

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

DAYSIANNE PEREIRA DE LIRA

**FLAVONÓIDES ISOLADOS DE *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke
(FABACEAE)**

JOÃO PESSOA-PB

2009

DAYSIANNE PEREIRA DE LIRA

**FLAVONÓIDES ISOLADOS DE *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke
(FABACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacoquímica.

Orientadora:

Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

JOÃO PESSOA-PB

2009

L768f Lira, Daysianne Pereira de.
Flavonóides isolados de Piptadenia stipulacea (Benth.) Ducke (Fabaceae) /
Daysianne Pereira de Lira. -- João Pessoa: UFPB, 2009.
169 f. : il.

Orientador: Bárbara Viviana de Oliveira Santos.
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS.

1. Produtos naturais 2. Farmacoquímica. 3. Piptadenia
stipulacea. 4. Fabaceae.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

DAYSIANNE PEREIRA DE LIRA

**FLAVONÓIDES ISOLADOS DE *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke
(FABACEAE)**

Dissertação aprovada em 12 /11/09

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**

**Profa. Dra. Vanusia Cavalcanti França
(Universidade Estadual da Paraíba)
Examinadora Externa**

**Prof. Dr. Davi Antas e Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo**

*Aos meus pais, Normando Pereira de Lira e Maria Lúcia
Pereira de Lira, e ao meu noivo Otonildo Moreira Uchôaa Segundo.*

AGRADECIMENTOS

- ★ A **Deus** pai todo poderoso, por nunca permitir eu caminhar sozinha, por sempre me ouvir e me confortar e por me mostrar sempre o sentido da vida.
- ★ Aos meus pais **Normando** e **Lúcia**, por toda a dedicação em todos os momentos da minha vida, pela sempre torcida tanto em momentos felizes com tristes e por ter sempre me incentivado a conquistar a maior herança do mundo, a educação.
- ★ Ao meu noivo **Segundo**, pela participação intensa na minha vida, por sempre está disposto a me ajudar a qualquer hora e por todos os momentos felizes que já passamos juntos.
- ★ Aos meus irmãos **Nando**, **Rafael** e **Luciano** pelo carinho e apoio.
- ★ A minha avó **Maria José** pelo carinho e afeto.
- ★ A dona **Fátima** e seu **Otonildo** pelo apoio, força e estímulo.
- ★ A professora **Bárbara** por todos os ensinamentos, apoio, dedicação, incentivo, amizade e por acreditar no meu trabalho.
- ★ Ao professor **Barbosa** pelos ensinamentos e pelo exemplo profissional.
- ★ A professora **Célia Chavier** por ter contribuído com este trabalho.
- ★ A professora **Magna Suzana** e sua aluna **Aline** da Universidade Federal de Alagoas, pela realização dos testes de inflamação e assim pela grande colaboração que fizeram neste trabalho.
- ★ Ao professor **Edilberto** da Universidade Federal do Ceará/CENAUREM, pela realização dos espectros deste trabalho.
- ★ A minha amiga **Allana**, que apesar da pouca convivência recentemente, sempre esteve presente nos momentos mais importantes da minha vida. **Xirley**, por todo o ensinamento, dedicação e confiança na minha iniciação científica e principalmente pela amizade que se firmou entre nós.
- ★ A **Ana Silvia** amiga de graduação, iniciação científica e pós-graduação. Agradeço pela companhia e amizade por todo este tempo e por ter me mostrado a oportunidade de entrar no LTF.
- ★ A minha amiga e prima **Fernanda Flávia** pelo apoio, torcida e presença na minha vida.

- ★ A **Fábio Henrique**, uma pessoa única, prestativo, companheiro, sincero, inteligente, dedicado a tudo que faz. Muito obrigada por todo o conhecimento que já compartilhou comigo e principalmente pela amizade.
- ★ As companheiras de bancada que se tornaram muito especiais pra mim **Gabriela, Analucia, Thaisa e Viviane**. Muito obrigada meninas, pela amizade e companheirismo.
- ★ A **Camila** e a **Karine**, por serem meninas meigas e que também são muito especiais para mim.
- ★ A **Charlane** pela amizade que construímos desde o primeiro dia de aula do mestrado.
- ★ Ao funcionário **Nonato** por ser tão prestativo e dedicado ao laboratório. Muito obrigada pelo apoio durante todas as fases deste trabalho.
- ★ A aluna de iniciação científica **Heloísa Mara** pela alegria e pela cor rosa que sempre me passa quando estou ao seu lado.
- ★ Aos alunos **Daniele, Narlize, Fabiana, Kiriake, Roberto, Antônio, Sócrates, Roosevelt, Adriana, Steno, Mariane, Rafael e Thiago** pelo apoio e convívio.
- ★ Aos alunos de iniciação científica **Kamylla, Sandro, Cíntia, Hellane, Ricardo e Tainá** pelo convívio e pelo excelente trabalho que vocês realizam no laboratório.
- ★ A **Vicente Carlos** não apenas pelo apoio técnico, mas pela disponibilidade de ajudar, pelo convívio e amizade.
- ★ Ao funcionário **Welliton** pela sua dedicação.
- ★ Aos professores **Jackson** e **Josean** que também contribuíram para a minha formação.
- ★ A todos os colegas da minha turma de mestrado, pela união, companheirismo, desafios e alegrias compartilhadas.
- ★ A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos do LTF/UFPB, especialmente a **Profa. Dra. Bagnólia Araújo, Profa. Dra. Celidarque Dias, Profa. Dra. Fátima Vanderley, Profa. Dra. Fátima Agra, Prof. Dr. Eduardo Jesus, Profa. Dra. Antônio Lúcia, Profa. Dra. Márcia Piuvezam, Profa. Dra. Margarete Formiga**.
- ★ A todos os funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, nos seus mais diversos setores.

- ★ Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudos, o qual foi muito importante para a realização deste trabalho.

A todos vocês muito obrigada!

RESUMO

LIRA, Daysianne Pereira. **Flavonóides isolados de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke (Fabaceae)**. 169 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

Piptadenia stipulaceae pertencente a família Fabaceae, uma das maiores em dicotiledôneas e a terceira maior família das angiospermas. Esta espécie é conhecida vulgarmente no Nordeste brasileiro como jurema branca, carcará, calumbi e apresenta ampla distribuição na caatinga nordestina, sendo utilizada na medicina popular nas inflamações. O presente trabalho descreve o isolamento e a identificação estrutural de alguns constituintes químicos das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke, com o objetivo de ampliar o conhecimento químico sobre o gênero *Piptadenia*, bem como disponibilizar amostras para a realização de ensaios farmacológicos que confirmem o uso popular da espécie. Os constituintes químicos foram identificados através da análise de dados obtidos por métodos espectroscópicos como IV e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, além de comparação com valores da literatura. O estudo fitoquímico da fase clorofórmica de *P. stipulacea* resultou no isolamento de cinco flavonóides: 5-7-diidroxi-3,4',6-trimetoxiflavona; 4',5,7-triidroxi-3,3',6-trimetoxiflavona; 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxiflavona, relatados pela primeira vez no gênero, 3,3',5,7-tetraiidroxi-4',6-dimetoxiflavona e 4',5,7-triidroxi-3,6-dimetoxiflavona, descritos pela primeira vez na família.

Palavras-chave: *Piptadenia stipulacea*, Fabaceae, flavonóides.

ABSTRACT

LIRA, Daysianne Pereira. **Flavonóides isolados de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke (Fabaceae)**. 169 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

Piptadenia stipulaceae belonging to the Fabaceae family, one of the largest in dicots and the third largest family of flowering plants. This species is commonly known in the Brazilian Northeast as mimosa white, carcara, calumbi and is widely distributed in the caatinga, and is used in folk medicine in inflammation. This paper describes the isolation and structural identification of some chemical constituents of aerial parts of *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke, in order to increase knowledge about the chemical *Piptadenia* genus, and provide samples for testing to confirm the pharmacological popular use of the species. The chemical constituents were identified through analysis of data obtained by spectroscopic methods such as Infrared Spectroscopy and ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance uni-dimensional, and compared with literature values. Phytochemical study of the chloroform extract of *P. stipulacea* resulted in the isolation of five flavonoids: 5-7-dihydroxy-3,4',6-trimethoxyflavone; 4',5,7-trihydroxy-3,3',6-trimethoxyflavone; 4',5,7- trihydroxy-3',6-dimethoxyflavone, first reported in the genus, 3,3',5,7-tetrahydroxy-4',6-dimethoxyflavone and 4',5,7-trihydroxy-3,6-dimethoxyflavone, first described in the family.

Keywords: *Piptadenia stipulacea*, Fabaceae, flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Alguns dos constituintes químicos isolados da família Fabaceae no LTF.....	22
FIGURA 2. Mapa de distribuição da família Fabaceae	25
FIGURA 3. Espécies de Fabaceae com importância agrícola e econômica	26
FIGURA 4. Mapa de distribuição do gênero <i>Piptadenia</i>	29
FIGURA 5. <i>Piptadenia stipulaceae</i> (Benth) Ducke.....	41
FIGURA 6. Percolador de aço inoxidável.....	50
FIGURA 7. Rota-evaporador.....	50
FIGURA 8. Cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC)	53
FIGURA 9. Constituintes químicos isolados de <i>Piptadenia stipulacea</i>	57
FIGURA 10. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, DMSO- d_6) de Ps-01	63
FIGURA 11. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-01	64
FIGURA 12. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-01.....	65
FIGURA 13. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, DMSO- d_6) de Ps-01	66
FIGURA 14. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-01	67
FIGURA 15. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-01.....	68
FIGURA 16. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-01.....	69
FIGURA 17. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-01.....	70
FIGURA 18. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-01.....	71
FIGURA 19. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-01.....	72
FIGURA 20. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-01.....	73
FIGURA 21. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, DMSO- d_6) de Ps-02	78
FIGURA 22. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-02	79
FIGURA 23. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-02.....	80
FIGURA 24. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135(125 MHz, DMSO- d_6) de Ps-02	81
FIGURA 25. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-02.....	82
FIGURA 26. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-02	83

FIGURA 27. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-02.....	84
FIGURA 28. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-02.....	85
FIGURA 29. Espectro na região do Infravermelho de Ps-03 (Pastilha de Kbr)	91
FIGURA 30. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, DMSO- d_6) de Ps-03	92
FIGURA 31. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-03	93
FIGURA 32. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-03.....	94
FIGURA 33. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-03.....	95
FIGURA 34. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, DMSO- d_6) de Ps-03	96
FIGURA 35. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-03	97
FIGURA 36. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6)97 de Ps-03	98
FIGURA 37. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-03.....	99
FIGURA 38. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-03...	100
FIGURA 39. Espectro na região do Infravermelho de Ps-04 (Pastilha de Kbr)	106
FIGURA 40. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, DMSO- d_6) de Ps-04	107
FIGURA 41. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-04	108
FIGURA 42. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-04...	109
FIGURA 43. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-04...	110
FIGURA 44. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, DMSO- d_6) de Ps-04	111
FIGURA 45. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-04...	112
FIGURA 46. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-04 ...	113
FIGURA 47. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-04.....	114
FIGURA 48. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-04.....	115
FIGURA 49. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-04.....	116
FIGURA 50. Espectro na região do Infravermelho de Ps-05 (Pastilha de Kbr)	121
FIGURA 51. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, DMSO- d_6) de Ps-05	122
FIGURA 52. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-05	123
FIGURA 53. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-05...	124

FIGURA 54. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-05...	125
FIGURA 55. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-05.....	126
FIGURA 56. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-05.....	127
FIGURA 57. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-05 ...	128
FIGURA 58. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-05.....	129
FIGURA 59. Representação esquemática da primeira etapa da biossíntese dos flavonóides	134
FIGURA 60. Representação da proposta biogenética para os flavonóides isolados de <i>P. stipulacea</i>	135
FIGURA 61. Flavonóides antioxidantes e mecanismo da estabilização do elétron desemparelhado.....	140
FIGURA 62. Efeito antinociceptivo da fase aquosa, fase acetato, galetina 3,6-dimetil éter, jaceidina de <i>Piptadenia stipulacea</i> e dipirona no ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético.....	142
FIGURA 63. Perfil antihipernociceptivo da fase aquosa, fase acetato, galetina 3,6-dimetil éter, jaceidina de <i>Piptadenia stipulacea</i> e morfina no ensaio da placa quente... ..	143
FIGURA 64. Perfil antihipernociceptivo da fase aquosa, fase acetato, galetina 3,6-dimetil éter, jaceidina de <i>Piptadenia stipulacea</i> e indometacina no teste de formalina.....	144
FIGURA 65. Perfil antiinflamatório da fase aquosa, fase acetato, galetina 3,6-dimetil éter de <i>Piptadenia stipulacea</i> e indometacina no ensaio de peritonite induzida por zymosan.....	146

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Constituintes químicos isolados de espécies do gênero <i>Piptadenia</i>	31
TABELA 2. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMQC e HMBC) de Ps-01 registrados em DMSO- d_6 (δ em ppm e J em Hz).....	61
TABELA 3. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Ps-01 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz) com dados da literatura (DMSO- d_6) (AGRAWAL, 1989).....	62
TABELA 4. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMQC e HMBC) de Ps-02 registrados em DMSO- d_6 (δ em ppm e J em Hz).....	77
TABELA 5. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMQC e HMBC) de Ps-03 registrados em DMSO- d_6 (δ em ppm e J em Hz).....	89
TABELA 6. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Ps-03 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz) com dados da literatura (DMSO- d_6) (AGRAWAL, 1989).....	90
TABELA 7. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMQC e HMBC) de Ps-04 registrados em DMSO- d_6 (δ em ppm e J em Hz).....	104
TABELA 8. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Ps-04 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz) com Ps-03(δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)	105
TABELA 9. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMQC e HMBC) de Ps-05 registrados em DMSO- d_6 (δ em ppm e J em Hz).....	119
TABELA 10. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Ps-05 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz) com Ps-01 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)	120

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Classificação taxonômica da espécie <i>Piptadenia stipulaceae</i> (Benth.) Ducke	42
QUADRO2. Dados referentes à triagem fitoquímica realizada com o extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>Piptadenia stipulaceae</i>	52
QUADRO 3. Frações obtidas na CC e sistema de solvente utilizado	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BB: Broadening

BIONCEs: Bioactives new chemical entities

CC: Cromatografia de adsorção em coluna

CCD: Cromatografia em camada delgada

CCDA: Cromatografia em camada delgada analítica

CCDP: Cromatografia em camada delgada preparativa

CENAUREM: Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear

CHI: Chalcona isomerase

CHS: Chalcona sintase

CLAE: Cromatografia Líquida de alta eficiência

CoA: Coenzima A

***d*:** Dupleto

***dd*:** Duplo dupleto

DAH_P: Ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosônico-7-fosfato

DMSO-*d*₆: Dimetilsulfóxido deuterado

EM: Espectrômetro de Massas

EP_{SF}: Ácido 5-enolpiruvil-chiquímico-3-fosfato

ERNs: Espécies reativas de nitrogênio

EROs: Espécies reativas de oxigênio

EtOH: Etanol

FLS: Flavonol sintase

FNS I: Flavona sintase I-2-oxiglutarato dioxigenase dependente

FNS II: Flavona sintase II-2-oxiglutarato dioxigenase dependente

HA: Hidroalcoólica

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

Hz: Hertz

HNO₂: Ácido nitroso

HO[•]: Radical hidroxila

IV: Infravermelho

J: Constante de acoplamento

LAFI: Laboratório de Farmacologia e Imunidade

LTF: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

***m*:** Multiplete

MHz: Megahertz

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAPRALERT: Natural PProducts ALERT

NO[•]: Radical óxido nítrico

N₂O₃: Óxido nitroso

ONOO⁻: Peroxinitritos

O₂^{•-}: Radical superóxido

PAL: Fenilalanina amônia liase

PEP: Fosfoenolpiruvato

ppm: Partes por milhão

R_f: Fator de retenção

RMN de ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RO[•]: Radical alcóxila

ROO[•]: Radical peróxila

s: Simpleto

SAM: S-adenosilmetionina

***t*:** Tripleto

UFC: Universidade Federal do Ceará

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

UV: Ultravioleta

δ: Deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1 Considerações sobre a família Fabaceae	25
2.2 Considerações sobre a subfamília Mimosóidea e o gênero <i>Piptadenia</i>	28
2.3 Aspectos botânicos de <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth) Ducke.....	41
2.4 Generalidades da espécie <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth) Ducke	42
3 OBJETIVOS.....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Métodos cromatográficos	47
4.2 Métodos espectroscópicos	48
4.3 Ponto de fusão	48
4.4 Coleta do material botânico.....	48
4.5 Processamento do material botânico	49
4.6 Preparação dos extratos	49
4.7 Avaliação fitoquímica dos constituintes químicos.....	51
4.8 Isolamento e purificação dos constituintes químicos.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Constituintes químicos isolados da fase clorofórmica de <i>Piptadenia stipulaceae</i> (Benth) Ducke	57
5.2 Identificação estrutural de Ps-01	58
5.3 Identificação estrutural de Ps-02	74
5.4 Identificação estrutural de Ps-03	86
5.5 Identificação estrutural de Ps-04	101
5.6 Identificação estrutural de Ps-05	117
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	130
6.1. Proposta biossintética para os constituintes químicos isolados de <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth) Ducke	131

6.2 Potencial farmacológico dos falvonóides.....	136
6.2.1 Atividade antiinflamatória e antinociceptiva de galentina 3,6-dimetil éter e jaceidina isolados de <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth) Ducke.	141
7 CONCLUSÕES	148
8 PERSPECTIVAS.....	150
REFERÊNCIAS.....	152
APÊNDICE A	164
APÊNDICE B	166
APÊNDICE C	168



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002). A fantástica variedade e complexidade desses metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas teriam-se formados e evoluído, como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microorganismos, insetos, animais e também as condições de adaptação e regulação (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

No contexto da evolução das plantas terrestres, estima-se que cerca de 500.000 espécies ocupam todo o planeta, sendo que 50% são constituídas por angiospermas. No auge desse processo evolutivo, as angiospermas alcançaram, sem dúvida, um desenvolvimento ímpar dada à ocorrência de micromoléculas distintas e complexas, com vários centros estereogênicos que provavelmente, devido a essas características, sejam-lhe atribuídas inúmeras finalidades alelopáticas e bológicas. Dessa forma, as plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, frutos de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra FUNARI e FERRO, 2005).

Embora haja, nas plantas, um laboratório biossintético de compostos orgânicos, sabe-se que o perfil metabólico de seus extratos brutos não é uma tarefa fácil de ser realizada, em razão da diversidade de estruturas químicas presente nas plantas. Porém, o avanço tecnológico de técnicas analíticas, sobretudo das técnicas hifenadas, proporcionou um papel importante na elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com níveis de sensibilidade e seletividade impensáveis até poucos anos atrás (RODRIGUES et al., 2006). O emprego das primeiras técnicas acopladas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) abriu a possibilidade do uso de outros sistemas de detecção, como ultravioleta (UV), infravermelho (IV), eletroquímico e fluorescência, entre outros. Nenhum destes sistemas novamente pode ser considerado universal, mas possibilita a análise de matrizes não voláteis e de alto peso molecular. Contudo, a necessidade de uma maior informação estrutural de cada componente das matrizes analisadas

levou ao desenvolvimento de técnicas hífenadas mais modernas, como o acoplamento da CLAE com EM (Espectrômetro de Massas) e com ressonância magnética nuclear (RMN) (MONTANARI e BOLZANI, 2001). Isso possibilitou o estudo do extrato vegetal bruto, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, muitas vezes, leva a compostos já conhecidos. Sendo assim, estratégias de triagem química têm sido desenvolvidas através do uso de técnicas hífenadas que fornecem numerosas informações estruturais dos metabólitos antes mesmo do seu isolamento (RODRIGUES et al., 2006).

Com o desenvolvimento dessas novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até a pouco tempo difícil de serem identificados (PINTO et al., 2002). A cada momento são relatadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica, como exemplo o taxol (isolado de plantas do gênero *Taxus* que consitui uma grande esperança para pessoas portadoras de câncer nos ovários e pulmões), a forskolina (obtida de *Coleus barbatius* que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores), a artemisina (presente na *Artemisia annua* que apresenta potente atividade antimalárica) e mais recentemente camptotecina, alcalóide que inspirou inúmeros derivados que ingressaram no mercado dos fármacos oncológicos (proveniente de *Camptotheca acuminata*) (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998).

Neste contexto é importante mencionar que a indústria farmacêutica motivada em parte pela descoberta desses medicamentos reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente, pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional. Dentre alguns exemplos, temos as substâncias enantiomericamente puras, sintetizadas pelas plantas (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Em função desses dados a indústria farmacêutica investiu bastante em programas de prospecção, mesmo tendo em conta que a pesquisa de novos fármacos é um investimento de alto custo, e assim os Produtos Naturais ganham seu espaço como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos. (FARDELONE e BRANCHI, 2006). Com objetivos de otimizar a busca de princípios ativos de maneira racional, na década de 80, houve um redirecionamento de todo o processo de seleção de produtos bioativos, no que se denominou de “busca racional

de drogas” pelo uso de fracionamento guiado por bioensaios específicos para enzimas, receptores, DNA, etc, e também motivado pelo conhecimento do mecanismo de ação de novas substâncias bioativas (bioactives new chemical entities – BIONCEs). Nos anos noventa, os avanços de tecnologias de “highthroughput” (HTS) associados a química combinatória, biotecnologia e estudos genômicos mudou completamente o panorama da pesquisa de Produtos Naturais praticada nos países industrializados. A fitoquímica deixou de ser o alvo, pois eram necessários estudos mais abrangentes sobre a função, regulação e natureza desses produtos naturais. A biossíntese bem reconhecida de muitas classes foi o elo de transição para o entendimento de processos moleculares. A corrida vertiginosa por novos protótipos de fármacos gerou as já conhecidas “fábricas de descoberta de produtos bioativos” onde centenas de extratos poderiam ser testados em um único dia (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Diante do exposto fica claro que a descoberta de produtos naturais bioativos constitui, não apenas uma necessidade de sua identificação própria, mas contribuir para o conhecimento de NCEs que podem ser usadas como matrizes para a descoberta de novos fármacos. É importante salientar que esse NCEs não será necessariamente, uma substância matriz e, certamente, não será um fármaco, pois é muito provável que um produto natural de uma espécie vegetal tenha que sofrer, racionalmente, modificações moleculares na estrutura desse protótipo (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Considerando que um programa de descoberta de novos fármacos de origem vegetal é um processo muito longo, complexo e de alto custo e reconhecendo a importância destes produtos como fonte inigualável de diversidade estrutural de constituintes químicos das mais variadas classes, capaz de construir moléculas de alta complexidade estrutural, com absoluta quimio, regio e estereosseletividade, grupos de pesquisadores do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF/UFPB), estudam, dentre outras, a família Fabaceae, família esta, possuidora de um grande número de espécies, sendo uma das maiores em dicotiledôneas e a terceira maior família das angiospermas (LEWIS, et al. 2005).

Estudos fitoquímicos realizados anteriormente com essa família no LTF demonstram uma variedade de constituintes químicos (Figura 1), destacando-se os esteróides δ amirona **(1)** (ROMERO, 2008), calenduladiol **(2)** (MAIA, 2008), os flavonóides pachipodol **(3)** (NUNES, 2008), 4'-O-metil sigmoidina B **(4)** (CABRAL,

2009), diploflavona **(5)** (ALMEIDA, 2005), diplotropina (ALMEIDA, 2003) **(6)**, os alcalóides erisovina **(7)** (CABRAL, 2009), bowdichina **(8)** (BARBOSA FILHO, 2004), a feofitina 15¹ hidroxi-feofitina a **(9)** (NUNES, 2008), entre outros.

A partir do estudo fitoquímico, foi possível também a realização de alguns testes farmacológicos, podendo citar os testes em músculo liso com o flavonóide diplotropina **(6)**, que apresentou atividade espasmolítica em íleo de cobaia mediada pelo bloqueio de canais de cálcio (LIMA et al., 2005) e com o extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *M. paraibana*, que apresentou efeito espasmolítico não seletivo nos órgão testados (aorta de rato, útero de rata e Íleo de cobaia) e espasmogênico em íleo de cobaia (SIQUEIRA et al., 2006).

Diante destes dados e na premissa de encontrar novos constituintes químicos que poderão servir como modelos estruturais para novos NCEs, objetivamos neste trabalho, dar continuidade ao estudo da família Fabaceae, com o estudo fitoquímico da espécie *Piptadenia stipulaceae*.

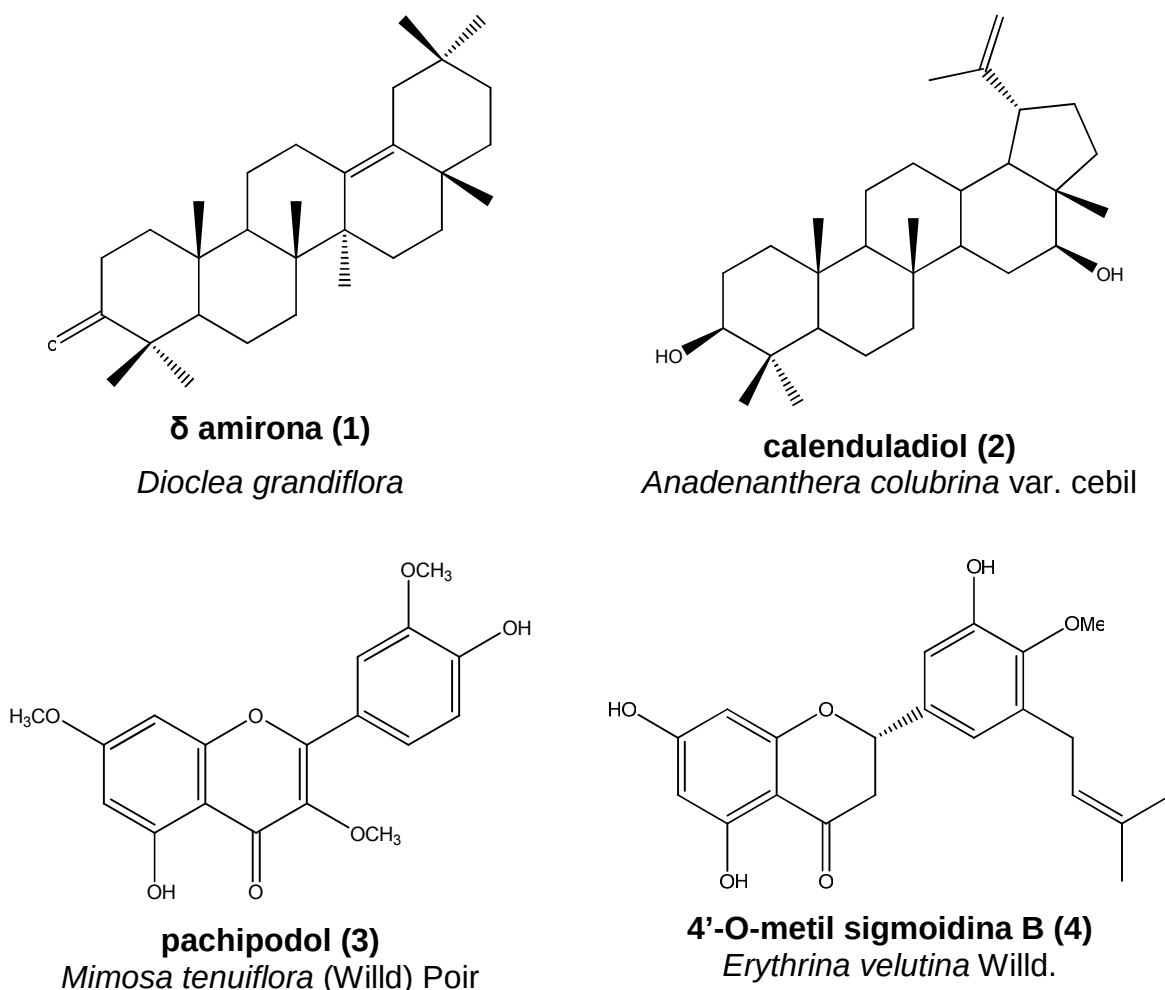
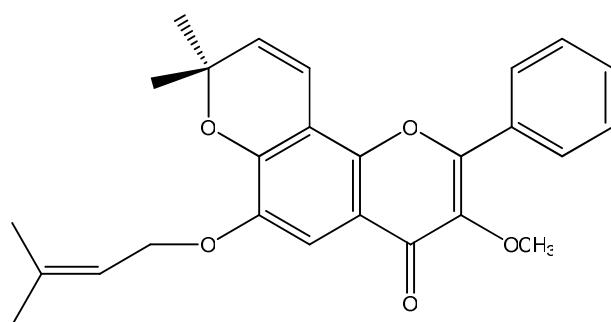
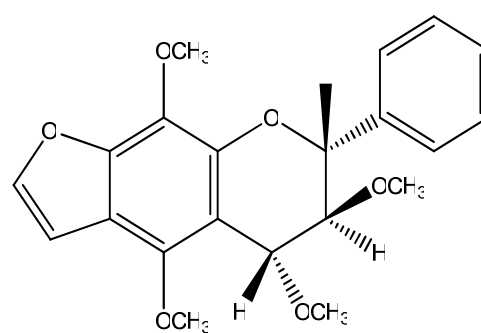


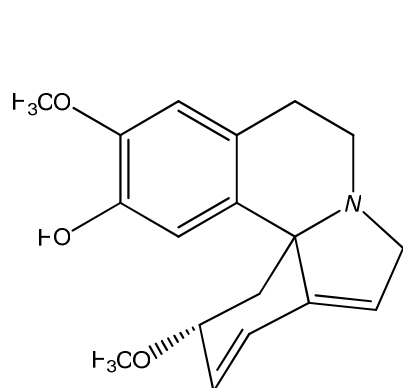
Figura 1. Alguns dos constituintes químicos isolados da família Fabaceae no LTF.



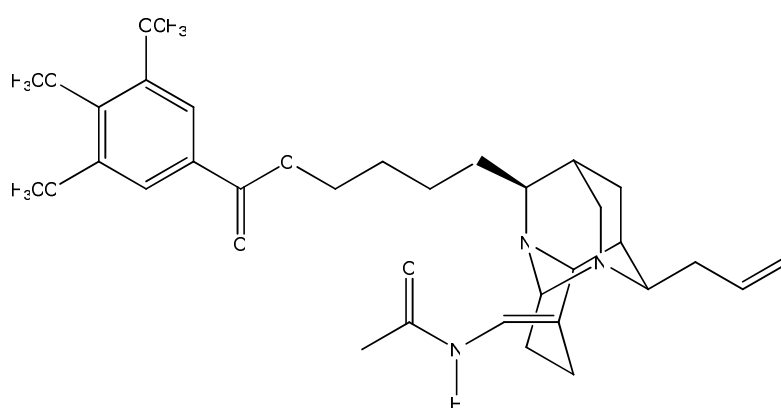
diploflavona (5)
Diploptis ferruginea Benth



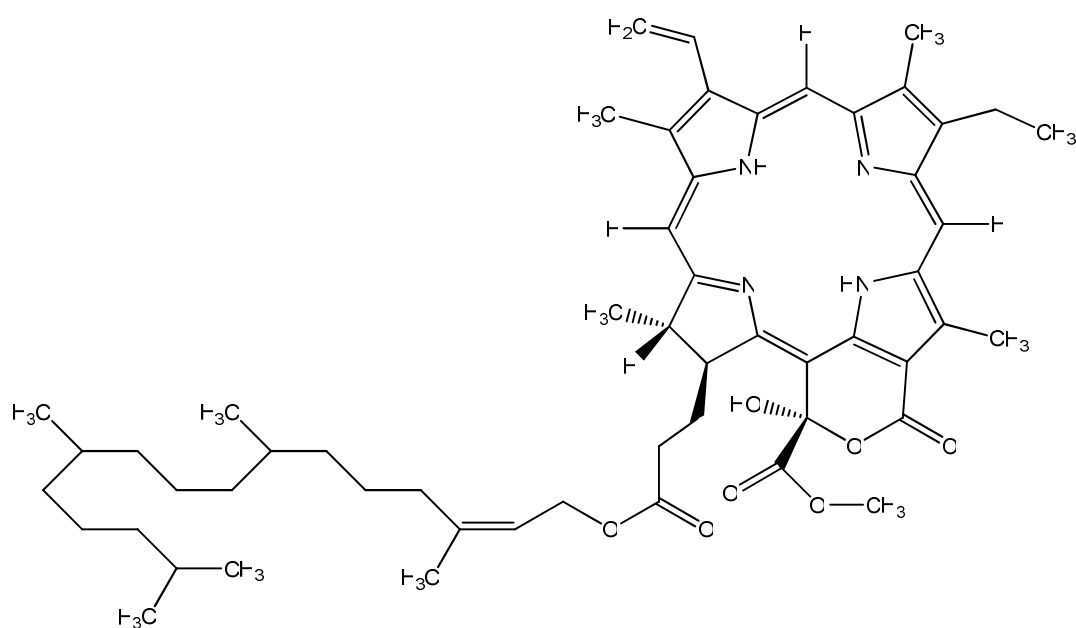
diplotropina (6)
Diploptis ferruginea Benth



erisovina (7)
Erythrina velutina Willd



Bowdichina (8)
Bowdichia virgilioides Kunt



15¹ hidroxi-feofitina a (9)
Mimosa paribana Barneby

Figura 1. Continuação

**FUNDAMENTAÇÃO
TEÓRICA**

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Considerações sobre a família Fabaceae

Fabaceae é uma grande família com 750 gêneros e mais de 18.000 espécies no mundo (WINK, 2003), com exceção das regiões Ártica e Antártica, está difundida pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta e em zonas áridas ou semi-áridas (Figura 2). Em número de espécies, é uma das maiores em dicotiledôneas e é a terceira maior família das angiospermas, ocorrendo em um grande número de habitats (HEYWOOD, 1996). No Brasil está representada por aproximadamente 188 gêneros e 2.100 espécies, distribuídas em quase todas as formações vegetais (LEWIS, et al. 2005). No entanto, as espécies que compõe esta família se diferenciam entre as áreas, não só quanto à ocorrência, mas, sobretudo, quanto à abundância (TUCKER, 2003).



Figura 2. Mapa de distribuição da família Fabaceae, representada nas áreas pintadas (In: Missouri Botanical Garden).

Esta é a terceira maior família de plantas com floração, embora seja a maior em termos de diversidade das formas e número de habitats. As leguminosas são bastante conhecidas por sua importância agrícola e econômica, representada por sua diversidade de espécies que são usadas para adubação (*Cajanus cajan*)(Figura 3.a), ornamentação (*Tipuana tipu*)(Figura 3.b), alimentação (*Phaseolus vulgaris*)(

Figura 3.c), madeira (*Amburana cearensis*)(Figura 3.d), combustível (*Mimosa caesalpiniaefolia*)(Figura 3.e) (LEWIS et al., 2005). Ecologicamente esta família é importante em uma diversidade de ecossistemas, algumas de suas subfamílias estão presentes e muitas vezes dominante, em quase todo tipo de vegetação da terra, de florestas tropicais a desertos (WOJCIECHOWSKI, 2003).

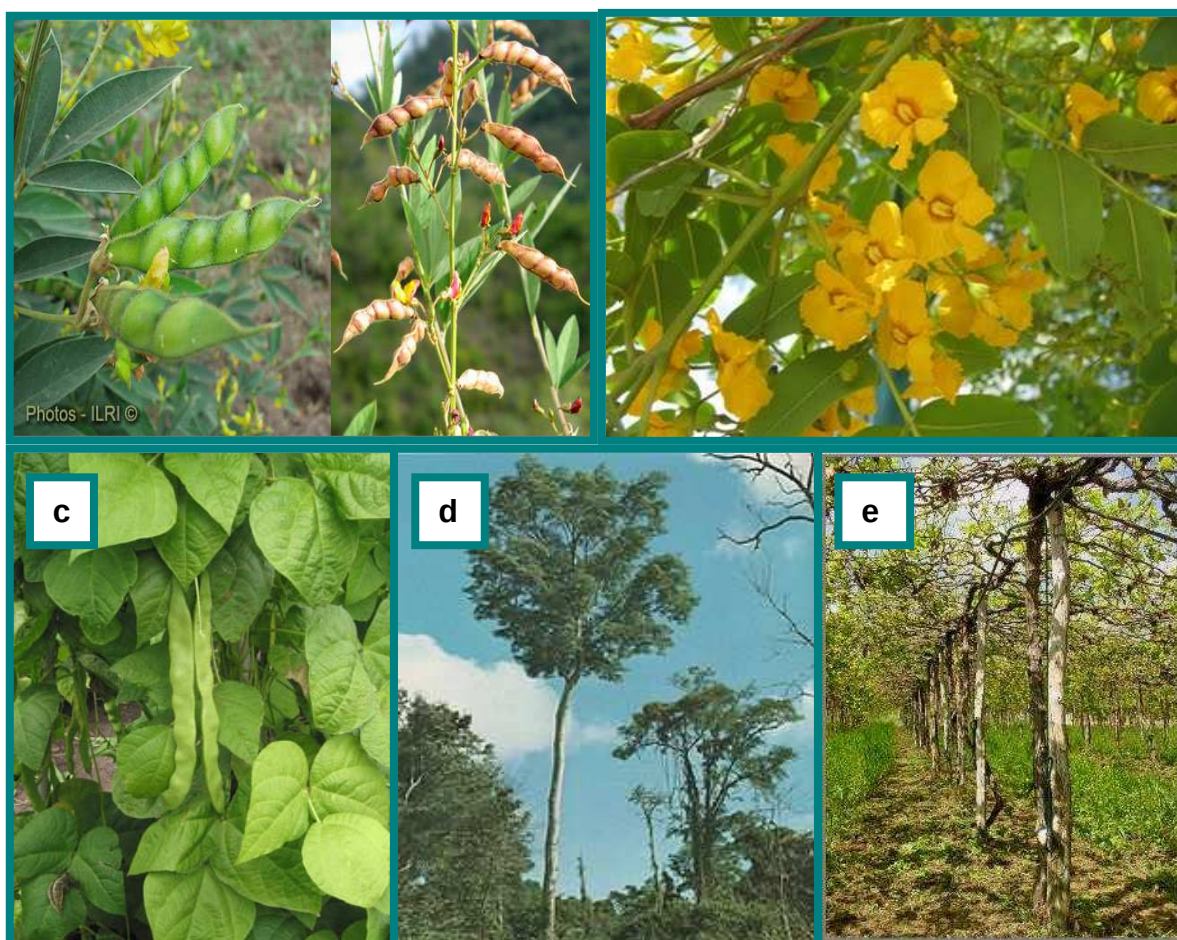


Figura 3. Espécies de Leguminosae com importância agrícola e econômica: a) *Cajanus cajan*; b) *Tipuana tipu*; c) *Phaseolus vulgaris*; d) *Amburana cearensis*; e) *Mimosa caesalpiniae folia* (Fonte: <http://images.google.com.br>).

A caatinga é a vegetação predominante no Nordeste do Brasil, com clima semi-árido, apresenta uma heterogeneidade marcante com várias fisionomias, o que faz dela um ambiente de extrema importância biológica. A família Fabaceae é de grande relevância para a caracterização fisionômica dos diversos ambientes no domínio das caatingas. Estudos recentes enfatizam a distinção de sua flora em diferentes tipos de sedimento, abrindo caminho para uma nova visão em termos de

florística e estimulando estudos de análise de similaridade. Na caatinga nordestina, estão catalogados até o momento 77 gêneros e cerca de 300 espécies desta família, representando aproximadamente um terço da vegetação e diversos representantes possuem grande potencial econômico como recurso forrageiro durante a seca, por ser o principal componente da diversidade vegetal do ambiente (CÓDULA et al., 2008).

O cariri paraibano contém um total de 396 espécies, distribuídas em 90 famílias botânicas, sendo 85 famílias de Angiospermas. Porém a família mais diversa é a Fabaceae, com 71 espécies (BARBOSA et al., 2007).

A circunscrição de Fabaceae e sua divisão em famílias ou subfamílias têm sido de divergências entre diferentes autores. Mas tradicionalmente foi reconhecida segundo Grupo para a Filogenia das Angiospermas (APG-II) como uma única família, com três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae ou Faboideae. (SOUZA e LORENZI, 2008). A subfamília Caesalpinioideae, bastante típica na flora amazônica e pobremente representada no Nordeste brasileiro, compreende 170 gêneros e cerca de 3.000 espécies. A Papilionoideae é a maior das três subfamílias, com 455 gêneros e cerca de 12.000 espécies. Alguns gêneros são característicos da flora amazônica e outros do Nordeste brasileiro. Mimosoideae é bastante rica em espécies no Nordeste brasileiro, compreendendo 65 gêneros e cerca de 3.000 espécies (TUCKER, 2003), nas quais destacamos a espécie *Piptadenia stipulacea* como objetivo deste trabalho.

A subfamília Mimosoideae possui grande importância na fixação de nitrogênio com microrganismos, por apresentar maior incidência de gêneros com capacidade para associação simbiótica facultativa com bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*, denominadas genericamente rizóbio, fornecendo assim subsídios para a fixação do N₂ atmosférico (KLEIN, 2000). Logo, esse alto potencial de nodulação com o nitrogênio, justifica a grande diversidade de alcalóides já isolados nesta família. Entretanto é bastante reportado que a classe dos flavonóides, também se destaca como marcador taxonômico. Dentre estes são encontrados flavonóis, flavonóis glicosilados, flavonas, isoflavonas, chalconas, entre outros. Já na classe dos alcalóides encontram-se alcalóides derivados da fenilalanina, da tirosina e do triptofano entre outros (HARBONE, 1971). Além dos alcalóides e flavonóides, já foram relatados, vários outros tipos de

metabólitos, tais como aminoácidos não proteicos, aminas, cumarinas, antraquinonas, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, glicosídeos cianogênicos, entre outros (WINK, 2003).

2.2 Considerações sobre a subfamília Mimosoideae e o gênero *Piptadenia*

A subfamília Mimosoideae à qual pertence a espécie *Piptadenia stipulaceae*, é a menor das subfamílias das leguminosas, compreendendo 65 gêneros e abrangendo aproximadamente 3.000 espécies (TUCKER, 2003), distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e cáldo-temperadas do globo (SOUZA e LORENZI, 2008). Esta subfamília caracteriza-se botanicamente como árvores, arbustos (principalmente) e ervas (raramente), resinosas ou não resinosas. Suas folhas são verdes o ano todo, suas flores são pequenas, bissexuais ou raramente unissexuais e seu fruto é usualmente um legume. Numerosas espécies são importantes economicamente, servindo como, ornamentais, madeira, forragem para ração animal, especialmente nas regiões áridas e nos continentes subdesenvolvidos (NEILSON, 1992).

No Brasil destacam-se as espécies dos gêneros *Mimosa*, *Acacia*, *Calliandra*, *Inga*, *Pithecellobium*, *Prakia*, *Piptadenia* e *Stryphnodendron*, muitos deles de valor medicinal (BARROSO, 1991). Suas espécies, geralmente ocupam os primeiros lugares na maioria dos levantamentos florísticos, realizados em ecossistemas de caatinga, onde em muitas delas no fim da estação chuvosa, suas flores, na maioria bem alvas, se tornam características na paisagem (PEREIRA et al., 2001). No Cariri Paraibano, esta subfamília é apresentada por 14 espécies, pertencentes a sete gêneros: *Acácia*, *Adenanthera*, *Chloroleucon*, *Mimosa*, *Piptadenia*, *Parapiptadenia* e *Prosopis* (BARBOSA et al., 2007).

O gênero *Piptadenia* compreende cerca de 80 espécies (CARDOZO, 2006) de árvores, arbustos e trepadeiras, muitas nativas da América tropical, tais como *Piptadenia stipulacea*, *Piptadenia gonoacantha*, *Piptadenia moniliformis* Benth, *Piptadenia viridifolia* (JOBSON e LUCKOW, 2007). No Brasil ocorrem nos estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo. (CARDOZO, 2006). Todavia, várias espécies, incluindo: *Piptadenia*

peregrina, *Piptadenia macrocarpa*, *Piptadenia rigida*, *Piptadenia vidiflora*, *Piptadenia paraguayensi* e *Piptadenia africana* estão distribuídas na África tropical, do Senegal a Angola e em todo o Congo (Figura 4). Apenas a última espécie é encontrada em Camarões (MBOUANGOUERE et al., 2007).



Figura 4. Mapa de distribuição do gênero *Piptadenia*, representada nas áreas verdes (In: Missouri Botanical Garden).

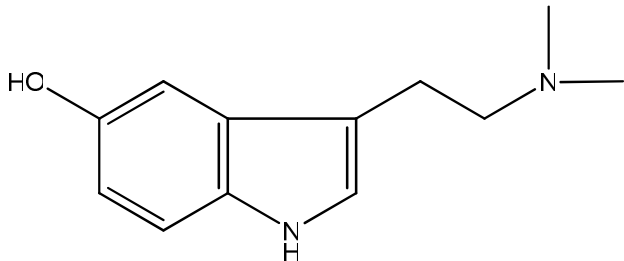
O gênero *Piptadenia* despertou o interesse dos cientistas por seu uso na preparação do rapé (pó usado para inalação). Isto foi evidenciado desde a chegada de Cristóvão Colombo no novo mundo, quando Ramón Pane descreveu a inalação de um rapé narcótico pelos nativos das Ilhas do Caribe ao parecer preparado com espécies de *Piptadenia*. O mesmo era observado por muitas tribos indígenas da América do Sul, onde o pó obtido a partir de sementes torradas de *Piptadenia peregrina*, chamada por eles de cohoba, paricá ou yopo, quando inalado na forma de rapé produziam êxtase e alucinações. Só em 1954, através do trabalho de Stromberg, foi relatado a presença do alcalóide indólico 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina (Bufotenina), o então responsável pelo efeito alucinógeno (HENKER e HUSTON, 1950).

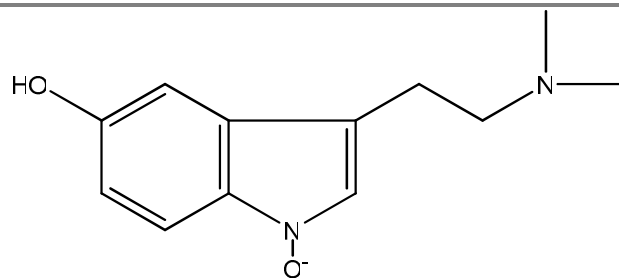
Entretanto, um dos primeiros trabalhos fitoquímicos no gênero, foi a determinação do conteúdo de taninos na espécie *Piptadenia cebil* (ZELADA e CONI, 1915), o que justifica até hoje as espécies do gênero *Piptadenia* serem utilizadas na indústria dos curtumes por possuírem a casca rica em taninos (CARDOZO, 2006).

Do ponto de vista etnomedicinal, o extrato aquoso da espécie *Piptadenia africana* (Fabaceae) Bark Guinea é usado externamente para o tratamento da gonorréia (AKENDENGUE, 1992). Já as folhas de *Piptadenia macrocarpa* (Fabaceae) Leaf Brazil é reportado como tóxico ao gado (CANELLA, et al., 1966).

Segundo levantamento bibliográfico feito no Chemical Abstracts, Biological Abstracts e banco de dados NATural PProducts ALERT (NAPRALERT), a química deste gênero é composta por diferentes classes de substâncias (Tabela 1). Estudos com diferentes espécies como *Piptadenia colubrina* Benth, *Piptadenia communis*, *Piptadenia contorta*, *Piptadenia excelta*, *Piptadenia falcata*, *Piptadenia leptostachya*, *Piptadenia macrocarpa*, *Piptadenia moniliformis* e *Piptadenia peregrina* mostraram que os alcalóides são os compostos majoritários do gênero *Piptadenia*, devido a presença de diferentes tipos de alcalóides indólicos nestas espécies. Outros metabólitos secundários que merecem destaque por sua presença no gênero são os esteróides, encontrados nas espécies *Piptadenia gonoacantha* e *Piptadenia macrocarpa* e os flavonóides encontrados nas espécies *Piptadenia africana*, *Piptadenia cebil*, *Piptadenia gonoacantha*, *Piptadenia macrocarpa* e *Piptadenia rígida*. Essa pesquisa bibliográfica permitiu constatar que os alcalóides, quando presentes na espécie, são encontrados predominantemente nas sementes. Os trabalhos mais recentes, certamente usando técnicas mais eficientes de análise, não têm detectado alcalóides nas outras partes de espécies desse gênero. Mas, entretanto, têm registrado a ocorrência de constituintes de outras classes de metabólitos especiais.

Tabela 1. Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Piptadenia*.

Substância	Espécie	Partes usadas	Referência
 Bufotenina	<i>P. colubrina</i> Benth	Sementes	PACHTER et al., 1959.
	<i>P. communis</i>	sementes	WILLAMAN e LI, 1970;
	<i>P. contorta</i>		YAMATASO et al., 1972.
	<i>P. excelta</i>	sementes	IACOBUECCI e REVEDA, 1964; WILLAMAN e LI, 1970.
	<i>P. falcata</i>	sementes	GIESBRECHT, 1960;
	<i>P. leptostachya</i>	sementes	WILLAMAN e LI, 1970.
	<i>P. macrocarpa</i>	sementes e vagens	FISH et al., 1955.; IACOBUECCI e REVEDA, 1964.; RENDON e WILLY, 1985.; WILLAMAN e LI, 1970.
	<i>P. moniliformis</i>	sementes	YAMATASO et al., 1972.
	<i>P. peregrina</i>	sementes	FISH et al., 1955.; PARIS, 1967.; STROMBERG, 1954.
			continua



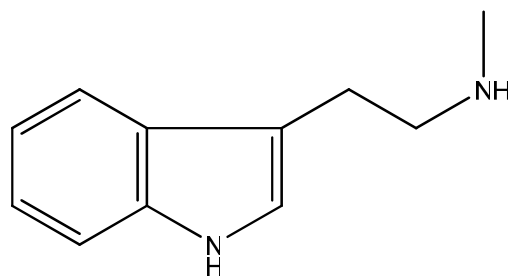
óxido de bufotenina

P. macrocarpa

sementes e cascas

IACOBUCCI e REVEDA,
1964.*P. peregrina*

sementes

FISH et al.,1955. ; PARIS,
1967.óxido de *N,N* dimetiltriptamina*P. macrocarpa*

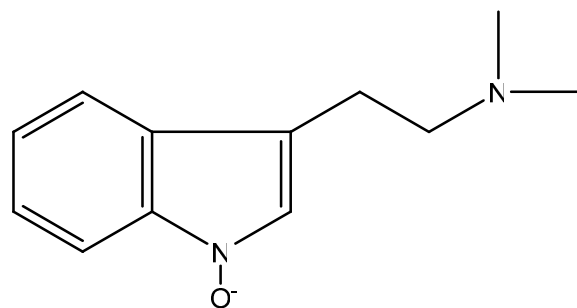
sementes

FISH et al.,1955.

