

Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinaceae)

Bianco, E.M.; Santos, C.A.M*

Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia,
Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

Recebido para publicação em: 26/06/2003
Aceito para publicação em: 12/12/2003

RESUMO: Neste trabalho é relatado o isolamento de três substâncias das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpinaceae, incluindo dois constituintes isolados pela primeira vez nesta espécie, a vitexina e o hidrocarboneto hexatriacontano. As estruturas desses compostos foram estabelecidas através de estudos de RMN- ¹H 1D, 2D e EM.

Unitermos: *Bauhinia microstachya*, vitexina, galato de metila, hexatriacontano.

ABSTRACT: **Substances isolated from *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. Caesalpinaceae) leaves.** It is reported the isolation of three compounds from leaves of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpinaceae, including two new constituents in this species, vitexin and the hydrocarbon hexatriacontane. Their structures were established by extensive 1D and 2D ¹H NMR and MS spectral studies.

Key words: *Bauhinia microstachya*, vitexin, methyl gallate, hexatriacontane.

INTRODUÇÃO

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal estão as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família Caesalpinaceae, as quais podem ser encontradas, principalmente, nas áreas tropicais do planeta. Estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com essas plantas revelaram que os principais metabólitos secundários por elas produzidos são em geral flavonóides, triterpenóides e glicosídeos esteroidais. No Brasil, as plantas do gênero *Bauhinia* são conhecidas como pata-de-vaca, unha ou casco-de-boi (FORTUNATO, 1986). Folhas, caules e raízes de *B. forficata*, *B. variegata*, *B. splendens*, *B. manca* e *B. rufescens* são amplamente utilizados, em forma de chás e outras preparações, para o tratamento de várias enfermidades, principalmente, infecções, processos dolorosos e diabetes (VOLPATO et al., 1999; SILVA et al., 2002; PEPATO et al., 2002; GONZALEZ-MUJICA et al., 2003). Além das espécies citadas, muitas outras são usadas, indiscriminadamente, como medicinais, tais como *B. rufa*, *B. monandra*, *B.*

holophylla e *B. smiliciana*; entretanto, pouco se sabe a respeito dos seus constituintes químicos (SILVA; CECHINEL-FILHO, 2002).

Muitas espécies do gênero *Bauhinia* têm sido estudadas com relação à sua constituição química, e várias classes químicas e substâncias de interesse medicinal foram isoladas e relatadas nesses últimos anos, embora muito pouco se conheça a respeito do potencial farmacológico desses compostos. Foi demonstrado que os extratos EtOH/H₂O e AcOEt de *B. splendens* apresentaram pronunciados efeitos analgésicos, quando analisados no modelo de dor causada pelo ácido acético a 0,6%, em camundongos (WILLAIN-FILHO et al., 1997). Estudos realizados com folhas de *B. microstachya* (MEYRE-SILVA et al., 2001) demonstraram a presença de canferol-3-O-ramnosil, quercetina-3-O-ramnosil, miricetina-3-O-ramnosil e galato de metila. Nesse estudo foi, também, demonstrada uma relevante atividade analgésica para o extrato metanólico das folhas, tendo sido sugerido que os compostos fenólicos poderiam estar associados à essa analgesia, sendo necessário maiores estudos para comprovar tal atividade.

Neste trabalho é relatado o isolamento de três substâncias das folhas de *B. microstachya*: galato de metila, vitexina e hexatriacontano, sendo que as duas últimas foram isoladas pela primeira vez, dessa espécie vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (4,2kg) foram coletados em fevereiro de 2002 em Morretes-PR. A espécie foi identificada pelo Dr. Gert G. Hatschbach, e uma exsicata, foi depositada no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, sob o número de registro MBM 264.361.

