

## CONSTITUENTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Chomelia obtusa* CHAM. & SCHLTDL. (RUBIACEAE)

Michely Pereira de Barros, Silvana Maria de Oliveira Santin, Willian Ferreira da Costa, Gentil José Vidotti e Maria Helena Sarraggiotto\*

Departamento de Química, 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

Ciomar Aparecida Bersani-Amado

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

Recebido em 28/9/07; aceito em 12/6/08; publicado na web 31/10/08

CHEMICAL CONSTITUENTS AND ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES EVALUATION OF THE LEAVES EXTRACTS OF *Chomelia obtusa* CHAM. & SCHLTDL. (RUBIACEAE). The phytochemical investigation of *Chomelia obtusa* leaves led to the isolation of four triterpenes (3-*O*- $\beta$ -D-quinovopyranosyl-28-*O*- $\beta$ -D-glycopyranosyl quinovic acid, 3-*O*- $\beta$ -D-quinovopyranosyl-28-*O*- $\beta$ -D-glycopyranosyl cincholic acid, and a mixture of ursolic and oleanolic acids), two flavonoids (3-*O*- $\beta$ -D-glycopyranosyl quercetin, 3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactopyranoside] quercetin), besides bornesitol and a mixture of 3,5- and 4,5-*O*-dicaffeoyl quinic acids. The structures of the isolated compounds were assigned on the basis of spectroscopic data, including two-dimensional NMR methods. The anti-inflammatory and antioxidant activities of the crude methanolic extract and of its fractions were evaluated. This is the first report on the chemical and biological investigation of the *Chomelia* genus.

Keywords: *Chomelia obtusa*; Guettardeae; chemical constituents.

### INTRODUÇÃO

A planície de inundação do alto rio Paraná, abrangendo parte da Área de Proteção Ambiental (APA) das Ilhas e Várzeas do Rio Paraná (Porto Rico-PR e MS),<sup>1</sup> tem sido alvo de pesquisa de nosso grupo, com o objetivo de avaliar o potencial químico e farmacológico das plantas nativas daquela região. Nossos estudos visam contribuir para a preservação da biodiversidade da referida APA, bem como dar suporte à classificação das espécies vegetais presentes, com base em quimiotaxonomia. Na região, a família Rubiaceae está representada por 22 espécies distribuídas em 18 gêneros e 3 subfamílias,<sup>1</sup> podendo-se destacar a subfamília Guettardoideae-tribo Guettardeae, com a ocorrência dos gêneros *Machaonia*, *Guettarda* e *Chomelia*. Dentre os poucos estudos químicos encontrados desta tribo constata-se a presença de alcalóides indólicos e quinolínicos, ácidos clorogênicos, triterpenos glicosilados e iridóides como principais constituintes,<sup>2-7</sup> tendo o gênero *Guettarda*<sup>2</sup> o maior número de espécies investigadas.

Em trabalhos anteriores, com a tribo Guettardeae, realizamos os estudos das espécies *Machaonia brasiliensis* e *Guettarda pohliana*, os quais revelaram a presença do iridóide secologanosídeo e de flavonóides,<sup>6</sup> de ácidos clorogênicos,<sup>6,7</sup> dos ácidos quinóico, ursólico e oleanóico<sup>7</sup> e de saponinas derivadas dos ácidos quinóico e cinchólico.<sup>7</sup> A presença de secologanosídeo em *M. brasiliensis* foi considerada de importância quimiotaxonômica para estudos da subfamília Guettardoideae e da tribo Guettardeae.<sup>6</sup>

Em continuidade ao nosso projeto de bioprospecção com plantas nativas da planície alagável do alto rio Paraná, especialmente da tribo Guettardeae, neste trabalho relatamos a investigação química e a avaliação das atividades antiinflamatória e antioxidante da espécie *Chomelia obtusa* Cham. & Schltdl. A investigação de *C. obtusa* contribuirá para os

