

TRITERPENÓIDES PENTACÍCLICOS DE *MENTHA VILLOSA*: IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL E ATRIBUIÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS ÁTOMOS DE HIDROGÊNIO E CARBONO**Francisco J. Queiroz Monte, Eliete F. de Oliveira**

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CP 12200, 60021-970 Fortaleza – CE

Raimundo Braz Filho

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

Recebido em 5/6/00; aceito em 10/10/00

PENTACYCLIC TRITERPENOIDS OF *MENTHA VILLOSA*: STRUCTURAL IDENTIFICATION AND ^1H AND ^{13}C RESONANCE ASSIGNMENTS. The structures of seven oleanene and ursene triterpenoids (1-7) isolated from aerial parts of *Mentha villosa* were identified. In addition, the complete ^1H and ^{13}C resonance assignments of these triterpenoids were accomplished using 1D and 2D NMR spectroscopic experiments.

Keywords: *Mentha villosa*; Labiatae; pentacyclic triterpenoids; 1D and 2D NMR.

INTRODUÇÃO

Várias espécies de *Mentha* têm sido investigadas, tanto por suas atividades biológicas¹⁻⁶ como também pelos óleos essenciais^{5,7-10} produzidos por suas folhas. O gênero *Mentha* L., família Labiatae, da subfamília Nepetoideae e da tribo Menthae, consiste aproximadamente de vinte e cinco espécies. A espécie *Mentha villosa*¹¹ é uma erva cultivada em todo o Brasil e é usada como remédio popular no tratamento de amebíase, giardíase³ e shistosomíase².

Este trabalho descreve o isolamento, purificação e identificação estrutural de sete triterpenóides (1-7) das séries oleanano e ursano, isolados do extrato etanólico das partes aéreas de *M. villosa*. A identificação foi estabelecida com base na interpretação de dados espectrais, principalmente RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz). Experiências 1D e 2D de RMN ^1H , RMN ^{13}C e NOESY foram também usados para a completa e inequívoca atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. Estes metabólitos estão sendo descritos pela primeira vez na espécie *M. villosa*.

Várias atividades biológicas para este tipo de compostos foram relatadas¹² nas duas últimas décadas, inclusive algumas delas determinando a relação entre estrutura química e atividade anti-câncer¹³⁻¹⁹. Os dados espectrais corretos podem ser utilizados em posteriores investigações de novos membros desta importante classe de produtos naturais, assim como na compreensão das correlações entre conformação molecular e atividade biológica^{20,21}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resíduo obtido após concentração da parte solúvel em CHCl_3 do extrato etanólico das partes aéreas de *M. villosa* forneceu após sucessivos fracionamentos cromatográficos em colunas de sílica gel, quatro frações denominadas A, B, D e E. Estas foram identificadas como misturas de ácidos carboxílicos triterpênicos através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), infravermelho (IV) e espectrometria de massa (EM). As frações A, B e D foram metiladas e acetiladas e os respectivos ésteres metílicos acetilados (A-MeAc, B-MeAc e D-MeAc) submetidos a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) seguida de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), permitindo a separação dos triterpenos 1 - 7. Todos os derivados apresentaram-se como sólidos amorfos incolores e tiveram as

fórmulas moleculares determinadas por espectrometria de massa em combinação com os espectros de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz).

Os sinais correspondentes aos átomos de carbono quaternário, metínico, metilênico e metílico (Tabelas 1-6) de todos os triterpenóides isolados (1-7) foram identificados por análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -HBB (Hydrogen Broad Band Decoupled) e RMN ^{13}C -DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer). A atribuição dos sinais dos átomos de carbono nos espectros de RMN ^{13}C foi efetuada com base nos espectros bidimensionais [2D: $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3), $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -COSY e $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY]. A atribuição dos sinais dos átomos de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H por sua vez, foi conseguida pela utilização dos espectros de $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -COSY e $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC (Tabelas 1-6).

Nos espectros de RMN ^1H de 1 e 3 observou-se os sinais do H-18 como dupletos de dupletos [J = 12,0 e 3,6 Hz (1) e J = 12,0 e 3,4 Hz (3)] em δ_{H} 2,85 e 2,86, enquanto em 2 e 4 apareceram como dupletos [J = 12,0 Hz (2) e J = 10,4 Hz (4)] centrados em δ_{H} 2,22 e 2,24, respectivamente. Estes dados associados aos demais, caracterizaram os triterpenóides 1 e 3 como oleananos e 2 e 4 como ursanos (J = 12,0 e 10,4 Hz são correspondentes a interação axial-axial, H-18 β axial).

Os triterpenos 1 e 2 revelaram espectros de massa semelhantes, compatíveis com mesma composição elementar (m/z 512 [M] $^+$, $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{O}_4$) e exibindo picos intensos em m/z 262 e 203 comumente observados em olean-12-en-28-ato de metila e ursa-12-en-28-ato de metila sem substituintes nos anéis C, D e E, atribuídos a fragmentos formados através de reação do tipo retro Diels-Alder envolvendo o anel C^{22,23}.

Um exemplo da estratégia aplicada de modo geral para os triterpenos 1-7 e que permitiu identificar facilmente os átomos de carbono não hidrogenados (exceção do C-17) além de vários carbonos hidrogenados, é ilustrado através do composto 1, onde estão indicadas as correlações a longa distância ($^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$) entre os deslocamentos químicos dos hidrogênios metílicos (δ_{H}) e os carbonos (δ_{C}) marcados α e β em relação a estes hidrogênios (Figura 1). Utilizando-se o mesmo procedimento, os espectros de RMN ^{13}C -HBB, ^{13}C -DEPT, HMBC, HMQC, COSY e NOESY forneceram os deslocamentos químicos de 2 - 7 (Tabelas 2 - 6).

