

Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae)

PEREIRA, M.M.^{1,2*}; SOUZA JÚNIOR, S.N.²; ALCÂNTARA, A.F.C.²; PILO-VELOSO, D.²; ALVES, R.B.²; MACHADO, P.O.²; AZEVEDO, A.O.³; MOREIRA, F.H.³; CASTRO, M.S.A.³; RASLAN, D.S.²

¹Departamento de Medicamentos e Alimentos, UFAM, Rua Com. Alexandre Amorim, 330, Aparecida, CEP 69010-300 Manaus, AM. e-mail: mariameneses@ufam.edu.br ²Departamento de Química, ICEX, UFMG ³Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, ICB, UFMG, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG.

RESUMO: Esse trabalho descreve o estudo fitoquímico e a avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico do cerne de *Aspidosperma nitidum* Benth ex Müll. Arg. (Apocynaceae), espécie muito utilizada na medicina popular da região amazônica para tratamento de inflamações, além de febre e de malária. O estudo fitoquímico de *A. nitidum* resultou no isolamento de uma mistura de esteróides (â-sitosterol e stigmasterol), triterpenos pentacíclicos (â-amirina e lupeol), L-2-O-metil-*chiro*-inositol e um alcalóide â-carbolínico, o ácido 3-harmanocarboxílico. O extrato etanólico apresentou atividade antinociceptiva e antiinflamatória.

Palavras-chave: Apocynaceae, *Aspidosperma nitidum*, alcalóide â-carbolínico, ácido 3-harmanocarboxílico, atividade antiinflamatória.

ABSTRACT: Chemical constituents and biological study of *Aspidosperma nitidum*. This work describes the phytochemical study as well as the antinociceptive and anti-inflammatory actions of the ethanolic extract of the *Aspidosperma nitidum* Benth ex Müll. Arg. (Apocynaceae) wood, species very used in the Amazonian popular medicine for the anti-inflammatory treatment, besides fever and malaria. The phytochemical study of *A. nitidum* has led to the isolation of the mixture of steroids (â-sitosterol and stigmasterol), pentacyclic triterpenes (â-amirine and lupeol), L-2-O-methyl-*chiro*-inositol and a â-carbolinic alkaloid, the harman-3-carboxylic acid. The ethanolic extract has showed antinociceptive and anti-inflammatory activities.

Key words: Apocynaceae, *Aspidosperma nitidum*, â-carbolinic alkaloid, harman-3-carboxylic acid, anti-inflammatory activities.

INTRODUÇÃO

O gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae) caracteriza-se quimicamente pela ocorrência freqüente de alcalóides indólicos, principalmente monoterpênicos (Bolzani et al., 1987; Henriques et al., 2001; Schripsema et al., 2001). Inúmeras espécies desse gênero são usadas na Amazônia por suas diferentes propriedades medicinais (Weniger et al., 2001; Ferreira et al., 2004) e pela qualidade de suas madeiras (Albuquerque, 1971; Ribeiro et al., 1999). *Aspidosperma nitidum*, popularmente conhecida como carapanaúba, é utilizada no tratamento de inflamações do útero e ovário, em problemas de diabetes, do estômago, contra câncer, como anticoncepcivo (Ribeiro et al., 1999) e contra febre e reumatismo (Weniger et al., 2001). As cascas dessa espécie são usadas por nativos de diferentes locais da Amazônia

para a cura da malária (Oliveira et al., 2003; Bourdy et al., 2004; Brandão et al., 1992). Na Colômbia, o látex de *A. nitidum* é utilizado pelos índios Makuna e Taiwano para cura da hanseníase (Ribeiro et al., 1999). Apesar de seu vasto uso na medicina popular, a literatura consultada apresenta apenas uma referência a um estudo químico de *A. nitidum*. Arndt e colaboradores (1967) citam o isolamento do alcalóide 10-metoxidiidrocorinanteol.

Considerando que *A. nitidum* é empregada popularmente no tratamento de inflamações, este trabalho descreve a avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico do cerne, através dos testes de nocicepção induzida por formalina, da latência para o reflexo de retirada da cauda ("tail-flick"), de performance motora ("rota-rod") e edema induzido pela injeção intra-plantar de carragenina. Realizou-se

ainda o estudo fitoquímico dessa espécie, para isolamento de constituintes químicos que possam estar relacionados com a atividade biológica. Esse estudo é justificável tendo em vista a importância da busca de alternativas medicamentosas oriundas de produtos naturais, principalmente na Amazônia, onde o acesso à medicina convencional apresenta-se dificultado por fatores geográficos e culturais.

MATERIAL E MÉTODO

1. Planta

O material vegetal foi coletado na Fazenda da Universidade Federal do Amazonas (Manaus, AM) em fevereiro de 2001. A exsiccata da espécie encontra-se depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob o código 181832.

