



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

Estudo fitoquímico biomonitorado do extrato etanólico da casca do caule de  
*Aspidosperma nitidum* Benth. (Apocynaceae)

Bolsista: Samara de Souza Rojas, CNPq.

MANAUS

2011



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

RELATÓRIO PARCIAL DO PIBIC

PIB-S/0090/2010

Estudo fitoquímico biomonitorado do extrato etanólico da casca do caule de  
*Aspidosperma nitidum* Benth. (Apocynaceae)

Bolsista: Samara de Souza Rojas

Orientador: Prof. Dr. Pierre Alexandre dos Santos

Colaboradoras: Jane Vasconcelos Neves Marinho

Maurianne Sales de Menezes Aquino

MANAUS

2011

## Resumo

Apocynaceae é típica de trópicos e subtropicais sendo constituída por 400 gêneros com cerca de 2000 espécies. É comum a presença de alcalóides tóxicos, principalmente os que apresentam núcleo indol. *Aspidosperma* é conhecido por seu potencial hipoglicemiante, hipolipêmico e antimalárico, provavelmente atribuídos aos metabólitos nitrogenados. Deste gênero destaca-se *Aspidosperma nitidum*, conhecida popularmente como carapanaúba, usada para diabetes, inflamação no útero e ovário, no combate ao câncer, problemas estomacais, contra febre e reumatismo. Estudos demonstraram a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato bruto. Diante dessas atividades terapêuticas relatadas pela população, neste trabalho objetivou-se realizar um estudo cromatográfico a partir do extrato etanólico da casca do caule de *A. nitidum* para a obtenção de frações purificadas ou semipurificadas e substâncias isoladas. Para isto, foi realizada uma partição do extrato etanólico com hexano, acetato de etila e butanol, a seguir cada fase foi submetida a um fracionamento cromatográfico e a partir de suas respectivas frações foram realizadas análises por cromatografia em camada delgada (CCD), visualizadas sob UV<sub>365</sub> e reveladas com anisaldeído e reagente de Dragendorff. Em todas as fases podemos observar uma mancha laranja quando reveladas com Dragendorff, característica de substâncias nitrogenadas. Isso demonstra que a espécie em questão pode possuir alcalóides, substâncias comuns ao gênero e que se apresenta rica em metabólitos secundários.

Palavras-chave: Apocynaceae, *Aspidosperma nitidum*, alcalóides, cromatografia.

## **Abstract**

*Aspidosperma* species have been commonly used in folk medicine as antimalarial, in the treatment of leishmaniasis, uterus and ovary inflammation, as contraceptive, in diabetes and stomach disorders; against cancer, fever and rheumatism. This genus is characterized by the occurrence of indole alkaloids. The aim of this work was to obtain fractions or substances from the crude extract from stem bark of this specie. The ethanolic crude extract was partitioned with hexane, ethyl acetate and buthanol. TLC analyses of the extract and fractions showed the presence of alkaloids and other metabolites. These fractions are being fractioned by column chromatography.

Key-words: Apocynaceae, *Aspidosperma nitidum*, alkaloid, chromatography

# Sumário

	<b>Resumo</b>	<b>iv</b>
	<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Levantamento bibliográfico</b>	<b>7</b>
2.1	Apocynaceae	7
2.2	<i>Aspidosperma</i>	8
2.3	Metabólitos secundários	9
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>11</b>
3.1	Objetivo Geral	11
3.2	Objetivos específicos	11
<b>4</b>	<b>Metodologia</b>	<b>12</b>
<b>5</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>15</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>22</b>
<b>7</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>22</b>
<b>8</b>	<b>Cronograma de atividades</b>	<b>26</b>

## 1 Introdução

O início do uso de plantas como medicamentos, na forma de tinturas, chás, pós, entre outras preparações, confunde-se com o início da humanidade, sendo elas, até hoje, parte de um sofisticado sistema de saúde, fortemente presente em comunidades pobres de países em desenvolvimento (NEWMAN *et al.*, 2000).

No entanto, mesmo países desenvolvidos têm voltado sua atenção ao potencial terapêutico do reino vegetal, dado que um número cada vez maior de medicamentos tem sido originado de estudos de plantas empregadas empiricamente com finalidade terapêutica (SCHMIDT *et al.*, 2008). No entanto, comparada ao número de plantas catalogadas no mundo, a quantidade de estudos que associem abordagens fitoquímica e farmacológica ainda é pequena (HEIRINCH, 2003).

Apocynaceae compreende cerca de 300 gêneros e 2.000 espécies tropicais e subtropicais. Na Amazônia, em particular, infusões da casca do caule de espécies de *Aspidosperma* são largamente empregadas contra doenças tropicais como malária e leishmaniose, inflamações, reumatismo e até câncer (PEREIRA *et al.*, 2007).

Um estudo químico-farmacológico com *A. nitidum*, espécie arbórea amplamente empregada na medicina popular da Região Amazônica brasileira como anti-inflamatório, levou ao isolamento de esteroides ( $\beta$ -sitosterol e estigmasterol), triterpenos pentacíclicos ( $\beta$ -amirina e lupeol), um inositol (L-2-O-metil-chiro-inositol), um alcaloide  $\beta$ -carbonílico (ácido 3-harmanocarboxílico) e à comprovação de atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico da casca do caule dessa espécie (PEREIRA *et al.*, 2006a). Outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa relata o isolamento de um alcaloide indólico inédito a partir da mesma droga vegetal, denominado braznitidumina (PEREIRA *et al.*, 2006b). Tais estudos credenciam *A. nitidum* como promissora fonte de moléculas bioativas.

