

## ATIVIDADE DO EXTRATO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS CAS-CAS DE *Geissospermum vellosii* ALLEMÃO (APOCYNACEAE) SOBRE *Artemia salina* LEACH

### ACTIVITY OF EXTRACT, FRACTIONS AND ISOLATED SUBSTANCES OF THE BARKS FROM *Geissospermum vellosii* ALLEMÃO (APOCYNACEAE) ON *Artemia salina* LEACH

DIAS, Josiane de F.G.<sup>1</sup>; KALEGARI, Milena<sup>1</sup>; MIGUEL, Marilis D.<sup>1</sup>; ZANIN, Sandra M.W.<sup>1</sup>; LORDELLO, Ana Luisa L.<sup>2</sup>; SANTOS, Luciana M. Dos<sup>3</sup>, SENS, Rafaele C. V.<sup>3</sup>, WUNDER, Paulo R.<sup>1</sup>; MIGUEL, Obdúlio G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UFPR, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Campus Jardim Botânico, 80210-170, Curitiba, Brasil. email: [jodias@ufpr.br](mailto:jodias@ufpr.br)

<sup>2</sup>UFPR, Departamento de Química, Centro Politécnico, 81531-990, Curitiba, Brasil

<sup>3</sup>UFPR, Departamento de Farmácia, Campus Jardim Botânico, 80210-170, Curitiba, Brasil

REC: 03/2010 AC:04/2010

#### RESUMO:

O extrato, frações e substâncias isoladas das cascas de *G. vellosii* foram submetidos ao teste de bioatividade sobre *A. salina*. Os dados foram analisados pelo método Probitos e determinados os valores de DL<sub>50</sub> e 95% de intervalos de confiança. As amostras foram consideradas ativas quando DL<sub>50</sub> < 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. Todas as amostras testadas demonstraram bioatividade contra *A. salina*, destacando-se F4 e F9, as quais apresentaram valores de DL<sub>50</sub> de 7,60 e 29,48 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os resultados demonstram o potencial biotecnológico da espécie, pois segundo literatura este bioensaio pode ser utilizado como avaliação prévia de possível atividade antitumoral.

**Palavras-chave:** *Geissospermum*, *Artemia*, bioatividade.

#### ABSTRACT:

The extract, fractions and isolated substances of the barks from *G. vellosii* were submitted to the bioactivity test on *A. salina*. The data were analyzed by the Probitos' method and certain the values of DL<sub>50</sub> and 95% of trust intervals. The samples were considered active when DL<sub>50</sub> < 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. All of the tested samples demonstrated bioactivity against *A. salina*, standing out F4 and F9, which presented values of DL<sub>50</sub> 7.60 and 29.48 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively. The results demonstrate the biotechnological potential of the species, because according to literature this bioessay can be used as previous evaluation of possible antitumoral activity.

**Key words:** *Geissospermum*, *Artemia*, bioactivity.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Geissospermum vellosii* é conhecida popularmente como Pau Pereira (MANSKE & HOLMES, 1952), Câmara-de-Bilro, Ubá-Açu, Pau-Forquilha, Canudo-Amargoso, Tringuaaba, Pau-Pente, Câmara-do-Mato, Pinguaciba, Pereiro (CORRÊA, 1974) e Maria Congo (BERTANI et al., 2005). Apresenta os sinônimos *Geissospermum leave*, Miers, *Geissospermum vellozii*, Fr. Allem (INDEX KEWENSIS, 1895), *Tabernaemontana laevis* (CORRÊA, 1974; (INDEX KEWENSIS, 1913) e *Geissospermum laevis*, Miers (CORRÊA, 1974).

As substâncias geissospermina, pereirina, velosina (MANSKE & HOLMES, 1952), flavopereirina (HUGHES & RAPOPORT, 1958), velosimina, velosiminol, geissolosimina (RAPOPORT & MOORE, 1962) e geissovelina (MOORE e RAPOPORT, 1973) foram isoladas da referida espécie. O extrato etanólico de *G. vellosii* apresenta atividade contra *Plasmodium vinckei* (BERTANI et al., 2005; MUÑOZ et al., 2000) e atividade antinociceptiva (WERNER et al., 2009). A flavopereirina apresenta atividade contra *Plasmodium falciparum* (SOMEL & YAMADA, 2004) e atividade antitumoral (BELJANSKI & BELJANSKI, 1982), assim como seu derivado denominado PB-100 (BELJANSKI, 2000). A geissospermina apresenta ação hipotensora e ação depressora do Sistema Nervoso Central (AUROUSSEAU, 1960; AUROSSEAU, 1961), foi classificada como veneno paralisante vascular (CORRÊA, 1974) e apresenta ação relaxante (TANAE et al., 1999; TANAE et al., 2004).

