



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MARIA VALDELINE SOUSA TEIXEIRA**

**REINVESTIGAÇÃO QUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS DE**  
*Tephrosia egregia* Sandwith

**FORTALEZA**

**2016**

**MARIA VALDELINE SOUSA TEIXEIRA**

**REINVESTIGAÇÃO QUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS DE**  
*Tephrosia egregia* Sandwith

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

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Angela Martha Campos Arriaga.

Co-orientadora: Antonia Pimenta Ávilla Torres

**FORTALEZA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- T267r Teixeira, Maria Valdeline Sousa.  
Reinvestigação Química e Ensaio Biológicos de Tephrosia egregia Sandwith / Maria Valdeline Sousa  
Teixeira. – 2016.  
113 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Profa. Dra. Angela Martha Campos Arriaga.  
Coorientação: Profa. Dra. Antonia Pimenta Avila Torres.
1. Fabaceae. 2. Tephrosia egregia. 3. Gastoprotetor. 4. Atividade Citotóxica. I. Título.
- CDD 540
-

MARIA VALDELINE SOUSA TEIXEIRA

**REINVESTIGAÇÃO QUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS DE**  
***Tephrosia egregia* Sandwith**

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

Área de concentração: Química Orgânica

Aprovada em 20 / 07 / 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra, Angela Martha Campos Arriaga (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra, Gilvandete Maria Pinheiro Santiago  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Marcos Reinaldo da Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas as oportunidades concedidas e pelo o dom da vida.

A minha família, principalmente aos meus pai e irmãos, por todo o apoio e companheirismo ao longo dos anos.

A meu namorado Pedro Henrique, por toda a ajuda e consolo nos momentos de aflição.

A minha orientadora, Prof. Dra. Angela Arriaga, pela oportunidade de pesquisa e por todo o conhecimento transmitido.

A todos os meus amigos e companheiros de laboratório principalmente a Renata por toda a ajuda, orientação e amizade. Vocês tornaram os dias bem mais divertidos.

Aos meus amigos de graduação, especialmente ao Tiago, Ana Kelly, Tamires, David e Edinilton pelo carinho, amizade, brigas e reconciliações, vocês são demais.

A todos os professores da Graduação e da Pós-Graduação, por compartilharem o saber que possuem.

A Camila, Thyarles, Jéssica e Renatinha, amigos de uma vida inteira.

A todos os funcionários do Departamento de Pós-Graduação por manterem um ambiente de trabalho funcional e eficiente.

Ao CNPq, CAPES, FUNCAP pelo suporte financeiro.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muito, nos aproxima”. (Louis Pasteur)

## RESUMO

A utilização de plantas como medicamentos, impulsionada por seu baixo custo, por sua menor toxicidade e por seus menores efeitos colaterais, quando comparada aos fármacos sintéticos, tem crescido junto a todas as classes sociais e é referendada cada vez mais pela comunidade médica, em todo mundo. Extratos de plantas e seus componentes químicos têm apresentado atividades biológicas relevantes, tornando o estudo fitoquímico de vital importância na busca de novas fontes de substâncias potencialmente ativas. *Tephrosia egregia* pertence à família Fabaceae, que possui cerca de 300 espécies incluídas em seu gênero. No Brasil ocorre, principalmente, na região Nordeste sendo popularmente conhecida como anil-bravo. Plantas do gênero *Tephrosia* apresentam em sua maioria compostos flavonoídicos como chalconas, flavonas, flavonóis, isoflavonas, rotenóides, biflavonas, pterocarpanos e também esteroides; muitos deles apresentam atividades biológicas relevantes, dentre as quais destacamos atividade antitumoral, antiviral, inseticida, etc. A reinvestigação fitoquímica de *Tephrosia egregia*, que trata o presente trabalho, compreende o isolamento e determinação de metabólitos secundários, e a avaliação da atividade gastroprotetora e citotóxica dos extratos e compostos isolados dessa espécie vegetal.

**Palavras-chaves:** Fabaceae, *Tephrosia egregia*, gastroprotetor, atividade citotóxica.

## ABSTRACT

Actually, there is an increasing demand for plant-based drugs, especially by minor side effects that they have compared to synthetic drugs. The use of medicinal plants has been well accepted by the population, also because of its low cost, and is growing in the medical community. Plant extracts have shown relevant biological activities. So, the phytochemical study becomes vitally important in the search for potentially active molecules, as well as, the characterization and identification of new molecules. *Tephrosia egregia* belongs to the Fabaceae family, that has about 300 species included in its genus. In Brazil, it occurs mainly in the Northeast region, where it “anil bravo”. *Tephrosia* genus is a source of chalcones, flavones, flavonols, isoflavones, rotenoids, biflavones, pterocarpanes and steroids. Many of these metabolites are biologically active, showing antitumor activity, antiviral, insecticidal, etc. Phytochemical investigation of *Tephrosia egregia* led the isolation and identification of secondary metabolites, and evaluation of gastroprotective and cytotoxic activities of extracts and isolated compounds of this plant.

**Keywords:** Fabaceae, *Tephrosia egregia*, gastroprotective, cytotoxic activity



## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

<b>BB</b>	“Broad band decoupling”
<b>CCD</b>	Cromatografia em Cana Delgada
<b>CENAUREMN</b>	Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear
<b>CG</b>	Cromatografia Gasosa
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração Letal capaz de matar 50%
<b>COSY</b>	“Correlation Spectroscopy”
<b>DEPT</b>	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
<b>EM</b>	Espectrometria de Massas
<b>δ</b>	Deslocamento químico
<b>d</b>	Dupleto
<b>dd</b>	Duplo dupleto
<b>Hz</b>	Hertz
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>IV</b>	Infravermelho
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento
<b>m</b>	Multipeto
<b>MHz</b>	Mega Hertz
<b>p.f.</b>	Ponto de fusão
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>s</b>	Simpleto
<b>sl</b>	Simpleto largo
<b>t</b>	Tripleto
<b>TE-1</b>	2'6'-dimetoxi-4',5'-(2'',2''-dimetil)piranochalcona

<b>TE-2</b>	Preacansona
<b>TE-3</b>	Pongaflavona
<b>TE-4</b>	12a-hidroxirotenona
<b>TE-5</b>	5-hidroxi-8-(1'',2''-epóxi-3''-hidroxi-3''-metilbutil)-7-metoxiflavona
<b>TEFE</b>	Extrato etanólico das folhas de <i>T. egregia</i>
<b>TERA-S</b>	Extrato acetato de etila das raízes de <i>T. egregia</i> em Soxlet
<b>TERE</b>	Extrato etanólico das raízes de <i>T. egregia</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Tephrosia egregia</i> Sandwith .....	23
<b>Figura 2.</b> Gráfico referente aos compostos isolados de <i>T. egregia</i> de 2009 a 2016 .....	25
<b>Figura 3.</b> Rota biossintética dos flavonoides .....	26
<b>Figura 4.</b> Esqueleto básico das subclasses dos flavonoides .....	27
<b>Figura 5.</b> Estruturas dos compostos isolados TE (1-5) de <i>T. egregia</i> Sandwith .....	41
<b>Figura 6.</b> Estrutura proposta para TE-1 .....	44
<b>Figura 7.</b> Espectro na região do infravermelho de TE-1 .....	45
<b>Figura 8.</b> Espectro de massas (i.e 70 eV) de TE-1 .....	45
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TE-1 .....	46
<b>Figura 10.</b> (a) Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TE-1 e (b) DEPT $135^\circ$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TE-1 .....	47
<b>Figura 11.</b> (a) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY e (b) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de TE-1 .....	48
<b>Figura 12.</b> $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de TE-1 .....	49
<b>Figura 13.</b> Estrutura proposta para TE-2 .....	51
<b>Figura 14.</b> Espectro na região do infravermelho de TE-2 .....	53
<b>Figura 15.</b> Espectro de massa (i.e 70 eV) de TE-2.....	53
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de TE-2.....	54
<b>Figura 17.</b> (a) Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de TE-1 e (b) DEPT $135^\circ$ ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de TE-2.....	55
<b>Figura 18.</b> (a) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) e (b) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de TE-2.....	56
<b>Figura 19.</b> $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de TE-2 .....	57
<b>Figura 20.</b> Esqueleto básico das flavonas.....	59
<b>Figura 21.</b> (a) Estrutura angular e (b) Estrutura linear .....	59
<b>Figura 22.</b> Principais correlações observadas no espectro de HMBC de TE-3 .....	60
<b>Figura 23.</b> Estrutura proposta para TE-3 .....	61
<b>Figura 24.</b> Espectro na região do infravermelho de TE-3 .....	62
<b>Figura 25.</b> Espectro de massa (i.e., 70 eV) de TE-3.....	62
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TE-3 .....	63

<b>Figura 27.</b> (a) Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (, 125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TE-1 e (b) DEPT $135^\circ$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de TE-3 .....	64
<b>Figura 28.</b> (a) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY e (b) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de TE-3.....	65
<b>Figura 29.</b> $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de TE-3 .....	66
<b>Figura 30.</b> Principais correlações observadas no espectro de HMBC de TE-4 .....	68
<b>Figura 31.</b> Esqueleto básico dos rotenóides .....	69
<b>Figura 32.</b> Estrutura proposta para TE-4 .....	69
<b>Figura 33.</b> Espectro na região do infravermelho de TE-4 .....	71
<b>Figura 34.</b> Espectro de massa (i.e 70 eV) de TE-4.....	71
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de TE-4.....	72
<b>Figura 36.</b> (a) Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de TE-1 e (b) DEPT $135^\circ$ ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de TE-4.....	73
<b>Figura 37.</b> (a) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) e (b) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC $\text{CDCl}_3$ 125 MHz) de TE-4.....	74
<b>Figura 38.</b> $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de TE-4 .....	75
<b>Figura 39.</b> Estrutura proposta para TE-5 .....	77
<b>Figura 40.</b> Espectro na região do infravermelho de TE-5 .....	78
<b>Figura 41.</b> Espectro de MAR de TE-5.....	79
<b>Figura 42.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de TE-5.....	80
<b>Figura 43.</b> (a) Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de TE-5 .....	81
<b>Figura 44.</b> (a) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY e (b) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de TE-5.....	82
<b>Figura 45.</b> $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de TE-5 .....	83
<b>Figura 46.</b> Fotografia das lesões gastricas hemorrágicas ou ulcerativas dos estômagos tratados retirados dos grupos tratados e não tratados . .....	84
<b>Figura 47.</b> Efeito de <i>T. egregia</i> (folha, caule e raíz) 200 mg/kg na gastropatia induzida por etanol .....	85
<b>Figura 48.</b> Efeito de <i>T. egregia</i> na redução dos níveis de hemoglobina .....	86
<b>Figura 49.</b> Cromatograma de isolamento de TE-1 .....	95
<b>Figura 50.</b> Cromatograma de isolamento de TE-5 .....	102

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Substâncias isoladas do gênero <i>Tephrosia</i> no período de 2009 a 2016 .....	28
<b>Tabela 2.</b> Metabólitos secundários de <i>Tephrosia egregia</i> .....	29
<b>Tabela 3.</b> Dados espectroscópicos de TE-1 .....	44
<b>Tabela 4.</b> Dados espectroscópicos de TE-2 e TE-1 comparados com a literatura (ARRIAGA, <i>et al.</i> , 2009) .....	52
<b>Tabela 5.</b> Dados espectroscópicos de TE-3 comparados com a literatura (ANDREI, <i>et al.</i> , 2000) .....	61
<b>Tabela 6.</b> Dados espectroscópicos de TE-4 comparados com a literatura (YOU-ZHI, <i>et al.</i> , 2011) .....	70
<b>Tabela 7.</b> Dados espectroscópicos de TE-5 .....	78
<b>Tabela 8.</b> Efeito de <i>T. egregia</i> na concentração de hemoglobina tecidual .....	86
<b>Tabela 9.</b> Valores de $Cl_{50}$ com um intervalo de confiança obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em duplicata em três linhagens anticancerígenas .....	87
<b>Tabela 10.</b> Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de TERA-S .....	94
<b>Tabela 11.</b> Dados referentes aos pesos das frações obtidas no tratamento cromatográfico de F (2) (Hexano/ $CH_2Cl_2$ 1:1) .....	94
<b>Tabela 12.</b> Dados referentes aos pesos das frações obtidas no tratamento cromatográfico de F (13-23) .....	95
<b>Tabela 13.</b> Gradiente de eluição do tratamento de F (3) .....	96
<b>Tabela 14.</b> Dados referentes aos pesos das frações obtidas no tratamento cromatográfico de F (3) .....	97
<b>Tabela 15.</b> Dados referentes às frações e as massas no fracionamento de F (98-112)..	97
<b>Tabela 16.</b> Dados referentes às frações e as massas no fracionamento de F(59-69) ....	98
<b>Tabela 17.</b> Dados referentes às frações e as massas no fracionamento de F (60-67)....	98
<b>Tabela 18.</b> Dados referentes às massas no fracionamento de F (44-59) .....	99
<b>Tabela 19.</b> Dados referentes às massas no fracionamento de F (13-24) .....	99
<b>Tabela 20.</b> Serie de eluição do fracionamento de TETE-D .....	101

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1.** Rota esquemática de obtenção dos extratos etanólicos de *T. egregia* ..91
- Fluxograma 2.** Rota esquemática dos extratos em sistema soxlet de *T. egregia* ..... 93
- Fluxograma 3.** Rota esquemática do isolamento de TE (1-4) ..... 100

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS</b> .....	22
<b>3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO</b> .....	25
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	41
<b>4.1 Determinação Estrutural de TE-1</b> .....	42
<b>4.2 Determinação Estrutural de TE-2</b> .....	50
<b>4.3 Determinação Estrutural de TE-3</b> .....	58
<b>4.4 Determinação Estrutural de TE-4</b> .....	67
<b>4.4 Determinação Estrutural de TE-5</b> .....	76
<b>5. ATIVIDADES BIOLÓGICAS</b> .....	84
<b>5.1 Atividade Gastroprotetora e Determinação da Concentração de Hemoglobina</b> .....	84
<b>5.2 Teste de Atividade Citotóxica</b> .....	86
<b>6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	89
<b>6.1 Material Vegetal</b> .....	89
<b>6.2 Métodos Analíticos</b> .....	89
<b>6.2.1 Métodos Cromatográficos</b> .....	89
<b>6.3 Métodos Físicos de Análise</b> .....	90
<b>6.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)</b> .....	90
<b>6.3.2 Espectrometria de Massa</b> .....	90
<b>6.3.3 Pontos de Fusão</b> .....	91
<b>6.3.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	91
<b>6.4 Extração e Isolamento</b> .....	91
<b>6.4.1 Obtenção do extrato etanólico das folhas (TEFE), talos (TETE) e raízes</b> <b>(TERE) de <i>Tephrosia egregia</i></b> .....	92
<b>6.4.2 Preparação do extrato hexânico (TERH-S) e Acetato de etila (TERA-S)</b> <b>à quente das raízes de <i>Tephrosia egregia</i></b> .....	92
<b>6.4.3 Fracionamento cromatográfico de TERA-S (coluna filtrante)</b> .....	93
<b>6.4.3.1 Fracionamento cromatográfico e isolamento de TE-1</b> .....	94
<b>6.4.3.2 Fracionamento cromatográfico e isolamento de TE-2</b> .....	96

6.4.3.3 <i>Fracionamento cromatográfico e isolamento de TE-3</i> .....	96
6.4.3.4 <i>Fracionamento cromatográfico e isolamento de TE-4</i> .....	98
<b>6.4.4 Fracionamento cromatográfico do extrato TETE</b> .....	101
6.4.3.4 <i>Fracionamento cromatográfico de TETE-D e isolamento de TE-5</i> .....	101
<b>6.5 Teste de atividade gastroprotetora e determinação dos níveis de Hemoglobina</b> .....	102
<b>6.6. Teste de Atividade Citotóxica</b> .....	103
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	106
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	108



# INTRODUÇÃO

---



## 1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, as plantas são utilizadas para o tratamento de diversas doenças, e ao longo dos anos pesquisas em espécies vegetais ganham cada vez mais destaque, na busca de novas fontes medicamentosas; por isso a elucidação dos seus constituintes, suas atividades biológicas e seus mecanismos de ação vêm sendo um constante desafio para os pesquisadores em todo mundo.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013) cerca de 80% da população mundial utiliza plantas para o combate de diversas doenças incentivado principalmente pelo baixo custo e pela menor toxicidade, que geralmente apresentam os fármacos sintéticos. A prática do consumo de fitoterápicos, validada por informações terapêuticas através do tempo, vem despertando o interesse das pesquisas fitoquímica, botânica e farmacológica.

Os vegetais são fontes inesgotáveis de substâncias que podem agir sozinhas ou sinergicamente em seus extratos, onde a presença de compostos pertencentes à classes diferentes ou com estruturas distintas contribuem para a mesma atividade (TOUQUEER; SAEED; AJAIB, 2013; MACIEL; PINTO; VEIGA *et al.*, 2002).

O gênero *Tephrosia* (Fabaceae) possui cerca 400 espécies que ocorrem em regiões tropicais, subtropicais e áridas, e é rico em compostos com grande diversidade estrutural, onde se destaca a ocorrência majoritária de substâncias flavonoidicas, que possuem diversas atividades biológicas, como antioxidante, inseticida, antimicrobiana, dentre outras (NGADJUI *et al.*, 2008; VASCONCELOS, *et al.*, 2012).

Na medicina popular, as espécies do gênero *Tephrosia* são tradicionalmente utilizadas no tratamento de doenças, como asma, reumatismo, diarreias, inflamações, doenças respiratórias, renais, do fígado e etc. Estudos farmacológicos e fitoquímicos relatam para estas plantas atividades citotóxicas e hipoglicemiante e a presença de compostos fenólicos especiais, os isoflavonoides rotenoides. Estas substâncias além de propriedades medicinais tais como antioxidante e antitumoral, possuem atividade inseticida e imobilizante de peixes (ictiotoxica) (ANDREI, *et al.*, 1997; KHALAFALAH *et al.*, 2010).

*Tephrosia egregia* Sandwith, popularmente conhecida como “anil bravo”, apresenta-se como arbusto e ocorre geralmente em regiões arenosas, próximas ao mar.

Pesquisas anteriores realizados por nosso grupo demonstraram *Tephrosia egregia* Sandwith como uma fonte de compostos estruturalmente diversificados como terpenos, fenilpropanoides, chalconas, flavonas, rotenoides, pterocarpanos e esteroides (LIMA, 2010).

Tendo em vista o alto potencial biológico dos compostos existentes na planta e a importância, principalmente dos compostos fenólicos predominantes na espécie e no gênero, na dieta e na saúde humana, houve a necessidade de realizar um re-estudo fitoquímico dos extratos *T. egregia*.

Essa reinvestigação teve como objetivo a separação de novos metabólitos e estudar diferentes partes e extratos da planta, e envolveu também técnicas mais avançadas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na separação dos metabólitos secundários de alguns extratos. A avaliação da atividades biológicas de *T. egregia* também é relatada.

As estruturas dos compostos obtidos foram determinadas através da interpretação de seus dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo experimentos bidimensionais como COSY, HSQC e HMBC. A confirmação final de suas estruturas foi realizada por comparação com dados espectroscópicos e físicos disponíveis na literatura.

# CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

---



## 2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

A família Fabaceae também conhecida como Leguminosae apresenta mais de 600 gêneros, sendo que cerca de 490 espécies apresentam fins terapêuticos, colocando-a como a segunda família que mais possui plantas medicinais. Suas espécies possuem importantes propriedades biológicas e são amplamente utilizadas como componentes farmacêuticos e na medicina popular para o tratamento de várias doenças (GAO, *et al.*, 2010).

As plantas dessa família existem em diferentes latitudes e altitudes e podem ser árvores grandes, arbustos ou subarbustos, ervas anuais ou perenes, também podem ser trepadeiras. Podem ser divididas em três subfamílias, são elas: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae (JOLY, 1985).

As Fabaceas não possuem apenas importância medicinal, visto que a maioria dos legumes pertence à sub-família Papilionoideae, dentre os quais podemos destacar: *Pisum* (ervilha), *Cajanus* (ervilha-de-arvore), *Glycine* (soja) e *Vicia* (grão-de-bico) (WATSON, 2004).

Outras espécies são utilizadas para recuperação de solos, como plantas do gênero, *Glicine* e *Dolichos* por sua capacidade de fixar nitrogênio na presença de bactérias nitricantes em simbiose. O gênero *Tephrosia* também é utilizado para a redução da salinidade e do pH dos solos. Algumas são tóxicas para mamíferos, aves e peixes, como por exemplo, algumas *Crotalaria* que contém alcaloides tóxicos e as *Tephrosias* que possuem rotenoides (GAO, *et al.*, 2010; DALWADI; PATEL; PATANI, 2014; WATSON, 2004).

O gênero *Tephrosia* engloba cerca de 400 espécies e ocorre principalmente no continente africano, mas há relatos na América do Sul, Latina e Oceania. Apresentam-se como arbustos ou subarbustos, com folhas imparipinadas ou seudorecemas terminais ou auxiliar e são lateralmente comprimidas, suas vargens são longas contendo muitas sementes. Sua ocorrência se dá em regiões tropicais ou subtropicais (QUEIROZ; TOZZI; LEWIS, 2013; TARUS, *et al.*, 2002).

O gênero *Tephrosia* é rico em compostos bioativos principalmente flavonoides dentre os quais destacam-se os rotenoides. *Tephrosia egregia* Sandwith (Figura 1) é conhecida popularmente no Nordeste do Brasil como “anil bravo”, esta planta é um arbusto com folhas

imparipinadas e folíolos de dez a vinte jugos. Apresenta flores lilás e dispostas em racemos auxiliares ou terminais (BOLLAND, 1947).

Estudos anteriores relataram em *T. egregia* a presença de rotenoides, esteroides, pterocarpanos, chalconas, flavonas dentre outros. Seus extratos apresentaram atividades antioxidante, antimicrobiana, nematocida, alelopática e larvicida frente ao *Aedes aegypti*, atividades estas que podem estar associadas à ampla diversidade estrutural existente nos extratos dessa planta (AL-HAZIMI, *et al.*, 2006; LIMA, 2010).

**Figura 1** - *Tephrosia egregia* Sandwith



# **LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO**

---



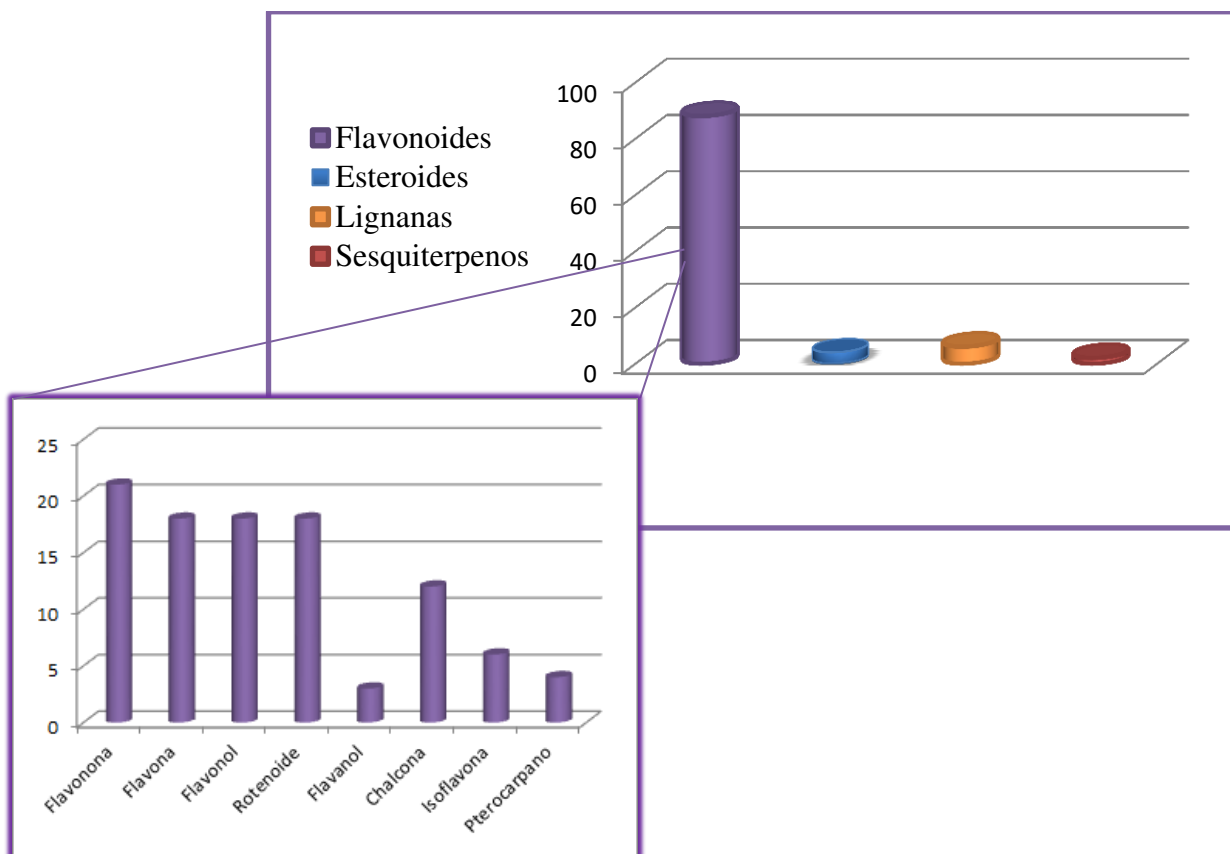
### 3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

A pesquisa bibliográfica acerca dos metabólitos secundários do gênero *Tephrosia* foi realizada no *Chemical Abstract* (SciFinder Scholar) e nos periódicos disponíveis no portal da CAPES (<http://periodicos.capes.gov.br>), abrangendo o período de 2009 até o presente ano.

A partir dos dados obtidos pode-se observar que das aproximadamente 400 espécies existentes no gênero apenas 46 foram estudadas o que torna evidente a necessidade de mais estudos sobre as *Tephrosias*, tendo em vista a presença de compostos farmacologicamente ativos nessas plantas.

A pesquisa revelou o isolamento e a caracterização de 81 metabólitos secundários, no qual predomina a presença de compostos flavonoidicos (85%), e apenas 15% foram relacionados a outras classes de substâncias, como lignanas, sesquiterpenos e esteroides. Dentre os flavonoides isolados pode-se observar através da Figura 2 que o maior percentual está reservado as flavononas (18%), seguido pelas flavonas (16%), rotenoides (15%), chalconas (10%), isoflavonas (5%), flavanóis (6%), e pterocarpanos (4%).

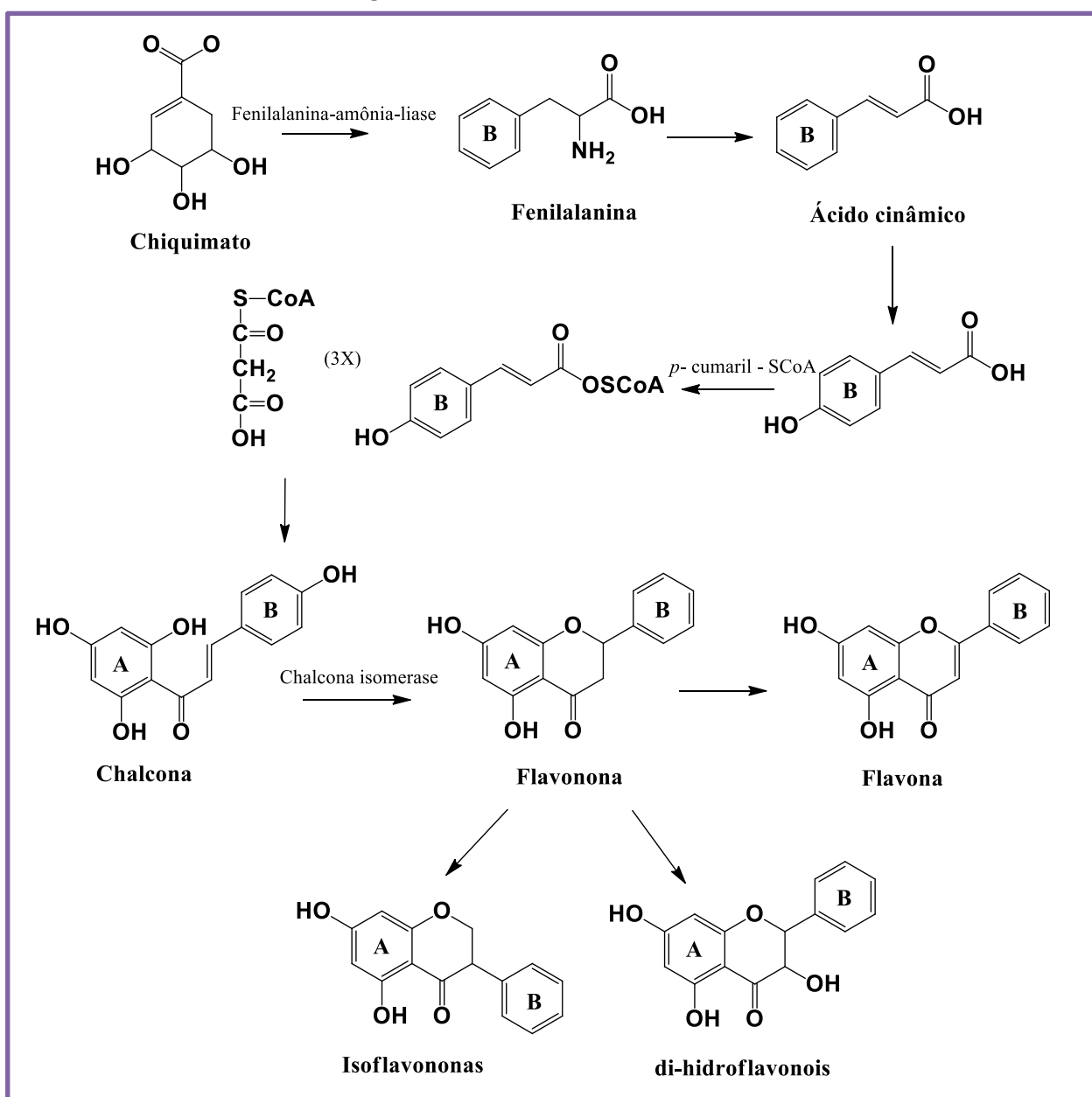
**Figura 2** - Gráfico referente aos compostos isolados de *Tephrosia* de 2009 a 2016





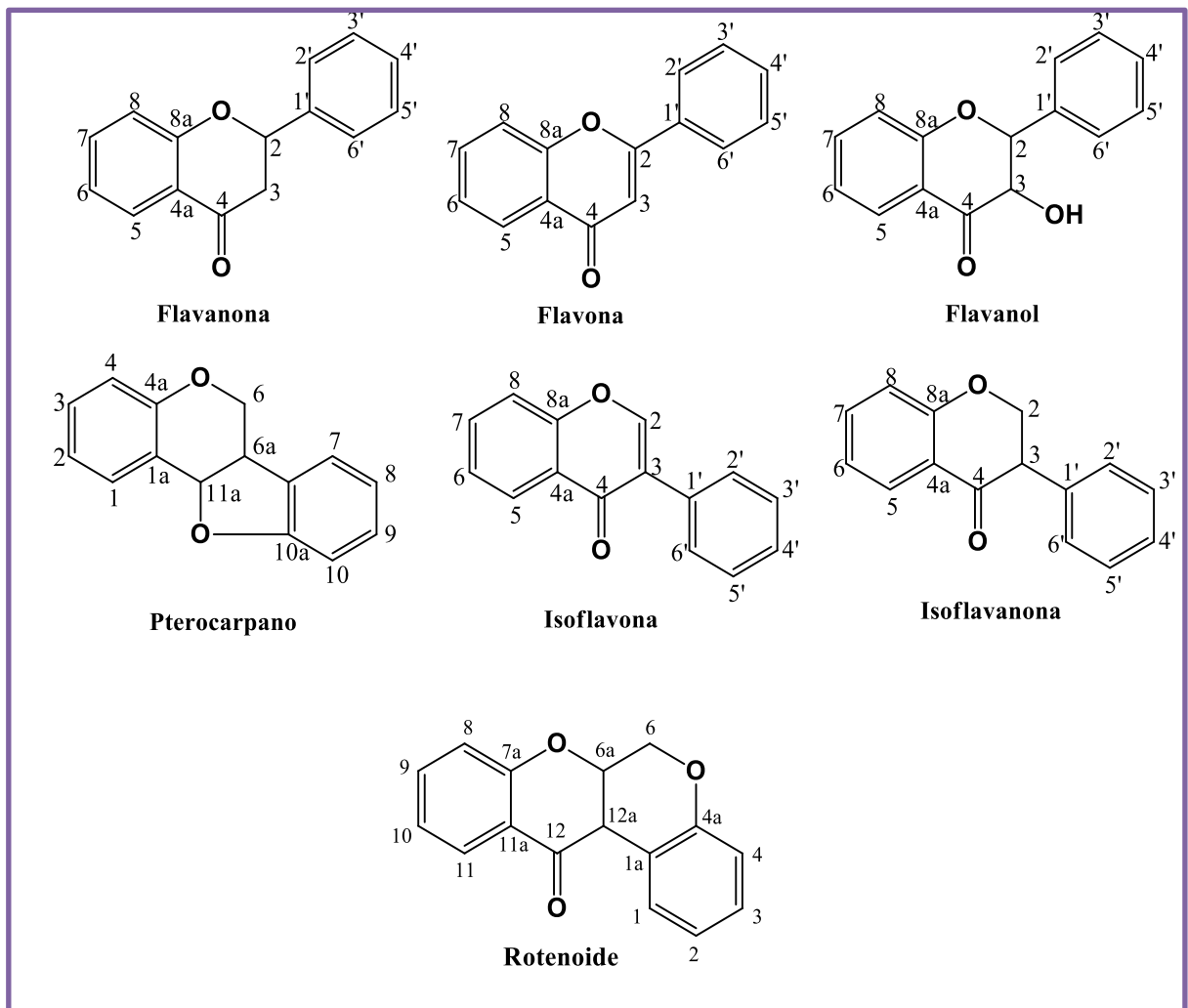
Os flavonoides são de um extenso grupo de metabólitos secundários, cuja biossíntese ocorre através de reações enzimáticas complexas a partir do ácido chiquímico e da acetil coenzima A (Acetil-CoA). A adição posterior da coenzima A e de malonil-CoA ao ácido cinâmico e seus derivados (ácidos cafeícos, ferúlico, etc) formam a chalcona, que por ação de enzimas específicas levam a formação de outros compostos flavonoídicos. A Figura 3 resume esses processos biossintéticos (KARAM, T. K. *et al.*, 2013).

