

Outros constituintes isolados de *Licania arianaeae* (Chrysobalanaceae)

Mário G. de Carvalho*, Patrícia M. da Costa

Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro 23890-000
Seropédica-RJ, Brasil

RESUMO: O ácido flavona-6-sulfônico, 4'-*O*-metil-5,7-diidroxi-flavona-6-sulfonato, conhecido como niruriflavona, e a saponina, ácido 3-*O*-[6'-*O*-4-hidroxibenzoil]-β-D-galactopiranosil-ursa-12-en-28-óico, foram isolados, respectivamente, de madeira e folhas de *Licania arianaeae*. As estruturas foram estabelecidas através da análise de espectros de massas e RMN incluindo experimentos bidimensionais.

Unitermos: *Licania arianaeae*, Chrysobalanaceae, niruriflavona, ácido flavona sulfônico, saponina.

ABSTRACT: "Other constituents isolated from *Licania arianaeae* (Chrysobalanaceae)". The flavone-6-sulfonic acid, 4'-metil-5,7-dihydroxy-flavone-6-sulfonic acid, known as niruriflavone, and the saponin 3-*O*-[6'-*O*-4-hydroxybenzoyl]-β-D-galactopyranosyl-ursa-12-en-28-oic acid were isolated, respectively, from wood and leaves of *Licania arianaeae*. The structures were established from the NMR and mass spectra data analysis including two-dimensional NMR experiments.

Keywords: *Licania arianaeae*, Chrysobalanaceae, niruriflavone, flavone sulfonic acid, saponin, benzoyl-galactopyranosyl-ursolic acid.

INTRODUÇÃO

Espécies da família Chrysobalanaceae são largamente usadas na medicina popular tradicional da África e América do Sul (Mendes & Bilia, 1996; Agra et al., 2007, 2008). O gênero *Licania* é comum nos países sul americanos, como Venezuela e Brasil. No Brasil as espécies deste gênero são encontradas em floresta atlântica dos estados de Pernambuco, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Minas Gerais e na região Amazônica. Estudo fitoquímico e farmacológico sobre espécies deste gênero coletadas na região Amazônica revelaram a presença de esteróides, triterpenos, flavonóides e flavonóides glicosilados além de atividades como antitumoral, antimicrobial e antioxidante. Estas atividades têm sido atribuídas aos flavonóides e triterpenoides isolados destas plantas (Badisa et al., 2000; Braca et al., 2002; Mendez et al., 1997; Oberlies et al., 2001).

A espécie *Licania arianaeae* é conhecida popularmente no nordeste do Brasil como "quebra machado". Em trabalhos anteriores sobre o estudo de *L. arianaeae* descreveram-se o isolamento e identificação de cromonas de folhas (Cândido, 2000; Carvalho et al., 2005) e triterpenos e saponinas de folhas e madeira desta planta (Cândido, 2000; Costa, 2003; Carvalho et al., 2008). Este trabalho descreve os resultados adicionais das análises de frações obtidas em trabalhos anteriores desta espécie. Este estudo conduziu a identificação de

um ácido 6-sulfônico-flavonóide isolado da madeira e de uma saponina triterpênica isolada das folhas desta planta que está sendo descrita pela primeira vez na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos experimentais gerais

Os pontos de fusão (PF) foram determinados em aparelho Kofler e não foram corrigidos. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1600/1605 FT-IR, em KBr e as frequências de absorção foram medidas em cm^{-1} . Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, ^1H e ^{13}C (incluindo experimentos em 2D) foram registrados em espectrômetros Bruker Ac-200 (200 MHz para ^1H e 50.3 MHz para ^{13}C) usando DMSO-d_6 e MeOD-d_4 como solvente e tetrametilsilano como padrão de referência. O espectro de massas de alta resolução com sistema elétron-spray (HRESIMS) foi obtido com espectrômetro VG 7070E-HF usando metanol:água como solvente e detecção em modo negativo.

