



Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae

Elaine A. Domingues,^{*1} Celso V. Nakamura,² Maria C. de Souza,³ Tatiane S. Teixeira,¹
Juliana L. B. Peixoto,¹ Maria H. Sarragiotto,¹ Gentil J. Vidotti^{†1}

¹Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900 Maringá-PR, Brasil

²Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900 Maringá-PR, Brasil

³Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900 Maringá-PR, Brasil.

RESUMO: O estudo fitoquímico das folhas de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae, resultou no isolamento e identificação de: sesquiterpeno [8-hidroxicalameneno (1)], triterpenos [α -amirina (2a) e β -amirina (2b)], flavonóide [3-O- α -ramnopiranosil-7-O- β -glucopiranosil canferol (3)], e alcalóide [1,2,3,4-tetraidro-1-metil- β -carbolina (4)]. As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas com base nos seus dados de RMN em comparação com os da literatura. A substância 8-hidroxicalameneno apresentou atividade antibacteriana (MIC = 7,8 μ g/mL) e antifúngica (MIC = 15,6 μ g/mL).

Unitermos: *Calycorectes psidiiflorus*, Myrtaceae, constituintes químicos, ensaios biológicos.

ABSTRACT: "Phytochemical study and evaluation of toxicity against *Artemia salina* and antimicrobial activity of *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae". The phytochemical study of *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral leaves resulted in isolation and identification of the sesquiterpene 8-hydroxycalamenene (1), triterpenes α -amyrin (2a) and β -amyrin (2b), flavonoid 3-O- α -rhamnopyranosyl-7-O- β -glucopyranosyl kaempferol (3), and of the alkaloid 1,2,3,4-tetrahydro-1-methyl- β -carboline (4). The structures of the isolated compounds were elucidated based on their spectroscopic NMR data and comparison with those reported in literature. Substance 1 presented antibacterial (MIC = 7.8 μ g/mL) and antifungal (MIC = 15.6 μ g/mL) activities.

Keywords: *Calycorectes psidiiflorus*, Myrtaceae, chemical constituents; biological assays.

INTRODUÇÃO

Calycorectes psidiiflorus (O. Berg) Sobral pertence à família Myrtaceae, que abrange cerca de cem gêneros e três mil espécies (Trease, 1983). Compreende duas subfamílias, a Leptospermoideae que reúne as espécies de frutos secos com maior concentração na Austrália, e a Myrtoideae que apresenta espécies de frutos carnosos e se concentra principalmente nas Américas do Sul e Central (Romagnolo, 2003). A subfamília Myrtoideae possui espécies com características apícolas e produzem frutos comestíveis muito apreciados pela fauna silvestre e também pelo homem, tais como: pitanga, goiaba, araçá, jabuticaba, guabiroba, uvaia, jambolão, jambo (Romagnolo, 2003).

Calycorectes psidiiflorus é conhecida popularmente como guamirim-de-riedel ou cambuí (Romagnolo, 2003) e apresenta-se normalmente como

uma árvoreta, com cerca de três metros de altura, mas pode alcançar até dez metros; possui flores com pétalas brancas e frutos globosos (10-20 mm de diâmetro) de coloração vermelha quando maduros. Sua distribuição geográfica ocorre no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. As folhas de *Calycorectes psidiiflorus*, conhecidas popularmente no Paraguai como Ñangapiry (Schmeda, 1995), em infusão ou decocção, são utilizadas como digestivo, anti-hipertensivo.

O gênero *Calycorectes* apresenta cerca de dezoito espécies distribuídas do México até a América do Sul e que são utilizadas na medicina popular, porém poucos estudos são apresentados na literatura.

