



IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOL DIGLICOSILADO EM *CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM* BENTH VISANDO O SETOR COSMÉTICO

Viviane Magrini¹, Antonio F. Bobey², Karina Fraige³, Dulce Helena Siqueira⁴, Vanderlan da S. Bolzani⁵

RESUMO: O gênero *Calycophyllum* é caracterizado pela diversidade de metabólitos secundários, levando à abundância de atividades biológicas. Visando a busca de compostos bioativos, foram analisados diferentes extratos das partes aéreas de *Calycophyllum spruceanum* Benth, utilizando técnicas de CLAE-DAD, RMN e EM-IES, além de ensaios para atividade antioxidante. No extrato hidroalcoólico de folhas foi identificada a presença do composto canferol 3-O-β-D-glucopiranosil (1→2) β-D-xilopiranosídeo.

PALAVRAS-CHAVE: *Calycophyllum spruceanum* Benth; Canferol 3-O-β-D-glucopiranosil (1→2) β-D-xilopiranosídeo; EM-IES; RMN; Rubiaceae.

1 INTRODUÇÃO

Diversos grupos de pesquisa têm por objetivo a descoberta de produtos naturais, sendo esta realizada com enfoque no fato de serem recursos disponíveis, renováveis e permitindo atividades sustentáveis. Destaca-se que os produtos oriundos da biodiversidade se apresentam como estratégia de inovação nos países emergentes. Atualmente, o Brasil tem se destacado devido à sua grande biodiversidade, sendo esta considerada como um fator econômico importante para gerar produtos com valor monetário e assim contribuir para a geração de riquezas do país, sendo a área de produtos naturais um fator estratégico significativo não só de forma econômica, mas também de cunho científico e tecnológico. Porém, a grande parte das pesquisas científicas tem como foco uma pequena parte da biodiversidade brasileira em relação ao potencial de produção de extratos vegetais, agroquímicos, fármacos, cosméticos, entre outros. O quinto barômetro de biodiversidade da Union Ethical BioTrade (UEBT) (empresa sem fins lucrativos que monitora a relação entre consumo e biodiversidade) realizado com apoio de diversas instituições e empresas nacionais e multinacionais, como por exemplo Natura, L'Oreal, Bayer, Aldivia, entre outras empresas, demonstrou que cerca de 62% dos consumidores mundiais são adeptos aos produtos com origem na biodiversidade e que em nosso país, este parâmetro se apresenta de forma cada vez mais acentuada do que nos países da América do Norte, Europa e Ásia envolvidos na pesquisa (Funari et al, 2013). O sucesso da utilização dos produtos naturais para a obtenção de artigos monetários é devido à sua biossíntese ser *in natura*, o que os associa à saúde e ao bem estar populacional, destacando que a conscientização da demanda por inovações, tecnologia e ciência vêm crescendo entre os consumidores. De acordo com a Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), no ano de 2014, o Brasil foi considerado o terceiro maior mercado de cosméticos, higiene pessoal e perfumaria do mundo, representando cerca de 9,4% do consumo mundial. A indústria cosmética brasileira vem sendo avaliada em cerca de US \$ 43,5 bilhões, ficando atrás apenas dos EUA (\$ 76,3 bilhões) e China (\$ 47,8 bilhões). Sendo este mercado promissor, algumas empresas brasileiras de cosméticos começaram a investir em linhas de produtos a base de produtos naturais, como por exemplo, a empresa Natura.

E indispensável no mercado de cosméticos a constante pesquisa de artigos modernos e diferenciados, assim como a implantação de inovações nas respectivas linhas de pesquisa. Assim, sendo constante a busca por novas tecnologias, é necessário o recrutamento de um time apropriado e inovador de cientistas e pesquisadores para que haja a comunicação das novas descobertas. Tanto o mercado e as ciências dos cosméticos se encontram em fases instigantes de desenvolvimento, surgindo uma competição em relação às pesquisas que exploram novos territórios. A biodiversidade deve ser utilizada de forma sustentável em programas de pesquisa levando de forma conjunta e linear os esforços do setor acadêmico e o setor produtivo (indústrias), permitindo que haja a transformação do conhecimento produzido em produtos para imediata comercialização. Neste contexto, nota-se que a flora brasileira atinge valores cada vez mais extraordinários, desde que haja uma exploração científica e tecnológica apropriada, permitindo o progresso não só econômico como também social para o nosso país.

