

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

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Ambrosia artemisiifolia* L.

Bolsista: David de Souza Rosa, FAPEAM

MANAUS

2012

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

RELATÓRIO PARCIAL

PIB – E/0110/2011

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Ambrosia artemisiifolia* L.

Bolsista: David de Souza Rosa

Orientadora: Profª Drª Rita de Cássia Saraiva Nunomura

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura

MANAUS

2012

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas ao Departamento de Apoio à Pesquisa, Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, através do Programa Institucional de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas foi desenvolvida em parceria com o grupo de pesquisa de Prospecção e Aplicação de Micromoléculas Naturais da Amazônia, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	acetato de etila
ACN	acetonitrila
CBA	Centro de Biotecnologia da Amazônia
CCD	cromatografia em camada delgada
CCF	cromatografia em coluna filtrante
CG	cromatografia gasosa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DCM	Diclorometano
EC	extrato clorofórmico
EtOH	Etanol
HEX	Hexano
LS	lactonas sesquiterpênicas
MeOH	Metanol
OMS	Organização Mundial de Saúde
p. Ex.	Por exemplo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

RESUMO

Em meio à imensidão da flora amazônica, o presente trabalho vem a destacar os marcadores químicos da espécie vegetal *Ambrosia artemisiifolia* L. , pertencente à família Asteraceae, erva daninha conhecida popularmente como artemisia, arquemijo e catinga-de-bode e é encontrada com facilidade em solos argilosos, à beira de praias de rio. A sua predominante utilidade se encontra na medicina popular, através do chá das partes aéreas desta espécie, utilizada no tratamento de males estomacais e no combate a inflamações. A partir do extrato clorofórmico, oriundo de maceração a frio das partes aéreas de *A. artemisiifolia*, foi realizado o isolamento dos princípios ativos desta espécie, que são terpenóides contidos na divisão química das lactonas sesquiterpênicas. O material vegetal foi coletado na praia do CEASA à beira do Rio Negro, em Manaus. Primeiramente, para remoção da clorofila do extrato clorofórmico, fez-se uma filtração a vácuo em uma camada de celite, utilizando solventes orgânicos, obtendo-se as frações hidroalcoólica, hexânica e clorofórmica. A partir de análises por CCD utilizando o revelador químico anisaldeído, constatou-se maior possibilidade de presença dos marcadores químicos interessantes na fração hidroalcoólica, que foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica filtrante utilizando sílica gel 60 (Merck, 63-200 µm), para obtenção das frações diclorometano 100% e diclorometano/ acetato de etila (8:2). Para purificação final das LS, utilizou-se a técnica da CLAE.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3. OBJETIVOS	8
3.1 Geral.....	8
3.2 Específicos	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1 Modelo de estudo	9
4.2 Organização experimental	9
4.3 Procedimento de eliminação de clorofila de DSR – EC – 1.....	10
4.4 CCF da fração hidroalcoólica.....	10
4.5 Recristalização da fração DCM/ AcOEt 8:2.....	10
4.6 Testes por CCD do material recristalizado.....	11
4.7 Centrifugação das amostras recristalizadas.....	11
4.8 Análise de amostras em CLAE semipreparativo	11
4.9 Análise de pureza das amostras obtidas do CLAE	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1 Extratos clorofórmico e metanólico	13
5.2 Procedimento de eliminação de clorofila de DSR – EC – 1.....	13
5.2.1 Fração hidroalcoólica.....	13
5.2.2 Fração hexânica	14
5.2.3 Fração clorofórmica	14
5.3 Fracionamento a partir de CCF.....	15
5.4 Recristalização da fração DCM/ AcOEt 8:2.....	16
5.5 Testes por CCD das amostras recristalizadas	17
5.6 Centrifugação das amostras recristalizadas.....	18
5.7 Análises no aparelho de CLAE semipreparativo para isolamento de substâncias	18
5.8 Análise de pureza das substâncias obtidas no CLAE semipreparativo	19
6. CONCLUSÕES.....	22
7. REFERÊNCIAS	23

1. INTRODUÇÃO

O homem, ao longo da sua vida na Terra, sempre buscou explorar os recursos naturais do ambiente no qual se encontra. Normalmente busca alguma utilidade para estes recursos, sendo as finalidades clínicas as que mais se destacam, pelo fato de ser notável o avanço da comunidade científica quanto ao estudo de fontes de produtos com aplicações terapêuticas (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). Para curar as mais diversas enfermidades, o ser humano, no decorrer da sua existência, elaborou várias receitas medicamentosas (lambedores, chás, pós, xaropes etc.) partindo das mais variadas espécies de plantas (LORENZI & MATOS, 2002).

Uma planta medicinal consiste em toda e qualquer planta que, quando aplicada de alguma forma, por alguma via ao homem, é capaz de induzir um efeito farmacológico apreciável, através da cura de enfermidades e do alívio de dores ou moléstias (AKERELE, 1993). Normalmente, a busca pelo uso das plantas medicinais se deve a uma receita difundida na cultura de um determinado povo, podendo também advir do baixo custo exigido por este recurso, bem como do fácil acesso a este, principalmente no âmbito regional amazônico.

Eventualmente, o uso indevido de plantas desconhecidas, bem como a automedicação, podem acarretar efeitos nocivos no organismo humano. Para dirimir quaisquer incertezas sobre a atividade biológica, a toxicidade e a finalidade correta de um determinado extrato de uma planta medicinal, é necessário um minucioso estudo fitoquímico, associado a um controle de qualidade idôneo.

Neste projeto, realizou-se o isolamento de lactonas sesquiterpênicas presentes na espécie *Ambrosia artemisiifolia*, uma vez que essa classe de substâncias podem ser responsáveis pelas propriedades medicinais até então apreciadas na planta mas, sem atividade biológica comprovada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Amazônia ocupa cerca de 60% do território nacional. Dispersas nessa imensa extensão territorial, estão cerca de 33.000 espécies de plantas conhecidas, no entanto, estima-se que, no total, existam 80.000 espécies de plantas superiores. Das espécies de plantas conhecidas, cerca de um terço apresenta alguma utilidade popular, devido às suas características aromáticas, alimentícias ou medicinais (FERREIRA, 1998).

