



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



PgPNSB

ANNE DAYSE SOARES DA SILVA

**FLAVONOIDES DE *Zornia brasiliensis* E ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA DA 7-METOXIFLAVONA**

JOÃO PESSOA – PB

2013

ANNE DAYSE SOARES DA SILVA

**FLAVONOIDES DE *Zornia brasiliensis* E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA
DA 7-METOXIFLAVONA**

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 obtenção do título de Mestre na área de Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

COORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

JOÃO PESSOA – PB

2013

XXXX Silva, Anne Dayse Soares.

FLAVONOIDES DE *Zornia brasiliensis* E ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA DA 7-METOXIFLAVONA / Anne Dayse Soares da
Silva – João Pessoa, 2013.

xxx : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Dissertação (Mestrado) –UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. *Zornia brasiliensis*. 3. Flavonoides 4.
Farmacoquímica.

UFPB/BC

CDU:

ANNE DAYSE SOARES DA SILVA

**FLAVONOIDES DE *Zornia brasiliensis* E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA
DA 7-METOXIFLAVONA**

Dissertação aprovada em: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

PhD em Química Orgânica
Universidade de São Paulo-USP
(Orientador)

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior

PhD em Química de Produtos Naturais
Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Examinador Externo)

Prof. Dr^a. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

Doutora em Produtos Naturais
Universidade Federal da Paraíba-UFPB
(Examinadora Interna)

Dedico este trabalho:

*A minha família, meu porto seguro, em especial
a minha mãe, Maria Edilene Almeida da Silva Soares pelo
amor, confiança e ensinamentos imprescindíveis em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que sempre me guiou dando-me discernimento sobre que decisões e caminhos tomar em minha vida.

Ao professor Dr. Marcelo Sobral da Silva, meu orientador pela oportunidade e confiança depositada em mim durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Professor Josean Fachine pelo fundamental auxílio e orientação fornecidos a mim para desempenhar este trabalho, sem seu auxílio direto este trabalho não seria possível.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Agra da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela identificação botânica da espécie *Zornia brasiliensis*, objeto deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A Professora Magna Suzana Alexandre Moreira pela parceria na realização dos experimentos farmacológicos na Universidade Federal de Alagoas.

Aos professores do Programa por todos os ensinamentos passados.

As secretárias da Pós-Graduação Tânia Maria e Caroline Manguiera pelo trabalho e apoio e por estarem sempre dispostas a ajudar.

A Ana Carolina Carvalho Correia, minha amiga de Maceió que me ajudou muito nos anos iniciais em João Pessoa quando não sabia onde ficava nada e nem onde resolver nada....

A Polyana Barros, com quem morei nos anos iniciais em João Pessoa e que muito me ajudou.

Aos meus amigos de laboratório em especial Paula Ferreira, Denise Aline, Hellanne Fabricia, Caroline Figueiredo, Camila Figueiredo (queria poder colocar o sotaque do Rio aqui), Cinthia Queiroga, Camila Holanda e Otemberg Chaves por todo o apoio, ajuda e auxílio no laboratório e pela companhia diária na bancada.

A Rafaela Soares que todos os dias “me estressou, discutindo” pelos mais variados motivos, mas me fez dar muitas risadas com seu sorriso fácil e sincero. Muito obrigada por suas inúmeras ajudas e por sua amizade.

Vivianne Marcelino que me fez rir muitas vezes, que me aperreou o juízo todos os dias pelos artigos e pelos certificados. Muito obrigada por todos os dias de sua companhia.

A Sara Alves uma amigona pessoa sensacional sempre com um sorriso no rosto pronta a ajudar.

A Jaqueline (Jeickobe) por suas 1.346 caronas para casa, por suas conversas diárias, sua amizade e seu auxílio em tudo que precisei. Você me ensinou muito nos espectros, sou orgulhosa de ter uma amiga espectroscopista, SABE MUITO!!

A Ana Sílvia, que sempre esteve disposta a me ajudar e que em muitos momentos dividiu comigo várias manhãs de conversas, conselhos e preocupações!

A Susyanne, pela sua amizade, carinho e apoio com ajudas e conselhos fornecidos a mim em vários momentos de dificuldade! Me orgulho muito de ter uma amiga como você!

A Marcelo Manso, meu amigo que me ajudou muito, principalmente no início quando não sabia absolutamente nada no laboratório.

Aos técnicos Sócrates Golzio, Wellington Lima e Alexsandro pela contribuição imprescindível para realização deste trabalho.

A Raimundo Nonato (Nonatis) que mais que um técnico é “o cara”. Com uma bondade sem fim ele é nosso anjo da guarda.... obrigada por tudooo!

A Vicente a única pessoa que conhecia aqui na Paraíba... foi graças a sua confiança e ajuda que também vim parar aqui.

A Luiz Henrique meu amigo de Maceió, que mesmo a distância sempre me ajudou e auxiliou em tudo.

A Heloisa Mara (pequeninha) que todos os dias me mostrava sua força e esperança. Que foi minha luz e força “Meuuu Deusss” quando tudo parecia estar dando errado. Sou e serei sempre muito grata a você pelo auxílio, amizade (ou melhor, quase uma irmandade) que você me proporcionou nesses dois anos. Obrigada por tudo.

Ao meu anjo da guarda, minha amiga, minha segunda mãe, minha eterna orientadora Fabiana de Andrade Cavalcante, por toda a confiança depositada em mim. Fui, sou e sempre serei eternamente grata por tudo que você fez por mim. Saiba que é meu exemplo de profissional. Muito, muito, muitíssimo obrigada por tudo.

A minha tia Enilda, uma segunda mãe que sempre confiou e se interessou por tudo que fizesse na minha vida. Tenho a senhora em um local muito especial em meu coração.

A meu pai, que do seu jeito particular me apoiou e me ajudou na minha caminhada.

Aos meus irmãos, sobrinhos e cunhadas que sempre confiaram em mim.

A minha família, em especial minha avó Cicera, e minha madrinha Elizete que sempre me reergueram nos momentos de tristeza e dúvida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Anne Dayse Soares da Silva

“...Não digas ‘não posso’ nem de brincadeira, porque o inconsciente não tem sentido de humor, o tomará a sério, e disso o lembrará sempre que tentares...”

Facundo Cabral

RESUMO

SILVA, A. D. S. **Flavonoides de *Zornia brasiliensis* e atividade antinociceptiva da 7-metoxiflavona.** 2013 150p. Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João pessoa.

O gênero *Zornia* possui cerca de 75 espécies no mundo, com 41 representantes na América, 16 na África, 13 na Oceania e 7 na Ásia (MOHLENDROCK 1961), é o segundo representante mais numeroso do clado Adesmia. No Brasil ocorre desde a região amazônica até os “pampas” no Rio Grande do Sul. A espécie *Zornia brasiliensis* é conhecida popularmente como “urinária”, “urinana” e “carrapicho” é relatada por sua utilização na medicina popular como diurética. Ocorre em vários estados do Brasil, sendo abundante no Nordeste do Brasil ocorrendo nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba. Neste trabalho descrevemos o isolamento e elucidação estrutural de flavonoides, chalconas e pterocarpanos das partes aéreas de *Zornia brasiliensis*. Para isso o material vegetal, após secagem e pulverização, foi submetido a processos de extração, partição e cromatografia para isolamentos dos constituintes químicos. A estrutura química dos mesmos foi determinada pelos métodos espectroscópicos de Infravermelho, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais bem como por comparações com modelos da literatura. Das fases diclorometano e acetato de etila obtiveram-se cinco compostos sendo três flavonas: 7-metoxiflavona, 5-hidroxi-7-metoxiflavona e 5,7-dimetoxiflavona; uma chalcona a 2',4'-dihidroxichalcona e um pterocarpano o 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano, todas isoladas pela primeira vez no gênero. Além disto, este trabalho avaliou a atividade antinociceptiva da 7-metoxiflavona isolada no presente trabalho. Desta forma, os resultados obtidos contribuíram para a ampliação do conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Zornia* e da atividade antinociceptiva de uma flavona até então não estudada.

Palavras-chave: *Zornia*, *Zornia brasiliensis*, flavonas.

ABSTRACT

SILVA, A. D. S. **Flavonoids and of *Zornia brasiliensis* and activity of antinociceptive 7-methoxyflavone**. Master thesis- Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João pessoa.

The genus *Zornia* has about 75 species worldwide, with 41 representatives in America, 16 in Africa, 13 in Asia-Oceania and 7 (MOHLENDROCK 1961), is the second most numerous representative of clade Adesmia. Occurs in Brazil from the Amazon region to the "pampas" in Rio Grande do Sul *Zornia brasiliensis* species is popularly known as "urinaria", "urinana" and "carrapicho" is reported by its use in folk medicine as a diuretic. It occurs in several states in Brazil, being abundant in northeastern Brazil occurring in the states of Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte and Paraíba. Here we describe the isolation and structural elucidation of flavonoids, chalcones and Pterocarpan aerial parts of *Zornia brasiliensis*. For this the plant material after drying and pulverization was subjected to extraction processes, partition and chromatography for isolation of the chemical constituents. The same chemical structure was determined by spectroscopic methods IR, Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance ^1H and ^{13}C and uni-dimensional as well as comparisons with literature. Phases of dichloromethane and ethyl acetate afforded three of five compounds flavones: 7-methoxyflavone, 5-hydroxy-7-methoxyflavone and 5,7-dimethoxyflavone, a chalcone 2', 4'-dihydroxichalcona pterocarpan and a 3 - hydroxy-9-metoxipterocarpano, all isolated for the first time in the genre. Furthermore, this study evaluated the antinociceptive activity of 7-methoxyflavone isolated in this study. Thus, the results contributed to the expansion of knowledge of gender *Zornia* chemotaxonomic and antinociceptive activity of a flavone, so far not.

Studied Keywords: *Zornia*, *Zornia brasiliensis*, flavones.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt	Acetato de etila
APT	Attached Proton Test
Benz	Benzeno
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
(CD₃)₂CO	Acetona deuterada
CH₂Cl₂	Diclorometano
¹³C	Carbono 13
d	Dupleto
Dd	Duplo Dupleto
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EtOH	Etanol
¹H	Hidrogênio
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
i.p.	Intraperitoneal
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
M	Multipeto
MeOH	Metanol
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S	Singleto
SI	Singleto largo
T	Tripleto

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição geográfica da família Leguminosae no mundo, representada pelas áreas em verde.....	29
Figura 2 - <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel.....	39
Figura 3 - Desenho ilustrativo mostrando <i>Zornia brasiliensis</i> e seus detalhes anatômicos.....	40
Figura 4 – Esqueletos básicos do flavonoide e das subclasses.....	43
Figura 5 . Cromatogramas da Fração M-1 nas proporções de solventes (34:100/H ₂ O:MeCN).....	58
Figura 6 - Contorção abdominal após injeção i.p. de ácido acético.....	62
Figura 7 - Camundongo lambendo a pata no ensaio de nocicepção induzida por formalina.....	63
Figura 8 - Ensaio de placa quente.....	64
Figura 9 . Substâncias isoladas de <i>Zornia brasiliensis</i> no presente trabalho....	67
Figura 10 - Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de Zb-1	74
Figura 11 - Espectro de RMN ¹³ C-BB (CDCl ₃ , 125 MHz) de Zb-1	75
Figura 12 - Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de Zb-1	76
Figura 13 - Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de Zb-1 na região de 8,1-6,5 ppm.....	76
Figura 14 - Espectro de HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-1	77
Figura 15 - Expansão do espectro de HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-1 na região de (8,7-6,1) x (90x130) ppm.....	77
Figura 16 - Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-1	78
Figura 17 - Expansão do espectro de HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-1 na região de (8,20-7,35) x (115x180) ppm.....	78

Figura 18- Expansão do espectro de HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-1 na região de (6,90-6,35) x (100x180) ppm.....	79
Figura 19- Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de Zb-2	85
Figura 20 Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de Zb-2	86
Figura 21- Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de Zb-2	87
Figura 22- Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de Zb-2 na região de 7,9-6,4 ppm.....	87
Figura 23- Espectro de HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-2	88
Figura 24- Expansão do espectro de HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-2 na região de (130-90 ppm) X (7,9-6,3 ppm).....	88
Figura 25- Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-2	89
Figura 26- Expansão do espectro de HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-2 na região de (165-90 ppm) x (8,2-6,3 ppm).....	89
Figura 27- Espectro de NOESY (CDCl ₃ , 500 MHz) de Zb-2	90
Figura 28- Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de Zb-3	96
Figura 29- Espectro de RMN ¹³ C-BB (CDCl ₃ , 125 MHz) de Zb-3	97
Figura 30- Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de Zb-3	97
Figura 31- Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de Zb-3 na região de 7,9-6,3 ppm.....	98
Figura 32- Espectro de HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-3	99
Figura 33- Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-3	100
Figura 34- Expansão do espectro de HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-3 na região de (170-90 ppm) X (13,0-12,0 ppm).....	100
Figura 35- Expansão do espectro de HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-3 na região de (109-91 ppm) X (6,8-6,25 ppm).....	101
Figura 36- Expansão do espectro de HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Zb-3 na região de (135-125 ppm) X (7,9-6,6 ppm).....	101

Figura 37- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Zb-3 na região de (184-154 ppm) X (8,1-6,1 ppm).....	102
Figura 38- Espectro de massas de baixa resolução de Zb-4	107
Figura 39- Espectro de RMN ^{13}C -APT ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 125 MHz) de Zb-4	108
Figura 40- Espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de Zb-4	109
Figura 41- Expansão do espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de Zb-4 na região 7,35-6.25 ppm.....	109
Figura 42- Expansão do espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de Zb-4 na região 5,6-1,6 ppm.....	110
Figura 43- Espectro de HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Zb-4	111
Figura 44- Expansão do espectro de HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Zb-4 na região de (20-80 ppm) X (5,6-1,0 ppm).....	111
Figura 45- Expansão do espectro de HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Zb-4 na região de (95-135 ppm) X (7,6-6,2 ppm).....	112
Figura 46- Espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Zb-4	112
Figura 47- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Zb-4 na região de (40-85 ppm) X (7,6-4,9 ppm).....	112
Figura 48- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Zb-4 na região de (40-80 ppm) X (4,6-3,1 ppm).....	113
Figura 49- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Zb-4 na região de (95-135 ppm) X (7,4-3,4 ppm).....	113
Figura 50- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Zb-4 na região de (130-170 ppm) X (7,5-3,5 ppm).....	114
Figura 51- Espectro de massas de baixa resolução de Zb-5	120
Figura 52- Espectro de RMN ^{13}C -BB ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 125 MHz) de Zb-5	121
Figura 53- Espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de Zb-5	121

Figura 54- Expansão do espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de Zb-5 na região de 8.1-6.3 ppm.....	122
Figura 55- Espectro de HMQC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 e 125 MHz) de Zb-5	122
Figura 56- Expansão do espectro de HMQC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 e 125 MHz) de Zb-6 na região de (121-135 ppm) X (8,2-7,4 ppm).....	123
Figura 57- Expansão do espectro de HMQC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 e 125 MHz) de Zb-5 na região de (102-112 ppm) X (6,6-6,1 ppm).....	123
Figura 58- Espectro de HMBC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 e 125 MHz) de Zb-5	124
Figura 59- Expansão do espectro de HMBC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 e 125 MHz) de Zb-5 na região de (98-119 ppm) X (6,75-6,1 ppm).....	124
Figura 60- Expansão do espectro de HMBC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 e 125 MHz) de Zb-5 na região de (120-146 ppm) X (8,35-7,25 ppm).....	125

Lista de Tabelas

Tabela 1- Atividades farmacológicas de espécies de <i>Zornia</i>	37
Tabela 2 – Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de Zb-1 em CDCl_3 (125 e 500 MHz, respectivamente) e da 7-metoxiflavona em CDCl_3 (75 e 300 MHz, respectivamente) Lee; Son; Park, 2007.....	72
Tabela 3 – Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para Zb-1 , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3	73
Tabela 4 – Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de Zb-2 em CDCl_3 (125 e 500 MHz, respectivamente) e da 5,7-dimetoxiflavona em CDCl_3 (100 e 400 MHz, respectivamente) SUTTHANUT et al., 2007.....	83
Tabela 5 – Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para Zb-2 , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3	84
Tabela 6 – Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de Zb-3 em CDCl_3 (125 e 500 MHz, respectivamente) e da 5-Hidroxi-7-metoxiflavona em CDCl_3 (100 e 400 MHz, respectivamente) Sutthanut; Sripanidkulchai; Jay, 2007.....	94
Tabela 7 – Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para Zb-3 , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3	95
Tabela 8 – Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de Zb-4 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (125 e 500 MHz, respectivamente) e do medicarpin em CDCl_3 (100 e 400 MHz, respectivamente) SOTRES et al., 2012.....	105
Tabela 9 – Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para Zb-4 , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	106
Tabela 10 – Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de Zb-5 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (500 e 125 MHz, respectivamente) e da 2',4'-dihidroxihaconina em CD_3OD (150 e 300 MHz, respectivamente) MIKELL; KHAN, 2012 e GHANI; et al., 2012.....	118
Tabela 11 – Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para Zb-5 , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	119

Lista de Esquemas

Esquema 1 – Representação da biossíntese dos flavonoides.....44

Esquema 2- Obtenção e cromatografia do extrato etanólico bruto de *Zornia brasiliensis*.....54

Lista de Quadros

Quadro 1- Flavonoides isolados de espécies da subfamília Papilionoideae.....	32
Quadro 2- Flavonoides isolados da espécie <i>Zornia diphylla</i>	38
Quadro 3- Processamento cromatográfico da fase diclorometano do EEB de <i>Zornia basiliensis</i> – Coluna 1.....	56
Quadro 4- Processamento cromatográfico da fase acetato do EEB de <i>Zornia basiliensis</i> – Coluna 2.....	59
Quadro 5- Processamento cromatográfico da fração 63-70 da coluna 2 - coluna 2.1.....	60

Lista de Gráficos

Gráfico 1- Efeito da 7-metoxiflavona (7-MF) nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....127

Gráfico 2- Efeito da 7-metoxiflavona (7-MF) na nocicepção induzidas por formalina em camundongos. **A:** Fase neurogênica e **B:** Fase inflamatória.....129

Gráfico 3- Efeito da 7-metoxiflavona (7-MF) no ensaio de placa quente.....130

Gráfico 4- Efeito da 7-metoxiflavona (7-MF) no ensaio de nocicepção induzida por glutamato em camundongos.....132

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
3.1. Considerações sobre a família Leguminosae	29
3.2. Considerações sobre o gênero <i>Zornia</i>	36
3.3. Considerações sobre a espécie <i>Zornia brasiliensis</i>	38
3.4. Considerações sobre flavonoides	41
3.5. considerações sobre dor	46
4. EXPERIMENTAL	50
4.1. Material Botânico	51
4.2. Obtenção do extrato etanólico bruto	51
4.3. Cromatografia do EEB de <i>Zornia brasiliensis</i>	51
4.4. Métodos cromatográficos	52
4.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE	52
4.5. Métodos espectroscópicos	53
4.5.1. Espectroscopia de IV	53
4.5.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	53
4.5.3. Espectrometria de Massas (EM)	53
4.6. Ponto de Fusão	54
4.7. Isolamento e purificação dos componentes químicos	55
4.7.1. Processamento cromatográfico da fase diclorometano	55
4.7.2. Processamento cromatográfico da fase acetato de etila	56
4.8. Ensaio farmacológico	60
4.8.1. Aprovação pelo Comitê de Ética	60
4.8.2. Animais	60
4.8.3. Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético	61
4.8.4. Ensaio de nocicepção induzida por Formalina	62
4.8.5. Ensaio de Placa Quente	63
4.8.6. Ensaio de nocicepção induzida por glutamato	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1. Avaliação fitoquímica	67
5.1.1. Determinação estrutural de <i>Zb-1</i>	68
5.1.2. Determinação estrutural de <i>Zb-2</i>	80
5.1.3. Determinação Estrutural de <i>Zb-3</i>	91
5.1.4. Determinação Estrutural de <i>Zb-4</i>	102
5.1.5. Determinação Estrutural de <i>Zb-5</i>	115
5.2. Avaliação farmacológica	126

5.2.1 Efeito da 7-metoxiflavona (7-MF) no ensaio de contorção abdominal induzidas por ácido acético.....	126
5.2.2 Ensaio de placa quente	127
5.2.3 Ensaio de nocicepção induzida por glutamato.....	131
6. CONCLUSÕES	133
REFERÊNCIAS.....	135
APÊNDICE.....	151

Introdução



1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais remota dos primórdios da civilização. Hipócrates, considerado pai da medicina entre 460-361 a.C. já utilizava na Grécia centenas de drogas de origem vegetal (BALBACH, 1992). Essas utilizações não foram esquecidas com o tempo, apenas aumentaram com o conhecimento crescente de mais espécies medicinais.

A natureza tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas até o momento e o reino vegetal destaca-se nesse cenário, devido à possibilidade de utilizações diversificadas (YAMADA, 1998). Sob esse aspecto, a flora se torna um campo promissor para a investigação de soluções satisfatórias e criativas de ferramentas farmacológicas (COUTINHO et al., 2004).

Cada população possui sua própria lista de ervas medicinais que são passadas de geração para geração (CARAVACA, 2000). O conhecimento tradicional sobre o uso das plantas ainda é vasto e, em muitos casos, o único recurso terapêutico disponível às populações rurais de países em desenvolvimento (PASA et al., 2005). As práticas relacionadas ao uso popular de plantas medicinais são o que muitas comunidades têm como alternativa viável para o tratamento de doenças ou manutenção da saúde (SOUZA; FERNANDES; PASA, 2010). Esse amplo uso e aceitação são compreendidos pela sua inserção cultural e pela atual biodisponibilidade desses recursos na região, ao contrário do que ocorre com outros medicamentos industrializados (DUTRA et al., 2009).

O Brasil possui a maior diversidade genética vegetal do mundo, devido a sua abundância ambiental. Estima-se que dos 1,4 milhões de organismos já descritos no planeta, em torno de 10% ocorram no território nacional (SCHOPPAN; GASTAL, 2009). As espécies já catalogadas no Brasil são cerca de 31.702 espécies de angiospermas (FORZZA et al., 2012) e 26.000 de gimnospermas (SOUZA., 2012), no entanto estes números vem sendo atualizados constantemente.

No entanto, o desenvolvimento científico atual fornece condições de se comprovar os conhecimentos experimentais milenares do uso de plantas. Ao se comparar a riqueza de espécies vegetais da Amazônia com o resto do mundo observa-se que em países industrializados como a Alemanha a fitoterapia participa com mais de 30% na produção de fármacos ao passo que no Brasil, apesar da sua ampla riqueza vegetal, apenas 5% dos fármacos são fitoterápicos (FRANCO, 2004).

Esses números mostram que a necessidade de pesquisas que envolvam o uso de plantas medicinais já consagradas no meio popular se tornou premente (SCHOPPAN; GASTAL, 2009). Mas essas pesquisas devem envolver uma rigorosa identificação da planta e estabelecer os parâmetros de qualidade necessários a sua utilização a fim de garantir o seu uso seguro, evitando intoxicações ou efeitos colaterais relacionados a doses e utilizações inadequadas (PAULA et al., 2008).

A segurança desses estudos pode ser aumentada se as pesquisas fitoquímicas caminharem conjuntamente com as investigações farmacológicas que podem através de ensaios comprovar os riscos toxicológicos de sua utilização em diferentes vias, doses e apresentações.

A utilização de produtos naturais na busca por novos fármacos é proveniente de sua riqueza estrutural e da variedade de seus esqueletos carbônicos. Além disso, como os produtos naturais são metabólitos naturais de seres vivos, podem em alguns casos ser menos agressivos aos sistemas biológicos do que moléculas sintéticas (RAPAKA; SADEE, 2005; CHIN, et al., 2006). A variedade e a complexidade das micromoléculas que constituem os metabólitos secundários de plantas e microorganismos marinhos ainda são inalcançáveis por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (VEIGAS-JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A síntese de novas substâncias, com atividades farmacológicas é sem dúvida um grande avanço tecnológico. Entretanto o estudo químico e farmacológico dos produtos naturais ainda continua sendo um grande desafio, particularmente na transformação das plantas medicinais em substâncias medicamentosas (MOELLERING, 2000). As descobertas já realizadas impulsionam as pesquisas e a procura pelo potencial fitoquímico ainda desconhecido. Essas novas descobertas incrementarão o mercado mundial de drogas de origem vegetal já estimado em US\$: 12,4 bilhões (SIMÕES et al., 2002a). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais. Dos fármacos aprovados no período de 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir destes (CALIXTO, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2007). No

Brasil, estima-se que 25% dos oito bilhões de faturamento da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados de plantas (SIMÕES et al., 2002b).

Diante da necessidade de se buscar mais informações sobre o potencial fitoquímico ainda desconhecido, observou-se a necessidade de investigar os constituintes químicos presentes na espécie *Zornia brasiliensis*, uma vez que a mesma pertence a um gênero pouco relatado e estudado até então na literatura, dirigindo o estudo para o isolamento e caracterização estrutural dos metabólitos secundários, bem como avaliação de atividades farmacológicas de substâncias isoladas.

Objetivos



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Contribuir para o estudo fitoquímico do gênero *Zornia*, através do isolamento e identificação de metabólitos secundários da espécie *Zornia brasiliensis* Vogel.

2.2. Objetivos específicos

- Extrair metabólitos secundários da espécie *Zornia brasiliensis*;
- Isolar constituintes químicos da espécie avaliada no presente trabalho;
- Identificar e/ou elucidar a estrutura de seus constituintes químicos;
- Contribuir com o conhecimento fitoquímico do gênero em estudo;
- Avaliar frações e/ou substâncias isoladas no ensaio de nocicepção;

Fundamentação Teórica

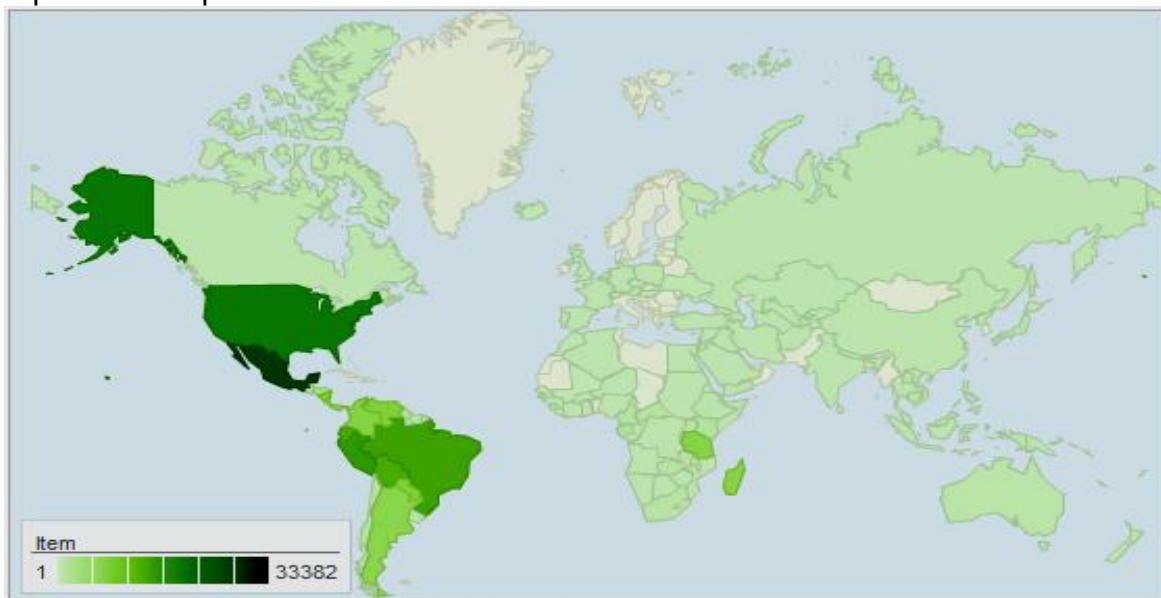


3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a família Leguminosae

A família Leguminosae está representada por cerca de 750 gêneros e 19500 espécies (LEWIS et al., 2005), distribuídas em florestas tropicais e desertos quentes (Figura 1) (DUTRA; MESSIAS; GARCIA, 2005). No Brasil sua ocorrência é muito significativa, estando presente na maioria das vegetações brasileiras (LIMA, 2000). Na lista de espécies da flora do Brasil a família está representada por 210 gêneros (15 endêmicos) e detém o maior número de espécies, 2697. Destas, 1897 são restritas ao território brasileiro (LIMA et al., 2010). Entre as angiospermas, a Leguminosae é família com maior número de espécies na flora brasileira (FORZZA et al., 2010).

Figura 1– Distribuição geográfica da família Leguminosae no mundo, representada pelas áreas em verde.



Fonte: tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=42000184&tab

De acordo com Lewis e colaboradores (2005) a família Leguminosae é dividida em três subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Faboideae). Em Papilionoideae estão incluídos cerca de dois terços de todos os gêneros e espécies da família (POLHILL, 1994), aproximadamente 478 gêneros e 13.800 espécies (LEWIS et al., 2005). Essa subfamília é

considerada o grupo mais evoluído das leguminosas, está distribuída através do mundo, em diferentes habitats, latitude e altitudes. Suas espécies são facilmente reconhecidas, em sua grande parte, pelas suas flores papilionáceas, além das folhas geralmente alternas e compostas, mas nunca bipinadas (PEREZ, 2009).

Em muitas publicações é ocasional a utilização do nome Fabaceae para designar a família, entretanto, Leguminosae é um nome alternativo e aceito pelo Código Internacional de Nomenclaturas Botânicas, pois o nome Fabaceae é ambíguo, sendo usado tanto para designar o nome da família compreendendo as três subfamílias, como somente para Papilionoideae (LEWIS & SCHIRE, 2003).

O potencial econômico da família é muito importante devido aos múltiplos usos, dentre os quais se destaca o uso na alimentação humana (DOYLE & LUCKOW, 2003; WOJCIECHOWSKI, 2003). Pertencem a esta família todos os nossos legumes, a maioria constituída por plantas cultivadas tais como *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Pisum sativum* L. (ervilha), *Lens culinaris* Medik. (lentilha), *Vicia faba* L. (fava), *Cicer arietinum* L. (grão-de-bico), *Glycine max* L. (soja) e *Arachis hypogaea* L. (amendoim). São fontes ricas de proteínas bem como de conteúdo mineral, sendo, portanto, de alto valor em áreas deficientes de tais constituintes.

Na indústria são muito utilizadas *Astragalus gummifer* (goma-arábica), *Indigofera anil* L. e *Indigofera hirsuta* L. (anil). Como madeiras importantes podem-se citar *Myroxylon balsamum* L. (cabriúva ou bálsamo), *Dalbergia brasiliensis* Vog. e *Dalbergia nigra* All. (caviúna), *Machaerium ocutifolium* Vog. e *Machaerium scleroxylon* Tul. (jacarandá), *Centrolobium microchaete* Mart., *Centrolobium robustum* Mart. e *Centrolobium tomentosum* Guill. (araribá), *Bowdichia nitida* Spruce., *Bowdichia virgilioides* H. B. K. e *Bowdichia martiusii* Benth. (sucupira), *Andira bahiensis* N. (angelim) e *Dipteryx odorata* Aubl. (cumarú da Amazônia). Como plantas forrageiras destacam-se *Melilotus alba* e *Medicago sativa* L. (alfafa) (JOLY, 2002; DA SILVA et al., 2004).

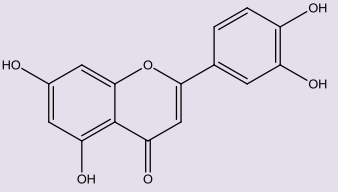
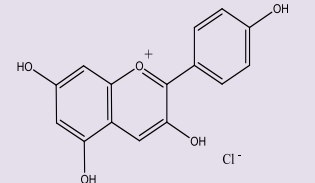
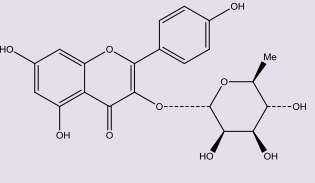
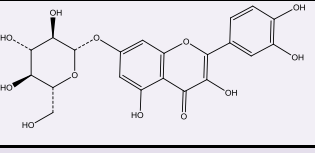
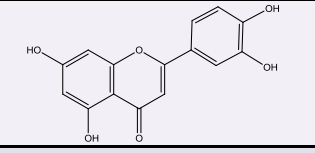
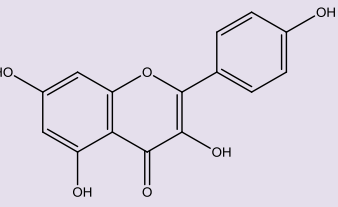
Algumas espécies são usadas como fertilizantes e aumentam largamente os níveis de nitrogênio do solo que são importantes por fornecer nutrição as plantas (HEYWOOD, 1996). Muitas espécies são também

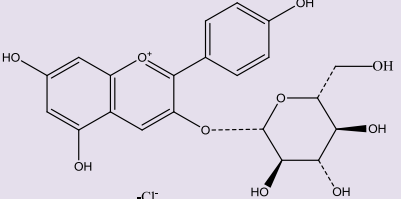
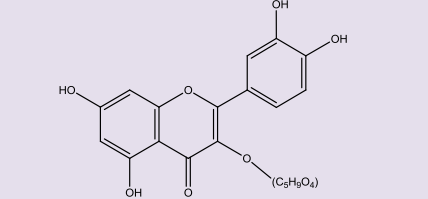
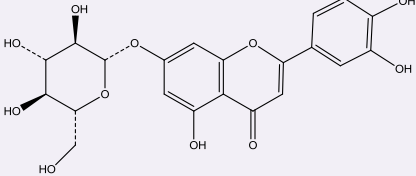
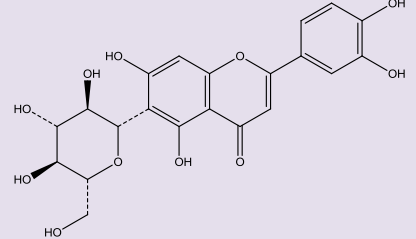
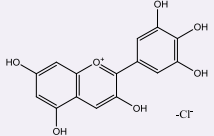
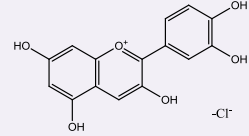
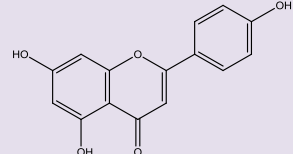
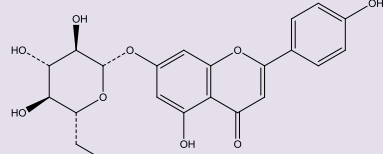
cultivadas apenas para uso ornamental, devido principalmente as suas belas flores como, por exemplo, *Lathyrus odoratus* L. (ervilha de cheiro), *Spartium junceum* L. (giesta), *Lupinus polyphyllus* Lindl. (lupino), certas espécies de *Phaeseolus*, *Erythrina crista-galli* L., *Erythrina falcata* Benth., *Erythrina glauca* Willd., *Erythrina mulungu* Mart., *Erythrina velutina* Willd e *Erythrina verna* Vell. (sanduba, maçaranduba, suína, corticeira-do-litoral e mulungu) e *Wisteria floribunda* D. C. e *Wisteria sinensis* Sweet. (glícia) que são trepadeiras de flores roxas (JOLY, 2002; DA SILVA et al., 2004). Boa parte destas plantas pertence, originariamente, à flora brasileira.

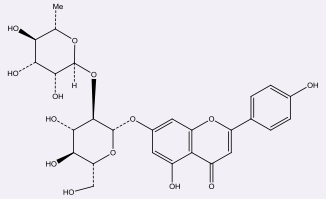
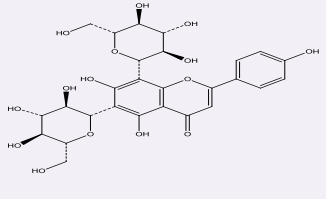
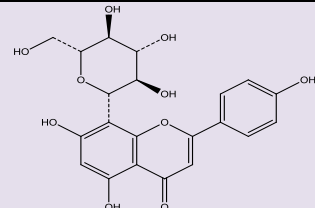
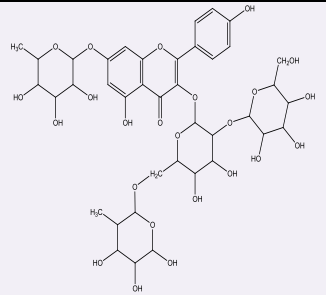
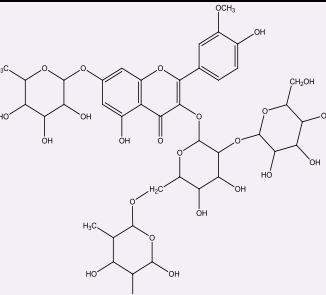
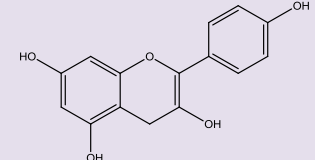
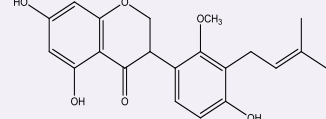
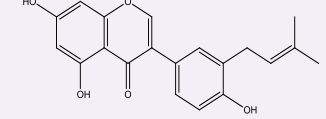
Dados químicos demonstram a presença de compostos que dão características à família como ácidos graxos com cadeias de 20, 22 ou 24 carbonos, nos óleos das sementes; classes de compostos que se distribuem homogeneamente pela família como saponinas triterpênicas, taninos, alcaloides quinozilidínicos; compostos com uma distribuição mais aleatória como antraquinonas e alcaloides pirrolizidínicos; e classe de distribuição mais homogênea como a dos flavonoides. A taxonomia das leguminosas tem evoluído principalmente devido ao estudo da classe dos flavonoides, visto a importância destes metabólitos secundários e de sua diversidade metabólica nessa família. Membros da família Leguminosae contém não apenas flavonas e flavonóis, que são flavonoides comumente encontrados em plantas de outras famílias, mas produzem especialmente, chalconas, 2,3-diidroflavonoides e flavanonas, além de flavonoides que são raros em qualquer planta do reino vegetal como isoflavonoides e rotenoides (HEGNAVEL & GRAYEBARKMEIJER, 1993).

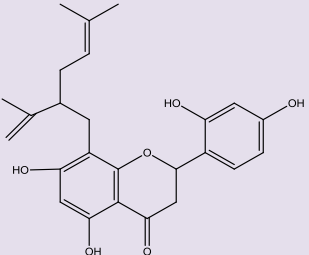
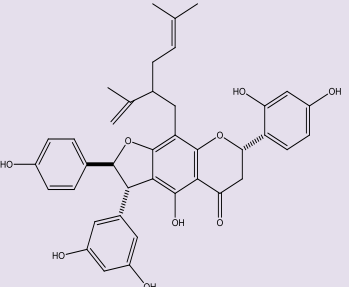
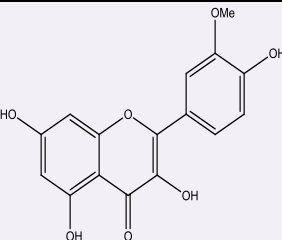
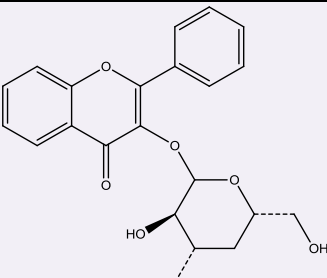
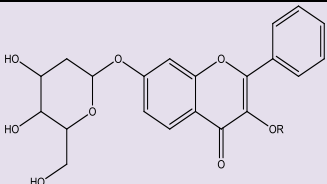
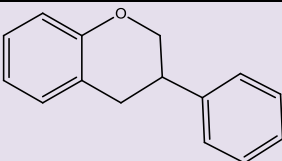
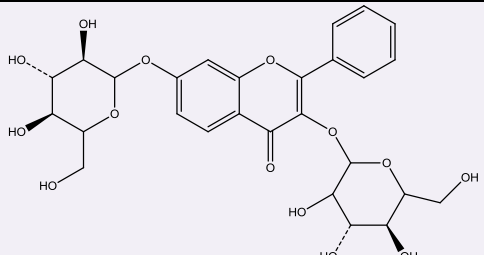
Dessa forma, levando-se em consideração que flavonoides de diversas subclasses como isoflavonoide, flavonas, flavanonas são reputados como constituintes químicos dessa família, realizou-se um levantamento dos flavonoides já relatados na subfamília Papilionoideae no site de busca Scifinder no período até novembro de 2012 (Quadro 1).

Quadro 1- Flavonoides isolados de espécies da subfamília Papilionoideae.

ESTRUTURA	PARTE ESTUDADA	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
	Flores	<i>Lonchocarpus cyanescens</i>	OGBEIDE & PARVEZ, 1991.
	—	<i>Eriosema montanum</i> <i>Eriosema psoraleoides</i> <i>Eriosema robustum</i>	BAUDET & TORCK, 1978.
	Flores	<i>Ononis natrix</i>	GHODIS, et al., 1970
	Sementes	<i>Carmichaelia sp.</i>	PURDIE, 1984.
	Flores	<i>Lonchocarpus cyanescens</i>	OGBEIDE & PARVEZ, 1991.
			
	Flores	<i>Lonchocarpus cyanescens</i>	OGBEIDE & PARVEZ, 1991.
	Flores	<i>Lonchocarpus cyanescens</i>	OGBEIDE & PARVEZ, 1991.
	Flores	<i>Lonchocarpus cyanescens</i>	OGBEIDE & PARVEZ, 1991.
	—	<i>Eriosema montanum</i> <i>Eriosema psoraleoides</i> <i>Eriosema robustum</i>	BAUDET & TORCK, 1978.
	Flores	<i>Ononis natrix</i>	GHODIS, et al., 1970
	Folhas	<i>Carmichaelia sp.</i>	PURDIE, 1984.

		Flores	<i>Lonchocarpus cyanescens</i>	OGBEIDE & PARVEZ, 1991.
		Flores	<i>Lonchocarpus cyanescens</i>	OGBEIDE & PARVEZ, 1991.
		—	<i>Eriosema montanum</i> <i>Eriosema psoraleoides</i> <i>Eriosema robustum</i>	BAUDET & TORCK, 1978.
		Flores	<i>Ononis rotundiflora</i>	GHODIS, et al., 1970.
		Folhas	<i>Cadia ellisiana</i>	PARIS; FAUGERAS; PELTIER, 1974.

		Folhas	<i>Cadia ellisiana</i>	PARIS; FAUGERAS; PELTIER, 1974.
		Folhas	<i>Cadia ellisiana</i>	PARIS; FAUGERAS; PELTIER, 1974.
		Sementes	<i>Ateleia chicoasensis</i>	VEITCH, et al., 2005.
		Sementes	<i>Ateleia chicoasensis</i>	VEITCH, et al., 2005.
		Raízes	<i>Sophora pachycarpa</i>	EMAMI, et al., 2007.

		Raízes	<i>Sophora pachycarpa</i>	EMAMI, et al., 2007.
		Folhas	<i>Carmichaelia sp.</i>	PURDIE, 1984.
		Folhas	<i>Carmichaelia sp.</i>	PURDIE, 1984.
		Folhas	<i>Carmichaelia sp.</i>	PURDIE, 1984.

Fonte: SILVA, 2013.

3.2 Considerações sobre o gênero *Zornia*

Zornia possui cerca de 75 espécies no mundo, com 41 representantes na América, 16 na África, 13 na Oceania e 7 na Ásia (MOHLENDROCK, 1961), é o segundo representante mais numeroso do clado Adesmia. No Brasil o gênero *Zornia* ocorre desde a região amazônica até os “pampas” no Rio Grande do Sul (SCIAMARELLI & TOZZI, 1996). Possui como característica diagnósticas basicamente as flores dispostas em inflorescência espiciforme com bractéolas peltadas, aos pares, protegendo cada flor (SCIAMARELLI, 1994), estipulas semelhantes às bractéolas, folhas 2 e 4-foliadas e hábito subarbustivo.

O Brasil é o principal centro de diversidade do gênero *Zornia* com 36 espécies, sendo 15 exclusivas. As duas espécies do gênero que apresentam flores solitárias, *Z. myriadena* e *Z. echinocarpa*, ocorrem no Brasil, além destas, no Brasil ocorrem 12 espécies que são tetrafoliadas e apresentam flores dispostas em inflorescência (10 destas são exclusivas) e 22 que são bifoliadas e também dispostas em inflorescência (PEREZ, 2009).

As espécies do gênero *Zornia* ocorrem em todas as regiões Nordeste (21 spp.), Sudeste (20 spp.) e Sul (14 spp.). Bahia e Minas Gerais são os estados que concentram o maior número de espécies (20 spp.), mas o primeiro Estado é o único que apresenta toda a diversidade do gênero, representado pelas espécies que apresentam as flores solitárias e pelas que apresentam as flores dispostas em inflorescência, tanto as tetrafoliadas quanto as bifoliadas. Outro Estado muito representativo é o Rio Grande do Sul (13 spp.), seguido de São Paulo (10 spp.) e Goiás (10 spp) (PEREZ, 2009).

