

## Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker

Ricardo Basso Zanon,<sup>1</sup> Danielle Fontana Pereira,<sup>1</sup> Ticiane Krapf Boschetti,<sup>1</sup> Mariane dos Santos,<sup>1</sup> Margareth Linde Athayde<sup>\*,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Camobi, 97119-900 Santa Maria-RS, Brasil,

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Camobi, 97119-900 Santa Maria-RS, Brasil

**RESUMO:** Fracionamento cromatográfico da fração em diclorometano obtida do extrato etanólico das folhas de *Vernonia tweediana* Baker (Asteraceae) conduziu ao isolamento de  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, lupeol,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e espinasterol. As estruturas foram identificadas através de técnicas espectroscópicas usuais, além da comparação com dados relatados na literatura. Os compostos isolados são relatados pela primeira vez para a espécie *V. tweediana*.

**Unitermos:** *Vernonia tweediana*, Asteraceae, triterpenos, esteróides.

**ABSTRACT:** "Phytoconstituents isolated from dichloromethane fraction of *Vernonia tweediana* Baker leaves". Fractionation of the dichloromethane -soluble fraction from the ethanol extract of the leaves of *Vernonia tweediana* (Asteraceae) led to the isolation of  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin, lupeol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol and spinasterol. The structures of the isolates were elucidated by spectroscopic analysis and comparison with literature data. The isolated compounds are reported for the first time to the species *V. tweediana*.

**Keywords:** *Vernonia tweediana*, Asteraceae, triterpenes, steroids.

### INTRODUÇÃO

O gênero *Vernonia* (Asteraceae) abrange uma grande diversidade de espécies, com representantes no mundo inteiro. As espécies deste gênero são utilizadas em várias partes do mundo para o tratamento de diversas enfermidades, salientando-se o uso para o tratamento da malária, em doenças respiratórias e distúrbios gastrintestinais. Os principais constituintes relatados para o gênero são lactonas sesquiterpênicas, flavonóides, triterpenos, esteróides, lignóides e carotenóides, além de alcalóides e taninos (Awe et al., 1998; Carvalho et al., 1999; Barbosa-Filho et al., 2008).

No Brasil, várias espécies de *Vernonia* são utilizadas empiricamente pela população, destacando-se o macerado de folhas de *V. condensata* Baker, usado como analgésico, anti-ulcerogênico e para a prevenção de distúrbios no estômago e fígado (Frutuoso et al., 1994) e os extratos alcoólicos de *V. scorpioides* (Lam.) Pers., utilizados no tratamento dos mais variados ferimentos cutâneos (Dalazen et al., 2005).

A espécie *Vernonia tweediana* Baker, conhecida como "assa-peixe", é um arbusto e representa uma das principais plantas invasoras de pastagens artificiais implantadas ao longo da costa atlântica (Cabrera & Klein, 1980). Característica da região sul do Brasil, Paraguai

e Argentina, a planta é popularmente utilizada para o tratamento de doenças respiratórias, constituindo-se de uma alternativa de tratamento em gripes, bronquites e tosses. A ausência de estudos sobre a espécie e a importância do registro químico de espécies endêmicas dos biomas brasileiros, principalmente as que são utilizadas para fins terapêuticos, motivaram o presente trabalho, que descreve os primeiros resultados obtidos no estudo fitoquímico da fração em diclorometano das folhas de *V. tweediana*.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Instrumentação e procedimentos gerais

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram registrados em espectrômetro Nicolet Magna 550, utilizando-se pastilhas de KBr. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) e de <sup>13</sup>C (100 MHz), foram realizados em espectrômetro Bruker DPX, utilizando-se CDCl<sub>3</sub> como solvente e TMS como padrão de referência interna. As análises de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo Hewlett-Packard 6890 Series Plus +, equipado com injetor automático split-splitless modelo

HP 6890 Series GC Auto Sampler Controller e detector seletivo de massas modelo HP 5973 MSD, utilizando-se coluna capilar cromatográfica de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,32 mm diâmetro interno e espessura do filme 0,25 µM) com 5% fenil e 95% de metilsiloxano. O gás de arraste foi hélio (fluxo de 2 mL/min). Temperatura do injetor de 250 °C com programação de taxa de aquecimento de 12 °C/min até 280 °C. Energia de ionização 70 eV. Para as cromatografias em coluna, utilizou-se gel de sílica 60 da Merck, com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 mesh-ASTM). Para cromatografia de camada delgada (CCD) utilizou-se cromatofolhas de gel de sílica GF<sub>254</sub> (Merck) e gel de sílica impregnado com solução de nitrato de prata a 10% (Stahl, 1969). Para a detecção das substâncias, utilizou-se anisaldeído-sulfúrico seguido de aquecimento.