O presente trabalho tem como objetivo a investigação fitoquímica de *Calycorectes psidiiflorus* (folhas e galhos) visando o isolamento e identificação dos principais compostos presentes na planta, de forma a

*E-mail: pg41579@uem.br (Elaine A. Domingues), Tel. 55 44 3261 4332, Fax. 55 44 3261 4125
†In Memoriam

ampliar os estudos químicos da espécie e contribuir para os estudos quimiotaxonômicos do gênero, bem como avaliar as atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos e substâncias isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Instrumentação e material cromatográfico

Nos procedimentos de separação por coluna cromatográfica (CC) foram utilizadas sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) e sílica flash (0,035-0,070 mm) como fases estacionárias. Como fases móveis foram utilizados solventes puros e ou combinados, em ordem crescente de polaridade. Na cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) foi utilizado sílica gel 60 GF (Merck), nas espessuras 0,3 e 0,8 mm, respectivamente.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram registrados em espectrômetro VARIAN, modelo Mercury Plus BB, 300 MHz, (300,06 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C).

Material vegetal

A espécie vegetal *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae (folhas e galhos), foi coletada em novembro de 2001, às margens da planície alagável do alto rio Paraná, na região de Porto Rico-PR. Sua identificação foi feita pela Prof^a. Dr^a. Maria Conceição de Souza, do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá. Uma exsiccata de *Calycorectes psidiiflorus* foi depositada no acervo do Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUM) sob n^o 9602, coletor: M. B. Romagnolo 316.

Extração e isolamento das substâncias

As folhas e os galhos secos e moídos de *C. psidiiflorus* foram, separadamente, submetidos à extração com etanol 95%, utilizando técnicas de maceração e percolação combinadas. Após liofilização obteve-se extrato bruto das folhas e extrato bruto dos galhos de *C. psidiiflorus*, os quais foram fracionados por partição em solventes originando as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila. A fração hexânica foi submetida a sucessivas colunas cromatográficas (CC) de sílica gel, empregando os eluentes hexano, clorofórmio e metanol (na forma binária e em ordem crescente de polaridade), o que resultou em sete sub-frações. A purificação da sub-fração 7.1 por cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP, sílica gel, CH_2Cl_2 , vapor de amônia) forneceu a substância **1** na forma de um líquido de coloração amarela.

A sub-fração 7.2 foi submetida a CC de sílica gel 60 com os eluentes hexano:éter etílico em ordem crescente de polaridade, e uma das frações forneceu a mistura das

substâncias **2a** e **2b**, na forma de cristais brancos solúveis em diclorometano. A quantidade obtida de **2a** e **2b** correspondeu a 29,51% da subfração, ou seja, 9,74% da fração hexânica e 2,38% do extrato bruto das folhas de *Calycorectes psidiiflorus*.

A fração acetato de etila foi submetida à CC de sílica gel com o eluente CH_2Cl_2 :MeOH 2%, em ordem crescente de polaridade, sendo coletadas seis frações. A subfração 5 foi submetida à CCDP, sendo utilizado como fase móvel CH_2Cl_2 :metanol 20%, o que forneceu a substância **3** como um sólido amarelo.

Do extrato bruto dos galhos de *Calycorectes psidiiflorus* foi realizada uma extração ácido-base. A solução aquosa ácida (com solução de ácido sulfúrico pH 2) foi extraída com CH_2Cl_2 (3 x 100 mL) e então alcalinizada com hidróxido de amônio 30% até pH 10. A solução básica foi extraída com CH_2Cl_2 (3x100 mL) fornecendo a fração CH_2Cl_2 básica. Esta fração foi submetida à CCDP, usando como fase móvel acetato de etila:metanol 70% (com vapor de amônia), o que levou ao isolamento da substância **4** que apresentou fluorescência a UV 254 nm e teste positivo para alcaloides com revelador de Dragendorff.

Ensaio biológicos

A avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* foi realizada com o extrato bruto das folhas e dos galhos de *C. psidiiflorus* e com as frações resultantes de seu fracionamento. O bioensaio de toxicidade foi realizado conforme descrito na literatura (Dey & Harbone, 1993). Os testes foram realizados em triplicata. A concentração de amostra necessária para promover a mortalidade de 50% e 90% dos microcrustáceos (DL_{50} e DL_{90}) foi calculada através do logaritmo da concentração versus a média da porcentagem de mortalidade.

