) (Expansão da	
região entre 89,4-161,4 ppm) da 6',7'-diidro-12,12a- desidrorotenona	183
Figura 138 - Mapa de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C (HMQC) da 6',7'-	184
diidro-12,12a-desidrorotenona	
Figura 139 - Espectro de massas da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	188
Figura 140 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 6-oxo-6a,12a-	189
desidrorotenona	
Figura 141 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região	190
entre 0,88-1,82 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	
Figura 142 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região	191
entre 3,30-4,50 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	
Figura 143 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região	192
entre 4,9-5,9 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	
Figura 144 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região	193
entre 5,6-9,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	
Figura 145 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6-oxo-	194
6a,12a-desidrorotenona	
Figura 146 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6-oxo-	195
6a,12a-desidrorotenona.	
Figura 147 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6-oxo-	196
6a,12a-desidrorotenona	
Figura 148 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6-oxo-	197
6a,12a-desidrorotenona	
Figura 149 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da 6-oxo-6a,12a-	198

desidrorotenona	
Figura 150 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 14,0-60,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	199
Figura 151 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 85,0-135,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	200
Figura 152 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	201
Figura 153 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 3,0-32,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	202
Figura 154 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 55,0-56,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	203
Figura 155 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 88,0-100,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	204
Figura 156 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 106,0-123,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	205
Figura 157 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 25,0-143,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	206
Figura 158 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 144,0-178,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	207
Figura 159 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 140,0-180,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	208
Figura 160 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	209
Figura 161 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	210
Figura 162 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	211
Figura 163 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	212
Figura 164 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	213
Figura 165 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	214
Figura 166 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	215
Figura 167 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	216
Figura 168 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	217

6a,12a-desidrorotenona.	
Figura 169 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	218
Figura 170 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	219
Figura 171 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	220
Figura 172 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	221
Figura 173 - Espectro de infravermelho da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	222
Figura 174 - Espectro de massas do produto de oxidação com ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico	226

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência de rotenóides isolados do gênero <i>Derris urucu</i>	14
Tabela 2 - Toxicidade da rotenona sobre vários organismos	18
Tabela 3 - Comparação da toxicidade da rotenona com outros inseticidas	19
Tabela 4 - Atividade Anti <i>Helicobacter pylori</i> de alguns rotenóides	20
Tabela 5 - Citotoxicidade de rotenona sobre células cancerígenas	21
Tabela 6 - Ordem Rosales	26
Tabela 7 - Distribuição geográfica das famílias da ordem Rosales	27
Tabela 8 - Classificação botânica de <i>Derris urucu</i>	31
Tabela 9 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da rotenona	41
Tabela 10 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da 6a-12a- desidrorotenona	77
Tabela 11 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da 6a-12a-desidrodeguelina	78
Tabela 12 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da 12-hidroxirottenona	110
Tabela 13 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da 6',7'-diidrorotenona	139
Tabela 14 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da 6',7'-diidro-12a-desidrorotenona	169
Tabela 15 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da 6-oxo-6a-12a desidrorotenona	187
Tabela 16 - Resultados obtidos no teste de letalidade frente às larvas de <i>Artemia salina</i>	231

RESUMO

INÁCIO, Márcia Verônica de Souza; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense; janeiro de 2007; Modificações Estruturais e Avaliação da Citotoxicidade de Rotenóides Isolados e Modificados da Espécie *Derris Urucu*; Orientadora: Leda Mathias; Co-Orientador Carlos Roberto Ribeiro Matos

O presente trabalho relata o estudo fitoquímico realizado em raízes da espécie *Derris urucu* (Fabaceae). A importância das plantas desse gênero deve-se ao fato das mesmas produzirem uma classe de substâncias isoflavonóidicas relacionadas à rotenona que possui atividade piscicida e inseticida. A partir desses estudos foram propostas algumas modificações estruturais nos rotenóides obtidos: rotenona e mistura binária 6a,12a- desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina, visando relacionar a citotoxicidade com a estruturas de rotenóides naturais e dos modificados quimicamente frente às larvas de *Artemia salina*. Foram realizadas duas reações de redução, hidrogenação catalítica e epoxidação com a rotenona. Com a mistura binária de 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina foi realizada reação de oxidação.

A determinação das substâncias foi realizada através da obtenção e interpretação de espectros na região do infravermelho (IV), espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN) a uma (1D) e duas (2D) dimensões e através de informações fornecidas pelo espectro de massas (EM) e dados da literatura.

ABSTRACT

INÁCIO, Márcia Verônica de Souza; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense; janeiro de 2007; Avaliação da Atividade Citotóxica de Rotenóides Isolados e Modificados da Espécie *Derris Urucu*; Orientadora: Leda Mathias; Co-Orientador Carlos Roberto Ribeiro Matos

The present work tells the phytochemistry study carried through in roots of the *Derris urucu* species (Fabaceae). The importance of the plants of this sort must it the fact of the same ones are produced a isoflavonoids substance related to rotenone that it holds piscicide and insecticidal activity. From these studies some structural modifications in rotenoids had been proposals gotten: rotenone and binary mixture of 6a,12a- dehydrorotenone and 6a,12a-dehydrodeguelin, aiming at chemically to relate the cytotoxicity with the natural structures of rotenoids and modified the front to the larvae of *Artemia salina*. Two reactions of reduction, catalytic hydrogenation and epoxidation with rotenone had been carried through. With the binary mixture of 6a, 12a- dehydrorotenone and 6a,12a-dehydrodeguelin was carried through oxidation reaction. The determination of substances was carried through the attainment and interpretation of specters in the region of the infrared ray (IV), of nuclear magnetic resonance spectra of ^1H and ^{13}C (RMN) to one (1D) and two (2 D) dimensions and through information supplied for the mass spectra (MS) and data of literature.

CAPÍTULO 1.0

INTRODUÇÃO

Desde as civilizações mais antigas, as plantas medicinais são usadas pelas mais distintas culturas, em todas as regiões do planeta. Com o decorrer dos anos esse uso foi cada vez mais se intensificando, e devido a esse fato durante séculos as plantas medicinais constituíram a base da terapêutica (SCHENKEL, 1985).

Com a evolução da química, a partir do século XIX, modificou-se a forma de utilização das plantas, e do uso direto destas e seus preparados, passou-se a utilizar as substâncias nelas contidas, chegando-se à síntese das substâncias ativas isoladas; e como consequência, relegou-se ao segundo plano a utilização da planta *in natura* (NEVES, 1998).

Até a década de 40, ocorreu uma predominância no uso de produtos de origem vegetal. Houve então, a utilização intensa de inseticidas derivados de produtos naturais. Com o surgimento dos inseticidas sintéticos, obtidos como subprodutos de pesquisa de agentes químicos biocidas durante a segunda grande guerra mundial, por serem mais potentes que os naturais, acabaram por praticamente substituí-los por completo. Atualmente, com o aumento no padrão de exigência das populações no que diz respeito à conscientização ecológica, ressurgem o interesse na utilização de defensivos naturais e não poluentes.

Assim sendo, a utilização de plantas medicinais vem atingindo um público cada vez maior, e o principal fator a contribuir para o crescimento dessa prática terapêutica consiste no desenvolvimento de estudos químicos, biológicos e/ou farmacológicos que comprovam a eficácia dessas plantas. No Brasil, com 30% das florestas tropicais do planeta, existem entre 40 a 200 mil espécies vegetais, das quais em torno de 10 mil são medicinais (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). Fato esse, que reflete a disponibilidade de matéria-prima para o desenvolvimento da pesquisa no país, bem como representa também esperança concreta para a cura de muitos males. Em outro contexto, o estudo dos produtos naturais justifica-se não só pela importância que assume na descoberta de novas substâncias naturais bioativas, produzidas pelo metabolismo secundário, como também pela significativa

contribuição para organização dos vegetais em classes segundo sua composição química (FERRACIN,1992).

Nos últimos anos, as substâncias naturais bioativas, produzidas pelo metabolismo secundário ganharam uma importância expressiva e atualmente cerca de 50.000 metabólitos secundários isolados de angiospermas tiveram sua estrutura elucidada quimicamente, graças ao avanço e modernização das técnicas de isolamento e determinação estrutural.

Outro aspecto importante dentro da química de produtos naturais é a enorme diversidade molecular de padrões estruturais que se encontram nas distintas classes de produtos naturais, como flavonóides, **rotenóides**, isoflavonóides, ligninas, neoligninas, terpenos, cumarinas, furocumarinas, quinonas, alcalóides, entre outras, que representam fontes inesgotáveis de modelos originais que possibilitam sua utilização como matérias-primas na síntese de substâncias bioativas. As modificações efetuadas na estrutura destas substâncias naturais constituem uma das estratégias para a manipulação do potencial biológico de uma determinada molécula.

Para auxiliar na avaliação do potencial biológico, o uso de bioensaios de citotoxicidade, pode representar uma ferramenta importante no que diz respeito a bioatividade das substâncias. Nesse contexto, o bioensaio de citotoxicidade frente as larvas de *Artemia salina* representa uma boa opção por tratar-se de um bioensaio de baixo custo, rápido e simples para determinação da DL₅₀ (µg/mL) de substâncias puras e extratos brutos (McLAUGHLIN *et al.*,1982). O ensaio de letalidade de organismos simples, como o microcrustáceo marinho *Artemia salina* Leach, permite a avaliação da toxicidade geral e é considerado um bioensaio preliminar no estudo de extratos e metabólitos especiais com potencial atividade biológica (MEYER, *et al.* 1982).

Existem relatos na literatura que correlacionam a citotoxicidade frente as larvas de *A. salina* com atividades antifúngicas, viruscida, antimicrobiana (MACRAE *et al.*,1998) parasiticida (SAHPAZ *et al.*,1994), tripanossomicida (ZANI *et al.*, 1995) e antitumoral (CITÓ *et al.*,2003). McLaughlin e colaboradores com o intuito de obter substâncias anticancerígenas têm utilizado este bioensaio na avaliação de extratos de plantas com potencial antitumoral, onde frações ativas testadas em diferentes culturas de células tumorais têm demonstrado uma boa correlação.

CAPITULO 2.0

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - UTILIZAÇÃO DE INSETICIDAS NO COMBATE A PRAGAS

Em geral a utilização de inseticidas no combate a pragas pode ser dividida em quatro períodos distintos:

a) A PRIMEIRA FASE DO SÉCULO XX

Na primeira metade do século XX, imperava a utilização dos inseticidas naturais tanto de origem orgânica como inorgânica.

Dentre os inorgânicos os mais usados foram o arseniato de cálcio e de chumbo, derivado de cobre, enxofre em pó ou na forma de vários sulfatos, cal, fluorsilicato de bário, amônioselenosulfito de potássio “cryolite” e óleos minerais derivados de petróleo. Entre estes, os inseticidas a base de arsênio foram os que apresentaram maior impacto ambiental e prejuízos a saúde humana.

Quanto aos orgânicos, estes podem ser divididos em:

- I. **Orgânicos sintéticos**, onde os mais utilizados foram os tiocianatos, ácido hidrocianico, brometo de metila, dicloroetileno, óxido de etileno, tartaratos, dinitrocresóis e dinitro-cicloexilfenóis.
- II. **Orgânicos naturais**, onde os mais utilizados foram os alcalóides (nicotina, nornicotina e anabasina (Figura 1, p. 4), piretróides (piretrina e aletrina) (Figura 2, p. 6) e rotenóides (rotenona, toxicarol, desidrorrotenona, rotoxenona e desidrodeguelina (Figura 1, p. 4), seguidos em menor escala dos quassinóides (quassina), rianodina e sabadilla, veratridina e cevadina (Figura 3, p. 7).

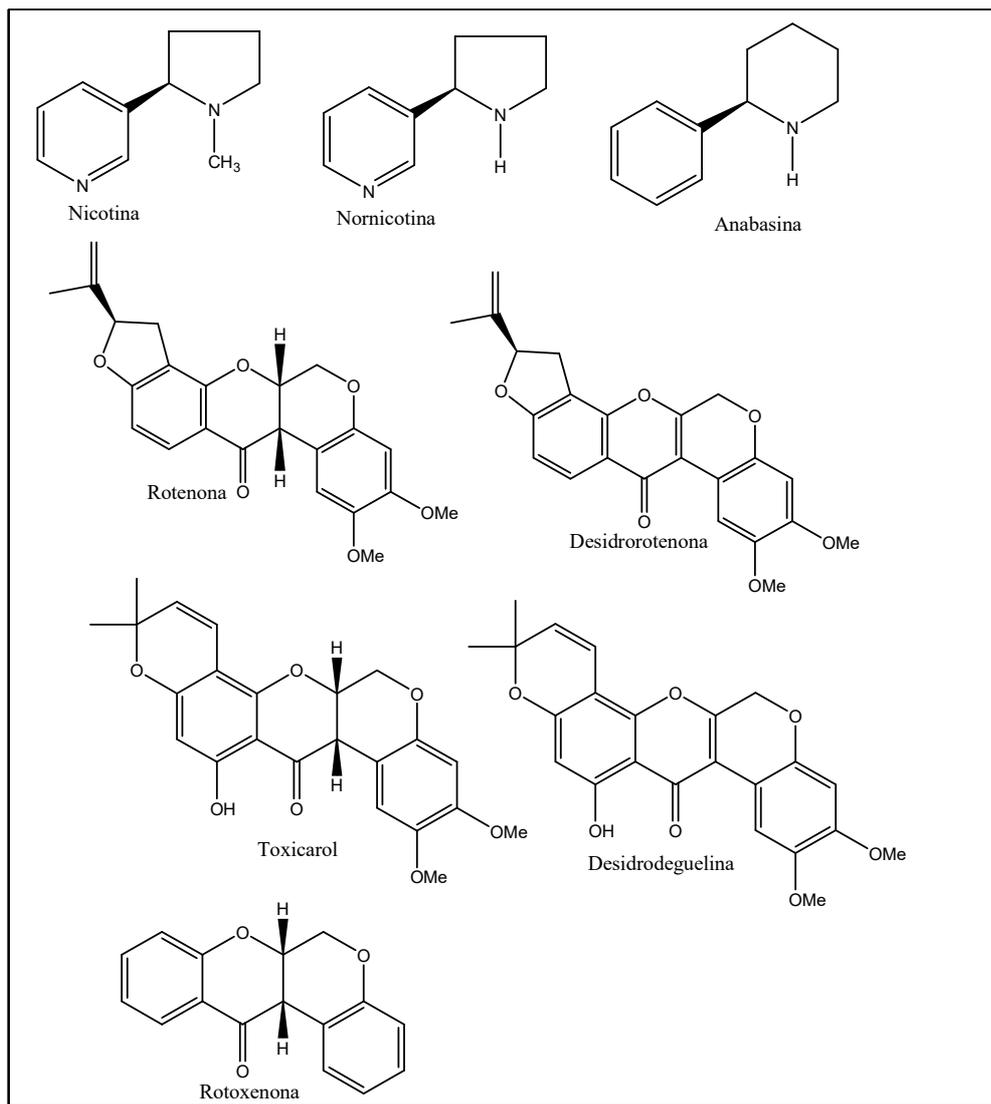


Figura 1- Alguns exemplos de inseticidas naturais utilizados na primeira metade do século XX

A nicotina foi utilizada pela primeira vez como inseticida na França no final do século XVII sob a forma de lavagem de fumo. O isolamento da substância pura (alcalóide) e seu emprego como inseticida em larga escala data de 1928, e sua síntese de 1904. A nicotina ocorre em aproximadamente 15 espécies de plantas do gênero *Nicotiana* (Solanaceae), sendo que as espécies mais utilizadas como inseticidas são a *N. tabacum* e *N. rústica*. Além da nicotina essas espécies apresentam outros alcalóides como a nicotimina, nornicotina, anabasina onde a nicotina representa cerca de 97% da fração alcaloídica total. A atividade inseticida,

fica restrita a nicotina, nornicotina e anabasina (Figura1, p. 4) (MARICONI,1981; SHMELTZ,1971).

O Piretro também conhecido como pó da Pérsia, teve sua primeira utilização no século XVII nas regiões do Cáucaso e norte do Irã. Originalmente o piretro foi extraído da trituração de flores de algumas espécies do gênero *Chrysanthemum* (Asteraceae). A grande vantagem, que impulsionou sua utilização e pesquisa, é a baixa toxicidade dos piretróides para mamíferos, ao contrário do que se observa com relação aos insetos (BOYCE,1974). As principais espécies, produtoras de piretro são *C. cinerariaefolium* e *C. coccineum*. As flores podem conter de 0,7 a 3% de princípio ativo piretrinas (MARICONI,1977).

O Piretro é vendido sob a forma de pó e de extrato bruto que é constituído de quatro substâncias inseticidas: piretrina I, piretrina II, cinerina I e cinerina II. As cinerinas são mais estáveis que as piretrinas enquanto que a piretrina I e cinerina I são mais tóxicas que a piretrina II e cinerina II (Figura 2 p. 6); (MARICONI, 1977).

De um modo geral, as piretrinas são mais tóxicas para os insetos que a nicotina. Entretanto, as piretrinas têm contra si diversos fatores: são caras; decompõem-se muito rapidamente, após a sua aplicação nas plantas, ou quando exposta ao ar. A baixa toxicidade das piretrinas para mamíferos e a sua alta toxicidade para insetos impulsionaram a utilização dessas substâncias até os dias atuais. O inseticida pode ser encontrado em formulações que vão desde líquidos, aerossóis e cartuchos empregados em dispositivos elétricos (MARICONI, 1977).

Dentre as sintéticas tem-se a aletrina, resmetrina e os derivados não ciclopropânicos, onde se destaca principalmente a deltametrina, o fenvalerato e o esfenvalerato (Figura 2, p. 6).

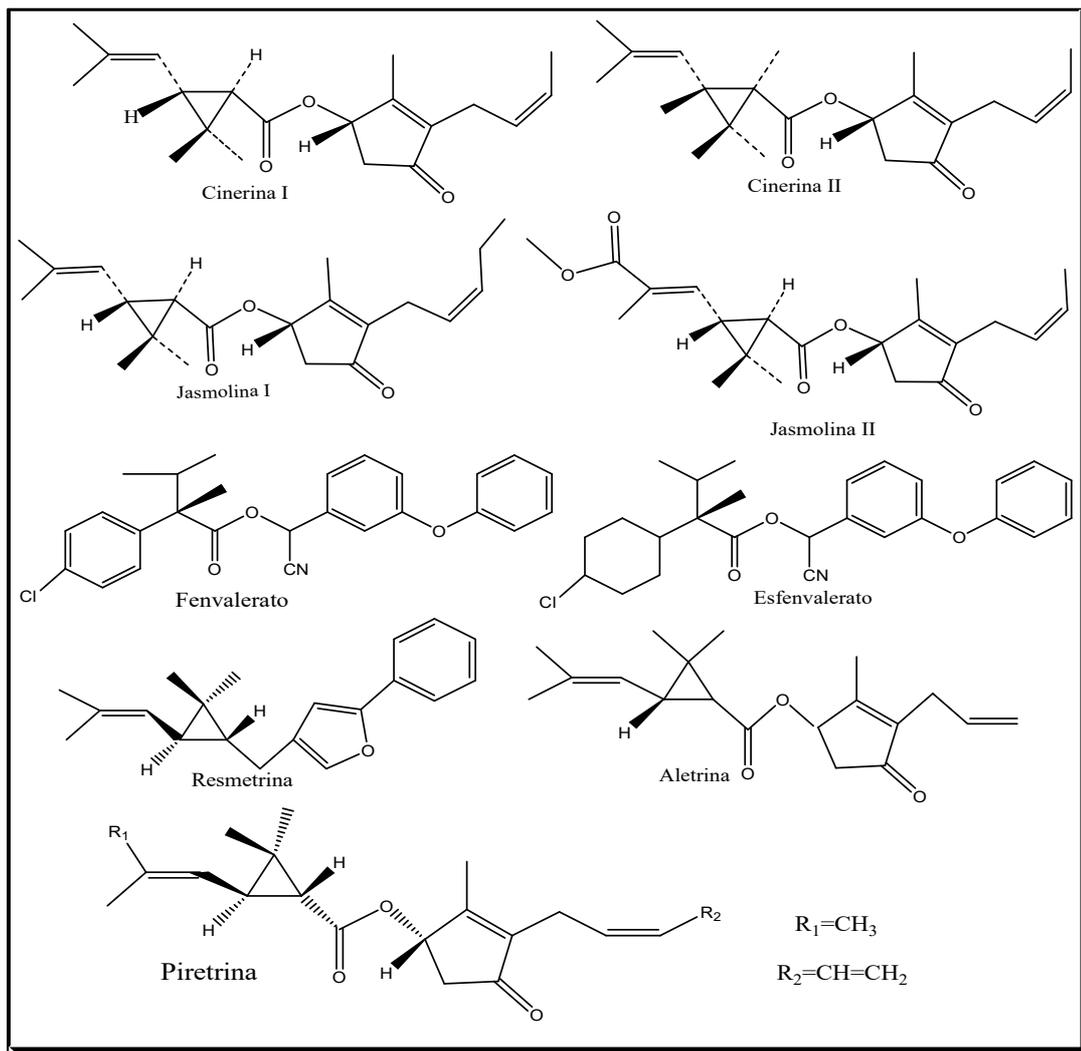


Figura 2 - Piretróides naturais e sintéticos

Quassina é um alcalóide isolado da espécie *Quassia amara* (Meliaceae) muito utilizado como inseticida natural, tanto para produtos armazenados quanto para pragas que infectam animais e plantas. A utilização da quassina como inseticida teve início no final do século XVII. Embora sua principal fonte de ocorrência seja a *Q. amara*, espécies dos gêneros *Aeschion*, *Picrasma* e *Ailantes*, existentes na América Central, do Norte e Índia também foram utilizadas por suas propriedades inseticidas (CROSBY, 1971).

A rianodina (Figura 3, p. 7) é um alcalóide encontrado em galhos e raízes de plantas do gênero *Ryania*. A substância ativa é obtida principalmente da espécie *Ryania speciosa* (Flacourtiaceae), cujos galhos e raízes contêm de 0,16 a 0,2% de rianodina que apresenta toxicidade para *Musca domestica* (mosca doméstica)

(MARICONI, 1977). Este alcalóide também pode ser encontrado nas espécies *R. acuminata*, *R. sagotiana* e *R. subtiflora*. A utilização desse princípio ativo é limitado devido ao alto custo e toxicidade.

A sabadilha é um inseticida natural encontrado em sementes da espécie *Schoenocaulon officinale* (Liliaceae). Planta conhecida como fonte de alcalóides veratrínicos e utilizada desde 1500 pelos índios americanos como pó inseticida (pó das sementes). Os principais alcalóides são a veratridina e cevadina (Figura 3, p. 7) na proporção de 10 e 13 % respectivamente, sendo que a cevadina é o mais tóxico (MARICONI, 1963).

A sabadilha é menos tóxica para animais de sangue quente, que a rotenona. Seu efeito residual é mais longo que o do piretro e da rotenona (MARICONI, 1963).

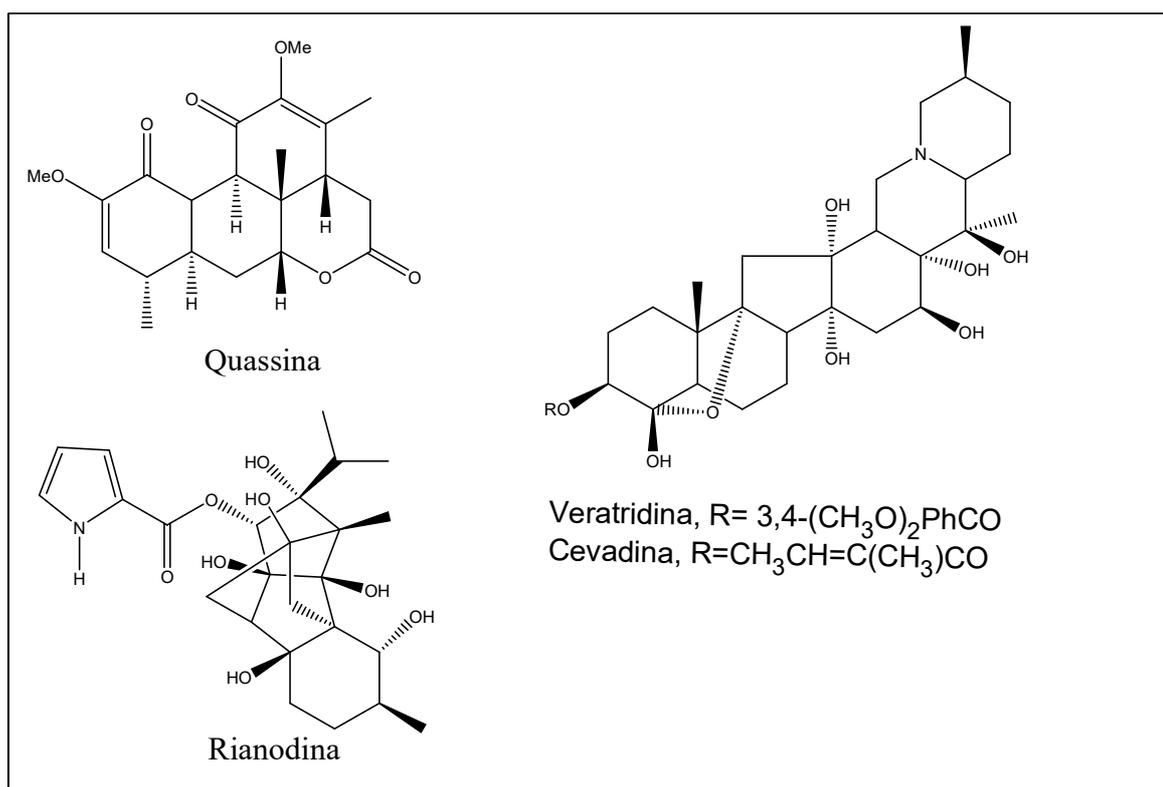


Figura 3 - Inseticidas naturais: quassina, rianodina, sabadilha e veratridina

A rotenona foi utilizada pela primeira vez como inseticida em 1948 na Malásia. Juntamente com os piretróides, os rotenóides já foram objeto de largo comércio, os Estados Unidos, por exemplo, importavam do Peru e do Brasil grandes

quantidades de raízes de *Derris*. No estado do Pará existiam cerca de 40 indústrias de moagem de raízes de *Derris*. As raízes eram moídas e submetidas à extração com CCl₄. A fração bruta obtida era então emulsificada com tensoativos ou diluída com querosene para posterior aplicação (JONES, 1931).

A rotenona foi isolada pela primeira vez na forma cristalina por Geoffroy (1896) em 1892 quando começou a pesquisar a espécie *Lonchocarpus nicou* (planta originária da Guiana Francesa). A substância foi denominada de “nicoulina”. Lenz (1911) isolou a mesma substância de *Derris elliptica* e denominou de “derrina” ou “tubatoxina”. Em 1912 K. Nagai a isolou das raízes de *D. chinensis* e deu-lhe o nome atual, “rotenona”, derivado de “roh-ten” denominação local da planta.

A rotenona se decompõe por exposição à luz e ao calor, originando como produto de oxidação a 6a,12a-desidrorrotenona (Figura 1, p.4), que não apresenta ação inseticida marcante. Consequentemente seu efeito sobre a superfície das plantas permanece por poucos dias. Ela não é tóxica para insetos ortópteros, porém é eficiente para hemípteros, lepidópteros e coleópteros parasitas de plantas e animais como a sarna de ovinos (WILLE, *et al*, 1939).

b) A SEGUNDA FASE DO SÉCULO XX

Logo após o término da Segunda Guerra, ocorreu um aumento na síntese e consumo de inseticidas sintéticos, e neste período os inseticidas naturais foram quase que esquecidos.

Nesta fase as indústrias químicas realizaram grandes negócios com o surgimento dos inseticidas clorados. O diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Figura 4 p. 9) surge como precursor desses inseticidas devido a sua alta toxicidade contra insetos, alta persistência e baixa seletividade, propriedades estas consideradas vantajosas na época. Durante muito tempo este inseticida foi considerado o mais eficaz no combate às pragas agrícolas. Posteriormente vieram o hexaclorobenzeno (BHC), Heptaclor (inseticida de contato) (Figura 4, p. 9) e logo a seguir foi introduzido o conceito de inseticidas sistêmicos, isto é, aqueles que circulam na seiva da planta, combatendo insetos sugadores, como percevejos e cigarrinhas. Desta classe de inseticidas os produtos sintéticos que mais se destacaram na época foram: Aldrin, Dieldrin e Clordano (Figura 4, p. 9).

Para aumentar as opções de uso e devido a algumas restrições de uso aos inseticidas clorados, foram lançados os organofosforados bem mais potentes e tóxicos, onde podemos citar o Paration e o Malation (Figura 4, p.9).

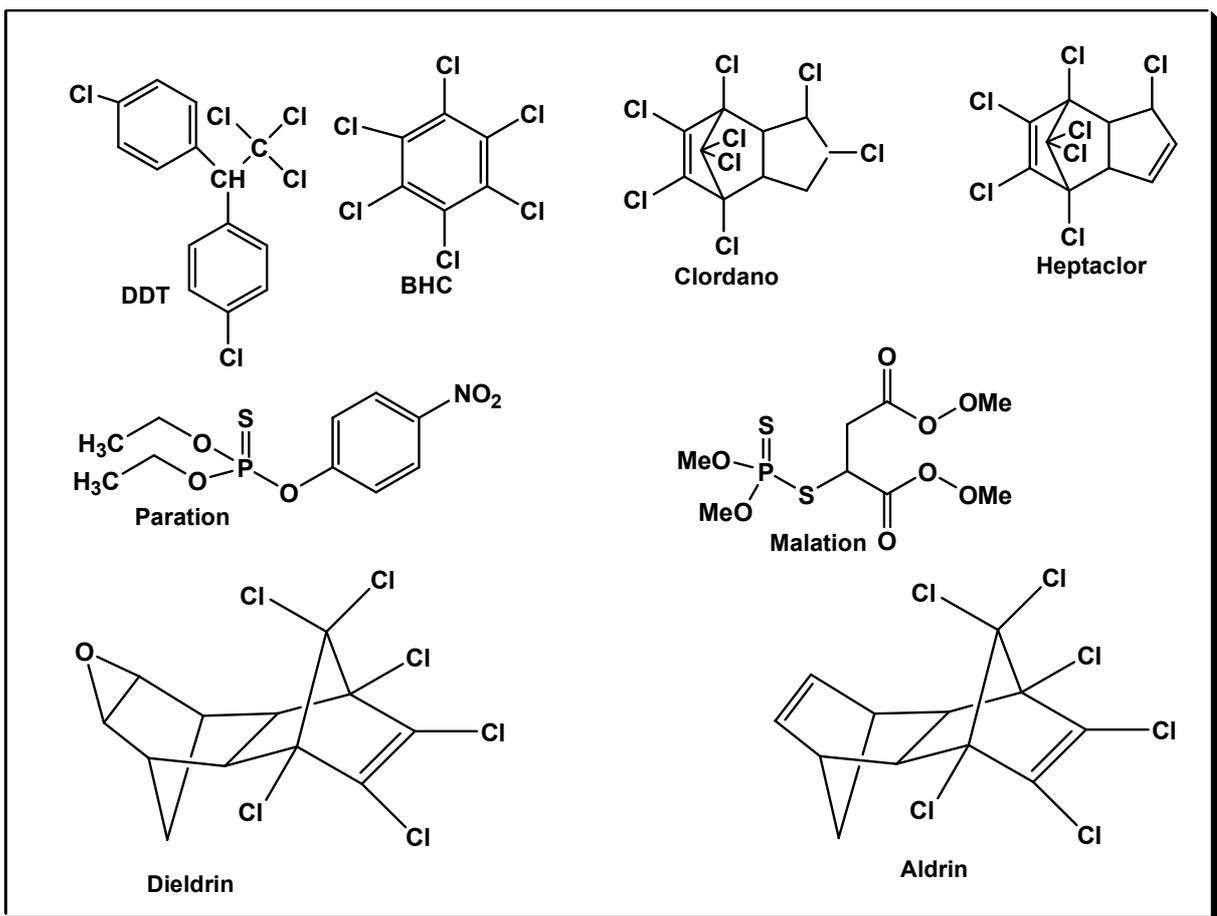


Figura 4- Alguns exemplos de inseticidas sintéticos utilizados na segunda metade do século XX

c) TERCEIRA FASE: DÉCADAS DE 50 A 70

Neste terceiro período de importância, logo após o término da Segunda Guerra, ocorreu uma verdadeira explosão tanto na síntese como na utilização de inseticidas sintéticos e nesta fase os inseticidas de origem natural foram colocados de lado.

O declínio desta fase surgiu por dois motivos principais. O primeiro foi a capacidade de adaptação da natureza em relação à mesma sistemática de controle de insetos imposta pelo homem, ou seja, o uso alternado e às vezes concomitante dos inseticidas clorados e fosforados de forma indiscriminada, gerando um processo de seleção natural, onde sobreviviam os insetos mais resistentes e sua reprodução obrigava a criação de novos inseticidas mais eficientes, e por vezes, mais nocivos ao ambiente.

O segundo motivo foi que alertados por trabalhos como o de Rachel Carson no seu livro *Silent Spring* (1962), o homem começou a refletir sobre a relação inseto-planta, e desta forma passou-se a respeitar um pouco mais os mecanismos naturais de adaptação. É bom salientar que essa reflexão não foi puramente ecológica, mas o homem observou que era necessário ser mais objetivo no que diz respeito ao controle de pragas, pois a simples inserção de novos agentes cada vez mais tóxicos não garantiria o controle a médio e curto prazo e ainda tornava crescente a poluição ambiental.

Após as décadas de 50-60, ocorreu uma mudança na mentalidade humana, pois passou a existir uma crescente preocupação com o ambiente, e este fato deixou de ser apenas uma questão filosófica. Dando espaço ao que chamamos hoje em dia de ecologia.

Os inseticidas sintéticos passaram a ser desenvolvidos com o objetivo de serem mais seletivos, atuando em pragas específicas e não destruindo os predadores naturais dos insetos alvos. Um inseticida biodegradável passou a ser uma característica almejada para que o ambiente não sofresse com o acúmulo de substâncias tóxicas, já que a persistência agora já não representava uma vantagem. Portanto, melhor seria diminuir a população de insetos alvos no período de maior incidência, a erradicá-los e promover uma maior contaminação ambiental.

d) QUARTA FASE: DÉCADA DE 70 ATÉ OS DIAS ATUAIS

Principais fatos ocorridos nesse período: mudança radical da mentalidade, preocupação com preservação do meio ambiente, surgimento de novos conceitos visando à busca de seletividade, biodegradabilidade e a utilização de métodos alternativos de combate a insetos, tais como: uso de feromônios, combate integrado com inimigos naturais, produtos naturais insetifugos e fagorrepelentes, mutações induzidas (esterilidade), hormônios e estratégias (armadilhas químicas) que busquem o equilíbrio do ecossistema.

Uma das estratégias investigada é o emprego de hormônios, utilizados no controle por comportamento, onde são usados os hormônios endócrinos tais como; hormônio juvenil (JH) e o ecdisônico (Figura 5, p.11) os quais regulam o desenvolvimento e metamorfose dos insetos. O hormônio juvenil retarda o desenvolvimento e o hormônio ecdisônico acelera. Assim, sua síntese para aplicação como método de controle tem sido bastante difundida, apresentando como grande vantagem a dificuldade para o desenvolvimento de populações resistentes, pois os insetos dificilmente adquirem resistência a seu próprio hormônio (GALLO, *et al*, 2002).

Um dos componentes do hormônio juvenil de *Cecropia* (Saturniidae) foi isolado, sintetizado e testado contra insetos. A substância agia por contato e indiscriminadamente, isto é, matando insetos que atuavam como pragas e também seus inimigos naturais (GALLO, 1978).

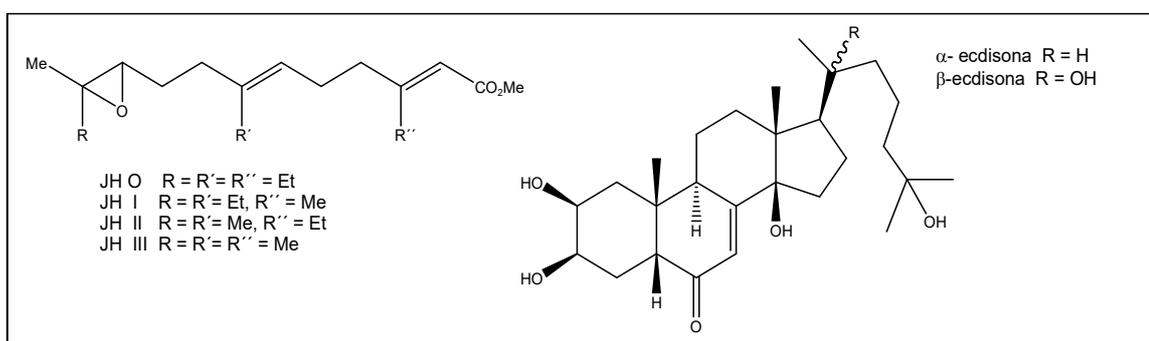


Figura 5- Estruturas dos hormônios juvenilizantes e ecdisonas

A descoberta dos efeitos análogos do hormônio juvenil contra insetos ocorreu casualmente quando se verificou o efeito de terpenos (metropreno, hidropreno e

quinopreno) (Figura 6, p.12) presentes no bálsamo de abeto sobre o percevejo *Pyrrhocoris apterus*. Essas substâncias, conhecidas como juvenóides, simulam o mesmo efeito dos hormônios juvenis biossintetizados pelos insetos (GALLO, *et al*, 2002). O metropreno faz parte de uma geração de inseticidas modernos, conhecida como juvenóides e age contra larvas de pernilongos e insetos voadores de diversas ordens (Diptera, Lepdoptera, Coleoptera, Siphonaptera e Hymenoptera) (GALLO,1978). Quinopreno é utilizado no controle de afídeos e moscas brancas. O hidropreno interfere diretamente sobre a ecdise dos insetos sendo eficiente no controle de insetos de espécies das ordens Lepdoptera, Coleóptera, homóptera e Blattodea (GALLO, 1978).

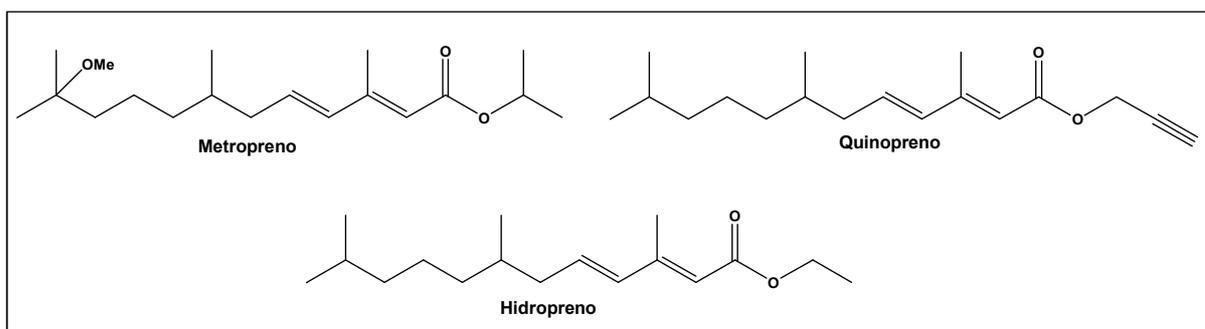


Figura 6- Estruturas dos hormônios juvenóides

O hormônio β -ecdisona foi isolado de pupas de bicho da seda localizadas nas folhas de *Taxus bacata*. Esse hormônio age estimulando a metamorfose de larvas, um efeito oposto à atividade do hormônio juvenil. Para estimular a metamorfose de um inseto são necessárias concentrações extremamente baixas de ecdisona (BUTENANDT, *et al*, 1965).

Outra estratégia de controle de insetos é a utilização de outros grupos modernos de substâncias que são os anti-hormônios do hormônio juvenil. As substâncias precoceno I e II (Figura 7, p.13) são responsáveis pela inibição da metamorfose em larvas de insetos (PRATT & BOWERS, 1977).

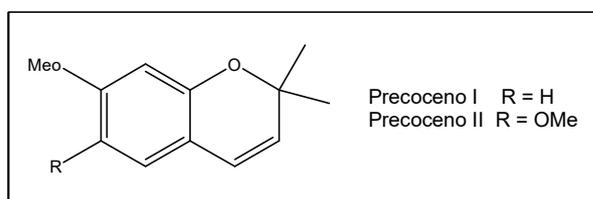


Figura 7- Antagonistas de hormônios juvenilizantes

Outra alternativa usada no controle de insetos é a utilização de hormônios de ovoposição. Esses hormônios agem impedindo a ovoposição e conseqüentemente o crescimento da população de pragas (VENDRAMIM & CASTIGLIONI, 2001). Estudos relatam que fatores químicos influenciam na ovoposição de fêmeas de várias espécies de mosquitos. Por exemplo, fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* mostraram-se sensíveis a vários semioquímicos, tais como: 6-hexanolactona, metil dodecanoato, ácido dodecanóico, 7,11-dimetiloctadecano entre outros (KUMARAN *et al.*, 2006).

2.2 - ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE ROTENÓIDES

Dentro do contexto onde se busca a redução do impacto ambiental, ressurgem o interesse no estudo e na utilização de defensivos não poluentes. Assim sendo, os rotenóides, principalmente a rotenona, apresentam-se como um bom candidato, visto que possui atividade inseticida e apresenta baixa persistência no ambiente, devido a sua degradação físico-química (HOWARD, 1988).

A rotenona apresenta baixa toxicidade contra mamíferos (inclusive o homem). A substância apresenta ainda, eficiência no uso agrícola, veterinário e farmacêutico, podendo ser utilizada como uma opção aos agrotóxicos e inseticidas sintéticos e inorgânicos.

O estudo da natureza química da rotenona ganhou ênfase, pois a mesma surgiu como um promissor agente praguicida, interessante sob o ponto de vista ecotoxicológico (ROSSI, *et al.* 1988). A rotenona possui atividade tóxica para peixes, e algumas classes de insetos, e tem amplo efeito contra parasitoses de animais, como a sarna dos ovinos (WILLE *et al.* 1939).

As principais fontes de rotenóides são raízes de leguminosas do gênero *Derris* e afins. Outras famílias de Angiospermas também se caracterizam pela produção de rotenóides, dentre elas destacamos a Iridaceae e a Nyctaginaceae. Estudos indicam que essas plantas são as mais eficazes dentre um vasto conjunto de vegetais conhecidos como ictiotóxicos (PIRES, 1973; ARAGÃO).

O uso de plantas ictiotóxicas no Brasil tem sido referido desde a descoberta das Américas, sabe-se que os indígenas de diversas regiões do Brasil, particularmente da bacia amazônica, faziam sua pesca aplicando o suco leitoso de certos vegetais.

A tabela 1 mostra a ocorrência de alguns rotenóides isolados do gênero *Derris*.

Tabela 1. OCORRÊNCIA DE ROTENÓIDES ISOLADOS NO GÊNERO *DERRIS*

Espécie	Substância isolada	Parte da Planta	Referência
<i>D. oblonga</i>	A, B	Raiz	YUN-LIAN & YUEH-HSIUNG KUO. (1992).
<i>D. elliptica</i>	C, D	Raiz	F. DELLE MONACHE <i>et al.</i> (1978)
<i>D. malacensis</i>	A, C, D, E, F,G, H, I, J, K	Raiz	JUNKO TAKASHIMA <i>et al.</i> (2001).
<i>D. trifoliata</i>	B, C, D, F, K, L	Raiz	CHIIRO ITO <i>et al.</i> (2004).

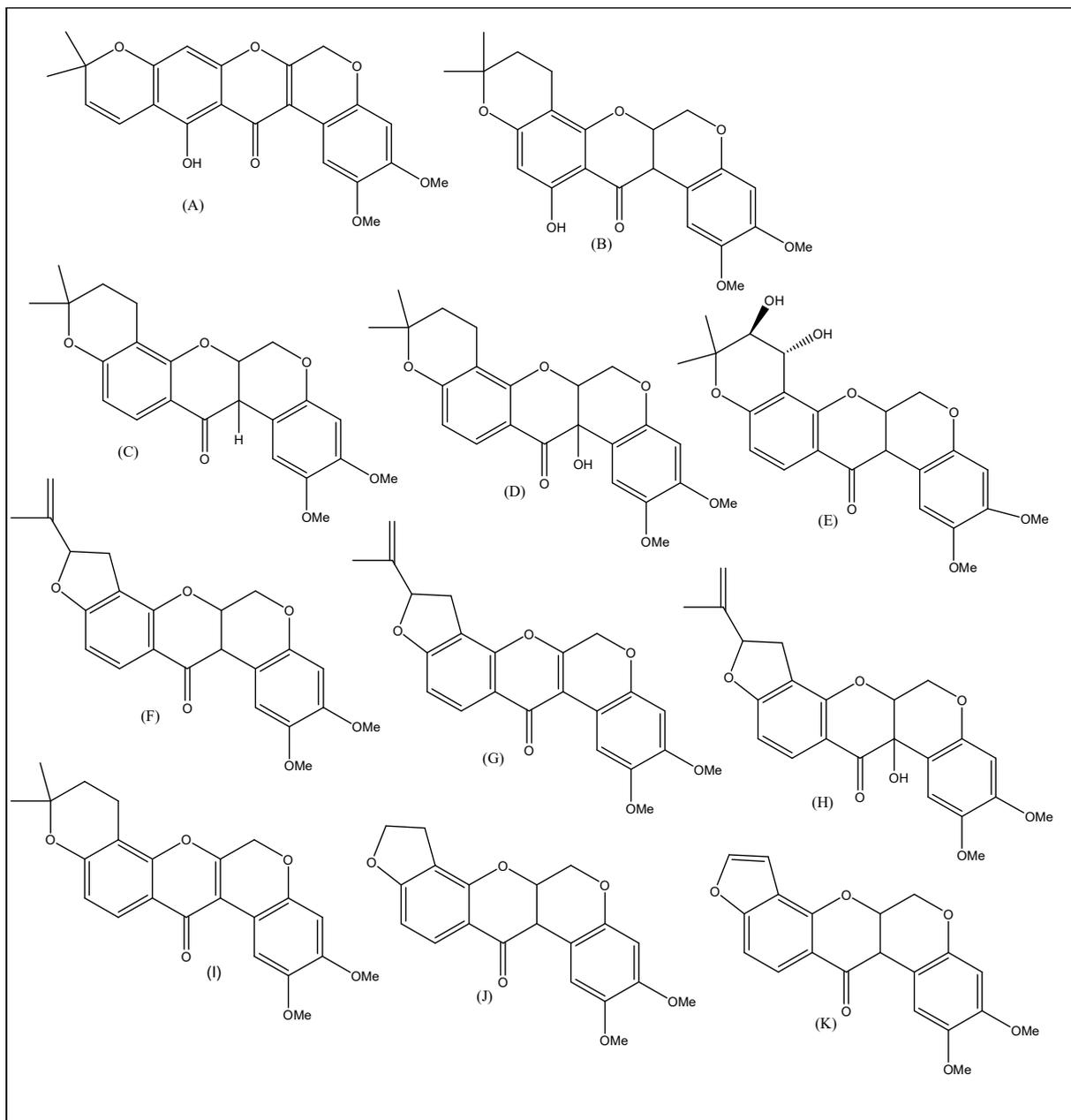
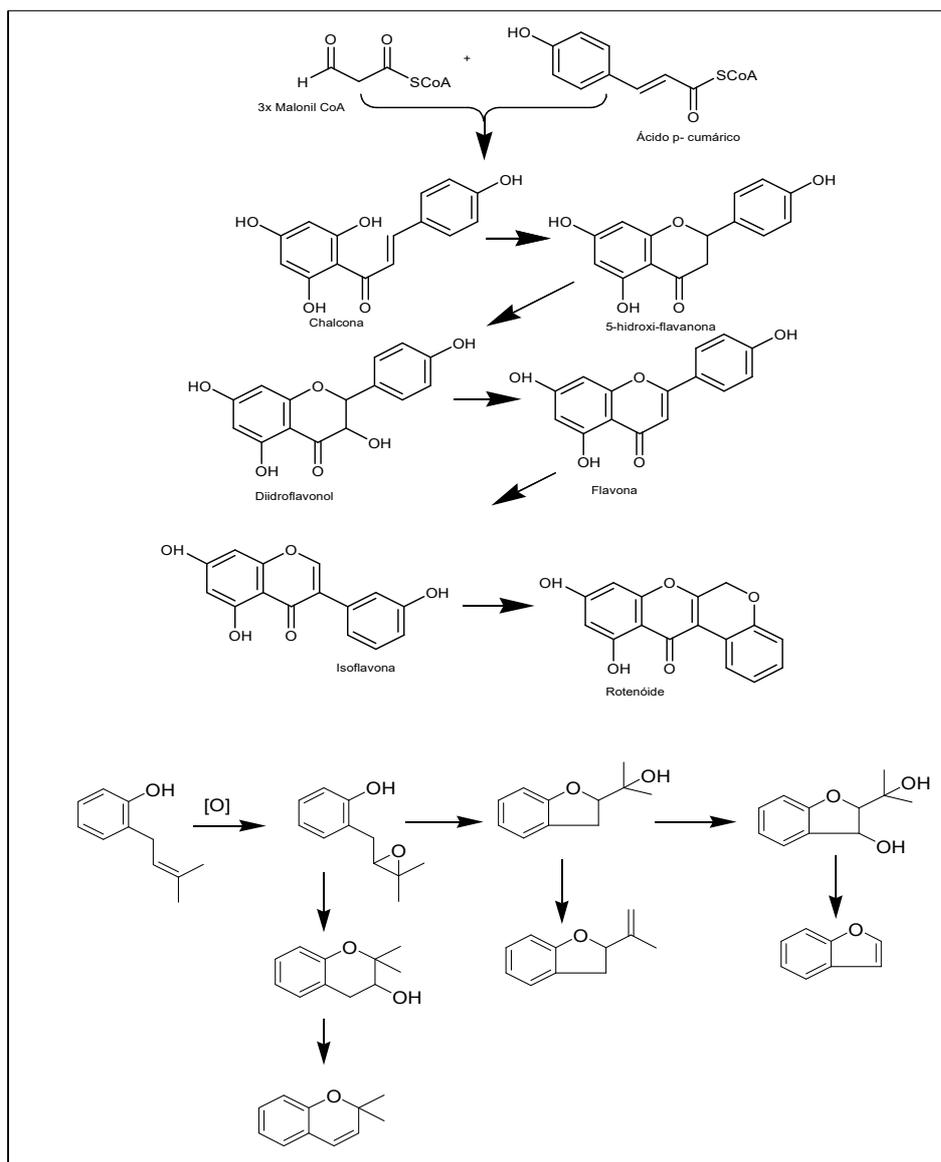


Figura 8 - Rotenóides isolados do Gênero *Derris*

2.3 - BIOSSÍNTESE DE ROTENÓIDES

Os rotenóides fazem parte de um grupo de substâncias naturais que possuem em comum um esqueleto de quatro anéis, 6a,12a-diidro-12-rotoxenona. Biogeneticamente trata-se de isoflavonas modificadas com um átomo de carbono extra no sistema heterocíclico, conforme o apresentado no Esquema 1, p. 17.

A subfamília papilionoideae caracteriza-se por apresentar em suas espécies vegetais unidades de isopreno nos esqueletos de isoflavonóides e flavonóides. Esta unidade de cinco anéis de carbonos, conhecida como grupo prenila, pode se apresentar sob várias formas modificadas, diferindo no estado de oxidação e também envolvida na formação do anel (furano, dimetilcromeno, isoprenildiidrofurano), por enlace com uma hidroxila vizinha (CROMBIE, 1982).



Esquema 1- Biossíntese de rotenóides e formação de substituintes prenilados comumente encontrados em isoflavonóides de Papilionoideae

2.3.1. ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ROTENÓIDES

2.3.3.1. EFEITO SOBRE MAMÍFEROS

FEINSTEIN *et al.* (1963) revisaram a toxicidade da rotenona sobre mamíferos, e HAAG (1931;1937) a comparou com outros venenos administrados por via oral.

A rotenona é mais tóxica para insetos, peixes e outros animais de sangue frio do que para mamíferos (Tabela 2). Estudos realizados por SANTI, *et al.* (1966) sobre as propriedades farmacológicas da rotenona em cobaias mostraram que a substância exerce um forte efeito miolítico semelhante ao da papaverina.

TABELA 2- Toxidez da rotenona sobre vários organismos (NEGHERBON 1959)

Animal	Via de administração	DL₅₀ (mg/kg)
Rato	Oral	132
cobaia	Oral	200
	Intraperitoneal	15
Abelha	Oral	3
Percevejo	Tópico	25
Barata	Tópico	2000
	Oral	1000
	Injetável	5
Besouro	Tópico	25
	Injetável	40
Tabaqui	Tópico	2,6
Tilápia	Tópico	4,8
Cascudo	Tópico	14,20

2.3.3.2. EFEITO SOBRE OS INSETOS

Várias pesquisas têm sido realizadas com a intenção de se estabelecer a ação da rotenona em diferentes classes de insetos (ROARK,1937; McINDOO,1947; McINDOO *et al.* 1919). Em contra partida, existem poucos dados a respeito de outros rotenóides que foram isolados posteriormente. A Tabela 3 compara a toxicidade da rotenona com outros inseticidas.

Substância	DL₅₀ (mg/kg)
Rotenona	3000
Arseniato	100
Nicotina	30
Cloreto mercúrico	25
Estricnina	4,24

TABELA 3- Comparação da toxidez da rotenona com outros inseticidas (FUKAMI, 1967)

2.3.3.3. EFEITO SOBRE BACTÉRIAS

Existe relato na literatura de trabalhos realizados para verificação de atividade antibacterial contra *Helicobacter pylori*, a maior causadora de gastrite crônica e úlcera péptica. TAKASHIMA, *et al.* (2002) avaliaram 10 rotenóides isolados de *Derris malaccensis* contra *H. pylori*. A Tabela 4 mostra que a rotenona apresentou uma concentração mínima inibitória (MIC) de 1,3 µg/mL, outros rotenóides tais como, toxicarol, tefrosina e deguelina apresentaram-se mais ativos.

Outros microorganismos foram testados para avaliação da atividade antimicrobiana desses rotenóides: Bactérias gram positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 e *Bacteróides fragilis* ATCC 25285), bactérias gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 10536 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), e fungos (*Candida albicans* ATCC 10231). Esses rotenóides foram inativos contra todos os microorganismos testados mesmo numa concentração de 625 µg/mL.

TABELA 4-Atividade anti- *Helicobacter pylori* de alguns rotenóides (TAKASHIMA, 2002).

Substância	MIC (mg/mL)
derrisina	85.0
rotenona	1.3
rotenolona	1.3
desidrorotenona	9.8
deguelina	0.6
tefrosina	0.3
toxicarol	0.3
desidrodeguelina	4.0
eliptona	3.0

2.3.3.4. EFEITO ANTICARCINOGENICO

Rotenóides são conhecidos como agente anticarcinogênico. Estudos demonstram o efeito da rotenona, eliptona, 6,12a-diidroxieliptona, deguelina e α toxicarol sobre o crescimento de células cancerígenas em culturas de células e tumores experimentais. A substância 12a-hidroxiamorfigenina isolada de *Amorpha fruticosa* foi a primeira a exibir um efeito citotóxico extremamente alto em seis linhagens de células neoplásicas (LI, *et al*, 1993).

Testes para estabelecer o potencial citotóxico da rotenona em cultura de células P-388 Kb, bem com em vários tipos de tumores sólidos humanos (fibrossarcoma, pulmão, fígado, cólon, câncer de mama e melanoma), são mostrados na Tabela 5, p. 21.

TABELA 5 - Citotoxicidade da rotenona sobre células cancerígenas(LI, *et al*, 1993).

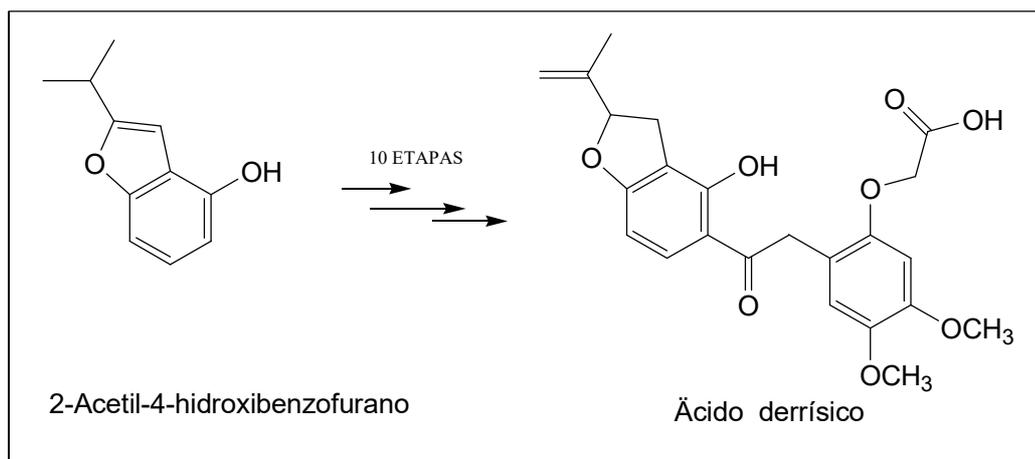
Linhagem de células	DL ₅₀ (μ g/mL)
BC-1 câncer de mama	0,039
COL-2 câncer de cólon	0,15
HT- 1080 fibrossarcoma humano	0,047
LU-1 câncer de pulmão	0,044
MEL-1 melanoma	0,092

KB carcinoma de nasofaringe	0,067
P-388 leucemia linfocítica	0,005

2.4 - SÍNTESE DA ROTENONA

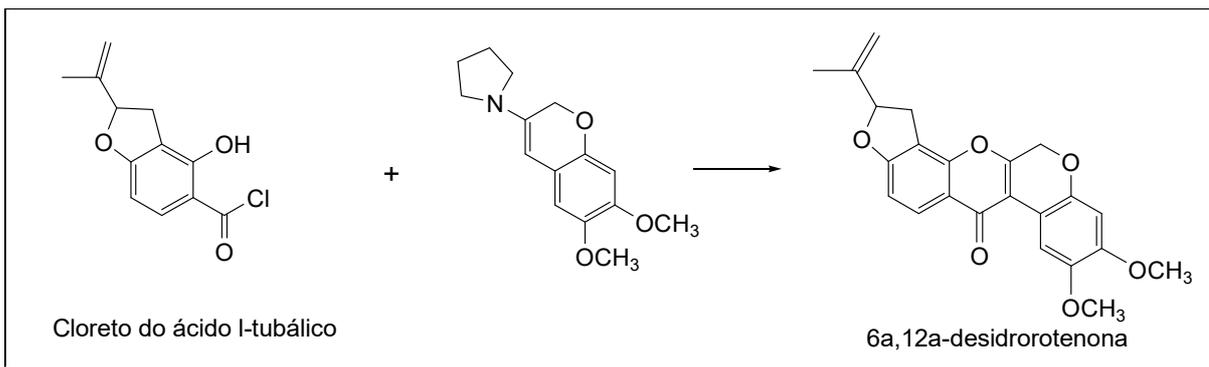
A estrutura da rotenona foi elucidada a partir dos trabalhos realizados por BUTENANDT, LaFORGE (1933) e TAKEI em 1932. A sua estereoquímica foi determinada por BUCHI & CROMBIE (1961), e foi confirmada através da cristalografia de raios-X do derivado 8-bromo do (6a*S*,12a*S*,5'*R*)-rotenona, determinando assim, sua configuração absoluta.

A primeira síntese total e formal da rotenona foi realizada em 10 etapas, utilizando como material de partida o 2-acetil-4-hidroxibenzofurano, entretanto o rendimento do precursor imediato da rotenona, o ácido *dl*-derrísico, foi de apenas 0,01%; inviabilizando a síntese (Esquema 2).



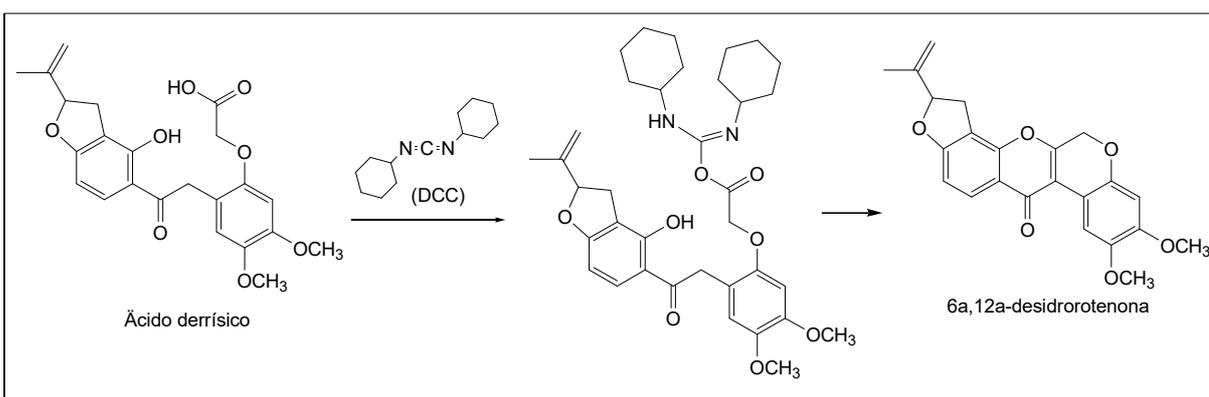
Esquema 2- Síntese do ácido derrísico

MIYANO (1965), sintetizou a desidrorotenona utilizando como etapa chave à reação de condensação do cloreto de ácido tubálico com uma enamina convenientemente funcionalizada (Esquema 3). O rendimento da síntese foi de 14,6 %.



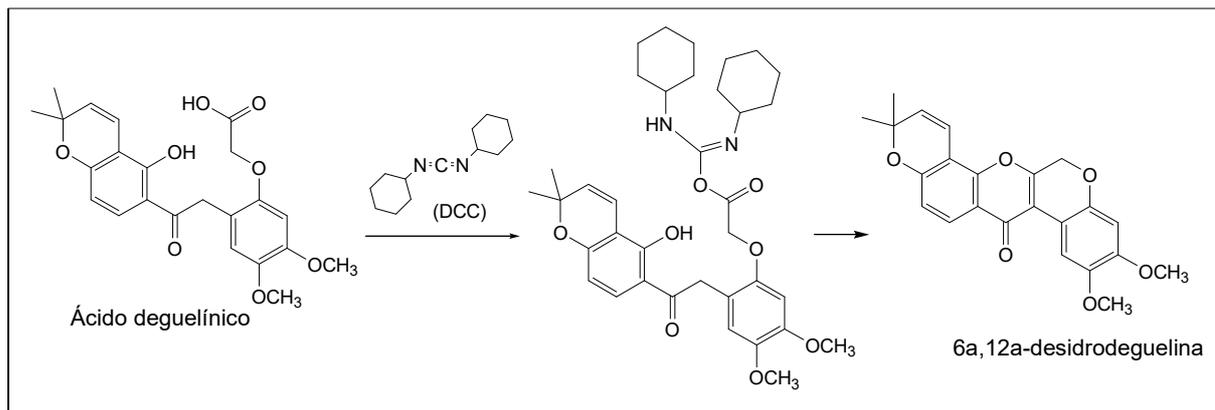
Esquema 3. Síntese da 6a,12a-desidrorotenona a partir do ácido tubálico

No mesmo ano, MIYANO converteu ácido derrísico em desidrorotenona utilizando dicicloexilcarbodiimida (DCC) em meio básico. O rendimento da reação foi de 40% (Esquema 4).



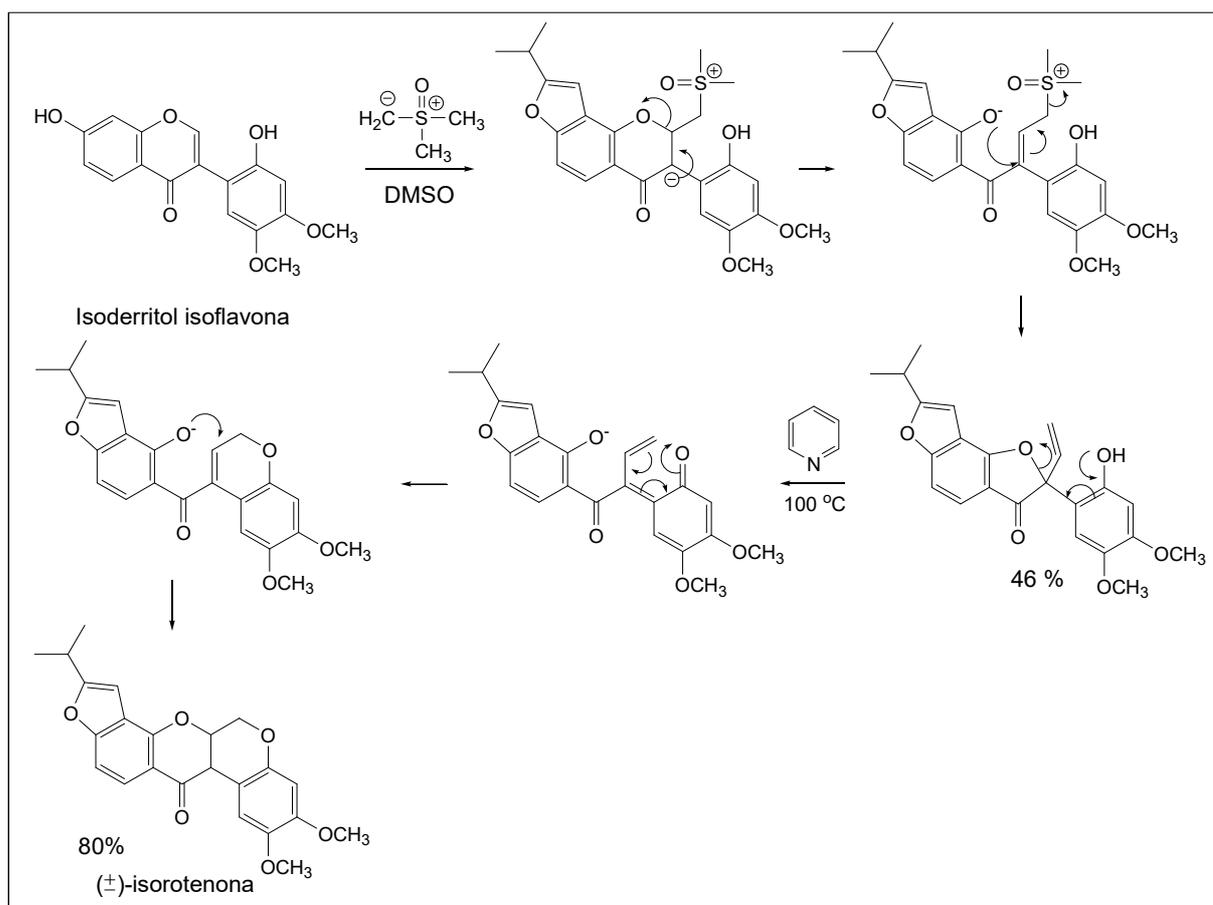
Esquema 4- Síntese da 6a,12a-desidrorotenona a partir do ácido derrísico

Nesse mesmo trabalho o ácido deguelínico foi convertido em deguelina utilizando a mesma metodologia acima citada, porém o rendimento obtido foi muito baixo (Esquema 5, pag.23).



Esquema 5- Síntese da 6a,12a-desidrodeguelina partir do ácido derrísico

CROMBIE, *et al.* (1973), sintetizaram vários rotenóides como o 9-dimetilmunduserona, munduserona, ácido rotenóico, dalpanol, rotenona e isorotenona a partir de uma isoflavona isoderritol (Esquema 6).



Esquema 6- Síntese da isorotenona

2.5. MODO DE AÇÃO DOS ROTENÓIDES

Durante muito tempo às informações sobre o modo de ação da rotenona e seus análogos se resumiam na descrição de sintomas como: diminuição do ritmo dos batimentos cardíacos; depressão dos movimentos respiratórios, decréscimo do consumo do consumo de oxigênio e eventual paralisia. Nos anos 30 notou-se, entretanto, que diferentemente da maioria dos inseticidas orgânicos, a rotenona não tinha ação específica sobre o sistema nervoso central ou periférico. Este fato levou Tischler a propor que o bloqueio na utilização de oxigênio era a causa do envenenamento. Nos anos seguintes, Fukami, *et al.*, examinando as sugestões de Tischler a nível bioquímico e utilizando para tal, ensaios com tecido de barata, induziram alguns autores a rever a utilização de oxigênio nos organismos vivos.

A produção de energia nos organismos vivos gira em torno da produção de ATP (adenosina trifosfato) a partir do ADP (adenosina difosfato). Pares de elétrons derivados do ácido tricarboxílico fluem através da cadeia respiratória até o oxigênio molecular, que é o último aceptor de elétrons na respiração. Este transporte de elétrons, constitui a origem das atividades celulares, uma vez que libera energia que em grande parte esta armazenada na forma de ligação fosfato no ATP sintetizado através do processo de fosforilação oxidativa. Este processo ocorre via oxidação de substratos como: glutamato, piruvato succinato e da concomitante redução de oxigênio a água por meio de enzimas de oxirredução, que participam do transporte de elétrons e se localizam na membrana interna da mitocôndria. A quebra da cadeia em algum ponto provoca bloqueio no passo final, que é a utilização do oxigênio, resultando na morte do organismo. Pode-se dizer então, que a fosforilação oxidativa é fundamental em todos os aspectos da vida celular dos organismos aeróbicos, uma vez que é a sua principal fonte de energia.

Segundo Tischler a ação primária da rotenona está associada com a inibição da capacidade do inseto de utilizar oxigênio em virtude do bloqueio do sistema enzimático respiratório causando, desse modo, distúrbio da sua função fisiológica. Fukami observou que o tecido muscular da barata ficava deficiente em sua capacidade de oxidar succinato completamente e conseqüentemente incapaz de utilizar oxigênio (inibição da capacidade da succinico oxidase), embora a succinico desidrogenase, não estivesse completamente inibida. Este fato sugere que o bloqueio está localizado abaixo da succinico desidrogenase. Ensaios "*in vitro*" mostram inibição endógena (oxidação de glutamato, piruvato e succinato), sugerindo

um bloqueio à nível do citocromo, que é comum para todos os substratos da fosforilação oxidativa.

2.6. CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, esta inserida na ordem Rosales (Tabela 6, p.26) e (Tabela 7, p.27), sendo considerada uma das mais importantes do ponto de vista econômico, constituindo-se em uma valiosa fonte de alimentos básicos, através de suas sementes (feijão, lentilha e soja, entre outros) (BUCKINGHAMN, 1994; HEYWOOD, 1971; RAWITSCHER, 1979).

Várias espécies dessa família são utilizadas como plantas forrageiras, outras são utilizadas como fonte de taninos, resinas e madeira fina para fabricação de móveis (HEYWOOD, 1971). A família é caracterizada por seu tipo de fruto, denominados de legumes. Legume é um fruto seco, simples, usualmente deiscente que se desenvolve a partir de um único carpelo (<http://pt.wikipedia.org/wiki/legume>).

Alguns autores subdividem a família em três subfamílias, sendo Caesalpinoideae (152 gêneros com cerca de 2.800 espécies), Mimosoideae (56 gêneros com cerca de 2.800 espécies) e Papilionoideae (440 gêneros com cerca de 12.000 espécies) (HEYWOOD, 1971). Essas subfamílias são reconhecidas como independentes: Caesalpinoideae, com cerca de 150 gêneros e aproximadamente 2.200 espécies, Mimosaceae com cerca de 50 a 60 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies e Fabaceae (Papilionaceae), com cerca de 650 gêneros e aproximadamente 13.000 espécies (JOLY, 1983). Os gêneros compostos de representantes herbáceos, considerados mais avançados, são mais difundidos nas regiões temperadas, ao passo que os compostos de representantes lenhosos são mais representados nas regiões tropicais (BARROSO *et al.*, 1991).

A subfamília Papilionoideae representa o grupo mais evoluído dentro da família e é de distribuição mundial, apresentando aproximadamente 500 gêneros e mais de 10.000 espécies divididas em 31 tribos. A maior parte de seus representantes arbóreos são encontrados nos trópicos e hemisfério sul, e os arbustivos e herbáceos em regiões temperadas do globo (HEYWOOD, 1971; HUTCHINSON, 1967; RIBEIRO, *et al.* 1999).

Tabela 6 - Ordem Rosales (BARROSO *et al.*, 1991)

	Família	Gêneros	Espécies	Gêneros indígenas/ subespontâneos	Espécies indígenas /subespontâneas
s	Cunoniace	27	265	2	
ae	Pittosporace	9	240	-	17
ae	Crassulace	30	1.400	1	-
ae	Saxifragace	80	1.500	1	1
ae	Rosaceae	124	3.500	3	9
	Chysobalanac	7	420	7	10
eae	Legumino	152	2.800	64	180 790
sae	Caesalpinioideae				
	Mimosac	56	2.800	26	
eae	Fabacea	482	2.000	88	580
e					180

Tabela 7- Distribuição geográfica das famílias da ordem Rosales (BARROSO *et al.*, 1991)

Famílias	Distribuição no mundo	Distribuição no Brasil
Cunoniaceae	Regiões temperadas e tropicais,	MG, BA, RJ, GO, SC, SP

	predominantemente	no e PA	
Pittosporaceae	hemisfério sul Regiões tropicais temperadas	Cultivada	como
Crassulaceae	Cosmopolita	Em todo Brasil	ornamental
Saxifragaceae	Cosmopolita	De Minas Gerais ao Rio Grande do Sul	
Rosaceae	Cosmopolita, mais freqüente na América do Norte, Europa e Ásia	Predominantemente no Sul e Sudeste do Brasil,	
Chysobalanaceae	Pantropical	Em todo Brasil,	em regiões montanhosas
Leguminosae	Trópicos e subtrópicos,	Em todo brasil	predominantemente na Amazônia
Caesalpinioidae	predominantemente nas Américas		
Mimosaceae	Trópicos e subtrópicos	Em todo Brasil	
Fabaceae	Largamente distribuída; os gêneros arbóreos mais primitivos predominam no Hemisfério Sul	Em todo Brasil	

A família Fabaceae caracteriza-se por conter aproximadamente 90% dos isoflavonóides de origem vegetal identificados até hoje (INGHAM,1983). Apesar da distribuição restrita dos isoflavonóides dentro do reino vegetal, existe uma grande variabilidade estrutural nessa classe de substâncias, e isso se deve tanto ao número e complexidade dos substituintes no sistema 3-fenilbenzenopirano, como também aos diferentes níveis de oxidação neste esqueleto básico e à presença de anéis heterocíclicos extras (DEWICK,1988).

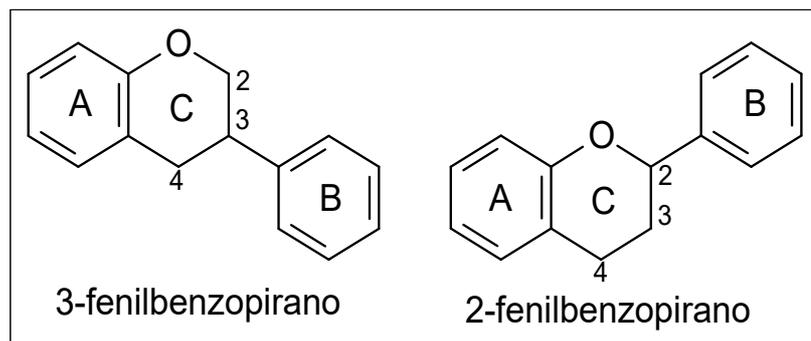
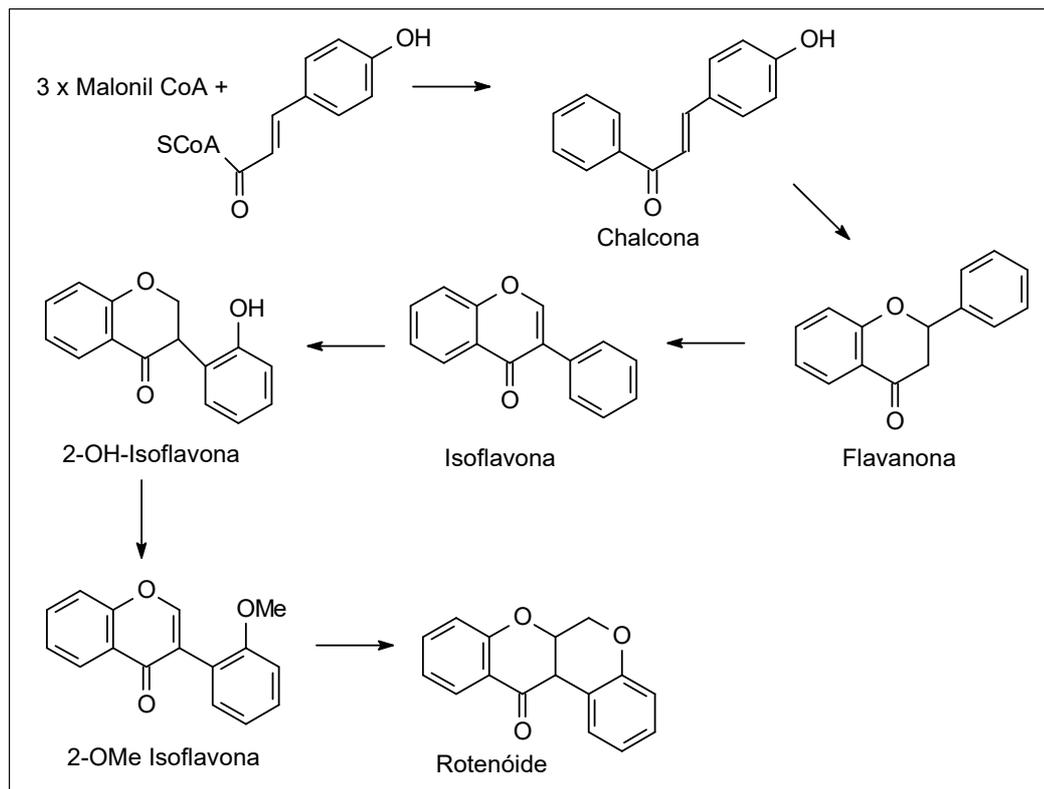


Figura 9. Sistema 3-fenilbenzopirano e 2-fenilbenzopirano

Quanto a sua biogênese, os isoflavonóides são constituídos de uma unidade C-6 e uma C-9. A unidade C-6, que dá origem ao anel A, é formada pela condensação de três unidades de malonilCoA (com eliminação de três moléculas de CO₂), enquanto que a unidade C-9, que compõe o anel B e os carbonos 2, 3 e 4, é derivada do ácido cinâmico ou um seu derivado oxigenado. A condensação do ácido cinâmico com três moléculas de malonilCoA forma como primeiro intermediário a chalcona, que por ciclização, dá origem à flavanona correspondente, que é modificada em um número limitado de etapas levando aos diferentes tipos de isoflavonóides (GEISSMAN,1969 ;WONG,1970;HALBROCK,1975) (Esquema 7, p.29).

Os isoflavonóides isolados de plantas são classificados em tipos ou classes, dependendo da sua formação (INGHAM,1983). Podem ocorrer como componentes de tecidos saudios, sendo conhecidos como *constitutivos*. E também podem ocorrer em tecidos que foram atacados por organismos bióticos, sendo chamados de *induzidos*. Esta última classe comumente encontrada em Papilionoideae é produzida como substância de defesa da planta e tem ação antimicrobiana que é conhecida como fitoalexina ou metabólito secundário de plantas com *stress*.



Esquema 7- Afinidades biossintéticas entre os isoflavonóides

2.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *DERRIS*

As espécies que apresentam maiores teores de rotenona são as do gênero *Derris* (*Lonchocarpus*) da família Fabaceae.

O gênero *Derris*, tribo Millettieae é pantropical, com representantes na Ásia, Austrália, América e África, sendo que a maior concentração de espécies ocorre no continente americano, mais precisamente na América do Sul e Central. O gênero apresenta numerosas espécies, escandentes, arbustivas e arbóreas, de flores vermelhas ou brancas (RIBEIRO, *et al.* 1999).

Quanto à divisão taxonômica, *Lonchocarpus* é um táxon que apresenta controvérsias quanto a sua delimitação genérica, posição sistemática e composição específica dentro da família. No que diz respeito à delimitação genérica, a maioria dos botânicos concorda que existe grande dificuldade em se designar uma determinada espécie ao gênero *Lonchocarpus* ou a outros próximos, como *Derris* Lour. , *Muelleria* Linn. F., *Millettia*, WIGHT. & ARN, *Pongamia* Vent. e *Piscidia* L. Estes gêneros formam um complexo que apresenta grande afinidade vegetativa e

floral. Conseqüentemente, o posicionamento dos autores que se dedicaram ao estudo do complexo acima citado é controverso. Macbride (1943) sugeriu a fusão dos gêneros *Derris* e *Lonchocarpus* prevalecendo o nome *Derris*. Ducke (1949) adotou esta proposta para as espécies brasileiras. LOUREIRO (1970) estabeleceu o gênero *Derris* com base em duas espécies: *D. pinnata* e *D. trifoliata*, a última designada posteriormente como lectotipo do gênero (STAFLEU, 1972). Anteriormente, AUBLET (1775) já havia descrito o gênero *Deguelia*, com base na espécie *Deguelia scandens* Aublet. Mais tarde BENTHAM (1860) sinonimizou *Deguelia* com *Derris*. KUNTH (1823) estabeleceu o gênero *Lonchocarpus* descrevendo duas espécies: *L. punctatus* e *L. macrophyllus*. Após a descrição inicial, KUNTH (1823) também propôs a mudança de várias espécies para o novo gênero.

2.8. A ESPÉCIE *DERRIS URUCU*

A espécie *Derris urucu* apresenta como características, arbusto ereto de até 3 metros de altura quando jovem; quando adulta, subscandente, com ramos longos, ascendentes ou reptantes, trepadeira lenhosa nas partes apicais, grossa subindo em árvores de até 15 metros de altura (TOZZI, 1998).

Essa espécie possui uma vasta distribuição geográfica, ocorrendo tanto na Ásia como na América do Sul. No Brasil, ocorre na zona da mata latifoliada da Bacia do Alto Uruguai, sendo comumente encontrada nos ecossistemas amazônicos.

No Brasil os representantes do gênero *Derris* são vulgarmente conhecidos por diversos nomes, que variam de acordo com a espécie e a região de ocorrência. O nome mais tradicional é “timbó”, palavra de origem tupi que significa “suco de cobra” ou “suco que mata”. Outras designações são “timbó-urucu”, “timbó-carajuru” e sucupira - preta”.

Dentre as espécies de timbós, as de uso mais generalizado na Amazônia são o timbó-vermelho, *Derris urucu*, e o timbó-branco, *Derris nicou*. O primeiro apresenta produção de até quatro vezes mais raízes e melhor proteção ao solo com relação ao segundo (LIMA, 1987). Porém, as raízes de *D. nicou* apresentam maior teor em rotenona. As duas espécies apresentam um percentual de mais ou menos 10% de rotenona, sendo que esta porcentagem se apresenta com mais freqüência para o

“timbó - branco” (COSTA, 1996; LIMA, 1987). A espécie *Derris urucu* possui a classificação botânica apresentada na tabela 8.

Tabela 8 - Classificação Botânica

CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DE <i>Derris urucu</i>	
CLASSE	Angiospermae
SUBCLASSE	Dicotyledoneae
SUPERORDEM	Rosidae
ORDEM	Fabales
FAMILIA	Fabaceae
SUBFAMILIA	Papilionoideae
TRIBO	Millettieae
GÊNERO	<i>Derris</i>
ESPÉCIE	<i>Derris urucu</i>

CAPÍTULO 3.0

OBJETIVOS:

3.1. OBJETIVOS GERAIS

- Isolar e caracterizar estruturalmente rotenóides da espécie *Derris urucu*;
- Aprender técnicas básicas de isolamento e identificação de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo secundário;
- Modificar as estruturas das substâncias de interesse, visando à correlação entre estrutura e atividade biológica;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato etanólico, e de rotenóides isolados de raízes da espécie *Derris urucu*, bem como dos modificados quimicamente;

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar metodologia descrita na literatura para situações concretas encontradas em laboratório;
- Isolar substâncias orgânicas através de técnicas básicas; purificação de substâncias orgânicas através de cromatografia.
- Aprender a utilizar laboratórios de ensaios biológicos simples para avaliação preliminar da citotoxicidade de extratos brutos, substâncias naturais e modificadas quimicamente;

CAPÍTULO. 4.0

PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAL BOTÂNICO: COLETA E IDENTIFICAÇÃO

O material vegetal foi gentilmente cedido pelo centro de pesquisa agroflorestal (CPATU/EMBRAPA), Belém – PA.

4.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

As cromatografias em camada delgada (CCDA) foram feitas em cromatofolhas de sílica gel 60 GF₂₅₄. As substâncias foram detectadas por irradiação com lâmpada ultravioleta a 254 e 365nm e/ou borrifação com reveladores cromogênicos (vanilina sulfúrica e sulfato cérico).

Os critérios de pureza adotados foram a observação de uma única mancha em cromatografia em camada delgada (CCDA), variando-se a fase móvel.

Nas separações cromatográficas em coluna, foram utilizados dois tipos de sílica: sílica gel 60G (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh ASTM) e sílica gel 60G (0,04-0,063 mm; 230-400 mesh ASTM).

No desenvolvimento das colunas cromatográficas e nas placas preparativas foram utilizados os seguintes eluentes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol), puros e em misturas binárias em ordem crescente de polaridade.

4.3. REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÕES

Nas reações de derivatização foram utilizados solventes secos e analiticamente puros.

Agente dessecante: Na₂SO₄ anidro.

4.4. MÉTODOS FÍSICOS

4.4.1. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os dados espectrais na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro Shimadzu, modelo FT-IR 8300, do Laboratório de Ciências Químicas da UENF. Utilizou-se pastilha de brometo de potássio (KBr) na análise das amostras sólidas e filme nas amostras líquidas.

4.4.2. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (^1H) E DE CARBONO-13 (^{13}C).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) unidimensional e bidimensional foram obtidos em espectrometros Jeol Eclipse, do Laboratório de Ciências Químicas da UENF operando a uma frequência de 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , e Bruker, do laboratório de ressonância magnética nuclear do DQ/UFSCAR, operando a uma frequência de 400 MHz para ^1H e 100 Mhz ^{13}C .

Os solventes utilizados para dissolução das amostras na obtenção dos espectros foram: Clorofórmio deuterado (CDCl_3) puro, utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de RMN ^1H , pelos sinais pertencentes as moléculas não deuteradas do solvente deuterado utilizado: clorofórmio (δ 7,24). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelos sinais dos carbonos-13 do solvente: clorofórmio (δ 77,0).

As multiplicidades das bandas de absorção dos hidrogênios nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: *s* (sinal simples), *d* (sinal duplo), *dd* (sinal quadruplo), *t* (sinal triplo), e *m* (sinal múltiplo).

Por meio da técnica APT, CH e CH_3 com amplitudes em oposição a C e CH_2 , determinou-se o padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C , de acordo com a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico).

As constantes de acoplamento (*J*) foram expressas em Hz.

4.4.3. ESPECTROMETRIA DE MASSA (EM)

Os espectros de massas (EM) foram obtidos no aparelho GC/EM, modelo QP-5050 a 70 eV do Laboratório de Ciências Químicas da UENF, utilizando a técnica de inserção direta.

4.4.4. PONTO DE FUSÃO

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho MQAPF – 301 da Microquímica do Laboratório de Ciências Químicas da UENF. As determinações foram realizadas a velocidade de aquecimento de 10 °C/min e não foram corrigidos.

4.5. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA

4.5.1. ISOLAMENTO DA ROTENONA E DA MISTURA BINÁRIA DE DESIDROROTENONA/ DESIDRODEGUELINA

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das raízes de *Derris urucu* foi realizado através de técnicas como cromatografia em colunas empacotadas com gel de sílica, cromatografia tipo “Flash” e cromatografia em camada delgada preparativa, resultando no isolamento da rotenona e da mistura binária 6a-12a-desidrrotenona / 6a-12a-desidrodeguelina.

4.5.2. SECAGEM, MOAGEM E PESAGEM DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal após seco à temperatura ambiente foi moído em moinho tipo Willey e pesado.

4.5.3. – PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

As raízes de *Derris urucu* (322,86 g), foram secas a temperatura ambiente, moídas e submetidas a extração em aparelho de Soxhlet em etanol, durante 16h.

A solução obtida foi deixada em repouso produzindo um material cristalino que foi separado por filtração. O filtrado foi concentrado a pressão reduzida em evaporador rotativo produzindo 58,11g de extrato bruto, sob a forma de uma massa oleosa escura.

4.5.3.1 - OBTENÇÃO DA ROTENONA

O material cristalino obtido da solução etanólica de *D.urucu* (253,3 mg) foi submetido a CCDP eluida com CH₂Cl₂/AcOEt/acetona (196:3:1) até produzir 227,4 mg de cristais brancos identificados como rotenona.

4.5.3.2 - OBTENÇÃO DA MISTURA BINÁRIA

2,59 g de extrato etanólico bruto foi submetido a cromatografia em coluna utilizando como eluente, CH₂Cl₂/AcOEt/acetona (196:3:1) → (184:120:20) resultando em 28 frações que foram reunidas de acordo com a semelhança de R_f em CCDA. As frações de nº 5 a 10 (340,1 mg) foram submetidas a CCDP utilizando o mesmo sistema de solvente empregado para rotenona. Este procedimento produziu 302,45 mg da mistura binária de 6a-12a-desidrorotenona e 6a-12a-desidrodeguelina.

4.6 - MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS

4.6.1. OBTENÇÃO DA 12-HIDROXIROTENONA

Em um balão de 20 mL, provido de barra magnética, foram adicionados 200mg de rotenona (0,508 mmol), 2 mL de THF e 2 mL de metanol.

A solução obtida foi resfriada a 0 °C, com banho de gelo e foram adicionados lentamente 60 mg de NaBH₄ (1,587mmol). Após 2 horas sob agitação magnética a 0 °C, verificou-se por CCDA o desaparecimento da rotenona e surgimento de um produto mais polar. A mistura reacional foi então tratada com 8mL de solução de NH₄Cl a 5% e o produto foi extraído com clorofórmio (2 porções de 10 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro e concentrado em evaporador rotativo, obtendo 185,8 mg de um óleo amarelo claro com 92,2% de rendimento. Esse material foi submetido a cromatografia tipo flash, utilizando como eluente, éter de petróleo /acetato (60:40).

4.6.2. OBTENÇÃO DA 6',7'-DIIDROROTENONA

Em balão de 20 mL foram adicionados 500 mg de rotenona, (2690 μmol), 10 mL de acetato de etila e 20 mg de Pd/carvão a 10%. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética em atmosfera de hidrogênio por 48 horas. Após esse período a solução foi filtrada em papel de filtro e em celite e evaporada em evaporador rotativo. O produto obtido foi um sólido branco de massa 215 mg com rendimento de 43,0%. O material foi submetido a cromatografia tipo flash, utilizando como eluente, CH_2Cl_2 / AcOEt/acetona (196:3:1).

4.6.3. OBTENÇÃO DO 6',7'-DIIDRO-12-DESIDROROTENONA

Em balão de 20 mL, foram adicionados 100 mg de 6',7'-diidrorotenona (0,252 μmol), 1 mL de THF e 1 mL de metanol. O sistema reacional foi resfriado a 0 °C com auxílio de um banho de gelo e adicionou-se lentamente 30 mg de NaBH_4 . Após 2 horas de agitação magnética a 0 °C, foi verificado por CCDA o desaparecimento da 6',7'-diidrorotenona. Na mistura reacional foi então adicionados 4 mL de solução de NH_4Cl a 5% e a fase orgânica foi extraída com clorofórmio (2 porções de 10 mL). As fases orgânicas reunidas foram secas com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentradas num evaporador rotativo fornecendo assim 98,6 mg de um óleo amarelo claro com 98,8% de rendimento. O material foi submetido a cromatografia tipo flash, utilizando como eluente, CH_2Cl_2 / AcOEt/acetona (196:3:1).

4.6.4. OBTENÇÃO DO 6-OXO-6a,12a-DESIDROROTENONA

Em um balão de duas bocas de 50 mL, provido de barra magnética e adaptado a um condensador de refluxo, foram adicionados 100 mg da mistura binária de 6a-12a-desidrorotenona e 6a-12a-desidrodeguelina e 9,5 mg de I_2 (0,0374 μmol), 0,002 mL de H_2SO_4 e 0,8 mL de DMSO. A mistura reacional foi agitada e aquecida a 140 °C por 24 horas, quando foi verificado por CCDA (clorofórmio 100%) o equilíbrio da reação. Após esse tempo foi adicionado 10 mL de água gelada formando um precipitado que foi filtrado e seco em dessecador fornecendo 99 mg de um sólido amarelo escuro.

A purificação do sólido obtido utilizando cromatografia em coluna com gel de sílica e utilizando clorofórmio como eluente, forneceu 40 mg de 6-oxo-6a-12a-desidrrotenona com rendimento de 96,3%.

4.6.5. REAÇÃO DA ROTENONA COM ÁCIDO *m*-CLOROPERBENZÓICO

Uma solução de 63,0 mg de AMCPB em 5 mL de clorofórmio foi seca com Na₂SO₄ anidro e transferida para um balão de 20 mL contendo 50 mg de rotenona. A mistura formada foi agitada magneticamente por um período de 24 horas. Após esse período foi realizado uma CCDA que demonstrava a presença do material de partida (rotenona). Foram adicionados mais 33 mg de AMCPB e a reação foi aquecida a temperatura de refluxo por mais 4 horas. O consumo total dos reagentes foi confirmado por CCDA. A mistura foi tratada com 10 mL de NaHCO₃ a 5% e a fase orgânica foi separada em um funil de separação seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotativo. Após cromatografia em coluna utilizando gel de sílica e utilizando éter de petróleo/acetato (60:40) como eluente foram obtidos 42,0 mg de um sólido branco com 74,2% de rendimento.

CAPÍTULO 5.0

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ROTENÓIDES DAS RAÍZES DE *D. urucu*

O extrato em EtOH de raízes de *D. urucu*, após fracionamento em coluna cromatográfica e processos usuais de purificação, permitiu o isolamento dos rotenóides: rotenona e da mistura binária desidrorrotenona e desidrodequelina.

