

Utilização de CLAE, como paradigma na obtenção e controle do diterpeno solidagenona a partir de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira)

HPLC as a paradigm in the solidagenona diterpene acquisition and control from *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira) inflorescences

Valverde-Soares¹, S.S.; Azevedo-Silva², R.C. & Tomassini³, T.C.B.

RESUMO – O diterpeno labdano, solidagenona, descrito ser ativo como anti-inflamatório, gastroprotetor e imunomodulador, foi isolado do extrato éter:etanol, obtido da inflorescência de *Solidago chilensis* Meyen, a Arnica Brasileira. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), quando efetuada nas condições descritas nesse artigo, possibilitou controlar através do monitoramento dos seus eluatos, a saída do diterpeno até seu total esgotamento no tempo de retenção de 71,60min. Durante o processo de isolamento da substância por Cromatografia Líquida em Coluna (CLC), o labdano foi separado com o sistema hexano:acetato de etila, ratificando os procedimentos inéditos deste trabalho. A análise qualitativa por espectroscopia de RMN, UV, IR e Massas, bem como, a quantitativa, permitiram inferir que os rendimentos foram de 9,00% para o extrato bruto e 6,38% para a solidagenona recristalizada em hexano:diclorometano, confirmando a estrutura daquele labdano derivado.

PALAVRAS CHAVE – *Solidago chilensis* Meyen, solidagenona, extrato das inflorescências, CLAE.

SUMMARY – The diterpene labdane solidagenone, described as anti-inflammatory, gastroprotective and an immunomodulating active substance, has been extracted from the *Solidago chilensis* Meyen inflorescences with ethyl ether:ethanol solvent system. The elution procedure to obtain the pure diterpene was done in an open column using the hexane ethyl-acetate solvent system. The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) when realized as described conditions allow to control, monitorate and do the solidagenone's total depletion in 71,60 minutes retention time. Qualitative analyses using NMR, UV, IR, mass techniques and melting point, confirm the literature data to its compound. The quantitative results pointed out values as 9.00% to yield obtained extract and 6.38% yield to recrystallized solidagenone using hexane-ethyl acetate solvent system.

KEYWORDS – *Solidago chilensis* Meyen, solidagenone, inflorescences extract, HPLC analysis.

INTRODUÇÃO

Solidago *chilensis* Meyen é uma espécie nativa da América do Sul, encontrada nas regiões sul e sudeste do Brasil. Seus rizomas frescos são utilizados na medicina tradicional como diurético, estimulante do apetite e antihelmíntico^{4,9} e suas partes aéreas são empregadas como anti-inflamatório^{2,3}. Esta espécie vem sendo usada entre nós, como sucedânea da *Arnica montana* L. por acreditar-se ter efeito farmacológico semelhante⁷. *S. chilensis* é considerada uma espécie melífera, além de apresentar certa toxicidade ao rebanho devido à alta concentração de saponinas^{4,9}. Entre os constituintes químicos do gênero *Solidago* encontram-se terpenos (sesquiterpenos e diterpenos), flavonóides entre outras substâncias². Alguns dos terpenos ou seus derivados de *Solidago chilensis* Meyen

já demonstraram ter atividade gastroprotetora em diferentes modelos experimentais de úlcera induzida, em animais, sem apresentar sinais de toxicidade em doses superiores a 600mg/kg. Além disso, a solidagenona (100mg/kg) apresentou atividade similar ao lansoprazol (20mg/kg), cujo efeito ocorre sem alterações na mucosa gástrica ou na secreção ácida.

