

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**ISOLAMENTO BIOMONITORADO DE FLAVONÓIDES DE
Sedum dendroideum: COMPROVAÇÃO DE SEU USO
POPULAR EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS**

Giany Oliveira de Melo

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais
Bloco H, CCS, Cidade Universitária
21 941-590 Rio de Janeiro
Fax 55-21-2562 6512

“Isolamento biomonitorado de flavonóides de *Sedum dendoideum*: comprovação de seu uso popular em processos inflamatórios”

GIANY OLIVEIRA DE MELO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Sônia Soares Costa

Rio de Janeiro
Agosto, 2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais

Bloco H, CCS, Cidade Universitária

21 941-590 Rio de Janeiro

Fax 55-21-2562 6512

**“Isolamento biomonitorado de flavonóides de *Sedum dendroideum*:
comprovação de seu uso popular em processos inflamatórios”**

GIANY OLIVEIRA DE MELO

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Rio de Janeiro, 04 de agosto de 2006.

Aprovada por:

Presidente, Profa. Dra. Sônia Soares Costa

Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira

Profa. Dra. Lusiele Guaraldo

Prof. Dr. Carlos Roland Kaiser

Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva

Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa

Melo, Giany Oliveira de.

Isolamento biomonitorado de flavonóides de *Sedum dendroideum*: comprovação de seu uso popular em processos inflamatórios/Giany Oliveira de Melo. Rio de Janeiro:UFRJ/ NPPN, 2006.

xxiii,187f.:il.; 31 cm.

Orientador: Sônia Soares Costa

Tese (doutorado) - UFRJ/ NPPN/ Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, 2006.

Referências Bibliográficas: f.188-201.

1. *Sedum dendroideum*. 2. Crassulaceae. 3. Flavonóis glicosídicos. 4. Kaempferol. 5. Quercetina. 6. Folhas. 7. Caules. 8. Atividade antinociceptiva. 9. Atividade antiinflamatória. 10. RMN. I. Costa, Sônia Soares. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais. III. Título.

A Deus, por ter me dado força e coragem durante toda a minha trajetória acadêmica, não me deixando nunca desistir dos meus objetivos.

Aos meus queridos pais, José Barbosa de Melo e Maria do Carmo O. de Melo, pelo amor, pela força, carinho e formação; por terem me acompanhado e me incentivado.

À professora Sônia Soares Costa, pela orientação, dedicação, aprendizado, ensinamentos, formação, carinho e exemplo de profissionalismo.

*Ao meu namorado Agustín Mínguez, pelo amor,
dedicação, cumplicidade, incentivo, compreensão,
companheirismo e paciência em todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

☞ Aos professores Edilberto Rocha Silveira (Universidade do Ceará), Lusiele Guaraldo (Santa Casa - SP), Paulo Roberto Ribeiro Costa (UFRJ), Carlos Roland Kaiser (UFRJ), Antonio Jorge Ribeiro da Silva (UFRJ), Luzineide W. Tinoco (suplente - UFRJ) e Rosana Conrado Lopes (suplente - UFRJ) por terem aceitado fazer parte da banca examinadora desta tese de doutorado.

☞ Ao professor Frederico Argollo Vanderlinde do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela parceria e colaboração nos ensaios farmacológicos, em especial aos seus alunos de iniciação científica David do C. Malvar e Priscilla A. Pires.

☞ Ao professor Carlos Roland Kaiser (Instituto de Química, UFRJ) pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

☞ Ao professor Pedro Germano Filho do Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela identificação botânica do bálsamo.

☞ À professora Catherine Guette (SONAS UFR Sciences Pharmaceutiques et Ingénierie de la Santé – França) pela realização dos espectros de massas.

☞ Ao professor Franco Francesco Vincieri (Universidade de Florença, Itália) pela utilização do aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas.

☞ Ao professor John Payne Woodall (Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ) pela generosa ajuda na elaboração do *Abstract* desta tese.

☞ A todos os professores do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais que colaboraram com a minha formação.

☞ À professora Sônia Ubatuba pela constante disponibilidade ao longo deste trabalho.

☞ Ao técnico Francisco de Assis Vieira dos Santos (Central Analítica - NPPN) pela realização de alguns espectros de RMN.

☞ À grande amiga e doutoranda Michelle Frazão Muzitano pelas análises de CLAE-UV-EM realizadas na Universidade de Florença, pela amizade, carinho, companheirismo, disponibilidade e presença constante no dia-a-dia do laboratório e nos momentos mais importantes da minha vida.

☞ À grande amiga doutoranda e professora Janaína Dória Líbano Soares, pela longa amizade e carinho.

☞ Aos doutores Ana Paula de Almeida, Daniela Barros de Oliveira e Zenildo Buarque de Moraes Filho, que muito contribuíram para meu aprimoramento, pela amizade e pelo companheirismo.

☞ À doutoranda Maria de Lourdes M. de Souza pela amizade, incentivo e grande disponibilidade.

☞ À mestranda Maria Fernanda Paresqui Corrêa pela disponibilidade, amizade, paciência e palavras de incentivo.

☞ Ao mestrando Douglas Siqueira de Almeida Chaves pela alegria constante, bom humor carinho e amizade.

☞ A todos os alunos de Iniciação Científica que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos (LPN-Bio), em especial às alunas Fernanda do Nascimento José, Camila A. Linhares, Luciana Santos de Oliveira, Marina J. Santiago, Nathalia S. Segreto, Natalia Bousquet, Isabel Cristina V. Silva e Marcela Coutinho, que muito contribuíram para o clima familiar de nossa equipe.

☞ A toda minha família, tios, primos e avós, pela paciência e palavras de incentivo, que deixaram minha vida um pouco mais alegre e menos tensa neste momento tão importante e decisivo.

☞ Aos funcionários do NPPN pelas gentilezas.

☞ À Coordenação de Ensino de Pós-Graduação do NPPN pelo apoio prestado.

☞ À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida durante a realização deste trabalho.

☞ A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE ESQUEMAS	xiii
ÍNDICE DE ESPECTROS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xx
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiii
INTRODUÇÃO	001
A REAÇÃO INFLAMATÓRIA	002
MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO	003
FÁRMACOS UTILIZADOS NO COMBATE AO PROCESSO INFLAMATÓRIO	007
ÚLCERAS PÉPTICAS	010
TRATAMENTO DAS ÚLCERAS PÉPTICAS	012
O PAPEL DA INFLAMAÇÃO NA PATOGÊNESE DAS ÚLCERAS PÉPTICAS	013
BUSCA POR NOVOS AGENTES ANTIINFLAMATÓRIOS	014
PLANTAS MEDICINAIS	015
Fitoterapia	015
Plantas com Atividade Antiinflamatória	017
FAMÍLIA CRASSULACEAE	017
Gêneros mais Utilizados na Medicina Popular	018
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS ESPÉCIES DE <i>Sedum</i>	020
A ESPÉCIE <i>Sedum dendroideum</i> MOC ET SESSÉ EX DC	026
Importância do Estudo do Bálsamo	027
OBJETIVOS	028
MATERIAIS E MÉTODOS	030
EXPERIMENTAL GERAL	031
MATERIAL VEGETAL	032
EXTRAÇÃO	032
FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS	033
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	034
ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)	035
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	035
PARTE FITOQUÍMICA	037
OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO SUMO DAS FOLHAS FRESCAS	038
OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO DOS CAULES	052
PARTE FARMACOLÓGICA	056
GERAL	057

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA	058
RESULTADOS E DISCUSSÃO	061
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS FLAVONÓIDES ISOLADOS DAS FOLHAS	062
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF1	063
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF2	072
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF3	081
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF4	091
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF5	100
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF6	109
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF7	116
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF8	123
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS FLAVONÓIDES ISOLADOS DOS CAULES	125
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SC1	126
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SC2	128
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SC3	130
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SC4	138
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SC5	140
PERFIL QUÍMICO DE <i>Sedum dendroideum</i>	144
ANÁLISE QUALITATIVA DO SUMO DAS FOLHAS	145
ANÁLISE QUALITATIVA DO EXTRATO DOS CAULES	151
PERFIL FLAVONOÍDICO: FOLHAS X CAULES	153
Análise Quantitativa dos Flavonóides das Folhas	153
Análise Quantitativa dos Flavonóides dos Caules	156
CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO DE <i>Sedum dendroideum</i> PARA O GÊNERO	158
ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DO SUMO, FRAÇÕES E FLAVONÓIDES DE <i>Sedum dendroideum</i>	161
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DO SUMO DE <i>Sedum dendroideum</i>	162
FRACIONAMENTO DO SUMO DE <i>Sedum dendroideum</i> GUIADO PELA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	168
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DE FLAVONÓIDES ISOLADOS DO SUMO DE <i>Sedum dendroideum</i>	171
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, DADOS ESPECTROMÉTRICOS E FARMACOLÓGICOS DOS FLAVONÓIDES ISOLADOS DE <i>Sedum dendroideum</i>	179
RESUMO DOS FLAVONÓIDES ISOLADOS	180
CONCLUSÕES	185
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	188
ANEXO	202

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Partição dos sobrenadantes com solventes orgânicos	033
Esquema 2: Fracionamento do sumo seco (SF1ss) obtido da partida Sd01	039
Esquema 3: Isolamento dos flavonóides SF1 e SF2	040
Esquema 4: Isolamento do flavonóide SF3	040
Esquema 5: Purificação da fração butanólica SFB	043
Esquema 6: Fracionamento de SFB2 e isolamento do flavonóide SF4	044
Esquema 7: Fracionamento de SFB3	045
Esquema 8: Obtenção dos flavonóides SF3 e SF5	046
Esquema 9: Partição do sobrenadante do sumo das folhas da partida Sd04	047
Esquema 10: Purificação da fração butanólica de Sd04 (SF4B)	048
Esquema 11: Fracionamento de SF4A	049
Esquema 12: Fracionamento de SF4A3	049
Esquema 13: Isolamento do flavonóide SF7	050
Esquema 14: Fracionamento de SF4A4 e isolamento dos flavonóides SF6 e SF8	051
Esquema 15: Partição do sobrenadante do extrato dos caules de <i>Sedum dendroideum</i>	052
Esquema 16: Purificação da fração butanólica de <i>S. dendroideum</i>	053
Esquema 17: Fracionamento de SCB2	053
Esquema 18: Obtenção dos flavonóides SC3 e SC4	054
Esquema 19: Isolamento dos flavonóides SC2 e SC5	055

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de SF1 (DMSO- d_6)	063
Espectro 2: Expansão da faixa de 7,80 a 6,40 ppm do espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de SF1 (DMSO- d_6)	064
Espectro 3: Expansão da faixa de 0,6 a 5,6 ppm do espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de SF1 (DMSO- d_6)	066
Espectro 4: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de SF1 (DMSO- d_6)	067
Espectro 5: Espectro de RMN 2D COSY (300,13 MHz) de SF1 (DMSO- d_6)	068
Espectro 6: Espectro de RMN 2D HMQC (300,13 x 75,47 MHz) de SF1 (DMSO- d_6)	069
Espectro 7: Espectro de RMN ^1H (400,13 MHz) de SF2 (DMSO- d_6)	072
Espectro 8: Expansão da faixa de 1,0 a 5,6 ppm do espectro de RMN ^1H (400,13 MHz) de SF2 (DMSO- d_6)	073
Espectro 9: Espectro de RMN ^{13}C (100,63 MHz) de SF2 (DMSO- d_6)	074
Espectro 10: Espectro de DEPT 135 (100,63 MHz) de SF2 (DMSO- d_6)	075
Espectro 11: Espectro de RMN 2D COSY (400,13 MHz) de SF2 (DMSO- d_6)	076
Espectro 12: Espectro de RMN 2D HMQC (400,13 x 100,63 MHz) de SF2 (DMSO- d_6)	077
Espectro 13: Expansão da faixa de 5,0 a 8,4 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMBC (400,13 x 100,63 MHz) de SF2 (DMSO- d_6)	078
Espectro 14: Espectro de RMN ^1H (200,13 MHz) de SF3 (DMSO- d_6)	081
Espectro 15: Espectro de RMN ^{13}C (100,63 MHz) de SF3 (DMSO- d_6)	083
Espectro 16: Expansão da região entre 68 e 102 ppm do espectro de RMN ^{13}C (100,63 MHz) de SF3 (DMSO- d_6)	084
Espectro 17: Expansão da faixa de 0 a 6 ppm do espectro de RMN 2D COSY (400,13 MHz) de SF3 (DMSO- d_6)	085
Espectro 18: Expansão da faixa de 2,6 a 4,2 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMQC (400,13 x 100,63 MHz) de SF3 (DMSO- d_6)	086
Espectro 19: Expansão da faixa entre 5,4 e 8,4 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMBC (400,13 x 100,63 MHz) de SF3 (DMSO- d_6)	087
Espectro 20: Expansão da faixa de 4,5 a 7,0 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMBC (400,13 x 100,63 MHz) de SF3 (DMSO- d_6)	088

Espectro 21: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de SF4 (DMSO- d_6)	091
Espectro 22: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) para SF4 (DMSO- d_6)	093
Espectro 23: Expansão da faixa entre 60 e 105 ppm do espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de SF4 (DMSO- d_6)	094
Espectro 24: Espectro de DEPT 135 (75,47 MHz) de SF4 (DMSO- d_6)	094
Espectro 25: Expansão da faixa de 2,9 a 5,7 ppm do espectro de RMN 2D COSY (300,16 x 75,47 MHz) de SF4 (DMSO- d_6)	095
Espectro 26: Expansão da faixa de 0 a 4,0 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMQC (300,16 x 75,47 MHz) de SF4 (DMSO- d_6)	096
Espectro 27: Expansão da faixa entre 5,0 e 8,2 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMBC (300,16 x 75,47 MHz) de SF4 (DMSO- d_6)	097
Espectro 28: Espectro de RMN ^1H (300,16 MHz) de SF5 (DMSO- d_6)	100
Espectro 29: Expansão da faixa de 3,0 a 5,8 ppm do espectro de RMN ^1H (supressão de água) (300,16 MHz) de SF5 (DMSO- d_6)	101
Espectro 30: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de SF5 (DMSO- d_6)	102
Espectro 31: Expansão da faixa de 61 a 83 ppm do espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de SF5 (DMSO- d_6)	103
Espectro 32: Espectro de RMN 2D COSY (300,16 MHz) de SF5 (DMSO- d_6)	104
Espectro 33: Espectro de RMN 2D HMQC (300,16 x 75,47 MHz) de SF5 (DMSO- d_6)	105
Espectro 34: Expansão da faixa entre 4,4 e 8,2 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMBC (300,16 x 75,47 MHz) de SF5 (DMSO- d_6)	106
Espectro 35: Espectro de RMN ^1H (300,16 MHz) de SF6 (CD $_3$ OD)	109
Espectro 36: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de SF6 (CD $_3$ OD)	111
Espectro 37: Espectro de RMN 2D COSY (300,16 MHz) de SF6 (CD $_3$ OD)	112
Espectro 38: Espectro de RMN 2D HMQC (300,16 x 75,47 MHz) de SF6 (CD $_3$ OD)	113
Espectro 39: Expansão da faixa de 5,3 a 8,2 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN HMBC 2D (300,16 x 75,47 MHz) de SF6 (CD $_3$ OD)	114
Espectro 40: Espectro de RMN ^1H (200,16 MHz) de SF7 (CD $_3$ OD)	116
Espectro 41: Espectro de RMN ^{13}C (100,63 MHz) para SF7 (CD $_3$ OD)	118
Espectro 42: Espectro de RMN 2D COSY (200,16 MHz) de SF7 (CD $_3$ OD)	119
Espectro 43: Espectro de RMN 2D HMQC (200,16 x 50,33 MHz) de SF7 (CD $_3$ OD)	120

Espectro 44: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) para SF8 (CD_3OD)	123
Espectro 45: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de SF8 (CD_3OD)	124
Espectro 46: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de SC1 ($\text{DMSO}-d_6$)	126
Espectro 47: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) para SC1 ($\text{DMSO}-d_6$)	127
Espectro 48: Espectro de RMN ^1H (199,97 MHz) de SC2 ($\text{DMSO}-d_6$)	128
Espectro 49: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de SC3 ($\text{DMSO}-d_6$)	130
Espectro 50: Expansão da faixa entre 6,40 e 7,80 ppm do espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de SC3 ($\text{DMSO}-d_6$)	131
Espectro 51: Expansão da região entre 1,0 e 5,6 ppm do espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de SC3 ($\text{DMSO}-d_6$)	132
Espectro 52: Espectro de RMN 2D COSY (300,13 MHz) de SC3 ($\text{DMSO}-d_6$)	133
Espectro 53: Espectro de RMN 2D HMQC (300,13 x 75,47 MHz) de SC3 ($\text{DMSO}-d_6$)	134
Espectro 54: Expansão da faixa de 5,5 a 12,8 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMBC (300,13 x 75,47 MHz) de SC3 ($\text{DMSO}-d_6$)	135
Espectro 55: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de SC4 ($\text{DMSO}-d_6$)	138
Espectro 56: Espectro de RMN ^1H (199,97 MHz) de SC5 ($\text{DMSO}-d_6$)	140
Espectro 57: Espectro de massas correspondente ao flavonóide SF1	148
Espectro 58: Espectro de massas correspondente ao flavonóide SF2	148
Espectro 59: Espectro de massas correspondente ao flavonóide SF3	149
Espectro 60: Espectro de massas correspondente ao flavonóide SF4	149
Espectro 61: Espectro de massas correspondente ao flavonóide SF5	150
Espectro 62: Espectro de massas correspondente ao flavonóide SF6	150
Espectro 63: Espectro de massas correspondente ao flavonóide SF7	151
Espectro 64: Espectro de massas correspondente ao flavonóide SC3	152
Espectro 65: Espectro de massas correspondente ao flavonóide SC5	152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Biossíntese das prostaglandinas	004
Figura 2: Dois exemplos de glicocorticóides	007
Figura 3: Estruturas químicas de alguns AINEs não seletivos	008
Figura 4: Estruturas químicas de alguns AINEs seletivos para a COX-2	009
Figura 5: Estruturas químicas de alguns fármacos antiulcerogênicos	012
Figura 6: Fotos de <i>Sedum dendroideum</i>	026
Figura 7: Mudas de bálsamo (<i>Sedum dendroideum</i>)	032
Figura 8: Estrutura do kaempferol	065
Figura 9: Estrutura de SF1	070
Figura 10: Estrutura de SF2	079
Figura 11: Estrutura de SF3	089
Figura 12: Estrutura de SF4	098
Figura 13: Estrutura de SF5	107
Figura 14: Estrutura de SF6	115
Figura 15: Estrutura de SF7	121
Figura 16: Estrutura da quercetina	131
Figura 17: Estrutura de SC3	136
Figura 18: Estrutura de SC5	142
Figura 19: Cromatograma do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> (coleta Sd01)	145
Figura 20: Cromatograma do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> (coleta Sd02)	146
Figura 21: Cromatograma do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> (coleta Sd03)	146
Figura 22: Cromatograma do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> (coleta Sd04)	146
Figura 23: Cromatograma da fração em acetato de etila obtida da partição do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> (coleta Sd04)	146
Figura 24: Cromatograma da fração butanólica obtida da partição do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> (coleta Sd04)	146
Figura 25: Cromatograma do extrato aquoso dos caules de <i>Sedum dendroideum</i>	151

Figura 26: Curva de calibração da rotina por CLAE	153
Figura 27: Concentração (% m/m) dos flavonóides no sumo das folhas frescas de diferentes partidas de <i>Sedum dendroideum</i> (Sd01, Sd02, Sd03 e Sd04)	155
Figura 28: Concentração (% m/m) dos flavonóides SC1-5 no extrato dos caules de <i>Sedum dendroideum</i>	157
Figura 29: Classes de flavonóides (%) encontradas no gênero <i>Sedum</i>	159
Figura 30: Ocorrência das agliconas (%) de flavonóis no gênero <i>Sedum</i>	160
Figura 31: Efeito do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> no número de contorções abdominais	162
Figura 32: Efeito do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> sobre a dor neurogênica e a dor inflamatória	164
Figura 33: Avaliação da atividade antiedematogênica do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i>	165
Figura 34: Efeito do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> sobre a migração leucocitária	166
Figura 35: Avaliação do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> no teste do <i>rota-rod</i>	167
Figura 36: Efeito do sobrenadante e do precipitado obtidos do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> sobre o número de contorções abdominais	169
Figura 37: Avaliação das frações aquosa e metanólica sobre as contorções abdominais	170
Figura 38: Inibição do número de contorções abdominais pelos flavonóides isolados de <i>Sedum dendroideum</i>	172
Figura 39: Padrão de substituição dos flavonóides SF1, SF2, SF3 e SF6	176

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Flavonóides isolados em espécies do gênero <i>Sedum</i>	021
Tabela 2: Agliconas encontradas no gênero <i>Sedum</i>	025
Tabela 3: Esquema do gradiente de solventes	036
Tabela 4: Código das diferentes partidas de <i>Sedum dendroideum</i>	038
Tabela 5: Rendimento da extração e precipitação de Sd02 e Sd03	041
Tabela 6: Rendimento das partições com solventes orgânicos de Sd02 e Sd03	042
Tabela 7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de SF1 (DMSO- d_6)	071
Tabela 8: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de SF2 (DMSO- d_6)	080
Tabela 9: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de SF3 (DMSO- d_6)	090
Tabela 10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de SF4 (DMSO- d_6)	099
Tabela 11: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de SF5 (DMSO- d_6)	108
Tabela 12: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de SF6 (CD $_3$ OD)	115
Tabela 13: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de SF7 (CD $_3$ OD)	122
Tabela 14: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de SF8 (CD $_3$ OD)	124
Tabela 15: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de SC3 (DMSO- d_6)	137
Tabela 16: Dados de RMN ^1H de SC5 (DMSO- d_6)	143
Tabela 17: Área (254 nm) e percentual dos flavonóides isolados (% m/m) calculados em relação ao sumo liofilizado	154
Tabela 18: Área e percentual (m/m) dos flavonóides isolados no extrato dos caules	156
Tabela 19: Efeito dos flavonóides obtidos do sumo das folhas de <i>Sedum dendroideum</i> no teste da migração leucocitária induzida por carragenina	173
Tabela 20: Percentuais de inibição da nocicepção e da inflamação dos flavonóides SF1 , SF2 e SF3 e SF6 , em dose molar (mmol/kg), para a dose de 10 mg/kg	174

LISTA DE ABREVIATURAS

2D	bidimensional
μg	micrograma
μm	micrômetro
AAAA	Acetato de Etila/Acetona/Ácido acético/Água
AINES	antiinflamatórios não-esteróides
BAW	<i>n</i> -butanol/Ácido acético/Água
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD₃OD	metanol deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy Homonuclear (¹ H- ¹ H)
COX	ciclooxigenase
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DEXA	Dexametasona
DIAZ	Diazepan
DMSO-<i>d</i>₆	Hexadeuteriodimetil-sulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
HMBC	¹ H-Detected Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy
HMQC	¹ H-Detected Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence Experiment
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
<i>i.p.</i>	via intraperitoneal
ID₅₀	Dose Inibitória 50%
IL-1	interleucina-1
INDO	indometacina
INF-γ	interferon γ
iNOS	óxido nítrico sintetase indutível
kg	quilograma
kV	quilo volt
LOX	lipoxigenase
mg	miligrama
MHz	Megahertz
min	minuto
mL	mililitros
mm	milímetro
mmol	milimol
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetase

p.o.	via oral
PAF	fator de ativação plaquetária
PG	prostaglandina
PL	fosfolipase
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP	Reverse Phase
s.c.	via sub-cutânea
SC1	kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo
SC2	kaempferol 3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo
SC3	quercetina 3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo
SC4	kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo
SC5	quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo
SF1	kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo
SF1A	fração aquosa obtida do fracionamento do sobrenadante do sumo das folhas de <i>S. dendroideum</i>
SF1M	fração metanólica obtida do fracionamento do sobrenadante do sumo das folhas de <i>S. dendroideum</i>
SF2	kaempferol 3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo
SF3	kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo
SF4	kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- β -D-glicopiranosídeo
SF5	kaempferol 3-O- β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo
SF6	kaempferol 7-O- α -L-ramnopiranosídeo
SF7	kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo (afzelina)
SF8	kaempferol
SF1sn	sobrenadante obtido a partir da precipitação do sumo do bálsamo
SF1ppt	precipitado obtido a partir da precipitação do sumo do bálsamo
TNF-α	fator de necrose tumoral α
TX	tromboxano
UV	Ultravioleta
V	volt
ppm	partes por milhão
rpm	rotações por minuto

RESUMO

Isolamento biomonitorado de flavonóides de *Sedum dendroideum*: comprovação de seu uso popular em processos inflamatórios

GIANY OLIVEIRA DE MELO

Orientadora: Sônia Soares Costa

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

O sumo das folhas de *Sedum dendroideum* (Crassulaceae), conhecido popularmente por bálsamo, é utilizado no tratamento de úlceras gastrintestinais e de afecções de pele. Considerando a importância terapêutica desta espécie, este trabalho teve como objetivo seu estudo químico e farmacológico, visando justificar seu uso na medicina popular.

O estudo fitoquímico do bálsamo levou ao isolamento de dez flavonóides. A partir do sumo das folhas foram isolados 8 flavonóides, todos derivados de kaempferol: kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF1**; kaempferitrina), kaempferol 3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF2**), kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF3**), kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- β -D-glicopiranosídeo (**SF4**), kaempferol 3-O- β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF5**, um flavonóide inédito), kaempferol 7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF6**), kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF7**; afzelina) e kaempferol (**SF8**). Do extrato aquoso dos caules foram isolados cinco flavonóides: dois são glicosídeos de quercetina (quercetina 3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo e quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo), e três já tinham sido encontrados nas folhas (**SF1**, **SF2** e **SF3**). A elucidação estrutural dos flavonóides foi feita com base nas análises de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135, COSY, HMQC, HMBC e Espectrometria de Massas.

A análise do sumo das folhas por CLAE-UV-EM permitiu determinar **SF1** como o flavonóide majoritário presente no bálsamo, seguido de **SF2** e **SF3**.

O sumo das folhas de *S. dendroideum* foi avaliado quanto às atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiinflamatória após sua administração por via oral em camundongos. Observou-se um efeito analgésico dose dependente, sem efeitos sobre o sistema nervoso central. Além disso, foram evidenciadas as atividades antiedematogênica e imunossupressora, confirmando a presença de substâncias no sumo que influenciam a síntese de mediadores inflamatórios, exercendo, assim, a atividade antiinflamatória.

O estudo fitoquímico do sumo das folhas utilizando a estratégia de fracionamento biomonitorado pela atividade antinociceptiva levou a uma fração flavonoídica ativa, de onde apenas quatro flavonóides apresentaram massa disponível para os ensaios farmacológicos: **SF1**, **SF2**, **SF3** e **SF6**.

Os flavonóides foram avaliados quanto às atividades antinociceptiva e antiinflamatória *in vivo*. Todos os flavonóides testados apresentaram atividade, em maior ou menor grau, mostrando que estes contribuem conjuntamente para os efeitos observados no sumo. Entretanto, considerando que **SF1** é o flavonóide majoritário presente no bálsamo, ele pode ser considerado como principal responsável por essas atividades. Enquanto a administração por via oral do sumo (1 g/mg) inibiu 54,6% a nocicepção e 67,8% a migração leucocitária, **SF1** apresentou inibição de 59,9% (1 mg/kg) e 43,0% (10 mg/kg), respectivamente.

O estudo químico e farmacológico das folhas de *Sedum dendroideum* levou ao isolamento de flavonóides ativos, o que justifica o uso desta planta medicinal pela população no combate a doenças que envolvem processos inflamatórios.

Palavras-chave: *Sedum dendroideum*; Crassulaceae; flavonóis glicosídicos; kaempferol; quercetina; folhas; caules; atividade antinociceptiva; atividade antiinflamatória; RMN.

Rio de Janeiro
Agosto, 2006

ABSTRACT

Bio-guided isolation of flavonoids from *Sedum dendroideum*: support of its popular use to treat inflammation

GIANY OLIVEIRA DE MELO

Orientadora: Sônia Soares Costa

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

The fresh juice from leaves of *Sedum dendroideum* (Crassulaceae), known popularly as balsam, is used to treat ulcers and dermatitis. Considering the therapeutic profile of this species, the aim of this work was to assess the chemical and pharmacological properties that could explain its use in folk medicine.

The phytochemical investigation of balsam yielded ten flavonoids. From leaf juice eight flavonoids were obtained, all of them kaempferol derivatives: kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside (**SF1**; kaempferitrin), kaempferol 3-O- α -D-glucopyranoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside (**SF2**), kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside (**SF3**), kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside-7-O- β -D-glucopyranoside (**SF4**), kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside (**SF5**, a new flavonoid), kaempferol 7-O- α -L-rhamnopyranoside (**SF6**), kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside (**SF7**; afzelin) and kaempferol (**SF8**). From stem extract five flavonoids were obtained: two are quercetin glycosides (quercetin 3-O- α -D-glucopyranoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside and quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside) and three were found previously in leaves (**SF1**, **SF2** e **SF3**). The chemical structures of flavonoids were based on ^1H , ^{13}C NMR, DEPT 135, COSY, HMQC, HMBC data and Mass Spectrometry.

The analysis of the leaf juice by HPLC-UV-MS permitted the determination of **SF1** as the major flavonoid in balsam, followed by **SF2** and **SF3**.

The antinociceptive, antioedematogenic and anti-inflammatory activities of fresh juice from *S. dendroideum* leaves were evaluated, after oral administration in mice. The juice caused a dose-related analgesic effect, without involvement of central analgesic mechanisms. Furthermore, the antioedematogenic and immunosuppressive activities were exhibited, confirming the presence of substances in the juice that influence inflammatory mediator synthesis, characterizing the anti-inflammatory activity.

The phytochemical study of the juice from leaves of *S. dendroideum* using the strategy of bio-guided purification by antinociceptive activity yielded an active flavonoid-enriched fraction, of which only four flavonoids with sufficient weight were evaluated by pharmacological assays: **SF1**, **SF2**, **SF3** and **SF6**.

Flavonoids were evaluated as to *in vivo* antinociceptive and anti-inflammatory activities. All the flavonoids assessed show activity, in a large or small range, showing that these substances contribute to the effects observed with the fresh juice. However, as **SF1** is the most abundant flavonoid in this species, it can be considered as the main one responsible for these activities. While the oral administration of fresh juice (1 g/mg) in mice inhibited 54.6% of nociception and 67.8% of leukocyte migration, **SF1** showed inhibition of 59.9% (1 mg/kg) and 43.0% (10 mg/kg), respectively.

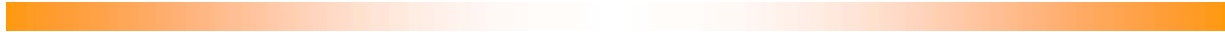
These chemical and pharmacological studies of *Sedum dendroideum* leaves led to isolation of active flavonoids, which explain the medicinal use of this plant by the public.

Keywords: *Sedum dendroideum*; Crassulaceae; glycosyl flavonols; kaempferol; quercetin; leaves; stems; antinociceptive activity; anti-inflammatory activity; NMR.

Rio de Janeiro
Agosto, 2006



INTRODUÇÃO



A REAÇÃO INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma resposta protetora imediata que ocorre nos tecidos sempre que há lesão ou destruição tissular. O processo inflamatório envolve uma série de fenômenos que podem ser desencadeados pela invasão de um patógeno (microorganismo causador de doença) ou pela ação de agentes físicos (radiação, queimadura, trauma), químicos (substâncias cáusticas), isquemia e interações antígeno-anticorpo (SILVA & CARVALHO, 2004).

Essas reações são protetoras, isto é, possuem valor em termos de sobrevivência do indivíduo. Entretanto, em alguns casos, as respostas de defesa podem atuar imprópriamente contra substâncias inócuas externas ao corpo ou contra tecidos do próprio corpo, de modo que as próprias respostas podem produzir lesões e passar a constituir parte do processo patológico (SILVA & CARVALHO, 2004).

A área inflamada, em nível macroscópico, apresenta características marcantes. A região atingida apresenta-se avermelhada, edemaciada, quente e dolorosa, havendo interferência ou alteração na função. O resultado final do processo inflamatório pode ser a cura, com ou sem cicatrização, ou a inflamação crônica, se o patógeno ou a substância nociva persistirem (LUENGO, 2005).

A reação inflamatória aguda consiste em dois componentes: uma reação inata, não imunológica, e uma resposta imune específica adquirida.

Reações Inatas

As reações inatas ocorrem localmente no interior dos tecidos, podendo se dividir em eventos vasculares (onde são produzidos mediadores a partir do plasma e das células provocando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular com exsudação) e eventos celulares (BUCKLE & HEDGECOCK, 1997; LUENGO, 2005).

A vasodilatação é produzida por diversos mediadores químicos (histamina, prostaglandinas E_2 e I_2) formados em decorrência da interação do microorganismo com o tecido. Alguns desses mediadores (histamina e PAF – fator de agregação plaquetária, por exemplo) também são responsáveis pela fase inicial de aumento da permeabilidade vascular (LAWRENCE *et al.*, 2002).

Nos eventos celulares, as células envolvidas na inflamação estão normalmente presentes nos tecidos (células endoteliais, mastócitos e macrófagos teciduais) ou então têm acesso ao local a partir do sangue (plaquetas e leucócitos) (LAWRENCE *et al.*, 2002; ABBAS & LICHTMAN, 2003).

Resposta imunológica específica

A resposta imunológica específica a um microorganismo invasor melhora acentuadamente a eficácia das respostas inatas não imunológicas do hospedeiro, já que ela se torna específica contra um determinado patógeno invasor.

As principais células dessa resposta são os linfócitos, que são divididos em três grupos principais: células B, responsáveis pela produção de anticorpos; células T, importantes na fase de inibição da resposta imune e responsáveis pelas reações imunes mediadas por células; e células NK (*natural killer*), células especializadas que são ativadas na resposta inata não imunológica (ABBAS & LICHTMAN, 2003).

A participação de linfócitos na resposta imune específica envolve duas fases: uma fase de indução, onde os linfócitos T regulam o desenvolvimento adicional da resposta imune, e uma fase efetora, onde as reações podem ser mediadas por anticorpos ou por células (ABBAS & LICHTMAN, 2003; ROBERTS II & MORROW, 2005).

Os anticorpos, envolvidos na resposta humoral, melhoram acentuadamente a resposta do hospedeiro a determinado patógeno. Entretanto, como os anticorpos não podem alcançar os patógenos quando estes se encontram no interior das células, foram desenvolvidos mecanismos imunes mediados por células, onde os linfócitos envolvidos nessa resposta migram para a área inflamada através da interação entre as moléculas de adesão e a célula endotelial e o linfócito (ABBAS & LICHTMAN, 2003).

MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO

A lesão tissular ou a exposição de macrófagos, neutrófilos ou outras células inflamatórias a diferentes patógenos durante o processo infeccioso resulta na formação, produção e liberação de diversos mediadores químicos. Estes serão os responsáveis pelas características marcantes da área inflamada, onde esta se apresenta avermelhada, edemaciada, quente e dolorosa (TRACEY, 2002; LUENGO, 2005).

Histamina

A histamina está armazenada em grânulos dos mastócitos e basófilos. É secretada quando os componentes do sistema do complemento interagem com receptores de membrana específicos, ou quando o antígeno interage com imunoglobulinas fixadas a células. Sua ação no processo inflamatório está relacionada com a vasodilatação e com o aumento da permeabilidade vascular (LAWRENCE *et al.*, 2002).

Eicosanóides

Os eicosanóides não são encontrados pré-formados nos tecidos, são produzidos a partir de fosfolipídios. Os eicosanóides estão implicados no controle de numerosos processos fisiopatológicos e estão entre os mais importantes mediadores e moduladores da reação inflamatória (MALAN JR & PORRECA, 2005).

Os eicosanóides são derivados do ácido araquidônico, que podem ser liberados a partir de fosfolipídios pela ação da fosfolipase A₂ (processo em uma etapa), ou em duas etapas envolvendo a fosfolipase C e a diacilglicerol lipase (MORROW & ROBERTS II, 2005).

O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado pelas ciclooxygenases (COX), iniciando a biossíntese de prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos), ou pelas lipoxigenases (LOX), originando os leucotrienos.

Prostanóides

A ciclooxygenase (COX) atua sobre o ácido araquidônico produzindo endoperóxidos cíclicos (PGG₂ e PGH₂) que dão origem aos prostanóides (PG – prostaglandinas e TX – tromboxanos). Estes afetam a maioria dos tecidos, exibindo uma variedade de efeitos notórios (MORROW & ROBERTS II, 2005; BOTTING, 2006) (**Figura 1**).

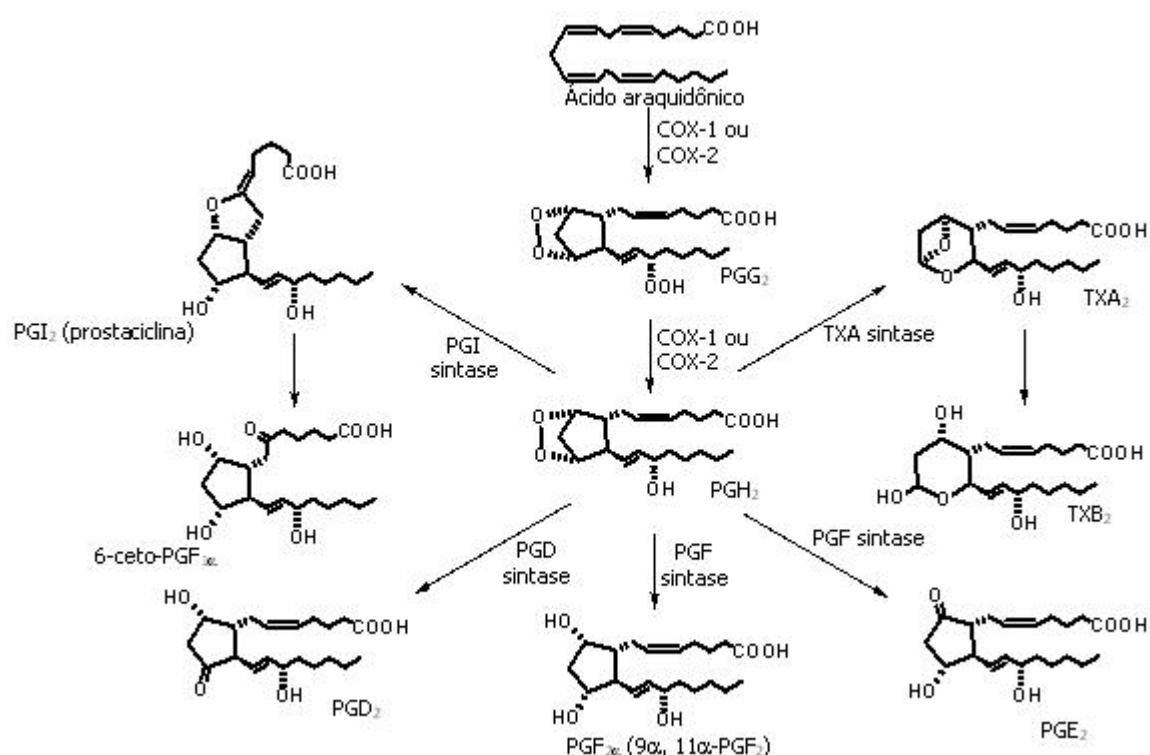


Figura 1: Biossíntese das prostaglandinas (modificado de BOTTING, 2006).

A resposta inflamatória é sempre acompanhada de liberação de prostanóides, onde a PGE_2 é predominante. Em áreas de inflamação aguda, a PGE_2 e a PGI_2 são produzidas pelos tecidos e vasos sanguíneos locais, enquanto os mastócitos liberam PGD_2 . Na inflamação crônica, as células da série monócitos-macrófagos também liberam PGE_2 e TXA_2 (SAUTEBIN, 2000; LAWRENCE *et al.*, 2002).

Leucotrienos (LT)

O LTB_4 é o principal leucotrieno envolvido no processo inflamatório. Ele exerce potente atividade quimiotática para leucócitos polimorfonucleares, eosinófilos e monócitos, promovendo a migração destes tipos celulares para o local afetado. Uma vez no sítio, os leucotrienos irão ativar as células da série branca, promovendo a desgranulação e a produção de superóxidos, que contribuem para os danos teciduais característicos da inflamação (BUCKLE & HEDGECOCK, 1997; LAWRENCE *et al.*, 2002; MORROW & ROBERTS II, 2005).

Fator de Ativação Plaquetária – PAF

O PAF, outro mediador derivado de fosfolípido, é liberado indiretamente por muitas células inflamatórias ativadas através da atividade da enzima PLA_2 sobre receptores específicos (MORROW & ROBERTS II, 2005).

Dentre as ações farmacológicas do PAF destacam-se a vasodilatação, com conseqüente aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia para leucócitos (eosinófilos, principalmente), ativação de leucócitos e ativação e agregação plaquetária (MORROW & ROBERTS II, 2005).

Bradicinina

A bradicinina é um peptídeo vasoativo formado pela ação da calicreína sobre substratos protéicos, denominados cininogênios. É formada quando a calicreína é ativada, ou seja, quando há exposição de colágeno, membrana basal, lipopolissacarídeos bacterianos entre outros (BROWN & ROBERTS II, 2005).

Na inflamação, a bradicinina causa vasodilatação (dependente, em grande parte, da célula endotelial devido à produção de NO e ativação de PLA_2 , com liberação de prostaciclina), aumento da permeabilidade vascular e estimulação das terminações nervosas para a dor (BROWN & ROBERTS II, 2005).

Óxido Nítrico (NO)

O NO possui ações principalmente pró-inflamatórias. Trata-se de um potente vasodilatador, que aumenta a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. O NO ou derivados exercem ação citotóxica contra bactérias, fungos, vírus e parasitas além de potencializar os mecanismos de defesa local. Entretanto, em excesso, pode ser prejudicial para as células do hospedeiro (SAUTEBIN, 2000; LAWRENCE *et al.*, 2002).

O NO é sintetizado pela NO sintetase (NOS). Existem três isoformas, sendo a forma indutível (iNOS), induzida em macrófagos e outras células pelo INF- γ (interferon γ), que está envolvida nas reações inflamatórias (SAUTEBIN, 2000).

Neuropeptídeos

Os neuropeptídeos liberados dos neurônios sensoriais contribuem para as reações inflamatórias, constituindo um fenômeno conhecido como inflamação neurogênica. Os principais peptídeos são a substância P, a neurocinina A e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (TRACEY, 2002).

Citocinas

As citocinas são peptídeos que, nas reações imunes e inflamatórias, são liberados e regulam a ação de células inflamatórias e do sistema imune (TRACEY, 2002).

Neste grupo estão incluídos as citocinas pró-inflamatórias TNF- α (fator de necrose tumoral α) e IL-1 (interleucina-1), liberadas dos macrófagos e de muitas outras células, que podem desencadear uma cascata de citocinas secundárias, entre as quais se destacam as quimiocinas (subfamília de citocinas que atraem e ativam as células inflamatórias móveis) (TRACEY, 2002; LAWRENCE *et al.*, 2002; ROBERTS II & MORROW, 2005).

FÁRMACOS UTILIZADOS NO COMBATE AO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Os principais agentes antiinflamatórios são representados pelos glicocorticóides e pelos antiinflamatórios não esteroidais.

Glicocorticóides

A ação antiinflamatória dos glicocorticóides (por exemplo, a hidrocortisona e a dexametasona; **Figura 2**) deve-se, em grande parte, à inibição da transcrição do gene da ciclooxigenase-2 e à indução da proteína lipocortina, um inibidor da enzima fosfolipase A₂. São muito utilizados na terapia das doenças auto-imunes e na prevenção e/ou tratamento da rejeição de transplantes (SCHIMMER & PARKER, 2005).

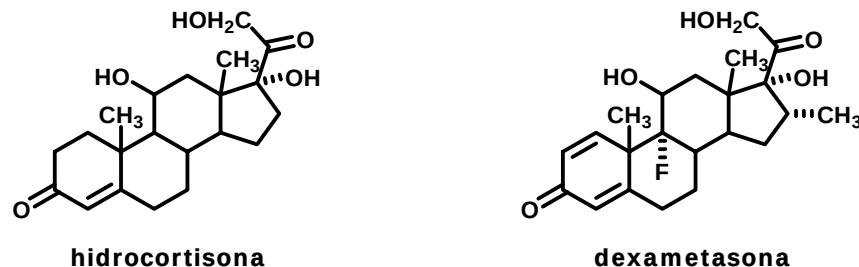


Figura 2: Dois exemplos de glicocorticóides.

Entretanto, os principais fármacos utilizados no tratamento dos sinais e sintomas da inflamação são os antiinflamatórios não esteroidais.

Agentes antiinflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os AINEs (antiinflamatórios não esteroidais) são os agentes antiinflamatórios mais utilizados na terapêutica. Na atualidade, já existem mais de 50 AINEs diferentes no mercado, porém nenhum deles é ideal no controle ou na modificação dos sinais e sintomas da inflamação, particularmente aqueles que ocorrem nas doenças articulares inflamatórias comuns. Praticamente todos os AINEs do mercado possuem efeitos indesejáveis significativos, particularmente nos indivíduos idosos (FLOWER, 2003).

Seus efeitos (antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos), em geral, estão relacionados com a inibição da araquidonato ciclooxigenase (COX) e, portanto, inibição da produção de prostaglandinas e tromboxanos (ROBERTS II & MORROW, 2005).

Existem dois tipos de COX. A COX-1, que é uma enzima constitutiva expressa na maioria dos tecidos, incluindo as plaquetas, e está envolvida na sinalização entre células e na homeostasia tecidual; e a COX-2, induzida principalmente nas células inflamatórias quando estas são ativadas. Conseqüentemente, é responsável pela produção dos mediadores prostanóides da inflamação (ROBERTS II & MORROW, 2005; BOTTING, 2006).

A ação antiinflamatória dos AINEs está claramente relacionada com a sua inibição da COX-2, e quando utilizados como agentes antiinflamatórios, seus efeitos indesejáveis decorrem, em grande parte, da inibição da COX-1.

O AINE mais antigo é a aspirina ou ácido acetilsalicílico, um derivado do salicilato originalmente obtido de fontes vegetais. Além deste, outros antiinflamatórios não esteroidais se destacam: paracetamol, diclofenaco, piroxicam, ácido mefenâmico e naproxeno (**Figura 3**), todos inibidores não seletivos da COX (atuam sobre ambas as enzimas COX-1 e COX-2) (ROBERTS II & MORROW, 2005; BOTTING, 2006).

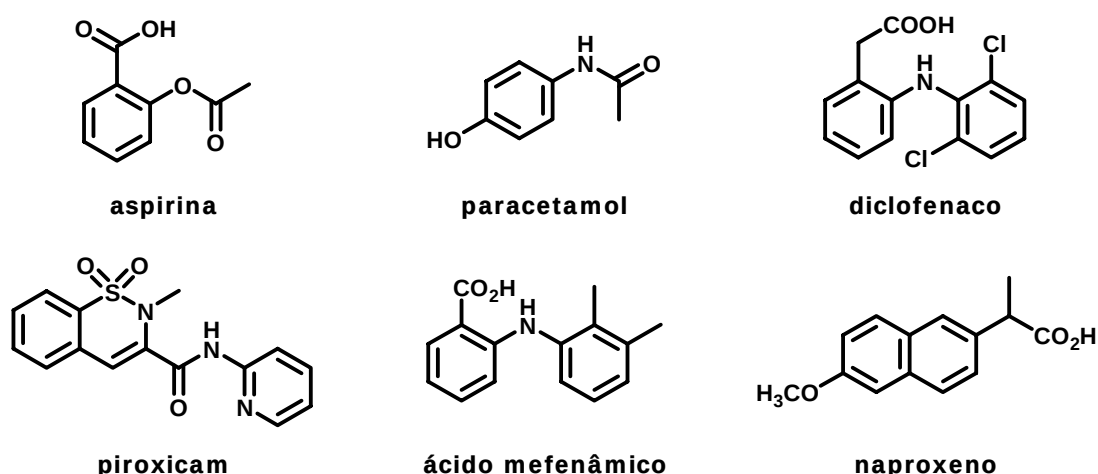


Figura 3: Estruturas químicas de alguns AINEs não seletivos.

Além das diversas propriedades terapêuticas, os AINEs não seletivos podem apresentar vários efeitos colaterais, sendo o mais importante a tendência a produzir ulceração gástrica e duodenal. Os pacientes que usam AINEs por períodos longos têm risco relativo cerca de 3 vezes maior de desenvolver complicações gastrintestinais, em comparação com os pacientes que não usam este tipo de medicamento (RASKIN, 1999; ROBERTS II & MORROW, 2005).

A lesão gástrica provocada por esses agentes pode ser ocasionada por pelo menos dois mecanismos distintos. Um deles está relacionado com a inibição da biossíntese das prostaglandinas gástricas, principalmente PGI_2 e PGE_2 , que atuam como citoprotetores da mucosa gástrica. Além disso, é provável que a produção aumentada de produtos das

lipoxigenases contribua para a ulcerogenicidade nos pacientes tratados com AINEs e que haja alguma associação com a infecção por *Helicobacter pylori* (ROBERTS II & MORROW, 2005).

Essas complicações gástricas podem ser reduzidas pela identificação de pacientes de risco, que já possuam danos no trato gastrointestinal (úlceras pépticas).

Os inibidores seletivos da COX-2 foram introduzidos em 1999. Os primeiros AINEs seletivos para esta enzima foram o celecoxib (Celebrex®) e o rofecoxib (Vioxx®). Outros fármacos também mostram ser mais seletivos para a COX-2 do que para a COX-1 como a nimesulida e o etodolac (**Figura 4**) (BOTTING, 2006).

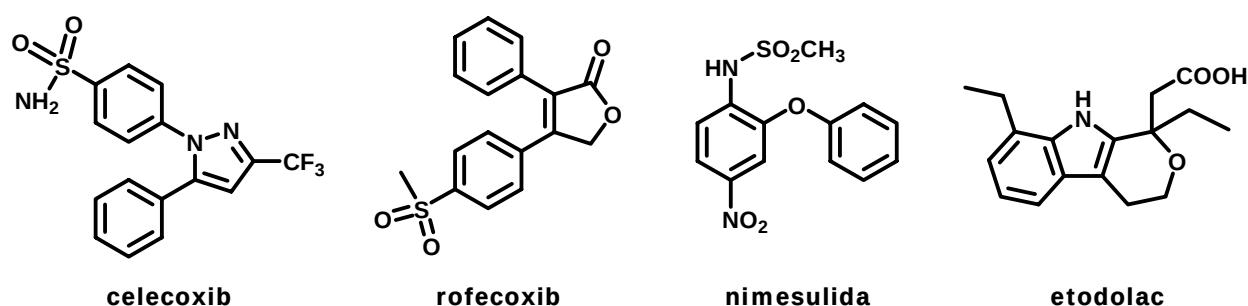


Figura 4: Estruturas químicas de alguns AINEs seletivos para a COX-2.

Entretanto, apesar da diminuição na incidência de complicações gástricas com o uso de inibidores seletivos da COX-2, estes fármacos também não são isentos de efeitos colaterais. O aumento na incidência de ataques cardíacos é o principal fator de risco para quem usa esses inibidores seletivos (ROBERTS II & MORROW, 2005; BOTTING, 2006).

Este fato fez com que em 2004 o rofecoxib (Vioxx®) fosse retirado do mercado devido ao aumento de vítimas com problemas cardiovasculares. Os inibidores seletivos da COX-2 são obrigados agora a apresentar um aviso de risco de efeitos colaterais cardiovasculares (BOTTING, 2006).

Neste momento, vários grupos de pesquisa estão em busca de medicamentos antiinflamatórios que ofereçam baixa gastrotoxicidade e que não apresentem perigo de problemas cardiovasculares.

ÚLCERAS PÉPTICAS

A úlcera péptica é uma das doenças orgânicas mais frequentes, atingindo aproximadamente 10% da população adulta no mundo. Suas complicações, tais como hemorragia e perfuração, continuam sendo importantes causas de morte podendo, inclusive, levar ao desenvolvimento de câncer gástrico (CHENG *et al.*, 2000; ROTH, 2003).

O impacto econômico envolvendo doenças do trato gastrointestinal como as úlceras pépticas são enormes. Os custos diretos envolvem os custos relacionados ao tratamento, serviços hospitalares e hospitalizações. Já os indiretos, mais difíceis de serem medidos, estão associados com perdas de produtividade causadas pela impossibilidade de trabalho ou morte prematura. Nos Estados Unidos são gastos, anualmente, cerca de 3 bilhões de dólares com o tratamento de úlceras (SANDLER *et al.*, 2002).

A úlcera péptica é caracterizada por lesões crônicas no revestimento da mucosa do trato gastrointestinal, atingindo os vasos sanguíneos subjacentes (fontes de hemorragia). A profundidade varia podendo ser superficial, acometendo apenas a muscular da mucosa, ou profunda, ocorrendo perfuração para cavidade peritoneal. Pode ser classificada em úlcera gástrica, quando as lesões se localizam no estômago, ou úlcera duodenal, quando se localizam na primeira porção do duodeno (TARNAWSKI, 2005).

A fisiopatologia da úlcera péptica pode ser observada como um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa e os fatores agressivos da mucosa gastrointestinal (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

Defesas Locais da Mucosa Gastrointestinal

A mucosa gastrointestinal se protege da lesão causada pelo ácido clorídrico por meio de vários mecanismos, tais como a presença de junções estreitas intercelulares entre as células epiteliais gástricas, a presença de uma camada de mucina recobrando essas células, a presença de prostaglandinas na mucosa e a secreção de íons bicarbonatos na camada de mucina. O bicarbonato também está presente em grande quantidade no suco pancreático, sendo responsável por proteger o duodeno, neutralizando o ácido oriundo do estômago (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

As prostaglandinas E_2 e I_2 (PGE_2 e PGI_2), as prostaglandinas predominantes sintetizadas pela mucosa gástrica, são responsáveis pela inibição da secreção de ácido. Além disso, potencializam o fluxo sanguíneo local e estimulam a secreção de muco e bicarbonato (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

Fatores Agressivos da Mucosa Gastrintestinal

Os principais agressores endógenos são o ácido clorídrico e a pepsina. O ácido clorídrico provê o meio altamente ácido necessário para que a pepsina quebre as proteínas. A alta acidez gástrica também atua como uma barreira contra infecções, matando a maioria das bactérias. A secreção ácida é estimulada por impulsos nervosos que chegam ao estômago, pelo hormônio gastrina e pela histamina liberados pelo estômago (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

Durante muito tempo o entendimento desta doença foi baseado em duas crenças: "sem ácido, não há úlcera" e "uma vez ulceroso, sempre ulceroso". Com base nestes princípios a definição era de uma doença crônica de longa duração, com períodos variáveis de atividade e de acalmia e que só ocorria na presença de ácido e pepsina, portanto, somente em áreas banhadas por estas substâncias, como o estômago e duodeno (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

Com o tempo descobriu-se que o ácido não era o único responsável pelo aparecimento das úlceras e que existiam outros fatores de risco envolvidos na patologia da doença, tais como: a bactéria *Helicobacter pylori* e os medicamentos antiinflamatórios não esteroidais.

Estudos mostram que a infecção por *H. pylori* está presente em 90% dos casos de úlceras duodenais e 70% das úlceras gástricas e a sua erradicação está correlacionada a uma redução na recorrência de úlceras (BLASER, 1998; FORD *et al.*, 2004). Este microorganismo possui a capacidade de invadir e colonizar os estômagos humanos, interagindo diretamente com as células epiteliais (DE LUCA & IAQUINTO, 2004).

Os medicamentos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) estão freqüentemente associados às úlceras pépticas, atingindo cerca de 60% dos pacientes (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005), e têm levado a um grande número de hospitalizações devido a complicações ulcerosas (sangramento e perfuração), podendo resultar em milhares de mortes todos os anos (KLASSER, 2005).

Entretanto, nem sempre a úlcera péptica apresenta algum desses fatores envolvidos. Estudos revelam que 5% a 20% dos pacientes com úlcera gástrica ou duodenal não apresentam uma etiologia orgânica definida. Porém, nesses pacientes alguns fatores psicossociais desempenham um papel significativo (JONES, 2006). Dentre esses fatores destacam-se o estresse (BHATIA & TANDON, 2005; JONES, 2006) e o fumo (ROSENSTOCK *et al.*, 2003).

TRATAMENTO DAS ÚLCERAS PÉPTICAS

As metas das terapias para úlceras são basicamente: o alívio da dor, a promoção da cicatrização e a prevenção da recorrência. As estratégias terapêuticas destinam-se ao equilíbrio entre os fatores agressivos e os fatores citoprotetores (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

Antagonistas dos receptores H_2

Os antagonistas dos receptores H_2 inibem as ações da histamina, atuando como inibidores da secreção de ácido clorídrico e promovendo a cicatrização das úlceras duodenais. Os fármacos mais utilizados são a cimetidina e a ranitidina (**Figura 5**) (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

Inibidores da bomba de prótons

Os supressores mais eficazes da secreção de ácido clorídrico são os inibidores gástricos irreversíveis da H^+ , K^+ -ATPase (bomba de prótons). Atualmente, existem vários inibidores da bomba de prótons disponíveis para uso clínico. Dentre estes se destacam o omeprazol e o lansoprazol (**Figura 5**) (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

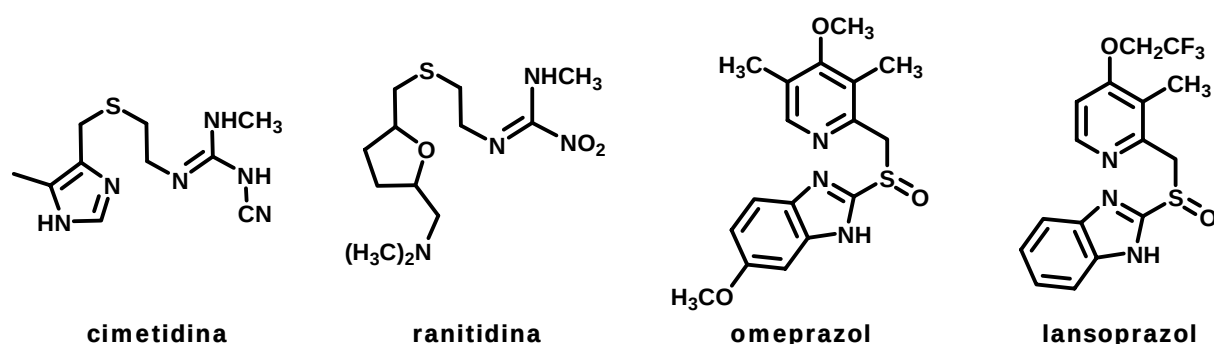


Figura 5: Estruturas químicas de alguns fármacos antiulcerogênicos.

Quelato de bismuto

O quelato de bismuto (subcitrato de bismuto coloidal, dicitrato bismutato de tripotássio) é utilizado no tratamento da infecção por *H. pylori*, juntamente com um inibidor da bomba de prótons e um antibiótico. Possui efeitos tóxicos sobre a bactéria, impedindo sua aderência à mucosa e inibindo as suas enzimas proteolíticas (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

Antiácidos

Os antiácidos, como por exemplo os hidróxidos de alumínio e magnésio, atuam ao neutralizar o ácido gástrico elevando, assim, o pH gástrico. Isto tem por efeito inibir a atividade péptica, que praticamente cessa com um valor de pH 5 (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

Sucralfato

O sucralfato é um complexo de hidróxido de alumínio e sacarose sulfatada que, na presença de ácido, libera alumínio, adquire uma forte carga negativa e liga-se a grupos de carga positiva nas proteínas, glicoproteínas, formando géis complexos com o muco (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

Misoprostol

É um análogo estável da prostaglandina E₁, sendo responsável por inibir a secreção gástrica, manter ou aumentar o fluxo sanguíneo na mucosa e também aumentar a secreção de muco e bicarbonato (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

O PAPEL DA INFLAMAÇÃO NA PATOGÊNESE DAS ÚLCERAS PÉPTICAS

A grande maioria das úlceras pépticas, independente dos fatores envolvidos, causa dor epigástrica constante. Isto é ocasionado pela produção aumentada de suco gástrico e seu contato com a mucosa lesionada e inflamada. O agravamento da inflamação na mucosa gastrointestinal leva à fibrose do epitélio, podendo acarretar no desenvolvimento de câncer gástrico (ERNST, 1999).

Evidências epidemiológicas sugerem que a inflamação crônica observada no epitélio gástrico nas úlceras pépticas muitas vezes está relacionada à presença da bactéria *H. pylori*. A infecção aguda por esta bactéria induz infiltração da mucosa por leucócitos. Dentro de poucas semanas, a inflamação aguda se desenvolve para uma inflamação crônica dominada por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células sangüíneas (ANDERSEN *et al.*, 2005).

A inflamação provoca um impacto nas células epiteliais assim como nas células especializadas na secreção de muco e bicarbonato da mucosa. Além disso, aumenta a permeabilidade da mucosa e dificulta a absorção (SPILLER, 2004). Portanto, a inflamação desempenha um importante papel na fisiopatologia das úlceras pépticas.

BUSCA POR NOVOS AGENTES ANTIINFLAMATÓRIOS

Vários estudos estão sendo realizados na tentativa de descobrir novos medicamentos antiinflamatórios mais eficazes e com menos efeitos colaterais. O uso de agentes antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) é a principal e praticamente única abordagem terapêutica para o tratamento de doenças que envolvem processos inflamatórios, mesmo com a grande incidência de seus efeitos colaterais gastroduodenais (inibidores não seletivos da COX) e, mais recentemente, cardiovasculares (inibidores seletivos da COX-2). Esses medicamentos são eficazes para proporcionar alívio sintomático, porém, todos os agentes disponíveis apresentam toxicidade associada e, algumas vezes, grave (ROBERTS II & MORROW, 2005; BOTTING, 2006).

Um grande número de compostos tem aparecido desde a introdução da aspirina em 1898, com poucas diferenças em sua potência terapêutica ou efeitos colaterais (FLOWER, 2003). Portanto, a atenção de muitos grupos de pesquisa tem sido particularmente focada na pesquisa de novos compostos com atividade antiinflamatória.

Plantas contendo salicilatos são comumente encontradas e têm sido utilizadas para o alívio dos sinais de inflamação em diversas civilizações por séculos (SAUTEBIN, 2000). Além disso, um grande percentual de medicamentos - usados em todo o mundo - teve sua origem na medicina tradicional. Portanto, as plantas medicinais podem representar uma fonte útil na busca por novos agentes terapêuticos eficazes.

O uso crônico de AINEs pode levar a sérios danos gastrintestinais, sendo muitas vezes necessária a co-administração de agentes antiulcerogênicos, como por exemplo, o omeprazol, para diminuir a toxicidade gástrica. Entretanto, esta terapia concomitante não está livre de efeitos colaterais adicionais e representa custos adicionais para os pacientes (RASKIN, 1999).

Portanto, a escolha das plantas medicinais como fonte de pesquisa justifica-se pelo fato de que, considerando sua complexa composição química, é mais razoável pensar na possibilidade de existirem substâncias diferentes, agindo em alvos distintos que, com isso, reduziriam os efeitos colaterais observados na administração de somente uma única substância.

PLANTAS MEDICINAIS

As plantas têm sido utilizadas no tratamento de diversas enfermidades por milhares de anos. Registros fósseis datam o uso de plantas como medicamentos pelo homem a pelo menos 60000 anos (FABRICANT & FARSWORTH, 2001). Desde então, as informações trazidas desta época têm sido a fonte de novas pesquisas para a descoberta de novos fármacos.

A descoberta de novos fármacos a partir de plantas conduziu ao isolamento de muitas substâncias que ainda hoje são utilizadas na terapêutica, tais como codeína, digitoxina, morfina, reserpina, quinina, taxol entre outros (BALUNAS & KINGHORN, 2005); ou então serviram como protótipos para a síntese de novos fármacos (FABRICANT & FARSWORTH, 2001).

Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microorganismos e 3% de animais. Dos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir destes (CALIXTO, 2003; NEWMAN *et al.*, 2003).

Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população africana usa os recursos da medicina popular para suprir as necessidades de assistência médica primária. Na Europa, América do Norte e em outras regiões industrializadas, 50% da população já utilizaram pelo menos uma vez esse recurso (WHO, 2004), ratificando a importância do estudo das plantas.

A transformação das plantas medicinais em produtos com maior valor tecnológico agregado representa uma estratégia que pode contribuir para o progresso da sociedade. A produção desses produtos exclusivamente com matérias-primas vegetais - fitoterápicos - representa uma estratégia que pode contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

Fitoterapia

A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos, ao ponto que atualmente o mercado mundial de medicamentos fitoterápicos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares (YUNES *et al.*, 2001).

Os fitoterápicos são medicamentos obtidos por processos tecnologicamente adequados, empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais, como princípio ativo, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (ANVISA, 2004).

Nos medicamentos fitoterápicos, considerando que existe um balanço de compostos ativos, os riscos de efeitos secundários indesejáveis são muito menores. Além disso, enquanto que a descoberta e o desenvolvimento de um novo fármaco envolvem investimentos altíssimos, o desenvolvimento de um novo fitoterápico pode ser obtido a custos mais baixos (YUNES *et al.*, 2001).

Um dos mais comuns fitoterápicos é o extrato de *Ginkgo biloba*, utilizado tradicionalmente para aumentar a memória e melhorar as anormalidades de circulação sangüínea (HOWES & HOUGHTON, 2003). O extrato das folhas de *Ginkgo* é o fitoterápico mais vendido na Europa e está entre os 10 mais vendidos nos Estados Unidos (SIERPINA *et al.*, 2003). Além deste, os fitoterápicos a base de erva de São João (*Hypericum perforatum*), kava pironas (*Piper methysticum*) e ginseng (*Pfaffia glomerata*) também são muito comercializados. Eles são bastante conhecidos e muito utilizados pela população em todo o mundo (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Para a elaboração de um fitoterápico é necessário conhecer os marcadores químicos presentes na espécie vegetal. Estes marcadores são componentes presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente o próprio princípio ativo, utilizados como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos (CARVALHO, 2004).

O conhecimento da composição química de uma espécie vegetal é fundamental para poder trabalhar com um extrato padrão, onde os constituintes químicos estejam padronizados. Dependendo de fatores ambientais como solo, altitude e variações sazonais climáticas, o nível dos componentes de um determinado lote de plantas pode variar consideravelmente. Portanto, é desejável possuir uma preparação padronizada, com uma composição de constituintes químicos conhecida, para a finalidade de consumo humano, para pesquisa e reprodutibilidade (SMITH & LUO, 2004; SUK, 2005).

Plantas com Atividade Antiinflamatória

O Brasil, sendo detentor de aproximadamente um terço da flora mundial (YUNES *et al.*, 2001), possui um grande número de plantas que vem sendo utilizadas pela população para diferentes fins terapêuticos.

Apesar do nosso país não possuir uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, existe no país um grande número de grupos de pesquisa que tem contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas e da farmacologia envolvendo seus constituintes químicos.

A flora brasileira é particularmente rica em plantas empregadas popularmente contra processos infecciosos. No entanto, pouco se sabe sobre a natureza química de seus constituintes bem como de seus efeitos no organismo humano.

A busca por princípios ativos de origem vegetal com ação sobre o sistema imunológico faz parte de um programa interdisciplinar, coordenado pela Profa. Sônia Soares Costa (Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais - UFRJ), que visa isolar substâncias potencialmente terapêuticas a partir de plantas usadas contra doenças que envolvem a dor e a inflamação.

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular contra processos inflamatórios e estudadas por nossa equipe destacam-se *Kalanchoe brasiliensis* e *Kalanchoe pinnata*, ambas pertencentes à família Crassulaceae.

Plantas da família Crassulaceae, de uma maneira geral, são bastante estudadas devido ao fato de grande parte delas ser utilizada pela população para diversos fins terapêuticos, principalmente no combate aos processos infecciosos e inflamatórios. Além disto, essas plantas têm mostrado uma composição química bastante rica em flavonóides, substâncias estas que apresentam um leque variado de atividades biológicas.

FAMÍLIA CRASSULACEAE

A família Crassulaceae, além de ser reconhecida como ornamental, o que muito contribuiu para dispersão de suas espécies pelo mundo, possui uma série de gêneros que se sobressaem devido às suas propriedades medicinais (LORENZI & SOUZA, 1995).

Espécies pertencentes a esta família consistem, primariamente, em ervas suculentas as quais ocorrem, predominantemente, em regiões áridas, temperadas e subtropicais do hemisfério norte e no sul da África. Na medicina popular essas plantas são muito utilizadas contra queimaduras, inflamações, abscessos e contusões (LORENZI & SOUZA, 1995).

Gêneros mais Utilizados na Medicina Popular

Muitos gêneros pertencentes à família Crassulaceae foram objeto de estudo químico. As espécies de Crassulaceae mostram-se ricas em flavonóides, esteróides, intermediários da via do chiquimato, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, triterpenóides, cumarinas e taninos. Dentre esses gêneros, destacam-se principalmente os gêneros *Kalanchoe*, *Rhodiola*, e *Sedum* (CASTILHO & KAPLAN, 1997).

Kalanchoe

Kalanchoe é um gênero conhecido popularmente no Brasil, Índia, China e África por seu uso na cura de ferimentos, artrites e úlceras gástricas. O extrato de suas folhas possui ação antifúngica, antiinflamatória, anti-histamínica e imunossupressora (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 1995). É um gênero rico em flavonóides, que são substâncias com efeitos diversos, tais como antialérgico, antitumoral e antiinflamatório.

Dentro do gênero *Kalanchoe*, inúmeras espécies se destacam devido às suas propriedades medicinais, dentre as quais temos *Kalanchoe pinnata* e *Kalanchoe brasiliensis*, ambas conhecidas popularmente como saião e folha da fortuna. Estas espécies são indistintamente utilizadas pela população com as mesmas finalidades.

Kalanchoe brasiliensis

O sumo de suas folhas inibe a proliferação de linfócitos humanos *in vitro* (SOUZA, 1995; COSTA *et al.*, 1994) e possui uma acentuada atividade antiinflamatória *in vivo*, em modelo de inflamação provocada por zimozan (IBRAHIM *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2006).

Kalanchoe pinnata

Os extratos de suas folhas suprimem significativamente as células T de humanos e murinos *in vivo* (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 1995) e *in vitro* (ALMEIDA *et al.*, 2000). Verificou-se também uma apreciável atividade antileishmania deste extrato em camundongos infectados por *L. amazonensis* (DA SILVA *et al.*, 1995; DA SILVA *et al.*, 1999) e em macrófagos infectados pelo parasita (MUZITANO *et al.*, 2006). Recentemente, o efeito antileishmania de *K. pinnata* foi evidenciado em um relato de caso clínico (TORRES-SANTOS *et al.*, 2003).

Rhodiola

O gênero *Rhodiola* compreende aproximadamente 200 espécies, das quais pelo menos 20 são usadas na medicina tradicional asiática. Espécies deste gênero têm sido muito estudadas por pesquisadores japoneses, que têm se dedicado ao isolamento de substâncias bioativas de algumas espécies. Dentre estas espécies destacam-se *R. quadrifida* e *R. sachalinensis*.

Os remédios naturais chineses originados de diversas plantas alpinas pertencentes às espécies de *Rhodiola* têm sido prescritos como hemostáticos, antitussígenos e tônicos nas preparações chinesas tradicionais e como linimento endérmico em queimaduras e contusões (YOSHIKAWA *et al.*, 1996).

Rhodiola quadrifida

Do extrato obtido das partes subterrâneas de *R. quadrifida* foram isoladas as substâncias ativas (compostos cianoglicosídeos e flavonóides) responsáveis pela atividade antialérgica (YOSHIKAWA *et al.*, 1995 e YOSHIKAWA *et al.*, 1996).

Rhodiola sachalinensis

O extrato das raízes de *R. sachalinensis* tem sido utilizado para tratamento dos sintomas de resfriado, promoção da longevidade e aumento da resistência corporal para estresse físico e mental (SEO *et al.*, 2001). Desta espécie foram isolados flavonóides, terpenos e compostos cianoglicosídeos (FAN *et al.*, 2001; SONG *et al.*, 2003).

Sedum

O gênero *Sedum* compreende cerca de 350-500 espécies, sendo o maior da família Crassulaceae. É encontrado primariamente em zonas temperadas e frias do hemisfério norte. Um grande número de suas espécies é usado farmaceuticamente (NIEMANN *et al.*, 1976). Muitas das drogas derivam das partes aéreas dessas plantas cujas folhas frescas e seu suco servem para aplicações tópicas e uso interno (MULINACCI *et al.*, 1995).

Dentre as espécies do gênero *Sedum*, algumas foram objetos de extenso estudo químico e farmacológico. Dentre estas podem ser destacadas as espécies *S. telephium* ssp. *maximum* e *S. sarmentosum*.