A análise das informações obtidas dos espectros de IV, RMN ^1H e de ^{13}C e comparação com dados da literatura forneceu informações muito importantes para definir a estrutura das substâncias isoladas, possibilitando, principalmente, a identificação dos carbonos que compõem os anéis A, B e o heterociclo C dos rotenóides.

5.1.2 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA ROTENONA

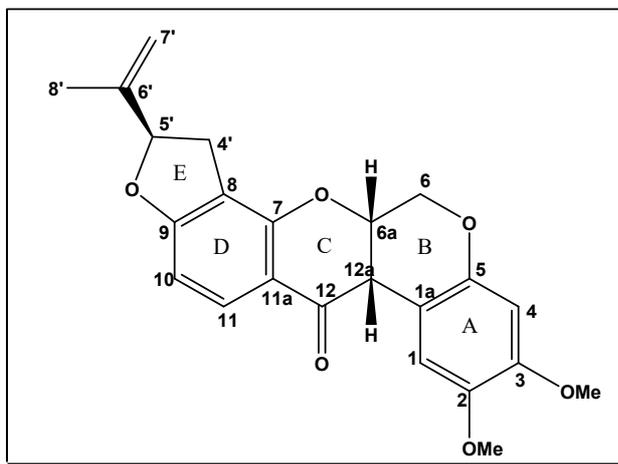


Figura 10 - Estrutura da Rotenona

A substância rotenona apresentou-se sob a forma de um sólido branco cristalino, com faixa de fusão 164,6 - 168,04. A fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$ foi deduzida a partir da análise dos espectros de massas e RMN de ^1H ^{13}C -HBBDD, RMN ^{13}C -APT, e os experimentos bidimensionais, COSY, HMQC e HMBC.

O espectro de massas da rotenona, apresentou os seguintes fragmentos iônicos; m/z 394 (íon molecular), m/z 192 e m/z 177 característicos da fragmentação do tipo retro Diels Alder (Figura 12, p 43).

O espectro de RMN ^1H (Figura 13, p. 44) da rotenona apresentou nove sinais simples, onde são destacados os sinais relativos as duas metoxilas δ_{H} (3,76 e 3,81) e dois na região de hidrogênio aromático δ_{H} (6,77 e 6,45), quatro sinais duplos, sendo dois na região de hidrogênios aromáticos δ_{H} (6,50 e 7,84), um sinal triplo e um sinal múltiplo.

Os sinais a δ_{H} [(6,77; s) e (6,45, s)] na região de hidrogênios aromáticos caracterizam os hidrogênios H-1 e H-4 do anel **A** em posição *para*, enquanto que os sinais duplos a δ_{H} [(6,50; d; $J=8,0$) e 7,84; d; $J=8,0$] caracterizam os hidrogênios H-10 e H-11 do anel aromático **D** em posição *orto*, sendo que o primeiro aparece em frequência mais baixa por estar em posição *orto* a uma função oxigenada. A região alifática do espectro mostra um sinal simples à δ_{H} [1,77 (Me-8)] característico de grupo metila ligado ao carbono insaturado; dois sinais simples a δ_{H} [(5,07) e (4,93)], caracterizando a presença de um sistema metilênico terminal; um sinal triplo a δ_{H} (5,24; t; $J=8,4$) e dois sinais múltiplos centrados a δ_{H} [(3,31) e 2,97)]. Este conjunto de dados caracteriza o sistema isopropenildiidrofuranico muito comum em rotenóides prenilados (JACKMAN,1965) Os hidrogênios metilênicos H-6 aparecem como dois sinais duplos a δ_{H} (4,18; d; $J=11,7$) e (4,61; d; $J=12$) (Figura 16, p.48).

Através do numero de linhas espectrais revelado pelo espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 22, p. 54), e do espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 29, p.60), foi possível observar a presença de 22 sinais simples, sendo dez carbonos quaternários sp^2 , seis ligados a oxigênio, sete metínicos, três metilênicos e três metílicos.

O sinal a δ_{C} (188,91) atribuído à carbonila foi confirmado através do espectro de infravermelho (Figura 11, p.42), onde se observa o sinal a $1674,1\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento de carbonila de cetona (SILVERSTEIN *et al.*, 2000).

A atribuição dos demais sinais do espectro foi feita através da análise dos mapas de correlação heteronuclear HMQC (Figura 33 p. 64) e HMBC (Figura 40, p.71) e comparação com dados da literatura (FANG & CASIDA, 1997) (Tabela 9, p.41).

TABELA 9 – Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) da rotenona em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz

	HMQC		HMBC	FANG & CASIDA, 1997		
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
1a	104,79	-			104,8	
2	143,85	-			143,8	
3	149,46	-			149,4	
5	147,34	-			147,3	
7	157,90	-			157,8	
8	112,93	-	2H-4'		112,8	
9	167,33	-			167,2	
11a	113,30	-		H-10	113,2	
12	188,91	-			188,7	
6'	143,00	-			142,9	
CH						
1	110,34	6,77 (s)			110,5	6,77
4	100,88	6,45 (s)			100,9	6,45
6a	72,19	4,93 (s)			72,2	4,94
10	104,86	6,50 (<i>d</i> ; $J=8,0$)			104,7	6,51
11	129,95	7,84 (<i>d</i> ; $J=8,0$)			129,8	7,84
12a	44,57	3,84 (s)			44,5	3,84
5'	87,80	5,24 (<i>t</i> ; $J=8,4$)	H-4'	2H-7'; 3H-8'	87,7	5,24
CH₂						
6	66,24	4,18 (<i>d</i> ; $J=11,7$)			66,1	4,18
		4,61 (<i>d</i> ; $J=12,0$)				4,62
4'	31,24	2,97 (<i>m</i>)	H-5'		31,2	2,95
		3,31 (<i>m</i>)				3,32
7'	112,53	5,07 (s)		H-5'	112,3	5,07
		4,93 (s)				4,94
CH₃						
8'	17,09	1,77 (s)		H-7'; H-5'	17,0	1,77
CH₃O						
	55,82	3,76 (s)			55,7	3,77
	56,28	3,81 (s)			56,2	3,81

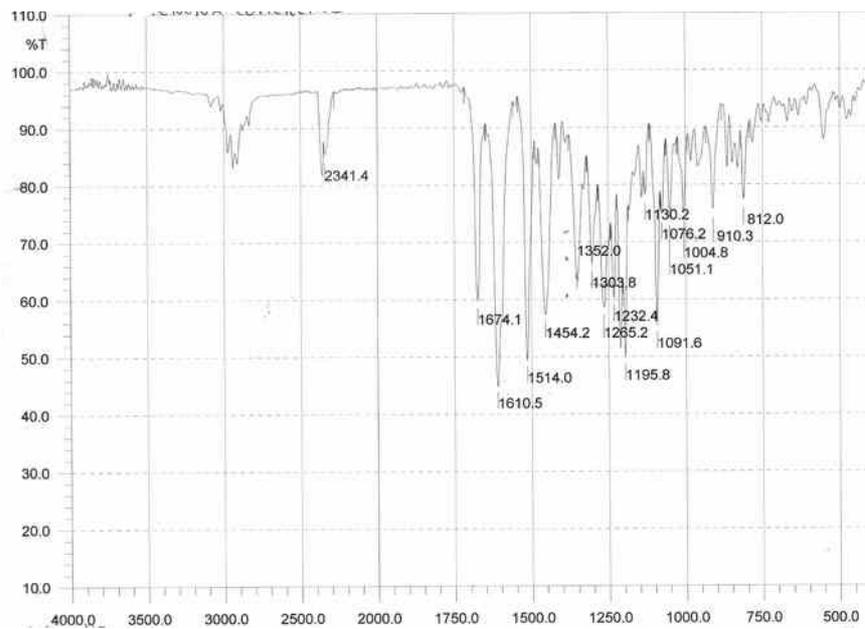


Figura 11 - Espectro de IV da Rotenona

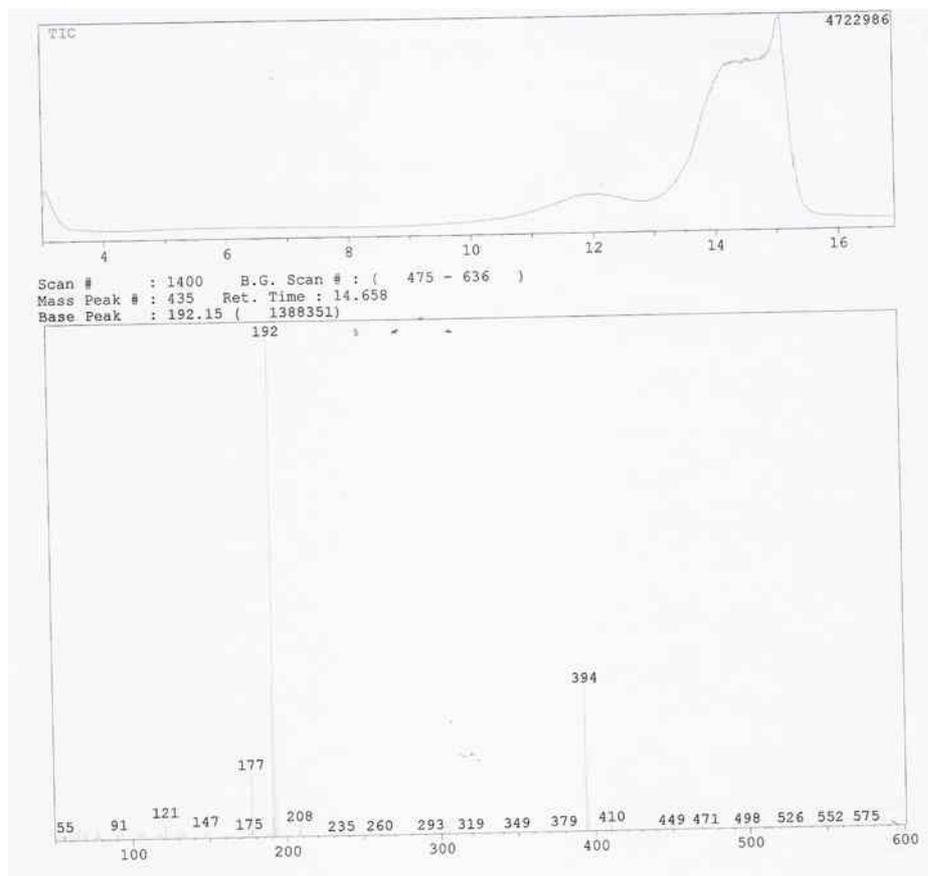


Figura 12 - Espectro de massas da Rotenona

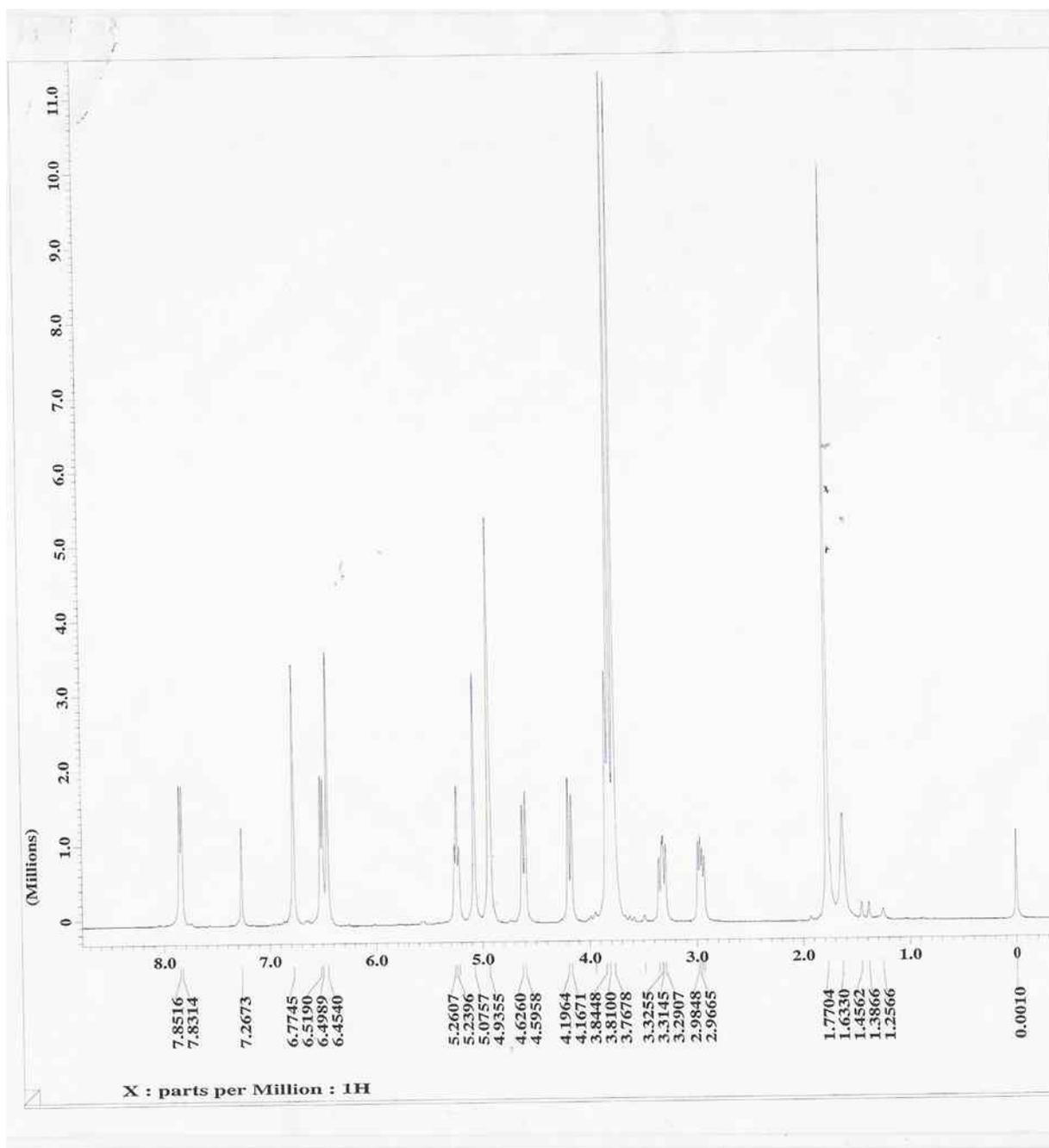


Figura 13 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Rotenona

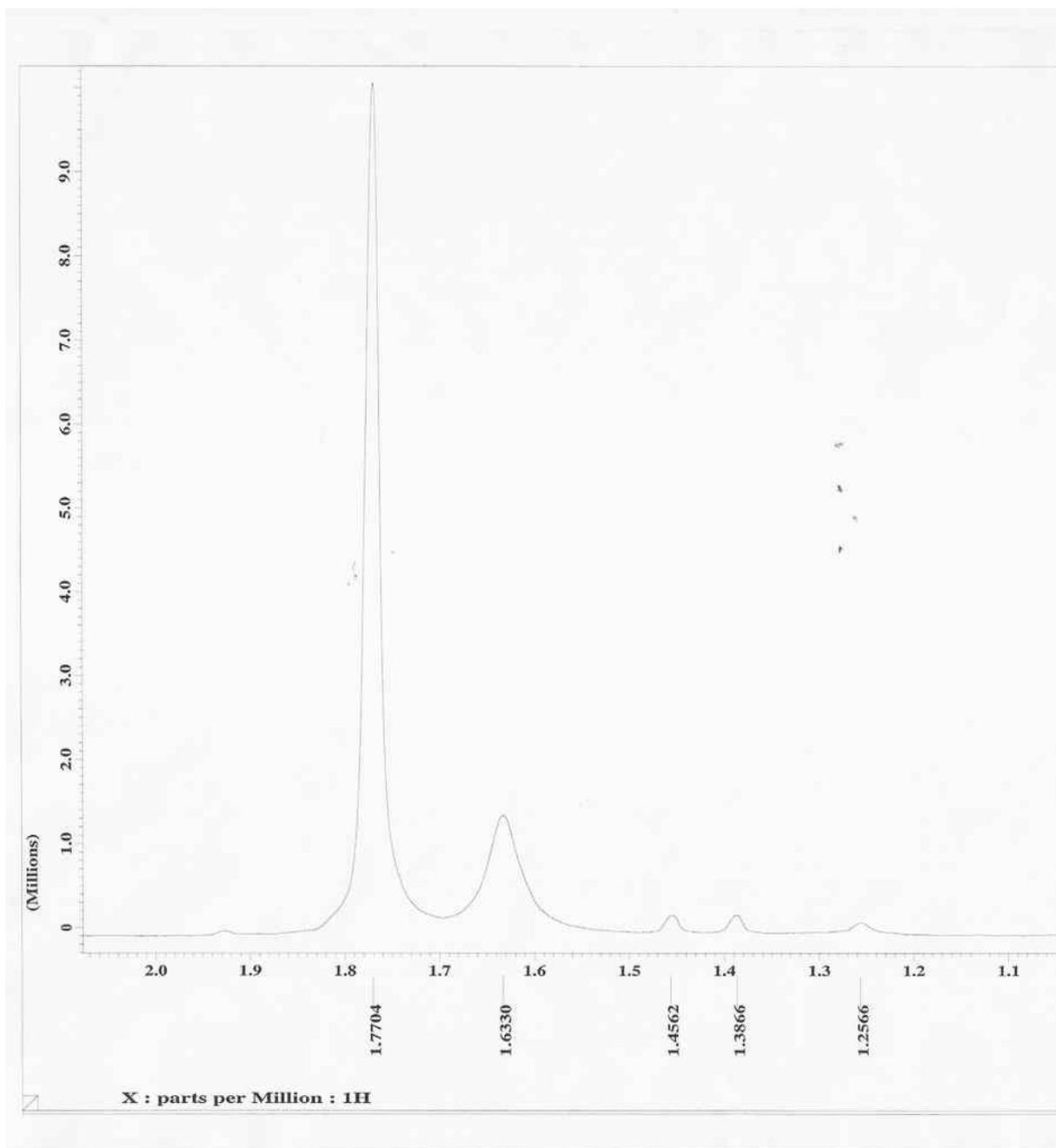


Figura 14 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 1,1 – 2,0 ppm) da Rotenona

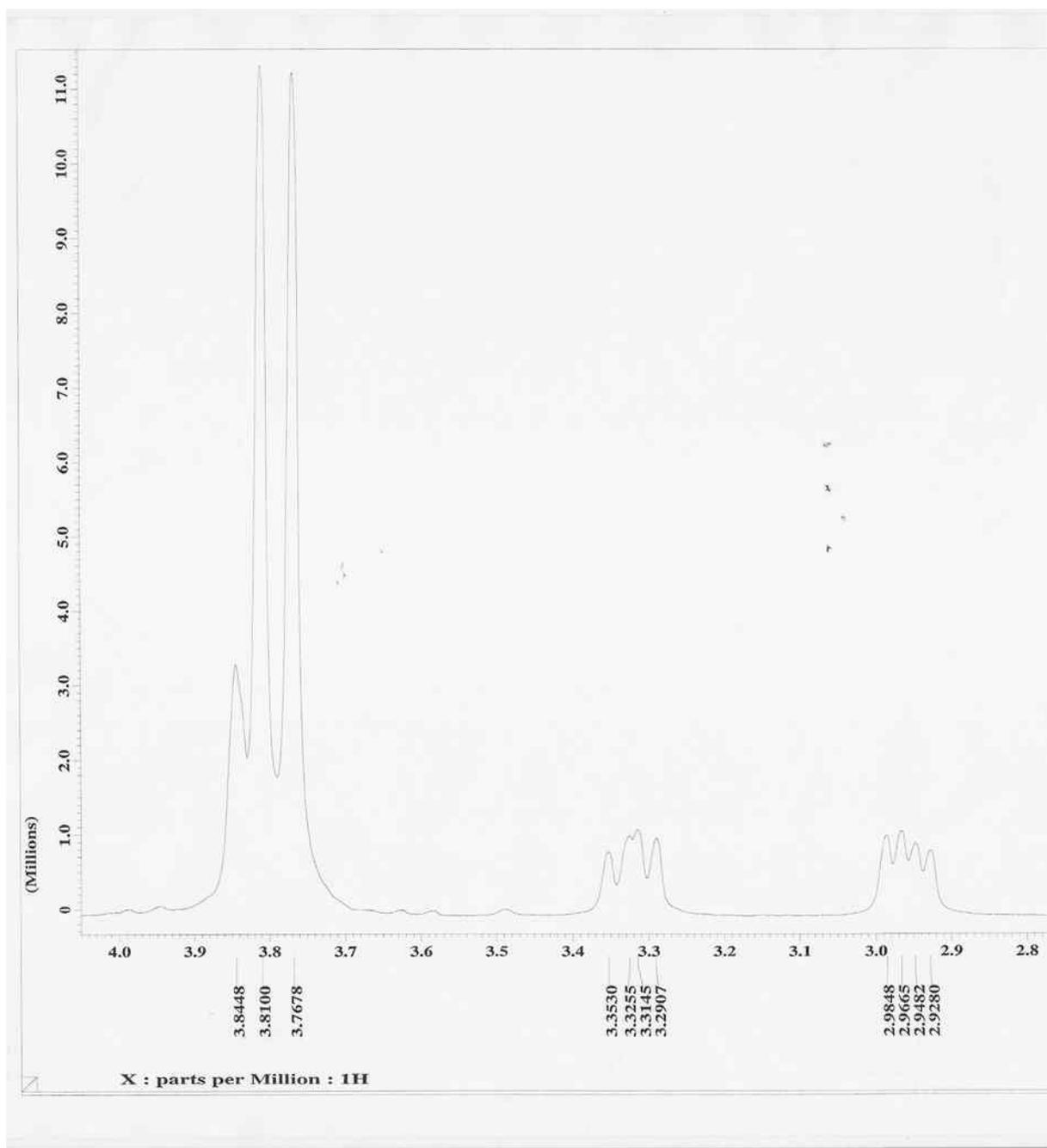


Figura 15 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 2,8–4,0 ppm) da Rotenona

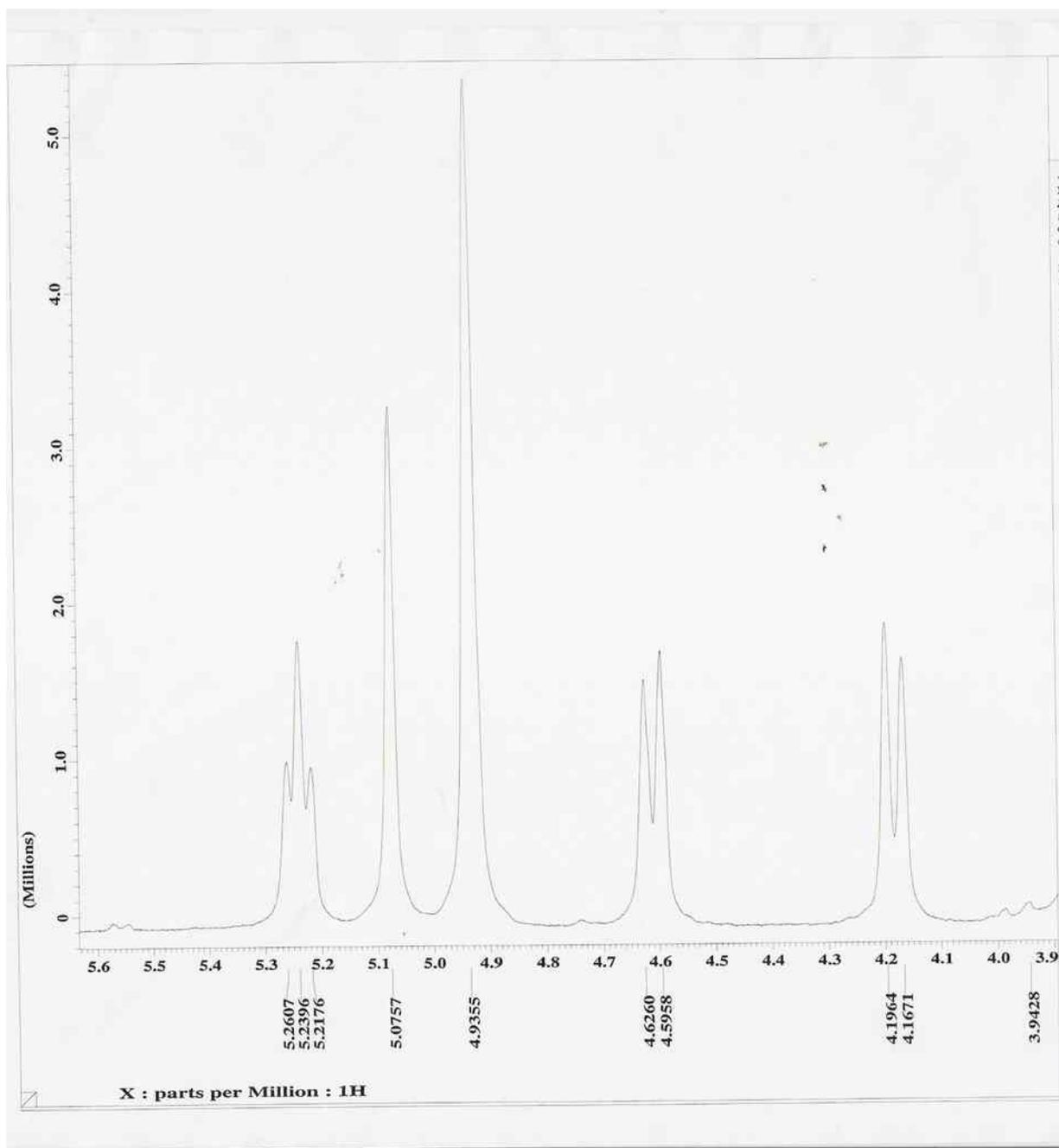


Figura 16 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 3,9 – 5,6 ppm) da Rotenona

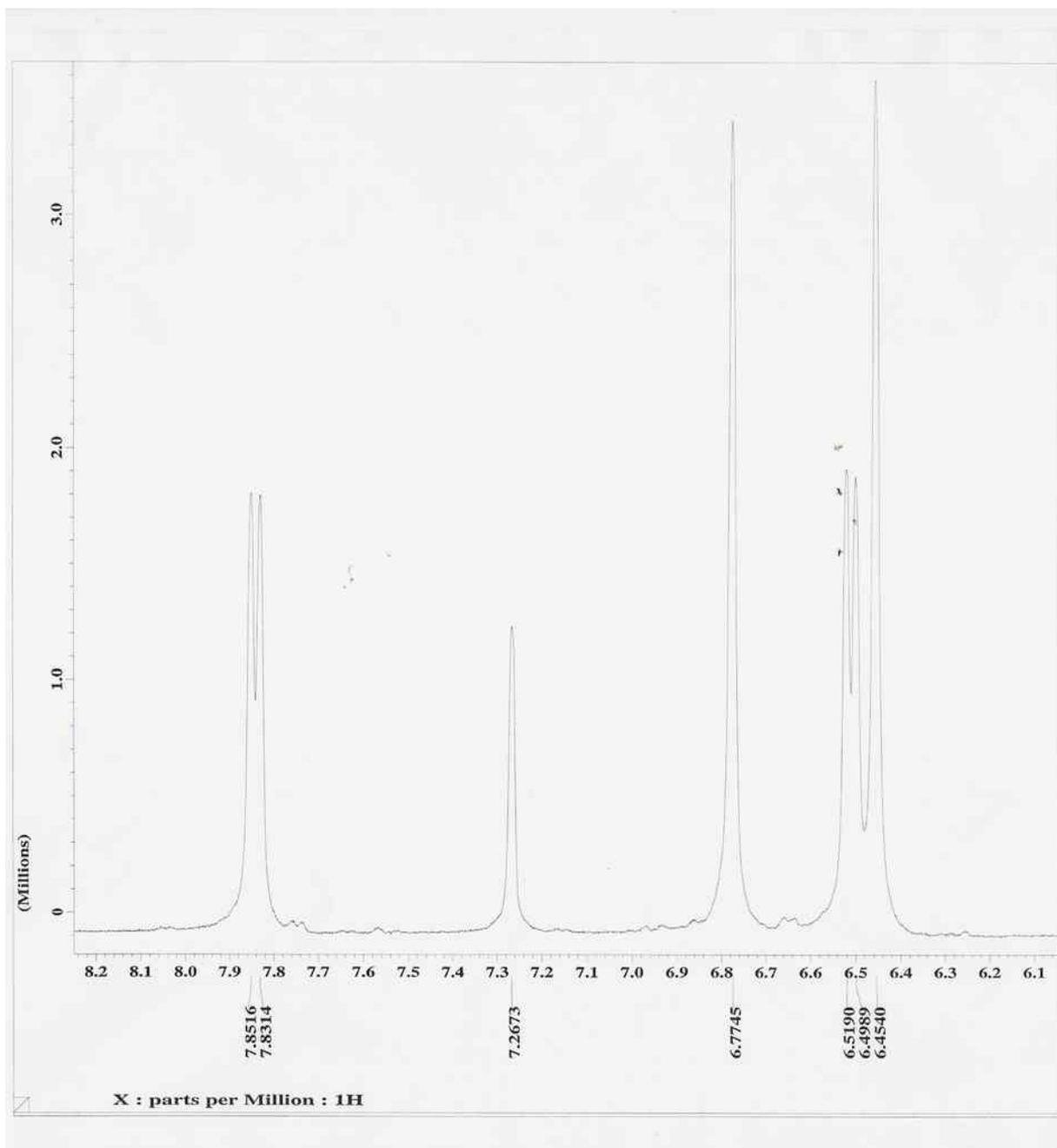


Figura 17 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 6,1 – 8,2 ppm) da Rotenona

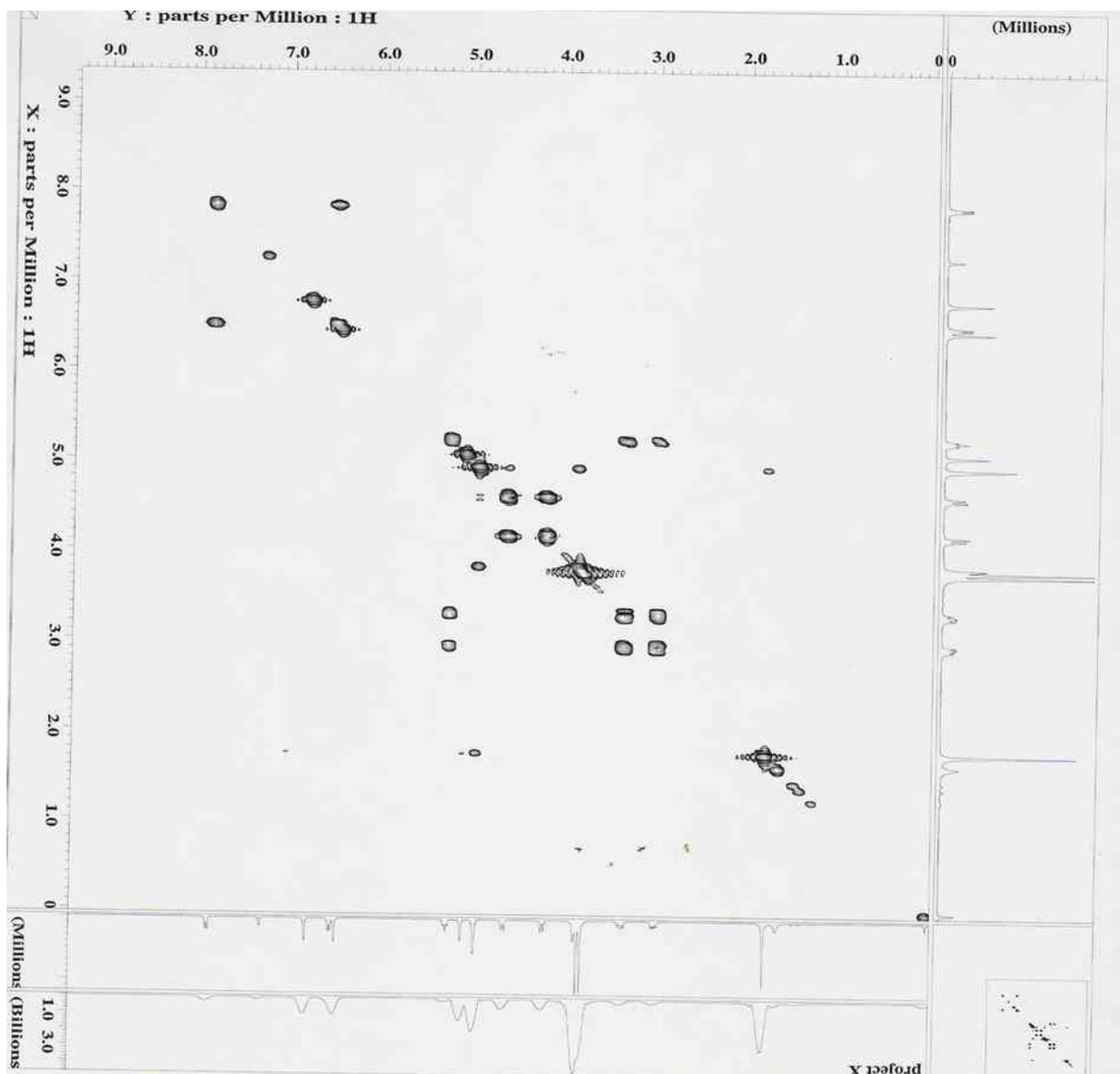


Figura 18 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da Rotenona

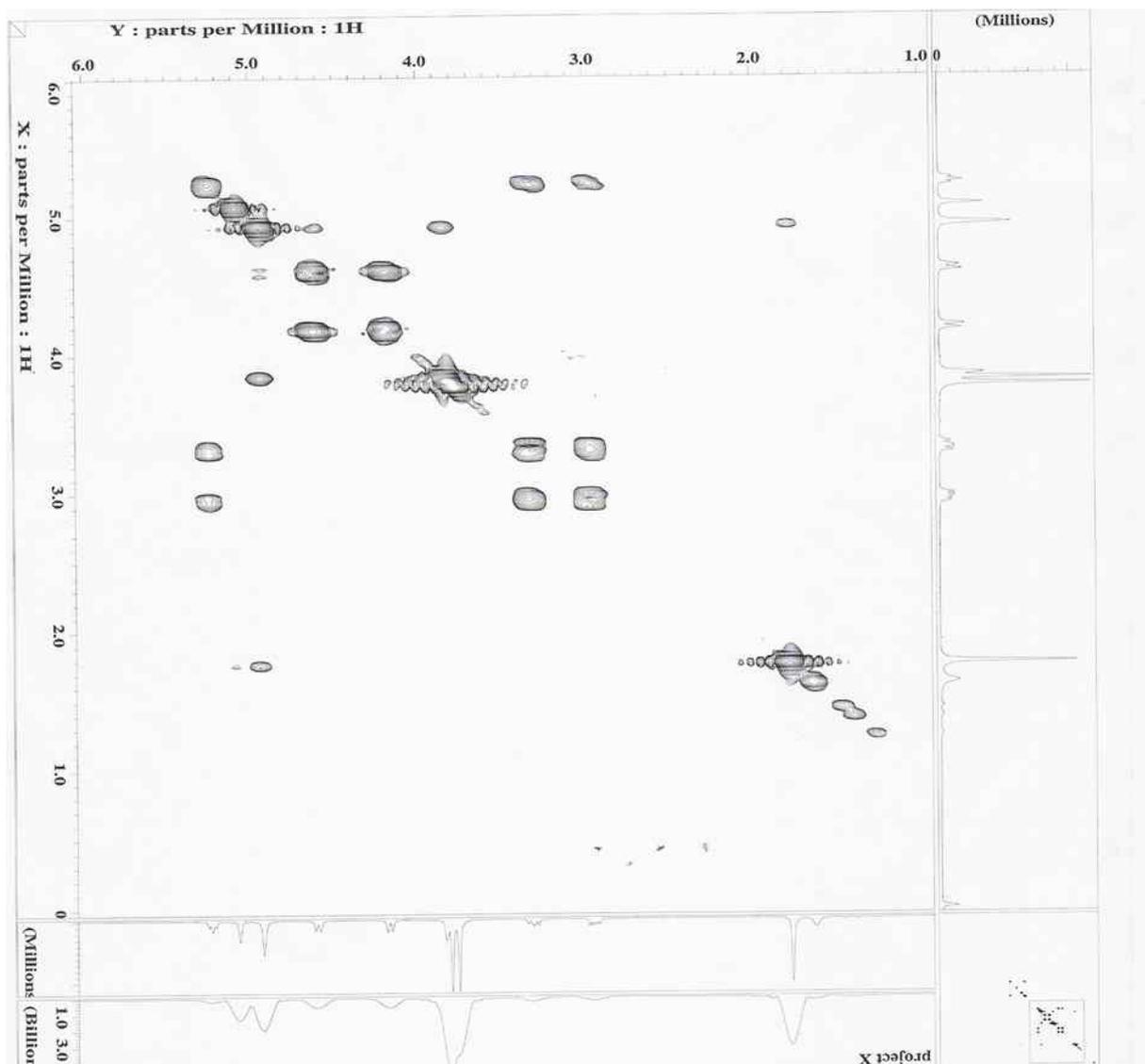


Figura 19 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da Rotenona

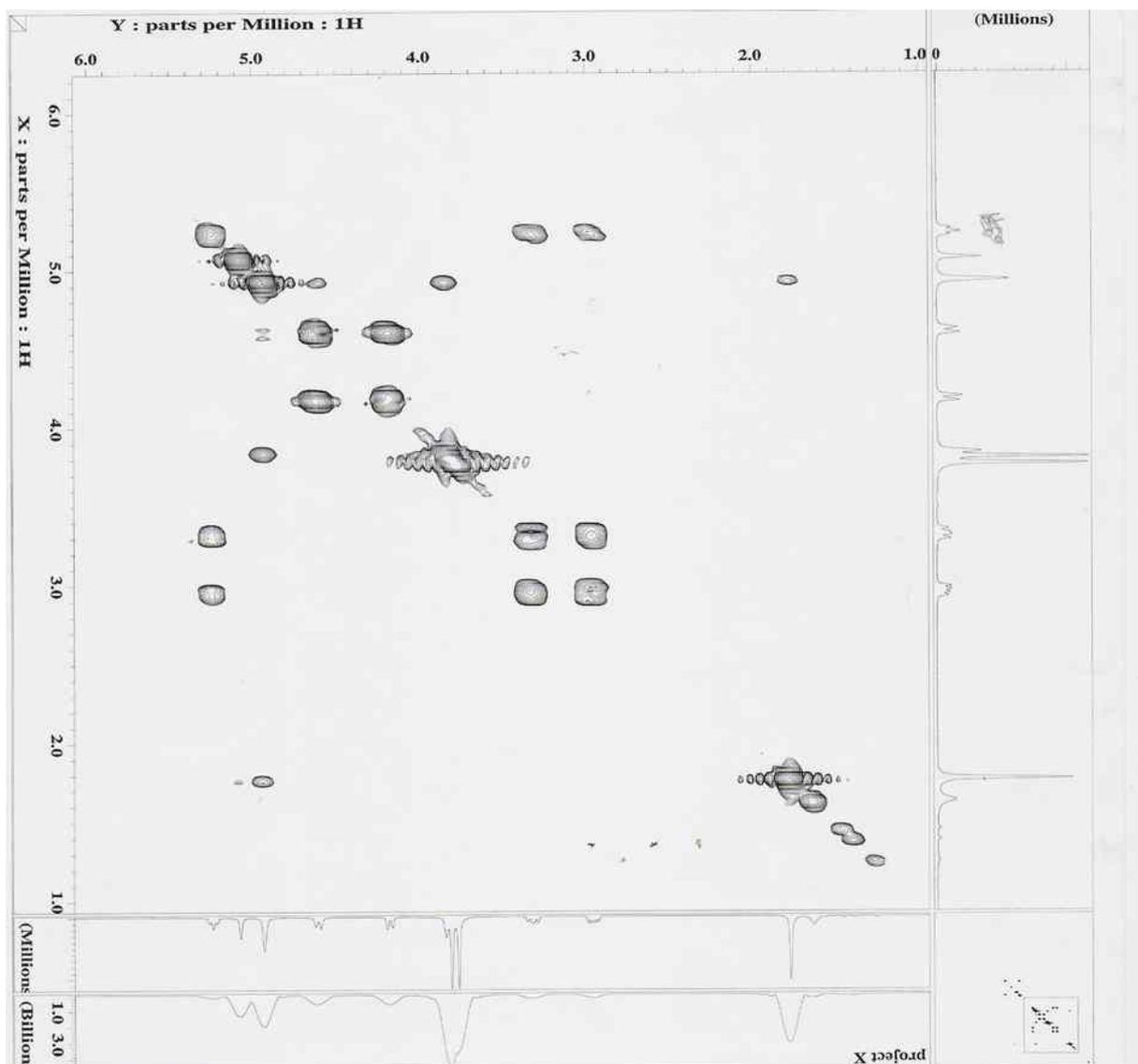


Figura 20 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da Rotenona (Expansão)

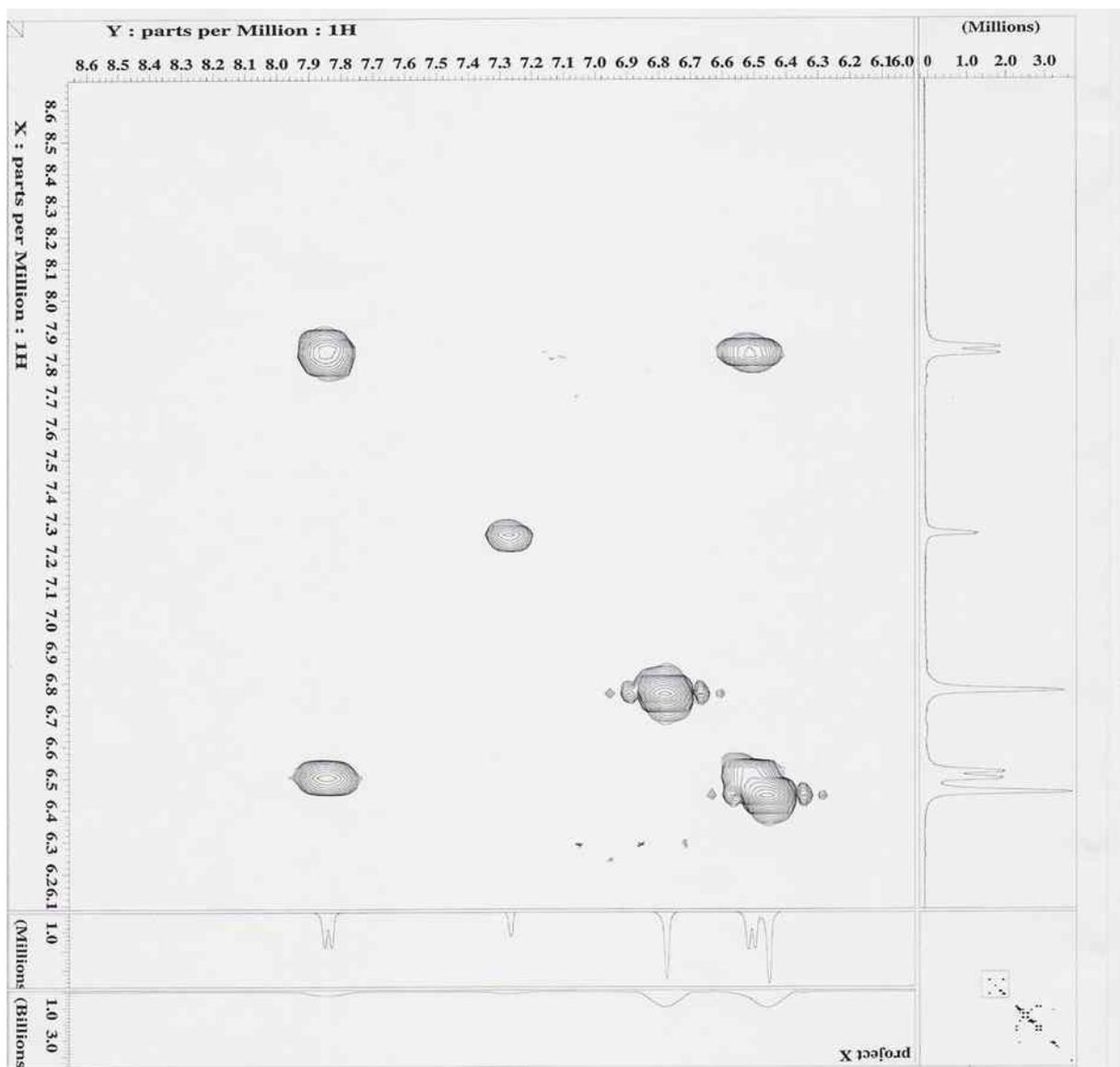


Figura 21 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da Rotenona
(Expansão)

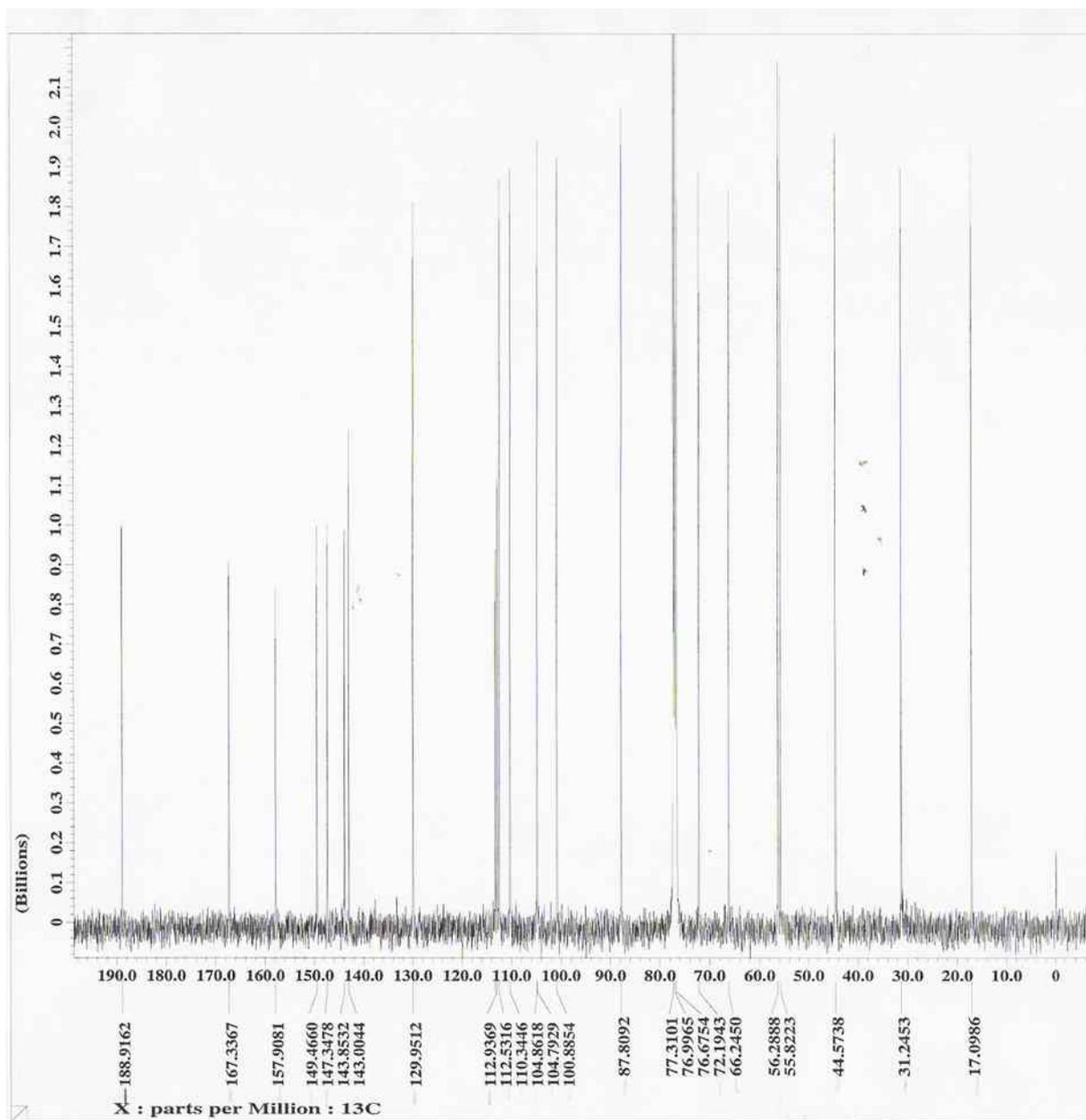


Figura 22 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Rotenona

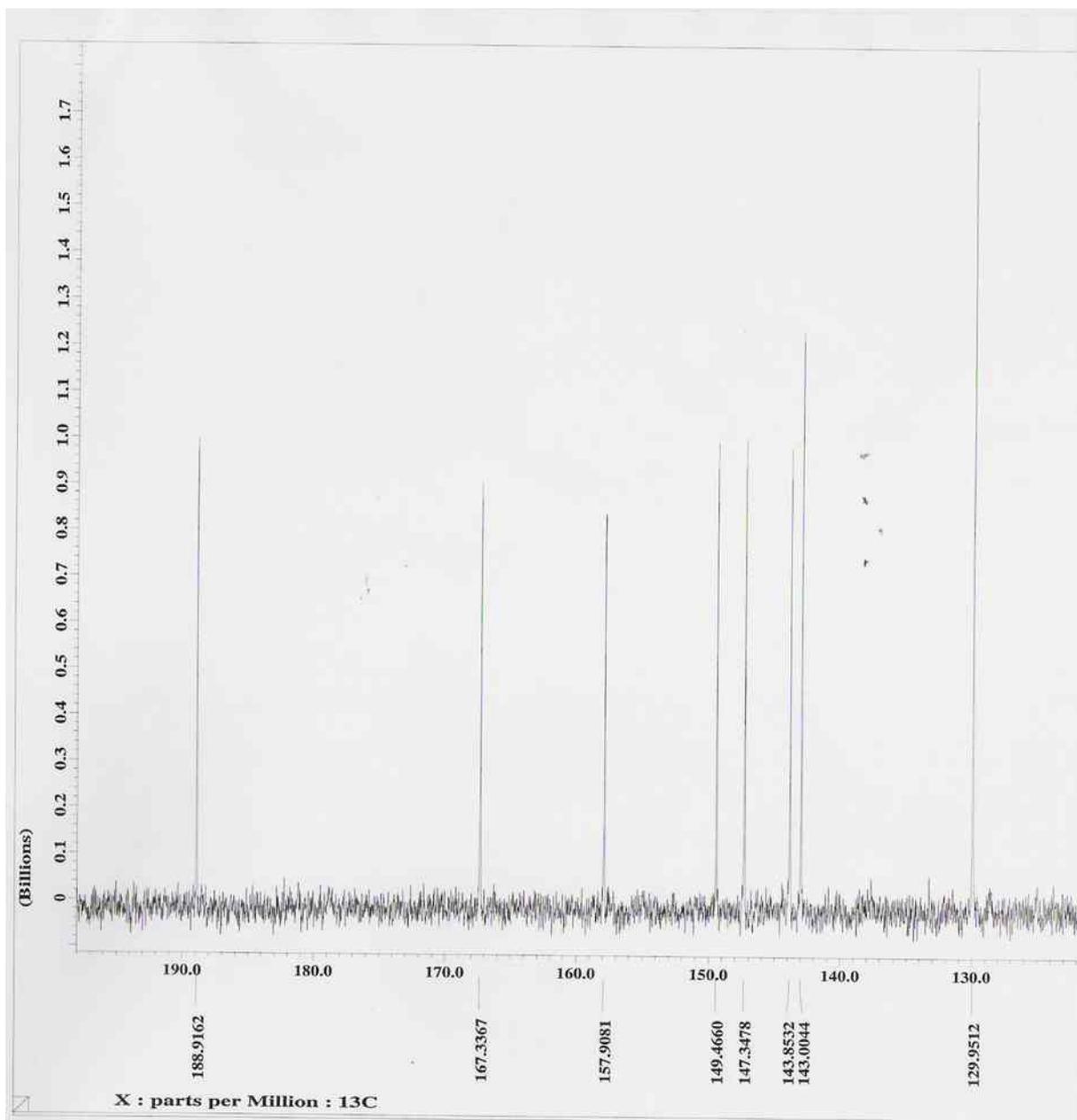


Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 130,0- 190,0 ppm da Rotenona).

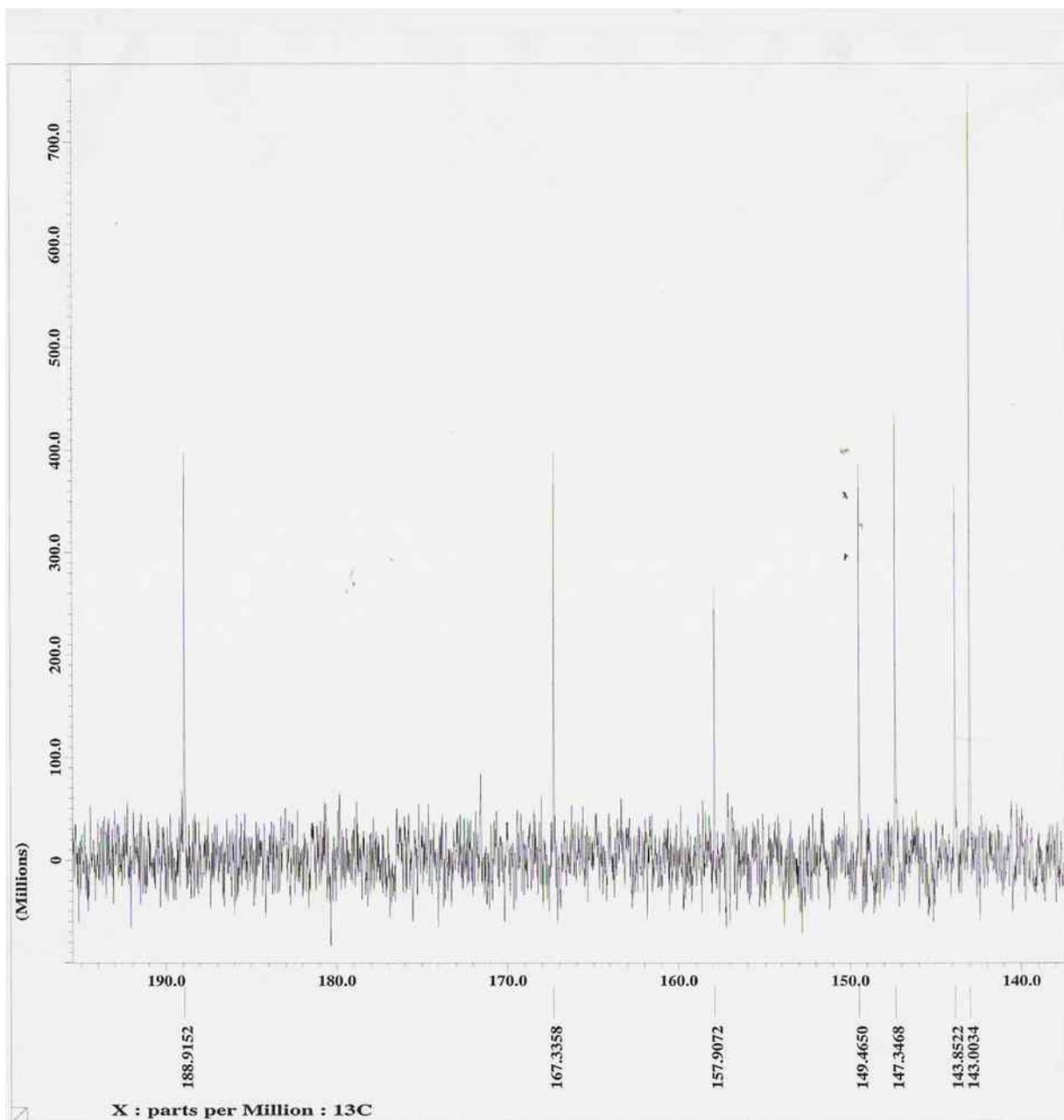


Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 140,0 – 190,0)

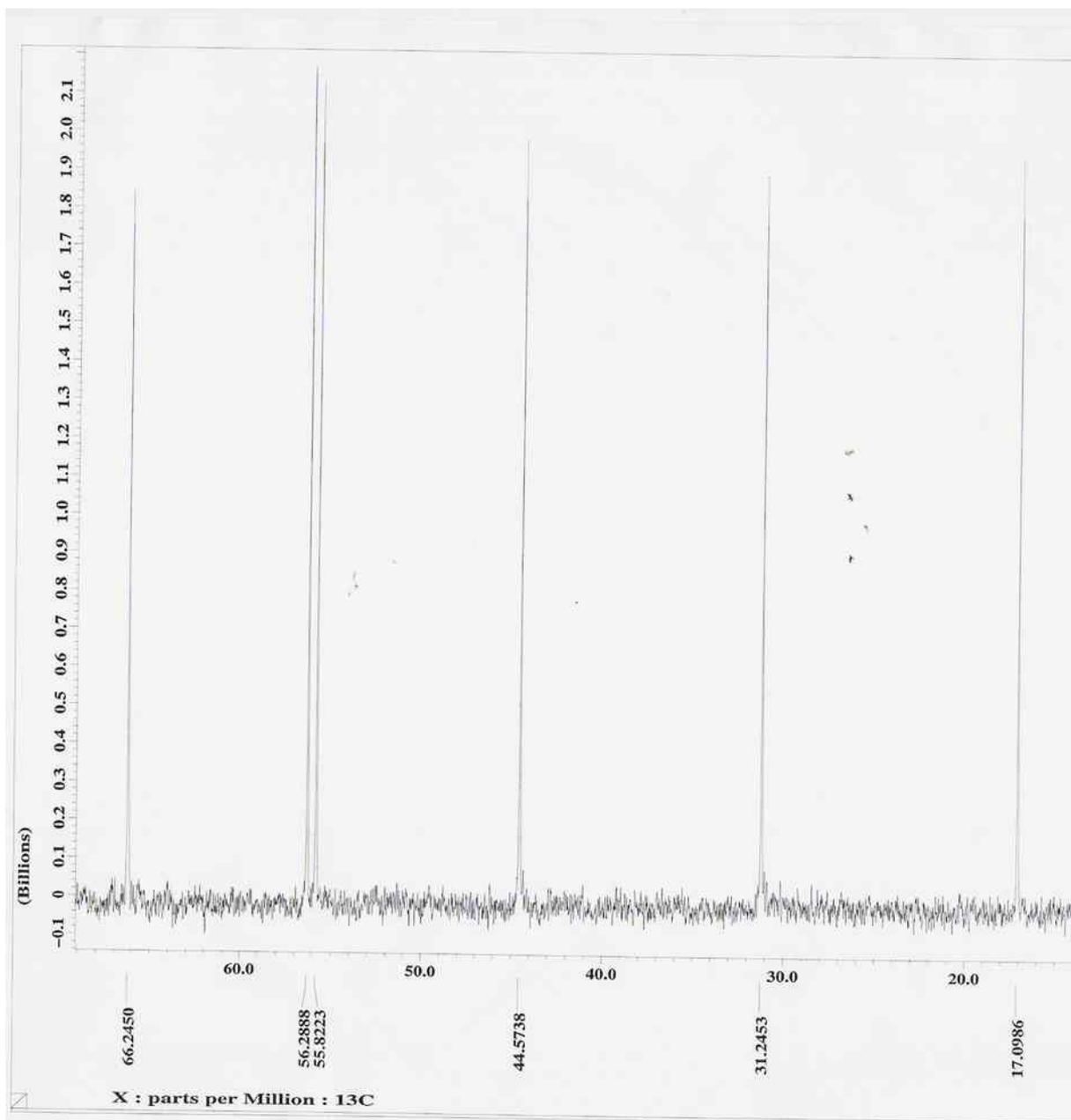


Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 20,0 – 60,0 ppm) da Rotenona

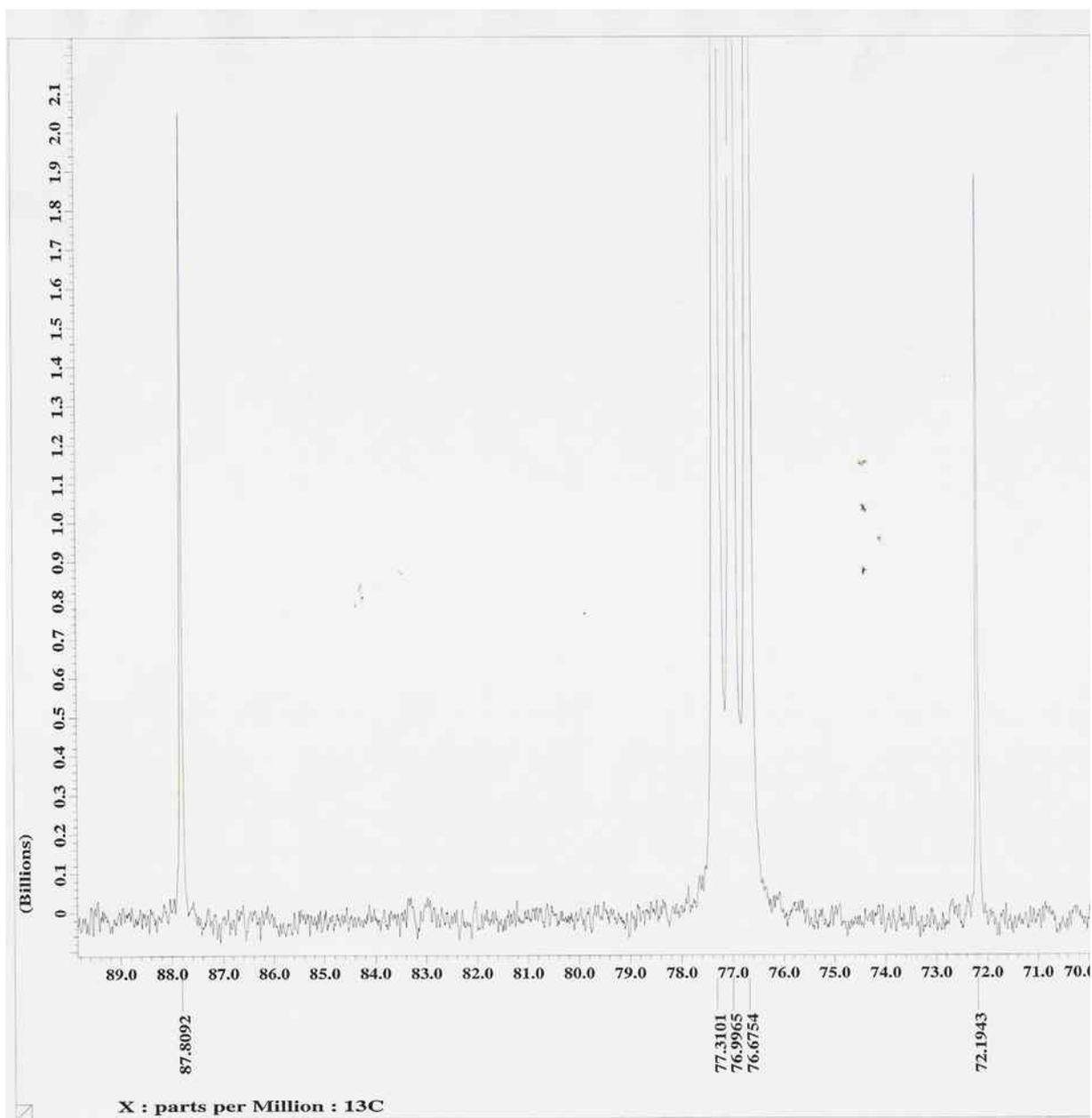


Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 70,0 – 89,0 ppm) da Rotenona

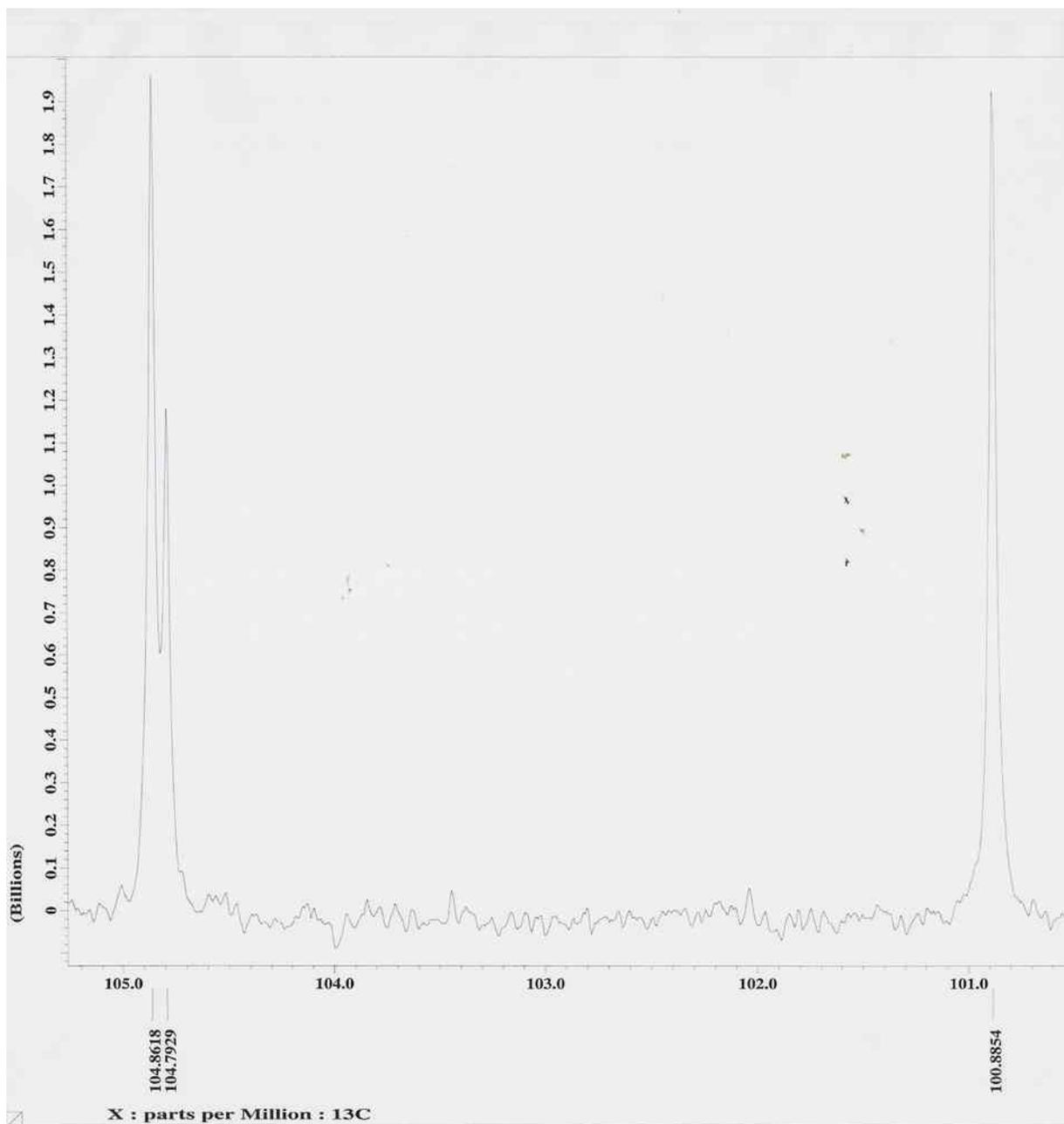


Figura 27 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 100,0 – 105,0 ppm) da Rotenona

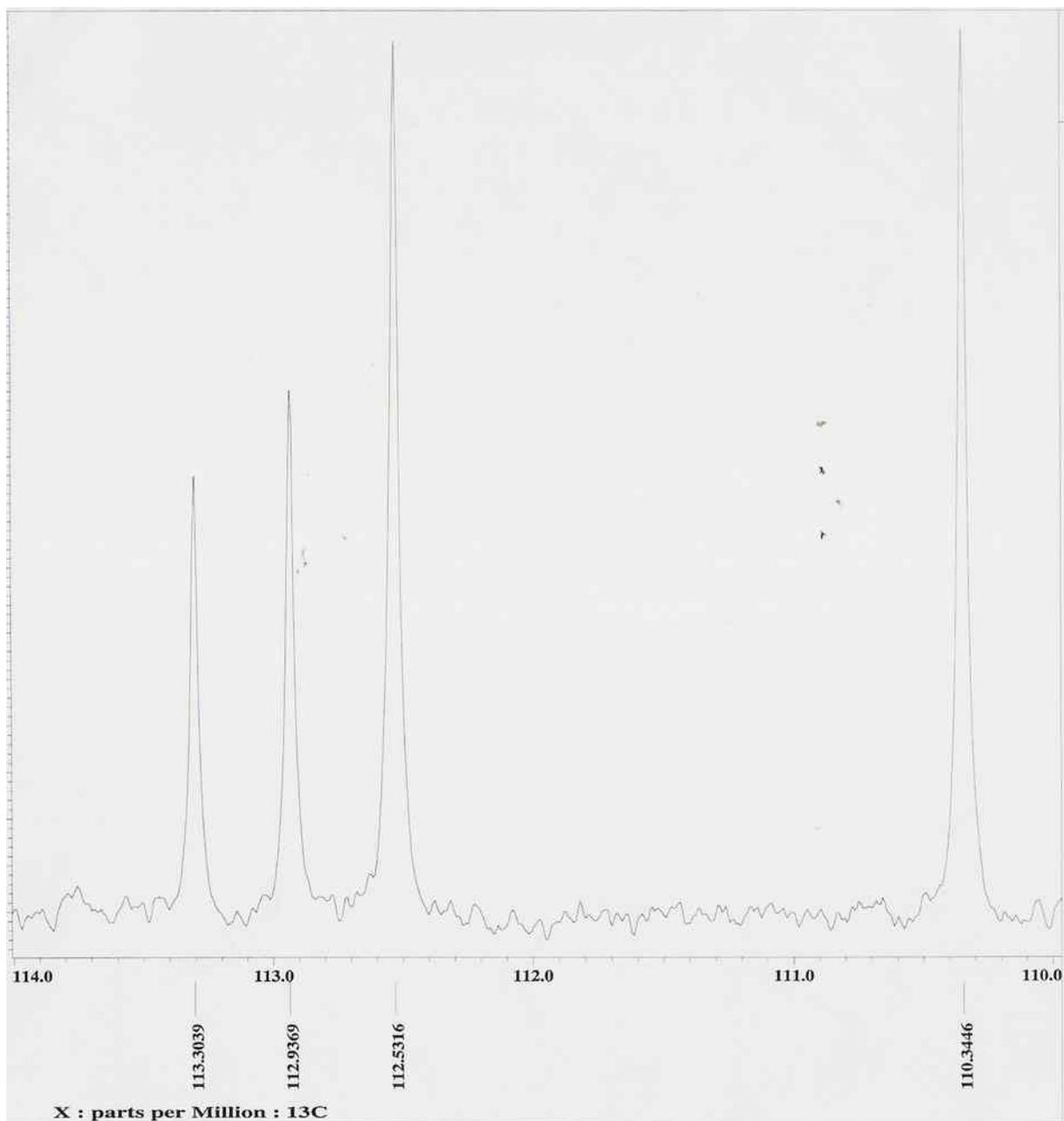


Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 110,0 – 114,0 ppm) da Rotenona

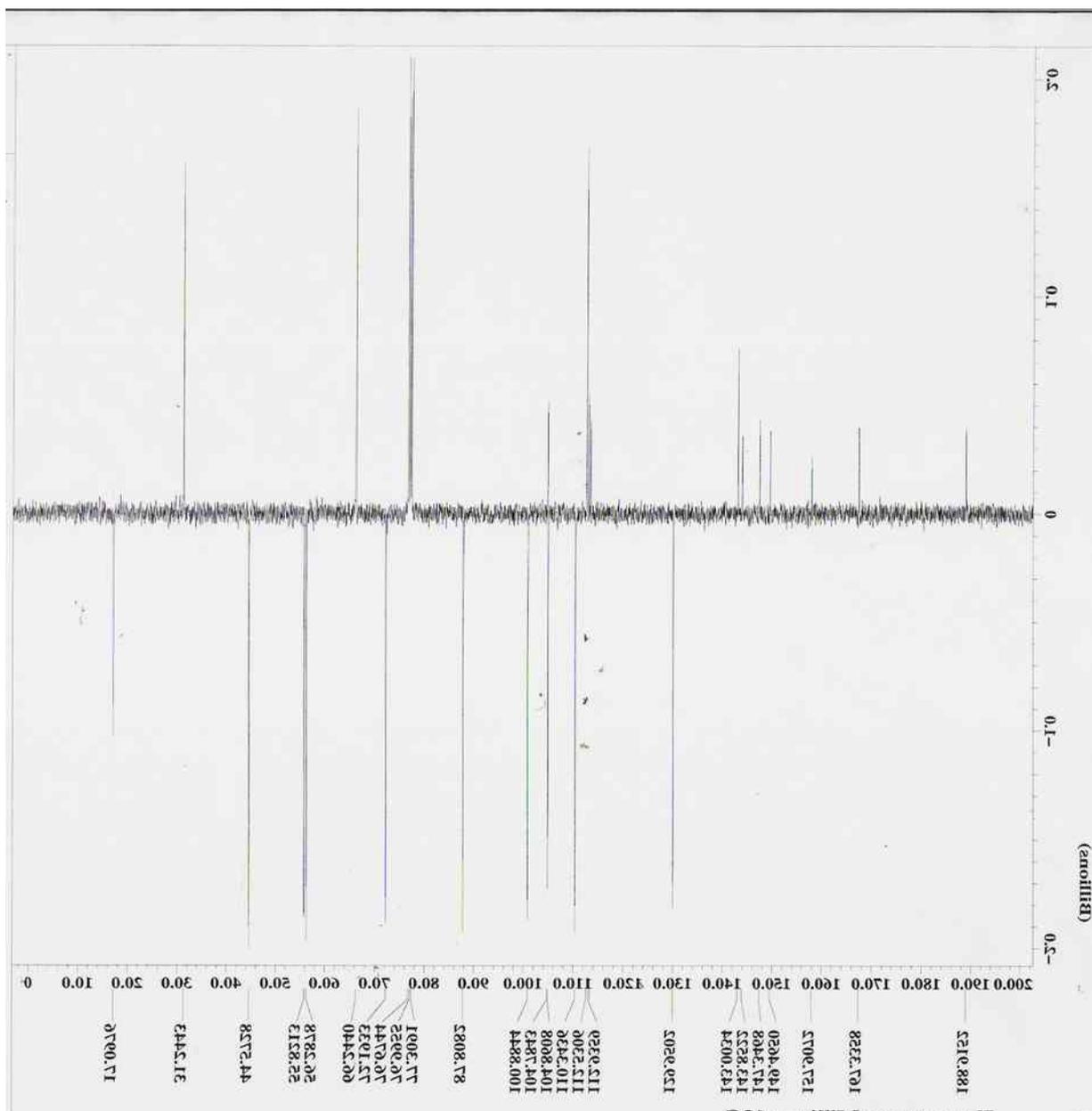


Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C RMN-APT (100 MHz, CDCl_3) da Rotenona

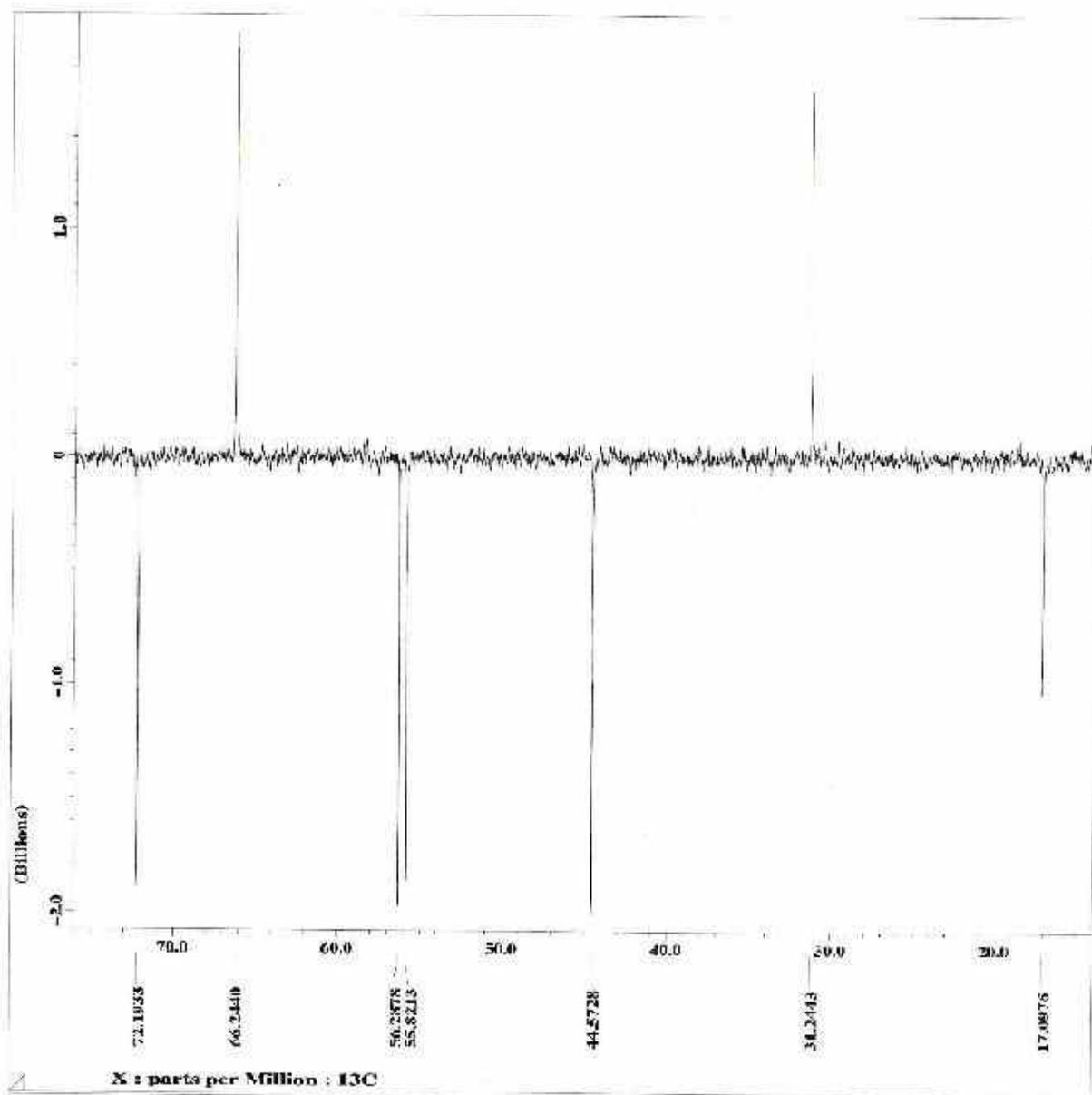


Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 20,0 – 70,0 ppm) da Rotenona

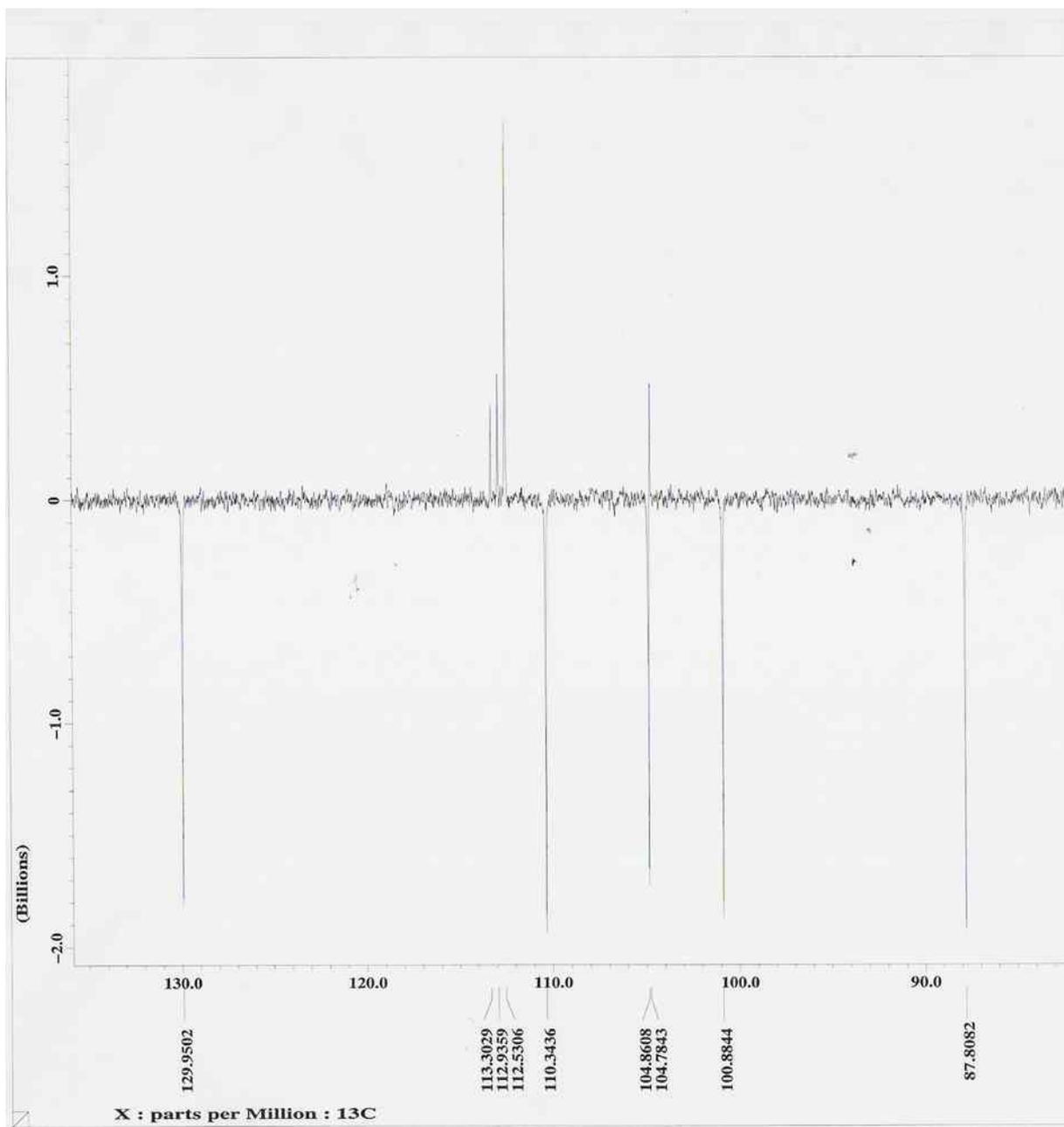


Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 90,0 – 130,0 ppm) da Rotenona

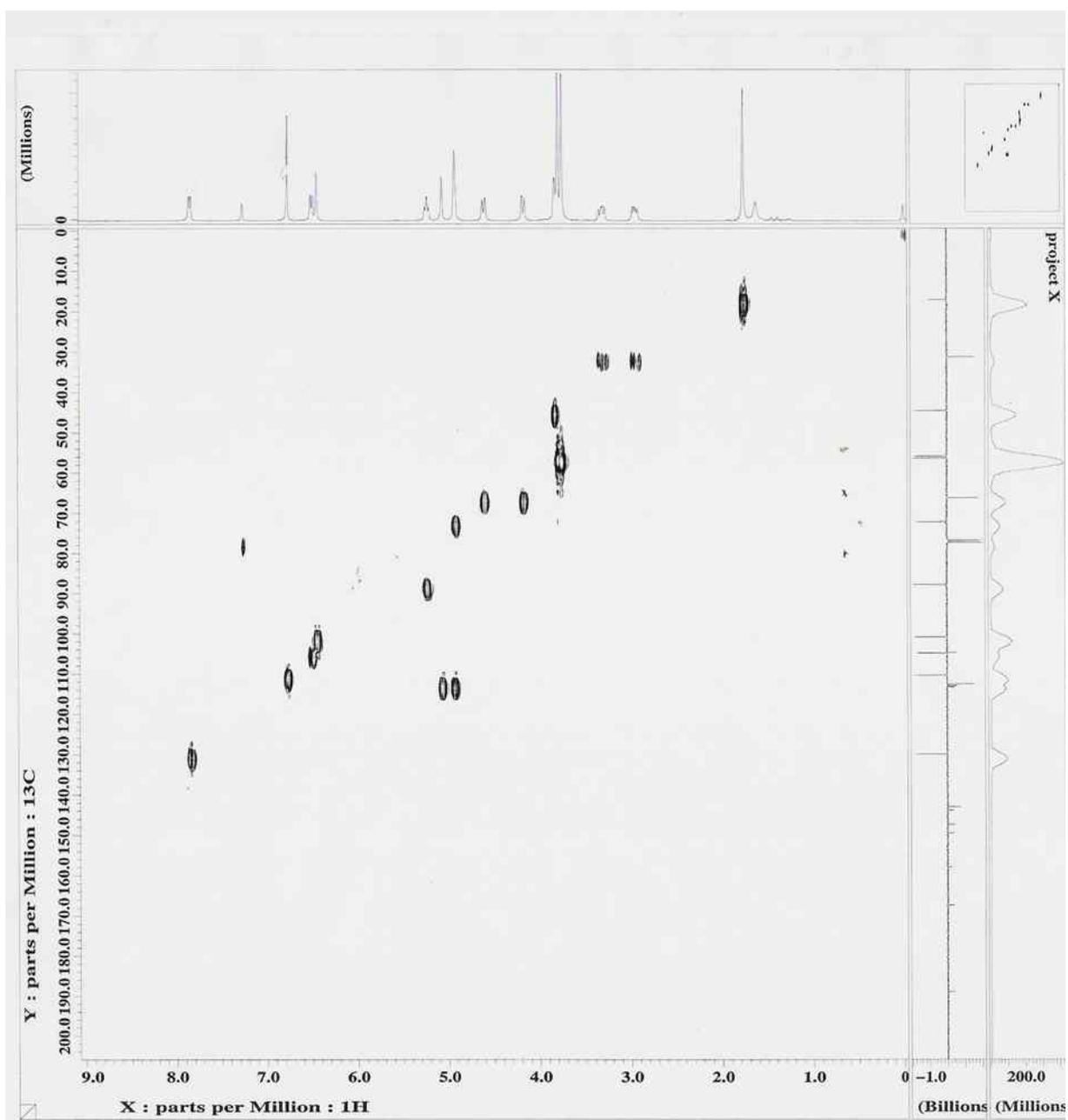


Figura 32 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da rotenona

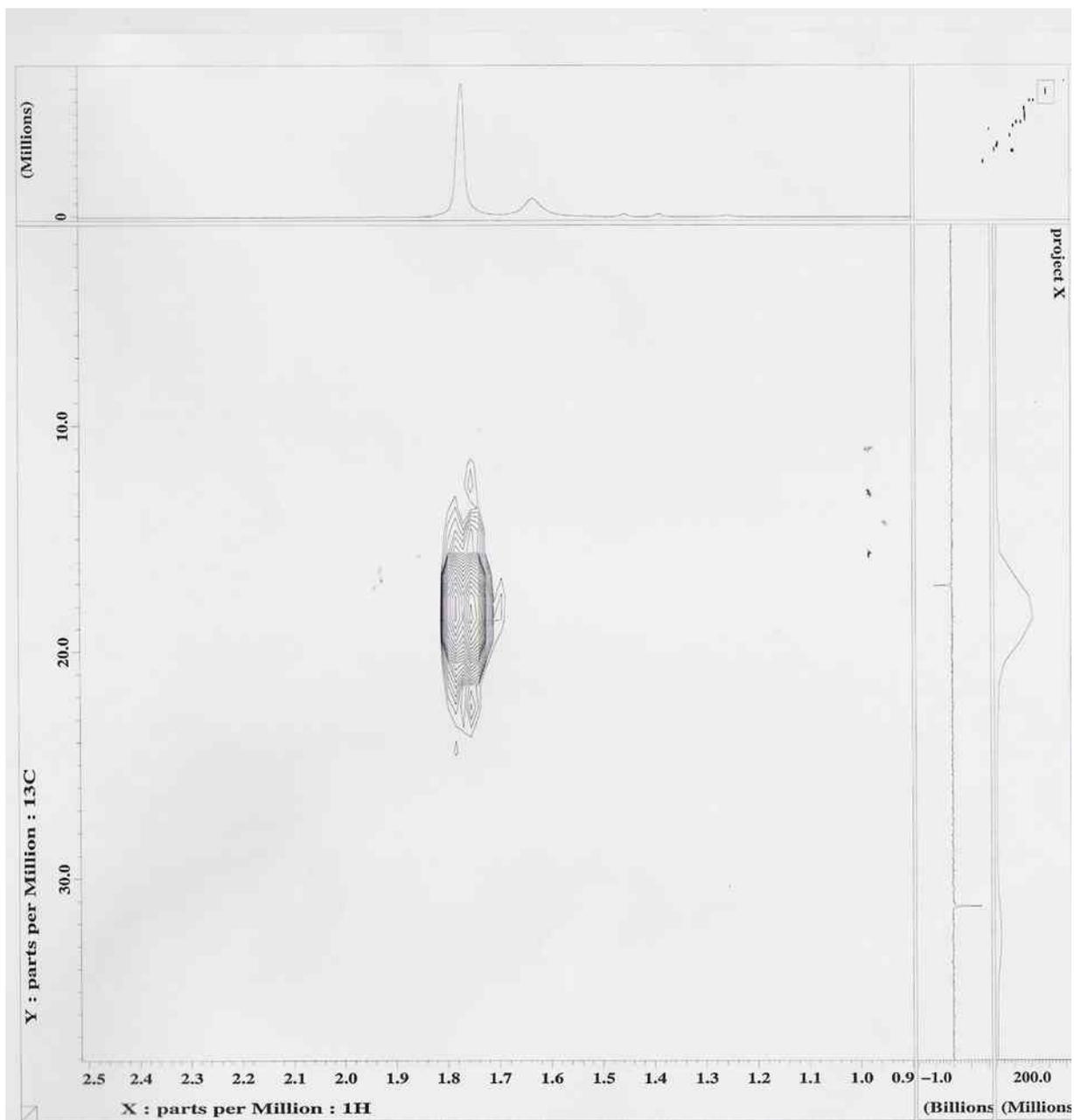


Figura 33 - Mapa de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C (HMQC) da Rotenona

