

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *UNONOPSIS LINDMANII* - ANNONACEAE, BIOMONITORADO PELO ENSAIO DE TOXICIDADE SOBRE A *ARTEMIA SALINA* LEACH

João Máximo de Siqueira*, Mauro Dionei Bomm e Núbia Fernanda Gomes Pereira

DFB - CCBS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - CP 549 - 79070-900 - Campo Grande - MS

Walmir Silva Garcez

Departamento de Química - CCET - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - CP 549 - 79070-900 - Campo Grande - MS

Maria Amélia Diamantino Boaventura

Departamento de Química - ICEx - Universidade Federal de Minas Gerais - CP 702 - 31270-901 - Belo Horizonte - MG

Recebido em 3/3/97; aceito em 23/1/98

ACTIVITY - GUIDED ISOLATION OF CONSTITUENTS OF *UNONOPSIS LINDMANII* - ANNONACEAE, BASED ON THE BRINE SHRIMP LETHALITY BIOASSAY. Extracts obtained from leaves, seeds and bark of *Unonopsis lindmanii* were evaluated by means of Brine Shrimp Lethality test (BSL). Through bioassay-guided chromatographic fractionation, liriodenine, an oxoaporphine alkaloid, was isolated from the bark extracts as the bioactive compound. Two additional inactive known alkaloids, unonopsine and lysicamine were also isolated from the bark extracts.

Keywords: Annonaceae; *Artemia salina*; oxoaporphinic alkaloids; liriodenine; unonopsine; lysicamine.

INTRODUÇÃO

Muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentro de suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, diversos ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas¹. Dentre estes bioensaios, encontra-se a toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS), que se caracteriza por ser de baixo custo, rápido e não exigir técnicas assépticas. Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de extratos vegetais utilizando este teste na monitoração de estudos fitoquímicos^{2,3}. *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. A simplicidade do bioensaio TAS favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório de fitoquímica².

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana⁴, parasiticida⁵, tripanossomicida⁶, entre outras. McLaughlin e colaboradores^{2,3,7-10} têm utilizado sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais. As frações ou substâncias ativas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação. .

Várias espécies da família Annonaceae foram estudadas empregando o bioensaio TAS, juntamente com outros ensaios biológicos⁷⁻¹⁰. Porém, nenhuma espécie do gênero *Unonopsis* havia sido quimicamente investigada utilizando monitoramento por bioensaio.

A literatura contém poucos dados sobre a composição química do gênero *Unonopsis*, que é um dos 27 gêneros da família Annonaceae. Apenas as espécies *U. Stipitata* e *U. guaterioides* foram motivo de publicação, sendo que da primeira foram obtidos alcalóides do tipo bisaporfínico, azafluorenona e oxaporfínicos¹¹, enquanto na segunda a presença de policarpol¹² foi detectada por cromatografia em camada delgada. Algumas utilizações empíricas do gênero *Unonopsis* foram descritas por Schultes, que menciona o uso de plantas desse gênero pelos

índios da Floresta Amazônica no tratamento de demência senil. As mesmas plantas têm utilização como veneno para ponta de setas e são, também, utilizadas como antifertilizante¹³.

U. lindmanii, conhecida popularmente como pindaíva preta, possui porte de arbusto a arvoreta de 2-5 metros, é encontrado em capoeiras, matas, cerrados e em mata ciliar alagável e seu fruto, quando maduro, é comido por aves¹⁴. Não se encontrou dados de sua utilização popular, bem como dados relativos à sua composição química.

O objetivo do presente trabalho é o isolamento de substâncias biologicamente ativas dos extratos obtidos das folhas, cascas do caule e sementes de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, pelo estudo cromatográfico biomonitorado, utilizando a *Artemia salina* como organismo teste.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram submetidos ao bioensaio com *A. salina* os extratos de folhas, sementes e de cascas do caule de *U. lindmanii* (Tabela 1). Destes, apenas o último foi considerado ativo (TAS < 1000ppm)⁷, sendo por isso submetido à partição entre CHCl₃ e MeOH/H₂O. A atividade concentrou-se na fração clorofórmica (TAS=19,4ppm), na qual detectou-se a presença de alcalóides através do reagente Dragendorff. Outra porção das cascas do caule de *U. lindmanii* foi submetida à extração ácido-base, evidenciando-se através do referido bioensaio que o princípio ativo estava contido no extrato alcaloídico (TAS=13,9ppm).