¹ Mestranda do Curso de Química – UNESP Araraquara, SP. Bolsista CNPq. viviane_magrini@yahoo.com.br

² Mestrando do Curso de Química – UNESP Araraquara, SP. Bolsista CNPq. antoniofernandezbobey86@gmail.com

³ Pós - Doutoranda do Curso de Química – UNESP Araraquara, SP. Bolsista Fapesp.kfraige@yahoo.com.br

⁴ Professora do Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP. dhsilva@iq.unesp.br

⁵ Professora do Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP. bolzaniv@iq.unesp.br



O gênero *Calycophyllum* pertencente à família Rubiaceae e apresenta alta diversidade metabólica, sendo muito utilizada em tratamento de diversas doenças (dermatológicas, estomacais, diabetes, parasitoses, câncer, entre outras) (Zuleta et al, 2003).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo realizar o estudo cromatográfico e químico, de forma biomonitorada, de extratos orgânicos e aquosos, das folhas, galhos e cascas do caule de *Calycophyllum spruceanum* Benth (Rubiaceae), assim como identificar a(s) substância(s) antioxidante(s) ativa(s) frente ao extrato hidroalcoólico de folhas. Destaca-se a relevância da comunicação do presente estudo fitoquímico na busca de substâncias naturais potencialmente ativas, eficientes e biodegradáveis, apresentando menor potencial tóxico às pessoas e ao meio ambiente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados no laboratório de Produtos Naturais do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) - Instituto de Química/ Unesp Araraquara, utilizando material vegetal de *Calycophyllum spruceanum* Benth (folhas, galhos e cascas de caule) coletado no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RJ) (abril e agosto/2014). As diferentes partes vegetais foram secas em estufa com circulação de ar a 40 °C durante aproximadamente 3 dias e, posteriormente, trituradas em moinho. O material seco e moído (10,0 g) foi submetido às extrações em banho de ultrassom, em temperatura controlada, por três vezes consecutivas em cada solvente (150 mL), 40 min/ ciclo de solvente, em ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol, sendo filtrados e concentrados em rotaevaporador. O extrato hidroalcoólico das partes da planta foi obtido por meio da mesma metodologia descrita anteriormente, considerando que a solução extratora corresponde à mistura de etanol: água (70:30 v/v). Os extratos aquosos das partes aéreas foram obtidos por meio da técnica de extração a quente (decoção), com a mesma quantidade de massa do material vegetal, e água como solvente extrator. Posteriormente, estes extratos foram submetidos à filtração e a parte sobrenadante liofilizada.

Os testes iniciais para a determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos foram baseados na redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) ou do cátion radical 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}). O ensaio de capacidade redutora de DPPH[•] foi realizado de acordo com Brand-Williams et al (1995), e se baseia na facilidade com que o radical livre estável DPPH recebe um átomo de hidrogênio de uma espécie química com potencial antioxidante. Para o outro ensaio o cátion radical ABTS (ABTS^{•+}) foi produzido por meio da reação de solução de ABTS estoque com persulfato de potássio. A mistura formada foi agitada e mantida no escuro à temperatura ambiente por cerca 16 h, sendo esta solução diluída 60 vezes com água para o ensaio (Re et al, 1999). Os procedimentos de avaliação biológica foram realizados em triplicata, pela adição de uma alíquota de 215 µL da solução etanólica de DPPH[•] (1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹), ou da solução aquosa de ABTS^{•+}, a 35 µL dos extratos a serem estudados e do padrão (rutina), em diferentes concentrações. A variação na absorbância das diferentes soluções da espécie redutora com o controle e com as amostras foi medida em 517 nm (DPPH[•]) ou 715 nm (ABTS^{•+}) após 30 min de reação, utilizando-se um espectrofotômetro de microplacas (Synergy2Multi-Mode, BioTek, EUA). O resultado positivo é baseado na observação da mudança de coloração característica em cada teste, ou seja, de uma cor amarela com intensidade variada de acordo com o poder antioxidante da amostra testada (teste de DPPH[•]), ou de azul para incolor (teste de ABTS^{•+}), devido ao grau de redução do cátion radical. Ao final do procedimento, a capacidade de redução do DPPH[•] ou ABTS^{•+} pelo padrão e amostras estudadas, foi expressa em termos de quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH[•] ou ABTS^{•+} em 50% (EC₅₀), calculado por meio da equação de regressão linear das curvas analíticas construídas para cada amostra na faixa linear (concentração *versus* % DPPH[•] ou ABTS^{•+} reduzido).

Os extratos mais promissores frente aos testes biológicos foram submetidos às análises cromatográfica e espectroscópica pertinentes para uma maior exploração do perfil e da natureza dos metabólitos secundários presentes. Foram realizadas análises das amostras antioxidantes promissoras via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) em escala analítica. As amostras foram solubilizadas em MeOH : H₂O (70 : 30 v/v) e submetidas a um *clean up* utilizando cartuchos de sílica octadecilsilano (Chromabond C18ec 500mg). As análises foram feitas em um cromatógrafo Shimadzu equipado com bombas LC-20AT, detector UV-DAD SPD-M20A, auto injetor SIL-20A, controlador CBM-20[®], e os cromatogramas foram registrados e processados utilizando o software LC-solution. O sistema utilizado para as análises foi coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 µm; h x Φ = 250 x 4,6 mm), volume de injeção de 15,0 µL e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água (A) e MeOH (B), partindo de 15 % B a 70 % B em 60 min, 100% B em 65 min, permanecendo em 100 % B por 3 min e retornando à condição inicial. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL min⁻¹ e λ de monitoramento de 254 nm. Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) dos extratos antioxidantes promissores foram realizados em um espectrômetro Varian Inova 300 operando a 300 MHz. Para estas análises utilizou-se cerca de 10,0 mg do extrato bruto que foi dissolvido em solvente deuterado DMSO-*d*₆ (Merck).

