

Artigo

Estudo Químico e Avaliação das Atividades Anti-Inflamatória, Antitumoral e Antioxidante das Partes Aéreas de *Aeschynomene sensitiva*

Arruda, R. F.; Alves-Olher, V. G.; Vandresen, F.;* Schuquel, I. T. A.; Bersani-Amado, C. A.; Nakamura, C. V.; Silva, C. C.

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (3), 684-697. Data de publicação na Web: 15 de junho de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>

Chemical Study and Evaluation of Anti-Inflammatory, Antitumor and Antioxidant Activities of Aerial Parts from *Aeschynomene sensitiva*

Abstract: The specie *Aeschynomene sensitiva* can be found in several Brazilian states and is considered a weed occurring mainly in regions with a floodable tropical climate. The first phytochemical investigation of *A. sensitiva* seeds, leaves and stem led to the isolation of rotenoid 6'-O-β-D-glucopyranoside-6a, 12a-hydroxyrotenone, the isoflavonoid dihydroxy-4', 5'-dimethoxyisoflavone, quercetin 3-O-β-D-glycoside, quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside, quercetin 3-O-α-L-rhamnopyranoside, the triterpenic saponin soyasaponin I and a mixture of gallic acid and methyl gallate. The structures of the isolated compounds were assigned on the basis of one- and two dimensional NMR spectroscopic methods and by comparison with literature data. The anti-inflammatory, antitumoral and antioxidant activities of the crude methanolic extract and its fractions were analyzed. The ethyl acetate fraction of seeds (FACS) and leaves (FACF) showed high antioxidant activities with IC₅₀ of 12.4 and 18.2 μg/mL, respectively.

Keywords: *Aeschynomene sensitiva*; Fabaceae; anti-inflammatory activity; antioxidant activity; rotenoid; saponin.

Resumo

A espécie *Aeschynomene sensitiva* é considerada uma erva daninha que ocorre principalmente em regiões de clima tropical alagável, e pode ser encontrada em vários estados brasileiros. Até o presente momento não há relatos na literatura sobre estudo químico e farmacológico para essa espécie. O primeiro estudo fitoquímico de sementes, folhas e galhos de *Aeschynomene sensitiva* levou ao isolamento do rotenóide 6'-O-β-D-glucopiranosídeo-6a, 12a-dehidrorotenona, do isoflavonoide glicosilado 2',7-dihidroxi-4',5'-dimetoxiisoflavona, dos flavonoides quercetina-3-O-β-D-glicosídeo, quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo e quercetina-3-O-α-L-rampiranosídeo, dos compostos fenólicos ácido gálico e galato de metila e da saponina soiasaponina I. As estruturas dos compostos isolados foram atribuídas com base em dados espectroscópicos de RMN uni- e bidimensionais e comparação com dados da literatura. Foram avaliadas as atividades anti-inflamatória, antitumoral e antioxidantes do extrato metanólico bruto e suas frações. As frações acetato de etila das sementes (FACS) e folhas (FACF) apresentaram elevada atividade antioxidante com IC₅₀ 12,4 and 18,2 μg/mL, respectivamente

Palavras-chave: *Aeschynomene sensitiva*; Fabaceae; atividade anti-inflamatória; atividade antioxidante; rotenóide; saponina.

* Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Química, Av. dos Pioneiros 3131, CEP 86036-370, Londrina-PR, Brazil.

✉ fabiovandresen@utfpr.edu.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20180050](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180050)

Estudo Químico e Avaliação das Atividades Anti-Inflamatória, Antitumoral e Antioxidante das Partes Aéreas de *Aeschynomene sensitiva*

Rafael F. Arruda,^a Vanessa G. Alves-Olher,^b Fábio Vandresen,^{c,*} Ivânia T. A. Schuquel,^a Ciomar A. Bersani-Amado,^d Celso V. Nakamura,^e Cleuza C. da Silva^a

^a Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Química, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

^b Instituto Federal do Paraná, Departamento de Química, CEP 87703-536 Paranavaí-PR, Brasil.

^c Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Química, CEP 86036-370, Londrina-PR, Brasil.

^d Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmacologia e Terapêutica, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

^e Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Av. Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

* fabiovandresen@utfpr.edu.br

Recebido em 15 de março de 2018. Aceito para publicação em 6 de junho de 2018

1. Introdução

2. Resultados e discussão

2.1. Estudo Químico

2.2. Avaliação das Atividades Anti-inflamatória, Antitumoral e Antioxidante

3. Parte experimental

3.1. Procedimentos Gerais

3.2. Material Vegetal

3.3. Isolamento dos Constituintes Químicos

3.4. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

3.5. Pleurisia Induzida por Carragenina

3.6. Avaliação da atividade antitumoral frente a células Caco-2

3.7. Avaliação da Atividade Antioxidante

4. Conclusão

1. Introdução

A espécie *Aeschynomene sensitiva* SW é considerada uma erva daninha popularmente conhecida como “angiquinho” que se desenvolve principalmente em regiões de clima tropical alagável e pode ser encontrada nos Estados do Paraná, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul.¹ Até o presente momento não foram encontrados estudos sobre a constituição química ou potencial farmacológico para esta espécie, sendo que o único estudo encontrado descreve que partes não especificadas da planta possuem atividade inseticida.²

Contudo, os estudos químicos e farmacológicos encontrados para espécies do gênero *Aeschynomene* relatam a presença de flavonóides, neoflavonóides e rotenóides como principais constituintes químicos. Fullas e colaboradores³ isolaram os neoflavonóides mimosifoliol e mimosifolenona a partir das raízes de *Aeschynomene mimosifolia*, os quais demonstraram moderada atividade citotóxica frente a células tumorais de carcinoma epidermóide oral. Para a espécie *A. indica* foi relatado a presença de compostos aromáticos, esteróides rotenóides e flavonóides.⁴⁻⁷ A espécie *A. virgata* foi avaliada frente a herpes-vírus bovino e suíno, e demonstrou um importante efeito anti-herpético.⁸ Em outro estudo, Braggio e colaboradores⁹ evidenciaram que o sumo liofilizado das folhas desta espécie exibe um acentuado efeito depressor do SNC (Sistema Nervoso Central), além de propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. O extrato etanólico de *Aeschynomene stolzii* foi considerado citotóxico frente à células leucêmicas e melanoma.¹⁰

Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisas com a espécie *A. fluminensis* foi reportado o isolamento dos

flavonóides canferitrina, α -raminoisorobina, 3-*O*-apiofuranosil-7-*O*-raminopiranosilcanferol, quercetina, avicularina, daidzeína, iso-hemifloína, da procianidina A2, e do poliol 3-*O*-metil-quirositol. Além disso foi verificado neste estudo que os extratos e frações obtidos a partir desta espécie apresentam significativa atividade anti-inflamatória.¹¹

O reduzido número de informações na literatura sobre a composição química e potencial farmacológico de espécies pertencentes ao gênero *Aeschynomene* motivou a realização do presente trabalho. O objetivo desta pesquisa foi o estudo fitoquímico das folhas, galhos e sementes da espécie *A. sensitiva* e a avaliação das atividades anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante dos extratos brutos e frações.