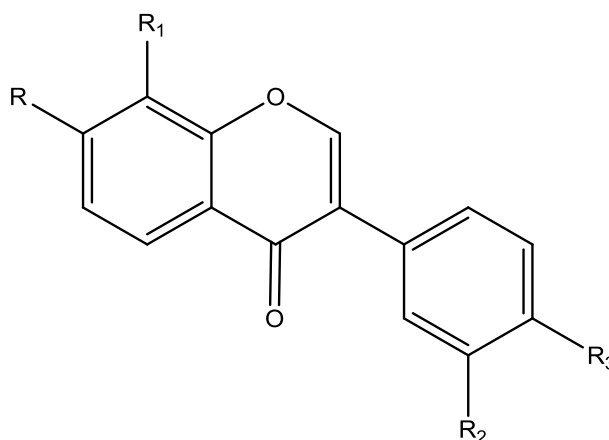
Em levantamentos realizado até o período de novembro de 2012 em banco de dados como NAPRALERT (NATURAL PRODUCTS ALERT) e em artigos indexados utilizando SciFinder foram observados que algumas espécies de *Zornia* já foram estudadas quanto à sua atividade farmacológica e apresentaram atividade nos estudos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1- Atividades farmacológicas de espécies de *Zornia*.

Espécie	Atividade avaliada	Referência
<i>Zornia brasiliensis</i> Vogel	Moluscicida	DAVID, et al., 2007
<i>Zornia diphylla</i> (L) Perls.	Relaxante sobre musculo liso	ROJAS, et al., 1999
	Atividade citotóxica	BELCAVELLO, et al., 2012
	Atividade anticonvulsinante Potencial antioxidante	GREETHA; SHILPA; MURUGAN, 2012 BRAHMACHARI, et al., 2009
<i>Zornia elegans</i> (L) Perls.	Antibacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus faecium</i>) Antimicobacteriana	CHIAPPETA & DE MELLO, 1984
<i>Zornia setosa</i> Baker	Moluscicida	KLOOS, et al., 1987
<i>Zornia tenuifolia</i> Moric.	Antibacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>) Citotóxica	DO NASCIMENTO; DE MELLO; CHIAPPETA, 1985
<i>Zornia milneana</i> Mohlenbr.	Antibacteriana (<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> e <i>A. caviae</i>)	OBI, et al., 2007

Fonte: SILVA, 2013.

Apenas no ano de 2012 é que começaram a surgir publicações contendo algum estudo fitoquímico com espécies deste gênero, em particular com a espécie *Zornia diphylla*. Leuner, et al., 2012 relataram a presença dos constituintes 7,4'-diidroxiiisoflavona, 5,7,3'-triidroxiiisoflavona, 7-hidroxi-4'-metoxiiisoflavona e 7-b-D-Glucosyl-5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavona, nas partes aéreas desta espécie. Além deste estudo um artigo publicado por Ren e colaboradores na revista Chinese Pharmaceutical Journal em 2012 relatou a ocorrência dos constituintes 7,4'-dimetoxi-isoflavona, 7-hidroxi-4'-metoxiflavona, 7-3'-diidroxii-4'-metoxiiisoflavona, 7,8-dihidroxi-4'-metoxiiisoflavona e 7,4'-diidroxiiisoflavona como constituintes da espécie *Zornia diphylla* (Quadro 2).

Quadro 2- Flavonoides isolados da espécie *Zornia diphylla* (REN, et al., 2012).

ISOFLAVONAS	R	R ₁	R ₂	R ₃
7-4' Dimetoxiisoflavona	CH ₃ OH-	H	H	CH ₃ OH-
7-Hidroxi-4'-metoxiisoflvona	OH-	H	H	CH ₃ OH-
7-3'-diidroxi-4'metoxiisoflavona	OH-	H	OH-	CH ₃ OH-
7,8-diidroxi-4'metoxiisoflavona	OH-	OH-	H	CH ₃ OH-
7,4'dihidroxiisoflavona	OH-	H	H	OH-

Fonte: Silva, 2013.

3.3 Considerações sobre a espécie *Zornia brasiliensis*

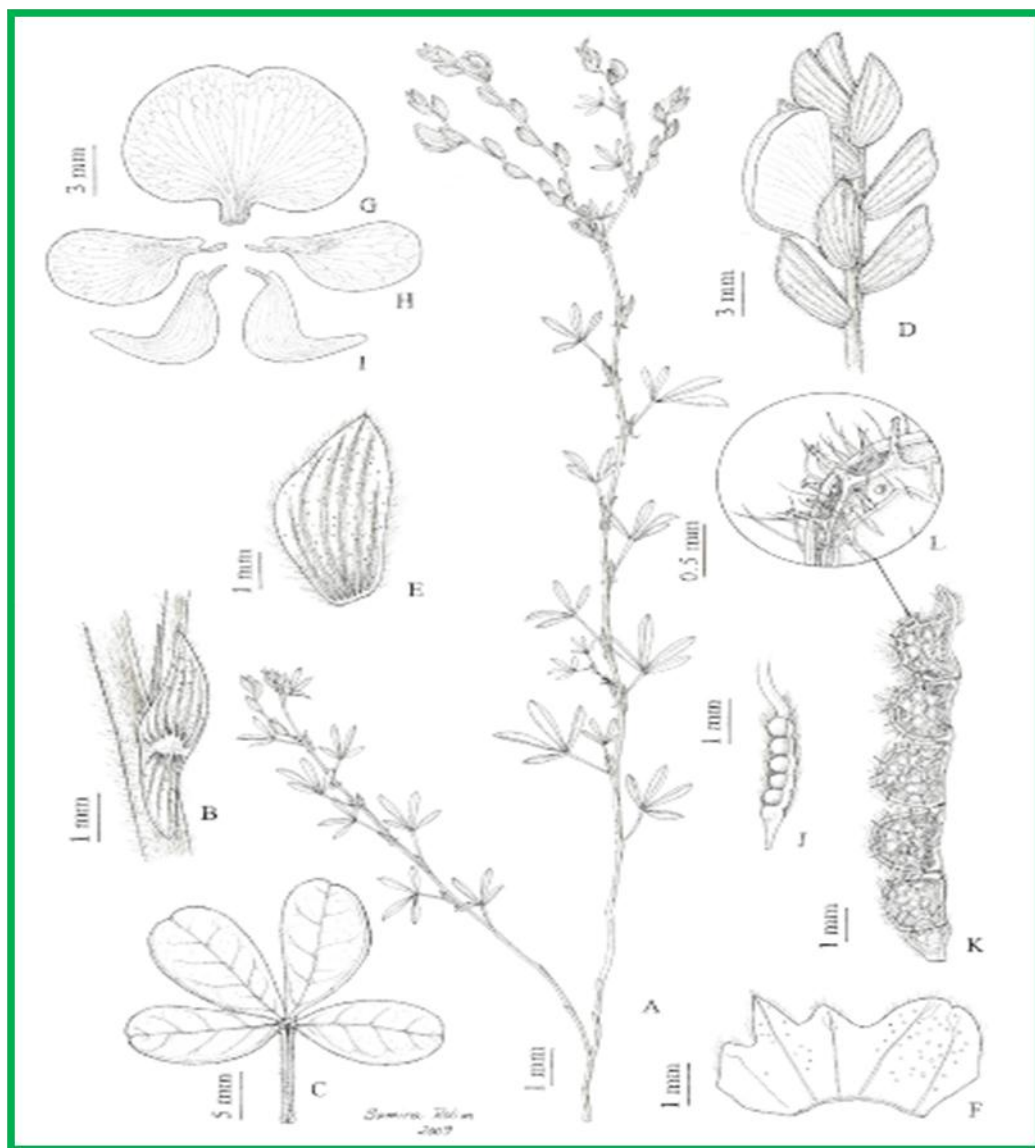
A espécie *Zornia brasiliensis* (Figura 2) é conhecida popularmente como “urinária”, “urinana” e “carrapicho” é relatada por sua utilização na medicina popular como diurética (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Ocorre em vários estados do Brasil, sendo abundante no Nordeste do Brasil ocorrendo nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba (AYMARD, 1999; MOHLENBROCK, 1961).

Figura 2- *Zornia brasiliensis* Vogel.

Foto: Tavares, 2009 (Serra Branca-PB).

Nesta espécie, que se apresenta como um subarbusto de 60 cm, o florescimento e frutificação ocorrem nos meses de dezembro e fevereiro (QUEIROZ, 1997). Mohlenbrock (1961) ao revisar o gênero *Zornia* considerou *Zornia brasiliensis* distinta das demais espécies tetrafoliadas especialmente pelos artículos do lomento dorsalmente côncavos e desprovidos de glândulas o que tende a tornar ainda mais complexa a taxonomia deste grupo (Figura 3). No entanto a forma dos artículos revela-se um bom caráter diagnóstico já que essa espécie é a única a apresentá-lo, sendo esse critério, mais do que a presença/ausência de glândulas o utilizado para caracterização e identificação da espécie (QUEIROZ, 1997).

Figura 3- Desenho ilustrativo mostrando *Zornia brasiliensis* e seus detalhes anatômicos.



A) Detalhe do ramo. B) Detalhe da estípula. C) Folha. D) Detalhe da inflorescência. E) Bractéola. F) Cálice. G) Estande. H) Alas. I) Pétalas da quilha. J) Ovário. K) Lomento. L) Detalhe do artículo do lomento. Fonte: PEREZ, 2007.

Esses aspectos para identificação devem ser atentados uma vez que *Zornia brasiliensis* é uma espécie muito confundida com *Z. myriadena* por ambas compartilharem do mesmo aspecto vegetativo, forma de folíolos, coloração dos ramos e por muitas vezes ocorrerem simpatricamente, porém *Z. brasiliensis* apresenta flores em inflorescência e *Z. myriadena* flores solitárias (PEREZ, 2009).

Nenhum estudo químico foi realizado até o momento com esta espécie, o que justificou a realização deste trabalho. Quanto às avaliações farmacológicas já realizadas, foram avaliados a atividade moluscicida do óleo essencial das partes aéreas frente à *Biomphalaria glabrata* (DAVID, et al., 2007) e a atividade do extrato metanólico das partes aéreas frente à *Artemia salina* (ROUQUAYROL, et al., 1980), sendo observado atividade farmacológica apenas do extrato metanólico.

3.4 considerações sobre flavonoides

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Estes compostos foram descobertos pelo Nobel Szent-György, que em 1930 isolou uma substância da casca do limão, que regulava a permeabilidade dos vasos capilares. Inicialmente Szent-György acreditou se tratar de um novo membro da família das vitaminas designando-a de vitamina P devido à regulação da permeabilidade e também de vitamina C2, porque se comprovou algumas atividades semelhantes à da vitamina C. No entanto, a suposição destas substâncias serem vitaminas não pôde ser comprovada, e ambos os nomes foram retirados por volta de 1950 (MARTINEZ-FLÓREZ, et al., 2002).

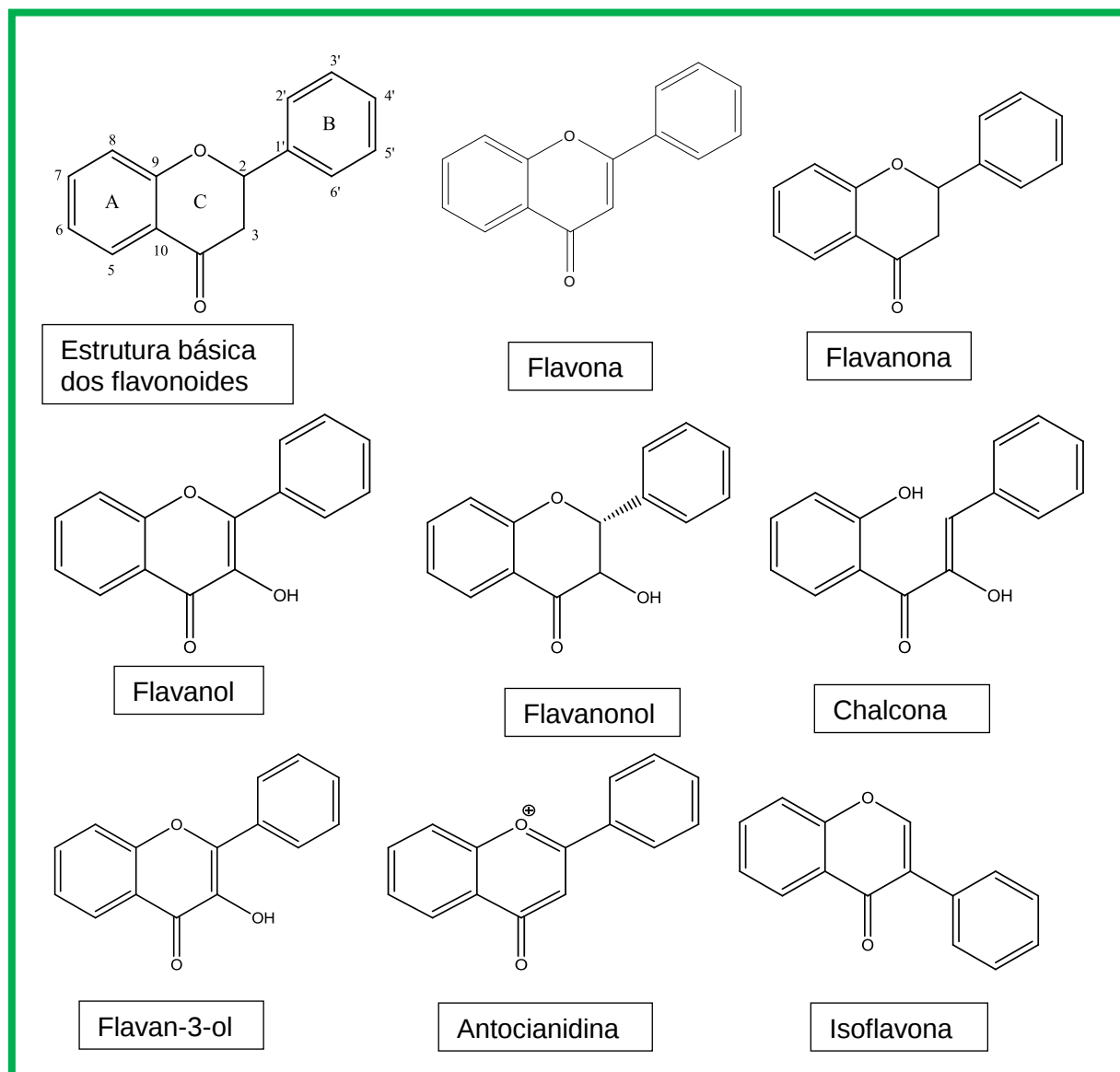
Os flavonoides são pigmentos naturais de plantas encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (TAHARA, 2007). Não são produzidos por organismos humanos que os obtém através da alimentação. Com poucos relatos em algas, alguns representantes foram identificados em briófitas, existindo apenas um relato de ocorrência em fungos. Em pteridófitas também foram encontrados, mas sua variedade estrutural é pequena. Todavia

estão presentes em abundância nas angiospermas, apresentando nesse grupo enorme diversidade estrutural (SIMÕES, et al., 2004).

A estrutura química dos flavonoides está baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas e das antocianidinas, denominado de núcleo flavana. Devido ao fato do terceiro anel apresentar-se como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonoide (AHERNE, O'BRIEN, 2002).

A diversidade estrutural dos flavonoides pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização (TAHARA, 2007). Os flavonoides podem ser encontrados como agliconas ou sob a forma de glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados (SIMÕES, et al., 2004; HAVSTEEN, 2002; VEITCH, GRAYER, 2008). As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses distintas, tais como: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-óis e antocianidinas (VEITCH, GRAYER, 2008; BOOTS, HAENEN, BAST, 2008).

A estrutura básica do flavonoide é o núcleo flavilium, que consiste de 15 átomos de carbono dispostos em três anéis (C6-C3-C6), os quais são rotulados A, B, e C e os carbonos recebem numeração com números ordinários para os núcleos A e C, e os mesmos números, seguidos de uma linha (') para o núcleo B. As várias classes de flavonoides diferem no nível de oxidação e padrão de substituição do anel C, enquanto que os compostos individuais dentro de uma classe diferem no padrão de substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000). As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses distintas, tais como: flavona, flavanona, flavonol, flavanonol, chalcona, flavan-3-ol, antocianidinas e isoflavona. (VEITCH; GRAYER, 2008; BOOTS et al., 2008), as quais estão elencadas abaixo (Figura 4).

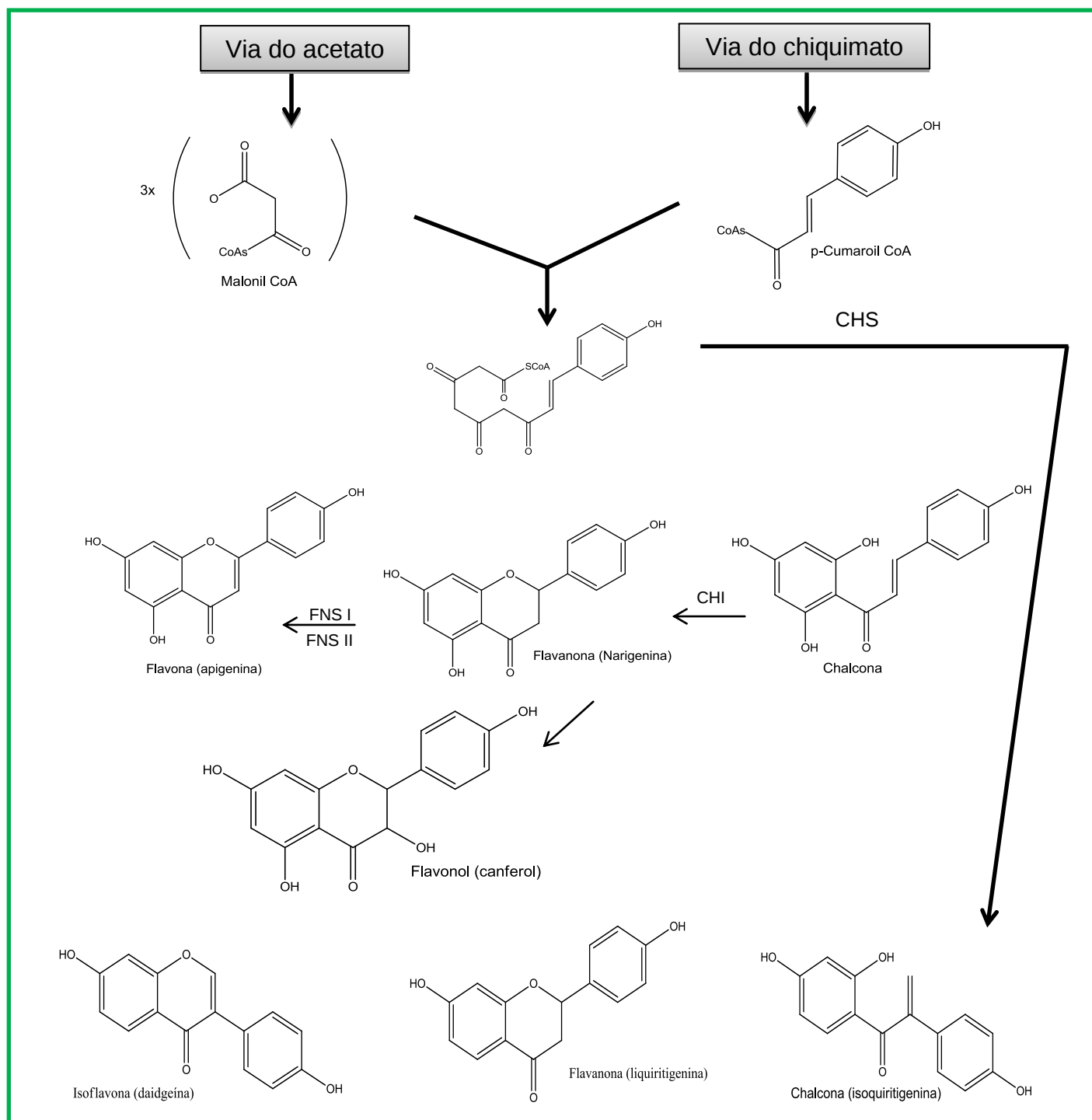
Figura 4 – Esqueletos básicos do flavonoide e das subclasses.

Fonte: Silva, 2013

A principal enzima envolvida na formação do esqueleto flavônico é a chalcona sintase (CHS), esse catalisa a condensação gradual de três unidades de acetato malonil-CoA com *p*-cumaroil-CoA originando a chalcona (Esquema 1). O composto 6'-deoxichalcona, isoliquiritigenina, é um similar sintetizado a partir do malonil-CoA e do *p*-cumaroil-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 flavonoides e isoflavonoides. A ligação estereoespecífica da chalcona,

catalisada pela enzima chalcona isomerase (CHI), origina a flavanona com o esqueleto flavonoide típico (HELLER; FORKMANN, 1994).

Esquema 1 – Representação da biossíntese dos flavonoides.



Fonte: DEWICK, 1997.

Diversos ensaios “in vivo” e “in vitro” vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavonoídicos. Segundo Ratty & Das (1998), algumas dessas propriedades farmacológicas já foram observadas por Szent-Gyorgi em 1936. Destacam-se, dentre outros, os seguintes efeitos dos flavonoides sobre os sistemas biológicos: capacidade antioxidativa (esta constitui a atividade mais elucidada pelos estudos até agora desenvolvidos); efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade antitumoral, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica; atuação antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais. Pesquisas recentes demonstraram que alguns flavonóides atuam na inibição da replicação viral do agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Humana HIV (Lin et al., 1997). Estes efeitos podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonoides desempenham nos vários sistemas enzimáticos incluindo hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidorreduções, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinas e aminoácido oxidase (FERGUSON, 2001).

Dentre as atividades relacionadas aos flavonoides pode-se citar ainda a participação no bloqueio dos processos biossintéticos dos eicosanoides. Eles também são responsáveis pela inibição de processos mitogênicos, interações célula-célula, incluindo possíveis efeitos na adesão molecular. O mecanismo de inibição exercido pelos flavonoides sobre as enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase está sendo extensivamente pesquisado (NIJVELTD et al., 2001). Flavonoides como a quercetina e a epigenina têm demonstrado possuir ação antiinflamatória por causa da inibição de COX-2 e de óxido nítrico sintase (MUTOH et al., 2000; RASO et al., 2001).

Segundo Friesenecker, Tsai, Intagliatta, (1995), flavonoides, como a quercetina e a luteolina, podem reduzir a ativação do sistema complemento, diminuindo a adesão de células inflamatórias ao endotélio, resultando em uma redução da resposta inflamatória. Essa capacidade dos flavonoides de agir sobre a inflamação e sobre o sistema imunológico ocorre graças à capacidade desses compostos fenólicos de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes (BRODY, 1994) conferindo a esta classe química uma alternativa promissora frente aos processos inflamatórios. Dentre os 40 fármacos anti-

inflamatórios aprovados entre 1983 e 1994, 12 foram derivados ou baseados em polifenóis de origem natural (YOON; BAEK; YONSEI, 2005).

No leste da Europa, durante séculos os flavonoides vêm sendo indicados na clínica por cirurgiões dentistas para o tratamento da dor e regeneração tecidual (RONZÉRE et al., 1981; SAKAGAMI, et al., 1999). Contudo, os mecanismos pelos quais estes compostos regeneram o tecido não são completamente entendidos (RONZÉRE et al., 1981). Flavonoides aliviam a dor em ferimentos causados por picadas de insetos, cobras, queimaduras ou cortes. Este efeito é atribuído, pelo menos em parte à inibição de fosfolipases e ciclooxigenases (LANG, 1999; HAVSTEEN, 2002).

Além de seus efeitos periféricos, flavonoides possuem efeito sobre o SNC, uma vez que, podem atuar como agonistas dos receptores adenosinérgicos e de receptores GABA_A sensíveis aos benzodiazepínicos (MEDINA et al., 1997; PALADINI et al., 1999; BLARDIR et al., 1999).

Diante destas premissas o isolamento de uma flavona na espécie *Zornia brasiliensis* no presente trabalho motivou a investigação da atividade antinociceptiva em camundongos.

3.5 considerações sobre dor

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, International Association for the Study of Pain), conceitua dor como sendo “uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual atual, potencial, ou descrita em termos de tal lesão”. A dor fisiológica é um reflexo protetor do organismo, para evitar uma injúria ou dano tecidual. A experiência dolorosa é, portanto, resultado da interrelação entre a interpretação das qualidades sensoriais com os componentes afetivos, cognitivos, comportamentais com as reações fisiológicas que se expressam frente à estimulação ou disfunção do sistema nociceptivo. A interpretação do fenômeno é individual. O indivíduo atribui significados idiossincrásicos ao fenômeno sensorial de acordo com o estado mental e o valor simbólico imaginário que representa. Os comportamentos são determinados pelo significado e não pela natureza ou intensidade do estímulo original (TEXEIRA, 2001).

O termo nocicepção está relacionado com o reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, que formulam informações relacionadas à lesão. Baseado nestes conceitos, o termo dor seria melhor aplicado a seres humanos do que aos animais, pelo fato deste termo envolver um componente emocional. Mesmo assim tornou-se uma convenção o uso do termo “dor” para pacientes humanos e animais (HELLEBREKERS, 2002). LUNA (2006) considera a dor como sendo o quinto sinal vital, juntamente com a função cardiorespiratória e a térmica.

O componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, que consiste dos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. De forma simplificada, pode ser considerado como uma cadeia de três-neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem ascende pela medula espinhal e o neurônio de terceira ordem projeta-se para o córtex cerebral (MESSLINGER, 1997; TRANQUILLI, 2004).

A dor pode ser classificada em aguda e crônica, como se segue:

Dor aguda: está relacionada a afecções traumáticas, infecciosas ou inflamatórias; há expectativa de desaparecimento após a cura da lesão; a delimitação têmporo-espacial é precisa; há respostas neurovegetativas associadas (elevação da pressão arterial, taquicardia, taquipnéia, entre outras); ansiedade e agitação psicomotora são respostas frequentes e têm a função biológica de alertar o organismo sobre a agressão.

Dor crônica: é aquela que persiste após o tempo razoável para a cura de uma lesão ou que está associada a processos patológicos crônicos, que causam dor contínua ou recorrente. Não tem mais a função biológica de alerta, geralmente não há respostas neurovegetativas associadas ao sintoma, é mal delimitada no tempo e no espaço e ansiedade e depressão são respostas freqüentemente associadas ao quadro clínico (FERNANDES et al., 1981).

Segundo PISERA (2005) o primeiro processo da nocicepção é a decodificação de sensações mecânica, térmica e química em impulsos elétricos por terminais nervosos especializados denominados nociceptores. Os nociceptores são terminações nervosas livres dos neurônios de primeira

ordem, cuja função é preservar a homeostasia tecidual, assinalando uma injúria potencial ou real. Os neurônios de primeira ordem são classificados em três grandes grupos, segundo seu diâmetro, seu grau de mielinização e sua velocidade de condução:

1. Fibras A β : são fibras de diâmetro grande (maior que 10 μ m), mielinizadas e de condução rápida, responsáveis por sensações inócuas.

2. Fibras A δ : são de diâmetro intermediário (2 a 6 μ m), mielinizadas. Sua velocidade de condução é intermediária, modulando a primeira fase da dor: mais aguda ou semelhante à pontada.

3. Fibras C: são fibras de diâmetro pequeno (0,4 a 1,2 μ m), não mielinizadas e de velocidade de condução lenta, responsáveis pela segunda dor ou dor difusa, queimação persistente.

4. Na ausência de dano tecidual ou nervoso as fibras A β somente transmitem informação referente a estímulos inócuos, como tato, vibração e pressão. Normalmente, a informação nociceptiva é transmitida por fibras do tipo C e A δ localizadas na pele, vísceras, vasos sanguíneos, peritônio, pleura, periósteo, tendão, fáscia, cápsula articular e fibras do músculo esquelético; sua distribuição dependendo da espécie e localização anatômica, podendo aparecer a cada 2 a 10 mm (MESSLINGER, 1997; LAMONT e TRANQUILLI, 2000; MUIR III et al., 2001). As fibras A δ são responsáveis pela primeira fase da dor, rápida e forte, do tipo picada ou ferroadada e são sensíveis a estímulos mecânicos intensos (mecanorreceptores de alto limiar). As fibras C produzem uma segunda fase de dor mais difusa e persistente e formam, na periferia, receptores de alto limiar para estímulos térmicos e/ou mecânicos. Existem também fibras do tipo C polimodais que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Os campos receptivos destes neurônios oscilam entre 2 e 10 mm (BESSON, 1997; TRANQUILLI, 2004; PISERA, 2005).

Diversos são os mediadores inflamatórios que, quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, ativam as fibras nervosas tipos A δ e C, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006). Dentre os mediadores inflamatórios (também denominados algogênicos) incluídos neste grupo estão a acetilcolina (ACh), bradicinina (BK), histamina, serotonina,

leucotrieno (LT), fator de ativação plaquetário (PAF), íons potássio, prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TX), interleucinas (ILs), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento nervoso (NGF) e mais recentemente as serinas proteases (VERGNOLLE, 2008).

Esses neurotransmissores ativam neurônios de segunda ordem e o sinal nociceptivo ascende para regiões do sistema límbico principalmente para o tálamo, especialmente pelo trato espinotalâmico. No tálamo ocorre a somatização do estímulo nocivo onde existe o componente emocional que discrimina a dor. O tálamo e o córtex são regiões finais da projeção das vias de nocicepção. O tálamo informa que existe sensação nociceptiva, e o córtex discrimina o tipo de sensação nociceptiva (ROY et al., 2009). Em resposta a estimulação nociceptiva ascendente, ocorre ativação de algumas vias descendentes de controle da nocicepção, culminando na liberação de noradrenalina, serotonina e encefalinas na região do corno dorsal medular, modulando assim o sinal nociceptivo (BASBAUM et al., 2009).

Experimental



4 EXPERIMENTAL

4.1 Material Botânico

O material botânico utilizado de *Zornia brasiliensis* (partes aéreas) foi coletado no município de Serra Branca-PB em setembro de 2009, pela Professora Doutora Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde (PgPNSB/CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da UFPB sob o código AGRA-6833.

4.2 Obtenção do extrato etanólico bruto

As partes aéreas de *Zornia brasiliensis* foram secas em estufa com ar circulante à temperatura de 45°C durante 72 horas. Após a secagem, o material foi pulverizado em moinho mecânico obtendo-se o pó. Em seguida, o pó foi submetido a uma maceração exaustiva com etanol (EtOH) 95% por 72 horas, em macerador de aço inoxidável, sendo esse processo repetido por quatro vezes, obtendo-se a solução extrativa. A solução extrativa foi concentrada sob pressão reduzida, em evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C para eliminação do solvente obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 2, pág. 54).

4.3 Cromatografia do EEB de *Zornia brasiliensis*

Uma alíquota do extrato etanólico bruto (100,0g) foi submetido a uma Cromatografia líquida à vácuo (CLV) com 300 g de sílica desativada com solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. As frações resultantes desse processo foram concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se 0,73 g da fase hexânica; 20,0 g da fase diclorometano; 15,97g da fase acetato; 5,96 g da fase acetato-metanol 10% (AcOEt-MeOH10%); e 59,81

g da fase acetato-metanol 50% (AcOEt-MeOH 50%) como ilustrado no Esquema 2 (pág. 54).

4.4 Métodos Cromatográficos

Os métodos cromatográficos utilizados para o isolamento dos constituintes químicos foram Cromatografia em Coluna (CC), utilizando como fase estacionária sílica gel ART 7734 da MERCK de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm e 0,04-0,063 mm. O comprimento e as dimensões das colunas de vidro variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada.

O monitoramento das frações obtidas das Colunas foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA). Para isso, foram utilizadas placas de vidro (10,0 x 20,0 cm e 20,0 x 20,0 cm) preparadas com uma suspensão de sílica gel PF254 (ART 7749 da MERCK) em água destilada (1:2 m/v) distribuída sobre a placa de vidro com ajuda de um espalhador mecânico tipo *quick fit*.

Como fases móveis foram utilizados solventes orgânicos (Hexano, Acetato de etila e Metanol) para eluição de placas e colunas puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade. Os solventes utilizados apresentavam um alto grau de pureza (P.A.) ou eram comerciais destilados na Central de Destilação do PgPNSB/CCS, localizada no Centro de Biotecnologia.

As visualizações das substâncias aplicadas às placas analíticas foram feitas através da exposição das mesmas à lâmpada de irradiação ultravioleta, aparelho BOITTON (modelo BOIT-LUB01) e pela impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo.

4.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE

Para análise por CLAE foi utilizado equipamento SHIMADZU Modelo Série 10A vp, com módulos Detector: SPD-M10A vp com duas bombas LC-6AD e injetor Rheodyne com interface (Comunicação) SCL-10A vp. As colunas utilizadas foram: C18 (150 mm X 4,6 mm e 5 µm de tamanho de partícula) e C18 (250 mm X 10 mm e 5 µm de tamanho de partícula) ShimPack–Shimadzu,

com fluxo de 1 mL/min ou 4 mL/min, ambos a temperatura de 40°C, respectivamente.

4.5 Métodos Espectroscópicos

4.5.1 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

As análises de infravermelho foram obtidas na região (4000 a 400 cm^{-1}) utilizando aparelho de BOMEM FT-IR (modelo MB 100) do Centro de Ciências da Saúde da UFPB, utilizando-se de 1 a 3 mg de amostra em pastilhas de brometo de potássio (KBr), com frequência medida em cm^{-1} .

4.5.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas em espectrômetro SYSTEM operando em 500 MHz ou 200 MHz (RMN ^1H) e 125 ou 50 MHz (RMN ^{13}C) do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. Os solventes utilizados para dissolução das amostras foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e acetona deuterada (CD_3COCD_3), cujos picos característicos em RMN de hidrogênio e carbono 13 serviram como padrão interno durante a obtenção dos espectros. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades dos deslocamentos químicos de RMN de hidrogênio foram indicadas segundo as convenções: *s* (singleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (tripleto), *m* (multiplete).

Os espectros de RMN de ^{13}C obtidos pela técnica APT tiveram como conversão adotada: sinais de carbono não hydrogenados (C) e metilênicos (CH_2) acima da linha da base e sinais de carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3) abaixo da linha da base.

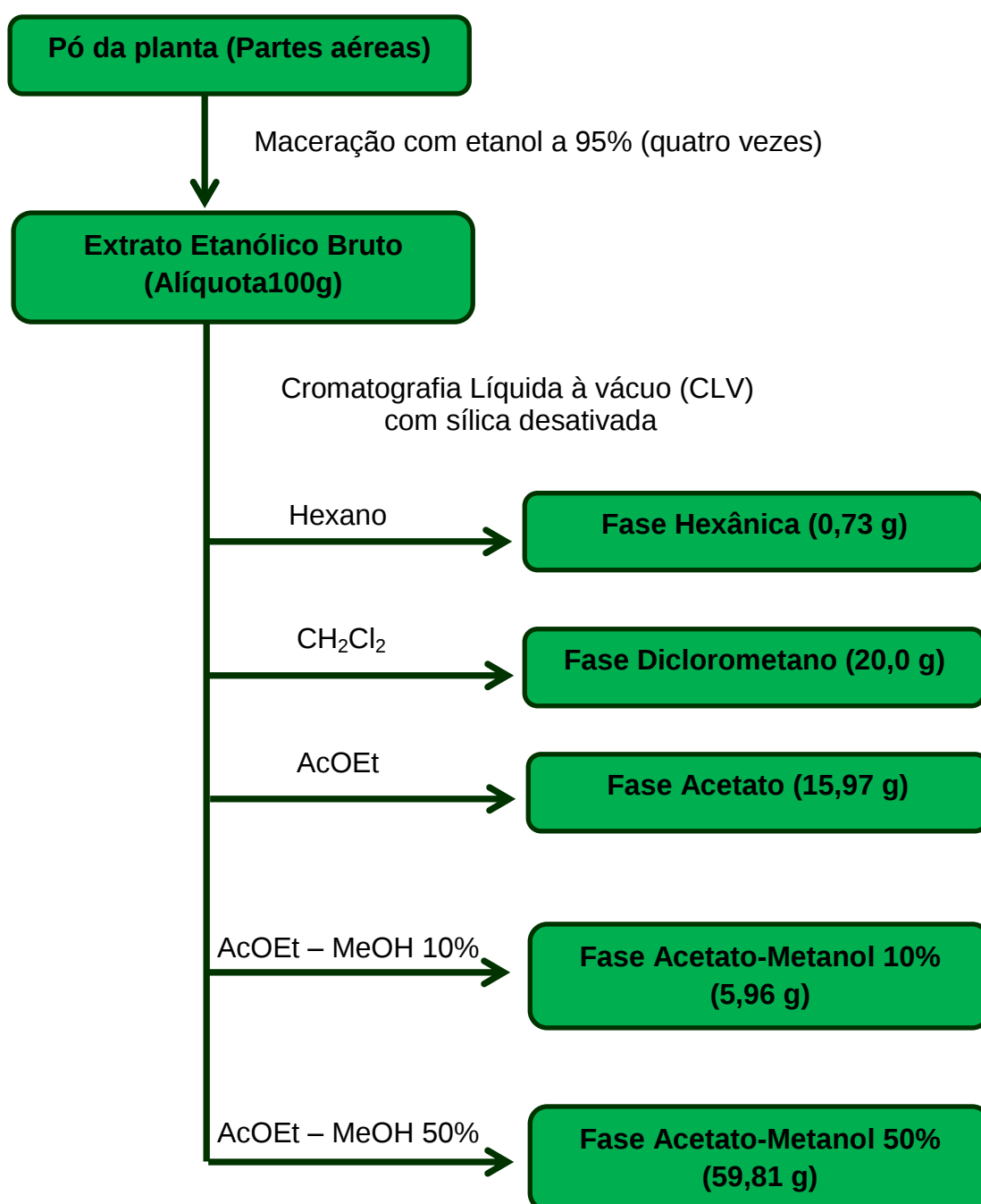
4.5.3. Espectrometria de Massas (EM)

Para obtenção dos espectros de massas das substâncias foram utilizados espectrômetro de massa de baixa resolução da marca Bruker, modelo Ion Trap-Amazonx, respectivamente, pela técnica de Ionização por Eletrospray, modo positivo (ESI+) ou negativo (ESI-), localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. As amostras foram diluídas em uma solução de água:acetonitrila.

4.6. Ponto de fusão

O ponto de fusão das substâncias foi determinado utilizando aparelho digital para ponto de fusão, modelo MQAPF-302 da microquímica, com bloco de platina em microscópio óptico tipo “kopfler”, marca REICHERT, modelo R3279, com variação de temperatura na faixa de 25-350°C.

Esquema 2- Obtenção e cromatografia do extrato etanólico bruto de *Zornia brasiliensis*



4.7 Isolamento e purificação dos componentes químicos

4.7.1 Processamento cromatográfico da fase diclorometano

A fase diclorometano (10,0g) do extrato etanólico bruto de *Zornia brasiliensis* foi submetido à CC utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes hexano (Hex), acetato de etila (Acoet) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Desta coluna (Coluna 1) foram coletadas 203 frações de 250 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo, analisadas por CCDA e quando semelhantes, reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos, o que resultou em 80 grupos (Quadro 3, pág. 56).

A fração 17 apresentou um precipitado e um sobrenadante esverdeado que foi separado por recristalização com solvente de baixa polaridade (Hexano). As frações foram separadas e identificadas com 17-S o qual representou o sobrenadante e 17-P que representou o precipitado na cor amarelada. O precipitado obtido foi analisado por CCDA e mostrou-se como uma única mancha quando expostas a irradiação ultravioleta e quando reveladas com vapores de iodo, sendo então codificada como **Zb-3** (14,0 mg).

As frações 36 até 41 apresentaram um precipitado na cor esverdeada que foram analisadas por CCDA e apresentaram-se como manchas únicas quando expostas a irradiação ultravioleta. As manchas apresentaram o mesmo fator de retenção o que as levou a serem reunidas em uma única fração (Fr 36-41) que foi codificada como **Zb-1** (987,0 mg).

As frações 106 e 107 apresentaram precipitados brancos que foram analisadas por CCDA e quando expostas a irradiação ultravioleta apresentaram-se como manchas únicas. A análise dos fatores de retenção mostrou valores semelhantes nas duas frações analisadas o que as levou a serem reunidas (Fr 106-107) e codificadas como **Zb-2** (18,0 mg).

Quadro 3- Processamento cromatográfico da fase diclorometano do EEB de *Zornia brasiliensis* – Coluna 1.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
Hex:AcOEt (95:5)	1-9	1-3; 4-5; 6-7; 8; 9
Hex:AcOEt (90:10)	10-20	10-12; 13; 14-15; 16; 17-S 17-P ; 18; 19-20
Hex:AcOEt (85:15)	21-25	21; 22-24; 25
Hex:AcOEt (80:20)	26-29	-
Hex:AcOEt (75:25)	30-36	30; 31; 32; 33; 34; 35; 36-41 42-48; 49-51; 52
Hex:AcOEt (70:30)	37-52	
Hex:AcOEt (65:35)	53-64	53-61; 62; 63; 64
Hex:AcOEt (60:40)	65-80	-
Hex:AcOEt (55:45)	81-88	81; 82-88
Hex:AcOEt (50:50)	89-101	88-93; 94-100; 101
Hex:AcOEt (45:55)	102-116	102-105; 106-107 ; 108; 109-116
Hex:AcOEt (40:60)	117-125	118; 119-125
Hex:AcOEt (35:65)	126-136	126-136
Hex:AcOEt (30:70)	137-144	137-138; 139-144
Hex:AcOEt (20:80)	145-154	145-147; 148-154
Hex:AcOEt (10:90)	155-165	155-158; 159-165
AcOEt	166-173	166-167; 168-173
AcOEt:MeOH (95:5)	174-180	174; 175; 176; 177-180
AcOEt:MeOH (90:10)	181-189	181-187; 188-189
AcOEt:MeOH (85:15)	190-193	190-193
AcOEt:MeOH (80:20)	194-199	194; 195-198; 199
AcOEt:MeOH (70:30)	200-203	200-203

4.7.2 Processamento cromatográfico da fase acetato de etila

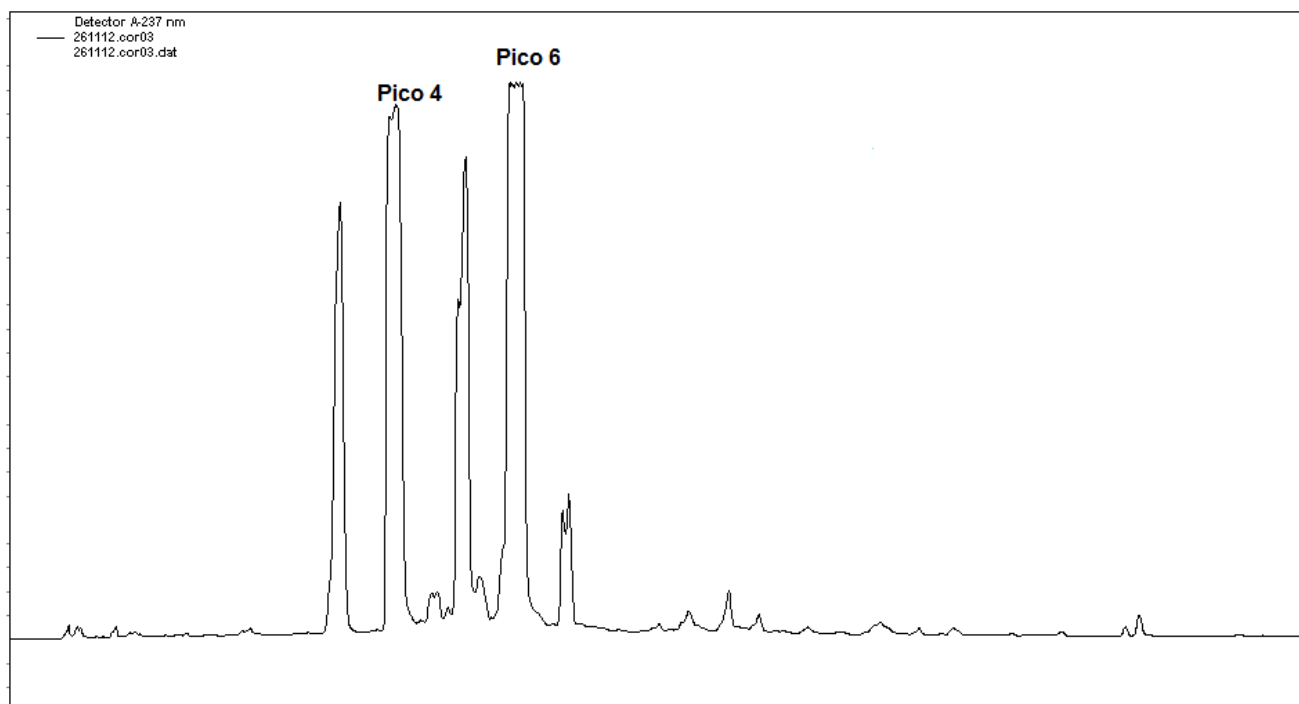
A fase acetato de etila (10,0g) do extrato etanólico bruto de *Zornia brasiliensis* foi submetido à CC utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes hexano (Hex), acetato de etila (Acoet) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Desta coluna (Coluna 2) foram coletadas 260 frações de 250 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo, analisadas por CCDA e quando semelhantes, reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos, o que resultou em 117 grupos (Quadro 4, pág. 59).