Material vegetal

O material em estudo pertence a um espécime de *Licania arianaeae* Prance (Chrysobalanaceae),

conhecida popularmente como “quebra machado”, foi coletado na Estrada da Farinha seca (km 2.26) da Reserva Florestal da Companhia da Vale do Rio Doce, Linhares-ES, Brasil, pela Dra Ariane Luna Peixoto (Depto de Botânica, IB-UFRRJ). Uma exsicata (n° 2892) se encontra depositada no Herbário da RBR-IB-UFRRJ. Foi identificada por Ghrilleant T. Prance, N. Y. Botanical Garden.

Extração e isolamento

A madeira seca e moída (1000 g) foi submetida a extração com diclorometano e metanol através de maceração. Os resíduos dos extratos foram obtidos pela destilação do solvente em evaporador rotativo, obtendo-se 85,8 g de material do extrato em diclorometano LAMD (*Licania arianaeae*, Madeira, Diclorometano) e 372,8 g de material do extrato metanólico LAMM (*Licania arianaeae*, Madeira, Metanol). O resíduo do extrato LAMM (342,9 g) foi dissolvido em metanol:água (8:2) e extraído com clorofórmio e acetato de etila. A fração metanólica desta partição (LAMMM, 131,9 g), foi fracionada através de cromatografia em coluna de sílica gel, usando como fase móvel inicial acetato de etila e mistura com metanol em ordem crescente de polaridade até 100% de metanol. Foram obtidas 132 frações de 150 ml cada uma e concentradas em evaporador rotativo. Estas frações foram analisadas através de cromatografia em camada delgada de sílica gel e reunidas em grupos. O grupo de frações 32-43 foi submetido a filtração

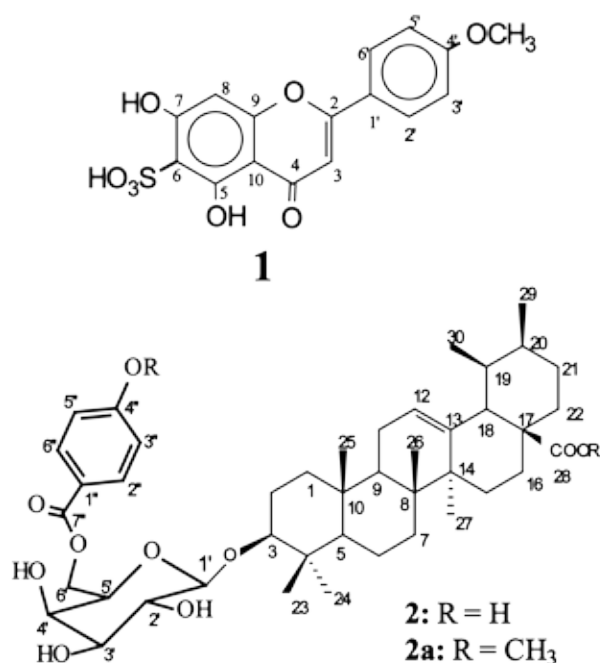
em sephadex usando metanol como eluente e foram coletadas 20 frações de 10 ml cada uma que foram analisadas através de cromatografia em camada delgada com gel de sílica e reunidas em grupos. Os espectros de IV e RMN¹H e ¹³C e massas da fração 14-20 foram compatíveis com a substância aromática identificada como **1** (PF 298 °C, 60,0 mg). Os resultados dos estudos das demais frações foram divulgados anteriormente (Carvalho et al., 2005; Carvalho et al., 2008).

As folhas secas e moídas (2890 g) foram submetidas a extração com hexano e metanol através de maceração. Os resíduos dos extratos foram obtidos pela destilação dos solventes em evaporador rotativo, obtendo-se 45,0 g de material do extrato hexânico LAFH (*Licania arianaeae*, Folhas, Hexano) e 240,48 g de material do extrato metanólico LAFM (*Licania arianaeae*, Folha, Metanol). O extrato metanólico (LAFM) foi submetido ao mesmo procedimento acima. A fração acetato de etila (LAFMA, 54,9 g) foi fracionada através de cromatografia em coluna com gel de sílica, usando como fase móvel inicial diclorometano seguido da mistura com acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade até metanol (100%). Foram obtidas 76 frações de 150 ml cada uma e concentradas em evaporador rotativo. Estas frações foram analisadas através de cromatografia em camada delgada de sílica gel e reunidas em grupos. O grupo de frações 5-7 foi submetido a filtração em sephadex usando metanol como eluente, coletando-se 13 frações de 10 ml cada uma. A análise dos espectros de IV, RMN¹H e ¹³C da

Tabela 1. Dados de RMN ¹³C (50 MHz) e ¹H (200 MHz), incluindo experimentos HMQC, de **2** em MeO-d₄.