Figura 2 - Rota biossintética dos flavonoides



Os flavonoides constituem o principal grupo de metabólitos existentes nessa planta. Mais de 5000 flavonoides foram isolados e caracterizados e, devido a sua ampla diversidade estrutural levou a subdivisão dessa classe de compostos que se distingue principalmente pela posição do anel B em seu esqueleto básico. A Figura 4 mostra os esqueletos básicos de diferentes subclasses de flavonoides (MARTINEZ-FLÓREZ, *et al.*, 2002).

**Figura 3** – Esqueleto básico das subclasses dos flavonoides



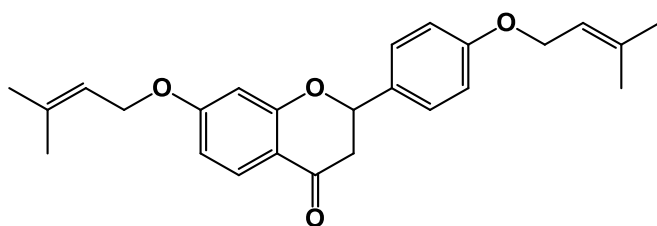
As substâncias isoladas do gênero *Tephrosia* estão listadas na Tabela 1 e suas respectivas estruturas podem ser conferidas na Tabela 2.

Tabela 1 - Substâncias isoladas do gênero *Tephrosia* no período de 2009 a 2016

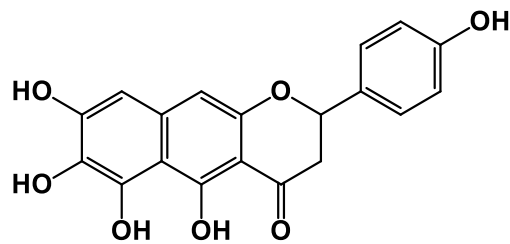
SUBSTÂNCIAS	REFERÊNCIAS
1, 36, 40, 43, 44, 45, 79	PETHAKAMSETTY; SERU; KANDULA, 2010.
2, 12, 57	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2009
3, 4, 51, 75	MADHSUDHAMA <i>et al.</i> , 2010
5, 37, 56, 73	GANAPATY <i>et al.</i> , 2009
6	NAMRATHA, 2015
7, 8, 9, 49, 60	REDDEPPA, ALURU, RACALAKUNTA, 2014
10, 15, 29, 31	SINGH <i>et al.</i> , 2014
11, 50, 52, 55, 58, 59	YOUZHI <i>et al.</i> , 2011
13, 14, 42	REDDY <i>et al.</i> , 2009
16, 17, 35, 38, 39	YAN <i>et al.</i> , 2014
18, 32, 33, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,69	MALDINI <i>et al.</i> , 2011
19, 20, 21	AMMAR, NENAAH, ABULHAMED, 2013
22, 25, 26	GEDARA; ADBEL; AHMED, 2009
23, 24	JUMA <i>et al.</i> , 2011
27, 30	ABHMANYU <i>et al.</i> , 2014
28, 54	ARRIAGA <i>et al.</i> , 2009
34, 70, 71, 72, 80	XAO-LI <i>et al.</i> , 2014
41, 75	KHALAFALAH <i>et al.</i> , 2010
46, 47, 48, 53	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2012
74, 76, 77, 78	WEI <i>et al.</i> , 2009
81	AGNIHOTRY <i>et al.</i> , 2011

Tabela 2 - Metabólitos secundários de *Tephrosia*

FLAVONONAS	
	<p>(1) <math>R_1 =</math> <math>R_2 = OH</math></p> <p>(2) <math>R_1 = H</math> <math>R_2 = H</math></p>
(1 - 2)	
	<p>(3) <math>R_1 =</math> <math>R_2 = OH</math></p> <p>(4) <math>R_1 = H</math></p>
(3 - 4)	
	<p>(5) <math>R_1 =</math> <math>R_2 = OCH_3</math> <math>R_3 = H</math> <math>R_4 = OCH_3</math></p> <p>(6) <math>R_1 =</math> <math>R_2 = H</math> <math>R_3 =</math> <math>R_4 = H</math></p> <p>(7) <math>R_1 =</math> <math>R_2 = OCH_3</math> <math>R_3 = H</math> <math>R_4 = OH</math></p> <p>(8) <math>R_1 =</math> <math>R_2 = OH</math> <math>R_3 =</math> <math>R_4 = OH</math></p> <p>(9) <math>R_1 =</math> <math>R_2 = OCH_3</math> <math>R_3 = H</math> <math>R_4 = OH</math></p>
(5 - 9)	
	<p>(10) <math>R_1 = H</math></p> <p>(11) <math>R_1 = OCH_3</math></p> <p>(12) <math>R_1 = OH</math></p>
(10 - 12)	
	<p>(13)</p>

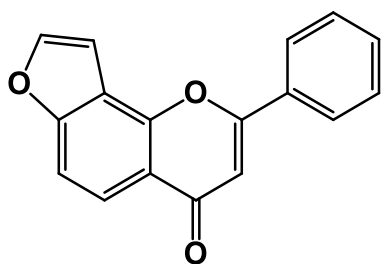


(14)

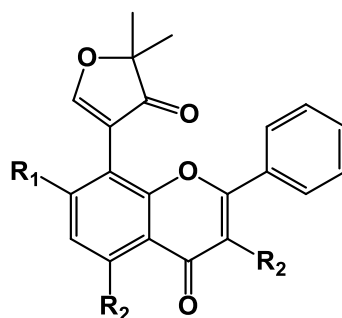


(15)

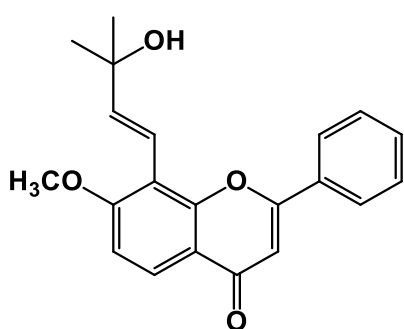
## FLAVONA



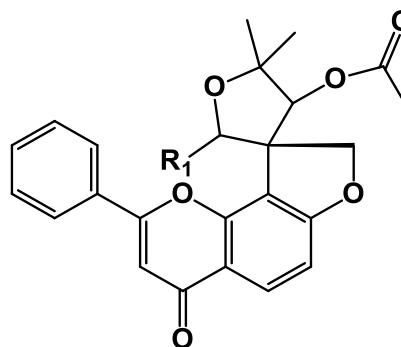
(16)



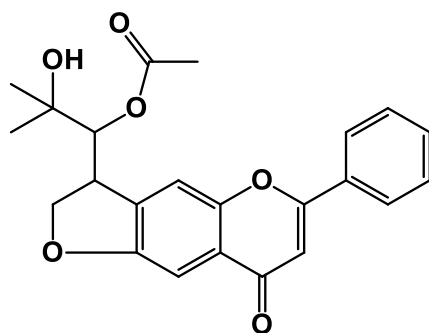
(17 - 18)

(17)  $R_1 = \text{OCH}_3$   $R_2 = \text{OCH}_3$ (18)  $R_1 = \text{OCH}_3$   $R_2 = \text{H}$ 

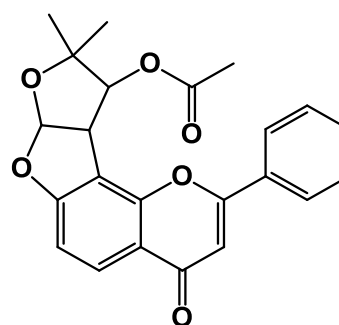
(19)



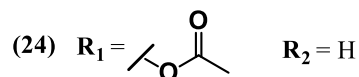
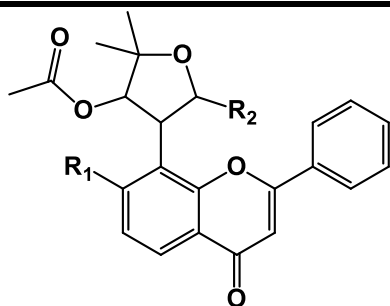
(20 - 21)

(20)  $R_1 = \text{C=O}$ (21)  $R_1 = \text{H}$ 

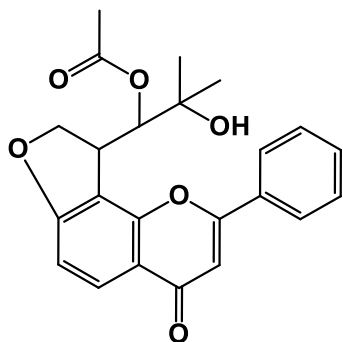
(22)



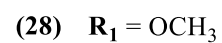
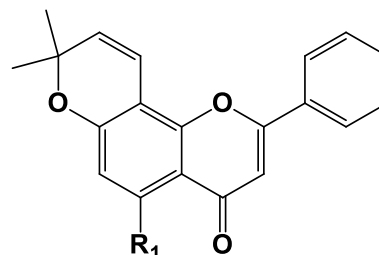
(23)



(24 - 25)

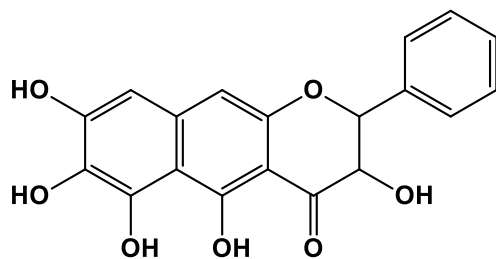


(26)

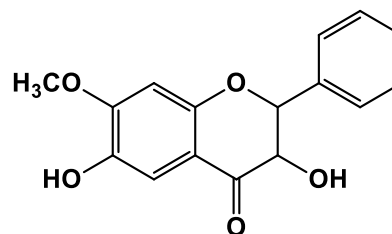


(27 - 28)

FLAVANOL

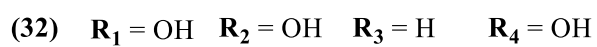
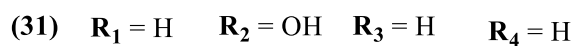
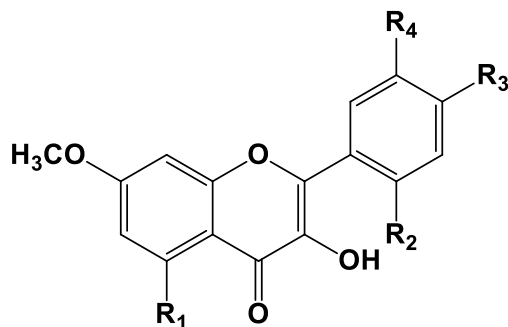


(29)

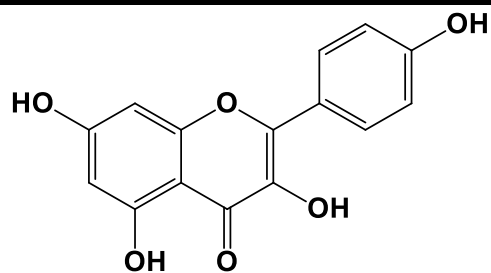


(30)

FLAVONOL

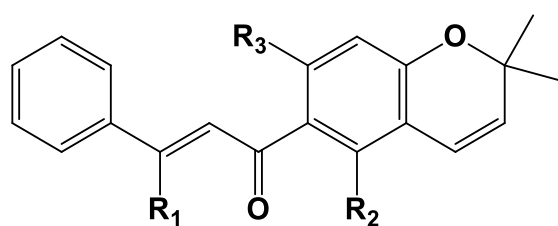


(31 - 32)

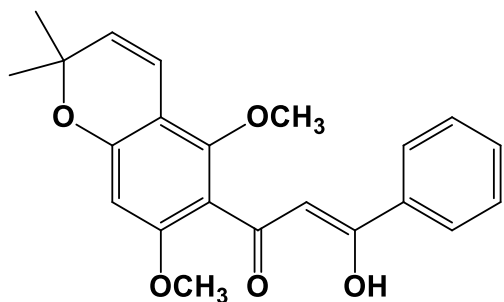
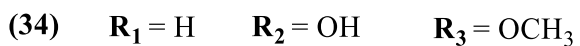


(33)

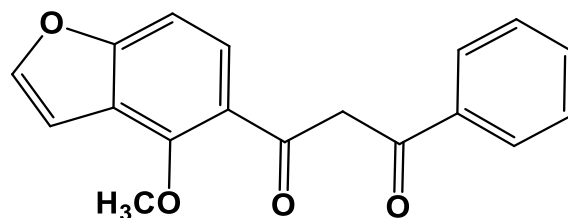
CHALCONA



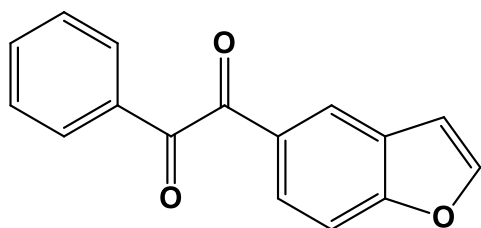
(34 - 36)



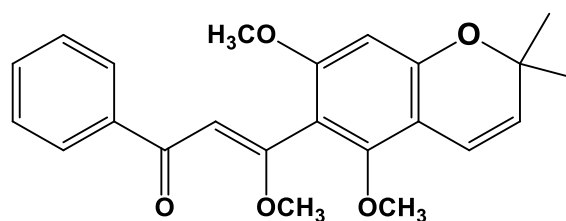
(37)



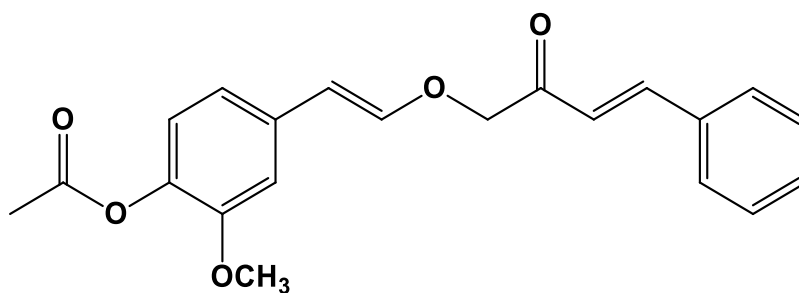
(38)



(39)

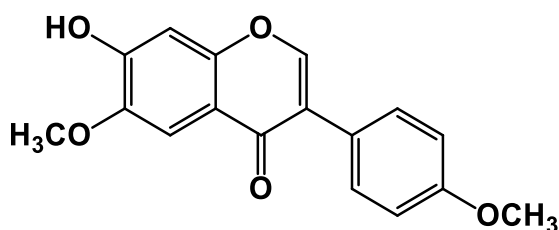


(40)

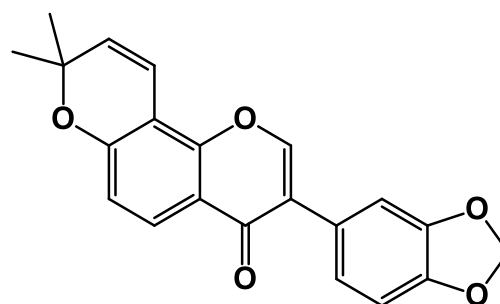


(41)

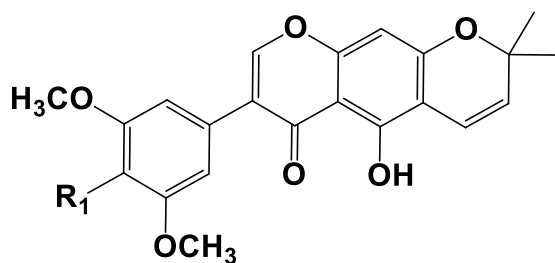
## ISOFLAVONA



(42)



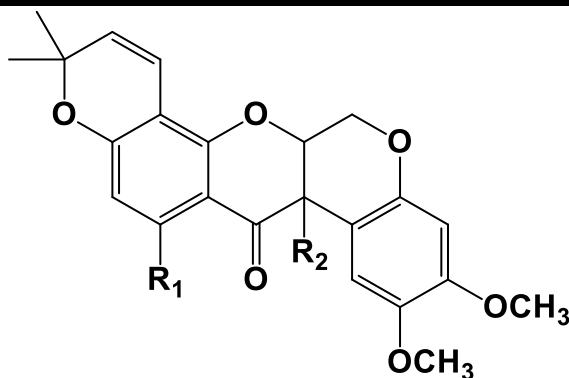
(43)



(44 - 45)

(44)  $R_1 = \text{OH}$ (45)  $R_1 = \text{---O---C(CH}_3)_2\text{---CH=CH}_2$ 

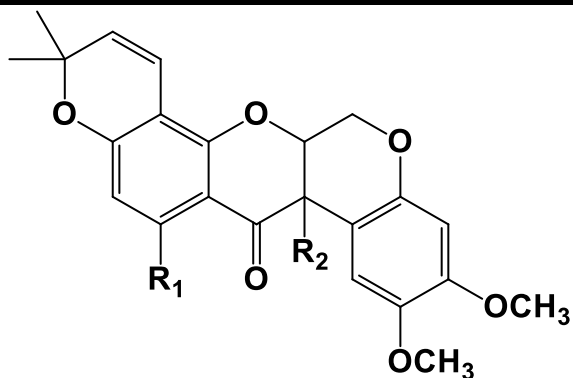
## ROTENOIDES



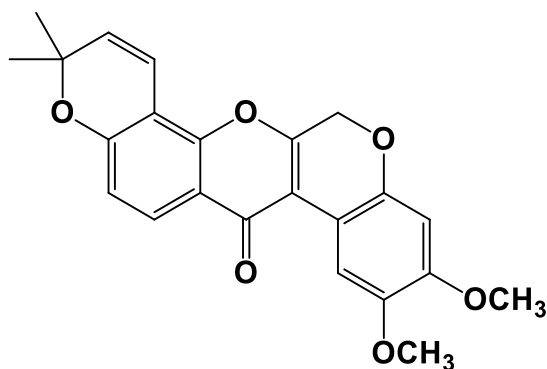
(46 - 48)

(46)  $R_1 = \text{H}$      $R_2 = \text{H}$ (47)  $R_1 = \text{H}$      $R_2 = \text{OH}$ (48)  $R_1 = \text{OH}$      $R_2 = \text{H}$

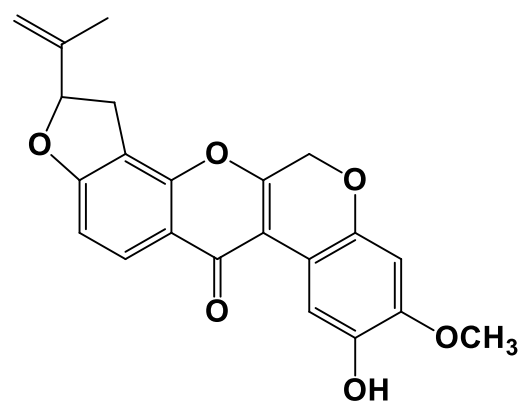


(46)  $R_1 = H$   $R_2 = H$ (47)  $R_1 = H$   $R_2 = OH$ (48)  $R_1 = OH$   $R_2 = H$ 

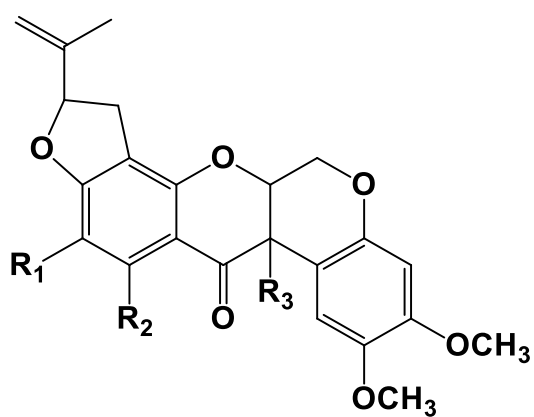
(46 - 48)



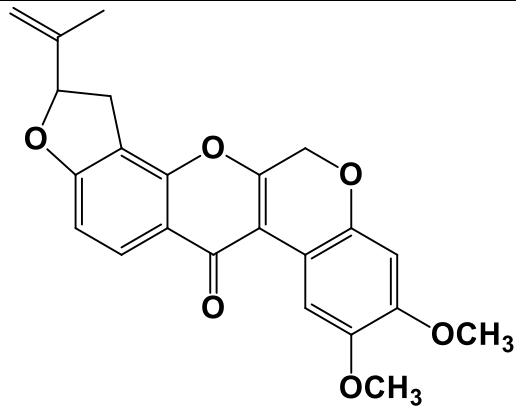
(49)



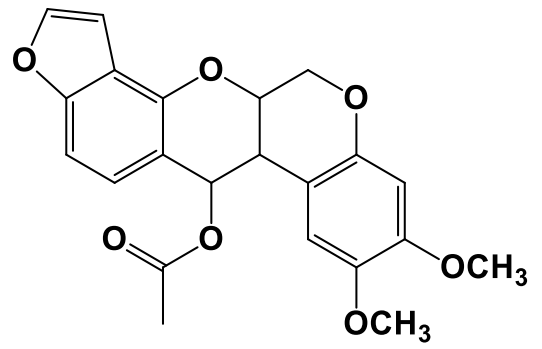
(50)

(51)  $R_1 = OH$   $R_2 = OH$   $R_3 = H$ (52)  $R_1 = H$   $R_2 = H$   $R_3 = OH$ (53)  $R_1 = H$   $R_2 = H$   $R_3 = H$ 

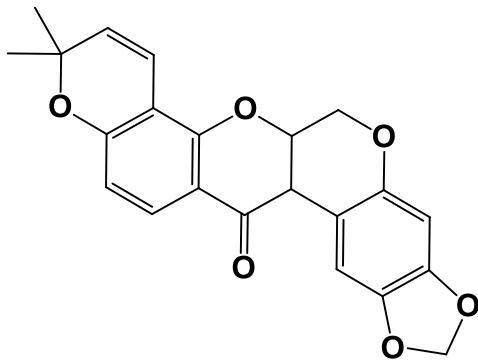
(51 - 53)



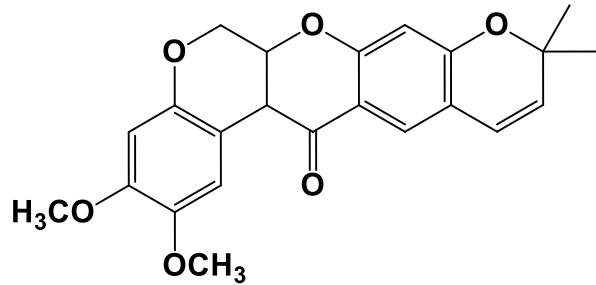
(54)



(55)

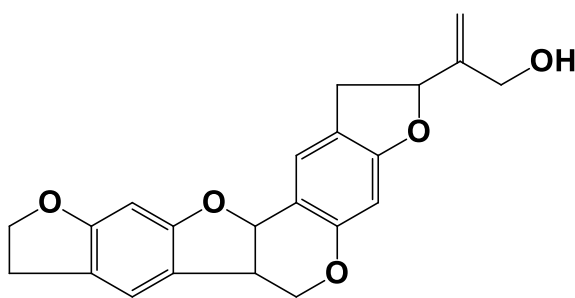


(56)

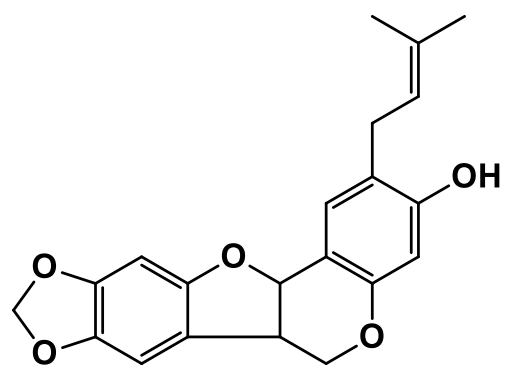


(57)

**PTEROCARPANO**

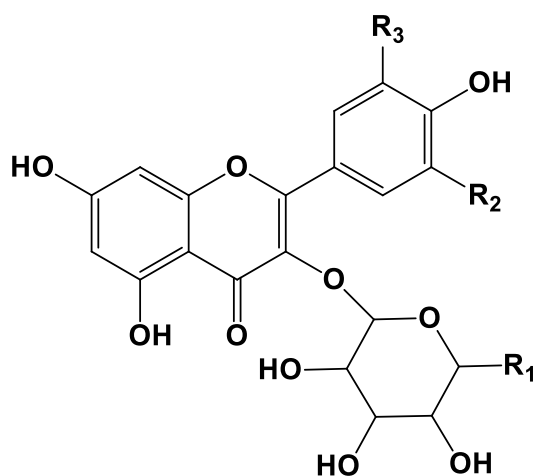


(58)

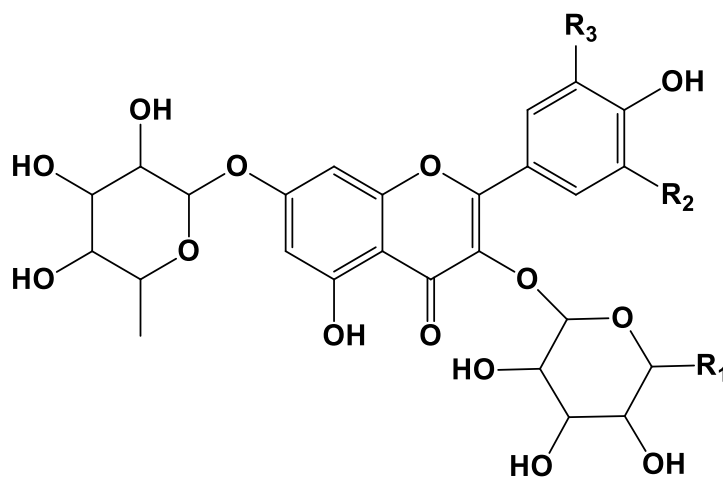


(59)

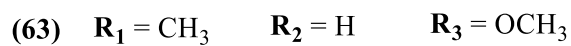
## FLAVONOIDES GLICOSILADOS

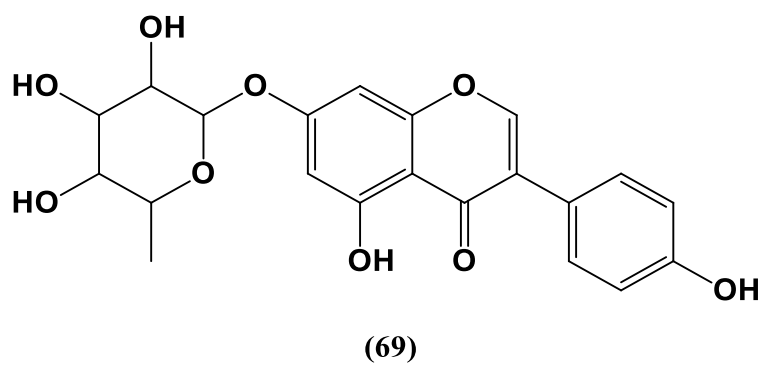
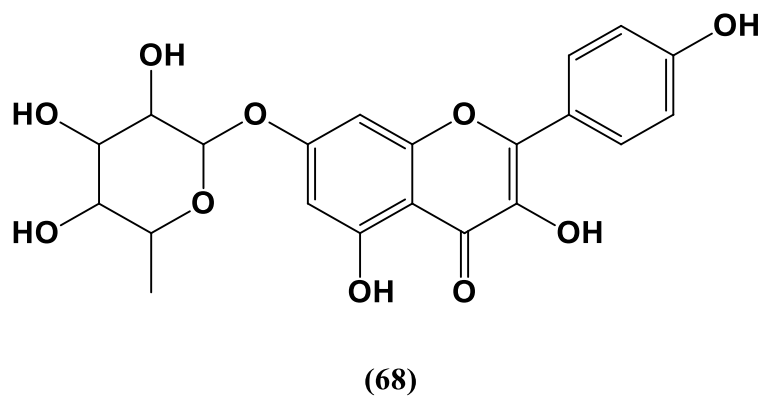
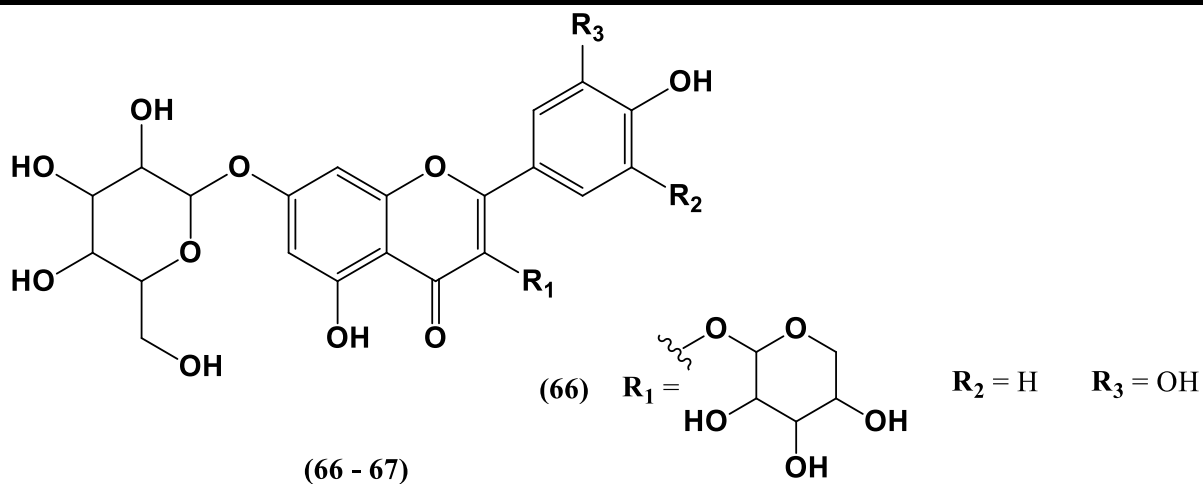


(60 - 62)

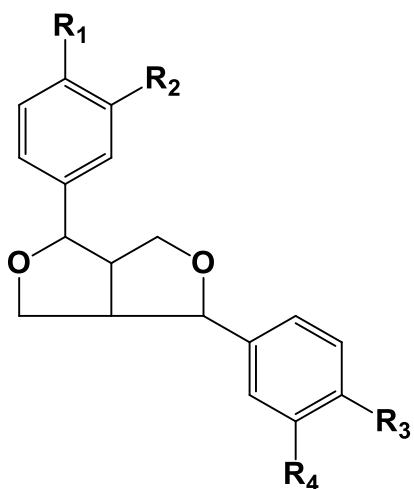


(63 - 65)





## LIGNANAS

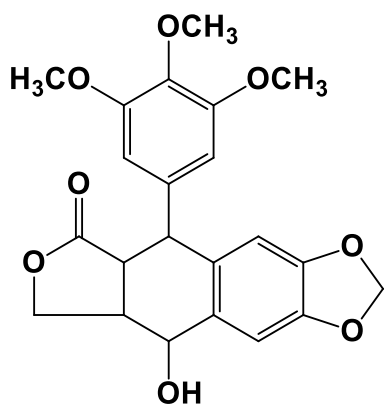


(70) R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>3</sub> = OH R<sub>4</sub> = OCH<sub>3</sub>

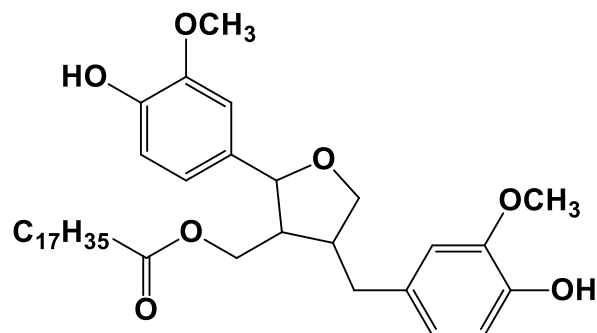
(71) R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = OH R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>4</sub> = OH

(72) R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>4</sub> = OCH<sub>3</sub>

(70 - 72)

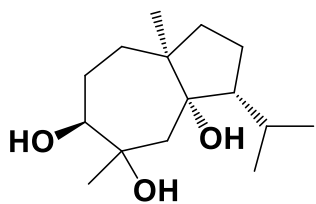


(73)

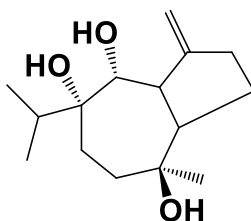


(74)

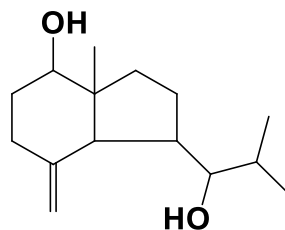
## SESQUITERPENOS



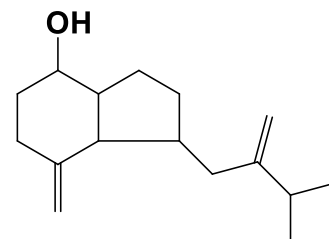
(75)



(76)

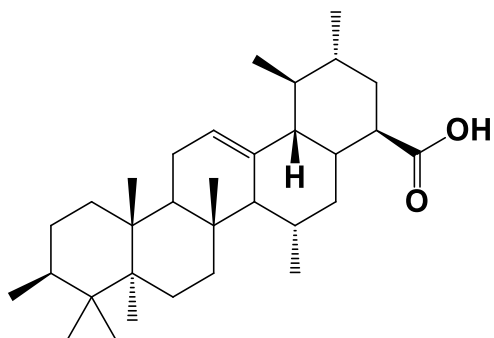


(77)

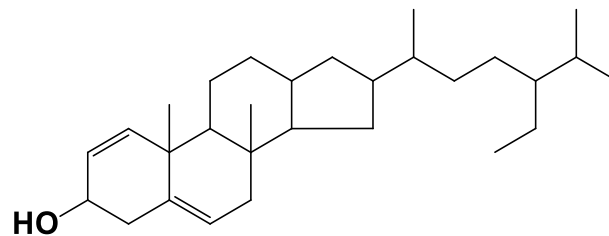


(78)

