

Cromatografia Contracorrente no Isolamento de Bisflavonóide de *Garcinia xanthochymus*

Countercurrent Chromatography for the Isolation of Biflavanoids from *Garcinia xanthochymus*

*Santos, C. C.;
Oliveira, R. R.;
Figueiredo, M. R.

Laboratório de Química de Produtos Naturais PN-3, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Far-Manguinhos, FIOCRUZ, Rua Sizenando Nabuco 100, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Resumo

O gênero *Garcinia* é pertencente à família Clusiaceae e contém cerca de 200 espécies distribuídas nas regiões tropicais. Dados etnofarmacológicos indicam para algumas espécies desse gênero as atividades: adstringentes, diuréticas e antiinflamatórias e a fitoquímica mostra que o gênero *Garcinia* contém bisflavonóides e xantonas como seus constituintes majoritários. Em contribuição ao estudo químico da espécie *Garcinia xanthochymus*, o extrato metanólico das folhas de *G. xanthochymus* foi cromatografado em aparelho de contracorrente utilizando o sistema de solventes Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água (2:8:5:5) visando o isolamento de metabólitos especiais. O material cristalino e de coloração amarela obtido através da elucidação estrutural por técnicas espectrométricas de RMN ^1H e ^{13}C foi identificado como morelloflavona.

Abstract

The *Garcinia* genus belongs to the Clusiaceae family and contains 200 species distributed in the tropical regions. Ethnopharmacology indicates for this genus the activities: astringent, diuretic and anti-inflammatory and the phytochemical profile shows that the *Garcinia* genus contains biflavanoids and xanthenes as the major constituents. In order to contribute with the chemistry of the species, the methanol extract of leaves was chromatographed in a countercurrent apparatus using the solvent system: n-hexane: ethyl acetate: methanol: water (2:8:5:5) aiming the isolation of metabolites special. The isolated material as yellow crystals was identified as morelloflavona by the ^1H and ^{13}C NMR spectrometric analysis.

Introdução

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso

*Correspondência:
E-mail: cristianecardoso@far.fiocruz.br

Unitermos:
Cromatografia Contracorrente;
Garcinia xanthochymus;
Morelloflavona

Key words:
Countercurrent Chromatography;
Garcinia xanthochymus;
Morelloflavone



patrimônio genético tem na atualidade um valor econômico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde se encontra sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003). Sendo assim, quaisquer que sejam o projeto de identificação, a exploração e a avaliação da biodiversidade, devem ser considerados os métodos científicos e procedimentos biotecnológicos especiais, particularmente aqueles relacionados com fitoquímica, fitofarmacologia, taxonomia, botânica, fisiologia de plantas e etnobotânica (GARCIA, 1995).

A família Clusiaceae, também conhecida como Guttiferae, pertence à superordem Theiflorae, ordem Theales de acordo com o sistema de classificação de Dahlgren (1980). Essa família compreende 49 gêneros de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, possuindo mais de 1000 espécies distribuídas em 6 subfamílias, todas com representantes no Brasil (JOLY, 1993).

O gênero *Garcinia*, pertencente a essa família, compreende mais de 200 espécies de hábitos arbóreo ou arbustivo distribuídos nas regiões tropicais (MBWAMBO et al., 2006). O perfil químico de *Garcinia* é marcado pelas presenças de terpenóides, xantonas, flavonóides, bisflavonóides, benzofenonas, entre outros. As xantonas e os flavonóides são considerados as principais classes de substâncias associadas ao potencial terapêutico do gênero *Garcinia* (KUETE et al., 2007). A espécie *Garcinia xanthochymus* Hook. f. ex T. Anders., também chamada de gamboge, é uma árvore de 10 a 12 metros de altura, com folhas lineares-oblongas a oblongo-lanceoladas e frutos com polpa amarela; também chamados de falso mangustão. Entre os inúmeros frutos tropicais, o mangustão é considerado o principal fruto do trópico asiático devido ao sabor e aroma agradáveis de sua polpa, além do uso na medicina para o tratamento de diarreia e disenteria (NASCI-MENTO et al., 2001).

