

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Protium heptaphyllum* MARCH

Paulo Nogueira Bandeira, Oflia Deusdênia Loiola Pessoa, Maria Teresa Salles Trevisan e Telma Leda Gomes Lemos*
Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CP 12200, 60021-970 Fortaleza - CE

Recebido em 21/9/01; aceito em 20/3/02

SECONDARY METABOLITES OF *PROTIUM HEPTAPHYLLUM* MARCH. Phytochemical investigation of the resin, fruits, leaves, and trunk of *Protium heptaphyllum* led to the isolation of the monoterpene *p*-menth-3-ene-1,2,8-triol, α and β amyrin, quercetin, brein, quercetin-3-*O*-rhamnosyl, (-) catechin and scopoletin. Their structures were established by 1D and 2D NMR spectroscopy and comparison with published data.

Keywords: *Protium heptaphyllum*; Burseraceae; *p*-menth-3-ene-1,2,8-triol.

INTRODUÇÃO

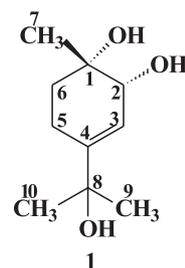
A família Burseraceae compreende 16 gêneros e mais de 800 espécies tropicais e subtropicais. Alguns gêneros desta família são produtores de uma seiva oleosa rica em óleo essencial e triterpenos das séries oleano, ursano e eufano¹. A espécie *Protium heptaphyllum*, conhecida popularmente como almecegueira, breu-branco-verdadeiro, almecegueira cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueira vermelha ou almecegueiro bravo, ocorre em todo Brasil, sendo largamente encontrada na região amazônica, onde sua seiva é conhecida como breu branco, goma limão, almécega do Brasil². Na medicina popular, esta espécie é considerada como um importante agente terapêutico, sendo utilizada como antiinflamatório, analgésico, expectorante e cicatrizante. É utilizada também na indústria de verniz e calafetagem de embarcações³. Recentemente, estudos farmacológicos realizados com o óleo da resina comprovaram sua eficácia terapêutica, demonstrando atividades antiinflamatória, antinociceptiva e antineoplásica⁴. Há registros de vários trabalhos sobre a composição química da resina de *P. heptaphyllum*⁵⁻⁷. O mais recente relata a caracterização de oito triterpenos, os quais foram caracterizados em misturas binárias⁸.

O presente trabalho representa uma complementação aos estudos fitoquímicos já existentes sobre a composição química da resina, estendendo-se a outras partes da planta, tais como caule, folhas e frutos de um exemplar coletado no estado do Ceará. Da resina, além do óleo essencial, cujo teor é de 11%, foram isolados o monoterpene triidroxilado **1**, os triterpenos α -amirina, β -amirina e breina; dos frutos verdes, (-) catequina; dos frutos maduros e folhas, os flavonóides quercetina e quercetina-3-*O*-ramnosil, respectivamente; e do caule, escopoletina. O registro de monoterpene triidroxilados é bastante raro, encontrando-se apenas oito exemplos⁹⁻¹³, dentre estes, o composto **1** na forma 2-*O*-acetil, o qual foi isolado da espécie *Asiasari radix*¹⁴. Embora todos os compostos isolados sejam conhecidos, este é o primeiro trabalho que menciona o isolamento de outras classes de metabólitos secundários diferentes de terpenos para a espécie em investigação. A composição química do óleo essencial da resina, caule, folhas e frutos de *P. heptaphyllum* foi recentemente publicada⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto **1**, foi isolado como um sólido cristalino, com p.f.