O ensaio de bioatividade com *Artemia salina* é utilizado por ser rápido, de baixo custo (MEYER et al., 1982), não requerer ambiente asséptico, utilizar grande número de organismos para validação estatística, não requerer equipamentos especiais e utilizar quantidade de amostra relativamente pequena (2-20 mg) (MCLAUGHLIN et al., 1991). Alguns trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *A. salina* com atividades como antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida (MACRAE et al., 1988), parasiticida (CHAN-BACAB et al., 2003) e antitumoral (RUPPRECHT et al., 1990; SIQUEIRA et al., 2001).

Nesta perspectiva, este trabalho teve como objetivo testar extrato, frações e substâncias isoladas de *G. vellosii* sobre *A. salina*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do material vegetal

Cascas de *G. vellosii* foram colhidas em novembro de 2002. O material vegetal foi identificado por comparação com exsicata registrada no Museu Botânico de Curitiba sob número 36060 como *Geissospermum vellosii*. Cascas moídas de *G. vellosii* foram submetidas à extração em Soxhlet em etanol absoluto até esgotamento total obtendo-se o extrato bruto etanólico, o qual foi fracionado em extrator de Soxhlet modificado (CARVALHO et al, 2009) com solventes de polaridade crescente, obtendo-se as frações diclorometano, acetato de etila, butanol e hidroalcólica. A fração diclorometano foi acrescida de duas partes de sílica gel em relação ao seu peso e foi cromatografada por meio de coluna com sílica gel utilizando fases móveis apropriadas com uma vazão de 1 mL por minuto. Foram coletados frascos de 20 mL que foram reunidos segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada. Após reunião dos frascos, estes foram levados à secura, lavados com benzina e filtrados em funil de vidro sinterizado, obtendo-se substâncias denominadas preliminarmente de F4, F9 e F17.

## 2.2. Ensaio de bioatividade com *Artemia salina*

O ensaio foi realizado segundo Meyer et al. (1982) com amostras do extrato etanólico, frações diclorometano, acetato de etila, butanol, hidroalcoólica e substâncias F4, F9 e F17. Foram pesados 20 mg de cada amostra e adicionado clorofórmio em quantidade suficiente para obter a concentração inicial de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Desta solução foram transferidos 5, 50 e 500 mL para tubos de ensaio correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000 mg.mL<sup>-1</sup>, em triplicata. O solvente foi evaporado por 12 horas (MCLAUGHLIN et al., 1991). Após a eclosão dos ovos, foram transferidas 10 larvas de *Artemia salina* para cada tubo de ensaio contendo as amostras e para os tubos controles. Os controles negativos consistiram de tubos com clorofórmio, o qual foi evaporado juntamente com as amostras, e de tubos vazios. O controle positivo foi sulfato de quinidina. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 5 mL. Após 24 horas foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas, com auxílio de lupa e iluminação incandescente. Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos (FINNEY, 1971) e determinados os valores de DL<sub>50</sub> e 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas ativas quando DL<sub>50</sub> foi menor que 1000 mg.mL<sup>-1</sup> (MEYER et al., 1982).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar os resultados obtidos (Tabela 1), verifica-se que todas as amostras apresentaram DL<sub>50</sub> menor que 1000 mg.mL<sup>-1</sup>. Os menores DL<sub>50</sub> foram verificados pelas substâncias isoladas F4, F9 e F17, as quais preliminarmente foram identificadas como alcalóides.

**TABELA 1 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE AMOSTRAS DE *G. vellosii* SOBRE *Artemia salina***

Amostra	DL <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	Intervalo de confiança de 95% (µg.mL <sup>-1</sup> )
Extrato Bruto Etanólico	398,11	66,05 – 2399,68
Fração Diclorometano	251,19	195,18 – 323,25
F4	7,60	4,67 – 12,34
F9	29,48	21,51 – 37,71
F17	232,63	174,80 – 309,59
Fração Acetato de Etila	173,65	93,37 – 322,94
Fração Butanol	146,70	28,13 – 765,90
Fração Hidroalcoólica	439,40	240,28 – 803,53
Sulfato de Quinidina	50,12	35,80 – 70,16

Ao comparar os resultados obtidos com o resultado de outros autores, verifica-se que os alcalóides possuem toxicidade sobre *Artemia salina* (MARTÍNEZ et al., 1997; SIQUEIRA et al., 1998; SIQUEIRA et al., 2001) e estes resultados podem correlacionar a espécie com outras atividades biológicas (MACRAE et al., 1988; RUPPRECHT et al., 1990; SIQUEIRA et al., 2001; CHAN-BACAB et al., 2003).