P. peregrina

sementes

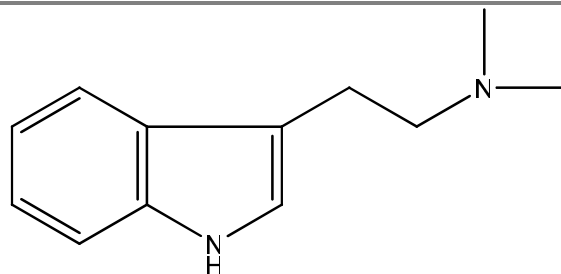
FISH et al.,1955.

*N*-metiltriptamina*P. peregrina*

Cascas

LEGLER e TSCHESCHE,
1963.

continua

**N,N-dimetiltriptamina**

P. excelta
P. macrocarpa

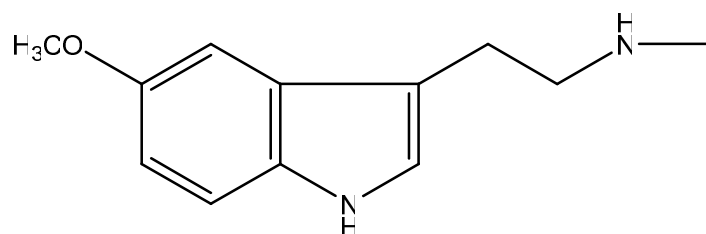
sementes
vagens e sementes

WILLAMAN e LI, 1970.
FISH et al., 1955. ;
IACOBUCCI e REVEDA,
1964.; WILLAMAN e LI,
1970.

P. peregrina

vagens e sementes

FISH et al., 1955. ; PARIS,
1967.

**5-metoxi-N-metiltriptamina**

P. peregrina

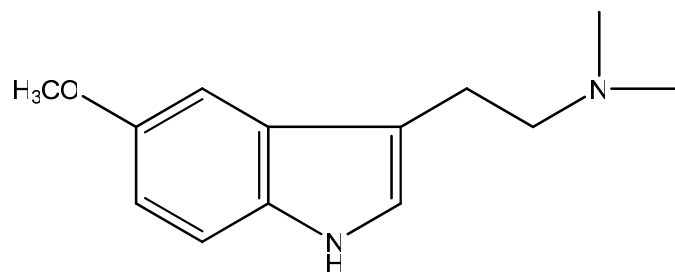
cascas

LEGLER e TSCHESCHE,
1963.

P. macrocarpa

cascas

IACOBUCCI e REVEDA,
1964.

**5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina**

P. peregrina

cascas

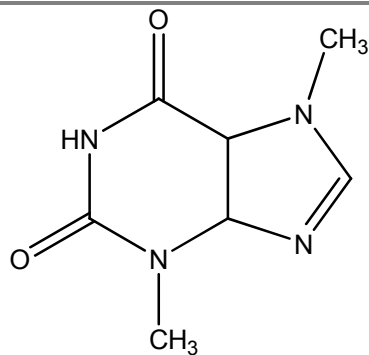
LEGLER e TSCHESCHE,
1963.

P. macrocarpa

cascas

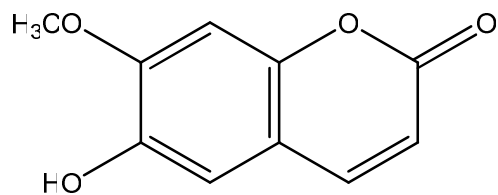
IACOBUCCI e REVEDA,
1964.

Continua

**Tebromina***P. leprostachya*

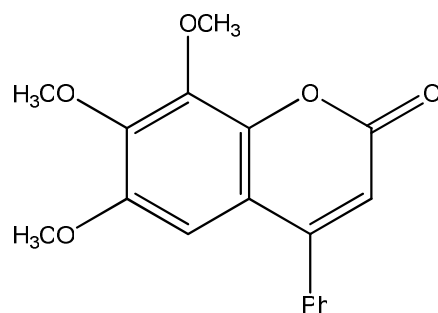
Sementes

YAMATASO et al., 1972.

**Dalbergenina***P. macrocarpa*

Madeira

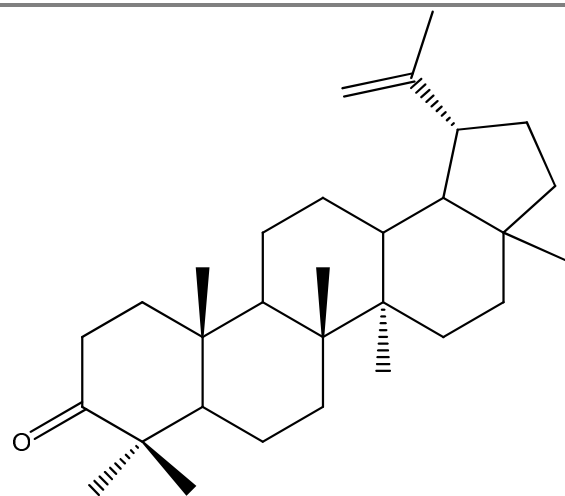
MIYAUCHI et al., 1976.

**Kuhlmannina***P. macrocarpa*

Madeira

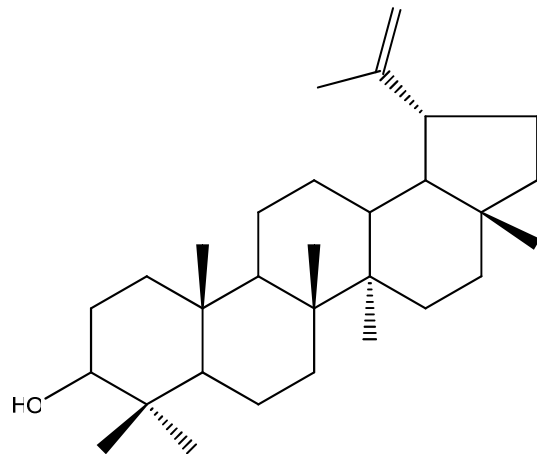
MIYAUCHI et al., 1976.

Continua

**Lupeona***P. macrocarpa*

Madeira

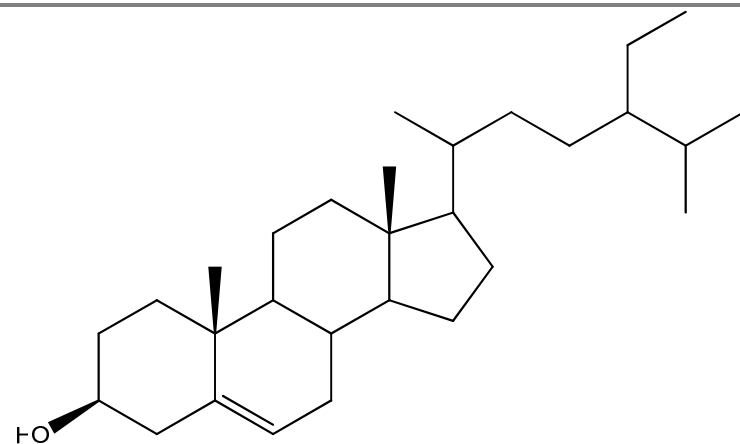
MIYAUCHI et al., 1976.

**Lupeol***P. macrocarpa*

Madeira

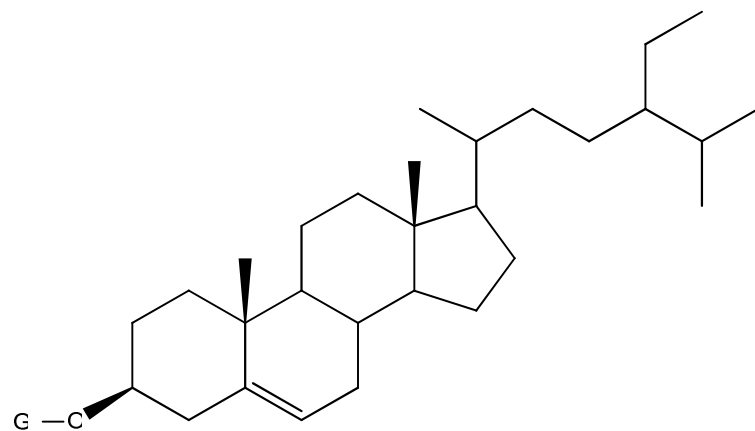
MIYAUCHI et al., 1976.

Continua

**Sistosterol***P. macrocarpa*

Madeira

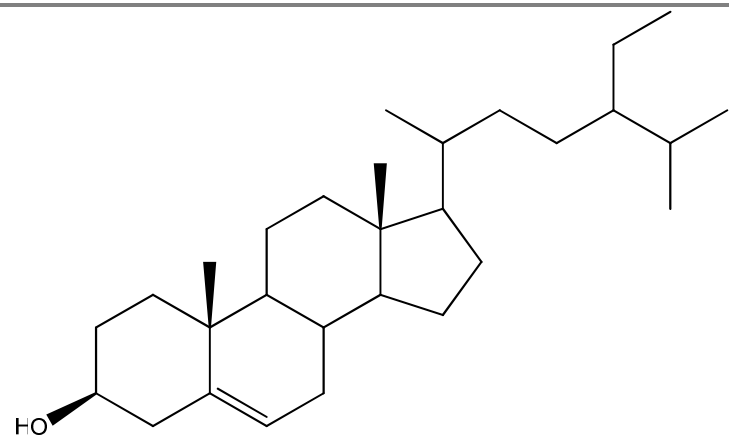
MIYAUCHI et al., 1976.

**3-O-glucopiranosil sistosterol***P. macrocarpa*

Madeira

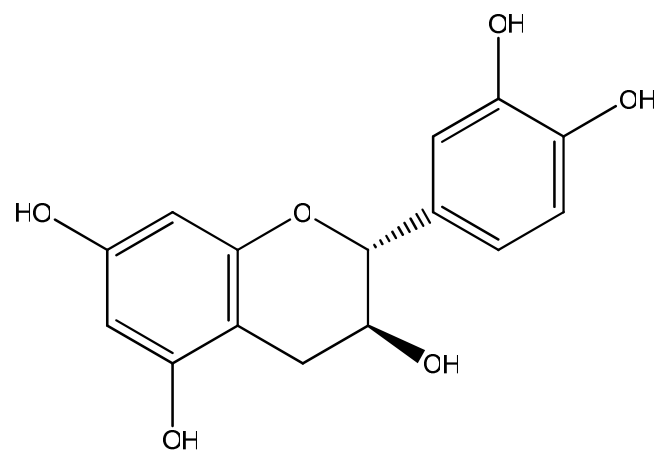
MIYAUCHI et al., 1976.

Continua

**Estigmasterol***P. gonoacantha*

Galhos

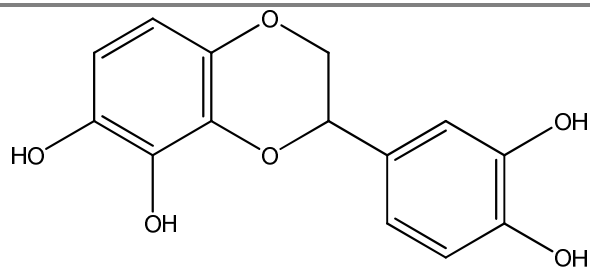
CARDOZO, 2006.

**Catecol***P. cebil*

Casca

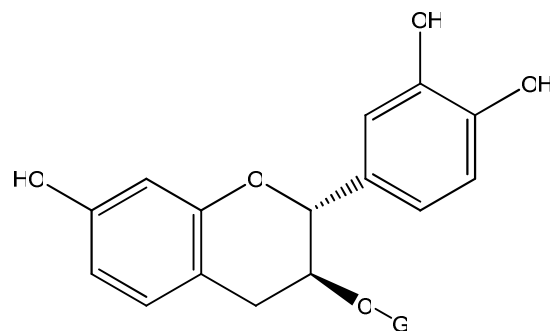
ZELADA e CONI, 1915.

Continua

**7,8,3', 4' tetraidroxiflavonona***P. rígida*

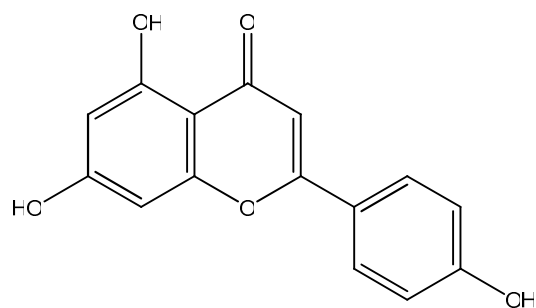
Casca

ALVES et al., 2003.

**Anadantosídeo***P. macrocarpa*

Casca

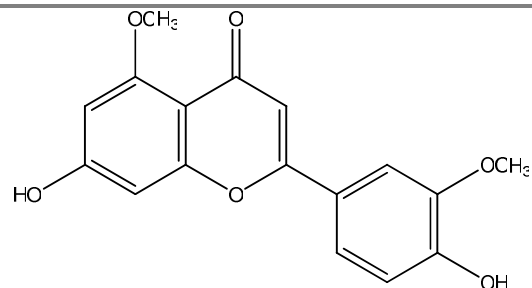
PIACENTE et al., 1999.

**Apigenina***P. gonoacantha*

Galhos

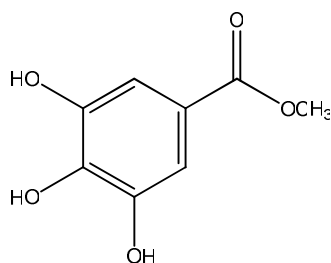
CARDOZO, 2006.

Continua

**5,3'-dimetil-apigenina***P. gonoacantha*

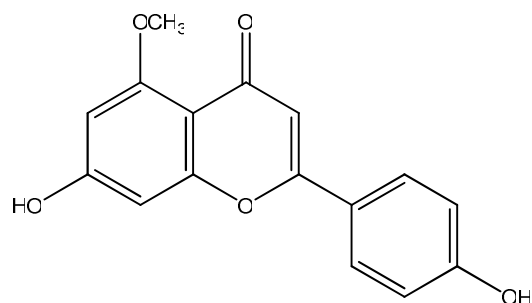
Galhos

CARDOZO, 2006.

**galato de metila***P. gonoacantha*

Galhos

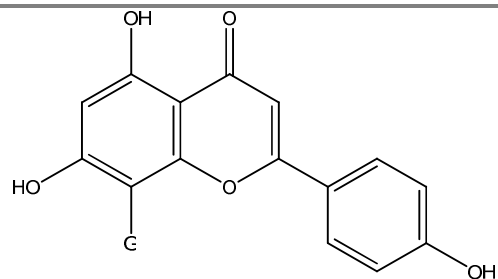
CARDOZO, 2006.

**5-metil-apigenina***P. gonoacantha*

Galhos

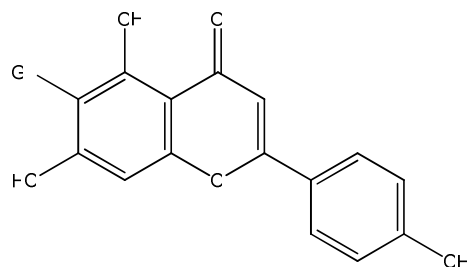
CARDOZO, 2006.

Continua

**Vitexina***P. gonoacantha*

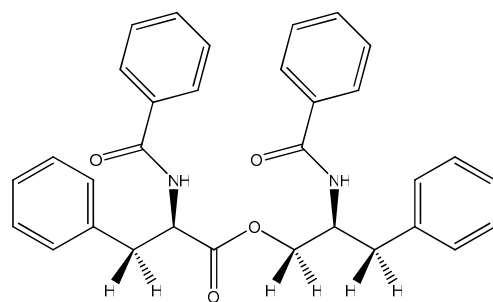
Folhas

CARDOZO, 2006.

**Isovitexina***P. gonoacantha*

Folhas

CARDOZO, 2006.

**N-benzoylphenylalaninato
de N-benzoylphenylalaninila***P. gonoacantha*

Galhos

CARDOZO, 2006.

2.3 Aspectos botânicos de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke

Piptadenia stipulacea (Figura 5, Quadro 1) é uma árvore pequena com cerca de 2-4m de altura, com casca castanho-claro, fortemente armada por acúleos vigorosos. Possui folhas alternas, compostas, com 10-16 pares de pinas opostas, cada pina com 2 a 5,5cm de comprimento e com 25-40 pares de folíolos verde-claros, foscos, oblongos, com 3-8mm de comprimento. As flores em espigas possuem de 4-8cm de comprimento, de cor alva, na extremidade dos ramos onde se encontram até três espigas por axila de folha. Seu fruto é uma vagem de cor castanho-pálido, com 8-12cm de comprimento, com superfície ondulada nas áreas onde ficam as sementes. Contém 2-12 sementes pequenas, ovais de cor marrom por vagem. A madeira é de cor clara (BEZERRA, 2008).

É uma planta caducifólia e sua floração ocorre na estação chuvosa, mas pode também ser encontrada na estação seca, seguida pela frutificação que se estende até a estação seca (BEZERRA, 2008).



Figura 5. *Piptadenia Stipulacea* (Benth.) Ducke. A. árvore; B. madeira; C. galhos (In: Centro Nordeste de Informações sobre Plantas).

Divisão: Angiospermae
Classe: Dicotyledoneae
Ordem: Rosales
Família: Fabaceae
Sub-família: Mimosoideae
Gênero: <i>Piptadenia</i>
Espécie: <i>Piptadenia stipulaceae</i> (Benth.) Ducke

Quadro 1. Classificação taxonômica da espécie *Piptadenia stipulaceae* (Benth.) Ducke segundo Grupo para a Filogenia das Angiospermas (APG-II).

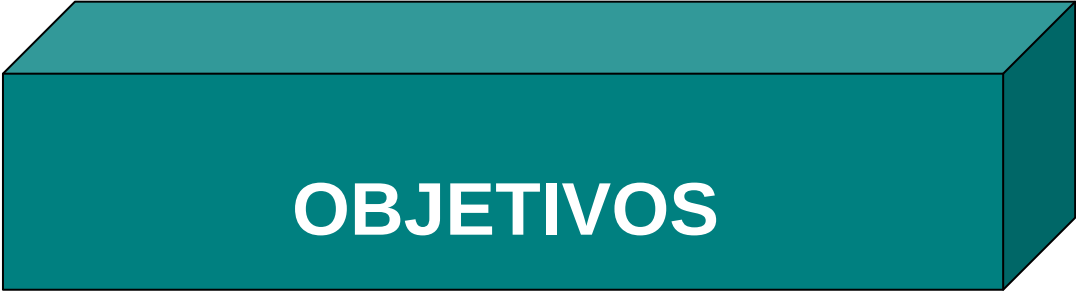
2.4 Generalidades da espécie *Piptadenia stipulaceae* (Benth.) Ducke

A espécie *Piptadenia stipulacea* é conhecida vulgarmente no Nordeste brasileiro como jurema branca (FABRICANTE e ANDRADE, 2007), jurema malícia-da-serra, carcará (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002), calumbi (FLORENTINO et al., 2007) e apresenta ampla distribuição no bioma da caatinga nordestina, ocorrendo do Piauí até a Bahia (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002; BARBOSA, et al. 2007; SANTANA e SOUTO, 2006; VASCONCELOS et al., 1984;). Ela é uma planta pioneira que facilmente ocupa capoeiras e beiras de estrada, sendo tolerante a elevados níveis de perturbação da vegetação (PEREIRA et al., 2001) e é muito utilizada como alimento por ovinos, caprinos e bovinos principalmente na estação seca quando não há pastagens para sua alimentação (BEZERRA, 2008).

A casca do caule e folhas de *Piptadenia stipulaceae* é utilizada na medicina popular nas feridas externas na forma de tintura ou decocto (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002). Seu uso também já foi indicado como cicatrizante (BEZERRA, 2008).

Em testes para avaliar o seu potencial biológico, a folha da *P. stipulacea* apresentou atividade antimicrobiana contra cepas da bactéria *Klebsiella pneumoniae* multiresistentes e o fungo *Candida albicans* (BEZERRA, 2008). Testes com extratos (parte não especificada) apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus faecium* e atifúngica contra *Neurospora crassa* (CHIAPPETA e MELLO, 1984).

Piptadenia stipulaceae apresenta-se com dois sinônimos, *Piptadenia communis* var. *stipulaceae* Benth e *Pityrocarpa stipulacea* (Benth) Brenan. No entanto, pouco se sabe sobre a constituição química do seu metabolismo secundário, visto que, em levantamento bibliográfico feito no Chemical Abstracts, Biological Abstracts, banco de dados NATural PRoducts ALERT (NAPRALERT), bem como, em diversos “sites” de busca na internet até o ano de 2009, o único estudo químico relatado foi o isolamento do alcalóide indólico bufotenina (WILLAMAN e LI, 1970). Este fato, juntamente com a escassez de estudos na área farmacológica, tornou oportuna a investigação fitoquímica com ênfase no isolamento de constituintes químicos bioativos da espécie *Piptadenia stipulaceae*.



OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- Contribuir para o estudo quimiotaxonômico da família Fabaceae através do estudo fitoquímico da espécie *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke e desta forma cooperar para o conhecimento da nossa flora, especialmente a paraibana.
- Identificar e/ou elucidar as estruturas dos constituintes químicos desta espécie, através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais).
- Integrar estudos farmacológicos ao estudo químico de *Piptadenia stipulacea*, através da disponibilização das suas substâncias isoladas para realização de testes de inflamação com o intuito de confirmação do seu uso popular.



MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Métodos cromatográficos

Visando o isolamento químico, foi utilizada a cromatografia de adsorção em coluna (CC), constituída por um tubo de vidro, em posição vertical. O adsorvente empregado foi a sílica gel 60, ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm. As dimensões da coluna dependeram da quantidade de material que foi cromatografado.

Para a análise e separação dos componentes de uma mistura, foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD). Este processo de separação está fundamentado, principalmente no fenômeno de adsorção (COOLINS et al., 2007). Para as cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) e preparativa (CCDP), foram usadas a sílica gel 60 PF₂₅₄, ART 7749 da MERCK, em placas de vidro (20 x 20, 10 x 20, 5 x 20 cm). Em geral a sílica é empregada na separação de compostos lipofílicos, como os fenóis (COOLINS et al., 2007).

Na revelação das placas cromatográficas, foram utilizados reveladores químicos universais e específicos, para detecção de grupos químicos, ou aqueles já consagrados classicamente como é o caso do anisaldeído sulfúrico, vapores de iodo, solução de ácido sulfúrico, vanilina sulfúrica, sulfato sérico, cloreto férrico, hidróxido de potássio 10% EtOH, Dragendorff, Libermann- Bouchard, reativo de Mayer, indicadores fluorescentes bem como, reveladores físicos tais como, lâmpadas UV de curto e longo comprimento de ondas (254 –366 nm) por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58.

Como fase móvel foi utilizado na CC e na CCD os solventes hexano, clorofórmio, diclorometano e metanol (MERCK ou VETEC) isoladamente ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade. Para a escolha dos solventes, foram levadas em consideração as relações de solubilidade dos componentes da mistura a ser cromatografada, e quando necessário, a evaporação dos mesmos foi realizada com rotavapor da marca BUCHI.

4.2 Métodos espectrométricos

Na análise espectral, os espectros de infravermelho (IV) foram registrados em pastilhas de KBr, em espectrofotômetro da marca SHIMADZU, modelo IRPrestige-21 (LTF/UFPB). Já os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C), uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Bruker Ac-500 [500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C)] (CENAUREM/UFC) e VARIAN Mercury 500 [500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C)] (LTF/UFPB). As amostras para análise foram dissolvidas em dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) da MERC. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN de ^1H pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas do solvente $\text{DMSO-}d_6$ ($\delta_{\text{H}} = 2,49$). Os mesmos parâmetros foram utilizados para os espectros de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, $\delta_{\text{C}} = 39,00$).

As multiplicidades das bandas de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *d* (duplete), *t* (triplete), *m* (multiplete).

4.3 Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram determinados sem correção de valores em aparelho com bloco de platina em microscópio óptico tipo “Kofler”, marca REICHERT, modelo R3279, com temperatura que varia de 0-350°C.

4.4 Coleta do material botânico

As partes aéreas foram coletadas no município de Serra Branca, no estado da Paraíba, em abril de 2005 e identificadas pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra do setor de Botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes Medeiros” (LTF/UFPB). A exsicata da espécie foi codificada e depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba (JPB) sob o código Coleção Agra et al. 3331 (JPB).

4.5 Processamento do material botânico

O material vegetal foi dessecado em estufa com ar circulante, à temperatura média de 40 °C, por cerca de 72-96 horas. Após a completa secagem, o material foi pulverizado em moinho de lâminas cortantes, obtendo-se um material vegetal seco e pulverizado, pesando 1,200 Kg.

4.6 Preparação do extrato

O material vegetal seco e pulverizado (1,200 kg) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95 %, em um recipiente de aço inoxidável (Figura 6). Foram feitos vários processos de extração num intervalo de 72 horas entre eles, para garantir uma máxima extração dos constituintes químicos. Esta solução etanólica foi filtrada, fazendo-se em seguida, a evaporação do solvente com o auxílio de um rota-evaporador (Figura 7) a uma temperatura média de 50 °C. Assim, o extrato etanólico bruto obtido, foi solubilizado em um mistura de MeOH:H₂O (3:7 v/v) através de um agitador mecânico por 60 minutos, obtendo-se a solução hidroalcoólica, a qual foi submetida a um processo de partição líquido-líquido (Fluxograma 1) com solventes de polaridades crescentes como hexano, clorofórmio e acetato de etila, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades. Com o objetivo de localizar os princípios ativos, as fases semi-puras foram testados pelo Laboratório de Farmacologia e Imunologia (LAFI) da Universidade Federal de Alagoas, e aquele que apresentou efeito farmacológico de interesse, foi submetido a procedimentos cromatográficos para o isolamento e purificação dos compostos.

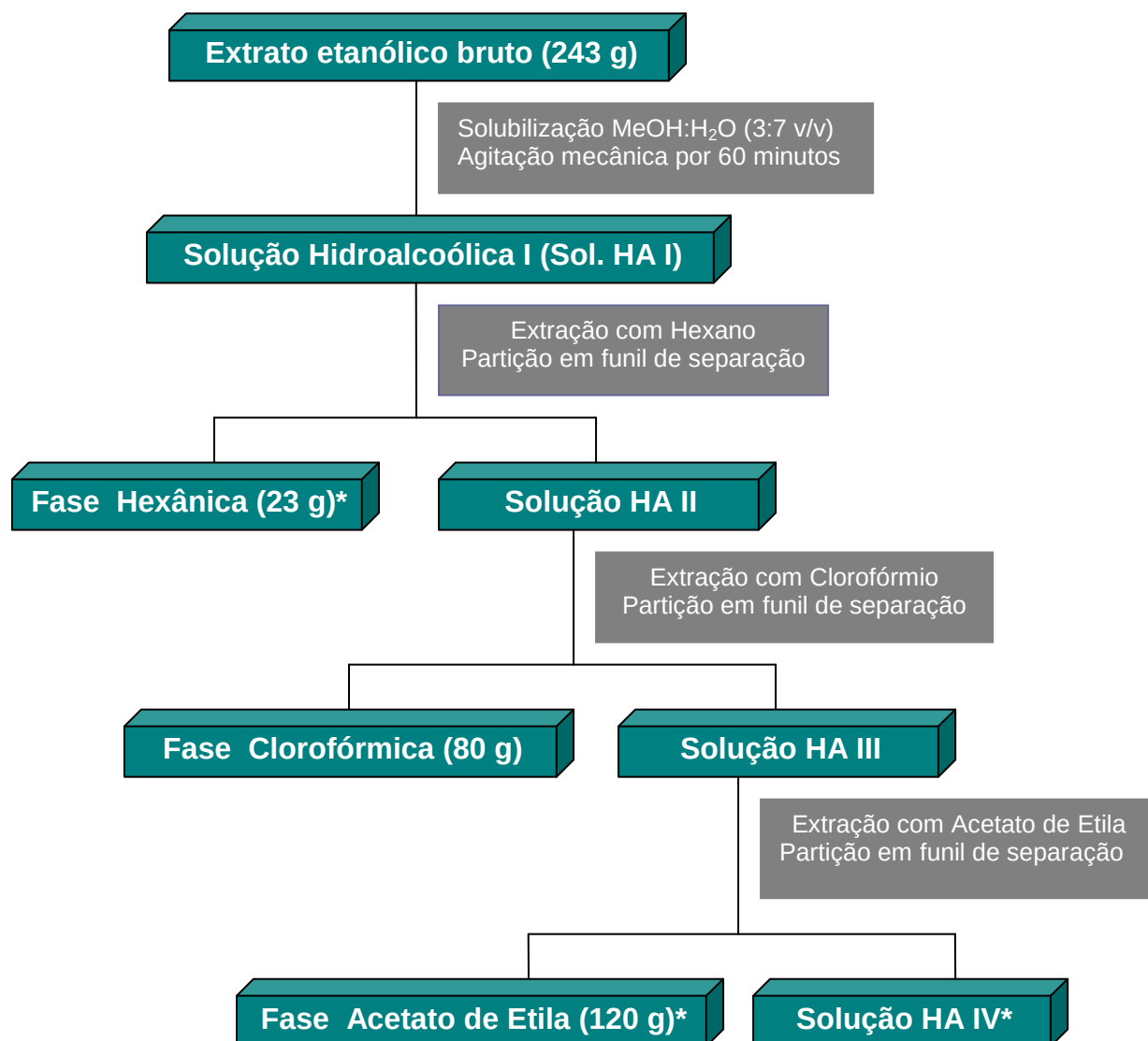


Figura 6. Percolador de aço inoxidável (Foto: Daysianne Pereira de Lira, 2009).



Figura 7. Rota-evaporador (Foto: Daysianne Pereira de Lira, 2009).

FLUXOGRAMA 1: Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke.



* Fases reservadas para estudos posteriores.

4.7 Avaliação fitoquímica preliminar dos constituintes químicos

A avaliação fitoquímica auxilia no conhecimento dos constituintes químicos de espécies vegetais e pode indicar grupos de metabólitos secundários de interesse farmacológico. Esta triagem procurou sistematizar, ou rastrear os principais grupos de constituintes químicos que compõem um extrato vegetal. Este é um exame rápido

e qualitativo através de reagentes de coloração e/ou precipitação que revela ou não a presença de metabólitos secundários presentes em um extrato. A triagem fitoquímica preliminar, com vistas ao estabelecimento da possível natureza química dos compostos existentes, foi realizada com o extrato etanólico bruto, utilizando a metodologia descrita por Matos (1997). Os resultados da triagem fitoquímica encontram-se sumarizados no Quadro 2.

Grupos químicos	Reagentes	Resultados
Alcalóides	Bouchardat	++
	Mayer	++
	Dragendorff	+++
Esteróides e terpenóides	Ácido sílico-tungstico	++
	Lieberman-Buchard	++
	Cloreto férrico 2%	+++
Taninos	Shinoda	++
Flavonóides	Oxalo-bórico	++
Saponinas	Teste de espuma	+

Quadro 2. Dados referentes à triagem fitoquímica realizada com o extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea*. Legenda: (-) Reação negativa, (+) Reação fracamente positiva, (++) Reação positiva, (+++) Reação fortemente positiva.

4.8 Isolamento e purificação dos constituintes químicos

Parte da fase clorofórmica (40g) foi submetida à diferentes técnicas cromatográficas (fluxograma 2). A princípio, foi empregada a cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC) (Figura 8), utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes os solventes hexano, diclorometano e metanol puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade, obtendo-se 156 frações de 100 mL (Quadro 3), que foram concentradas em rotavapor e reunidas após CCDA de acordo com seu fator de retenção(Rf).

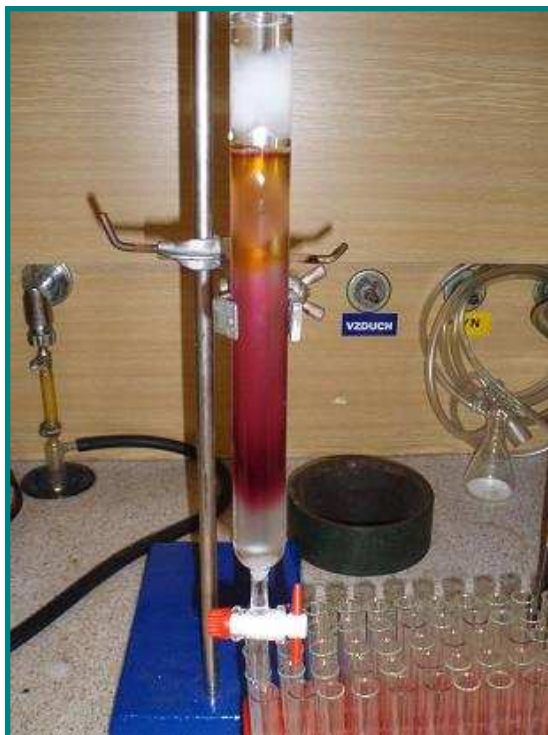


Figura 8. Cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC) (Foto:www.googleimagens.com.br).

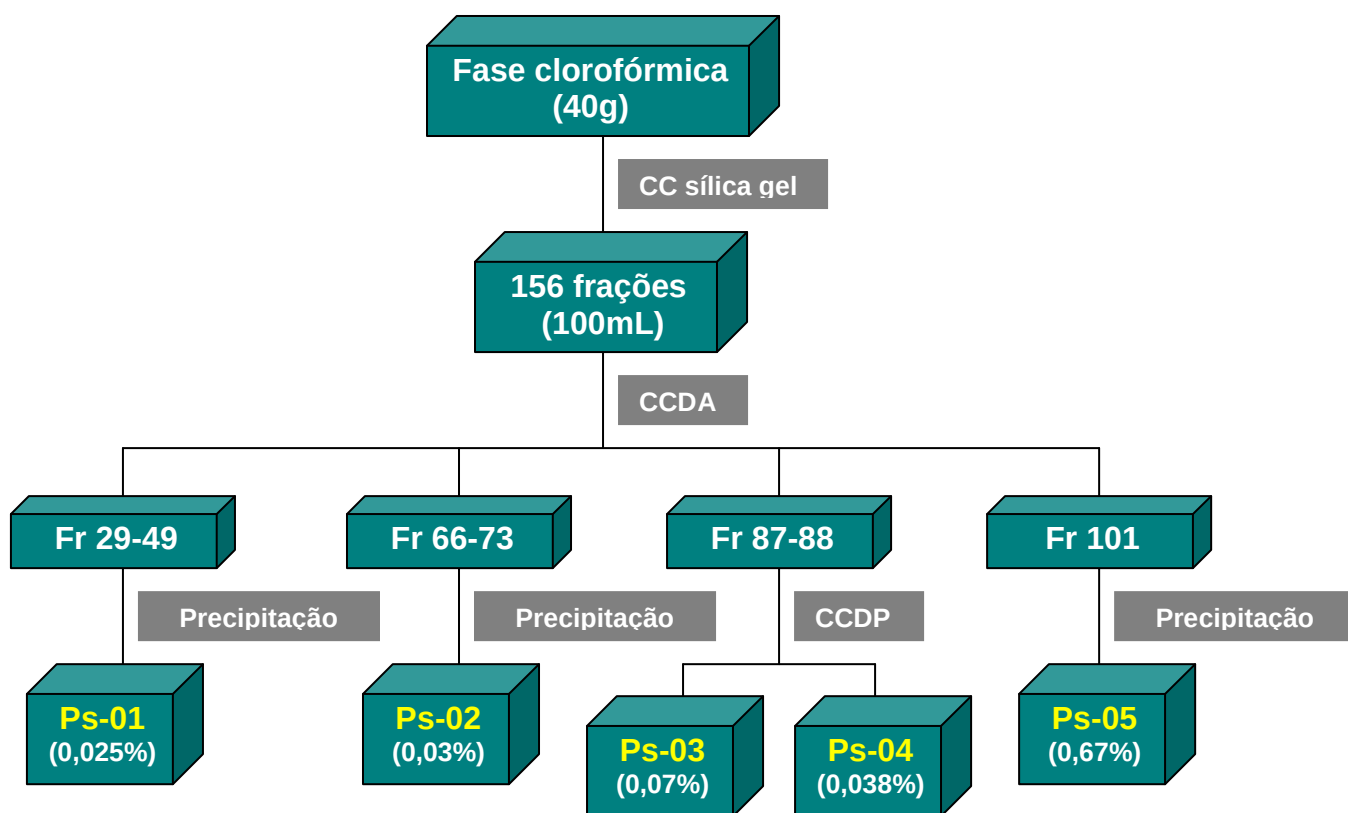
Frações	Solvente	Proporção
1-28	Hexano-Diclorometano	50 : 50 v/v
29-42	Hexano-Diclorometano	30 : 70 v/v
43-70	Diclorometano	100 v/v
71-81	Diclorometano-Metanol	99,5 : 0,5 v/v
82-101	Diclorometano-Metanol	99 : 1 v/v
102-117	Diclorometano-Metanol	98 : 2 v/v
118-121	Diclorometano-Metanol	96 : 4 v/v
122-138	Diclorometano-Metanol	94 : 6 v/v
139-142	Diclorometano-Metanol	92 : 8 v/v
143-147	Diclorometano-Metanol	88 : 12 v/v
148-156	Diclorometano-Metanol	80 : 20 v/v

Quadro 3. Frações obtidas na CC e sistema de solvente utilizado.

Na análise em CCDA, a fração reunida 29-40, apresentou-se como duas manchas. Desta forma, a mesma foi precipitada com metanol obtendo-se um pó amarelo. Após análise novamente em CCDA demonstrou seu grau de pureza pela presença de uma única mancha. E assim, a mesma foi codificada como sendo a substância **Ps-01** (Peso=10mg).

Da mesma forma apresentaram-se as frações 66-73 e 101, que após precipitação com metanol também forneceram um pó amarelo e foram codificadas como sendo as substâncias **Ps-02** (Peso=12mg) e **Ps-05** (Peso=266mg), respectivamente.

A fração 87-88 (Peso=46mg) também apresentou-se como duas machas, entretanto a mesma foi submetida à CCDP, obtendo-se o composto 87-88a (um pó amarelo) e 87-88b (um pó marrom), sendo codificadas como **Ps-03** (Peso=28mg) e **Ps-04** (Peso=15mg), respectivamente.

Fluxograma 2. Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica.

O uso em conjunto de técnicas espectrais como IV, RMN ^1H e ^{13}C aliado ao uso de técnicas sofisticadas de RMN (HMQC e HMBC) permitiu propor a estrutura molecular das substâncias isoladas.

**RESULTADOS E
DISCUSSÃO**

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Substâncias isoladas neste trabalho

O fracionamento do extrato clorofórmico de *Piptadenia stipulacea* permitiu o isolamento e identificação de 5 flavonóides (Figura 10), constituintes químicos estes isolados pela primeira vez no gênero em estudo.

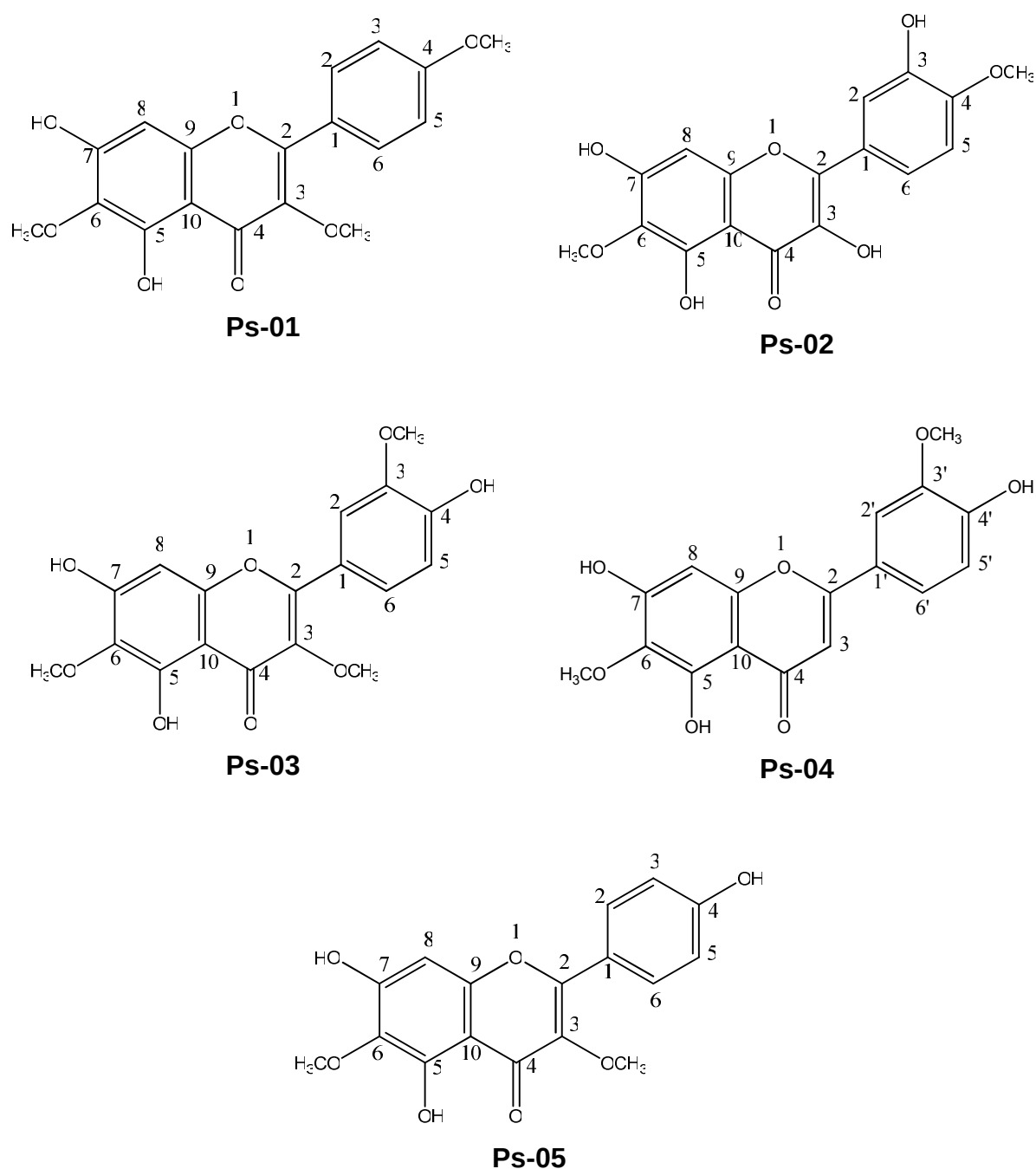


Figura 9. Constituintes químicos isolados de *Piptadenia stipulacea*.

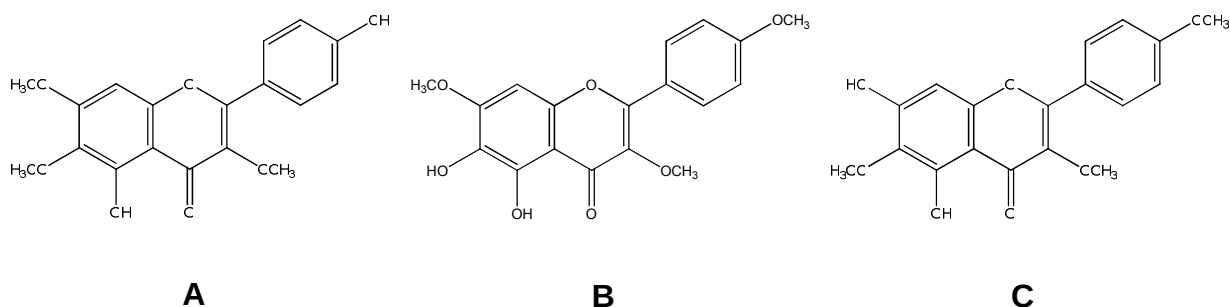
5.2 Identificação estrutural de Ps-01

A substância Ps-01 apresentou-se na forma de pó amarelo claro, solúvel em DMSO e com ponto de fusão de 160,5 °C. A mesma foi identificada através de análise espectral dos dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com os dados encontrados na literatura.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 10, p. 63; Tabela 2, p. 61) de PS-01 em DMSO- d_6 utilizando a técnica Broadening (BB) mostrou a presença de dezesseis sinais, sendo que os sinais em δ_c 114,25 e δ_c 130,00 apresentaram-se dobrados, totalizando, portanto, 18 carbonos. Destes sinais, dez foram atribuídos a carbonos não-hidrogenados, três a carbonos metínicos e três a carbonos metoxilícos. Absorções estas sugestivas de núcleo flavonoídico.

O espectro RMN de ^1H e sua expansão (Figuras 11 e 12, p. 64 e 65; Tabela 2, p. 61) apresentou sinais de hidrogênio característicos de um sistema aromático *para* dissustituído, representado por dois dupletos em δ_H 8,01 e δ_H 7,12 correspondentes aos dois pares de átomos de hidrogênio H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel B de flavonóides, acoplados através de interação spin-spin em *orto* ($J=9,0$ Hz), constituindo um típico sistema AA'BB', confirmado pela presença no espectro de RMN ^{13}C de dois sinais intensos em δ_c 114,25 e δ_c 130,00, sugerindo desta forma uma substituição em C-4'. A presença de três simpletos em δ_H 3,75, δ_H 3,78 e δ_H 3,85 são compatíveis com a presença de três metoxilas na molécula confirmando os deslocamentos químicos no espectro de RMN ^{13}C . Este espectro mostrou ainda, um sinal simples com deslocamento químico de δ_H 6,56 para um hidrogênio aromático, indicando a presença de anel A trissustituído. Foi observado também a presença de um simpleto em região mais desblindada de δ_H 12,72, indicativo de hidroxila quelatogênica com o C-4 da estrutura em análise. A ausência de um simpleto com absorção entre δ_H 6,39 e δ_H 6,94 confirmada pela ausência de absorção na região de δ_c 107,00 no espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 10, p. 63; Tabela 2, p. 61) e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 13, p. 66), característico de carbono metínico, correspondente ao H-3, fez propor que a substância PS-01 tratava-se de um flavonóide do tipo flavonol, com função oxigenada no C-3, podendo a hidroxila quelada está na posição 3 ou 5 do esqueleto flavonoídico.

Esses dados juntamente com os dados apresentados anteriormente, que mostraram a presença de sistema AA'BB' para o anel B, bem como um sistema tetrasubstituído para o anel A do esqueleto em análise, fez propor as seguintes estruturas para Ps-01:

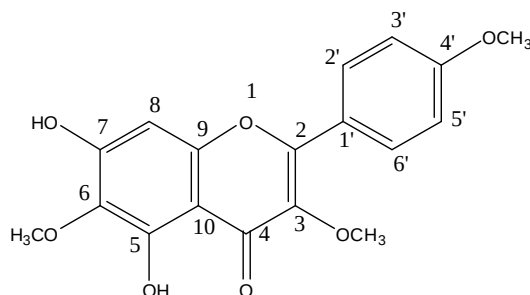


O espectro de correlações heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC) (Figuras 14, p. 67; Tabela 2, p. 61) e suas expansões (Figuras 15, 16, 17 e 18, p. 68, 69, 70 e 71,

respectivamente), mostraram uma correlação a duas ligações (2J) dos hidrogênios H-3'/H-5' (δ_H 7,12) com o carbono C-4' (δ_C 161,34), e a três ligações (3J) dos hidrogênios H-2'/H-6' (δ_H 8,01) com o mesmo, confirmando o padrão de substituição nesta região, bem como confirmando o deslocamento químico do C-4'. Uma correlação a três ligações dos hidrogênios δ_H 3,85 com o C-4', fez descartar a proposta A, visto que esta correlação confirma a metoxila δ_C 55,44 ligada ao carbono C-4', propondo portanto para Ps-01 a proposta C.

A proposta estrutural da molécula, ainda teve sua confirmação feita através do espectro de correlação heteronuclear direta ($^1H \times ^{13}C$ -HMQC) (Figuras 19 e 20, p. 72 e 73) e suas correlações estão compiladas na tabela 2 da página 61.

Através da análise de dados de RMN 1H e ^{13}C (1D e 2D) e comparação com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989; Tabela 3, p. 62), foi possível a determinação inequívoca da estrutura proposta como sendo o flavonóide 5,7-diidroxi-3,4',6-trimetoxiflavona conhecida como centaureidina ou santina. Este flavonóide foi relatado em outros gêneros da família Fabaceae, porém esse é o primeiro relato no gênero *Piptadenia*.



5,7-diidroxi-3,4',6-trimetoxiflavona

Diversas atividades farmacológicas já foram atribuídas ao flavonóide santina, podendo citar a inibição da ciclooxigenase e da lipooxigenase (SILVAN et al., 1998), inibição da síntese de óxido nítrico e da prostaglandina E2 (ABAD et al., 2004), atividade antibacteriana e antifúngica (ALJANCIC et al., 1999). A atividade antiinflamatória evidenciada neste flavonóide pode justificar em parte, o uso popular de *Piptadenia stipulaceae* em inflamações.

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) de **Ps-01** registrados em DMSO- d_6 (δ em ppm e J em Hz).

	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
2	155,26	-		
3	137,60	-		
4	178,21	-		
5	152,38	-		
6	131,17	-		
7	157,44	-		
9	151,61	-		
10	104,66	-		
1`	122,21	-		
4`	161,34	-		
CH				
8	94,04	6,56 (s, 1H)	C-7, C-9	C-6, C-10
2'/6'	130,00	8,01 (d, $J=9$ Hz, 2H)		C-2, C-4'
3'/5'	114,25	7,12 (d, $J=9$ Hz, 2H)	C-4'	C-1', C-4'
CH₃O				
CH ₃ O-3	59,76	3,78 (s, 3H)		C-3
CH ₃ O-6	59,98	3,75 (s, 3H)		C-6
CH ₃ O-4'	55,44	3,85 (s, 3H)		C-4`
HO-5	-	12,72 (s, 1H)	C-5	C-6, C-10

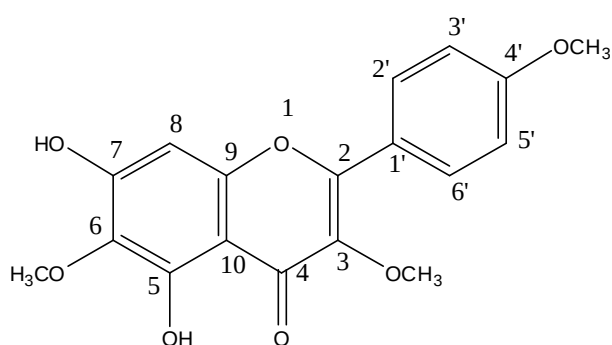
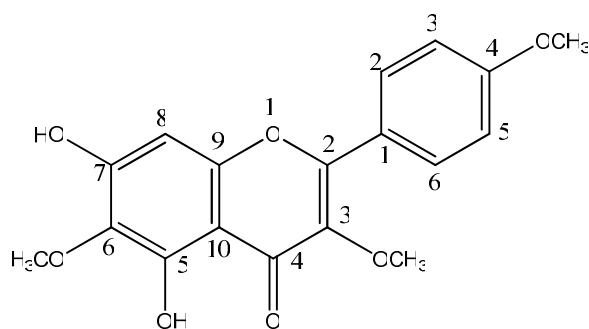


Tabela 3. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância **Ps-01** (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz) com dados da literatura (DMSO- d_6) (AGRAWAL, 1989).