Os compostos 3 e 4 revelaram espectros de massa com pico correspondente ao íon molecular em m/z 570 ([M] $^+$), em acordo com a mesma fórmula molecular $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{O}_6$ para as duas substâncias e compatível com a presença de um grupo acetoxílico

Tabela 1. Dados de RMN¹³C (125 MHz) e ¹H (500 MHz) (CDCl₃) de 3β-O-acetilolean-12-en-28-ato de metila (**1**)*.

C	¹ H x ¹³ C-HMQC (¹ J _{CH})		¹ H x ¹ H-COSY	¹ H x ¹³ C-HMBC	
	δ _C	δ _H		² J _{CH}	³ J _{CH}
4	37,80	—	—	3H-23, 3H-24	
8	39,20	—	—	3H-26	
10	36,80	—	—	3H-25	
13	143,70	—	—		3H-27
14	41,80	—	—	3H-27	3H-26
17	46,50	—	—		
20	30,70	—	—		3H-29, 3H30
28	178,10	—	—		<u>MeO</u> -28
AcO-3	171,10	—	—	<u>MeCO</u> ₂ -3	H-3
CH					
3	80,90	4,49 (dd, J=10,5 , 5,0 Hz, H-3α)	H-2, H-2'		3H-23, 2H-24
5	55,30	0,86 (H-5α)	H-6		3H-23, 3H-24, 3H-25
9	47,50	1,54 (H-9α)			3H-25, 3H-26
12	122,30	5,28 (t, J= 4,0 Hz)	2H-11		
18	41,30	2,85 (dd, J=12,0, 3,6Hz, H-18β)	H-19, H-19'	H-19, H-19'	
CH₂					
1	38,10	1,61 1,06			3H-25
2	23,20	1,61 1,04	H-3		
6	18,20	1,51			
		1,37	H-5		
7	32,80	1,44 1,32			3H-26
11	23,30	1,88 (2H-11)	H-9, H-12		
15	27,70	1,62	H-16		
		1,07	H-16, H-16'		3H-27
16	23,50	1,97	H-15, H-15'	H-15, H-15'	
		1,61	H-15		
19	45,90	1,65 1,13	H-18		3H-29, 3H-30
21	33,80	1,34 1,17	H-22		3H-29, 3H-30
22	32,40	1,68	H-21, H-21'		
		1,57			
CH₃					
23	28,10	0,86			H-3, 2H-24
24	16,70	0,85			H-3, 3H-23
25	15,40	0,93			H-1, H-9
26	16,80	0,72			H-9
27	25,90	1,12			H-15, H-15'
29	33,10	0,92			3H-30
30	23,70	0,89			3H-29
AcO-3	21,30	2,04			
MeO-28	51,50	3,62			

* A multiplicidade dos sinais dos átomos de carbono foi deduzida pela análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³C-HBBD e DEPT. Os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio foram obtidos do espectro 1D de RMN ¹H . Os espectros 2D ¹Hx¹³C-COSY e ¹Hx¹³C-HMQC também foram usados nestas correlações.

Tabela 2. Dados de RMN¹³C (125 MHz) e ¹H (500 MHz) (CDCl₃) de 3β-O-acetilursa-12-en-28-ato de metila (**2**)*.

C	¹ H x ¹³ C-HMQC (¹ J _{CH})		¹ H x ¹ H-COSY	¹ H x ¹³ C-HMBC	
	δ _C	δ _H		² J _{CH}	³ J _{CH}
4	37,80	—	—	H-3, 3H-23, 3H-24	
8	39,50	—	—	3H-26	3H-11,3H-27
10	36,70	—	—	H-9, 3H-25	2H-11
13	138,30	—	—	H-12, H-18	2H-11, 3H-27
14	42,00	—	—	H-12, 3H-27	H-9, H-18, 3H-26
17	48,00	—	—	H-18, H-22	
28	178,00	—	—	H-16, H-18, H-22, MeO-28	
AcO-3	171,00	—	—	<u>Me</u> CO ₂ -3	H-3
CH					
3	80,90	4,49 (dd, J=11, 0, 5,5 Hz, H-3α)	H-2, H-2'	H-2	H-1, 3H-23, 2H-24
5	55,30	0,83 (H-5α)	H-6, H-6'		H-1, H-9, 3H-23, 3H-24, 3H-25
9	47,50	1,51 (d, J=8,8 Hz, H-9α)	2H-11	2H-11	H-12, 3H-25, 3H-26
12	125,50	5,23 (t, J=3,6 Hz)	2H-11, H-18	2H-11	H-18
18	52,90	2,22 (d, J=12,0 Hz, H-18β)	H-12, H-16β**, H-19	H-19	H-12, 3H-29
19	39,10	1,32	H-18, H-20	H-18, 3H-29	3H-30
20	38,90	0,98	H-19	3H-30	H-18, 3H-29
CH₂					
1	38,30	1,61, 1,08	H-2		3H-25
2	23,60	1,62, 1,07	H-1, H-3	H-1, H-3	
6	18,20	1,51, 1,36	H-5	H-5	
7	32,90	1,48 (H-7α) 1,32 (H-7β)			3H-26
11	23,30	1,91 (dd, J= 8,8, 3,6 Hz)	H-9, H-12	H-9, H-12	
15	28,00	1,76 (dt, J=12,0, 4,2 Hz), 1,07	H-16, H-16'		3H-27
16	24,20	2,00 (dt, J=12,0, 4,5 Hz, H-16α) 1,66 (H-16β)	H-15, H-15' H-15, H-15', H-18**		H-18, H-22
21	30,70	1,47, 1,28	H-22, H-22'	H-22	3H-30
22	36,70	1,66 (H-22α) 1,58 (dt, J= 12,0, 4,5 Hz, H-22-β)	H-21, H-21' H-21, H-21'		
CH₃					
23	28,10	0,85			H-3, 3H-24
24	16,90	0,84			H-3, H-5, 3H-23
25	15,50	0,93			H-1, H-5, H-9
26	15,50	0,74	H-7α**		H-7, H-9
27	23,60	1,06			
29	17,00	0,85 (d, J=6,4 Hz)		H-19	H-18
30	21,20	0,93 (d, J=6,0 Hz)			H-19
AcO-3	21,30	2,04			
MeO-28	51,50	3,60			

* A multiplicidade dos sinais dos átomos de carbono foi deduzida pela análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³C-HBBD e DEPT. Os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio foram obtidos do espectro 1D de RMN ¹H. Os espectros 2D ¹Hx¹H-COSY e ¹Hx¹³C-HMQC também foram usados nestas correlações; ** Acoplamento a longa distância em W (⁴J_{HH}).

