

## FITOQUÍMICA E POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DA ESPÉCIE VEGETAL ANIBA FIRMULA

**Leonardo Bindelli Verly, Ana Carla Rangel Rosa, Cecília Fernandes Patta Muller Marques, João Victor Andrade, Mario Ferreira Conceição Santos.**

Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, S/N - Guararema, Alegre - 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, leobindelli@gmail.com, anacarlarangelrosa@yahoo.com, ceciliafernandespmm@gmail.com, joavictorandrade927@gmail.com, mariosantos408@gmail.com.

### Resumo

A busca pelo desenvolvimento de novos fármacos de origem vegetal tem ganhado destaque nos últimos anos. Nesse sentido, o estudo teve como objetivo a análise fitoquímica da espécie vegetal *Aniba firmula* e a atividade anti-inflamatória de seus compostos isolados. O material vegetal foi coletado em uma área de reserva de Mata Atlântica na cidade de Alfenas, Minas Gerais, Brasil e submetido às técnicas cromatográficas para purificação e isolamento dos compostos. Foi isolado um composto através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), que foi posteriormente identificado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) como 2'-hidroxi-3', 5'-metoxi-3,4-metilenodioxifenil-1',2',3',4',5',6-tetrahidro-4'-oxo-7,3',8,1'-neolignana. Os efeitos anti-inflamatórios do composto isolado foram avaliados através da via de sinalização induzida por lipopolissacarídeos (LPS) por um ensaio *ex vivo*. O composto obteve uma razoável atividade anti-inflamatória, atuando diminuindo a liberação de PGE2 na via da ciclooxigenase (COX) com uma inibição de 40,2%.

**Palavras-chave:** Isolamento. Ressonância Magnética Nuclear. Farmacognosia. Mata Atlântica.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas – Farmacologia.

### Introdução

Diversos são os fatores que impulsionaram a busca por novos fármacos de origem vegetal, como a descoberta de medicamentos eficazes no combate ao câncer, a falta de acesso a medicamentos modernos para a maioria da população, estudos sobre a sua biodiversidade e a preservação de espécies (Calixto, 2003).

Com a constante busca por terapias à base de plantas, o aumento do uso de medicamentos fitoterápicos e drogas vegetais tem se intensificado consideravelmente e, portanto, há a necessidade de novos estudos sobre a qualidade desses produtos. A demanda por produtos naturais foi mais uma vez destacada, especialmente pela indústria farmacêutica, por meio de grandes investimentos em cultivo, processos de extração e expansão da pesquisa de produtos naturais para outras fontes pertencentes a outros organismos da biodiversidade até então inexplorados (Harvey, 2008).

Os produtos naturais têm um histórico longo e bem-sucedido nos processos de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. As plantas, os insetos, os microrganismos e os organismos marinhos apresentam uma interação complexa com o ambiente e produzem metabólitos usados para sua preservação. Como uma consequência de sua função biológica para os organismos produtores, esses metabólitos podem apresentar um grande espectro de aplicações biológicas (Pupo *et al.*, 2006).

A importância dos produtos naturais em medicina, agricultura e indústria levou a numerosos estudos sobre a síntese, biossíntese e atividades biológicas de substâncias extraídas destes produtos. No entanto, ainda sabe-se relativamente pouco sobre seus papéis reais na natureza (Macias-Villamizar; Cuca-Suárez; Coybarrera, 2015).

A espécie vegetal *Aniba firmula*, conhecida popularmente como louro-rosa, pertence à família Lauraceae, que abrange mais de 50 gêneros e aproximadamente 3000 espécies. Possui odor característico, com seu lenho possuindo coloração avermelhada e com grande valor econômico (Rohwer, 1993). Os estudos sobre sua fitoquímica são escassos, assim como os de sua atividade biológica, o que reforça a necessidade de estudos sobre a espécie.

