

TRITERPENOS ESTERIFICADOS COM ÁCIDOS GRAXOS E ÁCIDOS TRITERPÊNICOS ISOLADOS DE *BYRSONIMA MICROPHYLLA*

Carla C. Mendes, Frederico G. Cruz e Jorge M. David*

Instituto de Química - UFBA - 40170-290 - Salvador - BA

Ivan P. Nascimento e Juceni P. David

Faculdade de Farmácia - UFBA - 40170-290 - Salvador - BA

Recebido em 15/12/97; aceito em 29/6/98

TRITERPENES ESTERIFIED WITH FATTY ACID AND TRITERPENE ACIDS ISOLATED FROM *BYRSONIMA MICROPHYLLA*. The hexane extract of leaves of *B. microphylla* afforded a mixture of triterpenes esterified with fatty acids. Analyses of spectral data of the mixture and of the derivatives obtained by a transesterification reaction with NaOMe/MeOH permitted to identify the composition of the mixtures as being 24-hydroxy-urs-12-enyl 3 β -eicosanate, estearate and palmitate as well as of the 24-hydroxy-olean-12-enyl 3 β -eicosanate, estearate and palmitate. From the chloroform and ethyl acetate extracts were isolated the oleanolic and 3 β ,24-dihydroxy-urs-12-en-28-oic acids, quercetin and methyl galic ester, respectively. The compounds were identified through analysis of their spectral data.

Keywords: *Byrsonima microphylla*; triterpenes; fatty acid esters of triterpenes.

INTRODUÇÃO

A família Malpighiaceae é constituída por aproximadamente 800 espécies distribuídas em 60 gêneros sendo que, o Brasil concentra cerca de 50% das espécies¹. A família contém exemplares que apresentam diferentes substâncias biologicamente ativas. Por exemplo, o gênero *Banisteriopsis*, de ocorrência principalmente na região Amazônica, apresenta algumas espécies que são empregadas em rituais indígenas² devido aos seus efeitos narcóticos e alucinógenos e que foram bem estudadas sob o ponto de vista químico e farmacológico. As substâncias responsáveis por esses efeitos são comumente alcalóides carbolínicos³.

No Nordeste brasileiro, ocorrem várias espécies do gênero *Byrsonima* que são principalmente conhecidas pela utilização dos seus frutos na alimentação e pelo emprego com fins medicinais. Levantamento no NAPRALERT[#] indicou que espécies deste gênero são comumente empregadas como antiasmáticas, contra a febre e infecção de pele⁴. Já foram isolados do gênero *Byrsonima* alguns derivados flavonoidicos (*B. verbascifolia*)⁵, no entanto, são os triterpenos^{6,7} que representam a classe de substâncias naturais de ocorrência mais freqüente no gênero.

Dando continuidade ao estudo fitoquímico de espécies da família Malpighiaceae que ocorrem na restinga do Estado da Bahia, este trabalho descreve os resultados obtidos com as folhas de um espécimen de *B. microphylla* Juss. cuja ocorrência é endêmica no Estado.

EXPERIMENTAL

Os espectros de absorção no IV foram registrados num espectrômetro Jasco mod. Valor III. Os espectros no UV foram registrados em espectrofotômetro Hewlett Packard mod. 8451A. Os espectros de RMN foram obtidos num espectrômetro Gemini 300 Varian sendo que o referencial interno utilizado foi o sinal do TMS. Os espectros de massas foram obtidos num CG acoplado a detetor de massas da Varian mod. Saturn II.

As folhas de *B. microphylla* foram coletadas nas dunas da

restinga do Parque Metropolitano do Abaeté, Salvador (BA) e identificadas pela Prof^a. Maria Lenise S. Guedes. Um exemplar do espécimen encontra-se catalogado no Herbário Alexandre Leal Costa do Instituto de Biologia da UFBA sob número 027883.

As folhas (20,4 g), após secagem e trituração, foram submetidas à maceração com hexano e posteriormente, com metanol. Dessa maneira foram obtidos 65 mg do extrato hexânico. O extrato metanólico (1,5 g) foi particionado com CHCl₃/MeOH:H₂O e em seguida com AcOEt/H₂O fornecendo 35,1 mg da partição com CHCl₃ e 528 mg da partição com acetato.

O extrato hexânico foi submetido a CC em sílica gel, eluída com uma mistura de hexano:AcOEt (95:5). Análise através de CCD das frações obtidas usando reagente de Liebermann-Buchard resultou numa fração denominada **BMH** (43,0 mg) constituída de substâncias terpenoidicas que, após revelação, apresentavam-se como uma mancha única na placa cromatográfica.

