

PERFIL CROMATOGRÁFICO DE DUAS ESPÉCIES DE PLUMBAGINACEAE: *Plumbago scandens* L. E *Plumbago auriculata* LAM

Selma Ribeiro de Paiva*, Licínio de Almeida Fontoura e Maria Raquel Figueiredo

Laboratório de Química de Produtos Naturais, Far-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, 21041-250 Rio de Janeiro - RJ

José Luiz Mazzei

Escola de Química, CT, Bl. E, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21949-900 Rio de Janeiro - RJ

Maria Auxiliadora Coelho Kaplan

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, CCS, Bl. H, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21949-900 Rio de Janeiro - RJ

Recebido em 20/2/01; aceito em 27/2/02

CHROMATOGRAPHIC PROFILE OF TWO PLUMBAGINACEAE SPECIES: *Plumbago scandens* L. AND *Plumbago auriculata* LAM. The genus *Plumbago* belongs to the family Plumbaginaceae, order Plumbaginales. Comparative chemical profile of *P. scandens* (native) and *P. auriculata* (cultivated) was obtained by normal and reversed-phase high performance liquid chromatography with photodiode array detector. Comparison of the ultraviolet spectra and the retention times for the compounds allowed to find similar metabolic patterns in roots, stems and leaves. Four flavonoids, one phenolic acid or derivative and the naphthoquinone plumbagin were comparatively identified to standards.

Keywords: *Plumbago auriculata*; *Plumbago scandens*; HPLC/PDA.

INTRODUÇÃO

Plumbago scandens L. e *Plumbago auriculata* LAM. (sin. *Plumbago capensis* Thunb.) pertencem à família Plumbaginaceae, ordem Plumbaginales, superordem Malviflorae¹. Essa família compreende cerca de 20 gêneros e aproximadamente 500 espécies, apresentando uma ampla distribuição geográfica².

Plumbago scandens L. é um sub-arbusto escandente, encontrado em vegetação típica de restinga, caracterizada por alta intensidade luminosa, solo arenoso e vegetação herbácea e arbustiva. *P. auriculata* LAM. é uma espécie arbustiva originária da África que se apresenta cultivada em locais com elevada exposição à luz e em solo adubado.

Plantas do gênero *Plumbago* têm sido usadas na medicina popular como anti-reumático, purgativo, contra sífilis e dores de dente^{3,4}. Em trabalho anterior⁵ de quimiosistemática, naftoquinonas e flavonóides foram considerados marcadores quimiotaxonômicos da ordem Plumbaginales, devido à representatividade e diversidade estrutural desses metabolitos. Algumas das atividades biológicas atribuídas às espécies de *Plumbago* estão relacionadas com a presença da naftoquinona plumbagina, isolada principalmente das raízes⁶.

A padronização química de plantas medicinais pode envolver técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que permite análises quali e quantitativas de misturas complexas com alta resolução e sensibilidade.

Gupta e colaboradores⁷ utilizaram CLAE em sílica para a determinação da naftoquinona plumbagina e de um cromeno em *Plumbago zeylanica* L., que é uma planta considerada medicinal na Índia.

Não se encontra na literatura a aplicação de CLAE para análise de flavonóides nas plantas em questão. No entanto, CLAE em fase reversa com grupos octil e octadecilsilanos é largamente aplicada para a análise de flavonóides em material vegetal. Recentemente

Canela e colaboradores⁸ caracterizaram os flavonóides em espécies de *Phyllanthus* por CLAE com sílica modificada com grupo octadecilsilano sob modo gradiente de composição do eluente. A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência conjugada à técnica de detecção por varredura de espectro ao ultravioleta é uma ferramenta muito útil na caracterização do perfil químico de plantas, permitindo caracterizar simultaneamente as substâncias constituintes ou seus principais grupos estruturais.

No presente trabalho foram realizadas análises de naftoquinonas por CLAE em fase normal pelo sistema similar ao de Gupta e colaboradores⁷ e de ácidos fenólicos e flavonóides por CLAE em fase reversa pelo sistema similar ao trabalho de Canela e colaboradores⁸ em amostras de caules, folhas e raízes de *P. scandens* L. e *P. auriculata* LAM., de modo a caracterizar o perfil cromatográfico dessas espécies.