2. Resultados e discussão

2.1. Estudo Químico

O estudo fitoquímico das folhas e sementes de *A. sensitiva* SW resultou no isolamento da mistura do rotenóide glicosilado 6'-hidroxi-6a, 12a-dehidrorotenona (**1**)¹⁷ e do isoflavonóide dihidroxi-4',5'-dimetoxiisoflavona (**2**),¹⁸ da mistura dos flavonóides quercetina 3-*O*- β -D-glicosídeo (**3**),¹⁹ quercetina 3-*O*- β -D-galactopiranosídeo (**4**)²⁰ e quercetina 3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (**5**),²⁰ da saponina triterpênica soyasaponina I (**6**),^{21,22} e da mistura de ácido gálico (**7**)²³ e galato de metila (**8**).²⁴ As estruturas das substâncias foram elucidadas com base na análise dos dados espectroscópicos de RMN (¹H, ¹³C, DEPT, COSY, NOESY, TOCSY, HSQC e HMBC) e por comparação com os dados disponíveis na literatura.

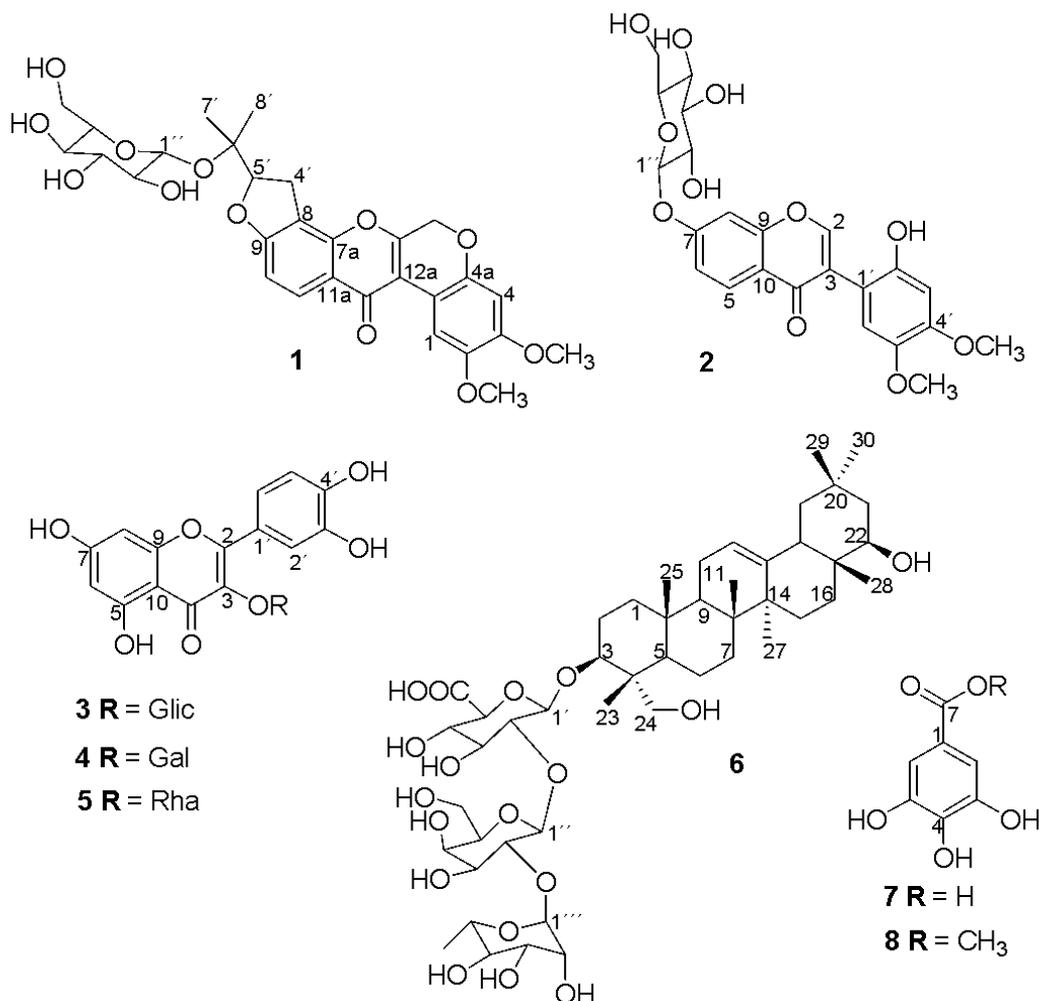


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados de *Aeschynomene sensitiva* SW

As substâncias **1** e **2** foram isoladas em mistura a partir do estudo do extrato (EBS) na forma de sólido amarelo, sendo caracterizadas como o rotenóide 6'-O-β-D-glucopiranosídeo-6a, 12a-dehidrorotenona e o isoflavonóide dihidroxi-4',5'-dimetoxiisoflavona, respectivamente, por meio da comparação dos dados espectroscópicos de RMN com os descritos na literatura.^{12,13} Para a substância **1**, a qual foi majoritária na mistura, o espectro de RMN de ¹H mostrou sinais característicos de rotenóide, apresentando na região de aromáticos dois singletos em δ 6,68 (s, H-4) e 6,49 (s, H-1) e dois sinais de hidrogênios com acoplamento *orto*- entre si [δ 6,45 (H-10) e 7,73 (H-11) d, *J* = 8,4 Hz], sinais referentes a dois grupos oximetílicos em δ 3,65 (s, 2-OMe) e 3,76 (s, 3-OMe) e sinais de ressonância

característicos de anel di-hidrofurano em δ 1,22 (s, Me-8'), 1,36 (s, Me-7'), 3,09 e 3,18 (m, H-4'), 4,88 (dd, *J* = 9,9 e 7,2 Hz, H-5'). A unidade glicosídica foi caracterizada como β-glicose pelos demais sinais de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos observados entre δ 3,11 (m) e 3,80 (m) e do ¹H anomérico em δ 4,53 (d, *J* = 7,5 Hz) e os sinais de RMN ¹³C em δ 98,8 (C-1''), 75,1 (C-2''), 78,1 (C-3''), 71,7 (C-4''), 77,6 (C-5'') e 62,8 (C-6''). As posições da unidade de glicose e dos grupos metoxilas foram inferidas com base nas correlações observadas no HMBC (**Figura 2**). O hidrogênio anomérico (H-1'', δ 4,53) apresentou correlação com o carbono em δ 79,2 (C-6') e os sinais de hidrogênios referentes às metoxilas em δ 3,65 e 3,76 com os carbonos em δ 144,9 (C-2) e 152,8 (C-3), respectivamente (**Tabela 1**).

