



Constituintes químicos de *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A. St.-Hil. Rutaceae

Lucia Elaine Ranieri Cortez^{1*}, Diógenes Aparício Garcia Cortez², Antônio Gilberto Ferreira³,
Paulo Cezar Vieira³, Maria Fátima das Garças Fernandes da Silva³,
João Batista Fernandes³

¹Departamento de Farmácia, Centro de Ensino Superior de Maringá, 87050-390,
Maringá, PR, Brasil,

²Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá,
87.020-900, Maringá, PR, Brasil,

³Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos,
Caixa Postal 676, 1365-905, São Carlos, SP, Brasil

RESUMO: Do extrato diclorometano do caule de *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A. St.-Hil. foi isolado um triterpeno o 20-hidroxi-diidroloupeol (**1**), e do extrato metanólico foram isolados os alcalóides dictamina (**2**) e eskimianina (**3**), além de uma mistura dos esteróides sitosterol (**4**) e estigmasterol (**5**). A identificação substâncias foi realizada pela análise dos espectros de Massas, RMN ¹H, RMN ¹³C, HSQC, HMBC, e por comparação com dados da literatura.

Unitermos: *Almeidea coerulea*, Rutaceae, triterpeno, alcalóides.

ABSTRACT: "Chemical constituents of *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A. St.-Hil. Rutaceae". From the dichloromethane extract of *Almeidea coerulea* stem one triterpene, 20-hydroxy-dihydroloupeol was isolated (**1**) and from the methanol extract the known alkaloids dictamine (**2**) and skimmianine (**3**), as well the steroids sitosterol (**4**) and stigmasterol (**5**). The identification of these compounds was performed on the basis of spectroscopic analyses (MS, ¹H NMR, ¹³C NMR, HSQC and HMBC) as well as comparison with literature data.

Keywords: *Almeidea coerulea*, Rutaceae, triterpene, alkaloids.

INTRODUÇÃO

A família Rutaceae é constituída de 1600 espécies distribuídas em aproximadamente 150 gêneros (Waterman, 1983) sendo que no Brasil são citadas aproximadamente 200 espécies (Albuquerque, 1976). O gênero *Almeidea* é encontrado nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Santos et al. (1998) identificaram, nas folhas de *Almeidea coerulea*, a presença de cinco alcalóides como o 7-*O*-acetilhaplofilidina, dutadрупina, isodutadрупina, 7-metoxi-8-(3,3-dimetilalil)-dictamina e arborina, e nas folhas de *Almeidea rubra*, alcalóides dos tipos furoquinilínico, 2-quinolona e acridônico, além de cumarinas. Claude et al. (1983) também isolaram alcalóides do tipo 2-quinolona do caule e raízes de *Almeidea guyanensis*. Revisões de quimiosistemática da família Rutaceae são frequentes (Mabberley, 2004), propos uma nova reclassificação da família. Estas propostas foram formuladas mediante dados químicos dos alcalóides derivados do ácido antranílico, cumarinas e limonóides (Silva et al. 1988).

Dentre as diversas atividades biológicas experimentalmente comprovadas para a família Rutaceae

colocam em destaque o seu potencial antiparasitário. Lavaud et al. (1995) relatam a atividade leishmanicida de alcalóides do tipo 4-quinolona, os quais possuem cadeias longas como substituintes em C2, tais como dictiolomida A e dictiolomida B isoladas de *Dictyoloma peruviana*. Outros alcalóides como chimanina B, 2-*n*-propilquinolona e 2-fenilquinolona, isolados de *Galipea longiflora*, utilizados na dose de 50 mg/kg, apresentaram o mesmo efeito em relação à droga antimonial clássica utilizada no tratamento, segundo Fournet et al. (1996). Muitas das substâncias isoladas dessas espécies apresentaram, também atividade tripanomicida (Mafezoli et al., 2000; Ambrozin et al., 2004). Lúcio et al. (2000) observou que epiisopilosina isolada de *Pilocarpus microphyllus* mostrou ser um estimulante periférico do sistema nervoso parassimpático.