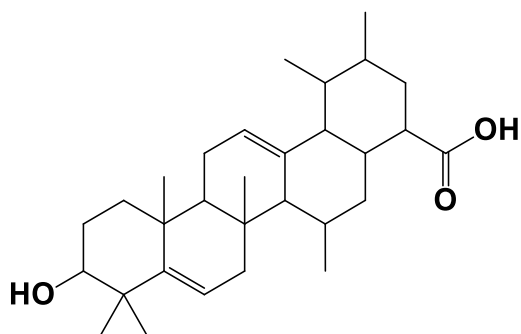
ESTEROIDES E TRITERPENOS



(79)



(80)



(81)

# RESULTADOS E DISCUSSÕES

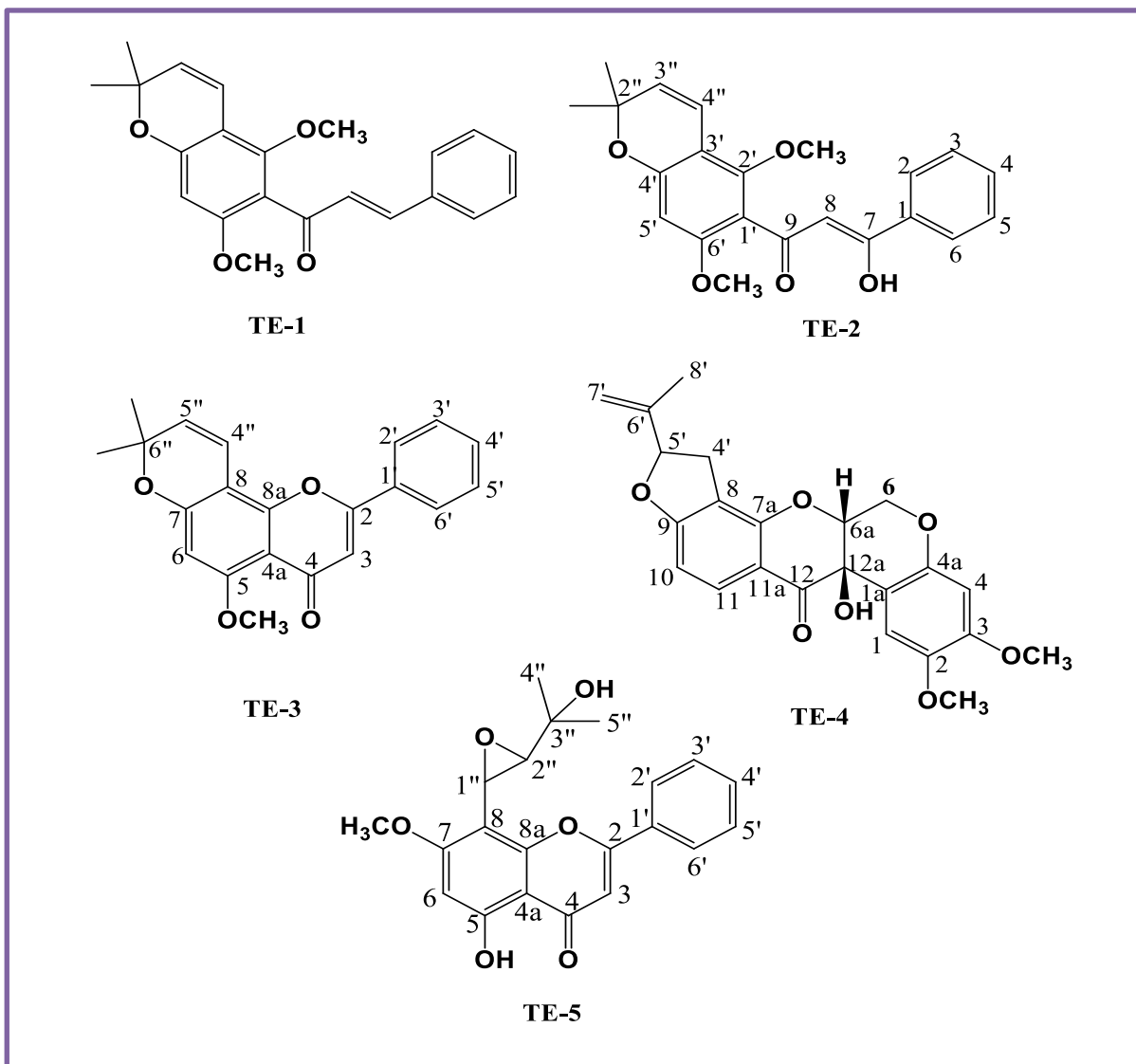
---



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O estudo químico do extrato em AcOEt das raízes e etanólico dos talos de *T. egregia*, utilizando métodos convencionais de cromatografia em gel de sílica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), culminou no isolamento e identificação de duas chalconas a 2',6'-dimetoxi-4',5'-(2'',2''-dimetil)piranochalcona (**TE-1**) e a praecansona B (**TE-2**), duas flavonas a 5-metóxi-2',2'-dimetilpirano-[5',6':7,8]flavona (**TE-3**) e a 5-hidróxi-8-(2'',3''-epóxi-3''-hidróxi-3''-metilbutil)-7-metoxiflavona (**TE-5**) e um rotenoide, a 12a-hidroxirotenona (**TE-4**). Sendo o composto TE-1 relatado pela primeira vez na espécie e o composto TE-5 relatado pela primeira vez na literatura. As estruturas das substâncias isoladas podem ser conferidas na Figura 5.

**Figura 4** - Estruturas dos compostos (**TE 1-5**) isolados de *Tephrosia egregia* Sandwith





#### 4.1 Determinação Estrutural de TE-1

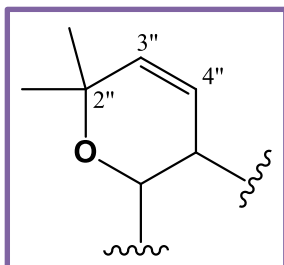
O extrato AcOEt das raízes de *T. egregia* após sucessivos processos cromatográficos e por tratamento em CLAE (Procedimento Experimental, p. 96) forneceu um óleo avermelhado com valor de rotação óptica  $[\alpha]_D^{20} = +8,8667$  ( $c = 0,1$ ;  $\text{CHCl}_3$ ), solúvel em clorofórmio denominado TE-1. A fórmula molecular igual a  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_4$  é compatível com espectro de massa (i. e. 70 eV, Figura 8) de  $m/z$  igual a 350,20 Daltons.

O espectro na região do infravermelho (IV) (Figura 7) apresentou bandas em  $2968\text{ cm}^{-1}$  associado à banda de C-H de carbono  $sp^2$ . A banda intensa em  $1603\text{ cm}^{-1}$  foi relacionada à deformação axial da ligação C=O de cetonas, e as bandas em  $1138$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas à deformação axial da ligação C-O de éteres.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 10 a) apresentou 19 sinais espectrais. A análise comparativa dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$  (Figura 10 b) permitiu identificar a presença de oito carbonos não hidrogenados, entre os quais, uma carbonila em  $\delta_{\text{C}} 194,3$  (C-9), atribuído a uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Também foram observados sinais em  $\delta_{\text{C}} 128,6$  (C-2/6);  $129,0$  (C-3/5);  $130,5$  (C-4);  $108,2$  (C-3') e  $96,4$  (C-5') característicos de carbono  $sp^2$  de sistema aromático.

Observou-se também três sinais para carbono  $sp^3$  oxigenados em  $\delta_{\text{C}} 77,1$  (C-2'');  $53,1$  (OMe-6');  $63,5$  (OMe-2'), sendo os dois últimos característicos de grupos metoxila. Os sinais em  $\delta_{\text{C}} 158,4$  (C-6');  $155,1$  (C-2');  $156,2$  (C-4') encontram-se na região de carbono  $sp^2$  oxigenado. O sinal em  $\delta_{\text{C}} 28,2$  foi atribuído a grupamento metila ( $\text{CH}_3$ ).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 9) indicou a presença de um sistema olefínico característico do substituinte 2'',2''-dimetilcromeno, através do sinal para



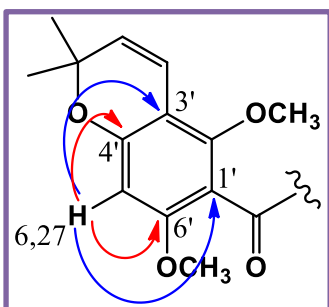
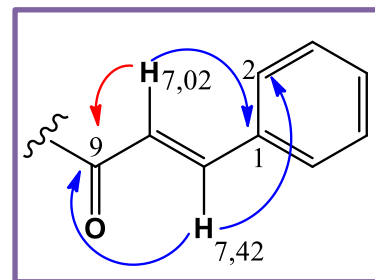
dois grupamentos metila em  $\delta_{\text{H}} 1,5$  (6H, s), presentes em ambientes químicos semelhantes, fato confirmado pela correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HSQC (Figura 11 b), onde o carbono em  $\delta_{\text{C}} 28,2$  correlaciona com o sinal em  $\delta_{\text{H}} 1,5$  (s). Além disso, os dupletos em  $\delta_{\text{H}} 5,5$  (1H, d,  $J = 9,9$  Hz) e  $6,5$  (1H, d,  $J = 9,9$  Hz) sugerem a presença

desse substituinte comum em substâncias isoladas de espécies do gênero *Tephrosia*. A confirmação do sistema 2'',2''-dimetilcromeno se deu também através de sinais característicos em  $\delta_C$  77,1 (C-2''); 127,9 (C-3''); 116,8 (C-4'').

No espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY (Figura 11 a), o hidrogênio  $\delta_H$  5,5 (1H, d,  $J = 9,9$  Hz), o qual mostrou correlação com o carbono  $\delta_C$  127,9 no espectro de HSQC, apresentou acoplamento com o hidrogênio  $\delta_H$  6,5 (1H, d,  $J = 9,9$  Hz).

O espectro de correlação heteronuclear a longa distância  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HMBC (Figura 12) mostrou a correlação a três ligações ( $^3J$ ) do hidrogênio em  $\delta_H$  3,8 com o carbono em  $\delta_C$  155,05 (C-2') e do hidrogênio em  $\delta_H$  3,7 com o carbono em  $\delta_C$  158,4 (C-6'), estes são os acoplamentos referentes aos grupos metoxila existentes na molécula.

Outra correlação importante foi a existente entre os sinais em  $\delta_C$  128,9 (C-8) e 144,9 (C-7) com os hidrogênios em  $\delta_H$  7,0 (1H; d;  $J = 16$  Hz) e 7,4 (1H; d;  $J = 16$  Hz) respectivamente, que através do valor da constante de acoplamento ( $J = 16$  Hz) sugere a existência de uma dupla ligação com geometria trans, assim, tem-se a possibilidade de um esqueleto chalcônico, também frequente no gênero. A correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  7,4 (1H; d;  $J = 16$  Hz) a três ligações ( $^3J$ ) com o carbono em  $\delta_C$  128,6 (C-2) e com a carbonila em  $\delta_C$  194,3 (C-9) e o hidrogênio em  $\delta_H$  7,0 (1H; d;  $J = 16$  Hz) que correlaciona a duas ligações ( $^2J$ ) com o carbono em  $\delta_C$  194,3 (C-9) e a três ligações ( $^3J$ ) com o carbono em  $\delta_C$  135,1 (C-1'), confirmaram a sugestão de que TE-1 tratava-se de um flavonoide da classe das chalconas.



Destaca-se também que o hidrogênio em  $\delta_H$  6,3 correlaciona a duas ligações ( $^2J$ ) com os carbonos em  $\delta_C$  158,4 (C-6') e 156,2 (C-4') e a três ligações ( $^3J$ ) com o carbono  $\delta_C$  116,5 (C-1') e 108,2 (C-3').

Todas essas observações aliadas a comparação com dados descritos na literatura permitiram apontar a identidade de TE-1 com a 2',6'-dimetoxi-4',5'-(2'',2''-dimetil)-piranochalcona (Figura 6), já isolada em *Tephrosia pulcherrima* mas que está sendo relatado pela primeira vez na espécie (GANAPATY, *et al.*, 2008; ARRIAGA, *et al.*, 2009; CHEN, *et al.*, 2014).

Figura 5 - Estrutura proposta para TE-1

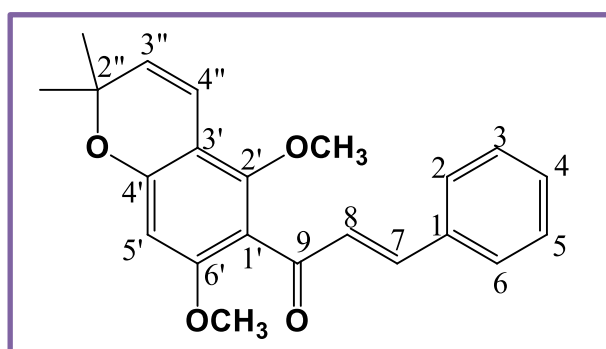


Tabela 3 - Dados espectrocópicos de TE-1

C	TE-1			
	HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult.; J, Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1	135,1	-		H-3/H-5; H-8
2/6	128,6	7,53-7,56 (m)		H-4; H-7
3/5	129,0	7,36-7,44 (m)		
4	130,5	7,36-7,44 (m)		H-2; H-6
7	144,9	7,44 (d; 16)		
8	128,9	7,02 (d; 16)		
9	194,3	-	H-8	H-7
1'	116,5	-		H-5'; H-8'
2'	155,0	-		MeO-2'
3'	108,2	-		H-3''; H-5'
4'	156,2	-	H-5'	
5'	96,4	6,8 (1H, s)		
6'	158,4	-	H-5'	MeO-6'
2''	77,1	-	H-3''; H-Me	H-4''
3''	127,9	5,5 (1H; d; 9,9)		H-Me
4''	116,8	6,5 (1H; d; 9,9)		
Me	28,1	1,5 (3H; s)		
MeO-2'	63,5	3,74 (3H, s)		
MeO-6'	56,1	3,75 (3H, s)		

Figura 6 – Espectro na região do infravermelho de TE-1

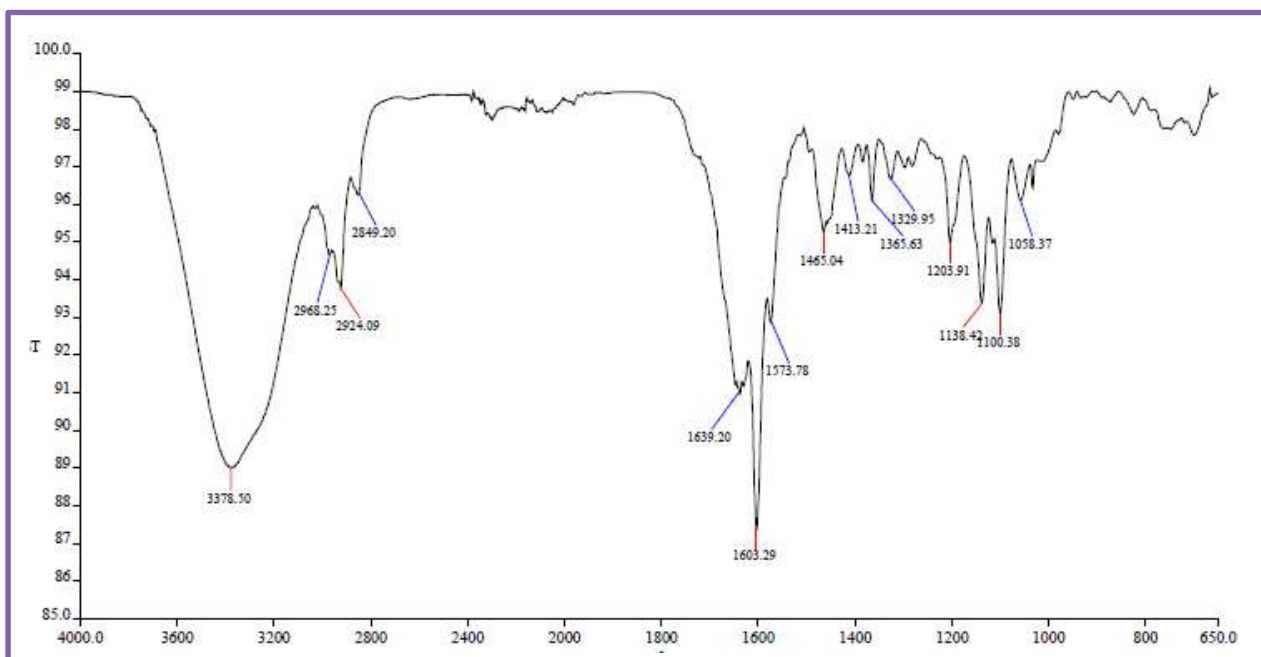


Figura 7 - Espectro de massas (i.e. 70eV) e fragmentações de TE-1

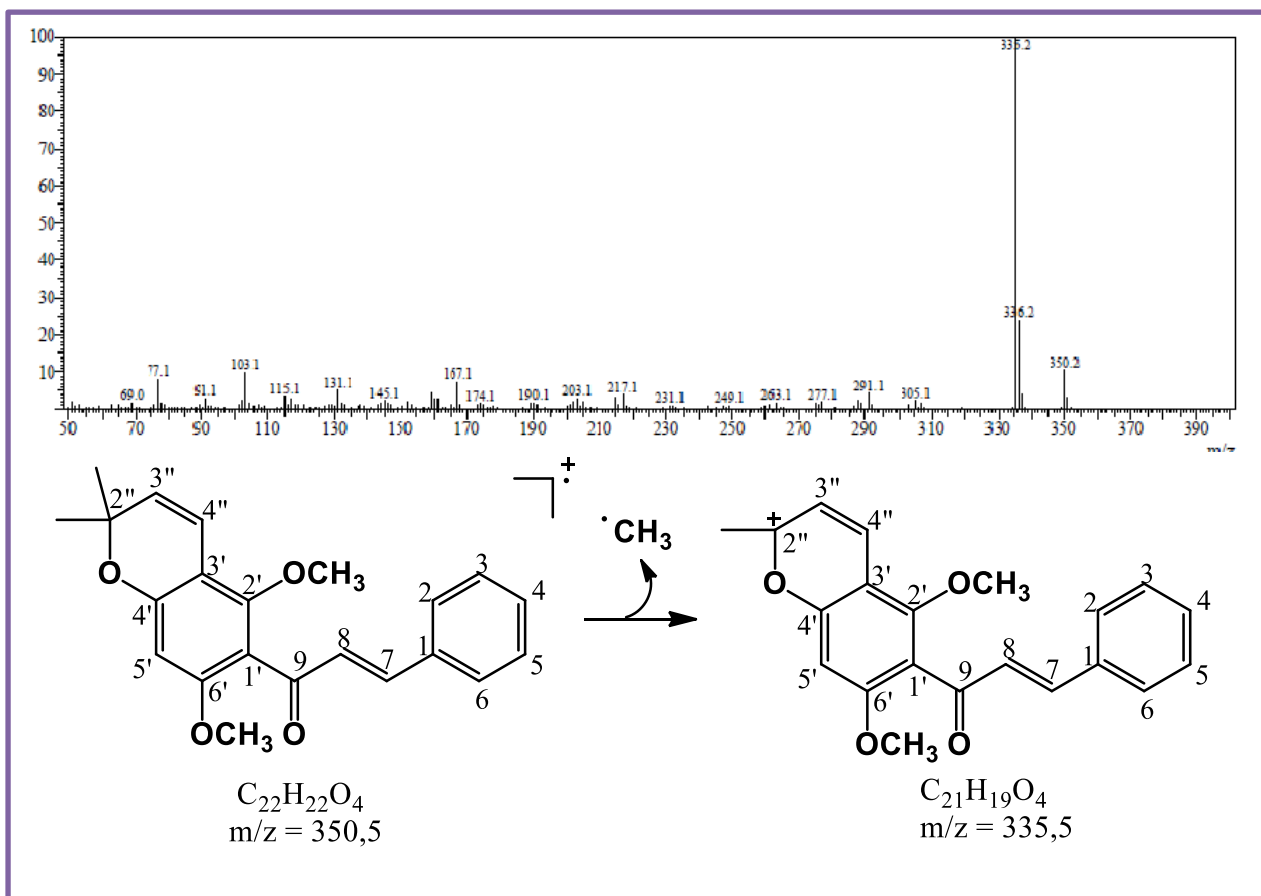
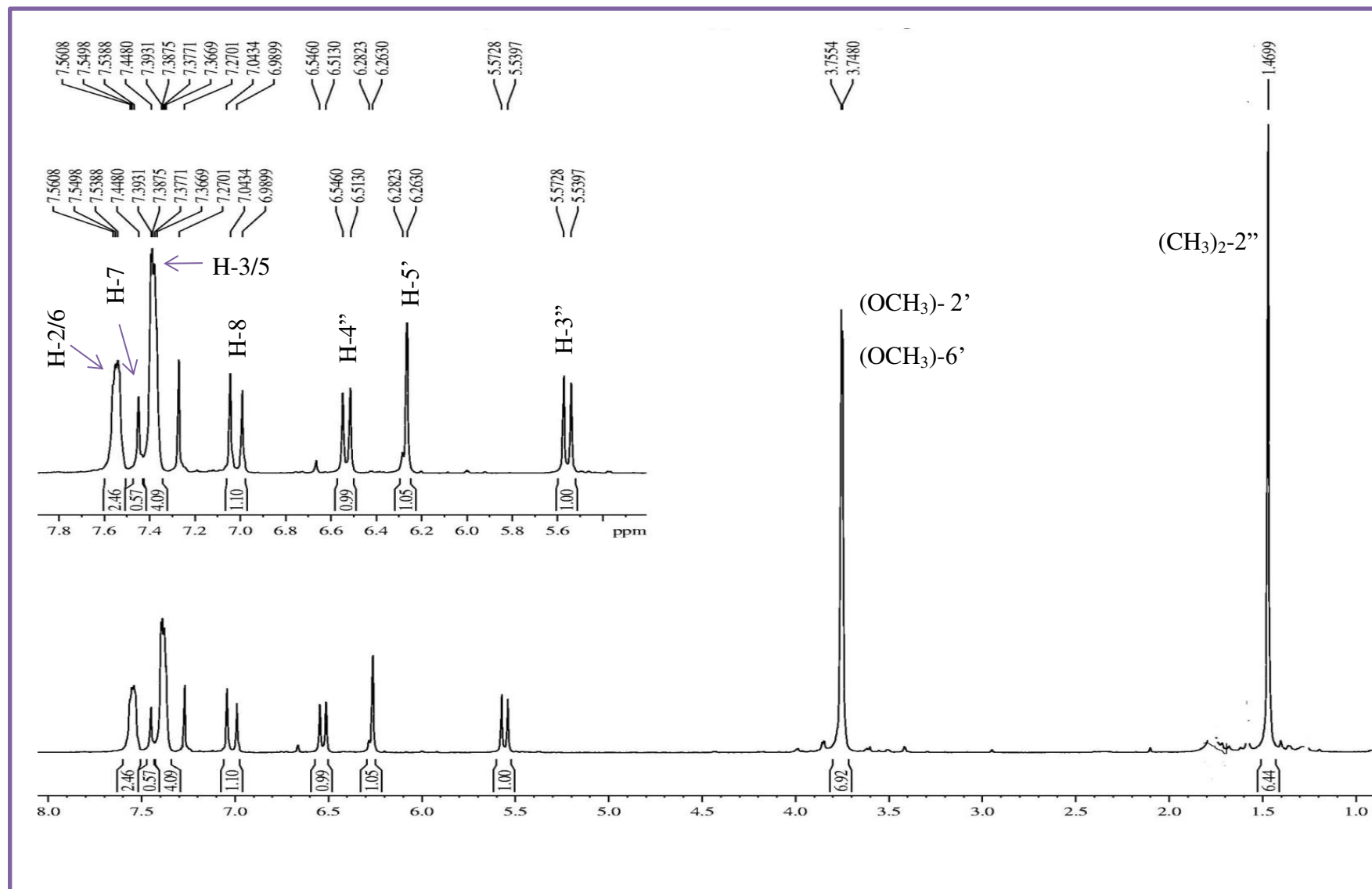


Figura 8 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de TE-1



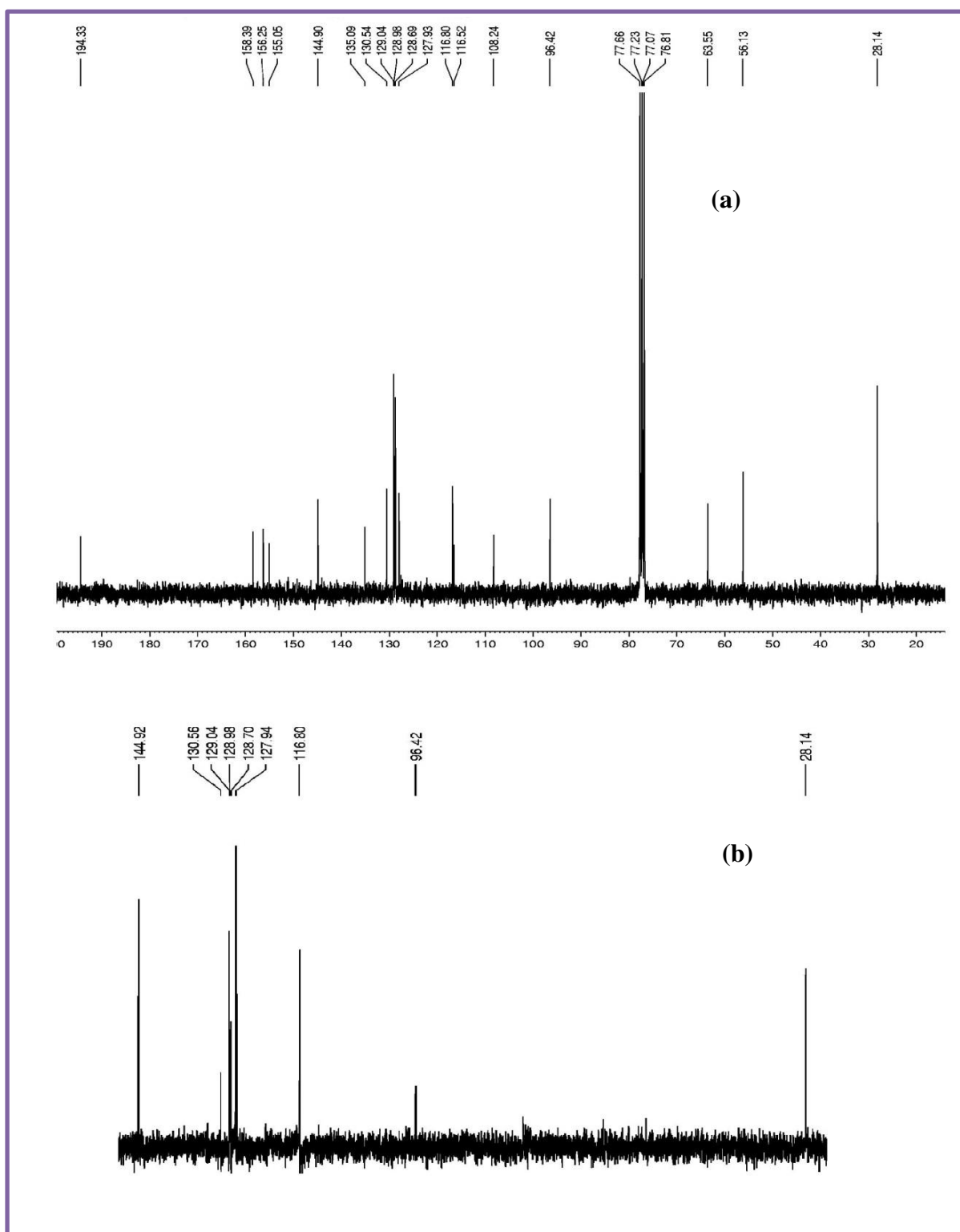
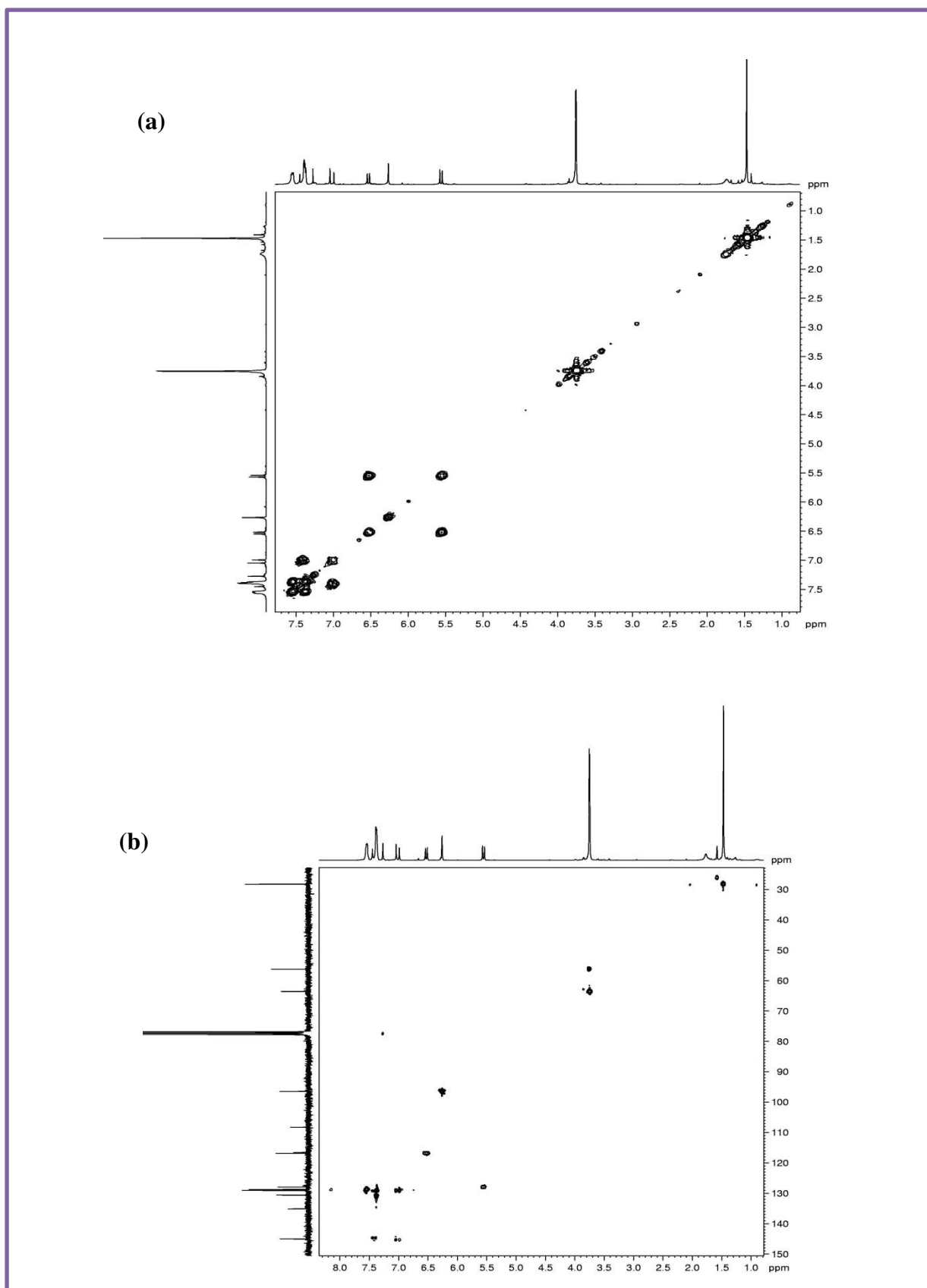
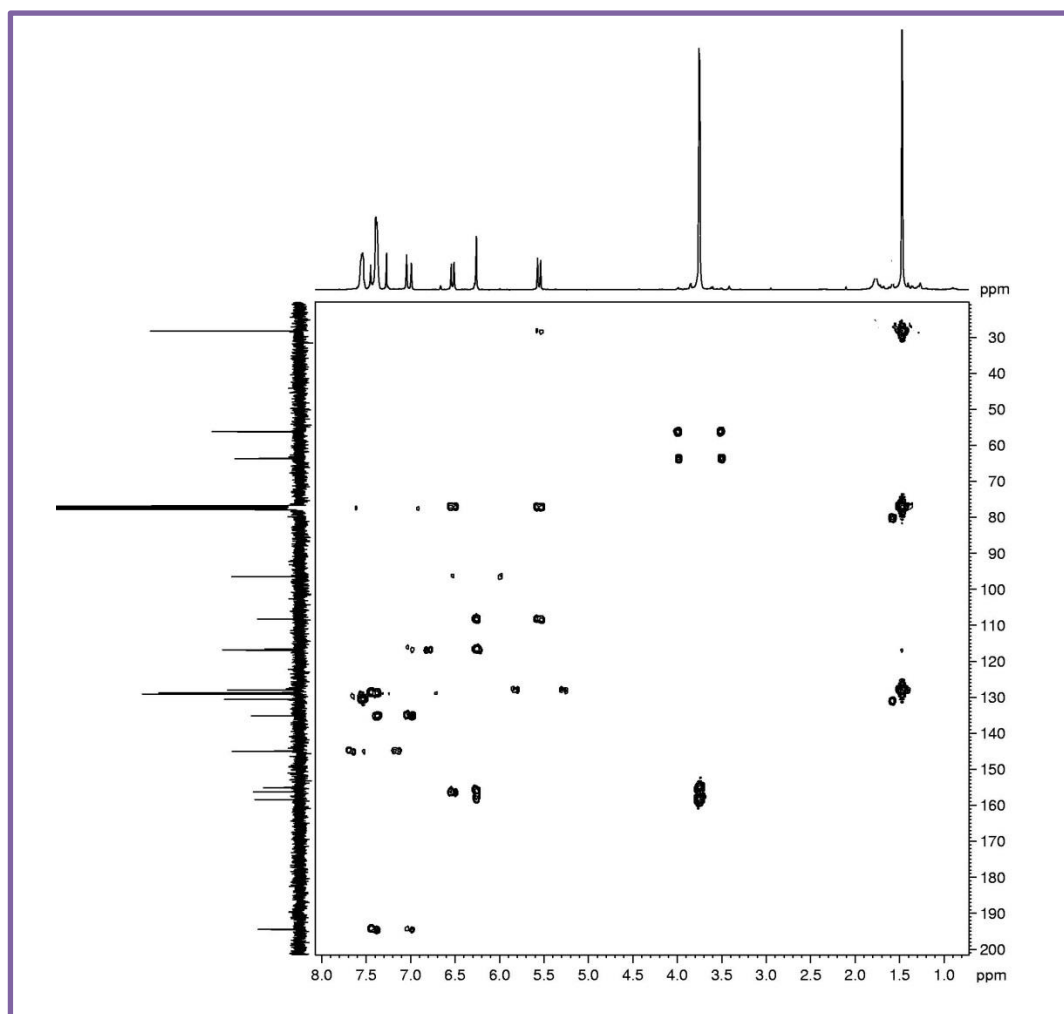
**Figura 9** - (a) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (b) DEPT 135° (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-1

Figura 10 - (a)  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), (b)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HSQC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-1



**Figura 11** -  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HMBC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-1



## 4.2 Determinação Estrutural de TE-2

O extrato AcOEt das raízes de *T. egregia* após sucessivos processos cromatográficos (Procedimento Experimental, p. 98) forneceu um óleo amarelo, com valor de  $[\alpha]_D^{21} = -13,73$  ( $c = 0,1$ ;  $\text{CHCl}_3$ ) solúvel em clorofórmio denominado TE-2.

