

CONSTITUÍNTES FENÓLICOS POLARES DE *Schinus terebinthifolius* RADDI (ANACARDIACEAE)

Melina Ceruks, Paulete Romoff, Oriana A. Fávero e João Henrique G. Lago*

Departamento de Química, Centro de Ciências e Humanidades, Universidade Presbiteriana Mackenzie, Rua da Consolação, 930, 01302-907 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 24/3/06; aceito em 17/7/06; publicado na web em 10/1/07

POLAR PHENOLIC CONSTITUENTS FROM *Schinus terebinthifolius* Raddi (ANACARDIACEAE). The EtOH extract from the leaves of *Schinus terebinthifolius* showed anti-radicalar potential in the DPPH test. It was partitioned between *n*-BuOH:H₂O (1:1) and these two phases were also evaluated for anti-radicalar activity. The active *n*-BuOH phase was partitioned between EtOAc:H₂O (1:1) and the active EtOAc phase was submitted to chromatographic procedures to afford five active phenolic compounds: ethyl gallate, methyl gallate, quercitrin, myricitrin and myricetin. The structures of these compounds were established by NMR spectral data analysis.

Keywords: *Schinus terebinthifolius*; phenolic compounds; anti-radicalar potential.

INTRODUÇÃO

Anacardiaceae é uma família botânica representada por 70 gêneros e cerca de 600 espécies de árvores ou arbustos, conhecidas por serem frutíferas e apresentarem madeira de boa qualidade¹.

Schinus terebinthifolius Raddi, vernaculamente conhecida como aroeira-pimenteira, é uma árvore de porte médio, monóica, de folhas compostas e aromáticas sendo usada em culinária e, na França, recebe o nome de *poivre rose*, um tipo de pimenta doce. Ocorre desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, em várias formações vegetais, sendo mais comum em beiras de rios².

Estudos fitoquímicos e biológicos efetuados com espécies do gênero *Schinus* descrevem a ocorrência de terpenóides e ácidos graxos em *S. molle*³⁻⁵ e em *S. terebinthifolius*⁶⁻¹⁰. Dentre os terpenóides, dois triterpenos isolados de *S. terebinthifolius*¹⁰ foram caracterizados como inibidores específicos da fosfolipase A₂. A literatura cita ainda que o extrato em etanol das cascas do tronco de *S. terebinthifolius* e as frações em hexano, clorofórmio e em acetato de etila, provenientes da partição deste, foram ativos frente a *Staphylococcus aureus*¹¹ e que os extratos aquosos de *S. molle* e de *S. terebinthifolius* inibiram o crescimento de *Candida albicans*¹². Além disso, extratos de *S. terebinthifolius*¹³ e de *S. weinmannifolia*¹³ apresentaram atividade anti-radicalar em ensaios de peroxidação lipídica e com DPPH.

Em vista dos estudos químicos com *S. terebinthifolius* terem sido direcionados aos componentes de baixa e média polaridade, associado ao fato de que nenhum estudo foi até então realizado com o objetivo de conhecer as substâncias responsáveis pela atividade anti-oxidante observada para esta espécie¹³ efetuou-se, no presente trabalho, o estudo fitoquímico da fase em acetato de etila, oriunda do extrato em etanol das folhas de *S. terebinthifolius* com potencial anti-radicalar através de ensaio em CCD/DPPH, o qual, após sucessivas etapas de purificação com Sephadex LH-20, conduziu ao isolamento de galato de etila (1), miricetrina (2), quercitrina (3), galato de metila (4) e miricetina (5), descritas pela primeira vez neste gênero.

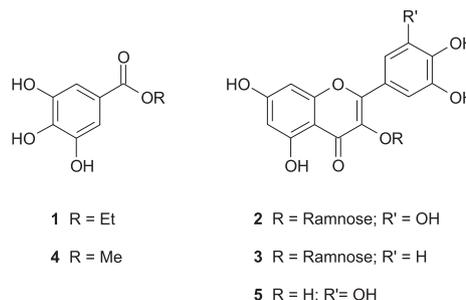


Figura 1. Substâncias isoladas das folhas de *Schinus terebinthifolius*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico do extrato em etanol das folhas de *S. terebinthifolius*, guiado pelo ensaio para detecção do potencial anti-radicalar, resultou no isolamento de cinco compostos fenólicos (1–5) ativos, cujas estruturas foram identificadas com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN.

Os compostos 1-2 foram identificados, respectivamente, como galatos de etila e de metila pela comparação dos dados de RMN com os descritos na literatura^{14,15}. A possibilidade de 1 ser artefato, devido à extração ter sido realizada com EtOH, foi descartada quando o material vegetal foi extraído com MeOH. Após a realização do processo de partição descrito na parte experimental, foi registrado um espectro de RMN de ¹H da fase AcOEt, o qual mostrou os sinais referentes ao grupo etoxílico, além daqueles referentes ao grupo metoxílico, indicativo da presença de ambos metabólitos.