Tabela 3. Dados de RMN¹³C (125 MHz) e ¹H (500 MHz) (CDCl₃) de 2 α ,3 α -di-O-acetilolean-12-en-28-ato de metila (**3**)*.

C	¹ H x ¹³ C-HMQC (¹ J _{CH})		¹ H x ¹ H-COSY	¹ H x ¹³ C-HMBC	
	δ_c	δ_H		² J _{CH}	³ J _{CH}
4	38,00	—	—	H-3	
8	39,60	—	—	3H-27	
10	38,40	—	—	H-1, H-1'	
13	143,60	—	—	H-18	3H-27
14	41,80	—	—	3H-27	H-12, H-15, H-18, 3H-26
17	47,00	—	—	H-18	
20	30,60	—	—	H-19	
28	178,00	—	—		H-18
AcO-2	170,20	—	—	MeCO ₂ -2	H-2
AcO-3	170,50	—	—	MeCO ₂ -3	H-3
CH					
2	68,00	5,23 (td, J \approx 10,5 , 4,8 Hz, H-2 β)	H-1, H-1', H-3	H-1, H-1', H-3	3
3	77,00	4,96 (d, J \approx 4,8 Hz, H-3 β)	H-2	H-2	H-1, H-1', 3H-23, 2H-24
5	49,50	1,15 (H-5 α)	H-6, H-6'		H-1, H-3
9	47,00	1,72 (H-9 α)	2H-11		H-12, 3H-27
12	122,50	5,28 (t, J=4,0 Hz)	2H-11		H-18
18	40,50	2,86 (dd, J=12,0 , 3,4 Hz, H-18 β)	H-19, H-19'		H-22.
CH₂					
1	38,20	1,62 1,33	H-2		H-3
6	17,20	1,44, 1,34	H-5		
7	32,20	1,48, 1,28			3H-26
11	23,00	1,90 (2H-11)	H-9	H-9	
15	27,50	1,62 1,06	H-16		3H-27
16	22,60	1,95 1,60	H-16, H-16' H-15	H-15	H-18
19	45,50	1,62 1,13	H-18		
21	33,30	1,33 1,18	H-22, H-22'	H-22	
22	32,00	1,70 1,51	H-21, H-21'	H-21	
CH₃					
23	27,20	0,87			H-3
24	21,00	0,98			H-3
25	15,80	1,02			
26	16,50	0,72			H-9
27	25,80	1,17			
29	33,00	0,89			H-19
30	23,00	0,92			3H-29
AcO-2	21,00	2,11			
AcO-3	21,00	1,95			
MeO-28	51,30	3,61			

* A multiplicidade dos sinais dos átomos de carbono foi deduzida pela análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³C-HBBD e DEPT. Os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio foram obtidos do espectro 1D de RMN ¹H . Os espectros 2D ¹Hx¹H-COSY e ¹Hx¹³C-HMQC também foram usados nestas correlações.

Tabela 4. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) (CDCl_3) de 3 β ,24-di-O-acetilursa-12-en-28-ato de metila (**4**)*.

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC ($^1J_{\text{CH}}$)		$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}		$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
4	41,06	—	—	H-3, 3H-23, 3H-24	
8	39,46	—	—	H-9, 3H-26	3H-27
10	36,80	—	—	H-9, 3H-25	
13	138,17	—	—	H-18	3H-27
14	41,78	—	—	3H-27	H-9, H-12, 3H-26
17	48,09	—	—	H-18	H-16, H-22, H-22'
28	178,70	—	—		H-16, H-18, H-22, MeO-28
AcO-3	171,23	—	—	MeCO ₂ -3	H-3
AcO-24	171,59	—	—	MeCO ₂ -24	H-24, H-24'
CH					
3	80,21	4,58 (dd, J=10,4 , 5,2 Hz, H-3 α)	H-2, H-2'		3H-23, H-24, H-24'
5	56,01	0,97 (H-5 α)	H-6		H-7, H-9, 3H-23, H-24, H-24', 3H-25
9	47,65	1,54 (H-9 α)	2H-11		H-12, 3H-25, 3H-26
12	125,34	5,25 (t, J=4,3 Hz)	2H-11	2H-11	H-18
18	52,90	2,24 (d, J=10,4 Hz, H-18 β)	H-19		H-12, 3H-29
19	39,10	1,35	H-18, H-20	3H-29	3H-30
20	38,89	0,95	H-19	3H-30	3H-29
CH₂					
1	38,51	1,71 , 1,10			H-9, 3H-25
2	23,59	1,72 , 1,66	H-3		
6	19,33	1,67	H-7		
		1,44	H-5		
7	33,37	1,46			3H-26
		1,33	H-6, H-6'		
11	23,44	1,90 (2H-11)	H-9, H-12	H-9, H-12	
15	28,03	1,75 , 1,07	H-16		3H-27
16	24,23	2,00 , 1,67	H-15		H-18, H-22
21	30,67	1,50			
		1,25	H-22		3H-30
22	36,65	1,70			
		1,53	H-21		
24	65,52	4,38 (d, J=10.4 Hz, H-24')			
		4,12 (d, J=10.4 Hz, H-24)	H-24		H-3, 3H-23
			H-24'		H-3, 3H-23
CH₃					
23	22,59	1,01			H-3, 3H-24
25	15,40	0,95			H-9
26	16,74	0,73			H-9
27	23,53	1,07			
29	17,04	0,86 (d, J=6,8 Hz)			
30	21,19	0,94 (d, J=6,8 Hz)			
AcO-3	21,19	2,04			
AcO-24	21,13	2,07			
MeO-28	51,46	3,60			

* A multiplicidade dos sinais dos átomos de carbono foi deduzida pela análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C -HBBDD e DEPT. Os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio foram obtidos do espectro 1D de RMN ^1H . Os espectros 2D $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY e $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC também foram usados nestas correlações.