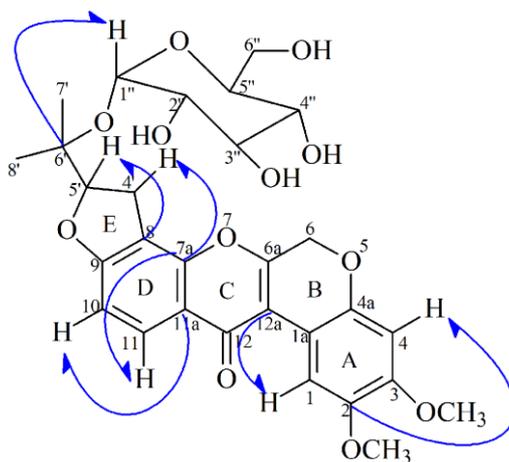


Figura 2. Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância **1**

Para o composto **2** o espectro de RMN de ^1H apresentou dois singletos na região de sinais oximetílicos (δ 3,78 e 3,90), sinais na região de aromáticos em δ 6,75 (s, H-3'), 6,90 (s, H-6'), 7,20 (H-6, dd, $J = 8,7$ e $2,1$ Hz), 7,25 (H-8, d, $J = 2,1$ Hz) e 8,10 (H-5, d, $J = 8,7$ Hz) e um singlete em δ 8,11 (H-2) característico de isoflavonóide. A unidade de glicose foi caracterizada pelo sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,11 (H-1'', d, $J = 7,5$ Hz) e dos sinais de RMN ^{13}C em δ 101,8 (C-1''), 74,7 (C-2''), 78,4 (C-3''), 71,2 (C-4''), 77,8 (C-5'') e 62,4 (C-6''). A conectividade desta unidade na posição C-7 da aglicona foi confirmada pela interação de H-1'' (δ 5,11) com H-8 (δ 7,25) observada no NOESY.

A mistura de **3**, **4** e **5**, isolada da fração acetato de etila das sementes (FACS) como um sólido amarelo, foi evidenciada pelos sinais característicos de hidrogênios anoméricos de três unidades glicosídicas observados no espectro de RMN ^1H em δ 5,24 (d), 5,15 (d) e 5,34 (d) com integrações em diferentes proporções. A unidade aglicona comum para as três substâncias dos glicosídeos **3**, **4** e **5** foi caracterizada como quercetina. No espectro de RMN ^1H foram observados sinais de um sistema AB atribuídos aos H-6/H-8 [δ 6,17/6,36 d, $J = 1,8$ Hz (**3** e **4**) e δ 6,17/6,65 d, $J = 1,8$ Hz (**5**)] e sinais típicos de anel B de flavonóides 3',4'-disubstituídos, os hidrogênios H-2'/H-5'/H-6' [δ 7,70 d, $J = 2,4$ Hz/6,85 d, $J = 8,4$ Hz/7,56 dd, $J = 8,4$ e $2,4$ Hz (**3**), 7,84 d, $J = 2,4$ Hz/6,85 d, $J = 8,4$ Hz/7,56 dd, $J = 8,4$ e $2,4$ Hz (**4**) e 7,33 d, $J = 2,1$ Hz/6,90 d, $J = 8,4$ Hz/7,29 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 **3**, a qual é majoritária na mistura, o sinal de RMN ^1H em δ 5,24 (d, $J = 7,5$ Hz) referente ao hidrogênio anomérico e os sinais de ^{13}C em δ 104,3 (C-1''), 75,7 (C-2''), 78,0 (C-3''), 71,1 (C-4''), 78,3 (C-5'') e 62,5, esse último referente ao carbono oximetilênico C-6'', permitiram caracterizar a unidade de glicose. A posição desta unidade em C-3 da quercetina foi confirmada pela correlação, observada no HMBC, entre o hidrogênio anomérico H-1'' (δ 5,24) e o carbono em δ 135,6 (C-3). Os dados de RMN de **3** foram comparados com os da literatura¹⁴ sendo condizentes para quercetina 3-O- β -D-glicosídeo.

Para a substância **4**, o sinal de H-1'' (δ 5,15 d, $J = 7,8$ Hz) e os sinais de ^{13}C em δ 105,4 (C-1''), 73,2 (C-2''), 75,1 (C-3''), 70,0 (C-4''), 77,1 (C-5'') e 61,9 (C-6'') caracterizaram a unidade de galactose. A posição desta unidade em C-3 da aglicona foi estabelecida através da correlação do H-1'' anomérico com o carbono em δ 135,8 (C-3), observada no HMBC. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **4** comparados com os da literatura¹⁵ são condizentes para quercetina -3-O- β -D-galactopiranosídeo.

Para a substância **5** os sinais em δ 5,34 (d,

$J = 1,8$ Hz) e 0,93 (d, $J = 6,0$ Hz) característicos de ^1H anomérico e metílicos, respectivamente, e os correspondentes carbonos em δ 103,5 (C-1'') e 17,6 (C-6'') permitiram estabelecer a unidade de raminose. A posição da mesma em C-3 da quercetina foi definida pela correlação, observada no HMBC, de H-1'' com o carbono em δ 136,2 (C-3). Os dados de RMN de ^1H comparados aos da literatura¹⁵ são concordantes com quercetina 3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo.

A substância **6** foi isolada da fração hidrometanólica na forma de um sólido branco e caracterizada como a saponina triterpênica soiasaponina I por meio da análise dos dados espectroscópicos de RMN e comparação com os descritos na literatura.^{16,17} No espectro de RMN ^1H foram observados, dentre outros sinais, sete singletos correspondentes a hidrogênios metílicos em δ 1,25 (H-23), 0,89 (H-25), 0,97 (H-26), 1,12 (H-27), 0,82 (H-28), 0,91 (H-29) e 1,00 (H-30), sinal de um hidrogênio olefínico em δ 5,24 (H-12) e um multipletto em δ 2,24 atribuído ao H-18, que são característicos de triterpeno do tipo oleano. Os dados de RMN ^{13}C também foram consistentes com a aglicona da série dos oleanos, principalmente pelos sinais típicos de ressonância dos carbonos olefínicos C-12 e C-13 em δ 123,7 e 145,1, respectivamente. Os espectros de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ mostraram dois sinais de carbonos

oximetínicos em δ 77,0 e 92,4 e o sinal de carbono oximetilênico em δ 64,4 que foram atribuídos a C-22, C-3 e C-23, respectivamente, além de outros sinais de carbonos oximetínicos e metilênicos correspondentes a unidades glicosídicas, dos quais três de carbonos característicos de anoméricos em δ 105,6, 102,2 e 102,3 que sugeriram três unidades glicosídicas para o composto. No espectro de ^1H foram observados, ainda, sinais de três hidrogênios anoméricos em δ 4,45 (d, $J = 7,8$ Hz), 4,87 (d, $J = 7,4$ Hz) e 5,14 (d, $J = 1,8$ Hz) (**Tabela 1**). Uma análise minuciosa dos dados de TOCSY, COSY e HSQC permitiu caracterizar as unidades glicosídicas como β -glicose ácida, β -galactose e α -raminose. As posições destas unidades foram estabelecidas com base nas correlações observadas no HMBC (**Figura 3**) e, pelo efeito de desproteção no deslocamento químico de C-3 (δ 92,4), o qual indicou substituição *O*-glicosídica nesta posição. A conectividade da unidade de glicose ácida no C-3 da aglicona foi confirmada pela correlação, observada no HMBC, de H-1' (δ 4,45) com C-3 (δ 92,4), e a ligação da unidade de galactose ao C-2' da glicose ácida pela correlação de H-2' (δ 3,75) com o C-1'' (δ 102,2), enquanto que a ligação da unidade de raminose ao C-2'' da galactose pelas correlações de H-2'' (δ 3,64) com C-1''' (δ 102,3) e de H-1''' (δ 5,14) com C-2'' (δ 78,1).