PARTE EXPERIMENTAL

Material Botânico

Para este estudo foram coletadas, no estado do Rio de Janeiro, duas espécies em época de floração da família Plumbaginaceae, *Plumbago scandens* L., nativa, coletada na região de Búzios, e *Plumbago auriculata* LAM., cultivada no campus da Fundação Oswaldo Cruz, na cidade do Rio de Janeiro. A identificação do material botânico foi realizada por R. J. Paixão e as exsiccatas encontram-se depositadas no herbário do Museu Nacional, sob os registros de número 194907 e 193592, respectivamente.

Procedimento de extração

Folhas e caules de ambas espécies foram secos, moídos e submetidos à extração por maceração dinâmica com metanol em mesa giratória modelo Shaker Bigger Bill com rotação de 50 rpm, em temperatura ambiente. Os extratos brutos clorofórmicos das raízes fo-

*e-mail: s_paiva@far.fiocruz.br

ram obtidos através de extração das raízes secas e moídas em Soxhlet por 30 h. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório Büchi R114, com temperatura de 40 °C, equipado com controlador de vácuo e banho refrigerante.

Para as análises cromatográficas em sílica, alíquotas de extrato seco foram dissolvidas, sob ultrassom, à concentração de 30 mg/mL com fase móvel como solvente e posteriormente filtradas em filtros de 0,45 µm. Para as análises em fase reversa as amostras foram dissolvidas em metanol.

Os solventes foram de grau P.A. da Merck para extração e para as análises cromatográficas de grau HPLC/UV da Merck.

Aparelhagem

Para as análises cromatográficas foi utilizado cromatógrafo líquido Shimadzu Class-LC10, equipado com duas bombas LC10AT, detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M10A e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20 µL.

Condições da cromatografia líquida de alta eficiência

As naftoquinonas foram avaliadas por CLAE em fase normal utilizando coluna Shim-pack CLC-SIL 250×4,6 mm e pré-coluna Shim-pack CLC-G-SIL 10×4,0 mm, ambos com partículas de sílica de 5 µm, e ciclohexano-clorofórmio-isopropanol (50:50:1 v/v) como fase móvel à vazão de 1 mL/min. Detecção por varredura de espectro de 250 nm a 600 nm com acompanhamento em dois comprimentos de onda, 267 nm e 415 nm.

Para análise de flavonóides e substâncias fenólicas utilizou-se CLAE em fase reversa em coluna e pré-coluna com as mesmas dimensões das anteriores, Shim-pack CLC-ODS e CLC-G-ODS, respectivamente, ambas com fase C18. A composição da fase móvel variou em gradiente linear de acetonitrila-água nas proporções de 10:90 v/v a 70:30 v/v em 60 min. Ambas fases continham 0,05% de ácido trifluoroacético. A vazão da fase móvel permaneceu a 1 mL/min. Detecção por varredura de espectro de 200 nm a 400 nm com acompanhamento em 3 comprimentos de onda, 220 nm, 260 nm e 340 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de flavonóides por CLAE em fase reversa foi executada com gradiente de composição de fase móvel em vista da rica produção de flavonóides em ambas espécies, evidenciada pelo número de substâncias nos resultados cromatográficos aliado à informação dos espectros de ultravioleta. Esta metodologia de gradiente com fase móvel ácida também caracteriza a presença de ácidos fenólicos e seus derivados nos extratos⁸. Um cromatograma típico para extrato metanólico de folhas é apresentado na Figura 1.

A similaridade entre os perfis cromatográficos obtidos para os diferentes órgãos das duas espécies foi avaliada através da comparação dos tempos de retenção dos sinais cromatográficos observados e de seus espectros de absorção obtidos de 220 a 400 nm, conforme apresentado na Tabela 1. A identificação das substâncias flavonóicas e derivados de ácidos fenólicos foi realizada por comparação com banco de dados de padrões, contendo tempo de retenção e espectro no UV obtidos nas mesmas condições⁸.