### Material vegetal

Folhas de *V. tweediana* foram coletadas em abril de 2004 em Ijuí-RS e identificadas pelo Dr. Geraldo Ceni Coelho do Departamento de Biologia e Química (DeBQ/UNIJUÍ). A exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM, catalogada sob o número SMDB 9536.

### Extração e isolamento dos constituintes

As folhas foram secas a temperatura ambiente e moídas, resultando em uma massa de 1,9 Kg de material vegetal, que foi submetido à maceração em EtOH 65% em água (v/v), na proporção de 15 g/100 mL de solvente, durante sete dias, com agitação diária. O extrato obtido foi filtrado e o EtOH removido sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O extrato aquoso remanescente foi fracionado com solventes de polaridade crescente (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e *n*-BuOH e 3 x 200 mL para cada solvente). A fração em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna "flash" sobre gel de sílica 60 (225 g) usando-se inicialmente como fase móvel apenas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 L) e posteriormente as misturas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH 9:1 v/v (1L) e 8,5:1,5 v/v (1L). Foram coletadas 30 frações de ±100 mL, que, após monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD), foram agrupadas com base na semelhança de perfil cromatográfico. O agrupamento de frações conduziu à obtenção de duas principais sub-frações, codificadas como I (2,082 g) e II (131 mg). Parte da sub-fração I (600 mg) foi cromatografada em coluna de gel de sílica 60 (58 g) e eluída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:éter de petróleo (9:1, v/v), obtendo-se outra sub-fração (230 mg) que foi novamente submetida à cromatografia em coluna de SiO<sub>2</sub>-AgNO<sub>3</sub> (22 g), originando o composto **1** (43,6 mg) e a mistura **2 + 3** (50 mg). A sub-fração II (131 mg) foi submetida a cromatografia em gel de sílica 60 (40 g), tendo como eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:éter de petróleo (7:3, v/v). Após monitoramento por cromatografia

