

Triterpenos das folhas de *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae)

Manoel Feitosa JEFFREYS¹, Cecilia Veronica NUNEZ^{1*}

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Tecnologia e Inovação, Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, CEP 69067-375, Manaus, Amazonas, Brasil.

* Autor correspondente: cecilia@inpa.gov.br

RESUMO

A floresta Amazônica é rica em diversas espécies vegetais, dentre elas, destaca-se *Piranhea trifoliata*, a qual é conhecida popularmente como piranheira, por seus frutos servirem de alimentos para peixes. Suas cascas são utilizadas como curativo para inflamação no útero em banhos de assento e para chás no tratamento de malária. O objetivo deste trabalho foi o fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico e da fase diclorometânica do extrato metanólico das folhas de *Piranhea trifoliata*. As folhas foram secas, moídas e extraídas com diclorometano, metanol e água. O extrato metanólico foi submetido à partição com diclorometano e acetato de etila. O fracionamento cromatográfico conduziu ao isolamento de seis triterpenoides pentacíclicos: friedelan-3-ona, 28-hidroxi-friedelan-3-ona, 30-hidroxi-friedelan-3-ona, lupeol, mistura de α - e β -amirina, além da mistura dos esteroides β -sitosterol e stigmasterol. As estruturas das substâncias foram identificadas pela análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C e comparações com dados da literatura. Este é o primeiro relato descrevendo o estudo químico das folhas de *P. trifoliata*.

PALAVRAS-CHAVE: Floresta amazônica, análise de RMN, esteroides, terpenos.

Triterpenes of leaves from *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae)

ABSTRACT

The Amazon forest is rich in plant species diversity, among them, *Piranhea trifoliata* stands out, which is popularly known as piranheira, because their fruits are eaten by fish. Their barks are used as bath composition on uterus inflammation and as tea in malaria treatment. This study aimed to fractionate the dichloromethane and dichloromethane phase from methanolic extract of leaves of *Piranhea trifoliata*. The leaves were dried, grounded and extracted with dichloromethane, methanol and water. The methanol extract was partitioned with dichloromethane and ethyl acetate. The chromatographic fractionation yielded six pentacyclic triterpenoids: friedelan-3-one, 28-hydroxy-friedelan-3-one, 30-hydroxy-friedelan-3-one, lupeol, α - and β -amyrin mixture, besides the mixture of the steroids: β -sitosterol and stigmasterol. The substances structures were identified by ¹H- and ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analysis and literature data comparison. This is the first report describing the chemical study of *P. trifoliata* leaves.

KEYWORDS: Amazon Forest, NMR analysis, steroids, terpenes.

INTRODUÇÃO

A família Picrodendraceae surgiu da divisão da família Euphorbiaceae (Chase *et al.* 2002; APG 2003), pois estudos realizados sobre a anatomia das folhas, madeiras e das estruturas do pólen comprovaram que Euphorbiaceae não era um grupo monofilético (Wurdack *et al.* 2004). Uma nova reclassificação foi proposta para alguns gêneros, gerando assim duas novas famílias: Picrodendraceae e Phyllanthaceae, sendo que alguns gêneros permaneceram em Euphorbiaceae (Chase *et al.* 2002; APG 2003). A família Picrodendraceae possui atualmente 29 gêneros e 100 espécies (Sutter *et al.* 2006), nativas de zonas tropicais. Possui uma distribuição bastante restrita, ocorrendo em vários tipos de vegetação de várzea, florestas secas e cerrado árido, principalmente no Hemisfério Sul.

Piranhea trifoliata Baill (Picrodendraceae) são árvores grandes com os ramos bem desenvolvidos, em geral parcialmente submersos nas margens dos rios, troncos com cascas de cor cinza, estriadas longitudinalmente, pode ser encontrada no Brasil, Bolívia e Venezuela. No Brasil é frequente nos estados do Amazonas, Pará, Tocantins, Rondônia e Mato Grosso (Secco e Cordeiro 2015). É conhecida popularmente como piranha, pois seus frutos e sementes são usados como alimento por piranhas e outros peixes que vivem nos rios da região e é encontrada nas áreas de várzeas e igapós.