## 2 Levantamento Bibliográfico

### 2.1 Apocynaceae

Diante dessa vasta flora com inúmeras propriedades capaz de combater os males que acometem a humanidade destaca-se a família Apocynaceae, a qual é caracterizada por produzir alcaloides tóxicos e ou medicinais (BARBOSA *et al.*, 2002) encontrada com frequência nos trópicos e subtropicais (FUMAGALI *et al.*, 2008). As espécies desta família são consideradas dicotiledôneas bem evoluídas e apresentam látex. Na flora brasileira são catalogadas como Apocynaceae mais de 400 espécies em 41 gêneros, sendo 32 destes encontrados apenas na Amazônia (PEREIRA *et al.*, 2006a).

A partir de espécies de Apocynaceae foram isoladas substâncias como glicosídeos cardiotônicos; ácidos ursólico e oleonólico com diversas atividades farmacológicas, glicosídeos cianogênicos; leucoantocianidinas; saponinas; taninos; cumarinas; ácidos fenólicos; triterpenos e esteroides (CARVALHO *et al.*, 2007). Também, nestas espécies são biossintetizados alcaloides indólicos com inúmeras atividades farmacológica como aspidoespermina (diurético, hipotensor e estimulante respiratório), olivacina (anticancerígeno), ioimbina (bloqueador  $\alpha$ -adrenérgico) (FUMAGALI *et al.*, 2008).

Espécies de Apocynaceae merecem destaque, como *Tabernaemontana salzmannii* rica em alcaloides indólicos monoterpênicos, marcadores biológicos do gênero, os quais apresentam atividade antitumoral, antimicrobiana, anti-hipertensiva, estimulante do sistema nervoso (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

*Himatanthus sucuuba* e *Plumeria rubras* são usadas na medicina popular brasileira. Infusões e decocções feitas com a casca de *Plumeria rubra* são usados como purgativo, antibacteriano, antitumoral e no tratamento de doenças venéreas. O látex de *Himatanthus sucuuba* é utilizado como fungicida, antianêmico, anti-inflamatório e no tratamento de câncer (BARRETO *et al.*, 2006).

As folhas de *Catharanthus roseus* eram usadas na Jamaica para fazer chá terapêutico para tratar o diabetes. A busca pelo princípio responsável por esta ação em *C. roseus* acabou levando à descoberta de duas substâncias com ação citostática. Esta descoberta conduziu ao desenvolvimento de dois medicamentos anticancerígenos com ampla utilização ainda atualmente - a vinblastina e a vincristina. Estas substâncias são alcaloides indólicos monoterpênicos diméricos, produzidos em quantidades muito pequenas nas folhas de *C. roseus* (MARINHO, 2001).

Para *Peschiera australis* relata-se que estudos químicos demonstraram a presença de voacangina e voacamina nos ramos. Estudos com espécies desse gênero evidenciaram para extratos brutos atividade antitumoral e citotóxica (RATES *et al.*, 1988).

## 2.2 *Aspidosperma*

A presença de alcaloides indólicos em *Aspidosperma*, principalmente os monoterpênicos conferem um amplo espectro de atividade biológica às espécies deste gênero, tais como antitumoral, antiplasmódica, antimicrobiana e antibacteriana consistentes muitas das vezes com suas utilizações populares. Dentre as suas atividades, a mais representativa é o seu potencial citotóxico frente à linhagem de células tumorais, como exemplo, a elipticina, um alcaloide indólico, o qual chegou a ser utilizado em ensaios clínicos no tratamento para o câncer (HENRIQUE; NONOMURA; POHLIT, 2009).

Este gênero é conhecido por sua ação hipoglicemiante (LINO; GARROTE, 2005) e hipolipemiante. *Aspidosperma subincanum* foi ativa em modelo de hiperlipidemia induzida por Triton WR 1339 em camundongos, reduzindo o nível de triglicérides sérico em 41% quando comparado aos animais normais. Esta espécie foi indicada para problemas associados ao aparelho digestivo, para o tratamento de diabetes e de hipercolesterolemia (DA SILVA *et al.*, 2010).

Estudos mostraram que o extrato alcaloídico de *A. ramiflorum* apresentou eficácia no tratamento de leishmaniose. Demonstrou-se também atividade antimalárica em extratos polares das cascas de *A. megalocarpon* (HENRIQUE *et al.*, 2009). Ensaio biológico com alcaloides monoterpênicos isolados da casca de *A. quebracho-blanco* indicaram atividade bloqueadora  $\alpha$ -adrenérgica e ação inibitória de músculo liso de tecidos de animais além de ação hipotensora e analgésica, e alcaloides das cascas das raízes e das folhas de *A. pyriformum* apresentam efeito hipotensivo (PEREIRA *et al.*, 2006a).

*A. nitidum* popularmente conhecida como “carapanaúba”, possui vasto uso popular na região Amazônica, como anticoncepcional, no tratamento de inflamações no útero e ovário, em diabetes, para problemas estomacais, contra câncer, febre e reumatismo. De extratos etanólicos da casca do caule desta espécie já foram isolados esteroides, triterpenos (PEREIRA *et al.*, 2006a), e os alcaloides 10-metoxidiidrocorinateol (ARNDT *et al.*, 1967), ácido 3-harmanocarboxílico e braznitidumina (PEREIRA *et al.*, 2006b). Ensaio biológico como edema de pata induzido e ação antinociceptiva foram realizados revelando que o efeito antinociceptivo foi detectado em segunda fase, indicando que não houve atuação do sistema

opiodérgico e quanto ao edema de pata observou-se uma redução do edema em relação ao controle do teste (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Dessa forma, fica evidente que estudos científicos de plantas brasileiras podem vir a alavancar a indústria de medicamentos no país, tendo consequências sócio-econômicas significativas pela diminuição de gastos com importação e a disponibilização de medicamentos mais baratos à população, além de aumentar a autonomia nacional para a criação e o gerenciamento de políticas de saúde (DOS SANTOS, 2001).

### **2.3 Metabólitos secundários**

Sabe-se que o principal fator responsável pelo potencial terapêutico dos organismos vegetais e animais é a presença de classe de substâncias denominadas de metabólitos secundários, os quais possuem um papel fundamental na adaptação do organismo ao seu ambiente. Estes aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim como, por exemplo, podendo atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas de patógenos, e também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas, fitoalexinas (FUMAGALI *et al.*, 2008).