A cromatografia contracorrente (CCC) é uma técnica cromatográfica, de partição líquido-líquido, que consiste na utilização de duas fases líquidas imiscí-

veis sem a necessidade de matriz de sustentação. O princípio da separação envolve a partição de um soluto entre as fases do sistema e a proporção de soluto que passa para cada uma das fases é função do seu coeficiente de partição (LEITÃO, 2005). O CCC apresenta inúmeras vantagens quando comparado com o método de separação tradicional sólido-líquido: não existe adsorção, baixo consumo de solvente, baixo risco de degradação da amostra, curto tempo de análise, dentre outras (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

Com o objetivo de contribuir com a química da espécie e também visando possíveis avaliações farmacológicas, o extrato metanólico das folhas de *G. xanthochymus* foi cromatografado em aparelho de contracorrente para isolamento de metabólitos especiais.

Material e Métodos

Equipamentos: O cromatógrafo de contracorrente da marca Pharma-Tech Research Corp. modelo CCC-1000, foi equipado com coluna de 325mL adaptada em três bobinas, bomba de solventes LDC Analytical de modelo ConstaMetric 3500; válvula manual de injeção com loop de 10mL; e coletor de frações CF1 da Spectrum Chromatography. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono (RMN ¹³C) além de DEPT, COSY HMBC e HMQC, foram adquiridos em espectrômetro Brücker Digital NMR model 400 em frequências de 400.15 MHz para o hidrogênio e 100.61 MHz para o carbono. Os espectros de massas foram obtidos por injeção direta da solução de 10 ppm em equipamento da Micromass ZQ com capilar de 4kV.

Solventes e Reagentes: Os solventes utilizados foram hexano, acetato de etila e metanol grau analítico. Para a cromatografia em camada fina foram utilizadas cromatoplas de gel de sílica 60 F254 da marca Merck, reveladas com Godin (vanilina 1% em etanol e ácido perclórico 3% em água, na proporção 1:1, ácido sulfúrico 10% em etanol) (GODIN, 1954) e NP/PEG (difenilboriloxietilamina/polietileno-glicol) (WAGNER et al., 1984).



Coleta do Material Botânico e Preparo dos Extratos: As folhas de *G. xanthochymus* foram coletadas e depositadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ sob o registro RB 390170. As folhas (904 g) foram previamente secas em estufa a 40 °C, moídas e extraídas por maceração dinâmica com solventes de diferentes polaridades, que após evaporação, forneceram os seguintes extratos: hexânico (11,71 g), diclorometânico (18,29 g) e metanólico (55,55 g).

Escolha do sistema de solvente para a separação em CCC: Para o procedimento cromatográfico o sistema de solvente utilizado foi hexano: acetato de etila: metanol: água (2:8:5:5; v/v/v/v). A mistura dos solventes foi agitada em funil de separação e após o equilíbrio hidrostático, as fases foram separadas. Uma pequena quantidade do extrato metanólico de folhas de *G. xanthochymus* (GXFM) foi dissolvido em 1 mL de cada uma das fases do sistema. Cada fase foi aplicada em CCD separadamente e eluída com a fase superior desse sistema solvente. A revelação da cromatoplaça com NP/PEG e Godin mostrou uma boa separação dos componentes do extrato metanólico.

Procedimento de separação em CCC: Após a degaseificação do sistema de solvente em ultra-som, o aparelho CCC foi primeiramente preenchido com a fase estacionária (fase orgânica). Em seguida, a rotação (900 rpm) foi iniciada e a fase móvel (fase aquosa) do sistema selecionado foi bombeada com fluxo constante de 1.0 mL/min. Foi observada uma retenção de fase estacionária de 60,31%. Quando as fases entraram em equilíbrio, 1 g de extrato metanólico foi dissolvido em 10 mL de ambas as fases do sistema (1:1; v/v) e injetado através de uma válvula de injeção, no CCC. Frações de 5 mL foram coletadas com auxílio de um coletor de frações. As 216 frações resultantes da separação foram reunidas de acordo com o seu comportamento cromatográfico em CCD. As frações 55-60 reunidas (43 mg), após completa volatilização do solvente, apresentaram cristais amarelos amorfos, identificados por técnicas espectrométricas de RMN ¹H e ¹³C (COSY, DEPT, HMQC, HMBC).