No levantamento bibliográfico realizado, o estudo químico de *Piranhea trifoliata* está sendo realizado apenas pelo nosso grupo de pesquisas (Jeffreys 2011). Assim, o objetivo deste trabalho foi o fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico e da fase diclorometânica do extrato metanólico das folhas de *Piranhea trifoliata*, por indicarem a presença de terpenos quando revelados com anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico em cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preparo dos extratos

As folhas da espécie *P. trifoliata* Baill (Picrodendraceae), foram coletadas em agosto de 2009, em Altamira – PA. A planta foi identificada pela Dra. Daiane Martins e a exsiccata depositada no Herbário do Instituto Federal do Amazonas – IFAM, Manaus – AM, sob o número: 10653. As folhas (421,0 g) foram secas em temperatura ambiente, em seguida foram moídas em moinho de facas. O material vegetal foi extraído com diclorometano (DCM), usando ultrassom por 20 min e filtrado. Após, o material foi re-extraído com DCM e ultrassom, repetindo o procedimento 2 vezes. O material vegetal foi então seco em estufa (< 50 °C) e extraído com metanol (MeOH), usando ultrassom por 20 min, filtrado e re-extraído com MeOH mais 2 vezes. O material vegetal foi novamente seco em estufa (< 50 °C) e extraído com água,

apenas uma vez. Os extratos obtidos foram concentrados em rota-evaporador (para extratos DCM e MeOH) e liofilizador (extrato aquoso). Obtendo-se 3,24 g de extrato DCM, 6,21 g de extrato MeOH e 1,02 g de extrato aquoso. Uma parte do extrato metanólico (5 g) foi dissolvido em metanol/H₂O 7:3 e submetido a uma partição líquido-líquido com diclorometano, e depois com acetato de etila, gerando 2,4 g da fase diclorometânica e 1,2 g da fase acetato de etila e 1,0 g da fase hidroalcoólica.

Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico e da fase diclorometânica do extrato metanólico das folhas

Após a obtenção dos extratos vegetais, uma parte do extrato DCM (840,0 mg) das folhas foi submetido a uma coluna cromatográfica de sílica gel 60 Mesh com os solventes DCM/acetona 9:1 até acetona 100% e acetona/MeOH 9:1 até MeOH 100%, resultando em 84 frações com aproximadamente 120 mL cada, as quais foram concentradas em rota-evaporador, analisadas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) e reveladas com os reveladores químicos: anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico, cloreto férrico e iodo ressublimado e físicos: luz ultravioleta com 254 nm e 365 nm. A reunião das frações deu-se de acordo com suas similaridades, resultando em 6 frações (coluna D1). A fração D1.6-13 (110 mg) foi fracionada utilizando sílica gel 60 Mesh como fase estacionária e gradiente de 10% de acetona em DCM até 100% de acetona e 10% de MeOH em acetona até 100% de MeOH como fase móvel, obtendo-se 20 frações, as quais foram reagrupadas após análise em CCDC. A fração D1.6-13.8-13 (35 mg) foi fracionada utilizando sílica gel 60 Mesh como fase estacionária e gradiente de acetona em DCM, iniciando em acetona/DCM 9:1 como fase móvel, gerando 20 frações, sendo que a reunião das frações D1.6-13.8-13.2-8 (1,6 mg) forneceu a substância 1. A fração D1.17-18 (24 mg) apresentou um precipitado branco que foi lavado com acetona fornecendo a substância 2 (8 mg). A fração D1.23-29 (30 mg) foi fracionada com 10% de DCM em Hexano até 100% de DCM e 10% de acetato de etila (AcOEt) em DCM até AcOEt 100%. A fração D1.23-29.7 (8 mg) foi submetida à uma cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando o sistema DCM/Acetona (1:1), gerando a fração D1.23-29.7.2 (3 mg) que era constituída da substância 3.

A fase DCM do extrato MeOH das folhas (1,0 g) foi fracionada em coluna de sílica gel 60 Mesh e usando como eluente gradiente de 10% de acetona em hexano até acetona 100% e gradiente de 10% de MeOH em acetona até MeOH 100%, obtendo 58 frações (coluna DM1). A fração DM1.8-10 foi fracionada em coluna de sílica gel 60 Mesh com 10% de acetona em hexano até acetona 100%, gerando as frações:

a fração DM1.8-10.2 (4 mg), contendo as substâncias **4** e **5**; DM1.8-10.28 (5 mg) contendo a substância **6**; a fração DM1.8-10.31 (7 mg) contendo as substâncias **7** e **8**.

RESULTADOS

O estudo fitoquímico conduziu ao isolamento e identificação de seis triterpenos (**1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6**) além de dois esteroides (**7** e **8**) (Figura 1).