Dessa forma, o presente trabalho objetivou o isolamento de compostos químicos da espécie vegetal *Aniba firmula* e a avaliação do seu potencial anti-inflamatório através de ensaios *ex-vivo*.

## Metodologia

As cascas do caule da *Aniba firmula* foram coletadas no entorno da região da cidade de Alfenas, Minas Gerais, Brasil, onde existe área remanescente de Mata Atlântica. Em seguida, o material foi seco, moído e homogeneizado. Seguidamente, foi extraído com 2L de álcool etílico da marca Synth. O solvente foi reduzido usando um rotaevaporador do modelo IKA RV 8 para 500 mL. O extrato resultante foi diluído em 30 mL de água realizado uma extração líquido – líquido com 250 mL de acetato de etila da marca Synth, três vezes. Foram obtidas duas frações: a fração alcoólica e a fração acetato de etila.

A fração acetato de etila foi submetida ao fracionamento por cartuchos C18 (10g) com as seguintes porcentagens de solventes: 40% MeOH / 60% H<sub>2</sub>O; 60% MeOH / 40% H<sub>2</sub>O; 80% MeOH / 20% H<sub>2</sub>O; 100% MeOH. Produzindo assim quatro frações, possuindo 100 mL cada.

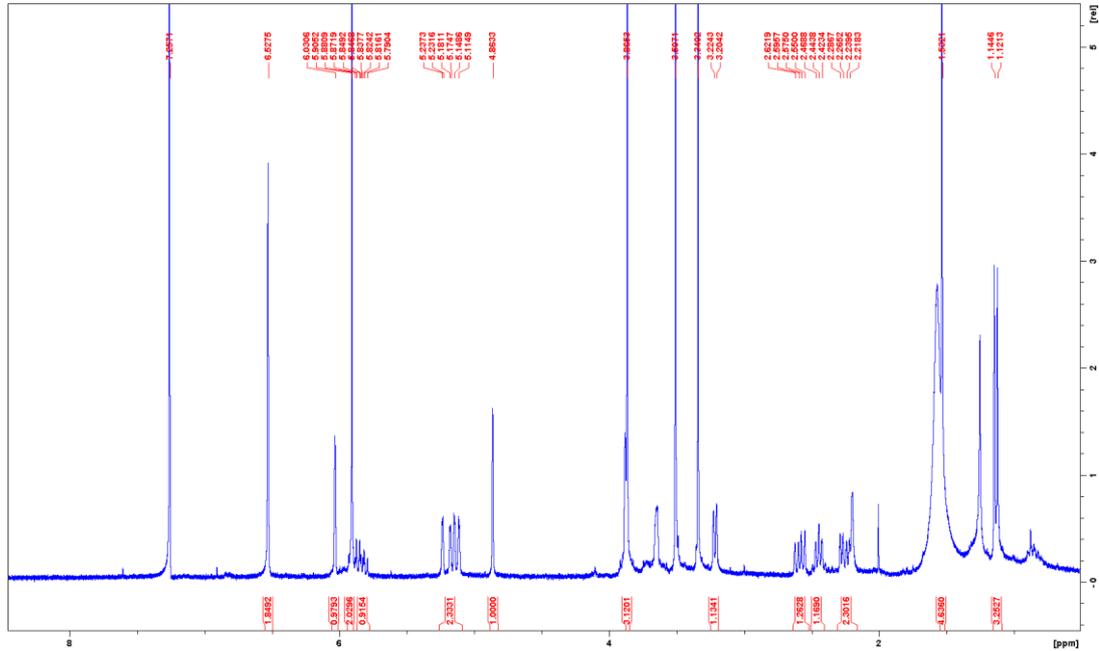
A terceira fração (80% MeOH / 20% H<sub>2</sub>O) foi purificada no HPLC da marca Shimadzu, utilizando uma coluna de fase reversa (ODS-4 Intersil, C18, 7,6 x 250 mm, 5 µm). A fase móvel utilizada na separação foi Acetonitrila/ H<sub>2</sub>O (0,1% de ácido acético) 57: 33. Com essa separação foi possível o isolamento do composto 1. O composto isolado foi identificado por Ressonância Magnética Nuclear Unidimensionais (1H e 13C). Os espectros foram obtidos em um espectrômetro da Bruker de 300 MHz, que se encontra localizado na Universidade Federal de Alfenas.

