



Metabólitos especiais isolados de *Laseguea erecta* (Apocynaceae)

Mario G. de Carvalho^{1*}, Cássia C.F. Alves^{1,2}, Alcení A. Werle³, Raimundo Braz-Filho⁴

¹Departamento de Química, ICE, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23851-970, Seropédica, RJ, Brasil,

²Departamento de Química, Campus de Arraias, Universidade Federal do Tocantins, 77330-000, Arraias, TO, Brasil,

³Departamento de Química, ICEB, Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, MG, Brasil,

⁴Setor de Química de Produtos Naturais, Universidade Estadual Norte Fluminense, 28013-603, Campos, RJ, Brasil

RESUMO: Do caule de *Laseguea erecta* foram isolados o lupeol, a cumarina escopoletina, o lignóide pinosinol e o glicosil-cardenoídeo, α -L-tevetosil-digitoxigenina. As estruturas foram identificadas com o uso de técnicas espectroscópicas de IV, RMN ¹H e ¹³C, incluindo técnicas especiais 1D e 2D, espectroscopia de massas e comparação com dados da literatura.

Unitermos: *Laseguea erecta*, Apocynaceae, glicosil-cardenoídeo, escopoletina, lignana.

ABSTRACT: "Special metabolites isolated from *Laseguea erecta* (Apocynaceae)". From the stem of *Laseguea erecta* the triterpene lupeol, the cumarine scopoletin, the lignoid pinosinol and digitoxigenin α -L-tevetoside, known as thevetoside, were isolated. The structures were identified by IR, mass, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, including 1D and 2D techniques, together with comparison with literature data.

Keywords: *Laseguea erecta*, Apocynaceae, cardenolide glycoside, scopoletin, lignan.

INTRODUÇÃO

Espécies de Apocynaceae são conhecidas como bioprodutoras de alcalóides, terpenóides e iridóides (Carvalho et al., 2002; Vanderlei et al., 1991; Barreto et al., 1998), ocorrendo com menor frequência os flavonóides glicosilados (Carvalho et al., 2001a). O estudo fitoquímico de espécies representantes dos gêneros desta família, e cuja química ainda é pouco conhecida, pode conduzir à descoberta de novas fontes de substâncias naturais ativas uma vez que são frequentemente citadas em trabalhos de revisão sobre plantas com atividades farmacológicas e medicinais (Barbosa-Filho et al., 2006; Falcão et al., 2005; Morais et al., 2005). Este é o primeiro trabalho relacionado a estudo fitoquímico de uma espécie do gênero *Laseguea* e revela-o como bioprodutor de diferentes classes de metabólitos especiais, como lignóides, cumarinas e glicosídeos cardiotônicos. A presença dessas classes de compostos neste gênero revela o seu potencial para ser investigado através de estudos farmacognósticos. Isto se caracteriza não só devido às atividades dos arilpropanóides, como antibacteriais das cumarinas e inibição da AMP fosfodiesterase cíclica do pinosinol e derivados (Nishibe, 1989) mas, também, pela presença da digitoxina. A presença deste heterosídeo reforça a atenção a este gênero nesta área de conhecimento, uma vez que é um representante dos heterosídeos esteróides que são estimulantes e tônicos do

coração (Souza et al., 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Equipamentos

Os dados espectrométricos no infravermelho foram obtidos em aparelho Perkin-Elmer FT-IR-1600/1605 usando pastilha de KBr ou filme de NaCl e as frequências de absorção foram medidas em cm⁻¹. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker 200 MHz (¹H) e 50 MHz (¹³C) e Jeol JNM-GX-400 400 MHz (¹H) e 100 MHz (¹³C), usando CDCl₃ e D₃CCOCD₃ como solventes e tetrametilsilano (TMS) com referência interna. Os espectros de massas foram obtidos no aparelho CG/EM Varian Saturn 2000 com ionização de impacto de elétrons.

