

ISOLAMENTO DO ALCALÓIDE RICININA DAS FOLHAS DE *Ricinus communis* (EUPHORBIACEAE) ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIAS EM CONTRACORRENTE

Ana Cristina Leite, Elaine Cristina Cabral, Djalma Antônio P. dos Santos, João Batista Fernandes*, Paulo Cezar Vieira e M. Fátima das G. F. da Silva

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970 São Carlos - SP

Recebido em 9/8/04; aceito em 14/3/05; publicado na web em 11/7/05

ISOLATION OF THE ALKALOID RICININE FROM THE LEAVES OF *Ricinus communis* (EUPHORBIACEAE) THROUGH COUNTER-CURRENT CHROMATOGRAPHY. Droplet counter-current chromatography, rotation locular counter-current chromatography and high-speed counter-current chromatography were applied to the preparative separation of the alkaloid ricinine from the dichloromethane extracts of *Ricinus communis* leaves. The solvent system used was composed of dichloromethane-methanol-water (93:35:72 v/v/v) and all techniques led to the isolation of large amounts of the alkaloid. The best result was obtained through HSCCC, since the ricinine yield was respectively 50% and 30% higher than when using RLCC or DCCC.

Keywords: counter-current chromatography; ricinine; leaf-cutting ants.

INTRODUÇÃO

A cromatografia contracorrente (CCC) é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido sem o uso de adsorbente. Esta técnica consiste na utilização de duas fases líquidas imiscíveis, onde uma é a fase móvel e a outra, a fase estacionária. A distribuição do soluto em cada uma das fases é determinada através de seus respectivos coeficientes de partição¹. Esta técnica é amplamente utilizada na separação de produtos naturais pois, devido à ausência de suporte sólido, evita problemas como a adsorção irreversível das amostras e a degradação de seus constituintes^{1,2}, assim como permite a injeção de grande quantidade de amostra sem necessidade de pré-purificações, a recuperação total da mesma e, também, um baixo consumo de solventes. O sucesso da CCC depende da escolha correta do sistema de solvente, que pode ser realizada através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), partição líquido-líquido ou consulta de listas de solventes otimizados para classes específicas de produtos naturais^{1,3,5}.

A cromatografia contracorrente de gotas ("DCCC: droplet counter-current chromatography") consiste na passagem de gotas da fase móvel através da fase estacionária líquida, levando à partição do soluto entre as duas fases imiscíveis. O equipamento de DCCC é geralmente constituído por 200-600 colunas de vidro verticais, conectadas em série por tubos de teflon. A fase móvel pode ser introduzida no modo ascendente ou descendente, conforme sua densidade em relação à fase estacionária. Geralmente são utilizados sistemas de solventes ternários ou quaternários. Raramente são utilizados sistemas binários, já que a adição de um terceiro ou quarto solvente diminui a diferença de polaridade entre as duas fases, aumentando a seletividade do sistema¹. Esta técnica é bastante utilizada na separação de produtos naturais polares, como por ex., flavonóides glicosilados⁶, saponinas⁷⁻⁸ e alcalóides⁹⁻¹⁰. A DCCC mostrou-se eficiente também na separação de produtos naturais apolares¹¹.

A cromatografia contracorrente locular rotacional ("RLCC: rotation locular counter-current chromatography") é realizada em um equipamento constituído por 16 colunas de vidro, compostas de 16 compartimentos cada, posicionadas em torno de um eixo rotacional,

onde o ângulo de inclinação e a velocidade de rotação podem ser variados¹². Assim como na técnica de DCCC, as análises em RLCC podem ser realizadas no modo ascendente ou descendente. Apesar desta técnica apresentar menor resolução em comparação com a DCCC, vários trabalhos relatam sua utilização no isolamento de produtos naturais¹³⁻¹⁵. A principal vantagem desta técnica em relação à DCCC é a possibilidade da utilização de maior variedade de solventes já que, neste caso, há necessidade apenas da existência de um sistema bifásico, mas não da formação de gotas, para realização da análise.

A técnica de cromatografia contracorrente mais utilizada atualmente no isolamento de produtos naturais é a cromatografia contracorrente de alta velocidade ("HSCCC: high-speed counter-current chromatography")^{1,16}. A instrumentação da HSCCC é composta por uma bobina de tubo de teflon enrolado de forma espiral, que realiza um movimento planetário em torno de um eixo central. Nesta técnica, a fase estacionária é mantida no equipamento através da força centrífuga e a fase móvel pode ser bombeada em alta velocidade permitindo, assim, menor tempo de análise¹. Nos equipamentos de DCCC e RLCC, a fase estacionária é mantida pela força gravitacional. A HSCCC apresenta várias vantagens em relação às outras técnicas descritas, como por ex., a diminuição do tempo de análise sem perda de resolução e a utilização de quantidades menores de solventes¹.