Variações temporais e espaciais podem alterar o conteúdo de metabólitos secundários, bem como as proporções relativas destes nas plantas. Apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (PELLISSARI, 2008).

De acordo com estudos fitoquímicos, as principais classes de metabólitos secundários encontradas na casca do caule de *A. nitidum* são; alcalóides, taninos condensados, glicosídeos cardiotônicos e cumarinas, sendo estes relatados na literatura com várias aplicações terapêuticas.

As substâncias fenólicas possuem função de defesa contra o ataque de pragas. Tem-se observado que eles são capazes de reagir com radicais livres, estabilizando-os. Esse poder de neutralização das estruturas radicalares é devido a sua estrutura química formada por pelo menos um anel aromático com grupamentos hidroxilas. Pesquisas recentes têm destacado múltiplas funções e mecanismos importantes relacionados à habilidade das substâncias fenólicas de se ligarem a receptores celulares e transportadores de membrana, influenciando a expressão gênica, a sinalização e a adesão celular.

Estudos demonstram que as 13 plantas medicinais que apresentam percentuais de inibição da ECA superiores a 50% contêm taninos. Estes possuem a propriedade de precipitar proteínas devido à formação de ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas com essas macromoléculas. Portanto, essa ação talvez se deva por uma ligação inespecífica (ENDRINGER, 2007).

Os glicosídeos cardioativos são substâncias que contêm um ou mais resíduos de sacarídeo, apresentam gosto amargo e são extremamente tóxicos. Na medicina é usado para o tratamento de insuficiência cardíaca, no entanto, altas concentrações podem levar a efeitos drásticos na musculatura cardíaca devido a sua influência nas ATPases ativadas por  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Extratos de plantas contendo essas substâncias são usados no envenenamento de flechas por indígenas (PEDRINHO *et al.*, 2007).

Os alcaloides podem ser definidos como substâncias farmacologicamente ativas, contendo pelo menos um átomo de nitrogênio e derivados de aminoácidos (FUMAGALI *et al.*, 2008). Os alcaloides indólicos monoterpênicos estão restritos a quatro famílias: Loganiaceae, Rubiaceae, Apocynaceae e Nyssaceae. Estes possuem um núcleo indólico derivado do triptofano e uma unidade  $\text{C}_9$  ou  $\text{C}_{10}$  derivada da secologanina (MARINHO, 2001). Essa classe de substâncias é importante por sua acentuada ação sobre o sistema nervoso central, sendo muitos deles utilizados como venenos ou alucinógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Empregar técnicas de fracionamento cromatográfico para a obtenção de frações enriquecidas de fitoconstituintes e ou isolamento de substâncias, a partir do extrato etanólico do caule da espécie *Aspidosperma nitidum* Benth., avaliando o potencial anti-inflamatório das mesmas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar substâncias presentes no extrato etanólico da casca do caule da espécie *A. nitidum*;
- Quantificar as substâncias identificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a relação do potencial anti-inflamatório de frações e ou substâncias obtidas a partir extrato etanólico do caule da espécie *A. nitidum* com a atividade anti-inflamatória deste extrato.

## **4. Metodologia**

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

Amostras da casca do caule da espécie *Aspidosperma nitidum* foram coletadas na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas, Km 38, BR-174, Manaus, Amazonas. Exsiccatas da espécie foram encaminhadas ao herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) para identificação.

### **4.4 Preparação da droga vegetal**

Após a coleta, a casca do caule foi secada em estufa de ar circulante a 45 °C. Em seguida, o material foi pulverizado em moinho de facas, dando origem ao pó empregado na obtenção do extrato bruto.

### **4.3 Obtenção do extrato bruto**

Foi obtido um extrato etanólico a partir da matéria-prima vegetal seca e pulverizada por três ciclos de maceração à temperatura ambiente, durante 72 horas. O extrato assim obtido foi concentrado em rotaevaporador, levado à secura em evaporador centrífugo, pulverizado em graal e acondicionado em dessecador até utilização.

### **4.4 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)**

Foram utilizadas cromatoplaças de alumínio revestidas com sílica gel 60 F<sub>254</sub>, 0,2 mm de espessura (Macherey-Nagel) para análise do extrato bruto e das frações oriundas do seu fracionamento. As placas foram eluídas com diferentes sistemas de solventes e reveladas com reveladores específicos, para a verificação do grau de pureza e de características físico-químicas (COLLINS *et al.*, 1987).

### **4.5 Cromatografia em coluna**

O extrato etanólico bruto foi fracionado em colunas de sílica gel 60 (230-400 mesh) (fase estacionária), eluídas com solventes e ou sistemas de solventes de polaridades diferentes e crescentes (fases móveis), determinados pela análise prévia por CCDC. As novas frações

também foram submetidas à análise por CCDC e, aquelas consideradas semelhantes foram reunidas e fracionadas.