Métodos gerais

Para as cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasas em gel de sílica F₂₅₄ (Merck®) e as cromatografias em coluna foram realizadas usando como fases estacionárias gel de sílica 60 70-230 mesh e 230-400 mesh (Merck® e Aldrich®) e Sephadex® LH20 (Pharmacia®). Os espectros de UV foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu®, modelo 1601; os espectros de ressonância nuclear magnética em espectrômetro DRX-400®, 400 MHz e ARX-200®, 200 MHz. A cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (CG-EM) foi realizada em cromatógrafo gasoso HP® 6890, utilizando coluna capilar de fenilmetilsiloxano HP5MS como fase estacionária, com injetor automático, gás de arraste Hélio, volume de injeção 0,2 ml e temperatura do injetor 250°C. Os solventes foram destilados e purificados antes do uso (ARMAREGO; PERRIN, 2000).

Obtenção dos extratos e frações

Folhas (1kg) foram secas (45°C, 48 h), moídas e extraídas com solventes de polaridade crescente (*n*-hexano, clorofórmio e etanol 90%), fornecendo os extratos EHF, ECF e EBEF, respectivamente. O extrato EBEF foi submetido a desclorofilação e deslipidificação por meio de agitação em água gelada (1:8), sendo denominado então de EEF. Este extrato hidrofílico foi submetido à partição com diclorometano e acetato de etila fornecendo as frações diclorometano (FDF), acetato de etila (FAEF) e aquosa (FAQF) (Figura 1).

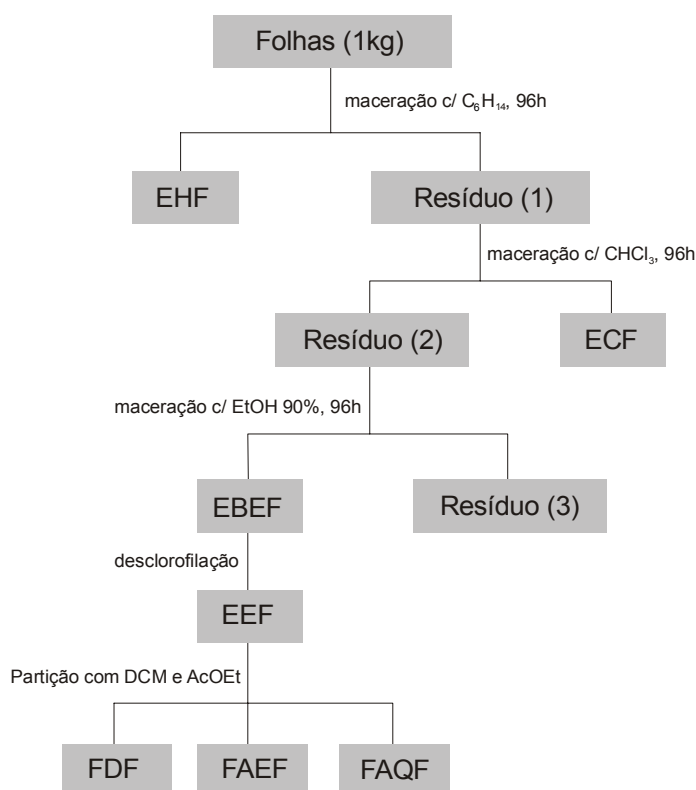


Figura 1. Obtenção dos extratos e frações a partir das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpiniaceae)

Isolamento da vitexina

Aproximadamente 26 g da fração FAEF foram suspensos em Me₂CO ocorrendo a precipitação de um sólido amarelado (40 mg) que foi separado por filtração. O filtrado foi submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica e eluída com solventes na forma de gradiente de polaridade crescente (C₆H₁₄, C₆H₁₄-CHCl₃ (1:1), CHCl₃, CHCl₃-AcOEt (1:1), AcOEt, AcOEt-MeOH (1:1) e MeOH). As frações eluídas com metanol foram reunidas, secas e dissolvidas em clorofórmio, de onde precipitou um sólido amarelo amorfo, que foi filtrado a vácuo e lavado sucessivas vezes com C₆H₁₄ e CHCl₃. O precipitado seco resultou em um sólido amarelo-claro (3 mg), que mostrou estar puro por CCD.

