

COMPOSTOS POLIFENÓLICOS DO KINO DE *Eucalyptus citriodora*

Marinalva Oliveira Freitas, Mary Anne S. Lima e Edilberto R. Silveira*

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CP 12200, 60451-970 Fortaleza – CE, Brasil

Recebido em 13/12/06; aceito em 24/4/07; publicado na web em 25/10/07

POLYPHENOL COMPOUNDS OF THE KINO OF *Eucalyptus citriodora*. Phytochemical analysis of the kino of *Eucalyptus citriodora* led to the isolation of 1-*O*,2-*O*-digaloi-6-*O*-*trans*-*p*-cumaroil- β -D-glucopyranoside, 1-*O*-*trans*-*p*-cumaroil-6-*O*-cinamoil- β -D-glucopyranoside, α and β 6-*O*-*trans*-*p*-cumaroil-D-glucopyranoside, 7-methylaromadendrin-4'-*O*-6''-*trans*-*p*-cumaroil- β -D-glucopyranoside, aromadendrin, aromadendrin-7-methyl-ether, naringenin, sakuranetin, kaempferol-7-methyl-ether and galic acid. Structural elucidation of the isolated compounds was established on the basis of spectral data, particularly by the use of 1D NMR and several 2D shift correlated NMR pulse sequences (^1H , ^1H -COSY, HMQC, HMBC).

Keywords: *Eucalyptus citriodora*; kino; polyphenols.

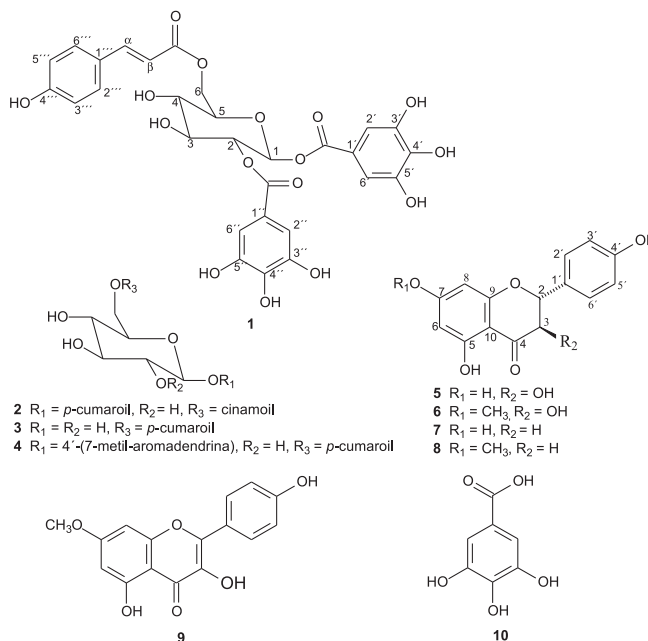
INTRODUÇÃO

Eucalyptus (Mirtaceae) é um gênero originário da Austrália constituído de aproximadamente 600 espécies. Apesar de mundialmente conhecidas pelo alto valor terapêutico e comercial de seus óleos essenciais, as espécies deste gênero também são caracterizadas pela formação de “kino”, um exudato espesso e quebradiço depois de seco encontrado nas cavidades dos caules. Os veios de kino são formados pela quebra ou dissolução de bandas de células do parênquima no xilema ou floema dos troncos das árvores, como um mecanismo de defesa contra as infecções patogênicas causadas por insetos, fungos ou queimadas¹.

