

Constituintes químicos isolados dos galhos e cascas de amapazeiro (*Parahancornia amapa*, Apocynaceae)

Marycleuma Campos HENRIQUE^{1*}, Rita de Cássia Saraiva NUNOMURA¹,
Sergio Massayoshi NUNOMURA², Suniá Gomes SILVA¹

¹ Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Química, Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6.200 - Japiim, 69079-000, Manaus-Amazonas, Brasil.

² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais, Av. André Araújo, 2.936 - Petrópolis - CEP 69067-375 - Manaus -AM, Brasil.

* Autor correspondente: marycleuma@yahoo.com.br

RESUMO

Parahancornia amapa (Apocynaceae) é típica da região amazônica e conhecida popularmente como amapazeiro e muito utilizada na medicina popular da região Amazônica. O objetivo desse trabalho foi o estudo fitoquímico dos galhos e cascas dessa espécie. Do extrato diclorometânico dos galhos foram isolados o β -sitosterol, estigmasterol, além de triterpenóides pentacíclicos, α -amirina, β -amirina, lupeol e friedelina. Do extrato metanólico das cascas foi isolado o alcaloide indólico isositsiriquina. As estruturas desses compostos foram identificadas por análise dos espectros de massa de alta resolução, Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C e comparações com dados da literatura. Esse é o primeiro relato de isolamento de alcaloide neste gênero.

PALAVRAS-CHAVE: Triterpenos, alcaloide, esteroides.

Chemical constituents isolated from twigs and barks of amapazeiro (*Parahancornia amapa*, Apocynaceae)

ABSTRACT

Parahancornia amapa (Apocynaceae) is typical of the Amazon region and popularly known as amapazeiro and widely used in folk medicine in the Amazon region. The objective of this work was to study the phytochemical composition of twigs and barks of this species. From the dichloromethane extract of twigs were isolated β -sitosterol, stigmasterol, and pentacyclic triterpenoids α -amyirin, β -amyirin, lupeol and friedelin. From the methanol extract of barks was isolated indole alkaloid isositsiriquina. The structures of these compounds were identified by analysis of the mass spectra high-resolution, ¹H and ¹³C NMR and comparisons with literature data. This is the first report of isolation of alkaloid in this genus.

KEYWORDS: Triterpenes, alkaloid, steroids.

Parahancornia amapa (Huber) é uma espécie da família Apocynaceae, típica da Amazônia brasileira, especialmente, do estado do Amapá, conhecida popularmente como amapa ou amapazeiro e as cascas e o látex são utilizados medicinalmente pelos nativos como tônico, anti-sífilis (Sobrinho *et al.* 1991) e repelente (Mendonça *et al.* 2010). O estudo fitoquímico realizado por Sobrinho *et al.* (1991) relatam o isolamento dos triterpenos friedelina, α -amirina, β -amirina, lupeol e seus derivados acetilados, quatro ésteres de 3β -O-acil lupeol, dois 3β -O-3'-hidroxiaxil lupeol, dois 3β -O-3'5'-diidroxiaxil lupeol das cascas e látex. Carvalho *et al.* (2001) relatam em seu estudo com as raízes o isolamento de nove novos 3β -O-acil-lupeois, além dos já descritos na literatura para esta espécie. O presente trabalho teve como objetivo o estudo fitoquímico de *P. amapa* na busca de novas classes de substâncias, além das classes químicas já descritas para o gênero. O estudo teve como resultado isolamento e caracterização estrutural dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol e dos triterpenóides pentacíclicos, α -amirina, β -amirina, lupeol e friedelina. Também contribui com o isolamento do alcaloide isositsiriquina (amostra sete). Esse é o primeiro relato de isolamento dessa classe química para o gênero *Parahancornia*.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais foram registrados em espectrômetro (Unity Inova, Varian, Palo Alto, CA, USA) operando na frequência de 500 MHz para hidrogênio (^1H) e 125 MHz para carbono-13 (^{13}C). Foram utilizados os solventes CD_3OD para a amostra sete e o CDCl_3 para as demais amostras. O espectro de massas de alta resolução foi obtido em espectrômetro utilizando a técnica ESI (MicrOTOF II – ESI TOF, Bruker-daltons, MA, USA). Cromatografias em coluna aberta foram realizadas utilizando gel de sílica 60 (0,040-0,063 mm e 0,063-0,200 mm, ambas da merck). Para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas cromatoplasas em fase normal e fase reversa RP-18 recortadas (5 x 5 cm) e as substâncias foram evidenciadas em CCDC pelo uso de radiação ultravioleta (UV) sob comprimentos de onda de 254 e 366 nm, pela impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo, solução de anisaldeído seguido de aquecimento e solução de Dragendorff. As análises foram efetuadas em cromatógrafo líquido semipreparativo (7725i, Shimadzu, Kyoto, Japan). A aquisição dos dados foi feita utilizando o programa CLASS-VP versão 6.13 SP2. Uma coluna semipreparativa SHIM-PACK PREP-ODS H (250 mm x 20 mm de 5 μm) foi utilizada.