Sedum telephium ssp. *maximum*

A espécie *S. telephium* ssp. *maximum* apresenta potente atividade antiinflamatória, analgésica e queratolítica assim como efeitos regenerativos de células da pele. É utilizada para tratamento de eczemas, fístulas, queimaduras graves e ferimentos purulentos e dolorosos (SENDL *et al.*, 1993), de maneira semelhante às espécies de *Kalanchoe*. Desta espécie foram isolados flavonóides (MULINACCI *et al.*, 1995) e polissacarídeos (SENDL *et al.*, 1993).

Sedum sarmentosum

A espécie *S. sarmentosum* tem sido utilizada na medicina popular asiática para tratamento de hepatites virais crônicas, cuja atividade hepatoprotetora foi atribuída a presença de alcalóides (KANG *et al.*, 2000) e de triterpenos (HE *et al.*, 1998).

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS ESPÉCIES DE *Sedum*

O gênero *Sedum* é conhecido por conter taninos (STEVENS *et al.*, 1995; KORUL'KIN, 2001), compostos cianogênicos (NAHRSTEDT *et al.*, 1982) e, principalmente, alcalóides (KOOY, 1976; KIM *et al.*, 1996) e flavonóides (WOLBIŚ, 1989a; NIEMANN *et al.*, 1976; STEVENS *et al.*, 1996).

Alcalóides

Os alcalóides estão distribuídos em muitas espécies de *Sedum*. Muitos dos relatos para alcalóides em Crassulaceae (ca. 1500 espécies) relacionam-se a este gênero (KIM *et al.*, 1996). Dentre todas as espécies estudadas, *Sedum acre* é certamente aquela que mais atenção tem recebido por parte dos pesquisadores. Dentre os alcalóides piperidínicos descritos na literatura e originados do gênero *Sedum* (ca. 30), a grande maioria foi isolada a partir desta espécie (KOOY, 1976; STEVENS *et al.*, 1992; KIM *et al.*, 1996).

Além de *S. acre*, outras espécies também merecem destaque: *S. aetnense*, *S. anglicum*, *S. brissemoreti*, *S. farinosum*, *S. fusiforme*, *S. lancerottense*, *S. melanatherum*, *S. nudum* (STEVENS *et al.*, 1992), *S. bulbiferum*, *S. japonicum*, *S. lepidopodium*, *S. morrisonensis*, *S. oryzifolium*, *S. polytrichoides* (KIM *et al.*, 1996) e *S. sarmentosum* (KIM *et al.*, 1996; KANG *et al.*, 2000).

Flavonóides

A presença de flavonóides no gênero *Sedum* tem sido relatada desde a década de 50 (PARIS & FRIGOT, 1959). Várias espécies foram objetos de extenso estudo fitoquímico em busca dessa classe de substâncias. Das 28 espécies estudadas, *S. alfredi*, *S. sarmentosum*, *S. telephium* ssp. *maximum*, *S. hybridum* e *S. acre* se destacam por apresentar o maior número de flavonóides isolados (acima de 15 por espécie).

Na **Tabela 1** encontram-se os flavonóides isolados das diferentes espécies de *Sedum*.

Tabela 1: Flavonóides isolados em espécies do gênero *Sedum*.

<i>Sedum acre</i> L.	
Kaempferol [*]	Limocitrina ^q
Kaempferol 3-O-ramnosídeo [*]	Limocitrina 3-O-glicosídeo ^q
Isoramnetina ^q	Limocitrina 3-O-glicosídeo-7-O-glicosídeo ^q
Isoramnetina 3-O-(2"-O-acetil)-glicosídeo ^q	Limocitrina 7-O-glicosídeo ^q
Isoramnetina 3-O-glicosídeo ^q	Quercetina ^q
Isoramnetina 3-O-glicosídeo-7-O-glicosídeo ^q	Quercetina 3-O-glicosídeo ^q
Isoramnetina 7-O-glicosídeo ^q	Quercetina 3-O-glicosídeo-7-O-glicosídeo ^q
Isoramnetina 3-O-glicosídeo-7-O-[6"-(2-hidroximetil)-1-oxobutil]-glicosídeo ^w	Quercetina 3-O-rutinosídeo ^q
<i>Sedum aizoon</i> L.	
Gossipetina [*]	Quercetina ^{∇,*}
Kaempferol [*]	Quercetina 3-O-glicosídeo [*]
Miricetina [∇]	Quercetina 3-O-(2"-O-galoil)-ramnosídeo [∇]
Miricetina 3-O-ramnosídeo [∇]	Quercetina 3-O-ramnosídeo ^{∇,*}
Peonidina 3-O-glicosídeo [*]	Quercetina 3-O-rutinosídeo [*]
<i>Sedum album</i> L.	
Gossipetina 8-O-glucuronídeo ^r	Isoramnetina 7-O-soforosídeo ^r
Herbacetina 8-O-glucuronídeo ^r	Isoramnetina 7-O-glicosídeo ^r
Isoramnetina ^{o,r}	Quercetina ^r
Isoramnetina 3-O-ramnosídeo ^{o,r}	3-metoxi quercetina ^r
Isoramnetina 3-O-ramnosídeo-7-O-glicosídeo ^r	Quercetina 4'-O-glicosídeo ^r
Isoramnetina 3-O-ramnosídeo 7-O-soforosídeo ^{o,r}	Quercetina 3-O-ramnosídeo ^r
<i>Sedum alfredi</i> (Malterud) (= <i>Sedum formosanum</i> Hay.)	
Corniculatusina ^m	Quercetina ^m
Corniculatusina 3-O-glicosídeo-7-O-glicosídeo ^l	Quercetina 7-O-glicosídeo ^l
Crisoeriol 7-O-glicosídeo ^l	Quercetina 3-O-ramnosídeo-7-O-glicosídeo ^l
Crisoeriol 7-O-neo-hesperidosídeo ^l	Luteolina ^m
Crisoeriol 7-O-ramnosídeo ^e	Luteolina 7-O-glicosídeo ^{l,m}
Isoramnetina 7-O-glicosídeo	Tricetina 7-O-glicosídeo ^l
Isoramnetina 3-O-glicosídeo-7-O-glicosídeo ^l	Pratenseína ^m
Limocitrina ^m	Pratenseína 7-O-glicosídeo ^m
Limocitrina 3-O-glicosídeo ^{l,m}	3'-metoxi pratenseína 7-O-glicosídeo ^m
Limocitrina 3-O-glicosídeo-7-O-glicosídeo ^l	3'-metoxi pratenseína 7-O-neo-hesperidosídeo ^l
Limocitrina 3-O-(6"-O- <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo ^m	3'-metoxi orobol 7-O-glicosídeo ^m

(continua na página seguinte)

<i>Sedum caucasicum</i> (Grossh.) Boriss.	
Isoramnetina 7-O-ramnosídeo ^k	Kaempferol 7-O-ramnosídeo ^k
Quercetina 7-O-ramnosídeo ^k	
<i>Sedum cressipes</i> Wall.	
Kaempferol 3-O-glicosídeo-7-O-glicosídeo ⁿ	3'-metoxi miricetina ⁿ
<i>Sedum ewersii</i> Lbd.	
Gossipetina [*]	Peonidina 3-O-glicosídeo [*]
Gossipetina 7-O-xilosídeo [*]	Quercetina ^{f,*}
Kaempferol ^{f,*}	Quercetina 3-O-glicosídeo [*]
Kaempferol 3-O-ramnosídeo [*]	Quercetina 3-O-ramnosídeo [*]
Kaempferol 7-O-ramnosídeo ^f	Quercetina 3-O-rutinosídeo ^{f,*}
Kaempferol 4'-O-glicosídeo ^f	Quercetina 3-O-xilosil-(1→6)-galactosídeo [*]
<i>Sedum forsterianum</i> Sm. (= <i>S. rupestre</i> L.)	
Isoramnetina ^g	Quercetina 3-O-ramnosídeo ^g
Miricetina 3-O-ramnosídeo ^g	
<i>Sedum hybridum</i> L.	
Gossipetina [*]	Quercetina [*]
Gossipetina 7-O-xilosídeo [*]	Quercetina 3-O-(2"-O-galoil)-glicosídeo [*]
Kaempferol [*]	Quercetina 3-O-glicosídeo [*]
Kaempferol 3-O-ramnosídeo [*]	Quercetina 3'-O-glicosídeo [*]
Kaempferol 3-O-ramnosídeo-7-O-glicofuranosídeo [*]	Quercetina 3-O-ramnosídeo [*]
Kaempferol 3-O-ramnosídeo-7-O-ramnosídeo [*]	Quercetina 3-O-rutinosídeo [*]
Kaempferol 3-O-ramnoglicosídeo-7-O-ramnoglicosídeo [*]	Quercetina 3-O-ramnoglicosídeo-7-O-ramnoglicosídeo [*]
Pelargonidina 3-O-glicosídeo [*]	Quercetina 3-O-xilosil-(1→6)-galactosídeo [*]
Peonidina 3-O-glicosídeo [*]	
<i>Sedum kamtschaticum</i> Fisch.	
Kaempferol [*]	Quercetina 3-O-rutinosídeo [*]
Quercetina [*]	Quercetina 3-O-(2"-O-galoil)-glicosídeo [*]
Quercetina 3-O-ramnosídeo [*]	
<i>Sedum kamtschaticum</i> Fisch.	
Miricetina 3-O-glicosídeo ^{d,i}	Gossipetina 8-O-glicosídeo ^d
Miricetina 3-O-galactosídeo ⁱ	Gossipetina ^d
Miricetina 3-O-ramnosídeo ^d	Quercetina 3-O-galactosídeo ^d
Miricetina 3-O-(6"-O-galoil)-glicosídeo ⁱ	Miricetina 3-O-(6"-O-galoil)-galactosídeo ⁱ
<i>Sedum lineare</i> Thunb.	
Crisoeriol ^u	3'-O-metoxi orobol-7-O-glicosídeo ^u
Pratenseína ^u	Orobol 7-O-glicosídeo ^u
<i>Sedum litoreum</i>	
Epigallocatequina-3-galato [#]	Epigallocatequina-(4β→8)-epicatequina-3-galato [#]
<i>Sedum middendorffianum</i> Maxim.	
Kaempferol ^g	Quercetina ^g
Miricetina ^g	Quercetina 3-O-glicosídeo ^d
<i>Sedum montanum</i> ssp. <i>orientale</i> Song & Perr.	
Corniculatusina ^g	Miricetina 3-O-ramnosídeo ^{g,y}
Miricetina ^g	Quercetina ^g
Miricetina 3-O-arabinofuranosídeo ^y	Quercetina 3-O-ramnosídeo ^{g,y}

(continua na página seguinte)

<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix. in Vill	
Corniculatusina ^g	Quercetina ^g
Miricetina ^g	Quercetina 3-O-ramnosídeo ^g
Miricetina 3-O-ramnosídeo ^g	
<i>Sedum pallescens</i> Freyn	
Kaempferol 3-O-ramnosídeo-7-O-ramnosídeo ^g	Kaempferol 7-O-ramnosídeo ^g
<i>Sedum populifolium</i> L.	
Kaempferol 7-O-arabinosídeo ^h	
<i>Sedum pruinaum</i> Brot	
Isoramnetina ^g	Quercetina 3-O-ramnosídeo ^g
Miricetina 3-O-ramnosídeo ^g	
<i>Sedum purpureum</i> (L.) Schult	
Kaempferol [*]	Quercetina [*]
Kaempferol 3-O-ramnosídeo [*]	Quercetina 3-O-glicosídeo [*]
Pelargonidina 3-O-glicosídeo [*]	Quercetina 3-O-ramnosídeo [*]
Peonidina 3-O-glicosídeo [*]	
<i>Sedum reflexum</i> L.	
Limocitrina ^s	Quercetina ^s
Limocitrina 3-O-glicosídeo ^s	Quercetina 3-O-ramnosídeo ^{g,s}
Miricetina ^s	Quercetina 3-O-glicosídeo ^s
Miricetina 3-O-arabinosídeo ^s	(+)-taxifolina ^x
Miricetina 3-O-glicosídeo ^s	(+)-diidromiricetina ^x
Miricetina 3-O-ramnosídeo ^{g,s}	
<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge	
Isoramnetina [*]	Luteolina ^{*,*}
Isoramnetina 3-O-glicosídeo ^Δ	Luteolina-7-O-glicosídeo [*]
Isoramnetina 7-O-glicosídeo [*]	Tricina [*]
Isoramnetina 3-O-glicosídeo-7-O-glicosídeo [*]	Tricina-7-O-glicosídeo ^{*,*,*}
Kaempferol 3-O-arabinosídeo ^Δ	Liquiritigenina [*]
Limocitrina [*]	Liquiritigenina 4'-O-glicosídeo [*]
Limocitrina 3-O-glicosídeo [*]	Isoliquiritigenina ^{*,*}
Limocitrina 3-O-glicosídeo-7-O-glicosídeo [*]	Isoliquiritigenina 4-O-glicosídeo [*]
Quercetina [*]	Quercetina 3-O-glicosídeo ^Δ
Quercetina 3-O-(6"-cafeoil)-[glicosil-(1→2)-ramnosídeo] ^Δ	
Quercetina 3-O-(6"-p-coumaroil)-[glicosil-(1→2)-ramnosídeo] ^Δ	
<i>Sedum sediforme</i> (Jacq.) Pau (=S. altissimum Poiret)	
Epicatequina 3-O-galato ^v	Limocitrina ^g
Epigallocatequina 3-O-galato ^v	Limocitrina 3-O-glicosídeo ^v
3',5,5'-trimetoxi epigallocatequina 3-O-galato ^v	Miricetina ^g
3',4',5,7-tetraidroxiflavanona (eriodictiol) ^a	Miricetina 3-O-ramnosídeo ^{g,v}
Corniculatisina ^g	Quercetina ^g
Kaempferol 3-O-ramnosídeo ^v	Quercetina 3-O-ramnosídeo ^{g,v}
<i>Sedum selskianum</i> Regel & Maack	
Miricetina 3-O-(2"-O-galoil)-ramnosídeo ^δ	Isoramnetina 3-O-glicosídeo-7-O-ramnosídeo ^d

(continua na página seguinte)

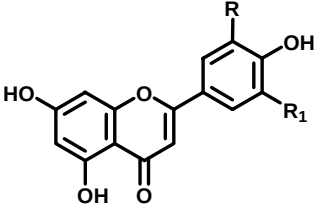
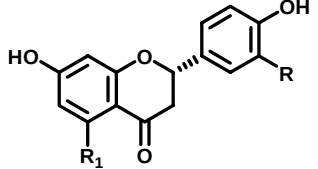
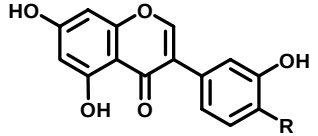
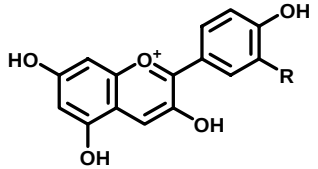
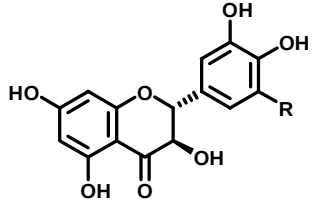
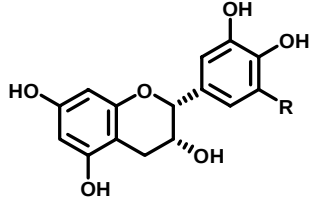
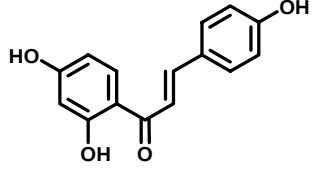
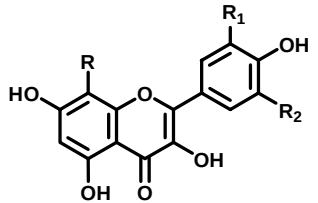
<i>Sedum sexangulare</i> L.	
Corniculatusina ^t	Limocitrina 3-O-glicosídeo ^t
Corniculatusina 7-O-ramnosídeo ^t	Limocitrina 7-O-ramnosídeo ^t
Miricetina ^t	Sexangularetina ^{b,t}
8-metoxi miricetina 3-O-glicosídeo ^t	Sexangularetina 7-O-ramnosídeo ^t
Limocitrina ^t	Sexangularetina 3-O-ramnosídeo-7-O-ramnoglicosídeo ^c
<i>Sedum stoloniferum</i> S. G. Gmelin	
Epigallocatequina 3-O-galato ^v	Epigallocatequina 3,4'-di-O-galato ^v
Epicatequina 3-O-galato ^v	Kaempferol 3-O-ramnosídeo ^v
Epigallocatequina 3,3'-di-O-galato ^v	Quercetina 3-O-glicosídeo ^v
Epigallocatequina 3-O-galato-(4β→8)-epigallocatequina 3-O-galato ^v	
<i>Sedum telephium</i> ssp <i>maximum</i> Schinz & Thell	
Kaempferol ^{j,*}	Miricetina 3-O-ramnosídeo ^{j,p}
Kaempferol 3-O-glicosídeo-7-O-ramnosídeo ^{p,z}	Quercetina ^{j,*}
Kaempferol 7-O-ramnosídeo ^{p,*}	Quercetina 7-O-ramnosídeo ^{p,*}
Kaempferol 3-O-ramnosídeo ^p	Quercetina 3-O-glicosídeo ^{j,p,*}
Kaempferol 3-O-ramnosídeo-7-O-ramnosídeo ^{p,z}	Quercetina 3-O-glicosídeo-7-O-ramnosídeo ^{p,z}
Kaempferol 3-O-neo-hesperidosídeo-7-O-ramnosídeo ^z	Quercetina 3-O-ramnosídeo ^{p,*}
Isoramnetina ^j	Quercetina 3-O-ramnosídeo-7-O-ramnosídeo ^z
Isoramnetina 3-O-glicosídeo ^j	Quercetina 3-O-neo-hesperidosídeo-7-O-ramnosídeo ^z
Miricetina ^j	Peonidina 3-O-glicosídeo [*]
Miricetina 3-O-glicosídeo ^{p,*}	
<i>Sedum tenuifolium</i> (Sibth. & Sm.) Strobl	
Isoramnetina ^g	

^aPARIS & FRIGOT, 1959; ^bCOMBIER *et al.*, 1968; ^cMNAJED *et al.*, 1972; ^dSHNYAKINA & ZAPESOCHNAYA, 1975; ^eZAPESOCHNAYA & SHNYAKINA, 1975; ^fCHOU *et al.*, 1976; ^gGUMENYUK *et al.*, 1976; ^hKRASNOV & KONDAREVA, 1976; ⁱNIEMANN *et al.*, 1976; ^jDEMIDENKO & KRASNOV, 1978; ^kZAPESOCHNAYA & SHNYAKINA, 1978; ^lGNEDKOV *et al.*, 1981; ^mZAITSSEV *et al.*, 1983; ⁿCHOU & MEN, 1986; ^oMEN, 1986; ^pKHETWAL *et al.*, 1988; ^qWOLBIŚ, 1987a; ^rWOLBIŚ, 1987b; ^sWOLBIŚ & KRÓLIKOWSKA, 1988; ^tWOLBIŚ, 1989a; ^uWOLBIŚ, 1989b; ^vWOLBIŚ & KAWALEC, 1990; ^wLI & ZUO, 1991; ^xSAKAR *et al.*, 1993; ^yWOLBIŚ, 1993; ^zWOLBIŚ & NOWAK, 1993; ^{aa}STEVENS *et al.*, 1994; ^{ab}MULINACCI *et al.*, 1995; ^{ac}STEVENS *et al.*, 1996; ^{ad}WOLBIŚ & OLSZEWSKA, 1996; ^{ae}HE & WANG, 1997; ^{af}SAKAR *et al.*, 1997; ^{ag}PETEREIT *et al.*, 1998; ^{ah}KORUL'KIN, 2001; ^{ai}LIANG *et al.*, 2001; ^{aj}WEI *et al.*, 2003; ^{ak}OH *et al.*, 2004

Dentre os flavonóides isolados em *Sedum* encontram-se as seguintes classes: flavonóis, flavonas, flavans 3-óis, isoflavonas, antocianidinas, flavanonas, chalconas e diidroflavonóis.

Na **Tabela 2** (pág. 25) estão representadas as estruturas das agliconas encontradas no gênero e suas respectivas classes flavonoídicas.

Tabela 2: Agliconas encontradas no gênero *Sedum*.

Agliconas	Estrutura
Flavonas Crisoeriol (R= OCH ₃ ; R ₁ = H) Luteolina (R=OH; R ₁ = H) Tricetina (R=R ₁ = OH) Tricina (R=R ₁ = OCH ₃)	
Flavanonas Eriodictiol (R=R ₁ = OH) Liquiritigenina (R=R ₁ = H)	
Isoflavonas Orobol (R= OH) Pratenseína (R = OCH ₃)	
Antocianidinas Pelargonidina (R = H) Peonidina (R = OCH ₃)	
Diidroflavonóis Diidromiricetina (R= OH) Taxifolina (R= H)	
Flavans 3-óis Epicatequina (R = H) Epigallocatequina (R = OH)	
Chalcona Isoliquiritigenina	
Flavonóis Kaempferol (R=R ₁ =R ₂ = H) Quercetina (R=R ₂ = H; R ₁ = OH) Miricetina (R = H; R ₁ =R ₂ = OH) Gossipetina (R=R ₁ = OH; R ₂ = H) Limocitrina (R=R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = H) Isoramnetina (R=R ₂ = H; R ₁ = OCH ₃) Herbacetina (R = OH; R ₁ =R ₂ = H) Sexangularetina (R = OCH ₃ ; R ₁ =R ₂ = H) Corniculatusina (R = OCH ₃ ; R ₁ = OH; R ₂ = H)	

A ESPÉCIE *Sedum dendroideum* MOC ET SESSÉ EX DC

Sedum dendroideum (= *Sedum praealtum* DC.), conhecido popularmente por bálsamo, foi descrito pela primeira vez em 1952 por De la Cruz, embora se conheça sua aplicação na medicina tradicional do México pré-colonial (PINEDA *et al.*, 1986).

Esta espécie originária da África do Sul e Ásia é uma planta herbácea, suculenta, subarbustiva e ramificada. Suas folhas, com aproximadamente 1 a 5 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura, são alternas, simples, de tonalidade verde intenso, planas, lanceoladas, recurvadas e reunidas em rosetas. Possui inflorescências terminais, ramificadas, com flores amarelas numerosas formadas no outono-inverno. Propaga-se facilmente pelas brotações laterais transformadas em estacas, podendo atingir 1 m de altura (**Figura 6**) (LORENZI & SOUZA, 1995; DUARTE & ZANETI, 2002).



Figura 6: Fotos de *Sedum dendroideum* (LORENZI & SOUZA, 1995).

Classificação Botânica (APG II, 2003)

Reino: Plantae

Divisão: Angiospermae

Classe: Eudicotiledôneas core

Ordem: Saxifragales

Família: Crassulaceae

Subfamília: Sempervivoideae

Gênero: *Sedum*

Espécie: *Sedum dendroideum* Moc et Sessé ex DC

O bálsamo, além do uso ornamental, também apresenta propriedades medicinais. Na medicina tradicional mexicana, o bálsamo é utilizado no tratamento de diabetes (ANDRADE-CETTO & HEINRICH, 2005), de doenças oculares e como contraceptivo (SILVA-TORRES *et al.*, 2003). No Brasil, o sumo das folhas frescas é muito utilizado para tratar inflamações de pele, contusões e no tratamento de úlceras gastrintestinais (CARLINI *et al.*, 1970; LORENZI & SOUZA, 1995; DUARTE & ZANETI, 2002; COELHO DE SOUZA *et al.*, 2004), devido suas ações emoliente e cicatrizante, razão do seu nome popular.

Estudos anteriores com esta espécie evidenciaram uma proteção do extrato aquoso contra úlceras gástricas em ratos (CARLINI *et al.*, 1970), uma diminuição na atividade funcional dos espermatozóides (PINEDA *et al.*, 1986), as atividades antiinflamatória (CAMARGO *et al.*, 2002) e espermicida (SILVA-TORRES *et al.*, 2003).

Importância do Estudo do Bálsamo

Apesar da importância terapêutica do bálsamo, poucos estudos validando seu uso medicinal foram realizados. Estudos com esta espécie evidenciaram as atividades antiinflamatória e espermicida para extratos das partes aéreas (CAMARGO *et al.*, 2002; SILVA-TORRES *et al.*, 2003). Entretanto, os extratos utilizados não estavam de acordo com o uso popular (extrato etanólico e aquoso a quente, respectivamente). Além disso, sua composição química até então não era conhecida e as substâncias farmacologicamente ativas não tinham ainda sido identificadas.

A crescente necessidade de se encontrar novos fármacos antiinflamatórios para uso clínico, sem efeitos colaterais importantes, despertou nosso interesse pela busca de substâncias com potencial terapêutico na espécie medicinal *S. dendroideum*.

O uso de agentes antiulcerogênicos têm se mostrado eficaz na profilaxia e no tratamento dos danos gastrintestinais provocados pelos AINEs, mas esta terapia concomitante não apresenta uma eficácia completa, não é livre de efeitos adversos adicionais e ainda representa custos adicionais para os pacientes (RASKIN, 1999).

Portanto, o uso do bálsamo contra processos inflamatórios (LORENZI & SOUZA, 1995; DUARTE & ZANETI, 2002; COELHO DE SOUZA *et al.*, 2004) e no tratamento de úlceras gástricas (CARLINI *et al.*, 1970) evidencia seu potencial terapêutico como fonte de agentes antiinflamatórios com propriedades antiulcerogênicas.



OBJETIVOS



OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo químico e farmacológico das folhas de *Sedum dendroideum* (bálsamo) em busca das substâncias farmacologicamente ativas que justifiquem seu uso na cura de feridas de pele e no tratamento de úlceras gastrintestinais.

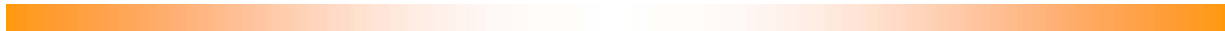
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

De forma a justificar o uso medicinal das folhas do bálsamo pela população, o presente estudo teve como objetivos:

1. Avaliar as atividades antinociceptiva e antiinflamatória do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* visando validar seu uso popular em processos que envolvem mecanismos de dor e inflamação;
2. Isolar e caracterizar as substâncias ativas presentes no sumo das folhas pelo fracionamento monitorado pela atividade antinociceptiva;
3. Avaliar as atividades farmacológicas das substâncias isoladas;
4. Realizar o estudo fitoquímico dos caules do bálsamo;
5. Comparar o perfil químico dos caules de *S. dendroideum* com a composição química presente nas folhas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas.



MATERIAIS E MÉTODOS



EXPERIMENTAL GERAL

MATERIAL VEGETAL

Mudas de *Sedum dendroideum* com aproximadamente 15 cm de altura, fora do período de floração, foram trazidas de um horto localizado em São Paulo (SP). Uma amostra vegetal foi separada, identificada e sua exsicata (RBR 7401) está depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



Figura 7: Mudas de bálsamo (*Sedum dendroideum*).

EXTRAÇÃO

Folhas

As folhas frescas de *S. dendroideum* foram coletadas (tamanho médio das folhas: 5,3 cm; massa: 0,76 g/folha), lavadas com água destilada, reduzidas a pedaços pequenos e expressas em um liquidificador de uso doméstico. O sumo obtido da expressão das folhas foi filtrado em algodão até a obtenção de um líquido amarelo forte e límpido.

Caules

Os caules frescos de *S. dendroideum* foram separados, lavados com água destilada, triturados em um liquidificador de uso doméstico com água destilada na proporção de 1 g de material vegetal para 1 mL de água. O extrato aquoso obtido foi filtrado em algodão, obtendo-se ao final um líquido amarelo claro e límpido.

FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

O fracionamento dos extratos das folhas e dos caules foi feito com o auxílio de três técnicas: precipitação com etanol, partição com solventes orgânicos e cromatografia.

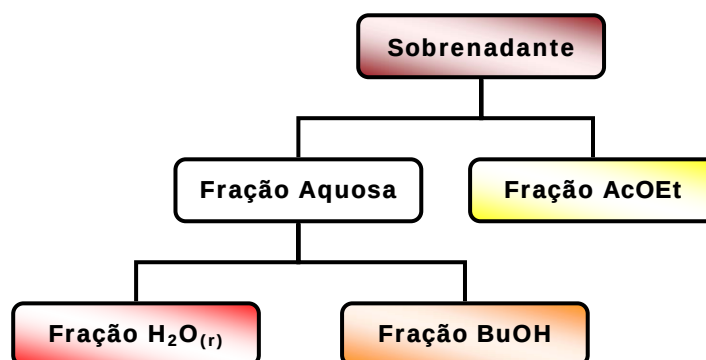
Precipitação com Etanol

Com o objetivo de separar as macromoléculas, foi feita uma precipitação com etanol dos extratos na proporção de 1:1. Esta técnica permite a separação dos macrometabólitos, como polissacarídeos e proteínas, dos micrometabólitos. Isso porque a adição de etanol no meio aquoso muda a solvatação entre as moléculas e, conseqüentemente, a interação entre elas. Os polímeros são encontrados no precipitado e os micrometabólitos, as substâncias de interesse, no sobrenadante (TERAWAKI *et al.*, 1998).

Após a precipitação, o sobrenadante foi separado do precipitado por filtração. O precipitado, retomado em água, e o sobrenadante, após evaporação do etanol, foram liofilizados e quantificados.

Partição com Solventes Orgânicos

A fim de separar as substâncias presentes no sobrenadante em três faixas distintas de polaridade, foram feitas partições em acetato de etila e *n*-butanol do extrato, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se uma fração em acetato de etila (AcOEt), uma fração butanólica (BuOH) e uma fração aquosa residual ($H_2O_{(r)}$) (**Esquema 1**). A partição utilizando acetato de etila permite separar moléculas de baixa e média polaridade, como por exemplo, ácidos graxos, flavonóides, terpenos e cumarinas. Já as moléculas de maior polaridade, como aquelas conjugadas com unidades de carboidratos, vão preferencialmente ficar na fase butanólica. Os carboidratos, ácidos aminados e taninos, por exemplo, serão encontrados na fase aquosa residual (FALKENBERG *et al.*, 2004).



Esquema 1: Partição dos sobrenadantes com solventes orgânicos.

Cromatografia

As cromatografias em fase inversa foram realizadas em sílica silanizada RP-2 (70-230 mesh) ou RP-18 (40-63 μM , Merck) e as cromatografias por exclusão molecular foram realizadas em gel Sephadex LH-20 (25-100 nm, Sigma) ou gel Sephadex G-15-120 (40-120 μM , Sigma).

O fracionamento em colunas cromatográficas foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando Silica 60 F₂₅₄ (Merck) como suporte e *n*-butanol/ácido acético/água (BAW 8:1:1) e acetato de etila/acetona/ácido acético/água (AAAA 30:3:1:1) como eluentes. Os cromatogramas foram visualizados sob luz ultravioleta (UV; 254 nm e 366 nm) e revelados com solução de sulfato cérico para detecção de manchas características para flavonóides.

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os espectros de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) ^1H e ^{13}C , utilizando DMSO-*d*₆ ou CD₃OD como solventes, foram realizados nos seguintes espectrômetros:

- ✓ Bruker DRX-400 (^1H : 400,14 MHz; ^{13}C : 100,61 MHz);
- ✓ Bruker DRX-300 (^1H : 300,13 MHz; ^{13}C : 75,48 MHz);
- ✓ Bruker AC200A (^1H : 200,16 MHz; ^{13}C : 50,33 MHz);
- ✓ Varian Gemini 200 (^1H : 199,97 MHz; ^{13}C : 50,28 MHz).

Técnicas 2D utilizadas:

COSY (*homonuclear CO*relation *S*pectroscopy) – esta técnica permite estabelecer as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por $^2-3J_{\text{H,H}}$ (acoplamentos geminais e vicinais, mensuráveis no espectro 1D) e assim discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN ^1H (KAISER, 2000).

HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) – neste experimento só são observados os acoplamentos entre hidrogênio e carbono que participam da mesma ligação química ($^1J_{\text{C,H}}$). O espectro é apresentado com o eixo horizontal correspondendo aos δ_{H} e o eixo vertical correspondendo aos δ_{C} (KAISER, 2000).

HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) – este experimento estabelece as correlações entre hidrogênio e carbono com duas ou mais ligações entre si ($^nJ_{\text{C,H}}$; $n \geq 2$). O espectro é apresentado com o eixo horizontal correspondendo aos δ_{H} e o eixo vertical correspondendo aos δ_{C} (KAISER, 2000).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)

As análises de Espectrometria de Massas foram realizadas em espectrômetro Biflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) em modo de reflexão, IS1: 19kV, IS2: 16,5 kV, reflector: 20 kV. Matriz: ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Aldrich, Milwaukee, WI). Nestas análises, as amostras foram diluídas em H₂O/MeOH (1:1) (1 μ g/mL). Alíquotas de 0,5 μ L da amostra e da matriz foram utilizadas. O espectro foi calibrado internamente utilizando os picos da matriz.

ROTAÇÃO ÓPTICA

Os desvios de rotação óptica $[\alpha]_D^{25}$ das substâncias isoladas foram medidos em um polarímetro Perkin-Elmer 243B. O desvio foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha}{l \times c} \times 100$$

Onde:

$[\alpha]_D^{25}$: rotação óptica específica à temperatura de 25 °C utilizando a linha D da lâmpada de sódio ($\lambda = 589,6$ nm) para a luz

α : rotação observada

c : concentração da solução em gramas por 100 mililitros de solução (g/100 mL)

l : comprimento do tubo em decímetros (1 dm = 10 cm)

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Os experimentos foram realizados por Michelle Frazão Muzitano, sob a orientação do Professor Franco Francesco Vincieri da Universidade de Florença, Itália.

As análises de CLAE/UV foram executadas em instrumento HP 1100L com detector "Diode Array" e controladas por uma estação de trabalho HP 9000 (Hewlett & Packard, Palo Alto, CA, EUA). Coluna de fase inversa RP-18 (5 μ m, 250 mm, 0.5 mm d.i., Luna, Phenomenex, USA) mantida a 30 °C; eluentes: (A) gradiente de H₂O com pH 3,2 ajustado com HCOOH e (B) Acetonitrila (**Tabela 3**); fluxo de eluição 1 mL/min; volume de injeção: 10 μ L. Os espectros do UV-Vis foram adquiridos na escala de 200-450 nm.

O sistema do HPLC foi acoplado a um espectrômetro de massas HP 1100MSD API-electrospray (Hewlett & Packard, Palo Alto, CA, USA). Os espectros de massas foram registrados na modalidade íon-negativa. Parâmetros EM: temperatura capilar: 220 °C; tensão do capilar: 3,0 V; tensão da fonte: 4,2 kV; tensão das lentes do tubo: 30 V; energia de colisão: 35%.

Tabela 3: Esquema do gradiente de solventes.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0
10	80	20
20	78	22
35	75	25
40	70	30

Resumo teórico sobre a técnica de ionização por elétron-spray:

Essa técnica consiste na formação de uma névoa de partículas carregadas obtidas mediante ação de um campo elétrico sobre um efluente líquido dentro de um capilar mantido a um alto potencial (4-6 kV).

A fonte ESI utiliza sempre um gás de auxílio a nebulização e é capaz de suportar fluxo de até 1 mL/min, o que permite o acoplamento direto com colunas de CLAE analíticas.

Mecanismo de ionização: cada gota de líquido presente na névoa obtida contém certo número de íons, ou seja, de partículas carregadas, com prevalência de um tipo de carga, positiva ou negativa. A evaporação do solvente provoca uma contração das gotas com redução da superfície externa e com conseqüente aumento do campo elétrico. Atingindo um valor crítico, as partículas carregadas não conseguem mais permanecer na superfície e são desprendidas como íons em fase gasosa mais ou menos solvatados. Esses íons são guiados por um campo elétrico dentro do analisador, onde são separados e revelados. No modo negativo de ionização podemos encontrar além do $[M - H]^-$, $[M + Cl]^-$ e $[M + HCOO]^-$.

PARTE FITOQUÍMICA

OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO SUMO DAS FOLHAS FRESCAS

Para isolamento e identificação dos flavonóides presentes nas folhas de *Sedum dendroideum* foram trabalhadas quatro partidas de material vegetal (folhas), obtidas em períodos distintos.

A **Tabela 4** mostra o código para cada partida trabalhada, a massa de material vegetal coletada e o rendimento obtido na extração por expressão das folhas (massa de sumo seco para 100 g de folhas frescas).

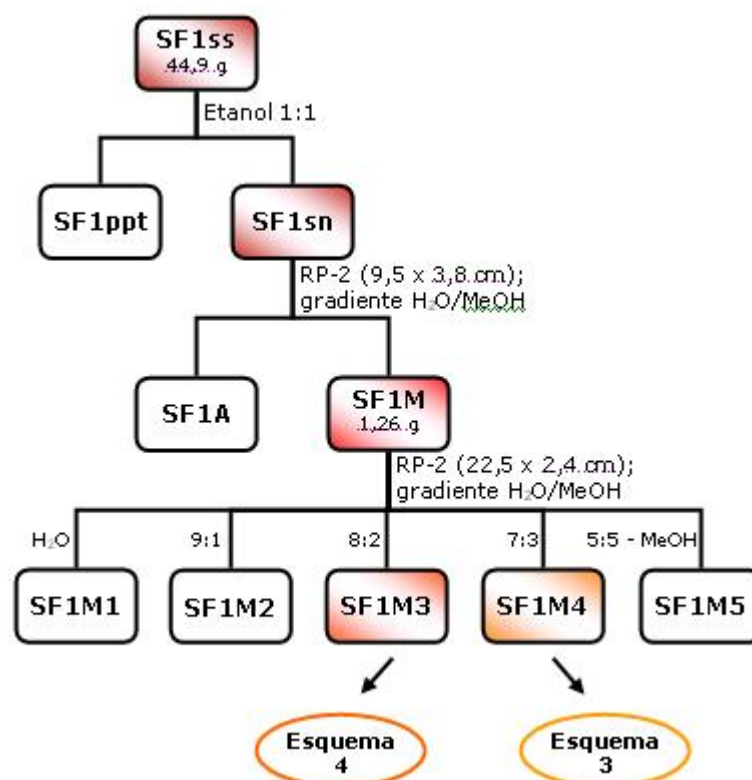
Tabela 4: Código das diferentes partidas de *Sedum dendroideum*

Código	Período da partida	Massa de folhas frescas	Rendimento da extração
Sd01	Dezembro 2001	2,12 kg	1,85 %
Sd02	Agosto 2003	1,81 kg	1,66 %
Sd03	Janeiro 2004	0,55 kg	2,49 %
Sd04	Novembro 2004	6,23 kg	2,09 %

FRACIONAMENTO DE Sd01

O fracionamento do material coletado em dezembro de 2001, codificado como Sd01, foi monitorado pelos ensaios biológicos em busca das substâncias ativas presentes em *S. dendroideum*.

Folhas frescas (2,12 kg) foram expressas em um liquidificador caseiro fornecendo 1,9 L de sumo, que foi congelado e liofilizado. O sumo seco (SF1ss; 44,9 g) foi solubilizado em água destilada e precipitado com etanol na proporção de 1:1. O sobrenadante obtido, após evaporação do etanol e liofilização, foi fracionado em coluna de sílica de fase inversa RP-2 (9,5 x 3,8 cm; gradiente H₂O/MeOH), fornecendo 2 frações: SF1A (2,8 L), eluída com água, e SF1M (1,8 L), eluída com gradiente H₂O/MeOH até 100% MeOH. SF1M, após nova purificação em coluna RP-2, forneceu 3 frações flavonoídicas: SF1M2 (211,8 mg), SF1M3 (255,1 mg) e SF1M4 (587,8 mg) (**Esquema 2**).



Esquema 2: Fracionamento do sumo seco (SF1ss) obtido da partida Sd01.

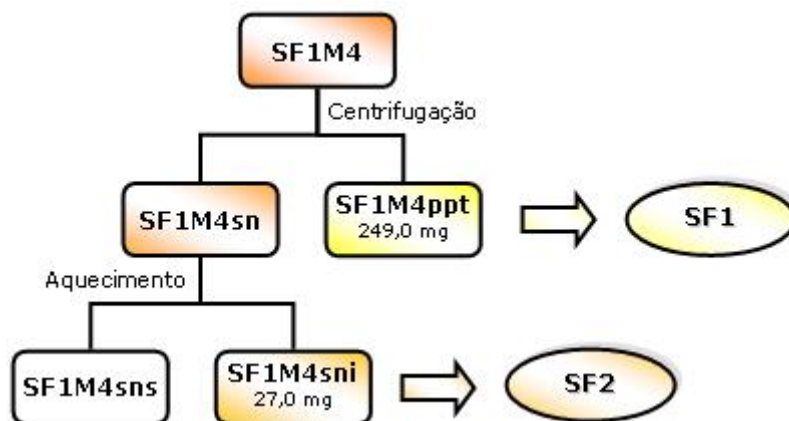
ISOLAMENTO DE SF1

A partir de SF1M4 foram obtidos cristais amarelos que foram separados por centrifugação, lavados com água destilada e liofilizados (**Esquema 3**). Este precipitado (SF1M4ppt; 249,0 mg) foi analisado por CCD (BAW 8:1:1) e após revelação sob luz UV, seguida de oxidação com sulfato cérico, mostrou tratar-se de um flavonóide com R_f 0,73. Este flavonóide foi codificado como **SF1**.

ISOLAMENTO DE SF2

SF1M4sn, após concentração em banho-maria para evaporação do metanol, gerou um segundo sólido amarelo insolúvel, que foi separado por centrifugação e lavado com água destilada (27,0 mg). A análise por CCD, nas mesmas condições anteriores, mostrou que este era um outro flavonóide, codificado como **SF2**, com R_f 0,63 (**Esquema 3**).

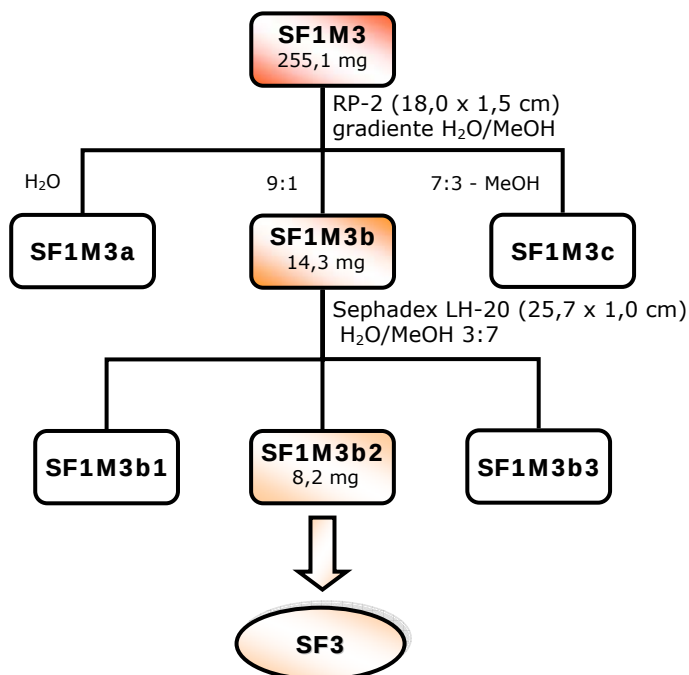
Os flavonóides **SF1** e **SF2** foram enviados para as análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C , experimentos mono e bidimensionais.



Esquema 3: Isolamento dos flavonóides **SF1** e **SF2**

ISOLAMENTO DE SF3

A fração SF1M3 foi cromatografada em uma coluna RP-2 originando 3 frações. A segunda fração (SF1M3b), eluída com H₂O/MeOH 9:1, apresentou em CCD (BAW 8:1:1) um flavonóide com R_f 0,49. Após purificação em Sephadex LH-20, foram obtidos 8,2 mg de **SF3** (**Esquema 4**). Este material foi enviado para experimentos mono e bidimensionais de RMN ¹H e ¹³C.



Esquema 4: Isolamento do flavonóide **SF3**

FRACIONAMENTO DE Sd02 E Sd03

A análise do sumo de *Sedum dendroideum* por CCD mostrou que outros flavonóides polares, porém minoritários, encontravam-se presentes. Com o objetivo de isolar estes flavonóides e obter mais massa dos flavonóides previamente isolados para realização dos ensaios biológicos, duas novas partidas de material vegetal (Sd02 e Sd03) foram obtidas.

As folhas frescas de Sd02 e Sd03 foram expressas, separadamente, em liquidificador doméstico fornecendo um sumo amarelo límpido que, após liofilização e quantificação, foi re-suspenso em água e precipitado com etanol na proporção de 1:1.

Antes da precipitação com etanol, uma alíquota do sumo (7,4391 g) obtida a partir de Sd02 foi separada para realização dos ensaios biológicos.

Na **Tabela 5** encontram-se os rendimentos obtidos em cada etapa do fracionamento de Sd02 e Sd03.

Tabela 5: Rendimento da extração e precipitação de Sd02 e Sd03.

Material	Sd02	Sd03
Folhas frescas	1,81 kg	0,550 kg
Sumo líquido	1550 mL	500 mL
Sumo liofilizado (total)	29,0603 g	13,69 g
Sobrenadante	15,6469 g	8,4 g
Precipitado	5,9743 g	3,98 g

Os sobrenadantes de coloração castanha obtidos de Sd02 e Sd03, após separação por filtração dos seus respectivos precipitados de coloração branca, foram colocados em banho-maria para evaporação do etanol. Após completa evaporação do álcool, os sobrenadantes, separadamente, foram liofilizados para quantificação.

Após serem re-suspenso em água, os sobrenadantes obtidos de Sd02 e Sd03 foram particionados sucessivamente com acetato de etila e butanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se as frações em acetato de etila, butanólica e aquosa. Os rendimentos obtidos nas partições encontram-se resumidos na **Tabela 6**.

Tabela 6: Rendimento das partições com solventes orgânicos de Sd02 e Sd03.

Frações	Sd02	Sd03
Sobrenadante	15,6230 g	8,4 g
Fração em acetato de etila	0,3784 g	0,3161 g
Fração butanólica	1,5604 g	1,0182 g
Fração aquosa	13,3978 g	6,0993 g

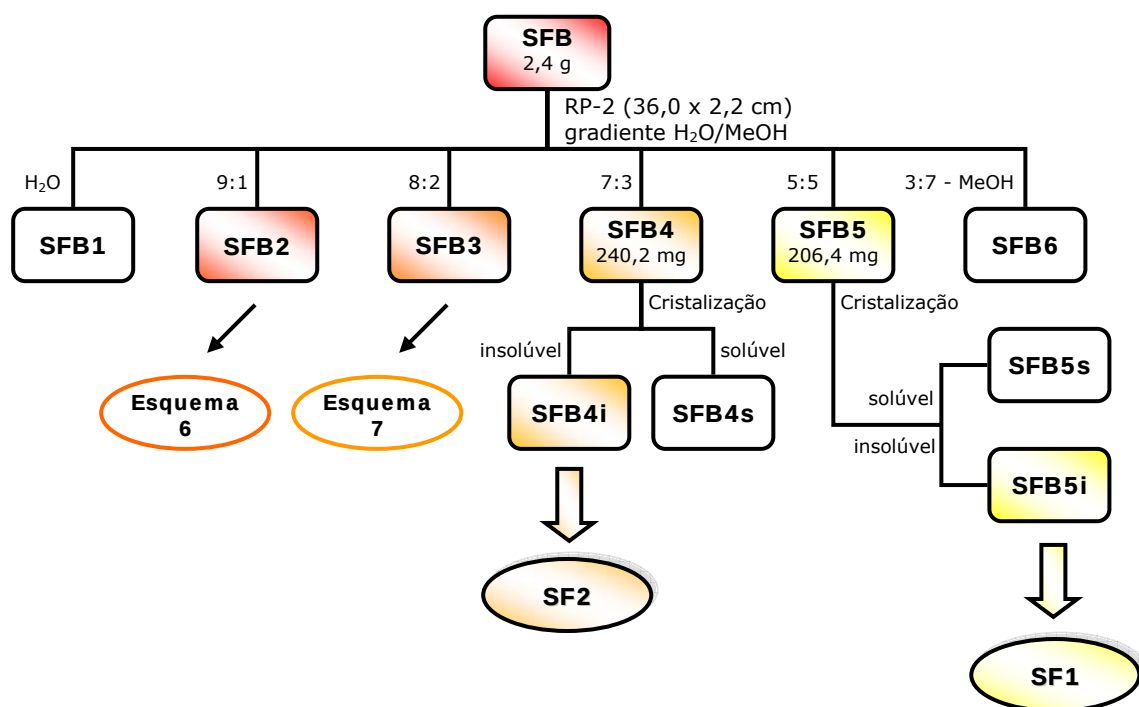
Em busca dos flavonóides polares presentes no sumo de *S. dendroideum*, as frações orgânicas (frações em acetato de etila e butanol) obtidas da partição foram analisadas por CCD (BAW 8:1:1) quanto à presença dessas substâncias. Verificou-se a presença de flavonóides com R_f 's que variavam de 0,35 a 0,73 na fração butanólica (flavonóides de alta e média polaridade) e 0,73 a 0,87 na fração em acetato de etila (flavonóides de média e baixa polaridade).

As frações butanólicas obtidas das partições de Sd02 e Sd03, por apresentarem um perfil flavonoídico polar semelhante em CCD, foram reunidas (SFB) para posterior fracionamento.

Fracionamento de SFB

O conjunto SFB foi cromatografado em coluna de sílica RP-2, gradiente $H_2O/MeOH$, originando seis frações (**Esquema 5**). Destas, quatro se destacaram por apresentar perfil flavonoídico em CCD: SFB2, SFB3, SFB4 e SFB5.

As frações SFB4 e SFB5, logo após serem coletadas, apresentaram intensa quantidade de um sólido amarelo. Ambas as frações foram centrifugadas separadamente, e seus respectivos precipitados foram lavados com água destilada e analisados por CCD (BAW 8:1:1). Os sólidos obtidos mostraram tratar-se de dois flavonóides diferentes, um com R_f 0,63 (obtido de SFB4) e outro com R_f 0,73 (obtido de SFB5), o mesmo de **SF2** (86,6 mg) e **SF1** (107,3 mg), respectivamente.



Esquema 5: Purificação da fração butanólica SFB

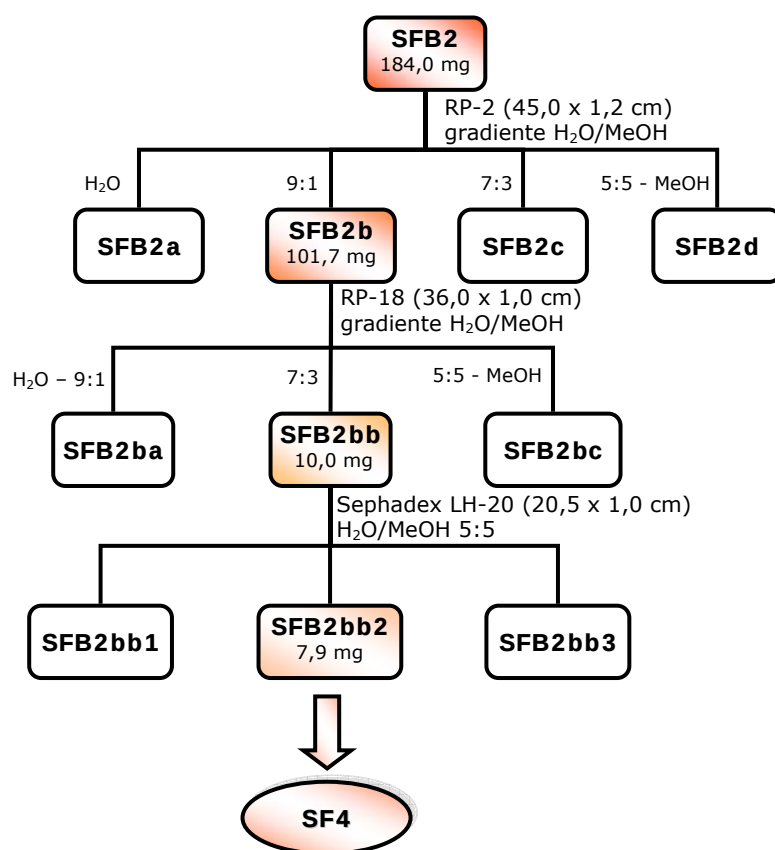
Fracionamento de SFB2

SFB2 (eluída com H₂O/MeOH 9:1), obtida do fracionamento de SFB, foi purificada em uma coluna de sílica RP-2 fornecendo 4 frações. A segunda fração (SFB2b), por apresentar perfil flavonoídico em CCD, foi cromatografada em uma coluna de sílica RP-18 originando três frações (**Esquema 6**).

ISOLAMENTO DE SF4

A fração flavonoídica proveniente da coluna RP-18 (eluída com H₂O/MeOH 7:3), codificada como SFB2bb, foi purificada em coluna de gel Sephadex LH-20 (H₂O/MeOH 5:5) fornecendo 7,9 mg de um flavonóide puro, codificado como **SF4** (*R_f* 0,35; BAW 8:1:1) (**Esquema 6**).

O flavonóide **SF4** foi enviado para as análises espectroscópicas de RMN ¹H e ¹³C, experimentos mono e bidimensionais.

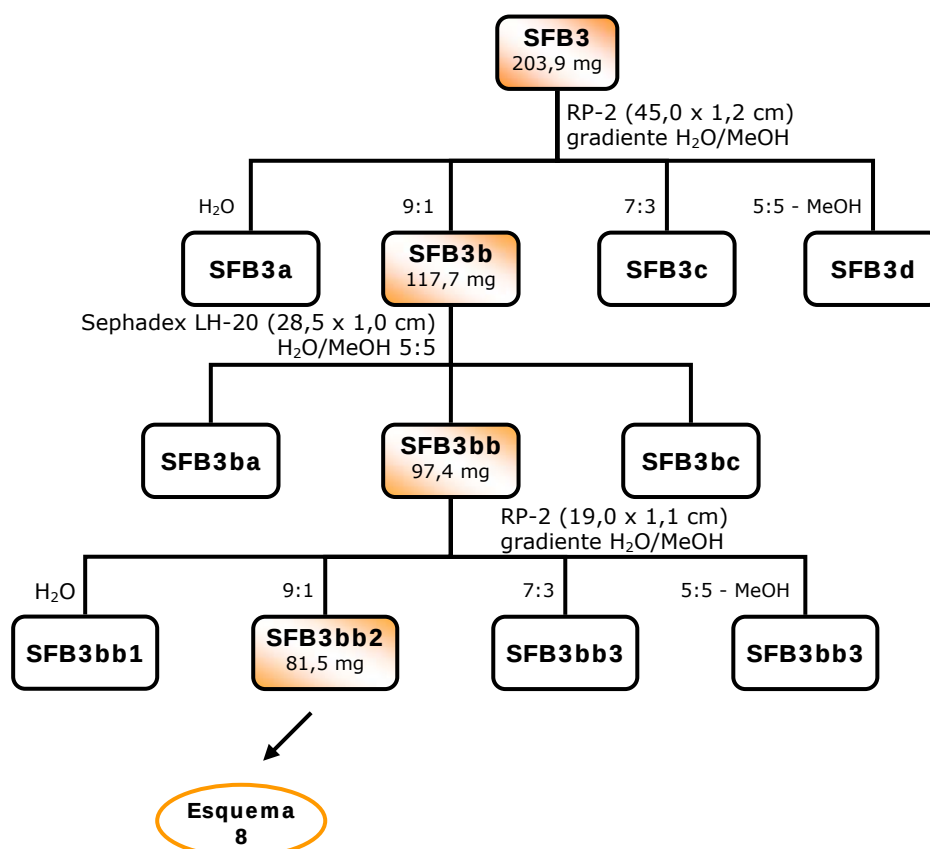


Esquema 6: Fracionamento de SFB2 e isolamento do flavonóide **SF4**

Fracionamento de SFB3

A fração SFB3, eluída com H₂O/MeOH 8:2, foi fracionada em uma coluna de sílica RP-2 fornecendo 4 frações (**Esquema 7**). A segunda fração, SFB3b, após purificação em coluna de gel Sephadex LH-20, originou uma fração rica em flavonóides polares (SFB3bb).

SFB3bb foi cromatografada novamente em uma coluna de sílica RP-2 e o segundo conjunto obtido desta coluna foi, em seguida, purificado em uma coluna de sílica RP-18. Dois conjuntos provenientes da coluna RP-18, quando comparados por CCD (BAW 8:1:1), se destacaram por possuir flavonóides: SFB3Y, com flavonóide de R_f 0,49 e SFB3Z, com flavonóide de R_f 0,52 (**Esquema 8**).

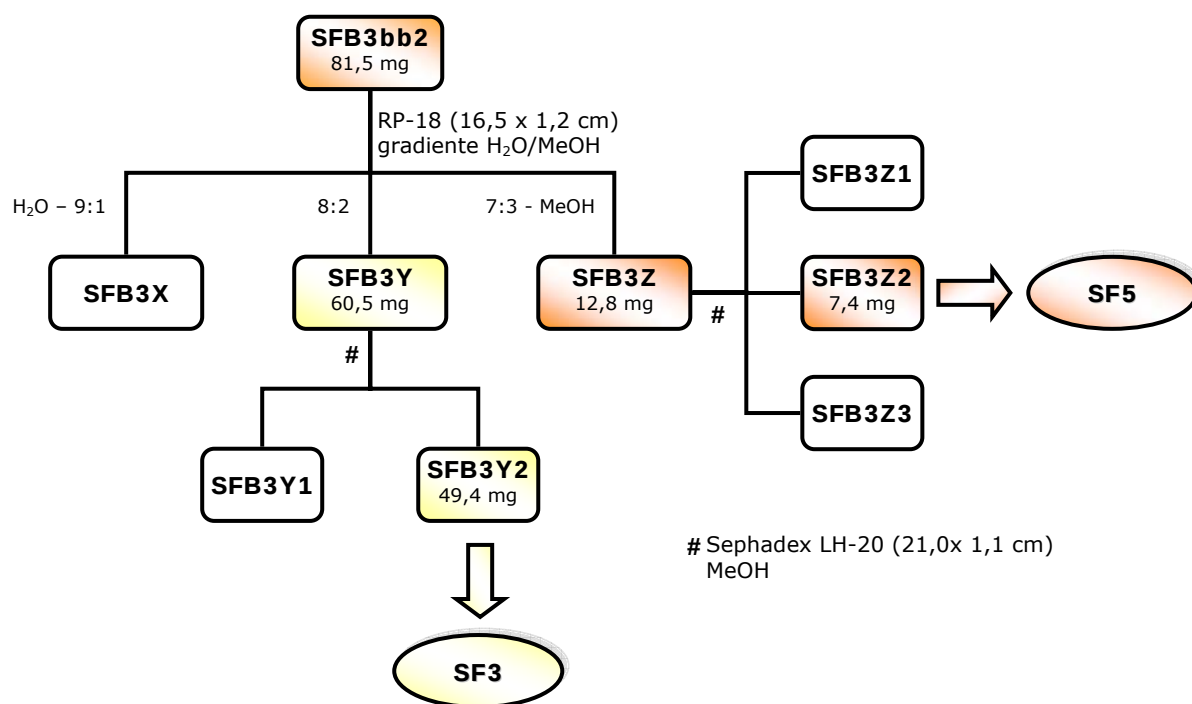


Esquema 7: Fracionamento de SFB3

ISOLAMENTO DE SF5

A fração SFB3Y foi purificada em Sephadex LH-20 fornecendo 49,4 mg de um flavonóide (SFB3Y2) puro, codificado como **SF3** (**Esquema 8**). Este flavonóide foi enviado para as análises de RMN ^1H e ^{13}C mono e bidimensionais.

A fração SFB3Z (**Esquema 8**), após purificação em Sephadex LH-20 (21,0 x 1,1 cm; H₂O/MeOH 3:7), forneceu 7,4 mg de um flavonóide puro, codificado como **SF5**. Este foi enviado para RMN ^1H e ^{13}C , experimentos mono e bidimensionais.



Esquema 8: Obtenção dos flavonóides **SF3** e **SF5**

FRACIONAMENTO DE Sd04

Como foi dito anteriormente, o sumo de *Sedum dendroideum* possui, além dos flavonóides de alta e média polaridade, flavonóides apolares. Portanto, em busca desses flavonóides, uma quarta partida foi trabalhada (Sd04).

Folhas frescas (6,3 kg) foram expressas em um liquidificador caseiro fornecendo 5,46 L de sumo. Este foi reduzido, a uma temperatura controlada de 57°C, até a um volume final de 1700 mL (SDF3). Uma alíquota de 160 mL foi separada, congelada, liofilizada e guardada para padrão (11,9752 g).

Foi feita uma precipitação com etanol (proporção de 1:1) do sumo das folhas resultando em um sobrenadante castanho (SDF3sn) e um precipitado branco (SFA; m= 54,4 g).

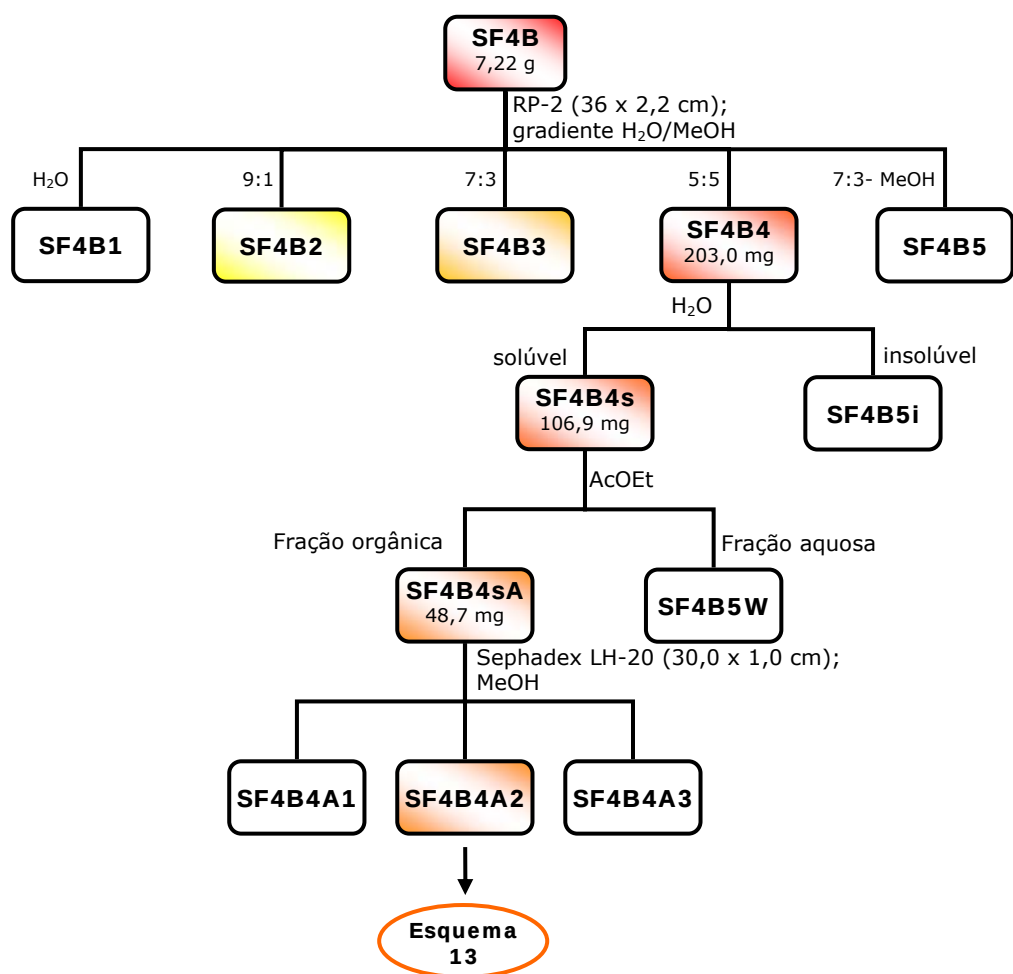
SDF4sn foi reduzido até a um volume de 300 mL e então particionado sucessivamente com acetato de etila e butanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se as frações em acetato de etila (SF4A), butanólica (SF4B) e aquosa (SF4Aq') – **Esquema 9**.



Portanto, visando uma maior massa flavonoídica apolar, tanto SF4A quanto SF4B foram purificados.

A fração butanólica foi cromatografada em coluna de sílica de fase inversa RP-2 (**Esquema 10**) fornecendo cinco frações das quais três se destacaram por possuir flavonóides: SF4B2, onde estão presentes os flavonóides polares, SF4B3, que possui majoritariamente **SF1**, e SF4B4, onde se encontram os flavonóides apolares.

- 47 -

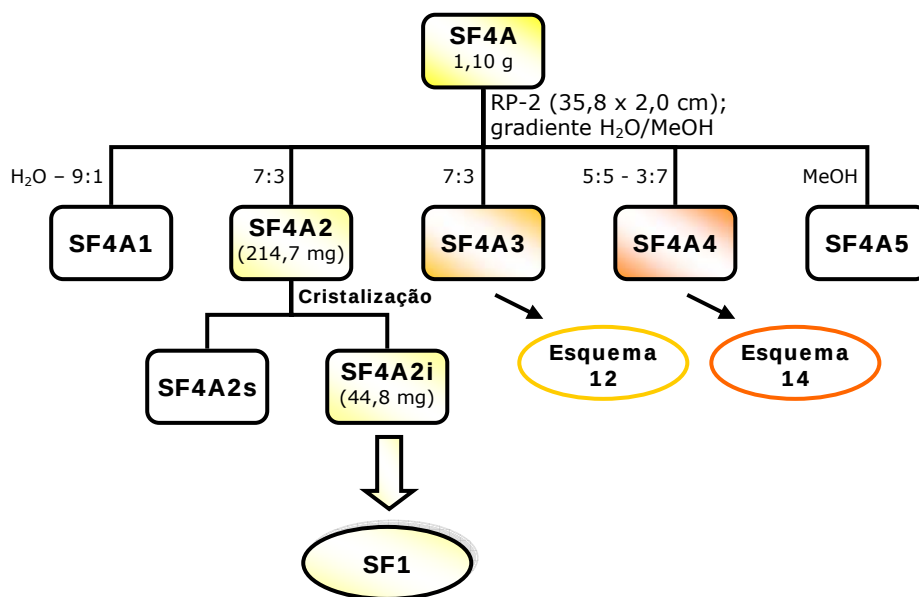


Esquema 10: Purificação da fração butanólica de Sd04 (SF4B)

Fracionamento de SF4A

A fração em acetato de etila (SF4A) foi cromatografada em coluna de sílica RP-2 gerando 5 frações. Destas, três se destacaram por possuir flavonóides: SF4A2, com flavonóide de R_f 0,28, SF4A3, com flavonóides de R_f 0,52 e 0,57, e SF4A4, com flavonóides de R_f 0,57 e 1,0. Por ser tratar de uma fração apolar, SF4A e suas sub-frações foram avaliadas por CCD em um eluente mais apolar que o BAW 8:1:1, o AAAA 30:3:1:1.

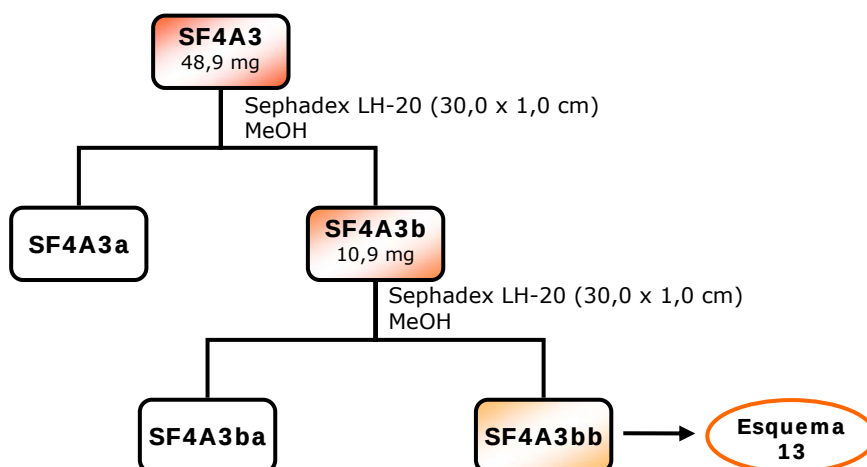
Da fração SF4A2 houve cristalização de mais **SF1** (R_f 0,28 em AAAA 30:3:1:1) - **Esquema 11**.



Esquema 11: Fracionamento de SF4A

Fracionamento de SF4A3

A fração SF4A3, eluída em H₂O/MeOH 7:3, foi purificada em coluna de gel Sephadex LH-20 resultando em dois conjuntos. O segundo conjunto (SF4A3b) foi recromatografado na mesma coluna gerando uma fração rica no flavonóide de R_f 0,52 (SF4A3bb) - **Esquema 12**.



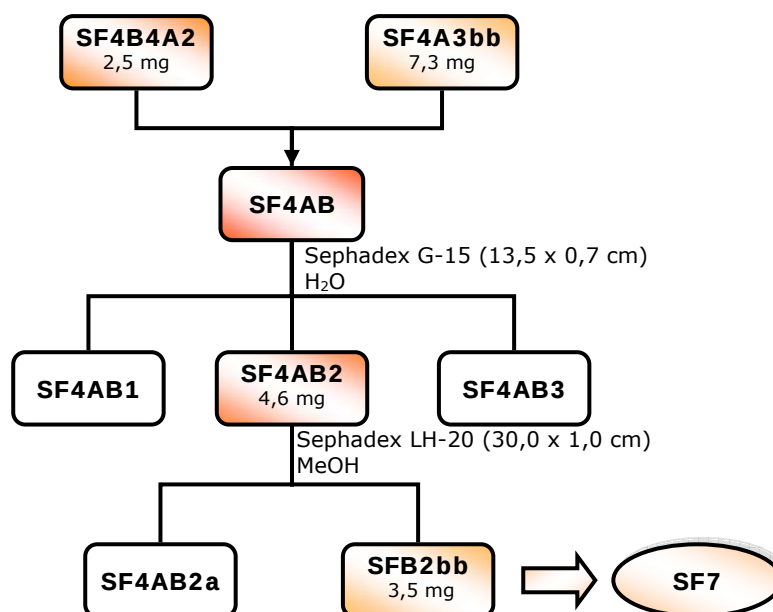
Esquema 12: Fracionamento de SF4A3

ISOLAMENTO DE SF7

A fração SF4A3bb (**Esquema 12**) e a fração SF4B4A2 (**Esquema 10**), por possuírem o mesmo perfil flavonoídico em CCD, foram reunidas e codificadas como SF4AB.

A fração SF4AB foi cromatografada em uma coluna de gel Sephadex G-15 resultando em três conjuntos. O segundo conjunto foi purificado em coluna de gel Sephadex LH-20 fornecendo 3,5 mg de **SF7** (**Esquema 13**).

O flavonóide **SF7** foi enviado para as análises de RMN ^1H e ^{13}C , experimentos mono e bidimensionais.



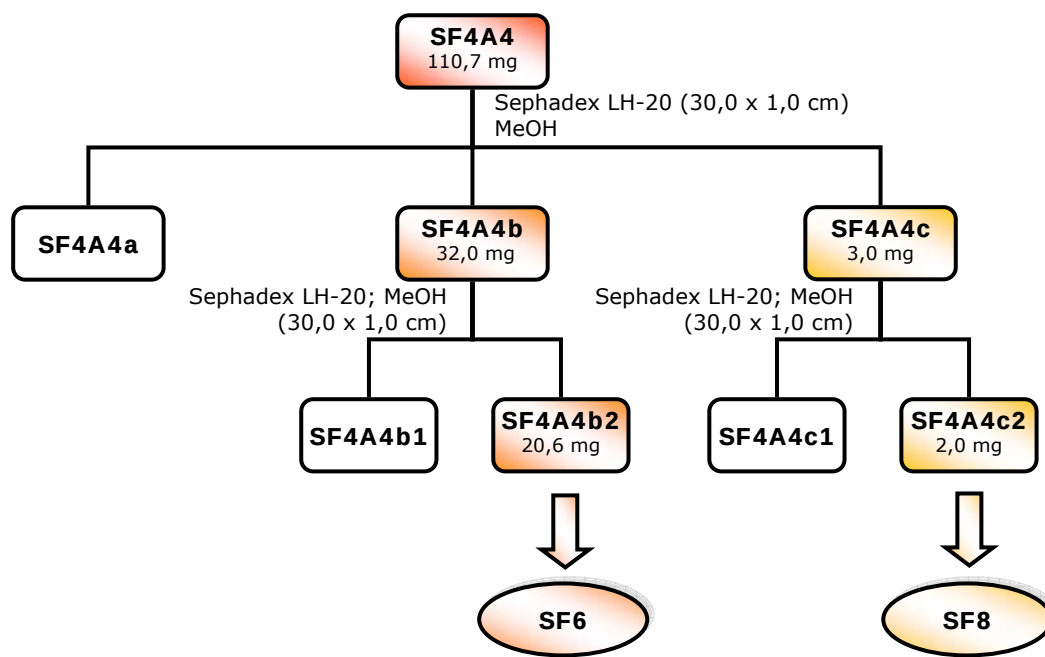
Esquema 13: Isolamento do flavonóide **SF7**

Fracionamento de SF4A4

A fração SF4A4, eluída em H₂O/MeOH 5:5 e 3:7, foi cromatografada em coluna de sílica RP-2 gerando 3 frações. Destas, duas se destacaram por possuir flavonóides: SF4A4b, com flavonóides de R_f 0,57, e SF4A4c, com flavonóide de R_f 1,0 (**Esquema 14**).