C	δ _C	δ _H	C	δ _C	δ _H
1	38,3	-	22	34,4	
2	26,9	-	23	28,4	
3	90,4	3,76 (m)	24	16,2	
4	46,0		25	17,1	
5	56,9		26	18,0	
6	19,3		27	24,5	0,83-1,1
7	31,9		28	183,9	
8	40,7		29	18,1	
9	45,9		30	21,7	
10	37,9		1'	106,6	4,9*
11	25,1		2'	72,1	
12	126,5	5,24(sl)	3'	74,9	
13	139,8		4'	71,8	4,60-3,0
14	43,2		5'	78,0	
15	29,2		6'	65,4	
16	25,1		1''	131,2	
17	46,0		2'',6''	130,0	6,74(d, 2H)
18	54,4	2,18(dl)	4''	156,8	-
19	40,5		3'',5''	115,8	6,53(d, 2H)
20	40,1		7''	174,1	
21	31,9		HO-4''	-	7,15(sl)

*Sobreposto pelo sinal da H₂O.



fração 9-11 permitiu identificar a saponina **2** (PF 288 °C, 75,0 mg).

Ácido 4'-metoxi-5,7-diidroxi-flavona-6-sulfônico (1): RMN ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): 12,70(HO-7), 13,90(HO-5), 8,14 (d; 7,9 Hz, H-2',6'), 7,21 (d; 7,9 Hz, H-3',5'), 6,67 (s, H-8), 6,61 (s, H-3), 3,94 (s, OCH₃) e RMN ¹³C(50,3 MHz, DMSO-d₆): 182,1(C-4), 163,3(C-7), 162,4 (C-5), 160,8 (C-4'), 160,3 (C-2), 156,9 (C-9) 128,2 (C-2',6'), 122,6 (C-1'), 114,0 (C-6), 103,4 (C-10 e C-3), 114,7 (C-3',5'), 94,1 (C-8), 55,6 (OCH₃); EM-IES: *m/z*: 364,1871 (15%, M⁻), 363,1650 (100%, M⁻ - H), 348,1425 (80%, M⁻ - H - CH₃), 267 (15%, M⁻ - SO₃ - OH), 283 (24%, M⁻ - [HSO₃]) e 225 (15%, 283 - H₂CO - CO).

RESULTADO E DISCUSSÃO

A análise dos dados de frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico da madeira de *Licania arianae* Prance conduziu a identificação do ácido flavona-sulfônico, 4'-metoxi-5,7-diidroxi-flavona-6-sulfônico (**1**) e do extrato metanólico de folhas identificou-se a saponina, ácido 3-*O*-[6'-*O*-4-hidroxibenzoil]-β-D-galactopiranosil-ursa-12-en-28-óico (**2**).

O espectro de IV de **1** apresentou sinal forte de absorção em 1679 cm⁻¹ típico de carbonila conjugada, sinal largo em 3437 de ν_{OH} além de absorções características de sistemas aromáticos oxigenados. Observaram-se sinais no espectro de RMN ¹H em δ_H 8,14 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H) e 7,21 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H) de hidrogênios em anel aromático para substituído, sinal em δ_H 3,94 (s, 3H) de grupo metoxila, dois simpletos em δ_H 6,67 (1H) e 6,61 (1H), além de dois sinais (sl)