## 5 Resultado e Discussão

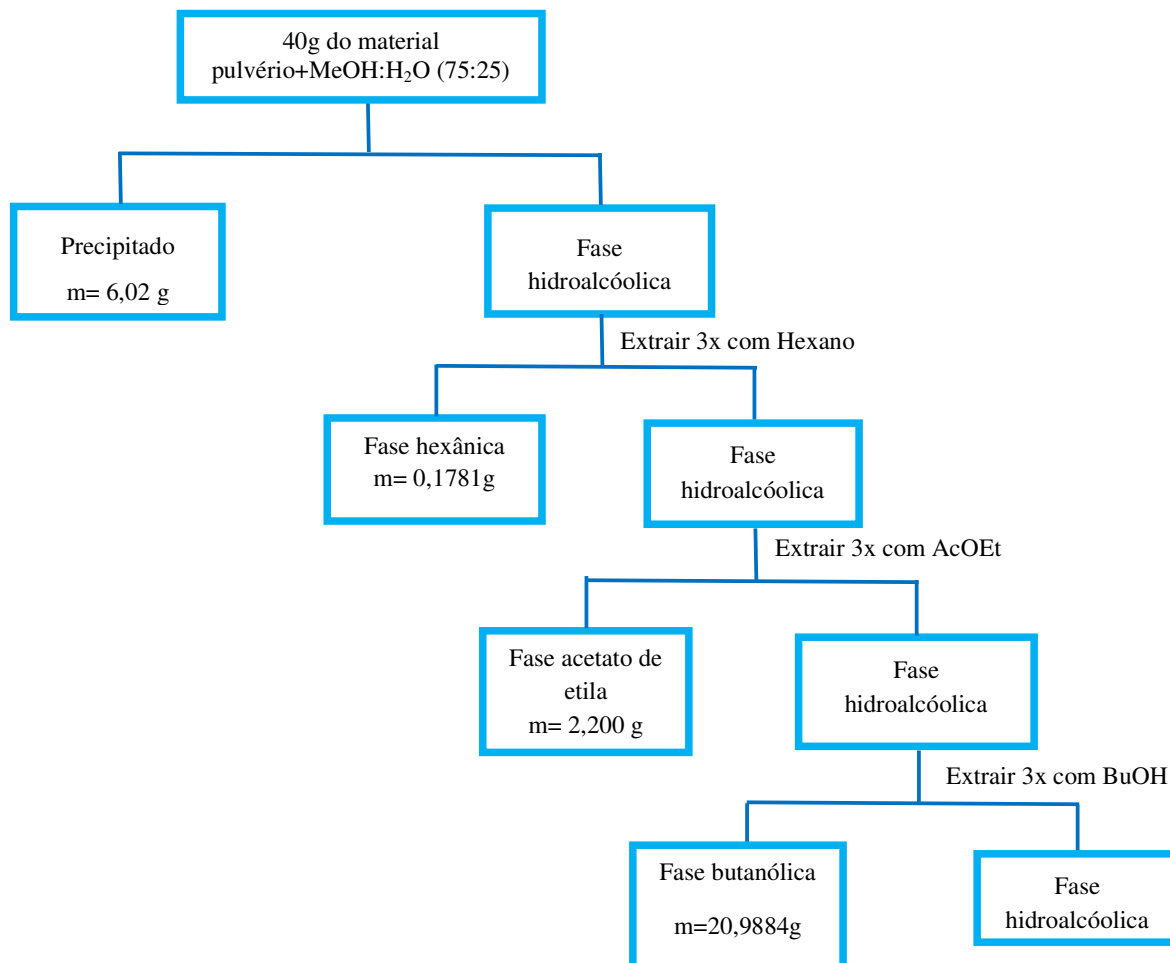
### 5.1 Fracionamento do extrato bruto

Durante o processo de solubilização do extrato bruto etanólico da casca do caule *Aspidosperma nitidum* em metanol: H<sub>2</sub>O (75:25) para a realização da partição, houve a formação de precipitado abundante, solúvel em piridina, o qual foi removido por filtração simples e secado por liofilização, obtendo-se assim um material com massa igual a 6,02 g, sendo reservado para posteriores estudos.

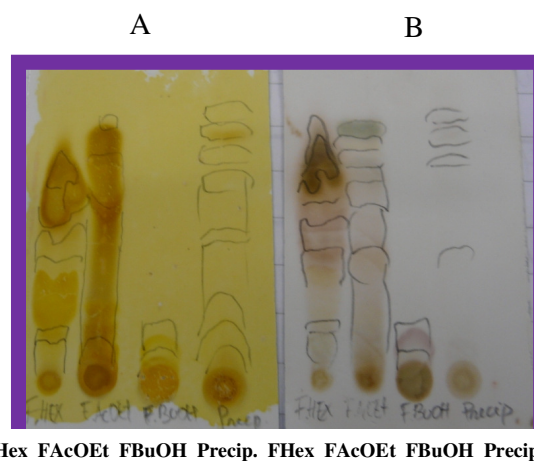
Depois da retirada do precipitado formado, procedeu-se à partição do extrato bruto (figura 1). A solução filtrada foi extraída com hexano e funil de separação, após a extração e separação das fases, a fase hidrometanólica foi extraída por mais duas vezes. As fases hexânicas foram reunidas. A fase hidrometanólica foi, em seguida extraída com acetato de etila, após a separação das fases a fase hidrometanólica foi extraída por mais duas vezes e as fases acetato de etila reunidas. Finalmente a fase hidrometanólica foi extraída, também por três vezes e as fases butanólicas reunidas. As fases orgânicas foram concentradas em evaporado rotatório. E em seguida, as fases butanólica e hidrometanólica foram secadas em liofilizador. As fases obtidas foram analisadas por CCDC para detectar a presença de substâncias de interesse, como alcaloides, classe de metabólitos secundários comprovadamente encontrada no extrato etanólico (figura 2).

A análise das placas (figura 2) revelou que todas as fases, inclusive o precipitado apresentam substâncias nitrogenadas (reveladas pelo reagente de Dragendorff) e outras substâncias reveladas por anisaldeído. Demonstrando assim que todas as fases são ricas em substâncias sendo estas promissoras para o fracionamento cromatográfico.