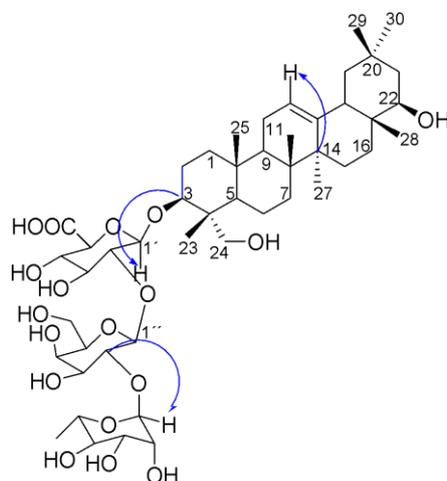


Figura 3. Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância **6**

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para o rotenóide (**1**) e saponina (**6**).

Composto 1			Composto 6		
C	δ_{C} (DEPT)	δ_{H} (mult; J em Hz)	C	δ_{C} (DEPT)	δ_{H} (mult; J em Hz)
1	104,9 (CH)	6,49 (s)	1	39,8 (CH ₂)	1,08 (m)
1^a	109,7 (C)		2	27,1 (CH ₂)	
2	144,9 (C)		3	92,4 (CH)	3,36 (m)
3	152,8 (C)		4	44,7 (C)	
4	102,2 (CH)	6,68 (s)	5	57,3 (CH)	
4^a	144,8 (C)		6	19,4 (CH ₂)	
6	64,9 (CH ₂)	4,54 (s)	7	34,4 (CH ₂)	1,49-1,52 (m)
6^a	158,6 (C)		8	40,0 (C)	
7^a	152,7 (C)		9	48,7 (CH)	
8	109,7 (C)		10	37,5 (C)	
9	163,5 (C)		11	24,8 (CH ₂)	1,52-1,85 (m)
10	105,4 (CH)	6,45 (d; 8,5)	12	123,7 (CH)	5,24 (m)
11	130,4 (CH)	7,73 (d; 8,5)	13	145,1 (C)	
11^a	117,0 (C)		14	43,4 (C)	
12	192,8 (C)		15	26,9 (CH ₂)	
12^a	115,1 (C)		16	29,9 (CH ₂)	
4'	28,0 (CH ₂)	3,09/3,18 (m)	17	38,6 (C)	
5'	91,9 (CH)	4,88 (dd; 9,9; 7,2)	18	46,8 (CH)	2,24 (m)
6'	79,2 (C)		19	47,5 (CH ₂)	
7'	23,5 (CH ₃)	1,36 (s)	20	31,4 (C)	
8'	21,4 (CH ₃)	1,22 (s)	21	42,2 (CH ₂)	
OCH₃	56,3	3,76 (s)	22	78,1 (CH ₂)	3,64 (m)
OCH₃	57,1	3,65 (s)	23	23,4 (CH ₃)	1,25 (s)
1''	98,8 (CH)	4,53 (d; 1,5)	24	64,4 (CH ₂)	3,18 (d; 10,5) e 4,13 (d; 10,8)
2''	75,1 (CH)	3,11 (m)	25	16,4 (CH ₃)	0,89 (s)
3''	78,1 (CH)	3,24 (m)	26	17,5 (CH ₃)	0,97 (s)
4''	71,7 (CH)	3,23 (m)	27	25,4 (CH ₃)	1,12 (s)
5''	77,6 (CH)	3,32 (m)	28	20,4 (CH ₃)	0,82 (s)
6''	62,8 (CH ₂)	3,62 (m)	29	32,5 (CH ₃)	0,91 (s)
			30	29,1 (CH ₃)	1,00 (s)

^a (δ -ppm; 300 e 75,45 MHz; CD₃OD)

A mistura das substâncias **7** e **8** isolada da fração acetato de etila na forma de sólido branco, foi deduzida com base na análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H foram observados dois singletos em δ 7,05 e 7,03 com integrações em diferentes proporções, e ainda, sinal em δ 3,95, característico de grupamento metoxila, com integração proporcional ao componente em menor quantidade. O espectro de RMN ^{13}C apresentou sinais duplicados na região de aromáticos, sinal de carbono metoxílico em δ 52,2, e dois sinais em δ 186,9 e 171,1 típicos de grupos ácido e éster, respectivamente. Os

dados de RMN foram concordantes com os da literatura para o ácido gálico (**7**),¹⁸ o qual é majoritário na mistura, e para o galato de metila (**8**).¹⁹

2.2. Avaliação das Atividades Anti-inflamatória, Antitumoral e Antioxidante

Os ensaios de avaliação da atividade anti-inflamatória foram realizados com os extratos brutos (EBS e EBF) e frações obtidas das folhas e sementes da espécie

Aeschynomene sensitiva. Para as sementes foi verificado que o extrato bruto (EBS) e a fração hidrometanólica (FHMS) não inibiram o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. No entanto, a fração acetato de etila (FACs) apresentou uma inibição de 57,2% da

inflamação (**Figura 4**). Pode-se associar de forma indireta que o significativo potencial anti-inflamatório observado para a fração acetato de etila (FACs) é consequência da maior concentração de flavonoides e compostos fenólicos nessa fração.

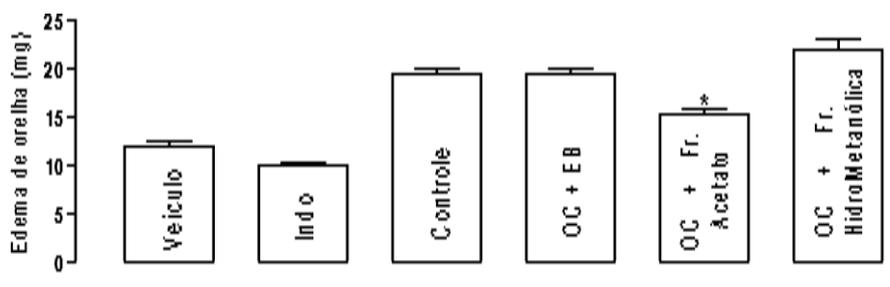


Figura 4. Efeito do extrato bruto (EBS), fração acetato de etila (FACs) e fração hidrometanólica (FHMS) das sementes de *A. sensitiva* sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos. Cada barra representa o peso médio das orelhas \pm E.P.M., 6h após a aplicação do óleo de cróton.* $P < 0,001$, comparado ao grupo OC+veículo, (ANOVA seguida do teste de Turkey)

No teste de pleurisia (**Figura 5**) realizado com os extratos brutos das folhas (EBF) e sementes (EBS) de *A. sensitiva* SW, somente

o último apresentou uma inibição significativa sobre o acúmulo de exsudato pleural (pleurisia).