O diterpeno labdânico solidagenona é o principal constituinte descrito para o rizoma de *Solidago chilensis* Meyen., isolado com rendimento de 6,56% a partir do extrato obtido em mistura de éter etílico:etanol (1:1)^{4,8}. Estudos realizados pelo nosso grupo mostram a atividade imunomoduladora da solidagenona, através do potencial dessa substância na inibição de óxido nítrico em macrófagos peritoniais de camundongos BALB/C. Estas células foram incubadas na presença de solidagenona, do interferon-gama e de

Data do aceite: 06/7/2009

¹Mestre em Química de Produtos Naturais (NPPN/UFRJ); Pesquisadora Tecnologista em Saúde Pública; LQPN (PN2) FarManguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (simonevalverde@far.fiocruz.br)

²Graduanda em Farmácia (UGF); Estagiária PEC/CIEE; LQPN (PN2) FarManguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (rafaellasilva@far.fiocruz.br)

³PhD em Pharmaceutical Sciences; Pesquisadora Tecnologista Sênior; LQPN (PN2) FarManguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (tomassini@far.fiocruz.br)

lipopolissacarídeos. Houve inibição de 93% da produção de óxido nítrico. A solidagenona também foi ensaiada para a verificação de sua capacidade em inibir a proliferação de linfócitos ativados, incubando-se células de baço na presença de concavalina A, causando inibição da proliferação em 99%⁵.

Para isolar quantidade significativa de solidagenona, visando viabilizar a continuidade dos ensaios farmacológicos já iniciados no CPqGM/Fiocruz (Bahia), foram desenvolvidas modificações da metodologia apresentada por SCHMEDA-HIRSCHMANN⁴, realizando a extração de inflorescências por maceração dinâmica em vez de maceração estática de raízes ou rizomas. Esta extração foi monitorada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) até o esgotamento da solidagenona. Os sistemas de solventes utilizados para a cromatografia líquida em coluna também foram modificados, baseando-se nas propriedades físico-químicas das substâncias envolvidas e na segurança laboratorial, evitando a utilização de éter etílico nesta etapa. Entre os objetivos deste trabalho, encontram-se a obtenção de um perfil cromatográfico do extrato em éter etílico:etanol (1:1) de inflorescências secas de *Solidago chilensis* Meyen e a caracterização da presença de solidagenona neste extrato, através do seu comportamento cromatográfico por CLAE, permitindo que esta substância também seja identificada.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Solidago chilensis Meyen foi cultivada e coletada na Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos (PAF), na FIOCRUZ/RJ, sendo submetida à mondanagem manual para a seleção das inflorescências; secagem em estufa e pulverização em moinho de facas. A identificação da espécie foi realizada por Mariana Reis de Brito, do Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia/UFRJ e uma exsicata foi depositada sob o código 32689/RFA.

Experimental

Para a maceração dinâmica, utilizou-se um *shaker* KS501 digital IKA Labortechnik®. Os pontos de fusão foram medidos em aparelho digital MQAPF-301 (Microquímica) e os valores obtidos não foram corrigidos.

Os solventes utilizados para a extração, Cromatografia Líquida em Coluna (CLC) e em Camada Delgada (CCD) apresentavam grau P.A.; os utilizados para a análise em CLAE (ácido trifluoroacético e acetonitrila) foram de grau cromatográfico e, aqueles utilizados nas recristalizações, foram previamente tratados¹ e destilados. Na CCD foram utilizadas cromatofolhas Merck®. A concentração dos extratos foi realizada em evaporador rotatório Büchi Rotavapor R-114.

Todas as amostras, antes de suas análises, foram mantidas em dessecador elétrico (Sanpla *Dry Keeper*, Sanplatic Corp.®) até peso constante.

As análises em CLAE (Figuras 1 e 3) foram realizadas em coluna Hibar Lichrospher (Merck®, Código 1.50377.001) para escala analítica, com 250mm de comprimento, 4mm de diâmetro e 5mm de tamanho de partícula, usando C18 como fase estacionária.

Extração de solidagenona

200g de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen foram secas a 30°C em estufa, pulverizadas (em moinho de facas) e submetidas à extração por maceração dinâmica à temperatura ambiente, com éter etílico:etanol (1:1) por 4 períodos de 6h diárias. O extrato obtido foi filtrado e submetido à evaporação sob pressão reduzida.

Condições cromatográficas para análise e isolamento de solidagenona

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foi utilizada uma mistura binária como sistema eluente isocrático, composta por ácido trifluoroacético 0,05% (54,94mL) e acetonitrila (27,06mL). As amostras foram diluídas na proporção de 1mg/10mL e alíquotas de 1L foram injetadas.

