

ESTUDO FITOQUÍMICO DAS RAÍZES E FLORES DE AUGUSTA LONGIFÓLIA

Joel Rocha Silva - Faculdade Anhanguera de Anápolis

Rafael Choze - Faculdade Anhanguera de Anápolis

RESUMO: A família Rubiaceae abrange cerca de 13000 espécies distribuídas em 650 gêneros, que ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais, atingindo, porém as regiões temperadas e frias da Europa. *Augusta longifolia* (Spreng). Rehder (Rubiaceae) é uma espécie endêmica do Brasil, sendo encontrada entre rochas ao longo de riachos ou pequenos rios usualmente com correntezas fortes, em regiões de cerrado e mata Atlântica. Foram estudadas as raízes e flores resultando no isolamento de dois esteróides comuns em espécies vegetais, uma cumarina e quatro flavonoides (quercetina, naringenina, kampferol e miricetina). Além da contribuição fitoquímica, o estudo reforçou a posição sistemática da espécie no gênero *Augusta*.

ABSTRACT: The family Rubiaceae covers about 13,000 species distributed in 650 genera, occurring mainly in tropical and subtropical, reaching, But the temperate and cold regions of Europe. *Augusta longifolia* (Spreng). Rehder (Rubiaceae) is a species endemic to Brazil, being found among rocks along streams or small rivers with strong currents usually, in areas of cerrado and Atlantic forest. We studied the roots and flowers resulting in the isolation of two steroids in common plant species, a coumarin and four flavonoids (quercetin, naringenin, and myricetin kampferol). Besides the contribution phytochemistry, the study reinforced the systematic position of the species in the genus *Augusta*.

PALAVRAS-CHAVE:

Augusta longifolia, fitoquímica, Rubiaceae.

KEYWORDS:

Augusta longifolia, Phytochemistry, Rubiaceae.

Relato de Pesquisa

Recebido em: 07/03/2013

Avaliado em: 04/06/2013

Publicado em: 12/12/2014

Publicação

Anhanguera Educacional Ltda.

Coordenação

Instituto de Pesquisas Aplicadas e

Desenvolvimento Educacional - IPADE

Correspondência

Sistema Anhanguera de

Revistas Eletrônicas - SARE

rc.ipade@anhanguera.com

1. INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae é composta por cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies, e representada por ervas, arbustos, árvores e cipós, principalmente de distribuição tropical e subtropical (DELPRETE, 2004). A família está dividida em três subfamílias: Rubioideae e Cinchonoideae e Rubioideae (BREMER et al, 1995;. ROVA et al, 2002;. DELPRETE, 2004).

Esta família é a quarta maior no mundo entre as Fanerógamas. A distribuição geográfica da família, a maior parte é própria de regiões mais quentes, principalmente dos trópicos. Mais de 95% de todas as espécies crescem nessas regiões, diminuindo em direção ao norte e ao sul. A América do Sul supera em número de espécies todas as regiões da Terra, tendo 30% do total delas, estando em seguida, respectivamente à região sul da Ásia, o continente africano e o Pacífico. No Brasil as rubiáceas são representadas por aproximadamente 2.000 espécies distribuídas em 110 gêneros (DELPRETE, 1998).

O levantamento bibliográfico de todas as espécies estudadas da família, realizado por Delprete et al. (2006), utilizando como fonte de pesquisa o Chemical Abstracts®, Biological Abstracts® e ISI Web of Science®, mostrou que quimicamente a família é caracterizada pela presença de 54 flavonóides, 87 quinonas, 43 saponinas, 25 cumarinas, 98 terpenóides, 287 alcalóides e 104 iridóides, em um total de 698 compostos diferentes. A subfamília Ixoroideae é caracterizada pela menor concentração de alcalóides (37), iridóides (56), cumarinas (6) e flavonóides (8) e uma moderada variedade de saponinas.

Dentre as espécies de Rubiaceae, podemos destacar aquelas pertencentes ao gênero *Augusta* devido ao escasso estudo sobre esse gênero.

Segundo recentes filogenias moleculares, *Augusta* é posicionada na subfamília Ixoroideae, mais especificamente como gênero irmão de *Wendlandia* (gênero com aproximadamente 50 espécies da Região Indo-Malesiana) (ROVA et al., 2002).