Isolamento do galato de etila

Parte da fração FAEF (5 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída com solventes na forma gradiente de polaridade crescente (C₆H₁₄, C₆H₁₄-CHCl₃ (1:1), CHCl₃, CHCl₃-MeOH (9,5:0,5), CHCl₃-MeOH (9:1), CHCl₃-MeOH (8:2), CHCl₃-MeOH (7:3) e MeOH). Dessa forma, 85 frações (10 ml), monitoradas por CCD, foram coletadas e as frações 13-45 (CHCl₃-MeOH 8:2) foram reunidas por semelhança, fornecendo um sólido alaranjado (2g). Parte desse (1g) foi solubilizado em metanol e cromatografado em CCD preparativa com acetato de etila, obtendo-se cinco bandas e, pela proximidade de duas delas, não foi possível sua total separação; sendo assim, essas bandas foram raspadas da placa, suspensas em metanol e o material obtido foi

cromatografado em coluna de Sephadex® LH20 com etanol, resultando no isolamento de um sólido branco-amarelado (1,6 mg), que mostrou estar puro por CCD.

Isolamento do hexatriacontano

Os extratos EHF e ECF, quando cromatografados por CCD, utilizando C_6H_{14} -AcOEt (1:1) como fase móvel e vanilina sulfúrica como solução reveladora, mostraram-se semelhantes quanto à composição química. Esses extratos EHF (9 g) e ECF (4 g) foram reunidos e cromatografados em coluna de gel de sílica, eluída com solventes na forma de gradiente de polaridade crescente. As frações 3-20 (15 ml cada) (éter de petróleo) foram reunidas por semelhança, secas, solubilizadas em C_6H_{14} e, através da adição de etanol, ocorreu precipitação de um sólido, que foi filtrado e lavado com porções de etanol e metanol, obtendo-se um sólido branco (32 mg), que mostrou estar puro por CCD.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação da vitexina

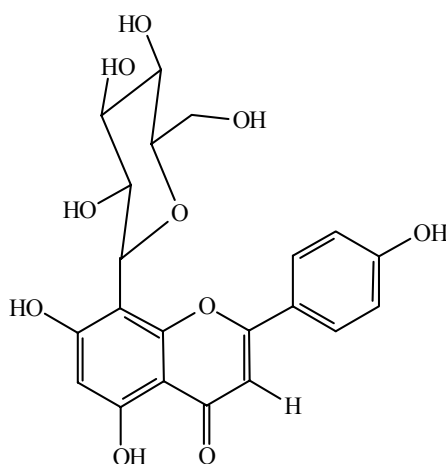
O composto apresentou-se na forma de sólido amarelo-claro e o espectro de UV mostrou bandas de absorção em λ_{max} (MeOH) 226, 270 e 332 nm e deslocamento batocrômico pela adição de NaOH 280, 329 e 394 nm. O espectro de infravermelho mostrou uma banda larga em ν_{max} 3350cm^{-1} , característico de grupos hidroxilas, absorção de carbonila conjugada e com ligação de hidrogênio intramolecular em 1665cm^{-1} e sinais de tamanho médio entre 1600 e 1500cm^{-1} , indicando também a presença de grupos aromáticos nesta molécula.