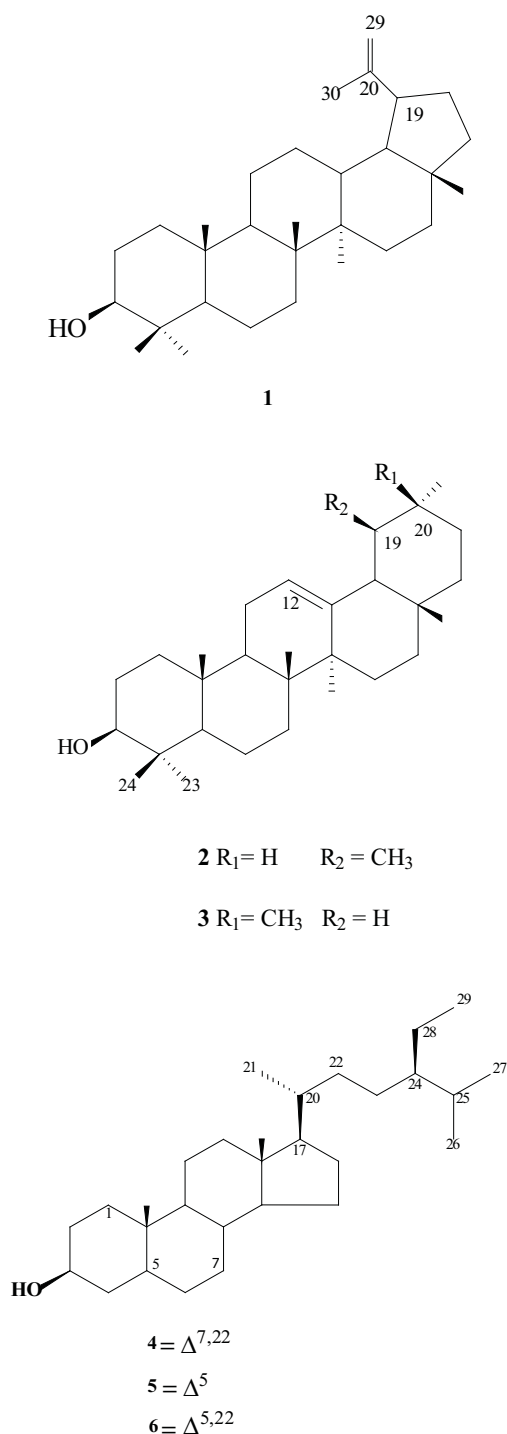
em camada delgada, as frações foram agrupadas com base na semelhança de perfil cromatográfico. Frações reunidas (61 mg) foram novamente cromatografadas em coluna de SiO<sub>2</sub>-AgNO<sub>3</sub> (12 g). As frações obtidas foram analisadas por CCD (SiO<sub>2</sub>/AgNO<sub>3</sub>) verificando-se a separação da substância **4** (7mg) e a da mistura composta por **5 + 6** (27 mg).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sucessivos fracionamentos cromatográficos da fração em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> obtida a partir do extrato hidroetanólico (65%) conduziram ao isolamento de três triterpenos e três fitoesteróides (Figura 1), cujas estruturas foram identificadas com base na análise de dados de IV, EM e RMN, bem como pela comparação com dados descritos na literatura (Ogunkoya, 1981; Chaturvedula et al., 2004; Olea & Roque 1990; De-Eknankul & Potduang, 2003; Forgo & Kövér, 2004; Villaseñor et al., 1996; Cortez et al., 2006).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C de **1**, indicou a presença de trinta átomos de carbono. Desses sinais, dois referentes a carbono sp<sup>2</sup>, são característicos de ligação dupla em compostos com esqueleto lupeno (δ<sub>C</sub> 109,3 e 150,9 ppm), que conjuntamente com o grupo metil em δ<sub>C</sub> 19,3, são indicativos de grupo isopropenil (C-29, C-20 e C-30, respectivamente). No espectro de RMN de <sup>1</sup>H, dois dubletos em δ<sub>H</sub> 4,56 e 4,68 correspondem aos dois hidrogênios geminais olefinicos (H-29a e H-29b). Estes sinais, somados ao δ<sub>H</sub> do sinal de metila em 1,67 ppm, corroboram com a indicação da presença de isopropenil, comprovando assim que **1** trata-se de um triterpeno pentacíclico do tipo lupeno (Chaturvedula et al., 2004; Aguiar et al., 2005). Na análise por CG da substância **1** foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 26,08 min. O EM (IE) mostrou pico em m/z 426, que corresponde ao pico do íon molecular de **1**. Outros picos oriundos da fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder do anel C, são típicos de triterpenos pentacíclicos, principalmente os de maior intensidade como os m/z 218; 207; 203 e 189. Destes, os mais intensos foram m/z 189 e 207, que são característicos de fragmentações de compostos do tipo lupeno (Ogunkoya, 1981), permitindo a identificação do composto **1** como lupeol.

A elucidação da mistura **2 + 3** (α e β-amirina, respectivamente), foi efetuada com base nos assinalamentos de RMN de <sup>13</sup>C e RMN de <sup>1</sup>H descritos na literatura (Ogunkoya, 1981; Olea & Roque 1990; Baykal et al., 1998; Bandeira et al., 2007). O espectro de RMN de <sup>13</sup>C, indicou a presença de 56 átomos de carbonos, sugerindo uma mistura binária de triterpenos. Observaram-se sinais que caracterizam as séries urseno (139,2 e 124,4 ppm) e oleaneno (121,7 e 145,2 ppm). No cromatograma obtido por CG-EM foi possível observar dois picos em tempos de retenção de 25,28 (β-amirina) e 26,07 (α-amirina) min., sendo as proporções



**Figura 1.** Compostos isolados de *V. tweediana*.

entre eles 1:1 (verificadas pelas áreas dos picos). Os espectros de massas foram muito semelhantes, diferindo apenas na intensidade de alguns picos, principalmente o pico em  $m/z$  203 ( $m/z$  218- $CH_3$ , mais intenso  $\beta$ -amirina). Ambos mostraram picos em  $m/z$  426, correspondentes aos íons moleculares dos dois isômeros. Picos oriundos da fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder do anel C, típicos de olean-12-enos e ursan-12-enos, foram

observados em  $m/z$  218; 203 e 189 (Ogunkoya, 1981; Morita et al., 2000).