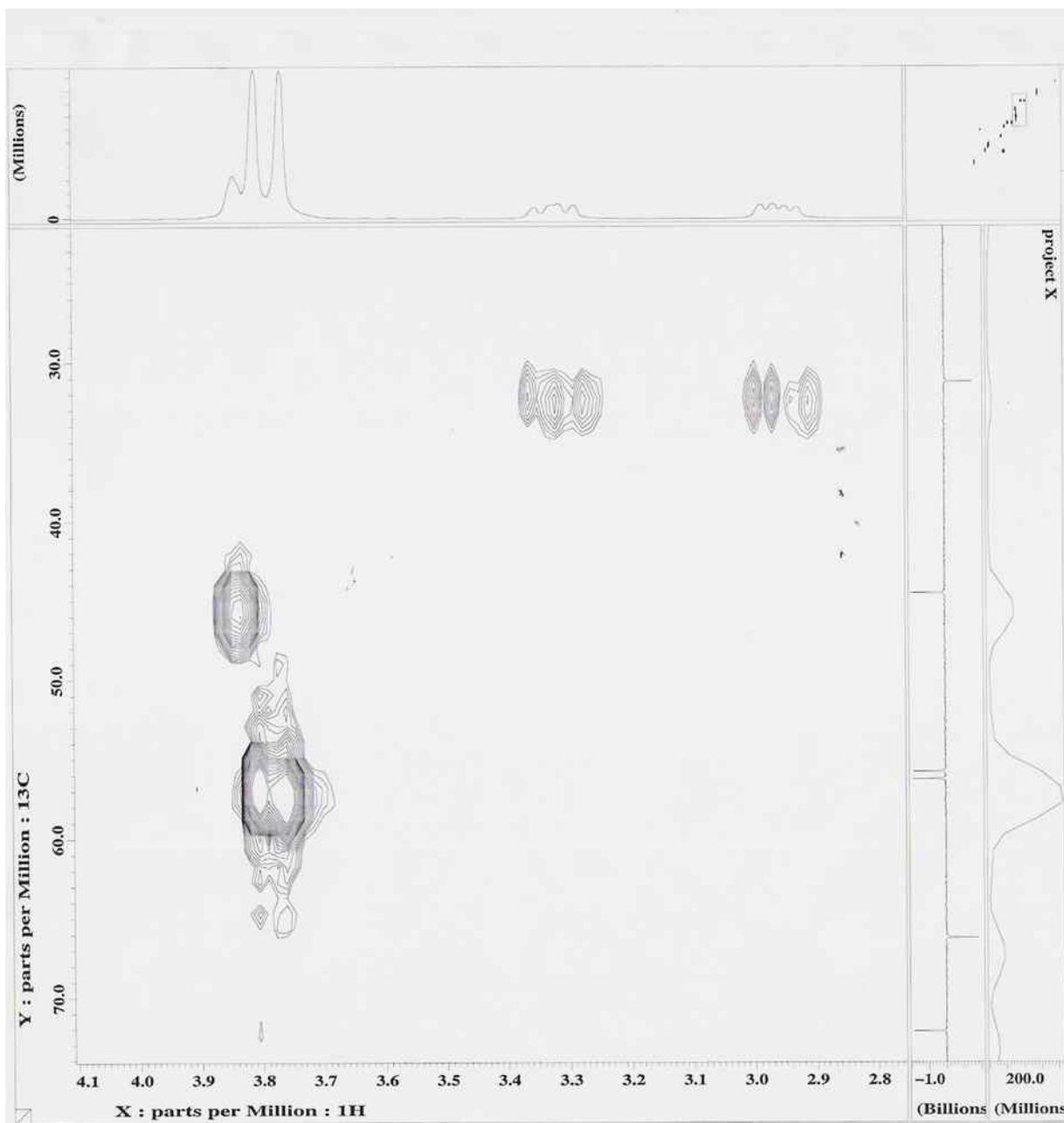


Figura 34 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da Rotenona

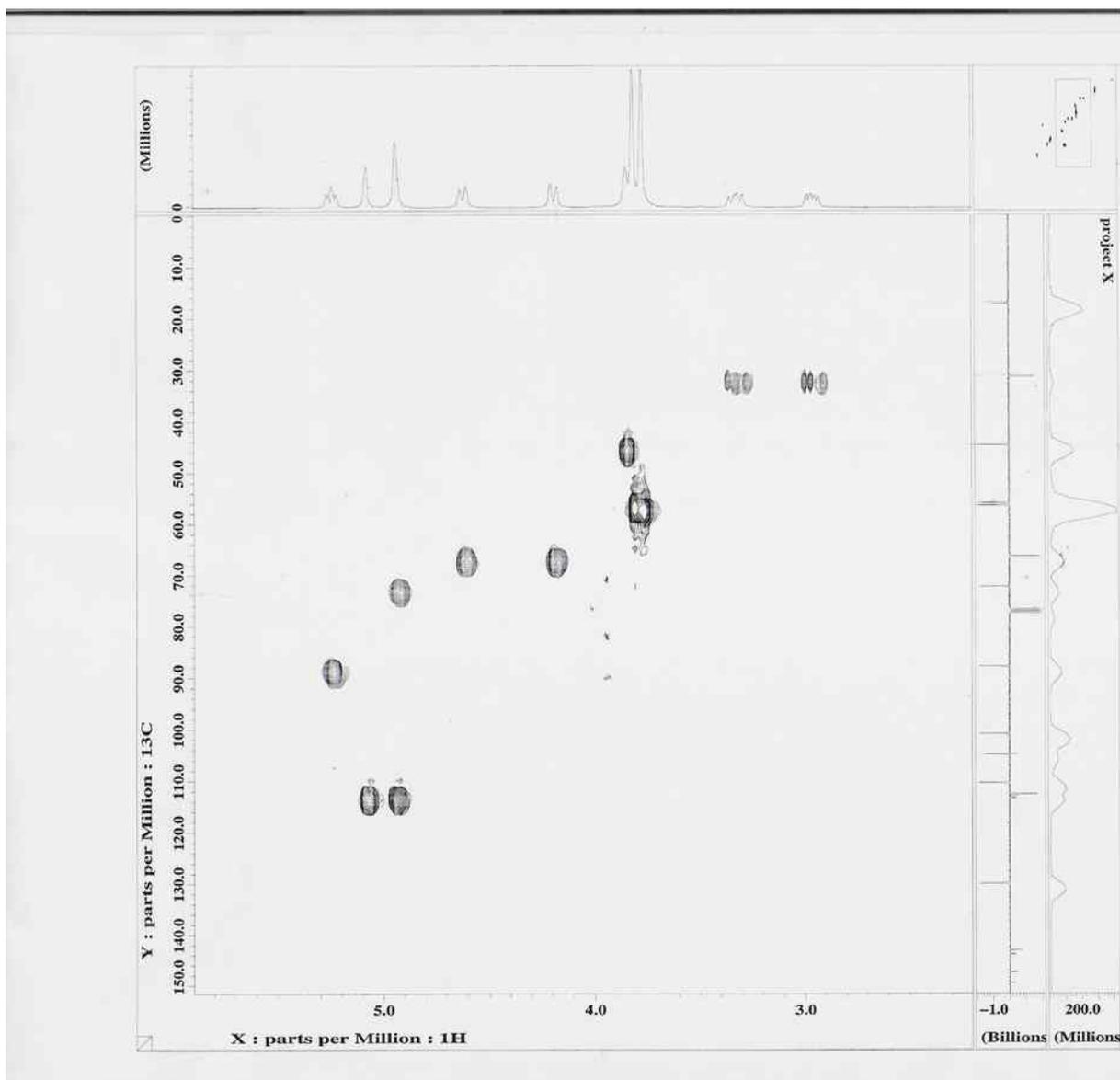


Figura 35 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da Rotenona

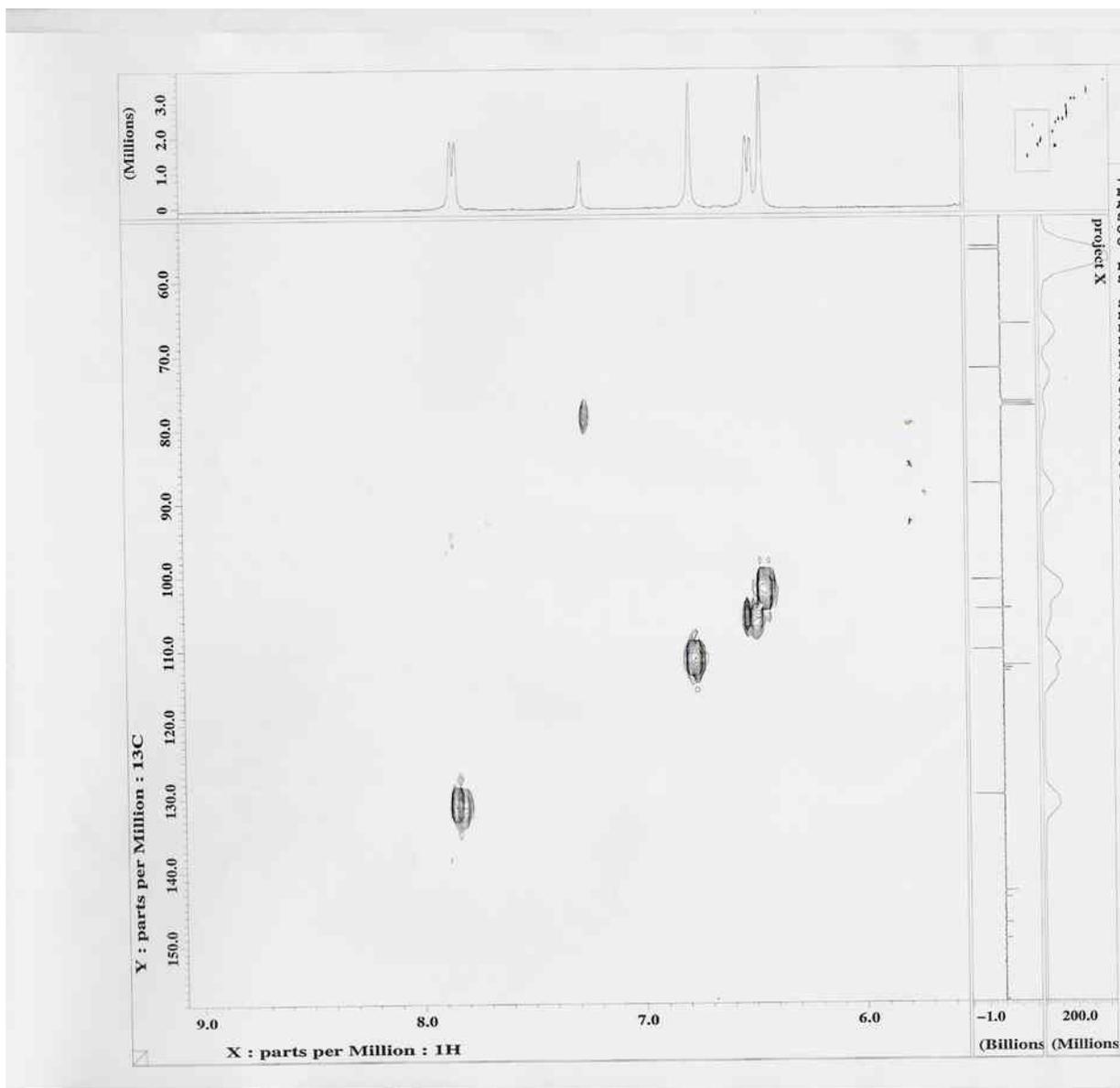


Figura 36 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da Rotenona

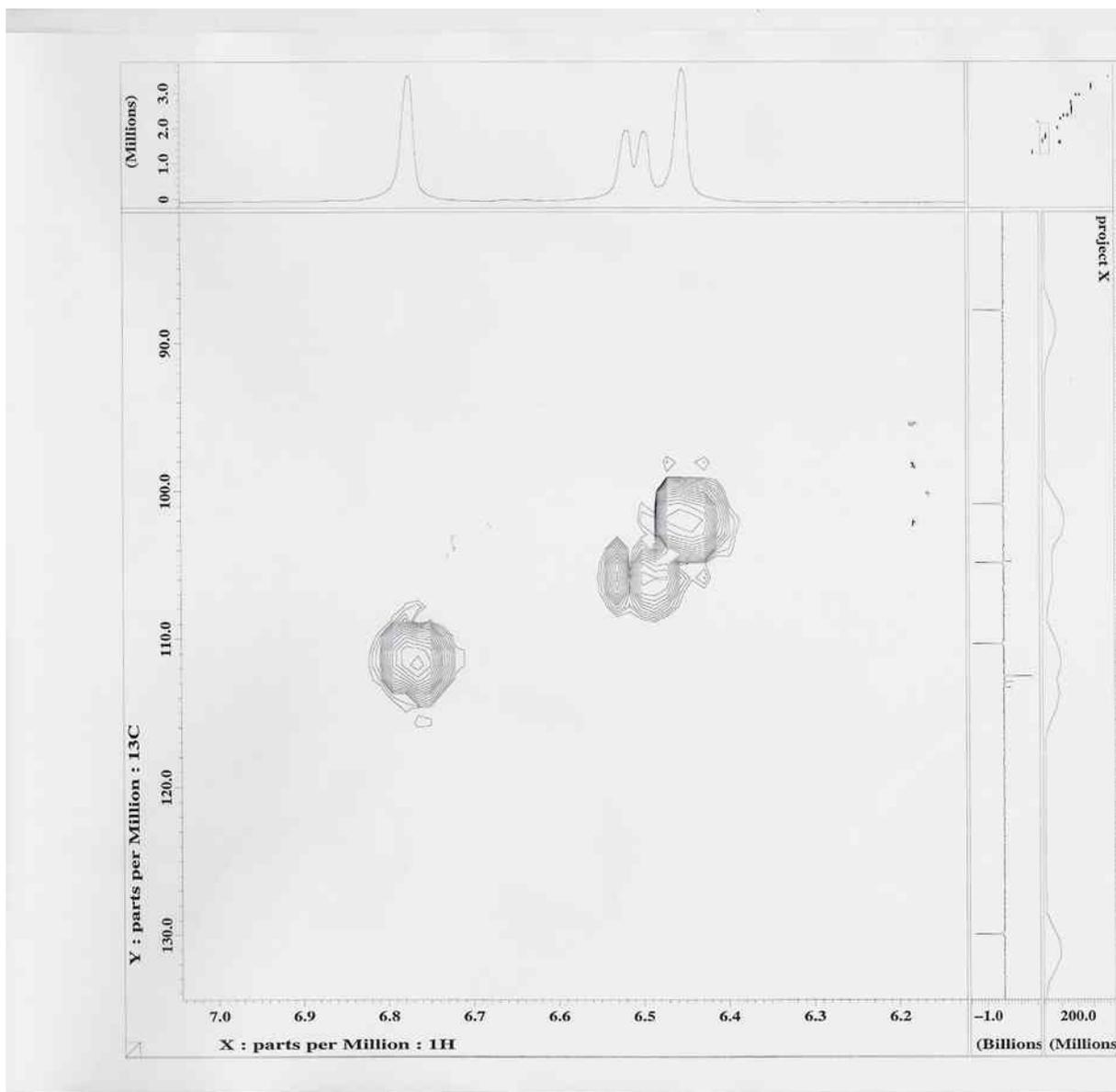


Figura 37 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da Rotenona

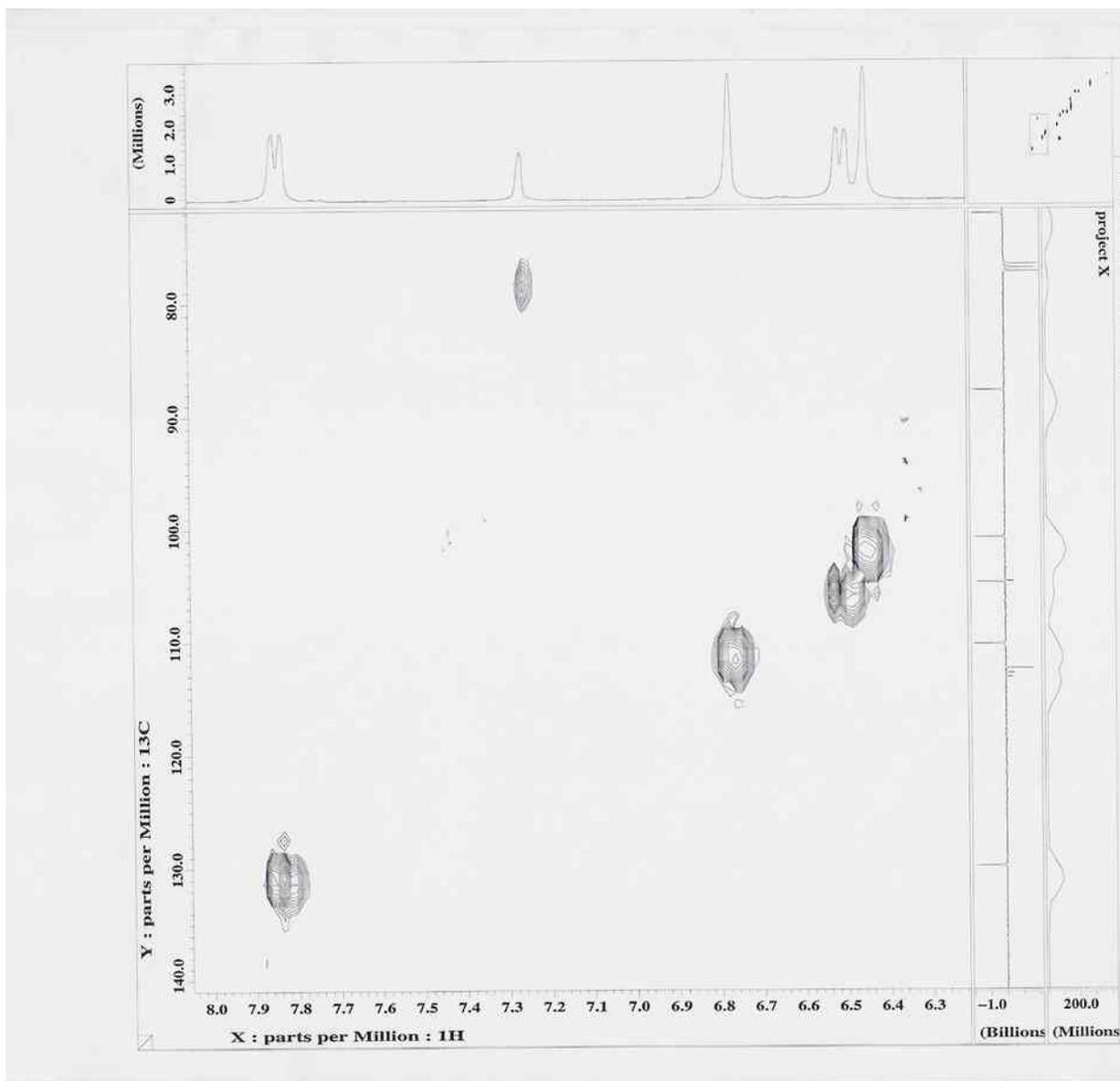


Figura 38 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da Rotenona

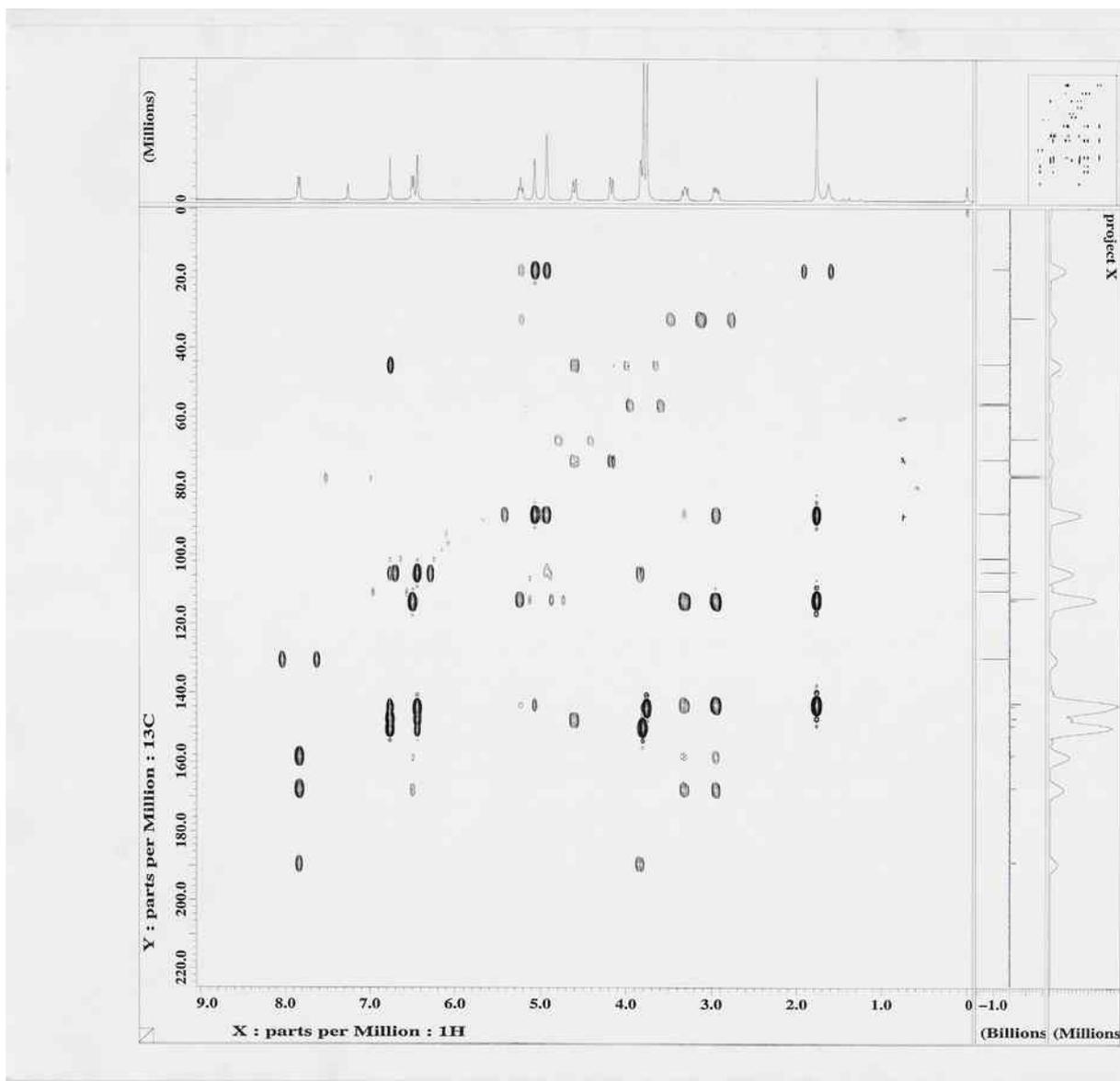


Figura 39 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da Rotenona

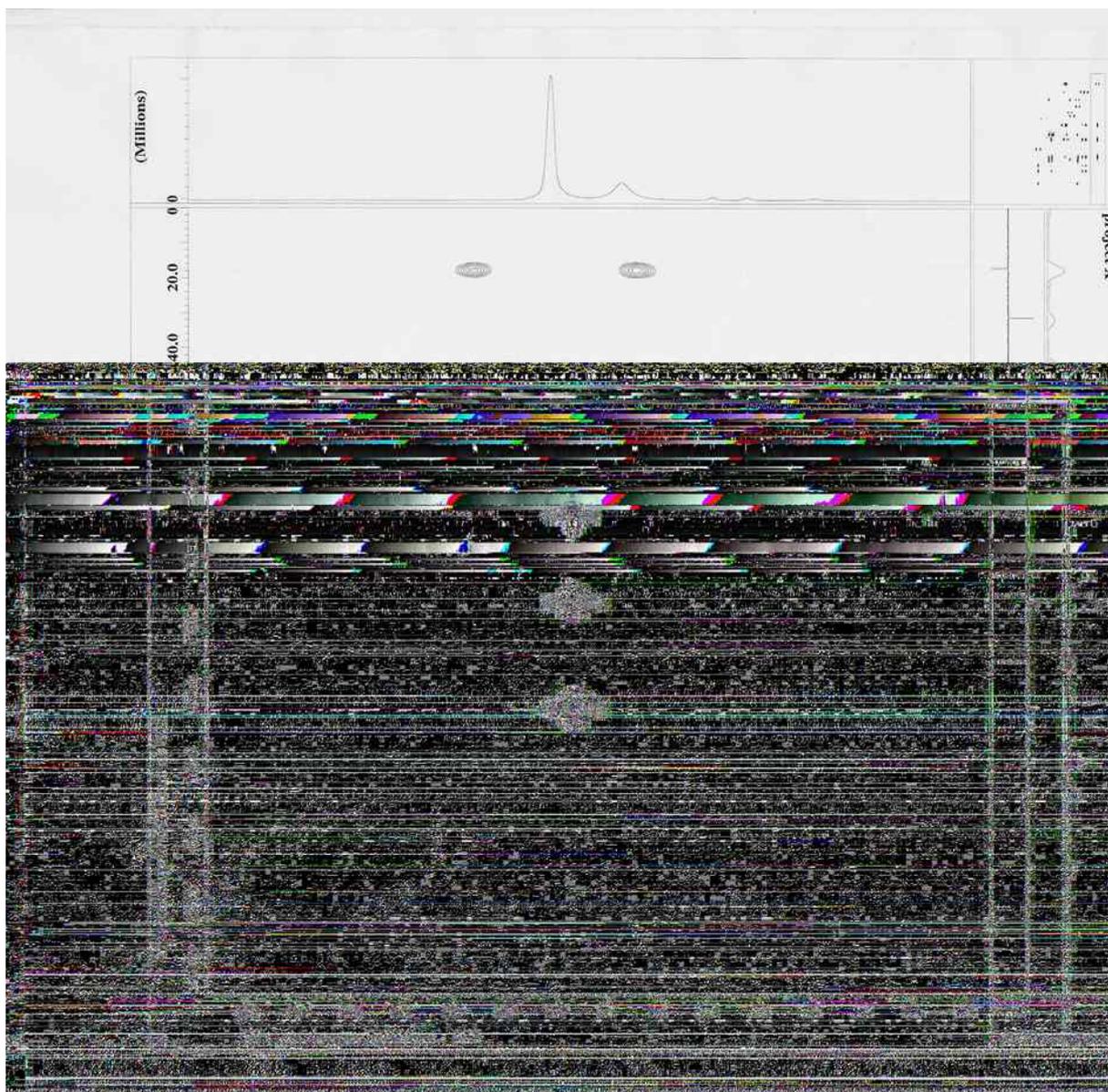


Figura 40 - Mapa de correlação heteronuclear ¹H x ¹³C (HMBC) da Rotenona

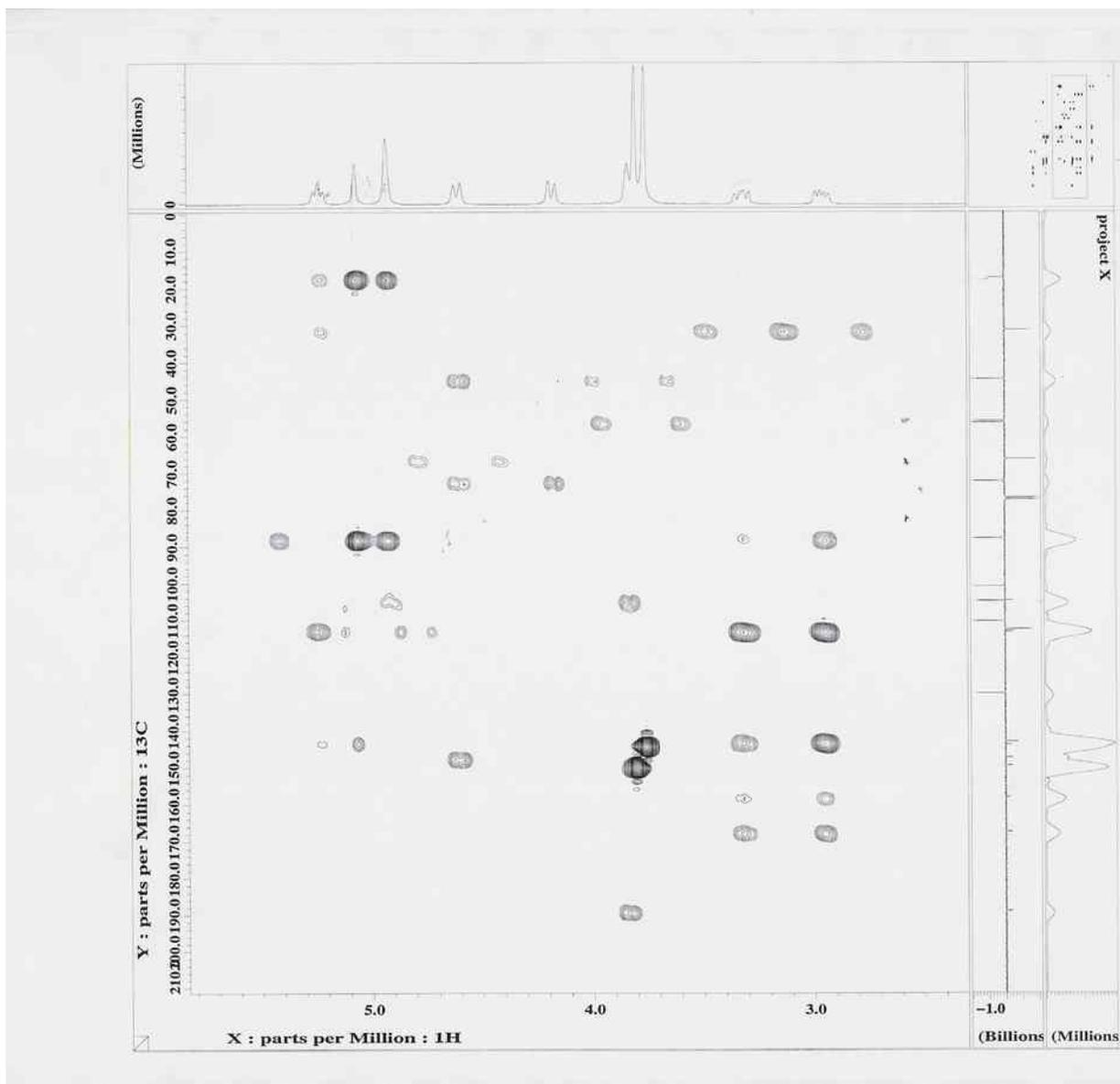


Figura 41 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da Rotenona

Figura 42 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da Rotenona

5.1.3 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA MISTURA DE ROTENÓIDES

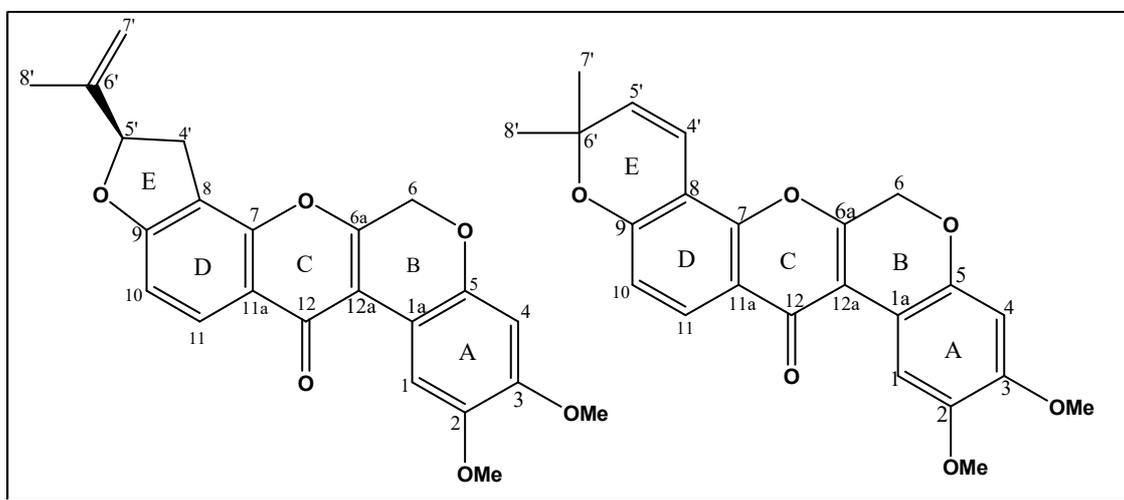
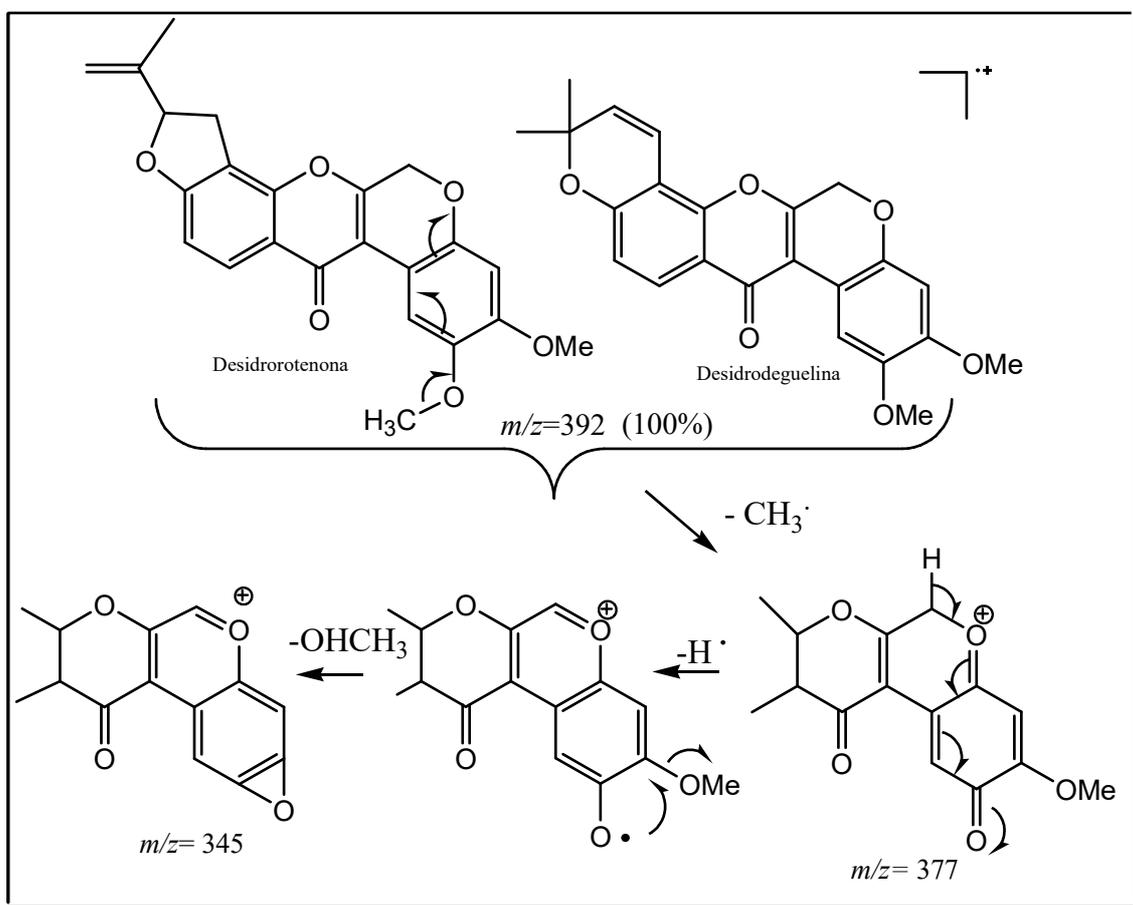


Figura 43 - Estrutura da 6a-12a-desidrorotenona/6a-12a-desidrodeguelina (52:48%)

A mistura das substâncias 6a-12a-desidrorotenona e 6a-12a-desidrodeguelina apresentou-se na forma de um sólido amarelo pálido de faixa de fusão 153,6 – 160,0 °C.

A fórmula molecular $C_{23}H_{20}O_6$ foi estabelecida com base na análise do espectro de massas m/z 392 (íon molecular) e dos espectros de RMN de 1H , ^{13}C -HBBB, ^{13}C -ATP e os experimentos bidimensionais COSY, HMQC e HMBC.

O espectro de massas além do pico do íon molecular apresentou os seguintes sinais m/z (M-15) e m/z 345 (Figura 45, p.80).



Esquema 8 - Principais fragmentos de massa proposto para o espectro de massa da mistura binária de 6a-12a-desidrorotenona e 6a-12a-desidrodeguelina

Analisando a região aromática do espectro de RMN 1H (Figura 46, p.81), nota-se sinais simples à δ_H 8,45 e 6,54 caracterizando o anel A dos rotenóides 6a-12a-desidrorotenona e 6a-12a-desidrodeguelina.

Comparando com a absorção dos mesmos hidrogênios da rotenona, nota-se a desproteção de H-1 evidenciando a coplanaridade de H-1 em relação a carbonila em C-12 (BUCHI, *et al.*1961)

O anel aromático D, está caracterizado pelos sinais duplos em [6,91 ($d, J=8,80$) e 8,12 ($d, J=8,44$)] e δ_H [6,86 ($d; J=8,44$) e 8,03 ($d; J=8,76$)] relativos aos hidrogênios H-10 e H-11 da 6a-12a-desidrorotenona e 6a-12adesidrodeguelina respectivamente, *orto* acoplados.

A principal diferença que caracteriza a mistura dos rotenóides desidrorotenona e 6a-12a-desidrodeguelina é verificada analisando o deslocamento químico referente ao anel alifático *E*. No caso da 6a-12adesidrorotenona, verifica-se a presença dos deslocamentos característicos do sistema isopropenildiidrofurânico, semelhante ao observado para a rotenona.

Para a 6a-12a-desidrodeguelina, são observados os hidrogênios H-4' e H-5' *cis* a δ_H [6,76 (d; J=10,24) e 5,75 (d; J=10,64)] e o sinal simples dos hidrogênios ambos a δ_H 1,50 (Figura 48, p.83).

Os espectros de RMN de ^{13}C -APT (Figura 56 p.91) forneceram os deslocamentos químicos e o número de hidrogênio ligado a cada átomo de carbono, δ_C 174,33.

A presença da carbonila em C-12 (δ_C 174,33), foi confirmada pelo espectro de infravermelho (Figura 44 p.79) através da absorção a 1635 cm^{-1} correspondente ao estiramento de carbonila de cetona, um pouco mais deslocado em relação à rotenona (1674 cm^{-1}) devido ao efeito da conjugação entre a carbonila e a dupla ligação em C-6a e C-12a.

A presença do anel **E** da 6a-12a-desidrodeguelina esta caracterizada pelo deslocamento químico a δ_C 78,5, referente ao carbono quaternário C-6' além dos sinais da olefina *cis* a δ_C [114,66 (C-4') e 130,54 (C-5')] e o sinal a δ_C 28,10 relativo as metilas C-7' e C-8'.

As demais atribuições dos sinais dos espectros foram feitas através da análise do mapa de correlação heteronuclear HMQC (Figura 62 p.97) e HMBC (Figura 65, p.100) e comparação com dados da literatura (TALLENT, *et al.* 1973; & FANG & CASIDA,1997).

A proporção de cada componente da mistura foi feita comparando-se as integrações relativas no espectro de RMN ^1H dos sinais referente aos átomos de hidrogênio equivalentes H-11. Através dessa análise foi possível avaliar a proporção de cada componente na mistura, como sendo: 6a-12a-desidrorotenona/6a-12a-desidrodeguelina (52:48%).

A atribuição total para a 6a-12a-desidrorotenona e 6a-12a-desidrodeguelina encontram-se nas Tabela 10 p.77 e Tabela 11, p.78 .

TABELA10 – Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) da 6a-12a-desidrorotenona em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

	HMQC		HMBC		TALLENT,1973; FANG & CASIDA, 1997	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C				H-4		
1a	110,56			H-4	118,8	
2	144,04				143,9	
3	148,92		H-4		148,3	
5	146,24				146,1	
6a	156,18		2H-6		152,1	
7	157,21			H-11	155,9	
8	111,69				110,5	
9	164,82				164,7	
11a	118,92			H-10	111,5	
12	174,33				174,1	
12a	118,44				112,9	
6'	142,80				142,7	
CH						
1	110,00				108,5	8,45 (s)
		8,45 (s)				
4	100,37	6,54 (s)			100,3	6,55 (s)
10	115,38	6,91 (<i>d</i> ; $J=8,80$)			110,0	6,93 (<i>d</i>)
11	127,87	8,12 (<i>d</i> ; $J=8,44$)			127,7	8,13 (<i>d</i>)
5'	87,85	5,40 (<i>t</i> ; $J=8,6$)			87,8	5,41 (<i>dd</i>)
CH₂						
6	64,82	4,99			64,7	5,00
4'	31,41	3,20				3,53 (<i>dd</i>)
		3,51				3,19
7'	112,95	5,01				5,41 (s)
		5,21				4,98 (s)
CH₃						
8'	17,02	1,80			17,0	1,81
CH₃O						
	55,26	3,95			55,8	3,96
	56,89	3,87			56,2	3,87

TABELA 11 – Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) da 6a-12a-desidrodequelina em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

	HMQC		HMBC		TALLENT,1973; FANG & CASIDA, 1997	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
1a	110,05			H-4	118,8	
2	144,04			H-4	143,9	
3	148,92		H-4		148,3	
5	146,24				146,1	
6a	156,18		2H-6		152,1	

7	157,21		H-11	155,9
8	111,69			110,5
9	164,82			164,7
11a	118,92		H-10	111,5
12	174,33			174,1
12a	118,44			112,9
6'	78,25			142,7
CH				
1	109,96			108,5
		8,45 (s)		8,45 (d)
4	100,37	6,54 (s)		100,3
10	115,38	6,86 (d; J=8,44)		110,0
11	126,40	8,03 (d; J=8,76)		127,7
4'	114,66	6,76 (d; J=10,24)		6,75 (d)
5'	130,54	5,75 (d; J=10,64)		87,8
				5,71 (d)
CH₂				
6	64,82	5,01		64,7
				5,00 (s)
CH₃				
7'	28,10	1,50		1,48
8'	28,10	1,50		17,0
				1,48
CH₃O				
	55,26	3,95 (s)		55,8
	56,89	3,97 (s)		56,2
				3,94
				3,85

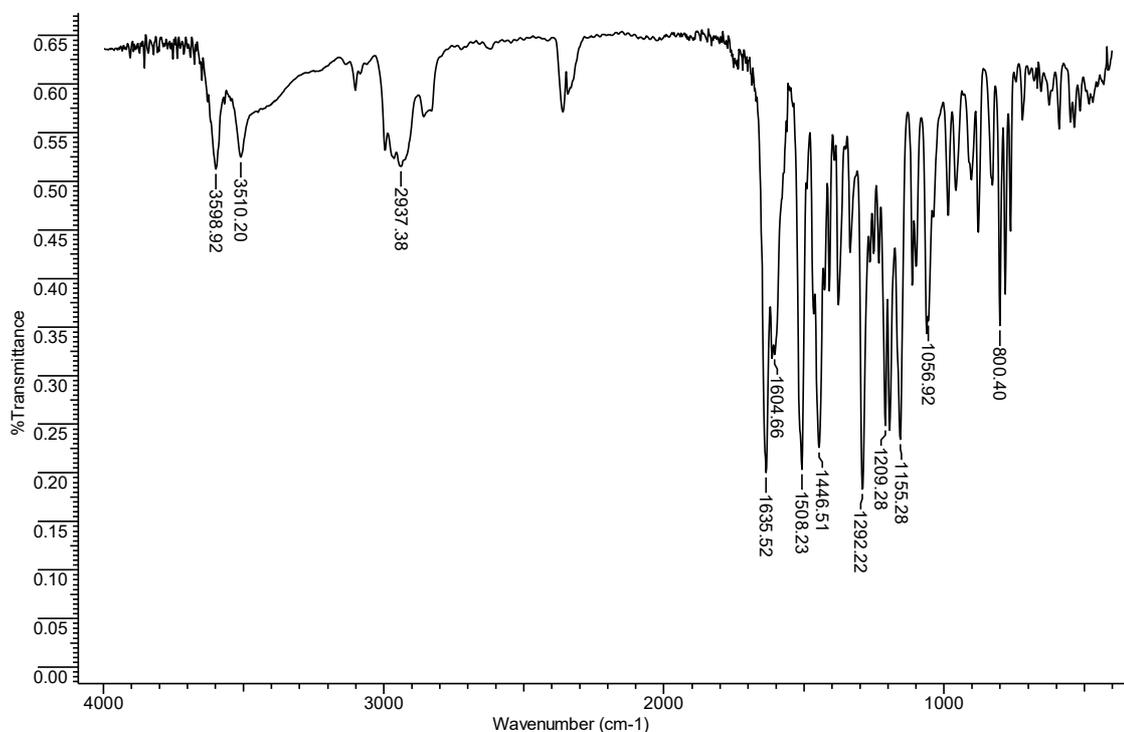


Figura 44- I.V. (KBr) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

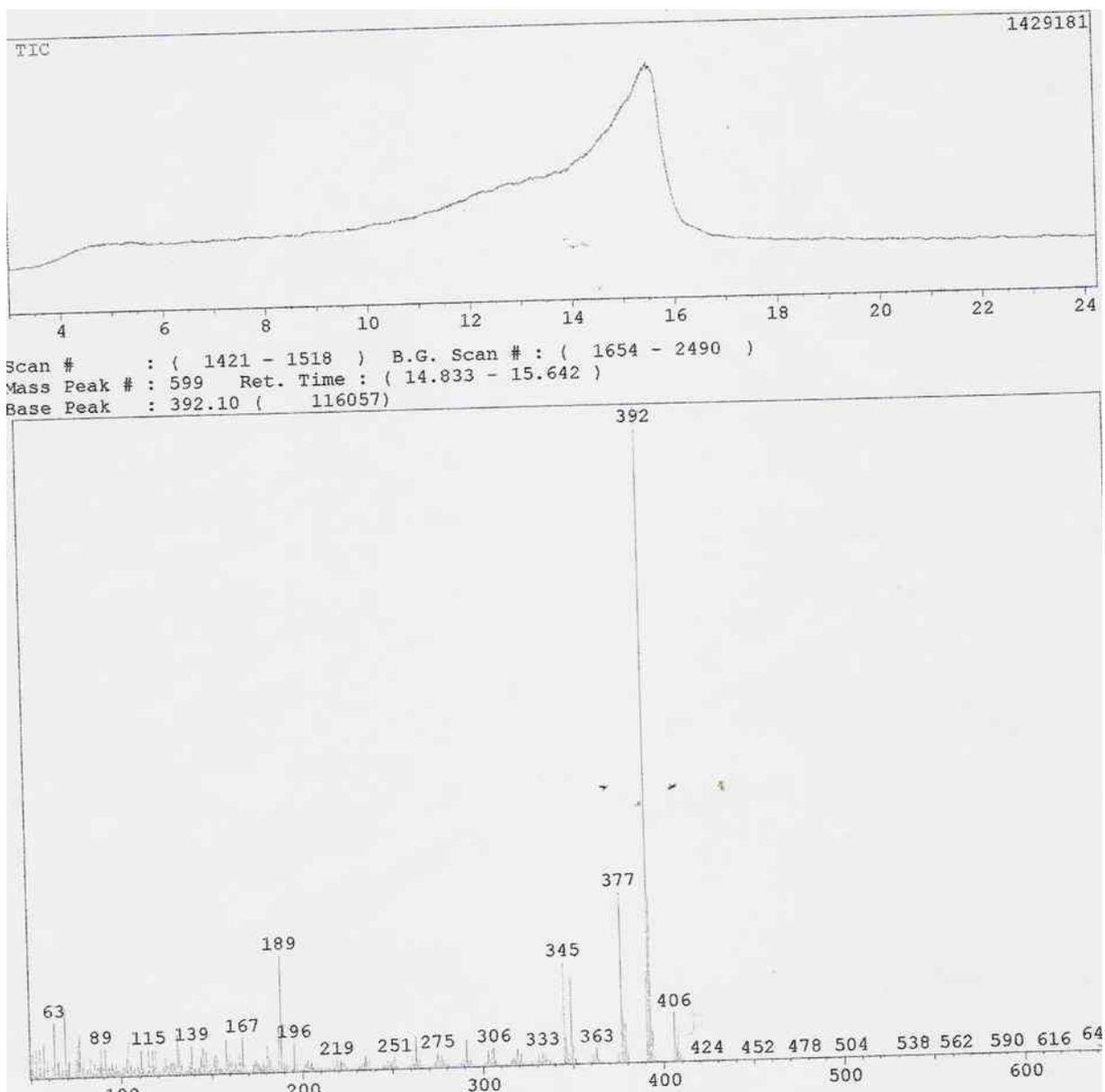


Figura 45 - Espectro de massas da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

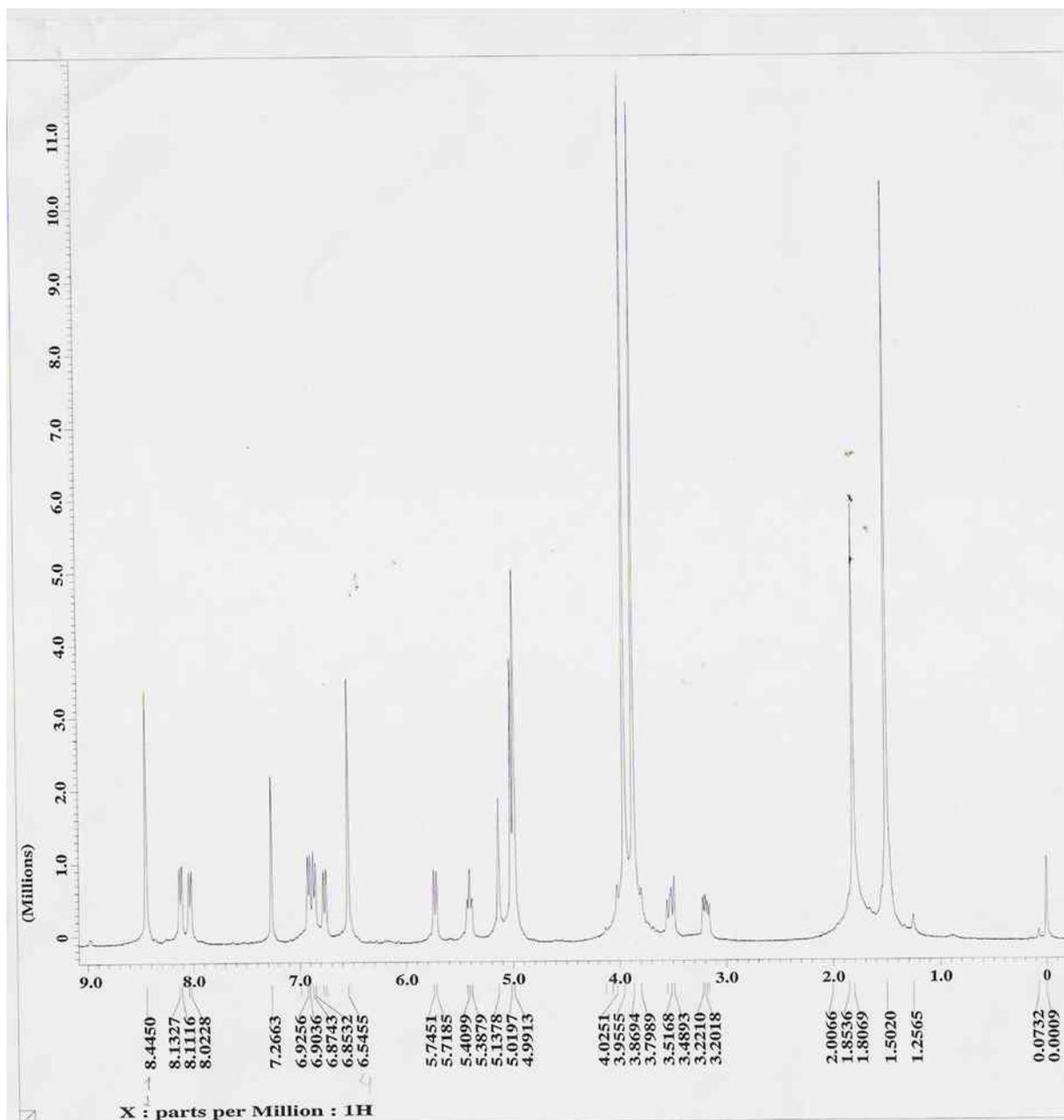


Figura 46 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina (52:48%)

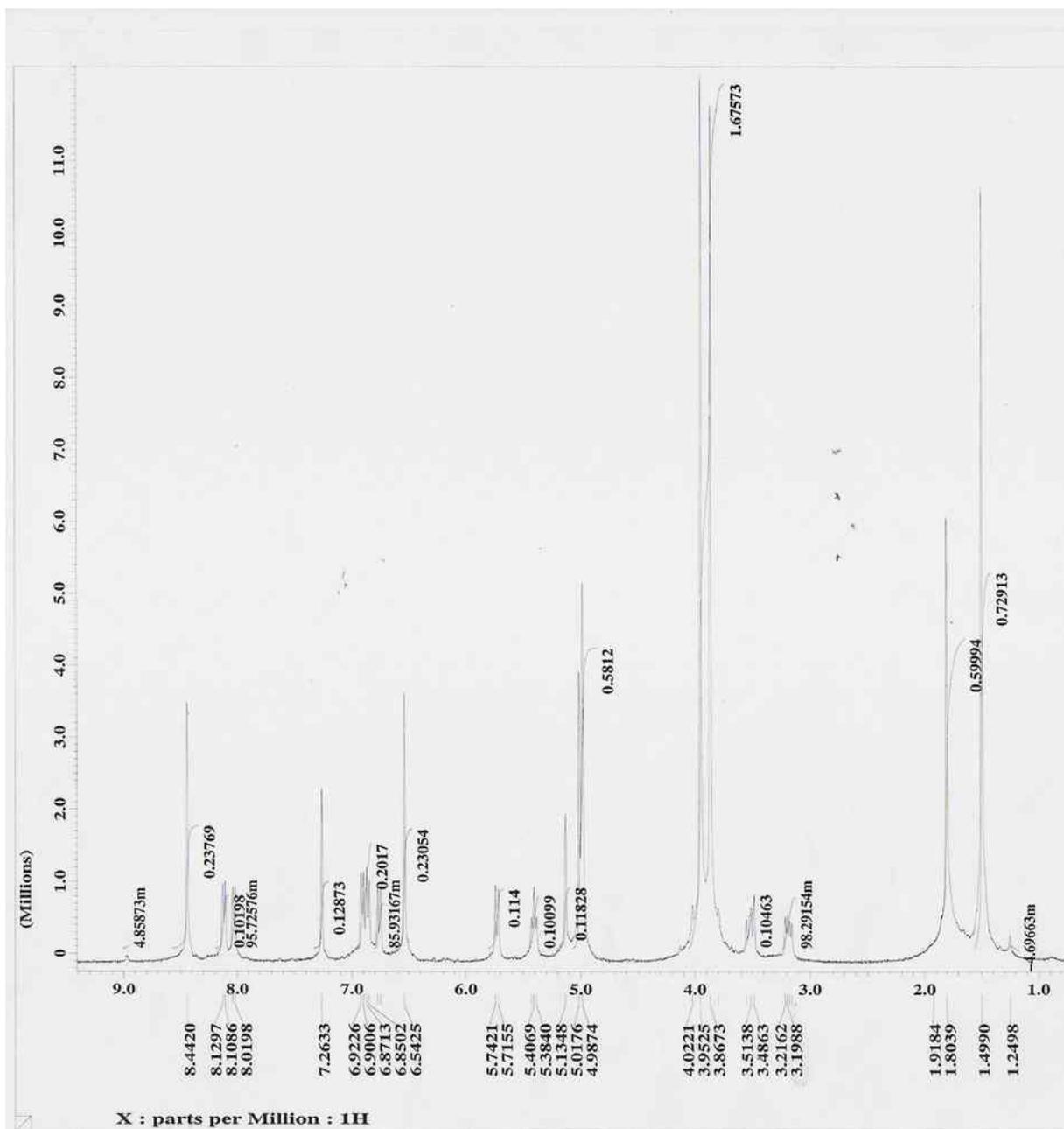


Figura 47 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 1,24-8,44 ppm) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodequelina

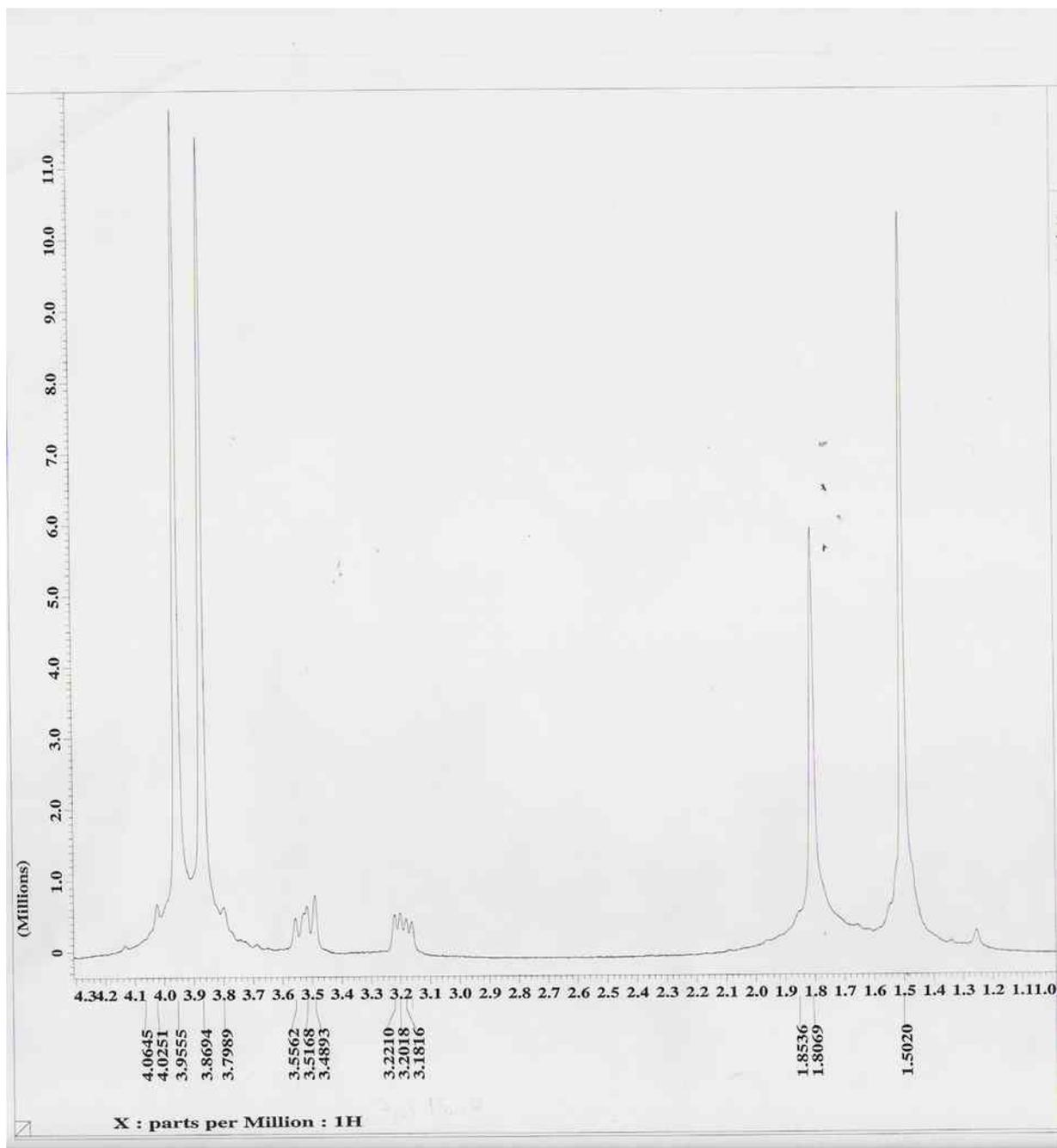


Figura 48 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 1,1-4,34 ppm) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodequelina

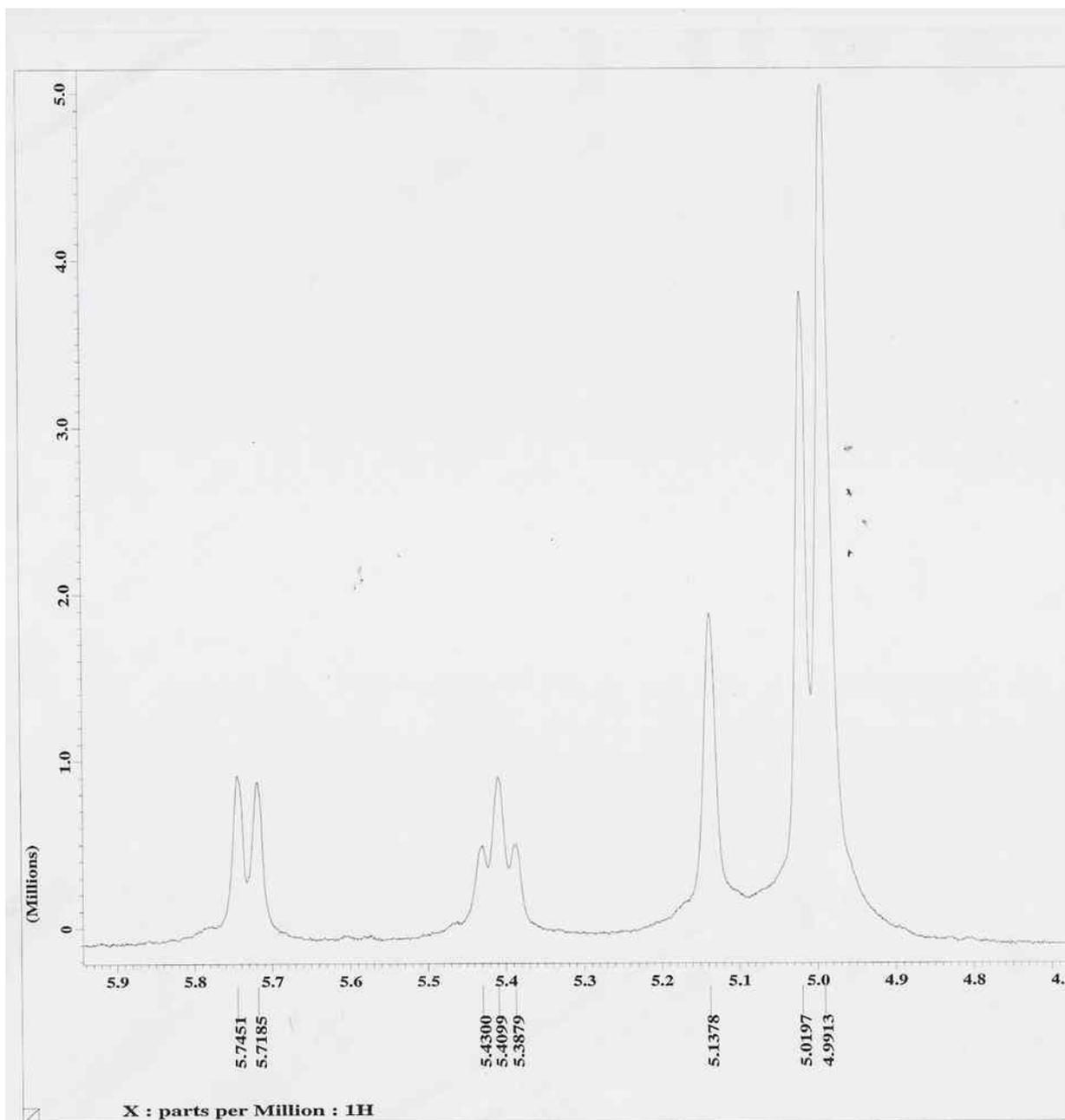


Figura 49 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 4,80-5,90 ppm) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

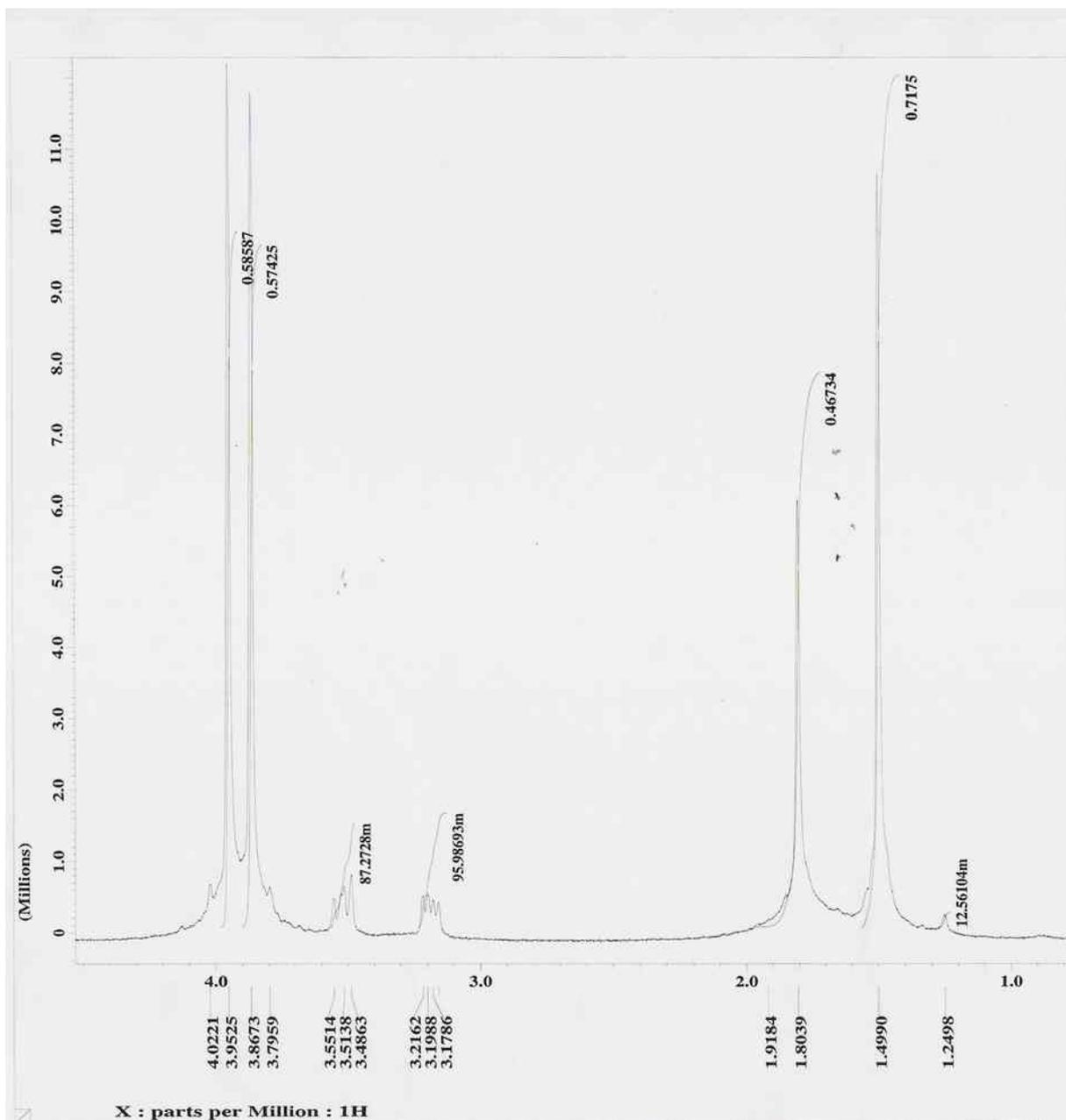


Figura 50 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 1,0-4,5 ppm) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

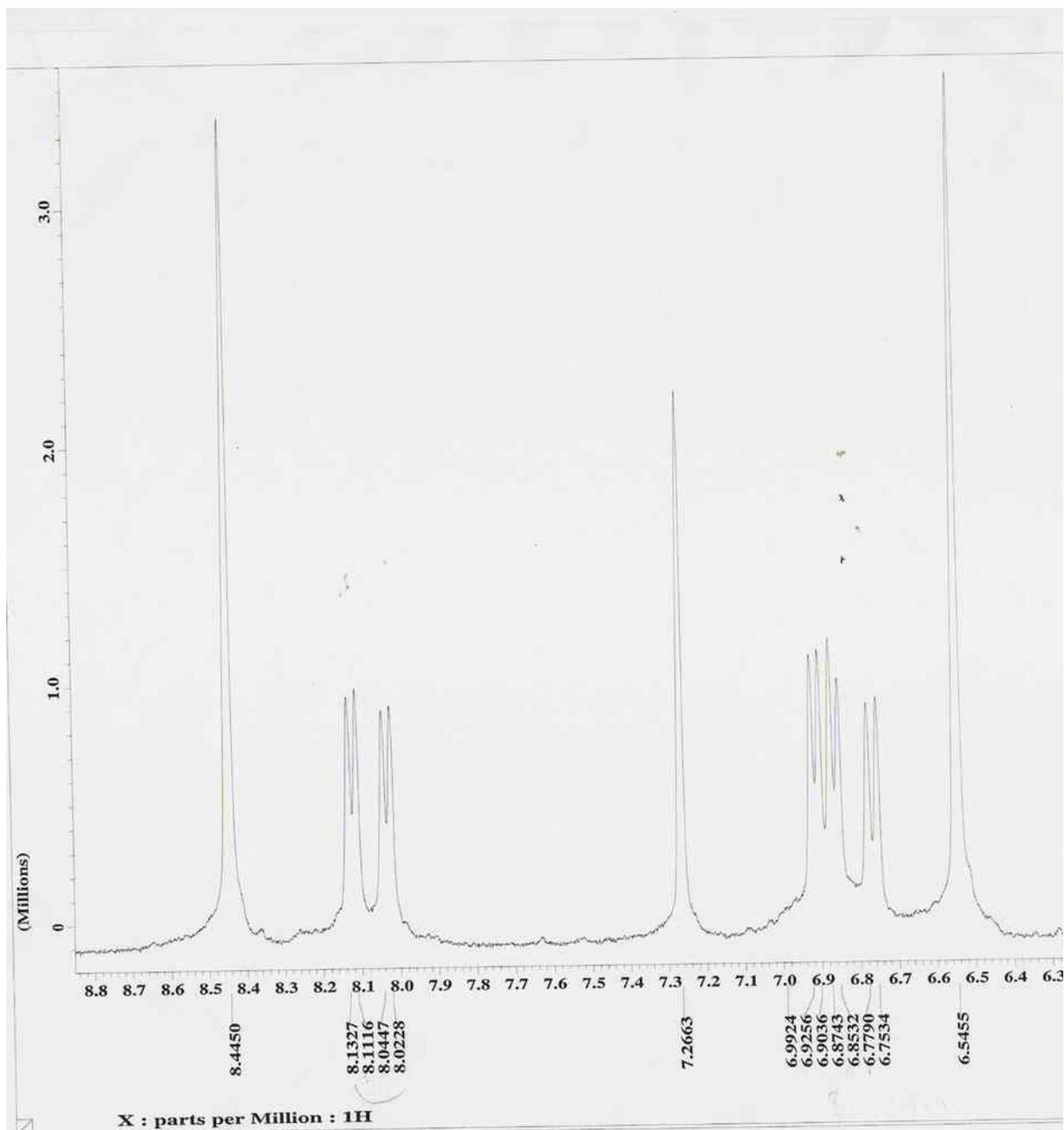


Figura 51 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 6,3-8,8 ppm) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodequelina

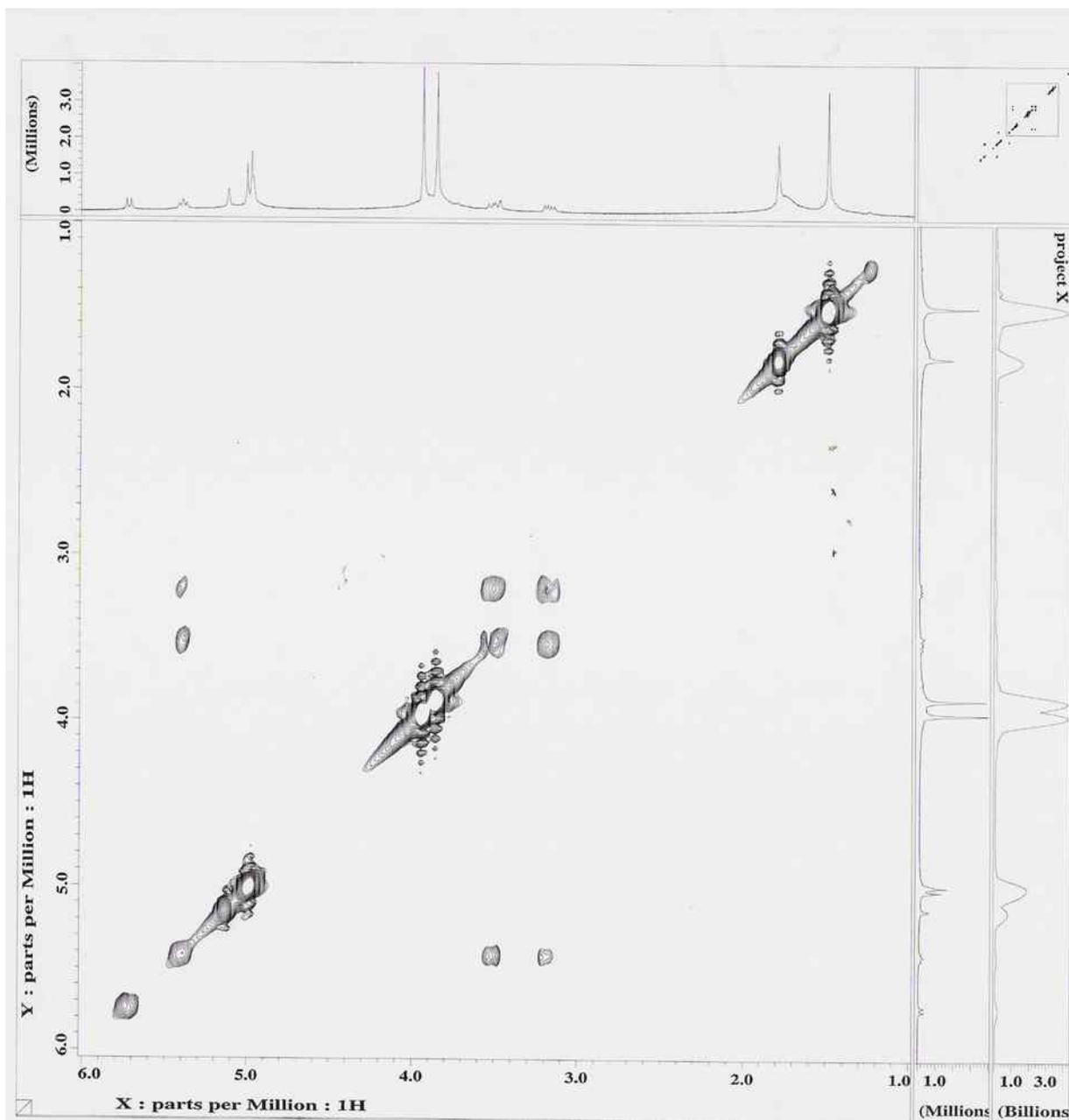


Figura 52 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H 6a, 12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

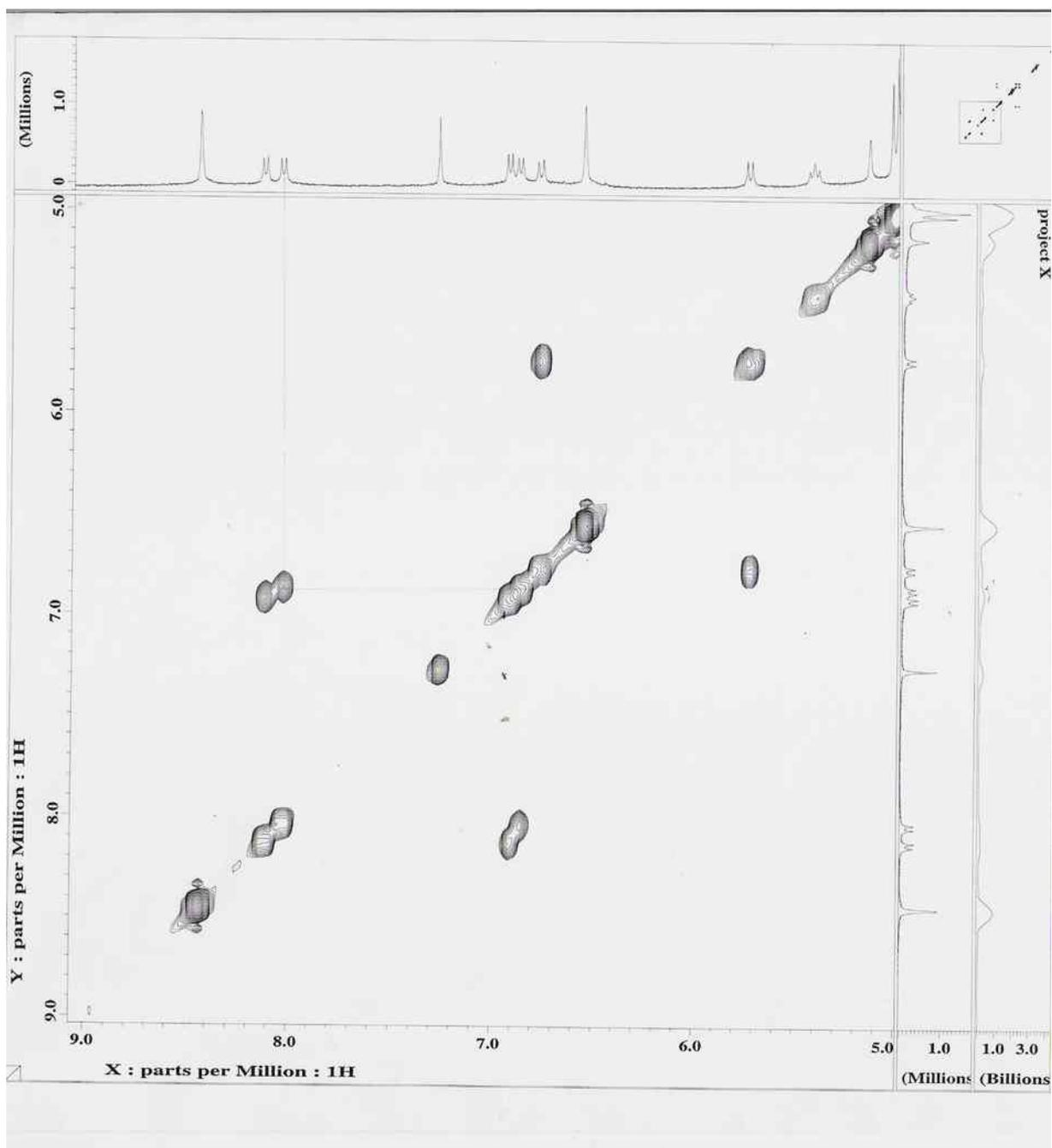


Figura 53 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

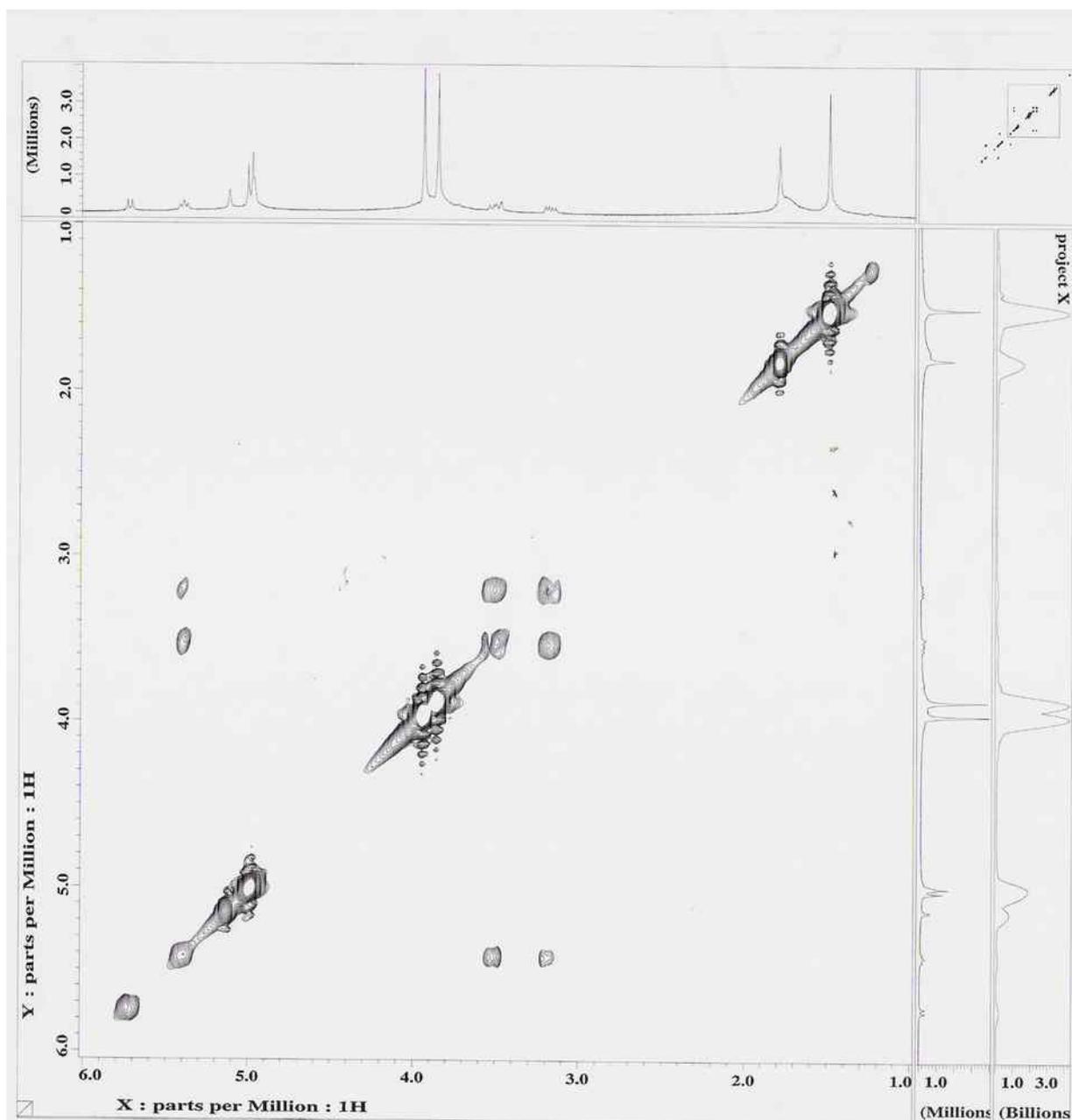


Figura 54 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6a,12a-desidorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina (Expansão)

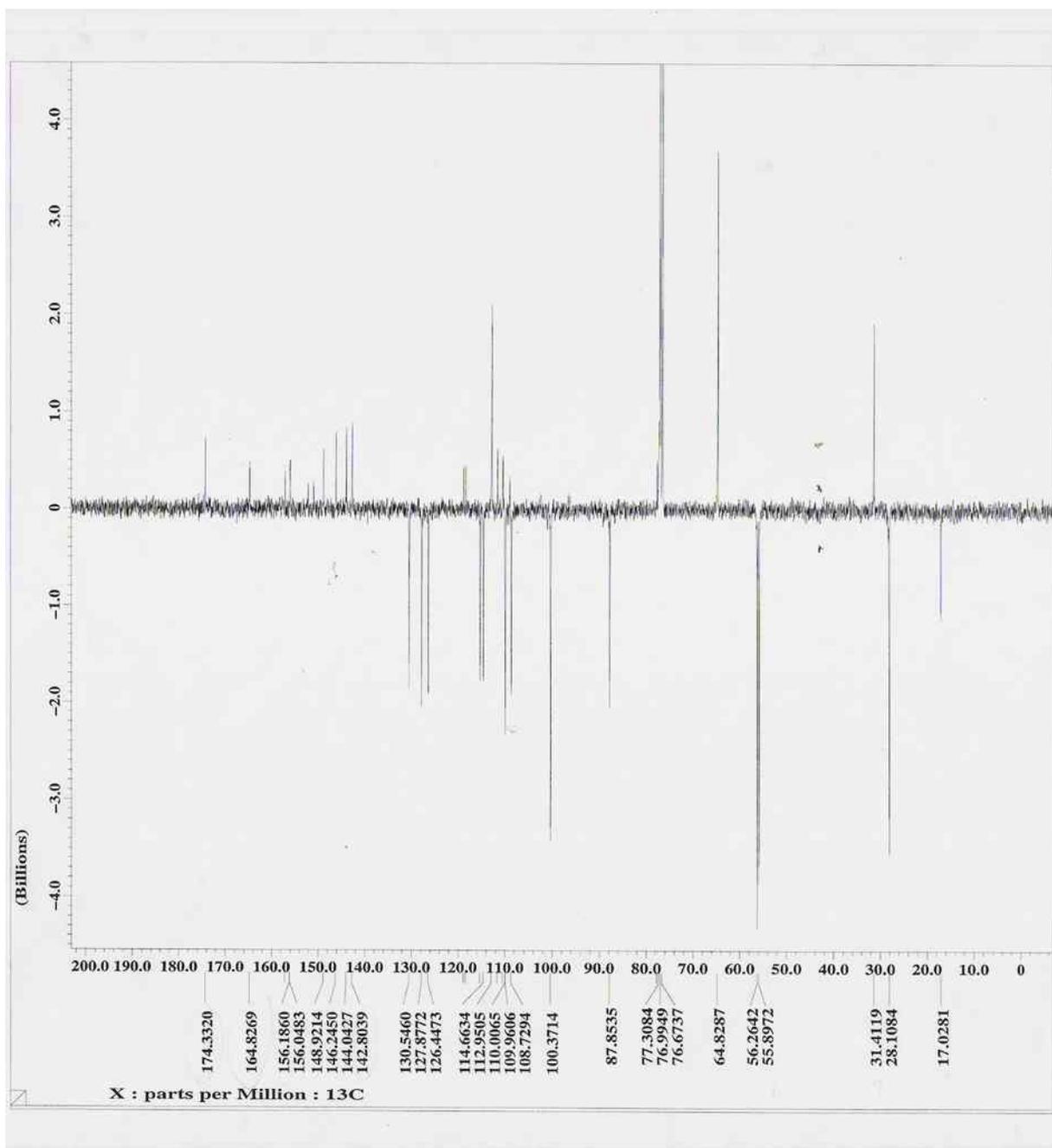


Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

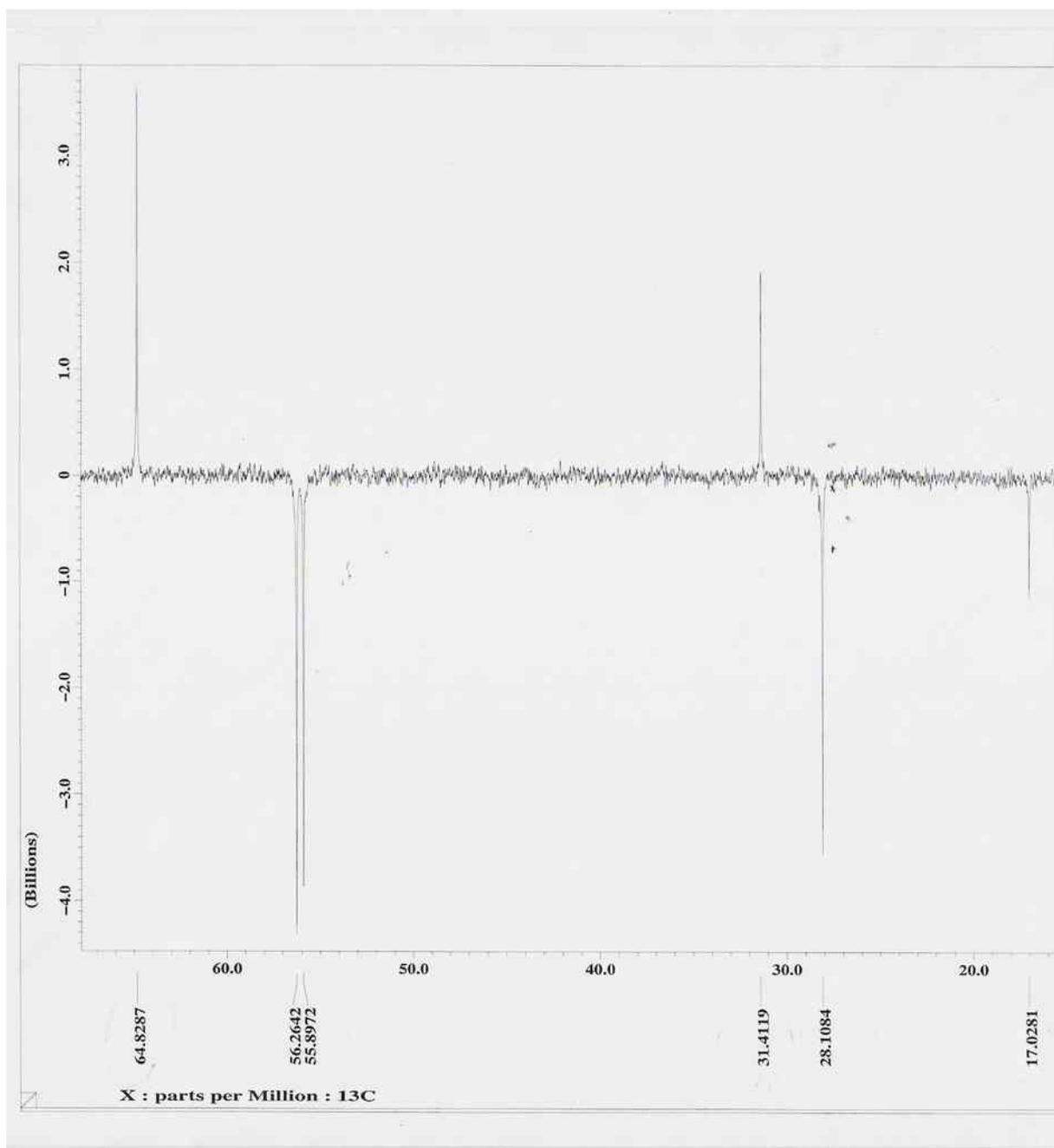


Figura 56 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 20,0- 65,0 ppm) da 6a, 12a-desidorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

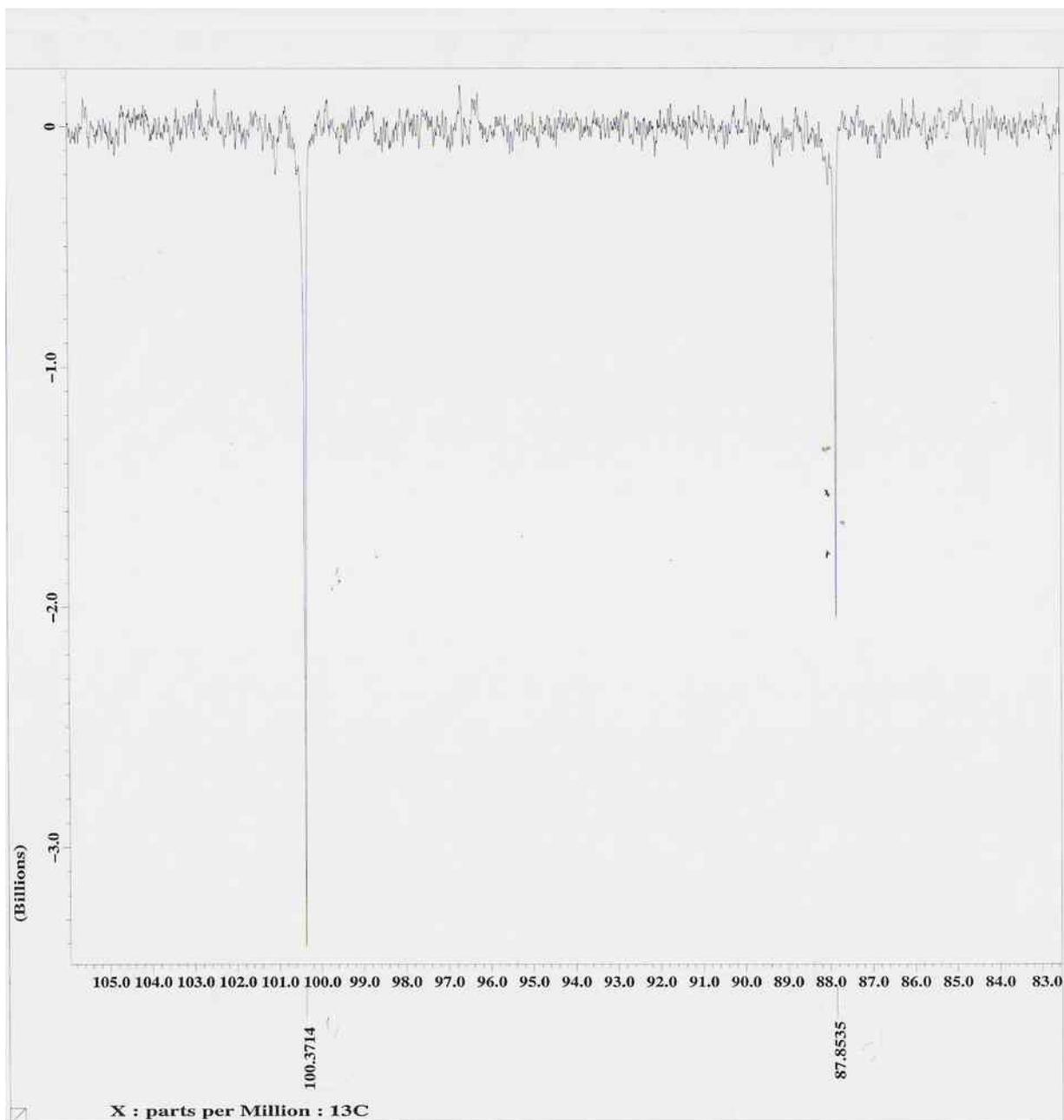


Figura 57 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 83,0- 105,0 ppm) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodequelina

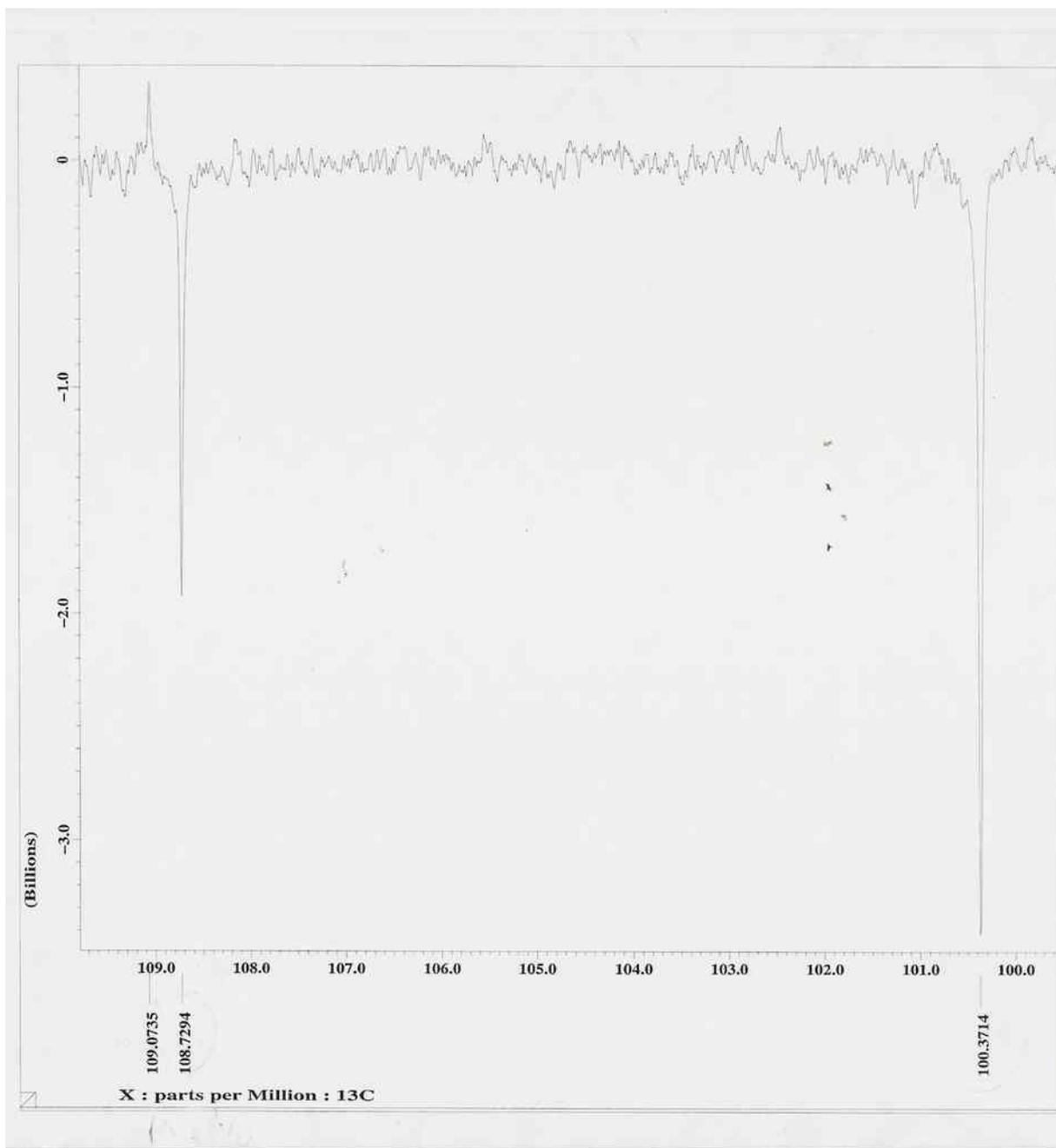


Figura 58 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 100,0- 110,0 ppm) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodequelina

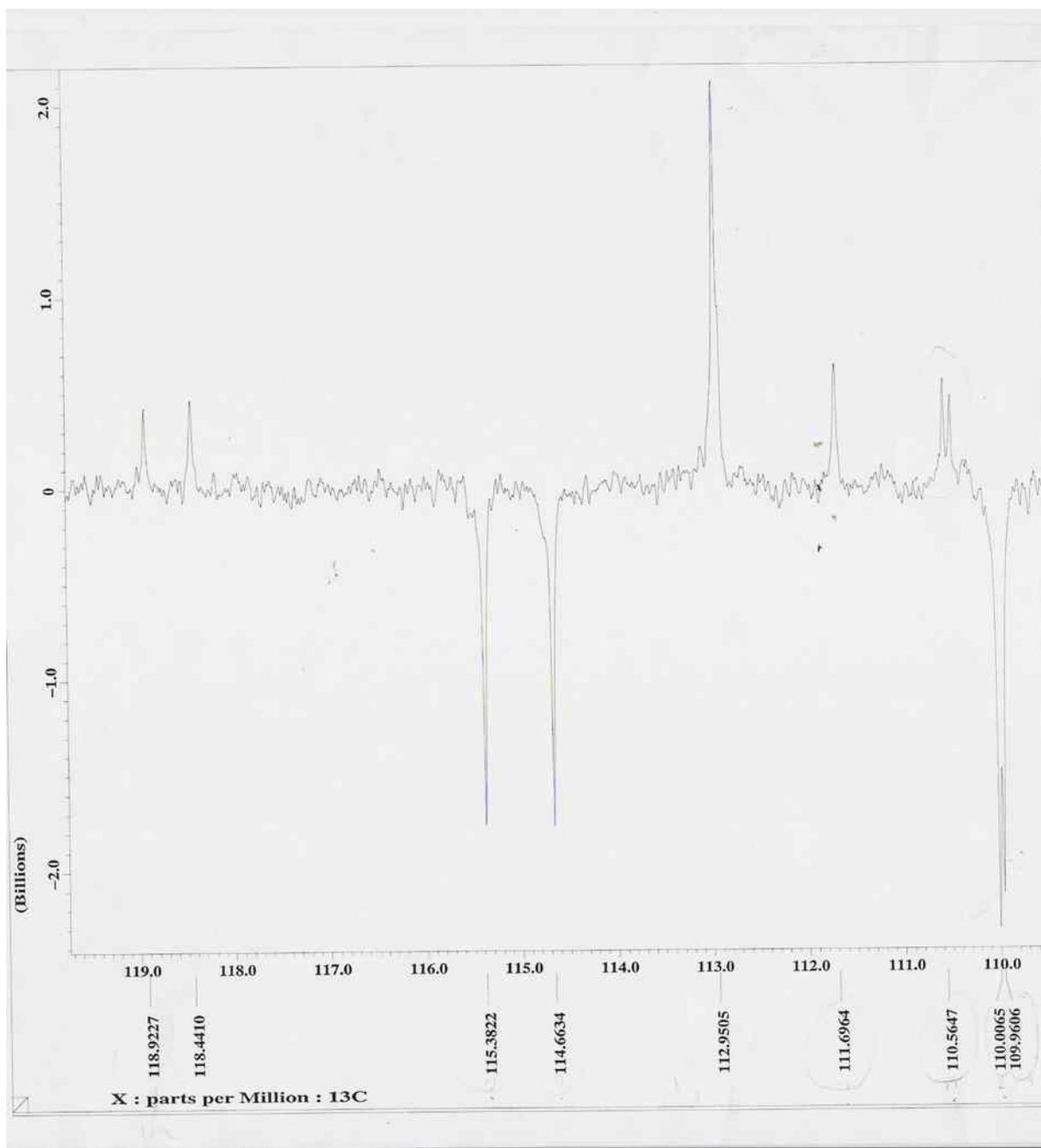


Figura 59 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 100,0- 120,0 ppm) da 6a,12a-desidorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

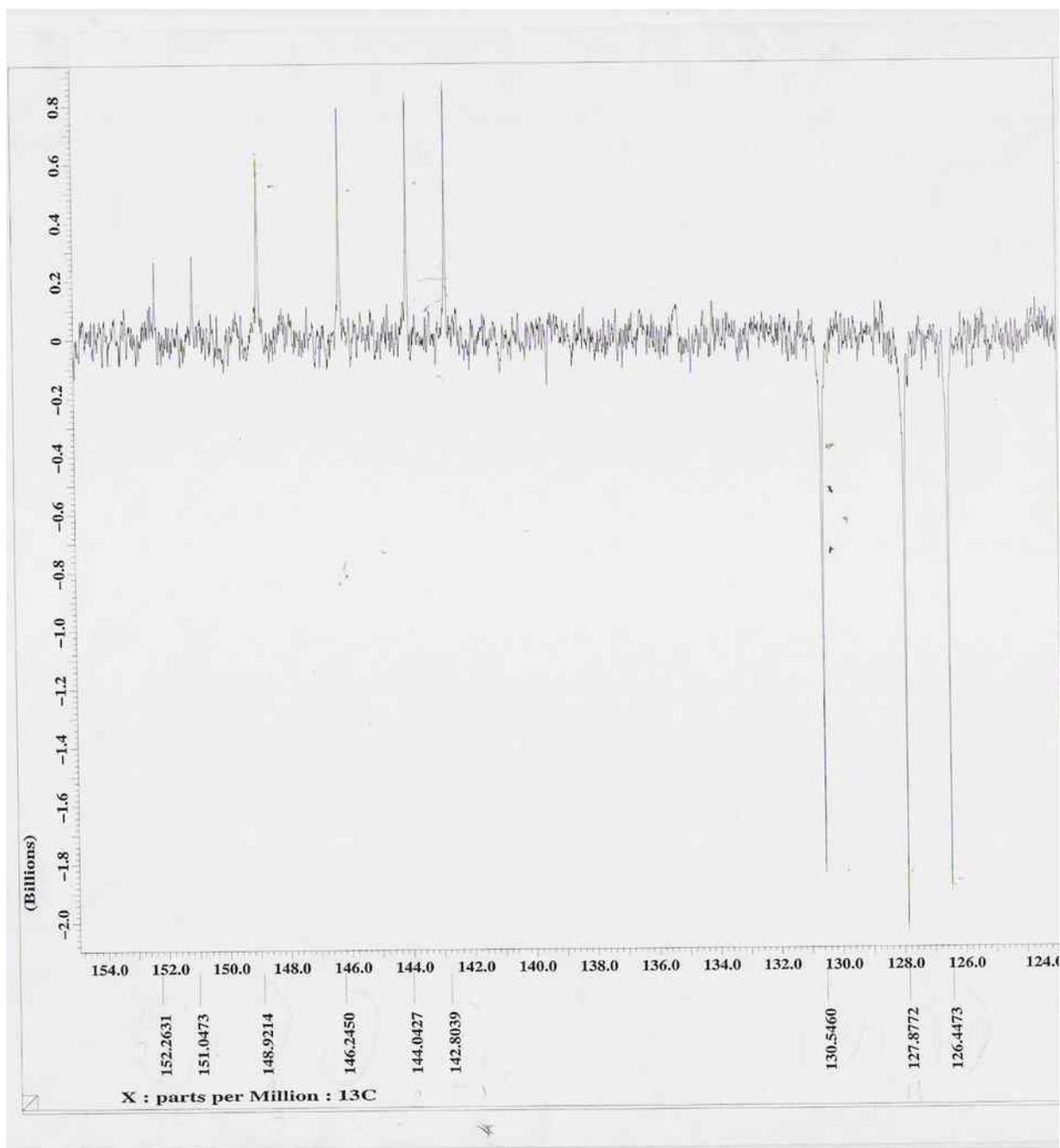


Figura 60 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 124,0-154,0 ppm) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodequelina

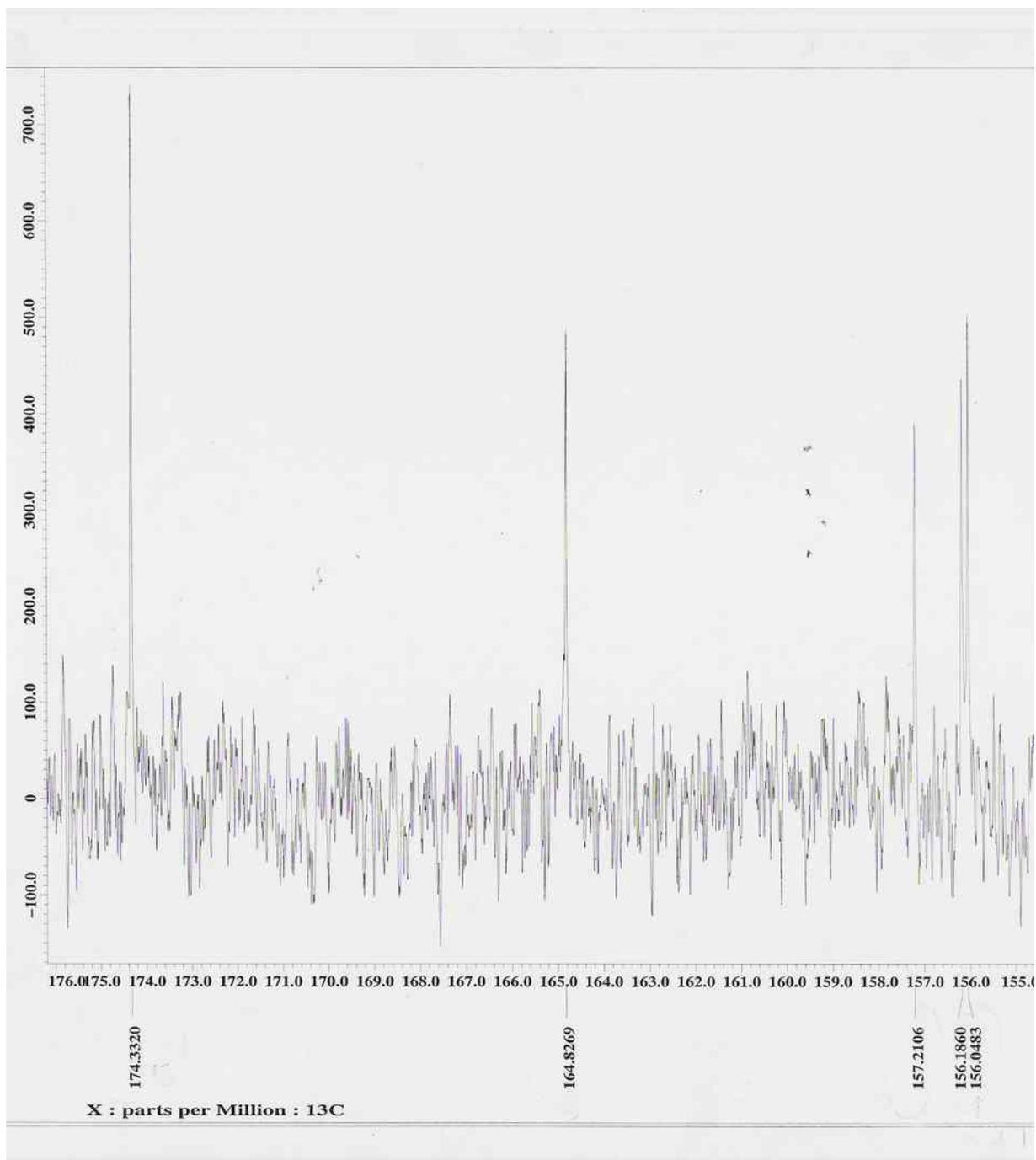


Figura 61 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 155,0- 176,0 ppm) da 6a, 12a-desidorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

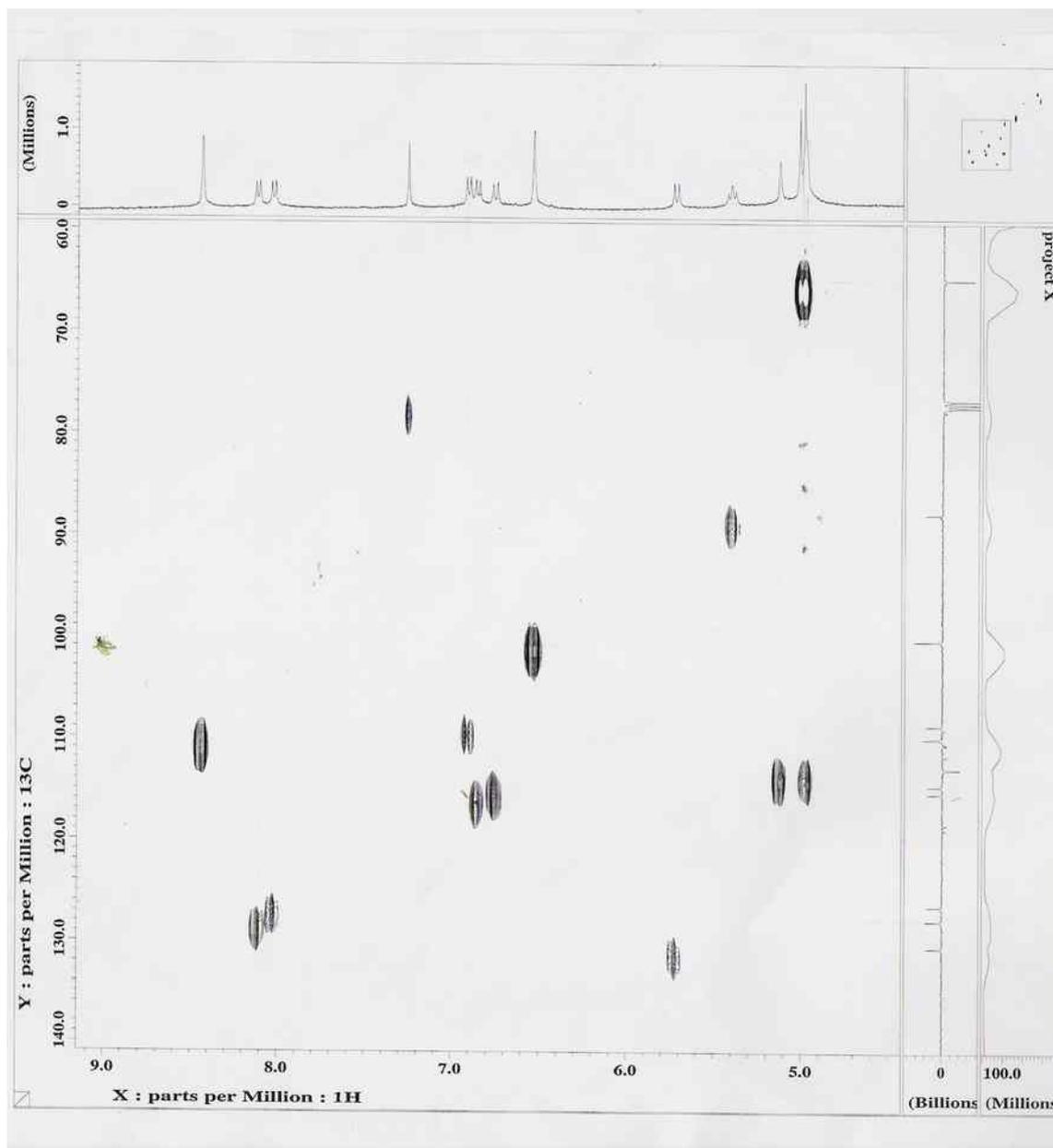


Figura 62 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

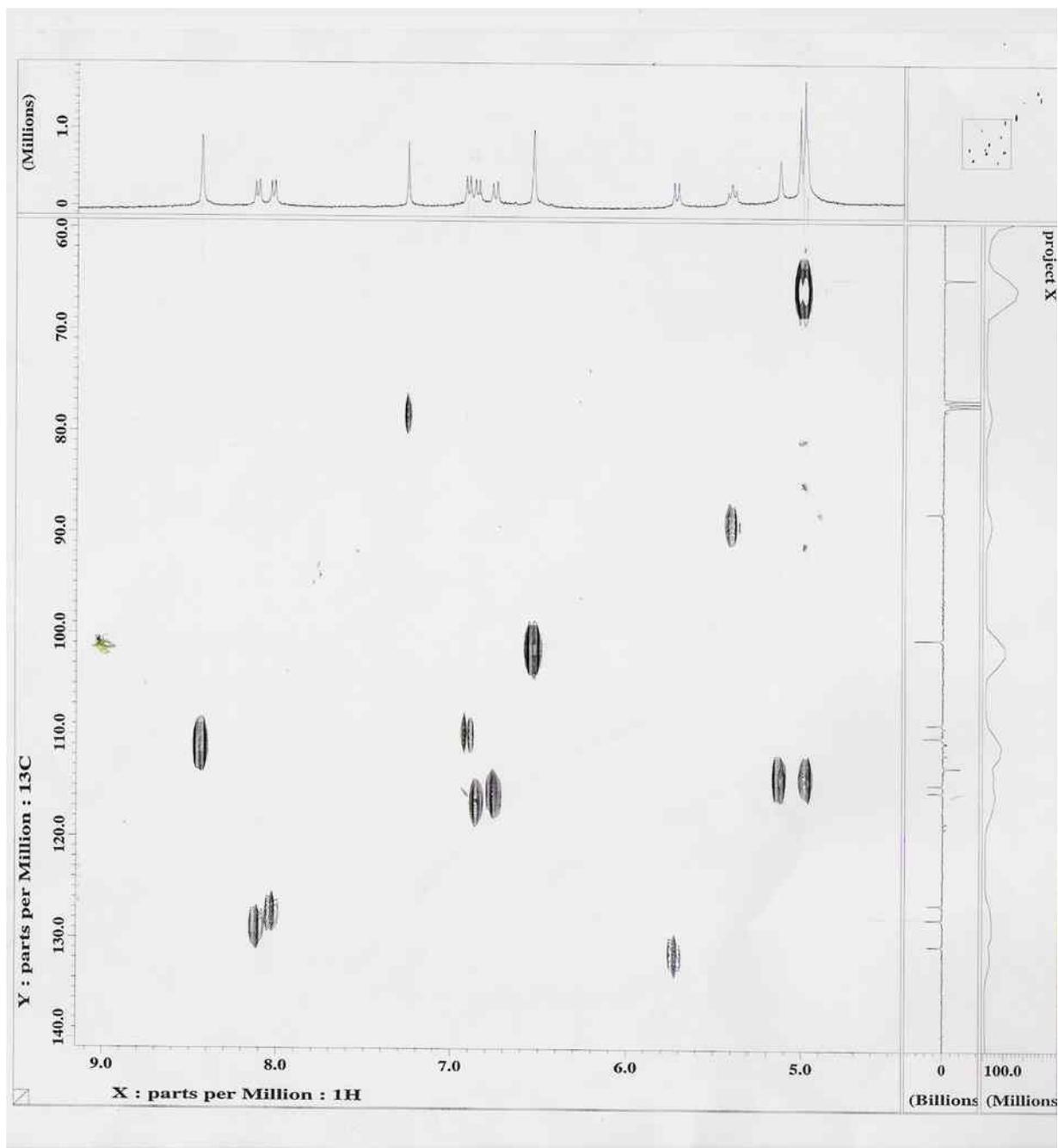


Figura 63 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

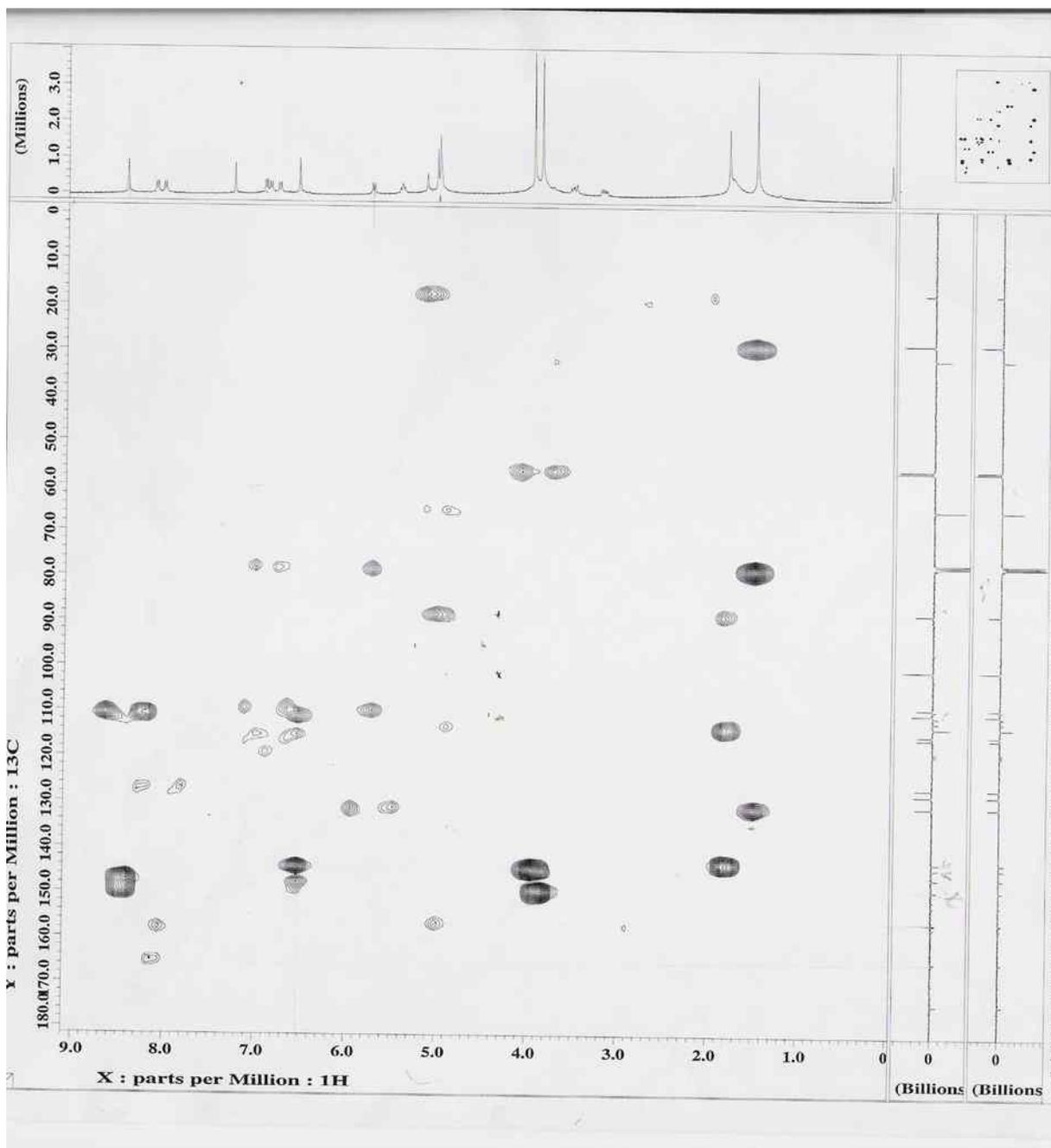


Figura 64 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

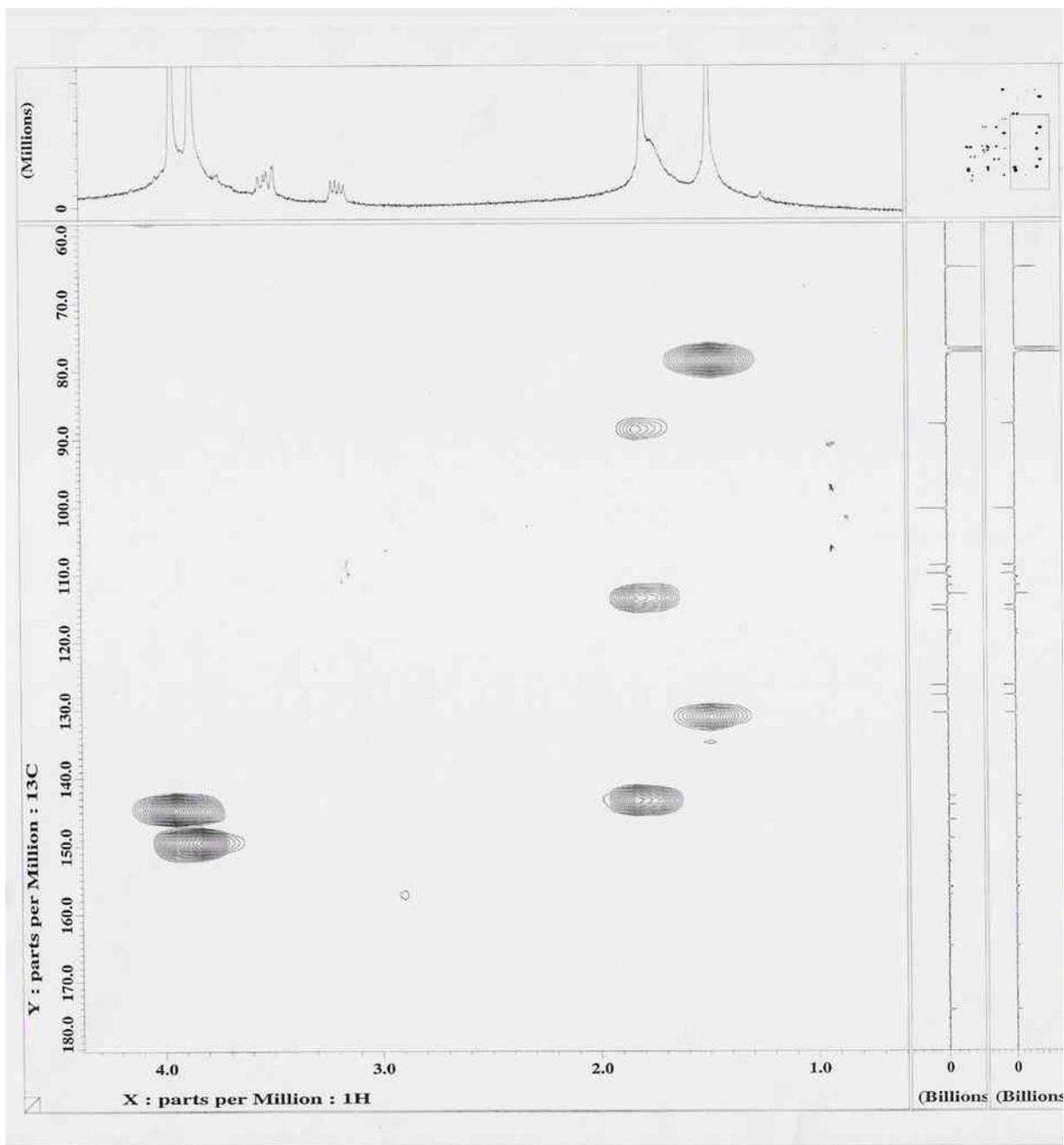


Figura 65 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

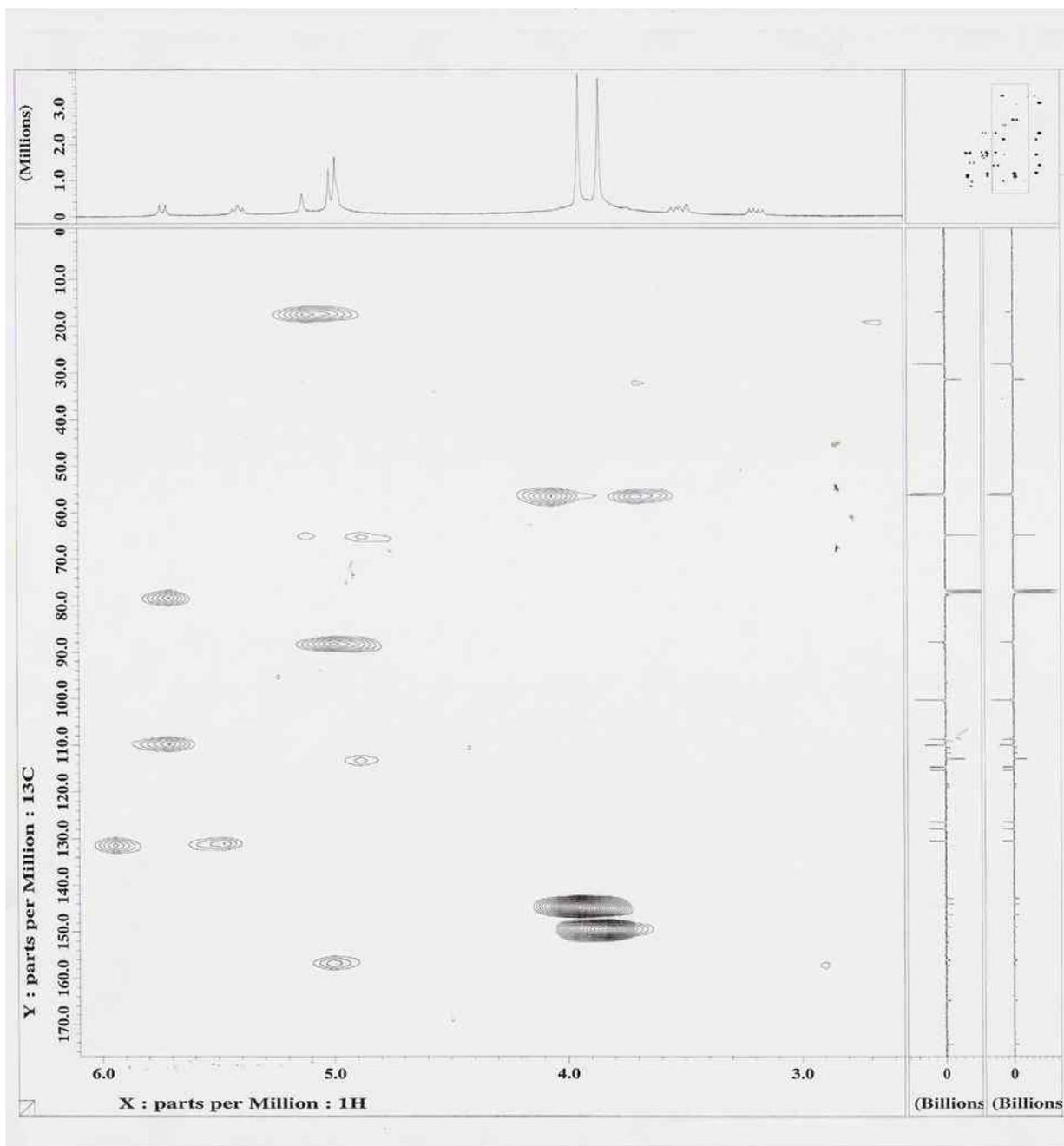


Figura 66 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

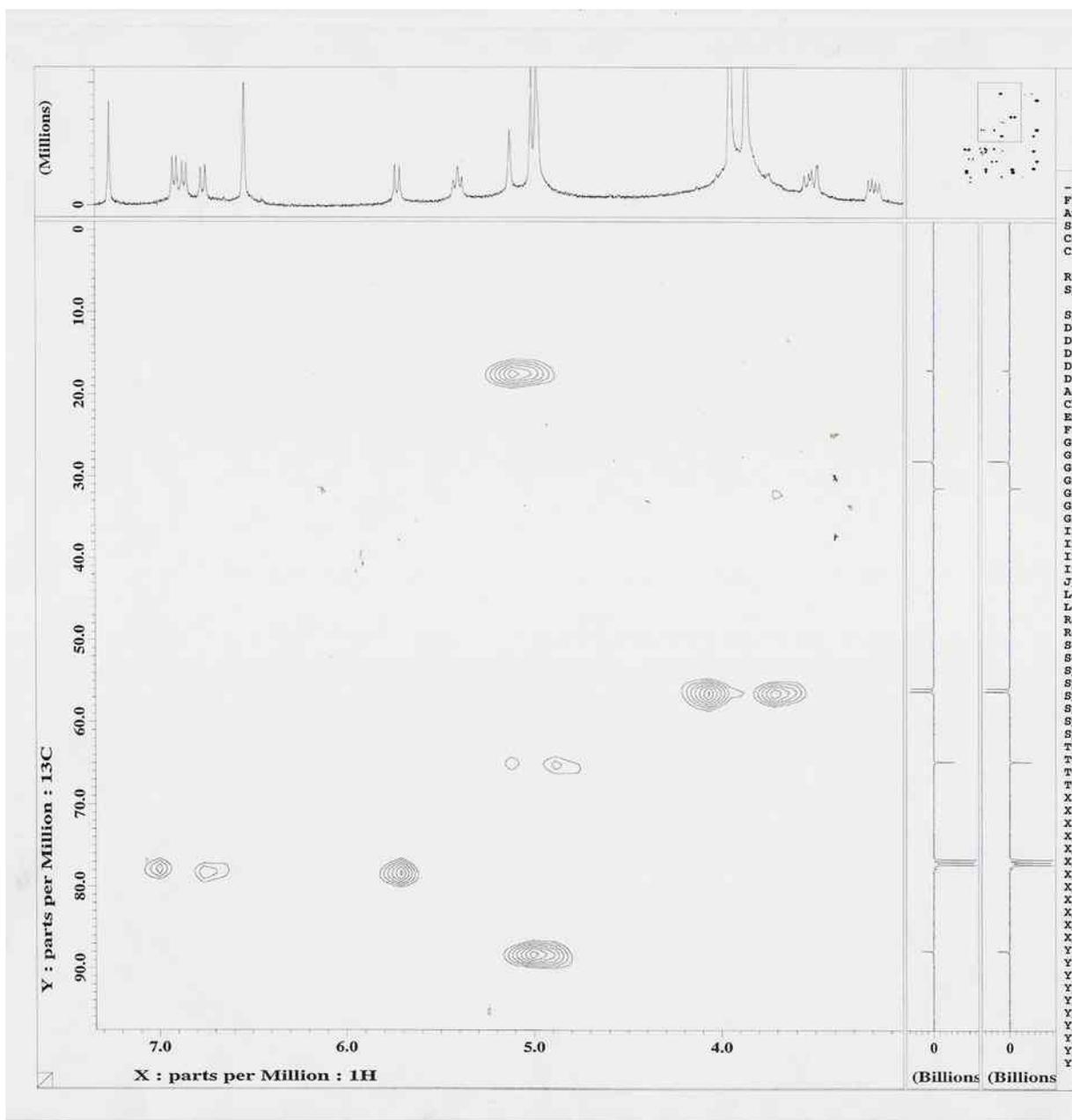


Figura 67 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

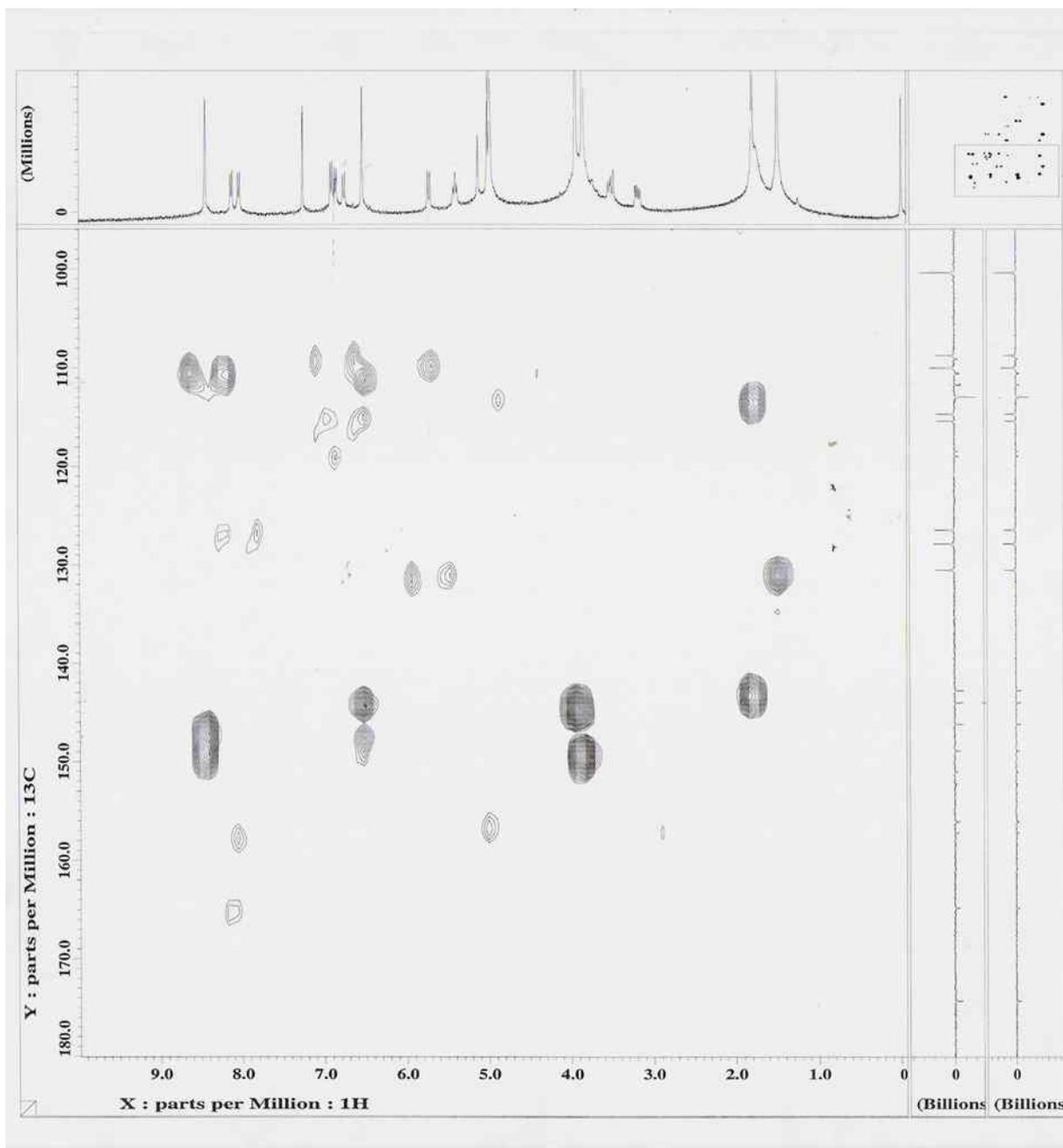


Figura 68 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

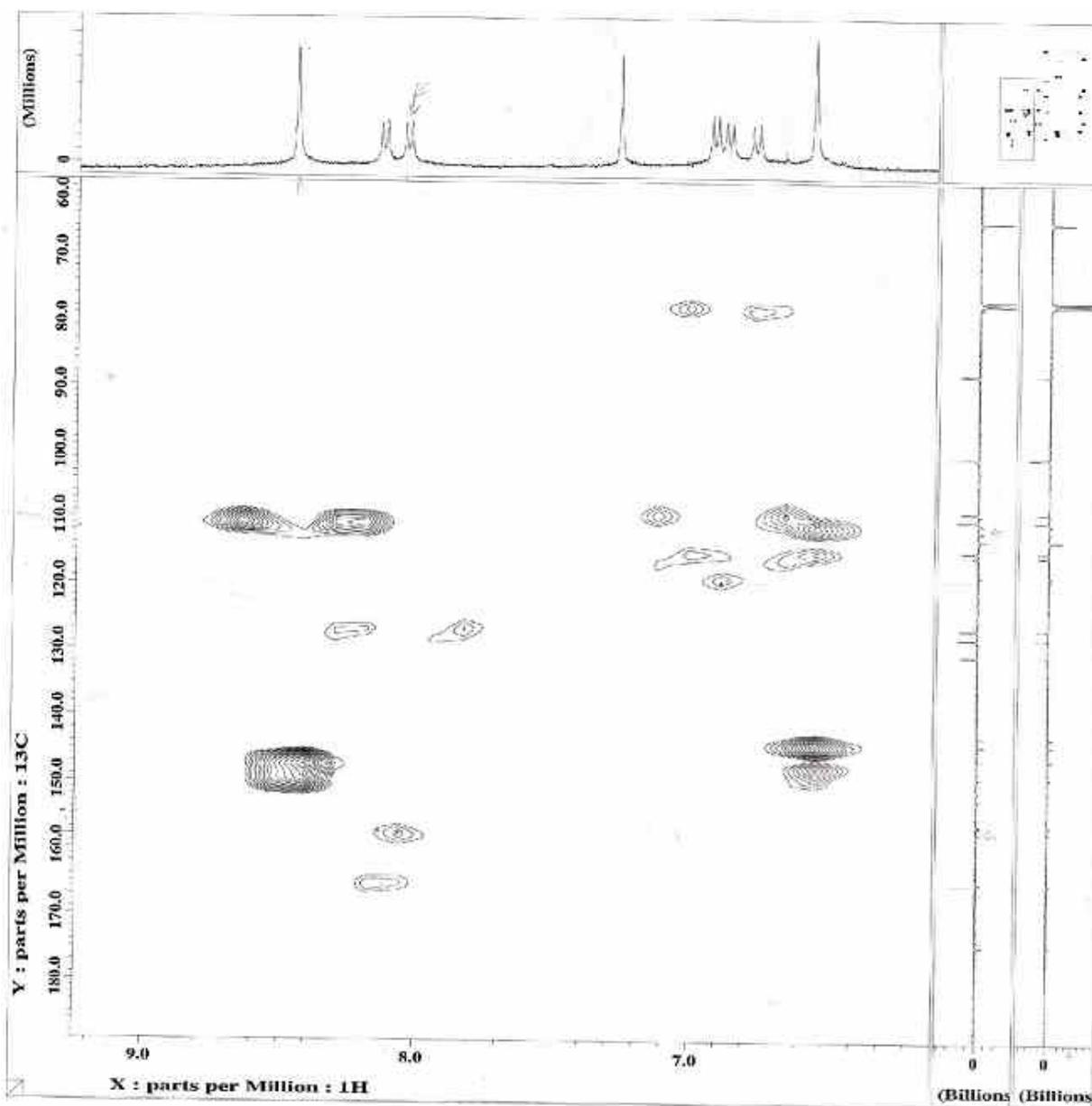


Figura 69 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodeguelina

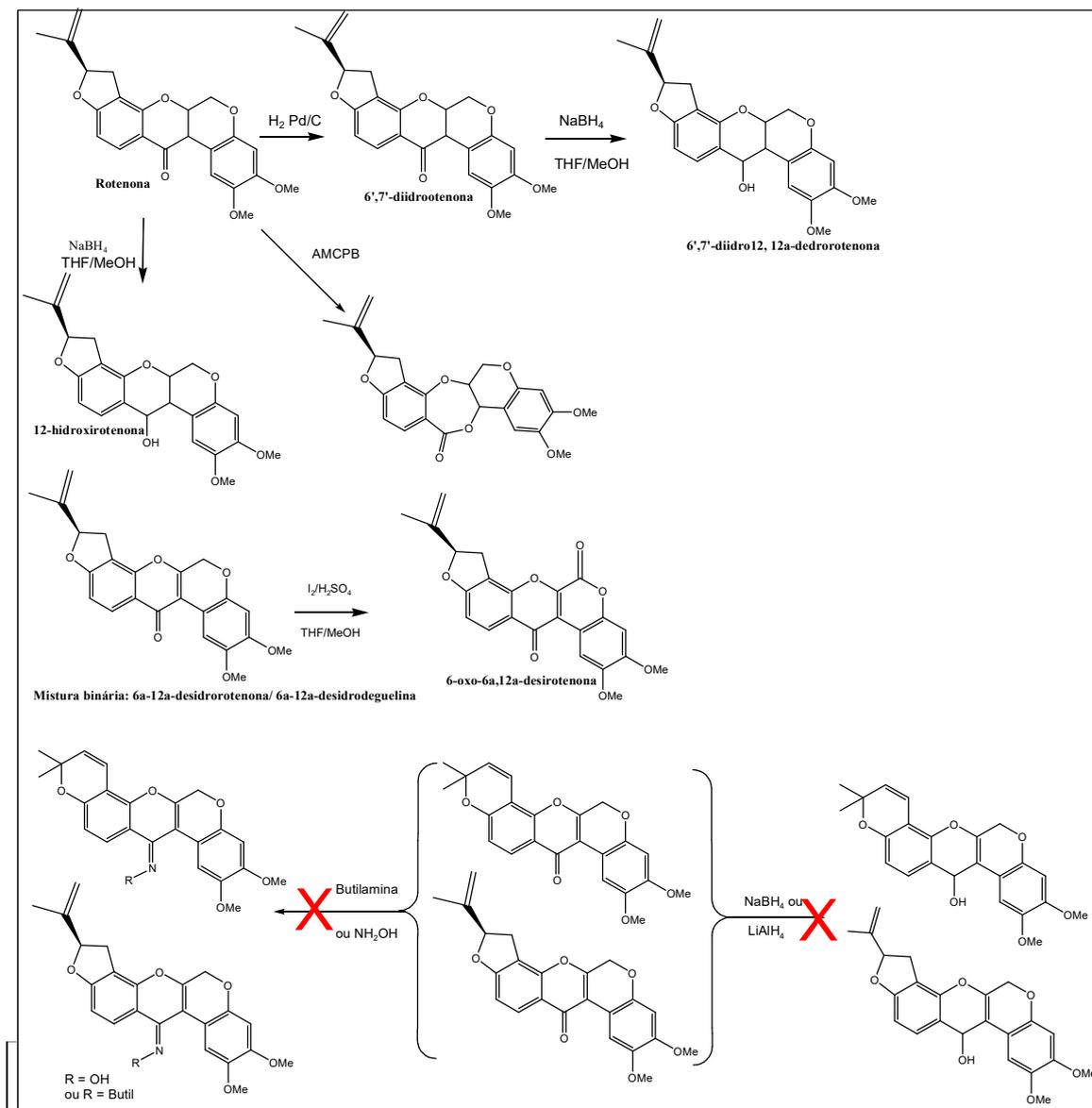
5.2 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS REACIONAIS PREPARADOS A PARTIR DA ROTENONA E DA MISTURA BINÁRIA DE DESIDROROTENONA E DESIDRODEGUELINA .

A modificação estrutural também chamada de manipulação molecular, constitui-se certamente um dos métodos mais usados atualmente em estudo de produtos naturais, quando se pretende avaliar a atividade biológica de uma determinada molécula. A metodologia consiste em se utilizar a estrutura de uma substância tentando simplificar, e/ou aumentar sua estrutura pela incorporação de novos grupamentos, que podem alterar a potência, a duração e ainda a natureza de um determinado efeito (WATERBEEM,1996).

Tais modificações produzidas pela introdução de um substituinte podem afetar várias propriedades físico-químicas da molécula. Essas modificações permitem obter rapidamente uma idéia da relação estrutura-atividade, com respeito aos efeitos sobre a hidrofobicidade, densidade eletrônica, pontes de hidrogênio, etc. (CECCHINEL FILHO & YUNES,1998).

A atividade citotóxica apresentada pela rotenona e pela mistura binária de 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a desidrodeguelina isoladas da raiz de *Derris urucu* estimularam a realização de algumas transformações químicas.

Devido à diversidade de grupos funcionais, as estruturas dos rotenóides permitem modificações em diversos sítios. Com o objetivo de verificar a relação entre a estrutura e a atividade citotóxica desses rotenóides, foram propostas algumas modificações na estrutura básica da rotenona e na mistura binária 6a-12a-desidrorotenona e 6a-12a-desidrodeguelina, como pode ser visto no Esquema 9, p.106.



Esquema 9 . Propostas de modificações estruturais para obtenção de derivados da rotenona e da mistura binária 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12a-desidrodequelina

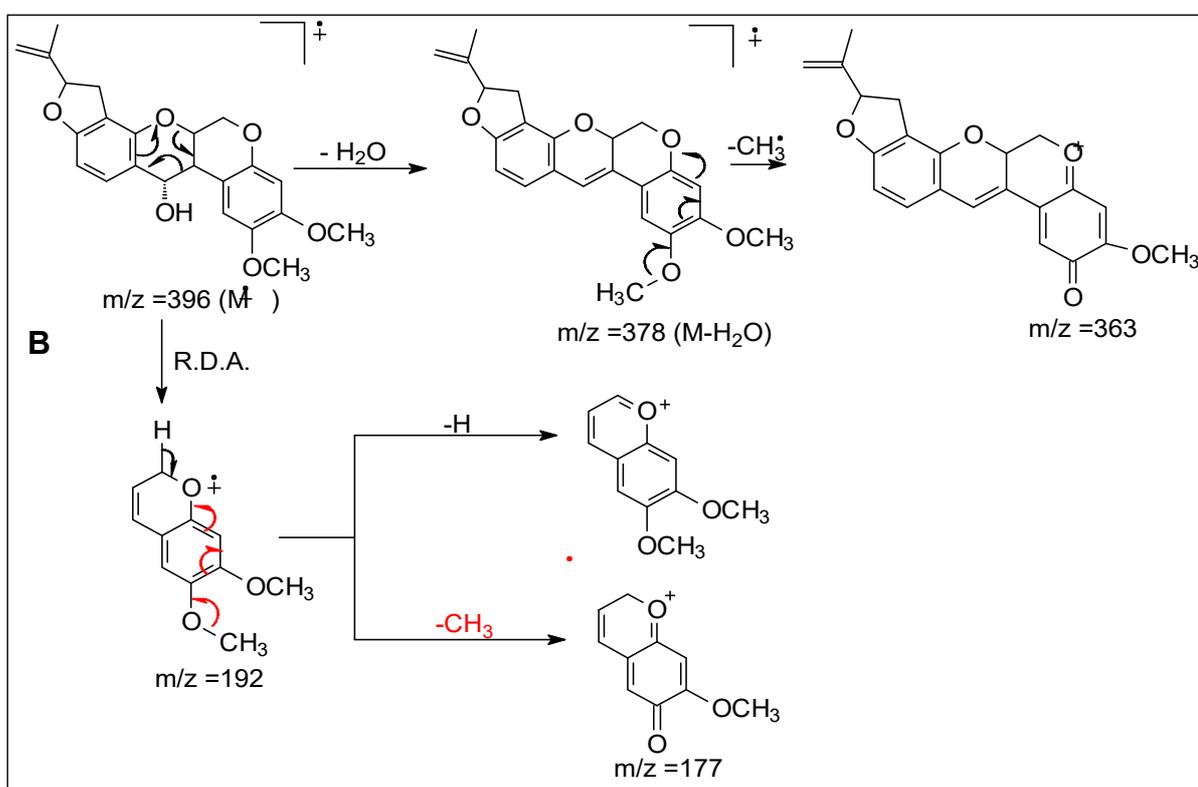
5.2.1. REAÇÃO DE REDUÇÃO DA ROTENONA COM NaBH_4

Com a finalidade de verificar a influência da carbonila na citotoxicidade dos rotenóides, a partir da rotenona foi realizada uma reação de redução com NaBH_4 . Usou-se como solvente tetraidrofurano/metanol a 0°C . Dessa reação foi obtido como produto um óleo amarelado correspondendo à 12-hidroxirotenona com 92,2 % de rendimento.

5.2.2 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA 12-HIDROXIROTENONA

O produto apresentou ponto de fusão 146,0 – 147,0°C e solubilidade em clorofórmio.

O espectro de massas apresentou íon molecular à m/z 396 $[M]^+$ compatível a fórmula molecular $C_{23}H_{24}O_6$. Apresentou também fragmento a m/z 378 indicando perda de 18 u.m.a ($M-18$), confirmando a redução da carbonila em C-12. O fragmento a m/z 192 é característico da decomposição do tipo retro Diels-Alder do anel **C**, este fragmento dá origem aos picos m/z 191 e 177 que correspondem às perdas de hidrogênio e de metila respectivamente (Figura 72, p.112).



Esquema 10 - Principais fragmentos de massas proposto para o 12-hidroxirotenona

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 71, p.111) apresentou, entre outros sinais, uma forte absorção em 3485 cm^{-1} característico de deformação axial de O-H de álcoois, sugerindo a formação do derivado desejado. Não foi observada a absorção em 1674 cm^{-1} que corresponde à absorção da

carbonila C-12 da rotenona. Estes dados confirmam a formação do 12-hidroxirottenona.

O espectro de RMN ^1H do 12-Hidroxirottenona (Figura 73, p.113) apresentou sete sinais simples, sendo dois relativos as duas metoxilas (δ_{H} 3,85 e 3,87) e dois na região de hidrogênios aromáticos H-1 e H-4 em posição *para* no anel **A** (δ_{H} 6,71 e 6,48), dois na região alifática da molécula a δ_{H} (5,09 e 4,92) característicos do metileno terminal H-7' e um sinal simples a δ_{H} (1,79) atribuído ao grupo metil H-8', ambos ligado ao anel **E**.

O anel **D** foi caracterizado pela presença dos sinais duplos a δ_{H} [6,46 (*d*; $J=8,4$) e 7,05 (*d*; $J=8,0$)] atribuídos aos hidrogênios H-10 e H-11 acoplados em *orto*. A presença da hidroxila OH-12 e sua estereoquímica foram confirmadas pela presença do sinal duplo a δ_{H} [4,93 (*d*; $J=4,76$)] atribuído a H-12 e pelo sinal a δ_{H} [3,40 (*t*; $J=4,9$)] atribuído a H-12a . Os valores de constante de acoplamento encontrados confirmam a estereoquímica *cis* dos hidrogênios H-12 e H-12a.

A atribuição completa de todos os hidrogênios da molécula foi feita através da análise do mapa de correlação homonuclear (COSY) (Figura 82, p.122) e comparação com dados da literatura (TAKASHIMA & CHIBA,1998) (Tabela 12; p.110).

A análise comparativa entre os espectros de RMN APT, permitiu identificar de forma clara a presença do carbono carbinólico C-12 δ_{C} (66,31), reforçando a idéia de um novo composto.

A confirmação dos carbonos quaternários da molécula foi feita através da análise dos mapas de correlação heteronuclear HMQC (Figura 90; p.130) e HMBC (Figura 92; p132.).

Todas as atribuições dos sinais registrados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C são mostradas na Tabela 12; p.110.

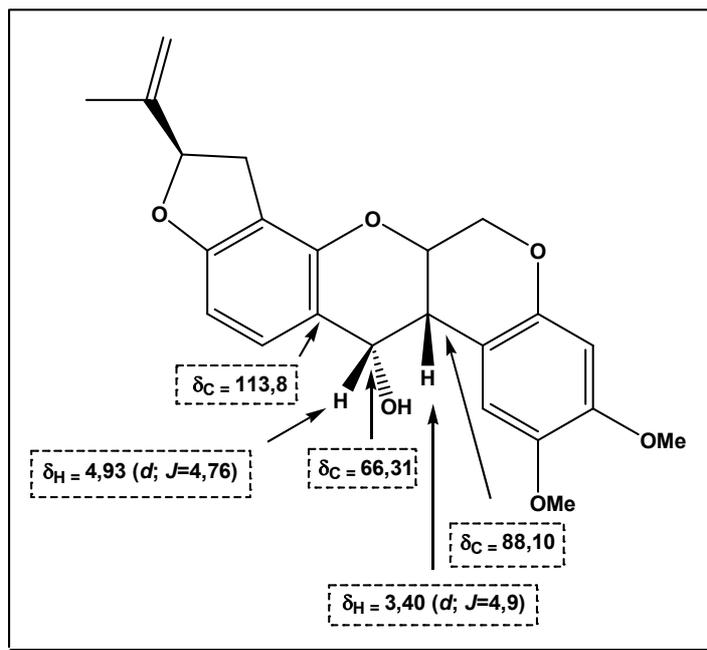


Figura 70 - Estrutura da 12-hidroxirotenona

Tabela 12 – Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) do 12-Hidroxirotenona em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) MHz. * Takashima & Chiba, 1998.

	δ_{C}	δ_{H}	HMQC $^2J_{\text{CH}}$	HMBC $^3J_{\text{CH}}$	Literatura* δ_{H}
C					
1a	108,00	-	H-1	H-12a	
2	143,88	-	H-1	H-4	
3	149,21	-	H-4	H-1	
5	149,35	-	H-4	H-1	
7	149,69	-	H-11; H-12	H-4'	
8	112,80	-	2H-4'	H-5'; H-10	
9	161,86	-	H-10	2H-4'; H-11	
11a	113,8	-	H-12	H-10	
6'	143,81	-	3H-8'; H-5'	2H-4'	
CH					
1	111,38	6,71 (s)			6,71
4	100,75	6,48 (s)			6,48
6a	69,17	4,83 (m)			4,84
10	102,77	6,46 (d; $J=8,4$)			6,46
11	130,40	7,05 (d; $J=8,04$)			7,06
12	66,31	4,93 (d; $J=4,76$)			4,92
12a	88,10	3,40 (t; $J=4,9$)		H-1	3,40
5'	86,60	5,25 (t; $J=8,8$)			5,25
CH₂					
6	65,01	4,24 (ddd; $J=1,46; 5,16; 9,92$)			4,23
		4,62 (dd; $J=9,92; 11,36$)			4,61
4'	31,95	2,97 (dd; $J=15,76; 8,44$)			2,97
		3,29 (dd; $J=15,72; 9,52$)			3,29
7'	111,93	5,09 (s)			5,09
		4,9 (s)			
CH₃					
8'	17,20	1,79			1,78
CH₃O					
	55,85	3,85 (s)			3,85
	56,36	3,87 (s)			3,87

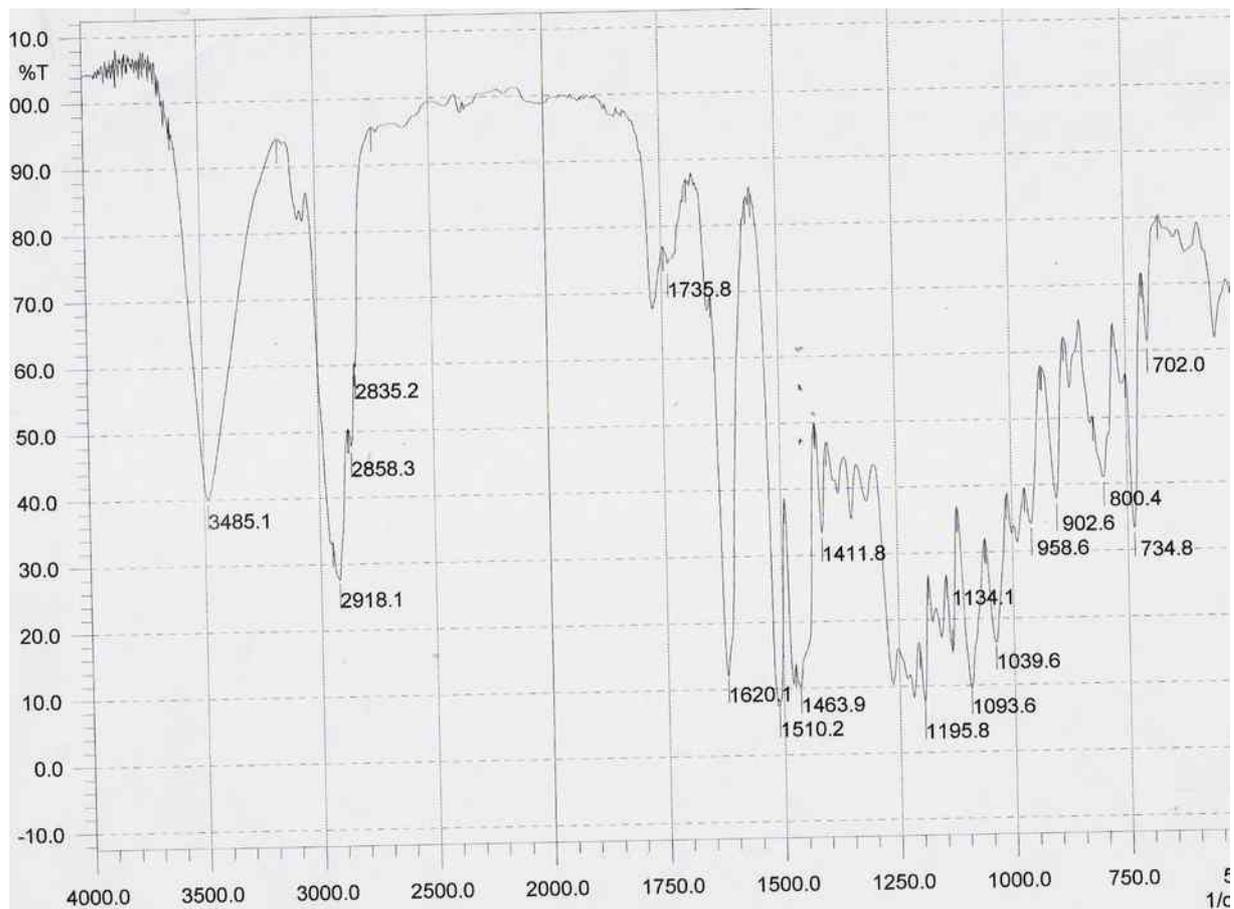


Figura 71 - Espectro de IV da 12-Hidroxirotenona

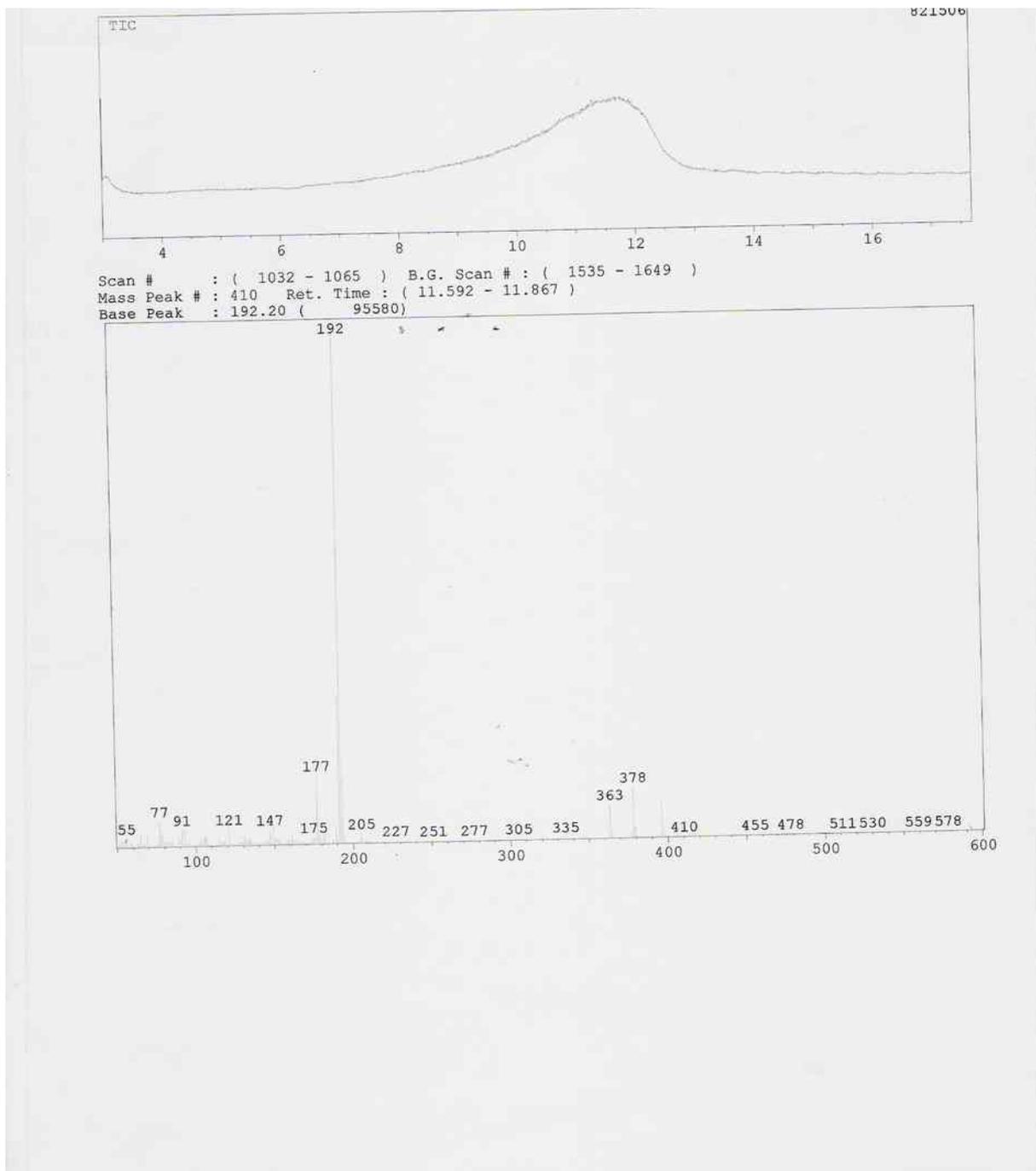


Figura 72 - Espectro de Massas da 12-hidroxirotenona

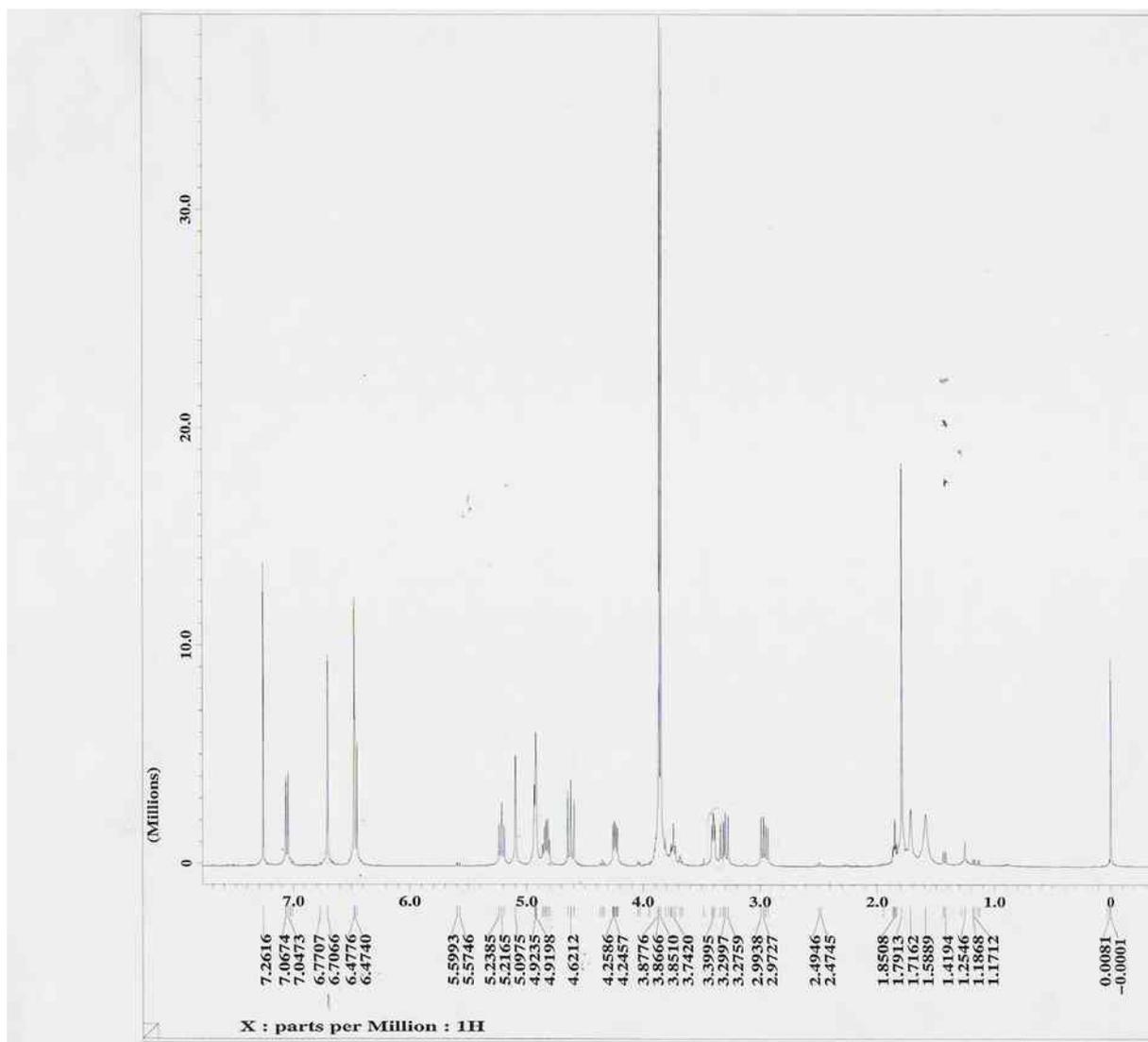


Figura 73 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 12-hidroxirottenona

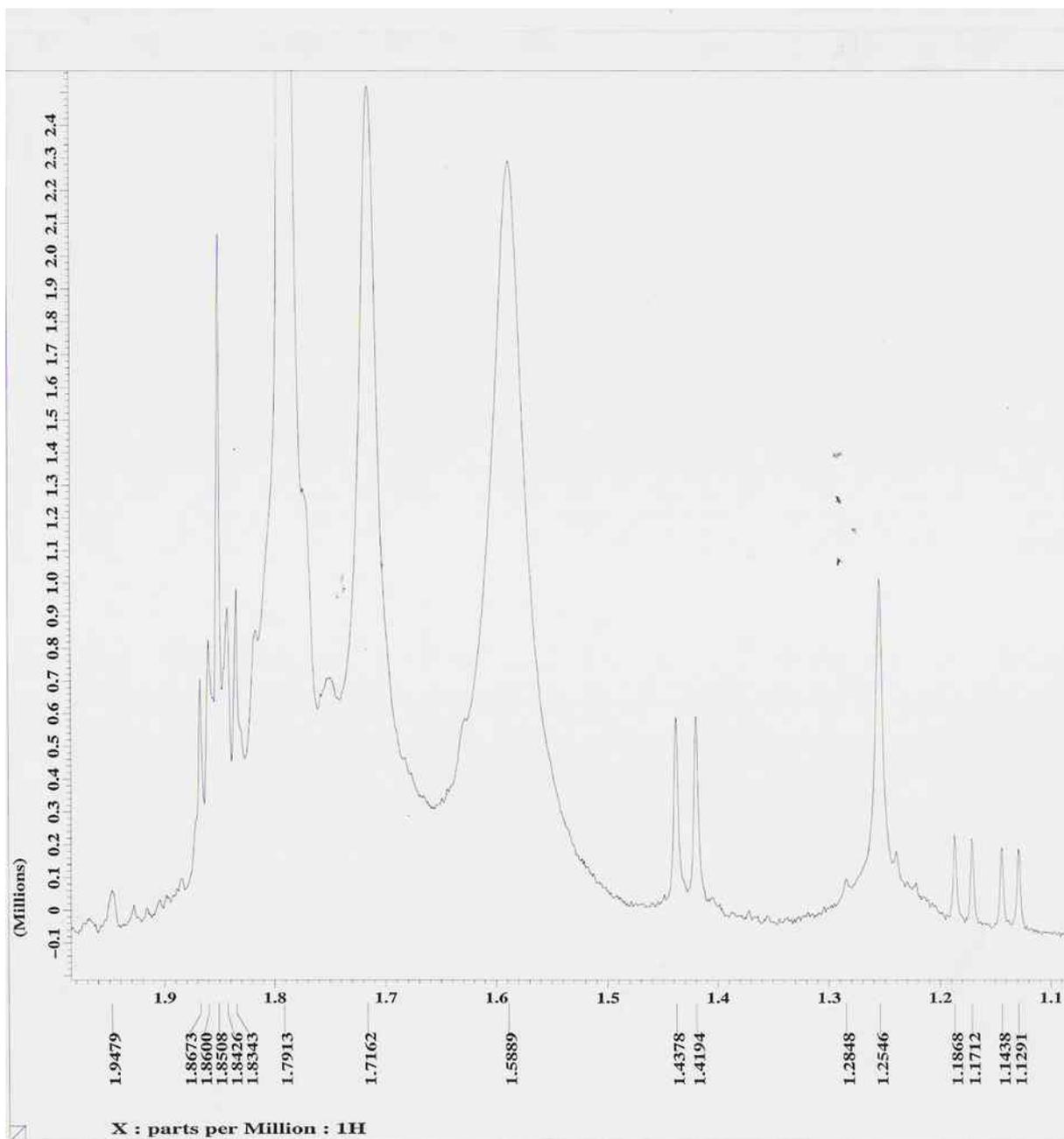


Figura 74 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 1,1 – 2,0 ppm) da 12-Hidroxirotenona

Figura 75 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 2,8-3,6 ppm) da 12-Hidroxirotenona

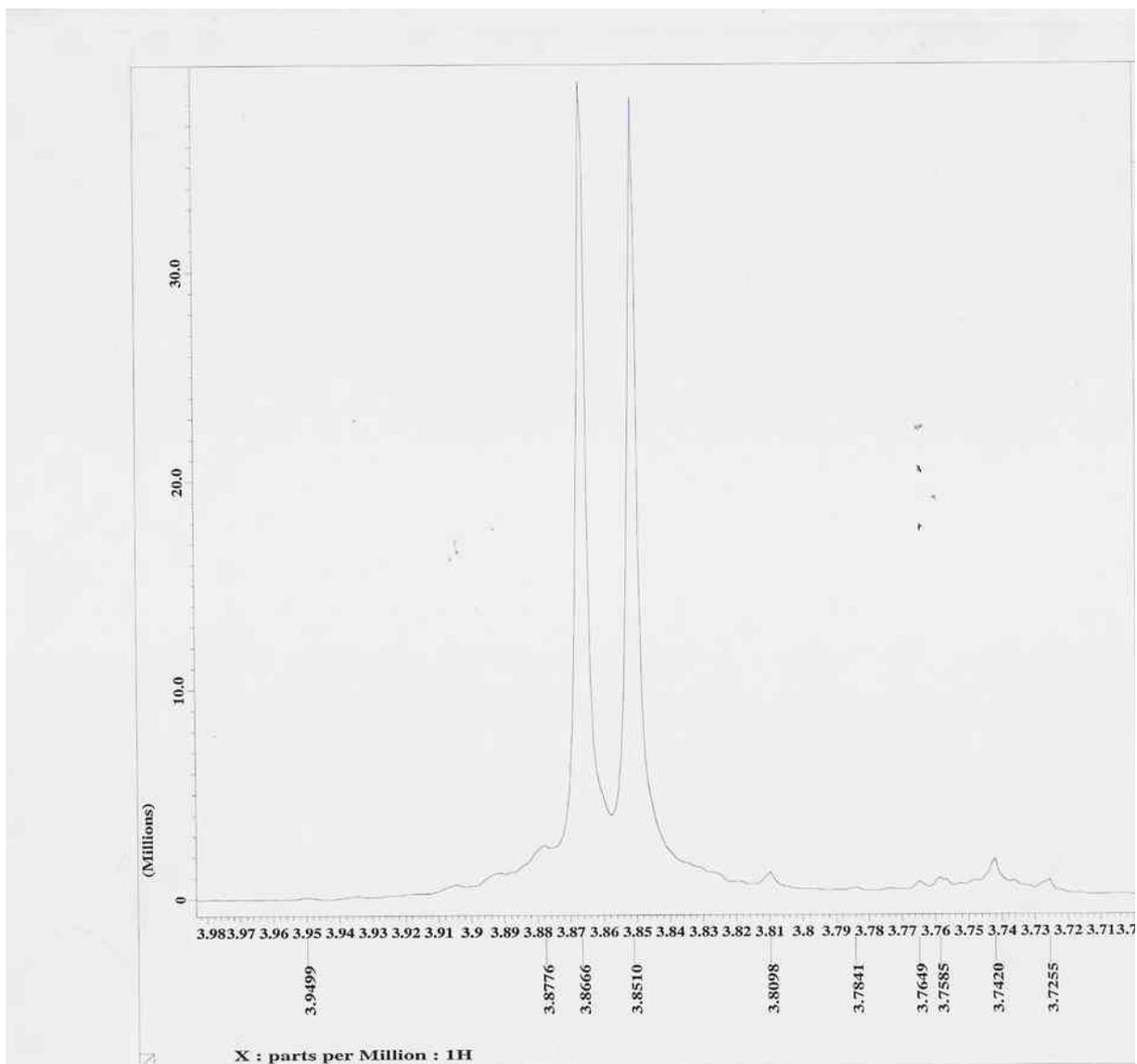


Figura 76 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 3,72-3,94 ppm) da 12-Hidroxirotenona

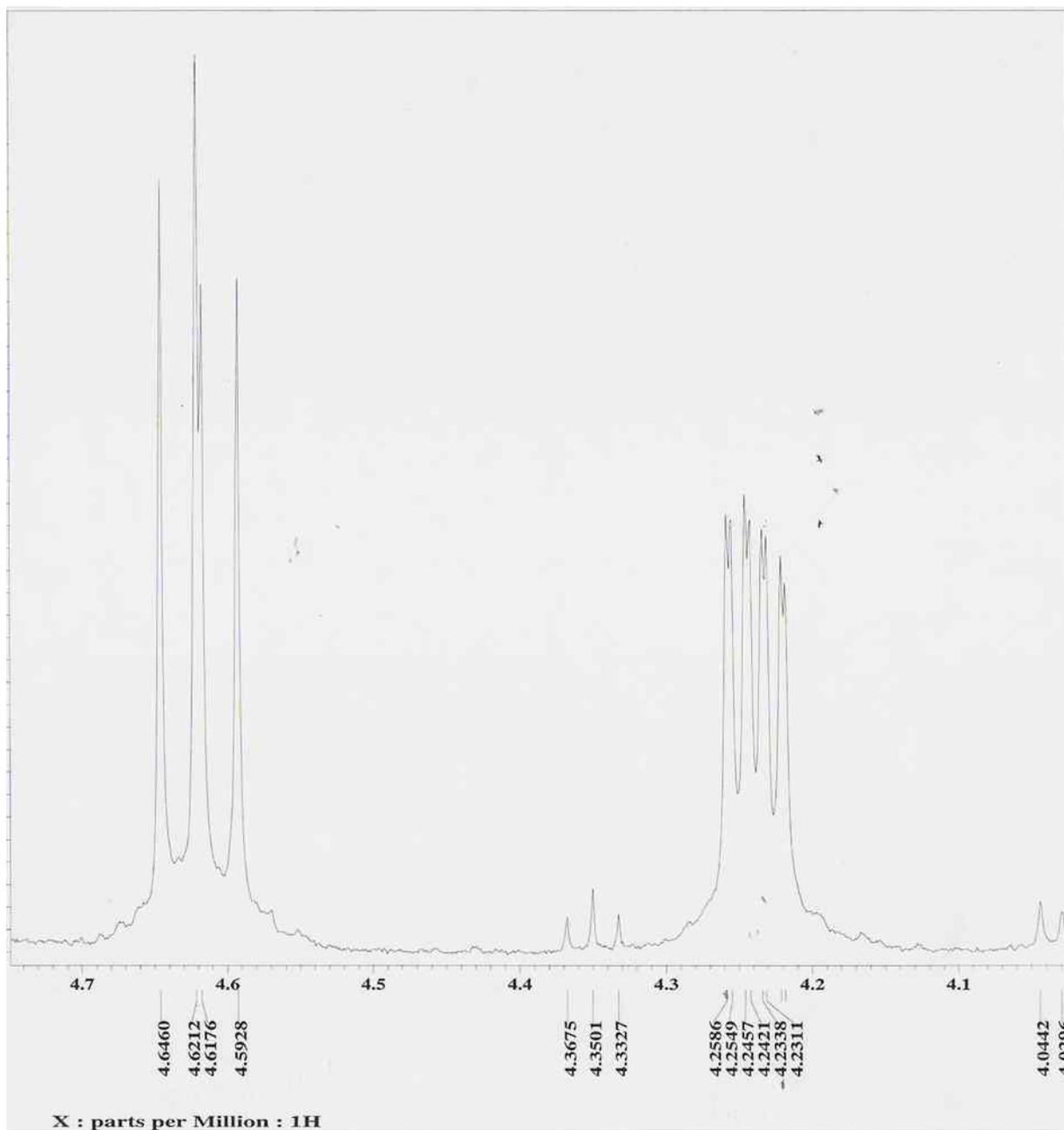


Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 4,02 - 4,64 ppm) da 12-Hidroxirotenona

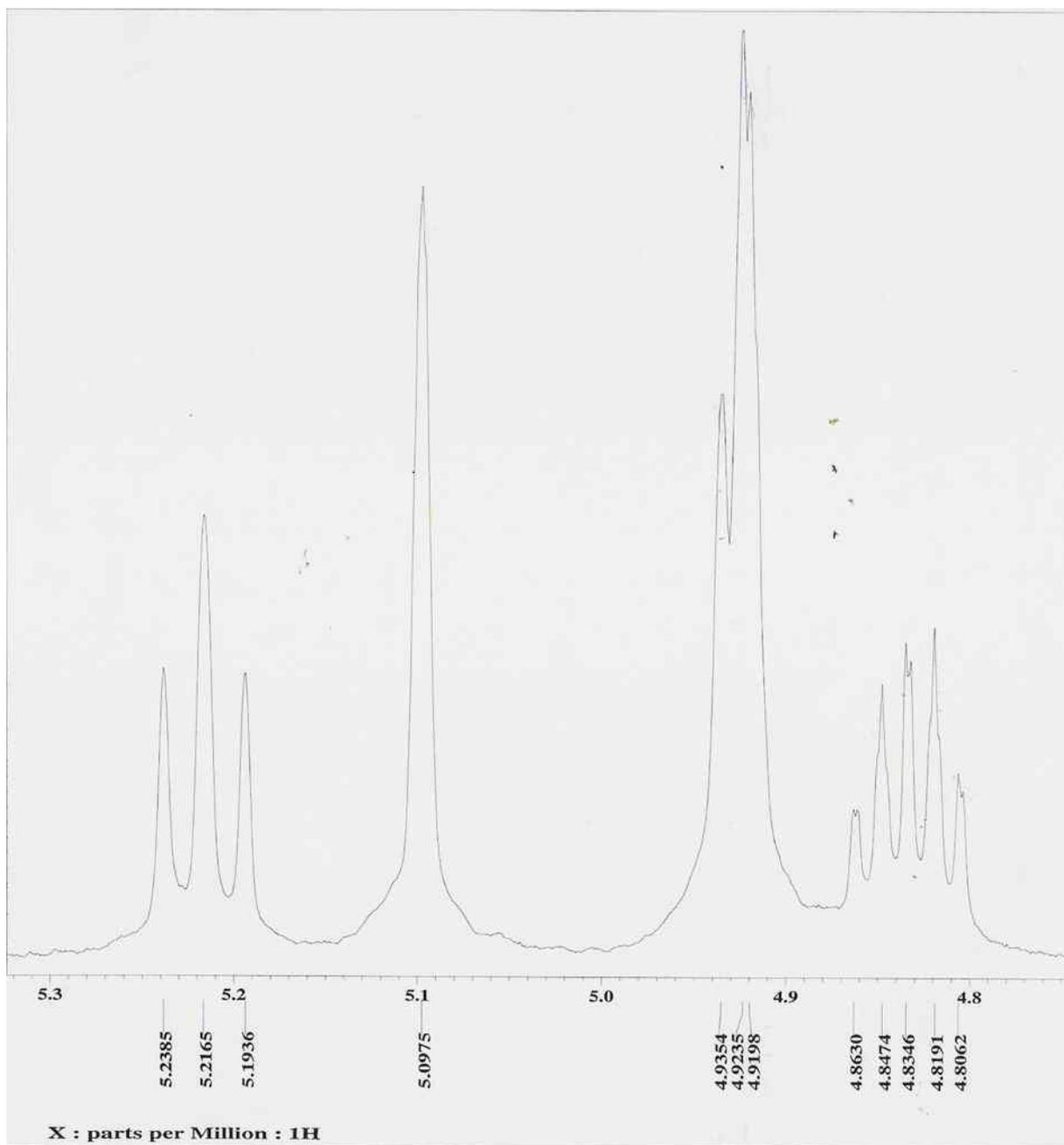


Figura 78 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 4,80- 5,23 ppm) da 12-Hidroxirottenona

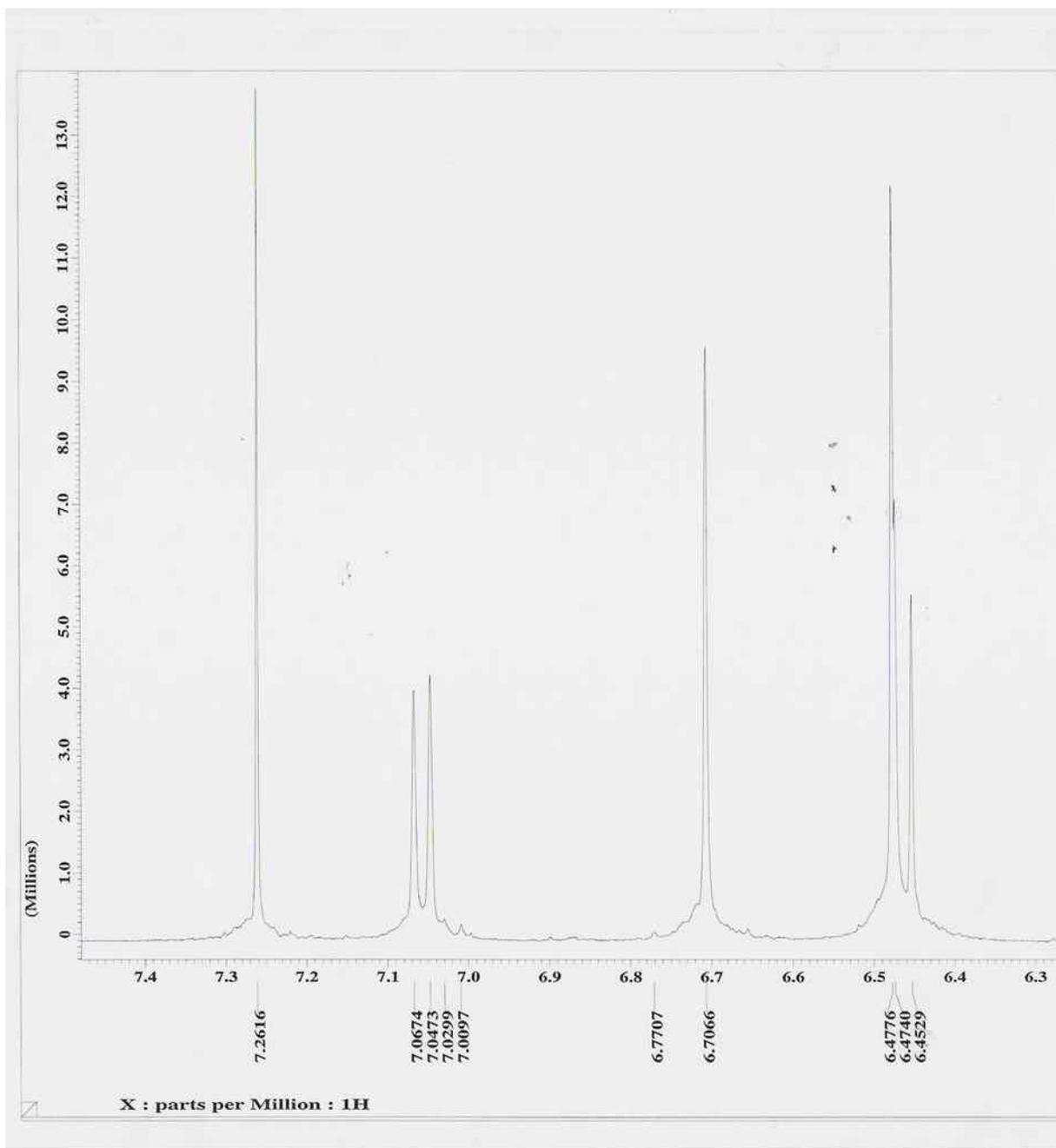


Figura 79 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 6,45-7,26 ppm) da 12-Hidroxirotenona

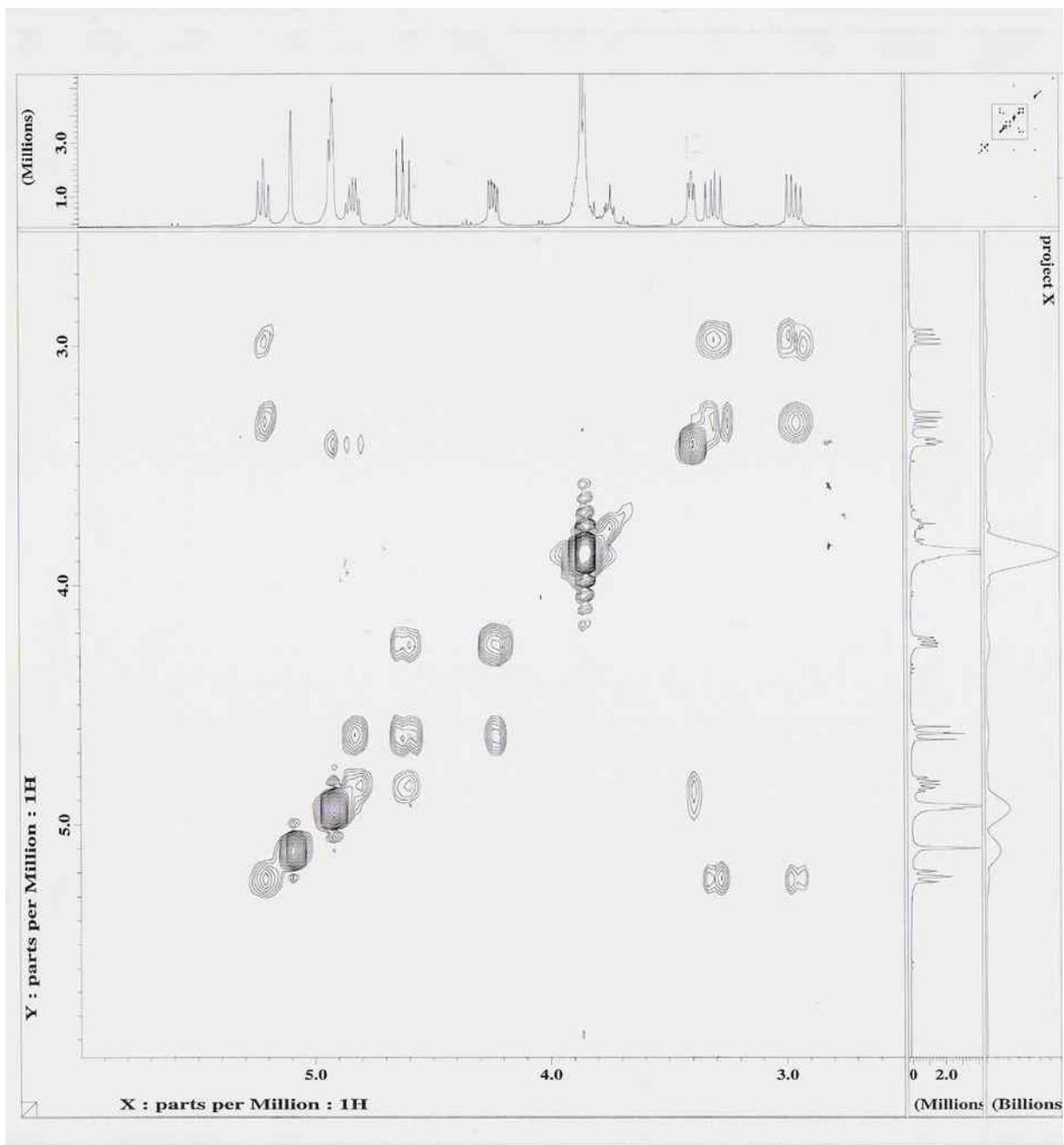


Figura 80 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 12-Hidroxirotenona

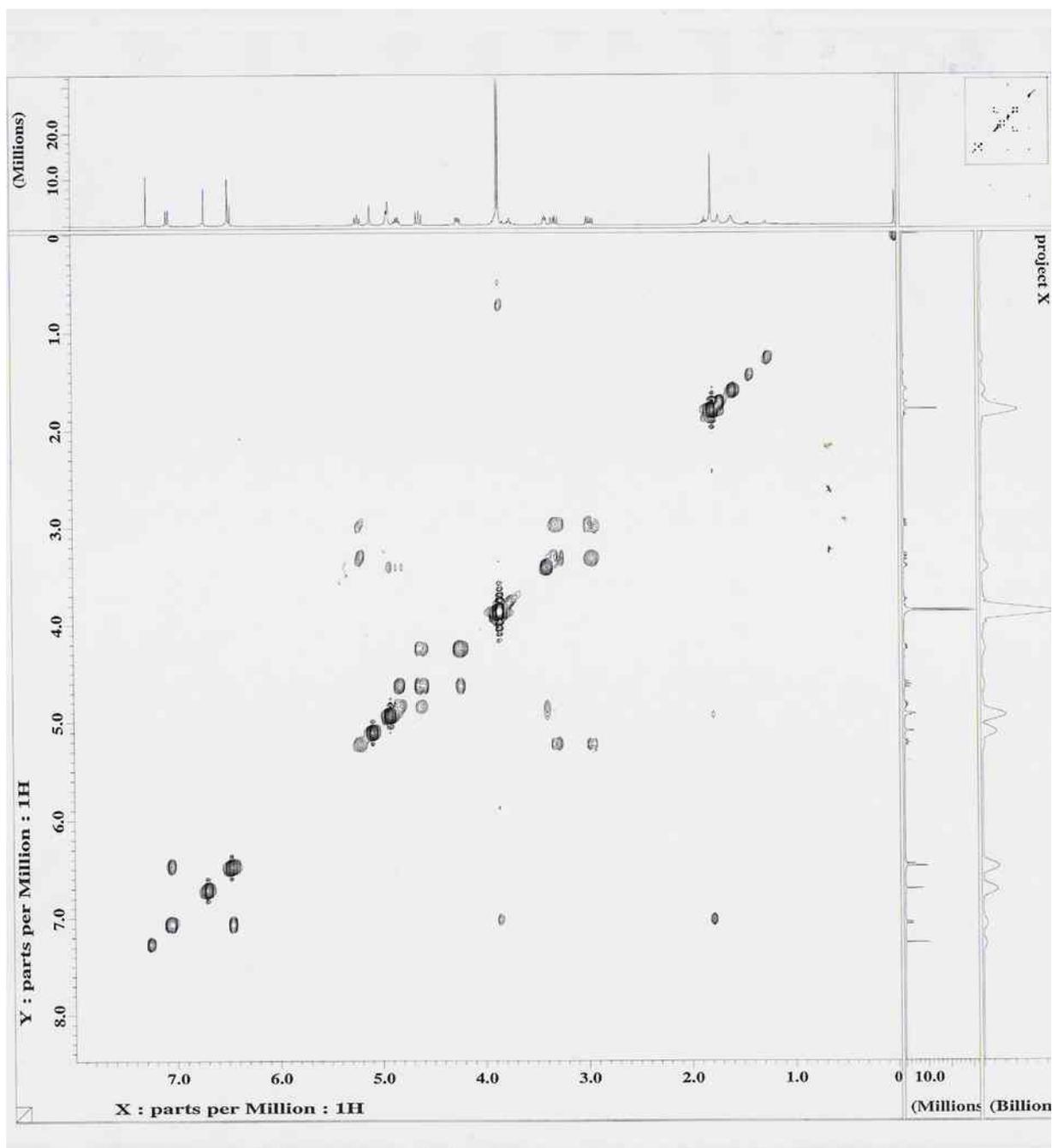


Figura 81 - Mapa de correlação homonuclear COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ da 12-Hidroxirotenoma