No estudo da atividade antibacteriana e antifúngica foi utilizado o método de microdiluição (McLaughlin et al., 1991) para determinação da concentração mínima inibitória. Foi utilizado o extrato bruto das folhas e dos galhos de *C. psidiiflorus*, as frações resultantes do fracionamento do extrato bruto e as substâncias isoladas 8-hidróxicalameneno (**1**), α -amirina (**2a**), β -amirina (**2b**), 3-*O*- α -raminopiranosil-7-*O*- β -glicopiranosil canferol (**3**) e 1,2,3,4-tetraidro-1-metil- β -carbolina (**4**).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico das folhas e galhos de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae, resultou no isolamento de três substâncias puras, identificadas como 8-hidróxicalameneno (**1**), 3-*O*- α -raminopiranosil-7-*O*- β -glicopiranosil canferol (**3**) e 1,2,3,4-tetraidro-1-metil- β -carbolina (**4**) e uma mistura de duas substâncias identificadas como α -amirina (**2a**) e β -amirina (**2b**).

A substância **1** foi isolada da fração hexânica

das folhas de *C. psidiiflorus*. No espectro de RMN de ^1H observaram-se dois singletos na região de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,40 e 6,57, cada um apresentando integração para um hidrogênio. Foram verificados três dubletos em δ_{H} 0,82 ($J = 6,9$ Hz), δ_{H} 0,97 ($J = 6,9$ Hz) e δ_{H} 1,19 ($J = 6,9$ Hz), cada um com integração para três hidrogênios, característicos de metilas. Foi observado também um singlete em δ_{H} 2,22 com integração para três hidrogênios, sinal típico de metila ligada a um hidrogênio, e um singlete em δ_{H} 4,89, com integral para um hidrogênio, característico de hidroxila.

No espectro de RMN de ^{13}C , com auxílio de experimentos de DEPT, foi possível determinar a presença de quatro carbonos metílicos (δ_{C} 19,8; 21,3; 21,4 e 22,3), dois carbonos metilênicos (δ_{C} 19,3 e 27,3), cinco carbonos metínicos (δ_{C} 26,8; 33,4; 43,3; 113,6 e 123,1) e de quatro carbonos não ligados a hidrogênio (δ_{C} 126,3; 135,2; 141,4 e 153,2). Através do espectro de HMQC foi possível verificar que a substância apresenta apenas um metileno (δ_{C} 27,3) com hidrogênios heterotópicos, correspondente aos hidrogênios δ_{H} 1,50 e δ_{H} 1,96 e ainda que as quatro metilas (δ_{C} 19,8, δ_{C} 21,3, δ_{C} 21,4 e δ_{C} 22,3) têm respectivamente, δ_{H} 0,82 ($J = 6,9$ Hz), δ_{H} 2,22 singlete, δ_{H} 1,19 ($J = 6,9$ Hz) e δ_{H} 0,97 ($J = 6,9$ Hz).

Conforme verificado no espectro de ^1H - ^1H COSY, o hidrogênio heterotópico H-2a correlaciona com o H-3 e H-2b correlaciona com H-1, sendo que estes também correlacionam entre si. Outra correlação importante é observada para H-11 que se correlaciona com os hidrogênios H-12, H-13 e H-4.

