

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Aeschynomene fluminensis* Vell. (Fabaceae)*

Marlene Capelin Ignoato, Rodrigo Monteiro Fabrão, Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel, Marcos Felipe Pinatto Botelho e Silvana Maria de Oliveira Santin*

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Laura Lícia Milani de Arruda e Ciomar Aparecida Bersani-Amado

Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Maria Conceição de Souza

Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Recebido em 11/12/11; aceito em 2/4/12; publicado na web em 2/7/12

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *Aeschynomene fluminensis* Vell. (Fabaceae). Phytochemical investigation of *Aeschynomene fluminensis* leaves and branches led to isolation of the flavonoid glycosides kaempferol 3,7-di-*O*- α -L-rhamnopyranoside, kaempferol 7-*O*- α -L-rhamnopyranoside, kaempferol 3-*O*-apiofuranosil-7-*O*-rhamnopyranoside, quercetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside, quercetin 3-*O*-arabinofuranoside, 8- β -D-glucopyranosyl 4',5,7-trihydroxyflavanone, the isoflavonoid 4',7-di-hydroxy-isoflavone, the dimer epicatechin-(2 β →7, 4 β →8)-epicatechin, the polyol 3-*O*-methyl-*chiro*-inositol and two steroids in sitosterol and stigmasterol mixture. These compounds were identified by NMR ^1H and ^{13}C and compared with literature data. Anti-inflammatory activity of the crude methanolic extract and its fractions was evaluated.

Keywords: *Aeschynomene fluminensis*; flavonoides; anti-inflammatory activity.

INTRODUÇÃO

Espécies nativas do alto do rio Paraná, região de Porto Rico-PR, têm sido alvo de nossos estudos em conjunto com pesquisadores das áreas de botânica e de farmacologia da Universidade Estadual de Maringá. Esta área, denominada planície alagável, abrange parte da Área de Proteção Ambiental das Ilhas e Várzeas do Rio Paraná (PR e MS) e do Parque Estadual do Ivinhema (MS) – local considerado reserva ecológica pelo Estado. Nossos estudos visam a avaliação dos potenciais químico e farmacológico das espécies vegetais desta região.

O gênero *Aeschynomene*, pertencente à família Fabaceae, é representado por 52 espécies brasileiras, de um total de 160 espécies descritas com ocorrência na América, Ásia e África. Destas espécies, 84 se distribuem pelo continente americano, predominantemente na região neotropical.¹ Em levantamento bibliográfico para o gênero foram encontrados estudos químicos e/ou biológicos de apenas cinco espécies: *A. indica*, *A. mimosifolia*, *A. virgata*, *A. sensitiva* e *A. stolzii*.² Estes estudos retratam a presença de flavonoides, neoflavonoides, isoflavonoides e rotenoides e, ainda, as atividades espermicida, inseticida, citotóxica e antitumoral para as espécies deste gênero.²

A espécie *Aeschynomene fluminensis*, conhecida popularmente como “cortiça”, se desenvolve em regiões que são sazonalmente inundadas, ocorrendo no Brasil nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pará, Paraná e Mato Grosso do Sul.¹

Neste trabalho são apresentados os resultados do estudo fitoquímico das folhas e dos galhos da espécie *Aeschynomene fluminensis* e da atividade anti-inflamatória dos extratos brutos e de suas frações.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos gerais

Os espectros de RMN (uni- e bidimensionais) foram obtidos em espectrômetro Varian, modelo Mercury plus BB, operando a 300 MHz para ^1H e 75,5 MHz para ^{13}C . Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o sinal do solvente e/ou do tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,0$ ppm). Os solventes utilizados foram CD_3OD , e CDCl_3 (Aldrich). Para as cromatografias em coluna (CC) utilizou-se gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm, Merck) ou Sephadex LH-20 (Sigma), como fase estacionária. Para as cromatografias em camada delgada (CCD) empregou-se gel de sílica 60 G e gel de sílica 60 GF₂₅₄ (Merck). A visualização das substâncias em CCD foi realizada por irradiação com luz ultravioleta em 254 e 366 nm e/ou por pulverização com solução de H_2SO_4 /anisaldeído/AcOH (1:0,5:48,5) seguida de aquecimento.

Material vegetal

A planta *Aeschynomene fluminensis* foi coletada em março de 2008, às margens da bacia de inundação do alto do Rio Paraná, na região de Porto Rico-PR, divisa com o município de Baitaporã-MS. A excisada do material vegetal encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob o registro nº HUEM 15708.

Isolamento dos constituintes químicos

As folhas (454,4 g) e os galhos (560,7 g) de *A. fluminensis* foram secos ao ar, triturados e submetidos à extração exaustiva com metanol a frio, fornecendo 46,8 e 23,5 g de extratos brutos EBF e EBG, respectivamente. Partes destes extratos (20,0 g de cada) foram dissolvidas em H_2O e particionadas em solventes de polaridade crescente, resultando nas frações hexânicas (FHF: 6,5 g e FHG: 1,3 g), clorofórmicas (FCF: 0,7 g e FCG: 0,9 g), acetato de etila (FAEF: 0,9 g

*e-mail: smoliveira@uem.br

#Artigo em homenagem ao Prof. Otto R. Gottlieb (31/8/1920-19/6/2011)

e FAEG: 1,8 g), *n*-butanólicas (FBF: 9,5 g e FBG: 6,3 g) e aquosas (FAF: 1,5 g e FAG: 8,6 g) das folhas e dos galhos, respectivamente. A fração FAEF (0,28 g) foi submetida a uma cromatografia em Sephadex LH-20 eluída com MeOH/H₂O 1:1 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g), resultando em 130 frações de 2 mL cada, que foram reagrupadas após análise em CCD. As subfrações 29-32, 35-67, 71-80, 107-112 e 117-119 e 122-128 resultaram no isolamento das substâncias **1** (5,5 mg), **2** (5,8 mg), **5** (8,2 mg), **8** (4,7 mg) e das misturas de **1** e **3** (15,4 mg) e de **1** e **7** (52,3 mg). A subfração 98-106 (30,9 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH-20 com MeOH ($\theta = 1,0$ cm e 3 g) resultando no isolamento da substância **4** (6,0 mg). As frações FBF (0,29 g) e FAF (0,49 mg) foram submetidas ao mesmo tratamento realizado para FAEF e forneceram novamente a substância **1** (33,2 mg) e a mistura de **1** e **7** (11,2 mg) para a primeira fração, e a substância **9** (22,7 mg) para a segunda. A fração FAEG (0,48 g) foi submetida a uma cromatografia em gel de Sephadex LH-20 com MeOH/H₂O, fornecendo a mesma mistura **1** e **7** (15,3 mg). Este mesmo tratamento foi realizado para a FBG (0,46 g) e possibilitou o isolamento novamente da substância **1** (5,5 mg). Para a fração FAG (0,58 g) este tratamento resultou no isolamento da substância **9** (3,5 mg). Parte da FCG (0,60 g) foi fracionada em CC de gel de sílica ($\theta = 2,0$ cm e 21 g) eluída com hexano e AcOEt em ordem crescente de polaridade hexano; hexano:AcOEt 10-95% e AcOEt. A subfração hexano:AcOEt 50% forneceu a substância **6** (4,4 mg). Parte da FHF (0,34 g) foi fracionada em CC de gel de sílica ($\theta = 1,5$ cm e 13 g) eluída com misturas de hexano e AcOEt em ordem crescente de polaridade. A subfração hexano:AcOEt 15% (3,9 mg) forneceu a mistura dos esteroides sitosterol e estigmasterol. O mesmo tratamento foi realizado para a FHG (0,75 g), sendo que a subfração hexano:AcOEt 20% (25,0 mg) forneceu a mesma mistura de esteroides.