A fração clorofórmica foi submetida à cromatografia em coluna de sílica, resultando na obtenção de uma mistura ativa contendo os alcalóides liriodenina (**1**) e lisicamina (**2**) e de uma outra substância, identificada como sendo o alcalóide bisaporfínico unonopsina (**3**). Além destes, isolou-se também, uma mistura dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol. As duas primeiras substâncias já haviam sido isoladas de várias espécies vegetais¹⁶, porém **3** foi obtido apenas de *U. spectabilis*¹¹, tendo sua estrutura sido elucidada com base nos seus espectros de RMN ¹H e massas. No presente trabalho estão sendo apresentados pela primeira vez os dados de RMN ¹³C de **3**, cuja atribuição foi efetuada por comparação com dados da heteropsina¹⁷. Vale destacar que a simetria da estrutura é confirmada pela observação de apenas 17 sinais, no espectro de RMN ¹³C, para os 34 carbonos existentes na molécula, bem

* E-mail: jmaximo@nin.ufms.br

Tabela 1. Teste de toxicidade para *Artemia salina* dos extratos e frações de *U. lindmanii*.

	DL ₅₀ ⁷ (ppm)	Intervalo de confiança de 95% ¹⁵ (ppm)
Folhas		
Extrato hexânico	> 1000	-
Extrato etanólico 95%	> 1000	-
Sementes		
Extrato hexânico	> 1000	-
Extrato etanólico 95%	> 1000	-
Casca do caule		
Extrato etanólico 95%	461,0	130,7-162,6
Fração metanólica 90%	> 1000	-
Fração intermediária	> 1000	-
Fração clorofórmica	19,4	6,1-62,1
β-sitosterol:estigmasterol	74,0	58,5-93,8
Unonopsina (3)	> 1000	-
Extrato alcaloídico	13,9	2,7-70,8
Liriodenina (1)	2,1	0,2-29,1
Sulfato de quinidina	211,0	167,0-269,0

como pela integração dos sinais do espectro de RMN ¹H, para 11 hidrogênios, excluindo o sinal alargado do hidrogênio ligado a nitrogênio. Um sinal importante na confirmação da estrutura dimérica aparece em δ 105,7 (carbono não ligado a hidrogênio) e que foi atribuído a C-7 e C-7'. O espectro de massas é compatível com a estrutura proposta, mostrando o M⁺ em m/z 524.

O extrato alcaloídico foi também submetido à cromatografia em coluna, resultando na purificação de **1**, que se mostrou ativo (TAS=2,1ppm), e mistura de **1** e **2**. Através de cromatografia em camada delgada preparativa, esta mistura resultou na obtenção destes constituintes, ainda em misturas, porém em proporções diferentes do material de partida. A análise dos espectros de RMN ¹H destas misturas permitiu atribuir os sinais relativos aos hidrogênios da liscamina(**2**).

CONCLUSÃO

Neste trabalho pôde-se observar a validade e a confiabilidade do bioensaio TAS, onde a toxicidade para *Artemia salina* convergiu para as frações que continham uma substância reconhecidamente ativa, o alcalóide oxaporfínico liriodenina (vide Tabela 1). Os resultados obtidos também demonstraram a sensibilidade da metodologia, já que nas misturas de liriodenina (**1**) e liscamina (**2**) a atividade é proporcional à concentração de **1**.

O composto ativo foi anteriormente isolado, juntamente com outros alcalóides aporfínoides, utilizando-se o biomonitoramento por culturas *in vitro* de células tumorais humanas, que se constitui num ensaio biológico de maior complexidade do que o utilizado neste trabalho. O referido alcalóide apresentou atividade citotóxica contra células tumorais do tipo KB, pulmão e tumor de cólon de útero¹⁸.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos Experimentais Gerais: Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C, de 300 e 75 MHz, respectivamente, foram registrados em espectrômetro DPX-300- Bruker. Os deslocamentos químicos estão apresentados em partes por milhão (δ) relativos ao tetrametilsilano (δ=0,0), sendo CDCl₃ utilizado como solvente e padrão interno (δ=7,24 e 77,0). O espectro de massas foi obtido em espectrômetro HP5988A através de injeção direta. Os solventes e reagentes utilizados tiveram grau de pureza P.A. Para as cromatografias em camada delgada (CCD) analítica e preparativa utilizou-se sílica-gel 60 MERCK e para cromatografia em coluna (CC) utilizou-se sílica-gel 70-230 mesh ALDRICH.