As informações que levaram à elucidação da estrutura foram obtidas dos experimentos de ressonância nuclear magnética de prótons, cujos espectros indicaram um padrão conhecido para 4',5,7-tri-hidróxiflavona (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). O espectro de RMN- ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto apresentou um singlete em δ 13,06 correspondente à hidroxila quelatogênica em C-5 e dois singletos em δ 10,74 e 10,25, atribuídos às hidroxilas em C-7 e C-4', respectivamente, como também sugerido pelos deslocamentos batocrômicos observados no espectro de UV, quando da adição de NaOH. O par de dubletes centrados em δ 8,07 (H-2' e H-6') e 6,94 (H-3' e H-5') com constante de acoplamento para prótons *orto* relacionados ($J = 8,98\text{ Hz}$) e integração para dois hidrogênios cada, estabelece o padrão de substituição de anel B *para*-dissubstituído, o que foi confirmado pelos acoplamentos observados no espectro de COSY. Ainda na região de aromáticos são observados dois singletos, um em δ 6,67 que é característico do H-3 de flavonas (MOREIRA et al., 2003) e outro em δ 6,16, que poderia ser atribuído ao hidrogênio H-6 ou H-8 do anel A. Sinais entre δ 5 e 3 indicam a presença de uma unidade açúcar na molécula, que poderia estar ligada em C-6 ou C-8.

Os prótons da porção açúcar foram identificados com o auxílio dos espectros de correlação homonuclear ^1H - ^1H (COSY) e heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMQC). Um dublete centrado em δ 4,73 com $J = 8,9\text{ Hz}$, típico para acoplamento *trans*-diaxial (WILLIAMS; FLEMING, 1997), foi atribuído ao próton do carbono anomérico H-1", estando o mesmo correlacionado com o sinal em 74,9 ppm atribuído ao C-1". Este sinal apresentou acoplamento com o multiplete em δ 3,88 ($J = 8,9\text{ Hz}$), assinalado para H-2", e este mostrou acoplamentos *trans*-diaxial com os prótons em C-1" e C-3" (δ 3,29, 1H, $J = 2,9\text{ Hz}$), como também um acoplamento à longa distância com H-4", representado pelo quinteto centrado em δ 3,57. Este sinal, devido à correlação com o multiplete em δ 3,81, possibilitou a identificação de H-5". Não foi evidenciado neste espectro, um sinal para H-6" metileno,

que poderia ser atribuído ao sinal em δ 3,39. Esses sinais apresentados para a porção glicosídica, aliados aos dados da literatura, sugerem a estrutura da glucose para a porção glicosídica.

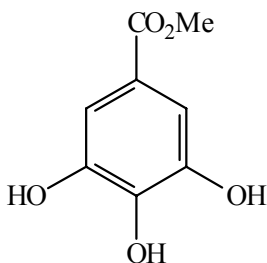
Restou, portanto, determinar se a posição da porção açúcar está ligada ao C-6 (isovitexina) ou ao C-8 (vitexina) para a identificação do composto. Levando em consideração os deslocamentos químicos do próton anomérico (δ 4,73) e o do sinal de ^{13}C -RMN em 105,4 ppm, não existe dúvida tratar-se de um C-glicosídeo. A determinação da posição da porção glicosídica foi definitivamente confirmada, em um espectro de HMBC, pelas correlações de longa distância (2J e 3J) entre o próton anomérico e os carbonos do anel A da estrutura flavonoídica apresentando, principalmente, correlação com o sinal em 157,8 ppm assinalado para C-9 (EL-MOUSALLAMY et al., 2000). Dessa forma, foi possível atribuir a estrutura da vitexina (**1**) a este composto, isolada, pela primeira vez, desta espécie vegetal.



(1) Estrutura da vitexina

Identificação do galato de metila

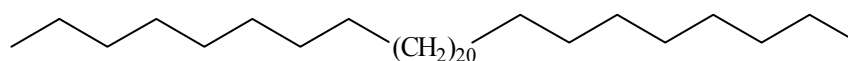
O segundo composto isolado apresentou espectro de RMN- ^1H (400MHz, $\text{DMSO-}d_6$) com apenas dois singletes em δ 3,79 e 6,98. O espectro de UV mostrou bandas em λ_{max} (MeOH) 273 e 302 nm, sugerindo a presença de um cromóforo aromático. O sinal em δ 3,79 pode ser atribuído para grupos $-\text{OCH}_3$ de ésteres metílicos ou metoxilas ligadas a anel aromático. Esse sinal, com integral para 3H, quando comparado com o singlete em δ 6,98 com integral de 2H, indica a presença de dois prótons simétricos em anel aromático, sugerindo a estrutura do composto galato de metila (**2**), já isolado desta espécie (MEYRE-SILVA et al., 2001).