Devido à sua marcante propriedade adstringente, o kino de *Eucalyptus* possui uma longa história de uso medicinal e na indústria de manufatura de couros. A composição química em várias espécies já foi investigada, e mostrou-se constituída particularmente de compostos polifenólicos, incluindo flavonóides, taninos e heterosídeos²⁻¹⁰. Estudos anteriores do kino de *E. citriodora* nativo da Índia revelaram éter 7-metil-aromadendrina, campferol, ácido elágico, éter dimetil-aromadendrina e citriodorol como principais constituintes². Na investigação fitoquímica atual, utilizando o kino de *E. citriodora* cultivado no Nordeste do Brasil, são relatados o isolamento de 1-*O*,2-*O*-digaloi-6-*O*-*trans*-*p*-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo (1), 1-*O*-*trans*-*p*-cumaroil-6-*O*-cinamoil- β -D-glicopiranosídeo (2), 6-*O*-*trans*-*p*-cumaroil-D-glicopiranosídeo nas configurações α (3a) e β (3b), 7-metil-aromadendrina-4'-*O*-6''-*trans*-*p*-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo (4), aromadendrina (5), 7-metil-aromadendrina (6), naringenina (7), sakuranetina (8), 7-metil-campferol (9) e ácido gálico (10).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto 1 foi obtido como um sólido amorfo amarelo, p.f. 167,9-170,2 °C, $[\alpha]_D^{20}$ -70° (c = 0,05, MeOH). Análise do espectro de RMN ^1H indicou sinais típicos de dois grupamentos galoi através dos singletos em δ_{H} 7,05 (s, H-2''/6') e 7,11 (s, H-2''/H-6''), com integração para dois hidrogênios cada. Os sinais em δ_{H} 7,40 (d, $J = 8,6$ Hz, H-2'''/H-6''') e 6,77 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3'''/H-5''') foram relacionados a um grupo *trans*-*p*-cumaroil, em virtude da



presença de dois hidrogênios *trans*-olefínicos característicos em δ_{H} 7,63 (d, $J = 16,0$ Hz, H- β) e 6,30 (d, $J = 16,0$ Hz, H- α), respectivamente. Os sinais na faixa de δ_{H} 3,68 a 5,17, em conjunto com o sinal do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,88 (d, $J = 8,6$ Hz, H-1), indicaram a presença de uma unidade β -glicosídica. A confirmação da existência de dois grupos galoi e um *trans*-*p*-cumaroil foi possível pela análise dos espectros de RMN ^{13}C , que exibiu sinais relativos a três carbonilas em δ_{C} 168,4, 168,6 e 166,6. Os valores dos sinais observados em δ_{C} 94,2 (C-1), 76,7 (C-3), 75,9 (C-5), 74,1 (C-2), 71,4 (C-4), e 64,3 (C-6) foram indicativos da existência de uma unidade β -glicose 1,2,6-trissubstituída através da comparação com valores descritos na literatura, considerando-se efeitos α - e β -causados pela esterificação nas hidroxilas¹¹ (Tabela 1). Esta sugestão foi definitivamente confirmada pela análise do espectro bidimensional HMBC, através das correlações a longa distância entre o hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,88 (H-1) e a carbonila em δ_{C} 166,6; (C-7), do hidrogênio em δ_{H} 5,17 (H-2) com o carbono anomérico em δ_{C} 94,2 (C-1) e a carbonila em δ_{C} 168,5 (C-7'), além dos