<i>Carbonos</i>	<i>Ps-01</i>	<i>Literatura</i>
	δ_c	δ_c
C		
2	155,26	155,20
3	137,60	137,60
4	178,21	178,20
5	152,38	152,30
6	131,17	131,30
7	157,44	157,80
9	151,61	151,60
10	104,66	104,50
1`	122,21	122,20
4`	161,34	161,30
CH		
8	94,04	94,10
2`/6`	130,00	129,90
3`/5`	114,25	114,20
CH₃O		
CH ₃ O-3	59,76	-
CH ₃ O-6	59,98	-
CH ₃ O-4`	55,44	-



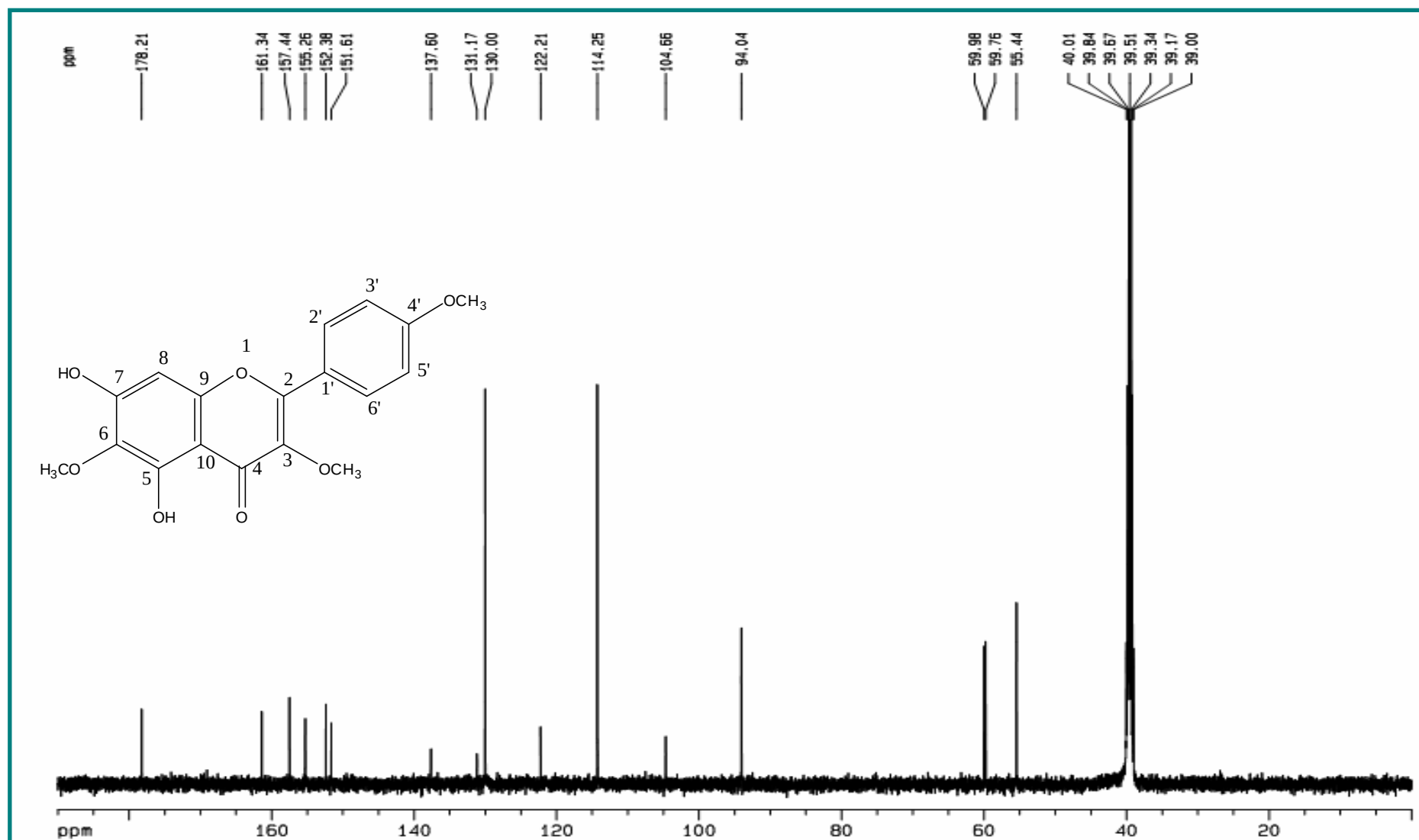


Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-01**.

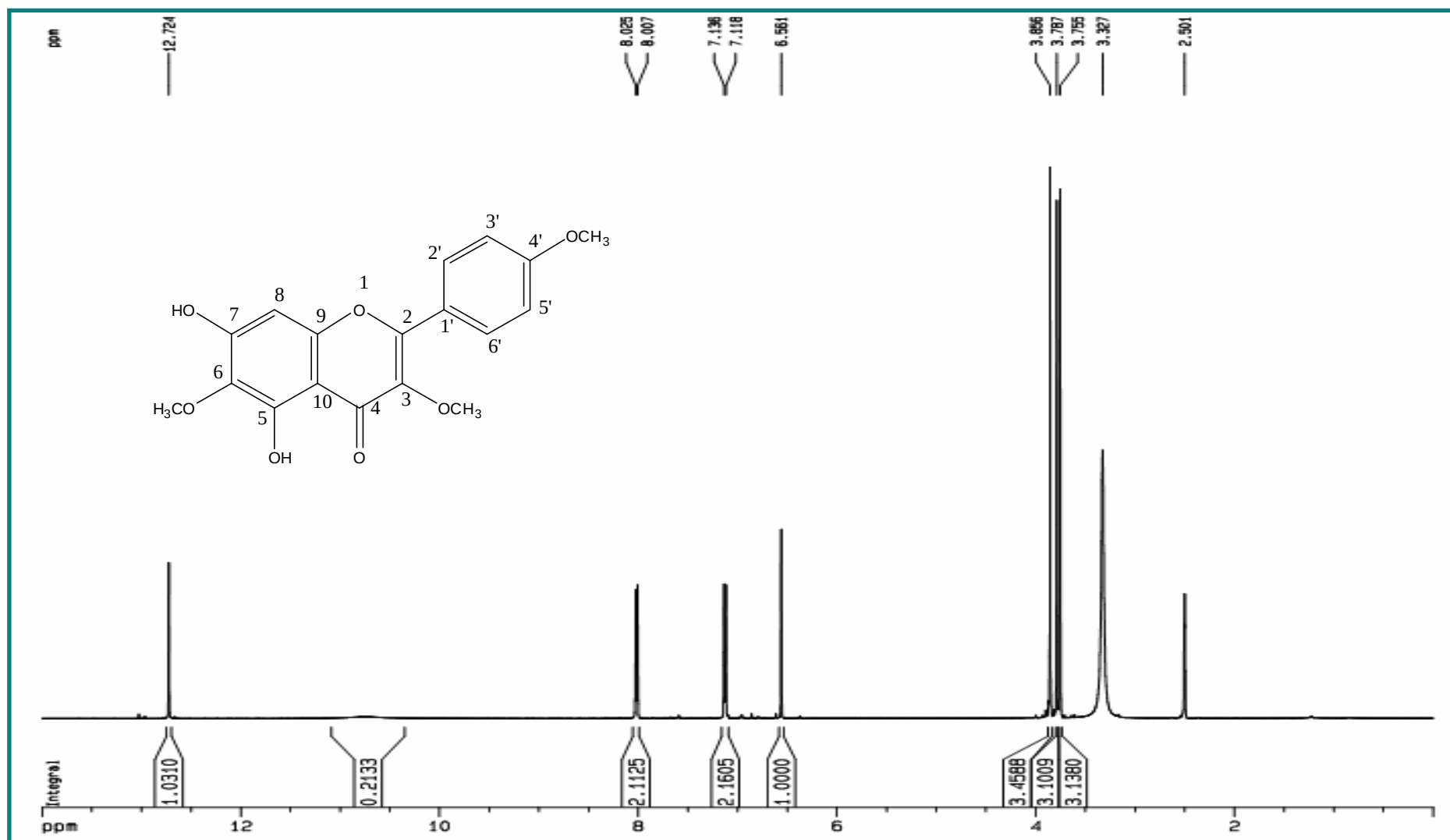


Figura 11. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-01**.

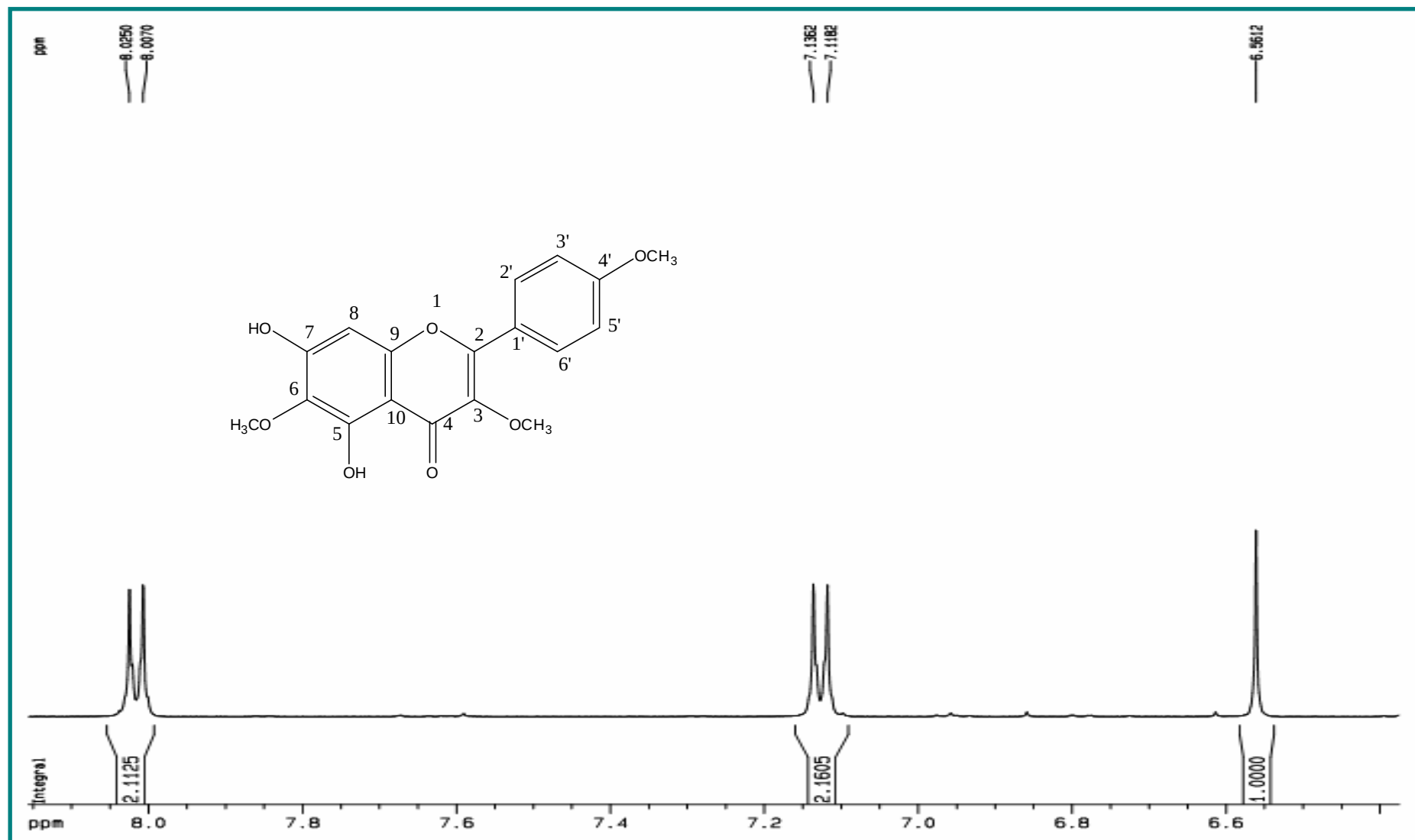


Figura 12. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-01**.

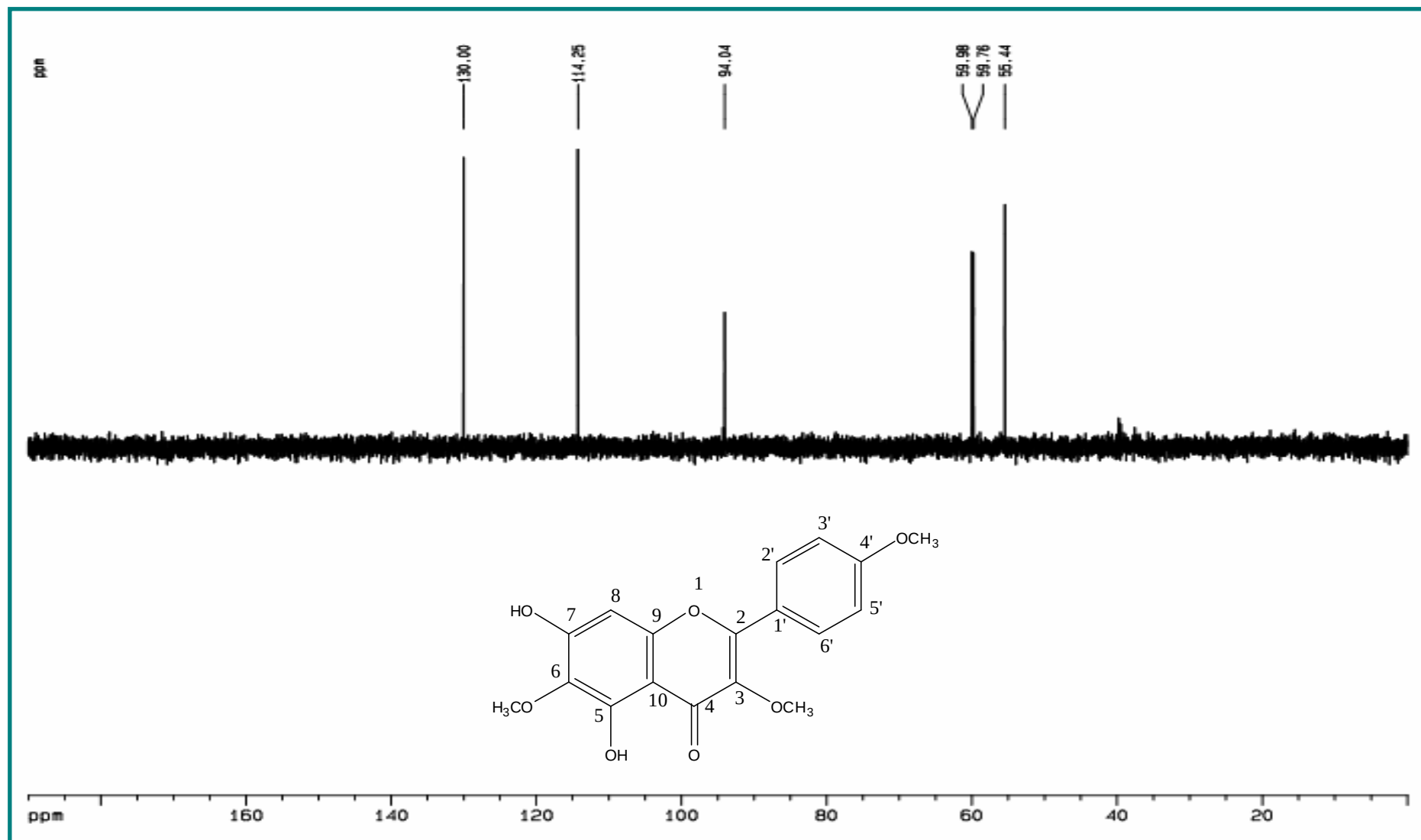


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-01**.

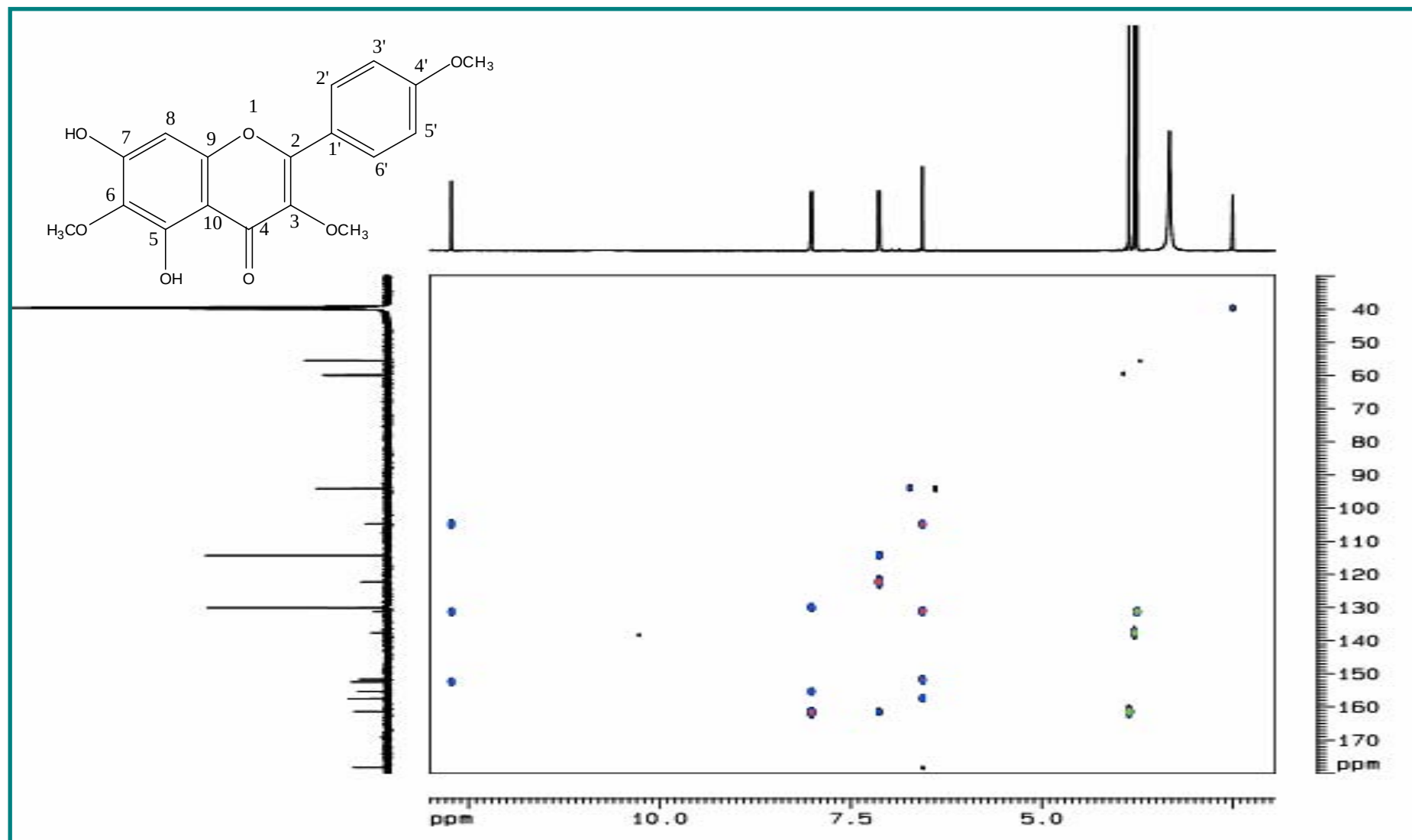


Figura 14. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-01**.

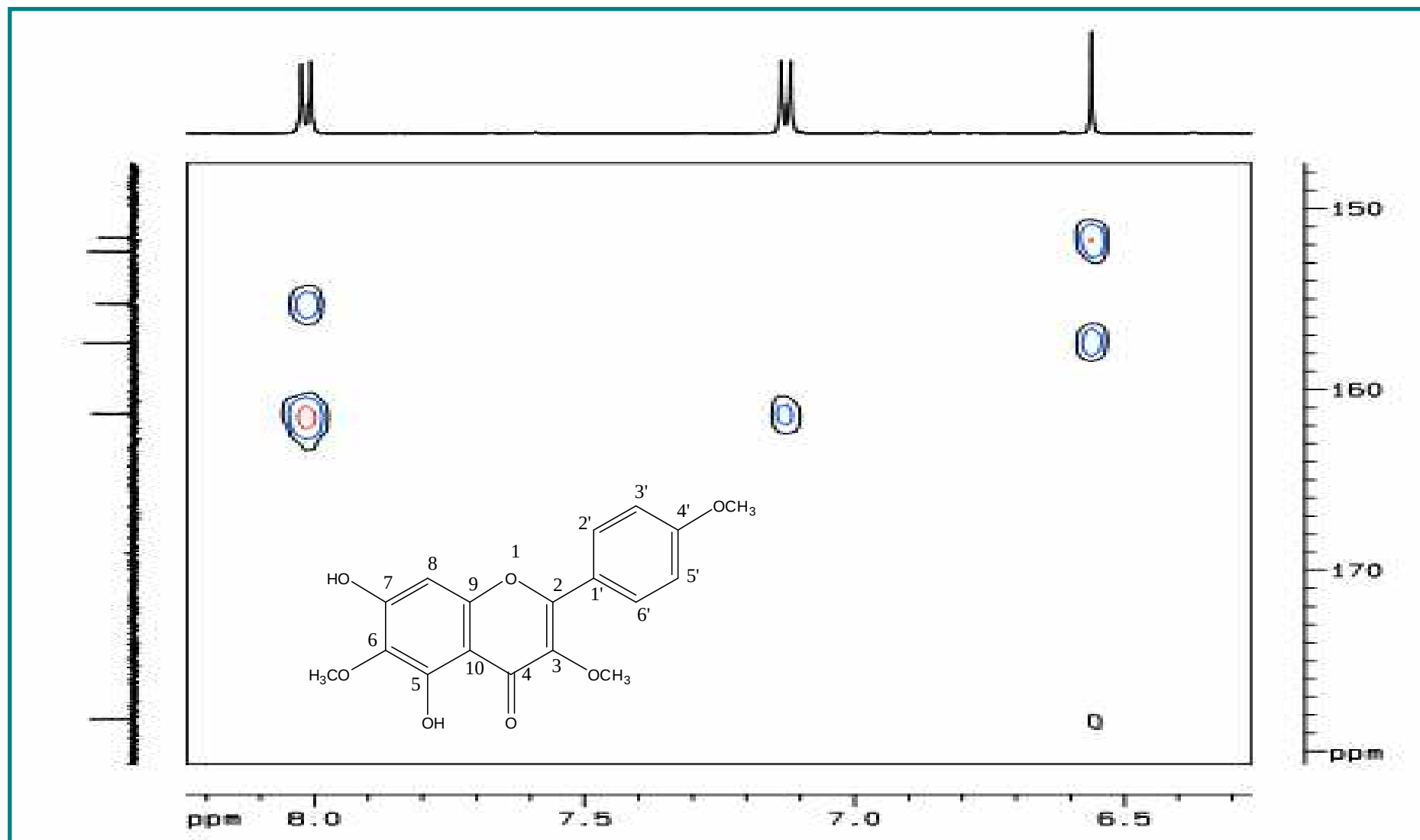


Figura 15. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-01**.

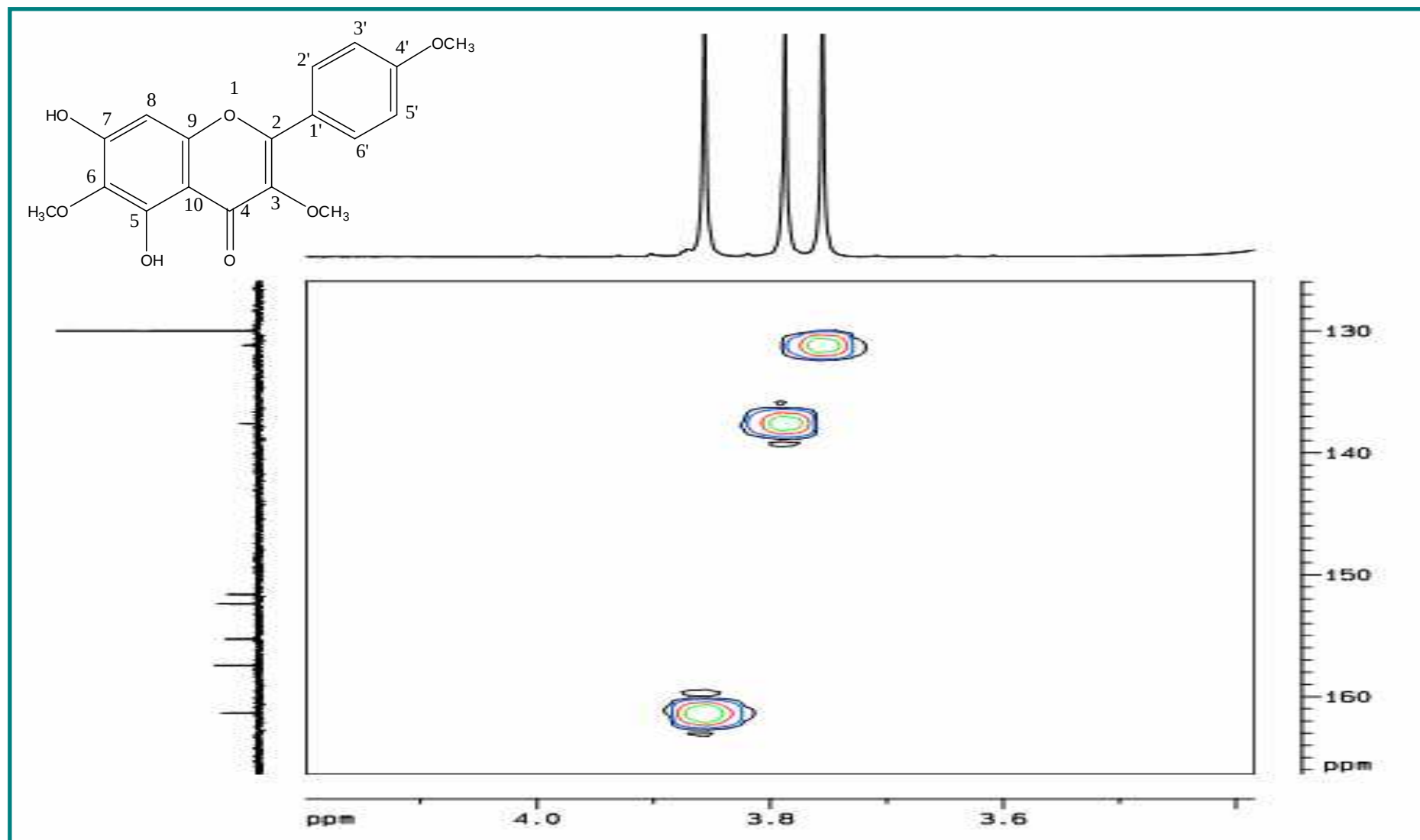


Figura 16. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-01**.

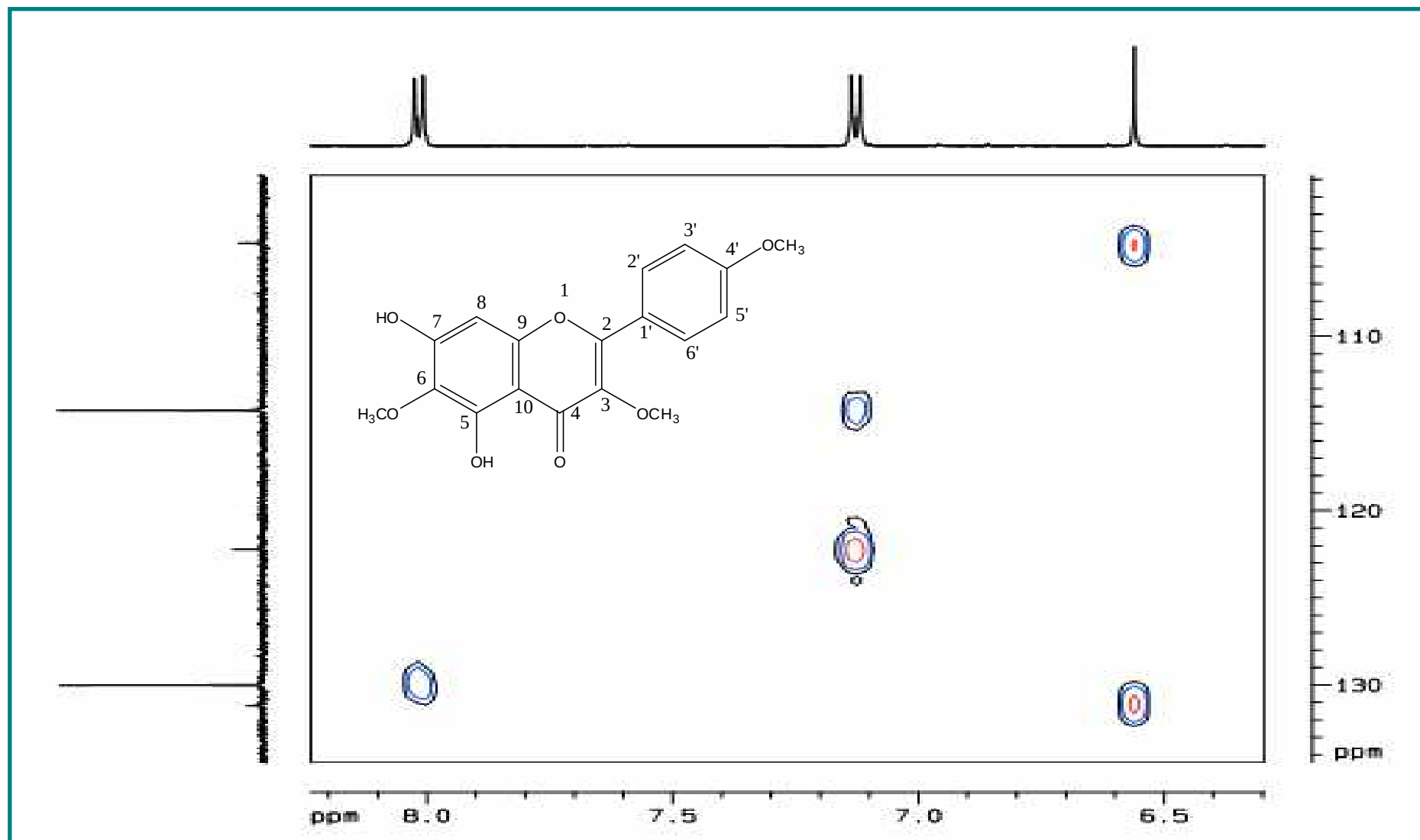


Figura 17. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-01**.

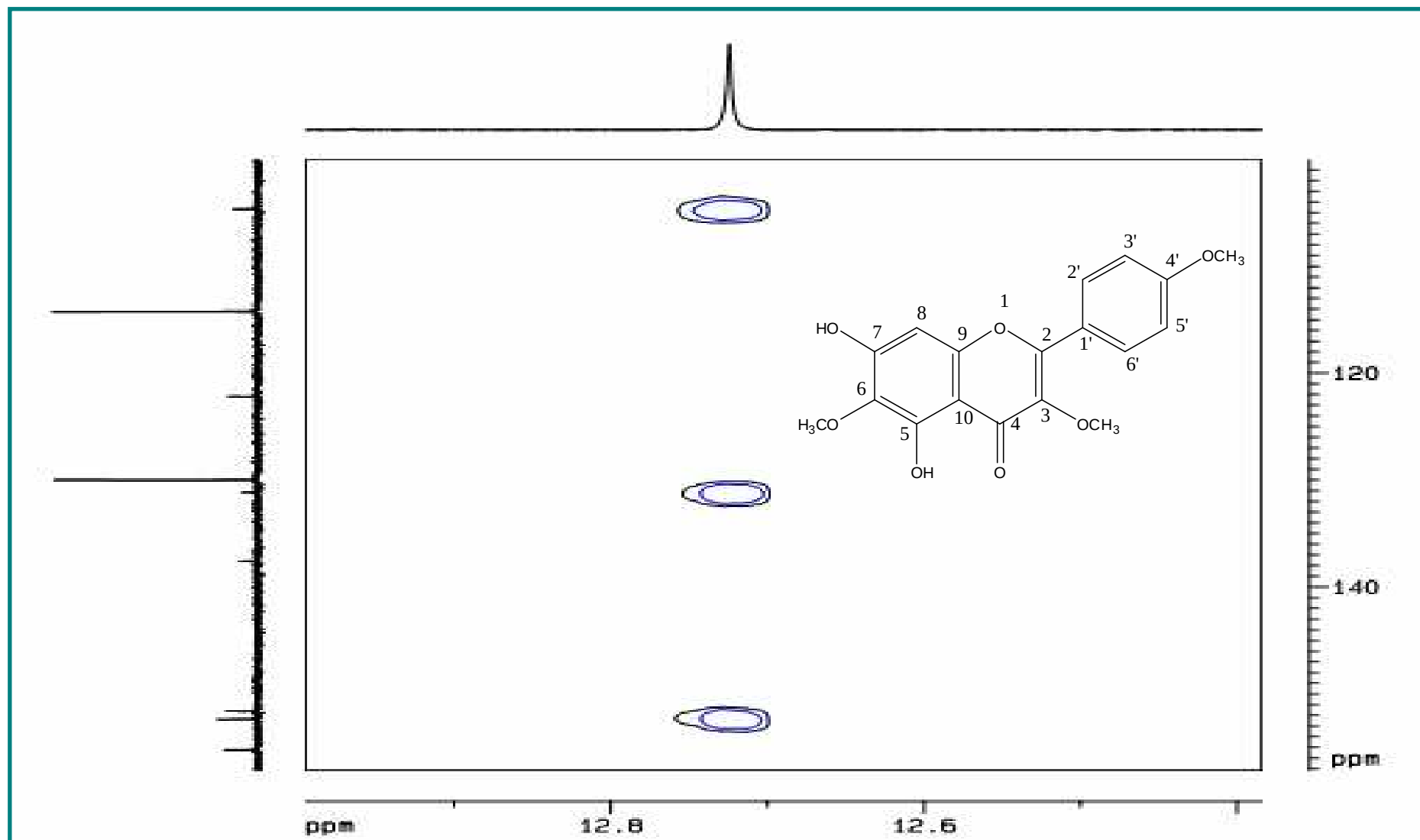


Figura 18. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-01**.

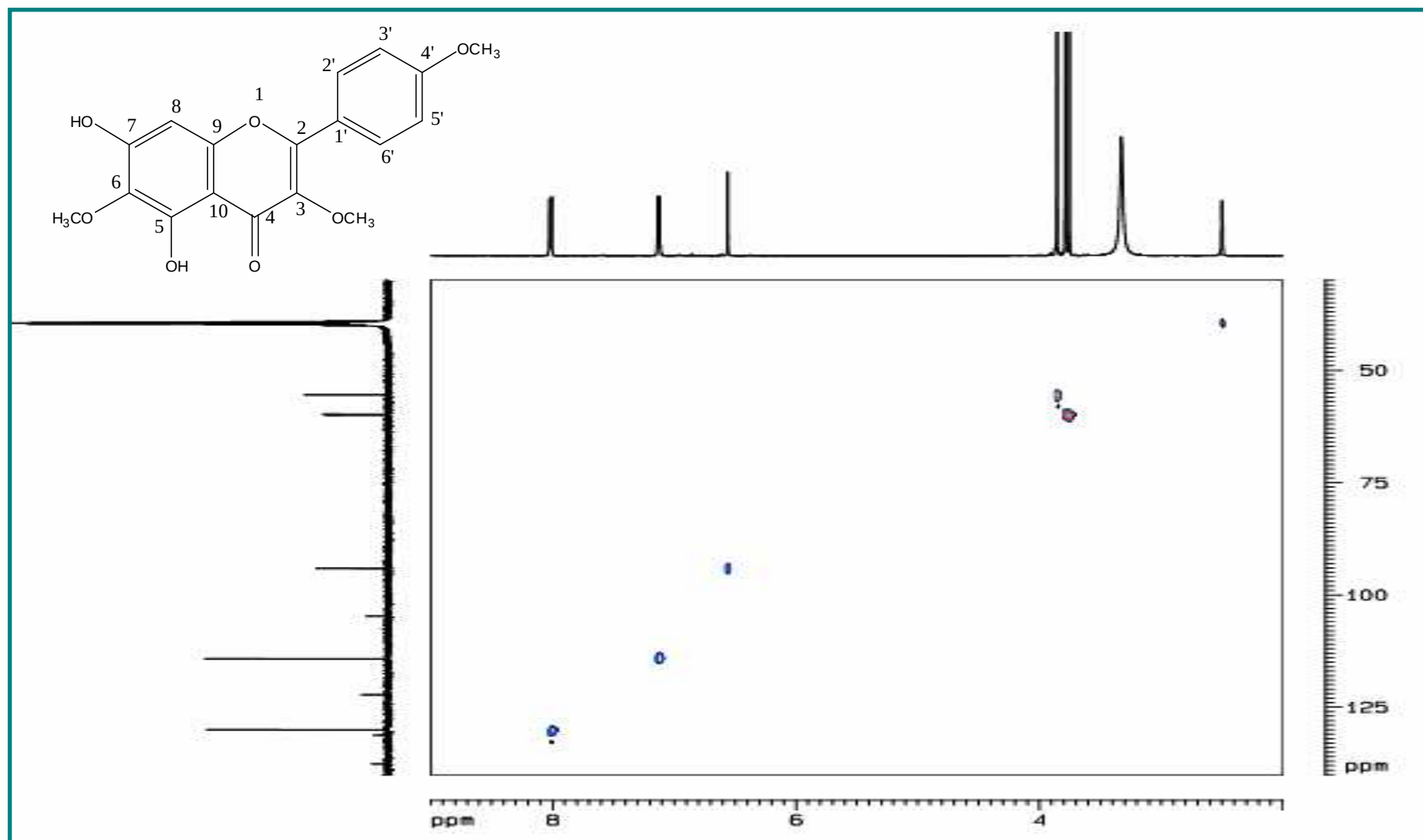


Figura 19. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) de **Ps-01**.

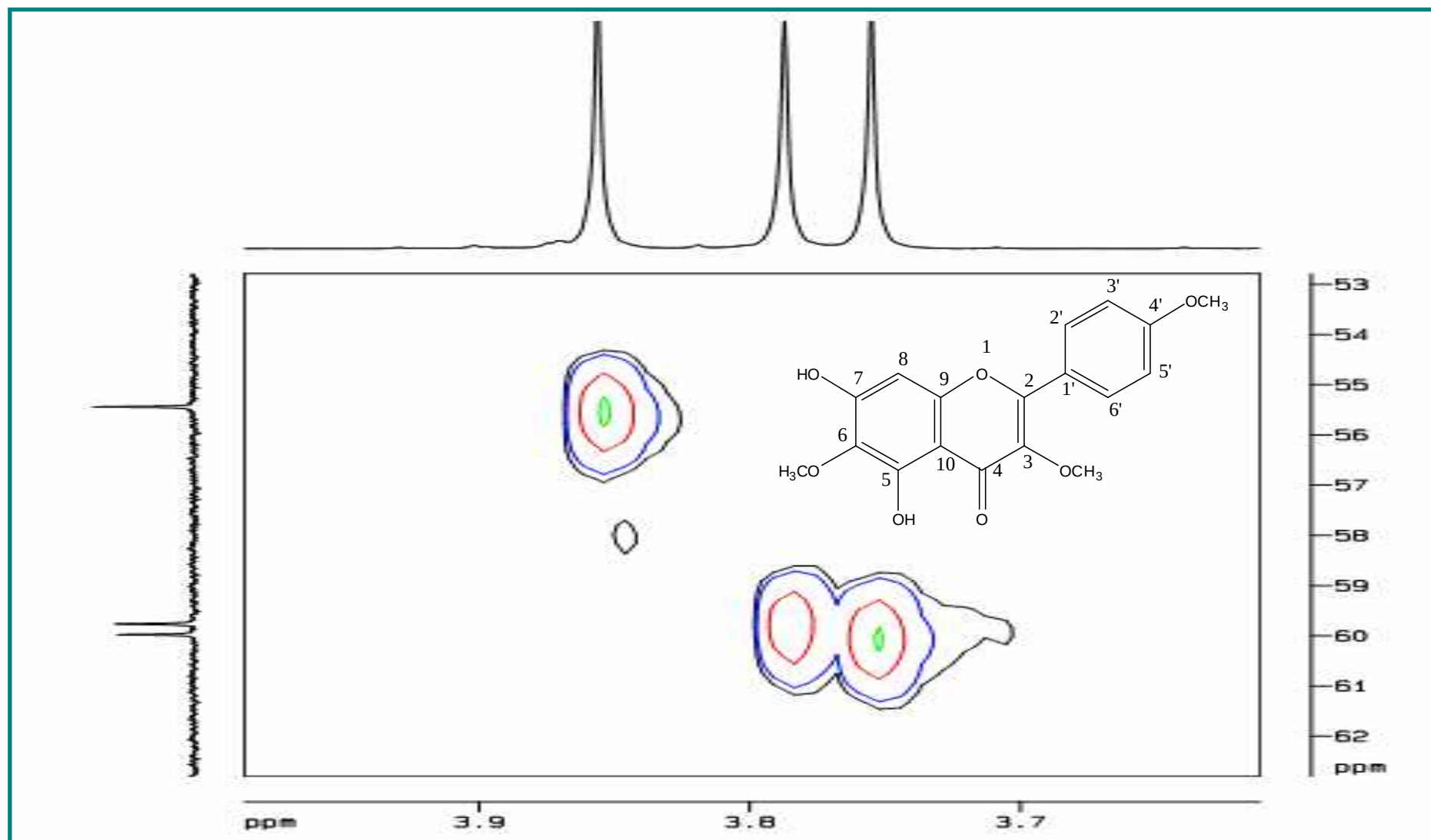


Figura 20. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-01**.

5.3 Identificação estrutural de PS-02

A substância Ps-02 apresentou-se na forma de pó amarelo claro, solúvel em DMSO e com ponto de fusão de 178,5 °C. Sua identificação foi realizada através de análises espectrais de RMN ^1H e ^{13}C .uni e bidimensionais.

A análise espectral de RMN ^{13}C -BB (Figura 21, p. 78; Tabela 4, p. 77) permitiu observar a presença de 17 sinais de carbonos. Destes sinais, onze foram atribuídos a carbonos quaternários, quatro à carbonos metínicos e dois à carbonos metoxílicos. Baseado nestes dados e levando-se em consideração o número de carbonos na molécula, foi proposto um esqueleto flavonoídico para o composto em análise.

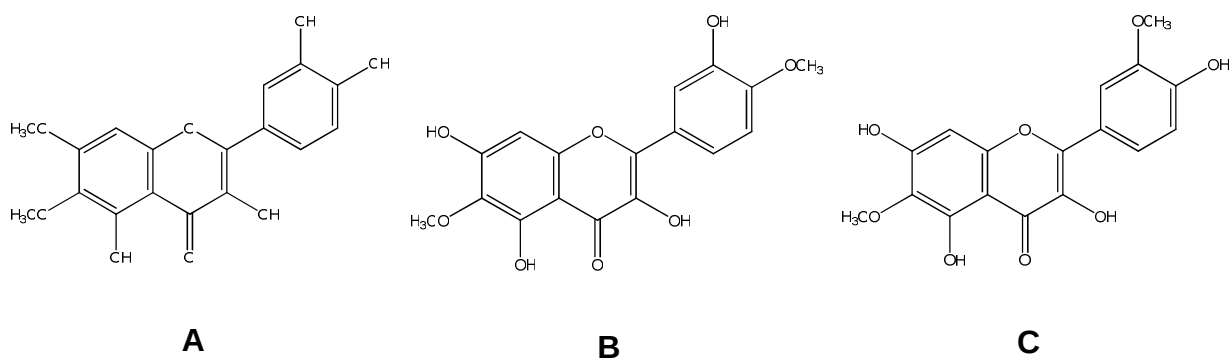
O espectro de RMN ^1H (Figura 22, p. 79; Tabela 4, p. 77) e sua expansão (Figura 23, p. 80) de Ps-02, mostraram absorções na região de aromático com presença de um conjunto de sinais correspondentes a um duplo duplete em δ_{H} 7,68 com acoplamento *orto* ($J= 8,5$ Hz) e *meta* ($J= 2$ Hz), um duplete em δ_{H} 6,93 com acoplamento *orto* ($J= 8,5$ Hz) e outro duplete em δ_{H} 7,75 ($J=2$ Hz) mostrando acoplamento *meta*. Estes dados juntamente com dados do espectro de RMN de ^{13}C -BB (Figura 21, p. 78) e RMN de ^{13}C -DEPT 135° (Figura 24, p. 81) que mostram, a presença de três sinais intensos em δ_{C} 111,74, δ_{C} 115,52 e, δ_{C} 121,71 sugerem sistema ABX na molécula. Foram observadas ainda no espectro de RMN ^1H (Figura 22, p. 79), a presença de metoxilas aromáticas em δ_{H} 3,75 e δ_{H} 3,85 e a presença de absorção em δ_{H} 12,54 referente ao grupo hidroxila formando ligação de hidrogênio com a carbonila. Esses valores de deslocamentos químicos associados aos dados de RMN ^{13}C , sugerem que o composto em análise, trata-se de um flavonóide com anel aromático B trissubstituído, com localização de funções oxigenadas nas posições 3' e 4'.

A análise detalhada do espectro de RMN ^1H (Figura 22, p. 79) de Ps-02 mostrou o mesmo perfil de substituição para os anéis A e C, quando comparado a PS-01, ou seja:

- a) um sinal simples para um hidrogênio aromático, sendo este de δ_{H} 6,58, indicando anel A trissubstituído;
- b) ausência de um simpleto na região entre δ_{H} 6,39-6,94, somado ao também ausente deslocamento químico em torno de δ_{C} 105,01-107,03 no espectro de RMN ^{13}C , permitindo deduzir que a posição C-3 encontra-se substituída ou por grupo hidroxila ou grupo metoxílico.

Como já dito anteriormente, a presença ou a ausência de substituintes nas posições C-3 e C-5 irão influenciar o deslocamento químico da carbonila presente na posição C-4. Dados da literatura relatam também que, a presença de hidroxila (-OH) em C-3 e C-5, influencia no deslocamento químico da carbonila deslocando-a para campo mais baixo pela interação da ligação intramolecular com os dois grupos, pois a OH-3 causa um efeito de blindagem de cerca $\Delta\delta = 5$ ppm e OH-5 causa um efeito de desblindagem de magnitude similar e assim, os efeitos referidos se anulam (SILVA et al., 1999). Diante dessa informação e comparando os sinais de carbonos no espectro de RMN de ^{13}C de Ps-01 (Figura 10, p. 63; Tabela 2, p. 61) e Ps-02 (Figura 21, p. 78; Tabela 4, p. 77), observa-se que o deslocamento da carbonila de Ps-02 é inferior em cerca de 2,5 ppm, sugerindo dessa forma que o substituinte no C-3 não trata-se de uma metoxila como PS-01, mas possivelmente de uma hidroxila, visto que o deslocamento em δ_{C} 176,08 é correspondente ao carbono C-4.

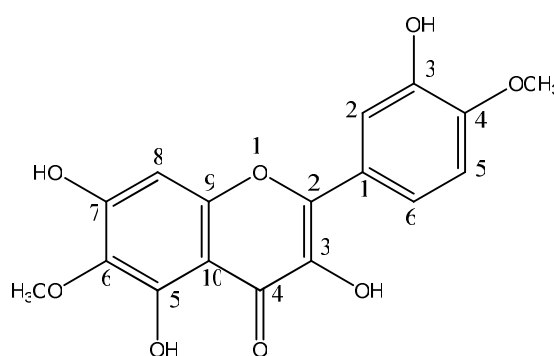
Dessa forma, baseado no padrão de substituição indicado para os anéis A e B no espectro de RMN de ^1H e nos deslocamentos químicos das metoxilas em δ_{C} 55,76 e δ_{C} 60,00 observados no espectro de RMN de ^{13}C pôde-se sugerir três propostas estruturais para Ps-02:



Pelo espectro de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (Figura 25, p. 82; Tabela 4, p. 77), foi possível observar as correlações diretas dos hidrogênios das metoxilas δ_{H} 3,75 e δ_{H} 3,85, com seus respectivos carbonos δ_{C} 60,00 e δ_{C} 55,76, além de mostrar as correlações entre o H-8 (δ_{H} 6,58) e o C-8 (δ_{C} 93,85), o H-5' (δ_{H} 6,93) e o C-5' (δ_{C} 115,52), o H-6' (δ_{H} 7,68) e C-6' (δ_{C} 121,71) e a correlação entre o H-2' (δ_{H} 7,75) e C-2' (δ_{C} 111,74).

A proposta estrutural de localização das metoxilas e hidroxilas da molécula teve sua confirmação feita através do espectro de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (Figura 26, p. 83;

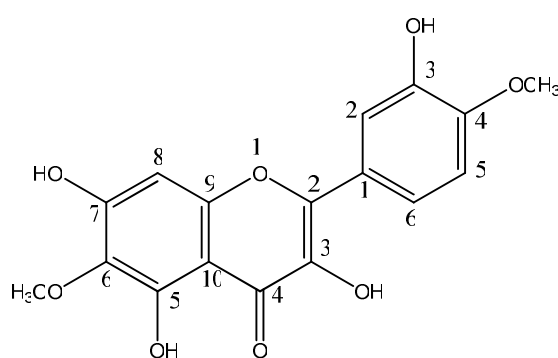
Tabela 4, p. 77) e suas expansões (Figuras 27 e 28, p. 84 e 85), que mostraram a correlação a três ligações do hidrogênio da hidroxila em δ_H 9,73 com o carbono em δ_C 148,382 (C-2), confirmando assim a posição desta hidroxila no C-3. Ainda observou-se a correlação a três ligações dos hidrogênios δ_H 3,75 com o carbono em δ_C 130,83, o qual sustenta a metoxila, e assim a mesma, foi realmente confirmada no C-6. A correlação do H-2' (δ_H 7,75) com o carbono em δ_C 147,34 fez sugerir que este sinal correspondia ao C-3' ou ao C-4'. Entretanto a correlação do H-6' (δ_H 7,68) a três ligações com o carbono em δ_C 147,34, permitiu atribuir que este correspondia ao C-4', isto, bem como a correlação a três ligações dos hidrogênios em δ_H 3,85 com este carbono, permitiu confirmar que a metoxila em δ_C 55,76 está inserida no mesmo, e assim descartando tanto a proposta A como também a proposta C. Logo, a proposta B tratar-se-á do composto 3,3',5,7-tetraidroxi-4',6dimetoxiflvona, também conhecido como laciniatina, a qual está sendo descrita pela primeira vez na família Fabaceae.



3,3',5,7-tetraidroxi-4',6dimetoxiflvona

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **Ps-02** registrados em DMSO- d_6 (δ em ppm e J em Hz).