O material botânico (galhos e cascas do tronco) foi coletado na Reserva Adolpho Ducke, em outubro de 2007, no km 26 da rodovia Manaus-Itacoatiara a partir de espécimes previamente identificados no Projeto Flora da Reserva Ducke. A exsiccata de número 189608 foi atribuída ao espécime de

Parahancornia amapa (Huber) coletado e está depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia.

Os galhos de *P. amapa* (700 g) secos e moídos foram submetidos à extração em aparelho tipo Soxhlet (3x 400 mL, 3x 6 horas) com hexano e posteriormente com diclorometano. Após filtração e evaporação sob pressão reduzida, foi obtido 4,3 g do extrato diclorometânico dos galhos. Parte deste extrato (750 mg) foi submetida à cromatografia em coluna (h= 45 cm; \varnothing = 4,0 cm) de sílica gel eluída com a mistura de hexano/DCM (70:30), DCM (100) e DCM/MeOH (90:10, 80:20, 70:30) resultando 72 frações, as quais foram reunidas em sete grupos (A1-A7). A fração A1 (61,0 mg) foi submetida à separação cromatográfica em coluna (h= 15 cm; \varnothing = 2,0 cm) de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) eluída em gradientes de hexano:DCM (80:20), hexano:DCM (50:50) e DCM (100) resultando 20 frações, as quais foram reunidas em três grupos (B1-B3). A fração B1 (12,7 mg) forneceu um sólido cristalino branco identificado como a mistura de esteroides estigmasterol (amostra um) e β -sitosterol (amostra dois). As frações A2 (90,0 mg) e A6 (256,0 mg), após o fracionamento em CCDP utilizando-se como eluentes misturas de hexano/AcOEt (7:3), DCM/AcOEt (9:1) forneceram, respectivamente, friedelina (amostra três) (18,0 mg) e uma mistura (12,3 mg) composta por α -amirina (amostra 4) , β -amirina (amostra cinco) e lupeol (amostra seis) em forma de um sólido amorfo branco (Figura 1). As cascas do tronco de *P. amapa* (400 g) secas e moídas foram submetidas à extração em aparelho tipo Soxhlet (3x 400 mL, 3x 6 horas) com aumento de polaridade utilizando hexano, DCM, AcOEt e posteriormente metanol. Após filtração e evaporação sob pressão reduzida, foi obtido 18,9 g do extrato metanólico das cascas. Esse foi particionado com solventes de polaridade crescente, obtendo-se as frações hexânica (FH), diclorometânica (FD), acetato de etila (FAc) e metanólica (FM). A fração FD (2,2g) foi submetida à separação cromatográfica em coluna (h= 35cm; \varnothing = 3,0 cm) de sílica gel 60 eluída em mistura de $\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$ até MeOH (100%) resultando 94 frações, as quais foram reunidas em 14 grupos (FD1-FD14). Posteriormente, a fração FD10 (480,0 mg) foi purificada em cromatografia líquido de alta eficiência (CLAE) semipreparativo, utilizando como fase móvel a mistura dos solventes MeOH/ H_2O (30:70), em condição isocrática, com fluxo de 14 mL/min. Para a detecção dos picos de interesse foi utilizado o comprimento de onda de 254 nm para o alcaloide isositsiriquina (amostra sete) (Figura 1) (t_r = 18,2 minutos; 16,2 mg).

