

ÉSTERES TRITERPÊNICOS DE *HIMANTHUS SUCUUBA* (SPRUCE) WOODSON

Jefferson Rocha de A. Silva, Claudia M. Rezende e Ângelo C. Pinto

Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Cidade Universitária - Ilha do Fundão - C. T.; Bloco A - 21945-970 - Rio de Janeiro - RJ

Maria L. B. Pinheiro, Milade C. Cordeiro e Everaldo Tamborini

Departamento de Química - Universidade Federal do Amazonas - Campus Universitário - Mini-Campus - Estrada do Contorno nº 3000 - Japiim - 69077-000 - Manaus - AM

Cláudia M. Young

Instituto de Botânica de São Paulo - CP 4005 - 01061-970 - São Paulo - SP

Vanderlan da S. Bolzani

Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista - 14800-900 - Araraquara - SP

Recebido em 17/7/97; aceito em 14/5/98

TRITERPENIC ESTERS FROM *HIMANTHUS SUCUUBA* (SPRUCE) WOODSON. Bioactivity-guided fractionation from hexane extract of *Himantanthus sucuuba* barks utilizing *Cladosporium sphaerospermum* led to the isolation of iridoids *plumericin* and *isoplumericin*, which showed higher inhibition against *C. sphaerospermum* than the antibiotic nistatin. Besides bioactive iridoids were isolated the inactive triterpenes lupeol cinnamate, α -amyrin cinnamate and lupeol acetate.

Keywords: *Himantanthus sucuuba*; iridoids; triterpenes.

INTRODUÇÃO

Himantanthus sucuuba (Spruce) Woodson (Apocynaceae) é uma planta conhecida na região norte do Brasil como sucuba, janaguba ou sucuba. Esta planta é amplamente utilizada na medicina popular como antitumoral, antifúngica, vermífuga e anti-anêmica¹.

Estudos anteriores revelaram a presença de depsídeos, terpenos e iridóides em *H.sucuuba*^{2,3}. Dentre os iridóides foram encontrados a fulvoplumericina, isoplumericina e plumericina, de comprovada ação antineoplásica, antiflogística e antimicrobiana⁴⁻¹⁰. Os depsídeos isolados de *H.sucuuba* apresentaram atividade como inibidores da enzima beta monoamino-oxidase (MAO-B)³. No entanto, como foram encontrados nas cascas podem não ser provenientes da planta e sim de líquens infestantes.

No presente trabalho são descritos os resultados do estudo fitoquímico do extrato hexânico das cascas do caule de *H.sucuuba*. Este extrato é constituído basicamente por uma mistura de ésteres triterpênicos, que corresponde aproximadamente a 7% do peso do extrato. Estes ésteres triterpênicos já foram descritos no gênero *Himantanthus*^{11,12}. A atividade fungicida apresentada pelo extrato foi monitorada por bioautografia, utilizando-se o fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum*¹³⁻¹⁴. A análise das frações bioativas por CGAR-EM, RMN ¹H e ¹³C revelou a presença dos iridóides plumericina **1** e isoplumericina **2**.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato hexânico das cascas do caule foi submetido a bioautografia, utilizando o fungo *Cladosporium sphaerospermum*. A cromatoplaça de sílica foi eluída com uma mistura de hexano e acetato de etila (6:4). Uma zona de inibição intensa na cromatoplaça indicou a presença de substâncias fungitóxicas.

O extrato hexânico foi fracionado em coluna de SEPHADEX-LH 20, usando hexano, diclorometano, acetona e metanol como eluentes. Das oito frações obtidas, a segunda e a terceira frações apresentaram zona de inibição na bioautografia. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas destas duas frações mostrou a presença dos iridóides plumericina **1**, isoplumericina

2, e de uma mistura de ésteres triterpênicos das séries lupano e ursano, como constituintes em maior proporção na mistura.

