



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA

Fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp.  
*magnifolia* (Trécul), ativo contra *Aeromonas hydrophila*

Bolsista: Kédma Melo da Silva, CNPq.

MANAUS  
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0106/2011

Fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp.  
*magnifolia* (Trécul), ativo contra *Aeromonas hydrophila*

Bolsista: Kédma Melo da Silva, CNPq

Orientador: Prof. Dr. Pierre Alexandre dos Santos

Coorientadora: Doutoranda Jaqueline Inês Alves de Andrade

MANAUS  
2012

## Resumo

A espécie *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* Trécul (Urticaceae), também conhecida como apuí, apresenta em sua composição química, triglicerídeos esterificados com, ácido palmítico, linoleico, oleico e esteárico, ceras e baixo teor de glicídeos em extratos polares de frutos maduros. Um estudo com os extratos das folhas e frutos desta planta apresentam uma elevada atividade antioxidante. Além desta atividade, os extratos aquoso e metanólico dos frutos apresentaram atividade antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila*, bactéria patogênica para peixes. Em virtude deste fato, o extrato aquoso desse vegetal foi fracionado em coluna cromatográfica de Poliamida, a fim de se obter substâncias isoladas, que serão submetidas por teste *in vitro* para verificar a ação antibacteriana. Foram obtidas 99 frações que foram analisadas por cromatografia em camada delgada e reunidas. As frações purificadas foram analisadas por RMN  $^1\text{H}$ , revelando que se trata de flavonoides glicosilados, porém não estão puros.

Palavras chaves: Cromatografia; Atividade antibacteriana; Extrato aquoso.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BAW</b>	Buthanol, acetic acid, water
<b>CCDC</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EM</b>	Espectrometria de massas
<b>FE</b>	Fase estacionária
<b>FM</b>	Fase móvel
<b>HEX</b>	Hexano
<b>INPA</b>	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C
<b>UV</b>	Ultravioleta

## Lista de Figuras

- Figura 1** Fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* ssp *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Poliamida). **14**
- Figura 2** Frações 38, 39, 40 e 41, nas quais houve a formação de cristais. **17**  
( $m_{38}=5,24$  g;  $m_{39}=4,78$  g;  $m_{40}=5,26$  g;  $m_{41}=6,48$  g).
- Figura 3** Análise por CCDC dos cristais obtidos a partir das frações 38 a 41. FE: **19**  
Sílica gel 60, FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (4:6). **A:** UV 256nm; **B:** revelador anisaldeído sulfúrico.
- Figura 4** Análise por CCDC das frações que foram reunidas de 1 a 84. FE: Sílica **21**  
gel 60, FM: BAW (Butanol: Ácido Acético: Água) (5:1:4). Revelador anisaldeído sulfúrico.
- Figura 5** Frações reunidas 1 – 4; 5 – 8; 9 -13; 14 – 15; 16 – 19; 20 – 22; 23 – 26; **22**  
27 – 31; 32 – 35; 36 – 39; 40 – 41; 42 – 54; 55 – 80; 81 – 82 e 83 – 84, obtidas do fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Poliamida).
- Figura 6** Precipitado sólido de cor branca das frações reunidas (A) 27 – 31 e (B) **22**  
32 – 35 e análise por CCDC do precipitado e água-mãe. FE: Sílica gel 60, FM: BAW (Butanol: ácido acético: água) (5:1:4). Revelador anisaldeído sulfúrico. (\*Precipitado; \*\*Água-mãe).
- Figura 7** Placa para testes antibacterianos em triplicada das frações 29-31, 32-35 **24**  
e 39. Apresenta Controle Positivo, Controle Negativo, Controle do Caldo e Controle do Solvente.
- Figura 8** Fracionamento em duplicada da fração 36 - 39 provenientes do **26**  
fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Sephadex LH-10).
- Figura 9** Frações 3(I) e 3(II), nas quais houve a formação de cristais e **26**  
precipitado. ( $m_{3(I)}=18,6$  mg;  $m_{3(II)}=16,9$  mg).
- Figura 10** Análise por CCDC das frações 3(I) e 3(II).**(I):** 3(I) Metábólito Isolado; **26**  
**(II):** 3(II) Metábólito Isolado; **(III):** 3(I) Metábólito não isolado; **(IV):** 3(II) Metábólito não isolado. FE: Sílica gel 60, FM: (Metanol: Ácido acético) (9,5: 0,5). Revelador anisaldeído sulfúrico.

## Lista de Tabelas

- Tabela 1** Eluentes utilizados no fracionamento do extrato aquoso dos fruto: **15**  
*Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica e frações obtidas (FE: Poliamida).
- Tabela 2** Frações obtidas a partir do fracionamento do extrato aquoso dos frutos **18**  
de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Poliamida).
- Tabela 3** Frações reunidas e obtidas a partir do fracionamento do extrato aquoso **19**  
dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Poliamida).
- Tabela 4** Solubilidade das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato **20**  
aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Poliamida).
- Tabela 5** Frações obtidas a partir do fracionamento da fração 36 - 39 proveniente **25**  
do fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Sephadex LH-10).

# Sumário

<b>Resumo</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b>	<b>iv</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>v</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>vi</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>8</b>
<b>2 Levantamento bibliográfico</b>	<b>9</b>
2.1 Apocynaceae	<b>8</b>
2.2 <i>Aspidosperma</i>	<b>9</b>
2.3 Metabólitos secundários	<b>10</b>
<b>3 Objetivos</b>	<b>11</b>
3.1 Objetivo Geral	<b>11</b>
3.2 Objetivos específicos	<b>11</b>
<b>4 Metodologia</b>	<b>12</b>
4.1 Solventes e reagentes	<b>12</b>
4.2 Equipamentos	<b>12</b>
4.3 Coleta e identificação do material vegetal	<b>12</b>
4.4 Preparo dos extratos	<b>13</b>
4.5 Fracionamento do extrato aquoso dos frutos	<b>13</b>
4.5.1 Fracionamento do extrato aquoso dos frutos em coluna de Poliamida	<b>13</b>
4.6 Atividade antibacteriana	<b>16</b>
<b>5 Resultados e discussão</b>	<b>18</b>
<b>6 Conclusões</b>	<b>27</b>
<b>7 Referências Bibliográficas</b>	<b>28</b>

## 1. Introdução

Um dos fatores de extrema importância na descoberta de princípios ativos naturais consiste, principalmente, na interação entre a química e a farmacologia (SIMÕES *et al.*, 2004). Outro aspecto de grande importância para a seleção de plantas para estudo fitoquímico é o conhecimento da flora da região a ser pesquisada, isto é, o levantamento preliminar da vegetação e sua composição florística. Assim, é possível descobrir quais espécies são predominantes e sobre elas concentrar os estudos químicos. Os resultados dos estudos, neste caso, podem conduzir a trabalhos complementares, com o objetivo de se explorar economicamente estas plantas de larga ocorrência, com maior probabilidade de sucesso (MATOS, 1988).

*Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* Trécul (Urticaceae), conhecida como apuí, pode ser encontrada no Brasil, Peru, Colômbia, Equador, Panamá e Venezuela (Nunez, 2008). Segundo Nunez *et al.* (2008), esta espécie apresenta em sua composição química, triglicerídeos esterificados com, ácido palmítico, linoleico, oleico e esteárico, ceras e baixo teor de glicídeos em extratos polares de frutos maduros.

Um estudo mostrou que, os extratos das folhas e frutos desse vegetal apresentam uma elevada atividade antioxidante, e que provavelmente esta atividade esteja relacionada a substâncias fenólicas (JEFFREYS *et al.*, 2006). Além da atividade antioxidante bastante elevada, os extratos metanólico e aquoso dos frutos apresentam atividade antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila* (ANDRADE, 2009).

*A. hydrophila* apresenta grande importância nos sistemas aquícolas por causar grandes perdas econômicas (PAVANELLI, 2008). Peixes infectados por esta bactéria apresentam como sinais clínicos: lesões epidérmicas; erosão das nadadeiras; falta de apetite; hiperplasia do fígado; dentre outras (PAVANELLI, 2008). Além dos danos causados para os animais, esta espécie tem sido associada a doenças em seres humanos, sendo classificadas pela OMS (2003) como patógenos veiculados pela água e por alimentos contaminados, de interesse emergente à saúde pública (HEUZENROEDER *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2002; MERINO *et al.*, 1995).

Tem sido relatada na literatura, a múltipla resistência dessa bactéria frente aos antimicrobianos disponíveis (BELÉM-COSTA, 2006). Aliado a isto, os quimioterápicos comumente utilizados para o tratamento em sistemas piscícolas causam danos ao meio

ambiente (TAVECHIO *et al.*, 2009). Portanto, é de suma importância a busca por alternativas de tratamento dessas infecções, e os produtos vegetais são uma fonte promissora. O estudo químico-farmacológico de *C. asperifolia* subsp. *magnifolia*, é considerado um aspecto relevante, uma vez que se mostrou ativa contra *A. hydrophila*. Por isto, o objetivo deste trabalho é o fracionamento do extrato aquoso dos frutos biomonitorado, com o micro-organismo teste *A. hydrophila*.

## 2. Levantamento Bibliográfico

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novas substâncias com propriedades terapêuticas. Isto pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais ativos, como *Phytomedicine*, *Phytochemical Analysis*, *Natural Product Letter*, etc. (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

Segundo a RDC nº 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (ANVISA, 2004), fitoterápicos são medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou partes de plantas medicinais (raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes), que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico e ou tratamento sintomático de doenças, validados em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos de fase 3. Com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia as plantas medicinais estão tendo seu valor terapêutico pesquisado e ratificado pela ciência e vem crescendo sua utilização recomendada por profissionais de saúde (ARNOUS, 2005).

A floresta Amazônica se destaca por possuir a maior diversidade florística do mundo. Sendo assim, apresenta várias espécies vegetais que podem ser produtoras de princípios ativos, com potencial terapêutico contra várias doenças, principalmente no que diz respeito a doenças causadas por agentes bacterianos (CUNICO *et al.*, 2006; TANAKA *et al.*, 2005).

*Aeromonas hydrophila* é um bastonete Gram-negativo de aproximadamente 0,3-1,0 µm de diâmetro por 1,0-3,5 µm em comprimento. A bactéria é móvel devido à presença

de um flagelo polar, não produz esporos e não apresenta cápsula. O crescimento bacteriano ocorre preferencialmente entre 20 e 25 °C, mas pode ocorrer também a 37 °C, em meios artificiais de cultura, tais como, ágar nutriente, ágar triptose, ágar sangue e ágar MacConkey (AOKI, 1999). A bactéria é anaeróbica facultativa e sua classificação, de acordo com o perfil bioquímico, que é relativamente complexo, tem gerado divergências para a caracterização e classificação dos diferentes isolados (GRAF, 1999). Esta dificuldade na caracterização é importante, haja vista, que este micro-organismo é o principal agente patogênico na aquicultura (AOKI, 1999).

Os peixes são importantes veículos de infecções humanas causadas por *Aeromonas*, principalmente quando são consumidos crus ou após tratamento térmico brando. Além disso, essas bactérias podem sobreviver, multiplicar e produzir fatores de virulência até em pescados estocados a baixas temperaturas (RODRIGUES & RIBEIRO, 2004; DASKALOV, 2006).

Pessoas expostas ao contato direto com peixes, como exemplo, trabalhadores de pisciculturas, pescadores, comerciantes e processadores de peixes devem ser cuidadosas ao manipular esses produtos, pois os peixes podem estar infectados por cepas de *Aeromonas* e algumas delas, como *A. hydrophila*, podem causar afecções de pele, principalmente em pessoas imunocomprometidas (GONZALEZ-SERRANO *et al.*, 2002).

Em virtude desses fatos é importante buscar novas fontes para combater esses tipos de agente patogênicos. E, *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* pode ser uma fonte de substâncias com atividade biológica.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Utilizar técnicas de fracionamento cromatográfico para a obtenção de frações contendo substâncias biologicamente ativas e ou isolamento das mesmas, a partir do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

Isolar a(s) substância(s) responsável (eis) pela atividade contra a bactéria patogênica para peixes *Aeromonas hydrophila*;

Avaliar a atividade antibacteriana, das frações e substâncias purificadas;

Identificar ou elucidar as estruturas das substâncias presentes no extrato aquoso dos frutos de *C. asperifolia* subsp. *magnifolia*.