*e-mail: edil@ufc.br

Tabela 1. Dados de RMN ¹H e ¹³C dos compostos **1-3**

	RMN ¹ H (δ)				RMN ¹³ C (δ)			
	1	2	3a	3b	1	2	3a	3b
D-glicose								
1	5,88 (d, J = 8,6 Hz)	5,59 (d, J = 7,6 Hz)	5,12 (d, J = 3,6 Hz)	4,51 (d, J = 7,7 Hz)	94,2	95,9	94,1	98,4
2	5,17 (t, J = 8,6 Hz)	3,47 (m)	3,70 (m)	3,55 (m)	74,1	74,1	74,9	75,6
3	3,82 (t, J = 9,2 Hz)	3,47 (m)	3,38 (m)	3,38 (m)	76,7	78,0	73,9	78,0
4	3,68 (d, J = 9,2 Hz)	3,47 (m)	4,05 (m)	3,38 (m)	71,4	71,5	70,9	71,9
5	3,82 (m)	3,69 (m)	3,17 (m)	3,17 (t, J = 8,2 Hz)	75,9	76,4	72,1	76,3
6	4,57 (d, J = 11,3 Hz)	4,53 (d, J = 12,0 Hz)	4,51 (m)	4,49 (m)	64,3	64,7	65,0	64,9
	4,45 (d, J = 11,3, 4,6 Hz)	4,34 (d, J = 12,0 Hz)						
galoil A								
1'			4,31(m)	4,31(m)				
2'/6'	7,05 (s)				120,1			
3'/5'					110,7			
4'					146,6			
C=O - 7'					140,7			
galoil B								
1''					166,6			
2''/6''	7,11 (s)				121,4			
3''/5''					110,3			
4''					146,6			
C=O - 7''					140,0			
<i>trans-p-cumaroil</i>								
1'''					168,5			
2'''/6'''	7,40 (d, J = 8,6 Hz)	7,46 (d, J = 8,5 Hz)	7,45 (d, J = 8,5 Hz)	7,45 (d, J = 8,5 Hz)	127,2	127,1	127,2	127,2
3'''/5'''	6,77 (d, J = 8,6 Hz)	6,80 (d, J = 8,5 Hz)	6,81 (d, J = 8,5 Hz)	6,81 (d, J = 8,5 Hz)	131,4	131,5	131,3	131,3
4'''					116,9	117,0	116,9	116,9
α	6,30 (d, J = 16,0 Hz)	6,37 (d, J = 16,0 Hz)	6,34 (d, J = 15,9 Hz)	6,34 (d, J = 15,9 Hz)	161,4	161,7	161,4	161,4
β	7,63 (d, J = 16,0 Hz)	7,73 (d, J = 16,0 Hz)	7,63 (d, J = 15,9 Hz)	7,63 (d, J = 15,9 Hz)	114,7	114,5	115,0	115,1
C=O - 7'''					147,5	148,2	146,8	146,8
<i>p-cinamoil</i>								
1''''					168,4	167,7	169,3	169,2
2''''/6''''		7,39 (m)						
3''''/5''''		7,60 (m)						
4''''		7,39 (m)						
α		6,56 (d, J = 16,0 Hz)						
β		7,71 (d, J = 16,0 Hz)						
C=O - 7''''								

acoplamentos observados de ambos os hidrogênios do grupo metilênico da glicose em δ_{H} 4,57 e 4,45 (H-6) com a carbonila em δ_{C} 168,4 (C-7'''). Os dados obtidos revelaram o composto **1** como sendo o 1-*O*,2-*O*-digaloil-6-*O-trans-p-cumaroil*- β -D-glicopiranosídeo, descrito anteriormente como constituinte do Rhubarb, uma das mais importantes drogas na região asiática constituída por extratos de espécies de *Rheum* (Polygonaceae)¹².

O composto **2** apresentou-se como um sólido incolor, p. f. 116,9-119,6 °C. A banda de absorção no espectro de IV em 3400 cm⁻¹ foi relacionada a um grupo hidroxila, e as absorções em 1702 e 1684 cm⁻¹ foram correspondentes às duas carbonilas α,β -insaturadas. O espectro de RMN ¹H exibiu sinais típicos do anel aromático de grupos *trans-p-cumaroil* em δ_{H} 6,80 (H-3'''/5''') e 7,46 (H-2'''/6''') e cinamoil em δ_{H} 7,39 (H-4''') e 7,60 (H-5'''), além dos sinais relacionados aos hidrogênios α e β dos dois sistemas em δ_{H} 6,37 e 7,73 e δ_{H} 6,56 e 7,71, respectivamente. A unidade glicosídica foi caracterizada como uma β -glicose 1,6-dissubstituída baseado nos valores de deslocamentos químicos e das constantes de acoplamentos dos sinais em δ_{H} 3,47 (H-2), 3,69 (H-5), 4,53 e 4,34 (2H-6) e do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,59 (d, J = 7,6 Hz, H-1) (Tabela 1). Em particular, as correlações a mais de uma ligação no espectro de

HMBC entre o hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,59 (H-1) com a carbonila do grupo *p-cumaroil* em δ_{C} 167,7 (C-7'''), e dos hidrogênios metilênicos em δ_{H} 4,34 e 4,56 (2H-6) com a outra carbonila em δ_{C} 168,6 (C-7'''''), definitivamente estabeleceram a estrutura do composto **2** como sendo 1-*O*-cinamoil-6-*O-trans-p-cumaroil*- β -D-glicopiranosídeo³.

