

## TRITERPENOS, ESTERÓIDE GLICOSILADO E ALCALÓIDE ISOLADOS DE *Simira glaziovii*

Cassia Cristina Fernandes Alves<sup>1</sup>

Daniela C. Cranchi<sup>1</sup>

Mário Geraldo de Carvalho<sup>1</sup>

Sebastião José da Silva<sup>2</sup>

### RESUMO

O fracionamento cromatográfico dos extratos obtidos com solventes orgânicos das folhas de *Simira glaziovii* permitiu o isolamento do sitosterol, dois triterpenos acetilados, acetato de butirospermol e acetato de eufol, hexadecanoato de metila, os ácidos hexadecanóico, octadecanóico e eicosanóico, inositol e a saponina 3b-O-b-D-glicopiranosilsitosterol. Do extrato metanólico da madeira isolaram-se mistura de carboidratos e o alcalóide harmana. As substâncias foram identificadas através de análise dos dados espectrométricos de IV, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (PND e DEPT) e CG-EM, incluindo comparação com dados da literatura.

**Palavras-chave:** *Simira glaziovii*, esteróide, triterpenos, harmana

### ABSTRACT

#### TRITERPENES, GLUCOSYL STEROID AND ALKALOID ISOLATED FROM *Simira glaziovii*

Chromatographic fractionation of leaves extracts from *Simira glaziovii* (Rubiaceae) afforded methyl hexadecanoate, hexadecanoic, octadecanoic and eicosanoic acids, inositol, sitosterol, two triterpenes acetyl derivatives, butirospermol acetate and eufol acetate beside the saponin, 3b-O-b-D-glucopyranosylsitosterol. From the woods were isolated a carbohydrate mixture beside the harmane alkaloid. The identification of the compounds were established by IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and GC-MS analysis beside comparison with the literature data.

**Key words:** *Simira glaziovii*, steroid, triterpenes, harmane

### INTRODUÇÃO

O interesse sobre o estudo químico de espécies de *Simira* tem se baseado principalmente nas

atividades fototóxicas apresentadas por alguns constituintes isolados, e pelas informações etnomédicas sobre as cascas frescas de *S. rubescens* que são usadas no tratamento de

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

<sup>2</sup> DB, IB, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

manchas na cavidade oral e dentária (LEWIS et al., 1984). As espécies estudadas até o momento são: *S. Maxonii* (CASTRO & LOPES, 1986; HASBUN et al., 1989; KELLY & SUNDARESAN, 1993), *S. mexicana* (CASTANEDA et al., 1991), *S. Salvadorensis* e *S. rubra* (ARNASON et al., 1983). Além de policetídeos foram isolados alcalóides furoquinolínico e  $\beta$ -carbolínicos destas espécies vegetais. Os alcalóides mais comuns neste gênero são a harmana, maxonina e strictosamida os quais têm sido caracterizados como substâncias fotossensibilizantes (CASTANEDA et al., 1991). Trabalhos recentes revelam o isolamento do sitosterol, estigmasterol, 3,4-dimetoxicinamato de metila e os alcalóides harmana e ofiorina B das cascas de *Simira glaziovii* (BASTOS, 2001).

Neste trabalho descreve-se a identificação de ácidos e ésteres metílicos alifáticos, dois triterpenos tetracíclicos, uma saponina esteroideal e o alcalóide  $\beta$ -carbolínico harmana da madeira e folhas de *S. glaziovii*. Este é o primeiro registro de triterpeno tetracíclico e saponina no gênero *Simira*.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Procedimentos experimentais gerais:* Os pontos de fusão foram determinados em placa aquecida de Kofler e não foram corrigidos. Os espectros no infravermelho (IV) foram registrados em pastilhas de KBr no espectrômetro 1420 da Parkin-Elmer. Os espectros de RMN foram registrados no espectrômetro AC-200 ( $^1\text{H}$ : 200,13 MHz e  $^{13}\text{C}$ : 50,3 MHz) da Bruker, usando soluções em  $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{D}_3\text{COD}$ , com TMS para referência interna, em tubos de 5 mm. Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro VG-Quatro. Nas separações cromatográficas em coluna e camada fina analítica e preparativa usou-se sílica gel da Aldrich ou Merck com granulação adequada. As placas cromatográficas foram reveladas com luz UV (254 nm), vapores de iodo e/ou solução alcoólica de vanilina e ácido sulfúrico.

