



Atividade anti-helmíntica dos flavonóides isolados das raízes de *Andira anthelmia* (Leguminosae)

Virgínia C. da Silva,¹ Mário G. de Carvalho,^{*1} Hélcio R. Borba,² Sandra L. C. Silva³

¹Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47 BR 465, 23890-000 Seropédica-RJ, Brasil,

²Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47 BR 465, 23890-000 Seropédica-RJ, Brasil,

³Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Federal do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga, Km 3 BR 415, 45700-000 Itapetinga-BA, Brasil

RESUMO: As cascas e as raízes de *A. anthelmia* têm sido utilizadas tradicionalmente como vermífugas. Um estudo biomonitorado do extrato metanólico das raízes de *A. anthelmia* conduziu ao isolamento das isoflavonas biochanina A e genisteína da fração acetato de etila; biochanina A 7-O-β-D-glicopiranosídeo, biochanina A 7-O-α-L-rhamnopyranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosídeo e biochanina A 7-O-β-D-apiofuranosil-(1→5)-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosídeo da fração *n*-butanólica e catequina da fração metanólica. Suas estruturas foram elucidadas com base em dados espectrométricos. A atividade anti-helmíntica foi investigada em camundongos naturalmente infectados por *Aspiculuris tetraptera*. Os compostos isolados aplicados nos animais por via intragástrica na dose de 2,0 mg.kg⁻¹ durante três dias consecutivos revelaram percentuais significativos na eliminação de *A. tetraptera*, quando comparados com o lote controle.

Unitermos: *Andira anthelmia*, flavonóides, atividade anti-helmíntica.

ABSTRACT: "Anthelmintic activity of flavonoids isolated from roots of *Andira anthelmia* (Leguminosae)". Bioactivity-guided fractions of the methanol extract from the roots of *Andira anthelmia* led the isolation of the isoflavones biochanin A and genistein from the ethyl acetate fraction; biochanin A 7-O-β-D-glucopyranoside, biochanin A 7-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside and biochanin A 7-O-β-D-apiofuranosyl-(1→5)-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside from the *n*-butanol fraction and catechin from the methanol one. Their structures were elucidated on the basis of spectroscopy data. The anthelmintic activity was investigated in mice naturally infected by *Aspiculuris tetraptera*. The compounds administered in the animals by intragastric route in doses of 2.0 mg.kg⁻¹, were effective in the removal of the total number of the *A. tetraptera* when compared with the control group.

Keywords: *Andira anthelmia*, flavonoids, anthelmintic activity.

INTRODUÇÃO

O gênero *Andira* compreende o grupo de plantas popularmente conhecidos por angelins, representado por mais de 30 espécies distribuídas na América Tropical, com uma espécie na África (Matos, 1979; Pennigton & Lima, 1995), sendo a maioria originária do Brasil (Matos, 1979). No Brasil, foram encontradas 27 espécies e 7 variedades, sendo que o maior número de espécies se encontra na Amazônia (Matos, 1979). Devido às propriedades vermífugas, esse gênero foi utilizado na Europa desde 1755, por médicos e farmacêuticos de diversos países que preconizavam a industrialização das cascas, transformando-as em pó, com o qual procuravam obter uma droga de aplicação anti-helmíntica (Matos, 1979). Algumas espécies que pertencem ao gênero *Andira* ainda são utilizadas popularmente como anti-

helmínticas, apesar de seus efeitos tóxicos (Corrêa, 1984; Silva et al., 2003). Em trabalho anterior divulgamos a avaliação da ação anti-helmíntica dos extratos brutos de *A. anthelmia* e *A. fraxinifolia*, sugerindo o extrato bruto da espécie *A. anthelmia* como um potente anti-helmíntico (Silva et al., 2003). Há facilidade de disseminação de *A. tetraptera* em grandes criações de roedores, sendo frequentemente encontrados parasitando o intestino de camundongos mantidos em biotério (Zenner & Regnault, 2000). O presente estudo procurou investigar o efeito anti-helmíntico das frações geradas pelo fracionamento do extrato metanólico assim como dos compostos isolados das frações cujos resultados foram positivos frente ao biomonitoramento utilizando como modelo experimental camundongos naturalmente infectados com o nematóide *Aspiculuris tetraptera*.