O estudo fitoquímico dos galhos de *P. amapa* resultou na identificação da mistura dos esteroides estigmasterol (amostra um) e β -sitosterol (amostra dois) foram identificadas pela análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (Ahmed *et al.* 1992; Goulart *et al.* 1993).

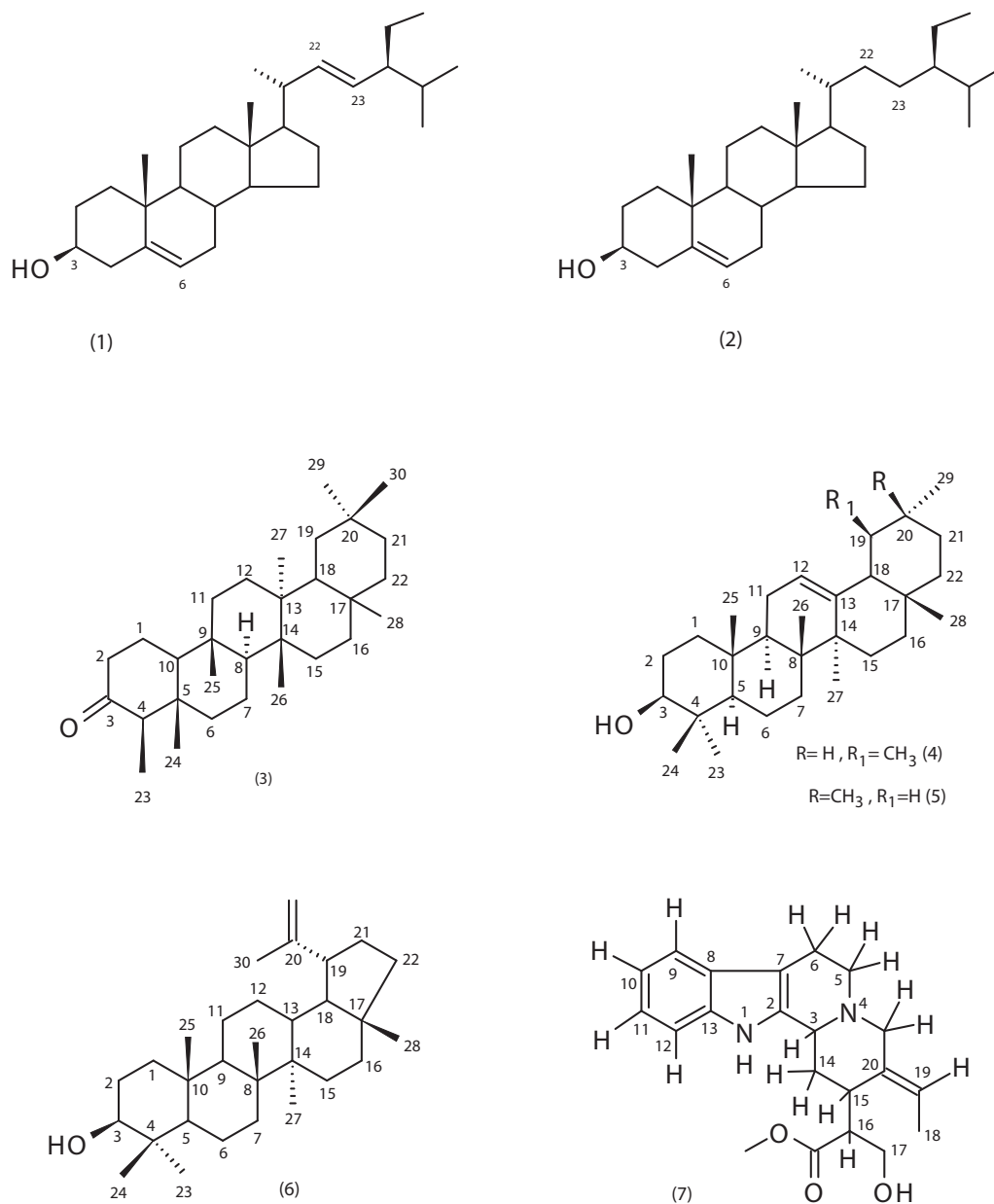


Figura 1. Estruturas químicas dos esteroides (amostra um e dois), triterpenos pentacíclicos (amostras três, quatro, cinco e seis) e do alcaloide (amostra sete) isolados de *P. amapa*.