A fração 25-29 foi recromatografada utilizando as mesmas condições citadas anteriormente descritas para a coluna 2, fornecendo 59 subfrações de 50 mL cada (coluna 2.1). Após análise em CCDA, as subfrações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos em 14 grupos (Quadro 5, pág. 60) e a fração 11-16 foi aplicada em uma placa preparativa e eluída em sistema Hexano-Acetato 20% durante 5 vezes, sendo observado na luz ultravioleta a presença de três manchas com R_fs diferentes. A mancha com o maior fator de retenção foi separada das demais manchas da placa, filtrada em sistema Acoet-MeoH 20% utilizando um funil de placa porosa e codificada como M-1. A análise de RMN de ¹H e ¹³C da fração mostrou a existência de uma mistura em M-1.

A fração M-1 foi recromatografada utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) com eluição por gradiente em um sistema de bombeamento a baixa pressão cuja fase móvel foi resultante da mistura binária de H₂O e MeCN. As análises foram feitas em 60 min a temperatura de 40°C, fluxo de 1 mL/min em uma Coluna C18 – ACE de 250 mm de comprimento com 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula, pré-coluna C18 com 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula, pré-coluna C18 com 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula.

Os cromatogramas por sistema de eluição por gradiente de solventes, da fração M-1 apresentou as seguintes informações: no método (34:100/H₂O:MeCN) houve o aparecimento de 8 picos com tempo de retenção de 5,3; 12,0; 14,4; 17,37; 20,5; 22,6; 25,43; 33,18 min (Figura 5, pág., 58). O método descrito acima foi utilizado para isolamento das substâncias utilizando no CLAE-DAD uma temperatura de 40°C, fluxo de 4 mL/min em uma Coluna semi-preparativa C18 – ACE de 250 mm de comprimento com 10 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula, pré-coluna C18 com 4,6 mm de diâmetro interno, pré-coluna C18 com 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula. Os picos com tempo de retenção de 17,3 e 22,6 minutos foram isolados e codificados como **Zb-4** e **Zb-5**.

Figura 5. Cromatogramas da Fração M-1 nas proporções de solventes (34:100/H₂O:MeCN).



Quadro 4- Processamento cromatográfico da fase acetato do EEB de *Zornia basiliensis* – Coluna 2.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
Hex:AcOEt (95:5)	1-5	1-5
Hex:AcOEt (90:10)	6-18	7-8; 9-10; 11-18
Hex:AcOEt (85:15)	19-26	19-24; 25-29
Hex:AcOEt (80:20)	27-42	30; 31-33; 34-35; 36-38; 39-42
Hex:AcOEt (75:25)	43-60	43-45; 46-47; 48-57; 58; 59; 60
Hex:AcOEt (70:30)	61-76	61; 62; 63-70; 71-76
Hex:AcOEt (65:35)	77-85	77-82; 83-86
Hex:AcOEt (60:40)	86-94	87-92
Hex:AcOEt (55:45)	95-103	93-103
Hex:AcOEt (50:50)	104-112	104; 105-107; 108-112
Hex:AcOEt (45:55)	113-121	113-116; 117-119; 120; 121
Hex:AcOEt (40:60)	122-129	122; 123; 124-126; 127-129
Hex:AcOEt (35:65)	130-139	130; 131; 132-134; 135-139
Hex:AcOEt (30:70)	140-152	140-143; 144-146; 147-154
Hex:AcOEt (25:75)	153-164	155; 156; 161-162; 163-164
Hex:AcOEt (20:80)	165-173	165-170; 171-173
Hex:AcOEt (15:85)	174-181	174-181
Hex:AcOEt (10:90)	182-192	182-183; 184-187; 188-190; 191; 192
Hex:AcOEt (5:95)	193-202	193-197
AcOEt	203-210	-
AcOEt:MeOH (90:10)	211-225	-
AcOEt:MeOH (80:20)	226-239	-
AcOEt:MeOH (75:25)	240-250	-
AcOEt:MeOH (70:30)	251-260	-

Quadro 5- Processamento cromatográfico da fração 63-70 da coluna 2 - coluna 2.1

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
Hexano 100%	1-6	1-6
Hex:AcOEt (98:2)	7-11	7-9;10; 11-16
Hex:AcOEt (95:5)	12-16	
Hex:AcOEt (93:7)	17-22	17-19; 20-22
Hex:AcOEt (90:10)	23-26	23-26
Hex:AcOEt (85:15)	27-33	27-30; 31-33
Hex:AcOEt (80:20)	34-39	34-39
Hex:AcOEt (70:30)	40-50	40-46; 47-50
Hex:AcOEt (55:45)	51-57	51-57
Hex:AcOEt (60:40)	58-59	58-59

4.8-Ensaios farmacológicos

4.8.1. Aprovação pelo Comitê de Ética

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, nº do CEP -002263/2011-65, e conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética Internacional para manuseio de animais em modelos de inflamação (ZIMMEMAN, 1983).

4.8.2 Animais

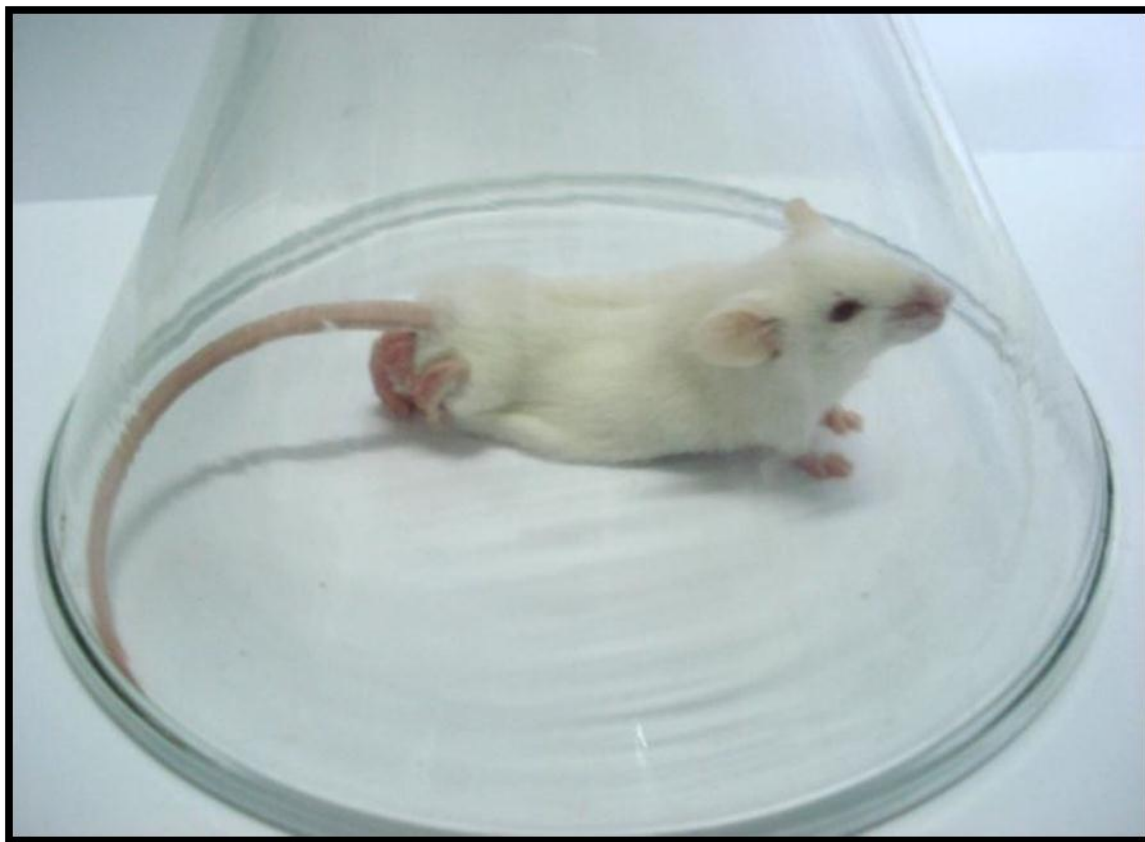
Neste trabalho foram utilizados camundongos da linhagem Swiss de ambos os sexos, pesando entre 25-30 g, com 6 a 8 semanas de idade, cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas - UFAL. Após o período de desmame, os animais foram transferidos para o Biotério do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS, onde foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura e luminosidade controladas, obedecendo a um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro, com livre acesso a água e ração especial para roedores. Os animais foram mantidos no laboratório pelo menos 24 h antes da realização dos experimentos para aclimação, os quais foram sempre realizados entre 8-17 horas.

Foram utilizados 6 animais por grupo e sempre que possível este número foi reduzido. Os animais foram deixados em jejum por oito horas antes do início dos experimentos com livre acesso à água. Logo após os experimentos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

4.8.3-Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O protocolo experimental utilizado nesse ensaio foi semelhante ao proposto originalmente por Collier et al. (1968), com pequenas modificações. Nesse método, a nocicepção é induzida pelo ácido acético 0,6%, que atua como um estímulo nocivo quando injetado através da via peritoneal (i.p.) do camundongo. A resposta do animal ao estímulo é representada por uma sequência de contrações da musculatura abdominal juntamente com a extensão dos membros inferiores (Figura 6). Quarenta minutos antes da injeção do ácido acético i.p, os animais foram tratados com **7-MF** (Zb-2) nas doses de 300, 100, 50 e 30 $\mu\text{mol/kg}$ (v.i.) ou dipirona (100 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), fármaco padrão. O grupo controle recebeu salina com o controle Tween 80®. Cinco minutos após a administração do agente álgico foi registrado o número de contorções abdominais produzidas pelo animal durante 20 min.

Figura 6- Contorção abdominal após injeção i.p. de ácido acético.



Fonte: LaFI-ICBS-UFAL, 2010

4.8.4 Ensaio de nocicepção induzida por Formalina

O procedimento utilizado para realização desse ensaio foi similar ao descrito por Hunskaar e Hole (1987). Esse ensaio é caracterizado por duas fases distintas: uma fase neurogênica (1ª fase) e outra inflamatória (2ª fase). Para isso, os camundongos receberam uma injeção s.pl. de 20 µl de formalina - formaldeído diluído em solução salina (2,5%) - na face dorsal da pata traseira, quarenta minutos após o tratamento com **7-MF** (100 µmol/kg, v.i.), indometacina (100 µmol/kg, v.i., fármaco padrão), ou veículo (salina e Tween 80®). Após a injeção os animais foram imediatamente colocados, individualmente, em um béquer e cronometrou-se o tempo que o animal permaneceu lambendo, mordendo ou batendo a pata, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção (Figura 7). Os primeiros 5 minutos

cronometrados representam a fase neurogênica do teste, os últimos 15 minutos representam a fase inflamatória, totalizando 30 minutos.

Figura 7- Camundongo lambendo a pata no ensaio de nocicepção induzida por formalina.



Fonte: LaFI-ICBS-UFAL, 2010.

4.8.5- Ensaio de Placa Quente

A atividade antinociceptiva central de 7-MF foi investigada utilizando o modelo da placa quente descrito por Kuraishi et al., (1983). Os camundongos foram colocados em uma placa aquecida a $54 \pm 1,0$ °C (Figura 8) e suas respostas ao estímulo térmico, tempo em segundos que o animal gastou para lamber, levantar ou morder uma de suas patas dianteiras ou traseiras (tempo de latência) foram cronometradas. Foram feitas duas medidas controle em intervalos de 30 minutos, estabelecendo-se o tempo de corte (máximo de permanência do animal na placa) de 15 segundos. Posteriormente, os animais foram tratados com 7-MF na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ via oral e a morfina, que foi

utilizada como padrão, na dose de 15 $\mu\text{mol/kg}$ pela via intraperitoneal. Então, foi registrado o tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa (tempo de latência do animal). Após um intervalo de 30 minutos, novas medidas do tempo de latência foram registradas em intervalos de 30 minutos durante 2 horas.

Figura 8- Ensaio de placa quente.



Fonte: LaFI-ICBS-UFAL, 2010.

4.8.6- Ensaio de nocicepção induzida por glutamato

Neste ensaio um volume de 20 μ L de uma solução de glutamato (30 μ mol/pata) era administrada intraplantarmente na face ventral da pata traseira direita dos camundongos. Os animais eram observados individualmente por 15 minutos após a administração de glutamato. O tempo que eles permaneciam lambendo a pata injetada era registrado e considerando como indicativo de nocicepção. Os animais foram tratados com 7-MF (100 μ mol/kg, i.p.), morfina (15 μ mol/kg, i.p.) ou veículo 40 minutos antes da administração de glutamato. (BEIRITH, SANTOS & CALIXTO, 2002).

Resultados e Discussão

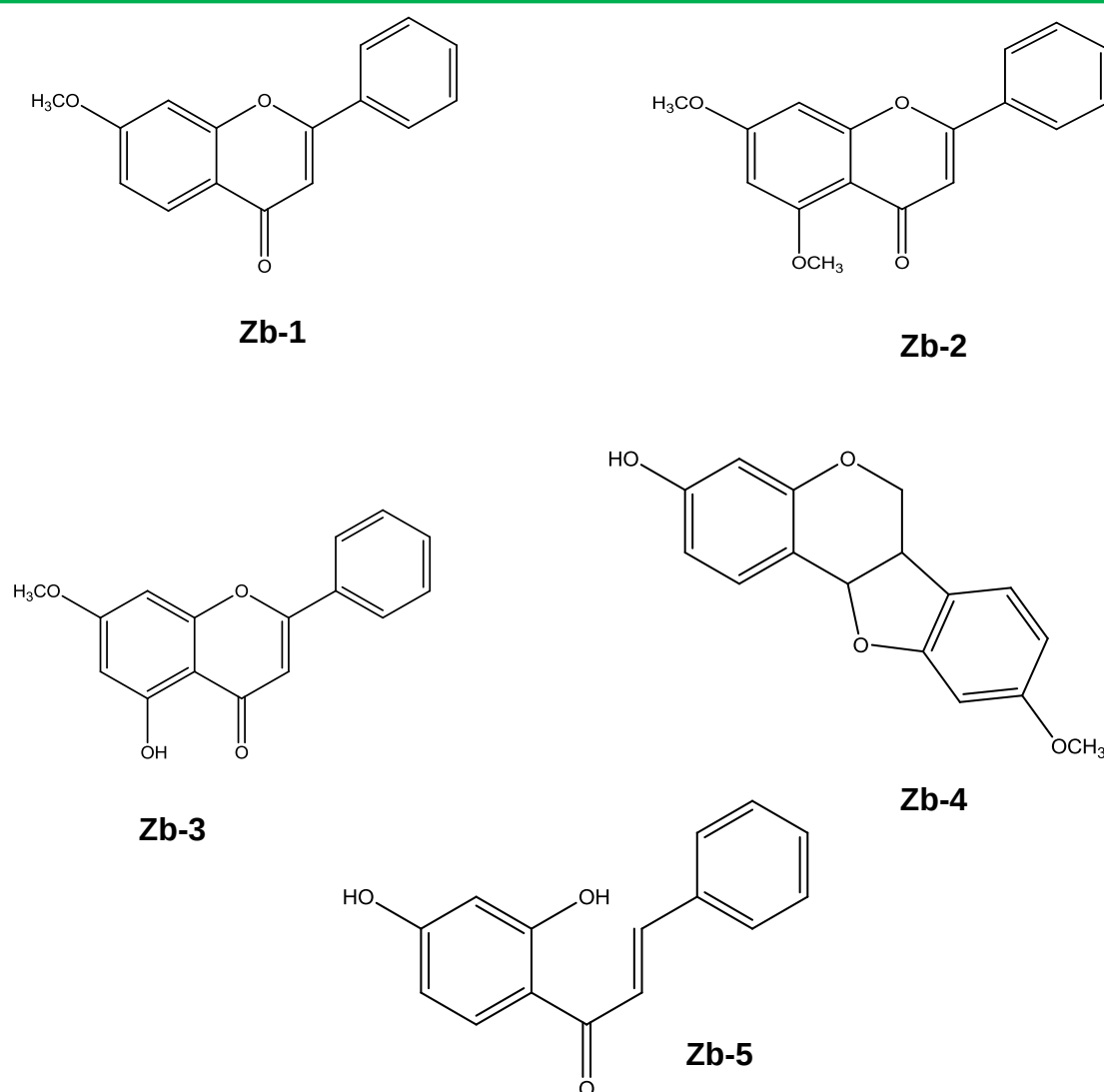


5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação fitoquímica

O estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* resultou no isolamento de cinco substâncias (Figura, 9), três da fase diclorometano: 7-metoxiflavona (**Zb-1**), 5,7-dimetoxiflavona (**Zb-2**); 5-hidroxi-7-metoxiflavona (**Zb-3**). Duas da fase acetato de etila: 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**Zb-4**) e 2'-4'-dihidroxichalcona (**Zb-5**). Para caracterização dessas substâncias foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de IV, massas, RMN de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, e comparação com dados da literatura.

Figura 9. Substâncias isoladas de *Zornia brasiliensis* no presente trabalho

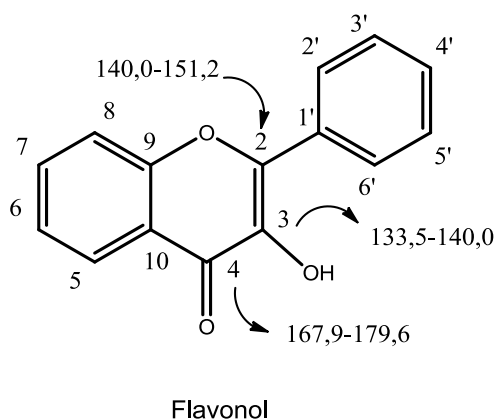
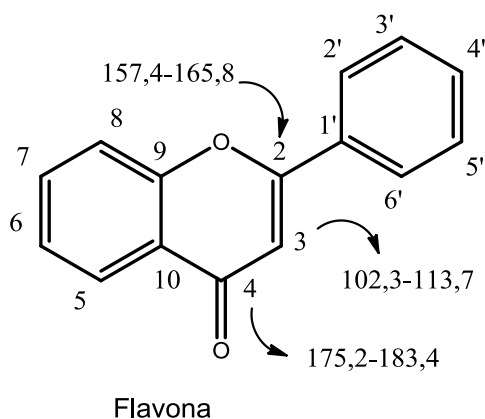


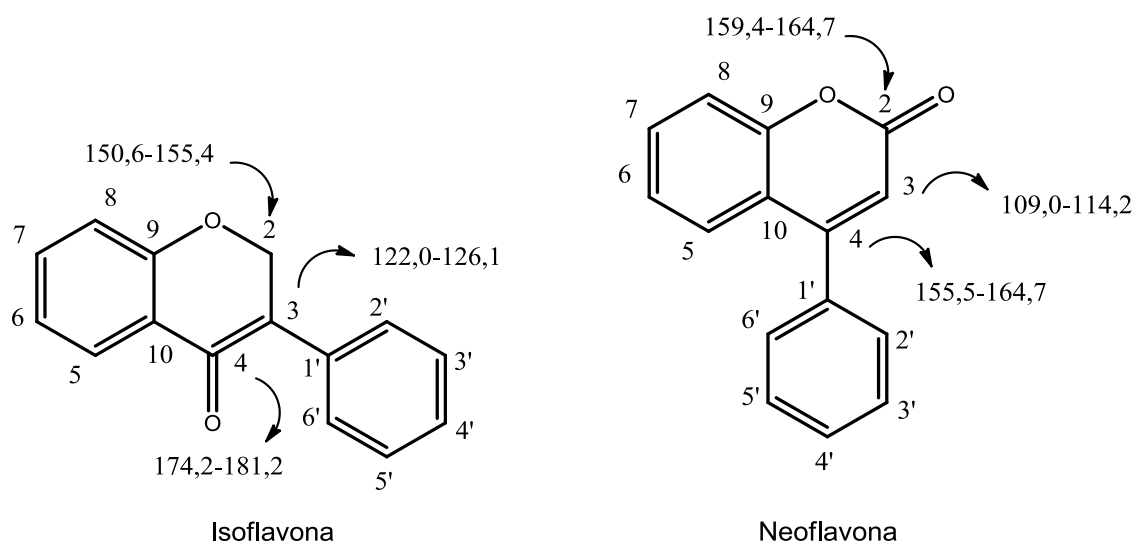
5.1.1. Determinação Estrutural de Zb-1.

A substância codificada como **Zb-1** foi isolada na forma de um pó amorfo esverdeado, com ponto de fusão de 106-109°C (relatado na literatura 108-110°C (LOOKER; HANNEMAN, 1962)) e massa de 987 mg.

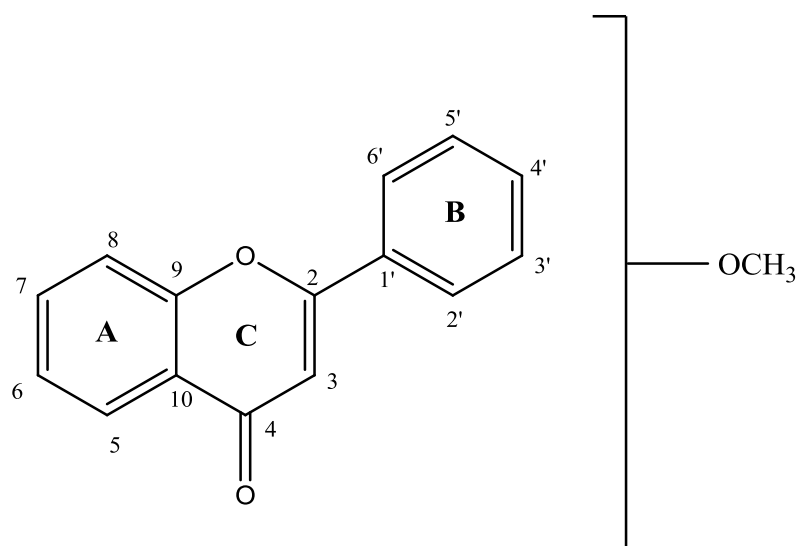
Na análise do espectro de infravermelho (Figura 10, pag. 74) foi possível observar a existência de bandas fortes de estiramento em 1654,92 cm^{-1} que são sugestivas de grupamento cetona α,β insaturada. Absorções de estiramento aos pares observadas em 1604,77 cm^{-1} e 1469 cm^{-1} indicativas de anel aromático. A presença de grupamento de éteres arílicos pode ser sugerida uma vez que estiramentos característicos de C-O-C em 1273,02 cm^{-1} e estiramento simétrico em 1026,13 cm^{-1} foram observados. Além dessas observações a presença de duas bandas fortes de deformação uma assimétrica em 852,54 cm^{-1} e uma simétrica perto de 771,53 cm^{-1} sugerem a presença do grupamento epóxido na forma de anéis dissustituídos.

No espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) (Figura 11, pág. 75) foram observados 14 sinais referentes a 16 carbonos que condizem com a condição característica de esqueleto flavonoídico (unidade $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$) (ALBUQUERQUE et al., 2007). Os dados fornecidos pelo espectro RMN de ^{13}C comparados com modelos da literatura (ilustrados abaixo) de Agrawal (1989) e Pelter e colaboradores (1976) possibilitou determinar o tipo de esqueleto flavonoídico dentre as possibilidades existentes nas subclasses dos flavonoides.





Dos 14 sinais observados no espectro de RMN ^{13}C , seis foram referentes a carbonos não hidrogenados, nove para carbonos metínicos (CH) e um para carbono metoxílico (OCH_3). Os sinais para carbonos sp^2 em δ_{C} 161,9 e 106,8, sugeriram a presença de dupla ligação em C-2 e C-3, respectivamente. Além destes dois sinais o sinal em δ_{C} 176,7 para carbonila em C-4, corroborou com a indicação de **Zb-1** como sendo uma flavona.



Ainda no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 11, pág. 75), sinais para carbonos metínicos sp^2 em δ_{C} 126,0 (C-5); 113,6 (C-6); 99,7 (C-8), permitiram sugerir a presença de um anel A 7-oxygenado (ALBUQUERQUE et al., 2007). Observou-se ainda a presença de sinais intensos em δ_{C} 125,3 (C-2'/C-6');

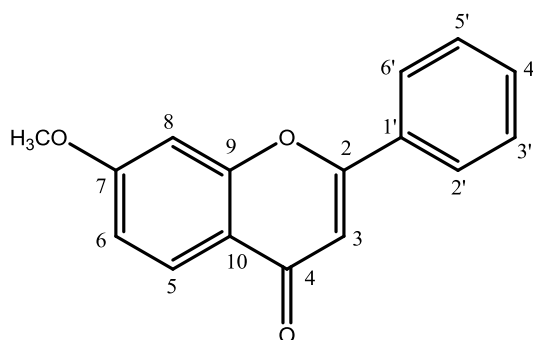
128,2 (C-3'/C-5') e 130,6 (C-4') atribuídos aos carbonos metínicos sp^2 do anel B.

O espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) e suas expansões (Figura 12 e 13, pág. 76) apresentaram deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta do espectro de RMN ^{13}C (Figura 11, pág. 75) para a presença de um esqueleto flavonoídico com esse padrão de substituição: dois multipletos com integral para dois e três hidrogênios cada, δ_H 7,82 e 7,44, compatíveis com os hidrogênios H 2'/6' e H 3'/4'/5', respectivamente, de anel B monossustituído de flavonoide. A presença de um duplo duplete em δ_H 6,89 ($J = 2,0$ e $9,0$ Hz) acoplando meta com um duplete δ_H 6,88 ($J = 2,0$ Hz) e orto com um duplete δ_H 8,05 ($J = 9,0$ Hz) que são condizentes com os hidrogênios H-5, H-6 e H-8, respectivamente, do anel A do esqueleto flavonoídico (Tabela 2, pág. 72). A presença de um singlete em 3,85 com integral para três hidrogênios forneceu a informação da presença de uma metoxila na molécula. A indicação do esqueleto de uma flavona foi reforçada pelo singlete em δ_H 6,68 com integral para um hidrogênio atribuído ao H-3.

Os sinais de carbonos hidrogenados (δ_C 130,6; 128,2; 126,0; 125,3; 113,6; 106,8; 99,7) foram atribuídos para as posições C-4', C-3'/5', C-5; C-2'/6', C-6, C-3 e C-8, respectivamente, através das correlações observadas no espectro bidimensional $^1H \times ^{13}C$ – HMQC ($CDCl_3$, 500/125 MHz) (Figura 14, pág.77) δ_H 7,44/ δ_C 130,6; δ_H 7,44/ δ_C 128,2; δ_H 8,05/ δ_C 126,0; δ_H 7,82/ δ_C 125,3; δ_H 6,89/ δ_C 113,6; δ_H 6,68/ δ_C 106,8 e δ_H 6,88/ δ_C 99,7. (Figura 15, pág.77 Expansão do espectro de HMQC). Além dessas correlações foi possível observar também uma correlação entre δ_H 3,85 e o carbono em 55,07 atribuído a metoxila.

No espectro de HMBC (Figura 16, pág. 78) foi possível observar correlações a longa distância entre o hidrogênio δ_H 8,05 (H-5) com os sinais de carbono em δ_C 176,7; δ_C 163,4 e δ_C 157,0 sendo possível atribuir estes sinais para as posições C-4; C-7 e C-9 e através da correlação δ_H 3,85/ δ_C 163,4 ppm foi possível confirmar que a metoxila esta inserida no carbono da posição 7.

Ainda no HMBC (Figura 17 e 18, pág. 78 e 79), as correlações dos hidrogênios δ_H 6,89 (H-6) e δ_H 6,88 (H-8) com o sinal de carbono em δ_C 117,0 possibilitou sugerir este sinal para o carbono 10. E através das correlações δ_H 6,68/ δ_C 161,9; δ_C 130,8 sugerir δ_C 161,9 e δ_C 130,8 para as posições 2 e 1', respectivamente; esta sugestão é confirmada pela correlação δ_H 7,82 (H-2'/6')/ δ_C 125,3 e δ_C 130,8. O conjunto de dados espectrais possibilitou assinalar **Zb-1** como sendo a substância 7-metoxiflavona isolada pela primeira vez no gênero *Zornia*.



De acordo com a literatura, a 7-metoxiflavona apresenta diversas atividades farmacológicas, como por exemplo, as atividades tripanossomicida (AMBROZIN, et al., 2008), inseticida (ROMANELLI, et al., 2010), quimioprotetora (TA & WALLE, 2007) e gastroprotetora (ARES, et al., 1996).

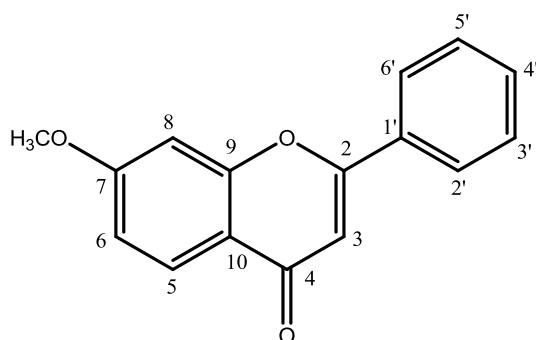


Tabela 2 – Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de **Zb-1** em CDCl_3 (125 e 500 MHz, respectivamente) e da 7-metoxiflavona em CDCl_3 (75 e 300 MHz, respectivamente) Lee; Son; Park, 2007.

Zb-1			Literatura	
			(CDCl_3 75 MHz)	(CDCl_3 300 MHz)
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	161,9	-	162,1	-
3	106,8	6,68 (s)	106,8	6,76 (s)
4	176,7	-	176,4	-
5	126,0	8,05 (d) $J = 9,0$ Hz	126,1	8,12 (d) $J = 9,0$ Hz
6	113,6	6,89 (dd) $J = 2,0; 9,0$ Hz	114,6	6,97 (m)
7	163,4	-	163,8	-
8	99,7	6,88 (d) $J = 2,0$ Hz	100,9	6,97 (m)
9	157,0	-	157,5	-
10	117,0	-	117,1	-
1'	130,8	-	131,2	-
2'	125,3	7,82 (m)	126,1	7,86 (m)
3'	128,2	7,44 (m)	129,0	7,44 (m)
4'	130,6	7,44 (m)	131,6	7,44 (m)
5'	128,2	7,44 (m)	129,0	7,44 (m)
6'	125,3	7,82 (m)	126,1	7,86 (m)
7- OCH₃	55,07	3,85 (s)	56,0	3,93 (s)

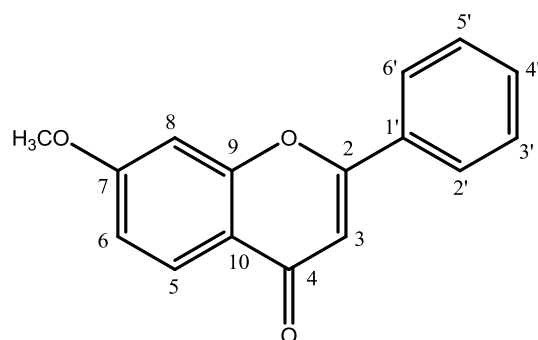
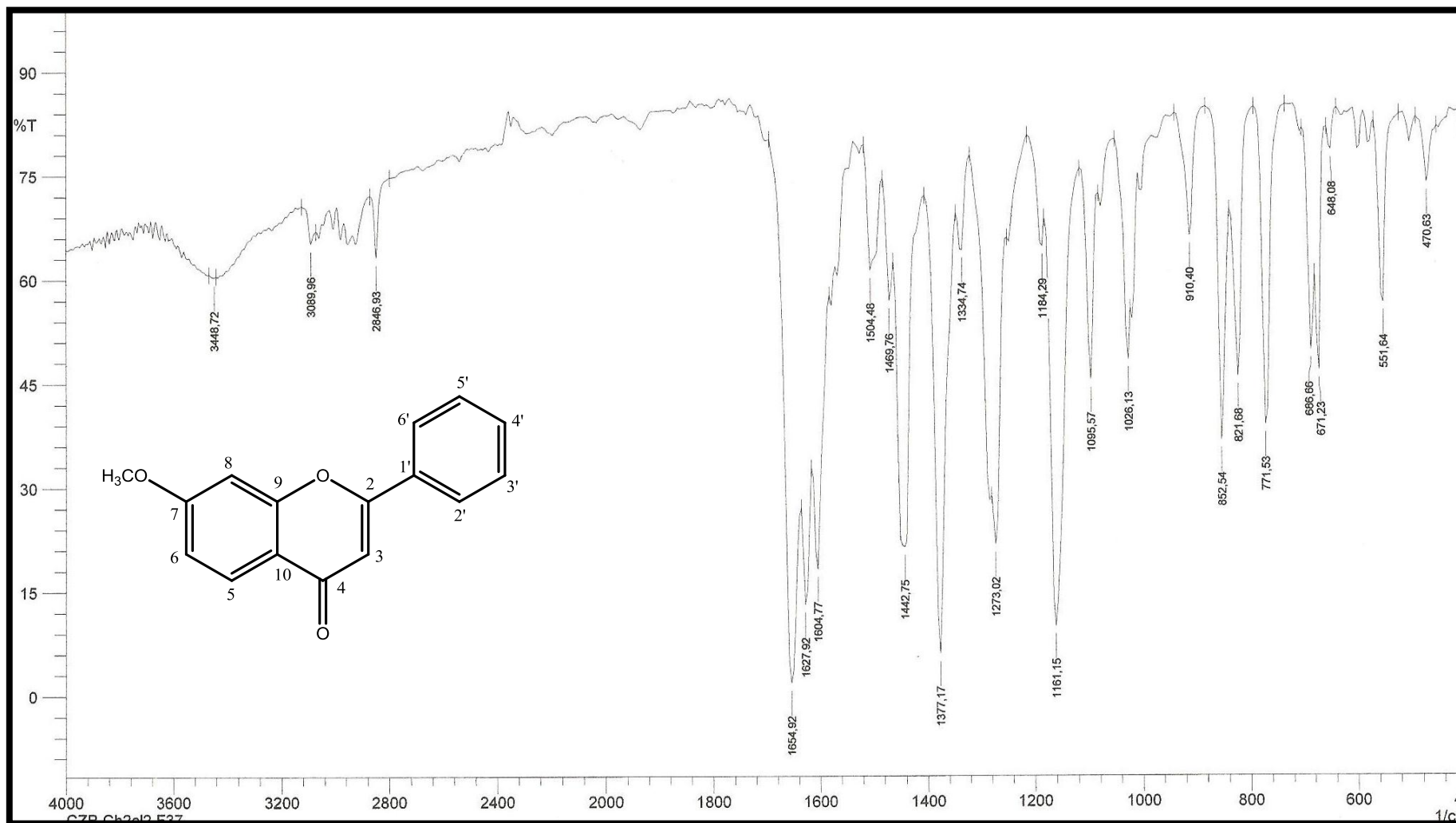


Tabela 3 – Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para **Zb-1**, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3

	HMQC		HMBC	
	δ_{H} (J Hz)	δ_{C}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
2	-	161,9		
4	-	176,7		
7	-	163,4		
9	-	157,0		
10	-	117,0		
1'	-	130,8		
CH				
3	6,71 (s)	106,8		C-10/C-1'
5	8,05 (d) $J = 8,5$ Hz	126,0		C-4/C-7/C-9
6	6,89 (dd) $J = 9,0; 2,5$ Hz	113,6		C-8/C-10
8	6,88 (d) $J = 2,0$ Hz	99,7		C-6/C-10
2'	7,82 (m)	125,3		C-6'/C-4'/C-1'; C-2
3'	7,44 (m)	128,2	C-2'/C-4'	C-5'
4'	7,44 (m)	130,6	C-3'/C-5'	C-6'/C-2'
5'	7,44 (m)	128,2	C-6'/C-4'	C-3'
6'	7,82 (m)	125,3		C-2'/C-4'/C-1'/C-2
7-OCH₃	3,85 (s)	55,07		C-7

Figura 10- Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de **Zb-1**.

SILVA, A. D. S.

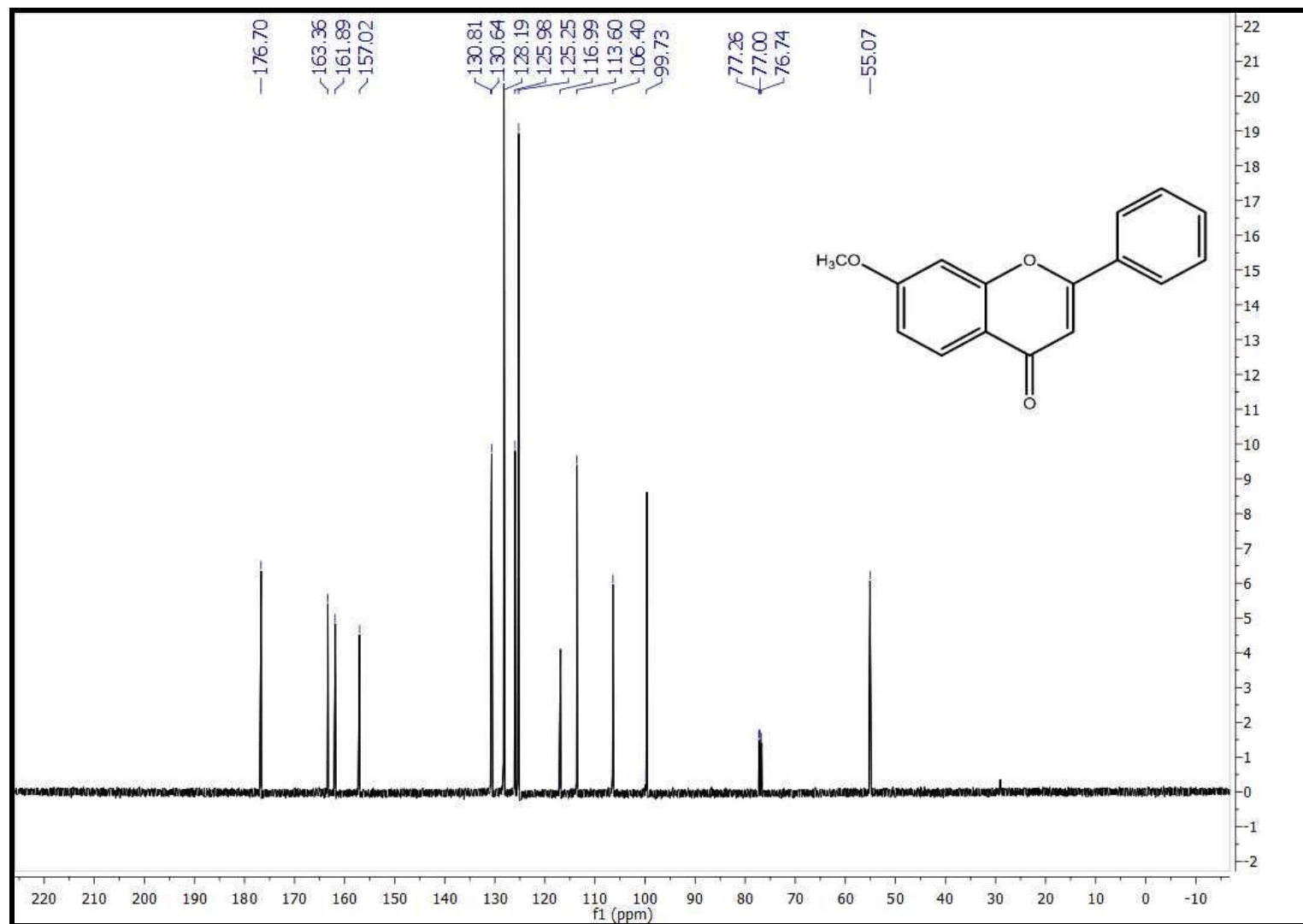
Figura 11- Espectro de RMN ^{13}C -BB (CDCl_3 , 125 MHz).

Figura 12- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **Zb-1**.

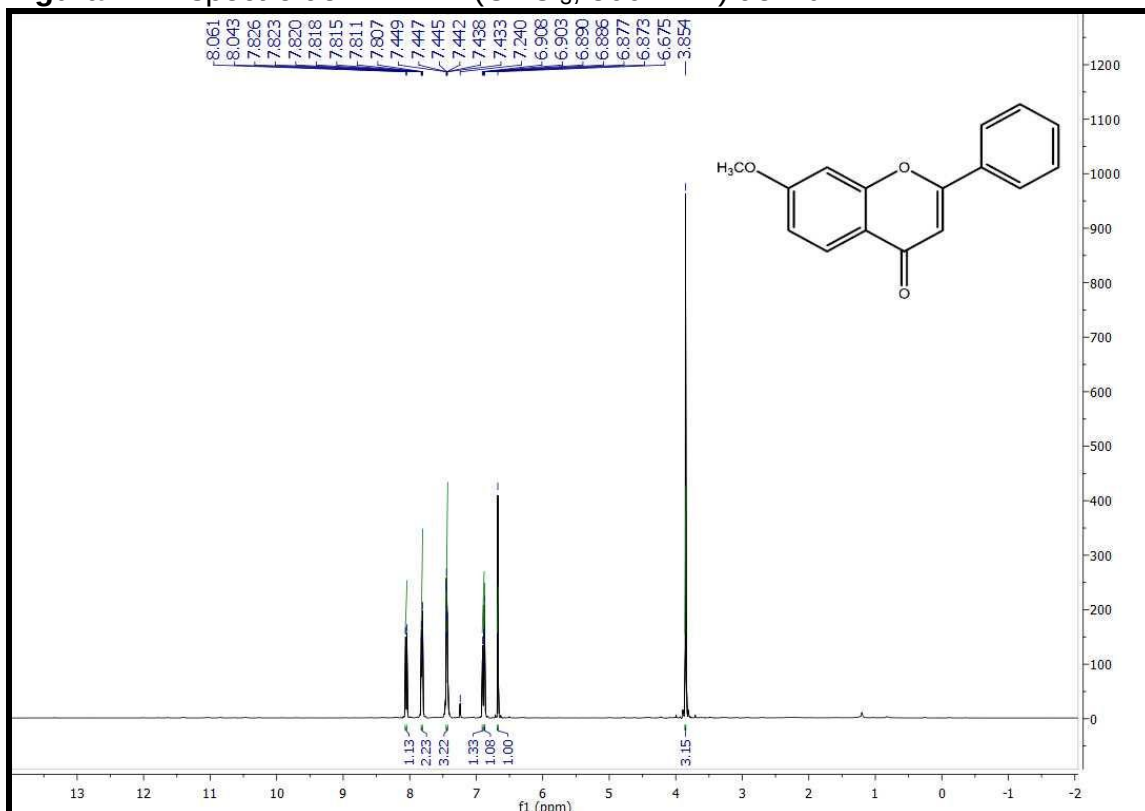


Figura 13- Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **Zb-1** na região de 8.1-6.5 ppm.

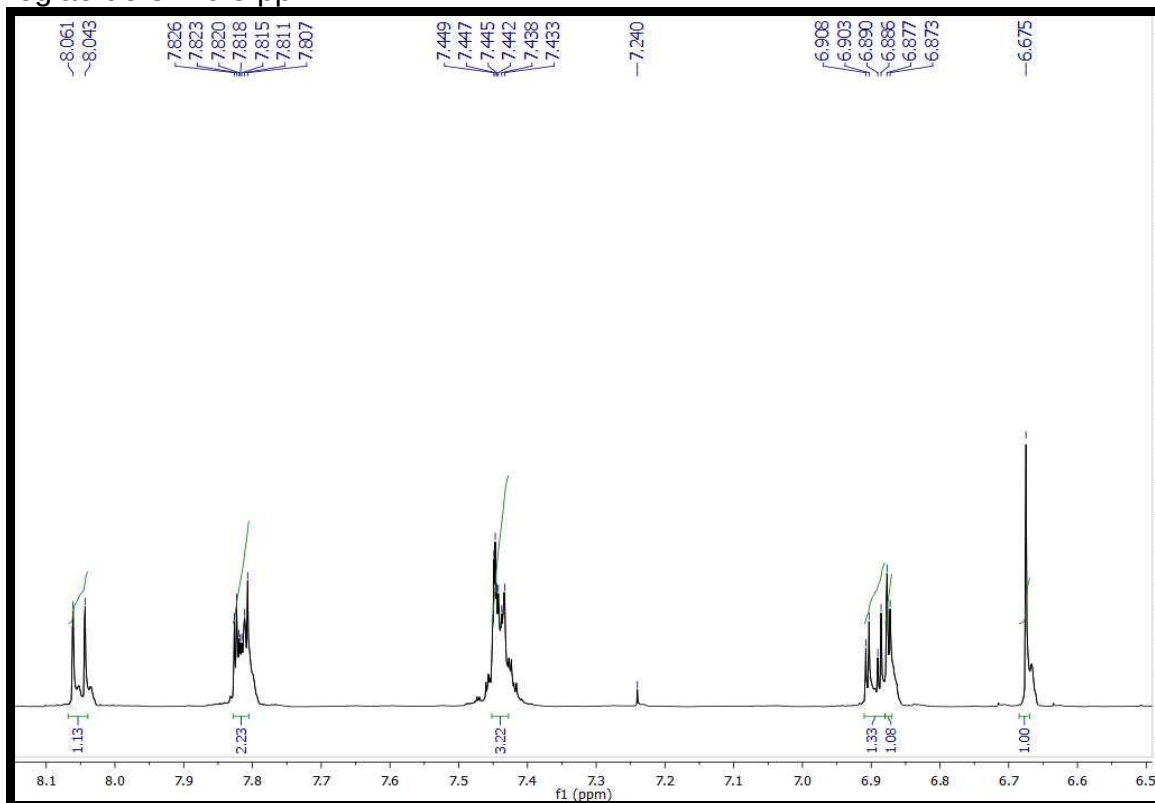


Figura 14- Espectro de HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-1**.