Parte do material graxo foi separado da fase CHCl₃ (35,1 mg) por precipitação empregando-se MeOH a frio. A solução resultante forneceu uma amostra denominada **BMC** em pequena quantidade, constituída de uma mistura terpenoidica (7,5 mg) com pelo menos duas substâncias de separação difícil.

O extrato AcOEt foi submetido à cromatografia em Poliamida 6 utilizando-se misturas de MeOH/H₂O em ordem decrescente de polaridade. A fração obtida com 10% de MeOH (422 mg) foi submetida à permeação em Sephadex LH-20 utilizando-se como eluente mistura de CHCl₃/MeOH (1:4). Foram recolhidas 11 subfrações, de 10 ml, cada. A sexta fração após CC em sílica gel empregando CHCl₃/MeOH/AcOH (80:19:1) forneceu o galato de metila (30,0 mg), enquanto que a décima primeira fração, após ser submetida à permeação em Sephadex LH-20 eluída com CH₂Cl₂/MeOH (1:1), forneceu a quercetina (15 mg).

Reação de transesterificação. Foram adicionados 20 ml de uma solução de NaOMe/MeOH (0,5 M) a 23 mg da amostra **BMH**. A solução foi mantida sob refluxo durante 2 horas. Foram então vertidos 20 ml de água ao sistema reacional e extraído por duas vezes consecutivas com 40 ml de CH₂Cl₂. Após concentração, a fase diclorometânica forneceu uma mistura com os ésteres graxos (6,5 mg). À fase aquosa foi adicionada uma solução de HCl 10% com controle do pH até neutralização. Em seguida foram realizadas extrações sucessivas com CH₂Cl₂ fornecendo 10,3 mg de uma mistura de triterpenos.

* E-mail:jmdavid@ufba.br

Natural Products Alert Database

3 β -Eicosanato, -estearato e -palmitato de 24-hidroxi-urs-12-enila (1a - 1c). Óleo. EM *m/z* (intensidade relativa): 218 (100), 205 (12), 203 (80), 189 (35), 175 (12), 135 (14), 119 (21). RMN de ¹³C: Tabela.

3 β -Eicosanato, -estearato e -palmitato de 24-hidroxi-olean-12-enila (2a - 2c). Óleo. EM *m/z* (intensidade relativa): 218 (100), 205 (12), 203 (80), 189 (35), 175 (12), 135 (14), 119 (21). RMN de ¹³C: Tabela.

Ácido 3 β -hidroxi-olean-12-en-28-óico [ácido oleanólico] (3) e ácido 3 β ,2 α -diidroxi-urs-12-en-28-óico (4). Sólido amorfo. IV $\nu_{\text{máx}}$. (cm⁻¹): 3432, 2927, 1710. RMN de ¹³C: Tabela.

Galato de metila. Dados de RMN de ¹³C e de ¹H similares ao padrão utilizado.

Quercetina. Dados no UV, IV e RMN comparados com os obtidos na literatura⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do espectro de RMN de ¹H da amostra **BMH** forneceu pouca informação, apresentando somente sinais indicativos da presença de ácidos graxos e derivados. A natureza triterpênica das substâncias pôde ser evidenciada pela coloração rósea obtida na CCD da amostra quando revelada utilizando-se o reagente de Liebermann-Buchard. O espectro de RMN de ¹³C comprovou a observação preliminar e, a análise conjunta com

os espectros DEPT (135° e 90°) pôde evidenciar que **BMH** se tratava de uma mistura de dois triterpenos esterificados com um ou mais ácidos graxos.

