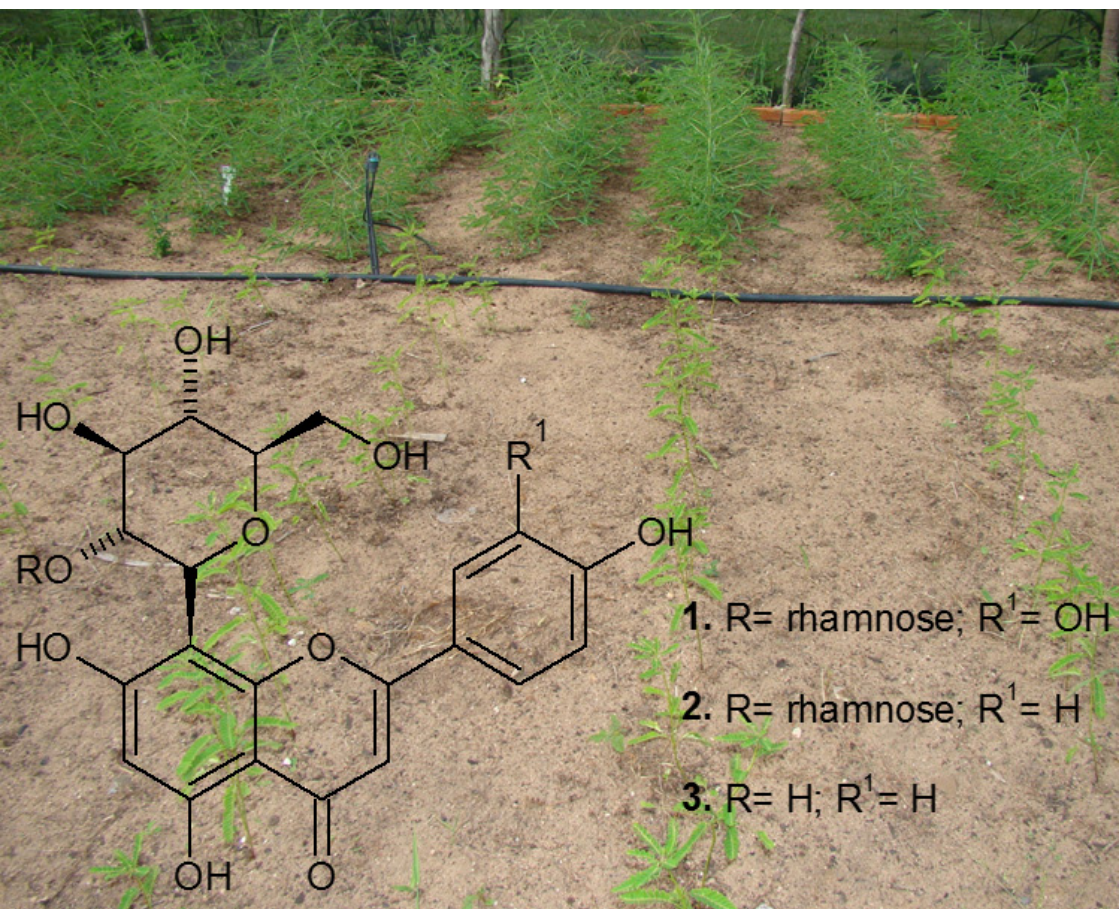


**Obtenção e Caracterização Química  
de Flavonoides Bioativos de  
*Phyllanthus niruri***



ISSN 1679-6543

Setembro, 2017

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroindústria Tropical  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 146***

## **Obtenção e Caracterização Química de Flavonoides Bioativos de *Phyllanthus niruri***

*Thalissa Tavares Cavalcante  
Kirley Marques Canuto  
Tigressa Helena Sousa Rodrigues  
Lorena Mara Alexandre e Silva  
Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro  
Guilherme Julião Zocolo  
Edy Sousa de Brito  
João Alencar de Sousa*

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Fortaleza, CE  
2017

**Unidade responsável pelo conteúdo e edição:**

Embrapa Agroindústria Tropical  
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
www.embrapa.br/agroindustria-tropical  
www.embrapa.br/fale-conosco

**Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical**

Presidente: *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*  
Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*  
Secretária-administrativa: *Eveline de Castro Menezes*  
Membros: *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra, Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner Valentim Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia Costa Cid, Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial: *Ana Elisa Galvão Sidrim*  
Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*  
Normalização: *Rita de Cassia Costa Cid*  
Foto da capa: *Rita de Cássia Alves Pereira*  
Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

**1ª edição**

On-line (2017)

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Agroindústria Tropical

---

Obtenção e caracterização química de flavonoides bioativos de *Phyllanthus niruri* / Thalissa Tavares Cavalcante... [et al.] – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2017.

19 p. : il. ; 14,8 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 146).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Quebra-pedra. 2. Flavonoides glicosilados. 3. Marcadores químicos. 4. RMN. 5. *Phyllanthus niruri*. I. Cavalcante, Thalissa Tavares. II. Canuto, Kirley Marques. III. Rodrigues, Tigressa Helena Sousa. IV. Silva, Lorena Mara Alexandre e. V. Ribeiro, Paulo Riceli Vasconcelos. VI. Brito, Edy Sousa de. VII. Sousa, João Alencar de. VIII. Série.