Mais ensaios serão conduzidos com a referida espécie para verificação de out-

ras atividades biológicas.

## REFERÊNCIAS

AUROSSEAU, M.M. Etude pharmacodynamique de la geissospermine alcaloide principal du *Geissospermum laeve* (Vellozo) Baillon (Apocynacées). **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v.19, n.2, p.104-116, 1960.

AUROSSEAU, M.M. Etude pharmacodynamique de la geissospermine alcaloide principal du *Geissospermum laeve* (Vellozo) Baillon (Apocynacées). **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v.19, n.3, p.175-189, 1961.

BELJANSKI, M.; BELJANSKI, M.S. Selective inhibition of in vitro synthesis of cancer DNA by alkaloids of  $\beta$ -carboline class. **Pathobiology**, v.50, n.2, p. 79-87, 1982.

BELJANSKI, M. The anticancer agent PB-100, selectively active on malignant cells, inhibits multiplication of sixteen malignant cells lines, even multidrug resistant. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n. 1, p. 29-33, 2000.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J.C.; ESTERRE Ph.; DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p. 45-54, 2005.

CARVALHO, J.L.S.; CUNICO, M.M.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.

Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p.1031-1035, 2009.

CHAN-BACAB, M.J. *et al.* Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 243-247, 2003.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1974.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge University Press: Cambridge, 1971.

HUGHES, N.A.; RAPOPORT, H. Flavopereirina, an alkaloid from *Geissospermum vellosii*. **Journal American of Chemical Society**, n. 80, v.7, p. 1604-1609, 1958.

INDEX KEWENSIS. Oxford University Press, 1895, p.179.

INDEX KEWENSIS. Oxford University Press, 1913, p.95.

MANSKE, R.H.F.; HOLMES, H.L. **The alkaloids chemistry and physiology**. New York: Academic Press Inc, 1952. p. 369-481.

MARTÍNEZ; J.L.; TORRES, R.; MORALES, M.A. Hypotensive effect of O-methyl-

---

---

sothalicberine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *Berberis chilensis* on normotensive rats. **Phytotherapy Research**, v.11, n.3, p. 246–248, 1997.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. “Bendh-Top” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A.R. (Ed.) **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., p. 383-409, 1991.

MACRAE, W.D.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 143-72, 1988.

MEYER, B.N. et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, p. 31, 1982.

MOORE, R.E.; RAPOPORT, H. Geissosvelline, a new alkaloid from *Geissospermum vellosii*. **Journal of Organic Chemistry**, v.38, n.2, 215-230, 1973.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J.A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p.127-137, 2000.

RAPOPORT, H.; MOORE, R.E. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Isolation and structures determinations of vellosimine, vellosiminol and geissolosimine. **The Journal of Organic Chemistry**, v.27, n.9, p. 2981-2985, 1962.

RUPPRECHT, J.K.; HUI, Y.H.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 237-278, 1990.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.G.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - ANNONACEAE, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* LEACH. **Química Nova**, v.21, n.5, p. 557-559, 1998.

SIQUEIRA, J.M.; ZIMINIANI, M.G.; RESENDE, U.M.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* LEACH. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p.185-187, 2001.

SOMEL, M.; YAMADA, F. Simple indole alkaloids and those with a nonrearranged monoterpene unit. **Natural Product Reports**, v.21, p.278-311, 2004.

TANAE, M.M.; MOTIDOME, M.; VALLIN, A.A.C.; CARDOSO E.M.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R. Liberação da geissospermina, alcalóide isolado do pau-pereira (*Geissospermum vellosii*) no músculo esquelético. In: Reunião anual da FESBE, 14, 1999, Caxambú. **Anais da XIV Reunião anual da FESBE**. Caxambú, 1999, p. 387.

TANAE, M.M.; GHEDINI, P.C.; SOUCCAR, C.; MOTIDOME, M.; LAPA, A.J.; LIMA-LANDMAN, M.T.R. Interação de Geissospermina, alcalóide isolado do pau pereira (*Geissospermum laeve*), com receptores nicotínicos musculares. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 18, 2004, Manaus. **Livro de Resumos**. Manaus, 2004, p.431.

WERNER, J.A.T., OLIVEIRA, S.M.; MARTINS, L.M.; DIAS, J.F.G.; LORDELLO, A.L.L.; MIGUEL, O.G.; ROYES, L.F.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S. Evidence for a role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology** , v. 125, p. 163–169, 2009.