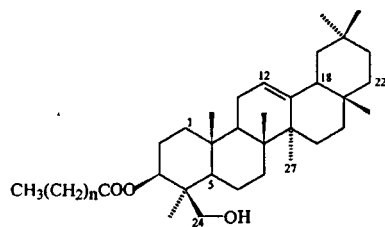
O espectro de RMN de ¹³C da amostra apresentou 56 sinais sendo que alguns deles com intensidades duplicadas. Na região de *Csp*², os sinais de quatro carbonos em δ 145,17; δ 124,27; δ 139,55 e δ 121,58 podem ser considerados característicos de triterpenos com esqueletos olean-12-eno e urs-12-eno, respectivamente⁹. Estes dados corroboram que a amostra **BMH** trata-se de uma mistura de triterpenos. Os dois sinais em δ 173,83 e δ 173,51 foram atribuídos aos carbonos carbonílicos dos ésteres graxos dos triterpenos (Tabela). A comparação dos deslocamentos mencionados anteriormente com os carbonos carbonílicos dos derivados acetilados da α - e β -amirina¹⁰ mostrou que os carbonos carbonílicos da mistura de triterpenos em **BMH** se encontram desprotegidos cerca de $\Delta\delta$ 3,2 ppm. Além disso, os C-2 da parte triterpênica das substâncias estavam protegidos ($\Delta\delta$ 5,0 ppm), enquanto que o carbono oximetínico C-3 apresentava efeito de desproteção em relação ao C-3 das amirinas. Os dados anteriormente apresentados permitiram concluir que a mistura de triterpenos estava esterificada com um ácido graxo no C-3 do esqueleto triterpênico.

De um modo geral, os sinais de RMN de ¹³C registrados para a amostra **BMH** são muito semelhantes aos obtidos para α - e β -amirina (Tabela). No entanto, pela análise do espectro de DEPT

Tabela. Dados de RMN de ¹³C das misturas **BMH** e **BMC** compostas pelos triterpenos 1a - 1c, 2a - 2c, e 3 - 4 [75 MHz, CDCl₃].

C	BMH			BMC		
	1a-1c	2a-2c	α -amirina ¹⁰	β -amirina ¹⁰	3	4
1	38,23	38,25	38,7	38,7	38,56	38,70
2	22,18	22,18	27,2	27,3	27,18	27,31
3	80,51	80,51	78,3	79,0	79,03	79,03
4	43,79	43,76	38,7	38,8	38,25	38,25
5	47,27	47,20	55,2	55,3	55,16	55,16
6	18,53	18,53	18,3	18,5	18,30	18,30
7	32,36	32,73	32,9	32,8	32,64	32,79
8	39,41	39,95	40,0	38,8	39,43	39,90
9	47,50	47,59	47,7	47,7	47,60	47,69
10	37,08	36,78	36,9	37,6	37,00	36,97
11	23,58	23,29	23,3	23,6	23,20	23,31
12	121,58	124,27	124,3	121,8	121,98	124,87
13	145,17	139,55	139,3	145,1	145,10	139,52
14	41,67	41,67	42,0	41,8	41,60	42,02
15	26,20	26,81	28,7	26,2	27,20	29,05
16	26,53	28,29	26,6	27,0	23,35	27,15
17	32,55	33,65	33,7	32,5	46,52	47,53
18	47,50	59,45	58,9	47,4	42,20	53,14
19	46,74	39,63	39,6	46,9	46,51	31,77
20	31,16	39,58	39,6	31,1	30,98	42,80
21	34,75	31,68	31,2	34,8	33,88	72,71
22	37,03	41,41	41,5	37,2	32,63	42,10
23	22,12	22,12	28,1	28,2	28,07	28,07
24	64,41	64,41	15,6	15,5	15,59	15,54
25	15,44	15,61	15,6	15,6	15,30	15,74
26	16,66	16,74	16,8	16,9	16,81	16,76
27	26,07	23,45	23,3	26,0	26,12	23,04
28	28,51	28,58	28,1	28,4	178,41	178,41
29	33,20	17,82	17,4	33,1	33,24	17,38
30	23,58	21,39	21,3	23,6	23,72	17,40
CO	173,83	173,51				
(CH ₂) _n	29,1-31,9	29,1-31,9				
CH ₃ CH ₂	22,12	22,12				
CH ₂ CO	33,70	33,70				
CH ₃	13,96	13,96				

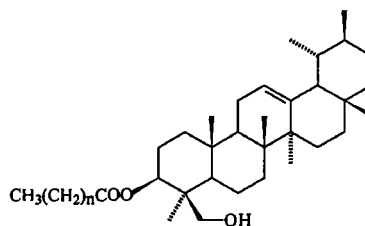
* Os dados foram atribuídos pela análise dos espectros de DEPT e comparação com dados de modelos e outras substâncias já descritas na literatura. Assim, os deslocamentos das misturas 1a-1c e 2a-2c, bem como de 3 e 4 podem estar trocados.



