

DITERPENOS, TRITERPENOS E ESTERÓIDES DAS FLORES DE *Wedelia paludosa*

Geizi Jane A. de Carvalho, Mário Geraldo de Carvalho

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23851-970 Seropédica - RJ

Dalva T. Ferreira, Terezinha de J. Faria

Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-970 Londrina - PR

Raimundo Braz-Filho

Setor de Química de Produtos Naturais, LCQUI-CCT, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 28015-620 Campos - RJ

Recebido em 4/11/99; aceito em 19/9/00

DITERPENES, TRITERPENES AND STEROIDS FROM FLOWERS OF *WEDELIA PALUDOSA*. Phytochemical investigation of the flowers of *Wedelia paludosa* afforded two diterpenes, *ent*-kaur-16-en-19-oic acid and *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid, three acylated triterpenes, 3 β -O-hexa-decanoylolean-12-en-28-oic acid, 3 β -O-pentadecanoylolean-12-en-28-oic acid and 3 β -O-tetradecanoylolean-12-en-28-oic acid, and three steroids, stigmasterol, 3 β -O- β -D-glycopyranosyl sitosterol and 3 β -O- β -D-glycopyranosylstigmasterol. The substances were identified by their spectral data.

Keywords: *Wedelia paludosa*; kaurenoic acids; 3 β -O-acyloleanoic acids.

INTRODUÇÃO

A família Asteraceae compreende cerca de 25.000 espécies distribuídas em aproximadamente 1.100 gêneros, sendo representada no Brasil por cerca 180 gêneros¹. Esta família aparece com um número relativamente grande de citações bibliográficas, envolvendo farmacognosia, fitoquímica e plantas medicinais².

As atividades farmacológicas reveladas pelos extratos ou substâncias isoladas de espécies do gênero *Wedelia* despertaram o interesse para estudo químico³.

A espécie *Wedelia paludosa* D. C., usada na medicina popular como expectorante e anticonvulsivo, foi estudada anteriormente após a verificação de atividade antibiótica revelada por testes preliminares envolvendo um extrato bruto das partes aéreas. O estudo químico desse extrato revelou a presença de sete ácidos caurenóicos, um labdano e uma *seco*-caurenolactona⁴. Recentemente, foi observada também atividade inseticida em ensaios com esta espécie e uma reinvestigação fitoquímica conduziu ao isolamento e caracterização de duas novas lactonas sesquiterpênicas⁵.

Este artigo descreve os resultados obtidos do estudo químico das flores de um espécimen de *Wedelia paludosa*. Identificaram-se dois ácidos caurenóicos (**1** e **2**), estigmasterol (**3**), glicosídeos de estigmasterol (**5**) e sitosterol (**6**) e três ésteres derivados do ácido oleanóico (**4a-4c**). As substâncias **2**, **4**, **5** e **6** estão sendo registradas pela primeira vez nesta espécie. Os dados de RMN ¹³C de **2** estão sendo registrados pela primeira vez na literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico do extrato etéreo das flores de *Wedelia paludosa* e a análise espectrométrica das frações permitiu a identificação de dois ácidos caurenóicos (**1** e **2**), estigmasterol (**3**), uma mistura de 3 β -O- β -D-glicopiranosil-sitosterol (**5**) e 3 β -O- β -D-glicopiranosil-stigmasterol (**6**) e uma mistura de três ésteres 3 β -O-acyloleanóicos (**4a**, **4b** e **4c**). Estas substâncias naturais foram identificadas através da análise dos dados espectrais de RMN e massas das frações contendo as substâncias naturais, dos derivados metilados (**1a** e **2a**) e acetilados (**5a** e **6a**) e comparação com dados registrados na literatura.