*Material vegetal:* A espécie *S. glaziovii* (K.

Schum) Sterm (Rubiaceae) usada para estudo foi coletada pelo Prof. Sebastião José da Silva, Dpto de Botânica-IB-UFRRJ, na Reserva Florestal de Tinguá, Nova Iguaçu, RJ. A identificação foi feita através de comparação com a exsicata nº 1513 depositada no herbário do Departamento de Botânica, IB-UFRRJ.

*Isolamento dos constituintes:* As folhas (250,5g) e madeira (1,1 Kg) após secas a sombra foram moídas em moinho de facas e submetidas a extração com hexano até exaustão e depois com metanol. Os solventes foram removidos através de destilação em evaporador rotativo sob vácuo e obtiveram-se os resíduos SGFH, SGFM, SGMH e SGMM. O extrato hexânico SGFH foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica gel obtendo-se 300 frações. Estas frações foram analisadas por cromatografia em camada fina analítica e foram agrupadas. O grupo de frações SGFH-44/52 foi fracionado em uma coluna filtrante de sílica gel e recolheram-se 40 frações. As frações SGFH-44/52-9 (óleo, 30,0 mg) e SGFH-44/52-13 (material pastoso, 40,0 mg), mostraram-se puras de acordo com as análises por cromatografia em camada delgada analítica de sílica. A análise dos espectros no IV e de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  destas frações permitiu identificar uma mistura de dois triterpenos (**5+6**), éster e ácidos alifáticos (**4**), respectivamente. A amostra SGFH 44-13 foi injetada no cromatógrafo de gás acoplado a espectrômetro de massas e foram identificados os ácidos hexadecanóico (**4a**), octadecanóico (**4b**) e eicosanóico (**4c**), além do éster hexadecanoato de metila (**4d**).

A fração SGFH-101/112 foi submetida a cristalização em metanol e forneceu cristais incolores, cuja análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , permitiu identificá-lo como sitosterol (**1**, p.f. 136-138°C, 80,0 mg).

A adição de acetona no extrato metanólico forneceu um precipitado SGFMP que foi submetido a acetilação com anidrido acético em presença de piridina. Este material acetilado foi filtrado em coluna de sílica gel e forneceu um material sólido, após evaporação do solvente. Este material foi cristalizado com metanol e após purificação dos cristais com filtração sob vácuo e lavagem com metanol obteve-

se o produto puro (p.f. 198-199 °C, 45,0mg). Os espectros de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e no IV deste produto foram analisados e permitiu identificá-lo como o hexaacetil-inositol (**3a**).

A água mãe do extrato metanólico (SGFMA) foi fracionada por cromatografia em coluna de sílica gel seca obtendo-se 4 frações. A fração 4 (SGFMA-4) foi filtrada em coluna de sílica gel. O resíduo desta filtração foi acetilado com anidrido acético em presença de piridina. Este foi analisado através de IV e de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (PND e DEPT) e permitiu identificar o tetraacetil-glucosilsterol (**2a**).

O extrato hexânico da madeira foi analisado através de espectros no IV e RMN <sup>1</sup>H e verificou ser constituído de mistura de hidrocarbonetos alifáticos.

O extrato metanólico da madeira foi submetido à fracionamento em coluna cromatográfica de fluorisil com clorofórmio em mistura com metanol. A fração 21 foi submetida à recristalização em diclorometano/metanol obtendo-se um sólido amorfo cujos dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C são idênticos aos do alcalóide harmana (**7**, p.f. 230-231, 40,0 mg).

