BIFLAVONOIDES DAS SEMENTES DE *Garcinia cochincinensis*.

Vinicius Monteiro Schaffka (PIBIC/FA), Cassia Gonçalves Magalhães, Barbara Celânea Fiorini, Domingos Sávio Nunes (Orientador), e-mail: senunsd@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química.

Ciências Exatas e da Terra, Química, Química Orgânica, Química dos Produtos Naturais.

Palavras-chave: Morelloflavona, Garcianina, Garpiranona, isolamento e identificação.

Resumo

Garcinia é um gênero botânico (Clusiaceae) que inclui árvores frutíferas, várias com usos medicinais e frutos comestíveis, que ocorrem em todo o mundo. *Garcinia cochinchinensis* é uma árvore vietnamita introduzida no Brasil e não foram encontrados estudos químicos sobre a composição das sementes. Sementes de diversas *Garcinia* produzem como metabólitos principais, compostos poliprenilados dotados de atividade citotóxica (bifenilas, benzofenonas e xantonas) e biflavonoides com fortes atividades farmacológicas e alto poder antioxidante. O presente trabalho cumpriu os objetivos de isolar e identificar os biflavonoides das sementes de *Garcinica cochinchinensis*. Dois biflavonoides foram isolados e identificados com uso de técnicas espectrométricas de análise, ultravioleta (UV); infravermelho (IV); ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM): morelloflavona e garcinianina. Uma terceira substância foi isolada (garpiranona), mesmo não sendo um composto fenólico, cujos dados analíticos sugerem a estrutura de uma piran-2-ona muito rara ou até mesmo inédita na literatura. O biflavonoide morelloflavona foi obtido em quantidade relativamente alta (cerca de 1,5 grama) e está sendo fornecido para preparação e estudo de bioatividade de nano-partículas de prata.

Introdução

O gênero *Garcinia*, da família Clusiaceae, é constituído por árvores de porte médio a grande, as quais são encontradas em todas as partes do mundo. Seus frutos são geralmente comestíveis e aproveitados como alimento, como o fruto da *Garcinia brasiliensis*, da Amazônia (bacupari) que é extensamente consumido e utilizado na preparação de sorvetes, tendo também suas folhas empregadas na medicina tradicional, para o tratamento de inflamações e alívio de dores. O estudo químico da polpa dos frutos desse vegetal levou à obtenção de benzofenonas, flavonoides e xantonas poliisopreniladas que apresentaram diversas atividades significativas, como por exemplo, citotóxica, antimicrobiana, neuroprotetora e antioxidante [1, 2].

Diversas espécies desse gênero já foram estudas como a *Garcinia kola* árvore encontrada na Nigéria e outras regiões do oeste da África e que possui atividade antimicrobiana. O extrato das sementes de G. kola é utilizado em infecções do trato respiratório, como anti-hepatotóxica, dentre outras aplicações [3].

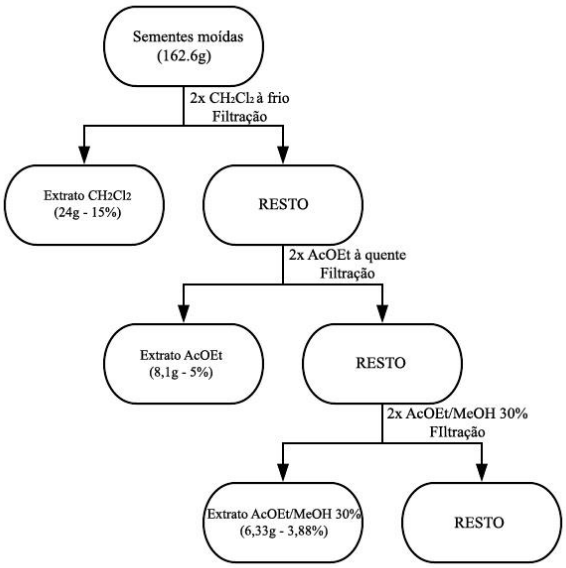
As sementes de diversas espécies de *Garcinia* já foram estudadas, isolando-se importantes compostos da classe dos biflavonoides, dotados de fortes capacidades antioxidantes e diversas atividades biológicas relevantes [3, 4].