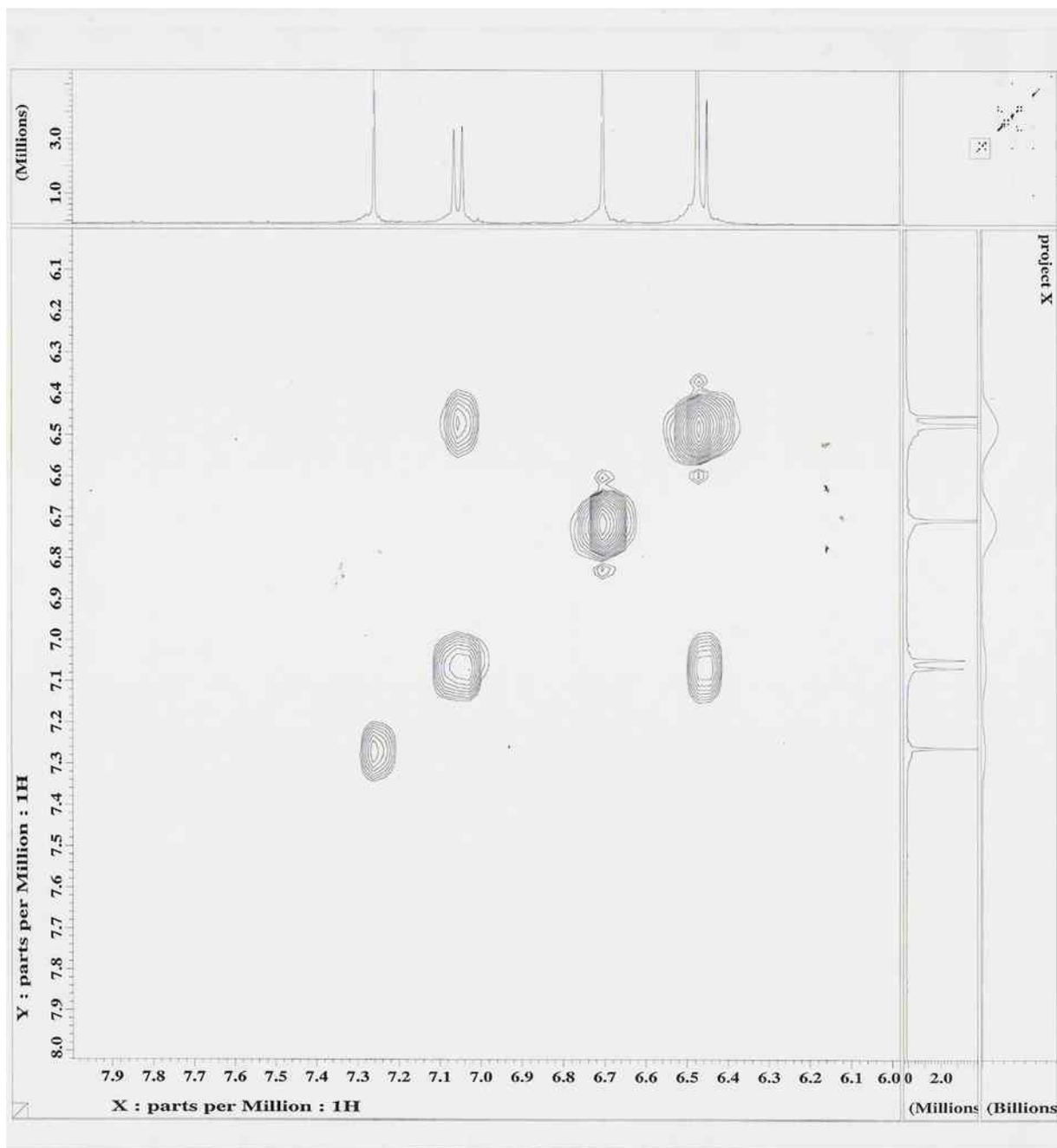


Figura 82 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 12-Hidroxirotenona

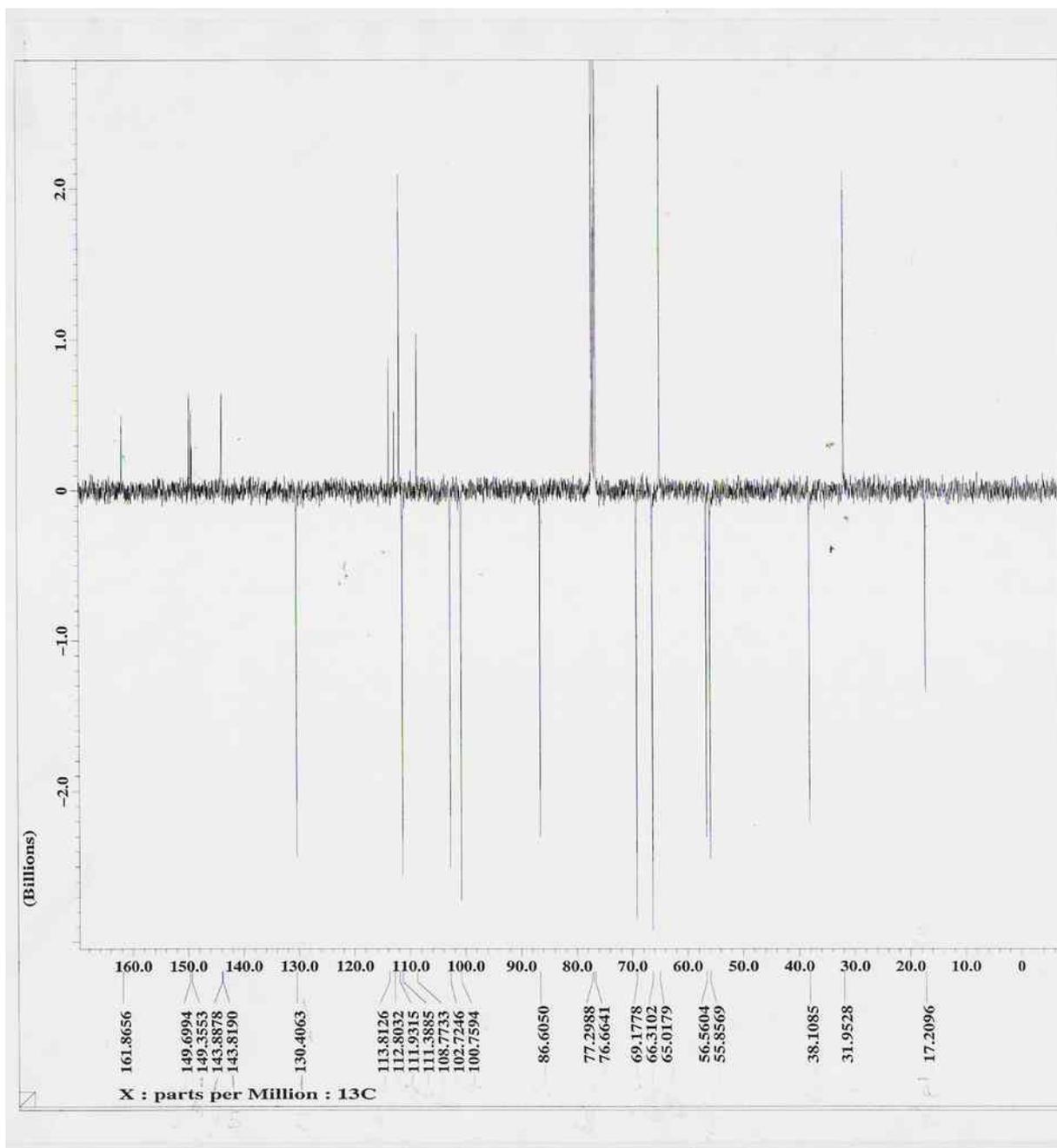


Figura 83 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da 12-Hidroxirotenona

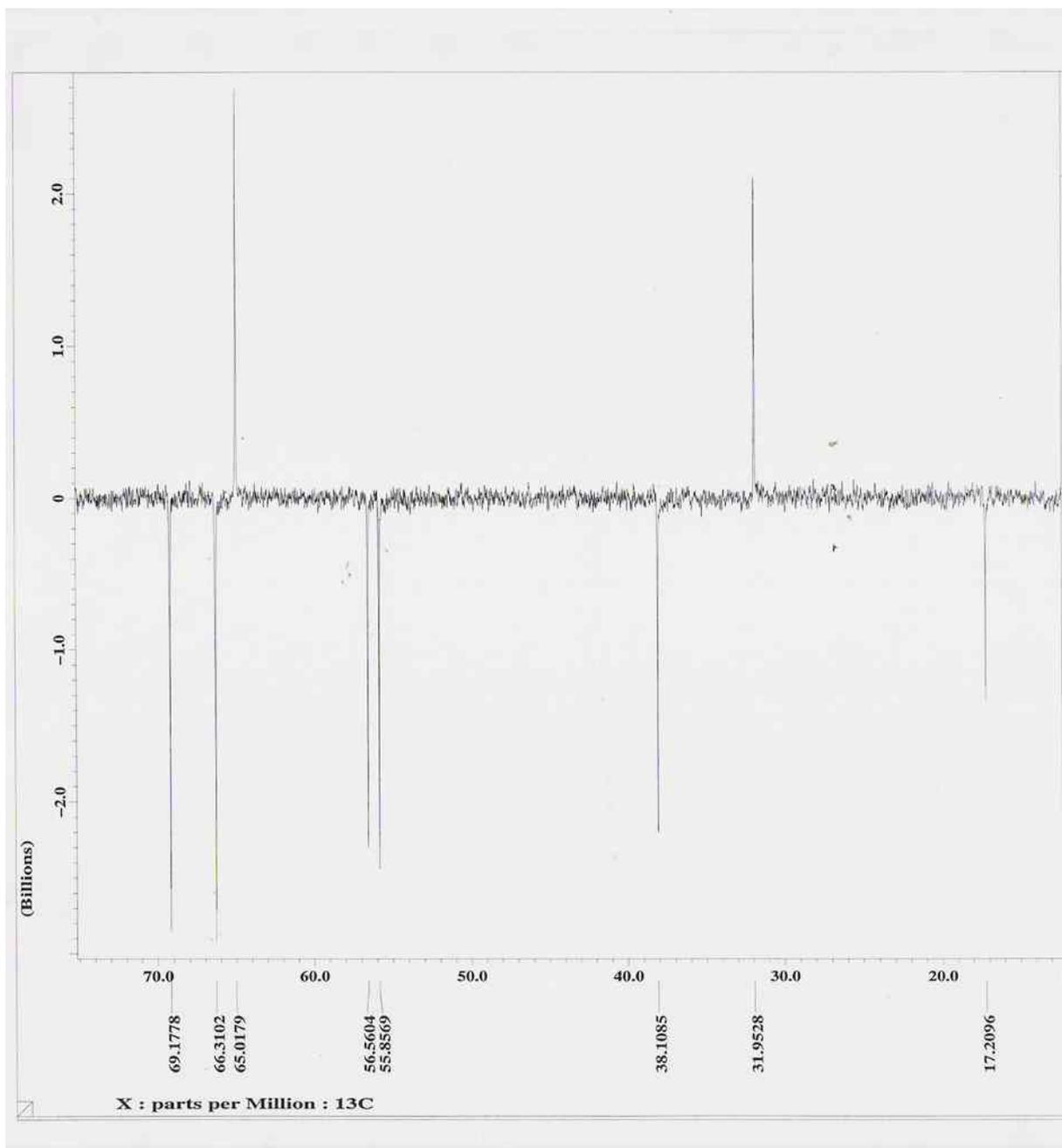


Figura 84 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 20,0-70,0 ppm) da 12-Hidroxirottenona

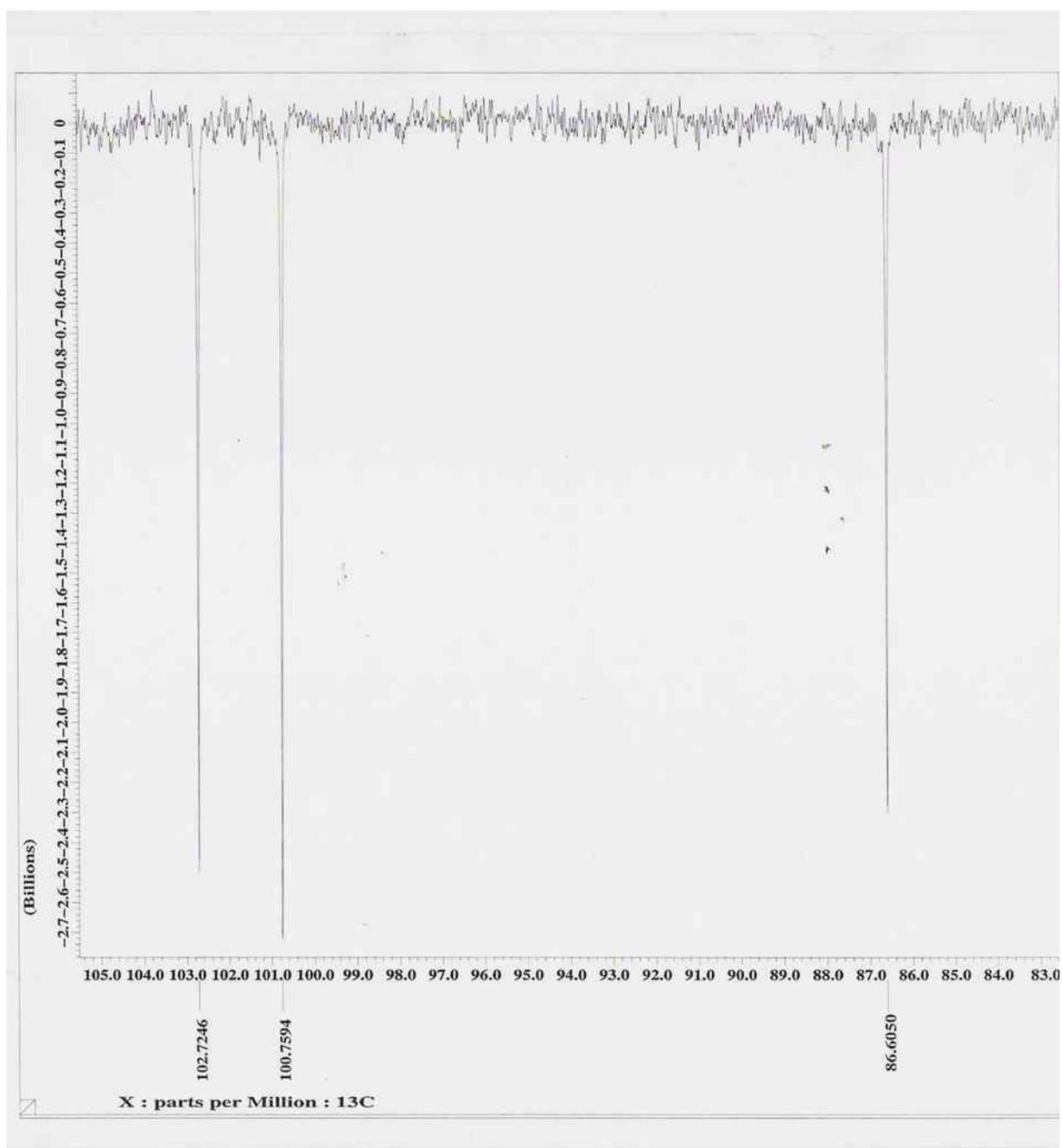


Figura 85 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3) (Expansão da região entre 83,0- 105,0 ppm) da 12-Hidroxirotenona

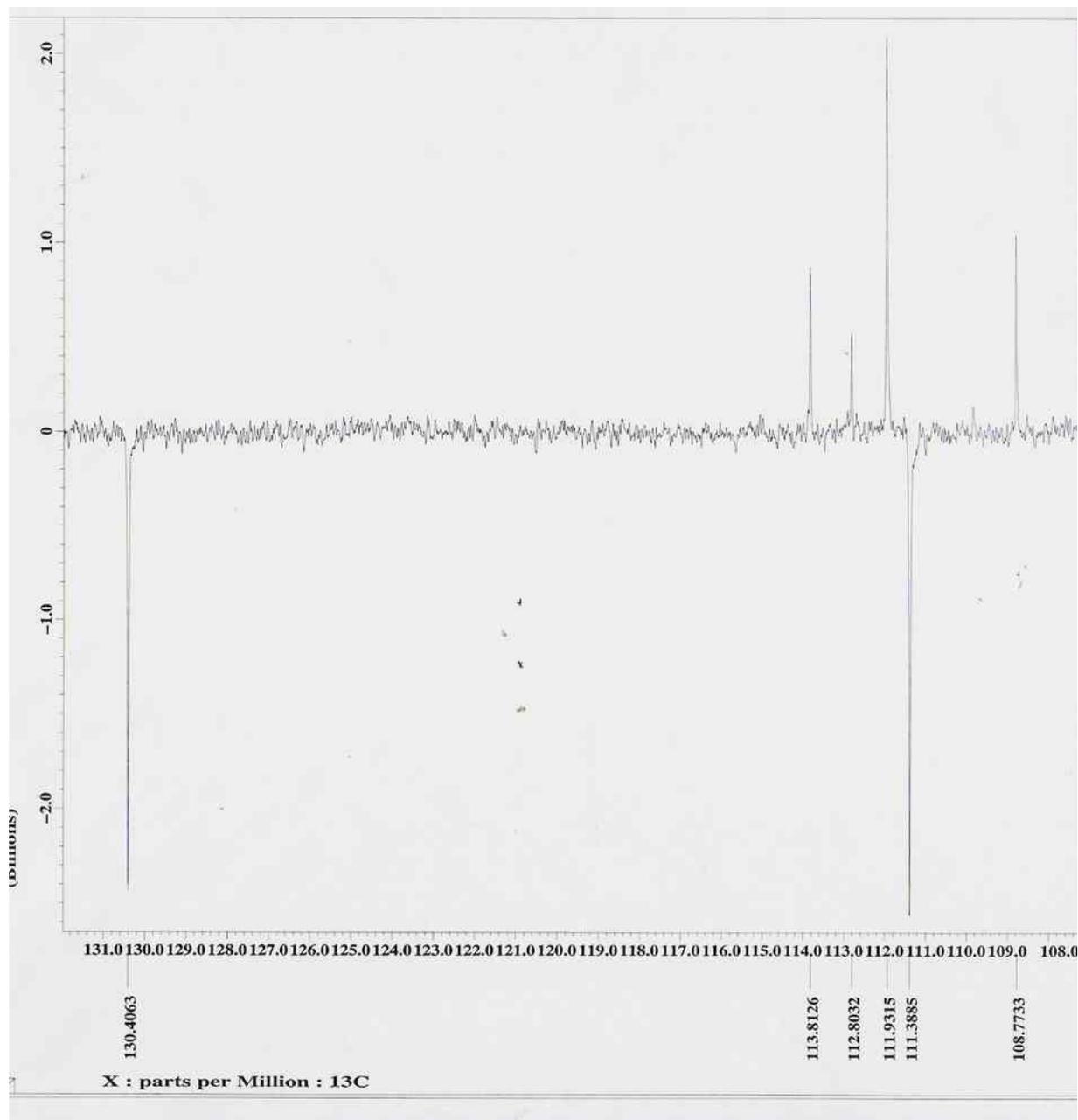


Figura 86 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3) (Expansão da região entre 108,0-131,0) ppm da 12-hidroxirotenona

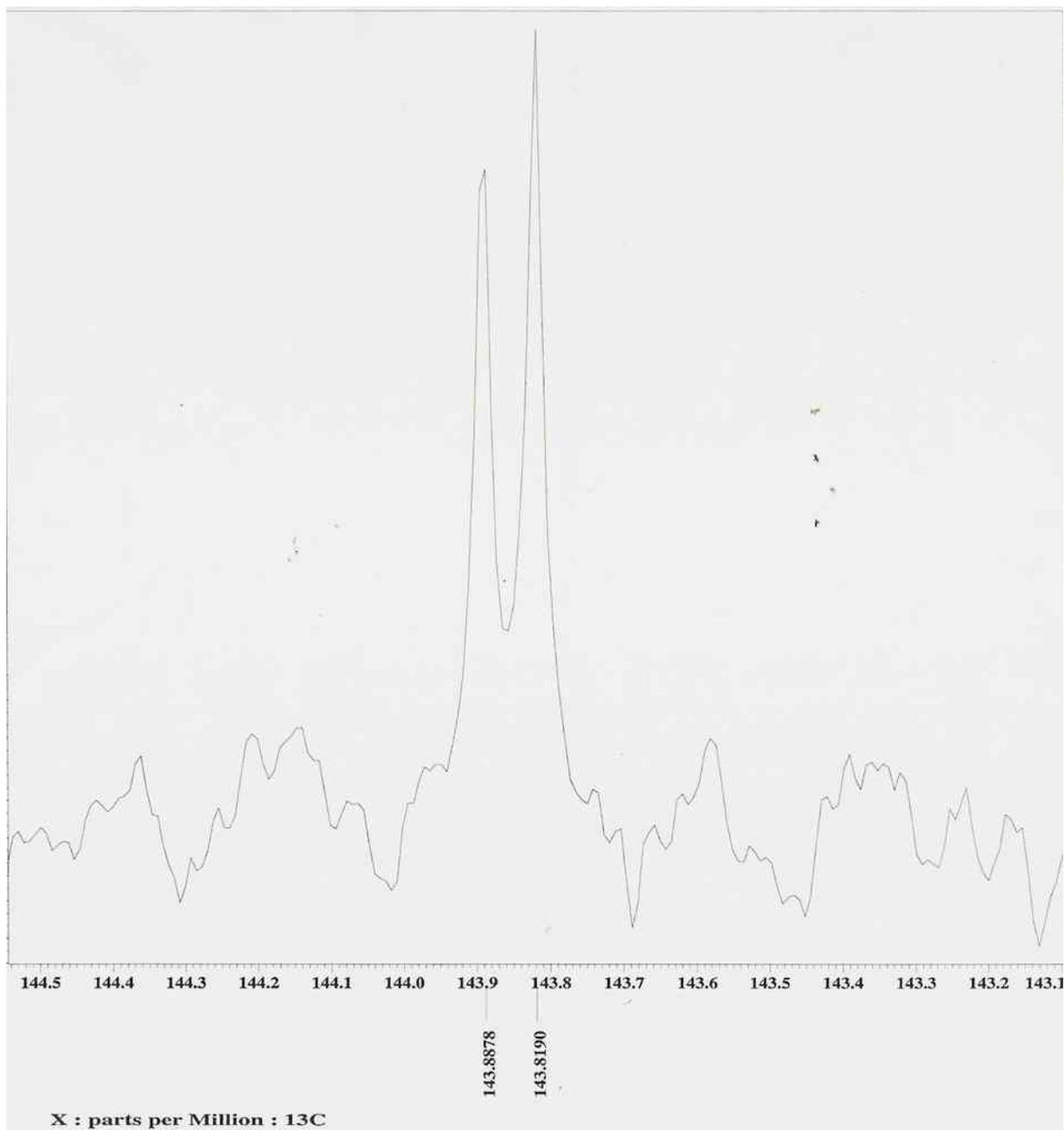


Figura 87 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3) (Expansão da região entre 143,1-144,5 ppm) da 12-Hidroxirottenona

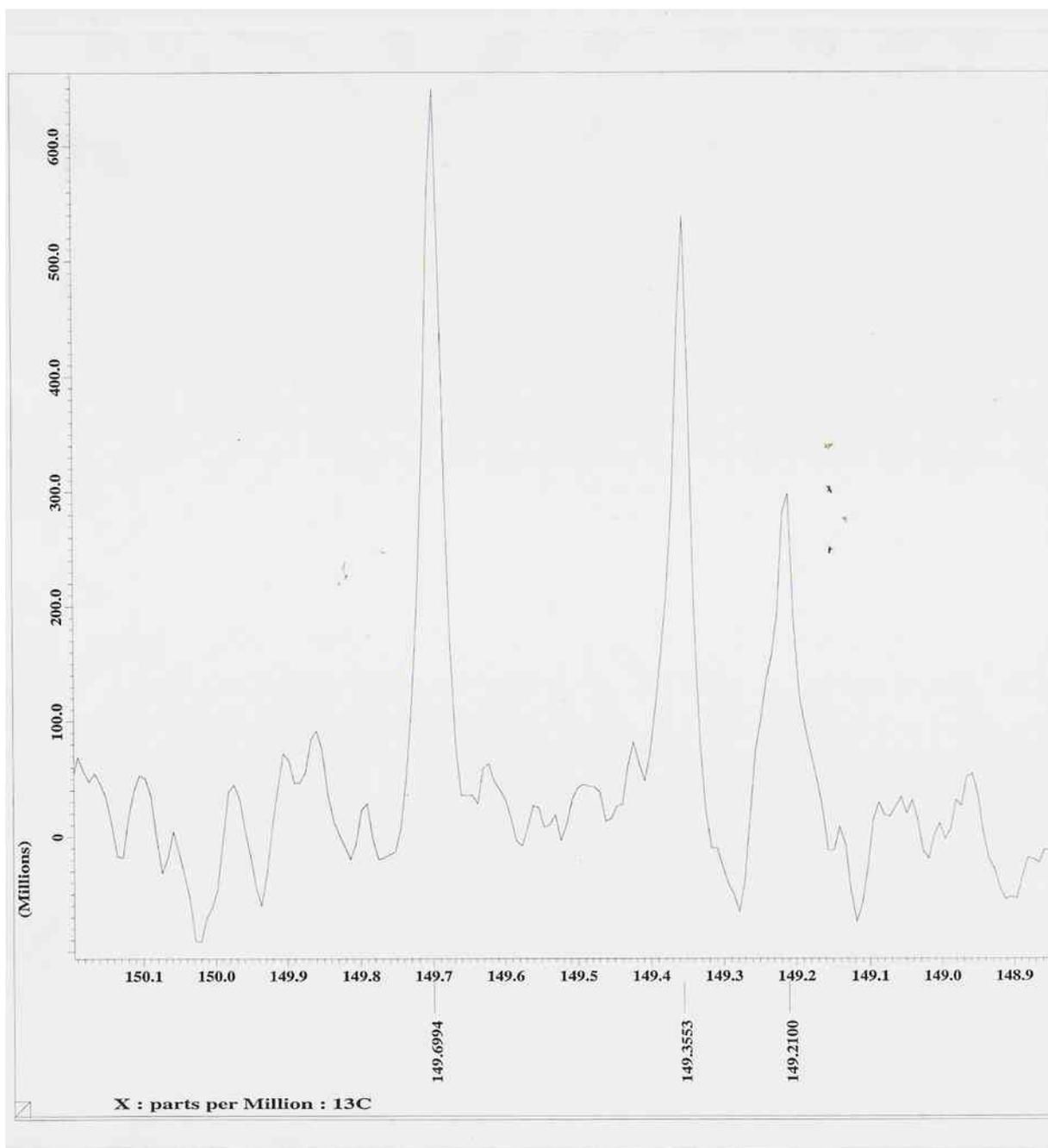


Figura 88 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3) (Expansão da região entre 148,9-150,1 ppm) da 12-Hidroxirotenona

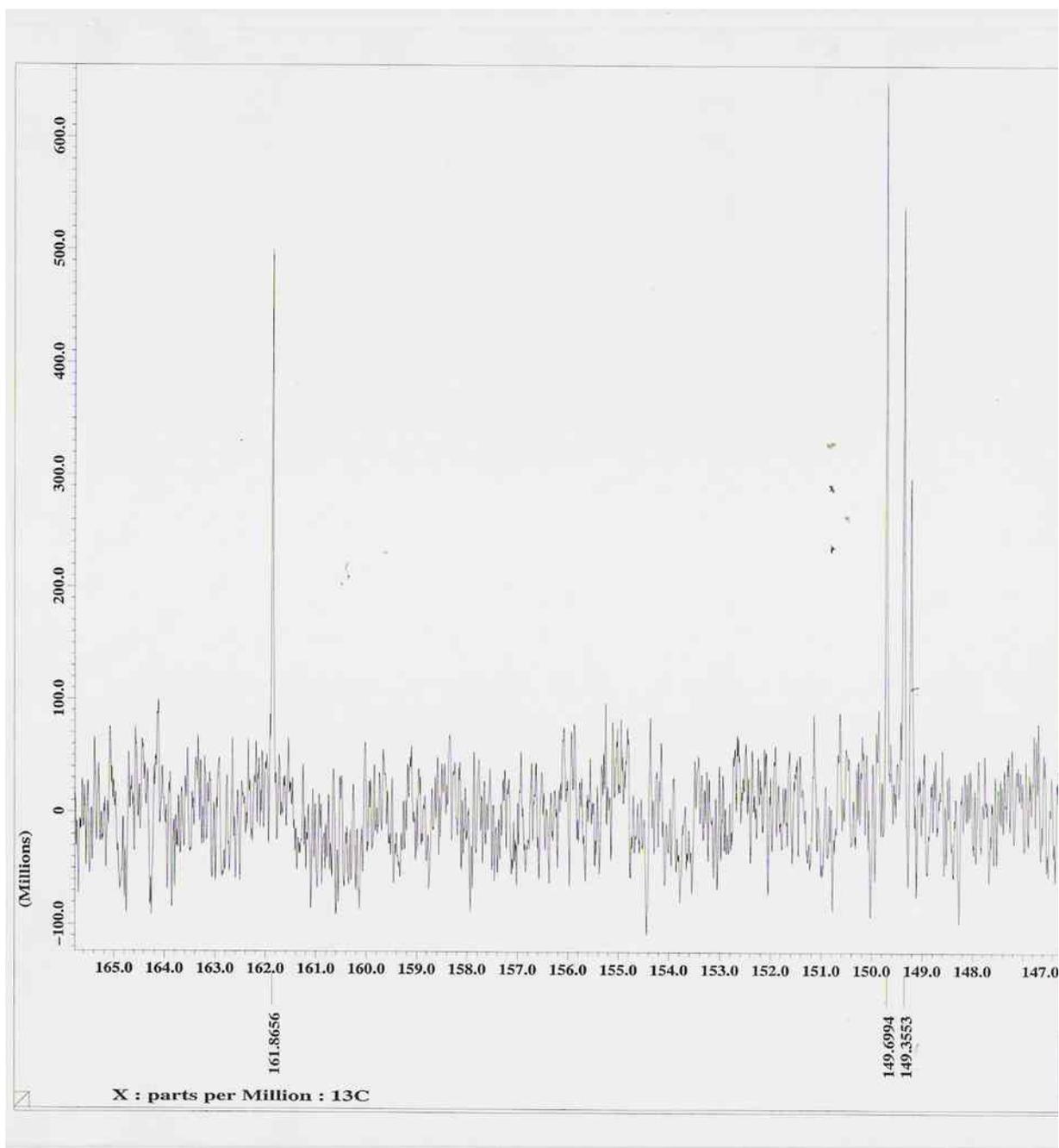


Figura 89 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3) (Expansão da região entre 147,0-165,0 ppm) da 12-Hidroxirotenona

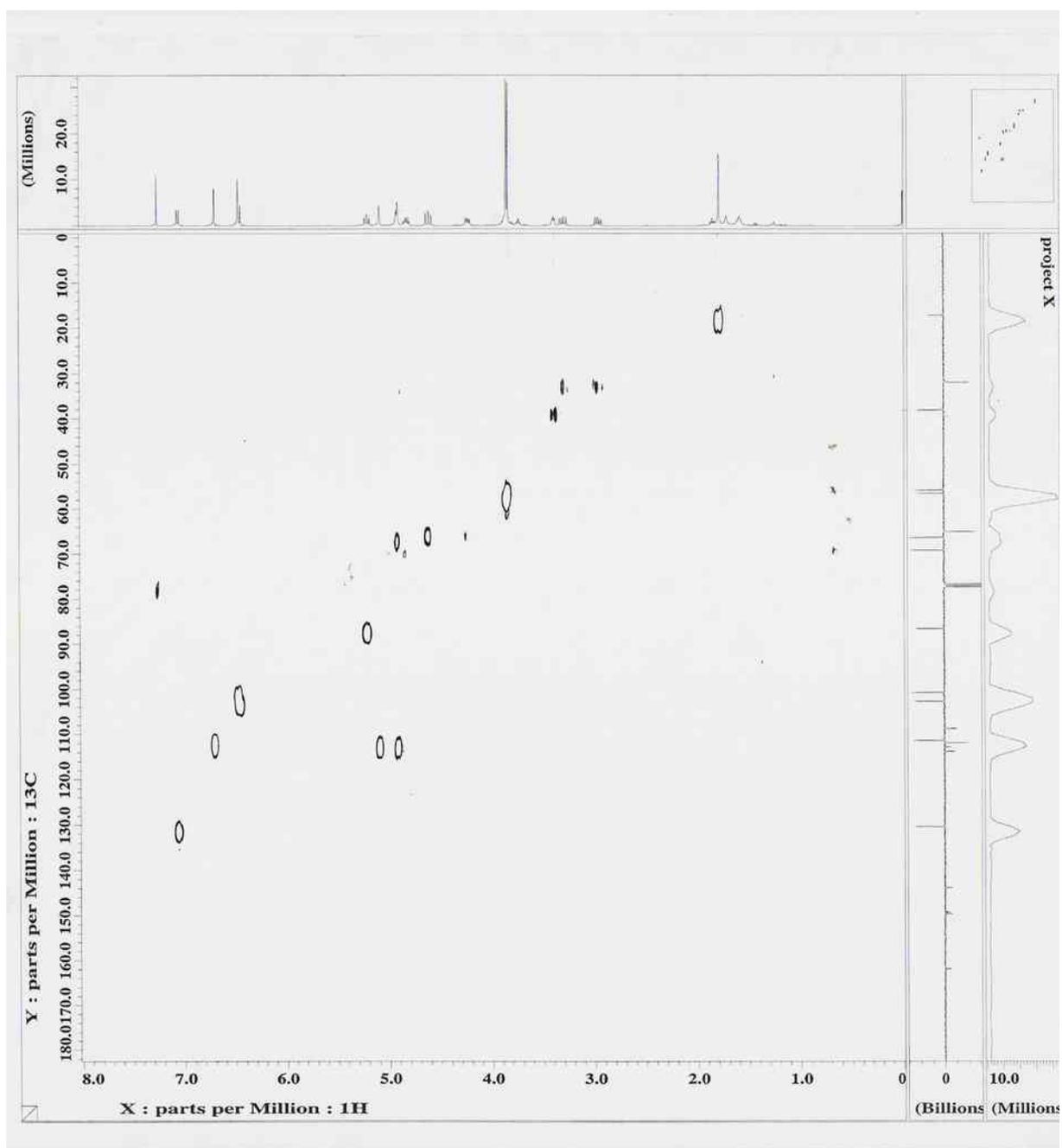


Figura 90 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 12-Hidroxirottenona

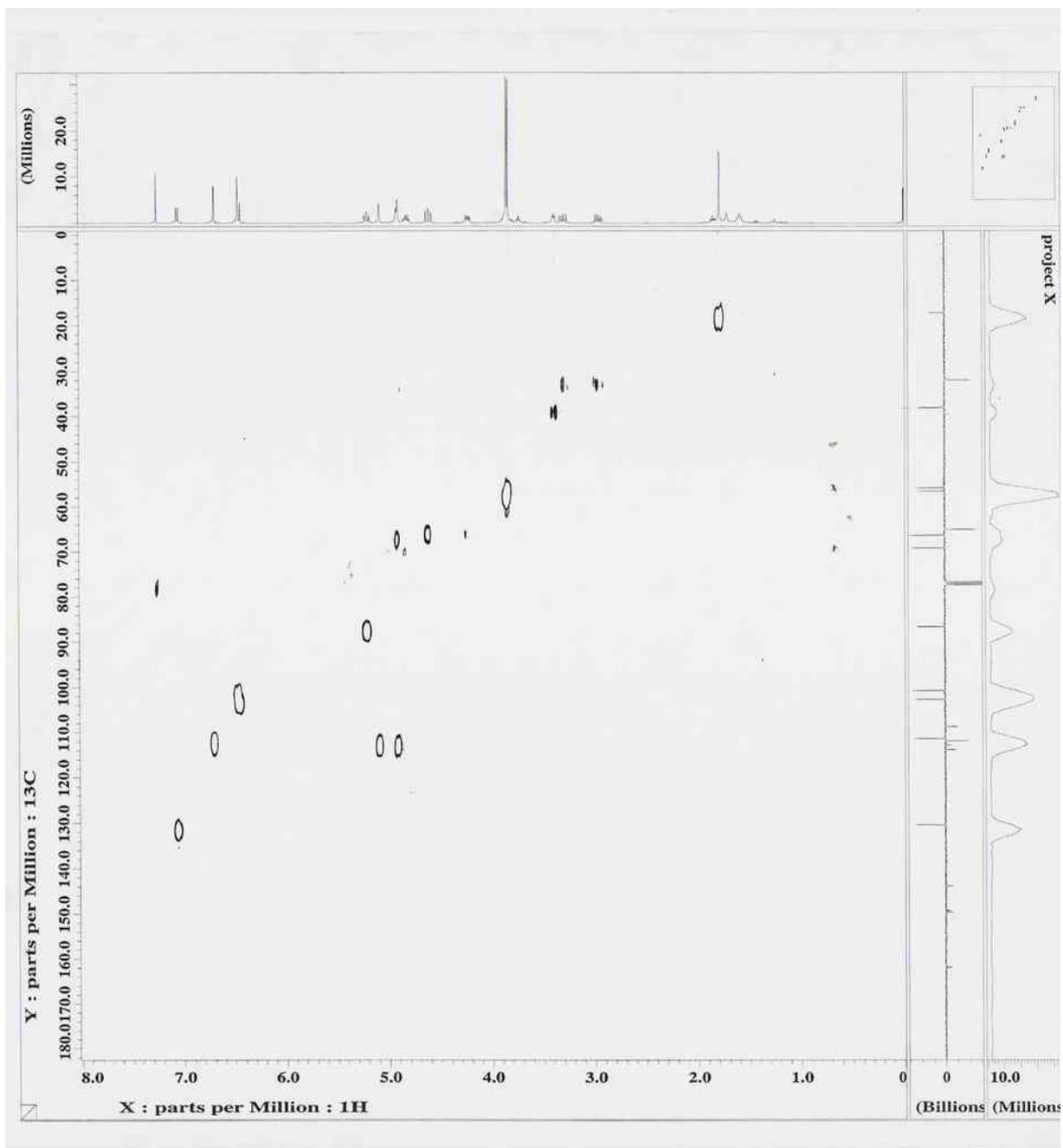


Figura 9 1 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 12-Hidroxirottenona

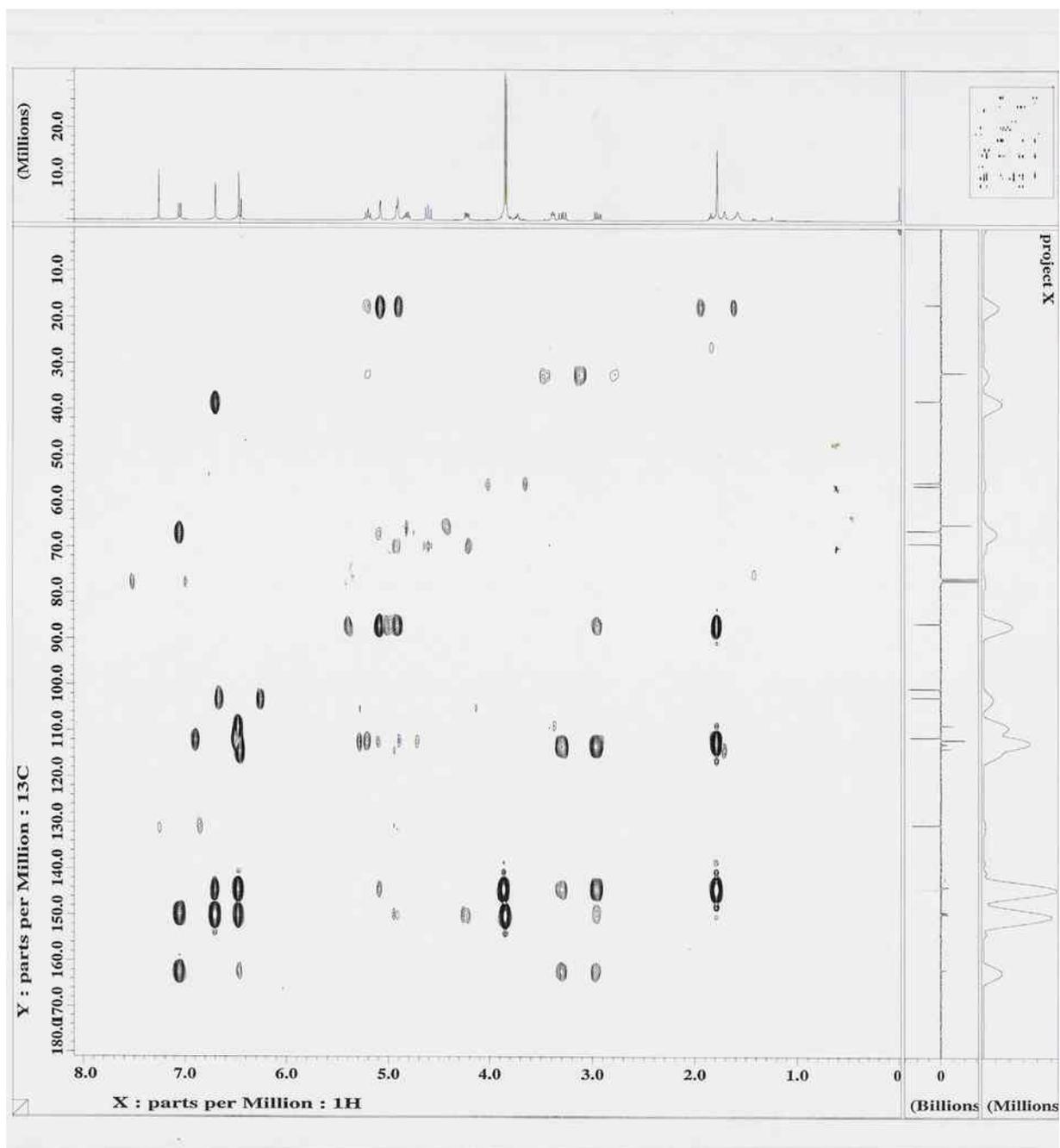


Figura 92 - Mapa de correlação heteronuclear (HMBC) da 12-Hidroxirotenona

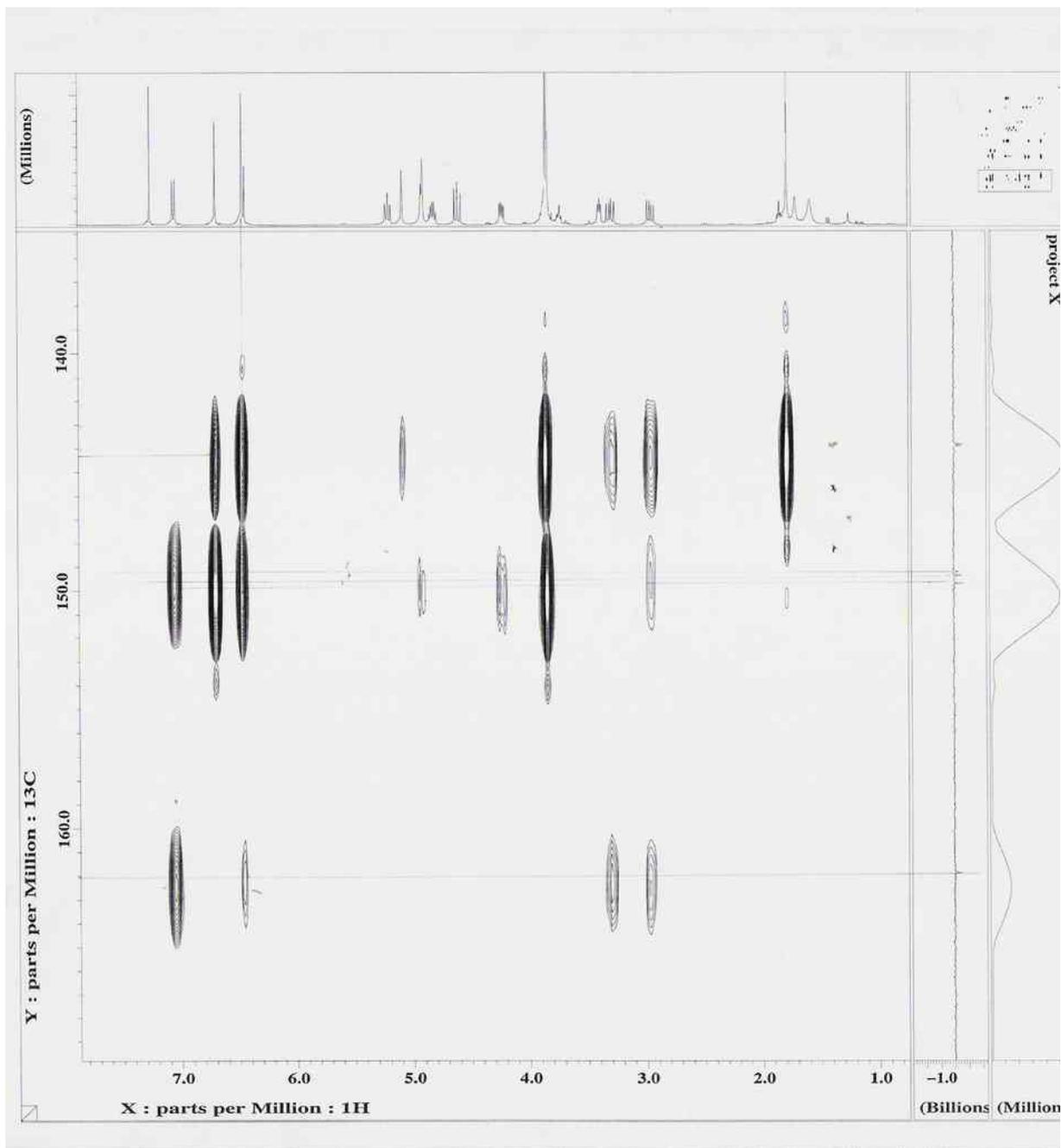


Figura 93 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 12-Hidroxirotenona

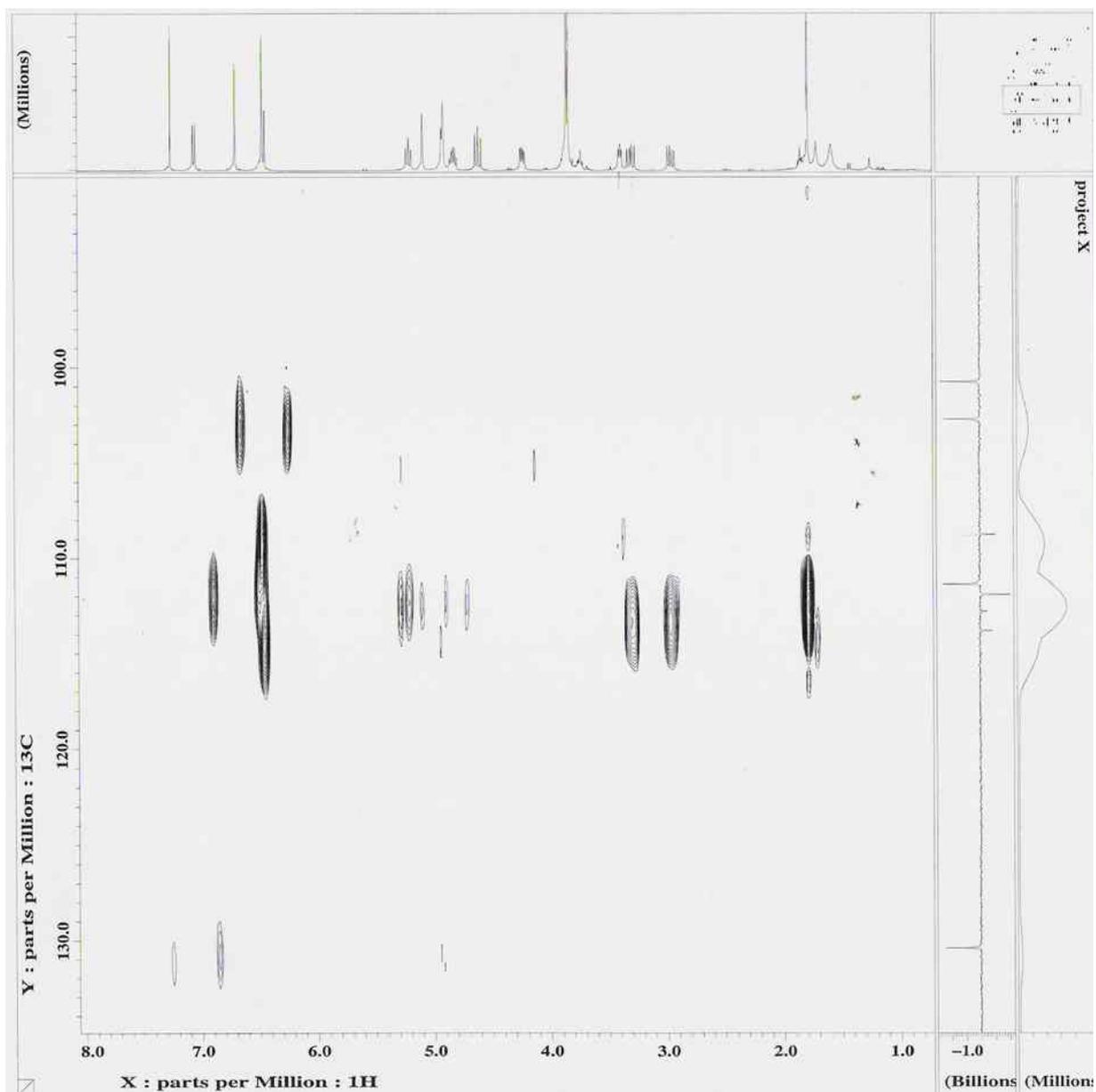


Figura 94 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 12-Hidroxirottenona

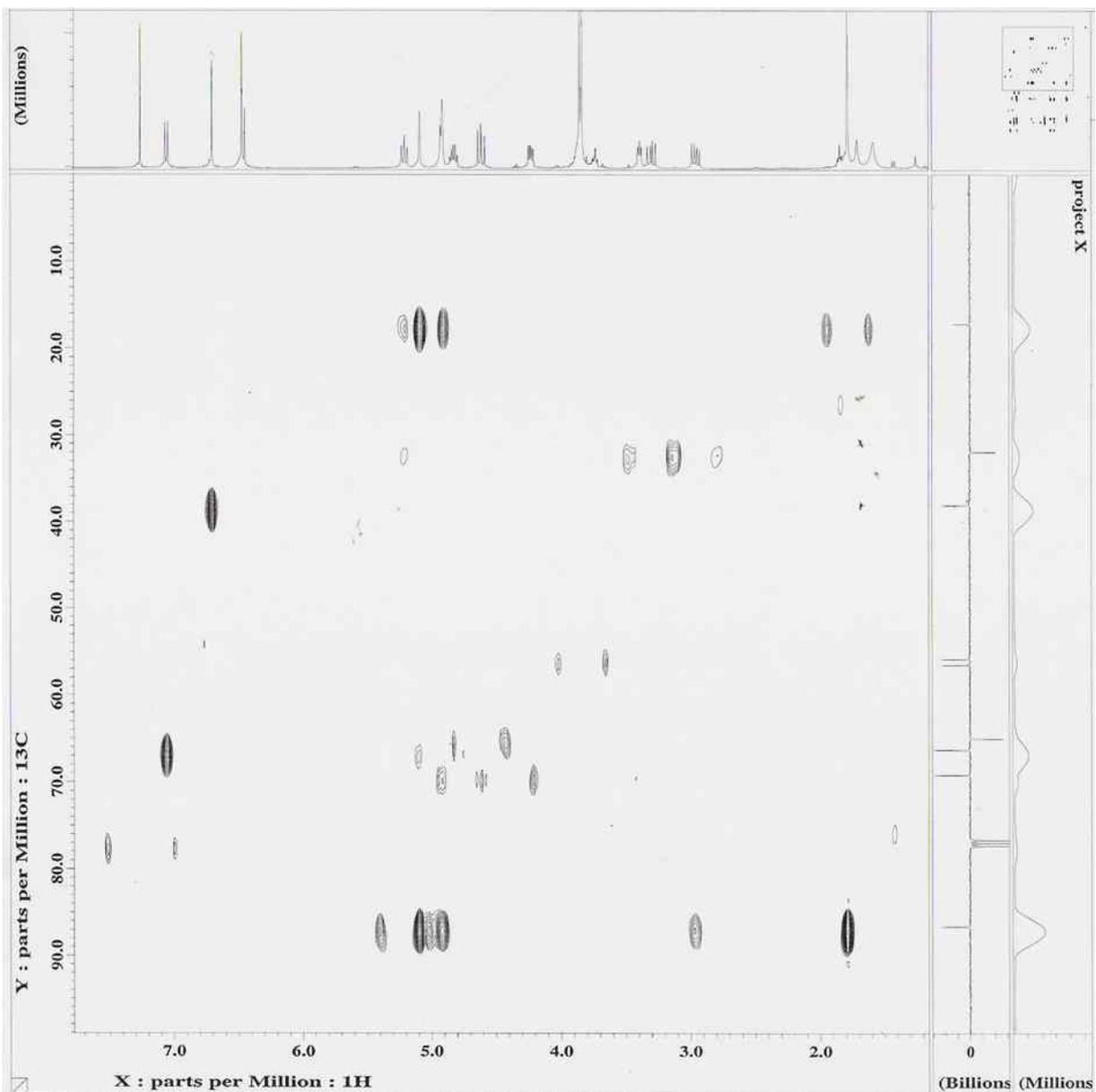
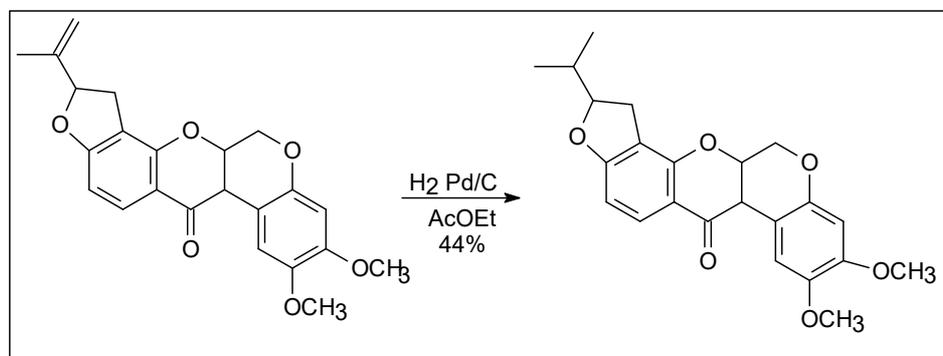


Figura 95 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 12-Hidroxirotenona

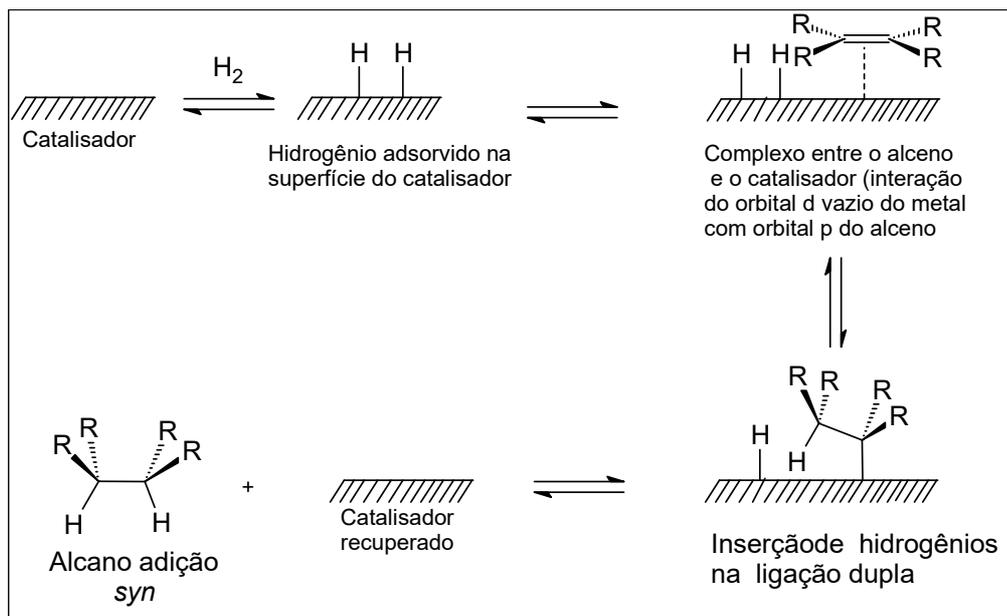
5.2.3 - REAÇÃO DE HIDROGENAÇÃO CATALÍTICA DA ROTENONA

Com a finalidade de verificar a influência da dupla ligação exocíclica do anel **E** da rotenona na citotoxicidade dos rotenóides foi realizada uma reação de hidrogenação catalítica, utilizando procedimento descrito por Richard *et al.* (1979), onde foi utilizado Pd/C como catalisador. O produto obtido dessa reação foi um sólido branco correspondendo a 6',7'-diidrorotenona, com faixa de fusão 161,4-163,0 °C, com 43% de rendimento (Esquema11).



Esquema 11. Reação de hidrogenação catalítica da rotenona

A hidrogenação de alquenos é realizada com vários solventes. No caso da catálise heterogênea, os catalisadores mais utilizados são Pd/C, Pt e Ni. O mecanismo dessa redução é complexo, e o mecanismo encontra-se proposto no esquema 12, p.137.



Esquema 12. Representação esquemática simplificada do mecanismo proposto.

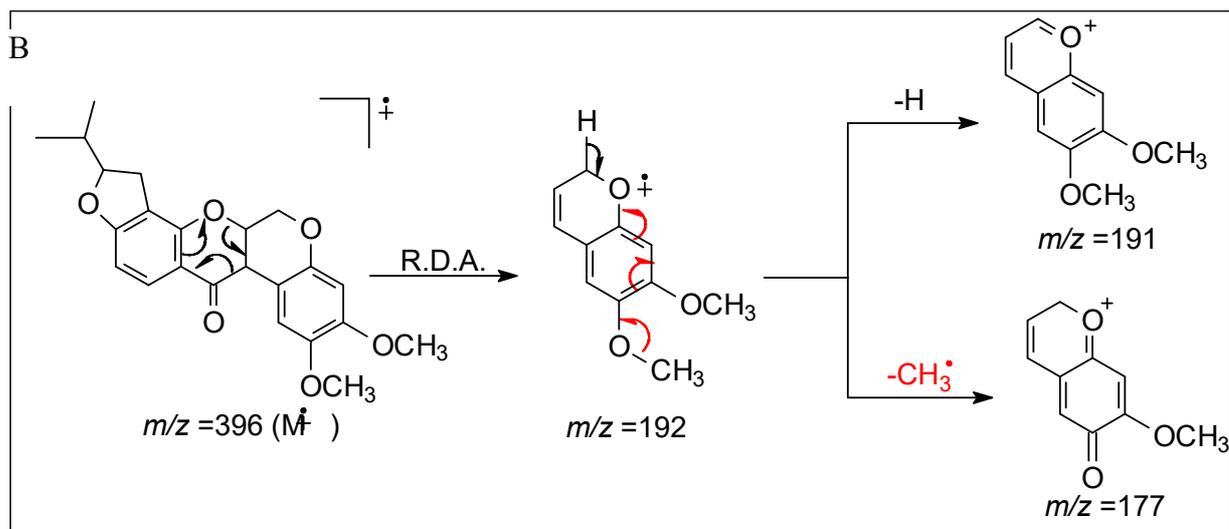
5.2.4 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO 6',7'-DIIDROROTENONA

O espectro de massa da 6',7'-diidrorotenona apresentou íon molecular à m/z 396 $[M]^+$ compatível com a fórmula molecular, $C_{23}H_{24}O_6$ (Figura 97; p.141).

O fragmento a m/z 192 corresponde ao pico base, é devido à decomposição do tipo retro Diels-Alder do anel C, e dá origem aos fragmentos m/z 191 e m/z 177 correspondentes às perdas de hidrogênio e de metila respectivamente (Esquema13; p.138).

A confirmação da hidrogenação foi através da observação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C dos carbonos alifáticos C-5', C- 6', C-7' e C-8' a δ_c 90,75; 31,14; 17,90; 17,53 respectivamente. Os hidrogênios ligados a esses carbonos no espectro de RMN 1H (Figura 98; p142) absorvem a δ_H [4,60 (*m*); 1,96 (*m*); 0,96 (*d*; $J=6,96$) e 1,02 (*d*; $J=6,60$)].

A atribuição completa dos sinais da molécula são mostrados na tabela 13, p.139



Esquema13 - Principais Fragmentos de massa, proposto para 6',7'-diidrorotenona

Tabela 13 – Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) do 6',7'-diidrorotenona em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) MHz.

	δ_{C}	δ_{H}
C		
1a	104,9	
2	143,88	
3	149,45	
5	147,36	
7	157,89	
8	113,00	
9	167,68	
11a	113,33	
12	188,93	
CH		
1	110,40	6,77 (s)
4	100,89	6,44 (s)
6a	72,13	4,92 (sl)
10	104,79	6,46 (d, $J=8,44$)
11	129,79	7,81 (d, $J=8,40$)
12a	44,58	3,83 (d, $J=4,40$)
5'	90,75	4,60 (m)
6'	31,14	1,96 (m)
CH₂		
6	66,27	4,18 $J=12,08$
		4,60 $J=11,0$
4'	29,36	3,16 (dd, $J=9,52; 15,76$)
		2,84 (dd, $J=8,40; 15,76$)
CH₃		
7'	17,90	0,96 (d, $J=6,69$)
8'	17,53	1,02 (d, $J=6,60$)
CH₃O		
	56,30	3,76
	55,82	3,80

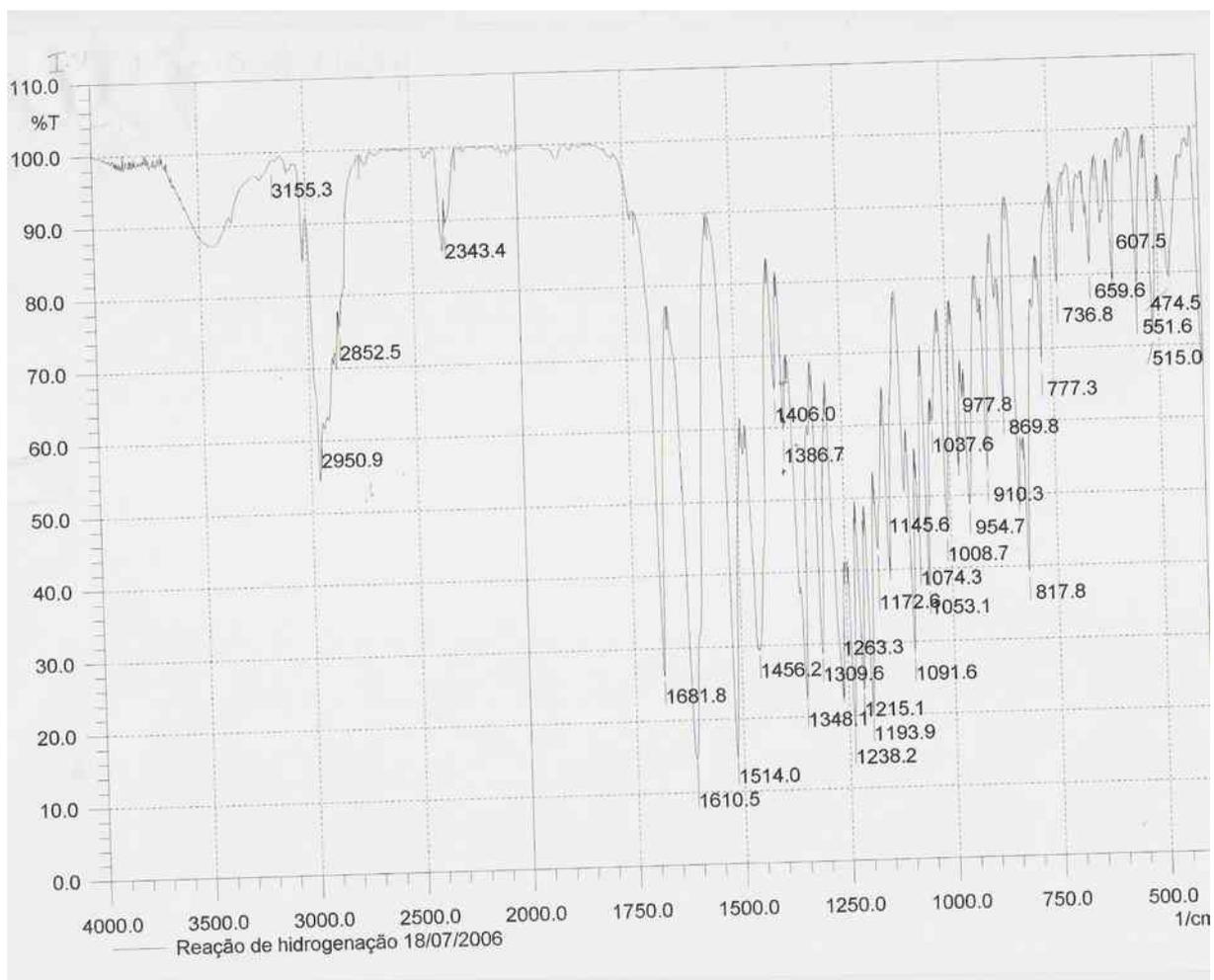


Figura 96 - Espectro de IV da 6',7' diidrorotenona

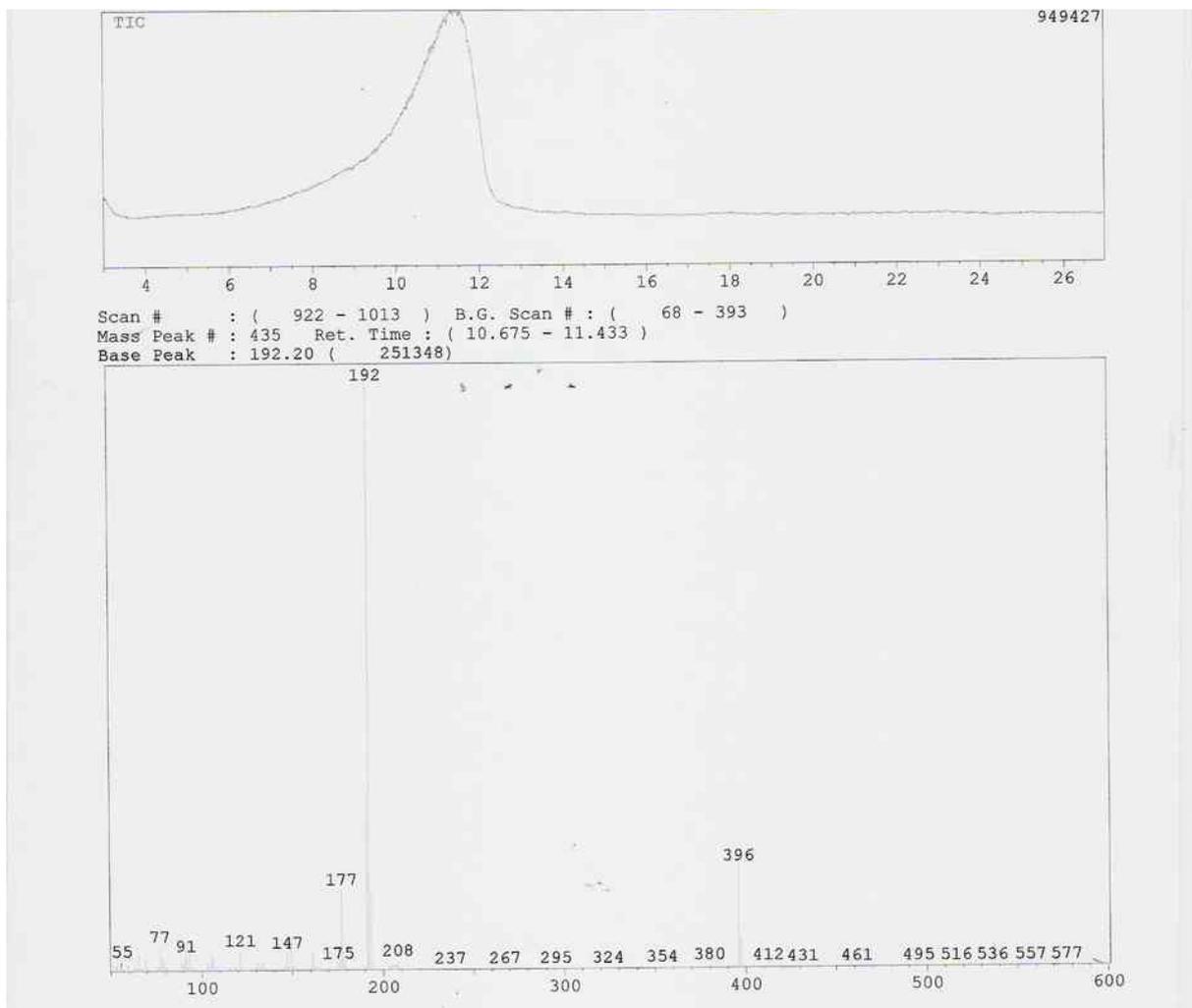


Figura 97 - Espectro de massas da 6',7'-diidrorotenona

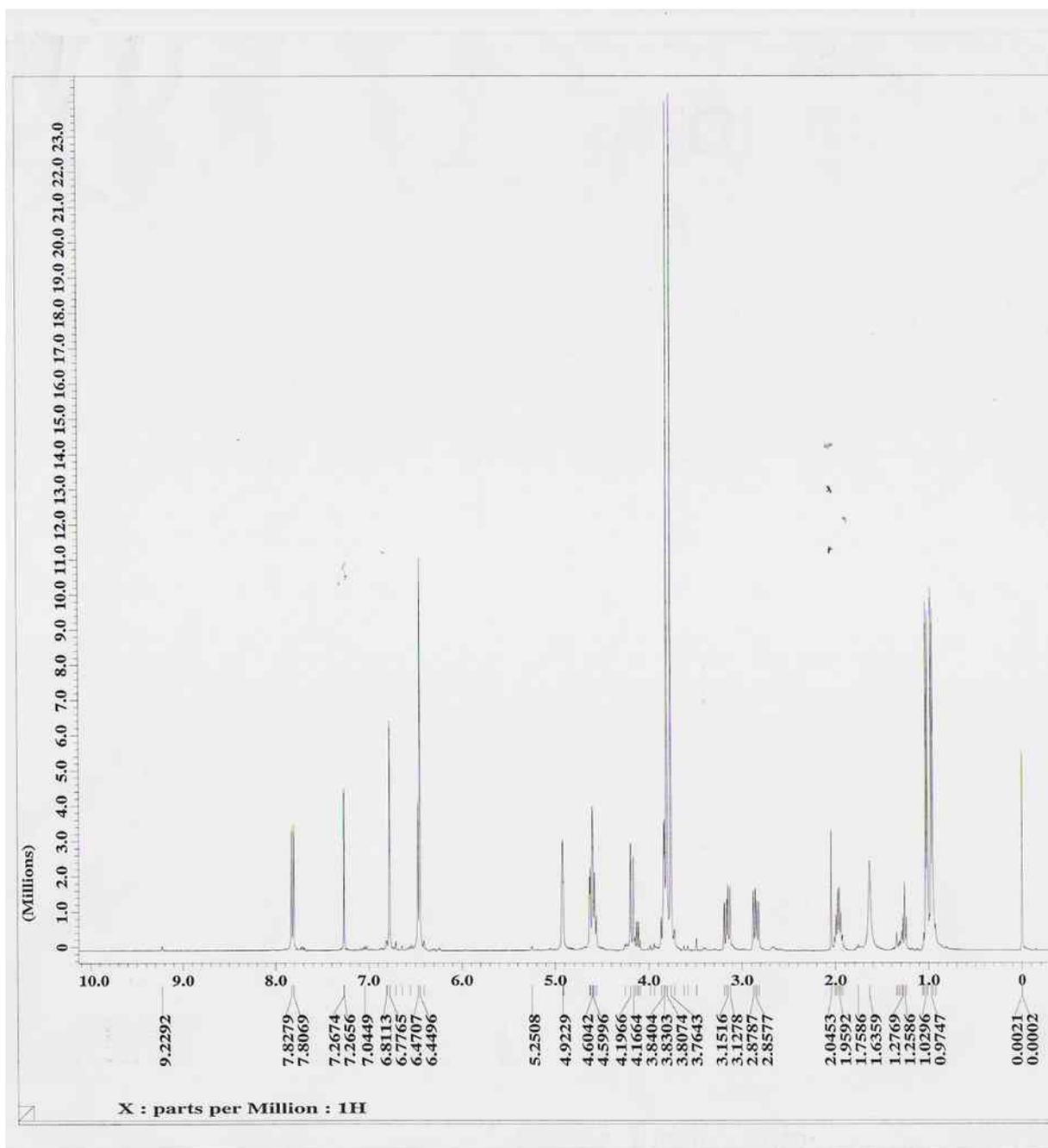


Figura 98 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 6',7'-Dihidrorotenona

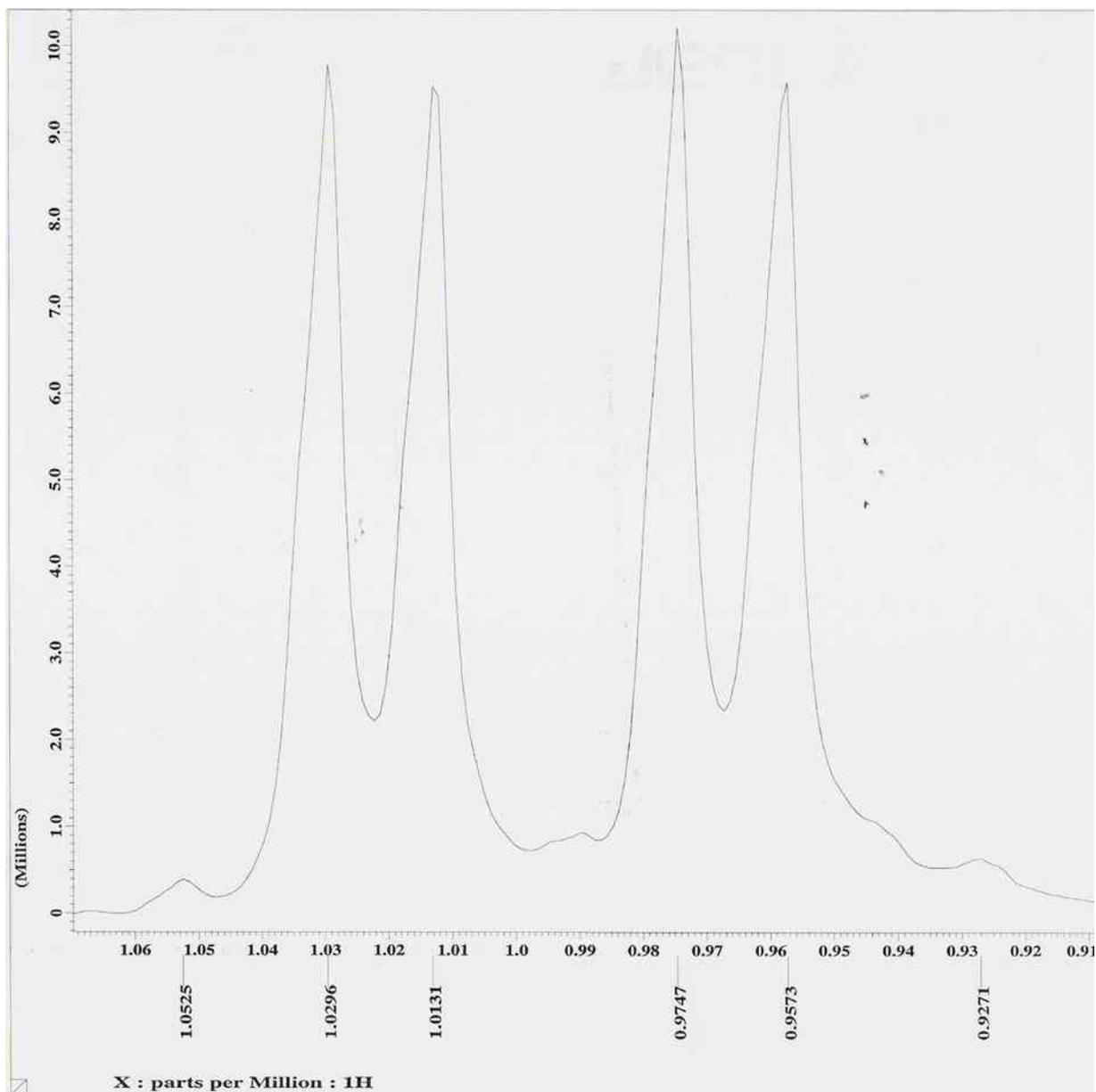


Figura 99 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 0,91-1,05 ppm) da 6',7'-Diidrorotenona

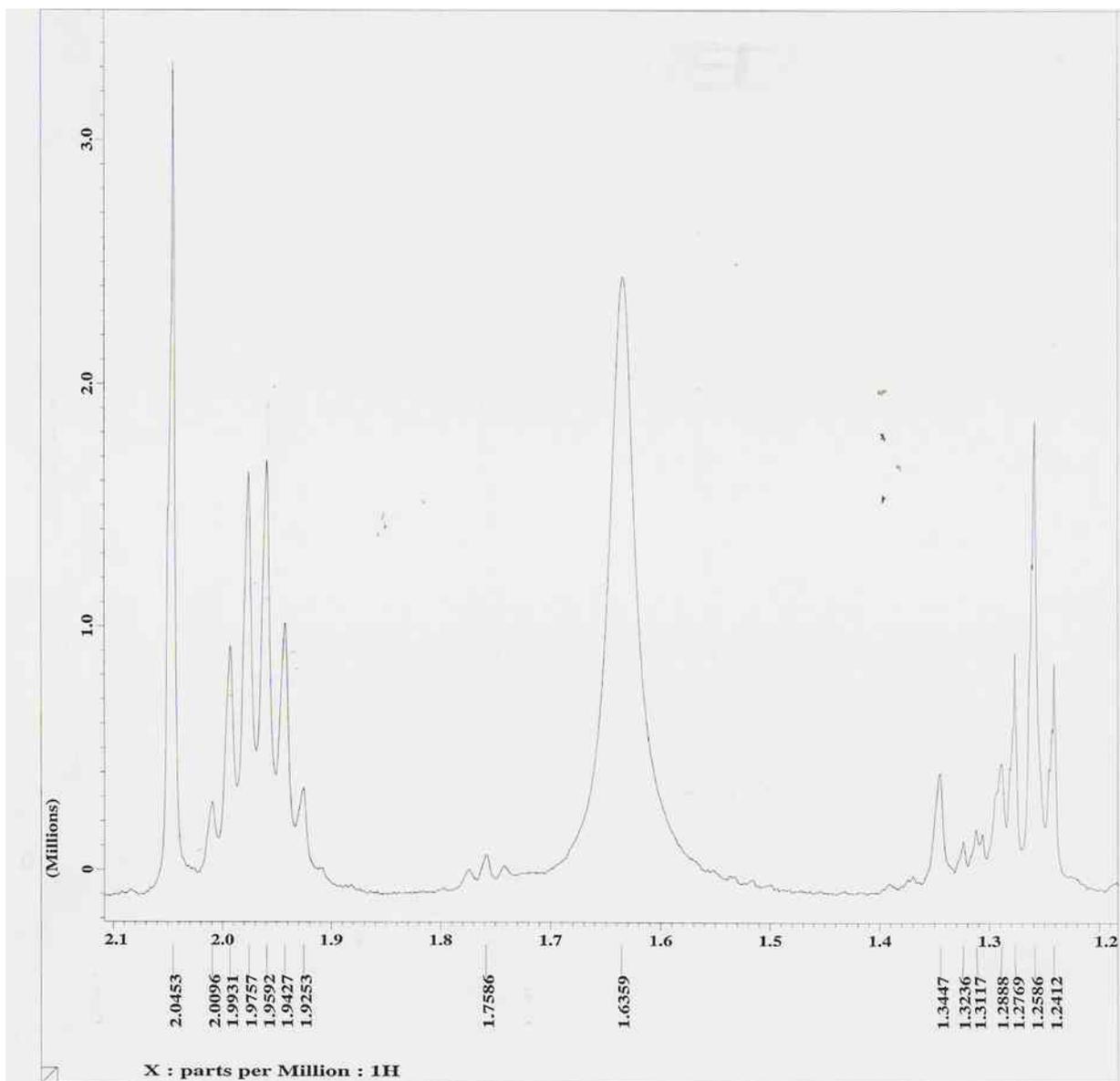


Figura 100 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 1,24- 2,04 ppm) da 6',7'-Dihidrorottenona

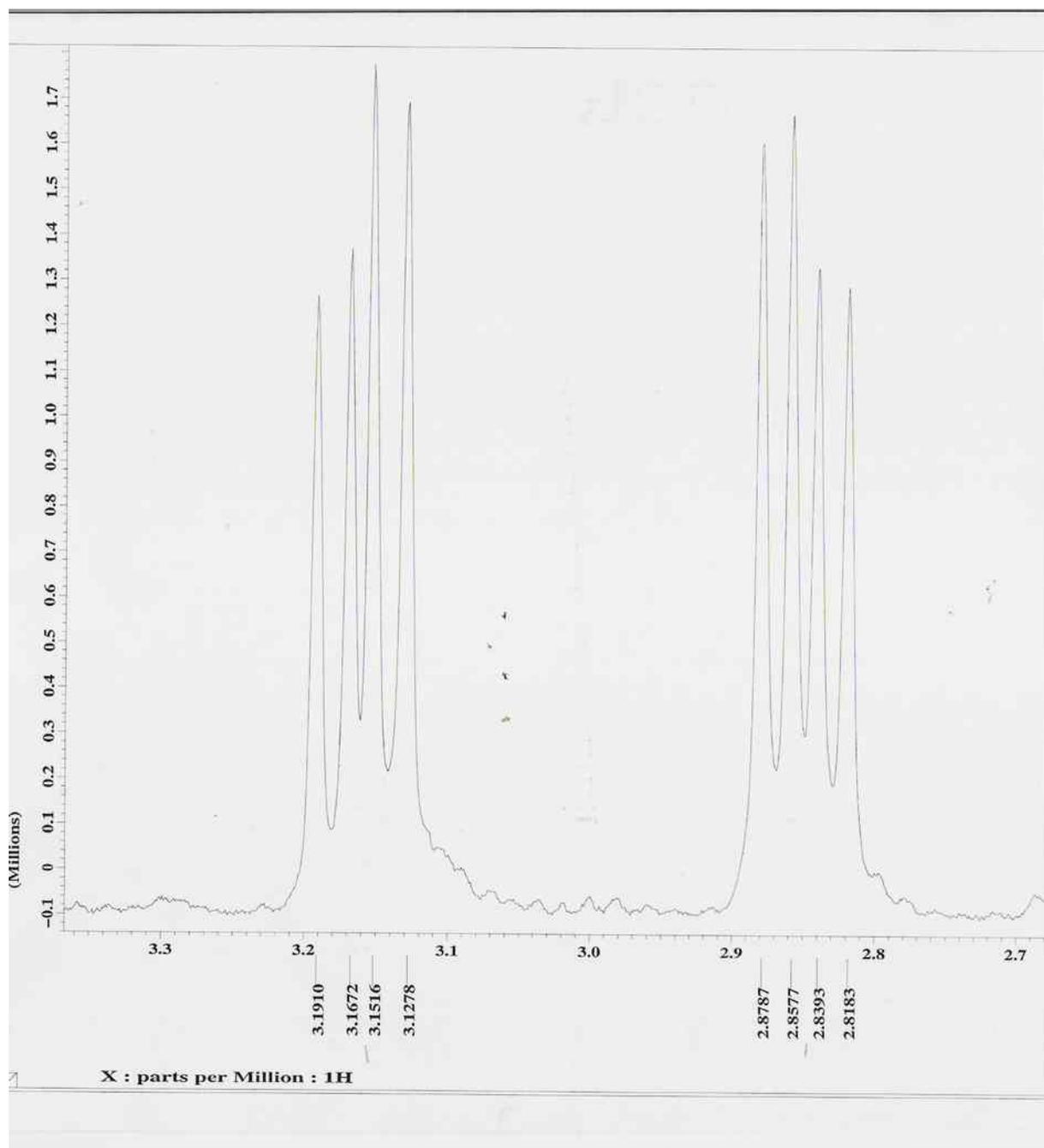


Figura 101 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 2,81- 3,19 ppm) da 6',7'-Dihidrorotenona

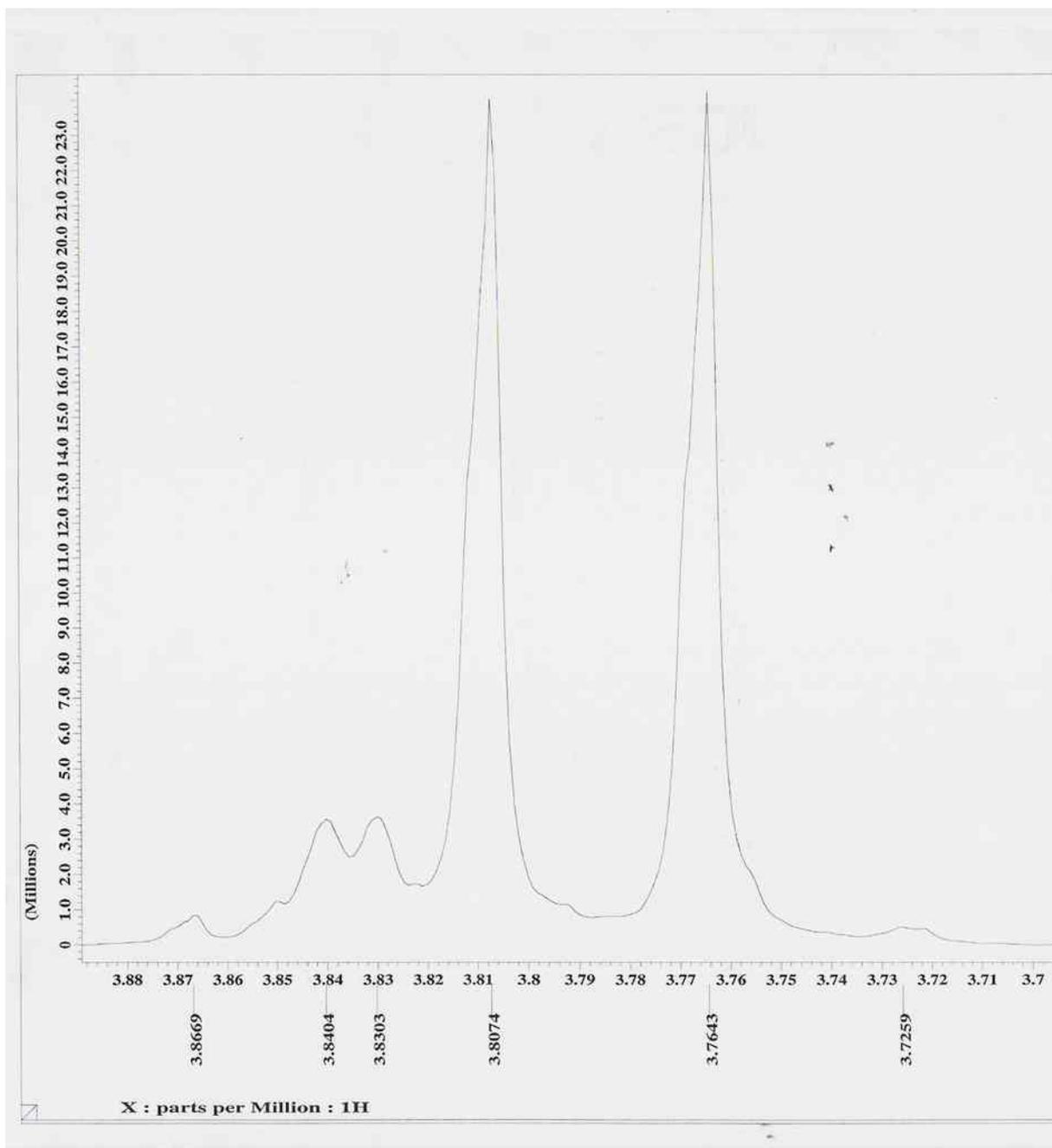


Figura 102 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 3,72- 3,86 ppm) da 6',7'-Diidrorotenona

Figura 103 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 4,09- 4,92 ppm) da 6',7'- Diidrorotenona

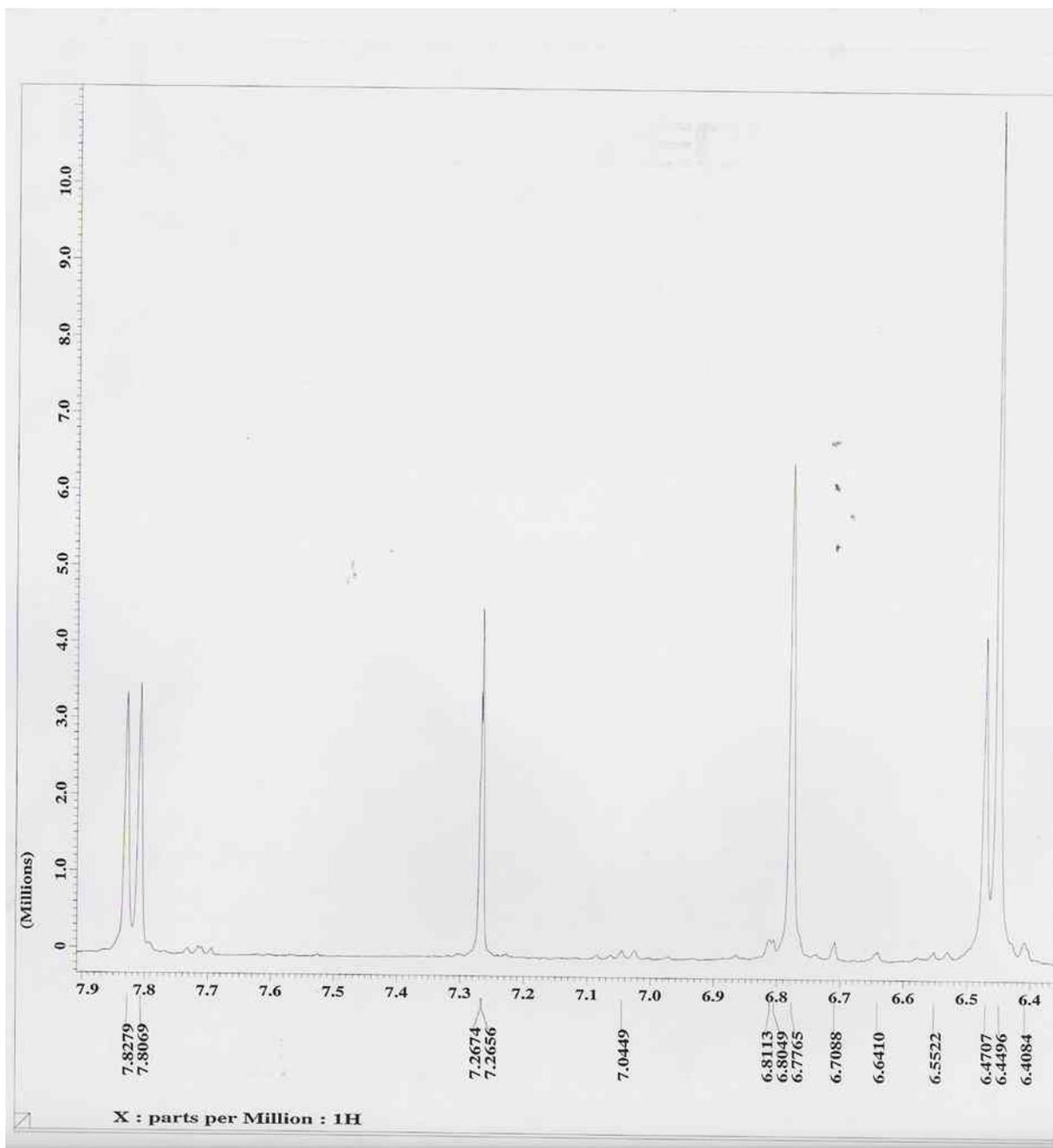


Figura 104 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 6,40- 7,82 ppm) da 6',7'-Dihidrorotenona

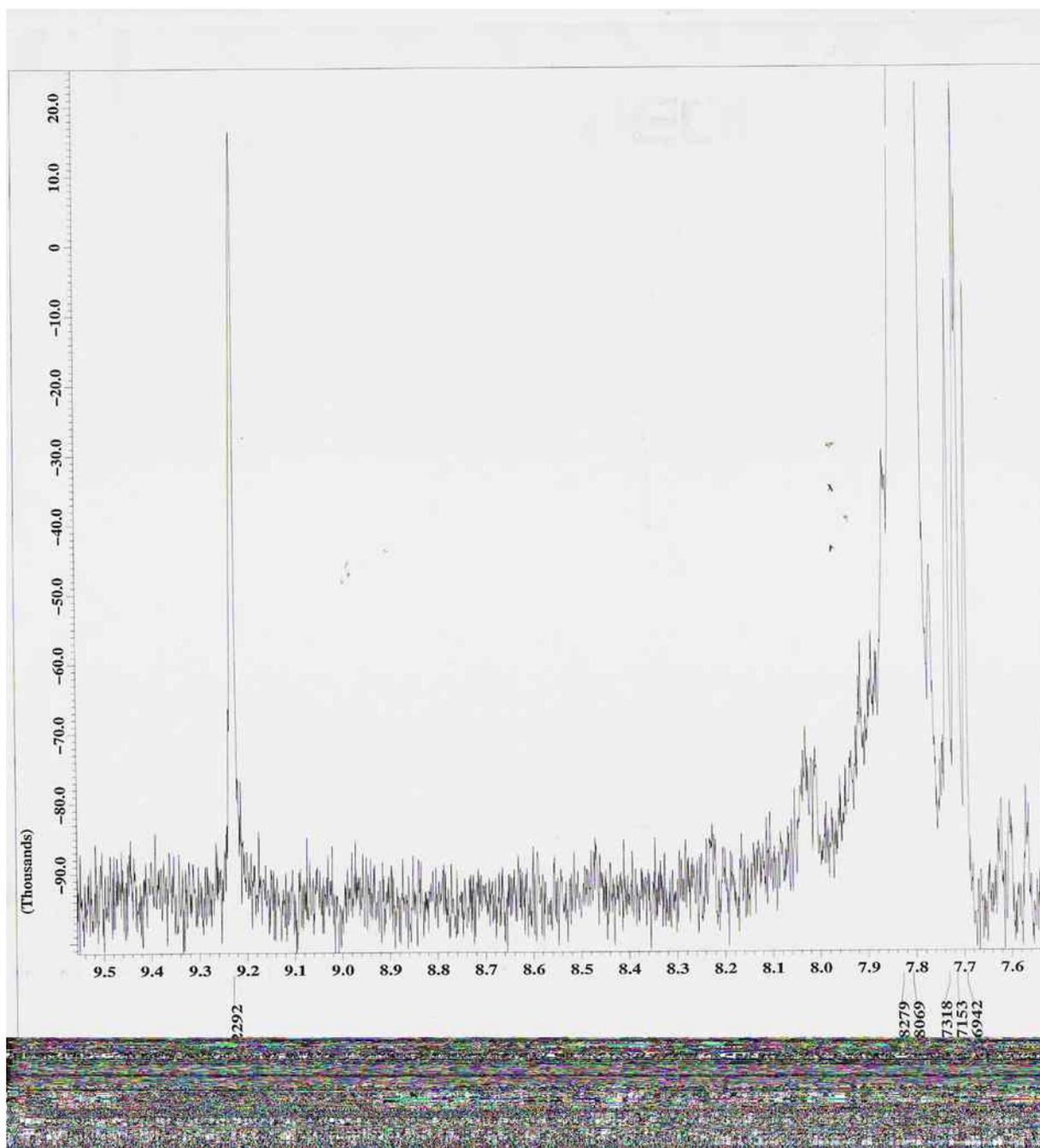


Figura 105 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 7,69- 9,22 ppm) da 6',7' Diidorotenona