*Preparação dos derivados acetilados:* O precipitado do extrato metanólico SGFMP (500,0 mg) e a fração SGFMA-4 (40,0mg) foram acetilados através da adição de 1 mL de piridina e 1 mL de anidrido acético e a solução foi deixada em repouso por 24h. Após esse período adicionou-se água destilada gelada no funil de decantação e extraiu-se com clorofórmio três vezes (10mL). Lavou-se a solução clorofórmica com ácido clorídrico 10%, três vezes (10mL), seguido de água destilada (10mL). A solução foi seca com sulfato de sódio anidro e após evaporação do solvente em evaporador rotativo sob vácuo obteveram-se os resíduos dos produtos acetilados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas forneceu o sitosterol (**1**), a mistura dos acetatos dos triterpenos butirospermol e eufol (**5+6**), mistura dos ácidos hexadecanóico (**4a**),

octadecanóico (**4b**), eicosanóico (**4c**) e o éster hexadecanoato de metila (**4d**). Do extrato metanólico isolaram-se inositol (**3**) e a saponina 3β-O-β-D-glicopiranosilsterol (**2**) e do extrato metanólico da madeira identificou-se uma mistura de carboidratos e isolou-se o alcalóide harmana (**7**).

A análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, permitiu identificar a substância **1** como sitosterol (80,0 mg, p.f.= 136-138°C). Esta identificação foi confirmada após comparação com padrão através de cromatografia em camada fina e com os dados espectrométricos deste esteróide descritos na literatura (ITOH et al., 1982; ALVES, 1991).

Os espectros no IV da fração contendo **2a** apresenta banda de absorção em [1730 cm<sup>-1</sup> (n<sub>C=O</sub>) e 1260 cm<sup>-1</sup> (n<sub>C-O</sub>)] de éster confirmando a formação do produto. O espectro de RMN <sup>1</sup>H apresenta sinais semelhantes aos de **1** e sinais adicionais da glicose acetilada [4,55δ, (d, J=9,0 Hz, H-1'), 4,92, 5,04 e 5,17δ (t, J=9,0 Hz, H-2, 4' e 3'), 3,60δ (m, H-5') e 4,19, 4,09δ (d, J = 12,0 Hz, H-6')]. A análise dos espectros de RMN <sup>13</sup>C (PND e DEPT) permitiu identificar um sinal de carbono (CH) anomérico (99,6 δ), cinco sinais de CH carbinólico (72,9; 71,6; 71,5; 68,5 δ), um sinal em 80,8 δ compatível com o deslocamento químico do C-3 de esteróide glicosilado e dois sinais de carbonos sp<sup>2</sup> (δ<sub>C</sub> 140,7 e δ<sub>CH</sub> 121,7) de ligação dupla (Δ<sup>5,6</sup>) de esteróides. Os demais sinais representantes dos grupos metílicos, metilênicos (sendo um CH<sub>2</sub>-O do açúcar, 62,1 δ), metínicos e carbonos quaternários são semelhantes aos do sitosterol registrado na literatura (BRAZ-FILHO, 1986). Os grupos acetoxílicos estão representados pelos singletos em 1,90-2,10 δ no espectro de RMN <sup>1</sup>H e pelos sinais em 21,7δ (CH<sub>3</sub>) e 170,4δ (C=O) no espectro de RMN <sup>13</sup>C. Estes dados foram comparados com os dados da literatura (ALVES, 1991; BRAZ-FILHO et al., 1986) para o 3β-O-β-D-tetraacetil-glicopiranosilsterol e permitiram confirmar a presença da saponina natural 3β-O-β-D-glicopiranosilsterol (**2**) na planta.

Os dados espectrométricos de RMN <sup>13</sup>C (PND e DEPT) do produto da acetilação do precipitado obtido do extrato metanólico forneceu sinais relativos a grupos metínicos com δ<sub>CH</sub>: 69,4 (2xCH),