Uma das espécies mais abundantes na flora brasileira, em especial na amazônica, é a *Ambrosia artemisiifolia* L. Trata-se de uma erva daninha pertencente à família Asteraceae, que cresce em clima quente e úmido, em solos alagadiços – normalmente beiras de praias de rio e conhecida em várias regiões por diversos nomes populares: catinga-de-bode, artemísia, arquemijo, artemija, artemigem, absintio, dentre outros. Não são necessários muitos cuidados para o seu cultivo, visto que esta espécie é de natureza agressiva e colonizadora, considerada em alguns países uma praga (REVILLA, 2002; VIEIRA, 1992).

No gênero *Ambrosia*, a classe de compostos químicos mais conhecidos é a das lactonas sesquiterpênicas. Foi relatada nessa espécie a primeira ocorrência natural da LS diidrocurmanina (4), partindo do extrato clorofórmico das folhas da espécie, coletada próximo das cachoeiras do Chippawa Falls, Wisconsin, resultou em três substâncias cristalinas, duas dessasidênticas às já conhecidas curmanina (2), peruvina (5) e a diidrocurmanina (4) (classificadas como pseudoguaianolídeos), sendo essa última, uma substância que anteriormente só tinha sido identificada como um produto de redução da curmanina (2) (PORTER & MABRY, 1969).

A partir de investigações sistemáticas do gênero *Ambrosia* (Asteraceae), em 1969, foi descrito o isolamento e a determinação de estrutura de uma nova lactona sesquiterpênica, de esqueleto germacranolídeo. Analisando o extrato clorofórmico de folhas secas ao ar de *A. artemisiifolia* coletada em Austin, Texas, o extrato forneceu 1,5% de rendimento de uma substância, a qual foi nomeada de artemisiifolina (1). Também foi isolado como uma substância minoritária a isabelina (9) (PORTER *et al.*, 1970).

Apesar do grande número de estudos já realizados de *A. artemisiifolia* (HERZ & HOGENAUER, 1961; PORTER & MABRY, 1969; PORTER *et al.*, 1970), em 1999 foi descrito o isolamento e purificação de duas lactonas sesquiterpênicas, a paulitina (7) e a isopaulitina (6), de partes aéreas de amostras de *A. artemisiifolia* compradas na cidade de Salvador (BA), até então desconhecidas para a espécie (DAVID *et al.*, 1999).

A partir do trabalho desenvolvido por VALDIVINO (2005), foi possível o isolamento de duas lactonas sesquiterpênicas: ambrosina (3) e damsina (8). Ambas são classificadas, a partir de seus esqueletos, como pseudoguaianolídeos. Possuem propriedade moluscicida comprovada por Shoeb e El Emam (1976) (GEERTS *et al.*, 1991). Também são descritas atividades citotóxica e antitumoral de ambas. A presença do grupo α -metileno- γ -lactona foi associado como exigência estrutural essencial de LS para a atividade antiulcerogênica (RODRÍGUEZ, 1997; GIORDANO *et al.*, 1990). Esse é o primeiro relato do isolamento destas em *A. artemisiifolia*.

Usualmente, para a obtenção de substâncias isoladas, são utilizadas várias técnicas cromatográficas. Na cromatografia líquida, as substâncias são separadas mediante a partição entre um líquido móvel e uma fase estacionária 'sólida'. A escolha dos tipos de fases móvel e estacionária variam de acordo com o analito; caso o analito seja apolar (p. Ex.: lactonas sesquiterpênicas), a fase estacionária deve ser polar, para que não retenha a substância que se queira visualizar, e, conseqüentemente, para que haja a eluição, a fase móvel deve possuir baixa polaridade, para que assim possa interagir com os analitos. (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

Para o isolamento de substâncias no aparelho de CLAE semipreparativo, é necessário investigar um método que forneça uma boa separação dos picos, que são os sinais fornecidos pelas substâncias nas amostras, uma boa resolução, ou seja, picos não muito largos. É insuficiente constatar a separação de substâncias em um cromatograma apenas pelo tempo de retenção; deve-se também avaliar a largura dos picos para classificar qualitativamente o processo cromatográfico. Picos muito largos indicam a ocorrência de processos não cromatográficos ao longo da análise, que devem ser minimizados (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

A Figura 1 exemplifica algumas lactonas sesquiterpênicas isoladas, encontradas na literatura.