Pela análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H da amostra três foram observados sinais de hidrogênio de sete metilas em simpletos (δ_{H} 1,18, 1,05, 1,01, 1,00, 0,95, 0,87 e 0,73) além de um duplete em δ 0,88 (J 7,0 Hz), referente ao grupo metila H-23 que é característico de esqueleto friedelano. Pela análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C e de intensificação sem distorção por transferência de

polarização (DEPT) foram observadas a presença de um sinal em δ 213,3, referente ao carbono da carbonila e um sinal em δ 7,0 indicando a presença de um grupo metílico (C-23), esses valores sugerem a presença de um triterpeno da série friedelano (Akihisa *et al.* 1992; Mahato 1994; Abreu *et al.* 2013). A análise dos dados espectrais e a comparação com os dados da literatura disponíveis permitiram caracterizar a amostra três como friedelina.

Na análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H para a mistura de triterpenos (amostras quatro, cinco e seis) foram observados os sinais de simpletos entre δ 0,8 e δ 1,2 característicos de hidrogênios de esqueletos triterpênicos, dois tripletos largos com integração para um hidrogênio cada, em δ 5,18 e δ 5,13, atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos olefínicos de esqueleto ursano e oleano, respectivamente (Mahato *et al.* 1994). Os sinais de duplete largo e duplo duplete com integração para um hidrogênio cada, acoplando entre si, em δ 4,69 e 4,57 caracterizam os hidrogênios vinílicos presentes na amostra seis (Mahato *et al.* 1994; Costa *et al.* 2010). O espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C e de intensificação sem distorção por transferência de polarização (DEPT) (125 MHz, CDCl_3) apresentaram sinais que permitiram sugerir seu esqueleto triterpênico em: δ 139,1 (C-13) e δ 124,3 (C-12), em δ 145,1 (C-13) e δ 121,5 (C-12) e em: δ 150,9 (C-20) e δ 109,5 (C-29) atribuídos a carbonos insaturados tipo sp^2 que são compatíveis com triterpenos pentacíclicos das séries ursano, oleanano e lupano, respectivamente (Mahato *et al.* 1994; Cursino *et al.* 2009). Foram observados sinais em δ 79,0 para os carbonos carbinólicos C-3 e em δ 19,5 sugerido a um grupo metila (C-30) ligado a carbono sp^2 da série lupano (Olea *et al.* 1990; Mahato *et al.* 1994). Consequentemente com base nos resultados das análises dos dados espectrais e a comparação com os dados da literatura a mistura foi identificada como α -amirina (amostra 4), β -amirina (amostra 5) e lupeol (amostra 6), respectivamente. O isolamento e identificação desses constituintes revelaram a semelhança com os registrados na literatura para estudos químicos anteriores com o gênero *Parahancornia*.

A amostra sete apresentou-se como uma resina amarela, teste positivo para alcaloides frente ao reagente de Dragendorff e fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3$ deduzida do seu espectro de massas de alta resolução $[\text{M}+\text{H}]^+$ 355,2012 (calculado 355,2016). O espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H da substância (amostra sete) apresentou quatro sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos em δ 7,49 (d, 8,0 Hz, H-9), δ 7,07 (t, 8,0 Hz, H-10), δ 7,18 (t, 8,0 Hz, H-11), δ 7,44 (d, 8,0 Hz, H-12), que sugeriram a natureza indólica da substância (Tabela 1). A análise do espectro de ^{13}C permitiu identificar 21 sinais (Tabela 1), que em conjunto com o mapa de contornos de correlação heteronuclear de um único quantum (HSQC), espectro de intensificação sem distorção por transferência de polarização (DEPT) e o espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H evidenciaram a presença de quatro carbonos metínicos com δ 119,34 (C-9), δ 120,77 (C-10), δ 123,84 (C-11) e δ 112,78 (C-12) correlacionando com os hidrogênios em δ 7,49 (d, 8,0 Hz, H-9), δ 7,07 (t, 8,0 Hz, H-10), δ 7,18 (t, 8,0 Hz, H-11) e δ 7,44 (d, 8,0 Hz, H-12), respectivamente. Também foi possível verificar a presença de um simpleto em δ 3,03