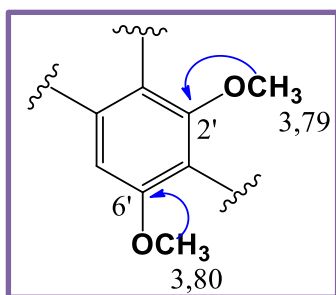
O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 14) apresentou uma banda em  $3354\text{ cm}^{-1}$  relacionada à deformação axial de ligação O-H sugerindo a presença de uma hidroxila na molécula; uma banda forte e fina em  $1603\text{ cm}^{-1}$ , associada à deformação axial da ligação C=O sugerindo a presença de uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada; uma banda em  $1116$  e  $1099\text{ cm}^{-1}$  referente a ligação C-O, e uma banda em  $693\text{ cm}^{-1}$  característico de anel aromático monosubstituído (LIMA, 2010).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 17 a) apresentou 19 linhas espectrais. O sinal em  $\delta_{\text{C}} 188,2$  (C-9) foi atribuído a uma carbonila de cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Existem quatro sinais na região de carbono  $sp^2$  oxigenados em  $\delta_{\text{C}} 155,4$  (C-2'');  $158,6$  (C-6');  $156,6$  (C-4') e  $182,2$  (C-7).

Os sinais em  $\delta_{\text{C}} 63,3$  ( $\text{OCH}_3$ -2') e  $56,2$  ( $\text{OCH}_3$ -6') foram atribuídos a grupos metoxila. Já o sinal em  $\delta_{\text{C}} 77,4$  (C-2'') sobreposto ao sinal do solvente  $\text{CDCl}_3$  refere-se a um carbono não hidrogenado, confirmado através do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – DEPT (Figura 17 b).

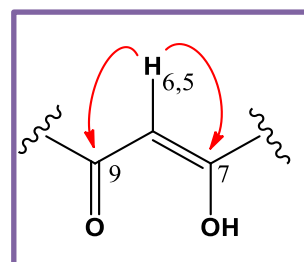
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 16) apresentou sinais entre  $\delta_{\text{H}} 7,42$  à  $7,93$ , característicos de hidrogênios olefínicos ligados a carbonos aromático. O espectro indicou também a presença do esqueleto 2'',2''-dimetilcromeno, o que sugere uma estrutura semelhante a TE-1. O espectro de massa (i.e. 70 eV, Figura 15) mostrou um pico em  $m/z$  205 Daltons (pico base) referente a perda de um ceteno aromático seguida de um radical metila.

O espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HSQC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 18 a) confirmou a presença do sistema 2'',2''-dimetilcromeno através da correlação entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}} 6,5$  (1H; d;  $J = 9,9$  Hz) e  $5,5$  (1H; d;  $J = 9,9$  Hz) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}} 116,7$  (C-4'') e  $127,9$  (C-3''), respectivamente. No espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  – COSY (Figura 19), o hidrogênio  $\delta_{\text{H}} 5,5$  (1H, d,  $J = 9,9$  Hz) apresentou acoplamento com o hidrogênio  $\delta_{\text{H}} 6,5$  (1H, d,  $J = 9,9$  Hz).



O espectro de correlação heteronuclear a longa distância  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 18 b) mostrou correlação a três ligações ( $^3J$ ) do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,8 (3H, s) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  158,6 (C-6') e do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,8 (3H, s) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  155,4 (C-2'), estes são os acoplamentos referentes aos grupos metoxila existentes na molécula, como em TE-1.

Todos os deslocamentos químicos observados nos espectros de hidrogênio e carbono sugerem uma grande similaridade entre as estruturas de TE-1 e TE-2, entretanto os sinais observados em  $\delta_{\text{C}}$  182,2 (C-7); 100,7 (C-8) e 188,2 (C-9) são compatíveis com os carbonos carbonílico e o  $\alpha,\beta$ -oxigenado de um sistema ceto-enólico. A presença do singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,5 (1H, s) bem como a correlação observada no espectro HMBC com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  188,2 (C-9) e 182,2 (C-7) corroboraram com a proposta estrutural de TE-2 confirmando que a diferença entre TE-1 e TE-2 estaria na presença da hidroxila em C-7, argumento reforçado pela presença do simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,5 (1H, s).



A confirmação da estrutura pode ser feita por comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura para Praecanosa B (Figura 13) (ARRIAGA *et al.*, 2009) com a qual TE-2 mostrou identidade. Já isolada em outras espécies do gênero *Tephrosia*, como *T. preacans* e *T. aequilata* (CAMELE *et al.*, 1980; TARUS *et al.*, 2002). Os dados espectroscópicos de TE-1 e TE-2 e sua devida comparação são mostrados na Tabela 4.

**Figura 12** - Estrutura proposta para TE-2

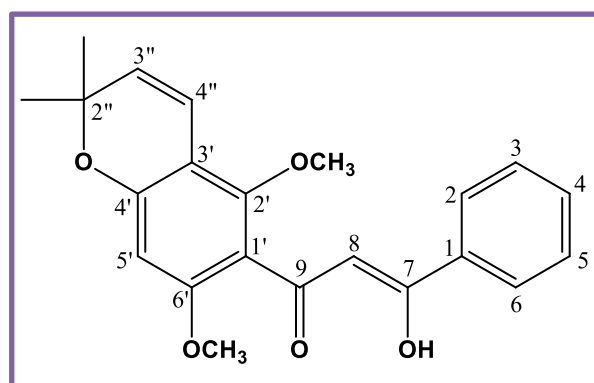


Tabela 4 - Dados espectroscópicos de TE-2 e TE-1 comparados com a literatura (ARRIAGA *et al.*, 2009).

C	TE-2				LITERATURA	TE-1			
	HSQC		HMBC			HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult.; J, Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$		$\delta_C$	$\delta_H$ (mult.; J, Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1	135,3	-		H-3/H-5; H-8	135,3	-	135,09	-	H-3/H-5; H-8
2	127,2	7,9 (dl; 8,4)			127,2	7,94 (d)	128,64	7,53-7,56 (m)	H-4; H-7
3	128,7	7,42-7,52 (m)			128,7	7,45 (t ; 7,75)	129,04	7,36-7,44 (m)	
4	132,2	7,42-7,52 (m)			132,2	7,55 (t ; 7,75)	130,54	7,36-7,44 (m)	H-2; H-6
5	128,7	7,42-7,52 (m)			128,7	7,45 (t ; 7,75)	129,04	7,36-7,44 (m)	
6	127,2	7,92 (dl; 8,4)			127,2	7,94 (d)	128,64	7,53-7,56 (m)	
7	182,2	-	H-8		182,2	-	144,90	7,4 (1H; d; 16)	
8	100,7	6,5 (s)			100,7	6,50 (s)	128,98	7,0 (1H; d; 16)	
9	188,2	-	H-8		188,2	-	194,33	-	H-8
1'	114,5	-		H-5'	108,3	-	116,52	-	H-7
2'	155,4	-		MeO-2'	158,6	-	155,05	-	H-5'; H-8'
3'	108,3	-	H-Me	H-5'; H-2''	114,5	-	108,24	-	MeO-2'
4'	156,6	-		H-4'	155,4	-	156,25	-	H-3''; H-5'
5'	96,4	6,2 (1H; s)			96,4	6,26 (s)	96,42	6,1 (1H; s)	
6'	158,6	-	H-5'	MeO-6'	156,6	-	158,39	-	H-5'
2''	77,4	-	H-3''; H-Me	H-4''	77,4	-	77,07	-	MeO-6'
3''	127,9	5,5 (1H; d; 9,9)		H-Me	127,9	5,55 (d; 10,0)	127,93	5,5 (1H; d; 9,9)	H-4''
4''	116,7	6,5 (1H; d; 9,9)			116,7	6,52 (d; 10,0)	116,80	6,5 (1H;d; 9,9)	H-Me
Me	28,1	1,5 (6H; s)		H-3''	28,1	1,46 (6H, s)	28,14	1,5 (6H; s)	
MeO-2'	63,3	3,79 (3H; s)			56,2	3,79 (3H, s)	63,55	3,74 (3H; s)	
MeO-6'	56,2	3,80 (3H; s)			63,6	3,80 (3H, s)	56,13	3,75 (3H; s)	
OH-7						16,33 (sl)	-	-	-

Figura 13 - Espectro na região do infravermelho de TE-2

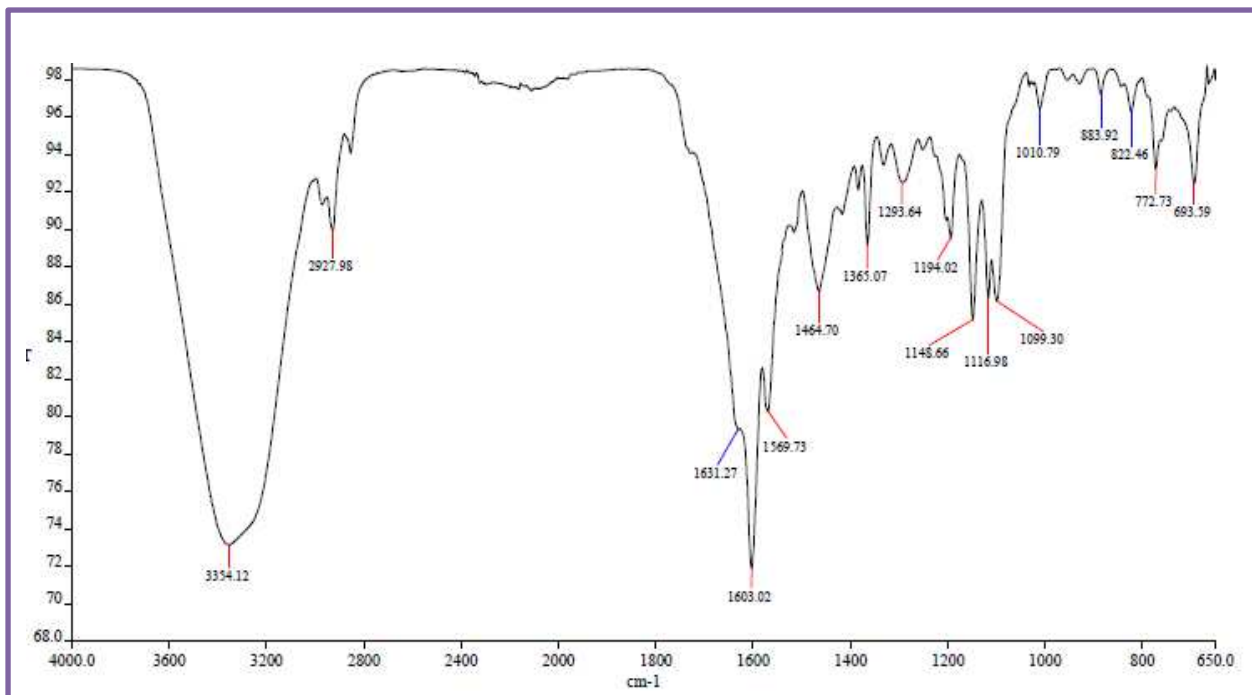


Figura 14 - Espectro de massas (i.e. 70 eV.) e fragmentações de TE-2

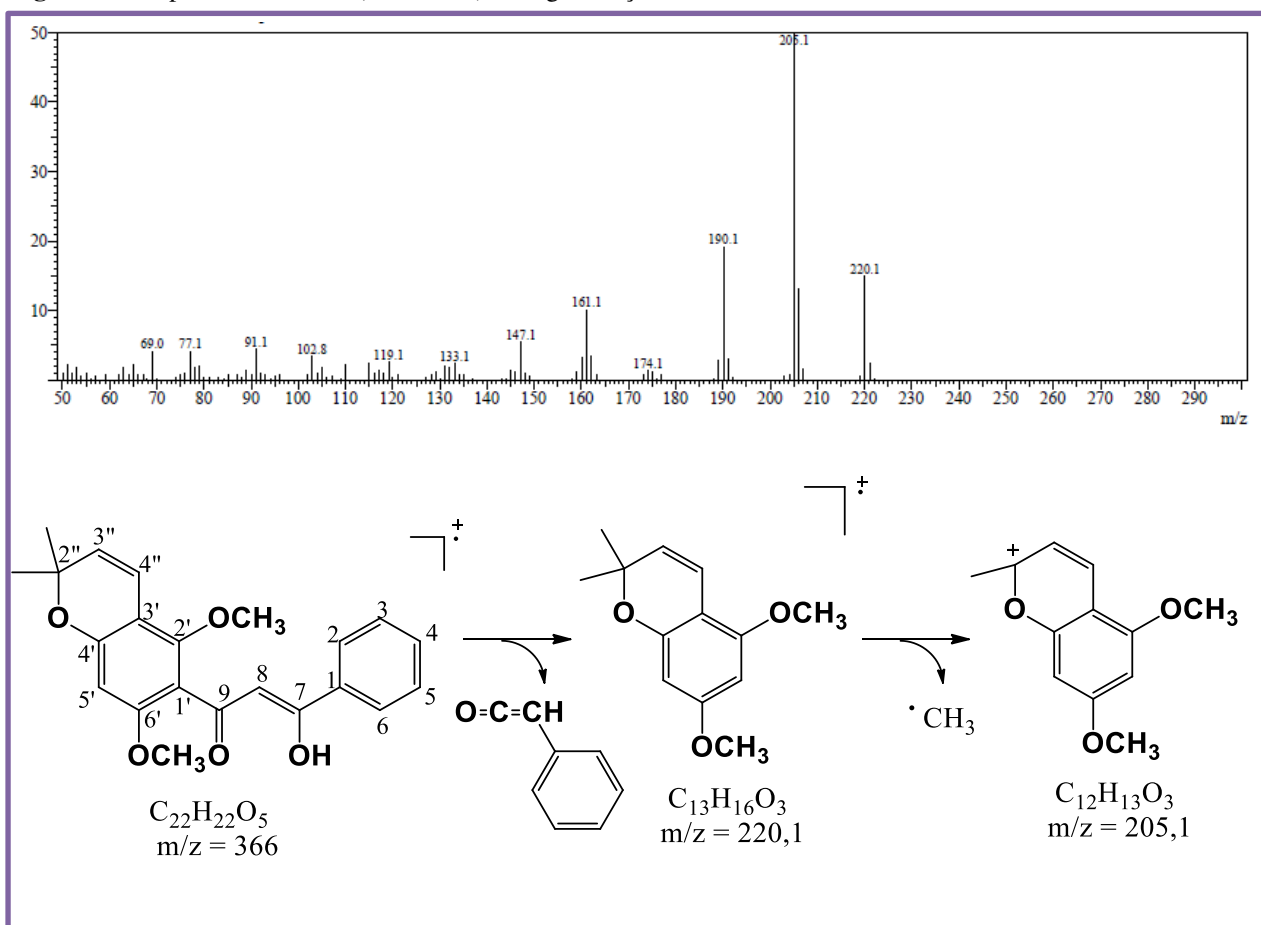




Figura 15 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de TE-2

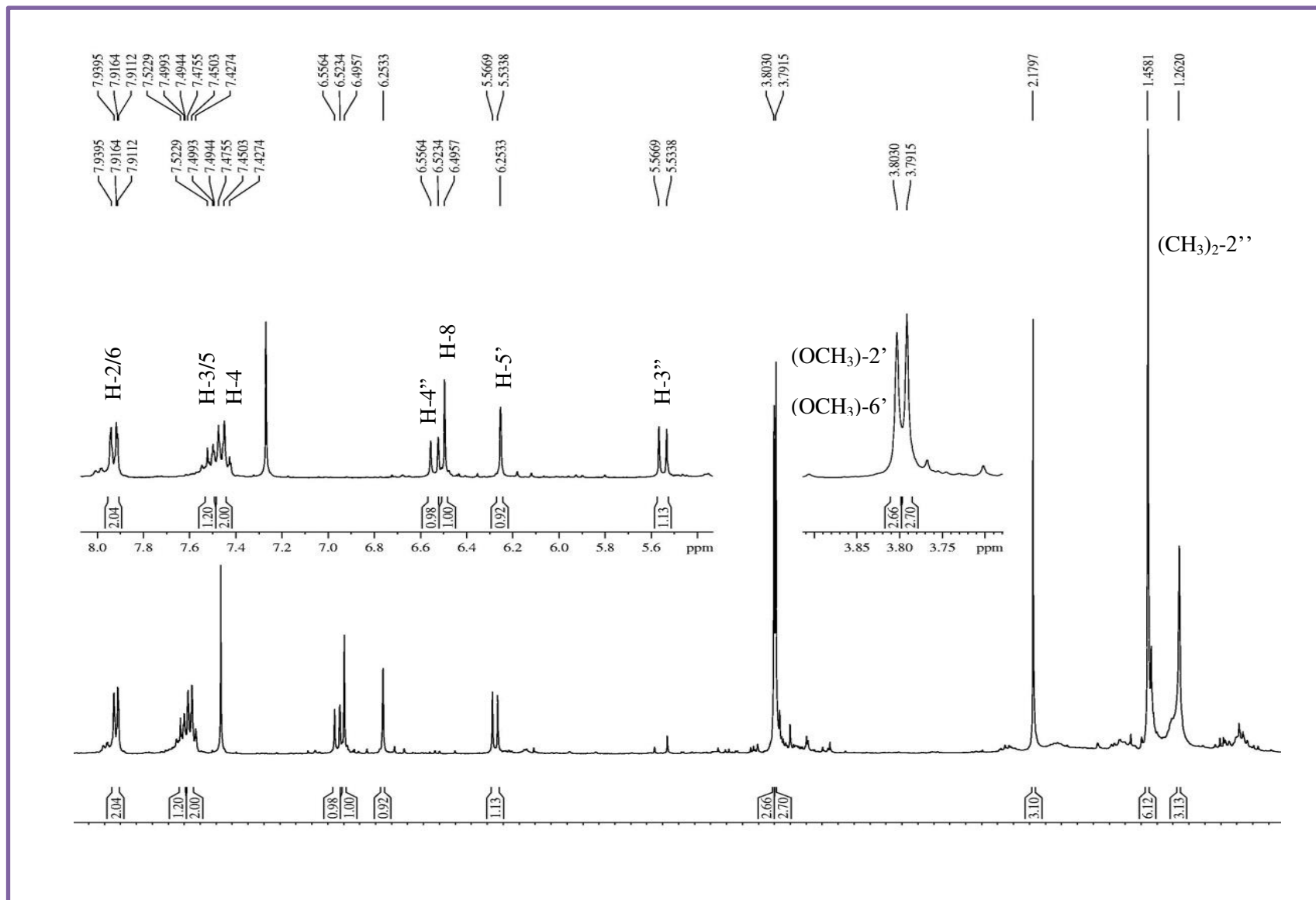
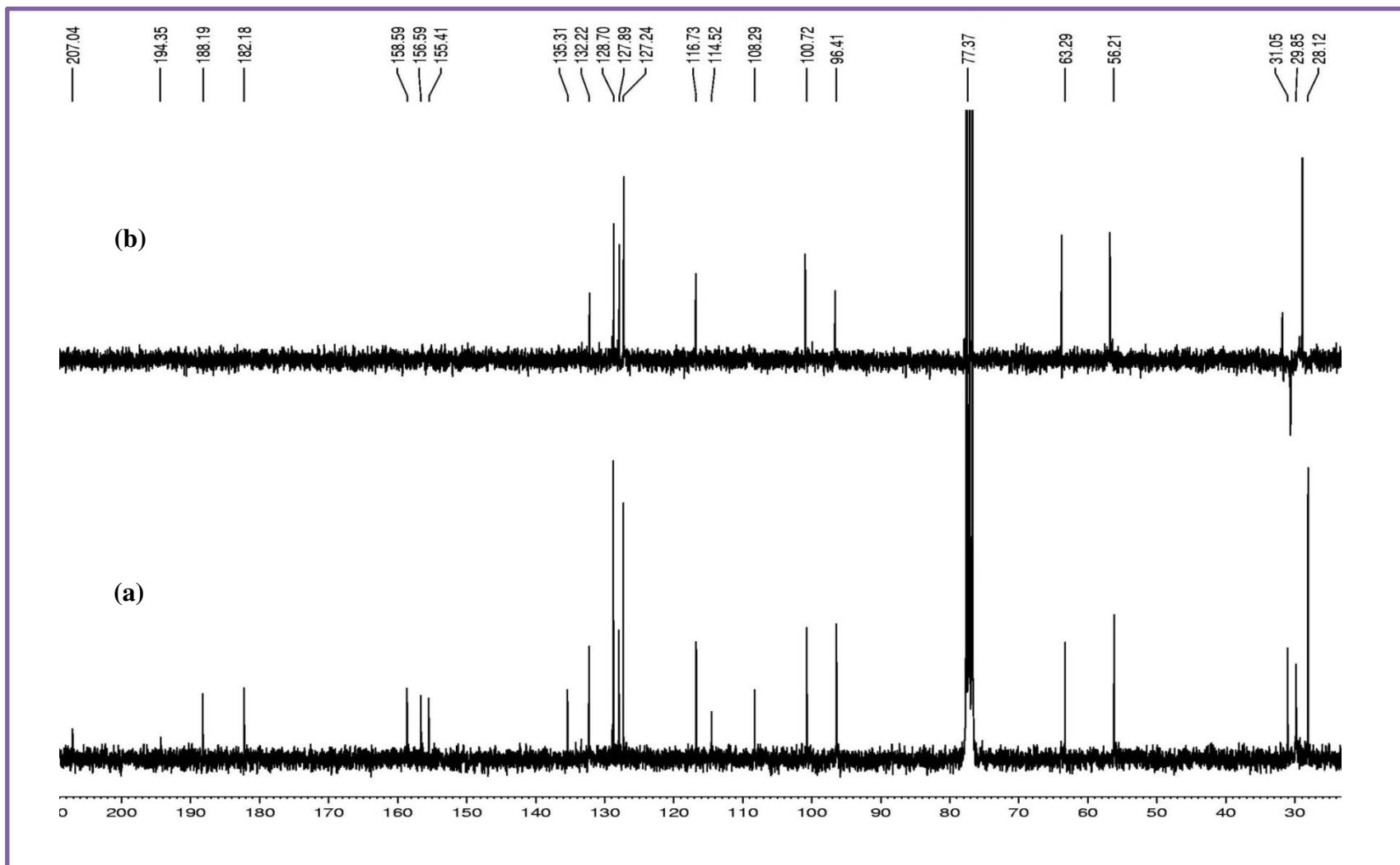


Figura 16 - a) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (b) DEPT 135° (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-2



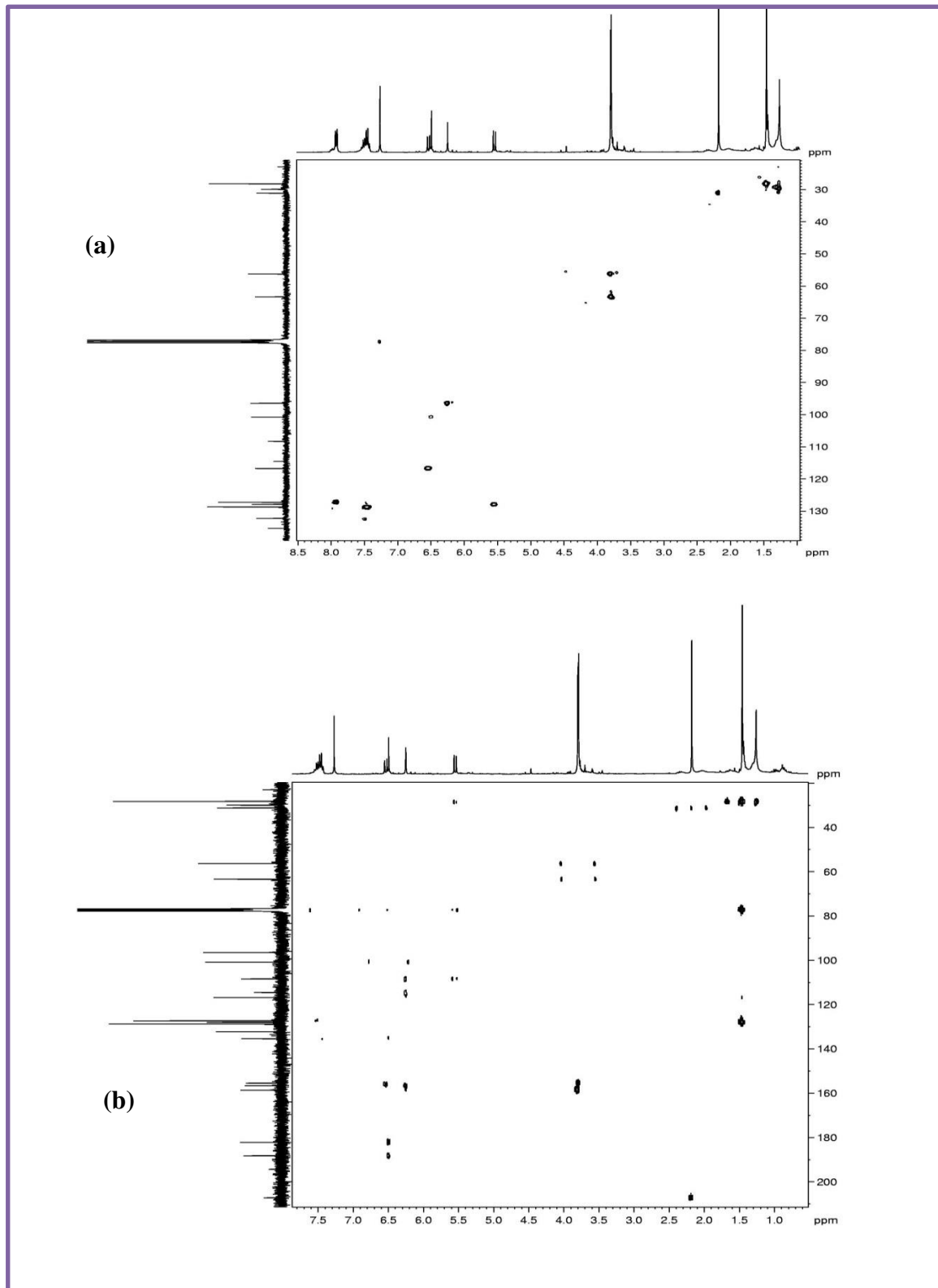
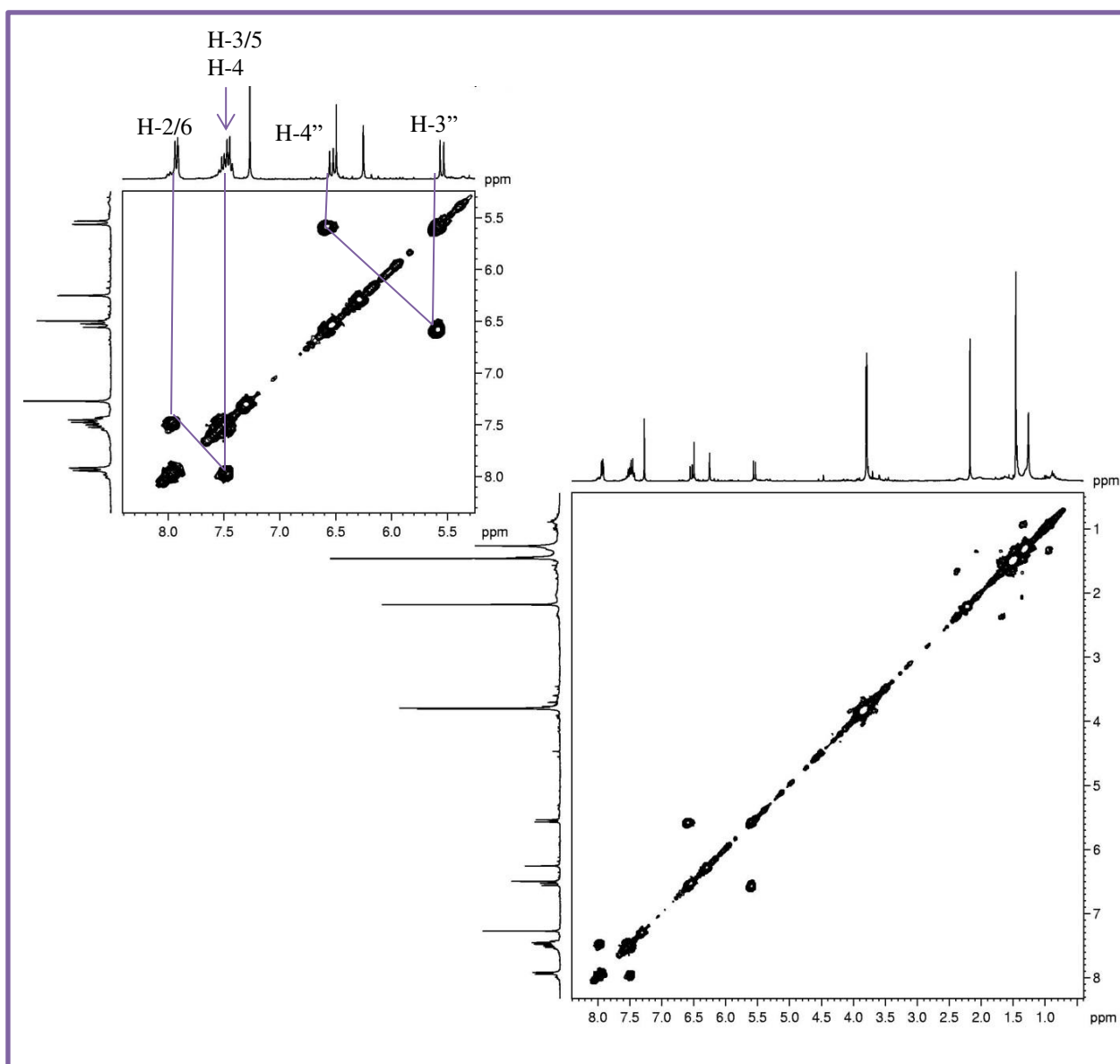
**Figura 17** - (a)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HSQC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), (b)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HMBC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-2



Figura 18 -  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-2



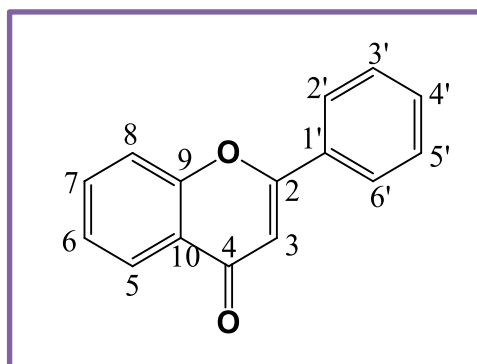
### 4.3 Determinação Estrutural de TE- 3

O tratamento cromatográfico da fração diclorometano do extrato acetato de etila das raízes de *T. egregia* (Procedimento Experimental, p. 98) forneceu um sólido cristalino branco, solúvel em clorofórmio com valor de rotação óptica  $[\alpha]_D^{21} = +48,23$  ( $c = 0,1$ ;  $\text{CHCl}_3$ ) e P.f.° 198-200 °C, que foi denominado TE-3. Sua massa molecular é  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_4$  compatível com o espectro de massa (i.e., 70 eV, Figura 25) de  $m/z = 334$  Daltons.

O espectro na região do infravermelho (Figura 24) apresentou uma banda em  $2974\text{ cm}^{-1}$  relacionada à deformação axial de ligação C-H; uma banda de forte absorção em  $1640\text{ cm}^{-1}$  compatível com cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada; uma banda em  $1597\text{ cm}^{-1}$  atribuída a deformação axial de ligação C=C de anel aromático; um pico em  $1344\text{ cm}^{-1}$  característico de  $\text{CH}_3$  e uma forte absorção em  $696\text{ cm}^{-1}$  associada a um anel aromático monossustituído (LIMA, 2010).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 27 a), apresentou dezessete linhas espectrais que quando comparados com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT  $135^\circ$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 27 b) mostrou a presença de dois carbonos metílicos, sete carbonos metínicos e oito carbonos não hidrogenados.

Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  131,9 (C-1'); 126,2 (C-2'/6'); 129,2 (C-3'/5'); 131,5 (C-4'); 96,9 (C-6); 102,9 (C-8) e 108,9 (C-10) são característicos de carbonos  $sp^2$  aromáticos, bem como os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  158,3 (C-7) e 160,9 (C-2) característicos de carbonos  $sp^2$  oxigenados e 177,9 (C-4) atribuído a carbono carbonílico de cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. A presença destes sinais aliados ao fato das plantas do gênero *Tephrosia* serem fontes de substâncias flavonoidicas permitiram sugerir o esqueleto básico de uma flavona como mostrado na Figura 20.