De acordo com o rendimento de cada fase e de seus respectivos comportamentos em sílica, realizou-se um fracionamento cromatográfico das seguintes fases: hexânica e acetato de etila. A fase hexânica apresentou um baixo rendimento (0,17 g), porém demonstrou ter muitas substâncias, enquanto que a fase acetato de etila apresentou um rendimento superior ao da fase hexânica, com cerca de 2,2 g. Já a fase butanólica mesmo sendo a que apresentou o



**Figura 1:** Partição do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma nitidum*.

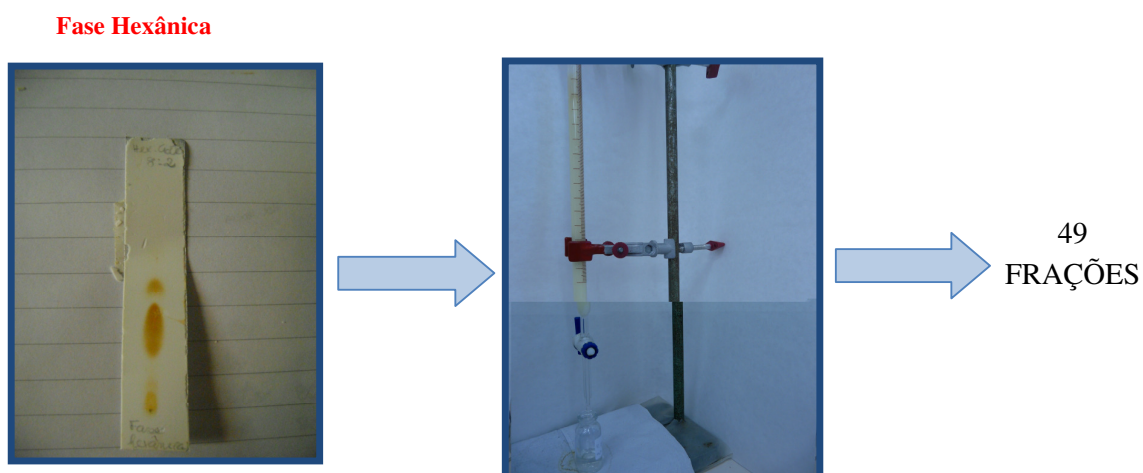


**Figura 2:** Cromatoplas das fases oriundas da partição e do precipitado reveladas respectivamente com Dragendorff (A) e anisaldeído (B). Fase estacionária = sílica gel; FM = DCM:AcOEt (3:7). (FHex = Fase Hexânica; FAcOEt = Fase acetato de etila; FBuOH = Fase butonólica; Precip. = Precipitado).

melhor rendimento com 20,98 g, é composta por substâncias polares, as quais ficaram retidas próximas à origem quando analisada por CCDC, cuja FE foi sílica. Desta forma, para o fracionamento desta fase será necessário a utilização de outras fases estacionárias.

## 5.2 Fracionamento em coluna da fase hexânica

A fase hexânica, após análise por CCDC, utilizando hexano:acetato (8:2) como fase móvel foi fracionada em coluna aberta com sílica gel 60 (230-400 mesh) (figura 3). Foram utilizados 100 mg de amostra, na proporção 1:30 (amostra:FE).



**Figura 3:** Fracionamento da fase hexânica eluido inicialmente com Hex:AcOEt 85:15 dando origem a 49 frações.

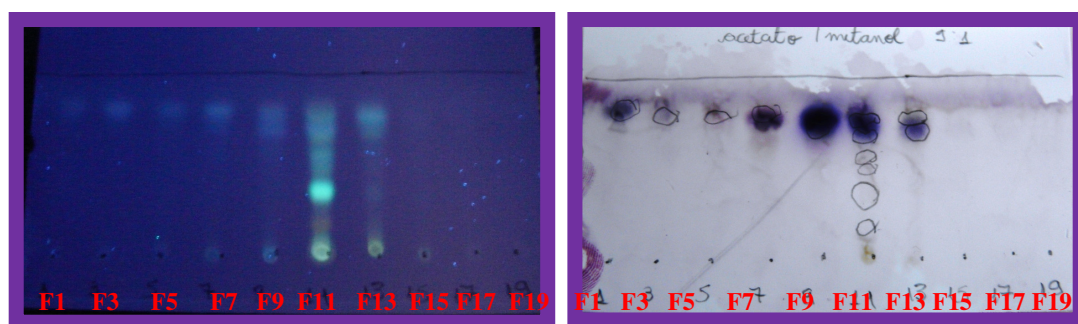
O volume morto medido foi 30 mL e a eluição da coluna foi iniciada com hexano 100%, com aumento gradual da polaridade da FM com adição de AcOEt 100 % e em seguida adição de MeOH até 100 %. Estes estão listados na tabela 1.

**Tabela 1:** Eluentes utilizados no fracionamento da fase hexânica.

1 Hex: AcOEt (85:15)	11 DCM: AcOEt (3:7)
2 Hex: AcOEt (8:2)	12 DCM: AcOEt (4:6)
3 Hex: AcOEt (7:3)	13 DCM: AcOEt (1:1)
4 Hex: AcOEt (6:4)	14 AcOEt: MeOH (9:1)
5 Hex: AcOEt (1:1)	15 AcOEt: MeOH (8:2)
6 Hex: AcOEt (4:6)	16 AcOEt: MeOH (7:3)
7 Hex: AcOEt (3:7)	17 AcOEt: MeOH (6:4)
8 Hex: AcOEt (2:8)	18 AcOEt: MeOH (1:1)
9 Hex: AcOEt (1:9)	19 MeOH 100%
10 DCM: AcOEt (2:8)	

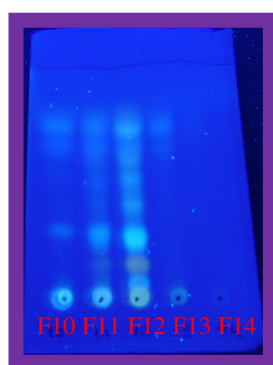
As 49 frações oriundas do fracionamento foram analisadas por CCDC, reveladas e aquelas semelhantes foram reunidas (figura 4).

Com base na análise das cromatoplasas foram reunidas as frações 1-5, 6-7, 8-9, 11-12 e 28-35.

