

ESTUDO QUÍMICO E PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS CASCAS DE *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (“PAU-PEREIRA”)

Rose Lisieux R. Paiva Jácome* e Alaíde Braga de Oliveira

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Olegário Maciel, 2360, 30180 -112 Belo Horizonte - MG

Délio S. Raslan

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-010 Belo Horizonte - MG

Hildebert Wagner

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, D-81377 München - Germany

Recebido em 23/9/03; aceito em 18/6/04; publicado na web em 8/10/04

CHEMICAL CONSTITUENTS AND CHROMATOGRAPHIC PROFILE OF THE STEM BARK OF *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (“PAU-PEREIRA”). Four known alkaloids, uleine, epiuleine, apparicine and desmethyluleine, besides the isoprenoids lupeol and stigmasterol were isolated from the stem bark of *Aspidosperma parvifolium*. Their identification was based on spectroscopic analysis (UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS). The chromatographic profile of the ethanolic extract was obtained by HPLC and uleine, epiuleine and apparicine were identified in the extract.

Keywords: *Aspidosperma parvifolium*; uleine; HPLC.

INTRODUÇÃO

A família Apocynaceae possui cerca de 200 gêneros e 2000 espécies, de distribuição tropical e subtropical, podendo chegar até regiões temperadas. O gênero *Aspidosperma* Mart. ocorre desde o México até a Argentina¹ e distingue-se pela ocorrência frequente de alcalóides indólicos².

Algumas espécies de *Aspidosperma* são usadas popularmente como remédios para febre, mas *A. parvifolium*, apesar de ser citada como planta medicinal³, pouco se conhece sobre seu uso popular. É uma árvore com altura em torno de 10-15 m, com o tronco de 40-60 cm de diâmetro, que ocorre desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, em Minas Gerais, Goiás e no Mato Grosso. É conhecida popularmente como “guatambu”, “peroba” ou “pau-pereira”⁴.

Desta espécie foi isolado, anteriormente, o alcalóide N-metiltetraidroelipiticina².

Este artigo descreve o estudo fitoquímico desta espécie, o isolamento e a caracterização do triterpeno lupeol, do esteróide estigmasterol e dos alcalóides uleína (**1a**), epiuleína (**2**), aparicina (**3**) e desmetiluleína (**1b**). Todos os constituintes químicos estão sendo descritos pela primeira vez em *A. parvifolium*.

Foram obtidos os perfis cromatográficos do extrato etanólico das cascas, através de CLAE, assim como dos alcalóides isolados e estes, identificados no cromatograma pelo tempo de retenção e espectros UV obtidos “on line”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas de *A. parvifolium* revelou a presença de dois isoprenóides, lupeol e estigmasterol, e quatro alcalóides (Figura 1), uleína (**1a**), epiuleína (**2**), aparicina (**3**) e desmetiluleína (**1b**) que foram identificados atra-

vés da análise dos dados fornecidos pelos espectros UV, IV, RMN ¹H e ¹³C e de massas, comparados com valores registrados na literatura⁵⁻¹⁵.

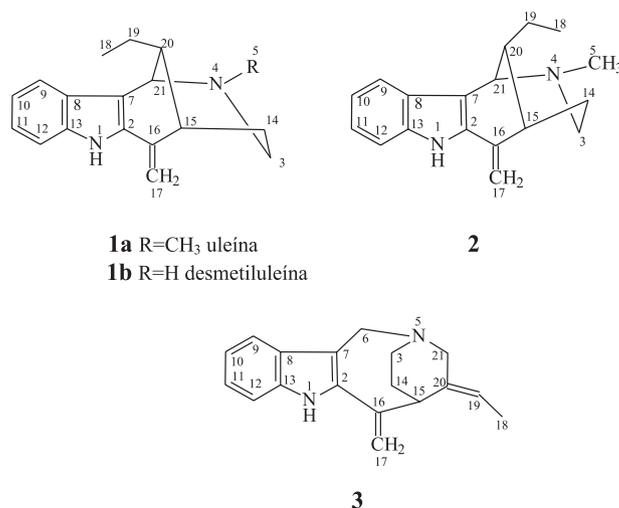


Figura 1. Alcalóides isolados (**1-3**) do extrato etanólico das cascas de *A. parvifolium*

Os espectros de ultravioleta (UV), obtidos “on line”, em CLAE (acetronitrila:água), para uleína, epiuleína e aparicina foram muito parecidos, com máximos de absorção em 209, 240 e 309 nm (Figura 2)⁷.