O composto **3** apresentou-se como um sólido amarelo-claro e mostrou bandas no espectro de IV características de grupamento hidroxila e carbonila em 3339 e 1690 cm⁻¹, respectivamente. De maneira análoga aos compostos **1** e **2**, o espectro de RMN ¹H de **3** apresentou absorções referentes a um grupo *trans-p-cumaroil* em δ_{H} 6,34 (H- α), 6,81 (H-3'''/5'''), 7,45 (H-2'''/6''') e 7,63 (H- β). Foram observados ainda sinais relativos aos hidrogênios anoméricos de uma unidade β -glicose em δ_{H} 4,51 (d, J = 7,7 Hz, H-1) e do seu respectivo isômero α em δ_{H} 5,12 (d, J = 3,6 Hz, H-1) (Tabela 1). Os valores da integração dos sinais das duas unidades de açúcar, em adição aos valores dos deslocamentos químicos de RMN ¹H e RMN ¹³C observados, possibilitou determinar o composto **3** como sendo a mistura dos isômeros configuracionais 6-*O-trans-p-cumaroil*- β -D-glicopiranosídeo (**3a**) e *trans-p-cumaroil*- α -D-glicopiranosídeo (**3b**), anteriormente isolados de *Picrorhiza scophulariiflora*¹³.

O composto **4** apresentou-se como um sólido branco amorfo, com p. f. 194,9-196,1 °C. O espectro de RMN ¹H apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em um sistema AB em δ_{H} 6,25 (H-6) e 6,35 (H-8), de um sistema AA'BB' típico de anel B de flavonóides *p*-dissubstituídos em δ_{H} 7,46 (H-3'/5') e 7,74 (H-2'/6'), além de dois hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 4,77 (H-3) e 5,47 (H-2), e uma metoxila em δ_{H} 3,71 (OCH₃-7). Os dados obtidos em comparação com a literatura caracterizaram a estrutura do flavonóide 7-metil-aromadendrina (3,5,4'-tri-hidroxi-7-metoxi-flavanona) como unidade aglicônica¹⁴. Semelhantemente ao composto **3**, foi também observada a presença de uma unidade β -glicose substituída em C-6'', com um grupo *trans-p*-cumaroil pela comparação dos valores dos deslocamentos químicos dos carbonos do composto **3** no espectro de RMN ¹³C. Esta observação foi confirmada pela análise do espectro bidimensional HMBC, que também permitiu a localização da unidade de açúcar no carbono C-4' da aglicona, através da correlação do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,64 (H-1) com o carbono em δ_{C} 159,4 (C-4'). A atribuição inequívoca dos dados de carbono e hidrogênio e a comparação com dados da literatura permitiram definir o composto **4** como sendo 7-metil-aromadendrina-4'-O-6''-*trans-p*-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo³.

