

## SEPARAÇÃO SEMIPREPARATIVA DE $\alpha$ E $\beta$ -AMIRINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Marluce Oliveira Dias, Lidilhone Hamerski\* e Angelo C. Pinto

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Bl. A, Cidade Universitária, 21941-909 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 16/7/10; aceito em 25/10/10; publicado na web em 18/2/11

SEMI-PREPARATIVE SEPARATION OF  $\alpha$  AND  $\beta$ -AMYRIN BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC. The resin obtained from species of the genus *Protium* (Burseraceae) is formed mostly of pentacyclic triterpenes:  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin. The separation and purification of these triterpenes were optimized in three steps.

Keywords: Protium; HPLC; separation of  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin.

### INTRODUÇÃO

Os triterpenos apresentam ampla diversidade estrutural, podendo ser tetracíclicos, pentacíclicos e acíclicos.<sup>1</sup> A maioria dos triterpenos pentacíclicos pertence às subclasses ursano, oleanano e lupano.<sup>1</sup> Estão presentes como constituintes majoritários de resinas produzidas por um grande número de espécies vegetais, entre as quais destacam-se as espécies do gênero *Protium* (Burseraceae). Este gênero é amplamente distribuído na América do Sul, em especial na Amazônia.

As resinas produzidas por espécies do gênero *Protium* possuem aplicação industrial, com uso em perfumaria, na confecção de vernizes e para a calafetação de embarcações. Na medicina popular são utilizadas como repelentes de insetos, expectorantes e no tratamento de diversas enfermidades. Há na literatura vários trabalhos que descrevem a atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, imunestimulante e antineoplásica dessas resinas.<sup>2-4</sup>

Os constituintes majoritários das resinas de *Protium* são os triterpenos pentacíclicos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina. Tanto as misturas de acetato como o cinamato de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina apresentam significativa atividade anti-inflamatória e, ainda, ação antiartrite e analgésica, respectivamente.<sup>3,4</sup> Todavia, estas atividades foram resultados de ensaios biológicos feitos com estes triterpenos em mistura. Assim, o potencial biológico não foi estabelecido para estes derivados da  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina individualmente.

Neste trabalho descreve-se o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no modo preparativo para a purificação dos isômeros triterpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina. A separação da  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina em mistura é praticamente impossível de ser alcançada utilizando-se técnicas cromatográficas de baixa eficiência.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Reagentes e instrumentos

Foram utilizados reagentes com grau de pureza CLAE e água ultrapura (MilliQ). Acetonitrila (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil) foi usada como modificador de polaridade da fase móvel. Para cromatografia clássica em coluna usou-se os solventes orgânicos de grau P.A. (Tedia) e gel de sílica 0,063 a 0,200 mm, 70-230 mesh ASTM (E. Merck, Darmstadt).

A análise por CLAE foi efetuada utilizando-se o cromatógrafo da Agilent, modelo HP série 1100 equipado com detector UV. As colunas usadas foram: Agilent Zorbax 300SB-C18 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m e Agilent Zorbax 300SB-C18 9,4 x 250 mm, 5  $\mu$ m. A fase móvel consistiu de acetonitrila e água (acidificada com 0,05% de ácido acético) na proporção 88:12 v/v e vazão de 0,7 e 3,0 mL min<sup>-1</sup> para cromatografia no modo analítico e semipreparativo, respectivamente. O comprimento de onda de detecção foi de 200 nm. As amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada (Agilent): polipropileno, 0,45  $\mu$ m e diâmetro 13 mm.

A análise por cromatografia em fase gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM) foi realizada em um aparelho da marca Agilent, modelo 6890 acoplado a um detector de espectrometria de massas, marca Agilent modelo 5973, no modo ionização por elétrons a 70 eV e analisador do tipo quadrupolo, e a varredura foi efetuada na faixa de massa de 40 a 600 u.m.a. Foi utilizada uma coluna DB-5 J&W Scientific, UK (5% fenilmetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,10  $\mu$ m), no modo com divisão de fluxo (*split*) 10:1, com linha de transferência a 290 °C, gás de arraste hélio com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial do forno cromatográfico foi de 100 °C por 5 min, com taxa de aquecimento de 15 °C/min até 290 °C e posteriormente de 2 °C/min até 300 °C, permanecendo nesta condição por 15 min. Os fragmentos foram descritos como razão de massa atômica por carga (*m/z*).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) foram obtidos a 500 e 125 MHz, respectivamente, em espectrômetro Bruker (Madison, USA), após dissolução das amostras em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>).

#### Obtenção da mistura de $\alpha$ e $\beta$ -amirina

A resina de *Protium* (7,0 g), adquirida no mercado municipal de Manaus – AM, foi submetida à extração em Soxhlet com diclorometano durante 15 h. O extrato em diclorometano (6,0 g) foi fracionado em coluna de gel de sílica 60, usando-se gradiente de polaridade crescente: hexano (500 mL, fração 1), Hex/AcOEt 98:02 v/v (500 mL, fração 2), Hex/AcOEt 95:05 v/v (250 mL cada fração, frações 3-6), Hex/AcOEt 93:07 v/v (250 mL cada fração, frações 7-10), Hex/AcOEt 85:15 v/v (250 mL cada fração, frações 11-14), Hex/AcOEt 60:40 v/v (250 mL cada fração, frações 15-17), AcOEt (500 mL, fração 18). As frações foram analisadas por cromatografia em