Material botânico

O material vegetal foi coletado no Morro de São Sebastião, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, e autenticado através de comparação com exsiccata (N^o 6732) depositada no Herbário OUPR-UFOP, curadora do herbário Dra Maria Cristina Trivelato Messias, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, Brasil.

*E-mail: mgeraldo@ufrj.br, Tel. + 55-21-26822807

Extração e Isolamento dos constituintes químicos

O caule seco e triturado (500,0 g) de *Laseguea erecta* foi submetido a extração através de maceração com hexano e em seguida com metanol até exaustão. Os solventes das soluções dos extratos foram retirados através de destilação em evaporador rotativo, obtendo-se, após total evaporação do solvente, os resíduos dos extratos LECH (30,8 g) e LECM (11,6 g). A análise dos espectros IV e RMN ¹H de LECH revelou ser constituído apenas de hidrocarbonetos alifáticos saturados. O extrato LECM foi submetido a partição com solventes orgânicos. Para isso foi dissolvido em metanol:água (9:1), extraído sucessivamente com hexano, diclorometano e acetato de etila, fornecendo, respectivamente, as frações LECMH (197,0 mg), LECMD (2,0 g), LECMA (270,0 mg) e LECMM (3,0 g).

O resíduo LECMA revelou-se pouco solúvel em clorofórmio. Acetilação com anidrido acético na presença de piridina (1:1) forneceu 236,0 mg de produto acetilado. Este produto foi submetido a filtração em coluna de sílica gel, recolhendo-se 6 frações. As frações reunidas 1-3 (30,0 mg) foram analisadas através de espectros de IV e RMN ¹H e foi identificado como derivado acetato de lupelila (**1a**); as demais frações revelaram-se constituídas de mistura de álcoois alifáticos. O resíduo obtido com diclorometano (2,0 g) foi submetido a fracionamento em coluna de sílica gel, recolhendo-se 24 frações que foram analisadas com CCDA e reunidas em grupos de acordo com a semelhança na revelação com vapor de iodo. A fração 1-4 foi submetida a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20, obtendo-se 12 frações; nas frações LECMD-1-4/3 e LECMD-1-4/6 foram identificados **1** (8,0 mg) e **2** (6,0 mg), respectivamente. E a fração 5-10 (das 24 frações da primeira coluna) foi submetida também a uma coluna de Sephadex LH-20, obtendo-se nas primeiras frações a substância **3** (3,0 mg). A análise dos espectros de IV e RMN ¹H das últimas frações desta coluna permitiu reconhecer a presença de mistura de **3** com outros álcoois alifáticos. O tratamento de **1** com anidrido acético/piridina (1:1) forneceu **1a**, que serviu para confirmar a estrutura proposta para **1**.