1a n=18

1b n=16

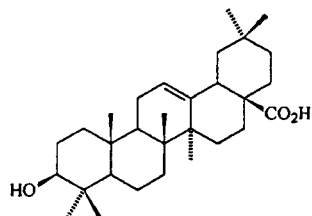
1c n=14



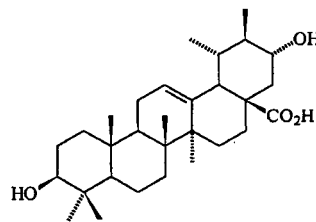
2a n=18

2b n=16

2c n=14



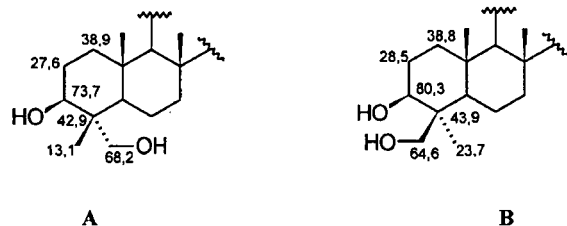
3



4

135°, pôde ser constatado a presença de 14 grupos metílicos diferentemente dos 16 encontrados nos espectros das amirinas (8 grupos de cada). No entanto, a presença de um carbono oximetilênico de intensidade duplicada em relação a outros sinais, em δ 64,41, indicou que dois grupos metílicos poderiam estar substituídos. A partir da comparação dos dados de RMN de ^{13}C dessas substâncias com as das amirinas, pôde-se constatar efeitos de proteção em C-23, C-2 e C-5 e efeito de desproteção no C-4. Estes dados são indicativos da presença de grupo oximetilênico nas posições 23 ou 24. A análise comparativa dos deslocamentos químicos do grupo CH_3 -23 em **BMH**, na α - e β -amirina e com as ressonâncias do anel A da hederagenina e *epi*-hederagenina¹¹ (Figura 1), tornou possível a identificação da parte triterpênica de **BMH** como sendo formada pelo derivado de 3 β ,24-diidroxi-olean-12-eno e 3 β ,24-diidroxi-urs-12-eno. Os picos em m/z 218 (pico base) e m/z 203 observados no espectro de massas da parte triterpênica de **BMH**, oriundos da fragmentação retro Diels-Alder no anel C são típicos de olen-12-enos e urs-12-enos com anéis D e E não substituídos¹² (Figura 2). Esta observação corrobora a informação previamente apresentada.

A análise dos ácidos graxos esterificados com estes triterpenos foi efetuada via CG/EM dos ésteres graxos metílicos obtidos pela reação de transesterificação de **BMH** com MeONa/MeOH . O cromatograma de íons totais apresentou três picos com diferentes tempos de retenção e cada um deles originou um espectro de massas cujos íons moleculares (m/z 326, 298 e 270)



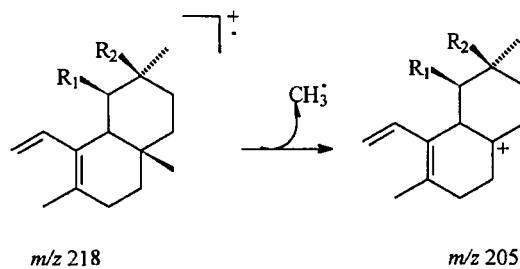
A

B

Figura 1. Alguns dados de RMN de ^{13}C do anel A da hederagenina (A) e *epi*-hederagenina (B)¹¹.

e fragmentos eram correspondentes ao eicosanato de metila, estearato de metila e palmitato de metila, respectivamente. Portanto, a análise conjunta dos dados permitiu propor como constituintes da fração **BMH** as seguintes substâncias: 3 β -eicosanato, 3 β -estearato e 3 β -palmitato de 24-hidroxi-urs-12-enila (1a - 1c) e 3 β -eicosanato, 3 β -estearato e 3 β -palmitato de 24-hidroxi-olean-12-enila (2a - 2c). Os constituintes triterpênicos da mistura **BMH** foram encontrados pela primeira vez em *Phyllanthus flexuosus* (Euphorbiaceae), além de estarem presentes em outras fontes vegetais¹³. No entanto, os triterpenos esterificados com os ácidos graxos ainda não haviam sido descritos. Triterpenos simples como as amirinas, esterificadas com ácidos graxos ainda são de distribuição relativamente restrita. A ocorrência desse tipo de substância tem se mostrado comum nas folhas das espécies do gênero *Erythroxylum*¹⁴ (Erythroxylaceae) coletados em solos arenosos e restingas.