Avaliação da atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton,³ em camundongos Swiss machos (25-30 g). O edema de orelha foi induzido pela aplicação de 20 μ L de solução óleo de cróton (200 μ g) diluído em 10 mL de acetona/água (7:3) na superfície interna da orelha esquerda do camundongo. Imediatamente após a aplicação do agente flogístico, nos grupos de animais tratados, foram aplicados 20 μ L de uma solução dos extratos brutos das folhas e dos galhos ou das suas frações de *A. fluminensis*, na superfície interna da orelha esquerda (5 mg/orelha). A orelha direita recebeu apenas o veículo (20 μ L). Após 6 h, os animais foram anestesiados, sacrificados e as orelhas seccionadas em discos de 6,0 mm de diâmetro. Estas secções foram pesadas em uma balança analítica. Utilizou-se a indometacina como controle positivo. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm) e analisados utilizando teste de Student para comparação de duas médias, ou análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, sendo utilizados $P < 0,05$ como nível de significância. A porcentagem da inibição do edema foi determinada pela Equação 1:

$$(\%) \text{ de inibição} = \frac{\text{peso das orelhas inflamadas (OC+V)} - \text{peso das orelhas tratadas}}{\text{peso das orelhas inflamadas (OC+V)} - \text{peso da orelha não inflamada (V)}} \times 100 \quad (1)$$

Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO foi avaliada através do sobrenadante de homogenizados das secções de orelhas direita (controles) e esquerda (tratadas com extrato bruto e frações, 5,0 mg e indometacina 1 mg), de acordo com a técnica descrita por Bradley.⁴ O tecido da orelha foi colocado em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo

0,5% de brometo de hexadeciltrimetil-amônio (Sigma - 1 mL/50 mg de tecido) em homogeneizador de Potter. O homogenizado foi agitado em vórtex e centrifugado durante 5,0 min a 2500 rpm e 25 °C. Foram adicionados 10 μ L do sobrenadante obtido em microplaca de 96 cavidades, em triplicata sendo, a seguir, adicionados 200 μ L de uma solução tampão contendo o-dianisidina di-hidrocloro (Sigma-16,7 mg), água bidestilada (90 mL), tampão fosfato de potássio (10 mL) e H₂O₂ 1% (50 μ L). A reação foi interrompida pela adição de 30 μ L de acetato de sódio 1,46 M (pH 3,0) e a atividade da enzima foi determinada pela técnica do ponto final,⁴ através de medida de absorbância (450 nm). A porcentagem de redução na atividade da enzima mieloperoxidase foi determinada pela Equação 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico das folhas e galhos de *A. fluminensis* resultou no isolamento dos flavonoides 3,7-di-*O*- α -L-raminopiranosilcanferol (canferitrina) (**1**), 7-*O*- α -L-raminopiranosilcanferol (α -raminoisobobina) (**2**), 3-*O*-apiofuranosil-7-*O*- α -L-raminopiranosilcanferol (**3**), 3-*O*- α -L-raminopiranosilquercetina (quercitrina) (**4**), 3-*O*- α -L-arabinofuranosilquercetina (avicularina) (**5**), o isoflavono 4',7-di-hidroxi-isoflavona (daidzeína) (**6**), a flavanona 8-*C*- β -D-glicopiranosil-4',5,7-tri-hidroxi-flavanona (iso-hemifloina) (**7**), o dímero epicatequina-(2 β →7, 4 β →8)-epicatequina (procianidina A₂) (**8**), o poliol 3-*O*-metil-*quiro*-inositol (**9**). As estruturas das substâncias isoladas foram estabelecidas com base nas análises dos dados espectroscópicos (RMN ¹H e ¹³C, DEPT, gCOSY ¹H-¹H, gHSQC, gHMBC, NOESY) e por comparação com os dados disponíveis na literatura.

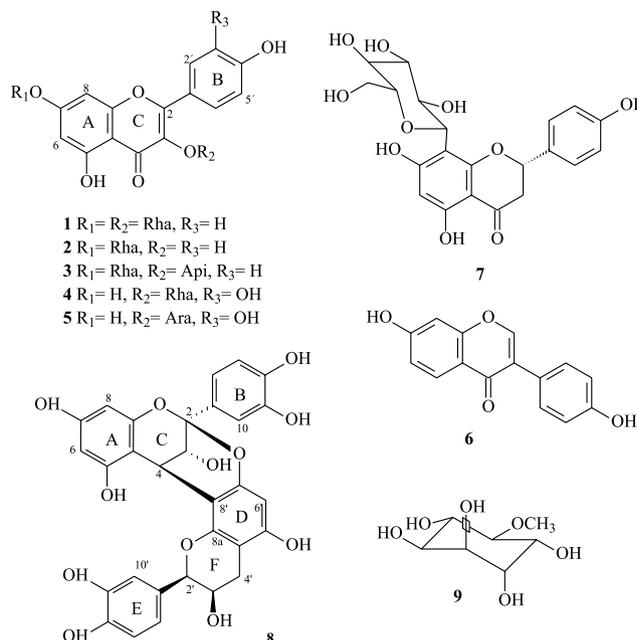


Figura 1. Estruturas dos metabólitos secundários de *Aeschynomene fluminensis*

A substância **1** foi obtida das frações acetato de etila e *n*-butanólica das folhas e dos galhos como sólido amorfo amarelo. Através do espectro de RMN de ¹H foram observados dois dupletos em δ_H 7,89 ($J = 8,7$ Hz, H-2' e H-6') e 6,93 ($J = 8,7$ Hz, H-3' e H-5') característico de um anel **B** *p*-hidroxilado, e de dois dupletos em δ_H 6,46 ($J = 1,8$ Hz, H-6), 6,72 ($J = 1,8$ Hz, H-8) correspondentes ao anel **A**, que indicaram como aglicona a estrutura 3,4',5,7-tetraidroxiflavona (canferol). A presença dos sinais na região de hidrogênios carbinólicos, em δ_H 5,39 ($d, J = 1,8$ Hz, H-1'') e 5,56 ($sl, H-1''$), característicos de hidrogênios

anoméricos e dos sinais em 0,92 (d ; $J = 5,7$ Hz, H-6'') e 1,25 (d ; $J = 6,0$ Hz, H-6'') determinaram a presença de duas unidades de raminopiranosose. Pelo espectro de RMN ^{13}C foram observados sinais em δ_{C} 95,6 (C-8), 100,6 (C-6), 116,6 (C-3' e C-5'), 132,0 (C-2' e C-6') e 179,8 característicos da unidade de canferol, sinais em δ_{C} 103,5 e 99,9 de carbonos anoméricos e de dois carbonos metílicos em δ_{C} 17,7 e 18,1, confirmando a presença de duas unidades de raminopiranosose. Estas unidades foram inferidas nas posições C-3 e C-7 baseando-se nos deslocamentos químicos dos hidrogênios anoméricos em δ_{H} 5,39 (d , 1,8 Hz, H-1'') e δ_{H} 5,56 (sl, H-1'') compatíveis a estas localizações quando comparados com aqueles encontrados na literatura,⁵ e ainda confirmadas pelo mapa de contornos HMBC pelas interações heteronucleares destes hidrogênios com os carbonos em δ_{C} 136,5 (C-3) e 163,6 (C-7) da aglicona. A comparação dos dados espectroscópicos obtidos com os da literatura⁵ permitiu identificar a substância **1** como 3,7-di-*O*- α -L-raminopiranosilcanferol (canferitrina).

Nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias **2** e **3** foram observados sinais similares aos da substância **1**, característicos de uma unidade canferol como aglicona e de uma raminopiranosose na posição C-7. Para a substância **3** foram observados sinais adicionais em δ_{H} 5,71 (d , $J = 1,8$ Hz, H-1'')/ δ_{C} 111,1 (C-1'') característicos de anomérico, em δ_{H} 3,60 (m , H-4'')/ δ_{C} 76,6 (C-4'') e 3,53 (s , H-5'')/ δ_{C} 65,2 (C-5'') característicos de metilênicos e, ainda, os sinais δ_{H} 4,28 (d , $J = 1,8$ Hz, H-2'')/ δ_{C} 79,2 (C-2'') de oximetínico e em δ_{C} 81,1 (C) de carbono não ligado a hidrogênio, que possibilitaram a identificação de uma unidade apiose. Os dados espectroscópicos de **2** e **3** foram comparados aos da literatura⁶ e permitiram definir as estruturas destes glicosídeos como 7-*O*- α -L-raminopiranosilcanferol (α -raminoisorobina) e 3-*O*-apiofuranosil-7-*O*-raminopiranosil-canferol.