No Estado do Paraná esta doença parasitária também é endêmica cuja manifestação clínica ocorre nas formas cutânea, mucocutânea e visceral. Ela atingiu proporções epidêmicas em 1993, 1994 e 1995 com 819, 1361 e 962 casos notificados, respectivamente. Em Maringá (PR), são notificados com frequência novos casos. Atualmente, para o tratamento de leishmaniose,

Tabela 1. Dados de RMN ^1H (δ) de **1**

Hidrogênio	(1) $\delta_{\text{H}}^{(a)}$
3	2,94-3,04 (1H, m)
5	3,58-3,60 (1H, m)
19	2,94-3,04 (1H, m)
23	1,07 (3H, s)
24	0,76 (3H, s)
25	0,64 (3H, s)
26	0,98 (3H, s)
27	0,91 (3H, s)
28	1,07 (3H, s)
29	0,95 (3H, s)
30	0,86 (3H, s)
3-OH	4,26 (1H, d, $J=5,4$ Hz)

(a) 300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ *Os valores de δ_{H} (ppm) e J (entre parênteses, em Hz) foram deduzidos do espectro unidimensional (1D) de RMN ^1H e (2D) de $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY.

são utilizados compostos de antimônio e de arsênico, bem como diamidinas aromáticas e alguns antibióticos, que, de um modo geral, apresentam alta toxicidade (Rey, 1991). O aumento do número de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil requer cuidados imediatos como o preparo de profissionais para a identificação da doença e o suprimento de medicamentos eficazes e menos tóxicos (Silveira et al., 1999).

No presente trabalho é apresentado o estudo fitoquímico e a identificação de alcalóides furoquinolínicos, esteróides e um triterpeno do tipo lupano obtidos do caule da *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A. St.-Hil., com o objetivo de contribuir com a quimiosistemática e obtenção de substâncias puras para a realização de futuros ensaios de atividade leishmanicida.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrômetro BOMEN – MV 100, Hartmann & Braun- Michelson. Os espectros de RMN de ^1H (400,13 MHz) e de ^{13}C (100,6 MHz) foram obtidos em espectrômetro BRUKER AVANCE e VARIAN, modelos GEMINI 2000 BB, 300 MHz (300 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C). Foram utilizados $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ e CDCl_3 como solventes e TMS como referência interna. Para a obtenção de espectros no ultravioleta foi utilizado o aparelho VARIAN Cary 1E. Os espectros de massa por electrospray foram obtidos em espectrômetro Micromass Quattro LC.

As cromatografias em coluna foram realizadas em colunas de vidro, utilizando-se sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM) e, na cromatografia no modo flash, sílica gel 60 (230-400 mesh ASTM), ambas da marca Merck. Nas cromatografias em placa, utilizou-se sílica gel 60 GF $_{254}$. As revelações deste tipo de cromatografia foram

efetuadas por irradiação no ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm) e por pulverizações com solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ 1:1, seguidas de aquecimento a 105°C, até a revelação das substâncias químicas.

Material vegetal

As partes aéreas de *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A. St.-Hil. foram coletadas em fevereiro de 1993, no município de Itacaré, Bahia. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. José Pirani do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo e uma exsicata (Pirani & Kallunki 2747) foi depositada no Herbário dessa universidade.

Isolamento dos constituintes

Os extratos em diclorometano (8,1 g) e metanólico (22,1 g) obtidos do caule de *Almeidea coerulea* foram submetidos a cromatografia a vácuo, empacotada com celulose microcristalina (Avicel®), eluindo-se com hexano, hexano- CHCl_3 (1:1, v/v), CHCl_3 , CHCl_3 -EtOAc (1:1, v/v), EtOAc, e MeOH e obtendo-se 7 frações de cada extrato. A fração 3 (1,47 g) obtida do extrato em diclorometano, foi cromatografada em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM) utilizando-se como solvente hexano, hexano- CH_2Cl_2 (98:2, 95:5, 90:10, 80:20 e 50:50), CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -EtOAc (98:2, 95:5, 90:10, 80:20 e 50:50) e acetona obtendo-se 156 frações. As frações 30 a 47 foram reunidas (239 mg) e recromatografadas em sílica gel 60 (230-400 mesh) com o mesmo sistema de eluentes, obtendo-se as frações 26 (17 mg) e 36 (13 mg). Essas frações foram submetidas a filtração em coluna de gel de SEPHADEX LH-20, utilizando-se como fase móvel MeOH- CHCl_3 (1:1, v/v), obtendo-se a substância **1** (22,3 mg). A fração 2 (1,14 g) do extrato metanólico foi cromatografada em sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM), por eluição com hexano, hexano- CH_2Cl_2 (98:2, 95:5,