Augusta compreende quatro espécies: *A. longifolia* (Spreng.) Rehder (endêmica do Brasil), *A. rivalis* (Benth.) J.H. KIRKBR (localizada na América Central), *A. vitiensis* (Seem.) J.H. KIRKBR. (habitat nas ilhas Fiji) e *A. austrocaledonica* (BRONG.) J.H. Kirbr. (localizada na Nova Caledônia) (KIRKBRIDGE, 1997). Até o momento, existe apenas um registro na literatura sobre a composição química de plantas desse gênero, onde foi relatado o isolamento de dois iridóides alcaloídicos, a lindencialina (VI) e a lindeniamina (VII) (Figura 1), da casca do caule de *A. austrocaledonica*, espécie de ocorrência geográfica muito distante de *A. longifolia* (SAAD et al., 1988).

O levantamento bibliográfico de todas as espécies estudadas da família, realizado por Delprete et al. (2006), utilizando como fonte de pesquisa o Chemical Abstracts®, Biological Abstracts® e ISI Web of Science®, mostrou que quimicamente a família é caracterizada pela presença de 54 flavonóides, 87 quinonas, 43 saponinas, 25 cumarinas, 98 terpenóides, 287 alcalóides e 104 iridóides, em um total de 698 compostos diferentes. A distribuição

destes compostos em termos de subfamília (Figura 1) mostra que a subfamília Rubioideae é caracterizada pela segunda maior concentração de alcalóides (96) e a maior concentração de iridóides (56), flavonóides (26) e quinonas (76). Já a subfamília Ixoroideae é caracterizada pela menor concentração de alcalóides (37), iridóides (56), cumarinas (6) e flavonóides (8) e uma moderada variedade de saponinas (24). A total ausência de quinonas pode ser representada como um importante marcador taxonômico, embora muitos gêneros não tenham sido estudados. A subfamília Cinchonoideae é caracterizada pela maior concentração de alcalóides (162) e cumarinas (16) e uma moderada variedade de iridóides (18).

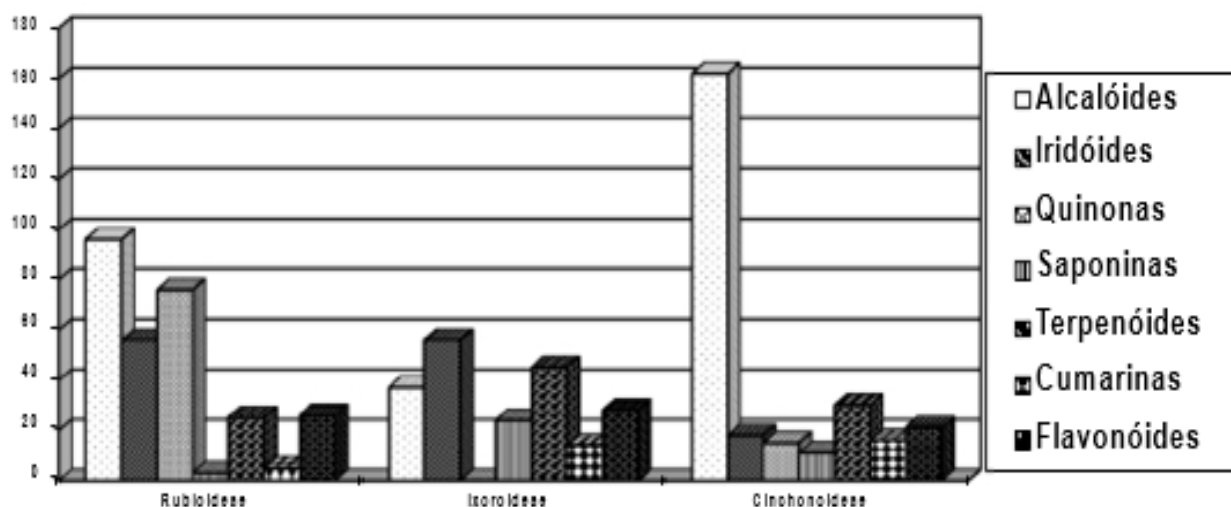


Figura 1. Diagrama mostrando a distribuição dos principais metabólitos especiais nas três subfamílias da família Rubiaceae.

Estudos realizados por Choze et al. (2010), revelaram a presença de cumarinas, triterpenos e flavonoides nas cascas do caule e folhas de *Augusta longifolia*. Vale ressaltar, que não foram encontrados iridóides neste estudo.

Em relação ao gênero *Wendlandia* Willd. Há somente estudos fitoquímicos de três espécies: *W. formosana* Cowan, *W. tinctoria* (Roxb.) DC. e *W. bicuspidata* Wight & Arn. Nestes estudos foram isolados os iridóides glicosilados ácido geniposídico (VIII), gardenosídeo (IX), tarenosídeo (X) e os triterpenos ácido ursólico (XI) e fitol (XII) (SILVA et al., 1986; DINDA et al., 2004) (Figura 2).