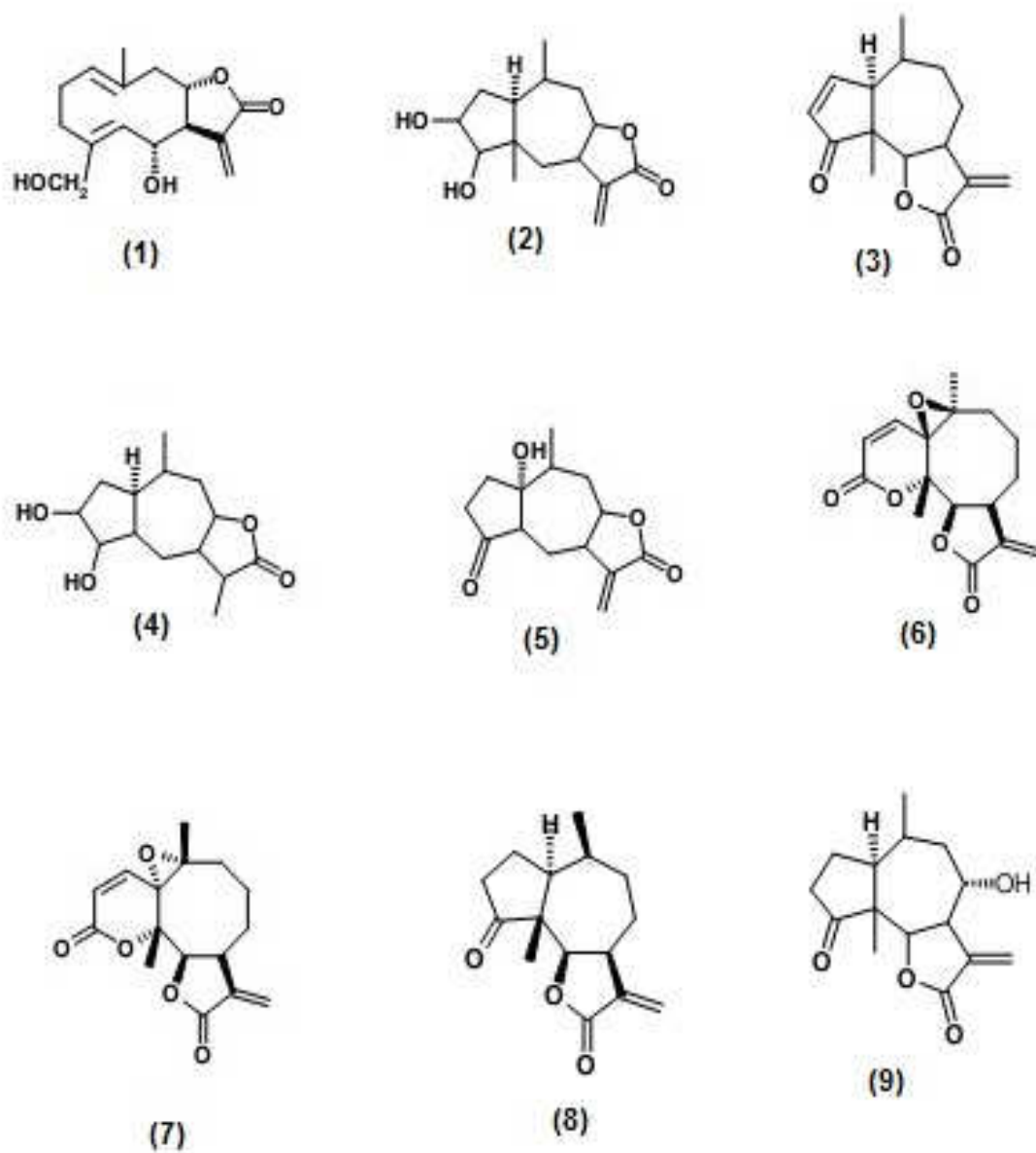


Figura 1. Lactonas sesquiterpênicas isoladas de *A. artemisiifolia* (STEFANOVIC *et al.*, 1987; PORTER & MABRY, 1969; PORTER *et al.*, 1970; DAVID *et al.*, 1999; VALDIVINO, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Isolar e identificar lactonas sesquiterpênicas de *Ambrosia artemisiifolia* L.

3.2 Específicos

- Preparar extratos buscando isolar os marcadores químicos de interesse (lactonas sesquiterpênicas);
- Isolar as principais lactonas sesquiterpênicas presentes nas partes aéreas de *Ambrosia artemisiifolia* L (Asteraceae);
- Avaliar atividade antiulcerogênica das lactonas sesquiterpênicas isoladas;
- Realizar estudo de atividade antiinflamatória dos extratos e frações obtidos;
- Avaliar por CLAE os extratos aquosos de *Ambrosia artemisiifolia* L. Coletados de diferentes localidades para avaliação da variabilidade química.

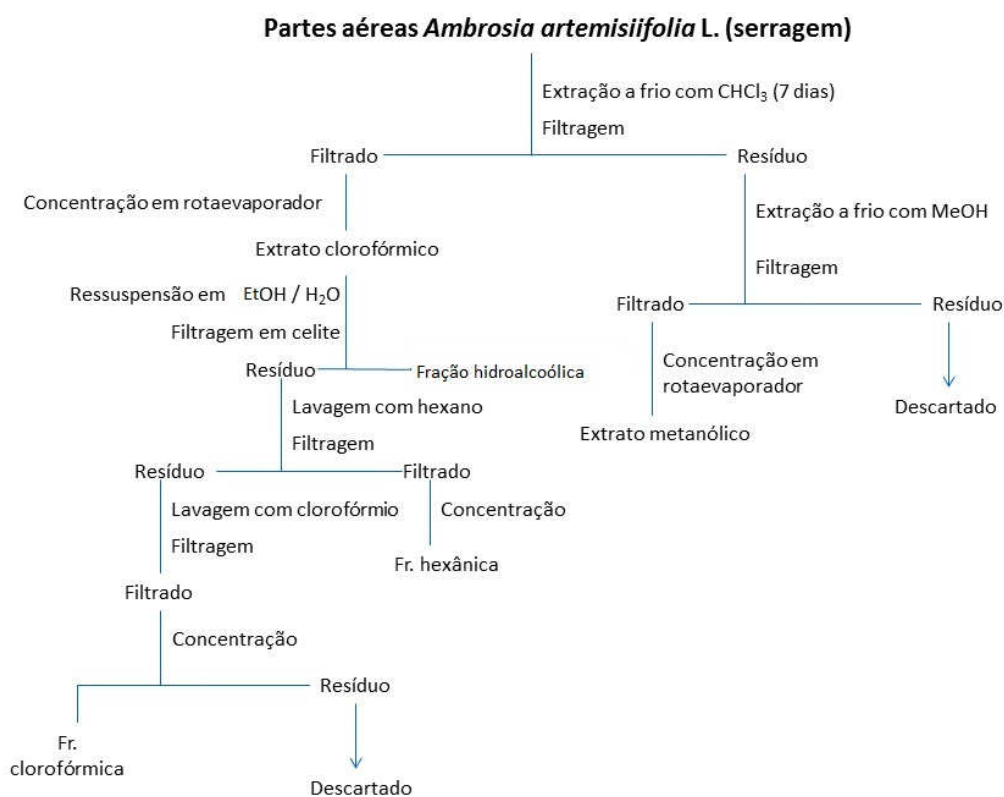
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de estudo

Trata-se de um estudo experimental que tem como objetivo o estudo fitoquímico e da atividade biológica das partes aéreas de *Ambrosia artemisiifolia* L. na busca de seus princípios ativos.