68,4 (2xCH), 68,1 e 70,9 $\delta$  (ambos representando 1xCH) e os sinais do grupo acetoxílicos ( $\delta_{\text{CH}_3}$  20,6-20,4 $\delta$  e  $\delta_{\text{CO}}$  169,6-169,3 $\delta$ ) semelhantes aos divulgados na literatura (ALVES, 1991; BRAITMAIER & VOELTER, 1987; GAO et al., 1990) para o inositol **3** e seu derivado acetilado **3a**. Os sinais em 5,57 $\delta$  (t, J = 2,8 Hz, 1H), 5,08 $\delta$  (dd,  $J_{\text{ax,ax}} = 10,0$  e  $J_{\text{ax}^{\text{eq}}} = 2,8$  Hz, 2H), os tripletos ( $J_{\text{ax,ax}} = 10,5$  Hz,) em 5,46 $\delta$  (2H) e 5,19 $\delta$  (1H) e os singletos em 1,96, 1,97 e 2,17 $\delta$  ( $\text{H}_3\text{C-CO}$ ) confirmam a estrutura **3a** para o acetato deste carboidrato.

A mistura de material graxo foi identificada pela presença dos sinais em 0,82 $\delta$  (t, J = 6,0 Hz), 1,23 (m), 1,59 (m), 2,26 $\delta$  (t, J = 7,0 Hz) no espectro de RMN  $^1\text{H}$ . O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,64 (s) corresponde aos hidrogênios do grupo metoxílico. O espectro no IV mostra, além da banda de absorção de éster (1730  $\text{cm}^{-1}$ ), uma banda em 1690  $\text{cm}^{-1}$  de carbonila de ácido. Esta mistura foi injetada do cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa e a análise dos espectros de massas permitiu identificar quatro componentes majoritários, **4a-4d**, na mistura.

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  da fração contendo **5+6** revelou a presença de sinais de grupos metila compatíveis com feição de sinais de triterpenos. Os singletos em 1,66 e 1,58 $\delta$  revelam a presença de  $\text{CH}_3$  ligado a  $\text{C-sp}^2$ . Os sinais em 5,10 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 5,25 (m) e 4,60/4,69 $\delta$  (s) são compatíveis com deslocamento químicos de hidrogênios olefínicos (duas ligações trissubstituídas e um grupo vinila). Os sinais em 5,10 e 5,25 $\delta$  possuem a mesma intensidade e possuem integração diferentes dos sinais do grupo vinila. Isto permitiu propor duas estruturas, uma contendo as duas ligações duplas trissubstituídas (**5**) e a outra com a ligação dupla vinílica (**6**). A natureza triterpênica destes componentes foi confirmada pela contagem número de carbonos de  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  e CH no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (PND e DEPT). Os valores de deslocamentos químicos em  $d_{\text{CH}}$  80,8 e 80,9 $\delta$  com diferentes intensidades estão de acordo CH carbinólico sustentando um grupo acetato no C-3 dos dois componentes. A semelhança de intensidade entre os sinais em 134,3/134,5 $\delta$  (C-8/C-

9) e 156 $\delta$  (C-24) permite localizar uma ligação dupla tetrassubstituída e a vinila na mesma estrutura (**6**) e semelhança de intensidade entre os sinais em  $d_{\text{C}}$  146,0/130,9 $\delta$  (C-8/C-25) e 125,2/117,6 $\delta$  (CH-24/CH-7), correspondentes às ligações duplas trissubstituídas, permitiu localizá-las na outra estrutura triterpênica (**5**). Após estas deduções fez-se comparação dos deslocamentos químicos de todos os carbonos divulgados na literatura (TEREZA et al., 1987) para os derivados acetilados do butirospermol e eufol (Tabela 1) e identificar a presença destes triterpenos pentacíclicos acetilados ( $\beta$ -O-Acetil-butirospermol (**5a**) e  $\beta$ -O-Acetil-eufol (**6a**), como substâncias naturais na planta.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração contendo **7** possui seis sinais de hidrogênios aromáticos sendo dois dubletos com constante de acoplamento compatível com um sistema AB de um anel heterocíclico [ $\delta_{\text{H}}$  8,38 (d, J = 5,4 Hz, 1H) e 7,85 (d, J = 5,4 Hz, 1H)], quatro sinais representando quatro hidrogênios vizinhos em um anel aromático dissubstituído  $\delta_{\text{H}}$  8,10 $\delta$  (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,53 $\delta$  (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,50 $\delta$  (t, J = 8,0 Hz, 1H) e 7,3 $\delta$  (t, J = 8,0 Hz, 1H) e um singlete em 2,83 $\delta$  (3H) correspondente a um sinal de grupo metila ligado em um anel aromático. Estes dados, o teste positivo com reagente de Dragendorff e a comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono-13 obtidos com os valores registrados na literatura (CASTRO & LOPES, 1986) permitiu identificar **7** como o alcalóide  $\beta$ -carbolínico, harmana, que foi isolado anteriormente das cascas de *Simira glaziovii* (BASTOS, 2001, BASTOS et al., 2001) de *Arariba rubra* (Fabaceae) e *Passiflora incarnata* (Passifloraceae) (BUCKINGHAM, 1994).