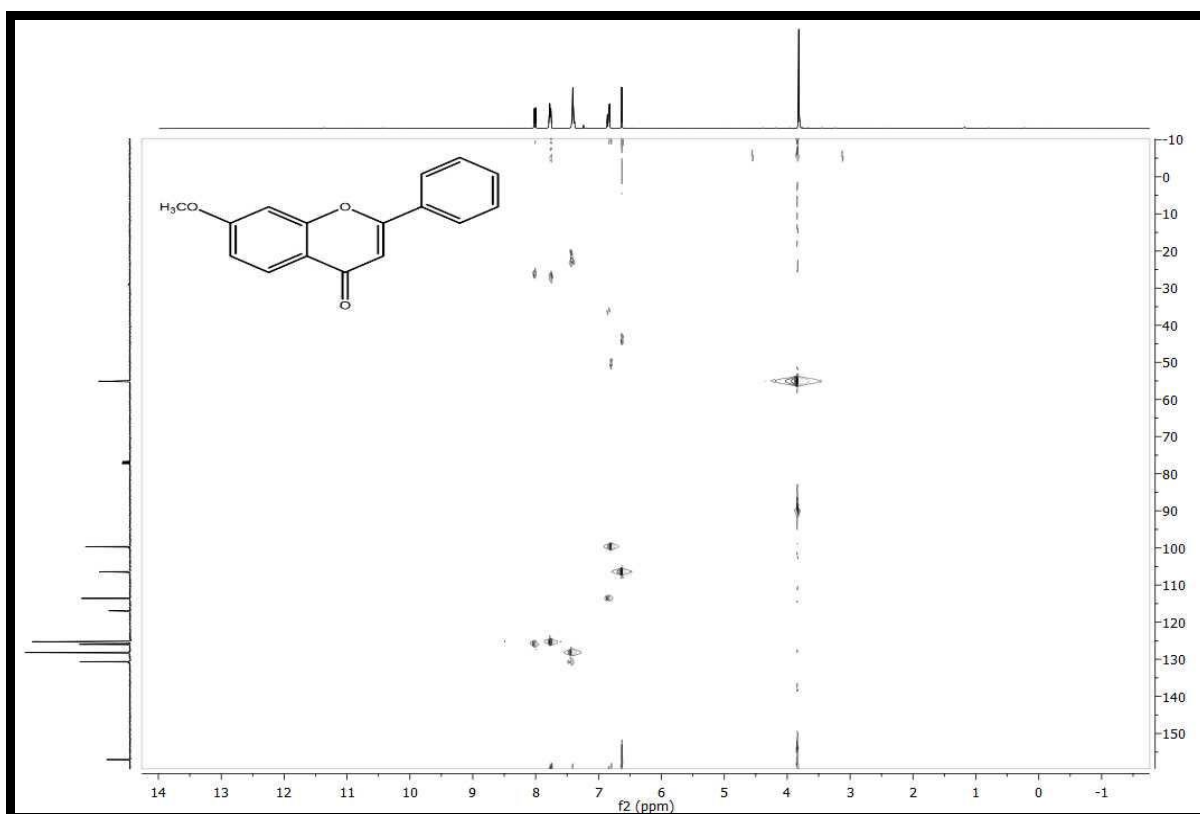


Figura 15- Expansão do espectro de HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-1** na região de (8,7-6,1) x (90x130) ppm.

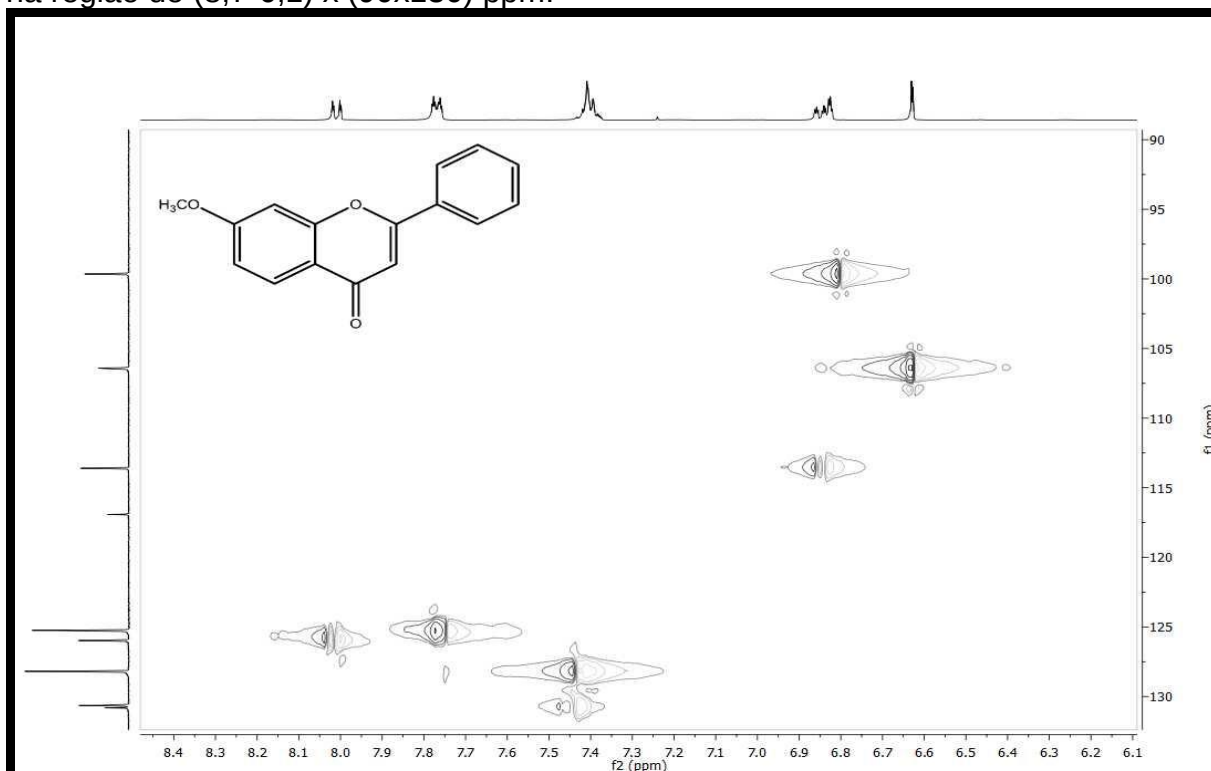


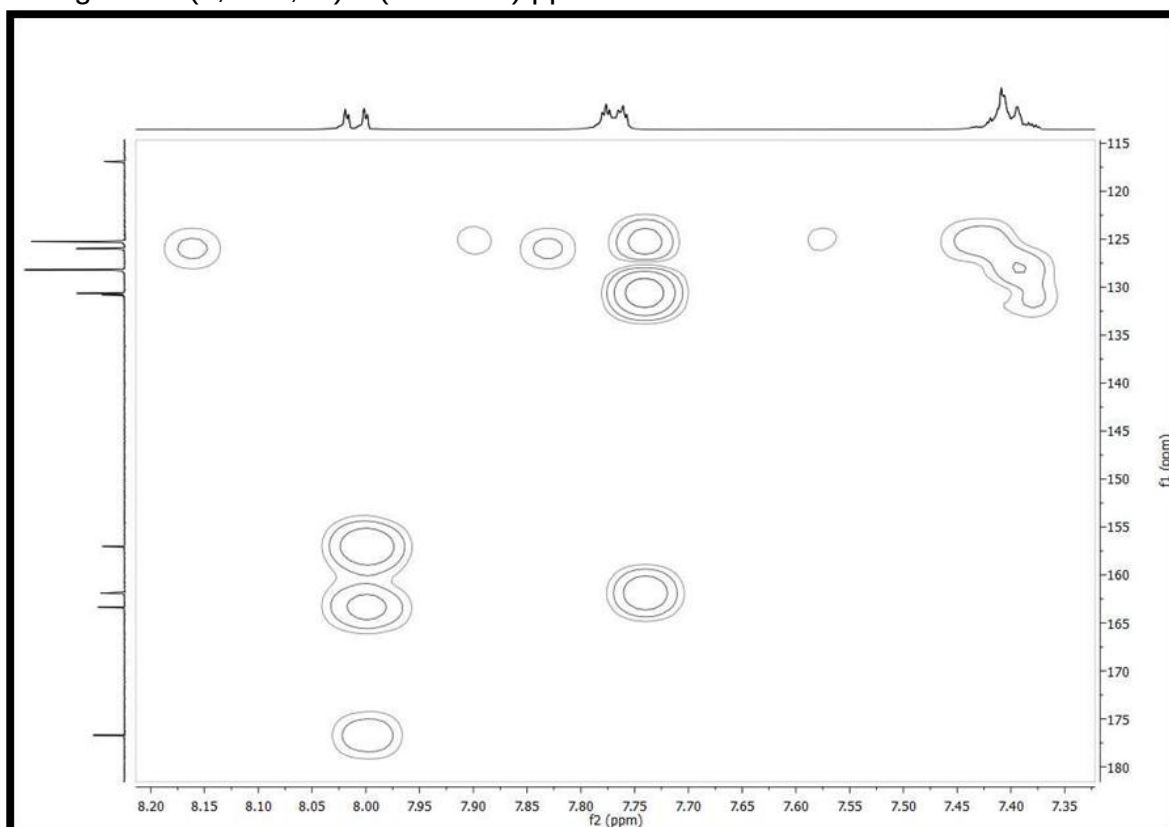
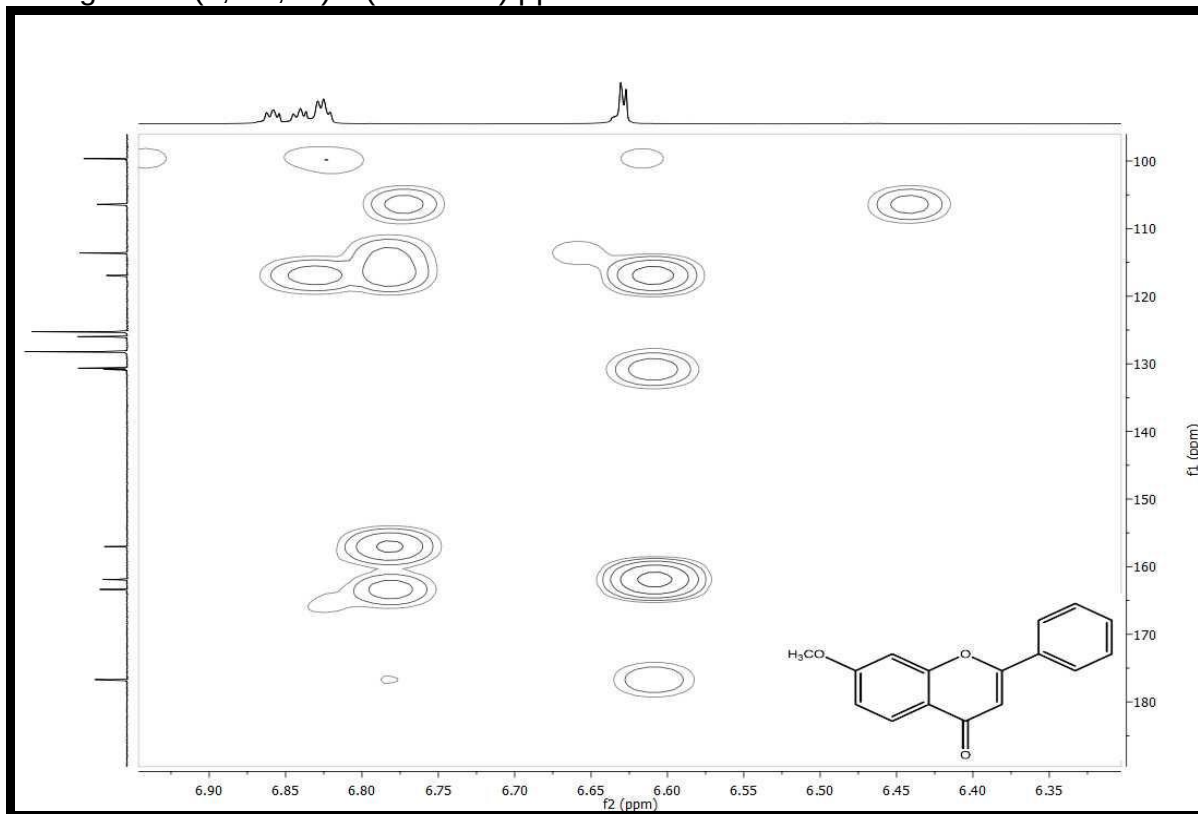
Figura 16- Espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-1**.**Figura 17-** Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-1** na região de (8,20-7,35) x (115x180) ppm.

Figura 18- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-1** na região de (6,9-6,35) x (100x180) ppm



5.1.2. Determinação Estrutural de Zb-2

A substância codificada como Zb-2 foi isolada na forma de cristais brancos, com ponto de fusão na faixa de 147-149°C condizente com o ponto da literatura na faixa de 145-149°C (YENJAI, et al. 2009) e massa de 18,0 mg.

A fração foi submetida à espectroscopia de Infravermelho obtendo-se o espectro ilustrado na Figura 19 (pág. 85). A análise do espectro mostrou a presença de uma banda em $1647,21\text{ cm}^{-1}$ atribuído a uma cetona α,β insaturada. Absorções de estiramento de anel ocorrendo aos pares foram observadas em $1604,77\text{ cm}^{-1}$ e $1490,97\text{ cm}^{-1}$ sugestivos de anel aromático. A presença de duas bandas fortes de deformação de anel uma assimétrica em $823,60\text{ cm}^{-1}$ e uma simétrica em $769,60\text{ cm}^{-1}$ são sugestivas de epóxidos dissustituídos. Além dessas observações foi sugerida ainda a presença de um éter arílico uma vez que bandas fortes, uma de estiramento C-O-C em $1124,50\text{ cm}^{-1}$ e uma de estiramento simétrico em $1056,99\text{ cm}^{-1}$ estavam presentes.

No espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (Figura, 20, pág. 86) foram observados a presença de 15 sinais referentes a 17 átomos de carbono sendo destes 2 sinais correspondentes a carbonos metílicos, 6 sinais à carbonos metínicos e 7 sinais à carbono não hidrogenados. Dentre estes a presença dos sinais referentes a carbono sp^2 em δ_{C} 160,71 e 109,07 foram sugestivos de dupla ligação em carbonos C-2 e C-3 respectivamente. Sinais em δ_{C} 96,21 (C-6) e 92,87 (C-8) não observados no espectro de **Zb-1** sugeriram ao anel A substituições nas posições 5,7 para **Zb-2**. Além destes a presença de sinais em δ_{C} 131,14 (C-4'); 128,90 (C-3'/C-5') e 125,94 (C-2'/C-6') semelhantes ao observado para **Zb-1** sugeriram a ausência de oxigenação no anel B de **Zb-2**.

No espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500MHz) e sua expansão (Figura 21 e 22, pág. 87) foram observados deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta de RMN de ^{13}C para a presença de um esqueleto flavonoídico com esse padrão de substituição: a presença de dois multipletos em δ_{H} 7,85 e 7,48, com integrais para dois e três hidrogênios foram compatíveis com os hidrogênios H-2'/6' e H-3'/4'/5', respectivamente, de anel B monosubstituído, padrão este de substituição semelhante ao observado no anel B da estrutura

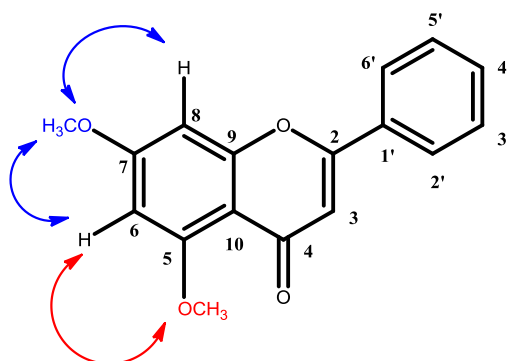
de **Zb-1**. No espectro de hidrogênio a presença de dois dupletos com integral para um hidrogênio cada acoplando meta entre si, em δ_H 6,36 ($J = 2,0$ Hz) e δ_H 6,55 ($J = 2,0$ Hz) (Figura 22, pág. 87) são característico de flavonoides que possuem anel A 5,7-dissubstituído, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 respectivamente do anel A de esqueleto flavonoídico. A presença de dois singletos em δ_H 3,94 e 3,89 com integrais para três hidrogênios cada, forneceu a informação que os substituintes das posições 5 e 7 do anel A dissubstituído de **Zb-2** seriam duas metoxilas (Tabela 4, pág. 83)

Os sinais de carbonos hidrogenados (δ_C 131,14; 128,90; 125,94; 109,07; 96,21; 92,87) foram atribuídos aos carbonos nas posições C-4'; C-3'/C-5'; C-2'/C-6'; C-3; C-6; C-8, respectivamente, através das correlações observadas no espectro bidimensional $^1H \times ^{13}C$ - HMQC (Figura 23, pág. 88) δ_H 7,85/ δ_C 125,94; δ_H 7,48/ δ_C 121,14; δ_H 7,48/ δ_C 128,90; δ_H 6,65/ δ_C 109,07; δ_H 6,36/ δ_C 96,21; δ_H 6,55/ δ_C 92,87 (Figura 24, pág. 88 expansão do espectro de HMQC). Além dessas correlações foi possível observar também duas correlações em δ_H 3,94/ δ_C 56,39; δ_H 3,89/ δ_C 55,64 atribuídos as duas metoxilas.

No espectro de correlação heteronuclear HMBC e sua expansão (Figura 25 e 26, pág. 89) foi possível observar correlações a longa distância entre o hidrogênio δ_H 7,85 (H-2') com o sinal de carbono δ_C 160,71 atribuído a posição C-2 e do hidrogênio δ_H 6,65 (H-3) com os sinais de carbono δ_C 109,33; 131,58 atribuídos as posições C-10 e C-1' respectivamente. Através da correlação δ_H 7,48 (H-3'/H-5')/ δ_C 131,58 confirma este valor para a posição C-1'. As correlações a duas ligações (2J) do hidrogênio δ_H 6,36 (H-6) com os sinais de carbono em δ_C 159,94 e δ_C 164,09 sugerindo estes sinais para as posições em C-5 e C-7, respectivamente e a correlação δ_H 6,55 (H-8) com os carbonos δ_C 164,09 e δ_C 159,94 possibilitaram confirmar o carbono da posição C-9 e assinalar o δ_C 164,09 para a posição C-7.

Ainda no HMBC (Figura 25, pág. 89) as correlações do hidrogênio δ_H 3,94 (5 OCH₃-) com o sinal de carbono δ_C 161,00 (C-5) e do δ_H 3,89 (7 OCH₃-) com o carbono δ_C 164,09 possibilitou sugerir estes sinais para as metoxilas nas posições C-5 e C-7, respectivamente. Essa sugestão foi confirmada no

espectro de correlação homonuclear NOESY (Figura 27, pág. 90) que apresentou as correlações de 5 H₃CO- com δ_H 6,36 (H-6) e de 7 H₃CO- com δ_H 6,36 (H-6) e δ_H 6,55 (H-8).



A compilação dos dados obtidos nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da substância em comparação com os valores obtidos na literatura permitiram identificar **Zb-2** como sendo a 5,7-dimetoxiflavona isolada pela primeira vez no gênero *Zornia*.

Em levantamentos realizados na literatura foram observados para a 5,7-dimetoxiflavona atividades farmacológicas já comprovadas, como a atividade antiviral (SOOKKONGWAREE, 2006) e atividade anticolinesterásica (SAWASDEE, 2009).

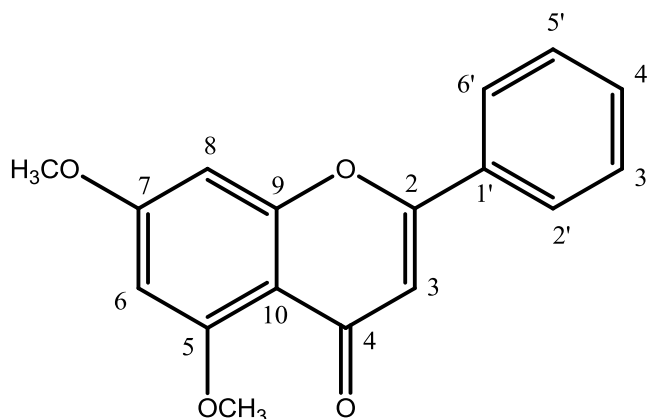


Tabela 4 – Dados comparativos de RMN ¹³C e ¹H de **Zb-2** em CDCl₃ (125 e 500 MHz, respectivamente) e da 5,7-dimetoxiflavona em CD₃Cl₃ (100 e 400 MHz, respectivamente) SUTTHANUT et al., 2007.

Zb-2			Literatura	
	δ _C	δ _H	δ _C (CDCl ₃ 100MHz)	δ _H (CDCl ₃ 400MHz)
2	160,71	-	160,7	-
3	109,07	6,65 (s)	109,1	6,67
4	177,61	-	177,5	-
5	161,00	-	161,0	-
6	96,21	6,36 (d) J = 2,5Hz	96,2	6,37 (d) J = 2,2Hz
7	164,09	-	164,1	-
8	92,87	6,55 (d) J = 2,5Hz	92,9	6,56 (d) J = 2,2Hz
9	159,94	-	159,9	-
10	109,33	-	109,4	-
1'	131,58	-	131,6	-
2'	125,94	7,85 (m)	125,9	7,86 (m)
3'	128,90	7,48 (m)	128,9	7,49 (m)
4'	131,14	7,48 (m)	131,1	7,49 (m)
5'	128,90	7,48 (m)	128,9	7,49 (m)
6'	125,94	7,85 (m)	125,9	7,86 (m)
5 OCH ₃ -	56,39	3,94 (s)	56,3	3,94 (s)
7 OCH ₃ -	55,64	3,89 (s)	55,7	3,90 (s)

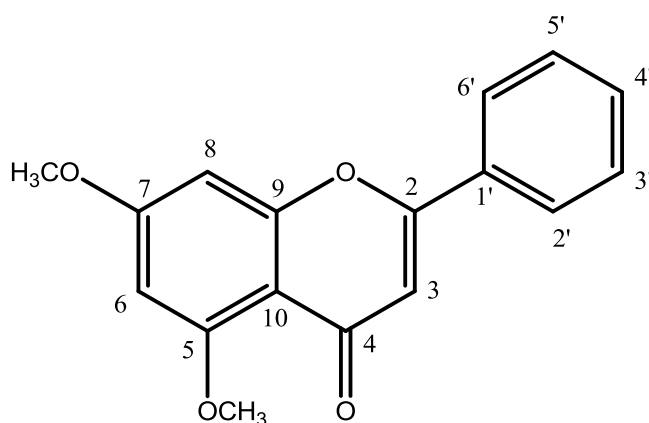


Tabela 5 – Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para **Zb-2**, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3

	HMQC		HMBC		NOESY
C	δ_{H} (J Hz)	δ_{C}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$
2	-	160,71			
4	-	177,61			
5	-	161,00			
7	-	164,09			
9	-	159,94			
10	-	109,33			
1'	-	131,58			
CH					
3	6,65 (s)	109,07	C-4/C-2	C-10/C-1'	H-2'
6	6,36 (d) $J = 2$ Hz	96,21	C-5/C-7		$\text{H}_3\text{COH-5}$; $\text{H}_3\text{COH-7}$
8	6,55 (d) $J = 2,5$ Hz	92,87	C-9/C-7	C-6	$\text{H}_3\text{COH-7}$
2'	7,85 (m)	125,94		C-2/C-6'/C-4'	H-3/H-3'
3'	7,48 (m)	128,90		C-1'	H-2'
4'	7,48 (m)	131,14			
5'	7,48 (m)	128,90		C-1'	H-6'
6'	7,85 (m)	125,94		C-2/C-2'/C-4'	H-5'
5 $\text{H}_3\text{CO-}$	3,94 (s)	56,39		C-5	H-6
7 $\text{H}_3\text{CO-}$	3,89 (s)	55,64		C-7	H-6/H-8

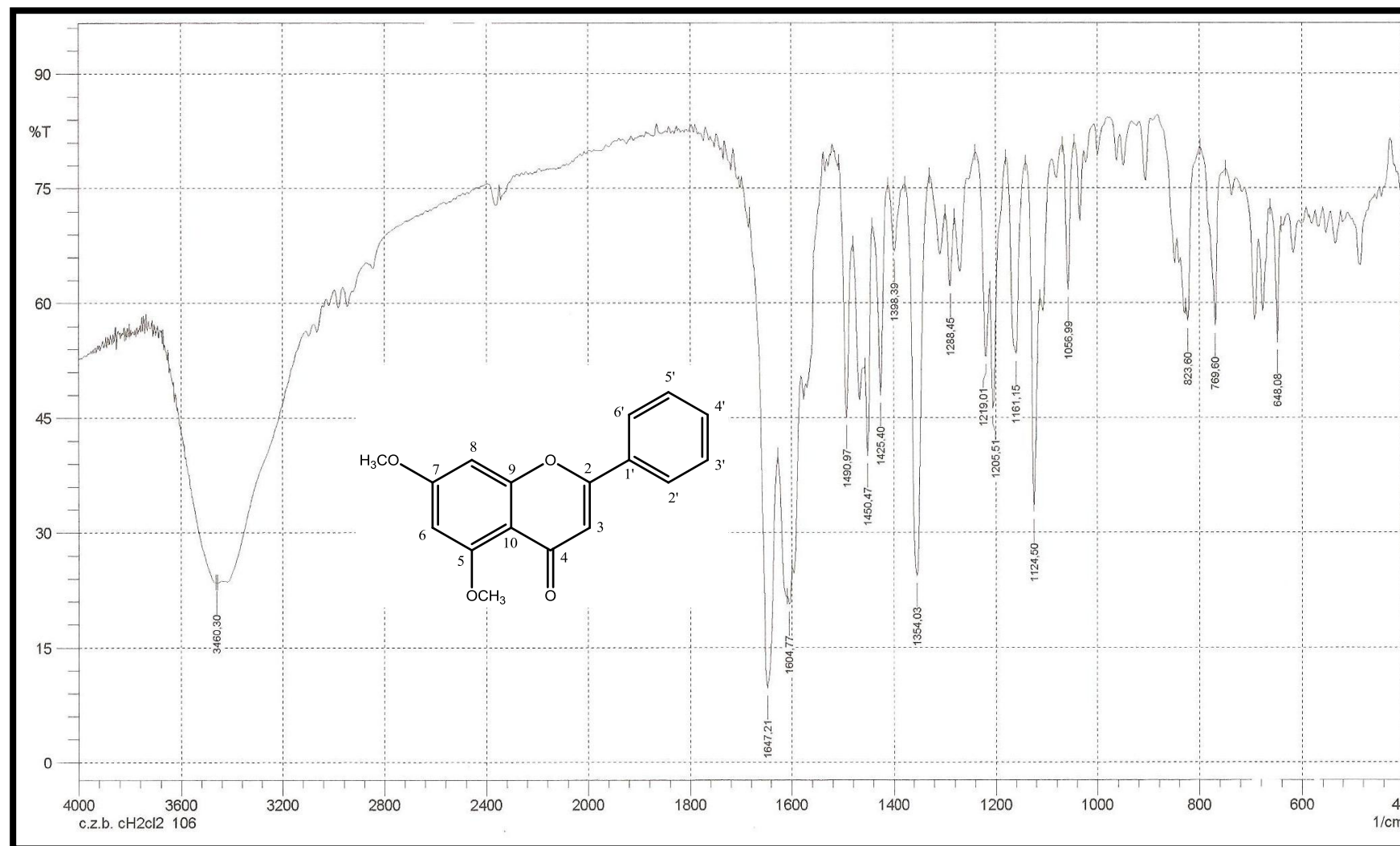
Figura 19- Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Zb-2.

Figura 20 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3 , 125 MHz) de **Zb-2**.



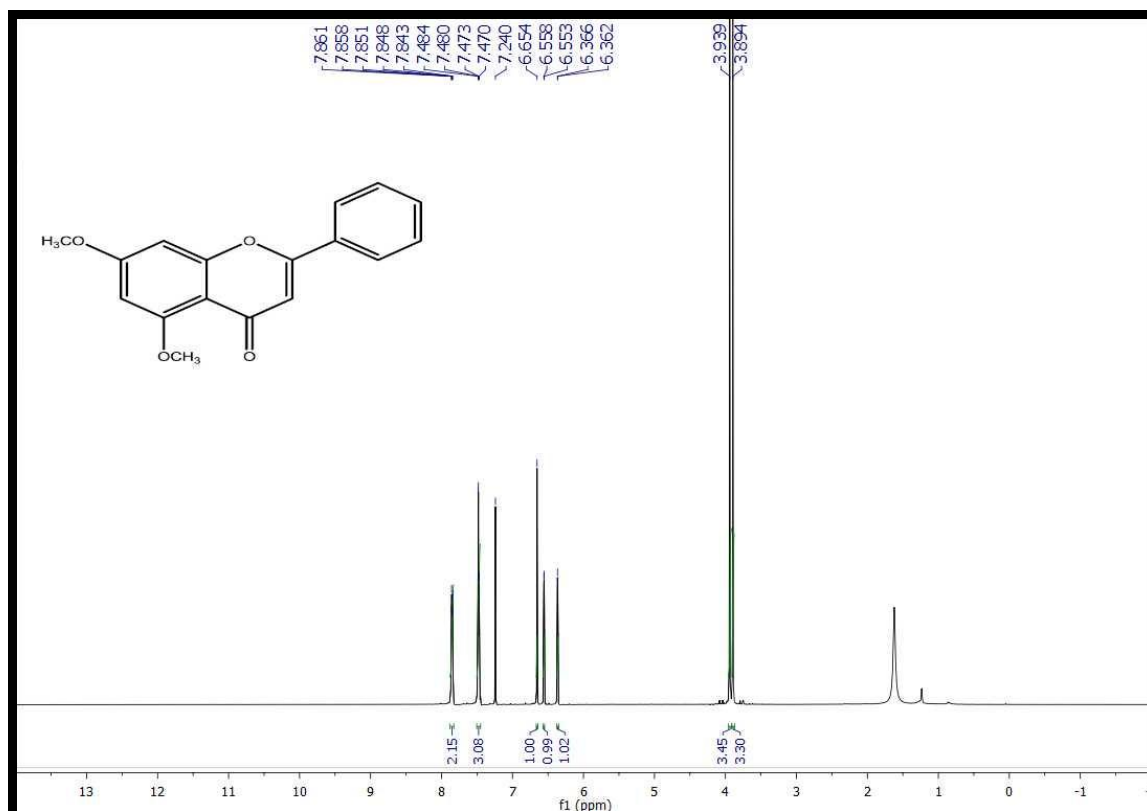
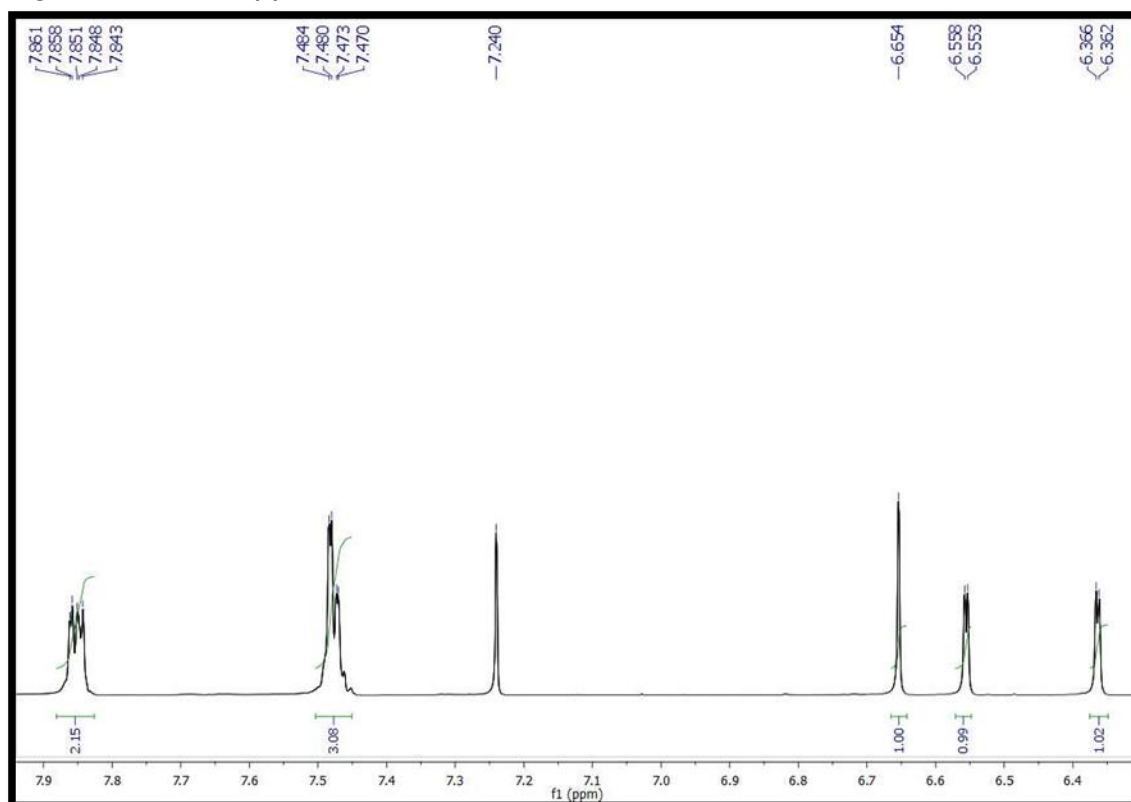
Figura 21- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **Zb-2**.Figura 22- Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **Zb-2** na região de 7,9-6,4 ppm.

Figura 23- Espectro de HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-2**.



Figura 24- Expansão do espectro de HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-2** na região de (130-90 ppm) X (7,9-6,3 ppm).

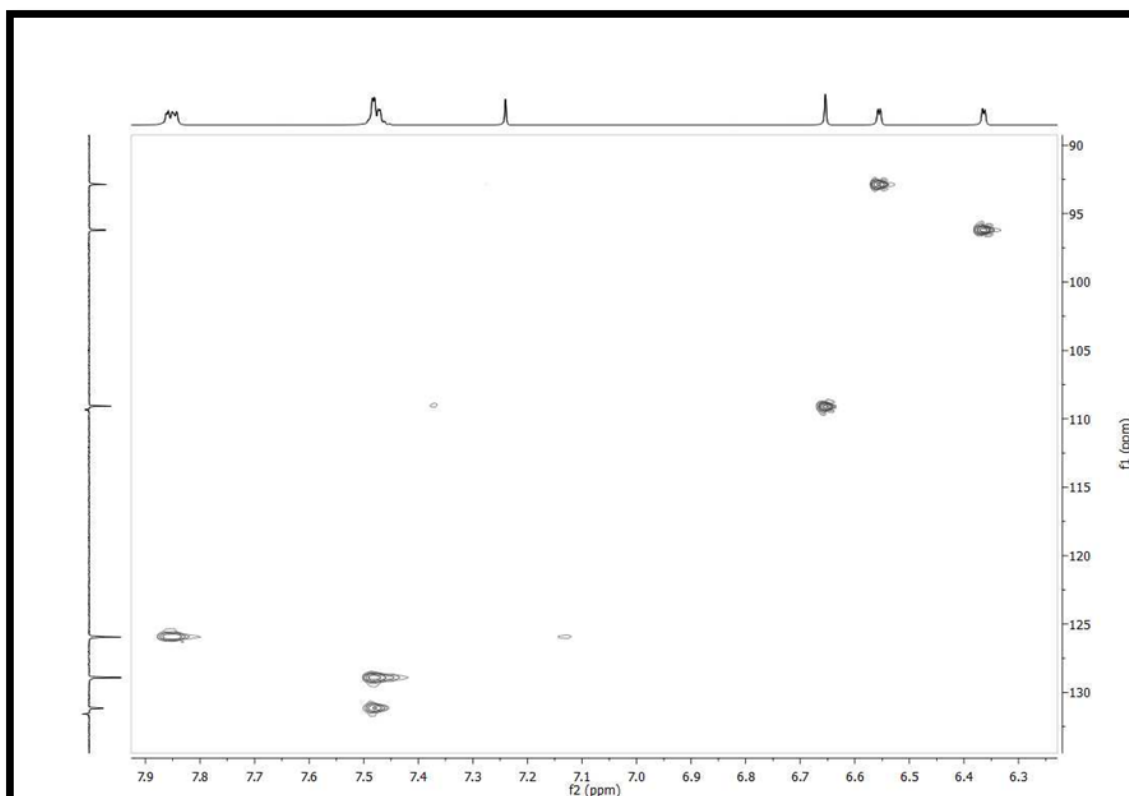


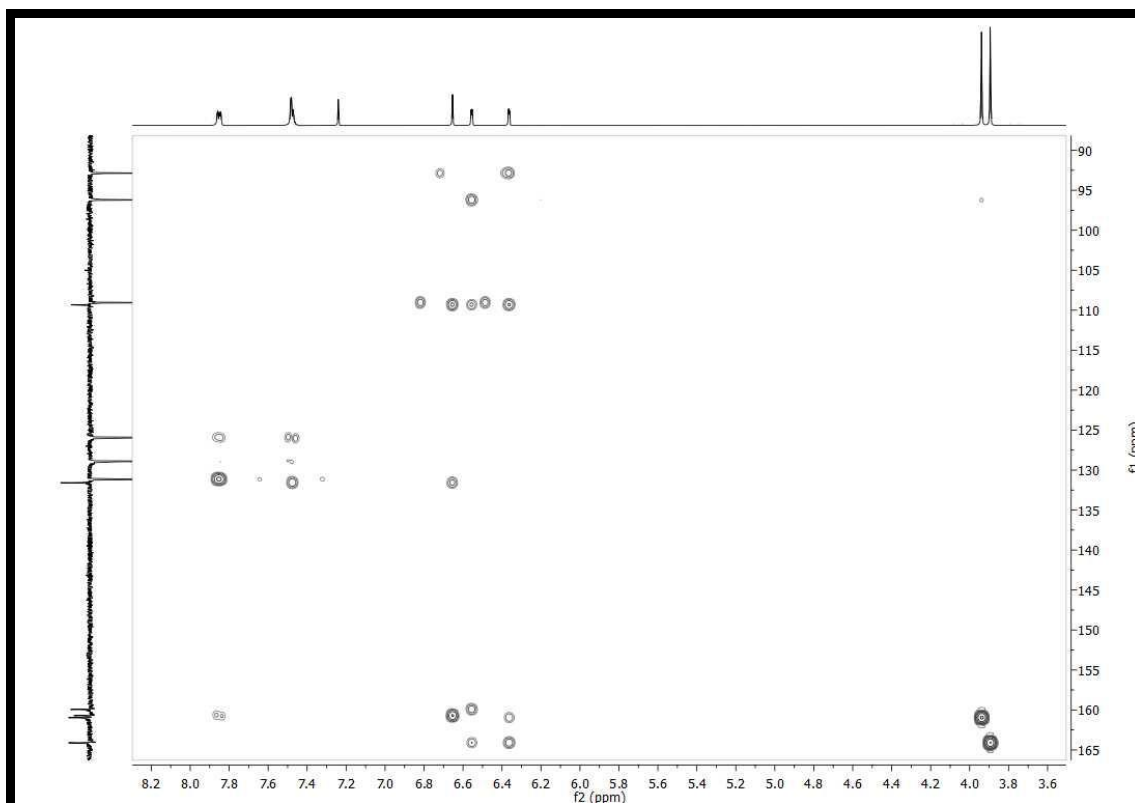
Figura 25- Espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-2**.**Figura 26-** Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-2** na região de (165-90 ppm) x (8,2-3,6 ppm).

Figura 27- Espectro de NOESY (CDCl_3 , 500 MHz) de **Zb-2**.



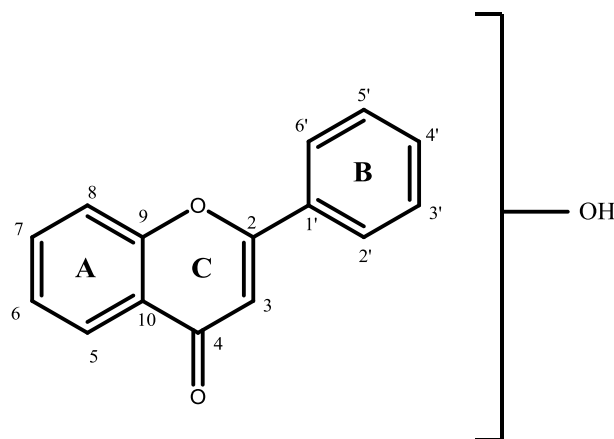
5.1.3. Determinação Estrutural de Zb-3

A substância codificada como Zb-3 foi isolada na forma de cristais amarelados, com ponto de fusão na faixa entre 162-168°C, condizente com o ponto de fusão relatado na literatura 166-168°C (SUTTHANUT; SRIPANIDKULCHAI; JAY, 2007) e massa de 14,0 mg.

O espectro de infravermelho (Figura 28, pág. 96) mostrou sinais característicos de hidroxila fenólica, não impedida estericamente, na presença de uma banda de grande intensidade em 3446 cm^{-1} . O sinal em 1668 cm^{-1} foi atribuído a C=O de cetona. No entanto, os sinais observados para a hidroxila (OH) e para a carbonila (C=O) estavam deslocados para frequências menores o que sugere que a OH deva estar quelada. A presença de duas bandas fortes uma de um estiramento C-O-C próxima de 1250 cm^{-1} (1201,65 cm^{-1}) e um estiramento simétrico próximo de 1040 (1039,63 cm^{-1}) sugeriam a presença de um éter arílico. Essa suspeita foi corroborada pela presença de mais duas bandas fortes uma entre 950 e 815 (806,25 cm^{-1}) e uma simétrica perto de 775 cm^{-1} (769,60 cm^{-1}) características de deformação de anel em epóxidos dissubstituídos (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Além dessas deformações pode-se observar ainda sinais de estiramento de anel aos pares em 1600 cm^{-1} (1587,42 cm^{-1}) e 1475 cm^{-1} (1494,83 cm^{-1}) que indicaram a presença de anel aromático (PAVIA et al., 2010).

No espectro de RMN ^{13}C -BB (CDCl_3 , 125 MHz) e na sua expansão (Figuras 29, pág. 97) observou-se a presença de 14 sinais correspondentes a 16 carbonos sendo destes sete sinais de carbonos não hidrogenados, oito para carbonos metínicos e um para carbono metílico (Tabela 6, pág 94). A presença dos sinais para carbonos metínicos em δ_{C} 105,88, oxibenzílico em δ_{C} 163,97 e carbonílico em δ_{C} 182,46, sugeriu para **Zb-3** a existência de um esqueleto de flavona, como observado para **Zb-1** e **Zb-2**. O sinal para carbono metínico aromático em δ_{C} 162,22 sugeriu a presença de um carbono oxigenado.



Além destes sinais o espectro de ^{13}C ainda apresentou sinais em δ_{C} 105,72 característico de carbono não hidrogenado (C-10), e sobreposição de sinais para carbonos metínicos em δ_{C} 126,27 e 129,06, atribuídos aos carbonos nas posições C-6'; C-3'/C-5', respectivamente.