Os compostos **5** e **6** apresentaram-se na forma de cristais brancos com p.f. 222,8-225,5 °C e 182,8-183,9 °C, respectivamente. A determinação da estrutura de flavanonóis para ambos os compostos foi possível através da existência de sistemas AB na região de hidrogênios alifáticos (**5**: δ_{H} 4,97 e 4,53, **6**: δ_{H} 5,02 e 4,58), e sistemas AA'BB' (**5**: δ_{H} 7,35 e 6,83, **6**: δ_{H} 7,37 e 6,85) e AB (**5**: δ_{H} 5,92 e 5,88, **6**: δ_{H} 6,09 e 6,04) na região de hidrogênios aromáticos nos espectros de RMN ¹H. O grupo metoxila adicional em δ_{H} 3,82 no composto **6**, foi localizado no carbono 7 da estrutura flavonóide, através da sua correlação a longa distância com o carbono insaturado em δ_{C} 168,8 (C-7), confirmando desta forma os compostos **5** e **6** como sendo a aromadendrina (3,5,7,4'-tetra-hidroxi-flavanona) e o seu derivado metilado na posição 7, respectivamente¹⁴.

O composto **7** apresentou-se como um sólido branco cristalino com p.f. 227,8-229,9 °C e o composto **8** como um sólido de cor amarela com p.f. 74,9-76,1 °C. Os espectros de RMN ¹H de **7** e **8** mostraram-se semelhantes aos dos compostos **5** e **6**, exceto pelos sinais de um sistema ABX na região de hidrogênios alifáticos (**7**: δ_{H} 5,34, 3,11 e 2,71, **8**: δ_{H} 5,30, 3,08 e 2,67) caracterizando a estrutura de flavanonas. Esta sugestão foi confirmada pelo espectro de RMN ¹³C que exibiu para cada composto um sinal adicional relacionado a um carbono metilênico em δ_{C} 44,1 (C-3). Estes dados, associados com aqueles obtidos da análise dos espectros bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC) e comparação com dados da literatura, possibilitou identificar os compostos como sendo a naringenina (5,7,4'-trihidroxiflavanona) (**7**) e a sakuranetina (5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona) (**8**)¹⁴.

O composto **9** apresentou-se na forma de um sólido amorfo de cor amarela e com p.f. 215,2-218,5 °C. Os sinais do sistema ABX observados para os compostos **7** e **8** mostraram-se ausentes no espectro de RMN ¹H do composto **9**, sugerindo a existência de um flavonol. Esta observação foi confirmada no espectro de RMN ¹³C que revelou a ausência de dois carbonos oxigenados e a presença de dois carbonos insaturados adicionais em δ_{C} 148,3 (C-2) e 138,5 (C-3). Tais dados permitiram identificar a estrutura do composto **9** como sendo o 7-metil-campferol¹⁴.

Dados da literatura revelam o kino de *Eucalyptus* como uma prolífica fonte de compostos polifenólicos. O isolamento de flavonóides e heterosídeos do kino de *E. citriodora* do Nordeste do Brasil corrobora com os dados registrados para o kino de outras espécies do gênero. Os compostos **2**, **4** e **7** já foram isolados do kino de *E. maculata*^{3,10}, o composto **8** do kino de *E. citriodora*³, o com-

posto **9** dos kinos de *E. maculata*, *E. callophylla*, *E. corymbosa* e *E. citriodora*^{2,6,10}, e o composto **10** dos kinos de *E. astringens*, *E. lehmanii* e *E. platypus*⁴. No entanto, este é o primeiro relato do isolamento do composto **1** e da mistura dos isômeros **3a-3b** em exudatos de *Eucalyptus*.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos gerais

Os pontos de fusão foram obtidos em um aparelho Mettler FP82HT e os valores não foram corrigidos. Os espectros de infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Perkin Elmer 1000 utilizando pastilhas de KBr anidro. Para a obtenção dos espectros de massa foi utilizado um espectrômetro Hewlett-Packard 5971 por impacto de elétrons a 70 eV. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance DRX-500; operando a 500 MHz para RMN ¹H e 125 MHz para RMN ¹³C. As placas de CCD foram visualizadas em câmara com lâmpada ultravioleta (λ_{max} = 254 e 365 nm) e reveladas sob aquecimento com solução de vanilina/ácido perclórico em etanol.

Material vegetal

O kino foi coletado de um espécimen de *Eucalyptus citriodora* Hook cultivado no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. O material vegetal foi identificado pelo Dr. A. G. Fernandes do Herbário Prisco Bezerra (EAC), Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, cuja exsiccata encontra-se depositada sob o número 35532.