estudos da tribo Guettardeae, uma vez que este corresponde ao primeiro relato sobre constituintes químicos do gênero *Chomelia*.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN (uni- e bidimensionais) foram obtidos em espectrômetro Varian, modelo Mercury plus BB, operando a 300 MHz para <sup>1</sup>H e 75,5 MHz para <sup>13</sup>C. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano TMS ( $\delta = 0,0$  ppm) ou o próprio solvente. Os solventes utilizados foram D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>OD e CDCl<sub>3</sub>. Para as cromatografias em coluna (CC) foi utilizado gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm, Merck) ou Sephadex LH-20, como fase estacionária. A quantidade de adsorvente e as dimensões das colunas variaram de acordo com a quantidade de material empregado. Para as cromatografias em camada delgada (CCD) e em camada delgada preparativa (CCDP) empregou-se gel de sílica 60 G e 60 GF<sub>254</sub> (Merck), suspenso em água destilada, numa proporção de 1:2, e distribuído em espessura de 0,25 e 1,0 mm, respectivamente. A visualização dos compostos em CCD foi realizada por irradiação com luz ultravioleta em 254 e 366 nm e/ou por pulverização com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH (1:1), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/anisaldeído/ácido acético (1:0,5:50 mL) seguido de aquecimento.

#### Material vegetal

A planta *Chomelia obtusa* (folhas) foi coletada em dezembro de 2001, às margens da planície de inundação do rio Paraná, na região de Porto Rico-PR e identificada pela Dr<sup>a</sup> M. C. de Souza, do Departamento de Biologia da UEM. Uma exsiccata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário do NUPÉLIA da UEM, sob registro HUEM 13.517.

\*e-mail: mhsarraggiotto@uem.br

## Isolamento dos constituintes químicos

O material vegetal (405,0 g), após seco e moído, foi extraído por maceração em metanol. O solvente foi eliminado sob vácuo em evaporador rotativo fornecendo o extrato metanólico (68,0 g). Parte deste extrato (37,0 g) foi submetido a um pré-fracionamento em coluna de gel de sílica 60 utilizando-se  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  1:1 e MeOH como eluentes, obtendo-se as frações  $\text{CHCl}_3$  (COC, 580,0 mg),  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (COCM, 18,5 g) e MeOH (COM, 14,0 g). A purificação da fração COC (370,0 mg) por coluna cromatográfica em gel de sílica 60 empregando-se como eluentes misturas de hexano/AcOEt 9:1, 7:3 e 1:1 e AcOEt forneceu uma mistura constituída pelas substâncias **1** e **2** (4,2 mg). Parte da fração COCM (6,4 g) foi submetida à coluna cromatográfica em gel de sílica 60 e eluída em  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1, 8:2, 7:3 e 1:1 e MeOH, obtendo-se 18 subfrações (COCM-1 a COCM-18). A subfração COCM-10 (504,0 mg), eluída em  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  8:2, foi submetida a sucessivas filtrações em coluna de Sephadex LH-20, empregando-se como eluentes  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  3:1, 1:1 e MeOH. Este procedimento resultou no isolamento das substâncias **3** (17,8 mg) e **4** (12,2 mg), na forma pura, e na obtenção de diversas subfrações contendo estas substâncias como mistura binária. Purificação da subfração COCM-11 (393,0 mg), eluída em  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  7:3 em coluna de Sephadex LH-20, empregando-se  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  3:1, 1:1, 3:7 e 1:9 e MeOH forneceu as substâncias **5** (6,9 mg) e **6** (5,0 mg), além de uma mistura de **3** e **4** (240,0 mg). O mesmo procedimento foi empregado para a purificação da subfração COCM-18 (320,0 mg), eluída em  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  1:1, o que resultou no isolamento da substância **7** (16,6 mg) e uma mistura de **8** e **9** (43,0 mg).

As frações COCM-1 a COCM-9 apresentaram espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  característicos de ácidos graxos e não foram estudadas. Os espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  das frações COCM-12 e COCM-14 a COCM-17 mostraram que eram compostas pelas mesmas substâncias já isoladas das frações estudadas.

Parte da fração COM (405,0 mg), obtida do fracionamento do extrato bruto, foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 utilizando como eluentes  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  3:1, 1:1, 3:7 e 1:9 e MeOH, o que resultou em 24 subfrações (COM-1 a COM-24). A cromatografia da fração COM-11, em Sephadex LH-20, forneceu uma mistura das substâncias **8** e **9** (40,5 mg). Os espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  das demais subfrações mostraram a presença de misturas dos flavonóides **5** e **6** e dos ácidos clorogênicos **8** e **9**, além de açúcares livres.