Em trabalhos publicados pelo nosso grupo, *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), conhecida popularmente como mamona, foi descrita como uma planta potencialmente tóxica às formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*^{17,18}. O objetivo deste trabalho foi a obtenção das melhores condições de isolamento, através das técnicas de cromatografia contracorrente, do alcalóide ricinina, isolado anteriormente das folhas de mamona¹⁹. Isto foi realizado devido à necessidade do isolamento deste composto em quantidade suficiente para elaboração de ensaios biológicos com as formigas cortadeiras, através da elaboração de iscas granuladas e nebulizações.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal e preparação do extrato bruto

As folhas de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) foram coletadas no Campus da Universidade Federal de São Carlos

*e-mail: djbf@power.ufscar.br

(UFSCar), SP, em julho de 1998. A identificação da espécie foi realizada pela Prof^a. M. I. S. Lima e a exsiccata foi depositada no herbário HUFSCar do Departamento de Botânica da UFSCar sob o número 981. O material coletado foi seco em estufa de circulação de ar por 48 h a 40 °C (3,5 kg) e moídos em moinho do tipo Willey. A extração foi realizada com diclorometano durante 7 dias à temperatura ambiente e em repouso. O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo, obtendo-se 380 g de extrato bruto.

Condições gerais das análises

O isolamento de ricinina a partir do extrato diclorometânico das folhas de *R. communis* foi realizado através de cromatografia contracorrente de gotas (DCCC), cromatografia contracorrente locular rotacional (RLCC) e cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC). Para cada análise foi utilizado 1,5 g do extrato bruto. As amostras foram dissolvidas na fase móvel e injetadas de acordo com a capacidade do "loop" de cada equipamento. O sistema de solventes utilizado nas três técnicas foi CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (93:35:72 v/v/v), tendo-se a fase inferior como móvel e a fase superior como estacionária. A otimização do sistema de solventes foi realizada com base em CCDA e partição líquido-líquido de pequenas quantidades da amostra. Na análise através de CCDA, quando se utilizou a fase orgânica do sistema de solventes como eluente, o R_F foi de 0,4 (valor ideal: 0,2 a 0,5¹). Como este método fornece apenas uma indicação aproximada da utilização de um determinado solvente, a escolha final foi feita através da partição líquido-líquido¹.

As análises foram desenvolvidas no modo descendente nos equipamentos de DCCC e RLCC e na direção cabeça-cauda no equipamento HSCCC. Os solventes empregados nas análises de DCCC e RLCC foram comerciais destilados no Departamento de Química – UFSCar. Na análise de HSCCC foram utilizados solventes de grau P.A. da LabSynt.

Cromatografia contracorrente de gotas (DCCC)

O equipamento de DCCC utilizado foi um modelo Tokyo Rikakikai CO., equipado com 250 colunas de vidro (400 x 3,4 mm; volume total: 462 mL), conectadas por tubos de teflon nº 24, um "loop" de 25 mL, fluxo de 1,5 mL/min e um coletor de frações automático Eyela, DC-1200. Esta análise foi realizada com a introdução da fase estacionária até o preenchimento de todas as colunas, seguida pela injeção da amostra e introdução da fase móvel. Foram coletadas 120 frações de 15 mL cada. A ricinina foi obtida na forma pura nas frações 50 a 63.

Cromatografia contracorrente locular rotacional (RLCC)

Para análise em RLCC foi utilizado um cromatógrafo Eyela, RLCC-1000, equipado com uma bomba cerâmica Eyela, VSP-3050, um desgaseificador Gastorr 101, um "loop" de 3 mL, fluxo de 1,5 mL/min e um coletor de frações automático Eyela, DC-1200. Inicialmente foi introduzida a fase estacionária (700 mL), mantendo-se as colunas em rotação na posição vertical. Em seguida, a fase móvel foi introduzida (400 mL), com as colunas em repouso na posição horizontal. Após a introdução das duas fases, a amostra foi injetada e iniciou-se a cromatografia, sendo coletadas 120 frações de 15 mL cada. A ricinina foi obtida na forma pura nas frações 75 a 90.

Cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC)

Para separação em HSCCC, foi utilizado um equipamento da P.C. Inc., Potomac, MD 20854, USA, equipado com uma bobina de teflon

(diâmetro interno: 1,7 mm; volume total: 310 mL) em múltiplas camadas espirais, uma bomba FMI-50 QD-O SSSY BS/BS, um "loop" de 16 mL e um coletor de frações automático Eyela, DC-1200. Inicialmente a coluna foi preenchida com a fase estacionária. Em seguida, o equipamento foi submetido à rotação de 800 rpm, enquanto a fase móvel foi bombeada para a coluna a um fluxo de 3,0 mL/min. A retenção da fase estacionária na coluna foi de 80% (S_F = 0,8). A amostra foi injetada e a análise foi realizada a 800 rpm, originando 60 frações de 10 mL cada. A ricinina foi obtida na forma pura nas frações 35-49.

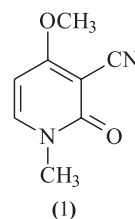
Identificação da ricinina

Todas as frações obtidas a partir das análises por cromatografia contracorrente foram analisadas por CCDA utilizando-se Cromatofolha – Sílica gel F₂₅₄ Al TLC da Merck e CH₂Cl₂/MeOH (9,5:0,5) como eluente, comparando-se a um padrão de ricinina isolada anteriormente das folhas de *R. communis*. A pureza e a estrutura deste composto foram confirmadas através da comparação dos dados de CG-EM e RMN ¹H e RMN ¹³C com aqueles da literatura²⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à alta polaridade, a complexidade do extrato do qual ela é obtida e baixa estabilidade da ricinina em meio ácido (observação experimental ainda não publicada), seu isolamento através do uso de técnicas cromatográficas convencionais é dificultado, já que são necessárias várias etapas desde o fracionamento do extrato bruto até o isolamento do composto. Além disso, com a utilização de técnicas com suportes sólidos, como sílica gel e alumina, ocorre uma adsorção irreversível do composto, levando a perdas significativas durante o processo de fracionamento. A complexidade do extrato diclorometânico das folhas de *R. communis* foi determinada anteriormente por de Groote²¹ através de estudo fitoquímico que levou ao isolamento de ricinina, escopoletina, isofraxidina e palmitato de glicerina e cetil do palmitato de glicerina. Este trabalho visou apenas o isolamento de ricinina em quantidade suficiente para realização de ensaios biológicos frente às formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*. Assim, as demais frações obtidas a partir dos fracionamentos realizados por cromatografia contracorrente não foram analisadas.

Na Tabela 1 estão representadas as quantidades de ricinina (1) isoladas do extrato diclorometânico das folhas de *R. communis* (1,5 g) através das técnicas de cromatografia contracorrente empregadas, o tempo de fracionamento do extrato bruto e o tempo total de cada fracionamento, incluindo o tempo de introdução do sistema de solventes e limpeza do equipamento.



Os resultados obtidos mostraram que as técnicas de cromatografia contracorrente utilizadas foram bastante eficientes no isolamento de ricinina. Comparando-se as três técnicas, conclui-se que o método mais satisfatório foi o de HSCCC, levando ao isolamento de uma maior quantidade de ricinina em curto período de tempo. Nos fracionamentos por DCCC e RLCC, além da obtenção da ricinina

Tabela 1. Tempos de fracionamentos e quantidades de ricinina pura isoladas a partir de 1,5 g de extrato bruto das folhas de *Ricinus communis* através das técnicas de cromatografia contracorrente (CCC)

Técnica de CCC	Massa de ricinina (mg)/ % de ricinina	Tempo de fracionamento no CCC (h) ^a	Tempo total de fracionamento (h) ^b
DCCC	62,3/4,2	20	72
RLCC	104,0/6,9	20	48
HSCCC	209,1/13,9	3	7

^a tempo de fracionamento no CCC: período de fracionamento do extrato bruto no cromatógrafo; ^b tempo total de fracionamento: período entre a introdução do sistema de solventes, fracionamento do extrato bruto e limpeza do equipamento.

pura, várias frações apresentaram este composto como componente majoritário, indicando que fracionamentos subseqüentes poderiam facilmente levar ao isolamento de uma maior quantidade de ricinina. Já na análise por HSCCC, praticamente toda ricinina presente no extrato bruto foi obtida na forma pura.

Apesar da menor eficiência das técnicas de DCCC e RLCC em relação à HSCCC no isolamento de ricinina, os resultados obtidos são bastante satisfatórios. Estas técnicas, além de possibilitarem o isolamento de substâncias a partir de extratos brutos, têm sido utilizadas também para fracionamentos preliminares no processo de isolamento de produtos naturais ou na purificação final de misturas. Estas técnicas são bastante utilizadas no isolamento de alcalóides, como por ex., alcalóides pirrolizidínicos presentes em *Arnica montana* (Asteraceae)²², *Crotalaria sessiliflora*²³ (Leguminosae), *Senecio anonymus* (Asteraceae)²⁴ e *Heliotropium spathulatum* (Boraginaceae)¹⁵.