em δ_H 12,70 e 13,9 compatíveis a duas hidroxilas queladas. Estes dados e a revelação em cromatografia em camada delgada analítica com cloreto de alumínio, permitiram propor a estrutura de uma flavona contendo um sistema aromático para substituído, uma metoxila, duas hidroxilas fenólicas e um substituinte adicional nas posições 3, 6 ou 8. O espectro de RMN ¹³C (BBD e DEPT) mostrou sinais em δ_{CH} 128,2 (2C, C-2',6'), 114,7 (2C, C-3',5'), 103,4 (compatível para CH-3) e 94,1 (compatível para CH-8); δ_{OCH₃} 55,6 e nove sinais de carbonos quaternários, sendo um de carbonila de flavona com HO-5 (δ_C 182), cinco carbonos oxigenados sp² [δ_C: 163,3 (C-7), 162,4 (C-5), 160,8(C-4'), 160,3 (C-2) e 156,9(C-9) e três não oxigenados [δ_C 122,6 (C-1'), 114,0(C-6) e 103,4 (C-10)]. Estes dados, os sinais detectados no espectro ¹³C-¹H-COSY (¹J_{CH}) e os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos metínicos e quaternários confirmaram a proposta de uma flavona contendo substituintes em 4' (OCH₃), 5 (HO), 7 (HO). A ausência do sinal em δ_{CH} 98 compatível com o HC-6 de flavona e o sinal em 114,0 (δ_C) permitiu propor o substituinte adicional em 6. O valor de δ_{CH} em 114,7 é compatível com a localização da metoxila em 4'. Os dados acima permitiram propor a fórmula C₁₆H₁₁O₅ (*m/z* = 283 u) a partir da fórmula parcial C₃(=C-O)₃(C=O)₁(=CH)₆(CH₃)₁. O espectro de massas (MS/MS) em modo negativo do íon de maior massa detectado no espectro obtido com sistema elétron Spray (*m/z* 363), apresentou picos cujos *m/z* (veja experimental) justificaram a flavona proposta. A diferença *m/z* 363 - 283 = 80 é compatível com um sulfonato (SO₃). A localização deste grupo em 6 justifica os valores detectados nos espectros de RMN em δ_C 114,0 (C-6) e de δ_H em 12,7 e 13,9 devido a ligação de hidrogênio entre HO e os oxigênios da carbonila e do sulfonato. Estas informações acordaram com a proposta do ácido 4'-metoxi-5,7-diidroxi-flavona-6-sulfônico para a substância **1** isolada anteriormente de *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae), conhecida como niruriflavona (Thana et al., 2006).

O espectro de IV de **2** apresentou sinais de absorção de ν_{OH} em 3416 cm⁻¹ (compatível para ácido carboxílico), de carbonila conjugada de éster (1696 cm⁻¹), de sistema aromático (1517 e 1452 cm⁻¹) e 1230 cm⁻¹ (ν_{C-O}). Os sinais observados no espectro de RMN em δ_H 6,53 (2H), 6,74 (2H) e 7,15 (HO) são característicos de sistema aromático para substituído. Estes dados e os valores de deslocamentos químicos detectados no espectro de RMN ¹³C δ_C: 174,1 e 131,2, δ_{CH}: 130,0 e 115,8 (Tabela 2) permitiram propor a unidade *p*-hidroxibenzoila. O singlete largo em δ_H 5,24, série de sinais entre 4,6-3,0 e 2,30-1,5 e uma série de singletos entre 0,83-1,1 são compatíveis com um triterpeno ligado a uma unidade de carboidrato. A análise detalhada do espectro de RMN ¹³C (BBD e DEPT) permitiu identificar os sinais de carbonos metílicos, metilênicos, metínicos e quaternários e comparar com valores do ácido ursólico