Ensaio biológico: O ensaio de toxicidade sobre a *Artemia*

salina (TAS) foi executado de acordo com a metodologia proposta por McLaughlin². Diluições das amostras e do controle positivo foram feitos pelo método de diluições aritméticas em solução aquosa de sal marinho sintético (38g/L, Enterprise Co.) com 1% DMSO (v/v). Todas as etapas foram acompanhadas utilizando-se o sulfato de quinidina como controle positivo⁷ e cada avaliação foi repetida pelo menos duas vezes. Utilizou-se o método Probitos de análise para obtenção das DL₅₀ e respectivos intervalos de confiança¹⁵. Os extratos foram considerados ativos quando TAS <1000ppm⁷.

Material vegetal: Folhas, cascas e sementes de *Unonopsis lindmanii* R. E. Fries (R. E. Fries) Annonaceae, foram coletadas no Jardim Botânico de Mato Grosso do Sul (Campo Grande-MS). A planta foi identificada pelo Prof. R. Mello-Silva e uma excisada foi depositada no Herbário da UFMS (Campo Grande, MS) sob número 4730.

Obtenção dos extratos: Os pós obtidos a partir das folhas e sementes de *U. lindmanii* foram exaustivamente extraídos com hexano em aparelho tipo soxhlet. As tortas, bem como o pó das cascas secas de *U. lindmanii* (500g), foram extraídas com etanol 95% por exaustiva maceração.

O extrato alcaloídico e a fração clorofórmica proveniente do extrato etanólico das cascas, ambos ativos, foram submetidos a cromatografia em coluna. As frações originadas deste processo foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico e testadas.

Mistura de β-sitosterol e stigmasterol: Os dados obtidos dos espectros de IV, RMN ¹³C e massas foram idênticos aos valores registrados na literatura¹⁹.

Alcalóides: Unonopsina (**3**), liriodenina (**1**) e liscamina (**2**) foram identificados por comparação de seus dados espectrais com aqueles registrados na literatura^{17,16,20}. Liriodenina foi também identificada por comparação direta com amostra autêntica, cedida pela Prof^a Mariana H. Chaves (UFPI) e que foi obtida no seu doutoramento no IQ-USP, sob a orientação da Prof. Nídia F. Roque.

Liriodenina (1): microcristais amarelos (MeOH/CHCl₃). RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ: 8,87 (1H, d, J=5,3Hz, H-5); 8,64 (1H, dl, J=8,0Hz, H-11); 8,57 (1H, dl, J=8,0Hz, H-8); 7,76 (1H, d, J=5,3Hz, H-4); 7,73 (1H, td, J=7,8 e 2,0Hz, H-10); 7,56 (1H, td, J=7,8 e 2,0Hz, H-9); 7,18 (1H, s, H-3); 6,38 (2H, s, OCH₂O).

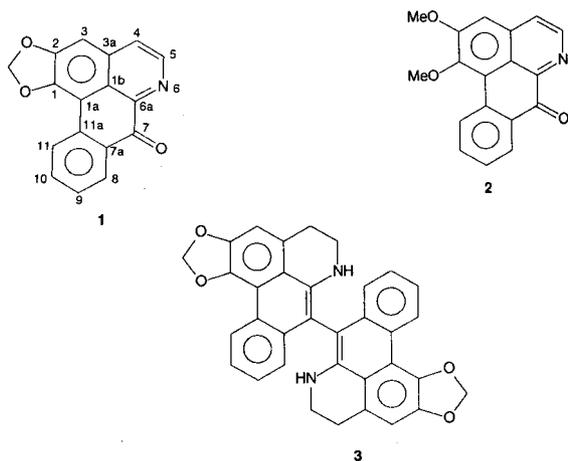
Liscamina (2): microcristais amarelos (MeOH/CHCl₃): RMN ¹H (300MHz, CDCl₃)^a δ: 9,16 (1H, dl, J=7,9Hz, H-11); 8,88 (1H, d, J=5,2Hz, H-5); 8,56 (1H, dd, J=7,9 e 1,2Hz, H-8);

7,78 (1H, dl, J=5,2Hz, H-4); 7,76 (1H, td, J=7,9 e 1,2Hz, H-10); 7,56 (1H, td, J=7,9 e 1,2Hz, H-9); 7,20 (1H, sl, H-3); 4,08 (3H, s, OCH₃ em C-1); 4,00 (3H, s, OCH₃ em C-2).

^aSinais correspondentes à lirisicina na mistura com lirioidenina, na proporção de 85:15.