\*e-mail: hamerski\_1@hotmail.com

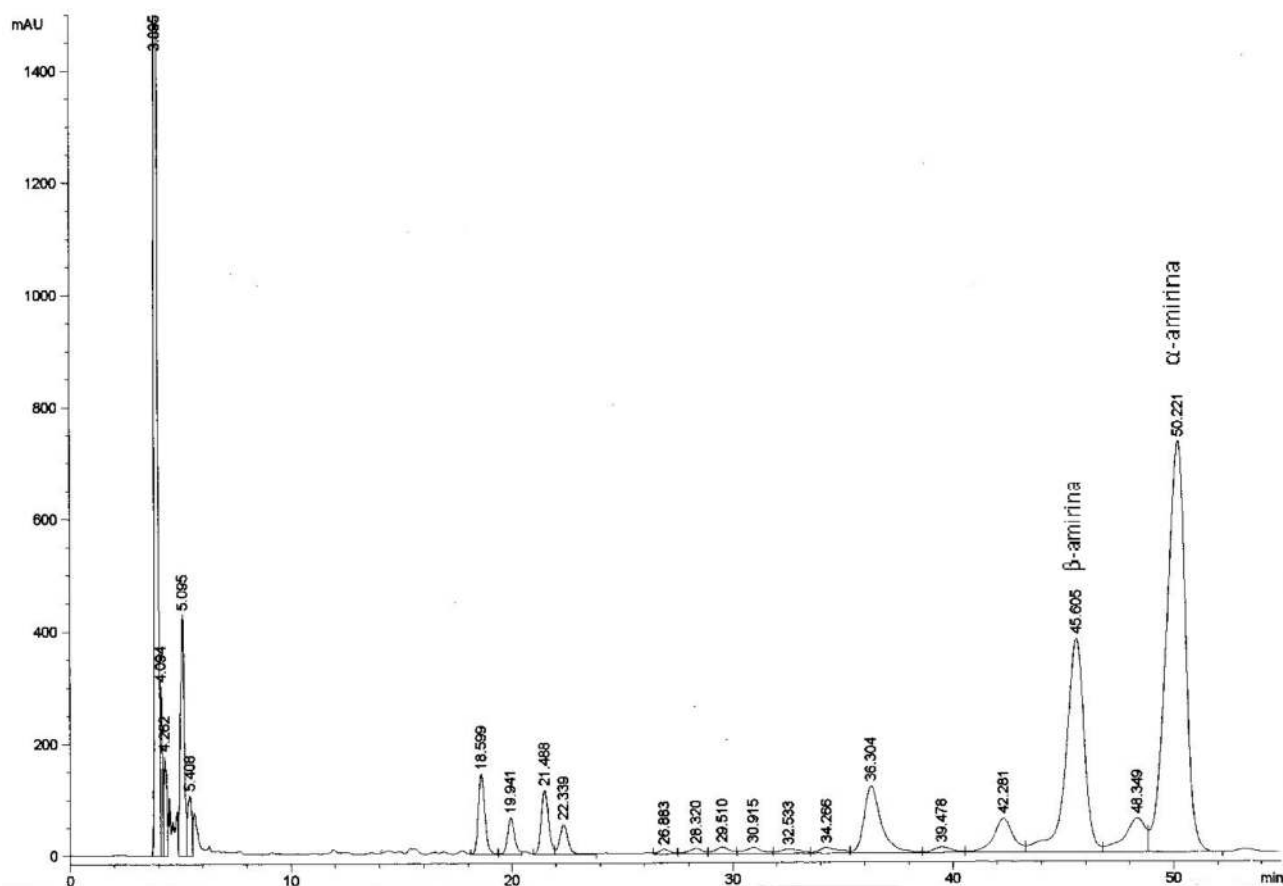


Figura 1. Cromatograma da mistura de triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina obtida da resina de *Protium* (condição de análise ver parte experimental)

camada delgada (CCD) e comparadas com uma amostra certificada de uma mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (mistura identificada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ). Os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina foram encontrados nas frações 3 a 6 (4,0 g) e confirmados, ainda, por CG-EM.

#### Isolamento e purificação da $\alpha$ e $\beta$ -amirina por CLAE

A mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (80,0 mg) foi solubilizada em acetonitrila e isopropanol (4:1 v/v) com auxílio de ultrassom. A solução foi filtrada em membrana de celulose e submetida à CLAE preparativo em C-18.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração com a mistura da  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, obtida através do fracionamento cromatográfico da resina de espécies de *Protium*, foi analisada por CCD e por CG. Apesar destes métodos cromatográficos indicarem estes triterpenos como majoritários, a análise desta mistura por CLAE revelou nesta fração a presença de outras substâncias além dos dois triterpenos majoritários. As substâncias correspondentes aos picos de menores intensidades no cromatograma (Figura 1) foram coletadas, mas como o objetivo do trabalho é a separação da  $\alpha$ -amirina e da  $\beta$ -amirina, estes componentes não foram analisados.

O cromatograma obtido através do procedimento preparativo (Figura 1) mostrou a  $\alpha$ -amirina eluindo com  $t_r$  de 50,2 min e a  $\beta$ -amirina com  $t_r$  de 45,6 min, numa proporção de aproximadamente 2 para 1, respectivamente. Foram obtidos 22 mg (27%) de  $\alpha$ -amirina e 12 mg (15%) de  $\beta$ -amirina, a partir de 80 mg da fração proveniente do fracionamento em coluna de sílica da resina de *Protium*, confirmando a proporção das duas substâncias na mistura, como indicado na análise cromatográfica.