4.2 Organização experimental

Inicialmente foram realizados estudos preliminares com amostras de extratos e frações armazenadas no banco de extratos do grupo de pesquisa do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM), localizado no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Posteriormente, realizou-se a coleta do material botânico no Porto do CEASA. Em seguida, após a moagem, o material coletado foi submetido a um procedimento sequencial de extração a frio, primeiramente com clorofórmio e depois com metanol, que foram concentrados em rotaevaporador e transferidos para frascos pesados e codificados: DSR – EC – 1 e DSR – MeOH – 1, respectivamente. Os aspectos inerentes à parte experimental já realizada seguem a metodologia segundo VALDIVINO (2005), descrita pelo fluxograma abaixo:



Esquema 1. Obtenção dos extratos brutos e fracionamento do extrato clorofórmico

Para o desenvolvimento experimental deste projeto, seguiu-se a mesma metodologia adotada por VALDIVINO (2005), no que tange ao preparo dos extratos brutos, bem como aos fracionamentos para isolamento dos marcadores químicos de *A. artemisiifolia* L. Primeiramente, obteve-se extratos brutos de partes aéreas da planta a partir de macerações a frio com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (clorofórmio e depois metanol).

4.3 Procedimento de eliminação de clorofila de DSR – EC – 1

Nesta etapa, realizou-se uma filtração a vácuo em celite, com o auxílio de um funil de Büchner. É necessária a ressuspensão do extrato clorofórmico em uma solução de etanol/água 7:3, sendo que deve haver uma proporcionalidade entre a massa de extrato e a quantidade de solução: para cada 2 gramas de extrato, utilizam-se 70 mL de solução, logo, 7,65 gramas de extrato requerem a utilização de 270 mL de solvente. A sequência utilizada foi EtOH/ H₂O 7:3, hexano 100% e, por fim, clorofórmio 100%.

4.4 CCF da fração hidroalcoólica

Os marcadores químicos de interesse (lactonas sesquiterpênicas) são de natureza apolar, portanto, constituintes polares devem ser interpretados como possíveis interferentes, sendo necessária a sua remoção. Para tal, utilizou-se uma coluna de vidro de 3 cm de diâmetro e 12 cm de altura. Como fase estacionária, foi utilizada sílica gel 60 Merck (63 – 200 µm) de fase normal, e diclorometano foi o solvente utilizado no sistema de eluição, primeiramente a 100%, depois em mistura com acetato de etila a 8:2, respectivamente. Neste procedimento é importante resguardar uma proporção de 1:10 entre massas de amostra e sílica, respectivamente. Foram utilizados aproximadamente 4,7 gramas de amostra, logo, 47 gramas de sílica foram empacotados na coluna.

4.5 Recristalização da fração DCM/ AcOEt 8:2

A fração DCM/AcOEt 8:2 foi submetida a um processo de purificação mediante recristalização. Neste procedimento, é necessário encontrar um solvente ou uma mistura de solventes que solubilize da forma mais seletiva possível as impurezas, permitindo a separação. O solvente mais adequado foi a mistura MeOH/H₂O 7:3. Primeiramente foi adicionada uma pequena quantidade de metanol e aquecida a amostra em seguida para solubilização completa. Depois, adicionou-se uma quantidade de água mantendo a proporção 7:3, ocorrendo turvação. Depois disso, as amostras foram postas para resfriar. Após aparecimento dos cristais (cujas massas estão listadas na tabela 6 localizada no item 5.5), estes foram filtrados e lavados com o solvente de recristalização gelado.

4.6 Testes por CCD do material recristalizado

Segundo o trabalho desenvolvido por VALDIVINO (2005), amostras analisadas em placas de sílica de fase normal no sistema DCM/ acetona 95:5, utilizando o revelador anisaldeído, gera manchas com colorações laranja e amarela, correspondentes às lactonas sesquiterpênicas.

4.7 Centrifugação das amostras recristalizadas

Para retirada de interferentes (compostos insolúveis em metanol) as amostras obtidas da recristalização foram transferidas para frascos tipo eppendorfs. É importante que haja um equilíbrio de massa simétrico no rotor da centrífuga, por isso, os frascos foram pesados de forma que se aproximassem bastante de uma mesma massa estipulada, havendo assim um equilíbrio, evitando danificação do aparelho e garantindo, de certa forma, uma centrifugação mais eficiente.

4.8 Análise de amostras em CLAE semipreparativo

Dos materiais sobrenadantes obtidos da centrifugação, foram retiradas alíquotas, que foram solubilizadas em metanol e injetadas no CLAE com a finalidade de determinar o método de separação mais adequado. Testou-se a mistura de solventes metanol/ água, como fase móvel, e uma coluna analítica Shim-pack PREP – ODS (H) KIT de dimensões 4,6 x 250 mm, de fase reversa. O fluxo utilizado foi de 1 mL/ min de MeOH/ H₂O, que gerava uma pressão de 3200 psi. Depois de o método ser adaptado para a coluna preparativa do mesmo kit, (dimensões 20 x 250 mm) realizou-se a separação de substâncias. O fluxo utilizado foi de 12 mL/ min, que gerava uma pressão igual à anterior. Foi feita uma injeção preliminar de 40 µL para avaliar a reprodutibilidade do método e, depois, efetuadas injeções de 150 µL, sem comprometer a resolução dos picos. As substâncias foram coletadas em balões de fundo redondo, sendo, em seguida, concentradas em rotaevaporador e postas para congelar. Por fim foram liofilizadas, transferidas para frascos transparentes e pesadas. Segue o método utilizado:

Tabela 1. Método utilizado para isolamento e análise de pureza das substâncias

Tempo (min)	Proporção MeOH/ H ₂ O
0	4 : 6
30	5,5 : 4,5
40	5,5 : 4,5
45	4 : 6

4.9 Análise de pureza das amostras obtidas do CLAE

Das amostras referentes aos picos nos cromatogramas obtidos, foram retiradas alíquotas e solubilizadas em metanol a 1 mg/ mL. Daí estas foram submetidas a injeções utilizando a coluna analítica mencionada anteriormente para avaliar a pureza das substâncias obtidas. Primeiramente, utilizou-se a mesma mistura de solventes como fase móvel e, depois, alterada para acetonitrila/ água para testar a seletividade dos solventes. A programação do método referente à segunda mistura de solventes encontra-se na tabela 2:

Tabela 2. Método utilizado em análise de pureza e purificação de substância.