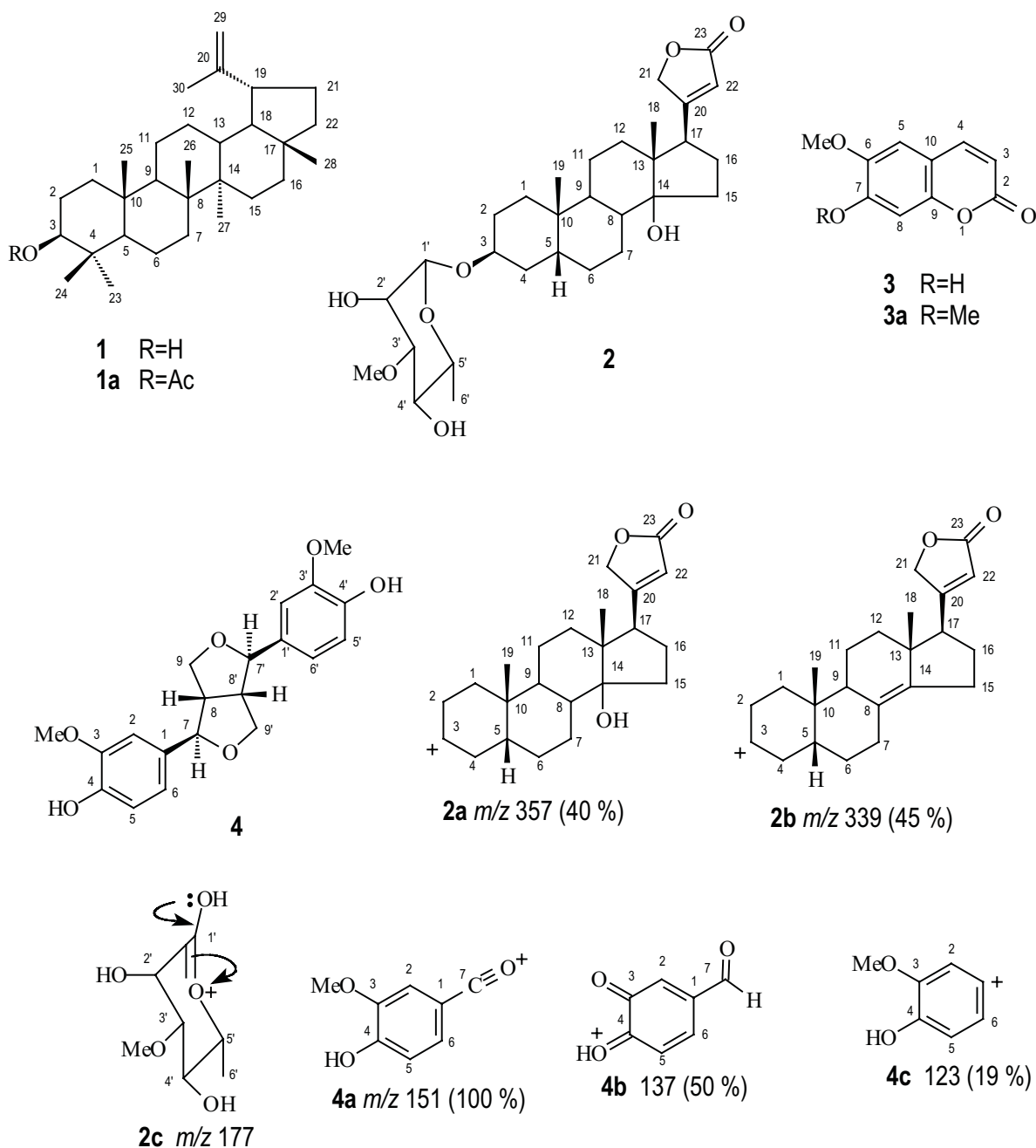
3-(3-O-metilrhamnosil)-digitoxigenina ou α-L-tevetosil-digitoxigenina (2): RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ_H (multiplicidade, J em Hz, atribuição): 1,25-1,26 (m, H-1 e H-2), 4,05 (sl, H-3), 1,49 (sl, H-4), 1,66 (m, H-5), 1,87 (m, H-6), 1,64 e 1,20 (H-7), 1,54 (H-8), 1,58 (H-9), 1,97 e 1,43 (2H-11), 1,39 (H-12), 2,08 e 1,68 (2H-15), 1,70 e 1,54 (2H-16), 2,77 (dd, J=9,2 e 4,5, H-17), 0,87 (s, 3H-18), 0,94 (3H-19), 4,80 e 4,98 (dd, J=18,2 e 1,6 Hz, 2H-21), 5,88 (s, H-22), 4,25 (d, J=7,8 Hz, H-1'), 3,65 (t, J=9,0 Hz, H-2'), 3,22 (dd, J=9,2 e 3,4 Hz, H-3'), 3,85 (dl, J=3,0 Hz, H-4'), 3,57 (q, J=6,4 Hz, H-5'), 1,35 (d, J=6,4 Hz, H-6'), 3,53 (s, MeO-3').