Extração e isolamento

O kino de *E. citriodora* (40 g) foi dissolvido em uma mistura de EtOH:H₂O 1:1 (400 mL) e submetido à partição líquido-líquido com os solventes hexano, CHCl₃, EtOAc e n-BuOH.

A fração CHCl₃ (6,4 g) foi cromatografada em Sephadex LH-20 utilizando MeOH como solvente. Foram obtidas 25 frações de 10 mL que foram combinadas em 5 sub-frações após a análise comparativa em CCD. Sucessivas cromatografias do tipo flash da sub-fração (2-3) (1,53 g) utilizando a mistura de solventes CHCl₃/MeOH 10% de forma isocrática, levou ao isolamento dos compostos **5** (97 mg), **6** (352 mg), **7** (9 mg) e **8** (5 mg). A sub-fração (4-10) (830 mg) foi submetida a sucessivas cromatografias em Sephadex LH-20 utilizando MeOH como solvente, para fornecer o composto **9** (5 mg). A sub-fração (18-20) (530 mg) foi submetida à cromatografia flash utilizando a mistura de solventes CHCl₃/MeOH 6%. As frações obtidas foram posteriormente combinadas de acordo com as suas semelhanças após análise em CCD. A sub-fração (18-20) (30-40) foi recromatografada em Sephadex LH-20 utilizando MeOH, para fornecer o composto **2** (9 mg). Cromatografia flash utilizando a mistura acetona/MeOH 60% da sub-fração (18-20)(21-25) (25 mg) forneceu o composto **4** (10 mg).

A fração AcOEt (5,42 g) foi submetida a sucessivas cromatografias flash utilizando os solventes CHCl₃, acetona e MeOH, seguindo um gradiente de concentração em ordem crescente de polaridade, para fornecer os compostos **1** (40 mg), **3a-3b** (24 mg) e **10** (12 mg).

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/CAPES/PADCT/PRONEX/FUNCAP/FINEP pelas bolsas e auxílios concedidos.

REFERÊNCIAS

1. Hillis, W. E.; Hasegawa, M.; *Phytochemistry* **1963**, 2, 195.
2. Satwalekar, A. S.; Gupta, T. R.; Narashimha, R. P. L.; *J. Indian Inst. Sci.* **1957**, 39, 195.
3. Rashwan, O. A.; *Molecules* **2002**, 7, 75.
4. Hillis, W. E.; Yazaki, Y.; *Phytochemistry* **1974**, 13, 495.
5. Mcgooken, A.; Heilbron, I. M.; *J. Pharmacol.* **1926**, 26, 421.
6. Hillis, W. E.; *Aust. J. Sci. Res.* **1952**, A5, 379.
7. Hillis, W. E.; *Aust. J. Applied Sci.* **1951**, 2, 385.
8. Hillis, W. E.; Carle, A.; *Aust. J. Chem.* **1960**, 13, 390.
9. Echeverri, F.; Torres, F.; Cardona, G.; Lopez, J.; Quinones, W.; Gallego, L. H.; Pelaez, C. A.; Rojas, M.; Garcia, F.; Restrepo, L. M.; *Rev. Boliv. Quim.* **1992**, 11, 43.
10. Gell, R. J.; Pinhey, J. T.; Ritchie, E.; *Aust. J. Chem.* **1958**, 11, 372.
11. Nawwar, M. A. M.; Souleman, A. M. A.; Buddrus, J.; Bauer, H.; Linscheid, M.; *Tetrahedron* **1984**, 25, 49.
12. Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishioka, I.; Yamagishi, T.; *Phytochemistry* **1988**, 27, 1473.
13. Huang, S.; Liao, X.; Nie, Q.; Ding, L.; Peng, S.; *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 598.
14. Agrawal, P. K.; *Carbon-13 NMR of flavonoids*, Elsevier:Amsterdam, 1989.