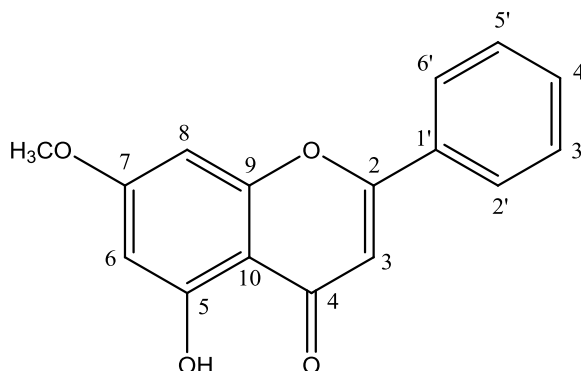
No espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz), Figura 30 (pág. 97) absorções na forma de multipletos em δ_{H} 7,86 e 7,51, com integrais para dois e três hidrogênios foram compatíveis com os hidrogênios H-2'/6' e H-3'/4'/5', respectivamente, sugerindo para **Zb-3** um padrão de substituição para o anel B de sistema AB de flavonoides semelhante ao observado em **Zb-1** e **Zb-2**. A presença de dois dupletos com integral para um hidrogênio cada acoplando meta entre si em δ_{H} 6,35 ($J = 2,0$ Hz) e δ_{H} 6,48 ($J = 2,0$ Hz) compatíveis com as posições H-6 e H-8 sugeriram a presença de um anel A de flavonoide 5,7-dissubstituído como o observado em **Zb-2**, no entanto a presença de dois singletos um em δ_{H} 12,69 com integral para um hidrogênio e outro em δ_{H} 3,86 com integral para três hidrogênios sugeriram a presença de hidroxila na posição 5 e metoxila na posição 7.

As correlações diretas $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ obtidas no espectro de HMQC (500 MHz, CDCl_3) (Figura 32, pág., 99) de **Zb-3** são apresentados na Tabela 7 (pág., 95).

O espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, CDCl_3) (Figura 33, pág. 100) e suas expansões (Figura 34, 35, 36 e 37, pág. 100, 101 e 102) confirmou a proposta do substituinte no carbono da posição 7, uma vez que apresentou correlações entre os hidrogênios δ_{H} 3,86 (s) e carbonos δ_{C} 165,6 (C-7). A hidroxila foi assinalada na posição 5 através das correlações a duas ligações

com o carbono δ_C 162,2 (C-5) e a três ligações com os carbonos δ_C 98,2 (C-6) e 105,7 (C-10).

A compilação dos dados obtidos nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C em comparação com os valores obtidos na literatura (Tabela 6, pág. 94), permitiram identificar **Zb-3** como a 5-hidroxi-7-metoxiflavona, substância isolada pela primeira vez no gênero *Zornia*.



De acordo com a literatura, a 5-hidroxi-7-metoxiflavona apresenta diversas atividades farmacológicas, como por exemplo, as atividades antimicrobiana (RACOWSKI, 2007), antioxidante (LIAO, 2012) e antiviral (SOOKKONGWAREE, 2006).

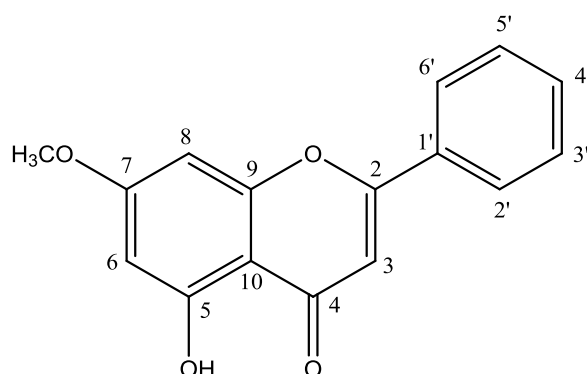


Tabela 6 – Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de **Zb-3** em CDCl_3 (125 e 500 MHz, respectivamente) e da 5-Hidroxi-7-metoxiflavona em CDCl_3 (100 e 400 MHz, respectivamente) Sutthanut; Sripanidkulchai; Jay, 2007

Zb-3			Literatura	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C} (CDCl_3 100 MHz)	δ_{H} (CDCl_3 400MHz)
2	163,97	-	163,8	-
3	105,88	6,64 (s)	105,7	6,64 (s)
4	182,46	-	182,4	-
5	162,22	-	162,1	-
6	98,19	6,35 (d) $J = 2$ Hz	98,1	6,36 (d) $J = 2$ Hz
7	165,62	-	165,5	-
8	92,68	6,48 (d) $J = 2$ Hz	92,6	6,48 (d) $J = 2$ Hz
9	157,80	-	157,7	-
10	105,72	-	105,6	-
1'	131,33	-	131,2	-
2'	126,27	7,86 (m)	126,2	7,87 (m)
3'	129,06	7,51 (m)	129,0	7,52 (m)
4'	131,79	7,51 (m)	131,5	7,52 (m)
5'	129,06	7,51 (m)	129,0	7,52 (m)
6'	126,27	7,86 (m)	126,2	7,87 (m)
5 OH-	-	12,69 (s)	-	12,73 (s)
7 OCH₃-	55,79	3,86	55,7	3,88 (s)

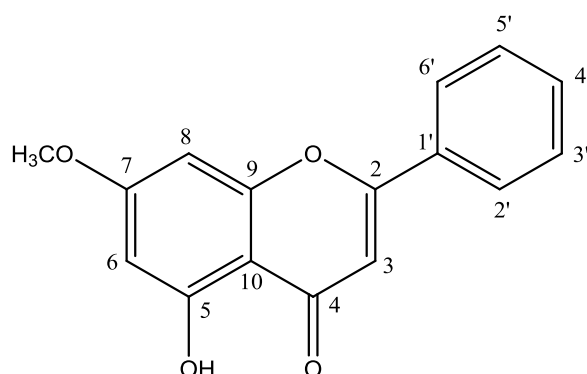


Tabela 7 – Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para **Zb-3**, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3 .

C	HMQC		HMBC	
	δ_{H} (J Hz)	δ_{C}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	-	163,97		
4	-	182,46		
5	-	162,22		
7	-	165,62		
9	-	157,80		
10	-	105,72		
1'		131,33		
CH				
3	6,64 (s)	105,88	C-2/C-4	C-10/C-1'
6	6,35 (d)	98,19	C-5/C-7	C-10/C-8
8	6,48 (d)	92,68	C-9/C-7	C-10/C-6
2'	7,86 (m)	126,27		C-4'/C-6'/C-3'
3'	7,51 (m)	129,06	C-2'	C-5'/C-1'
4'	7,51 (m)	131,79		C-6'/C-2'
5'	7,51 (m)	129,06	C-6'	C-3'/C-1'
6'	7,86 (m)	126,27		C-4'/C-2'/C-3'
7 H ₃ CO-	3,86 (s)	55,79	C-7	
5 HO-	12,69		C-5	C-6/C-10

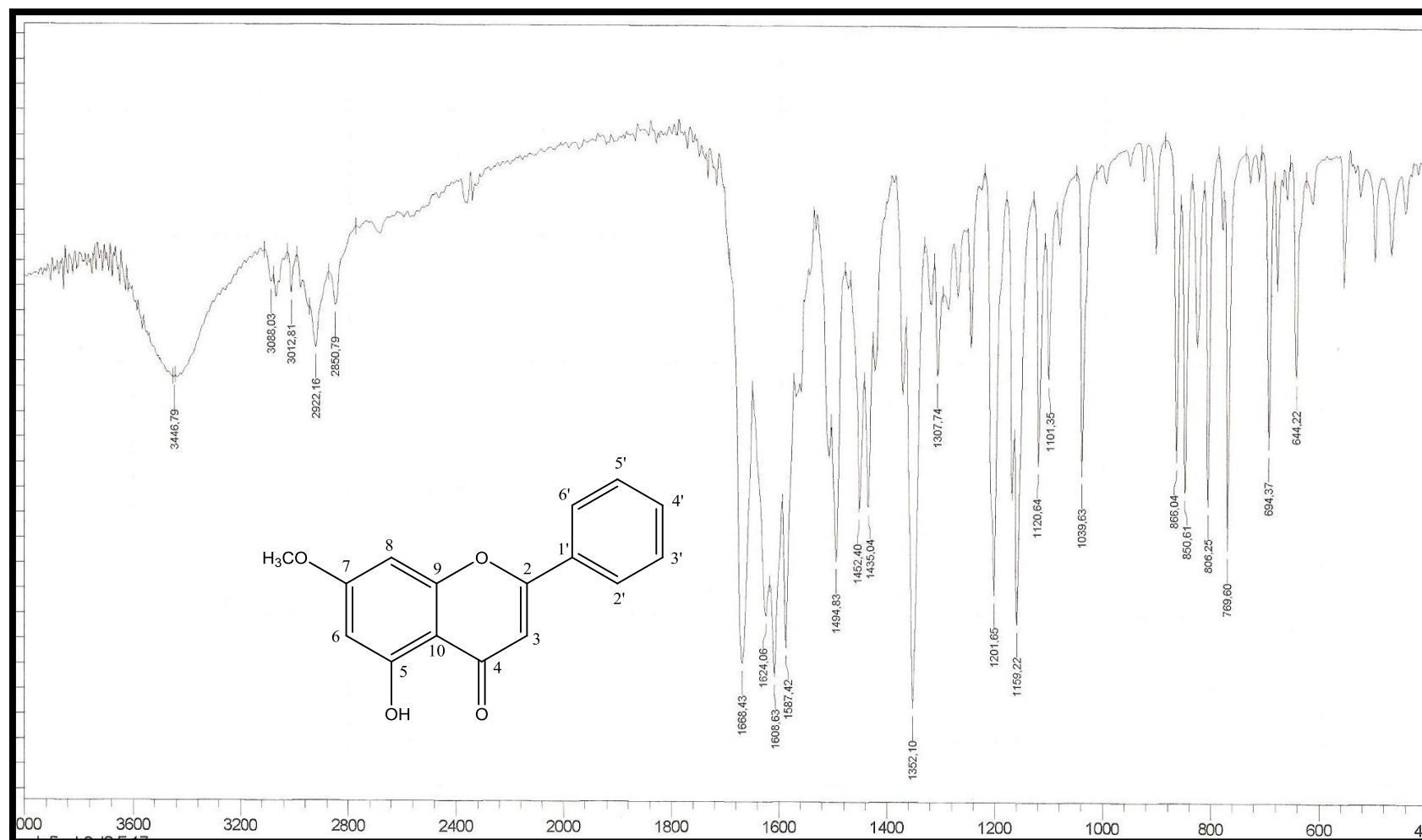
Figura 28- Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Zb-3.

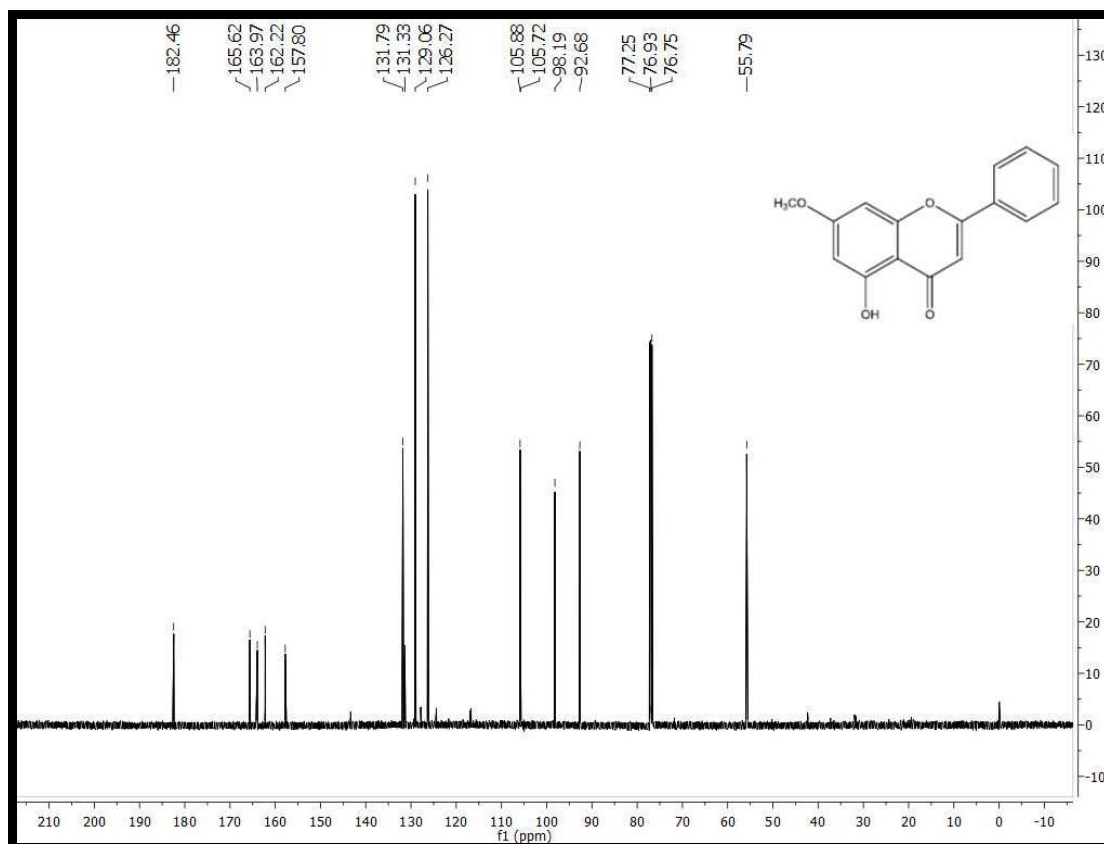
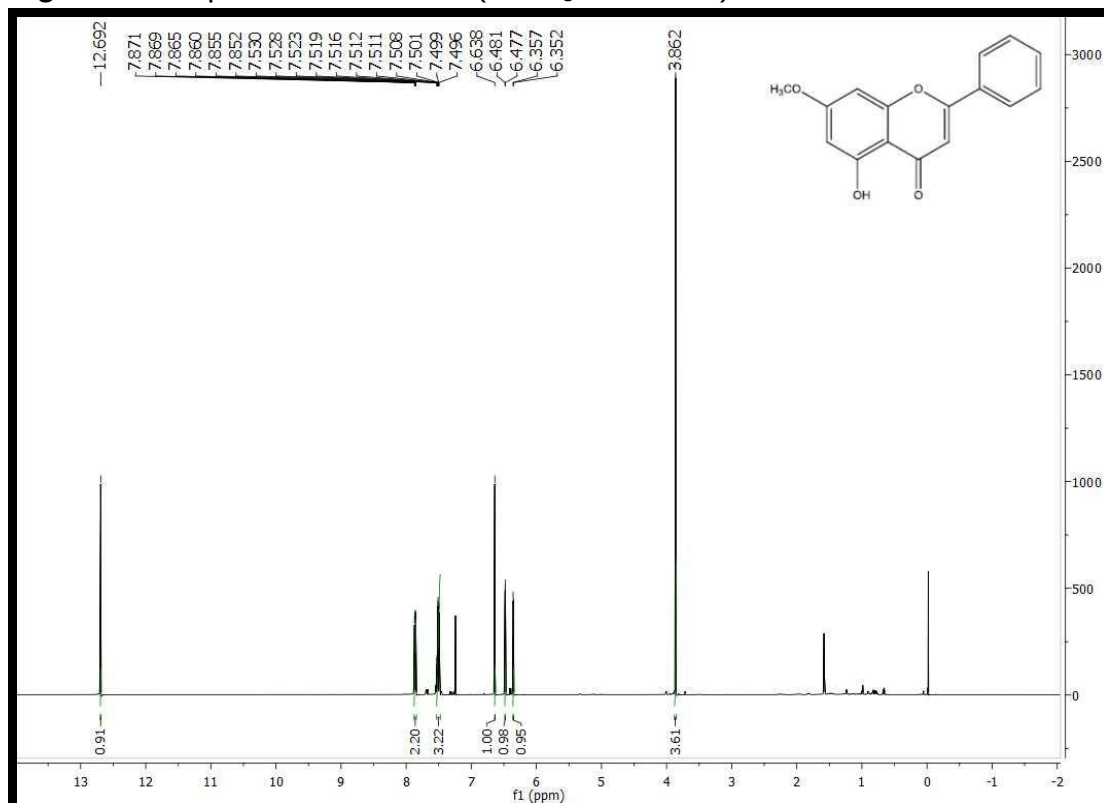
Figura 29- Espectro de RMN ^{13}C -BB (CDCl_3 , 125 MHz) de **Zb-3**.Figura 30- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **Zb-3**.

Figura 31- Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **Zb-3** na região de 7,9-6,3 ppm.

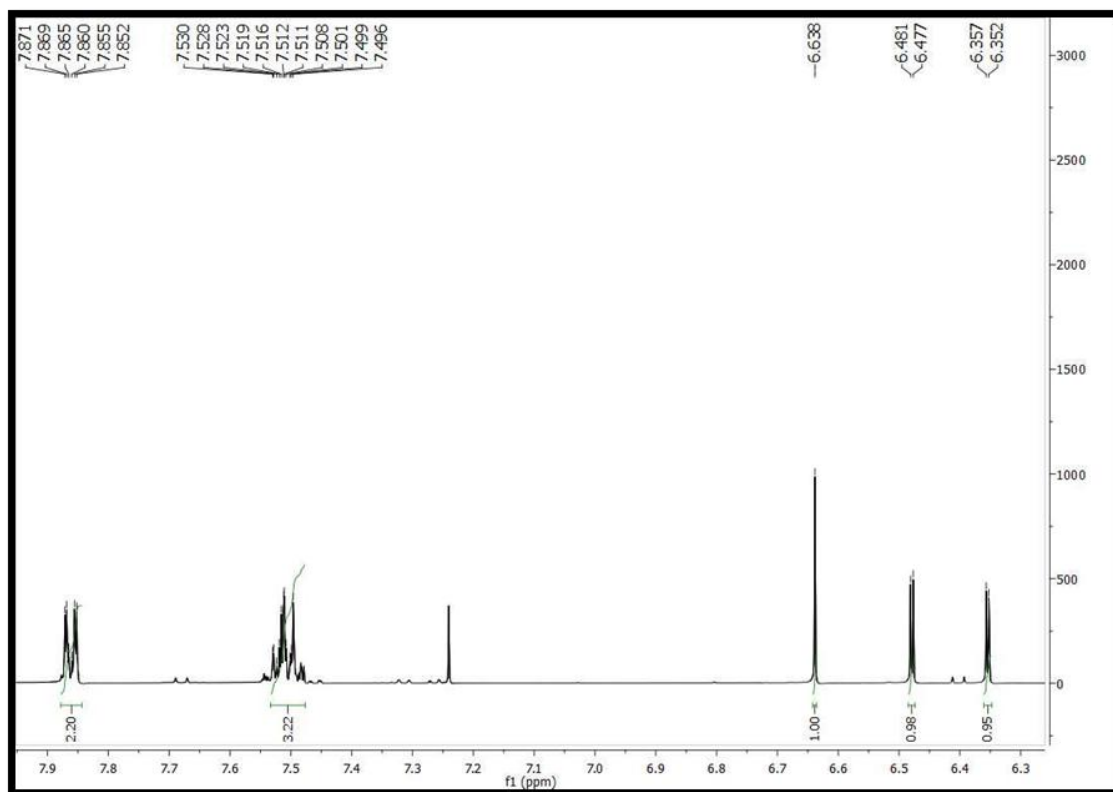


Figura 32- Espectro de HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-3**.

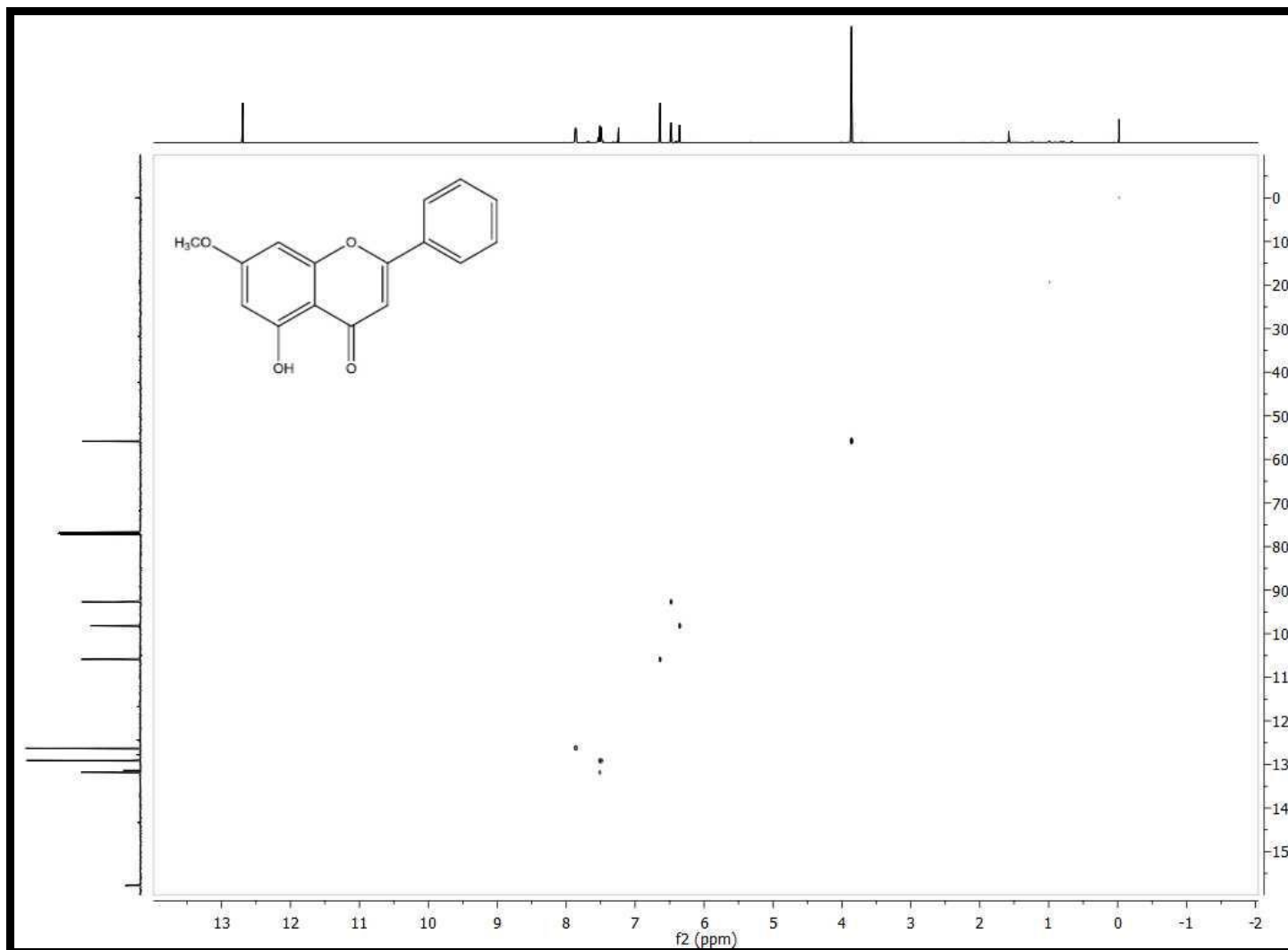


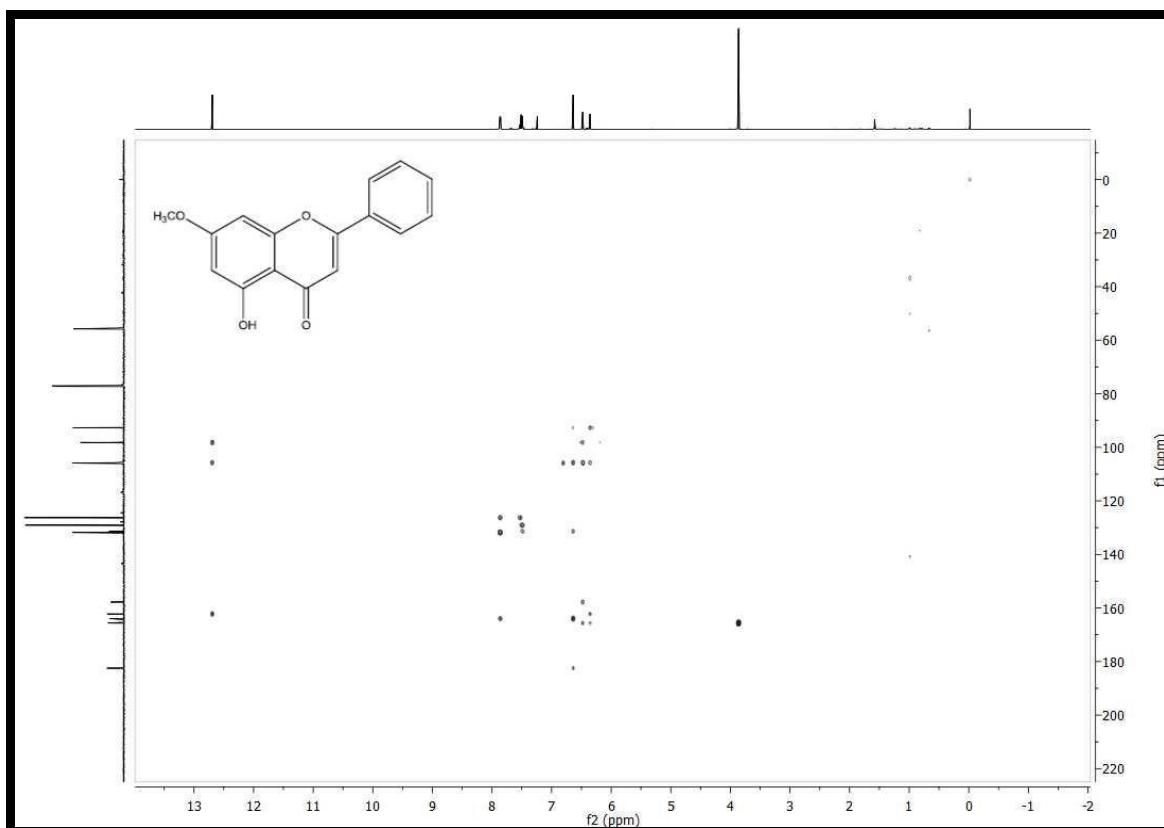
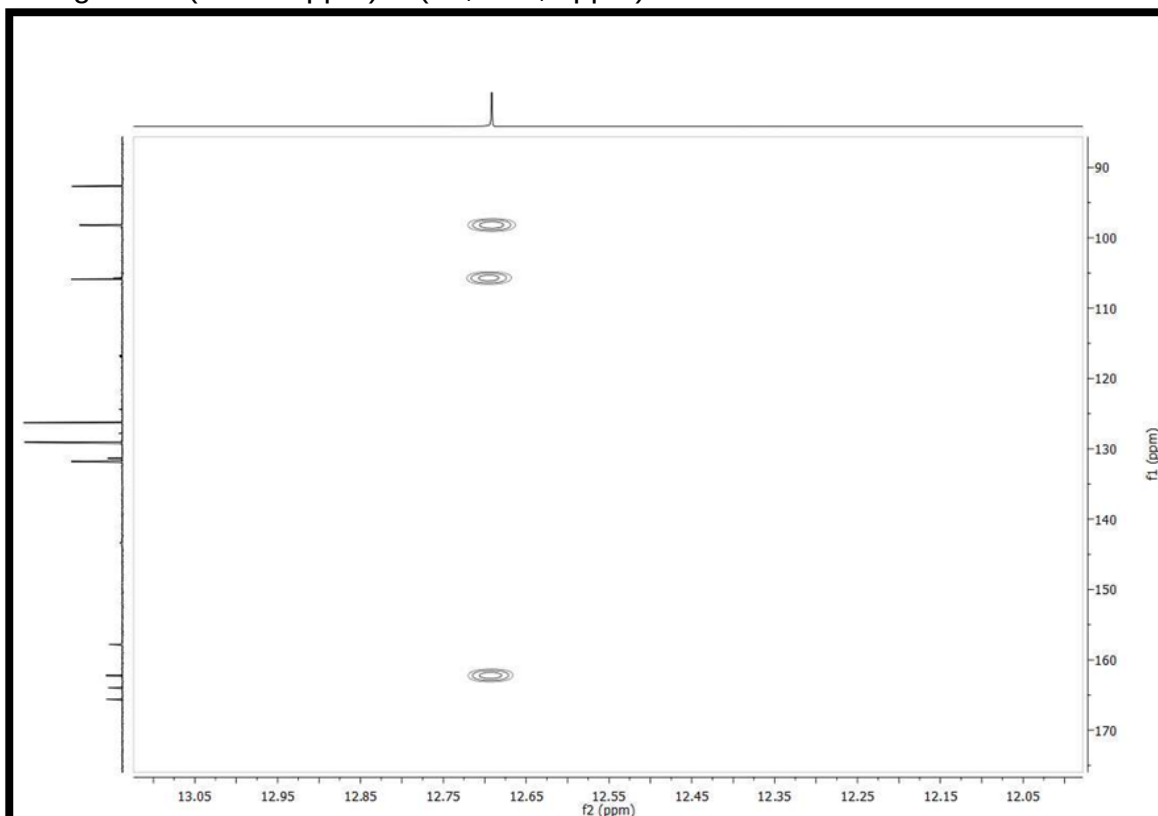
Figura 33- Espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-3**.**Figura 34-** Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-3** na região de (170-90 ppm) X (13,0-12,0 ppm)

Figura 35- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-3** na região de (108-91 ppm) X (6,8-6,25 ppm)

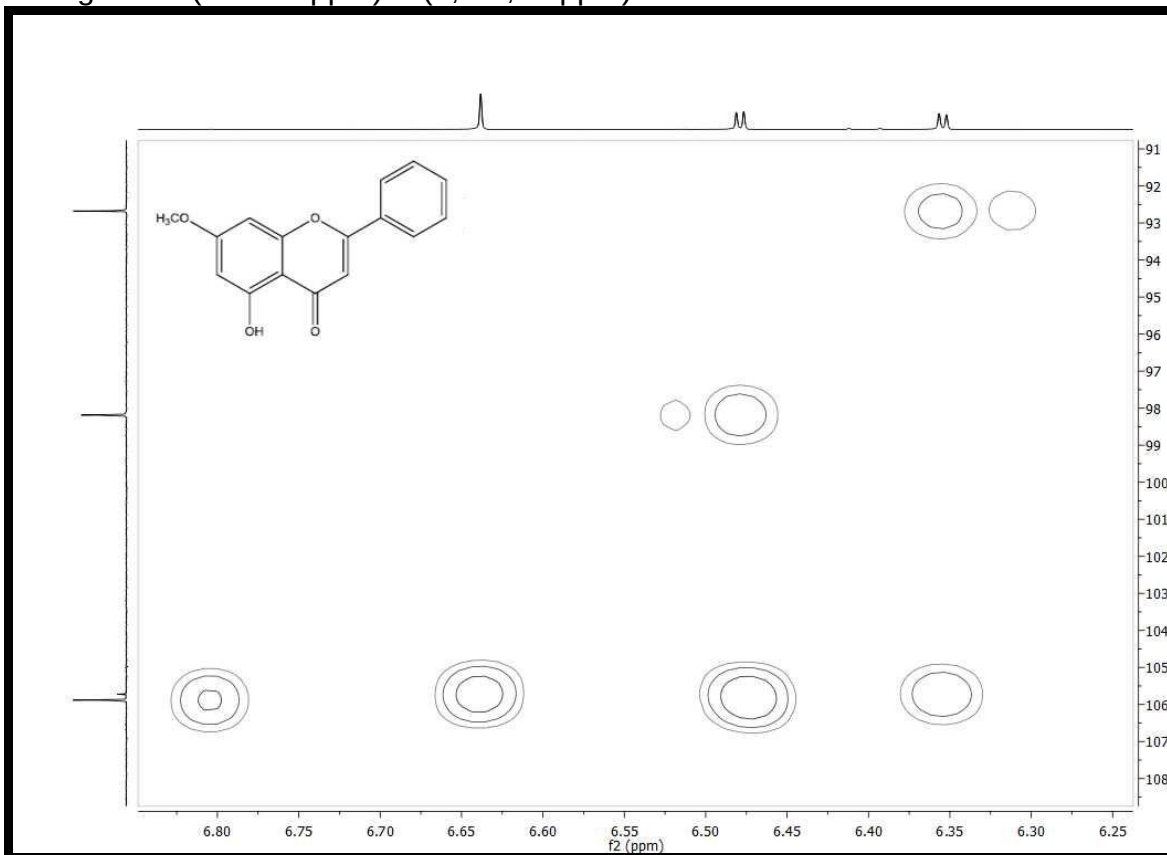


Figura 36- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-3** na região de (133-125 ppm) X (7,9-6,6 ppm)

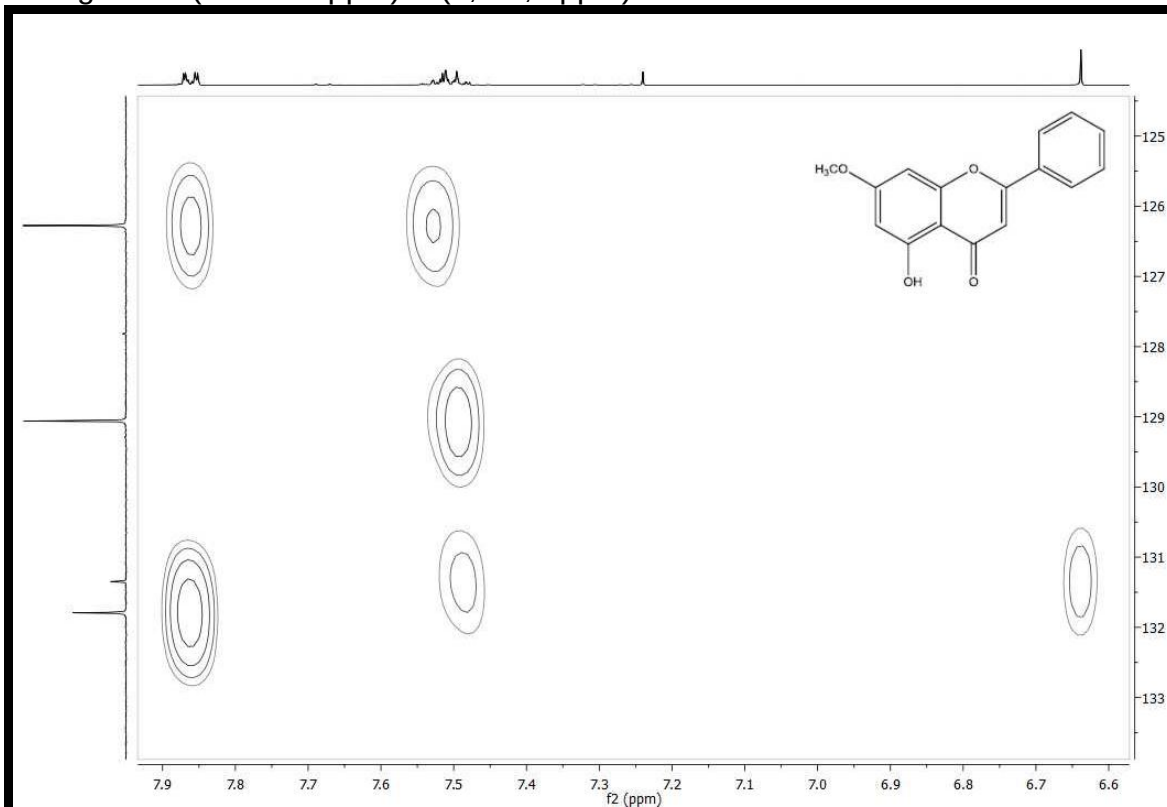
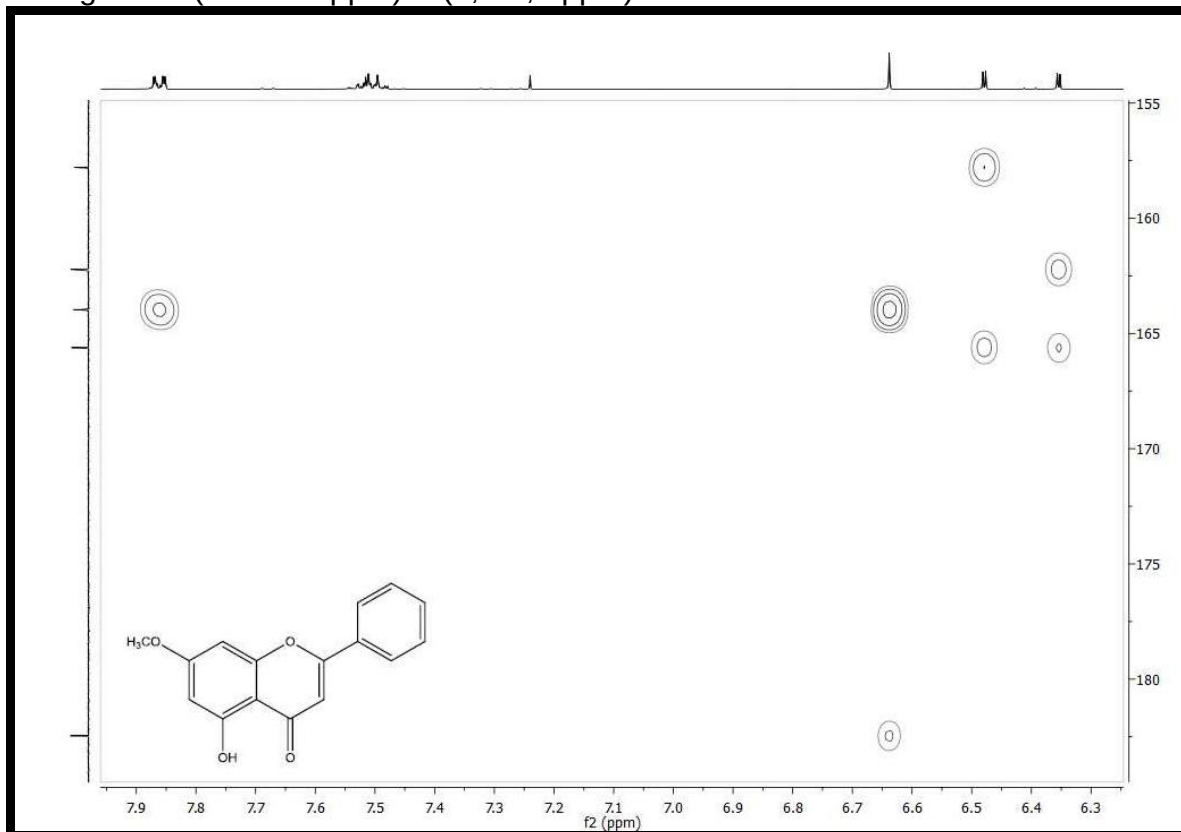


Figura 37- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-3** na região de (184-154 ppm) X (8,1-6,1 ppm)



5.1.4. Determinação Estrutural de Zb-4

A substância codificada como **Zb-4** foi isolada na forma de cristais brancos, com ponto de fusão na faixa 126-128°C condizente com o ponto de fusão relatado na literatura por Bandara e colaboradores (1990) na faixa de 127-129°C. O espectro de massas de baixa resolução utilizando o modo ESI+ (Figura 38, pág. 107), mostrou o pico da molécula protonada em m/z 271,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (calc. 270,09).

No espectro de carbono ^{13}C -APT (Figura 39, pág. 108) a presença de no mínimo três sinais referentes a carbonos não hidrogenados δ_{C} 162,14; 161,84; 159,75; 157,76, aliado a ausência de sinal referente a carbono carbonílico sugere a presença de um esqueleto de pterocarpano (PELTER; WARD; GRAY, 1976). Essa sugestão de esqueleto é corroborada pela presença de sinais para carbonos referentes a átomos de carbonos aromáticos diretamente ligados a átomos de oxigênio de éter.

No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) (Figura 40, pág. 109) foi possível observar na região de hidrogênios a presença de dois duplos dubletos em δ_{H} 6,56 ($J = 8,5$ e $2,5$ Hz) e 6,45 ($J = 8,5$ e $2,5$ Hz) e quatro dubletos em δ_{H} 7,32 ($J = 8,5$ Hz), δ_{H} 7,22 ($J = 8,5$ Hz), δ_{H} 6,37 ($J = 2,0$ Hz) e δ_{H} 6,36 ($J = 2,5$ Hz), sugestivos da presença de dois anéis aromáticos trissubstituídos na estrutura de **Zb-4**. Além destes sinais a presença do duplo duplete geminado δ_{H} 4,26 ($J = 10$ Hz) em H-6 e δ_{H} 3,59 ($J = 10$ Hz) em H-6a também foi observada (Figura 42, pág. 110).

O espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 39, pág. 108) revelou 16 sinais correspondentes a 16 carbonos, sendo 6 não hydrogenados (δ_{C} : 162,14, 161,84, 159,75, 157,76, 120,49 e 112,85), 8 metínicos (δ_{C} : 133,14, 125,86, 110,52, 106,91, 103,96 e 97,25), 1 metilênico (δ_{C} : 67,13) e 1 oximetílico (δ_{C} : 55,74)

No espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500/125 MHz) (Figura, 43, pág. 110) foi possível observar correlações diretas δ_{H} 7,32/ δ_{C} 133,14, δ_{H} 6,55/ δ_{C} 110,52, δ_{H} 6,36/ δ_{C} 103,96 e δ_{H} 5,51/ δ_{C} 79,41, que aliadas as correlações a longa distância observadas no espectro de HMBC (Figura 46, pág. 112) δ_{H} 7,32/ δ_{C} 159,75, δ_{C} 157,76 e δ_{C} 79,41; δ_{H} 6,55/ δ_{C} 159,75, δ_{C} 112,85 e δ_{C} 103,96; δ_{H} 6,36/ δ_{C} 159,75; δ_{C} 103,96; δ_{C} 157,76; δ_{C} 112,85 e δ_{C} 110,52; δ_{H} 5,51/ δ_{C} 157,76, δ_{C} 133,14, δ_{C} 112,85, δ_{C} 67,13 e δ_{C} 40,44, possibilitou atribuir os sinais em δ_{C} 133,14, δ_{C} 110,52, δ_{C} 159,75, δ_{C} 157,76, δ_{C} 112,85 e δ_{C} 79,41 para as posições C-1, C-2, C-3, C-4, C-4a, C-11b e C-11a, respectivamente além de sugerir que os valores em δ_{C} 67,13 e δ_{C} 40,44 seriam referentes as posições C-6 e C-6a, respectivamente.

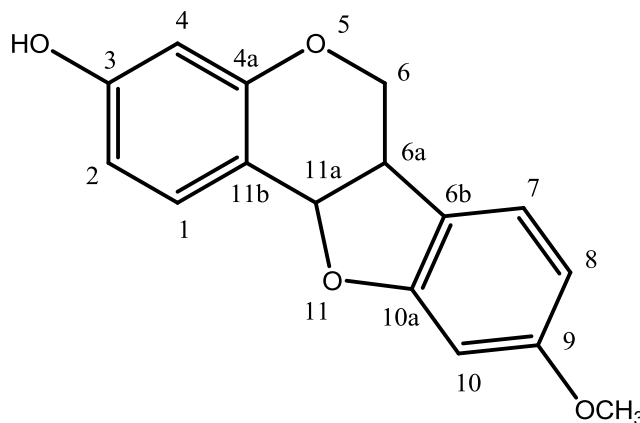
As correlações δ_{H} 4,26/ δ_{C} 67,13 e δ_{H} 3,60/ δ_{C} 67,13 e δ_{C} 40,44, reveladas no HMQC (Figura 44, pág. 111), juntamente com as seguintes correlações observadas no HMBC δ_{H} 4,26/ δ_{C} 157,76, δ_{C} 120,49, δ_{C} 79,41 e δ_{C} 40,44 e δ_{H} 3,60/ δ_{C} 161,84, δ_{C} 157,76, δ_{C} 120,49, δ_{C} 79,41, confirmaram para as posições C-6 e C-6a os sinais em δ_{C} 67,13 e δ_{C} 40,44 e sugeriram os valores de δ_{C} 161,84 e δ_{C} 120,49, para as posições C-10a e C-6b (Figura 43, pág. 110).

O hidrogênio em δ_{H} 7,22 correlaciona-se diretamente com o sinal em δ_{C} 125,86 e a longa distância com os sinais em δ_{C} 162,14, δ_{C} 161,84 e δ_{C} 40,44,

confirmando os sinais δ_C 161,84 e δ_C 40,44, para as posições C-10a e C-6b, além de sugerir δ_C 125,86 e δ_C 162,14 para as posições C-7 e C-9. Com a correlação δ_H 3,75/ δ_C 162,14, observada no espectro de HMBC pode-se concluir que a metoxila esta inserida no carbono da posição 9 (Tabela 9, pág. 106).

Ainda no espectro de HMQC as correlações δ_H 6,45/ δ_C 106,91 e δ_H 6,37/ δ_C 97,25 (Figura 45, pág. 111), e correlações no HMBC δ_H 6,45/ δ_C 162,14, δ_C 120,49 e δ_C 97,25 e δ_H 6,37/ δ_C 162,14, δ_C 161,84, δ_C 120,49 e δ_C 106,91 pode assinalar δ_C 106,91 e δ_C 97,25 para C-8 e C-10 e confirmar δ_C 162,14, δ_C 161,84, δ_C 120,49 para C-9, C-10a e C-6b (Figura 46, pág. 112).