As substâncias friedelan-3-ona (**1**) (1,6 mg), β -sitosterol e estigmasterol (**7** e **8**) (4 mg), apresentaram-se como sólidos brancos amorfos, e as substâncias 28-hidroxi-friedelan-3-ona (**2**) (8 mg), 30-hidroxi-friedelan-3-ona (**3**) (26 mg), α - e

β -amirina (**4** e **5**) (2,6 mg) e o lupeol (**6**) (3mg), apresentaram-se como sólidos brancos cristalinos em formato de agulhas.

As substâncias foram analisadas em equipamento de RMN de 300 MHz (Bruker BioSpin AG, Modelo Fourier 300 UltraShield, com frequência de 300 MHz para hidrogênio com sonda EasyProbe Dual 300 MHz S1 5mm Z-gradient), para os núcleos de ^1H e de ^{13}C (300 e 75 MHz, respectivamente), em CDCl_3 . Os dados de RMN de ^{13}C foram comparados com os descritos por Mahato e Kundu (1994) (Tabela 1). A fim de confirmar a estrutura da substância **3**, esta foi analisada no experimento de correlação heteronuclear *single-quantum* (heteronuclear single-quantum correlation - HSQC).

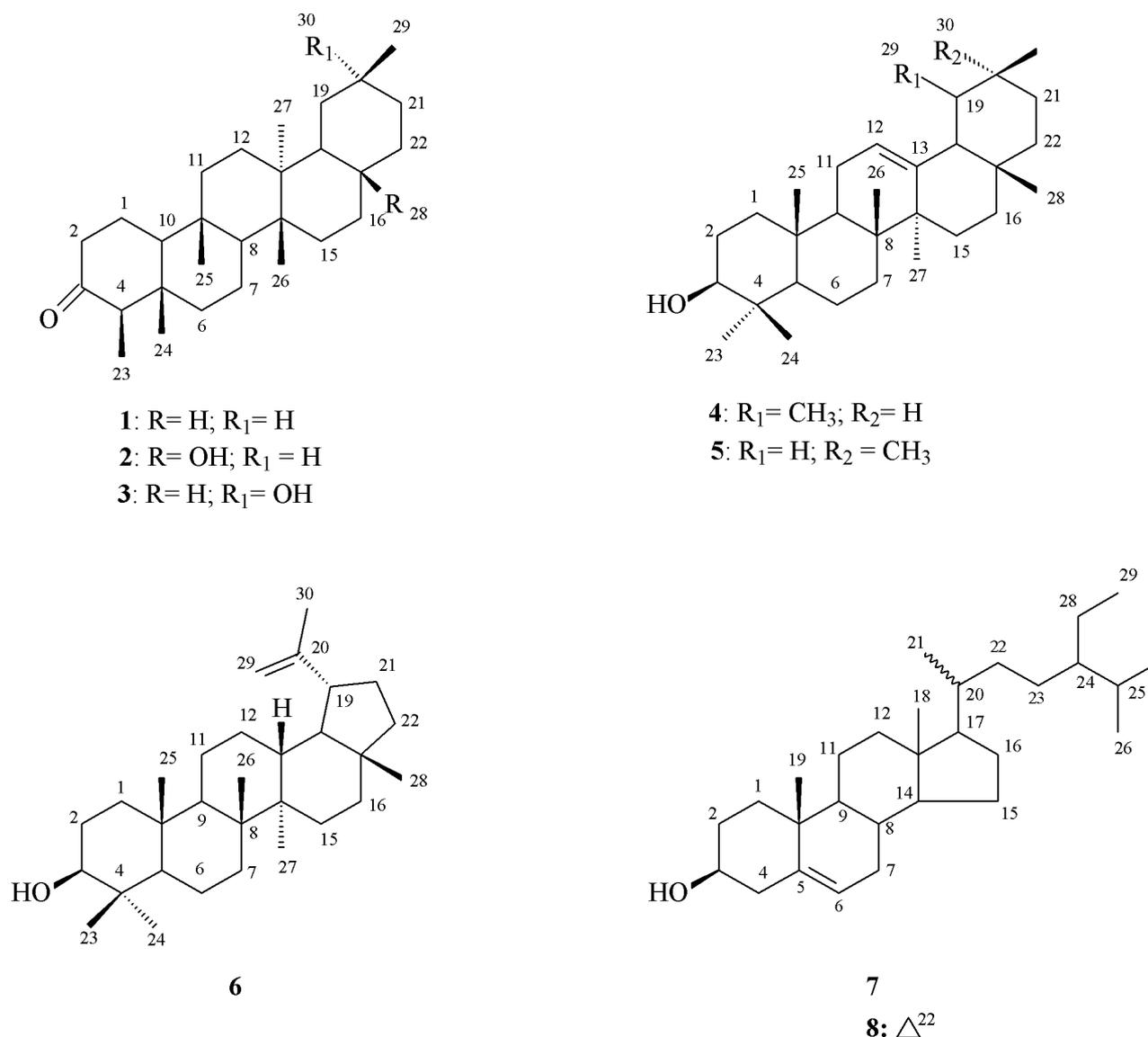


Figura 1. Substâncias isoladas do extrato diclorometânico e da fase diclorometânica do extrato metanólico das folhas de *Piranhea trifoliata*.

Tabela 1. Dados de RMN de ^{13}C das substâncias: friedelan-3-ona, 28-hidroxi-friedelan-3-ona, 30-hidroxi-friedelan-3-ona, α -amirina, β -amirina e lupeol (CDCl_3 , 75 MHz)

	friedelan-3-ona	28-hidroxi-friedelan-3-ona	30-hidroxi-friedelan-3-ona	α -amirina	β -amirina	lupeol
Posição	Observado	Observado	Observado	Observado	Observado	Observado
1	22,3	22,4	22,2	38,8	38,8	38,7
2	41,5	41,7	41,5	27,4	27,4	27,4
3	213,2	213	213,1	79,4	79,4	79
4	58,2	58,4	58,2	39,0	39,0	38,7
5	42,1	42,2	42,1	55,5	55,5	55,3
6	41,3	41,4	41,1	18,6	18,6	18,3