Tabela 2. Dados de RMN ^{13}C (δ) de **1**, lupeol (**1A**) (Razdan et al., 1988) e do derivado do lupano **1B** (Wenkert et al., 1978)

Carbono	Padrão Hidrogenação	1 δ_{C} ^(a)	1A δ_{C} ^(b)	1B δ_{C} ^(c)
1	CH ₂	38,5	38,7	40,2
2	CH ₂	27,6	27,4	18,6
3	CH	77,1	78,8	42,0
4	C	38,6	38,3	33,2
5	CH	55,0	55,2	56,1
6	CH ₂	18,2	18,3	18,6
7	CH ₂	34,2	34,2	34,5
8	C	41,1	40,9	41,5
9	CH	49,8	50,3	50,2
10	C	36,7	37,3	37,4
11	CH ₂	21,1	20,9	21,2
12	CH ₂	27,2	25,1	29,1
13	CH	36,2	38,0	37,4
14	C	43,0	42,8	43,5
15	CH ₂	27,4	27,4	27,5
16	CH ₂	33,2	35,5	35,5
17	C	48,7	42,9	44,6
18	CH	48,4	48,2	48,2
19	CH	50,9	47,9	49,9
20	C	71,1	150,6	73,3
21	CH ₂	28,1	29,8	28,7
22	CH ₂	38,5	39,9	40,2
23	CH ₃	31,8	28,0	33,3
24	CH ₃	16,1	15,4	21,5
25	CH ₃	15,9	16,1	16,1
26	CH ₃	15,9	15,9	16,2
27	CH ₃	15,2	14,5	14,8
28	CH ₃	15,9	18,0	19,2
29	CH ₃	25,1	109,2	24,8
30	CH ₃	28,3	19,3	31,4

(a) 75,5 MHz, (CD₃)₂SO, (b) 62,89 MHz, CDCl₃, (c) 25,2 MHz, CDCl₃*Os sinais de carbonos quaternários, metínicos, metilênicos e metílicos foram reconhecidos pela análise comparativa dos espectros de DEPT 135° e 90°, $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -HSQC.

90:10, 80:20 e 50:50), CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, -EtOAc (98:2, 95:5, 90:10, 80:20 e 50:50) e acetona, obtendo-se as substâncias **3** (3 mg) e uma mistura de duas substâncias **4** e **5** (3 mg). As frações 21 a 25 foram reunidas (100 mg) e cromatografadas em coluna de filtração em gel de SEPHADEX LH-20, utilizando-se como fase móvel MeOH-CHCl₃ (1:1, v/v), obtendo-se 34 frações e purificadas em sílica gel 60 (230-400 mesh) hexano-acetona (98:2, 95:5, 90:10, 80:20 e 50:50) e acetona, obtendo-se a substância **2** (3,8 mg) (Figura 1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do extrato em diclorometano do caule de *Almeidea coerulea* foi isolado o triterpeno (**1**) e do extrato metanólico foram isolados dois alcalóides (**2**) e (**3**) e uma mistura de esteróides (**5**) e (**6**). Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram idênticos aos da literatura para

a dictamina (**2**) (Chen et al. 1996) e eskimianina (**3**) (Chakravarty et al., 1999) e a mistura de esteróides como sitosterol e estigmasterol (**4** e **5**) por meio da comparação dos espectros de massas, RMN de ^1H e ^{13}C , com os dados da literatura (Pessoa et al., 1995).