A unidade aglicona dos glicosídeos **4** e **5** foi caracterizada como quercetina, através da análise dos espectros de RMN ^1H , pela presença dos sinais de um sistema AB atribuídos aos hidrogênios H-6/H-8 [δ_{H} 6,19/6,36, d , $J = 1,8$ Hz (4) e δ_{H} 6,20/6,39, d , $J = 2,1$ Hz (5)] e dos sinais típicos de anel B de flavonoides 3',4'-dissubstituídos, os hidrogênios H2'/H5'/H6' [δ_{H} 7,32, d , $J = 2,1$ Hz/6,90, d , $J = 8,1$ Hz/7,29, dd , $J = 8,1$ e 2,1 Hz (4) e δ_{H} 7,52, d , $J = 2,1$ Hz/6,89, d , $J = 8,4$ Hz/7,49, dd , $J = 8,4$ e 2,1 Hz (5)]. A natureza glicosídica para as substâncias foi caracterizada pelos demais sinais oximetínicos e oximetilênicos observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Para a substância **4**, os sinais em δ_{H} 5,33 (d , $J = 1,5$ Hz)/ δ_{C} 103,5 característico de H/C anoméricos, e de metílicos em δ_{H} 0,93 (d , $J = 5,7$ Hz)/ δ_{C} 17,6 indicaram a presença de uma raminose. A posição desta unidade no C-3 da quercetina foi confirmada pelo mapa de contornos HMBC, pela correlação heteronuclear deste carbono, em δ_{C} 136,2, com o hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,33 (H-1''). Os dados espectroscópicos de **4** foram comparados com os da literatura⁷ sendo condizentes para 3-*O*- α -L-raminopiranosil-quercetina (quercitrina). Para a substância **5**, a presença dos sinais em δ_{H} 5,46 (d , $J = 0,9$ Hz, H-1'')/ δ_{C} 109,6 (C-1'') e δ_{H} 3,49 (d , $J = 4,8$ Hz, H-5'')/ δ_{C} 62,6 (C-5'') característicos de anoméricos e metilênicos, e os sinais δ_{H} 4,32 (dd , $J = 0,9$ e 3,0 Hz, H-2'')/ δ_{C} 83,5 (C-2''), 3,90 (dd , $J = 3,0$ e 5,1 Hz, H-3'')/ δ_{C} 78,3 (C-3'') e δ_{H} 3,86 (m , H-4'')/ δ_{C} 88,1 (C-4'') confirmaram a presença da unidade de arabinose. Os dados espectroscópicos para a substância **5** foram condizentes com os da literatura⁸ para 3-*O*-arabinofuranosil-quercetina (avicularina).

A substância **6** foi obtida da fração clorofórmica dos galhos como um sólido amarelo. A análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C e a comparação com aqueles da literatura⁹ permitiram caracterizar inequivocamente a substância como o isoflavonoide 4',7-di-hidroxii-soflavona (daidzeína).

A substância **7** foi obtida em mistura com o flavonoide **1** na proporção de 2:1. Esta mistura foi obtida nesta proporção nas frações acetato de etila das folhas e dos galhos e *n*-butanólica das folhas

como sólido amarelo-castanho. O espectro de RMN ^1H apresentou 3 sinais na região de hidrogênios aromáticos: δ_{H} 6,80 (d , $J = 8,7$ Hz, H-3' e 5') e 7,29 (d , $J = 8,7$ Hz, H-2' e 6') característicos de anel B *p*-hidroxilado, e em δ_{H} 5,95 (sl, H-6) correspondente ao anel A. Ainda foram observados sinais de hidrogênios alifáticos de sistema ABX em δ_{H} 5,33 (dd , $J = 12,3$ e 3,0 Hz, H-2), 2,72 (dd , $J = 17,1$ e 3,0 Hz, H₃-3) e 3,11 (dd , $J = 17,1$ e 12,3 Hz, H₃-3) caracterizando o anel C do esqueleto flavanona. As constantes de acoplamento observadas para H-2 indicaram interação axial-axial e, conseqüentemente, uma conformação de H-2 em axial. Além destes, foram observados sinais adicionais característicos de uma unidade glicosídica, porém a ausência de sinal referente a hidrogênio anomérico sugeriu uma ligação C-glicosídica. O espectro de RMN ^{13}C apresentou 21 carbonos, sendo 12 carbonos aromáticos, 5 carbonos oximetínicos, 2 carbonos metilênicos e 1 carbono metínico. A posição da unidade C-glicosilada no C-8 foi confirmada pelas interações heteronucleares do H-1'' (δ_{H} 4,78) com δ_{C} 106,0 (C-8) e do H-6 (δ_{H} 5,95) com os sinais δ_{C} 164,2 (C-5) e 167,5 (C-7), observadas pelo mapa de contornos HMBC. Através dos dados espectroscópicos uni- e bidimensionais e comparação destes com os encontrados na literatura,⁹ esta substância foi caracterizada como sendo 8-C- β -D-glicopiranosil-4',5,7-tri-hidroxiflavanona (iso-hemifloina).

A substância **8** foi isolada da fração acetato de etila das folhas como um sólido amorfo amarelo com rotação específica $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +55,26$ (C = 3,8 mg/mL, acetona). Nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram observados sinais com deslocamentos químicos característicos para duas unidades de epicatequina ligadas entre si. A presença de um sistema AB entre os sinais δ_{H} 4,05 (1H, d , $J = 3,3$ Hz, H-3) e 4,40 (1H, d , $J = 3,3$ Hz, H-4), típico de hidrogênios de anel C de uma procianidina do tipo A, onde as unidades de flavonóis estão ligadas através de 2 ligações (C-C e C-O). O deslocamento em δ_{C} 100,3 do C-2 da epicatequina, devido à ligação deste com o oxigênio da outra unidade, é típico de ligação C-2_c \rightarrow O \rightarrow C-7'_D. Através do mapa de contornos HMBC foi possível observar as interações heteronuclear entre o H-6'_D com os carbonos C-5'_D e C-7'_D e, ainda, a interação do H-4_C com os carbonos C-8'_D e C-8'a_F, que comprovaram as ligações C-4_C \rightarrow C-8'_D e C-2_c \rightarrow C-7'_D entre os flavonoides. A configuração relativa 2',3'-*cis* no anel F foi atribuída pela observação do sinal de H-2' (em δ_{H} 4,91) como um singlete. A rotação específica observada para **8** e os dados de RMN ^1H e ^{13}C foram concordantes com os da literatura¹⁰ para a epicatequina-(4 β \rightarrow 8', 2 β \rightarrow O \rightarrow 7')-epicatequina (procianidina A2).

A substância **9** foi obtida das frações aquosas das folhas e dos galhos como um sólido amarelo. O espectro de RMN ^1H de **9** apresentou um singlete em δ_{H} 3,60, referente a hidrogênios oximetílicos, e sinais de hidrogênios metínicos em δ_{H} 3,88 (d , $J = 2,4$ Hz; H-1 e 6), 3,74 (dd , $J = 9,9$ e 2,4 Hz; H-2), 3,69 (dd , $J = 9,9$ e 2,4 Hz; H-5), 3,25 (dd , $J = 9,6$ e 9,0 Hz; H-3) e 3,59 (t , $J = 9,9$ Hz; H-4). Nos espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ foram observados 7 sinais, sendo 6 de carbonos metínicos em δ_{C} 84,8 (C-3), 74,2 (C-4), 73,7 (C-6), 73,4 (C-1), 72,5 (C-5), 72,0 (C-2) e um de carbono metílico em δ_{C} 60,8. A posição do grupo metoxila em C-3 foi confirmada pela correlação do H-3 (δ_{C} 3,25) com o C-7 (OCH₃) e dos hidrogênios metílicos (δ_{C} 3,60) com o C-3 (δ_{C} 84,8) pelo mapa de contornos HMBC. Estes dados foram concordantes com os da literatura¹¹ para o poliol 3-*O*-metil-*qui*ro-inositol.

Ensaio de atividade anti-inflamatória foram realizados para os extratos brutos das folhas e dos galhos e suas frações. Foi utilizado o modelo de edema de orelha induzido por óleo de crôton em camundongo, na administração da dose de 5,0 mg/orelha, por via tópica. Nestes ensaios todas as amostras inibiram o edema de orelha, sendo que os extratos bruto e das frações das folhas apresentaram inibição de 54, 57, 30, 55, 35 e 46% para o extrato EBF e as frações FHF, FCF, FAEF, FBF e FAF; os extratos dos galhos, EBG e suas frações

FHG, FCG, FAEG, FBG e FAG, inibiram em 52, 77, 8, 26, 31 e 6%.

A atividade sobre a enzima mieloperoxidase (MPO), utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi também avaliada para os extratos brutos e as frações polares de *A. fluminensis*. A MPO é uma heme-enzima considerada responsável pela resposta imunológica inespecífica a vários agentes.¹² Os resultados mostraram que a administração na dose de 5,0 mg/orelha inibiu a atividade sobre a enzima em 0,3; 17; 61,7; 67,1; 86,4; 78,8; 77,0 e 50,9% nos extratos EBF e EBG e as frações FAEF, FAEG, FBF, FBG, FAF e FAG, respectivamente. O processo anti-inflamatório tóxico pode ser promovido por diferentes mediadores na formação do edema. A maior atividade observada na enzima mieloperoxidase indica a migração de células polimorfonucleares para o local inflamado.