## **4. Metodologia**

### **4.1 Solventes e reagentes**

Os extratos foram obtidos utilizando-se solventes orgânicos, grau comercial, purificados por destilação fracionada no Laboratório de Bioprospecção (INPA) ou água destilada.

Para as análises cromatográficas foram utilizados solventes P.A. e ou água destilada. Sílica gel 60 (Vetec 230 – 400 mesh) e Poliamida (RIEDEL – DE HAEN<sup>®</sup>) foram utilizadas para o fracionamento em coluna. As análises por cromatografia em camada delgada (CCDC) foram realizadas em placas cromatográficas (MENACHERY-NAGEL) recobertas com sílica gel 60.

### **4.2 Equipamentos**

Para a eliminação dos solventes orgânicos foi utilizado evaporador rotatório marca IKA<sup>®</sup>, modelo RV10 basic. A liofilização dos extratos foi realizada em liofilizador Virtis, modelo BenchTop K.

As placas cromatográficas foram visualizadas sob luz UV<sub>256</sub> e reveladas utilizando-se reveladores químicos [anisaldeído sulfúrico, sulfato de cério(IV) e cloreto de ferro(III)].

### **4.3 Coleta e identificação do material vegetal**

O material vegetal foi coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke (AM-010, km 26), Manaus-AM. E, identificado no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da

Amazônia, onde se encontra depositada uma exsicata sob nº 183483 (ANDRADE, 2009).

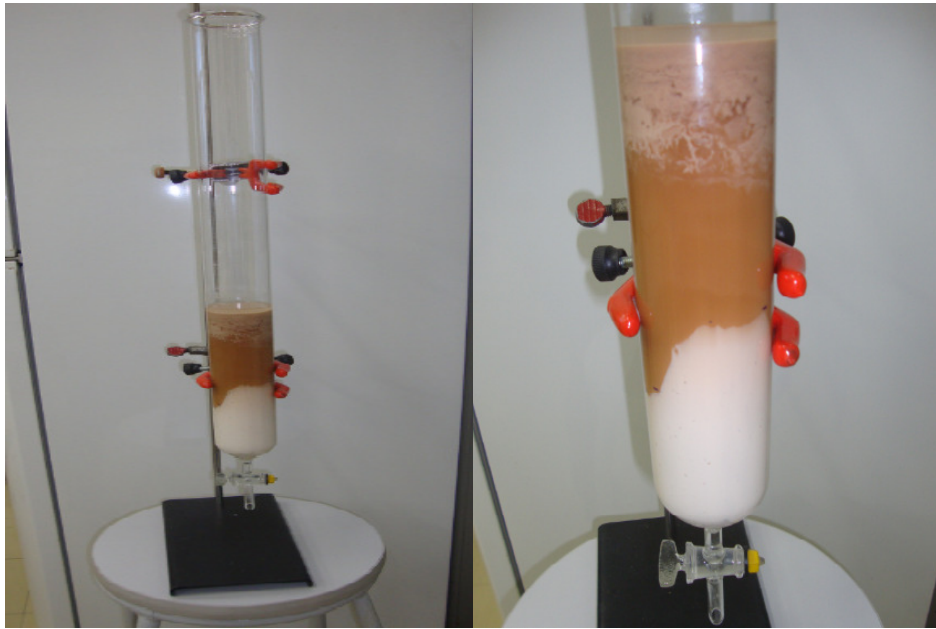
#### **4.4 Preparo dos extratos**

O material vegetal coletado (frutos imaturos) foi seco em estufa de ar circulante aquecido a 45 °C, por 3 dias. Em seguida este material foi pulverizado em moinho de facas e submetido à extração exaustiva com DCM, MeOH e água, sucessivamente, em banho de ultrassom por 20 min. Os extratos orgânicos foram concentrados em evaporador rotativo e o extrato aquoso foi liofilizado.

#### **4.5 Fracionamentos do extrato aquoso dos frutos**

##### *4.5.1 Fracionamento do extrato aquoso dos frutos em coluna de Poliamida*

O extrato aquoso dos frutos (30 g) foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica aberta. Foi utilizada coluna de vidro (22,5 x 6 cm), utilizando como fase estacionária poliamida (109,32 g) e como fase móvel, água, MeOH, AcOEt e suas misturas (FIGURA 1 e TABELA 1).



**Figura 1:** Fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Poliamida).

**Tabela 1:** Eluentes utilizados no fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica e frações obtidas (FE: Poliamida).

<b>Eluentes</b>	<b>Proporções</b>	<b>Frações Coletadas</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	100 %	01-04
<b>H<sub>2</sub>O: MeOH</b>	9:1	05-10
<b>H<sub>2</sub>O: MeOH</b>	8:2	11-16
<b>H<sub>2</sub>O: MeOH</b>	7:3	17-20
<b>H<sub>2</sub>O: MeOH</b>	6:4	21-23
<b>H<sub>2</sub>O: MeOH</b>	5:5	24-27
<b>H<sub>2</sub>O: MeOH</b>	4:6	28-30
<b>H<sub>2</sub>O: MeOH</b>	3:7	31-36
<b>H<sub>2</sub>O: MeOH</b>	2:8	37-43
<b>H<sub>2</sub>O: MeOH</b>	1:9	44-50
<b>MeOH</b>	100 %	51-55
<b>MeOH: AcOEt</b>	9:1	56-58
<b>MeOH: AcOEt</b>	8:2	59-62
<b>MeOH: AcOEt</b>	7;3	63-67
<b>MeOH: AcOEt</b>	6:4	68-71
<b>MeOH: AcOEt</b>	5:5	72-76
<b>MeOH: AcOEt</b>	4:6	77-80
<b>MeOH: AcOEt</b>	3:7	81-84
<b>MeOH: AcOEt</b>	2:8	85-86
<b>MeOH: AcOEt*</b>	1:9	87-88
<b>AcOEt</b>	100 %	89-91
<b>AcOEt: HEX</b>	9:1	92:93
<b>AcOEt: HEX</b>	8:2	94-97
<b>AcOEt: HEX</b>	7:3	98-99
<b>AcOEt: HEX</b>	6:4	100

AcOEt = acetato de etila; HEX = hexano; MeOH = metanol

#### 4.6. Atividade antibacteriana

Para os testes antibacterianos, inicialmente foi avaliada a concentração dos solventes com o objetivo de encontrar a concentração máxima que o solvente não interferisse nos resultados de inibição bacteriana. Os testes revelaram que a concentração máxima permitida de DMSO para *Aeromonas hydrophila* é de 5%.