A análise comparativa dos espectros de RMN ¹³C-HBBD (Hydrogen Broad Band Decoupled) e RMN ¹³C-DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) de **1**

permitiu propor a fórmula parcial C₅(CH)₃(CH₂)₁₀(CH₃)₂. Os grupos ácido e vinila foram caracterizados pelos valores dos δ_C 185,0 (CO₂H), 155,5 (=C) e 103,0 (=CH₂) e pelos sinais de dois hidrogênios metilênicos de carbono sp² em δ_H 4,74 (sl) e 4,79 (sl) presentes no espectro de RMN de ¹H. Estas informações em conjunto e o pico em *m/z* 302 D ([M]⁺) revelado pelo espectro de massas e comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono (δ_C) e hidrogênio (δ_H) com valores descritos na literatura^{6,7} permitiram a identificação desta substância natural como ácido *ent*-caur-16-en-19-óico (**1**). Este diterpeno (**1**) foi isolado anteriormente desta espécie⁴.

A substância **2** foi reconhecida numa mistura com **1**. A análise do espectro de RMN ¹H da mistura de **1** e **2** revelou, além dos sinais do terpeno **1**, um sinal adicional na região de absorção de hidrogênios olefínicos (δ_H 5,25, t, H-11), com integração correspondendo a aproximadamente 50 % do valor da intensidade do singlete largo em δ_H 4,79 (H-17) de **1**. A análise comparativa dos espectros de RMN ¹³C (HBBD e DEPT, $\theta=135^\circ$ e $\theta=90^\circ$) permitiu reconhecer, além dos sinais dos carbonos de **1**, os sinais de uma ligação dupla trisubstituída [δ_C 138,0 (C-9) e 114,8 (CH-11)] e um sinal de grupo metila adicional (δ_C 23,8, CH₃-20).

O espectro de massas da mistura de **1** e **2** apresentou picos em *m/z* 302 (100) correspondente ao íon molecular de **1** e em *m/z* 300 (10) compatível com a presença do diterpeno **2** com estrutura semelhante a **1** contendo uma ligação dupla adicional.

A localização da ligação dupla trisubstituída entre os átomos de carbono C-9 e CH-11 foi confirmada pelo resultado de NOE (2 %) observado no sinal do hidrogênio H-11 (δ_H 5,25) com a irradiação na frequência dos hidrogênios metilícos 3H-20. Estas informações e a comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos de **2** com valores de modelos relatados na literatura⁷ foram usados para deduzir a estrutura do ácido *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (**2**) e atribuir pela primeira vez os deslocamentos químicos dos carbonos deste diterpeno. Esta substância foi também isolada de *Wedelia hispida*, *W. callycina*⁸, *W. hookeriana*⁹ e *W. buphthalmiflora*².

As estruturas dos esteróides **3**, **5** e **6** foram deduzidas através da análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C (HBBD e DEPT) de **3** e dos derivados acetilados **5a** e **6a**, envolvendo a comparação com valores divulgados na literatura para **3**^{10,11}, **5a** e **6a**^{11,12}.

A presença da unidade triterpênica pentacíclica em **4** foi reconhecida pelos deslocamentos químicos e multiplicidade dos

sinais de RMN ^{13}C (HBBD e DEPT), comparação com os valores do ácido oleanólico registrados na literatura¹³ e pelos deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios H-12 (δ_{H} 5,25, t, $J=3,6$ Hz), H-3 (δ_{H} 4,50, t, $J=8,8$ Hz) e H-18 (δ_{H} 2,80, dd, $J=9,6$ e $6,8$ Hz) presentes no espectro de RMN de ^1H . Os picos em m/z 439 (55, **4d**), 248 (48, **4e**), 203 (48, **4f**) e 191 (100, **4g**) observados no espectro de massas de **4** revelaram-se em acordo com a presença desta unidade. Os valores dos deslocamentos químicos do H-3 (δ_{H} 4,50, t, $J=8,8$ Hz) e CH-3 (δ_{C} 80,5) permitiram postular a presença de uma função ester no átomo de carbono CH-3.