O espectro de RMN de ¹H do composto 5 (DMSO-d₆) mostrou dois dubletos em δ_H 6,38 (*J* = 1,8 Hz, 1H) e 6,17 (*J* = 1,8 Hz, 1H), relativos a hidrogênios acoplados em relação *meta* que, associados ao singleto em δ_H 7,21 (2H), sugeriram o esqueleto de um flavonol. O espectro de RMN de ¹³C (DMSO-d₆) mostrou treze sinais, dos quais seis referentes aos carbonos do anel A, quatro referentes ao anel B e mais três atribuídos aos carbonos do sistema α,β-insaturado (anel C) de um flavonol. A comparação dos dados espectrais com os da miricetina¹⁶ comprovou a identidade estrutural de 5.

O espectro de RMN de ¹H (DMSO-d₆) de 2 mostrou o mesmo perfil daquele observado para 5, exceto pela presença dos dubletos

*e-mail: joaolago@iq.usp.br

em δ_{H} 5,18 ($J = 1,0$ Hz, 1H) e em δ_{H} 0,79 ($J = 5,3$ Hz, 3H) e do multiplete entre δ_{H} 3,1–4,0, relativos a uma unidade glicosídica. No espectro de RMN de ^{13}C (metanol- d_4) foram observados treze sinais relativos à aglicona além de seis referentes à ramnose, possibilitando, após comparação com dados da literatura¹⁶, a identificação de **2** como a miricetrina (miricetina-3- O - α -ramnosídeo). Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **3** mostraram-se muito similares aos de **2**, inclusive em relação aos sinais referentes à unidade ramnosídica. No entanto, foram observados sinais adicionais em δ_{H} 7,21 (d, $J = 1,7$ Hz, 2H), 7,20 (sl, 1H) e 6,86 (dd, $J = 8,2$ e 1,7 Hz, 1H), os quais são indicativos de um sistema 1,3,4-trissubstituído no anel B do flavonol. Após comparação dos dados de RMN descritos na literatura^{16,17} foi possível identificar a estrutura de **3** como a quercitrina (quercetina-3- O - α -ramnosídeo). As configurações *alfa* para as unidades ramnosídicas das substâncias **2** e **3** foram definidas com base no valor da constante de acoplamento ($J = 1,0$ Hz) dos dubletos relativos a H-1", o qual sugeriu um acoplamento di-equatorial entre H-1" e H-2"¹⁸.

Todos os compostos isolados da fase ativa (**1–5**) foram submetidos à avaliação do potencial anti-radicalar, aspergindo-se uma solução de 2,0 mg/mL de DPPH em metanol em uma placa de CCD (SiO_2). Após 5 min, foram observadas manchas amareladas sob fundo violeta, sugerindo que **1–5** são os responsáveis pelo potencial anti-radicalar observado nos extratos testados.

A atividade anti-radicalar de flavonóides, ésteres do ácido gálico e aldeído caféico extraídos das folhas de *Tachigalia paniculata* (Leguminosae) foi avaliada usando-se três ensaios distintos¹⁹. Os autores observaram que dois derivados glicosídicos da miricetina e o galato de metila se mostraram ativos frente ao cátion radical ABTS; além disso, os dois derivados glicosídicos da miricetina foram as substâncias mais ativas no teste da xantina oxidase. Em outro trabalho²⁰, os autores compararam as atividades do ácido gálico e de uma série de seus ésteres (galatos de metila, de propila, de laurila e de estearila) frente ao DPPH. Todas as substâncias foram mais ativas que o α -tocoferol, indicando que, neste ensaio, o tamanho da cadeia alquílica não interferiu com a atividade observada. Assim, visto que ésteres do ácido gálico e flavonóides derivados da miricetina e quercetina apresentam elevado potencial anti-radicalar^{14,19–22}, sugerimos que as substâncias isoladas no presente trabalho sejam as responsáveis pela atividade observada nos extratos avaliados.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos gerais

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados em espectrômetro Brüker DPX-300 (^1H : 300 MHz e ^{13}C : 75 MHz) utilizando DMSO- d_6 e metanol- d_4 como solventes e como referência interna o sinal residual do solvente. Nas separações cromatográficas em coluna aberta usou-se Sephadex LH-20 (Aldrich); nas análises com camada fina foi utilizado gel de sílica 60 PF₂₅₄ (Merck) (0,25 mm) seguido de revelação com luz UV (254 e 366 nm), além de solução metanólica 2,0 mg/mL de DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (Sigma-Aldrich).