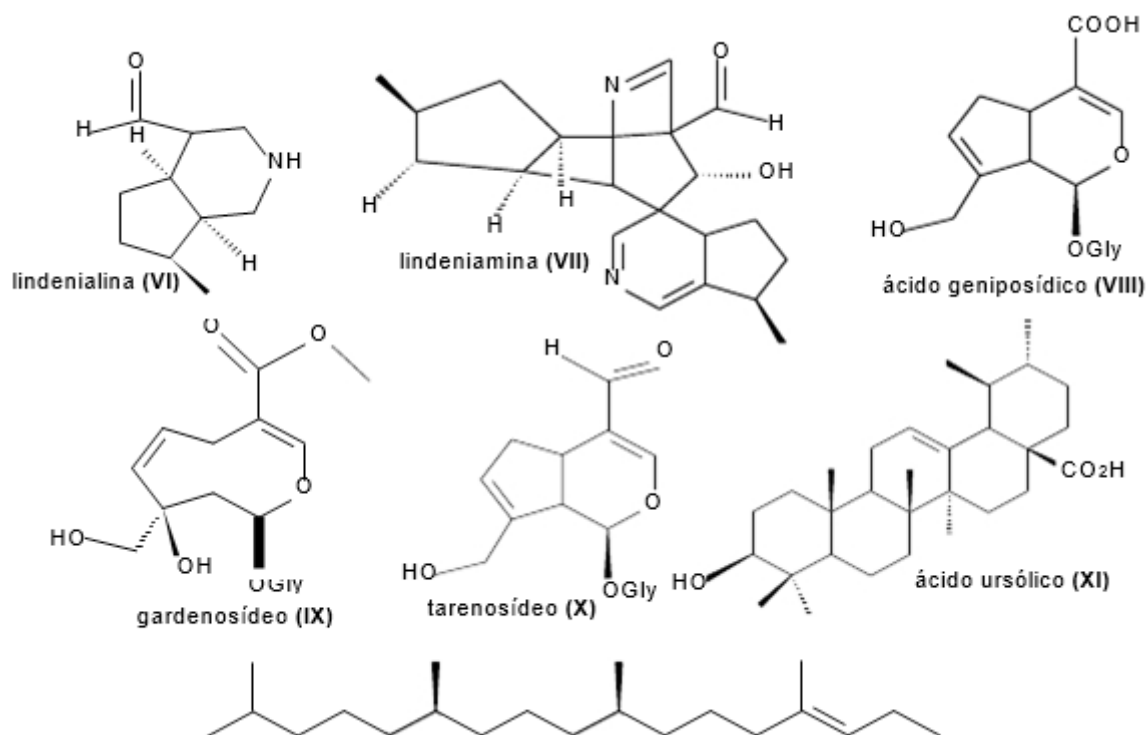


Figura 2. Iridóides alcaloídicos isolados de *Augusta austrocaledonica* e metabólitos especiais isolados de espécies do gênero *Wendlandia*

Deste modo, o trabalho tem o objetivo de realizar um estudo comparativo dos metabólitos secundários presentes nas raízes e folhas da espécie com os metabólitos encontrados no trabalho de Choze et al. (2010).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Identificação do material vegetal

As raízes e flores de *Augusta longifolia* foram coletadas no Estado de Goiás, Município de Mossâmedes, base do Serra Dourada, Córrego Piçarrão, floresta de galeria, coord. 16° 04' S, 50° 11' W, altitude 500 m, em 18 de dezembro de 2005. A coleta foi realizada pelo Prof. P.G. Delprete e R. Choze e depositada no herbário da Universidade Federal de Goiás (UFG), com o registro 9442- A. A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. Piero G. Delprete especialista na família Rubiaceae.

Equipamentos

Para as análises de Ressonância Magnética Nuclear utilizaram-se os solventes deuterados: clorofórmio (CDCl_3), acetona- d_6 , metanol (CD_3OD) e DMSO-d_6 - Merck e Aldrich.

Isolamento dos compostos

As partes vegetais foram secadas em estufa com circulação de ar a 40°C e, em seguida pulverizadas em moinho de facas marca Marconi, obtendo-se, respectivamente, 400 g e 800 g de material. O pulverizado de cada parte da planta foi sucessivamente extraído (4 x 72 horas) com álcool etílico à temperatura ambiente sob repouso. Ao final obteve-se 5 g de extrato bruto das raízes e 8,5g de extrato das flores.