A amostra **BMC** isolada do extrato clorofórmico era constituída de uma mistura de dois triterpenos ácidos, evidenciados pelos espectros de absorção no IV (3432 e 1710 cm^{-1}), EM e RMN. O espectro de RMN de ^{13}C mostrou absorções características de triterpenos, assim como em **BMH**. Os sinais na região de Csp^2 sugeriram a ocorrência de uma mistura de triterpenos de esqueletos urs-12-eno (δ 121,98 e 145,10) e olean-12-eno



m/z 218

m/z 205

$\text{R}_1 = \text{H}$ ou CH_3 ; $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ ou H

Figura 2. Alguns fragmentos obtidos pelo EM para a fração transesterificada de **BMH**.

(δ 124,87 e 139,52). A mistura apresenta, entre outros, sinais para um grupo hidroxílico adicional (δ 72,1) cuja intensidade é metade da observada para o sinal do C-3 (δ 79,03). Isso sugeriu que esta absorção pertence somente a um dos componentes da mistura, enquanto que o C-3 apresenta o mesmo deslocamento químico nos dois triterpenos componentes da mistura. O sinal em δ 178,41 foi atribuído ao grupo carboxílico em C-28. a comparação com os dados de RMN de ^{13}C de alguns triterpenos ácidos¹¹, possibilitou identificar um dos componentes como sendo o ácido 3 β -hidroxi-olena-12-en-28-óico (3) e permitiu observar algumas semelhanças estruturais entre o outro triterpeno que compõe a mistura e o ursolato de metila¹¹. No entanto, esse segundo triterpeno da mistura possui um grupo hidroxílico adicional. A posição de substituição deste grupo hidroxílico na estrutura do ácido ursólico foi proposta baseada na inspeção dos valores de carbonos oximetínicos de diversos derivados do ácido ursólico e seus efeitos de proteção e desproteção nos carbonos relacionados. Assim, a comparação com os dados de RMN de ^{13}C reportados para 3 β , 21 α -diidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, isolado de *Amaracus dictamnus*¹⁵, tornou possível a identificação do segundo componente triterpênico da amostra BMC como sendo o derivado ácido correspondente 4.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e FINEP pelos auxílios financeiros necessários ao desenvolvimento deste trabalho. Ao Dr. Geoffrey A. Cordell, da Universidade de Illinois em Chicago pelo levantamento dos dados no NAPRALERT, aos Drs. Jailson B. de Andrade e Pedro A. P. de Paula pelo auxílio na análise via CG/Massas. I. P. N. e C.C.M. agradecem ao CNPq/PIBIC/UFBA e CAPES respectivamente pelas bolsas de estudos.

REFERÊNCIAS

1. Joly, A. B.; *Botânica - Introdução à Taxonomia Vegetal*; Cia Editora Nacional; 4ª ed.; São Paulo, 1977; p 413.
2. Dias, S. M. C.; *Arq. Inst. Biol.* **1977**, *44*, 15.
3. Ghosal, S.; *Planta Med.* **1972**, *21*, 200.
4. Caceres, A.; Figueroa, L.; Taracena, A. M.; Samayoa, I.; *J. Ethnopharmacol.* **1993**, *39*, 77.
5. Dosseh, C.; Moretti, C.; Tessier, A. M.; Delaveau, P.; *Planta Med. Phytother.* **1980**, *14*, 136.
6. Felício, J. D.; Gonçalves, E.; Lins, A. L.; Braggio, M. M.; David, J. M.; *Arq. Inst. Biol.* **1995**, *62*, 91.
7. Gottlieb, O. R.; Mendes, P. H.; Magalhães, M. T.; *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1456.
8. Piozzi, F.; Paternostro, M.; Passannanti, S.; Gaes-Baitz, E.; *Phytochemistry* **1986**, *25*, 539.
9. Gallegos-Olea, R. S.; Roque, N. F.; *Quím. Nova* **1990**, *13*, 278.
10. Wehrli, F. W.; Nishida, T.; In: *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*; Herz, W.; Grisebach, H.; Kirby, G. W., Eds.; Springer-Verlag; New York, 1979; p 99.
11. Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.
12. Djerassi, C.; Wilson, J. M.; Budzikiewicz, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3688.
13. Mahato, S. B.; Nandy, A. K.; Roy, G.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2199.
14. Chávez, J. P.; Santos, I. D.; Cruz, F. G.; David, J. M.; *Phytochemistry* **1996**, *41*, 941.
15. Markham, K. R.; Geiger, H.; In *The Flavonoids: Advances in research since 1986*; Harborne, J. B., Ed.; Chapman & Hall; London, 1994; p 441.