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O lupeol **1** foi identificado através da análise do espectro de IV e RMN ¹H e ¹³C do derivado acetilado (**1a**) envolvendo a comparação com os dados do derivado isolado de *Parahancornia amapa* (Sobrinho et al., 1991 e Carvalho et al., 2001b).

O espectro no IV da substância **2** apresentou bandas de absorção de hidroxila (ν_{máx} 3468 cm⁻¹), grupamentos CH₂ e CH₃ (ν_{máx} 2934 e 2861 cm⁻¹), carbonila de γ-lactona α,β-conjugada (ν_{máx} 1745 cm⁻¹), C=C conjugada (ν_{máx} 1625 cm⁻¹) e C-O (ν_{máx} 1263-1071 cm⁻¹). O espectro de RMN ¹H desta substância apresentou sinais de hidrogênio olefínico em δ_H 5,88 (s, 1H), dois duplo dubletos em δ_H 4,80 e 4,98 (J=18,2 e 1,6 Hz, 1H cada) de um grupo metileno oxigenado, um dubleto em δ_H 4,25 (J=7,8 Hz) e um singlete largo em δ_H 4,05. Um grupo de sinais adicionais foi usado para caracterizar a presença de uma unidade de carboidrato. A análise comparativa dos espectros de RMN ¹³C-HBBD e RMN ¹³C-DEPT (100 MHz) permitiu identificar o número de CH₃, CH₂, CH e C, e o espectro 2D HMQC foi usado para a correlação heteronuclear dos valores de deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados correspondentes. Além do sistema γ-lactonônico α,β-insaturado, representado pelos sinais correspondentes aos átomos de carbono em δ_C 174,5 (C-23 ou C-20), 174,4 (C-20 ou C-23) e 117,7 (CH-21, ligado ao H com δ_H 5,88) e 73,4 (CH₂, ligado aos hidrogênios com δ_H 4,80 e 4,98), os espectros de RMN ¹³C (HBBD) e HMQC apresentaram sinais que permitiu identificar um CH em 73,9 (ligado ao H com δ_H 4,05) e os sinais da 3-O-metilrhamnose: δ_{CH} 101,2 (CH-1'), 70,8 (CH-4'), 82,8 (CH-3'), 68,2 (CH-2'), 70,4 (CH-5'), e δ_{CH3} 16,5 (H₃C-6') ligados aos respectivos hidrogênios em δ_H 4,25 (d, J=7,8 Hz, H-1'), 3,65 (t, J=9,0 Hz, H-4'), 3,22 (dd, J=9,0 e 3,4 Hz, H-3'), 3,85 (dl, J=3,0 Hz, H-2'), 3,57 (m, H-5'), 1,35 (d, J=6,4 Hz, 3H-6'). A ausência de sinal de acoplamento a uma ligação (¹J_{CH}) permitiu identificar um carbono oxigenado quaternário com δ_C 85,6. Além destes sinais, foi ainda possível identificar as absorções adicionais de dois grupos metílicos [(CH₃)₂], nove metilênicos [(CH₂)₉], quatro metínicos [(CH)₄], e confirmar a presença de dois carbonos quaternários [(C)₂] e um grupo metoxílico (MeO-3'). Todos os dados espectrais acima interpretados, incluindo-se a comparação com valores da literatura (Abe et al., 1992), permitiram propor a estrutura do heterosídeo esteróico **2** [3(3-O-metilrhamnosil)-digitoxigenina] e a completa atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. O espectro de massas apresentou picos em m/z 357 ([M - C₇H₁₃O₅]⁺, **2a**, 40 %), 339 ([357-H₂O]⁺, **2b**, 45 %), 177 ([C₇H₁₃O₅]⁺, **2c**, 15%), que contribuíram para a confirmação da estrutura proposta. O pico em m/z 177 (**2c**) foi também utilizado para a caracterização da presença da unidade O-metilrhamnose.