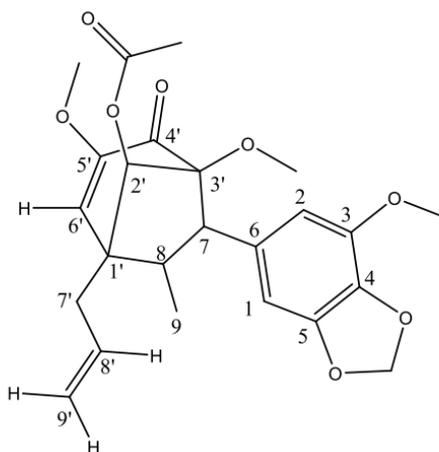
O ensaio anti-inflamatório *ex vivo* foi realizado na Universidade de Alfenas. O sangue venoso periférico foi coletado de doadores que não relataram administração de anti-inflamatórios de controle ou cloranfenicol (CAP, padrão interno - IS) pelo menos 15 dias antes da coleta de sangue. Os voluntários foram voluntários saudáveis do sexo masculino e feminino com idade entre 20 e 35 anos e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação na pesquisa autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas (número 89325818.1.0000.5142). O ensaio anti-inflamatório será realizado de acordo com Rosa *et al.*, 2021. Porém, resumidamente, o sangue humano heparinizado (200 µL) foi utilizado para a avaliação quantitativa de mediadores químicos no plasma, utilizando os lipopolissacarídeos (LPS, *E. coli* O26 : B6, 10 µg/mL) como agente indutor de inflamação do sangue. As amostras foram diluídas em placas de 96 poços com solução salina tamponada com fosfato (PBS - 0,01 M de fosfato, 0,15 M de cloreto, pH 7,2). Os compostos isolados (1 µg/mL), controles positivos (medicamentos de referência: dexametasona/indometacina - 1 µg/mL) e controle negativo (PBS) foram incubados por 24 horas em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C e centrifugado (5 min a 1000 rpm, 4°C). O plasma (100 µL) foi removido seguido de precipitação de proteína realizada pela adição de 500 µL de metanol:acetonitrila refrigerado (1:1, v/v) às amostras de plasma e centrifugação (6000 rpm, 4°C) por 10 min. Os sobrenadantes foram coletados, diluídos em água destilada (4,5 mL), carregados em cartuchos de fase sólida-C18 (com 100 mg de sorvente), e então eluídos com 1 mL de solução de ácido acético metanólico a 0,1% em tubos plásticos, secos e armazenados em -20 °C para posterior análise de quantificação de PGE<sub>2</sub>.

## Resultados

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H apresentou sinal de metila em δH 1,13 (d). Apresentou também três sinais de hidrogênios de metoxilas em δH 3,34 (s), δH 3,50 (s) e δH 3,83 (s). Também apresentou sinal de hidrogênio de carbono com dupla ligação em δH 5,16 (m) e 6,02 (m) pode-se observar também hidrogênio de anel benzeno isotrópico δH 6,02. O espectro de RMN de <sup>13</sup>C confirmou a presença das metoxilas, pois apresentou 3 sinais em δC 52,2, δC 55,0 e δC 56,5. Também apresentou sinal de carbono insaturado com δC 104,1 pode-se observar também carbonos em δC 18,4 referente a carbono metilênicos.

Figura 1- Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (clorofórmio, 300 MHz) do Composto 1





Fonte: Os autores (2024).