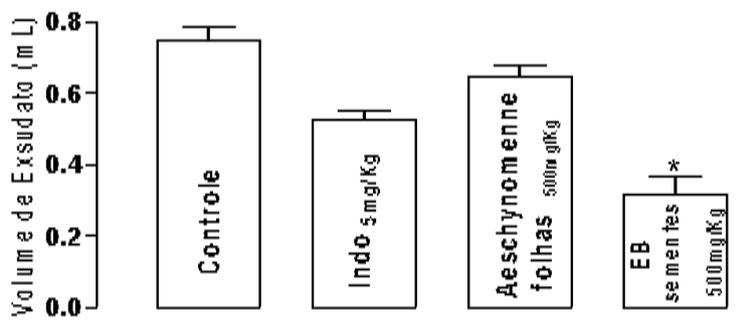


Figura 5. Efeito do extrato bruto das folhas (EBF) e sementes (EBS) de *A. sensitiva* sobre o acúmulo de exsudato pleural (pleurisia) induzido pela injeção intrapleural de carragenina (Cg) em camundongos tratados por via oral com os extratos (500mg/kg). Um grupo de animais recebeu o veículo água (Vo). $P < 0,001$, comparado ao grupo Cg+água (ANOVA, teste de Turkey)

Os extratos brutos das sementes, folhas e galhos e as respectivas frações da espécie *A. sensitiva* SW não demonstraram atividade frente as células tumorais Caco-2.

A avaliação do potencial antioxidante foi realizada com as frações acetato de etila

(FACs e FACF) e hidrometanólica (FHMS e FHMF) das sementes e folhas de *A. sensitiva* SW. A atividade antioxidante avalia a capacidade que os compostos presentes nas frações possuem para sequestrar o radical DPPH. O agente antioxidante utilizado como

referência foi a catequina. Os resultados da avaliação da atividade antioxidante (**Figura 6**) mostraram que a fração acetato de etila das sementes (FACS) e folhas (FACF) apresentaram IC_{50} de 12,4 e 18,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, e a fração hidrometanólica das sementes (FHMS) e folhas (FHMF) apresentaram IC_{50} de 119,8 e 90,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Estes resultados estão

concordantes com que foi observado para estas frações em termos dos constituintes químicos isolados. Razavi e colaboradores,²⁰ relatam que a quercetina-3-O- β -D-glicosídeo apresenta um elevado potencial antioxidante e isto pode ser comprovado com o isolamento da mesma da fração com maior atividade antioxidante.

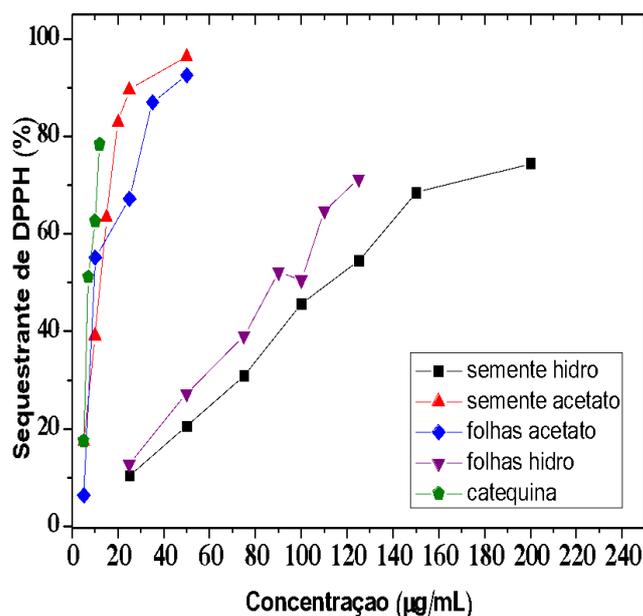


Figura 6. Atividade sequestrante de radicais DPPH das frações acetato de etila e hidrometanólica das sementes (FHMS) e folhas (FHMF) de *Aeschynomene sensitiva*

3. Parte experimental

3.1. Procedimentos gerais

Os espectros de RMN uni- e bidimensionais (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY e TOCSY) foram obtidos em espectrômetro VARIAN, modelo Mercury plus 300 MHz (^1H) e 75,5 MHz (^{13}C). Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) e/ou o sinal residual do solvente deuterado CD_3OD , em $\delta 3,31$ e $49,15$ para os núcleos de ^1H e ^{13}C

respectivamente. Nas separações por cromatografia de adsorção utilizou-se gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm), (70-230 mesh ASTM) ou (0,2-0,5 mm) (35-70 mesh ASTM) da Merck, enquanto que nos fracionamentos cromatográficos por exclusão molecular foi empregado Sephadex LH 20 como fase estacionária e utilizando H_2O , $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 25%, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 50%, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 75% e MeOH como padrão de eluição. Nas análises por cromatografia em camada delgada (CCD) empregou-se gel de sílica 60 G e 60 GF₂₅₄ (Merck). A visualização dos compostos em CCD foi realizada por irradiação com luz ultravioleta em 254 e 366 nm e/ou por aspersão com solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1),

revelador para terpenos 4-metóxi-benzaldeído/ácido acético/H₂SO₄ (1,0:48,5:0,5) seguido de aquecimento.

3.1.1. Dados espectroscópicos das substâncias

Substância 2: RMN de ¹H (300,06 MHz, CD₃OD): 8,11 (s, H-2, 1H), 8,10 (d, J=8,7 Hz, H-5, 1H), 7,20 (dd, J=8,7 e 2,1 Hz, H-6, 1H), 7,25 (d, J=2,1 Hz, H-8, 1H), 6,75 (s, H-3', 1H), 6,90 (s, H-6', 1H), 5,11 (d, J=7,5 Hz, H-1'', 1H), 3,32 (m, H-2'', 1H), 3,50 (m, H-3'', 1H), 3,24-3,25 (m, H-4''-5'', 2H), 3,84 (m, H-6'', 2H), 3,78 (s, OCH₃), 3,90 (s, OCH₃). RMN de ¹³C (75,45 MHz, CD₃OD): 156,9 (C-2), 123,0 (C-3), 178,0 (C-4), 128,2 (C-5), 117,0 (C-6), 163,5 (C-7), 105,0 (C-8), 159,3 (C-9), 120,1 (C-10), 113,3 (C-1'), 151,6 (C-2'), 99,4 (C-3'), 153,9 (C-4'), 144,2 (C-5'), 117,5 (C-6'), 101,8 (C-1''), 78,4 (C-2''), 74,7 (C-3''), 77,8 (C-4''), 71,2 (C-5''), 62,4 (C-6''), 57,4 (OCH₃), 56,7 (OCH₃).