2. Procedimentos químicos

2.1. Geral

Para os procedimentos cromatográficos foram utilizadas sílica gel 60 (70-230 mesh, Merk, D-6100 Darmstadt, Germany) e NM-Poliâmida SC6 (Macherey-Nagel, Germany). Nas análises por cromatografia em camada delgada (CCDS) foram utilizadas placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merk, Germany), com 0,25 mm de espessura (Collins et al., 1993). Os pontos de fusão não corrigidos foram determinados em aparelho Mettler FP82HT, temperatura inicial de aquecimento 50°C, velocidade de aquecimento de 5°C min⁻¹. Os espectros de absorção na região do Infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer/IR 408, em partilhas de KBr. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C e experimentos em 2D (COSY, HMQC e HMBC), em CDCl₃ ou DMSO-*d*₆, foram registrados em espectrômetros Bruker DPX 200 (¹H: 200 MHz; ¹³C: 50 MHz) e Bruker DRX 400 AVANCE (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados tendo o TMS como padrão interno.

2.2. Extração, isolamento e purificação

O cerne do vegetal foi pulverizado (10,0 kg) e submetido a extrações sucessivas com etanol, obtendo-se 160,0 g de extrato após evaporação do solvente. Em seguida, esse extrato foi submetido à filtração cromatográfica em sílica gel com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol, obtendo-se os extratos correspondentes: EH (1,2 g; 0,8%), ED (4,3 g; 2,7%), EAE (4,5 g; 2,8%), EE (74,0 g; 46,3%) e EM (68,0 g; 42,5%).

Uma parte (3,3 g) do extrato diclorometânico (ED) foi submetida à coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e empregando-se hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol como eluentes em gradiente. Da fração eluída em

hexano:diclorometano (1:1) obteve-se uma mistura de sólidos brancos, recristalizada em metanol, denominados de **1a** e **1b** (28,0 mg; 0,9%), que apresentou teste de Lieberman-Burchard positivo para esteróides (Matos, 1988). Faixa de fusão entre 156 e 160°C. IV (KBr, cm⁻¹) v. 3419; 2956; 2921; 2852; 1668; 1463; 1377; 1059; 1022; 971, 888 cm⁻¹. RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ: 5,35 (m); 5,22-4,95 (m); 3,50 (m); 2,29-0,68 (vários multipletos). RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ: 140,72; 138,29; 129,24; 121,66; 72,05; 71,74; 56,83; 55,92; 51,21; 50,11; 45,79; 42,18; 40,48; 39,65; 37,23; 36,47; 33,91; 31,87; 31,60; 29,12; 28,89; 28,22; 26,05; 25,38; 24,34; 24,27; 23,03; 21,20; 19,80; 19,37; 19,01; 18,96; 18,75; 12,23; 11,96; 11,83.

A fração diclorometânica foi recromatografada em coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e hexano, diclorometano e acetato de etila como eluentes em ordem crescente de polaridade. Um sólido branco obtido da fração eluída em hexano:diclorometano (1:1) foi purificado por recristalização em metanol, denominado composto **2** (15,0 mg; 0,5%), que apresentou teste de Lieberman-Burchard positivo para triterpenos pentacíclicos (Matos, 1988). Faixa de fusão entre 196,5 e 199,7°C. RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 5,18 (t, *J* = 3,50 Hz); 3,21-3,20 (m); 1,96-0,76 (vários multipletos). RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 145,22; 121,78; 79,07; 55,25; 47,70; 47,31; 46,89; 41,78; 38,81; 38,77; 38,66; 37,23; 37,20; 34,79; 33,35; 32,73; 32,53; 31,11; 28,42; 28,13; 27,29; 27,00; 26,21; 26,01; 23,72; 23,57; 18,42; 16,86; 15,60; 15,52.

Uma parte (3,5 g) do extrato em acetato de etila (EAE) foi submetida à coluna cromatográfica de sílica gel como fase estacionária e acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade, como eluentes. A fração acetato de etila foi recromatografada em sílica gel usando-se como eluentes hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade. Da fração eluída com hexano:acetato de etila (7:3) obteve-se um sólido branco, purificado por recristalização em metanol, denominado composto **3** (18,0 mg; 0,5%), que apresentou teste de Lieberman-Burchard positivo para triterpenos pentacíclicos (Matos, 1988). Faixa de fusão entre 212,0 e 213,0°C. IV (KBr, cm⁻¹) v. 3340; 2940; 2837 e 1615. RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 5,10 (t, *J* = 3,50 Hz); 4,70-4,60 (m); 3,19-3,16 (m); 1,90-0,67 (vários multipletos). RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 150,90; 109,31; 78,99; 55,34; 50,47; 48,34; 47,98; 43,00; 42,84; 40,86; 39,82; 38,77; 38,74; 38,09; 37,12; 35,60; 34,31; 29,87; 28,10; 27,43; 27,42; 25,18; 20,95; 19,31; 18,33; 18,00; 16,10; 15,99; 15,48; 14,56.

Uma parte (24,0 g) do extrato etanólico (EE) foi submetida à partição trifásica, hexano:clorofórmio:acetoneitrila:água (2:3:4:1:1), originando: fração hexânica (0,1 g; 0,4%), fração acetoneitrila:clorofórmio (1,4 g; 5,8%) e fração aquosa (21,5 g; 89,6%). Parte da fração aquosa (19,0 g) foi

submetida à cromatografia em coluna de NM-Poliamida usando-se água, metanol e acetato de etila, em ordem decrescente de polaridade. Da fração eluída com água obteve-se um sólido branco, denominado de composto **4** (20,0 mg; 0,1%). Faixa de fusão entre 91,4 e 92,1°C. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ : 4,67 (d, $J = 4,50$ Hz); 4,65 (d, $J = 4,10$ Hz); 4,48 (d, $J = 3,80$ Hz); 4,46 (d, $J = 3,40$ Hz); 4,33 (d, $J = 5,40$ Hz); 3,68-3,64 (m); 3,85-3,82 (m); 3,41-3,29 (m); 3,29 (s); 3,28-3,25 (m); 3,09 (dd, $J = 9,10$ e $2,90$ Hz). RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 50 MHz) δ : 81,09; 73,31; 72,22; 72,04; 70,49; 68,04; 57,04.