## Ensaios biológicos

### Avaliação da atividade antiinflamatória

Empregou-se o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongo.<sup>8</sup> Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas, pesando 25-30 g, em média. O óleo de cróton foi diluído em uma solução de acetona/água 7:3 e aplicado, na concentração de 200  $\mu\text{g}/\text{orelha}$ , em ambas as faces internas das orelhas dos camundongos. Uma solução (20  $\mu\text{L}$ ) do extrato bruto metanólico e da fração COCM foi aplicada na superfície interna da orelha esquerda (2,5 mg/orelha). A orelha direita recebeu apenas o solvente utilizado para solubilização das amostras (20  $\mu\text{L}$ ). Após 6 h, os animais foram sacrificados e as orelhas seccionadas em discos circulares de 6 mm de diâmetro. Estas secções foram pesadas em uma balança analítica. A indometacina foi usada 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 utilizado  $P < 0,05$  como nível de significância.

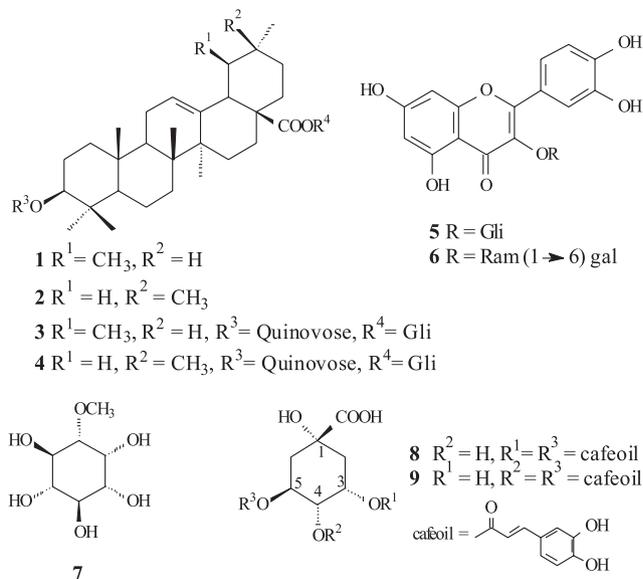
### Avaliação da atividade antioxidante

Os testes de atividade antioxidante foram realizados para o extrato bruto metanólico, frações COCM e COM e subfrações COCM-10, COCM-11 e COCM-18. Os potenciais de atividade antioxidante foram determinados com base na atividade sequestradora de radical livre do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).<sup>9</sup> As amostras foram adicionadas em diferentes concentrações a 2 mL de uma solução de DPPH (4,7 mg em 75 mL de metanol). Foram empregadas 10 diferentes concentrações, na faixa de 0 a 140  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para COCM-10 e de 0 a 73  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para as demais amostras. Após 30 min a absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-visível, a 515 nm, empregando metanol como branco. Os testes foram realizados em triplicata. Uma solução de DPPH sem adição das amostras foi utilizada como controle. O BHT foi utilizado como padrão. A capacidade sequestradora de radicais livres foi determinada utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ( $P < 0,05$ ). Os resultados foram expressos como  $\text{IC}_{50}$ , que corresponde à concentração da amostra necessária para sequestrar 50% de radicais livres.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, extratos do material vegetal foram submetidos a ensaios qualitativos para a detecção de alcalóides e/ou iridóides,<sup>10</sup> os quais representam constituintes comumente encontrados na família Rubiaceae. Os resultados dos ensaios revelaram a ausência destas substâncias nos extratos das folhas de *Chomelia obtusa*.

O extrato bruto metanólico foi então fracionado em coluna cromatográfica em gel de sílica, fornecendo as frações clorofórmio (COC), clorofórmio/metanol (COCM) e metanol (COM). A purificação das frações obtidas, por sucessivas cromatografias em gel de sílica ou Sephadex LH-20, resultou no isolamento dos triterpenos **1-4**, dos flavonóides glicosilados **5** e **6**, do açúcar **7** e de uma mistura dos ácidos clorogênicos **8** e **9**.