A identificação e análise de pureza dos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina foi realizada por CGAR-EM e por RMN. O cromatograma da  $\beta$ -amirina apresentou um único pico no modo TIC com tempo de retenção de 27,4 min (Figura 2A), e para a  $\alpha$ -amirina o tempo de retenção de 28,3 min (Figura 2B). Os tempos de retenção foram semelhantes aos observados quando estes triterpenos foram analisados em mistura. Os espectros de massas de ambos os triterpenos apresentaram os íons moleculares  $[M]^+$  426 e pico base de  $m/z$  218 (Figura 2).

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono da  $\alpha$ -amirina e da  $\beta$ -amirina, estão de acordo com os descritos na literatura.<sup>5</sup> Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  não foram observados sinais que caracterizassem a presença de contaminantes, comprovando a pureza dos triterpenos e, portanto, a eficiência da metodologia empregada.

A condição estabelecida para a purificação dos triterpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina ainda pode ser otimizada para diminuir o tempo da corrida, que foi em torno de 50 min. Mas, vale ressaltar que esses triterpenos foram obtidos em poucas etapas, com alto grau de pureza, a partir de resinas comerciais de *Protium*. Na literatura há relatos da utilização da CLAE para a análise dos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina utilizando apenas o modo analítico, sem o propósito de isolamento.<sup>6</sup>

#### CONCLUSÃO

Os triterpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina foram obtidos com alto grau de pureza através de metodologia rápida, reprodutível e em bom rendimento, demonstrando-se mais uma vez a importância da CLAE na separação de misturas de substâncias estruturalmente semelhantes.

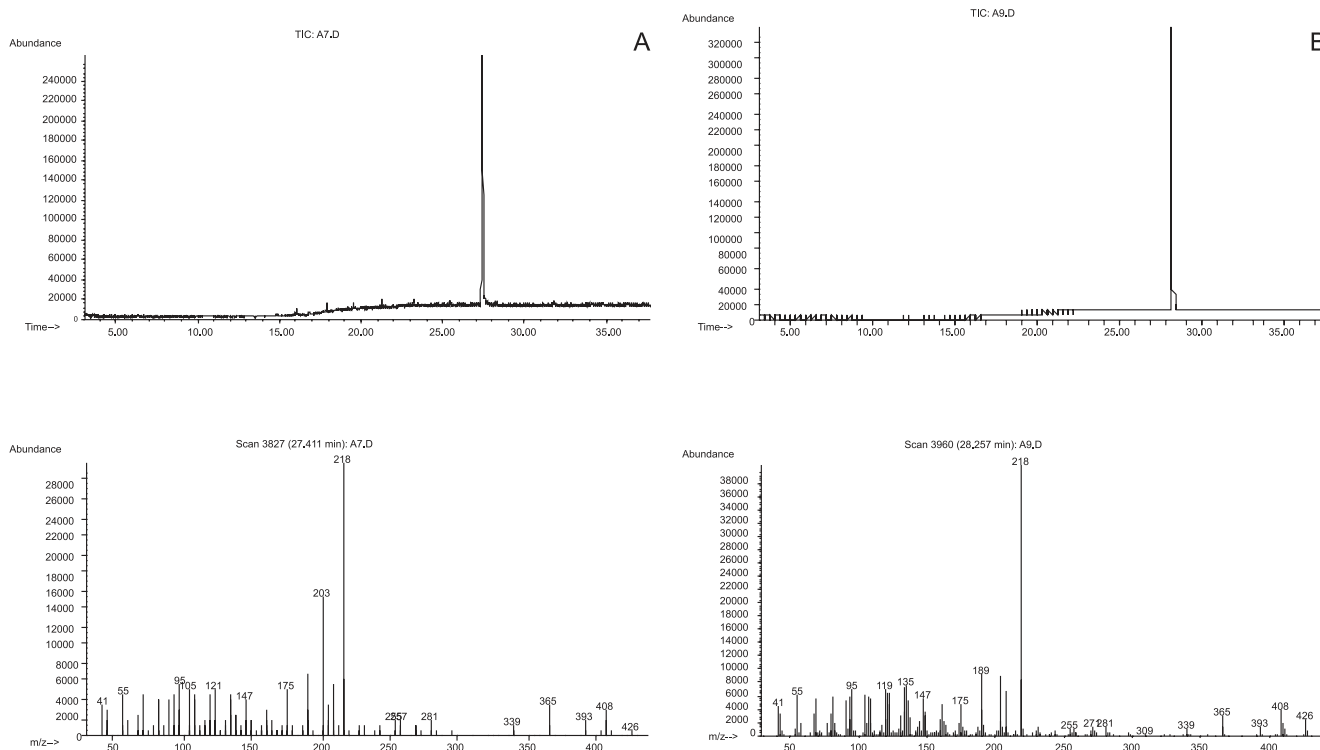


Figura 2. Cromatograma e espectro de massas do triterpeno  $\beta$ -amirina (A) e  $\alpha$ -amirina (B) obtido por CG-EM (condição de análise ver parte experimental)

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Está disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo .PDF com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à CAPES e FAPERJ.