	HMBC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
2	148,82	-		
3	135,48	-		
4	176,08	-		
5	151,66	-		
6	130,83	-		
7	157,18	-		
9	151,36	-		
10	103,38	-		
1'	121,98	-		
3'	156,76	-		
4'	147,34	-		
CH				
8	93,85	6,58 (s, 1H)	C-7, C-9	C-6, C-10
2'	111,74	7,75 (d, $J= 2,0$ Hz, 1H)		C-2, C-4', C-6'
5'	115,52	6,93 (d, $J= 8,5$ Hz)	C-4'	C-1'
6'	121,71	7,68 (dd, $J= 2,0$ e $8,5$ Hz, 1H)		C-2, C-2', C-4'
CH₃O				
CH ₃ O-6	60,00	3,75 (s, 3H)		C-6
CH ₃ O-4'	55,75	3,85 (s, 3H)		C-4'
OH-3		9,73 (s, 1H)		C-2
OH-3'		9,41 (s, 1H)		C-4'
OH-5	-	12,54 (s, 1H)	C-5	C-6, C-10



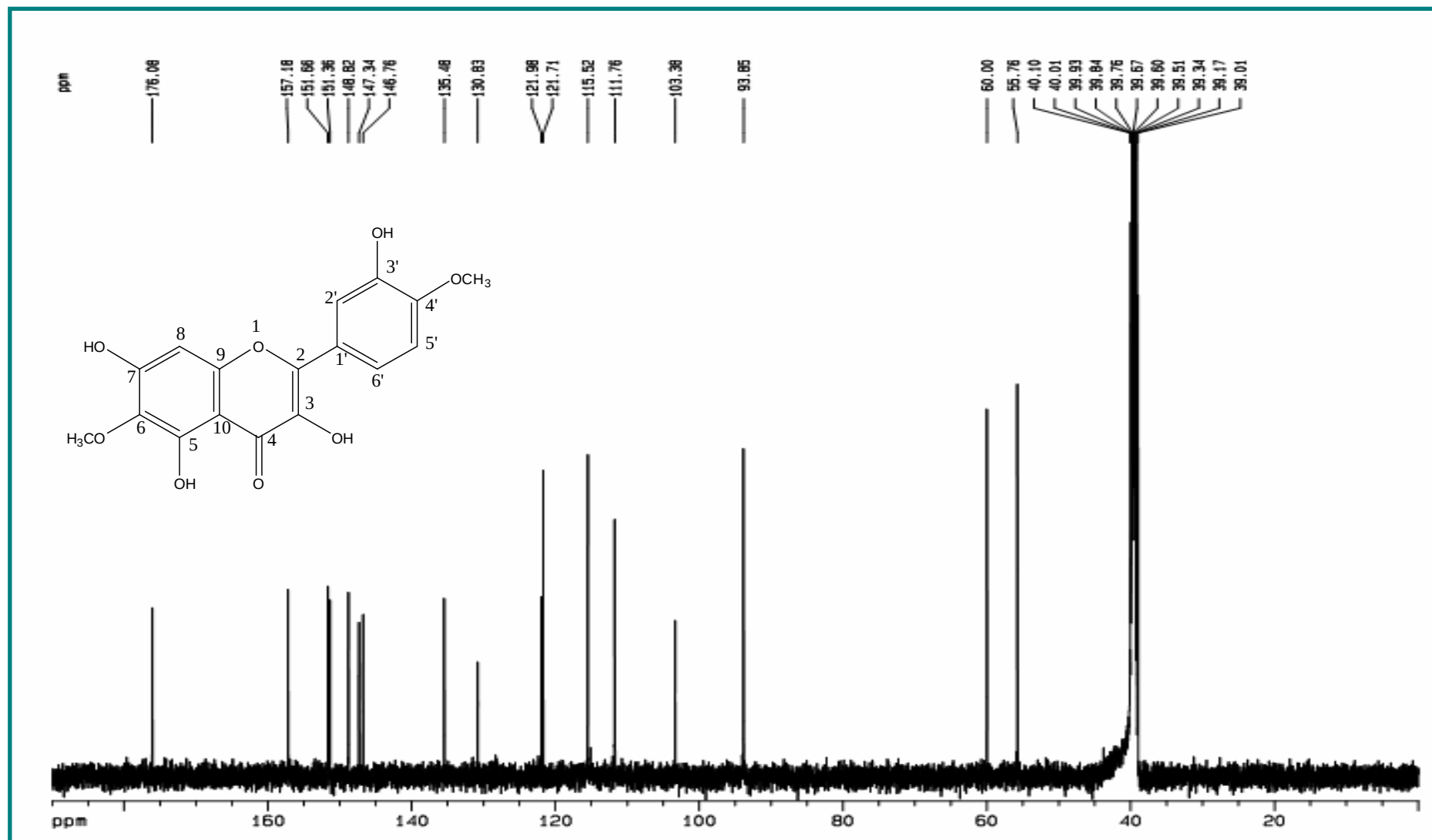


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-02**.

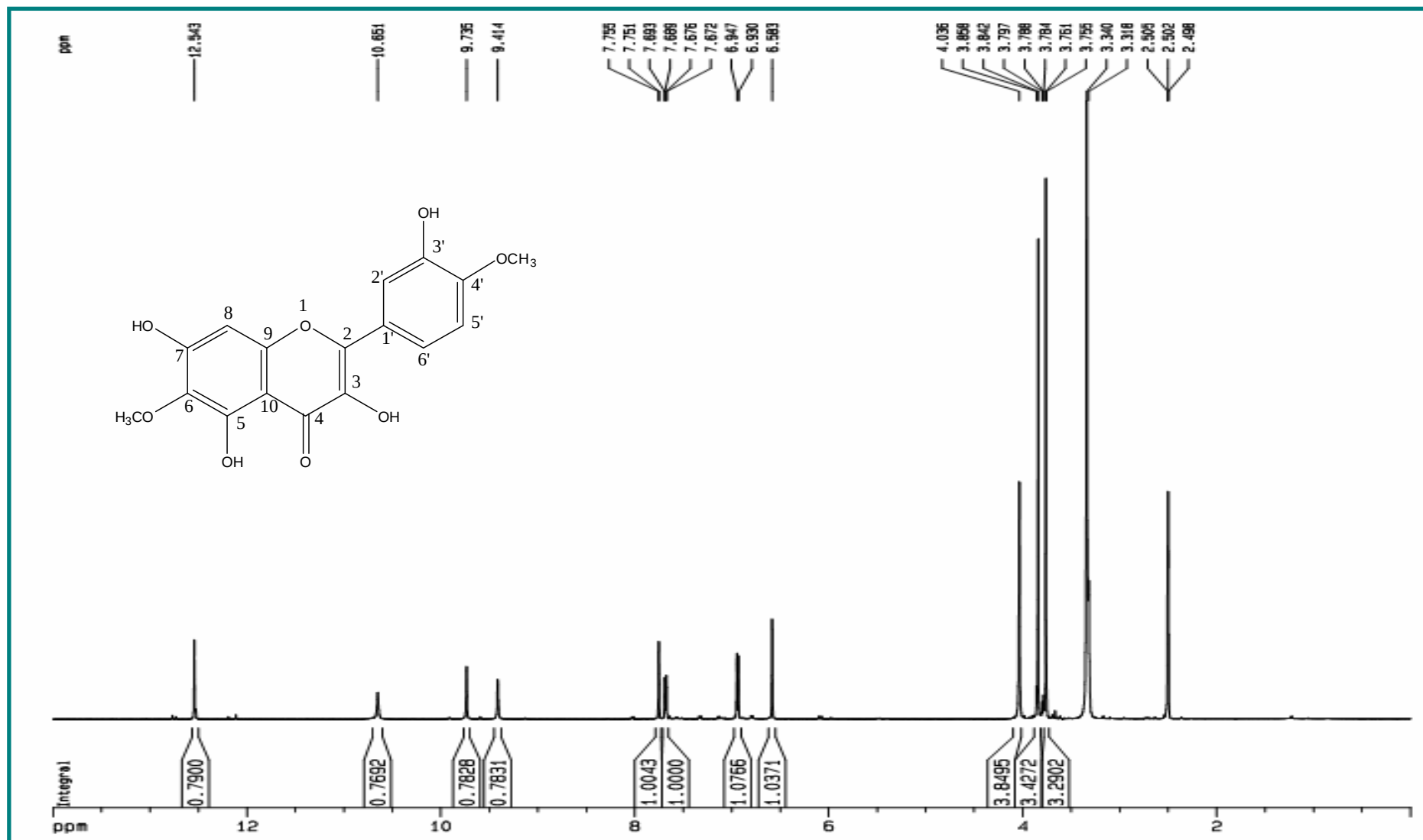


Figura 22. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-02**.

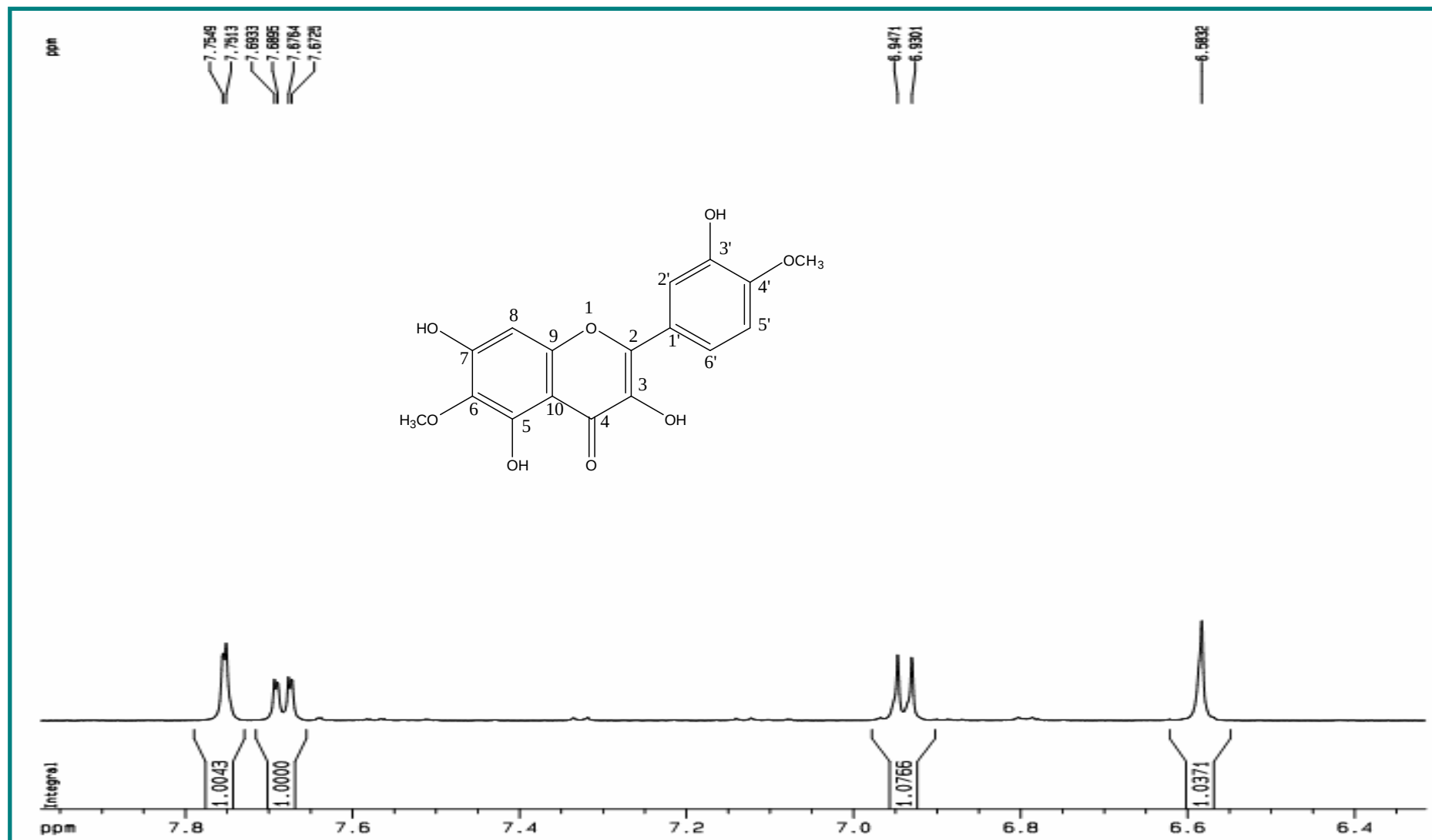


Figura 23. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-02**.

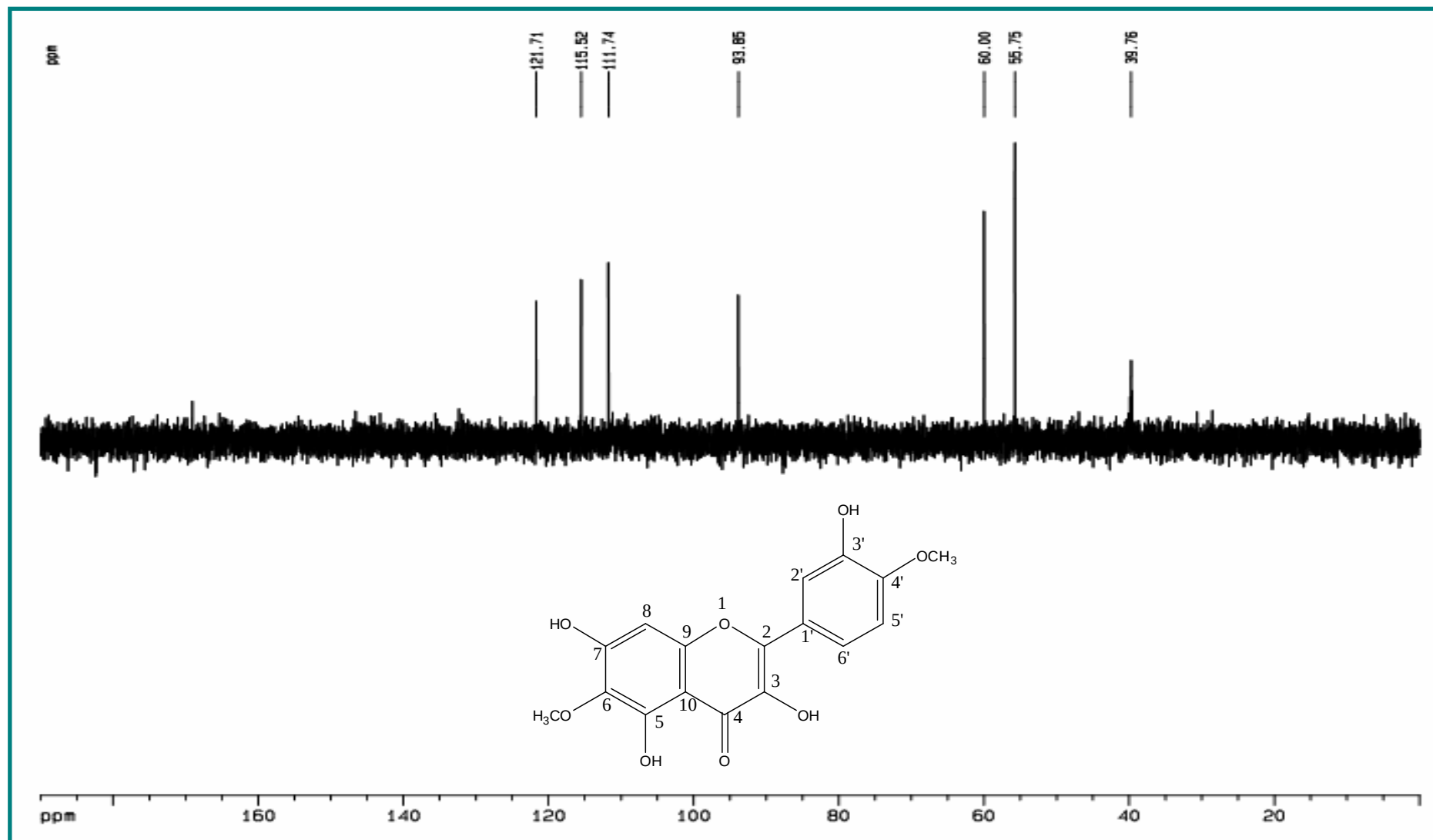


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135(125 MHz, DMSO- d_6) de **Ps-02**.

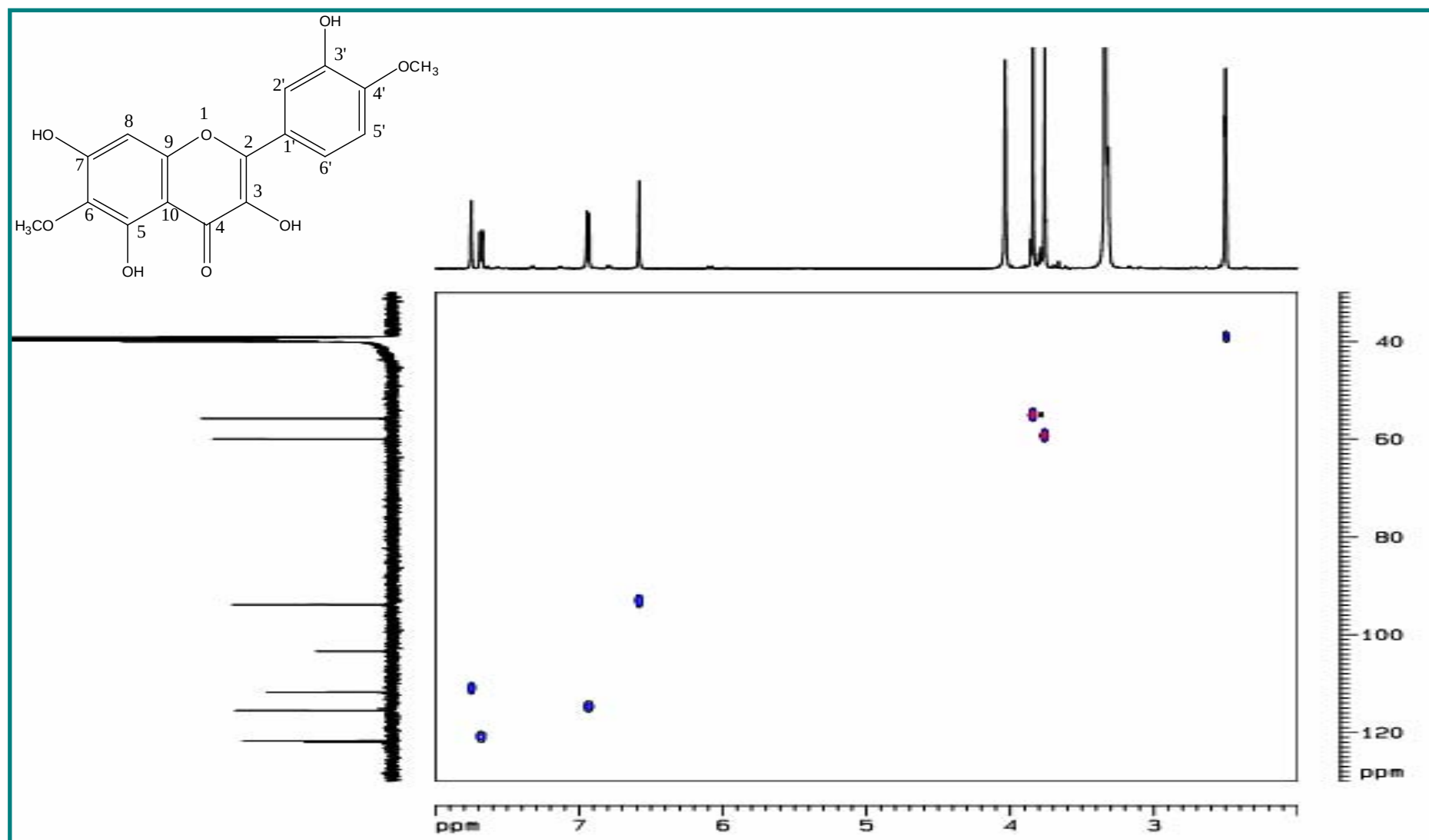


Figura 25. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Ps-02.

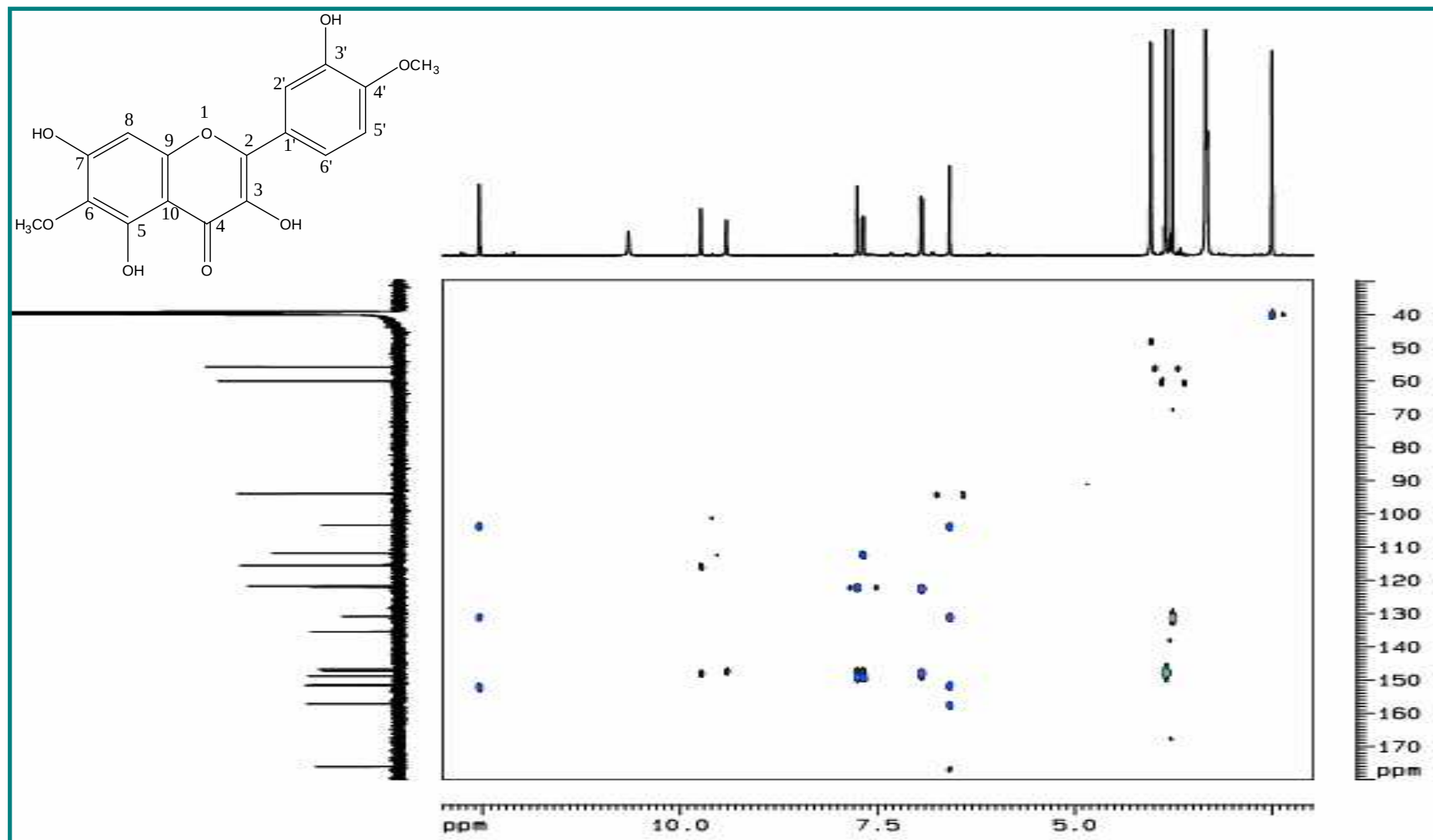


Figura 26. Espectro de RMN ¹H X ¹³C-HMBC (500 MHz, DMSO-*d*₆) de Ps-02.

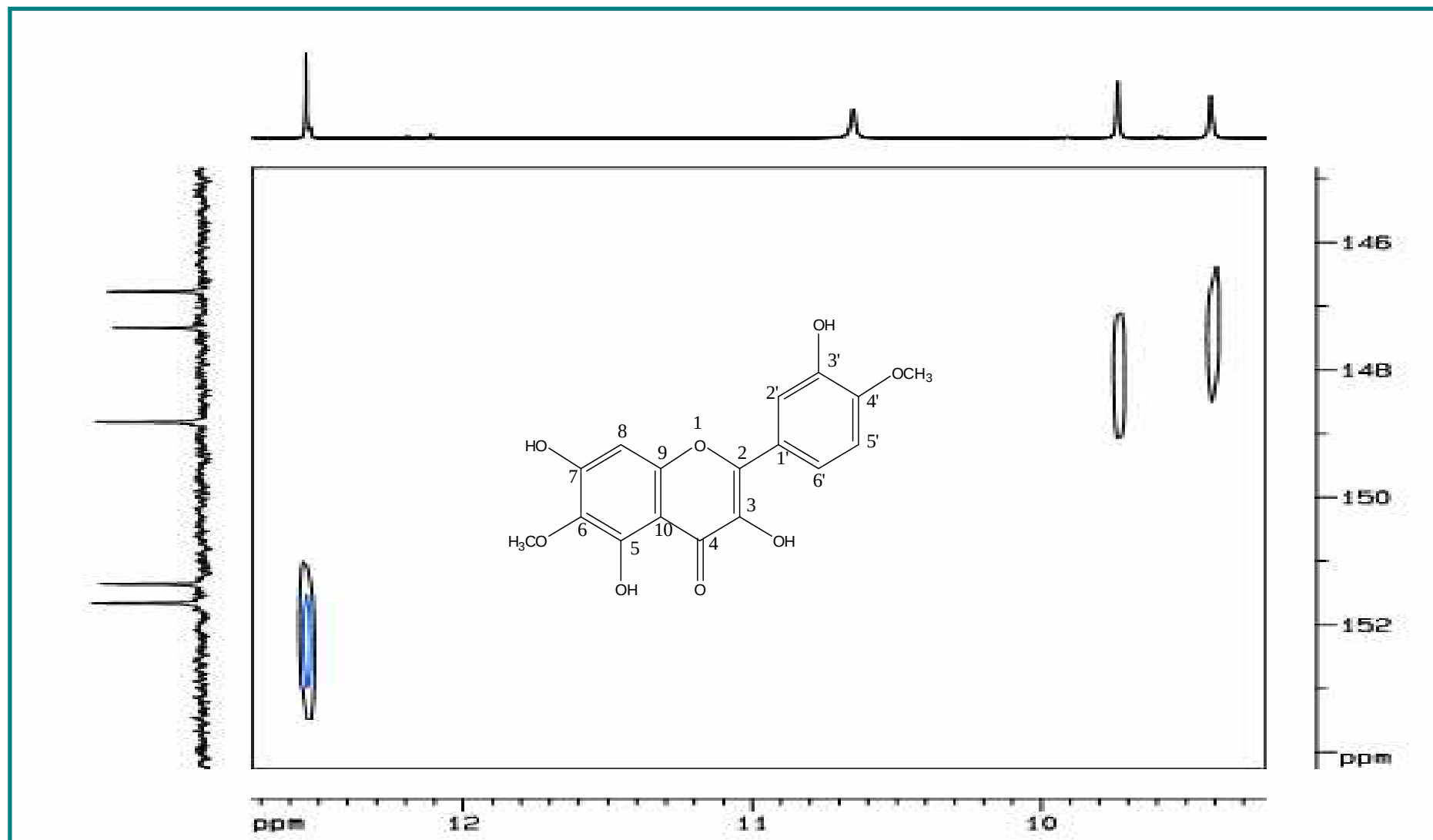


Figura 27. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-02**.

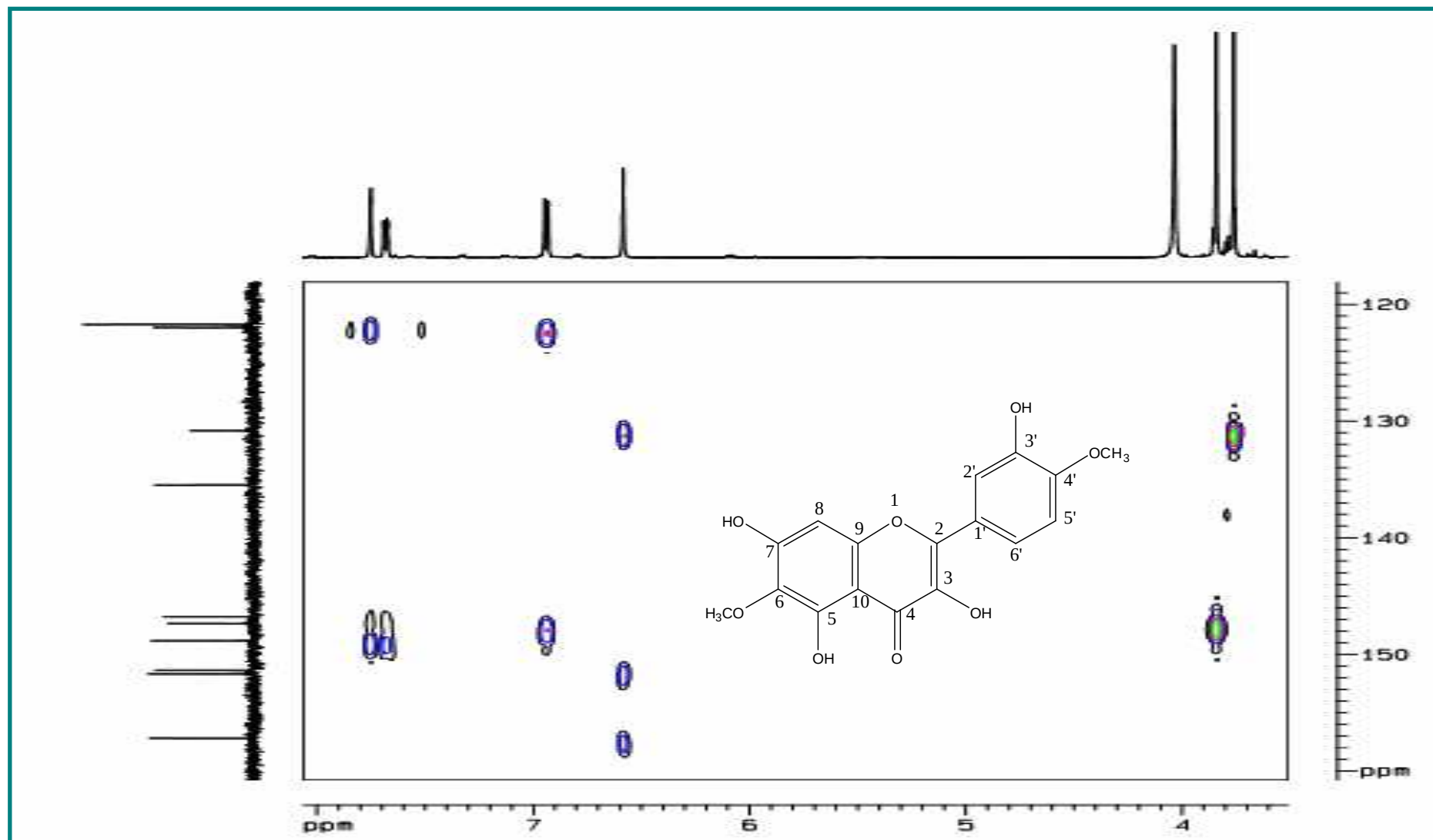


Figura 28. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-02**.

5.4 Identificação estrutural de Ps-03

A substância PS-03 apresentou-se na forma de cristais amarelo claro, solúvel em DMSO com ponto de fusão de 173,8 °C. Sua identificação foi realizada através de análise espectral dos dados de IV, RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com os dados encontrados na literatura.

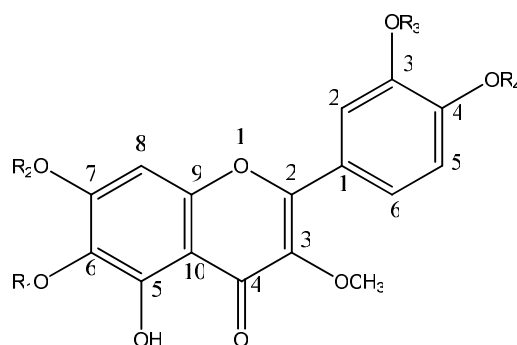
O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 29, p. 90), obtido em pastilhas de KBr, mostrou uma banda larga em 3433 cm^{-1} , sugerindo grupo OH fenólico e/ou de álcool na molécula. Esta absorção foi corroborada pelo pico em 1095 cm^{-1} , típico de deformação axial de C-O (SILVERSTEIN et al., 2007). O espectro de IV (Figura 29, p. 91) sugeriu ainda, a presença de núcleo aromático em Ps-03 devido a presença de absorções entre 1597 e 1473 cm^{-1} , característicos de C=C. Duas bandas em 2920 e 2850 cm^{-1} referem-se ao estiramento C-H de grupos metílicos, metínicos e/ou metilênicos. Uma absorção em 1651 cm^{-1} permitiu inferir sobre a presença de uma carbonila conjugada ou formando ponte de hidrogênio (SILVERSTEIN et al., 2007).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 30, p. 92; Tabela 5, p. 89) utilizando a técnica BB, mostrou 18 absorções de carbonos, sendo onze carbonos não-hidrogenados, quatro carbonos metínicos e três carbonos metoxílicos.

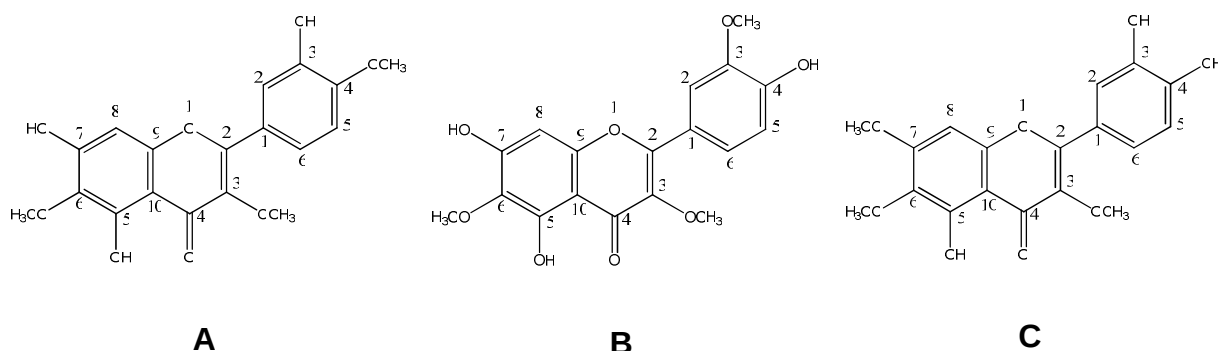
O espectro de RMN ^1H (Figura 31, p. 93; Tabela 5, p. 89) e suas expansões (Figuras 32 e 33, p. 94 e 95), revelaram absorções com o mesmo padrão de hidrogenação que Ps-02, ou seja: um sistema ABX [δ_{H} 7,62 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), δ_{H} 6,95 (d, $J = 8,45$ Hz, 1H) e δ_{H} 7,55 (dd, $J = 2,0$ e 8,45 Hz, 1H)], com o anel A trissubstituído, visto que foi observado a presença de um simpleto em δ_{H} 6,51 referente ao hidrogênio oito, sugestivo de substituição nos carbonos 5, 6 e 7 por funções oxigenadas e a presença de uma hidroxila quelatogênica na molécula (δ_{H} 12,73). O espectro de RMN ^1H (Figura 31, p. 93) mostrou ainda, três outras absorções referentes à metoxilas aromáticas. E mais uma vez a ausência de um simpleto na região entre δ_{H} 6,39-6,94, sugerindo que a posição C-3 do anel C encontrava-se substituída.

De maneira semelhante a Ps-01, os dados de RMN ^{13}C (Figura 30, p. 92; Tabela 5, p. 89) mostrou um deslocamento químico em δ_{C} 178,58 corresponde a carbonila, quando há a presença de metoxila na posição C-3. Dado esse confirmado

pela presença de absorção em δ_c 138,03 que é característico, segundo a literatura, de esqueleto flavonolídico com carbono 3 sustentando metoxila (AGRAWAL, 1989). Através da atribuição dos sinais dos carbonos não-oxygenados pela comparação dos espectros de RMN ^{13}C -BB (Figura 30, p. 92) e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 34, p. 96) e pela análise do padrão de substituição observado nos anéis A e B através do espectro de RMN ^1H , foi possível sugerir a presença de substituintes oxygenados na posições 3',4',5,6 e 7, permitindo propor o seguinte esqueleto:



Como os espectros de RMN ^{13}C -BB (Figura 30, p. 92; Tabela 5, p. 89) e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 34, p. 96) mostraram três absorções referentes à metoxilas aromáticas, cujos picos se encontram em δ_c 56,42, δ_c 60,42 e δ_c 60,53, sendo os dois últimos característicos de metoxila impedida estericamente, pode-se sugerir que a posição da segunda metoxila impedida esteja localizada no C-6 da molécula. Desta forma permite-se propor as seguintes estruturas para Ps-03:

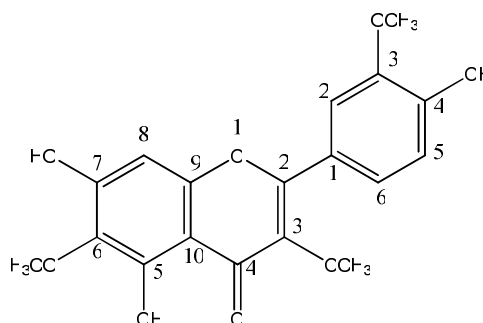


A proposta estrutural de localização das metoxilas e hidroxilas da molécula teve sua confirmação feita através do espectro ^1H X ^{13}C -HMBC (Figura 35, p. 97; Tabela 5, p. 89) e suas expansões (Figuras 36 e 37, p. 98 e 99) que mostraram correlações entre hidrogênios e carbonos a três ligações. Desta forma os carbonos

que sustentam metoxila foram confirmadas pelas correlações δ_H/δ_C 3,74/132,24; 3,78/138,05 e 3,84/148,18 (Figura 37, p. 99). Já a análise detalhada deste espectro (Figura 35, p. 97), mostra as seguintes correlações:

- a) Correlação do H-2'e H-5' com um carbono que sustenta metoxila em δ_C 148,18, informação esta, que no levou a descartar a proposta estrutural C, uma vez que diante esta informação a metoxila desimpedida só poderia está na posição C-3' ou C-4'.
- b) A ausência de correlação à três ligações do H-6' com o carbono em δ_C 148,18 e a presença da correlação do mesmo hidrogênio com o carbono em δ_C 150,48, descarta a proposta estrutural A, levando a sugerir que o composto em análise é o B.

Desta forma, a análise detalhada dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com os dados encontrados na literatura (AGRAWAL, 1989)(Tabela 6, p. 90) confirmaram a estrutura B como sendo o flavonóide 4',5,7-triidroxi-3,3',6-trimetoxiflavona, também conhecido como jaceidina, decrito pela primeira vez no gênero *Piptadenia*.



4',5,7-triidroxi-3,3',6-trimetoxiflavona

São reportadas diversas atividades farmacológicas ao flavonóide jaceidina, podendo citar a atividade hepato-protetora (MOHAMED et al., 2009), atividade antioxidante (LEACH et al., 2007), efeito imunomodulador (TALEB-CONTINI et al., 2006), agente antineoplásico (PETTIT et al., 2005), atividade antiplaquetária (AFIFI; ABURJAI, 2004), efeito antiprotozoário (TALEB-CONTINI et al., 2004), atividade antimicrobiana (TALEB-CONTINI et al., 2003), atividade antiviral (ELSOHLY et al., 1997), atividade antifúngica (AFIFI et al., 1991), entre outras.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **Ps-03** registrados em DMSO- d_6 (δ em ppm e J em Hz).

	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
2	155,84	-		
3	138,03	-		
4	178,58	-		
5	152,92	-		
6	132,24	-		
7	159,77	-		
9	152,50	-		
10	104,62	-		
1'	121,58	-		
3'	148,18	-		
4'	150,48	-		
CH				
8	95,02	6,51 (s, 1H)	C-7, C-9	C-6, C-10
2'	112,68	7,62 (d, $J=2$ Hz, 1H)		C-2, C-4', C-6'
5'	116,37	6,95 (d, $J=8,45$ Hz, 1H)		C-1', C-3'
6'	122,82	7,55 (dd, $J=2$ e $8,45$ Hz, 1H)		C-2, C-2', C-4'
CH₃O				
CH ₃ O-3	60,42	3,78 (s, 3H)		C-3
CH ₃ O-3'	56,42	3,84 (s, 3H)		C-3'
CH ₃ O-6	60,53	3,74 (s, 3H)		C-6
OH-5	-	12,73 (s, 1H)		

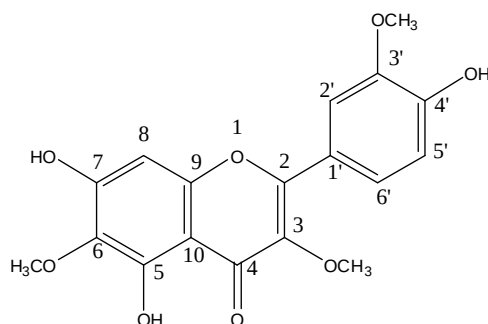
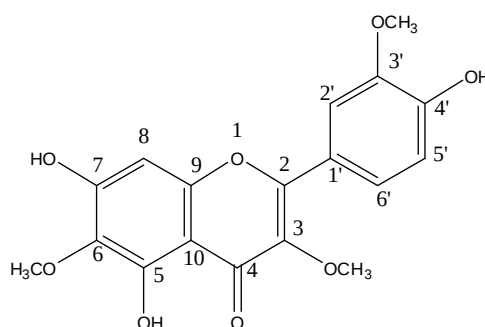


Tabela 6. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância **Ps-03** (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz) com dados da literatura (DMSO- d_6) (AGRAWAL, 1989).

Carbonos	Os-03	Literatura
	δ_c	δ_c
C		
2	155,84	155,30
3	138,03	137,30
4	178,58	178,00
5	152,92	152,20
6	132,24	131,20
7	159,77	157,80
9	152,50	151,50
10	104,62	104,30
1'	121,58	120,80
3'	148,18	147,40
4'	150,48	149,70
CH		
8	95,02	94,10
2'	112,68	112,00
5'	116,37	115,60
6'	122,82	122,10
CH₃O		
CH ₃ O-3	60,42	-
CH ₃ O-3'	56,42	-
CH ₃ O-6	60,53	-



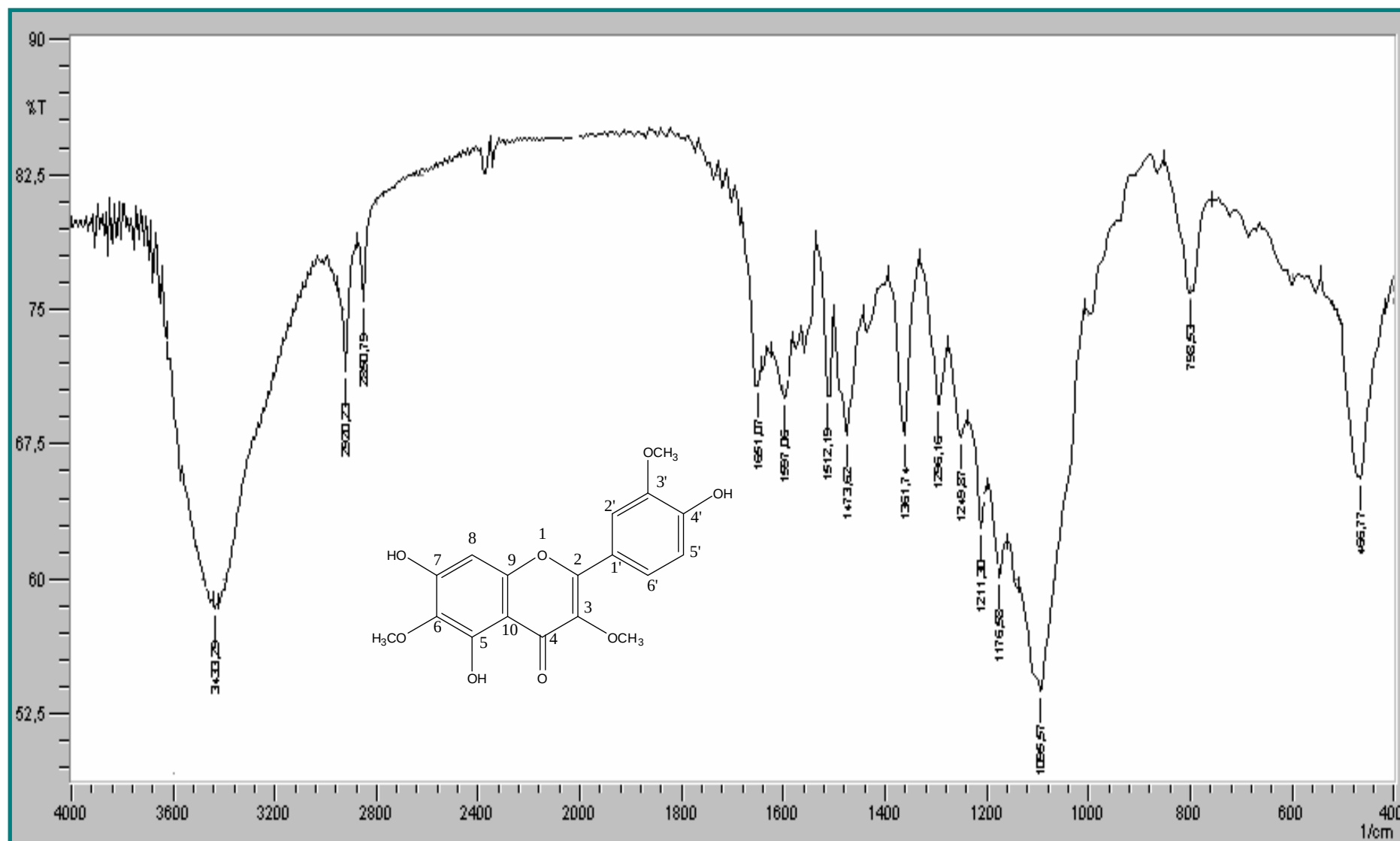


Figura 29. Espectro na região do Infravermelho de **Ps-03** (Pastilha de Kbr).

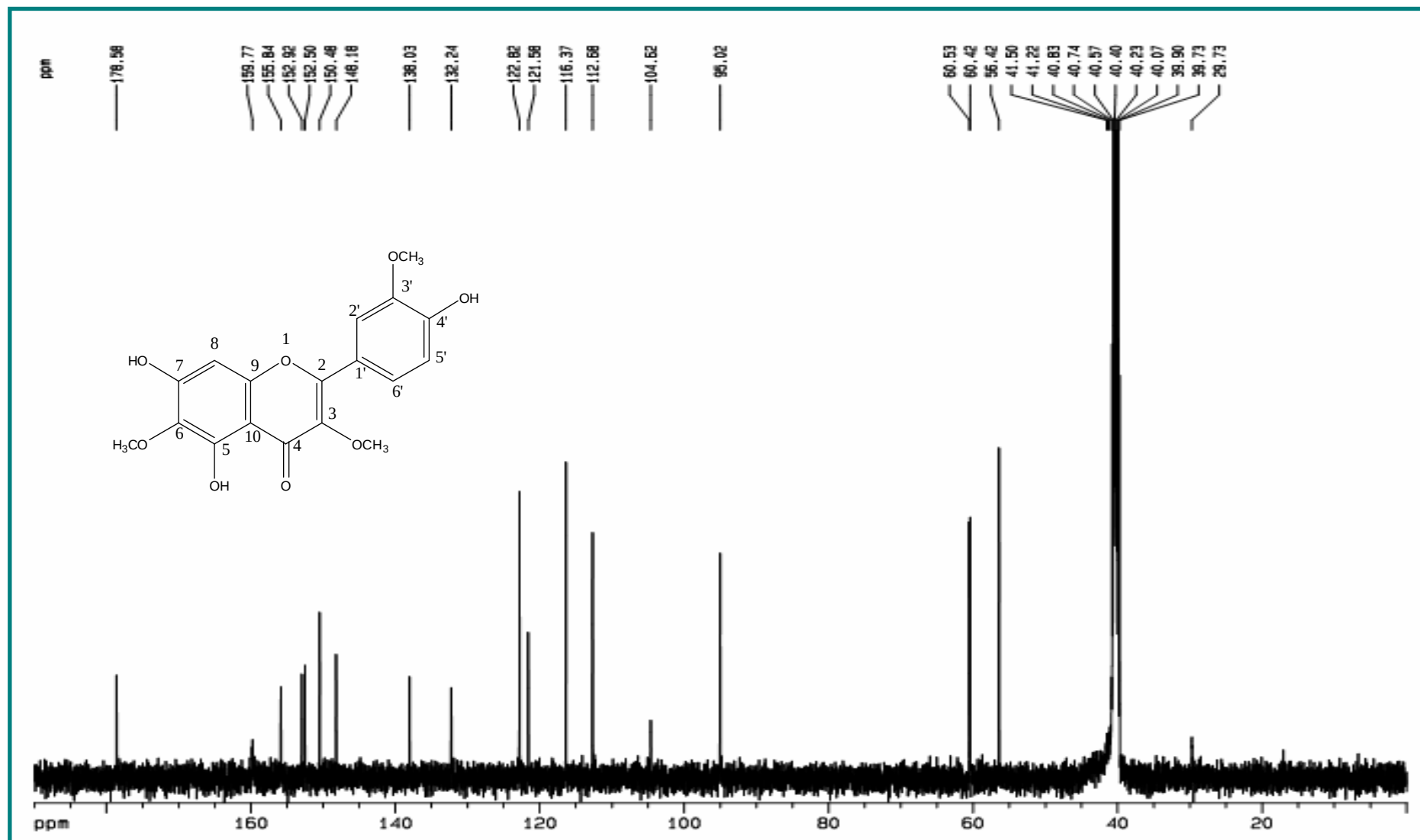


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-03**.