##### 4.6.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos e substâncias são realizadas conforme metodologia descrita conforme (CLSI, 2003; Eloff, 1998).

##### 4.6.1.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em meio líquido, através da técnica de microdiluição. Para isto, foram feitas diluições sucessivas das substâncias em tubos de ensaio, e em seguida, 95 µL de cada diluição é colocado em cada poço da placa de 96 poços. Em seguida, foi inoculado o micro-organismo-teste (5 µL), preparado pela escala de (McFarland 0,5) diluído 10 vezes. As placas são incubadas a temperatura (30°C ou 37°C) e tempo adequado (18 a 24 horas), de acordo com a necessidade de cada micro-organismo. Após esse período, foi inoculado 40 µL de revelador (2,3,5 cloreto de trifeniltetrazóleo – a 2 mg/mL) em cada poço, e as placas incubadas novamente por 30 minutos. Onde houver crescimento bacteriano, os poços serão revelados em vermelho, e onde não houver crescimento, os poços permanecerão da coloração do meio ou do extrato. A CIM é considerada a menor concentração da substância onde não houver crescimento bacteriano (onde não houver alteração de coloração em relação ao início do teste). O teste foi realizado em triplicata.

Foi feito um controle negativo (caldo + micro-organismo), um controle do solvente (solvente utilizado para solubilizar o extrato – na mesma concentração final utilizada na placa + micro-organismo). Serve para controle de crescimento.

Foi feito um controle positivo com antibiótico (oxitetraciclina a 15 µg/mL + micro-organismo) e um controle de esterilidade do caldo (apenas o caldo – sem micro-organismo).

#### 4.6.1.2. Concentração Mínima Bactericida (MBC)

Os tubos utilizados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizados para determinação da CBM. Uma alíquota (100 µL) de cada concentração a partir da CIM foi inoculada em placas de Ágar Müller-Hinton e posteriormente incubadas em temperatura e tempo adequado. A CBM é considerada a menor concentração da substância onde não houver crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado.

## 5. Resultados e discussão

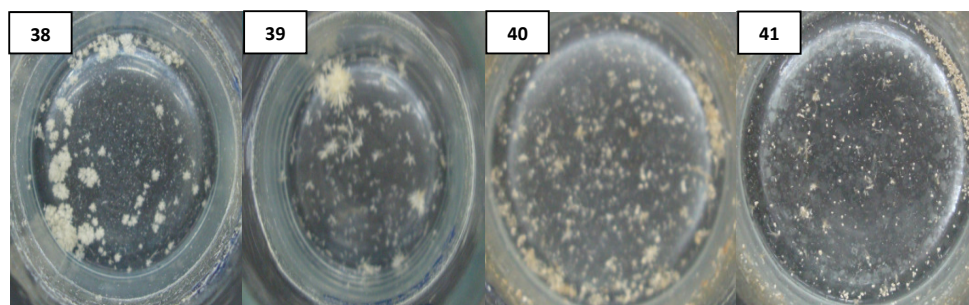
As análises em CCDC (FE: Sílica gel) indicaram que este extrato é composto por substâncias muito polares e que interagem fortemente com a sílica. Assim, seria necessário o uso de um adsorvente com uma polaridade inferior à da sílica para realizar o fracionamento, diminuindo as perdas por retenção destas moléculas na fase estacionária. A FE escolhida foi a Poliamida, um polímero de baixa polaridade utilizado em eluições no modo reverso. A TABELA 1 ilustra os eluentes utilizados e as frações recolhidas e a TABELA 2 as massas destas frações.

Ainda assim, uma parte do extrato ficou retida na FE após a eluição da coluna. Sendo necessário que esta fosse desempacotada para realizar a recuperação da FE.

Algumas frações apresentaram precipitado durante a evaporação do eluente. E, as frações 38 a 41 apresentaram-se na forma de cristais (FIGURA 2). Estas frações apresentaram bom rendimento para a realização dos testes antibacterianos futuros de acordo com a Tabela 2. Estes cristais foram analisados por CCDC como observado na figura 3. De acordo com esta análise estas frações ainda estão impuras, o que tornou necessário a continuação do processo de isolamento do metabólito majoritário presente. Estas frações foram submetidas à recristalização com o objetivo de se obter a substância majoritária isolada. As frações 38 (13,3 mg), 39 (16,3 mg), 40 (17 mg) e 41 (7,1 mg) foram enviadas para obtenção dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  a fim de se realizar sua elucidação estrutural.

Após a obtenção das 99 frações, o eluente foi eliminado em rotaevaporador e o liofilizado. Em seguida testou-se a solubilidade de cada fração (TABELA 3) foram comparadas por CCDC como observado na figura 4 e aquelas semelhantes foram reunidas para dar prosseguimento ao processo de purificação e isolamento de acordo com a Tabela 4 e Figura 5. As frações reunidas 27-31 e 32-35 apresentaram um precipitado de cor branca, insolúvel em metanol e solúvel em acetona, como mostrado na Figura 6. Estas frações foram recristalizadas para se isolar o precipitado da água-mãe. Foram enviados 10 mg do sólido, de cada fração, a fim de serem submetidos a métodos físicos de análise (IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e EM) para que sejam identificados.

Após estas análises e se for possível a elucidação estrutural de algumas substâncias isoladas, aquelas que possuírem massa suficiente, serão submetidas à avaliação de sua atividade contra *Aeromonas hydrophila*.



**Figura 2.** Frações 38, 39, 40 e 41, nas quais houve a formação de cristais. ( $m_{38}=5,24$  g;  $m_{39}=4,78$  g;  $m_{40}=5,26$  g;  $m_{41}=6,48$  g).