Unonopsina (3): sólido branco amorfo, RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ: 3,10 a 3,35 (8H, m, H-4, 4', 5 e 5'); 6,27 (4H, s, OCH₂O em C-1, 2 e C-1', 2'); 7,03 (2H, s, H-3 e 3'); 7,11 (1H, dd, J=8,0 e 1,2Hz, H-8 e 8'); 7,23 (2H, td, J=8,0 e 1,2Hz, H-9 e 9'); 7,33 (2H, td, J=8,0 e 1,2Hz, H-10 e 10'); 9,05 (2H, dd, J=8,0 e 1,2Hz, H-11 e 11'). RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃) δ: 30,5 (C-4 e 4'); 41,3 (C-5 e 5') 101,1 (OCH₂O, em C-1, 2 e C-1', 2'); 105,7 (C-7 e 7'); 108,0 (C-3 e 3'); 117,6 *(C-3b e 3'b); 118,1* (C-11b e 11'b); 122,8 (C-10 e 10'); 123,5 (C-8 e 8'); 124,3 (C-11a e 11'a); 127,3 (C-9 e 9'); 127,6 (C-11 e 11'); 128,1 (C-3a e 3'a); 132,8 (C-7a e 7'a); 140,1 (C-6a e 6'a); 142,1 (C-1 e 1'); 145,7 (C-2 e 2'). EM m/z (int. rel.): 524 (100), 262(30), 261(30).

*Valores que podem ser permutados.



AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a pronta atenção dos Prof. J. L. McLaughlin e Prof. K. Hostettmann que enviaram-nos dados recentes sobre diferentes ensaios biológicos, à Ubirazilda Resendes pela coleta da espécie vegetal, aos Profs. R. de Mello-Silva, pela identificação botânica, à Maria C. Guerra de Souza pelo auxílio técnico no trabalho experimental, à Rute A. Santos, da Central Analítica do IQ-USP, pela obtenção do espectro de massa e à Dr. Mariana H. Chaves (UFPI) pela gentileza de ceder a amostra autêntica de lirioidenina. Este trabalho teve o suporte financeiro da PROPP-UFMS e bolsas de IC do programa PIBIC/CNPq.

REFERÊNCIAS

- Hamburger, M. e Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3864.
- McLaughlin, J. L.; Chang, C-J.; Smith, D. L.; In *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 9, Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam 1991, p. 383-409.
- McLaughlin, J. L., Chang, C-J.; Smith, D. L.; In *Human Medicinal Agents from Plants*, Kinghorn, A. D. & Balandrin, M. F., eds., Symposium Series N^o. 534, American Chemical Society, Washington, D.C. 1993, p. 112-137.
- MacRae, W. D.; Hudson, J. B.; Towers, G. H. N.; *J. of Ethnopharm.* **1988**, *22*, 143.
- Sahpaz, S.; Boris, Ch.; Loieau, P. M.; Cortes, D; Hacquemiller, R.; Laurens A.; Cavé, A.; *Planta Medica* **1994**, *60*, 538.
- Zani, C. L; Chaves, P. P. G.; Queiroz, R.; De Oliveira, A. B.; Cardoso, J. E.; Anjos, A. M. G.; Grandi, T. S. M.; *Phytomedicine* **1995**, *2*, 47.
- Meyer, B. N.; Ferrigini, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L.; *Planta Medica* **1982**, *45*, 31.
- McLaughlin, J. L.; In *Methods in Plant Biochemistry*, vol 6, Ed. Hostettmann K., Academic Press, London 1991, p. 1-32.
- Rupprecht, J. K.; Hui, Y-H.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 237.
- Colman-Saizarbitoria, T.; Gu, Z-M.; Zhao, G-X.; Zeng, L.; Kozlowski, J. F.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 532.
- Laprévote, O.; Roblot, F.; Hacquemiller, R.; Cavé, A.; *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 984.
- Touche, A.; Desconclois, J. F.; Jacquemin, H.; Lelievre, Y.; Forgacs, P.; *Plantes Medicinales et Phytotherapie* **1981**, *15*, 4.
- Schultes, R. E.; *J. of Ethnopharm.* **1993**, *38*, 129.
- Pott, A. e Pott, V. J.; *Plantas do Pantanal*, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Corumbá, MS 1994, p. 36.
- Finney, D. J.; *Probit Analysis*, 3ed., Cambridge University Press, Cambridge. 1971, p. 76-80.
- Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé A.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1033.
- Achenbach, H.; Schwinn, A.; *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1037
- Wu, Y-C.; Chang, G-Y.; Duh, C-Y.; Wang, S-K.; *Phytochemistry* **1993**, *33*, 497.
- Goulart, M. O. F.; Sant'Ana, A. E. G.; De Lima, R. A.; Cavalcante, S. H.; De Carvalho, M. G.; Braz Filho, R.; *Quím. Nova* **1993**, *16*, 95.
- Hossain, M. S., Ferdous, A.J.; Hasan, C. M.; *Fitoterapia* **1995**, *LXVI*, 463.