## REFERÊNCIAS

- Bandeira, P. N.; Lemos, T. L. G.; Costa, S. M. O.; Santos, H. S.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 204; Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. T.; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261.
- Pinto, S. A. H.; Pinto, L. M. S.; Guedes, M. A.; Cunha, G. M. A.; Chaves, M. H.; Santos, F. A.; Rao, V. S.; *Phytomedicine* **2008**, *15*, 630; Bandeira, P. N.; Pessoa, O. D. L.; Trevisan, M. T. S.; Lemos, T. L. G.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1078; Rodriguez-Gamboa, T.; Fernandes, J. B.; Rodrigues, E.; Silva, M. F. D. F.; Vieira, P. C.; Barrios, M.; Castro-Castillo, O.; Victor, S. R.; Pagnocca, F. C.; Bueno, O. C.; Hebling, M. J. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 386; Oliveira, F. A.; Vieira-Júnior, G. M.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R. C.; Florêncio, M. G.; Lima, R. C. P.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N.; *Pharm. Res.* **2004**, *49*, 105; Siani, A. C.; Ramos, M. F. S.; Menezes-de-Lima, O.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Fernandez-Ferreira, E.; Soares, R. O. A.; Rosas, E. C.; Susunaga, G. S.; Guimarães, A. C.; Zoghbi, M. G. B.; Henriques, M. G. M. O.; *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *66*, 57.
- Bandeira, P. N.; Lemos, T. L. G.; Costa, S. M. O.; Santos, H. S.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 204.
- Miranda, A. L. P.; Silva, J. R. A.; Rezende, C. M.; Neves, J. S.; Parrini, S. C.; Pinheiro, M. L. B.; Cordeiro, M. C.; Tamborini, E.; Pinto, A. C.; *Planta Med.* **2000**, *66*, 284.
- Maia, R. M.; Barbosa, P. R.; Cruz, F. G.; Roque, N. F.; Fascio, M.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 623.
- Martilanc, M.; Vovk, I.; Simonoeska, B.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 6662; Hernandez-Vazquez, L.; Mangas, S.; Palazon, J.; Navarro-Ocaña, A.; *Ind. Crop. Prod.* **2010**, *31*, 476.

SEPARAÇÃO SEMIPREPARATIVA DE  $\alpha$  E  $\beta$ -AMIRINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Marluce Oliveira Dias, Lidilhone Hamerski\* e Angelo C. Pinto

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Bl. A, Cidade Universitária, 21941-909 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Tabela 1S. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos triterpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz)

Posição	$\alpha$ -amirina		$\beta$ -amirina	
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1		38,7		38,7
2		28,7		27,2
3	3,16 (dd, $J = 5,1; 11,2$ )	79,6	3,15 (dd, $J = 4,4; 10,8$ )	79,3
4		38,7		38,5
5	0,67 (d, $J = 11,6$ )	55,1	0,68 (d, $J = 11,0$ )	55,1
6		18,4		18,6
7		32,2		32,4
8	-	40,0		39,8
9		47,7		47,6
10	-	36,9		36,9
11		23,3		23,6
12	5,06 (t, $J = 3,2$ )	124,4	5,12 (t, $J = 3,2$ )	121,7
13	-	139,5		145,2
14	-	42,0		41,7
15	1,94 (td, $J = 4,5; 13,5 \text{ H}_\beta$ )	27,2	1,89 (td, $J = 4,0; 14,0 \text{ H}_\beta$ )	26,2
16	1,76 (td, $J = 5,0; 13,5 \text{ H}_\beta$ )	26,6	1,70 (td, $J = 4,3; 13,5 \text{ H}_\beta$ )	26,1
17	-	33,7		32,6
18		59,0		47,2
19		39,6	1,93 (dd, $J = 4,0; 13,7 \text{ H}_\beta$ )	46,8
20		39,6		31,0
21		31,2		34,7
22	1,85 (dt, $J = 3,0; 7,0$ )	41,5	1,80 m	37,1
23	0,93 s	28,1	0,77 s	28,0
24	0,74 s	15,6	0,90 s	15,4
25	0,73 s	15,6	0,73 s	15,4
26	0,89 s	16,8	0,93 s	16,8
27	1,01 s	23,2	1,19 s	25,9
28	0,94 s	28,1	1,07 s	28,4
29	0,85 (d, $J = 6,0$ )	17,4	0,87 s	33,8
30	0,73 (d, $J = 7,0$ )	21,4	0,80 s	23,7