137– 138 °C e $[\alpha]_D^{20} + 2^\circ$ (*c* 0,2 CH₃OH). Seu espectro de infravermelho apresentou bandas em 3292 e 1135 cm⁻¹ típicas de grupos hidroxila de álcoois, além de bandas em 1478 e 1458 cm⁻¹ referentes a um sistema olefínico. A análise dos espectros de RMN ¹³C (BBD e DEPT 135°) indicou a presença de três átomos de carbono não-hidrogenado (um sp² e dois sp³), dois carbonos metínicos (um sp²), dois metilênicos e três grupos metila. De acordo com os valores dos deslocamentos químicos, dois dos carbonos não hidrogenados e um metínico são oxigenados. Estes dados, aliados àqueles do espectro de RMN ¹H permitiram sugerir a fórmula molecular C₁₀H₁₈O₃, em acordo com o pico do íon molecular em *m/z* 186 (M⁺), observado no espectro de massas obtido a 70 eV. A presença de uma ligação dupla trissubstituída foi evidenciada pelas absorções em δ_C 122,4 (CH) e 147,2 (C) e confirmada pela absorção em δ_H 5,58 (m), referente a um hidrogênio olefínico. O espectro de RMN¹H revelou dois singletos intensos em δ_H 1,14 (3H) e 1,27 (6H) que, de acordo com a integração, correspondem a três grupos metila, os quais, através do experimento HMQC, foram associados aos sinais em δ_C 21,9; 29,1 e 29,2, respectivamente. O experimento HMBC mostrou a correlação dos átomos de carbono em δ_C 73,1 e 147,2 com os hidrogênios de dois grupos metilas, com os hidrogênios de um carbono metilênico e ainda com o hidrogênio olefínico. Observou-se também a correlação do carbono quaternário oxigenado em δ_C 72,7 com os hidrogênios referentes aos sinais em δ_H 1,14 (3H); 3,90 (1H) e 5,58 (1H), enquanto o carbono em δ_C 74,9 mostrou acoplamento com os hidrogênios correspondentes aos sinais em δ_H 1,14 (3H) e 1,60-1,70 (2H). Com base nestes resultados e nos dados descritos na Tabela 1, chegou-se à conclusão de que o composto **1** se trata de um monoterpene triidroxilado, caracterizado como *p*-menth-3-eno-1,2,8-triol. A configuração *cis* das hidroxilas localizadas em C-1 e C-2 foi determinada através do efeito NOE observado no sinal relativo aos hidrogênios da metila em C-7, por irradiação na frequência do hidrogênio carbinólico H-2. Estes dados permitiram de-



*e-mail: tlemos@dqoi.ufc.br

Tabela 1. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) de *p*-ment-3-eno-1,2,8-triol, **1**

Posição	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	72,7	-	H - 2; 3H - 7	H - 3
2	74,9	3,90 (m)		2H - 6; 3H - 7
3	122,4	5,58 (m)		2H - 5
4	147,2	-	H - 3; 2H - 5	2H - 6; 3H - 9; 3H - 10
5	24,3	2,21 e 2,10 (m)	2H - 6	H - 3
6	34,8	1,70 e 1,60 (m)	2H - 5	3H - 7
7	21,9	1,14 (s)		2H - 6
8	73,1	-	3H - 9; 3H - 10	H - 3; 2H - 5
9	29,1*	1,27 (s)		
10	29,2*	1,27 (s)		

*estes valores podem estar trocados

finir a configuração relativa de **1**. Como comentado anteriormente, a literatura cita o isolamento deste composto apenas na forma acetilada¹⁴.

Três compostos foram isolados da resina e identificados como sendo triterpenos pentacíclicos, através das informações fornecidas por seus espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (BBD) e DEPT 135° correspondentes. A identificação individual de cada substância foi realizada levando-se em conta o padrão de hidrogenação de cada átomo de carbono, os deslocamentos químicos dos átomos de carbono, principalmente dos carbonos de ligação dupla, e ainda o número de metilas e multiplicidade destas, observadas nos espectros de RMN ^1H . Assim, dois dos compostos foram identificados como sendo a mistura de α e β -amirina¹⁵ e o terceiro, como breina¹⁶.