Com base nos resultados obtidos pelas análises realizadas, o extrato hidroalcoólico de folhas foi selecionado para a continuação dos estudos. Assim, o extrato bruto hidroalcoólico de folhas (CFEHidr) (100,0 mg) foi submetido a microfracionamento em cartuchos de extração em fase sólida (Chromabond C18ec 500 mg),



utilizando-se como fase móvel uma mistura de metanol e água em diferentes proporções (Tabela 1), obtendo nove frações a partir do extrato estudado. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, utilizando 5 mL de eluente para cada sistema de fase móvel.

Tabela 1: Frações obtidas no microfracionamento do extrato hidroalcoólico de folhas (CFEHidr) e sistema de eluente (% em v:v) envolvido na extração.

| Material Vegetal | Código | % em v : v |
|------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Folhas | CFEHidr A (a ₁) | 20: 80 MeOH : H ₂ O |
| | CFEHidr B (a ₂) | 30: 70 MeOH : H ₂ O |
| | CFEHidr C (a ₃) | 40: 60 MeOH : H ₂ O |
| | CFEHidr D (a ₄) | 50: 50 MeOH : H ₂ O |
| | CFEHidr E (a ₅) | 60:40 MeOH : H ₂ O |
| | CFEHidr F (a ₆) | 70: 30 MeOH : H ₂ O |
| | CFEHidr G (a ₇) | 80: 20 MeOH : H ₂ O |
| | CFEHidr H (a ₈) | 90: 10 MeOH : H ₂ O |
| | CFEHidr I (a ₉) | 100% MeOH |

Fonte: Dados da pesquisa

As frações (A a I) foram analisadas via CLAE-DAD, nas mesmas condições descritas anteriormente, e de acordo com o perfil cromatográfico obtido de A à F foram selecionadas e submetidas ao teste de atividade antioxidante de DPPH[·] seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

O extrato hidroalcoólico de folhas (100,0 mg) foi analisado também em escala preparativa CLAE-DAD, sendo solubilizado em MeOH : H₂O (15 : 70 v/v) e filtrado em filtros (Simplepure) de porosidade 0,22 µm. Para essa análise foi utilizada a coluna preparativa Luna Phenomenex C₁₈ (100 Å) (5 µm; h x Φ = 150 x 21,20 mm), volume de injeção de 500,0 µL, fluxo de 10,0 mL min⁻¹ e eluição em gradiente de acordo com o programa utilizado em escala analítica, mas partindo de 25% B. Verificada a repetibilidade das análises, realizou-se a coleta das regiões de interesse. A fração 'região 5' (t_r 38,5 à 40,0 min) foi selecionada, monitorada nas mesmas condições de gradiente de eluição anteriormente descritas, porém em escala analítica, e submetida a diferentes experimentos para a identificação da espécie química majoritária. Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance 600 operando a 600 MHz na frequência de ¹H e a 150 MHz do ¹³C, com duas probes, *crioprobe* e *smartprobe*, e utilizou-se cerca de 2,0 mg da amostra dissolvida em solvente deuterado MeOD-*d*4 (Merck). Ao final do estudo, foi pertinente a realização de análises via Espectrometria de Massas com ionização por Electrospray (EM-IES) para a complementação do estudo de identificação estrutural. Estas análises foram realizadas em colaboração com o laboratório NDECOM (Núcleo de Desenvolvimento de Métodos de Análises de Combustíveis) do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (UNESP-Araraquara) por inserção direta em um Espectrômetro de Massas 3200 QTRAP (quadrupolo – *IonTrap linear*), AB Sciex (Darmstadt, DE), com ionização por *electrospray* (ESI - Turbo *Ion Spray*) operando em modo positivo e negativo. Os parâmetros utilizados para o modo positivo foram: voltagem do capilar: 2900 V, temperatura: 180°C, *curtain gas*: 0,3 bar, potencial de entrada 10 V e os parâmetros para o modo negativo foram: voltagem do capilar: 3500 V, *curtain gas*: 0,3 bar, temperatura: 180°C, potencial de entrada 10 V. Os espectros de *fullscan* foram adquiridos na faixa de 50 a 1000 Da. As amostras foram diluídas à uma concentração de 2,5 ppm em MeOH : H₂O (1 : 1 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico e inseridas a um fluxo de 10 µL/ min.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os extratos brutos de folhas, galhos e cascas do caule, em concentrações na faixa de 1 a 100 µg/mL, foram analisados frente ao ensaio da capacidade redutora do radical DPPH[·], para uma avaliação preliminar, e ABTS^{·+} no decorrer do trabalho, para uma maior exploração da atividade destes extratos. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Testes da capacidade redutora do radical DPPH[·] e ABTS^{·+} dos extratos de folhas, galhos e cascas do caule de *C. spruceanum* Benth

| Amostra | Código | DPPH [·] / EC ₅₀ (µg/mL) | ABTS ^{·+} / EC ₅₀ (µg/mL) |
|---------|---------|--|---|
| Padrão | Rutina | 6,34 | 10,05 |
| Folhas | CFEAc | 61,92 | 49,71 |
| | CFEM | 14,26 | 13,29 |
| | CFEHidr | 14,37 | 40,48 |
| | CFEAq | 149,02 | 146,17 |
| | CGEAc | 201,70 | 47,50 |
| | CGEM | 22,61 | 23,50 |



| | | | |
|----------------|---------|-------|--------|
| Galhos | CGEHidr | 17,48 | 41,89 |
| | CGEAq | 81,30 | 429,98 |
| Casca do Caule | CCEAc | 41,01 | 27,75 |
| | CCEM | 12,23 | 11,48 |
| | CCEHidr | 12,33 | 25,03 |
| | CCEAq | 16,28 | 16,10 |