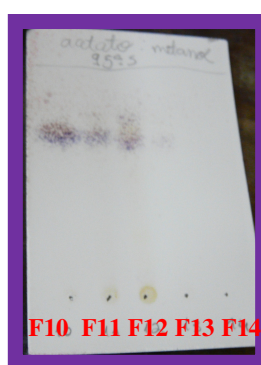


Reveladores: UV

Anisaldeído



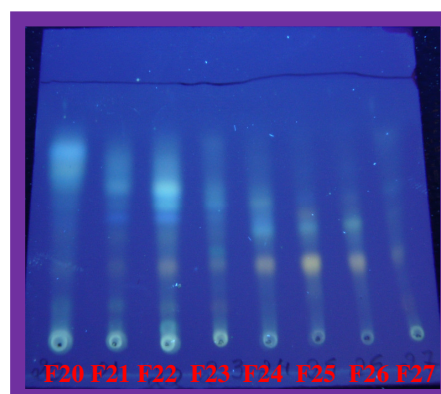
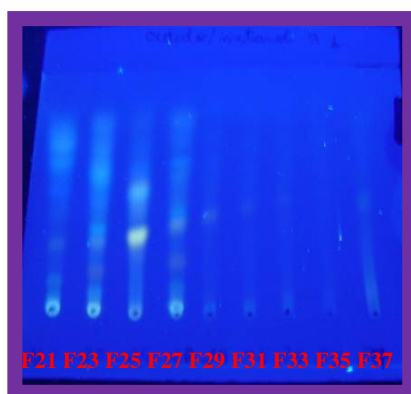
Reveladores: UV



Anisaldeído

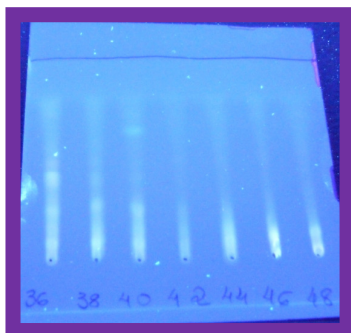


Dragendorff



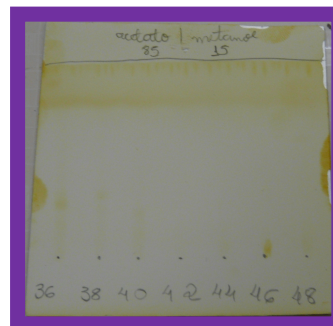
UV (365 nm)

**Figura 4:** Análise por cromatografia em camada delgada comparativa das 49 frações oriundas do fracionamento da fase hexânica, utilizando diversos reveladores. (Continua)



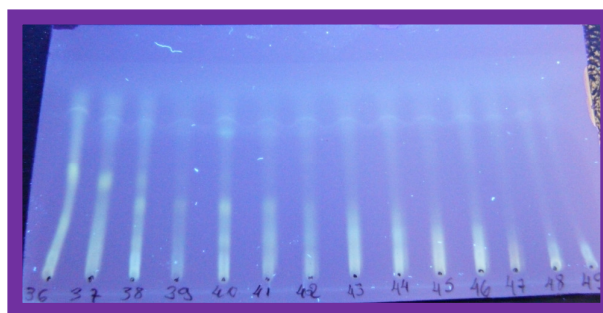
**F36 F38 F40 F42 F44 F46 F48**

**UV (365 nm)**



**F36 F38 F40 F42 F44 F46 F48**

**Iodo**



**F36 F37 F38 F39 F40 F41 F42 F43 F44 F45 F46 F47 F48 F49**

**UV (365 nm)**

**Figura 4:** Análise por cromatografia em camada delgada comparativa das 49 frações oriundas do fracionamento da fase hexânica, utilizando diversos reveladores. (Continuação)

### 5.3 Fracionamento da fase acetato de etila

Procedeu-se também um fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila utilizando apenas 2,054 g da mesma. Foram utilizados 140 g de sílica gel 60 como fase estacionária, sendo o volume morto medido de 600 mL, sendo coletadas 98 frações. Os eluentes utilizados e as frações coletadas estão esquematizados na Tabela 1. Após a obtenção das 98 frações, estas foram analisadas por CCDC e reunidas (figura 5).



**Figura 5:** Análise das frações 1-33 oriundas do fracionamento da fase acetato de etila após reunião. (FE: sílica gel 60, revelador: reagente de Dragendorf)

**Tabela 2:** Eluentes utilizados no fracionamento da fase acetato de etila do extrato bruto etanólico de cascas do caule de *Aspidosperma nitidum* e frações obtidas.

ELUENTES	FRAÇÕES
HEX: DCM (3:7)	01-02
HEX: DCM(2:8)	03-05
HEX: DCM(1:9)	05-08
HEX: AcOEt(2:8)	09-15
HEX: AcOEt(1:9)	16-27
DCM:AcOEt(8:2)	28-35
DCM:AcOEt(6:4)	36-37
DCM:AcOEt(1:9)	38-44
AcOEt:MeOH(9:1)	45-51
AcOEt:MeOH(8:2)	52-57
AcOEt:MeOH(7:3)	58-63
AcOEt:MeOH(1:1)	64-69
AcOEt:MeOH(3:7)	70-75

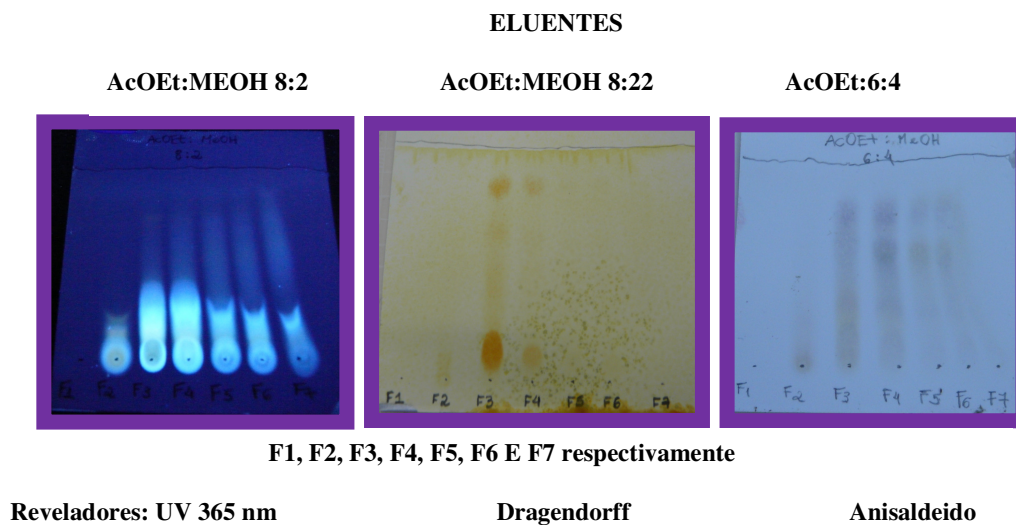
AcOEt:MeOH(2:8)	76-79
AcOEt:MeOH(1:9)	80-85
AcOEt:MeOH(05:95)	86-91
MeOH 100%	91-98