7	18,2	18,4	18,2	32,8	32,8	34,3
8	53,1	52,7	53,0	40,0	37,3	40,9
9	37,4	38,5	37,4	47,8	47,8	50,5
10	59,4	59,7	59,5	37,1	37,1	37,2
11	35,6	35,6	35,9	23,7	23,7	20,9
12	30,5	29,9	29,3	125,3	121,9	25,2
13	39,7	39,7	39,6	139,6	145,5	38,1
14	38,3	37,8	38,1	41,9	41,9	42,8
15	32,4	31,4	32,1	28,6	26,2	27,4
16	36,0	29,3	29,7	26,3	27,1	35,6
17	30,0	35,7	30,0	33,5	32,7	42,8
18	42,7	39,6	42,7	59,9	47,4	48,3
19	35,3	34,7	30,5	39,0	47,0	48,0
20	28,1	28,4	33	40,0	31,3	151
21	32,7	31,6	28,1	31,3	34,9	29,9
22	39,2	33,5	39,8	41,9	37,1	40,0
23	6,8	7,0	6,8	28,3	28,3	28,00
24	14,6	14,8	14,6	15,7	15,7	15,3
25	17,9	18,2	18,2	15,8	15,8	16,1
26	20,2	19,3	18,5	17,0	17,0	16,0
27	18,6	19,4	19,9	23,9	26,3	14,6
28	32,1	68,2	32,1	28,3	28,6	18,0
29	35,0	33,0	28,9	17,0	33,5	109,3
30	31,7	34,4	71,9	21,8	23,9	19,3

DISCUSSÃO

O espectro de RMN de ^1H da substância **1** registrou sete singletos em δ_{H} 0,74; 0,88; 0,90; 1,01; 1,02; 1,06 e 1,19 relativos a sete grupos metila e um dubleto em δ_{H} 0,88 ($J = 6,0$ Hz) correspondente à metila C-23 característica do esqueleto friedelano. O espectro apresentou a ausência de ligação dupla na região entre δ_{H} 5,0 e 6,0 ppm. Foi observado ainda um multiplete entre δ_{H} 2,23 e 2,40 ppm, indicando a presença de três hidrogênios α -carbonílicos, além de sinais

entre δ_{H} 1,27 a 1,58 ppm, indicando a presença de hidrogênios metilênicos e metínicos na molécula. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou trinta sinais. O sinal em 213,0 ppm, indicou que a molécula possui uma carbonila em C-3, além de um sinal em 6,8 ppm referente ao C-23. Ao comparar esses dados com os da literatura de Mahato e Kundu (1994) verificou-se que a molécula se tratava da friedelan-3-ona.