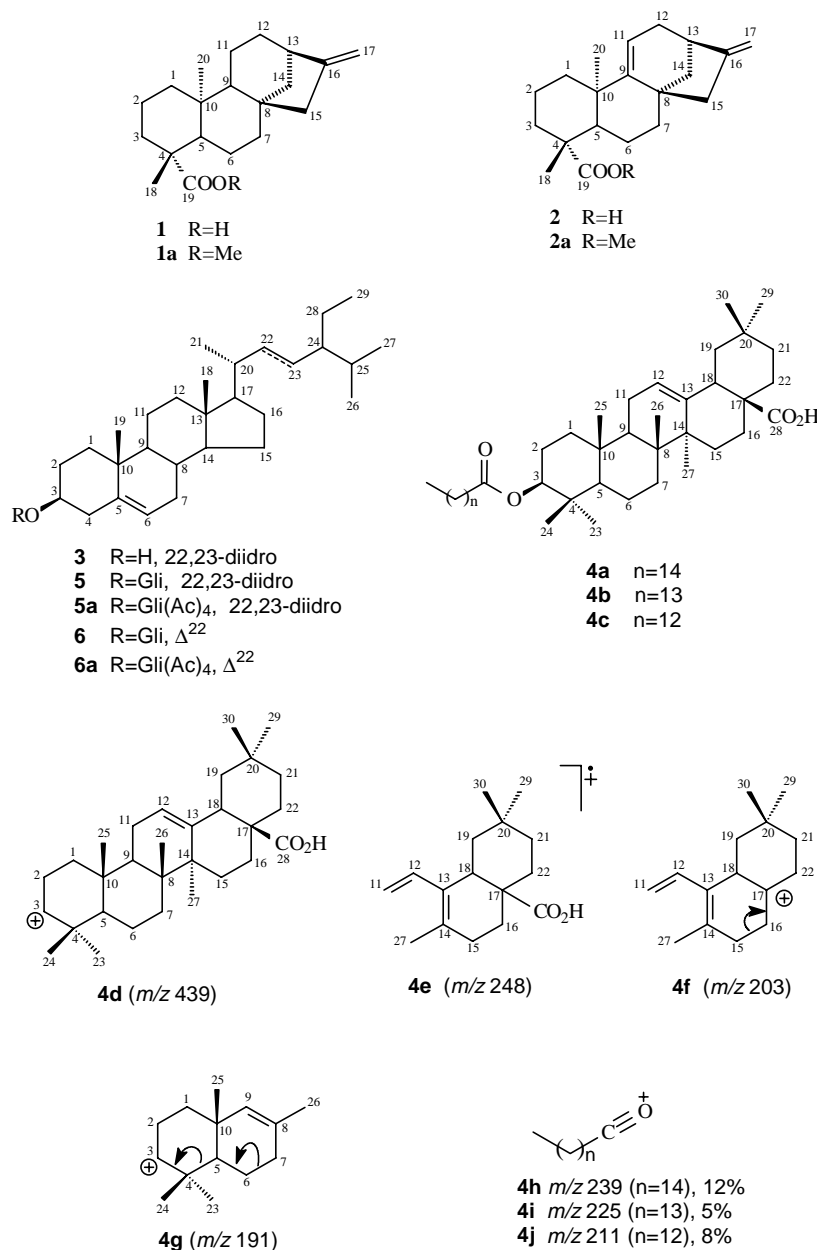
Os sinais adicionais presentes nos espectros de RMN ^{13}C e RMN ^1H foram correlacionados com unidade acila: δ_{C} 173,7 (C-1'), 34,8 (CH₂-2'), 31,9 [CH₂-(n-3)], 29,1[(CH₂)_n], 22,5 [CH₂-(n-2)] e 14,1 (CH₃-n); δ_{H} 2,30 (t, $J=6,0$ Hz, H-2'), 1,24 [m, (CH₂)_n] e 1,00 (t, $J=$ Hz, CH₃).