De acordo com as análises por CCDC das frações obtidas aquelas com perfil semelhante foram reunidas: 1-17, 18-22, 23-27, 28-33, 34-35, 36-38, 39-44, 45-49, 51-56, 57-60, 61-64, 65-69, 71-73, 75-78, 79-80, 81-84, 85-90 e 91-98.

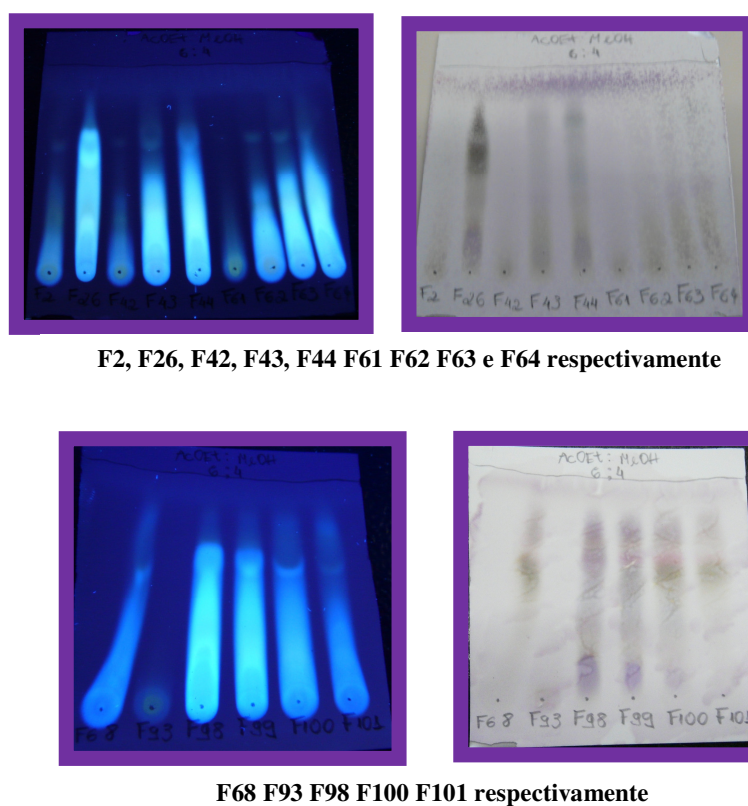
A fração 91-98 depois de evaporar todo o solvente apresentou cristais transparentes.

#### 5.4 Fracionamento da fase butanólica

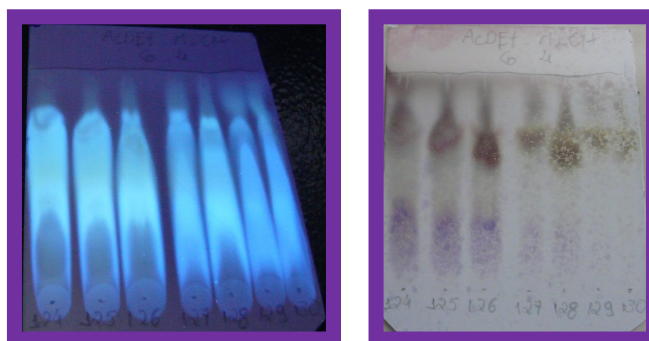
Foram utilizados cerca de 18 g da fase butanólica, os quais foram dissolvidos em MeOH. O fracionamento foi realizado em coluna de Sephadex LH-20<sup>®</sup>, pois a análise da placa cromatográfica revelou que seu metabólitos ficaram retidos próximo à origem (figura 2). A eluição da coluna foi realizada no modo isocrático utilizando MeOH como eluente e foram obtidas 192 frações, as quais foram analisadas por CCDC e reveladas com reagente de Dragendorff e anisaldeído. A reunião das frações 3 e 4 resultou na fração de maior rendimento (m= 1,55 g). Nesta fração podemos observar a presença não só de substâncias nitrogenados, quando a placa é eluída em AcOEt:MeOH 8:2, como também a de outras substâncias, as quais podem ser visualizar na figura 6 através das diversas manchas com coloração distintas presentes. As cromatoplasmas mostradas a seguir foram eluídas em AcOEt:MeOH 6:4 estão representadas pela figura 7.



**Figura 6:** Análise cromatográfica das frações 3 e 4 mostrando a presença de substâncias nitrogenadas quando reveladas com Dragendorff.



**Figura 7:** Análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas da fase butanólica. (Reveladores: UV<sub>365</sub> e anisaldeido). (Continua)



F124 F125 F126 F127 F128 F129 F130 respectivamente

**Figura 7:** Análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas da fase butanólica. (Reveladores: UV<sub>365</sub> e anisaldeído). (Continuação)

## 6 Conclusões

A fase hexânica da partição do extrato bruto etanólico das cascas do caule de *aspidosperma nitidum* apresentou pequena quantidade de massa. Contudo, sua análise por CCDC revelou ser esta um amostra complexa. A tentativa de fracionamento por coluna aberta de sílica não foi bem sucedida, pois, as frações obtidas ainda apresentavam-se complexas, porém com massa insuficiente para dar prosseguimento ao processo de purificação.