Tabela 5. Dados de RMN¹³C (125 MHz) e ¹H (500 MHz) (CDCl₃) de 2α,3β-di-O-acetilursa-12,18-dien-28-ato de metila (**5**)*.

C	¹ H x ¹³ C-HMQC (¹ J _{CH})		¹ H x ¹ H-COSY	¹ H x ¹³ C-HMBC	
	δ _C	δ _H		² J _{CH}	³ J _{CH}
4	39,40	—	—	H-3, 3H-23, 3H-24	
8	39,00	—	—	3H-26	2H-11, 3H-27
10	38,10	—	—	H-1, 3H-25	
13	138,72	—	—		3H-27
14	44,65	—	—	3H-27	3H-26
17	49,48	—	—		
18	132,78	—	—		3H-29
19	136,09	—	—	3H-29	3H-30
28	177,92	—	—		MeO-28
AcO-2	171,23	—	—	<u>MeCO</u> ₂ -2	
AcO-3	171,59	—	—	<u>MeCO</u> ₂ -3	
CH					
2	70,17	5,13 (dt, J=10,5 , 10,5 , 4.3 Hz, H-2β)		H-3	H-1
3	80,65	4,76 (d, J=10,5 Hz, H-3α)		H-2	H-1, 3H-24
5	55,10	0,99 (H-5α)		H-6	H-1
9	47,77	1,48 (H-9α)		2H-11	3H-25, 3H-26
12	125,4	5,36		2H-11	
20	34,30	2,19		H-21, H-21', 3H-30	3H-29
CH₂					
1	44,55	2,13 , 1,12			H-9, 3H-25
6	18,20	1,55 , 1,38		H-5	
7	34,39	1,55 , 1,45			3H-26
11	23,30	1,93		H-9, H-12	
15	28,50	1,72		H-16, H-16'	3H-27
		1,13		H-16	
16	34,95	2,20		H-15, H-15'	
		1,35		H-15	
21	26,55	1,71 , 1,34		H-20	3H-30
22	31,15	1,80			
		1,58			
CH₃					
23	28,54	0,90		3H-24	H-3
24	17,75	0,91		3H-23	H-3
25	17,23	1,11			
26	17,82	0,86			
27	21,76	0,96			
29	19,32	1,70			
30	18,69	1,05 (d, J=7,0 Hz)		H-20	
AcO-2	21,17	1,97			
AcO-3	20,96	2,05			
MeO-28	51,67	3,60			

*A multiplicidade dos sinais dos átomos de carbono foi deduzida pela análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³C-HBBD e DEPT. Os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio foram obtidos do espectro 1D de RMN ¹H . Os espectros 2D ¹Hx¹H-COSY e ¹Hx¹³C-HMQC também foram usados nestas correlações.

Tabela 6. Dados de RMN¹³C (125 MHz) e ¹H (500 MHz) (CDCl₃) de 3β-O-acetil-19α-hidroxiursa-12-en-28-ato de metila (**6**)* e de 2α,3α-di-O-acetilursa-12,18-dien-28-ato de metila (**7**)*.

6			7		
¹ H x ¹³ C-HMQC (¹ J _{CH})			¹ H x ¹³ C-HMBC		
C	δ _C	δ _H		² J _{CH}	³ J _{CH}
4	37,70	—	4	38,25	—
8	39,95	—	8	39,20	—
10	36,90	—	10	38,45	—
13	138,15	—	13	138,50	—
14	41,15	—	14	44,75	—
17	47,90	—	17	49,54	—
19	73,20	—	18	132,74	—
28	178,35	—	19	135,80	—
AcO-3	171,05	—	28	176,70	—
AcO-2	170,18	—			
AcO-3	170,38	—			
CH			CH		
3	81,00	4,48 (H-3a)	2	68,30	2,26 (H-2b)
5	55,25	0,85 (H-5a)	3	77,10	4,97 (H-3b)
9	47,15	1,60 (H-9a)	5	49,88	1,09 (H-5a)
12	129,15	5,35	9	47,75	1,56 (H-9a)
18	53,20	2,59 (H-18b)	12	125,25	5,37
20	41,15	1,40	20	34,40	2,20
CH₂			CH₂		
1	38,15	1,61 , 1,07	1	39,58	1,75 , 1,40
2	23,70	1,60 , 1,10	6	17,95	1,42 , 1,32
6	18,30	1,52 , 1,38	7	34,40	1,54 , 1,46
7	32,70	1,73 , 1,50	11	23,30	1,96 (2H-11)
11	23,55	1,96 (2H-11)	15	28,65	1,78 , 1,15
15	28,20	1,60 , 1,00	16	35,10	2,20 , 1,40
16	25,45	2,50 , 1,58	21	26,65	1,75 , 1,32
21	26,05	1,68 , 1,25	22	31,25	1,80 , 1,60
22	37,45	1,72 , 1,55			
CH₃			CH₃		
23	28,05	0,87	23	27,93	0,89
24	16,70	0,86	24	21,85	0,99
25	15,30	0,94	25	17,10	1,10
26	16,65	0,68	26	17,95	0,87
27	24,50	1,24	27	22,10	1,00
29	27,50	1,20	29	19,45	1,72
30	16,15	0,96	30	18,85	1,07
AcO-3	21,35	2,05	AcO-2	21,15	2,12
MeO-28	51,60	3,60	AcO-3	21,23	1,96
MeO-28	51,68	3,61			

* A multiplicidade dos sinais dos átomos de carbono foi deduzida pela análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³C-HBBD e DEPT. Os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio foram obtidos do espectro 1D de RMN ¹H. Os espectros 2D ¹Hx¹H-COSY e ¹Hx¹³C-HMQC também foram usados nestas correlações.