Utilizou-se a base de dados Scifinder para verificar se a estrutura era conhecida. O composto, com nomenclatura traduzida para o idioma português, trata-se do 2'-hidroxi-3', 5'-metoxi-3,4-metilenodioxifenil-1',2',3',4',5',6-tetrahydro-4'-oxo-7,3',8,1'-neolignana, pertencente quimicamente à uma subclasse das lignanas.

O resultado do bioensaio está descrito na Tabela 1.

Tabela 1- Porcentagem de inibição do Composto 1

Amostra	% Inibição
Veículo	-
Indometacina	86,2
Dexametasona	76,0
COMPOSTO 1	40,2

Fonte: Os autores (2024).

Os efeitos anti-inflamatórios do composto puro (Tabela 1) foram medidos através da via de sinalização induzida por lipopolissacarídeos (LPS) por um ensaio *ex vivo* que quantifica a concentração plasmática de PGE2 através de análise UPLC-MS/MS (Rosa *et al.*, 2021). Este ensaio anti-inflamatório *ex vivo* se destaca como um método de baixo custo, alta sensibilidade, seletividade e ampla aplicabilidade para explorar o potencial anti-inflamatório de amostras (Rosa *et al.*, 2021). Além disso, o ensaio *ex vivo* utilizando sangue perfurado está mais próximo dos resultados *in vivo* do que os ensaios *in vitro* habituais (Rosa *et al.*, 2021).

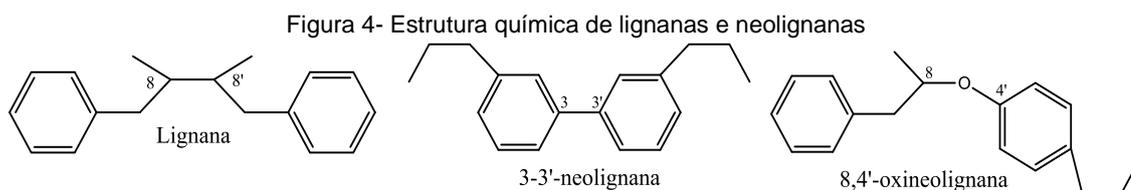
## Discussão

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 65% da população mundial incorpora a medicina tradicional (usos etnobotânicos) nos cuidados médicos. Os estudos etnobotânicos ao longo dos anos permitiram a associação de plantas altamente diversificadas com atividades biológicas, desde observação, descrição e pesquisa experimental, o que muito contribuiu para a descoberta de produtos naturais com ação biológica (Owona *et al.*, 2020).

Nesse sentido, o desenvolvimento de novos fármacos de origem vegetal são de grande interesse da indústria farmacêutica, destacando-se os medicamentos com ação anti-inflamatória. Um exemplo de agente anti-inflamatório fitoterápico é o Acheflan®, indicado para o tratamento local de processos inflamatórios, e o Daflon 500 mg®, medicamento composto por uma fração flavonóide purificada que apresenta ação venotônica e vasoprotetora (Lucas *et al.*, 2018).

O composto isolado – 2'-hidroxi-3', 5'-metoxi-3,4-metilenodioxifenil-1',2',3',4',5',6-tetrahydro-4'-oxo-7,3',8,1'-neolignana – enquadra-se na classe das neolignanas. As lignanas e neolignanas são

compostos derivados da lignina. Oriundas do metabolismo secundário das espécies vegetais, são resultantes do acoplamento oxidativo de unidades de fenilpropano (C6-C3). Ambas constituem uma classe de compostos naturais com uma ampla variedade de estruturas químicas e atividades farmacológicas, sendo formadas pela união de duas unidades fenilpropanóides (eugenol, álcool coniferílico, isoeugenol, etc.). A maneira como essas unidades se conectam determina sua classificação: as lignanas se ligam pela posição 8 e 8' da cadeia alifática, enquanto as neolignanas são formadas pela ligação em qualquer outra posição da unidade fenilpropanóide que não seja 8 e 8' (Figura 2) (Moss, 2000). As oxineolignanas (formadas por ligações C-O-C') exibem uma variedade de atividades biológicas, como antifúngica, leishmanicida, antioxidante e esquistossomicida (Alves *et al.*, 1998; Barata *et al.*, 2000; Konya, 2001).