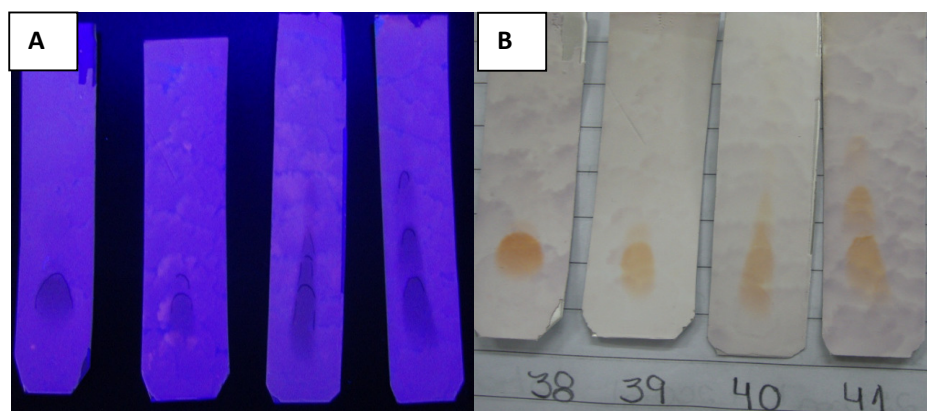
**Tabela 2.** Frações obtidas a partir do fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Poliamida).

Fração	Massa	Fração	Massa	Fração	Massa	Fração	Massa
01	5,49 g	27	5,58 g	53	5,61 g	79	5,43 g
02	6,55 g	28	5,55 g	54	5,55 g	80	4,16 g
03	7,39 g	29	5,62 g	55	5,64 g	81	6,83 g
04	12,34 g	30	5,54 g	56	5,56 g	82	0,01 g
05	5,81 g	31	5,98 g	57	5,48 g	83	5,82 g
06	5,83 g	32	5,68 g	58	5,68 g	84	0,03 g
07	5,23 g	33	5,35 g	59	5,48 g	85	5,83 g
08	5,74 g	34	5,46 g	60	5,41 g	86	6,43 g
09	5,33 g	35	6,04 g	61	5,36 g	87	5,72 g
10	5,35 g	36	6,13 g	62	5,59 g	88	5,77 g
11	5,57 g	37	5,61 g	63	5,46 g	89	5,78 g
12	8,04 g	<b>38</b>	<b>5,24 g</b>	64	5,74 g	90	0,001 g
13	5,44 g	<b>39</b>	<b>4,78 g</b>	65	5,55 g	91	0,001 g
14	5,92 g	<b>40</b>	<b>5,26 g</b>	66	5,50 g	92	0,001 g
15	1,00 g	<b>41</b>	<b>6,48 g</b>	67	5,40 g	93	0,001 g
16	5,38 g	42	5,57 g	68	3,13 g	94	0,002 g
17	5,62 g	43	5,45 g	69	5,33 g	95	0,0004 g
18	0,01 g	44	5,56 g	70	5,61 g	96	0,002 g
19	5,26 g	45	5,56 g	71	5,41 g	97	0,002 g
20	5,40 g	46	5,60 g	72	5,51 g	98	0,004 g
21	5,71 g	47	5,73 g	73	5,30 g	99	0,06 g
22	5,67 g	48	5,78 g	74	5,62 g		
23	5,83 g	49	5,64 g	75	5,60 g		
24	5,55 g	50	5,62 g	76	5,38 g		
25	5,63 g	51	5,54 g	77	5,53 g		
26	5,05 g	52	5,61 g	78	5,51 g		

**Tabela 3.** Frações reunidas e obtidas a partir do fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Poliamida).

Frações	Massas
1 - 4	4,5445 g
5 - 8	64,42 mg
9 - 13	15,90 mg
14 -15	7,72 mg
16 -19	11,95 mg
20 -22	7,50 mg
23 -26	6,83 mg
27 - 31	76,25 mg
*27 - 31	1,0465 g
32 - 35	29,66 mg
*32 - 35	5,41 mg
36 - 39	39,3 mg
40 - 41	10,49 mg
42 - 54	33,92 mg
55 - 80	16,19 mg
81 - 82	5,46 mg
83 - 84	5,00 mg
85 -99	Não apresentou massa suficiente

\*Precipitado

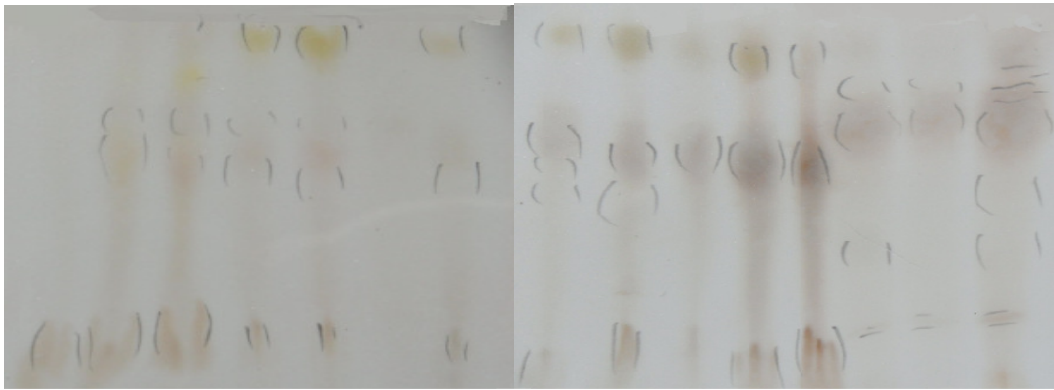


**Figura 3:** Análise por CCDC dos cristais obtidos a partir das frações 38 a 41. FE: Sílica gel 60, FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (4:6). **A:** UV 365 nm; **B:** revelador anisaldeído sulfúrico.

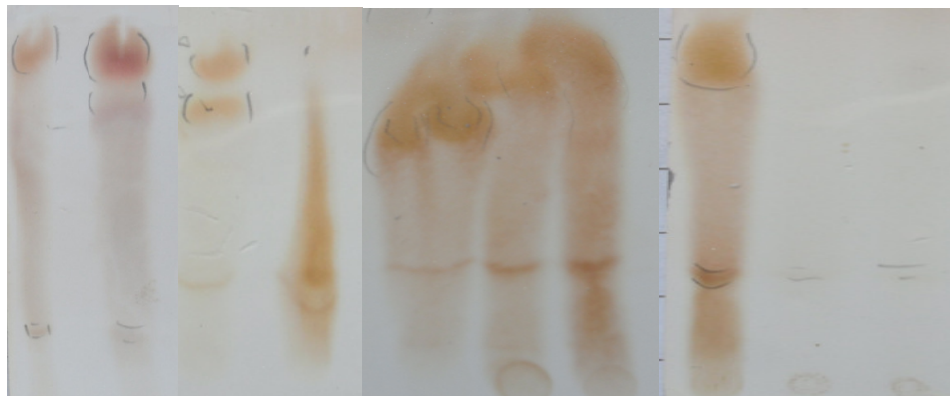
**Tabela 4.** Solubilidade das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Poliamida).