Ao extrato hexânico dissolvido em clorofórmio adicionou-se etanol. Este procedimento levou à obtenção de um sólido amorfo que foi cromatografado em coluna de gel de sílica. A eluição da coluna com uma mistura de hexano/benzeno em gradiente de polaridade crescente forneceu uma mistura de duas substâncias e um sólido cristalino. A análise da mistura, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, mostrou o mesmo íon molecular de m/z 556 para as duas substâncias, compatível com a fórmula molecular C₃₉H₅₆O₂. Foram observados íons característicos de triterpenos das séries lupano de m/z 189 (32%) e Δ^{12} -urseno ou oleaneno de m/z 218 (46%), este último proveniente de um rearranjo de tipo retro-Diels-Alder¹⁵⁻¹⁶. O íon de m/z 408 (M⁺-148), resultante da perda de C₉H₈O₂, acompanhado do fragmento de m/z 131 (100%) levaram a suposição da presença de um grupamento cinamoila no esqueleto triterpênico¹⁷⁻¹⁸.

Os espectros de RMN ¹³C (desacoplado e DEPT 90° e 135°) da mistura registraram os pares de deslocamentos químicos 124,5 (CH) e 139,8 (C), e 109,6 (CH₂) e 151,1 (C), característicos para as ligações duplas C(12) - C(13) da série urseno e C(20)-C(29) do grupo isopropilideno do esqueleto lupano¹⁹⁻²⁰, respectivamente. A unidade cinamoila foi confirmada através dos deslocamentos químicos em δ 128,2 (C-2' e C-6'), 129,0 (C-3' e C-5'), 130,3 (C-4') e 134,3 (C-1') do anel aromático e em 119,0, 144,4 e 166,3 da unidade (CH=CH-COO). O par de dubletos no RMN ¹H em δ 7,70 (1H, J=16Hz) e 6,48 (1H, J=16 Hz) e 7,65 (1H, J=16Hz); e 6,42 (1H, J=16 Hz.) mostram que a ligação dupla tem configuração E²¹⁻²². A hidrólise básica desta mistura levou a obtenção de ácido cinâmico, lupeol e α -amirina²³, cujas estruturas foram confirmadas através de seus espectros de massas (CGAR-EM) e co-injeção com padrões.

O sólido cristalino **5** mostrou o íon molecular de m/z 468, compatível com a fórmula molecular C₃₂H₅₂O₂, e fragmentos no espectro de massas característicos do esqueleto lupano^{19-21,24-26}.

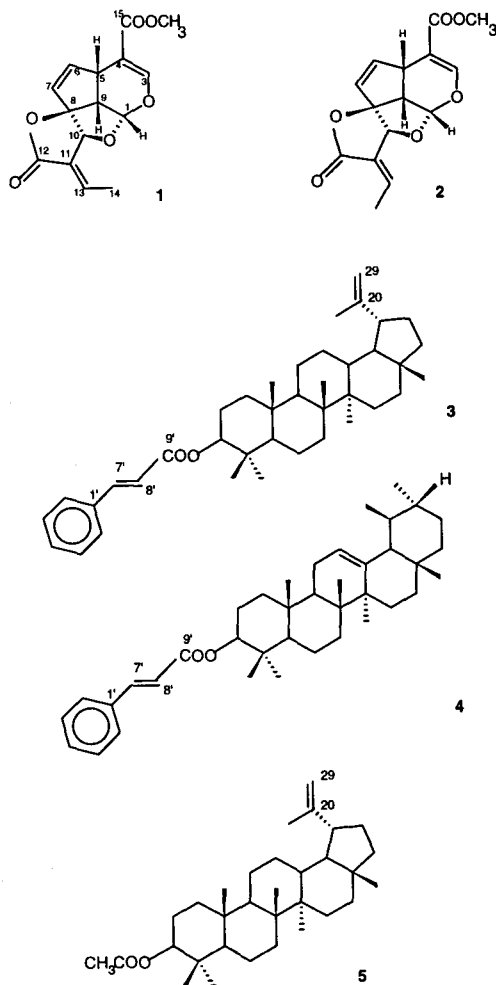
A unidade acetil foi caracterizada pelos espectros de RMN ¹H e ¹³C de **5**^{19-21, 24-26}, que foi identificado como acetato de lupeol.