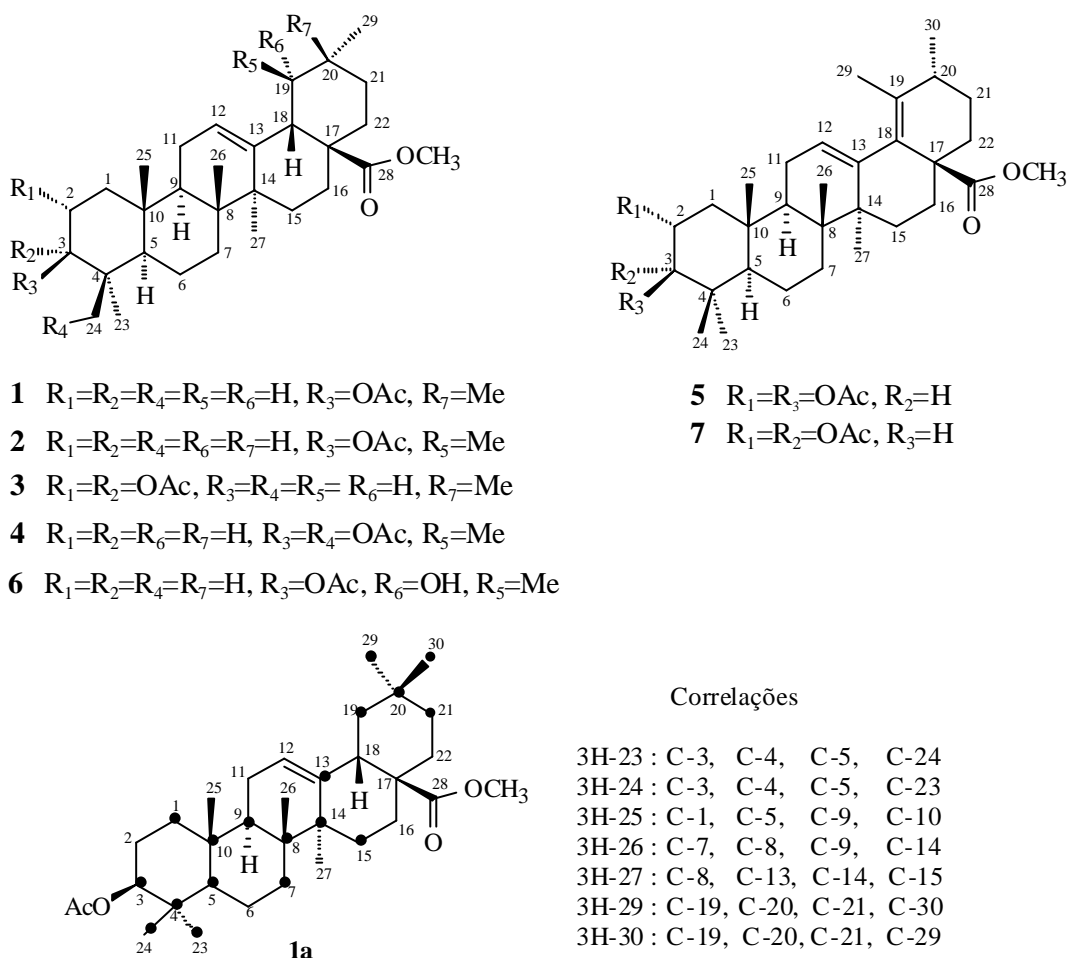


Figura 1. Correlações a longa distancia ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$) entre os hidrogênios metílicos e os respectivos carbonos **a** e **b**

adicional quando comparados com **1** e **2**. Os sinais em δ_H 2,11 e 1,95 (**3**) e d_H 2,04 e 2,07 (**4**) observados nos espectros de RMN 1H foram usados para confirmar esta dedução. No espectro de RMN ^{13}C de **3**, o deslocamento químico do CH-5 (δ_C 49,5) revelou-se consistente com a configuração 3α -OAc (efeito γ sobre o CH-5) e, consequentemente, H- 3β . Assim, o dubleto ($J = 4,8$ Hz) em d_H 4,96 corresponde a H-3 em posição equatorial. A localização do segundo grupo acetoxílico em posição α do C-2 foi deduzida com base no espectro 2D NOESY. Picos transversais de correlação do sinal em δ_H 5,23 (td, $J = 10,5$ e 4,8 Hz) atribuído a H- 2β mostrou sua proximidade espacial para com H- 3β (δ_H 4,96), 3H-24 (δ_H 0,98) e 3H-25 (δ_H 1,02). O valor de $J = 10,5$ Hz observado no sinal de H- 2β (δ_H 5,23) confirmou interação axial-axial deste hidrogênio com o H-1 do grupo metilênico CH_2 -1 ocupando também posição axial. Por outro lado, o sinal atribuído a H- 3β (δ_H 4,96) exibiu um efeito Overhauser com 3H-23 (δ_H 0,87) e 3H-24 (δ_H 0,98), em acordo com a posição equatorial. Estas observações, confirmaram a presença do sistema $2\alpha,3\alpha$ -di-*O*-acetil em **3**.