Parte do extrato bruto das raízes e flores foram submetidos a uma partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol).

Estudo da raiz A Fração acetato de etila foi novamente dividida com CHCl₃, acetato de etila e metanol. A subfração clorofórmio foi submetida a CC sobre gel de sílica (70-230 mesh) utilizando CHCl₃: AcOEt (65:35) para se obter o composto 1. A subfração acetato de etila foi cromatografada sobre uma coluna de gel de sílica (70-230 mesh) utilizando um gradiente de CHCl₃: MeOH, resultando em cinco frações. O composto 2 foi obtido pela reunião das duas primeiras frações. Através de uma CCDP das 3 últimas frações utilizando CHCl₃: acetona: MeOH (6:3:1) produziu o composto 3. A fração sub-metanol foi eluída com um gradiente de acetona: MeOH em coluna de gel de sílica (70-230 mesh), obtendo-se o composto 4, e uma mistura contendo os compostos 5 e 6. Esta mistura foi resolvida por CC sobre gel de sílica (230-400 mesh) com acetona: MeOH (15:85).

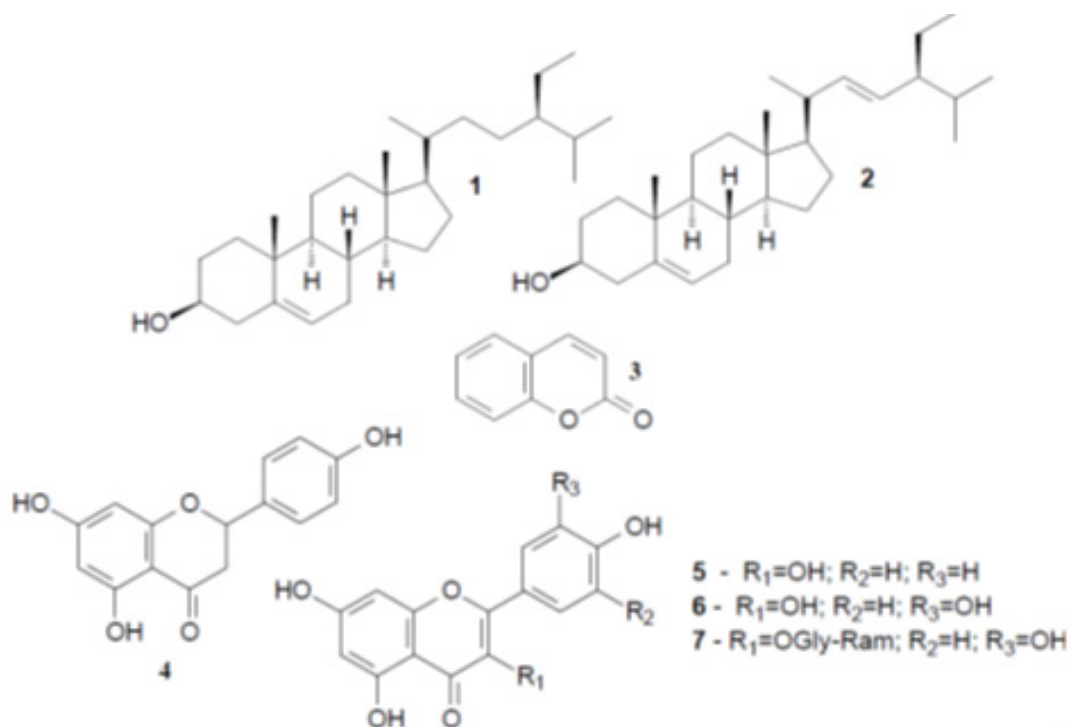
Estudo das flores

O extrato bruto das flores foram submetidas a CC com sílica gel resultando nas frações hexano, acetato de etila e metanol. O fração metanólica foi cromatografada através de uma CC com sílica geal com CHCl₃:MeOH:H₂O (3:5:1) – fase orgânica + 10% de metanol, resultando no composto 7.

A fração hexano foi submetida a cromatografia em sílica gel (70-230 mesh), através de um gradiente de CHCl₃: CHCl₂, obtendo o composto 1 e 2 novamente. Não foram obtidos compostos da subfração acetato de etila.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico das raízes resultou no isolamento e identificação dos esteróides β-sitosterol (1) e estigmasterol (2), da cumarina (3), além dos flavonóides naringenina (4), kaempferol (5) e quercetina (6) Das flores foram isolados o flavonóide miricetina (7) e os mesmos esteróides obtidos das raízes da espécie. Estes compostos estão mostrados na Figura 3.