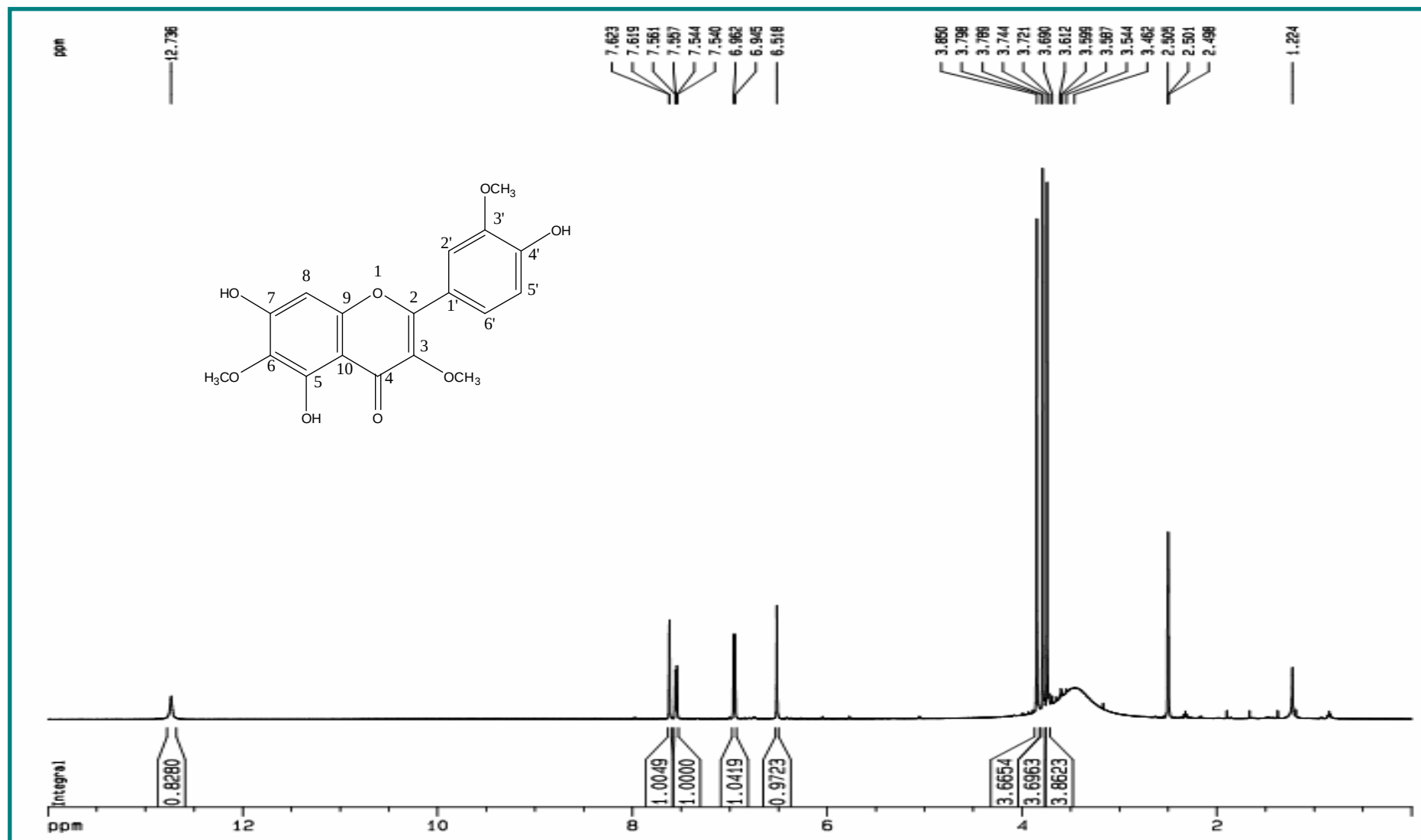


Figura 31. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) de **Ps-03**.

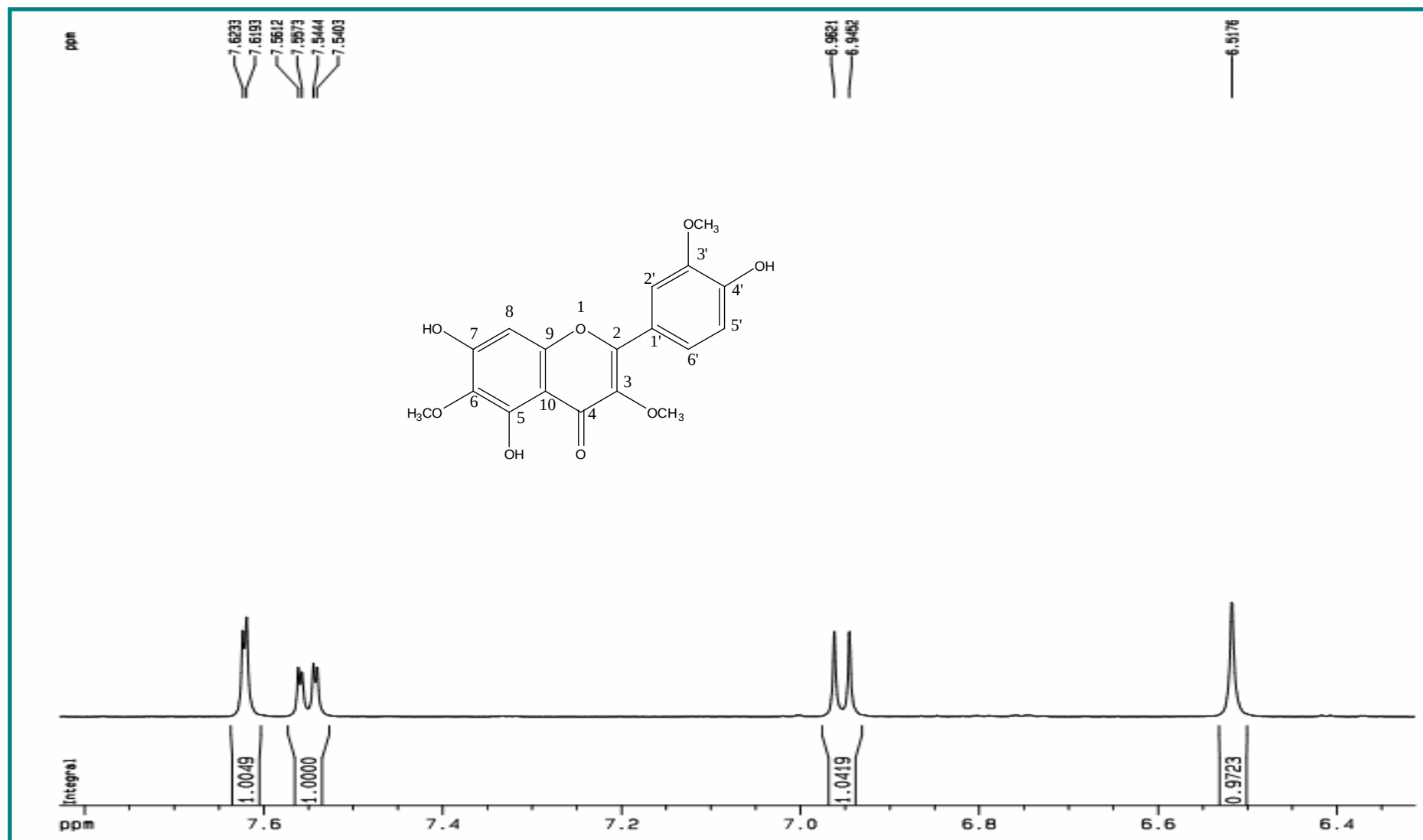


Figura 32. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-03**.

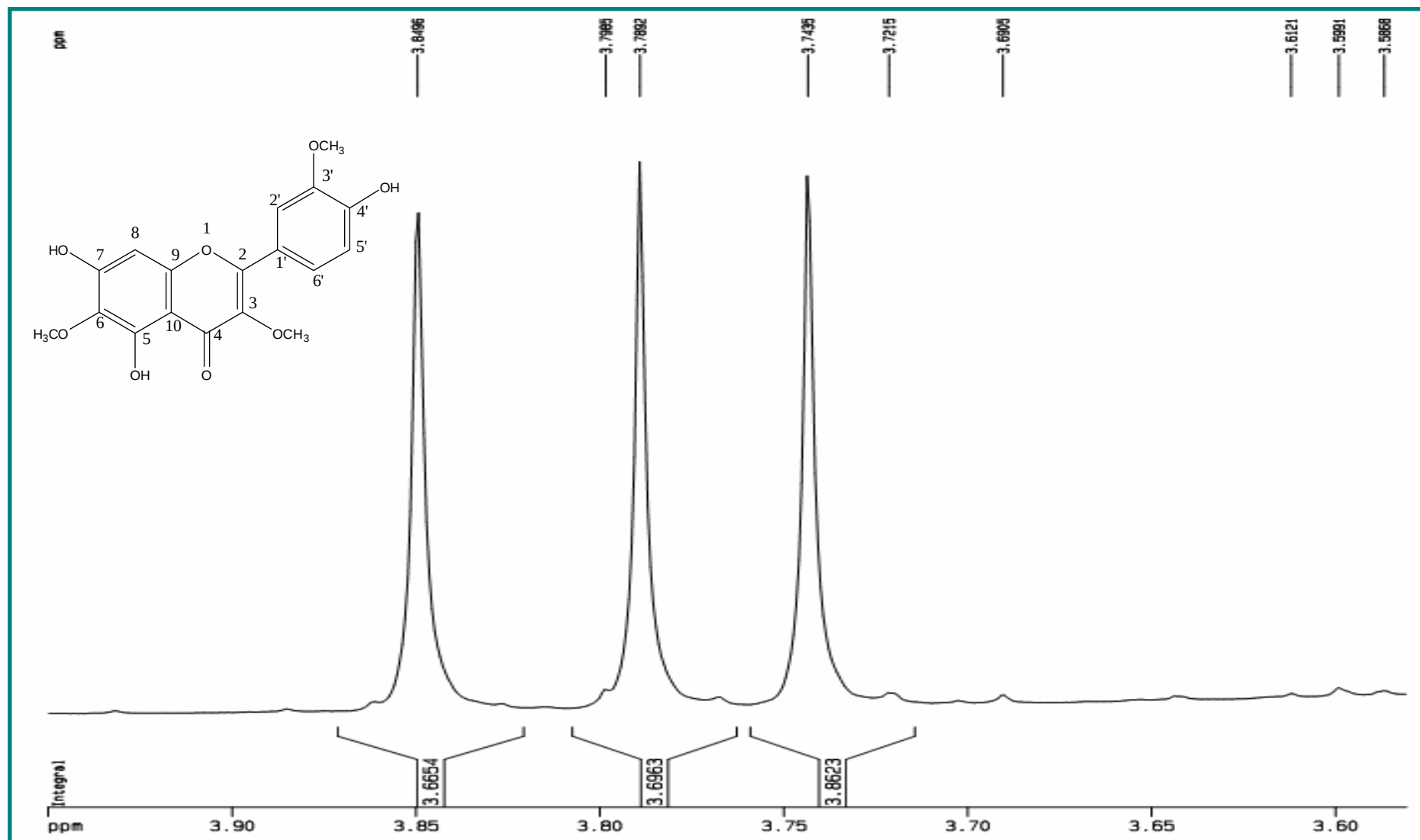


Figura 33. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-03**.

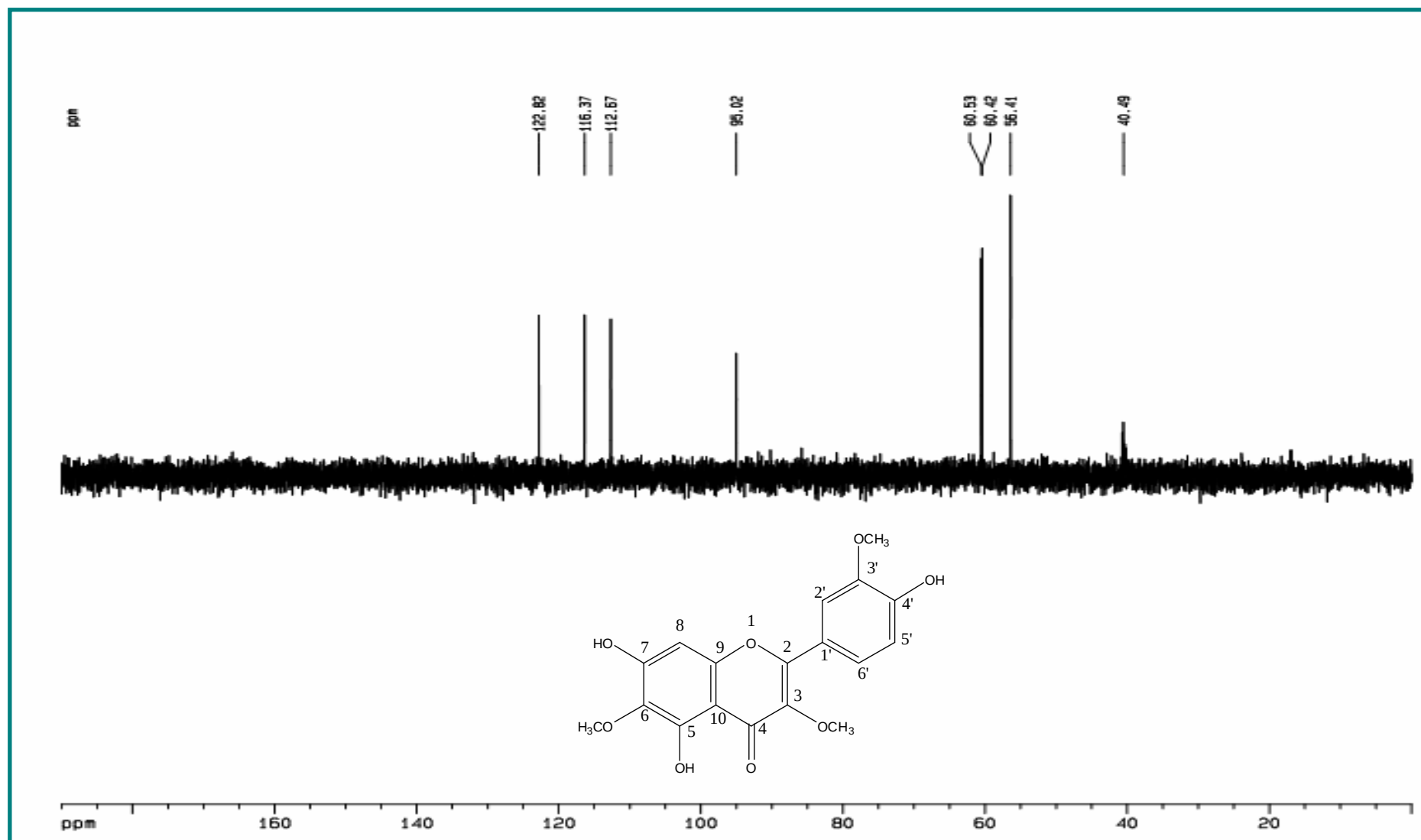


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-03**.

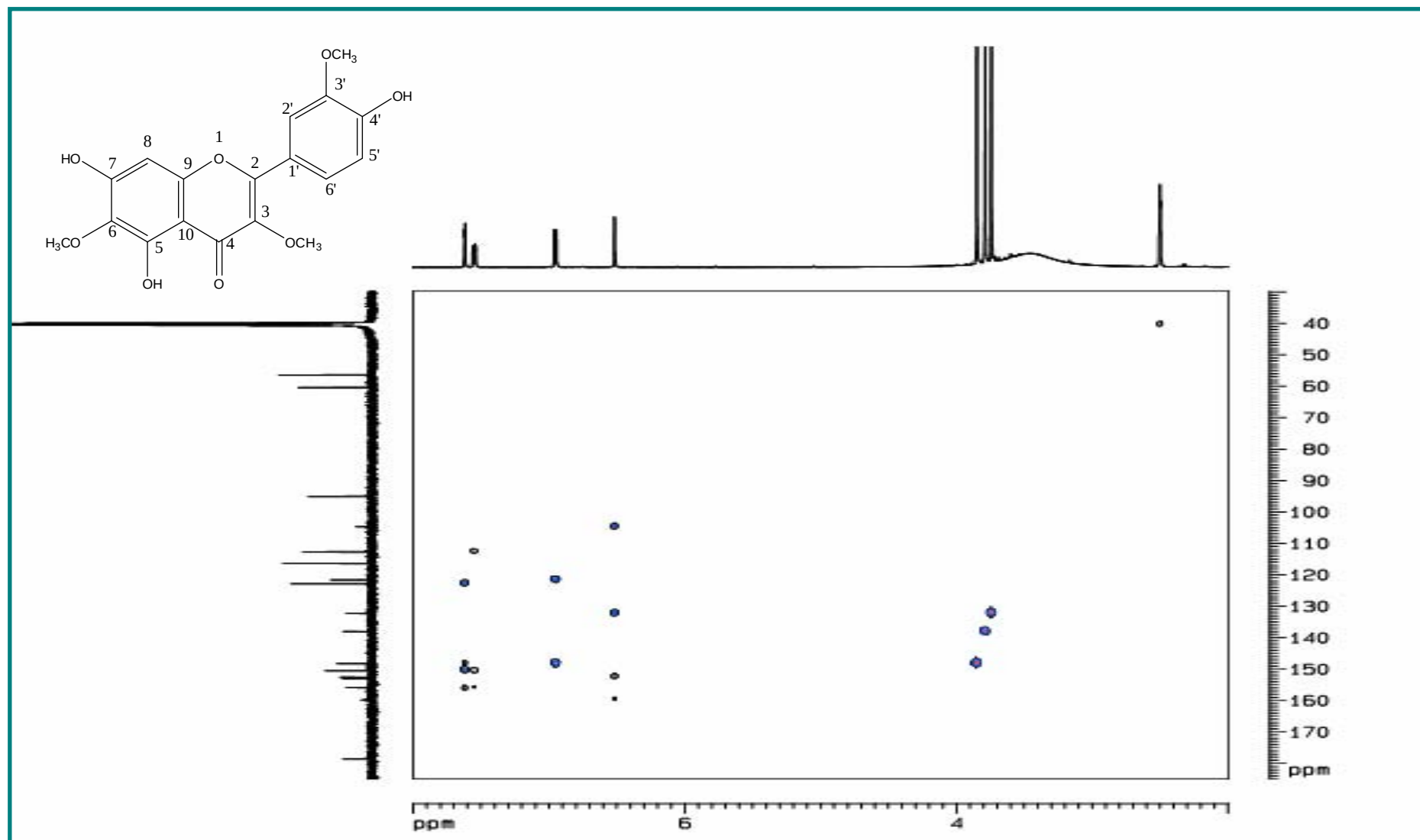


Figura 35. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Ps-03.

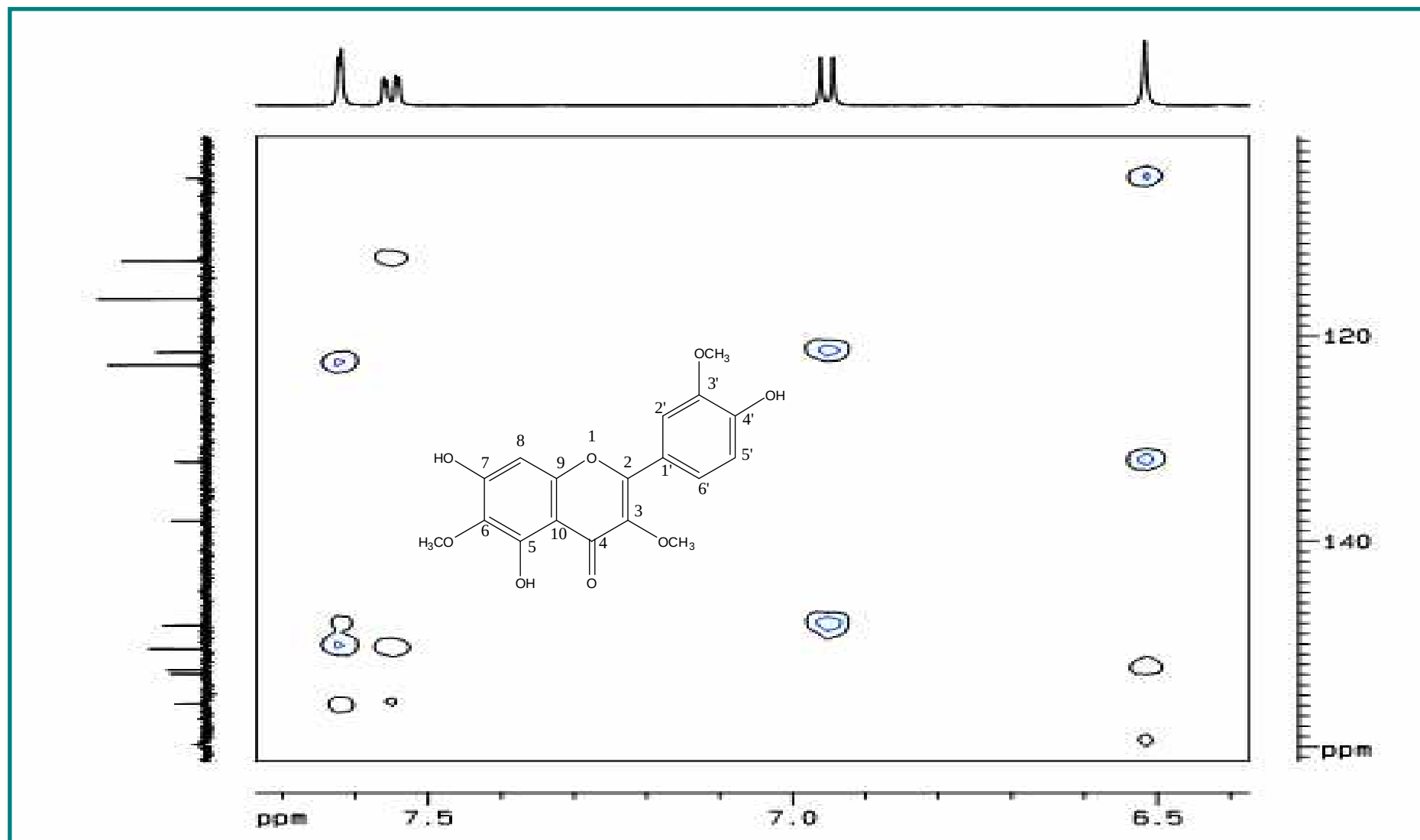


Figura 36. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-03**.

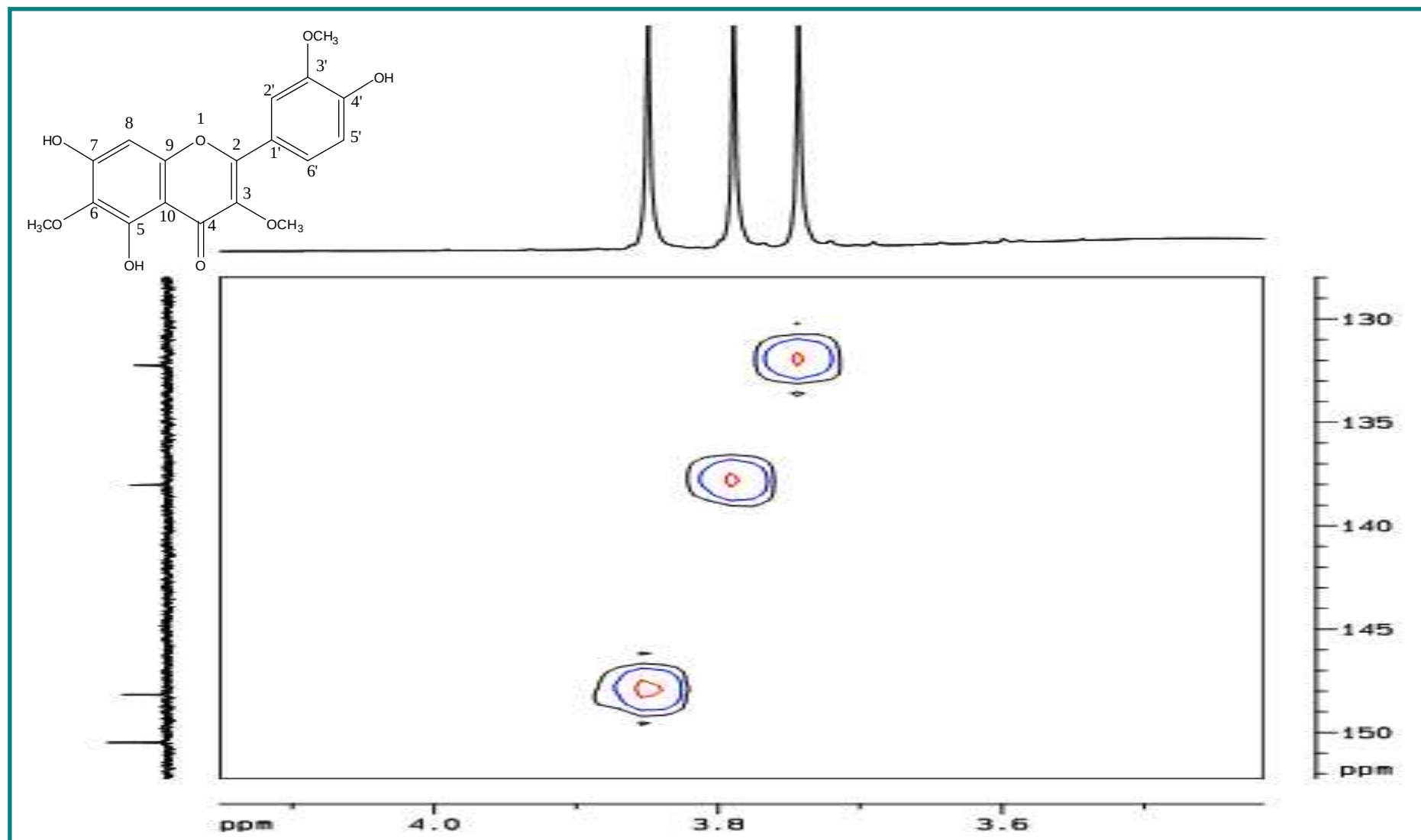


Figura 37. Expansão do espectro de RMN ¹H x ¹³C-HMBC (500 MHz, DMSO-*d*₆) de **Ps-03**.

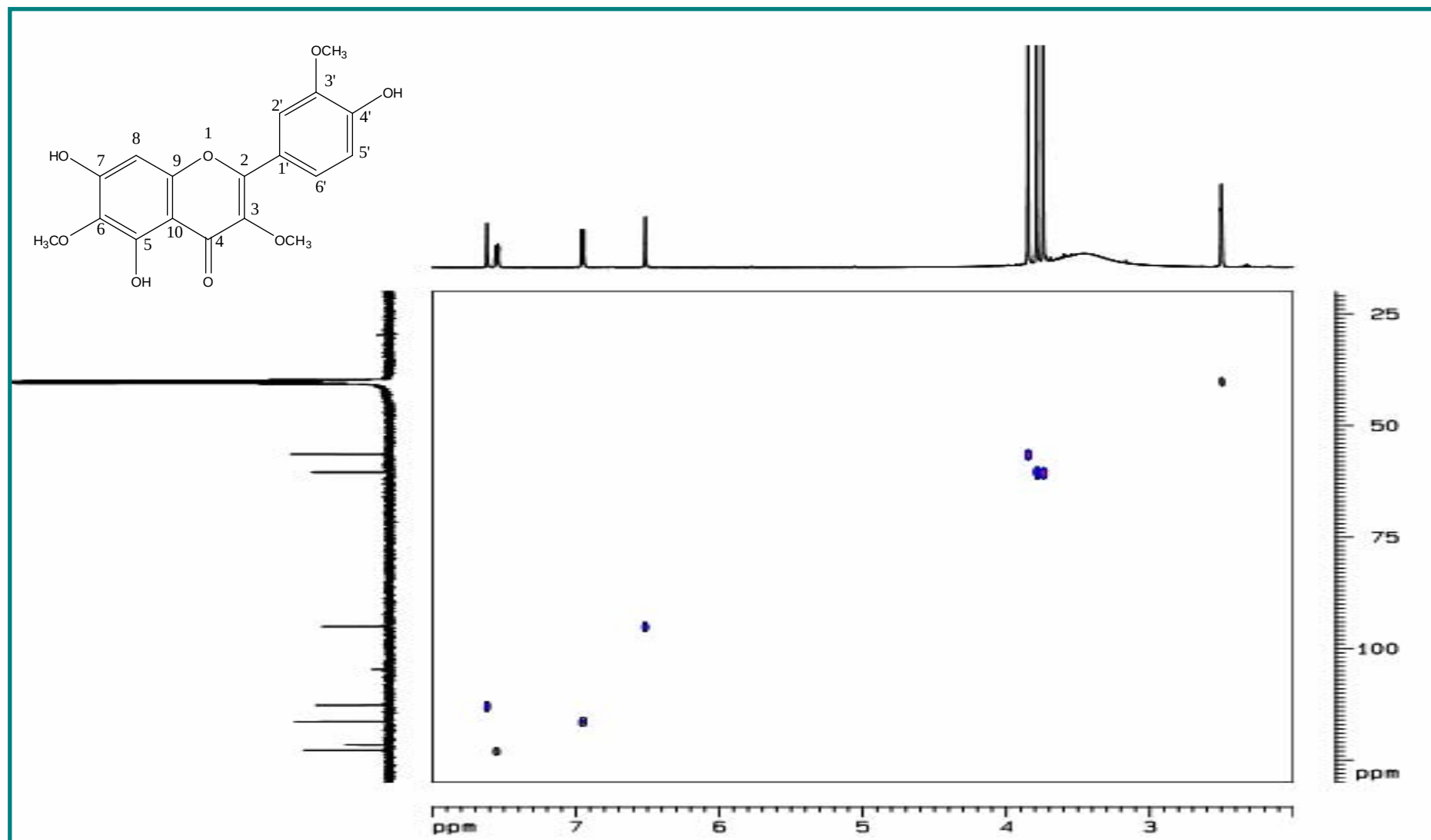


Figura 38. Espectro de RMN ¹H X ¹³C-HMQC (500 MHz, DMSO-*d*₆) de **Ps-03**.

5.5 Identificação estrutural de Ps-04.

A substância Ps-04 apresentou-se na forma de cristais marrom, solúvel em DMSO e apresentando ponto de fusão de 171,5 °C. A mesma foi identificada através da interpretação dos espectros de IV e 1D e 2D de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com os dados encontrados na literatura.

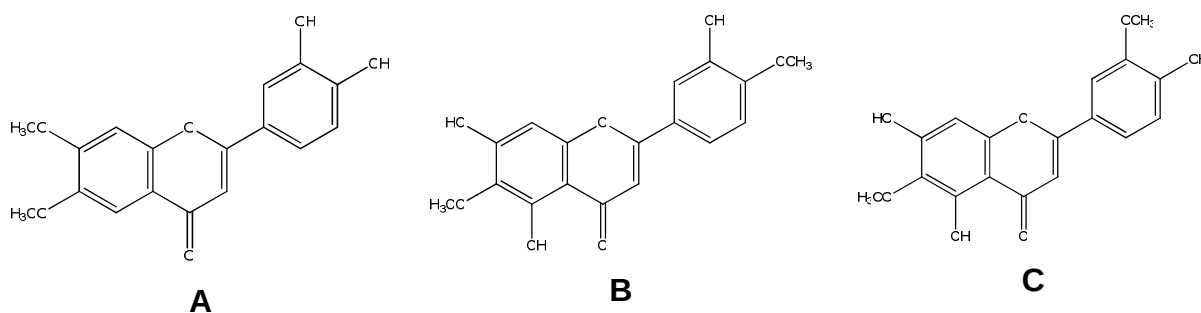
O espectro de Ps-04 na região do IV (Figura 39, p. 106), obtido em pastilhas de KBr, revelou a presença de uma banda de absorção forte em 3433 cm^{-1} , característica de estiramento de OH, sugerindo a presença de grupamentos hidroxilas na molécula. A absorção de OH é ainda confirmada, pelo pico em 1111 cm^{-1} , típico de deformação axial de C-O (SILVERSTEIN et al., 2007). Na região de 2920 e 2850 cm^{-1} têm-se absorções que podem tratar - se de estiramento de CH de grupos metínicos, metilênicos e/ou metílicos. Entre 1597 e 1423 cm^{-1} verificam-se absorções que foram atribuídas a C=C de anel aromático. Em 1654 cm^{-1} observa-se um sinal característico da presença de carbonila conjugada ou formando ponte de hidrogênio (SILVERSTEIN et al., 2007), podendo-se inferir a possível presença deste grupamento funcional na estrutura da substância em questão.

De forma semelhante a Ps-02, o espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 40, p. 107; Tabela 7, p. 104), mostrou a presença de 17 sinais característicos de flavonóide, nos quais, dez foram atribuídos à carbonos não hidrogenados, cinco à carbonos metínicos e dois à carbonos metílicos. Os sinais δ_{C} 55,90 e 59,61 também observados nos espectros de RMN ^{13}C -BB (Figura 40, p. 107) e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 44, p. 111) são compatíveis com carbonos metoxílicos, sendo que a primeira desimpedida e a última impedida estericamente. Análise criteriosa desse espectro mostra a presença de um sinal que até então não tinha sido observado por nenhum dos espectros de RMN ^{13}C dos flavonóides anteriores, característico de carbono metínico (δ_{C} 102,48) sugerindo que Ps-04 é uma flavona.

O espectro de RMN ^1H (Figura 41, p. 108; Tabela 7, p. 104) e suas expansões (Figuras 42 e 43, p. 109 e 110), da mesma maneira que em Ps-02 e Ps-03, apresentaram um sistema ABX, caracterizado pela presença dos seguintes sinais: *dd* (δ_{H} 7,51), *d* (δ_{H} 7,50) e *d* (δ_{H} 6,92). Além do deslocamento em δ_{H} 6,50 sugestivo do H-8 do anel A de flavonóides, o espectro apresentou outro simpleto em δ_{H} 6,79 o

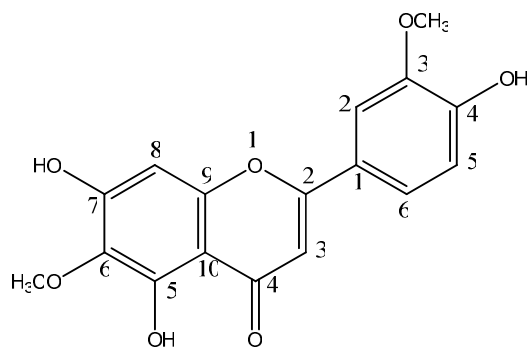
que corrobora com a hipótese da posição C-3 não estar substituída. Foi observado também a presença de hidroxila quelada na região de δ_H 13,02.

Através dos dados supracitados associadas ao padrão de substituição observados no anel A (5,6,7-trissubstituído) e no anel B (3', 4'-bissubstituído), pode-se sugerir duas propostas estruturais para Ps-04:



O espectro de correlação heteronuclear direta ($^1H \times ^{13}C$ -HMQC) (Figura 45, p. 112; Tabela 7, p. 104) permitiu observar todas as correlações dos hidrogênios da molécula com seus respectivos carbonos. Entretanto foi através do espectro de correlação heteronuclear ($^1H \times ^{13}C$ -HMBC) (Figura 46, p. 113; Tabela 7, p. 104) e suas expansões (Figuras 47, 48 e 49, p. 114, 115 e 116) que foi possível atribuir a posição da metoxila desimpedida estericamente. Para tanto, observou-se a correlação à três ligações dos hidrogênios da metoxila desimpedida em δ_H 3,87 com o carbono em δ_C 148,07, o qual sustenta esta metoxila. A correlação dos H-2' e H-5' com o mesmo carbono (δ_C 148,07), fez sugerir que este seria o C-3' ou C-4', descartando assim a proposta A. Entretanto a ausência de correlação do H-6' com este carbono que sustenta a metoxila desimpedida estericamente, confirmou que o deslocamento em δ_C 148,07 pertencia ao C-3' descartando com isso a proposta B.

Comparações realizadas entre os dados espectrais de RMN ^{13}C de Ps-04 e Ps-03 (Tabela 8, p. 105), permitiram a determinação inequívoca da proposta estrutural C, como sendo a 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxiflavona, também conhecida como jaceosidina, descrita pela primeira vez no gênero *Piptadenia*.



4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxiflavona

Ao flavonóide jaceosidina, já foram atribuídas diversas atividades farmacológicas, podendo citar tratamento de doenças auto-imune (LEE; LIM, 2009a), tratamento da inflamação crônica (LEE; LIM, 2009b), prevenção e tratamento de diabetes mellitus (CHOI et al., 2009), indutor de apoptose em células humanas de câncer de ovário através da via mitocondrial (WEN et al., 2008), efeito anti-inflamatório e imunossupressor (YE et al. 2008), atividade antioxidante (SHARIFIFAR et al., 2008), indução de apoptose em células epiteliais através da geração de espécies reativas de oxigênio (MIN-JUNG et al. 2007), efeito antiprotozoário (TALEB-CONTINI et al. 2004), atividade antifúngica (HONG-XIANG et al. 2002), entre outras.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **Ps-04** registrados em DMSO- d_6 (δ em ppm e J em Hz).

	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
2	163,11	-		
4	181,61	-		
5	152,47	-		
6	132,02	-		
7	161,00	-		
9	152,84	-		
10	102,76	-		
1'	121,49	-		
3'	148,07	-		
4'	150,91	-		
CH				
3	102,48	6,79 (s, 1H)	C-2, C-4	C-1'
8	94,74	6,50 (s, 1H)	C-9	C-6, C-10
2'	110,00	7,50 (d, $J=2\text{Hz}$, 1H)	C-3'	C-4', C-6'
5'	115,79	6,92 (d, $J=8,95$)		C-1', C-3'
6'	120,17	7,51 (dd, $J=2$ e $J=8,95$ Hz, 1H)		C-4'
CH₃O				
CH ₃ O-3'	55,90	3,87 (s, 3H)		C-3'
CH ₃ O-6	59,61	3,73 (s, 3H)		C-6
OH-5	-	13,02 (s, 1H)		-

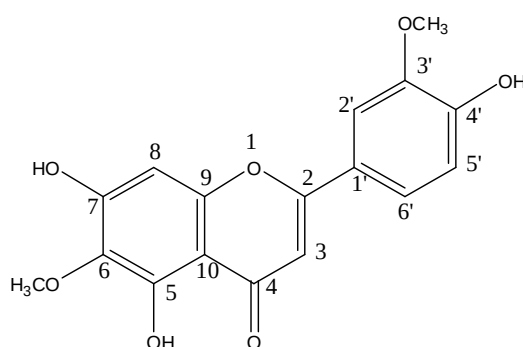
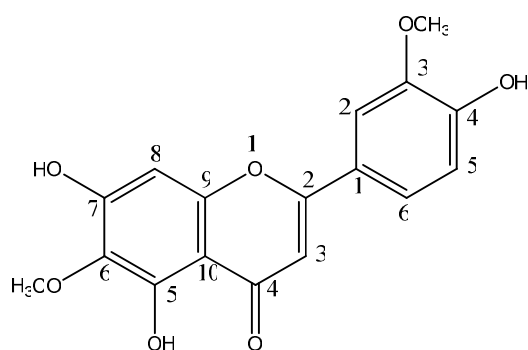
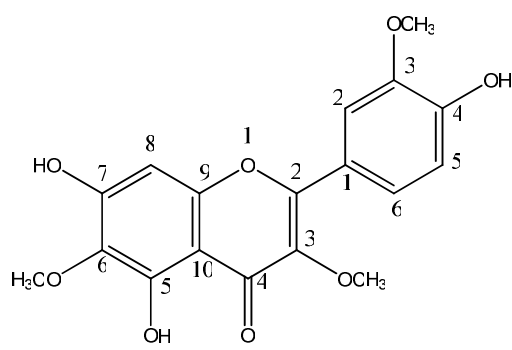


Tabela 8. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância **Ps-04** (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz) com Ps-03(δ , DMSO- d_6 , 125 MHz).

Carbonos	Ps-04	Carbonos	Ps-03
	δ_c		δ_c
C		C	
2	163,11	2	155,84
4	181,61	3	138,03
5	152,47	4	178,58
6	132,02	5	152,92
7	161,00	6	132,24
9	152,84	7	159,77
10	102,76	9	152,50
1'	121,49	10	104,62
3'	148,07	1'	121,58
4'	150,91	3'	148,18
CH		4'	150,48
3	102,48	CH	
8	94,74	8	95,02
2'	110,00	2'	112,68
5'	115,79	5'	116,37
6'	120,17	6'	122,82
CH₃O		CH₃O	
CH ₃ O-3'	55,90	CH ₃ O-3	60,42
CH ₃ O-6	59,61	CH ₃ O-3'	56,42
		CH ₃ O-6	60,53



Ps-04



Ps-03

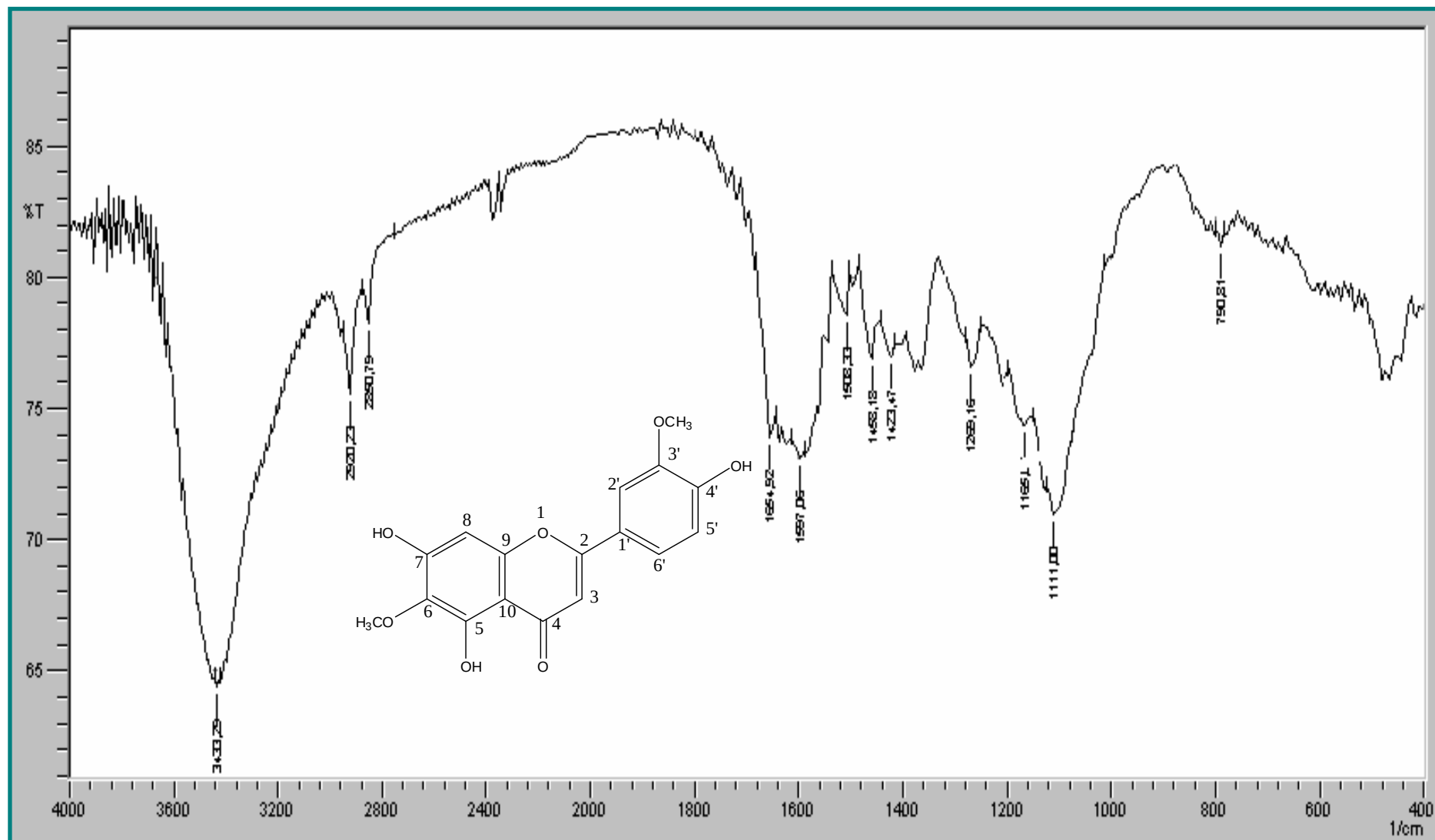


Figura 39. Espectro na região do Infravermelho de **Ps-04** (Pastilha de Kbr).

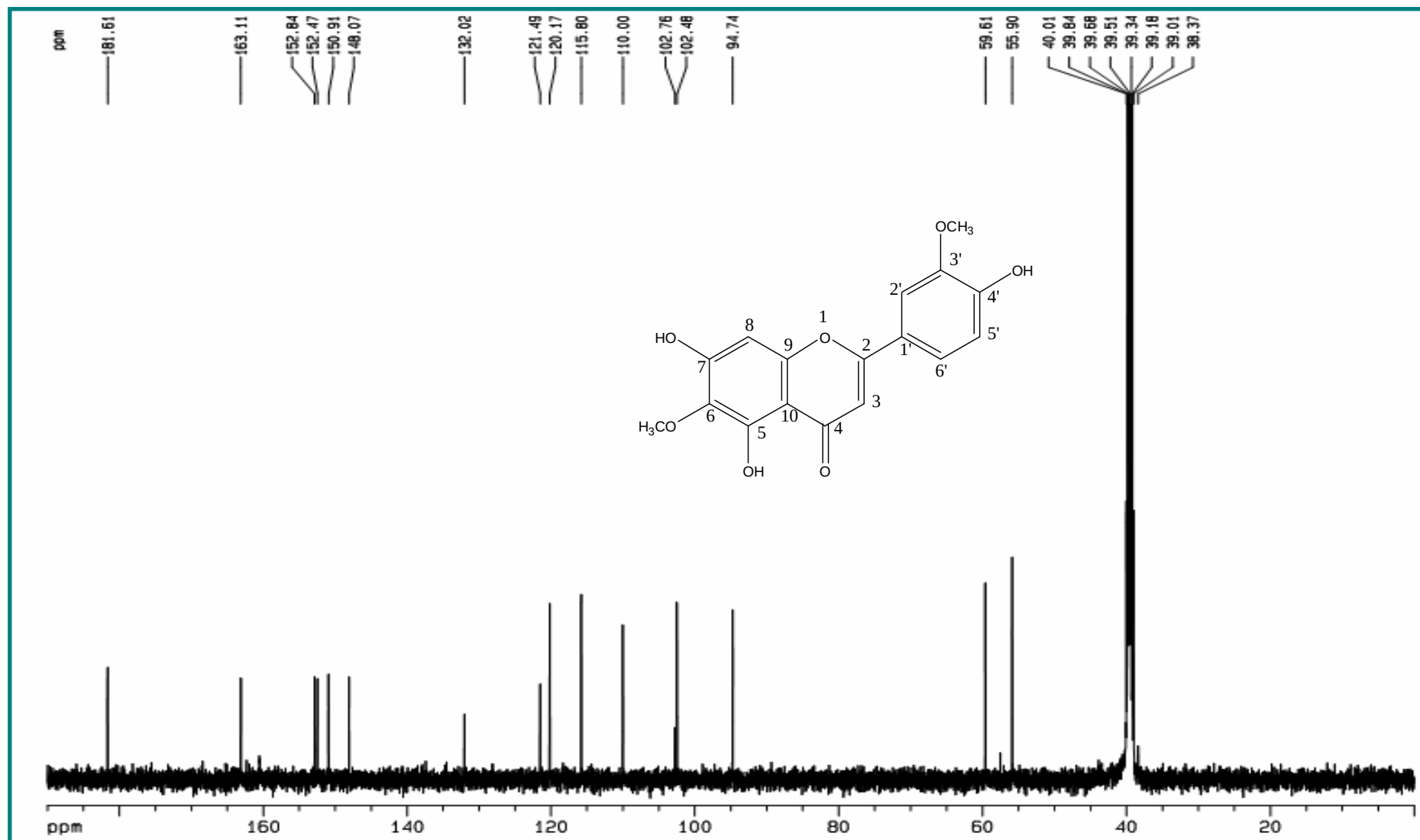


Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-04**.

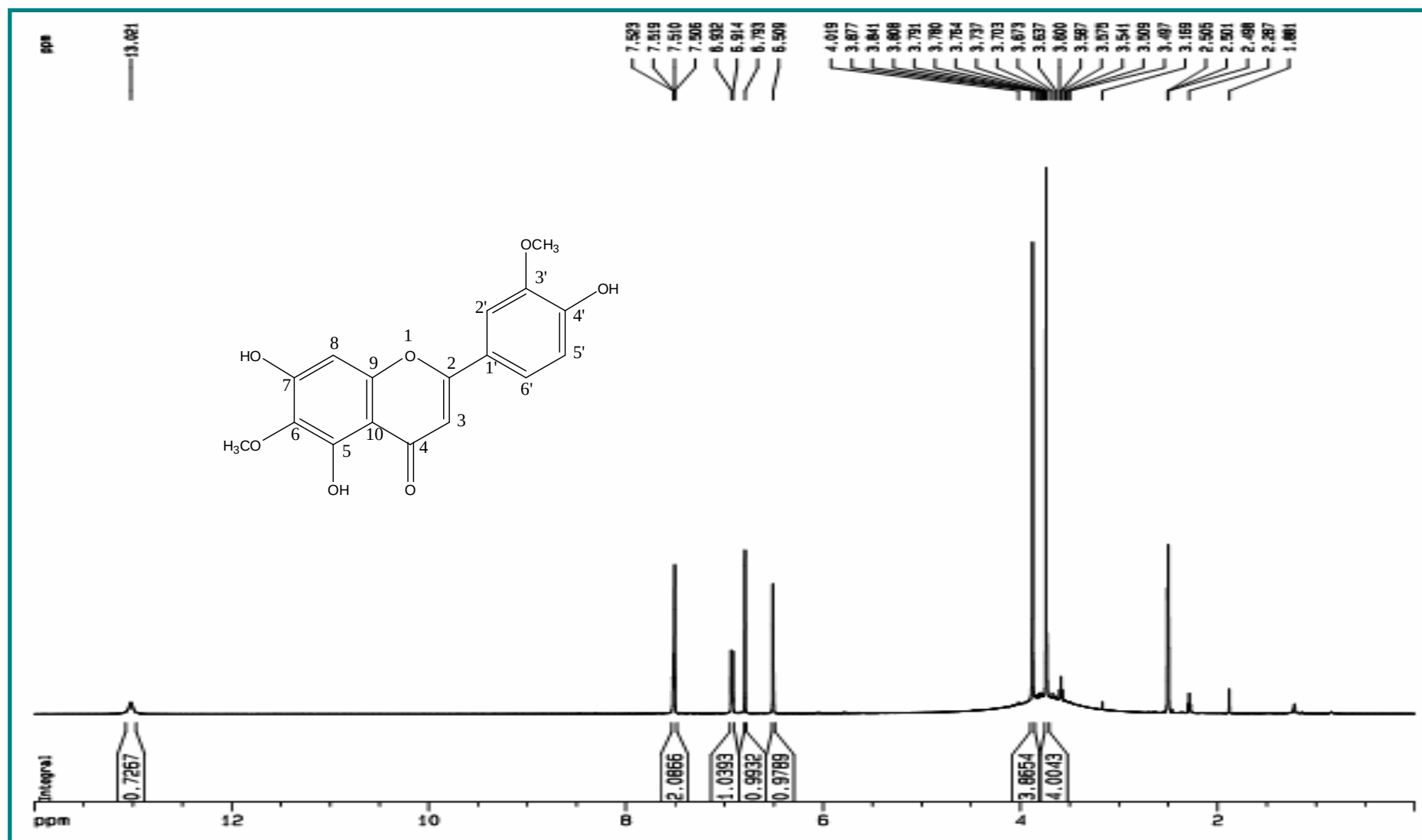


Figura 41. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-04**.