(3H, s) atribuído à metila da metoxila e em δ 1,88 (3H, d, J 6,5 Hz) referente à metila do grupo etilidênico. Para esse grupo etilidênico também foi observada a presença de um quarteto atribuído ao hidrogênio olefínico em δ 6,05 (q, 6,5 Hz, H-19). O mapa de contornos de correlação heteronuclear de múltiplos quanta (HMBC) possibilitou determinar as seguintes correlações entre o sinal em δ 1,88 (3H-18) com o (C-20) em δ 129,5; o sinal em δ 6,05 (H-19) com o (C-21) em δ 68,34; entre os sinais dos H-15 (δ 3,37) e H-21a (δ 3,70) com C-19 δ 135,46 que permitiram observar a conexão entre a cadeia olefínica e o núcleo indolquinolizidínico. Também foram observadas as correlações entre os sinais dos hidrogênios em δ 3,37 (H-15), δ 3,73 (H-17b), δ 3,63 (H-17a) e δ 2,47 (H-16) com o sinal δ 180,40 (C=O), atribuído a carbonila do grupo éster. A análise do espectro de efeito nuclear Overhauser (NOESY) mostrou as correlações dos hidrogênios em δ 1,88 (3H-18) com os sinais dos hidrogênios em δ 3,36

Tabela 1. Dados de RMN (500 MHz, CD_3OD) de ^1H e ^{13}C do alcaloide isositsiriquina (amostra sete) isolado de *P. amapa*.

Nº H/C	δH , (multip., J Hz)	δC
2	-	128,65
3	4,33 (1H, d, 11 Hz)	66,54
5a	3,36 (m, 1H)	59,07
5b	3,54 (m, 1H)	
6	2,97 (m, 2H)	18,24
7	-	105,68
8	-	126,99
9	7,49 (d, 8,0 Hz, 1H)	119,34
10	7,07 (t, 8,0 Hz, 1H)	120,77
11	7,18 (t, 8,0 Hz, 1H)	123,84
12	7,44 (d, 8,0 Hz, 1H)	112,78
13	-	138,75
14a	2,33 (m, 1H)	30,48
14b	2,51 (m, 1H)	
15	3,37 (m, 1H)	35,64
16	2,47 (m, 1H)	54,47
17a	3,63 (m, 1H)	62,85
17b	3,73 (m, 1H)	
18	1,88 (d, 6,5 Hz, 3H)	14,38
19	6,05 (q, 6,5 Hz, 1H)	135,46
20	-	129,52
21a	3,70 (d, 13,0 Hz, 1H)	68,34
21b	4,19 (d, 13,0 Hz, 1H)	
22	-	180,40
OCH_3	3,03 (s, 3H)	48,42

(H-5a), δ 2,51 (H-14b) e δ 2,47 (H-16). Outras correlações foram observadas pela análise do espectro de efeito nuclear Overhauser (NOESY) entre o sinal do hidrogênio em δ 3,37 (H-15) com δ 4,33 (H-3) e entre o sinal dos hidrogênios δ 3,03 (3H, s) com os sinais em δ 4,33 (H-3), δ 3,70 (H-21a) e δ 4,33 (H-3), sugerindo a orientação espacial desses átomos na estrutura.