Substância 3: RMN de ¹H (300,06 MHz, CD₃OD): 6,17 (d, J=1,8 Hz, H-6, 1H), 6,36 (d, J=1,8 Hz, H-8, 1H), 7,70 (d, J=2,4 Hz, H-2', 1H), 6,85 (d, J=8,4 Hz, H-5', 1H), 7,56 (dd, J=8,4 e 2,4 Hz, H-6', 1H), 5,24 (d, J=7,5 Hz, H-1'', 1H), 3,46 (m, H-2'', 1H), 3,41 (m, H-3'', 1H), 3,31 (m, H-4'', 1H), 3,23 (m, H-5'', 1H), 3,71 (dd, J=12,0 e 2,7 Hz, H-6'', 2H). RMN de ¹³C (75,45 MHz, CD₃OD): 158,0 (C-2), 135,6 (C-3), 179,4 (C-4), 162,9 (C-5), 100,0 (C-6), 166,0 (C-7), 94,7 (C-8), 158,4 (C-9), 105,6 (C-10), 122,9 (C-1'), 117,6 (C-2'), 145,9 (C-3'), 149,8 (C-4'), 116,0 (C-5'), 123,2 (C-6'), 104,3 (C-1''), 75,7 (C-2''), 78,0 (C-3''), 71,1 (C-4''), 78,3 (C-5''), 62,5 (C-6'').

Substância 4: RMN de ¹H (300,06 MHz, CD₃OD): 6,17 (d, J=1,8 Hz, H-6, 1H), 6,36 (d, J=1,8 Hz, H-8, 1H), 7,84 (d, J=2,4 Hz, H-2', 1H), 6,85 (d, J=8,4 Hz, H-5', 1H), 7,56 (dd, J=8,4 e 2,4 Hz, H-6', 1H), 5,15 (d, J=7,8 Hz, H-1'', 1H), 3,80 (m, H-2'', 1H), 3,56 (m, H-3'', 1H), 3,83 (m, H-4'', 1H), 3,49 (m, H-5'', 1H), 3,65 (m, H-6'', 2H). RMN de ¹³C (75,45 MHz, CD₃OD):

158,7 (C-2), 135,6 (C-3), 179,4 (C-4), 162,9 (C-5), 100,0 (C-6), 166,1 (C-7), 94,7 (C-8), 158,4 (C-9), 105,5 (C-10), 117,8 (C-1'), 118,8 (C-2'), 145,8 (C-3'), 149,9 (C-4'), 116,1 (C-5'), 123,0 (C-6'), 105,4 (C-1''), 73,2 (C-2''), 75,1 (C-3''), 70,0 (C-4''), 77,1 (C-5''), 61,9 (C-6'').

Substância 5: RMN de ¹H (300,06 MHz, CD₃OD): 6,17 (d, J=1,8 Hz, H-6, 1H), 6,65 (d, J=2,1 Hz, H-8, 1H), 7,33 (d, J=2,1 Hz, H-2', 1H), 6,90 (d, J=8,4 Hz, H-5', 1H), 7,29 (dd, J=8,4 e 2,1 Hz, H-6', 1H), 5,34 (d, J=1,5 Hz, H-1'', 1H), 4,21 (dd, J=3,0 e 1,5 Hz, H-2'', 1H), 3,77 (m, H-3''-H-4'', 2H), 3,39 (m, H-5'', 1H), 0,93 (d, J=6,0 Hz, H-6'', 3H). RMN de ¹³C (75,45 MHz, CD₃OD): 158,5 (C-2), 136,2 (C-3), 181,0 (C-4), 163,2 (C-5), 99,9 (C-6), 169,9 (C-7), 94,7 (C-8), 159,3 (C-9), 105,7 (C-10), 122,9 (C-1'), 116,9 (C-2'), 146,4 (C-3'), 149,8 (C-4'), 116,9 (C-5'), 123,0 (C-6'), 103,5 (C-1''), 71,9 (C-2''), 72,1 (C-3''), 72,0 (C-4''), 73,2 (C-5''), 17,6 (C-6'').

Substância 7: RMN de ¹H (300,06 MHz, CD₃OD): 7,05 (s, H-2 e H-6, 2H). RMN de ¹³C (75,45 MHz, CD₃OD): 122,9 (C-1), 110,2 (C-2), 146,3 (C-3), 139,2 (C-4), 146,3 (C-5), 110,2 (C-6), 186,9 (C-7).

Substância 8: RMN de ¹H (300,06 MHz, CD₃OD): 7,03 (s, H-2 e H-6), 3,95 (s, OCH₃). RMN de ¹³C (75,45 MHz, CD₃OD): 121,3 (C-1), 109,9 (C-2), 146,4 (C-3), 139,2 (C-4), 146,4 (C-5), 109,9 (C-6), 171,1 (C-7), 52,2 (OCH₃).

3.2. Material vegetal e obtenção de extratos brutos

As partes aéreas e sementes da espécie vegetal *A. sensitiva* SW foram coletadas às margens da bacia de inundação do alto rio Paraná, situado na Área de Proteção Ambiental das Ilhas e Várzeas do rio Paraná (PR e MS) e no Parque Estadual do Ivinhema (MS), na região de Porto Rico-PR, e identificadas pela prof. Dra. Maria Conceição de Souza. A exsicata do material vegetal

encontra-se depositada no Herbário do Nupélia (HNUP) da Universidade Estadual de Maringá sob o número HUEM 1836. As sementes, folhas e galhos foram separados, secos em estufa de ar circulante a 40 °C e moídos em moinho de facas. Inicialmente as sementes (m = 414,4 g) foram submetidas à extração exaustiva em hexano à frio para remoção do material lipofílico, resultando no extrato bruto hexânico (3,045g). Em seguida as sementes foram novamente submetidas a extração exaustiva em metanol a frio, assim como as folhas (m = 388,9 g) e os galhos (m = 298,0 g), obtendo-se os respectivos extratos brutos metanólicos das sementes (EBS, m = 18,06 g), folhas (EBF, m = 17,20 g) e galhos (EBG, m = 16,35 g).