Como detalhado na Tabela 1, o flavonóide orientina foi caracterizado nos extratos de caules das duas plantas e de folhas de *P. auriculata*, do mesmo modo que quercitrina foi caracterizada nos extratos de folhas de ambas espécies e de caule de *P. auriculata*.

Do mesmo modo, caracterizou-se a presença de outros flavonóides O-glicosilados ou O-metilados, particulares a cada es-

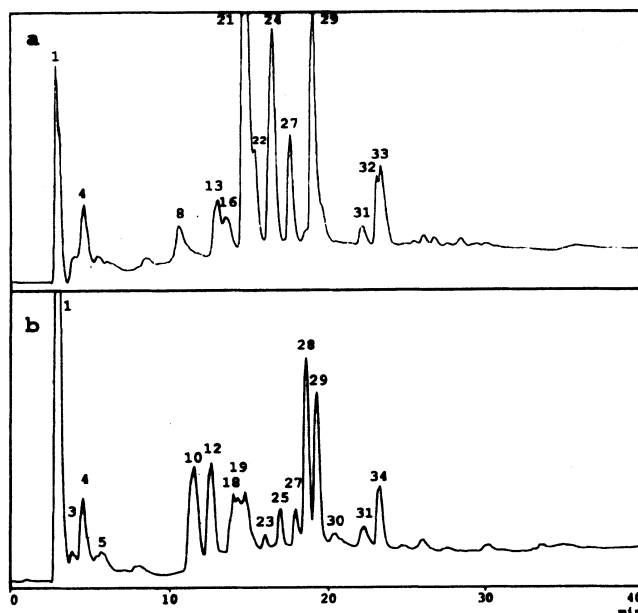


Figura 1. Cromatogramas típicos a 220nm dos extratos metanólicos de folhas de *Plumbago scandens* (a) e de *P. auriculata* (b) em CLAE com coluna Shim-Pack CLC-ODS 5µm. Fase móvel a 1ml/min, ACN-H₂O com 0,05% TFA, 10:90 – 70:30 em 60 min. Sinais identificados como na Tabela 1

pécie e parte da planta (Tabela 1), pela similaridade dos espectros com padrões de substâncias contendo a aglicona correspondente. Na Figura 2 encontram-se representados os espectros ao ultravioleta dos padrões em comparação com os das substâncias identificadas nos extratos.

Afora estas classes de metabolitos, a análise comparativa do perfil cromatográfico dos extratos metanólicos de folhas e caules de *P. scandens* e *P. auriculata*, bem como dos extratos clorofórmicos de raízes das duas espécies, demonstrou que as plantas apresentam perfis cromatográficos peculiares para cada órgão. A análise dos tempos de retenção relacionados na Tabela 1, comparada com os espectros de ultravioleta das substâncias, demonstrou algumas diferenças em relação à produção de metabolitos pelas espécies em questão. Na CLAE em fase reversa observa-se 5 substâncias que estão presentes nos caules das duas espécies, o mesmo acontecendo nos resultados obtidos em análise por CLAE em fase normal (Tabela 2). *P. auriculata* apresenta maior número de substâncias, dentre as detectadas, tanto nas folhas, como também no caule e nas raízes, o que foi evidenciado através do número de sinais nos cromatogramas. Esses resultados confrontam as observações apresentadas por Larsson e colaboradores⁹, nas quais a quantidade de substâncias fenólicas aumentam em plantas sujeitas a altas taxas de luminosidade e baixa disponibilidade de nutrientes. Assim sendo, uma vez estando *P. scandens* sujeita a maiores pressões ambientais sendo originária de ambiente pobre em nutrientes, sujeito a altas taxas de luminosidade e temperatura, deveria portanto exibir maior diversidade metabólica, destacando os produtos que pudessem atuar como defesa à radiação solar.

A partir dos dados apresentados na tabela é possível observar, na comparação entre as duas espécies, que ocorre maior equivalência química nas folhas pela similaridade dos sinais cromatográficos e seus respectivos espectros, além da presença de substâncias flavonóicas. Este resultado referenda a peculiar proximidade taxonômica das plantas através do seu metabolismo secundário.