<b>Frações</b>	<b>Solubilidade</b>
<b>1 - 4</b>	Água
<b>5 - 8</b>	Água
<b>9 - 13</b>	Metanol
<b>14 -15</b>	Metanol
<b>16 -19</b>	Metanol
<b>20 -22</b>	Metanol
<b>23 -26</b>	Metanol
<b>27 - 31</b>	Metanol
<b>*27 - 31</b>	Acetona
<b>32 - 35</b>	Metanol
<b>*32 - 35</b>	Acetona
<b>36 - 39</b>	Metanol
<b>40 - 41</b>	Metanol
<b>42 - 54</b>	Metanol
<b>55 - 80</b>	Metanol
<b>81 - 82</b>	Metanol
<b>83 - 84</b>	Metanol
<b>85 -99</b>	Não apresentou massa suficiente

\*Precipitado

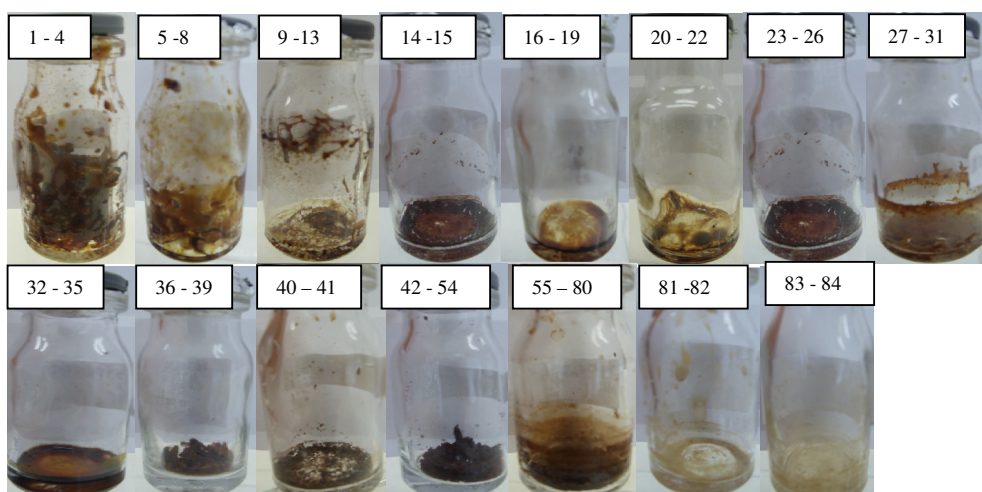


(1 - 4)(5) (6 - 8) (9 - 10) (11) (12) (13) (14) (15)(16 - 18) (20)(21) (22)(23 -24)(25 - 26)

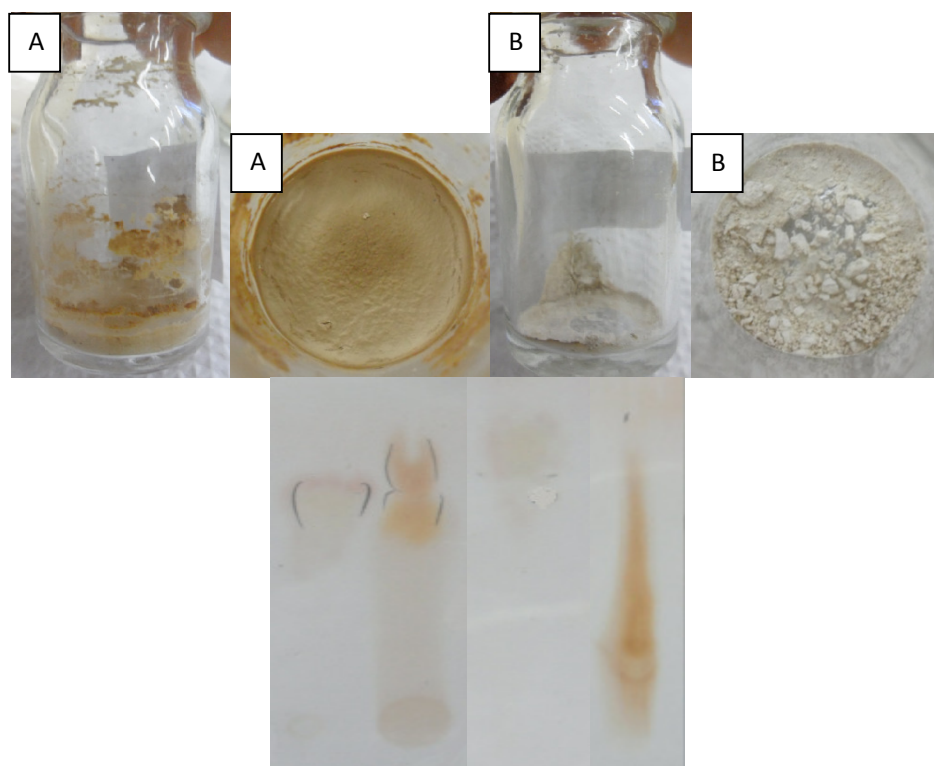


(23 - 24)(25 - 26)(27 - 31)(32 - 35)(36 - 9)(40 - 41)(42 - 54) (55 - 80)(81- 82)(83 -84)

**Figura 4 .** Análise por CCDC das frações que foram reunidas de 1 a 84. FE: Sílica gel 60, FM: BAW (Butanol: ácido acético: água) (5:1:4). Revelador anisaldeído sulfúrico.