Analisando-se a Tabela 1 nota-se que, através de HSCCC, uma grande quantidade de ricinina (209,1 mg) foi isolada em apenas 3 h de fracionamento. Além da maior resolução e do tempo de análise reduzido, esta técnica apresenta outras vantagens em relação à DCCC e RLCC, como menor consumo de solventes e ausência de vazamentos que são comuns nestas técnicas, já que não existem selos no equipamento de HSCCC. Esta técnica é amplamente utilizada na separação de alcalóides presentes em diversas plantas, como por ex., *Buchenavia capitata* (Combretaceae)²⁵, *Stipa robusta* (Graminae)²⁶ e *Vinca minor* (Apocynaceae)²⁷.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPESP, CAPES e FINEP pelo apoio financeiro e ao Prof. W. Vilegas do Instituto de Química da UNESP, Araraquara - SP, pela utilização do equipamento de HSCCC.

REFERÊNCIAS

- Marston, A.; Hostettmann, K.; *J. Chromatogr. A* **1994**, *658*, 315.
- Oka, H.; Harada, K.; Ito, Y.; Ito, Y.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *812*, 35.
- Hostettmann, K.; Hostettmann, M.; Marston, A.; *Preparative Chromatography Techniques – Applications in Natural Product Isolation*, Springer: Berlin, 1986.
- Conway, W. D.; *Countercurrent Chromatography; Apparatus, Theory and Application*, VCH: Weinheim, 1989.
- Mandava, N. B.; Ito, Y.; *Countercurrent Chromatography – Theory and Practice*, Marcel Dekker: New York, 1988.
- Brasseur, T.; Angenot, L.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1487.
- Maillard, M.; Adewunmi, C. O.; Hostettmann, K.; *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 668.
- Gopalsamy, N.; Vargas, D.; Guého, J.; Ricaud C.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3593.
- De Rosa, S.; Di Vincenzo, G.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1085.
- Vilegas, J. H. Y.; Gottlieb, O. R.; Kaplan, M. A. C.; Gottlieb, H. E.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 3577.
- Vieira, I. J. C.; Lião, M. L.; Velozo, E. S.; David, V.; Vieira, P. C.; da Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Rodrigues Filho, E.; *Quim. Nova* **1996**, *19*, 21.
- Snyder, J. K.; Nakanishi, K.; Hostettmann K.; Hostettmann M.; *J. Liq. Chromatogr.* **1984**, *7*, 243.
- Domon, K.; Hostettmann K.; Prelog, V.; *J. Chromatogr.* **1982**, *250*, 149.
- Kubo, I.; *J. Chromatogr.* **1991**, *538*, 187.
- Roeder, E.; Breitmaier, E.; Birecka, H. Frohlich, M. W.; Badzies-Crombach, A.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1703.
- Han, X.; Zhang, T.; Wei, Y.; Cao, X.; Ito, Y.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *971*, 237.
- Hebling, M. J. A.; Maroti, P. S.; Bueno, O. C.; Silva, O. A.; Pagnocca, F. C.; *Bull. Entom. Res.* **1996**, *86*, 253.
- Acácio-Bigi, M. F. M.; Hebling, M. J. A.; Bueno, O. C.; Pagnocca, F. C.; Silva, O. A.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; *Rev. Bras. Ent.* **1998**, *41*, 239.
- Bigi, M. F. M. A.; Torkomian, V. L. V.; de Groote, S. T. C. S.; Hebling M. J. A.; Bueno, O. C.; Pagnocca, F. C.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; da Silva M. F. G. F.; *Pest Manage. Sci.* **2004**, *60*, 933.
- Essery, J. M.; *Can. J. Chem.* **1963**, *41*, 1142.
- De Groote, S. C. T. S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 1994.
- Passreiter, C. M.; Willuhn, G.; Roder, E.; *Planta Med.* **1992**, *58*, 556.
- Roder, E.; Liang, X. T.; Kabus, K. J.; *Planta Med.* **1992**, *58*, 283.
- Zalkow, L. H.; Asibal, C. F.; Gliniski, J. A.; Bonetti, S. J.; Gelbaum, L. T.; Vanderveer, D.; Powis, G.; *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 690.
- Beutler, J. A.; Cardellina, J. H.; McMahon, J. B.; Boyd, M. R.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 207.
- Petroski, R. J.; Powell, R. G.; Clay, K.; *Nat. Toxins* **1992**, *1*, 84.
- Zhou, U. Y.; Fang, Q. C.; Lee, Y. W.; *Phytochem. Anal.* **1990**, *1*, 74.