Os espectros de massas, para uleína e epiuleína, exibem íons moleculares de 266 u. e fragmentos em *m/z* 237, 223, 209, 194 e 180 u., conforme proposta de Manske⁷. A aparicina exibe o íon molecular de 264 u., duas unidades de massa a menos que a uleína, com fragmentação muito semelhante. Quanto à desmetiluleína, o espectro de massas exibe o íon molecular de 252 u., ou seja, 14 unidades a menos que a uleína e fragmentação de acordo com aquela esperada para uleína^{8,9}.

*e-mail: lisieux@dedalus.lcc.ufmg.br

Os espectros de RMN ^1H para uleína e epiuleína são semelhantes, mas diferem em relação aos tripletos correspondentes aos grupos CH_3 (C-18) do grupo etila, centrados em δ 0,85 para uleína e em δ 1,08 para epiuleína. De acordo com a literatura, o grupo etila na uleína está sobre o sistema π -aromático e, portanto, espera-se para 3H-18 um sinal mais próximo do TMS (δ 0,82), devido à proteção do sistema π , enquanto que na epiuleína o grupo etila está à direita e o mesmo sinal aparece em δ 1,08¹¹.

O espectro de RMN ^1H da aparicina difere daquele da uleína em dois aspectos principais: ausência do tripleto a δ 0,82 atribuído aos três hidrogênios 3H-18 da uleína e ausência de um simpleto a δ 2,30 atribuídos aos 3 hidrogênios do grupo N-metila (3H-5) da uleína. Já o espectro de RMN ^{13}C da aparicina difere do espectro da uleína, pela ausência dos sinais a δ 46,27 e 24,35, atribuídos respectivamente aos C-20 e C-19 da uleína. Outra diferença significativa foi o aparecimento de sinais de carbonos olefínicos a δ 131,39 e 120,48.

Os espectros de RMN ^{13}C da uleína, epiuleína e aparicina estão representados na Tabela 1, com os valores dos deslocamentos químicos de ^{13}C para os três alcalóides e mostram completo acordo com as estruturas propostas^{12,13}.

O espectro de massas do lupeol mostrou o pico do íon molecular em m/z 426 u. e do estigmasterol em m/z 412 u. Os espectros de RMN ^1H dos dois sólidos mostraram acúmulos de sinais na faixa de δ 0,7 – 2,0 que, associados com o desenvolvimento de cor rosa com o teste de Liebermann-Buchard e ponto de fusão de 165 e 136 °C, respectivamente, foram suficientes para identificação do lupeol e estigmasterol. A identificação foi confirmada pela fragmentação no espectrômetro de massas e pela análise comparativa de dados de RMN ^{13}C ^{14,15}.

O perfil cromatográfico do extrato etanólico das cascas de *A. parvifolium* mostrou um pico intenso com o tempo de retenção em 32 min que, comparado com os picos obtidos para a uleína (31,9 min) e epiuleína (31,4 min) e os espectros de UV “on line”, sugere tratar-se destes alcalóides (Figuras 2 e 3). Anterior a 32 min há um outro pico cujo tempo de retenção e o espectro UV “on line” que, comparado com aquele da aparicina (29,5 min), sugere tratar-se deste outro alcalóide (Figuras 2 e 3).