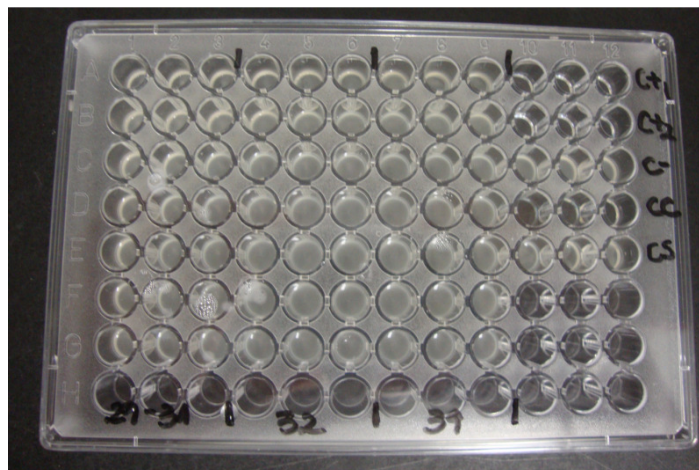
**Figura 5.** Frações reunidas 1 – 4; 5 – 8; 9 -13; 14 – 15; 16 – 19; 20 – 22; 23 – 26; 27 – 31; 32 – 35; 36 – 39; 40 – 41; 42 – 54; 55 – 80; 81 – 82 e 83 – 84, obtidas do fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Poliamida).



\*(27 – 31)\*\*(27 – 31)\*(32 – 35)\*\*(32 – 35)

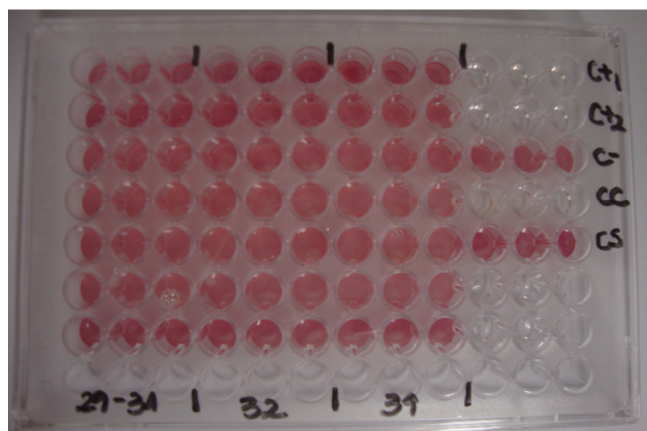
**Figura 6.** Precipitado sólido de cor branca das frações reunidas (A) 27 – 31 e (B) 32 – 35 e análise por CCDC do precipitado e água-mãe. FE: Sílica gel 60, FM : BAW (Butanol: ácido acético: água) (5:1:4). Revelador anisaldeído sulfúrico. (\*Precipitado; \*\*Água-mãe).

Foi realizado a partir das frações 38, 39 40 e 41 representantes dos flavonoides glicosilados e as frações 27-31 e 32-35 os testes antibacterianos (FIGURA 7).



**Figura 7.** Placa para testes antibacterianos em triplicada das frações 29-31, 32-35 e 39. Apresenta Controle Positivo, Controle Negativo, Controle do Caldo e Controle do Solvente.

Os testes antibacterianos para estas frações não apresentou Concentração inibitória Mínima, ou seja, não inibindo o crescimento bacteriano (FIGURA 8).



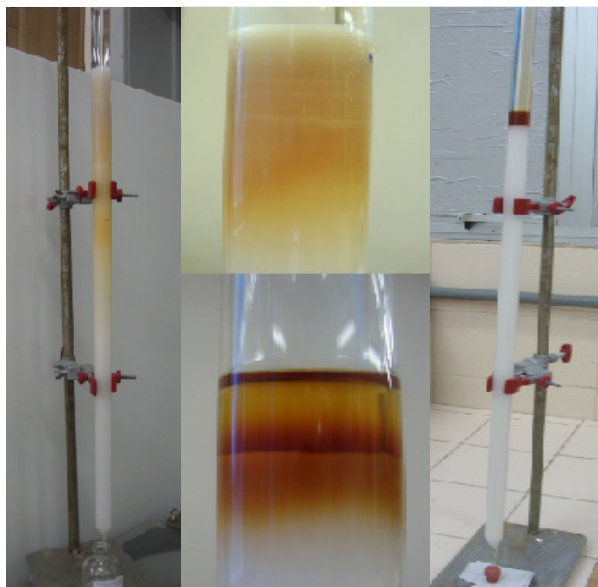
**Figura 8.** Placa para testes antibacterianos em triplicada das frações 29-31, 32-35 e 39. Apresentando coloração vermelha indicando crescimento bacteriano na presença das frações do fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *Magnifolia*.

A fração 36 – 39 (39,3 mg) foi submetida à separação por Coluna Cromatográfica. Sephadex LH-10 (marca<sup>®</sup>) e Metanol foram utilizadas para o fracionamento em coluna (Figura 7). As análises por cromatografia em camada delgada (CCDC) foram realizadas em placas cromatográficas (MENACHERY-NAGEL) recobertas com sílica gel 60. Foram obtidas 22 frações devido o fracionamento ser feito em duplicada (TABELA 5).

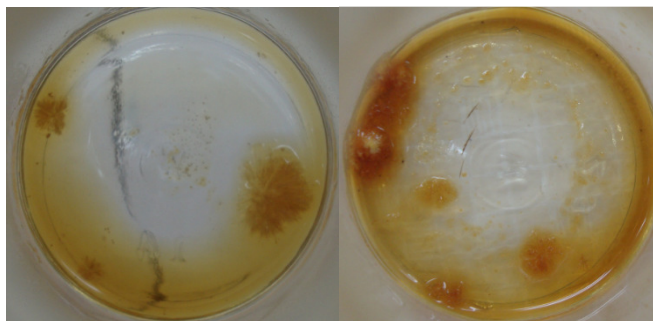
Algumas frações apresentaram precipitado durante a evaporação do eluente. E, as frações 3(I) e 3(II) apresentaram forma de cristais e precipitado (FIGURA 8). As frações foram submetidas à recristalização com Acetona a fim de se obter o metabólito majoritário presente. Após este processo foram analisados por CCDC como observado na Figura 9. As frações (I):3(I) e (II):3(II) foram reunidas e enviadas para obtenção dos espectros de RMN <sup>1</sup>H a fim de se realizar sua elucidação estrutural.