No espectro de massas de **1**, observou-se o íon pseudomolecular detectado em m/z 483 $[\text{M}+\text{K}]^+$, por electrospray (ESI) no modo positivo. A análise conjunta dos espectros de massas, de RMN ^1H , RMN ^{13}C , RMN ^{13}C -DEPT de **1** (Tabelas 1 e 2) permitiu propor a fórmula molecular C₃₀H₅₂O₂. No espectro de RMN ^1H de **1**, observou-se um multipletto em 2,94-3,04 δ (2H, m), atribuído aos hidrogênios H-3 e H-19. Outro multipletto em 3,58-3,60 δ (1H, m) foi atribuído a H-5. Um dubleto em 4,26 δ (1H, d, $J = 5,4$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila ligada ao C-3. O sinal de hidrogênio dessa hidroxila não apresenta correlação no espectro de correlação heteronuclear de hidrogênio e

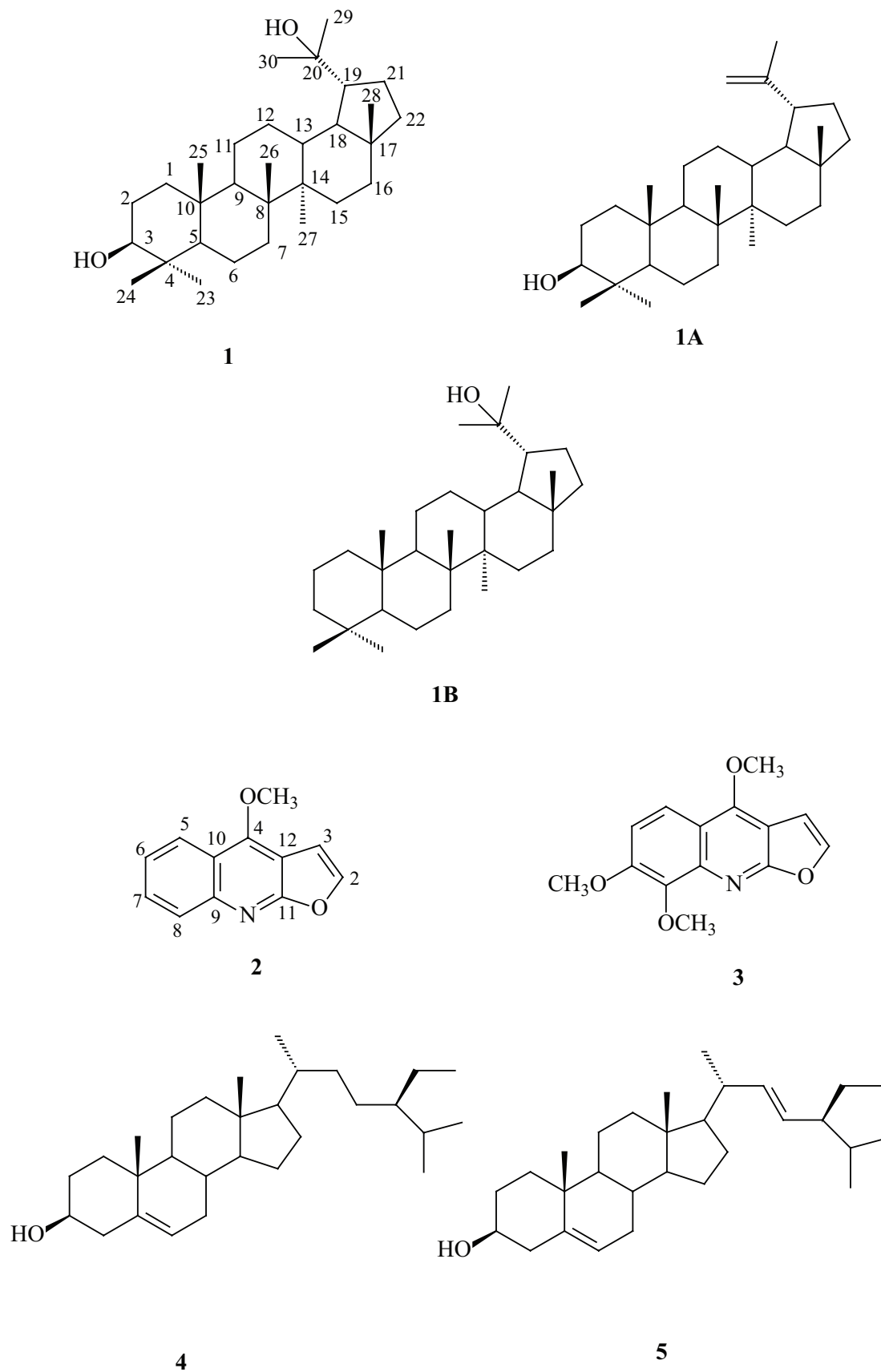


Figura 1. Constituintes químicos de *Almeida coerulea* (Nees & Mart.) A. St.-Hil. Rutaceae.