No espectro de RMN 1H de **4**, a presença de dois dubletos ($J = 10,4$ Hz) em δ_H 4,38 e 4,12, representando um sistema AB correspondentes a dois hidrogênios geminados mutualmente acoplados, indicou a existência de um grupo acetoximetílico ligado a um carbono quaternário. Este grupo CH_2OAc foi localizado no C-4 em posição axial com base na ausência de efeito γ no C-5 (δ_C 56,01). Em adição, o hidrogênio H-3 com sinal no espectro de RMN 1H em δ_H 4,58 (dd, $J = 10,4$ e 5,2 Hz), geminado com um grupo acetoxílico (AcO-3), foi situado em posição axial (orientação α) com base no valor de $J=10,4$ Hz (interação axial-axial) e nas correlações espaciais entre os

hidrogênios H- 3α (δ_H 4,58), H- 2α (δ_H 1,66), H- 5α (δ_H 0,97) e 3H-23 (δ_H 1,01) observadas no espectro NOESY.

Assim, com base nestes resultados e nos dados das Tabelas 1 – 4, os derivados triterpênicos **1**, **2**, **3** e **4** foram identificados como 3β -*O*-acetilolean-12-en-28-ato de metila, 3β -*O*-acetilursula-12-en-28-ato de metila, $2\alpha,3\alpha$ -di-*O*-acetilolean-12-en-28-ato de metila e $3\beta,24$ -di-*O*-acetilursula-12-en-28-ato de metila, respectivamente. Consequentemente, pode-se caracterizar os triterpenos naturais como ácidos 3β -hidroxiolean-12-en-28-óico, 3β -hidroxiursula-12-en-28-óico, $2\alpha,3\alpha$ -diidroxiolean-12-en-28-óico e $3\beta,24$ -diidroxiursula-12-en-28-óico, já que não se observou a presença de sinais correspondentes a grupos acetoxílico e metoxílico nos espectros de RMN 1H das amostras antes de serem submetidas às reações de acetilação e metilação.

A fórmula molecular $C_{35}H_{52}O_6$ de **5**, deduzida através do pico em m/z 568 ($[M]^+$) observado no espectro de mssa e dados de RMN 1H e ^{13}C , revelou uma diferença de dois átomos de hidrogênio quando comparada com a de **3** ($C_{35}H_{54}O_6$). Os espectros de RMN 1H e ^{13}C (Tabela 5) permitiram reconhecer a presença do sistema $2\alpha,3\beta$ -di-*O*-acetil, uma ligação dupla adicional tetrasubstituída (δ_C 132,78 e 136,09), além dos sinais dos carbonos C-13 (δ_C 138,72) e CH-12 (δ_C 125,24 e δ_H 5,36). O tipo ursano foi estabelecido pelo sinal de grupo metílico ligado a um carbono sp^2 (δ_H 1,70, 3H-29), localizando assim, a ligação dupla adicional entre os átomos de carbono 18 e 19, caracterizando-se um sistema diênico conjugado ($\Delta^{12,18}$) na molécula de **5**. Em uma publicação²⁴, relatando a presença do ácido $2\alpha,3\beta$ -dihidroxiursula-12,18-dien-28-óico, o deslocamento químico do C-19 não foi descrito e o do C-21 (δ_C 31,90) revelou-se inconsistente com o observado para o composto **5**

(δ_C 26,55). O espectro de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono a longa distância $^1Hx^{13}C-COSY-^2J_{CH}$ ($n=2$ e 3 , HMBC) de **5** permitiu atribuição inequívoca do deslocamento químico do C-19 (δ_C 136,09) através dos picos transversais correspondentes aos sinais em δ_H 1,70 (3H-29, $^2J_{CH}$) e δ_H 1,05 (3H-30, $^3J_{CH}$) assim como, do sinal em δ_H 1,70 (3H-29, $^3J_{CH}$) com o sinal em δ_C 132,78 (C-18). Estes dados permitiram, obviamente, localizar o sistema diênico e confirmar a caracterização do triterpeno **5** como do tipo ursano. Por outro lado, a interação heteronuclear spin-spin revelada pela correlação entre os sinais em δ_H 1,05 (3H-30, $^3J_{CH}$) e δ_C 26,55 (CH₂-21) identificou o sinal deste átomo de carbono metilênico. Assim, o derivado **5** foi identificado como 2 α ,3 β -di-O-acetilursa-12,18-dien-28-ato de metila e, em consequência, o produto natural como 2 α ,3 β -diidroxiursa-12,18-dien-28-óico.

O derivado triterpênico **6**, com peso molecular com 16 Daltons a mais quando comparado com **2** e fórmula molecular C₃₃H₅₂O₅ (m/z 528, [M]⁺), mostrou o espectro de RMN 1H semelhante ao de **2**. Nos espectros de RMN ^{13}C (HBBT e DEPT) observou-se a ausência do sinal correspondente ao CH-19 (δ_C 39,10) de **2** e a presença de um sinal representando um carbono quaternário oxigenado em δ_C 73,20 (C-19 de **6**). Deste modo, o átomo de oxigênio adicional indicado pelo peso molecular foi localizado no C-19 como um grupo hidroxila terciário (Tabela 6). Por tratamento com Ac₂O na presença de piridina somente o grupo hidroxila do C-3 foi esterificado, formando um derivado monoacetilado, conforme espectro de RMN 1H (δ_H 2,05). Consequentemente, a estrutura do derivado acetilado **6** foi estabelecida como a do 3 β -O-acetil-19 α -hidroxiursa-12-en-28-ato de metila e a substância natural como ácido 3 β ,19 α -diidroxiursa-12-en-28-óico.

Finalmente, o EM do composto **7** mostrou o pico correspondente ao íon molecular em m/z 568, sugerindo a mesma fórmula molecular C₃₅H₅₂O₆, de **5**. Os espectros de RMN 1H e ^{13}C revelaram-se muito semelhantes aos de **5**, destacando-se nos espectros de RMN ^{13}C como diferença mais significativa, os sinais atribuídos ao CH-5 (δ_C 55,10) em **5** e δ_C 49,88 em **7**. Esta observação indicou a configuração 3 α -Oac como em **3** (Tabela 6). Com base nestes dados e por comparação com **3** e **5**, a estrutura de **7** foi estabelecida como sendo o 2 α ,3 α -di-O-acetilursa-12,18-dien-28-ato de metila e o produto natural como 2 α ,3 α -diidroxiursa-12-18-dien-28-óico.