O espectro de RMN de ^1H da substância **2** mostrou 7 sinais referentes aos hidrogênios de metilas, indicando um

triterpeno com uma metila a menos. Observaram-se sinais em δ_H 2,27 (*m*, 2H), em δ_H 2,39 (*ddd*, 2H, $J = 7,0; 5,0; 2,0$ Hz) e em δ_H 3,63 (*sl*, 2H) característico de hidrogênio carbinólico. O espectro de RMN de ^{13}C mostra um sinal de metila em 7,0 ppm e a falta de sinais de ligação dupla sugeriram a presença do esqueleto do tipo friedelano. Ainda foram observados um sinal em 213,0 ppm, de um grupo carbonílico em C-3 e um carbono carbinólico em 68,2 ppm (referente ao C-28). A análise destes dados confirmaram que o triterpeno se tratava da 28-hidroxi-friedelin-3-ona (Mahato e Kundu 1994). Vale ressaltar que este é um triterpeno de ocorrência pouco frequente e está sendo descrito pela primeira vez nesta família.

Os dados de RMN de 1H da substância **3** apresentaram grande semelhança com os dados da substância **1**, pois continham os mesmos sinais de metilas entre δ_H 0,7 a 1,27, além de um dubleto em δ_H 0,89 (3H, *d*, $J = 6,0$ Hz), característico da metila C-23. Os dados que diferenciaram foram observados em δ_H 3,37 (1H, *d*, $J = 10,4$ Hz) e em δ_H 3,45 (1H, *d*, $J = 10,8$ Hz) que estão relacionados a átomos de hidrogênio diastereotópicos em carbono oxigenado. A análise do espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença de metilas em δ_C 6,8; 14,6; 18,2; 18,5; 19,9; 32,1; 28,9; além de um sinal em δ_C 71,9, atribuído ao carbono metilênico ligado ao grupo OH o qual foi confirmado através do espectro bidimensional HSQC sua relação com os sinais em δ_H 3,37 e 3,45 correspondendo aos hidrogênios ligados ao carbono C-30 contendo um grupamento hidroxila. A comparação de todos esses dados obtidos com os da literatura, permitiu identificar a substância **3** como 30-hidroxi-friedelin-3-ona. Esta substância foi isolada pela primeira vez de *Catha cassinoides* (Betancor *et al.* 1980), é um triterpeno de ocorrência pouco frequente e está sendo descrito pela primeira vez nesta família.

O espectro de RMN de 1H das substâncias **4** e **5** mostrou, além de vários singletos característicos de triterpenos (entre 0,79 e 1,13 ppm), sinais de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos em δ_H 5,19 (*t*, $J = 3,5$ Hz) e δ_H 5,13 (*m*), referentes aos H-12, aonde ambos acoplam com os dois hidrogênios em H-11, resultando em um tripleto para β -amirina; o sinal para o H-12 da α -amirina também deveria dar um tripleto, mas o sinal não apresentou boa resolução, sendo considerado um multipletto. Entre os sinais de RMN de ^{13}C tem se os referentes aos das ligações duplas, sendo uma dupla em δ_C 125,3 (C-12) e δ_C 139,6 (C-13) para a α -amirina e a outra em δ_C 121,9 (C-12) e δ_C 145,5 (C-13) para a β -amirina. Também está presente um sinal em δ_C 79,2 referente aos 2 carbonos carbinólicos em C-3. Os sinais de RMN de ^{13}C foram confirmados com os da literatura (Mahato e Kundu 1994).

Nos espectros de RMN de 1H da substância **6** foi observado um singleto em δ_H 1,68 indicativo de hidrogênios de grupo metila ligado a carbono insaturado H-30, além de vários singletos entre δ_H 0,76 a 1,03 característicos de triterpenos.

Observou-se também um dubleto em δ_H 4,69 (1H, *d*, $J = 2,4$ Hz) e um quinteto em δ_H 4,57 (1H, *qt*, $J = 2,4$ Hz) referentes ao hidrogênio vinílico H-29 da ligação dupla terminal e um multipletto em δ_H 3,19 (1H, *m*) relativo ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (H-3) do lupeol. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 30 sinais que permitiu identificar a presença de sete carbonos metílicos, onze metilênicos e seis metínicos. Um sinal em δ_C 79,0 sugeriu a ocorrência de carbono metínico oxigenado em C-3. O sinal em δ_C 151,0 referente a um carbono quaternário e em δ_C 109,3 referente a um carbono terminal foram atribuídos aos carbonos C-20 e C-29, referentes à dupla terminal do triterpeno lupeol. Os demais dados de RMN de 1H e de ^{13}C indicaram que a substância denominada **6** tratava-se do triterpeno lupeol, a qual foi confirmada pelos dados de RMN de ^{13}C descritos na literatura (Mahato e Kundu 1994).