A análise dos espectros 1D e 2D de  $\text{RMN}^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados descritos na literatura permitiu a identificação das estruturas das substâncias **1-6** como sendo ácido ursólico (**1**),<sup>11</sup> ácido oleanólico (**2**),<sup>11</sup> ácido 3-O- $\beta$ -D-quinovopiranosil-28-O- $\beta$ -D-glucopiranosil quinóvico (**3**),<sup>12</sup> ácido 3-O- $\beta$ -D-quinovopiranosil-28-O- $\beta$ -D-glucopiranosil cinchólido (**4**),<sup>12</sup> 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil quercetina (**5**)<sup>13</sup> e 3-O-[ $\alpha$ -raminosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -galactopiranosideo] quercetina (**6**).<sup>13</sup> A definição da posição das unidades glicosídicas para as substâncias **3-6** foi realizada com base nas correlações observadas nos respectivos espectros de HMBC. Além

disto, no caso das substâncias **3** e **4**, o valor do deslocamento químico do C-3 ( $\delta_c$  90,7) corrobora a presença de uma unidade glicosídica neste carbono, uma vez que este sinal aparece em  $\delta_c$  77,0 (C-3) para os ácidos quinóvico e cinchólico não glicosilados nesta posição.<sup>11</sup>

A comparação dos dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C com os da literatura permitiu a identificação da substância **7** como 1-*O*-metilinositol (bornesitol).<sup>14</sup> O estabelecimento da estereoquímica relativa de **7** foi baseado nos valores das constantes de acoplamento e nas correlações entre os hidrogênios observadas no espectro de COSY.

As substâncias **8** e **9** foram caracterizadas como ácidos 3,5- e 4,5-*O*-dicafeoilquinóvico, respectivamente, através da comparação dos dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C com os descritos na literatura para os possíveis isômeros do ácido dicafeoilquinóvico.<sup>6,15</sup> A presença de duas unidades cafeoila foi evidenciada, principalmente, pelos sinais de dois grupos de hidrogênios olefínicos *trans* na região de  $\delta_H$  7,40 (d, *J*~16 Hz, H-7'/H-7'') e 6,00 (d, *J*~16 Hz, H-8'/H-8''), além dos sinais para hidrogênios e carbonos dos sistemas aromáticos. As posições dos grupos cafeoila foram determinadas com base nos valores de deslocamentos químicos para H-3, H-4 e H-5 e comparação destes com os dos possíveis isômeros resultantes da substituição de duas hidroxilas do ácido quinóvico por unidades cafeoila.<sup>6,15</sup>

A ocorrência de derivados glicosilados do ácido quinóvico e de ácidos clorogênicos já foi relatada anteriormente na tribo Guettardeae. Das espécies *Timonius timon*,<sup>4</sup> *Antirhea chinensis*<sup>5</sup> e de algumas do gênero *Guettarda*<sup>2</sup> foram isolados derivados do ácido quinóvico contendo unidades glicosídicas ligadas ao C-3 e C-28, como no caso da substância **3**. A presença da aglicona foi detectada em *Guettarda* e na espécie *Antirhea chinensis*.<sup>5</sup> Ácidos quinóvicos contendo a unidade cafeoila, como em **8** e **9**, foram isolados de *Guettarda*<sup>2</sup> e de *Machaonia brasiliensis*.<sup>6</sup>

O isolamento dos triterpenos **3** e **4** e dos ácidos quinóvicos **8** e **9**, bem como a ausência de secoiridóides e alcalóides indólicos em *Chomelia obtusa*, verificada através dos testes qualitativos realizados e pelos espectros de RMN <sup>1</sup>H obtidos para todas as subfrações, representam dados importantes para futuros estudos quimiotaxonômicos envolvendo o gênero *Chomelia* e a tribo Guettardeae.

O extrato bruto e algumas das frações e subfrações resultantes do fracionamento deste foram submetidas a ensaios biológicos para avaliação de suas atividades antiinflamatória e antioxidante.

A atividade antiinflamatória foi determinada para o extrato bruto e para a fração COCM, utilizando-se o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongo. Os resultados mostraram que a administração do extrato bruto e da fração COCM, na dose de 2,5 mg por via tópica, produziram 24 e 57% de inibição do edema de orelha, respectivamente.

Na avaliação da atividade antioxidante foi empregado o método do DPPH, metodologia muito utilizada para medir a capacidade seqüestradora de radicais livres de produtos naturais.<sup>9</sup> Os resultados deste ensaio (Tabela 1) mostraram que o extrato bruto e a fração COM apresentaram significativa atividade seqüestradora de radicais livres, com IC<sub>50</sub> compa-