Três flavanóides foram identificados através de seus respectivos espectros de RMN ^{13}C (BBD e DEPT 135°) e ^1H . Os espectros de carbono-13 de dois deles revelaram sinais correspondentes a 15 átomos de carbono que, de acordo com os valores de deslocamentos químicos, são compatíveis com a estrutura de uma catequina e um flavonol, respectivamente. De acordo com os espectros de RMN ^1H de dois destes flavonóides, a multiplicidade dos sinais na região de aromático mostrou-se semelhante indicando, portanto, o mesmo padrão de substituição, permitindo posicionar grupos hidroxilas nos carbonos 5 e 7 do anel A e 3' e 4' do anel B. O espectro de RMN ^{13}C do terceiro flavonóide revelou sinais correspondentes a 21 átomos de carbono, 6 deles relativos a uma unidade de açúcar, a qual após análise dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono-13 foi identificada como a ramnose. Os deslocamentos químicos dos 15 átomos de carbono restantes mostraram-se semelhantes aos do flavonol indicando, portanto, que a única diferença entre estes constituintes trata-se do substituinte ligado ao C-3, em um deles um grupo hidroxila, enquanto no outro, a ramnose. Desta forma, os três flavonóides foram identificados como: (-) catequina¹⁷, quercetina¹⁸ e quercetina-3-*O*-ramnosil¹⁹, respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C do oitavo composto isolado apresentou sinais correspondentes a 10 átomos de carbono, dentre estes 9 com hibridação sp^2 , sendo 3 oxigenados e uma carbonila de éster conjugado. O espectro de RMN ^1H revelou absorções relacionadas a uma metoxila e 2 hidrogênios de ligação dupla com configuração *cis*. Estes dados permitiram propor que este metabólito secundário trata-se de uma cumarina dissustituída, identificada como escopoletina²⁰.

Na determinação estrutural de todos os compostos, foram também utilizadas técnicas de RMN 2D, como HMQC e HMBC, e suas estruturas foram corroboradas mediante comparação dos dados obtidos, inclusive ponto de fusão, com aqueles registrados na literatura.

Como parte do nosso programa de isolamento e caracterização de princípios ativos naturais de plantas, foi recentemente implantada a

linha de pesquisa em biotecnologia, onde testes estão sendo realizados visando encontrar compostos neuroativos, úteis para o tratamento da doença de Alzheimer. Uma das terapias mais utilizadas envolve o uso de inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Embora os inibidores mais utilizados sejam os alcalóides, a resina e todos os constituintes químicos isolados de *P. heptaphyllum* foram testados. Destes, apenas a resina e a (-) catequina apresentaram inibição da acetilcolinesterase, nas concentrações de 0,5 mg/mL e 1,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os pontos de fusão (p.f.) foram determinados em equipamento Mettler com placa aquecedora, modelo FP52 e unidade de controle FP5. Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em pastilhas de KBr utilizando espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000. As rotações ópticas foram medidas em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 341. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Bruker ARX-500, usando-se CD_3OD ou CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro VG-Auto Spec da FISONS INSTRUMENT, operando a 70 eV. Nas cromatografias em coluna utilizou-se sílica gel 60S.

Material vegetal

As partes botânicas da espécie em estudo foram coletadas na chapada do Araripe (Crato-CE), em setembro e novembro de 1998. A identificação da espécie foi realizada por botânicos do Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, onde se encontra depositada a exsiccata sob o N° 28509.

Isolamento dos constituintes químicos

A seiva exsudada do caule (50 g), os frutos verdes (350 g) e os frutos maduros (500 g) foram submetidos ao processo de hidrodestilação, obtendo-se seus óleos essenciais nos teores de 11,0%, 3,0% e 1,5%, respectivamente. O decocto da resina foi evaporado sobre pressão reduzida obtendo-se 1,2 g de resíduo, enquanto os decoctos provenientes dos frutos verdes e maduros foram submetidos à partição utilizando AcOEt, para fornecer 0,8 g e 1,4 g de extratos, respectivamente. Do resíduo proveniente do decocto da resina foi isolado através de coluna cromatográfica em gel de sílica e por eluição com AcOEt/MeOH 4:1, o monoterpeno **1**. Da resina bruta foram obtidos os triterpenos α -amirina, β -amirina e breina. Os ex-

tratos AcOEt dos decoctos dos frutos verdes e maduros, após cromatografia em gel de sílica, forneceram os compostos (-) catequina e quercetina-3-*O*-ramnosil, respectivamente.

As folhas (1,2 kg) e caule (2 kg), após secos à temperatura ambiente e triturados, foram submetidos à extração com EtOH. A destilação das soluções sob pressão reduzida, forneceu 20 g de extrato das folhas e 24 g de extrato do caule. A cromatografia do extrato EtOH das folhas, em coluna aberta, utilizando-se gel de sílica e AcOEt como eluente, resultou no isolamento da quercetina. Do extrato EtOH do caule, seguindo-se o procedimento descrito acima, obteve-se a escopoletina.

p-Ment-3-eno-1,2,8-triol (**1**, 5,0 mg). p.f. 137-138 °C. $[\alpha]_D^{20} + 2^\circ$ (c 0,2 CH₃OH). IV(KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3293, 2976, 1458, 1366, 1135. EM (70eV) *m/z* (intensidade relativa) 186 (M⁺), 168 (4), 150 (5), 107 (34), 95 (100), 59 (46), 43 (65). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) e ¹³C (125 MHz, CD₃OD), Tabela 1.