O fracionamento guiado por bioensaio das frações bioativas levou à obtenção de uma mistura dos iridóides **1** e **2**. A análise

por CGAR-EM mostrou que ambos os iridóides tem o mesmo peso molecular ($M^{++} 290$, $C_{15}H_{14}O_6$). Os fragmentos de m/z 258 ($M^{++}-32$, 42%) e de m/z 230 ($M^{++}-60$, 85%) são provenientes da perda de MeOH e de formiato de metila, enquanto o de m/z 193 ($M^{++}-97$, 78%) é resultante da perda do anel da lactona.

O espectro de RMN 1H desta mistura registrou um par de dubletos de quartetos em δ 7,14 (1H, $J=1,0$ e 7,0 Hz) e 6,80 (1H, $J=1,0$ e 7,0 Hz), que foram atribuídos ao hidrogênio olefínico no C-13 da plumericina **1** e isoplumericina **2**, respectivamente.

A avaliação biológica foi feita utilizando a suspensão de esporos do fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum*. Pelo método da autobiografia utilizando diferentes concentrações das substâncias **1** e **2**, verificou-se que o limite de detecção, tanto para plumericina **1** quanto para isoplumericina **2** está abaixo de 1 μ g. Este resultado indica uma atividade fungitóxica para estes iridóides cinco vezes maior do que o observado para o antibiótico nistatina (5 μ g), usado como padrão.



EXPERIMENTAL

Planta - Coletada em janeiro de 1995 no município de Santarém, estado do Pará. A exsiccata está depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil, registrada sob N^o 5436.

Extração e separação - 350g de material botânico (casca do caule) de *Himantanthus sucuba*, seco e moído, foram submetidos a extração em aparelho Soxhlet por 3 dias, utilizando-se sucessivamente, hexano, clorofórmio e etanol. O resíduo hexânico (28,7g), de coloração laranja e consistência pastosa,

foi tratado com clorofórmio e etanol, precipitando 2,0 g de um sólido branco amorfo. 200 mg deste sólido foram cromatografados em coluna de gel de sílica (hexano/benzeno em gradiente crescente de polaridade), fornecendo uma mistura constituída de **3** e **4** (58,8 mg) e um sólido **5** (25,2 mg). 6,0 g da fração hexânica bruta foram ainda cromatografados em coluna aberta utilizando SEPHADEX LH-20 (60 g) como fase estacionária e como eluentes hexano, diclorometano, acetona e metanol em gradiente de polaridade crescente fornecendo: (A) C_6H_{14} (5,0 g); (B) $C_6H_{14}:CH_2Cl_2$ (8:2; $m=0,5$ g); (C) $C_6H_{14}:CH_2Cl_2$ (6:4; $m=0,3$ g); (D) $C_6H_{14}:CH_2Cl_2$ (2:8; $m=0,05$ g); (E) $CH_2Cl_2:C_3H_6O$ (8:2; $m=0,08$ g); (F) $CH_2Cl_2:C_3H_6O$ (6:4; $m=0,03$ g); (G) $CH_2Cl_2:C_3H_6O$ (2:8; $m=0,008$ g); (H) MeOH ($m=0,002$ g).