C = *Calycophyllum spruceanum* Benth; F = Folha; G = Galho; C = Casca do Caule; E = Extrato; Ac = Acetato de Etila; M = Metanol; Hidr = Hidroalcoólico; Aq = Aquoso.

Fonte: Dados da Pesquisa

Como se pode observar na Tabela 2, os dados referentes ao teste do DPPH[·] demonstram que os extratos metanólicos e hidroalcoólicos de folhas, galhos e cascas do caule, assim como o extrato aquoso deste último, apresentaram os menores valores de EC₅₀, indicando o potencial antioxidante das amostras. De acordo com os dados referentes ao teste de ABTS^{·+}, nota-se que os extratos mais promissores quanto à atividade antioxidante são os extratos metanólicos, corroborando com parte dos resultados obtidos no teste anterior. Cada um destes testes avalia um tipo de ambiente químico. O teste de DPPH pode ser utilizado para uma avaliação da atividade de compostos específicos ou de extratos de forma rápida. Este teste pode ser considerado com alta acessibilidade, ou seja, há uma grande disponibilidade do radical DPPH às moléculas com atividade antioxidante de tamanho menor e com certa complexidade, em relação às moléculas como maior disposição espacial (Tiveron, 2010), assim como com espécies químicas presentes em extratos polares com grupos hidroxila (de caráter fenólico ou não) disponíveis. Este radical se encontra na forma comercial pronta para ser utilizado em análises, o que evita que haja sua geração por meio de outros procedimentos, levando a menores porcentagens de erros durante as análises. A aplicação do método ABTS^{·+} nos leva a resultados eficazes para os extratos metanólicos, indicando que essa metodologia foi pertinente para uma avaliação preliminar quanto à presença de compostos de natureza tanto lipofílica como hidrofílica (Sucupira et al, 2012). Porém, este teste indica que para qualquer componente que apresente um potencial redox inferior ao do ABTS^{·+}, ocorre reação química entre eles, levando a uma baixa seletividade do radical em relação às espécies químicas com átomos doadores de hidrogênio. Em comparação ao teste de DPPH, nesta metodologia o radical deve ser gerado, o que torna menos viável a facilidade de sua utilização em laboratório, mesmo que sua solubilidade seja tanto orgânica como aquosa. Testes biológicos de ensaio da capacidade redutora de ABTS e DPPH são métodos denominados indiretos e podem ter seus resultados com variações (baixa reprodutibilidade em relação à aplicação da metodologia) devido à dependência das etapas de análises com a concentração da amostra e tempo de incubação. Porém, ambos são de fácil aplicabilidade e manipulação. Apesar de cada teste avaliar comportamentos distintos e atuar por diferentes mecanismos, nota-se a corroboração de parte dos resultados obtidos em ambos os testes. Desta forma o teste do DPPH foi escolhido para dar continuidade aos estudos, devido à disponibilidade inicial dos reagentes em laboratório, como também a facilidade de execução do mesmo.

Por meio das análises cromatográficas dos extratos brutos com atividade antioxidante mais relevante (Figura 1) foram observados picos com diferentes intensidades e característicos de compostos com distintas polaridades.

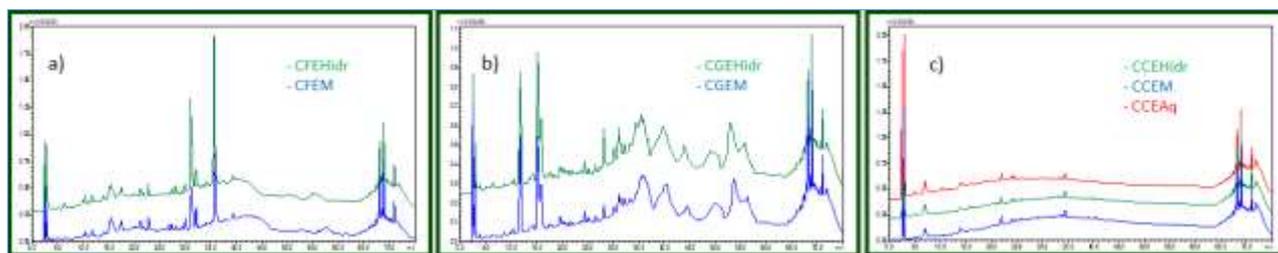


Figura 1 - Cromatogramas dos extratos metanólico, hidroalcoólico e aquoso de folhas (a), galhos (b) e cascas do caule (c) em $\lambda=254$ nm

Fonte: Dados da Pesquisa

Dessa forma, verifica-se uma semelhança entre os perfis cromatográficos, entre os diferentes extratos escolhidos de cada órgão vegetal, somente variando a intensidade dos picos. Observou-se o extrato hidroalcoólico das partes aéreas apresentavam sempre uma maior intensidade, o que pode indicar uma extração mais eficiente da solução hidroalcoólica quando comparada à metanólica e/ou aquosa. Pode-se observar a variação metabólica dos diferentes extratos em 254 nm, com uma quantidade significativa de picos por todo o cromatograma. A absorção neste comprimento de onda indica a presença de uma ampla variedade de compostos, entre eles aromáticos de forma geral, fenólicos, compostos insaturados.