carbono HETCOR e $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -HSQC, confirmando ser um hidrogênio ligado ao átomo de oxigênio. O acoplamento do hidrogênio dessa hidroxila com o hidrogênio carbinólico na posição α também foi confirmado pelo espectro de correlação homonuclear de hidrogênio $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY. Observou-se a presença de sete singletos de hidrogênios metílicos, com integral para 24 hidrogênios, sugerindo a presença de oito grupos metila, correspondentes a H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-29 e H-30 em 1,07 δ (6H, s); 0,76 δ (3H, s); 0,64 δ (3H, s); 0,98 δ (3H, s); 0,91 δ (3H, s); 0,95 δ (3H, s); e 0,86 δ (3H, s), respectivamente.

Mediante a análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C e RMN ^{13}C -DEPT ($\theta = 135^\circ$ e $\theta = 90^\circ$, a 50 MHz), de correlação heteronuclear de hidrogênio $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -HSQC e carbono a longa distância $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3 , HMBC) foi possível atribuir os seis sinais de carbonos quaternários, seis de carbonos metínicos, dez de carbonos metilênicos e oito de carbonos metílicos. Os sinais em 77,1 e 71,1 ppm foram atribuídos aos carbonos carbinólicos em C-3 e C-20, respectivamente, confirmando a presença de um grupo hidroxila em cada uma dessas posições. A análise dos espectros de Massas, RMN ^1H , RMN ^{13}C e a comparação com os dados da literatura para o lupeol (**1A**) (Razdan et al., 1988) e para o derivado do lupano (**1B**) (Wenkert et al., 1978), permitiram identificar a substância **1** o 20-hidroxi-diidroloupeol, já relatado na literatura, e não foi encontrado relato na literatura de seus dados de RMN ^{13}C .

20-Hidroxi-diidroloupeol (1): Aspecto físico: sólido amarelo amorfo. RMN de ^1H [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ Tabela 1. RMN de ^{13}C [75,5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ Tabela 2. ESI-MS: m/z (int. rel.): 483 $[\text{M}+\text{k}]^+$ (65).

Dictamina (2): Aspecto físico: sólido amarelo amorfo. UV (MeOH) λ_{max} /nm (log ϵ): 240 (3,93), 311 (3,22). RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 8,09 (d , $J = 8,5$ Hz, H-5); 7,78 (d , $J = 8,5$ Hz, H-8); 7,71 (d , $J = 2,0$ Hz, H-2); 7,65 (t , $J = 8,5$ Hz, H-7); 7,38 (t , $J = 8,5$ Hz, H-6); 7,21 (d , $J = 2,0$ Hz, H-3); 4,37 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O-4}$). RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD): δ 162,6 (C-11), 157,0 (C-4), 145,1 (C-9), 143,6 (C-2), 129,8 (C-7), 128,0 (C-8), 123,7 (C-6), 121,8 (C-5), 117,0 (C-12), 104,2 (C-3), 102,5 (C-10), 58,0 ($\text{CH}_3\text{O-4}$). ESI-MS: m/z (int. rel.): 200 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100) e 222 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (40).

Eskimianina (3): Aspecto físico: sólido amarelo amorfo. IV: ν_{max} . NaCl cm^{-1} : 1618, 1486, 1486, 1092, 869. UV (MeOH) λ_{max} /nm (log ϵ): 251 (3,77), 328 (3,04). RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 7,95 (d , $J = 7,1$ Hz, H-5); 7,67 (d , $J = 2,1$ Hz, H-2); 7,28 (d , $J = 7,1$ Hz, H-6); 7,23 (d , $J = 2,1$ Hz, H-3), 4,39 (s, $\text{CH}_3\text{O-4}$); 3,93 (s, $\text{CH}_3\text{O-8}$); 3,86 (s, $\text{CH}_3\text{O-7}$). RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD): δ 142,3 (C-2), 117,6 (C-5), 111,2 (C-6), 104,2 (C-3), 59,6 ($\text{CH}_3\text{O-4}$), 55,0 ($\text{CH}_3\text{O-7}$), 61,7 ($\text{CH}_3\text{O-8}$). ESI-MS: m/z (int. rel.): 260 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (12) e 282 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (12).