Da fração eluída com água:metanol (9:1), da coluna de NM-Poliamida, obteve-se um sólido branco, denominado de composto **5** (20,0 mg; 0,1%). Ponto de fusão acima de 300°C. A CCDS em sílica gel, revelada com reagente de Dragendorff, indicou o aparecimento de mancha única, amarelo-alaranjada, característica de composto de natureza alcaloídica. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ : 12,06 (sl); 8,75 (s); 8,33 (d, $J = 7,85$ Hz); 7,65 (d, $J = 8,16$ Hz); 7,58 (t, $J = 7,55$ Hz); 7,29 (t, $J = 7,38$ Hz); 2,82 (s). RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 50 MHz) δ : 166,92; 141,77; 140,93; 136,79; 136,18; 128,50; 127,20; 122,21; 121,41; 120,22; 115,55; 112,40; 20,29.

3. Ensaios biológicos

3.1. Geral

Para a avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória foram utilizados camundongos "Swiss", machos, pesando entre 20 a 30 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas. A ração foi retirada 12 horas antes dos testes, mantendo-se a água durante todo o tempo (*ad libitum*). Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG.

Como controles positivos dos ensaios biológicos formalina, "tail-flick" e "rota-rod" foram utilizados diclofenaco de sódio (Sigma, St. Louis, MO), sulfato de morfina (Sigma, St. Louis, MO) e cloridrato de xilazina (Sigma, St. Louis, MO), respectivamente. Para o teste do edema induzido o agente edematogênico utilizado foi a carragenina (Sigma, St. Louis, MO).

3.2. Teste da nocicepção induzida por formalina

A injeção subplantar de formalina em camundongos determina o aparecimento de uma gama de respostas motoras bem caracterizadas, cuja quantificação permite uma avaliação da intensidade da resposta nociceptiva (Dubuisson & Dennis, 1977). Esta se desenvolve em duas fases com mediação química e mecanismos de modulação distintos,

apresentando diferenças marcantes quanto à sua sensibilidade a drogas analgésicas. A primeira fase, de origem neurogênica, começa imediatamente após a aplicação e perdura por cerca de 5 minutos. A segunda fase, inflamatória, inicia-se de 15 a 20 minutos após a injeção e atinge o máximo entre 30 e 45 minutos. No método original, descrito por Dubuisson & Dennis (1977), a resposta nociceptiva era avaliada através do tempo despendido pelo animal em comportamentos assumidamente relacionados à dor, através de uma escala arbitrária de quatro pontos. Inúmeras variações foram propostas para este método de medida, a maioria das quais preconiza o uso de apenas um parâmetro de avaliação da resposta. O tempo, contado em segundos, em que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada ("licking time" ou "tempo de lambedura") tem sido frequentemente usado como índice de nocicepção.

Nesse experimento, os camundongos foram divididos em três grupos contendo 6 animais. Aproximadamente 15 minutos antes do início do teste, os camundongos foram colocados individualmente em caixas de acrílico transparente de 12x12x20 cm, contendo espelhos em ângulo de 45° na parede posterior para permitir a visualização da pata injetada. Uma solução de formalina (formaldeído 2% em solução tampão PBS; 30 mL pata⁻¹) foi injetada por via subplantar (subcutânea - s.c.) e a resposta computada pelo tempo (em segundos) em que o animal permanecia com a pata fora do piso (agitando, lambendo, mordendo ou simplesmente mantendo-a elevada). Os grupos experimentais utilizados foram tratados com água comum (controle; 10 mL kg⁻¹), sulfato de morfina (5 mg kg⁻¹; s.c.) e diclofenaco (10 mg kg⁻¹; por via oral; p.o.) como controles positivos da primeira e segunda fases do teste, respectivamente, e com o extrato etanólico de *A. nitidum* (10; 100; 300 mg kg⁻¹; p.o.), todos administrados uma hora antes da injeção subplantar de formalina.

A dose mais alta do extrato, usada para o teste da nocicepção induzida por formalina foi selecionada para ser utilizada nos testes "tail-flick" e "rota-rod" por causar a maior redução do tempo de lambedura durante a segunda fase do teste em relação ao controle.

3.3. Teste da latência para o reflexo de retirada da cauda ("tail-flick")

O teste "tail-flick" foi realizado de acordo com procedimento previamente descrito (D'Amour & Smith, 1941), onde um estímulo térmico de intensidade superior a 40°C é aplicado à cauda do camundongo (Ness et al., 1987). Nesse teste foram utilizados três grupos contendo de 6 a 8 animais. Os controles, grupos 1 e 2, receberam água comum (controle; 10 mL kg⁻¹; p.o.) e sulfato de morfina (5 mg kg⁻¹; s.c.), respectivamente. O grupo 3 foi tratado com o extrato

etanólico de *A. nitidum* (300 mg kg⁻¹; p.o.), todos administrados uma hora antes do teste. A latência para o reflexo de retirada da cauda foi medida a cada 30 minutos, a partir de uma hora antes (valores basais) até 2 horas depois dos tratamentos.