\*e-mail: hamerski\_1@hotmail.com

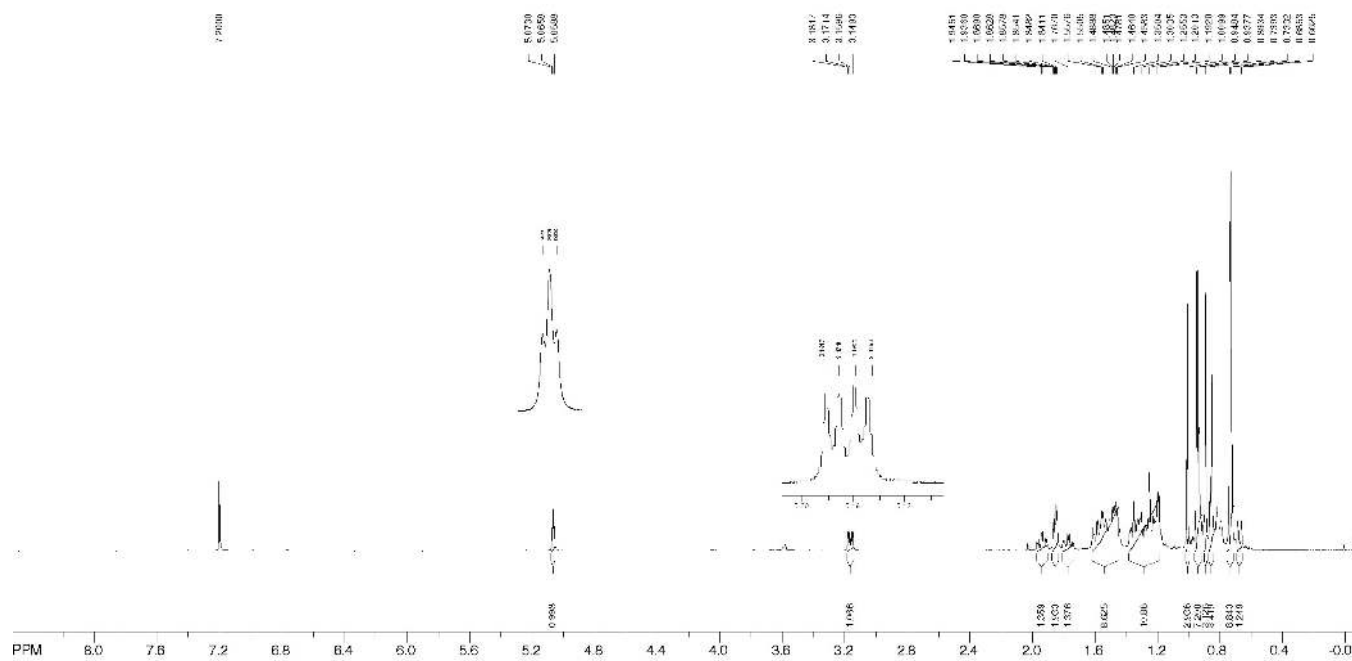


Figura 1S. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)

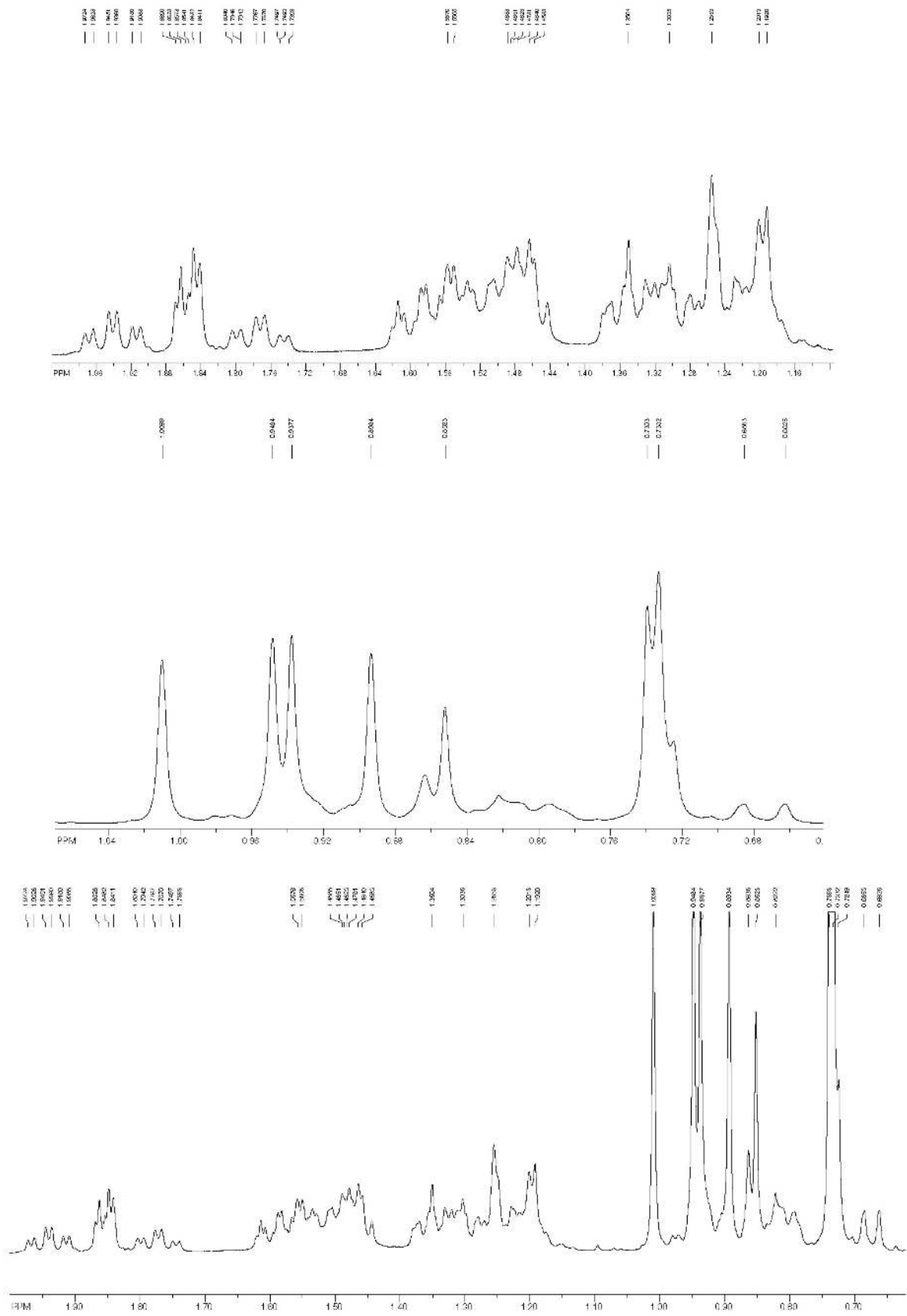


Figura 2S. Expansões do espectro de RMN de <sup>1</sup>H do triterpene  $\alpha$ -amirina (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