A canferitrina (**1**) está presente nas frações polares (FAE e FB) das folhas e dos galhos em quantidades expressivas. Esta substância e também a quercitrina (**4**) e a procianidina A₂ (**8**), isoladas da FAEF, são conhecidas como agentes anti-inflamatórios e a presença das mesmas contribuiu para as significativas atividades observadas nestas frações.¹³

CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* resultou no isolamento dos flavonoides canferitrina, α -raminoisorobina, 3-*O*-apiofuranosil-7-*O*-raminopiranosilcanferol, quercitrina, avicularina, daidzeina, iso-hemifloina, da procianidina A₂, do poliol 3-*O*-metil-*quiro*-inositol e dos esteroides sitosterol e estigmasterol. Este é o primeiro relato do isolamento destas substâncias no gênero *Aeschynomene*. Os extratos brutos das folhas e dos galhos e frações provenientes destes extratos apresentaram significativa atividade anti-inflamatória para o modelo de edema de orelha e MPO.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Está disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, em arquivo pdf, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária, PIQDT - CAPES e UEM pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Fernandes, A.; *O taxon Aeschynomene no Brasil*, EUFC: Fortaleza, 1996.
2. Braggio, M. M.; Lima, M. E. L.; Veasey, E. A.; Haraguchi, M.; *Arq. Inst. Biol.* **2002**, *69*, 49; Fullas, F.; Kornberg, L. J.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Farnsworth, N.; Chagwedera, T. E.; Kinghorn, A. D.; *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 190; Powell, R. G.; Smith-Jr., C. R.; Weisleder, D.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2789; Ueda, M.; Hiraoka, T.; Niwa, M.; Yamamura, S.; *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6777; Ueda, M.; Niwa, M.; Yamamura, S.; *Phytochemistry* **1995**, *39*, 817.
3. van Arman, G. C.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1974**, *16*, 900.
4. Bradley, P. P.; Priebe, D. A.; Christensen, R. D.; Rothstein, G.; *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78*, 206.
5. Aragão, P. C. A.; Toledo, J. B.; Morais, A. A.; Braz-Filho, R.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 254.
6. Chua, M.-T.; Tung, Y.-T.; Chang, S.-T.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 1918; Spanou, C.; Bourou, G.; Dervishi, A.; Aligiannis, N.; Angelis, A.; Komiotis, D.; Skaltsounis, A.-L.; Kouretas, D.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6967.
7. Sirat, H. M.; Rezali, M. F.; Ujang, Z.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10404.
8. Velozo, L. S. M.; Da Silva, B. P.; Da Silva, E. M. B.; Parente, J. P.; *Fitoterapia* **1999**, *70*, 532.
9. Agrawal, P. K.; *Studies in Organic Chemistry: Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Ed. Elsevier Science: Lucknow, 1989.
10. Lou, H.; Yamazaki, Y.; Sasaki, T.; Uchida, M.; Tanaka, H.; Oka, S.; *Phytochemistry* **1999**, *51*, 297.
11. DellaGreca, M.; Fiorentino, A.; Izzo, A.; Napoli, F.; Purcaro, R.; Zarrelli, A.; *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 118.
12. Regasini, L. O.; Fernandes, D. C.; Castro-Gamboa, I.; Silva, D. H. S.; Furlan, M.; Barreiro, E. J.; Cardoso-Lopes, E. M.; Young, C. M.; Torres, L. B.; Velloso, J. C. R.; Oliveira, O. M. M.; Bolzani, V. S.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 802.
13. Pizzollatti, M. G.; Cunha Jr., A.; Szpoganicz, B.; Sousa, E.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 466; Toker, G.; K peli, E.; Memisoglu, M.; Yesilada, E.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 393; Yen, C.-T.; Hsieh, P.-W.; Hwang, T.-L.; Lan, Y.-H.; Chang, F.-R.; Wu, Y.-C.; *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 280; Nandakumar, V.; Singh, T.; Katiyar, S.; *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 378.

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Aeschynomene fluminensis* VELL. (FABACEAE)[#]

Marlene Capelin Ignoato, Rodrigo Monteiro Fabrão, Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel, Marcos Felipe Pinatto Botelho e Silvana Maria de Oliveira Santin*

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Laura Lícia Milani de Arruda e Ciomar Aparecida Bersani-Amado

Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Maria Conceição de Souza

Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Tabela 1S. Dados de RMN de ¹³C/DEPT (75,45 MHz) e ¹H (300,06 MHz) e gHMBC para a substância **7** em CD₃OD [ppm] (multiplicidade *J* Hz) e dados da literatura⁹ para a iso-hemifloina

| C | 7 | ¹ H/gHSQC | iso-hemifloina ⁹ |
|---------|-------------------------|--|-----------------------------|
| 2 | 80,4 (CH) | 5,33 <i>ddJ</i> = 3,0 e 12,3 Hz | 78,4 (CH) |
| 3 | 43,9 (CH ₂) | Ha 2,72 <i>ddJ</i> = 3,0 e 17,1 Hz Hb 3,11 <i>ddJ</i> =12,3 e 17,1 Hz | 42,1 (CH ₂) |
| 4 | 198,0 (C) | | 196,6 (C) |
| 5 | 164,2 (C) | | 161,8 (C) |
| 6 | 96,4 (CH) | 5,95 <i>sl</i> | 95,0 (C) |
| 7 | 167,5 (C) | | 166,1 (C) |
| 8 | 106,0 (C) | | 105,9 (CH) |
| 9 (8a) | 163,0 (C) | | 162,9 (C) |
| 10 (4a) | 103,2 (C) | | 101,6 (C) |
| 1' | 130,9 (C) | | 129,0 (C) |
| 2' e 6' | 129,0 (CH) | 7,29 <i>dJ</i> = 8,7 Hz | 128,4 (CH) |
| 3' e 5' | 116,3 (CH) | 6,80 <i>dJ</i> = 8,7 Hz | 115,4 (CH) |
| 4' | 159,0 (C) | | 157,8 (C) |
| 1'' | 75,2 (CH) | 4,78 <i>dJ</i> = 10,2 Hz | 73,1 (CH) |
| 2'' | 72,6 (CH) | 4,12 <i>m</i> | 70,5 (CH) |
| 3'' | 80,2 (CH) | 3,39-3,44 <i>m</i> | 79,2 (CH) |
| 4'' | 71,8 (CH) | 3,32-3,37 <i>m</i> | 70,8 (CH) |
| 5'' | 82,5 (CH) | 3,39-3,44 <i>m</i> | 81,6 (CH) |
| 6'' | 62,9 (CH ₂) | Ha 3,71 <i>ddJ</i> = 2,7 e 5,4 Hz Hb 3,82 <i>ddJ</i> = 2,7 e 5,4 Hz | 61,7 (CH ₂) |
| | | | (DMSO _d) |

*e-mail: smoliveira@uem.br

[#]Artigo em homenagem ao Prof. Otto R. Gottlieb (31/8/1920-19/6/2011)