O espectro de RMN de  $^{13}C$  de **5** + **6** indicou a presença de 43 átomos de carbonos, sugerindo uma mistura binária. Quatro sinais na região de carbonos  $sp^2$  (121,7, 129,3, 138,3 e 140,8 ppm) indicam duas ligações duplas. Os sinais em  $\delta_c$  121,7 e 140,8 são característicos de esteróides com uma ligação dupla entre C-5 e C-6 (Forgo & Kövér, 2004; De-Eknankul & Potduang, 2003; Tomaz et al., 2008) e os sinais em  $\delta_c$  129,3 e 138,3 são característicos de uma ligação dupla entre C-22 e C-23 (Forgo; Kövér, 2004). O  $\beta$ -sitosterol (24 $\alpha$ -etil-colestan-5-eno-3 $\beta$ -ol) e o estigmasterol (24 $\alpha$ -etil-colestan-5,22-dieno-3 $\beta$ -ol) possuem uma mesma insaturação ( $\Delta^5$ ), portanto, os sinais nos espectros de RMN de  $^{13}C$  irão coincidir e assim C-5 e C-6 estarão mais intensos quando comparados com os outros dois sinais referentes a insaturação em  $\Delta^{22}$ , presente somente em estigmasterol (De-Eknankul & Potduang, 2003; Ayres et al., 2008). No espectro de RMN de  $^1H$  destacam-se o singleto largo em  $\delta_H$  5,36 (H-6), comum em ambos os compostos e os duplo-dubletes em  $\delta_H$  5,02 ( $J = 8$  e 16 Hz, H-23) e 5,16 ( $J = 8$  e 15 Hz, H-22), que caracterizam os demais hidrogênios olefínicos do estigmasterol (De-Eknankul & Potduang, 2003; Forgo & Kövér, 2004). O cromatograma resultante do CG-EM mostrou os dois picos referentes ao estigmasterol (TR = 23,83 min.) e ao  $\beta$ -sitosterol (TR = 24,70 min.). As concentrações percentuais, com base nas áreas dos picos, foram de 91:9 estigmasterol (**6**)/ $\beta$ -sitosterol (**5**).

O espectro de RMN de  $^{13}C$  de **4** registrou a presença de 29 átomos de carbono. Desses sinais, quatro característicos de carbonos  $sp^2$  ( $\delta_c$  117,5, 129,5, 138,1 e 140,8 ppm) sugerem a presença de duas ligações duplas. Estes sinais são característicos de compostos com esqueletos esteroidais ramificados, quando uma das insaturações está localizada entre C-7 e C-8 ( $\delta_c$  117,5 e 138,1) e a outra entre C-22 e C-23 ( $\delta_c$  129,5 e 140,8) (Villaseñor et al., 1996; Gomes & Alegrio, 1998). O EM mostrou pico em  $m/z$  412, indicando a fórmula molecular  $C_{29}H_{50}O$ . O pico base a  $m/z$  271 caracteriza a presença de ligação dupla na posição 7 em moléculas esteroidais (Villaseñor et al., 1996). O espectro de IV apresenta um sinal em  $970\text{ cm}^{-1}$ , indicativo da posição *trans* em  $HC=CH$  (C22 e C23) (Villaseñor et al., 1996). O singleto largo em  $\delta_H$  5,09 foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-7 e os sinais em  $\delta_H$  4,96 (1H, *dd*,  $J = 8$  e 15 Hz, H-22 ou H-23) e  $\delta_H$  5,12 (1H, *dd*,  $J = 8$  e 15 Hz, H-22 ou H-23) aos dois hidrogênios olefínicos restantes. A comparação dos deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}C$  e RMN de  $^1H$  da substância **4**, com os registrados na literatura (Garg & Nes, 1984a,b; Villaseñor et al., 1996; Gomes & Alegrio, 1998; Paulo et al., 2005) permitiu propor a estrutura do espinasterol.

Todos os compostos isolados foram descritos previamente para o gênero (Bohlmann & Zdero, 1982; Misra et al., 1984). Estas informações sobre a espécie

*Vernonia tweediana* Baker, conhecida como pertencente a um grupo de plantas de ocorrência marcante na América do Sul, apresentam os primeiros resultados do estudo fitoquímico da fração em diclorometano das folhas da planta. No entanto, o potencial químico merece ser ampliado e a eficácia biológica avaliada.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado (R.B.Z.), ao CNPq (BIC de T. K. B.), ao FIEX/UFSM (Bolsa de Extensão de M.S.), ao Departamento de Química da UFSM, pela confecção dos espectros de RMN e ao Dr. Geraldo Ceni Coelho (UNIJUÍ) pela identificação do material botânico.