O espectro no IV de **3** apresentou bandas em ν_{máx} 3442 (OH), 1270 (C-O), 1721 (C=O) e 1642, 1517 e 918 (aromático e ligação dupla olefínica) cm⁻¹. O espectro de RMN ¹³C (HBBD) apresentou quatro sinais



intensos de carbonos metínicos em δ_{CH} 143,8, 113,3, 107,4 e 103,2, um sinal em δ_{OMe} 56,4 representando uma metoxila, além de absorções em δ_C 161,5, 149,7, 150,0, 144,0, 111,0 de carbonos quaternários. O espectro de RMN 1H (200 MHz, CD_3OD) apresentou dois singletos em δ_H 7,09 (H-8) e 6,75 (H-5), e dois dubletos ($J=9,4$ Hz) em δ_H 6,20 (H-3) e 7,80 (H-4). Estes dados permitiu caracterizar um esqueleto de uma cumarina (**3**) contendo dois substituintes no anel aromático, um OH (sl, 8,5 ppm) e uma metoxila (δ_H 3,89, s, 3H) nas posições 6 e 7. Esta estrutura revelou-se compatível com o valor do pico (m/z 192, 100 %) correspondente ao íon molecular ($[M]^+$) e os picos adicionais em m/z 177 ($[M-Me]^+$, 60 %), 164 ($[M-CO]^+$, 40 %), 149 ($[M-Me-CO]^+$ e/ou $[M$

- CO - Me] $^+$, 50 %) e 121 ($([m/z$ 149 - CO] $^+$, 30 %). Os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono-13 de **3** foram comparados com os valores corrigidos através de técnicas especiais de RMN e registrados na literatura (Vasconcelos et al., 1998). Esta comparação confirmou a proposta da escopoletina para **3**. O tratamento de **3** com diazomentano forneceu **3a** cujo espectro de RMN 1H (200 MHz, D_3CCOCD_3) apresentou sinais em δ_H 7,87 (d, $J=9,6$ Hz, H-4), 7,17 (s, H-5), 6,95 (s, H-8), 6,21 (d, $J=9,6$, H-3), 3,94 (s, MeO) e 3,86 (s, MeO). Os espectros obtidos com NOEDIFF (200 MHz) com irradiação em: a) em δ_H 3,85 (MeO-6) revelou NOE em δ_H 7,17 (H-5); b) em δ_H 3,93 (MeO-7) apresentou NOE em δ_H 6,95 (H-8); c) em δ_H 7,17 (H-5) gerou NOE em δ_H 7,87 (H-4).

Esta análise permitiu fazer atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos das metoxilas δ_{H} 3,93 (MeO-7), 3,85 (MeO-6) e dos hidrogênios H-5 e H-8 em 7,17, e 6,95, respectivamente. Sendo, assim, a estrutura de **3** foi definida como 7-hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopirran-2-ona, isolada anteriormente de *Guarea rhopalocarpa* (Camacho et al., 2001) e de *Artemisia campestris* subsp. *maritima* (Vasconcelos et al., 1998) conhecida como escopoletina.

A substância **4** foi identificada através da análise dos espectros de hidrogênio (400 MHz) incluindo NOESY, espectro de massas e comparação com dados da literatura (Cuenca, Catalan, 1991). A presença de sistema aromático 1,2,4-tri-substituído foi reconhecida pelos sinais em δ_{H} 6,98 (d, $J=2,0$ Hz, H-2/H-2'), 6,78 (d, $J=8,0$ Hz, H-5/H-5') e 6,82 (dd, $J=8,0$ e 2,0 Hz, H-6/H-6') no espectro de RMN ^1H . Este espectro apresentou também um sinal de grupo metoxílico em δ_{H} 3,84. Os demais sinais em δ_{H} 4,66 (d, $J=4,4$ Hz, H-7/H-7'), 4,19 (dd, $J=9,0$ e 7,0 Hz, H-9a/H-9'a), 3,80 (dd, $J=9,0$ e 4,4 Hz, H-9b/H-9'b) e 3,08 (m, H-8/H-8'). Os picos em m/z 151 (**4a**, 100 %), 137 (**4b**, 50 %) e 123 (**4c**, 19 %) no espectro de massas permitiram sugerir a presença de anel aromático sustentando um grupo hidroxila e uma metoxila. O pico M^+ em m/z 358 (29 %) revelou-se compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_2(\text{OH})_2(\text{OCH}_3)_2$, em acordo com lignana furofurânica contendo dois grupos guaiacila (**4**). A posição da metoxila em 3',3 foi deduzida pelo sinal de NOE revelado pelo espectro de NOESY, revelando interação entre a metoxila (MeO-3'/MeO-3) e os hidrogênios H-2/H-2'. A comparação desses dados com valores da literatura para lignanas furofurânicas permitiu definir a estrutura de **4** como o pinoresinol (Cuenca, Catalan, 1991)