ISOLAMENTO DE SF6 E SF8

SF4A4b e SF4A4c foram purificadas em Sephadex LH-20 originando os flavonóides puros **SF6** e **SF8**, respectivamente (**Esquema 14**).



Esquema 14: Fracionamento de SF4A4 e isolamento dos flavonóides **SF6** e **SF8**

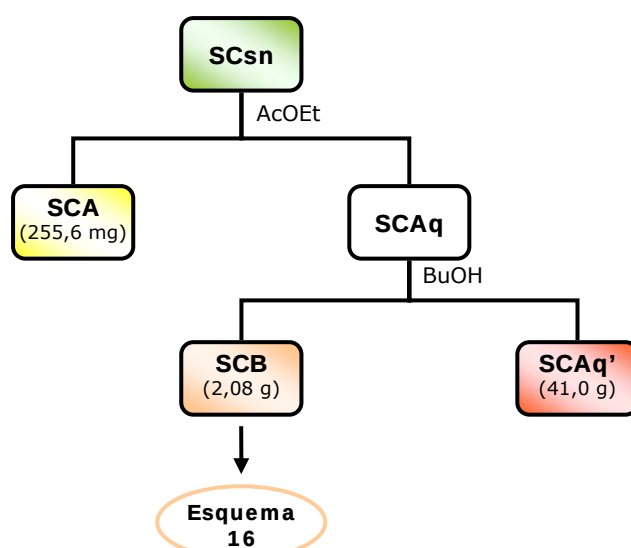
O flavonóides **SF6** e **SF8** foram enviados para as análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C mono e bidimensionais.

OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO DOS CAULES

Os caules (1,61 kg), obtidos da partida Sd04, foram extraídos com água destilada (1,6 L) fornecendo 1,93 L de extrato aquoso. Este foi reduzido, a uma temperatura controlada de 57°C, até a um volume final de 300 mL (SC). Uma alíquota de 1 mL foi separada, congelada, liofilizada e guardada para padrão (216,6 mg).

Foi feita uma precipitação com etanol, na proporção de 1:1, do extrato dos caules obtendo-se um sobrenadante de coloração vermelho-vinho (SCsn; m= 44,3 g) e um precipitado de coloração rosa (SCppt; m= 5,29 g).

SCsn, ressuspenso em 100 mL de água destilada, foi particionado sucessivamente com acetato de etila e butanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se as frações em acetato de etila (SCA), butanólica (SCB) e aquosa (SCAq') – **Esquema 15**.



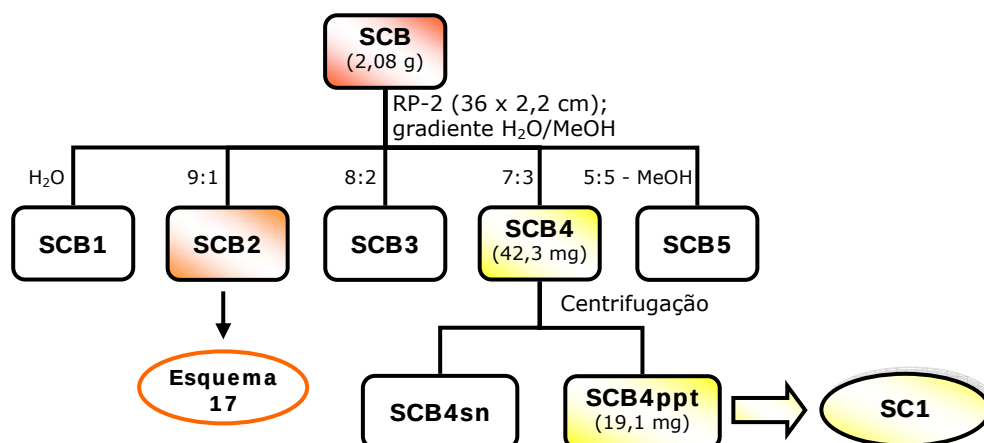
Esquema 15: Partição do sobrenadante do extrato dos caules de *Sedum dendroideum*

Fracionamento de SCB

A fração butanólica, por apresentar perfil flavonoídico em cromatografia em camada delgada (CCD; BAW 8:1:1), foi cromatografada em coluna de sílica de fase inversa RP-2 (**Esquema 16**). Foram obtidas cinco frações das quais duas se destacaram por possuir flavonóides: SCB2, de onde foram isolados os flavonóides codificados como **SC2**, **SC3**, **SC4** e **SC5**, e SCB4, de onde foi isolado **SC1**.

ISOLAMENTO DE SC1

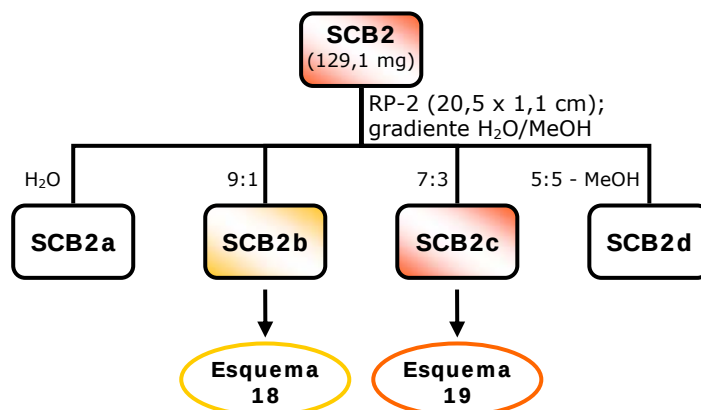
A partir da fração SCB4 foram obtidos cristais amarelos que, após serem separados por centrifugação, foram lavados com água destilada e liofilizados (**Esquema 16**). Este precipitado foi codificado como **SC1** (R_f 0,73) e enviado para análise de RMN ^1H e ^{13}C para confirmar se é o mesmo flavonóide que **SF1** (R_f 0,73).



Esquema 16: Purificação da fração butanólica de *S. dendroideum*

Fracionamento de SCB2

A fração SCB2, eluída em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 9:1, foi cromatografada em coluna de sílica RP-2 gerando 4 frações (**Esquema 17**). Destas, duas se destacaram por possuir flavonóides: SCB2b, com flavonóides de R_f 0,49 e 0,52, e SCB2c, com flavonóides de R_f 0,63 e 0,68.



Esquema 17: Fracionamento de SCB2

ISOLAMENTO DE SC3 E SC4

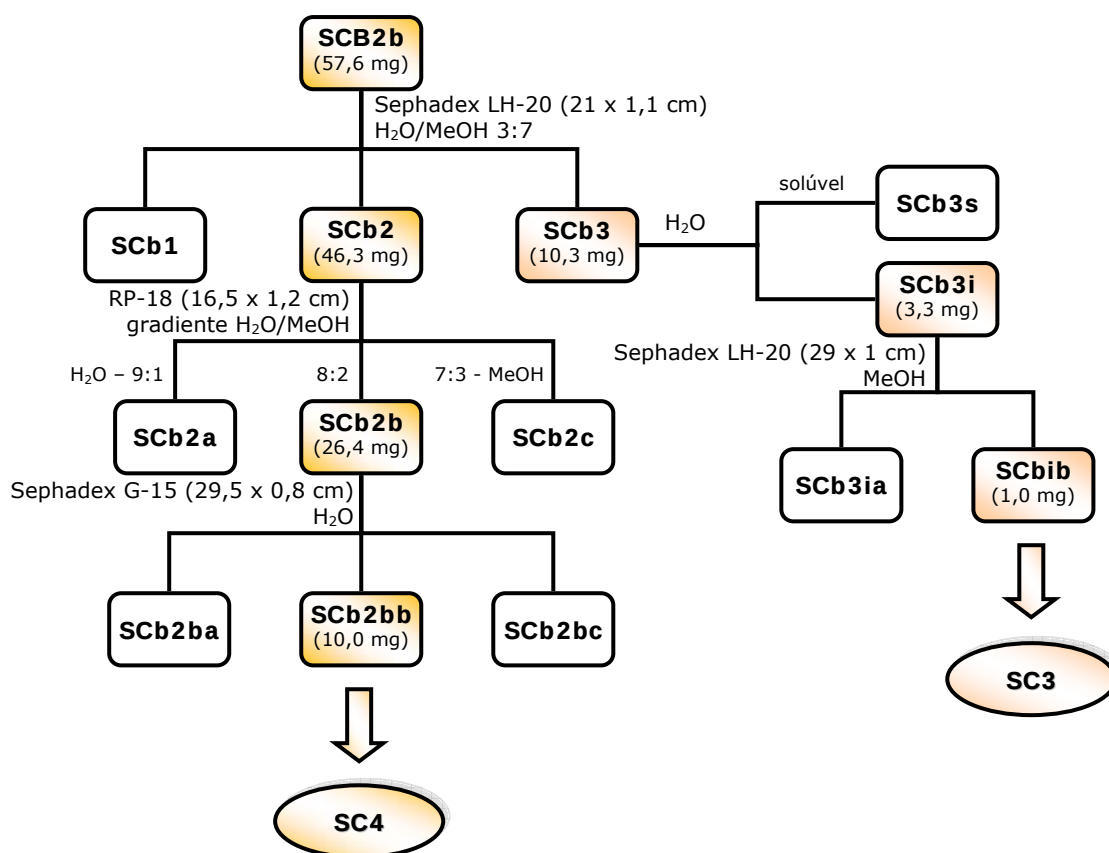
A fração SCB2b, eluída em H₂O/MeOH 9:1, foi purificada em coluna de gel Sephadex LH-20 (21,0 x 1,1 cm; H₂O/MeOH 3:7) resultando em três conjuntos. A partir de SCb2 e SCb3 foram isolados **SC4** e **SC3**, respectivamente (**Esquema 18**).

Para obtenção de **SC4**, a fração SCb2 foi cromatografada em uma coluna de sílica de fase inversa RP-18 resultando em uma fração majoritária em massa, codificada como SCb2b. Esta fração foi purificada, em seguida, em uma coluna Sephadex G-15. A segunda fração desta coluna forneceu 10,0 mg de **SC4** puro (R_f 0,49).

SC4 foi enviado para análise de RMN ¹H para confirmar se este é o mesmo flavonóide **SF3** (R_f 0,49) isolado das folhas.

A fração SCb3 foi re-suspensa em água gerando uma fração solúvel e outra insolúvel. A fração insolúvel foi solubilizada em metanol e purificada em uma coluna Sephadex LH-20. Foi obtido 1,0 mg de **SC3** (R_f 0,52).

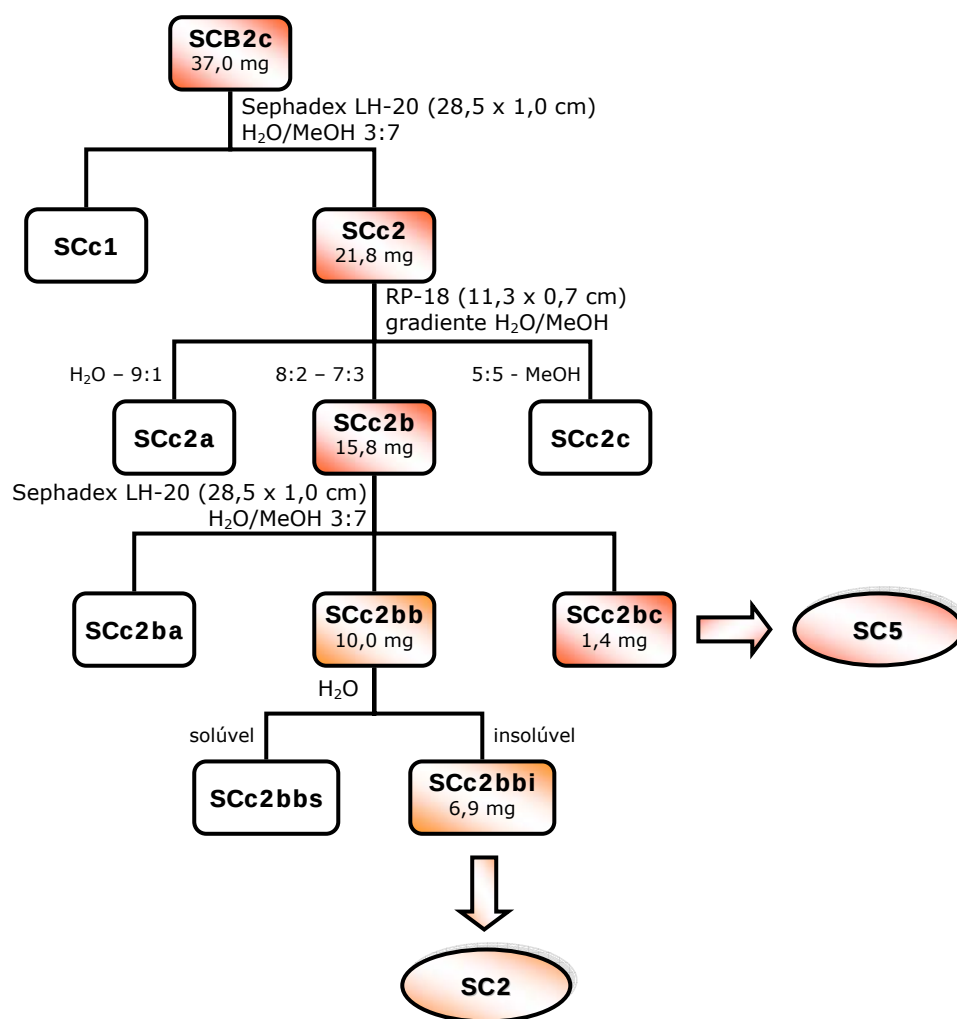
SC3 foi enviado para análise espectroscópica de RMN ¹H, experimentos mono e bidimensionais. A pouca massa isolada não permitiu a análise de RMN ¹³C.



Esquema 18: Obtenção dos flavonóides **SC3** e **SC4**

ISOLAMENTO DE SC2 E SC5

A fração SCB2c, eluída em H₂O/MeOH 7:3, foi purificada em coluna de gel Sephadex LH-20 (28,5 x 1,0 cm; H₂O/MeOH 3:7) resultando em dois conjuntos. O segundo conjunto (SCc2), por apresentar perfil flavonoídico em CCD, foi cromatografado em uma coluna de sílica RP-18 originando 3 frações. A segunda fração (SCc2b), após purificação em Sephadex LH-20, forneceu **SC2** e **SC5** (**Esquema 19**).



Esquema 19: Isolamento dos flavonóides **SC2** e **SC5**.

SC2 foi enviado para análise de RMN ¹H para confirmar se este é o mesmo flavonóide **SF2** (R_f 0,63) isolado das folhas.

SC5 (R_f 0,68) foi enviado somente para análise de RMN ¹H devido a pouca massa de material isolado.

PARTE FARMACOLÓGICA

GERAL

Fármacos, reagentes, solventes e sais

κ -carragenina (tipo I, Sigma); hidrocloreto de naloxona (Sigma), dexametasona (Decadron – Prodrone), indometacina (Sigma), fentanil (Janssen Farmacêutica), formaldeído (Miyako do Brasil), ácido acético glacial (ISO FAR do Brasil), dimetilsulfóxido (DMSO), tween 80, cloreto de sódio e bicarbonato de sódio (Vetec Química Fina).

Todos os fármacos testados e injetados por via parenteral foram solubilizados, antes de seu uso, em salina fisiológica (NaCl 0,9%). A diluição das drogas administradas pela via oral foi realizada com água. Na dissolução da indometacina utilizou-se 5% de bicarbonato de sódio.

Animais

Nos ensaios foram usados camundongos albinos (*Mus musculus*), adultos, pesando entre 20 e 35 g, fornecidos pelo biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas – Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e mantidos com regime de água e ração *ad libitum*.

Os pré-tratamentos dos animais com o veículo, com o sumo, frações e flavonóides de *Sedum dendroideum* ou com diferentes substâncias, foram sempre em concentrações adequadas para a administração de um volume constante de 10 mL/kg. As administrações antecederam os testes farmacológicos em 60 minutos quando feitas por via oral e 30 minutos quando feitas por via intraperitoneal ou subcutânea.

Todos os experimentos foram desenvolvidos seguindo normas que envolvem cuidados com os animais de laboratório e normas éticas para seu uso em experimentos com dor (ZIMMERMANN, 1983; PORTER, 1992).

Após os testes de atividade farmacológica os animais foram sacrificados por anestesia etérea profunda quando necessário e CO₂ se possível.

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA

Esses ensaios foram realizados no Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como parte do projeto de Iniciação Científica de David do Carmo Malvar, aluno do curso de Medicina Veterinária – UFRuralRJ, sob a orientação do Prof. Frederico Argollo Vanderlinde, com o qual o nosso grupo de pesquisa mantém colaboração.

Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

Grupos experimentais de 6 camundongos foram tratados oralmente com água (grupo veículo), com o sumo do *Sedum dendroideum* (0,1, 0,3 e 1 g/kg) ou com a indometacina (grupo controle positivo, 10 mg/kg). Após 60 minutos dos tratamentos, todos os animais foram injetados pela via intraperitoneal com ácido acético diluído em salina (1,2%; 20 µL/10g) (KOSTER *et al.*, 1959). As contorções abdominais, consideradas como contrações da parede abdominal seguida por extensão de pelo menos uma das patas posteriores (VACHER *et al.*, 1964), foram contadas por 30 minutos, após a injeção do ácido acético. Para isso, os camundongos foram colocados individualmente em funis de vidro, por um período de adaptação prévia de 15 minutos. Os resultados foram expressos como as médias dos números de contorções acumuladas durante os 30 minutos de avaliação experimental, ou como percentagem de inibição das contorções comparativamente ao grupo controle, permitindo, desta forma, a avaliação da dose inibitória 50% (ID₅₀) (KOSTER *et al.*, 1959).

Teste da Formalina

Este teste permite, após a injeção intraplantar de formalina, avaliar dois tipos de dor: a de origem neurogênica, que ocorre pela estimulação direta de terminações nervosas, e a de origem inflamatória produzida pela liberação de mediadores inflamatórios. Os animais foram tratados oralmente com água (grupo veículo), com o sumo do *Sedum dendroideum* (1 g/kg) ou com a indometacina (grupo controle positivo, 10 mg/kg), 60 minutos antes da injeção intraplantar da solução formalina (1,2% de formol em salina; 20 µL/pata), na pata posterior direita. Em seguida a aplicação, foi medida a reatividade do animal, considerada como o tempo, em segundos, que o animal permaneceu lambendo, mordendo ou sacudindo a pata injetada. O efeito antinociceptivo foi avaliado durante as duas fases da dor: nos primeiros 5 minutos (dor neurogênica) e no período de 15 a 30 minutos (dor inflamatória), sendo os resultados expressos como as médias dos tempos de reatividade ou como percentual de inibição da reatividade nas distintas fases, comparativamente ao grupo veículo (HUNSKAAR *et al.*, 1985 e 1986; HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Teste da Placa Quente

Neste teste, a latência ao estímulo térmico ($55 \pm 0,5$ °C), em segundos, foi mensurada a cada 30 minutos, começando 30 minutos antes dos tratamentos, imediatamente após e até 2 horas depois dos tratamentos pela via oral com água (grupo veículo), com o sumo do *Sedum dendroideum* (1 g/kg) ou com o fentanil (grupo controle positivo, 200 µg/kg, via subcutânea). O tempo de reação do animal ao estímulo térmico caracteriza-se pelo comportamento de levantar ou lambear as patas, considerado como indicativo de efeito nociceptivo (WOOLFE & MACDONALD, 1944). Os animais foram previamente selecionados quanto a sua reatividade ao estímulo nociceptivo, não sendo usados animais cujo tempo de reação seja superior a 9 segundos. Objetivando impedir a lesão tecidual, foi estabelecido o *cut-off* de 30 segundos (D'AMOUR & SMITH, 1941).

Teste do Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton

O óleo de Cróton desencadeia um processo inflamatório agudo com diferentes fases onde ocorre a liberação de diferentes mediadores envolvidos na inflamação, tais como aminas biogênicas (histamina e serotonina), cininas e eicosanóides (DI ROSA *et al.*, 1971). O edema de orelha induzido por óleo de Cróton é um modelo muito utilizado para avaliar a ação de drogas com possível atividade antiinflamatória, pois o processo induzido na orelha é sensível à ação de drogas antiinflamatórias esteroidais e não esteroidais.

Neste experimento, grupos experimentais de 8 camundongos foram tratados por via oral com água (grupo veículo), com o sumo de *Sedum dendroideum* (1 g/kg) ou com indometacina (10 mg/kg), controle positivo do teste. Após 60 minutos dos tratamentos, os animais foram injetados na superfície interna da orelha direita com 10 µL de óleo de cróton (2,5% v/v em acetona). A superfície interna da orelha esquerda foi tratada com o mesmo volume de acetona e usada como controle. Quatro horas após a administração do óleo de cróton, os animais foram mortos por deslocamento cervical e um disco de 6 mm de diâmetro foi removido de cada orelha e pesado em balança analítica. Os resultados foram representados como as médias e erros padrões da diferença de peso entre as duas orelhas (Δ), comparando os resultados obtidos no grupo veículo (TUBARO *et al.*, 1986; ZANINI JR *et al.*, 1992).

Teste da Migração Leucocitária

Este ensaio avalia a migração leucocitária para a cavidade peritoneal, segundo protocolo originalmente descrito por Ferrándiz e Alcaraz (1991).

Grupos experimentais de 5 a 7 animais foram tratados previamente por via oral com água (grupo veículo) e com o sumo de *Sedum dendroideum* (1 g/kg) ou por via subcutânea (s.c.) com dexametasona (2 mg/Kg), utilizada como controle positivo de teste. Decorridos 60 minutos (p.o.) dos tratamentos, os animais foram injetados pela via intraperitoneal com 0,25 mL de carragenina (1% em salina). Após 4 horas os animais foram sacrificados sob anestesia etérea profunda e injetados na cavidade peritoneal com 2 mL de PBS heparinizado (10 UI/mL), livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Feito isso, foram realizadas 50 compressões leves no abdômen e, então, coletado o fluido peritoneal. A amostra foi diluída em solução de Türk (1:20) e a contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como as médias dos números de leucócitos totais ($\times 10^6/\text{mL}$) de cada grupo experimental ou como percentagem de inibição da migração de leucócitos comparativamente ao grupo experimental controle (FERRÁNDIZ & ALCARAZ, 1991).

Teste do rota-rod

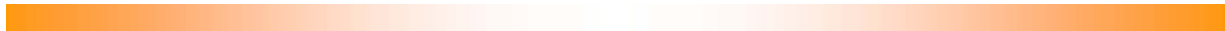
Este aparelho consiste de uma barra giratória com diâmetro de 2,5 cm, colocada a 25 cm de altura e subdividida em seis compartimentos iguais por discos de 25 cm de diâmetro, com o objetivo de avaliar seis animais simultaneamente. A barra giratória mantém uma velocidade constante de 9 rpm. Neste teste, 1 hora após os tratamentos, pela via oral, com o veículo (água), com o sumo do *Sedum dendroideum* (1 g/kg) ou, pela via subcutânea, com o controle positivo diazepam (3 mg/kg), os grupos de 7 animais foram avaliados por 1 minuto sobre a barra giratória, onde foi cronometrado o tempo, em segundos, de permanência na barra giratória (DUHAM & MYIA, 1957). Este método permite avaliar se os tratamentos promoveram incoordenação motora nos animais, por sedação e/ou relaxamento muscular.

Análise Estatística dos Dados

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos o erro padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA). Para comparação entre as médias dos grupos experimentais foi utilizado o teste *t* não pareado, admitindo diferenças significativas a partir de $p < 0,05$ (SOKAL & ROHLF, 1981). As análises estatísticas foram feitas através dos programas GraphPad Prism 3.0 e GraphPad InStat 3.0.



RESULTADOS E DISCUSSÃO



**ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS
FLAVONÓIDES ISOLADOS DAS FOLHAS**

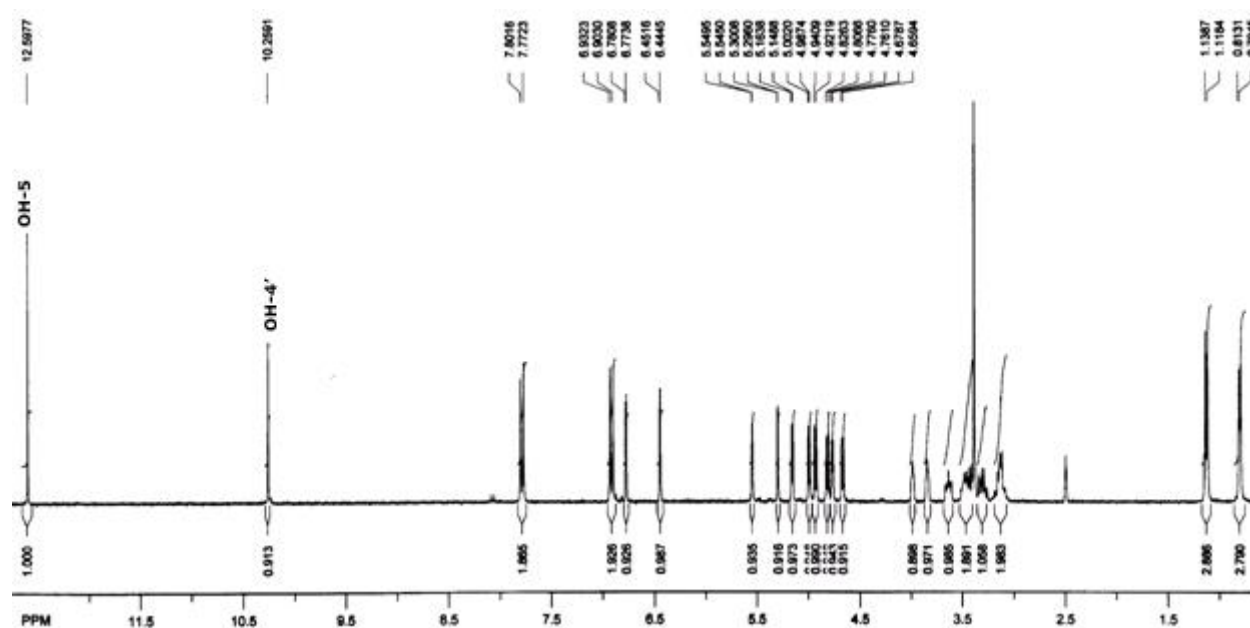
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF1

O flavonóide codificado como **SF1**, isolado a partir das frações metanólica (partida Sd01), butanólica (partidas Sd02 e Sd03) e acetato de etila (partida Sd04) das folhas, apresentou-se sob a forma de pó amorfo amarelo-pálido, com uma massa total isolada de 401,4 mg.

A proposta estrutural para o flavonóide **SF1** foi baseada nos dados de RMN ^1H e ^{13}C , dos experimentos bidimensionais HMQC, HMBC e COSY, todos obtidos em DMSO- d_6 (concentração: 80 mg/mL), e confirmada pela espectrometria de massas.

RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H de **SF1** (**Espectro 1**) apresentou sinais compatíveis para um flavonóide de natureza glicosídica.



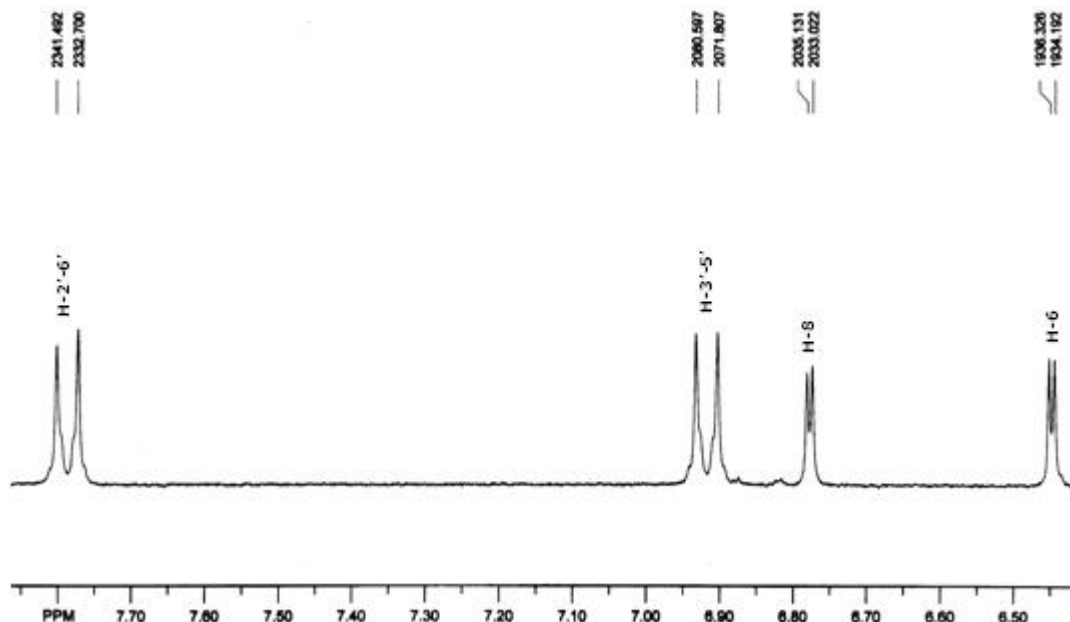
Espectro 1: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de **SF1** (DMSO- d_6)

Os simpletos em 12,60 e 10,26 ppm são correspondentes aos hidrogênios de duas hidroxilas da aglicona. O sinal mais deslocado, ou seja, mais desblindado, corresponde ao hidrogênio da posição 5, que se encontra em ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila em 4. O outro sinal corresponde ao hidrogênio da hidroxila em 4'.

A faixa entre 6,40 e 8,0 ppm do espectro de RMN ^1H (**Espectro 2**), referente à região aromática de **SF1**, apresentou dupletos em 6,92 ppm ($J = 8,81$ Hz) e 7,79 ppm ($J = 8,81$ Hz), com integração para dois hidrogênios cada um. As constantes de acoplamento calculadas (8-9 Hz) indicam uma correlação *orto* entre esses hidrogênios. Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-3',5' e H-2',6' do anel B respectivamente, característicos de um anel aromático substituído na posição 4' (padrão 4'-OH). Isso ocorre devido à simetria apresentada por este anel, fazendo com que os hidrogênios das posições 2' e 3' apresentem equivalência em deslocamento químico com os hidrogênios das posições 6' e 5', respectivamente.

Para o anel A foram observados dupletos em 6,45 ppm (H-6, $J = 2,13$ Hz) e 6,78 ppm (H-8, $J = 2,13$ Hz). A constante de acoplamento observada (aproximadamente 2 Hz) confirma um acoplamento *meta* entre esses hidrogênios, mostrando tratar-se de um flavonóide 5,7-diidroxilado no anel A.

De acordo com o deslocamento observado para H-6 e H-8, a posição 7 da aglicona apresenta substituição uma vez que, quando a hidroxila desta posição está livre, os sinais para os hidrogênios das posições 6 e 8 apresentam-se mais protegidos (6,20 e 6,40 ppm, respectivamente) (PIZZOLATTI *et al.*, 2003).



Espectro 2: Expansão da faixa de 7,80 a 6,40 ppm do espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de **SF1** ($\text{DMSO}-d_6$)

Não foi observado sinal para a posição 3 da aglicona (simpleto entre 6,4 e 6,9 ppm), característico de flavona.

De acordo com esses dados foi possível propor para a aglicona deste flavonóide a estrutura do kaempferol (3,5,7,4'-tetraidroxiflavonol; **Figura 8**).

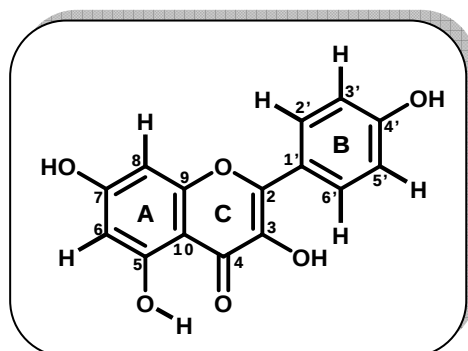


Figura 8: Estrutura do kaempferol

A faixa entre 0,6 e 5,6 ppm do espectro de RMN ^1H , correspondente à parte glicosídica de **SF1 (Espectro 3)**, mostrou dois sinais de hidrogênios anoméricos (5,55 e 5,30 ppm) compatíveis com O-glicosilação diretamente no anel da aglicona. As constantes de acoplamento observadas para ambos os hidrogênios ($J \sim 1,45$ Hz) mostram uma relação *trans*-diequatorial entre os hidrogênios das posições 1 e 2 dos açúcares.

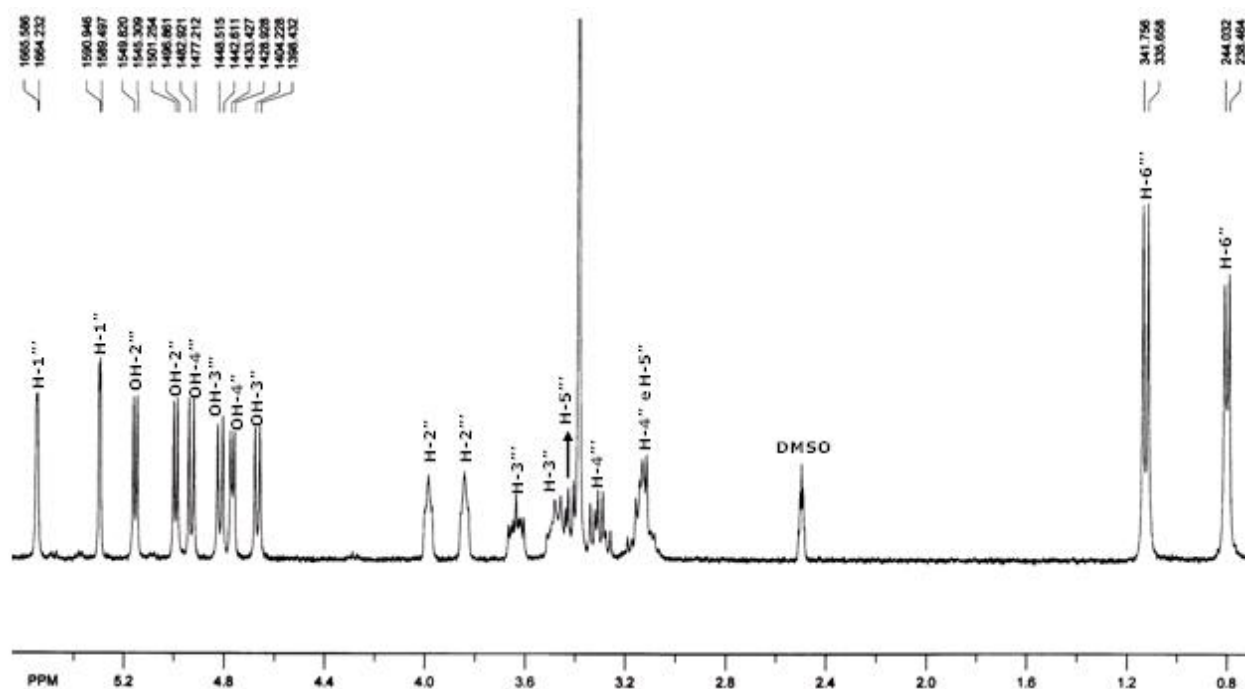
Alguns hidrogênios das unidades glicosídicas aparecem sob a forma de multipletos na região entre 3,99 e 3,10 ppm. A multiplicidade de cada sinal assim como o deslocamento de cada hidrogênio encontram-se na **Tabela 7** (pág. 71).

O espectro de RMN ^1H mostrou ainda dupletos entre 4,67 e 5,16 ppm, os quais correspondem às hidroxilas das duas unidades de carboidrato.

Dois dupletos em 1,13 (3H; $J = 6,11$ Hz) e 0,80 ppm (3H; $J = 5,58$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos de duas ramnose (SILVA *et al.*, 2005). A presença desta unidade sacarídica também pode ser evidenciada pela pequena constante de acoplamento observada para os hidrogênios anoméricos ($\text{H}-1''$: $J = 1,49$ Hz; $\text{H}-1'''$: $J = 1,42$ Hz).

De acordo com esses dados parciais, pode-se propor para **SF1** a estrutura de um flavonol di-O-glicosilado nas posições 3 e 7 por moléculas de ramnose.

Segundo Markham & Geiger (1994), quando a ramnose ocorre na posição 3 no esqueleto de flavonóis, o valor de deslocamento químico dos hidrogênios metílicos e anomérico aparecem entre δ 0,72-0,86 e δ 4,96-5,36, respectivamente, enquanto que a ramnose na posição 7 apresenta tais sinais entre δ 1,04-1,21 e δ 5,22-5,75.



Espectro 3: Expansão da faixa de 0,6 a 5,6 ppm do espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de **SF1** ($\text{DMSO}-d_6$)

Portanto, com base nos dados obtidos a partir do espectro de RMN ^1H de **SF1**, foi possível sugerir para a ramnose substituída na posição 3 do kaempferol os sinais em 5,30 e 0,80 ppm (3-*O*-ramnosídeo), e para a outra unidade, substituída na posição 7 da aglicona, os sinais em 5,55 e 1,13 ppm (7-*O*-ramnosídeo).

RMN ^{13}C

O espectro de RMN ^{13}C forneceu 24 sinais (**Espectro 4**). Treze destes sinais foram atribuídos aos carbonos da aglicona do flavonóide e os onze sinais restantes aos carbonos das duas unidades de açúcar.

Os sinais observados entre 178,4-106,3 ppm e os sinais em 100,0 e 95,1 ppm correspondem aos deslocamentos químicos para os carbonos da aglicona.

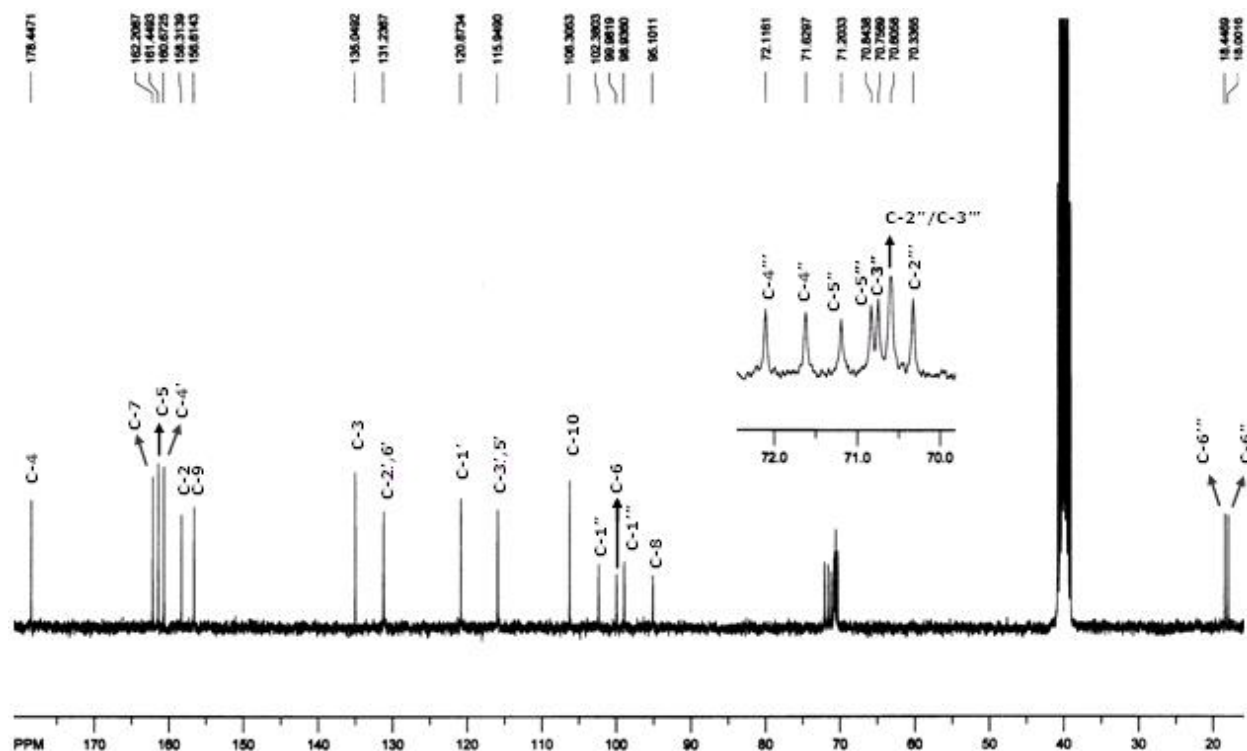
Para o anel C observa-se o sinal mais desprotegido do espectro, em 178,4 ppm, confirmando a presença de uma carbonila cetônica em C-4 α - β insaturada, oxigenada na posição 3 (MARKHAM *et al.*, 1978).

Em 158,3 ppm encontra-se o sinal atribuído ao C-2. Com base no deslocamento observado (mais desprotegido), a posição 3 da aglicona está O-glicosilada uma vez que,

quando esta posição não está substituída, o deslocamento para C-2 fica próximo de 148 ppm (MARKHAM *et al.*, 1978; AGRAWAL, 1989).

Para o anel B, devido a sua simetria, apenas quatro sinais são observados. Isto ocorre pois os carbonos das posições 3' e 5' (115,9 ppm) e os carbonos das posições 2' e 6' (131,2 ppm) apresentam equivalência em deslocamento químico.

Esses dados confirmam para **SF1** a aglicona do kaempferol.



Espectro 4: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de **SF1** ($\text{DMSO-}d_6$)

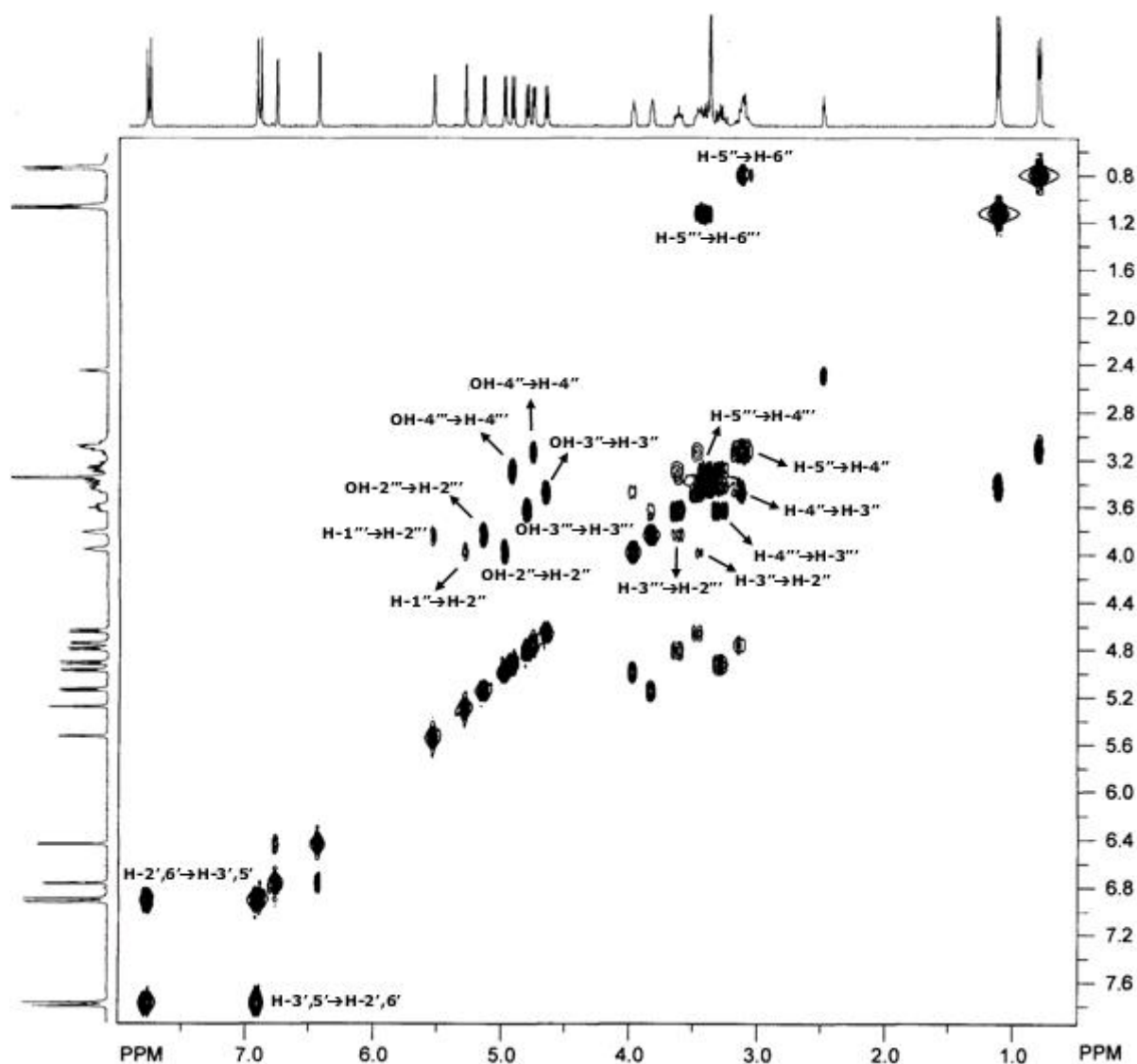
Com base nos sinais em 102,4 ppm e 98,9 ppm, atribuídas aos carbonos anoméricos, confirma-se a presença de O-glicosilação na aglicona. Entre 72,1-70,3 ppm são observados 7 sinais de carbonos ligados a oxigênio, correspondentes às unidades sacarídicas, sendo que o sinal em 70,6 ppm apresenta-se como um simpleto largo, evidenciando que há sinais sobrepostos.

Os sinais em 18,4 e 18,0 ppm, referentes aos carbonos metílicos, confirmam a proposta da presença de duas ramnoses.

A partir dos dados obtidos de RMN ^{13}C é possível propor para o flavonóide **SF1** a estrutura do kaempferol 3,7 di-O-ramnosídeo.

COSY

A partir da análise do espectro de RMN 2D COSY (correlação homonuclear ^1H - ^1H) (**Espectro 5**) foi possível estabelecer os deslocamentos químicos de todos os hidrogênios das duas moléculas de ramnose através do acoplamento seqüenciado dos hidrogênios destes açúcares, inclusive das hidroxilas. Além disso, observou-se o acoplamento entre H-2',6' com H-3',5', confirmando o padrão 4'-OH para o anel B evidenciado nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

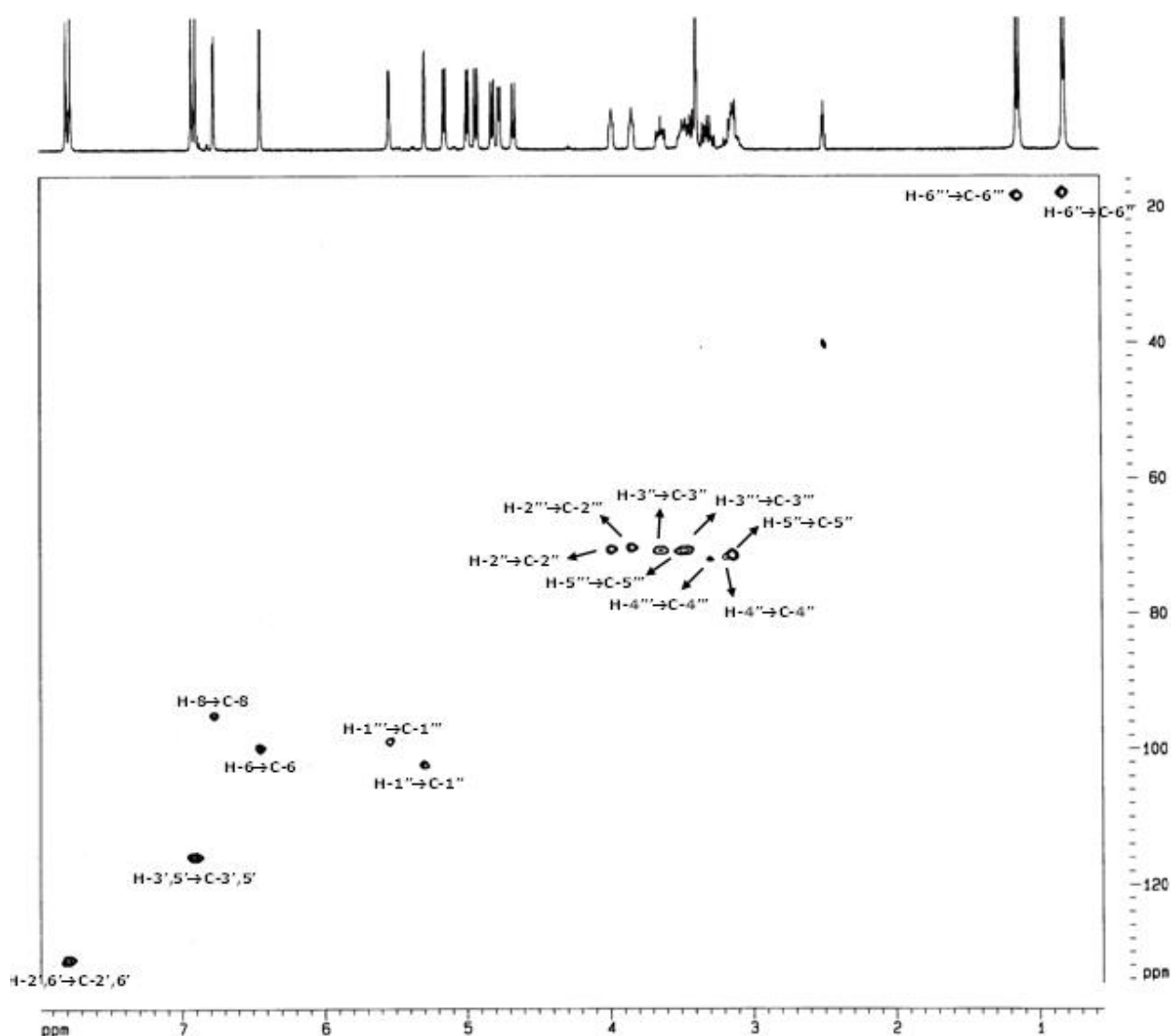


Espectro 5: Espectro de RMN 2D COSY (300,13 MHz) de **SF1** ($\text{DMSO-}d_6$)

HMQC

O espectro de RMN 2D HMQC (**Espectro 6**), a partir da correlação direta heteronuclear ^1H - ^{13}C , permitiu correlacionar os hidrogênios das duas unidades de ramnose e da aglicona aos seus respectivos carbonos.

Portanto, a partir dos dados obtidos no espectro 2D de HMQC e COSY, foi possível estabelecer os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos para cada unidade de ramnose, sem ambigüidade.



Espectro 6: Espectro de RMN 2D HMQC (300,13 x 75,47 MHz) de **SF1** ($\text{DMSO}-d_6$)

HMBC

O espectro de RMN 2D HMBC mostrou as correlações a longa distância entre H-1'' (5,30 ppm) e C-2''' (70,6 ppm), e entre H-1''' (5,55 ppm) e C-2'' (70,3 ppm). Porém não foi possível observar a correlação desses hidrogênios com os carbonos 3 e 7 do kaempferol.

Apesar dos dados do espectro de RMN 2D HMBC não permitirem a confirmação da localização das duas unidades de ramnose nas posições 3 e 7 do kaempferol, os dados obtidos no espectro de RMN ^1H já evidenciavam as suas posições (δ 5,30 em C-3 e δ 5,55 em C-7). Além disso, dados de RMN ^{13}C da literatura para flavonóides com esqueleto de kaempferol substituído nas posições 3 e 7 por unidades de ramnose (AGRAWAL, 1989; ARAGÃO *et al.*, 1990; MORENO *et al.*, 2002; PIZZOLATTI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005) confirmam essa proposta.

Pelos dados acima apresentados, confirma-se para **SF1** a estrutura do kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo, também conhecido com kaempferitrina (**Figura 9**). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a molécula estão listados na **Tabela 7**.

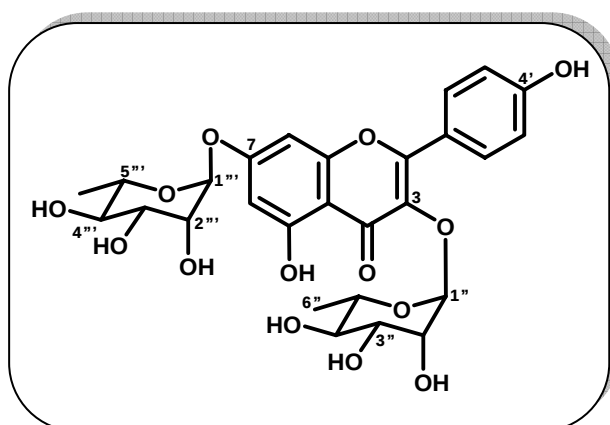


Figura 9: Estrutura de **SF1**

O flavonóide kaempferitrina é um dos flavonóis mais comuns tendo sido isolado também de outras espécies do gênero *Sedum* como *S. pallescens* (NIEMANN *et al.*, 1976), *S. telephium* ssp. *maximum* (MULINACCI *et al.*, 1995) e *S. hybridum* (KORUL'KIN, 2001).

Este flavonol possui uma grande variedade de atividades biológicas. Toker *et al.* (2004) observaram que a kaempferitrina apresentou atividades antinociceptiva e antiinflamatória sem provocar toxidez aguda aparente ou danos gástricos em camundongos. Além disso, este flavonóide apresenta atividade antioxidante (DE SOUZA *et al.*, 2004) e é a substância responsável pelo efeito hipoglicemiante de *Bauhinia forficata*, uma planta utilizada no Brasil como antidiabética (DE SOUZA *et al.*, 2004; JORGE *et al.*, 2004).

Tabela 7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **SF1** (DMSO- d_6).

Aglicona	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); m; J (Hz)
2	158,3	-
3	135,0	-
4	178,4	-
5	161,4	-
6	100,0	6,45; d; 2,13
7	162,2	-
8	95,1	6,78; d; 2,13
9	156,6	-
10	106,3	-
1'	120,9	-
2',6'	131,2	7,79; d; 8,81
3',5'	115,9	6,92; d; 8,81
4'	160,7	-
5-OH	-	12,60; s
4'-OH	-	10,26; s
Açúcar 1	3-O-α-L-ramnopiranosídeo	
1''	102,4	5,30; d; 1,49
2''	70,6	3,98; m
3''	70,8	3,50; m
4''	71,6	3,14; m
5''	71,2	3,14; m
6''	18,0	0,80; d; 5,58
OH-2''	-	4,99; d; 4,39
OH-3''	-	4,66; d; 5,80
OH-4''	-	4,77; d; 4,50
Açúcar 2	7-O-α-L-ramnopiranosídeo	
1'''	98,9	5,55; d; 1,42
2'''	70,3	3,85; m
3'''	70,6	3,64; m
4'''	72,1	3,32; m
5'''	70,8	3,45; m
6'''	18,4	1,13; d; 6,11
OH-2'''	-	5,15; d; 4,51
OH-3'''	-	4,81; d; 5,90
OH-4'''	-	4,93; d; 5,70

d: dupleteo; m: multipleteo; s: simpleto

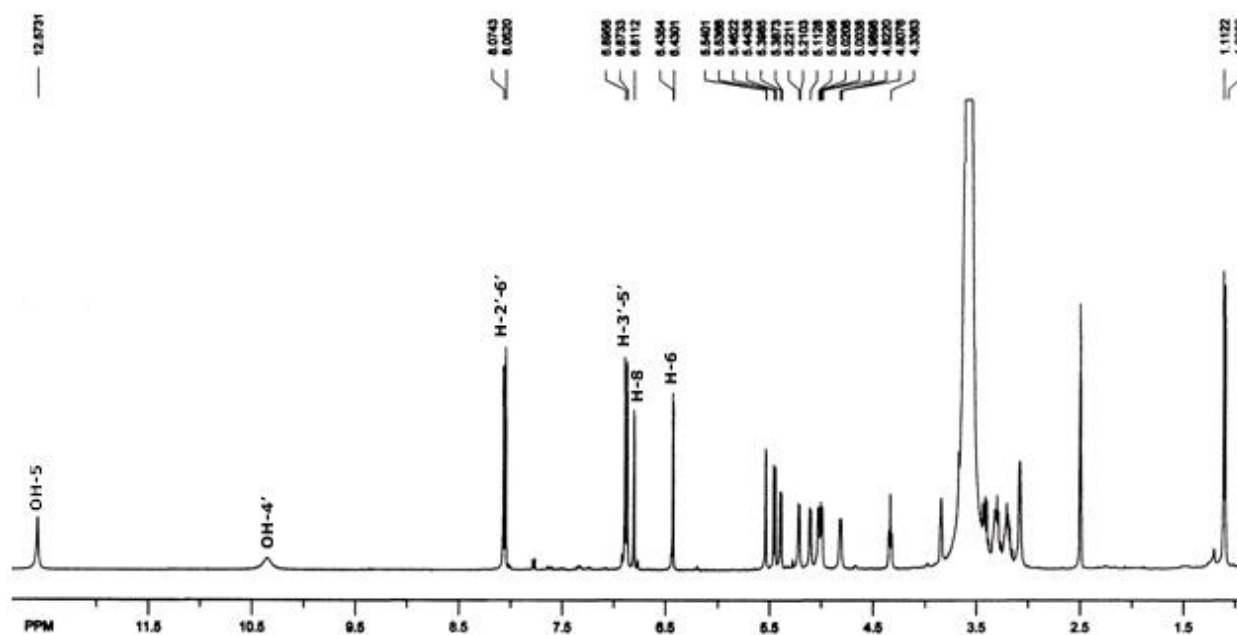
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF2

O flavonóide codificado como **SF2**, isolado a partir das frações metanólica (partida Sd01) e butanólica das folhas (partidas Sd02 e Sd03), apresentou-se sob a forma de grânulos amarelos, com uma massa total isolada de 113,6 mg.

A proposta estrutural para o flavonóide **SF2** foi baseada nos dados de RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, em experimentos 2D de HMQC, HMBC e COSY, todos obtidos em DMSO- d_6 (concentração: 40 mg/mL), e confirmada pela espectrometria de massas.

RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H de **SF2** apresentou o mesmo padrão de aglicona apresentado pelo **SF1**, com sinais em 6,88 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,91$ Hz) e 8,06 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,91$ Hz), correspondentes aos hidrogênios H-3',5' e H-2',6' do anel B, e 6,43 ppm (H-6, d, $J_{\text{meta}} = 2,13$ Hz) e 6,81 ppm (H-8, d, $J_{\text{meta}} = 2,13$ Hz) para os hidrogênios do anel A (**Espectro 7**).



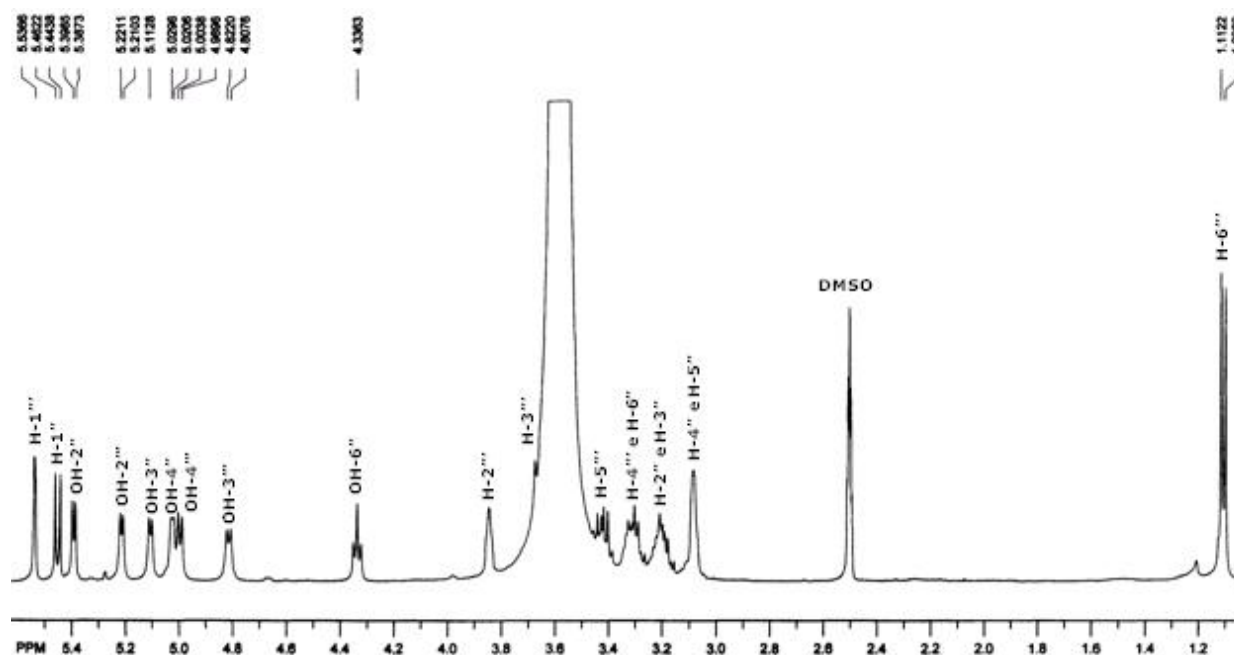
Espectro 7: Espectro de RMN ^1H (400,13 MHz) de **SF2** (DMSO- d_6).

Para os anéis aromáticos observam-se ainda sinais em 12,60 e 10,35 ppm, correspondentes aos hidrogênios de duas hidroxilas da aglicona. O sinal mais desblindado corresponde ao hidrogênio da posição 5 e o outro sinal corresponde ao hidrogênio da hidroxila em 4'. Esses sinais, portanto, são compatíveis com o esqueleto do kaempferol.

De acordo com o deslocamento observado para H-6 (6,43 ppm) e H-8 (6,81 ppm), **SF2** também apresenta substituição na posição 7, assim como observado para **SF1**.

Na faixa entre 1,0 e 5,6 ppm do espectro de RMN ^1H (**Espectro 8**), correspondente à região glicosídica de **SF2**, foram observados dois sinais de hidrogênios anoméricos (H-1'': 5,45 ppm e H-1''': 5,54 ppm) compatíveis com O-glicosilação diretamente no anel da aglicona. A constante de acoplamento observada para o H-1'' (d; $J = 7,35$ Hz) mostra uma relação *trans*-diaxial entre H-1'' e H-2'', enquanto que o valor observado para a constante de acoplamento entre H-1''' e H-2''' (d; $J = 1,42$ Hz) mostra uma relação *trans*-diequatorial.

Os sinais para os outros hidrogênios das unidades sacarídicas aparecem sob a forma de multipletos entre 4,35 ppm e 3,80 ppm, além de um duplete em 1,10 ppm (3H; d; $J = 6,12$ Hz), referente aos hidrogênios de uma metila terminal de açúcar. Observam-se ainda dupletos para as hidroxilas das duas unidades de carboidrato, entre 5,39 e 4,34 ppm.



Espectro 8: Expansão da faixa de 1,0 a 5,6 ppm do espectro de RMN ^1H (400,13 MHz) de **SF2** ($\text{DMSO}-d_6$).

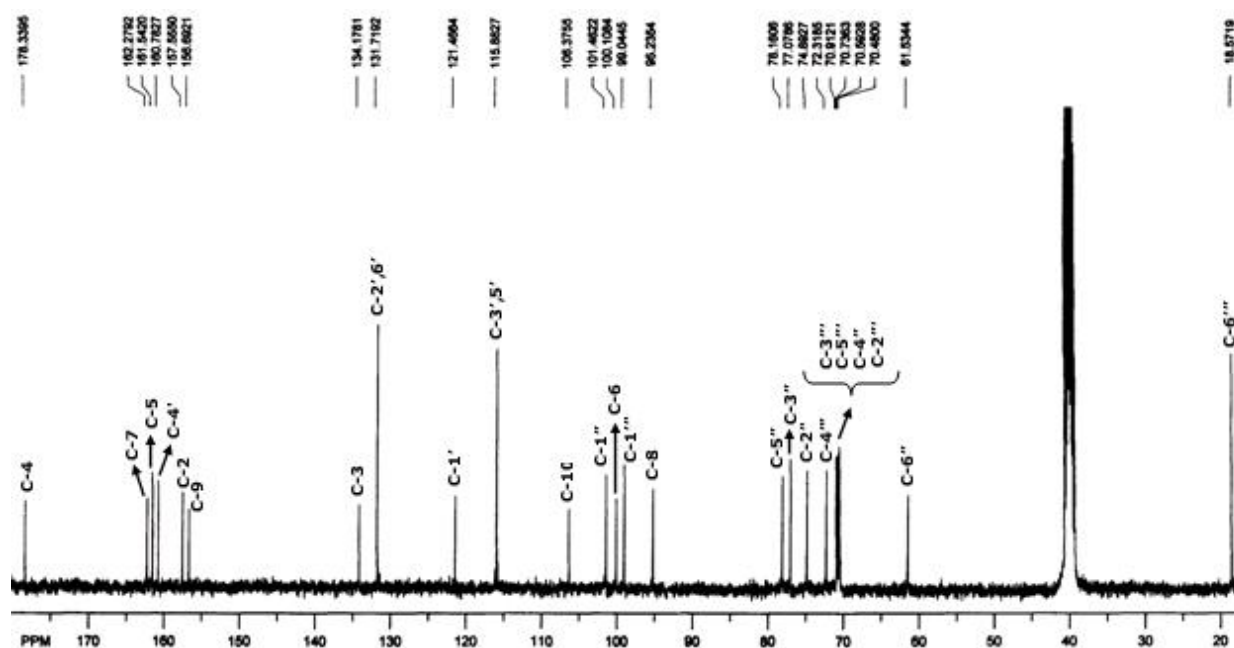
O duplete em δ 1,10 e a relação *trans*-diequatorial entre H-1''' e H-2''' indicam a presença de ramnose em **SF2**. Com base no deslocamento observado para H-1''', esta unidade de ramnose está substituída na posição 7 do kaempferol (MARKHAM & GEIGER, 1994).

De acordo com Markham & Geiger (1994) e Silva *et al.* (2005), deslocamentos químicos observados entre 5,35 e 5,56 ppm com $J = 7-8$ Hz são típicos de hidrogênios anoméricos de moléculas de β -D-glicose substituídas na posição 3.

De acordo com esses dados parciais, pode-se propor para **SF2** a estrutura do kaempferol 3,7-di-O-glicosilado, onde uma de suas glicosilações corresponde a uma ramnose (C-7) e a outra a uma glicose (C-3).

RMN ^{13}C e DEPT 135

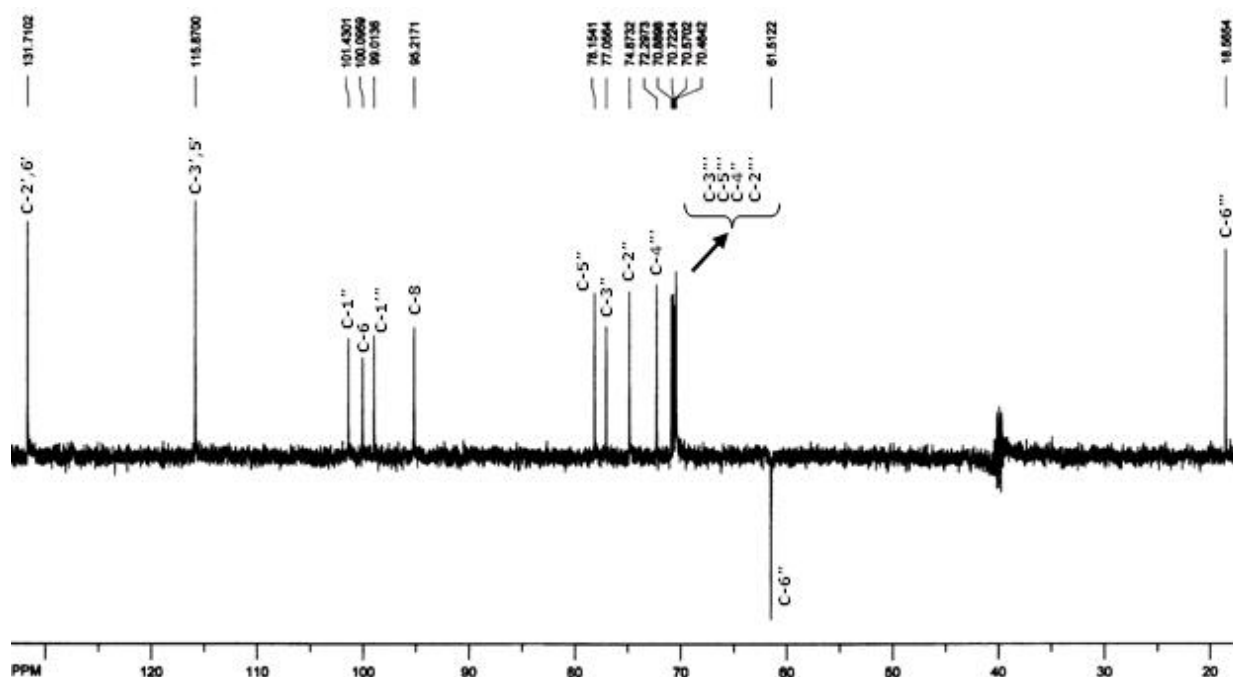
O espectro de RMN ^{13}C forneceu 25 sinais (**Espectro 9**). Treze destes sinais correspondem à aglicona do flavonóide e os sinais restantes são referentes a duas unidades de carboidrato (hexoses). O espectro de DEPT 135 confirma esses dados (**Espectro 10**).



Espectro 9: Espectro de RMN ^{13}C (100,63 MHz) de **SF2** ($\text{DMSO}-d_6$).

O padrão de sinais observado no espectro de RMN ^{13}C confirma a estrutura do kaempferol di-O-glicosilado nas posições 3 e 7, como proposto inicialmente a partir do espectro de RMN ^1H .

A O-glicosilação, observada inicialmente pela desblindagem dos hidrogênios anoméricos, também é evidenciada pelos sinais dos carbonos anoméricos em 101,5 e 99,0 ppm no espectro de RMN ^{13}C .



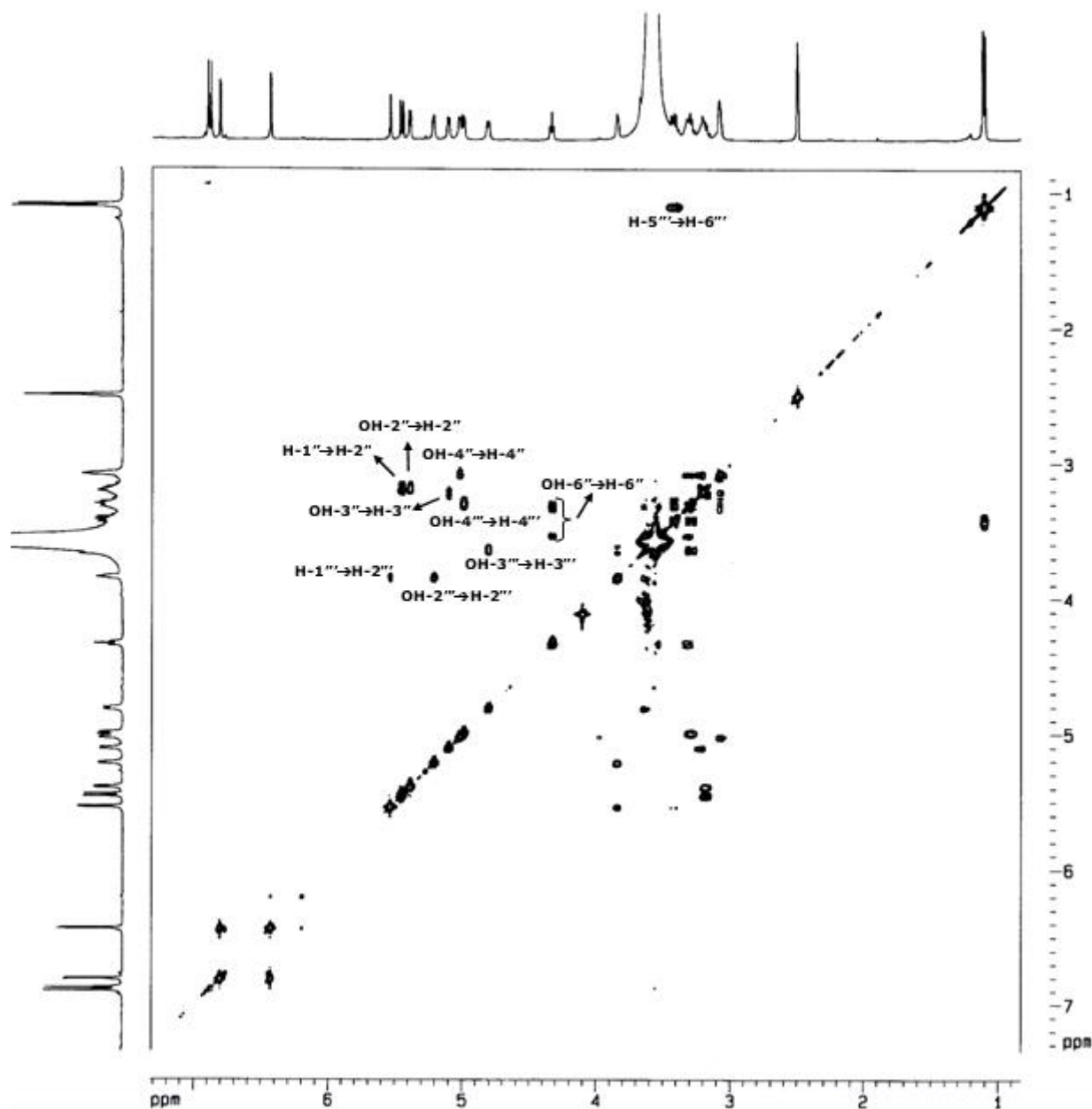
Espectro 10: Espectro de DEPT 135 (100,63 MHz) de **SF2** (DMSO- d_6).