A análise espectroscópica de RMN ^1H dos extratos, foi de grande valia para a realização de um *fingerprint* dentro do estudo fitoquímico, auxiliando de forma ampla na identificação de certas classes de produtos naturais. Destaca-se que esta análise corroborou com os resultados observados em CLAE-DAD, demonstrando que os extratos apresentam perfil semelhante das espécies metabólicas majoritárias. Foram observados sinais relevantes em δ_{H} 0,5 - 8,0 característicos de hidrogênios metílicos e metilênicos, assim como metínicos (δ_{H} 0,7 - 3,0), sinais característicos de açúcares (δ_{H} 2,0 - 5,0), hidrogênios carbinólicos (δ_{H} 3,0 - 4,0), hidrogênios olefínicos (δ_{H} 4,5 - 6,0), e uma região complexa de aromáticos (δ_{H} 6,5 - 8,0).

Estes resultados, juntamente com os resultados dos testes de atividade antioxidante, justificam o direcionamento para o fracionamento do extrato hidroalcoólico de folhas, visando à identificação dos metabólitos secundários presentes no mesmo. Ressaltando que a utilização de extratos hidroalcoólicos dentro da indústria de cosméticos está crescendo cada vez mais devido ao caráter “verde” dos mesmos, sendo assim correlacionados com menores potenciais tóxicos às pessoas e a geração de resíduos ao meio ambiente. Assim como, a inexistência de relatos de estudos a cerca de folhas na literatura.

O microfracionamento de CFEHidr levou à obtenção de 9 frações, que foram selecionadas e submetidas aos testes de atividade antioxidante, assim como o extrato bruto de origem.

Alíquotas das frações do extrato hidroalcoólico de folhas, em diferentes concentrações em uma faixa de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$, foram analisadas frente ao ensaio da capacidade redutora do radical DPPH $^{\cdot}$, e os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Teste preliminar da capacidade redutora do radical DPPH $^{\cdot}$ das frações do microfracionamento do extrato hidroalcoólico de folhas.

| Amostra | Código | EC $_{50}$ ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------|--------|---------------------------------|
| Padrão | Rutina | 6,34 |
| CFEHidr | A | 98,07 |
| | B | 16,01 |
| | C | 14,46 |
| | D | 92,92 |
| | E | 224,14 |
| | F | 296,57 |

Fonte: Dados da pesquisa

Observando os resultados da Tabela 3 referente ao teste de DPPH $^{\cdot}$, as frações B e C do extrato hidroalcoólico de folhas apresentaram menores valores de EC $_{50}$, indicando que possuem um maior potencial antioxidante. Desta forma, estas frações indicaram a faixa de polaridade a ser explorada em escala preparativa via CLAE-DAD, do extrato hidroalcoólico de folhas, para a avaliação do perfil cromatográfico e identificação da espécie química antioxidante presente.

O sistema utilizado para análise do extrato CFEHidr em CLAE-DAD preparativa (Figura 2) teve por objetivo coletar frações/regiões com faixas de polaridade semelhantes às frações obtidas no microfracionamento, tendo como intuito obter um maior ganho de massa (Tabela 4), e dar continuidade às análises de identificação dos compostos antioxidantes.

Tabela 4: Massas e tempos de retenção (t_{R}) das frações obtidas de CFEHidr via análise CLAE-DAD em escala preparativa

| Amostra | Código | Massa das Frações (mg) | Faixa de t_{R} (min) |
|---------|----------|------------------------|-------------------------------|
| CFEHidr | Região 1 | 32,7 | 0 - 25,0 |
| | Região 2 | 8,3 | 25,1 - 34,3 |
| | Região 3 | 1,8 | 34,4 - 35,4 |
| | Região 4 | 3,1 | 35,5 - 38,4 |
| | Região 5 | 2,3 | 38,5 - 40,0 |
| | Região 6 | 13,3 | 40,1 - 60,0 |

Fonte: Dados da pesquisa

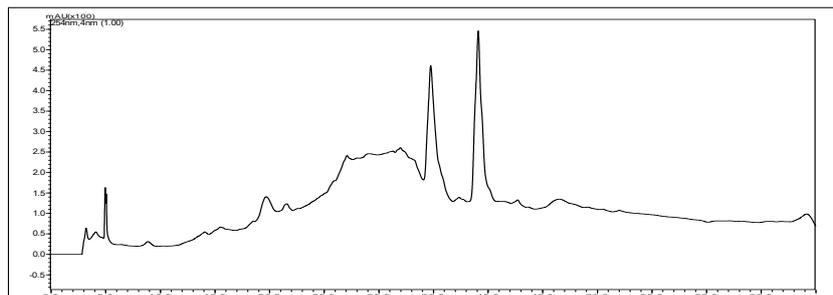


Figura 2 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas via CLAE - DAD em escala preparativa. Condições de análise: coluna preparativa Luna Phenomenex C₁₈ (100Å) (5 µm; h x Φ = 150 x 21,20 mm), volume de injeção de 500,0 µL, fluxo 10,0 mL min⁻¹ e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água (A) e MeOH (B) (25 - 70 % B em 60 min, 100% B em 65 min, permanecendo em 100 % B por 3 min e retornando à condição inicial).

