

TRITERPENOS DE *Styrax camporum* (STYRACACEAE)

Patrícia Mendonça Pauletti, Angela Regina Araújo e Vanderlan da Silva Bolzani

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 359, 14800-900 Araraquara - SP

Maria Claudia Marx Young

Secção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, CP 4005, 01061-970 São Paulo - SP

Recebido em 27/11/00; aceito em 20/12/01

TRITERPENES FROM *Styrax camporum* (STYRACACEAE). Chemical investigation of the leaves of *Styrax camporum* (Styracaceae) resulted in the isolation of the lignan lariciresinol and six triterpenes: ursolic acid, $2\alpha,3\alpha$ -dihydroxy-urs-12-en-28-oic acid and mixtures of uvaol and erythrodiol, as well as 3β -*O*-*trans*-*p*-coumaroyl- 2α -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid and 3β -*O*-*trans*-*p*-coumaroylmasilnic acid. The structures of these compounds were established by spectroscopic analysis. This paper deals with the first report of these compounds in *S. camporum*.

Keywords: *Styrax camporum*; Styracaceae; triterpenes.

INTRODUÇÃO

Styracaceae inclui espécies de plantas predominantemente arbóreas,¹ distribuídas em áreas distintas do continente americano, sudoeste da Ásia e região mediterrânea². Nas Américas, ocorre desde a região central dos Estados Unidos até o norte da Argentina. A família é bastante conhecida pela produção de resinas balsâmicas cujo nome genérico é benjoim, sendo o ácido benzóico o constituinte predominante das mesmas^{3,4}. Na indústria de perfumes e cosméticos, o benjoim é a matéria prima principal para a obtenção do ácido benzóico; na medicina tradicional, devido às suas propriedades expectorantes é utilizado como coadjuvante para inalação das vias respiratórias. Nas cerimônias religiosas da antiguidade foi muito apreciado como defumatório, pelos sacerdotes hebreus e da Índia^{3,4}.

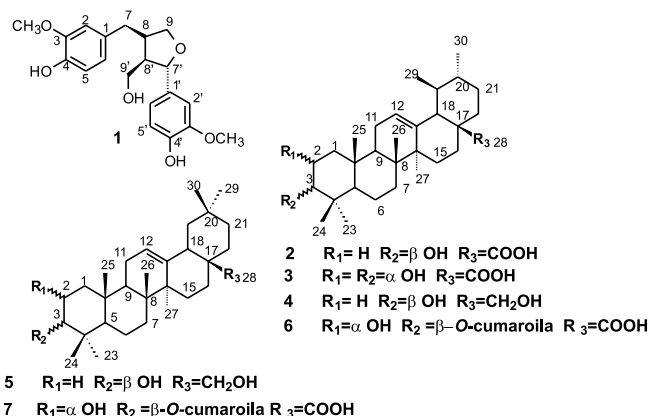
Styrax camporum Pohl é conhecida pela população brasileira como “benjoeiro”, “cua-do-brejo”, “canela-poca”, “fruta-de-pomba” e “pinduiba”. A planta adulta pode atingir uma altura média de 6-10 m e diâmetro do tronco de 30-40 cm. No Brasil, ocorre nos cerrados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná na floresta semidecídua da bacia do Paraná⁵.

Dados fitoquímicos de espécies de *Styrax* registram a ocorrência de lignanas, norlignanas⁶⁻¹⁵ e triterpenos¹⁵⁻¹⁸ como constituintes predominantes no gênero. Em ensaios preliminares, visando a detecção de atividade antitumoral, o extrato bruto das folhas dessa planta apresentou atividade inibidora do crescimento de linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (Rad+, Rad 52Y e RS 321) que perderam a capacidade de regenerar o DNA. O presente trabalho descreve o isolamento de uma lignana e seis triterpenos pentacíclicos inéditos para o gênero. Para um deles, o ácido $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi-urs-12-en-28-óico, foi observada atividade inibidora seletiva da linhagem 52Y de *S. cerevisiae*, indicando ação específica no DNA. A norlignana egonol, já relatada para a espécie¹⁹, também foi isolada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Investigação fitoquímica das folhas de *Styrax camporum* Pohl resultou no isolamento do lignóide lariciresinol (**1**) e de seis