Fonte: Os autores (2024).

A revisão realizada por Jang *et al.* (2022) abordou as principais atividades biológicas da classe das lignanas, entre elas a atividade anti-inflamatória e antioxidante desses compostos. No estudo, foi apontado que as lignanas inibem a ativação de diferentes vias inflamatórias, como a via do NF-κB (Nuclear Factor kappa B), iNOS (Óxido Nítrico Sintase Induzível) e COX (Ciclooxigenase). Além disso, foi discutido que esses compostos demonstraram capacidade de neutralizar radicais livres, protegendo as células contra danos oxidativos.

O ensaio anti-inflamatório realizado para a avaliação do potencial do Composto 1 revelou a sua eficiência no combate à inflamação, com um resultado razoável quando comparado ao grupo controle. Sua atuação se deu pela diminuição da liberação de PGE<sub>2</sub> na via da COX, um dos principais alvos finais anti-inflamatórios dos medicamentos atualmente disponíveis (Cui; Jia, 2021). Não foram encontrados na literatura estudos que realizassem testes biológicos com essa substância, o que torna o presente estudo pioneiro na investigação de sua atividade anti-inflamatória

## Conclusão

Em termos gerais, o composto isolado da espécie vegetal *A. firmula* obteve um resultado positivo no bioensaio realizado, apresentando atividade anti-inflamatória razoável quando comparado aos anti-inflamatórios utilizados no grupo controle, tornando uma opção promissora para o desenvolvimento de novos fármacos dessa classe. Entretanto, são necessários mais estudos acerca de sua atividade biológica e elucidação de seus mecanismos de ação.

## Referências

- ALVES, C. N. *et al.* Structure-Activity Relationship of Compounds which are Anti-Schistosomiasis Active. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 6, p. 577–582, dez. 1998.
- BARATA, L. E. S. *et al.* Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 589–595, nov. 2000.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- CUI, J.; JIA, J. Natural COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 18, p. 3622-3646, 2021.
- DE SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORRÊA, A. G. Atividade antichagásica de lignanas e neolignanas. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

GOTTLIEB, O. R. Lignóides de plantas amazônicas: investigações biológicas e químicas. **Acta Amazonica**, v. 18, p. 333–344, 1988.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19, 2008.

JANG, W. Y.; KIM, M.; CHO, J. Y. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-menopausal, and anti-cancer effects of lignans and their metabolites. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 24, p. 15482, 2022.

KONYA, K. Antioxidant properties of 8.O.4'-neolignans. **Phytomedicine**, v. 8, n. 6, p. 454–459, 2001.

LUCAS, G. N. C. *et al.* Pathophysiological aspects of nephropathy caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 41, n. 1, p. 124-130, 2018.

MACÍAS-VILLAMIZAR, V. E.; CUCA-SUÁREZ, L. E.; COY-BARRERA, E. D. Genus *Nectandra*: "Phytochemistry and Biological Activity". **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 4, p. 317-342, 2015.

MOSS, G. P. Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). **Pure and applied chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1493-1523, 2000.

OWONA, B. A.; ABIA, W. A.; MOUNDIPA, P. F. Natural compounds flavonoids as modulators of inflammasomes in chronic diseases. **International immunopharmacology**, v. 84, p. 106498, 2020.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. **Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds**. In: Taft, C. A. *Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry*. Kerala: Research Signpost, 51- 78, 2006.

ROHWER, J. G. Lauraceae. In: **Flowering Plants- Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 366-391. 1993.

ROSA, W. *et al.* *In vivo* anti-inflammatory activity of Fabaceae species extracts screened by a new *ex vivo* assay using human whole blood. **Phytochemical analysis**, 32(5), 859–883, 2021.