CDD 615.321

---

# Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>7</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>8</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>10</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>17</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>17</b>
<b>Referências .....</b>	<b>18</b>

# Obtenção e Caracterização Química de Flavonoides Bioativos de *Phyllanthus niruri*

---

**Thalissa Tavares Cavalcante<sup>1</sup>**

**Kirley Marques Canuto<sup>2</sup>**

**Tigressa Helena Sousa Rodrigues<sup>3</sup>**

**Lorena Mara Alexandre e Silva<sup>4</sup>**

**Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro<sup>5</sup>**

**Guilherme Julião Zocolo<sup>6</sup>**

**Edy Sousa de Brito<sup>7</sup>**

**João Alencar de Sousa<sup>8</sup>**

## Resumo

*Phyllanthus niruri* (Phyllanthaceae) é uma erva daninha encontrada em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, ela ocorre predominantemente no Sul, onde é conhecida popularmente como “quebra-pedra”, devido ao seu uso tradicional no tratamento de cálculos renais. Em vários estudos, extratos e constituintes químicos de *P. niruri* demonstraram atividades hepatoprotetora, anti-inflamatória, anticâncer, antiviral, analgésica e diurética, sendo os seus efeitos farmacológicos em geral atribuídos aos taninos hidrolisáveis e

---

<sup>1</sup> Química pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, thalissatc@hotmail.com

<sup>2</sup> Farmacêutico, doutor em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, kirley.canuto@embrapa.br

<sup>3</sup> Engenheira química, doutora em Engenharia Química, técnica da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, tigressa.rodrigues@embrapa.br

<sup>4</sup> Química, doutora em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, lorena.mara@embrapa.br

<sup>5</sup> Químico, doutor em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, paulo.riceli@embrapa.br

<sup>6</sup> Químico, doutor em Química Analítica, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, guilherme.zocolo@embrapa.br

<sup>7</sup> Químico, doutor em Ciência de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, edy.brito@embrapa.br

<sup>8</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, joao.alencar@embrapa.br

lignanais. Entretanto, a escassez de padrões analíticos para o controle de qualidade da matéria-prima e de seus derivados pode afetar significativamente a eficácia terapêutica dessa planta. Por isso, o objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar constituintes químicos bioativos presentes no extrato aquoso das folhas de *P. niruri*, visando a seu uso futuro como marcadores químicos. Dessa forma, partições líquido-líquido (hexano, acetato de etila e n-butanol) do extrato aquoso de *P. niruri*, seguidas de separações em gel de dextrana e cromatografia líquida de alta eficiência, levaram ao isolamento de três sólidos amarelos, cujos rendimentos foram de (1) 0,17%, (2) 0,22% e (3) 0,01% (m/m extrato seco). Análises de ressonância magnética nuclear (RMN) e de espectrometria de massas revelaram as estruturas das substâncias isoladas como sendo os flavonoides glicosilados orientina-2"-*O*-ramnosídeo (1); vitexina-2"-*O*-ramnosídeo (2) e vitexina (3).

Palavras-chaves: quebra-pedra, flavonoides glicosilados, marcadores químicos, RMN, *Phyllanthus niruri*.

# Bioactive Flavonoids of *Phyllanthus niruri* Obtaining and Chemical Characterization

## Abstract

*Phyllanthus niruri* (Phyllanthaceae) is a weed found in tropical and subtropical regions. In Brazil, it occurs predominantly in the south, where it is popularly known as stonebreaker, due to its traditional use in the treatment of kidney stones. In several studies, extracts and chemical constituents of *P. niruri* have demonstrated hepatoprotective, anti-inflammatory, anticancer, antiviral, analgesic and diuretic activities, which are generally attributed to hydrolysable tannins and lignans. However, the scarcity of analytical standards for quality control of the raw material and its derivatives may significantly affect the therapeutic efficacy of this plant. Therefore, the aim of this study was to isolate and identify bioactive phytochemicals from the aqueous extract of *P. niruri* leaves, in order to use them as chemical markers in the future. Thus, liquid-liquid partitions of the aqueous extract (hexane, ethyl acetate etila and *n*-butanol), followed by dextran gel separations and high-performance liquid chromatography, led to the isolation of three yellow solids whose yields were (1) 0.17%, (2), 0.22% e (3) 0.01% (m/m dry extract). Nuclear magnetic resonance (NMR) and high resolution mass spectrometry (HR-MS) analysis revealed their structures as being the glycosylated flavonoids orientin-2'-*O*-rhamnoside (1), vitexin-2'-*O*-rhamnoside (2) and vitexin (3).

**Keywords:** stonebreaker, glycosylated flavonoids, chemical marker, NMR, HR-MS, *Phyllanthus niruri*.

## Introdução

*Phyllanthus niruri* Linn (Phyllanthaceae) é uma erva daninha encontrada em regiões tropicais e subtropicais. No gênero *Phyllanthus*, o qual é composto por mais de 700 espécies, *P. niruri* é uma das três espécies mais utilizadas para fins medicinais e provavelmente a mais dispersa no mundo (MAO et al., 2016). No Brasil, ela ocorre predominantemente no Sul, onde é conhecida popularmente como quebra-pedra, devido ao seu uso tradicional no tratamento de cálculos renais (BAGALKOTKAR, 2006).