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e a FAPERJ pelas bolsas e suporte financeiro concedidos.

REFERÊNCIAS

- Abe R, Yamauchi T, Nohara T 1992. C-Nor-D-homo-cardenolide glycosides from *Thevetia nerifolia*. *Phytochemistry* 31: 251-254.
- Barbosa-Filho JM, Medeiros KCP, Diniz MFFM, Batista LM, Athayde-filho PF, Silva MS, Cunha EVL, Almeida JRGS, Quintans-Junior LJ 2006. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev Bras Farmacogn* 16: 258-285.
- Barreto AS, Carvalho MG, Nery IA, Gonzaga L, Kaplan MAC 1998. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. *J Braz Chem Soc* 9: 430-434.
- Camacho MR, Phillipson JD, Croft SL, Kirby GC, Warhurst DC, Solis PN 2001. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. *Phytochemistry* 56: 203-210.
- Carvalho SF, Costa DL, Mazzei JL, Taddei LEM, d'Avila LA 2002. Alternative extraction of alkaloid

- anticarcinogens from Brazilian "vinca rósea" using long exchange chromatography. *Rev Bras Farmacogn* 12 (supl.): 83-34
- Carvalho MG, Cranchi DC, Kingston DGI, Werle AA 2001a. Proposed active constituents of *Dipladenia martiana*. *Phytother Res* 15: 715-717.
- Carvalho MG, Velloso CRX, Braz-Filho R, Costa WF 2001b. Acyl-lupeol esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *J Braz Chem Soc* 12: 556-559.
- Cuenca MDR, Catalan CAN 1991. Monoterpenes and lignans from *Mikania saltensis*. *J Nat Prod* 54: 1162-1164.
- Falcão HS, Lima IO, Santos VL, Dantas HF, Diniz MFFM, Barbosa-Filho JM, Batista LM 2005. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 15: 381-391.
- Morais SMM, Dantas JDP, Silva ARA, Magalhães EF 2005. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Rev Bras Farmacogn* 15: 169-177.
- Nishibe S 1989. *Structure elucidation and biological activities of phenylpropanoids, coumarins and lignans from medicinal plants*. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, V.5, NY, Atta-ur-Rahman ed. Elsevier, p. 511 e 544.
- Sobrinho DC, Hauptli MB, Appolinário EV, Kollenz CLM, Carvalho MG, Braz-Filho R 1991. Triterpenoids isolated from *Parahancornia amapa*, *J Braz Chem Soc* 2: 15-20.
- Sousa MP, Matos MEO, Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA 2004. *Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais Brasileiras*. Fortaleza-CE, 2ª Ed., Editora da UFC, p. 216.
- Vanderlei MF, Silva MS, Gottlieb HE, Braz-Filho R 1991. Iridoids and triterpenes from *Himatanthus phagadaenica*, The complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of two Iridoids glycosides. *J Braz Chem Soc* 2: 51-55.
- Vasconcelos JMJ, Silva MAS, Cavaleiro JAS 1998. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* Subsp. *Maritima*. *Phytochemistry* 49: 1421-1424.