A análise de naftoquinonas por CLAE em fase normal foi executada no modo isocrático porque a utilização do modo gradiente im-

Tabela 1. Sinais cromatográficos em análises de extratos metanólicos de *Plumbago scandens* e *P. auriculata* por CLAE com coluna Shim-Pack CLC-ODS 5µm. Fase móvel, a 1ml/min, ACN-H₂O com 0,05% TFA, 10:90 – 70:30 em 60 min. Substâncias nas diferentes partes da planta caracterizadas pela similaridade dos espectros ao ultravioleta

Sinal	Tempo de retenção (min)	Prováveis Substâncias	Comprimento de onda (nm)		Partes da planta ¹	
			deteção	máximos no espectro	<i>P. scandens</i>	<i>P. auriculata</i>
1	2,80		220	204	f, c	f, c
2	3,02		260	210, 264	f	f, c
3	3,75		220, 260	201, 265	-	f, c
4	4,55		220, 260	225, 273	f, c	f, c
5	5,31		220, 260	214, 255	-	f, c
6	10,14		220, 260, 340	229, 250, 255, 295	-	c
7	10,43		220	207, 273	c	-
8	10,50	ácido fenólico	220, 340	217, 330	f, c	-
9	11,09		220, 260, 340	231, 252, 258, 295	-	c
10	11,43		220, 260, 340	229, 250, 256, 295	-	f
11	12,16		220, 260	215, 264	-	c
12	12,49		220, 260, 340	230, 252, 258, 295	-	f
13	12,97		220, 260, 340	218, 289, 310	f	-
14	13,10		220, 260	207, 220, 262, 293	-	c
15	13,15		220, 260, 340	212, 270	c	-
16	13,47		220, 340	215, 315	f	-
17	13,83		220, 340	213, 276, 300	c	-
18	13,90		220	220, 264, 290	-	f, c
19	14,19		220	220, 301, 312	-	f
20	14,30		340	210, 232, 315	-	f
21	14,67		220, 260, 340	217, 262, 335	f, c	-
22	15,34		220, 260, 340	215, 266, 347	f, c	-
23	15,93		220, 260, 340	216, 262, 348	-	f
24	16,41		220, 260, 340	228, 271, 342	f	-
25	16,87	orientina	220, 260, 340	256, 268, 351	c	f, c
26	17,47		220, 340	214, 260, 270, 344	-	-
27	17,84	vitexina-O- protegido ²	220, 260, 340	216, 271, 336	f	f
28	18,51		220, 260, 340	252, 265, 339	-	f, c
29	19,19		220, 260, 340	216, 271, 339	f, c	f, c
30	20,36		220, 340	206, 254, 268, 349	-	f
31	22,16	quercitrina	220, 260, 340	205, 258, 349	f, c	f, c
32	23,10		220, 260, 340	217, 267, 346	f	-
33	23,35		220, 260, 340	216, 266, 346	f, c	-
34	23,21	apigenina-O- protegido ²	220, 260, 340	206, 268, 336	-	f
35	25,93		340	207, 269 340	-	f, c
36	30,20		340	212, 313	-	f
37	33,51		340	269, 333	-	f, c

1. f: folhas, c: caules; 2. Possivelmente O-glicosilado ou O-metilado.