ráveis ao do BHT, antioxidante comercial utilizado como padrão. Como constatado na parte experimental, a fração COM é constituída basicamente pelos flavonóides **5** e **6** e pelos ácidos clorogênicos **8** e **9**, sendo estes, provavelmente, os responsáveis pela atividade antioxidante apresentada. Trabalhos descritos na literatura têm demonstrado que os ácidos 3,5- e 4,5-*O*-dicafeoilquinóvico (**8**) e (**9**)<sup>16</sup> e derivados 3-*O*-glicosilados da queretina<sup>17</sup> apresentam significativas capacidades seqüestradoras de radicais livres, com valores de IC<sub>50</sub> próximos aos obtidos para a fração COM.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária-PR, pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Souza, M. C.; Cislinski, J.; Romagnolo, M. B. Em *A planície de Inundação do Alto Rio Paraná: Aspectos Físicos, Químicos e Socioeconômicos*; Vazzoler, A. E. A. M.; Agostinho, A. A.; Hahn, N. S., eds.; Eduem: Maringá, 1997, cap. II.12.
- Sousa, M. P.; Matos, M. E. O.; Machado, M. I. L.; Vencato, I.; Mascarenhas, Y. P.; Braz Filho, R.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2589; Bhattacharyya, J.; Almeida, M. Z.; *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 148; Kan-Fan, C.; Brillanceau, M. H.; Husson, H. P.; *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 1130; Sousa, M. P.; Matos, M. E. O.; Machado, M. I. L.; Braz Filho, R.; *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1419; Montagnac, A.; Litaudon, M.; Pais, M.; *Phytochemistry* **1987**, *46*, 973; Aquino, R.; Simone, F.; Pizza, C.; Cerri, R.; Mello, J. F.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2927; Senatore, F.; Aquino, R.; Simone, F.; Pizza, C.; *Pharm. Res. Comm.* **1988**, *20*, 105; Aquino, R.; De Simone, F.; Pizza, C.; Mello, J.; *Phytochemistry* **1989**, *29*, 199; Capasso, A.; Balderrama, L.; Sivila, S. C.; Tommasi, N. D.; Sorrentino, L.; Pizza, C.; *Planta Med.* **1998**, *64*, 348.
- Weniger, B.; Jiang, Y.; Anton, R.; Bastida, J.; Varea, T.; Quirion, J.-C.; *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1587.
- Khan, I. A.; Rali, T.; Sticher, O.; *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 2163.
- Hui, W. H.; Szeto, S. K.; *Phytochemistry* **1967**, *6*, 443.
- Santos, A. R.; Barros, M. P.; Santin, S. M. O.; Souza, M. C.; Eberlin, M. N.; Meurer, E. C.; Sarragiotto, M. H.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 525.
- Oliveira, P. R. N.; Testa, G.; Sena, S. B.; Sarragiotto, M. H.; Costa, W. F.; Souza, M. C.; Santin, S. M. O.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 755.
- Van Arman, G. C.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1974**, *16*, 900.
- Silva, F. A. M.; Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 24; Cho, E. J.; Yokozawa, T.; Rhyu, D. Y.; Kim, S. C.; Shibahara, N.; Park, J. C.; *Phytomedicine* **2003**, *10*, 544.
- Harborne, J. B.; *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Chapman and Hall: London, 1973.
- Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.
- Arriaga, F. J.; Rumbero, E.; Vazquez, P.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 209.
- Agrawal, P. K.; *Carbon-13 NMR of flavonoids*, Elsevier: Netherlands, 1989; vol. 39.
- Ichimura, K.; Kohata, K.; Mukasa, Y.; Yamaguchi, Y.; Goto, R.; Suto, K.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 189.
- Cheminat, A.; Zawatzky, R.; Becker, H.; Brouillard, R.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2787; Kwon, H. C.; Jung, C. M.; Shin, C. G.; Lee, J. K.; Choi, S. U.; Kim, S. Y.; Lee, K. R.; *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1796.
- Hung, T. M.; Na, M.; Thuong, P. T.; Su, N. D.; Sok, D.; Song, K. S.; Seong, Y. H.; Bae, K.; *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *108*, 188.
- Seyoum, A.; Asres, K.; El-Fiky, F. K.; *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2058.

**Tabela 1.** Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) para extrato bruto, frações e subfrações obtidas de *Chomelia obtusa*

Amostra	IC <sub>50</sub> (intervalo de confiança de 95%)
Extrato bruto	15,19 (14,49 – 15,98)
COCM	27,86 (26,58 - 29,17)
COM	13,76 (12,49 – 15,02)
COCM-10	82,45 (76,52 - 89,10)
COCM-11	52,88 (47,14 - 58,74)
COCM-18	22,85 (22,02 - 23,80)
BHT	16,90 (14,30 – 20,10)