triterpenóides: ácido ursólico (**2**), ácido $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi-urs-12-en-28-óico (**3**) e as misturas de uvaol (**4**) e eritrodiol (**5**) bem como as do ácido 3β -*O*-*trans*-*p*-cumaroyl- 2α -hidroxi-urs-12-en-28-óico (**6**) e ácido 3β -*O*-*trans*-*p*-cumaroyl-masilnico (**7**). As substâncias **1**, **3**, **4**, **5**, **6** e **7** estão sendo identificadas pela primeira vez neste gênero.



As estruturas destas substâncias foram elucidadas a partir dos dados obtidos por análises espectroscópicas de RMN ¹H e ¹³C, experimentos DEPT 90° e 135°, COSY, IV e EM. Comparação dos registros na literatura para as substâncias obtidas neste estudo foram fundamentais para a confirmação de suas estruturas moleculares e atribuições de suas estereoquímicas relativas.

Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C, experimento COSY ¹H-¹H e EM-ES permitiram identificar a substância **1** como sendo o (+)-lariciresinol ($[\alpha]_D^{25} = +8,89^\circ$)²⁰⁻²².

Análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C permitiram identificar a estrutura do triterpeno **2** como o ácido ursólico^{23,24}.

O triterpeno **3** apresentou bandas em 3400 (OH) e 1700 cm⁻¹ (carbonila) no espectro de IV. O espectro de RMN de ¹H de **3** mostrou sinais em 5,20 δ (1H, t, $J = 3,5$ Hz, H-12), característicos de hidrogênio olefínico, em 3,90 δ (1H, m, H-2) e 3,36 δ (1H, sl, H-3) relativos aos hidrogênios carbinólicos, além de sinais em 0,72-1,25 δ e 1,34-2,34 δ , que foram atribuídos aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, respectivamente. Exame dos dados de RMN

*e-mail: bolzani@iq.unesp.br

Tabela 1. Dados de RMN ^{13}C (50 MHz) para as substâncias **3**^{a,b}, **4**^{a,c}, **5**^{a,c}, **6** e **7**^{a,b}