(2) Estrutura do galato de metila

Identificação do hexatriacontano

O terceiro composto isolado, p.f. 64-65 °C, quando analisado por CG-EM, mostrou 100% de um único pico em CG, cujo espectro de massa apresentou íon molecular M^{+} a m/z 506, com fragmentação característica de hidrocarboneto linear, com perdas sucessivas de 14 u.m.a. (m/z 43, 57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197). O espectro de RMN- 1H (200MHz, $DMSO-d_6$) mostrou: um singlete largo e intenso em δ 1,25 representando uma larga cadeia de CH_2 e um triplete em δ 0,88 atribuído ao CH_3 terminal. Esses dados sugerem a estrutura do hidrocarboneto de cadeia longa de fórmula molecular $C_{36}H_{74}$: hexatriacontano (3).



(3) Estrutura do hexatriacontano

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gert Guenther Hatschbach, do Museu Botânico Municipal de Curitiba, pela identificação da planta e à Companhia Paranaense de Energia Elétrica (COPEL-PR) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. *Purification of laboratory chemicals*. 4th ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 2000. 529 p.
- EL-MOUSALLAMY, A. M. D.; HUSSEIN, S. A. M.; MERFORT, I.; NAWWAR, A. M. Unusual phenolic glycosides from *Cotoneaster orbicularis*. *Phytochemistry*, v.53, n. 6, p. 699-704, 2000.
- FORTUNATO, R. H. Revision del genero *Bauhinia* (Cercideae, Caesalpinioideae, Fabaceae) para la Argentina. *Darwiniana*, v. 27, n. 1-4, p. 527-557, 1986.
- GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; MÁRQUEZ, A. H.; CAPOTE-ZULUETA, J. Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. *Fitoterapia*, v. 74, n. 1-2, p. 84-90, 2003.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. *The systematic identification of flavonoids*. New York: Springer-Verlag, 1970. 354 p.
- MEYRE-SILVA, C.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; SANTOS, A. R. S.; SCHMELING, L. O.; GADOTTI, F. L.; CECHINEL-FILHO, V. Phytochemical and pharmacological analysis of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Leguminosae. *Z. Naturforsch*, v. 56c, p. 939-942, 2001.
- MOREIRA, F. P. M.; COUTINHO, W.; MONTANHER, A. B. P.; CARO, M. S. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Flavonoides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* - bioatividade sobre *Artemis salina*. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.
- PEPATO, M. T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 191-197, 2002.
- SILVA, F. R. M. B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M. G.; WILLRICH, M. A. V.; SOUZA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, n. 1-2, p. 33-37, 2002.

SILVA, K. L.; CECHINEL-FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Study of *Bauhinia forficata* L. extract on diabetes in pregnant rats. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.2, n.1, p.49-55, 1999.

WILLAIN-FILHO, A. E.; BREVIGLIERI, E.; CECHINEL-FILHO, V.; SANTOS, R. S. Antinociceptive effect of the hydroethanolic extract of *Bauhinia splendens* stems in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.49, p. 823-827, 1997.

WILLIAMS, D. H.; FLEMING, I. Spectroscopic methods in organic chemistry. 5th ed. London: McGraw-Hill, 1997. 329p.

***Autor para correspondência:**

Prof. Dr. Cid Aimbiré Moraes dos Santos
Laboratório de Farmácia
Departamento de Farmácia – UFPR
Rua Prefeito Lothário Meissner, 3400
80210-170 – Curitiba – PR
e-mail: cid@ufpr.br