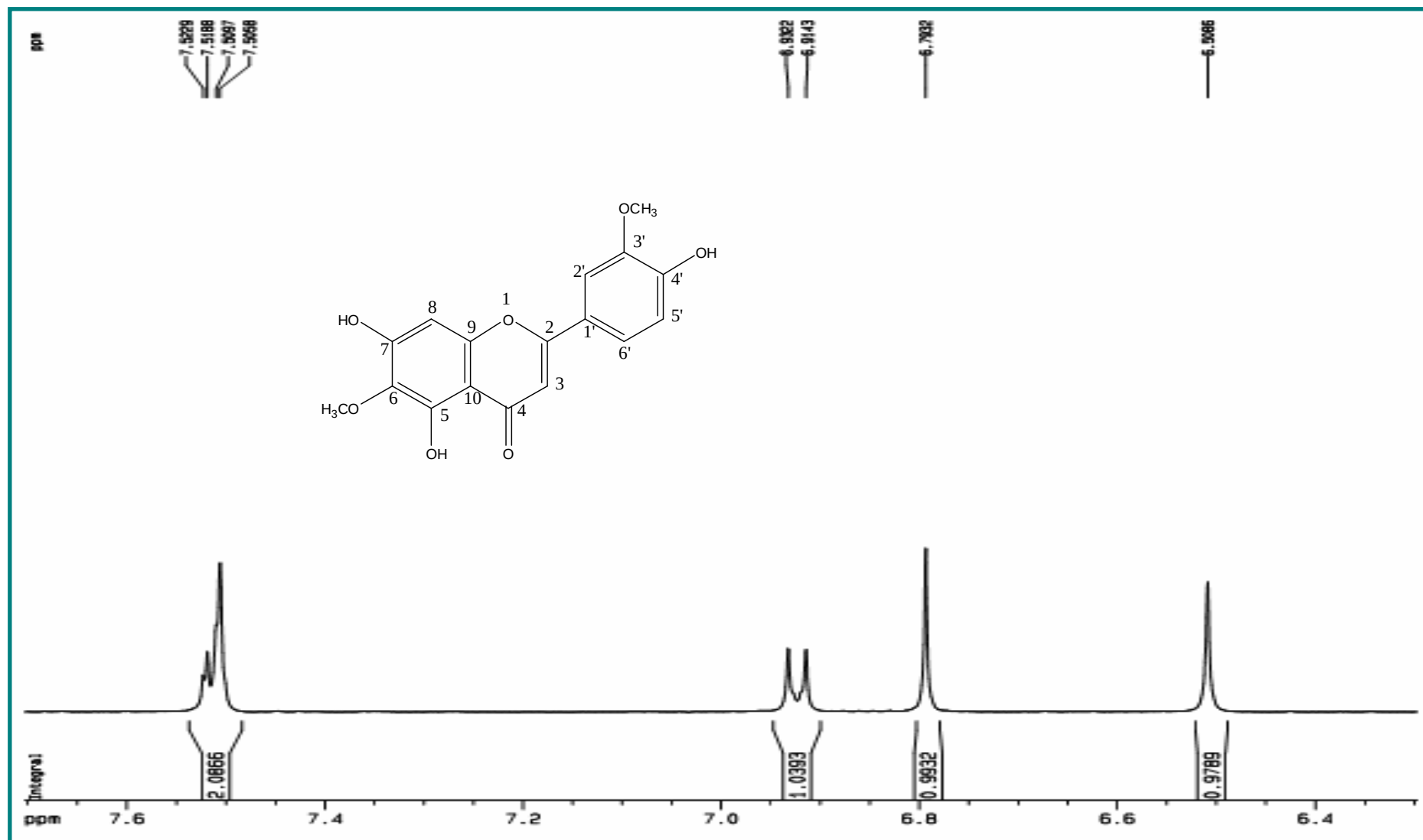


Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-04**.

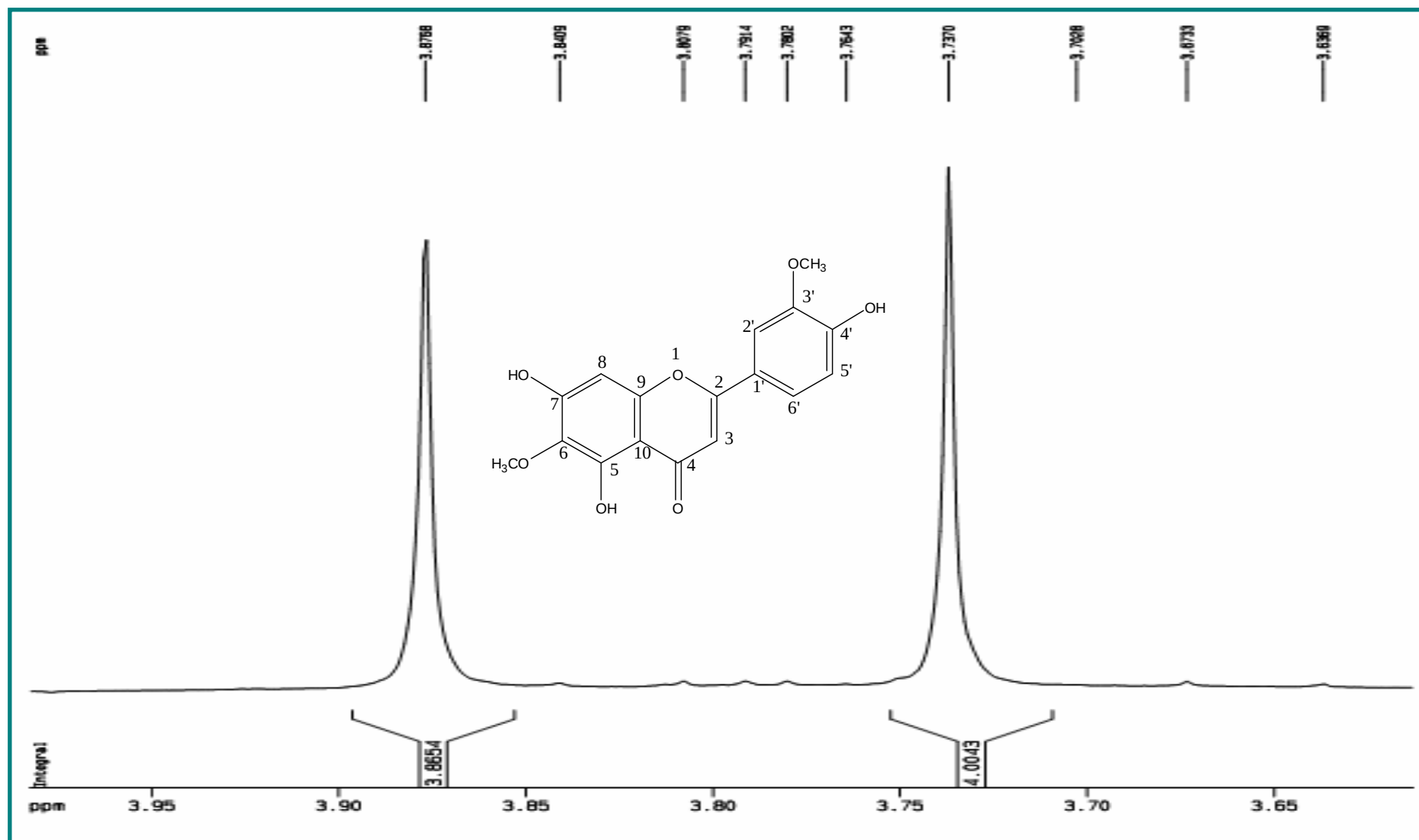


Figura 43. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-04**.

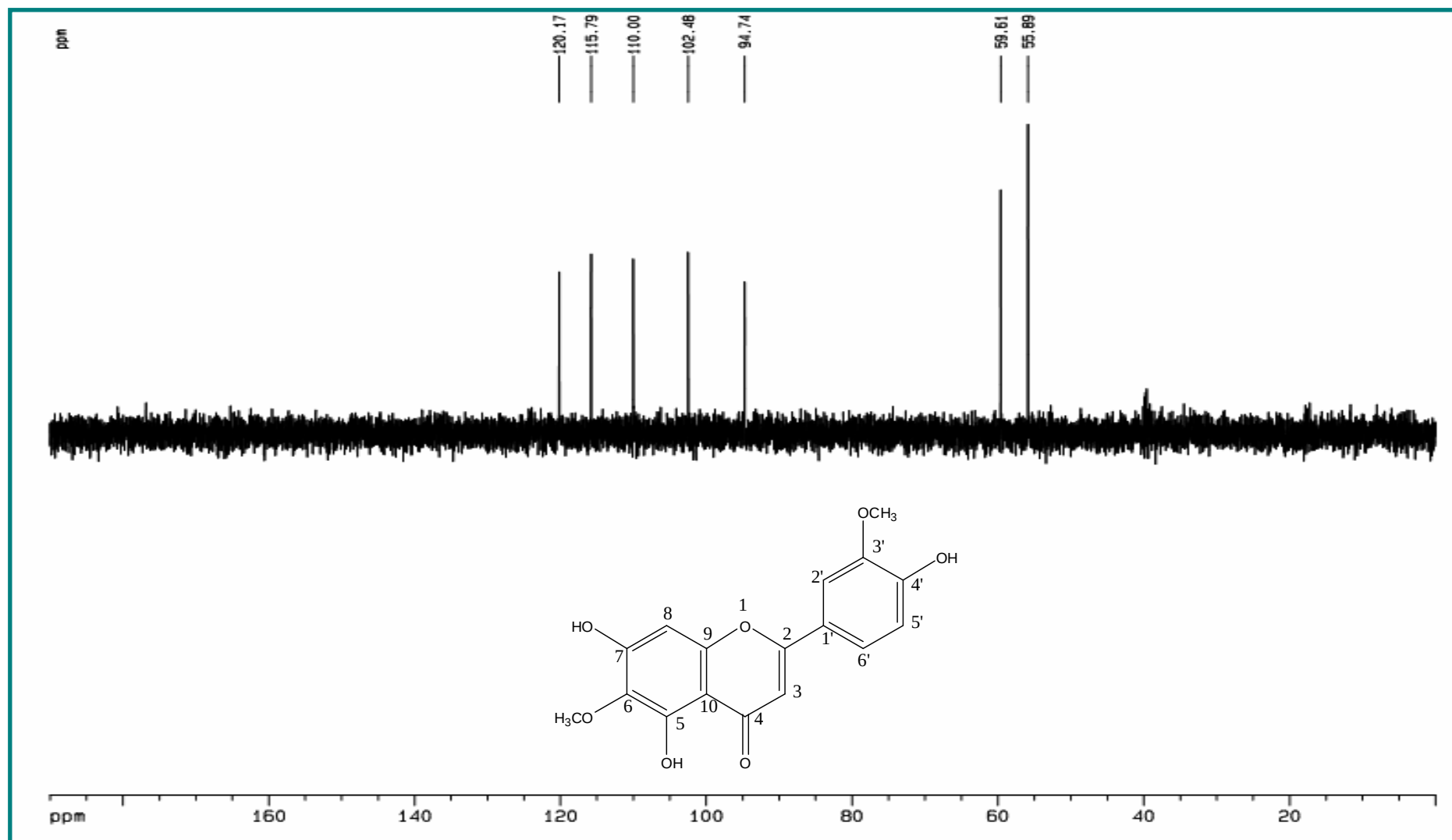


Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-04**.

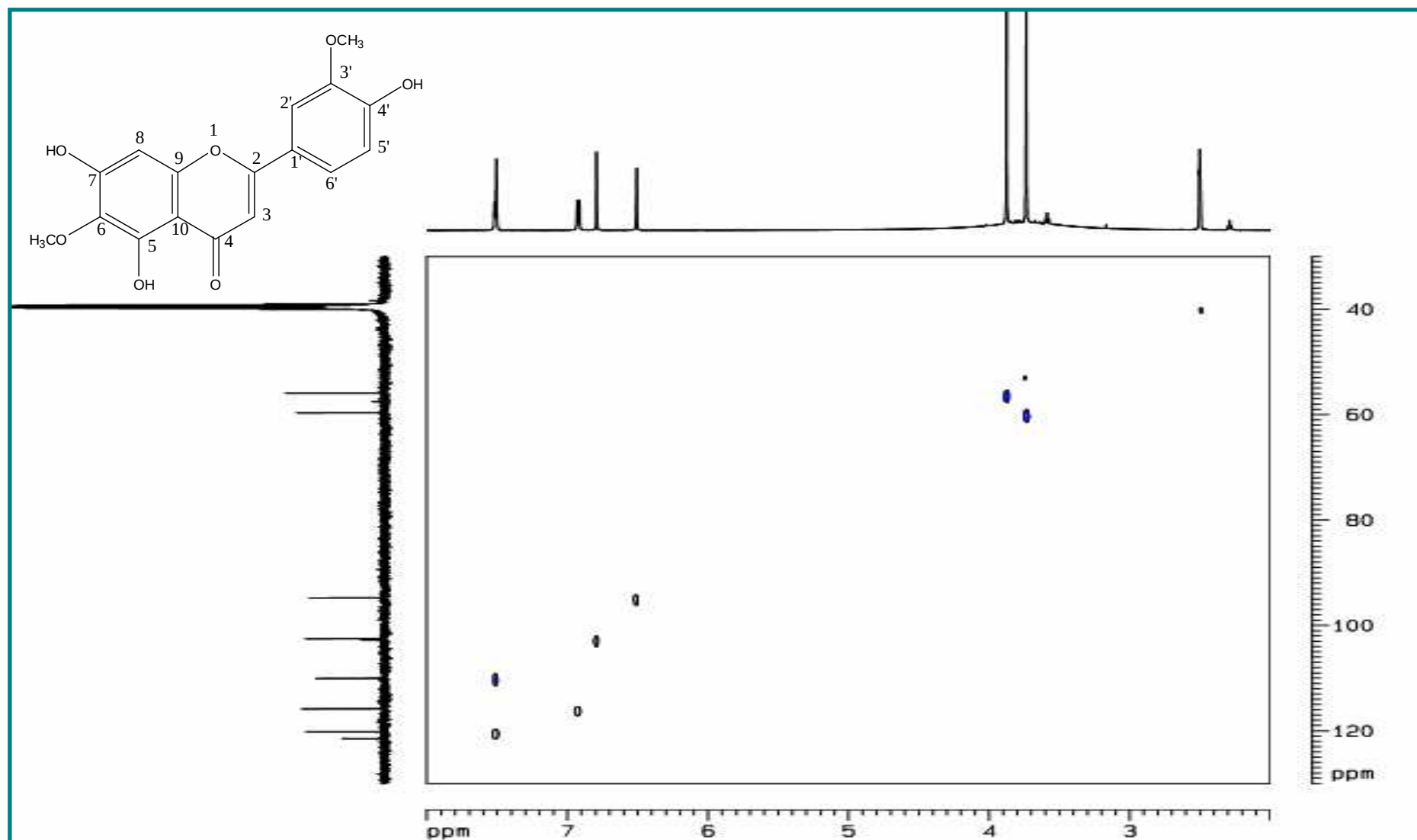


Figura 45. Espectro de RMN 1H x ^{13}C -HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) de **Ps-04**.

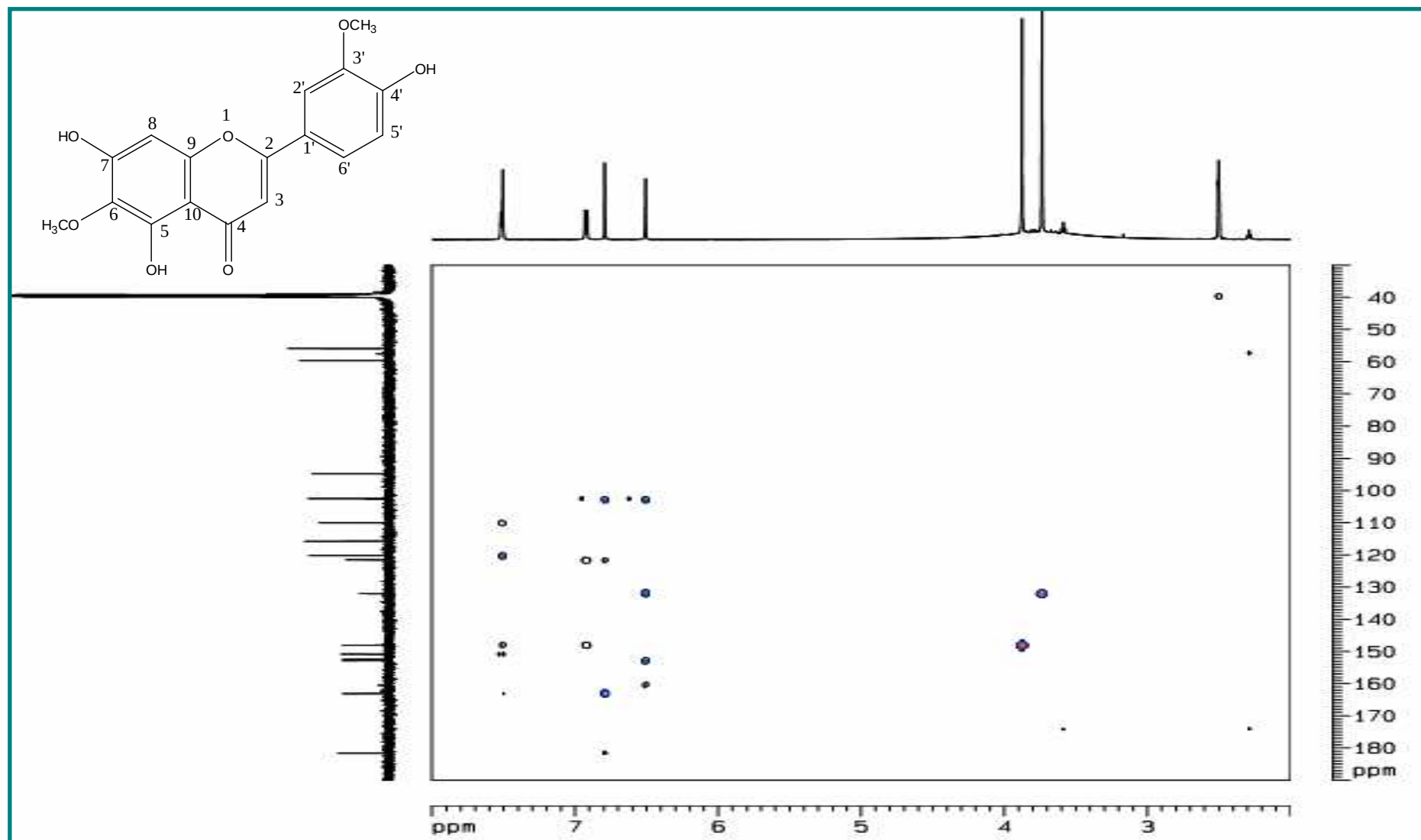


Figura 46. Espectro de RMN ¹H X ¹³C-HMBC (500 MHz, DMSO-*d*₆) de **Ps-04**.

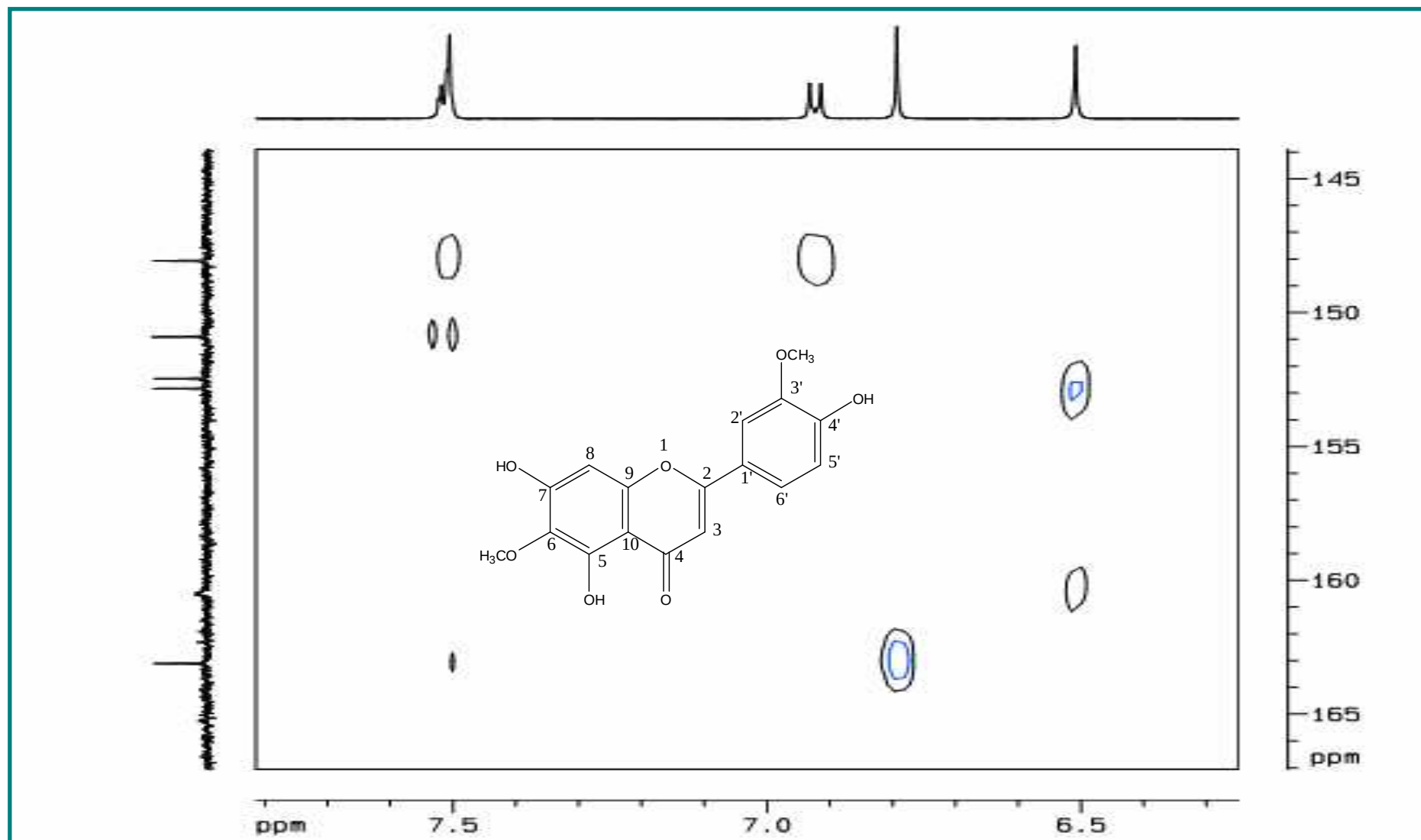


Figura 47. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de **Ps-04**.

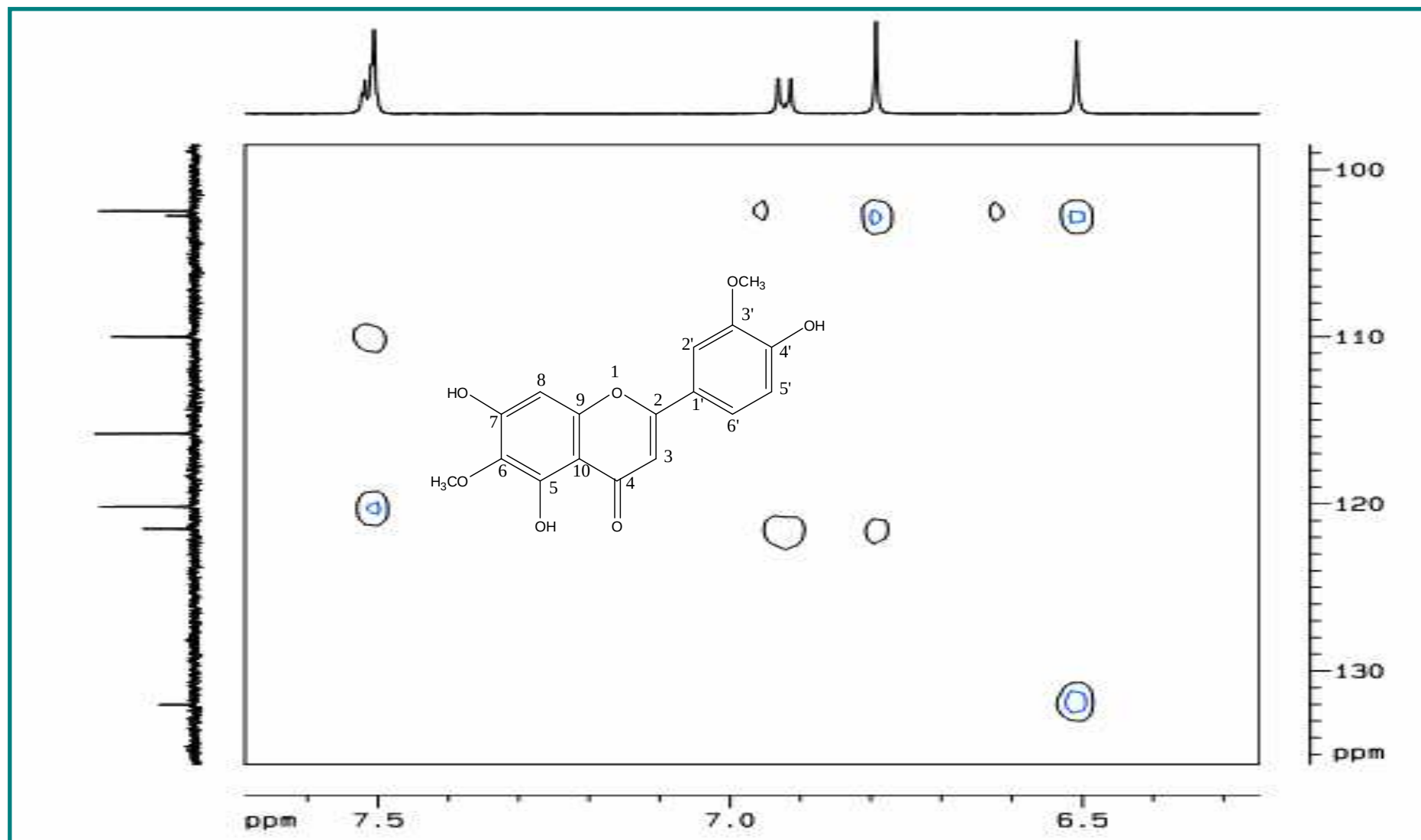


Figura 48. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-04**.

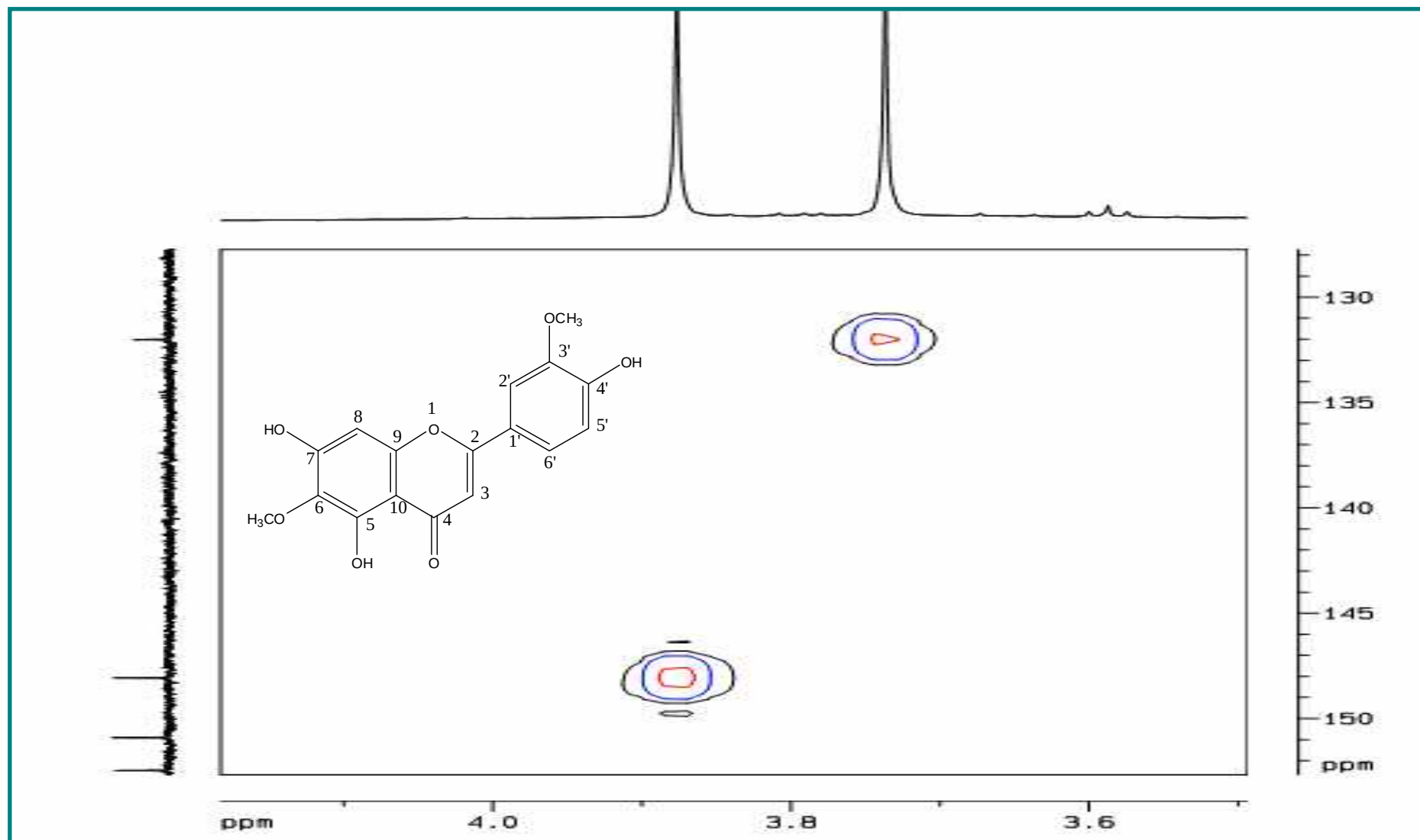


Figura 49. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-04**.

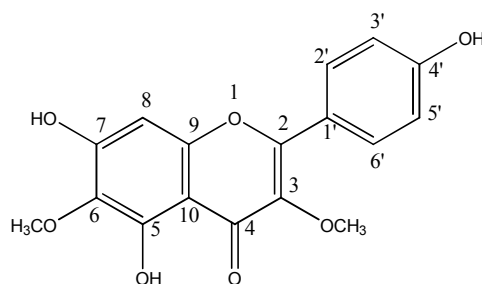
5.6 Identificação estrutural de Ps-05.

A substância Ps-05 apresentou-se na forma de cristais amarelo claro, solúvel em DMSO e apresentando ponto de fusão de 199,6 °C. A mesma foi identificada através de análise espectral dos dados de IV, RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com os dados encontrados na literatura.

Ps-05 mostrou no espectro IV (Figura 50, p. 121), obtido em pastilhas de KBr, uma banda de absorção em 3414 cm^{-1} , típicas de deformação axial de O-H fenólico e/ou de álcool, sugerindo a presença de hidroxila na molécula em análise. O pico em 1369 cm^{-1} , típico de deformação axial de C-O (SILVERSTEIN et al., 2007) corrobora com a hipótese de OH na molécula. A presença de carbonila conjugada e em ponte com hidrogênio intramolecular puderam ser inferidas pela absorção em 1654 cm^{-1} . O espectro de IV (Figura 50, p. 121), ainda sugeriu a presença de núcleo aromático devido a presença de absorções entre 1608 e 1496 cm^{-1} , característicos de C=C (SILVERSTEIN et al., 2007).

A análise espectral de RMN ^{13}C -BB (Figura 51, p. 122; Tabela 9, p. 119) e RMN ^1H (Figuras 52 e 53, p. 123 e 124) da substância mostra o mesmo padrão de deslocamentos químicos de carbonos que a substância PS-01, diferindo apenas no número de sinais para metoxilas, que neste caso foram mostrados no espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 51, p. 122; Tabela 9, p. 119) dois sinais em δ_c 59,62 e δ_c 59,91, correspondendo a duas metoxilas impedidas estericamente.

Sabendo-se que as posições C-3, C-5, C-6, C-7 e C-4' encontravam-se substituídas por funções oxigenadas e que as duas metoxilas presentes na molécula estavam localizadas em posições impedidas estericamente, pode-se deduzir que Ps-05 é o flavonóide denominado 4',5,7-triidroxi-3,6-dimetoxiflavona, também conhecido como 3,6-dimetil eter galletina, descrito pela primeira vez na família Fabaceae.



4',5,7-triidroxi-3,6-dimetoxiflavona

A proposta estrutural foi confirmada pelos espectros de correlações heteronuclear direta $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (Figuras 54, 55 e 56, p. 125, 126 e 127; Tabela 9, p. 119) e de correlações heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (Figuras 57 e 58, p. 128 e 129; Tabela 9, p. 118), bem como por comparação com os dados de Ps-01 observados no espectro de RMN ^{13}C (Tabela 10, p. 120).

Ao flavonóide 3,6-dimetil éter galetina já foram citadas várias atividades farmacológicas, tais como inibição da aldose redutase (HAI-BO et al., 2007), atividade antioxidante (LEACH et al., 2007), inibição da α -amilase (AL-DABBAS et al., 2006), tratamento da leucemia (ROSENBLOOM, 2006), inibição da produção de óxido nítrico (MORIKAWA et al., 2006), tratamento de doenças periféricas vasculares e neurais (ROSENBLOOM, 2004), tratamento de doenças de pele (ROSENBLOOM, 2003), atividade antiviral (ELSOHLY et al., 1997), entre outras.

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMBC) de **Ps-05** registrados em DMSO- d_6 (δ em ppm e J em Hz).

	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
2	155,61	-		
3	137,23	-		
4	178,11	-		
5	152,31	-		
6	131,10	-		
7	157,26	-		
9	151,49	-		
10	104,55	-		
1'	120,56	-		
4'	160,09	-		
CH				
8	93,92	6,53 (s, 1H)	C-7, C-9	C-6, C-10
2'/6'	130,05	7,91 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)		C-2, C-4'
3'/5'	115,58	6,93 (d, $J=9$ Hz, 2H)		C-1', C-4'
CH ₃ O-3	59,62	3,76 (s, 1H)		C-3
CH ₃ O-6	59,91	3,74 (s, 1H)		C-6
OH-5	-	12,75 (s, 1H)	C-5	C-6, C-10

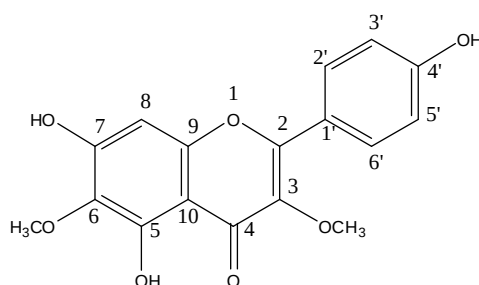
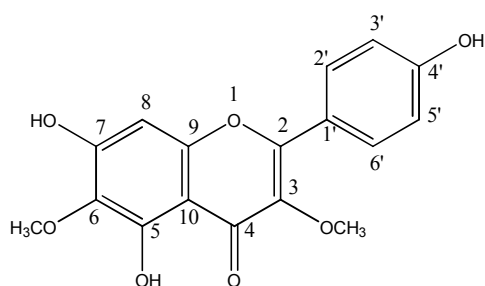
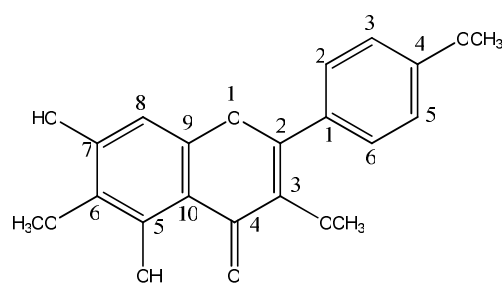


Tabela 10. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância **Ps-05** (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz) com Ps-01 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz).

Carbonos	Os-05	Ps-01
	δ_c	δ_c
C		
2	155,61	155,26
3	137,23	137,60
4	178,11	178,21
5	152,31	152,38
6	131,10	131,17
7	157,26	157,44
9	151,49	151,61
10	104,55	104,66
1'	120,56	122,21
4'	160,09	161,34
CH		
8	93,92	94,04
2'/6'	130,05	130,00
3'/5'	115,58	114,25
CH₃O		
CH ₃ O-3	59,62	59,76
CH ₃ O-6	59,91	59,98



Ps-05



Ps-01

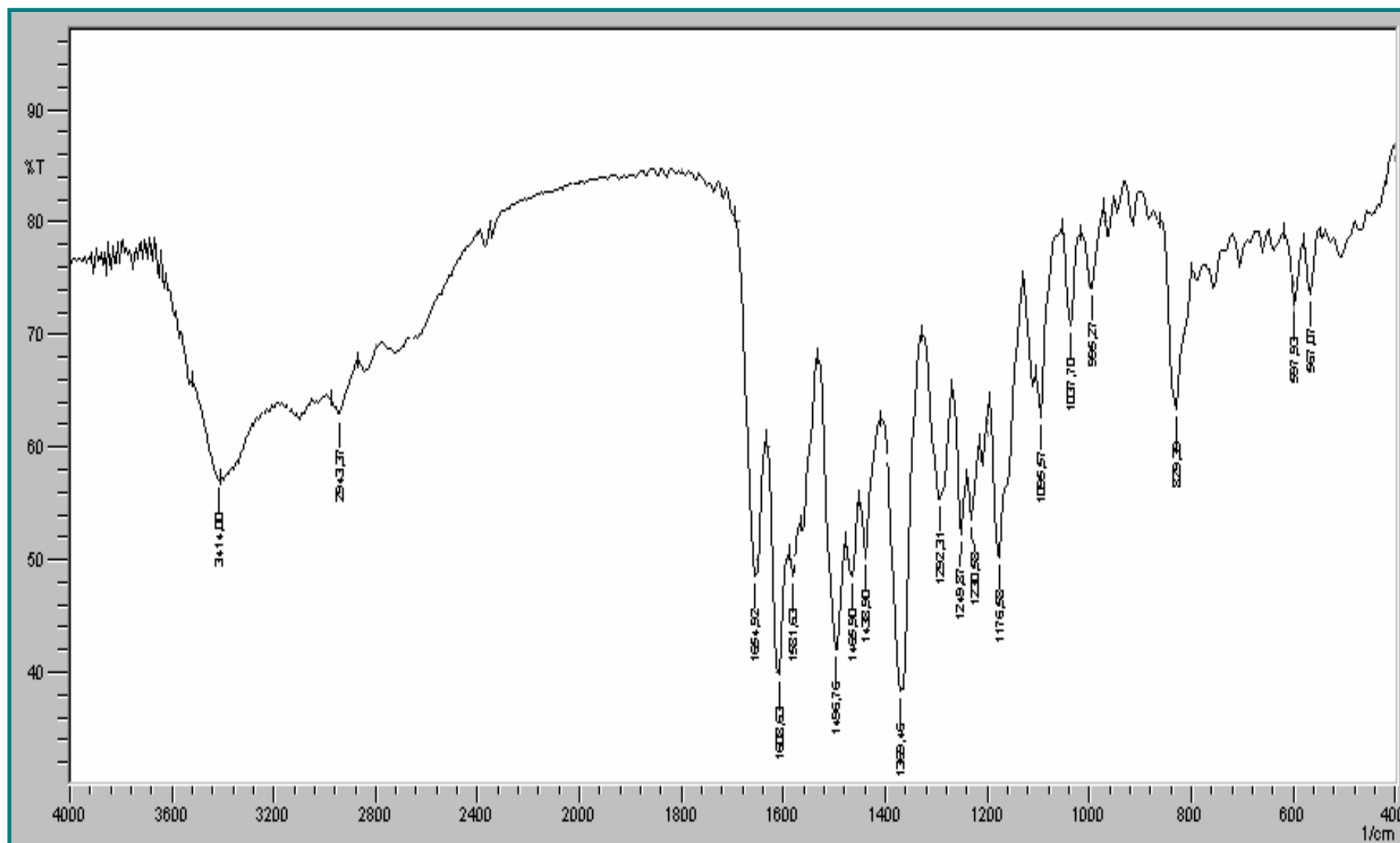


Figura 50. Espectro na região do Infravermelho de **Ps-05** (Pastilha de Kbr).

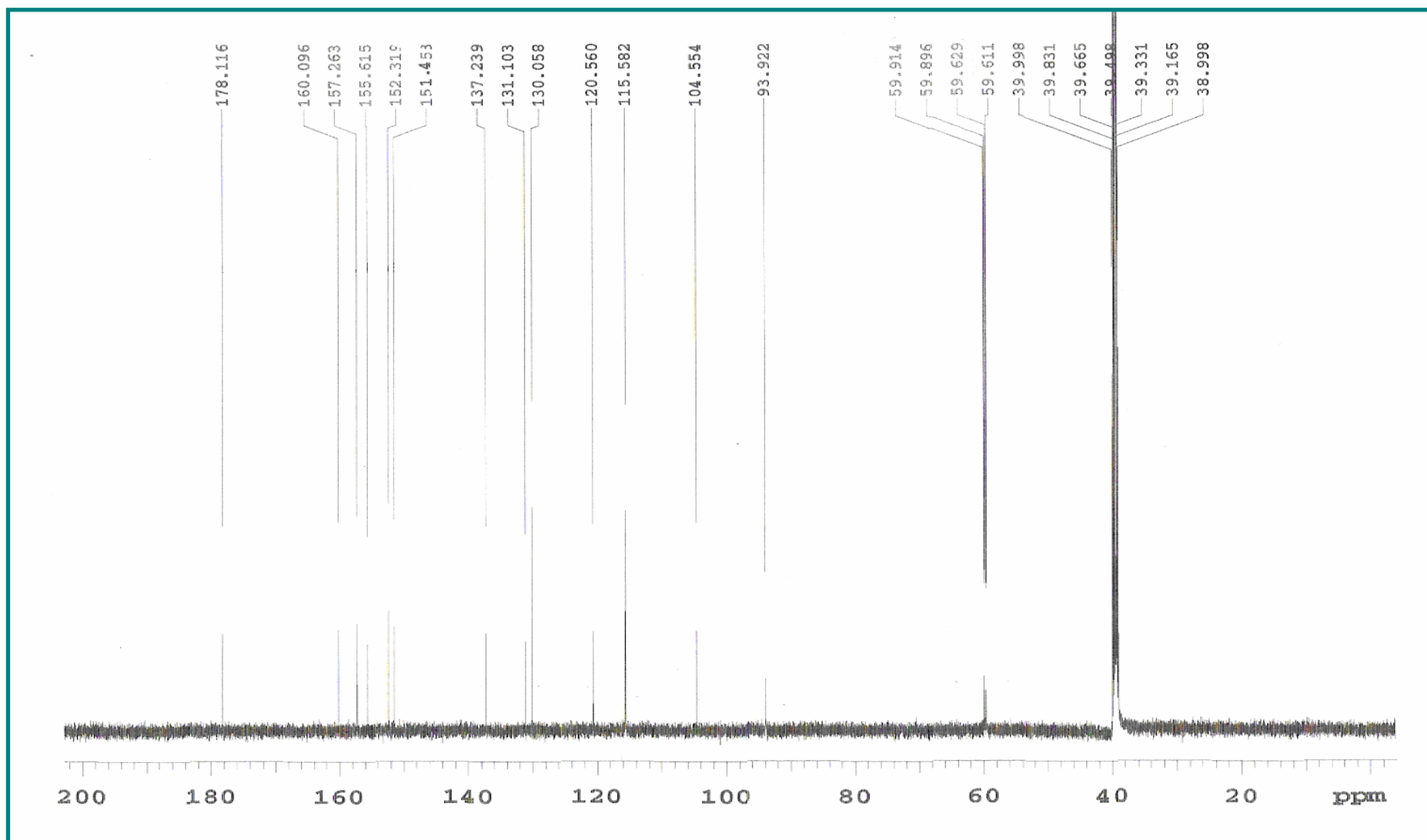


Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de Ps-05.

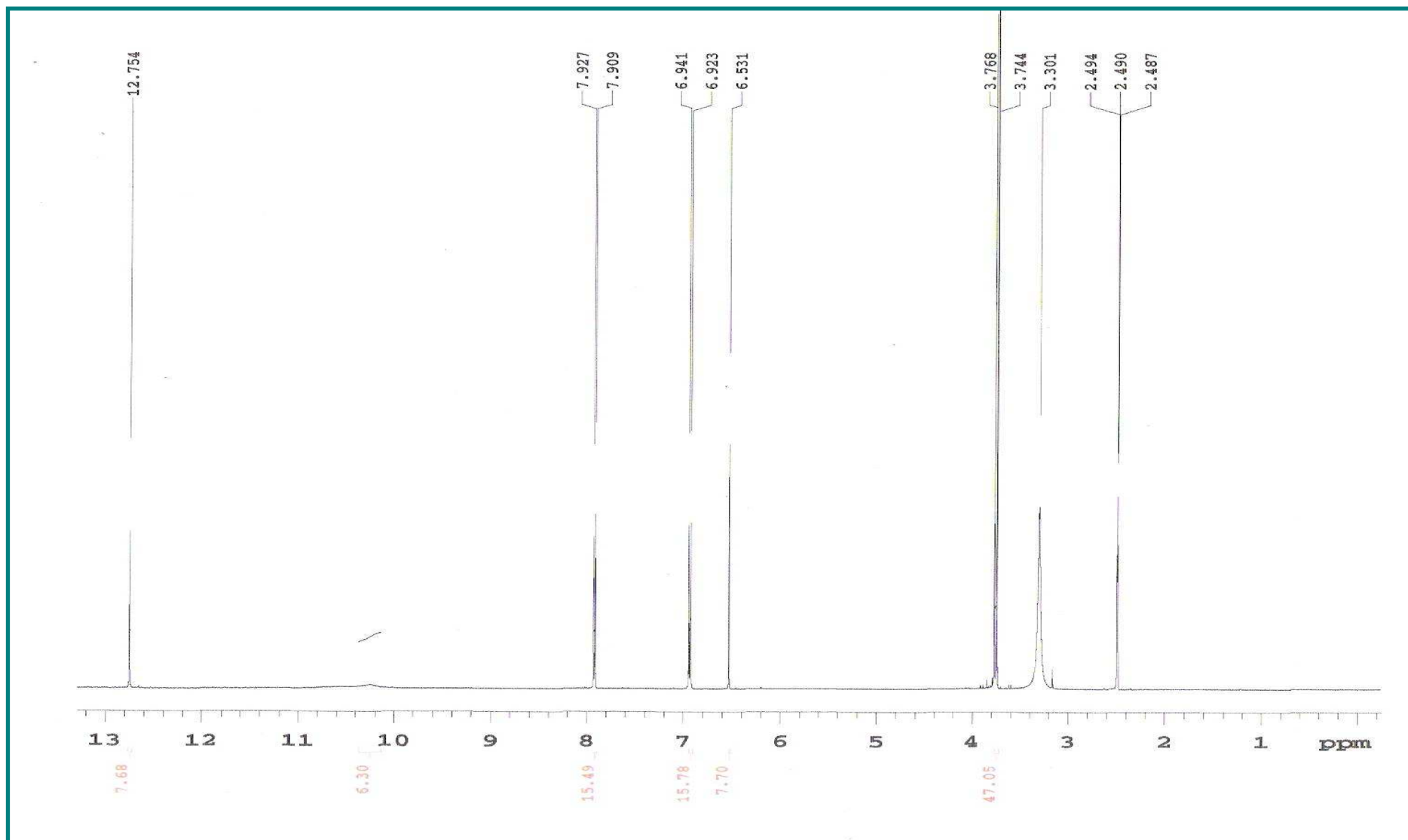


Figura 52. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Ps-05.

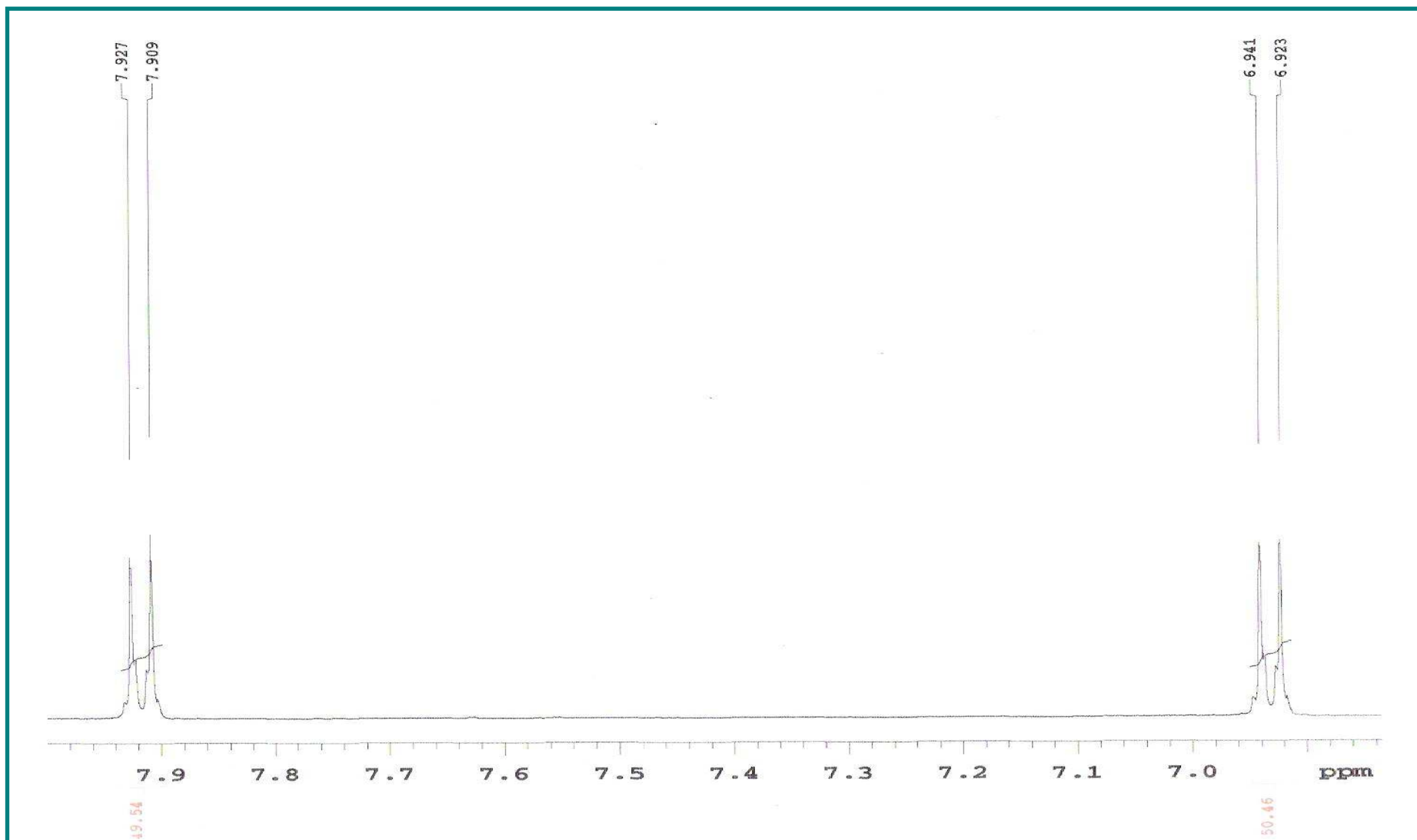


Figura 53. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Ps-05.