A separação ocorreu à temperatura de 30°C, com fluxo de 1mL min⁻¹. As substâncias eluídas foram analisadas quanto à sua absorção em UV entre 210 e 400nm.

Cromatografia Líquida em Coluna (CLC) e em Camada Delgada (CCD)

Para o isolamento da solidagenona, utilizou-se 10g de extrato que foram submetidos à cromatografia líquida em coluna com gradiente crescente de polaridade entre hexano e acetato de etila, resultando em 20 frações monitoradas por CCD, usando como sistema eluente, hexano:acetato de etila (8:2), reveladas sob lâmpada de UV e com solução de anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento a 100°C por 10min, para a detecção de carbonilas¹⁰. A solidagenona foi observada nas frações eluídas com hexano:acetato de etila (9:1), totalizando 0,65g sob a forma de cristais aciculares incolores e apresentou $R_f = 0,42$. A recristalização da solidagenona ocorreu em presença de uma mistura de hexano e diclorometano sob aquecimento, até a completa dissolução da amostra. A solução foi resfriada em refrigerador por 24-48h e os cristais obtidos foram filtrados e após secagem em *dry keeper*, foram submetidos às análises espectroscópicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise quantitativa

O extrato bruto obtido a partir de inflorescências de *S. chilensis* Meyen apresentou rendimento de 9,0%, sendo analisado por CLAE (Figura 1), permitindo a caracterização e o monitoramento de solidagenona (Figura 1) revelando a presença desta substância no extrato, com tempo de retenção de 71,6min e absorção em UV próximo a 225nm (Figuras 2 e 4; Tabelas I e III), compatível

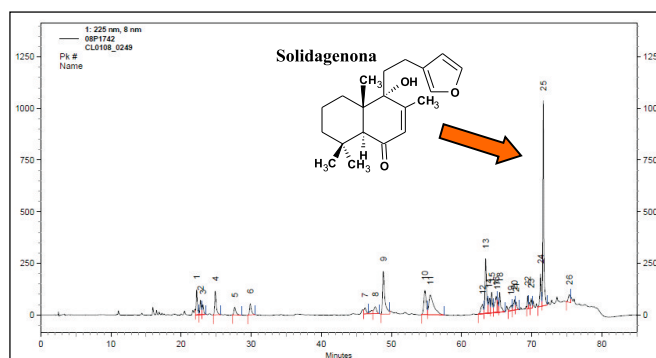


FIG. 1 - Cromatograma do extrato bruto.

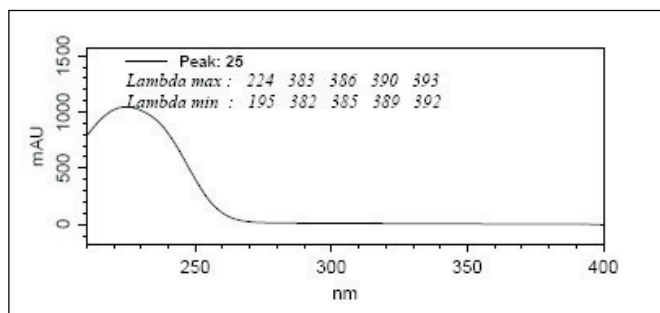


FIG. 2 - Absorbância da solidagenona no extrato em éter etílico:etanol sob UV (210 a 400nm).

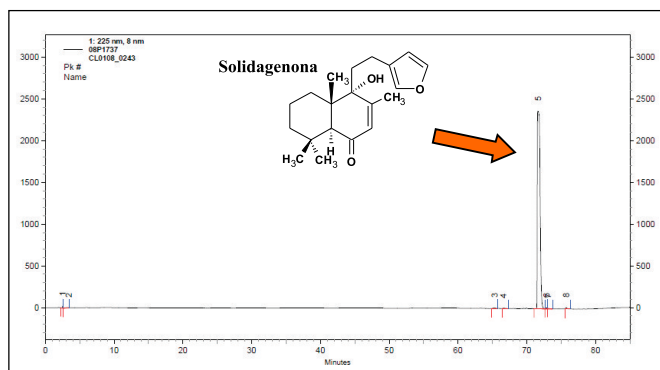


FIG. 3 - Cromatograma da solidagenona isolada em CLC.