* E-mail: mgeraldo@ufrj.br, Tel./Fax +55-21-26822807

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos gerais

Os espectros do RMN, ^1H e ^{13}C (inclusive experimentos em 2D) foram registrados em espectrômetros Bruker DRX-500 (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz); Bruker AS-200 (^1H 200 e ^{13}C 50 MHz) e Jeol JNM-GX-400 (^1H 400 e ^{13}C 100 MHz). O solvente usado na dissolução das amostras foi DMSO- d_6 e TMS como referência interna. Nas cromatografias em coluna (CC) foram usadas sílica gel (Merck e Aldrich) ou Sephadex LH-20 (Aldrich); nas análises em camada fina utilizou-se cromatofolhas de sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck e Aldrich) e revelação com UV (254 e 366 nm), AlCl_3 -EtOH (1%) e exibição em vapores de iodo.

Material vegetal

Raízes de *Andira anthelmia* foram coletadas em Dezembro de 2001 na Reserva Biológica de Poço das Antas, Município de Silva Jardim (Rio de Janeiro). Uma exsicata (n^o 4616) encontra-se catalogada no Herbário RBR-UFRRJ.

Extração e isolamento

Após secagem e trituração, 450,0 g de raízes de *Andira anthelmia* foram submetidas à maceração contínua com metanol à temperatura ambiente. O extrato metanólico (76,0 g) foi submetido à partição com solventes em polaridades crescentes obtendo os resíduos com acetato de etila (19,0 g), butanol (15,0 g) e metanol (24,0 g). O resíduo acetato de etila foi cromatografado em coluna

de sílica gel e eluída com clorofórmio, acetato de etila e metanol, com aumento de polaridade até 100% metanol. Foram coletadas 156 frações de 15 mL que foram analisadas por CCDA e reunidas em 16 novas frações. As frações 6/10 forneceram **1** (260,0 mg) e **2** (28,0 mg). A fração butanólica foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel eluída inicialmente com acetato de etila e aumento gradual de metanol. Foram coletadas 185 frações de 15 mL, que novamente por CCDA foram analisadas e reunidas em 25 novas frações. As frações 7/16 foram filtradas em Sephadex LH-20 eluída com metanol fornecendo o composto **3** (65,0 mg). As frações 17/25 foram submetidas a CCDA eluída com CHCl_3 :MeOH (8:2) [4x] fornecendo os compostos **4** (37,0 mg) e **5** (68,0 mg). A fração metanólica foi submetida ao mesmo procedimento cromatográfico que para fração *n*-butanólica. Foram coletadas 125 frações de 50 mL cada, sendo que as frações 1/56 foram filtradas em Sephadex LH-20 fornecendo **6** (50,0 mg) e uma mistura de carboidratos (Figura 1).

Atividade anti-helmíntica

130 camundongos albinos SW jovens, de ambos os sexos foram mantidos em gaiolas coletivas de polipropileno, nas quais, a limitação das medidas de higiene possibilitou o nível desejado da infecção natural pelo oxiurídeo *A. tetraaptera*. Para o teste cada camundongo foi colocado individualmente em uma gaiola. Foram utilizados lotes de 10 camundongos, machos ou fêmeas com peso compreendido entre 20 e 22 g. As gaiolas eram dotadas de piso telado, com o objetivo de facilitar a coleta diária de fezes (Amorim et al., 1987; Amorim & Borba, 1990). Foram utilizadas doses de 12,0