Só foi possível definir a posição da hidroxila (δ_{H} 4,89) com o espectro de diferença de NOE que através da irradiação no sinal δ_{H} 1,19 (H-14) apresentou aumento na intensidade dos sinais dos hidrogênios δ_{H} 3,07 (H-1), δ_{H} 4,89 (OH), δ_{H} 1,50 (H-2a) e δ_{H} 1,78 (H-3a) e através da irradiação no sinal δ_{H} 3,07 (H-1) apresentou aumento na intensidade dos sinais dos hidrogênios δ_{H} 1,19 (H-14), δ_{H} 4,89 (OH), δ_{H} 1,50 (H-2a) e δ_{H} 1,96 (H-2b). Diante dessas informações e comparação com dados da literatura (Mulholland et al., 1998) foi possível determinar que a hidroxila está ligada ao C-8, e que as metilas 13, 14 e 15, na publicação de Mulholland et al. (1998), estão com δ_{C} trocados, devendo serem corrigidos para δ_{C} 22,3 (13), δ_{C} 21,4 (14) e δ_{C} 21,3 (15). Desta forma, a substância isolada **1** foi identificada como sendo o sesquiterpeno: 8-hidróxicalameneno.

A mistura das substâncias **2a** e **2b** (cristais brancos, pouco solúveis em hexano e totalmente solúveis em CH_2Cl_2) foi isolada da fração hexânica das folhas de *C. psidiiflorus*. A concordância entre os dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , para as estruturas propostas, e comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (Mahato & Kundu, 1994), possibilitou a identificação das substâncias isoladas **2a** e **2b** como mistura dos triterpenos α -amirina (**2a**) e β -amirina (**2b**).

A substância **3** (sólido amarelo fluorescente em

UV 254 nm) foi isolada da fração acetato de etila, das folhas de *C. psidiiflorus*. Através do espectro de RMN de ^1H foi possível identificar a unidade aglicônica da substância **3** como canferol, devido à presença de dois dubletos em δ_{H} 6,32 e δ_{H} 6,15, com integração para um hidrogênio cada, e com padrão de acoplamento meta ($J = 1,8$ Hz) e dois dubletos em δ_{H} 6,92 e δ_{H} 7,75, com integração para dois hidrogênios cada, e com acoplamento orto ($J = 9,0$ Hz). Os espectros de RMN de ^{13}C e o DEPT confirmaram a unidade aglicônica como canferol, pela presença de uma carbonila em δ_{C} 179,58 e sinais de carbonos na região de aromáticos, correspondentes aos quinze carbonos da unidade aglicônica.

A presença de duas unidades glicosídicas foi evidenciada pelos sinais de dois hidrogênios anoméricos em δ_{H} 4,25 (d, $J = 7,5$ Hz) e δ_{H} 5,35 (d, $J = 1,8$ Hz) correlacionados aos carbonos anoméricos em δ_{C} 104,34 e δ_{C} 103,52, respectivamente, de acordo com o observado no espectro de HMQC. Uma das unidades glicosídicas foi caracterizada como glicose devido à presença de um carbono oximetilênico em δ_{C} 62,75, um hidrogênio anomérico com constante de acoplamento ($J = 7,5$ Hz) caracterizando configuração β para o carbono anomérico e demais sinais de carbonos oximetínicos. A outra unidade glicosídica foi caracterizada como raminose, devido à presença de um grupo metílico em δ_{H} 0,91 (d, $J = 6,0$ Hz) correlacionando ao sinal δ_{C} 17,64, de acordo com o observado no espectro de HMQC, e a presença do hidrogênio anomérico com constante de acoplamento ($J = 1,8$ Hz) caracterizando configuração α para o carbono anomérico, e acoplamento do tipo axial-equatorial entre o H-anomérico H-1''' com H-2''''.

A posição de ligação da raminose foi determinada pela análise do espectro de HMBC devido a correlação entre o sinal do hidrogênio anomérico δ_{H} 5,35 (H-1''') e o δ_{C} 136,17 (C-3) da unidade aglicônica. A concordância entre os dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , DEPT 135° e 90° , HMQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) e HMBC ^3J ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) para a estrutura proposta e comparação com os dados de RMN de ^1H da literatura (Sharafet al., 1997), possibilitou a identificação da substância isolada **3** como 3-*O*- α -ramnopiranosil-7-*O*- β -glicopiranosil canferol.