A compilação dos dados de RMN 1H e ^{13}C , 1D e 2D do composto **Zb-4** em comparação com os valores obtidos na literatura (Tabela 8 e 9, pág., 105 e 106) permitiram identificar este composto como 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (medicarpin). Esta substância esta sendo relatada pela primeira vez no gênero *Zornia*.



De acordo com a literatura, o pterocarpano apresenta diversas atividades farmacológicas, como por exemplo, as atividades antibacteriana (RIGHI, et al., 2011), antituberculose (HASAN, et al., 2012), citotóxica (FALCÃO, et al., 2005) e antioxidante (WANG; WENG; CHENG, 2000).

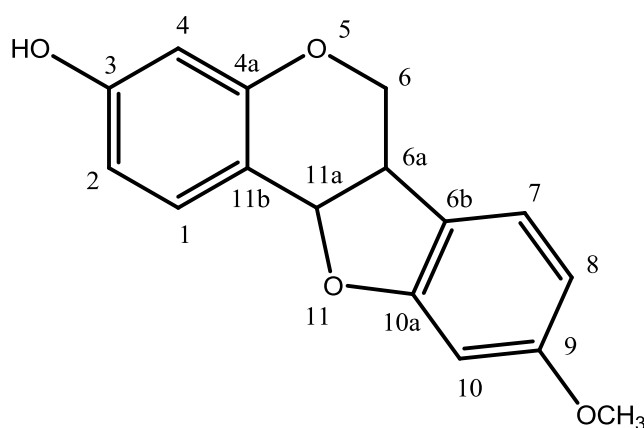


Tabela 8 — Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de **Zb-4** em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (125 e 500 MHz, respectivamente) e do medicarpin em CD_3OD_3 (100 e 400 MHz, respectivamente) BAIL et al., 2000.

Zb-4			Literatura (CD ₃ OD ₃)	
	δ _C	δ _H	δ _C (100MHz)	δ _H (400MHz)
1	133,14	7,32 (d, J= 8,5 Hz)	133,2	7,28/d (J = 8,4 Hz)
2	110,52	6,56 (dd, J= 8,0 e 2,5Hz)	110,8	6,49/dd (J = 8,4; 2,4 Hz)
3	159,75	-	160,2	-
4	103,96	6,36 (d J = 2,5Hz)	104,1	6,30/d (J = 2,4Hz)
5	-	-	-	-
6	67,13	4,26 (dd J= 16 e10 Hz) 3,60 (dd J= 16 e10 Hz)	67,6	4,21/dd (J = 10,7; 5,7 Hz) 3,52 (J = 10,5 Hz)
7	125,86	7,22 (d J= 8,5 Hz)	126,0	7,16/d (J = 8,2 Hz)
8	106,91	6,45 (dd J= 8,5 e 2,5 Hz)	106,8	6,44/dd (J = 8,2; 2,2 Hz)
9	162,14	-	162,7	-
10	97,25	6,37 (d J= 2,0 Hz)	97,6	6,37 (d, J = 2,2 Hz)
4a	157,76	-	158,1	-
6a	40,44	3,60 (dd J= 16,0 e 10 Hz)	41,0	3,51/ddd (J = 10,5; 6,3; 5,7 Hz)
6b	120,49	-	120,9	-
10a	161,84	-	162,1	-
11a	79,41	5,51/d (J= 6 Hz)	80,2	5,46/d (J = 6,3 Hz)
11b	112,85	-	113,0	-
-OCH ₃	55,72	3,75	55,9	3,73

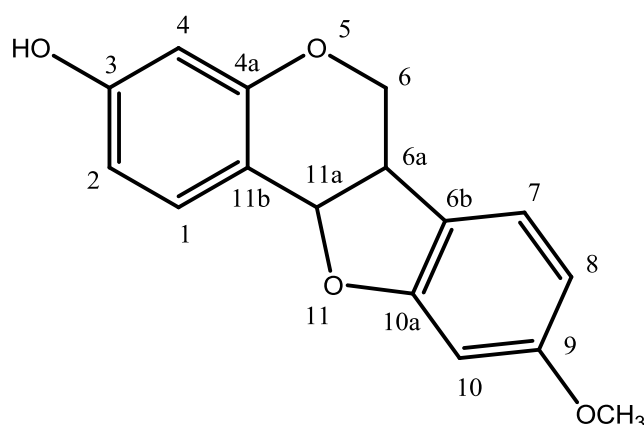


Tabela 9 – Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para **Zb-4**, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

HMQC			HMBC	
CH	δ_{H} (J Hz)	δ_{C}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	7,32/d (J= 8,5 Hz)	133,14		C-11a/C-4a/C-3
2	6,56 (dd, J= 8,0 e 2,5Hz)	110,52		C-4/C-11b
4	6,36 (d J = 2,5Hz)	103,96	C-4a/C-3	C-2/C-11b
5	-	-	-	-
6	4,26 (dd J= 16 e 10 Hz) 3,60 (dd J= 16 e 10 Hz)	67,13	C-6a	C-11a/C-6b/C-4a
7	7,22/d (J= 8,5 Hz)	125,86		C-6a/C-10a
8	6,45 (dd J= 8,5 e 2,5 Hz)	106,91		C-10/C-6b
10	6,37 (d J= 2,0 Hz)	97,25	C-10a	C-8
6a	3,60 (dd J= 16,0 e 10 Hz)	40,44	C-6/C-11a/C-6b	C-7/C-10/C-6/C-11a
6b	-	-		
11a	5,51/d (J= 6 Hz)	79,41	C-6a/C-11b	C-6/C-1/C-4a
11b	-	-		
-OH	-	-		
-OCH ₃	3,75/s	55,72		C-9

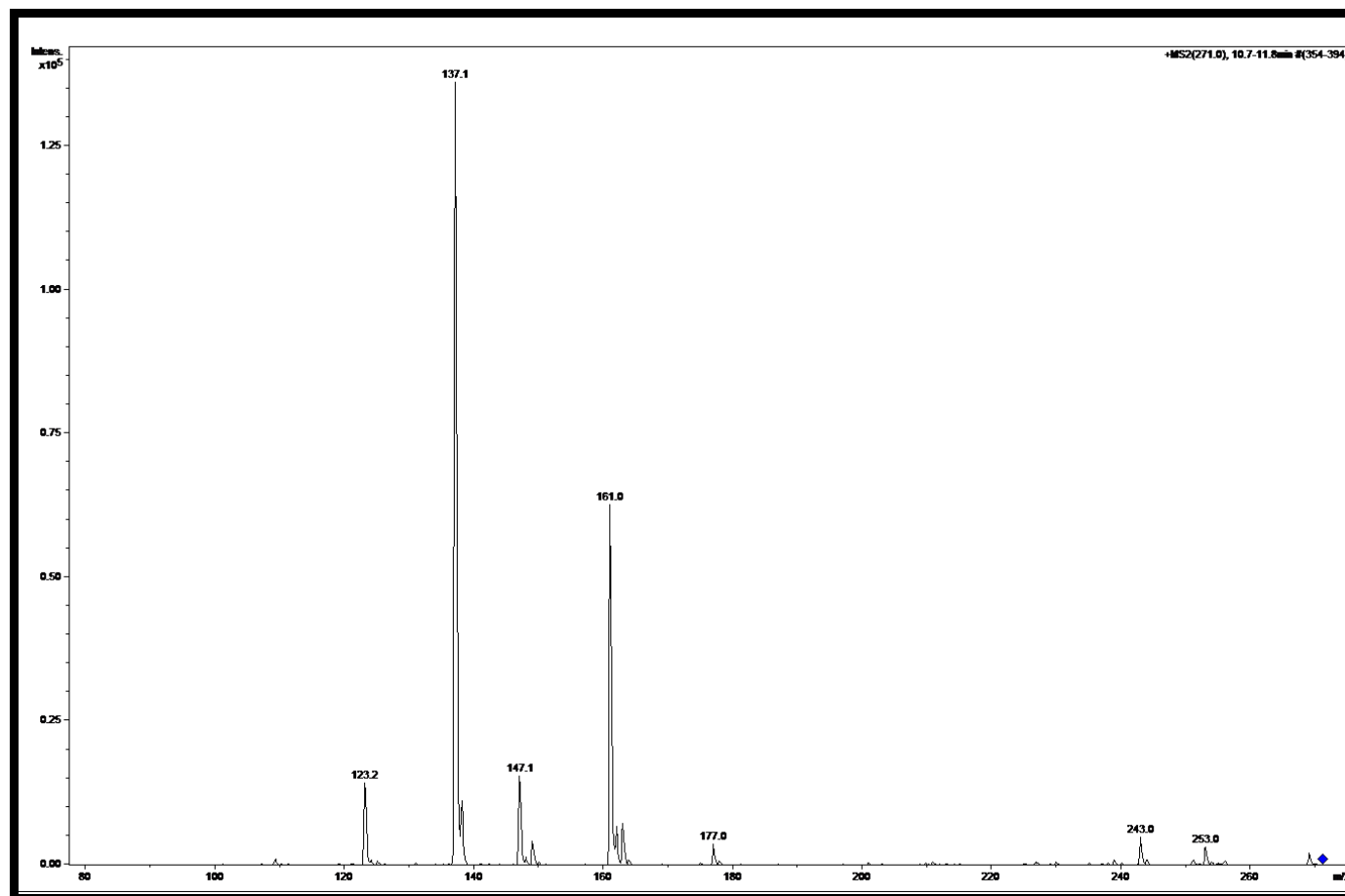
Figura 38- Espectro de massas de baixa resolução de **Zb-4**.

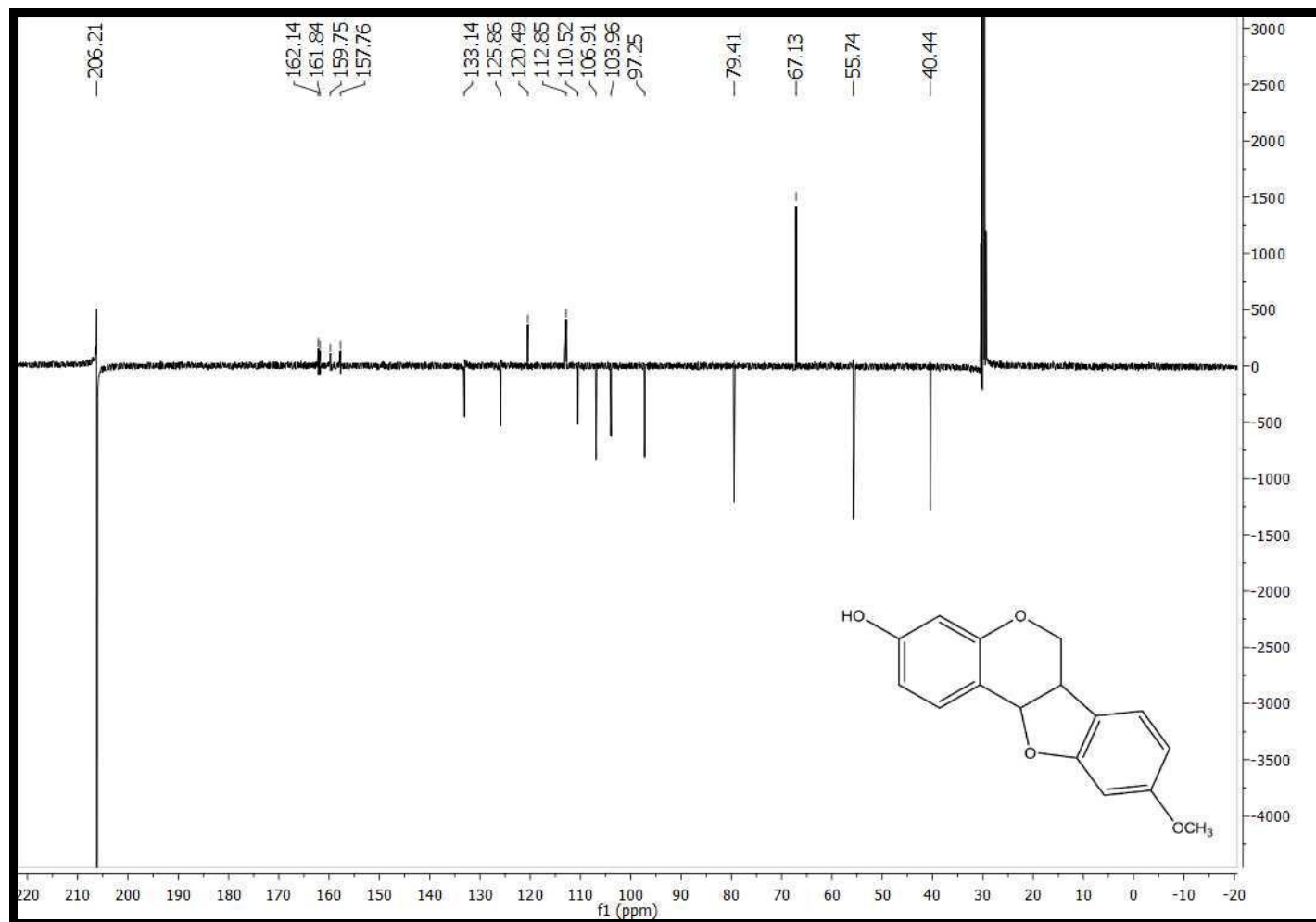
Figura 39- Espectro de RMN ^{13}C -APT ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 125 MHz) de **Zb-4**.

Figura 40- Espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de **Zb-4**.

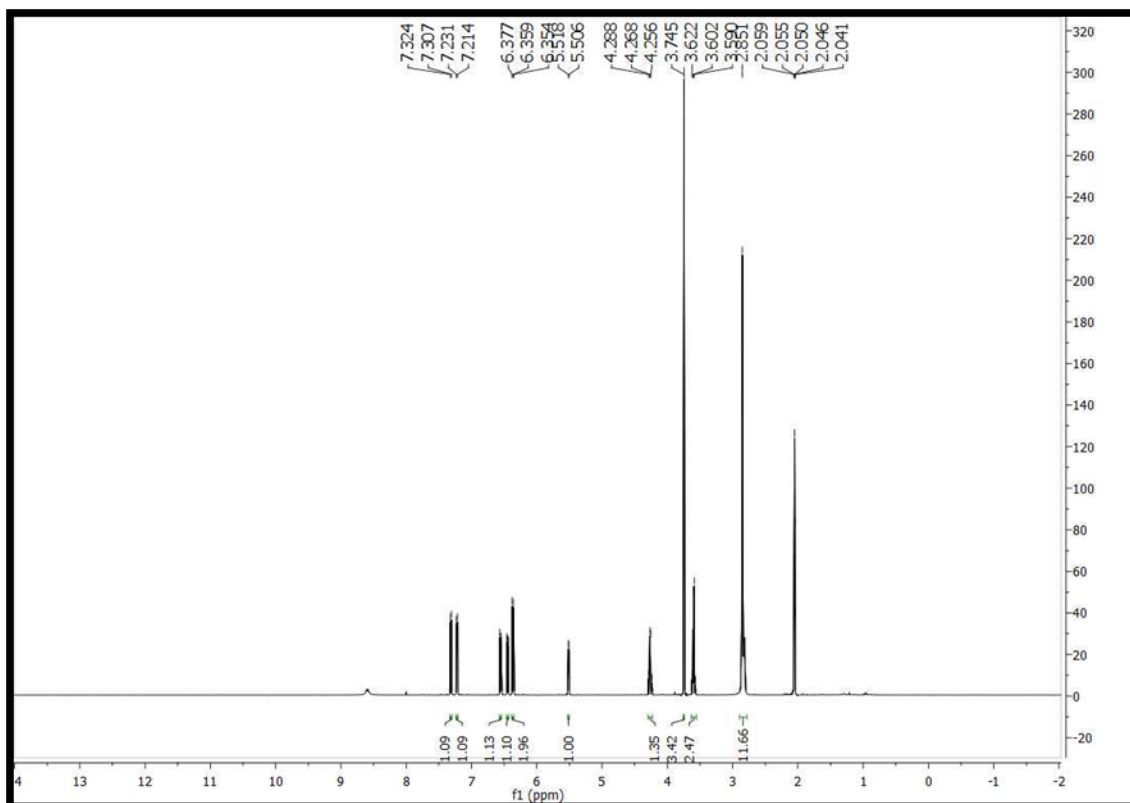


Figura 41- Expansão do espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de **Zb-4** na região 7,35-6,25 ppm.

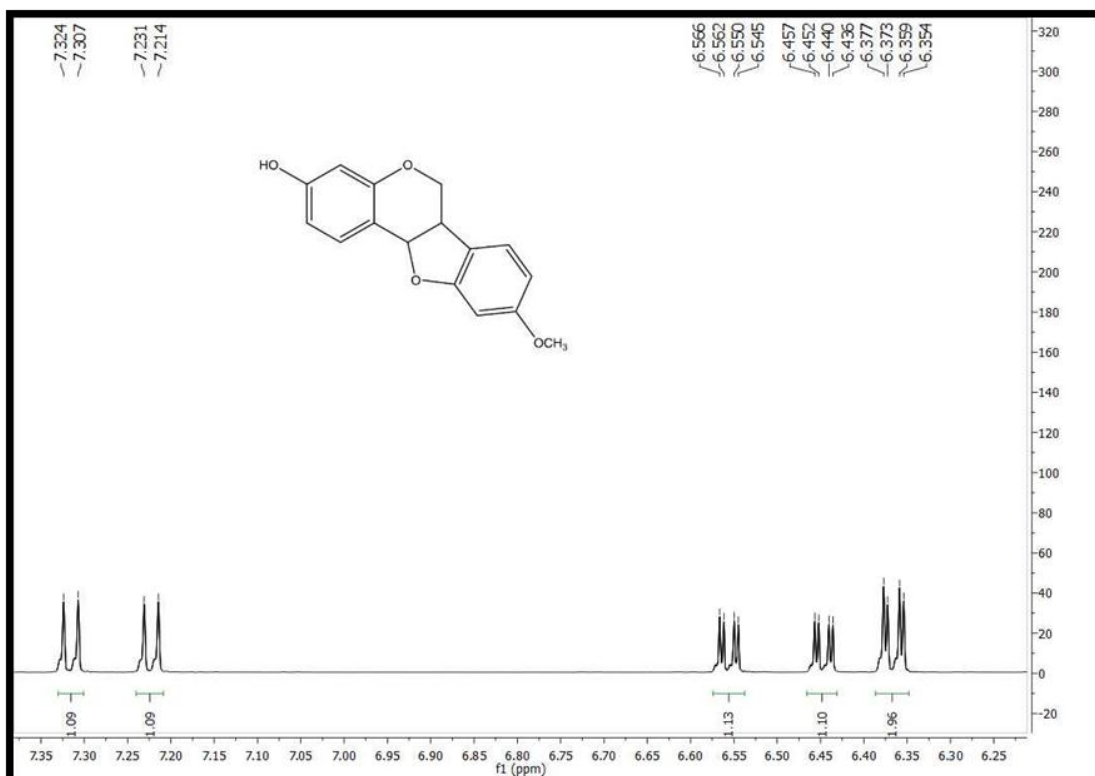


Figura 42- Expansão do espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de **Zb-4** na região 5,6-1,6 ppm.

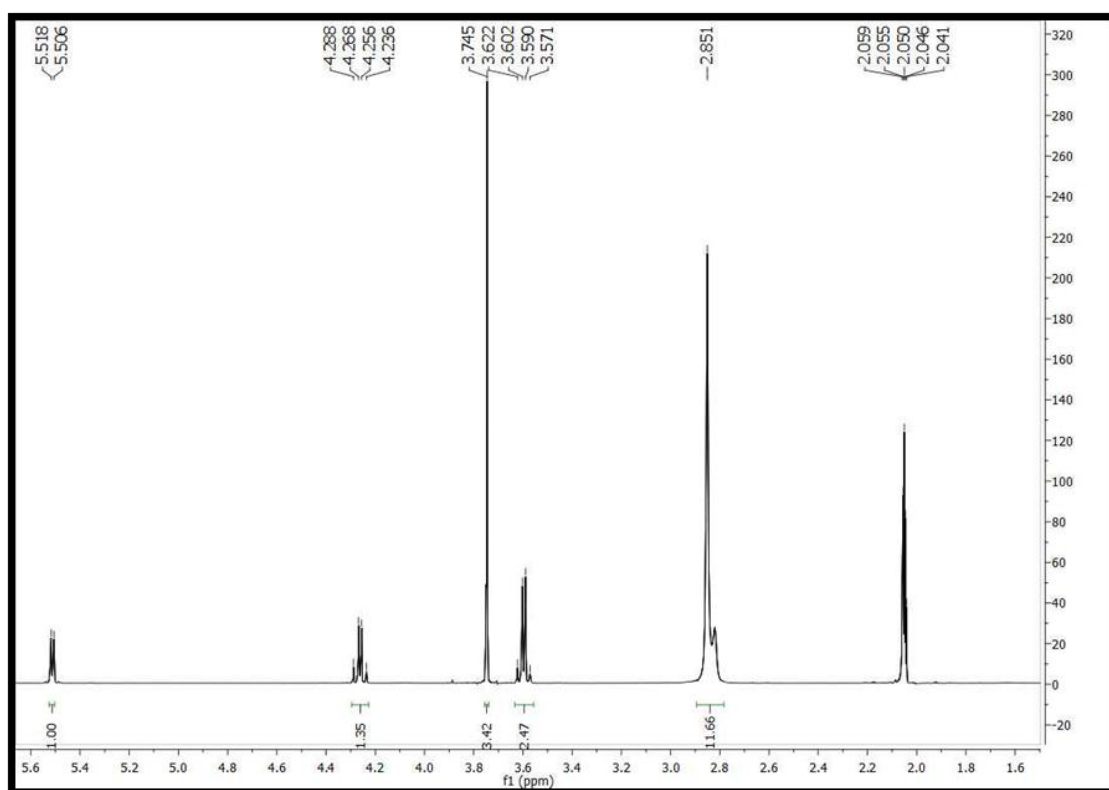


Figura 43- Espectro de HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-4**.

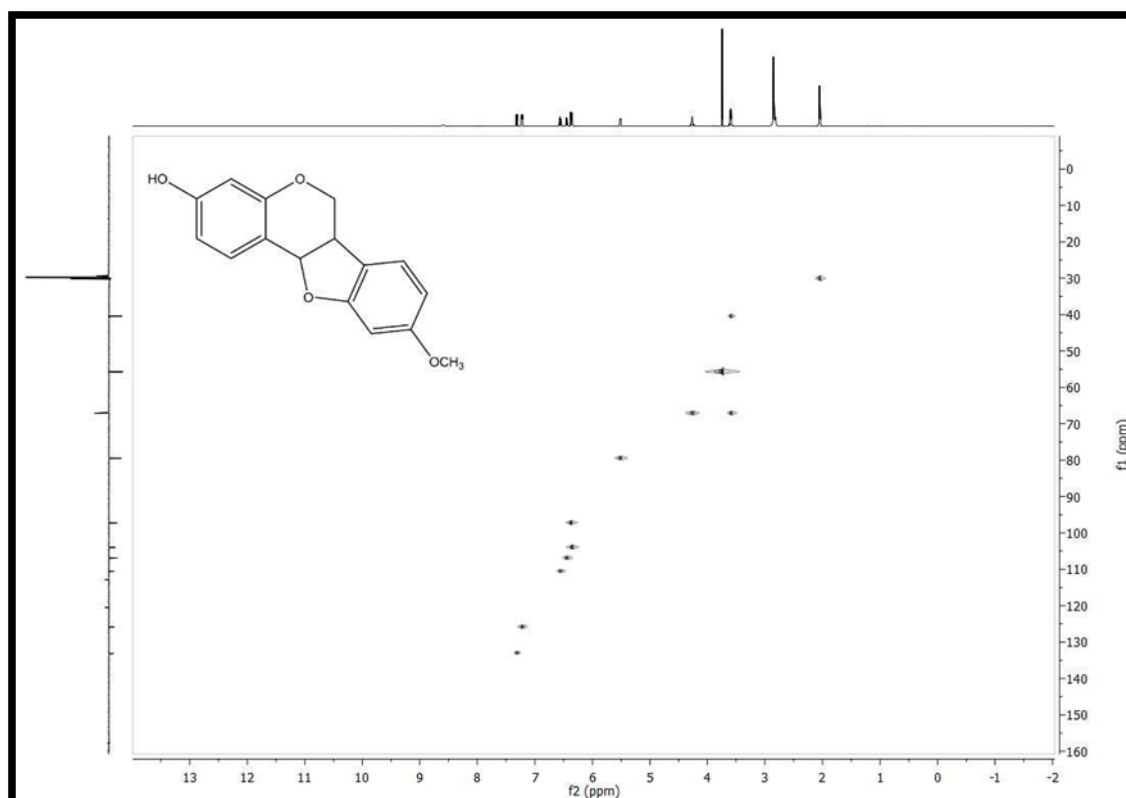


Figura 44- Expansão do espectro de HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-4** na região de (20-80 ppm) X (5,6-1,0 ppm).

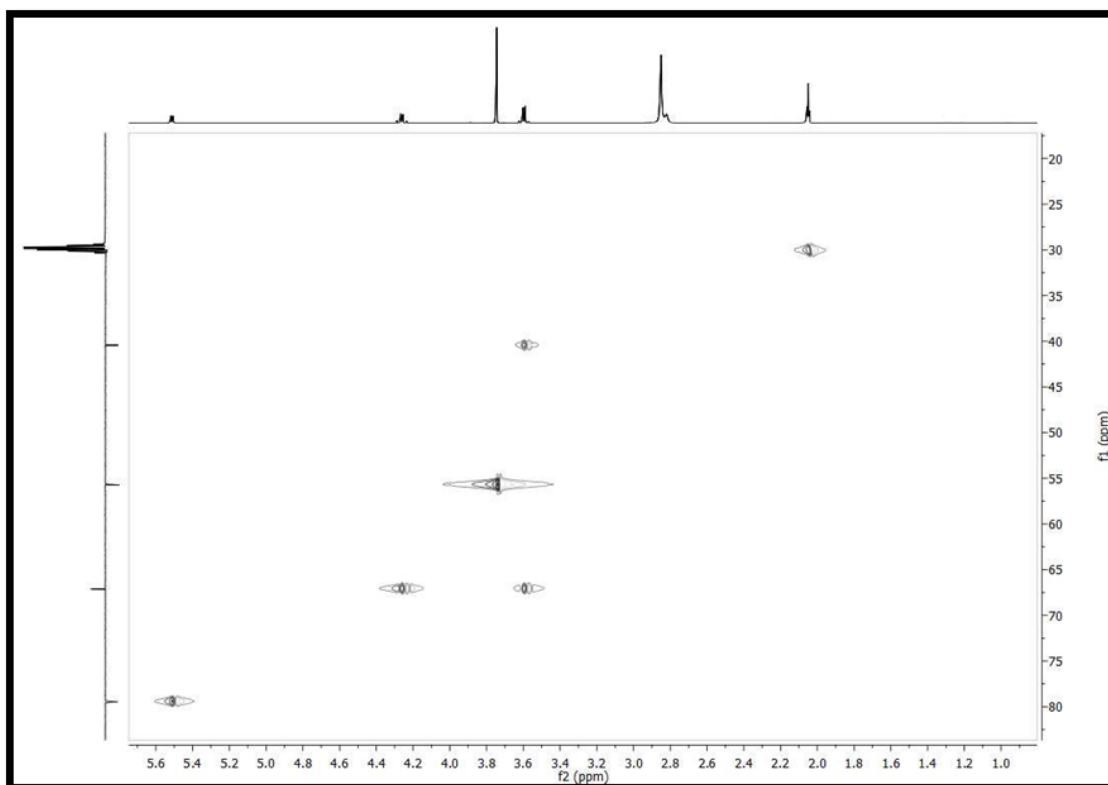


Figura 45- Expansão do espectro de HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-4** na região de (95-135 ppm) X (7,6-6,2 ppm)

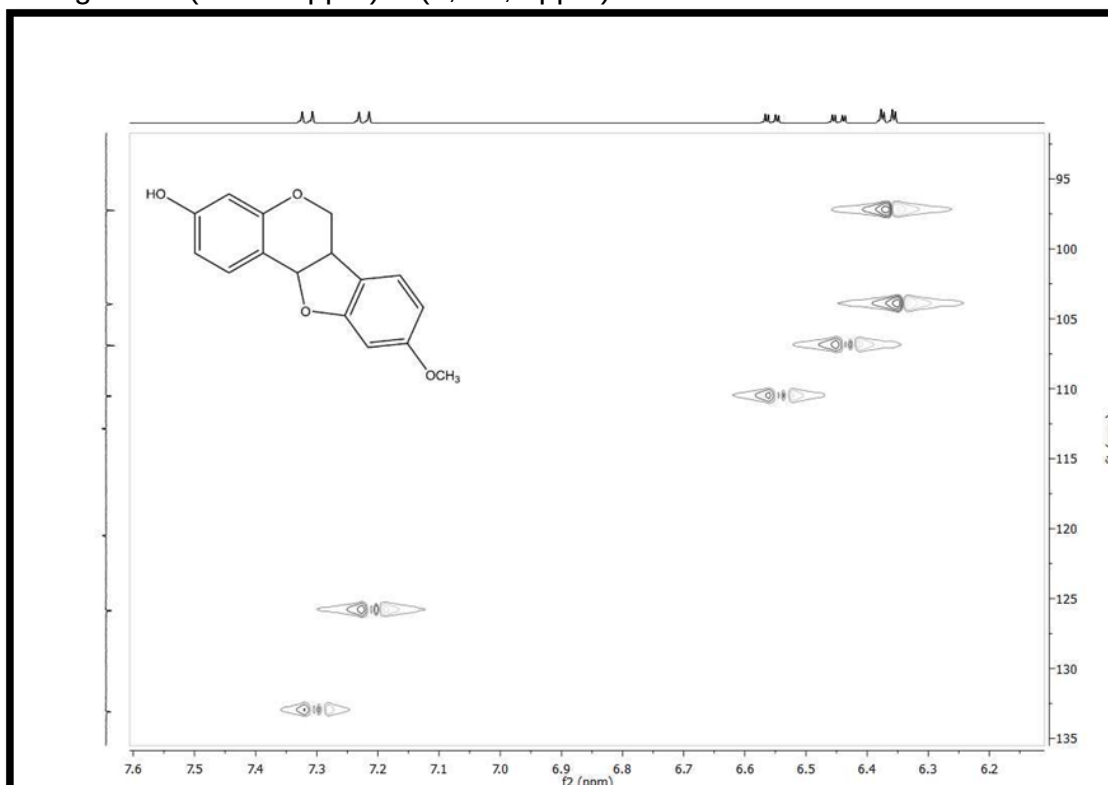


Figura 46- Espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-4**.

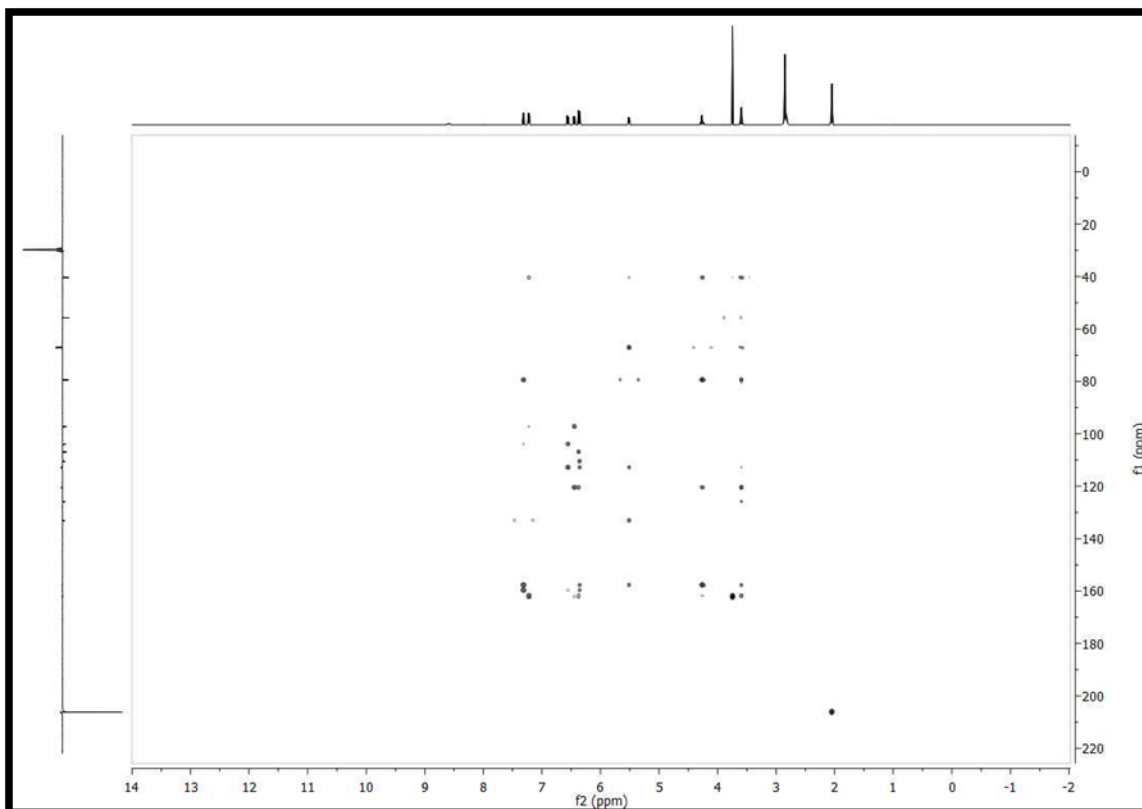


Figura 47- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-4** na região de (40-85 ppm) X (7,6-4,9 ppm).

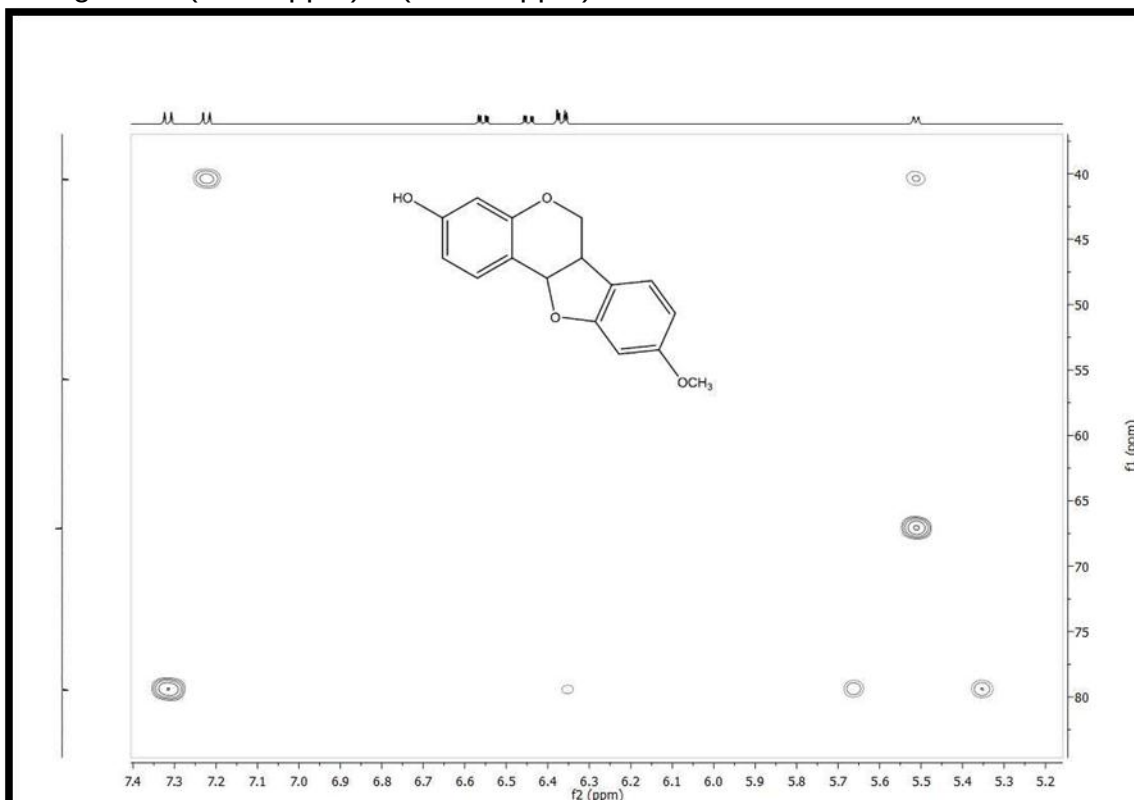


Figura 48- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-4** na região de (40-80 ppm) X (4,6-3,1 ppm).

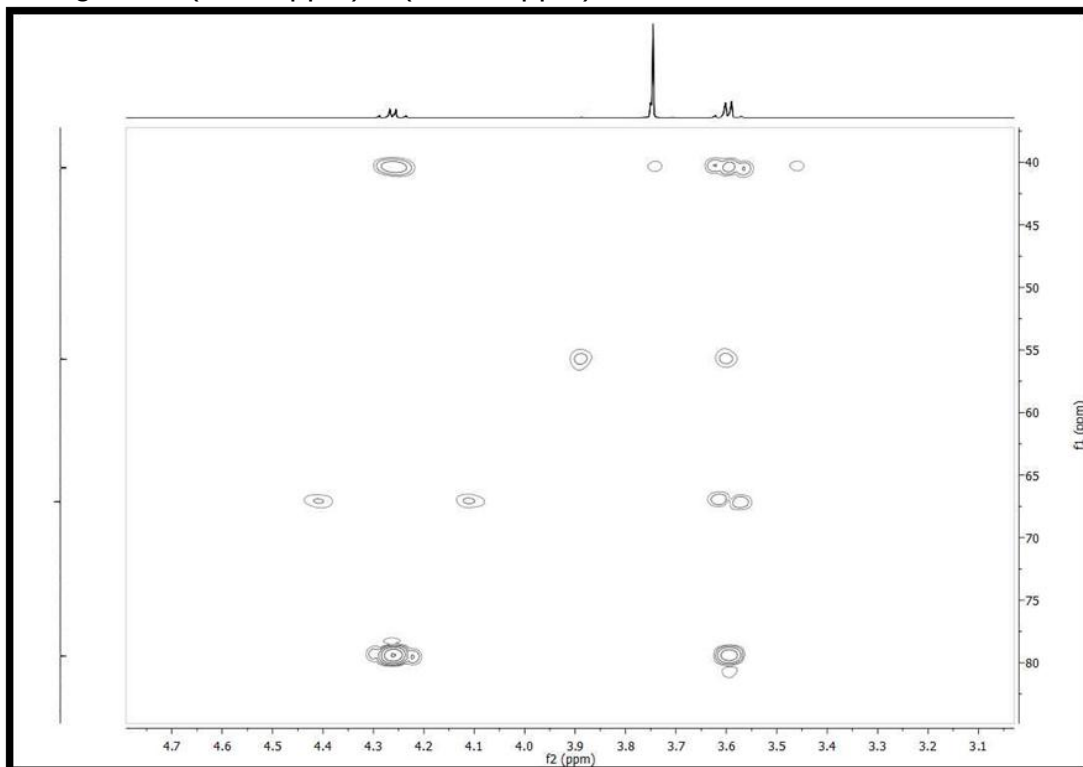


Figura 49- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-4** na região de (95-135 ppm) X (7,4-3,4 ppm).

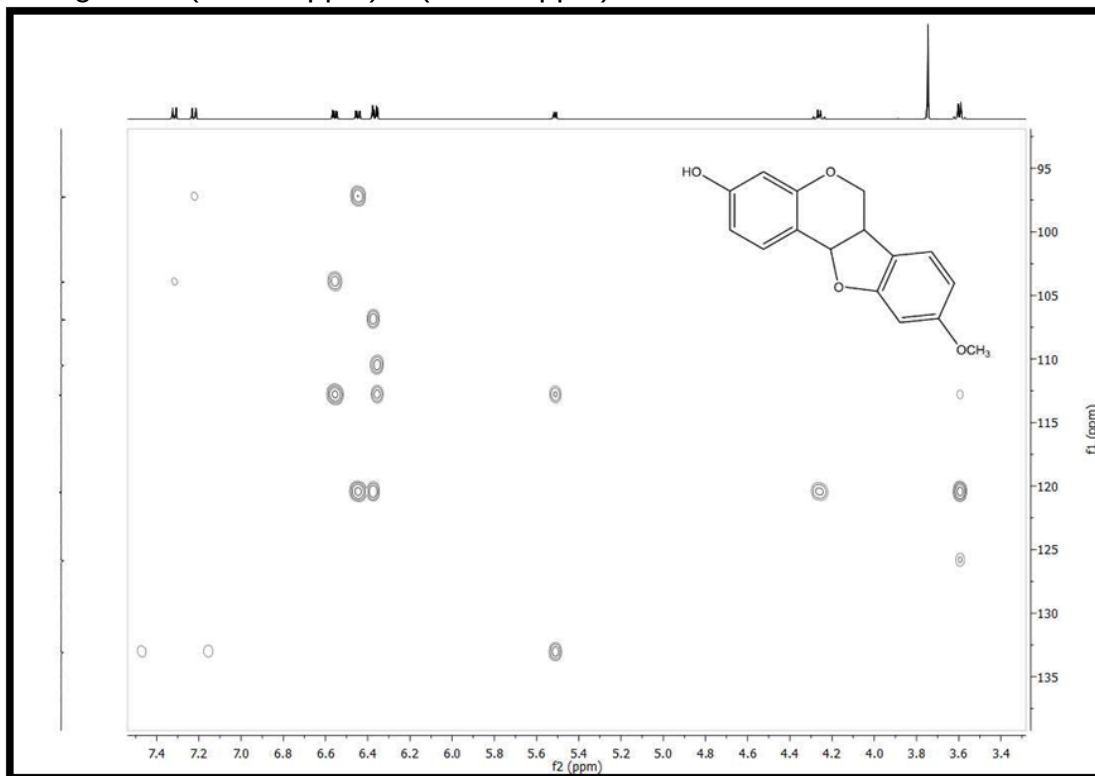
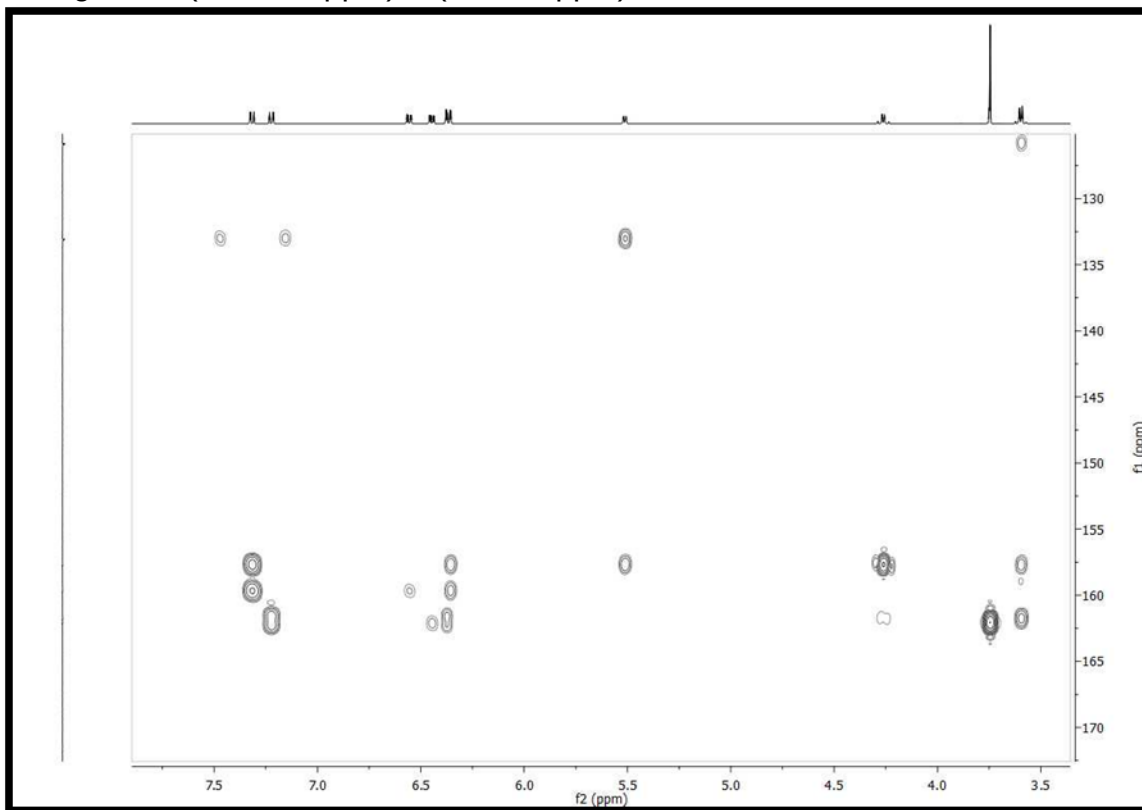


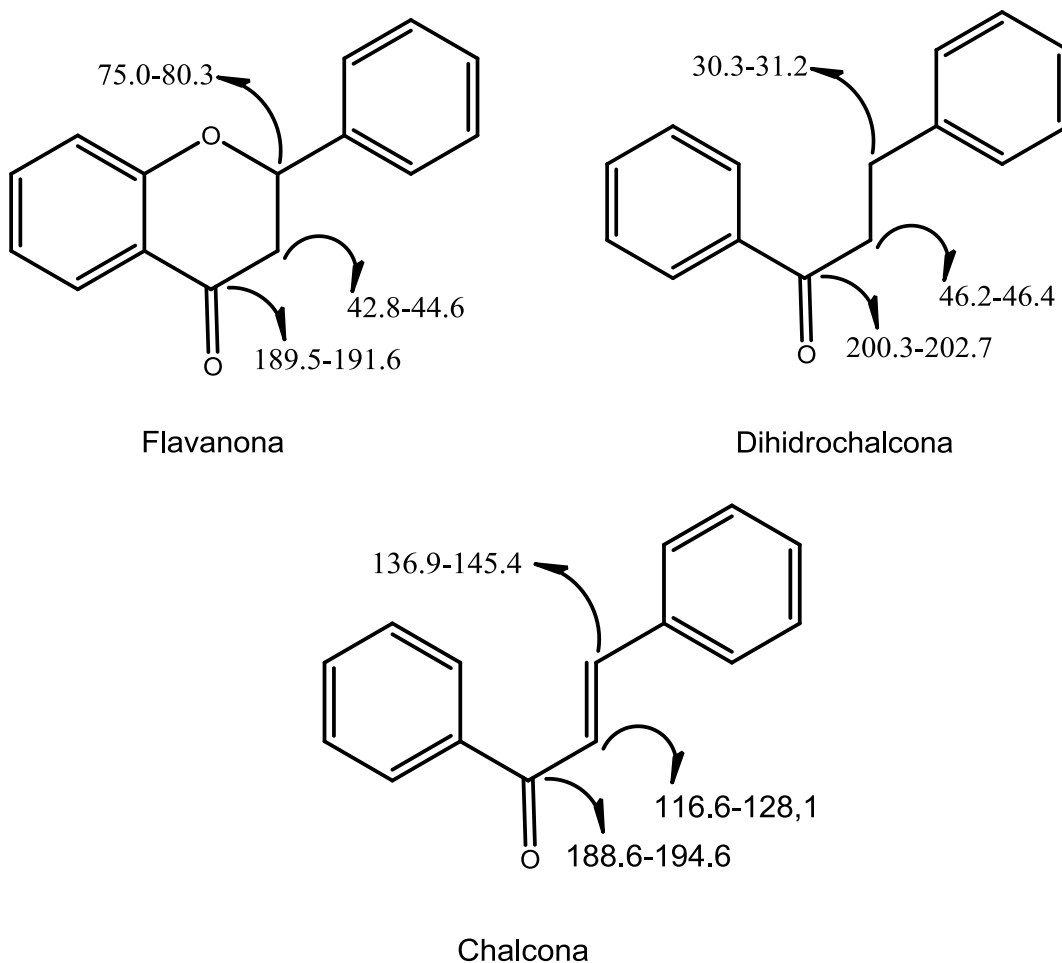
Figura 50- Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de **Zb-4** na região de (130-170 ppm) X (7,5-3,5 ppm).