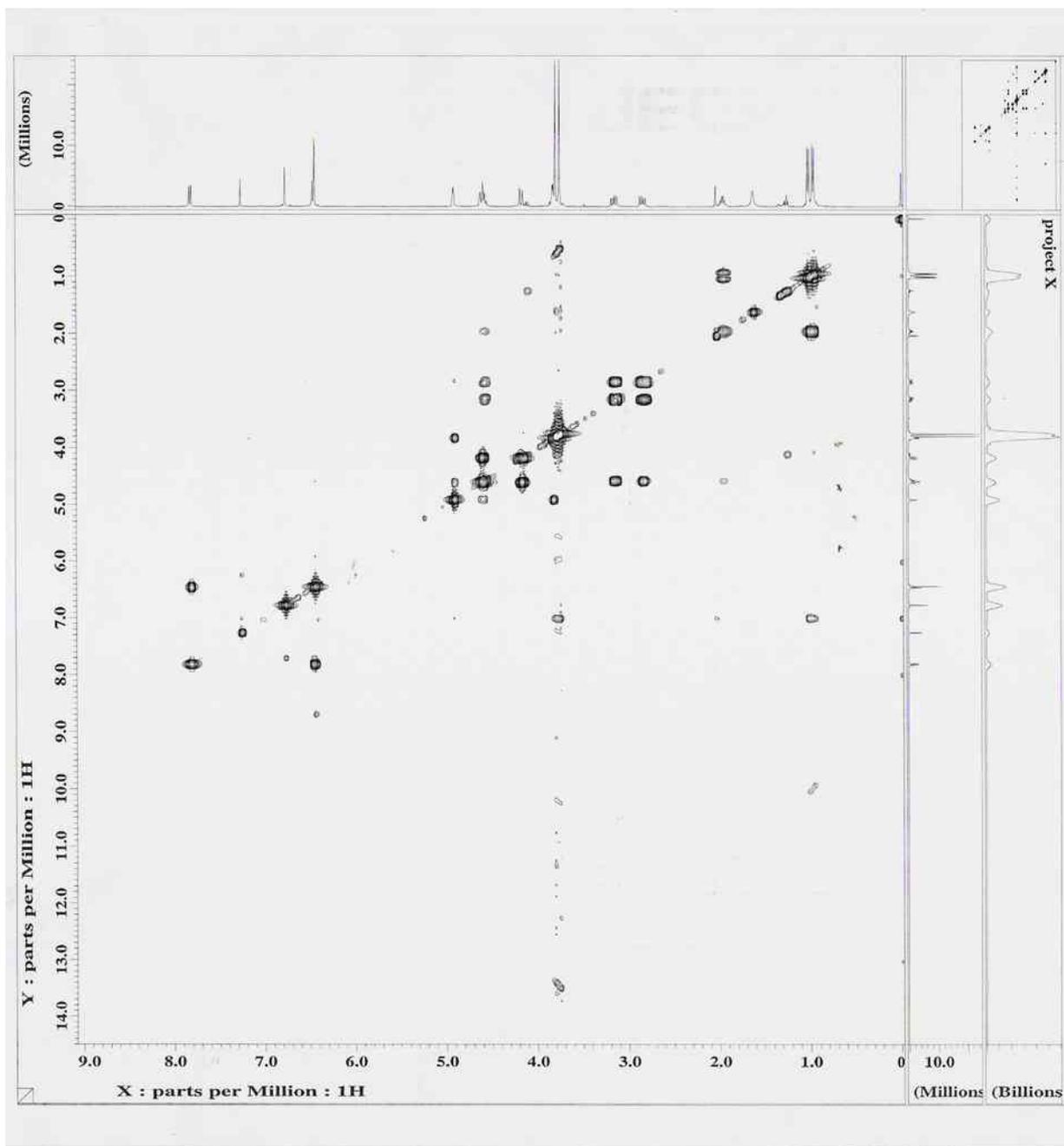


Figura 106 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6',7'-Diidrorotenona

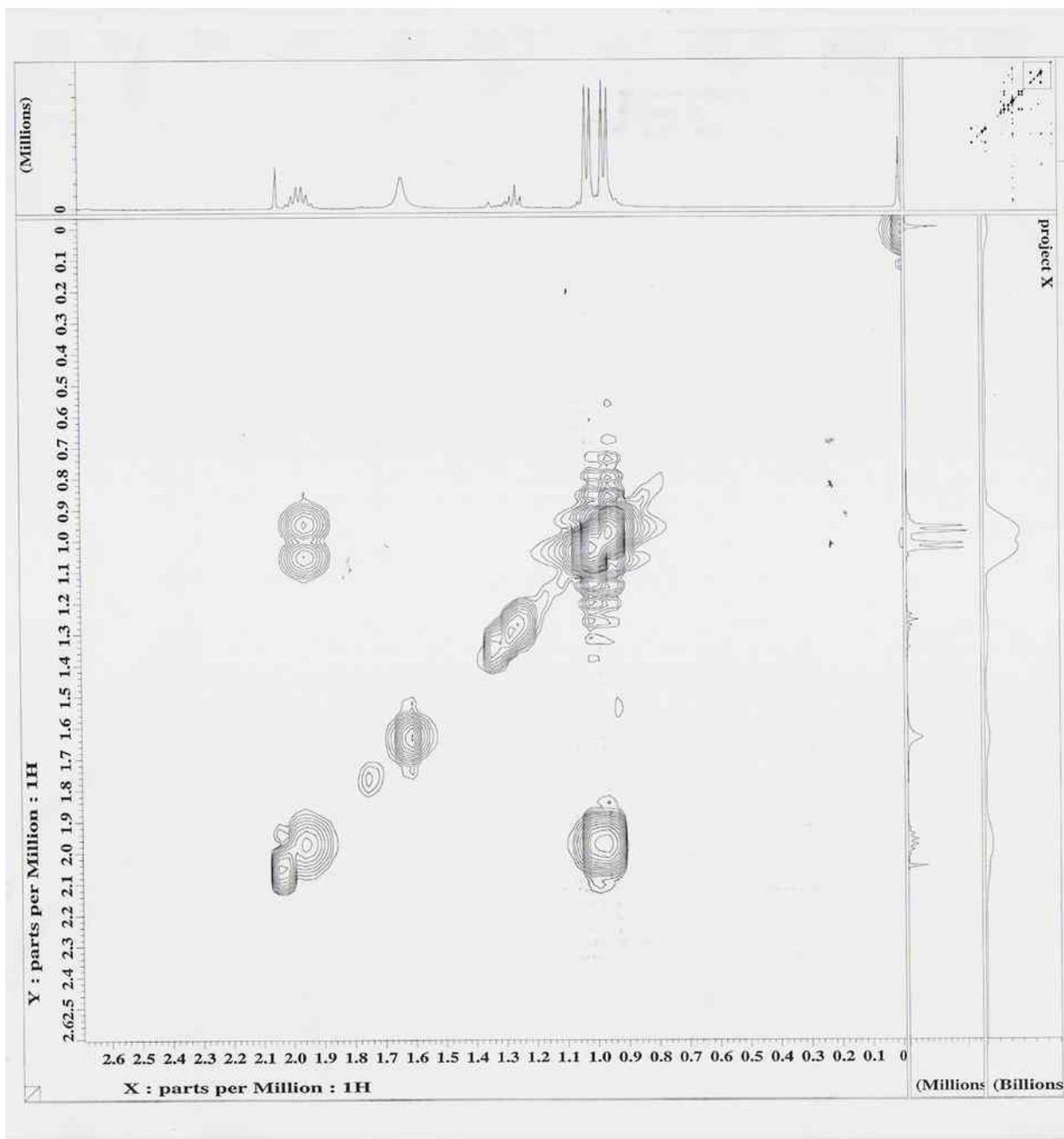


Figura 107 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6',7'-Diidrorotenona

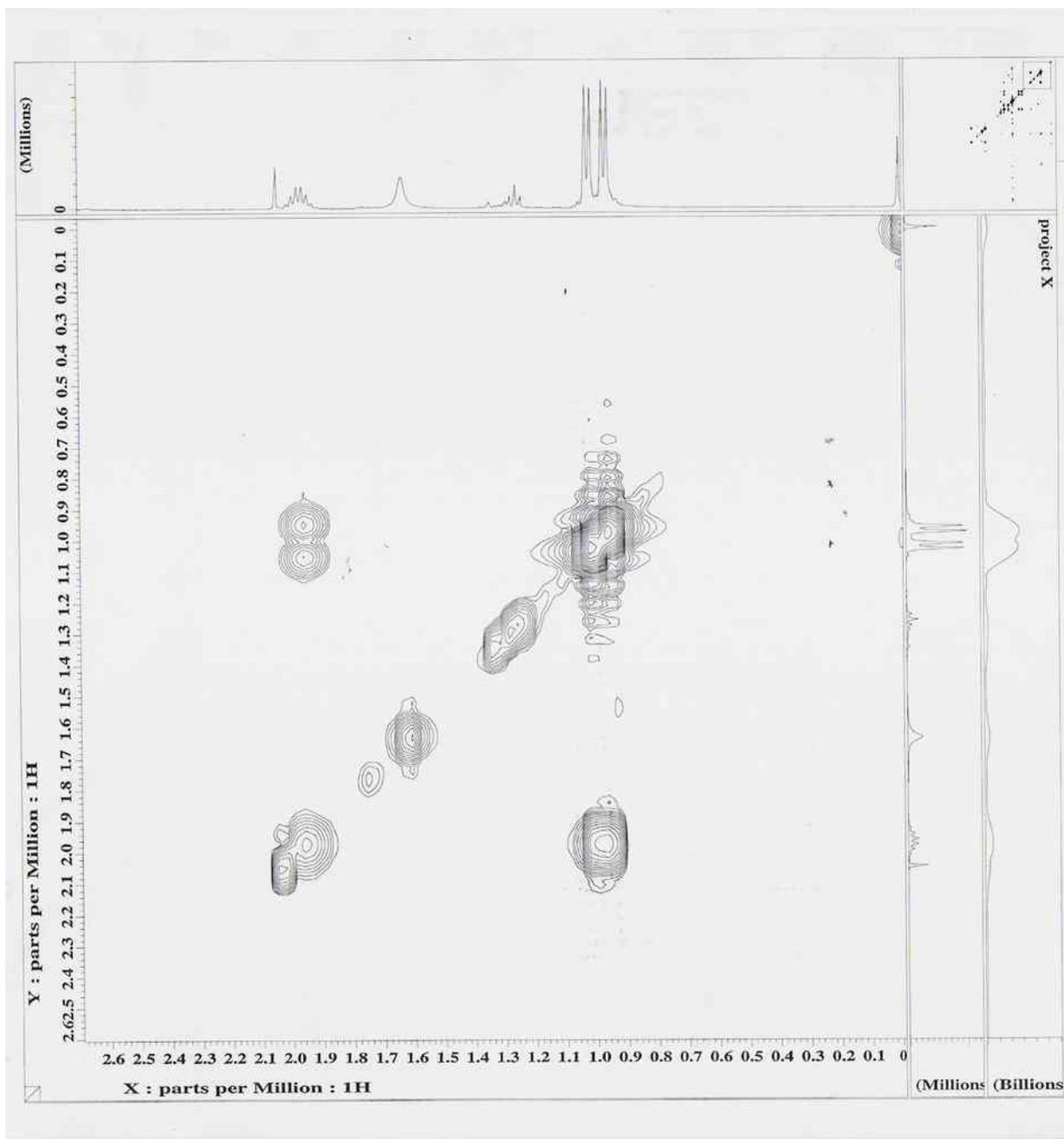


Figura 108 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6',7'-Diidrorotenona

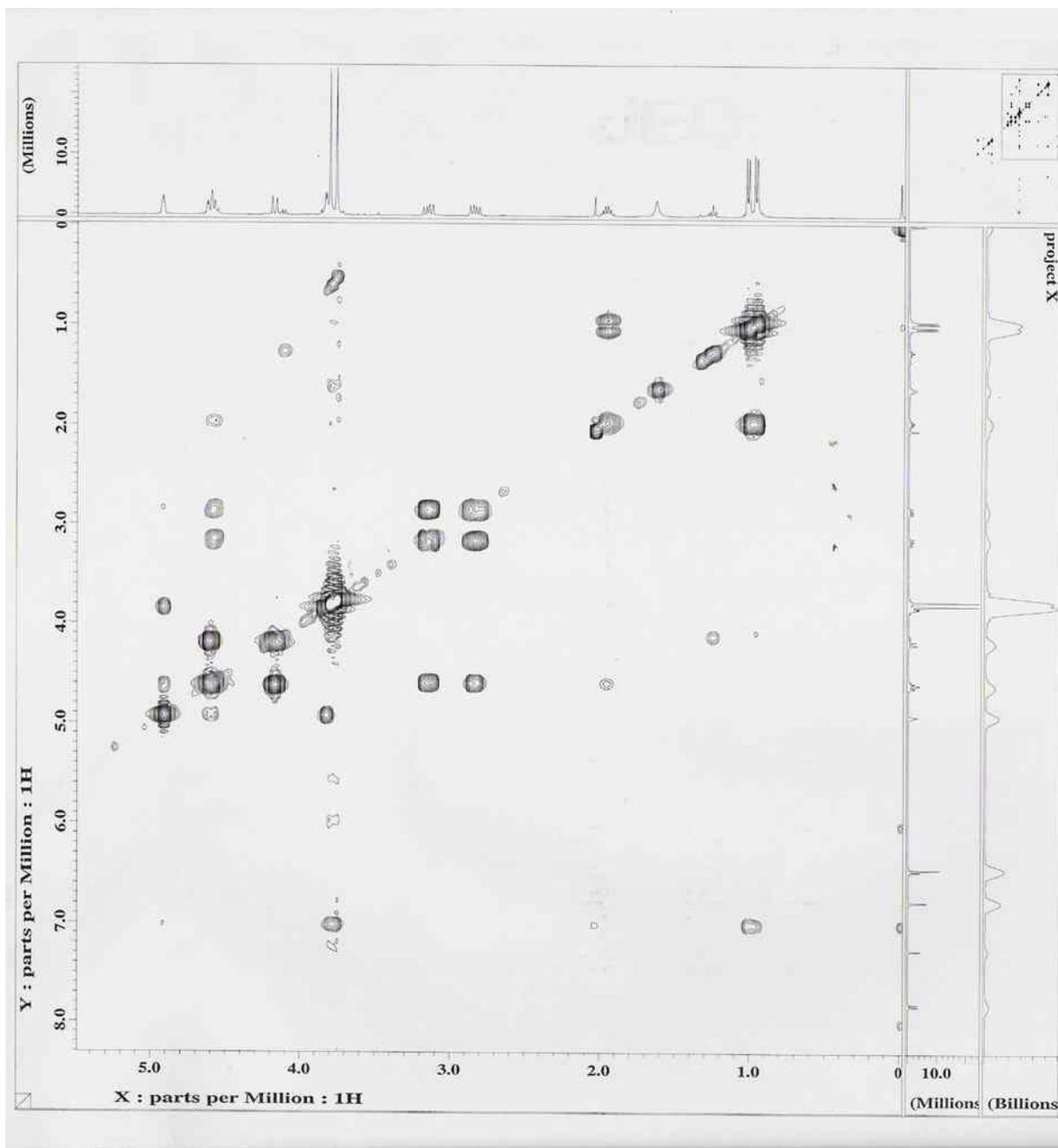


Figura 109 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6',7'-Dihidrorottenona

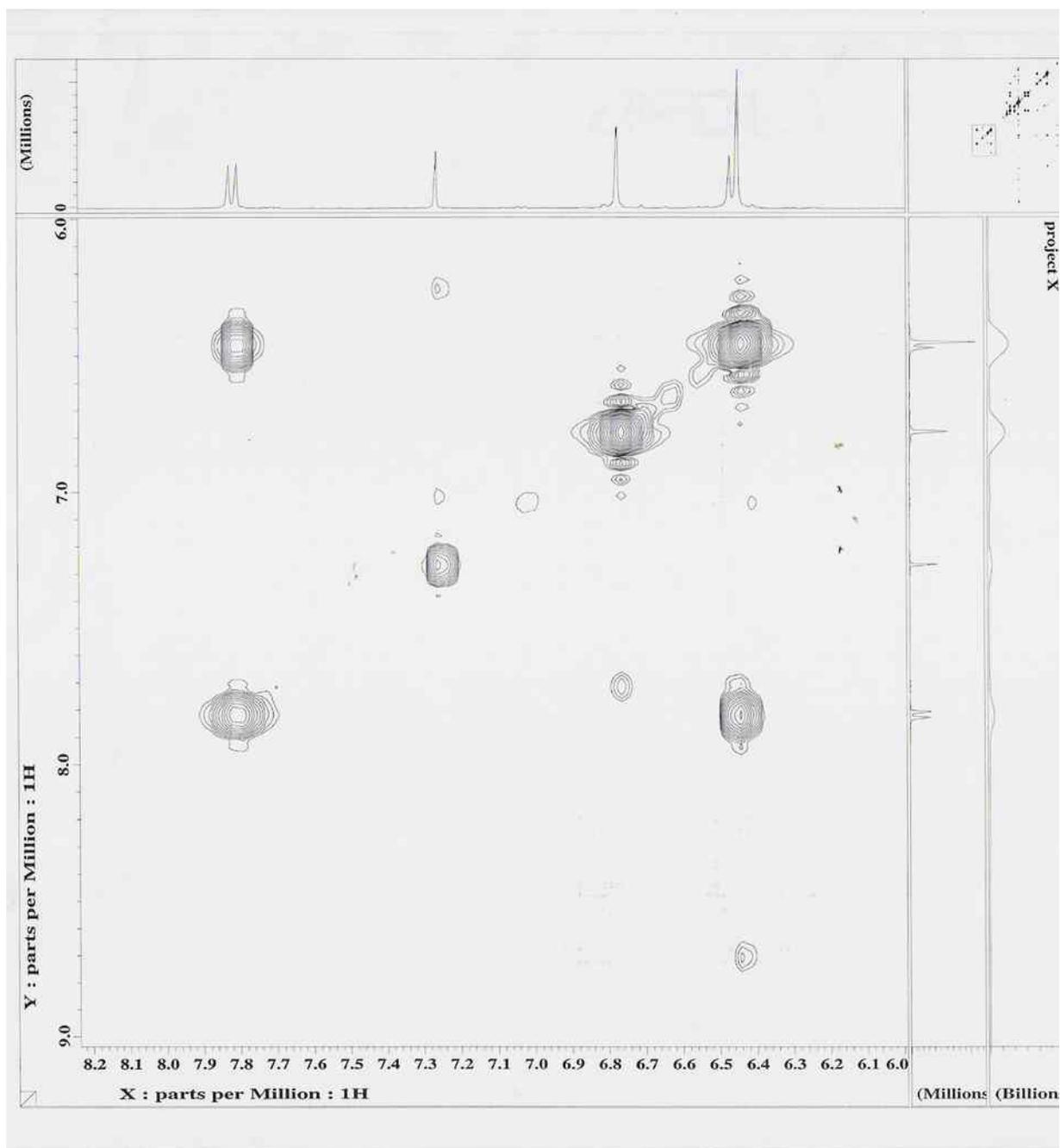


Figura 110 - Mapa de correlação homonuclear COSY ^1H x ^1H da 6',7'-Diidrorotenona

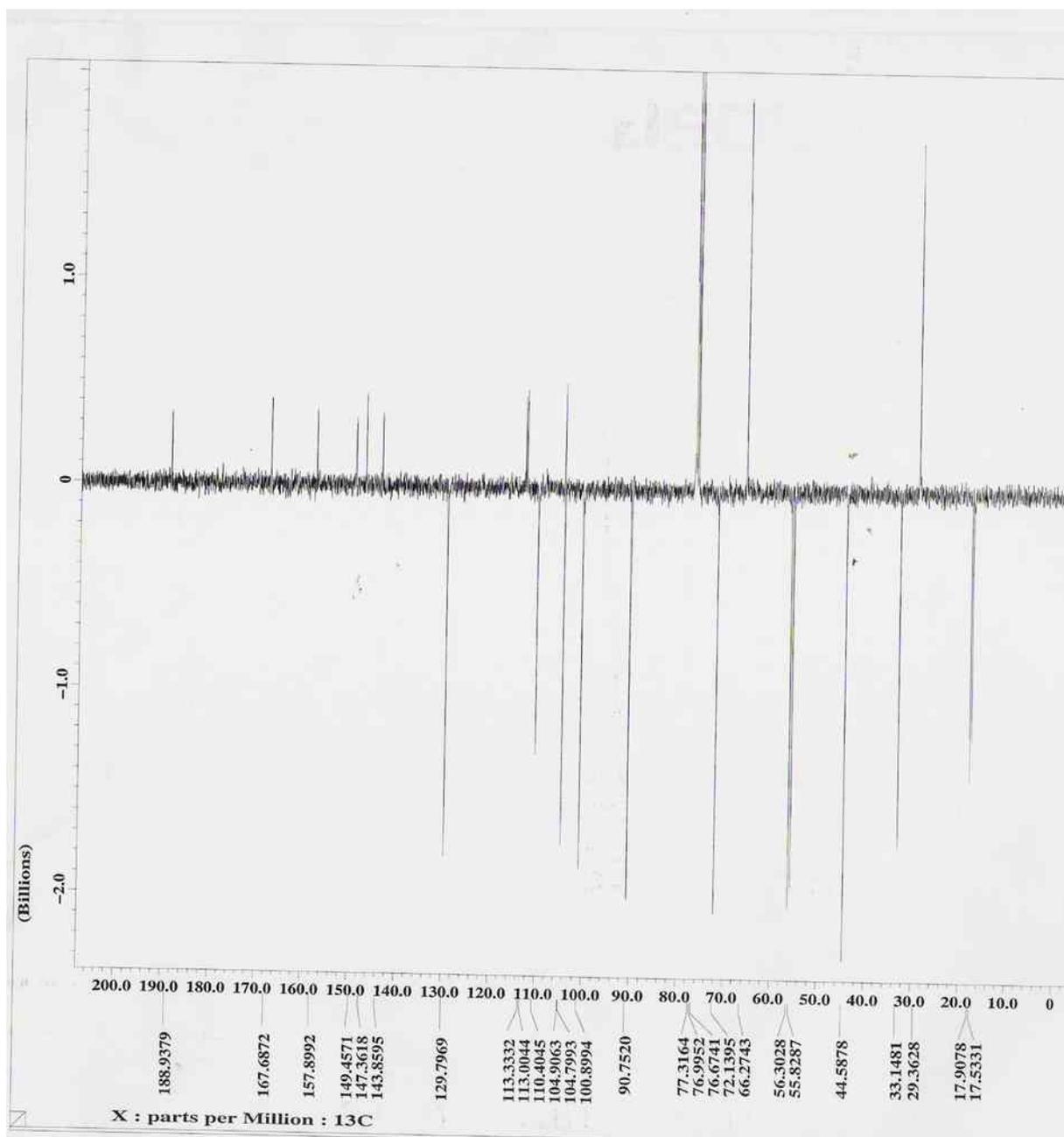


Figura 111 - Espectro de RMN ^{13}C -APT(100 MHz, CDCl_3) da 6',7'-Diidrorotenona

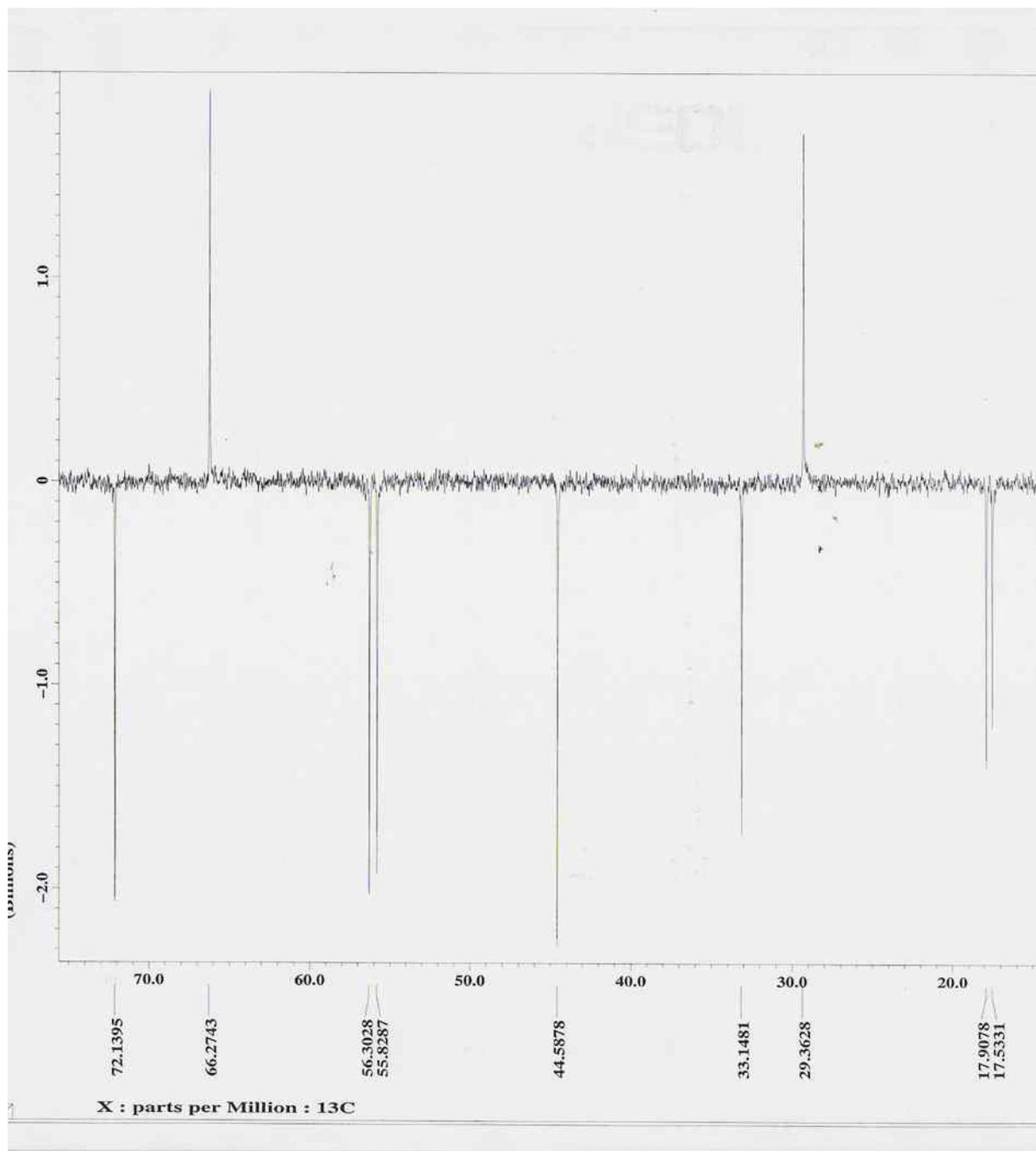


Figura 112 - Espectro de RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃) (Expansão da região entre 20,0- 72,0 ppm) da 6',7'-Diidrorotenona

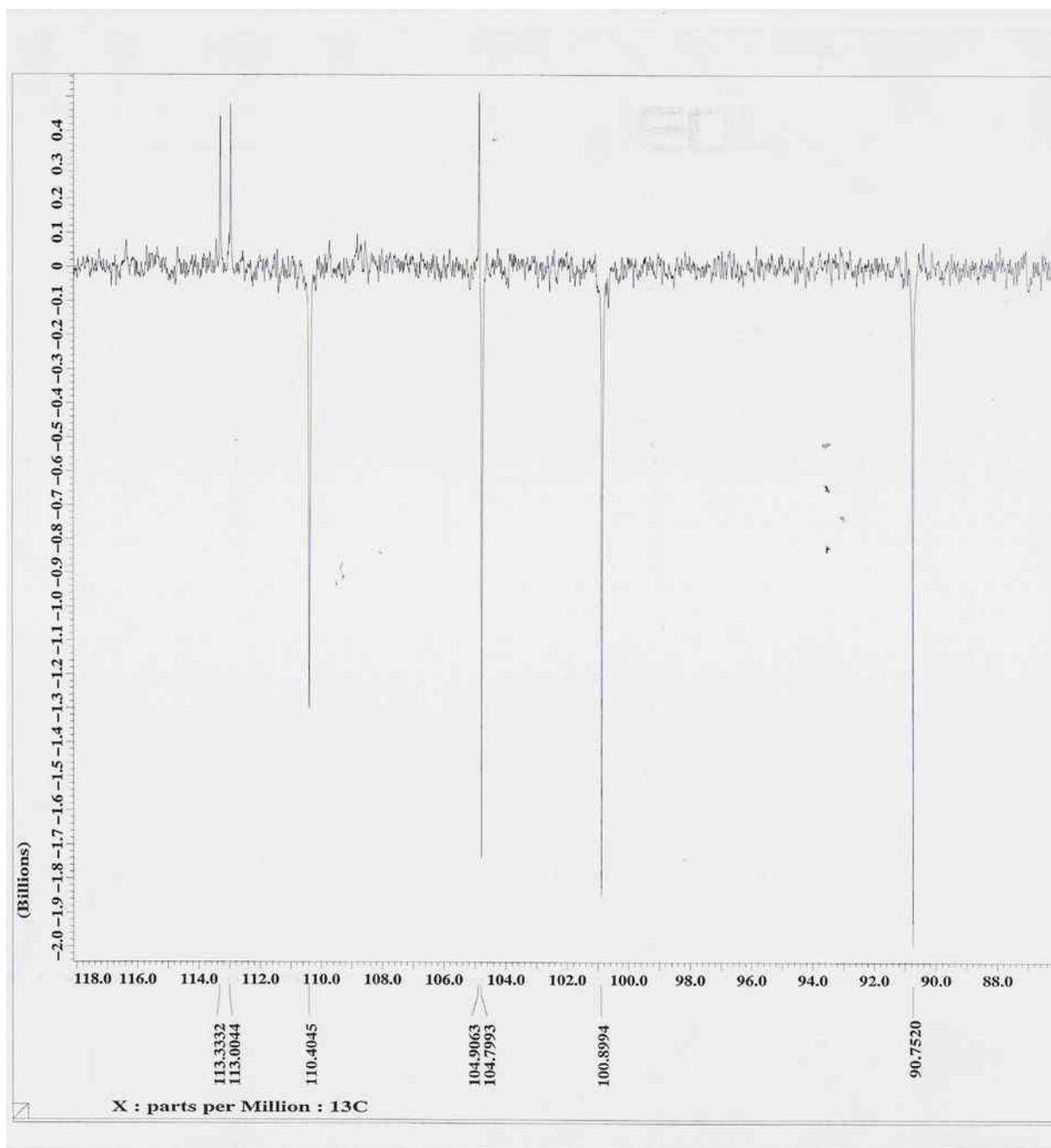


Figura 113 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 88,0- 118,0 ppm) da 6',7'-Diidrorotenona

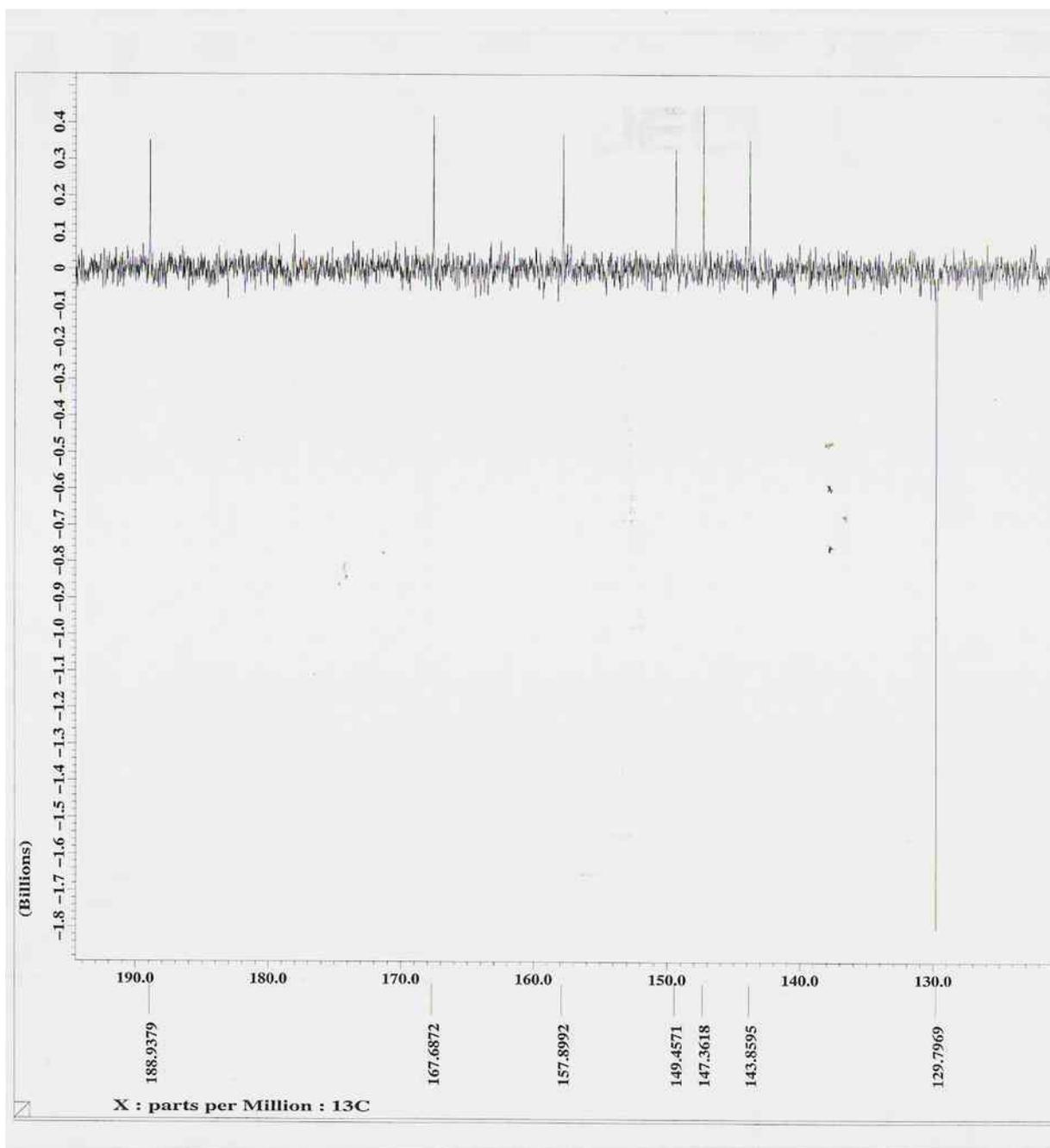


Figura 114 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 130,0- 190,0 ppm) da 6',7'-Diidrorotenona

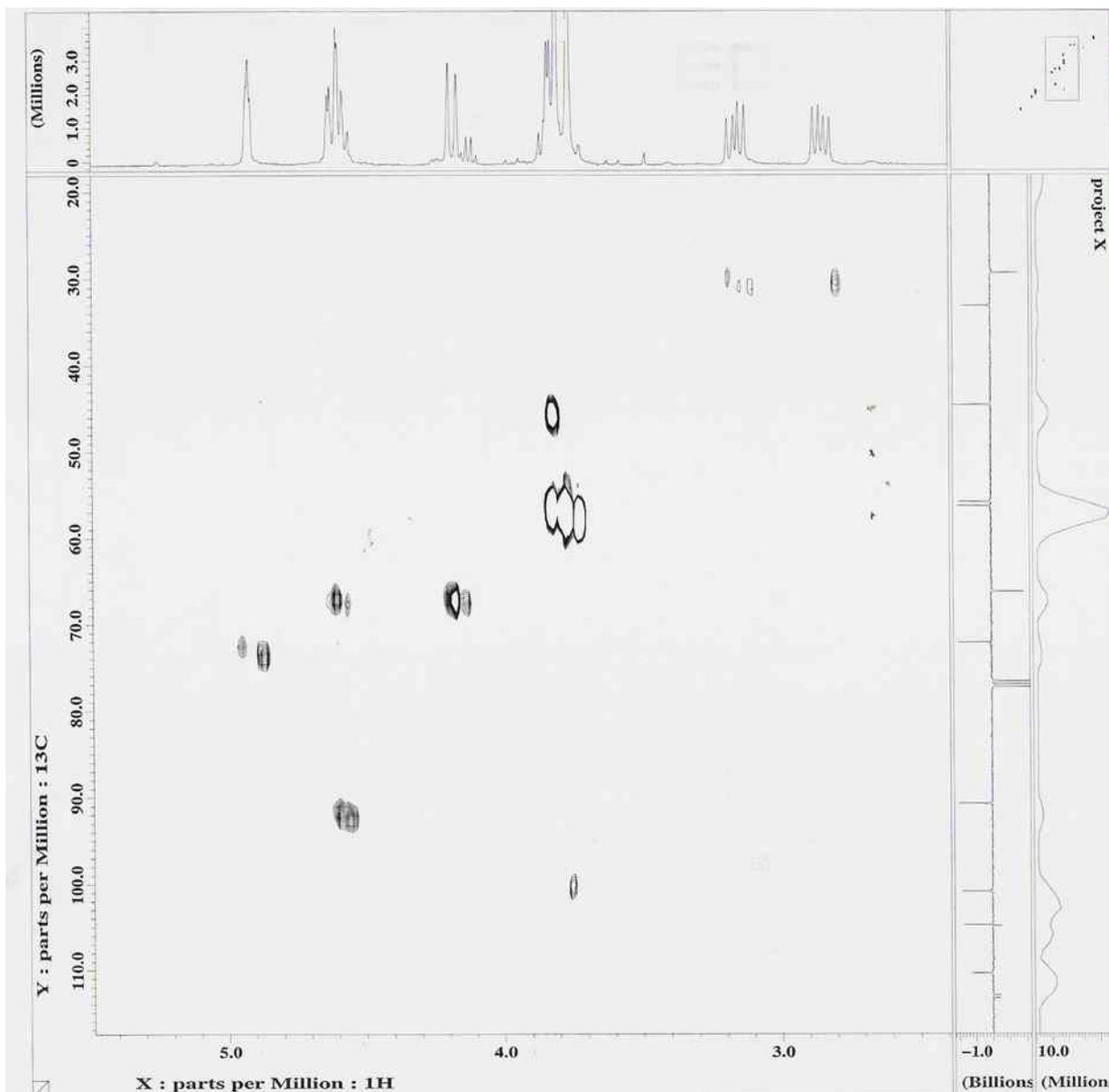


Figura 115 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6',7'-Diidrorotenona

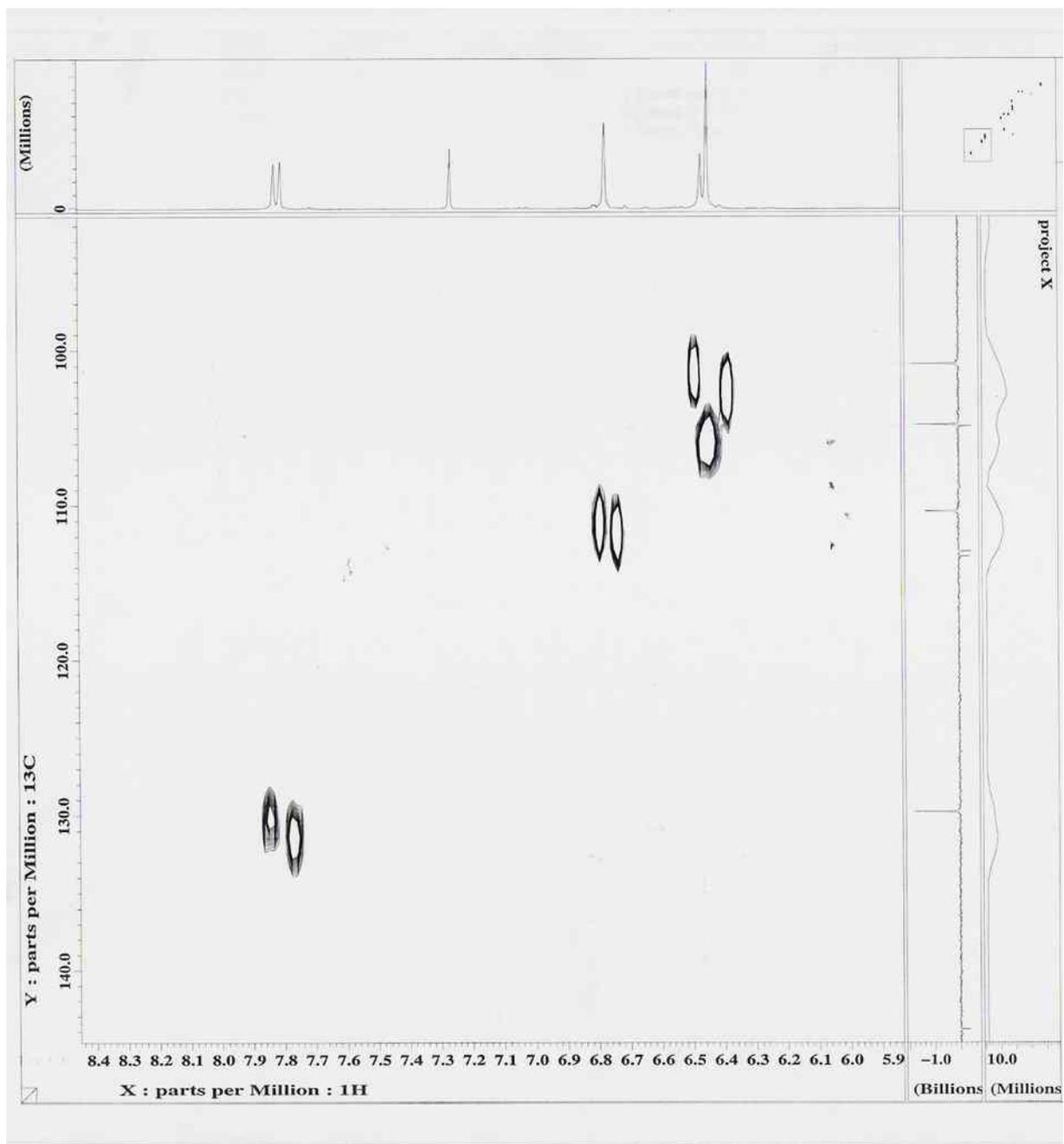


Figura 116 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6',7'-Dihidrotrotenona

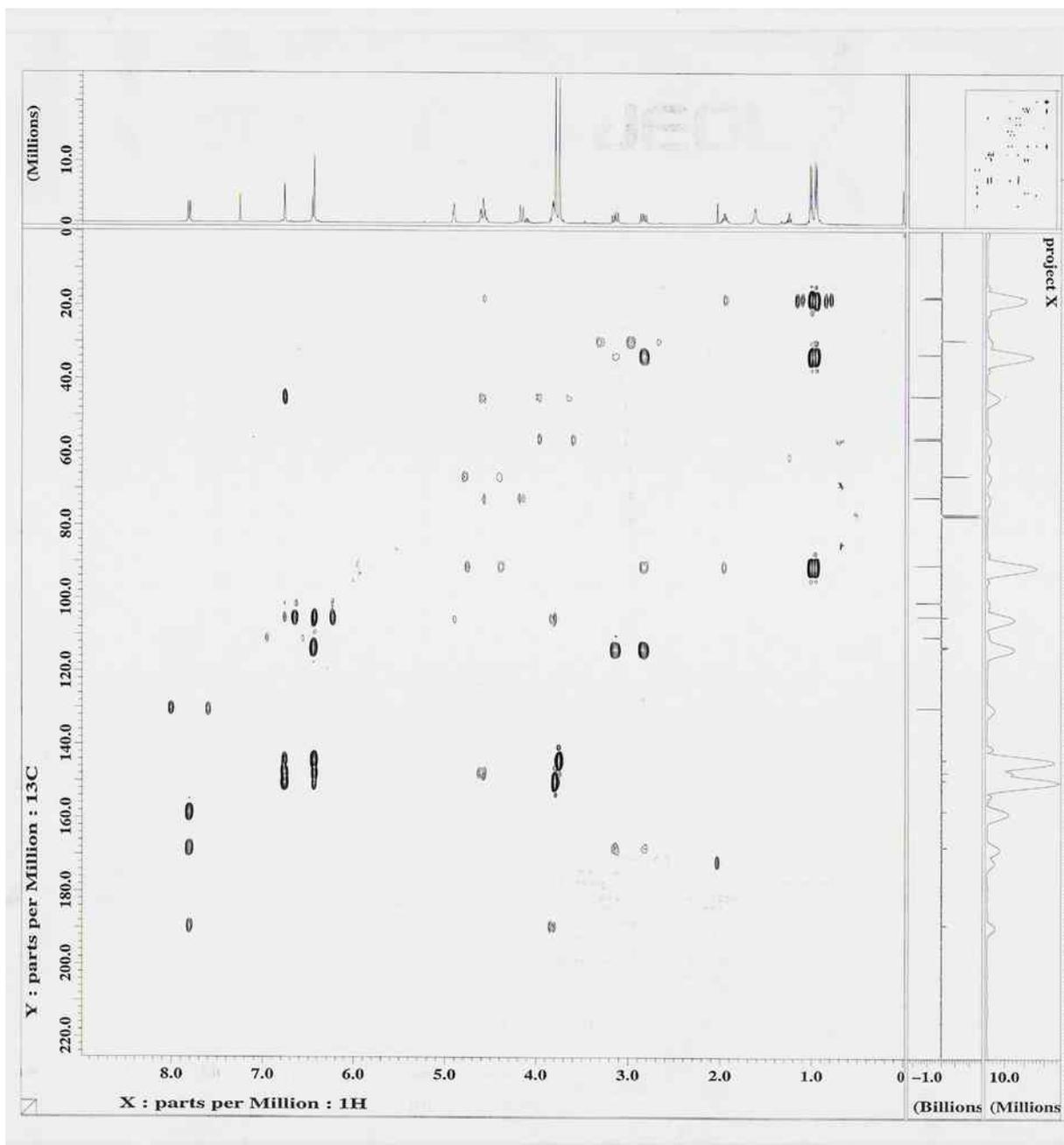


Figura 117 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6',7'-Diidrorotenona

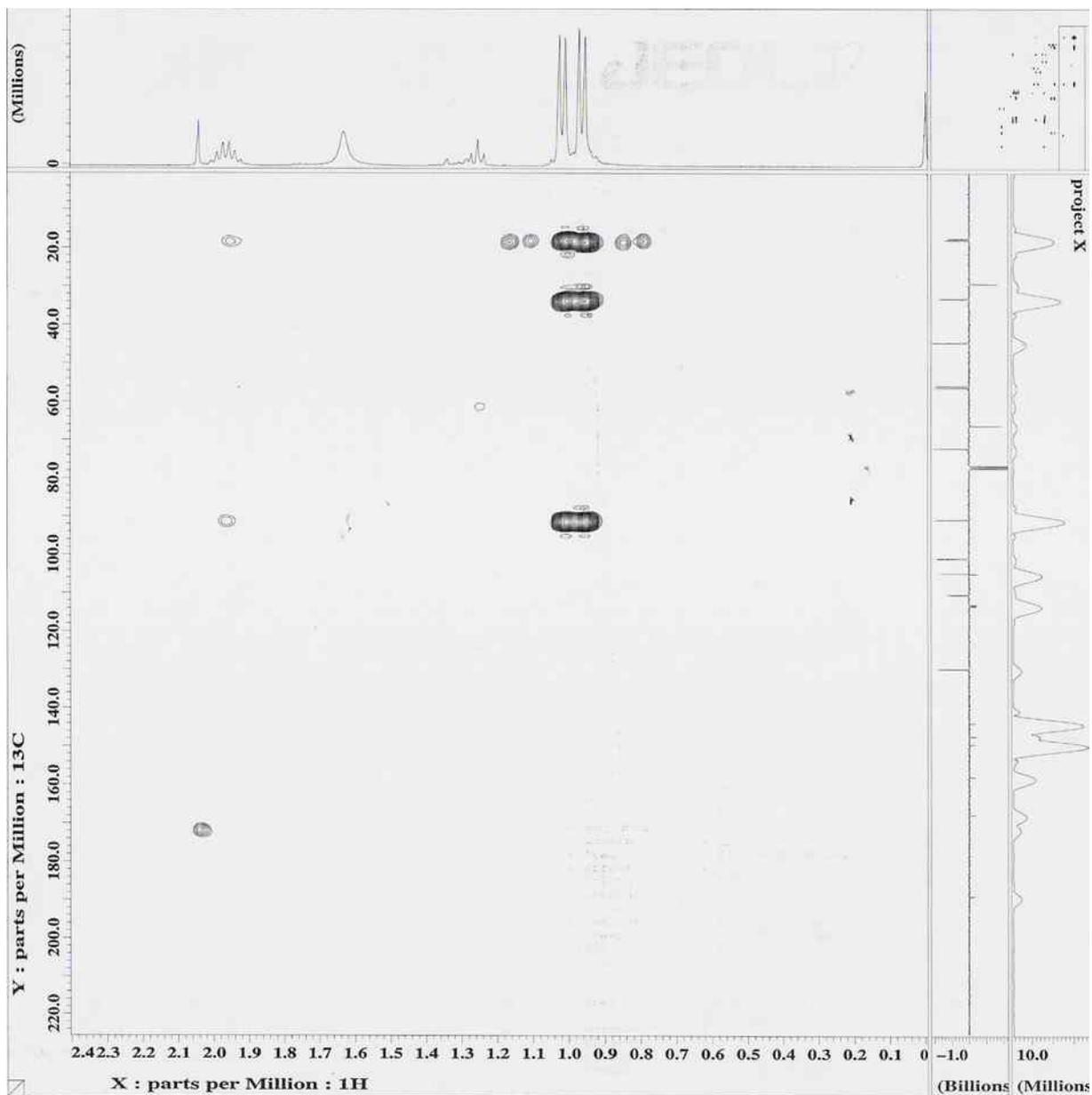


Figura 118 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6',7'-Diidrorotenona

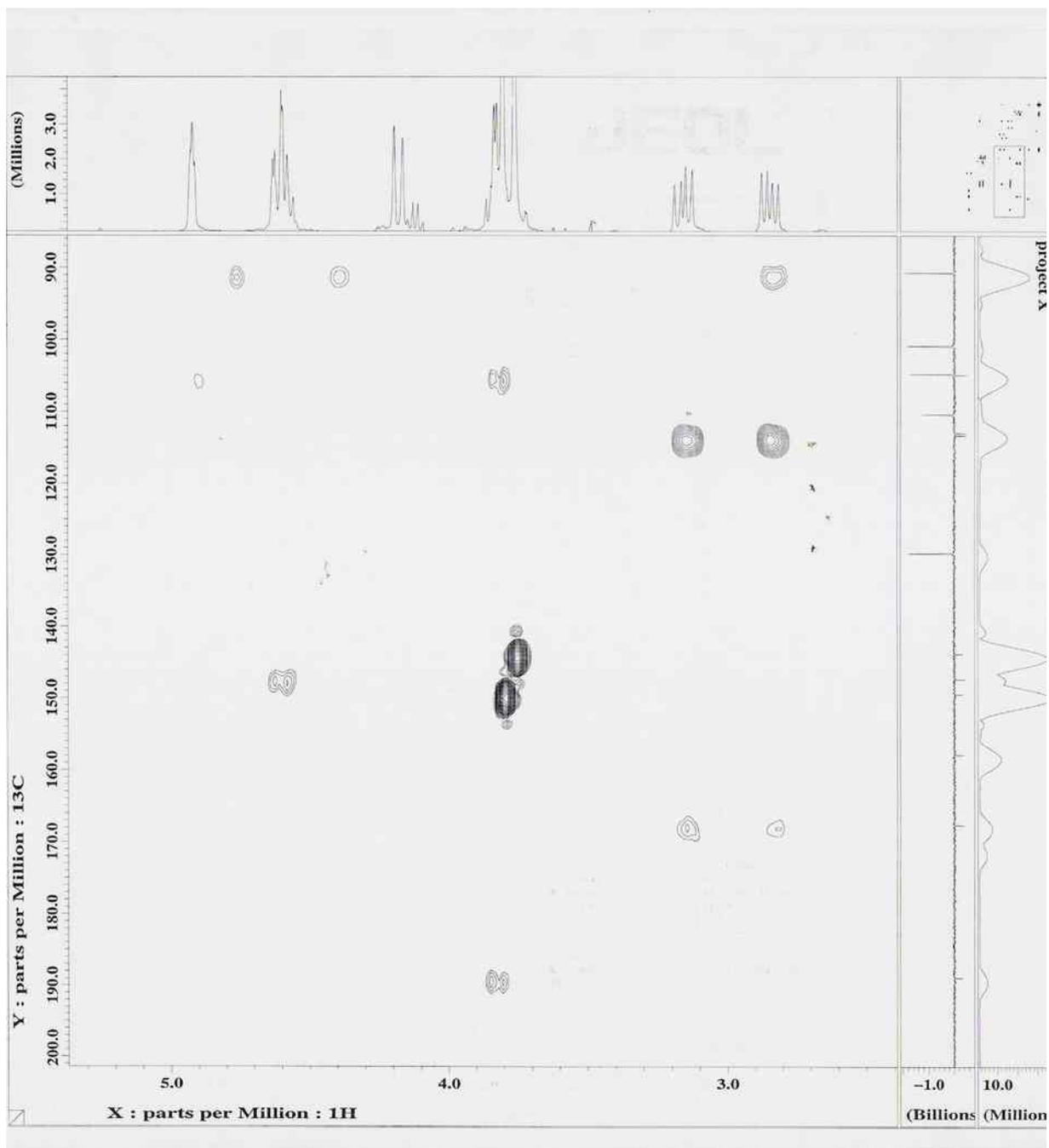


Figura 119 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6',7'-Diidrorotenona

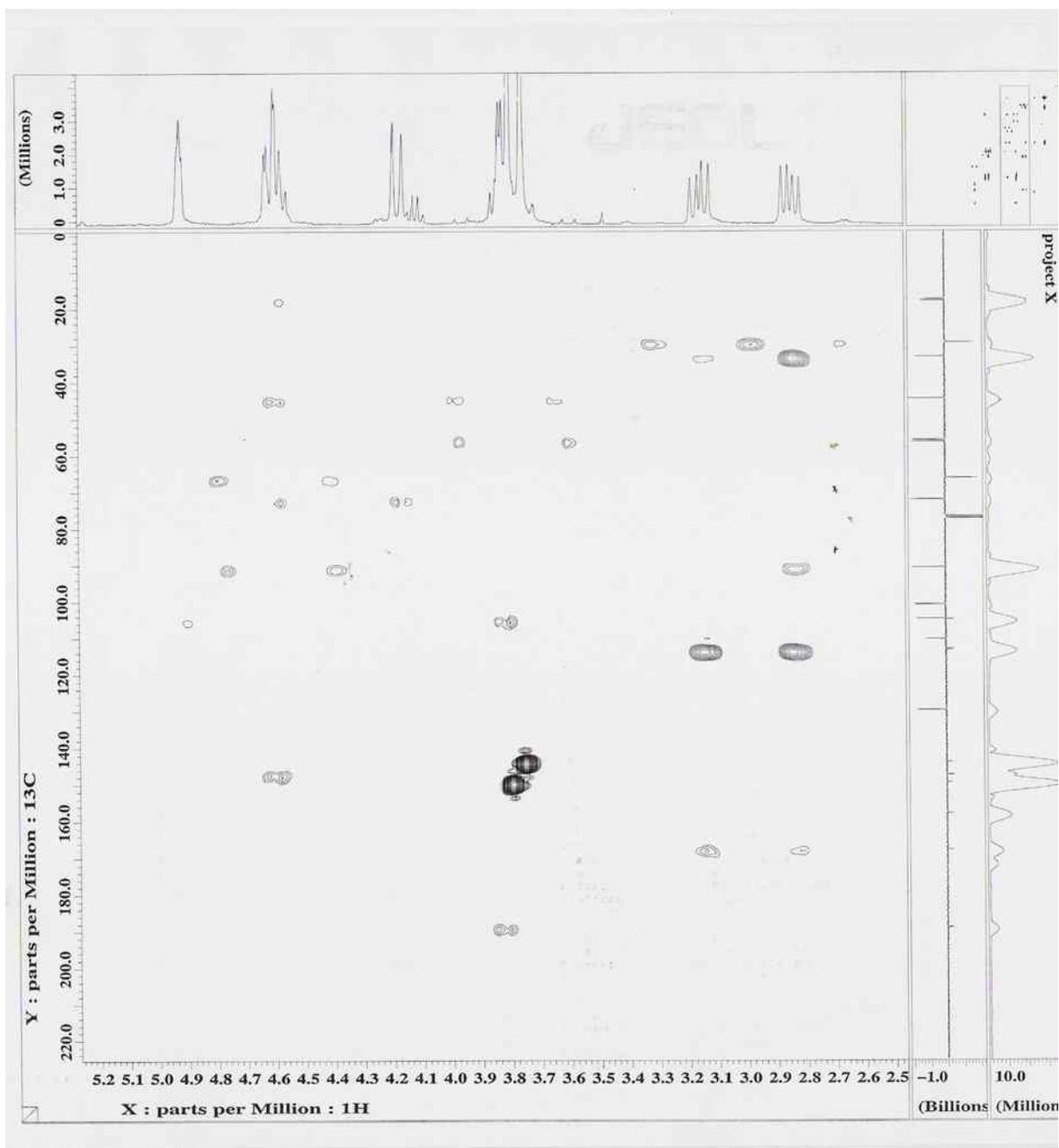


Figura 120 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6',7'-Diidrorotenona

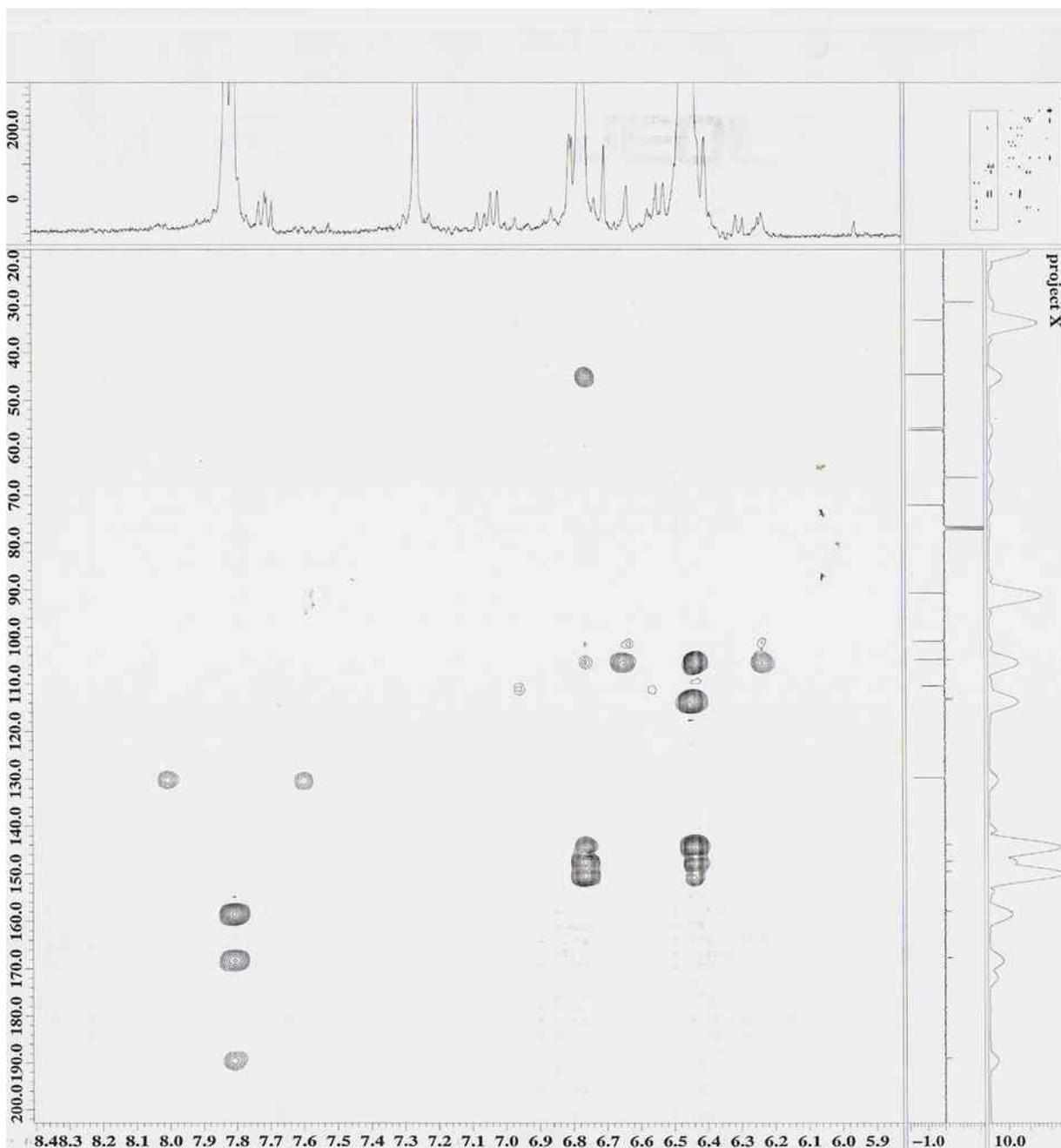


Figura 121 - Mapa de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C (HMBC) da 6',7'-Diidrorotenona

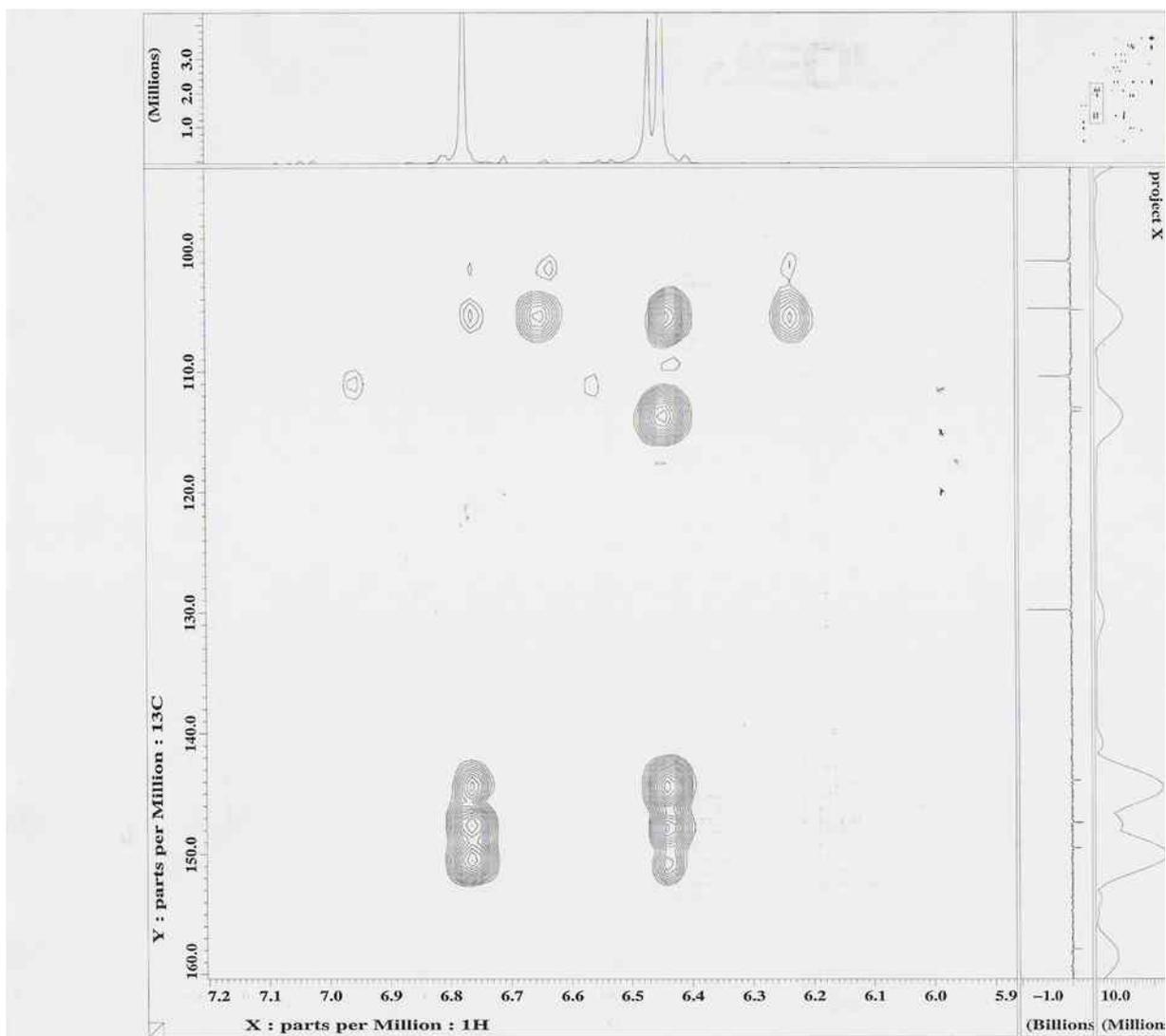


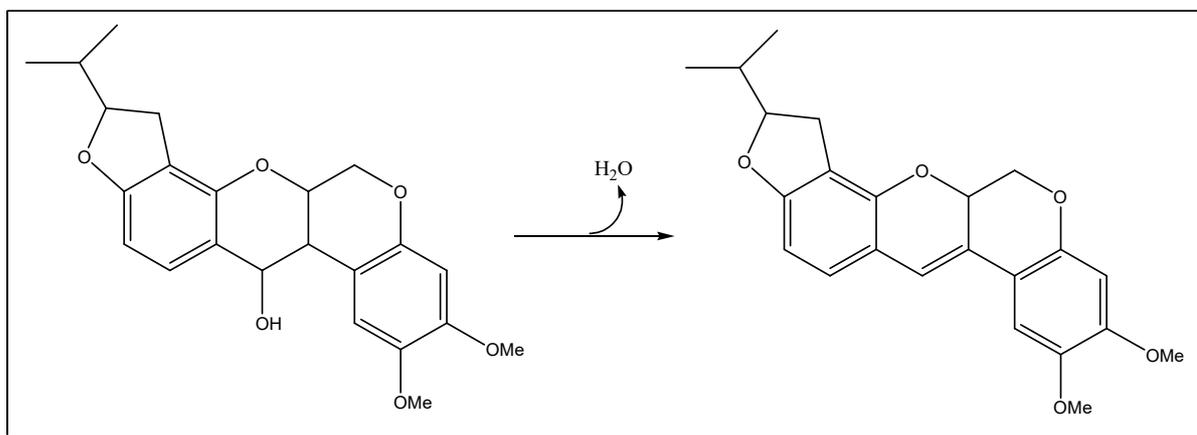
Figura 122 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6',7'-Diidrorotenona

5.2.5 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DA 6',7'- DIIDROROTENONA COM NABH₄

Com o mesmo intuito de se verificar a relação entre a estrutura de rotenóides e a citotoxicidade, a 6',7'- diidrorotenona foi submetida a uma reação de redução com NaBH₄, utilizando como solvente tetraidrofurano/metanol, fornecendo a 6',7'-diidrorotenol, que posteriormente sofreu desidratação originando o 6',7'-diidro-12,12a-desidrorotenona com 98,0% de rendimento.

5.2.6-DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL 6',7'-diidro-12, 12a-DESIDROROTENONA

A estrutura do produto de redução foi caracterizada pelo seu espectro de massas (Figura 124, p.170), o qual apresentou pico do íon molecular a m/z 398 compatível com a fórmula molecular C₂₃H₂₆O₆. O espectro apresentou também o fragmento a m/z 192, proveniente da decomposição do tipo retro Diels-Alder, que originou os fragmentos a m/z 191 e m/z 177 relativo a perda de um hidrogênio e de uma metila respectivamente. O fragmento a m/z 380 é devido a perda de uma molécula de água do íon molecular (Figura 124, p.170).



Esquema 14 - Produto de desidratação

Posterior análise através de técnicas de RMN, mostrou que o produto de redução sofreu desidratação, possivelmente devido ao contato prolongado com traços de ácido contido no CDCl₃.

O produto de desidratação foi confirmado através da observação dos deslocamentos químicos dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , bem como as correlações hetero e homonucleares existentes entre os carbonos adjacentes ao anel heterocíclico C.

A dupla ligação em C-12 e C-12a esta caracterizada pelo sinal duplo do H-12 a δ_{H} 6,61 (d ; $J=2,0$) relativo ao acoplamento alílico com H-6a δ_{H} 5,28. Esta atribuição pode ser confirmada através do mapa de correlação homonuclear (COSY) (Figura 133, p.179).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 135, p.181) mostra as absorções relativas ao anel C a δ_{c} [C-6a (70,94); C-7 (150,23); C-11a (113,28); C-12 (112,80) e C-12a (123,0).

O mapa de correlação heteronuclear permitiu a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono, principalmente os não hidrogenados, revelando de forma clara o acoplamento entre os átomos de carbono (C-7) e os hidrogênios (H-11 e H-12); o carbono (C-6a) e o hidrogênio (H-12); o carbono (C-12a) e os hidrogênios (H-1 e 2H-6); o carbono (C-11a) e os hidrogênios (H-10 e H-11).

A atribuição completa para a molécula foi feita através de comparação com dados da literatura (Tallent,1973) e dados de espectro de RMN (Tabela 14, p.169).

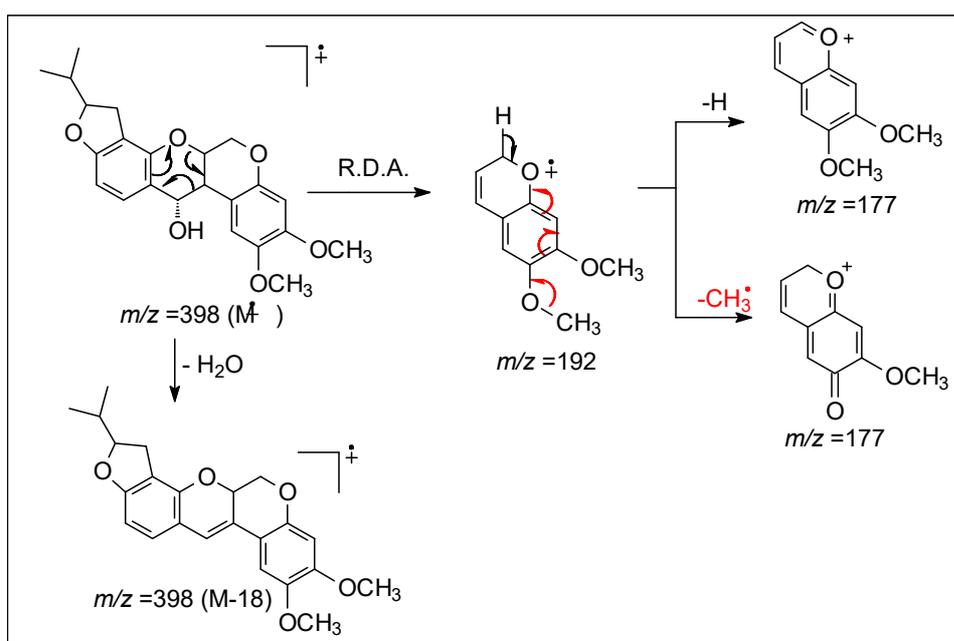


Figura 123-Proposta de fragmentos de massa para o 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

Tabela 14 – Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) do 6',7'-diidro-12,12a-desidrórótenona em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) MHz. Tallent, 1973.

	δ_{C}	δ_{H}	HMQC $^2J_{\text{CH}}$	HMBC $^3J_{\text{CH}}$
C				
1a	116,39			
2	144,66			
3	149,09			
5	149,33			
7	150,23			H-11; H-12
8	110,86			
9	161,46			
11a	113,28		H-11	H-10
12a	123,00		H-6a	H-1; H-2; H-6
CH				
1	105,14	7,00 (s)		
4	100,54	6,42 (s)		
6a	70,94	5,28 (ddd, $J=2,4$; 5,2 e 10,8)		H-12
10	102,65	6,36 (s)		
11	126,88	6,84 (d, $J=8,4$)		H-12
12	112,12	6,61 (d, $J=2,0$)		H-11
5'	89,43	4,51 (m)		
6'	33,18	1,98 (m)		
CH₂				
6	67,33	4,24 (dd, $J=9,78$ e 10,86); 4,55 (m)		
4'	29,72	2,87 ($J=8,4$; 15,60)		
		3,12 ($J=8,4$; 15,60)		
CH₃				
7'	18,18	0,98 (d, $J=6,80$)		
8'	17,68	1,04 (d, $J=6,40$)		
CH₃O				
	56,37	3,90 (s)		
	55,95	3,86 (s)		

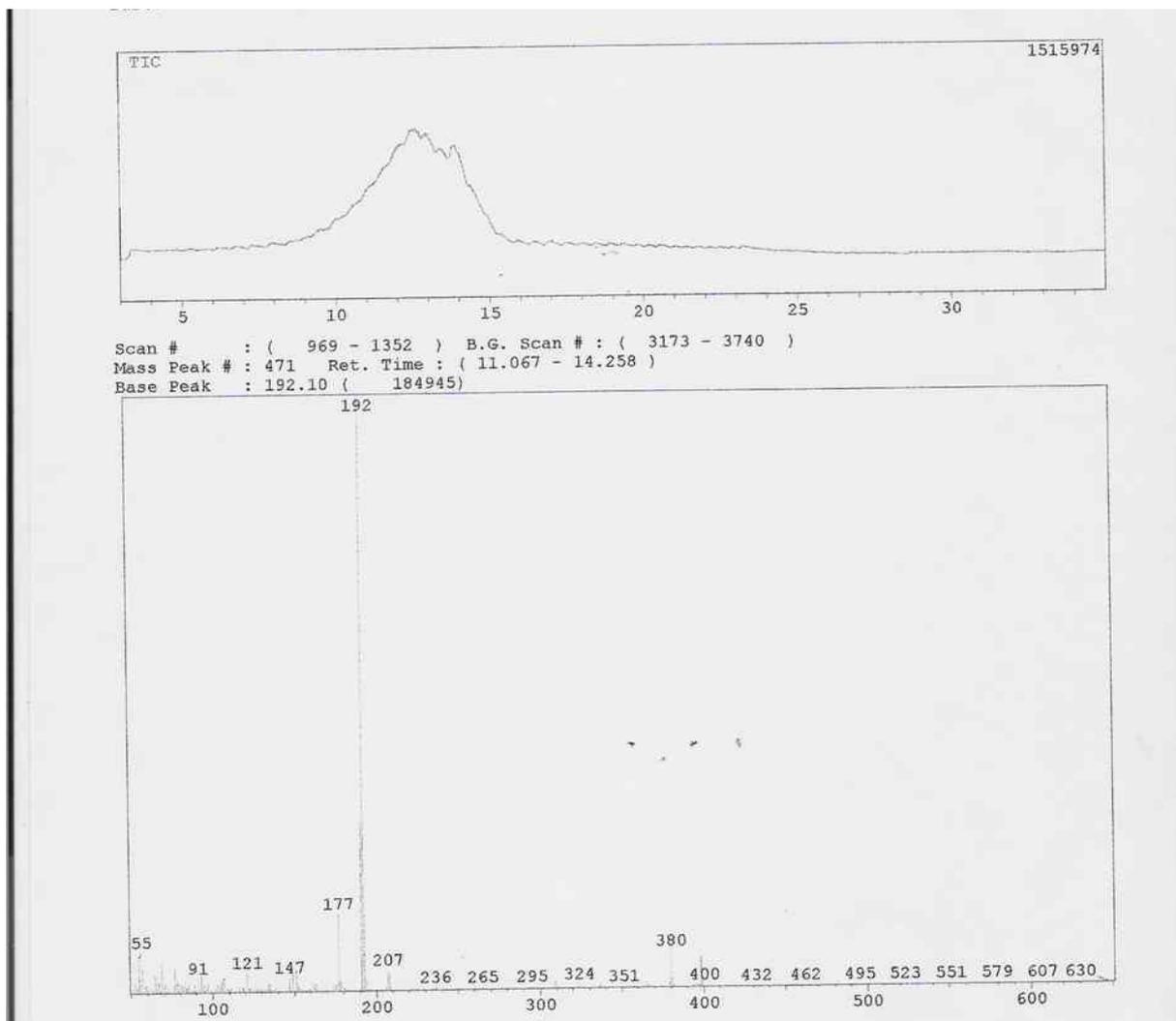


Figura 124 - Espectro de massa da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

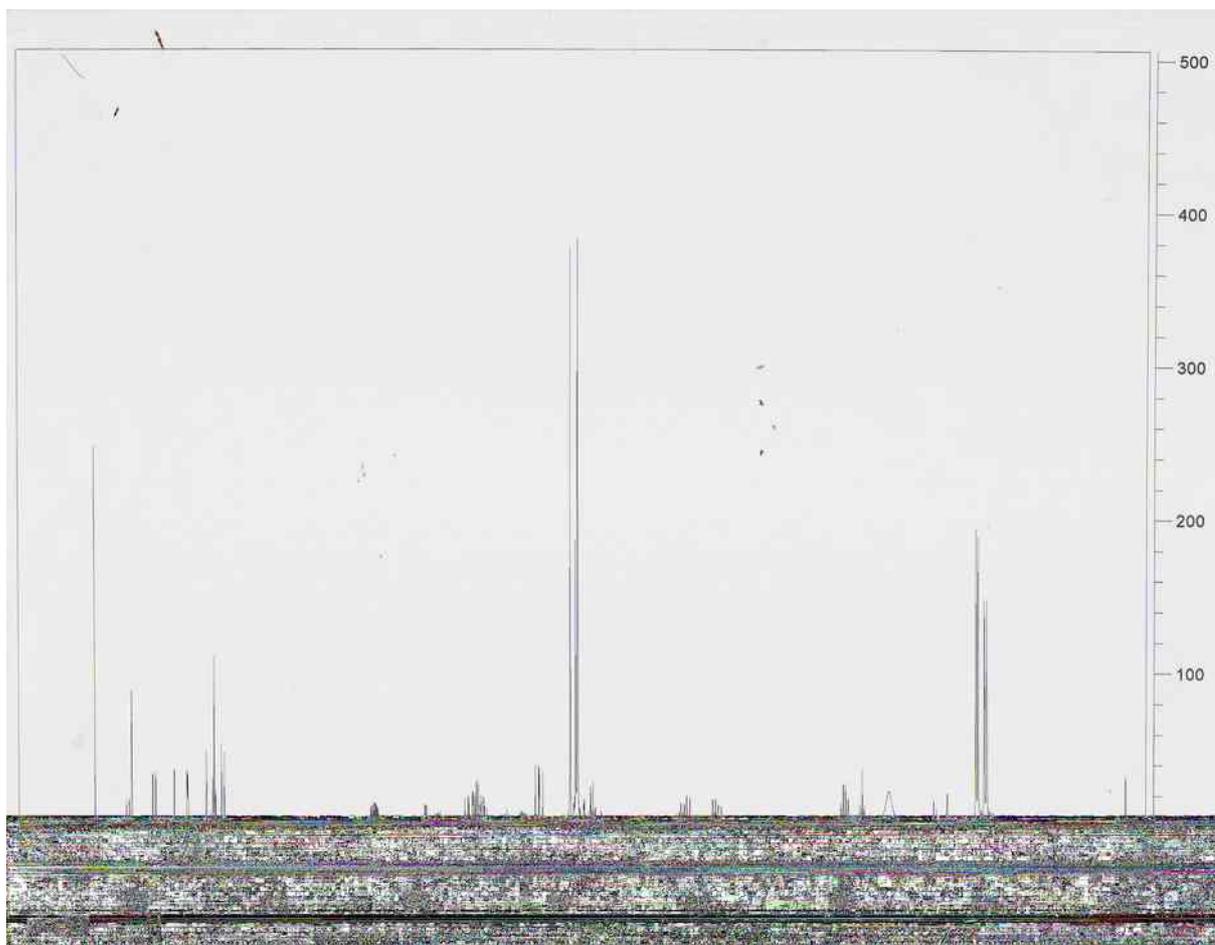


Figura 125 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) 6',7'-diidro-12, 12a-desidrotenona

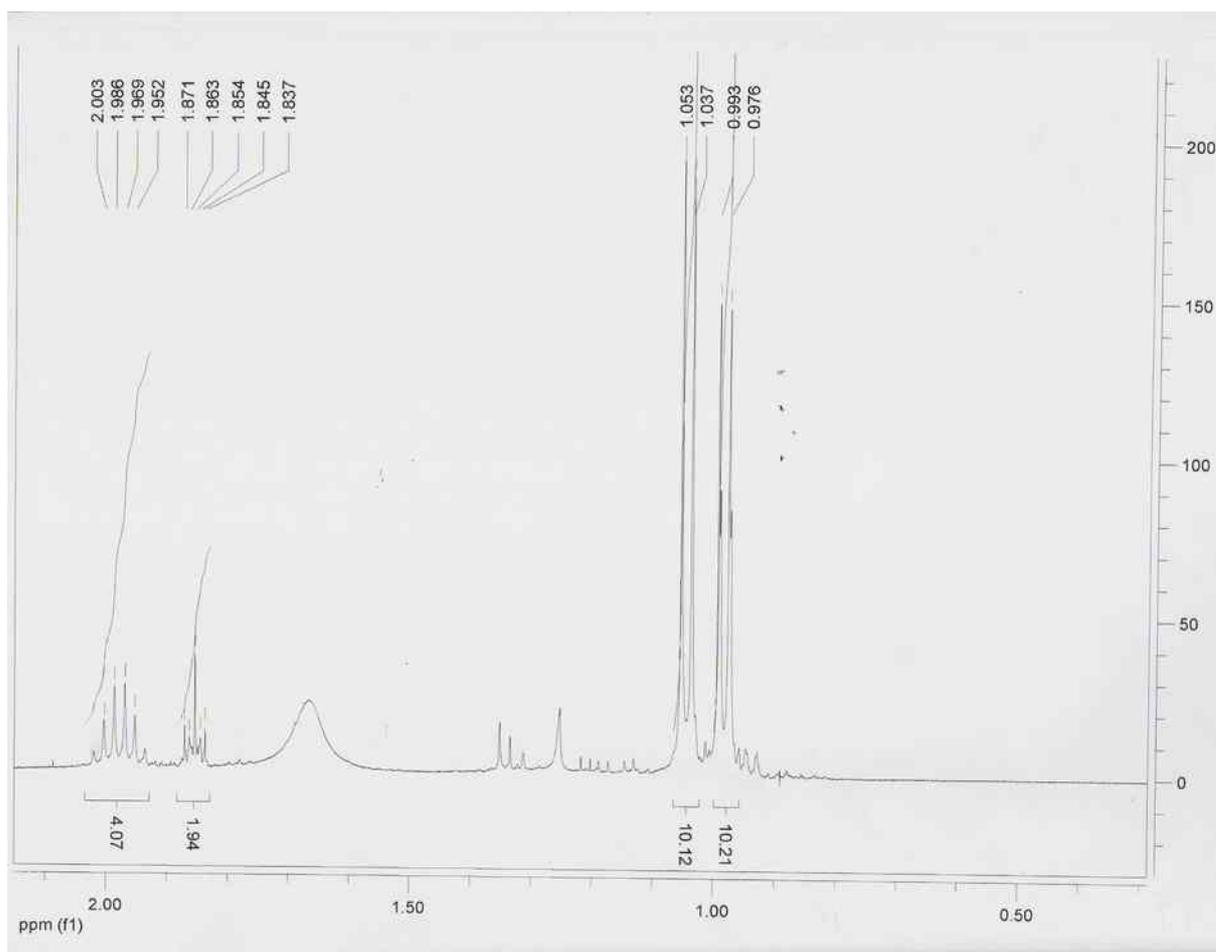


Figura 126 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 05,0-2,0 ppm) da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona



Figura 127 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 05,0-2,0 ppm) da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

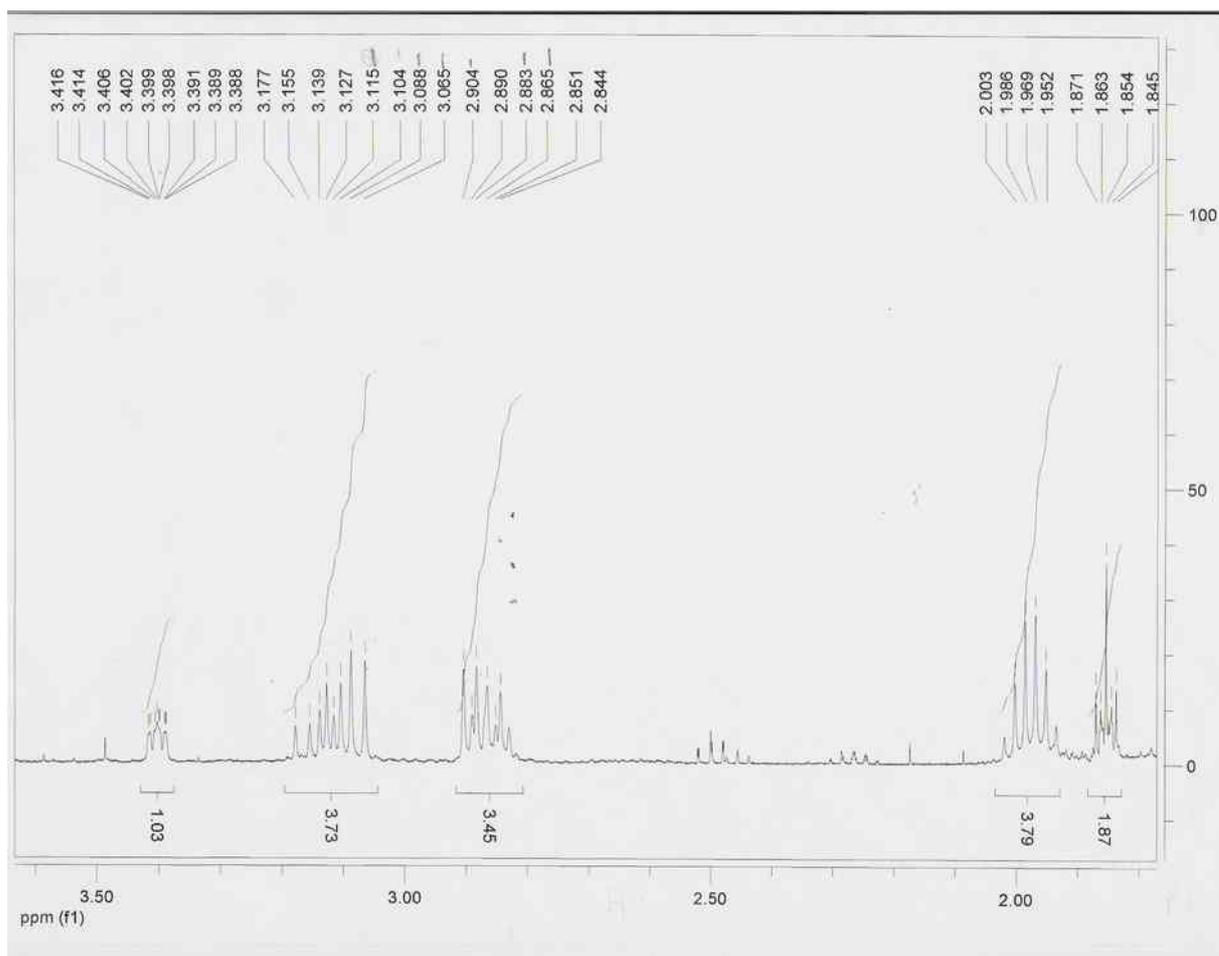


Figura 128 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 2,0-3,5 ppm) da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

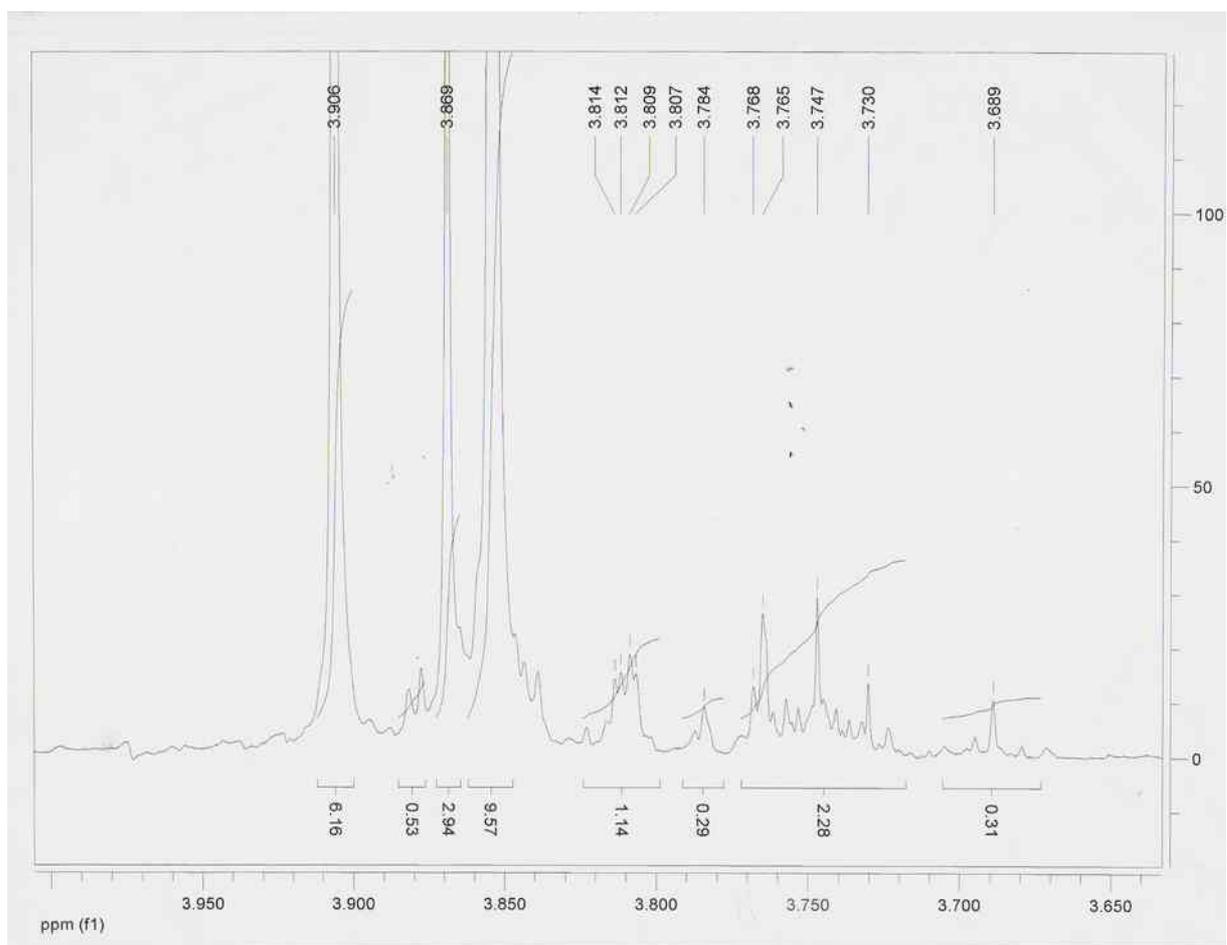


Figura 129 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 3,6-3,9 ppm) da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

Figura 130 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 3,7-3,9 ppm) da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