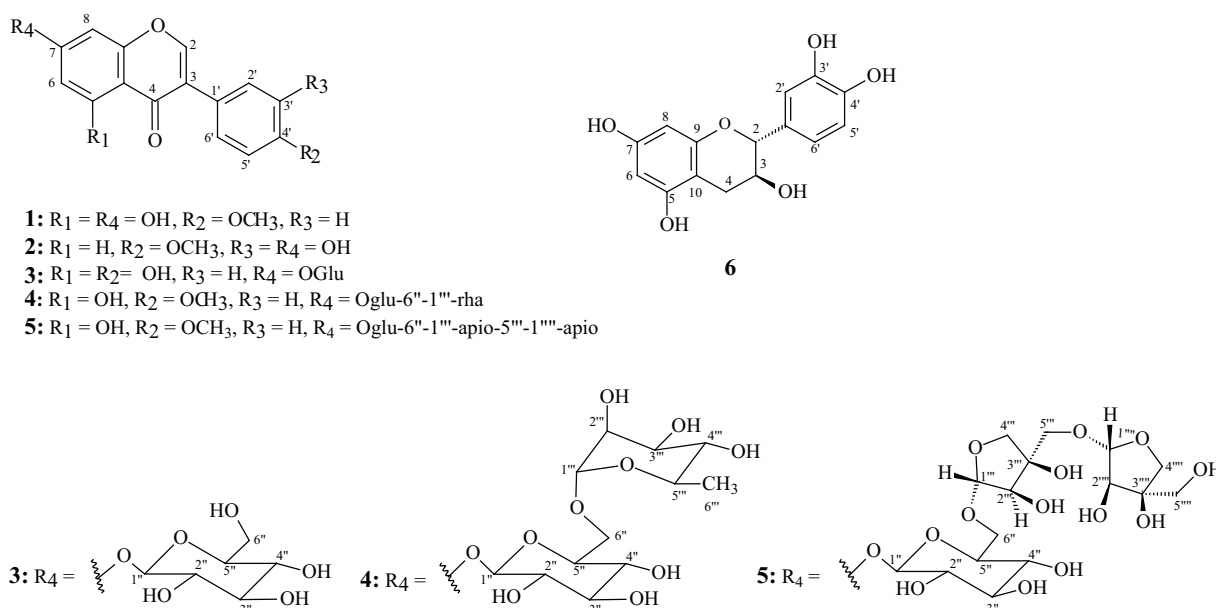


Figura 1. Constituintes químicos de *Andira anthelmia*.

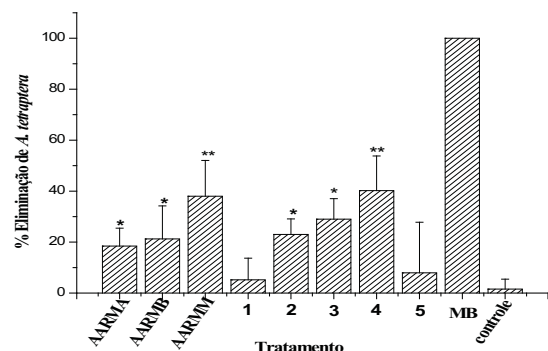


Figura 2. Atividade antihelmíntica em camundongos tratados com as frações e substâncias isoladas de *A. anthelmia* em comparação com o mebendazol (MB) e com animais não tratados (controle). Valores expressos em média \pm DP de nematóides eliminados nos diferentes grupos de animais testados. $n = 10$. Os símbolos* e ** indicam valores de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente.

e 24,0 mg.kg⁻¹ para os resíduos acetato de etila, *n*-butanol e metanol e doses de 2,0 mg.Kg⁻¹ para as substâncias **1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6**. Os resíduos e substâncias isoladas foram aplicadas por via intragástrica, no volume de 0,04 mL.g⁻¹, com emprego de sonda de polietileno, durante três dias consecutivos a cada camundongo dos lotes experimentais. As fezes de cada gaiola foram coletadas diariamente, processadas em tamis de malha 125 μ m e examinadas sob microscópio estereomicroscópio Wild M-5, visando à contagem de oxiurídeos eliminados do 2º ao 5º dia, perfazendo um total de quatro exames fecais. Dois lotes de 10 camundongos serviram como controle, sendo que um deles recebeu doses de mebendazol (MB) (Pantelmin®, Janssen-Cilag) em três dias consecutivos (2,0 mg.kg⁻¹) e o outro recebeu apenas o veículo (0,04 mL.g⁻¹), objetivando avaliar a eliminação espontânea do

helminto. No quinto e último dia dos testes, os animais foram eutanasiados por inalação de vapores de éter etílico e necropsiados, examinando-se o conteúdo do intestino grosso, de modo a avaliar-se o número de *A. tetraptera* remanescentes (Amorim et al., 1999).