A análise dos espectros de massas levou à proposta estrutural dos esteróides β -sitosterol (1) e estigmasterol (2), caracterizados pelos picos dos íons moleculares m/z 414, 412, respectivamente, assim como dos cinco íons fragmentados: m/z 227, 131, 107, 91 e 55, comum aos dois esteroides.

A cumarina foi isolada como um sólido branco cristalino, com alta solubilidade em clorofórmio, apresentando ponto de fusão (68-69°C) estando de acordo com o relatado na literatura por Canuto e Silveira (2006).

Na análise do espectro de RMN de ^1H para a substância observou-se o aparecimento de dois dubletos centrados em δ 6,41 (1H) e 7,68 (1H), com constantes de acoplamento de 9,5 Hz, típicos de prótons olefínicos, além de sinais complexos na região de prótons aromáticos, devido a não equivalência química e magnética destes hidrogênios, com integração para quatro hidrogênios.

As multiplicidades destes hidrogênios, segundo a literatura (TONIN; TAVARES, 2002) são apresentadas como multipletos e um estudo mais detalhado, utilizando técnicas bidimensionais de RMN do tipo HSQC e CIGAR-HMBC, resultou na completa atribuição das multiplicidades dos hidrogênios do anel aromático, os quais são: δ 7,50 (ddd) δ 7,30 (ddt), δ 7,28 (ddd) e δ 7,53 (ddd), bem como nas localizações destes hidrogênios aos seus respectivos carbonos.

Os flavonóides naringenina e kampferol foram isolados como dois sólidos de cor amarela, o primeiro apresentando solubilidade em acetona e o segundo somente em solventes mais polares, tais como etanol e metanol.

A naingenina foi identificada pelo espectro de RMN de ^1H como uma flavanona,

devido a observação de um sistema ABX na região de hidrogênios alifáticos (δ 5,47 dd, H-2, J = 12,8 e 3,2 Hz; δ 2,72 dd, H-3a, J = 16,8 e 3,2 Hz ; δ 3,17 dd H-3b, J = 16,8 e 12,8 Hz), típico dessa classe de substâncias. O anel B dessa flavanona revelou um perfil de sistema AA'BB' com base nos sinais em δ 7,40 (d, J = 10,0 Hz, H-2' e H-6') e δ 6,91 (d, J = 10,0 Hz, H-3' e H-5'). Apesar da ausência dos dois dubletos referentes ao anel A desta flavanona, o singlete largo em δ 5,96, integrando para 2H, confere o padrão 5,7 diidroxila a este anel, devido à ausência de sinais de grupos metoxila. Esta proposta estrutural foi confirmada através da comparação entre os dados obtidos e os da naringenina, isolada de *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Spreng. Por Almeida et al. (2005).

O kampferol apresentou um padrão espectroscópico semelhante a naringenina, sendo basicamente caracterizado através da análise de seu espectro de RMN de ¹H que apresentou sinais de um sistema AA'BB' [δ 8,09 (2H) e 6,90 (2H); d; J = 9,2 Hz] típico de anéis B de flavonóides p-dissubstituídos. Este sistema de quatro spins reflete no espectro de RMN de ¹H um conjunto de quatro tripletos, devido a não equivalência magnética dos hidrogênios do anel B do flavonóide.

A diferença entre estes flavonóides está nos sinais referentes aos hidrogênios do anel C. A ausência destes caracteriza o esqueleto de um flavonol. Esta proposta estrutural foi reforçada pelos dados do espectro de RMN de ¹³C deste flavonóide, onde se observam quinze sinais de carbonos sp², confirmando o esqueleto básico C6.C3.C6 e confirmada com os dados descritos na literatura por Oliveira et al. (1999).

A quercetina foi caracterizada pela observação na região de hidrogênios aromáticos para os dois compostos dois dubletos em δ 7,73 (J = 2,0 Hz, H-2') e 6,89 (J = 8,4 Hz, H-5'), além de um duplo-dublete em δ 7,63 (J = 8,4 Hz e 2,0 Hz; H-6'), e a miricetina foi caracterizada pelos sinais em δ 7,63 (J = 2,4 Hz, H-2') e; δ 6,84 (J = 8,4 Hz, H-5'), além de um duplo-dublete δ 7,59 (8,4 Hz e 2,4 Hz, H-6' - 11).