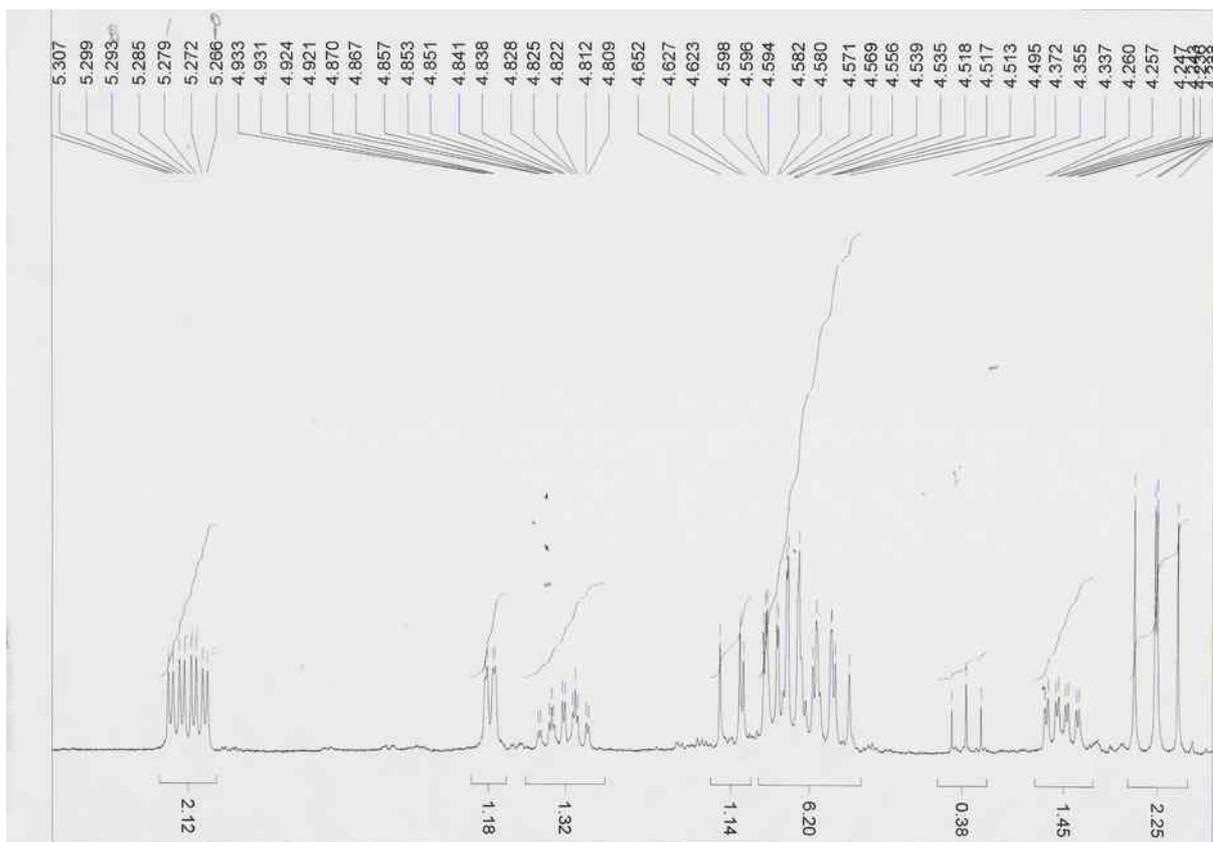


Figura 131 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

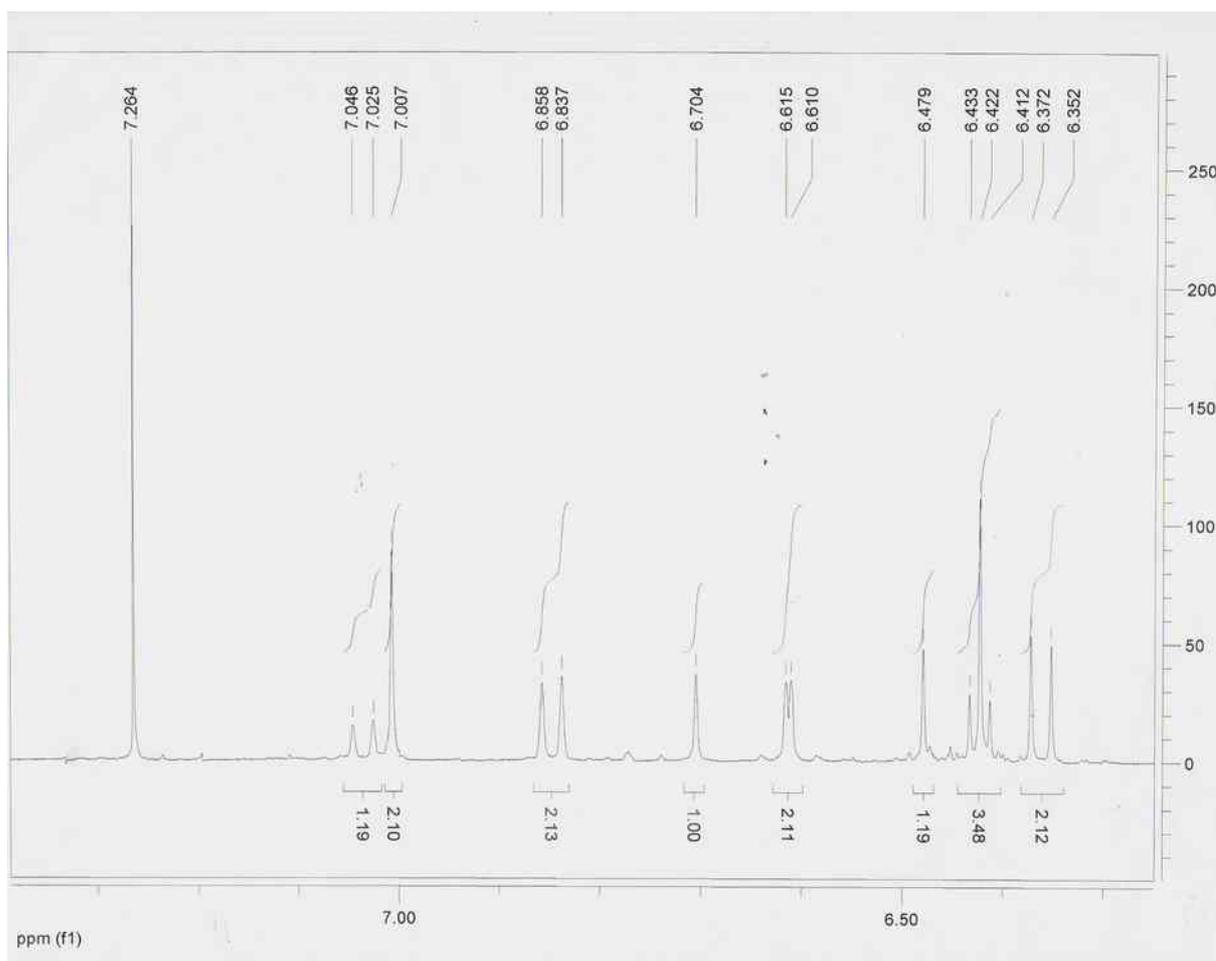


Figura 132 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 6,50-7,0 ppm) da 6',7'-diidro-12, 12a-desidorotenona

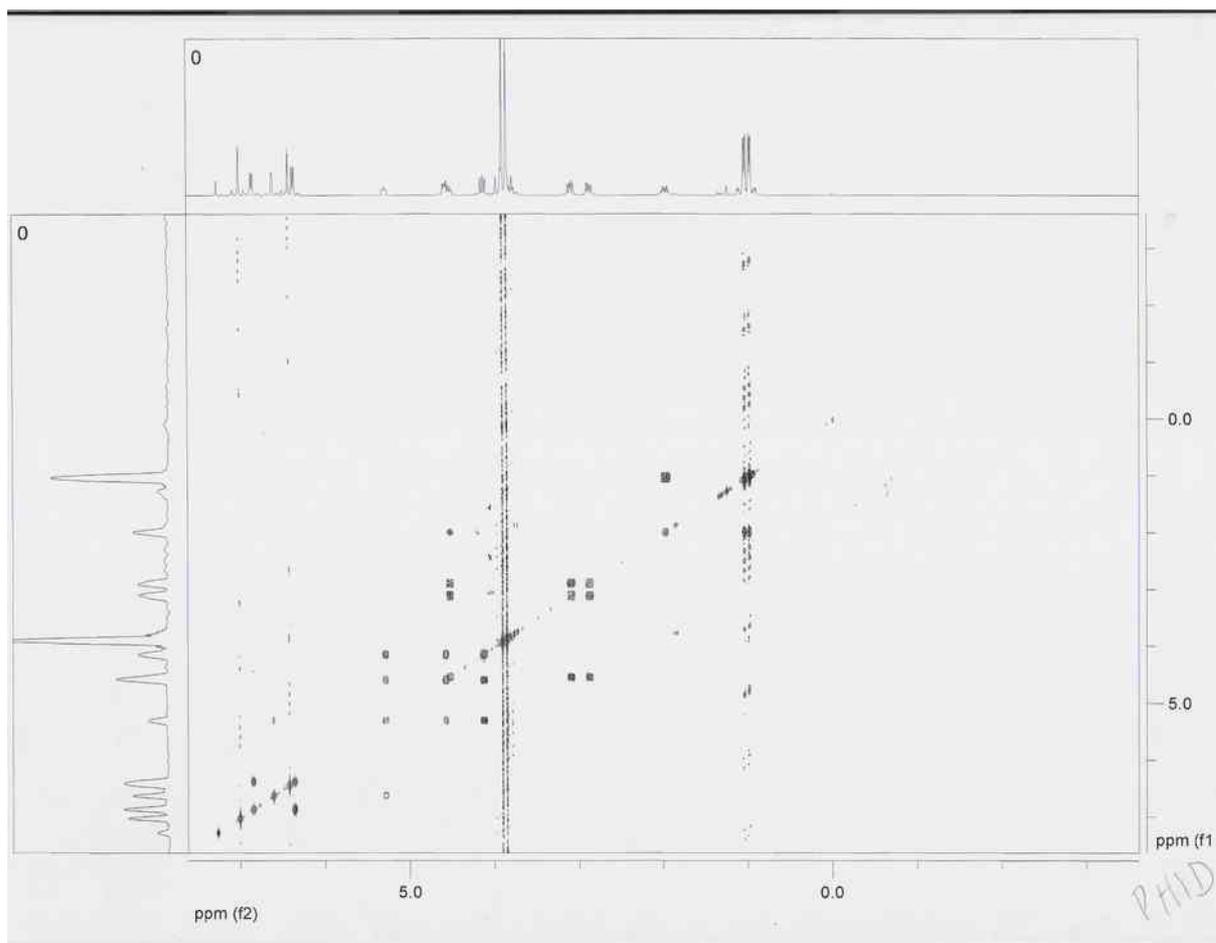


Figura 133 - Mapa de correlação homonuclear COSY ¹H x ¹H da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

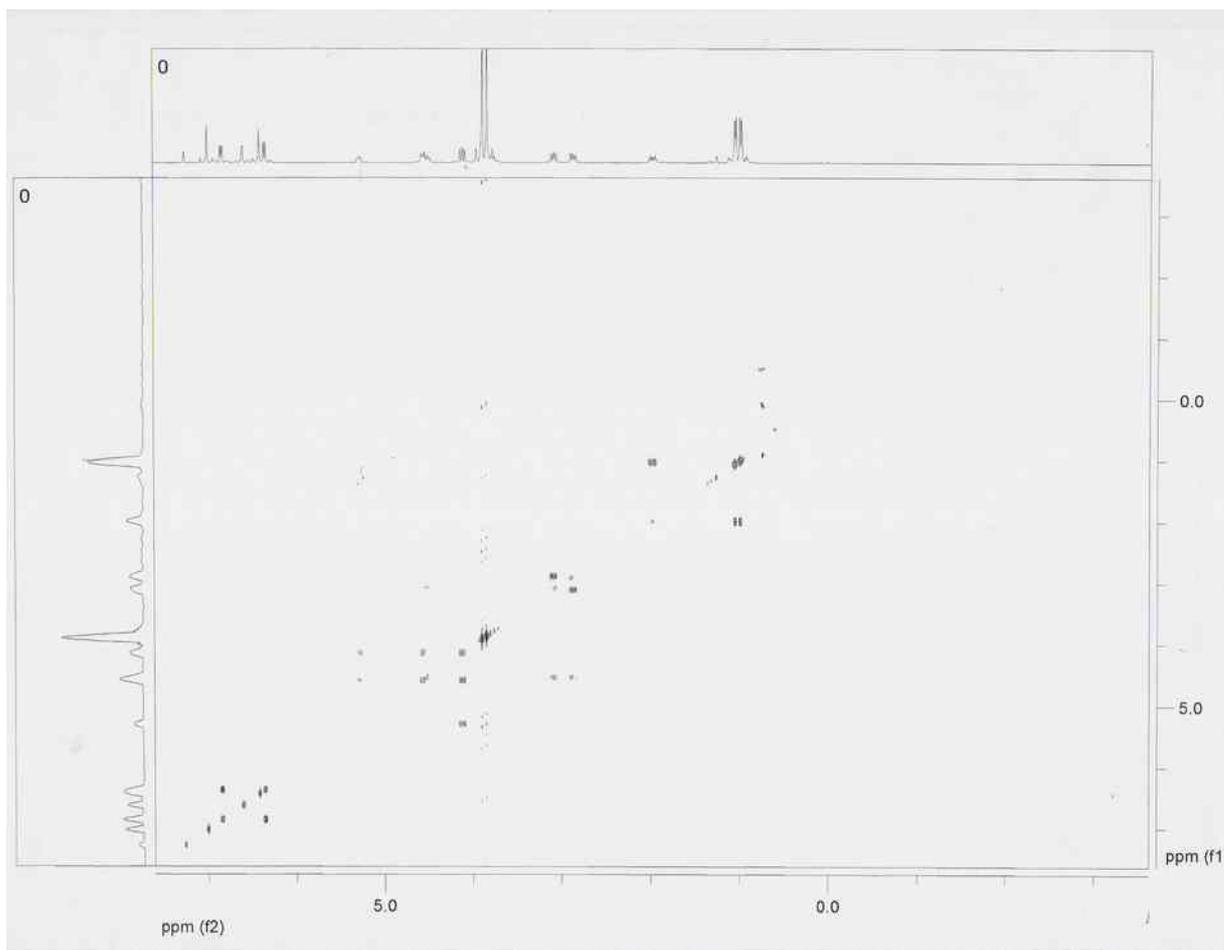


Figura 134 - Mapa de correlação homonuclear COSY ¹H x ¹H da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

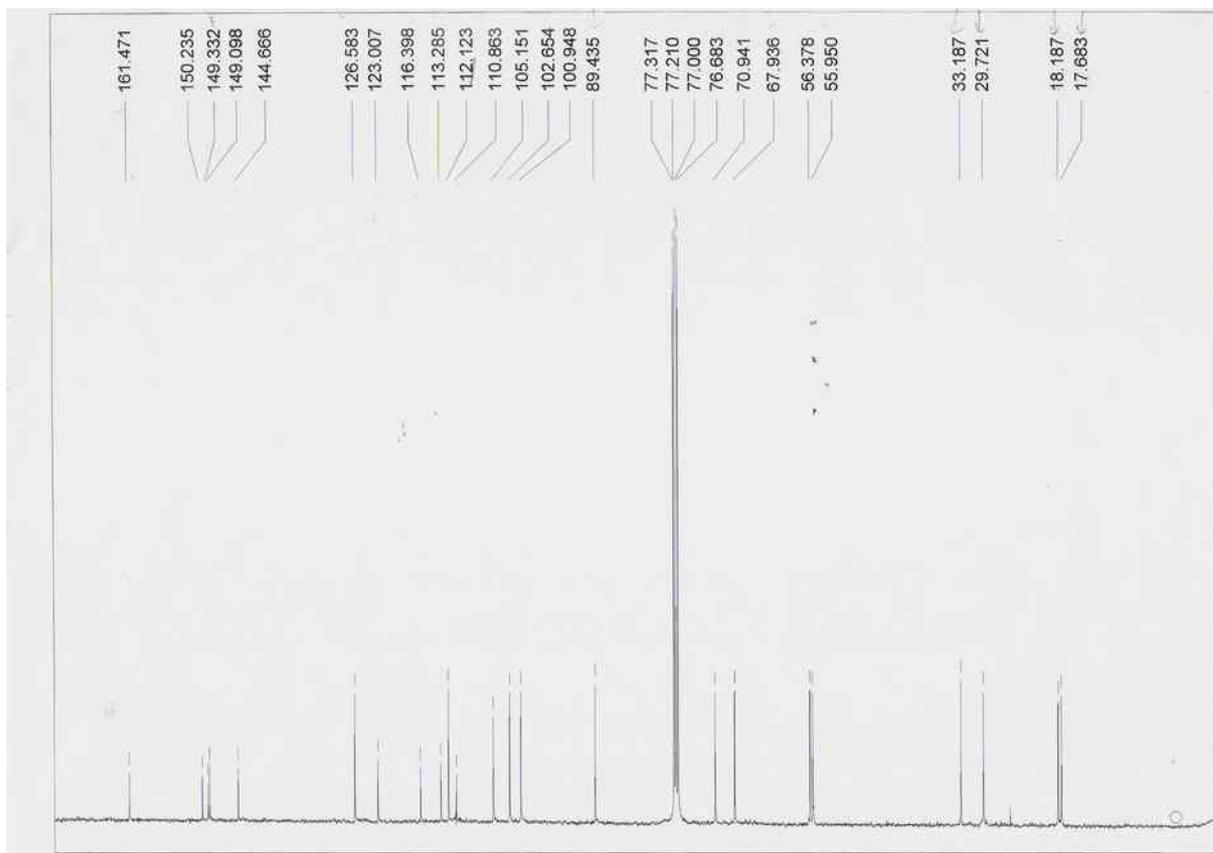


Figura 135 - Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

Figura 136 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 17,6-70,9 ppm) da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

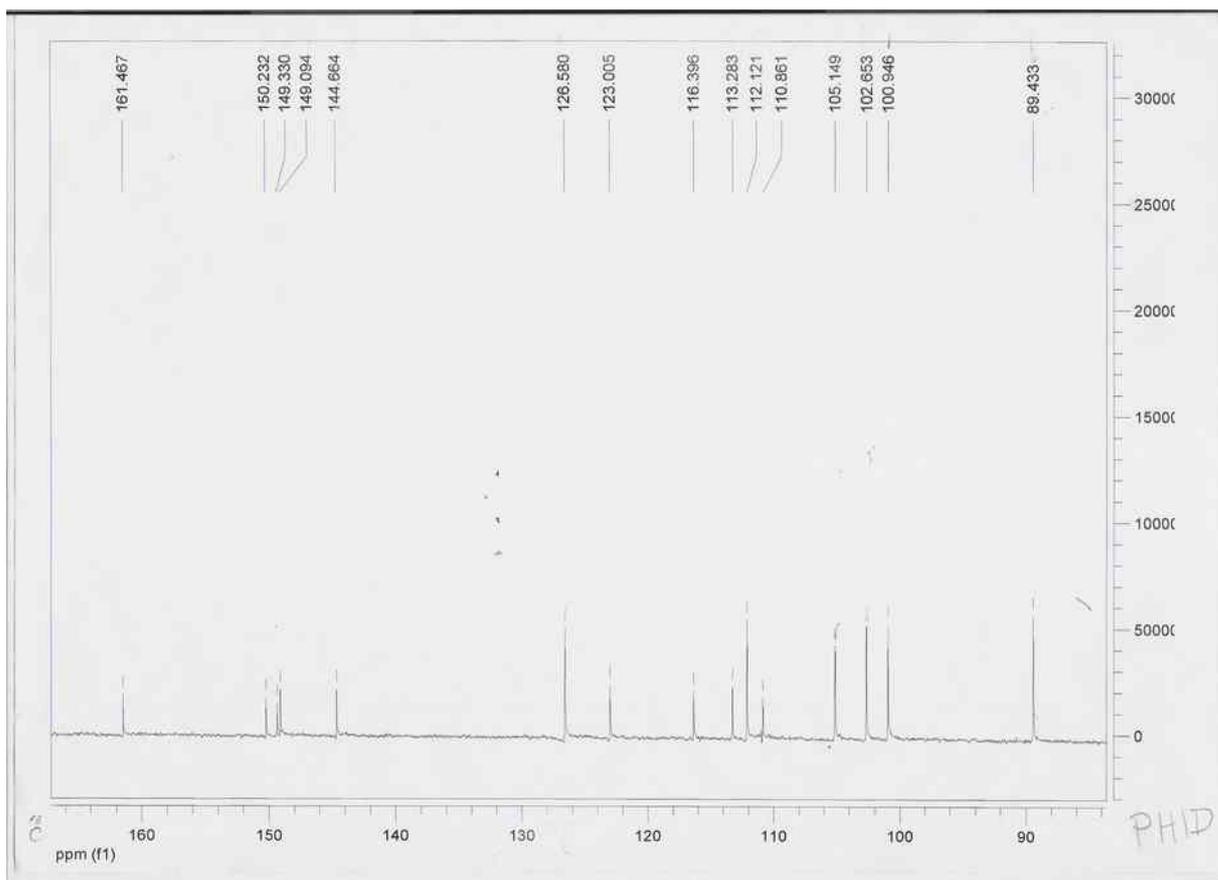


Figura 137 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 89,4-161,4 ppm) da 6',7'-diidro-12, 12a-desidrorotenona

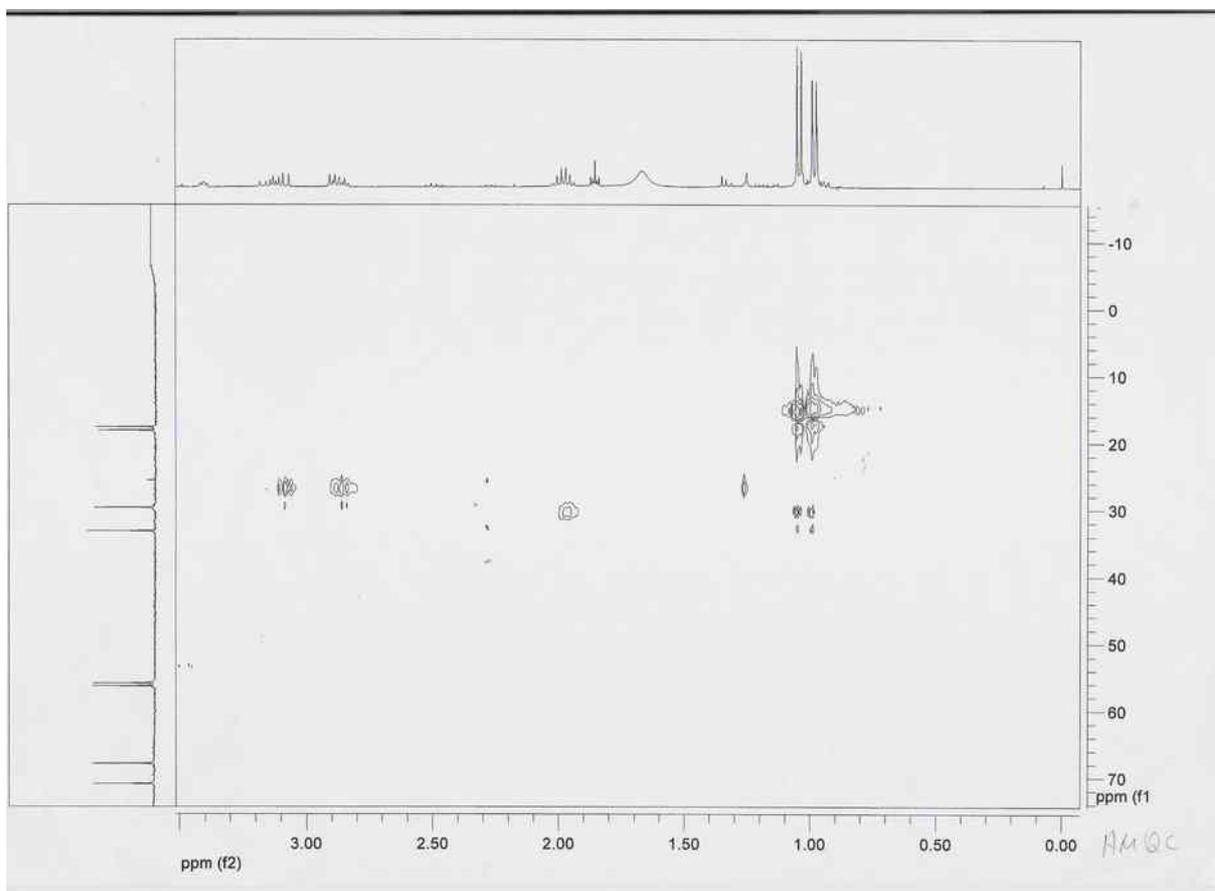
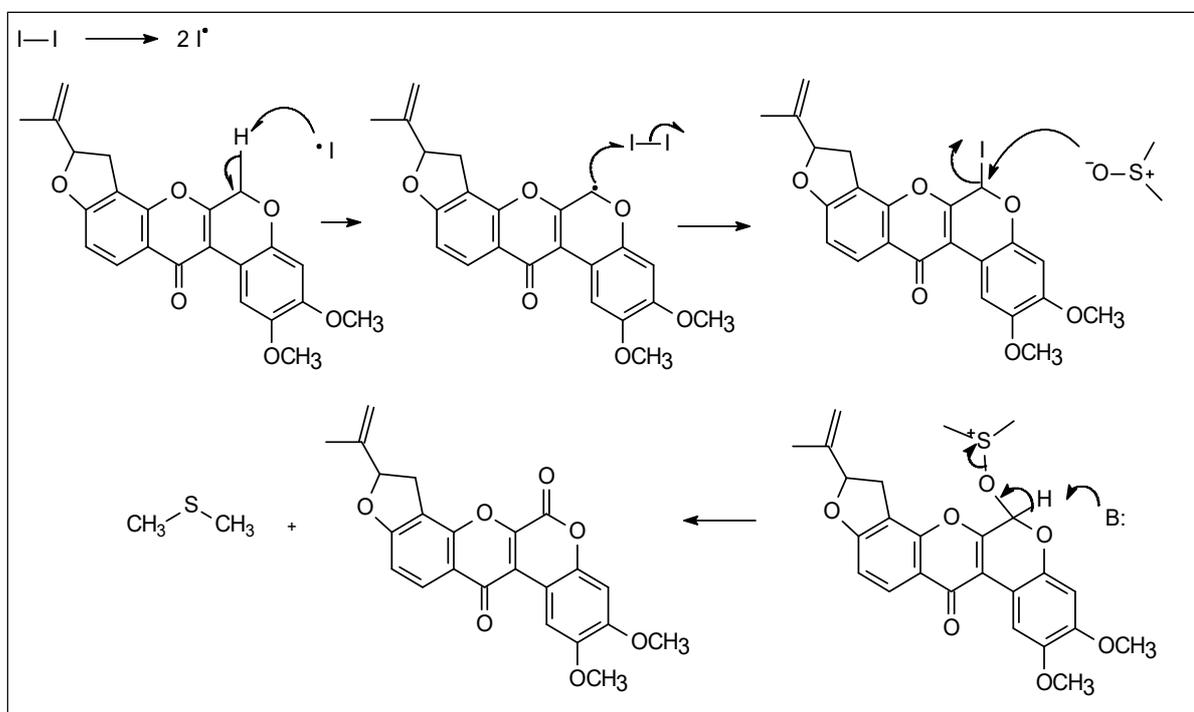


Figura 138 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6',7'-diidro-12,12a-desidrorotenona

5.2.7 - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA MISTURA BINÁRIA 6a-12a-DESIDROROTENONA/ 6a-12a-DESIDRODEGUELINA

Nesta reação foi realizada uma modificação do método de oxidação de Kornblum descrito por Sakakibara e colaboradores (1986). Desse modo a mistura de rotenóides foi tratada com os seguintes reagentes $I_2/H_2SO_4/DMSO$. O produto obtido após a purificação apresentou-se como sólido amarelo escuro de faixa de fusão $167,0-169,0\text{ }^\circ\text{C}$.



Esquema 15 - Mecanismo proposto da reação de oxidação

5.2.8 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA 6-OXO-6a,12a-DESIDROROTENONA

Observando os espectros de RMN notou-se que somente o produto de oxidação da desidrorotenona foi isolado.

A confirmação inicial do produto formado foi feita através do espectro de infravermelho (Figura. 173, p.222), o qual mostrou absorção a 1626 cm^{-1} relativa ao estilamento de $C=O$, característico de rotenóide seguido de uma outra absorção à 1743 cm^{-1} característico de estiramento $C=O$ da função lactônica.

O espectro de massas (Figura 139, p.188) apresentou pico do íon molecular m/z 406 compatível com a fórmula molecular $C_{23}H_{18}O_7$ e pico base a m/z 391 relativo a perda de metila.

O espectro de RMN 1H da oxo-6a,12a-desidrorotenona apresentou dois sinais simples δ_H 8,95 e δ_H 6,86 relativo ao hidrogênio H-1 e H-4 do anel A, dois sinais duplos δ_H [8,14 (d,J=8,8)] relativo ao anel B.

Comparando essas absorções com àquelas obtidas para a 6a-12a-desidrorotenona, nota-se um efeito de desproteção causado pela presença da carbonila em C-6 conjugada com dois anéis aromáticos. Este efeito também pode ser observado no deslocamento químico das metoxilas δ_H 4,01 e 3,96.

O espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 149, p.198) permitiu reconhecer a multiplicidade de cada átomo de carbono, evidenciando a presença de dois sinais em δ_c 176,30 e 155,0 que foram atribuídos às carbonilas, C-12 e C-6, respectivamente.

A introdução da carbonila em C-6 afetou os deslocamentos químicos dos carbonos adjacentes. O carbono C-7 (δ_c 152,56) encontra-se protegido, e o C-6a (δ_c 141,86) encontra-se desprotegido em relação aos mesmos carbonos da desidrorotenona. Enquanto que os carbonos C-12a (δ_c 121,36) e C-1a (δ_c 116,19) apresentam efeitos de desproteção.

O mapa de correlação heteronuclear (HMBC) (Figura 166, p.215) permitiu atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários apresentando os acoplamentos dos átomos de carbonos: C-2 com os hidrogênios da metoxila; C-3 com os hidrogênios da metoxila; C-5 com o hidrogênio H-1; C-8 com o hidrogênio H-10; C-9 com o hidrogênio H-11; C-11a com hidrogênio H-10; C-12 com o hidrogênio H-11 e C12a com o hidrogênio H-1. As demais atribuições da molécula encontram-se na Tabela 15, p.187.

Tabela 15 – Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) oxo-6a-12a-desidrorotenona em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) MHz. Tallent, 1973.

	δ_{C}	δ_{H}	HMQC $^2J_{\text{CH}}$	HMBC $^3J_{\text{CH}}$	Tallent, 1973 δ_{H}
C					
1a	116,19				
2	146,75			$^3J_{\text{-OCH}_3}$	
3	151,06			$^3J_{\text{-OCH}_3}$	
5	145,16			$^3J_{\text{-H-1}}$	
6a	141,86				
7	152,26			$^3J_{\text{-H-11}}$	
8	113,67			$^3J_{\text{-H-10}}$	
9	166,45			$^3J_{\text{-H-10}}$	
11a	118,29			$^3J_{\text{-H-10}}$	
12	176,30			$^3J_{\text{-H-11}}$	
12a	121,36			$^3J_{\text{-H-1}}$	
6	155,98			$^3J_{\text{-H-11}}$	
6'	142,51				
CH					
1	107,90	8,95 (s)			8,95
4	99,46	6,86 (s)			6,85
10	109,66	6,98 (d, $J=8,4$)			6,96
11	128,22	8,14 (d, $J=8,8$)			8,14
5'	88,45	5,47 (t=8,78)			5,47
CH₂					
4'	31,32	3,86/ 3,68			
8'	113,04	5,00/ 5,14			5,00/5,15
CH₃					
7'	17,11	1,82	$^2J_{\text{H-6'}}$		1,82
CH₃O	56,2	4,01			4,01/3,94
	56,1	3,96			

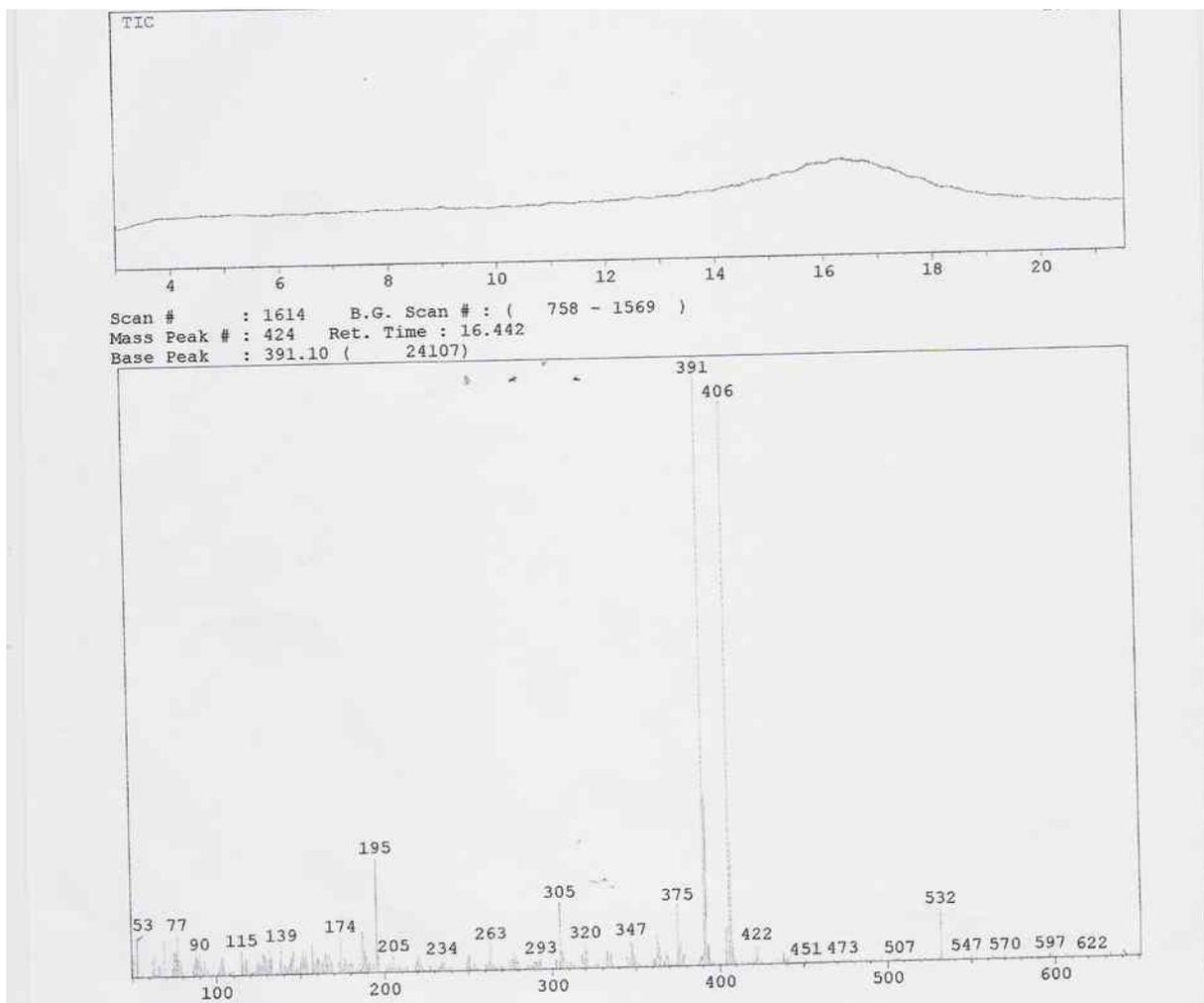


Figura 139 - Espectro de massas da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

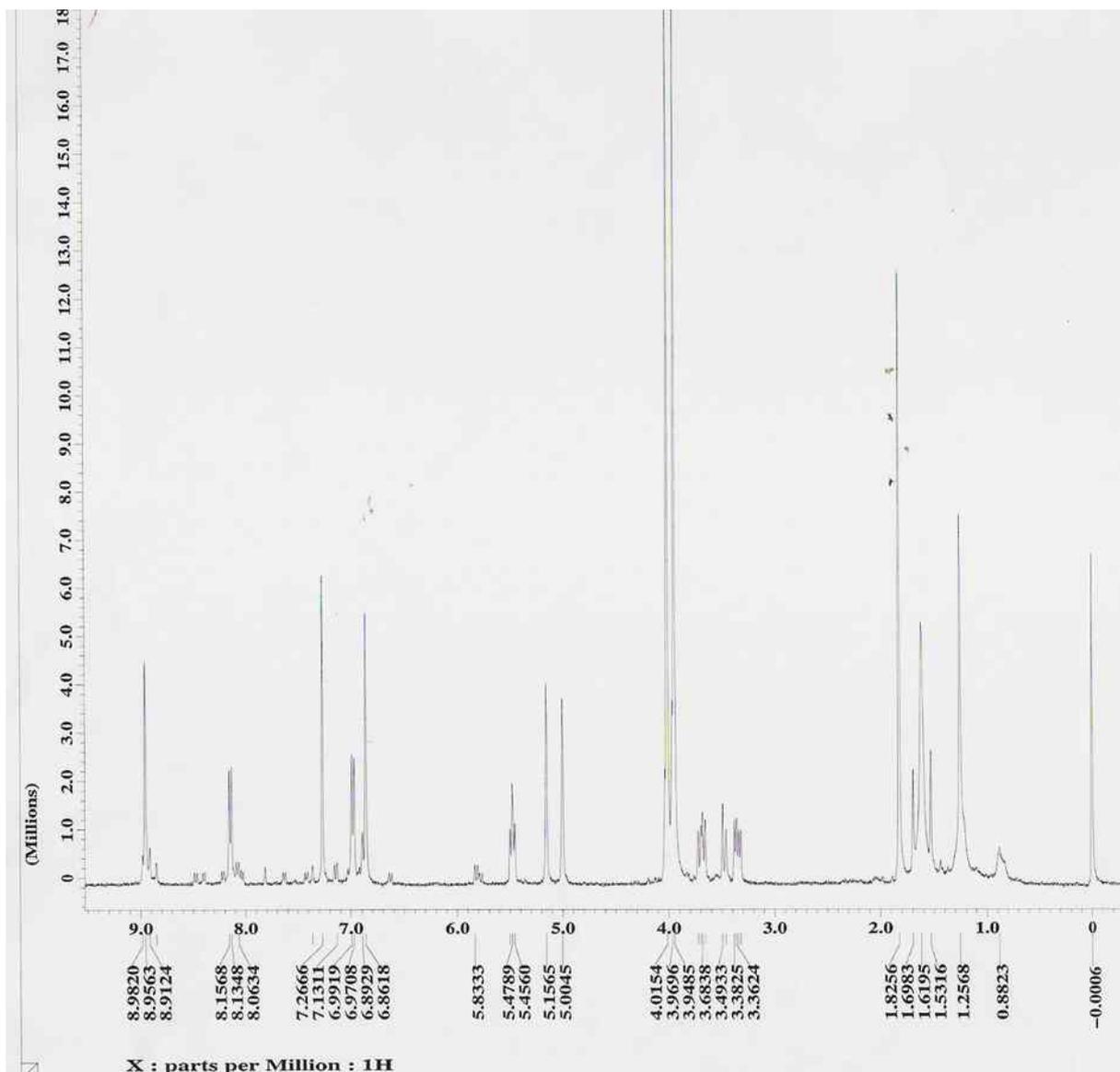


Figura 140 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 6-oxo-6a12a-desidrorotenona

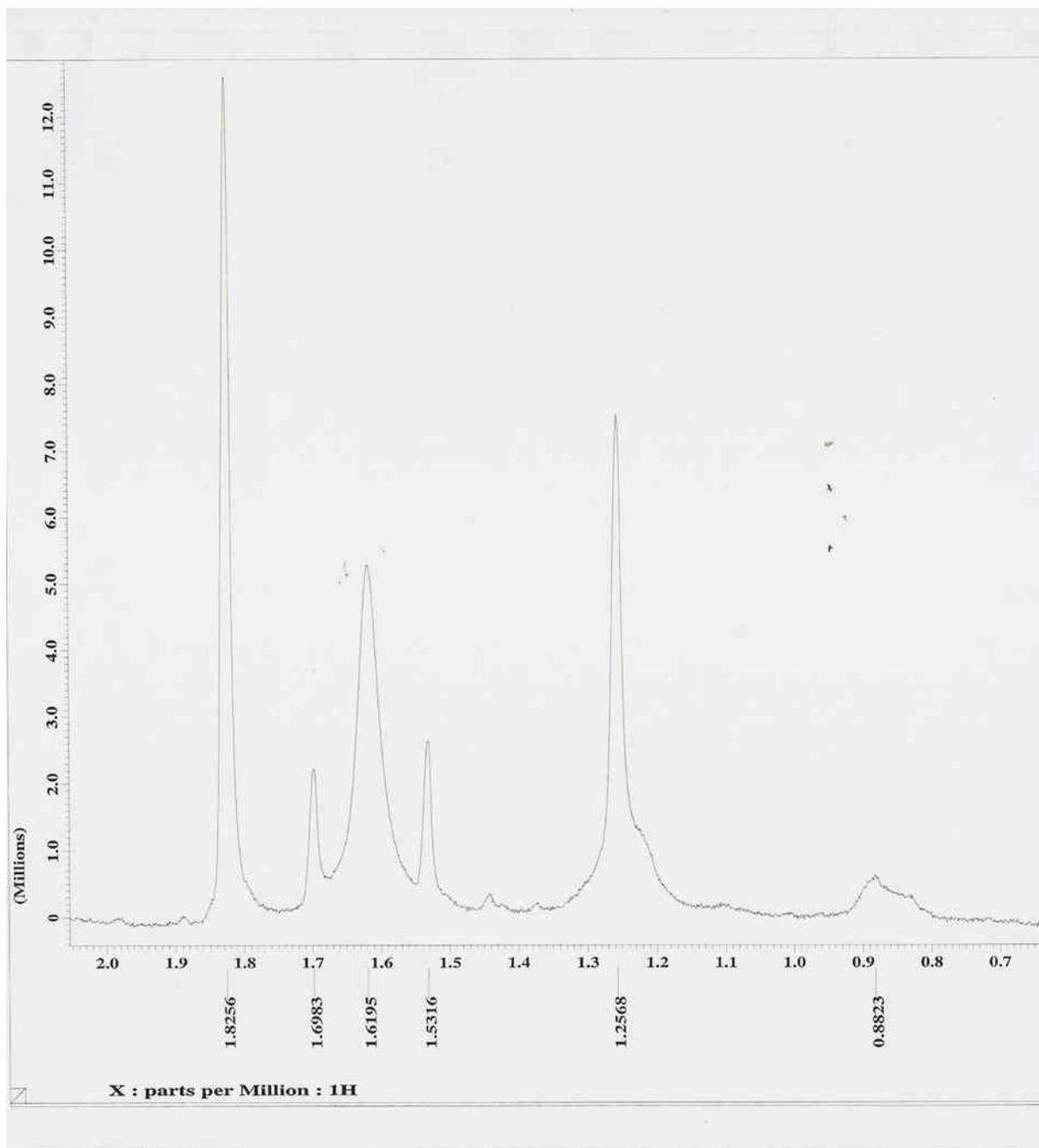


Figura 141 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 0,88-1,82 ppm) da 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona

Figura 142 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 3,30- 4,50 ppm) da 6-oxo-6a-12a-desidrrottenona

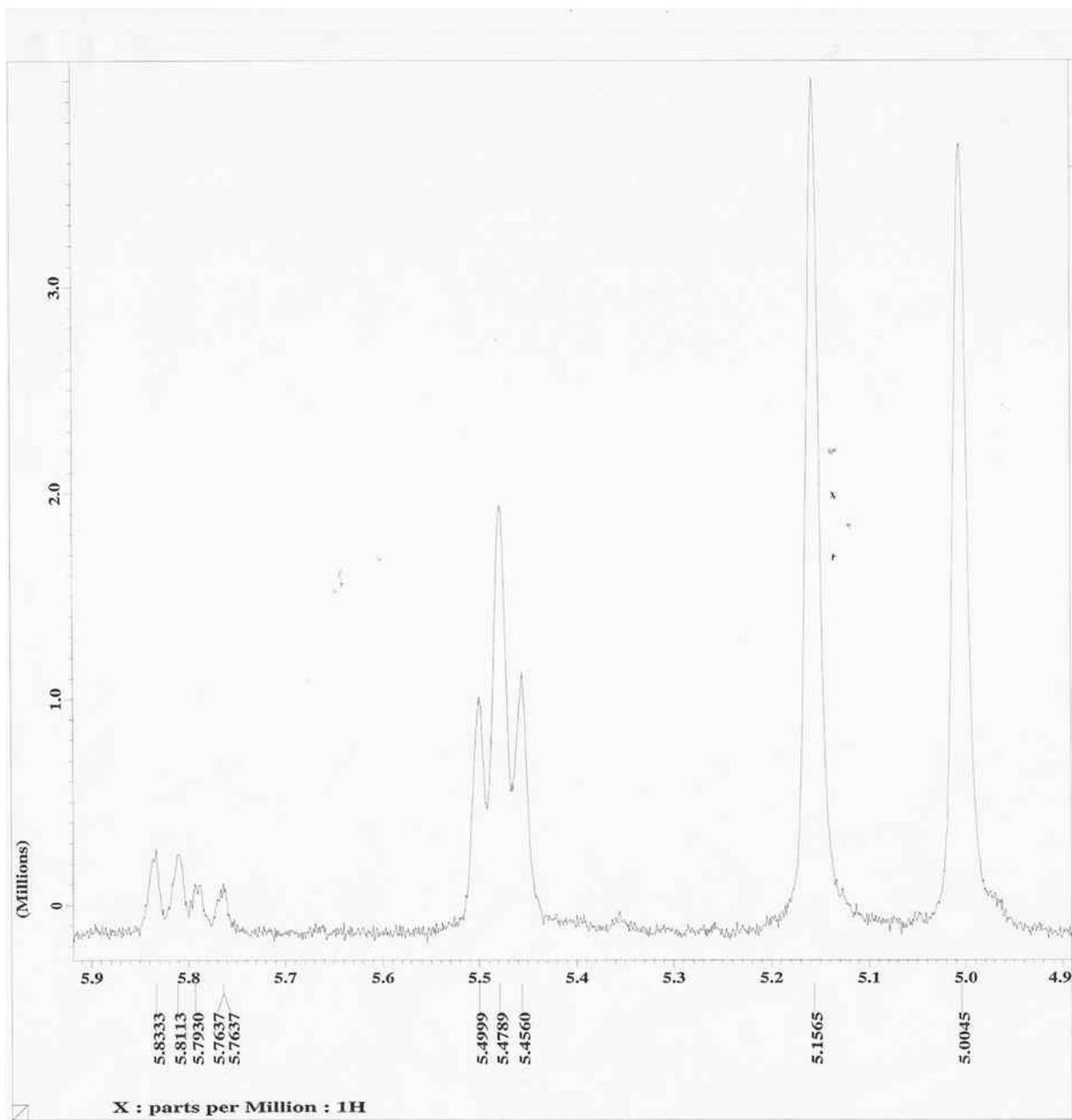


Figura 143 - Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 4,9-5,9 ppm) da 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona

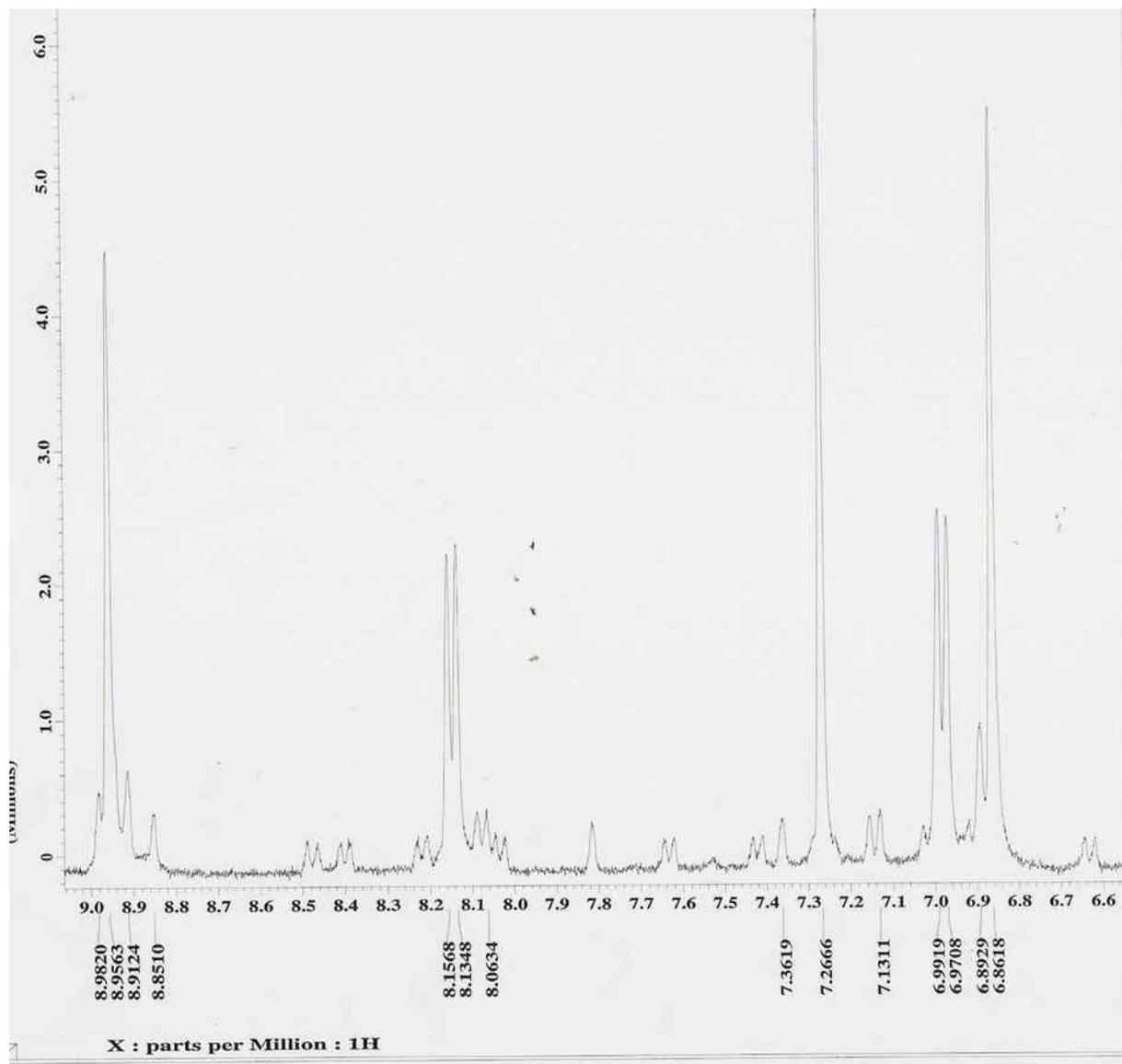


Figura 144 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 6,6-9,0ppm) da 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona

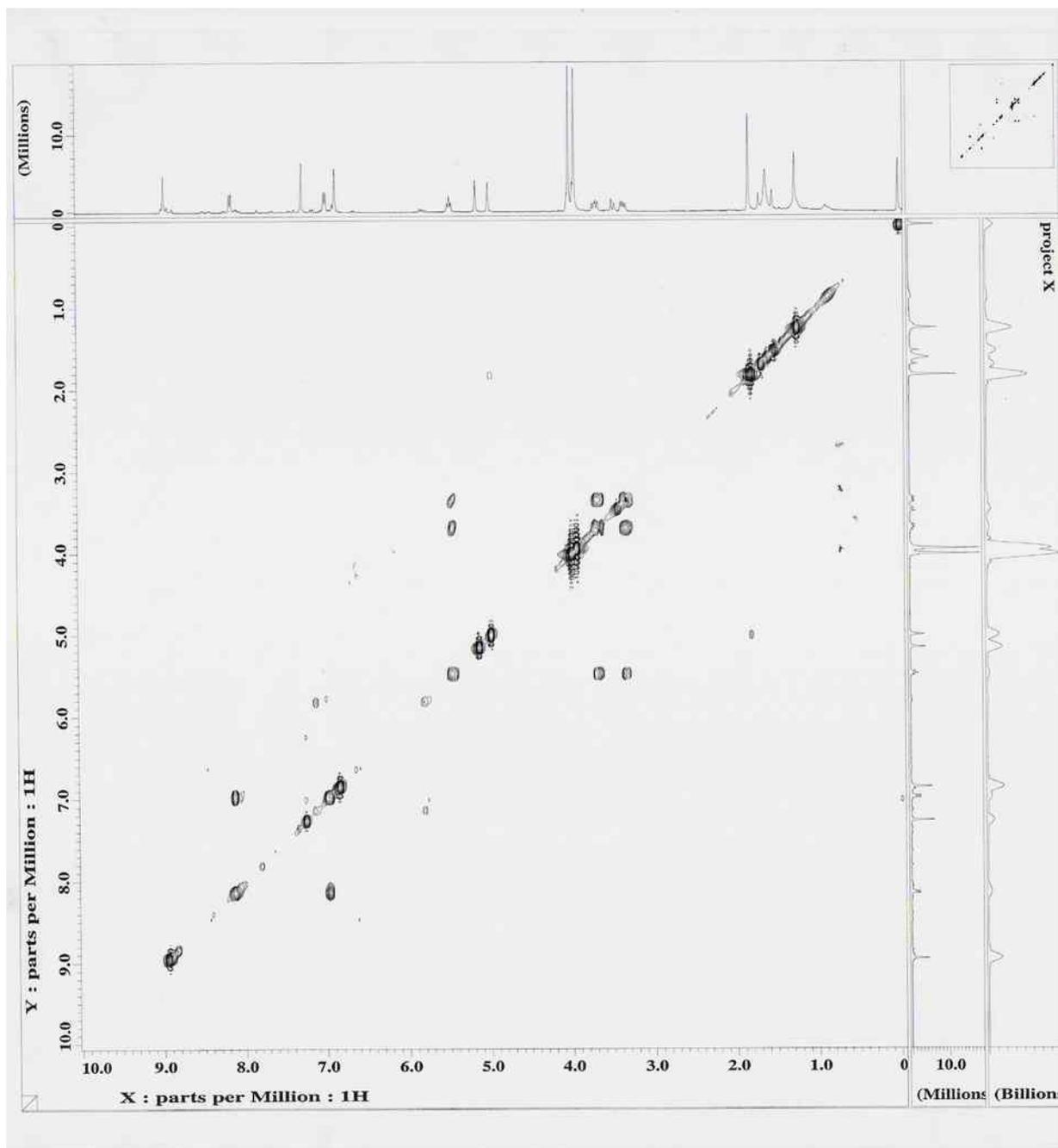


Figura 145 - Mapa de correlação homonuclear COSY da 6-oxo-6a-12a-desidrortenona

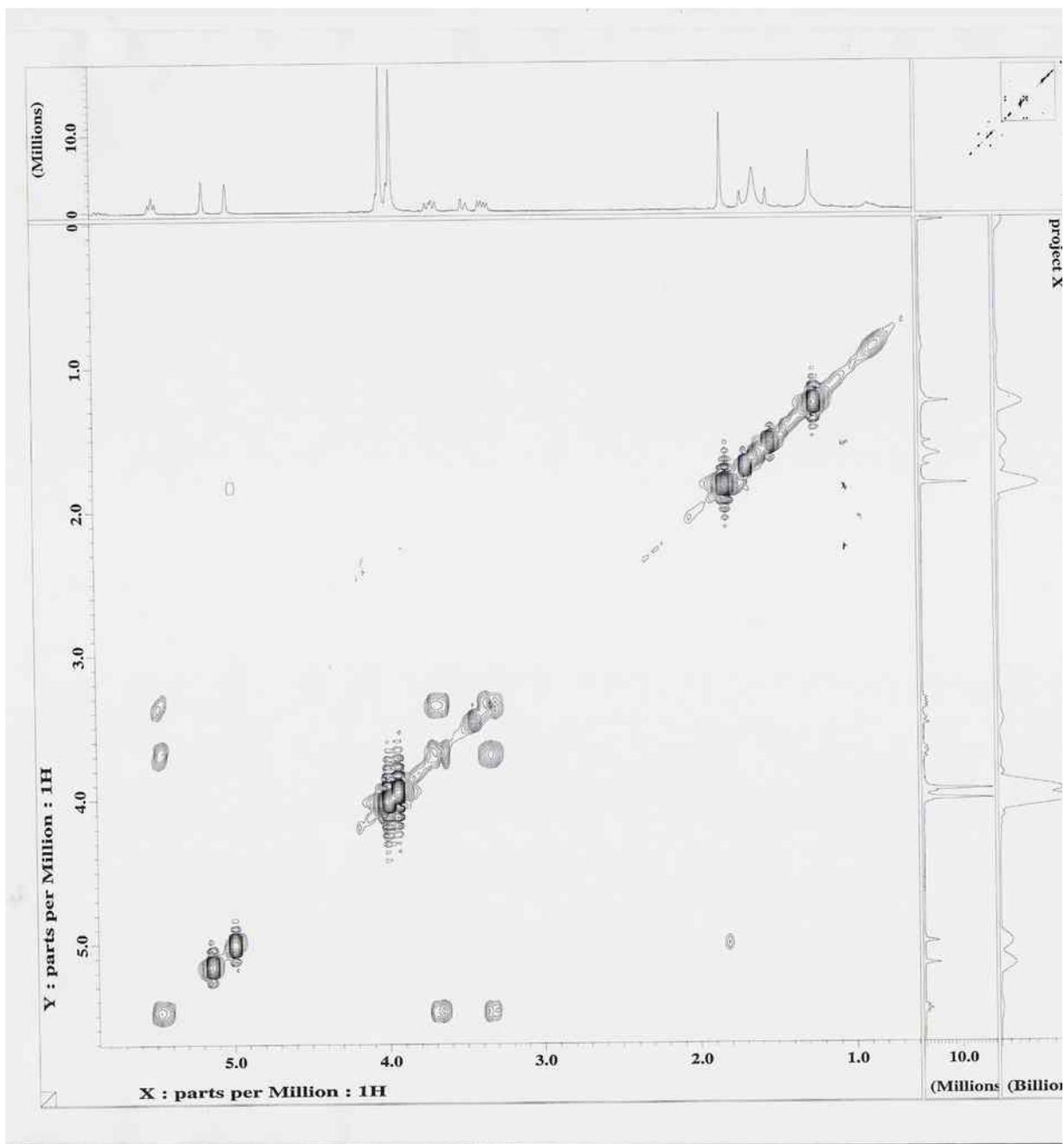


Figura 146 - Mapa de correlação homonuclear COSY da 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona

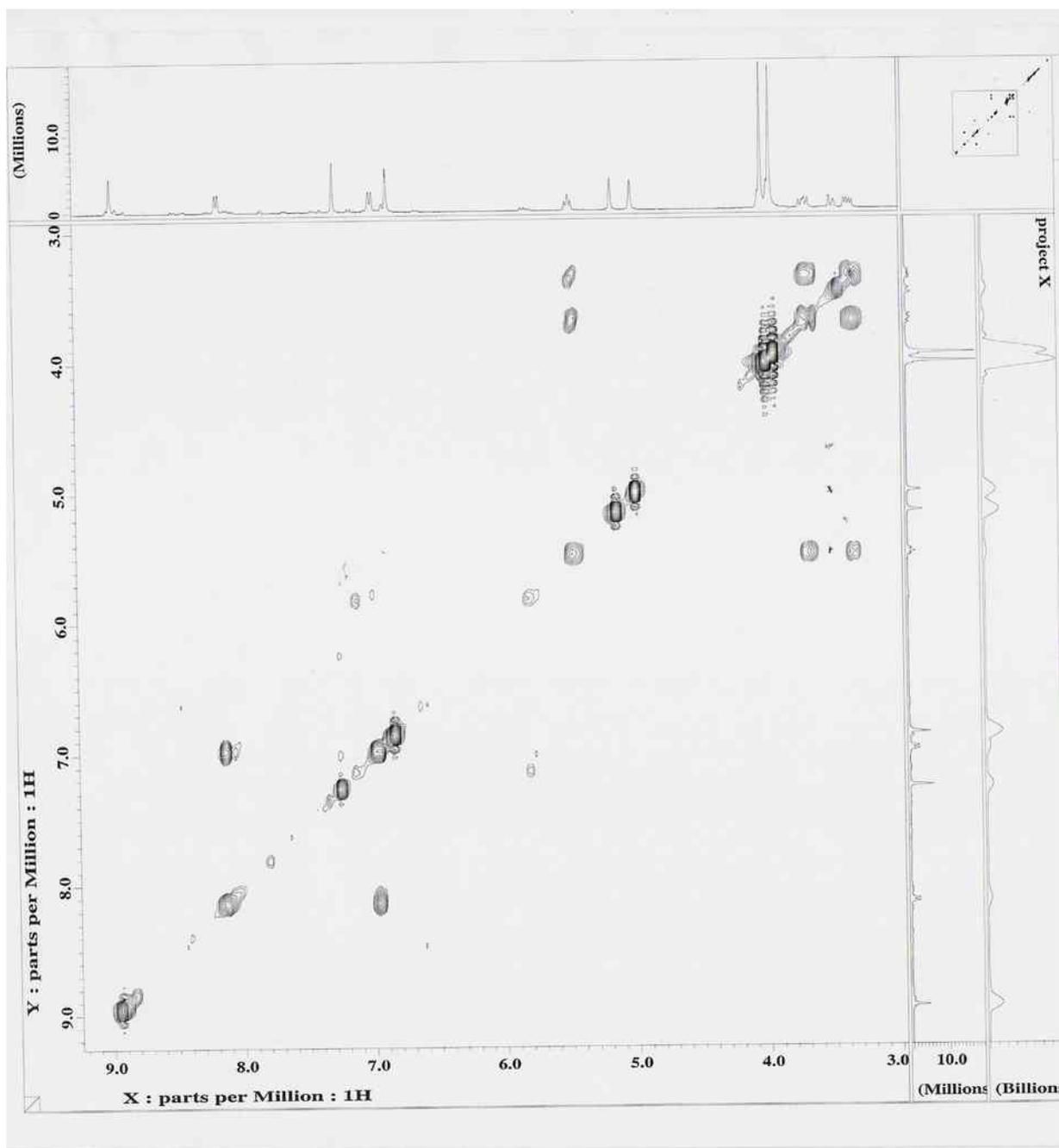


Figura 147 - Mapa de correlação homonuclear COSY da 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona

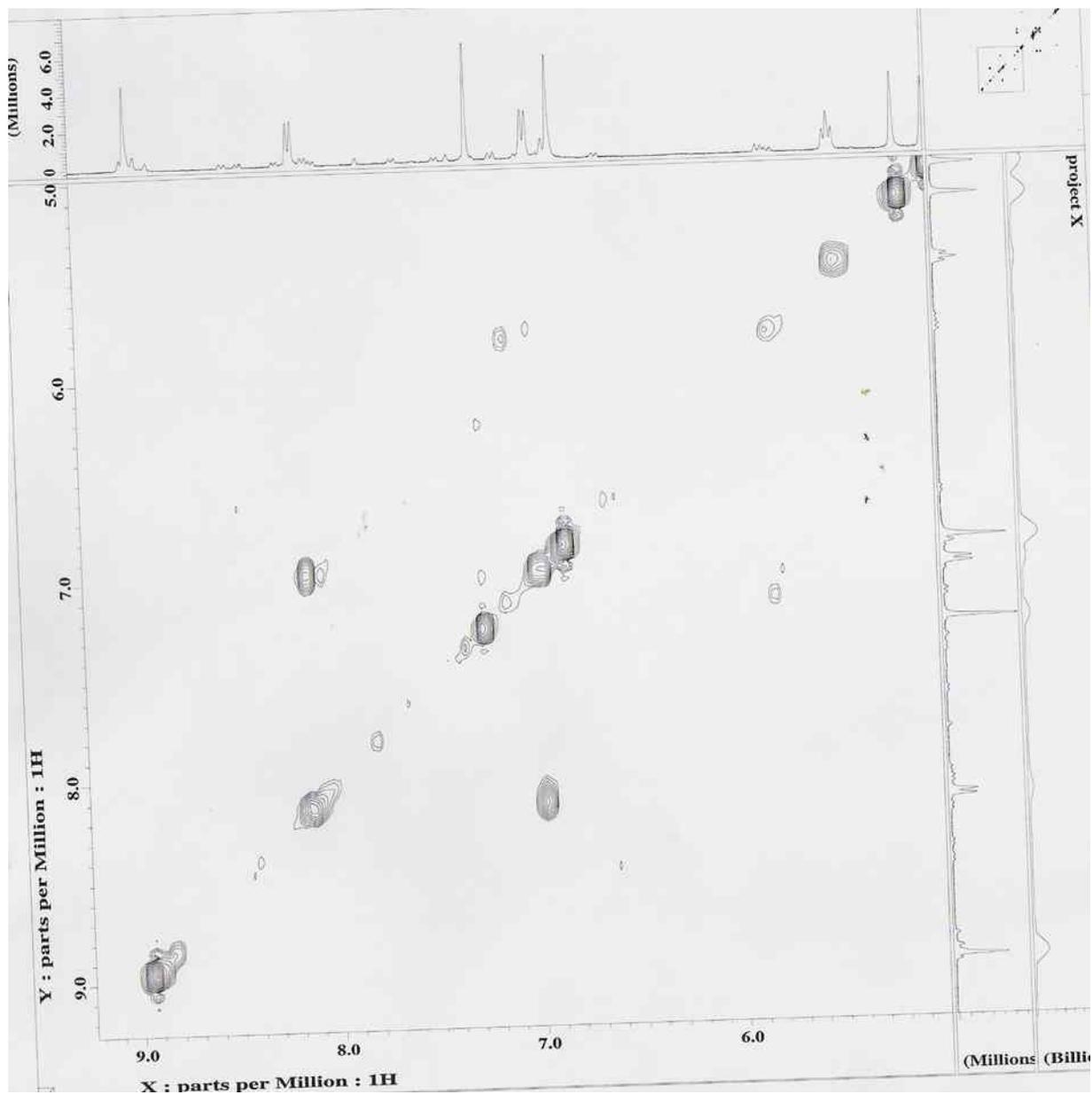


Figura 148 - Mapa de correlação homonuclear COSY da 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona

Figura 149 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona

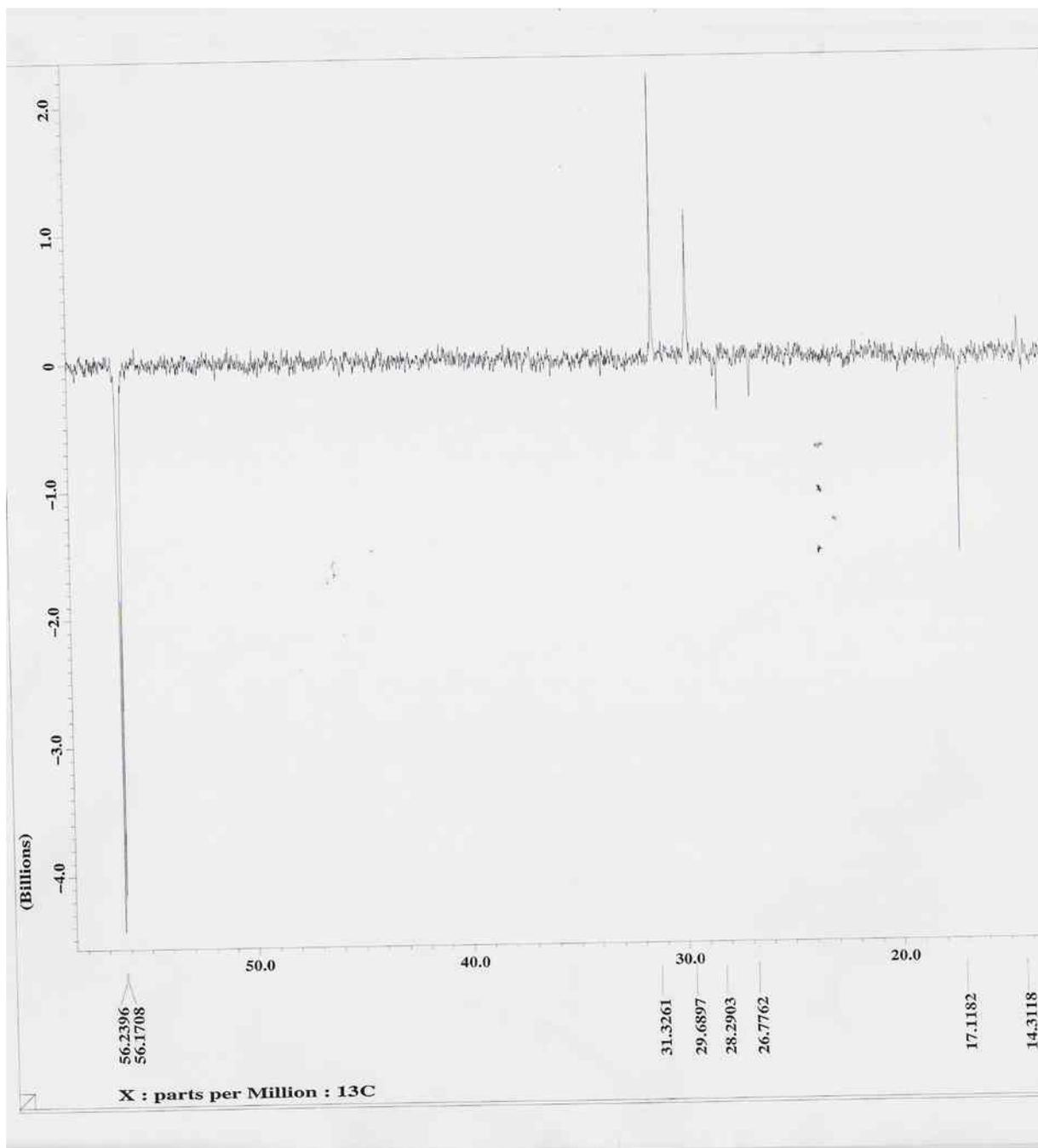


Figura 150 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 14,0- 60,0 ppm) da 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona

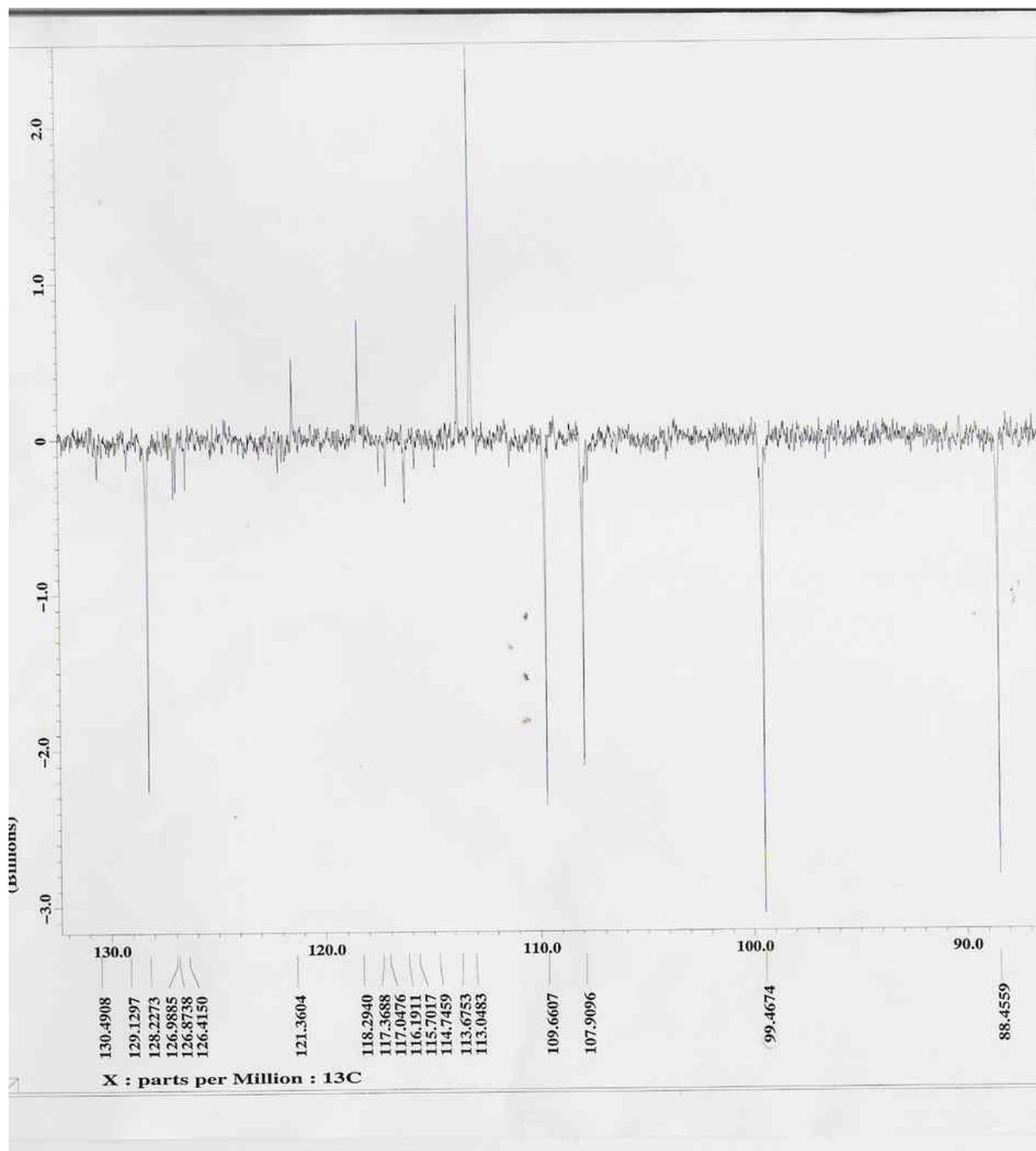


Figura 151 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 85,0- 135,0 ppm) da 6-oxo-6a-12a-desidrortenona

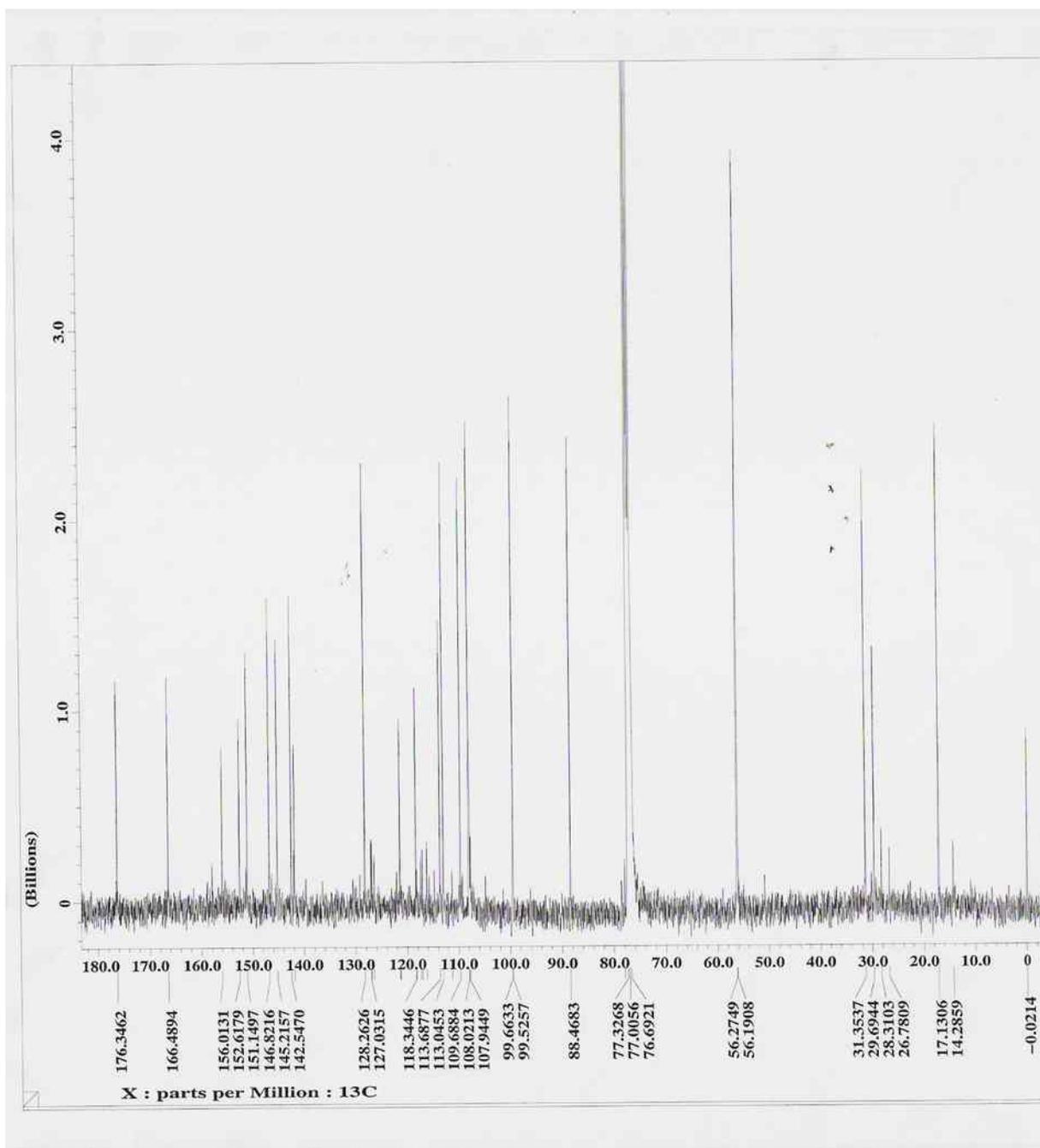


Figura 152 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona

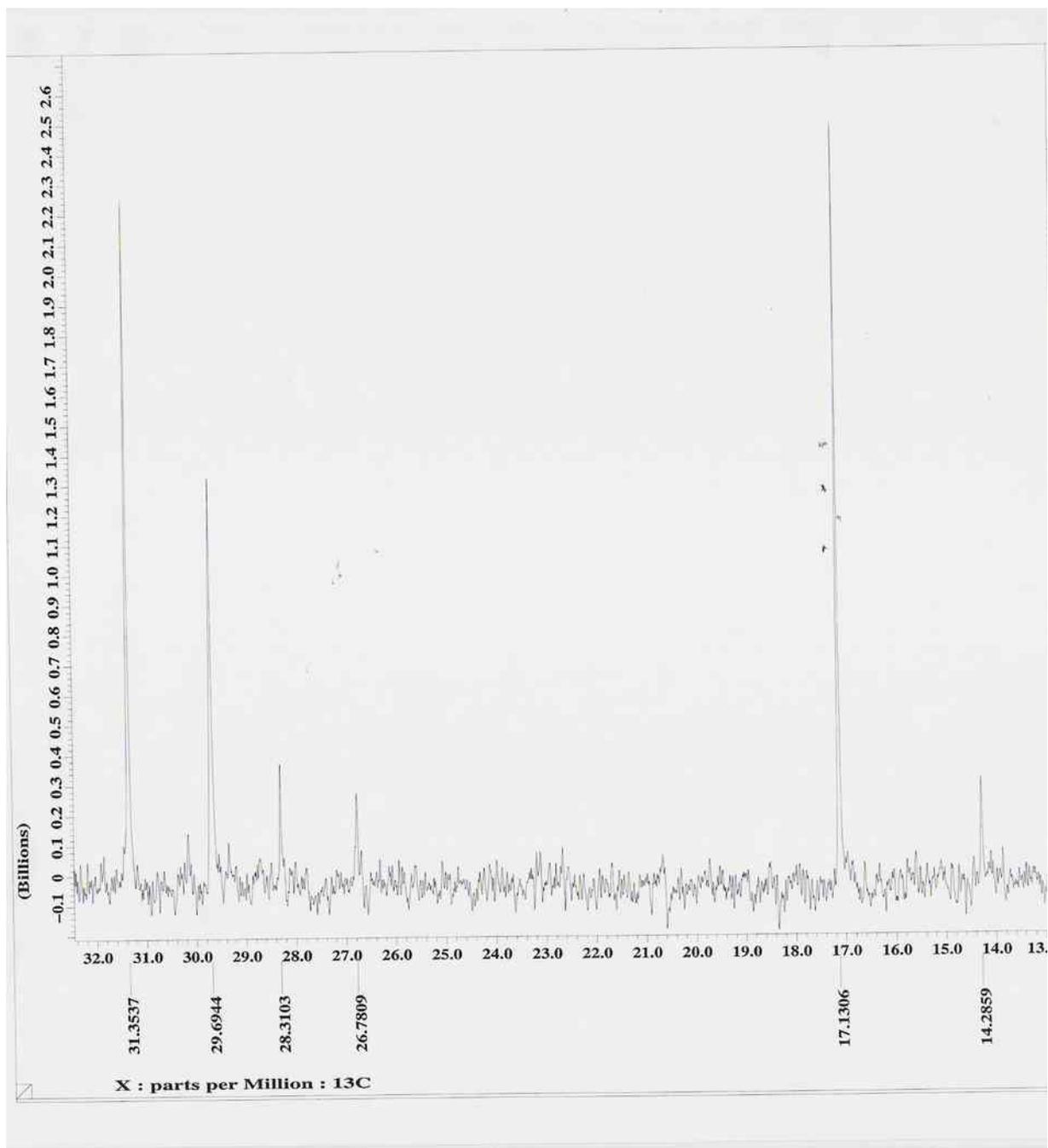


Figura 153 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 13,0- 32,0 ppm) da 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona

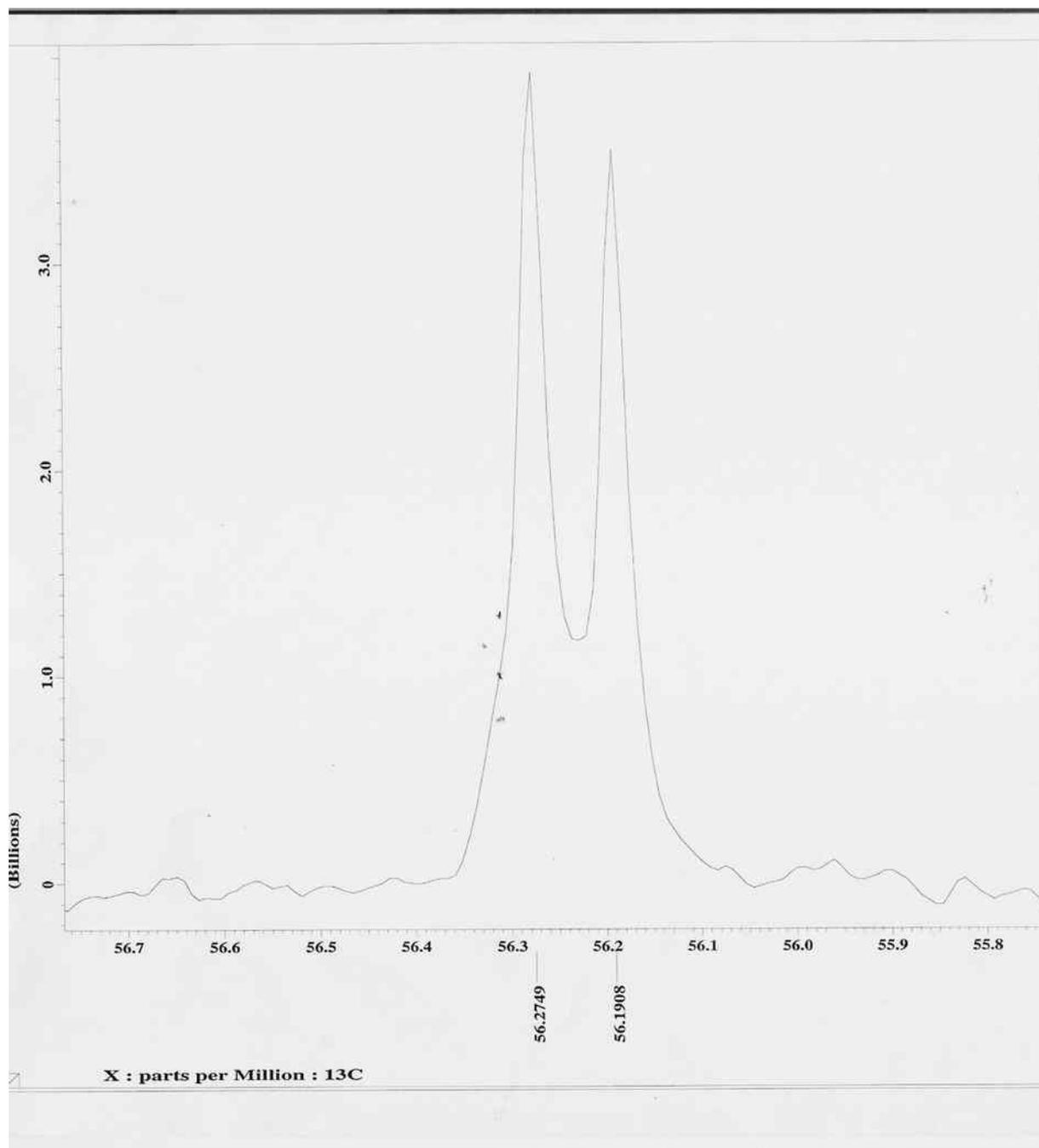


Figura 154 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 55,8- 56,7 ppm) da 6-oxo-6a-12a-desidrortenona

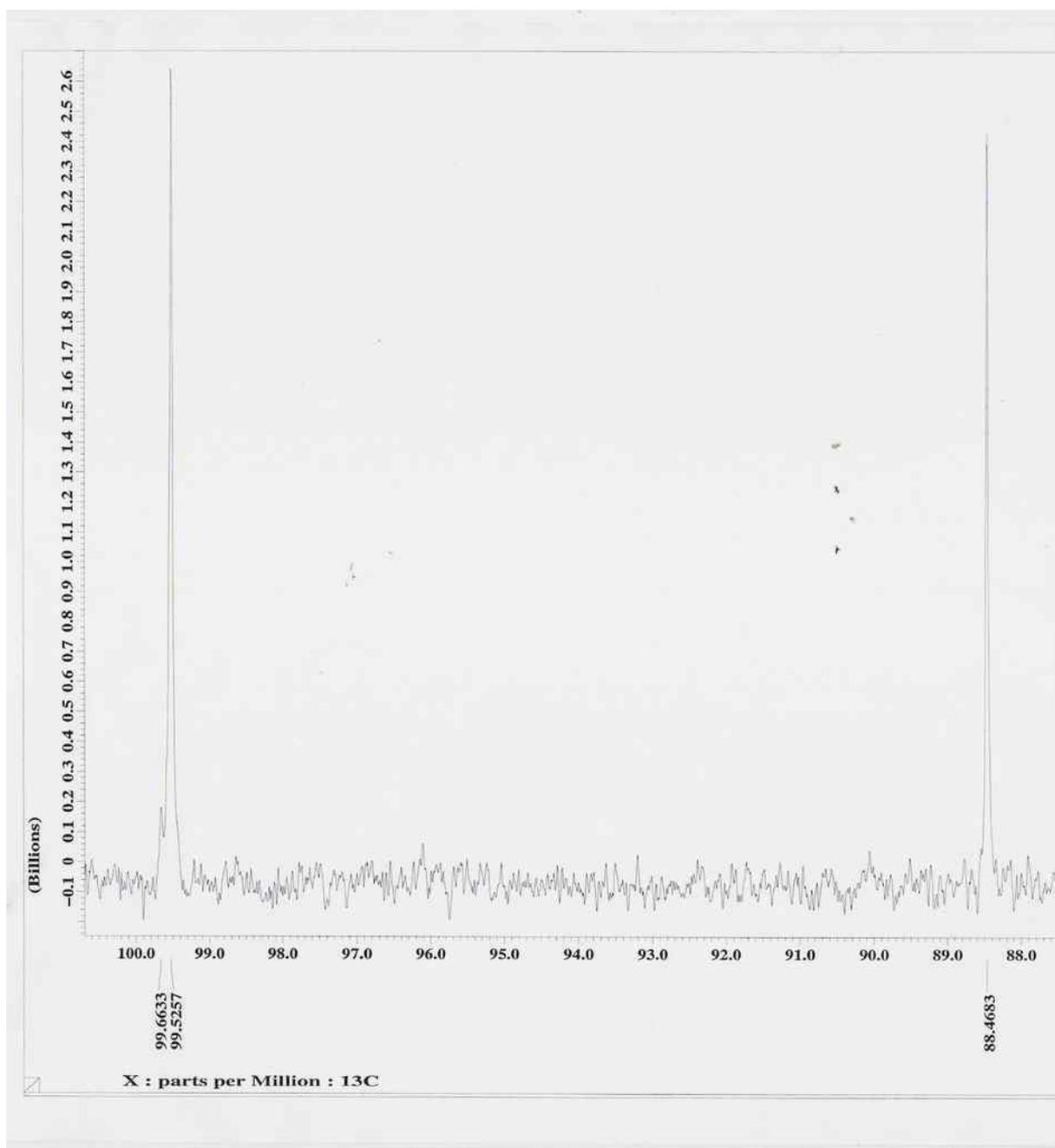


Figura 155 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 88,0- 100,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

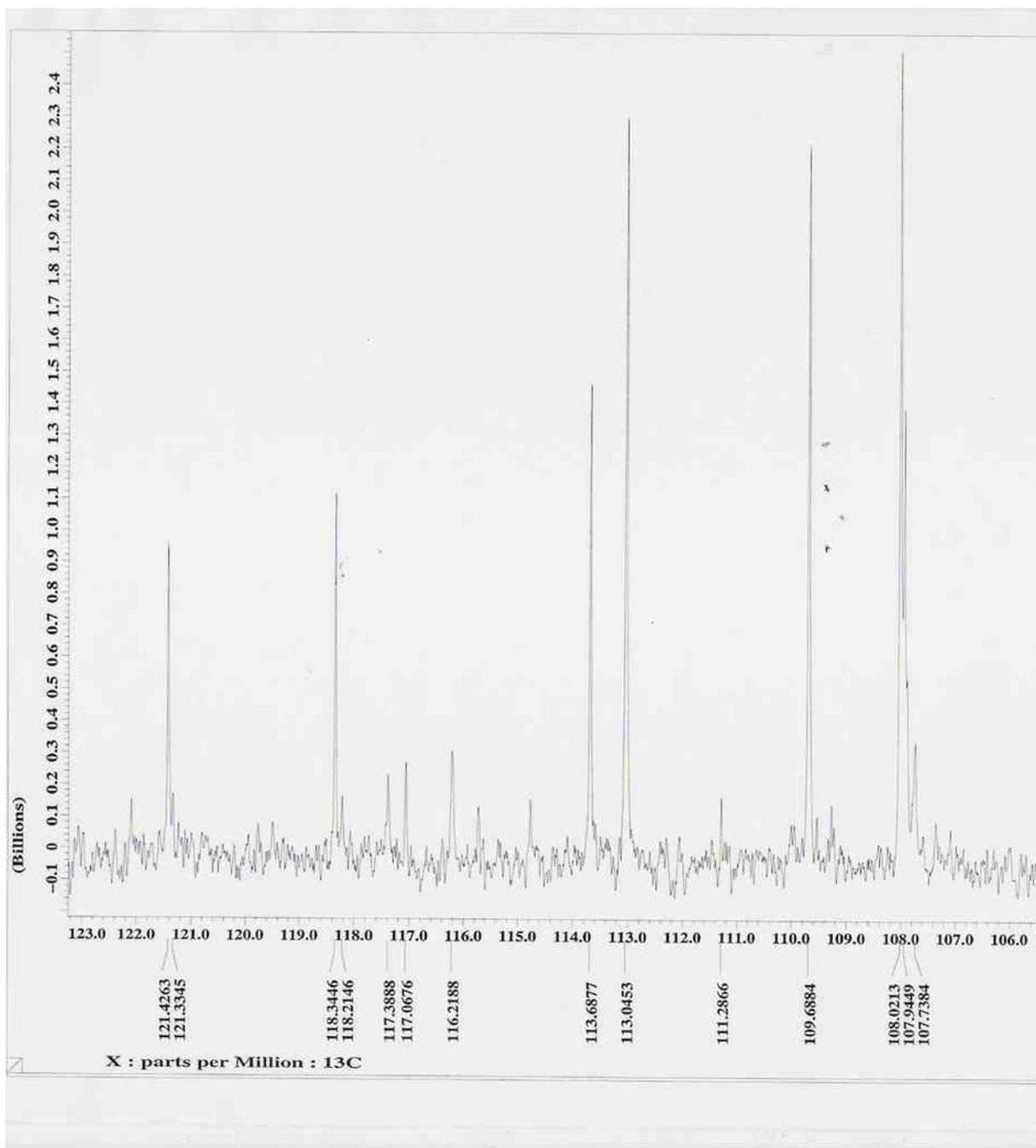


Figura 156 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 106,0- 123,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

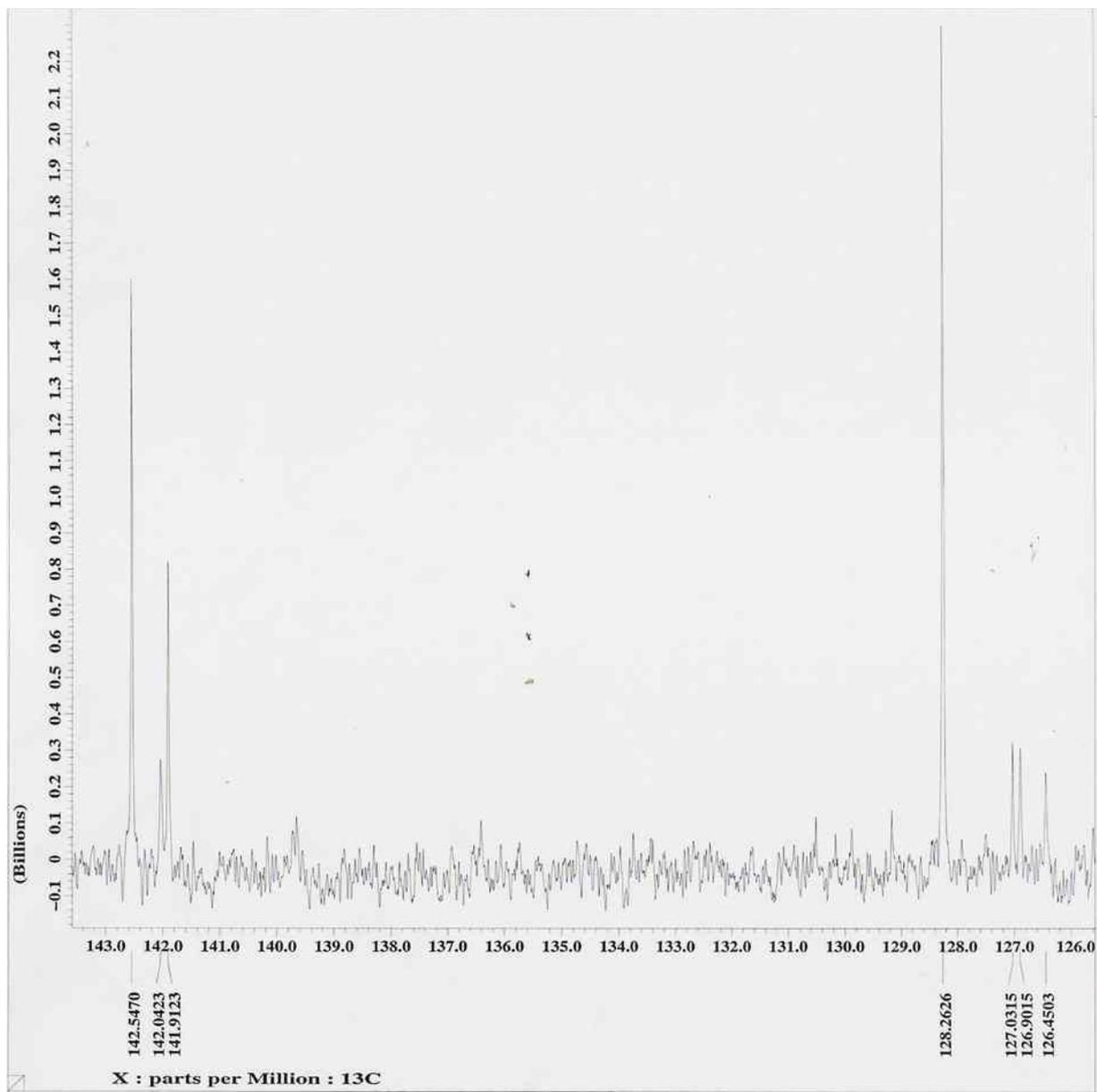


Figura 157 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 126,0- 143,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