Análise estatística

No teste de atividade anti-helmíntica, os resultados sofreram transformação angular e foram comparados com valores encontrados no lote controle empregando-se o teste *t* de "Student". O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Silva et al., (2003) em estudo posterior, com o extrato metanólico das raízes de *A. anthelmia* comprovou uma significativa atividade anti-helmíntica com uma porcentagem de eliminação de 63,20% de *A. tetraptera*. Silva et al., (2003) também verificou que o percentual diário de eliminação de *A. tetraptera* observado com os extratos da raiz de *A. anthelmia* foi similar ao comportamento do mebendazol, onde a ação foi lenta, por um período de quatro dias. O extrato metanólico das raízes de *A. anthelmia* mostrou significativa atividade anti-helmíntica com uma porcentagem de eliminação de *A. tetraptera* (26,71%). Portanto, este foi sucessivamente particionado fornecendo as frações acetato de etila, *n*-butanol e metanol que apresentaram 18,45%, 25,26% e 37,98% de eliminação do oxiurídeo respectivamente quando testadas na dose de 12 mg.kg⁻¹. Os animais tratados com os resíduos na dose de 24 mg.kg⁻¹, se mostraram extremamente irritados. Logo na primeira aplicação foi detectada 60% de mortalidade entre as cobaias. Essa informação alertou para a

Tabela 1. Influência das frações e substâncias isoladas de *A. anthelmia* na eliminação de *A. tetraptera*.

Tratamento	Doses mg.kg ⁻¹	Número de helmintos		% de eliminação
		Exame fecal	Necropsia	
AARMA [#]	12	114	521	18,45 \pm 7,01
AARMB [#]	12	406	1607	21,26 \pm 12,95
AARMM [#]	12	714	1880	38,0 \pm 14,04
1	2	103	1978	5,20 \pm 8,5
2	2	700	1741	23,0 \pm 6,10
3	2	132	633	29,0 \pm 8,06
4	2	23	95	40,21 \pm 13,58
5	2	166	2088	7,95 \pm 5,85
MB	2	324	0	100
Controle	---	45	2836	1,56 \pm 3,90

[#]AARMA - Resíduo acetato de etila das raízes de *A. anthelmia*/AARMB - Resíduo butanol das raízes de *A. anthelmia*/AARMM - Resíduo metanólica das raízes de *A. anthelmia*/MB - Mebendazol.

toxidez dos extratos e frações quando empregados em doses elevadas e permitiu um ajuste da dose para uma concentração de 12 mg.kg⁻¹. As frações acetato de etila, *n*-butanol e metanol, por mostrarem uma atividade anti-helmíntica significativa, foram submetidas a técnicas de isolamento e purificação por coluna cromatográfica, coluna de Sephadex LH-20 e CCDP. As substâncias foram identificadas por análises espectroscópicas e comparação com dados da literatura; biochanina A (**1**) e biochanina A 7-*O*-β-D-apiofuranosil-(1→5)-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo (**5**) (Silva et al., 2000), genisteína (**2**) (Demuner et al., 2003; César et al., 2007), biochanina A 7-*O*-β-D-glucopiranosídeo (**3**) (Rao et al., 1989), biochanina A 7-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo (**4**) (Ma et al., 1998) e catequina (**6**) (Foo & Karchesy, 1989).