Além de integrar a relação de 71 plantas medicinais de interesse do SUS (RENISUS), *P. niruri* é largamente empregada nas medicinas tradicionais chinesa e indiana (ayurveda) para tratar inflamações, febre, malária e gonorreia, etc. Em vários estudos, extratos de *P. niruri* demonstraram atividades hepatoprotetora, anti-inflamatória, anticâncer, antiviral, analgésica, diurética e gastroprotetora (BAGALKOTKAR et al., 2006; MAO et al., 2016; KLEIN-JÚNIOR et al., 2017).

Já foram relatados mais de 80 compostos de diferentes classes químicas presentes na planta, tais como alcaloides (ex.: nirurina, securinina), terpenoides (ex.: friedelina), saponinas, taninos hidrolisáveis (ex.: corilagina, geraniina), flavonoides (ex.: niruriflavona, rutina) e lignanas (ex.: filantina, hinokinina, nirantina); porém, as atividades farmacológicas são geralmente atribuídas principalmente aos compostos fenólicos e lignanas (MAO et al., 2016). Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), o ácido gálico é considerado o marcador químico dessa espécie. A filantina possui atividade hepatoprotetora, antitumoral (PATEL et al., 2011) e imunossupressora (ILANGKOVAN et al., 2016). Hinokinina está sendo apontada como um composto bioativo emergente em razão de suas várias ações biológicas, especialmente antitripanossoma (MARCOTULIO et al., 2014). O tanino corilagina exibe atividades gastroprotetora e anti-hiperalgésica (KLEIN-JÚNIOR et al., 2017; MOREIRA et al., 2013);, enquanto a geraniina apresenta ações antioxidante, antimicrobiano, citoprotetora, imunomoduladora, analgésica e efeito terapêutico na hipertensão e doenças cardiovasculares (CHENG et al., 2016).



Contudo, *P. niruri*, tal como a maioria das drogas vegetais comerciais, carece de padronização quanto à presença de princípios ativos, comprometendo a sua eficácia terapêutica. Além disso, como frequentemente padrões analíticos não estão disponíveis comercialmente ou são pouco acessíveis para realizar o controle de qualidade da matéria-prima e derivados, é necessário isolar e purificar seus componentes (SAHOO et al., 2010).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar constituintes químicos bioativos presentes no extrato aquoso das folhas de *P. niruri*, visando seu uso futuro como marcadores químicos em análises de controle de qualidade e de autenticidade botânica.

## Material e Métodos

### Preparação do extrato

A planta *P. niruri* foi coletada no campo experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, em Paraipaba, CE. As folhas foram separadas do restante da planta, secas a 40 °C e trituradas. Quatro alíquotas equitativas da amostra (massa total = 85,8 g) foram extraídas em um equipamento de extração com líquido pressurizado (Dionex ASE™ 350), munido de células de aço inoxidável de 66 mL. A extração foi realizada com água ultrapura a 80° C (pressão 1500-1700 psi) em três ciclos de 5 min no modo estático. As soluções aquosas foram liofilizadas, rendendo um sólido marrom viscoso denominado ExtPN (17,1 g).

### Isolamento dos compostos 1, 2 e 3

O extrato ExtPN (17,1 g) foi dissolvido em água (500 mL) e particionado sucessivamente com 250 mL de hexano, acetato de etila e álcool butílico, e o processo foi repetido mais duas vezes para cada solvente. A fase aquosa foi descartada, enquanto as fases orgânicas foram tratadas com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtradas e concentradas a vácuo a 50 °C. Ao final desse processo, foram obtidos três sólidos escuros denominados: fração hexânica (9,7 mg), fração AcOEt (597,4 mg) e fração butanólica (3,99 g). Uma alíquota da

fração butanólica (2,0 g) foi cromatografada em gel de Sephadex LH-20 (60 g), utilizando-se metanol como fase móvel. Oitenta alíquotas de 150 mL foram coletadas, rotaevaporadas a 40 °C e reunidas em cinco frações, após análises por cromatografia de camada delgada (CCD): F1 (13,5 mg), F2 (102,6 mg), F3 (207,4 mg), F4 (112,7 mg) e F5 (33,1 mg). Posteriormente, a fração F2 (102,6 mg) foi analisada em um cromatógrafo a líquido Waters 2555/2489, constituído de bomba quaternária e detector de ultravioleta (UV). A separação cromatográfica foi efetuada em uma coluna C18 SunFire- Waters (100 x 19 mm, 5 µm), a uma vazão de 17 mL/min, injetando-se sucessivas alíquotas de 500 µL. O gradiente de eluição foi composto de uma mistura de acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) e água, variando-se a proporção do solvente orgânico de 20% para 25% em 5 minutos. Os solventes empregados apresentavam grau CLAE (CH<sub>3</sub>CN-Tedia e água ultrapura produzida em aparelho Milli-Q Adventure A10- Millipore) e foram adequadamente filtrados por meio de membranas de nylon 0,45 µm (Simplepure, Membrane Solutions). As amostras foram dissolvidas em água/CH<sub>3</sub>CN (8:2) e filtradas por meio de filtros de PTFE 0,45 µm (Chromafil). Foram coletados três picos a 254 nm, nos seguintes tempos de retenção: 2,3 min, 2,90 min e 3,70 min. Após liofilizadas, as frações geraram três sólidos amarelos (1-3), com massas de 14,2 mg, 19,3 mg e 0,9 mg, respectivamente, que tiveram suas estruturas químicas elucidadas por meio de métodos espectrométricos.