Carbono/ δ	3 δ	4 δ	5 δ	6 δ	7 δ
1	41,34 (t)	38,7 (t)	38,5 (t)	47,3 (t)	47,3 (t)
2	65,6 (d)	27,2 (t)	27,2 (t)	66,0 (d)	66,0 (d)
3	78,2 (d)	79,0 (d)	79,0 (d)	84,1 (d)	84,1 (d)
4	39,2 (s)	39,0 (s)	39,0 (s)	40,4 (s)	40,4 (s)
5	47,5 (d)	55,1 (d)	55,1 (d)	54,6 (d)	54,6 (d)
6	17,5 (t)	18,3 (t)	18,3 (t)	17,9 (t)	17,9 (t)
7	32,3 (t)	32,7 (t)	32,5 (t)	32,5 (t)	32,5 (t)
8	40,3 (s)	39,3 (s)	39,3 (s)	40,4 (s)	40,4 (s)
9	47,5 (d)	47,6 (d)	47,5 (d)	47,1 (d)	47,1 (d)
10	37,7 (s)	36,9 (s)	36,9 (s)	39,6 (s)	39,6 (s)
11	23,7 (t)	23,5 (t)	23,6 (t)	22,9 (t)	22,9 (t)
12	124,7 (d)	125,0 (d)	122,3 (d)	125,3 (d)	121,9 (d)
13	138,0 (s)	138,7 (s)	144,2 (s)	138,1 (s)	143,8 (s)
14	41,7 (s)	42,0 (s)	41,7 (s)	41,7 (s)	41,7 (s)
15	27,5 (t)	28,1 (t)	25,5 (t)	29,2 (t)	29,2 (t)
16	23,7 (t)	23,3 (t)	23,5 (t)	23,8 (t)	23,8 (t)
17	47,0 (s)	36,9 (s)	36,9 (s)	47,1 (s)	47,1 (s)
18	52,2 (d)	54,0 (d)	42,3 (d)	52,3 (d)	41,2 (t)
19	38,4 (d)	39,4 (d)	46,4 (t)	39,1 (d)	47,1 (s)
20	38,6 (d)	39,4 (d)	31,0 (s)	38,9 (d)	32,3 (d)
21	30,2 (t)	30,7 (t)	34,1 (t)	30,7 (t)	36,4 (t)
22	36,3 (t)	30,6 (t)	31,0 (t)	36,8 (t)	32,5 (t)
23	28,3 (q)	28,1 (q)	28,1 (q)	28,3 (q)	28,3 (q)
24	21,5 (q)	15,4 (q)	15,5 (q)	17,6 (q)	17,6 (q)
25	16,0 (q)	15,6 (q)	15,5 (q)	16,8 (q)	16,8 (q)
26	16,6 (q)	16,8 (q)	16,7 (q)	20,9 (q)	20,9 (q)
27	23,2 (q)	23,5 (q)	25,9 (q)	25,6 (q)	25,6 (q)
28	179,4 (s)	69,6 (t)	69,8 (t)	179,5 (s)	179,5 (s)
29	16,7 (q)	16,6 (q)	33,2 (q)	17,2 (q)	32,7 (q)
30	20,8 (q)	21,9 (q)	23,3 (q)	21,4 (q)	23,1 (q)
1'	-	-	-	125,6 (s)	125,6 (s)
2'	-	-	-	132,3 (d)	132,3 (d)
3'	-	-	-	115,7 (d)	115,7 (d)
4'	-	-	-	159,4 (s)	159,4 (s)
5'	-	-	-	115,7 (d)	115,7 (d)
6'	-	-	-	132,4 (d)	132,4 (d)
7'	-	-	-	144,2 (d)	144,2 (d)
8'	-	-	-	115,7 (d)	115,7 (d)
9'	-	-	-	167,5 (s)	167,5 (s)

^a as multiplicidades entre parênteses foram determinadas pelo DEPT 135° e 90°, TMS como padrão interno, ^b CDCl₃ / DMSO D₆, ^c CDCl₃

^{13}C (Tabela 1) permitiram definir o esqueleto de um triterpeno do tipo ursano, principalmente pela presença dos sinais em 124,7 d e 138,0 d relativos à ligação dupla entre os C-12 e C-13. Entre outros, os sinais em 65,6 δ e 78,2 δ correspondem a dois carbonos hidroximetínicos em C-2 e C-3. A comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **3** com os valores registrados na literatura, levaram a concluir que a substância **3** é o ácido 2 α ,3 α -diidroxil-urs-12-en-28-óico²³.

O espectro de RMN de ^1H de **4** e **5** permitiu a visualização de sinais em 5,13 δ (1H, t, $J = 3,5$ Hz, H-12) e 5,07 δ (1H, t, $J = 3,5$ Hz, H-12), característicos de hidrogênios olefínicos de triterpenos, em 3,14 δ (4H, dd, $J = 11,0$ Hz e 3,7 Hz, H-28) e 3,48 δ (2H, dd, $J_{\text{a-a}} = 10,8$ Hz e $J_{\text{a-e}} = 4,2$ Hz, H-3) relativos aos hidrogênios carbinólicos. Observaram-se também duas regiões espectrais muito complexas em 0,73 - 1,25 δ , com sinais que foram atribuídos a grupos metílicos e em 1,32-1,82 δ que correspondem a hidrogênios metilênicos e metínicos. Os pares de sinais de RMN ^{13}C (Tabela 1) em 125,0 δ e

138,7 δ e em 122,3 δ e 144,2 δ , característicos de carbonos olefínicos, confirmaram a presença de uma mistura de triterpenos ursano e oleano. Análise dos dados de RMN de ^{13}C e comparação de dados da literatura para substâncias análogas^{23,25,26} levaram a concluir que a mistura é formada pelos triterpenos uvaol e eritrodíol.