Garcinia cochinchinensis é originária do Vietnã, introduzida no Brasil onde não é tão utilizada por conta do desconhecimento de suas propriedades, que são diversas e os seus frutos podem até mesmo ser consumidos. Sua casca e pericarpo, já foram estudados e contém diversos compostos com atividades antioxidantes e antibacteriana, dentre outras [5, 6].

Material e Métodos

Os frutos maduros de *Garcinia cochinchinensis* foram colhidos em Maringá, nas dependências da Universidade Estadual de Maringá. As sementes foram separadas da polpa, lavadas e secadas a 45ºC por 72 horas. As sobre-cascas secas (19,0g, 10,5%) foram separadas e as amêndoas (162,6g, 89.5%) foram moídas e submetidas a um processo de extração com uma sequência de solventes de polaridades crescentes. As extrações foram feitas em série com três solventes orgânicos em duplicata, com 250 mL do solvente ou mistura de solventes, sob aquecimento (60°C) durante 30 minutos. Os seguintes extratos foram obtidos na sequência e evaporados a vácuo: CH_2Cl_2 (24g, 14,8%), AcOEt (8,1g, 5,0%), AcOEt/MeOH 30% (6,3g, 3,9%) (Figura 1, abaixo).

Figura 1: Esquema do procedimento de extração.



Fonte: Elaborado pelo o autor.

Os extratos foram analisados sobre placas de sílica GF-254 usando $CHCl_3$/MeOH 15% como eluente (Figura 2). As placas foram visualizadas sob luz UV de 254/365 nm, e em seguida reveladas com $FeCl_3$ em MeOH a 5%, ou com H_2SO_4/MeOH 1/1 e aquecimento.

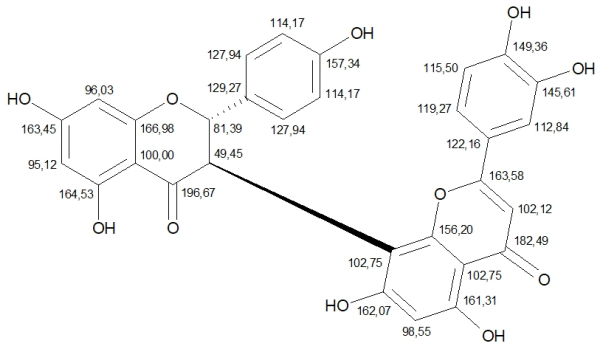
Partindo do extrato AcOEt/MeOH (30%) realizou-se uma coluna cromatográfica de sílica gel com 100g de sílica (0,04-0,063mm) em CH_2Cl_2 utilizando-se de uma coluna de vidro 50x3cm. A amostra (4,9g) foi dissolvida em uma pequena quantidade de CH_2Cl_2/MeOH adicionando-se em seguida 5g de sílica, evaporando-se o solvente a vácuo. Em seguida a amostra agregada à sílica, pulverizada e seca, foi aplicada no topo da coluna de sílica (27 x 3cm) empacotada com CH_2Cl_2. Utilizou-se CH_2Cl_2/MeOH em concentrações crescentes de MeOH como eluente, coletou-se 104 frações de 125mL cada, de acordo com análises realizadas durante a execução da coluna. As frações coletadas foram evaporadas e foram realizadas análises de cromatografia em camada delgada sobre placas de sílica (G/UV 254 0,20mm)

usando como eluente Hexano/MeOH 15%. Três amostras foram submetidas a análises espectrométricas para identificação de suas estruturas. As amostras 54 e 58 foram analisadas por IV, através da adsorção da amostra em pastilha de KBr, e também de UV com a adição de reagentes específicos para análise de flavonoides. Após isso, ambas as amostras foram encaminhadas para análises de RMN ^{1}H e ^{13}C e cromatografia liquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). A amostra 19-22 foi analisada por IV, UV, RMN ^{1}H e ^{13}C e por cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas e espectrometria de massas (CG-EM-DIC). Análises essas que nos possibilitaram identificar as três substâncias das respectivas frações.