Além dos picos atribuídos aos fragmentos **4d** (55), **4e** (48), **4f** (48) e **4g** (100), o espectro de massas revelou picos em m/z 694 (10, **4a**), 680 (6, **4b**) e 666 (7, **4c**), que foram correlacionados com os íons moleculares dos três ésteres (**4a** + **4b** + **4c**) presentes na mistura. A relação $M^+ - 498$ [15 (CH₃) + 44

(O=C-O) + 439 (**4d**)] = 14n permitiu deduzir o número de CH₂ de cada unidade acila: **4a** (n=14), **4b** (n=13) e **4c** (n=12). Esta dedução foi confirmada pelos picos em m/z 239 (12), 225 (5) e 211 (8), atribuídos aos íons acílio **4h**, **4i** e **4j**, respectivamente. Assim, as estruturas dos ácidos 3 β -O-hexadecanoilolean-12-en-28-óico (**4a**), 3 β -O-pentadecanoilolean-12-en-28-óico (**4b**) e 3 β -O-tetradecanoilolean-12-en-28-óico (**4c**) foram deduzidas. Estes ésteres encontram-se registrados na literatura^{10,11}.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais. Os pontos de fusão (p. f.) foram determinados em placa de Kofler e não foram corrigidos. Os espectros na região de infra-vermelho (IV) foram obtidos em pastilha de KBr em um espectrômetro Perkin-Elmer 1420. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram registrados em um aparelho Bruker AC 200 (^1H : 200 MHz; ^{13}C : 50.3 MHz) e Varian UN 400 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz), usando-se CDCl₃ como solvente e TMS como referência interna. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons em espectrômetro VG QUATTRO.



Para cromatografia em coluna e camada delgada usou-se sílica gel marca Merck.

Material Vegetal. Um espécime de *Wedelia paludosa* D.C. foi coletado no mês de outubro de 1990, nas proximidades do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina, Paraná, e identificado pela Professora Dra. Ana Odete de Santos Vieira, Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina.

Isolamentos dos constituintes químicos. As flores de *Wedelia paludosa* D.C. foram submetidas a secagem em estufa a 60°C, convertida a pó (332,7 g) e extraídas à temperatura ambiente com etanol. A destilação do etanol foi feita sob pressão reduzida e forneceu 131 g de resíduo. Este resíduo foi submetido à processo de partição com MeOH, H₂O e éter de petróleo (700 mL MeOH:90 mL H₂O:1000 mL de éter de petróleo). O extrato éter de petróleo foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se como eluente hexano/CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH em gradiente de polaridade, fornecendo 221 frações (250 mL cada) que foram reunidas em grupos após análise por cromatografia em camada delgada de sílica. O grupo **VIII** (frações 103-132) forneceu a substância **1** (723 mg, p. f. 181-182°C) e a mistura das substâncias **1** e **2** (300 mg, p. f. 181-185°C); o grupo **IX** (frações 133-142) forneceu a substância **3** (193 mg, p. f. 175-178°C); o grupo **VII** (frações 90-102) foi submetido a cromatografia em camada delgada preparativa, obtendo-se uma mistura dos ésteres **4a**, **4b** e **4c** (120 mg); e o grupo **XVI** (frações 208-212) forneceu a mistura das substâncias **5** e **6** (43,5 mg).

Ácido caur-16-en-19-óico (1). Cristais brancos, p. f. 181-182°C; $[\alpha]_D^{25}$ -94,8 (CHCl₃, 2,5). Os dados de RMN ¹³C (50,3 MHz, CDCl₃) e RMN de ¹H (200 MHz CDCl₃) revelaram-se em acordo com os valores descritos na literatura^{6,7}. Esta substância (100 mg) foi submetida a metilação com diazometano em éter etílico (3 mL), fornecendo o derivado metilado **1a** (100 mg). Dados de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) revelaram-se semelhantes aos valores de **1**, contendo sinal adicional do grupo metoxila em δ_H 3,56 (s, OMe).