Teste de inibição da AChE

A resina e os compostos isolados de *P. heptaphyllum*, foram individualmente dissolvidos em CHCl₃. Cada amostra foi diluída até um fator de 1 µg/mL e aplicada em placa cromatográfica de alumina (5.0 µL). A placa foi borrifada com a solução de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzólico] (reagente de Ellman, DTNB) e iodeto de acetilcolina (ACTI) 1 mM e, em seguida, com a enzima acetilcolinesterase (AChE) 3 U/mL. Após 10 min, observou-se as zonas onde houve inibição da enzima contrastando com a coloração amarela proveniente da reação da tiocolina com o reagente de Ellman. O teste, incluindo o preparo das soluções, foi realizado segundo metodologia desenvolvida por Rhee *et al.*²¹.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FUNCAP pelos financiamentos e bolsas que permitiram a realização deste trabalho, e ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnéti-

ca Nuclear (CENAUREM), Universidade Federal do Ceará, pela obtenção dos espectros.

REFERÊNCIAS

1. Pernet, R.; *Lloydia* **1972**, *35*, 280.
2. Lorenzi, H.; *Árvores Brasileiras*, Plantarum Ltda.: Piracicaba, 1972, p. 76.
3. Correia, M. P.; *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil*, 1984, vol. 1, p. 89.
4. Siani, A. C.; Ramos, M. F. S.; Lima, O. M.; Santos, R. R.; Ferreira, E. F.; Soares, R. O. A.; Rosas, E. C.; Susunaga, G. S.; Guimarães, A. C.; Zoghbi, M. G. B.; Henrique, M. G. M. O.; *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *66*, 57.
5. Siani, A. C.; Ramos, M. F. S.; Guimarães, A. C.; Susunaga, G. S.; Zoghbi, M. G. B.; *J. Essent. Oil Res.* **1999**, *11*, 72.
6. Zoghbi, M. G. B.; Maia, J. G. S.; Luz, A. I. R.; *J. Essent. Oil Res.* **1995**, *7*, 541.
7. Bandeira, P. N.; Machado, M. I. L.; Cavalcanti, F. S.; Lemos, T. L. G.; *J. Essent. Oil Res.* **2001**, *13*, 33.
8. Maia, R. M.; Barbosa, P. R.; Cruz, F. G.; Roque, N. F.; Fascio, M.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 623.
9. Ahmed, A.; Jakpovic, J.; Shiff El-Dint, A.; Melek, F. R.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1322.
10. Tan, X.; Jakpovic, J.; Bohlmann, F.; Jia, Z. J.; Huneck, S.; *Phytochemistry* **1991**, *2*, 583.
11. Dominguez, X. A.; Sanchez, H.; Slim, J.; Jakpovic, J.; Chau-Thi, T. V.; Bohlmann, T.; *Phytochemistry* **1998**, *27*, 613.
12. Wright, A. D.; König, G. M.; Sticher, O.; Nys, R.; *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5717.
13. Romeyke, Y.; Keller, M.; Keige, H.; Grabley, S.; Hammann, P.; *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3335.
14. Yahara, S.; Kato, K.; Nohara, K.; *Shoyakugaku Zasshi* **1990**, *44*, 331.
15. Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.
16. Tamai, M.; Watanabe, N.; Someya, M.; Kondoh, H.; Omura, S.; Ling, Z. P.; Chang, R.; Ming, C. W.; *Planta Med.* **1989**, *55*, 44.
17. Markham, K. R.; Ternai, B.; *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2607.
18. Wenkert, E.; Gottlieb, H. E.; *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1811.
19. Markham, K. R.; Ternai, B.; Stanley, R.; Geiger, H.; Mabry, T. J.; *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1389.
20. Pouchert, C. J.; Behnke, J.; *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT-NMR spectra*, 1 ed.; 1994, vol. 2, p. 326.
21. Rhee, I. K.; Van de Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *915*, 217.