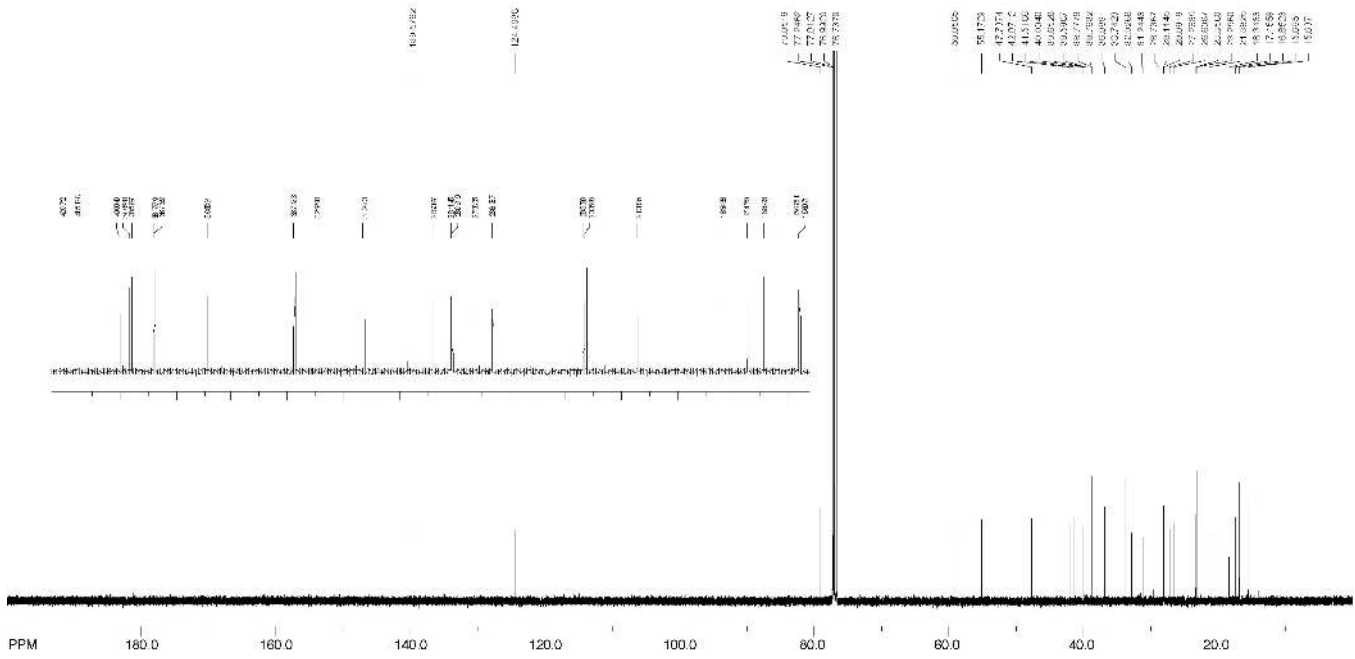


Figura 3S. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)