e derivados (Mahato & Kundu, 1994; Barreto et al., 1998), com os dados do 6'-*O*-benzoil derivado da glicose (Velandia et al., 2002) e com dados da galactose (Breitmaier & Voelter, 1987). Esta análise e comparação de valores de deslocamentos químicos permitiram propor a estrutura de uma saponina derivada do ácido ursólico. Os sinais em δ_{CH} 106,6, 78,0, 74,9, 72,1 e 71,8 e δ_{CH_2} 65,4 foram semelhantes aos da galactose contendo um substituinte no C-6 (Breitmaier & Voelter, 1987). Os grupos carbonilas foram representados pelos sinais em 183,9 (CO₂H, C-28), 174,1 (C-7") e os valores de δ_{CH} 90,4 e δ_{CH_2} 65,4 são compatíveis com os deslocamentos químicos dos carbonos 3 e 6 sustentando, respectivamente, os grupos glicopiranosila e benzoila. A análise dos espectros e comparação com valores da literatura (Barreto et al, 1997; Mahato & Kundu, 1994; Velandia et al., 2002) permitiram fazer a atribuição dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono-13 de 2 (Tabela 1) e propor a estrutura do ácido 3-*O*-β-D-galactopiranosil-6'-*(p*-hidroxibenzoil)-ursa-12-en-28-óico que é nova na literatura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelas bolsas e auxílios financeiros concedidos e ao Prof. Dr. Marcos N. Eberlin, Departamento de Química, UNICAMP, Campinas-SP, pelo espectro de massas.

REFERÊNCIAS

- Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140.
- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 472-508.
- Badisa RB, Chaudhuri SK, Pilarinou E, Rutkoski NJ, Hare J, Levenson CW 2000. *Licania michauxii* Prance root extract induces hsp 70 mRNA and necrotic cell death in cultured human hepatoma and collagen carcinoma cell lines. *Cancer* 149: 61-68.
- Barreto ASS, Carvalho MG de, Nery IA, Gonzaga L, Kaplan MAC 1998. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. *J Braz Chem Soc* 9: 430-434.
- Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I, Mendez J 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *L. licaniaeflora*. *J Ethnopharmacol* 79: 379-381.
- Breitmaier E, Voelter W 1987. *Carbon-13 NMR Spectroscopy High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry*, 3rd ed, VCH: Weinheim, 294.
- Cândido LFO 2000. *Triterpenos e cromonas isolados das folhas de L. arianaeae*. Dissertação de Mestrado, PPQO-UFRRJ, Seropédica-RJ, Brasil, 132 p.
- Carvalho MG de, Cândido LFO, Costa PM, Rumjanek VM 2005. Chomones isolated from *L. arianaeae* (Chrysobalanaceae). *Nat Prod Res* 19: 7-12.
- Carvalho MG de, Cândido LFO, Costa PM, Nascimento, IA, Braz-Filho R 2008. Triterpenes acids and saponins isolated from *Licania arianaeae* (Chrysobalanaceae). *Nat Med* 62: 360-361.
- Costa PM 2003. *Triterpenos, saponinas e flavonóides isolados de Licania arianaeae (Chrysobalanaceae) e de Eschweilera longipes (Lecythydaceae)*. Tese de Doutorado, PPGQO-Dpto de Química-UFRRJ, Seropédica-RJ-Brasil, 170 p.
- Mahato SB, Kundu AP 1994. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids- A compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37: 1517-1575.
- Mendez J, Bilia AR 1996. Phytochemical investigation of *Licania* genus: Flavonoids from *L. pyrifolia*. *Pharmacol Acta Helv* 71: 191-197.
- Mendez J, Bilia AR, Morelli I 1997. Phytochemical investigation of *Licania* genus: Flavonoids and triterpenoids from *L. carii*. *Acta Pharm Helv* 71: 191-197.
- Oberlies NH, Burges JP, Navarro HA, Pinos RE, Soejarto DD, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Wani MC, Wall ME 2001. Bioactive constituents of roots of *L. intrapetiolaris*. *J Nat Prod* 64: 496-501.
- Thana NN, Fotso S, Poeggeler B, Hardeland R, Laatsch H 2006. Niruriflavone, a new antioxidant flavone sulfonic acid from *Phullanthus niruri*. *Z Naturforsch* 61b: 57-60.
- Velandia JR, Carvalho MG, Braz-Filho R, Werle AA 2002. Biflanoid and glucopyranosil derivatives from *Ouretea semisserrata*. *Phytochem Anal* 18: 283-292.