## Caracterização química

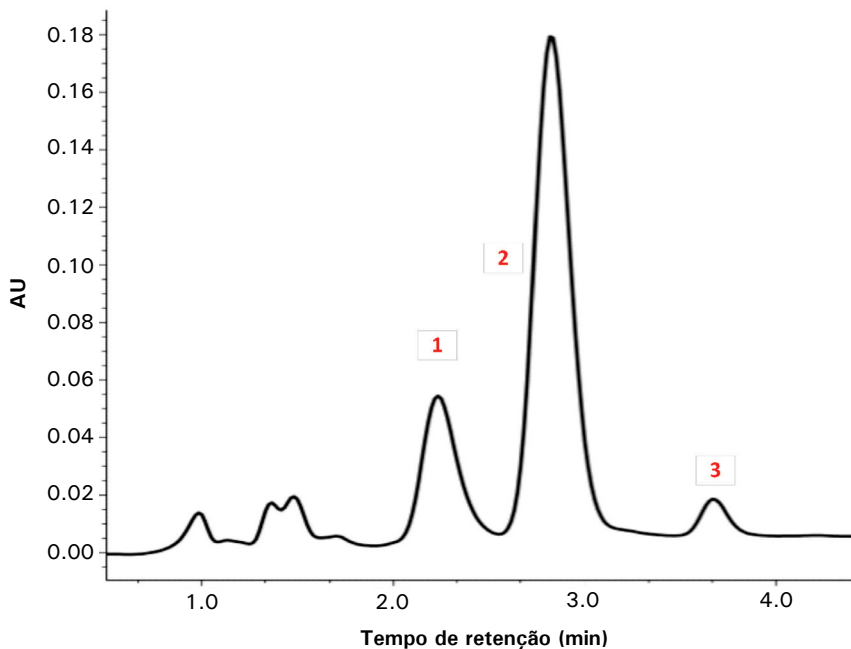
As análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), uni e bidimensionais, foram obtidas em um espectrômetro Agilent DD2 (14,1 Tesla), equipado com uma sonda de detecção dual de 5 mm, operando nas frequências do <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C a 599,94 MHz e 150,87 MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em 0,6 mL de metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD, Cambridge Isotope Laboratories), inseridas em tubos de vidro de 5 mm e analisadas. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelo sinal de hidrogênio das moléculas residuais não deuteradas do metanol (δ<sub>H</sub> 3,31) e pelo pico central de carbono (δ<sub>C</sub> 49,15). As análises foram realizadas à temperatura

ambiente. Nos experimentos unidimensionais de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , foram estabelecidos os seguintes valores para os parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 16 e 251 ppm, tempo de aquisição de 1,7 s e 0,865 s, larguras de pulso de  $45^\circ$  de 3,80  $\mu\text{s}$  (60 dB) e 4,20  $\mu\text{s}$  (56 dB), número de transientes de 16 e 16K, e tempo de relaxação de 1 s. Os experimentos unidimensionais foram adquiridos com 32.768 pontos e processados com 65.356 pontos. Os espectros bidimensionais de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear foram adquiridos com gradiente de campo, empregando um número de transientes de 16 e 32, respectivamente. No COSY, foram utilizados 897 x 128 pontos para a matriz de dados de aquisição e 4.096 x 4.096 pontos para o processamento, enquanto, para os experimentos HSQC e HMBC, foram utilizados 1.142 x 256 pontos na aquisição e 4.096 x 2.048 pontos no processamento.

Os espectros de massas de alta resolução (EM-AR) foram registrados em um sistema UPLC-ESI-Q-TOF (Acquity-Xevo, Waters), equipado com uma coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 mm x 2,1 cm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) mantida a 40 °C. As fases móveis foram compostas de água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), com gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B; 15,1-17 min (100%) de B; 17,1-19,1 min (2%) de B, fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção da amostra de 5  $\mu\text{L}$ . A amostra foi dissolvida em acetonitrila (Milli-Q, MILLIPORE) e filtrada em filtro de PTFE- 0,22  $\mu\text{m}$  (Simplepure, Membrane Solutions). A ionização por *electrospray* ocorreu na programação MSE centroide, sob rampa de tensão de 20 V a 40 V e fragmentação para a faixa de massa de 100-1000 Da.

## Resultados e Discussão

Partições líquido-líquido do extrato aquoso das folhas de *P. niruri*, seguidas de cromatografias em gel de dextrana e CLAE da fração butanólica, levaram ao isolamento de sólidos amarelos (1-3), correspondendo a um rendimento de 0,17%, 0,22% e 0,01% no extrato aquoso e 0,03%, 0,04% e 0,002% no material seco (Figura 1 e Tabela 1).



**Figura 1.** Cromatograma de CLAE preparativo da fração F2: orientina-2''-O-ramnosídeo (1), vitexina-2''-O-ramnosídeo (2) e vitexina (3).

Os compostos 1-3 tiveram suas estruturas químicas elucidadas por meio de técnicas espectrométricas, tal como discutido abaixo.