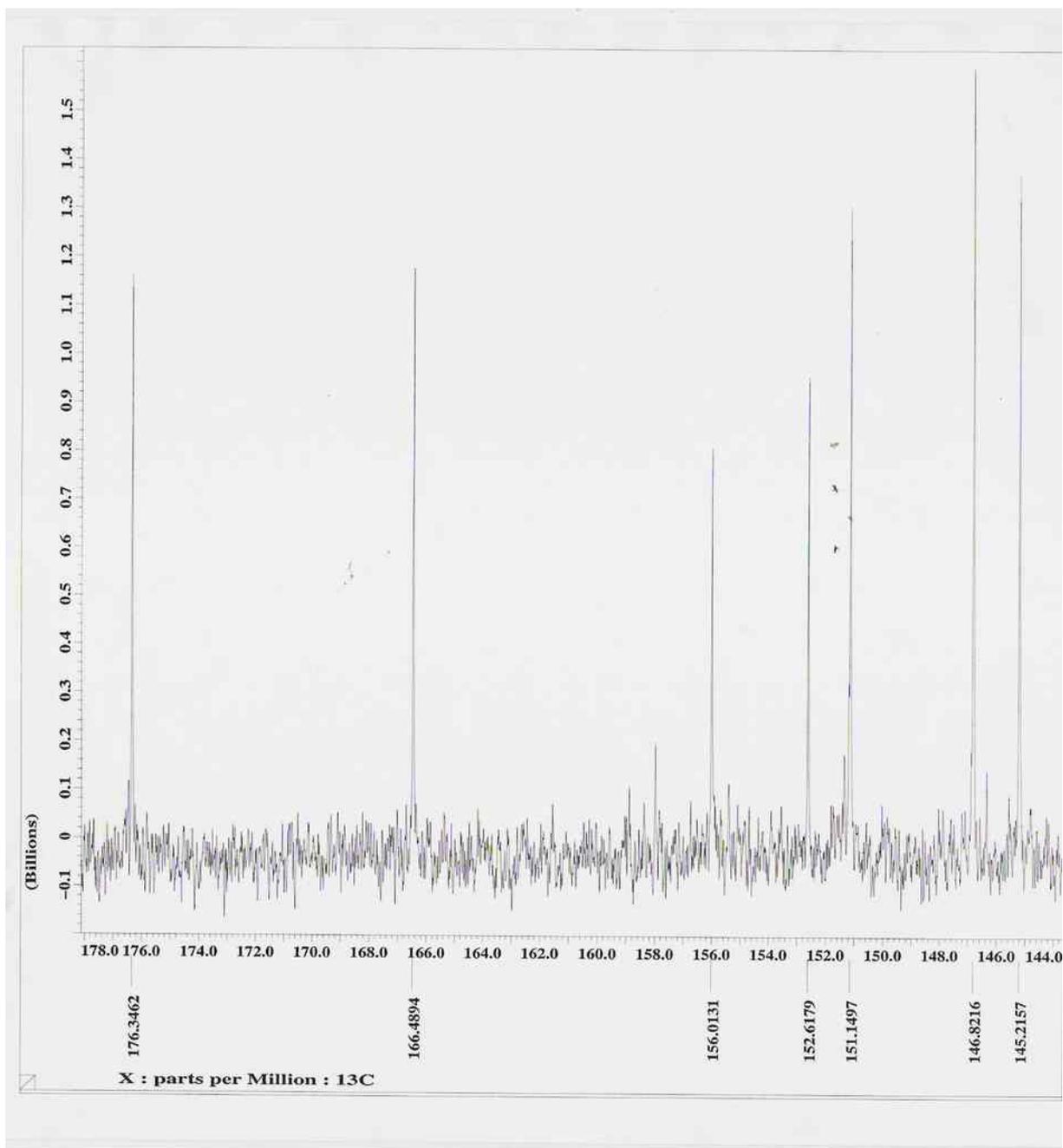


Figura 158 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 144,0- 178,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrortenona

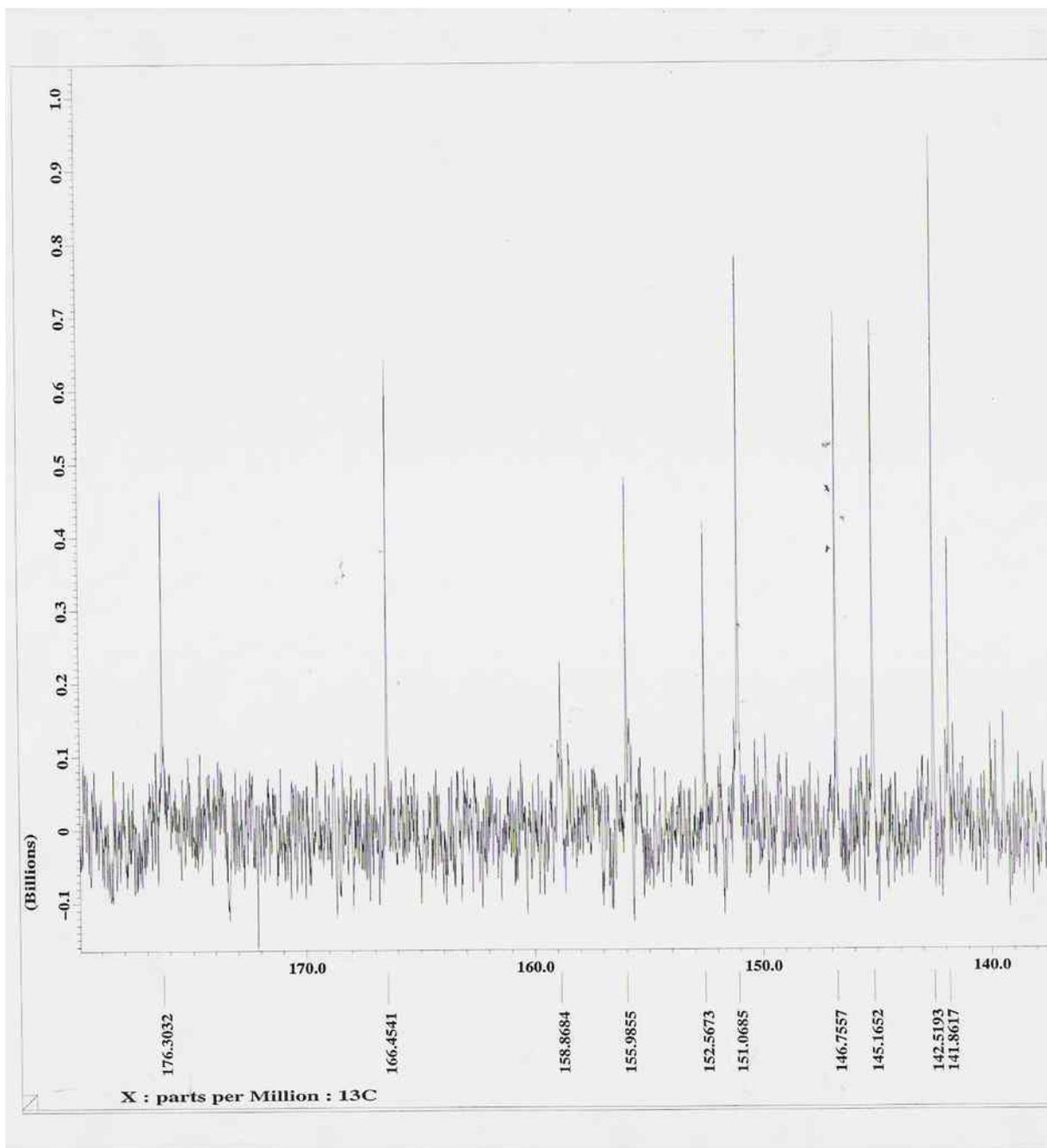


Figura 159 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 140,0- 180,0 ppm) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

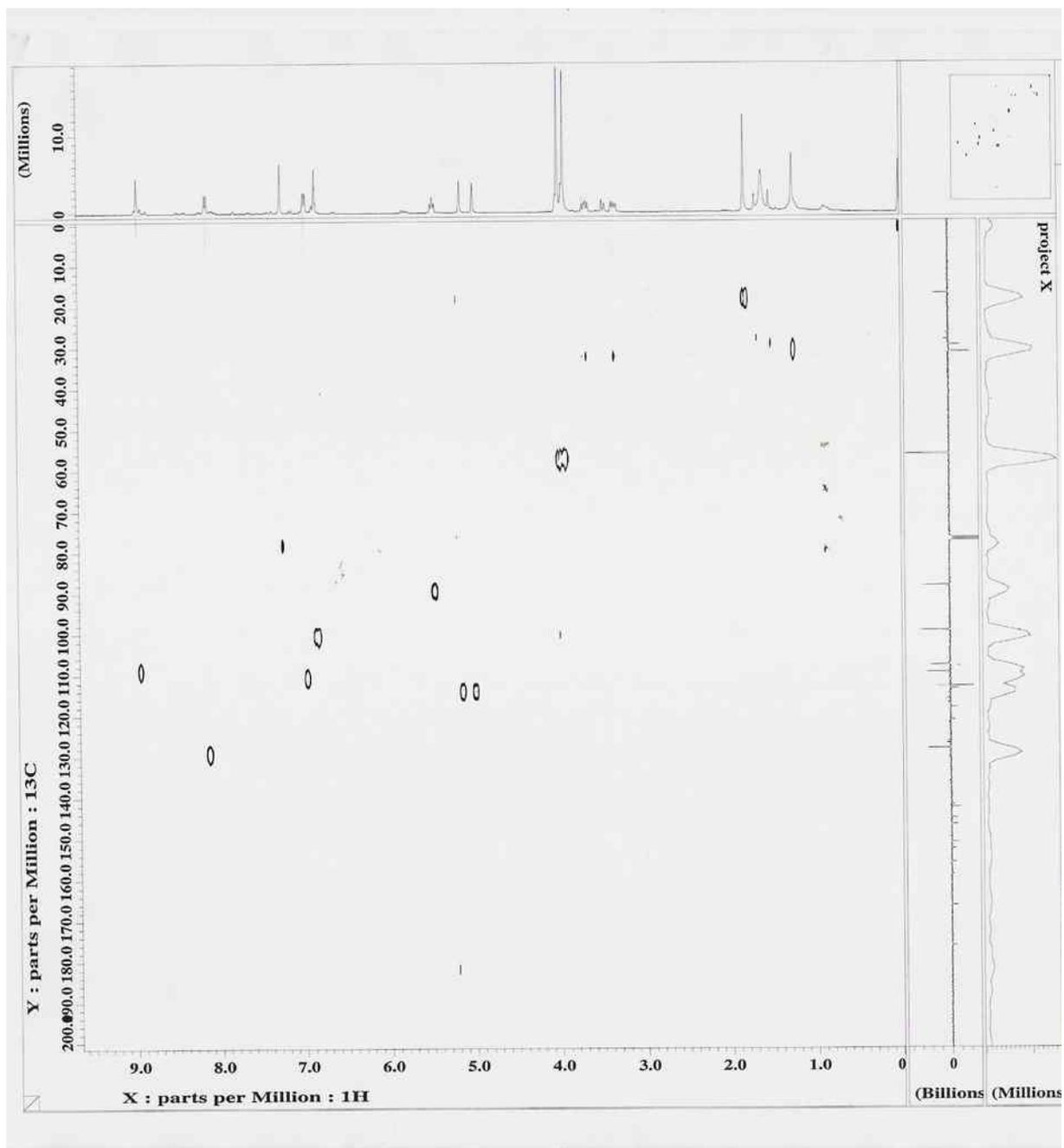


Figura 160 - Mapa de correlação Heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

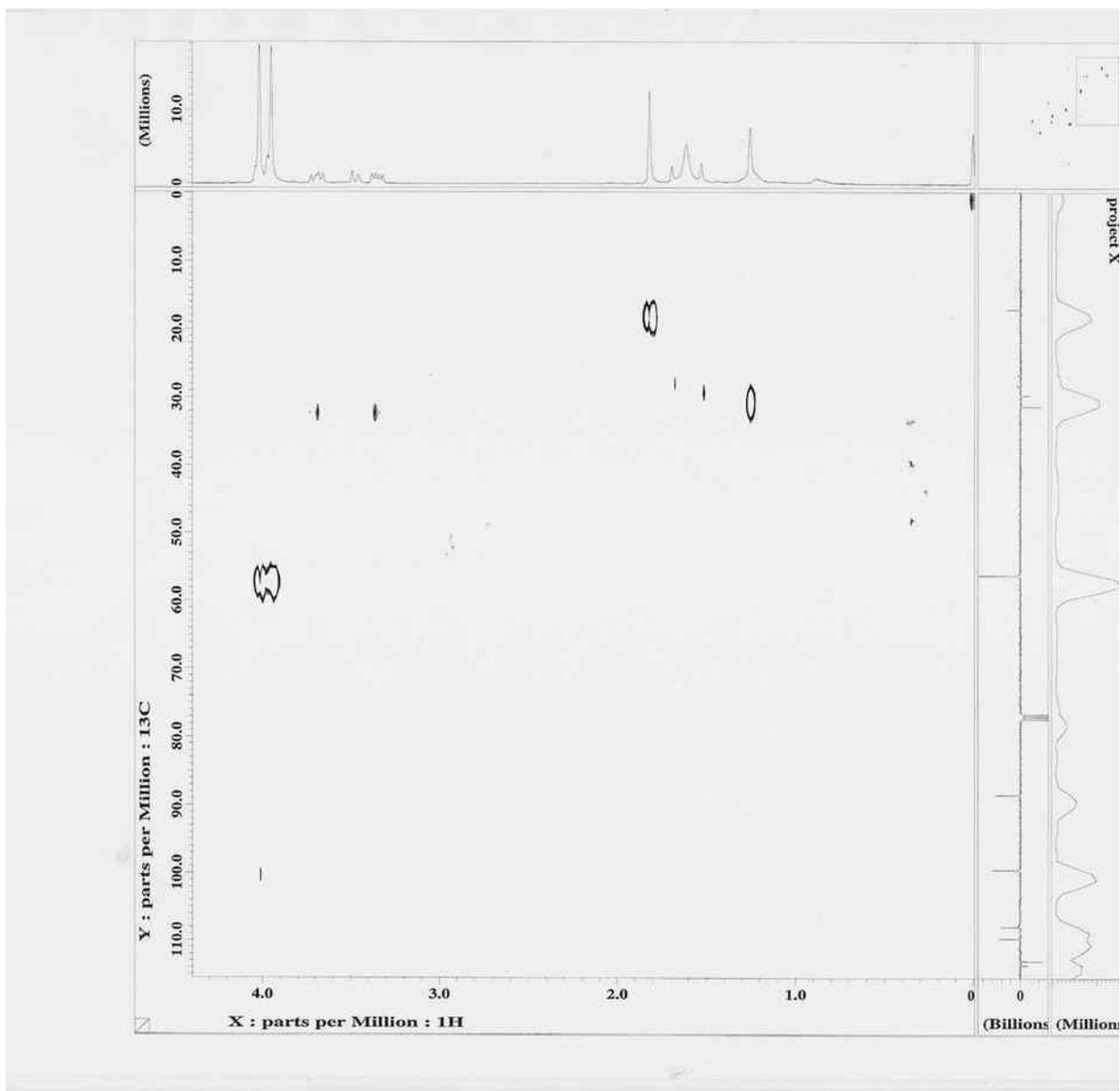


Figura 161 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6-oxo-6a,12a-desidrortena

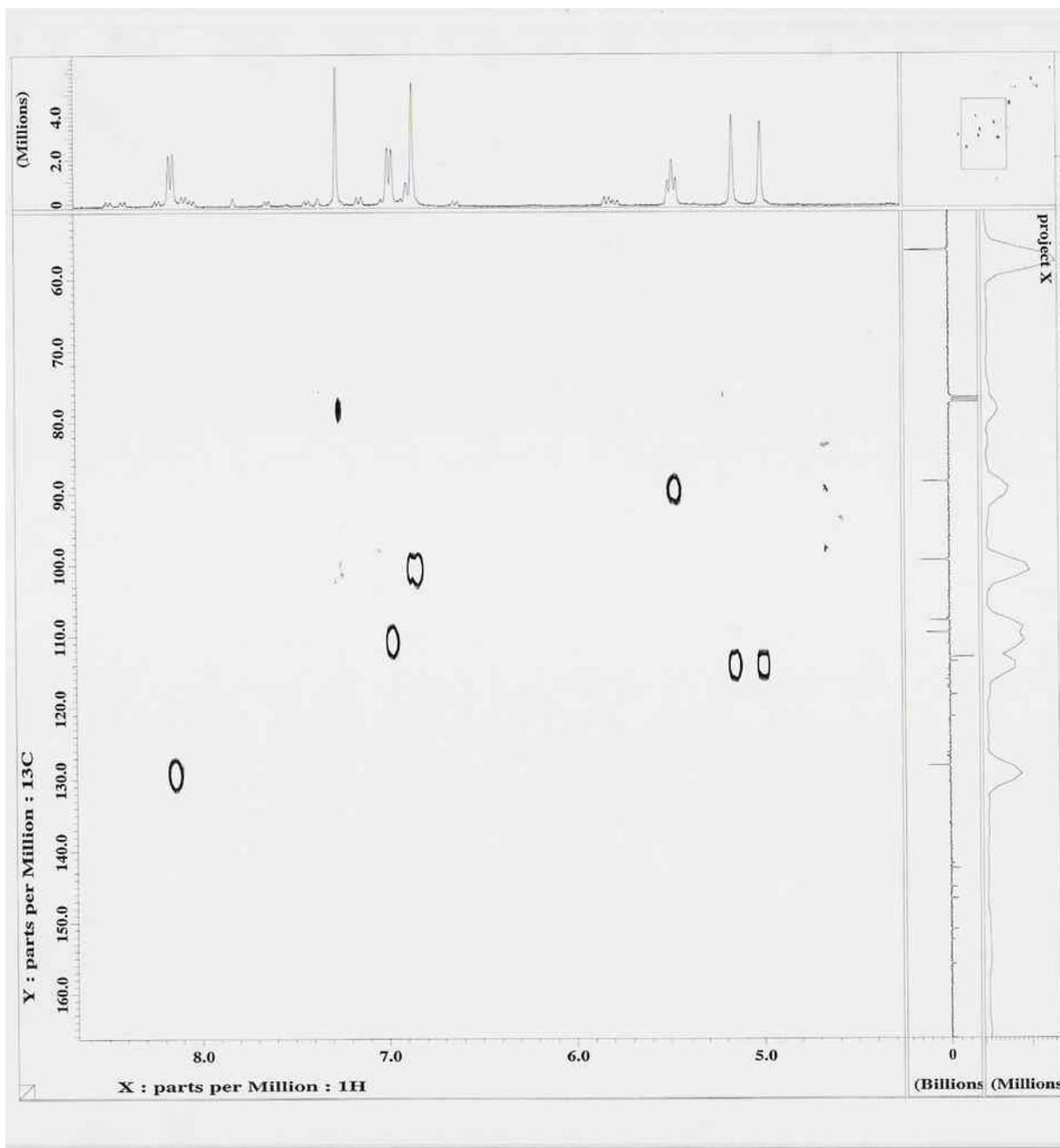


Figura 162 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6-oxo-6a,12a-desidrortenona

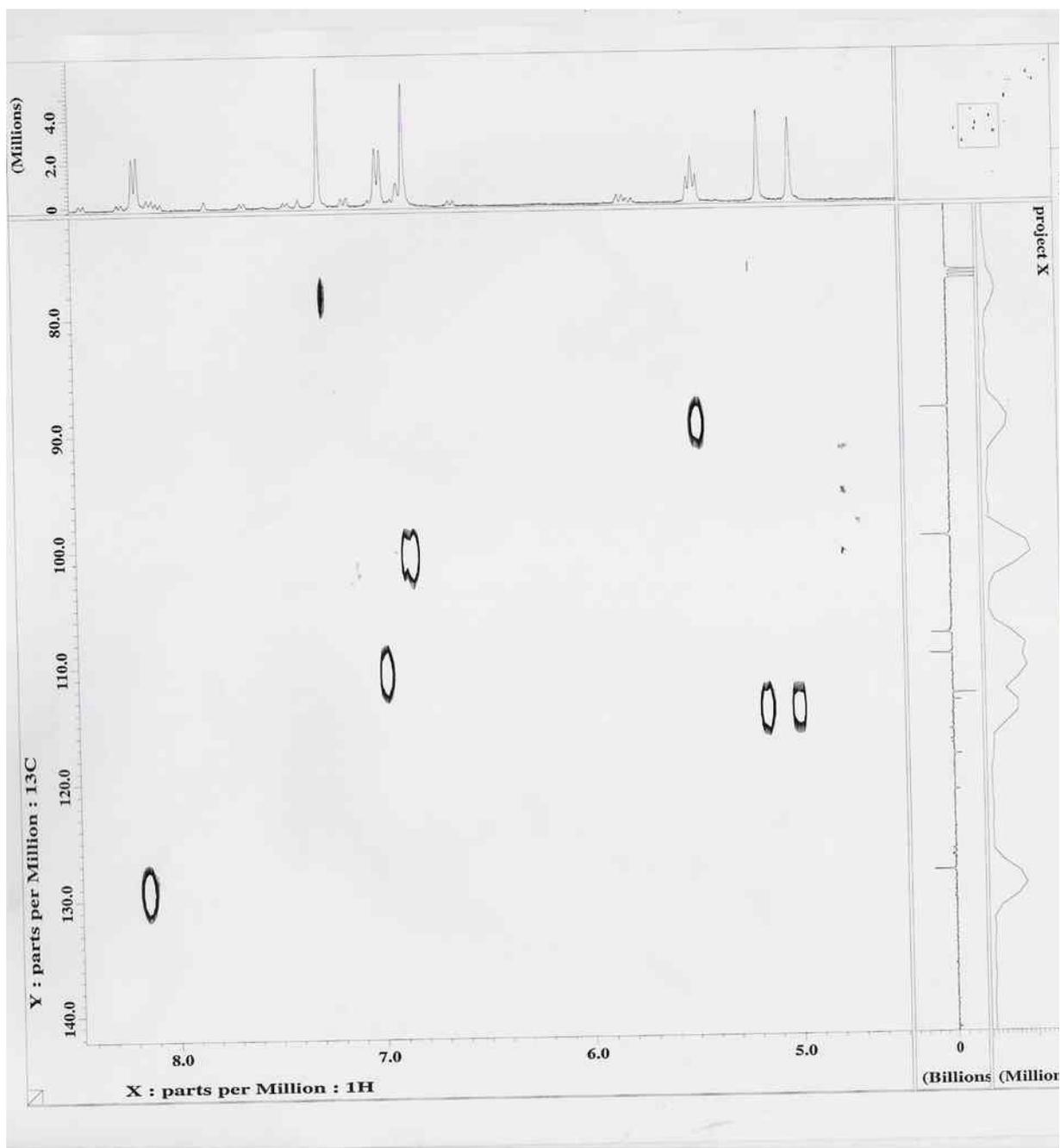


Figura 163 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

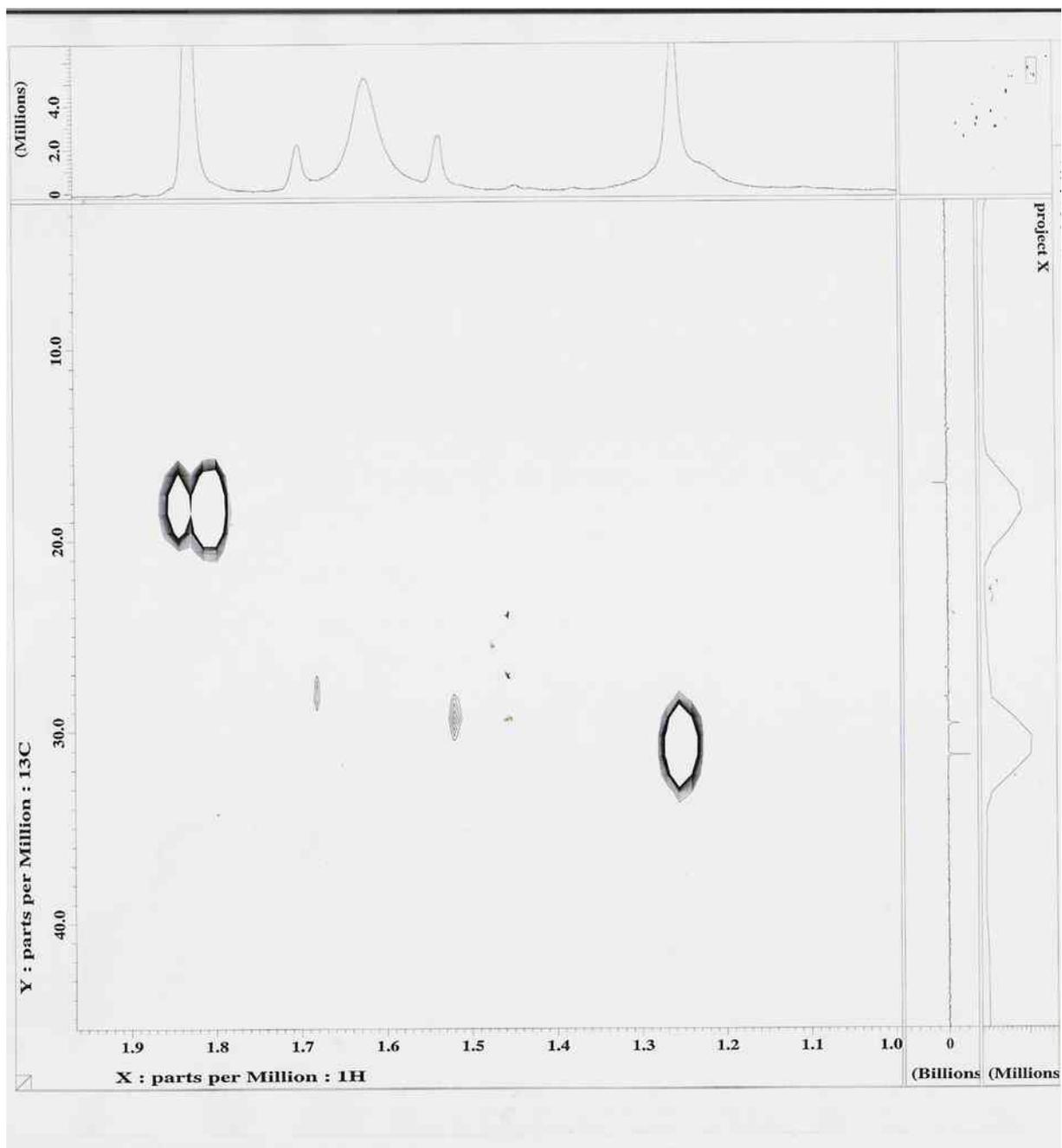


Figura 164 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

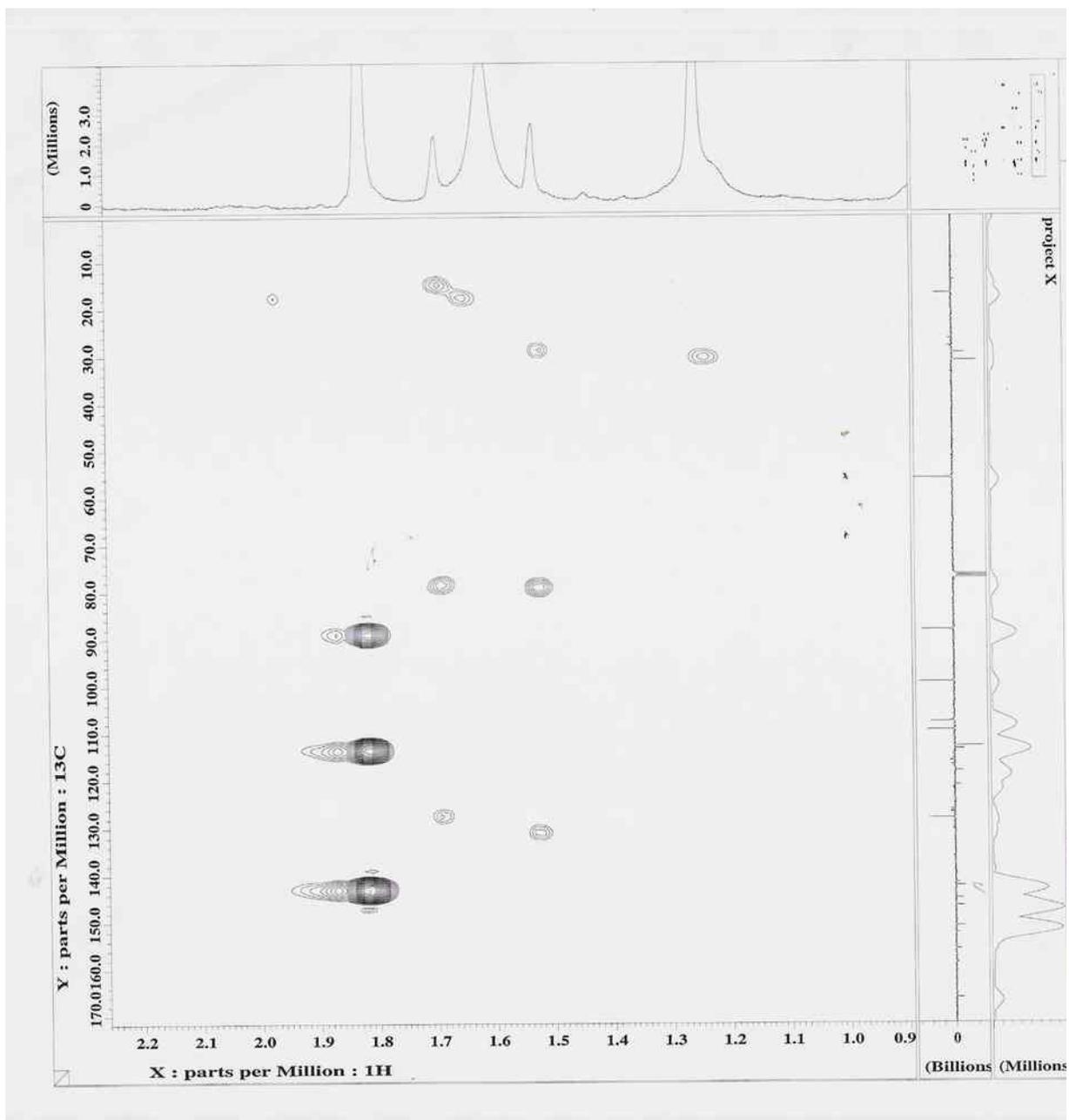


Figura 165 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

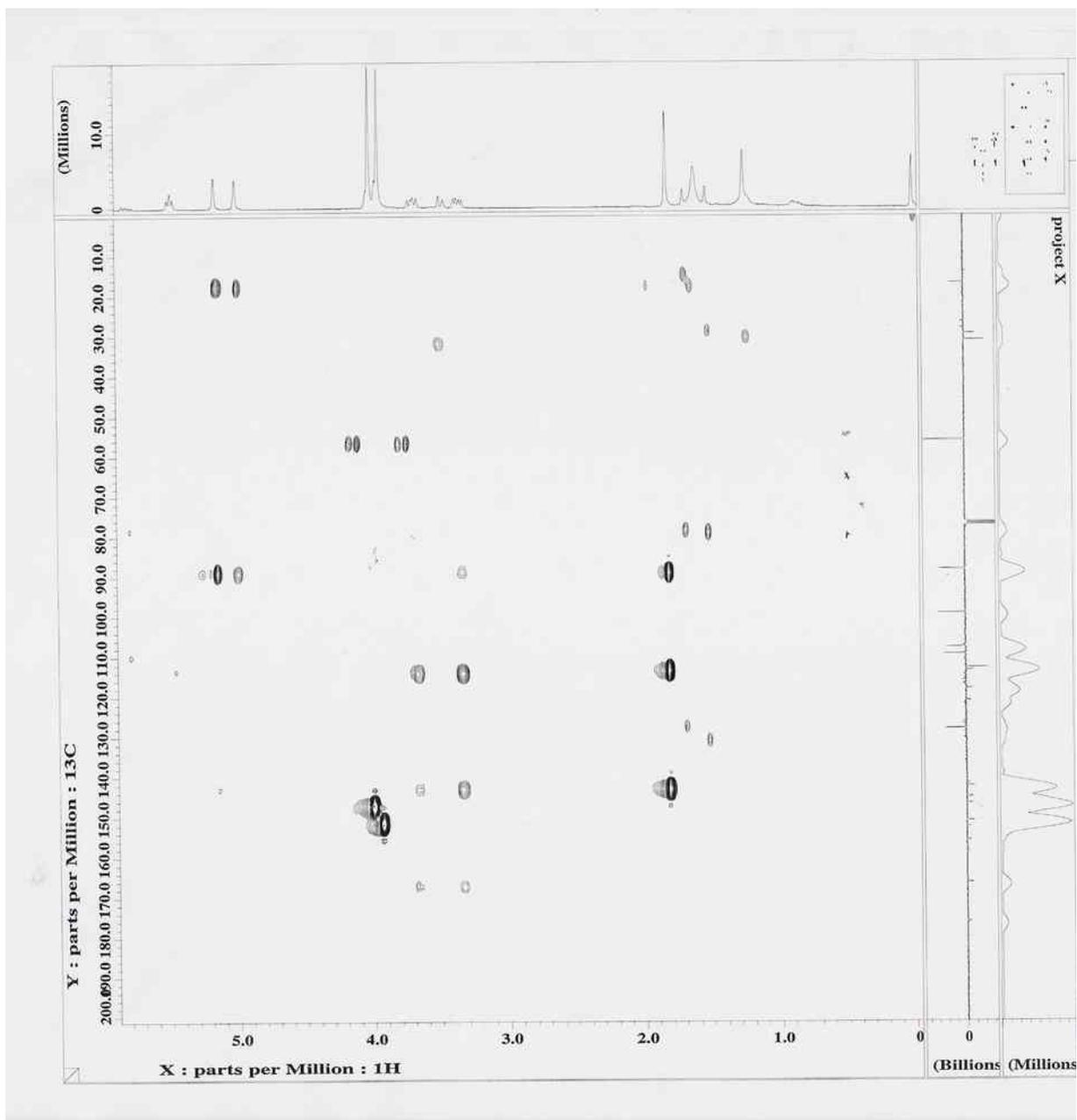


Figura 166 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

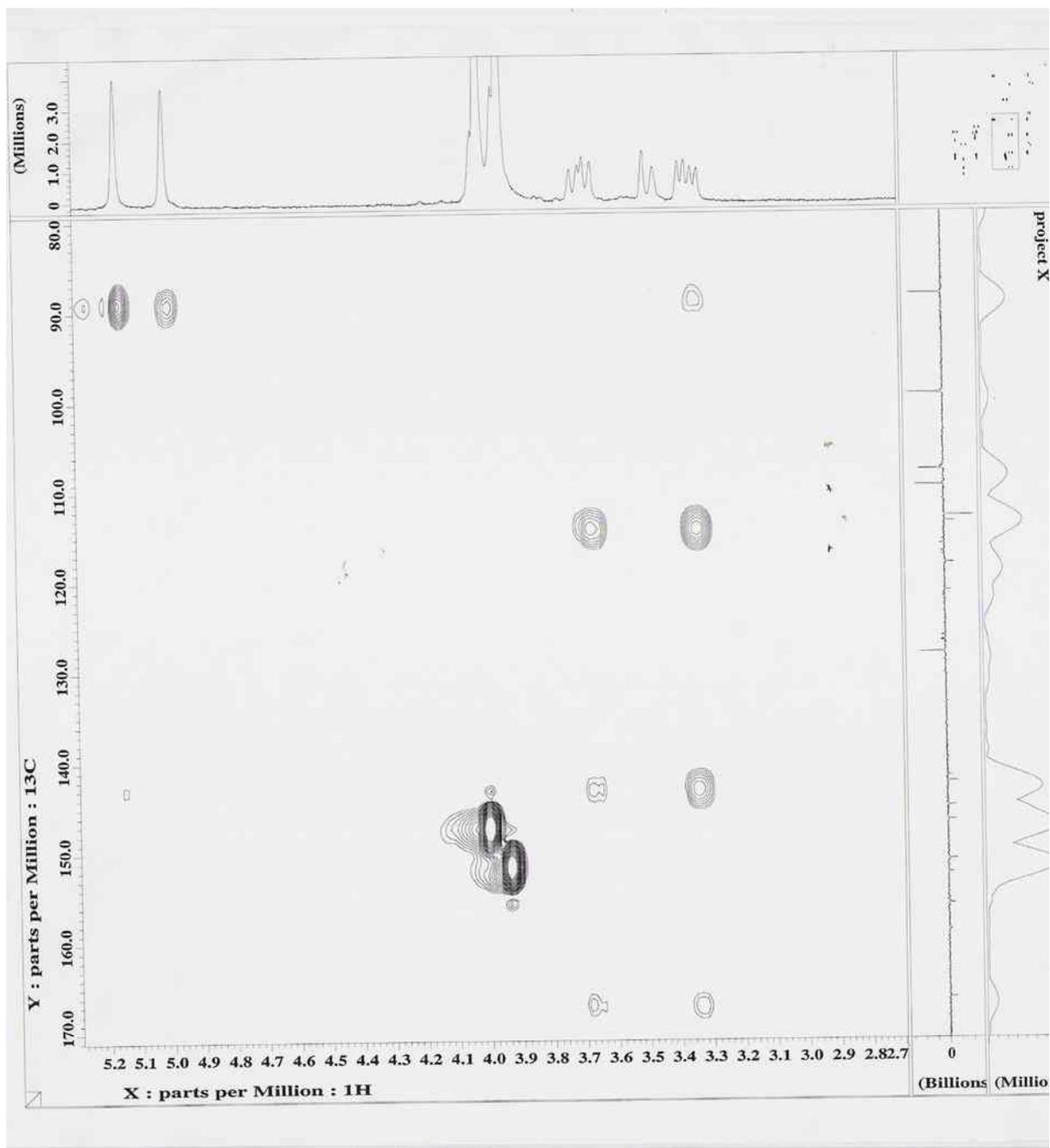


Figura 167 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrrotenona

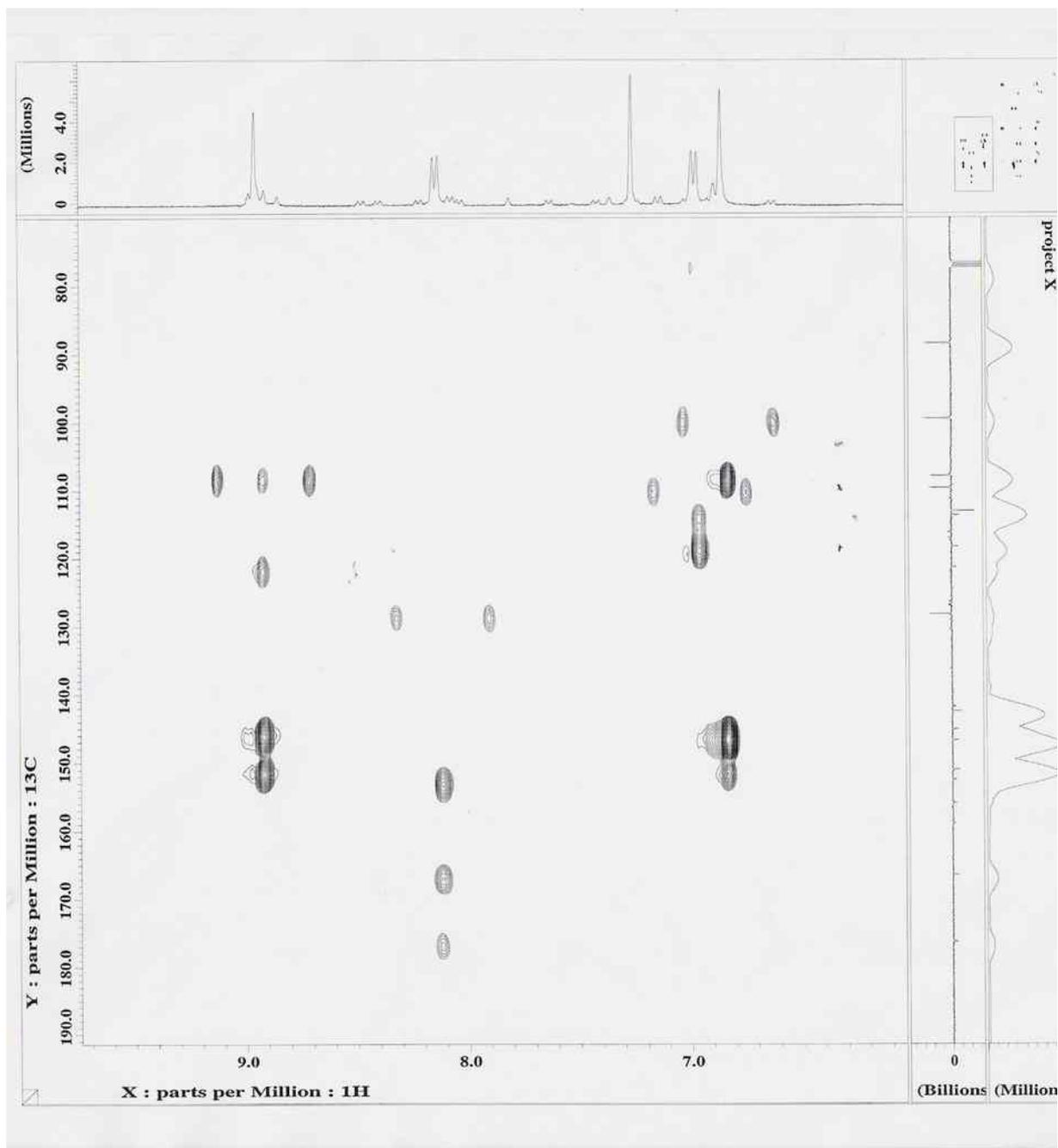


Figura 168 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrortenona

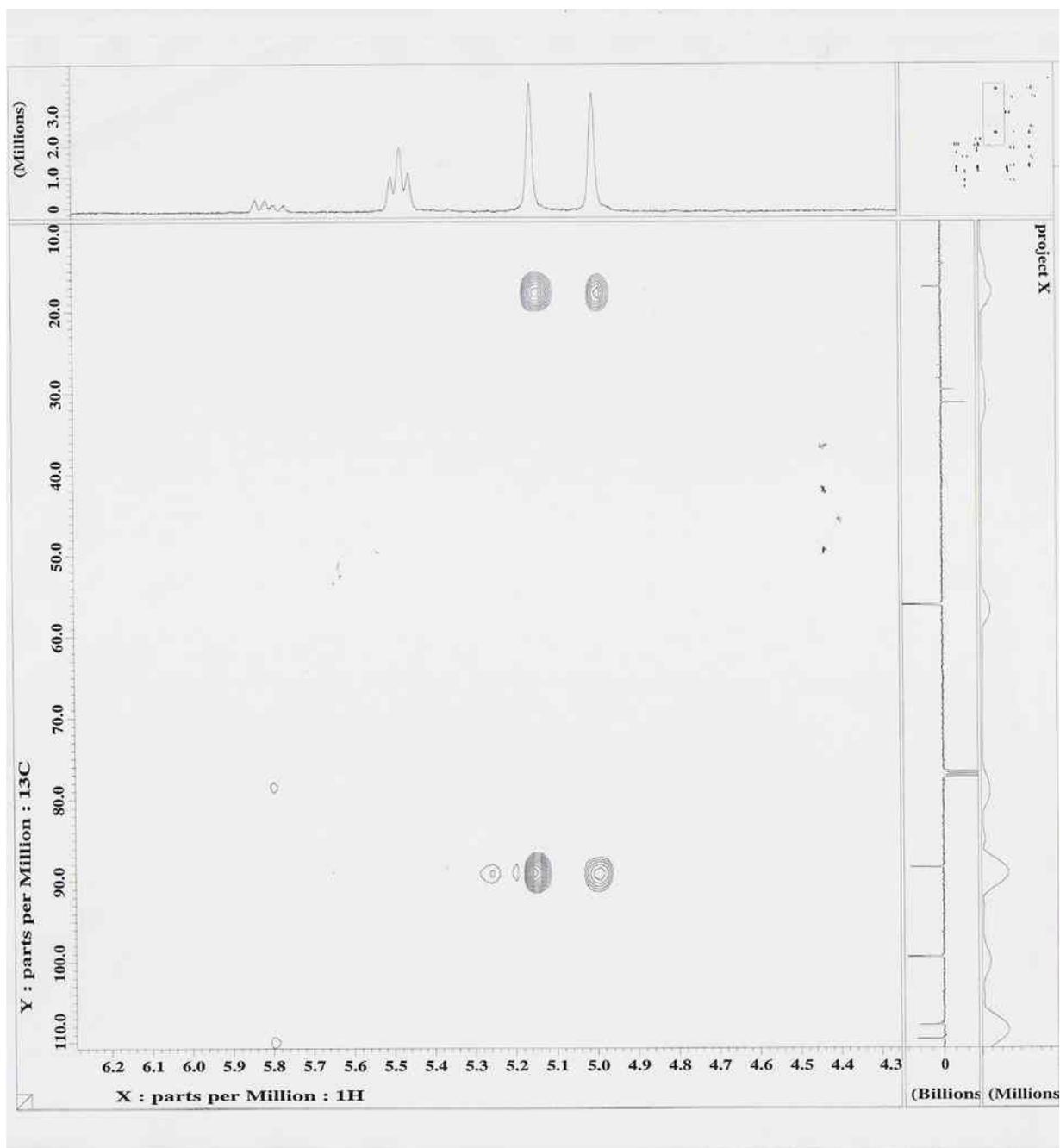


Figura 169 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

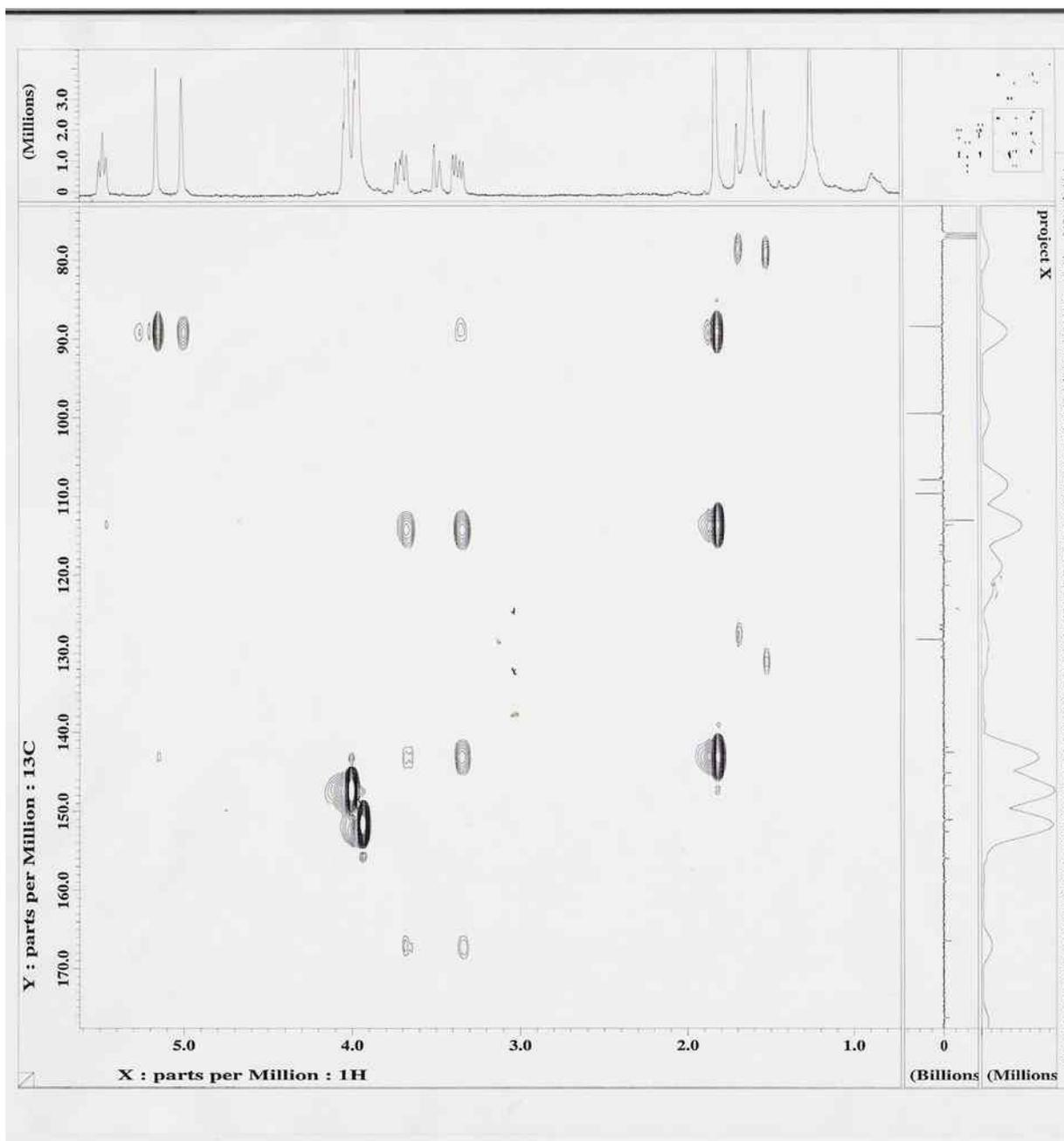


Figura 170 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

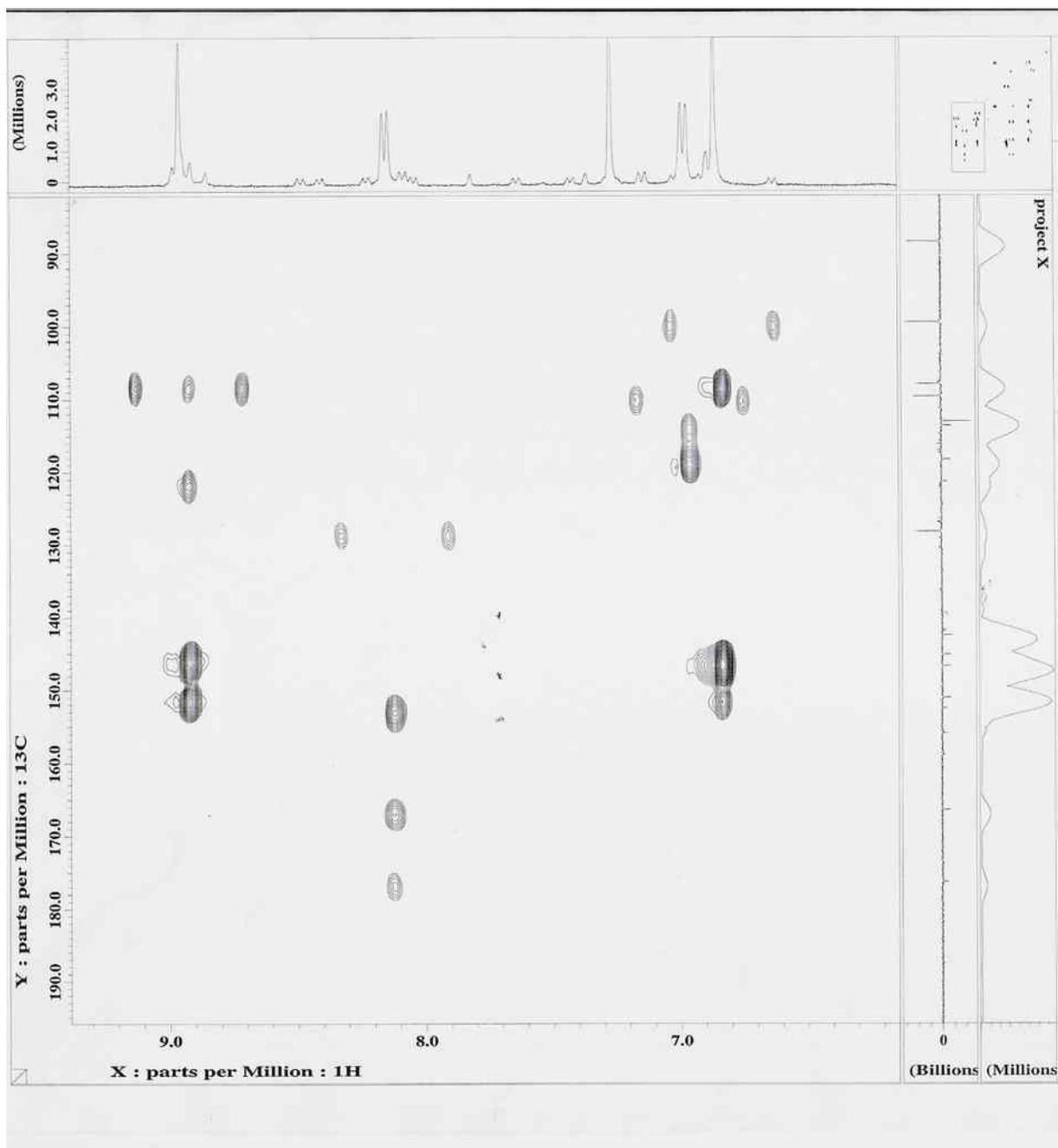


Figura 171 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da 6-oxo-6a,12a-desidrortenona

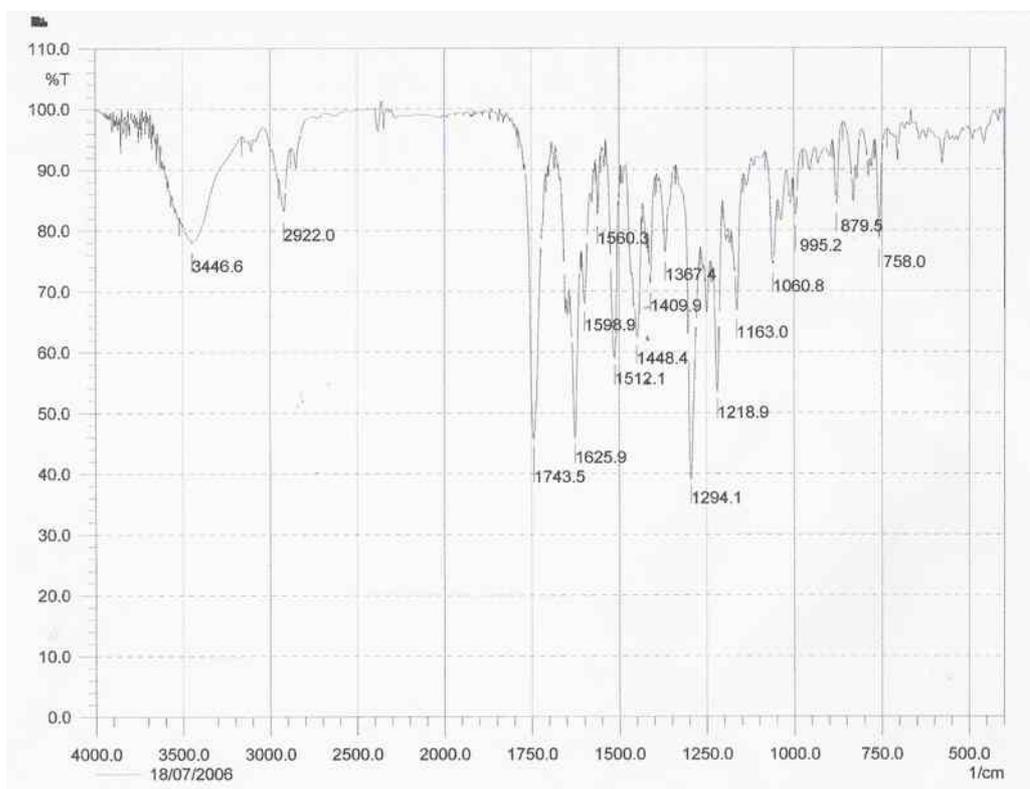
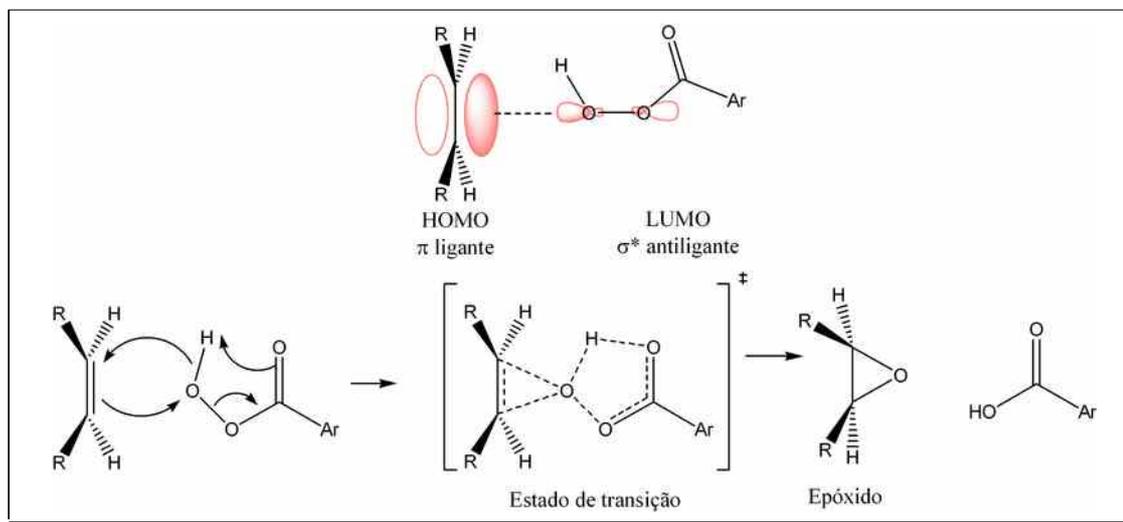


Figura 173 - Espectro de IV da 6-oxo-6a,12a-desidrorotenona

5.2.9. REAÇÃO DA ROTENONA COM O ÁCIDO *m*-CLOROPERBENZÓICO (MCPBA) - REAÇÃO DE BAEYER-VILLIGER

Os perácidos reagem com ligações C=C e C=O fornecendo respectivamente epóxidos e esteres. A reação com alcenos é denominada de epoxidação e a reação com cetona ou aldeído é chamada de reação de Baeyer-Villiger ou rearranjo de Baeyer-Villiger.

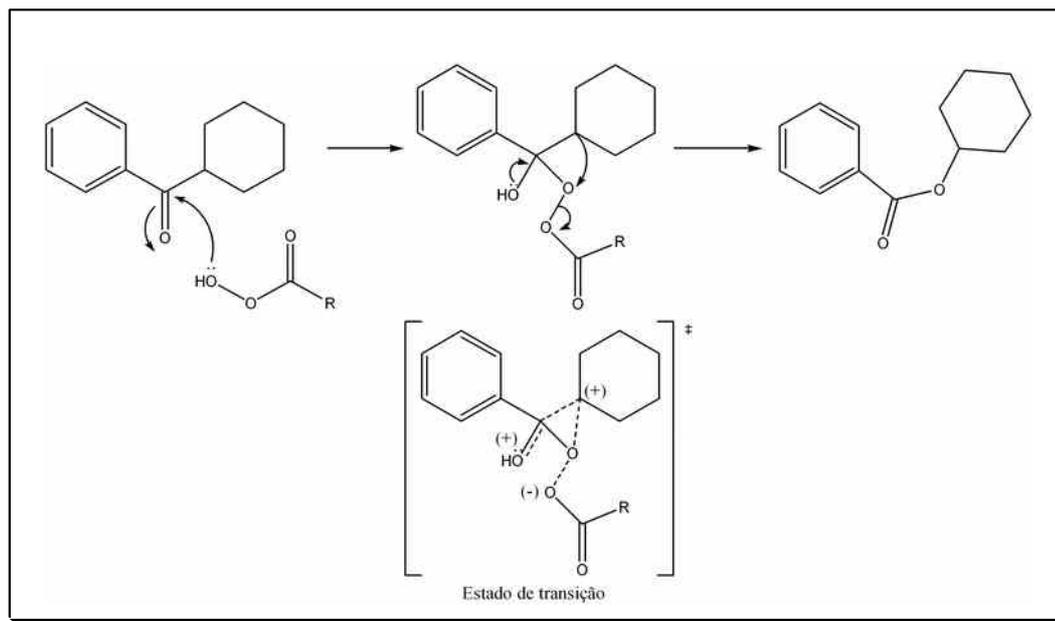
Na reação de epoxidação ocorre a interação do orbital *HOMO* do alceno com o orbital *LUMO* do perácido, ou seja, o orbital ligante do alceno participa da reação como nucleófilo doando elétrons para o oxigênio, quebrando a fraca ligação O-O conforme o mecanismo descrito no esquema 16.



Esquema 16. Mecanismo de epoxidação

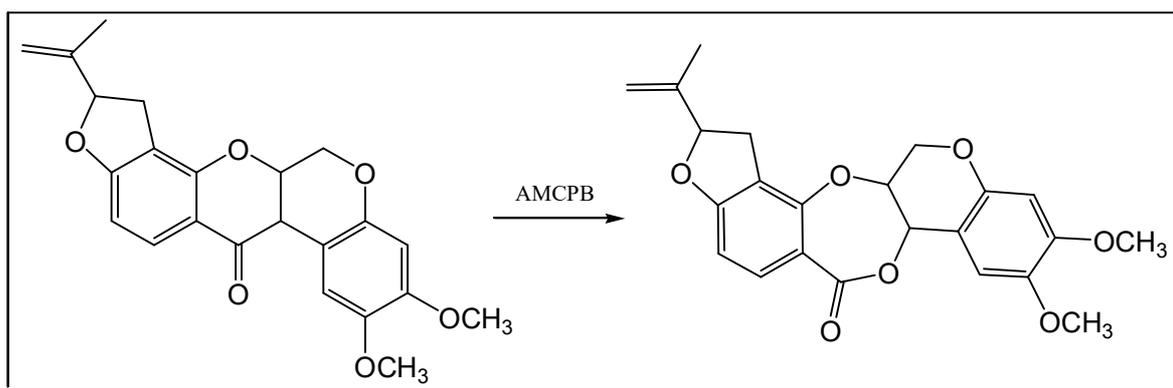
Na reação de Baeyer-Villiger a primeira etapa da reação é o ataque do oxigênio nucleofílico do perácido a carbonila, no intermediário formado ocorre migração de grupo alquilas. A preferência de migração dos grupos depende da capacidade em estabilizar as cargas positivas no estado de transição (esquema 16).

Quando a ligação C=C e a carbonila estão presente na mesma molécula, a presença de um catalisador ácido conduz preferencialmente ao ataque na carbonila. A epoxidação seletiva ocorre em meio isento de acidez ou com ácido *m*-cloroperbenzóico a baixa temperatura (SMITH, 1994).



Esquema 17. Mecanismo da reação de Baeyer-Villiger

A rotenona foi submetida a uma reação de oxidação, com 2 equivalentes de ácido *m*-cloroperbenzóico em clorofórmio utilizando-se um procedimento descrito por Laurent (2004), entretanto após 24 horas de reação não foi observado por cromatografia em camada fina o consumo do material de partida. Aqueceu-se o sistema à temperatura de refluxo do solvente. O produto obtido foi submetido à análise por espectrometria de massas e IV.

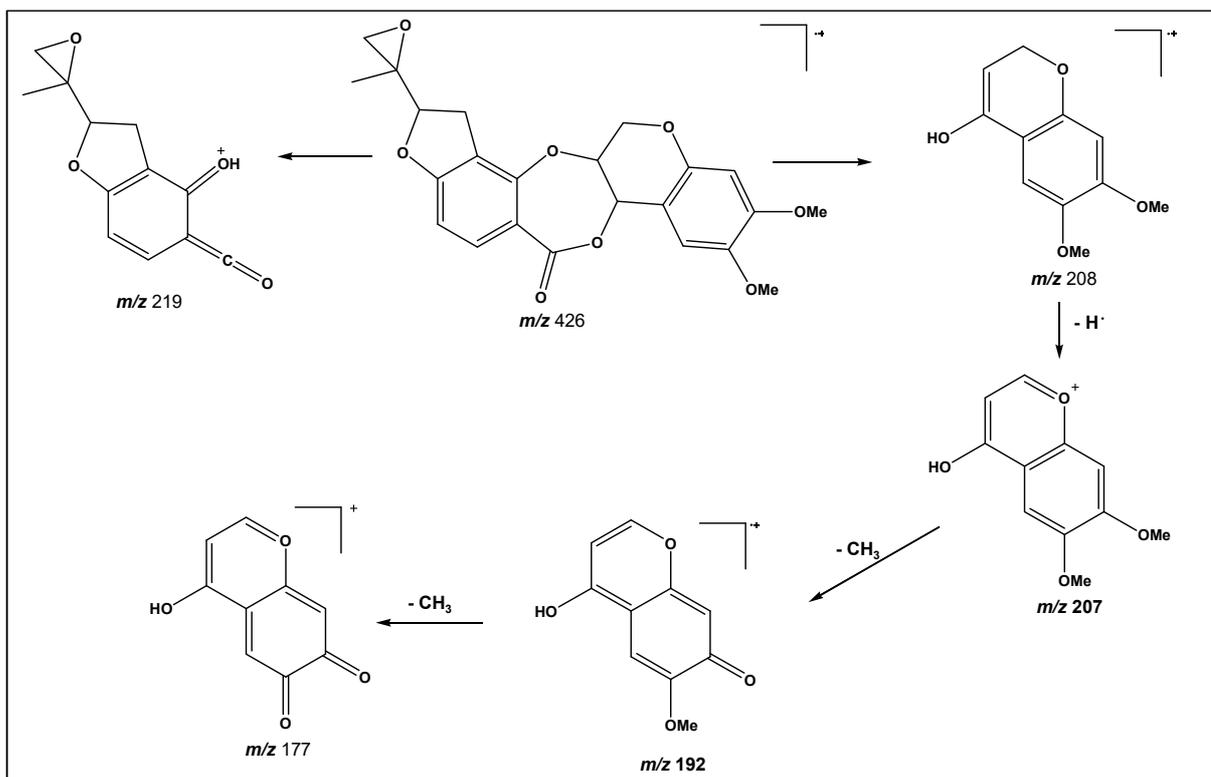


Esquema 18-Reação de oxidação da rotenona com ácido *m*-cloroperbenzóico

5.2.9.1 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO PRODUTO DA OXIDAÇÃO DA ROTENONA COM AMCPB

A análise do espectro de infravermelho mostra uma absorção em 1732 cm^{-1} relativo ao estiramento da carbonila do anel lactônico de sete membros. O espectro de massas da substância mostra íon molecular m/z 426 indicando a formação da lactona e epoxidação da dupla exocíclica do anel **E**. A proposta de fragmentação da molécula é ilustrada no Esquema 19.

O pico m/z 410 poderia ser atribuído à formação somente da lactona, visto que as condições reacionais empregadas favorecem o ataque nucleofílico à carbonila.



Esquema 19 - Proposta de fragmentação da rotenona com AMCPB

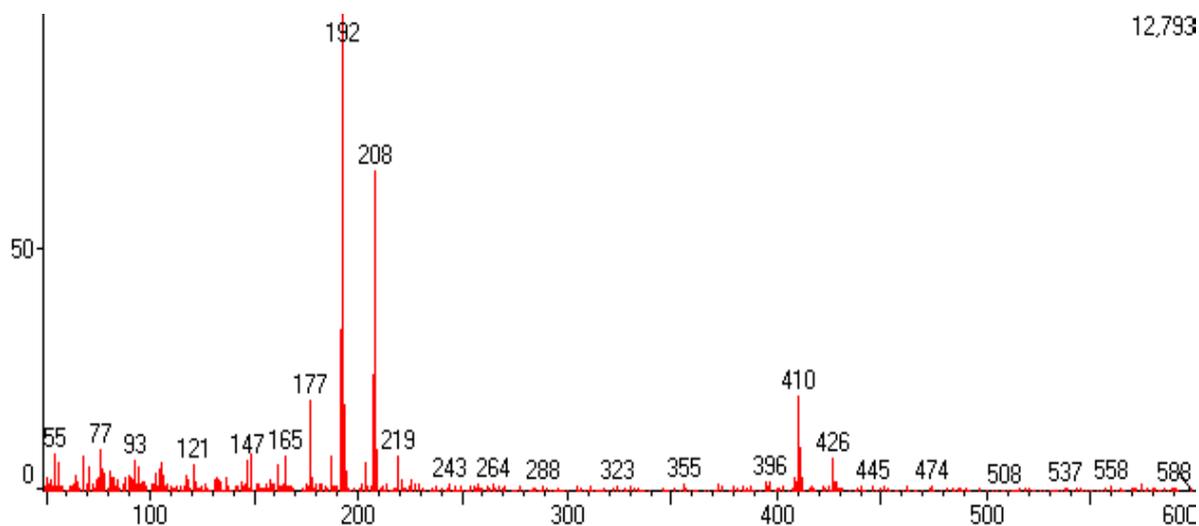
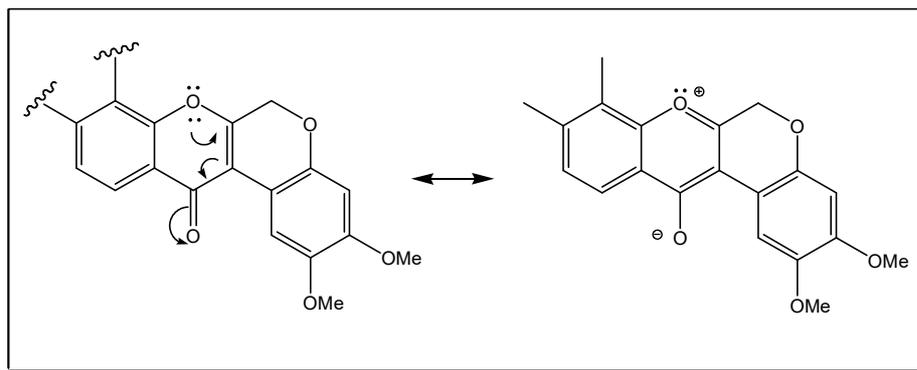


Figura 174. Espectro de massas do produto de oxidação com ácido *m*-cloroperbenzóico

5.2.9.2-TENTATIVAS DE REAÇÕES COM A MISTURA BINÁRIA DE 6a, 12a-DESIDROROTENONA E 6a,12a-DESIDRODEGUELINA

A mistura binária de 6a, 12a-desidrrotenona e 6a,12a-desidrodeguelina foi submetida a reações de adição à carbonila. Tentou-se reduzir a carbonila com NaBH_4 e com LiAlH_4 em diversas condições experimentais, entretanto ocorreu recuperação do produto de partida. A mistura binária também foi submetida a reações com butilamina e cloridrato de hidroxilamina em meio básico e novamente o sistema mostrou-se pouco reativo. Provavelmente a baixa reatividade da carbonila é devido a sua conjugação com o sistema pirânico Esquema 20, p.227.



Esquema 20 - Estruturas de ressonância do anel pirânico C

Capítulo 6.0

ATIVIDADE BIOLÓGICA

6.1 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE ÀS LARVAS DE *Artemia salina* Leach

Este experimento foi realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais – LCQUI – CCT - UENF

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. As plantas possuem inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais, é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico. Os sistemas de ensaio devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis.

Os bioensaios podem envolver organismos inferiores (microorganismos e microcrustáceos, entre outros), ensaios bioquímicos visando alvos moleculares (enzimas e receptores) e ainda cultura de células animais ou humanas.

6.1.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.2.1 - OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE RAÍZES DE *DERRIS URUCU* E SUBSTÂNCIAS PURAS.

O extrato bruto, rotenona, desidrorrotenona e derivados foram obtidos segundo metodologias descritas nos itens: 4.5.2.1; 4.5.2.2; 4.6.1; 4.6.2; 4.6.3; 4.6.4

O teste de letalidade com *Artemia salina* foi realizado segundo metodologia proposta por McLaughlin (1995).

6.1.2.2. BIOENSAIO COM *ARTEMIA SALINA*

a) Materiais

Na preparação de 2L de água do mar artificial foram utilizados os seguintes reagentes: NaCl (48,0 g), CaCl₂.2H₂O (3,0 g), KBr (0,2 g), KCl (1,4 g), Na₂SO₄ (8,0 g), NaHCO₃ (0,4 g), MgCl.6H₂O (22,0 g) e água destilada.

Como controle positivo utilizou-se K₂Cr₂O₇, DMSO e Tween 80. E no controle negativo, foram utilizados água do mar artificial H₂O:DMSO (3:2) em quaduplicata.

No laboratório foi utilizado um aquário de plástico (7,5 x 14,0 cm) provido de uma peneira, para eclosão dos ovos de *A. salina*; foram utilizados ainda, espátulas, estantes com tubos de ensaio, béqueres, pipeta automática e pipeta Pasteur.

b) Procedimento experimental

Para amostra de extrato bruto foram utilizados 50,00mg de amostra e para as substâncias puras quimicamente modificadas foram usados 2,00 mg diluídos em 1000mL. As amostras foram solubilizadas na mistura de solvente composto por H₂O e DMSO [3:2 (5mL)] e foram diluídas em diferentes concentrações. As análises foram realizadas em quaduplicatas.

Os ovos de *A.salina* foram colocados em água do mar artificial, para eclodir em 48 horas ao abrigo de luz. Após a eclosão dos ovos, 15 larvas foram adicionadas em cada tubo de ensaio contendo água do mar artificial. Após 24 horas em presença de luz, foi realizada a contagem dos indivíduos vivos e mortos.

c) Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo programa Finney, desenvolvido por McLaughlin para análise estatística e determinação dos valores de DL₅₀. Valores de DL₅₀ ≤ 1000 µg/mL são considerados ativos para extratos e < 30, muito ativos para substâncias puras.

d) Resultados e discussões

A rotenona e a mistura binária 6a,12a-desidrorotenona e 6a-12a-desidrodeguelina quando submetidas ao teste de letalidade, frente a *Artemia salina* forneceram respectivamente uma DL₅₀ de 0,057 ppm e 284 ppm.

A partir da rotenona foi realizada uma reação de redução com a finalidade de verificar a influência da carbonila na citotoxicidade desse rotenóide. O 12-hidroxirottenona, produto dessa reação quando submetido ao teste de letalidade resultou em uma DL₅₀ de 0,099 ppm. Para verificar a influência da dupla ligação exocíclica do anel **E** da rotenona, foi realizada reação de hidrogenação catalítica, da qual resultou a 6',7'-diidrorotenona que submetido ao teste de letalidade apresentou uma DL₅₀ de 0,619 ppm. Esse derivado foi submetido a uma reação de redução fornecendo o 6',7'-diidro-12-hidroxirottenona que após o teste apresentou uma DL₅₀ de 0,553 ppm.

Com a molécula da desidrorotenona foi realizada uma reação de oxidação que forneceu a 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona que submetida ao teste de letalidade apresentou uma DL₅₀ de 594 ppm.

TABELA 16. Resultados obtidos no teste de letalidade frente às larvas de *Artemia salina*

Substâncias	DL ₅₀ (ppm)
Rotenona	0,057
6a-12a-desidrorotenona/6a-12a-desidrodeguelina (52:48%)	284
12-hidroxirottenona	0,099
6',7'- diidro-rottenona	0,619
6',7'-diidro-12,12a-desidrorotenona	0,553
6-oxo-6a,12a-desidrorotenona	594

Os resultados obtidos após a avaliação citotóxica frente às larvas de *A. salina* mostram que alteração no anel heterocíclico **C** ocasionada pela redução da carbonila não produzem mudança significativa na atividade biológica, enquanto que alterações na cadeia lateral **E** resultam na redução da atividade da rotenona.

CONCLUSÕES

A avaliação fitoquímica do extrato etanólico das raízes de *Derris urucu* resultou no isolamento dos rotenóides rotenona e desidrorotenona.

Após modificações realizadas na molécula desses rotenóides a avaliação da atividade citotóxica frente às larvas de *Artemia salina* mostrou que alteração ocorrida na dupla ligação olefínica mediante a reação de hidrogenação catalítica que originou o 6',7'-diidro-rotenona promoveu uma redução da atividade biológica em 10 vezes. Enquanto que a redução da carbonila no anel heterocíclico C, de onde foi obtido a 12-hidroxirotenona reduziu a atividade biológica à metade. Os resultados mostraram ainda que a redução simultânea da dupla olefínica e da carbonila proposta na reação que produziu o 6',7'-diidro-12,12a-desidrorotenona também reduziu em 10 vezes a atividade biológica da substância modificada quando comparada a rotenona. O 6-oxo-6a-12a-desidrorotenona substância obtida a partir da reação de oxidação da mistura binária 6a-12a-desidrorotenona/ 6a-12a-desidrodeguelina, mostrou resultado não significativo sobre a atividade biológica quando comparado a rotenona.

CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS

8.1 – CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS PURAS E DAS MODIFICADAS.

✓ **Rotenona**



P.M = 394

P.f = 164,6-168,04 °C

Aspecto: sólido branco cristalino

Solubilidade: Clorofórmio

✓ **Mistura Binária 6a-12a-desidrorotenona e 6a-12a-desidrodeguelina
(52:48%)**



P.M = 392

P.f = 156,3-153,6-160,0 °C

Aspecto: Sólido amarelo

Solubilidade: Clorofórmio

✓ **12-Hidroxirottenona**



P.M = 396

P.f = 146,0- 147,0 °C

Aspecto: óleo marrom

Solubilidade: Clorofórmio

- ✓ **6',7'- diidrorotenona**
F.M = $C_{23}H_{24}O_6$
P.M = 396
p.f = 161,4- 163,0 °C
Aspecto: sólido branco
Solubilidade: Clorofórmio

- ✓ **6',7'- diidro-12, 12a-desidrorotenona**
F.M = $C_{23}H_{26}O_6$
P.M = 398
P.f = 143,9- 145,0 °C
Aspecto: sólido branco
Solubilidade: Clorofórmio

- ✓ **6-oxo-6a-12a-desidrorotenona**
F.M = $C_{23}H_{18}O_6$
P.M = 406
P.f = 167,0-169,0 °C
Aspecto: sólido amarelo
Solubilidade: Clorofórmio

BIBLIOGRAFIA

Aragão, J. A. & Valle, J. R. (1973). Ictiotoxidade de timbós dos gêneros *Serjana*, *Derris* e *Tephrosia*. *Ciência e cultura*, São Paulo, 25 (7):12-14.

Aublet, J. B. C.F., (1775). *Historie des Plantes de la Guiane Française*. Paris, Pierre Fraçoise Didot jeune. V.2.

Barroso, G.M., Peixoto, A. L., Ichaso, C. L. F., Costa, C. G., Guimarães, E.F. (1991). *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa-Br: Universidade Federal de Viçosa, 1ª ed., 2: 377.

Bentham, G. (1860). Synopsis of *Dalbergiae*, a tribe of Leguminosae. *J. Linn. Soc.*, 4. Suppl.:1.

Boyce, A.M. In: Metcalf, R.L.; Mckelvey Jr., J.J. (1974). (ed.). *The future of insecticides. Needs and Prospects*. New York: John Willey.

Buchii, G.; Crombie, L.; Godin, P. J.; Kaltenbronn, J. S. & Withing, D. A. (1961). The absolute configuration of rotenone. Part III. *Journal Chemistry Society* (London): 2843.

Buckinghamn, J. (1994). Ed. *Dictionary of Natural Products*. Chapman & Hill: London. 774: 238, 3856.

Butenandt, A. & McCartney, W. (1932). Untersuchungen über pflanzliche fischund insektengifte. III. 3. Mitt. Über rotenone, den physiologisch wirksamen bestandteil der *Derris elliptica*: Die Konstitution des rotenos. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 494:17.

Butenandt, A. and Karlson, P.Z. *Naturforsh.* 9b (1965) 389; Karlson, P., Hofmeister, H., Hummel, H. Hocks, P. and Spitiller, G. *Chemical*.

Carson, R. (1962). *Primavera silenciosa*. Lisboa: Pórtico

Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A (1998). Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v.21, n.1: 99-105.

Citó A.M.G.L., Souza, A.A., Lopes J.A.D., Chaves, M.H., Costa, F.B., Sousa, S.A.A., Amaral M.P.M. (2003). Resina de *Protium heptaphyllum* March (Burceraceae): Composição Química do Óleo Essencial e Avaliação Citotóxica frente a *Artemia Salina* Leach. *Anais da Associação Brasileira de Química*, 52(2): 74-76.

Costa, J. P. C. (1996). Efeito da variabilidade de timbós de diferentes regiões da Amazônia em *Musca doméstica* L. (*Díptera: Muscidae*). 119 f. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Crombie, L; Dewick, P.M.; Whiting, D. A. (1973). Application to 9-Demethylmunderone, Munderone, Rotenonic Acid, Dalpanol, and Rotenone. *Journal Chemical Society Perkin*: P.1277-1283.

Crombie, L.; Holden, I.; Kilbee, G.W.; Whiting, D. A. (1982). *Journal Chemical Society Perkin I*: 789.

Crosby, D.G. (1971). Minor Insecticides of Plant Origin In: Jacobson, M E Crosby, D.G. (ed.). Naturally occurring insecticides. New York: Marcel Dekker. P.177-178.

Dewick, P.M.(1988). Isoflavonoids. In: Harborne, J. B. The Flavonoids, Cap.5 Chapman and Hall, London.

Ducke, A. (1949). Notas sobre a flora neotropical II. As leguminosas da Amazônia brasileira. *Boletim Técnico do Instituto Agrônomo Norte*, 18:171.

Fang, N & Casida, J E.(1997). Anticancer action of cubé insecticide: Correlation for rotenoid constituents between inhibition of NADH:ubiquinone oxidoreductase and

induced ornithine decarboxylase activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, 3380-3384.

Feinstein, L. & Jacobsen, M. (1963). Inseticides occurring In higher plants. In: Progress in the chemistry of natural products. Vol.10 (ed. by I. Zechmeister). *Spinger Verlag. Vienna*: 436.

Ferracin, R. J. (1992). Estudo Fitoquímico de Hortia arborea: Uma Contribuição à Quimiosistemática de *Cupariae*. Tese (Mestrado). UFSCar, São Carlos- SP. P. 135.

Fukami, J.; Yamamoto, I. & Casida, J.E. (1967). Metabolism of rotenone *in vitro* by tissue homogenates from mammals and insects. *Science*, 155: 713.

Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L; Batista, G.C.de; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B. (1978). Manual de entomologia Agrícola, Ed. Agr. Ceres, SP.p. 157.

Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L; Batista, G.C.de; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B. (2002). Manual de entomologia Agrícola, Ed. Agr. Ceres, SP.p. 188.

Geissman, T. A. & Crout, D. G. (1969). Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. Freeman & CO, San Francisco.

Geoffroy, E. (1896). Contribution à l'étude du *Robinia nicou* au point de vue botanique, chimique et physiologique. *Ann. Inst. Colon. Marseilles*2,1.

Haag, H. B. (1931). Toxicological studies of *Derris elliptica* and its constituents. I. Rotenone. *J. Pharmacol. exp. Therapeut.* 43: 193.

Haag, H. B. (1937). A Study of the toxicity to human subjects and animals of rotenone-bearing products. *Soap*, 13(1): 112c, 112d, 137 ACA 31: 2690.

Halbrock, K. & Grisebach, H. (1975). Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne. J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H. (Ed). *The Flavonoids*, cap. 15. Chapman and Hall, London.

Heywood, V. H. (1971). *The Leguminosae – A Systemic Purview*. In: Harborne, J. B.; Boulter, D.; Turner, B. L. (Ed.) *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Cap.1, *Academic Express, London*.

Howard, R. K. (1988). The structure of a nearshore fish community of Western Australia: diet patens and the habitat role of limestone reefs. *Environ. Biology of Fishes* 24 (2): 93-104.

Hutchinson, J. (1967). *The Genera of Flowering Plants*, v.1. *Oxford Univ. Press, London*.

Ingham, J.L. (1983). Naturally occurring isoflavonoids. In: Zeichmeister, L. (Ed) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, v.43, cap.1. Springer-Verlag, Wien.

Jackman, L.M. (1965). Some application of NMR spectroscopy in natural products chemistry. In: Zeichmeister, L. (Ed.). *Progress in the Chemistry of Organic Natural products*, v.23. Springer-Verlag, Wien.

Joly, A. B. *Botânica Introdução a taxonomia vegetal*. (1983). 6. ed. *National*.

Jones, Howard A. (1931) Crystalline solvates of rotenone. *The Journal American Chemical Society*. V.53, p.2738-2741.

Kumaran, G., Murlidhar, J. M., Malladl, V. S. S., Shri, P., Ramesh, C. M. (2006). Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ovopositional responses to newly identified semiochemicals from conspecific eggs. *Australian Journal of Entomology*. 45: 75-80.

Kunth, C. S., (1823). Voyage de Humboldt et Bonpland. In: Humboldt, F.H.A. Von, Bonpland, A.J.A. & Kunth, K.S., *Nova Genera et Species Plantarum*, facsimile ed. 1963. *Weinhein, J. Cramer*. V.6: 382-385.

LaForge, F.B. ; Haller, H.L. & Smith, L.E. (1933). The determination of the rotenone. *Chem. Rev.*, 12: 181.

Laurent, M. Ceresiat, M. Marchand-Brynaert, J. (2004). Regioselective Baeyer-Villiger oxidation in 4-carbonyl-2-azetidinone series: A revisited route toward cabapenem precursor. *Journal of organic Chemistry*.v.69, n.9:3194-3197.

Lenz, W. (1911). Zur Kenntnis der Bestandteile einiger Derrisarten. *Arch. Pharm.* 249: 288.

Li, L.P.; Wang, H.K.; Chang, J.J.; Mcphail, A.T.; Mcphail, D.R.; Terada, H.; Konoshima, T.; Kokumai, M.; Kozuka, M.; Estes, J.R. & Lee, K.H. (1993). Antitumors agents. 138. Rotenoids and isoflavones as cytotoxic constituents from *Amorpha fruticosa*. *Journal of natural products – Lloydia*, 56(5): 690.

Lima, R. R. (1987). Informações sobre duas espécies de timbó: *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbride e *Derris nicou* (Killip et Smith) Macbride, como plantas inseticidas. Belém: EMBRAPA-CPATU, .23 p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 107).

Loureiro, J. de, (1970). Flora Cochinchinensis: sistemas Plantas in Regno Cochinchina nascentes. *Ulyssipone, Typis et expensis academicis*. V. 2: 431-433.

Macbride, J.F., (1943). Flora of Peru. *Field Mus. Nat. Hist.*,13 (3) :28-267.

Macrae, W.D., Hudson, J.B., Towers, G.H.N. (1998) *Journal of Ethnopharmacology*, 22: 143.

Mariconi, F.A.M.(1963).Inseticidas e seu emprego no combate as pragas. Editora Agronômica Ceres.607:270.

Mariconi, F.A.M.(1981). Inseticidas e seu emprego no combate às pragas.v. I, *Defensivos*, 5.ed. São Paulo: Nobel. P.122.

Mariconi, F.A.M.(1977).Inseticidas e seu emprego no combate as pragas. Editora Agronômica Ceres.. São Paulo 3ª edição.p.126-129.

Mcindoo, N. E.; Sievers, A. F. & abbot, W.S. (1919). *Derris* as inseticide. *J. agr. Research*, 17:177.

Mcindoo, N. E. (1947). A review of the insecticidal uses of the rotenone-bearing plants, 1938 to 1944. EU. S. Dept. agric., Bur. Entom. Plant Quarant. P. 713.

Mclaughlin, J.I., Meyer, B.N., Ferrigni, N.R, Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E (1982) Brine Shrimp: A convenient General Biossay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45:31-34.

Mclaughlin, J. L.; Coman- Saizarbitoria, T e Anderso J. E. (1995). Três Bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*,18:13-18.

Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R. Putnan, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, d.E.J; McLaughlin, J.L.. (1982). *Planta médica* . 45, 31.

Miyano,M.,(1965). Rotenoids. Cyclization of Derrisic Acid to Dehydrorotenone. *Journal of the American Chemical Society*, 87:17.

Nagai, K. (1912). Researches on the poisonous principles of roh-ten. I. *Journal Tokyo Chemical Society*

Negherbon, W. O. (1959). Handbook of toxicology. Vol.3. Saunders. Philadephia, : 661.

Neves, M., Morais, R., Gafner, S., Hostettmann, K. (1998) Three triterpenoids and one flavonoid from the liverwort *Asterala blumeana* grow in vitro. *Phytotherapy Research*, v.12: 21-24.

Pires, J.M. (1973). Plantas ictiotóxicas: aspectos químicos (timbós). *Ciência e Cultura, São Paulo*, v.26,n.(7) : 56-61.

Pratt, G.E. & Bowers, W.S. (1977). *Nature*. 265, 548-550.

Rawitscher, F. (1979). Elementos Básicos da Botânica. P.318-319.

Ribeiro, J.E.L. da S., Hopkins, M.J.G., Vicentini, A., Sothers, C.A., Costa, M.A.da S., Brito, J.M. de., Souza, M.A.D. de., Martins, L.H.P., Lohmann, L.G., Assunção, P.A.C.L., Pereira, E. da C., Silva, C.F.da, Mesquita, M.R., Procópio, L. C.(1999). Flora da reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Impa. DFID.

Richard, J. Ashack, Leslie P. McCarty, Rebecca S. Malek, Frank R. Goodman, and Norton P. Peet.(1979). Evaluation of Rotenone and Related Compounds as Antagonists of Slow-Reacting Substance of Anaphylaxis. *Journal Medica Chemical*. 23:1022-1026.

Roark, R.C. (1937). Tephrosia as an insecticide – A review of the literature. U.S. *Dept. Agric, Bur. Entom. Plant Quarant.*, p. 402.

Rossi M., Fule P.Z. & Taylor M.R. (1988). Conformational flexibility in the molecular structure of Rotenone, a naturally occurring insecticide. *Bioorganic Chemical*. 16:376-387.

Sakakibara. J. (1986). Studies on the Chemical Transformation of Rotenoids. Reactions of Rotenone and Rotenonone With Primary Amines.*Heterocycles*.24, nº 4.P. 1109.

Santi, R.; Ferrari, M. & Toth, E. (1966). Pharmacological properties of rotenone. II *Fármaco*, 10: 690.

Saphaz, S., Boris, C., Loieau, P.M., Cortes, D., Hacquemiller, R., Laurens A., Cavé, A. (1994) *Planta Medica*, 60:538.

Schenkel, E. P. (1985). Saponinas. In Simões, C.M.O.; Farmacognosia: da Planta ao Medicamento, *Universidade UFRGS/UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis*:64.

Shmeltz, I. (1971) Nicotine and other tobacco alkaloids. In: Jacobson, M.; Crosby, D.G. (ed.) Naturally occurring insecticides. New York: Marcel Dekker.p.99.

Silverstein, R.M., Basseler, G.C.,Morril, T.C (2000). Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6.ed.

Smith, M. B. (1994). Organic Synthesis. P.263-279.

Stafleu, F. A., ed , (1972). International Code of Botanical Nomenclature. Regnum veg., 82: 1- 462.

Takashima, J., Chiba, N. (1998). Drugs Containning Rotenoids as Antibacterial Agents against *Heliobacter pylori*. *Journal Nat. Prod.* P.57.

Takashima, J., Chiba, N., Yoneda, K. , Ohasaki, A. (2002). Derresin, a new Rotenoid from *Derris malaccensis* Plain and Anti-*Heliobacter pilory* Activity of its related constituents. *Journal Nat. Prod.*65: 611-613.

Takei, S. ; Miyajima, S.& Ono, M. (1932). Uber rotenon, den wirksamen bestandteil der *Derris* wurzel.. IX. Mitt. Nachtrag zur constitution der tetrahydro-tubasaure und des rotenons. Synthese einiger abbauprodukte des rotenons. *Ber. Deut. Chem. Ges.*,65:1041.

Tallent. W. H.; Carlson D. G. Weislede. D. (1973). NMR Investigations of Rotenoids. *Tetrahedron*, 29 (18): 2731-2741.

Tischler, N. (1936). Studies on how derris kills insects. *J. Econ. Entomol.*, 28: 215.

Tozzi, A. M. G., (1998). The identity of Timbó-verdadeiro: *Deguelia utilis* (A.C.Sm) A.M.G.Azevedo (Leguminosae – Papilionoideae). *Ver. Brasil. Biol.*, v. 58(3):511-516.

Vendramin, J. D., & Castiglioni, E. (2001). Aleloquímicos, Resistencia de plantas e plantas inseticidas. In: Guedes, J. C., Costa, I. D., Casteglioni,E; Cap.8.

WWW. [http:// pt. Wikipedia.org /wiki/ Legume.htm-31/01/2006](http://pt.wikipedia.org/wiki/Legume.htm-31/01/2006).

Waterbeem, H. V. (1996). In: The Practice of Medicinal Chemistry, *Acad. Press*, Grã Bretanha.

Wille, J. E.; Ocampo, J. A.; Weberbauer, A.; Schofield, D. (1939). El cube (*Lonchocarpus utilis*) y otros barbascos en el Peru. Peru, Direc. Agric. , y Ganad. , Minist. De Fomento. Boletin,16.

Wong, E. (1970). Structural and biogenetic relationship of isoflavonoids. In: Zeichmeister, L. (Ed.) Progress in the chemistry of Organic Natural Products, v.28. Springer-Verlag, Wien.

Zani, C.L, Chaves, P.P.G., Queiroz R., Mendes, N.M., Oliveira A.B., Cardoso J.E., Anjos, A.M.G., Grandi, T.S. (1995) Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti- *Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine*, 2:47-50.