Resultados e Discussão

As análises de RMN ^{1}H e ^{13}C, e principalmente os dados de ^{13}C permitiram o estabelecimento da estrutura química da morelloflavona para a substância **58**. Não foram obtidas boas análises de RMN para o composto **54**, que foi obtido em pequena quantidade, dificultando um pouco a sua identificação inicialmente. As análises realizadas por LC-MS das amostras **54**, **58** e de mistura de ambos, concluindo-se que os dois biflavonoides têm a mesma constituição $C_{30}H_{20}O_{11}$ e peso molecular 556 g/mol. Dentre os biflavonoides conhecidos na literatura, apenas dois tem essa mesma fórmula molecular, PM=556g/mol, a morelloflavona 58 e a **garcinianina**. Os espectros de UV obtidos para os compostos 54 e 58 permitiram confirmar a posição de todas as hidroxilas nas duas estruturas da morelloflavona e também assegurar a estrutura da garcinianina para o composto 54.

Figura 2 – Deslocamentos de 13C RMN para a morellloflavona 58 isolada.



Fonte: Elaborada pelo o autor.

A análise das frações iniciais da coluna mostrou a presença de uma substância majoritária entre as frações 11 e 25, a aparência dessas frações é de substâncias gordurosas incolores, de baixo ponto de fusão. A fração 19-22 foi utilizada para análises espectrométricas iniciais de IV, por RMN ^{1}H e ^{13}C, e por CG-EM-DIC. O estudo da fragmentação de massas permitiu propor a estrutura a piran-2-ona mostrada na para essa substância, à qual chamamos de Garpiranona. No entanto a amostra apresentava uma certa quantidade de impurezas então a fração 19-22 foi por fim reunida às demais frações similares da primeira coluna, e a mistura foi fracionada em coluna de sílica pequena obtendo-se uma amostra purificada de 0,320g. Foram repetidas todas as análises de RMN ^{1}H e ^{13}C 1D e 2D, confirmando-se a estrutura proposta para a **Garpiranona.**

Conclusão/ões

Foram cumpridos os objetivos e o cronograma proposto, isolando-se e identificando-se os dois biflavonoides presentes na semente de *Garcinia cochinchinensis* e disponibilizando os compostos isolados para a realização de testes biológicos

comparados com suas nano-partículas de prata. Uma substância não-fenólica nova foi também isolada e estudada nesse trabalho através da análise de seus espectros de massas, infra-vermelho, 1H e 13C RMN inclusive de duas dimensões (COSY, HMBC, HSQC), chegando-se à proposição da sua estrutura química como **3-[(7E)-undeca-7-eno-1-il]tetraidro-2H-piran-2-ona** (Garpiranona), dados que certamente serão publicados proximamente em revista científica especializada.

Agradecimentos
Agradecimentos à CAPES pelo financiamento de infraestrutura na UEPG, à Fundação Araucária pela Bolsa IC, à organização da PROPESP-UEPG, aos Técnicos do LAB-MU (UEPG) e aos Professores Pesquisadores que colaboraram para realização desse trabalho, tanto orientando quanto coorientando, ou realizando análises sofisticadas e ensinando sua interpretação [UEPG: orientador Dr. Domingos Sávio Nunes, colaboradores: Dra. Cássia Gonçalves Magalhães, Dra. Barbara Celânia Fionini, Dr. Flávio Luis Beltrame; UTFPR (Santa Helena – PR): Dra. Jociani Ascari; FURB (Blumenau): Dra. Dilamara Riva Scharf].

Referências

1. GONTIJO, V. S. et al. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the Garcinia brasiliensis epicarp**. Food Chem**., v.132, p. 1230-1235, 2012.
2. ARWA, P. A.; ZERAIK, M. L.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. Redox-active biflavonoids from Garcinia brasiliensis as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. **J. Ethnopharmacol.**, v. 174, p. 410–418, 2015.
3. ONUNKWO, G. C. et al. Some Physical Properties of Tabletted Seed of Garcinia kola (HECKEL). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 6, p.649-653, 2004.
4. FERREIRA, R. O. et al. Ocorrência de biflavonoides em Clusiaceas: Aspectos Químicos e Farmacológicos. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2271-2277, 2012.
5. NGUYEN, H. D.; TRINH, B. T.; NGUYEN, L. D. Guttiferones Q-S, cytotoxic polyisoprenylated benzophenones from the pericarp of Garcinia cochinchinensis. **Phytochemistry Letters,** v. 4, n. 2, p.129-133, jun. 2011
6. TRINH, Binh T.d. et al. Polyisoprenylated benzophenone and xanthone constituents of the bark of Garcinia cochinchinensis. **Phytochemistry Letters,** v. 6, n. 2, p.224-227, maio 2013.