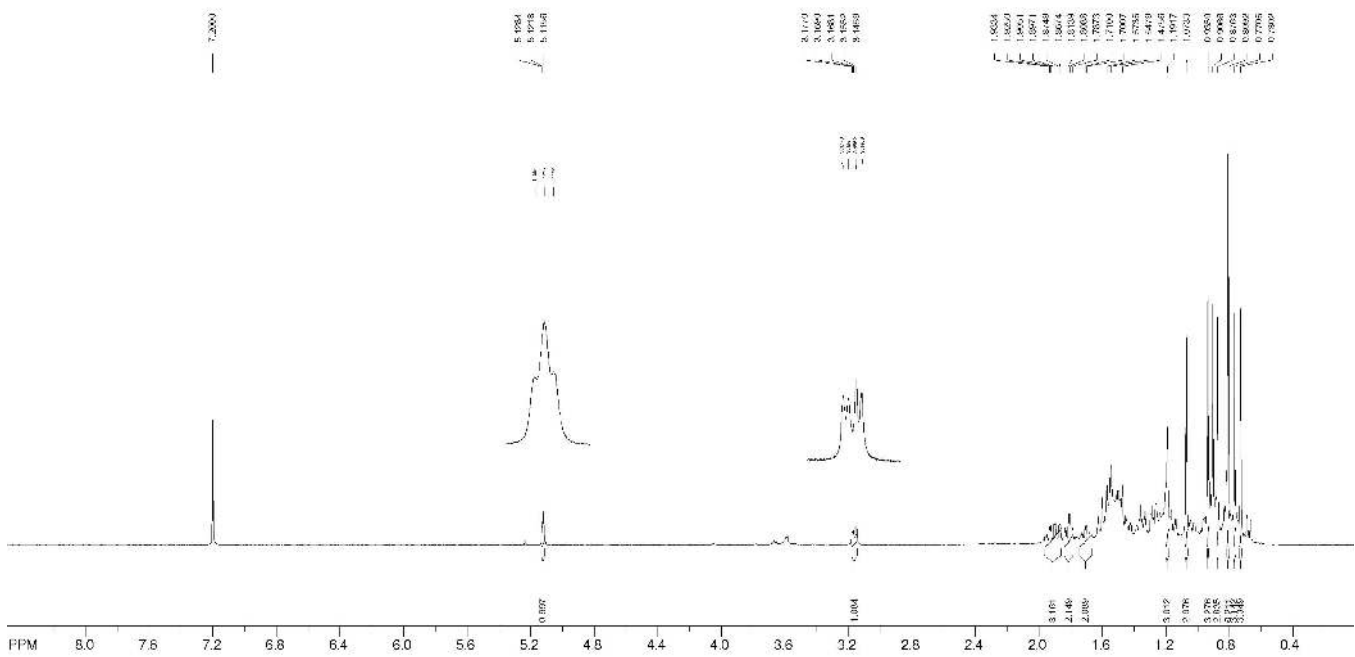


Figura 4S. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno  $\beta$ -amirina ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)

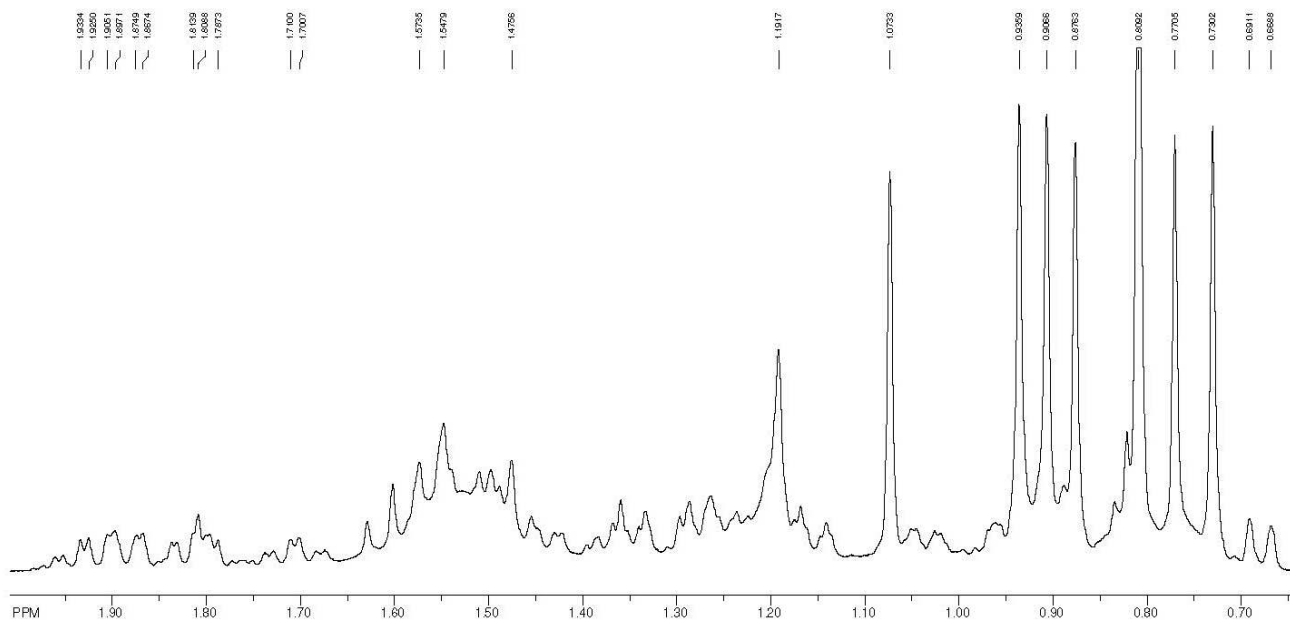


Figura 5S. Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno  $\beta$ -amirina ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)