No espectro de RMN de 1H das substâncias **7** e **8** foram observados um dubleto em δ_H 5,37 (2H, *d*, $J = 3,0$ Hz) referente aos hidrogênios H-6 de dois esteroides, um singleto em δ_H 0,69 característicos do β -sitosterol e estigmasterol. Em seguida foram observados dois duplos dubletos em δ_H 5,16 (H, *dd*, $J = 15,0; 9,0$ Hz) e em δ_H 5,01 (H, *dd*, $J = 15,0; 9,0$ Hz) referentes aos hidrogênios H-22 e H-23 do estigmasterol, diferenciando-se do β -sitosterol. Foi observado ainda um multipletto em δ_H 3,54 (2H, *m*, $J = 3,5$ Hz) referente aos hidrogênios H-3 de ambos os esteroides. O espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar, os sinais em δ_C 140,7 e 121,7 referentes aos carbonos C-5 e C-6 de ambos os esteroides, entretanto foram observados os sinais δ_C 138,4 e 129,2 referentes aos carbonos C-22 e C-23 apenas do estigmasterol. Baseado nos dados espectrais de RMN de 1H e de ^{13}C e por comparação destes com os dados encontrados na literatura (Goulart *et al.* 1993) a mistura foi identificada como os esteroides β -sitosterol e estigmasterol.

CONCLUSÃO

O presente trabalho mostra um marco no estudo fitoquímico da espécie *Piranhea trifoliata* o qual conduziu ao isolamento da friedelin-3-ona, 28-hidroxi-friedelin-3-ona, 30-hidroxi-friedelin-3-ona, lupeol, a mistura de α - e β -amirina, além dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol contribuindo para o estudo fitoquímico da família Picrodendraceae, sendo que os triterpenos 28-hidroxi-friedelin-3-ona e 30-hidroxi-friedelin-3-ona estão sendo relatados pela primeira vez para a família.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Projetos: CT-Agro/CNPq (n^o: 520281/2007-1), PPBio/CNPq (n^os: 558321/2009-7 e 457472/2012-0), REPENSA/CNPq/FAPEAM (n^o: 562892/2010-9),

CT-Amazonia/CNPq (nº: 405804/2013-0), INCT-CENBAM/CNPq (nº: 573721/2008-4), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Projeto: Proamazonia/CAPES, nº: 23038.000738/2013-78) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Projeto: REPENSA/CNPq/FAPEAM, nº: 562892/2010-9) pelos apoios financeiros.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- APG II. 2003. An update of the phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141: 399-436.
- Betancor, C.; Freire, R.; Gonzalez, A.G.; Salazar, J.A.; Pascard, C.; Prange, T. 1980. Three triterpenes and other terpenoids from *Catha cassinoides*. *Phytochemistry*, 19: 1989-1993.
- Chase, M.W.; Zmartzty, S.; Ledó, M.D.; Wurdack, K.J.; Swesen, S.M.; Fay, M.F. 2002. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis base do plastid rbcL DNA sequences. *Kew Bulletin*, 57: 141-181.
- 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 jatrofolonas A e B. *Química Nova*, 16: 95-100.
- Jeffreys, M.F. 2011. *Estudo químico e bioatividade de Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae). Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, Amazonas. 121p.
- Mahato, S.B.; Kundu, A.P. 1994. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37: 1517- 1575
- Secco, R.; Cordeiro, I. 2015. Picrodendraceae: In: Lista de espécies da flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB38587>). Acesso em: 14/08/ 2015.
- Sutter, D.M.; Forster, P.I.; Endress, P.K. 2006. Female flowers and systematic position of Picrodendraceae (Euphorbiaceae s.l., Malpighiales). *Plant Systematics and Evolution*, 261: 187-215.
- Wurdack, K.J.; Hoffmann, P.; Samuel, R.; Debruijn, A.; Vanderbank, M.; Cjase, M.W. 2004. Análise filogenética molecular de Phyllanthaceae (Phyllanthoideae pró contraditório, Euphorbiaceae sensu lato) usando plastídeo seqüências de DNA rbcL. *American Journal of Botany*, 91: 1882-1900.

Recebido em 12/10/2015

Aceito em 23/12/2015