Sitosterol/estigmasterol (4 e 5): Aspecto físico: sólido branco amorfo. ESI-MS: m/z (int. rel.): 413 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (47), 437 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (70).

CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu identificar substâncias químicas isoladas dos extratos metanólico e em diclorometano obtidos do caule de *Almeidea coerulea*. Foi possível também estabelecer, pela primeira vez, os dados de RMN ^{13}C de um triterpeno do tipo lupano o 20-hidroxi-diidroloupeol (**1**). Essas substâncias químicas foram relatadas pela primeira vez nessa espécie e vêm contribuir para o conhecimento da quimiosistemática desse gênero.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Capacitação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, e ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque BWP 1976. Revisão taxonômica de Rutaceae do Estado do Amazonas. *Acta Amazônica* 6: 1-67.
- Ambrozini ARP, Vieira PC, Fernandes JB, Silva MFGF, Albuquerque S 2004. Trypanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae plant extracts. *Mem I Oswaldo Cruz* 99: 227-231.
- Chakravarty AK, Sarkar T, Masuda K, Shiojima K 1999. Carbazole alkaloids from roots of *Glycosmis arborea*. *Phytochemistry* 50: 1263-1266.
- Chen IS, Wu SJ, Leu YL, Tsai IW, Wu TS 1996. Alkaloids from root bark of *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry* 42: 217-219.
- Claude M, Wirasutisna KR, Gleye J, Loiseau P, Stanislas E, Moretti CA 1983. 2-Quinolone alkaloid from *Almeidea guyanenses*. *Phytochemistry* 22: 2095-2096.
- Fournet A, Ferreira ME, De Arias AR, Ortiz ST, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R 1996. *In vivo* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis* *Antimicrob Agents Ch* 40: 2447-2451.
- Lavaud C, Massiot G, Vasquez C, Moretti C, Sauvain M, Balderrama L 1995. 4-Quinolone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. *Phytochemistry* 40: 317-320.
- Lúcio EMRA, Rosalen PL, Sharapin N, Souza-Brito ARM 2000. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Rev Bras Farmacogn* 9/10: 23-35.
- Mabberley DJ 2004. Citrus (Rutaceae): A review of recent advances in ethymology, systematics and medical applications. *Blumea* 49: 481-498.
- Mafezoli J, Vieira PC, Fernandes JB, Silva MFGF, Albuquerque S 2000. *In vitro* activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol* 73: 335-340.

- Pessoa ODL, Lemos TLG, Carvalho MG, Braz-Filho R 1995. Cordiachromes from *Auxemma oncocalyx*. *Phytochemistry* 40: 1777- 1786.
- Razdan KT, Harkar S, Qadri B, Qurishi AM, Khuroo AM 1988. Lupene derivatives from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry* 27: 1890-1892.
- Rey L 1991. *Parasitologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Santos CS, Januario AH, Vieira PC, Fernandes JB, Silva, MFGF, Pirani JR 1998. Cycloartane triterpenoid and alkaloids from *Almeidea* spp. *J Braz Chem Soc* 9: 39-42.
- Silva, MFGF, Gottlieb OR, Ehrendorfer F 1988. Chemosystematics of the Rutaceae: Suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family". *Plant Syst Evol* 161: 97-134.
- Silveira TGV, Arrais MAA, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MVC, Roberto ACBS, Ramos M, Sobribho NA, Ishikawa E, Shaw J 1999. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 413-423.
- Waterman PG, Grundon MF 1983. *Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales*. London: Academic Press.
- Wenkert E, Baddeley GV, Burfitt IR, Moreno LM 1978. C-13 nuclear magnetic-resonance spectroscopy of naturally-occurring substances .57. Triterpenes related to lupane and hopane. *Org Magn Reson* 11: 337-343.