3.3. Isolamento dos constituintes químicos

O extrato EBS (1,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica e eluída com hexano:AcOEt 80% e AcOEt:MeOH em gradiente crescente de polaridade resultando em 16 frações. A fração 7 foi submetida a um fracionamento em coluna de Sephadex LH 20 novas frações que por similaridade foram reunidas em 6 frações. Após filtração em coluna de Sephadex LH 20 da fração 6 obteve-se a mistura das substâncias **1** e **2** (11,7 mg). Outra parte do extrato EBS (6,68 g) foi solubilizado em H₂O:MeOH (9:1) e particionado em hexano, clorofórmio e acetato de etila, resultando nas frações hexânica FHS (0,47 g), clorofórmica FCS (0,32 g) e acetato de etila FAcS (1,706 g), além da fração hidrometanólica FHMS (4,18 g) remanescente. A fração FAcS (209 mg) foi submetida a filtração em coluna de Sephadex LH 20 obtendo-se 51 frações. As frações 24-26 foram novamente submetidas a uma filtração em coluna de Sephadex LH 20 utilizando o mesmo padrão de eluição anterior resultando em 16 novas frações. As frações 11-13 foram reunidas e recristalizadas em acetato de etila obtendo-se a mistura das substâncias **3**, **4** e **5** (20,8

mg). A fração 29-43, obtida do fracionamento da fração FAcS foi submetida a uma filtração em coluna de Sephadex LH 20 obtendo-se 56 frações. A análise da fração 41-45 resultou na obtenção da mistura das substâncias **7** e **8** (11,4 mg). A fração hidrometanólica FHMS (231 mg) foi submetida a um fracionamento em coluna de Sephadex LH-20, obtendo-se 71 frações. As frações 16-49 foram novamente submetidas a filtração em Sephadex LH-20 obtendo-se 14 novas frações. Da fração 1-4 foi isolada a substância **6** (3,0 mg).

O extrato bruto EBF (7,69 g) foi solubilizado em H₂O:MeOH 9:1 e submetido à partição em hexano, clorofórmio e acetato de etila, resultando nas frações hexânica FHF (m = 2,43 g), clorofórmica FCF (m = 0,42 g), acetato de etila FAcF (m = 2,26 g) além da fração hidrometanólica FHMF (m = 2,45 g) remanescente. Parte da fração FAcF (990 mg) foi submetida à filtração em coluna de Sephadex LH-20 obtendo-se 69 frações. A fração 34-53 foi novamente submetida à filtração em coluna de Sephadex LH 20 e eluída com MeOH resultando em 17 novas frações. Da fração 17, obteve-se a mistura de substâncias **3**, **4** e **5** (20,8 mg).

Parte do extrato bruto dos galhos EBG (8,43 g) foi solubilizada em H₂O:MeOH (9:1) e particionada em hexano, clorofórmio e acetato de etila resultando nas frações hexânica FHG (m = 0,88 g), clorofórmica FCG (m = 0,88 g) e acetato de etila FAcG (m = 1,00 g), além da fração hidrometanólica FHMG (m = 5,56 g) remanescente. Porém, não foram obtidas substâncias puras ou em mistura no estudo do EBG.

3.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória

O ensaio de atividade anti-inflamatória para o modelo de edema de orelha induzido foi realizado como descrito na literatura.²¹ Neste ensaio utilizou-se grupos de 6 ratos machos, adultos, da linhagem Wistar, com peso entre 25 e 35 gramas. Os animais, fornecidos pelo Biotério da Universidade

Estadual de Maringá foram acondicionados em gaiolas com alimentação balanceada e água *ad libitum* em ciclo claro-escuro de 12 horas, sobre temperatura constante de 22 ± 2 °C durante todo o período de experimentação. O ensaio anti-inflamatório foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (PRO 021/2009 CEAE). Foram avaliadas os extratos brutos das sementes (EBS) e das folhas (EBF) e as frações provenientes da partição destes extratos. As amostras foram aplicadas topicamente nas orelhas (n=6); 5 mg; 2,5 mg ou 1,25 mg/orelha, imediatamente após a aplicação do óleo de cróton (200 µg) diluído em acetona 70%. A indometacina (Indo), aplicada por via tópica (1 mg), foi utilizada como anti-inflamatório de referência (controle positivo) e acetona 70% utilizada como veículo. Os animais foram sacrificados após 6 horas e de cada orelha foram retirados discos de 7 mm de diâmetro para posterior pesagem em balança analítica. O edema foi medido pela subtração do peso da orelha que recebeu apenas o veículo daquele que recebeu o agente irritante.

3.5. Pleurisia induzida por carragenina

A realização do teste pleurisia foi induzido pela injeção de 0,25 mL de uma suspensão de carragenina (200 µg) na cavidade intrapleural, na região do mediastino direito, entre a 3ª e a 4ª costelas, de acordo com a técnica descrita na literatura.²² A carragenina foi diluída em salina tamponada com fosfato (PBS - pH=7,4). Os animais foram anestesiados e sacrificados na 4ª hora após a indução da pleurisia para a coleta do exsudato inflamatório intrapleural.

O material coletado por aspiração foi transferido para tubos cônicos de centrifuga. O volume total do exsudato foi medido e uma alíquota de 50 µL usada para determinar o número de leucócitos totais em câmara de Neubauer. As hemáceas foram lisadas pela adição de líquido de Turk para a contagem de

leucócitos totais. O fluido remanescente foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos e as células ressuspensas. As lâminas foram preparadas, secas, fixadas e coradas com solução de Leishman. O número de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares presentes no exsudato foi determinado em microscópio óptico comum.

O extrato bruto das sementes e folhas, a indometacina (5 mg kg⁻¹), o veículo (água ou DMSO 16 %) e a salina (0,9%) foram administrados por via oral (gavagem), em diferentes grupos de ratos, sob jejum de 15 h, 30 minutos antes da indução da pleurisia.

3.6. Avaliação da atividade antitumoral frente a células Caco-2

Os extratos brutos das sementes (EBS), folhas (EBF) e dos galhos (EBG) e as frações provenientes da partição destes extratos foram avaliados frente à cultura de células tumorais humanas de intestino Caco-2. O ensaio foi realizado pelo método de sulforodamina B previamente descrito por Skehan et al.²³; Skehan.²⁴ As células tumorais Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços. Cada poço teve 100 µL de meio de cultura com $2,5 \times 10^4$ células. As placas foram incubadas em estufa com 5% CO₂ à 37 °C por 24 horas. Em seguida, foram adicionados 100 µL de cada concentração dos extratos EBS, EBF e EBG e das suas respectivas frações, sendo feito um controle para células (DMEM + SBF 5%). Após incubação em estufa por 48 horas, fixou-se com 50 µL de ácido tricloroacético (10%) e levou a placa à 4 °C por 1 hora, lavou-se com água corrente 5 X com cuidado, secou-se a placa, adicionou-se 50 µL de Sulforodamida B e levou-se a placa à 4 °C por 30 minutos ao abrigo da luz, removeu-se o corante lavando 4 X com ácido acético 1%, adicionou-se 150 µl de 10 mM Trisbase em cada poço e por fim levou-se a placa para agitação por 15 minutos e fez-se a leitura em leitor de ELISA (Bio-Tek FL-600 Microplate Fluorescence Reader), em densidade óptica (DO) de 530 nm.