O espectro de RMN de ^1H de **6** e **7** apresentou sinais em 7,65 δ (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-7'), 7,40 δ (2H, d, $J = 7,4$ Hz, H-2' e H-6'), 6,85 δ (2H, d, $J = 7,4$ Hz, H-3' e H-5'), 6,33 δ (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-8'), relativos a hidrogênios aromáticos pertencentes a uma unidade *p*-cumarófla. Os demais sinais em 5,20 δ (1H, sl, H-12) característicos de hidrogênio olefínico e vários sinais entre 0,83 - 1,94 δ indicaram a natureza triterpênica desta substância. O sinal em 4,63 δ (1H, d, $J_{\text{a-a}} = 9,9$ Hz, H-3) foi atribuído ao H-3 e encontra-se mais desblindado devido à esterificação com o ácido *p*-cumárico. Os sinais do espectro de RMN ^{13}C (Tabela 1) em 125,3 δ , 138,1 δ , em 121,9 δ e 143,8 δ , característicos de ligações duplas, confirmaram a

presença de uma mistura de triterpenos do tipo ursano e oleano. Aos carbonos C-2 e C-3 foram atribuídos os valores de 66,0 δ e 84,1 δ , respectivamente. A fórmula molecular $C_{39}H_{54}O_6$ foi confirmada pelos dados de RMN ^{13}C e EM-ES. O espectro de massas apresentou os seguintes picos: m/z 658 $[M+K+H]^+$ (22%), m/z 642 $[M+Na+H]^+$ (100), íon RDA: m/z 247 (15%), m/z 203 (33%), m/z 164 (4%), m/z 147 (63%) e m/z 119 (25%).

Essas informações permitiram identificar **6** e **7** como o ácido 3 β -*O*-*trans*-*p*-cumaroil-2 α -hidroxi-urs-12-en-28-óico e ácido 3 β -*O*-*trans*-*p*-cumaroil-maslínico^{23,27}.

A norlignana com atividade antifúngica, 5-(3''-hidroxifenil)-2-(3',4'-metilenodioxifenil)-7-metoxibenzofurano, conhecida como egonol, foi identificada através da comparação de seus espectros de RMN com aqueles obtidos para uma amostra autêntica¹⁵.

Pesquisa bibliográfica sobre a constituição química de Styracaceae revelou a presença marcante de arilpropanóides monoméricos, lignóides⁶⁻¹⁵ e triterpenóides¹⁵⁻¹⁸. O gênero *Styrax*, o mais importante da família e com maior volume de informações, caracteriza-se pelo acúmulo de norlignóides do tipo benzofurânicos, uma vez que os mesmos foram isolados em todas as espécies do gênero investigadas até o momento. A presença de triterpenos do tipo oleanano e ursano em *S. officinalis*¹⁶ e *S. japonica*¹⁷⁻¹⁸ não se configura como um dado químico relevante para análise quimio-taxonomica, devido à baixa variabilidade estrutural observada para estes metabólitos encontrados nas duas espécies acima mencionadas, assim como à baixa ocorrência dos mesmos nos táxons afins estudados.