Os dados de RMN ^{13}C e DEPT 135 (**Espectro 10**) de **SF2** diferem essencialmente dos dados obtidos para **SF1** com relação aos sinais das unidades de carboidrato. Para **SF2** observam-se a ausência de um sinal próximo a 18 ppm, que em **SF1** correspondia à metila de uma das ramnoses, e a presença de um sinal em 61,5 ppm (DEPT 135: inversão de sinal corresponde a um metileno, CH_2). Além disso, os sinais para alguns dos carbonos das unidades sacarídicas apresentam-se um pouco mais desblindados (78,2 ppm a 74,9 ppm). Esses sinais são compatíveis com os deslocamentos observados para os carbonos da glicose (MARKHAM *et al.*, 1978; AGRAWAL, 1989).

O sinal em 18,6 ppm, referente a um carbono metílico, confirma a presença de uma ramnose como uma das unidades de açúcar.

COSY

A partir da análise do espectro de RMN 2D COSY (**Espectro 11**) foi possível estabelecer os deslocamentos químicos de todos os hidrogênios das duas moléculas glicosídicas através do acoplamento seqüenciado dos hidrogênios destes açúcares, inclusive das hidroxilas (ver assinalamento no espectro abaixo).

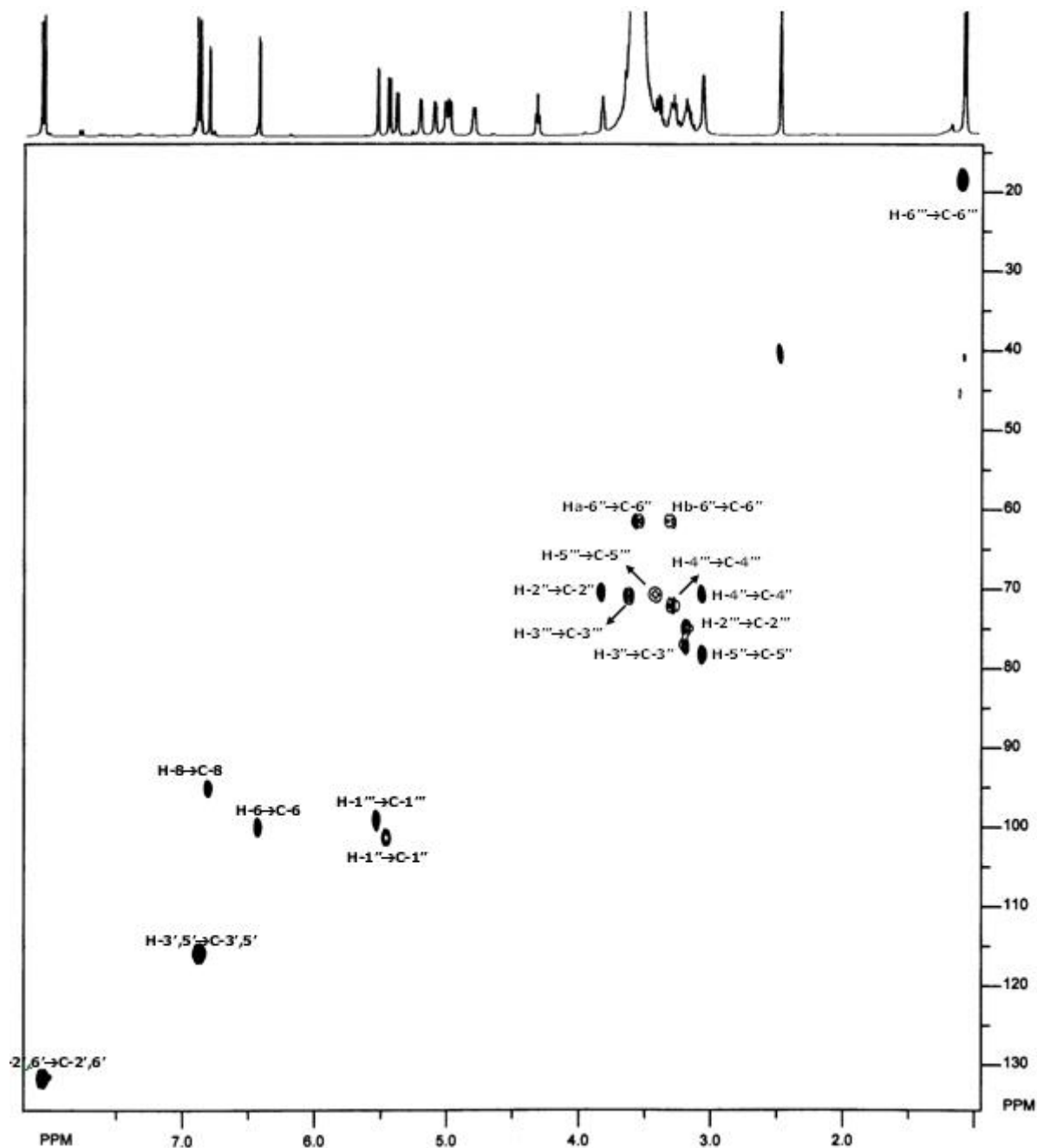


Espectro 11: Espectro de RMN 2D COSY (400,13 MHz) de **SF2** (DMSO- d_6).

HMQC

A partir dos dados obtidos no espectro de RMN 2D HMQC (**Espectro 12**) foi possível correlacionar os hidrogênios identificados anteriormente no espectro de RMN 2D COSY com seus respectivos carbonos, tanto para as moléculas de açúcar quanto para a aglicona.

Os dados obtidos no espectro de HMQC permitiram confirmar como L-ramnopirranose e D-glicopirranose as moléculas de açúcar ligadas ao kaempferol.

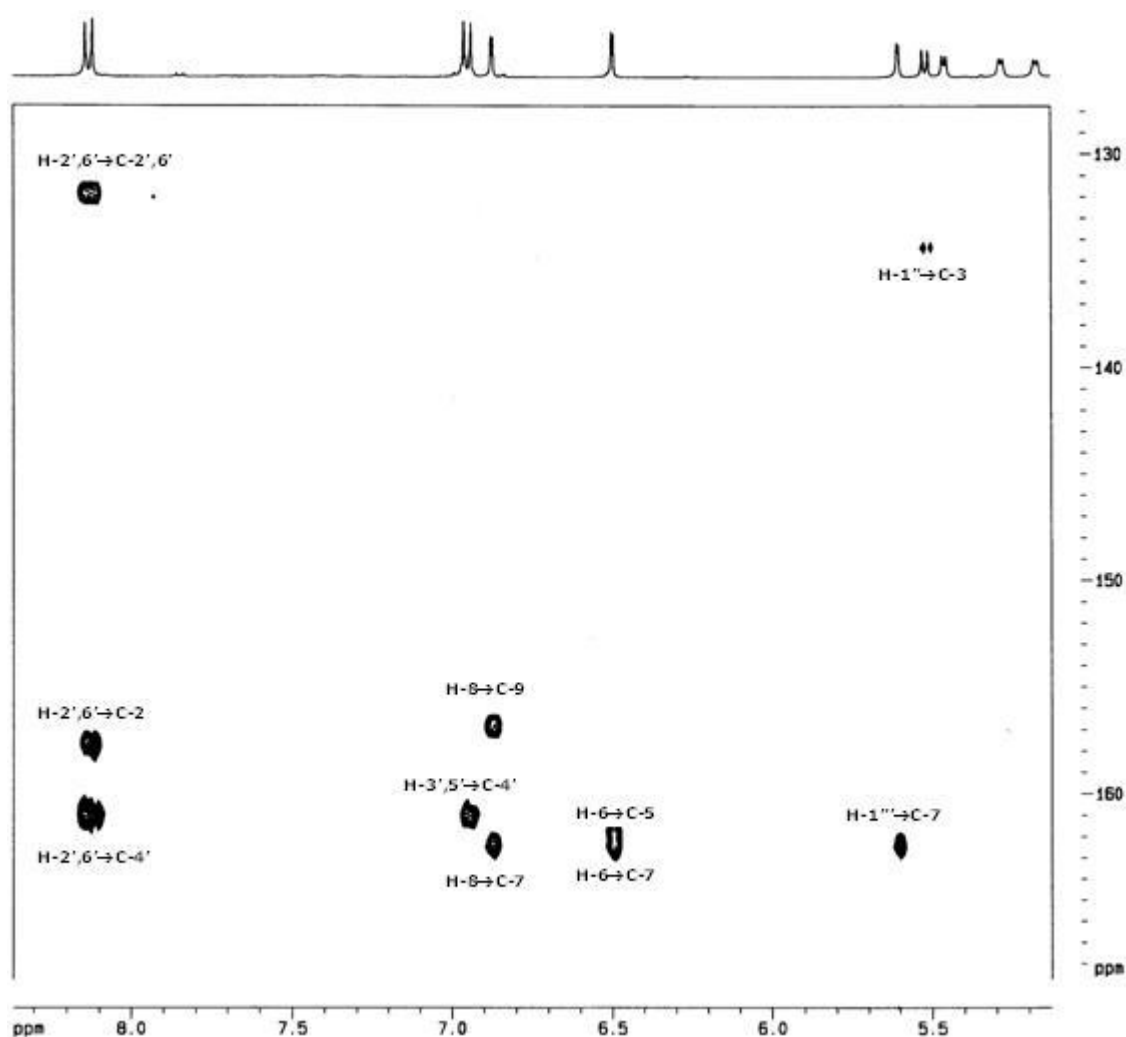


Espectro 12: Espectro de RMN 2D HMQC (400,13 x 100,63 MHz) de **SF2** (DMSO- d_6).

HMBC

A análise das correlações a longa distância ^1H - ^{13}C obtidas no espectro de RMN 2D HMBC (**Espectro 13**) permitiu confirmar a exata posição da glicose e da ramnose no kaempferol.

O espectro de HMBC mostrou a correlação entre o hidrogênio anomérico em δ 5,45 (H-1'') com o carbono 3 (δ 134,2), bem como entre o hidrogênio em δ 5,54 (H-1''') com o carbono 7, estabelecendo assim a posição da glicose e da ramnose nos carbonos 3 e 7, respectivamente, do kaempferol.



Espectro 13: Expansão da faixa de 5,0 a 8,4 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMBC (400,13 x 100,63 MHz) de **SF2** ($\text{DMSO}-d_6$).

Após comparação com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989; MULINACCI *et al.*, 1995) confirma-se para **SF2** a estrutura do kaempferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**Figura 10**). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a molécula estão listados na **Tabela 8**.

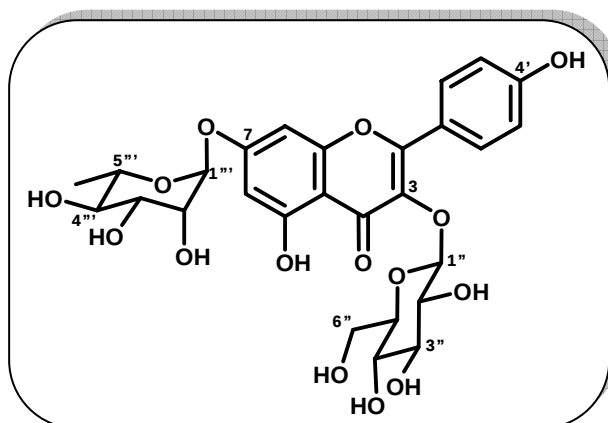


Figura 10: Estrutura de **SF2**

No gênero *Sedum*, este flavonóide é encontrado em uma única espécie, a *S. telephium* ssp. *maximum* (MULINACCI *et al.*, 1995), espécie de onde também foi isolada a kaempferitrina (**SF1**).

Dentre as atividades relatadas para este flavonóide encontram-se uma fraca atividade captadora de radicais livres e a atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e MRSA - Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* - (DEACHATHAI *et al.*, 2005).

Tabela 8: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **SF2** (DMSO- d_6).

Aglicona	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); m; J (Hz)
2	157,6	-
3	134,2	-
4	178,3	-
5	161,5	-
6	100,1	6,43; d; 2,13
7	162,3	-
8	95,2	6,81; d; 2,13
9	156,7	-
10	106,4	-
1'	121,5	-
2',6'	131,7	8,06; d; 8,91
3',5'	115,9	6,88; d; 8,91
4'	160,8	-
OH-5	-	12,57; s
OH-4'	-	10,35; sl
Açúcar 1	3-O-β-D-glicopiranosídeo	
1''	101,5	5,45; d; 7,35
2''	74,9	3,17; m
3''	77,1	3,19; m
4''	70,6	3,07; m
5''	78,2	3,07; m
6''	61,5	3,30 e 3,54; m
OH-2''	-	5,39; d; 4,48
OH-3''	-	5,11; d; 4,36
OH-4''	-	5,02; d; 5,68
OH-6''	-	4,33; t; 5,54
Açúcar 2	7-O-α-L-ramnopiranosídeo	
1'''	99,0	5,54; d; 1,42
2'''	70,5	3,85; m
3'''	70,9	3,67; m
4'''	72,3	3,28; m
5'''	70,7	3,42; dd; 6,15 e 9,33
6'''	18,6	1,10; d; 6,15
OH-2'''	-	5,22; d; 4,32
OH-3'''	-	4,81; d; 5,76
OH-4'''	-	4,99; d; 5,68

d: duplete; dd: duplo duplete; m: multiplete; s: simpleto; sl: simpleto largo; t: tripleto

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF3

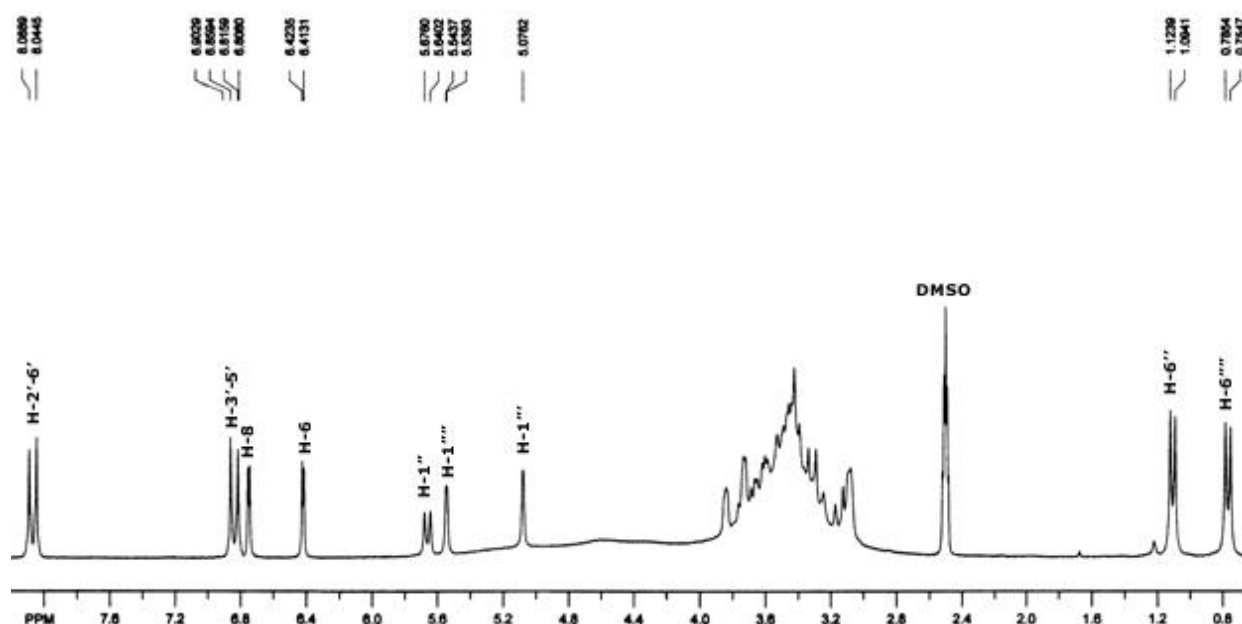
O flavonóide codificado como **SF3**, isolado a partir das frações metanólica (partida Sd01) e butanólica das folhas (partidas Sd02 e Sd03), apresentou-se sob a forma de pó amarelo, com uma massa total isolada de 57,5 mg.

A proposta estrutural para **SF3** foi baseada nos dados de RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, dos experimentos bidimensionais COSY, HMQC e HMBC, todos obtidos em DMSO- d_6 (concentração: 26 mg/mL), e confirmada pela espectrometria de massas.

RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H de **SF3** (**Espectro 14**) apresentou o mesmo padrão de aglicona e de substituição apresentados por **SF1** e **SF2**, com sinais em 6,89 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,92$ Hz) e 8,08 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,92$ Hz), correspondentes aos hidrogênios H-3',5' e H-2',6' do anel B, e 6,43 ppm (H-6, d, $J_{\text{meta}} = 2,11$ Hz) e 6,82 ppm (H-8, d, $J_{\text{meta}} = 2,11$ Hz) para os hidrogênios do anel A.

Em 12,61 e 10,20 ppm são observados simpletos correspondentes aos hidrogênios das hidroxilas das posições 5 e 4', respectivamente.



Espectro 14: Espectro de RMN ^1H (200,13 MHz) de **SF3** (DMSO- d_6).

Na faixa entre 0,6 e 5,7 ppm do espectro de RMN ^1H , correspondente à região glicosídica de **SF3**, foram observados três sinais de hidrogênios anoméricos (H-1'' : 5,67 ppm; H-1''' : 5,55 ppm e H-1'''' : 5,08 ppm), sendo que destes, dois sinais são compatíveis com O-glicosilação diretamente no anel da aglicona (5,67 e 5,55 ppm). O outro sinal, mais blindado (5,08 ppm), corresponde a uma molécula de açúcar que não está ligada diretamente na aglicona (5,08 ppm), ou seja, é um açúcar externo, ligado em uma outra molécula de açúcar.

A constante de acoplamento observada para H-1'' (d; $J = 7,15$ Hz) mostra uma relação *trans*-diaxial entre H-1'' e H-2'' , enquanto que o valor observado para a constante de acoplamento entre H-1''' (d; $J = 0,89$ Hz) e H-2''' mostra uma relação *trans*-diequatorial, a mesma observada para H-1'''' e H-2'''' . Neste último caso, devido à pequena constante de acoplamento apresentada por H-1'''' (δ 5,08), este mostra-se como um simpleto largo ao invés de um duplete.

Dois dupletos, referentes aos hidrogênios metílicos de duas ramnoses, são observados em 1,12 ppm (3H; $J = 5,97$ Hz) e 0,78 ppm (3H; $J = 6,14$ Hz). A presença de duas moléculas deste açúcar também pode ser evidenciada pelos sinais em δ 5,55 e δ 5,08, pois estes apresentam uma pequena constante de acoplamento.

Os sinais correspondentes aos outros hidrogênios das unidades sacarídicas aparecem em uma mesma região, sobrepostos, entre 3,84 ppm e 3,08 ppm.

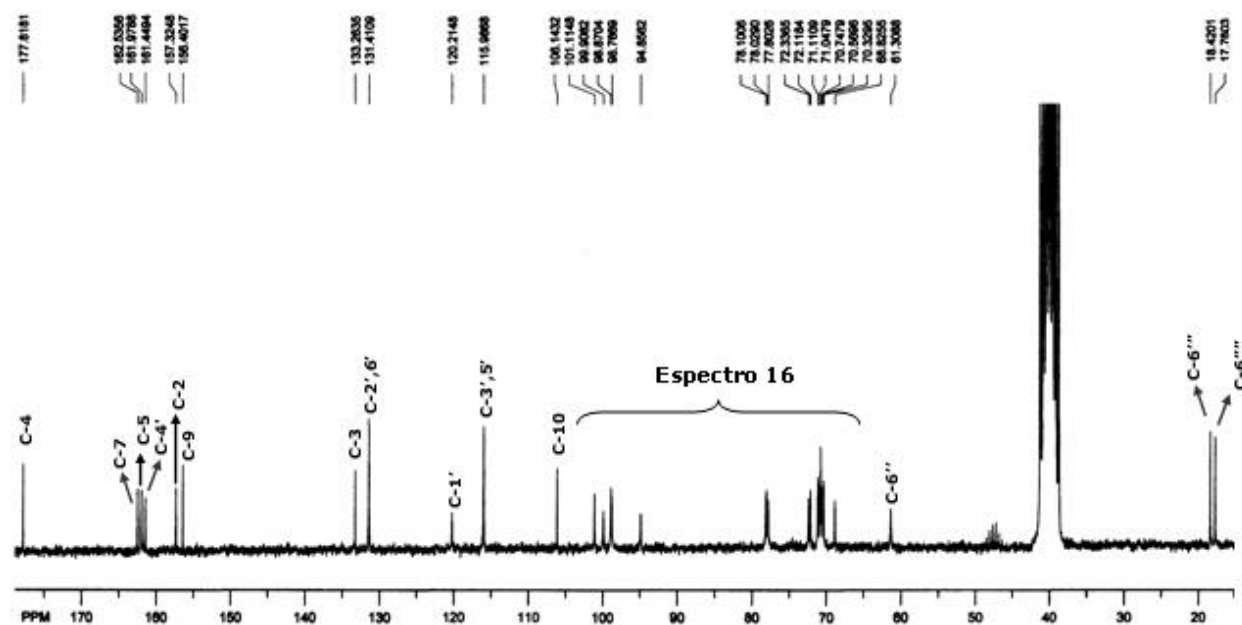
De acordo com o deslocamento químico observado para H-1''' , atribuído a uma das unidades de ramnose, este açúcar encontra-se substituído na posição 7 do kaempferol, seguindo o mesmo padrão de substituição observado para os flavonóides **SF1** e **SF2** (ramnose em C-7).

Segundo Markham & Geiger (1994), quando a glicose ocorre na posição 3 no esqueleto de flavonóis e está substituída na posição 2 por uma ramnose (açúcar terminal), o valor de deslocamento químico do hidrogênio anomérico para a glicose aparece entre δ 5,40-5,66 e para a ramnose entre δ 4,90-5,10, diferente do observado quando a ligação ocorre na posição 6 (glicose: δ 5,28; ramnose: δ 4,37-4,39).

A partir desses dados propõe-se para **SF3** a estrutura de um triglicosídeo de kaempferol, cujas moléculas glicosídicas seriam um dissacarídeo formado por ramnose e glicose (substituição na posição 3 da aglicona) e uma unidade de ramnose (substituída na posição 7 do kaempferol).

RMN ^{13}C e DEPT 135

No espectro de RMN ^{13}C de **SF3** foram listados 30 sinais referentes a um flavonol glicosilado (**Espectro 15**). Treze destes sinais correspondem aos carbonos da aglicona do flavonóide e os sinais restantes são referentes aos carbonos das três unidades glicosídicas (hexoses).

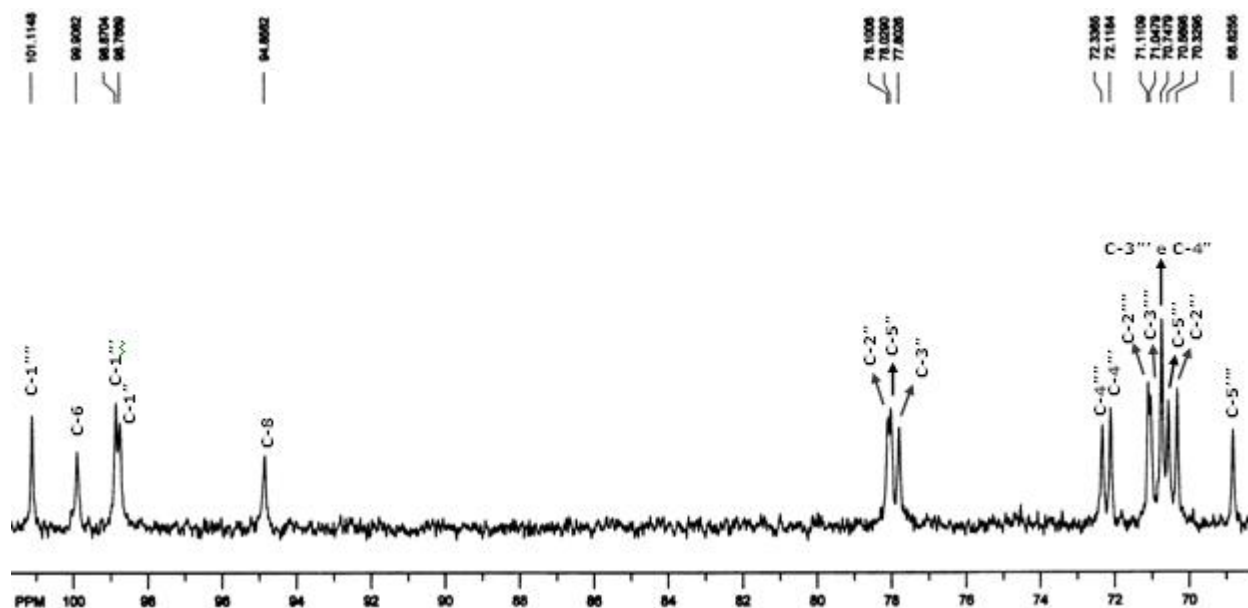


Espectro 15: Espectro de RMN ^{13}C (100,63 MHz) de **SF3** (DMSO- d_6)

Os deslocamentos atribuídos aos carbonos anoméricos (101,3; 98,9 e 98,8 ppm) confirmam a presença de O-glicosilação, o que já havia sido evidenciado no espectro de RMN ^1H .

Comparando os dados de RMN ^{13}C das unidades glicídicas de **SF3** com os valores observados para **SF2** e **SF1**, observa-se que os sinais para duas das unidades de carboidrato são compatíveis com os sinais da ramnose. Os sinais restantes, correspondentes ao terceiro carboidrato, diferem dos valores observados para a glicose de **SF2** pela ausência de um sinal em 74,7 (C-2) e presença de um outro sinal próximo a 78 ppm (em **SF2** observa-se somente um, atribuído ao C-5).

A presença de sinais mais desblindados no espectro de RMN ^{13}C para um carboidrato mostra a presença de ponte interglicosídica nesta molécula. Portanto, o sinal em 78,1 ppm, atribuído ao C-2 da glicose, indica que esta unidade monossacarídica está substituída na posição 2 por uma outra molécula de açúcar (ramnose), ou seja, a glicose é um dos açúcares ligados diretamente a aglicona (açúcar interno), sendo o outro uma das ramnosas.

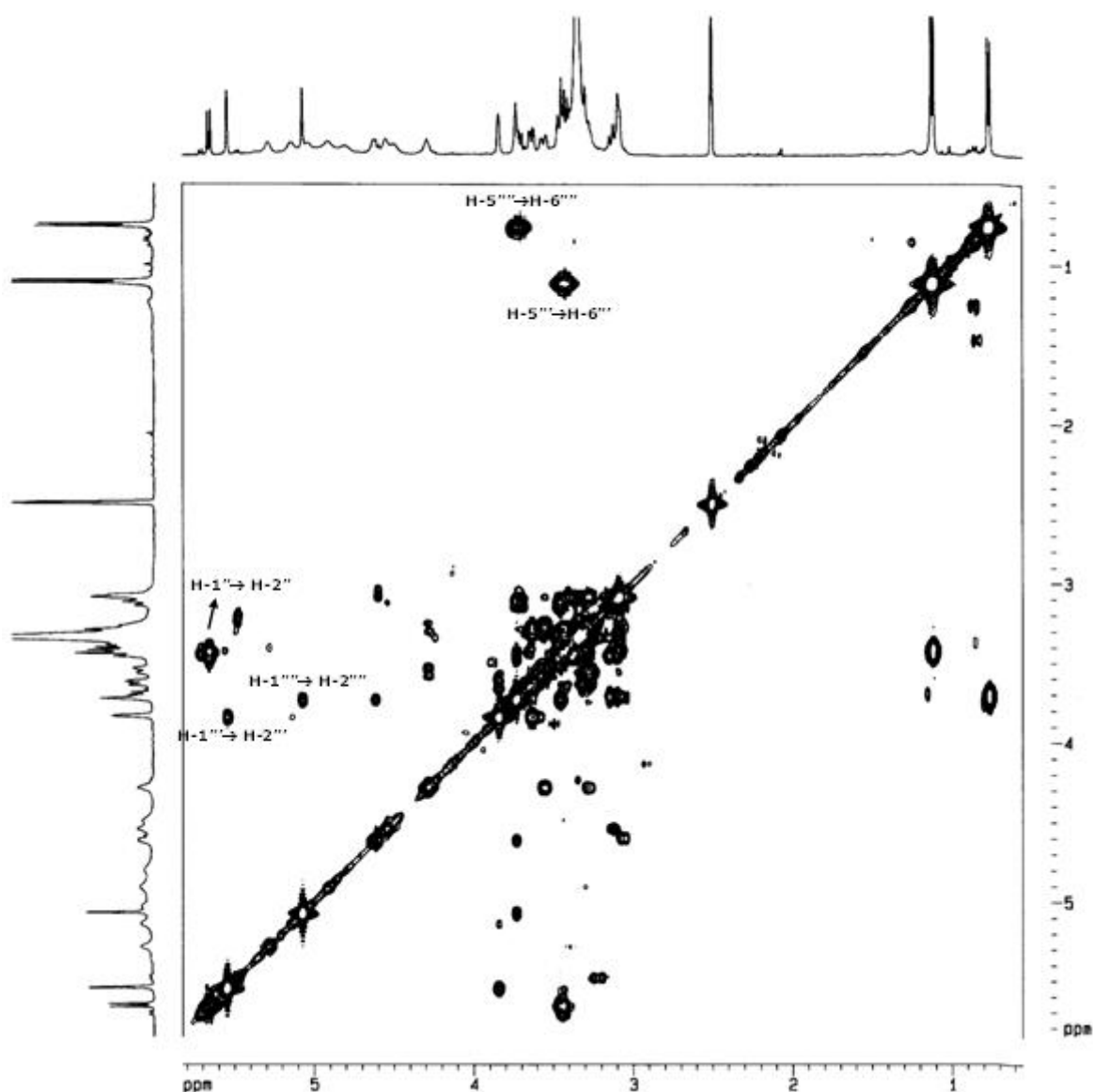


Espectro 16: Expansão da região entre 68 e 102 ppm do espectro de RMN ^{13}C (100,63 MHz) de **SF3** ($\text{DMSO}-d_6$)

Os dados obtidos nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 (espectro não mostrado) para **SF3** confirmam a estrutura da aglicona do kaempferol di-O-substituído por unidades glicídicas nas posições 3 e 7, o que já havia sido evidenciado anteriormente no espectro de RMN ^1H .

COSY

A análise do espectro de RMN 2D COSY (**Espectro 17**) permitiu estabelecer os deslocamentos químicos para todos os hidrogênios das três moléculas glicosídicas através do acoplamento seqüenciado dos hidrogênios destes açúcares. Além disso, observou-se o acoplamento entre H-2',6' com H-3',5' (não mostrado), confirmando o padrão 4'-OH para o anel B evidenciado nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

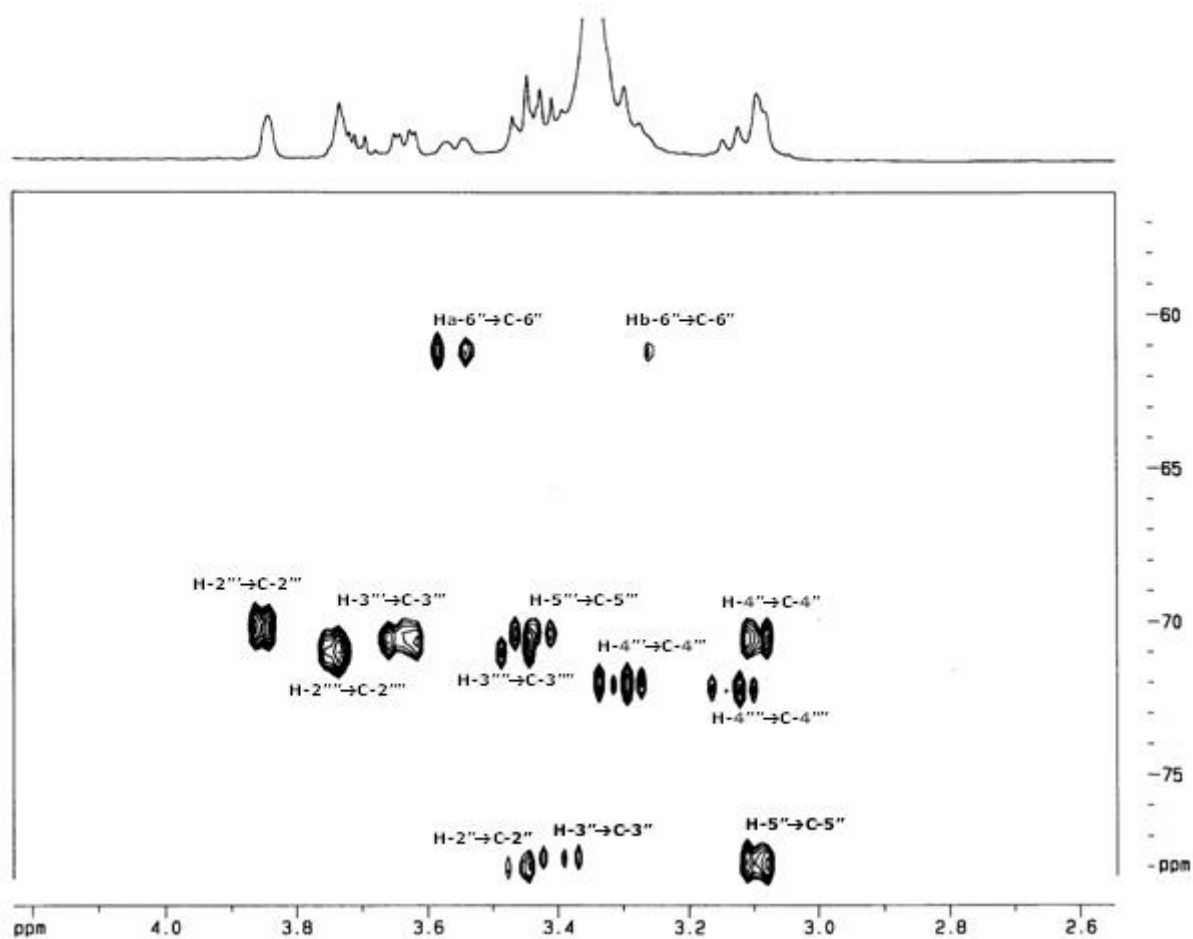


Espectro 17: Expansão da faixa de 0 a 6 ppm do espectro de RMN 2D COSY (400,13 MHz) de **SF3** ($\text{DMSO}-d_6$)

HMQC

A partir da análise do espectro de RMN 2D HMQC (**Espectro 18**) foi possível correlacionar os hidrogênios glicosídicos identificados anteriormente no espectro de COSY com seus respectivos carbonos (ver atribuição dos sinais no espectro abaixo), além dos hidrogênios da aglicona do kaempferol.

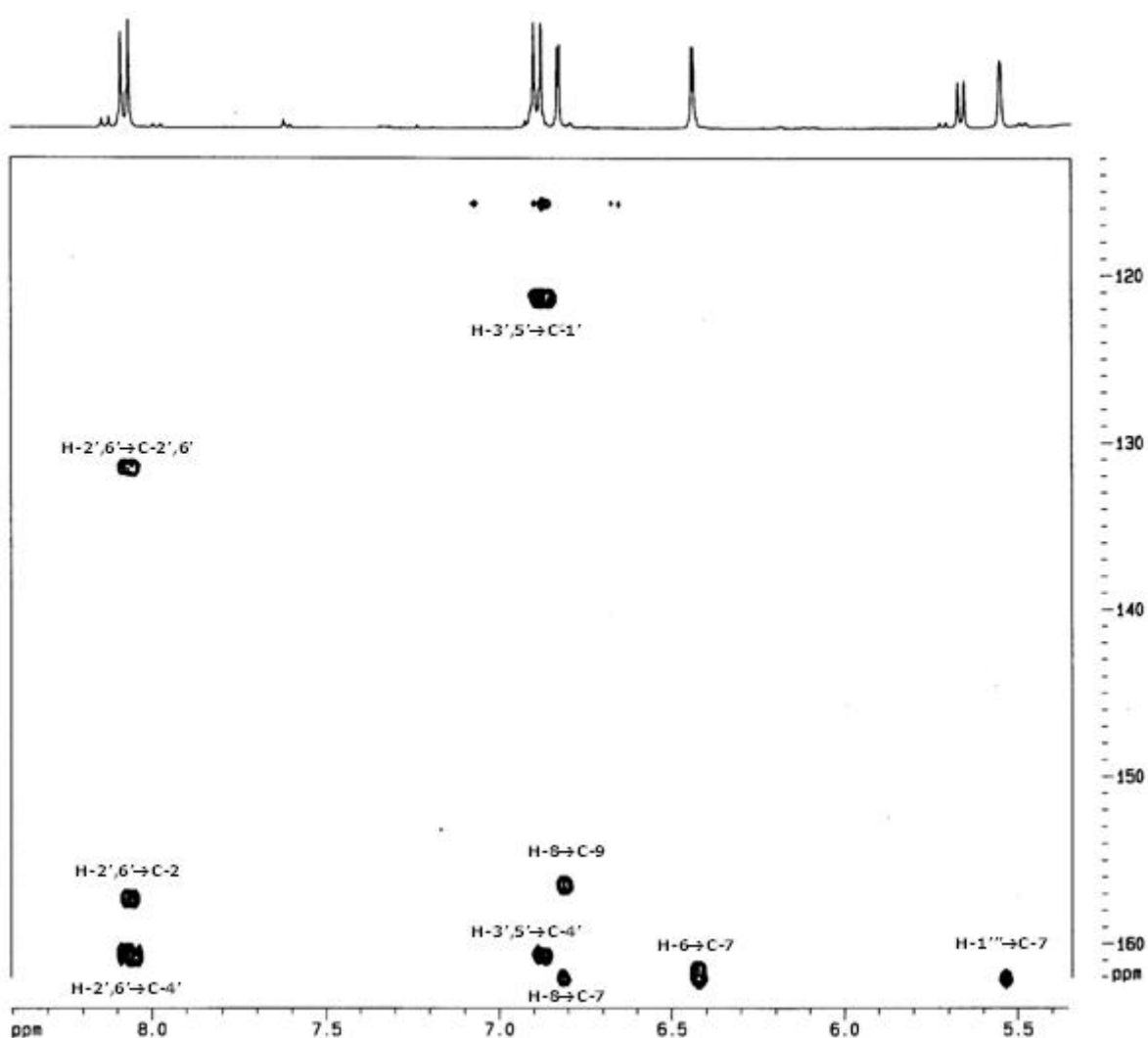
Os dados obtidos confirmaram as moléculas de açúcar presentes em **SF3** como uma D-glicopirranose e duas unidades de L-ramnopirranose.



Espectro 18: Expansão da faixa de 2,6 a 4,2 ppm (δ_H) do espectro de RMN 2D HMQC (400,13 x 100,63 MHz) de **SF3** (DMSO- d_6)

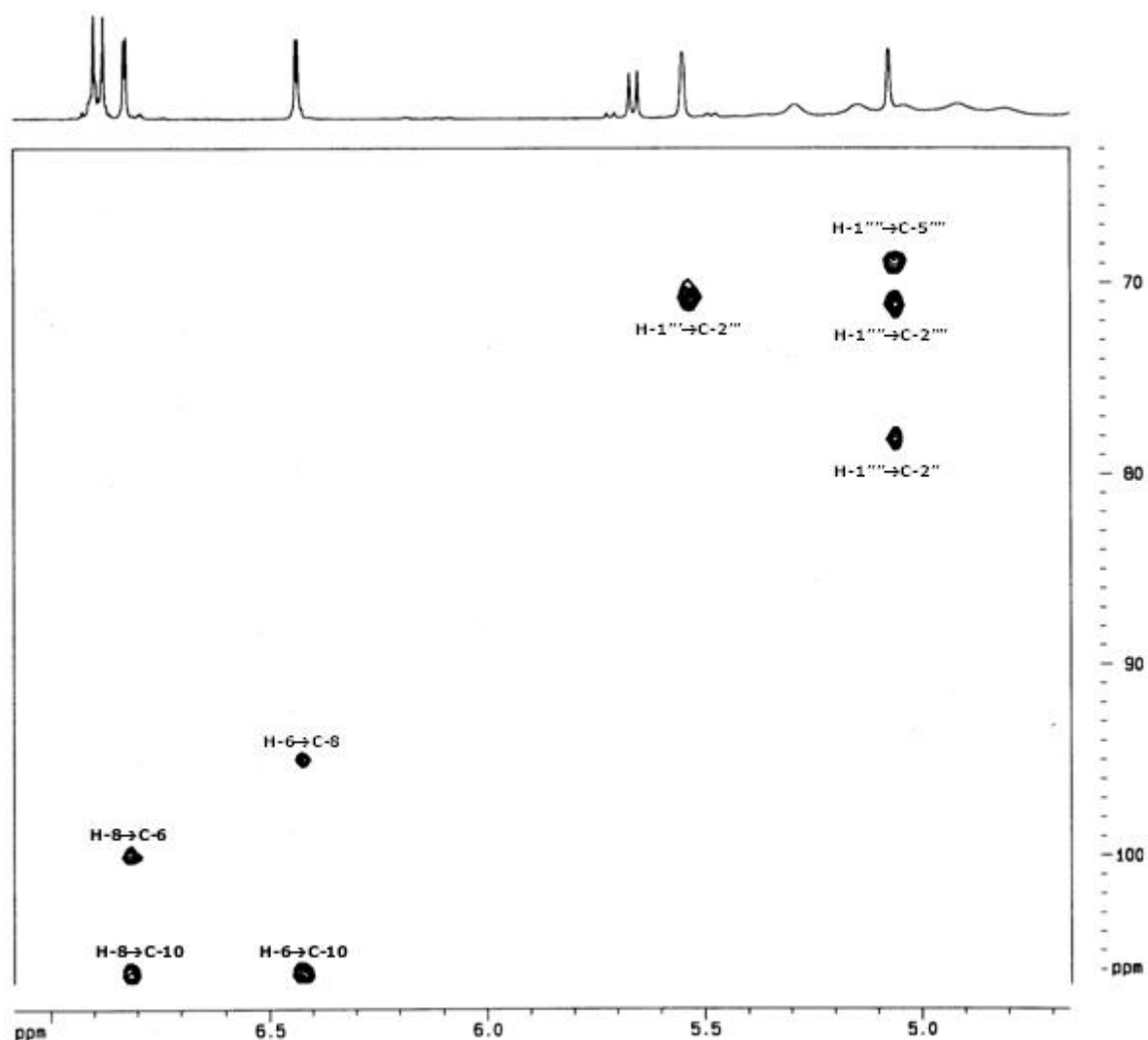
HMBC

A análise das correlações a longa distância ^1H - ^{13}C do espectro de RMN 2D HMBC permitiu definir a posição da ramnose (C-1''': 98,9 ppm) em C-7, com base nas correlações observadas entre o H-1''' (5,55 ppm) e C-7 (162,5 ppm) (**Espectro 19**). A posição da glicose (H-1'': 5,67 ppm) foi definida em C-3 com base no deslocamento observado em 157,3 ppm para o C-2 no espectro de RMN ^{13}C ; visto que este deslocamento mais desblindado é observado quando a posição 3 da aglicona está *O*-glicosilada.



Espectro 19: Expansão da faixa entre 5,4 e 8,4 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMBC (400,13 x 100,63 MHz) de **SF3** (DMSO- d_6)

A posição da ramnose externa foi confirmada com base na correlação a longa distância observada entre o hidrogênio anomérico H-1''' (5,08 ppm) e um sinal em 78,1 ppm (**Espectro 20**), correspondente ao C-2'' da glicose, indicando uma ligação interglicosídica do tipo (1→2). Esta unidade dissacarídica composta por ramnose e glicose, ligadas entre si através posição 1 da ramnose na posição 2 da glicose, é conhecida como neo-hesperidose.



Espectro 20: Expansão da faixa de 4,5 a 7,0 ppm (δ_H) do espectro de RMN 2D HMBC (400,13 x 100,63 MHz) de **SF3** (DMSO- d_6)

Após comparação com os dados da literatura (MULINACCI *et al.*, 1995) confirma-se para o flavonóide **SF3** a estrutura do kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**Figura 11**). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a molécula estão listados na **Tabela 9** (pág. 90).

Este é o segundo relato do isolamento deste flavonóide, também chamado de kaempferol-3-O-neo-hesperidosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo, tendo este sido descrito pela primeira vez por Mulinacci *et al.* (1995), a partir da espécie *S. telephium* ssp. *maximum*.

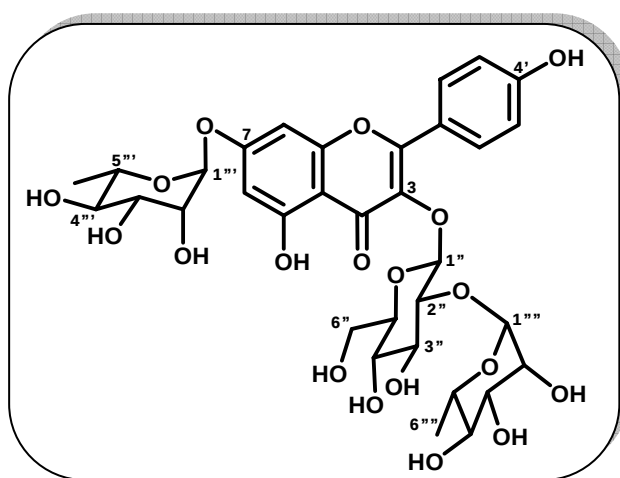


Figura 11: Estrutura de **SF3**

Tabela 9: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **SF3** (DMSO- d_6).

Aglicona	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); m; J (Hz)
2	157,3	-
3	133,3	-
4	177,8	-
5	162,0	-
6	99,9	6,43; d; 2,11
7	162,5	-
8	94,9	6,82; d; 2,11
9	156,4	-
10	106,1	-
1'	120,2	-
2',6'	131,4	8,08; d; 8,92
3',5'	116,0	6,89; d; 8,92
4'	161,4	-
5-OH	-	12,61; sl
4'-OH	-	10,20; sl
Açúcar 1	3-O-β-D-glicopiranosídeo	
1''	98,8	5,67; d; 7,15
2''	78,1	3,45; m
3''	77,8	3,38; m
4''	70,7	3,10; m
5''	78,0	3,10; m
6''	61,3	3,55 e 3,58; m
Açúcar 2	7-O-α-L-ramnopiranosídeo	
1'''	98,9	5,55; d; 0,89
2'''	70,3	3,84; m
3'''	70,7	3,65; m
4'''	72,1	3,25; m
5'''	70,5	3,44; m
6'''	18,4	1,12; d; 5,97
Açúcar 3	3-O-(1$\rightarrow$2)-α-L-ramnopiranosil	
1''''	101,1	5,08; sl
2''''	71,1	3,73; m
3''''	71,0	3,46; m
4''''	72,3	1,12; m
5''''	68,8	3,70; m
6''''	17,8	0,78; d; 6,14

d: duplete; m: multiplete; s: simpleto; sl: simpleto largo

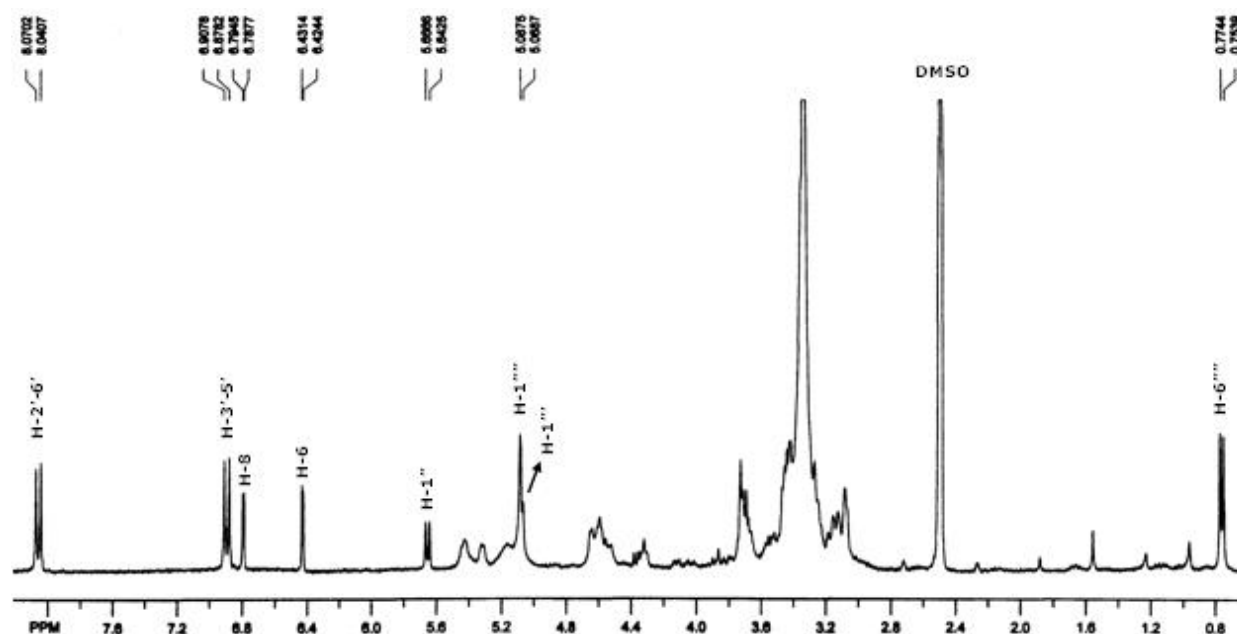
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF4

O flavonóide codificado como **SF4**, isolado a partir da fração butanólica das folhas (partidas Sd02 e Sd03), apresentou-se sob a forma de pó amarelo claro, com uma massa total isolada de 7,9 mg.

A proposta estrutural para o flavonóide **SF4** foi baseada nos dados obtidos nos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135, dos experimentos bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC, todos obtidos em DMSO- d_6 (concentração: 10 mg/mL), e confirmada pela espectrometria de massas.

RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H para **SF4** (**Espectro 21**) apresentou o mesmo padrão de sinais para a aglicona e de substituição apresentados pelos flavonóides descritos anteriormente. Para os hidrogênios H-3',5' e H-2',6' do anel B foram observados sinais em 6,89 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,88$ Hz) e 8,06 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,88$ Hz), respectivamente, e para os hidrogênios do anel A, sinais em 6,43 ppm (H-6, d, $J_{\text{meta}} = 2,07$ Hz) e 6,79 ppm (H-8, d, $J_{\text{meta}} = 2,07$ Hz).



Espectro 21: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de **SF4** (DMSO- d_6)

Para a faixa entre 0,6 e 5,7 ppm do espectro de RMN ^1H de **SF4**, referente à região glicosídica, foram observados, assim como para **SF3**, três sinais de hidrogênios anoméricos (H-1'': 5,65 ppm; H-1''': 5,09 ppm e H-1''': 5,07 ppm), sendo que H-1''' e H-1''' apresentaram-se parcialmente sobrepostos.

O sinal em 5,65 ppm, mais desblindado, é compatível com O-glicosilação diretamente no anel da aglicona. De acordo com a constante de acoplamento observada ($J = 7,24$ Hz), H-1'' e H-2'' apresentam entre si uma relação *trans*-diaxial. Este padrão é o mesmo observado para a glicose substituída na posição 3 de **SF3**.

Os sinais em 5,09 e 5,07 ppm, referentes aos hidrogênios anoméricos das duas unidades glicosídicas restantes, aparentam ser um duplete e um simpleto sobrepostos. O simpleto (5,09 ppm) indica a presença de um açúcar com acoplamento entre os H-1''' e H-2''' do tipo *trans*-diequatorial. Como existe a sobreposição de sinais, não se pode calcular o J do duplete correspondente ao hidrogênio anomérico H-1'''.

A presença de um duplete em 0,76 ppm (3H; $J = 6,16$ Hz), referente à metila de uma unidade sacarídica, e de um hidrogênio anomérico com relação *trans*-diequatorial, como descrito anteriormente, indicam a presença de uma ramnose.

O valor de deslocamento observado para os hidrogênios metílicos da ramnose e o valor observado para seu hidrogênio anomérico (δ 5,09) indicam a posição deste açúcar como terminal (ou externo), igualmente ao observado para **SF3**.

Comparando com os dados obtidos no espectro de RMN ^1H de **SF3**, onde a ramnose externa apresentava deslocamento químico (δ) em 5,08 ppm, o simpleto observado no espectro de RMN ^1H de **SF4** pode corresponder à mesma unidade glicosídica. Além disso, no caso de **SF3**, a glicose ligada à posição 3 da aglicona apresentou deslocamento químico em 5,67 ppm, muito próximo ao sinal observado para H-1'' de **SF4**.

Como o padrão de substituição de **SF4** é semelhante ao dos flavonóides descritos anteriormente, um dos hidrogênios sobrepostos (H-1''' ou H-1''') está ligado diretamente à aglicona do kaempferol, apesar de se apresentar mais blindado quando comparado ao H-1'' de **SF4** e aos hidrogênios anoméricos dos flavonóides **SF1**, **SF2** e **SF3**.

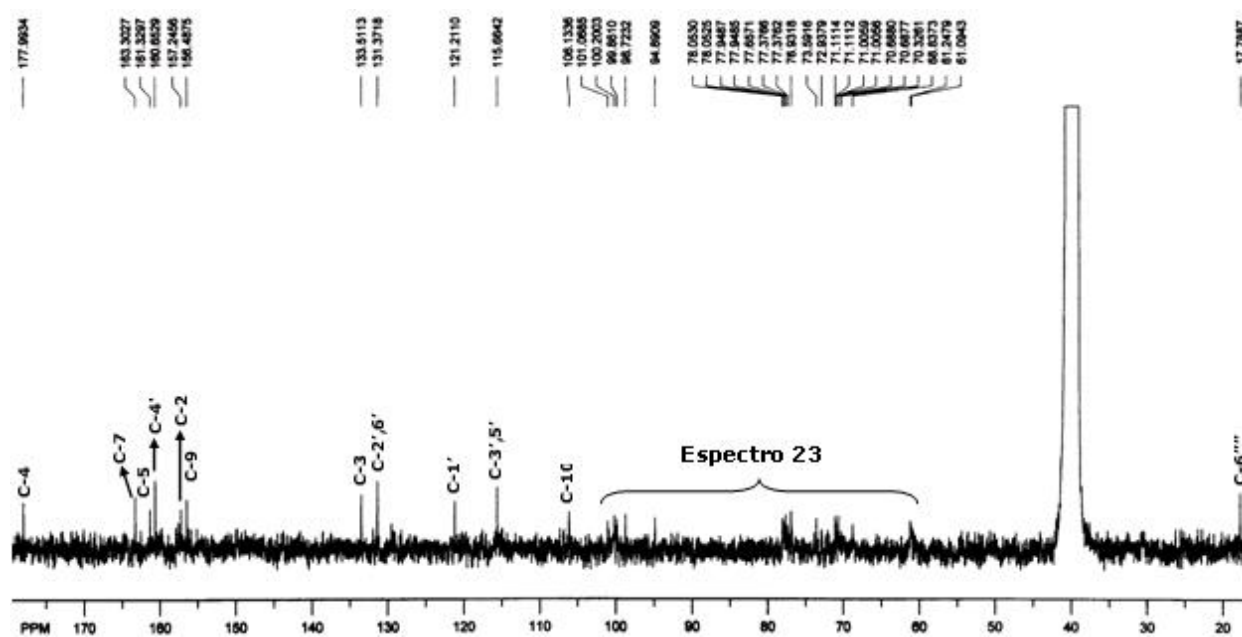
De acordo com Markham & Geiger (1994), uma unidade de glicose presente na posição 7 de um flavonóide apresenta deslocamento químico entre δ 4,9-5,25, distinto do deslocamento observado quando esta encontra-se localizada na posição 3 (δ 5,35-5,56).

Dados da literatura confirmam esta suposição, mostrando que o hidrogênio anomérico da glicose, quando esta se encontra em C-7, apresenta deslocamento químico em torno de 5 ppm (mais blindado), ao contrário do que acontece quando esta molécula está em C-3 (EL-DESOKY *et al.*, 2001).

Portanto, com base nesses dados, pode-se propor para **SF4** a estrutura do kaempferol 3-O-ramnoglicosídeo 7-O-glicosídeo.

RMN ^{13}C e DEPT 135

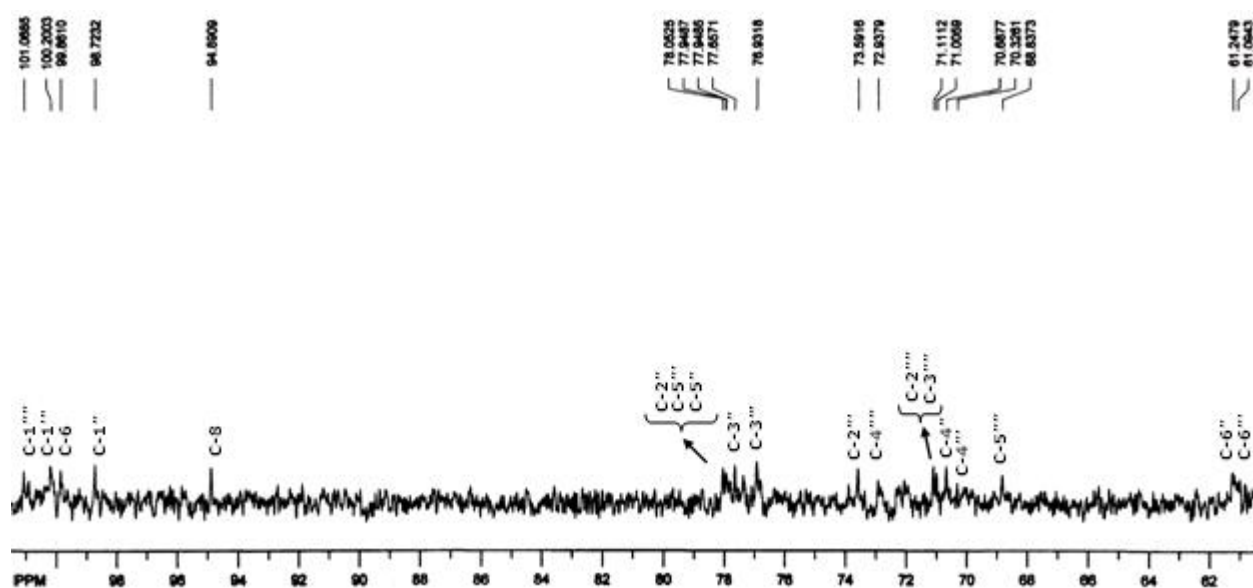
O espectro de RMN ^{13}C forneceu 31 sinais (**Espectro 22**). Treze destes sinais correspondem à aglicona do flavonóide e os sinais restantes são referentes a três unidades de carboidrato (três hexoses).



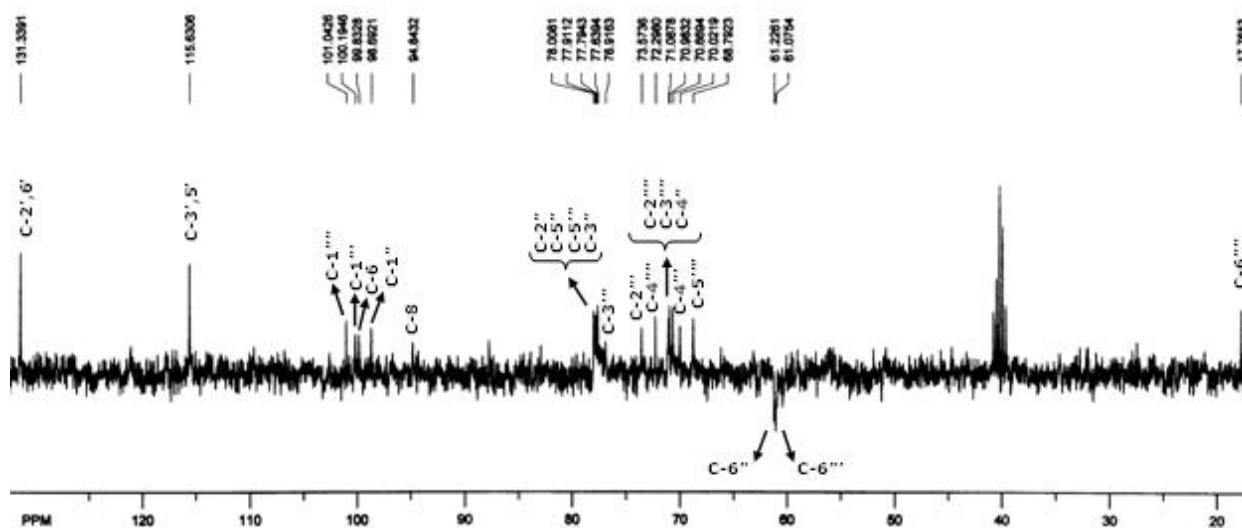
Espectro 22: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) para **SF4** (DMSO- d_6)

Os sinais de RMN ^{13}C para **SF4** confirmam a estrutura da aglicona do kaempferol disubstituído por unidades glicosídicas nas posições 3 e 7 e presença de O-glicosilação, o que já havia sido evidenciado no espectro de RMN ^1H . Este padrão de substituição é o mesmo observado para os flavonóides caracterizados anteriormente.

Os dados obtidos nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 (**Espectro 24**) de **SF4** diferem essencialmente dos dados de **SF3** com relação aos sinais das unidades de carboidrato. Para **SF4** observam-se a ausência de um sinal próximo a 18 ppm, que em **SF3** correspondia à metila de uma das ramnosas, e a presença de mais um sinal próximo 61 ppm, correspondente a um CH_2 (inversão de sinal no DEPT 135). Esses dados confirmam a presença de duas glicoses e de uma ramnose.



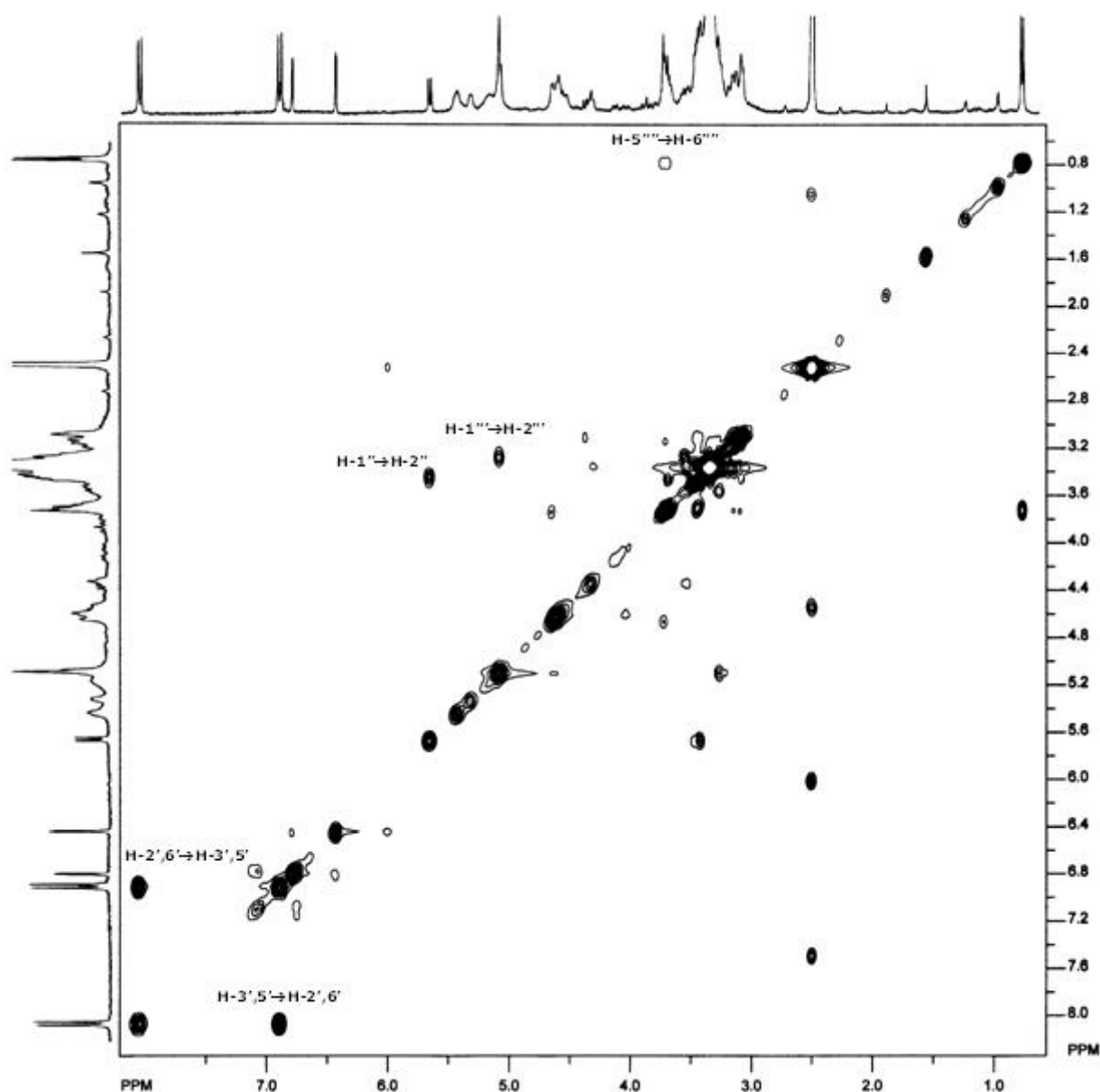
Espectro 23: Expansão da faixa entre 60 e 105 ppm do espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de **SF4** ($\text{DMSO}-d_6$)



Espectro 24: Espectro de DEPT 135 (75,47 MHz) de **SF4** ($\text{DMSO}-d_6$)

COSY

A partir da análise do espectro de RMN 2D COSY (**Espectro 25**) foi possível estabelecer os deslocamentos químicos para todos os hidrogênios das três moléculas glicosídicas através do acoplamento seqüenciado dos hidrogênios destes açúcares. Além disso, observou-se o acoplamento entre H-2',6' com H-3',5', confirmando o padrão 4'-OH evidenciado nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

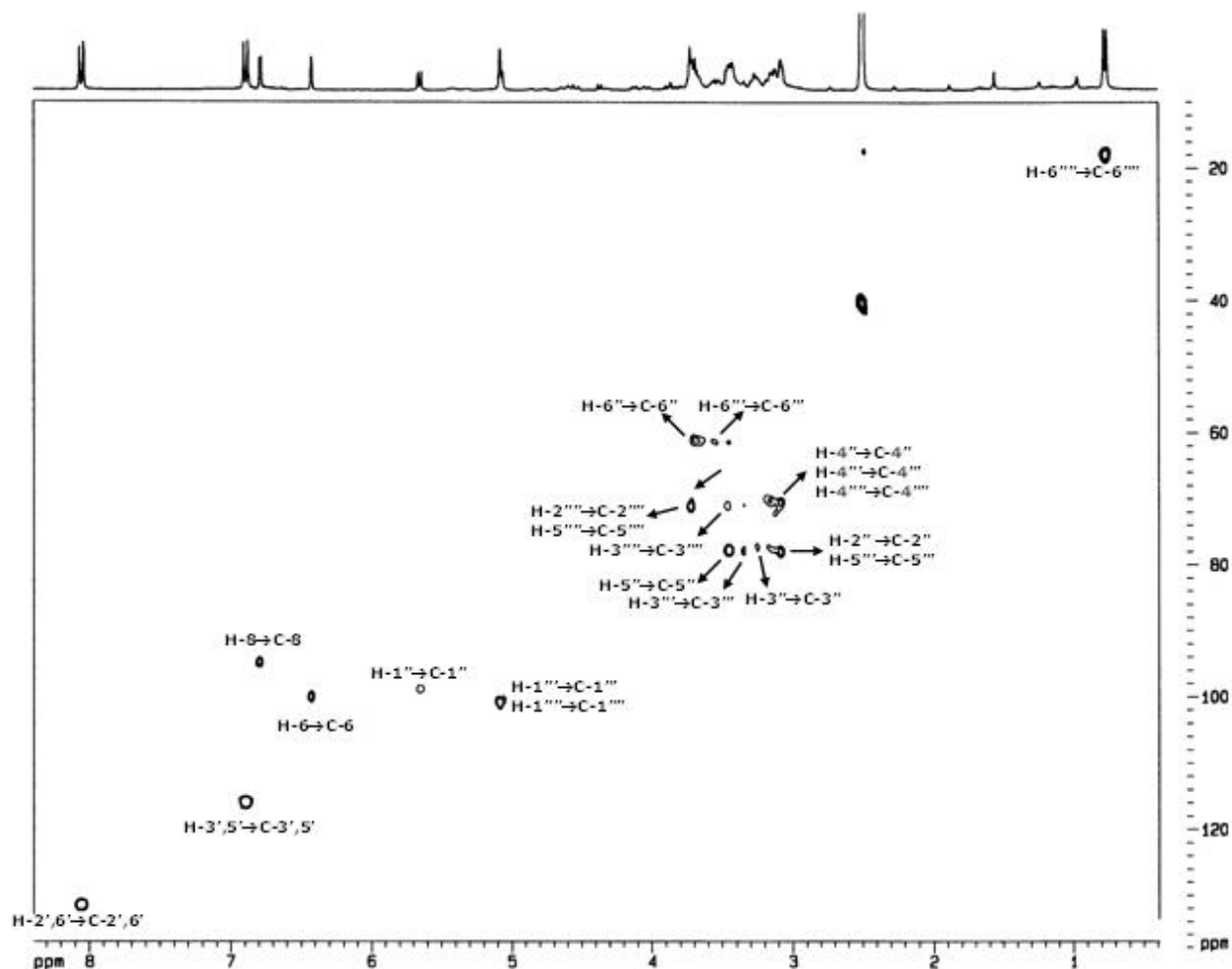


Espectro 25: Expansão da faixa de 2,9 a 5,7 ppm do espectro de RMN 2D COSY (300,16 x 75,47 MHz) de **SF4** (DMSO- d_6)

HMQC

A análise do espectro de RMN bidimensional de HMQC (**Espectro 26**) permitiu correlacionar os hidrogênios identificados anteriormente no espectro de COSY com seus respectivos carbonos, tanto para as moléculas sacarídicas quanto para o kaempferol (ver assinalamento no espectro abaixo).

A partir desses dados foi possível confirmar as moléculas de açúcar presentes em **SF4**: duas D-glicopiranoses e uma L-ramnopiranosose.