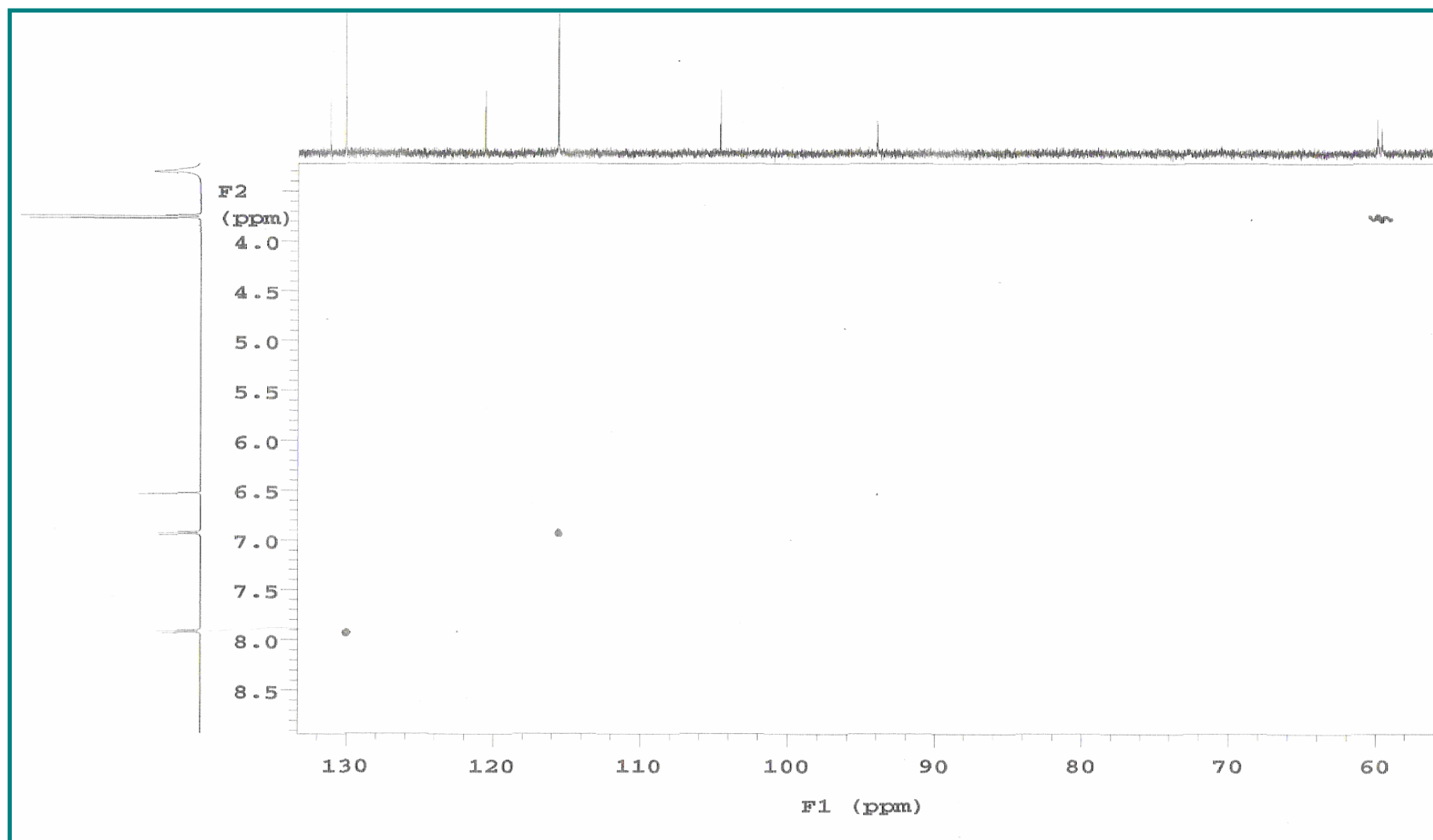


Figura 54. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Ps-05**.

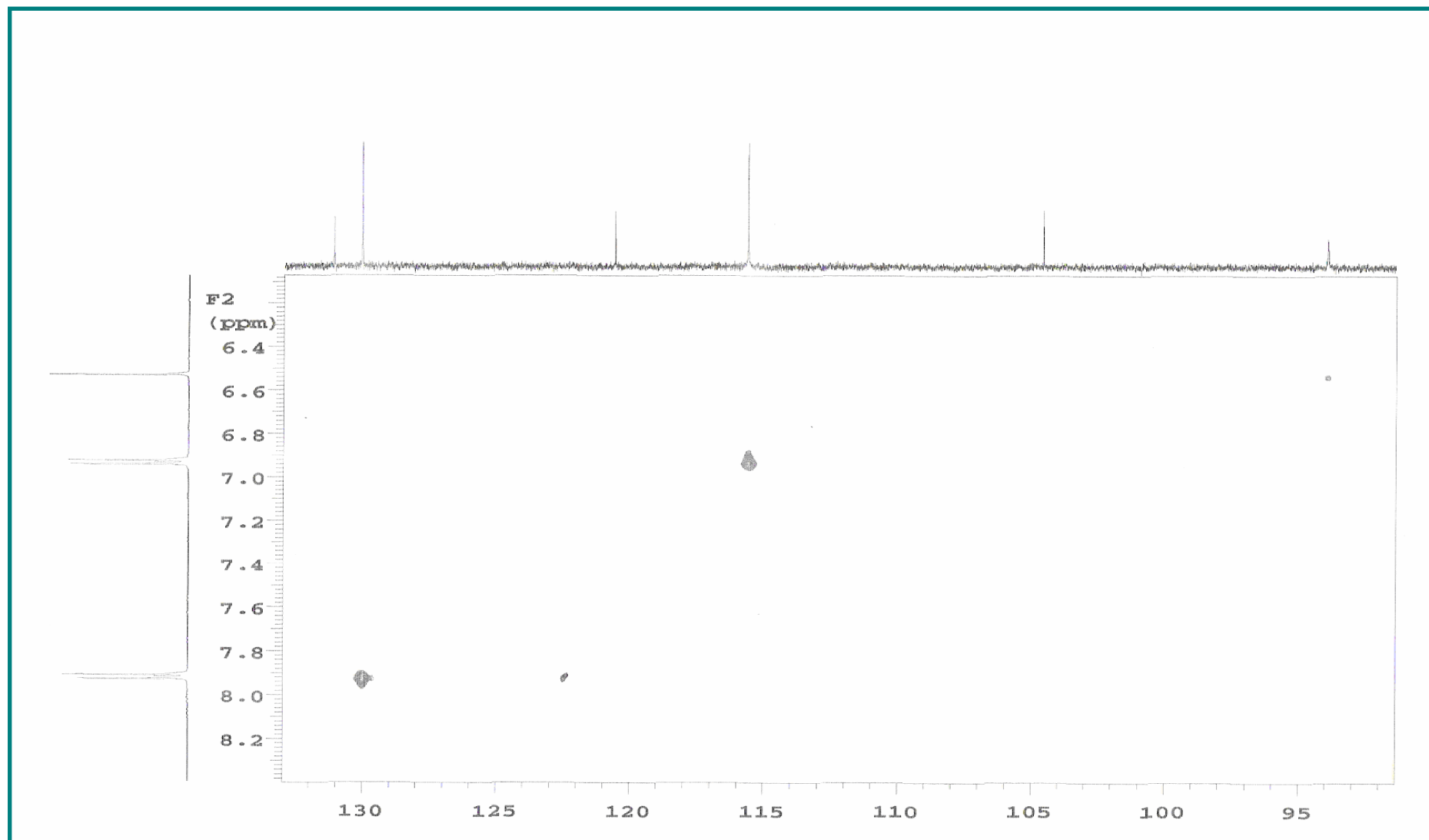


Figura 55. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-05.

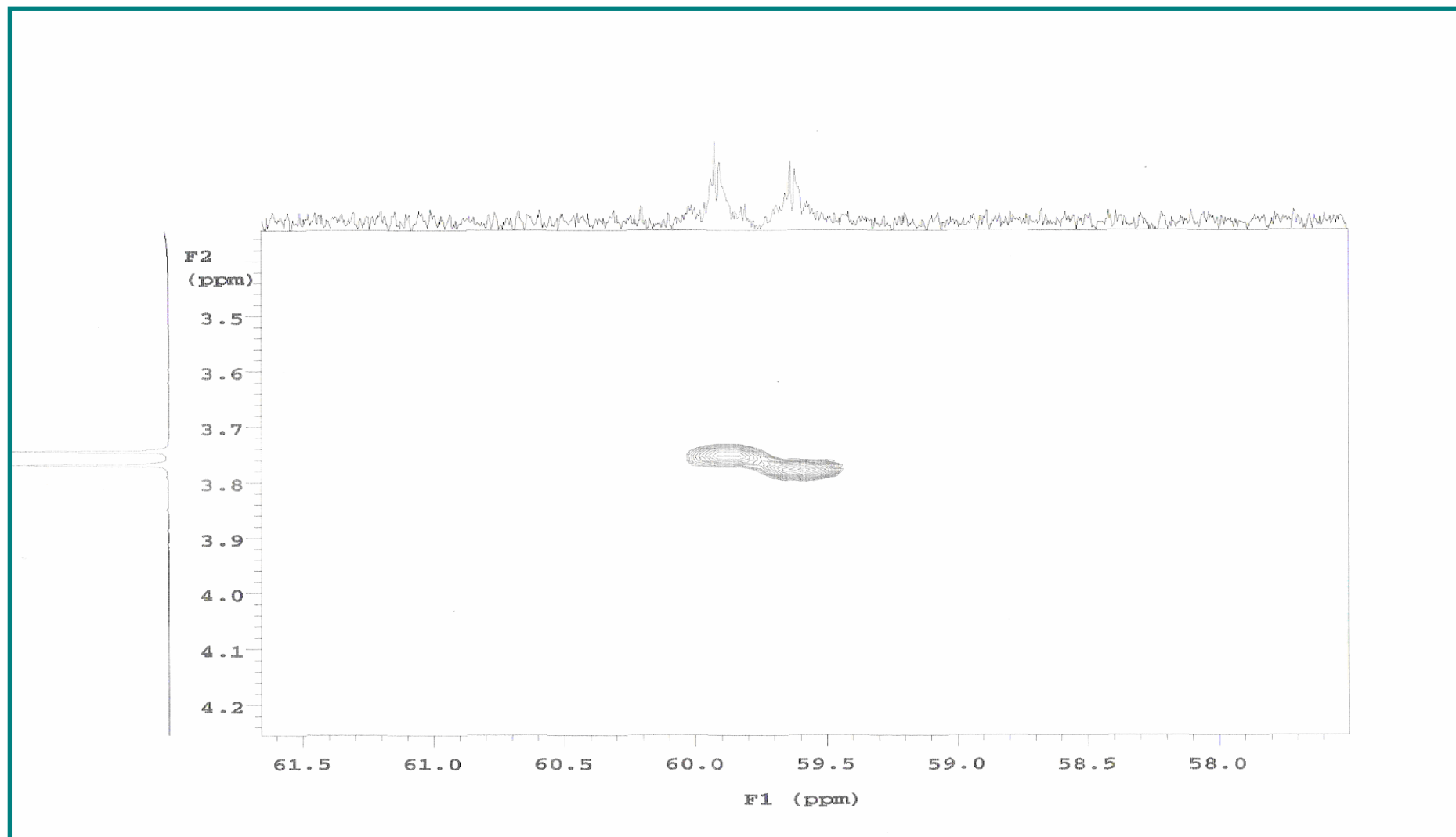


Figura 56. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-05**.

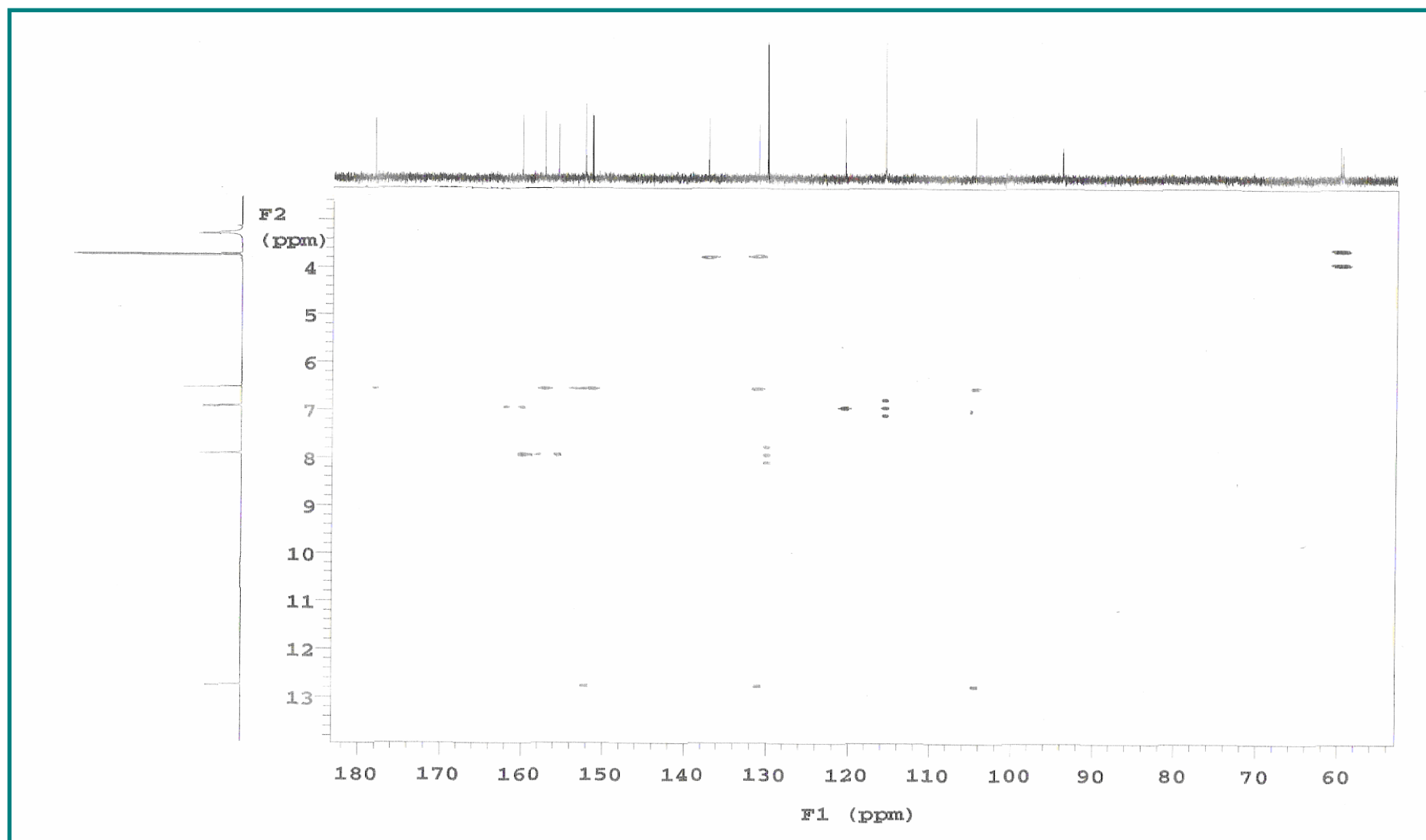


Figura 57. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de **Ps-05**.

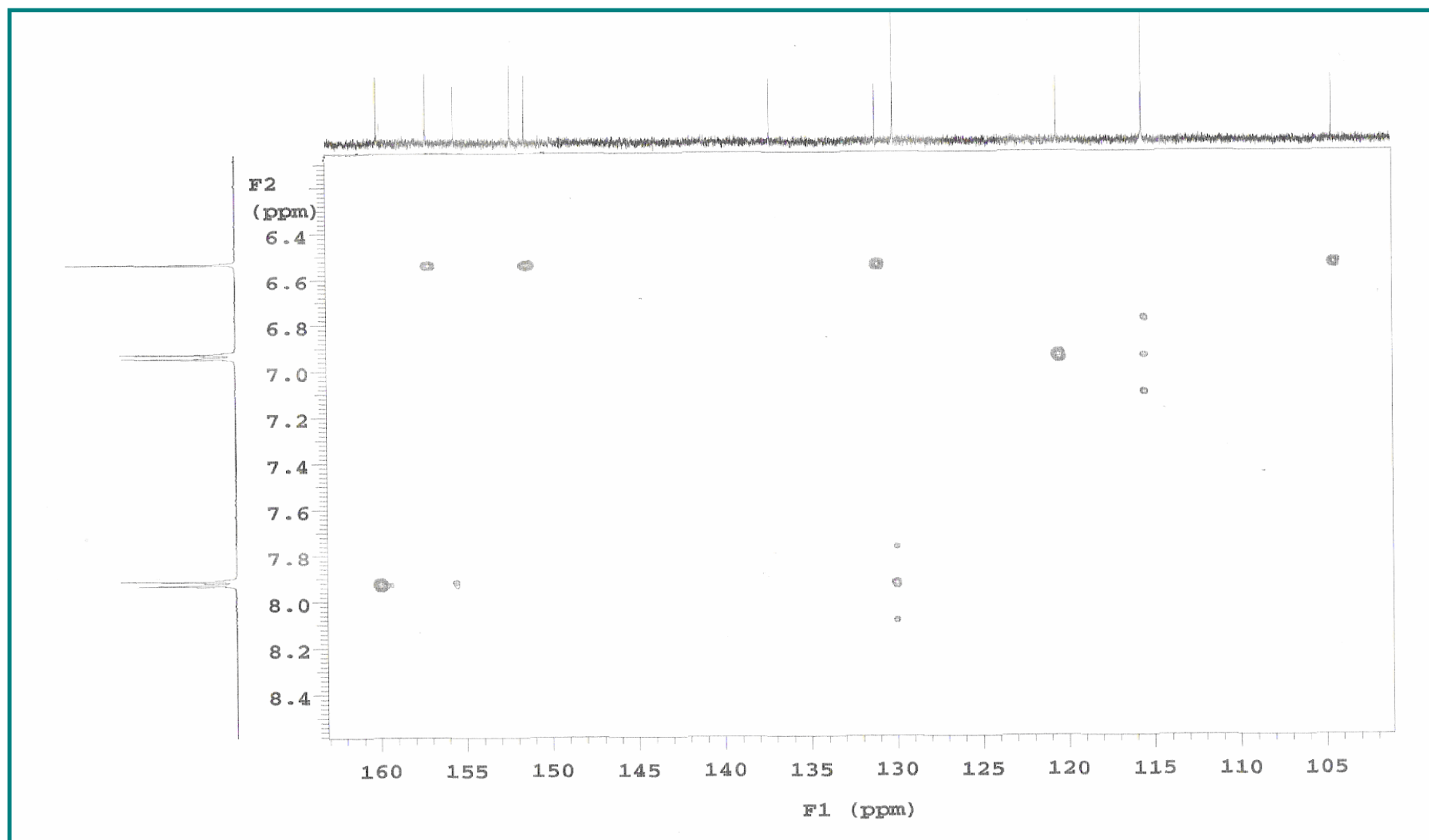


Figura 58. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **Ps-05**.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 Proposta biossintética para os constituintes químicos isolados de *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke.

No estudo químico e determinação estrutural de produtos naturais deve-se levar em consideração o conhecimento dos precursores das substâncias isoladas. Por isso são apresentadas as propostas biossintéticas dos flavonóides obtidos neste trabalho.

A origem biossintética dos flavonóides é constituída por duas rotas metabólicas: a do ácido chiquímico e a do acetato (via ácido mevalônico). A via chiquimato dá origem ao anel B e a parte heterocíclica do esqueleto flavônico. Enquanto o anel A é obtido a partir da via do acetato (DI CARLO et al., 1999).

A primeira etapa da biossíntese ocorre via chiquimato (Figura 59), quando o fosfoenolpiruvato (PEP) reage com a D-eritrose-4-fosfato, através de uma reação aldólica, produzindo um açúcar cetofosforilado com sete carbonos, o ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosônico-7-fosfato (DAHP). Este composto, pela perda do grupo fosfato, sofre ciclização e converte-se em ácido 3-desidroquínico, que pela perda de uma molécula de água é então convertido a seus derivados, como por exemplo, o ácido chiquímico. Após fosforilação na posição 3 do ácido chiquímico, origina-se o ácido chiquímico-3-fosfato, que reage com o fosfoenolpiruvato (PEP) formando o ácido 5-enolpiruvil -chiquímico-3-fosfato (EPSF). Este, por sua vez, origina o ácido corísmico por eliminação de um grupo fosfato e um próton. O ácido corísmico sofre uma reordenação pericíclica do tipo Claisen levando ao ácido prefênico, que por descarboxilação, origina o ácido fenilpirúvico, precursor da fenilalanina e tirosina. A fenilalanina sofre desaminação pela ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), originando o ácido cinâmico, o precursor da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides (DEWICK, 1997). Esta enzima liga o metabolismo primário com a via dos fenilpropanóides. Por intervenção da enzima 4-hidroxilase cinamato, uma citocromo P450 monoxigenase de função mista, o ácido cinâmico é hidroxilado, formando o ácido p-cumárico, também conhecido por 4-cumarato (BRUNETON, 2001). A ativação do 4-cumarato pela formação do éster CoA é catalisada pela ligase de 4-cumarato-CoA. O 4-cumaril-CoA pode ser hidroxilado na posição 3 para

cafeoil-CoA, que pode servir como substrato para a formação de chalconas (Figura 59) (GOTTLIEB e BORIN, 1998).

Na segunda etapa da biossíntese (Figura 60), rota do acetato polimalonato, ocorre a condensação de três moléculas de acetato com um derivado do ácido cinâmico, o 4-hidroxicinamoil-CoA, ordinariamente denominado p-cumaroil-CoA. Provavelmente, cada molécula de acetil-CoA é primeiramente convertida em malonil-CoA, enquanto que a do ácido cinâmico é convertida em p-cumaroil-CoA, ambas intermediárias ativas transformadas por uma coenzima-A (GOTTLIEB e BORIN, 1998).

A principal enzima envolvida na condensação e consequente formação do esqueleto flavônico é a chalcona sintase (CHS), que catalisa a condensação gradual de três unidades de acetato malonil-CoA com 4-cumaril-CoA ao C15 intermediário 2',4',6',4-tetrahidroxichalcona (naringenina-chalcona). Já o composto 6'-deoxichalcona (isoliquiritigenina), é um similar sintetizado a partir do malonil-CoA e do 4-cumaril-CoA via CHS, envolvendo nessa reação uma redutase dependente (NADPH). Os dois tipos de chalcona citados podem ser precursores diretos das auronas e de outros fenilpropanóides. Mas, em particular o 6-hidroxi e 6-deoxichalcona são os genitores imediatos de todos os tipos de flavonóides e isoflavonóides. Contudo, as enzimas envolvidas nesta etapa ainda não são conhecidas (DEWICK, 1994.)

A ligação estereoespecífica da chalcona, catalisada pela enzima chalcona isomerase (CHI), provê a 2S-flavanona com o esqueleto flavonóide típico. Dois tipos de CHI são conhecidos: um catalisa a ciclização de 6'-hidroxichalcona a 5-hidroxi-flavanona; a outra CHI conhecida é o substrato chave na isomerização da 6'-hidroxi e 6'-deoxichalcona para a 5-hidroxi e 5-deoxichalcona, respectivamente (HELLER e FORKMANN, 1994).

As flavanonas, por sua vez, são os precursores diretos das flavonas (BOHM, 1994), às quais são introduzidas uma dupla ligação entre C-2 e C-3. Dois tipos de enzimas catalisam essa reação: a flavona sintase I-2-oxiglutarato dioxigenase dependente (FNS I) e a flavona sintase II (FNS II) (BOHM, 1994). O padrão de oxigenação nos carbonos 5, 7, 3' e 4' são oriundos da via biossintética, por enzimas específicas. A metilação entretanto é catalizada por enzimas como a S-adenosilmetionina (SAM) (ZUANAZZI e MONTANA, 2003).

As flavanonas quando hidroxiladas na posição 3 formam os diidroflavonóis, que são os intermediários biossintéticos na formação de flavonóis. Estes são biossintetizados pela introdução de uma dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3, reação esta catalisada pela enzima flavonol sintase (FLS), outra 2-oxoglutarato dioxigenase dependente (DEWICK, 1994).

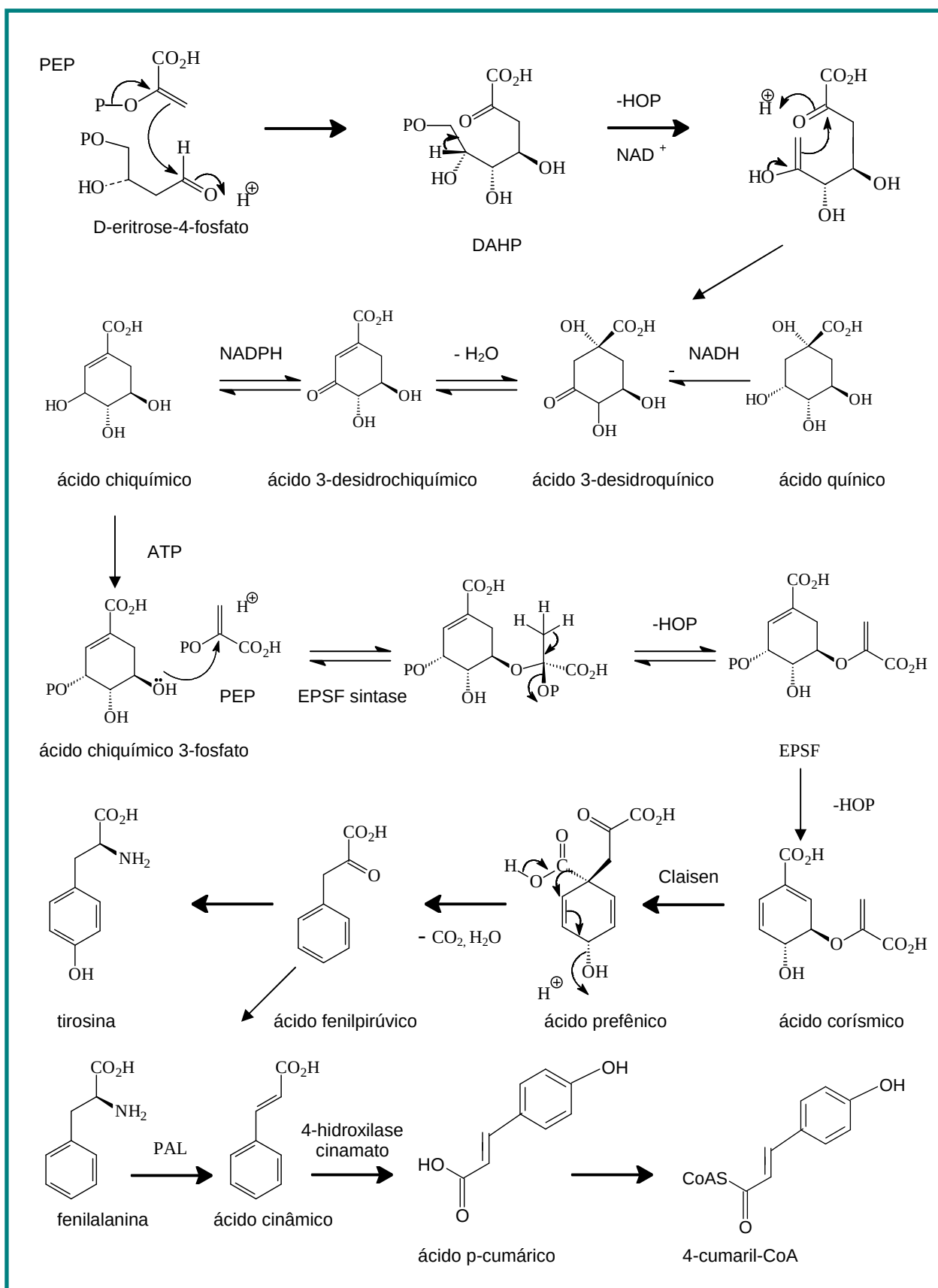


Figura 59. Representação esquemática da primeira etapa da biossíntese dos flavonóides (Fonte: DEWICK, 1997).

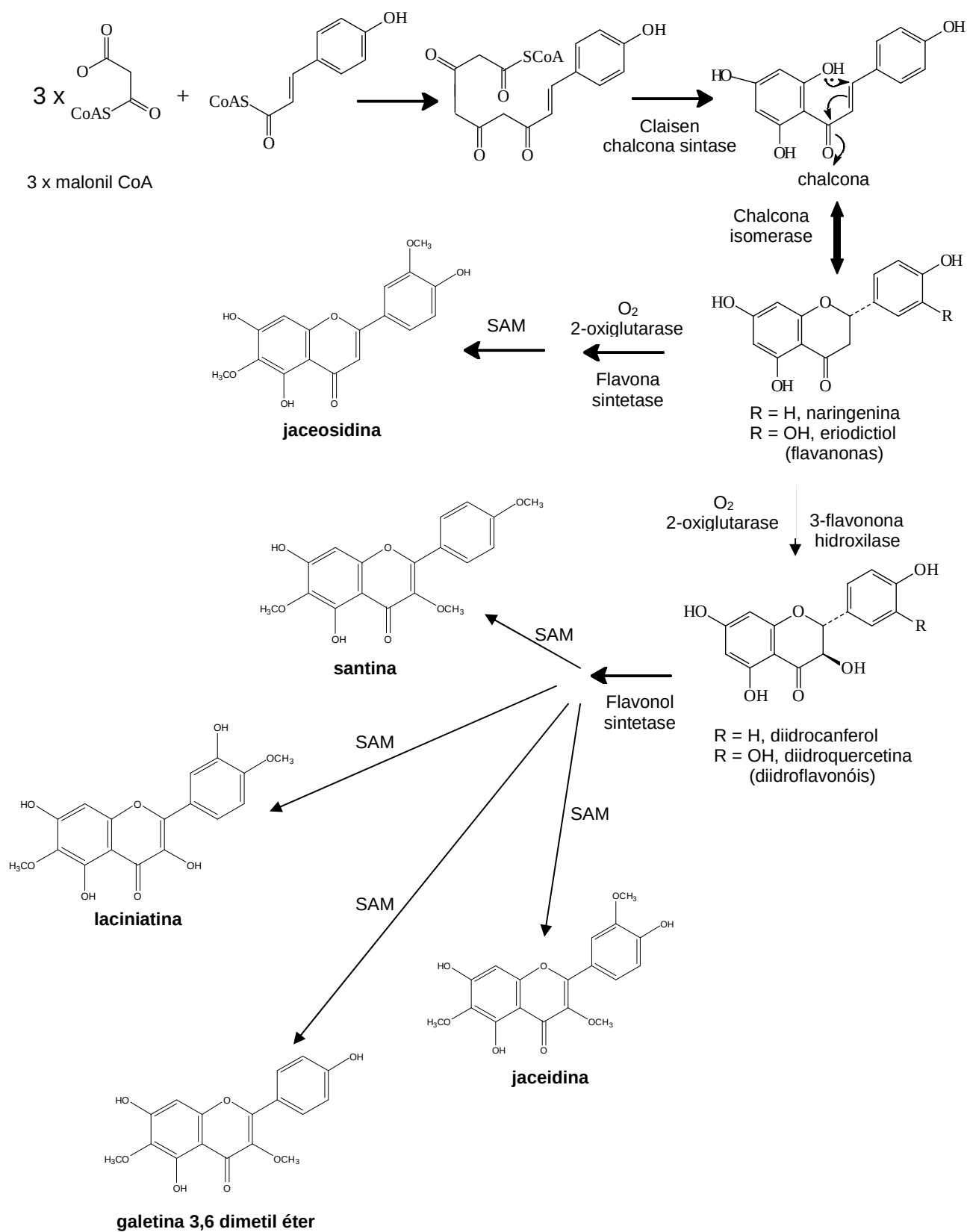


Figura 60. Representação da proposta biogenética para os flavonóides isolados de *P. stipulacea* (Adaptado de DEWICK, 1997).

6.2 Potencial farmacológico dos flavonóides

Vários efeitos farmacológicos têm sido atribuídos aos flavonóides pela sua capacidade de seqüestrar espécies reativas e de quelar cátions divalentes, o que caracteriza sua atividade antioxidante, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação de plaquetas, e de inibir sistemas de enzimas, incluindo ciclooxygenases e lipoxigenases (BRODY, 1994).

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Muitas reações dos processos metabólicos geram essas substâncias químicas (BARREIROS e DAVID, 2006). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) e alcóxila ($\text{RO}^\bullet$); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Estes radicais livres apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, e este desemparelhamento faz com que sejam levemente atraídos por um campo magnético, tornando-os altamente reativos (THOMAS e KAKYANARAMAN, 1997).

Nas últimas décadas, as EROs e ERNs, têm sido foco de inúmeras pesquisas, uma vez que estão envolvidos em inúmeros processos fisiopatológicos de diversas doenças humanas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Nos organismos aeróbicos, a geração de EROs e/ou ERNs e a subsequente modificação oxidativa de biomoléculas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, são reações inevitáveis. Em pequenas quantidades, essas espécies reativas estão envolvidas em importantes funções fisiológicas, mas o excesso das mesmas, causado por algum tipo de injúria, seja por infecção, trauma, toxinas ou qualquer outra anormalidade, pode estar relacionado a uma série de doenças humanas que vão desde inflamações, artrites reumáticas, aterosclerose, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, dano de isquemia/reperfusão, até impotência sexual, entre muitas outras (TAKAHASHI et al., 2001; STEGHENS et al., 2001).

Entretanto, na maioria das patologias humanas, o estresse oxidativo (desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERNs e o sistema de defesa

antioxidante do organismo) é uma consequência e não uma causa do processo. Quando as espécies mediadoras de danos são produzidas em quantidades crescentes, maiores do que as normais, há fortes evidências de que tais espécies possuem funções específicas nas diferentes patologias humanas. As EROs e ERNs sofrem o mesmo processo, isto é, o tecido danificado pode levar à formação de maiores quantidades de espécies reativas, dependendo da patologia (TAKAHASHI et al., 2001).

O mecanismo pelo qual os radicais livres causam prejuízos é extremamente complexo. Devido a sua avidade por aceitar elétrons, podem modificar a estrutura e/ou funções de várias moléculas (CRISTAL, 1991). Os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos alvos mais atingidos em decorrência do processo de peroxidação lipídica, já que ocasiona alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Tanto a formação das EROs quanto o processo de lipoperoxidação nem sempre são prejudiciais (dependem do excesso) uma vez que seus produtos são importantes nas reações em cascata que ocorrem a partir do ácido araquidônico, responsável pela formação das prostaglandinas, mediadoras da dor e, portanto, na resposta inflamatória (SILVA et al., 2002).

A resposta inflamatória é um processo muito complexo em que estão envolvidos uma série de eventos bioquímicos. Pesquisas demonstram que as EROs, ERNs, prostanoídes, leucotrienos e enzimas hidrolíticas produzidas por neutrófilos, macrófagos e monócitos, estariam envolvidas nesse processo. As células fagocíticas, na maior parte neutrófilos, produzem, quando ativados, $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 . Essas EROs, podem reagir com metais de transição no organismo, especialmente o ferro livre e produzir o radical $\cdot OH$, que é o radical livre mais deletério ao organismo, e assim causando um dano ainda maior (SEIFRIZ, 2004).

As inflamações são normalmente limitantes e os efeitos benéficos são mais importantes do que o próprio dano. Contudo quando ocorre uma ativação anormal do sistema de defesa as consequências são desvantajosas. Atualmente estão sendo estudados diversos compostos que inibem as várias etapas da inflamação, pois os fármacos tradicionais exibem vários efeitos adversos e/ou colaterais (CARLINI, 2003).

Neste contexto, os flavonóides possuem especial importância, por possuírem uma estrutura ideal para o seqüestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E (BARREIROS e DAVID, 2006). Entretanto a atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura, devido a isso, muitos mecanismos antioxidantes têm sido propostos dentre eles: a) a opressão da formação de espécies reativas do oxigênio pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres (ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase); b) quelação de íons metálicos que podem iniciar a produção de radicais hidroxil pela Reação de Fenton ou Harber-Weis; c) seqüestro de radicais livres; d) regulação positiva ou proteção das defesas antioxidantes por induzir a fase II de enzimas como glutathione transferase que aumenta a excreção de espécies oxidadas ou e) indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína que é uma proteína queladora de metais, com propriedades antioxidantes (MIDDLETON et al., 2000; PIETTA, 2000)

A atividade de seqüestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonóides e das espécies a serem seqüestradas. Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons (CAO et al., 1997). Flavonóides monoidroxilados apresentam atividade muito baixa, por exemplo a 5-hidroxi-flavona tem atividade abaixo dos limites de detecção. Flavonas possuindo apenas uma hidroxila em 3, 6, 3' ou 4', assim como flavanonas apresentando apenas uma hidroxila em 2'-OH, 3'-OH, 4'-OH, 6-OH também mostram fraca atividade. A 7-hidroxi-flavanona representa uma exceção, que pode ser justificada pela tendência maior da 7-OH em doar H[•] devido à estabilização do radical formado por deslocalização com a carbonila em C-4 (10 e 11) (Figura 61). Entretanto, apesar dessa exceção, para proteger os lisossomos e outras membranas contra o estresse oxidativo foi constatada a necessidade de no mínimo duas hidroxilas fenólicas no flavonóide, demonstrando que os monoidroxiflavonóides não são efetivos (BARREIROS e DAVID, 2006).

A estabilidade do radical livre flavanoil formado depende da habilidade do flavonóide em deslocalizar o elétron desemparelhado. A presença de hidroxilas em *orto* é o principal fator que auxilia nessa deslocalização. Os outros fatores são a presença de insaturação no anel C e hidroxila em C-4' em B conjugada com a carbonila; ângulo do anel B do flavonóide e do radical formado em relação ao

restante da estrutura, sendo que esse ângulo é regulado pela presença ou ausência de hidroxila em C-3; presença de duas insaturações em C; conjugação da carbonila em C-4 com hidroxila em C-5 e, presença de hidroxila em C-7. A doação do H[•] ocorre principalmente nas posições 7-OH, 4'-OH, 5-OH (RICE-EVANS et al., 1996). Os flavonóides, devido ao seu caráter fracamente ácido encontram-se, em geral, parcialmente ionizados, o que aumenta a estabilidade na posição C-4' e favorece a deslocalização do elétron desemparelhado do radical formado entre os anéis A, B e C, por exemplo, quercetina parcialmente ionizada em C-4' (12). A doação do H radicalar para o radical livre ocorre principalmente nas posições C-4' (13) e C-7 (14). Ambos os radicais livres formados podem ter seu elétron deslocalizado pela estrutura, com maior estabilidade para os radicais 13, 15 e 16, devido à estabilização resultante das ligações de hidrogênio (PIETTA, 2000; RICE-EVANS et al., 1996; BORS et al., 1998).

A remoção de metais de transição livres no meio biológico é fundamental para a proteção antioxidante do organismo, pois como já dito anteriormente, os metais podem reagir e produzir mais radicais livres. Para a atividade de quelação de metais de transição é fundamental a presença de grupos *orto*-difenólicos, onde o mais comum é o sistema 3',4'-diidroxil, unidade catecol em B e/ou estruturas cetol como 4-ceto-3-hidroxil e 4-ceto-5-hidroxil. A substituição de qualquer uma das hidroxilas envolvidas na quelação de metais reduz essa atividade devido, principalmente, ao impedimento estérico provocado. Outros sistemas *orto*-difenólicos em flavonóides menos comuns também podem quelar os metais de transição, como por exemplo o 6,7-diidroxil ou 7,8-diidroxil (PIETTA, 2000; BORS et al., 1998).

O último fator importante que influencia a atividade antioxidante dos flavonóides é a sua interação com as biomembranas. A lipofilicidade do flavonóide indica a incorporação desse pela membrana, que é alvo da maioria das EROs e ERNs. Assim, deve haver uma concentração mínima do flavonóide por ácido graxo, de modo a assegurar a presença de uma de suas moléculas próxima ao sítio de ataque do radical (VAN ACKER et al., 1996). Flavonóides que possuem uma cadeia de açúcares ligada em sua estrutura são muito polares, não sendo assimilados pela membrana, porém, nesta forma eles podem ser armazenados em vesículas, possuindo um tempo maior de permanência no organismo. Os flavonóides que são assimilados pelas membranas exercem a função de moduladores de fluidez.

Restringindo essa fluidez os flavonóides geram um impedimento físico para a difusão das ERO e ERN, de modo que decresce a cinética das reações responsáveis pelo estresse oxidativo. Esse tipo de atividade antioxidante é similar ao relatado para o α -tocoferol e o colesterol (ARORA et al., 2000).

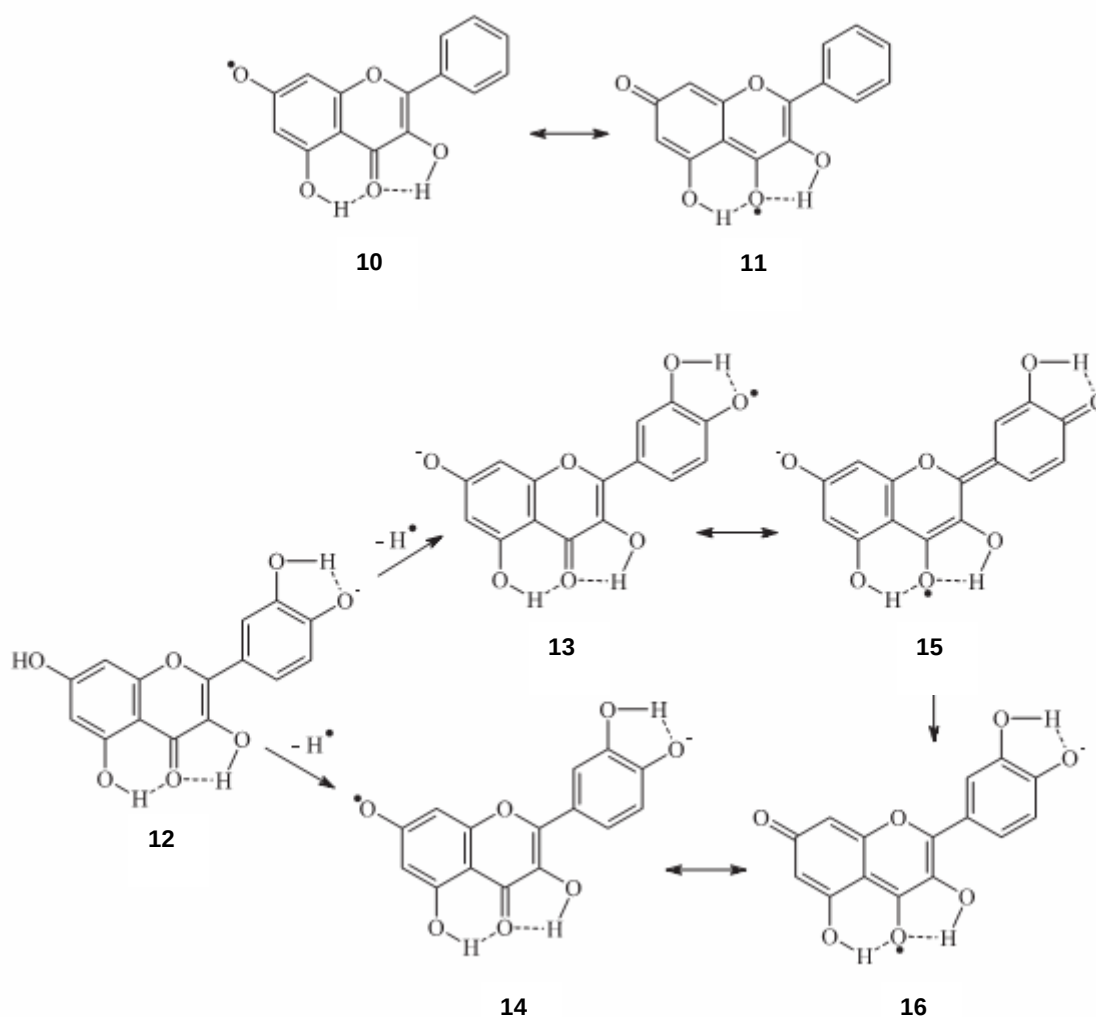


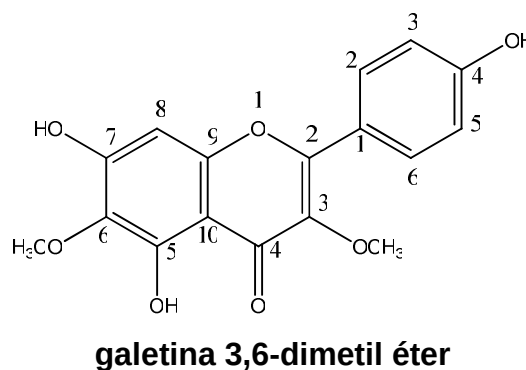
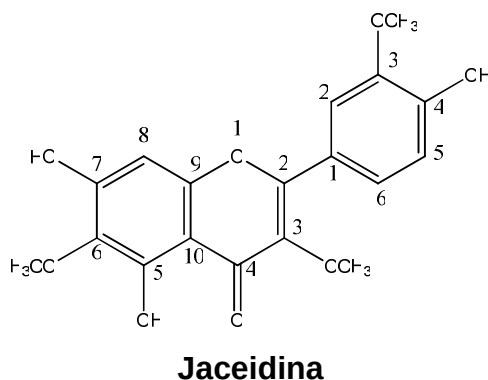
Figura 61. Flavonóides antioxidantes e mecanismo da estabilização do elétron desemparelhado.

Diante do potencial antioxidante dos flavonóides e levando em consideração a sua importância nos processos inflamatórios, resolvemos, em parceria com o grupo da Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira do Laboratório de Farmacologia e Imunidade - LAFI da Universidade Federal de Alagoas, realizar testes em modelos

de doenças antiinflamatórias e autoimune com os flavonóides jaceina e galetina 3,6-dimetil éter isolados neste trabalho, objetivando comprovar em parte o uso popular da espécie *Piptadenia stipulacea* como antiinflamatória.

6.2.1 Atividade antiinflamatória e antinociceptiva de galetina 3,6-dimetil éter e jaceidina isolados de *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke.

Para avaliar a atividade antinociceptiva e perfil antiinflamatório das fases aquosa e acetato de etila (100 mg/kg), dos flavonóides jaceidina (100 µmol/kg) e galetina 3,6-dimetil éter (100 µmol/kg), realizou-se ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético, ensaio de placa quente, ensaio de hipernocicepção induzida por formalina e peritonite induzida por Zymosan A.



Para avaliar o perfil antinociceptivo periférico das fases aquosa e acetato de etila, bem como os flavonóides galetina 3,6-dimetil éter e jaceidina de *Piptadenia stipulacea* foram submetidos ao ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético (Figura 62).

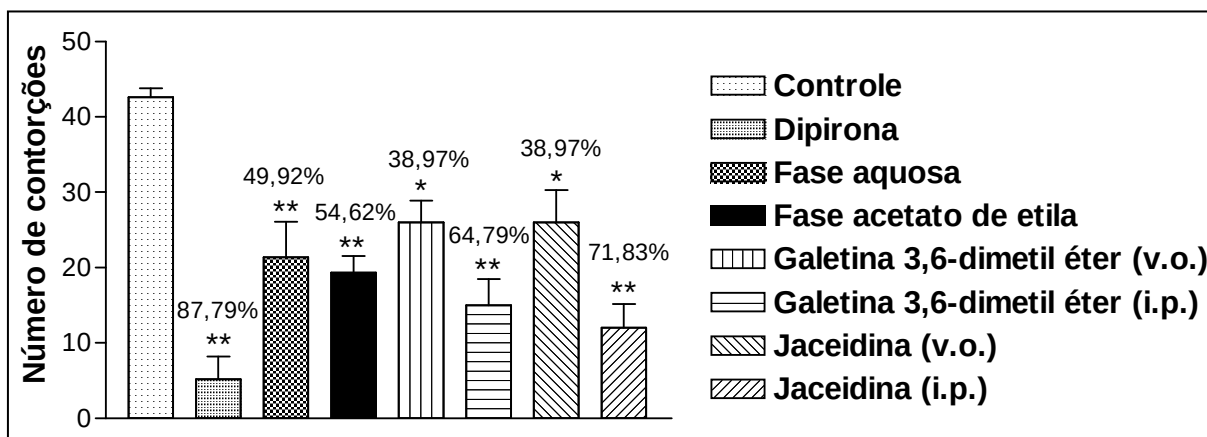


Figura 62. Efeito antinociceptivo da fase aquosa (100 mg/kg, v.o.), fase acetato (100 mg/kg, v.o.), galetina 3,6-dimetil éter (100 μ mol/kg, v.o. e i.p.), jaceidina (100 μ mol/kg, v.o. e i.p.) de *Piptadenia stipulacea* e dipirona (100 μ mol/kg, i.p.) no ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett).

O ensaio de contorção abdominal envolve diferentes mecanismos nociceptivos, como por exemplo, a liberação de aminas biogênicas através do sistema simpático e a produção de prostanoídes por meio da atuação de ciclooxigenases (COLLIER et al., 1968; DUARTE et al., 1996). O ácido acético atua diretamente induzindo a liberação de vários mediadores com estimulação de neurônios que são alvos de anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e/ou alvos de substâncias agonistas de receptores opióides (COLLIER et al., 1968).

Como exposto na Figura 62, a injeção intraperitoneal de ácido acético induziu $42,60 \pm 1,21$ contorções nos animais do grupo controle durante o período de 20 minutos de observação. Realizou-se primeiramente a avaliação farmacológica dos compostos-testes pela via oral, por ser a rota mais frequentemente utilizada para administração de medicamento em seres humanos, e também por não ser invasiva. De acordo com os resultados obtidos, as fases aquosa e acetato de etila de *Piptadenia stipulacea*, e os flavonóides galetina 3,6-dimetil éter e jaceidina nas referidas doses administradas por via oral, diminuíram significativamente o número de contorções abdominais quando comparado com o grupo controle, observando-se uma porcentagem de inibição de 49,92%, 54,62%, 38,97% e 38,97%, respectivamente. Portanto, como ambos flavonóides quando administrados por essa via apresentaram baixas porcentagens de inibição das contorções abdominais, decidiu-se verificar também a atividade dessa substância intraperitonealmente, via

de administração em que **galetina 3,6-dimetil éter** e **jaceidina** apresentaram maiores porcentagens de inibição (64,79% e 71,83%, respectivamente) (Figura 62), o que sugere a inativação de tais substâncias quando administrado por via oral, através do metabolismo de primeira passagem ou limitação na absorção no trato gastrointestinal por labilidade em meio ácido.