Resultados e Discussão

A escolha do sistema de solventes para a cromatografia contracorrente é o ponto chave para o sucesso da separação de substâncias de origem vegetal. O sistema foi escolhido com base na pesquisa desenvolvida por Kapadia e colaboradores (1994) que, empregando Hexano: AcOEt: MeOH: H₂O (2:8:5:5), conseguiram isolar bisflavonóides de sementes de *Garcinia kola*. O processo cromatográfico, embora com baixa retenção de fase estacionária (60,31%), permitiu a obtenção de cristais amorfos de coloração amarelada nas frações GXFM 55-60 e GXFM 127-139 sendo que, esta última segue em análise espectral.

De acordo com a aquisição por eletrospray negativo, a fração GXFM 55-60 apresentou o íon majoritário 555,4 m/z, que seria referente ao íon molecular [M-1]. O íon 429,4 m/z aparece como um possível fragmento da molécula em questão que pode ser formado através das perdas do anel E e de uma hidroxila. Na análise por eletrospray positivo essa fragmentação não foi observada, possivelmente pela necessidade do anel E para estabilizar a carga no íon molecular [M+1]. Contudo, houve a formação de um aduto da molécula neutra com o íon sódio pela presença do íon m/z 579,4.

A análise por RMN ¹H mostrou um sinal em 5,76 ppm (d, J = 12Hz) referente ao átomo de hidrogênio na posição 2, e a constante de acoplamento sugere que esse átomo de hidrogênio apresenta a configuração trans referente ao átomo de hidrogênio na posição 3 em 4,89 ppm (d, J = 12Hz). Os sinais em 7,11 ppm (d, J = 8,0 Hz) e em 6,41 ppm (d, J = 8,0 Hz) com integração de dois átomos de hidrogênio para cada sinal, confirmam o padrão de substituição 4' da porção flavanona do bisflavonóide e são referentes aos pares de átomos de hidrogênio nas posições 2', 6' e 3', 5'. Os dupletos em 5,97 ppm e em 5,98 ppm são referentes aos átomos de hidrogênio nas posições 6 e 8 respectivamente. O duplete mal resolvido em 7,35 ppm, referente ao átomo de hidrogênio 2'', mostra uma correlação no espectro COSY como o duplo duplete em 7,29 ppm (dd, J = 8,0 Hz), referente ao átomo de hidrogênio 6'''. O sinal em 6,92 ppm (d, J = 8,0 Hz; H5''') mostra uma correlação no espec-





tro COSY com o sinal em 7,29 ppm, confirmando a substituição 3''' e 4''' do anel E. Os singletos em 6,41 ppm e em 6,25 ppm são referentes aos átomos de hidrogênio na posição 3'' e 6''. A análise do espectro HMBC mostrou uma correlação entre o átomo de hidrogênio na posição 3 (4,89 ppm) da flavanona com o átomo de carbono na posição 8'' (103,3 ppm) da flavona, confirmando assim o ponto de ligação entre os átomos de carbono 3 e 8'' do bisflavonóide. Dados de RMN ¹³C para essa substância (Tabela 1) foram comparados com os dados espectrais descrito na literatura, confirmando a identificação do bisflavonóide conhecido como morelloflavone (sinônimo fukugentin) cuja fórmula molecular é C₃₀H₂₀O₁₁ (Figura 1). A morelloflavone foi isolada das folhas de *Garcinia morella* em 1967, sendo posteriormente isolada de outras espécies de *Garcinia* (LI et al., 2002; MBWAMBO et al., 2006).

Figura 1 – Estrutura do bisflavonóide isolado a partir de *Garcinia xanthochymus*