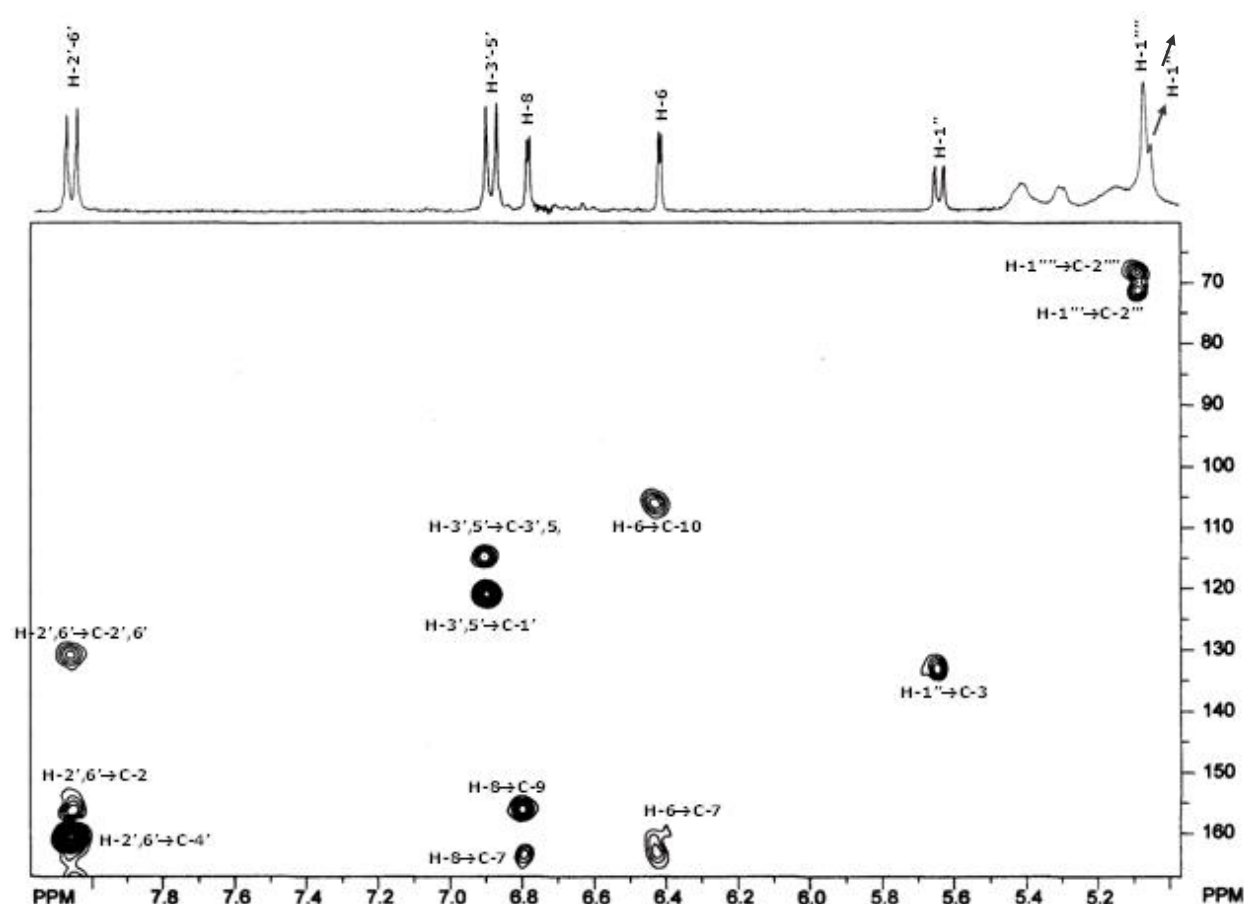


Espectro 26: Expansão da faixa de 0 a 4,0 ppm (δ_H) do espectro de RMN 2D HMQC (300,16 x 75,47 MHz) de **SF4** (DMSO- d_6)

HMBC

A análise das correlações a longa distância ^1H - ^{13}C no espectro de RMN 2D HMBC (**Espectro 27**) permitiu a definição da glicose (C-1'': 98,7 ppm) em C-3, com base nas correlações observadas entre o H-1'' (5,65 ppm) e C-3 (133,5 ppm). Entretanto, não foi possível definir o açúcar presente em C-7 nem a ligação interglicosídica.

Assim como observado para **SF3**, o deslocamento para o C-2'' da glicose em C-3 apresenta-se em campo mais baixo, indicando a presença da ligação interglicosídica nesta posição. Comparando os dados de RMN ^{13}C e ^1H atribuídos à unidade de neo-hesperidose de **SF3** com os dados de RMN obtidos nos espectros de **SF4**, pode-se propor que esta mesma unidade dissacarídica esteja presente. Portanto, na posição 7 da aglicona, a glicose estaria presente, confirmando a hipótese levantada a partir do espectro de RMN ^1H .



Espectro 27: Expansão da faixa entre 5,0 e 8,2 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMBC (300,16 x 75,47 MHz) de **SF4** ($\text{DMSO}-d_6$)

Após comparação com os dados da literatura (Nakano *et al.*, 1981) confirma-se para **SF4** a estrutura do kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- β -D-glicopiranosídeo (**Figura 12**). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a molécula estão listados na **Tabela 10**.

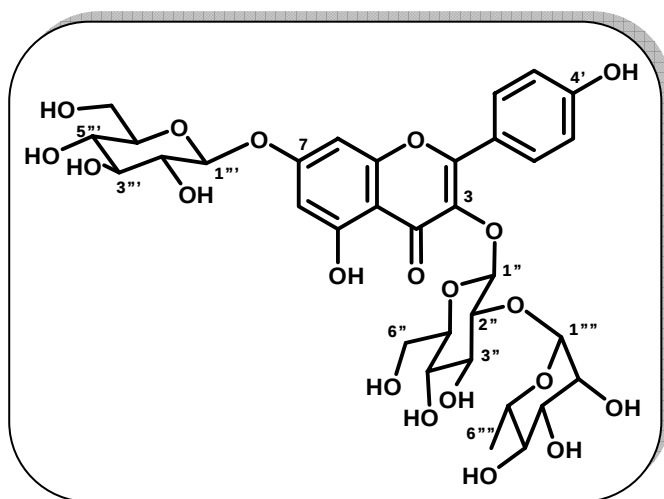


Figura 12: Estrutura de **SF4**

Este flavonóide, também chamado de kaempferol-3-O-neo-hesperidosídeo-7-O- β -glicopiranosídeo, foi isolado pela primeira vez a partir da espécie vegetal *Paris verticillata* M.v. Bieb. (Liliaceae) (NAKANO *et al.*, 1981), tendo sido encontrado também em outra espécie da mesma família, a *Allium neapolitanum* Cyr. (CAROTENUTO *et al.*, 1997). Este é o primeiro relato da presença deste flavonóide para a família Crassulaceae.

Tabela 10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **SF4** (DMSO- d_6).

Aglicona	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); m; J (Hz)
2	157,2	-
3	133,5	-
4	178,0	-
5	161,3	-
6	99,9	6,43; d; 2,07
7	163,3	-
8	94,9	6,79; d; 2,07
9	156,5	-
10	106,1	-
1'	121,2	-
2',6'	131,4	8,06; d; 8,88
3',5'	115,6	6,89; d; 8,88
4'	160,6	-
Açúcar 1	3-O-β-D-glicopiranosídeo	
1''	98,7	5,65; d; 7,24
2''	78,0	3,10; m
3''	77,6	3,18; m
4''	70,7	3,10; m
5''	77,9	3,44; m
6''	61,2	3,45 e 3,56; m
Açúcar 2	7-O-β-D-glicopiranosídeo	
1'''	100,2	5,07; d; -
2'''	73,6	3,43; m
3'''	76,9	3,26; m
4'''	70,0	3,15; m
5'''	77,9	3,35; m
6'''	61,1	3,64 e 3,72; m
Açúcar 3	3-O-(1$\rightarrow$2)-α-L-ramnopiranosil	
1''''	101,1	5,08; s
2''''	71,1	3,75; m
3''''	71,0	3,46; m
4''''	72,9	3,14; m
5''''	68,8	3,73; m
6''''	17,7	0,76; d; 6,16

d: duplete; m: multiplete; s: simpleto

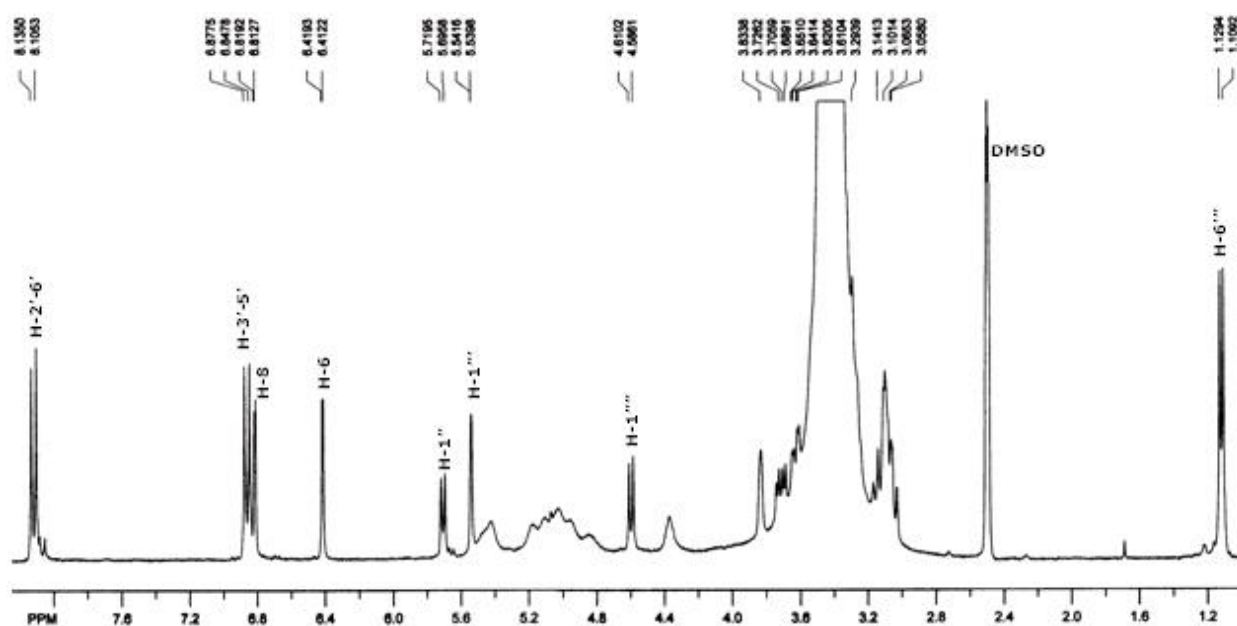
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF5

O flavonóide codificado como **SF5**, isolado a partir da fração butanólica das folhas (partidas Sd02 e Sd03), apresentou-se sob a forma de pó amarelo amorfo, com uma massa total isolada de 7,4 mg.

A proposta estrutural para **SF5** foi baseada nos dados obtidos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , dos experimentos bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC, todos obtidos em DMSO- d_6 (concentração: 15 mg/mL), e confirmada pela espectrometria de massas.

RMN ^1H

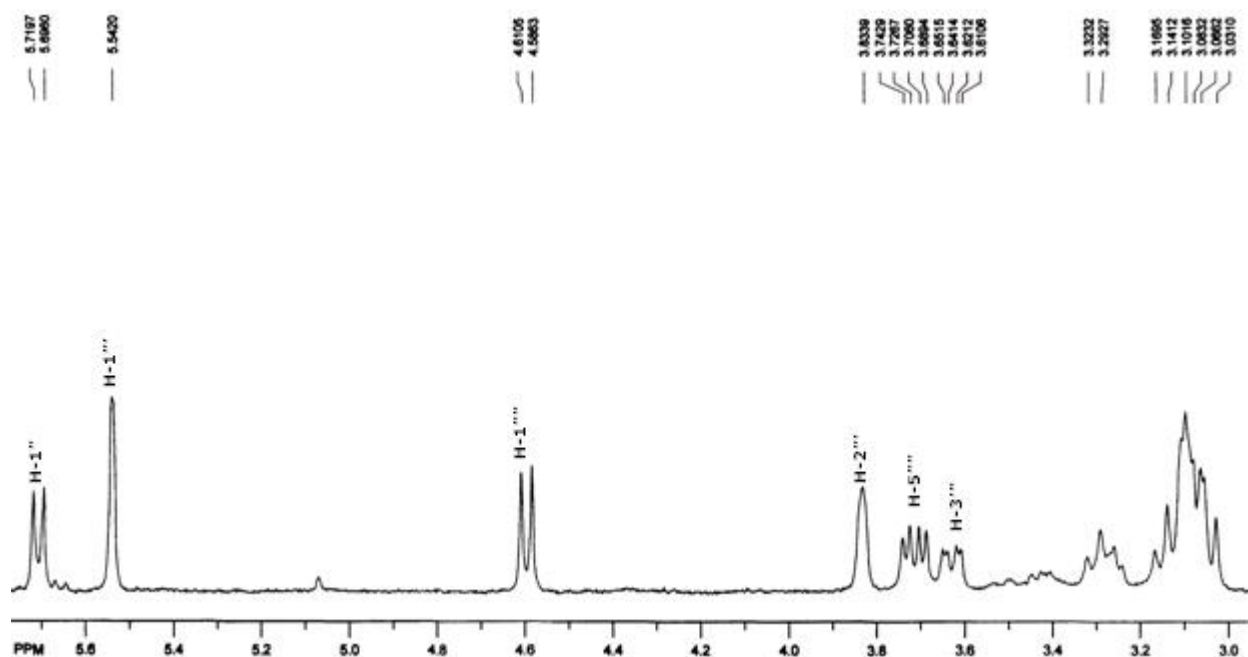
O espectro de RMN ^1H de **SF5** (**Espectro 28**) apresentou o mesmo padrão de aglicona e de substituição apresentados pelos flavonóides relatados anteriormente. Para os hidrogênios H-2',6' e H-3',5' do anel B foram observados sinais em 8,12 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,94$ Hz) e 6,86 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,94$ Hz), respectivamente, e para os hidrogênios do anel A, sinais em 6,42 ppm (H-6, d, $J_{\text{meta}} = 2,02$ Hz) e 6,82 ppm (H-8, d, $J_{\text{meta}} = 2,02$ Hz).



Espectro 28: Espectro de RMN ^1H (300,16 MHz) de **SF5** (DMSO- d_6)

Para a faixa entre 3,0 e 6,0 ppm do espectro de RMN ^1H (**Espectro 29**), correspondente aos hidrogênios da região glicosídica, foram observados três sinais de hidrogênios anoméricos (H-1'': 5,71 ppm; H-1''': 5,54 ppm e H-1''': 4,60 ppm), sendo que

destes, dois sinais são compatíveis com O-glicosilação diretamente no anel da aglicona (5,71 e 5,54 ppm). O outro sinal, bem mais blindado (4,60 ppm), corresponde a uma molécula de açúcar que não está ligada diretamente na aglicona, ou seja, é um açúcar externo, ligado em uma outra molécula de açúcar. Os sinais correspondentes aos outros hidrogênios das unidades sacarídicas aparecem em uma mesma região, sobrepostos, entre 3,84 ppm e 3,08 ppm.



Espectro 29: Expansão da faixa de 3,0 a 5,8 ppm do espectro de RMN ¹H (supressão de água) (300,16 MHz) de **SF5** (DMSO-*d*₆)

As constantes de acoplamento observadas para H-1'' (d; *J*= 7,12 Hz) e H-1''' (d; *J*= 7,22 Hz) mostram uma relação *trans*-diaxial entre os H-1 e H-2 das unidades sacarídicas, enquanto que o valor observado para a constante de acoplamento entre H-1''' e H-2''' (d; *J*= 0,55 Hz) mostra uma relação *trans*-diequatorial.

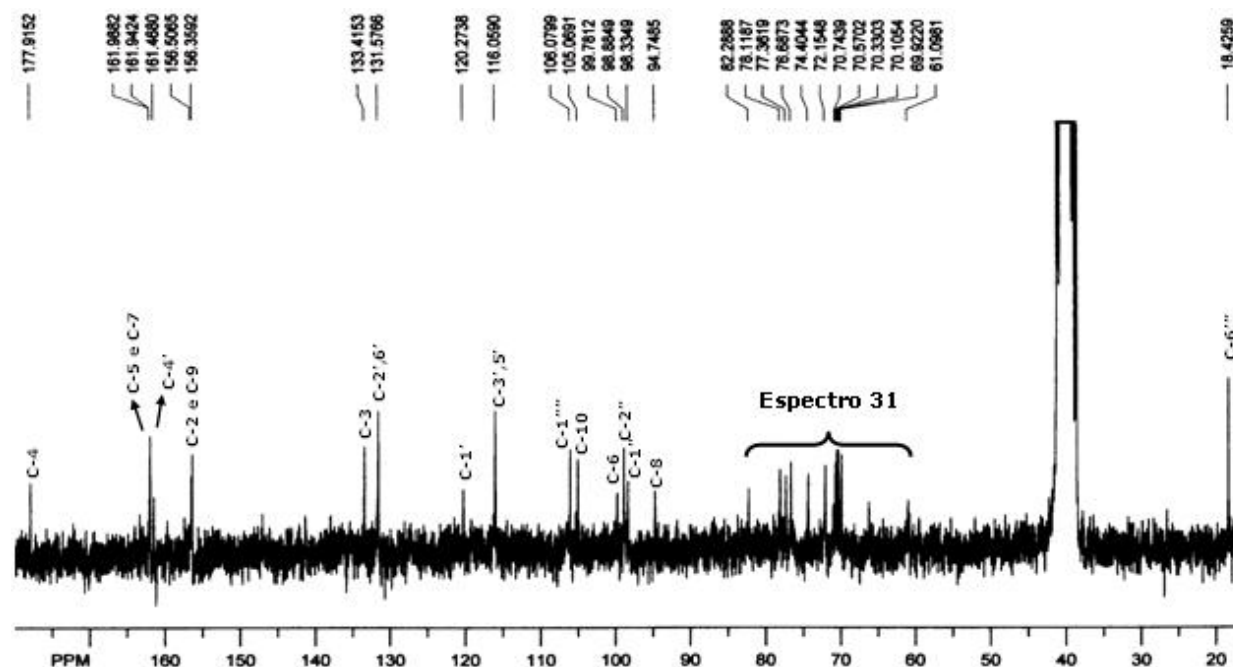
Assim como observado nos espectros de RMN ¹H dos flavonóides **SF1**, **SF2** e **SF3**, o espectro de RMN ¹H de **SF4** apresenta um duplete em 1,12 ppm (3H; *J*= 6,06 Hz) referente aos hidrogênios metílicos de uma unidade sacarídica, indicando a presença de uma ramnose (MULINACCI *et al.*, 1995; PIZZOLATTI *et al.*, 2003). A presença deste açúcar também é evidenciada pelo sinal em δ 5,54, o mesmo deslocamento apresentado pelas 7-O-ramnopiranoses de **SF1**, **SF2** e **SF3**. Esses dados indicam que **SF5** apresenta uma ramnose na posição 7 do kaempferol.

O sinal em δ 5,71 ($J = 7,12$ Hz) evidencia a presença de uma glicose na posição 3 do kaempferol. Segundo Markham & Geiger (1994), uma glicose presente na posição 3 de um flavonóide apresenta diferenças no deslocamento químico de seu hidrogênio anomérico dependendo do açúcar ligado a esta molécula. Para valores entre δ 5,65-5,72, a 3-O-glicopirranose está substituída na posição 2 por uma xilose, que apresentaria seu hidrogênio anomérico entre δ 4,58-4,62.

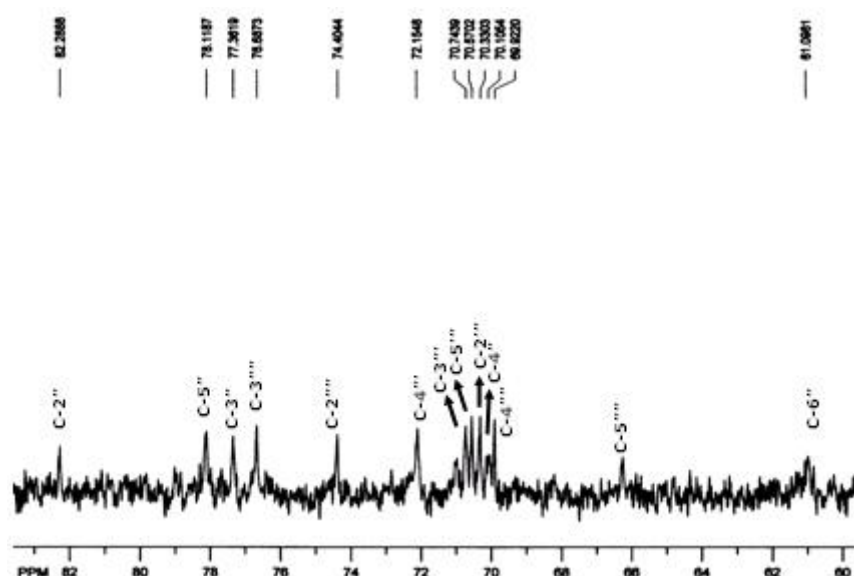
De acordo com esses dados parciais propõe-se para a estrutura de **SF5** a molécula do kaempferol 3-O-xiloglicosídeo 7-O-ramnosídeo.

RMN ^{13}C

O espectro de RMN ^{13}C forneceu 30 sinais (**Espectro 30**). Treze destes sinais correspondem aos carbonos da aglicona de **SF5** e os 17 sinais restantes são referentes aos carbonos de três unidades de carboidrato. Diferentemente do observado para os flavonóides descritos até o momento, estes sinais, referentes aos carboidratos, correspondem a duas hexoses e uma pentose.



Espectro 30: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de **SF5** ($\text{DMSO}-d_6$)



Espectro 31: Expansão da faixa de 61 a 83 ppm do espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de **SF5** ($\text{DMSO}-d_6$)

Os sinais de RMN ^{13}C para **SF5** confirmam a estrutura da aglicona do kaempferol di-O-substituído por unidades glicosídicas nas posições 3 e 7.

Os deslocamentos atribuídos aos carbonos anoméricos (105,1; 98,9 e 98,3 ppm) confirmam a presença de O-glicosilação, o que já havia sido evidenciado no espectro de RMN ^1H .

Comparando os dados de RMN ^{13}C das unidades glicosídicas de **SF5** com os valores observados para os outros flavonóides isolados, observa-se que uma das unidades sacarídicas corresponde a uma glicose ($\text{C}-1''$: 98,3 ppm) e a outra a uma ramnose ($\text{C}-1'''$: 98,9 ppm). Porém, observa-se um sinal para o carbono anomérico da terceira unidade glicosídica (uma pentose) mais desblindado quando comparado com os deslocamentos observados para os carbonos anoméricos dos flavonóides caracterizados anteriormente ($\text{C}-1'''$: 105,1 ppm).

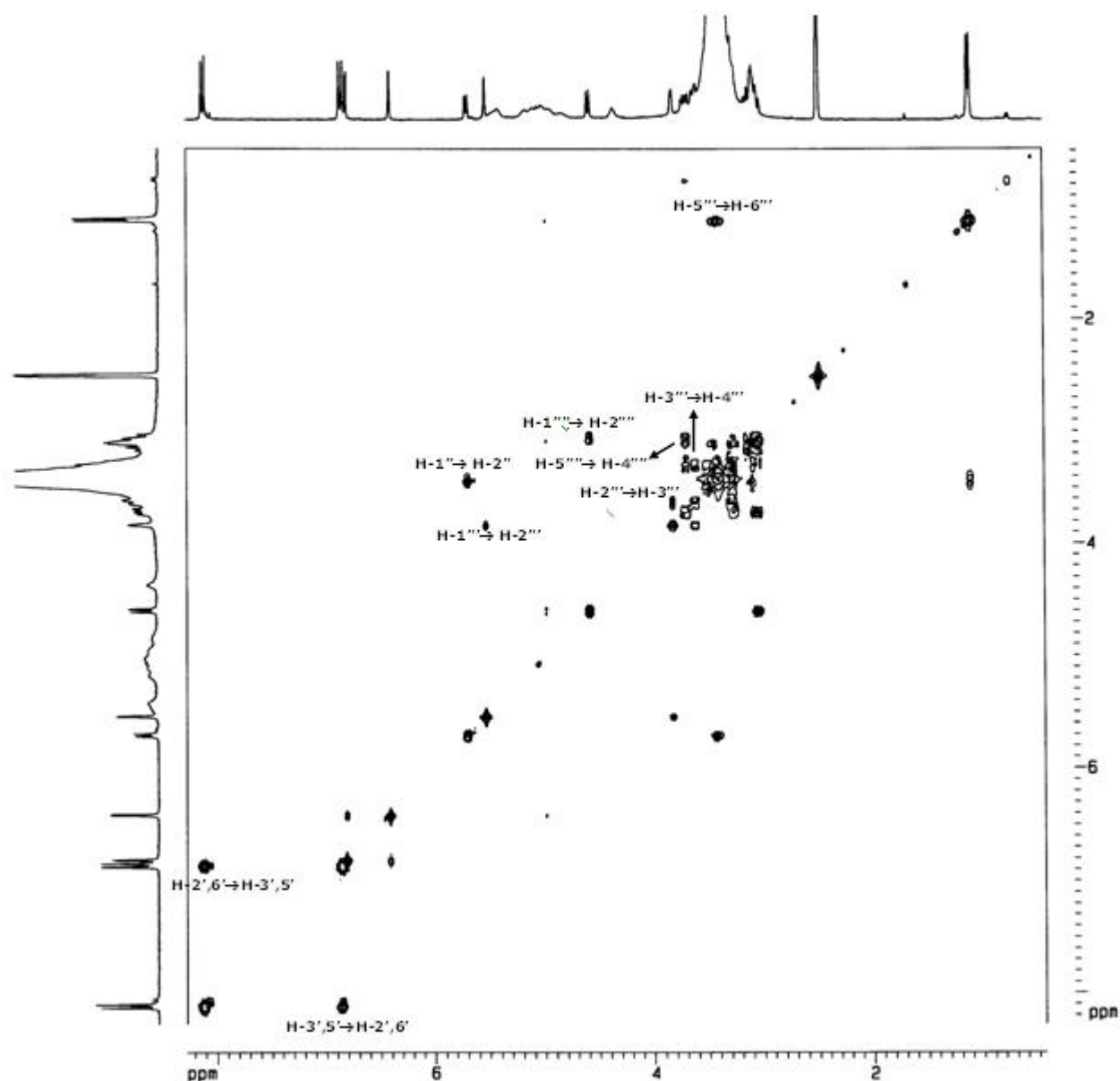
Os sinais de RMN ^{13}C atribuídos ao terceiro carboidrato, após comparação com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989), são compatíveis com os valores observados para a molécula de xilose.

A presença de um sinal em 82,3 ppm (sinal mais desblindado), atribuído ao C-2 da glicose, mostra a presença de ponte interglicosídica nesta posição. Portanto, este sinal indica que a unidade de glicose está substituída na posição 2 por uma outra molécula de açúcar, podendo esta ser a glicose ou a xilose.

COSY

A análise do espectro de RMN 2D COSY (**Espectro 32**) permitiu estabelecer os deslocamentos químicos para todos os hidrogênios das três moléculas glicosídicas (duas hexoses e uma pentose) através do acoplamento seqüenciado dos hidrogênios destes açúcares (algumas correlações encontram-se assinaladas no espectro abaixo).

Para o kaempferol foi possível observar o acoplamento entre H-2',6' com H-3',5', confirmando o padrão 4'-OH para o anel B evidenciado nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

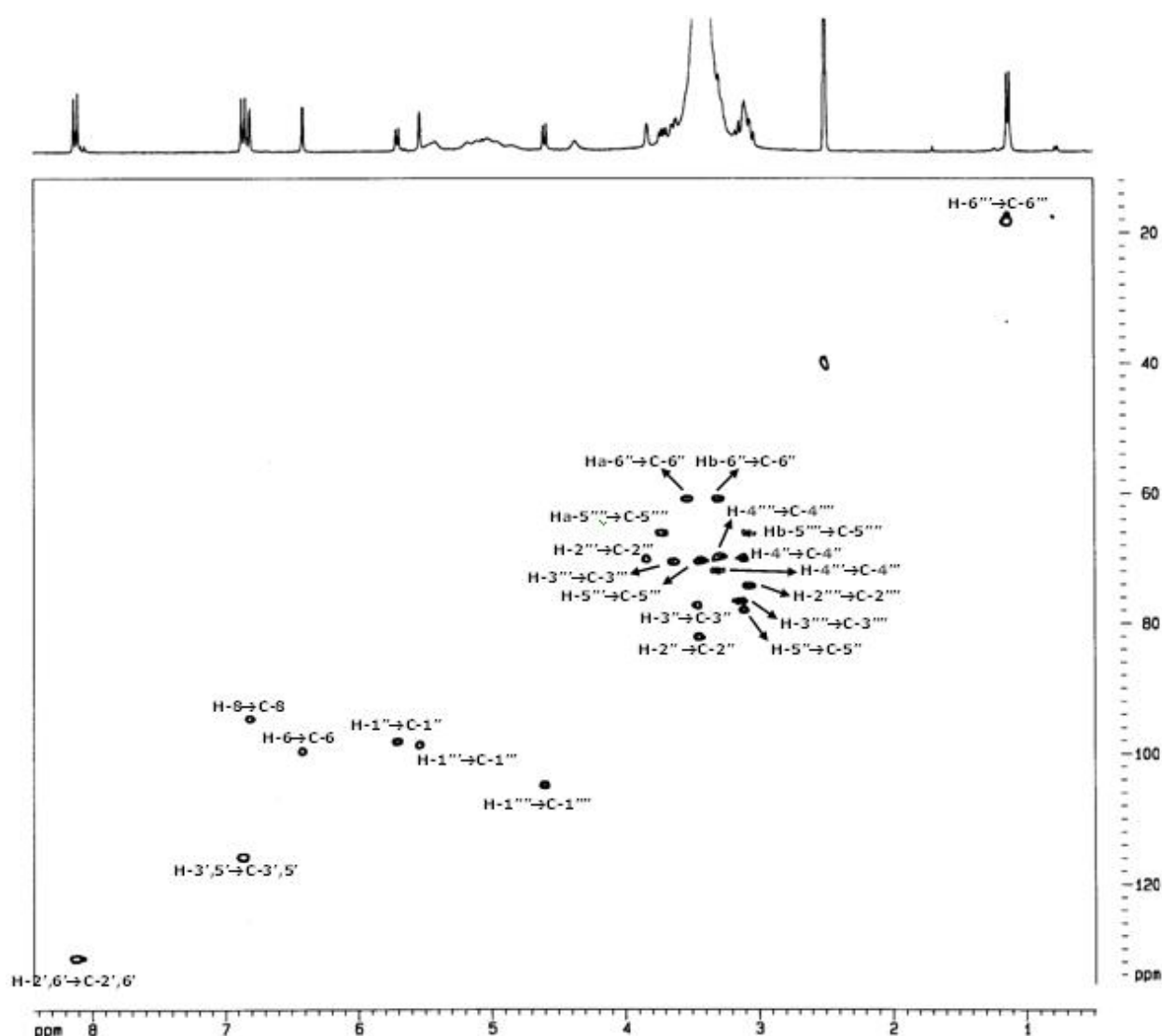


Espectro 32: Espectro de RMN 2D COSY (300,16 MHz) de **SF5** ($\text{DMSO-}d_6$)

HMQC

A partir da análise do espectro de RMN 2D HMQC (**Espectro 33**) foi possível correlacionar os hidrogênios identificados anteriormente no espectro de COSY com seus respectivos carbonos, tanto para as moléculas de sacarídicas quanto para a aglicona.

A partir desses dados foi possível identificar as moléculas de carboidrato presentes em **SF5** como sendo uma D-glicopirranose, uma L-ramnopirranose e uma D-xilopirranose.



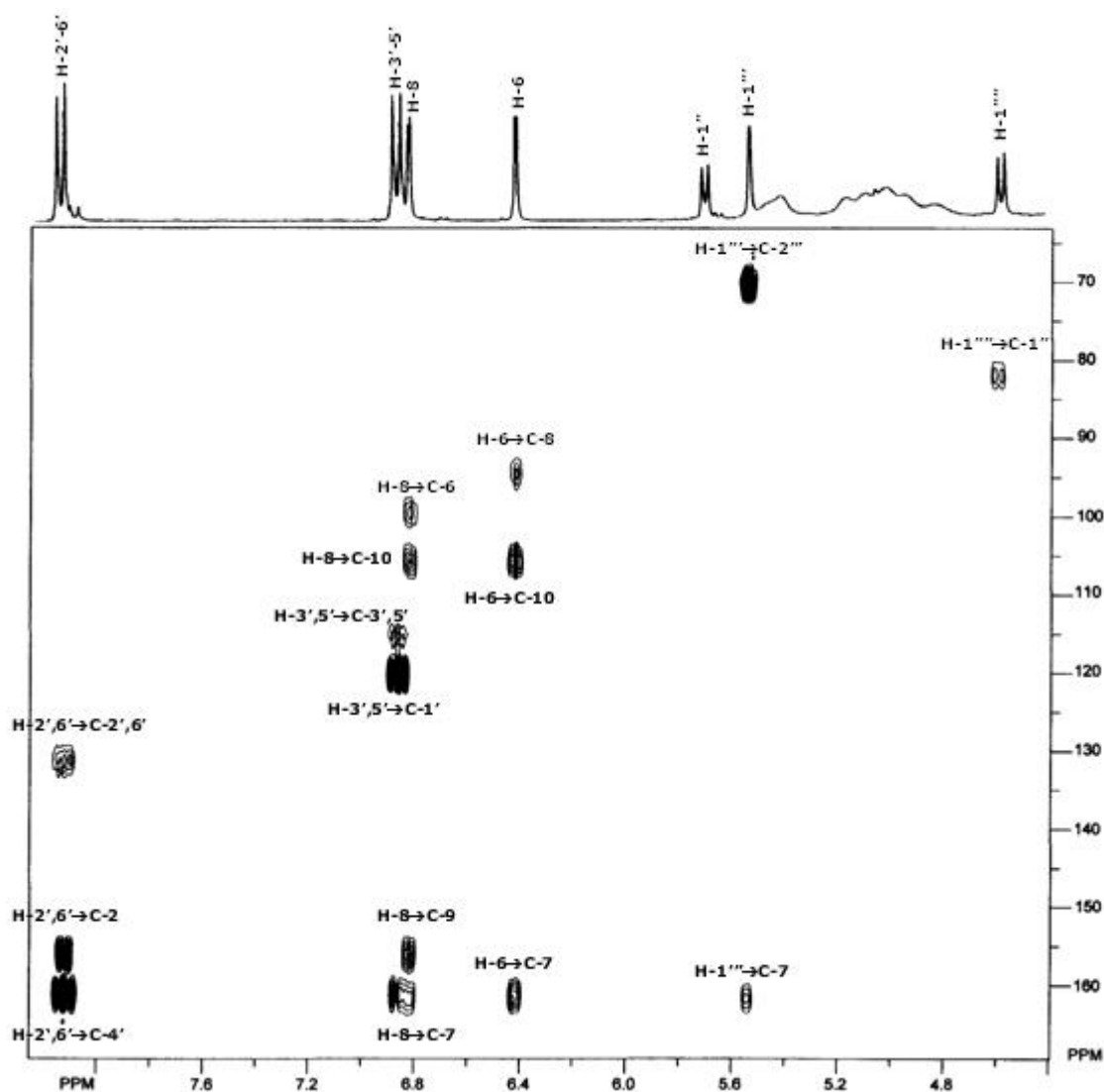
Espectro 33: Espectro de RMN 2D HMQC (300,16 x 75,47 MHz) de **SF5** (DMSO- d_6)

HMBC

A análise das correlações a longa distância do espectro de RMN 2D HMBC (**Espectro 34**) permitiu identificar as posições dos açúcares ligados ao esqueleto do kaempferol e a ponte interglicosídica da unidade dissacarídica.

A posição da ramnose foi definida em C-7 com base nas correlações observadas entre o H-1''' da ramnose (5,54 ppm) e o C-7 (162,5 ppm) do kaempferol. A posição da glicose (H-1'': 5,71 ppm) foi definida em C-3 com base no deslocamento em 156,5 ppm para C-2 no espectro de RMN ^{13}C ; visto que este valor é observado quando a posição 3 da aglicona está O-glicosilada.

A posição da xilose, como açúcar externo, foi confirmada a partir da correlação a longa distância observada entre o hidrogênio anomérico H-1'''' (4,60 ppm) e o sinal em 82,3 ppm, correspondente C-2'' da glicose, indicando uma ligação interglicosídica do tipo (1→2).



Espectro 34: Expansão da faixa entre 4,4 e 8,2 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMBC (300,16 x 75,47 MHz) de **SF5** ($\text{DMSO}-d_6$)

Tabela 11: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **SF5** ($\text{DMSO}-d_6$).

Aglicona	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); m; J (Hz)
2	156,5	-
3	133,4	-
4	177,9	-
5	161,9	-
6	99,8	6,42; d; 2,02
7	162,0	-
8	94,7	6,82; d; 2,02
9	156,4	-
10	106,1	-
1'	120,2	-
2',6'	131,6	8,12; d; 8,94
3',5'	116,1	6,86; d; 8,94
4'	161,5	-
Açúcar 1	3-O-β-D-glicopiranosídeo	
1''	98,3	5,71; d; 7,12
2''	82,3	3,47; m
3''	77,4	3,47; m
4''	70,1	3,13; m
5''	78,1	3,12; m
6''	61,0	3,34/3,56; m
Açúcar 2	7-O-α-L-ramnopiranosídeo	
1'''	98,9	5,54; d; 0,55
2'''	70,3	3,84; sl
3'''	70,7	3,65; dd; 3,2/9,11
4'''	72,1	3,32; m
5'''	70,6	3,44; m
6'''	18,4	1,12; d; 6,06
Açúcar 3	3-O-(1$\rightarrow$2)-β-D-xilopiranosil	
1''''	105,1	4,60; d; 7,22
2''''	74,4	3,08; m
3''''	76,7	3,17; m
4''''	69,9	3,31; m
5''''	66,3	3,09/3,73; dd/dd; 4,90/11,09

d: dupleteo; m: multipleteo; sl: simpleto largo

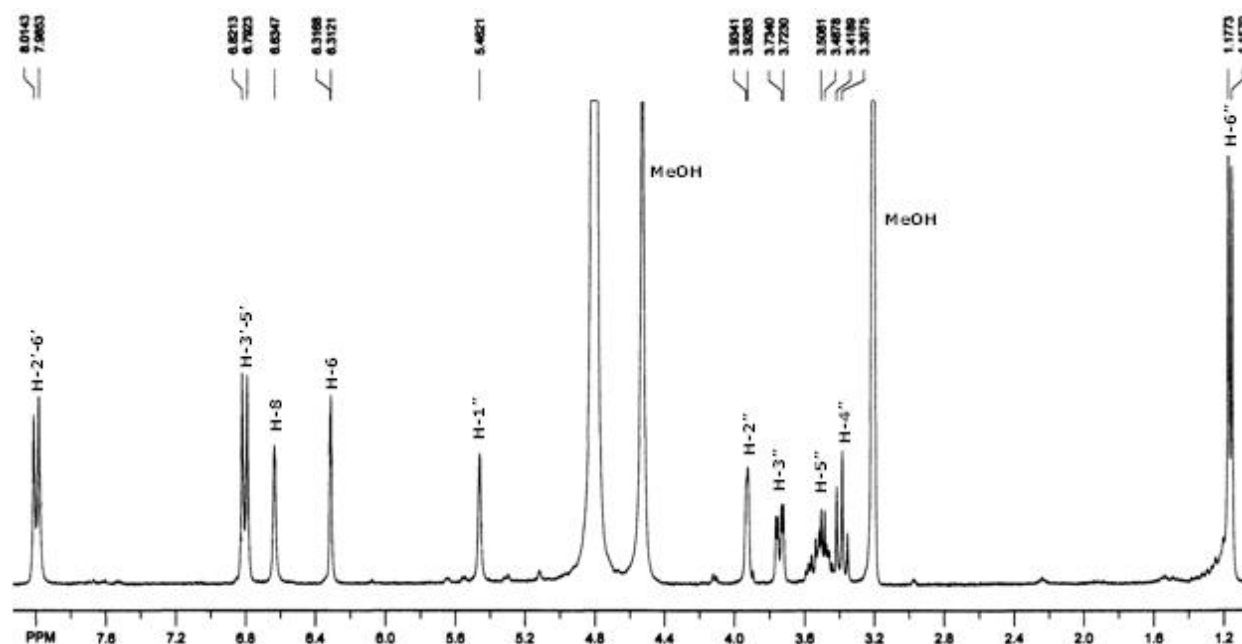
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF6

O flavonóide codificado como **SF6**, isolado a partir da fração butanólica das folhas de *S. dendroideum* (partida Sd04), apresentou-se sob a forma de pó amarelo, com uma massa total isolada de 20,6 mg.

A proposta estrutural para **SF6** foi baseada nos dados obtidos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , dos experimentos bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC, todos obtidos em CD_3OD (concentração: 10 mg/mL), e confirmada pela espectrometria de massas.

RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H obtido para o flavonóide **SF6** (**Espectro 35**) apresentou o mesmo padrão de aglicona apresentado pelos flavonóides descritos anteriormente. Foram observados sinais 6,81 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,69$ Hz) e 8,00 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,69$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-3',5' e H-2',6' do anel B, respectivamente, e sinais em 6,31 ppm (H-6, d, $J_{\text{meta}} = 1,38$ Hz) e 6,63 ppm (H-8, d, $J_{\text{meta}} = 1,38$ Hz), atribuídos aos hidrogênios do anel A.



Espectro 35: Espectro de RMN ^1H (300,16 MHz) de **SF6** (CD_3OD)

Na faixa entre 1,0 e 5,5 ppm do espectro de RMN ^1H , correspondente à região glicosídica do flavonóide **SF6**, apenas um sinal de hidrogênio anomérico (H-1'' : 5,46 ppm) foi observado, sendo este compatível com O-glicosilação diretamente no anel da aglicona do kaempferol. O simpleto largo apresentado por H-1'' , cuja constante de acoplamento não pode ser determinada, indica uma relação *trans*-diequatorial entre os hidrogênios das posições 1 e 2 do açúcar.

De acordo com o padrão observado para as unidades sacarídicas apresentadas pelos flavonóides caracterizados até o momento, e pela presença de um duplete em 1,13 ppm (3H; $J = 6,09 \text{ Hz}$), referente aos hidrogênios metílicos de um açúcar, evidencia-se a presença de uma unidade de ramnose na estrutura de **SF6**.

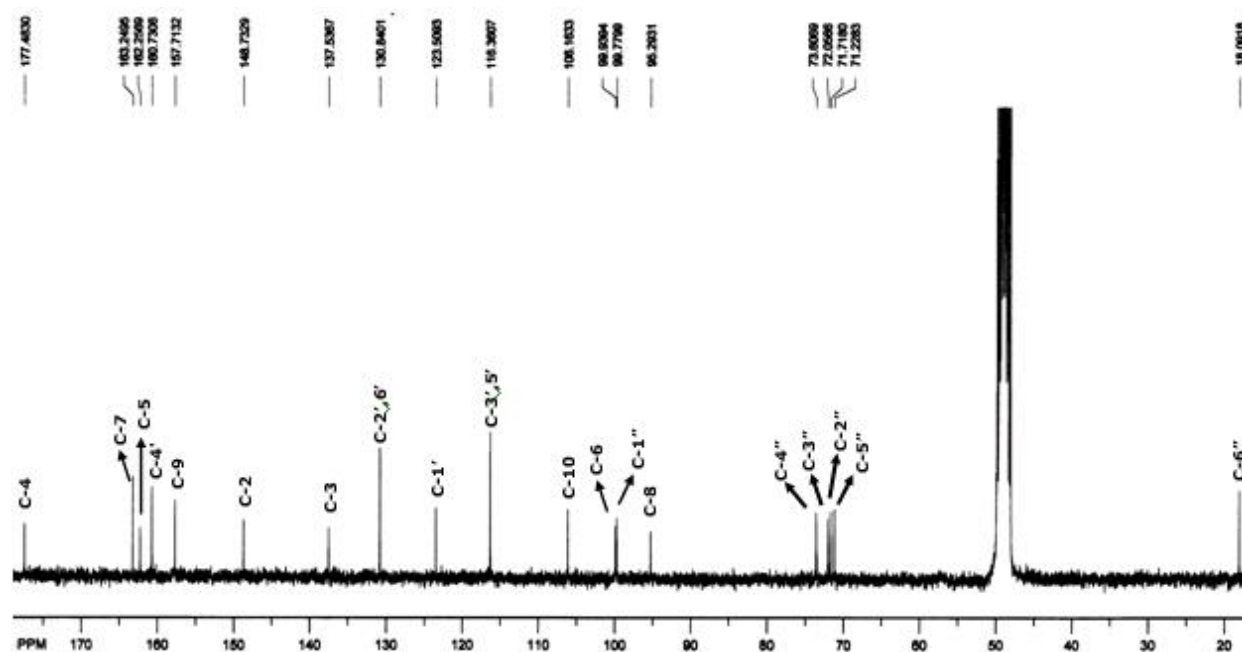
O flavonóide **SF6** apresenta apenas uma unidade glicosídica, portanto, a região entre 3,93 e 3,36 ppm no espectro de RMN ^1H referente aos demais hidrogênios da unidade sacarídica deste flavonóide aparece muito mais simplificada. A multiplicidade de cada sinal observado assim como o deslocamento de cada hidrogênio encontram-se listados na **Tabela 12** (pág. 115).

A posição da unidade glicosídica pode ser definida no carbono 7 do kaempferol pelo fato dos sinais observados para H-6 (6,31 ppm) e H-8 (6,63 ppm) se apresentarem mais desblindados do que o normalmente encontrado quando a hidroxila está livre naquele carbono (6,20 e 6,40 ppm, respectivamente). Além disso, os sinais observados em 5,46 e 1,17 ppm estão de acordo com os deslocamentos químicos observados para o hidrogênio anomérico e os hidrogênios metílicos de uma ramnose localizada na posição 7 do kaempferol (MARKHAM & GEIGER, 1994).

De acordo com esses dados parciais é possível propor para o flavonóide **SF6** a estrutura do kaempferol 7-O-ramnosídeo.

RMN ^{13}C

O espectro de RMN ^{13}C forneceu 19 sinais (**Espectro 36**). Treze destes sinais correspondem aos carbonos da aglicona e os sinais restantes (seis) são referentes à única unidade de carboidrato.



Espectro 36: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de **SF6** (CD_3OD)

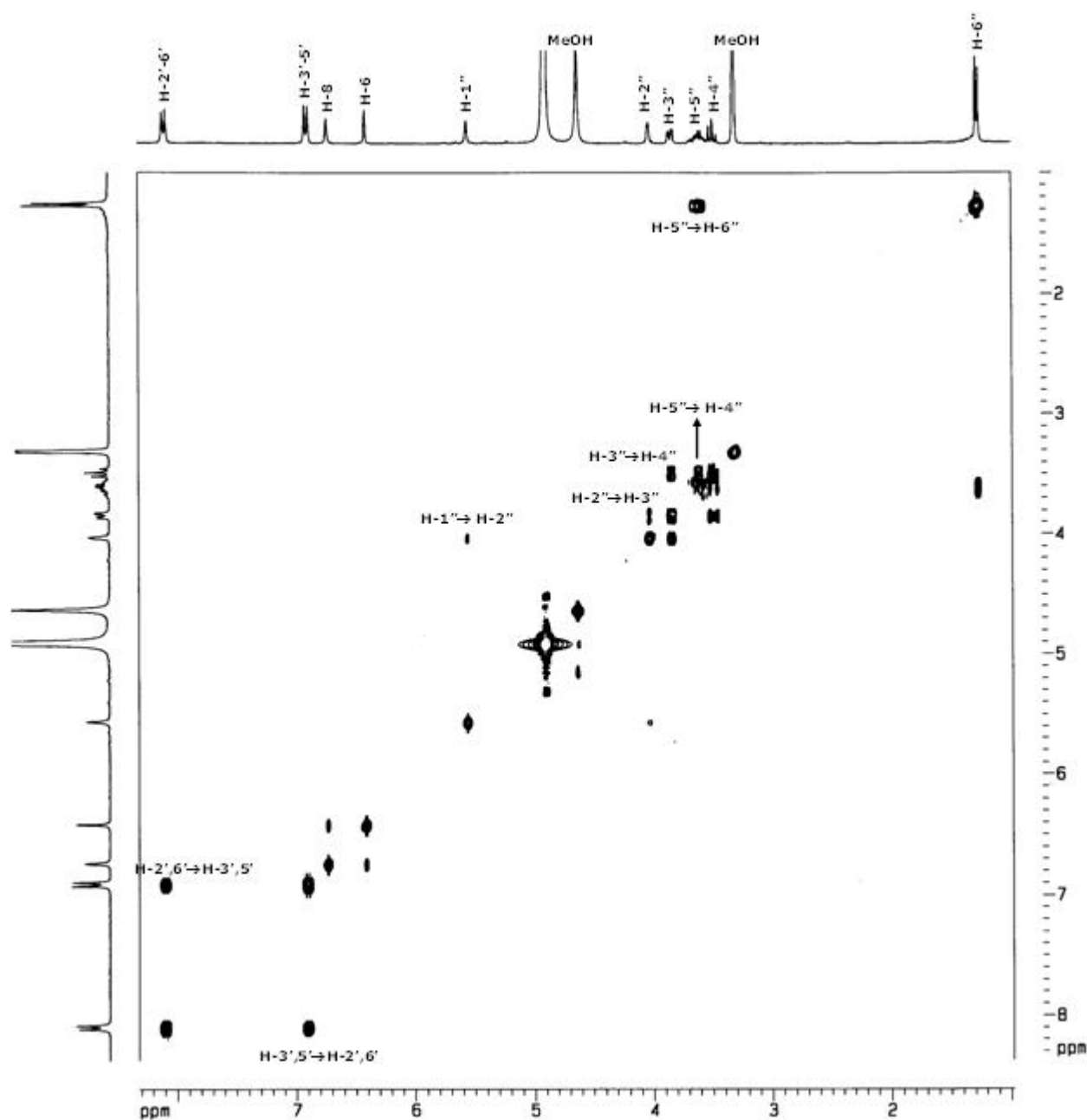
Os sinais de RMN ^{13}C para **SF6** confirmam a estrutura do kaempferol mono-substituído na posição 7 por uma unidade sacarídica.

O deslocamento atribuído ao carbono anomérico (C-1'' : 99,8 ppm) confirma a presença de O-glicosilação, o que já havia sido evidenciado no espectro de RMN ^1H . Os demais valores de RMN ^{13}C confirmam a estrutura da ramnose como a unidade glicosídica presente em **SF6**.

A substituição em C-7 da aglicona pela molécula de ramnose pode ser confirmada pelo valor atribuído ao C-2 do kaempferol (148,7 ppm), um sinal bem mais protegido quando comparado ao C-2 dos flavonóides **SF1** (δ 158,3), **SF2** (δ 157,6), **SF3** (δ 157,3), **SF4** (δ 157,2) e **SF5** (δ 156,5), que apresentavam glicosilação na posição 3.

COSY

A partir da análise do espectro de RMN 2D COSY (**Espectro 37**) foi possível estabelecer os deslocamentos químicos de todos os hidrogênios da molécula de açúcar através do acoplamento seqüenciado dos hidrogênios (ver assinalamento no espectro abaixo). Além disso, observou-se o acoplamento entre H-2',6' com H-3',5' da aglicona do kaempferol, confirmando o padrão 4'-OH para o anel B evidenciado nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

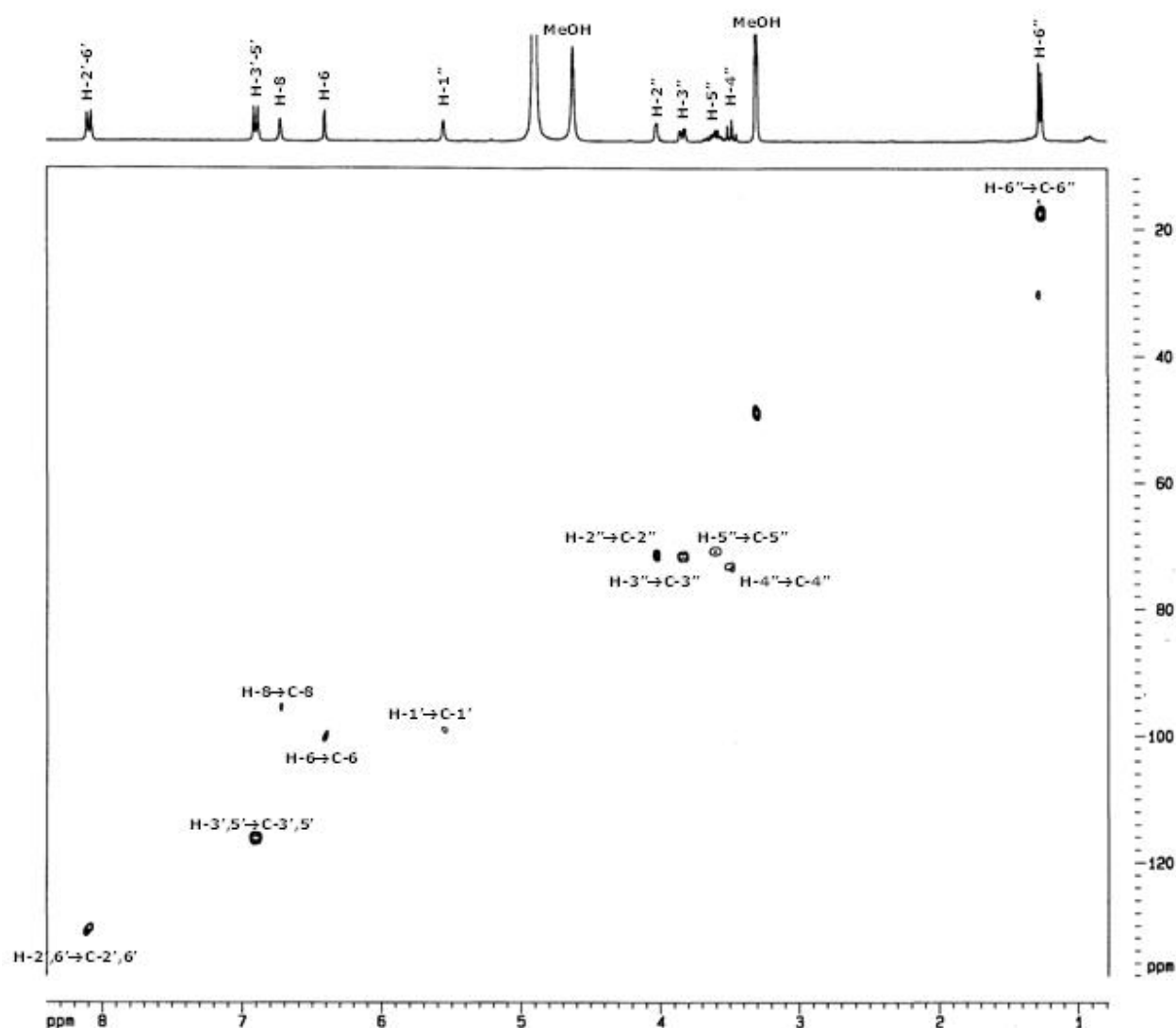


Espectro 37: Espectro de RMN 2D COSY (300,16 MHz) de **SF6** (CD_3OD)

HMQC

A partir da análise da correlação direta heteronuclear ^1H - ^{13}C do espectro de RMN 2D HMQC (**Espectro 38**), foi possível correlacionar os hidrogênios da unidade de ramnose e do kaempferol aos seus respectivos carbonos.

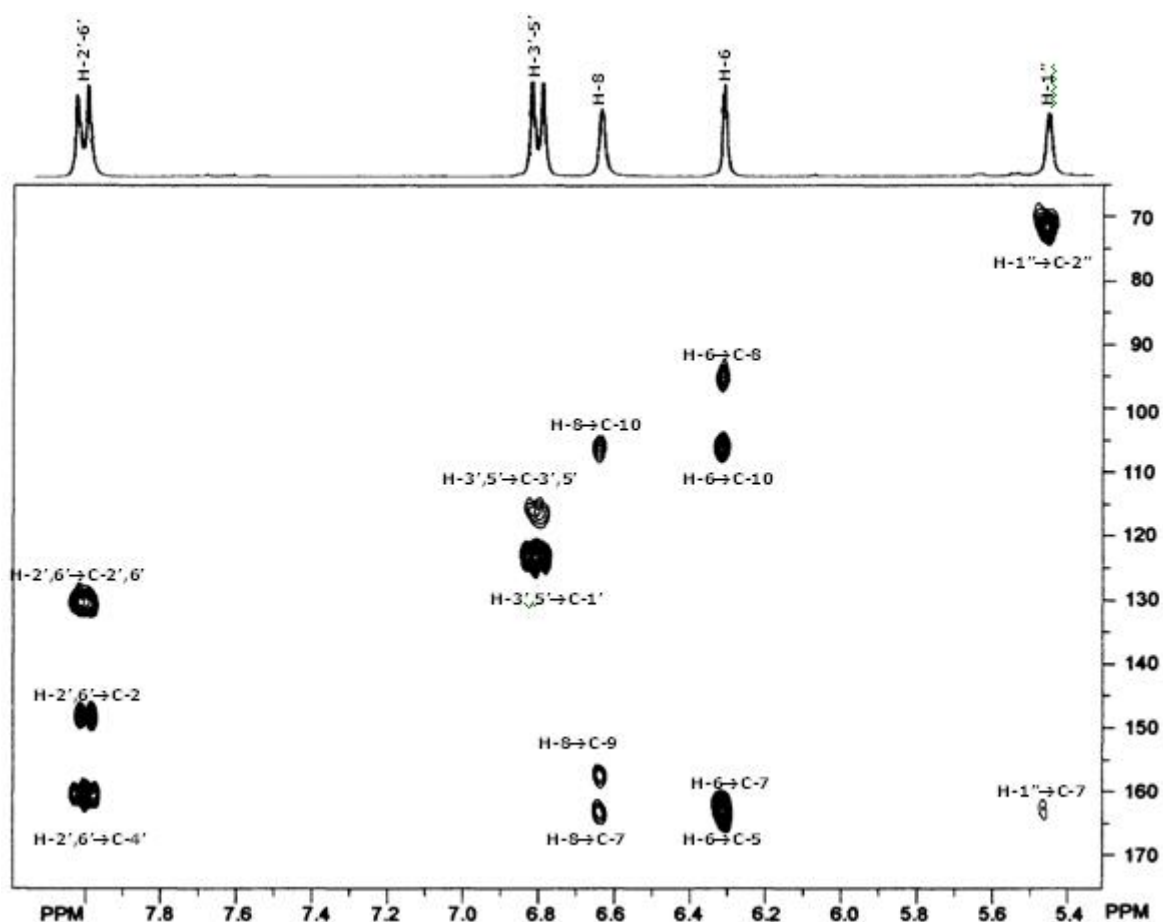
Portanto, a partir dos dados obtidos no espectro de HMQC e COSY, foi possível confirmar a molécula de açúcar presente em **SF6** como sendo uma L-ramnopiranosose.



Espectro 38: Espectro de RMN 2D HMQC (300,16 x 75,47 MHz) de **SF6** (CD_3OD)

HMBC

A análise das correlações a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ do espectro de RMN 2D HMBC (**Espectro 39**) permitiu confirmar a posição da ramnose em C-7 com base nas correlações observadas entre o H-1''' da ramnose (5,54 ppm) e o C-7 (162,5 ppm) do kaempferol.



Espectro 39: Expansão da faixa de 5,3 a 8,2 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN HMBC 2D (300,16 x 75,47 MHz) de **SF6** (CD_3OD)

Após a análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C mono e bidimensionais e comparação com os dados da literatura (PIZZOLATTI *et al.*, 2003), confirma-se para **SF6** a estrutura do kaempferol-7-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (**Figura 14**). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a molécula estão listados na **Tabela 12**.

Este flavonóide, também conhecido como α -ramnoisorobina, também foi isolado em outras espécies do gênero *Sedum* como *S. pallescens* (NIEMANN *et al.*, 1976), *S. ewersii* (KRASNOV & KONDAREVA, 1976), *S. caucasicum* (ZAITSEV *et al.*, 1983) e *S. maximum* (WOLBIŚ, 1987b).

Dentre as atividades biológicas relatadas para **SF6** encontram-se as atividades antiinflamatória (PATHAK *et al.*, 1991) e antioxidante (KEMERTELIDZE *et al.*, 2000).

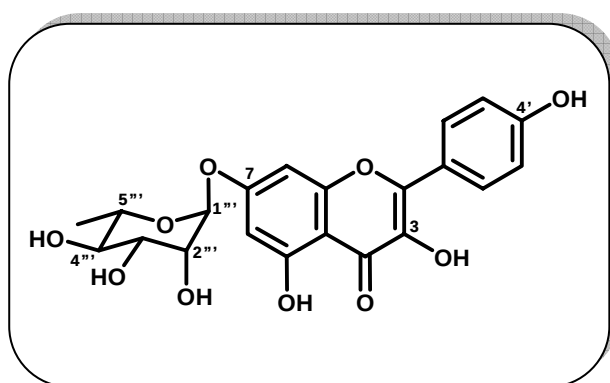


Figura 14: Estrutura de **SF6**

Tabela 12: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **SF6** (CD_3OD).

Aglicona	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm); m; J (Hz)
2	148,7	-
3	137,5	-
4	177,5	-
5	162,3	-
6	99,9	6,31; d; 1,38
7	163,3	-
8	95,3	6,63; d; 1,38
9	157,7	-
10	106,2	-
1'	123,5	-
2',6'	130,8	8,00; d; 8,69
3',5'	116,4	6,81; d; 8,69
4'	160,7	-
Açúcar 1	7-O- α -L-ramnopiranosídeo	
1''	99,8	5,46; s
2''	71,7	4,02; m
3''	72,1	3,82; dd; 3,43/9,34
4''	73,6	3,50; q; 9,43
5''	71,2	3,59; m
6''	18,1	1,26; d; 6,08

d: duplete; dd: duplo duplete m: multiplete; q: quarteto; s: simpleto

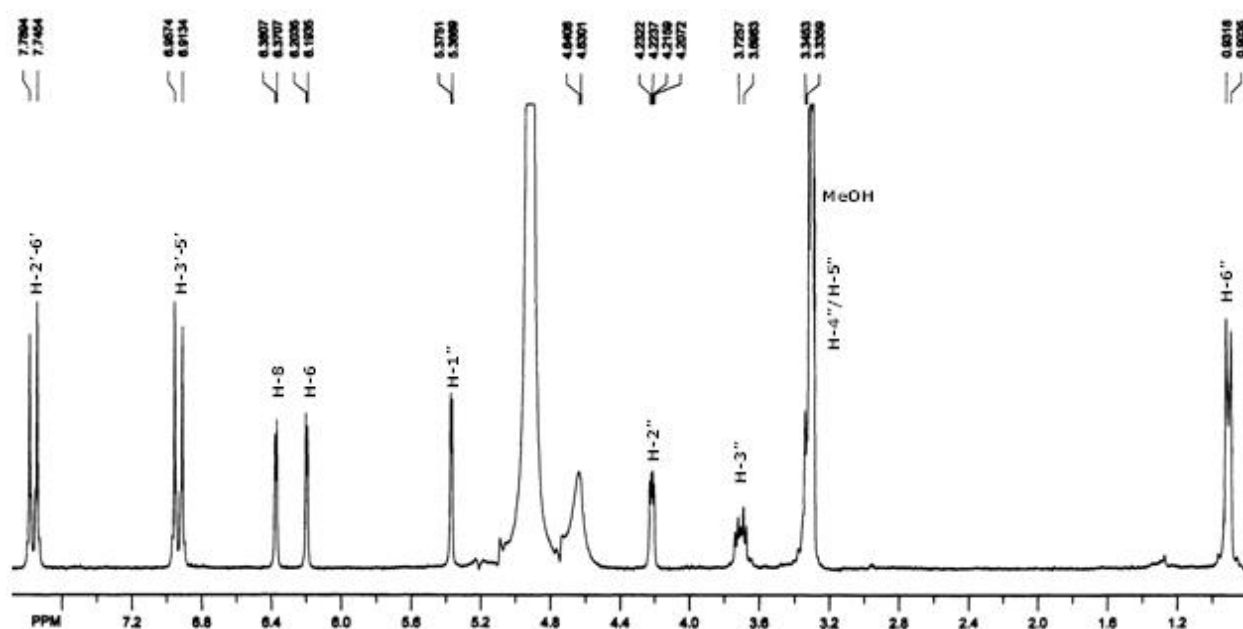
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF7

O flavonóide codificado como **SF7**, isolado a partir da fração butanólica das folhas (partida Sd04), apresentou-se sob a forma de pó amarelo, com uma massa total isolada de 3,5 mg.

A proposta estrutural para **SF7** foi baseada nos dados obtidos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , dos experimentos bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC, todos obtidos em CD_3OD (concentração: 7 mg/mL), e confirmada pela espectrometria de massas.

RMN ¹H

O espectro de RMN ^1H de **SF7 (Espectro 40)** apresentou sinais em 6,94 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,80$ Hz) e 7,77 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,80$ Hz), que foram atribuídos aos hidrogênios H-3',5' e H-2',6' do anel B, respectivamente, e sinais em 6,20 ppm (H-6, d, $J_{\text{meta}} = 2,00$ Hz) e 6,38 ppm (H-8, d, $J_{\text{meta}} = 2,00$ Hz), atribuídos aos hidrogênios do anel A do flavonóide. Esses sinais são compatíveis com a aglicona do kaempferol.



Espectro 40: Espectro de RMN ^1H (200,16 MHz) de **SF7** (CD_3OD)

Apesar da aglicona presente na estrutura de **SF7** ser a mesma apresentada pelos flavonóides descritos anteriormente (**SF1**, **SF2**, **SF3**, **SF4**, **SF5** e **SF6**), verifica-se que os deslocamentos para H-6 e H-8 (6,20 e 6,38 ppm, respectivamente) do kaempferol apresentam-se mais blindados quando comparado aos deslocamentos observados para os outros flavonóides. Esse fato indica que, apesar da aglicona ser a mesma, o padrão de glicosilação é diferente.

Como já discutido anteriormente, a glicosilação na posição 7 da aglicona de um flavonóide desloca os hidrogênios das posições 6 e 8 para uma região mais desprotegida. Já quando a hidroxila desta posição encontra-se livre, os sinais para H-6 e H-8 apresentam-se mais blindados (6,20 e 6,40 ppm, respectivamente) (DE ALMEIDA *et al.*, 1998; PIZZOLATTI *et al.*, 2003). Portanto, **SF7** difere dos outros flavonóides por não apresentar glicosilação na posição 7 do kaempferol.

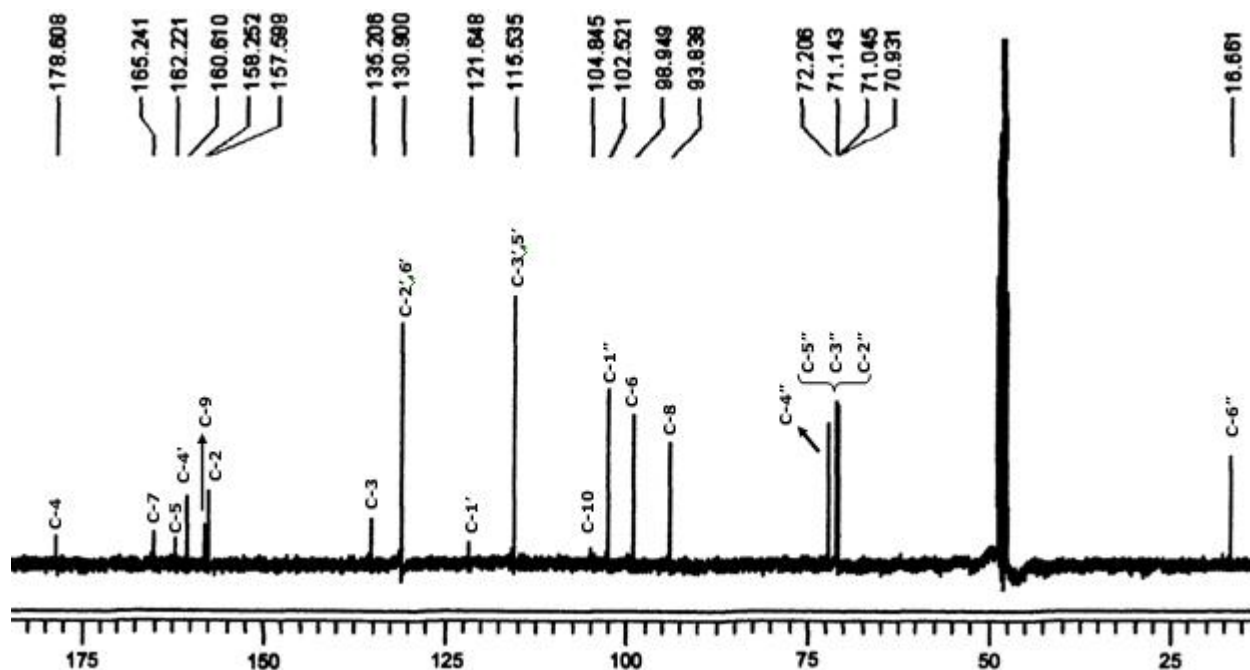
Assim como observado para **SF6**, a faixa entre 0,5 e 5,4 ppm do espectro de RMN ^1H , correspondente à região glicosídica do flavonóide, apresenta apenas um sinal de hidrogênio anomérico (H-1'': 5,37 ppm), sendo este compatível com O-glicosilação diretamente no anel da aglicona. A constante de acoplamento para este hidrogênio ($J = 1,63 \text{ Hz}$) indica uma relação *trans*-diequatorial entre H-1'' e H-2''.

Em 0,92 ppm observa-se um duplete (3H; $J = 5,66 \text{ Hz}$) correspondente à metila terminal do açúcar. Como já discutido para os outros flavonóides, a presença desta metila somada à presença de um hidrogênio anomérico com J pequeno sugerem que esta unidade sacarídica seja uma ramnose.

De acordo com esses dados, propõe-se para **SF7** a estrutura do kaempferol mono glicosilado na posição 3 por uma unidade de ramnose.

RMN ^{13}C

O espectro de RMN ^{13}C forneceu 19 sinais (**Espectro 41**). Treze destes sinais correspondem aos carbonos da aglicona e os sinais restantes (seis) são referentes à única unidade de carboidrato (hexose).



Espectro 41: Espectro de RMN ^{13}C (100,63 MHz) para **SF7** (CD_3OD)

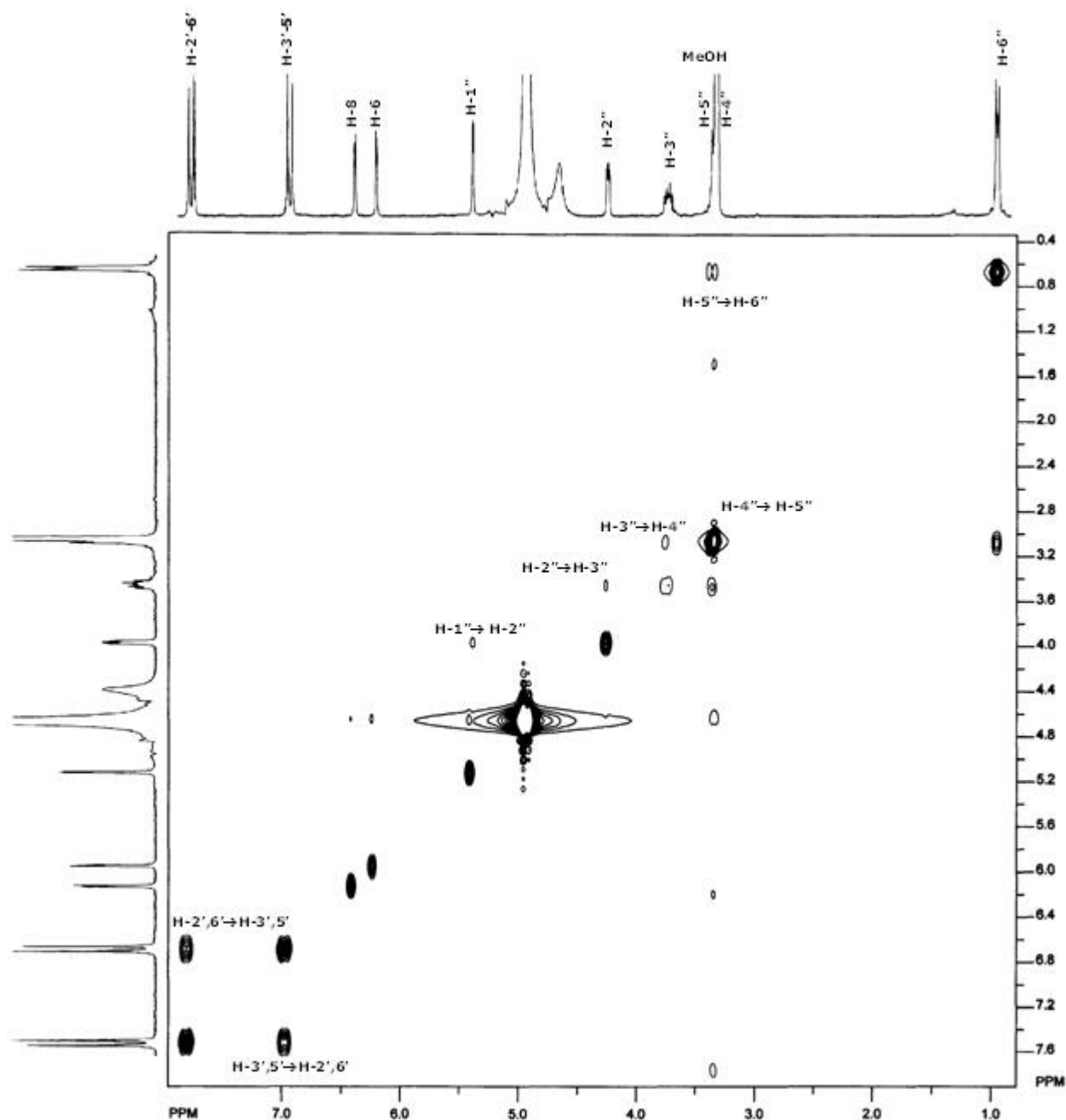
Os sinais obtidos no espectro de RMN ^{13}C de **SF7** confirmam a estrutura do kaempferol mono substituído na posição 3 por uma ramnose.