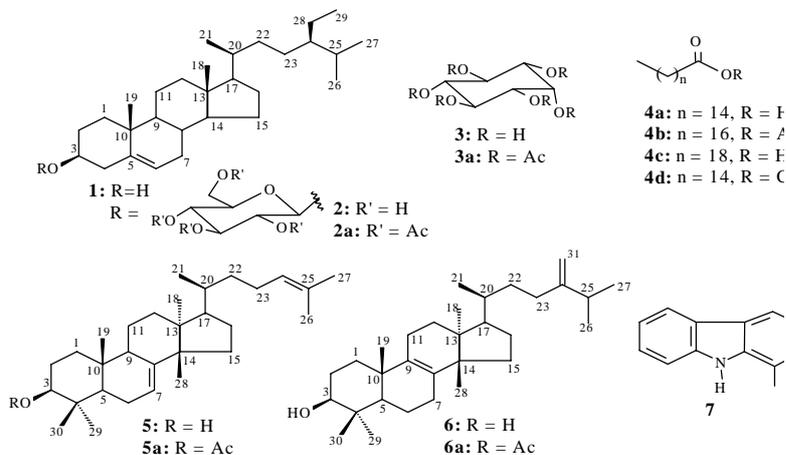
## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPERJ, CAPES, CNPq pelas bolsas e apoio financeiro concedidos e ao Prof. P. G. Filho, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia-UFRRJ pela colaboração na identificação botânica do espécimen usado para estudo.

**Tabela 1.** Comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos de **5a** e **6a** com os valores registrados na literatura (TEREZA *et al.*, 1987) para os acetatos de eufol e de butirospermol.

C	$\delta_C(\text{lit.})$		$\delta_C(\text{observado})^a$		C	
	Acetil-Butirospermol	Acetil-eufol	<b>5a</b>	<b>6a</b>		
<b>1</b>	36,9	35,4	36,8	35,3	<b>18</b>	13,2
<b>2</b>	24,3	24,3		24,2	<b>19</b>	22,1
<b>3</b>	81,2	81,0	80,8	80,9	<b>20</b>	35,8
<b>4</b>	37,9	37,9		37,9	<b>21</b>	18,6
<b>5</b>	50,9	50,6	50,7	50,5	<b>22</b>	35,3
<b>6</b>	23,8	18,2	23,8	18,1	<b>23</b>	25,4
<b>7</b>	117,6	26,5	117,6	26,4	<b>24</b>	125,2
<b>8</b>	146,0	134,4	146,0	134,3	<b>25</b>	130,9
<b>9</b>	48,9	134,6	48,8	134,5	<b>26</b>	18,7
<b>10</b>	34,9	37,1	34,9	37,9	<b>27</b>	27,7
<b>11</b>	18,1	21,1	18,1	21,0	<b>28</b>	27,6
<b>12</b>	33,8	28,3	33,9	28,5	<b>29</b>	27,4
<b>13</b>	43,7	44,6	43,5	44,5	<b>30</b>	15,9
<b>14</b>	51,4	49,9	51,3	50,0	<b>31</b>	-
<b>15</b>	34,0	31,1	33,9	31,3	<b>H<sub>3</sub>C</b>	21,7
<b>16</b>	28,5	30,9	28,5	30,9	<b>H<sub>3</sub>C</b>	170,9
<b>17</b>	53,3	50,5	53,2	50,5	-	-

<sup>a</sup>. Multiplicidade deduzida através da comparação entre os espectros de RMN <sup>13</sup>C totalmente desacoplado (todos os sinais de carbono-13) e DEPT (sinais de CH e CH<sub>3</sub> em direção inversa aos de CH<sub>2</sub>).