**Tabela 5.** Frações obtidas a partir do fracionamento da fração 36 - 39 proveniente do fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Sephadex LH-10).

Frações	Massa	Frações	Massa
1(I)	Indeterminada	1(II)	11,3 mg
2(I)	646 mg	2(II)	15,3 mg
3(I)	18,6 mg	3(II)	16,9 mg
4(I)	81,17 mg	4(II)	20,2 mg
5(I)	800,2 mg	5(II)	5,3 mg
6(I)	1,9 mg	6(II)	2,3 mg
7(I)	963,1 mg	7(II)	0,6 mg
8(I)	0,1 mg	8(II)	1,3 mg
9(I)	1,5 mg	9(II)	0,5 mg
10(I)	0,7 mg	10(II)	0,1 mg
11(I)	0,7 mg	11(II)	0,5 mg



**Figura 8.** Fracionamento em duplicada da fração 36 - 39 provenientes do fracionamento do extrato aquoso dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* em coluna cromatográfica. (FE: Sephadex LH-10).



**Figura 9.** Frações 3(I) e 3(II), nas quais houve a formação de cristais e precipitado. ( $m_{3(I)}=18,6$  mg;  $m_{3(II)}=16,9$  mg).



**Figura 10.** Análise por CCDC das frações 3(I) e 3(II). **(I):** 3(I) Metábólito Isolado; **(II):** 3(II) Metábólito Isolado; **(III):** 3(I) Metábólito não isolado; **(IV):** 3(II) Metábólito não isolado. FE: Sílica gel 60, FM: (Metanol: Ácido acético) (9,5: 0,5). Revelador anisaldeído sulfúrico.

## 6. Conclusões

As frações purificadas foram analisadas por RMN  $^1\text{H}$ , revelando que se trata de flavonoides glicosilados, mas ainda em mistura. Não foi possível chegar-se a estrutura dos metabólitos presentes, pois o espectro foi obtido em um aparelho de 60 MHz. Estas amostras foram enviadas para obtenção de um espectro em 500 MHz, sendo, possivelmente identificadas mesmo em mistura.

As frações semipurificadas então foram avaliadas quanto a sua atividade contra *Aeromonas hydrophila*, porém não apresentou atividade contra a bactéria.

## 7. Referências Bibliográficas

- ANDRADE, J.I.A. **Atividade antibacteriana dos extratos dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* (Trécul) contra *Aeromonas hydrophila* e fracionamento do extrato metanólico.** 2009. 40f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Universidade do Estado do Amazonas/Instituto de Pesquisas da Amazônia, Manaus.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). RDC Nº. 48, de 16 de março de 2004. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em 12 de dezembro de 2011.
- AOKI, T. **Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*).** In: Woo, P.T.K, Bruno, D.W. *Fish Diseases and disorders*. Cab International, p.427-476, 1999.
- ARNOUS, A.H, SANTOS A.S, BEINNER, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. *Rev. Espaço para a Saúde*, 6(2), p.1-6, 2005.
- BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Sci. Agric.*, 63(3), p.281-284, 2006.
- CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím. Nova*, 21(1), 1998.
- CUNICO, M.M.; DIAS, J.G.; MIGUEL, M.D.; OBDULIO, G.M.; AUER, C.G.; CÔCCO, L.C.; LOPES, A.R.; YAMAMOTO, C.I.; MONACHE, F.D. Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana* Miq. *Quím. Nova*, 29, p.746-749, 2006.

- DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control.**, 17, p. 474-483, 2006.
- GONZALEZ-SERRANO, C.J.; SANTOS, J.A.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; GONZALEZ, N.; OTERO, A. Virulence markers in *A. hydrophila* and *A. veronii* biovar sobria isolates from freshwater and from a diarrhea case. **J. Appl. Microbiol.**, 93(3), p.414-419, 2002.
- GRAF, J. Diverse restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. **J. Clin. Microbiol.**, 37(10):3194-3197, 1999.
- HEUZENROEDER, M.W.; WONG, C.Y.F.; FLOWER, R.L.P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates from *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. **FEMS Microbiol Lett.**, 174, p. 131-136, 1999.
- JEFFREYS, M.F., GONÇALVES, R.T., LIMA, R.D., ABREU, A.C.A., SERUDO, R.L., PEREIRA JR., O.L., SARGENTINI JR., E, AMARAL, I.L., NUNEZ, C.V. Quantification of the antioxidant activity of *Coussapoa asperifolia magnifolia* (Trécul) Akkermans & C.C. Berg (Cecropiaceae) and *Brosimum parinarioides* Ducke (Moraceae). **Pharmacol. Online**, 3, p. 348-351, 2006.
- MARTINS, L.M.; MARQUEZ, R.F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiol.**, 32 [S.1.], p. 237-242, 2002.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Edições UFC 1988. 128p.
- MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **Inter. J. Food Microbiol.**, v. 28, p. 157-168, 1995.

NUNEZ, C.V.; OLIVEIRA, M.L.; LIMA, R.D.; COLLANTES, I.E.; SARGENTINI JR, E.; PEREIRA-JR, O.; ARAÚJO, L.M. Chemical analyses confirm a rare case of seed dispersal by bees. **Apidologie**, v. 39, p. 618–626, 2008.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). Guidelines for drinking water quality. 3. ed. 2003. Disponível em: <[http://www.who.int/docstore/watersanitation\\_health/GDWQ/Updating/draftguidel/draftchap7.htm](http://www.who.int/docstore/watersanitation_health/GDWQ/Updating/draftguidel/draftchap7.htm)>.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3. ed. Nupélia, Maringá, 301 p. 2008.

RODRIGUES, D.P.; RIBEIRO, R.V.. *Aeromonas*. In: VIEIRA, R.H.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado – teoria e prática**. São Paulo: Varela. 2004. 380p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, p.598, 2004.

TANAKA, J.C.A.; SILVA, C.C.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; CARVALHO, J.E.; FOGGIO, M.A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Quím. Nova**, 28(5), p. 834-837, 2005.

TAVECHIO, W.L.G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **B. Inst. Pesca**, 35(2), p.335-341, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) - (antigo NCCLS) CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West. Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

Eloff JN 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med** 64: 711-713.