O deslocamento atribuído ao carbono anomérico (C-1'' : 102,5 ppm) confirma a presença de *O*-glicosilação, o que já havia sido evidenciado no espectro de RMN ^1H .

A substituição em C-3 da aglicona pela molécula de ramnose pode ser confirmada pelo valor atribuído ao C-2 do kaempferol (158,3 ppm), um sinal mais desprotegido quando comparado ao C-2 do flavonóide **SF6** (148,7 ppm), que apresenta a hidroxila da posição 3 do kaempferol livre.

COSY

A partir da análise do espectro de RMN 2D COSY (**Espectro 42**) foi possível estabelecer os deslocamentos de todos os hidrogênios da molécula de açúcar através do acoplamento seqüenciado dos hidrogênios (ver assinalamento no espectro abaixo). Além disso, observou-se o acoplamento entre H-2',6' com H-3',5', confirmando o padrão 4'-OH para o anel B do kaempferol, evidenciado nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

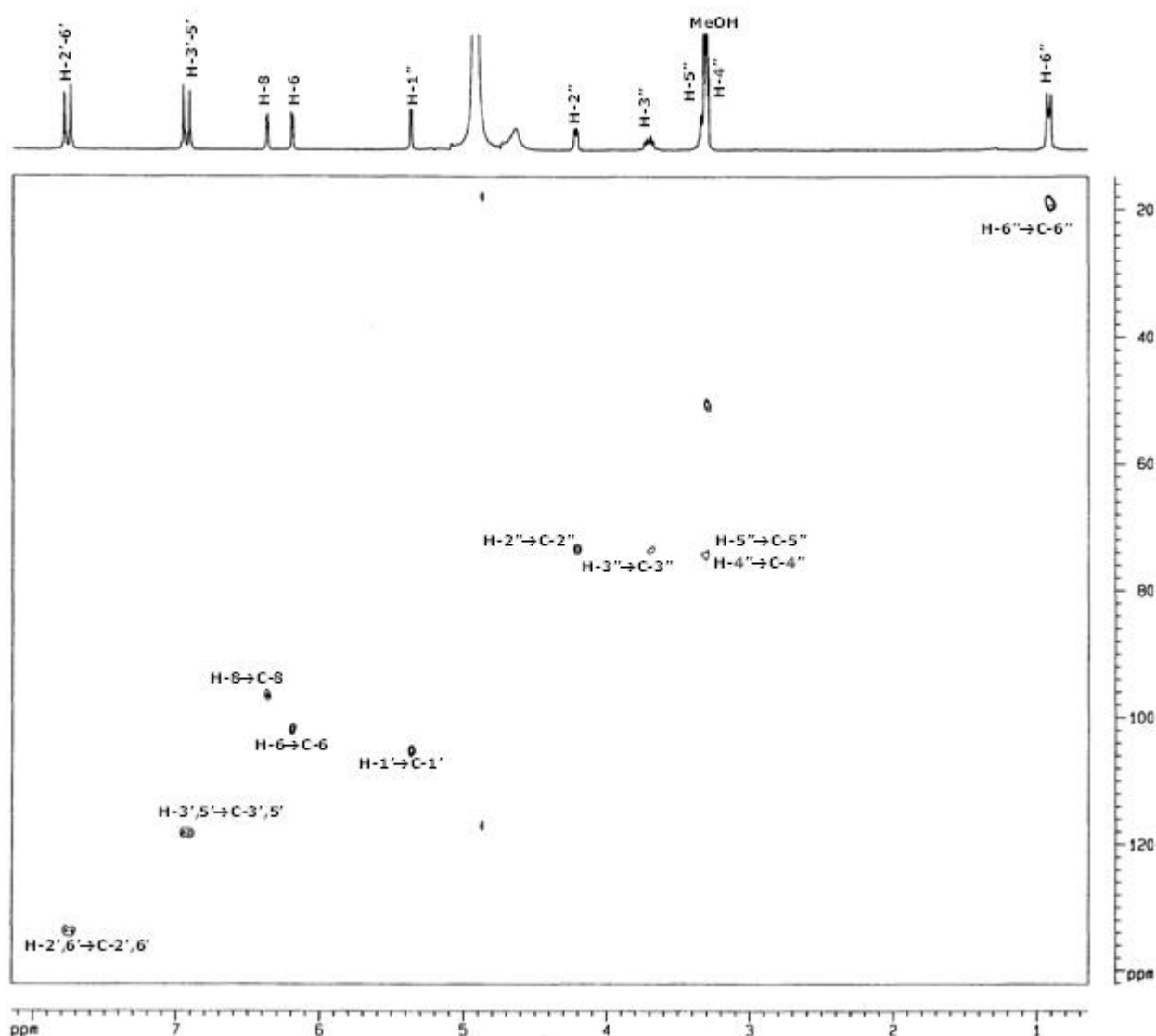


Espectro 42: Espectro de RMN 2D COSY (200,16 MHz) de **SF7** (CD_3OD)

HMQC

A análise do espectro de RMN bidimensional de HMQC (**Espectro 43**) permitiu correlacionar os hidrogênios da ramnose e da aglicona do kaempferol aos seus respectivos carbonos. Os dados obtidos estão de acordo com os valores observados na literatura.

Com base nesses dados foi possível confirmar a molécula de açúcar presente em **SF7** como sendo uma L-ramnopirranose.



Espectro 43: Espectro de RMN 2D HMQC (200,16 x 50,33 MHz) de **SF7** (CD₃OD)

HMBC

O espectro de RMN 2D HMBC mostrou a correlação a longa distância entre H-1'' (5,37 ppm) e C-2'' (70,9 ppm), porém não foi possível observar a correlação desse hidrogênio com o carbono 3 do kaempferol.

Apesar dos dados do espectro de RMN 2D HMBC não permitirem a confirmação da posição da unidade de ramnose, os dados obtidos no espectro de RMN ^1H já evidenciavam a sua posição (δ 5,37 em C-3). Além disso, dados de RMN ^{13}C da literatura para flavonóides com esqueleto de kaempferol substituído na posição 3 por ramnose (AGRAWAL, 1989; DE ALMEIDA *et al.*, 1998) confirmam essa proposta.

Após a análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C mono e bidimensionais e comparação com os dados da literatura (DE ALMEIDA *et al.*, 1998), confirma-se para **SF7** a estrutura do kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo, também conhecido como afzelina (**Figura 15**). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a molécula estão listados na **Tabela 13**.

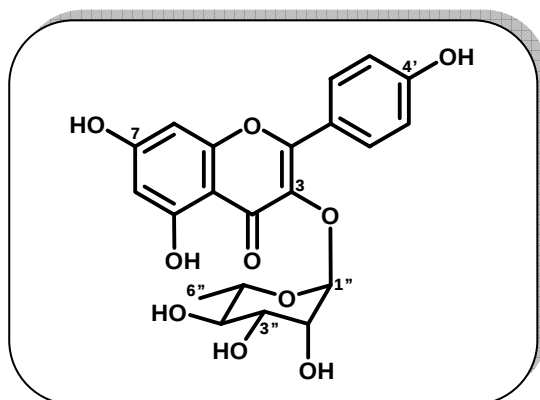


Figura 15: Estrutura de **SF7**

O flavonóide afzelina possui uma grande distribuição dentro do gênero *Sedum*, podendo ser encontrado em *S. acre*, *S. hybridum* (KORUL'KIN, 2001), *S. sediforme* (SAKAR *et al.*, 1993), entre outros.

Este flavonóide possui uma grande variedade de atividades biológicas. Há relatos para as atividades antioxidante moderada (EXARCHOU *et al.*, 2006), antiviral (DE ALMEIDA *et al.*, 1998) e inibidora da peroxidação lipídica (ADHIKARI *et al.*, 2006).

Tabela 13: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **SF7** (CD_3OD).

Aglicona	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm); m; J (Hz)
2	158,3	-
3	135,2	-
4	178,6	-
5	162,2	-
6	99,0	6,20; d; 2,00
7	165,2	-
8	93,8	6,38; d; 2,00
9	157,6	-
10	104,9	-
1'	121,6	-
2',6'	130,1	7,77; d; 8,80
3',5'	115,5	6,94; d; 8,80
4'	160,6	-
Açúcar 1	3-O-α-L-ramnopiranosídeo	
1''	102,5	5,37; d; 1,63
2''	70,9	4,22; dd
3''	71,0	3,71; dd;
4''	72,2	3,34; m
5''	71,1	3,34; m
6''	16,7	0,92; d; 5,66

d: duplete; dd: duplo duplete m: multiplete

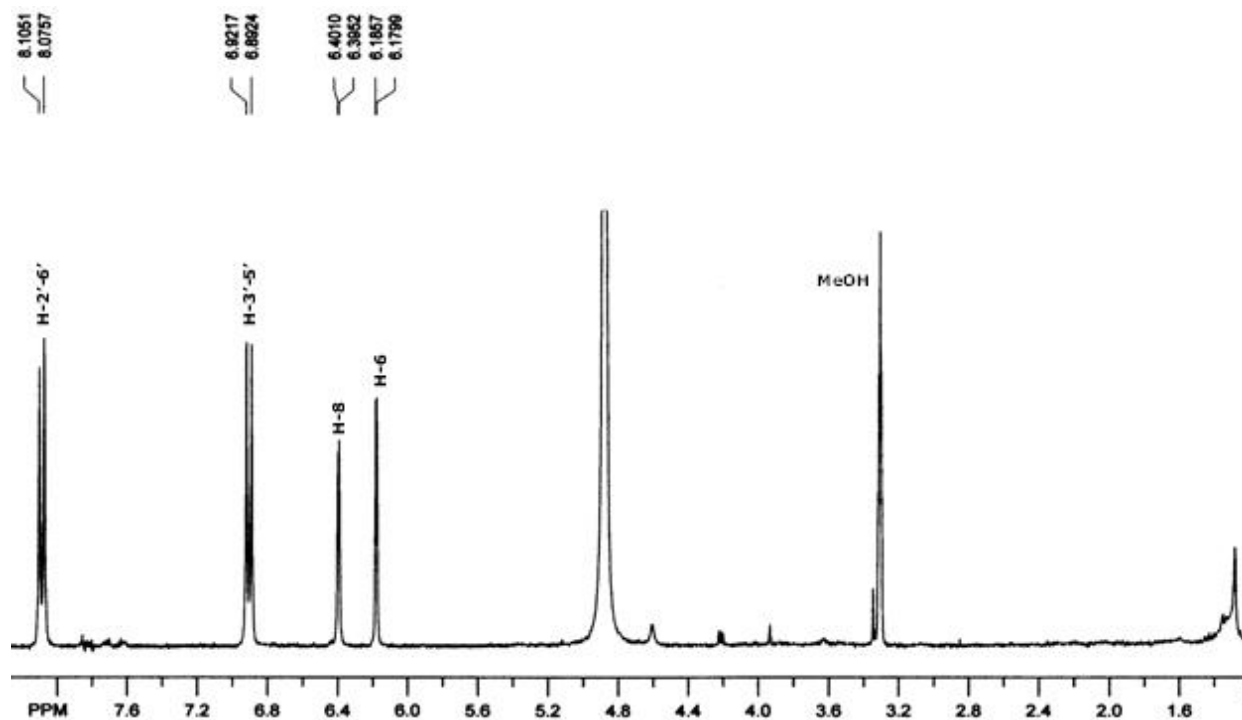
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SF8

O flavonóide codificado como **SF8**, isolado a partir da fração em acetato de etila das folhas (partida Sd04), apresentou-se sob a forma de pó amarelo, com uma massa total isolada de 2,0 mg.

A proposta estrutural para **SF8** foi baseada nos dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtidos em CD_3OD (concentração 2 mg/mL).

RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H para **SF8** (**Espectro 44**) apresentou somente sinais para hidrogênios aromáticos. Foram observados sinais em 6,91 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,81$ Hz) e 8,09 ppm (2H; d; $J_{\text{orto}} = 8,81$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-3',5' e H-2',6' do anel B, respectivamente, e sinais em 6,18 ppm (H-6, d, $J_{\text{meta}} = 1,74$ Hz) e 6,40 ppm (H-8, d, $J_{\text{meta}} = 1,74$ Hz), atribuídos aos hidrogênios do anel A do flavonóide. Esses sinais são compatíveis com a aglicona do kaempferol.

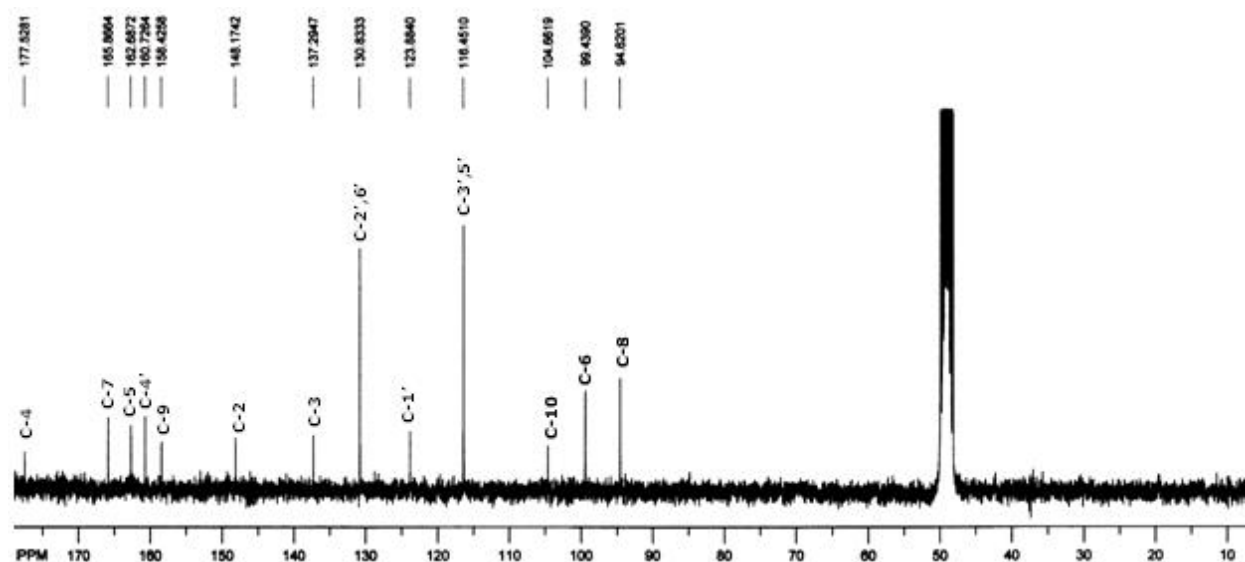


Espectro 44: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) para **SF8** (CD_3OD)

RMN ^{13}C e DEPT 135

Os dados do espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 45**) foram compatíveis com aglicona do kaempferol.

Os sinais de RMN ^1H e ^{13}C para **SF8** (**Figura 8**; pág. 65) estão listados na **Tabela 14**.



Espectro 45: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) de **SF8** (CD_3OD)

Tabela 14: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **SF8** (CD_3OD).

Aglicona	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm); m; J (Hz)
2	148,2	-
3	137,3	-
4	177,5	-
5	162,7	-
6	99,4	6,18; d; 1,74
7	165,9	-
8	94,6	6,40; d; 1,74
9	158,7	-
10	104,7	-
1'	123,9	-
2',6'	130,8	8,09; d; 8,81
3',5'	116,4	6,91; d; 8,81
4'	160,7	-

d: duplete

**ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS
FLAVONÓIDES ISOLADOS DOS CAULES**

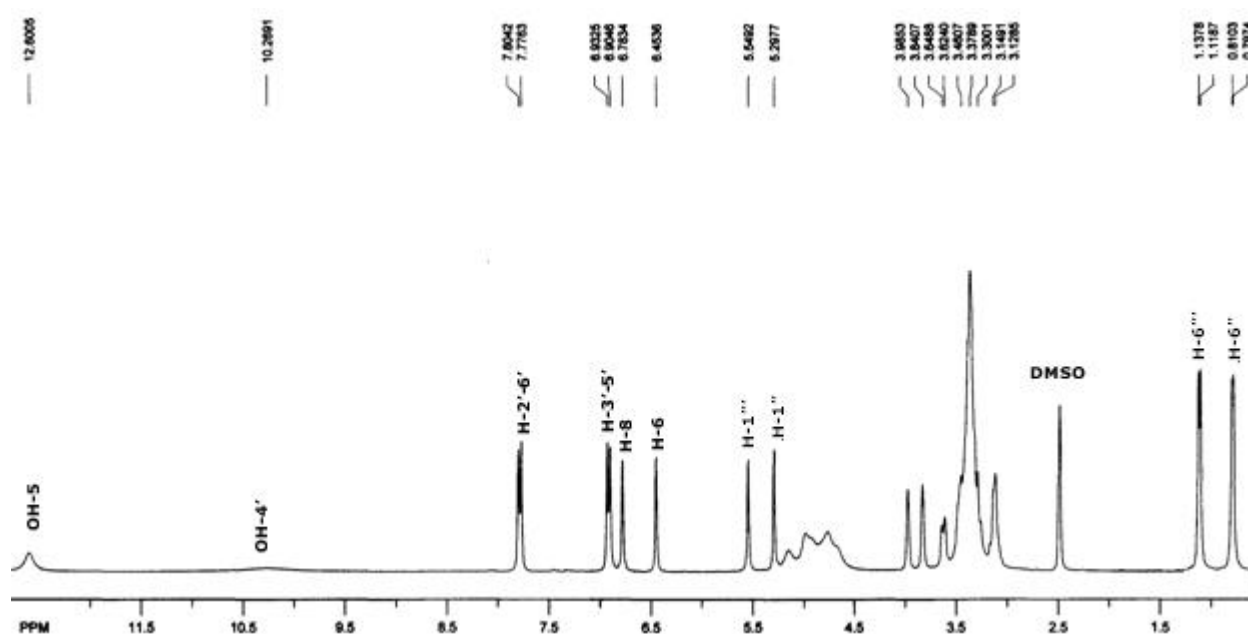
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE **SC1**

O flavonóide codificado como **SC1**, isolado a partir da fração butanólica dos caules, apresentou-se sob a forma de pó amorfo amarelo-pálido, com uma massa total de 19,1 mg.

A proposta estrutural para o flavonóide **SC1** foi baseada nos dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtidos em $\text{DMSO}-d_6$ (concentração 40 mg/mL) e confirmada pela espectrometria de massas.

RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H para **SC1** (**Espectro 46**) apresentou o mesmo padrão de sinais observados para o flavonóide **SF1**.



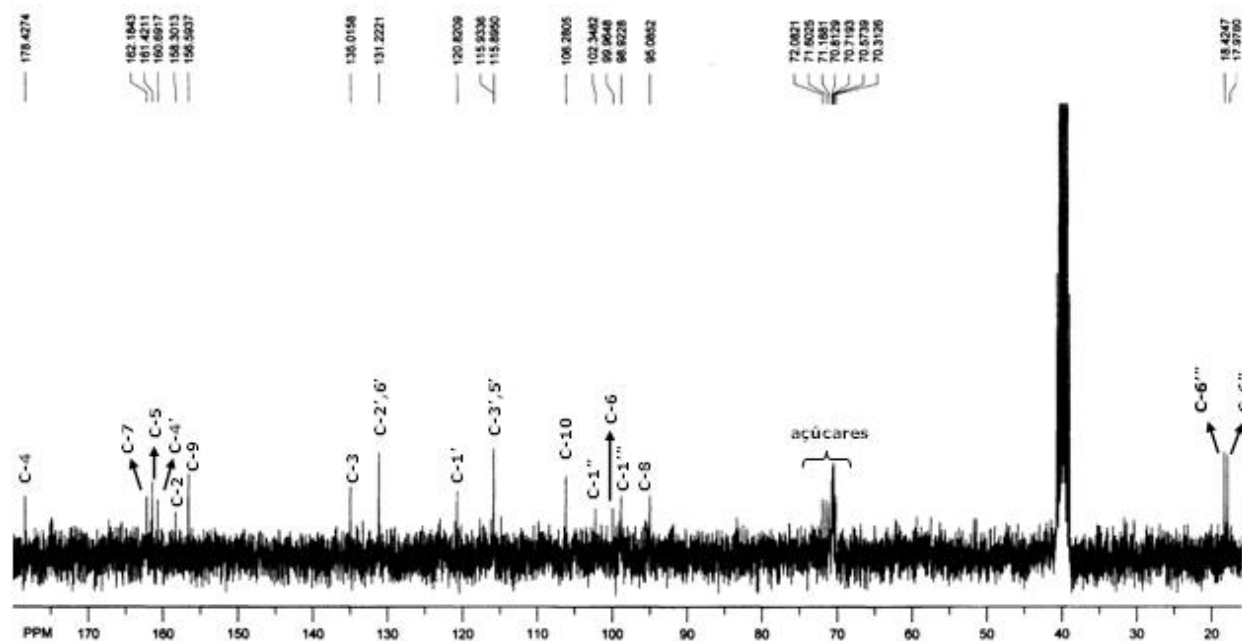
Espectro 46: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de **SC1** ($\text{DMSO}-d_6$)

Os sinais observados na faixa de 6,3 a 8,0 ppm do espectro de RMN ^1H de **SC1**, correspondente à região aromática deste flavonóide, foram compatíveis com o esqueleto do kaempferol. Os sinais em 7,79 ppm (H-2',6'; d; $J_{\text{orto}} = 8,38$ Hz) e 6,92 ppm (H-3',5'; d; $J_{\text{orto}} = 8,38$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios do anel B e os sinais em 6,45 ppm (H-6; s) e 6,78 ppm (H-8; s) foram atribuídos aos hidrogênios do anel A do flavonóide.

Na região entre 0,8 e 5,6 ppm do espectro de RMN ^1H de **SC1** foram observados sinais compatíveis com duas moléculas de ramnose, como observado para **SF1**.

RMN ^{13}C

O espectro de RMN ^{13}C de **SC1** forneceu 24 sinais (**Espectro 47**), todos com os mesmos deslocamentos químicos apresentados pelo flavonóide **SF1**.



Espectro 47: Espectro de RMN ^{13}C (75,47 MHz) para **SC1** (DMSO- d_6)

Após análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com os dados de **SF1**, confirma-se para **SC1** a estrutura do kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo – kaempferitrina (**Figura 9**; página 70).

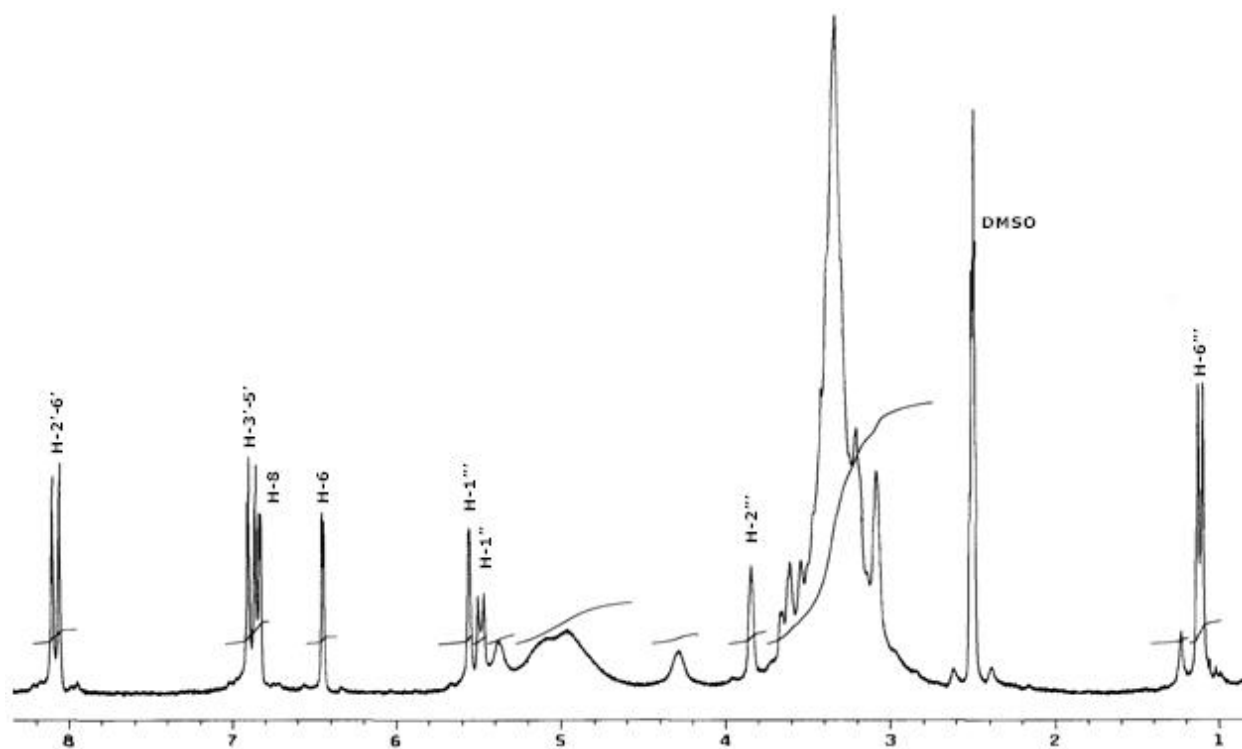
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE **SC2**

O flavonóide codificado como **SC2**, isolado a partir da fração butanólica dos caules, apresentou-se sob a forma de cristais amarelos, com massa total isolada de 6,9 mg.

A proposta estrutural para o flavonóide **SC2** foi baseada nos dados de RMN ^1H obtidos em $\text{DMSO}-d_6$ (concentração 12 mg/mL) e confirmada pela espectrometria de massas.

RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H obtido para o flavonóide **SC2** (**Espectro 48**) apresentou o mesmo padrão de sinais apresentado pelo flavonóide **SF2**, tanto para a aglicona quanto para a parte glicosídica.



Espectro 48: Espectro de RMN ^1H (199,97 MHz) de **SC2** ($\text{DMSO}-d_6$).

Para a aglicona foram observados sinais em 6,88 ppm (H-3',5'; d; $J_{\text{orto}} = 8,88$ Hz) e 8,08 ppm (H-2',6'; d; $J_{\text{orto}} = 8,88$ Hz), atribuídos aos hidrogênios do anel B, e 6,45 ppm (H-6, d, $J_{\text{meta}} = 2,11$ Hz) e 6,83 ppm (H-8, d, $J_{\text{meta}} = 2,11$ Hz), atribuídos aos hidrogênios do anel A.

Na faixa entre 1,0 e 5,6 ppm do espectro de RMN ^1H de **SC2**, correspondente à região glicosídica do flavonóide, dois sinais de hidrogênios anoméricos em 5,48 ppm (H-1"; d; $J = 7,42$ Hz), atribuído à glicose, e em 5,55 ppm (H-1'''; s), atribuído à ramnose, foram compatíveis com O-glicosilação diretamente no anel da aglicona.

A presença da ramnose também pode ser evidenciada pelo sinal em δ 1,12 ($J = 5,95$ Hz), atribuído aos hidrogênios metílicos. Com base no deslocamento observado para o hidrogênio anomérico da ramnose e de seus hidrogênios metílicos, esta unidade está localizada na posição 7 do kaempferol (MARKHAM & GEIGER, 1994).

A comparação dos espectros de RMN ^1H de **SC2** e **SF2** mostrou que ambos os flavonóides apresentam a mesma estrutura. Este fato pôde ser confirmado pelo tempo de retenção na cromatografia líquida de alta eficiência e pelo valor de íon molecular obtido para as duas substâncias.

Após a análise de todos os dados, confirma-se para **SC2** a estrutura do kaempferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**Figura 10**; página 79).

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SC3

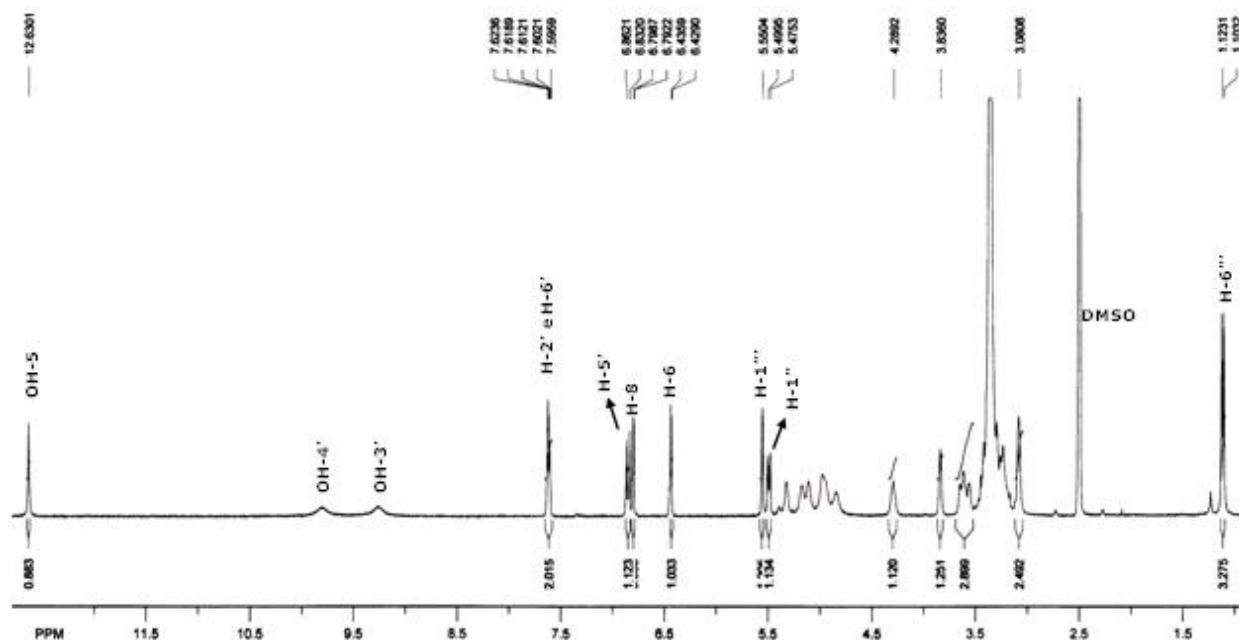
O flavonóide codificado como **SC3**, isolado a partir da fração butanólica dos caules, apresentou-se sob a forma de grânulos amarelos, com massa total de 1,0 mg.

A proposta estrutural para o flavonóide **SC3** foi baseada nos dados dos espectros de RMN ^1H , dos experimentos bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC, todos obtidos em DMSO- d_6 (concentração 2 mg/mL) e confirmada pela espectrometria de massas. A análise de RMN ^{13}C não foi realizada devido a pouca massa isolada do flavonóide.

RMN ¹H

O espectro de RMN ^1H de **SC3** (**Espectro 49**) mostrou um padrão de aglicona diferente do observado até o momento para os outros flavonóides já isolados.

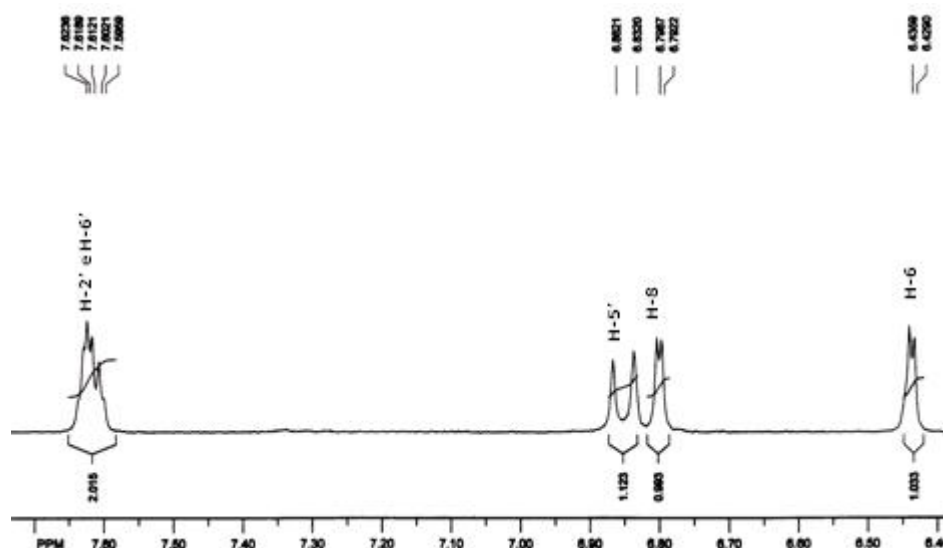
São observados três sinais em 12,63, 9,80 e 9,26 ppm, correspondendo aos hidrogênios de três hidroxilas da aglicona. O sinal mais desblindado corresponde ao hidrogênio da posição 5, que se encontra em ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila em 4. Os outros sinais correspondem aos hidrogênios das hidroxilas do anel B, das posições 3' e 4'.



Espectro 49: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de **SC3** ($\text{DMSO}-d_6$)

Para o anel A foram observados dupletos em 6,43 ppm (d, $J_{\text{meta}} = 2,02$ Hz) e 6,79 ppm (d, $J_{\text{meta}} = 2,02$ Hz), correspondentes aos hidrogênios das posições 6 e 8, respectivamente. De acordo com o deslocamento observado para H-6 e H-8, mais desprotegido, o flavonóide **SC3** apresenta glicosilação na posição 7.

Para o anel B foram observados sinais em 6,85 ppm (duplete; $J_{\text{orto}} = 8,99$ Hz), com integração para um hidrogênio, e em 7,61 ppm (multiplete), com integração para dois hidrogênios (**Espectro 50**). O hidrogênio em 6,85 ppm está acoplado em *orto* com um dos hidrogênios em 7,61 ppm, e este acopla em *meta* com o hidrogênio que apresenta o mesmo deslocamento. Esse padrão de sinais corresponde aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' do anel B, característicos de um anel aromático substituído na posição 3' e 4' (padrão 3',4'-OH).



Espectro 50: Expansão da faixa entre 6,40 e 7,80 ppm do espectro de RMN ¹H (300,13 MHz) de **SC3** (DMSO-*d*₆)

De acordo com esses dados foi possível propor para a aglicona deste flavonóide a estrutura da quercetina (3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavonol; **Figura 16**).

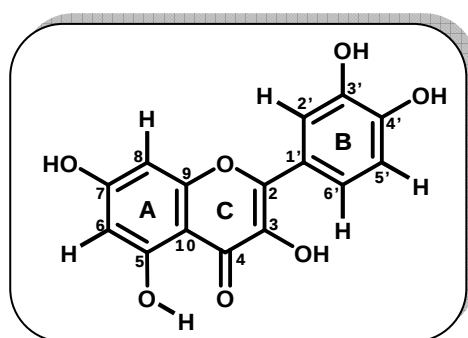


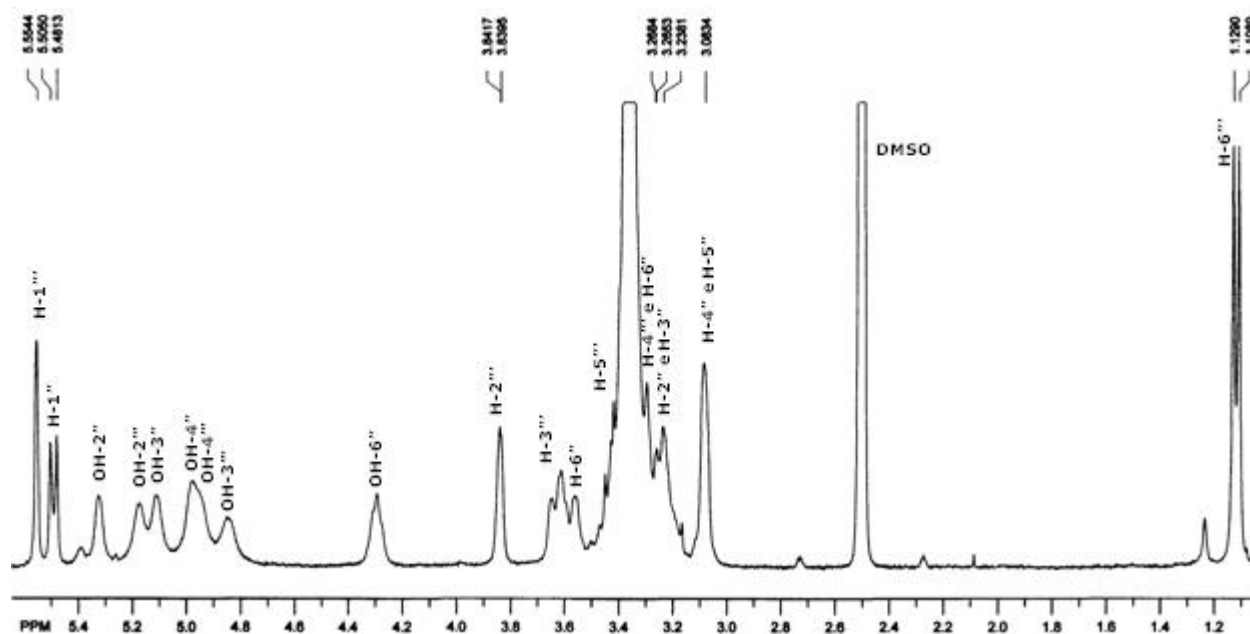
Figura 16: Estrutura da quercetina

Para a faixa entre 1,0 e 5,6 ppm do espectro de RMN ^1H , correspondente à região glicosídica do flavonóide **SC3** (**Espectro 51**), dois sinais de hidrogênios anoméricos (H-1'' : 5,49 ppm e H-1''' : 5,55 ppm) foram compatíveis com O-glicosilação diretamente no anel da aglicona. A constante de acoplamento observada para o H-1'' (d; $J = 7,25 \text{ Hz}$) mostra uma relação *trans*-diaxial entre H-1'' e H-2'' , enquanto que o simpleto apresentado por H-1''' indica uma relação *trans*-diequatorial.

Os sinais para os outros hidrogênios das unidades sacarídicas aparecem sob a forma de multipletos entre 3,08 e 4,29 ppm, além de um duplete em 1,11 ppm (3H; d; $J = 6,00 \text{ Hz}$), referente aos hidrogênios metílicos de um dos açúcares. Observam-se ainda sinais para as hidroxilas das duas unidades de carboidrato, entre 4,3 e 5,4 ppm.

Assim como observado para os flavonóides **SF2** e **SC2**, o duplete em δ 1,11 e o hidrogênio anomérico em δ 5,55 (s) indicam a presença de uma unidade de ramnose na posição 7 do kaempferol; e o sinal em δ 5,49 ($J = 7,25 \text{ Hz}$) é típico de uma molécula de β -D-glicose presente na posição 3 da aglicona (MARKHAM & GEIGER, 1994).

De acordo com esses dados parciais, pode-se propor para **SC3** a estrutura da quercetina 3-O-glicosídeo 7-O-ramnosídeo.

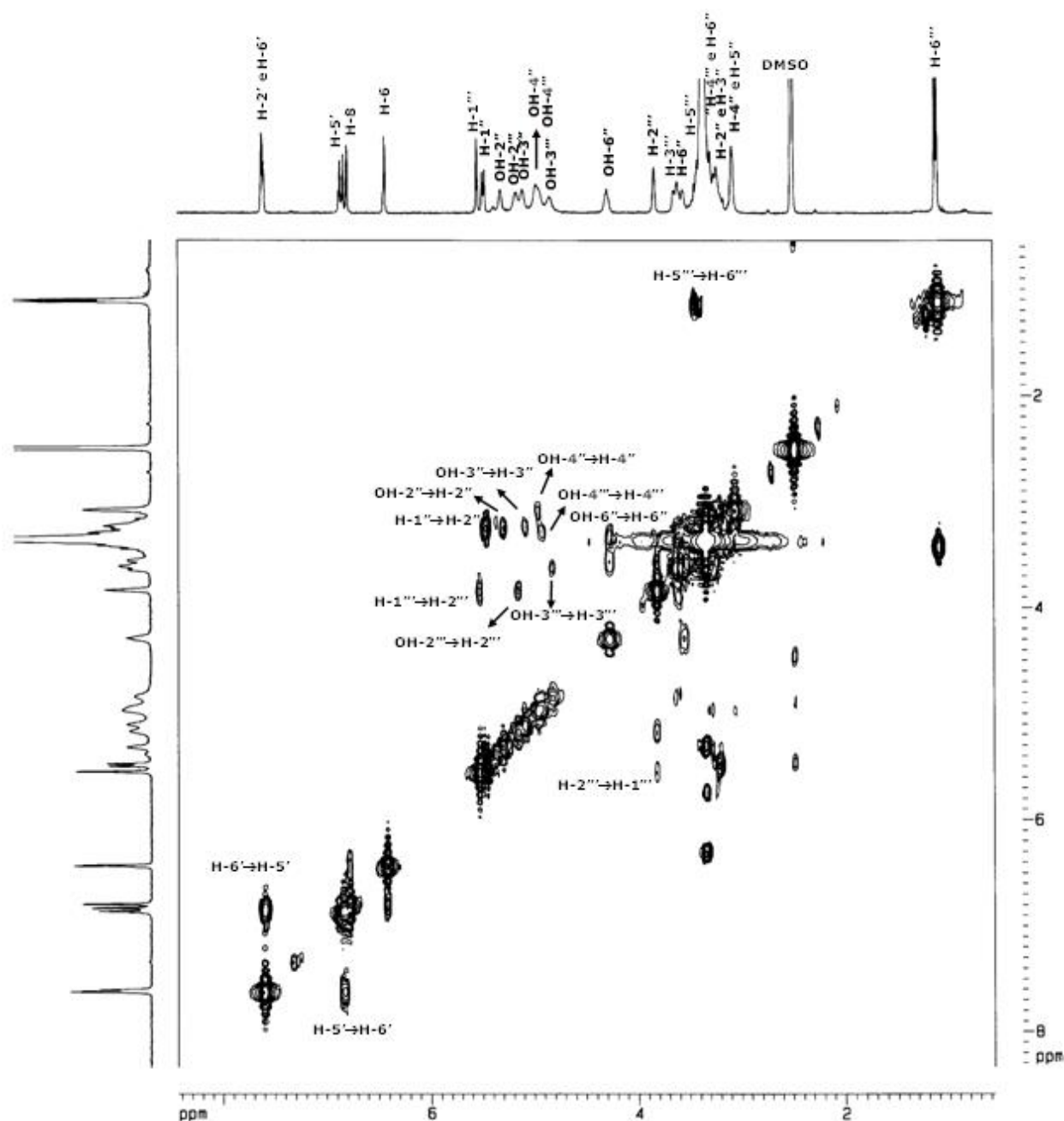


Espectro 51: Expansão da região entre 1,0 e 5,6 ppm do espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de **SC3** ($\text{DMSO-}d_6$)

COSY

A partir da análise do espectro de RMN 2D COSY (**Espectro 52**) foi possível determinar os deslocamentos de cada hidrogênio dos dois açúcares através do acoplamento seqüenciado dos hidrogênios destes, inclusive das hidroxilas (ver assinalamento abaixo).

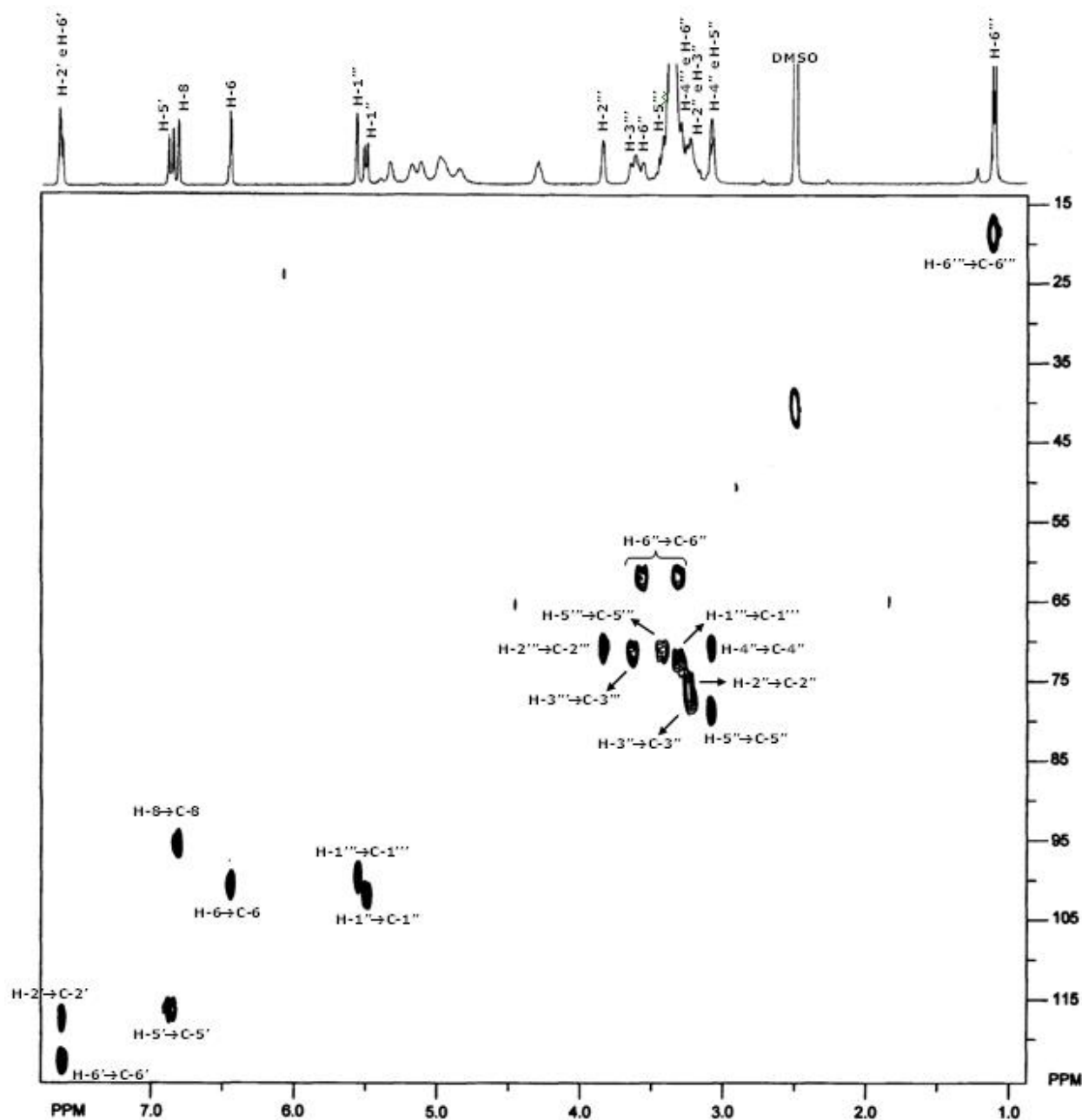
Através do espectro de COSY também pôde ser confirmada a aglicona da quercetina com base no acoplamento observado entre H-5' e H-6', confirmando o padrão 3',4'-di-OH para o anel B, evidenciado anteriormente no espectro de RMN ^1H .



Espectro 52: Espectro de RMN 2D COSY (300,13 MHz) de **3C** ($\text{DMSO}-d_6$)

HMQC

A análise dos dados obtidos no espectro de RMN 2D HMQC (**Espectro 53**) permitiu estabelecer a correlação direta entre os núcleos de ^1H com os núcleos de ^{13}C a eles diretamente ligados. Assim, a O-glicosilação observada inicialmente pela desblindagem dos hidrogênios anoméricos, também foi evidenciada pelos sinais atribuídos aos carbonos anoméricos em 101,9 e 99,5 ppm no espectro de HMQC.



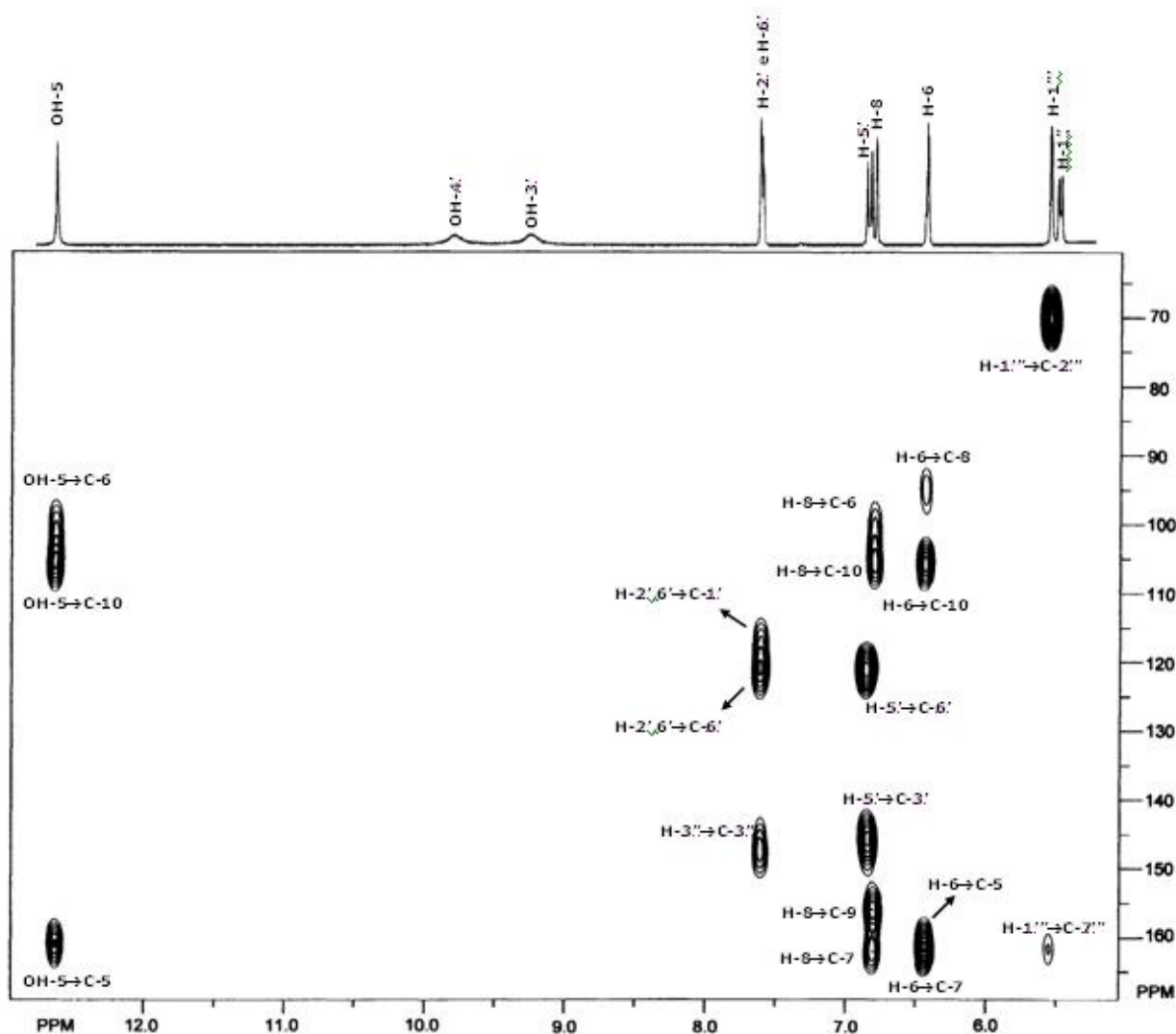
Espectro 53: Espectro de RMN 2D HMQC (300,13 x 75,47 MHz) de **SC3** (DMSO- d_6)

Os dados obtidos nos espectros de RMN 2D COSY e HMQC permitiram identificar as unidades glicosídicas ligadas à quercetina como L-ramnopirranose e D-glicopirranose.

HMBC

A análise das correlações a longa distância ^1H - ^{13}C do espectro de RMN 2D HMBC (**Espectro 54**) permitiu verificar a correlação dos núcleos de ^1H com os núcleos de ^{13}C com duas ou mais ligações de distância. Sendo assim, puderam ser definidos os deslocamentos de alguns carbonos que não possuíam hidrogênios ligados a eles.

Os dados obtidos no espectro de HMBC definiram a posição da ramnose na quercetina a partir da correlação observada entre H-1''' (5,55 ppm) e C-7 (162,3 ppm). A posição da glicose ficou definida em C-3 com base no deslocamento atribuído ao C-2 da quercetina (δ 157,2), pois se encontra mais desblindado, indicando a presença de O-glicosilação em C-3.



Espectro 54: Expansão da faixa de 5,5 a 12,8 ppm (δ_{H}) do espectro de RMN 2D HMBC (300,13 x 75,47 MHz) de **SC3** (DMSO- d_6)

Após comparação com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989; MULINACCI *et al.*, 1995) confirma-se para **SC3** a estrutura da quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**Figura 17**). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a molécula estão listados na **Tabela 15**.

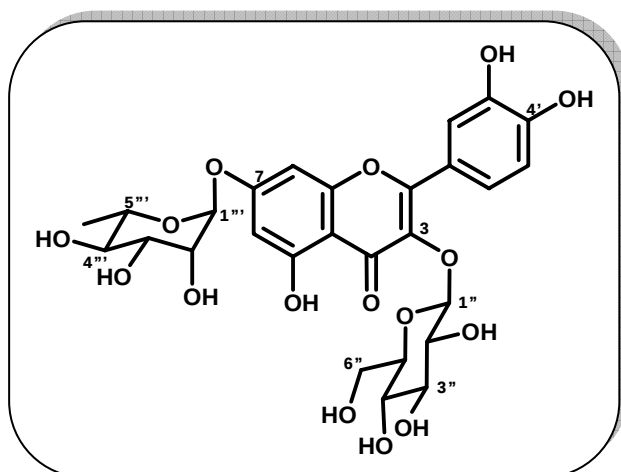


Figura 17: Estrutura de **SC3**

Este flavonóide, também chamado de vincetoxicósídeo A, pode ser encontrado em outra espécie do gênero *Sedum*, *S. telephium* ssp. *maximum* (MULINACCI *et al.*, 1995).

Há na literatura para vincetoxicósídeo A relatos da atividade antioxidante e anti-radicalar (BURDA & OLESZEK, 2001; BRACA *et al.*, 2003).

Tabela 15: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **SC3** (DMSO- d_6).

Aglicona	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); m; J (Hz)
2	157,2	-
3	*	-
4	*	-
5	161,7	-
6	100,6	6,43; d; 2,02
7	162,3	-
8	95,4	6,79; d; 2,02
9	156,5	-
10	106,2	-
1'	121,7	-
2'	117,4	7,61; m
3'	146,8	-
4'	149,2	-
5'	116,4	6,85; d; 8,99
6'	122,8	7,61; m
Açúcar 1	3-O-β-D-glicopiranosídeo	
1''	101,9	5,49; d; 7,25
2''	74,8	3,25; m
3''	77,3	3,23; m
4''	70,2	3,08; m
5''	78,1	3,08; m
6''	61,5	3,32/3,57; m
Açúcar 2	7-O-α-L-ramnopiranosídeo	
1'''	99,5	5,55; s
2'''	70,2	3,86; sl
3'''	70,9	3,60; m
4'''	71,8	3,29; m
5'''	70,7	3,42; m
6'''	18,1	1,11; d; 6,00

* Não observado. d: duplete; m: multiplete; s: simpleto; sl: simpleto largo

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SC4

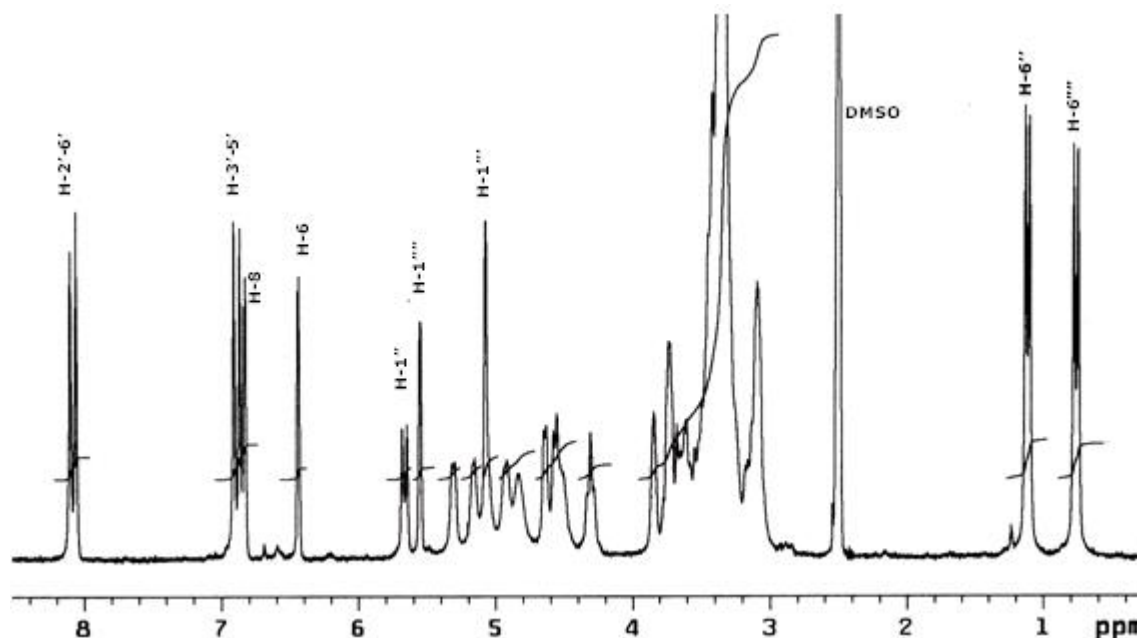
O flavonóide codificado como **SC4**, isolado a partir da fração butanólica dos caules, apresentou-se sob a forma de pó amarelo, com massa de 10,0 mg.

A proposta estrutural para o flavonóide **SC4** foi baseada nos dados obtidos no espectro de RMN ^1H realizado em $\text{DMSO}-d_6$ (9 mg/mL) e confirmada pela espectrometria de massas.

RMN ^1H

O espectro de RMN de ^1H para o flavonóide **SC4** (**Espectro 55**) apresentou o mesmo padrão de sinais observados para **SF3**, tanto para a aglicona quanto para a parte glicosídica.

Para a aglicona foram observados sinais em 6,88 ppm (H-3',5'; d; $J_{\text{orto}} = 8,91$ Hz) e 8,06 ppm (H-2',6'; d; $J_{\text{orto}} = 8,91$ Hz), atribuídos aos hidrogênios do anel B, e 6,43 ppm (H-6, d, $J_{\text{meta}} = 2,13$ Hz) e 6,81 ppm (H-8, d, $J_{\text{meta}} = 2,13$ Hz), atribuídos aos hidrogênios do anel A.



Espectro 55: Espectro de RMN ^1H (300,13 MHz) de **SC4** ($\text{DMSO}-d_6$)

Na faixa entre 0,7 e 5,7 ppm do espectro de RMN ^1H de **SC4**, correspondente à região glicosídica do flavonóide, foram observados três sinais de hidrogênios anoméricos. Os sinais em 5,67 ppm (H-1"; d; $J = 7,35$ Hz), atribuído à glicose, e em 5,55 ppm (H-1'''; s), atribuído à ramnose, foram compatíveis com O-glicosilação diretamente no anel da aglicona. O sinal em 5,08 ppm (H-1''''; s), atribuído a uma segunda molécula de ramnose, foi compatível com um açúcar externo.

A presença das duas ramnoses é confirmada pelos dois dupletos, referentes às metilas terminais deste carboidrato, observados em 1,12 ppm (3H; $J = 5,97$ Hz) e 0,78 ppm (3H; $J = 6,14$ Hz).

A comparação dos espectros de RMN ^1H de **SC4** e **SF3** mostrou que ambos os flavonóides apresentam a mesma estrutura. Este fato pôde ser confirmado pelo valor de íon molecular das duas substâncias.

Após a análise de todos os dados, confirma-se para **SC4** a estrutura do kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**Figura 11**; página 89).

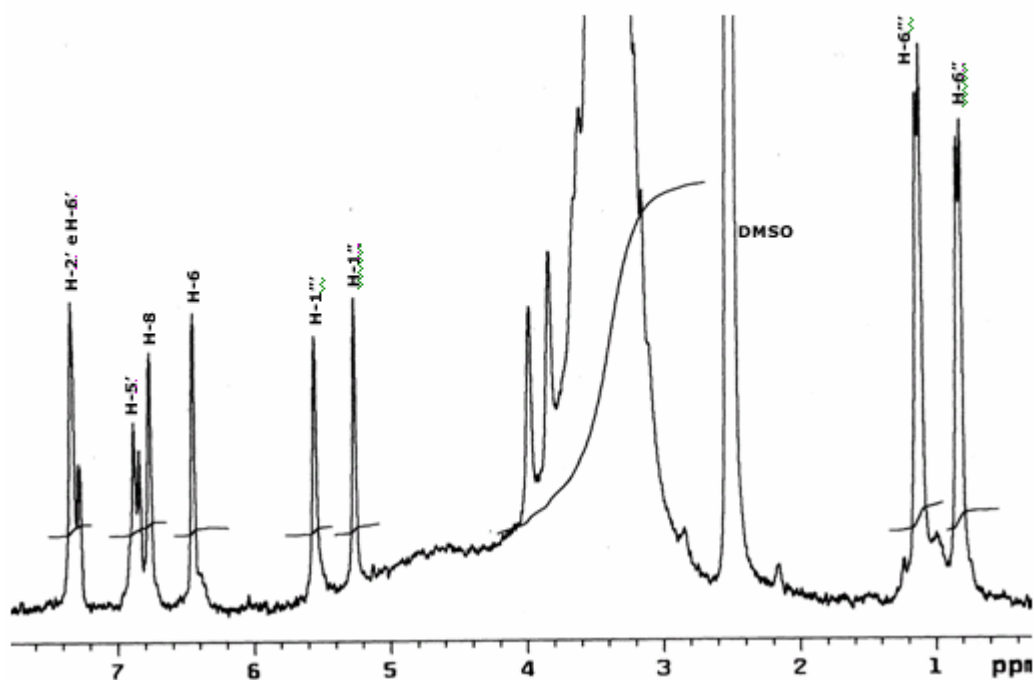
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SC5

O flavonóide codificado como **SC5**, isolado a partir da fração butanólica dos caules, apresentou-se sob a forma de grânulos amarelos, com massa de 1,4 mg.

A proposta estrutural para o flavonóide **SC5** foi baseada nos dados obtidos do espectro de RMN ^1H obtidos em DMSO- d_6 (2,8 mg/mL) e confirmada pela espectrometria de massas. A análise de RMN ^{13}C e os experimentos bidimensionais não foram realizados devido a pouca massa isolada do flavonóide e à baixa sensibilidade do aparelho de RMN.

RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H para **SC5** (**Espectro 56**) mostrou o mesmo padrão de aglicona apresentado por **SC3**.



Espectro 56: Espectro de RMN ^1H (199,97 MHz) de **SC5** (DMSO- d_6)

Para o anel B foram observados sinais em 6,86 ppm (duplete; $J_{orto} = 8,05$ Hz), com integração para um hidrogênio, e em 7,31 ppm (multiplete; sinais sobrepostos), com integração para dois hidrogênios. O hidrogênio em 6,86 ppm está acoplando em *orto* com um dos hidrogênios em 7,31 ppm, e este acopla em *meta* com o hidrogênio que apresenta o mesmo deslocamento. Esse padrão de sinais corresponde aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' do anel B, característicos de um anel aromático substituído na posição 3' e 4' (padrão 3',4'-OH).

Para o anel A foram observados dois simpletos largos em 6,44 ppm e 6,76 ppm, correspondentes aos hidrogênios das posições 6 e 8, respectivamente. De acordo com o deslocamento observado para H-6 e H-8, mais desblindado, **SC5** apresenta glicosilação na posição 7.

Na faixa entre 0,7 e 5,7 ppm do espectro de RMN ^1H de **SC5**, referente à região glicosídica deste flavonóide, dois sinais de hidrogênios anoméricos (H-1'': 5,29 ppm e H-1''': 5,55 ppm) foram compatíveis com O-glicosilação diretamente no anel da aglicona. Estes sinais, como simpletos largos, mostram uma relação *trans*-diequatorial entre os hidrogênios das posições 1 e 2 dos açúcares.

Os sinais para os outros hidrogênios das unidades sacarídicas aparecem sob a forma de multipletos entre 3,08 e 4,29 ppm, além de dois dupletos em 1,12 ppm (3H; d; $J = 5,65$ Hz) e 0,79 ppm (3H; d; $J = 5,99$ Hz), referentes às duas metilas de ramnoses.

Como discutido anteriormente para **SF1**, a ramnose presente na posição 3 da aglicona de um flavonóide apresenta os sinais referentes aos hidrogênios anoméricos e metílicos em 5,29 e 0,79 ppm (3-O-ramnosídeo), e a outra unidade, localizada na posição 7, apresenta os sinais em 5,55 e 1,12 ppm (7-O-ramnosídeo).

De acordo com esses dados, pode-se propor para **SC5** a estrutura da quercetina 3,7-di-O-ramnosídeo.

Comparando os espectros de **SC5** e **SF1**, nota-se que a região glicosídica para as duas moléculas é idêntica, diferenciando apenas pelos sinais da aglicona, que em **SF1** trata-se do kaempferol, e em **SC5** trata-se da quercetina.

Após comparação com os dados de RMN ^1H da literatura (MULINACCI *et al.*, 1995), confirma-se para **SC5** a estrutura da quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**Figura 18**). Esta estrutura também pôde ser confirmada pelo valor obtido de íon molecular.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a molécula estão listados na **Tabela 16**.

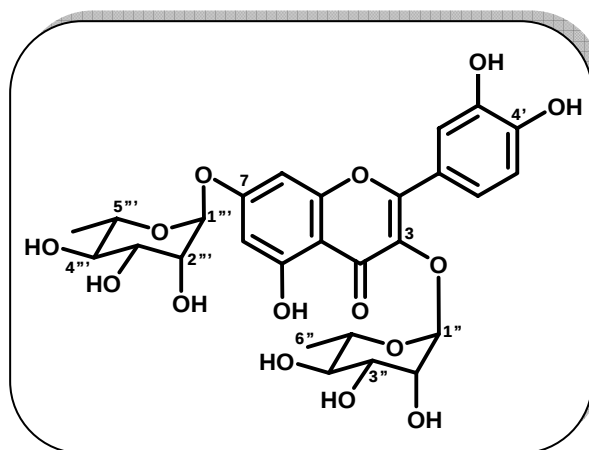


Figura 18: Estrutura de **SC5**

No gênero *Sedum*, este flavonóide é encontrado apenas em uma única espécie, a *S. telephium* ssp. *maximum* (WOLBIŚ, 1987b; MULINACCI *et al.*, 1995 e KORUL'KIN, 2001), espécie de onde também foram isolados **SF1** (= **SC1**), **SF2** (= **SC2**), **SF3** (= **SC4**), **SF6**, **SF7**, **SF8** e **SC3**.

Dentre as atividades relatadas para este flavonóide encontram-se as atividades antinociceptiva e antiinflamatória (TOKER *et al.*, 2004).

Tabela 16: Dados de RMN ^1H para **SC5** ($\text{DMSO}-d_6$)

Aglicona	δ_{H} (ppm); m; J (Hz)
2	-
3	-
4	-
5	-
6	6,44; s
7	-
8	6,76; s
9	-
10	-
1'	-
2'	7,31; m
3'	-
4'	-
5'	6,86; d; 8,05
6'	7,31; m
Açúcar 1	3-O-ramnopiranosídeo
1''	5,26; s
2''	-
3''	-
4''	-
5''	-
6''	0,79; d; 5,99
Açúcar 1	7-O-ramnopiranosídeo
1'''	5,55; s
2'''	-
3'''	-
4'''	-
5'''	-
6'''	1,12; d; 5,65

d: duplete; m: multiplete; s: simpleto

PERFIL QUÍMICO DE *Sedum dendroideum*

PERFIL QUÍMICO DE *Sedum dendroideum*

Conhecer a composição química de uma espécie vegetal é fundamental e é de extrema importância para a elaboração de um fitoterápico, já que é necessário trabalhar com um extrato padrão, onde os constituintes químicos estejam padronizados.

Com o objetivo de avaliar o perfil químico dos diferentes extratos obtidos (folhas e caules) de *S. dendroideum* e determinar o percentual de cada flavonóide isolado no extrato, estes foram submetidos à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD), utilizando o detector de massas.

ANÁLISE QUALITATIVA DO SUMO DAS FOLHAS

Para uma avaliação mais completa do perfil químico do sumo das folhas de *S. dendroideum*, os sumos obtidos nas quatro partidas trabalhadas (Sd01, Sd02, Sd03 e Sd04) foram avaliados por CLAE e comparados entre si quanto à sua composição flavonoídica.

A identificação dos flavonóides isolados de *S. dendroideum* em cada cromatograma foi feita através da comparação dos tempos de retenção observados com o tempo de retenção das substâncias isoladas e, então, confirmada pelo espectro de massas.

Como pode ser observado nas **Figuras 19-22**, os cromatogramas dos sumos das folhas de *S. dendroideum* obtidos nas diferentes partidas são muito similares qualitativamente, apresentando um perfil químico muito semelhante entre si, o que pode representar um *fingerprint* para esta espécie.

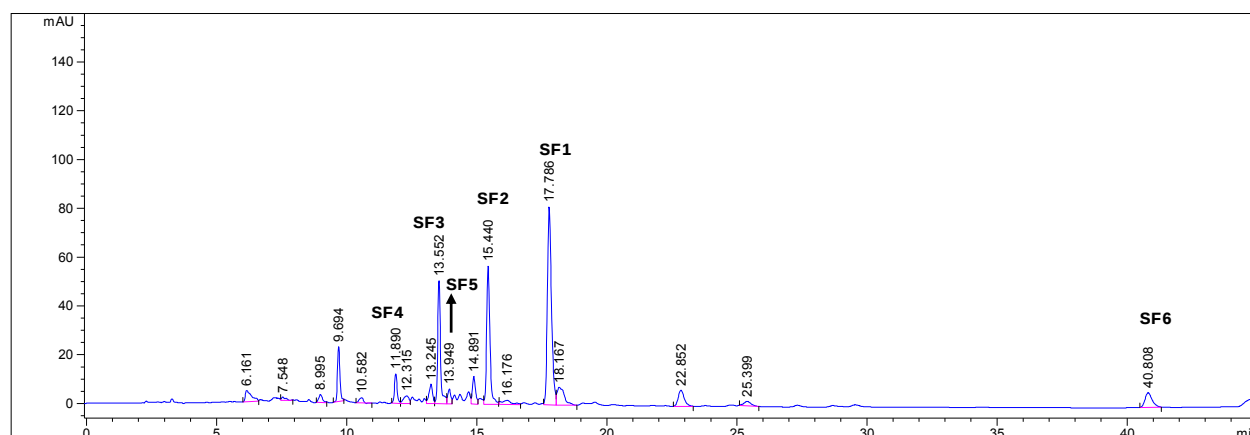


Figura 19: Cromatograma do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* (partida Sd01). Concentração: 10 mg/mL; volume de injeção: 10 μ L; detecção UV (254 nm).

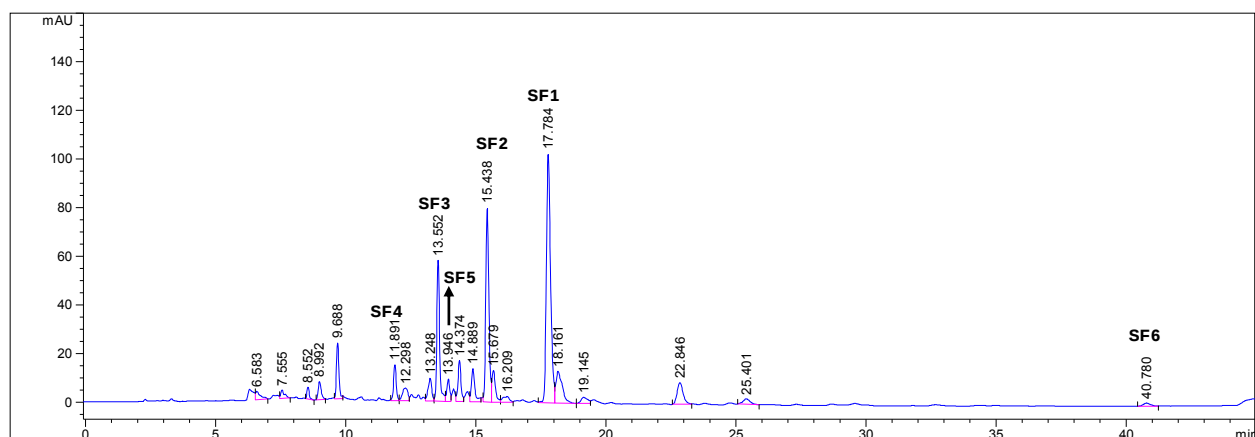


Figura 20: Cromatograma do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* (partida Sd02). Concentração: 10 mg/mL; volume de injeção: 10 μ L; detecção UV (254 nm).