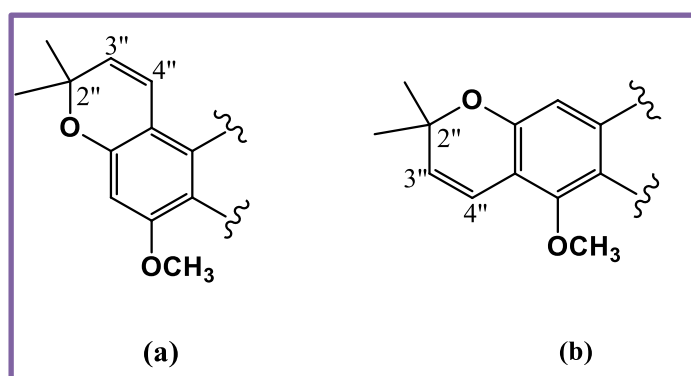
**Figura 19** - Esqueleto básico das flavonas

O sinal em  $\delta_C$  28,5 foi atribuído ao grupamento metila ( $\text{CH}_3$ ). O sinal em  $\delta_C$  56,7 indica a presença de uma metoxila ( $\text{OCH}_3$ ).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 26) mostrou dois dupletos em  $\delta_H$  5,6 (1H; d;  $J=10$  Hz) e 6,7 (1H; d;  $J=10$  Hz). O espectro de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY (Figura 28) mostrou a correlação existente entre os hidrogênios, sugerindo um sistema olefínico característico do substituinte 2'',2''-dimetilcromeno já observado em TE-1 e TE-2. O RMN de  $^1\text{H}$  mostrou também simpletos em  $\delta_H$  6,7 (H-3) e 6,3 (H-6) que foram atribuídos a hidrogênios olefínicos.

A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HSQC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 28 b) mostrou correlação entre os sinais  $\delta_C$  28,48 [ $(\text{CH}_3)_2$ ] e  $\delta_H$  1,52 (6H, s). Relacionou-se também os carbonos em  $\delta_C$  115,5 (C-4'') e  $\delta_C$  127,8 (C-5'') com os hidrogênios olefínicos em  $\delta_H$  6,8 (1H; d;  $J = 10$  Hz) e  $\delta_H$  5,5 (1H; d;  $J = 10$  Hz), respectivamente.

Existe a possibilidade de termos uma estrutura linear ou angular formada pelo anel 2'',2''-dimetilcromeno, conforme mostrado na figura 21 (a) e (b).

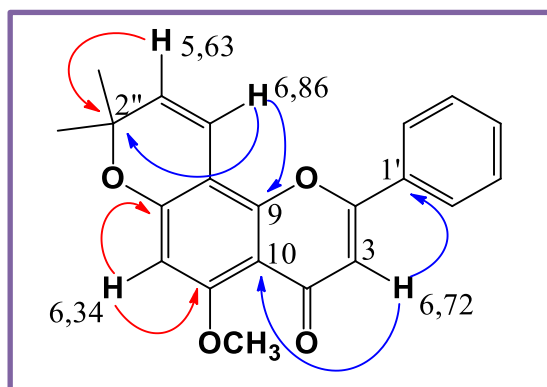
**Figura 20** - (a) Estrutura angular e (b) Estrutura linear

A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC (Figura 29) definiu a posição do referido anel através das correlações a duas ligações ( $^2J$ ) observadas entre o sinal do hidrogênio  $\delta_{\text{H}}$  6,3 (1H;s) com os carbonos  $\delta_{\text{C}}$  160,7 (C-5) e 158,3 (C-7).

Observou-se ainda as correlação entre os sinais  $\delta_{\text{H}}$  1,5 (6H, s) e  $\delta_{\text{C}}$  78,4 (C-2''). E correlação a três ligações ( $^3J$ ) entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,9 (3H, s) e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  160,7 (C-5). O mesmo experimento mostrou correlações de  $\delta_{\text{H}}$  6,7 (1H; s) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  131,9 (C-1') e 108,9 (C-10), do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,8 (H-4'') com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  78,4 (C-2'') e 154,8 (C-9) e de  $\delta_{\text{H}}$  5,6 (H-3'') com  $\delta_{\text{C}}$  78,4 (C-2'').

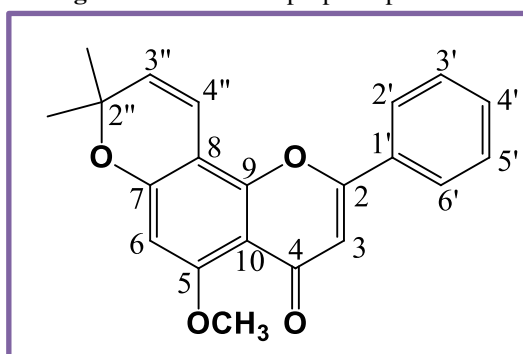
As principais correlações observadas no espectro de HMBC podem ser conferidas na Figura 22 e os dados espectroscópicos em comparação com a literatura são descritos na Tabela 5.

**Figura 21** - Principais correlações observadas no espectro de HMBC de TE-3



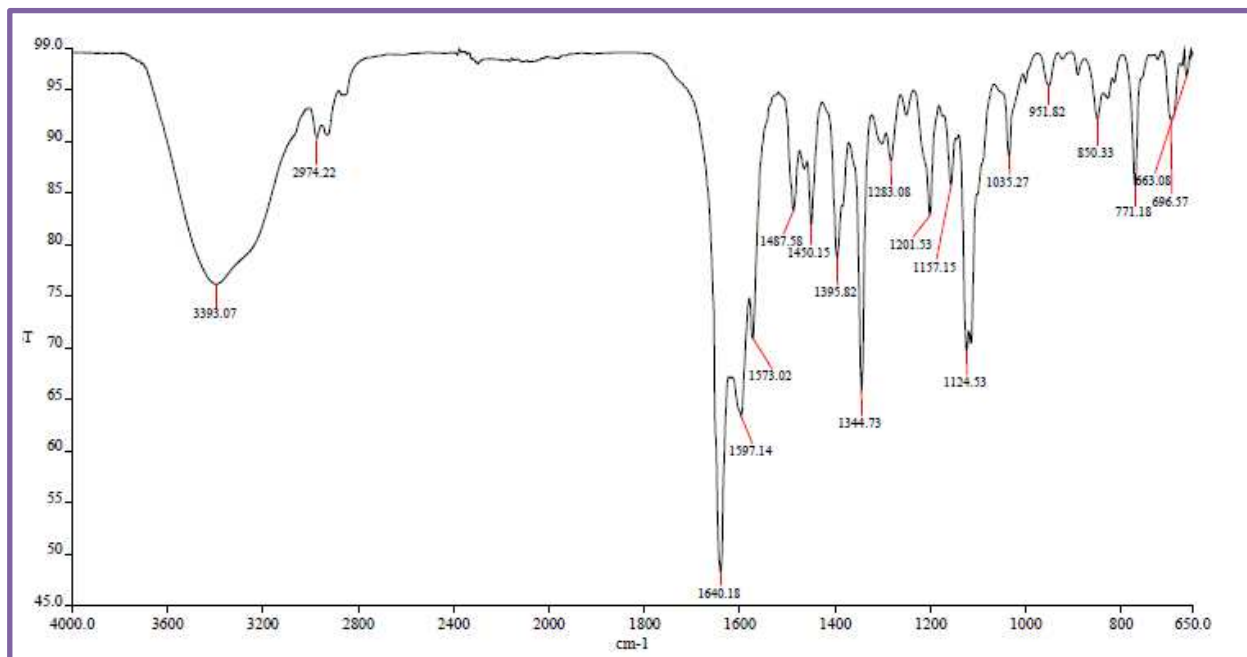
A comparação dos dados obtidos a partir dos espectros de ressonância magnética nuclear com a literatura, concluiu-se que TE-3 trata-se do 5-metoxi-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6'':7,8)flavona, conforme representado na figura 23. Esta substância foi isolada em outras plantas do gênero *Tephrosia*, como por exemplo, *T. tunicata* e *T. praecans* (ANDREI, *et al.*, 2000; CAMELE, *et al.*, 1980).

Figura 22 - Estrutura proposta para TE-3

Tabela 5 - Dados espectroscópicos de TE-3 comparados com a literatura (ANDREI, *et al.*, 2000).

C	HSQC		HMBC		LITERATURA	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult.; J, Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult.; J, Hz)
2	160,9	-	H-3		159,7	-
3	108,9	6,7 (1H; s)			107,3	6,67 (s)
4	177,9	-			176,6	-
5	160,2	-			157,1	-
6	96,9	6,3 (1H; s)			95,9	6,34 (s)
7	158,3	-		H-4''	159,1	-
8	102,9	-		H-8; H-5''	101,9	-
9	154,2	-		H-4''	153,0	-
10	108,9	-	H-3		101,9	-
1'	131,9	-	H-3		130,6	-
2'/6'	126,2	7,86-7,89 (m)			124,9	7,81-7,91(m)
3'/5'	129,2	7,50-7,53 (m)			128,1	7,51-7,64(m)
4'	131,4	7,50-7,53 (m)			130,3	7,51-7,64(m)
4''	115,4	6,8 (1H; d; 10)			114,5	6,86 (d; 10)
5''	127,8	5,6 (1H; d; 10)		H-Me	126,7	5,63 (d; 10)
6''	78,4	-	H-Me		77,2	-
Me	28,4	1,5 (6H; s)			27,4	1,50 (s)
MeO-5	56,7	3,9 (3H; s)			55,8	3,95 (s)

**Figura 23** - Espectro na região no infravermelho de TE-3



**Figura 24** – Espectro de massas (i.e. 70 eV) e fragmentações de TE-3

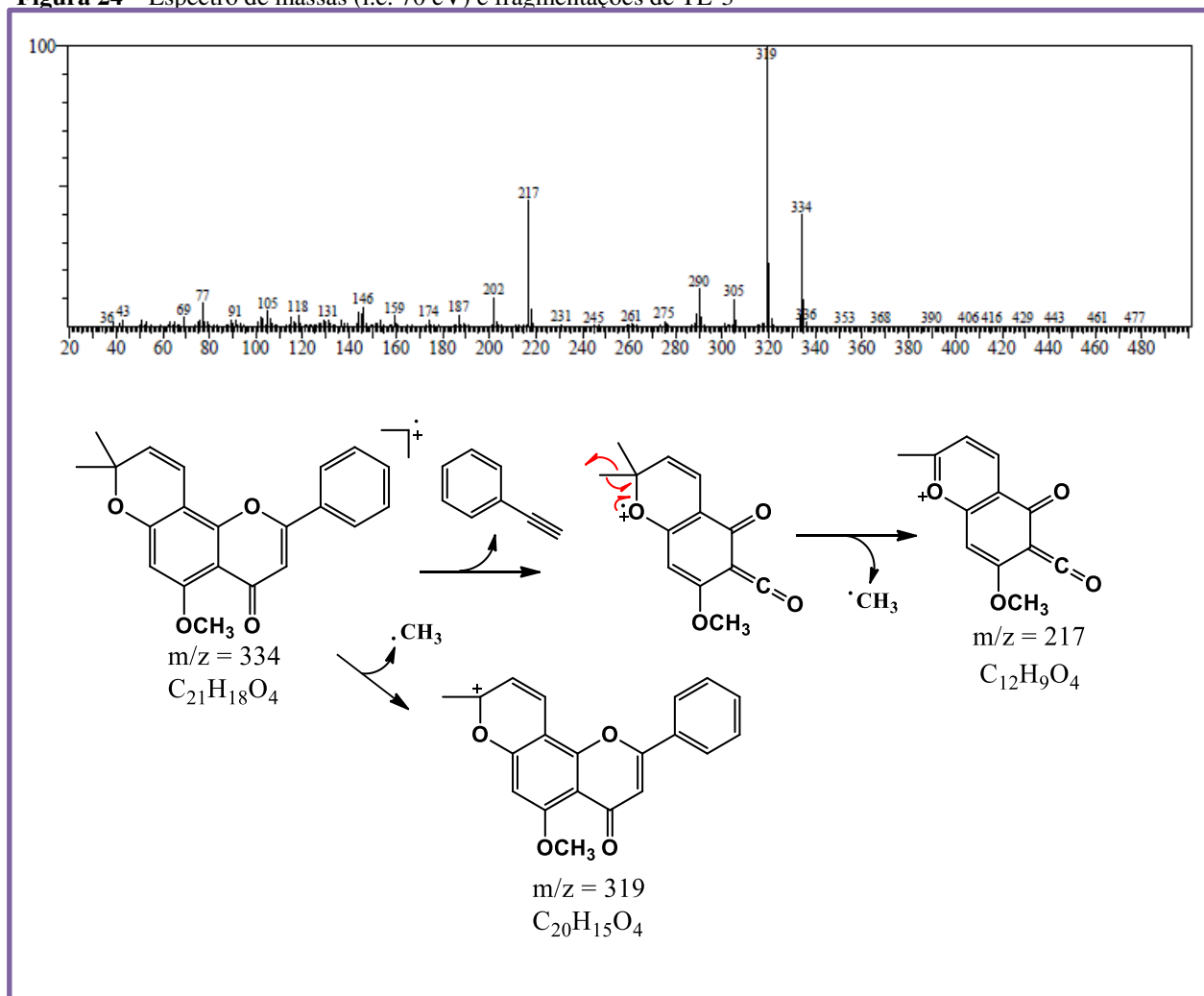


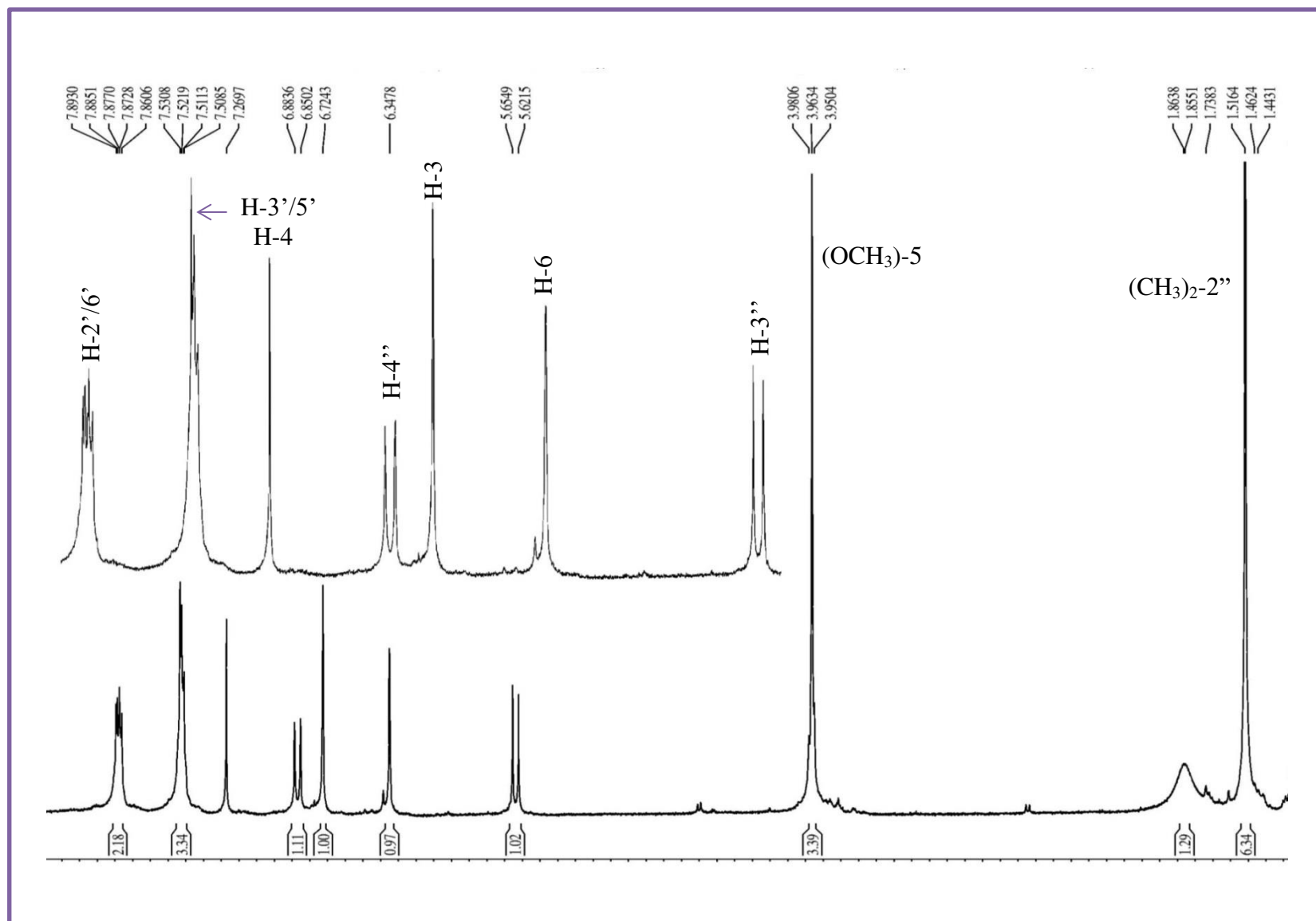
Figura 26 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-3

Figura 27 – (a) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (b) DEPT 135° (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-3

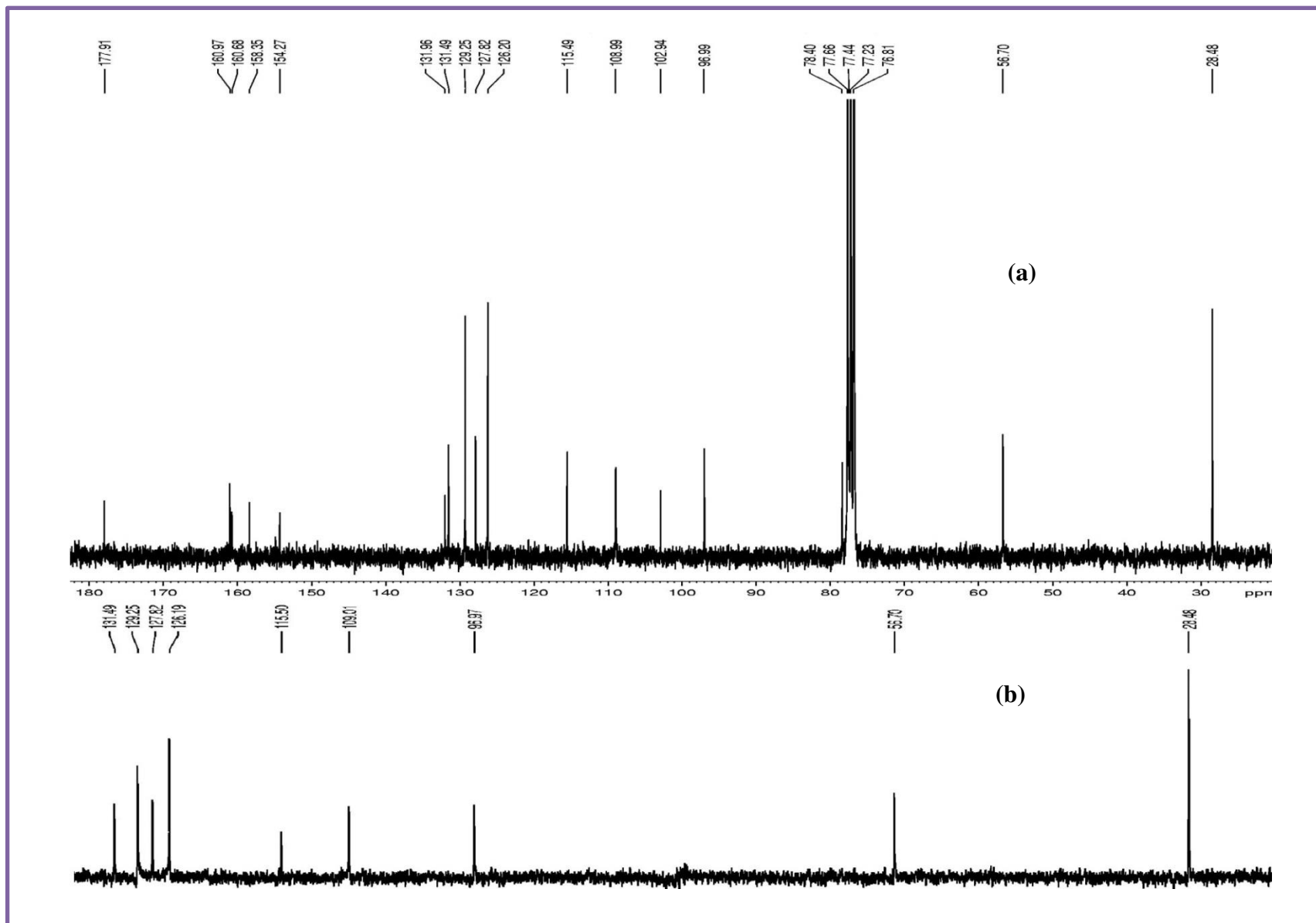




Figura 26 - (a)  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), (b)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HSQC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-3

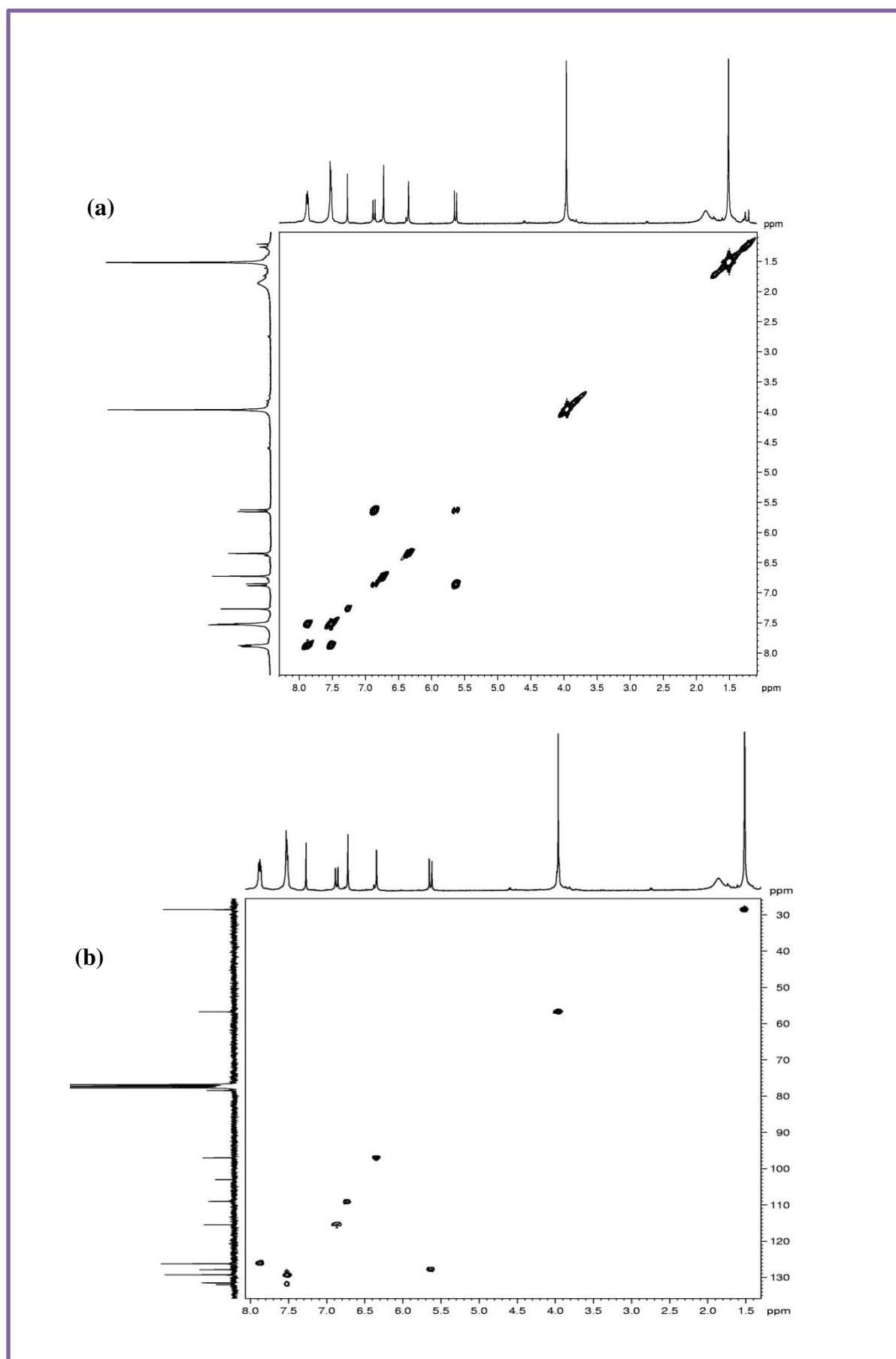
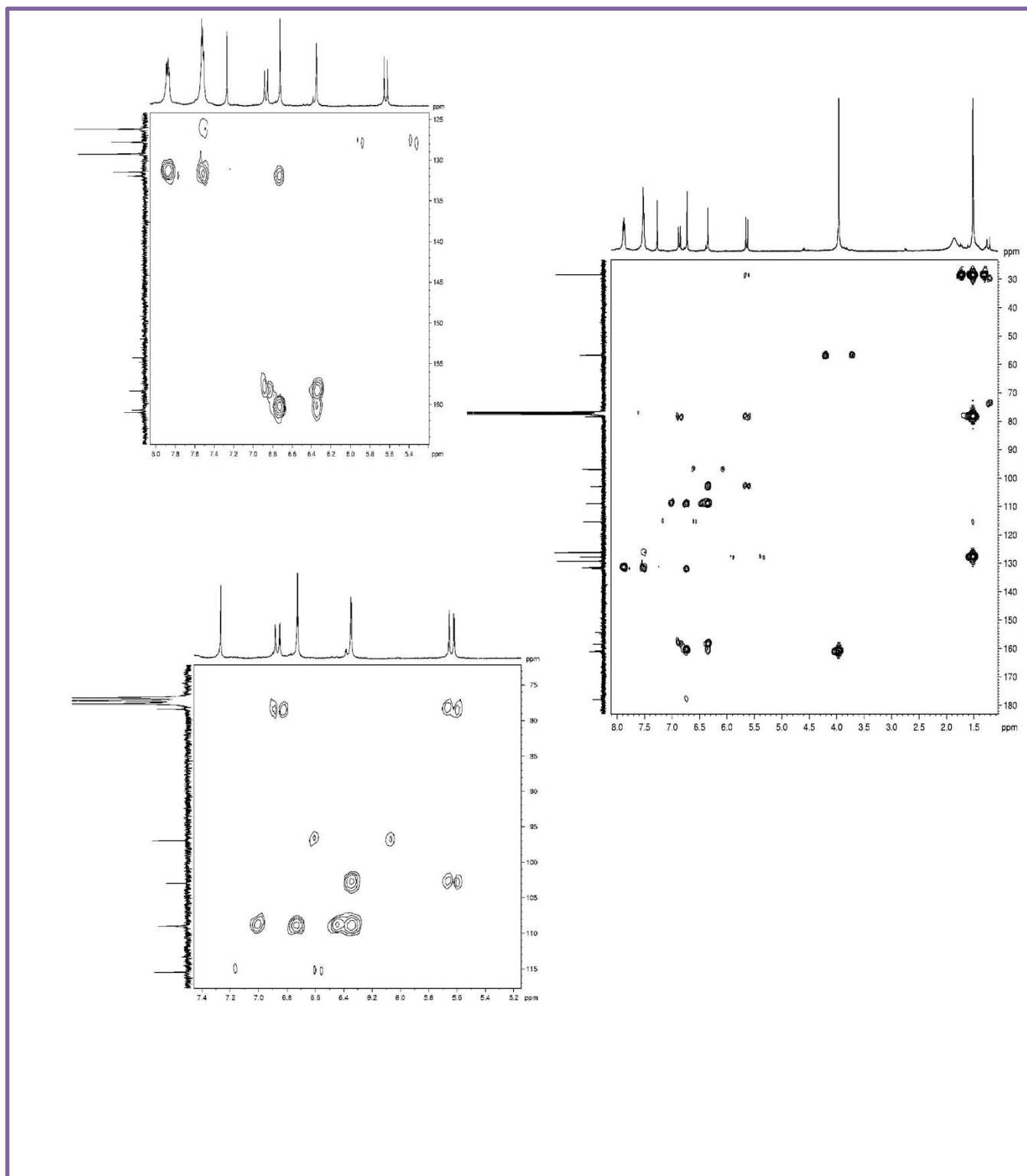


Figura 27 -  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HMBC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-3

#### 4.4 Determinação Estrutural de TE-4

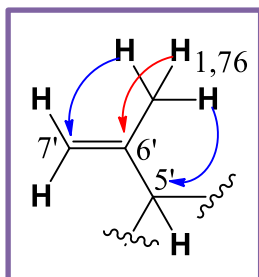
O fracionamento cromatográfico da fração diclorometano do extrato AcOEt das raízes de *T. egregia* (Procedimento Experimental, p. 101) forneceu um sólido amorfo amarelo e solúvel em clorofórmio denominado TE-4. Com valor de rotação óptica  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +5,400$  ( $c=0,1$ ;  $\text{CHCl}_3$ ). Seu espectro de massas (Figura 34) forneceu um pico íon molecular de 410,2 Daltons compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_7$ .

O espectro na região do infravermelho (Figura 33) mostrou bandas entre 1088–1259  $\text{cm}^{-1}$  característico de deformação axial da ligação C-O; duas bandas em 1457 e 1509  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas à deformação axial da ligação C=C. A presença de uma carbonila foi sugerida através da banda em 1610  $\text{cm}^{-1}$  e uma banda larga e intensa em 3355  $\text{cm}^{-1}$  sugere a presença de O-H de álcoois ou fenóis (LIMA, 2010).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 36) apresentou 23 linhas espectrais. A análise do espectro permitiu identificar a presença de onze carbonos não hidrogenados, incluindo uma carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  191,3 (C-12), compatível com cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Observou-se também cinco sinais referentes a carbonos metínicos, sendo quatro deles insaturados em  $\delta_{\text{C}}$  130,2 (C-11); 109,5 (C-1); 105,5 (C-10) e 101,2 (C-4) e um saturado em  $\delta_{\text{C}}$  88,1 (C-5'). O espectro também mostrou dois sinais de carbonos  $sp^3$  oxigenados de grupos metoxila em  $\delta_{\text{C}}$  56,07 (OMe-2) e 56,02 (OMe-3) e cinco sinais de carbonos  $sp^2$  oxigenados, são eles:  $\delta_{\text{C}}$  157,8 (C-7a); 148,6 (C-1a); 144,2 (C-2); 151,3 (C-3) e 168,2 (C-9). O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  143,0 (C-6') foi atribuído a carbono  $sp^2$  não hidrogenado, podendo tratar-se de carbono olefínico. Existem ainda três carbonos metilênicos, são eles:  $\delta_{\text{C}}$  31,3 (C-4'); 64,0 (C-6) e 112,8 (C-7') este último característico de sistema olefínico terminal.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 35) observou-se acoplamento entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,8 (1H; d;  $J = 8,5$  Hz) e 6,5 (1H; d;  $J = 8,5$  Hz), atribuídos a hidrogênios aromáticos em posição *orto*. Os simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,8 (H-4) e  $\delta_{\text{H}}$  6,5 (H-1) foram associados a hidrogênios para posicionados (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,3 (1H; dl;  $J = 15,7$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  2,9 (1H; dl;  $J = 15,7$  Hz) foram atribuídos a hidrogênios diastereotópicos, confirmados através da análise do espectro bidimensional de

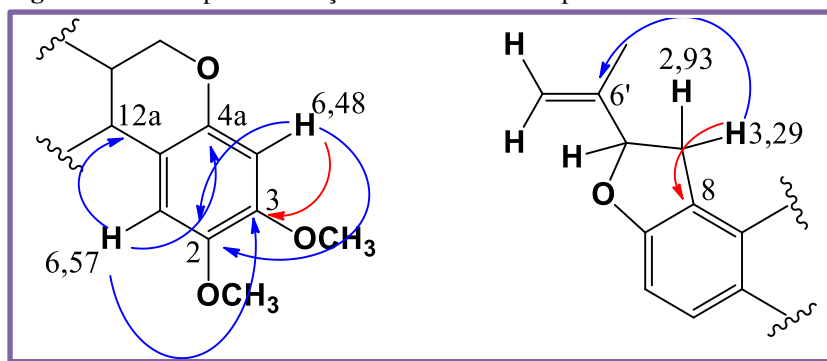
correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HSQC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 37 b), onde o sinal do carbono em  $\delta_{\text{C}} 31,1$  (C-4') correlaciona com os dois hidrogênios (PAVIA, 2010).



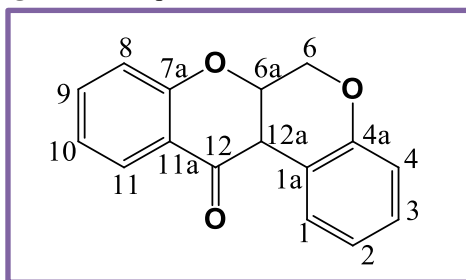
A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – HMBC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 38), mostrou que os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}} 1,8$  (3H, s) correlacionam a duas ligações ( $^2J$ ) com o carbono em  $\delta_{\text{C}} 143,0$  (C-6') e a três ligações ( $^3J$ ) com os carbonos  $\delta_{\text{C}} 88,1$  (C-5') e  $112,8$  (C-7'), sugerindo que o carbono metílico estava diretamente ligado a olefina, ideia sustentada pelo fato do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 1,8$  (3H, s) correlacionar com o carbono olefínico terminal.

Observa-se também o acoplamento entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}} 5,0$  (1H; s)  $4,9$  (1H; s) a duas ligações com o carbono em  $\delta_{\text{C}} 113,3$  (C-8) e a três ligações com o carbono em  $\delta_{\text{C}} 143,0$  (C-6'). O hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 6,6$  (1H; s) correlaciona-se com os carbonos em  $\delta_{\text{C}} 67,7$  (C-12a);  $148,6$  (C-4a) e  $151,3$  (C-3) a três ligações ( $^3J$ ) e a duas ligações ( $^2J$ ) com o carbono em  $\delta_{\text{C}} 144,2$  (C-2). O hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 6,9$  (1H, s) correlaciona-se com os carbonos em  $\delta_{\text{C}} 144,2$  (C-2) e  $151,3$  (C-3). Essas correlações podem ser observadas na figura 30.