Tempo (min)	Proporção ACN/ H ₂ O
0	2 : 8
30	2 : 8

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extratos clorofórmico e metanólico

Das macerações a frio, realizadas com os 227,5 gramas de serragem obtidos após a moagem das partes aéreas de *A. artemisiifolia* L. , obteve-se os extratos clorofórmico e metanólico:

Tabela 3. Massas e rendimentos dos extratos obtidos

Extrato	Código	Massa (g)	Rendimento (%)
Clorofórmico	DSR – EC – 1	7,6541	3,36
Metanólico	DSR – MeOH – 1	13,8000	6,06

5.2 Procedimento de eliminação de clorofila de DSR – EC – 1

Segundo o item 4.3 do Procedimento Experimental, foi realizada uma filtração em celite sob vácuo para remoção de clorofila do extrato clorofórmico. A partir deste procedimento foram obtidas três frações: hidroalcoólica, hexânica e clorofórmica, descritas nas figuras 2 a 6.

5.2.1 Fração hidroalcoólica



Figura 2. Filtragem com EtOH/H₂O 7:3

Como é possível perceber na Figura 2, a camada de celite tinha uma coloração verde escura, bastante negra. Nesta fração estão os constituintes químicos de interesse.

5.2.2 Fração hexânica



Figura 3. Lavagem com hexano



Figura 4. Celite pós hexano

Nesta etapa, percebeu-se que a camada de celite tornou-se um verde de tonalidade mais clara, certamente pelo fato de ter retido os pigmentos da planta (clorofila). A fração hexânica possui uma coloração bastante negra, certamente pelo fato de ter arrastado os óleos e gorduras da planta, dada a natureza bastante apolar do solvente utilizado (hexano).

5.2.3 Fração clorofórmica



Figura 5. Lavagem com clorofórmio



Figura 6. Celite pós-clorofórmio

Após a lavagem com clorofórmio, a camada de celite praticamente retornou à sua coloração original; o material nela retido (certamente pigmentos) foi quase que totalmente arrastado pelo clorofórmio.

As informações quantitativas deste procedimento estão descritas na tabela 4:

Tabela 4. Massas e rendimentos das frações da remoção de clorofila

Fração	Código	Massa (g)	Rendimento (%)
Hidroalcoólica	DSR – EtOH – 9	4,9716	64,95
Hexânica	DSR – Hex – 9	2,7174	35,50
Clorofórmica	DSR – CHCl ₃ – 9	0,2567	3,35

A partir da tabela 4, é possível perceber a alta afinidade entre o extrato clorofórmico e a solução EtOH/ H₂O 7:3, visto que este apresentou o maior rendimento. A fração hexânica também apresentou um alto rendimento, ou seja, o extrato clorofórmico fornece uma quantidade significativa de matéria que interage com o hexano. O clorofórmio forneceu o menor rendimento, certamente pelo fato de ser apenas uma purga da camada de celite, retirando desta somente o que não foi arrastado pelos solventes anteriores.

5.3 Fracionamento a partir de CCF

Segundo o item 4.4 do Procedimento Experimental, 4,7 g da fração hidroalcoólica do procedimento de remoção de clorofila foram submetidos a um procedimento de purificação por cromatografia em coluna filtrante. As frações obtidas a partir deste estão descritas na tabela 5.

Tabela 5. Massas e rendimentos das frações da CCF

Fração	Nome	Massa (g)	Rendimento (%)
1	DCM 100%	1,7804	37,88
2	DCM/ AcOEt 8:2 balão	1,2900	27,44
2	DCM/ AcOEt 8:2 banho	0,3000	6,38
3	Purga AcOEt 100%	0,6954	14,79
4	Purga MeOH 100%	0,6410	13,64

A fração DCM 100% forneceu o maior rendimento, e arrastou consigo impurezas de baixa polaridade, resquícios que não foram retirados pelo hexano no procedimento de remoção de clorofila. A fração DCM/ AcOEt 8:2 forneceu o segundo maior rendimento, e arrastou consigo substâncias de baixa a média polaridade, ou seja, certamente as lactonas sesquiterpênicas estão presentes nesta fração. A sílica da coluna ainda apresentou coloração esverdeada após

ser utilizada, por isso foi feita a purga com AcOEt, para retirar o restante de material impregnado na sílica e, em sequencia, outra purga com MeOH.

Após a concentração das frações obtidas, constatou-se o aparecimento de cristais em forma de agulhas na fração DCM/ AcOEt 8:2 conforme a Figura 7.

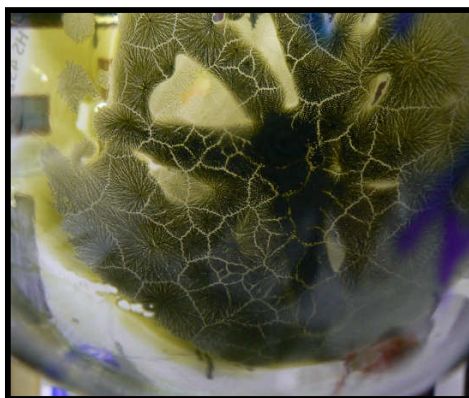


Figura 7. Cristais da fração DCM/ AcOEt 8:2

5.4 Recristalização da fração DCM/ AcOEt 8:2

Na fração DCM/ AcOEt 8:2 da coluna filtrante, após evaporação do solvente, percebeu-se a presença de cristais bem definidos, em forma de agulhas. Esta fração foi submetida ao procedimento de recristalização com EtOH/ H₂O 7:3, seguido de filtração e lavagem dos cristais com esta mistura de solventes em baixa temperatura.

Durante a filtração e a lavagem dos cristais, percebeu-se que estes não estavam presentes no papel de filtro. No papel estava apenas um material verde escuro, muito pastoso, o que certamente era clorofila. Os cristais, de certa forma, foram purificados, mesmo que parcialmente, pois os resquícios de clorofila foram retirados das amostras através da filtração. Os cristais certamente foram arrastados pelo solvente, sendo assim misturados com outras substâncias da matriz inicial, exceto a clorofila. Os materiais obtidos após filtração foram concentrados em rotaevaporador para retirada do solvente orgânico e postos para congelar, sendo liofilizados em seguida. As massas das amostras obtidas deste procedimento encontram-se na tabela 6.