Os resultados mostraram que as substâncias **1**, **2** e **6** apresentaram percentual de eliminação de *A. tetraptera* de 5,20%, 5,60% e 7,95%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (1,56%), embora não tenham sido estatisticamente significativos. Esses resultados sugerem que haja um sinergismo entre as moléculas existentes nas frações acetato de etila e metanol que influenciam na ação anti-helmíntica. Porém as substâncias **3**, **4** e **5** apresentaram significativa atividade anti-helmíntica quando comparado com o grupo controle, apesar de serem menos ativas do que o quimioterápico mebendazol (100%). Os percentuais de eliminação para as substâncias **3**, **4** e **5** foram de 40,21%, 20,85% e 24,21%, respectivamente, sendo a substância **3** a mais ativa dentro da fração *n*-butanólica. Esses resultados são mostrados na Tabela 1 e Figura 2. Esses dados sugerem que nesta série de flavonóides, a presença de unidades glicosídicas na posição C-7 em detrimento de flavonóides agliconas como **3**, **4** e **5** podem ser determinantes para a condição de anti-helmíntico.

Levando em consideração tais resultados, infusões de *A. anthelmia* podem ser indicativas de atividade antiparasitária, pois possui substâncias ativas que confirmam esta suposição com atividades terapêuticas interessantes. Porém, devido à alta toxidez as infusões de *A. anthelmia* devem ser administradas com certa precaução, não há estudos de dose segura para consumo humano sendo necessária uma avaliação toxicológica para seu uso popular como um medicamento vermífugo alternativo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelas bolsas concedidas e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

Amorim A, Borba HR, Silva WJ 1987. Ação anti-helmíntica de plantas. *Rev Bras Farm* 68: 64-70.

- Amorim A, Borba HR 1990. Ação anti-helmíntica III. Efeito de extratos aquosos de *Punica granatum* L. (romã) na eliminação de *Vampirolepis nana* e de oxiurídeos em camundongos. *Rev Bras Farm* 71: 85-87.
- Amorim A, Borba HR, Carauta JPP, Lopes D, Kaplan MAC 1999. Anthelmintic activity of latex of *Ficus* species. *J Ethnopharmacol* 64: 255-258.
- César IC, Braga FC, Vianna-Soares CD, Nunan EA, Barbosa TAF, Moreira-Campos LM 2007. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). *Rev Bras Farmacogn* 17: 616-625.
- Corrêa M 1984. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional do Rio de Janeiro.
- Demuner AJ, Barbosa LCA, Nascimento JC, Vieira JJ, Santos MA 2003. Isolamento e avaliação da atividade nematocida de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. *Quim Nova* 26: 335-339.
- Foo LY, Karchesy JJ 1989. Procyanidin dimmers and trimers from Douglas Fir Inner Bark. *Phytochemistry* 28: 1743-1747.
- Matos NF 1979. O gênero *Andira* Lam. (Leguminosae: Papilionoideae) no Brasil. *Acta Amazonica* 9: 241-266.
- Ma WG, Fukushi Y, Hostettmann K, Tahara S 1998. Isoflavonoid glycosides from *Eriosma tuberosum*. *Phytochemistry* 49: 251-254.
- Pennington T, Lima HC 1995. Two new species of *Andira* (Leguminosae) from Brazil and the influence of dispersal in determining their distributions. *Kew Bull* 50: 557-566.
- Rao PS, Asheervadam Y, Khalilulliah MD, Murti VVS 1989. A revised structure for the isoflavone lanceolarin. *Phytochemistry* 28: 957-958.
- Silva BP, Vellozo LSM, Parente JP 2000. Biochanin A triglycoside from *Andira inermis*. *Fitoterapia* 71: 663-667.
- Silva SLC, Borba HR, Bonfim RCB, Carvalho MG, Cavalcanti HL, Barbosa CG 2003. Ação Anti-helmíntica de extratos brutos de *Andira anthelmia* (Vell.) Macbr. e *Andira fraxinifolia* Benth., em camundongos naturalmente infectados por *Vampirolepis nana* e *Aspiculuris tetraptera*. *Parasitol Latinoam* 58: 23-29.
- Zenner L, Regnault JP 2000. A retrospective study of microbiological and parasitological status of laboratory rodents in France. *J Exp Anim Sci* 40: 211-222.