As substâncias **1-7** foram ensaiadas nas três linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* sendo que o triterpeno **3** apresentou inibição moderada do crescimento da linhagem 52Y. Embora a atividade observada para **3** seja fraca, ela foi seletiva para um dos mutantes deficientes nas vias de reparo de DNA, indicando especificidade sobre o mesmo²⁸. Outro dado bastante significativo deste resultado é que este é o primeiro registro da atividade de triterpenos sobre o reparo de DNA. Os demais triterpenos isolados mostraram-se inativos.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação e material cromatográfico

Os espectros de RMN foram registrados em $CDCl_3$, $DMSO-d_6$ e piridina- d_5 no espectrômetro Bruker Ac-200 F operando a 200 MHz para 1H e 50 MHz para ^{13}C , respectivamente, usando TMS como padrão de referência. Os experimentos de COSY, DEPT 90° e 135° foram realizados em espectrômetro Bruker Ac-200 F. O espectro de absorção no IV foi obtido no espectrômetro PERKIN ELMER- FT-IR, utilizando-se pastilhas de KBr. Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas de baixa resolução FISIONS-Modelo VG Platform II, no modo Eletrospray. Nas análises por CCDC e CCDP foram utilizadas placas de sílica gel 60 G F₂₅₄. As placas foram observadas sob luz UV 254 - 366 nm (Chromatovus) e reveladas com vapores de iodo ressublimado e solução de anisaldeído seguido de aquecimento. Nas cromatografias em coluna foram utilizadas sílica gel 60 G 230 - 400 e 70 - 230 mesh. A atividade óptica foi medida no Polamat A (Carlzeiss Jena).

Material vegetal

A espécie vegetal *Styrax camporum* Pohl foi coletada na Estação Ecológica e Experimental de Mogi-Guaçu-SP em dezembro de 1997. A exsiccata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo-SP.

Bioensaio

Para a detecção de atividade antitumoral em extratos e substâncias puras, foram utilizadas três linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (rad+, 52Y e RS321) segundo a metodologia descrita na literatura²⁸.

Extração

As folhas de *S. camporum* (1770,30 g) foram secas, pulverizadas e extraídas exaustivamente com etanol, à temperatura ambiente. Após a remoção do solvente sob vácuo, foram obtidos 404,27 g do extrato bruto etanólico. Este foi solubilizado em $CH_3OH : H_2O$ (8:2) e extraído sucessivamente com hexano, $CHCl_3$ e AcOEt. Após a concentração dos solventes, cada extrato originou 3,36 g, 16,8 g e 28,86 g, respectivamente.

O resíduo $CHCl_3$ (16,8 g) foi fracionado em uma coluna de sílica gel eluída com: Hexano: $CHCl_3$ (1:1); $CHCl_3$:AcOEt: $CHCl_3$ (1:1); AcOEt: CH_3OH :AcOEt (1:1) e CH_3OH . Desta coluna resultaram 10 subfrações.

A subfração 3 (4,68 g) foi submetida a uma coluna de sílica gel 60 G empregando gradiente de CH_2Cl_2 : CH_3OH . Desta coluna foram separadas 7 subfrações. A subfração 3.4 (2,68 g) foi recromatografada em coluna de sílica gel 60 G usando gradiente de CH_2Cl_2 : CH_3OH , fornecendo 17 subfrações. A subfração 3.4 (4-6) (389,7 mg) foi fracionada em coluna de sílica gel 60 G usando gradiente de CH_2Cl_2 : CH_3OH . Desta coluna resultaram 33 subfrações. A subfração 3-9 (202,9 mg) foi fracionada em coluna de sílica gel 60 G usando gradiente de Hexano: $CHCl_3$:AcOEt (9:1). Assim, foram obtidas 39 subfrações, sendo que da subfração 24-28 foram isoladas as substâncias **4** e **5** (33,6 mg) e da subfração 29-30, egonol (19,8 mg). Da subfração 3.4 (10) (127,3 mg) foi isolada a substância **2** (42,3 mg), após lavagem com CH_3OH . A subfração 3.4 (17) (304,0 mg) foi fracionada em coluna de sílica gel 60 G usando gradiente de Hexano: $CHCl_3$:AcOEt (9:1). Desta coluna foram obtidas 17 subfrações. A subfração 2-4 (211,9 mg) foi fracionada em coluna de sílica gel 60 G usando gradiente de CH_2Cl_2 : CH_3OH . Esta coluna forneceu 55 subfrações. Da subfração 41-47 (38,2 mg) foram isoladas as substâncias **6** e **7** e da subfração 38-40 (53,5 mg) foi identificada a substância **3**, após coluna de sílica gel 60 G usando gradiente de CH_2Cl_2 : CH_3OH na subfração 26-27 (32,4 mg).