Tabela 6. Massas das amostras recristalizadas

Código	Massa (g)
DSR-14-filtrado A	0,2293
DSR-14-filtrado A 2	0,0209
DSR-14-filtrado B	0,3173
DSR-14-filtrado B 2	0,1962
DSR-14-filtrado C	0,0760
DSR-14-filtrado D	0,2918

5.5 Testes por CCD das amostras recristalizadas

Para constatar a eficácia do procedimento de purificação por recristalização, foram feitos testes por CCD em placas de sílica de fase normal, utilizando o sistema de eluição DCM/Acetona 95:5, e revelador anisaldeído seguido de aquecimento.

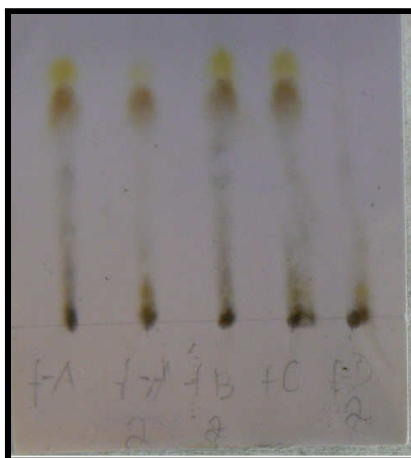


Figura 8. Teste por CCD das amostras recristalizadas

Em todas as amostras, excetuando-se a última, é possível perceber manchas amarela e laranja, que correspondem a duas lactonas sesquiterpênicas, presentes no trabalho de VALDIVINO (2005). A substância amarela é denominada damsina e, a de cor laranja, ambrosina. Ambas são pseudoguaianolídeos com propriedade moluscicida comprovada por Shoeb e El Emam (1976) (GEERTS, *et al.* 1991). Também há registros de atividades citotóxica e antitumoral de ambas as substâncias (VALDIVINO, 2005).

5.6 Centrifugação das amostras recristalizadas

Constatadas as presenças das substâncias de interesse, foi realizado um pré tratamento da amostra para posterior análise em aparelho de CLAE semipreparativo. As amostras deviam ser solubilizadas no menor volume possível de metanol, mas havia interferentes nas amostras que precipitavam. Para retirada dessas impurezas sólidas, as amostras em metanol foram transferidas para eppendorfs e centrifugadas. O sólido após a centrifugação ficou sedimentado na parte inferior do eppendorf, sendo o sobrenadante facilmente transferido para frascos previamente rotulados e pesados.

Tabela 7. Massas dos materiais sobrenadantes da centrifugação

Código	Massa (g)
DSR-17-CFS- D 1	0,2490
DSR-18-CFS- A	0,2129
DSR-18-CFS- A 2	0,0224
DSR-18-CFS- B 2	0,4134
DSR-18-CFS- C	0,0665

Após esse procedimento, os materiais sobrenadantes foram facilmente solubilizados em metanol, não havendo mais material particulado em nenhuma das amostras.

5.7 Análises no aparelho de CLAE semipreparativo para isolamento de substâncias

Segundo o item 4.8 do Procedimento Experimental, as amostras 'DSR-18-CFS-B 2' e 'DSR-18-CFS-A', que tinham maior massa e apresentaram a presença de substâncias de interesse (lactonas sesquiterpênicas), foram solubilizadas em metanol e analisadas por CLAE para determinação do método a ser utilizado. Depois, fez-se a purificação destas, também por CLAE, coletando-se as substâncias, de acordo com o seu respectivo pico, em balões de fundo redondo. Ambas as amostras apresentaram cromatograma quase idênticos.

Seguem abaixo os cromatogramas obtidos utilizando a coluna analítica e a coluna preparativa, respectivamente:

Obs.: O eixo das ordenadas diz respeito à absorvância a 230 nm e, o das abscissas, corresponde ao tempo de corrida, em minutos.