Os dados de RMN ^{13}C dos produtos analisados estão em acordo com valores descritos na literatura²⁴ para triterpenos semelhantes.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN 1H e de ^{13}C foram registrados em um espectrômetro Bruker ARX 500, operando a 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono-13, usando CDCl₃ como solvente. As soluções foram preparadas a partir de 1,5 – 8 mg dos triterpenos em 0,35 ml de CDCl₃ em tubos de 2,5 mm, com TMS como referência interna. Os espectros 2D foram obtidos e processados com um programa Bruker em um computador Aspect X32 com os seguintes parâmetros: temperatura = 279,0°K; ns = 16 e 32; TD = 2048; $^1Hx^{13}C$ -HMBC- $^nJ(C,H)$ op = 7,0 Hz. A função quadrática de seno e sua troca de funções ($\pi/4$, $\pi/6$ e $\pi/8$) de apodização foram usadas para o processamento com valores de LB = 0,00 Hz e GB = 0. As condições de obtenção e processamento nas experiências COSY e NOESY foram: intervalo de espera, 1-2 s; 512-1024 experimentos; 1024-2048 t₂ pontos e, largura de varredura de 6 ppm. O tempo de mistura no espectro NOESY foi de 1,2-1,5 s. Para correlações de 1H x ^{13}C (canal do ^{13}C) e ^{13}C x 1H (canal do 1H), o mesmo intervalo de espera foi usado, 512-1024 t₂ experimentos, 1024-2048 pontos sendo a largura de varredura de 7

ppm para 1H e 180 ppm para ^{13}C . Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro Finnigan TSQ 70, operando a 70 eV; Os espectros no infravermelho foram registrados em um espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000, em pastilhas de KBr; As separações por CLAE em instrumento Waters 6000A, equipado com detector refratométrico.

Material vegetal

Mentha villosa foi coletada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará, Brasil e identificada pelo Dr. Roy Harley da Universidade de Oxford, Inglaterra. Uma exsiccata (n° 16545) foi depositado no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Extração e isolamento dos constituintes

A planta, seca em estufa (60 °C) foi triturada e submetida a extração exaustiva com hexano e etanol, sucessivamente, na temperatura ambiente. Após filtração para remover os sais inorgânicos (5,25 g) o extrato etanólico (50 g) foi fracionado entre hexano, CHCl₃, Et₂O, EtOAc, n-BuOH e H₂O. A fase solúvel em CHCl₃ foi evaporada sob pressão reduzida e o correspondente extrato (9,6 g) foi cromatografado em coluna de sílica gel 60 [0,050-0,20 mm; Carlo Erba (70 g)] eluída com misturas de hexano-CHCl₃ contendo quantidades crescentes de CHCl₃, na seguinte ordem: hexano-CHCl₃, 9:1 (300 ml), hexano-CHCl₃, 8:2 (450 ml), hexano-CHCl₃, 1:1 (800 ml), hexano-CHCl₃, 4:6 (400 ml) e hexano-CHCl₃, 2:8 (1200 ml). As frações 33-44 eluídas com hexano-CHCl₃, 2:8 forneceram um resíduo (1,4 g) que foi recromatografado em coluna de sílica gel 60 [0,050-0,20 mm; Carlo Erba (60 g)] usando CHCl₃-EtOAc, 9,5:05 (1200 ml), CHCl₃-EtOAc, 7:3 (800 ml), EtOAc (1400 ml) e EtOAc-MeOH, 2:8 (1100 ml) como eluentes, para originar as frações A (560,0 mg), B (100,5 mg), D (169,5 mg) e E (186,0 mg), respectivamente.

Obtenção dos ésteres metílicos e dos acetados de A, B e D (A-MeAc, B-MeAc e D-MeAc)

Alíquotas das frações A (40 mg), B (27 mg) e D (54 mg) foram dissolvidas individualmente em uma mistura de éter etílico (9 ml) e metanol (1 ml). Uma solução etérea de diazometano (0 °C) recentemente preparada a partir de nitrosometilurea e hidróxido de potássio, foi adicionada às soluções de A, B e D à temperatura de 22 °C até que as soluções adquiriram coloração amarela. Após 24 horas à temperatura ambiente, os solventes das misturas foram evaporados originando sólidos amorfos incolores. Cada produto resultante da reação de metilação foi então acetilado em piridina (1 ml) e anidrido acético (1,5 ml). Após 24 horas à temperatura ambiente, o excesso de Ac₂O foi decomposto por adição de H₂O (8 ml) e, a solução foi extraída com CHCl₃ (3 x 5 ml). A fase clorofórmica foi lavada com água, sêca com Na₂SO₄ anidro e evaporada. Os resíduos foram submetidos à cromatografia em fase preparativa (sílica gel 60, F₂₅₄, 0,50 mm; Merck) fornecendo os seguintes resultados: A-MeAc (40 mg) exibiu uma banda principal com R_f 0,65 (37 mg), B-MeAc (27 mg) mostrou três bandas com R_f 0,70 (3 mg), R_f 0,40 (4,5 mg) e R_f 0,20 (9 mg) e, D-MeAc (55 mg) duas bandas com R_f 0,35 (19 mg) e R_f 0,25 (17 mg). Todas as bandas foram obtidas por eluição com diclorometano e foram visualizadas através de lâmpada UV (254 nm) após prévia pulverização com solução de rodamina 6G (Merck) em acetona.