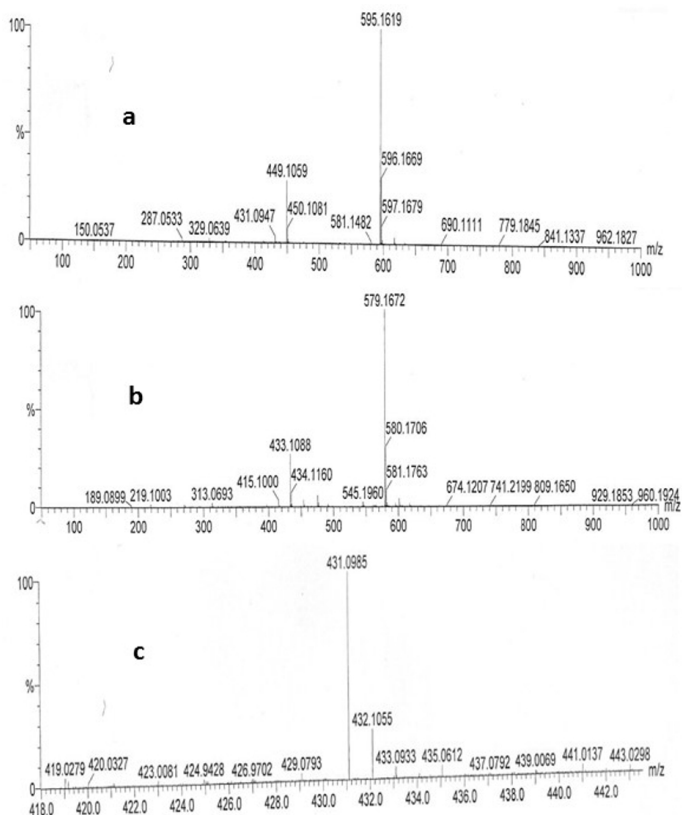
**Tabela 1.** Dados cromatográficos e de espectrometria de massas (Figura 2) dos três compostos isolados.

Composto	Tr (min)	$\lambda$ (nm)	$m/z$ observada
1	2,3	254	595,1619 [M + H] <sup>+</sup>
2	2,9	254	579,1672 [M + H] <sup>+</sup>
3	3,7	254	431,0985 [M - H] <sup>-</sup>

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **1** (Figura 3) exibiu sinais em  $\delta$  7,57 (1H, d, H-2'), 7,53 (1H, dd,  $J=8,4$  Hz, H-6') e 6,93 (1H, d,  $J=8,4$  Hz, H-5') típicos de sistema de spin ABX; dois singletos em  $\delta$  6,55 e 6,29 (1H, s, H-3 e H-6), correspondentes a hidrogênios aromáticos, e um singletto largo em  $\delta$  12,8 (1H, s, OH-5), atribuído à hidroxila quelada com carbonila. Além disso, o espectro exibiu um conjunto de sinais entre 5,09-2,43, característicos de hidrogênios glicosídicos e um dupletto em  $\delta$  0,64 (3H, d, H-6''), referente a uma metila. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou 27 linhas espectrais, das quais uma foi atribuída à carbonila de cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $\delta$  184,3, C-4), seis foram associadas a carbonos aromáticos oxigenados ( $\delta$  166,9, C-2; 164,4, C-7; 162,8, C-5; 158,0, C-9; 151,1, C-4' e 147,2, C-3'), oito foram relacionadas a carbonos  $\text{sp}^2$ , caracterizando a existência de um esqueleto flavônico. Dezesesseis sinais entre  $\delta$  102,6-18,6 foram identificados como pertencentes a duas unidades de hexoses, sendo uma delas compatível com ramnose devido à presença de metila ( $\delta$  18,1; C-6''), e a outra foi atribuída à glicose. O espectro de massas de alta resolução forneceu a fórmula molecular  $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_{15}$  a partir do pico de  $m/z$  595,1619 (calculado  $m/z$  595,1657  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , erro = 6,4 ppm), confirmando a proposta de um flavonoide diglicosilado (Figura 2).

O espectro de RMN- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC editado do composto **1** revelou as correlações dos carbonos hidrogenados e permitiu diferenciar os sinais de CH e  $\text{CH}_3$  de  $\text{CH}_2$ . Nesse caso, somente a correlação observada entre  $\delta_{\text{H}}$  3,96 e 3,84 (H-6') e  $\delta$  63,2 (C-6') foi referente a carbono metilênico. Os acoplamentos observados no espectro HSQC e COSY foram essenciais para definir o conjunto de sinais pertencentes a cada unidade de açúcar, entre eles o acoplamento dos hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  0,64 (H-6'') com o hidrogênio do anel piranosídico em  $\delta_{\text{H}}$  2,43 (H-5''), que ratificou o resíduo de ramnose. O espectro de RMN- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC permitiu a caracterização do esqueleto flavônico por meio das seguintes correlações: singletto do hidrogênio olefínico em  $\delta_{\text{H}}$  6,55 (H-3) com a carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada em  $\delta$  184,3 (C-4) e o carbono aromático em 123,7 (C-1'); o sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  7,57 e 7,53 (H-2' e 6') com o carbono olefínico  $\beta$  à carbonila em  $\delta$  166,9 (C-2); singletto em  $\delta_{\text{H}}$  6,28 (H-6) com os carbonos aromáticos do anel A

em  $\delta$  164,4 (C-7), 162,8 (C-5), 105,8 (C-8). A ligação osídica do tipo (1 $\rightarrow$ 2) entre ramnose e glicose foi evidenciada pelas correlações dos sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  4,25 (H-2') e 5,09 (H-1'') com os sinais de carbono em  $\delta$  102,6 (C-1'') e  $\delta$  78,2 (C-2'). A determinação da ligação C-glicosídica do tipo (1 $\rightarrow$ 8) entre a aglicona e a unidade açúcar foi caracterizada pelo acoplamento do hidrogênio glicosídico em  $\delta_H$  5,01 (H-1'') com os sinais de carbono em 164,4 (C-7), 158,0 (C-9) e 105,8 (C-1'').