3.4. Teste da performance motora (“rota-rod”)

A avaliação da performance motora tem por objetivo detectar a ocorrência de incoordenação motora, permitindo uma interpretação mais acurada dos resultados obtidos nos testes para determinação da atividade antinociceptiva. Portanto, drogas que promovem relaxamento ou sedação alteram a performance motora e podem interferir na resposta, sem serem necessariamente antinociceptivas. Esse teste foi desenvolvido de acordo com o método de Dunham & Miya (1957) e o desempenho motor do animal foi medido em aparelho “rota-rod” (mod. DS 37; Ugo Basille). Foram utilizados três grupos contendo de 8 a 10 camundongos, sendo computado o tempo basal de permanência (em segundos) na barra giratória de, no máximo, 2 minutos (tempo de corte). Uma hora antes do teste, o grupo 1 recebeu água comum (controle; 10 mL kg⁻¹; p.o.), o grupo 2 foi tratado com cloridrato de xilazina (8 mg kg⁻¹; s.c.) e o grupo 3 recebeu o extrato etanólico de *A. nitidum* (300 mg kg⁻¹; p.o.). O tempo foi cronometrado imediatamente após a administração das substâncias aos animais (tempo zero), avaliando-se a ocorrência de mudanças em seu desempenho motor.

3.5. Edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina

Nesse experimento foram utilizados três grupos de 6 animais. O grupo 1 foi tratado com água comum (controle; 10 mL kg⁻¹; p.o.), o grupo 2 com diclofenaco (10 mg kg⁻¹; p.o.) e o grupo 3 com extrato etanólico de *A. nitidum* (100 e 300 mg kg⁻¹; p.o.). A seqüência experimental foi iniciada pela medida basal do volume das patas traseiras de todos os animais. Após 1 hora, todos os animais receberam uma injeção intraplantar de carragenina (2,0%; 30 mL/pata) em uma das patas traseiras. Imediatamente foi realizada a leitura do volume das patas (tempo zero) utilizando-se pletismômetro digital (Ugo Basile, mod.7140), seguido de outras três leituras a cada 2 horas. O edema inflamatório produzido pela carragenina foi calculado pela diferença entre a medida pletismométrica da pata tratada com carragenina e a medida pletismométrica da pata tratada com salina (Castro, 2000).

3.6. Apresentação dos resultados e análise estatística

Os valores experimentais foram apresentados como a média ou pela média da área sob a curva (ASC)

± e.p.m (erro padrão da média) dos resultados obtidos em testes realizados com, pelo menos, 6 camundongos. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, sendo considerado significativo (*) $P < 0,05$.

RESULTADO E DISCUSSÃO

1. Identificação estrutural dos fitoconstituintes

Do extrato etanólico do cerne de *A. nitidum* foram obtidos os compostos **1-5** (Figura 1). Os compostos **1a** e **1b** apresentaram teste de Lieberman-Burchard positivo para esteróides (Matos, 1988). O espectro no IV apresenta absorção em 3419 cm⁻¹ característica de grupos hidroxila. A absorção de intensidade média em 1668 cm⁻¹ pode ser atribuída a estiramento de grupos olefínicos. As absorções em 1059 e 1022 cm⁻¹ podem ser atribuídas a estiramento de grupos C–O. Quando analisados por RMN de ¹H e de ¹³C apresentaram sinais compatíveis com aqueles encontrados na literatura para os esteróides β -sitosterol e estigmasterol (Goulart et al., 1993).

Os compostos **2** e **3** tiveram a natureza triterpênica evidenciada pelo desenvolvimento de coloração parda no teste de Lieberman-Burchard (Matos, 1988). O composto **2** apresentou absorções no espectro de IV em 3300, 1460 e 1077 cm⁻¹, características dos grupos hidroxila, olefina e de estiramento da ligação C–O, respectivamente (Silverstein & Webster, 2000). No espectro de RMN de ¹H foram observados sinais entre δ_H 3,21-3,20 (m) e 5,18 (t) atribuídos a hidrogênios carbinólicos e olefínicos, respectivamente. Os sinais em δ_C 145,22 e 121,78 no espectro de RMN de ¹³C foram atribuídos aos carbonos olefínicos e o sinal em δ_C 79,07 ao carbono carbinólico. Por comparação com dados descritos na literatura, o composto **2** foi, então, identificado como o constituinte químico b-amirina (Macari et al., 1990; Mahato & Kundu, 1994). O composto **3** nos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C apresentou sinais característicos de grupo olefínico (δ_H 4,70-4,60 e δ_C 150,90 e 109,31) e de grupo carbinólico (δ_H 3,19-3,16 e δ_C 78,99). Da mesma forma, o composto **3** foi, então, identificado como o constituinte químico lupeol (Macari et al., 1990; Mahato & Kundu, 1994).