O fracionamento da fase acetato de etila levou à obtenção de cristais a partir das últimas frações da coluna. As outras frações estão sendo analisadas a fim de se prosseguir seu fracionamento.

O fracionamento da fase butanólica em coluna de Sephadex LH-20 não foi satisfatório. A análise por CCDC das frações obtidas mostra que estas apresentam-se ainda muito complexas e com pouca massa, à exceção das frações 3 e 4. As quais possuem cerca de 1,5 g e sua análise por CCDC sugere que apresentem pouca complexidade quanto a sua constituição.

## 7 Referências Bibliográficas

ARNDT, R.R. *et al.* Alkaloids studies - LVIII. *Phytochemistry*, v.6, p.1653-1658, 1967

- BARBOSA, L.F.; VIEIRA, I.J.C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; UCHOA, D. Estudo fitoquímico de *Aspidosperma illustre* (Apocynaceae). In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Livro de Resumos (Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T0942-1.pdf>. Acesso: 25/01/2011).
- BARRETO, A. S.; AMARAL, A. C. F.; SILVA, J. R. A.; SCHRIPISEMA, J.; REZENDE, C. M.; PINTTO, A. C. Ácido 15-desmetilisolplumierídeo, um novo iridoide isolado das cascas de *Plumeria rubra* e do látex de *Himathantus sucuba*. Química Nova, v.30, n.5, p. 1133-1135, 2006.
- CARVALHO, M. G. ; CARDOZO, M. A. R. ; SILVA, V. C. ; WERLW, A. A. ; Triterpenos e flavonóides isolados de flores de *Laseguea erecta* (Apocynaceae). Revista Colombiana de Ciência Química Farmacognóstica, v.36, n.2, p. 127-133, 2007.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (coord.). Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: Editora UNICAMP, 279p, 1987.
- DA SILVA, M. A. B.; MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, J. P. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SILVA, R. M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, n.4, p. 549-562, 2010.
- DOS SANTOS, M. H. Estudo químico de *Vismia latifolia* e dos frutos de *Rheedia gardneriana*, atividades biológicas dos constituintes químicos isolados e transformações químicas em 7-epiclusianona. 2001. 301f. Tese (Doutorado em Ciências - Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ENDRINGER, D. C. Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção do câncer. Tese de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- FIGUEIREDO, E. R.; VIEIRA, I. J. C.; SOUZA, J. J. ; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L.; KANASHIRO, M. M.; CORTÊS, F. H. Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica dealcalóides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmännii* A. DC., Apocynaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.20, n.1, p.75-81, 2010.

- FUMAGALI, E. ; GONÇALVES, R. A. C. ; MACHADO, M. F. P.S. ; VIDOTI, G. J. ; OLIVEIRA, J. A. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, n.4, p. 627-641, 2008.
- HEINRICH, M. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures. Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 3, 29-42, 2003.
- HENRIQUE, M. C.; NONUMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Alcalóides indólicos de casca de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. Química Nova, v.33, n.2, p.284-287, 2009.
- LAPA, A. J. *et al.* Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 5. ed. São Paulo: UNIFESP/EPM, 2008. 144 p. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. Natural Products Reports, v. 17, 215, p. 234, 2000.
- LINO, R. C. & GARROTE, C. F. D. Isolamento dos alcalóides indólicos presentes na casca do caule de *Aspidosperma subincanum* Mart., para a obtenção de padrões com finalidade de desenvolvimento de metodologia para doseamento com marcadores de matéria-prima vegetal. Revista Eletrônica de Farmácia, v.2, n.2, p. 107-109, 2005.
- MARINHO, S. R. M.; Função dos alcaloides indólicos monoterpênicos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Tese de Mestrado em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal. Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2001.
- MARINHO, S. R. M.; Função dos alcaloides indólicos monoterpênicos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Tese de Mestrado em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal. Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2001.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. Natural Products Reports, v. 17, 215, p. 234, 2000.

- OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J.C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.11, n.1, p.92-99, 2009.
- PEDRINHO, D.; PIVETTA, K.; FAVERO, S.; SOLON, S.; MATIAS, R.; YASUNAKA, D.. Efeito da adubação nitrogenada na biomassa e no teor de glicosídeos cardioativos da ornamental *Nerium oleander* L. **Ensaio e Ciencia**, Campo Grande, v.11, n.1, p. 59-66, 2007.
- PELLISARI, G. Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melampodium divaricatum* (RICH. IN PERS.) DC. (ASTERACEAE). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2008.
- PEREIRA, M. M. et al. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Química nova*, v. 30, n. 4, p. 970-83, 2007
- PEREIRA, M. M. et al. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2006a.
- PEREIRA, M. M. et al. NMR structural analysis of braznitidumina: a new indole alkaloid with 1,2,9-triabicyclo[7.2.1] system, isolated from *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 17, n. 7, p. 1274-80, 2006b.
- RATES, S. M. K.; CAUDURU, A. D.; SALAZAR, Z.; MORENO, P. H. R.; HENRIQUES, A. T.; Alcaloides indólicos em *Peschiera australis* (MUELL. ARG.) MIERS. VARS. *australis*. **Caderno de farmácia**, v. 4, n.1/2, p.51-62, 1988.
- SCHMIDT, B. et al. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 57, suppl. 1, p. S3-S9, 2008.

**8 Cronograma de atividades**

<b>Item</b>	<b>Descrição</b>	<b>Cumprido</b>	<b>Parcialmente cumprido</b>	<b>Não cumprido</b>
1	Levantamento bibliográfico			
2	Coleta e identificação da espécie			
3	Obtenção do extrato bruto			
4	Fracionamento do extrato bruto			
5	Elaboração do relatório parcial			
6	Identificação de substâncias			
7	Quantificação das substâncias identificadas			
8	Avaliação da atividade anti-inflamatória			
9	Elaboração do resumo e relatório final			
10	Preparação da apresentação final para o congresso			