Tabela 2S. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz) e ^1H (300 MHz) para a substância **8** em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura¹⁰ para o dímero

| C | 8 | $^1\text{H}/\text{HSQC}$ | Procianidina A ₂ / ^1H |
|-----|-------------------------|---|---|
| 2 | 100,3 (C) | | 100,2 |
| 3 | 68,2 (CH) | 4,05 $dJ=3,3$ Hz | 68,1 4,05 $dJ=3,4$ Hz |
| 4 | 29,4 (CH) | 4,40 $dJ=3,3$ Hz | 29,3 4,39 $dJ=3,4$ Hz |
| 4a | 104,4 (C) | | 104,3 |
| 5 | 157,2 (C) | | 157,1 |
| 6 | 98,4 (CH) | 6,00 $dJ=2,4$ Hz | 98,3 6,00 $dJ=2,3$ Hz |
| 7 | 158,3 (C) | | 158,2 |
| 8 | 96,8 (CH) | 6,06 $dJ=2,4$ Hz | 96,7 6,07 $dJ=2,3$ Hz |
| 8a | 154,4 (C) | | 154,3 |
| 9 | 132,6 (C) | | 132,5 |
| 10 | 115,8 (CH) | 7,14 $dJ=2,1$ Hz | 115,7 7,14 $dJ=2,4$ Hz |
| 11 | 146,5 (C) | | 146,3 |
| 12 | 145,8 (C) | | 145,7 |
| 13 | 116,2 (CH) | 6,81 $dJ=8,1$ Hz | 116,1 6,82 $dJ=8,2$ Hz |
| 14 | 120,5 (CH) | 7,02 $ddJ=1,8$ e 3,9 Hz | 120,4 7,07 $ddJ=2,4$ e 8,2 Hz |
| 2' | 81,9 (CH) | 4,91 <i>br.s</i> | 81,8 4,91 <i>br.s</i> |
| 3' | 67,2 (CH) | 4,23 $dJ=3,3$ Hz | 67,0 4,23 <i>br.s</i> |
| 4' | 30,1 (CH ₂) | H α 2,75 $ddJ=2,4$ e 17,1 Hz H β 2,94 $ddJ=2,4$ e 17,3 Hz | 29,9 H α 2,74 $ddJ=3,2$ e 17,3 Hz H β 2,95 $ddJ=4,6$ e 17,3 Hz |
| 4'a | 102,6 (C) | | 102,5 |
| 5' | 156,8 (C) | | 156,7 |
| 6' | 96,6 (CH) | 6,08 <i>sl</i> | 96,5 6,09 <i>s</i> |
| 7' | 152,5 (C) | | 152,3 |
| 8' | 107,4 (C) | | 107,3 |
| 8'a | 152,3 (C) | | 152,3 |
| 9' | 131,4 (C) | | 131,2 |
| 10' | 115,8 (CH) | 7,12 $dJ=2,1$ Hz | 115,7 7,13 $dJ=2,2$ Hz |
| 11' | 146,9 (C) | | 146,8 |
| 12' | 146,2 (C) | | 146,0 |
| 13' | 116,1 (CH) | 6,79 $dJ=8,1$ Hz | 116,0 6,81 $dJ=8,2$ Hz |
| 14' | 119,9 (CH) | 6,99 $ddJ=1,5$ e 3,9 Hz | 119,8 6,99 $ddJ=2,2$ e 8,2 Hz |
| | | | CD_3OD |



Figura 1S. *Aeschynomene fluminensis* – foto cedida pelo Laboratório de Mata Ciliar/Nupélia/UEM

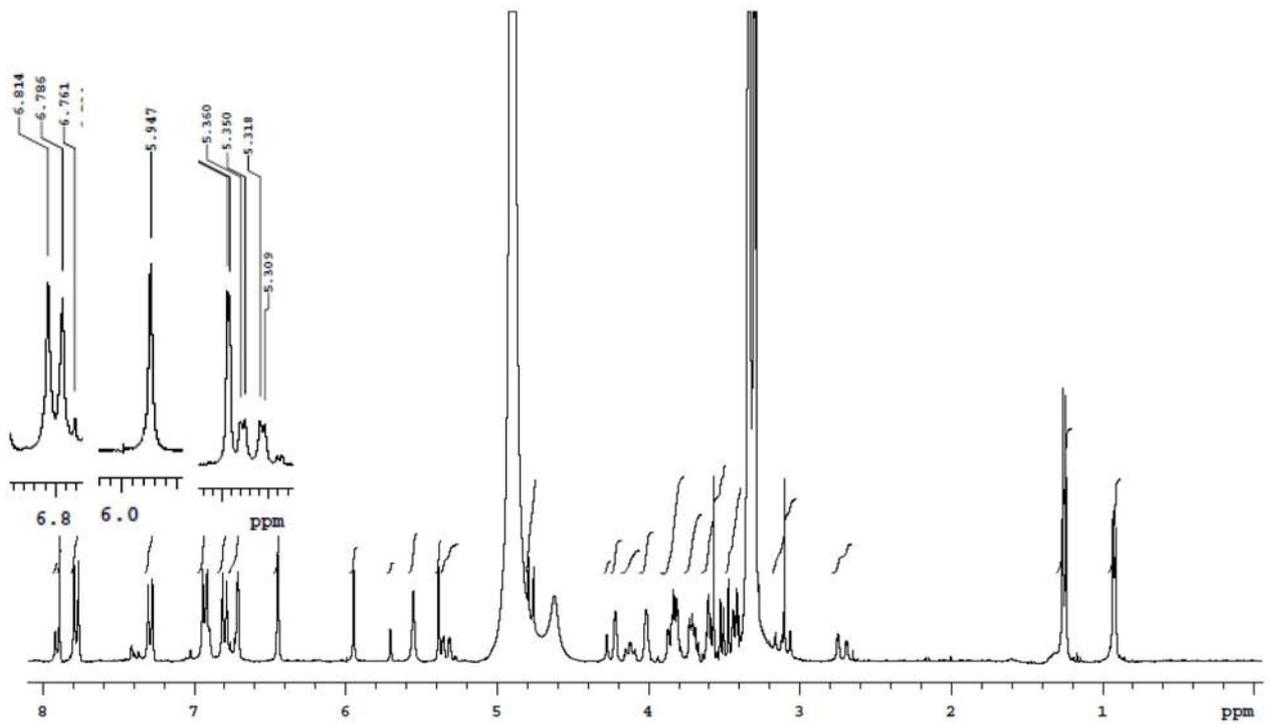


Figura 2S. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300 MHz) para a mistura 1 e 7

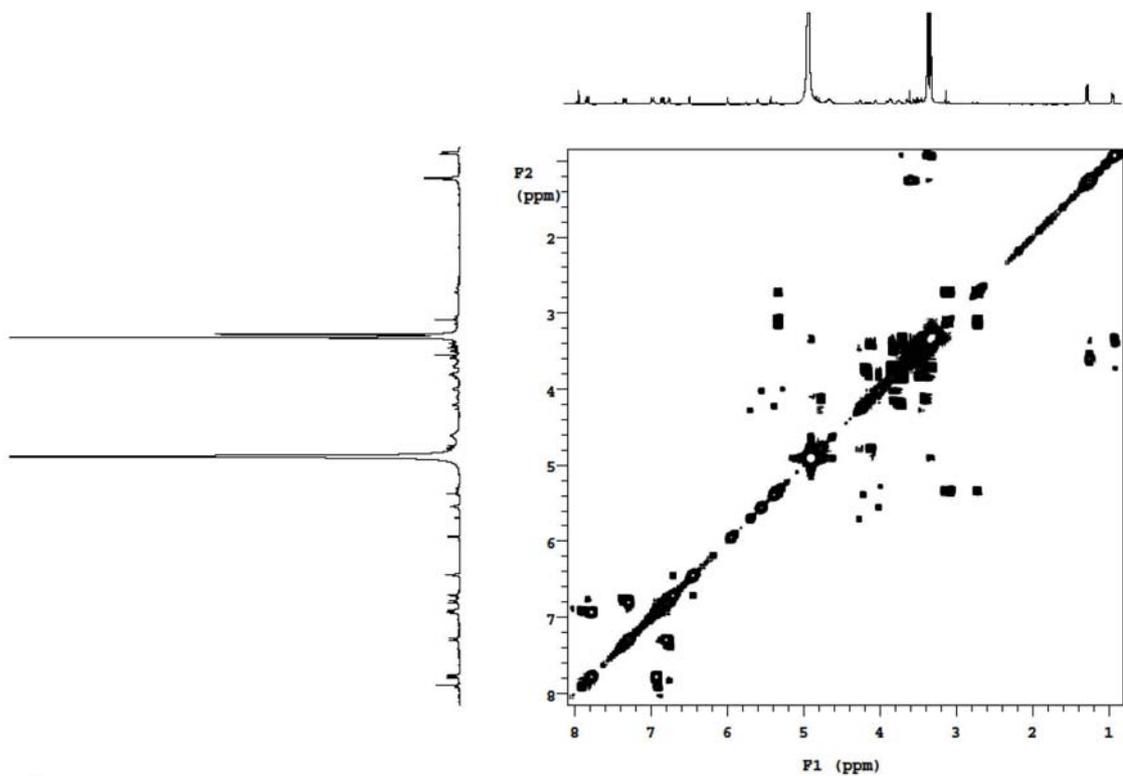


Figura 3S. Mapa de contornos gCOSY (CD_3OD ; 300 MHz) para a mistura das substâncias 1 e 7