O espectro no IV do composto **4** apresentou absorções em 3337 e 1501 cm⁻¹, características de grupos hidroxila e de estiramentos de grupos C–O, respectivamente. Os dados de RMN de ¹H mostram seis sinais registrados entre δ_H 4,68 e 3,00 que podem ser atribuídos a hidrogênios de carbonos hidroxilados ou metoxilados. Além disso, há um simpleto registrado em δ_H 3,29 que pode ser atribuído a hidrogênio de grupo metoxila. Os dados de RMN de ¹³C de **4** mostram-se concordantes com a sua análise por RMN de ¹H, sugerindo a estrutura de um *O*-metil-inositol. De acordo

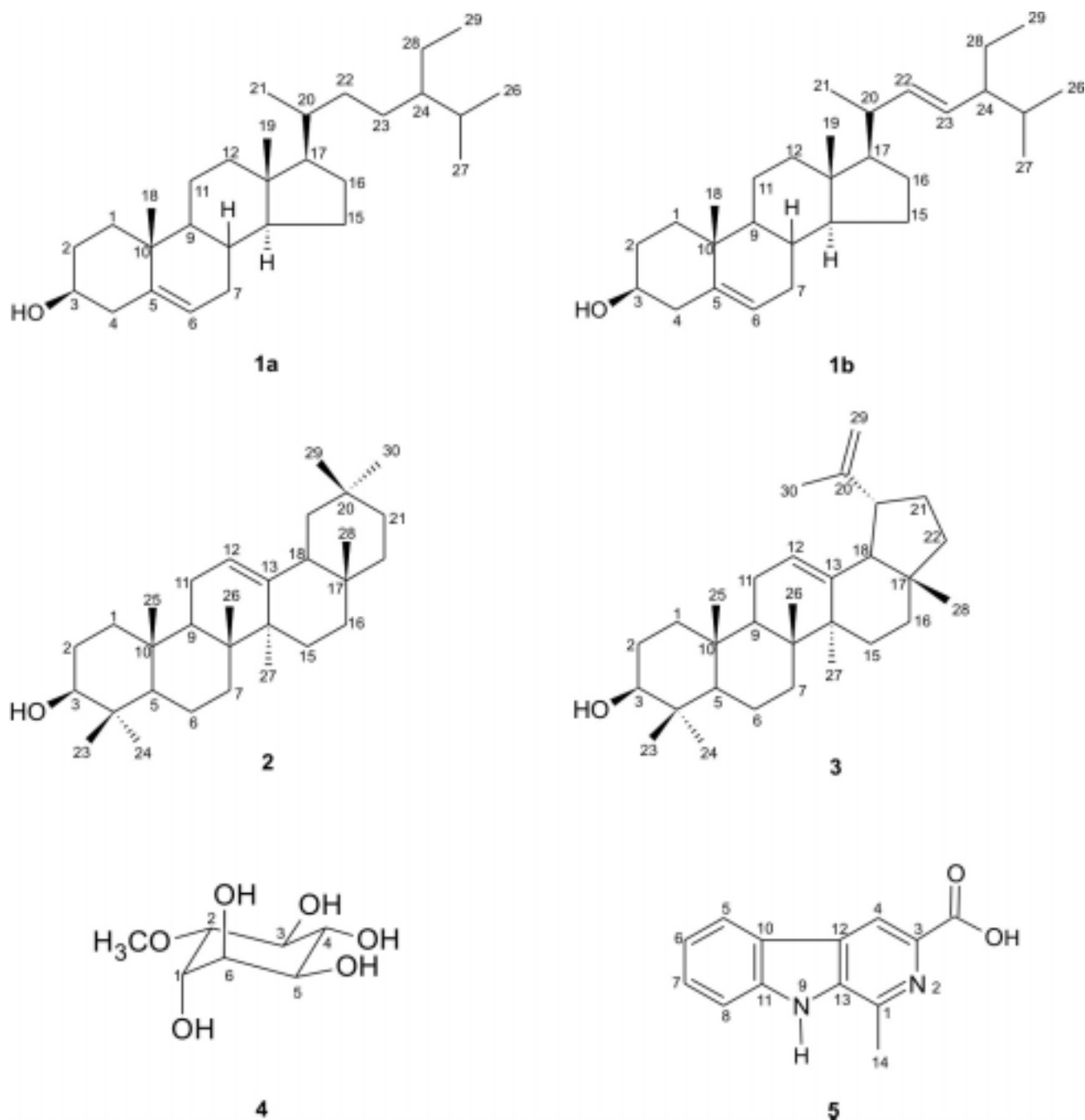


FIGURA 1. Constituintes químicos isolados do extrato etanólico do cerne de *A. nitidum*.

com a literatura (Breitmaier & Voelter, 1987), os dados de RMN de ^{13}C de **4** são compatíveis com aqueles registrados para L-2-O-metil-*chiro*-inositol.

O composto **5**, quando analisado por CCDS utilizando-se o reagente de Dragendorff como revelador, teve a natureza alcaloídica de sua estrutura indicada. A Tabela 1 mostra os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , assim como correlações dos mapas de contornos COSY e HMBC de **5**. Os dados de RMN de ^1H mostram cinco sinais na região entre δ_{H} 8,75 e 7,27, atribuídos a hidrogênios aromáticos. Dois simpletos são registrados em δ_{H} 2,82, atribuído a hidrogênios de grupo metila, e em δ_{H} 12,06, atribuído a hidrogênio de ácido

carboxílico. Os dados de RMN de ^{13}C mostram um sinal em δ_{C} 20,29, atribuído a carbono metílico, cinco sinais em δ_{C} 128,50, 122,21, 120,22, 115,55 e 112,40, atribuídos a carbonos metínicos aromáticos, e seis sinais de carbonos aromáticos não hidrogenados observados em δ_{C} 141,77, 140,93, 136,79, 136,18, 127,20 e 121,41. O subspectro DEPT-135 não registrou nenhum sinal de carbono metilênico. De acordo com a literatura (Sanchez & Brown, 1971), os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **5** são compatíveis com aqueles registrados para o ácido 3-harmanocarboxílico.