Purificação dos produtos

A análise através de cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelou que a amostra

com R_f 0,65 de A-MeAc, era constituída de três componentes. Uma alíquota (17 mg) foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) [coluna RP 18 Zorbax ODS (25 cm x 9,4 cm i.d., 7 mm); solvente: metanol – água, 8 : 2; fluxo: 5ml/min] em escala semi-preparativa permitindo coletar os dois componentes principais [**1** (2,5 mg) e **2** (10,0 mg)]. A análise da amostra com R_f 0,20 de B-MeAc (9 mg) revelou a existência de três componentes. Através de CLAE utilizando as mesmas condições descritas acima, foi possível separar os três [**3** (1,5 mg), **4** (4mg) e **5** (2 mg)]. A análise das amostras com R_f 0,25 (17,0 mg) e com R_f 0,35 (19,0 mg) de D-MeAc mostrou também que ambas tratavam-se de misturas. CLAE utilizando as mesmas condições anteriores, possibilitou a separação de **6** (5,5 mg) e **7** (2,5 mg), respectivamente.

Dados obtidos dos espectros de massa (EIMS) e IV classificados como principais

1: m/z 512 ($[M]^+$), 452 (M-CH₃CO₂H), 392 (M-2CH₃CO₂H), 262, 203; ν_{\max} , cm⁻¹ 1728, 1658, 1464, 1368, 1241; **2:** m/z 512 ($[M]^+$), 452 (M-CH₃CO₂H), 392 (M-2CH₃CO₂H), 262, 203; ν_{\max} , cm⁻¹ 1729, 1464, 1369, 1242; **3:** m/z 570 ($[M]^+$), 510 (M-CH₃CO₂H), 450 (M-2CH₃CO₂H), 262, 203; ν_{\max} , cm⁻¹ 1731, 1460, 1372, 1244, 1201; **4:** m/z 570 ($[M]^+$), 510 (M-CH₃CO₂H), 450 (M-2CH₃CO₂H), 391, 262, 203; ν_{\max} , cm⁻¹ 1741, 1460, 1372, 1247, 1039; **5:** m/z 568 ($[M]^+$), 508 (M-CH₃CO₂H), 449, 389, 247; ν_{\max} , cm⁻¹ 1742, 1460, 1373, 1247, 1039; **6:** m/z 528 ($[M]^+$), 510 (M-H₂O), 468 (M-CH₃CO₂H), 453, 260, 190, 179; ν_{\max} , cm⁻¹ 3440, 1732, 1460, 1373, 1244, 1201, 1027; **7:** m/z 568 ($[M]^+$), 508 (M-CH₃CO₂H), 448 (M-2CH₃CO₂H), 433, 389, 247; ν_{\max} , cm⁻¹ 1731, 1460, 1372, 1244, 1202, 1027.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pelo auxílio financeiro, ao Laboratoire de Géochimie Organique, ULP, Estrasburgo, França, pelas facilidades nas separações cromatográficas e, ao Laboratoire de RMN et de Modelisation Moléculaire, ULP, Estrasburgo, França, pelos espectros de RMN.

REFERÊNCIAS

1. Souza, A. H.; *Rev. Bras. Farm.* **1950**, *31*, 257.

2. Dikshita, A.; Husain, A.; *Fitoterapia* **1984**, *55*, 171.
3. Muniz, M.; *Ciência Hoje* **1990**, *16*, 68.
4. Matos, F. J. A.; *Farmácias Vivas*, Imprensa Universitária, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 1991, 108.
5. Singh, S. P.; *Fitoterapia* **1992**, *63*, 76.
6. Hiruma, A. C.; Almeida, R. N.; Barbosa, J. M. F.; *XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Curitiba, PR, 1992.
7. Craveiro, A. A.; Alencar, J. W.; Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L.; Monte, F. J. Q.; *13ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química-SBQ*, Caxambu, MG, 1990.
8. Scannerini, S.; Mucciarelli, M.; *Essent. Oil Res.* **1993**, *5*, 651.
9. Shimizu, S.; *Essent. Oil Res.* **1995**, *7*, 255.
10. Velasco-Negueruela, A.; Perez-Alonso, M. J.; Esteban, J.; Garcia Vallejo, M. C.; Zygadlo, J. A.; Guzman, C. A.; Ariza-Espinar, L.; *Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 81.
11. Oliveira, E. F.; *Dissertação de Mestrado*; UFC, Fortaleza, CE, 1995.
12. Mahato, S. B.; Nandy, A. K.; Roy, G.; *Phytochemistry* **1992**, *7*, 2199.
13. Ling, H. C.; King, M. L.; Chen, C. F.; Hsu, K. P.; Su, M. H.; Lin, M. H.; *Chem. Abs.* **1982**, *97*, 120120.
14. Nishino, H.; Nishino, A.; Takayasu, J.; Hasegawa, T.; Iwasihma, A.; Hirabayashi, K.; Iwata, S.; Shibata, S.; *Cancer Res.* **1988**, *48*, 5210.
15. Yamagishi, T.; Zhang, D. C.; Chang, J. J.; McPhail, D. R.; McPhail, A. T.; Lee, K. H.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3213.
16. Fujimoto, Y.; Made, S.; *Chem. Abs.* **1988**, *109*, 86332.
17. Liu, J.; Huang, M.; tao, Y.; *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 414.
18. Takayasu, J.; Nishino, H.; Hirabayashi, K.; Iwata, S.; Nagata, N.; Shibata, S.; *Chem. Abs.* **1989**, *110*, 225092.
19. Diallo, B.; Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fastre, R.; Konoshima, T.; Kozuka, M.; Tokuda, H.; *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 879.
20. Loganathan, D.; Trivedi, G. K.; Chary, K. V. R.; *Magn. Reson. Chem.* **1990**, *28*, 925.
21. Jimeno, M. J.; Rumbero, A.; Vázquez, P.; *Magn. Reson. Chem.* **1995**, *33*, 408.
22. Furuya, T.; Orihara, Y.; Hayashi, C.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 715.
23. Bhandari, S. P. S.; Garg, H. S.; Agrawal, P. K.; Bhakuni, D. S.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3956.
24. Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.