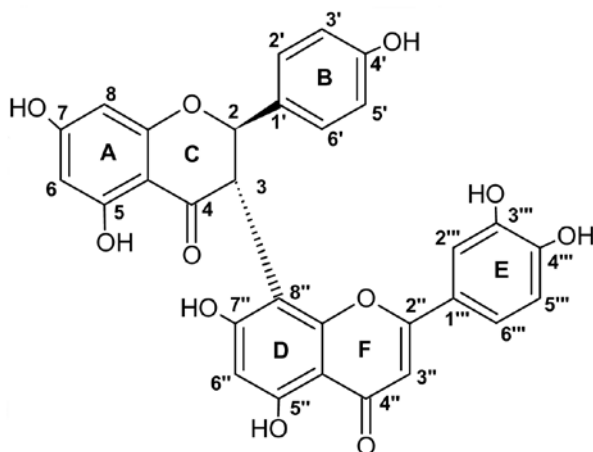


Tabela 1 – Dados de RMN ¹H e ¹³C de Morelloflavona em MeOD

Posição	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	Posição	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
2	5,76	82.8	2''	-	164.9
3	4,89	50.9	3''	6,41	103.5
4	-	198.0	4''	-	184.0
5	-	158.7	5''	-	164.5
6	5,97	96.5	6''	6,25	99.9
7	-	162.4	7''	-	168.3
8	5,98	97.5	8''	-	103.3
9	-	162.7	9''	-	168.8
10	-	101.8	10''	-	103.0
1'	-	130.6	1'''	-	120.6
2'	7,11	129.4	2'''	7,35	114.3
3'	6,41	115.7	3'''	-	147.0
4'	-	157.5	4'''	-	151.1
5'	6,41	115.5	5'''	6,92	117.0
6'	7,11	129.9	6'''	7,29	120,7



Os resultados reforçam a representatividade da espécie na produção de bisflavonóides e validam a cromatografia contracorrente com uma técnica poderosa na separação e purificação de substâncias do extrato metanólico de *G. xanthochymus*. O baixo consumo de solvente e a velocidade da análise são um dos principais atrativos dessa técnica em comparação com as demais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Central Analítica de Farmanguinhos e à Prof^a Dr^a Maria Auxiliadora Coelho Kaplan.

Referências

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*, v.55, n.3, 2003.

DAHLGREN, R. M. T. A Revised System of classification of Angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.80, n.2, p.91, 1980.

GARCIA, E.S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. *Cadernos de Saúde Pública*, v.11, n.3, p.491-494, 1995.

GODIN, P.A. Newspray reagent for paper chromatography of polyols and cetoses. *Nature*, v.174, p.134, 1954.

JOLY, A.B. Botânica – Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo: Editora Nacional, 1993.

KAPADIA, G.J.; OGUNTIMEIN, B.; SHUKLA, Y.N. High-speed counter-current chromatographic separation of biflavonoids from *Garcinia Kola* seeds. *Journal of Chromatography A*, v.673, p.142-146, 1994.

KUETE, V.; KOMGUEM, J.; BENG, V.P.; MELI, A. L.; TANGMOUO, J. G.; ETOA, F. X.; LONTSI, D. Antimicrobial components of the methanolic extract from the stem bark of *Garcinia smeathmannii* Oliver

(Clusiaceae). *South African Journal of Botany*, 2007, <doi:10.1016/j.sajb.2007.01.004>.

LEITÃO, G.G. Uso da cromatografia contracorrente na obtenção de padrões de origem vegetal. *Revista Fitos*, v.1, n.2, p.48-52, 2005.

LI, X.; JOSHI, A.S.; TAN, B.; ELSOHLY, H.N.; WALKER, L.A.; ZJAWIONY, J.K.; FERREIRA, D. Absolute configuration, conformation, and chiral properties of flavonone-(3-8'')-flavone biflavonoids from *Rheedia acuminata*. *Tetrahedron*, v.58, p.8709-8717, 2002.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography A*, v.1112, p.181-194, 2006.

MBWAMBO, Z.H.; KAPINGU, M.C.; MOSHI, M.J.; MACHUMI, F.; APERS, S.; COS, P.; FERREIRA, D.; MARAIS, J.P.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Antiparasitic Activity of Some Xanthones and Biflavonoids from the Root Bark of *Garcinia livingstonei*. *Journal of Natural Products*, v.69, p.369-372, 2006.

NASCIMENTO, W. M. O.; TOMÉ, A. T.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H. Comportamento fisiológico de sementes de mangostão (*Garcinia mangostana* L.) submetidas a diferentes períodos de fermentação da polpa. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.23, n.3, p.735-737, 2001.

WAGNER, W.H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer-Verlag, 1984.