2. Avaliação da atividade antinociceptiva

O extrato etanólico do cerne de *A. nitidum* foi submetido ao teste da nociceção induzida por formalina. A Figura 2 mostra os resultados da atividade antinociceptiva do extrato etanólico (EE) de *A. nitidum* em relação aos resultados obtidos empregando-se morfina (M) e diclofenaco (D), utilizados como controles da primeira e segunda fases, respectivamente. Em ambas as fases, a morfina causou redução do tempo de lambadura (Hunnskaar et al., 1985; Shibata et al., 1989). O diclofenaco e o extrato (EE) nas doses de 100,0 e 300,0 mg, apresentaram atividade apenas na segunda fase do teste, indicando a existência de atividade antinociceptiva sem a participação do sistema opioidérgico.

A latência do reflexo de retirada da cauda,

avaliada pelo teste "tail-flick", é uma resposta nociceptiva de integração medular, alterada por analgésicos opióides e não por antiinflamatórios não esteroidais (Le Bars et al., 2001). A Figura 3 mostra os resultados do teste "tail-flick" do EE em relação ao controle positivo. Os resultados mostram que apenas a morfina causou aumento significativo da latência, estando em concordância com os resultados obtidos pelo teste da nociceção induzida por formalina. Portanto, pode-se propor a não participação do sistema opioidérgico no efeito antinociceptivo apresentado pelo EE.

O teste "rota-rod" detecta a ocorrência de incoordenação motora, permitindo uma interpretação mais acurada dos resultados obtidos nos testes da nociceção induzida por formalina (Dunham & Myia,

TABELA 1. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz), bem como dados dos mapas de contornos COSY e HMBC de **5**, em DMSO- d_6 , TMS

Carbono	δ_c	δ_H , mult., (J Hz)	COSY $J_{(H-H)}$	HMBC $J_{(H-C)}$
1	141,77			
3	136,79			
4	115,55	8,75 s ^a		H-4/COOH H-4/C-13 H-4/C-10 H-5/C-11
5	122,21	8,33 d ^b (J = 7,85)	H-5/H-6	H-5/C-7 H-5/C-12
6	120,22	7,29 t ^c (J = 7,38)	H-6/H-7 H-6/H-5	H-6/C-10 H-6/C-8
7	128,50	7,58 t (J = 7,55)	H-7/H-6 H-7/H-8	H-7/C-11 H-7/C-5
8	112,40	7,65 d (J = 8,16)	H-8/H-9	H-8/C-10 H-8/C-6
10	121,41			
11	140,93			
12	127,20			
13	136,18			
14	20,29	2,82 s		
-COOH	166,92			

(a) s = simpleto; (b) d = dupleteo; (c) t = tripleto.

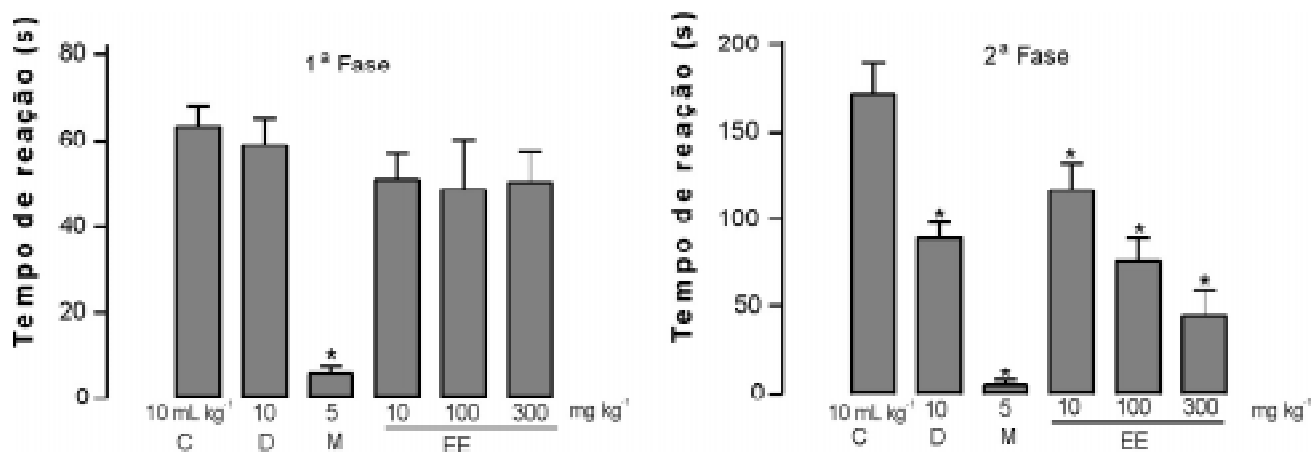


FIGURA 2. Efeito da administração do extrato etanólico de *A. nitidum* (EE; 10, 100 e 300 mg kg⁻¹; p.o.) sobre a nociceção induzida por formalina em camundongos. Grupos experimentais: sulfato de morfina (M; 5 mg Kg⁻¹; s.c., 1a fase) e diclofenaco (D; 10 mg kg⁻¹; p.o.; 2a fase), controle positivo; água (C; 10 mL⁻¹kg; p.o.), controle do teste. Os resultados são apresentados pela média e.p.m. (n = 6); (*) P < 0,05, significativos quando comparados com o controle.