λ=254 nm

Fonte: Dado da pesquisa

Pode-se notar um rendimento razoável do fracionamento realizado (61,5%) e a análise contribuiu para o isolamento de algumas regiões de interesse.

A fração 'região 5' foi selecionada para as análises de CLAE-DAD, RMN ¹H e ¹³C, e EM-IES, devido à observação de um pico majoritário em diferentes comprimentos de onda (220 nm, 254 nm, 365nm) (Figura 3 (a)), o qual elui na mesma faixa de polaridade da fração B que apresentou atividade antioxidante em análises iniciais no microfracionamento de CFEHidr. Analisando o espectro de absorção dessa fração (Figura 3 (b)), nota-se a presença de duas bandas características do esqueleto de um flavonol 3-OH-substituído, ou seja, a banda II em 265 nm, correlacionada ao anel A, e a banda I em 348 nm, correlacionada aos anéis B e C (Harborne, 1996; Markham, 1982).

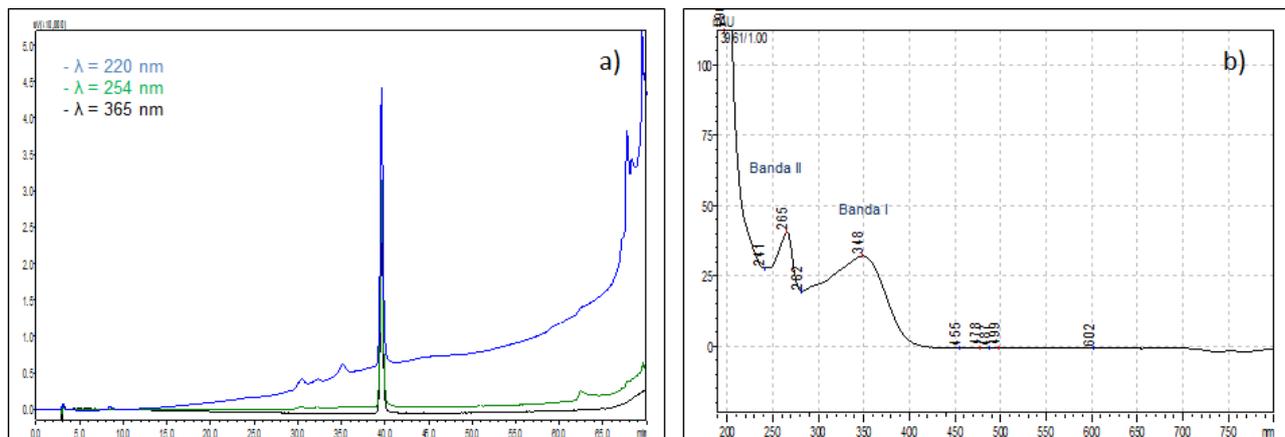


Figura 3 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda da fração 'região 5' coletada do extrato hidroalcoólico de folhas via CLAE – preparativo (a); Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da região 5 coletada do extrato hidroalcoólico de folhas via CLAE- preparativo (b). Condições experimentais: CLAE - DAD em escala preparativa. Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 µm; h x Φ = 250 x 4,6 mm), volume de injeção de 15,0 µL, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água (A) e MeOH (B) (25 % B a 70 % B em 60 min, 100% B em 65 min, permanecendo em 100 % B por 3 min e retornando à condição inicial).

Fonte: Dados da pesquisa

Nota-se que se não houvesse a presença de substituintes na posição 3, haveria um deslocamento batocrômico da banda I, levando a valores de absorção na faixa de 350-385 nm (Harborne, 1996; Markham, 1982). Dessa forma, há a demonstração da presença de um grupo substituinte na molécula em foco.

A análise do espectro de RMN-¹H demonstrou a presença de um esqueleto de flavonoide pelos sinais dos dupletos em δ_H 6,19 (H6, J=2,06 Hz) e 6,39 (H8, J=2,01 Hz) indicativo de acoplamento *meta* dos hidrogênios ligados ao anel A; em 6,90 (H5', H3', J=8,9 Hz) e 8,08 (2H, J=8,8 Hz) referentes às posições H2'/ H6', indicativo de acoplamentos na posição *orto*, atribuídos ao anel B, sendo análogos o deslocamento químico e a constante de acoplamento para estes dois átomos de hidrogênio, caracterizados quimicamente e magneticamente equivalentes. Estes acoplamentos foram confirmados por meio das correlações observadas no espectro de RMN - ¹H, e comparação com os dados obtidos na literatura (Harborne, 1996; Shafek et al, 2012), os quais seguem listados na



Tabela 5. Dessa forma, conclui-se que a espécie química majoritária da mistura a ser identificada se trata de um derivado de canferol.