Ácido caur-9(11),16-dien-19-óico (2). A análise dos espectros de RMN e massas da mistura de **1** e **2** permitiu reconhecer os dados de **1** e deduzir os valores correspondentes a **2**. δ_H (200 MHz, CDCl₃) e em acordo com valores relatados na literatura⁸. RMN ¹³C δ_C (50,3 MHz, CDCl₃): 41,0 (CH₂-1), 19,0 (CH₂-2), 37,7 (CH₂-3), 43,9(C-4), 57,0 (CH-5), 21,8 (CH₂-6), 41,2 (CH₂-7), 44,2 (C-8), 138,0 (C-9), 38,8 (C-10), 114,8 (CH-11), 33,1 (CH₂-12), 43,8 (CH-13), 39,6 (CH₂-14), 49,0 (CH₂-15), 156,0 (C-16), 105,5 (CH₂-17), 28,3 (CH₃-18), 185,0 (C-19), 23,8 (CH₃-20). Esta mistura (50 mg) foi metilada com diazometano em éter etílico (1,5 mL), fornecendo os derivados metilados **1a** e **2a**. O espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) revelou-se semelhante ao de **1** + **2**, contendo os sinais adicionais em δ_H 3,65 (s, OMe), e 3,64 (s, OMe).

Stigmasterol (3). Cristais brancos, p. f. 175-178°C. Os dados de RMN ¹³C e RMN ¹H revelaram-se em acordo com valores relatados na literatura^{10,11}.

Mistura dos Ácidos 3 β -O-hexadecanoilolean-12-en-28-óico (**4a**), 3 β -O-pentadecanoilolean-12-en-28-óico (**4b**) e 3 β -O-tetradecanoilolean-12-en-28-óico (**4c**). Óleo amarelo. Estes revelaram-se em acordo com dados descritos na literatura^{8,9}.

Tetra-O-acetil-3-O- β -D-glicopiranosilstosterol (5a) e **tetra-O-acetil-3-O- β -D-glicopi-ranosilestigmasterol (6a)**. A mistura de **5** + **6** (150 mg) foi submetida a acetilação com anidrido acético (6 mL) e piridina (6 mL). Após o repouso durante 24 horas à temperatura ambiente e extração do produto acetilado com CHCl₃ obteve-se a mistura dos derivados **5a** e **6a**. Os dados espectrais de RMN ¹³C e RMN ¹H revelaram-se semelhantes aos valores relatados na literatura^{9,12}.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelos auxílios e bolsas concedidas. Agradecemos também à Professora Ana Odete de Santos Vieira, Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, pela identificação da planta.

REFERÊNCIAS

- Barroso, G. M.; *Sistemática de Angiosperma do Brasil*, 2^a, Ed. UFV -MG, 1986.
- Miles, D. H.; Chittawong, V.; Payne, A. M.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1591.
- Bruneton, J.; *Pharmacology, Phytochemistry, Medicinal Plants*, 2nd Ed., Lavoisier, N. Y., USA, Intercept Ltd, Adover, England, UK, 1995.
- Roque, N. F.; Giannella, T. L.; Giesbrecht, A. M.; Barbosa, R. C. C. B. C.; *Rev. Latinoam. Quim.* **1987**, *18*, 110.
- Ferreira, D. T.; Levorato, A. R.; Faria, T. J.; Carvalho, M. G. de; Braz-Filho, R.; *Nat. Prod. Lett.* **1994**, *4*, 1.
- Hasan, C. M.; Healey, T. M.; Waterman, P. G.; *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1365.
- Atta-ur-Rahman and Ahmad, V. U., *¹³C NMR of Natural Products*, Vol 2, Premium Press, N. Y., 1992.
- Herz, W.; Kulanthavel, P.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2271.
- Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R. M.; Robinson, H.; *Phytochemistry* **1982**, *9*, 2329.
- Kojima, H.; Sato, N.; Hatano, A.; Ogura, H.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2351.
- Goulart, M. O. F.; Sant'ana, A. E. G.; Lima, R. A.; Cavalcante, S. H.; Carvalho, M. G. de; Braz-Filho, R.; *Quim. Nova* **1993**, *16*, 95.
- Akihisa, T.; Ghosh, P.; Thakur, S.; Oshikiri, S.; Tamura, T.; Matsumoto, T.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 241.
- Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.