A cromatografia em camada fina das frações obtidas indicou a presença de substâncias com o mesmo Rf nas frações B e C. Estas frações foram reunidas ($m=0,8$ g) e cromatografadas em coluna de gel de sílica tendo como eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em gradiente de eluição. Após a bioautografia das frações (vide procedimento abaixo), a fração eluída com $CH_2Cl_2:AcOEt$ (8:2, 108 mg) foi cromatografada em coluna de gel de sílica com hexano/acetato de etila em gradiente de eluição, obtendo-se oito frações das quais a fração eluída com $C_6H_{14} : AcOEt$ (7:3) é uma mistura constituída pelos iridóides **1** e **2** (16,3 mg).

Hidrólise da mistura de 3 e 4 - 45 mg deste material foram refluxados com 6 ml de solução metanólica de KOH a 5% em 60 ml de hexano. Após evaporação do metanol e adição de água, extraiu-se a solução com clorofórmio, obtendo-se uma fração insaponificável, que foi identificada por co-injeção em CGAR como lupeol e α -amirina. A fração aquosa alcalina acidificada com HCl e extraída com acetato de etila forneceu um sólido cristalino que foi identificado por comparação com amostra autêntica, através de CCD, IV e co-injeção em CGAR, como o ácido cinâmico.

Bioensaio - A análise do extrato hexânico foi realizada em cromatografia de camada fina, tendo como sistema de solventes hexano:acetato de etila (6:4). Após o registro das bandas cromatográficas que absorveram na luz ultravioleta, fez-se a aplicação da suspensão, contendo *Cladosporium sphaerospermum*, sobre a cromatoplaça com subsequente deposição em atmosfera úmida para incubação por um período de dois a três dias.

Suspensão de *Cladosporium sphaerospermum* - Uma solução contendo KH_2PO_4 (7 g), $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3 g), KNO_3 (4 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 g) foi autoclavada a 120°C por 20 minutos. A 60 ml desta solução foram adicionados 10 ml de uma solução de glicose a 30% e, em seguida, adicionou-se o fungo *Cladosporium sphaerospermum* até obter-se uma suspensão.

Dados físicos e espectrométricos: Plumericina (**1**). IV(KBr) $\nu_{max} cm^{-1}$ (mistura de **1** e **2**): 1757, 1707, 1685 e 1647. EM m/z (int.rel.): 290(30), 230(60), 201 (70), 193(80), 173 (40), 160 (70), 139 (100) e 115 (60). RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7,14 (dq, $J=1,0$ e 7,0 Hz, H-13), 6,04 (dd, $J=2,0$ e 5,0 Hz, H-6), 5,64 (dd, $J=2,0$ e 5,0 Hz, H-7), 5,30 (sl, H-10), 4,00 (m, H-5), 3,76 (COOMe), 2,01 (d, $J=7,0$ Hz, H-14). RMN ^{13}C (75,25 MHz, $CDCl_3$): 102,3 (C-1), 153 (C-3), 38,4 (C-5), 141,1 (C-6), 126,4 (C-7), 53,9 (C-9), 80,3 (C-10), 144,6 (C-13)²⁷⁻²⁹.

Isoplumericina (**2**). IV (KBr) $\nu_{max} cm^{-1}$ (mistura de **1** e **2**): 1757, 1707, 1685 e 1647. EM m/z (int.rel.): 290 (29), 230 (94), 201 (100), 193 (80), 173 (40), 160 (98), 139 (90) e 115 (60). RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6,80 (dq, $J=1,0$ e 7,0 Hz, H-13), 6,04 (dd, $J=2,0$ e 5,0 Hz, H-6), 5,64 (dd, $J=2,0$ e 5,0 Hz, H-7), 5,30 (sl, H-10), 4,00 (m, H-5), 3,76 (COOMe), 2,01 (d, $J=7,0$ Hz, H-14). RMN ^{13}C (75,25 MHz, $CDCl_3$): 102,3 (C-1), 153 (C-3), 38,4 (C-5), 141,16 (C-6), 126,4 (C-7), 53,9 (C-9), 80,3 (C-10), 144,6 (C-13)²⁷⁻²⁹.