5.1.5. Determinação Estrutural de Zb-5

A substância codificada como **Zb-5** foi isolada na forma de cristais amarelos, com ponto de fusão na faixa de 149-151°C condizente com a faixa de ponto de fusão descrita na literatura de 148-152°C (KAGAWA, et al., 2005). O espectro de massas de baixa resolução utilizando o modo ESI+ (Figura 51, pág. 120), mostrou o pico da molécula protonada em m/z 241,0 $[M+H]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_3$ (calc. 240,08).

Na análise do espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, $(CD_3)_2CO$) (Figura 52, pág., 121) foram observados 13 sinais referentes a 15 carbonos que sugeriram a possibilidade de se tratar de um flavonoide, já que satisfaria a condição característica dos flavonoides a unidade $C_6C_3C_6$. Os dados fornecidos pelo espectro RMN de ^{13}C comparados com modelos da literatura (ilustrados abaixo) de Pelter, Ward & Gray (1976) e Huang e colaboradores (2012), possibilitou determinar o tipo de esqueleto estrutural ao qual a estrutura **Zb-5** pertencia.



Flavonas, flavanonas chalconas e dihidrochalconas são compostos bioquimicamente relacionados de ocorrência restrita, por essa razão, eles são descritos como pequenos flavonoides. Flavanonas e flavonóis possuem anel contendo átomos de carbono saturado. Já chalconas e dihidrochalconas possuem átomos de carbono insaturado contidos em uma estrutura alicíclica (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000). Diante destas premissas aliado a análise do espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar a presença dos sinais δ_{C} 121,8; 144,7; 192,8 atribuídos aos carbonos C- α ; C- β e a C=O respectivamente de um esqueleto de chalcona. Os sinais em δ_{C} 166,1 foi sugestivo de carbono ligado a hidroxila e o sinal para carbono não hydrogenado δ_{C} 114,4 foi atribuído ao carbono C-1'.

No espectro RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) (Figura 53, pág. 121) foi possível observar a presença de dois multipletos em δ_{H} 7,85 (2H) e 7,47 (3H) sugestivos de anel B monosubstituído. No espectro de hidrogênio a presença de dois dubletos acoplando trans entre si com integrais para um hidrogênio cada foram assinaladas em δ_{H} 7,95 e 7,87 ($J = 15,5$ Hz) (Figura 55, pág. 122) e atribuídos aos hidrogênios α e β .

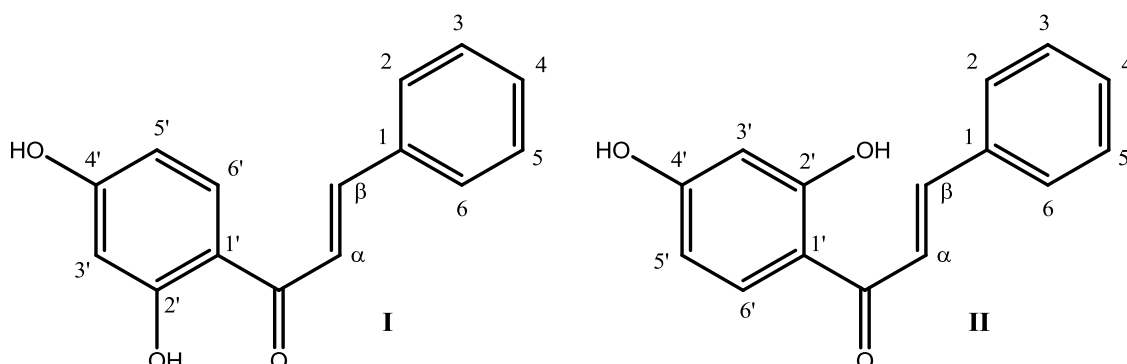
Ainda no espectro de RMN de ^1H a presença de um duplo duplete em δ_{H} 6,48 ($J = 9,0/J = 2,5$) acoplando orto com o duplete δ_{H} 8,15 ($J = 9,0$) e acoplando meta com o duplete δ_{H} 6,39 ($J = 2,5$) foi atribuído ao hidrogênio da posição 5' (Figura 54, pág. 122).

Os sinais de carbonos hydrogenados (δ_{C} 144,7; 133,6; 131,4; 129,9; 129,7; 121,8; 108,9; 103,9) foram atribuídos aos carbonos nas posições C- β ; C-6'; C-4; C-5/3; C-2/6; C- α ; C-5' e C-3', respectivamente, através das correlações observadas no espectro bidimensional $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ –HMQC (Figura 57, pág. 123) δ_{H} 7,87/ δ_{C} 144,7; δ_{H} 8,15/ δ_{C} 133,6; δ_{H} 7,47/ δ_{C} 131,4; δ_{H} 7,47/ δ_{C} 129,9; δ_{H} 7,85/ δ_{C} 129,7; δ_{H} 7,95/ δ_{C} 121,8; δ_{H} 6,48/ δ_{C} 108,9; δ_{H} 6,39/ δ_{C} 103,9 (Figura 56 e 57, pág. 123 Expansão do espectro de HMQC e Tabela 11, pág. 119).

No espectro $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) (Figura 59, pág.124) a presença de duas correlações do duplete em 8,15 atribuído ao H-6' com os carbonos em δ_{C} 166,1 e 167,8 possibilitou assinalar o deslocamento do carbono C-4' δ_{C} 167,8 não detectado no espectro de RMN ^{13}C . Correlações a

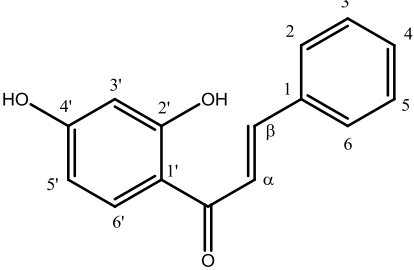
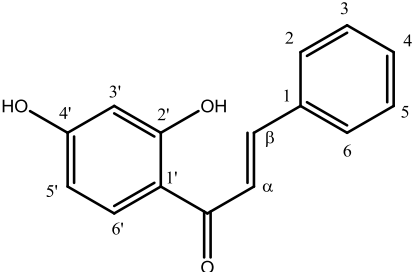
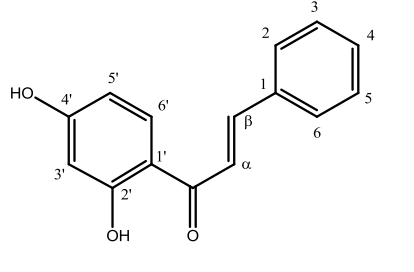
longa distância entre o hidrogênio δ_H 7,47 (C-3/C-5) com o sinal de carbono δ_C 135,9 e do hidrogênio δ_H 6,48 (H-5') com o δ_C 114,4 (C-1') sugeriu as posições C-1 e C-1', respectivamente. A posição C-2' foi sugerida através das correlações a longa distância (3J) do hidrogênio δ_H 8,15 (H-6') com o sinal de carbono δ_C 166,1.

Análises da literatura apontam duas formas de disposição da 2'-4'-diidroxichalcona do anel A apresentadas em **I** (MIKELL; KHAN, 2012) e **II** (GHANI; et al., 2012). Comparações com a literatura permitiram identificar **Zb-5** como sendo a estrutura **II**, uma vez que na disposição **I** o valor do sinal para C-2' δ_C 156,4 aponta para um carbono protegido não observado em **Zb-5** (δ_C 166,1). A compilação dos dados obtidos nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C da substância em comparação com os valores obtidos na literatura permitiram identificar **Zb-5** como a 2'-4'-diidroxichalcona (**II**) isolada pela primeira vez no gênero *Zornia*.



De acordo com a literatura, a 2'-4'-dihidroxichalcona apresenta diversas atividades farmacológicas, como por exemplo, as atividades inibitória da tirosinacina (JUN; HONG; JUN, 2007), anti-inflamatória e antioxidante (DONG, et al., 2010) e gastroprotetora (KAZUNDRI, et al., 1992).

Tabela 10 – Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de **Zb-5** em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (500 e 125 MHz, respectivamente) e da 2',4'-dihidroxialcona em CD_3OD (150; 75 e 600; 300 MHz, respectivamente) MIKELL; KHAN, 2012 e GHANI; et al., 2012.

	Zb-5		Literatura (CD_3OD 150 MHz, 600 MHz)		Literatura (CD_3OD 75 MHz, 300 MHz)	
						
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	135,9	-	134,9	-	134,7	-
2	129,7	7,85 (m)	128,3	7,72 (dd) $J = 7,8; 2,4\text{Hz}$	128,6	7,67 (m)
3	129,9	7,47 (m)	128,6	7,41 (m)	129,0	7,45 (m)
4	131,4	7,47 (m)	130,1	7,41 (m)	130,7	7,45 (m)
5	129,9	7,47 (m)	128,6	7,41 (m)	129,0	7,45 (m)
6	129,7	7,85 (m)	128,3	7,41 (dd) $J = 7,8; 2,4\text{Hz}$	128,6	7,67 (m)
1'	114,4	-	113,1	-	114,4	-
2'	166,1	-	165,9	-	156,4	-
3'	103,9	6,39 (d), $J = 2,5\text{Hz}$	102,5	6,27 (d), $J = 2,4\text{Hz}$	103,8	6,46 (d), $J = 2,1\text{Hz}$
4'	167,8	-	166,3	-	162,9	-
5'	108,9	6,48 (dd), $J = 9,0/2,5\text{Hz}$	108,2	6,40 (dd), $J = 9,0/2,4\text{Hz}$	107,9	6,49 (dd), $J = 9,3/2,1\text{Hz}$
6'	133,6	8,15 (d) $J = 9,0\text{ Hz}$	132,1	7,96 (d) $J = 9,0\text{ Hz}$	132,0	7,85 (d) $J = 9,3\text{ Hz}$
α	121,8	7,95(d) $J = 15,5\text{ Hz}$	120,6	7,79 (s)	120,3	7,59 (d) $J = 15,6\text{ Hz}$
β	144,7	7,87(d) $J = 15,5\text{ Hz}$	143,6	7,79 (s)	144,7	7,91 (d) $J = 15,6\text{ Hz}$
C=O	192,8	7,48 (m)	191,7	-	192,0	-

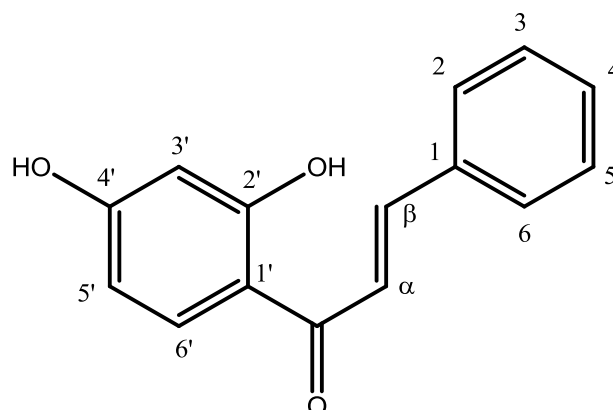


Tabela 11 – Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para **Zb-5**, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

HMQC			HMBC	
C	δ_{H} (J Hz)	δ_{C}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	-	-		
1'	-	-		
2'	-	-		
4'	-	-		
CH		-		
2	7,85 (m)	129,7	C-1	C-4/C- β
3	7,47 (m)	129,9		C-1
4	7,47 (m)	131,4		
5	7,47 (m)	129,9		C-1
6	7,85 (m)	129,7	C-1	C-4/C- β
3'	6,39 (d) $J=2.5\text{Hz}$	103,9	C-2'/C-4'	C-5'/C-1'
5'	6,48 (dd) $J=9.0/2.5\text{Hz}$	108,9		C-3'/C-1'
6'	8,15 (d) $J=9.0\text{Hz}$	133,6		C-2'/C-4'/C=O
α	7,95 (d) $J=15.5\text{Hz}$	121,8	C- β /C=O	C-1
β	7,87 (d) $J=15.5\text{Hz}$	144,7	C-1/C- α	C-2/C-6/C=O
C=O	7,48 (m)	192,8	-	-

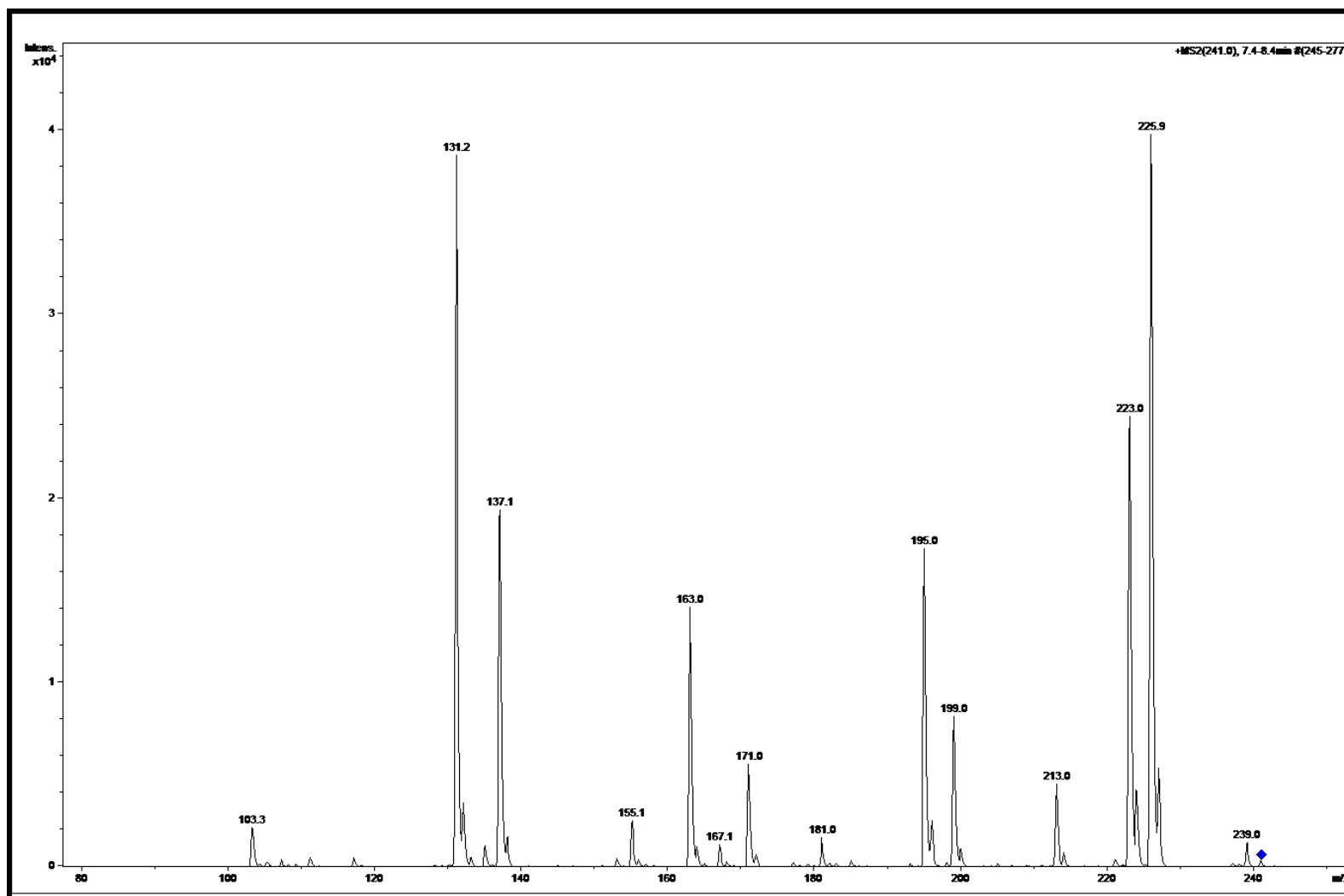
Figura 51- Espectro de massas de baixa resolução de **Zb-5**.

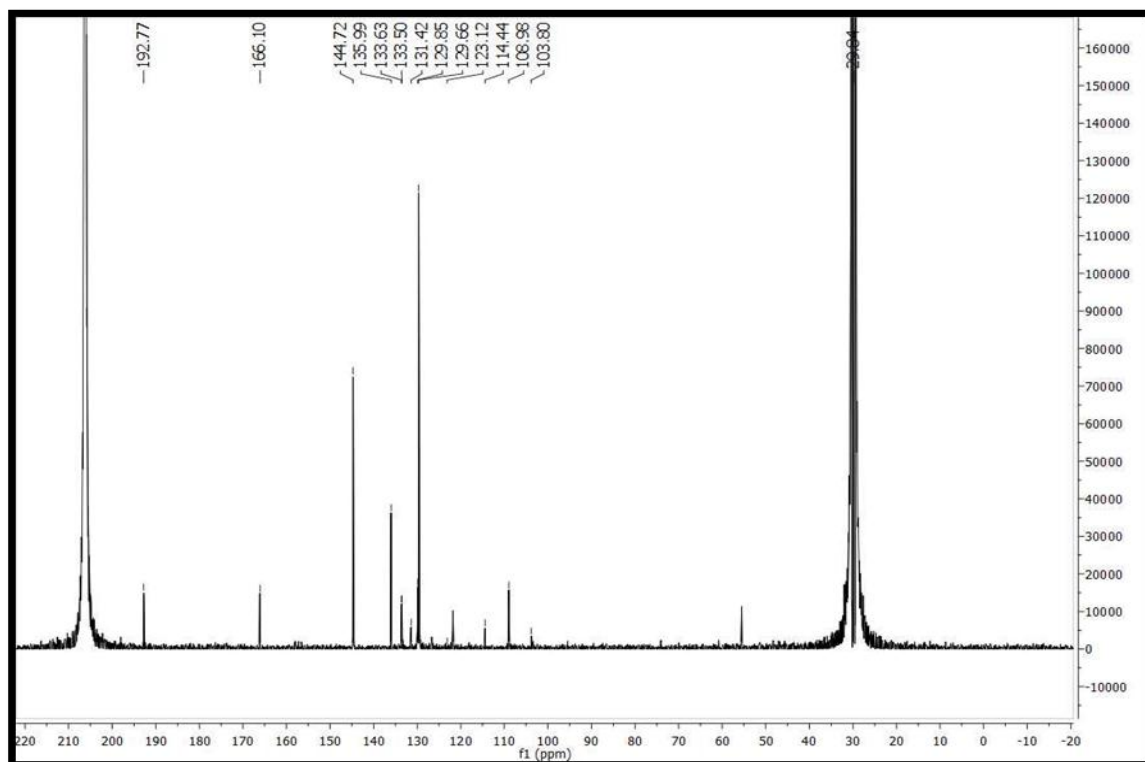
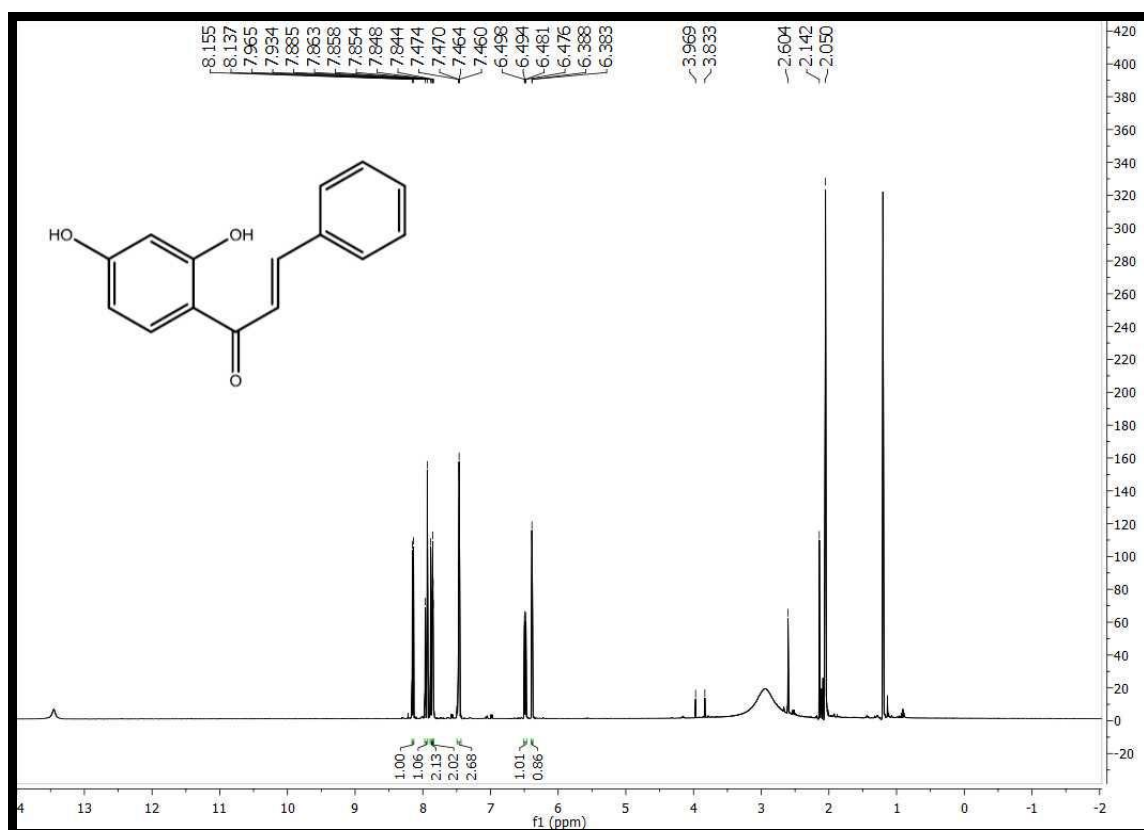
Figura 52- Espectro de RMN ^{13}C -BB ((CD_3) $_2\text{CO}$, 125 MHz) de **Zb-5**.Figura 53- Espectro de RMN ^1H ((CD_3) $_2\text{CO}$, 500 MHz) de **Zb-5**.

Figura 54- Expansão do espectro de RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz) de **Zb-5** na região de 8.1-6.3 ppm.

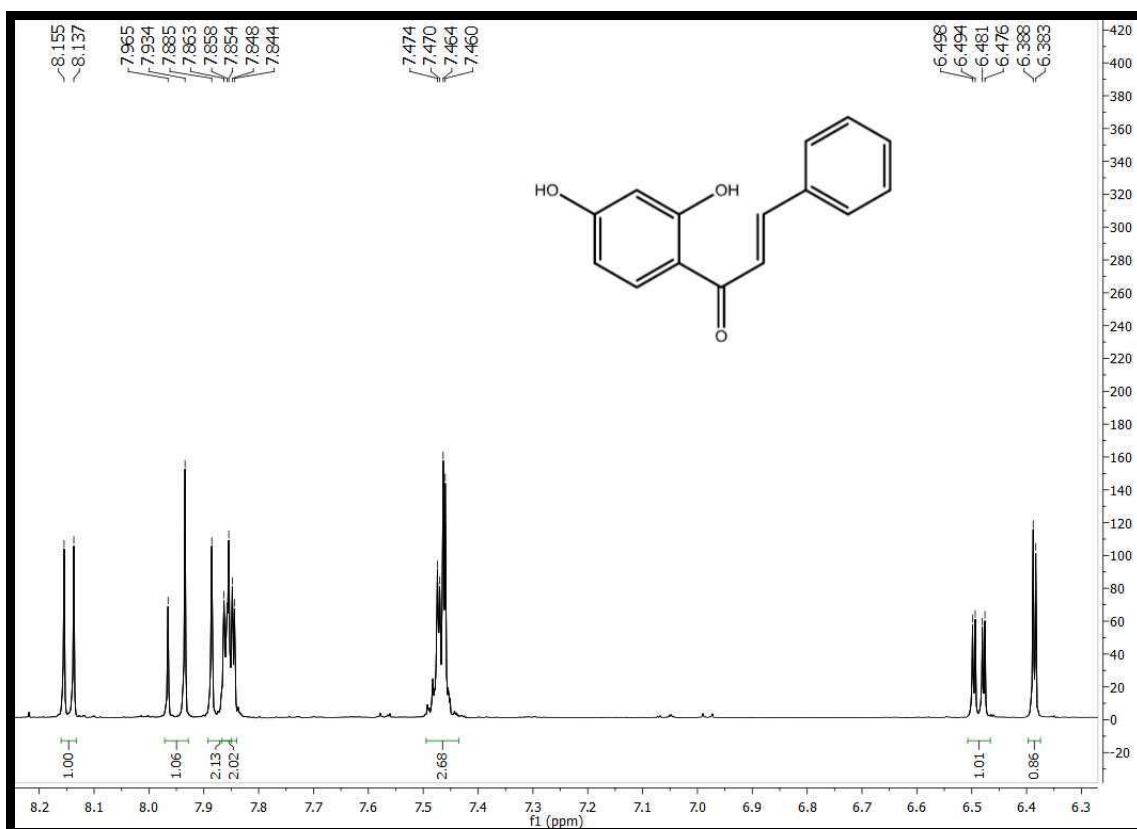


Figura 55- Espectro de HMQC ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 e 125 MHz) de **Zb-5**.

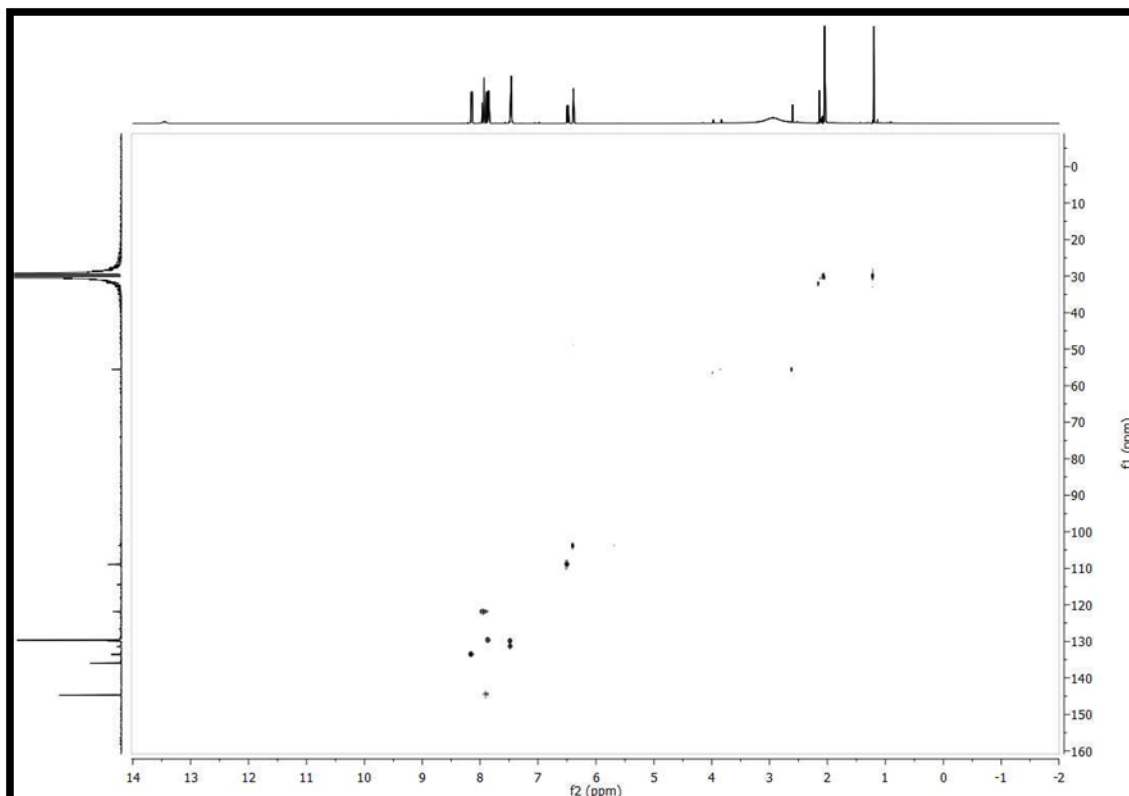


Figura 56- Expansão do espectro de HMQC ((CD₃)₂CO, 500 e 125 MHz) de **Zb-5** na região de (120-136 ppm) X (8,2-7,4 ppm).

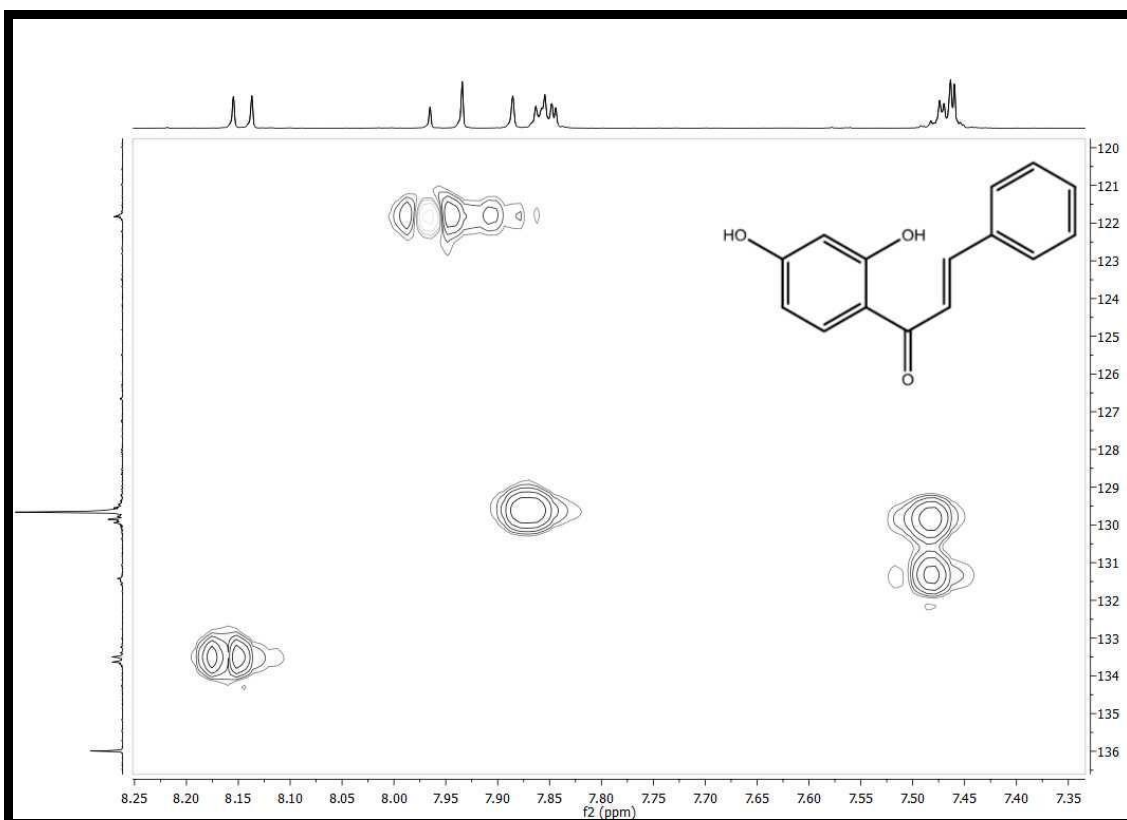


Figura 57- Expansão do espectro de HMQC ((CD₃)₂CO, 500 e 125 MHz) de **Zb-5** na região de (102-112 ppm) X (6,6-6,1 ppm).

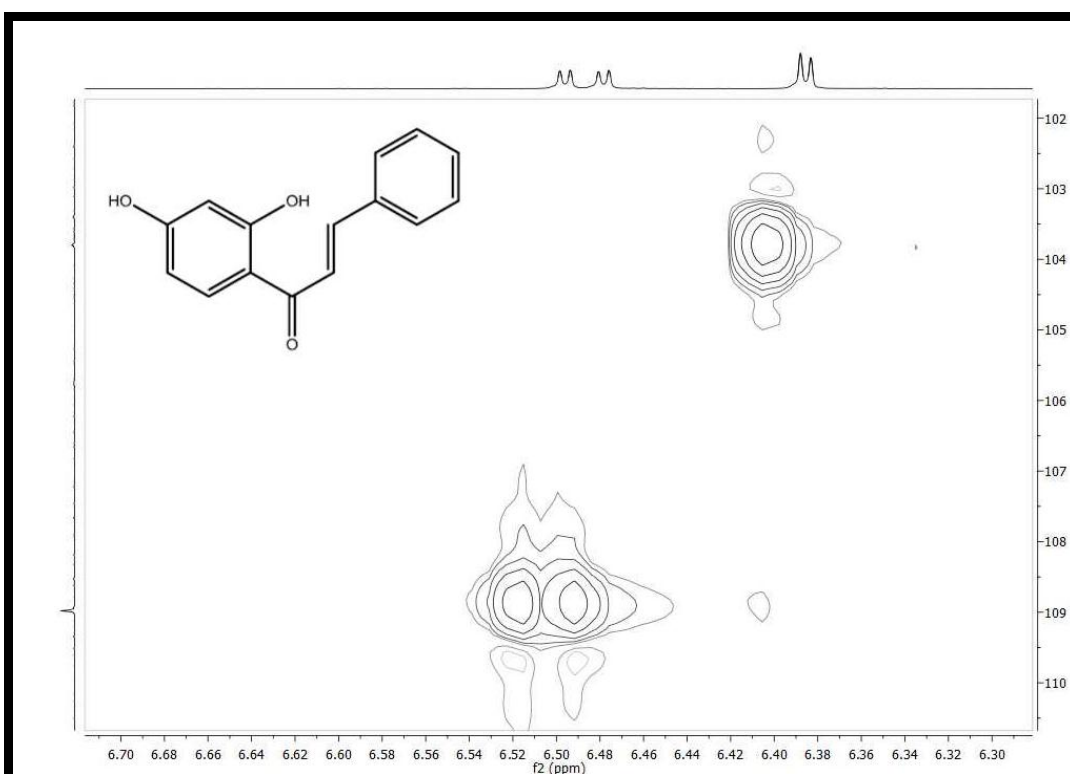


Figura 58- Espectro de HMBC ((CD₃)₂CO, 500 e 125 MHz) de **Zb-5**.

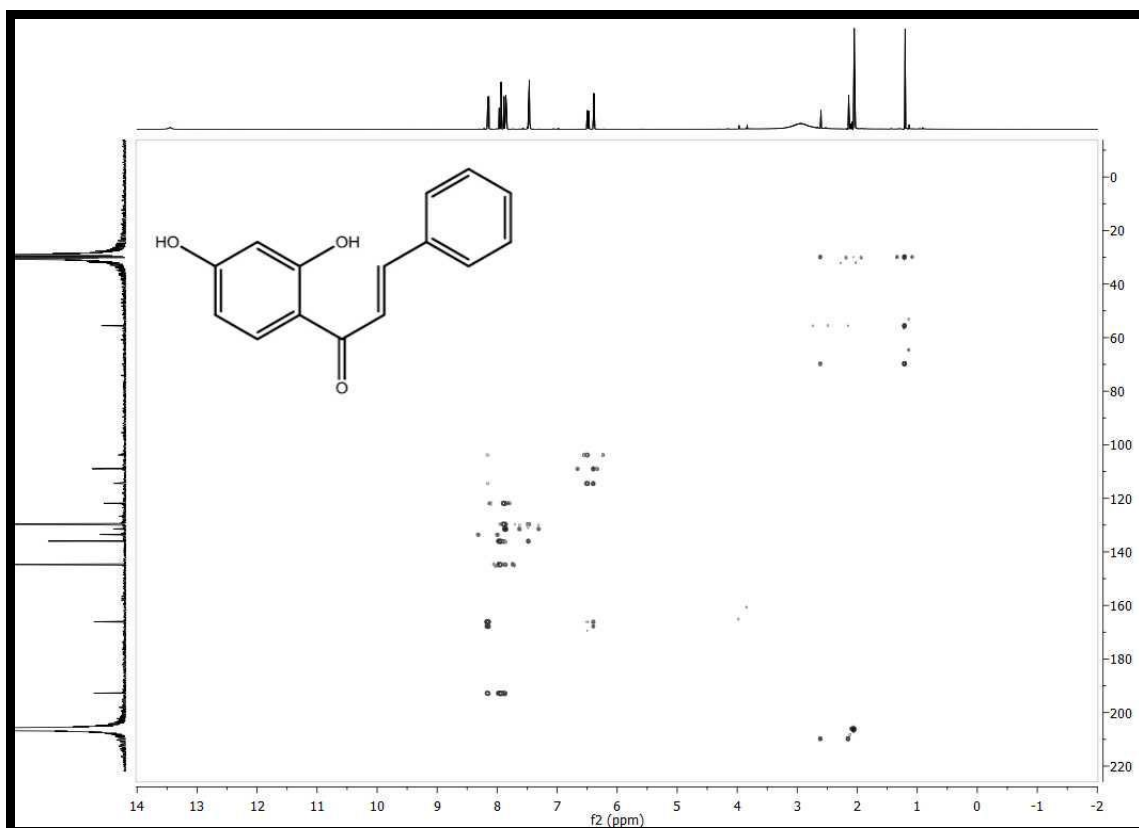


Figura 59- Expansão do espectro de HMBC ((CD₃)₂CO, 500 e 125 MHz) de **Zb-5** na região de (98-119 ppm) X (6,75-6,1 ppm).

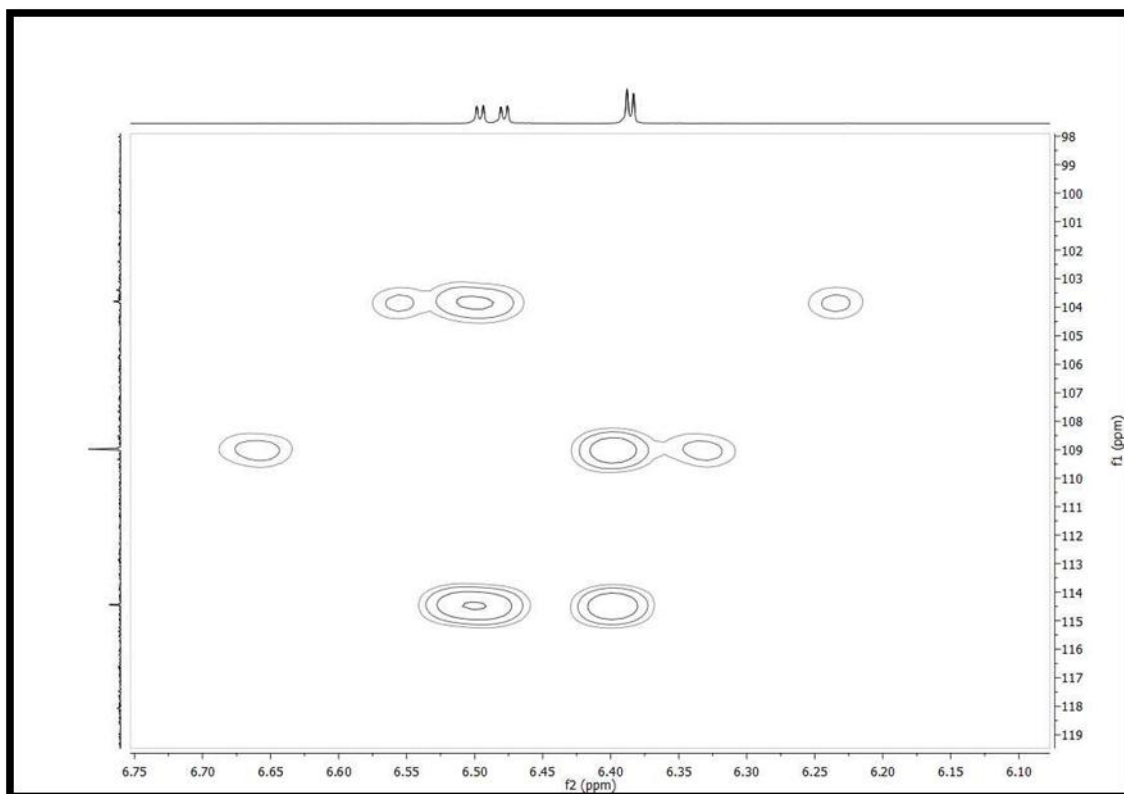
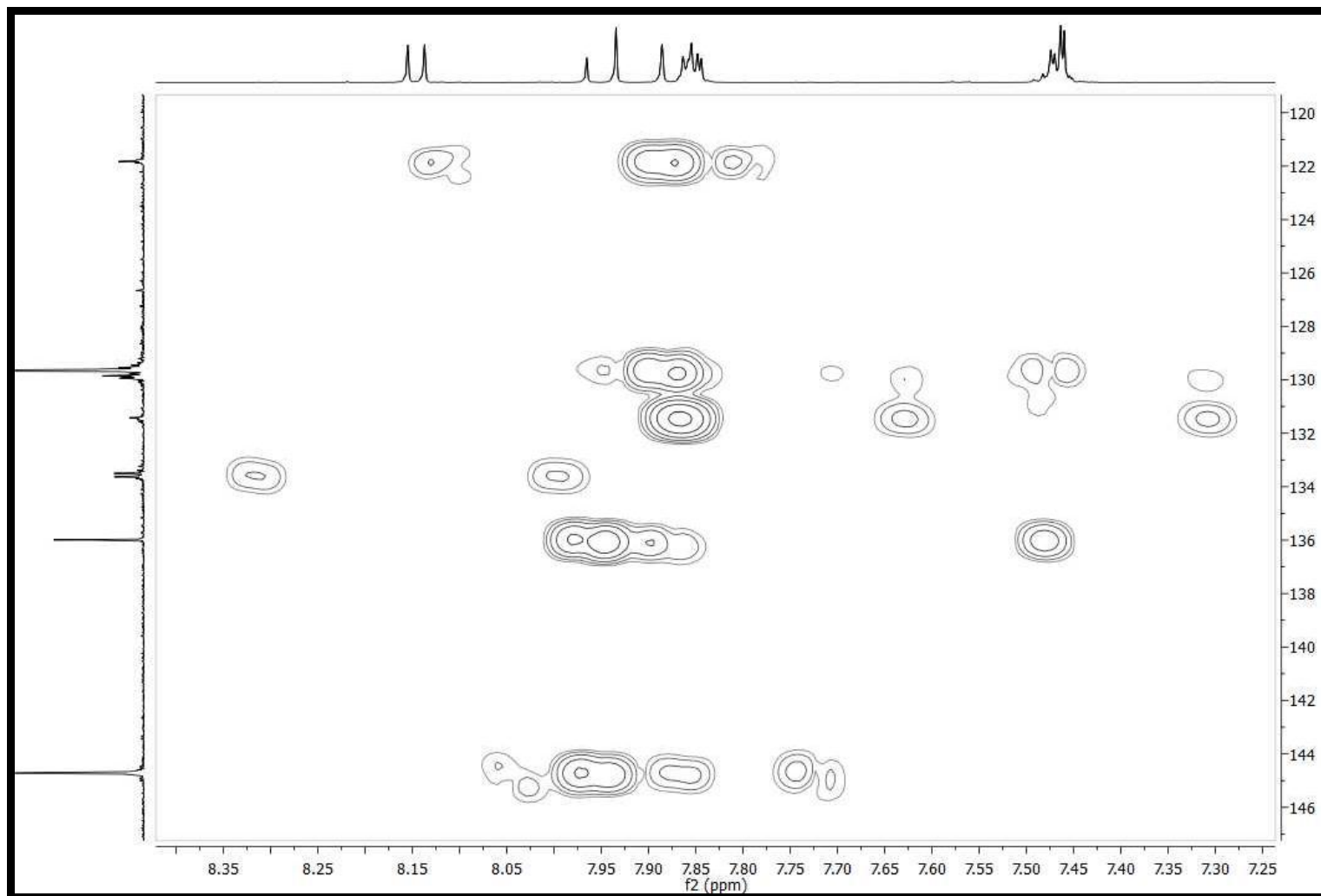


Figura 60- Expansão do espectro de HMBC ((CD₃)₂CO, 500 e 125 MHz) de **Zb-5** na região de (120-146 ppm) X (8,35-7,25 ppm).