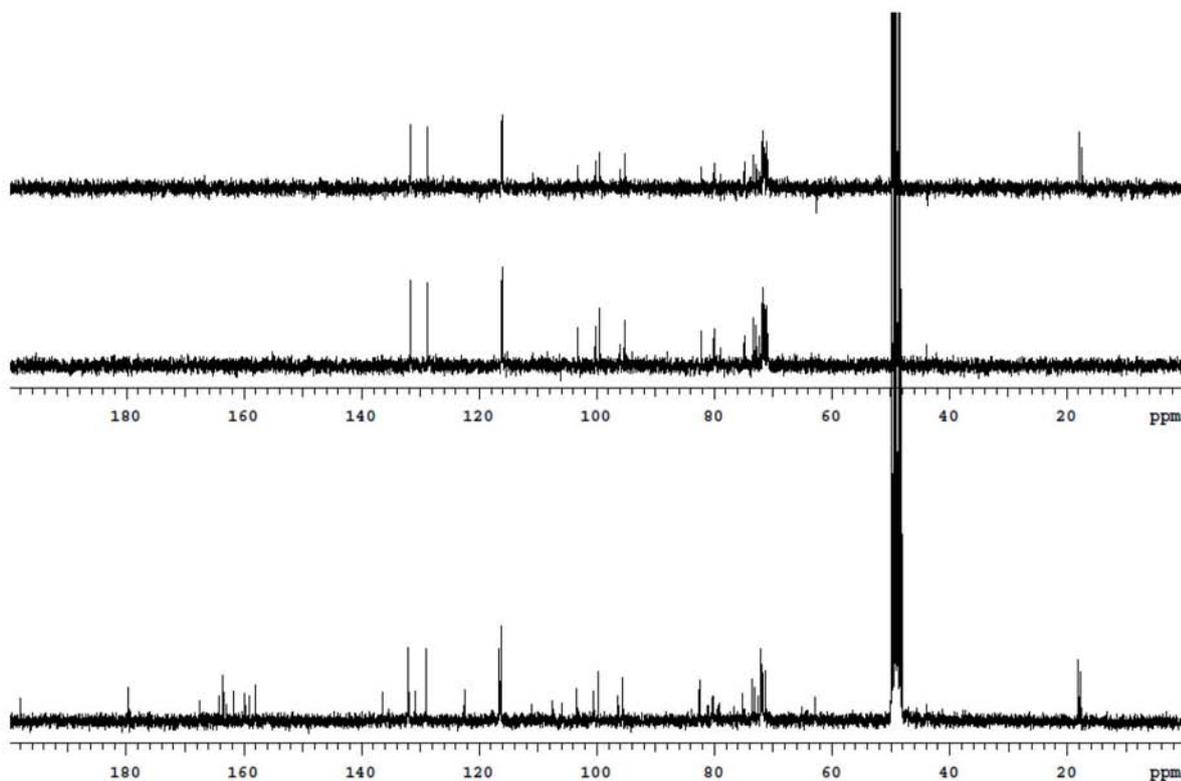


Figura 4S. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,5 MHz) para a mistura das substâncias 1 e 7

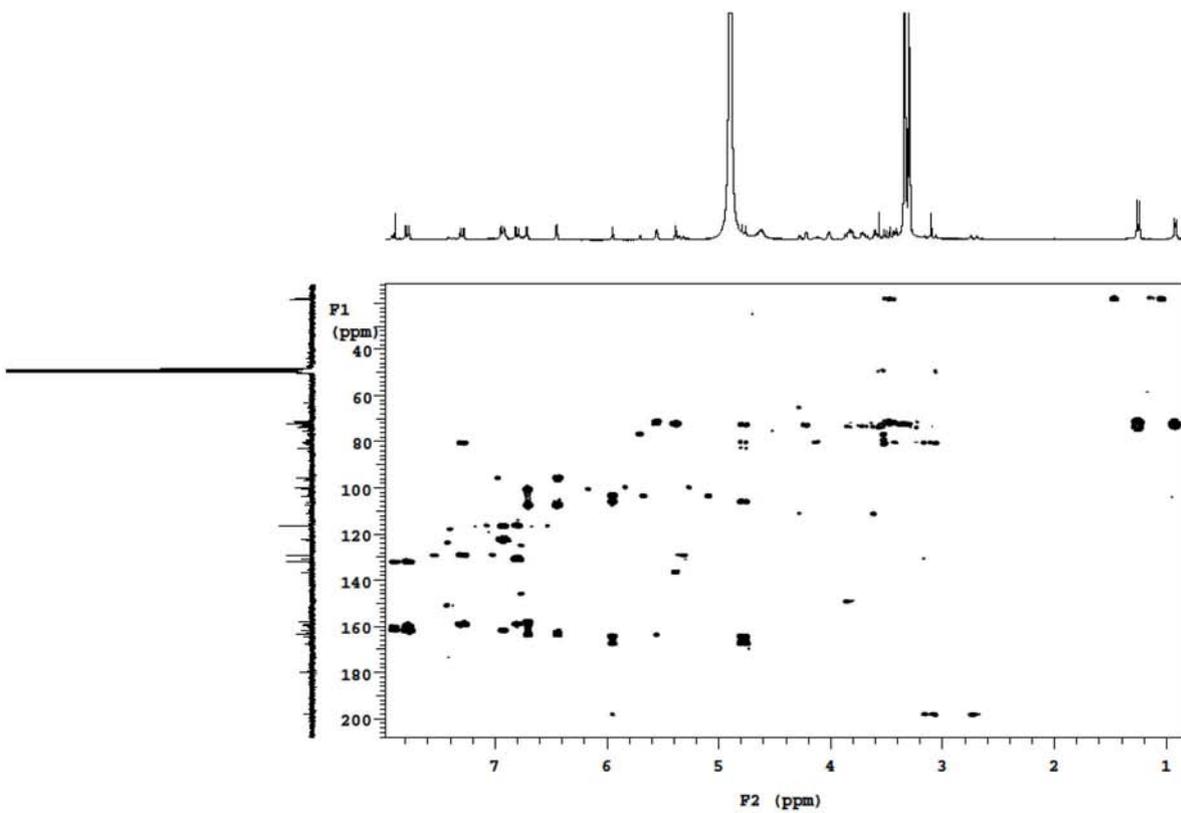


Figura 5S. Mapa de contornos $g\text{HMBC}$ (CD_3OD ; 75,5 e 300 MHz) para a mistura das substâncias 1 e 7

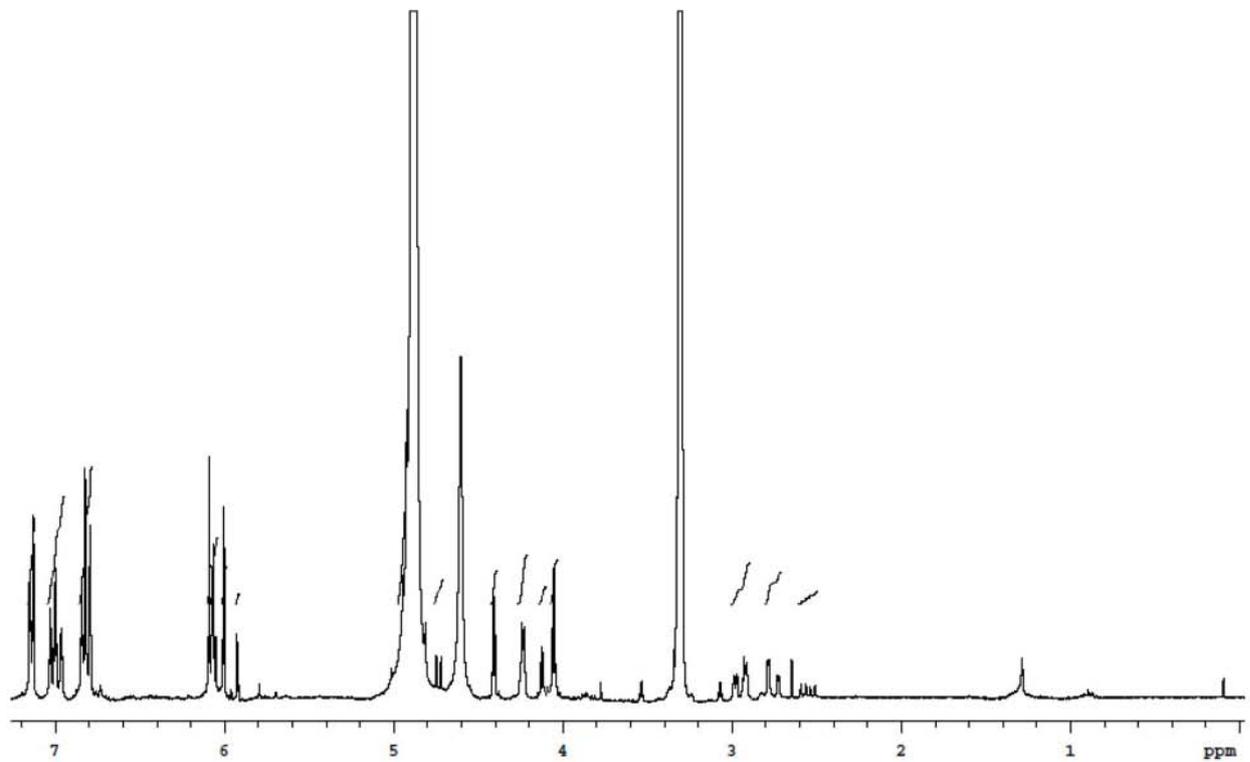


Figura 6S. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300 MHz) para a substância 8