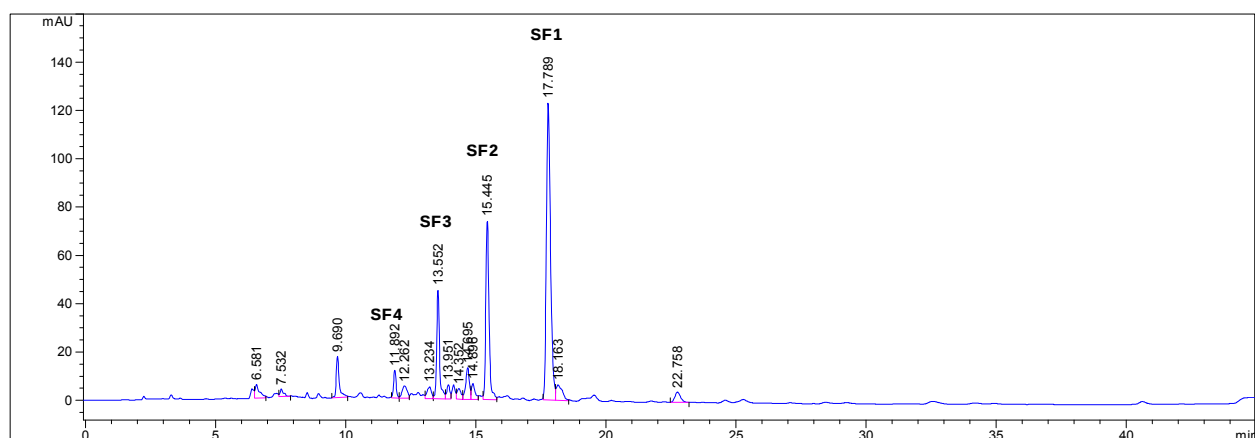


Figura 21: Cromatograma do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* (partida Sd03). Concentração: 10 mg/mL; volume de injeção: 10 μ L; detecção UV (254 nm).

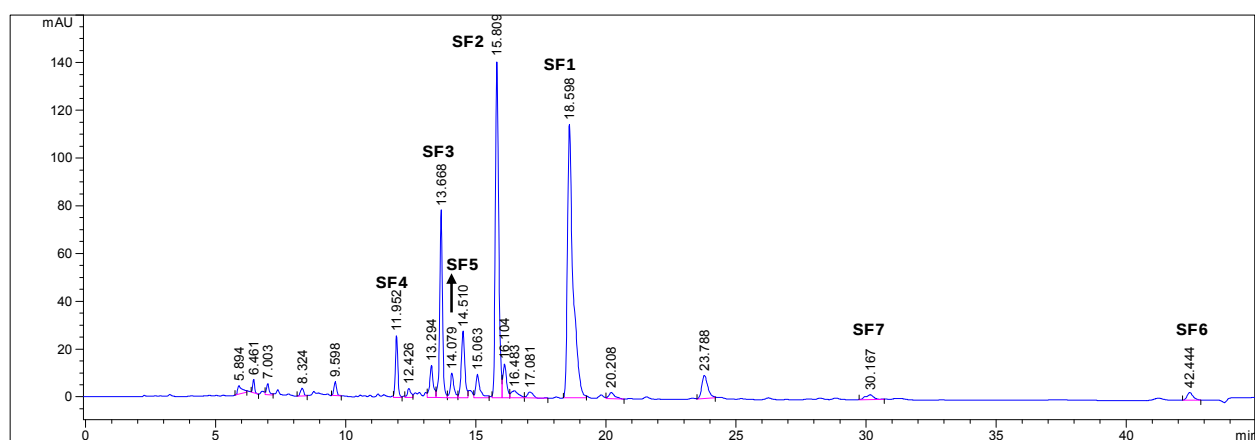


Figura 22: Cromatograma do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* (partida Sd04). Concentração: 10 mg/mL; volume de injeção: 10 μ L; detecção UV (254 nm).

Embora diferenças na concentração dos constituintes químicos sejam evidentes, impossibilitando inclusive em alguns casos a identificação de alguns flavonóides devido sua baixa concentração (como é o caso de **SF7** e **SF8**), os picos majoritários (**SF1**, **SF2** e **SF3**) são comuns a todos os quatro cromatogramas.

Para isolamento dos flavonóides do bálsamo, a partição com acetato de etila e butanol foi a técnica de escolha. Nos cromatogramas destas frações (**Figuras 23 e 24**) pode-se observar que esta técnica permite separar os flavonóides em duas faixas distintas de polaridade facilitando, com isso, o processo de isolamento. Os flavonóides presentes na fração em acetato de etila são **SF1**, **SF2**, **SF6**, e **SF7** (mono e di-glicosídicos); enquanto que na fração butanólica encontram-se **SF1**, **SF2**, **SF3**, **SF4** e **SF5** (di e tri-glicosídicos).

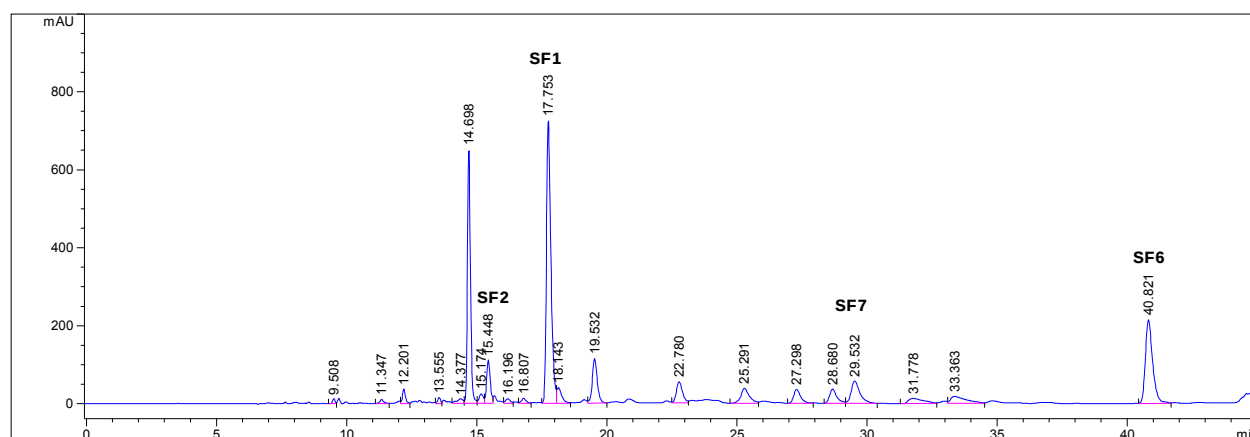


Figura 23: Cromatograma da fração em acetato de etila obtida da partição do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* (partida Sd04). Concentração: 5 mg/mL; volume de injeção: 10 μ L; detecção UV (254 nm).

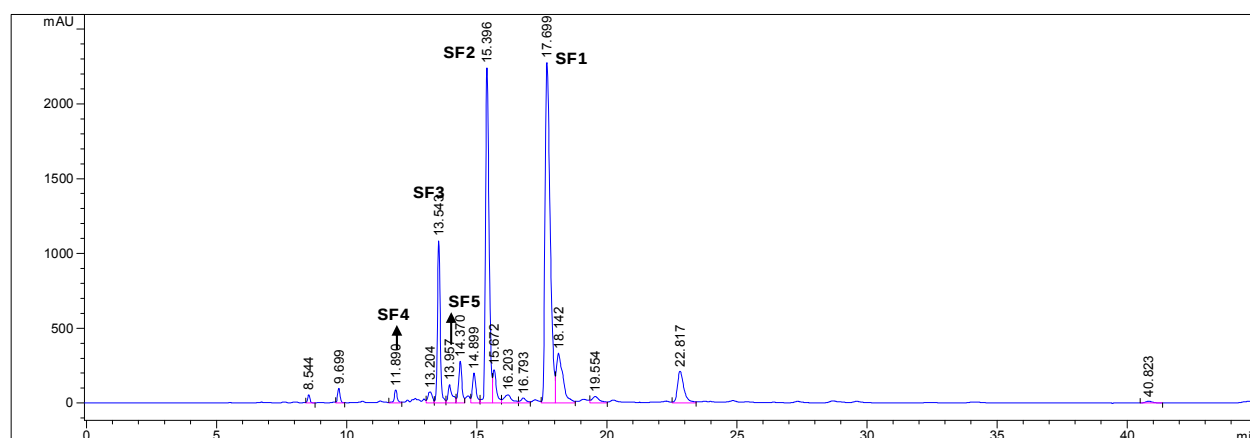
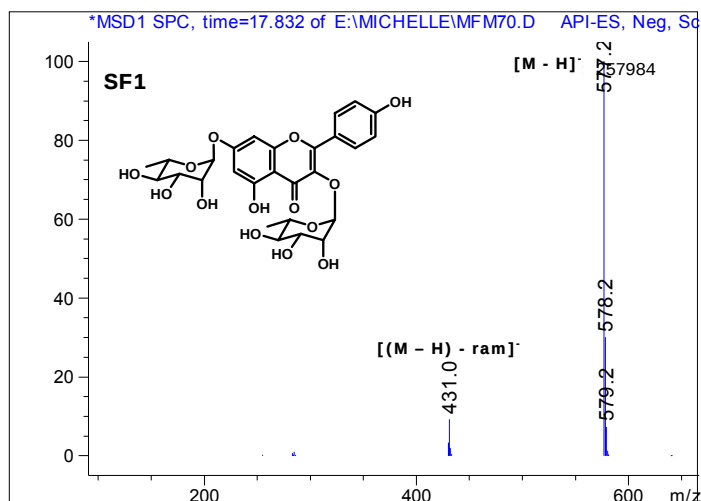


Figura 24: Cromatograma da fração butanólica obtida da partição do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* (partida Sd04). Concentração: 10 mg/mL; volume de injeção: 10 μ L; detecção UV (254 nm).

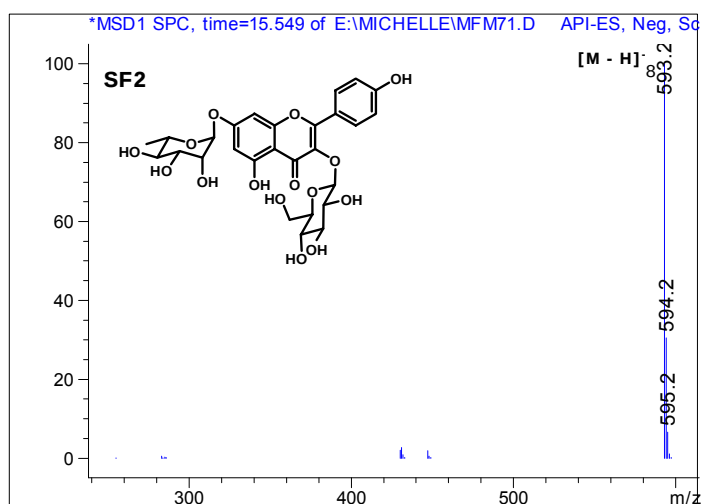
Flavonóides identificados nos cromatogramas dos sumos das folhas

☞ Kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo



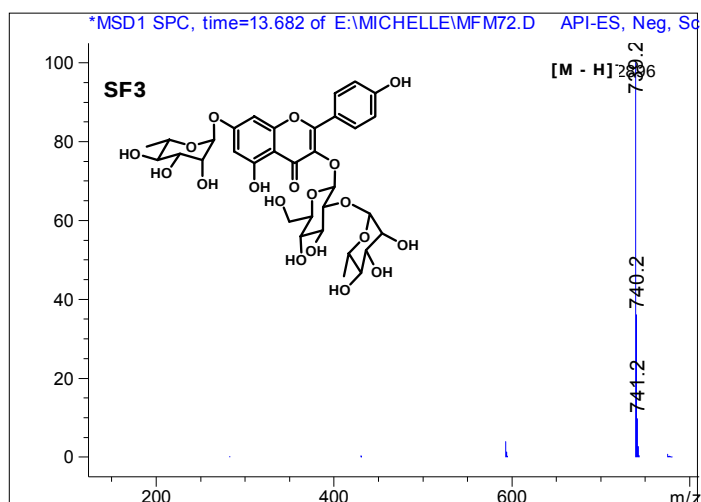
Espectro 57: Espectro de massas correspondente ao flavonóide **SF1** (kaempferitrina). $C_{27}H_{30}O_{14}$; MM: 578,5; Tempo de retenção: 17,832 minutos; Parâmetros EM: modalidade íon-negativa; m/z 577,2 $[M - H]^-$; ram= ramnose.

☞ Kaempferol 3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo



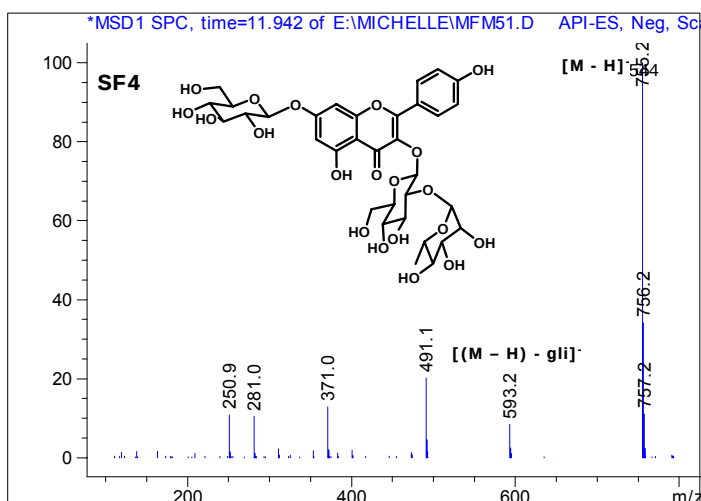
Espectro 58: Espectro de massas correspondente ao flavonóide **SF2**. $C_{27}H_{30}O_{15}$; MM: 594,5; Tempo de retenção: 15,549 minutos; Parâmetros EM: modalidade íon-negativa; m/z 593,2 $[M - H]^-$.

☞ **Kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranoídeo**



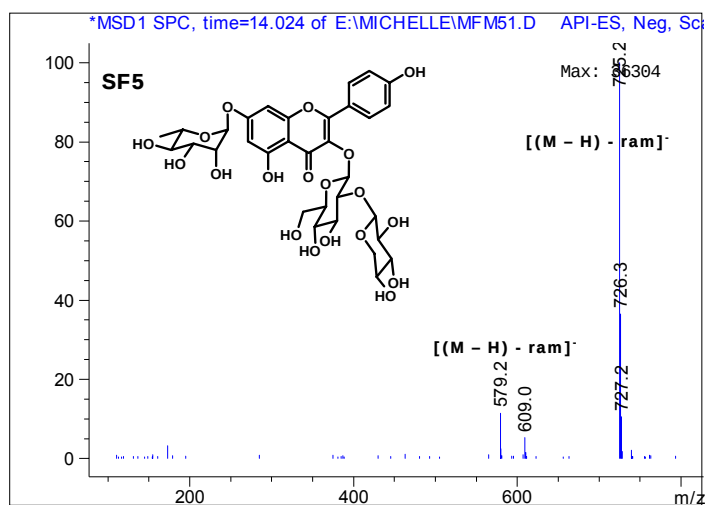
Espectro 59: Espectro de massas correspondente ao flavonóide **SF3**. C₃₃H₄₀O₁₉; MM: 740,7; Tempo de retenção: 13,682 minutos; Parâmetros EM: modalidade íon-negativa; m/z 739,2 [M - H]⁻.

☞ **Kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- β -D-glicopiranosídeo**



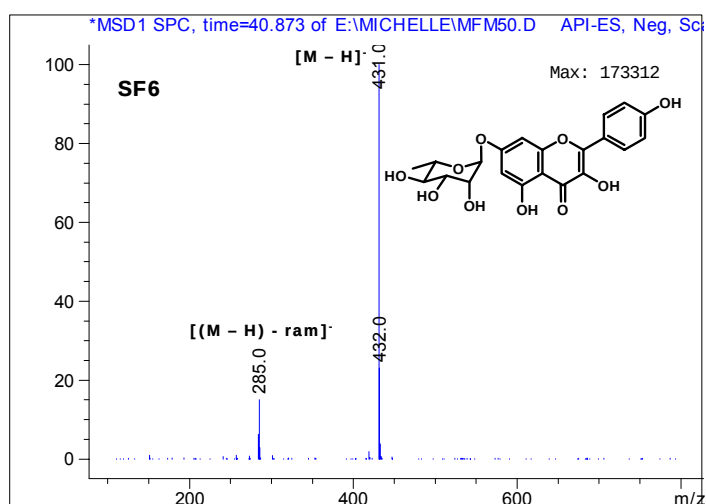
Espectro 60: Espectro de massas correspondente ao flavonóide **SF4**. C₃₃H₄₀O₂₀; MM: 756,7; Tempo de retenção: 11,942 minutos; Parâmetros EM: modalidade íon-negativa; m/z 755,2 [M - H]⁻; gli= glucose.

☞ **Kaempferol 3-O-β-D-xilopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo**



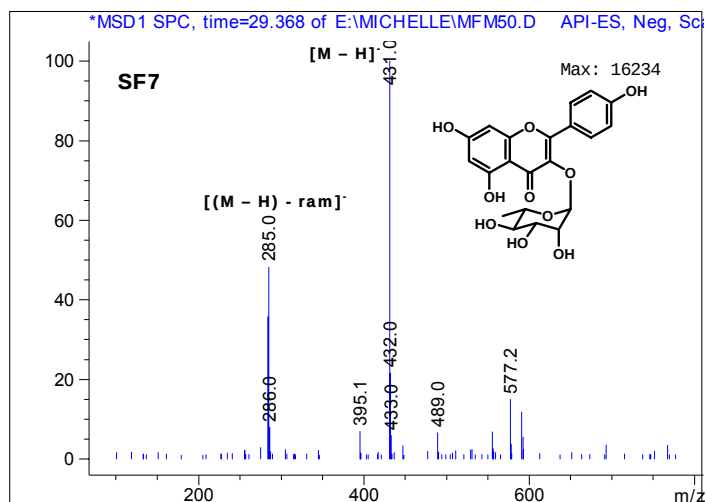
Espectro 61: Espectro de massas correspondente ao flavonóide **SF5**. C₃₂H₃₈O₁₉; MM: 726,6; Tempo de retenção: 14,024 minutos; Parâmetros EM: modalidade íon-negativa; m/z 725,2 [M - H]⁻; ram= ramnose.

☞ **Kaempferol 7-O-α-L-ramnopiranosídeo**



Espectro 62: Espectro de massas correspondente ao flavonóide **SF6** (α-ramnoisorobina). C₂₁H₂₀O₁₀; MM: 432,4; Tempo de retenção: 40,873 minutos; Parâmetros EM: modalidade íon-negativa; m/z 431,0 [M - H]⁻; ram= ramnose.

☞ Kaempferol 3-O- α -L-ramnosídeo



Espectro 63: Espectro de massas correspondente ao flavonóide **SF7** (afzelina). $C_{21}H_{20}O_{10}$; MM: 432,4; Tempo de retenção: 29,368 minutos; Parâmetros EM: modalidade íon-negativa; m/z 431,0 $[M - H]^-$; ram= ramnose.

ANÁLISE QUALITATIVA DO EXTRATO DOS CAULES

O perfil flavonoídico do extrato dos caules de *S. dendroideum* mostrou-se muito diferente do observado para as folhas. Foram observadas diferenças significativas tanto na composição flavonoídica das diferentes partes vegetais quanto na concentração dos principais flavonóides isolados.

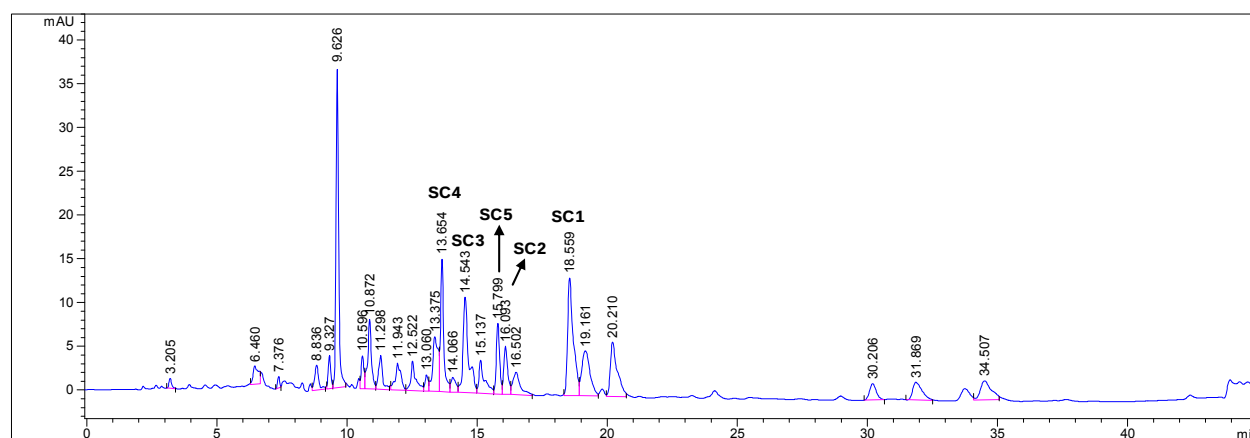
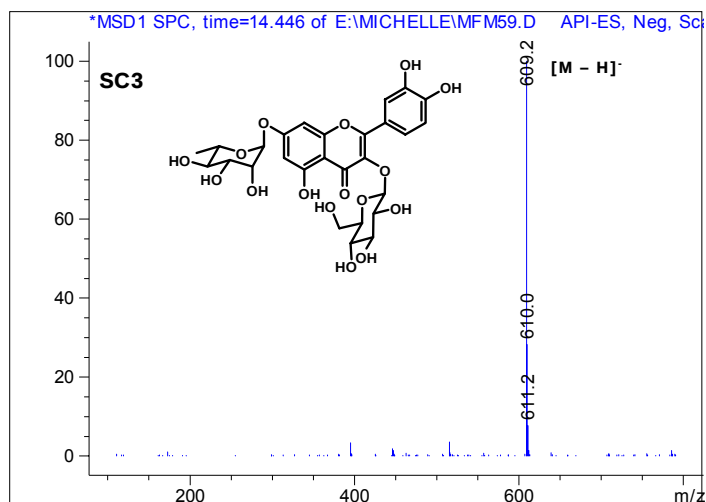


Figura 25: Cromatograma do extrato aquoso dos caules de *Sedum dendroideum*. Concentração: 10 mg/mL; volume de injeção: 10 μ L; detecção UV (254 nm).

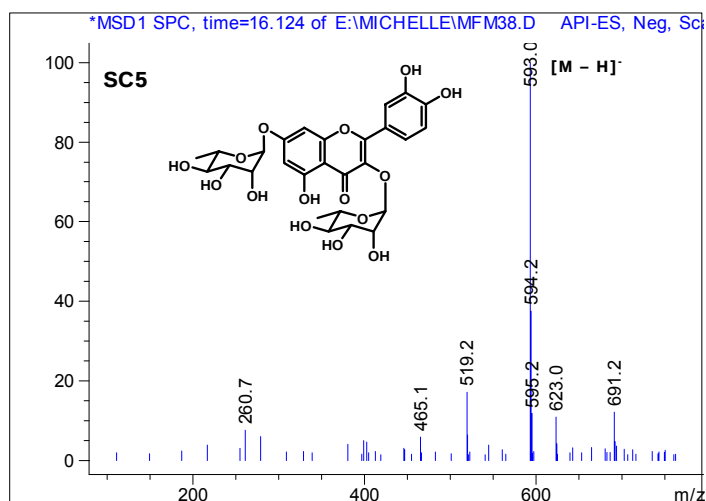
Flavonóides identificados no cromatograma do extrato dos caules

☞ Quercetina 3-O-β-D-glicopiranosídeo-7-O-α-L-ramnosídeo



Espectro 64: Espectro de massas correspondente ao flavonóide **SC3**. $C_{27}H_{30}O_{16}$; MM: 610,5; Tempo de retenção: 14,446 minutos; Parâmetros EM: modalidade íon-negativa; m/z 609,2 $[M - H]^-$.

☞ Quercetina 3-O-α-L-ramnopiranosídeo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo



Espectro 65: Espectro de massas correspondente ao flavonóide **SC5**. $C_{27}H_{30}O_{15}$; MM: 594,5; Tempo de retenção: 16,120 minutos; Parâmetros EM: modalidade íon-negativa; m/z 593,2 $[M - H]^-$.

PERFIL FLAVONOÍDICO: FOLHAS X CAULES

Dependendo da massa vegetal disponível ou do enfoque dado durante o processo de fracionamento, é praticamente impossível isolar de uma dada espécie todas as substâncias de interesse presentes, neste caso os flavonóides. Portanto, a partir da determinação dos tempos de retenção de cada flavonóide isolado, foi possível verificar a presença dessas substâncias tanto nas folhas quanto nos caules por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de massas.

Apesar de não ter sido isolado nenhum flavonóide com a aglicona da quercetina nas folhas, para o sumo desta parte vegetal foi detectado o pico referente ao flavonóide **SC3** isolados dos caules (T_r : 14,510 no cromatograma da partida Sd04). O mesmo não pode ser observado para o flavonóide **SC5**, que parece estar restrito aos caules.

Já para os caules, nenhum outro flavonóide isolado das folhas (**SF4**, **SF5**, **SF6** e **SF7**) pode ser detectado.

Análise Quantitativa dos Flavonóides das Folhas

Para determinação do percentual dos flavonóides nos diferentes sumos, construiu-se uma curva de calibração Área x Massa (μg) a partir de um padrão de Rutina para CLAE (**Figura 26**). Os valores de área obtidos e seus correspondentes em massa estão listados abaixo.

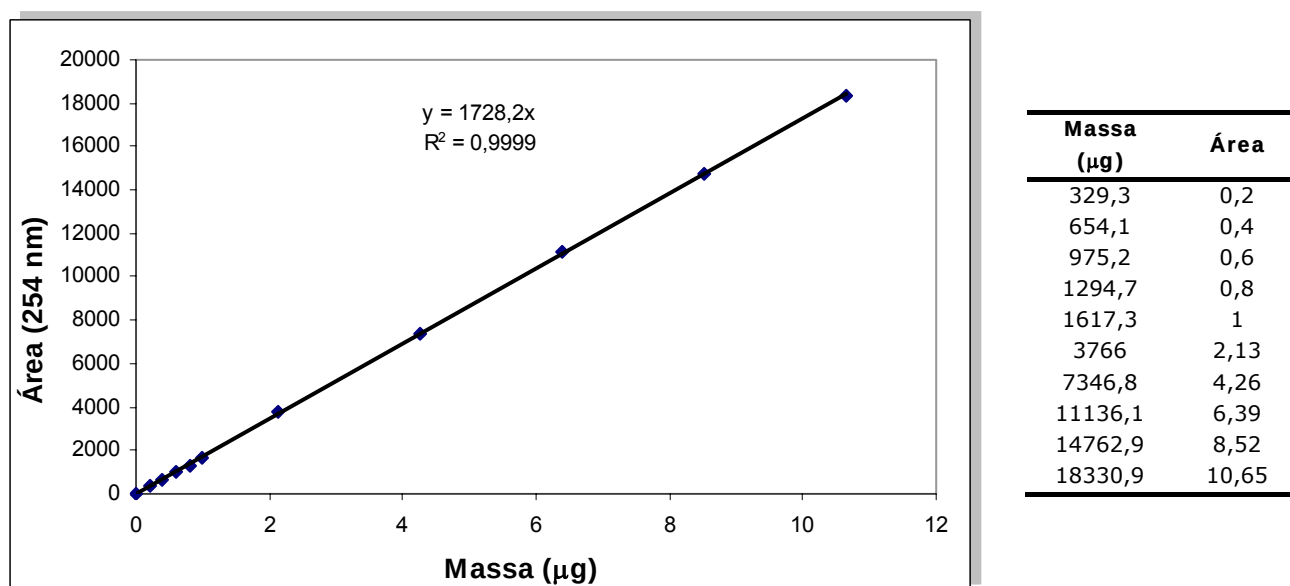


Figura 26: Curva de calibração da rutina por CLAE (deteção: UV; leitura em 254 nm).

Após a construção da curva de calibração, a determinação da concentração de cada flavonóide nas amostras analisadas foi feita pela equação da reta determinada por regressão linear. O percentual (m/m) dos flavonóides no extrato liofilizado (em termos de quantidade de rutina) foi corrigido utilizando o fator de correção de peso molecular (f_{PM}):

$$f_{PM} = \frac{PM \text{ flavonóide}}{PM \text{ rutina}}$$

Desta forma, os percentuais (% m/m) de cada flavonóide no extrato seco foram expressos em relação a cada flavonóide específico. A **Tabela 17** mostra as áreas correspondentes de cada um dos flavonóides isolados do sumo das folhas para os cromatogramas das partidas Sd01, Sd02, Sd03 e Sd04 (detecção em 254 nm) e os percentuais corrigidos.

Tabela 17: Área (254 nm) e percentual dos flavonóides isolados (% m/m) calculados em relação ao sumo liofilizado

	Sd01		Sd02		Sd03		Sd04	
	área	%	área	%	área	%	área	%
SF1	920,45	0,505	1156,2	0,636	1359,9	0,748	1736,01	0,954
SF2	512,14	0,288	669,7	0,378	637,0	0,360	1284,77	0,724
SF3	385,66	0,271	417,9	0,294	340,8	0,239	588,80	0,414
SF4	100,80	0,072	102,8	0,073	84,42	0,061	179,45	0,129
SF5	56,70	0,039	72,2	0,050	49,3	0,035	104,49	0,073
SF6	115,01	0,047	23,6	0,005	7,62	0,003	52,17	0,021
SF7	0	0	0	0	0	0	39,34	0,016

SF1 destaca-se como o flavonóide majoritário presente nas folhas de *Sedum dendroideum*, independente da partida ou época do ano realizada. Este fato já havia sido observado durante a etapa de isolamento e purificação, onde a kaempferitrina foi o flavonóide isolado em maior massa.

Em seguida, em termos de massa, estão os flavonóides **SF2** e **SF3**, sendo estes bastante representativos no sumo do bálsamo (**Figura 27**). Esta ordem mantém-se a mesma em todos os sumos trabalhados.

✎ Percentual de flavonóides no sumo das folhas de *Sedum dendroideum*

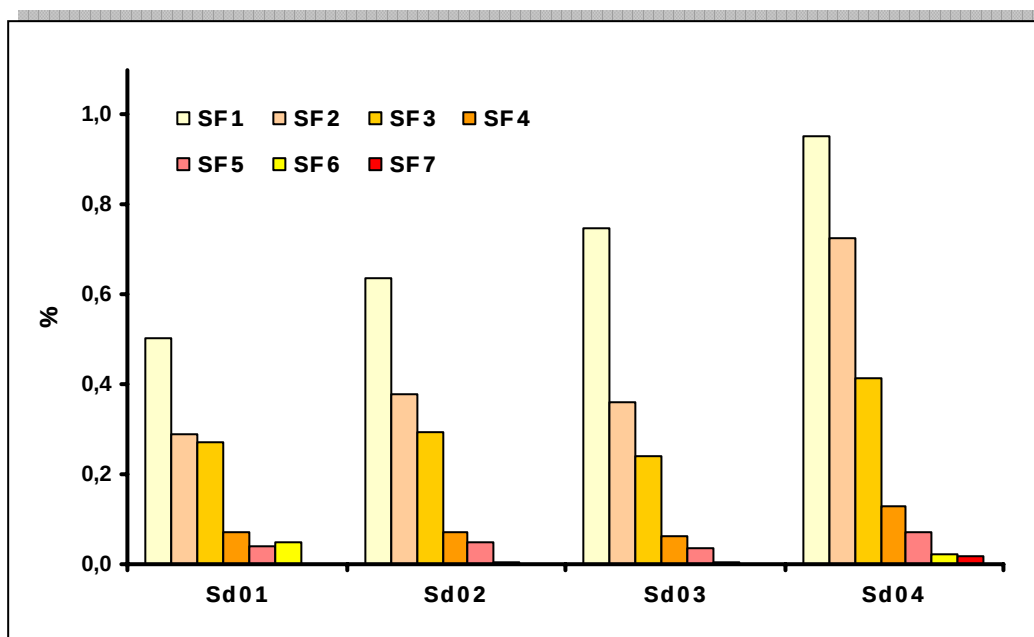


Figura 27: Concentração (% m/m) dos flavonóides no sumo das folhas frescas de diferentes partidas de *Sedum dendroideum* (Sd01, Sd02, Sd03 e Sd04).

Comparando os percentuais dos flavonóides com o rendimento obtido na expressão das folhas das quatro partidas trabalhadas (**Tabela 4**; pág. 38), observa-se que um maior rendimento na extração não necessariamente leva a um maior teor de flavonóides. Por exemplo, o maior percentual de **SF1**, **SF2** e **SF3**, que são os flavonóides majoritários no bálsamo, não foi obtido na partida que apresentou o melhor rendimento das quatro extrações (Sd03; 2,49 %). Entretanto, os flavonóides continuam sendo os principais constituintes químicos presentes no sumo. Este rendimento aumentado pode ser devido a um acréscimo de metabólitos primários, como por exemplo, os açúcares.

Observa-se também que a concentração dos flavonóides varia nas diferentes partidas trabalhadas. Isto ocorre pois, dependendo de fatores ambientais como solo, altitude e variações sazonais climáticas, a composição química de uma espécie vegetal pode variar consideravelmente (SUK, 2005). Além disso, estudos comprovam que o teor de flavonóides varia consideravelmente nas estações onde é maior a incidência luminosa influenciando, então, no metabolismo das plantas e, conseqüentemente, em sua composição química (YAO *et al.*, 2005). Portanto, como o cultivo das mudas utilizadas neste trabalho não foi controlado, fica difícil estabelecer qualquer parâmetro acerca destes fatores.

Como dito anteriormente, conhecer a composição química de uma espécie vegetal é de extrema importância para a elaboração de um fitoterápico. Além disso, é necessário estabelecer um marcador químico, não necessariamente o princípio ativo, utilizado como referência para o controle de qualidade. No caso do bálsamo, o melhor flavonóide para marcador da espécie seria o **SF3**, já que ele não é facilmente encontrado (além de *S. dendroideum*, apenas *S. telephium* apresenta este flavonóide em sua composição).

Apesar de **SF1** e **SF2** serem os flavonóides majoritários no bálsamo, eles não seriam bons marcadores, pois podem ser encontrados facilmente em outras espécies vegetais.

Análise Quantitativa dos Flavonóides dos Caules

Para determinação do percentual dos flavonóides no extrato aquoso dos caules foi utilizada a mesma curva de calibração Área x Massa (μg) construída com um padrão de Rutina comercial. A determinação do teor de cada flavonóide na amostra analisada foi feita pela equação da reta determinada por regressão linear. Em seguida, foi calculado o percentual destes no extrato liofilizado após aplicação do fator de correção para cada flavonóide. A **Tabela 18** mostra as áreas correspondentes a cada um dos flavonóides isolados do extrato dos caules (visualização em 254 nm).

Tabela 18: Área e percentual (m/m) dos flavonóides isolados no extrato dos caules

Flavonóides	Extrato dos caules	
	Área (254 nm)	%
SC1	210,03	0,116
SC2	76,94	0,0438
SC3	135,21	0,0780
SC4	139,75	0,0980
SC5	61,41	0,0351

A kaempferitrina (**SF1** e **SC1**) apresenta-se como o flavonóide majoritário tanto nas folhas quanto nos caules (concentração aproximadamente 8 vezes menor nos caules) (**Figura 28**), ratificando esta substância como o principal componente presente na espécie *Sedum dendroideum*.

Além da concentração de flavonóides totais, outras diferenças significativas são observadas quando se compara a composição química de folhas e caules. Enquanto **SF2** destaca-se como o segundo flavonóide em abundância no sumo das folhas, ele não é tão representativo no extrato dos caules (= **SC2**), ocupando o quarto lugar. Já o flavonóide **SC4** (= **SF3**) é bem mais representativo nos caules do que nas folhas, apresentando quase o mesmo percentual de **SC1**.

Os caules se destacam por apresentar uma química diferente, apresentando flavonóides com esqueleto de quercetina entre os flavonóides majoritários (**SC3** e **SC5**). Estes não foram isolados durante o processo de fracionamento nos diferentes sumos das folhas (partidas Sd01-04), porém o flavonóide **SC3** pode ser identificado por CLAE-EM, só que em uma concentração muito baixa.

☞ Percentual de flavonóides no extrato dos caules de *Sedum dendroideum*

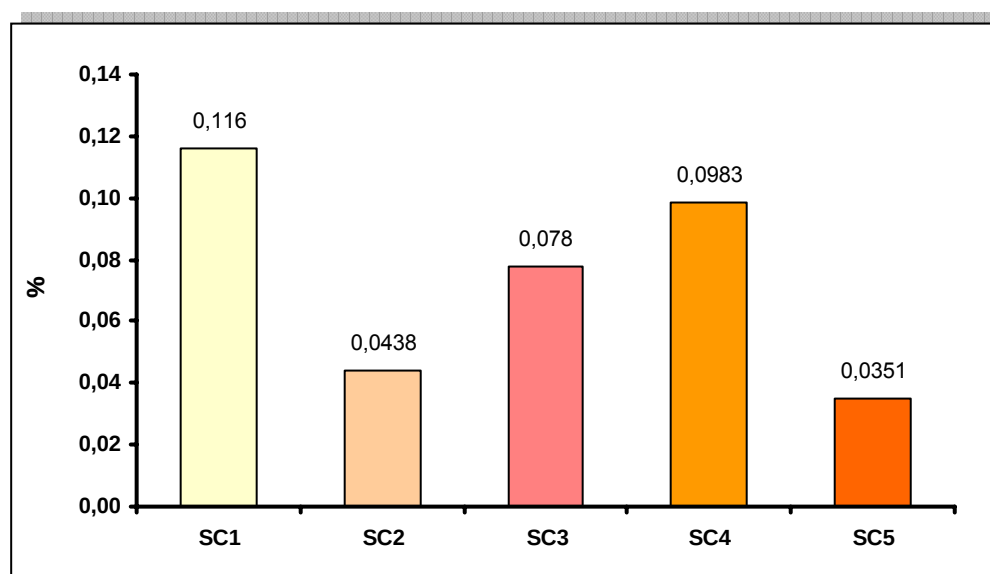


Figura 28: Concentração (% m/m) dos flavonóides **SC1-5** no extrato dos caules de *Sedum dendroideum*

CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO DE *Sedum dendroideum* PARA O GÊNERO

A partir do sumo das folhas frescas e do extrato aquoso dos caules de *Sedum dendroideum* foram isolados no total dez flavonóides: oito com esqueleto do kaempferol e dois derivados de quercetina.

A presença de flavonóides em *Sedum* (Crassulaceae) é bastante conhecida (WOLBIŚ, 1989a; NIEMANN *et al.*, 1976; STEVENS *et al.*, 1996). Das 28 espécies estudadas (**Tabela 1**, pág. 21), *S. alfredi*, *S. sarmentosum*, *S. telephium* ssp. *maximum*, *S. hybridum* e *S. acre* foram as que se destacaram por apresentar o maior número de flavonóides isolados (acima de 15 por espécie).

Em seguida, com mais de dez flavonóides isolados encontram-se seis espécies: *S. aizoon*, *S. album*, *S. ewersii*, *S. reflexum*, *S. sediforme* e *S. sexangulare*. A espécie *S. dendroideum*, com dez flavonóides isolados, passa a fazer parte deste segundo grupo sendo, portanto, bastante representativa entre as espécies ricas em flavonóides dentro do gênero.

Comparando os flavonóides isolados de *S. dendroideum* com as outras espécies deste gênero, uma espécie se destaca por apresentar um perfil químico muito parecido: *S. telephium* ssp. *maximum*. Dos dez flavonóides isolados no bálsamo, oito podem ser encontrados nesta espécie: kaempferitrina, kaempferol 3-O-glicosídeo-7-O-ramnosídeo, kaempferol 3-O-neo-hesperidosídeo-7-O-ramnosídeo, kaempferol 7-O-ramnosídeo, kaempferol 3-O-ramnosídeo, kaempferol, quercetina 3-O-glicosídeo-7-O-ramnosídeo e quercetina 3-O-ramnosídeo-7-O-ramnosídeo.

Além da semelhança quanto ao perfil químico, estas duas espécies também são semelhantes quanto às suas propriedades farmacêuticas. Assim como o bálsamo, a espécie *S. telephium* ssp. *maximum* é largamente utilizada na medicina tradicional européia para doenças inflamatórias de pele devido suas propriedades analgésicas e antiinflamatórias (SENDL *et al.*, 1993).

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado (**Tabela 1**, pág. 21) e com os flavonóides isolados no presente estudo, a subclasse de flavonóides predominante no gênero é a dos flavonóis, como pode ser observado na **Figura 29** (pág. 159). Dos 236 flavonóides isolados em *Sedum*, 193 pertencem a esta subclasse.

Dentro desta subclasse os flavonóides encontrados no gênero *Sedum* estão distribuídos entre as seguintes agliconas: quercetina, miricetina, kaempferol, isoramnetina, limocitrina, gossipetina, corniculatusina, sexangularetina e herbacetina.

☞ Subclasses de flavonóides no gênero *Sedum*

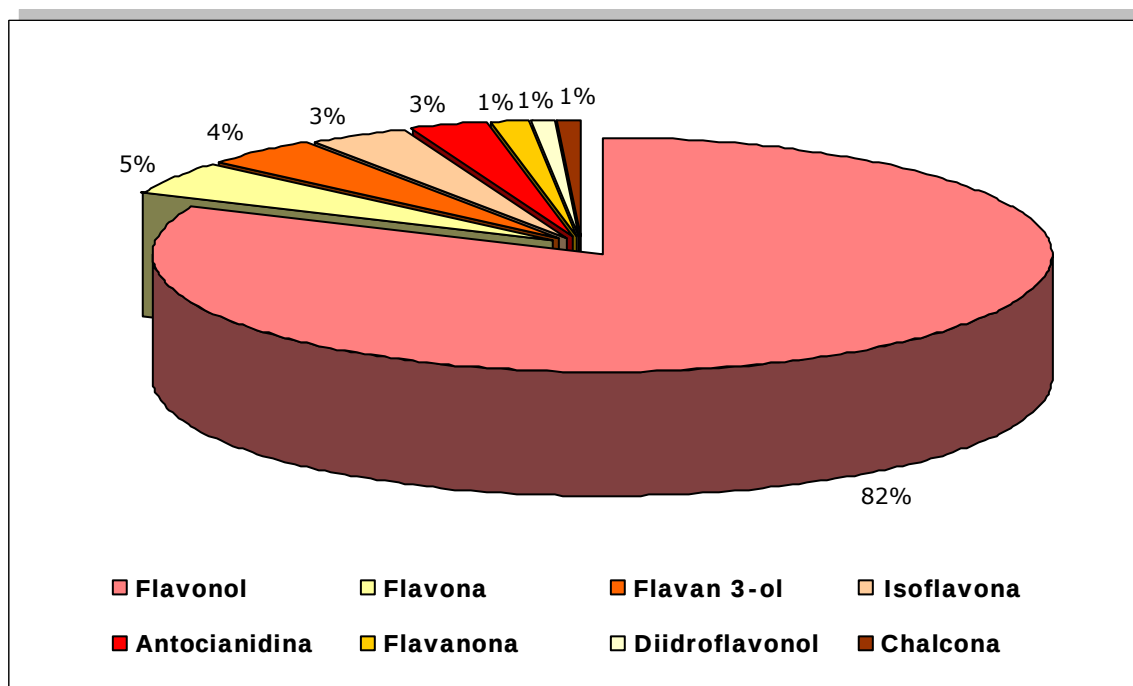


Figura 29: Classes de flavonóides (%) encontradas no gênero *Sedum*

Apesar dos flavonóis serem bem representativos para o gênero *Sedum*, de todas as espécies estudadas duas se destacam por não apresentarem flavonóides desta classe entre as substâncias isoladas. São elas: *S. lineare* e *S. litoreum*.

Outras três espécies do gênero se diferenciam das demais por possuírem um perfil flavonoídico diversificado, pois apresentam pelo menos três subclasses distintas. São elas:

- *S. alfredi*: flavonóis, flavonas e isoflavonas
- *S. sarmentosum*: flavonóis, flavonas, flavanonas e chalconas
- *S. sediforme*: flavonóis, flavanonas e flavans 3-óis

Como mencionado anteriormente, a subclasse predominante é a dos flavonóis, com a aglicona quercetina sendo a mais representativa entre todas as presentes. Dos flavonóides presentes no gênero *Sedum*, 34% apresentam esta aglicona como esqueleto principal (**Figura 30**; pág. 160). Em seguida encontra-se a aglicona do kaempferol e por último, com menor ocorrência no gênero, encontra-se a herbacetina.

🐞 Agliconas de flavonóis presentes no gênero *Sedum*

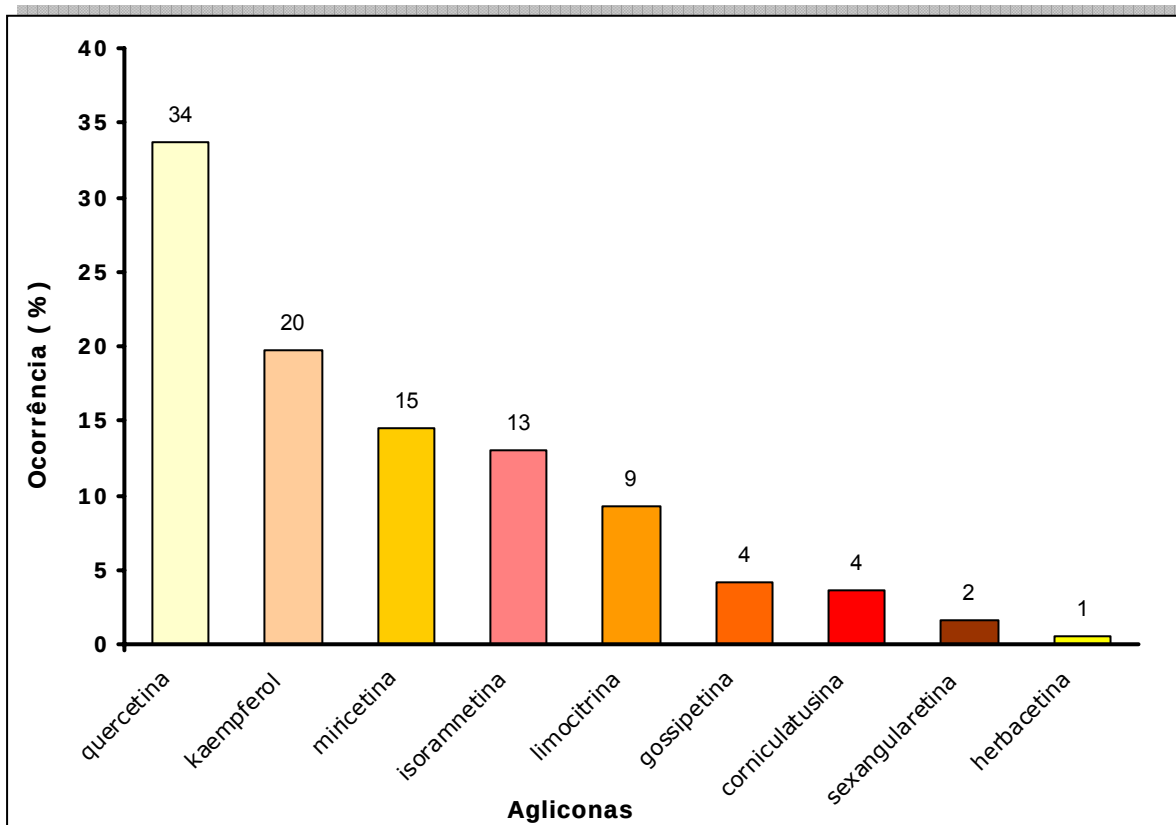


Figura 30: Ocorrência das agliconas (%) de flavonóis no gênero *Sedum*

O estudo da composição flavonoídica de *Sedum dendroideum* permitiu enriquecer o número de relatos de flavonóides para este gênero, totalizando 236 flavonóides, ratificando a importância desta classe como composição química predominante, juntamente com os alcalóides.

O isolamento de dez flavonóides de *S. dendroideum*, sendo oito com esqueleto de kaempferol, confirma esta aglicona como segundo lugar em importância no gênero, representando 20% dos flavonóis.

Outro ponto de extrema relevância deste trabalho é o fato de dois flavonóides estarem sendo relatados pela primeira vez tanto no gênero *Sedum* quanto na família Crassulaceae (**SF4** e **SF5**), sendo um deles, o kaempferol 3-O- β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF5**), inédito.

**ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DO SUMO, FRAÇÕES E
FLAVONÓIDES DE *Sedum dendroideum***

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DO SUMO DE *S. dendroideum*

O sumo das folhas de *Sedum dendroideum* foi avaliado quanto às atividades antinociceptiva e antiinflamatória com o objetivo de justificar seu uso na medicina popular em doenças que envolvem mecanismos de dor e inflamação.

Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

No teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, o pré-tratamento com o sumo de *Sedum dendroideum* nas doses de 0,1, 0,3 e 1 g/kg, produziu uma inibição dose dependente das contorções abdominais, reduzindo em até 54,6% (1 g/kg) o número de contorções quando comparado com o grupo veículo (água, *p.o.*) (**Figura 31**). A dose inibitória 50% (ID₅₀) obtida foi de 631 mg/kg.

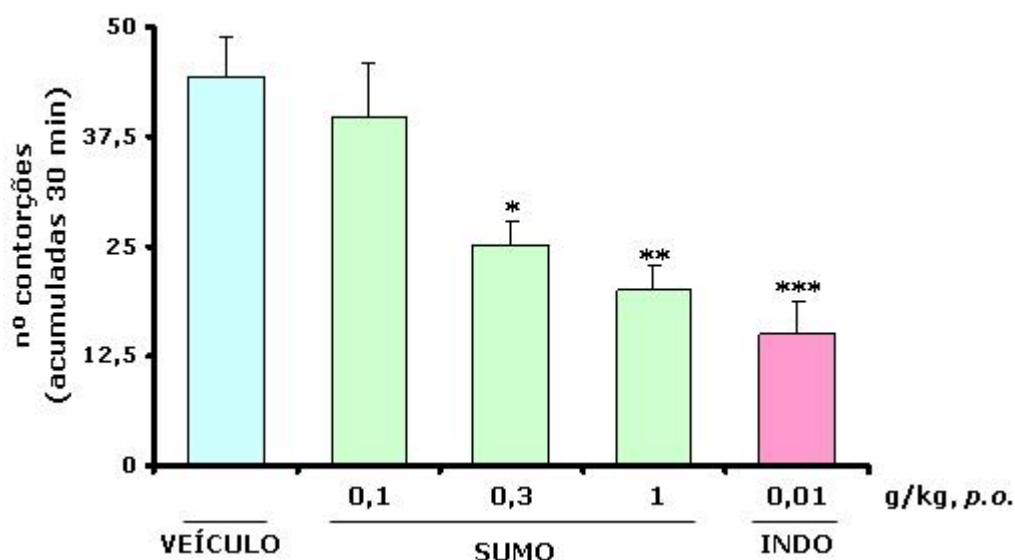


Figura 31: Efeito do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* no número de contorções abdominais. Contorções induzidas por ácido acético (1,2% em salina, 100 µL/10 g, *i.p.*), em camundongos, 1 h após a administração oral do veículo (água), do sumo ou do controle positivo indometacina (INDO). As colunas e barras verticais são as médias ± o erro padrão de 6 animais. Estatisticamente diferente do grupo controle para ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Esses resultados evidenciam a presença de substâncias com atividade antinociceptiva no sumo de *S. dendroideum* que, de forma dose dependente, inibiram significativamente o número de contorções acumuladas.

Este teste é útil para avaliar a analgesia moderada produzida por compostos antiinflamatórios uma vez que substâncias químicas injetadas por via intraperitoneal induzem contorções abdominais devido à sensibilização de nociceptores por prostaglandinas (FERREIRA & VANE, 1974; BERKENKOPF & WEICHMAN, 1988). Entretanto, este método é pouco específico já que é possível haver participação de mecanismos centrais no efeito antinociceptivo observado para o sumo de *S. dendroideum*. Sendo assim, foi necessário realizar ensaios adicionais para caracterizar e determinar os possíveis mecanismos envolvidos com essa antinocicepção.

Teste da Placa Quente

Com o objetivo de determinar os mecanismos envolvidos com a antinocicepção observada para o sumo de *S. dendroideum*, avaliou-se a reatividade de animais ao estímulo térmico com o teste da placa quente.

Neste teste, a latência basal apresentada pelo grupo tratado com veículo (água) foi de $6,7 \pm 0,4$ s. O sumo não modificou a reatividade dos animais ao estímulo térmico doloroso, mesmo na dose que produziu resposta máxima no teste das contorções abdominais (1 g/kg, *p.o.*). Por outro lado, o grupo controle positivo tratado com fentanil (200 µg/kg, via subcutânea), apresentou aumento na latência basal ao estímulo térmico em 3,3 vezes ($29,0 \pm 0,9$ s; 30 min) e 2,8 vezes ($27,9 \pm 1,8$ s; 60 min), quando comparadas suas reatividades ao grupo veículo. Este resultado sugere, a princípio, a não participação de mecanismos centrais na atividade analgésica deste sumo.

Com o objetivo de melhor caracterizar a atividade antinociceptiva do sumo de *S. dendroideum*, utilizou-se o teste da formalina em camundongos.

Teste da Formalina

O teste da formalina permite diferenciar a dor neurogênica (1ª fase) da dor inflamatória (2ª fase) (ABBOTT *et al.*, 1995). A primeira fase de nocicepção (5 minutos iniciais) decorre, em parte, do estímulo direto do formaldeído nos nociceptores e de mediadores como a substância P, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e o glutamato, que são liberados imediatamente após a lesão; enquanto que a segunda fase de nocicepção (15 – 30 minutos) é produzida pelos mediadores inflamatórios.

O pré-tratamento por via oral com o sumo de *S. dendroideum* na dose que produziu o efeito antinociceptivo máximo no modelo das contorções abdominais não modificou a reatividade durante a primeira fase (dor neurogênica) da resposta nociceptiva (**Figura**

32a), e inibiu em 46,5% a reatividade da segunda fase (dor inflamatória), comparativamente ao grupo veículo (**Figura 32b**). O grupo dos animais controle positivo, previamente tratado com indometacina (10 mg/kg, *p.o.*), não modificou a dor neurogênica e reduziu em 62,8% a dor inflamatória da segunda fase de nocicepção (**Figura 32a e 32b**). Estes resultados sugerem a participação de mecanismos antiinflamatórios no efeito analgésico do sumo.

Adicionalmente, a ausência de inibição da primeira fase de nocicepção e a não efetividade no teste da placa quente reforçam que os mecanismos determinantes da atividade antinociceptiva de *S. dendroideum* envolvem mecanismos antiinflamatórios.

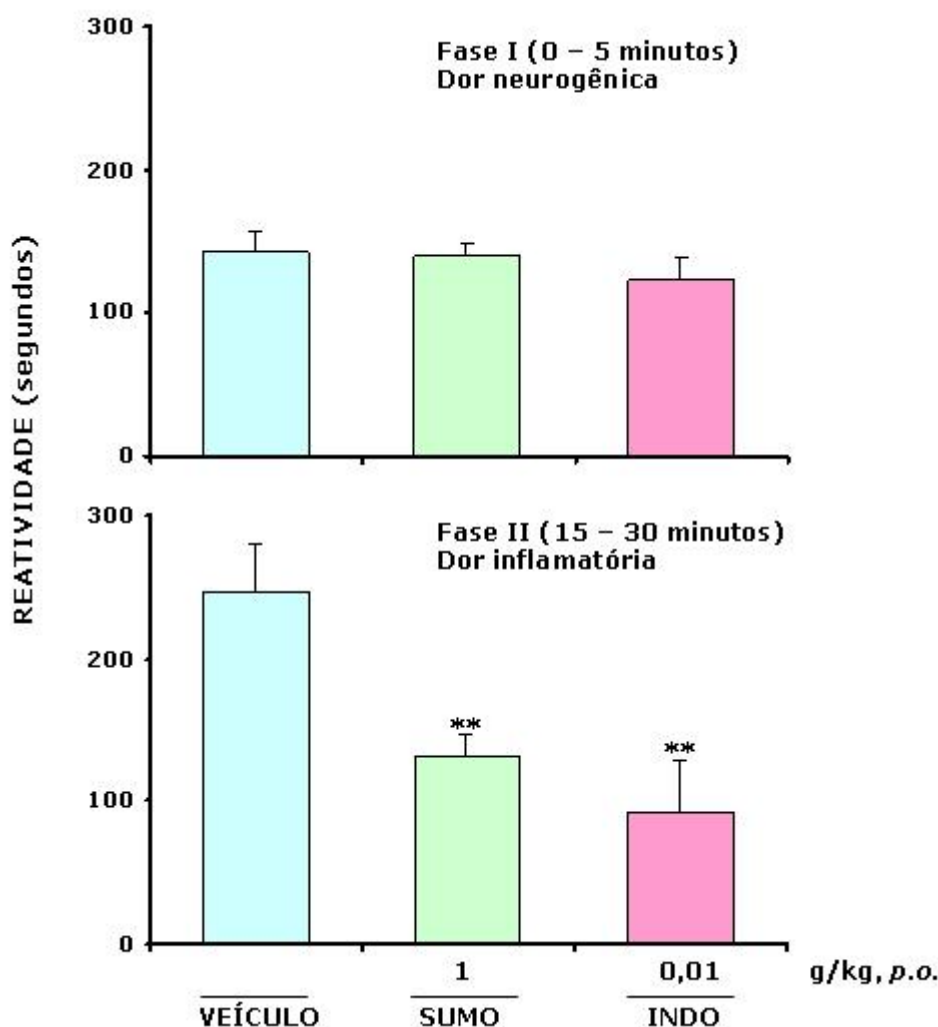


Figura 32: Efeito do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* sobre a dor neurogênica e a dor inflamatória. Reatividade, em segundos, ao estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina (20 μ L, 1,2% em salina), na pata posterior direita de camundongos, após a administração oral do veículo (água), do sumo ou do controle positivo Indometacina (Indo). Cada coluna e barra vertical representam a média $\pm$ erro padrão de 6 a 10 animais. Estatisticamente diferente do grupo controle para ** $p < 0,01$.

Teste do Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton

Além da dor, todo processo inflamatório envolve formação de edema no local injuriado. Com o objetivo de avaliar a atividade antiedematogênica do sumo de *S. dendroideum*, realizou-se o teste do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.

O tratamento com o sumo do *S.dendroideum* (1 g/kg), inibiu significativamente em 66,1% o edema induzido pelo óleo de cróton, quando comparado com o valor do edema produzido no grupo controle. Este efeito antiedematogênico foi semelhante ao da indometacina (57,6%), controle positivo do teste e um potente antiinflamatório não esteroideal (**Figura 33**).

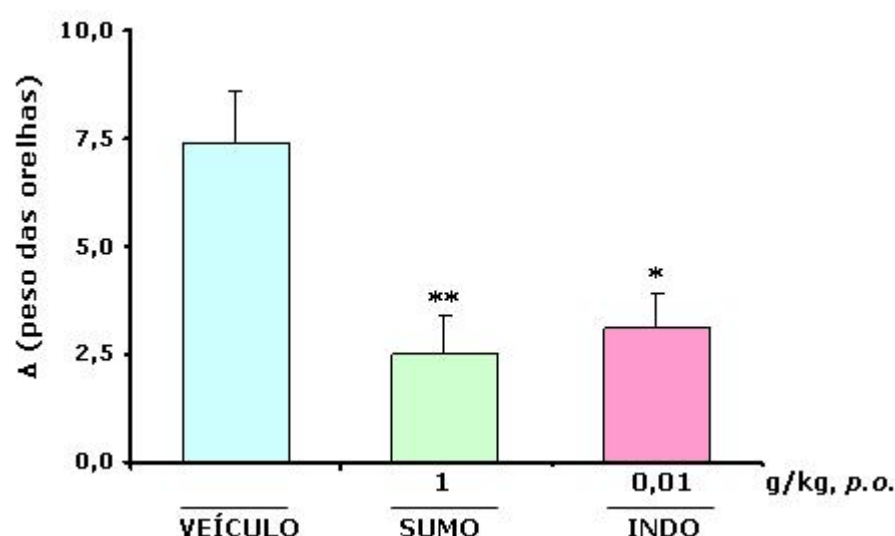


Figura 33: Avaliação da atividade antiedematogênica do sumo das folhas de *Sedum dendroideum*. Média da diferença do peso (mg), entre as orelhas direitas e esquerdas (Δ), representando a resposta edematogênica ao tratamento tópico de óleo de cróton a 5% em acetona, após a administração por via oral do veículo (água), do sumo ou do controle positivo Indometacina (Indo). Cada coluna e barra vertical representam a média $\pm$ erro padrão de 8 animais. Estatisticamente diferente do grupo controle para $**p < 0,01$.

Com este ensaio foi possível observar que o sumo contém princípios com atividade antiedematogênica e, considerando que uma das propriedades das substâncias antiinflamatórias é reduzir a formação do edema, este novo resultado reforça os obtidos anteriormente, que indicam a presença de princípios com atividade antiinflamatória no sumo.

Teste da Migração Leucocitária

Uma outra característica de alguns fármacos antiinflamatórios é a atividade imunossupressora. Esta atividade foi avaliada no teste da migração leucocitária induzida por uma peritonite química após a injeção intraperitoneal de carragenina.

Observou-se que o pré-tratamento com o sumo do *Sedum dendroideum* (1 g/kg) inibiu a migração de leucócitos para o peritônio inflamado em 67,8% quando comparado com o grupo veículo. Da mesma forma, o grupo tratado com o controle positivo dexametasona (2 mg/kg), inibiu em 81,2% (**Figura 34**).

Sendo o teste da migração leucocitária sensível à ação de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (inibidores da ciclooxigenase), bem como a ação dos antiinflamatórios esteroidais (inibidores da fosfolipase A₂) (VINEGAR *et al.*, 1973; MIKAMI & MIYASAKA, 1983), a análise deste resultado em conjunto com os anteriores confirma a presença de substâncias no sumo de *S. dendroideum* que influenciam a síntese de mediadores inflamatórios, exercendo assim as atividades antinociceptiva, antiedematogênica e imunossupressora.

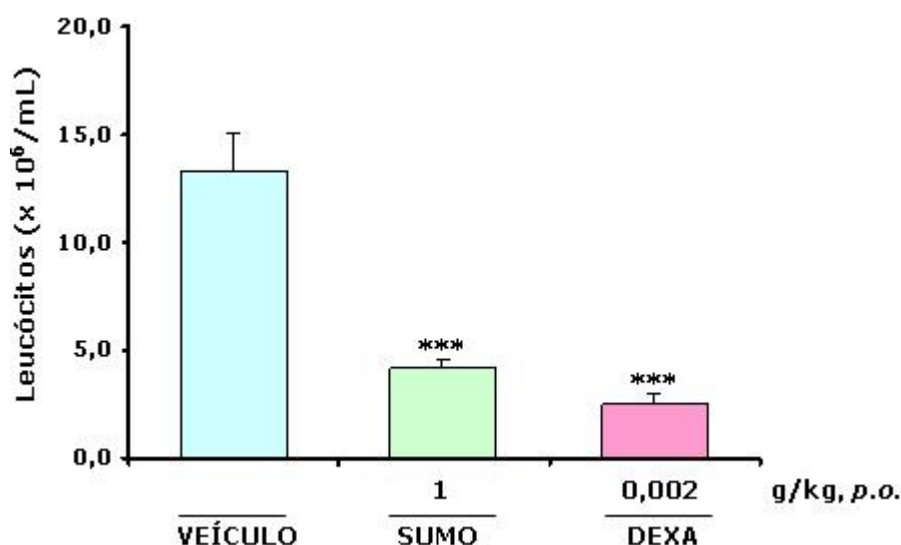


Figura 34: Efeito do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* sobre a migração leucocitária. Número de leucócitos totais (x 10⁶/mL) para a cavidade peritoneal inflamada após injeção intraperitoneal de carragenina 1% em salina, após a administração por via oral do veículo (água), do sumo ou, por via subcutânea, do controle positivo Dexametasona (Dexa). As colunas e as barras verticais representam as médias $\pm$ o erro padrão de 6 a 10 animais. Estatisticamente diferente do grupo controle para *** $p < 0,001$.

Considerando que os testes de avaliação da atividade antinociceptiva dependem de respostas motoras dos animais, resultados falsos positivos surgiriam, caso o sumo do *S. dendroideum* apresentasse atividade depressora do sistema nervoso e/ou produzisse alterações na motricidade. Portanto, com o objetivo de verificar a especificidade dos resultados obtidos nos testes de nocicepção, foi aplicado o teste *rota-rod*.

Teste do *Rota-Rod*

No teste do *rota-rod*, o pré-tratamento com o sumo do *S. dendroideum* (1 g/kg, *p.o.*) não alterou significativamente o tempo de permanência dos animais sobre a barra giratória, quando comparado ao tratamento com veículo (grupo controle; água, *p.o.*). Já os animais do grupo controle positivo, tratados com diazepam (3 mg/kg), tiveram uma diminuição de 24,9% na média de tempo de permanência sobre a barra giratória, quando comparado com a média de tempo do grupo controle (**Figura 35**).

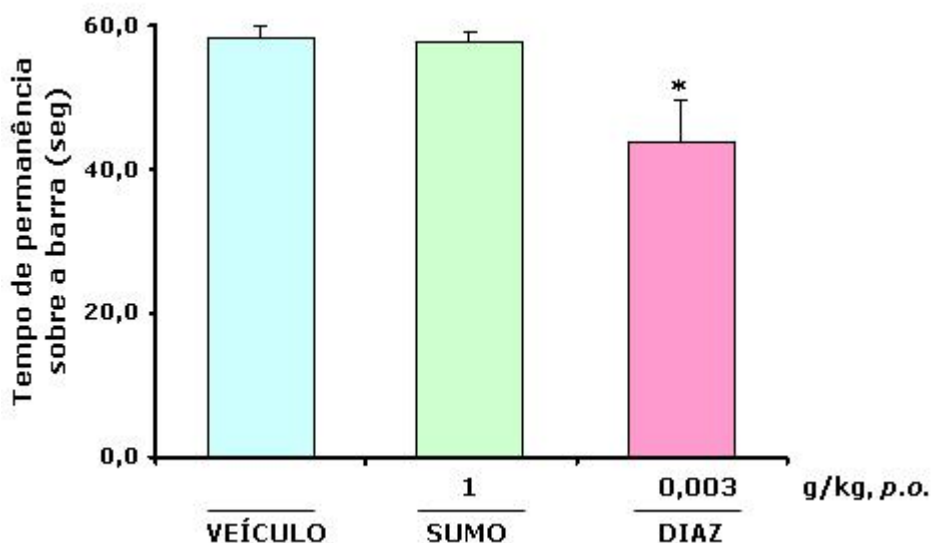


Figura 35: Avaliação do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* no teste do *rota-rod*. Tempo de permanência sobre uma barra giratória (9 rpm), contado até a primeira queda (tempo máximo de 60 s). Grupos de 7 a 12 animais foram submetidos ao pré-tratamento com o veículo (água, *p.o.*), com o sumo ou com diazepam (3 mg/kg, *s.c.*). As colunas e barras verticais representam as médias $\pm$ o erro padrão dos grupos experimentais. Estatisticamente diferente do grupo controle para * $p < 0,05$.

FRACIONAMENTO DO SUMO DE *S. dendroideum* GUIADO PELA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Em busca das substâncias presentes em *S. dendroideum* responsáveis pelas atividades antinociceptiva, antiedematogênica e imunossupressora, foi feita uma precipitação do sumo com etanol na proporção de 1:1, resultando em um sobrenadante (**SF1sn**; 65% do sumo) e um precipitado (**SF1ppt**; 35% do sumo).

Dando prosseguimento aos ensaios biológicos, selecionou-se o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético como “teste triagem” para ir à busca das substâncias ativas presentes no sumo.

Inicialmente, **SF1ppt** foi testado em uma dose igual a maior dose testada do sumo (1 g/kg) para verificar se esta fração apresentava o mesmo efeito observado para o extrato. Porém, o precipitado não apresentou redução no número de contorções acumuladas, indicando que esta fração não concentrou as substâncias responsáveis pela atividade analgésica.

Com o objetivo de avaliar e comparar o efeito analgésico do sobrenadante e do precipitado, **SF1sn** (650 mg/kg) foi testado na dose correspondente ao seu percentual no sumo – 65%, e **SF1ppt** foi testado na dose de 1500 mg/kg (dose inicial que não apresentou atividade - 1 g/kg - + 50% desta dose, o que equivale a aproximadamente 4 vezes o seu percentual no sumo). O precipitado não foi avaliado na dose correspondente ao seu rendimento (0,35 g/kg) já que esta fração não havia apresentado efeito a 1 g/kg.

Ao avaliar o sobrenadante e o precipitado no teste das contorções abdominais, evidenciou-se que tanto **SF1sn** (0,65 g/kg) quanto o **SF1ppt** (1,5 g/kg) reduziram significativamente o número de contorções abdominais acumuladas em 52,3% ($22,9 \pm 2,7$ contorções) e 45,6% ($26,1 \pm 5,3$ contorções), respectivamente, quando comparados com o grupo veículo (água, *p.o.*) (**Figura 36**).

Estes resultados mostram que a maior parte das substâncias com atividade antinociceptiva está presente no sobrenadante, visto que a dose desta fração necessária para inibir as contorções foi inferior à dose do precipitado.

Entretanto, a inibição das contorções abdominais observada com a administração do precipitado mostra que esta fração também contém substâncias analgésicas, que podem ser resíduos do sobrenadante que ficaram retidos no precipitado após o fracionamento; ou substâncias de outras classes, o que demonstraria que a atividade do sumo se dá por um pela presença conjunta de princípios com atividade antinociceptiva.

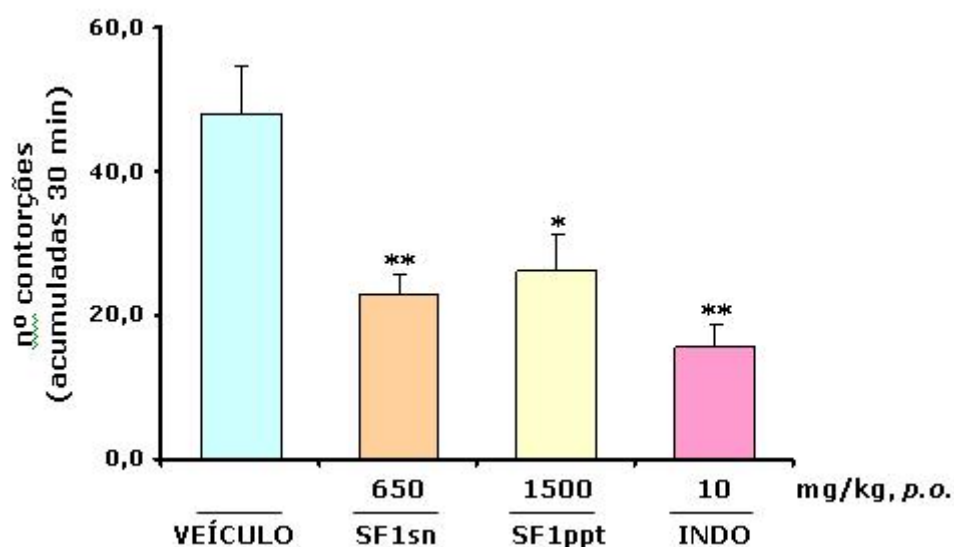


Figura 36: Efeito do sobrenadante e do precipitado obtidos do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* sobre o número de contorções abdominais. Contorções induzidas por ácido acético (1,2% em salina, 100 μ L/10g; *i.p.*), em camundongos, 1 h após a administração oral do veículo (água), do sobrenadante (**SF1sn**), do precipitado (**SF1ppt**) ou do controle positivo indometacina (INDO). As colunas e barras verticais são as médias $\pm$ o erro padrão de 6 a 8 animais. Estatisticamente diferente do grupo controle para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Seguindo o fracionamento monitorado pela atividade antinociceptiva do sobrenadante obtido da precipitação do sumo de *S. dendroideum*, a fração **SF1sn** foi purificada em uma coluna de sílica de fase inversa RP-2 (**Esquema 2**, pág. 39), utilizando gradiente $H_2O/MeOH$, originando duas frações com características bem distintas: uma fração aquosa (**SF1A**; 92%), eluída com água, e uma fração metanólica (**SF1M**; 8%), eluída com $MeOH$ e gradientes, e rica em flavonóides.