**Figura 2.** Espectros de massas de alta resolução das substâncias isoladas do extrato aquoso das folhas de *P. niruri*: a) orientina-2''-O-ramnosídeo (1), b) vitexina-2''-O-ramnosídeo (2) e c) vitexina (3). Os compostos 1 e 2 foram detectados no modo de ionização positivo, enquanto o composto 3 foi detectado no modo negativo.

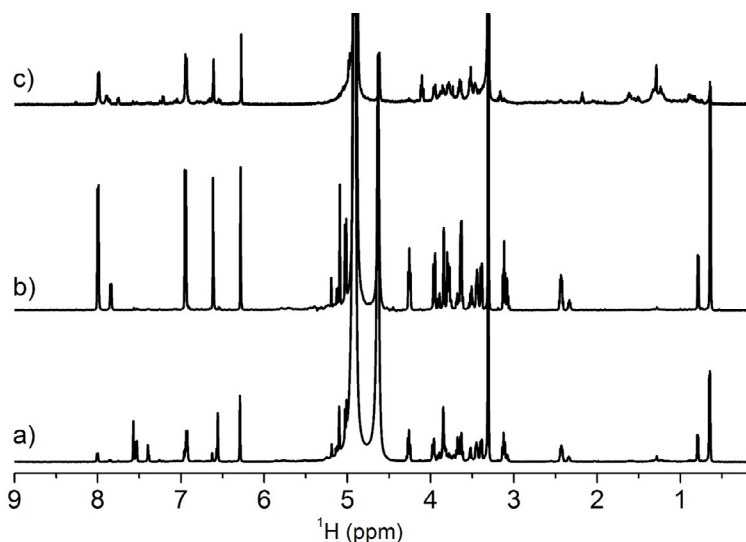
Dessa forma, o composto **1** teve sua estrutura elucidada como sendo orientina-2''-*O*-ramnosídeo. Por fim, comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  com os da literatura (Tabela 2) (RAYYAN et al., 2005) confirmou a estrutura química do composto **1** (Figura 4). Sinais "dobrados" nos espectros unidimensionais revelaram existência de rotâmeros originados pela restrição da rotação em torno da ligação C-heterosídica.

**Tabela 2.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos compostos **1**, **2** e **3** dispostos segundo as correlações obtidas por meio dos espectros HSQC e HMBC.

# C	$\delta\text{ C}$ (ppm) 1 MeOD	$\delta\text{ H}$ (ppm)* 1	$\delta\text{ C}$ (ppm) 2 MeOD	$\delta\text{ H}$ (ppm)* 2	$\delta\text{ C}$ (ppm) 3 MeOD	$\delta\text{ H}$ (ppm)* 3
2	166,9		166,9		165,5	
3	103,8	6,55 (1H, s)	103,7	6,61 (1H, s)	101,8	6,60 (1H, s)
4	184,3		184,3		184,3	
5	162,8		162,9		161,5	
6	99,9	6,29 (1H, s)	99,9	6,28 (1H, s)	98,4	6,27 (1H, s)
7	164,4		164,4		163,5	
8	106,1		105,8		104,0	
9	158,0		158,0		156,5	
10	105,8		106,0		104,0	
1'	124,1		123,7		122,0	
2'	115,1	7,57 (1H, d)	130,2	8,00 (2H, d, 8,4)	128,8	7,98 (2H, d, 9,0)
3'	147,2		117,1	6,94 (2H, d, 8,4)	115,7	6,93 (2H, d, 9,0)
4'	151,1		162,8		161,5	
5'	116,9	6,93 (1H, d, 8,4)	117,1	6,94 (2H, d, 8,4)	115,7	6,93 (2H, d, 9,0)
6'	121,1	7,53 (1H, dd, 8,4)	130,2	8,00 (2H, d, 8,4)	128,8	7,98 (2H, d, 9,0)
5-OH				12,9 (1H, s)		
$\beta$ -glic						
1''	73,8	5,01	73,8	5,01	74,0	4,98
2''	78,2	4,25	78,2	4,25	71,2	4,10
3''	81,7	3,60	81,7	3,63	78,0	3,54
4''	72,5	3,67	72,5	3,64	70,5	3,60
5''	83,0	3,44	82,9	3,44	81,5	3,47
6''	63,2	3,96; 3,84	63,1	3,95; 3,78	61,8	3,96; 3,76
$\alpha$ -ramn						
1'''	102,6	5,09	102,6	5,09		
2'''	72,3	3,84	72,3	3,84		
3'''	72,1	3,39	72,0	3,37		
4'''	73,6	3,11	73,6	3,11		
5'''	70,1	2,43	70,1	2,43		
6'''	18,1	0,64	18,1	0,63		

\*Os dados entre parênteses são referentes à integração, multiplicidade e à constante de acoplamento  $J_{\text{H,H}}$  em Hz.