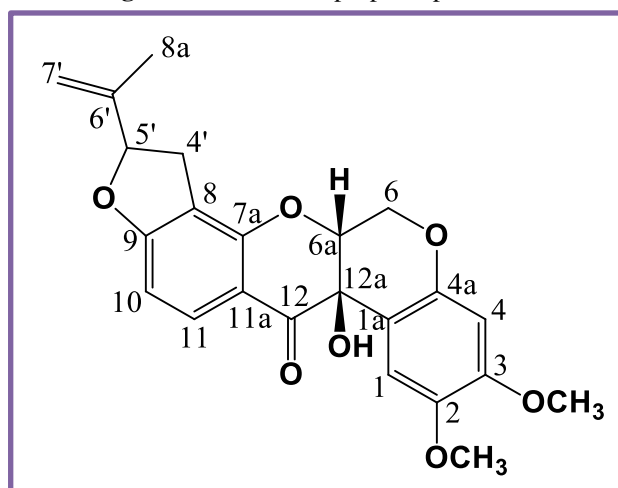
**Figura 30** - Principais correlações observadas no espectro de HMBC de TE-4



A ocorrência de rotenoides na espécie vegetal aliada aos dados espectroscópicos citados permitiu sugerir um esqueleto de rotenoide para TE-4 conforme mostrado na Figura 31.

**Figura 31** - Esqueleto básico dos rotenoides

O espectro de HMBC mostrou também que os hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  4,62 (1H; s; H-6) e 4,58 (1H; s; H-6) correlacionam com o carbono em  $\delta_C$  67,7 (C-12a). O hidrogênio em  $\delta_H$  6,56 (1H; s; H-1) também apresentou correlação a  $^3J$  com o C-12a. Assim, confirma-se a hidroxila presente na posição 12a.

**Figura 32** - Estrutura proposta para TE-4

A presença de dois pares de hidrogênios diastereotópicos, do grupo isopropilideno e de dados espectroscópicos até aqui discutidos aliados à comparação com a literatura foi possível sugerir que TE-4 trata-se da 12a-hidroxirotenona (Figura 32), já isolada na espécie e em outras Tephrosias (LIMA, 2010; YOU-ZHI, *et al.*, 2011), conforme a Tabela 6.

**Tabela 6** - Dados espectroscópicos de TE-4 comparados com a literatura (YOU-ZHI, *et al.*, 2011).

C	HSQC		HMBC		LITERATURA	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult.; J, Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult.; J, Hz)
1	109,7	6,6 (1H, s)			109,5	6,56 (1H, s)
1a	108,8	-			108,0	-
2	144,2	-	H-4	OMe-2	144,0	-
3	151,3	-	H-1	OMe-3; H-4	151,2	-
4	101,2	6,5 (1H, s)			101,1	6,49 (1H, s)
4a	148,6	-	H-1	H-6; H-4	148,4	-
6	63,0	4,5 (1H; d; 13,0)			63,9	4,50 (1H; d; 11,6)
		4,6 (1H; d; 13,0)				4,61 (1H; d; 11,6)
6a	76,2	4,6 (1H; s)			76,2	4,59 (1H;s)
7a	157,8	-		H-11	157,7	-
8	113,3	-	H-4'	H-10	113,2	-
9	168,2	-			168,0	-
10	105,5	6,5 (1H; d; 8,5)			105,3	6,54 (1H; d; 8,6)
11	130,2	7,8 (1H; d; 8,5)			130,1	7,83 (1H; d; 8,5)
11a	112,8	-			118,0	-
12	191,3	-		H-6a; H-11	191,0	-
12a	67,7	-	H-6a	H-6; H-4	67,6	-
4'	31,3	2,9 (1H; dl; 15,8)			31,5	2,94 (1H; dd; 15,8 e 8,2)
		3,3 (1H; dl; 15,8)				3,29 (1H; dd; 15,8 e 9,8)
5'	88,1	5,2 (1H; t; 8,8)		H-Me; H-7'	87,9	5,24 (1H; t; 9,0)
6'	143,0	-	H-Me	H-4'	142,9	-
7'	112,8	4,9 (1H, s)		H-Me	112,7	4,92 (1H, s)
		5,0 (1H, s)				5,07 (1H, s)
8'	17,2	1,8 (3H, s)			17,1	1,76 (3H, s)
MeO-2	56,1	3,7 (3H, s)			56,4	3,73 (3H, s)
MeO-3	55,0	3,8 (3H, s)			55,4	3,82 (3H, s)

Figura 33 - Espectro na região do infravermelho de TE-4

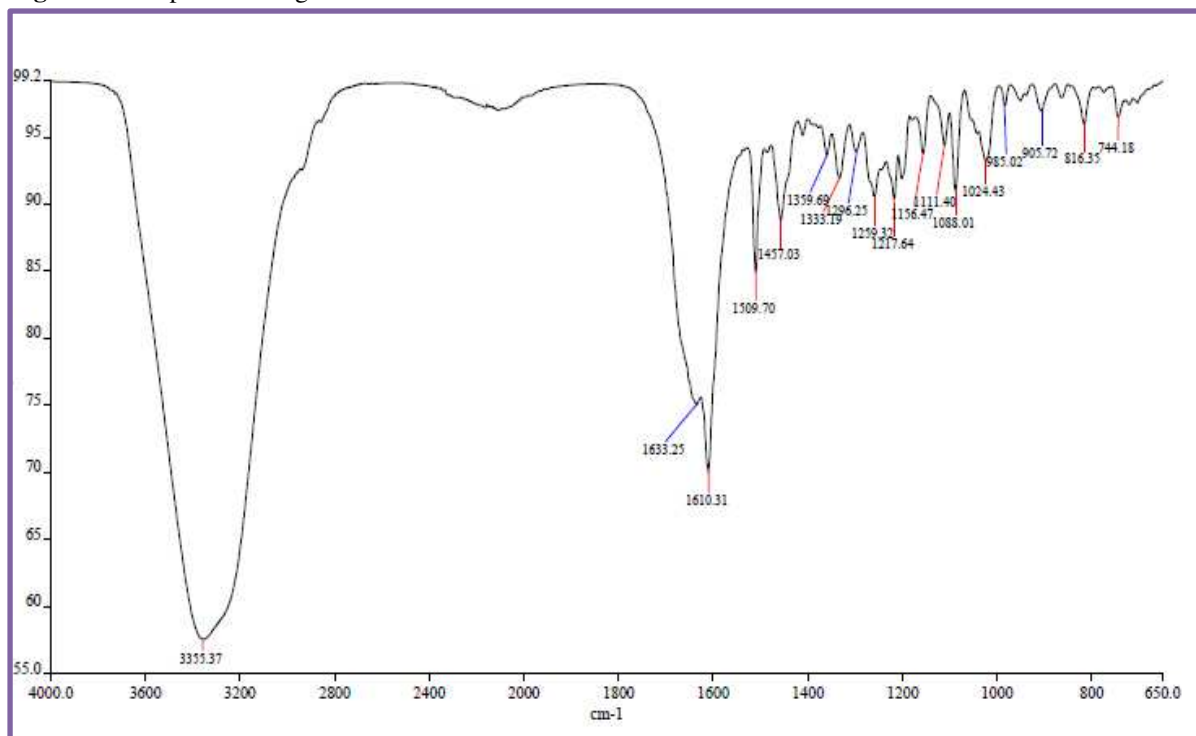


Figura 34 - Espectro de massas (i.e. 70 eV) e fragmentações de TE-4

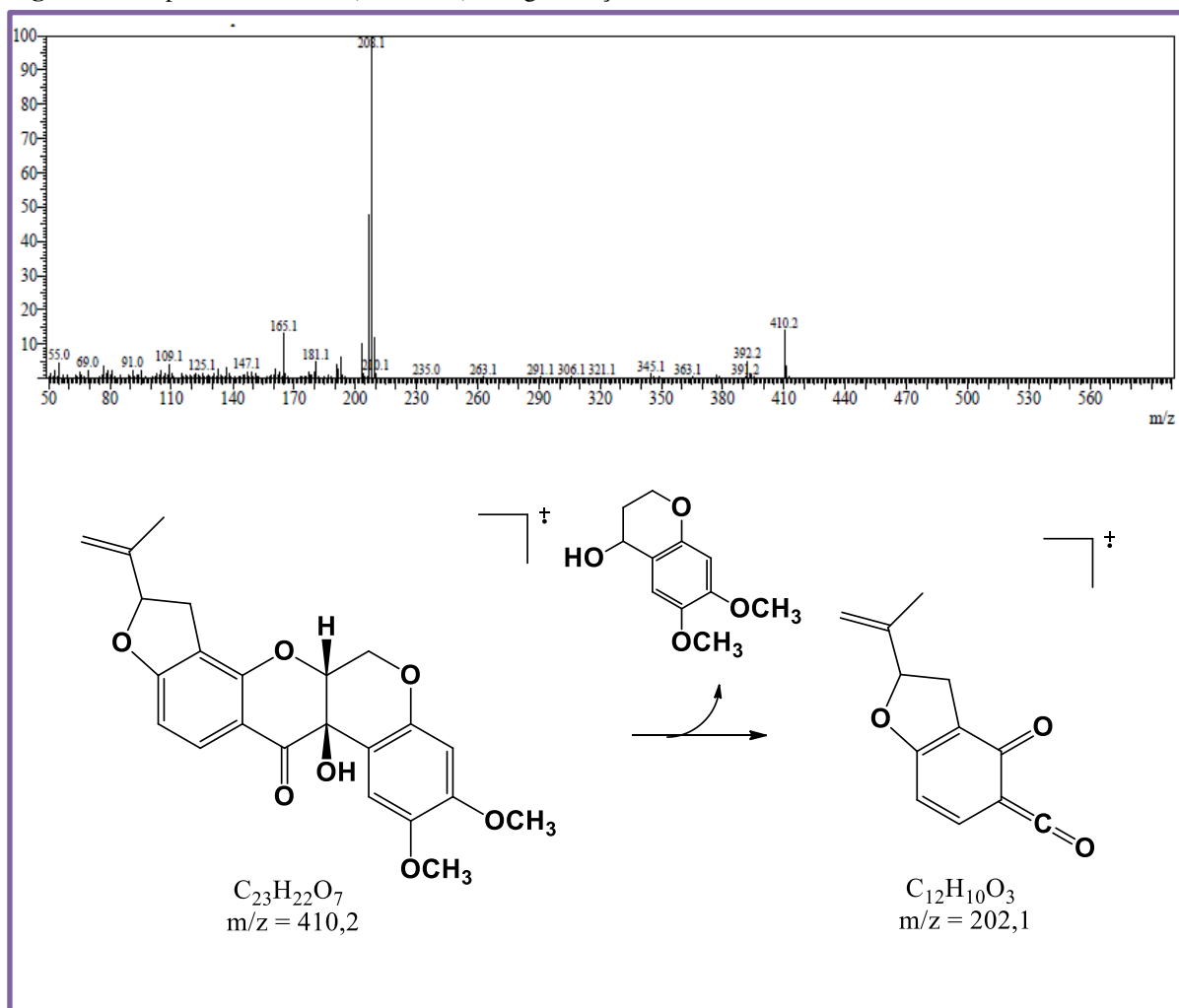
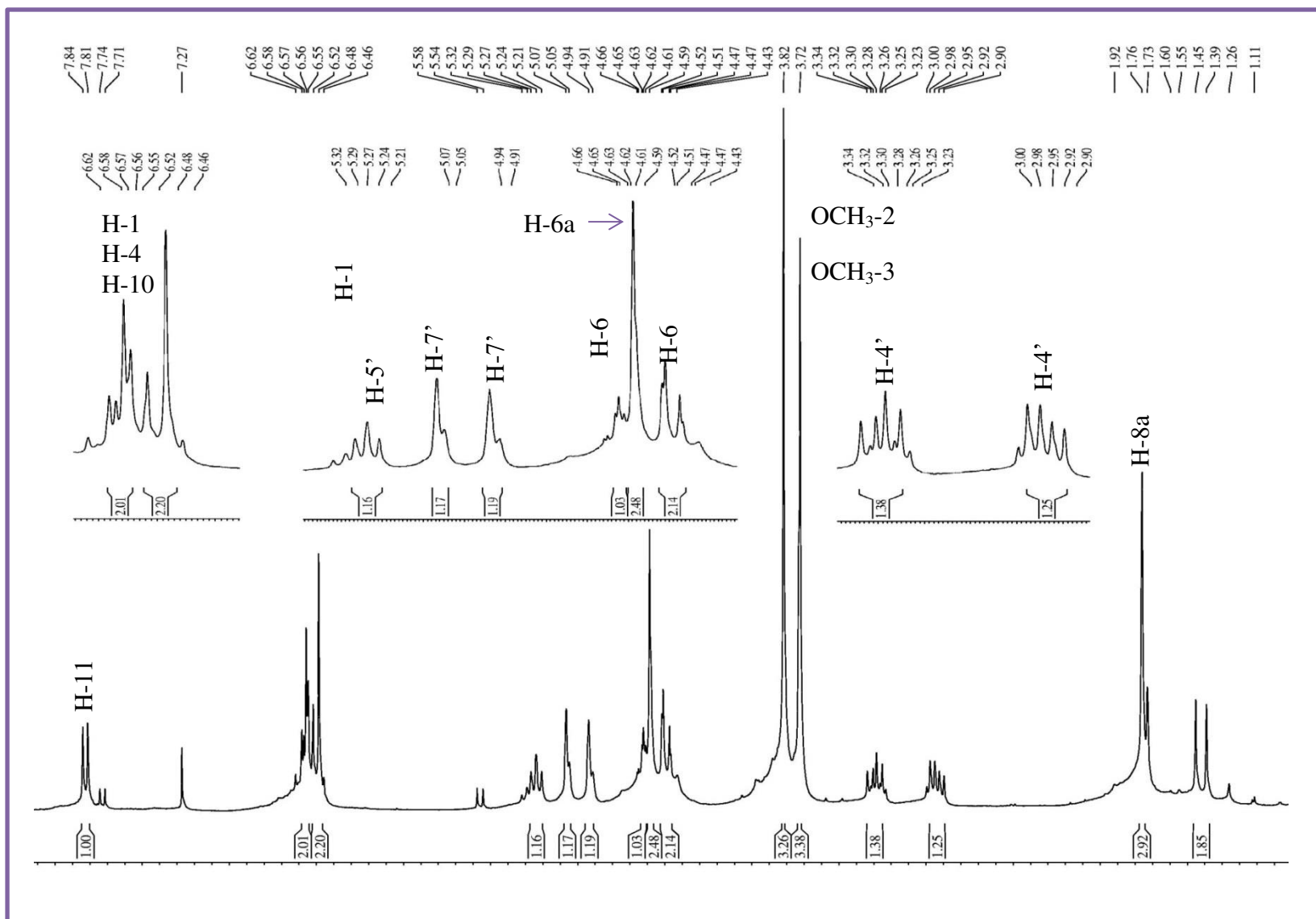
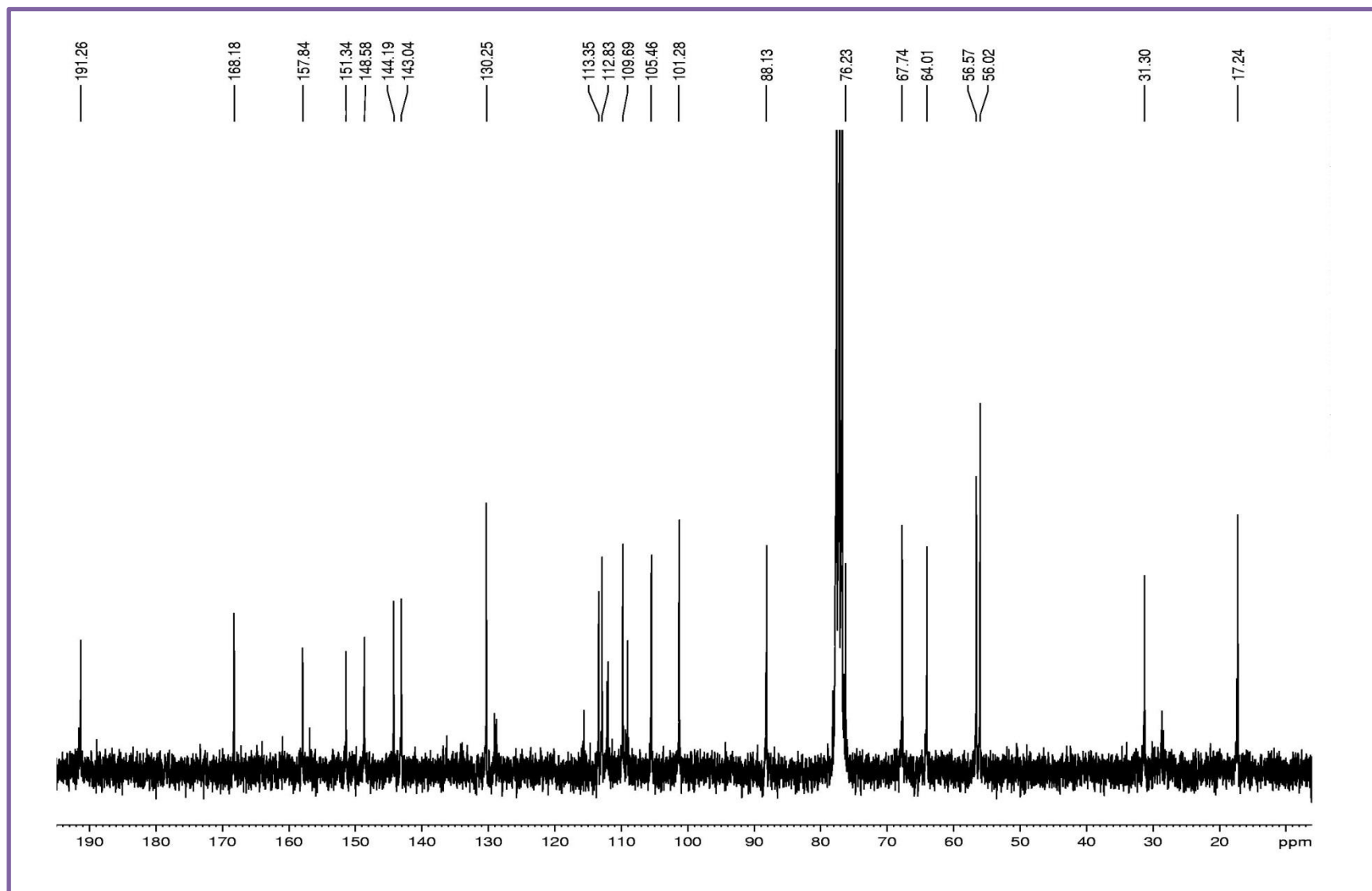
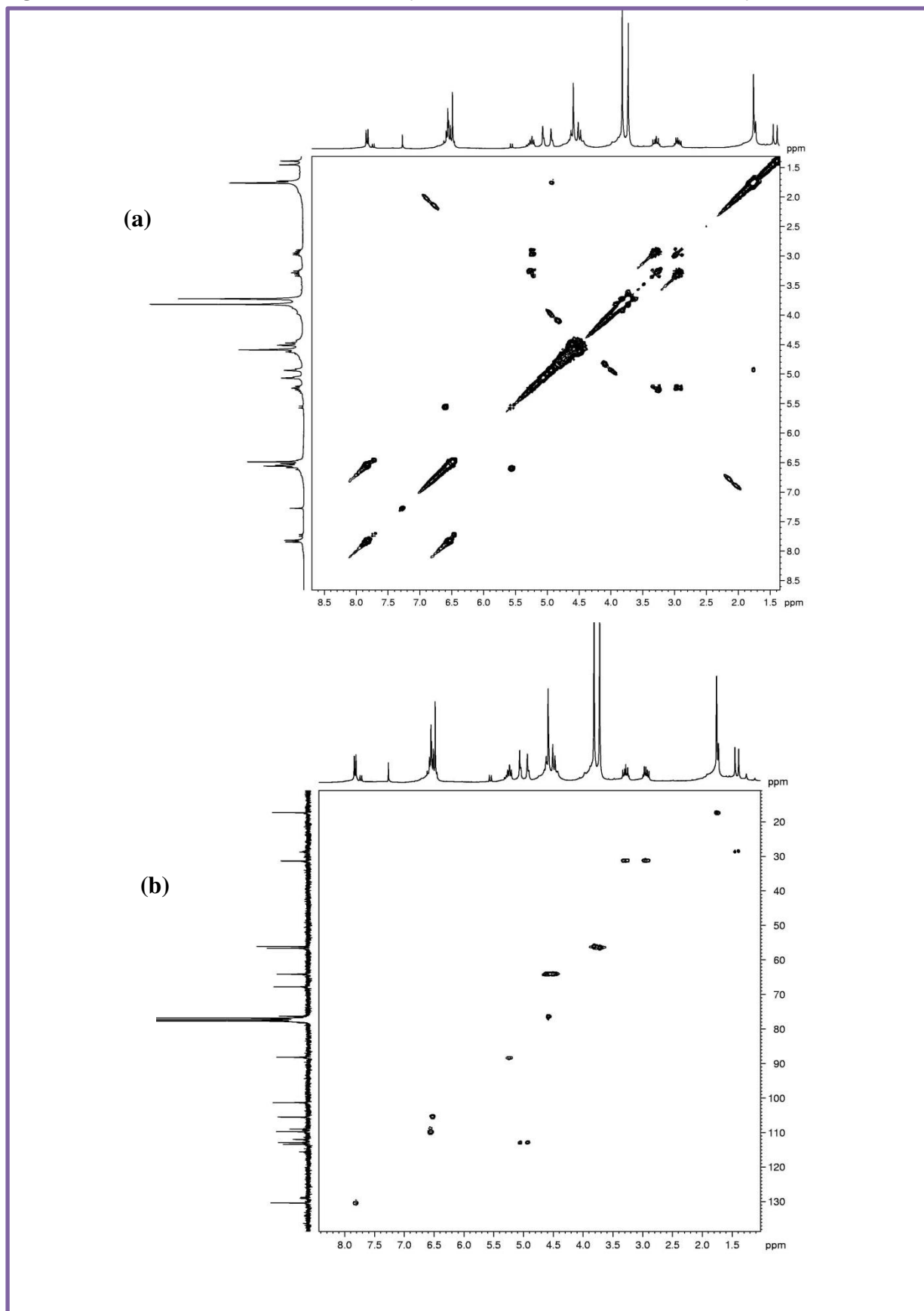
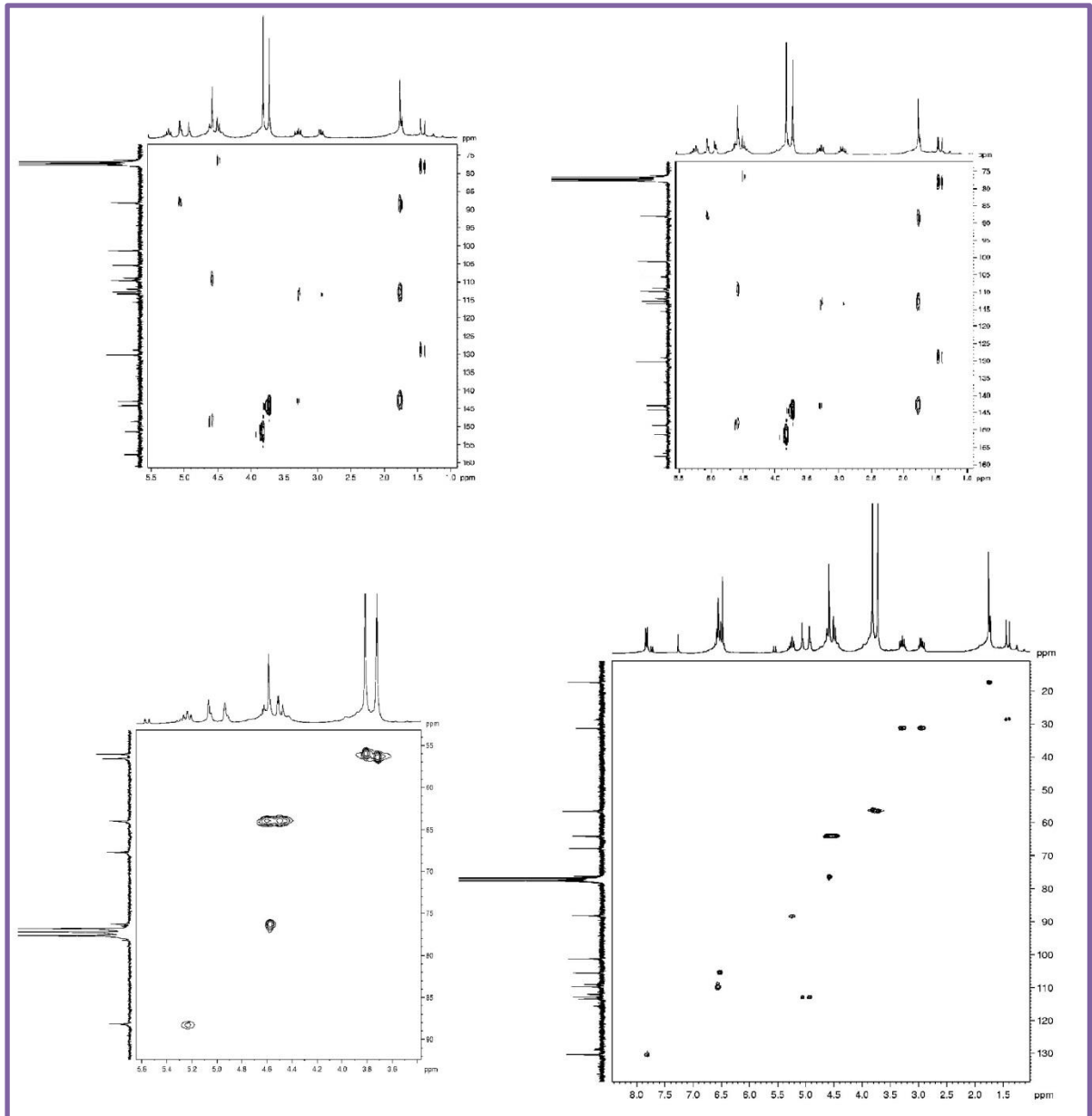


Figura 28 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-4



**Figura 29** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-4

**Figura 37** - (a)  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), (b)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HSQC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TE-4

**Figura 30** -  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HMBC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de TER-4

#### 4.5 Determinação Estrutural de TE-5

O tratamento cromatográfico da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> do extrato TETE de *T. egregia* por CLAE (Procedimento Experimental, p. 104) forneceu um sólido cristalino branco (260°, decomposição) o espectro de massa de alta resolução (Figura 41) apresentou um pico correspondente ao aduto com hidrogênio [M+H]<sup>+</sup> em m/z= 369,1336 compatível com a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>H e com valor de rotação óptica igual a  $[\alpha]_D^{25} = + 35,90$  (c=0,1; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 1:1).

O espectro na região do infravermelho (Figura 40) apresentou uma banda larga e intensa em 3391 cm<sup>-1</sup> característico de deformação axial da ligação O-H; uma banda fina e intensa em 2924 cm<sup>-1</sup> associada à deformação axial da ligação C-H; uma banda fina e intensa em 1643 cm<sup>-1</sup> relacionado à ligação C=O; uma banda em 1207 cm<sup>-1</sup> atribuído a bandas de epóxido.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C – BB (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, Figura 43) apresentou dezoito linhas espectrais, incluindo uma carbonila em  $\delta_C$  177,2 (C-4) compatível com cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Os sinais em  $\delta_C$  126,9 (C-2'/6'); 129,7 (C-3'/5'); 131,7 (C-4'); 97,8 (C-6); 106,1 (C-8) característico de carbono *sp*<sup>2</sup> de sistema aromático. Bem como os sinais em  $\delta_C$  158,78 (C-5); 161,4 (C-7); 159,8 (C-8a); 109,8 (C-3); 160,7 (C-2) atribuídos a carbono *sp*<sup>2</sup> oxigenados.

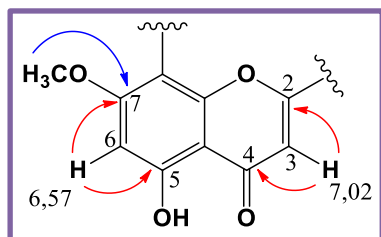
Há dois sinais para carbono *sp*<sup>3</sup> em  $\delta_C$  22,3 (C-4''); 27,7 (C-5'') de grupamento metila. A discrepância entre os deslocamentos das metilas sugere que elas estão em ambientes magneticamente distintos. Existem quatro sinais de carbono *sp*<sup>3</sup> – oxigenados em  $\delta_C$  56,6 (C-OMe-7) atribuído ao grupamento metoxila. Dois sinais em  $\delta_C$  62,7 (C-1'') e 73,3 (C-2'') associados a presença de um epóxido e um último sinal de carbono *sp*<sup>3</sup> – oxigenado em  $\delta_C$  80,5 (C-3'').

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, Figura 42) mostrou sinais múltiplos entre 7,38-8,17 equivalentes a cinco hidrogênios propondo um sistema aromático monossustituído. Os hidrogênios em  $\delta_H$  4,2 (1H; d; J=4,2) e 5,5 (1H; d; J=4,2) reforçam a presença de um epóxido na molécula.

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear <sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C – HSQC (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, Figura 44 b) foi possível associar os carbonos  $\delta_C$  62,7 (C-1'') e 73,3 (C-

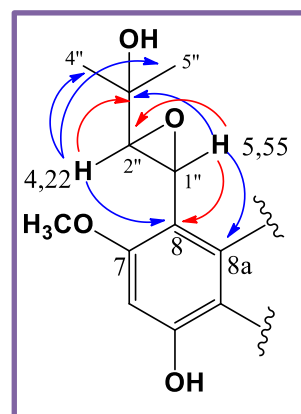
2'') com os hidrogênios em  $\delta_H$  4,2 (1H; d;  $J=4,2$ ) e 5,5 (1H; d;  $J=4,2$ ) respectivamente. Confirmou-se também a correlação entre o hidrogênio  $\delta_H$  7,0 (1H; s) com o carbono em  $\delta_C$  109,8 (C-3).

O espectro de correlação homonuclear  $^1H \times ^1H$ - COSY (Figura 44 a), mostrou que o hidrogênio  $\delta_H$  5,5 (1H; d) está correlacionado com o hidrogênio  $\delta_H$  4,2 (1H; d), estes correspondentes ao epóxido existente na molécula.



A análise do espectro bidimensional a longa distância  $^1H \times ^{13}C$  - HMBC (500 MHz,  $C_5D_5N$ , Figura 45) mostrou correlação a duas ligações entre o hidrogênio  $\delta_C$  7,0 com os carbonos  $\delta_C$  177,1 (C-4) e 160,7 (C-2). O hidrogênio  $\delta_H$  6,6 (1H; s) com os carbonos 158,8 (C-5) e 161,4 (C-7) a duas ligações ( $^2J$ ) e a três ligações ( $^3J$ ) com o hidrogênio  $\delta_H$  3,8 com o carbono em  $\delta_C$  161,4 confirmando a posição da metoxila.

Os hidrogênios  $\delta_H$  5,5 (1H; d) correlaciona a duas ligações ( $^2J$ ) com os carbonos  $\delta_C$  106,1 (C-8) e 73,3 (C-2'') e a três ligações com os carbonos  $\delta_C$  159,8 (C-8a) e 80,5 (C-3''). E o hidrogênio 4,2 (1H;d) correlaciona em ( $^2J$ ) com os carbonos  $\delta_C$  80,5 (C-3'') e 62,7 (C-1'') e a ( $^3J$ ) com os carbonos  $\delta_C$  27,7 (C-5'') e 22,9 (C-4'').



Baseado nos dados espectrométricos descritos foi possível concluir que TE-5 trata-se de uma flavona, nomeada 5-hidroxi-8-(2'',3''-epoxi-3''-hidroxi-3''-metilbutil)-7-metoxiflavona (Figura 39), relatada pela primeira vez na literatura. Os dados espectroscópicos de TE-5 podem ser conferidos na Tabela 7.