Para avaliar o perfil antinociceptivo central, a fase aquosa e acetato, bem como o flavonóide isolado de *Piptadenia stipulacea* foram submetidos ao ensaio de placa quente. Os resultados estão expressos na Figura 63.

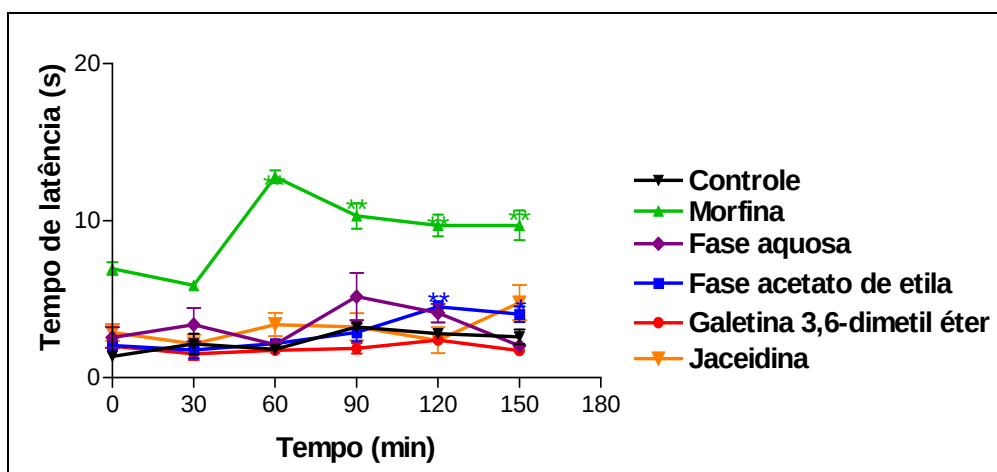


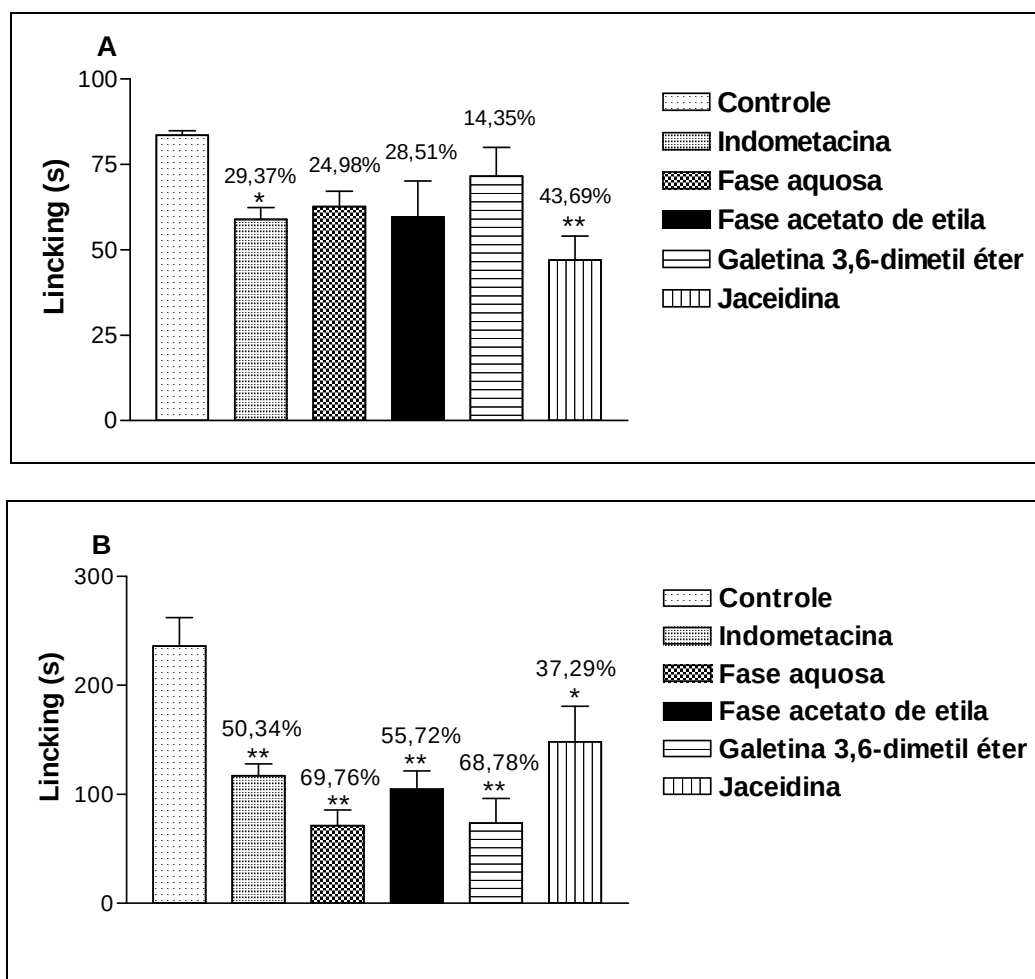
Figura 63. Perfil antinociceptivo da fase aquosa (100 mg/kg, v.o.), fase acetato (100 mg/kg, v.o.), galetina 3,6-dimetil éter (100 µmol/kg, i.p.), jaceidina (100 µmol/kg, i.p.) de *Piptadenia stipulacea* e morfina (15 µmol/kg, s.c.) no ensaio da placa quente. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (*P<0,05, **P<0,01 no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett).

A morfina é um potente analgésico de ação central que produz um efeito inibitório da resposta antinociceptiva no ensaio de placa quente, um teste antinociceptivo central (PARKHOUSE e PLEUVRY, 1979). Neste ensaio, o calor induz um efeito termonociceptivo cutâneo originário da estimulação de fibras do tipo C não-mielinizadas (FONTENELE et al., 1996). Embora o ensaio de placa quente seja comumente utilizado para avaliar antinociceptivos narcóticos, outras substâncias incluindo relaxantes musculares, sedativos e psicomiméticos também mostram atividade neste ensaio (ABBOUTT e MELZACK, 1982; FRANZOTTI et al., 2000). Em contraste com os efeitos inibitórios de nocicepção central da morfina,

AINEs de modo geral não demonstram efeitos inibitórios significantes na nocicepção térmica (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992).

Neste modelo, apenas a fase acetato de etila apresentou um aumento do tempo de latência, além da morfina, o fármaco padrão utilizado no modelo. Assim como evidenciado nos resultados, com exceção da fase acetato, a fase aquosa e o flavonóide galetina 3,6-dimetil éter não exercem efeitos antinociceptivos centrais (Figuras 63).

Para avaliar melhor o perfil antinociceptivo as substâncias foram submetidas ao ensaio de hipernocicepção induzida por formalina, cujos resultados estão mostrados na Figura 64.



Figuras 64. Perfil antihipernociceptivo da fase aquosa (100 mg/kg, v.o.), fase acetato (100 mg/kg, v.o.), galetina 3,6-dimetil éter (100 µmol/kg, i.p.), jaceidina (100 µmol/kg, i.p.) de *Piptadenia stipulacea* e indometacina (100 µmol/kg, i.p.) no teste de formalina (1ª fase – 65A e 2ª fase – 65B). Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (*P<0,05, **P<0,01 no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett).

Este ensaio é constituído por duas fases: a primeira fase que é caracterizada por intensa dor neurogênica, imediatamente após a injeção e parece ser causada pela estimulação de fibras C subsequente à estimulação periférica (estimulação direta de nociceptores). A fase nociceptiva é seguida por um período quiescente, cuja resposta nociceptiva é relativamente baixa e ocorre 5 a 15 minutos após a injeção de formalina. A segunda fase parece ser causada por mudanças teciduais e funcionais no corno dorsal da medula espinhal e é acompanhada por liberação de mediadores inflamatórios, sendo conhecida como fase inflamatória. A segunda fase não pode ser interpretada como consequência da primeira fase, mas originária a partir de mecanismos periféricos. Essa fase inflamatória parece ser mediada a partir de neurônios sensitivos centrais devido a inflamação periférica, bem pela ativação de neurônios primários aferentes. Por esta razão o teste de formalina é usado para avaliar o potencial antinociceptivo de substâncias, e também elucidar os mecanismos de analgesia na primeira (neurogênica) e na segunda (inflamatória) fase (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992). Tem sido bem documentado que vários mediadores inflamatórios tais como substância P e bradicinina participam da manifestação da resposta na primeira fase (SHIBATA et al., 1989), enquanto que prostaglandinas (HUNSKAAR e HOLE 1987; SHIBATA et al., 1989), serotonina, histamina e cininas estão envolvidas na resposta da segunda fase do teste de formalina (TJOLSEN et al., 1992).

Como expresso na Figura 64A, na 1ª fase do modelo apenas a fase acetato de etila exerceu efeito antinociceptivo, caracterizado pela diminuição estatisticamente significativa do tempo de latência quando comparado com o controle apenas com formalina (porcentagem de inibição de 43,69%). Já na fase inflamatória (Figura 64B), a fase aquosa e acetato de etila, ambas administradas via oral, e os flavonóides galetina 3,6-dimetil éter e jaceidina administrados via intraperitoneal apresentaram porcentagem de inibição da hipernocicepção na faixa de 69,76%, 55,72%, 68,78% e 37,29%, respectivamente. De acordo com os dados obtidos, observou-se que as fases e os flavonóides podem exercer efeito antiinflamatório.

Essa possível atividade antiinflamatória pode ser devido ao potencial antioxidante de **galetina 3,6-dimetil éter** e **jaceidina** por possuírem hidroxilas nas posições C-5, C-7 e C-4', os quais são fortes doadoras de H radicalar oprimindo

dessa forma a formação de espécies reativas, provavelmente, pela inibição dos sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres (ex. ciclooxigenase e lipooxigenase). Esses dados juntamente com presença de insaturação no anel C desses dois flavonóides, que permite a conjugação da hidroxila em C-4' com a carbonila estabilizando dessa forma o radical flavonoil, poderá justificar a excelente atividade antiinflamatória de **galetina 3,6-dimetil éter** e **jaceidina**. No entanto, novos experimentos precisam ser realizados para confirmar essa hipótese da relação estrutura-atividade desse flavonóide.

Para comprovar a possível atividade antiinflamatória, das fases e da galetina 3,6-dimetil éter realizou-se o ensaio de peritonite induzida por zymosan A (Figura 65). Devido ao baixo rendimento da jaceidina, o ensaio de peritonite induzida por Zymosan A não pôde ser efetivado.

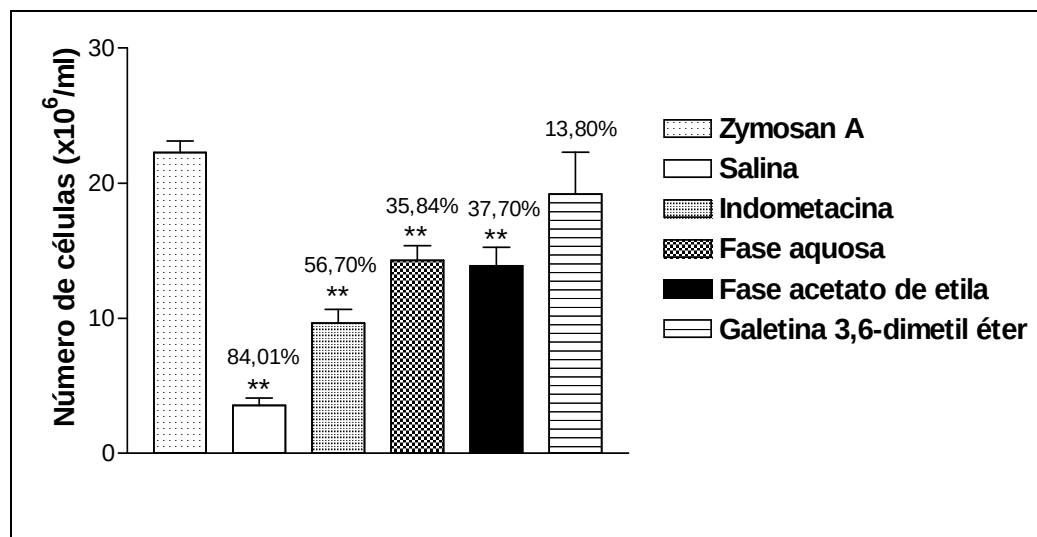


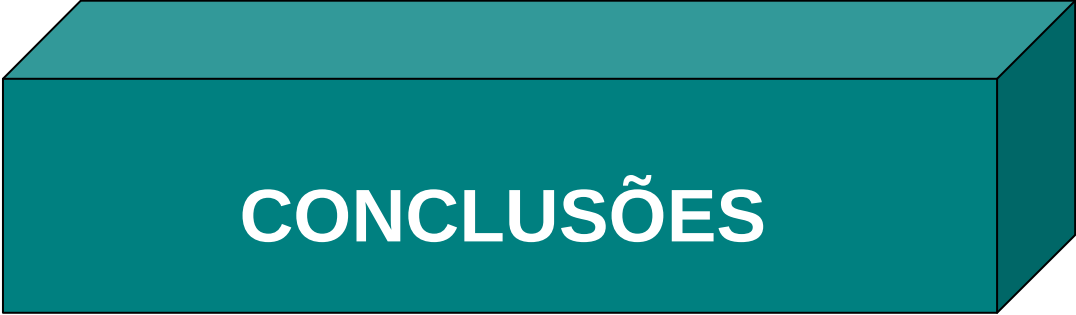
Figura 65. Perfil antiinflamatório da fase aquosa (100 mg/kg, v.o.), fase acetato (100 mg/kg, v.o.), galetina 3,6-dimetil éter (100 µmol/kg, i.p.) de *Piptadenia stipulacea* e indometacina (100 µmol/kg, i.p) no ensaio de peritonite induzida por zymosan A. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (**P<0,01 no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett).

O zymosan A é um polissacarídeo insolúvel que compõe a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. A injeção de zymosan A induz a inflamação peritoneal manifestada pelo influxo de leucócitos inflamatórios (LEITE et al., 2007; CHADZINSKA et al., 2008). Quando administrado na cavidade peritoneal de camundongos, o zymosan A induz a um aumento do extravasamento vascular, um dos primeiros sinais da inflamação. A formação do exsudato inflamatório é seguida

pelo recrutamento tempo-dependente de células de defesa, especialmente neutrófilos. Há muitos mediadores que coordenam os eventos inflamatórios iniciais, tais como aminas vasoativas, prostanóides, leucotrienos, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e citocinas. O edema é resultante do extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por aminas vasoativas e eicosanóides. A vasodilatação é mediada primariamente pelo óxido nítrico e prostanóides vasodilatadores. Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , ativam a via de sinalização em células endoteliais, a qual regula a expressão de moléculas de adesão para iniciar o recrutamento de leucócitos circulantes e células recrutadas parcialmente ativadas (LEITE et al., 2007).

Observa-se na Figura 65 que tanto a fase aquosa, como a fase acetato de etila apresentaram efeito antiinflamatório significativo quando comparadas ao grupo controle, apresentando porcentagem de inibição do recrutamento celular de 35,84% e 37,70%, respectivamente. Já o flavonóide galetina 3,6-dimetil éter não apresentou inibição estatisticamente significativa do recrutamento celular estimulada por zymosan A. Tal fato pode ser explicado pelo possível estímulo ao recrutamento celular quando a substância é administrada via intraperitoneal, uma vez que o flavonóide isolado é um agente exógeno, apesar de apresentar provável efeito antiinflamatório, evidenciado na segunda fase do teste de formalina.

Recentemente, estudos farmacológicos estão sendo realizados para avaliar a atividade central e a atividade antiinflamatória dos flavonóides **galetina 3,6-dimetil éter e jaceidina**, bem como para desvendar os seus mecanismos de ação com intuito de servir como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos que exerçam a ação antiinflamatória com redução de efeitos indesejáveis, visto que a grande maioria dos medicamentos antiinflamatórios causam diversos efeitos colaterais.



CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Ao concluir o presente trabalho, torna-se necessário examinar toda a trajetória percorrida e bem como o ponto de chegada. Tal retrospectiva, no sentido de retomar os objetivos propostos fazendo surgir uma grande satisfação e contentamento, visto que os conhecimentos utilizados, gerados e combinados neste trabalho, permitiram:

- a) através de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de IV e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, isolar e identificar cinco flavonóides da fase clorofórmica das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea*: 5-7-diidroxi-3,4',6-trimetoxiflavona; 4',5,7-triidrodroxi-3,3',6-trimetoxiflavona; 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxiflavona, relatados pela primeira vez no gênero *Piptadenia* e 3,5,7-triidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-6-metoxi; 4',5,7-triidroxi-3,6-dimetoxiflavona, descritos pela primeira vez na família Fabaceae;
- b) testar a atividade antiinflamatória e antinociceptiva dos flavonóides jaceidina e galetina 3,6-dimetil éter mostrando a potência do esqueleto flavonoídico em seqüestrar radicais livres quando substituídos por hidroxilas nas posições C-5, C-7 e C-4';
- c) Apesar desses flavonóides terem sido menos ativos por via oral pelos testes realizados, o uso da planta pode ser justificado como antiinflamatório provavelmente pela presença de outros flavonóides ou efeito sinérgico dos mesmos.



PERSPECTIVAS

8 PERSPECTIVAS

Na perspectiva de que todos os saberes parciais sobre as descobertas encontradas nesta pesquisa servirão para formular uma hipótese que subsidie propostas de ação que fortaleçam a competência dos avanços científicos, pretende-se:

- isolar uma maior quantidade dos flavonóides obtidos nesse trabalho objetivando fazer uma relação entre estrutura química e atividade antiinflamatória desses compostos, contribuindo dessa forma, na busca de modelos estruturais que poderão servir como fonte de novos fármacos.

Enfim, de que serviriam todos estes achados se não houver uma perspectiva de que todos os saberes, um dia, futuramente, estarão integrados a várias áreas do conhecimento e as contemporâneas formas de tratá-los, configurando um novo modelo paradigmático de interações interdisciplinares?

Ilana Seifriz



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; MERMEJO, P.; ALVAREZ, M.; GUERRA, J. A.; SILVAN, A. M.; VILLAR, A. M. Flavonoids And A Sesquiterpene Lactone from *Tanacetum Microphyllum* Inhibit Anti-Inflammatory Mediators In Lps-Stimulated Mouse Peritoneal Macrophages. **Planta Médica**, 70 (1): 34-38, 2004.
- ABBOUTT, F.V.; MELZACK, R. Brainstem lesions dissociated neural mechanisms of morphine analgesia in different kinds of pain. **Brain Research**, 251:149-155, 1982.
- AFIFI, F. U.; AL-KHALIL, S.; ABDUL-HAQ, B. K.; MAHASNEH, A.; AL-EISAWI, D. M.; SHARAF, M.; WONG, L. K.; SCHIFF, P. L., JR. Antifungal flavonoids from *Varthemia iphionoides*. **Phytotherapy Research**, 5(4): 173-175, 1991.
- AFIFI, F. U.; ABURJAI, T. Antiplatelet activity of *Varthemia iphionoides*. **Fitoterapia**, 75(7-8): 629-633, 2004.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids: Studies in Organic Chemistry 39**. Lucknov, India, Elsevier, 1989.
- AKENDENGUE, B. Medicinal plants used by the fang traditional healers in Equatorial Guinea. **J. Ethnopharmacol**, 37 (2): 165-173, 1992.
- AL-DABBAS, M. M.; KITAHARA, K.; SUGANUMA, T.; HASHIMOTO, F.; TADERA, K. Antioxidant and α -amylase inhibitory compounds from aerial parts of *Varthemia iphionoides* Boiss. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 70(9): 2178-2184, 2006.
- ALJANCIC, I.; VAIS, V.; MENKOVIC, N.; KARADZIC, I.; JURANIC, N.; MILOSAVLJEVIC, S.; MACURA, S. Flavones and sesquiterpene lactones from *Achillea atrata* Subsp. Multifida: antimicrobial activity. **Journal of Natural Products**, 62 (6): 909-911, 1999.
- ALVES, N.I.; GOMES, M.S.; CARVALHO, M.G.; CARVALHO, A.G. Deslocamentos químico ^1H e ^{13}C de 5-H flavanone e 5-H-flavonol isolados de Leguminosae. **Revista Universidade Rural**, Serie Ciências Exatas e da Terra, 22, (1-2): 81-87, 2003.
- ALBUQUERQUE; U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciência**, 27 (7), 2002.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA FILHO, J. M. ; CABRAL, A. G. S. ; AGRA, M. F. ; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; NASCIMENTO, S. C.; BRAZ FILHO, R. Diploflavone, a new flavonoid from *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 16 (6B): 1454-1457, 2005.

- ALMEIDA, J. R. G. S. ; SILVA, M. S. ; BARBOSA FILHO, J. M. ; CUNHA, E. V. L. ; BRAZ FILHO, R. ; MARQUES, A. S. ; ZHENG, C. . The assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra and X-ray crystallographic analysis of furanoflavan from *Diplotropis ferruginea* Benth. **Annals of Magnetic Resonance**, 2 (1-2): 32-37, 2003.
- ARORA, A.; BYREM, T. M.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 373: 102, 2000.
- BARBOSA, M. R. V.; LIMA, I. B.; LIMA, J. R.; CUNHA, J. P.; AGRA, M. F.; THOMAS, W. W. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, 11 (3): 313-322, 2007.
- BARBOSA FILHO, J. M. ; ALMEIDA, J. R. G. S. ; COSTA, V. C. O. ; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S. ; BRAZ FILHO, R. . Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, 6 (1): 11-17, 2004.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29 (1): 113-123, 2006.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universitária, v.2, 1991.
- BEZERRA, D. A. C. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Campina Grande. 2008.
- BOHM, B.A. **The minor flavonoids**. In: HARBORNE, J. B. (ed.) *The Flavonoids: advances in research since 1986*. London: Chapman & Hall, 1994.
- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M.; *Methods in Enzimology*, Academic Press: New York, 1990, vol. 186, p. 343; van Acker, S. A. B. E.; van Balen, G. P.; van den Berg, D-J.; Bast, A.; van der Vijgh, W. J. F.; **Biochemical Pharmacology**, 56: 935, 1998.
- BRODY T. **Nutritrional biochemistry**. Academic Press, San Diego, p. 658, 1994.
- BROW, J. E. RICE-EVANS, C. A. Luteolin-rich artichoke extract protectslow lipoprotein from oxidation in vitro. **Free Radical Research**, 3: 247-255, 1998.
- BRUNETON, J. **Farmacognosia: Fitoquímica & Plantas Medicinales**. 2ª ed. Ed. Acribia, 2001.
- CABRAL, A. G. S. **Constituintes Químicos de *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. 2009.
-

CANELLA, C. F. C.; TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J. Experiments with plants supposedly toxic to cattle in northeastern Brazil, with negative results. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 1: 345-352, 1966.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L.; **Free Radical Biology & Medicine**. 22: 749, 1997.

CARDOZO, N. A. R. **Metabolitos especiais isolados dos galhos e folhas de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. (Leguminosae) e das flores de *Laseguea erecta* Mull. Arg. (Apocynaceae)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2006.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 75 (3): 501-512, 2003.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21(1), 1998.

CENTRO NORDESTINO DE INFORMAÇÕES SOBRE PLANTAS. ***Piptadenia stipulacea***. Disponível em: < <http://www.cnip.br>. Acesso em: 06 de Jun. 2009.

CHADZINSKA, M.; LEON-KLOOSTERZIEL, K.M.; PLYTYCZ, B.; VERBURG VAN-KEMENADEYC, B.M.L. In vivo kinetics of cytokine expression during peritonitis in carp: Evidence for innate and alternative macrophage polarization. **Developmental & Comparative Immunology**, 32 (5): 509-518, 2008.

CHIAPPETA, A. D. A.; DE MELLO, J. F. Higher plants with biological activity. Plants of Pernambuco. **Rev. Inst. Antibiot.**, 11 (1/2): 99-111, 1984.

CHOI, M. S.; KANG, Y. J.; JEON, S. M. Eupatilin and jaceosidin for preventing and treating diabetes mellitus. **Korean Kongkae Taeho Kongbo**, p. 24, 2009.

CÓDULA, E.; QUEIROZ, L. P.; ALVES, M. Checklist da flora de Mirandiba, Pernambuco: Leguminosae. **Rodriguésia**, 59 (3): 597-602, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. São Paulo: Unicamp, 2007.

COOLIER, H. O. J., DINNEN, L. C., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mice. **British Journal of Pharmacology**, 32: 285-310, 1968.

CRISTAL, R.G. Introduction. **American Journal of Medicine**. 91(suppl 3C): 3C-13S, 1991.

DEWICK, P. M. **Isoflavonoids**. In: HARBORNE, J. B. (ed.) **The Flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1994.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. John Wiley & Sons Ltd., New York, 1997.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Minireview flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, 65 (4): 337-353, 1999.

DUARTE, IDG; FERREIRA-ALVES, DL; VELOSO, DP; NAKAMURA-CRAIG, M. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, 55: 13-18, 1996.

ELSOHLY, H. N.; EL-FERALY, F. S.; JOSHI, A. S.; WALKER, L. A. Antiviral flavonoids from *Alkanna orientalis*. **Planta Medica**, 63(4): 384, 1997.

FABRICANTE, J. R.; ANDRADE, L. A. Análise estrutural de um remanescente de caatinga no Seridó Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, 11 (3): 341-349, 2007.

FARDELONE, L. C.; BRANCHI, B. A. O setor de biofármacos e as oportunidades para o Brasil. **Revista da FAE**, 9 (2): 29-38, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43(1): 61-8; 1997.

FISH, M.S.; JOHNSON, N.M.; HORNING, E.C. Piptadenia alkaloids. Índole bases of Piptadenia peregrina and related species. **Journal of the American Chemical Society**, 77: 5892-5895, 1955.

FLORENTINO, A. T. N.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Contribuição de quintais agroflorestais na conservação de plantas da Caatinga, Município de Caruaru, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, 21(1): 37-47, 2007.

FONTENELE, J.B.; VIANA, G.S.B.; XAVIER-FILHO, J.; ALENCAR, J.W. Antiinflammatory and analgesic activity of a water-soluble fraction from shark cartilage. **Brazilian Journal of Medicinal and Biology Research**, 29: 643-646, 1996.

FRANZOTTI, E.M.; SANTOS, C.V.; RODRIGUES, H.M.; MOURÃO, R.H.; ANDRADE, M.R.; ANTONIOLLI, A.R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**, 72: 273-277, 2000.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(2): 178-182, 2005.

GIESBRECHT, A.M. **Bufotenine occurrence in *Piptadenia falcate* seeds**. Anais da Associação Brasileira de Química, 19: 117-119, 1960.

GOOGLE IMAGENS. **Espécies de Leguminosae**. Disponível em: <<http://http://images.google.com.br>>. Acesso em: 20 de Set. 2009.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Quantitative chemical biology IV: analogies of metabolical mechanism and biological evolution. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 70: 719-726, 1998.

HAI-BO, L.; ZHAN-LI, W.; YING-XIN, Q.; JIA-JU, Z. Flavonoids with aldose reductase inhibiting activity: pharmacophore modeling and implications for mechanism. **Wuli Huaxue Xuebao**, 23(7): 1059-1064, 2007.

HARBORNE, J. B. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. Ed. Academic press Inc. (London) LTD. 1971.

HELLER, W.; FORKMANN, G. **Biosynthesis of flavonoids**. In: HARBORNE, J. B. (ed.). The Flavonoids. London: Chapman & Hall, p. 499-536, 1994.

HENKER, G. A.; HUSTON, M. J. Yopo, a south American Snuff. **Canadian Pharmaceutical Journal**, 83 (18): 8-9, 1950.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. Londres: BT Batsford, 1996.

HONG-XIANG, L.; GUANG-YAO, L.; FENG-QIANG, W. A cytotoxic diterpenoid and antifungal phenolic compounds from *Frullania muscicola* Steph. **Journal of Asian Natural Products Research**, 4(2): 87-94, 2002.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory pain. **Pain**, 30: 103-114, 1987.

IACOBUCCI, G. A.; RUVEDA, E. A.; Bases derived from tryptamine In Argentine *Piptadenia* species. **Phytochemistry**, 3: 465-467, 1964.

JOBSON, R. W.; LUCKOW, M. Phylogenetic Study of the Genus *Piptadenia* (Mimosoideae: Leguminosae) using Plastid trnL-F and trnK/matK Sequence Data. **Systematic Botany**, 32(3): 569-575, 2007.

KLEIN, A. L. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro**. Unesp: São Paulo, p. 131-145, 2000.

LEACH, D.; STEVENSON, L.; GABRIEL, B.; BEATTIE, K. Biologically active compounds isolated from *Centipeda* and their biological activity as antioxidant and antiinflammatory agents. **PCT Patent Filing**. p. 49, 2007.

LEE, S. G.; LIM, J. S. Artemisia extracts for treating autoimmune diseases. **Korean Kongkae Taeho Kongbo**, p. 10, 2009a.

LEE, S. G.; LIM, J. S. Artemisia extracts for treating chronic inflammatory disease. **Korean Kongkae Taeho Kongbo**, p. 11, 2009b.

- LEGLER, G.; TSCHESCHE, R. The isolation of N-methyltryptamine, 5-methoxy-N-methyltryptamine and 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine from the bark of *Piptadenia peregrina*. **Naturwissenschaften**, 50: 94-95, 1963.
- LEITE, D. F. P.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERREIRA, S.C.; CALIXTO, J.B.; RUMJANEK, V.M. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **Journal of Leukocyte Biology**, 82: 630-637, 2007.
- LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. **Royal Botanic Gardens, Kew**, p.577, 2005.
- LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ASSIS, T. S.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, B. A. Spasmolytic action of Diploptropin, a furanoflavan from *Diploptropis ferruginea* Benth., involves calcium blockade in guinea-pig ileum. **Zeitschrift für Naturforschung B**, 60B: 093-1100, 2005.
- MAIA, G. L. A. **Constituintes Químicos de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Reis (Fabaceae)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. 2008.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ed. Fortaleza: edições UFC, 1997.
- MBOUANGOUERE, R. N.; TANE, P.; NGAMGAA, D.; DJEMGOUA, P.; CHOUDHARY, M. I.; NGADJUI, B. T. Piptaderol from *Piptadenia africana*. **Afr. J. Trad. CAM**, 4 (3): 294 – 298, 2007.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, 52 (4): 673-751, 2000.
- MIN-JUNG, K.; DO-HEE, K.; KI WON, L.; DO-YOUNG, Y.; YOUNG-JOON, S. Jaceosidin induces apoptosis in ras-transformed human breast epithelial cells through generation of reactive oxygen species. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 1095, 2007.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Distribuição da Família Fabaceae no mundo**. Disponível em: < <http://www.tropicos.org>. > Acesso em: 14 Set. 2009.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Distribuição de *Piptadenia stipulacea***. Disponível em: < <http://www.tropicos.org>. > Acesso em: 15 Set. 2009.
- MIYAUCHI, Y.; YOSHIMOTO, T.; MINAMI, K. Extractives of hardwood, IX, Extractives from hertwoos of *Piptadenia* sp. **Mokuzai gakkaiishi**, 22 (1): 47-50, 1976.
-

- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, 24 (1): 105-111, 2001.
- MOHAMED, G. A.; ADBEL-LATEFF, A.; FOUAD, M. A.; IBRAHIM, S. R. M.; ELKHAYAT, E. S.; OKINO, T. Chemical composition and hepato-protective activity of *Imperata cylindrica* Beauv. **Pharmacognosy Magazine**, 5(17): 28-36, 2009.
- MORIKAWA, T.; ABDEL-HALIM, O. B.; MATSUDA, H.; ANDO, S.; MURAOKA, O.; YOSHIKAWA, M. Pseudoguaiane-type sesquiterpenes and inhibitors on nitric oxide production from *Dichrocephala integrifolia*. **Tetrahedron**, 62(26): 6435-6442, 2006.
- NEILSON, I. C. **Mimosaceae (Leguminosae-Mimosoideae)**. Flora Malesiana. vol. 11, Part 1, Rijksherbarium, Leiden, 1992.
- NUNES, D. P. **Constituintes químicos das partes aéreas de *Momosa paraibana* Barneby e *Momosa tenuiflora* (Will) Poir.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. 2008.
- PARIS, R. R.; SAINT-FIRMIN, A.; ETCHEPARE, S. Alkaloids and flavonoids of *Piptadenia peregrina* from Haiti. Absence of alkaloids in *Piptadenia africana*. **Annales Pharmaceutiques francaises**, 25: 7-8, 1967.
- PARKHOUSE, J.; PLEUVRY, B. J. **Analgesic Drug**. Oxford: Blackwell, 1979. p. 1-5.
- PATCHER, I. J.; ZACHARIUS, D. E.; RIBEIRO, O.; Índole alkaloids of *Acer saccharinum* (Silver Maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrine*, and *Mimosa hostilitis*. **Journal of Organic Chemistry**, 24: 1285-1287, 1959.
- PELZER, L. E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **IL Farmaco**, 53 (6): 421-424, 1998.
- PEREIRA, I. M.; ANDRADE, L. A.; COSTA, J. R. M.; DIAS, J. M. Regeneração natural em um remanescente de caatinga sob diferentes níveis de perturbação, no agreste paraibano. **Acta Botanica Brasílica**, v. 15(3): 413-426, 2001.
- PETTIT, G. R.; MENG, Y.; HERALD, D. L.; STEVENS, A. M.; PETTIT, R. K.; DOUBEK, D. L. Antineoplastic agents 540. The Indian Gynandropsis gynandra (Capparidaceae). **Oncology Research**, 15(2): 59-68, 2005.
- PIACENTE, S.; BALDERRAMA, L.; DE TOMASSI, N.; MORALES, L.; VARGAS, L.; PIZZA, C. Anadanthoside: a flavanol-3-O- β -D-xylopyranoside from *Anadenanthera macrocarpa*. **Phytochemistry**, 51: 709-711, 1999.
- PIETTA, P. G. J. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63: 1035-1042, 2000.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, 25(1), 2002.

RENDON, P.; WILLY, J. Isolation of bufotenine from seeds of the *Piptadenia macrocarpa* Benth. **Revista Boliviana de Química**, 5 (1): 39-43, 1985.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G.; **Free Radical Biology & Medicine**, 20: 936, 1996.

RODRIGUES, M. V. N.; REHDER, V. L. C.; SARTORATTO, A.; JUNIOR, S. B.; SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multiciência**, 2006.

ROMERO, M. A. V. **Estudo Fitoquímico de *Dioclea grandiflora* e *Erythroxylum pungens* edistribuição e compilação de dados de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C de alcalóides tropânicos de *Erythroxylum***. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. 2008.

ROSENBLOOM, R. A. Flavonoid compositions for the treatment of skin disorders. **Patent Application Publication**, p. 11, 2003.

ROSENBLOOM, R. A. Methods using antioxidant flavonoid compounds for the treatment of peripheral neural and vascular ailments. **Patent Application Publication**, p. 11, 2004.

ROSENBLOOM, R. A. Compositions and methods for the treatment of leukemia. **Patent Application Publication**, p. 10, 2006.

SANTANA, J. A. S.; SOUTO, J. S. Diversidade e Estrutura Fitossociológica da Caatinga na Estação Ecológica do Seridó-RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 6 (2), 2006.

SEIFRIZ, I. **Propriedades antioxidantes de produtos de origem natural com potencial medicinal: Proteção da ação de espécies reativas de Oxigênio e de Nitrogênio sobre membranas lipídicas e ação como sequestradores de Radicais livres**. Tese submetida à Pós- Graduação de Química da Universidade Federal da Santa Catarina. 2004.

SHARIFIFAR, F.; DEHGHN-NUDEH, G.; MIRTAJALDINI, M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. **Food Chemistry**, 112(4): 885-888, 2008.

SHIBATA, M; OHKUBO, T; TAKAHASHI, H; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, 38: 347-352, 1989.

SILVA, D. A.; COSTA, D. A.; SILVA, D. F.; SOUZA, M. F. V.; AGRA, M. F.; MEDEIROS, I. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 15(1): 23-29, 2005.

SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LEÃO, M. A. Efeitos de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, 35: 127-133, 2002.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Estudos espectroscópicos em elucidação estrutural de flavonóides de *Solanum jabrense* Agra & NEE e *S. paludosum* Moric. **Química Nova**: 1-10, 1999.

SILVAN, A. M.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A. effects of compounds extracted from *Tanacetum microphyllum* on arachidonic acid metabolism in cellular systems. **Planta medica**, 64 (3): 200-203, 1998.

SIVESTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, p. 70-104, 2007.

SIQUEIRA, S.; SANTOS, R. F.; CAVALCANTE, F. A.; RIBEIRO, L. A. A.; LIRA, D. P.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, B. A. Efeitos Espasmolítico e Espasmogênico de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Anais do XIV Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal da Paraíba**, p. 192, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. São Paulo: Nova Odessa, 2008.

STEGHENS, J.-P.; KAPPEL, A.L.; DENIS, I.; COLLOMBEL, C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde In human plasma or serum. **Free Radical Biology & Medicine**. 31 (2): 242-249, 2001.

STROMBERG, V.L. The isolation of bufotenine from *Piptadenia peregrina*. **Journal of the American Chemical Society**, 76: 1707, 1954.

TAKAHASHI, M.; SHIBATA, M.; NIKI, Estimation of lipid peroxidation of live cells using a fluorescent probe, diphenyl-1-pyrenylphosphine. **Free Radical Biology & Medicine**. 31(2): 164-174, 2001.

TALEB-CONTINI, S. H.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; OLIVEIRA, D. C. R. Immunomodulatory effects of methoxylated flavonoids from two *Chromolaena* species: structure-activity relationships. **Phytotherapy Research**, 20(7): 573-575, 2006.

TALEB-CONTINI, S. H.; SALVADOR, M. J.; BALANCO, J. M. F.; ALBUQUERQUE, S.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Antiprotozoal effect of crude extracts and flavonoids isolated from *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, 18(3): 250-254, 2004.

TALEB-CONTINI, S. H.; SALVADOR, M. J.; WATANABE, E.; ITO, I. Y.; RODRIGUES-OLIVEIRA, D. C. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 39(4): 403-408, 2003.

THOMAS, C.E.; KAKYANARAMAN, B. **Oxygen Radicals and the Disease Process**. Edited by Craing E. Thomas and Balaraman Kakyanaraman; USA; 1997.

TJOLSEN, A; BERGE, OG; HUNSKAAR, S; ROSLAND, JH; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51: 5-17, 1992.

TUCKER, S. C. Floral Development in Legumes. **Plant Physiology**, 131: 911–926, 2003.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D-J.; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VUGH, W. J. F.; BAST, A.; **Free Radical Biology & Medicine**, 20: 331, 1996.

VASCONCELOS, I.; ALMEIDA, R. T.; MENDES- FILHO, P. F. Ocorrência de rizóbios e endomicorizas em leguminosas arbóreas e arbustivas do estado do Ceará. **Ciência Agronômica**, 15 (1/2): 45-52. 1984.

WEN, L.V.; XIA, S.; TING, C.; QIANG, X.; XING, X. Jaceosidin induces apoptosis in human ovary cancer cells through mitochondrial pathway. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2008.

WILLAMAN, J. J.; LI, H. L. alkaloid-bearing plants and their contained alkaloids, 1957-1968. (continued from a2230). **LLOYDIA**, 33S (1): 1-286, 1970.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry** 64 (3–19): 3-19, 2003.

WOJCIECHOWSKI, M.F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21 st century perpeccive. **Royal Botanic Gardens**, Advances in Legumes Systematics, part 10, Higher Level Systematics, p. 5-35, 2003.

YAMASATO, S.; KAWANISHI, K.; KATO, A.; HASHIMOTO, Y. Organic bases from Brazilian *Piptadenia* species. **Phytochemistry**, 11 (2): 737-739, 1972.

YE, Y.; FANG-YUAN, G.; XING-XIN, W.; YANG, S.; YI-HUA, L.; TING, C.; QIANG, X. Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. **Journal of Ethnopharmacology**, 120(1): 1-6, 2008.

ZELADA , F.; CONI, H. **Contribution to the study of *Piptadenia cebil***. Tese, Univesidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, p. 72, 1915.

ZUANAZZI, J.A. S.; MONTANHA, J.A. **Flavonóides** In: SIMÕES, C. M. O. et al (ed.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed., Porto alegre: Ed UFRGS, p. 577-614, 2003.



APÊNDICE A

Brazilian Chemical Society (SBQ). Division of Medicinal Chemistry. 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry

Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea*

Queiroz, A.C.^{1*}; Souza, E.T.¹; Freire-Dias, T.L.M.¹; Bispo Jr, W.¹; Lira, D.P.²; Barbosa-Filho, J.M.²; Santos, B.V.O.²; Alexandre-Moreira, M.S.¹

¹Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI), Setor de Fisiologia e Farmacologia; Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde- ICBS -Universidade Federal de Alagoas.

²Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - Universidade Federal da Paraíba.

Keywords: *Piptadenia stipulacea*; Mimosaceae; analgesic and antiinflammatory properties.

Introduction

Piptadenia stipulacea popularly known as “jurema-branca”, an important medicinal plant in northeastern Brazil, where it is reputed for its antinociceptive and anti-inflammatory properties¹. This study was intended to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous phase, the acetate phase and one flavonoid isolated from *Piptadenia stipulacea* in animal models.

Results and Discussion

The antinociceptive activity was quantified using the acetic acid-induced mice abdominal constrictions test², the hot plate³ and formalin tests⁴. The anti-inflammatory properties of compounds were evaluated on zymosan-induced peritoneal inflammation test⁵. The results obtained are illustrated in figures 1, 2, 3 and 4, respectively.

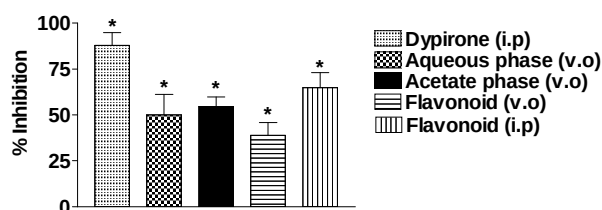


Figure 1. Antinociceptive effect of aqueous phase (100 mg/kg), acetate phase (100 mg/kg), flavonod (100 µmol/kg) and dypirone (100 µmol/kg) on the acetic acid-induced writhings in mice.

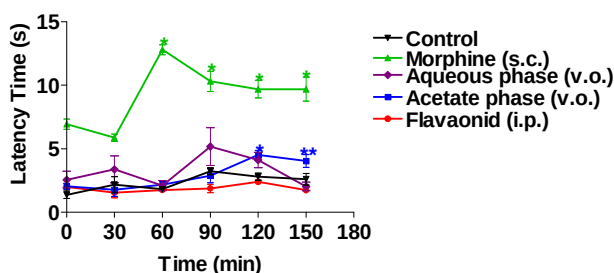


Figure 2. Time-course of the effects of aqueous phase (100mg/kg), acetate phase (100mg/kg), flavonod (100µmol/kg) and morphine (15µmol/kg) on thermal nociception.

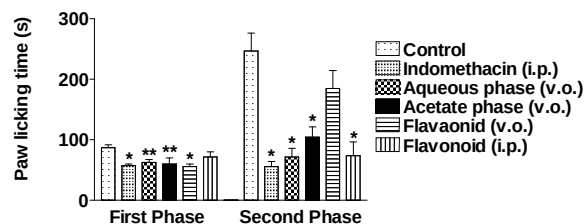


Figure 3. Antinociceptive of aqueous phase (100 mg/kg), acetate phase (100 mg/kg), flavonod (100 µmol/kg) and indomethacin (100 µmol/kg) on the formalin-induced nociception in mice.

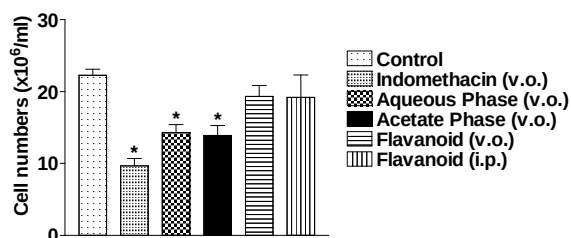


Figure 4. Anti-inflammatory effect of of aqueous phase (100 mg/kg), acetate phase (100 mg/kg), flavonod (100µmol/kg) and indomethacin (100 µmol/kg) on zymosan-induced peritoneal inflammation test.

From the obtained results nociceptivos models (acetic acid-induced writhings and formalin tests), it was noticed that the compounds showed considerable antinociceptive activity. These compounds not induced inhibition of pain in hot plate test. Moreover, aqueous phase and acetate phase inhibited the influx of inflammatory leukocytes into the peritoneal cavity.

Conclusions

The compounds exhibited antinociceptive and anti-inflammatory activities, however the data on hot plate test indicating that the plant is not a centrally acting antinociceptive.

Acknowledgements

CNPq, PPSUS, FAPEAL and IM-INOVAR

¹ Albuquerque, U.P. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2006, 2:30

² Collier, H.O.J.; Dinneen, J.C.; Johnson, C.A.; Schneider, C. *British Journal of Pharmacology Chemotherapy*. 1968, 32, 295–310. ³ Franzotti, E.M.; Santos, C.V.; Rodrigues, H.M.; Mourão, R.H.; Andrade, M.R.; Antonioli, A.R.; *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, 72, 273–277.

APÊNDICE B

Sociedade Brasileira de Química (SBQ)

Flavonóides de *Piptadania stipulacea* (Fabaceae): isolamento e atividade analgésica preliminar.

Daysianne Pereira de Lira^{1*} (PG) Aline Cavalcanti de Queiroz⁴ (IC) Everton Tenório de Souza² (TC) Maria de Fátima Agra¹ (PQ) João X. de Araújo Júnior^{2,3} (PQ) José Maria Barbosa Filho¹ (PQ) Magna Suzana Alexandre Moreira⁴ (PQ), Bárbara Viviana de Oliveira Santos¹ (PQ). *E-mail: daysianneplira@yahoo.com.br

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB, João Pessoa-PB, Brasil; ²Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais, IQB, UFAL, Maceió-AL; ³Escola de Enfermagem e Farmácia, UFAL; ⁴Laboratório de Farmacologia e Imunidade, ICBS, UFAL, Maceió-AL.

Palavras Chave: *Piptadania stipulacea*, Fabaceae, flavonóides, inflamação

Introdução

Piptadania stipulacea (Benth) Ducke (Fabaceae), árvore da caatinga do nordeste brasileiro, conhecida como jurema branca¹ é muito usada na medicina popular nos processos inflamatórios e estudos científicos confirmam sua atividade antibacteriana e antifúngica².

Resultados e Discussão

Partes aéreas da espécie coletada em Serra Branca-PB foram secas, moídas e extraídas a frio com etanol, obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB), que após extração líquido/líquido com solventes orgânicos obteve-se as fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica. A fase clorofórmica foi submetida à CC-fase normal, fornecendo três flavonóides (1) Santina, (2) desmetoxicentaureidina e (3) Galetina 3,6-dimetil éter. As estruturas dessas substâncias foram identificadas por técnicas de RMN ¹H e ¹³C (uni e bidimensionais) e por comparação com dados na literatura.

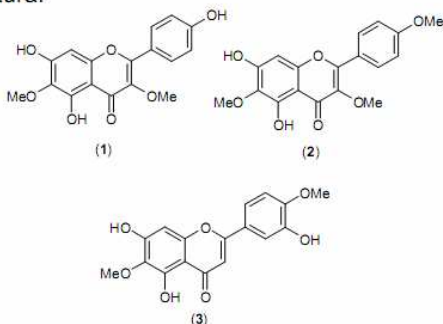


Figura 1. Flavonóides isolados da fase clorofórmica de *Piptadania stipulacea*.

Para avaliar a atividade antinociceptiva e perfil antiinflamatório, realizou-se ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético e ensaio de nocicepção induzida por formalina (100 mg/kg) da fase acetato e aquosa, bem como do flavonóide – galetina 3,6-dimetil éter (100 µmol/kg) (tabela 1). De acordo com os dados obtidos, observou-se que

as frações testadas mostraram considerável atividade antinociceptiva periférica e possível ação antiinflamatória, já que inibiram significativamente a segunda fase da formalina. Estudos futuros são necessários para avaliar a atividade antinociceptiva central, a atividade antiinflamatória, bem como para desvendar o mecanismo de ação do flavonóide.

Tabela 1. Efeito antinociceptivo de *Piptadania stipulacea* no ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético e no teste de formalina.

	Contorção abdominal		Teste de Formalina	
	Nº de contorções ^a	Inibição (%)	1ª Fase Tempo (s) ^a	2ª Fase Tempo (s) ^a
Controle	42,60 ± 1,2	---	86,80 ± 4,9	260,3 ± 39,3
Fase Aquosa	21,33 ± 4,7	49,92**	62,64 ± 4,5 ^b	84,57 ± 18,5**
Fase Acetato	19,33 ± 2,2	54,62**	59,69 ± 10,4*	89,39 ± 9,9**
Galetina 3,6-dimethyl ether	15,00 ± 3,4	64,79**	71,51 ± 8,4 ^b	73,67 ± 22,5**
Dipirona	5,20 ± 2,9	87,79**	---	---
Indometacina	---	---	57,00 ± 3,0**	56,00 ± 8,1**

^aResultados expressos em média ± epm, ^bnão estatisticamente significativo; *p<0,05, **p<0,01 (ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

Conclusões

Das partes aéreas de *Piptadania stipulacea* foram isolados e identificados três flavonóides inéditos na espécie em estudo. Verificou-se também a atividade antinociceptiva das fases aquosa e acetato, bem como do flavonóide Galetina 3,6-dimetil éter, sendo apontados como agentes promissores como analgésicos.

Agradecimentos

CNPq, FAPEAL e CENAUREMN/UFC

¹ ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de Recursos Vegetais da Caatinga: O caso do Agreste do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Revista de Ciência e Tecnologia da América (Interciência)*, volume 27, nº 007, p. 336-346, Caracas-Venezuela, 2002.

² CHIAPPETA, A. D. A.; DE MELLO, J. F. Higher Plants with Biological Activity. Plants of Pernambuco. II. III. *Rev. Inst. Antibiot Univ. Fed. Pernambuco*, 11 (1/2). Recife: 1984. 99-11p.



APÊNDICE C

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Ethnopharmacology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae)

Article Type: Full Length Article

Corresponding Author: Ms Magna Suzana Alexandre-Moreira, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Alagoas

First Author: Aline C Queiroz, MSc

Order of Authors: Aline C Queiroz, MSc; Daysianne P Lira, MSc; Thays L Dias, MSc; Éverton T Souza, MSc; Anansa B Aquino, MSc; Diogo José C Silva, MSc; Maria de Fátima Agra, PhD; José Maria Barbosa Filho, PhD; João X Araújo-Júnior, PhD; Bárbara Viviana O Santos, PhD; Magna Suzana Alexandre-Moreira, Ph.D.