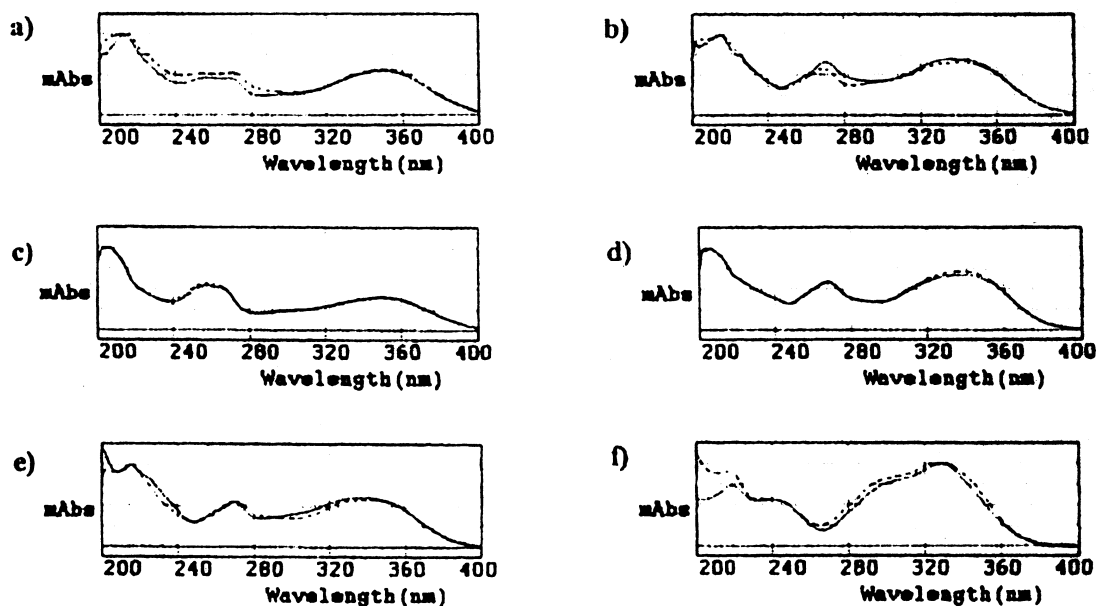


Figura 2. Espectros ao ultravioleta das substâncias identificadas em comparação com padrões (--). (a) Orientina; (b) Vitexina-2-O-rhamnosídeo; (c) Quercitrina; (d) Apigenina 7-O-glucosídeo; (e) Vitexina; (f) Ácido clorogênico

Tabela 2. Sinais cromatográficos em análises de extratos metanólicos de folhas, caules e extratos clorofórmicos de raízes de *Plumbago scandens* e *P. auriculata* por CLAE com coluna Shim-Pack CLC-SIL 5µm. Fase móvel, a 1ml/min, ciclohexano:clorofórmio:isopropanol em eluição isocrática 50:50:1 v/v. Substâncias nas diferentes partes da planta caracterizadas pela similaridade dos espectros ao ultravioleta

Sinal	Tempo de retenção (min)	Prováveis Substâncias	Comprimento de onda (nm)		Partes da planta ¹	
			deteção	máximos no espectro	<i>P. scandens</i>	<i>P. auriculata</i>
1	3,11		267, 415	458	f	-
2	3,35		267, 415	407	f, c	f
3	3,36		267, 415	281	r	r
4	3,56		267	269	-	c
5	3,62		267	409	c	-
6	3,85	quinona	267, 415	281, 425	r	r
7	3,86	quinona	267	277, 407	f	-
8	3,90	quinona	267	280, 403	-	f, c
9	4,15	plumbagina	415	263, 409	c, r	c, r
10	4,28		267	413	f	-
11	4,43	quinona	267, 415	296, 405	f	-
12	4,96	quinona	267	277, 415	-	c
13	5,22		267	275	c	c
14	5,59		267, 415	269, 360, 409	-	f, c
15	6,25		267, 415	411	f, c	f
16	6,58		267, 415	411	f, c	f, c
17	7,07	quinona	267	273, 415	-	c
18	7,20		267, 415	439	f	f, c
19	7,70		267, 415	405	c	-
20	7,72		267, 415	439	-	f
21	7,82		415	421, 437	f	-
22	8,17		267, 415	335, 407	-	c
23	8,54		415	415	f	-
24	9,12	quinona	267	267, 413	-	c
25	9,49		267	267	-	r
26	9,58		415	411	c	c
27	9,82		267	269	-	r
28	9,82		267, 415	370, 437	-	c
29	10,43	quinona	267	265, 411	f	f
30	10,94		267, 415	411	f	f
31	11,20		415	417, 439	-	c
32	11,26		267	273	-	r
33	11,93		267, 415	437	f	f
34	12,54		267, 415	410	f	f, c
35	12,98		267	273, 302	-	r
36	13,37		267	259, 339	c	-
37	13,40		267	439	f	f
38	14,22		267, 415	413	-	f, c
39	15,07		267	284	-	r
40	15,60		267, 415	417, 454, 482	f	-
41	15,64		267, 415	409	-	f, c
42	16,92		267, 415	437	r	-
43	18,49		267, 415	288, 376	-	r
44	18,92		267, 415	439	-	f
45	19,72		415	403	f	f
46	23,21		267	269, 333	r	r