**Figura 39** – Estrutura Proposta para TE-5

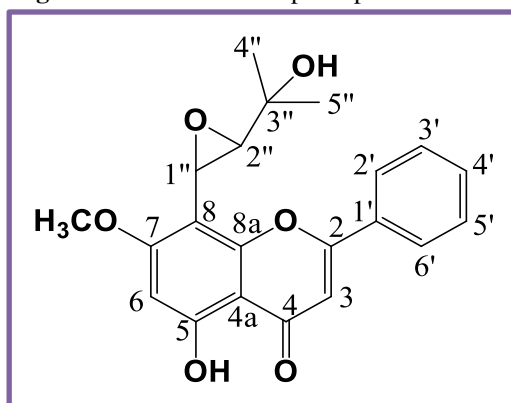


Tabela 7 - Dados espectroscópicos de TE-5

C	HSQC		HMBC	
	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	160,70	-	H-3	H-2'/H-6'
3	109,76	7,02 (1H; s)		
4	177,10	-	H-3	H-6 ( $^4J_{CH}$ )
4a	109,76	-		H-3'; H-6
5	158,78	-	H-6	
6	97,81	6,57 (1H; s)		
7	161,41	-	H-6	MeO-5
8	106,11	-	H-1''	H-6
8a	159,76	-		H-1''
1'	131,81	-	H-2''; 3H-4''; 3H-5''	H-1''
2'/6'	126,98	8,16 (2H; d)		H-4'
3'/5'	129,67	7,40 (2H; t)		
4'	131,75	7,44 (1H; t)		H-2'; H-6'
1''	62,75	5,55 (1H; d; 4,2)	H-2''	
2''	73,34	4,22 (1H; d; 4,2)	H-1''	H-4''; H-5''
3''	80,55	-	H-2''; H-4''; H-5''	H-1''
MeO-7	56,61	3,85 (3H; s)		
Me-4''	22,28	1,89 (3H; s)		H-2''
Me-5''	27,71	1,74 (3H; s)		H-2''

Figura 40 - Espectro na região do infravermelho de TE-5

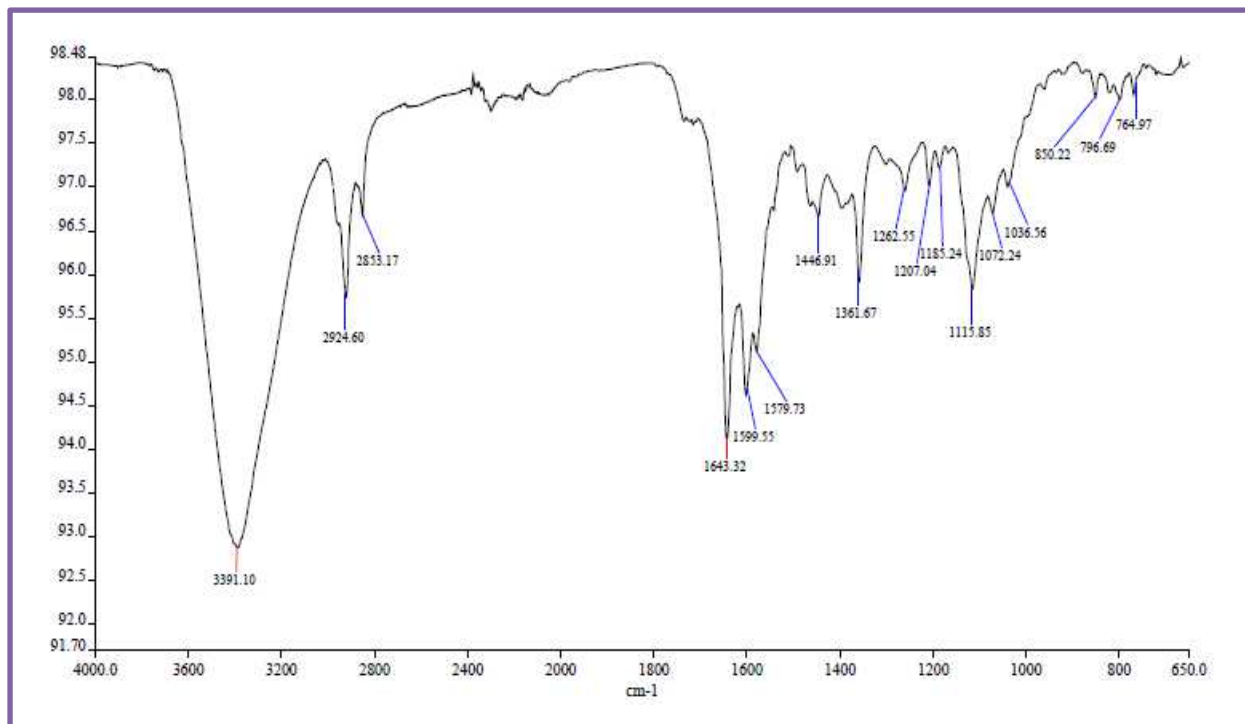


Figura 41 - Espectro de EMAR de TE-5

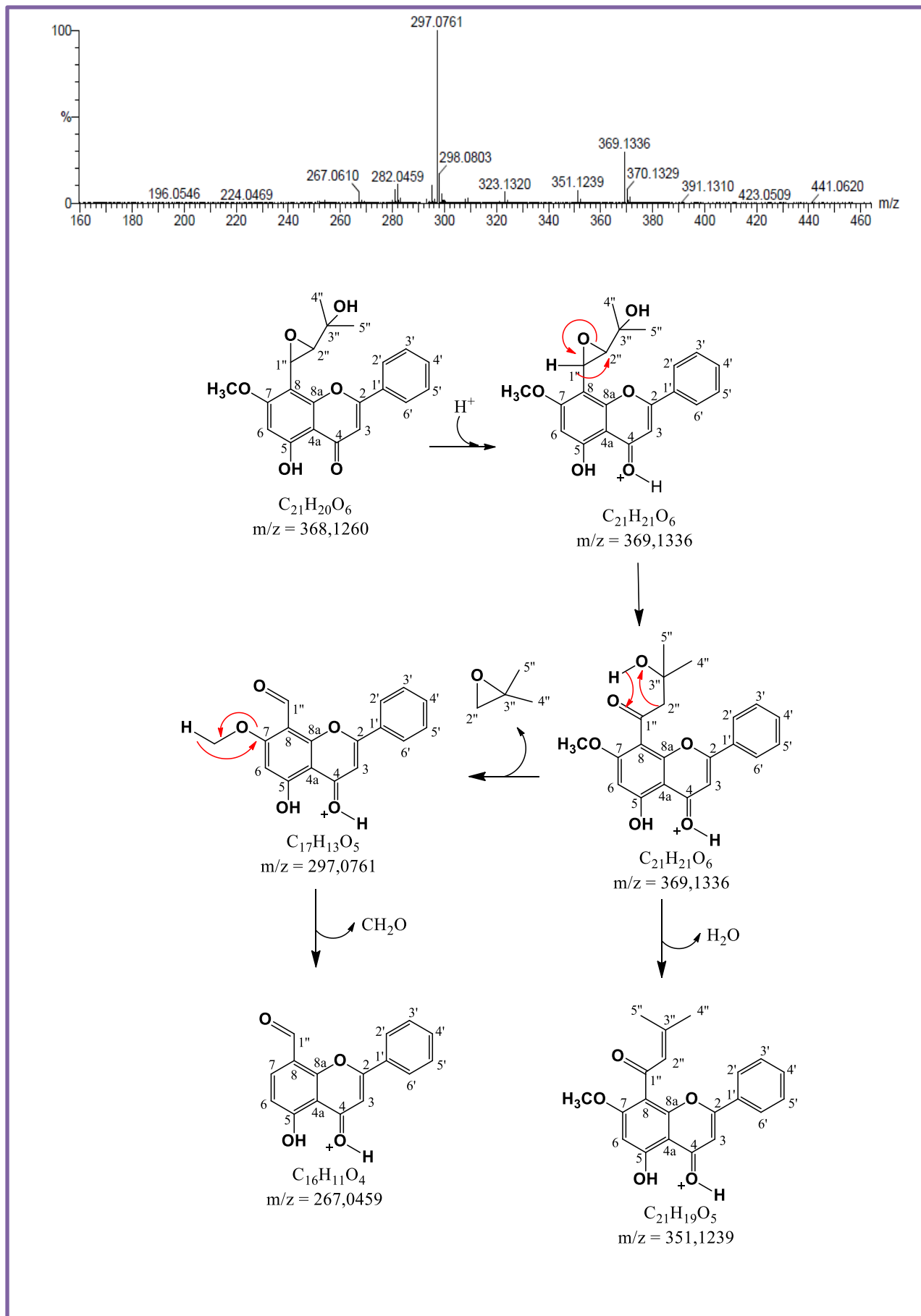
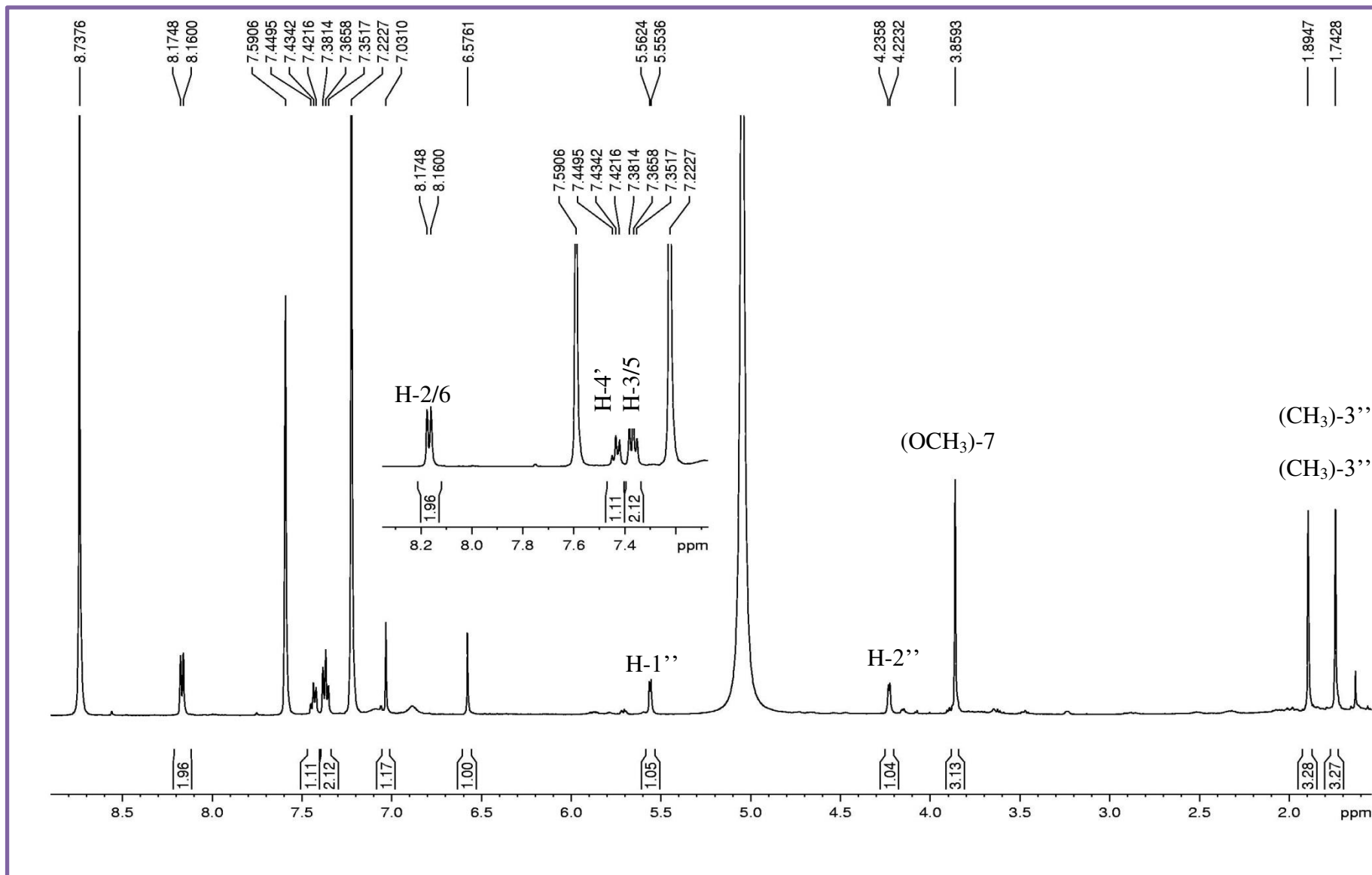
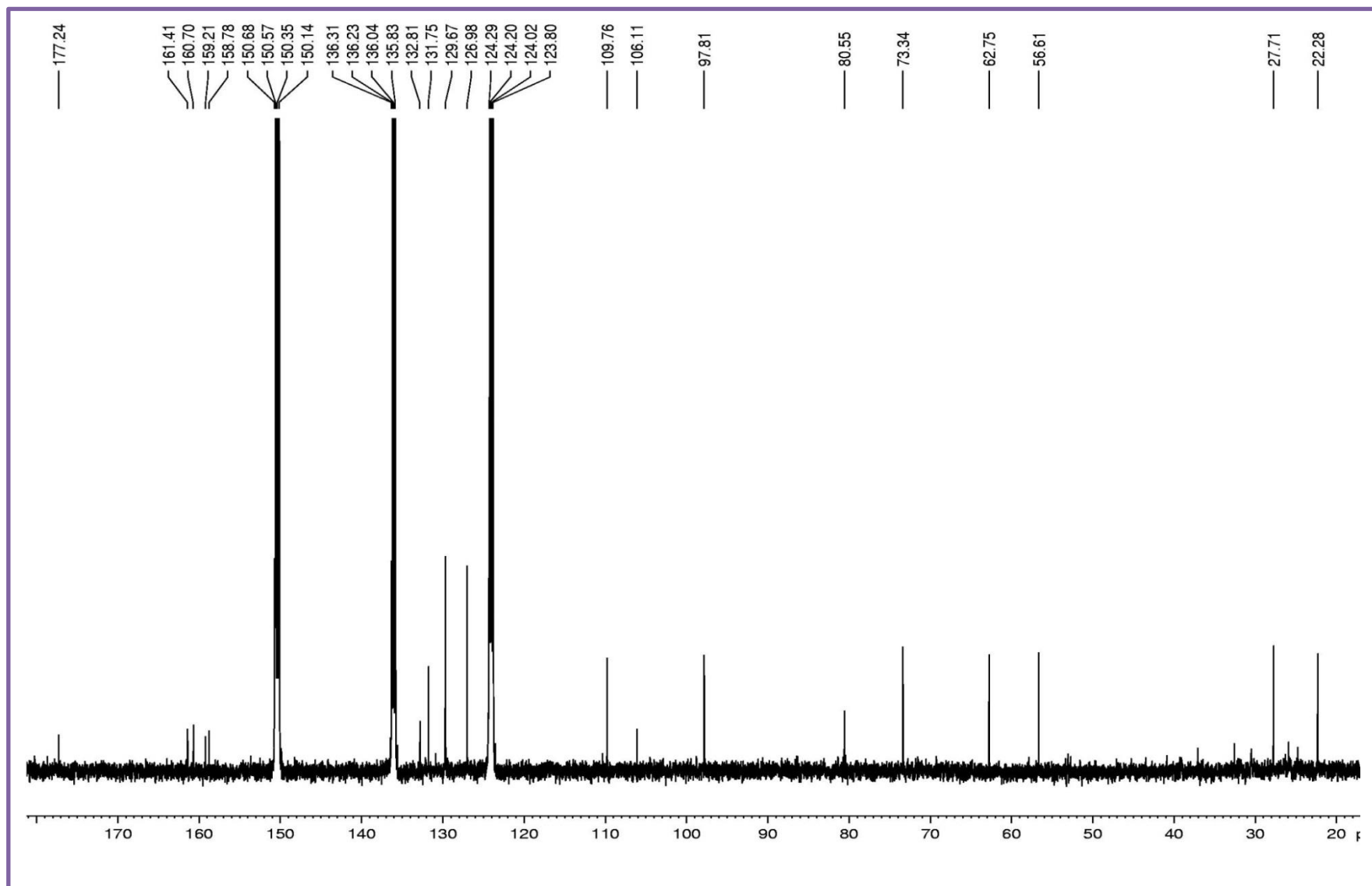


Figura 42 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de TE-5





**Figura 43** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de TE-5

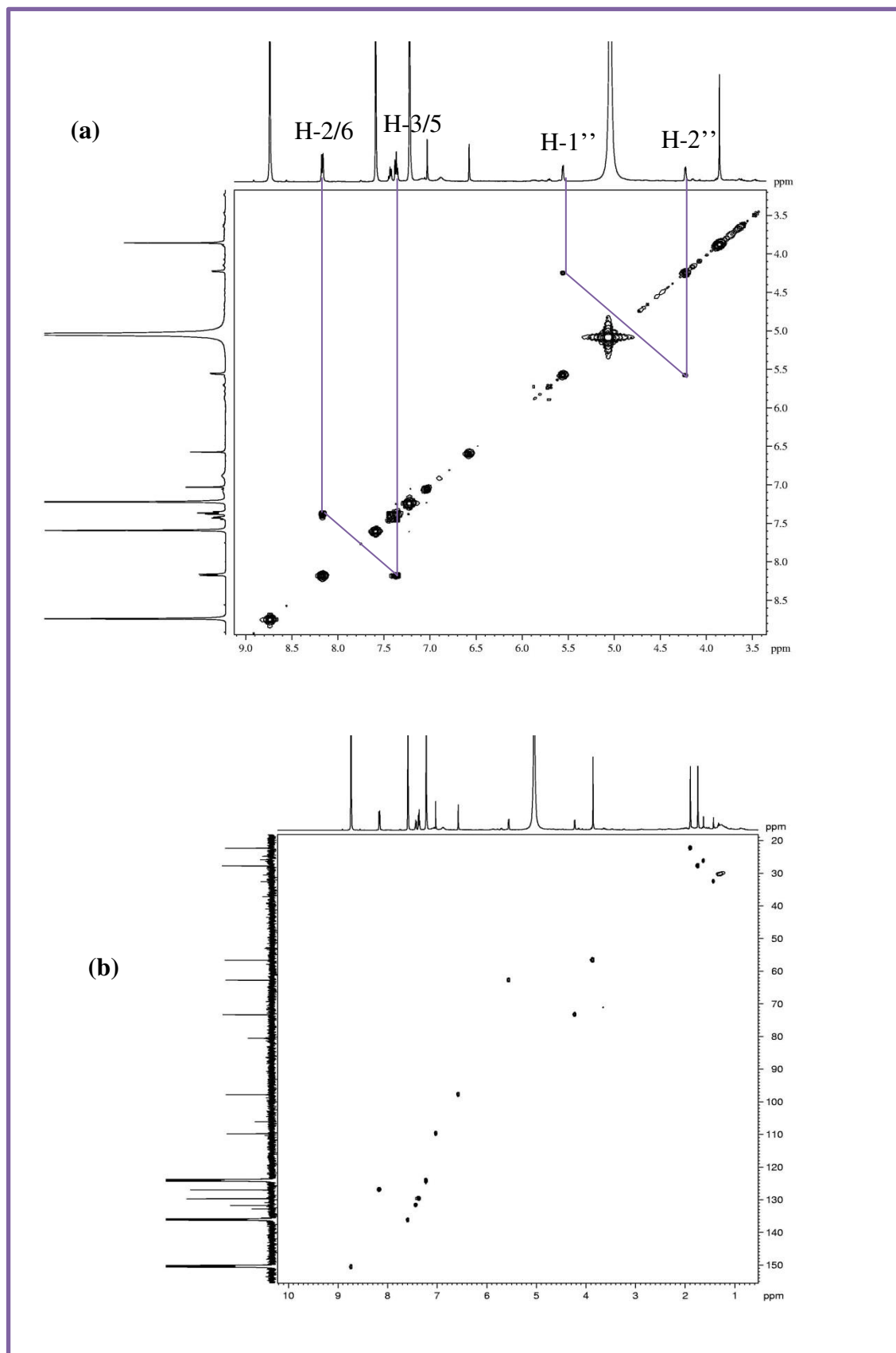
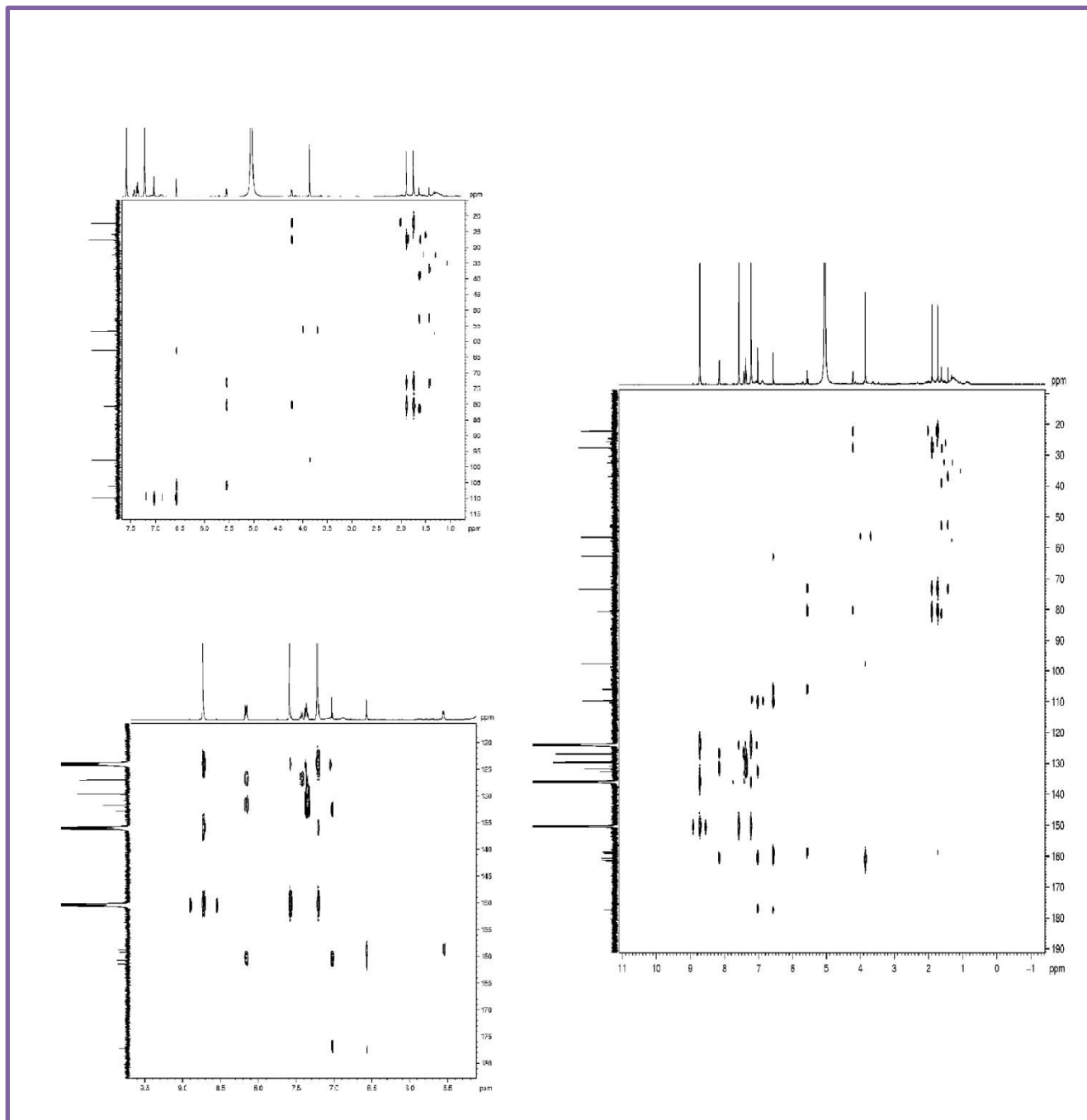
**Figura 44** - (a)  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) (b)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HSQC (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de TE-5

Figura 45 -  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HMBC (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de TE-5

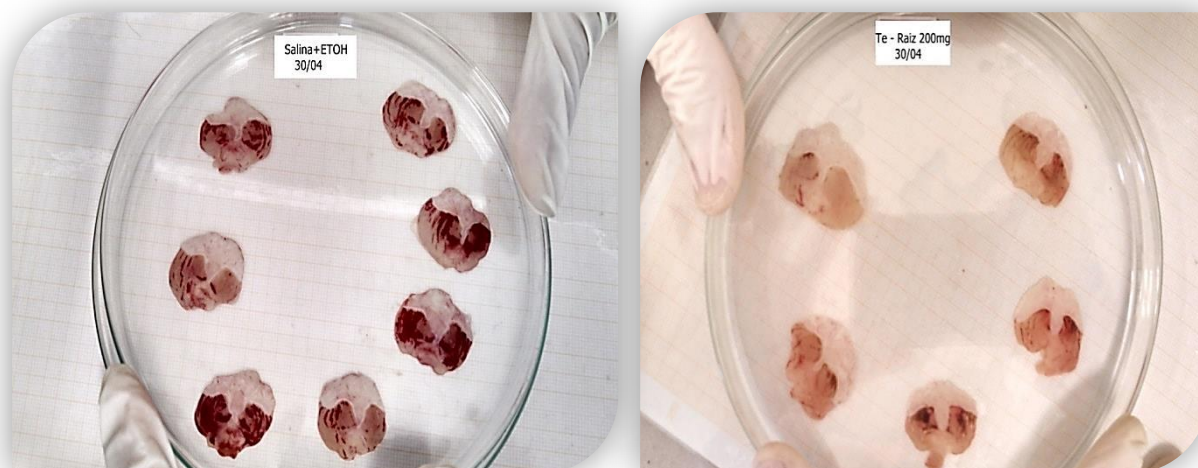


## 5.0 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 5.1 Atividade Gastoprotetora e Determinação da Concentração de Hemoglobina

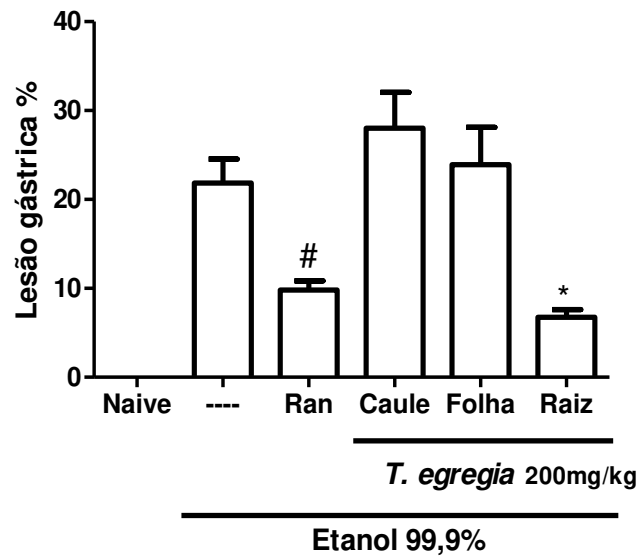
A capacidade gastoprotetora dos extratos etanólicos das folhas, talos e raízes de *Tephrosia egregia* foram testados em úlcera de ratos induzida por etanol. O extrato das folhas e talos não mostraram atividade satisfatória. O extrato das raízes reduziu o percentual de lesões gástricas quando comparados com o grupo que recebeu apenas o veículo (teste branco-solução salina). A ranitidina foi utilizada como controle positivo (80 mg/kg). A Figura 46 ilustra os tecidos de estômago tratados com solução salina (branco) e com os extratos das raízes de *T. egregia*.

**Figura 46** - Fotografia das lesões gástricas hemorrágicas ou ulcerativas dos estômagos retirados dos grupos tratados e não tratados



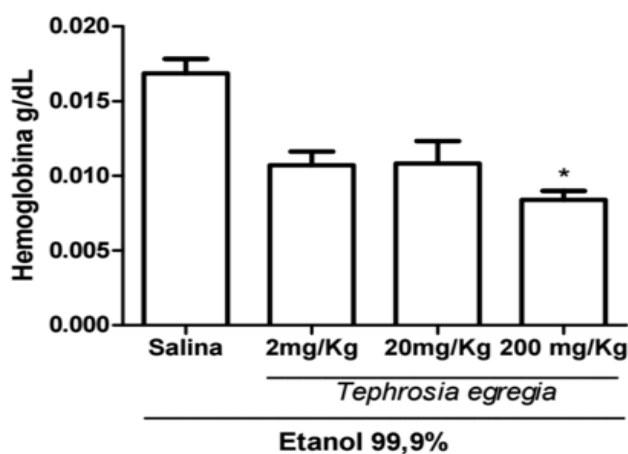
O extrato das raízes reduziu o exudato inflamatório em 75% mostrando-se mais ativo que a ranitidina (Figura 47).

**Figura 47** - Efeito da *T. egregia* (folha, caule e raiz – 200 mg/kg) na gastropatia induzida por etanol.



Como a úlcera é uma lesão hemorrágica no sistema gastrointestinal foi possível determinar os níveis de hemoglobina presentes na lesão induzida por etanol. O extrato das raízes foi o único a mostrar atividade gastoprotetora, portanto, ele foi o utilizado para a realização do teste.

A Figura 48 e a Tabela 8 mostram o tratamento com *Tephrosia egregia* (TE) em diferentes doses 2, 20 e 200 mg, em tecidos de estômagos de camundongos com úlcera péptica induzida por etanol (EtOH). Na tabela 8, a concentração de 8,4 µg hemoglobina presente nos tecidos tratados na dose de 200 mg de TE, foram obtidas através do programa grafpad que calcula a concentração média de células sanguíneas do grupo analisado. Dessa forma, observamos uma redução acentuada no nível de hemoglobina – Hb, quando comparada com animais tratados com salina.

Figura 48 – Efeito de *T. egregia* na redução dos níveis de hemoglobinaTabela 8 - Efeito de *T. egregia* na concentração de hemoglobina tecidual

Grupo experimental	Hb tecidual ( $\mu\text{g}/100 \text{ mg tecido}$ ) $\pm$
Salina	$9,4 \pm 0,7$
EtOH + Salina	$16,9 \pm 0,10$
EtOH + TE (2 mg/kg)	$10,7 \pm 0,9$
EtOH + TE (20 mg/kg)	$10,8 \pm 1,5$
EtOH + TE (200 mg/kg)	$8,4 \pm 0,6^*$

O resultado obtido, dentre outros, pode ser usado para confirmar o efeito anti-inflamatório do extrato de *Tephrosia egregia* (TE), haja vista que uma das características de lesões gástricas inflamatórias, é a presença de hemorragias, com o aumento de hemoglobinas localizadas.

## 5.2 Teste de Atividade Citotóxica

As substâncias TE 1, 2, 3 e 5 e o extrato etanólico das raízes de *T. egregia*, TERA-S, foram submetidos a teste citotoxicidade *in vitro* em três linhagens tumorais de próstata (PC3), de cólon-humano (HCT-116) e glioblastoma (SF-295).

A atividade citotóxica apresentada das amostras está apresentada na Tabela 9, com seus respectivos valores de  $CI_{50}$ .

**Tabela 9** - Valores de  $CI_{50}$  com um intervalo de confiança obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em duplicata em três linhagens anticancerígenas

	MTT		
	$CI_{50}$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Intervalo)		
	PC3 (Próstata)	HCT-116 (Colorretal)	SF-295 (Glioblastoma)
TE-1	ND	>5	ND
TE-2	>5	3,953 (2,688 - 5,814)	ND
TE-3	ND	>5	ND
TE-5	ND	>5	ND
TERA-S	>5	2,016 (1,290 - 3,152)	ND

\*ND: não definida

O composto denominado TE-2 e o extrato TERA-S, apresentaram moderada atividade contra o câncer colorretal. Os demais compostos não apresentaram atividade citotóxica significativa.

# PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

---





## **6.0 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **6.1 Material Vegetal**

As folhas, talos e raízes de *Tephrosia egregia* Sandw foram coletados na praia do Icaraí no município de Caucaia, em 22 de julho de 2014, pela profa. Dra. Ângela Martha Campos Arriaga, do curso de Pós-Graduação em Química pela Universidade Federal do Ceará.

A identificação botânica foi realizada pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob o número de registro 55945.

### **6.2 Métodos Analíticos**

#### **6.2.1 Métodos Cromatográficos**

Para a separação e purificação dos compostos foram empregadas cromatografias de adsorção em gel de sílica 60 da Vetec ( $\emptyset$  0,04 – 0,020 mm); sílica 60 para cromatografia “flash” ( $\emptyset$  0,040 – 0,063).

Os fracionamentos realizados por exclusão molecular foram efetuados em gel de Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se diclorometano/metanol (1:1) e/ou metanol como fase móvel de forma isocrática.

As cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas com gel de sílica 60 para cromatografia em camada fina e cromatoplasmas de alumínio de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> da Merck, com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm. As substâncias foram reveladas por aspersão de uma solução de vanilina/ácido perclórico/EtOH, seguida de aquecimento em estufa (~100 °C).

Para a purificação dos compostos também foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) realizada em um equipamento constituído de uma bomba ternária Shimadzu LC-20AT e um detector Shimadzu SPD-M20A, utilizando coluna Phenomenex RP-18 (250 x 10 mm, 5 $\mu$ m). Os solventes empregados apresentaram grau de pureza HPLC (MeOH-Tedia) e foram filtrados através de membrana de nylon com poros 0,45  $\mu$ m (Phenomenex), seguido de gaseificação a vácuo durante 5 min. As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise, e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0,4  $\mu$ m (Waters).

### **6.3 Métodos Físicos de Análises**

Todos os espectros apresentados nesse trabalho foram obtidos em equipamentos pertencentes a Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica e do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará.

#### **6.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)**

Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrômetro da Perkin-Elmer, Spectrum 100 FTIR, equipado com acessório UATR.

#### **6.3.2 Espectrometria de Massa**

Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV em espectrômetro de massa SHIMADZU, modelo QP 5000, DI-50 (DQOI/UFC). Os

espectros de massa de alta resolução foram registrados em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QToF, Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA.

### **6.3.3 Pontos de Fusão**

Os pontos de fusão não corrigidos foram feitos em um aparelho digital Marconi MA-381.

### **6.3.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni- e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance DRX-500 (500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) ou Avance DRX-300 (300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).

Para a dissolução das amostras para a obtenção dos espectros, os solventes utilizados foram clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ). Foi utilizado solvente deuterado. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em parte por milhão (ppm).

As multiplicidades das bandas para RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: *s* (simpleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete), *q* (quarteto) e *m* (multiplete).

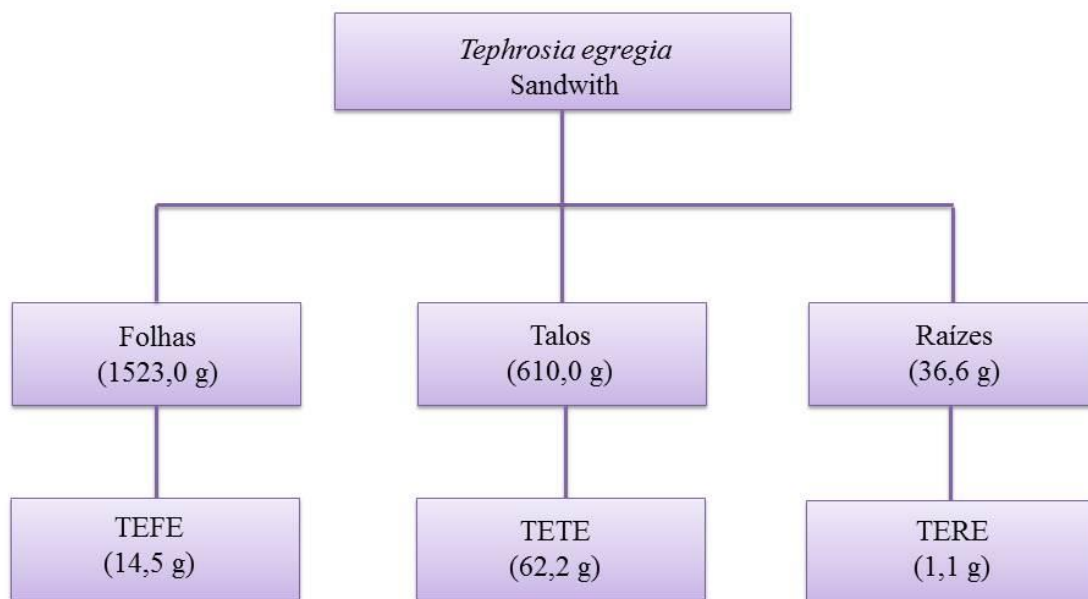
O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) ( $\theta = 135^\circ$ ). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais espectrais observados no espectro BB (Broad Band).