## REFERÊNCIAS

- Aguiar RM, David JP, David JM 2005. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphilla*. *Phytochemistry* 66: 2388-2392.
- Awe SO, Olajide O, Makinde JM 1998. Cathartic effect of the leaf extract of *Vernonia amygdalina*. *Phytother Res* 12: 57-58.
- Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, Chaves MH 2008. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Rev Bras Farmacogn* 18: 90-97.
- Bandeira PN, Lemos TLG, Costa SMO, Santos HS 2007. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina. *Rev Bras Farmacogn* 17: 204-208.
- Barbosa-Filho JM, Alencar AA, Nunes XP, Tomaz, ACA, Sena-Filho JG, Athayde-Filho PF, Silva MS, Souza MFV, Cunha EVL 2008. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. *Rev Bras Farmacogn* 18: 135-154.
- Baykal T, Panayr T, Tasdemir D, Sticher O, Çalis I 1998. Triterpene saponins from *Scabiosa rotata*. *Phytochemistry* 48: 867-873.
- Bohlmann F, Zdero C 1982. Allenic germacranolides, bourbonene derived lactones and other constituents from *Vernonia* species. *Phytochemistry* 20: 473-480.
- Cabrera AL, Klein RM 1980. Fascículo Compostas: 3. Tribo: Vernoniae. *Flora Ilustrada Catarinense* 324-326.
- Carvalho MG, Costa PM, Abreu HS 1999. Flavones from *Vernonia diffusa*. *J Braz Chem Soc* 10: 163-166.
- Chaturvedula VSP, Zhou B, Gao Z, Thomas SJ, Hecht SM, Kingston DGI 2004. New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase  $\beta$ . *Bioorg Med Chem* 12: 6271-6275.
- Cortez LER, Cortez DAG, Ferreira AG, Vieira PC, Silva MFGF, Fernandes JB 2006. Constituintes químicos de *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A. St.-Hil. Rutaceae. *Rev Bras Farmacogn* 16: 164-169.
- Dalazen P, Molon A, Biavatti MW, Kreuger MRO 2005. Effects of the topical application of the extract of *Vernonia scorpioides* on excisional wounds in mice. *Rev Bras Farmacogn* 15: 82-87.
- De-Eknankul W, Potduang B 2003. Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmaterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry* 62: 389-398.
- Forgo P, Kövér K 2004. Gradient enhanced selective experiments in the  $^1\text{H}$  NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmaterol, a phytosterol derivative. *Steroids* 69: 43-50.
- Frutuoso VS, Gurjão MRR, Cordeiro RSB, Martins MA 1994. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. *Planta Med* 60: 21-25.
- Garg VK, Nes WR 1984a. Studies on the C-24 configurations of  $\Delta^7$ -sterols in the seeds of *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry* 23: 2919-2924.
- Garg VK, Nes WR 1984b. Codisterol and other  $\Delta^5$ -sterols in the seeds of *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry* 23: 2925-2929.
- Gomes DCF, Alegrio LV 1998. Acyl steryl glycosides from *Pithecellobium cauliflorum*. *Phytochemistry* 49: 1365-1367.
- Misra TN, Singh RS, Upadhyay J, Srivastava R 1984. Chemical constituents of *Vernonia cinerea*. Isolation and structure elucidation of a new pentacyclic triterpenoid. *J Nat Prod* 47: 865-867.
- Morita M, Shibuya M, Kushihiro T, Masuda K, Ebizuka, Y 2000. Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*). New  $\alpha$ -amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *Eur J Biochem* 267: 3453-3460.
- Ogunkoya L 1981. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry* 20: 121-126.
- Olea RSG, Roque NF 1990. Análise de misturas de triterpenos. *Quim Nova* 13: 278-281.
- Paulo A, Dias C, Jimeno ML, Borges C, Nascimento JA 2005. A new  $\Delta^{7,22}$  sterol from the bulbs of *Autonoe madeirensis*. *Fitoterapia* 76: 765-767.
- Stahl E 1969. *Thin-layer chromatography – a laboratory handbook*. 2<sup>a</sup> ed. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
- Tomaz ACA, Nogueira RBSS, Pinto DS, Agra MF, Souza MFV, Cunha EVL 2008. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). *Rev Bras Farmacogn* 18: 47-52.
- Villaseñor IM, Lemon P, Palileo A, Bremner JB 1996. Antigenotoxic spinasterol from *Cucurbita maxima* flowers. *Mutat Res* 360: 89-93.