Tendo em vista que os espectros de RMN dos compostos **2** e **3** (Figura 3) foram semelhantes com os do composto **1**, apresentando vários sinais na região de aromáticos, ( $\delta_H$  7,98-6,55 e  $\delta_C$  166,9-98,4) e osídicos ( $\delta_H$  5,09-3,11 e  $\delta_C$  102,6-63,1) bem como de carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $\delta_C$  184,3, C-4), deduziu-se que esses compostos também eram flavonoides glicosilados. Contudo, os compostos **2** e **3** apresentaram pares de dupletos em torno de  $\delta$  8,00 e 6,94 (2H, d,  $J=8,4$  Hz, H-2',6' e H-3',5'), que são típicos de sistema *para*-dissubstituído, levando-nos a sugerir que a aglicona fosse uma apigenina, em vez da luteolina como encontrada no composto **1**.

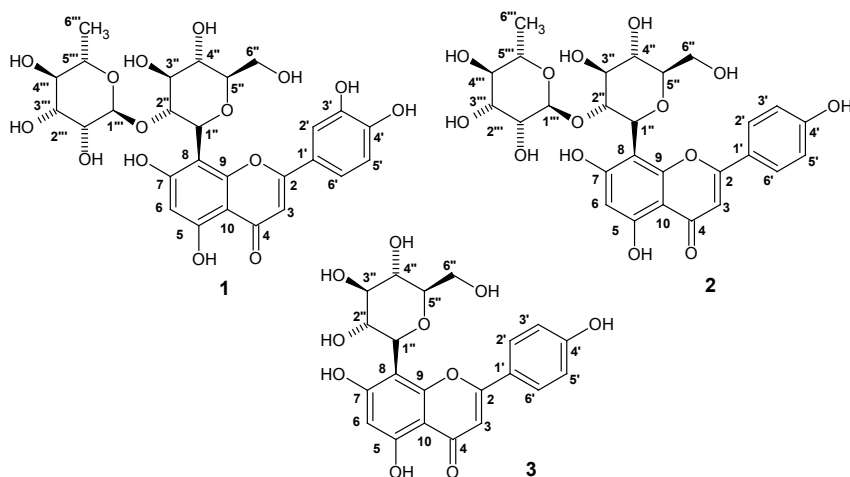


**Figura 3.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) das substâncias isoladas do extrato aquoso das folhas de *P. niruri*: a) orientina-2''-*O*-ramnosídeo (**1**), b) vitexina-2''-*O*-ramnosídeo (**2**) e c) vitexina (**3**).

O espectro de massas de alta resolução do composto **2** exibiu um pico de  $m/z$  579,1672 (calculado  $m/z$  579,1708  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , erro = 6,2 ppm), compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$ , corroborando a proposta de um flavonoide diglicosilado constituído de apigenina e dois resíduos de açúcar semelhantes aos identificados no composto **1**. Além disso, os



espectros de RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC evidenciaram a ligação osídica do tipo (1 $\rightarrow$ 2) entre ramnose e glicose por meio das correlações dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,25 (H-2') e 5,09 (H-1'') com os sinais em  $\delta$  102,6 (C-1'') e  $\delta$  78,2 (C-2'), enquanto a ligação C-glicosídica do tipo (1 $\rightarrow$ 8) entre a aglicona e a unidade açúcar foi caracterizada pelo acoplamento do hidrogênio glicosídico em  $\delta_{\text{H}}$  5,01 (H-1'') com os sinais de carbono em 164,4 (C-7), 158,0 (C-9) e 105,8 (C-1''). Portanto, o composto **2** foi caracterizado inequivocamente como sendo vitexina-2''-*O*-ramnosídeo (Figura 4).



**Figura 4.** Estruturas químicas numeradas dos flavonoides: orientina-2''-*O*-ramnosídeo (**1**), vitexina-2''-*O*-ramnosídeo (**2**) e vitexina (**3**).

No tocante ao composto **3**, seu espectro de massas apresentou um pico de  $m/z$  431,0985 (calculado  $m/z$  431,0983 [M-H] $^-$ , erro = 4,6 ppm), consistente com a fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$ . Em razão da ausência dos sinais referentes à ramnose no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , o composto foi proposto como sendo a vitexina, também denominada apigenina-8-*C*-glicosídeo (Figura 4). Correlações observadas nos espectros de RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC e HMBC (Tabela 2) e comparação com dados da literatura corroboraram de forma inequívoca a estrutura do composto **3** (RAYYAN et al., 2005).

Em um estudo de caracterização química com as quatro espécies de *Phyllanthus* (*P. niruri*, *P. amarus*, *P. tenellus* e *P. stipulatus*) de uso medicinal mais difundido no Brasil, vitexina-2"-O-ramnosídeo e orientina-2"-O-ramnosídeo, além de orientina, foram propostos como marcadores químicos para *P. niruri* (SPRENGER; CASS, 2013).