A comparação com os valores publicados para o alcaloide isositsiriquina, bem como os dados obtidos pelo experimento de efeito nuclear Overhauser (NOESY), possibilitou sugerir a estereoquímica do composto, determinando α para H-3 (*S*) e H-15 (*R*) e β para H-16 (*R*) e configuração para a dupla ligação C19-C20 foi determinada como *E*, pois de acordo com trabalho anterior (Lounasmaa *et al.* 1994) essa configuração confere deslocamento $\sim \delta$ 33,0 ppm ao carbono C-15 e para a configuração *Z* atribui o valor de $\sim \delta$ 41,0 ppm. Com base nesses dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a comparação com os dados da literatura foi possível inferir que a amostra sete tratava-se do alcaloide indólico (3*S*, 15*R*, 16*R*)-*E*-isositsiriquina.

Neste estudo foi confirmado à presença de triterpenos e esteroides característicos dessa espécie e em acréscimo ao conhecimento fitoquímico foi isolado o alcaloide indólico isositsiriquina. Este é o primeiro relato dessa classe química para o gênero *Parahancornia*, apesar de pertencer à família Apocynaceae, a qual é conhecida como bioprodutora dessa classe química. Classe essa que possui amplo espectro de atividades biológicas. Portanto esse estudo contribui com a determinação de novos constituintes químicos de *P. amapa*, a qual é bastante utilizada na Amazônia por suas propriedades medicinais.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela bolsa de Doutorado concedida. Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia na pessoa do Prof. Dr. Massayoshi Yoshida, pela obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e ao Prof. Dr. N. P. Lopes (FCF/USP-RP) pela aquisição dos espectros de massas de alta resolução.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Abreu, V. G. da C.; Corrêa, G. M.; Lagos, I. A. dos S.; Silva, R. R. S.; Alcântara, A. F. de C. 2013. Triterpenos pentacíclicos e

esteroides da casca do uchi (*Sacoglottis uchi*, Humiriaceae). *Acta Amazonica*, 43: 525 – 528.

Akihisa, T.; Yamamoto, K. Tamura, T.; Kimura, Y.; Iida, T.; Nambara, T.; Chang, F. C. 1992. Triterpenoid ketones from *Lingnania chungii* McClure – arborinone, friedelin and glutinone. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40:789-91.

Ahmed, W.; Ahmad, Z.; Malik, A. 1992. Stigmasterol galactoside from *Rhynchosia minima*. *Phytochemistry*, 31: 4038-4039.

Carvalho, M. G.; Velloso, C. R. X.; Braz-Filho, R.; Costa, W. F. 2001. Acyl-lupeol esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society*, 12: 556-559.

Costa, D. A.; Chaves, M. H.; Silva, W. C. S.; Costa, C. L. S. 2010. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. *Acta Amazonica*, 40: 207-212.

Cursino, L. M. de C.; Mesquita, A. S.S.; Mesquita, D.W. de O.; Fernandes, C.C.; Pereira Junior, O.L.; Amaral, I.L.; Nunez, C.V. 2009. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae) *Acta Amazonica*, 39: 181-186.

Goulart, M. O. F.; Sant'Ana, A. E. G.; Lima, R. A.; Cavalcante, S. H.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R. 1993. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B. *Química Nova*, 16: 95-100.

Lounasmaa, M.; Jokew, R.; Hanbinen, P.; Mlettinen, J.; Sale, J. 1994. Preparation and conformational study of *Z*- and *E* isositsirikine epimers and model compounds. Determination of their C-16 configurations. *Tetrahedron*, 50, 9207- 9222.

Mahato, S. B., Kundu, A. P. 1994. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37: 1517-1575.

Mendonça, P. M.; Lima, M. G.; Albuquerque, L. A. O.; Carvalho, M. G.; Queiroz, M. C. 2010. Effects of Latex from "Amapazeiro" *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera:Calliphoridae) post-embryonic development. *Veterinary Parasitology*, 178: 379-382.

Olea, R. S. G.; Roque, N. F. 1990. Análise de misturas de triterpenos por RMN ¹³C. *Química Nova*, 13: 278-281.

Sobrinho, D. C.; Hauptli, M. B.; Appolinário, E. V.; Kollenz, C. L. M.; Carvalho, M. G. de; Braz-Filho, R. 1991. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2: 15-20.

Recebido em 26/10/2013

Aceito em 14/03/2014