O perfil glicosilado da miricetina foi estabelecido com base nos sinais dublete em δ 1,08 (J = 6,0 Hz) característico do grupo metila da ramnose, dublete em δ 4,48 (J = 1,6 Hz) e 5,08 (J = 7,6 Hz), típicos dos hidrogênios anoméricos da ramnose e glicose, respectivamente, e pelo acúmulo de sinais na região entre δ 3,20 e δ 3,80, relativos aos hidrogênios carbinólicos.

Os resultados mostraram que o perfil químico das raízes e flores de *Augusta longifolia* é muito semelhante aos obtidos nos estudos das folhas e casca do caule da espécie. É importante ressaltar que as espécies do gênero *Wendlandia* (gênero irmão a *Augusta*) são caracterizadas pela presença de iridóides e novamente não foi encontrado estes metabólitos, o que sugere que esta espécie está em uma posição sistemática diferente em relação a *Wendlandia* (gêneros diferentes), conforme Rova et al. (2002).

4. CONCLUSÃO

Os estudos das raízes e flores levaram ao isolamento dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol, da cumarina, além dos flavonóides naringenina, kaempferol glicosilado e da quercetina (raízes) e nas flores foi isolado o flavonóide miricetina e os mesmos esteróides obtidos das raízes da espécie. Adicionalmente, este estudo veio comprovar a posição sistemática da espécie *Augusta longifolia* no gênero *Augusta*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S.C.X.; LEMOS, T.L.G.; SILVEIRA, E.R.; PESSOAS, O.D.L. Constituintes voláteis e não voláteis *Cochlospermum vitifolium*. *Química Nova*, v.28, n.1, p.57-60, 2005
- BREMER, B.; ANDREASEN, K.; OLSSON, D. Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on rbcL sequence data. *Annals of the Missouri Botanic Garden*, v. 82, p. 383-397, 1995.
- CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis*. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1-3, 2006.
- CHOZE, R.; DELPRETE, P.G.; LIÃO, L. Significance of flavonoids, coumarins and triterpenes of *Augusta longifolia* (Spreng.) Rehder, Rubiaceae-Ixoroideae, with new insights about its systematic position within the family. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2010.
- DELPRETE, P.G. Revision and typification of Brazilian *Augusta* (Rubiaceae, Rondeletieae), with ecological observations on the riverine vegetation of the cerrado and Atlantic forests. *Brittonia*, v. 49, n. 4, p. 487-497, 1997.
- _____. Sinopse dos gêneros de Rubiaceae do Brasil. 49º Congresso Nacional de Botânica (26 Julho - 1 Agosto), Resumos, Salvador, Bahia, p. 85-86, 1998.
- _____. Rubiaceae. In: SMITH, N.P. et al. Flowering Plant Families of the American Tropics. Ed. Princeton University Press, p. 328-333, 2004.
- DELPRETE, P.G.; CHOZE, R.; DUFRAYER, C.F.; SILVA, R.A. Chemotaxonomy and macroclassification of Rubiaceae. Third International Rubiaceae Conference Rubiaceae (18-21 September), Leuven, Belgium. Program and Abstracts, p. 28. 2006.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; ARIMA, S.; SATO, N.; HARIGAYA, Y. Chemical constituents of *Lasia spinosa*, *Mussaenda incana* and *Wendlandia tinctoria*. *Journal of the Indian Chemical Society*, v. 81, n.1, p. 73-76, 2004.
- ROVA, J.H.E.; DELPRETE, P.G.; ANDERSSON, L.; ALBERT, V.A. A trnL-F cpDNA sequence study of the Condamineae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. *American Journal of Botany*. v. 89, p. 145-159, 2002.
- SAAD, H.E.A.; ANTON, R.; QUIRION, J.C.; CHAUVÈRE, G.; PUSSET, J. New-caledonian plants. 116(1) Lindenialine and lindeniamine, two new iridoids from *Augusta austro-caledonica*. *Tetrahedron letters*, v. 29, n. 6, p. 615-618, 1988.
- SILVA, L.B.; HERATH, W.H.M.W.; NAVARATNE, K.M. An iridoid glycoside from *Wendlandia bicuspidata*. *Journal of Natural Products*, v. 50, n. 6, p. 1184, 1986.
- TONIN, F.G.; TAVARES, M.F.M. Otimização de extração de cumarina em folhas de *Mikania laevigata* para uso fitoterápico. In: Simpósio de Plantas Medicinais, Cuiabá, 2002.