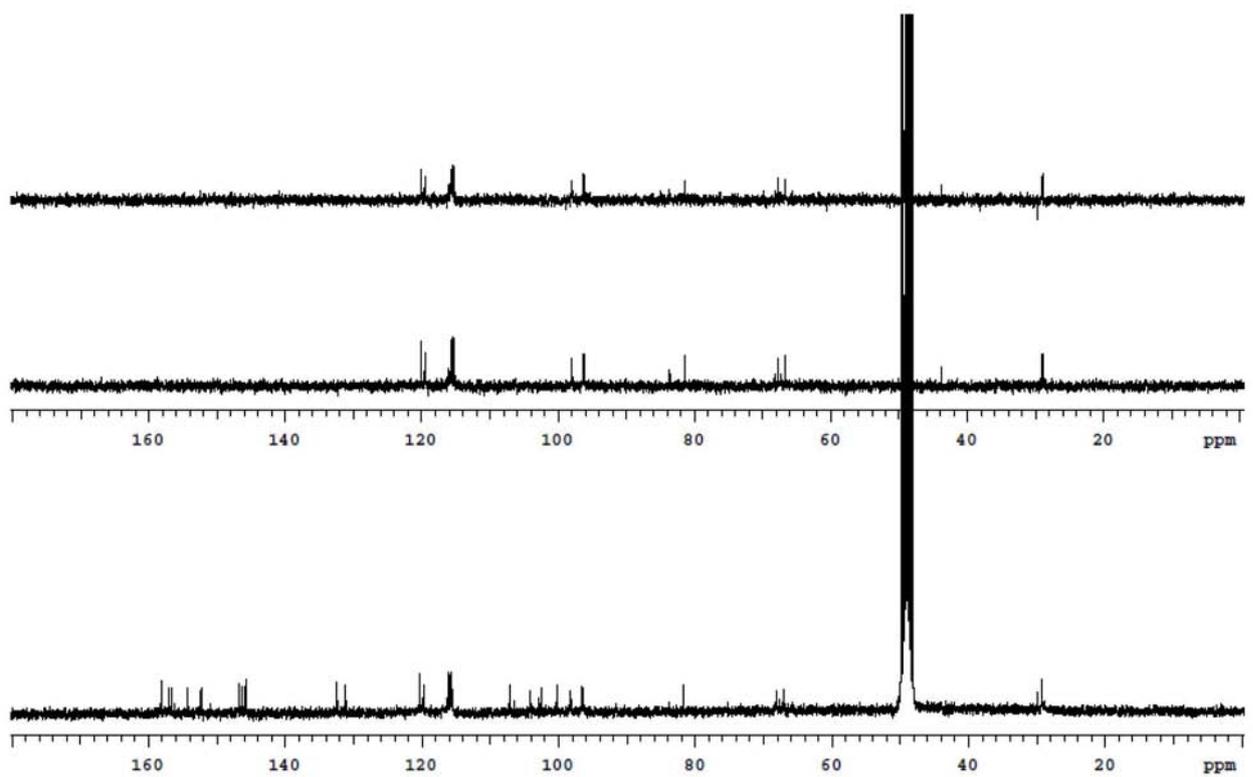


Figura 7S. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75 MHz) para a substância 8