Tabela 5: Correlações observadas nos espectros de RMN para a unidade aglicona e glicosídeos de canferol 3-O- β -D-Glucopiranosil (1 \rightarrow 2) β -D-Xilopiranosídeo

| Posição | $\delta^1\text{H}$ (ppm), J(Hz) | Literatura* | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) | Literatura** |
|-----------------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|--------------|
| Aglicona | | | | |
| 2 | - | - | 157,1 | 156,4 |
| 3 | - | - | 133,5 | 133,2 |
| 4 | - | - | 178,4 | 177,6 |
| 5 | - | - | 161,7 | 161,2 |
| 6 | 6,19/ d (2,06) | 6,20/ d (2,5) | 99,8 | 98,7 |
| 7 | - | - | 164,9 | 164,1 |
| 8 | 6,39/ d (2,01) | 6,40/ d (2,5) | 93,4 | 93,5 |
| 9 | - | - | 156,9 | 156,3 |
| 10 | - | - | 104,2 | 104,1 |
| 1' | - | - | 121,3 | 121,2 |
| 2' | 8,08/ d (8,8) | 8,05/ d (8,0) | 130,9 | 130,5 |
| 3' | 6,90/ d (8,9) | 6,91/ d (8,0) | 114,8 | 115,5 |
| 4' | - | - | 160,1 | 159,8 |
| 5' | 6,90/ d (8,9) | 6,91/ d (8,0) | 114,8 | 115,2 |
| 6' | 8,08/ d (8,8) | 8,05/ d (8,0) | 130,9 | 130,8 |
| Glicose | | | | |
| 1''' | 4,75/ d (6,87) | 4,70/ d (7,5) | 104,2 | 102,6 |
| 2''' | 3,40/ M | 3,0 – 3,88 (M) | 73,7 | 74,2 |
| 3''' | 3,40/ M | 3,0 – 3,88 (M) | 75,6 | 76,5 |
| 4''' | 3,26/ dd (9,8; 11,52) | 3,0 – 3,88 (M) | 69,7 | 69,7 |
| 5''' | 3,96/ dd (5,0; 11,52) | 3,0 – 3,88 (M) | 76,9 | 76,5 |
| 6a''' | 3,54/ M | 3,0 – 3,88 (M) | 60,4 | 60,7 |
| 6b''' | 3,54/ M | 3,0 – 3,88 (M) | 60,4 | 60,7 |
| Xilose | | | | |
| 1'' | 5,36/ d (7,60) | 5,37/ d (8,0) | 98,6 | 99,6 |
| 2'' | 4,00/ dd (7,76; 9,44) | 3,2 – 4,1 (M) | 76,9 | 76,5 |
| 3'' | 4,00/ dd (7,76; 9,44) | 3,2 – 4,1 (M) | 75,9 | 75,9 |
| 4'' | 3,72/ dd (9,80; 11,52) | 3,2 – 4,1 (M) | 68,6 | 69,2 |
| 5'' | 3,84/ d (5,0; 11,52) | 3,2 – 4,1 (M) | 65,4 | 65,6 |

*Dados disponíveis em Shafek et al (2012)

**Dados disponíveis em Shafek et al (2012) e Harborne (1996)

Fonte: Dados da pesquisa

A confirmação da estrutura do esqueleto do flavonoide canferol diglicosilado na posição 3 foi obtida pela comparação dos dados experimentais de RMN - ^{13}C com os encontrados na literatura (Harborne, 1996; Shafek et al, 2012), .

No espectro de ^{13}C foi possível observar sinais característicos de carbonila em δ_{C} 178,4, sendo que 156,9; 160,1; 161,7; 164,9 são sinais característicos de carbonos aromáticos ligados ao átomo de oxigênio. Os sinais em 133,5 e 157,06 são sinais referentes ao átomo de carbono carbinólico (sp^2) ligado ao oxigênio, e os sinais de carbonos aromáticos ligados ao hidrogênio em δ_{C} 99,8; 93,4; 114,8 (2C); 130,9 (2C). Outros sinais de carbonos quaternários são observados em δ_{C} 104,2 e 121,3, correspondendo a um total de quinze átomos de carbono, estrutura básica de um flavonoide.

Os sinais múltiplos na região compreendida entre 3,24 a 5,36 ppm no espectro de RMN - ^1H indicam a presença de unidades de açúcar. As análises unidimensionais de RMN (^1H e TOCSY 1D) demonstraram a presença dos sinais dos hidrogênios anoméricos das unidades glicosídicas xilose e glicose, os quais são δ_{H} 5,36 (d, $J=7,60$ Hz) e δ_{H} 4,75 (d, $J=6,87$ Hz), respectivamente. Destaca-se que o hidrogênio anomérico (H 1''') de um açúcar diretamente ligado à outra unidade de açúcar terminal é facilmente diferenciado, devido às diferentes ressonâncias geradas.