Ensaio para detecção do potencial anti-radicalar

As amostras foram aplicadas em placas de CCD, eluídas com sistemas de solventes adequados e aspergidas com uma solução 2,0 mg/mL de DPPH em metanol. Após evaporação do solvente (cerca de 5 min), o potencial anti-radicalar foi verificado através do aparecimento de manchas amarelas sob fundo violeta, de acordo com o descrito na literatura²³.

Material vegetal

Folhas de *Schinus terebinthifolius* foram coletadas em Novembro de 2005 no Campus São Paulo da Universidade Presbiteriana Mackenzie (São Paulo–SP, Brasil). Uma exsicata (SP272591) encontra-se catalogada no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo – SP, Brasil.

Extração e isolamento dos constituintes químicos

Após secagem e moagem, 158 g das folhas de *S. terebinthifolius* foram submetidas à extração através de maceração com EtOH à temperatura ambiente. Após eliminação do solvente a vácuo obtiveram-se 40,0 g de um material viscoso, de coloração esverdeada. Este extrato foi dissolvido em *n*-BuOH- H_2O (1:1) e ambas as fases obtidas foram testadas para detecção de atividade anti-radicalar em experimento de CCD/DPPH. Verificou-se nesta análise que os compostos ativos estavam concentrados na fase *n*-BuOH. Após evaporação do solvente, acrescentou-se a esta fase solução de AcOEt: H_2O (1:1), sendo avaliado o potencial anti-radicalar das duas fases obtidas. A fase em AcOEt (9,8 g) ativa foi submetida à cromatografia de exclusão (Sephadex LH-20 com MeOH), resultando em 34 frações de 15 mL cada. Após análise por CCD, estas foram reunidas em 6 grupos (I–VI) e novamente cada grupo foi submetido ao ensaio para detecção do potencial anti-radicalar, onde se observou que a atividade estava concentrada nos grupos II–VI. As frações reunidas do grupo II (frações 9–11) forneceram o galato de etila (**1**, 243 mg); enquanto que o grupo III (frações 12–20, 563 mg) foi novamente fracionado em Sephadex LH-20 (metanol) para fornecer 34 frações (6 mL cada) que, após análise por CCD, foram reunidas em 4 grupos (III-1/III-4). Os grupos III-2 (frações 3–8), III-3 (frações 9–17) e III-4 (frações 24–32) forneceram, respectivamente, quantidade adicional de galato de etila (**1**, 236 mg), miricetrina (**2**, 172 mg) e quercitrina (**3**, 112 mg). As frações reunidas do grupo IV (frações 21–23, 638 mg) forneceram uma mistura constituída de galato de etila (**1**) e de galato de metila (**4**) na proporção 1:3, conforme análise por RMN de ^1H . O material das frações reunidas do grupo V (frações 24–27, 289 mg) mostrou-se constituído somente pela miricetina (**5**). O grupo VI (frações 28–34) forneceu galato de metila (**4**, 378 mg).

Adicionalmente, uma pequena quantidade das folhas secas e moídas (10 g) foi extraída com MeOH e submetida aos processos de partição, descritos anteriormente. Da fase AcOEt obtida registrou-se um espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) com o objetivo de descartar a formação de **1** como artefato.

Galato de etila (**1**): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} (mult; J em Hz; H): 6,92 (s; H-2/H-6), 4,18 (q; 7,2; H-8), 1,25 (t; 7,2; H-9). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 119,6 (C-1), 108,5 (C-2/C-6), 145,6 (C-3/C-5), 138,6 (C-4), 165,9 (C-7), 60,0 (C-8), 14,3 (C-9).

Miricetrina (**2**): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} (mult; J em Hz; H): 7,04 (s, H-2' e H-6'), 6,36 (d; 1,8; H-6), 6,18 (d; 1,8, H-8), 5,18 (d; 1,0; H-1"), 3,1 – 4,0 (m; H-2" – H-5"), 0,79 (d; 5,3; H-6"). RMN ^{13}C (75 MHz, metanol- d_4) δ_{C} : 158,3 (C-2), 134,5 (C-3), 177,9 (C-4), 162,9 (C-5), 99,9 (C-6), 165,4 (C-7), 94,3 (C-8), 157,5 (C-9), 105,0 (C-10), 122,5 (C-1'), 109,5 (C-2'), 146,4 (C-3'), 137,1 (C-4'), 146,4 (C-5'), 109,5 (C-6'), 102,0 (C-1"), 70,3 (C-2"), 70,4 (C-3"), 71,3 (C-4"), 69,6 (C-5"), 17,3 (C-6").