Não foi possível separar, nas condições cromatográficas utilizadas, a uleína da epiuleína, uma vez que cada um destes alcalóides

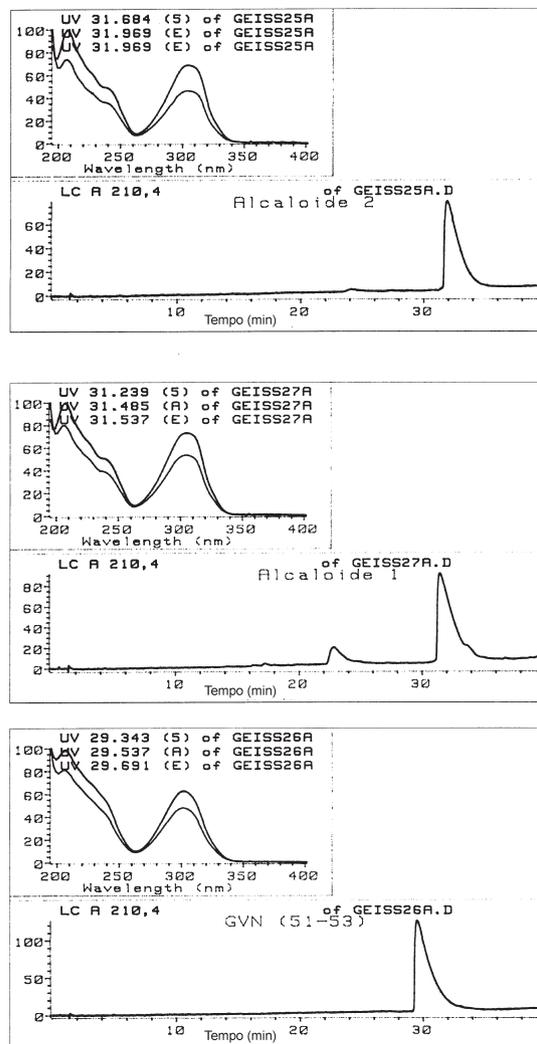


Figura 2. Cromatogramas a 210 nm e espectro UV “on line” da uleína, epiuleína e aparicina. Fase móvel: $\text{ACN-H}_2\text{O}$ com 0,05% de *ac.* hexanosulfônico, 10:90 – 90:10 em 50 min. Fluxo: 1 mL/min

Tabela 1. Deslocamentos químicos de ^{13}C (90 MHz) para uleína (1a), epiuleína (2) e aparicina (3) e comparação com a literatura (solvente CDCl_3)

Carbonos	Uleína	Uleína ¹²	Epiuleína	Epiuleína ¹²	Aparicina	Aparicina ¹³
2	135,1	135,5	136,5	136,4	144,9	142,6
3	46,3	46,2	46,4	46,2	45,2	45,3
5	44,4	44,1	44,8	44,4		
6					54,1	54,3
7	107,8	110,8	110,8	110,0	110,6	111,1
8	129,4	129,3	128,5	127,9	128,9	129,0
9	119,5	119,3	119,6	119,0	118,5	118,6
10	119,8	119,6	119,9	119,8	122,9	123,0
11	122,7	122,4	122,8	122,6	119,3	119,3
12	110,7	110,8	111,9	111,0	110,3	110,2
13	136,6	136,8	135,9	136,6	137,2	137,8
14	34,7	34,5	28,5	27,8	29,4	29,6
15	39,5	39,4	38,5	37,7	41,1	41,3
16	138,7	138,7	142,1	141,1	135,6	135,7
17	106,7	106,9	104,7	106,1	112,4	112,2
18	11,8	11,6	12,2	12,0	12,6	12,5
19	24,3	24,2	23,5	23,3	120,5	120,3
20	46,1	45,8	44,7	44,2	131,4	131,3
21	56,5	56,6	54,9	55,3	54,2	54,3