Cinamato de lupeol (**3**). IV (KBr) $\nu_{max} cm^{-1}$: 2940, 2860, 1709, 1638, 1458, 1171, 766 e 706 cm^{-1} . EM m/z (int.rel.): 556[M]⁺ (2), 408 (2), 337 (2), 218 (46), 190 (14), 189 (32), 131

(100) e 103 (26). RMN ¹H (300MHz,CDCl₃): δ 7.70 (d, J=16,0 Hz, H-7'), 7,35-7,55 (m, Ar-H), 6,42 (d, J=16 Hz, H-8'), 4,67 (m, H-29b), 4,57 (m, H-29a). RMN ¹³C (Tabela 1).

Cinamato de α-amirina (4). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,65 (d, J=16,0 Hz, H-7), 7,35-7,55 (m, Ar-H), 6,48 (d, J=16,0 Hz, H-8'), 5,14 (t, J=3,4 Hz, H-12). RMN ¹³C (Tabela 1).

Acetato de lupeol (5). p.f. 154-156°C; IV (KBr) ν_{max} cm⁻¹: 2950, 1734, 1244 e 1173 cm⁻¹. EM m/z: 468 [M]⁺ (11), 408 (4), 218 (44), 189 (100), 121 (66). RMN ¹H (300 MHz,CDCl₃): δ 4,69 (m), 4,57 (m), 2,04 (s), 1,03 (s), 0,94 (s), 0,85 (s) e 0,79 (s). RMN ¹³C (Tabela 1)

Instrumental - Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C (300 e 75,25 MHz, respectivamente) foram obtidos em um espectrômetro Bruker, utilizando CDCl₃ como solvente e TMS como padrão interno. A análise por CGAR (Cromatografia Gasosa de Alta Resolução) foi realizada em cromatógrafo HP5890 - Condições: injetor: 260°C; detector por ionização de chama: 330°C (DIC), gás carreador H₂; vazão: 2ml/min; temperatura programada: 250-320°C (5° C/min), 320°C (30min); injeção com divisão de fluxo (20:1); coluna capilar de sílica fundida, fase estacionária SE-54, 25 m, d_{ext}=0,3mm, d_{fasc}=0,2 nm. CGAR/EM - Cromatógrafo a gás HP-5880 acoplado a um espectrômetro de massas computadorizado HP-5897A com analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70eV; Temperatura programada: 40°-320°C (10°C/min); injeção *on column*, coluna capilar de sílica fundida, fase estacionária Silarem-30, 10m. d_{ext} 0,3 mm. Os espectros de IV foram realizados em espectrômetro Nicolet: Magna-IR 760

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro, empacotadas com Si 60-MERCK e SEPHADEX LH-20 (PHARMACIA); a CCD foi realizada em cromatofolhas MERCK PL, Si 60 F₂₅₄, 0,2mm de espessura. Os pontos de fusão foram obtidos em aparelho MICROQUÍMICA MQAPF-301 e não foram corrigidos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e ao PRONEX/FINEP nº 41.96.00911.00 reg. 4002-96 pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Van den Berg, M. E. *Plantas Mediciniais na Amazônia - Contribuição ao seu conhecimento sistemático*; CNPq/PRU/MPEG; Belém, Brasil 1982.
2. Persinos, G. P.; Blomster, R.N.; *J. Pharm. Sci.* **1978**, *67*, 1322.
3. Endo, Y.; Hayashi, H.; Sato, T.; Maruno, M.; Ohta, T.; Nozoe, S.; *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1198
4. Ferrigni, V. N. R.; Hasegawa, M.; *Rev. Latinoamer. Quím.* **1976**, *7*, 146.
5. Vanderlei, M. F.; Silva, M. S.; Gottlieb, H. E.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1991**, *2*, 51.
6. Kardono, L. B. S.; Tsauri, S.; Padmawinata, K.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D.; *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1447.
7. Sanduja, R.; Weinheimer, A. J.; Euler, K. L.; Alam, M.; *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 335.
8. Kupchan, S. M.; Dessertine, A. L.; Blaylock, B. T.; Bryan, R. F.; *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 2477.
9. Little, J. E.; Johnstone, D. B.; *Arch. Biochem.* **1951**, *30*, 445.
10. Anderson, J. E.; Chang, C. J.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 307.
11. Tan, G. T.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D.; Hughes, S. H.; *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 143.
12. Coppen, J. J. W.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 179.
13. Homans, A. L.; Fuchs, A.; *J. Chromatog.* **1970**, *51*, 327.
14. Rahalison, L.; Hamburger, M.; Monod, M.; Frenk, E.; Hostettmann, K.; *Planta. Med.* **1994**, *60*, 41.
15. Budzikiewics, H.; Wilson, J. M.; Djerassi, C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3688.