1. f: folhas, c: caules, r: raiz.

plicaria em alteração significativa da linha-base devido à alta absorção ao ultravioleta dos solventes. O método foi desenvolvido partindo da composição da fase móvel conforme o método de Gupta e colaboradores⁷ e modulando a mesma, de modo a obter melhor resolução entre as substâncias. Os dados cromatográficos e espectrométricos obtidos foram analisados como descrito para substâncias fenólicas. A produção de quinonas pelas espécies em questão (Tabela 2) foi comprovada através da comparação dos espectros obtidos com o da naftoquinona plumbagina padrão. Um cromatograma típico para extrato metanólico de folhas em CLAE em fase normal é apresentado na Figura 3.

Como detalhado na Tabela 2, foram caracterizadas nove quinonas, incluindo a naftoquinona plumbagina que foi encontrada nos caules e raízes de ambas espécies. A análise por CLAE em fase normal novamente demonstra a maior produção de metabolitos em *P.*

auriculata, confirmando o que já havia sido verificado na análise por CLAE em fase reversa.

A presença de quinonas foi observada em todos os órgãos das plantas em estudo, entretanto foram verificadas diferenças significativas relativas aos órgãos de maior ocorrência dessas substâncias. Em *P. auriculata* há predominância de quinonas nos caules, enquanto em *P. scandens* o maior número de substâncias dessa classe metabólica foi caracterizado nas folhas.

Em trabalho anterior¹⁰, a substância plumbagina havia sido isolada através de metodologia fitoquímica clássica e caracterizada por métodos espectrométricos. Essa naftoquinona foi caracterizada como produto majoritário produzido nas raízes de *P. auriculata* e *P. scandens*, representando cerca de 12% a 20% do extrato bruto.

A plumbagina foi caracterizada em CLAE em fase normal apresentando tempo de retenção de aproximadamente 4min (Tabela 2).

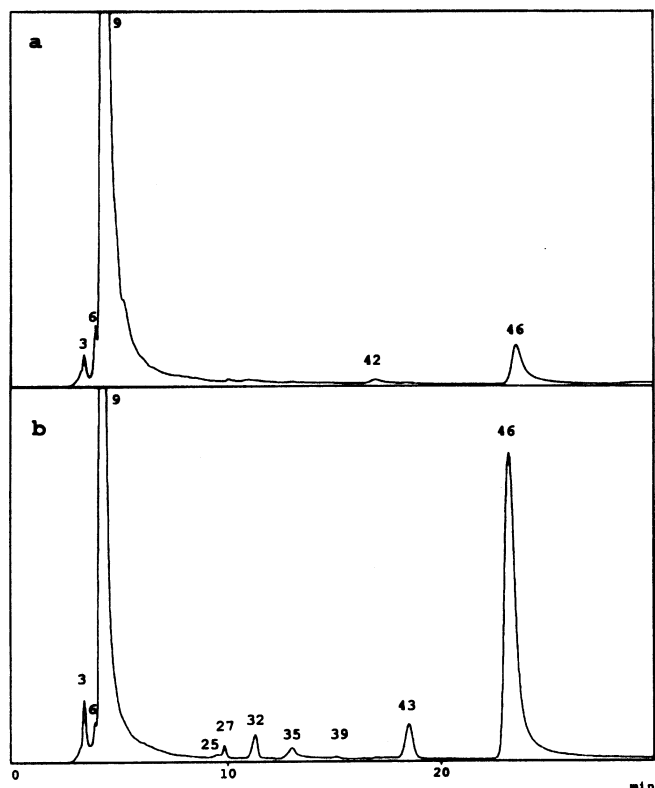


Figura 3. Cromatogramas típicos a 267nm dos extratos clorofórmicos de raízes de *Plumbago scandens* (a) e de *P. auriculata* (b) em CLAE com coluna Shim-Pack CLC-SIL 5 μ m. Fase móvel a 1ml/min, ciclohexano: clorofórmio: isopropanol em eluição isocrática 50:50:1 v/v. Sinais identificados como na Tabela 2