1957). As drogas que promovem relaxamento ou sedação alteram a performance motora do animal. Entretanto, deve-se considerar que algumas drogas podem interferir nos testes para detecção da atividade antinociceptiva, mesmo não sendo drogas antinociceptivas, caracteristicamente. A Figura 4 mostra os resultados do teste "rota-rod" realizado com EE (300 mg kg⁻¹; p.o.) e cloridrato de xilazina (X; 8 mg kg⁻¹s.c.). Nesse teste, a xilazina diminuiu significativamente a permanência dos animais na barra giratória, resultado não observado quando da administração do extrato etanólico do cerne de *A. nitidum*. Com isso, pode-se propor que a ação antinociceptiva desse extrato, observada na segunda fase do teste de antinocicepção induzida pela formalina e confirmada pelo teste do "tail-flick", não derivou de alterações neurológicas ou motoras, mas de um efeito antinociceptivo propriamente dito.

3. Avaliação da atividade antiinflamatória

A injeção intra-plantar de carragenina induz um aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada dos animais. Esse edema, que é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constitui-se em um parâmetro útil na avaliação da atividade antiinflamatória (Castro, 2000). A Figura 5 mostra os resultados dos testes de edema induzido por carragenina (2%; i.pl.) com o extrato etanólico do cerne de *A. nitidum* (EE; 100 e 300 mg kg⁻¹; p.o.), utilizando-se diclofenaco (D; 10 mg kg⁻¹; p.o.) como controle positivo, por ser um antiinflamatório não esteroidal padrão para esse tipo de teste. Os resultados obtidos indicam que o EE causou redução da média da ASC do edema induzido por carragenina em relação ao controle do teste.

CONCLUSÃO

Do extrato etanólico do cerne de *A. nitidum*, após sucessivos procedimentos cromatográficos, foram obtidos uma mistura de esteróides (β -sitosterol e estigmasterol **1a** e **1b**), triterpenos pentacíclicos (β -amirina **2** e lupeol **3**), um inositol (L-2-O-metil-chiro-inositol **4**) e um alcalóide β -carbolínico, identificado como o ácido 3-harmanocarboxílico, composto **5**, descritos pela primeira vez na espécie. Todos os compostos foram identificados comparativamente tanto por meio de CCDS com amostras autênticas quanto por dados no IV e RMN descritos na literatura.

Esse extrato apresentou um efeito antinociceptivo detectável na segunda fase do teste de nocicepção induzida por formalina e foi capaz de reduzir o edema de pata causado pela carragenina. A atividade constatada pode ser relacionada aos constituintes químicos isolados, uma vez que a literatura descreve alguns trabalhos que demonstram significativa atividade antiinflamatória dos compostos lupeol (**3**) (Geetha & Varalakshmi, 2001), sitosterol e

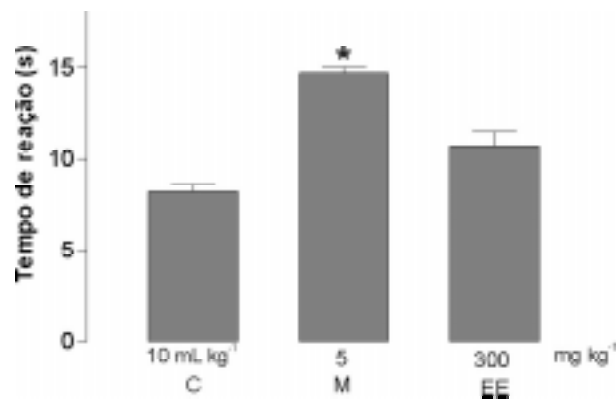


FIGURA 3. Efeito da administração do extrato etanólico de *A. nitidum* (EE; 300 mg kg⁻¹; p.o.) sobre a latência para o reflexo de retirada da cauda no teste "tail-flick". Grupos experimentais: sulfato de morfina (M; 5mg kg⁻¹; s.c), controle-positivo; água (C; 10 mL kg⁻¹; p.o.), controle do teste. Os resultados estão representados pela média \pm e.p.m. da ASC ($n = 6-8$); (*) $P < 0,05$, ANOVA.

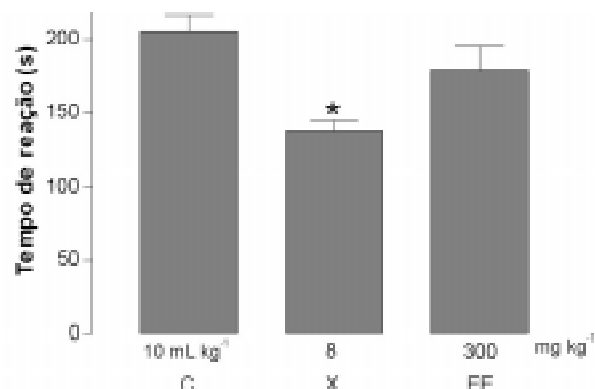


FIGURA 4. Efeito da administração do extrato etanólico de *A. nitidum* (EE; 300 mg kg⁻¹; p.o.) sobre a performance no teste rota-rod. Grupos experimentais: cloridrato de xilazina (X; 8mg kg⁻¹; s.c.), controle-positivo; água (C; 10 mL Kg⁻¹; p.o.) controle do teste. Os resultados estão representados pela média \pm e.p.m. da ASC ($n = 8-10$); (*) $P < 0,05$, ANOVA.