A fração 4 (1,33 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica usando sílica gel 60 G e gradiente de CH_2Cl_2 : CH_3OH como eluente em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 47 subfrações. A substância **1** foi isolada da subfração 4 (26-29), após coluna de Sephadex LH-20 utilizando CH_3OH como eluente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao programa Biota-FAPESP, CNPq e CNPq-PRONEX pelas bolsas e auxílios concedidos.

REFERÊNCIAS

- Barroso, G. M.; *Sistemática de Angiospermas do Brasil*, Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, 1978.
- Cronquist, A.; *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia: New York, 1981.
- Hoehne, F.C.; *Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais*, Graphicards: São Paulo/Rio de Janeiro, 1935.
- Costa, A. F.; *Farmacognosia I*, Fundação Calouste Gulbekian: Lisboa, 1968.
- Lorenzi, H.; *Árvores Brasileiras*, Instituto Plantarum de Estudos da Flora: Nova Odessa, 1988.
- Okada, H.; *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1915**, 657.

7. Hopkins, C. Y.; Ewing, D. F.; Chisholm, M. J.; *Can. J. Chem.* **1967**, *45*, 1425.
8. Takanashi, M.; Takizawa, Y.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1224.
9. Segal, R.; Milo-godzweig, I.; Sokoloff, S.; Zaitscek, D. V.; *J. Chem. Soc. C* **1967**, 2402.
10. Giesbrecht, A. M.; Alvarenga, M. A.; Silva, J. J.; Panizza, S.; *An. Farm. Quim.* **1985**, *25*, 55.
11. Takanashi, M.; Takizawa, Y.; Mitsuhashi, T.; *Chem. Lett.* **1980**, 869.
12. Anil, H.; *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2784.
13. Ulubelen, A.; Saiki, Y.; Lotter, H.; Chari, V. M.; Wagner, H.; *Planta Med.* **1978**, *34*, 403.
14. Pastorova, I.; Koster, C. G.; Boon, J. J.; *Phytochem. Anal.* **1997**, *8*, 63.
15. Pauletti, P. M.; Araújo, A. R.; Young, M. C. M.; Giesbrecht, A. M.; Bolzani, V. S.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 597.
16. Anil, H.; *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1760.
17. Sugiyama, N.; Aoyama, H.; Sayama, T.; Yamada, K.; *Nippon Kagaki Zasshi* **1967**, *88*, 1316.
18. Kitagawa, I.; Imakura, Y.; Hayashi, T.; Yosioka, I.; *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 1675.
19. Teles, H. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2001.
20. MacRae, W. D.; Towers, G. H. N.; *Phytochemistry* **1985**, *24*, 561.
21. Fonseca, S. F.; Campello, J. P.; Barata, L. E. S.; Rúveda, E. A.; *Phytochemistry* **1978**, *17*, 499.
22. Fonseca, S. F.; Nielsen, L. T.; Rúveda, E. A.; *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1703.
23. Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.
24. Kojima, H.; Ogura, H.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1703.
25. Siddiqui, S.; Hafeez, F.; Begum, S.; Siddiqui, B. S.; *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 1086.
26. Pant, P.; Rastogi, R. P.; *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1787.
27. Haberlein, H.; Tschiersch, K.; *Phytochemistry* **1994**, *35*, 765.
28. Gunatilaka, A. A. L.; Samaranayake, G.; Kingston, D. G. I.; Hofmann, G. Johnson, R.K.; *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1648.