5.2 Avaliação farmacológica

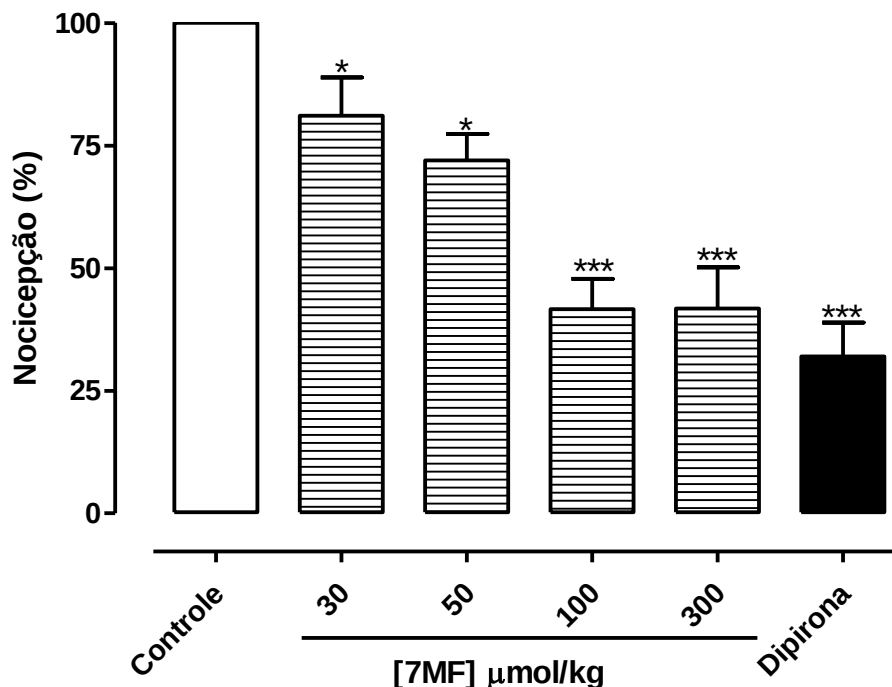
5.2.1 Efeito da 7-metoxiflavona (7-MF) no ensaio de contorção abdominal induzidas por ácido acético.

A administração oral de 7-MF nas doses de 30, 50, 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$ (Gráfico 1) reduziu de forma significativa e dependente de dose ($18,94 \pm 2,08$; $28,04 \pm 3,09$; $58,38 \pm 6,4$; $58,26 \pm 6,4\%$) respectivamente, a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético com uma $\text{DI}_{50} = 82,5 \pm 11,7$ $\mu\text{mol/kg}$ e um efeito máximo $E_{\text{max}} = 58,4\% \pm 8,4$. O fármaco utilizado como controle positivo neste ensaio foi a dipirona que na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ inibiu 68% da nocicepção quando comparado ao controle negativo.

O ensaio de contorção abdominal é um método clássico utilizado para triagem de compostos com efeito antinociceptivo. A injeção intraperitoneal de agentes algogênicos, como ácido acético, provocam um comportamento estereotipado em camundongos caracterizado por contrações abdominais e dorso abdominais, às vezes acompanhadas pelo estiramento das patas traseiras (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001). Os prótons oriundos da dissociação do ácido acético podem ativar diretamente canais iônicos (TRPV1 – receptor de potencial transiente vaniloide tipo 1, ASIC – canais iônicos sensíveis a ácidos, p. ex.) localizados nas fibras aferentes primárias (JULIUS; BASBAUM, 2001; FEIN, 2009). Além disso, a injeção de ácido acético na cavidade peritoneal de camundongos promove a liberação de diversos mediadores inflamatórios como PGE2, PGF2 α , bradicinina, substância P, fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-1 β e IL-8 entre outros (RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001).

Uma vez que 7-MF inibiu o número de contorções abdominais, sugere-se que este flavonoide é capaz de modular negativamente as vias nociceptivas ativadas pelo ácido acético. Diante dos resultados obtidos neste ensaio, a dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ foi escolhida como dose a ser avaliada nos ensaios posteriores, uma vez que foi nesta dose que o efeito máximo foi observado.

Gráfico 1- Efeito da 7-metoxiflavona (7-MF) nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.



As colunas e barras representam a média $\pm$ erro padrão da média, respectivamente. As diferenças estatísticas dos tratamentos e grupos controles foram obtidas utilizando o teste ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Os asteriscos representam o nível de significância comparadas ao grupo controle (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$). SILVA, 2012.

5.2.2 Efeito da 7-metoxiflavona (7-MF) na nocicepção induzida por formalina.

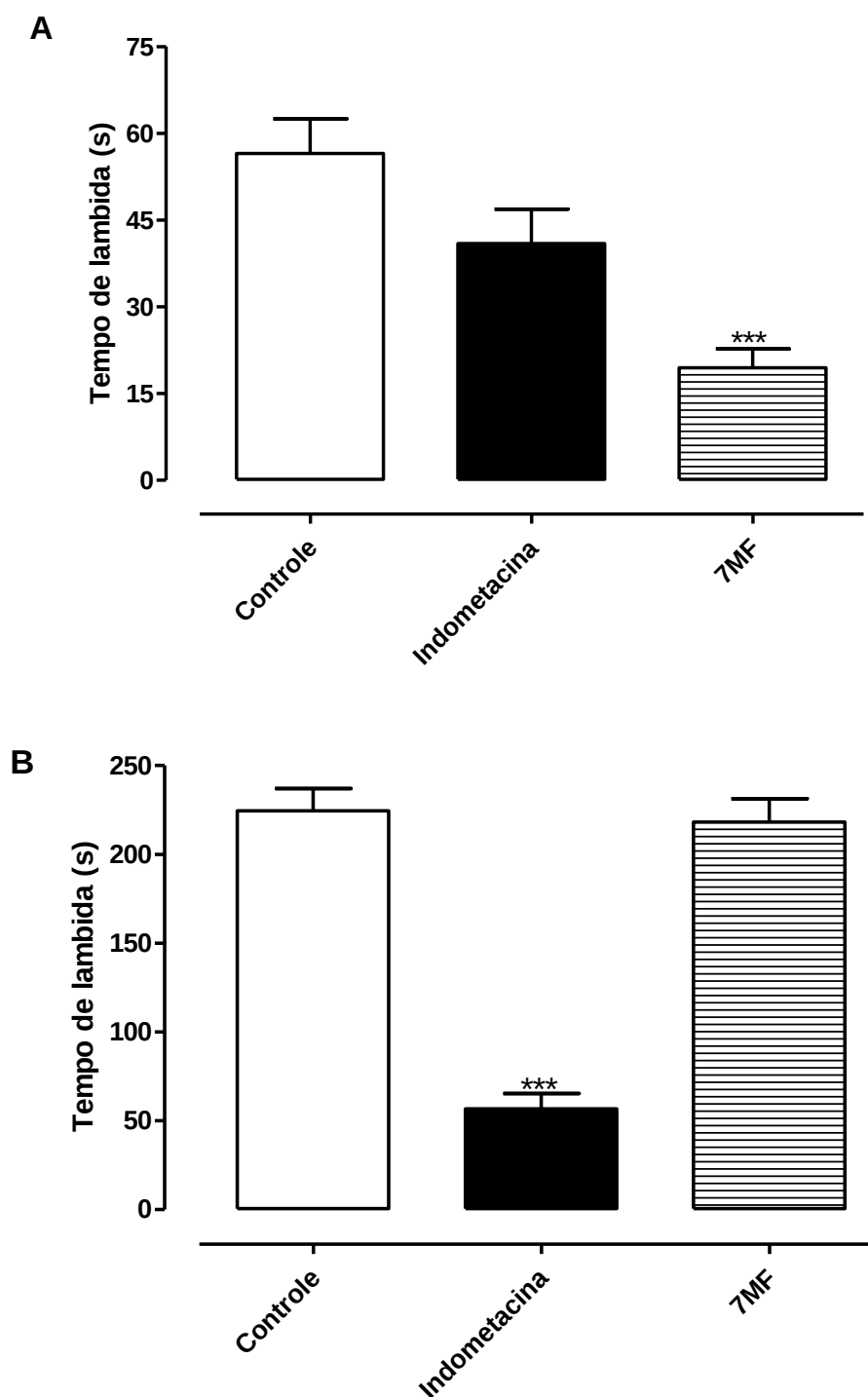
A administração de 7-MF (100 $\mu\text{mol/kg}$) (Gráfico 2A) foi capaz de inibir significativamente a fase neurogênica ($65,6\% \pm 5,8$), sem, no entanto, modular a resposta nociceptiva na fase inflamatória (Gráfico 2B).

A injeção de formalina culmina em uma intensa nocicepção, caracterizada por vigorosas lambidas e sacudidas na pata injetada com o agente irritante. A resposta à injeção de formalina desenvolve-se em duas fases. A fase neurogênica é iniciada logo após o estímulo e prolonga-se por cinco minutos. Essa fase caracterizada pela estimulação predominante de fibras C subsequente à estimulação direta dos nociceptores periféricos (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Após os cinco minutos iniciais, há um período de

ausência de resposta nociceptiva que dura cerca de dez minutos. Após esse período de repouso, inicia-se a fase inflamatória com duração de aproximadamente quinze minutos e está relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, prostaglandinas, bradicinina. Há também participação de citocinas como TNF- α e IL-1 β nessa fase tardia (GRANADOS-SOTO et al., 2001).

Os resultados obtidos neste ensaio indicam que 7-MF é capaz de modular negativamente apenas os mecanismos envolvidos na fase neurogênica, como antagonismo de receptores NK1 (SANTOS & CALIXTO, 1997), também envolvido no ensaio de contorção abdominal, ou ainda um efeito transiente sobre receptores 5-HT₃ (PARADA et al., 2001).

Gráfico 2- Efeito da 7-metoxiflavona (7-MF) na nocicepção induzidas por formalina em camundongos. **A:** Fase neurogênica e **B:** Fase inflamatória.

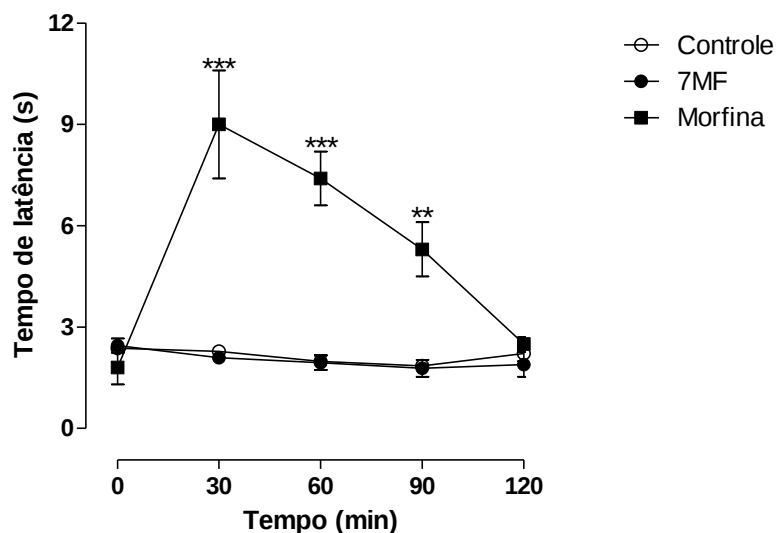


As colunas e barras representam a média $\pm$ erro padrão da média, respectivamente. As diferenças estatísticas dos tratamentos e grupos controles foram obtidas utilizando o teste ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Os asteriscos representam o nível de significância comparadas ao grupo controle (** $p < 0,001$). SILVA, 2012.

5.2.3 Ensaio de placa quente.

A 7-MF na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ não modificou o tempo de latência dos animais na placa quente ($54 \pm 1^\circ\text{C}$) em nenhum dos intervalos de tempo pré-estabelecidos quando comparado ao veículo (Gráfico 3), diferente da morfina (15 $\mu\text{mol/kg}$), usada como droga de referência que promoveu um aumento significativo ($p < 0,001$) no tempo de latência dos animais.

Gráfico 3- Efeito da 7-metoxiflavona (7-MF) no ensaio de placa quente



Os pontos e linhas representam a média $\pm$ erro padrão da média, respectivamente. As diferenças estatísticas dos tratamentos e grupos controles foram obtidas utilizando o teste ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Os asteriscos representam o nível de significância comparadas ao grupo controle (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). SILVA, 2012.

O ensaio de placa quente é um teste termo-algesimétrico utilizado para avaliação da atividade antinociceptiva em camundogos. A técnica consiste no registro temporal do início da resposta nociceptiva dos animais colocados sobre uma superfície com temperatura constante. Decorridos alguns segundos o estímulo térmico se torna aversivo e os animais reagem com um padrão consistente de comportamento.

O estímulo térmico induz dois tipos de comportamento no camundongo: retirada da pata e lambida da pata. Ambos são resultantes da

ativação direta dos nociceptores pelo calor, que irão conduzir o estímulo doloroso ao corno dorsal da medula espinal e posteriormente aos centros corticais (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). O calor é capaz de ativar receptores vaniloides, especificamente os receptores TRPV-1 (limiar de ativação em torno de 43 °C) e TRPV-2 (limiar de ativação em torno de 52 °C) (JULIUS; BASBAUM, 2001). Esses receptores são canais iônicos que, quando ativados, promovem o influxo de Ca^{2+} , despolarizando a fibra nervosa e ativando a abertura de canais de Na^{+} dependente de voltagem (ZIEGLGANSBERGER; BERTHELE; TOLLE, 2005).

O ensaio de placa quente é comumente utilizado para investigar substâncias com propriedades farmacodinâmicas semelhantes aos do opioides. Na temperatura utilizada ($54 \pm 1^{\circ}\text{C}$), o efeito antinociceptivo de tais substâncias é identificado facilmente empregando-se este método. No entanto, nesta temperatura, analgésicos não opioides não apresentam efeito antinociceptivo, ou este efeito é ínfimo (EDDY & LEIMBACH, 1952; JANICKI & LIBICH, 1978; KURAISHI et al., 1983; HUNSKAAR, BERGE & HOLE, 1986; LE BARS, GOZARIU & CADDEN, 2001). Assim, pode-se sugerir que 7-MF não possui propriedades antinociceptivas tão significantes quanto os analgésicos opioides.

5.2.4 Ensaio de nocicepção induzida por glutamato

No ensaio de nocicepção induzido por glutamato a 7-MF foi capaz de inibir de maneira significativa ($26\% \pm 6,5\%$) Gráfico 4 a resposta nociceptiva induzida por glutamato quando comparado ao veículo.

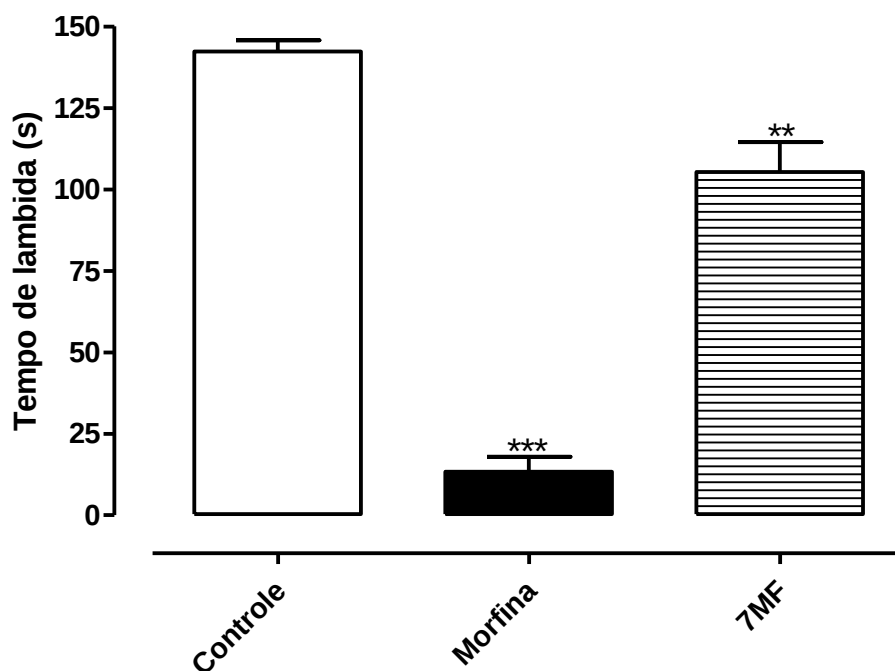
A injeção de glutamato na região intraplantar de camundongos causa um comportamento nociceptivo acompanhado de formação de edema de forma dose-dependente (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002). Estudos de Carlton, Zhou e Coggeshol (1998) mostraram que os receptores AMPA e NMDA estavam presentes na pata traseira de ratos fornecendo, deste modo, uma base anatômica que justificaria a ação periférica do glutamato exógeno. Além da ação sobre os receptores glutamatérgicos (NMDA e não NMDA), a

participação da via L-arginina-óxido nítrico também está envolvida na nocicepção induzida por glutamato.

Os resultados obtidos neste ensaio indicam que 7-MF inibe fracamente a ação nociceptiva da via glutamatérgica, sugerindo que a inibição das vias glutamatérgicas não é a principal via nociceptiva modulada por este flavonoide.

O conjunto de dados farmacológicos aqui apresentados foram aceitos para publicação na revista Natural Products Researchers através do artigo intitulado: Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis* (Apêndice 1)

Gráfico 4- Efeito da 7-metoxiflavona (7-MF) no ensaio de nocicepção induzida por glutamato em camundongos.



As colunas e barras representam a média $\pm$ erro padrão da média, respectivamente. As diferenças estatísticas dos tratamentos e grupos controles foram obtidas utilizando o teste ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Os asteriscos representam o nível de significância comparadas ao grupo controle ($**p < 0,01$ e $***p < 0,001$). SILVA, 2012.

Conclusão



6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Zornia brasiliensis* levou ao isolamento de cinco substâncias, que foram identificadas por Espectroscopia no Infravermelho, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY).

A espécie apresentou em sua constituição química três flavonas, 7-metoxiflavona, 5-hidroxi-7-metoxiflavona e 5,7-dimetoxiflavona; uma chalcona a 2',4'-dihidroxichalcona e um pterocarpano o 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano, sendo todas essas substâncias relatadas pela primeira vez no gênero *Zornia*. Foi possível concluir também que a substância 7-metoxiflavona apresenta efeito antinociceptivo, no entanto mais estudos se fazem necessário para caracterizar e identificar o alvo molecular responsável por este efeito.

Considerando a inexistência de estudos realizados com espécies deste gênero o presente trabalho vem contribuir para o conhecimento fitoquímico destas espécies, além de agregar informações para o conhecimento farmacológico dos flavonoides em especial da substância 7-metoxiflavona que não apresentava estudos de avaliação antinociceptiva até então.

Referências

Two horizontal bars are positioned below the title. The top bar is green and the bottom bar is dark green. Both bars are slightly offset to the left and right, creating a layered effect.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition**. New York, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- ALBUQUERQUE, I. L.; ALVES, L. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZFILHO, R. Ácido canário (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 828-831, 2007.
- AMBROZIN, A. R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *conchocarpus heterophyllus*. **Química Nova**. v. 31, n. 4, p. 740-743, 2008.
- ARES, J. J.; OUT, P. E.; RANDALL, J. L.; MURRAY, P. D.; WEISSHAAR, P. S.; OBRIEN, L. M.; EMS, B. L.; KAKODKAR, S. V.; KELM, G. R.; KERSHAW, W. C.; WERCHOWSKI, K. M.; PARKINSON, A. Synthesis and Biological Evaluation of Substituted Flavones as Gastroprotective Agents. **Journal Medical Chemistry**. v. 38, p. 4937-4943, 1996.
- AYMARD, G. A. *Zornia*. In STEYERMARK, J. A.; BERRY, P. E.; YATSKIEVYCH, K.; HOLST, B. K. (ed). Flora of the Venezuela Guayana. **Missouri Botanic Garden Press**. St. Louis. v. 5, 1999.
- BAILL, J. C. L.; CHAMPAVIER, Y.; CHULIA, A. J.; HABRIOUX, G. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3 β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. **Life Sciences**. v. 66, n. 14, p. 1281-1291, 2000.
- BALBACH, A. **As plantas curam**. São Paulo: Editora Missionária, 1992.
- BANDARA, B. M. R.; KUMAR, N. S.; WIMALASIRI, K. M. S. Constituents of the stem bark from *Butea monosperma* (LEGUMINOSAE). **Journal of the National Science Council of Sri Lanka**. v. 18, n. 2, p. 97-103, 1990.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BAUDET, J. C.; TORCK, M. Analysis of the taxonomic significance of the flavonoids in Papilionaceae-Phaseoleae. **Bulletin de la Societe Botanique de France**, v. 125, n. 9. p. 479-483, 1978.

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de Zornia diphylla, uma planta medicinal. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

BERITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.

BESSION, J.M. The complexity of physiopharmacologic **Aspects of Pain. Drugs**, v. 53, n. 2, p. 1-9, 1997.

BLARDI, P.; DE LALLA, A.; VOLPI, L.; DI PERRI, T. Stimulation of endogenous adenosine release by oral administration of quercetin and resveratrol in man. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 25, p. 105-110, 1999.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, v. 585, n. 13, p. 325-337, 2008.

BRAHMACHARI, G.; GHOSH, S.; MONDAL, S.; JASH, S. K.; MANDAL, L. C.; MONDAL, A. Cyclic voltammetric studies with plant extracts of some traditionally used Indian medicinal plants to evaluate their antioxidant potential. *BioChemistry: An Indian Journal*, v. 3, n. 1, p. 32-35, 2009.

BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. Academic Press, San Diego, 1994.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CARAVACA, H. **Plantas que curam**. [S.l.]: Editora Virtual Books, 2000.

CARLTON, S. M.; ZHOU, S.; COGGESHALL, R. E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. **Brain Research**, v. 790, p. 160-169, 1998.

COUTINHO, H. D.; BEZERRA, D. A. C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I. J. F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Conceitos**, p. 75-85, 2004.

COLLIER, H. O.; DINNEEN, J. L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its supression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, p. 295-310, 1968.

CHIAPPETA, A. D. A.; DE MELO, J. F.; Higher Plants with biological activity. Plants of Pernambuco. II. III. **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Recife**, v. 11, n.1/2, p. 99-111, 1984.

CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **American Association of Pharmaceuticaal Scientistic Journal**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.

DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidante and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.

DA SILVA, M. F.; SOUZA, L. A. G.; CARREIRA, L. M. M. **Nomes Populares das Leguminosas do Brasil**. Manus: Editora da Universidade Federal do Amazonas (EDUA), 2004.

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

DUTRA, R. C.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; BARBOSA, N. R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 429-435, 2009.

DUTRA, V. F.; MESSIAS, M. C. T. B.; GARCIA, F. C. P. Papilionoideae (Leguminosae) nos campos ferruginosos do parque estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: florística e fenologia. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 493-504, 2005.

DO NASCIMENTO, S. C.; DE MELO, J. F.; CHIAPPETA, A. D. A. Cytotoxic agentes. Experiments with KB cells. **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Recife**, v. 22, n. 1/2, p. 19-26, 1985.

DONG, W.; WEI, T.; GUANG-MING, Y.; BAO-CHANG, C. Anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxic activities of flavonoids from *Oxytropis falcata* Bunge. **Zhongguo Tianran Yaowu**. v. 8, n. 6, p. 461-465, 2010.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Update on phylogeny. **Plant Physiology**, v. 131, p. 900-910, 2003.

EDDY, N. B. & LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyland dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, p. 385–393, 1952.

EMAMI, S. M.; AMIN-AR-RAMIMEH, E.; AHI, A.; KASHY, M. R. B.; SCHNEIDER, B.; IRANSHAHI, M. Prenylated flavonoids and flavonostilbenes from *Sophora pachycarpa* roots. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 6, p. 453-457, 2007.

FALCÃO, M. J. C.; POULINQUE, Y. B. M.; LIMA, M. A. S.; GRAMOSA, N. V.; COSTA-LOUFO, L. V.; MILITA, G. C. G.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R. Cytotoxic Flavonoids from *Platymiscium floribundum*. **Journal Natural Products**. v. 68, p. 423-426, 2005.

FEIN, A. **Nociceptors: the cells that sense pain**. 1 ed. Connecticut: University of Connecticut - Health Center, p. 57, 2009.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89-111, 2001.

FERNANDES, R. A.; SALUM, M. J.; TEIXEIRA, M. B.; LEMNI, R. C. A.; MIURA M. Anotações de enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem-USP**, v. 15, n. 1, p. 63-67, 1981.

FORZZA, R. C.; COSTA, A.; WALTER, B. M. T.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, L. P.; MARTINELLI, G.; PEIXOTO, A. L.; COELHO, M. A. N.; BAUMGRATZ, J. F. A.; STEHMANN, J. R.; LOHMANN, L. G.; HOPKINS, M. Angiospermas in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO JÚNIOR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; LUGHADHA, E. N.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, S. de;

SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. **Síntese da diversidade brasileira**. In: FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F.; BICUDO, C. E. M.; CARVALHO JÚNIOR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. (Ed.). Catálogo de plantas e fungos do Brasil Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1 p. 21-42, 2010.

FRANCO, I. J.; FONTANA, V. L. **Ervas e plantas: a medicina dos simples**. 9.ed. Erechim-RS, 2004.

FRIESENECKER, B.; TSAI, A. G.; INTAGLIETTA, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental**, v. 15, p. 17-21, 1995.

GHANI, N. A.; AHMAT, N.; ISMAIL, N. H.; ZAKARIA, I. Chemical Constituents and Cytotoxic Activity of *Polyalthia cauliflora* var. *cauliflora*. **Research Journal of Medicinal Plant**. v. 6, n. 1, p. 74-82, 2012.

GHODSI, M.; RAYNAUD, J.; GORUNOVIC, M.; PRUM, N. Distribution of anthocyanes and flavonoids in flowers of various *Ononis* species (Papilionaceae). **Bulletin des Travaux de la Societe de Pharmacie de Lyon**, v. 14, n. 4, p. 129-133, 1970.

GRANADOS-SOTO, V.; ALONSO-LOPEZ, R.; ASOMOZA-ESPINOSA, R.; RUFINO, M. O.; GOMES-LOPES, L. D.; FERREIRA, S. H. Participation of COX, IL-1 β and TNF- α in formalin-induced inflammatory pain. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 44, p. 15-17. 2001.

GREETHA, K. M.; SHILPA, S.; MURUGAN, V. Anticonvulsant Activity of the Methanolic Extract of Whole Plant of *Zornia diphylla* (Linn) Pers. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 7, p. 3670-3672, 2012.

HASAN, N.; OSMAN, H.; MOHAMAD, S.; CHONG, W. K.; AWANG, K.; ZAHARILUDDIN, A. S. M. The Chemical Components of *Sesbania grandiflora* Root and Their Antituberculosis Activity. **Pharmaceuticals**. v. 5, p. 882-889, 2012.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEIJER, R. J.; Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34. n. 1, p. 3-16, 1993.

HELLEBREKERS, L. J. **Dor em Animais**. São Paulo: Manole, p. 69-79, 2002.

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

HEYWOOD, V. H. **Flowering Plants of the World**. Londres: BT Batsford, 1996.

HUANG, H. Y.; KO, H. H.; JIN, Y. J.; YANG, S. Z.; SHIH, Y. A.; CHEN, I. Dihydrochalcone glucosides and antioxidant activity from the roots of *Anneslea fragrans* var. *lanceolata*. **Phytochemistry**, v. 78, p. 120-125, 2012.

HUNSKAAR, S.; BERGE, O. G.; HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. **Behavioural Brain Research**, v. 21, n. 2, p. 101-108, 1986.

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

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911–2919, 2001.

JANICKI, P.; LIBICH, J. Detection of antagonist activity for narcotic analgesics in mouse hot-plate test. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 10, p. 623-626, 1978.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210. 2001.

JUN, N.; HONG, G.; JUN, K.; Synthesis and evaluation of 2',4',6'-trihydroxychalcones as a new class of tyrosinase inhibitors. **Bioorganic Medical Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 2396-2402, 2007.

KAGAWA, H.; SHIGEMATSU, A.; OHTA, S.; HARIGAYA, Y. Preparative Monohydroxyflavanone Syntheses and a Protocol for Gas Chromatography-

Mass Spectrometry Analysis of Monohydroxyflavanones. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 5, p. 547-554, 2005.

KAZUNDRI, Y.; HISAO, K.; HIROKI, U.; HITOSHI, M.; TADAMITSU, S.; TOKUTARO, M.; TOSHIO, S. Gastric cytoprotective anti-ulcerogenic actions of hydroxychalcones in rats. **Planta Medica**, v. 58, n. 5, p. 389-393, 1992.

KLOOS, H.; THIONGO, F. W.; OUMA, J. H.; BUTTERWORTH, A. E. Preliminary evaluation of some wild and cultivated plants for snail control in machakos district, Kenya. **Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 197-204, 1987.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. de A; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.

KURAISHI, Y. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal analgesic tests. **Brain Research**, v. 273, p. 245-252, 1983.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J. **Physiology of Pain. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. Philadelphia:Saunders, v. 30, n. 4, p. 703-728, 2000.

LANG, Y. C.; HUANG, Y. T.; TSAI, S. H.; LIN-SHIAU, S. Y.; CHEN, C. F.; LIN, J. K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1945-1952, 1999.

LE BARS, D., GOZARIU M. & CADDEN, S. Animal models of nociception. **Pharmacology Review**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEE, J. I.; SON, H. S; PARK, H. An efficient synthesis of flavones from 2-hydroxybenzoic acids. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 25, n. 12, p. 1945-1947, 2004.

LEUNER, O.; HAVLIK, J.; PROKUDINA, J. H. E.; NOVY, P.; KOKOSKA, L. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 15, 2012.

LEWIS, G. P.; SCHIRE, B. D. Leguminosae or fabaceae?. In; KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (ed.). **Advances in legume systematic. Kew: Royal Botanic Gardens**, v. 10, p. 1-3, 2003.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. **Legumes of the world**, Kew Royal Botanic Gardens, 2005.

LIAO, H. R.; CHEN, J. J.; CHIEN, Y. H.; LIN, S. Z.; LIN, S.; TSENG, C. P. 5-hydroxy-7-methoxyflavone inhibits N-formyl-L-methionyl-L-leucyl L-phenylalanine-induced superoxide anion production by specific modulate membrane localization of Tec with a PI3K independent mechanism in human neutrophils. **Biochemical Pharmacology**. v. 84, p. 182-191, 2012.

LIMA, H. C. **Leguminosas arbóreas da mata atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florística em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. 2000. Tese (doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

LIMA, H. C.; QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P.; SOUZA, V. C.; DUTRA, V. F.; BORTOLUZZI, R. L. C.; IGANCI, J. R. V.; FORTUNATO, R. H.; VAZ, A. M. S. F.; SOUZA, E. R.; FILARDI, F. R.; VALLS, J. F. M.; GARCIA, F. C. P.; FERNANDES, J. M.; SILVA, R. C. V. M.; FORTUNA-PEREZ, A. P.; MANASANO, V.; MIOTTO, S. T. S.; TOZZI, A. M. G. A.; MEIRELES, J. E.; LIMA, L. C. P.; OLIVEIRA, M. L. A. A.; FLORES, A. S.; TORKE, B. M.; PINTO, R. B.; LEWIS, G. P.; BARROS, M. J. F.; RIBEIRO, R. D.; SCHÜTZ, R.; PENNINGTON, R. T.; KLITGAARD, B. B.; RANDO, J. G.; SCALON, V. R.; CARDOSO, D. B. O. S.; COSTA, L. C.; SILVA, M. J.; MOURA, T. M.; BARROS, L. A. V.; SILVA, M. C. R.; QUEIROZ, R. T.; SARTORI, A. L. B.; CAMARGO, R. 2010. Fabaceae. In **Catálogo das Plantas e Fungos do Brasil** (FORZZA, R.C.; BAUMGRATZ, J. F.; BICUDO, C. E. M.; JUNIOR, A. C.; A. COSTA; COSTA, D. P.; HOPKINS M. J. G.; LEITMAN P.; LOHMANN, L. G.; MAIA, MARTINELLI, L. C.; MENEZES, G. M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J.; SYLVESTRE, L.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D., org.). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 2, p. 989-1102, 2010.

LIN, M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M. T.; PAI, Y. S. In vitro anti-HIV activity of bioflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal Natural Products**, v. 60, p. 884-888, 1997.

LOOKER, J. H.; HANNEMAN, W. W. Physical and chemical properties of hydroxyflavones. I. infrared absorption spectra of monohydroxyflavones and their O-methyl and O-acetyl derivates. **Journal of Organic Chemistry**, v. 27, p. 381-389, 1962.

LUNA, S. P. L. **Dor, analgesia e bem estar animal**. ANAIS - I Congresso Internacional de Conceitos em Bem-estar Animal, p. 16-18, 2006.

MARTINEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MEDINA, J. H.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; MARDER, M.; WASOWSKI, C.; CALVO, D.; PALADINI, A. C. Overview-flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. **Neurochemical Research**, v. 22, p. 419-425, 1997.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthesist**, v. 46, n. 2, p. 142-53, 1997.

MIKELL, J. R.; KHAN, I. A. Bioconversion of 7-hydroxyflavanone: isolation, characterization and bioactivity evaluation of twenty-one phase I and phase II microbial metabolites. **Chem Pharm Bull.** v. 60, n. 9, p. 1139-1145, 2012.

MOELLERING, R. C. Jr. Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: **Patógenos emergentes nas doenças infecciosas: Relatório Especial Hospital Practice**. Euromédice: Editora Médicas, p.5-7, 2000.

MOHLENDROCK, R.H. A monograph of the leguminous genus *Zornia*. **Webbia**, v. 16, p. 1-141, 1961.

MUIR III, W. W.; HUBBELL, J. A. E.; SKARDA, R. T.; BEDNARSKI, R. M. **Manual de anestesia veterinária**. 3 ed. Porto Alegre:Artmed, p. 242-249, 2001.

MUTOH, E. M.; TAKAHASHI, M.; FUKUDA, K.; KOMATSU, H.; ENYA, T.; MATSUSHIMA-HIBIYA, Y.; MUTOH, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. **Japanese Journal Cancer Research**, v. 91, p. 686-691, 2000.

NIJVELD, J. R. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 74, p. 418-425, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. J. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal Natural of Products*, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

OBI, C. L.; RAMALIVHANA, J.; SAMIE, A.; IGUMBOR, E. O. Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in-vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolated from stool samples of patients in the venda region of South Africa. **Journal Health Population Nutrition**, v, 25, n. 4, p. 428-235, 2007.

OGBEIDE, O. N.; PARVEZ, M. A simple colorimetric quantification of flavonoids in the flowers of *Lonchocarpus cyanescens* genus: *Lonchocarpus*. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 41, n. 3, p. 233-239, 1991.

PALADINI, A. C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; WASOWSKI, C.; MEDINA, J. H. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 519-526, 1999.

PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**. v. 102, p. 937-44, 2001.

PARIS, R. R.; FAUGERAS, G.; PELTIER, M. Alkaloids and polyphenols from leguminosae. XXX. *Cadia ellisiana*, a Papilionacea from Madagascar. Flavonoids. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 32, n. 7-8, p. 397-402, 1974.

PASA, M. C.; SOARES, J. R.; GUARIM NETO, G. Estudo etnobotânico da comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Ariça Açu, MT, Brasil). **Acta Botânica Brasilica**, v. 19, p.195-207, 2005.

PAULA, J. A. M.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocardyophyllus* (Gomes) L. R. Landrum-Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 265-278, 2008.

PELTER, A.; WARD, R. S.; GRAY, T. I. The Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectra of Flavonoids and related compounds. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 23, p. 2475-2483, 1976.

PEREZ, A. P. F. O gênero *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae): Revisão taxonômica das espécies ocorrentes no Brasil e filogenia. 2009. Tese (doutorado) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PISERA, D. **Fisiologia da dor**. In: Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais. OTERO, P. E. São Paulo: Interbook, p. 30-74, 2005.

POLHILL, R. M. Classification of the Leguminosae. In BISDY, F. A.; BUCKINGHAM, J.; HARBORNE, J. B. (ed.) *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*. **Chapman & Hall**, New York, v. 1, p. 35-48, 1994.

PURDIER, A. W. Some flavonoid components of *Carmichaelia* (Papilionaceae) – a chemotaxonomic survey. **New Zealand Journal of Botany**, v. 22, p. 7-14, 1984.

QUEIROZ, L. P. Novas combinações em *Moldenhawera schrad.* e *Cratylia mart.* EX BENTH. e uma nova variedade de *Zornia brasiliensis* VOG. (Leguminosae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 16, p. 107-109, 1997.

RACOWSKI, I.; SILVAS, F. P. C.; TAKUSHI, D. T. T.; SILVA, D. W. G.; MIRANDA, P. S. Ação antimicrobiana do mel em leite fermentado. **Revista Analytica**. v. 30, p. 106-115, 2007.

RAPAKA, R. S.; SADEE, W. Editorial: Theme issue “Drug addiction-From basic research to therapies”. **American Association of Pharmaceutical Scientific Journal**, v. 7, n. 2, 2005.

RASO, G. M.; MELI, R.; DI CARLO, G.; PACILIO, M.; DI CARLO, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci**, v. 68, p. 921-931, 2001.

RATTY, A., K.; DAS, P. N. Effects of Flavonoids on Nonenzymatic Lipid Peroxidation: Structure-Activity Relationship. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 39, p. 69-79, 1998.

REN, F. Z.; GAO, Y. Q.; CHENG, X. X.; LI, L. H.; CHEN, S. H.; ZHANG, Y. L. Study on Chemical Constituents of *Zornia diphylla*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 03, 2012.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by

zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111–118. 2000.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 91, n. 13, 2011.

ROJAS, A.; BAH, M.; ROJAS, J. I.; SERRANO, V.; PACHECO, S. Spasmolytic activity of some plants used by the otomi indians of queretaro (Mexico) for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine**, v. 6, n. 5, p. 367-371, 1999.

ROMANELLI, G. P.; VIRLA, E. G.; DUCHOWICZ, P. R.; GADDI, A. L.; RUIZ, D. M.; BENNARDI, D. O.; ORTIZ, E. D. V.; AUTINO, J. C. Sustainable Synthesis of Flavonoid Derivatives, QSAR Study and Insecticidal Activity against the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae). **Journal Agric. Food Chemistry**. v. 58, p. 6290-6295, 2010.

RONZERE, M. C.; HERBAGE, D. GARRONE, R.; FREY, J. Influence of some flavonoids on reticulation of collagen fibrils in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 30, p. 1771-1776, 1981.

ROUQUAYROL, M. Z.; FONTELES, M. C.; ALENCAR, J. E.; JOSE DE ABREU MATOS, F.; CRAVEIRO, A. A. Molluscicidal activity of essential oils from Northeastern Brazilian plants. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**, v. 13, p. 135-143, 1980.

ROY, M.; PICHÉ, M.; CHEN, J. I.; PERETZ, I.; RAINVILLE, P. Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 49, p. 20900-20905, 2009.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**. v. 31, p. 381-389, 1997.

SAKAGAMI, H.; OI, T.; SATOH, K. Prevention of oral diseases by polyphenols. **In Vivo**, v. 13, p. 155-171, 1999.

SAWASDEE, P.; SABPHON, C.; SITTHIWONGWANIT, D.; KOKPOL, U. Anticholinesterase Activity of 7-Methoxyflavones Isolated from *Kaempferia parviflora*. **Phytotherapy Research**. v. 23, p. 1792-1794, 2009.

SCHOPPAN, L. T.; GASTAL, C. V. S. Plantas medicinais de um parque municipal de Porto Alegre, RS-Brasil. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 21, n. 2, p. 31-45, 2009.

SCIAMARELLI, A.; TOZZI, A. M. G. A. *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae – Papilionoideae – Aeschynomeneae) no estado de São Paulo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, p. 237-266, 1996.

SCIAMARELLI, A. ***Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae – Papilionoideae – Aeschynomeneae) no estado de São Paulo**. 1994. Dissertação (mestrado) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1994.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRS. 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. Ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRS. p. 833, 2002a.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. Ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRS. p. 15, 2002b.

SOOKKONGWAREE, K.; GEITMANN, M.; ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A.; DANIELSON, U. H. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora*. **Die Pharmazie**. v. 61, n. 8, p. 717-721, 2006.

SOUZA M. D.; FERNANDES, R. R.; PASA, M. C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade São Gonçalo Beira Rio, Cuiabá, MT. **Revista biodiversidade**, v. 9, n. 1, p. 91-100, 2010.

SOUZA, V. C. Gimnospermas in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SUTTHANUT, K.; SRIPANIDKULCHAI, B.; YENJAI, C.; JAY, M. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatograph. **Journal of Chromatography A**, v.1143, p. 227-233, 2007.

- TA, N.; WALLE, T. Aromatase inhibition by bioavailable methylated flavones. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 107, n. 1, p. 127-129, 2007.
- TAHARA, S. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 6, p. 1387-1404, 2007.
- TEXEIRA, M. J. Fisiopatologia da Nocicepção e da Supressão da Dor. **Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial**, v. 1, n. 4, 2001.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; CLIFFORD, M. N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1073-1080, 2000.
- TRANQUILLI, W. J. **Fisiologia da dor aguda**. In: GREENE, S. A. Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor. Porto Alegre: Artmed, p. 399-402, 2004.
- VEIGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VEITCH, N. C.; GRAYER, R. E.; Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 3, p. 555-611, 2008.
- VEITCH, N. C.; TIBBLES, L. L.; KITE, G. C.; IRELAND, H. E. Flavonol tetraglycosides from *Ateleia chicoasensis* (Leguminosae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 1274-1279, 2005.
- VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Eurogastroenterology Motility**, v. 20, p. 73–80, 2008.
- YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua historia e importância. **Revista Racine**, v. 43, p. 50-51, 1998.
- YENJAI, C.; WANICH, S.; PITCHUANCHOM, S.; SRIPANIDKULCHAI, B. Structural Modification of 5,7-Dimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* and Biological Activities. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 9, p. 1179-1184, 2009.
- YOON, J. H.; BAEK, S. J. Molecular Targets of Dietary Polyphenols with Anti-inflammatory Properties. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 5, p. 585-596, 2005.

WANG, W.; WENG, X.; CHENG, D. Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. **Food Chemistry**. v. 71, p. 45-49, 2000.

WOJCIECHOWSKI, M. F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (ed.). *Advances in Legume Systematic*. **Kew: Royal Botanic Gardens**, v. 10, p. 5-35, 2003.

ZIEGLGANSBERGER, W.; BERTHELE, A.; TOLLE, T.R. Understanding neuropathic pain. **CNS Spectrums**, v. 10, n. 4, p. 289-308. 2005.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **PAIN**, v. 16, p. 109-110, 1983.

Apêndice