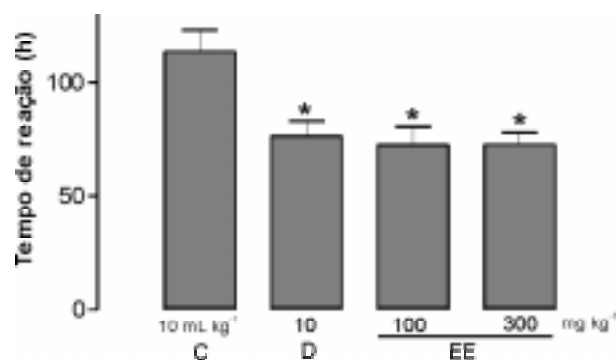


FIGURA 5. Efeito da administração do extrato etanólico de *A. nitidum* (EE; 100 e 300 mg kg⁻¹; p.o.) sob o edema induzido pela injeção de carragenina (2%; i.pl.). Grupos experimentais: diclofenaco (D; 10 mg kg⁻¹; p.o.), controle-positivo; água (C; 10 mL kg⁻¹; p.o.) controle do teste. Os resultados estão representados pela média \pm e.p.m. da ASC ($n = 6$); (*) $P < 0,05$, ANOVA.

estigmasterol (**1a**, **1b**) (Gomez et al., 1999; Senatore et al., 1989). Os resultados obtidos podem, certamente, justificar algumas das informações etnofarmacológicas dessa planta.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a CAPES e ao CNPq pela bolsa e outros auxílios financeiros.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALBUQUERQUE, B.W.P. Contribuição ao conhecimento das *Aspidosperma* da Amazônia Brasileira (Apocynaceae). **Acta Amazônica**, v. 1, n.3, p.9-20, 1971.

ARNDT, R.R. et al. Alkaloid Studies-LVIII. **Phytochemistry**, v.6, p.1653-8, 1967.

BOLZANI, V.S. et al. Indole alkaloid evolution in *Aspidosperma*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.15, p.187-200, 1987.

BOURDY, G. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.269-277, 2004.

BRANDÃO, M.G.L. et al. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v.36, p.175-82, 1992.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 NMR Spectroscopy**: high resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry. 3.ed, New York: VCH Publishers, 1987. p.400-1.

CASTRO, M.S.A. **Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do 3-O-glicosil-dihidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium* ("algodãozinho")**. 2000. 200p. Tese (Doutorado)-Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5.ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1993. 276p.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.72, p.74-9, 1941.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The Formalin Test: a quantitative study of the analgesic effect of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v.4, p.161-74, 1977.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detection neurological deficit in rats a mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.46, p.208-9, 1957.

FERREIRA, I.C.P. et al. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.3, p.325-7, 2004.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, n.1, p.77-80, 2001.

GOMEZ, M.A et al. A Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratatum* on chronic and acute inflammation models. **Journal of Biosciences**, v.54, n.11, p.937-41, 1999.

GOULART, M.O.I. et al. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos triterpenos de Jatrofolonas A e B. **Química Nova**, v.16, n.2, p.95-100, 1993.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 3.ed. Florianópolis: Editora da Universidade, 2001. p.651-66.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOULE, K. Formalin test in mice, a useful techniques for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p.69-76, 1985.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, W.W. Animal models of nociception. **Pharmacology**, v. 53, p. 597-652, 2001.

MACARI, P.A.T.; EMERECIANO, V.P.; FERREIRA, Z.M.G.S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* através de análise por "Micro Computador". **Química Nova**, v.13, n.4, p.260-4, 1990.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v.37, n.6, p.1517-75, 1994.

MATOS, F.J. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: EUFC, 1998. 114p.

NESS, T.J.; JONES, S.L.; GEBHART, G.F. Contribution of the site of heating to variability in the latency of the rat tail-flick reflex. **Brain Research**, v.426, p.169-72, 1987.

OLIVEIRA, F.Q. et al. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, n.2, p.23-31, 2003.

RIBEIRO, J.E.L.S. et al. **Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. 19. ed. Manaus: Midas Printing, 1999. p.568-81.

SANCHES, W.E.; BROWN JR., K.S. Dois novos alcalóides β-carbolínicos de *Aspidosperma exalatum* Monachino. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.3/4, p. 603-5, 1971.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos in *Aspidosperma*. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 3. ed. Florianópolis: Editora da Universidade, 2001. p.689-716.

SENATORE, F. et al. Steroidal constituents and anti-inflammatory activity of the horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) bark. **Bollettino - Societa Italiana di Biologia Sperimentale**, v.65, n.2, p.137-41, 1989.

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v.38, p.347-52, 1989.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos, 2000. 460p.

WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.193-200, 2001.