Quercitrina (**3**): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} (mult; J em Hz; H): 6,38 (d; 1,9; H-6), 6,19 (d; 1,9; H-8), 7,21 (d; 1,7; H-2'), 6,86 (dd; 8,2 e 1,7; H-5'), 7,20 (sl; H-6'), 5,23 (d; 1,0; H-1"), 3,1 – 3,9 (m; H-2" – H-5"), 0,79 (d; 5,2, H-6") RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 156,9 (C-2), 134,6 (C-3), 178,1 (C-4), 161,7 (C-5), 99,2 (C-6), 164,7 (C-7), 94,1 (C-8), 157,8 (C-9), 104,5 (C-10), 121,1 (C-1'), 115,9 (C-2'), 145,6 (C-3'), 148,9 (C-4'), 116,0 (C-5'), 121,6

(C-6'), 102,2 (C-1''), 70,5 (C-2''), 70,8 (C-3''), 71,6 (C-4''), 71,0 (C-5''), 17,7 (C-6'').

Galato de metila (4): RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H (mult; J em Hz; H): 6,92 (s; H-2/H-6), 3,73 (s; H-8). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ_C: 119,4 (C-1), 108,6 (C-2/C-6), 145,6 (C-3/C-5), 138,4 (C-4), 166,4 (C-7), 51,7 (C-8).

Miricetina (5): RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H (mult; J em Hz; H): 7,21 (s, H-2' e H-6'), 6,38 (d; 1,8; H-6), 6,17 (d; 1,8; H-8). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ_C: 147,1 (C-2), 136,1 (C-3), 176,1 (C-4), 161,0 (C-5), 98,5 (C-6), 164, 2 (C-7), 93,5 (C-8), 156,4 (C-9), 103,3 (C-10), 121,3 (C-1'), 107,7 (C-2'), 146,0 (C-3'), 136,1 (C-4'), 146,0 (C-5'), 107,7 (C-6').

AGRADECIMENTOS

À FAPESP e ao MackPesquisa pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- Pio Corrêa, M.; *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Ministério da Agricultura-IBDF, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, vol. 1.
- Lorenzi, H.; *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Ed. Plantarum: São Paulo, 1992, p. 8.
- Pozzo-Balbi, T.; Nobile, L.; Scapini, G.; Cini, M.; *Phytochemistry* **1978**, *17*, 2107.
- Terhune, S. J.; Hogg, J. W.; Lawrence, B. M.; *Phytochemistry* **1974**, *13*, 865.
- Dominguez, X. A.; Carmona, J. F.; Venegas, R. B.; *Phytochemistry* **1971**, *10*, 1687.
- Moneam, N. M. A.; Ghoneim, T.; *J. Chromatogr. A* **1986**, *361*, 391.
- Lloyd, H. A.; Jaouni, T. M.; Evans, S. L.; Morton, J. F.; *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1301.
- Campello, J. P.; Marsaioli, A. J.; *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2300.
- Campello, J. P.; Marsaioli, A. J.; *Phytochemistry* **1974**, *13*, 659.
- Jain, M. K.; Yu, B. Z.; Rogers, J. M.; Smith, A. E.; Boger, E. T. A.; Ostrander, R. L.; Rheingold, A. L.; *Phytochemistry* **1995**, *39*, 537.
- Lima, M. R. F.; Luna, J. D. S.; Santos, A. F.; Andrade, M. C. C.; Sant'Ana, A. E. G.; Genet, J. P.; Marquez, B.; Neuville, L.; Moreau, N.; *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *105*, 137.
- Schmourlo, G.; Mendonça-Filho, R. R.; Alviano, C. S.; Costa, S. S.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *96*, 563.
- Velázquez, E.; Tournier, H. A.; Buschiazzi, P. M.; Saavedra, G.; Schinella, G. R.; *Fitoterapia* **2003**, *74*, 91.
- The Merck Index*; 9th ed. Rahway, NJ, USA: Merck and Co. Inc., 1976.
- Ma, X.; Wu, L.; Ito, Y.; Tian, W.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1076*, 212.
- Agrawal, P. K.; Bansal, M. C.; Porter, L. J.; Foo, L. Y. Em *Carbon-13 NMR of Flavonoids - Studies in Organic Chemistry* 39; Agrawal, P. K., ed.; Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, 1989, vol. 39.
- Markham, K. R.; Ternai, B.; Stanley, R.; Geiger, H.; Mabry, T. J.; *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1389.
- Nasr, C.; Berrurier, M. H.; Guth, A. L.; Anton, R.; *Phytochemistry* **1986**, *25*, 770.
- Cioffi, G.; D'Auria, M.; Braca, A.; Mendez, J.; Castillo, A.; Morelli, I.; De Simone, F.; De Tommasi, N.; *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1526.
- Kikuzaki, H.; Hisamoto, M.; Hirose, K.; Akiyama, K.; Taniguchi, H.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2161.
- Luo, X. D.; Basile, M. J.; Kennelly, E. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1379.
- Aaby, K.; Hvattum, E.; Skrede, G.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4595.
- Cavin, A.; Potterat, O.; Wolfender, J. L.; Hostettmann, K.; Dyatmyko, W.; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1497.