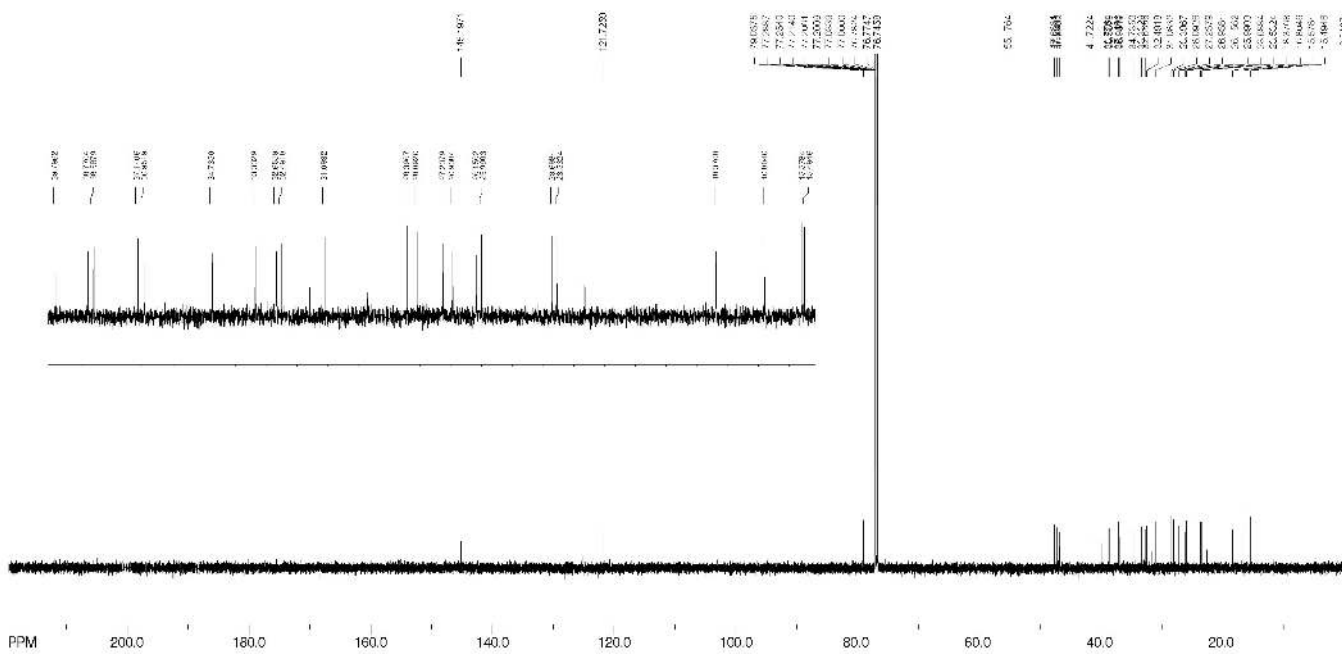


Figura 6S. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno  $\beta$ -amirina ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)



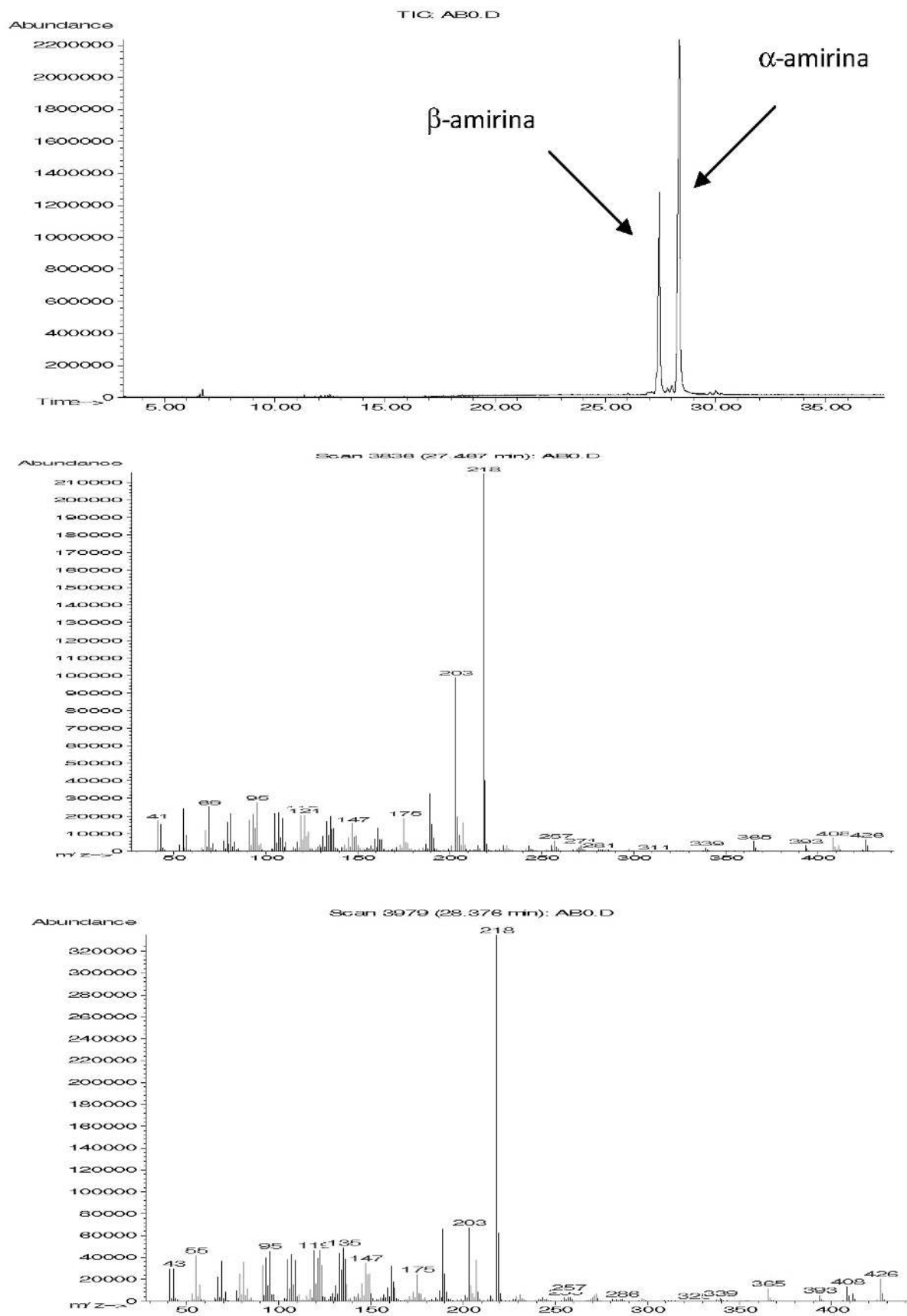


Figura 7S. Cromatograma gasoso e espectro de massas da fração rica nos triterpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina (condição de análise ver parte experimental)