Sua identificação foi realizada através da injeção de seu padrão e posterior comparação espectrométrica (Figura 4).

CONCLUSÃO

Perfis cromatográficos de folhas, caules e raízes de *Plumbago auriculata* e *P. scandens* foram caracterizados por CLAE em fase normal e em fase reversa para estudos de padronização química destas plantas, visando principalmente flavonóides e naftoquinonas. *Plumbago auriculata* demonstrou maior representatividade para as classes químicas analisadas, além de uma maior produção metabólica. Com a identificação da presença de quatro flavonóides, um ácido fenólico ou derivado e da naftoquinona plumbagina, além da caracterização de outras oito quinonas, o presente trabalho veio reafirmar

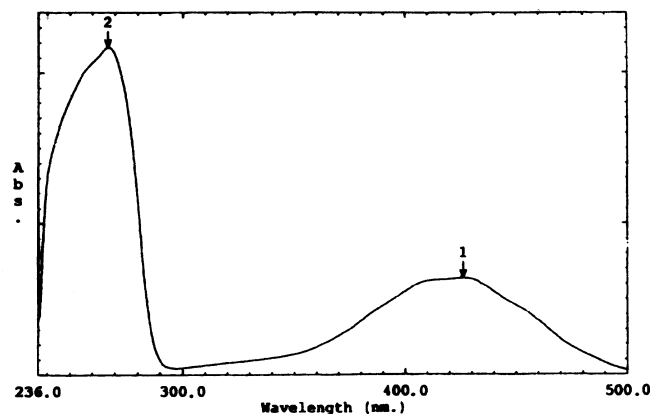


Figura 4. Espectro de absorção ao ultravioleta da naftoquinona plumbagina

os dados já obtidos em estudos anteriores de quimiosistemática da ordem Plumbaginales. A naftoquinona plumbagina, presente em grande quantidade nas raízes de ambas espécies pode indicar um desvio metabólico para sua produção, que deve apresentar uma função bastante significativa nessas espécies.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à R. J. Paixão (Museu Nacional, UFRJ), M. B. S. Almeida (Far-Manguinhos), à Central Analítica de Far-Manguinhos e às entidades de fomento, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- Dahlgren, R. M. T.; *Bot. J. Linn. Soc.* **1980**, 80, 91.
- Joly, A. B.; *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*, Companhia Editora Nacional: São Paulo, 1977, p. 542.
- Corrêa, M. P.; *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1926, vol. 1, p. 351.
- Morton, J. F.; *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*, Charles Thomas Publisher: Springfield, 1981, p. 1420.
- Paiva, S. R. de; Kaplan, M. A. C.; Gottlieb, O. R.; *An. Acad. Bras. Cienc.* **1995**, 67 (supl. 3), 461.
- Lima, O. G. de; D'Albuquerque, I. L.; Maciel, G. M.; Maciel, M. C. N.; *Rev. Inst. Antibiot.* **1968**, 8, 95.
- Gupta, M. M.; Verma, R. K.; Uniyal, G. C.; Jain, S. P.; *J. Chromatogr.* **1993**, 637, 209.
- Canela, J. P. F.; Almeida, M. B. S.; Mazzei, J. L.; Silva, A. I. F.; Ferreira, J. L. P.; Gilbert, B.; *Abstracts of 7th Latin-American Congress on Chromatography and Related Techniques*, Águas de São Pedro, Brasil, 1998.
- Larsson, S.; Wirén, A.; Lundgren, L.; Ericson, T.; *Oikos* **1986**, 47, 205.
- Paiva, S. R. de.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1999.