A vitexina (apigenina-8-C-glicosídeo) tem recebido recentemente uma maior atenção devido à sua vasta gama de efeitos farmacológicos tais como antioxidante, anticâncer, anti-inflamatório, antinociceptivo, anti-hipertensivo, anti-isquêmico, antidepressivo, antiespasmódico, antiviral, anticonvulsivante, ansiolítico e efeitos neuroprotetores contra doença de Alzheimer. Essa C-glicosilflavona é encontrada em várias plantas (trigo, maracujá, bambu, etc.), porém a principal fonte dessa substância são espécies de *Crataegus* (HE et al., 2016)

Vitexina-2"-O-ramnosídeo apresenta atividade antioxidante e antiapoptótica (WEI et al., 2014). Além disso, derivados da vitexina têm sido utilizados como marcadores químicos para discriminar espécies de *Passiflora* (COSTA et al., 2013) e *Crataegus* (PRINZA et al., 2007).

## Conclusão

O fracionamento cromatográfico do extrato aquoso das folhas de *P. niruri* resultou no isolamento de três flavonoides glicosilados: orientina-2"-O-ramnosídeo; vitexina-2"-O-ramnosídeo e vitexina, com rendimentos, respectivamente, de 0,17%, 0,22% e 0,01% no extrato seco. Dada a importância biológica desses compostos, eles podem ser empregados como marcadores químicos no controle de qualidade e autenticidade botânica para essa espécie.

## Agradecimentos

À Embrapa pelo apoio financeiro dado ao projeto "Desenvolvimento de metodologia por UPLC-QTOF-MS(/MS) e RMN como estratégia de desreplicação para determinação do perfil metabólico de *Phyllanthus niruri* e *Phyllanthus amarus*" (SEG 03.14.04.002.00.00).

## Referências

BAGALKOTKAR, G.; SAGINEEDU, S. R.; SAAD, M. S.; STANSLAS, J. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1559-1570, 2006.

CHENG, H. S.; TON, S. H.; KADIR, K. A. Ellagitannin geraniin: a review of the natural sources, biosynthesis, pharmacokinetics and biological effects. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 1, p. 159-193, 2016.

COSTA, G. M.; GAZOLA, A. C.; MADÓGLIO, F. A.; ZUCOLOTTI, S. M.; REGINATTO, F. H.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F. A. DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P. Vitexin derivatives as chemical markers in the differentiation of the closely related species *Passiflora alata* Curtis and *Passiflora quadrangularis* LINN. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36, p. 1697-1707, 2013.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Brasília, DF: Anvisa, 2010. 904 p. v. 2

HE, M.; MIN, J-W.; KONG, W-L.; HE, X-H.; LI, J-X.; PENG, B-W. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, p. 74-85, 2016.

ILANGKOVAN, M.; JANTAN, I.; BUKHARI, S. N. A. *Phyllanthin* from *Phyllanthus amarus* inhibits cellular and humoral immune responses in Balb/C mice. **Phytomedicine**, v. 23, p. 1441-1450, 2016.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; SILVA, L. M.; BOEING, T.; SOMENSI, L. B.; BEBER, A. P.; ROCHA, J. A. R.; HENRIQUES, A. T.; ANDRADE, S. F.; CECHINEL-FILHO, V. The protective potential of *Phyllanthus niruri* and corilagin on gastric lesions induced in rodents by different harmful agents. **Planta Medica**, v. 83, p. 30-39, 2017.

MAO, X; WU, L-F; GUO, H-L; CHEN, W-J; CUI, Y-P; QI, Q; LI, S.; LIANG, W-Y; YANG, G-H; SHAO, Y-Y; ZHU, D.; SHE, G-M.; YOU, Y.; ZHANG, L-Z. The *Genus Phyllanthus*:

an ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-36, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/7584952>>. Acesso em: 12 maio 2017.

MARCOTULIO, M. C.; PELOSI, A.; CURINI, M. Hinokinin, an emerging bioactive lignan. **Molecules**, v. 19, p. 14862-14878, 2014.

MOREIRA, J.; KLEIN-JÚNIOR, L. C.; CECHINEL FILHO, V.; BUZZI, F. D. C. Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 146, 318-323, 2013.

PATEL, J. R.; TRIPATHI, P.; SHARMA, V.; CHAUHAN, N. S.; DIXIT, V. K. *Phyllanthus amarus*: ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 286-313, 2011.

PRINZA, S.; RINGLA, A.; HUEFNERB, A.; PEMPA, E.; KOPP, B. 4''-Acetylvitexin-2''-O-rhamnoside, isoorientin, orientin, and 8-methoxykaempferol-3-o-glucoside as markers for the differentiation of *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna* from *Crataegus laevigata* (Rosaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, p. 2920-31, 2007.

RAYYAN, S.; FOSSEN; T.; NATELAND, H.; ANDERSEN, O.M. Isolation and identification of flavonoids, including flavones rotamers, from the herbal drug "Crataegi folium cum flore" (hawthorn). **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 334-341, 2005.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation **Fitoterapia**, v. 82, p. 462-471, 2010.

SPRENGER, R. D. F.; CASS, Q. B. Characterization of four *Phyllanthus* species using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1291, p. 97-103, 2013.

WEI, W.; YING, X.; ZHANG, W.; CHEN, Y.; LENG, A.; JIANG, C.; LIU, J. Effects of vitexin-2''-O-rhamnoside and vitexin-4''-O-glucoside on growth and oxidative stress-induced cell apoptosis of human adipose-derived stem cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 988-997, 2014.

**Embrapa**

---

*Agroindústria Tropical*



MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**