O espectro de ^{13}C também evidenciou dois sinais de carbono anomérico em δ_{C} 98,6 e δ_{C} 104,24, pertencentes às unidades de monossacarídeos xilose e glicose, respectivamente. As unidades glicosídicas, xilose e glicose, também foram confirmadas por meio da comparação dos dados encontrados com os descritos na literatura (Shafek et al, 2012).

A amostra foi submetida à análise de espectrometria de massas por infusão direta para a confirmação da identidade da espécie química majoritária, sendo os potenciais ajustados para os modos positivo e negativo. No modo negativo, o íon precursor de m/z 579 $[\text{M}-\text{H}]^-$, referente ao flavonol de massa molar 580 g/mol, canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 2) β -D-xilopiranosídeo, foi previamente selecionado. A fragmentação desse íon precursor gerou o íon produto m/z 285 $[\text{M}-294-\text{H}]^-$ devido à perda de duas unidades de açúcares, sendo estas xilose (132 Da) e glicose (162 Da), levando a formação do íon referente à aglicona canferol.

No modo positivo, o íon precursor de m/z 581 $[\text{M}+\text{H}]^+$ foi previamente selecionado e a respectiva fragmentação levou à formação dos íons produto m/z 449 $[\text{M}-132-\text{H}]^+$ devido à perda da unidade xilose levando a formação da aglicona canferol ligada à glicose, e m/z 287 $[\text{M}-132-162-\text{H}]^+$ referente à aglicona com a perda das duas unidades de açúcar, xilose e glicose. Ou seja, há uma perda residual do monossacarídeo interno e posteriormente do açúcar mais externo, devido à má fixação da carga positiva no átomo de oxigênio do monossacarídeo mais interno. De acordo com a literatura, flavonoides do tipo 3-O-glicosilados apresentam uma grande tendência em sofrer clivagens nas ligações glicosídicas devido a vários fatores como estrutura da aglicona, padrão de hidroxilação no anel B, glicosilação nos carbonos C-6 e C-7, energia de colisão empregada, padrão de ligação entre as unidades glicosídicas (1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6), açúcar residual presente e acetilação do mesmo (Yang et al, 2014). Portanto, em flavonoides O-diglicosilados é comum verificar a perda do açúcar mais interno de início e posteriormente a perda do açúcar mais externo, ocorrendo um rearranjo das unidades glicosídicas, quando submetidos à fragmentação em modo positivo (Ma et al, 2000).

Dessa forma, a corroboração dos dados encontrados nos experimentos de RMN e EM, com os já descritos na literatura, permitiu a confirmação da estrutura do flavonol diglicosilado canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 2) β -D-xilopiranosídeo.

4 CONCLUSÃO

Pelas técnicas de CLAE-DAD, RMN, EM-IES, e comparação com a literatura, foi possível identificar a substância canferol 3-O- β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 2) β -D-xilopiranosídeo, a qual apresenta atividade antioxidante citada em literatura (Shafek et al, 2012), o que corrobora e justifica o fato dessa amostra ter sido coletada em faixa de polaridade antioxidante promissora. Dessa forma, este estudo é de suma importância uma vez que não se encontra de forma ampla na literatura uma avaliação do perfil fitoquímico de extratos de folhas, de *Calycophyllum spruceanum* Benth, contribuindo para a geração de potenciais bioprodutos a serem utilizados como cosméticos funcionais.

REFERÊNCIAS

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie*, v. 28, n. 1, p. 5–30. 1995.
- FUNARI, C. S.; GAMBOA, I. C.; CAVALHEIRO, J. A.; BOLZANI, V. S. **Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios.** *Quim. Nova*, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.
- HARBORNE, J.B. **The Flavonoids advances in research since 1986.** London: Chapman and Hall, 1996. 675 p.
- MA, Y.-L.; VERDENIKOVA, I.; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAEYS, M. **Internal glucose residue loss in protonated O-diglycosyl flavonoids up on low-energy collision induces dissociation.** *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, v. 11, n. 2, p. 136-144, 2000.
- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification.** Londres: Academic Press, 1982. 113 p.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, NA.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS C. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, n. 9/10, pp. 1231–1237, 1999
- SHAFEK, R.E.; N.H. SHAFIK; MICHAEL, H. N. **Antibacterial and antioxidant activities of two new kaempferol glycosides isolated from *Solenostemma Argel* Stem Extract.** *Asian Journal of Plant Sciences*, v.11, n.3, p. 143-147. 2012.



TIVERON, A. P. **Estudo da Atividade Antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidas no Brasil.** 102 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba – S.P.

YANG, W. Z.; QUIAO, X.; BO, T.; WANG, Q.; GUO, D. A.; YE, M. **Low energy induced hemolytic fragmentation of flavonol 3-O-glycosides by negative electrospray ionization tandem mass spectrometry.** Rapid Commun. Mass Spectrom., v. 28, n. 4, p. 385–395. 2014.

ZULETA, L. M.; CAVALHEIRO, A.; SILVA, D.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C.; ALBURQUERQUE, S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. **Seco-iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae).** Phytochemistry v. 64, n. 2, p. 549-553. 2003.