3.7. Avaliação da atividade antioxidante

Os testes de atividade antioxidante foram realizados para os extratos brutos EBS, EBF e EBG e para as frações hexânicas, clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica proveniente da partição destes extratos. Os potenciais de atividade antioxidante foram determinados com base na atividade sequestradora de radical livre do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).²⁵ As amostras foram adicionadas em diferentes concentrações à 2 mL de uma solução de DPPH em metanol ($2,84 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Após 30 min a absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 517 nm, empregando metanol como branco. Os testes foram realizados em triplicata. Uma solução de DPPH sem adição das amostras foi utilizada como controle. A catequina foi utilizada 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).

4. Conclusão

O estudo químico das sementes da espécie *Aeschynomene sensitiva* resultou no isolamento do rotenoide glicosilado 6'-hidroxi-6a, 12a-dehidrorotenona, do isoflavonóide glicosilado 2',7 dihidroxi-4',5'dimetoxiisoflavona, dos flavonoides quercetina 3-O-β-D-glicosídeo, quercetina 3-O-β-D-galactopiranosídeo e quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosídeo, dos compostos fenólicos ácido gálico e galato de metila e da saponina soiasaponina I. Na literatura, existe relato do isolamento de rotenóides e isoflavonóides na família Leguminosae, porém, não foram encontrados relatos sobre a presença de rotenóides e isoflavonoides glicosilados e saponinas no gênero *Aeschynomene*. A fração acetato de etila proveniente do extrato bruto das sementes da espécie *A. sensitiva* mostrou potente atividade anti-inflamatória e significativo potencial antioxidante.

Agradecimentos

Os autores agradecem à DQI/UEM e à CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- ¹ Fernandes, A.; *O taxon Aeschynomene no Brasil*, EUFC: Fortaleza, **1996**.
- ² Sievers, A. F.; Archer, W. A.; Moore, R. H.; Mcgovran, B. R. J. Insecticidal tests of plants from tropical America. *Journal of Economic Entomology* **1949**, *42*, 549. [CrossRef]
- ³ Fullas, F.; Kornberg, L. J.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Farnsworth, N.; Chagwedera, T. E.; Kinghorn, A. D. Two new aromatic constituents from the root wood of *Aeschynomene mimosifolia*. *Journal of Natural Products* **1996**, *59*, 190. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Ueda, M.; Niwa, M.; Yamamura, S. Trigonelline, a leaf-closing factor of the nyctinastic plant, *Aeschynomene indica*. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 817. [CrossRef]
- ⁵ Ueda, M.; Hiraoka, T.; Niwa, M.; Yamamura, S. Potassium aeshynomate, a leaf opening substance of *Aeschynomene indica* L., containing a novel γ-amino acid. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 6777. [CrossRef]
- ⁶ Borghi, G. A.; Lopes, L. M. X.; Latorre, A.; Górnaiak, S. L.; Haraguchi, M.; Rotenóides das sementes de *Aeschynomene indica* (Leguminosae), Anais 29^o Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2006.
- ⁷ Chen, J. Y.; Tan, X.; Lu, W.; Ya, Q. A new stigmaterol ester from *Aeschynomene indica*. *Chinese Herbal Medicines*. **2011**, *3*, 248. [CrossRef]
- ⁸ Ikuno, A. A.; Braggio, M. M.; Haraguchi, M. Antiherpes activities of fraction from *Sesbania virgata* leaves. *Arquivos do Instituto Biológico* **2003**, *70*, 183. [Link]
- ⁹ Braggio, M. M.; Lima, M. E. L.; Veasey, E. A.; Haraguchi, M. Atividades Farmacológicas das Folhas da *Sesbania virgata* (CAV.) PERS. *Arquivos do Instituto Biológico* **2002**, *69*, 49.
- ¹⁰ Suffnes, M.; Abbot, B.; Statz, D.; Wonilowicz, E.; Spjut, R. The utility of P388

- leukemia compared to B16 melanoma and colon carcinoma 38 for in vivo screening of plants extracts. *Phytotherapy Research* **1988**, *2*, 89. [CrossRef]
- ¹¹ Ignoato, M. C.; Fabrão, R. M.; Schuquel, I. T. A.; Botelho, M. F. P.; Arruda, L. L. M.; Bersani-Amado, C. A.; Souza, M. C.; Santin, S. M. O. Phytochemical study and evaluation of anti-inflammatory activity of *Aeschynomene fluminensis* vell. (Fabaceae). *Química Nova* **2012**, *35*, 2241. [CrossRef]
- ¹² Ying, L. H; Yu, L J; Ping,Y.; Ying, C. X. Rotenoids from the Roots of *Derris elliptica* (Roxb.) Benth. II. *Chinese Journal of Natural Medicines* **2009**, *7*, 24. [CrossRef]
- ¹³ Chan, S.C.; Chang, Y.S.; Wang, J.P.; Chen, S.C.; Kuo, S.C. Three new flavonoid and antiallergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. *Planta Médica* **1997**, *64*, 153. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Melos, J. L. R; Honda, N. K. Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. ex. Willd (Pteridaceae). *Química Nova* **2007**, *30*, 292. [CrossRef]
- ¹⁵ Santos, P. M. L.; Schripsema, J.; Kuster, R. M. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacogogia* **2005**, *15*, 321. [CrossRef]
- ¹⁶ Tsunoda, Y.; Okawa, M.; Kinjo, J.; Ikeda, T.; Nohara, T. Studies on the constituents of *Gueldenstaedtia multiflora*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2008**, *56*, 1138. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁷ Avunduk, S.; Mitaine-offer, A.; Alankus-Caliskan, O. Triterpene Glycosides from the roots of *Astragalus flavescens*. *Journal of Natural Products* **2008**, *71*, 141. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Souza-filho, A. P. S.; Santos, R. A.; Santos, L. S.; Guilhon, G. M. P.; Santos, A. S.; Arruda, M. S. P.; Muller, A. H.; Arruda, A. C. Allelopathic Potential of *Myrcia guianensis*. *Planta daninha* **2006**, *24*, 649. [CrossRef]
- ¹⁹ Ceruks, M.; Romoff, P.; Fávero, O. A.; Lago, J. H. G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova* **2007**, *30*, 597. [CrossRef]
- ²⁰ Razavi SM, Zahri S, Zarrini G, Nazemiyeh H, Mohammadi S. Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **2009**, *35*, 376. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹ Van-Arman, G. C. Anti-inflammatory drugs. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **1974**, *16*, 900. [CrossRef] [PubMed]
- ²² Vinegar, R.; Traux, J. F.; Selph, J. L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1973**, *143*, 711. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudeiro, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1990**, *82*, 1107. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Skehan, P. Assays of cell growth and cytotoxicity. In: Studzinski (Ed.), *Cell Growth and Apoptosis. A Practical Approach*. Oxford University Press, p. 169, 1995.
- ²⁵ Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A. Métodos para Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante. *Química Nova* **1999**, *22*, 94. [CrossRef]