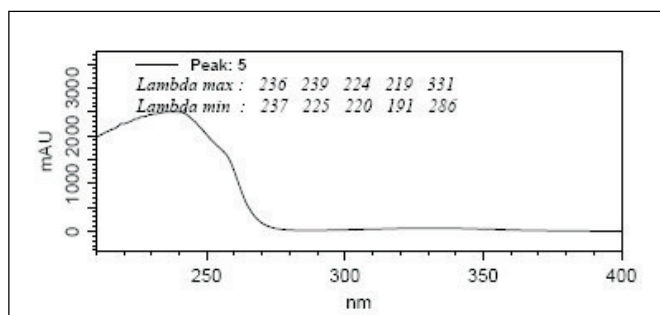


FIG. 4 - Absorbância da solidagenona isolada por CLC sob UV (225 a 400nm).

com a estrutura e com dados da literatura⁸. O extrato foi submetido à cromatografia em coluna com gel de sílica e gradiente de polaridade crescente de hexano a acetato de etila.

A análise quantitativa de solidagenona por CLAE (Figuras 3 e 4; Tabela II) foram realizadas através da medida da área sob o pico, tanto no extrato bruto, quanto para a substância isolada, revelando 20,81% de área para a solidagenona. Após o isolamento da solidagenona através de CLC, a análise por CLAE, mostrou presença de 98,10% da substância.

A solidagenona foi obtida com um percentual médio de 6,38% nas extrações realizadas. Foi recristalizada com hexano:diclorometano e apresentou ponto de fusão 130,60-131,00°C. A substância pura foi submetida à análise espectroscópica por RMN ¹H, ¹³C, UV e espectrométrica (massas) e à CLAE, através dos quais sua estrutura pôde ser confirmada.

CONCLUSÕES

As modificações da metodologia utilizada por SCHMEIDA-HIRSCHMANN⁴ mostraram que o rendimento foi equivalente àquele obtido, quando utilizadas inflorescências de

TABELA I
Análise do extrato bruto por CLAE/UV (210 a 400nm)

1:225 nm, 8 nm Pk #	Retention	Area	Area%	Height	Height %	Width
1	22.229	1552651	3.299	121999	3.989	0.51
2	22.773	880471	1.871	69786	2.282	0.39
3	23.115	671215	1.426	47924	1.567	0.61
4	24.885	1826740	3.881	114779	3.753	1.03
5	27.648	773393	1.643	36847	1.205	1.30
6	29.877	983293	2.089	53486	1.749	1.06
7	46.240	656998	1.396	29495	0.964	0.64
8	47.701	866139	1.840	32822	1.073	0.90
9	48.843	4642328	9.864	207287	6.777	1.23
10	54.784	2743576	5.829	117804	3.852	0.85
11	55.552	4619561	9.815	95484	3.122	2.40
12	62.997	1097001	2.331	45668	1.493	0.80
13	63.445	4158770	8.836	265601	8.684	0.60
14	63.957	1050462	2.232	72380	2.367	0.34
15	64.309	1396267	2.967	99999	3.270	0.41
16	64.939	1633630	3.471	79118	2.587	0.52
17	65.109	677037	1.439	59829	1.956	0.23
18	65.451	1499277	3.186	96255	3.147	0.86
19	67.072	552804	1.175	25498	0.834	0.59
20	67.541	812492	1.726	50749	1.659	0.43
21	67.787	504926	1.073	38330	1.253	0.54
22	69.440	554356	1.178	62551	2.045	0.27
23	69.941	533657	1.134	46953	1.535	0.32
24	71.275	1827611	3.883	157569	5.152	0.58
25	71.659	9798455	20.819	993380	32.480	0.80
26	75.381	751498	1.597	36867	1.205	0.61
Totals		47064608	100.000	3058460	100.000	

TABELA II
Análise de solidagenona por CLAE/UV (210 a 400nm)