Tabela 1. Dados espectrais (ppm) de RMN ¹³C de cinamato de lupeol (3), cinamato de α-amirina (4) e acetato de lupeol (5).

Carbono	3	4	5
1	38,6	38,6	38,6
2	23,6	23,6	23,9
3	81,2	81,2	81,2
4	37,3	38,1	38,0
5	55,5	55,5	55,5
6	17,7	18,4	18,2
7	34,4	32,8	34,4
8	41,0	40,2	41,0
9	50,5	47,8	50,5
10	37,0	37,0	37,2
11	21,1	17,7	21,1
12	26,8	124,5	25,2
13	38,1	139,8	38,2
14	43,0	42,3	43,0
15	27,6	28,6	27,6
16	35,7	26,8	35,7
17	43,0	33,9	43,0
18	48,2	59,2	48,4
19	47,8	39,8	48,2
20	151,1	39,8	151,1
21	29,9	31,3	29,9
22	39,8	41,7	40,2
23	28,2	28,2	28,1
24	15,9	16,8	16,7
25	16,1	15,9	16,2
26	16,4	16,8	16,8
27	14,7	23,4	14,7
28	17,7	28,1	18,2
29	109,6	23,4	109,5
30	21,6	21,6	19,4
1'	134,7	134,7	171,2
2'	128,2	128,2	21,1
3'	129,0	129,0	—
4'	130,3	130,3	—
5'	129,0	129,0	—
6'	128,2	128,2	—
7'	144,4	144,4	—
8'	119,0	119,0	—
9'	167,0	167,0	—

16. Ogunkoya, L.; *Phytochemistry* **1981**, *20*, 121.
17. Delgado, M. C. C.; Silva, M. S.; Braz Filho, R.; *Quim. Nova* **1986**, *9*, 119.
18. Misra, G.; Mitra, C. R.; *Phytochemistry* **1968**, *7*, 2173.
19. Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.
20. Olea, R. S. G.; Roque, N. F.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 278.
21. Bhattacharyya, J.; Barros, C. B.; *Phytochemistry* **1986**, *25*, 274.
22. Pan, H.; Lundgren, L. N.; Andersson, R.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 795.
23. Schmidt, J.; Lien, N. T.; Khoi, N. H.; Adam, G.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1032.
24. Sobrinho, D. C.; Hauptli, M. B.; Appolinário, E. V.; Kollenz, C. L. M.; Carvalho, M. G.; Braz Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1991**, *2*, 15.
25. Reynolds, W. F.; McLean, S.; Poplawski, J.; Enriquez, R. G.; Escobar, L. I.; I. Leon; *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3419.
26. Aragão, P. C. A.; Toledo, J. B.; Morais, A. A.; Braz Filho, R.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 254.
27. Abe, F.; Chen, R. F.; Yamauchi, T.; *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 2784.
28. El-Naggar, L. J.; Beal, J. L.; *J. Nat. Prod.*, **1980**, *43*, 649.
29. Abe, F.; Yamauchi, T.; *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 2947.