A substância **4** foi isolada por extração ácido-base, dos galhos de *C. psidiiflorus*. No espectro de RMN de ^1H foram observados sinais na região de hidrogênios aromáticos, em δ_{H} 6,96 (td, $J = 7,8$ e 1,2 Hz), δ_{H} 6,98 (td, $J = 7,2$ e 1,2 Hz), δ_{H} 7,27 (dd, $J = 7,8$ e 0,9 Hz) e δ_{H} 7,37 (dd, $J = 7,5$ e 0,9 Hz), cada um apresentando integração para um hidrogênio. Além destes, foram observados um quarteto em δ_{H} 4,15 ($J = 6,6$ Hz), com integração para um hidrogênio; um multipeto em δ_{H} 2,99, com integração para dois hidrogênios e um dublete em δ_{H} 1,48 ($J = 6,6$ Hz), correspondente a um grupo metila. Em δ_{H} 1,48 ($J = 6,6$ Hz) foi verificado um dublete, com integração para três hidrogênios, característico de metila.

No espectro de RMN de ^{13}C foram observados

onze picos e através de DEPT 135° e 90° foi possível verificar que sete destes carbonos estavam ligados a hidrogênio: uma metila (δ_c 18,99), dois metilenos (δ_c 42,36 e δ_c 21,59) e quatro carbonos aromáticos (δ_c 110,61, δ_c 120,76, δ_c 118,44 e δ_c 117,37). Através do HMQC (^1H x ^{13}C) foi possível atribuir o valor do décimo segundo carbono (δ_c 48,50) que no espectro de RMN ^{13}C ficou sob o sinal do solvente.

Através do COSY (^1H x ^1H) foi possível verificar as correlações entre δ_H 7,27 (H-5) e δ_H 6,98 (H-6), δ_H 6,96 (H-7) e δ_H 7,37 (H-8) e entre os hidrogênios δ_H 6,98 (H-6) e δ_H 6,96 (H-7).

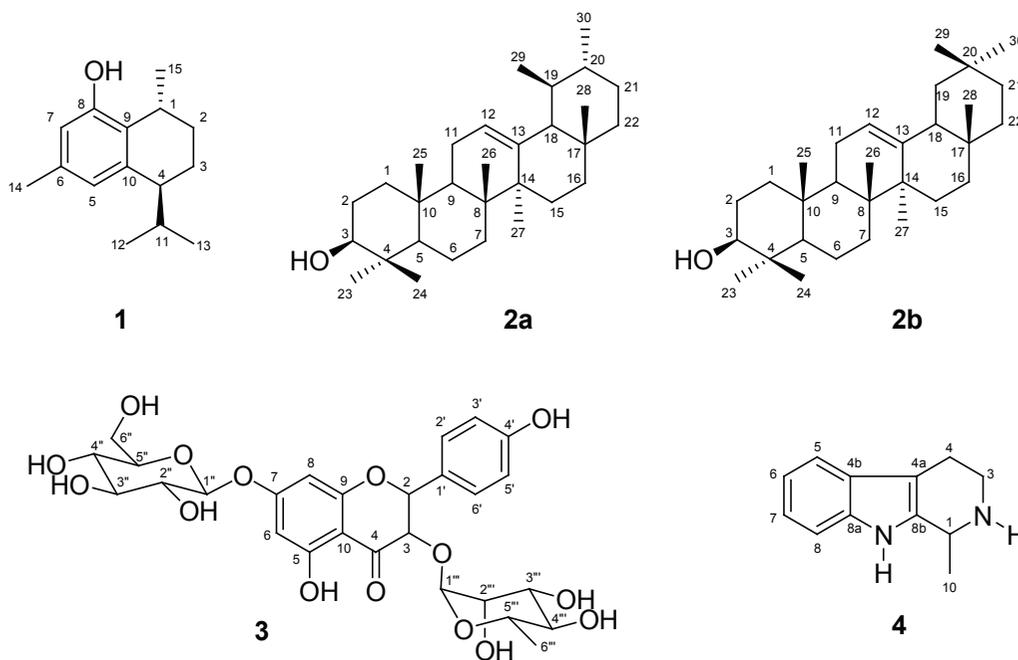
A concordância entre os dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , DEPT 135° e 90°, COSY (^1H x ^1H), HMQC (^1H x ^{13}C) para a estrutura proposta e comparação com os dados da literatura (Ortet, 2003), possibilitou a identificação da substância isolada **4** como sendo o alcaloide 1,2,3,4-tetraidro-1-metil- β -carbolina (eleagenina).

A avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* mostrou que o extrato bruto das folhas de *C. psidiiflorus* foi mais ativo que o extrato bruto dos galhos, DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$) = 186,64 e 566,24, respectivamente. Dentre as frações de folhas e galhos, a que apresentou maior toxicidade foi a fração clorofórmica dos galhos de

C. psidiiflorus (DL_{50} = 84,91 $\mu\text{g/mL}$ e DL_{90} = 746,44 $\mu\text{g/mL}$).

Na avaliação da atividade antibacteriana os extratos brutos e as frações acetato de etila e *n*-butanol das folhas e galhos de *C. psidiiflorus* apresentaram-se “moderadamente ativas” frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. A substância isolada **1** (8-hidróxi-calameneno) apresentou-se “fortemente ativa” frente às bactérias *S. aureus* (CMI = 7,8 $\mu\text{g/mL}$ e CMB = 15,6 $\mu\text{g/mL}$) e *B. subtilis* (CMI e CMB = 7,8 $\mu\text{g/mL}$).

Na avaliação da atividade antifúngica, dentre os extratos brutos das folhas e dos galhos, e suas frações, o melhor resultado foi observado para a fração hexânica das folhas de *C. psidiiflorus* que se apresentou “ativa” (CMI = 62,5 $\mu\text{g/mL}$) frente ao fungo *Candida parapsilosis* e “moderadamente ativa” frente aos fungos *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. As folhas apresentaram melhores resultados de atividade antifúngica que os galhos de *Calycorectes psidiiflorus*. A substância isolada **1** (8-hidróxi-calameneno) apresentou-se “mais ativa” frente aos fungos *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (CMI = 15,6 $\mu\text{g/mL}$) e a substância isolada **4** (1,2,3,4-tetraidro-1-metil- β -carbolina) apresentou-se “moderadamente ativa” frente ao fungo *Candida tropicalis*.



AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de mestrado (Elaine A. Domingues).

REFERÊNCIAS

Dey PM, Harbone JB 1993. *Methods in plant biochemistry (assays for bioactivity)*. Ed. Academic Press 6: 7-10.

Mahato SB, Kundu AP 1994. ^{13}C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37: 1517-1575.

Mclaughlin JL, Chang CJ, Smith DL 1991. *Studies in natural products chemistry*. Ed. Atta Rahman 9: 383-409.

Mulholland DA, Iourine S, Taylor DAH 1998. Sesquiterpenoids from *Dysoxylum schiffneri*. *Phytochemistry* 47: 1421-1422.

Ortet MRLBV 2003. *Estudo Químico da espécie vegetal Eugenia*

- repanda Berg. (*Myrtaceae*). Maringá. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá.
- Romagnolo MB 2003. *A família Myrtaceae na planície alagável do alto rio Paraná, estados de Mato Grosso do Sul e Paraná*, Brasil. Maringá, 120p. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Maringá.
- Schmeda HG 1995. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* e *Hexachlamys* species. *Fitoterapia* 66: 373-374.
- Sharaf M, El-Ansari MA, Saleh NAM 1997. Flavonoids of four cleome and three capparid species. *Biochem Syst Ecol* 25: 161-166.
- Trease GE 1983. *Pharmacognosy*. 12 ed. London:.