1:225 nm, 8 nm Pk #	Retention	Area	Area%	Height	Height %	Width
1	2.517	168515	0.250	26797	1.091	0.35
2	3.392	268603	0.399	6498	0.265	0.85
3	65.301	196683	0.292	9091	0.370	0.82
4	66.592	122044	0.181	5632	0.229	0.85
5	71.637	66094081	98.107	2368284	96.465	1.58
6	72.864	159601	0.237	13958	0.569	0.37
7	73.077	103543	0.154	6686	0.272	0.74
8	75.723	256405	0.381	18126	0.738	0.87

TABELA III
Análise de solidagenona por CLAE/UV (210 a 400nm)

Amostra	Cromatograma	Nº Sinal (Pico)	R _f (min)	Abs UV 225nm
Extrato em éter etílico:etanol	Fig 1	25	71,65	226
Solidagenona isolada por CLC	Fig 3	5	71,63	225

Solidago chilensis Meyen. Uma vez que a solidagenona é o constituinte responsável pela sua atividade farmacológica e pelo emprego de *Solidago chilensis* Meyen em substituição à *Arnica montana* L., foi necessária a determinação de um perfil cromatográfico por CLAE, mediante análise da substância isolada, sendo confirmada por métodos espectroscópicos. A metodologia empregada na análise por CLAE, mostrou-se eficiente para a rápida identificação da solidagenona, permitindo avaliação qualitativa e quantitativa nos extratos, independentemente da metodologia utilizada para sua extração. Este trabalho mostra, pela primeira vez, o registro do tempo de retenção da solidagenona, seu monitoramento em extratos brutos, bem como, pormenoriza sua recristalização.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem ao Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MORITA, T. & ASSUMPÇÃO, R.M.V. *Manual de Soluções Reagentes e Solventes*. 2 ed. São Paulo: Ed. Edgar Blucher, 1990, 629p.

2. RAZMILIC, I.B. & SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Activity of solidagenone and their semi synthetic derivatives on the glucocorticoid-mediated signal transduction, *Planta Med.*, 66: 86-88, 2000.
3. SANTOS, M.A.P. & REIS, M.C.P. Relato de uma experiência de incentivo ao uso popular da planta medicinal dentro de uma prática médica generalista numa comunidade adstrita. *Livro de Resumos*, 07.015, XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 1998, Águas de Lindóia, São Paulo.
4. SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. A Labdan Diterpene from *Solidago chilensis* roots. *Planta Med.*, 54: 179-180, 1988.
5. SOARES, M.; TOMASSINI, T.C.B.; LEDA, P.H.; COSTA, J.F.O. & SANTOS, R.R.. *Solidago chilensis* Meyen - *solidagenona* como agente imunomodulador. In: XXVI Congresso Latino Americano de Química. XXVII Reunião Anual da SBQ, 2004, Salvador. Livro de Resumos. Salvador - Bahia : Sociedade Brasileira de Química, 1: 339, 2004.
6. TORRES, L.M.B. *Estudo Químico da Espécie Solidago microglossa* DC. 1985. 175p. Tese de Doutorado em Química. Instituto de Química da USP, São Paulo.
7. TORRES, L.M.B.; AKISUE, M.K. & ROQUE, N.F. Quercetina em *Solidago microglossa* DC, a *Arnica* do Brasil. *Rev Farm Bioquím.*, Univ. S. Paulo, 23 (1): 33-40, 1987.
8. TORRES, L.M.B.; ROQUE, N.F. & AKISUE, M.K. Diterpenes from Roots of *Solidago microglossa*. *Rev Latinoamer Quím.*, 2012: 94-97, 1989.
9. VILA, R., MUNDINA, M. TOMI, F., FURLÁN, R., ZACCHINO, S., CASANOVA, J. & CAÑIGUERAL, S. Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Solidago chilensis*. *Planta Med.*, 68:164-167, 2002.
10. WAGNER, H.; BLADT, S. & ZGAINSKI, E.M. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Translation of the German edition 'Drogenanalyse' by Thomas A. Scott. Berlin: Springer-Verlag Edition. 1984, 320p.

Endereço eletrônico

Simone Valverde-Soares

e-mail: simonevalverde@far.fiocruz.br