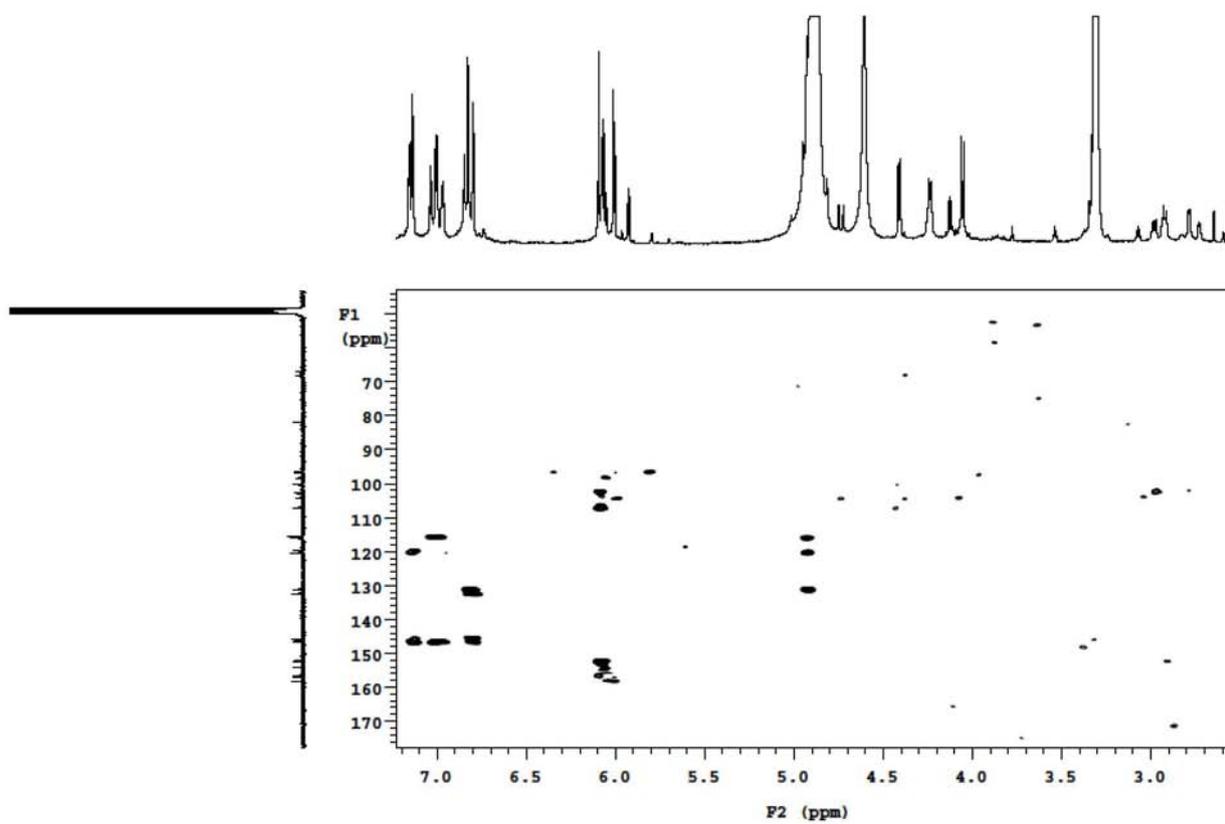


Figura 8S. Mapa de contornos gHMBC (CD_3OD ; 75 e 300 MHz) para a substância 8

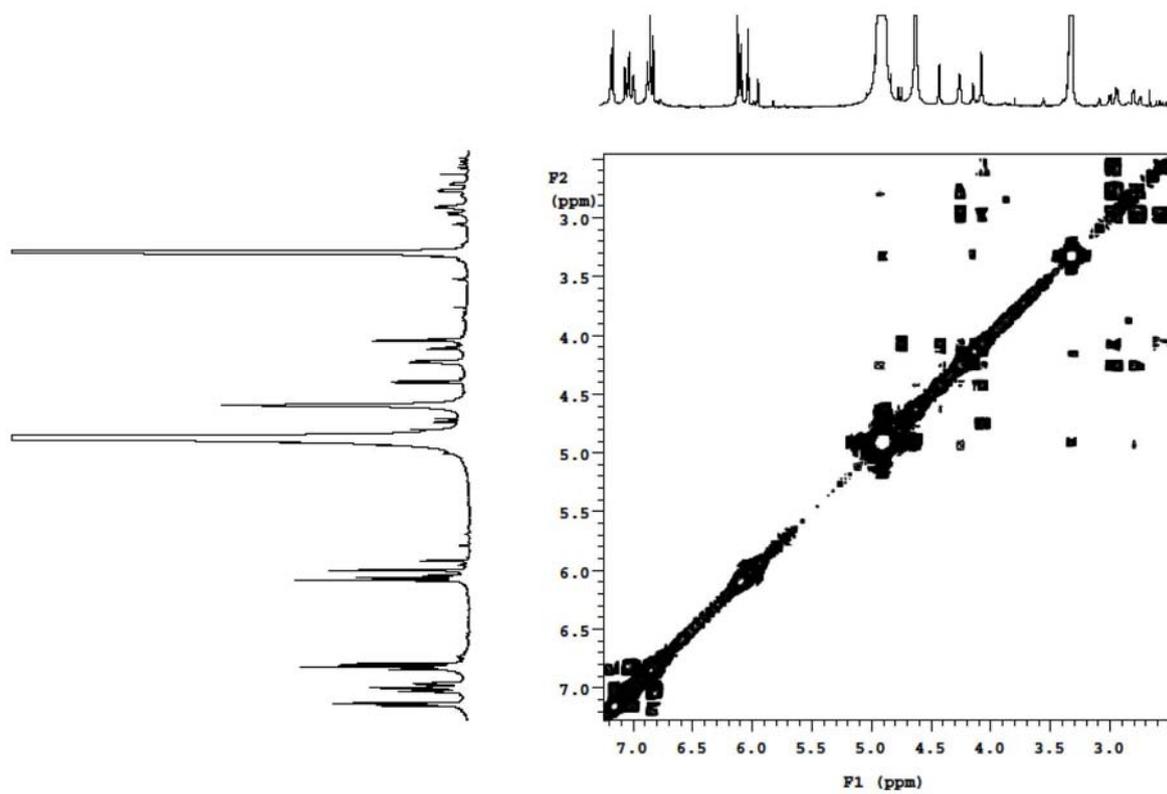


Figura 9S. Mapa de contornos gCOSY (CD_3OD ; 300 MHz) para a substância 8

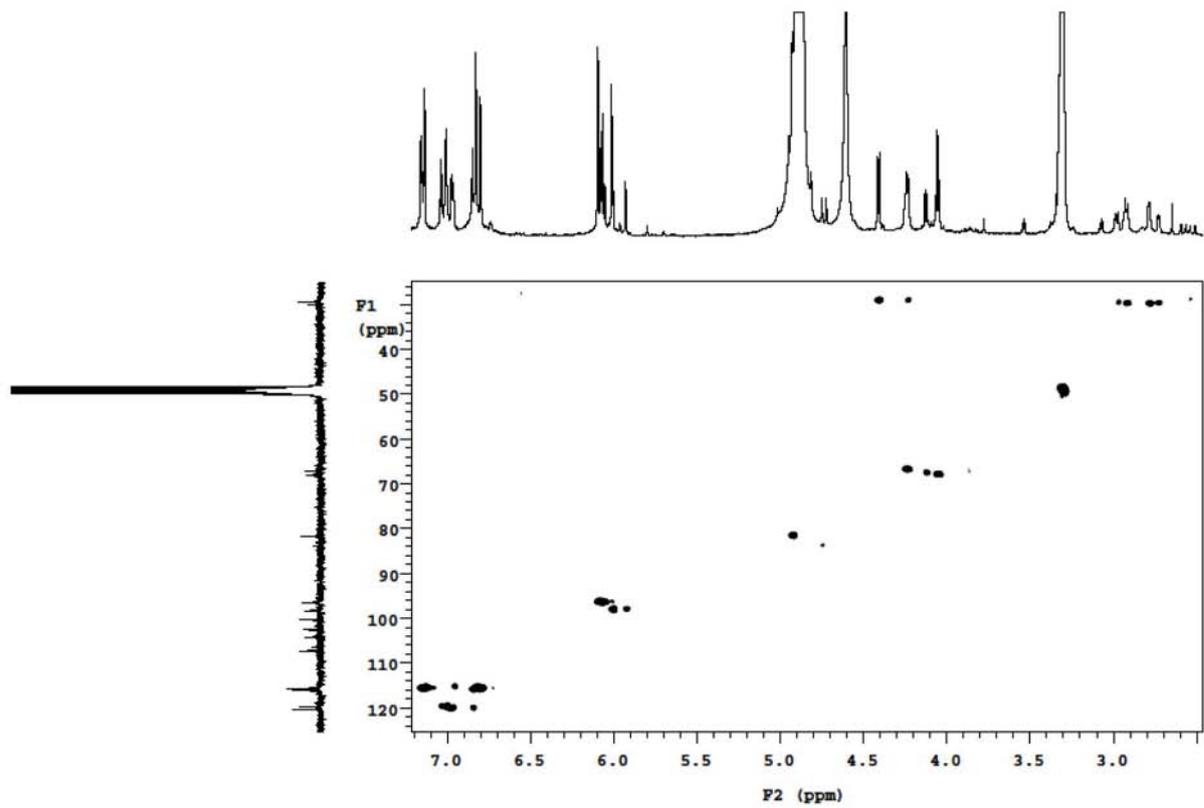


Figura 10S. Mapa de contornos gHSQC (CD_3OD ; 75 e 300 MHz) para a substância 8

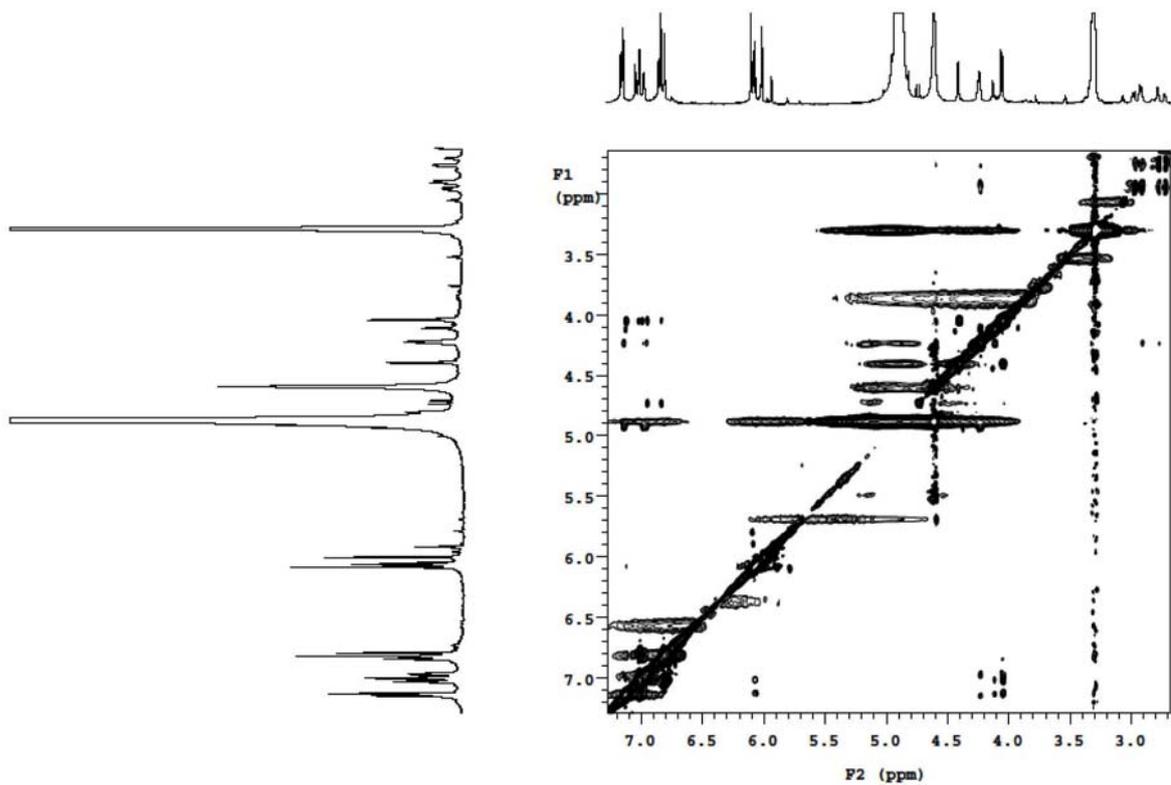


Figura 11S. Mapa de contornos NOESY (CD_3OD ; 75 e 300 MHz) para a substância 8