## LITERATURA CITADA

- ALVES, H. DE M.; Estudo Químico de *Simaba obovata*, Tese de Mestrado, PPGQO- D<sup>pro</sup>. de Química-UFRRJ,1991.
- ARNASON, T.; MORAND, P.; SALVADOR J.; REYES, I.; LAMBERT, J; TOWERS, N. Phototoxic substances from *Flaveria trinervis* and *Simira salvadorensis*. *Phytochemistry*. v.22 n.2, p.594-595, 1983.
- BASTOS, A. B. F. D'O. Constituintes químicos isolados das cascas de *Simira glaziovii* (k. Schum) Sterm, Tese de Mestrado, PPGQO, DQUIM-ICE-UFRRJ, 2001, 159p.
- BASTOS, A. B. F. D'O., CARVALHO, M. G., VELANDIA, J. R., BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos isolados de *Simira glaziovii* (K. Shum) Sterm. E a Atribuição dos Deslocamentos Químicos dos Átomos de Carbono e Hidrogênio do Alcalóide Ofiorina B e seus Derivados, *Química Nova*, v. 24, n.6, 2001 (no prelo)
- BRAZ-FILHO, R; GOTTLIEB, H. E. ; MOURÃO, A. P.; MIRNADA, C. A. S. 3b-O-b-D-glicopiranosilespinasterol, um novo glicosídeo esteroidal isolado de *Amarthospermum schomburghinana* (Miq) Baehni. *An. Acad. Bras. Ciências*, v.58: p.363, 1986.
- BREITMAIER, E. & VOELTER, W., Carbon-13 NMR Spectroscopy, High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry (3<sup>rd</sup> ed) VCH, Weinheim, p. 194, 1987.
- BUCKINGHAM, J. (ed.), *Dictionary of Natural Products*, Chapman & Hall, London, p. 1515, 1994.
- CASTANEDA, P.; ALBOR, C.; MATAR, R.; BYE, R.; LINARES, E. Alkaloids from *Simira mexicana*. *Fitoterapia*. v.62, n.4, p.366, 1991.
- CASTRO, O. & LOPES, V. J. Harman, the principal alkaloid in roots of *Simira maxonii* Standley (Rubiaceae). *Ing. Cienc. Quim.*, v.10, n. ¾, p.56-57, 1986.
- GAO, F.; WANG, H. P.; MABRY, T. J.; Inositol derivatives and pseudoguaianolides from *Hymenoxys texana*. *Phytochemistry*, v.29, n.7, p.2273-2276, 1990.
- HASBUN, C. P.; CALSERON, M.; CASTRO, O.; GACS-BAITZ, E.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F. Maxonine, a novel alkaloid from *Simira-maxonii*. *Tetrahedron Lett.* v.30, n.45, p.6199-6202, 1989.
- ITOH, T.; YOSHIDA, K.; TAMURA, T.; MATSUMOTO, T. Co-occurrence of C-24 epimeric 24-ethyl-delta-7-sterols in the roots of *Trichosanthes japonica*. *Phytochemistry*, v.21, n.3, p. 727-730, 1982.
- KELLY, T. R; XU, W.; SUNDARESAN, J. Maxonine - structure correction and synthesis. *Tetrahedron lett.* v.34, n.39, p.6173-6176, 1993.
- LEWIS, W. H. & ELVIN-LEWIS, M. P. F. In Plants and Dental Care Among the Jivaro of the Upper Amazon Basin. *Advances in Economic Botany Ethnobotany in the Neotropics*, G. T., France & J.A. Kallunki Eds. New York, Botanical Garden Bronx, NY, v.1: p. 53-61, 1984.
- TERESA, J. D.; URONES, J. G.; MARCOS, I. S.; BASABE, P.; CUADRADO, M. J. S.; MORO, R. F. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry*, v.26, n.6, p.1767-1776, 1987.