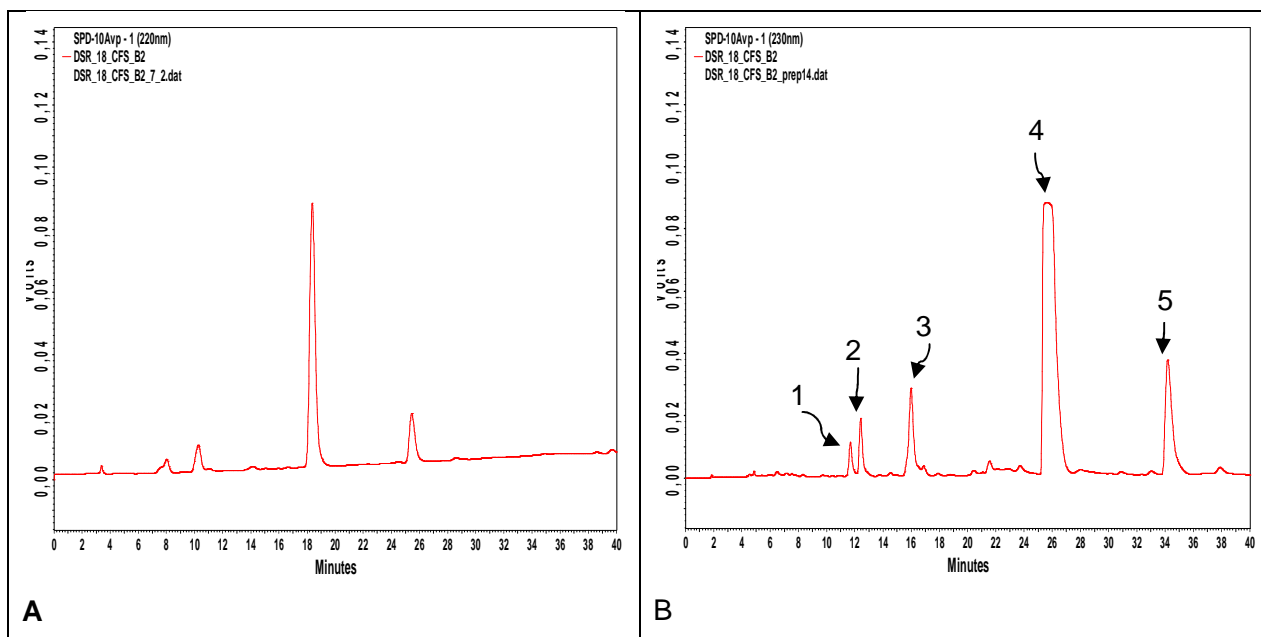


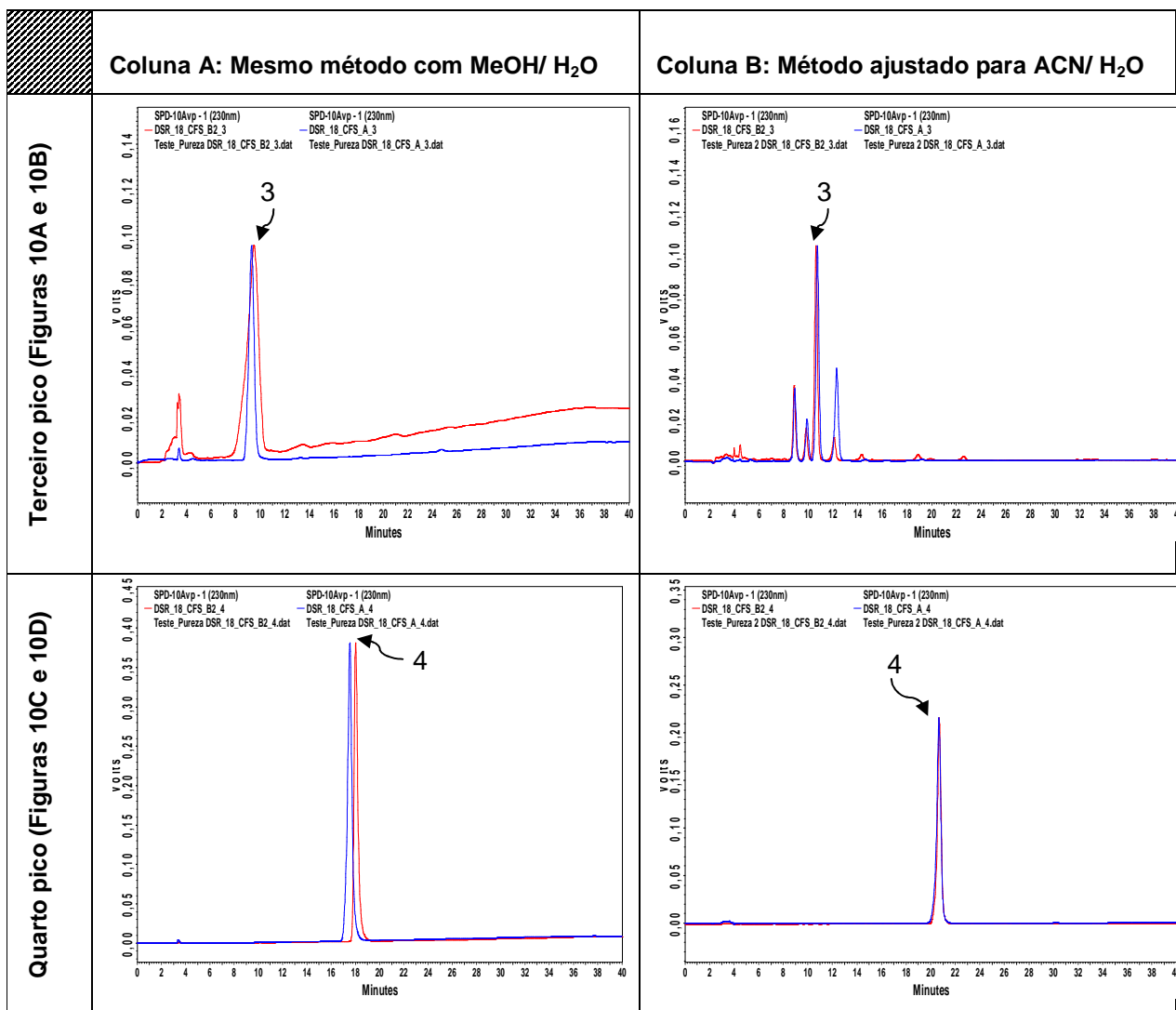
Figura 9.: Cromatogramas da fração ‘DSR-18-CFS-B2’, contendo lactonas sesquiterpênicas.

A: Escala analítica; B: Escala preparativa

Obs.: Cada número, acima do seu respectivo pico, exprime a sua ordem de coleta. Por exemplo, o terceiro pico, na figura 10, corresponde ao pico enumerado com ‘3’ na figura 9B.

5.8. Análise de pureza das substâncias obtidas no CLAE semipreparativo

Após o isolamento, é necessário analisar as amostras obtidas, primeiramente com o mesmo método utilizado e depois, alterando a mistura de solventes para verificar a seletividade desta. Os métodos estão descritos nos itens 4.8 e 4.9 do Procedimento Experimental. Seguem abaixo os cromatogramas das análises de pureza do terceiro, quarto e quinto picos, coletados a partir do fracionamento mencionado no item 5.7.