A dose utilizada para testar a fração aquosa foi equivalente a 92% de **SF1sn**, enquanto que a dose escolhida para testar a fração metanólica foi de 100 mg/kg, o que equivale ao dobro da dose de seu rendimento (8% de **SF1sn**). Esta dose foi escolhida a fim de se evitar perda de material no tratamento dos animais, o que aumentaria o erro experimental.

Ao avaliar **SF1A** (600 mg/kg) e **SF1M** (100 mg/kg) no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, observou-se que o pré-tratamento com ambas as frações reduziu significativamente o número de contorções abdominais acumuladas em torno de 50% (**SF1A**: $19,3 \pm 4,9$ contorções; **SF1M**: $22,6 \pm 3,2$ contorções) quando

comparado ao grupo veículo tratado com água ($40,0 \pm 4,5$ contorções). Entretanto, foi necessária uma dose seis vezes maior de **SF1A** para se observar a mesma atividade para **SF1M** (Figura 37).

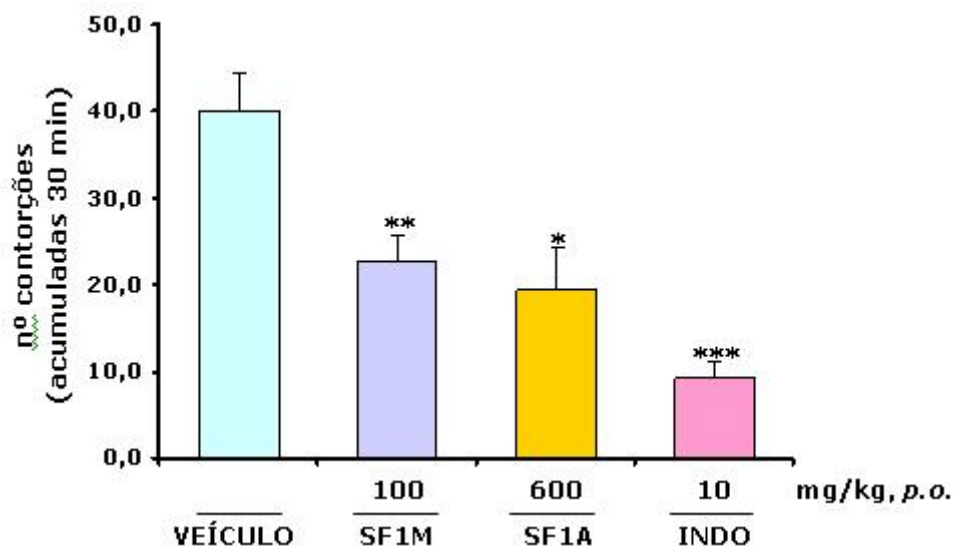


Figura 37: Avaliação das frações aquosa e metanólica sobre as contorções abdominais. Contorções induzidas por ácido acético (1,2% em salina, 100 μ L/10g, *i.p.*), em camundongos previamente tratados (1 h) por via oral com o veículo (água), controle positivo indometacina (INDO) e com as frações metanólica (**SF1M**) e aquosa (**SF1A**) obtidas do fracionamento do sobrenadante de *S. dendroideum*. As colunas e barras verticais representam as médias $\pm$ erro padrão de 6 a 10 animais. Estatisticamente diferente do grupo controle para * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Este ensaio evidenciou que as principais substâncias que contribuem para a atividade antinociceptiva previamente observada para o sumo de *S. dendroideum* concentram-se na fração metanólica.

Esta fração foi posteriormente cromatografada e purificada, de onde foram obtidos alguns flavonóides, sendo que somente quatro flavonóides foram isolados com massa suficiente para realização dos ensaios farmacológicos. São estes: **SF1**, **SF2**, **SF3** e **SF6**.

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DE FLAVONÓIDES ISOLADOS DO SUMO DE *S. dendroideum*

Para avaliação das atividades antinociceptiva e antiinflamatória de flavonóides isolados do sumo das folhas de *Sedum dendroideum*, foram escolhidos os testes das contorções abdominais induzidas por ácido acético e da migração leucocitária.

Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Com o objetivo de avaliar a atividade antinociceptiva dos flavonóides presentes no sumo de *S. dendroideum*, estes foram testados em três doses diferentes. Inicialmente os flavonóides foram testados na dose de 10 mg/kg, a mesma dose utilizada para o controle positivo indometacina. Apresentando atividade, novo ensaio foi realizado utilizando a dose de 3 mg/kg e, em seguida, 1 mg/kg (**Figura 38**).

No teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, o pré-tratamento com os flavonóides nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg produziu uma inibição das contorções abdominais, quando comparados com o grupo veículo, comprovando a importância dessas substâncias na atividade antinociceptiva observada para o sumo.

Para **SF1**, observou-se o máximo de 59,9% de inibição quando testado na dose de 1 mg/kg. Este efeito antinociceptivo foi semelhante ao da indometacina, controle positivo do teste e um potente antiinflamatório não-esteroidal, que reduziu a nocicepção em 68,8%. Esta atividade foi semelhante à observada para **SF6**, que também com a menor dose (1 mg/kg) produziu inibição de 55,4% no número de contorções.

Para o flavonóide **SF3**, observou-se uma redução significativa no número de contorções (60,1%) somente na dose de 10 mg/kg. Como na dose de 3 mg/kg não foi observada atividade, este flavonóide não foi testado na dose menor, de 1 mg/kg.

Enquanto **SF1**, **SF3** e **SF6** apresentaram inibições significativas do número de contorções acumuladas, o mesmo não pode ser observado para **SF2**. Nas doses testadas (1, 3, 10 mg/kg), o pré-tratamento com **SF2** não apresentou inibição da nocicepção dos animais quando comparado ao grupo tratado com veículo. Porém, este flavonóide apresenta tendência de inibição, mesmo não sendo significativo, uma vez que se observou uma leve inibição do número de contorções acumuladas quando comparado ao grupo veículo.

O grupo tratado com o controle positivo do teste indometacina (10 mg/kg) inibiu em 68,8% o número de contorções abdominais acumuladas quando comparada ao grupo veículo.

Os resultados das contorções com os flavonóides **SF1**, **SF2** e **SF6** não apresentaram uma relação dose-efeito característica, ou seja, quanto maior a dose, maior o efeito. Portanto, este resultado é indicativo de inibição máxima com as 3 doses.

Como visto anteriormente, os quatro flavonóides testados apresentam efeitos antinociceptivos variáveis nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg quando administrados por via oral, o que indica que o efeito nociceptivo do sumo é dependente da participação conjunta destes flavonóides.

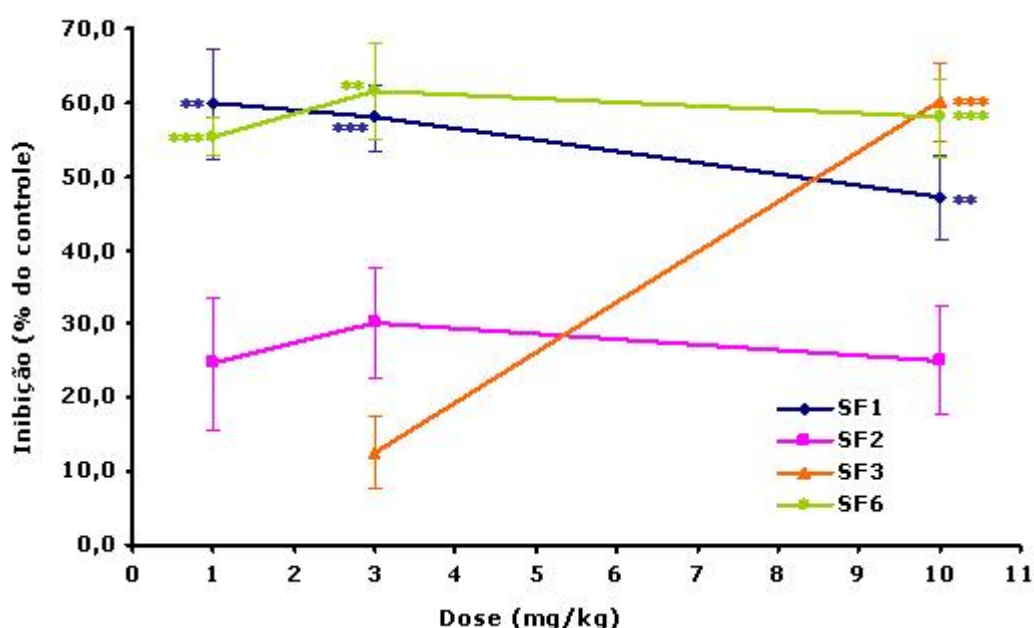


Figura 38: Inibição do número de contorções abdominais pelos flavonóides isolados de *Sedum dendroideum*. Contorções induzidas por ácido acético (1,2 % em salina, 100 μ L/10g, *i.p.*), em camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral (*p.o.*) com os flavonóides **SF1**, **SF2**, **SF3** e **SF6** nas dose de 1, 3 e 10 mg/kg. Médias $\pm$ erro padrão de 5 a 7 animais. Estatisticamente diferente do grupo controle para $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

Entretanto, considerando que a kaempferitrina (**SF1**) é o flavonóide majoritário presente no bálsamo, ela pode ser considerada como principal responsável por essa atividade. Enquanto a administração por via oral do sumo (1 g/mg) em camundongos inibiu em 54,6% a nocicepção, **SF1**, na dose de 1 mg/kg, apresentou uma inibição de 59,9 %.

Sabendo que estes flavonóides contribuem para a atividade antinociceptiva do sumo, viu-se a necessidade de avaliar a influência dessas substâncias sobre a atividade antiinflamatória.

Teste da Migração Leucocitária

Com o objetivo de avaliar a participação de mecanismos antiinflamatórios na atividade antinociceptiva evidenciada anteriormente no teste das contorções, os flavonóides **SF1**, **SF2** e **SF6** (10 mg/kg) foram avaliados quanto à atividade antiinflamatória no teste da migração leucocitária induzida por carragenina. O flavonóide **SF3**, por apresentar massa insuficiente, não pôde ser avaliado neste teste.

Na dose testada, os grupos tratados por via oral com os flavonóides **SF1**, **SF2** e **SF6** inibiram a migração leucocitária em 43,0%, 46,3% e 49,7%, respectivamente, quando comparado ao grupo tratado com veículo (água). Da mesma forma, o grupo tratado com o controle positivo dexametasona (2 mg/kg, s.c.) apresentou inibição de 66,1% (**Tabela 19**).

Tabela 19: Efeito dos flavonóides obtidos do sumo das folhas de *Sedum dendroideum* no teste da migração leucocitária induzida por carragenina.

Substâncias	Nº de leucócitos totais (x 10 ⁶)	Inibição (% do controle)
Veículo (água)	12,1 ± 1,0	0
Dexa	4,1 ± 0,5****	66,1
SF1	6,9 ± 0,9*	43,0
SF2	6,5 ± 0,5***	46,3
SF6	6,1 ± 0,4***	49,7

Dexa: dexametasona (2 mg/kg; s.c.); **SF1**, **SF2** e **SF6** (10 mg/kg, p.o.).

Médias ± erro padrão de 9 a 12 animais. Estatisticamente diferente do grupo controle para * $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$

Comparando o percentual de inibição dos três flavonóides testados, verifica-se que estes apresentam o mesmo perfil de atividade (em torno de 50%). Além disso, observa-se uma interessante atividade para o flavonóide **SF2**, ao contrário do observado no teste antinociceptivo, onde ela apenas apresentava tendência de inibição.

Estes resultados indicam que a atividade antinociceptiva apresentada por **SF1** e **SF6** pode ser explicada, em parte, pela atividade antiinflamatória observada para eles (influência na síntese de mediadores inflamatórios). Porém o mecanismo antiinflamatório apresentado por estes flavonóides não pode ser aplicado a **SF2**, visto que este não apresentou efeitos analgésicos. Este flavonóide provavelmente está inibindo mediadores que não estão envolvidos com a nocicepção.

Como o teste da migração leucocitária é sensível à ação de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (inibidores da ciclooxigenase), bem como a ação dos antiinflamatórios esteroidais (inibidores da fosfolipase A₂) (VINEGAR *et. al.*, 1973; MIKAMI & MIYASAKA, 1983), a análise deste resultado em conjunto com os anteriores confirma a influência dos flavonóides presentes no sumo do *Sedum dendroideum* na síntese de mediadores inflamatórios, exercendo assim as atividades antinociceptiva, antiedematogênica e imunossupressora.

Análise das Atividades Antinociceptiva e Antiinflamatória dos Flavonóides

Todos os flavonóides testados, quando administrados por via oral, apresentaram as atividades antinociceptiva e/ou antiinflamatória. De todos eles, **SF2** é o único que não apresentou atividade analgésica significativa, uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados com este flavonóide (1, 3 e 10 mg/kg) e o grupo tratado com veículo (água). Observou-se uma tendência de inibição deste flavonóide, mesmo não sendo significativa.

Comparando os resultados na dose de 10 mg/kg, **SF1**, **SF3** e **SF6** apresentaram o mesmo perfil de inibição do número de contorções abdominais comparado ao controle positivo do teste (indometacina). Este padrão de inibição também foi observado para os flavonóides avaliados quanto à atividade antiinflamatória (**SF1**, **SF2** e **SF6**).

Para avaliar de maneira direta esse resultado e eliminar as variações decorrentes do peso molecular dos flavonóides em questão, a dose em mg/kg foi transformada em número de mols/kg (**Tabela 20**).

Tabela 20: Percentuais de inibição da nocicepção e da inflamação dos flavonóides **SF1**, **SF2** e **SF3** e **SF6**, em dose molar (mmol/kg), para a dose de 10 mg/kg.

Flavonóides	Massa molecular	mmol / kg	% Inibição nocicepção	% Inibição inflamação
SF1	578,5	17,29	47,3	43,0
SF2	594,5	16,82	25,0	46,3
SF3	740,7	13,50	60,1	-
SF6	432,4	23,13	58,0	49,7

Avaliando a atividade antinociceptiva dos flavonóides na dose de 10 mg/kg, observa-se que com um menor número de mols de **SF3** obtém-se uma maior inibição das contorções abdominais quando comparada aos flavonóides **SF1** e **SF6**. Ou seja, na maior dose testada, **SF3** é a substância mais ativa.

Porém, quando a dose é reduzida a 3 mg/kg, **SF3** perde a atividade. Esta perda pode ser ocasionada pelo baixo número de moléculas presentes no local alvo, uma vez que estes flavonóides são administrados por via oral e os processos de absorção e metabolização atrapalham a biodisponibilidade destas substâncias (ver adiante).

Avaliando as atividades antinociceptivas dos flavonóides **SF1** e **SF6** nas três doses testadas, observa-se um patamar de atividade, não havendo diferenças estatísticas entre elas. Porém, se for levado em consideração que a dose molar do flavonóide **SF6** é maior que a de **SF1**, esta diferença já passa a ser mais significativa. **SF1** seria, portanto, mais ativo.

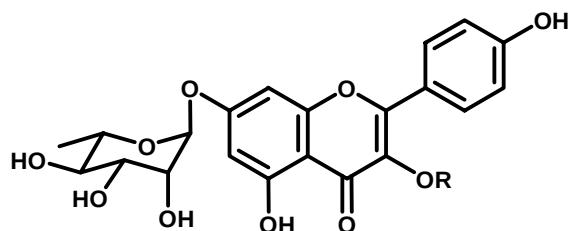
No caso da atividade antiinflamatória, onde o perfil de atividade é o mesmo para as substâncias testadas, o flavonóide **SF2** se destaca como a substância mais ativa. Com a menor dose molar ele apresenta a mesma atividade que **SF1** e **SF6**.

Para discutir a atividade real dos flavonóides em um determinado sistema, é fundamental considerar os fatores externos que podem estar influenciando na sua atividade. Em se tratando de compostos administrados por via oral, todo o processo de absorção e metabolização podem diminuir significativamente a biodisponibilidade destas substâncias.

A absorção de substâncias está intimamente ligada às características químicas das moléculas como solubilidade, lipossolubilidade e estabilidade frente às enzimas presentes no trato gastrointestinal, dentre outros.

Para estabelecer os parâmetros corretos acerca das atividades antinociceptiva e antiinflamatória dos flavonóides, é necessário conhecer as variações estruturais existentes entre os flavonóides testados.

Com relação à estrutura dos quatro flavonóides testados, todos possuem o esqueleto do kaempferol e uma unidade de ramnose substituída na posição 7. O que vai diferenciá-los é a substituição na posição 3 (**Figura 39**).



Flavonóides	R
SF1	ramnose
SF2	glicose
SF3	neo-hesperidose
SF6	H

Figura 39: Padrão de substituição dos flavonóides **SF1**, **SF2**, **SF3** e **SF6**.

A absorção e a biodisponibilidade de flavonóides glicosídicos são assuntos muito discutidos já que estes passam por processos de metabolização durante a absorção intestinal e sua distribuição até acúmulo em tecidos específicos (PRASAIN *et al.*, 2004).

Durante muito tempo acreditou-se que todo flavonóide glicosídico era desglicosilado a agliconas por enzimas bacterianas presentes no intestino delgado e que estas poderiam ser parcialmente absorvidas ou sofrerem novas biotransformações pelas bactérias. Entretanto, estudos recentes relatam que alguns flavonóides podem ser detectados no plasma de humanos ou ratos em sua forma intacta, indicando que os glicosídeos podem ser absorvidos antes de serem hidrolisados (AZIZ *et al.*, 1998; CHANG *et al.*, 2005).

Atualmente sabe-se que, além da absorção intacta de flavonóides glicosídicos, estes podem ser hidrolisados ainda no intestino delgado, podem entrar nos enterócitos e ser metabolizados por uma β -glicosidade presente nestas células, ou então ser metabolizados por enzimas produzidas por bactérias gastrintestinais (ERLUND *et al.*, 2000; WALLE, 2004).

Portanto, levando em consideração que no plasma encontram-se predominantemente os metabólitos dos flavonóides glicosídicos (agliconas sulfatadas ou glicuronizadas), é muito difícil estabelecer uma relação estrutura-atividade para os flavonóides testados uma vez que estes não são as substâncias presentes no local injuriado.

Entretanto, considerando a lipossolubilidade de alguns flavonóides, estes podem atravessar a membrana dos enterócitos por difusão, evitando de certo modo sua metabolização pelas bactérias intestinais e possível excreção. Logo, flavonóides mais apolares como **SF1** e **SF6** seriam mais capazes de serem absorvidos e, conseqüentemente, exercer suas atividades antinociceptiva e antiinflamatória.

ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DE FLAVONÓIDES

Os flavonóides são um grupo de aproximadamente 4000 substâncias de ocorrência natural que estão distribuídos em todas as plantas vasculares (DI CARLO *et al.*, 1999), sendo encontrados em várias plantas medicinais. Além disso, os fitoterápicos que contêm flavonóides têm sido utilizados na medicina popular em todo o mundo (SIERPINA *et al.*, 2003).

Os flavonóides possuem uma grande variedade de atividades biológicas, tais como antioxidante, antiulcerogênico, antinociceptivo e antiinflamatório (PATHAK *et al.*, 1991; BORELLI & IZZO, 2000; PIETTA, 2000; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; MIDDLETON JR *et al.*, 2000).

Entretanto, duas das aplicações dos flavonóides se destacam: o uso contra processos inflamatórios e, contraditoriamente, contra úlceras gástricas. Como dito anteriormente, os medicamentos mais utilizados (AINEs) pecam justamente pelos danos que causam à mucosa gastrintestinal. Portanto, a presença desta classe de substâncias em *Sedum dendroideum* desempenha um papel fundamental nos efeitos terapêuticos observados para esta espécie.

Não foram encontrados relatos na literatura para a atividade antinociceptiva dos flavonóides **SF3** e **SF6** isolados de *S. dendroideum*. Esta é, portanto, a primeira evidência da atividade analgésica para esses flavonóides. Mesmo para **SF2**, que na maior dose testada (10 mg/kg) apresentou apenas tendência de inibição da analgesia, nada se encontra sobre sua atividade no combate à dor e à inflamação.

Na avaliação da atividade antiinflamatória dos flavonóides **SF1**, **SF2** e **SF6** isolados de *S. dendroideum*, todos os flavonóides testados apresentaram uma boa atividade. Apesar de existirem relatos para a atividade antiinflamatória dos flavonóides **SF1** (TOKER *et al.*, 2004) e **SF6** (PATHAK *et al.*, 1991), esta é a primeira evidencia dessa atividade para o flavonóide **SF2**.

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar as atividades antinociceptiva e antiinflamatória de flavonóides e seus mecanismos de ação, porém são poucos os relatos desta atividade para flavonóides com esqueleto de kaempferol (TOKER *et al.*, 2004).

Na literatura há relatos para a atividade analgésica do kaempferol 3-O-soforosídeo, isolado de *Cassia alata* (PALANICHAMY & NAGARAJAN, 1990) e da kaempferitrina, isolada de *Tilia argentea* (TOKER *et al.*, 2004), e também evidenciada neste trabalho. Estes são alguns dos relatos para os efeitos antinociceptivos observados para derivados de kaempferol.

Vários relatos para a atividade antiinflamatória de flavonóides são encontrados, cujo mecanismo antiinflamatório está relacionado com a inibição de mediadores da inflamação como as prostaglandinas, os leucotrienos e o óxido nítrico (DI CARLO *et al.*, 1999), e também com a sua capacidade de atuar como antioxidante (PIETTA, 2000). Estes mecanismos estão envolvidos com a inibição das enzimas fosfolipase A₂, 5-lipoxigenase, ciclooxygenase e óxido nítrico sintase indutível (i-NOS) e com sua capacidade de captar radicais livres (LINDAHL & TAGESSON, 1997; WILLIAMS *et al.*, 1999; MIDDELETON JR *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001; RASO *et al.*, 2001; SCHEWE, *et al.*, 2002).

Estudos mostram que a presença de um padrão catecol no anel B do flavonóide, ou seja, anel 3',4'-diidroxilado, a insaturação no anel C (entre C-2 e C-3) e a carbonila em C-4 parecem ser fundamentais para uma alta atividade inibitória desta classe de compostos sobre as enzimas fosfolipase A₂, ciclooxygenase e 5-lipoxigenase (LINDAHL & TAGESSON, 1997; SCHNEIDER & BUCAR, 2005). Entretanto, subclasses de flavonóides que não possuem um destes padrões em sua estrutura, como no caso do kaempferol (aglicona encontrada nas folhas de *S. dendroideum*), também se destacam por apresentar atividade sobre algumas enzimas responsáveis pela cascata da inflamação.

GIL *et al.* (1994) relataram que o kaempferol-3-O-galactosídeo apresentou efeitos antiinflamatórios em experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* (enzima fosfolipase A₂). Outros dois glicosídeos de kaempferol, tilirosídeo (kaempferol 3-O-(6"-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo) e astragalina (kaempferol 3-O-glicosídeo) apresentaram uma potente inibição na produção de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória (MATSUDA *et al.*, 2002). Além disso, recentemente foi evidenciada a atividade inibitória da enzima iNOS pelo kaempferol (AUTHORE *et al.*, 2001). Este flavonóide também apresentou uma potente inibição na liberação de NO e da expressão de iNOS (LIANG *et al.*, 1999).

Embora esses dados mostrem a significância dessa classe de substâncias nos efeitos analgésicos e antiinflamatórios observados para o sumo, fazendo delas as principais substâncias responsáveis por esta atividade, não pode ser descartada, entretanto, a participação de outras substâncias presentes no sumo de *S. dendroideum*. Além disso, os resultados obtidos no presente trabalho sustentam a importância de flavonóides com esqueleto de kaempferol no combate aos processos antiinflamatórios.

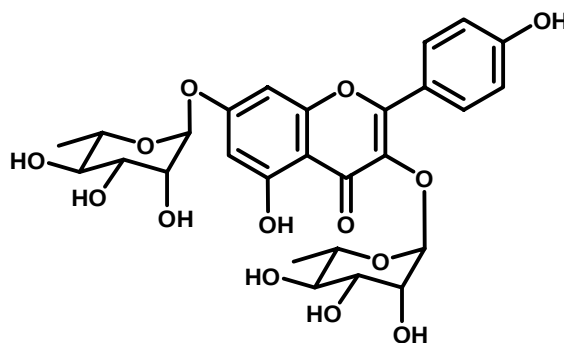
**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS,
DADOS ESPECTROMÉTRICOS E FARMACOLÓGICOS
DOS FLAVONÓIDES ISOLADOS DE *Sedum dendroideum***

RESUMO DOS FLAVONÓIDES ISOLADOS

Kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo

(SF1 = SC1; kaempferitrina)

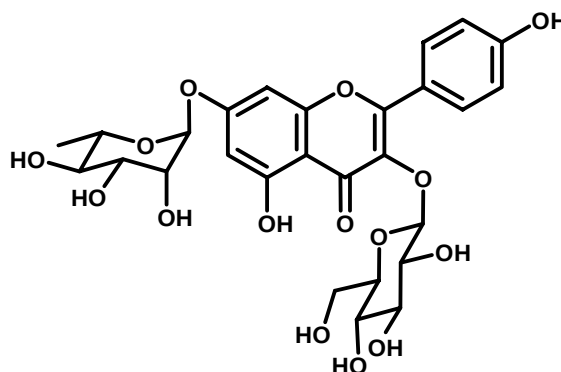
- ☞ Fórmula molecular: $C_{27}H_{30}O_{14}$
- ☞ Rotação óptica: $[\alpha]_D^{25} -234,7$ (c 1, MeOH)
- ☞ Íon pseudomolecular: m/z 601,15 $[M+Na]^+$
- ☞ Tempo de retenção: 17,832 minutos
- ☞ Teor no sumo das folhas: $\sim 0,71\%$ (m/m)
- ☞ Teor no extrato dos caules: $\sim 0,12\%$ (m/m)
- ☞ RMN 1H e ^{13}C (**Tabela 7**, pág. 71)
- ☞ % inibição nocicepção: 47,3% (10 mg/kg); 58,0% (3 mg/kg); 59,9% (1 mg/kg)
- ☞ % inibição inflamação: 43,0% (10 mg/kg)



Kaempferol 3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo

(SF2 = SC2)

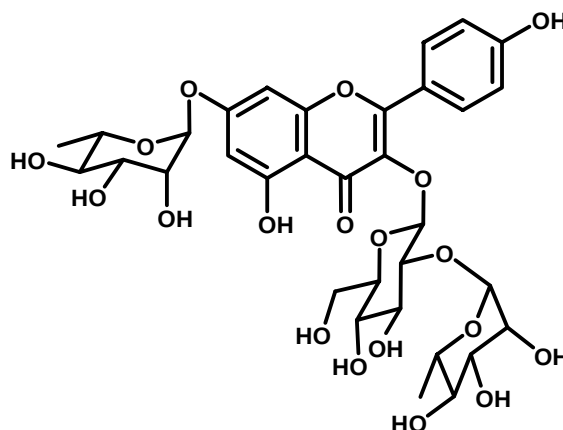
- ☞ Fórmula molecular: $C_{27}H_{30}O_{15}$
- ☞ Rotação óptica: $[\alpha]_D^{25} -100,1$ (c 1, MeOH)
- ☞ Íon pseudomolecular: m/z 617,15 $[M+Na]^+$
- ☞ Tempo de retenção: 15,549 minutos
- ☞ Teor no sumo das folhas: $\sim 0,44\%$ (m/m)
- ☞ Teor no extrato dos caules: $\sim 0,044\%$ (m/m)
- ☞ RMN 1H e ^{13}C (**Tabela 8**, pág. 80)
- ☞ % inibição nocicepção: 25,0% (10 mg/kg); 30,1% (3 mg/kg); 24,6% (mg/kg)
- ☞ % inibição inflamação: 46,3% (10 mg/kg)



Kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo

(SF3 = SC4)

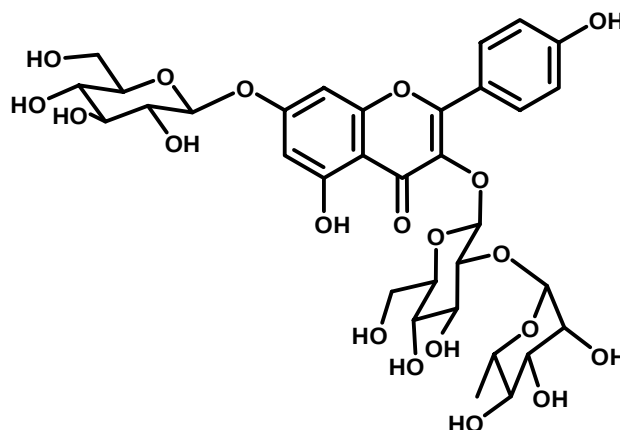
- ☞ Fórmula molecular: C₃₃H₄₀O₁₉
- ☞ Rotação óptica: $[\alpha]_D^{25}$ -80,7 (c 1, MeOH)
- ☞ Íon pseudomolecular: m/z 763,20 [M+Na]⁺
- ☞ Tempo de retenção: 13,682 minutos
- ☞ Teor no sumo das folhas: ~ 0,31% (m/m)
- ☞ Teor no extrato dos caules: ~ 0,098% (m/m)
- ☞ RMN ¹H e ¹³C (**Tabela 9**, pág. 90)
- ☞ % inibição nocicepção: 60,1% (10 mg/kg)



Kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo- β -D-glicopiranosídeo-7-O- β -D-glicopiranosídeo

(SF4)

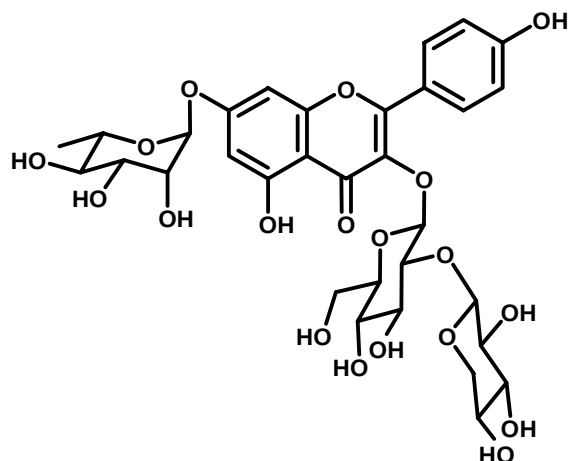
- ☞ Fórmula molecular: C₃₃H₄₀O₂₀
- ☞ Rotação óptica: $[\alpha]_D^{25}$ -5,7 (c 1, H₂O)
- ☞ Íon pseudomolecular: m/z 755,2 [M - H]⁻
- ☞ Tempo de retenção: 11,942 minutos
- ☞ Teor no sumo das folhas: ~ 0,084% (m/m)
- ☞ RMN ¹H e ¹³C (**Tabela 10**, pág. 99)



Kaempferol 3-O- β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo

(SF5)

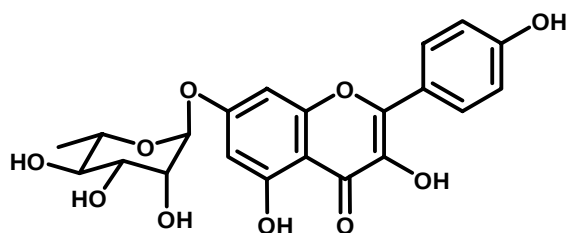
- ☞ Fórmula molecular: C₃₂H₃₈O₁₉
- ☞ Rotação óptica: $[\alpha]_D^{25}$ -220,0 (c 1, MeOH)
- ☞ Íon pseudomolecular: m/z 725,2 [M - H]⁻
- ☞ Tempo de retenção: 14,024 minutos
- ☞ Teor no sumo das folhas: ~ 0,049% (m/m)
- ☞ RMN ¹H e ¹³C (**Tabela 11**, pág. 108)



Kaempferol 7-O- α -L-ramnopiranosídeo

(SF6; α -ramnoisorobina)

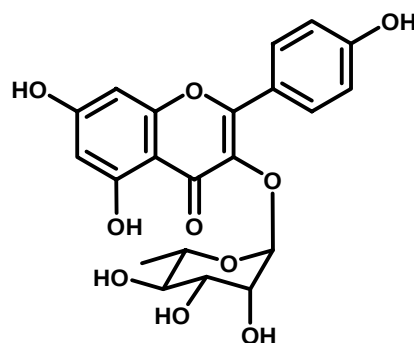
- ☞ Fórmula molecular: C₂₁H₂₀O₁₀
- ☞ Rotação óptica: $[\alpha]_D^{25}$ -92,0 (c 1, MeOH)
- ☞ Íon pseudomolecular: m/z 455,15 [M+Na]⁺
- ☞ Tempo de retenção: 40,873 minutos
- ☞ Teor no sumo das folhas: ~ 0,019% (m/m)
- ☞ RMN ¹H e ¹³C (**Tabela 12**, pág. 115)
- ☞ % inibição nocicepção: 58,0% (10 mg/kg); 61,6% (3 mg/kg); 55,4% (mg/kg)
- ☞ % inibição inflamação: 49,7% (10 mg/kg)



Kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo

(SF7; afzelina)

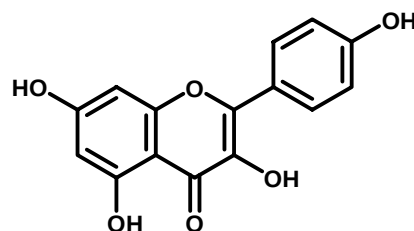
- ☞ Fórmula molecular: $C_{21}H_{20}O_{10}$
- ☞ Rotação óptica: $[\alpha]_D^{25} -87,0$ (c 1, MeOH)
- ☞ Íon pseudomolecular: m/z 431,0 $[M - H]^-$
- ☞ Tempo de retenção: 29,368 minutos
- ☞ Teor no sumo das folhas: $\sim 0,004\%$ (m/m)
- ☞ RMN 1H e ^{13}C (**Tabela 13**, pág. 122)



Kaempferol

(SF8)

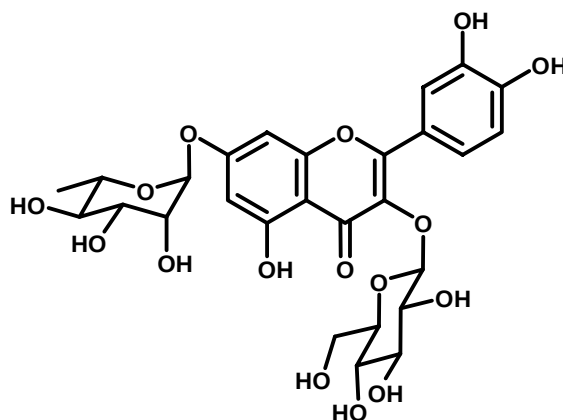
- ☞ Fórmula molecular: $C_{15}H_{10}O_6$
- ☞ Teor no sumo das folhas: traços
- ☞ RMN 1H e ^{13}C (**Tabela 14**, pág. 124)



Quercetina 3-O-β-D-glicopiranosídeo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo

(SC3)

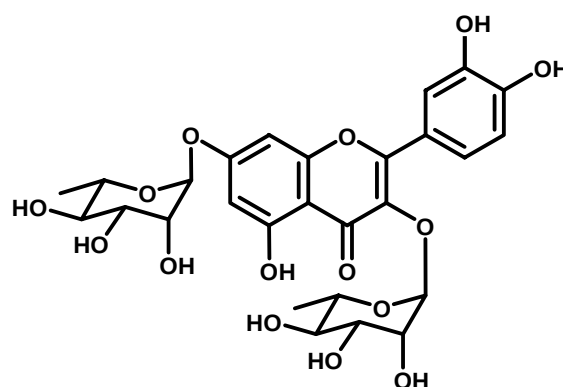
- ☞ Fórmula molecular: $C_{27}H_{30}O_{16}$
- ☞ Rotação óptica: $[\alpha]_D^{25} -24,0$ (c 0,5; MeOH)
- ☞ Íon pseudomolecular: m/z 609,2 $[M - H]^-$
- ☞ Tempo de retenção: 14,446 minutos
- ☞ Teor no extrato dos caules: ~ 0,078% (m/m)
- ☞ RMN 1H e ^{13}C (**Tabela 15**, pág. 137)



Quercetina 3-O-α-L-ramnopiranosídeo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo

(SC5)

- ☞ Fórmula molecular: $C_{27}H_{30}O_{15}$
- ☞ Rotação óptica: $[\alpha]_D^{25} -136,0$ (c 1, MeOH)
- ☞ Íon pseudomolecular: m/z 593,2 $[M - H]^-$
- ☞ Tempo de retenção: 16,120 minutos
- ☞ Teor no extrato dos caules: ~ 0,035% (m/m)
- ☞ RMN 1H (**Tabela 16**, pág. 143)





CONCLUSÕES

Foram isolados oito flavonóides do sumo das folhas de *Sedum dendroideum*, todos com esqueleto de kaempferol. São eles: kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF1**; kaempferitrina); kaempferol 3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF2**); kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF3**); kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- β -D-glicopiranosídeo (**SF4**); kaempferol 3-O- β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF5**); kaempferol 7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF6**); kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SF7**; afzelina) e kaempferol (**SF8**).

☞ Os únicos flavonóides que não foram identificados anteriormente em outras espécies do gênero *Sedum* foram **SF4** e **SF5**.

☞ Este é o primeiro relato do isolamento e da completa elucidação estrutural do flavonóide **SF5**. Estão sendo apresentados pela primeira vez os dados de RMN ^1H e ^{13}C , espectrometria de massas e rotação óptica.

☞ A partir do extrato aquoso dos caules de *S. dendroideum* foram isolados cinco flavonóides, sendo que três deles já tinham sido encontrados nas folhas (**SC1** = **SF1**, **SC2** = **SF2** e **SC4** = **SF3**). Os outros dois flavonóides são derivados da aglicona quercetina: quercetina 3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SC3**) e quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (**SC5**).

☞ Os flavonóides **SC3** e **SC5** foram identificados anteriormente na espécie *Sedum telephium* ssp. *maximum*.

☞ Dentre as espécies do gênero *Sedum*, a espécie *S. telephium* ssp. *maximum* é a que mais se parece com *S. dendroideum* quanto ao perfil químico. Dos dez flavonóides isolados no bálsamo, oito podem ser encontrados nesta espécie.

☞ O isolamento de oito flavonóides derivados de kaempferol em *Sedum dendroideum* confirma esta aglicona como segundo lugar em ocorrência no gênero, perdendo apenas para a quercetina. Dos flavonóides presentes no gênero *Sedum*, 34% apresentam esta aglicona como esqueleto principal.

☞ A análise do sumo das folhas por CLAE-UV-EM permitiu determinar **SF1** como o flavonóide majoritário presente no bálsamo, correspondendo a aproximadamente 0,71% do sumo seco (média das quatro partidas), seguido de **SF2** (0,44%) e **SF3** (0,31%).

☞ Dos flavonóides isolados, o melhor marcador químico da espécie *S. dendroideum* é **SF3**, já que este flavonóide pôde ser detectado nos sumos das diferentes partidas de plantas e este é o segundo relato de seu isolamento; ao contrário de **SF1** e **SF2**, que apesar de serem os flavonóides majoritários, são encontrados em muitas outras espécies.

☞ As folhas do bálsamo apresentam majoritariamente flavonóides com a aglicona do kaempferol; enquanto os caules apresentam flavonóides derivados de quercetina e kaempferol.

☞ A atividade antinociceptiva apresentada pelo sumo das folhas do bálsamo mostrou uma relação dose dependente, sem efeitos sobre o sistema nervoso central, quando administrado por via oral em camundongos.

☞ Neste estudo foram evidenciadas as atividades antiedematogênica e imunossupressora, confirmando a presença de substâncias que influenciam a síntese de mediadores inflamatórios, exercendo assim a atividade antiinflamatória.

☞ O fracionamento do sumo de *S. dendroideum* monitorado pela atividade antinociceptiva levou a uma fração ativa rica em substâncias fenólicas, onde os flavonóides são as substâncias majoritárias.

☞ Os quatro flavonóides que apresentaram massa disponível para os ensaios farmacológicos (**SF1**, **SF2**, **SF3** e **SF6**) foram avaliados quanto à atividade antinociceptiva. **SF1**, **SF3** e **SF6** inibiram a nocicepção nas doses de 1 a 10 mg/kg, quando administrados pela via oral. Para **SF2** observou-se tendência de inibição, mesmo não sendo significativa. Estes resultados mostram que estes flavonóides contribuem, de forma conjunta, para a atividade antinociceptiva observada no sumo.

☞ Na avaliação da atividade antiinflamatória, todos os flavonóides testados (**SF1**, **SF2** e **SF6**) foram ativos, o que evidencia a participação de mecanismos antiinflamatórios na ação analgésica desses flavonóides.

☞ Os resultados indicam que os efeitos analgésicos, antiedematogênico e antiinflamatório observados para o sumo do bálsamo são dependentes da participação conjunta desses flavonóides, visto que todos apresentaram atividade, em maior ou menor grau. Entretanto, considerando que a kaempferitrina é o flavonóide majoritário presente em *S. dendroideum*, ela pode ser considerada como o principal flavonóide responsável pelas atividades observadas.

☞ O estudo químico e farmacológico das folhas de *Sedum dendroideum* levou ao isolamento de flavonóides ativos, o que justifica o uso desta planta medicinal no tratamento de doenças que envolvem processos inflamatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: Elsevier Science (USA), 2003.
- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.; WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phase of the pain responses in rats. *Pain*, v.60, p.91-102, 1995.
- ADHIKARI, D.P.; SCHUTZKI, R.E.; DEWITT, D.L.; NAIR, M.G. Effects of Amelanchier fruit isolates on cyclooxygenase enzymes and lipid peroxidation. *Food Chemistry*, v.97, p.56-64, 2006.
- AGRAWAL, P.K. *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1989.
- ALMEIDA, A.P. *Extratos de *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae), uma planta usada na medicina popular: estudo químico guiado pelo ensaio de proliferação de linfócitos*. Tese de Doutorado – Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ, 2000.
- ANDERSEN, L.P.; HOLCK, S.; JANULAITYTE-GÜNTHER, D.; KUPCINSKAS, L.; KIUDELIS, G.; JONAITIS, L.; JANCIAUSKAS, D.; HOLCK, P.; BENNEDSEN, M.; PERMIN, H.; NORN, S.; WADSTRÖM, T. Gastric inflammatory markers and interleukins in patients with functional dyspepsia, with and without *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.44, p.233-238, 2005.
- ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, p.325-348, 2005.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em www.anvisa.gov.br, 2004.
- APG II (Angiosperm Phylogeny Group II). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.141, p.399-436, 2003. Disponível também em: <http://www.mobot.org/mobot/research/APweb/welcome.html>.
- ARAGÃO, P.C.A.; TOLEDO, J.B.; MORAIS, A.A.; BRAZ-FILHO, R. Substâncias isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. *Química Nova*, v.13, p.254-259, 1990.
- AUTHORE, G.; RASTRELLI, L.; LAURO, M.R.; MARZOCCO, S.; SORRENTINO, R.; SORRENTINO, U.; PINTO, A.; AQUINO, R. Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonoids. *Life Sciences*, v.70, p.523-524, 2001.
- AZIZ, A.A.; EDWARDS, C.A.; LEAN, M.E.; CROZIER, A. Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O- β -glucoside and isorhamnetin-4'-O- β -glucoside by human volunteers after consumption of onions. *Free Radical Research*, v.29, p.257-269, 1998.
- BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Science*, v.78, p.431-441, 2005.
- BELTON, O.; FITZGERALD, D.J. The three major pathways involved in arachidonic acid metabolism. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v.5, p.1-18, 2003.

- BERKENKOPF, J.W.; WEICHMAN, B.M. Production of prostacyclin in mice following intraperitoneal injection of acetic acid, phenylbenzoquinone and zymosan: its role in the writhing response. *Prostaglandins*, v.36, p.693-709, 1988.
- BHATIA V.; TANDON, R.K. Stress and the gastrointestinal tract. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v.20, p.332-339, 2005.
- BLASER, M.J. Helicobacters are indigenous to the human stomach: duodenal ulceration is due to changes in gastric microecology in the modern era. *Gut*, v.43, p.721-727, 1998.
- BORRELLI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research*, v.14, p.581-591, 2000.
- BOTTING, R.M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). *Journal of Thermal Biology*, v.21, p.208-219, 2006.
- BRACA, A.; POLITI, M.; SANOGO, R.; SANOU, H.; MORELLI, I.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.6689-6695, 2003.
- BROWN, N.J.; ROBERTS II, L.J. Histamina, bradicinina e seus antagonistas. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. *Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, p.485-501, 2005.
- BUCKLE, D.R.; HEDGECOCK, J.R. Drug targets in inflammation and immunomodulation. *Drug Discovery Today*, v.2, p.325-332, 1997.
- BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.2774-2779, 2001.
- CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*, v.55, p.37-39, 2003.
- CAMARGO, M.E.M.; ROMERO, M.B.; ZAMORA, D.R.; CARRILLO, P.C.; MALDONADO, M.E.V. Study of the anti-inflammatory effect of *Sedum praealtum* (siempreviva) in the rat: dose-dependent response. *Proceedings Western Pharmacology Society*, v.45, p.129-130, 2002.
- CARLINI, E.A.; NETO, J.P.; DE ALMEIDA, E.T.; MARIGO, C. Úlcera por contenção em ratos: ação protetora de extrato aquoso de "bálsamo". Estudo preliminar. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.42, p.267-270, 1970.
- CAROTENUTO, A.; FATTORUSSO, E.; LANZOTTI, V.; MAGNO, S.; DE FEO, V.; CICALA, C. The flavonoids of *Allium neapolitanum*. *Phytochemistry*, v.44, p.949-957, 1997.
- CARVALHO, J.C.T.; 2004. Considerações gerais sobre fitoterápicos. In: CARVALHO, J.C.T., *Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Tecmedd, Ribeirão Preto, SP.
- CASTILHO, R.O.; KAPLAN, M.A.C. Crassulaceae: uma abordagem química, farmacológica e etnofarmacológica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.78, p.93-95, 1997.

- CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M.S.S.; HO, W.K.K. Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.59, p.549–555, 2005.
- CHENG, Y.; MACERA, C.A.; DAVIS, D.R.; BLAIR, S.N. Physical activity and peptic ulcers. *British Journal of Sports Medicine*, v.173, p.116-121, 2000.
- CHOU, C.J.; MEN, Y.D. Studies on the constituents of *Sedum alfredi* (II). *Taiwan Yaoxue Zazhi*, v.38, p.214-225, 1986. *Chemical Abstract* 107:214792.
- CHOU, C.-J.; WANG, C.-B.; LIN, L.-C. Chrysoeriol 7-O-rhamnoside from *Sedum formosanum*. *Phytochemistry*, v.15, p.1420-1420, 1976.
- COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; POSER, G.L.V.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.90, p.135-143, 2004.
- COMBIER, H; MARKHAM, K; AUDIER, H; LEBRETON, P; MABRY, T; JAY, M. Recherches chimiotaxinomiques sur les plantes vasculaires. Sur la tétrahydroxy-3,4',5,7 méthoxy-8 flavone, extradite de *Sedum acre* L. var. *sexangulare* (L.) Koch. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Série D*, v.266, p.2495-2497, 1968.
- COSTA, S.S.; DE SOUZA, M.L.M.; IBRAHIM, T.; DE MELO, G.O.; ALMEIDA, A.P.; GUETTE, C.; FÉREZOU, J.-P.; KOATZ, V.L.G. Kalanchosine dimalate, an anti-inflammatory salt from *Kalanchoe brasiliensis*. *Journal of Natural Products*, v.69, p.815-818, 2006.
- COSTA, S.S.; JOSSANG, A.; SOUZA, M.L.; MORAES, V.L.G.; BODO, B. Patuletin acetylramnosides from *Kalanchoe brasiliensis*, as inhibitors of human lymphocyte proliferative activity. *Journal of Natural Products*, v.57, p.1503-1510, 1994.
- D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.72, p.74-79, 1941.
- DA SILVA, S.A.G.; COSTA, S.S.; MENDONÇA, S.C.F.; SILVA, E.M.; MORAES, V.L.G.; ROSSI-BERGMANN, B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica*, v.60, p.201-210, 1995.
- DA SILVA, S.A.G.; COSTA, S.S.; ROSSI-BERGMANN, B. The anti-leishmanial effect of *Kalanchoe* is mediated by nitric oxide intermediates. *Parasitology*, v.118, p.575-582, 1999.
- DE ALMEIDA, A.P.; MIRANDA, M.M.F. S.; SIMONI, I.C.; WIGG, M.D.; LAGROTA, M.H.C.; COSTA, S.S. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phytotherapy Research*, v.12, p.562–567, 1998.
- DE LUCA, A.; IAQUINTO, G. *Helicobacter pylori* and gastric diseases: a dangerous association. *Cancer Letters*, v.213, p.1–10, 2004.
- DE SOUZA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R.M.B. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *Journal of Natural Products*, v.67, p.829-832, 2004.

- DEACHATHAI, S.; MAHABUSARAKAM, W.; PHONGPAICHIT, S.; TAYLOR, W.C. Phenolic compounds from the fruit of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry*, v.66, 2368–2375, 2005.
- DEMIDENKO, L.A.; KRASNOV, E.A. Phenolic compounds of *Sedum populifolium*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, v.6, p.805-805, 1978.
- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, v.65, p.337-353, 1999.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. *The Journal of Pathology*, v.104, p.15-29, 1971.
- DUARTE, M.R.; ZANETI, C.C. Morfoanatomia de folhas de bálsamo: *Sedum dendroideum* Moc. et Sessé ex DC, Crassulaceae. *Revista Lecta*, v.20, p.153-160, 2002.
- DUHAM, N.W.; MYIA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, v.46, p.208-209, 1957.
- EL-DESOKY, S.K.; EL-ANSARI, M.A.; EL-NEGOUMY, S.I. Flavonol glycosides from *Mentha lavandulacea*. *Fitoterapia*, v.72, p.532-537, 2001.
- ERLUND, I.; KOSONEN, T.; ALFTHAN, G.; MAENPAA, J.; PERTTUNEN, K.; KENRAALI, J.; PARANTAINEN, J.; ARO, A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v.56, p.545-53, 2000.
- ERNST, P. Review article: the role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v.13, p.13-18, 1999.
- EXARCHOU, V.; FIAMEGOS, Y.C.; VAN BEEKC, TERIS A.; NANOS, CHRISTOS; VERVOORT, J. Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. *Journal of Chromatography A*, v.1112, p.293–302, 2006.
- FABRICANT D.S.; FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, v.109, p.69-75, 2001.
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade – UFRGS, p.229-246, 2004.
- FAN, W.; TEZUKA, Y.; NI, K.M.; KADDOA, S. Prolyl endopeptidase inhibitors from the underground part of *Rhodiola sachalinensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.49, p.396-401, 2001.
- FERRÁNDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions*, v. 32, p.283-288, 1991.
- FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. New aspects of the mode of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Annual Review of Pharmacology*, v.14, p.57-73, 1974.

- FLOWER, R.J. The development of COX 2 inhibitors. *Nature Reviews: Drug Discovery*, v.2, p.179-191, 2003.
- FORD, A.C.; DELANEY, B.C.; FORMAN, D.; MOAYYEDI, P. Eradication therapy in *Helicobacter pylori* positive peptic ulcer disease: systematic review and economic analysis. *American Journal of Gastroenterology*, v.99, p.1833-1855, 2004.
- FUKAI, T.; MARUMO, A.; KAITOU, K.; KANDA, T.; TERADA, S.; NOMURA, T. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorine extract. *Life Sciences*, v.71, p.1449-1463, 2002.
- GIL, B.; SANZ, M.J.; TERCENIO, M.C.; FERRANDIZ, M.L.; BUSTOS, G.; PAYA, M.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M.J. Effects of flavonoids on *Naja Naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice. *Life Science*, v.54, p.333-338, 1994.
- GNEDKOV, P.A.; LITVINENKO, V.I.; FURSA, N.S. Flavonol aglycons and monoglycosides of *Sedum maximum*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, n.4, p.521-522, 1981. *Chemical Abstract* 95:217698.
- GUMENYUK, L.A.; POKOTILO, I.V.; DIKHANOV, M.N. Phenol compounds of some species of *Sempervivum* and *Sedum* genera. *Farmatsevtichnii Zhurnal (Kiev)*, v.31, p.75-77, 1976. *Chemical Abstract* 85:59541.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v.55, p.481-504, 2000.
- HE, A.; WANG, M. Flavonoids from stringy stonecrop (*Sedum sarmentosum*). *Zhongcaoyao* v.28, p.517-522, 1997. *Chemical Abstract* 128:203045.
- HE, A.; WANG, M.; HAO, H.; ZHANG, D.; LEE, K.-H. Hepatoprotective triterpenes from *Sedum sarmentosum*. *Phytochemistry*, v.49, p.2607-2610, 1998.
- HOOGERWERF, W.A.; PASRICHA, P.J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastresofágico. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. *Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, p.757-768, 2005.
- HOWES, M.-J.R.; HOUGHTON, P.T. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.75, p.513-527, 2003.
- HUNSKAAR, S.; BERGE, O.G.; HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indometacin in formalin test. *Pain*, v. 25, p.125-132, 1986.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. *Journal of Neuroscience Methods*, v.14, p.69-76, 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v.30, p.103-114, 1987.
- IBRAHIM, T.; CUNHA, J.M.T.; MADI, K.; FONSECA, L.M.B.; COSTA, S.S.; KOATZ, V.L.G. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. *International Immunopharmacology*, v.2, p.875-883, 2002.

- JONES, M.P. The role of psychosocial factors in peptic ulcer disease: beyond *Helicobacter pylori* and NSAIDs. *Journal of Psychosomatic Research*, v.60, p.407-412, 2006.
- JORGE, A.P.; HORST, H.; DE SOUZA, E.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ^{14}C -glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interactions*, v.149, p.89-96, 2004.
- KAISER, C.R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*, v.23, p.231-236, 2000.
- KANG, T.H.; PAE, H.O.; YOO, J.C.; KIM, N.Y.; KIM, Y.C.; KO, G.I.; CHUNG, H.T. Antiproliferative effects of alkaloids from *Sedum sarmentosum* on murine and human hepatoma cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, v.70, p.177-182, 2000.
- KEMERTELIDZE, E.P.; TSITSISHVILI, V.G.; ALANIYA, M.D.; SAGAREISHVILI, T.G. Structure-function analysis of the radioprotective and antioxidant activity of flavonoids. *Chemistry of Natural Compounds*, v.36, p.54-59, 2000.
- KHETWAL, K.S.; MANRAL, K.; VERMA, D.L. Flavonoids from the roots of *Sedum cressipes*. *Planta Medica*, v.54, p.89-90, 1988.
- KIM, H.P.; PHAM, H.T.; ZIBOH, V.A. Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v.65, p.281-286, 2001.
- KIM, J.H.; HART, H.; STEVENS, J.F. Alkaloids of some Asian *Sedum* species. *Phytochemistry*, v.41, p.1319-1324, 1996.
- KLASSER, G.D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: confusion, controversy and dental implications. *Journal of the Canadian Dental Association*, v.71, p.575-80, 2005.
- KOOY, J.H. Alkaloids of *Sedum acre*. *Planta Medica*, v.30, p.295-296, 1976.
- KORUL'KIN D.Y. Chemical composition of certain *Sedum* species of Kazakhstan. *Chemistry of Natural Compounds*, v.37, p.219-223, 2001.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, v.18, p.412-412, 1959.
- KRASNOV, E.A.; KONDAREVA, T.V. Flavonoids and hydroxycoumarins of *Sedum ewersii*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, n.3, p.389-390, 1976. *Chemical Abstract* 85:106651.
- LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v.2, p.787-795, 2002.
- LI, S.; ZUO, C. Chemical constituents of linear stonecrop (*Sedum lineare*). *Zhongcaoyao*, v.22, p.438-40, 1991. *Chemical Abstract* 116:102714.
- LIANG, Q.; XU, L.; ZHUANG, Y.; WU, T. Studies on chemical constituents of *Sedum sarmentosum* Bunge. *Zhongcaoyao*, v.32, p.305-325, 2001. *Chemical Abstract* 136:236717.

- LIANG, 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.
- LIM, C.E.; PARK, J.H.; PARK, C.W. Flavonoid variation of the *Aconitum jaluense* complex (Ranunculaceae) in Korea. *Plant Systematics and Evolution*, v.218, p.125-131, 1999.
- LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation*, v.21, p.347-356, 1997.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. *Plantas ornamentais no Brasil. Arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, p.325, 1995.
- LUENGO, M.B. Uma revisão histórica dos principais acontecimentos da imunologia e da farmacologia na busca do entendimento e tratamento das doenças inflamatórias. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.2, p.64-72, 2005.
- MALAN JR., T.P.; PORRECA, F. Lipid mediators regulating pain sensitivity. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, v.77, 123-130, 2005.
- MARKHAM, K.R.; GEIGER, H. ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In: HARBORNE, J.B. *The flavonoids. Advances in research since 1986*, p.441-497, Florida: Chapman & Hall, 1994.
- MARKHAM, K.R.; TERNAI, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T.J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids – III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron*, v.34, p.1389-1397, 1978.
- MATSUDA, H.; NINOMIYA, K.; SHIMODA, H.; YOSHIKAWA, M. Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): structure requirement of tiliroside and mechanism of action. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.10, p.707-712, 2002.
- MEN, Y. D. Studies on the constituents of *Sedum alfredi*. *Taiwan Yaoxue Zazhi*, v.38, p.52-66, 1986. *Chemical Abstract* 107:205000.
- MIDDLETON JR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v.52, p.673-751, 2000.
- MIKAMI, T.; MIYASAKA, K. Effects of several anti-inflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammatory response in rat carrageenin-induced pleurisy. *European Journal of Pharmacology*, v.95, p.1-12, 1983.
- MNAJED, H.; RAYNAUD, J.; COMBIER, H. Sur un nouvel hétéroside naturel du méthoxy-8 kaempférol extrait de *Sedum sexangulare* L. (Crassulacées). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Série D*, v.274, p.445-448, 1972.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v.24, p.105-111, 2001.
- MORENO, A.; MARTIN-CORDERO, C.; IGLESIAS-GUERRA, F.; TORO, M.V. Flavonoids from *Dorycnium rectum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.30, p.73-74, 2002.

- MORROW, J.D.; ROBERTS II, L.J. Autacóides derivados dos lipídios: eicosanóides e fator de ativação das plaquetas. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. *Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, p.503-515, 2005.
- MULINACCI, N.; VINCIERI, F.F.; BALDI, A.; BAMBAGIOTTI-ALBERTI, M.; SENDL, A.; WAGNER, H. Flavonol glycosides from *Sedum telephium* subspecies *maximum* leaves. *Phytochemistry*, v.38, p.531-533, 1995.
- MUZITANO, M.F.; CRUZ, E.A.; ALMEIDA, A.P.; DA SILVA, S.A.G.; KAISER, C.R.; GUETTE, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta Medica*, v.72, p.81-83, 2006.
- NAHRSTEDT, A.; WALTHER, A.; WRAY, V. Sarmentosin epoxide, a new cyanogenic compound from *Sedum cepaea*. *Phytochemistry*, v.21, p.107-110, 1982.
- NAKANO, K.; MURAKAMI, K.; NOHARA, T.; TOMIMATSU, T.; KAWASAKI, T. The constituents of *Paris verticillata* M.v. Bieb. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.29, p.1445-1451, 1981.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of a new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v.66, p.1022-1037, 2003.
- NIEMANN, G.J.; VISSER-SIMONS, J.M.J.; HART, H. Flavonoids of some species of *Sedum*. *Planta Medica*, v.30, p.384-387, 1976.
- OH, H.; KANG, D.-G.; KWON, J.-W.; KWON, T.-O.; LEE, S.-Y.; LEE, D.-B.; LEE, H.-S. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.37, p.2035-2037, 2004.
- PALANICHAMY, S.; NAGARAJAN, S. Analgesic activity of *Cassia alata* leaf extract and kaempferol 3-O-sophoroside. *Journal of Ethnopharmacology*, v.29, p.73-78, 1990.
- PARIS, R.-R.; FRIGOT, P. Sur l'isolement d'une flavanone à partir d'une Crassulacée indigène, le *Sedum altissimum* Poir. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, v.249, p.560-561, 1959.
- PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A.K. Flavonoids as medicinal agents – Recent advances. *Fitoterapia*, v.62, p.371-389, 1991.
- PETEREIT, F.; SAKAR, M.K.; NAHRSTEDT, A. Flavan-di-O-gallates and further polyphenols from *Sedum stoloniferum*. *Pharmazie*, v.53, 280-281, 1998.
- PIETTA, P.-G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v.63, p.1035-1042, 2000.
- PINEDA, J.G.; WENS F., M.A.; VALENCIA S., A.; GALLEGOS, A.J. *Sedum dendroideum* action on the functional activity of the spermatozoa. *Archivos de Investigación Médica (México)*, v.17, p.391-397, 1986.
- PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA JR., A.; SZPOGANICZ, B.; DE SOUZA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Química Nova*, v.26, p.466-469, 2003.
- PORTER, D.G. Ethical scores for animal experiments. *Nature*, v.356, p.101-102, 1992.

- PRASAIN, J.K.; WANG, C.-C.; BARNES, S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology & Medicine*, v.37, p.1324-1350, 2004.
- RASKIN, J.B. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory therapy. *The American Journal of Medicine*, v.106, p.3S-12S, 1999.
- 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 Sciences*, v.68, p.921-931, 2001.
- ROBERTS II, L.J.; MORROW, J.D. Analgésico-antipiréticos, agentes antiinflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. *Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, p.517-550, 2005.
- ROSENSTOCK, S.; JØRGENSEN, T.; BONNEVIE, O.; ANDERSEN, L. Risk factors for peptic ulcer disease: a population based prospective cohort study comprising 2416 Danish adults. *Gut*, v.52, p.186-193, 2003.
- ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S.; BORGES, M.B.S.; DA SILVA, S.A.G.; NOLETO, G.R.; SOUZA, M.L.M.; MORAES, V.L.G. Immunosuppressive effect of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* in mice. *Phytotherapy Research*, v.8, p.399-402, 1995.
- ROTH, A.D. Curative treatment of gastric cancer: towards a multidisciplinary approach? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v.46, p.59-100, 2003.
- SAKAR, M.K.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-O-gallate and a prodelphinidin from *Sedum litoreum*. *Scientia Pharmaceutica*, v.65, p.33-37, 1997. *Chemical Abstract* 127:47690.
- SAKAR, M.K.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Two phloroglucinol glucosides, flavan gallates and flavonol glycosides from *Sedum sediforme* flowers. *Phytochemistry*, v.33, p.171-174, 1993.
- SANDLER, R.S.; EVERHART, J.E.; DONOWITZ, M.; ADAMS, E.; CRONIN, K.; GOODMAN, C.; GEMMEN, E.; SHAH, S.; AVDIC, A.; RUBIN, R. The burden of selected digestive diseases in the United States. *Gastroenterology*, v.122, p.1500-1511, 2002.
- SAUTEBIN, L. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia*, v.71, p.S48-S57, 2000.
- SCHEWE, T.; KÜHN, H.; SIES, H. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *The Journal of Nutrition*, v.132, p.1825-1829, 2002.
- SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Hormônio adrenocorticotrópico; esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. *Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, p.1241-1261, 2005.
- SCHNEIDER, I.; BUCAR, F. Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase/cyclooxygenase. *Phytotherapy Research*, v.19, p.81-102, 2005.

- SENDL, A.; MULINACCI, N.; VINCIERI, F.F.; WAGNER, H. Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Sedum telephium*. *Phytochemistry*, v.34, p.1357-1362, 1993.
- SEO, W.G.; PAE, H.O.; OH, G.S.; KIM, N.Y.; KNON, T.O.; SHIN, M.K.; CHAI, K.Y.; CHUNG, H.T. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, v.76, p.119-123, 2001.
- SHNYAKINA, G.P.; ZAPESOCHNAYA, G.G. Flavonoids of some *Sedum* species. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, v.11, p.92-93, 1975. *Chemical Abstract* 83:160734.
- SIERPINA, V.S.; WOLLSCHLAEGER, B.; BLUMENTHAL, M. *Ginkgo biloba*. *American Family Physician*, v.68, p.923-926, 2003.
- SILVA, D.A.; COSTA, D.A.; SILVA, D.F.; SOUZA, M.F.V.; AGRA, M.F.; MEDEIROS, I.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15, p.23-29, 2005.
- SILVA, M.C.; CARVALHO, J.C.T. Inflamação. In: CARVALHO, J.C.T. *Fitoterápicos antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Ribeirão Preto: Tecmedd Editora, p.49-68, 2004.
- SILVA-TORRES, R.; MONTELLANO-ROSALES, H.; RAMOS-ZAMORA, D.; CASTRO-MUSSOT, M.E.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M. Spermicidal activity of the crude ethanol extract of *Sedum praealtum* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.85, p.15-17, 2003.
- SMITH, J.V.; LUO, Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.64, p.465-472, 2004.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. Biometry. *The principles na practice of statistics*. 2 ed. New York: Edn. W.H. Freeman, p.859, 1981.
- SONG, E.-K.; KIM, J.-H.; KIM, J.-S.; CHO, H.; NAN, J.-X.; SOHN, D.-H.; KO, G.-I.; OH, H.; KIM, Y.-C. Hepatoprotective phenolic constituents of *Rhodiola sachalinensis* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Phytotherapy Research*, v.17, p.563-565, 2003.
- SOUZA, M.L.M. *Estudo químico de flavonóides isolados de Kalanchoe brasiliensis CAMB, com atividade sobre o sistema imunológico*. Tese de Mestrado – Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ, 1995.
- SPILLER, R.C. Inflammation as a basis for functional GI disorders. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v.18, p.641-661, 2004.
- STEVENS, J.F.; ELEMA, E.T.; HART, H. Myricetin 3-O-arabinofuranoside from *Sedum montanum* ssp. *orientale*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.22, p.861-862, 1994.
- STEVENS, J.F.; HART, H.; ELEMA, E.T.; BOLCK, A. Flavonoid variation in Eurasian *Sedum* and *Sempervivum*. *Phytochemistry*, v.41, p.503-512, 1996.
- STEVENS, J.F.; HART, H.; HENDRIKS, H.; MALINGRÉ, T.M. Alkaloids of some European and Macaronesian Sedoideae and Sempervivoideae (Crassulaceae). *Phytochemistry*, v.31, p.3917-3924, 1992.

- STEVENS, J.F.; HART, H.; VAN HAM, R.C.H.J.; ELEMA, E.T.; VAN DEN ENT, M.M.V.X.; WILDEBOER, M.; ZWAVING, J.H. Distribution of alkaloids and tannins in the Crassulaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.23, p.157-165, 1995.
- SUK, K. Regulation of neuroinflammation by herbal medicine and its implications for neurodegenerative diseases. *Neurosignals*, v.14, p.23-33, 2005.
- TARNAWSKI, A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Digestive Diseases and Sciences*, v.50, p.S24-S33, 2005.
- TERAWAKI, K.; NOSE, M.; OGIHARA, Y. The role of crude polysaccharide fractions on the mitogenic activity by Shosaikoto. *Phytomedicine*, v.5, p.347-352, 1998.
- TOKER, G.; KÜPELİ, E.; MEMİSOĞLU, M.; YESİLADA, E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *Journal of Ethnopharmacology*, v.95, p.393-397, 2004.
- TORRES-SANTOS, E.C.; DA SILVA, S.A.G.; COSTA, S.S.; SANTOS, A.P.P.T.; ALMEIDA, A.P.; ROSSI-BERGMANN, B. Toxicological analysis and effectiveness of oral *Kalanchoe pinnata* on a human case of cutaneous leishmaniasis. *Phytotherapy Research*, v.17, p.801-803, 2003.
- TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. *Nature*, v.420, p.853-859, 2002.
- TUBARO, A.; DRI, P.; MELATO, M.; MULAS, G.; BIANCHI, P.; DEL NEGRO, P.; DELLA LOGGIA, R. In the croton oil ear test the effects of non steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. *Agents Actions*, v.19, p.371-373, 1986.
- VACHER, P.J.; DUCHÉNE-MARULLAZ, P.; BARBOT, P. A propos de quelques produits usuels – comparaison de deux methods d'étude des analgésiques. *Medicina Experimentalis*, v.11, p.51-58, 1964.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELOH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin induced pleurisy in the rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.143, p.711-714, 1973.
- WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, v.36, p.829-837, 2004.
- WEI, T.; YAN, Y.; GUAN, X.; LIU, Y.; WEI, D. Chemical constituents of the above-ground part of *Sedum sarmentosum*. *Beijing Zhongyiyao Daxue Xuebao*, v.26, p.59-61, 2003. *Chemical Abstract* 141:384084.
- WHO (World Health Organization). *WHO issues guidelines for herbal medicines*. Bulletin of the World Health Organization, v.82, n.3, p.238-238, 2004.
- WILLIAMS, C.A.; HARBORNE, J.B.; GEIGER, H.; HOULT, J.R.S. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry*, v.51, p.417-423, 1999.
- WOLBIŚ, M. An acylated 3,7-diglucoside of isorhamnetin from *Sedum acre*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v.50, p.149-152, 1993. *Chemical Abstract* 120:279967.

- WOLBIŚ, M. Flavonoid compounds in *Sedum album*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v.44, p.383-384, 1987a. *Chemical Abstract* 109:89749.
- WOLBIŚ, M. Flavonol glycosides from *Sedum album*. *Phytochemistry*, v.28, p.2187-2189, 1989a.
- WOLBIŚ, M. Polyphenolic compounds in certain species of *Sedum*. II. Flavonoids in *Sedum maximum*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v.44, p.567-71, 1987b. *Chemical Abstract* 110:36743.
- WOLBIŚ, M. Polyphenolic compounds in *Sedum* species. III. *Sedum reflexum*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v.46, p.500-505, 1989b. *Chemical Abstract* 113:208391.
- WOLBIŚ, M.; KAWALEC, M. Investigation of phenolic compounds in *Sedum sexangulare* (Crassulaceae). *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v.47, p.81-82, 1990. *Chemical Abstract* 115:179352.
- WOLBIŚ, M.; KRÓLIKOWSKA, M. Flavonol glycosides from *Sedum acre*. *Phytochemistry*, v.27, p.3941-3943, 1988.
- WOLBIŚ, M.; NOWAK, S. Dihydroflavonols from *Sedum reflexum*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v.50, p.315-316, 1993. *Chemical Abstract* 121:91437.
- WOLBIŚ, M.; OLSZEWSKA, M. Polyphenolic compounds from *Sedum aizoon* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v.53, p.225-227, 1996. *Chemical Abstract* 126:57485.
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.80, p.300-307, 1944.
- YAO, L.H.; CAFFIN, N.; D'ARCY, B.; JIANG, Y.M.; SHI, J.; SINGANUSONG, R.; LIU, X.; DATTA, N.; KAKUDA, Y.; XU, Y. Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.6477-6483, 2005.
- YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; SHIMODA, H.; MATSUDA, H.; YAMAHARA, J.; MURAKAMI, N. Rhodiocyanoside A and B, new antiallergic cyanoglycosides from Chinese natural medicine "Si Lie Hong Jing Tian", the underground part of *Rhodiola quadrifida* (PALL.) FISH. et MEY. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.43, p.1245-1247, 1995.
- YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; SHIMODA, H.; MURAKAMI, N.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Bioactive constituents of Chinese natural medicines II. *Rhodiola Radix*. (1). Chemical structures and antiallergic activity of rhodiocyanoside A and B from the underground part of *Rhodiola quadrifida* (PALL.) FISH. et MEY. (Crassulaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.44, p.2086-2091, 1996.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v.24, p.147-152, 2001.
- ZAITSEV, V.G.; FURSA, N.S.; BELYAEVA, L.E. Hydroxycoumarins and flavonol-7-monorhamnosides from *Sedum caucasicum*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, n.4, p.527-528, 1983. *Chemical Abstract* 100:3490.

- ZANINI JR, J.C.; MEDEIROS, Y.S.; CRUZ, A.B.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Action of extract and compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-induced ear oedema in mice. A comparative study with steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Phytotherapy Research*, v.6, p.1-5, 1992.
- ZAPESOCHNAYA, G.G.; SHNYAKINA, G.P. Gallomyricitrin - new acylated flavonoid from *Sedum selskianum*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, v.11, p.720-722, 1975. *Chemical Abstract* 84:150897.
- ZAPESOCHNAYA, G.G.; SHNYAKINA, G.P. O-Acylated flavonoid glycosides of *Sedum kamtschaticum*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, v.6, p.806-807, 1978.
- ZAPESOCHNAYA, G.G.; SHNYAKINA, G.P. Gallomyricitrin - new acylated flavonoid from *Sedum selskianum*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, v.11, p.720-722, 1975. *Chemical Abstract* 84:150897.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v.16, p.109-110, 1983.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)