## **6.4 Extração e Isolamento**

### 6.4.1 Preparação do Extrato Etanólico das folhas, talos e raízes de *Tephrosia egregia*

As folhas, talos e raízes de *T. egregia* foram extraídas através de maceração contínua com EtOH (3x3,0 L) à temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, resultando em 14,56 g de extrato das folhas, 62,17 g de extrato dos talos e 1,13 g de extrato das raízes. A rota esquemática de obtenção dos extratos pode ser conferida no Fluxograma 1.

**Fluxograma 1** - Rota Esquemática de Obtenção dos Extratos Etanólicos de *T. egregia*.



### 6.4.2 Preparação do Extrato Hexânico (TERH-S) e Acetato de Etila (TERA-S) a quente das raízes de *Tephrosia egregia*.

Os constituintes fixos das raízes (500g) de *T. egregia* foram submetidos à extração exaustiva em sistema soxlet usando-se separadamente hexano e acetato de etila como solventes. Em seguida, a solução foi filtrada e concentrada com o auxílio de um evaporador

rotativo resultando em dois extratos distintos, o TERH-S com 8,50 g e o TERA-S com 6,29 g. A rota esquemática de obtenção desses extratos pode ser conferida no Fluxograma 2.

**Fluxograma 2** – Rota Esquemática de Obtenção dos Extratos em Sistema Soxlet de *T. egregia*



#### 6.4.3 Fracionamento Cromatográfico de TERA-S (coluna filtrante)

Foram adicionados 6,29 g do extrato acetato de etila (TERA-S) a 12,0 g de sílica gel 60 ( $\varnothing$  0,04 – 0,20 mm), este material foi pulverizado com o auxílio de um almofariz e pistilo (em grau de porcelana) em seguida o material foi cromatografado em 60,0 g de sílica gel 60 ( $\varnothing$  0,04 – 0,20 mm). A coluna possuía 5 cm de altura e um diâmetro de 6 cm. Utilizou-se os solventes Hexano, diclorometano, Acetona e Metanol puros e em misturas binárias 1:1. A série de eluição pode ser conferida na Tabela 10.

**Tabela 10** – Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de TERA-S

Eluente	Fração	Peso (mg)
Hexano	1	50
hexano/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1	2	962,5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3	632,2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Acetona 1:1	4	3752
Acetona	5	537
MeOH	6	77,8
Total		6011,5

#### 6.4.3.1 Fracionamento cromatográfico e isolamento de TE-1

A fração 2 (962,5 mg), oriunda da coluna filtrante de TERA-S por eluição em Hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi recromatografada utilizando-se 46,0 g de sílica gel como fase estacionária, em uma coluna de 3 cm de diâmetro e uma altura de 14 cm. A eluição se deu através da adição de hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH em diferentes proporções, foram coletadas 78 frações de 10 mL cada. Após a análise por camada delgada, as frações foram reagrupadas, como mostra a Tabela 11.

**Tabela 11** - Dados referentes aos pesos das frações obtidas no tratamento cromatográfico de F2 (Hexano/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1)

Fração	Peso (mg)
1-12	41,8
13-23	106,5
24-32	201,2
33-41	108,0
42-48	108,3
49-78	30,3
Total	596,1

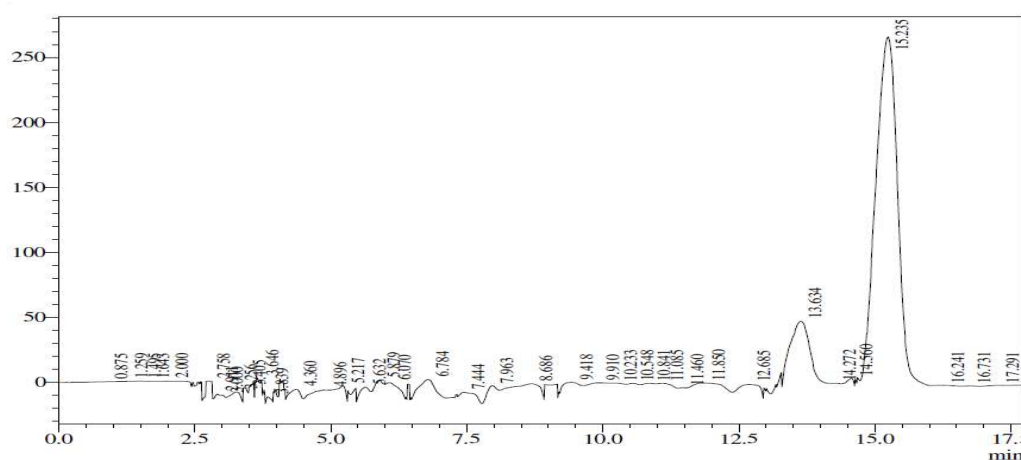
Foram obtidos 106,5 mg (F: 13-23) do fracionamento de F2, este foi submetido novamente a cromatografia utilizando-se como fase estacionária 17,05 g de sílica gel em uma coluna de 2 cm de diâmetro e uma altura de 21,5 cm. Os solventes utilizados para a eluição foram Hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH em diferentes proporções. Foram obtidas 98 frações que foram analisadas por CCD e reagrupadas conforme a Tabela 12.

**Tabela 12** - Dados referentes aos pesos das frações obtidas no tratamento cromatográfico de F (13-23).

Fração	Peso (mg)
1-39	14,3
40-58	7,1
59-86	40,4
87-109	27,9
Total	89,7

A fração F (59-86) foi solubilizada em MeOH/H<sub>2</sub>O (75:25), filtrada e analisada por CLAE, num sistema isocrático de MeOH/H<sub>2</sub>O (75:25) com fluxo de 4,72 mL/min e com tempo de eluição de 15 minutos. Foram coletados dois picos com tempo de retenção em aproximadamente 15 minutos conforme a Figura 49. Do experimento um dos picos apresentou-se puro, denominado TE-1, e foi identificado como 2',6'-dimetoxi-4',5'-(2'',2''-dimetil)-piranochalcona.

**Figura 49** - Cromatograma de Isolamento de TE-1



#### 6.4.3.2 Fracionamento cromatográfico e isolamento de TE-2

Uma parte da fração F (33-41) 60 mg oriunda de F2 foi submetida ao fracionamento em cromatofolhas de alumínio (cromatografia em placa preparativa). Após o processo a sílica resultante foi lavada com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e filtrada dando origem a TE-2, que foi caracterizada como sendo praecansona B.

#### 6.4.3.3 Fracionamento cromatográfico e isolamento de TE-3

A F(3) 632,2 mg oriunda da coluna filtrante de TERA-S por eluição em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  100% foi submetida a cromatografia utilizando 38,8 g de gel de sílica como fase estacionária em uma coluna de 7 cm de altura e 6 cm de diâmetro. Como fase móvel foram utilizados os solventes Hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt e MeOH em diferentes proporções, coletadas em frações de 10 mL. A série de eluição é mostrada na Tabela 13.

**Tabela 13-** Gradiente de eluição do tratamento de F (3).

Eluente	Frações
Hexano	1
Hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 9:1	2-17
Hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 8:2	18-28
Hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 6:4	29-40
Hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1	41-53
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	54-81
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /AcOEt 9:1	82-93
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /AcOEt 8:2	94-100
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /AcOEt 6:4	101-106
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /AcOEt 1:1	107-112
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /AcOEt 3:7	113-118
AcOEt	119-126
AcOEt / MeOH 1:1	127-132
MeOH	133-146



As frações foram analisadas por CCD e reagrupadas em sete novas frações como mostra a Tabela 14.

**Tabela 14** - Dados referentes aos pesos das frações obtidas no tratamento cromatográfico de F (3).

Fração	Peso (mg)
1-57	11,6
58-59	7,7
60-97	389,9
98-112	91,7
113-122	26,9
123-136	39,4
137-146	58,2
Total	625,4

A fração F (98-112) 91,7 mg foi recromatografada utilizando-se 24,4g de sílica gel como fase estacionária em uma coluna de 2 cm de diâmetro e 18 cm de altura. Os solventes utilizados para eluição foram Hexano, AcOEt e MeOH em diferentes proporções. Foram obtidas 84 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e reagrupadas em cinco novas frações conforme a Tabela 15.

**Tabela 15**- Dados referentes às frações e suas respectivas massas do fracionamento de F (98-112).

Fração	Peso (mg)
1-33	3,1
34-54	23,2
55-58	4,7
59-69	21,9
70-84	25,8
Total	78,8

A fração F (59 - 69) 21,9 mg, proveniente do fracionamento de F (98 - 112) foi cromatografada em resina sephadex utilizando-se como fase móvel o solvente MeOH em

uma coluna de 1 cm de diâmetro e 23,5 cm de altura. O fracionamento resultou em 30 frações que foram analisadas por CCD e reorganizadas conforme a Tabela 16.

**Tabela 16-** Dados referentes às frações e as massas do fracionamento de F (59-69).

Fração	Peso (mg)
1-13	8,7
14-19	9,0
20-30	1,6
Total	19,3

A fração F (14-19) apresentou-se pura e foi identificada como sendo 5-metoxi-2'',2''-dimetilpirano-(5',6':7,8)flavona, também conhecida como pongaflavona.

#### 6.4.3.4 Fracionamento cromatográfico e isolamento de TE-4

A fração F (60-67) 389,9 mg oriunda do fracionamento de F(3) foi submetida a um processo cromatográfico em 23,1 g de sílica gel como fase estacionária. Como fase móvel utilizou-se os solventes Hexano, AcOEt e MeOH em diferentes proporções. Ao final, foram obtidas 127 frações que foram analisadas por camada delgada e reagrupadas conforme a Tabela 17.

**Tabela 17-** Dados referentes às frações e as massas do fracionamento de F (60-67).

Fração	Peso (mg)
1-23	13,1
24-30	58,3
31-43	26,3
44-59	215,1
60-67	22,0
68-103	5,5
104-127	7,1
Total	347,4

A fração F (44-59) 215,1 mg se mostrou parcialmente solúvel em acetona, assim, solubilizou-se a amostra em acetona e o precipitado foi separado da solução resultante por filtração, dando origem a F (44-59 Acetona) 97,8 mg. Então, F (44-59 Acetona) foi cromatografada em resina sephadex em uma coluna de 2 cm de diâmetro e 18 cm de altura. Como fase móvel utilizou-se  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1:1 O fracionamento resultou em 48 frações que foram analisadas por camada delgada e reorganizadas conforme a Tabela 18.

**Tabela 18-** Dados referentes as massas do fracionamento de F (44-59).

Fração	Peso (mg)
1-12	13,9
13-24	61,8
25-27	7,5
28-36	6,3
37-48	4,0
Total	93,5

A fração F (13-24) 61,8 mg proveniente de F (44-59) foi recromatografada em resina sephadex em uma coluna de 1,5 cm de diâmetro e 16 cm de altura. O eluente utilizado na fase móvel foi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1:1. O fracionamento resultou em 31 frações que foram analisadas por CCD e reagrupadas como pode ser observado na Tabela 19.

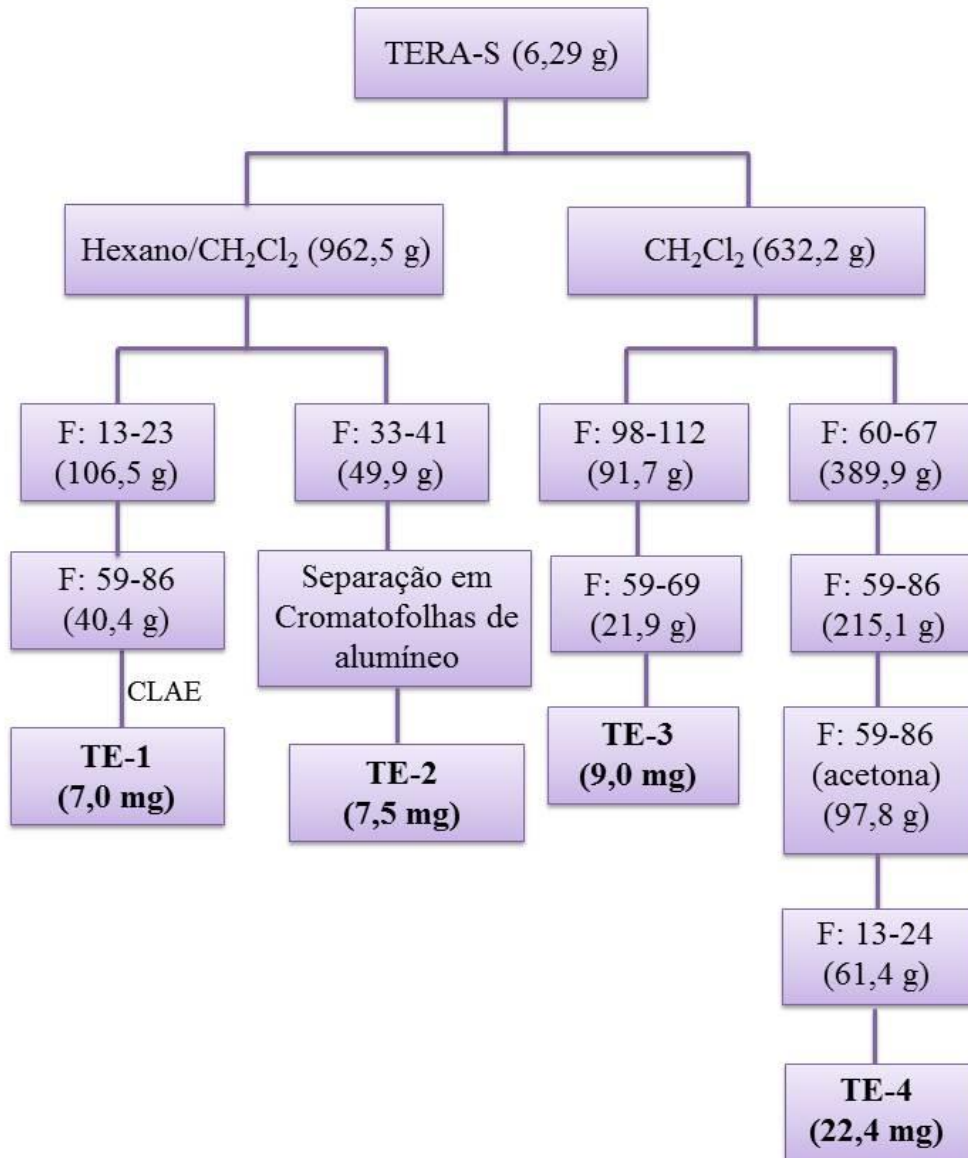
**Tabela 19-** Dados referentes às frações e as massas do fracionamento de F (13-24).

Fração	Peso (mg)
1-15	3,1
16-21	29,7
22-31	22,4
Total	55,2

A fração F (22-31) 22,4 mg mostrou-se pura e foi identificada como sendo 12a-hidroxirottenona.

O Fluxograma 3 mostra a rota esquemática de obtenção das substâncias TE-1, TE-2, TE-3 e TE-4.

**Fluxograma 3** - Rota esquemática do isolamento de TE - 1 a 4



#### 6.4.4 Fracionamento cromatográfico do extrato TETE

62,0 g de TETE foram submetidos a partição com os solventes orgânicos hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e AcOEt, respectivamente originando três novas frações TETE-H (7,5 g), TETE-D (3,9 g) e TETE-A (1,9 g).

##### 6.4.4.1 Fracionamento cromatográfico de TETE-D e isolamento de TE-5

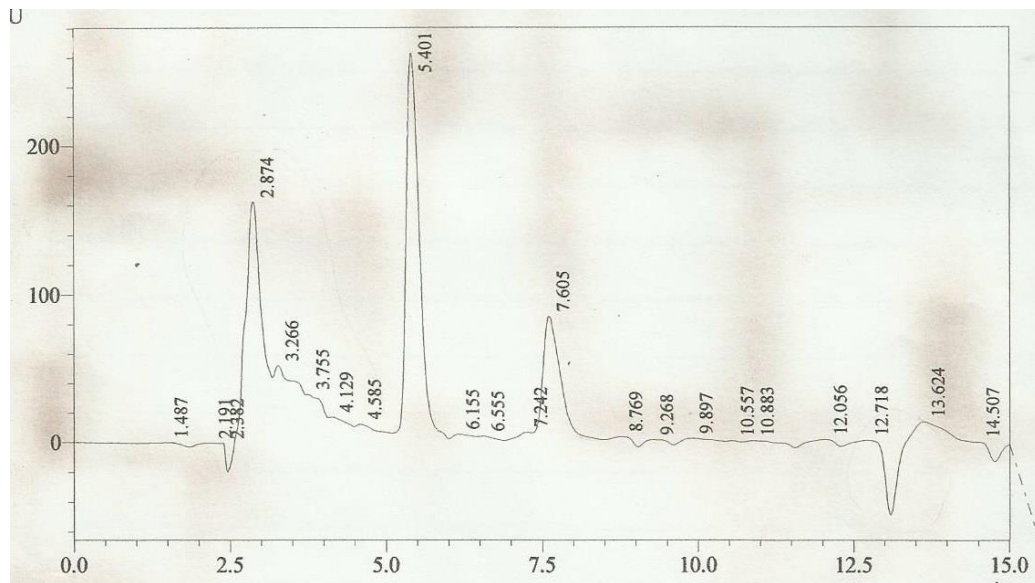
A fração TETE-D (3,9 g) proveniente da partição diclorometano do extrato etanólico dos talos de *T. egregia* foi cromatografada sobre 7,19 g de gel de sílica em coluna cromatográfica com o diâmetro 6,0 cm. Como fase estacionária utilizou-se os solvente Hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH em diferentes proporções. A serie de eluição pode ser conferida na Tabela 20.

**Tabela 20** - Series de eluição do fracionamento de TETE-D

Eluente	Frações
Hexano	1
Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1	2
Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 7,5:2,5	3
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 7,5:2,5	5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 1:1	6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 7,5/2,5	7
AcOEt	8
AcOEt/MeOH 2,5/7,5	9
AcOEt/MeOH 1:1	10
AcOEt/MeOH 7,5/2,5	11
MeOH	12

A fração F (8), 251,5 mg) eluída em AcOEt foi solubilizada em MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40), filtrada e analisada por CLAE, num sistema isocrático de MeOH/H<sub>2</sub>O (65:35) com fluxo de 4,72 mL/min com aproximadamente 10 minutos de tempo de eluição. Foram coletados três picos, onde um deles se mostrou puro, denominado TE-5, 5-hidroxi-8-(1'',2''-epoxi-3''-hidroxi-3''-metilbutil)-7-metoxi--flavona relatado pela primeira vez na literatura.

**Figura 50** – Cromatograma de Isolamento de TE-5



### 6.5 Teste de Atividade Gastroprotetora e Determinação dos níveis de Hemoglobina

Os testes de atividade gastroprotetora foram feitos em parceria com o Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, campus Sobral, sob coordenação da professora Mirna Marques Bezerra.

Os animais utilizados foram camundongos *Swiss* fêmeas com peso variando de 25 a 30 g, para que a análise fosse feita de forma correta os animais foram mantidos em jejum por 18h. Utilizou-se grupos de camundongos, onde estes foram pré-tratados com veículo (branco-salina, 0,3 mL/30 Kg, v.o), com *T. egregia* (2, 20 e 200 mg/Kg, v.o) ou ranitidina (0,2 mL/animal, v.o).

Após 60 minutos administrou-se etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o), decorridos 30 minutos os animais foram sacrificados e os estômagos analisados. Lesões hemorrágicas ou ulcerativas foram medidas e comparadas ao percentual da área gástrica determinada com o auxílio de um programa de planimetria computarizada (Image J 1.42q do Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

Os estômagos previamente utilizados no teste gastoprotetor foram pesados e guardados em freezer à -20°C. Para medir os níveis de hemoglobina utilizou-se um kit padrão para hemoglobina (Bioclin), conteúdo reagente de Drabkin's (ferrocianeto de potássio em pH fracamente alcalino).

As amostras de tecido do estômago foram homogeneizadas em solução de Drabkin (100 mg de tecido/1 mL de solução). Logo após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado, filtrado e novamente centrifugado nas mesmas condições.

A concentração de hemoglobina/100 mg foi determinada a partir da curva padrão de de hemoglobina sendo a leitura feita em ELISA com absorvância de 540 nm. Os resultados foram expressos em µg de Hb/100mg de tecido.

## **6.6 Teste de Atividade Citotóxica**

Os testes de atividade citotóxica foram realizados em parceria com o Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará pela professora Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

Foram utilizadas as amostras de células tumorais PC3 (câncer de próstata) HCT-116 (côlon - humano), SF-295 (Glioblastoma), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As

amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) puro estéril e testadas na concentração de 5 µg/mL.

Foi utilizado o método do MTT, que testa mais de 10.000 amostras a cada. Tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

As células foram plaqueadas na concentração de  $0,1 \times 10^6$  cél/mL para as linhagens PC3 e SF-295, e  $0,7 \times 10^5$  cél/mL para a linhagem HCT-116. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.



# CONCLUSÃO

---



## 7. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico dos extraos de *T. egregia* culminou no isolamento e identificação de cinco metabólitos secundários. O trabalho confirma a natureza flavonoidica conforme o perfil químico já esperado para o gênero.

Foram identificados cinco flavonoides, um rotenoide, 12a-hidroxirotenona, duas chalconas, praecansona B e 2',6'-dimetoxi-4',5'-(2'',2''-dimetil)piranochalcona e duas flavonas, a pongaflavona e a 5-hidroxi-8-(2'',3''-epóxi-3''-hidroxi-3''-metilbutil)-7-metoxiflavona, este último relatado pela primeira vez.

Embora o extrato das folhas e caules não tenha obtido um resultado satisfatório, o extrato etanólico das raízes se mostrou eficaz frente a lesões gástricas induzidas por etanol reduzindo o exudato ulcerativo em 75%, se mostrando mais eficiente que a ranitidina. E também na diminuição dos níveis de hemoglobina, esta atividade pode ser atribuída à natureza anti-inflamatória descrita em plantas ricas em compostos flavonoidicos.

Apesar de o resultado do teste *in vitro* ter se mostrado promissor em relação aos metabólitos isolados, o extrato das raízes, bem como a substância denominada TE-5, obteve atividade citotóxica moderada sendo importante estudar a origem desta.

Tendo em vista, os relatos da literatura e o resultado da atividade anti-inflamatória (gastoprotetora) leva-nos a crer que *T. egregia* é uma fonte potencial de composto bioativos e que a continuidade de sua investigação química e biológica é bastante promissora.

# REFERÊNCIAS

---



---

**REFERÊNCIAS**

ABHIMANYU, Y., VIGHA, S., PRATIKSHA, S., JAGDISH, P., A new flavone and glycosides of *Tephrosia purpurea*. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**. v. 4, p. 3048-3052, 2014.

AGNIHOTRY, V. K.; SHARMA, S. P.; AGNIHOTRY, N.; SAXENA, R. C.; Chemical constituents of *Tephrosia purpurea* family: Leguminosae. **International Journal of Chemical Sciences**. v. 9, p. 1045-1052, 2011.

AL-HAZIMI, H. M. A.; AL-JABER, N. A.; RAFIQ, M.; SIDDIQUI, H.; Phenilic compounds from *Tephrosia* plants (leguminosae) review article II. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 9, p. 597, 2006.

AMMAR, M. I.; NENAAH, G.; ABUL HAMED, M.; Antifungal activity of prenylated flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi. **Crop Protection**. v. 49, p. 21-25, 2013.

ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIÓN, M.; MORAIS, L. A. B.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. C-prenylflavonoids from root of *Tephrosia tunicata*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 799-804, 2000.

ANDREI, C.C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M. F. G. F.; FO, E. R.; Dimethylchromene Rotenoids from *Tephrosia cândida*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 1081-1085, 1997.

ARRIAGA, A. M.C; LIMA, J. Q.; VASCONCELOS, J. N.; OLIVEIRA, M. C. F.; ANDRADE-NETO, M.; SANTIAGO, G. M. P.; UCHOA, D. E. A.; MALCHER, G. T.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R., Unequivocal Assignments of from *Tephrosia* sp. (Fabaceae), **Magnect Resonance in Chemistry**, v. 47, p. 537-540, 2009.

- BOLLAND, G.; *Tephrosia egregia* Sandwith. **Bulletin of miscellaneous information** / Royal Botanic Gardens, Periodical Botany XB-U769, p. 249, 1947.
- BOSMAN, M.T.M. & HAAS, A.J.P. A revision of the genus *Tephrosia* (Leguminosae-Papilionoideae) in Malásia. **Blumea**, v. 28 p. 445-488. 1983.
- CAMELE, G.; MONACHE, F. D.; MONACHE, G., D.; BETTOLO, G. B. M.; Three news flavonoids from *Tephrosia praecans*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 707-709, 1980.
- CHEN, Y; YAN, T; GAO, C; CAO, W; HUANG R.; Natural Products from the Genus *Tephrosia*. **Molecules**, v. 19, p. 1432-1458, 2014.
- DALWADI, P. P.; PATEL, J. L.; PATANI, P. V.; *Tephrosia purpúrea* Linn (Sharpunka, will índigo): A review on Phytochemistry and pharmacological studies. **Indian journal of farmaceutical and biological research. (IJFBR)**. v. 2, p. 108-121, 2014.
- DONATINI, R. S.; ISHIKAWA, T.; BARROS, S. B. M; BACCHI, E. M; Atividades antiúlceras e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Brasilian Journal of Pharmacology**, v. 19, p. 89-94, 2009.
- DZENDA, T.; AYO, J., O.; ADELAIYE, A.,B.; ADAUDI, A., O.; Ethno – medical na veterinary uses of *Tephrosia vogelli* Hook. F.: A review. **Nigerian veterinary journal**, v. 28 p. 24-39, 2007.
- FERLAY, J; SOERJOMATARAM, I; ERVIK, M; Cancer Incidence and mortality worldwide: IARC cancer. **Globocan**, v.1, 2011.
- GANAPATY, S.; SRILAKSMI G. V. K.; THOMAS, P. S.; RAJAESWARI, N. R.; RAMAKRISHNA, S.; Cytotoxicity and Protozoal Activity of Flavonoid from Three *Tephrosia species*. **Journal of Natural Remedies**. v. 9, p. 202-208, 2009.

GAO, T.; YAU, H.; SONG, J.; LIU, C.; ZHU, Y.; MA, X.; PANG, X.; XU, H.; CHEN, S.; Identification of medicinal plants in the Family fabaceae using potential ITS2. **Journal Ethnopharmacology**, v. 130, p. 116-121, 2010.

GEDARA, S. R.; ADBEL, H.; AHMED, A. F.; Dunesin, a new 8-prenylated flavonoid from *Tephrosia purpurea* subsp. *Dunesis*. **Mansorra Journal of Farmaceutical Sciences**. v. 25, p. 94-102, 2009.

JOLY, A. B., **Botânica: Introdução a taxonomia vegetal**, v. 4, 11 ed., São Paulo: Editora Nacional, 1993.

JUMA, W. P.; AKALA, H. M.; EYASE, F. L.; MUIVA, L. M.; HEYDENEREICH, M.; OKALEBO, F. A.; GITU, P. M.; PETER, M.; PETER, M. G.; WALSH, D. S.; IMBUGA, M.; YENESEW, A.; Terpurinflavone: An antiplasmodial flavone from the stem of *Tephrosia Purpurea*. **Phytochemistry Letters**. v.5, p. 176-178, 2011.

KHALAFALAH, A. K.; YOUSEF, A. H.; ESMAIL, A. M.; ABDELRAZIK, M. H.; HEGAZY, M. E. F.; MOHAMED, A. H.; Chemical constituents of *Tephrosia purpurea* **Pharmacognosy Res.** v. 2, 72-75, 2010.

LIMA, J. Q.; *Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Gênero Tephrosia: Investigação Química e Ensaio Biológicos de Tephrosia egregia Sandwith (Fabaceae)*. 231f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 2010.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; Plantas Medicinais: a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MADHUSUDHANA, J.; REDDY, R. V. N.; REDDY, B. A. K.; REDDY, M. V. B.; GUNASEKAR, D.; DEVILLE, A.; BODO, B.; Two new geranyl flavanones from *Tephrosia villosa*. **Natural Products Research**. v. 24, p. 743-749, 2010.

MALDINI, M. T.; MONTORO, P.; MACCHIA, M.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; Profiling of Phenolics from *Tephrosia cinerea*. **Planta Medica**. v. 77, p. 1861-1864, 2011.

MARQUES, D, A; FOGLIO, M, A; MORGANTE, P, G; SLUYS, M, A, V; SHEPERD, S. L. K. Biotechnology approaches for production of antiulcerogenic dihydro-epideoxyarteannuin B isolated from *Artemisia annua* L. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 291-299, 2006.

MARTINEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, J. M.; Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalares**, p. 271-278, v. 6, 2002.

NAMRATHA, V.; Isolation and structure determination of a new flavanone from *Tephrosia spinose*. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 4, p. 1271-1274, 2015.

NGADJUI, B. T.; NGANDEU, F.; BEZABITH, M.; NGAMGA, D.; TCHINDA, A. T.; ABEGAZ, B. M.; DUFAT. H.; TILLEQUIN, F. Rotenoid Derivatives and Other Constituents of the twings of *Millettia duchesnei*. **Phytochemistry**, v.69, p. 258-263, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Estratégias da OMS sobre medicina tradicional 2014-2023**. Biblioteca da OMS, 2013. 72 p.

PAVIA, D. L.; LAMPNAM, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed (tradução). São Paulo: CENGAGE, 2010.

PETHAKAMSETTY, L.; SERU, G.; KANDULA, L.; Phytochemical and biological examination of the aerial parts of *Tephrosia pumila*. **Journal of Pharmacy Research**. v. 3, p. 193-197, 2010.

QUEIROZ, R. T.; TOZZI, A. M. G. A.; LEWIS, G. P.; Seed morphology: an addition to the taxonomy of *Tephrosia* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae) from South America. *Plant Syst Evol*, v. 299, p. 459-470, 2013.

REDDEPPA, R. G., ALURU, R., RACHAKUNTA, M., D, G., A new 5-deoxyflavonol from *Tephrosia tinctoria*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. v.6, p. 34-36, 2014.

REDDY, R. V. N.; KHALIVULA, S. I.; REDDY, B. A. K.; REDDY, M. V. B.; GUNASEKAR, D.; DEVILLE, A.; BODO, B.; Flavonoids from *Tephrosia calophylla*. *Natural Products Communications*. v. 4, p. 59-62, 2009.

SERRANO, R.; THEODORO, T. R.; PINHAL, M. P. S.; Oncogenes, genes supressores de tumores, microRNAs e o desenvolvimento de tumores. *RBM*, v. 71, p. 4-10, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed (tradução). Rio de Janeiro: LCT, 2007.

SINGH, J. P.; YADAV, A.; SINGH, V.; SINGH, P.; Contituents of *Tephrosia purpurea*. *Journal of Chemical Biological and Physic Sciences*. v. 4, p. 1941-1945, 2014.

TARUS, P. K.; MACHOCHO, A. K.; LANG'at THORUWA, C.; CHHABRA, S. C. Flavonoids from *Tephrosia aequilata*. *Phytochemistry*, v. 60, p. 375-379, 2002.

TARUS, P.K.; MACHOCO, A.K.; LANG'THORUWA,C.C.; CHHABRA, S.C. Flavonoids from *tephrosia aequilata*. *Phytochemistry*. v. 60 p. 375-379, 2009.

TOUQEER, S.; SAEED, M. A.; AJAIB, M.; A review on the phytochemistry and pharmacology of genus *Tephrosia*. *Phytopharmacology*, v. 4, p. 598-637, 2013.



VASCONCELOS, J. N.; LIMA, J. Q.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; ALMEIDA, M. C.; ANDRADE-NETO, M.; MAFEZOLI, J.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R.; Chemical and Biological Study of the *Tephrosia toxicaria* Pers. **Química Nova**, v. 382-386, 2012.

VASCONCELOS, J. N.; LIMA, J. Q.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; ALMEIDA, M. M. B.; ANDRADE-NETO, M.; MAFEZOLI, J.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R.; Chemical and Biological Study of the *Tephrosia toxicaria* Pers. **Química Nova**, v. 32, p. 382-386, 2009.

VASCONCELOS, J. N.; SANTIAGO, G. M. P.; LIMA, J. Q.; MAFEZOLI, J.; LEMOS, T. L. G.; SILVA, F. R. L.; LIMA, M. A. S.; PIMENTA, A. T. A.; BRAZ-FILHO, R.; ARRIAGA, A. M. C.; CESARIN-SOBRINHO, D.; Rotenoids from *Tephrosia toxicaria* with larvicidal activity against *Aedes aegypti*, the main vector of dengue fever. **Química Nova**, v. 35 p. 1097-110, 2012.

WATSON, L.; DALL WITZ, M. J.; **The families of flowering plants descriptions, illustrations, identification, and formation retrieval.** Disponível em <http://biodiversity.uno.edu/delta/angio/images/bmag60.jpg>. Acesso em 24/07/2015.

WEI, H.; XU, H.; XIE, H.; XU, L.; WEI, X.; Sesquiterpenes and Lignanas from *Tephrosia vogelli*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 92, p. 370-374, 2009.

XIAO-LI, P., WEN-BING, D., ZHI-XIANG, X., KAI, Z., RUI, H., YOU-ZHI, L., Chemical constituents from the leaves of *Tephrosia purpurea* **Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa**, v. 26, p. 1046-1050, 2014.

YAN, P.; YINNING, C.; CHENGHAIG.; TAO, Y.; WENHAO, C.; RIMING, H.; A new 1,2-ethanedione benzofurane derivative from *Tephrosia purpurea*. **Natural Products Research**, v. 28, p. 1705-1708, 2014.

YOUZHI, L.; GUANHUA, L.; XIAOYI, W.; ZHONGHUA, L.; HANHONG, X.; Isolation and identification of insecticidal compounds from *Tephrosia purpurea* bark and their insecticidal activity. **Kunchong Xuebao**, v. 54, p. 1368-1376, 2011.