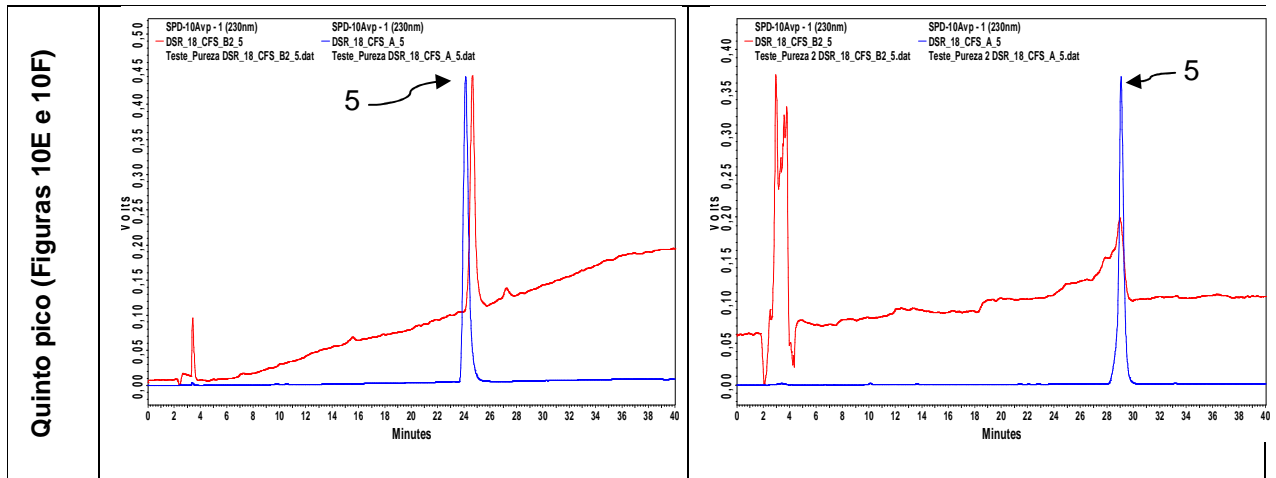


Figura 10. Cromatogramas referentes às análises de pureza das substâncias coletadas. A, C e E; análises com MeOH/ H₂O; B, D e F: análises com ACN/ H₂O. A e B, terceiro pico; C e D; quarto pico; E e F, quinto pico.

As amostras do terceiro pico não apresentaram uma pureza apreciável, em relação às do quarto e quinto picos, então, decidiu-se purificá-la utilizando a mistura ACN/ H₂O, pois fornece uma separação mais eficaz das substâncias.

As substâncias isoladas foram encaminhadas ao CBA para obtenção dos espectros de RMN para que assim sejam identificadas. As massas das amostras obtidas se encontram na tabela abaixo:

Tabela 8. Massas das substâncias isoladas por CLAE

Código	Massa (mg)
DSR-HPLC-3	2,8
DSR-HPLC-4	115,2
DSR-HPLC-5	25,2

6. CONCLUSÕES

- O metanol apresentou maior teor extrativo das partes aéreas de *A. artemisiifolia* em relação ao clorofórmio;
- O extrato clorofórmico (DSR – EC – 1) ao ser particionado em três frações, apresentou maior quantidade na fração hidroalcoólica, depois a hexânica e, com menor quantidade, a clorofórmica;
- Por meio dos testes por CCD, concluiu-se que o procedimento de eliminação de clorofila foi bem sucedido;
- As frações da coluna filtrante, ao serem testadas por CCD, apresentaram relativamente uma boa separação em relação aos interferentes de natureza polar;
- O procedimento de recristalização não foi tão eficiente, pois não foi possível o isolamento a partir deste, mas, a partir dos testes por CCD, foi possível constatar a presença das substâncias de interesse;
- O método utilizado no aparelho de CLAE semipreparativo se mostrou adequado, visto que ocorreu uma boa separação entre os picos, tanto pelo tempo de retenção quanto pela largura destes;
- O isolamento por CLAE é uma técnica bastante eficaz, visto que foi possível isolar três substâncias, com significativa quantidade de massa e alto grau de pureza.

7. REFERÊNCIAS

- AKERELE, O. *Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines*. **Herbal Gram**. 28: 13 – 19, 1993.
- AQUINO NETO, Francisco Radler de; NUNES, Denise da Silva e Sousa. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187 p.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. *Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade*. **Química Nova**, São Paulo. v.21, n. 1, p.99-105, 1998.
- DAVID, J.P.; SANTOS, J. O.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. M.; CHAI, H.B.; PEZZUTO, J. M.; ANGERHOFER, C. K.; CORDELL, G. A. *Sesquiterpene Lactones from Ambrosia artemisiaefolia (Asteraceae)*. **Pharmaceutical Biology**, Inglaterra. v.37,n.2.pp.165-168.1999.
- FERREIRA, S.H. (Org.). *Medicamentos a partir de Plantas Medicinais no Brasil*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciência, 1998. 132 p.
- GEERTS, S.; BELOT, J.; SABBE, F.; TRIEST, L.; SIDHOM, M. *Ambrosia maritima: effects on molluscs and non-target organisms*. **Journal of Ethnopharmacology**, Irlanda. v.33.p.1-12.1991.
- GIORDANO, O. S.; GUERREIRO, E.; PESTCHANKER, M. J.; GUZMAN, J.; PASTOR, D.; GUARDIA, T. *The Gastric Cytoprotective Effect of Several Sesquiterpene Lactones*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 04, p. 803-809, 1990.
- HERZ, W.; HOGENAUER G. *Isolation and structure of coronopilin, a new sesquiterpene lactone*. **Journal of Org. Chem.**, v.26, p.5011-5013, 1961.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MERFORT, I. *Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones*. **Journal of Chromatography**. A. Freiburg, Alemanha. v. 967, p. 115-130, 2002.

PORTER, T.H.; MABRY, T.J. *Sesquiterpene Lactones. Constituents of *Ambrosia artemisiifolia* L (Compositae)*. **Phytochemistry**, Inglaterra. v.8, pp.793-794 1969.

PORTER, T.H. MABRY, T. J.; YOSHIOKA, H.; FISCHER, N. H. *The Isolation and Structure Determination of Artemisiifolin, a New Germacranolide from *Ambrosia artemisiifolia* L (Compositae)*. **Phytochemistry**, Inglaterra. v.9, pp.199-204.1970.

REVILLA, J. *Plantas da Amazônia – Oportunidades Econômicas e Sustentáveis*. Ed. INPA e SEBRAE, Manaus – AM, pp. 89 – 90, 283 – 284. 2002.

RODRÍGUEZ, A. *Structure-Cytoprotective Activity Relationship of Simple Molecules Containing α, β - Unsaturated Carbonyl System*. **Journal of Medicinal Chemistry**, Carolina do Norte, v. 40, n. 12, p. 1827-1834, 1997.

STEFANOVIC, M.; SOLAJA, I. A.; MILOSAVLJEVIC. S. *A 3,4- seco- ambrosanolide from *Ambrosia artemisiifolia**. **Phytochemistry**, Inglaterra. v.26, n.3, pp.850-852.1987.

VALDIVINO, H.B.G. *Estudo de marcadores químicos de *Ambrosia artemisiifolia* L (Asteraceae)*. Dissertação de mestrado, UEA, 152 p. 2005.