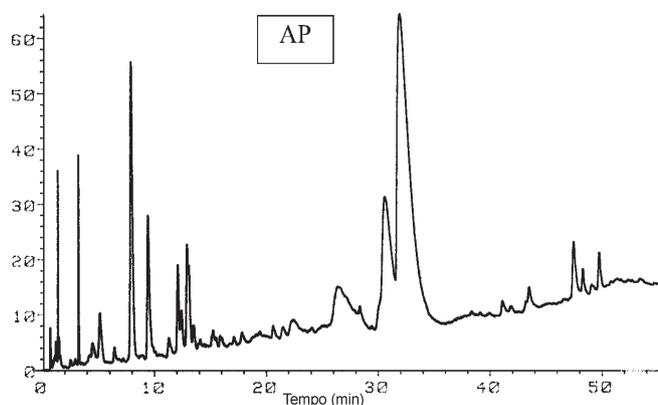


Figura 3. Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato etanólico de *A. parvifolium* a 210 nm. Fase móvel: ACN-H₂O com 0,05 de ác. hexanosulfônico, 10:90 – 90:10 em 50 min. Fluxo: 1mL/min

injetados separadamente, apresentou tempos de retenção muito próximos de 31,9 e 31,4 min, respectivamente (Figuras 2 e 3).

PARTE EXPERIMENTAL

Material botânico

As cascas de *A. parvifolium* foram coletadas em Paraobebeba, Minas Gerais, e a espécie foi identificada pelo Dr. J. A. Lombardi, do Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

Extração e separação

O extrato etanólico de *A. parvifolium* foi obtido por percolação a partir de 2,5 kg das cascas da árvore. Em torno de 60 g do extrato foram dissolvidos em etanol e HCl 1N e fracionados com diclorometano. Obteve-se assim uma camada orgânica neutra (APN), uma interface (API) e uma camada aquosa ácida (APA). A camada aquosa ácida foi alcalinizada com NH₄OH até pH 9 e foi extraída com diclorometano (APT). Formou-se um precipitado que foi separado (APP). Este procedimento está sumariado na Figura 4.

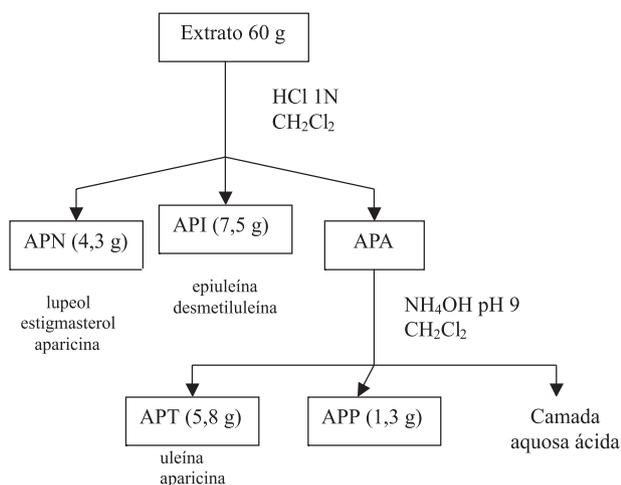


Figura 4. Fracionamento do extrato etanólico das cascas de *A. parvifolium*

Cromatografia da fração neutra (APN 4,3 g)

Esta fração foi eluída, em uma coluna de sílica-gel, com os eluentes em ordem crescente de polaridade. Das frações 6-10

(0,124 g) e 11-20 (0,119 g), através de CCD preparativa, usando-se como eluente de desenvolvimento tolueno-acetato de etila (93:7), foram isolados dois sólidos identificados como lupeol e estigmasterol, respectivamente.

Das frações 50-56 (0,178 g) e 61-63 (0,178 g), através de CCD preparativa, usando-se como eluente de desenvolvimento tolueno-acetato de etila-dietilamina (7:2:1), foi isolado o sólido cristalino branco identificado como aparicina (8,6 mg).

Cromatografia da Interface (API 7,5 g)

Este material foi fracionado em uma coluna de sílica-gel com os eluentes em ordem crescente de polaridade. As frações 59-60 (0,100 g) foram cromatografadas em CCD preparativa e foram isolados dois alcalóides: a desmetiluleína (3,8 mg) e o alcalóide **6** (1 mg) que não teve sua estrutura elucidada.

Cromatografia da camada orgânica (APT 5,8 g)

A camada orgânica foi submetida a fracionamento em coluna de sílica-gel. As frações 5-20 (0,243 g) foram submetidas à CCD preparativa, usando-se como eluente clorofórmio:dietilamina (9:1). Obtiveram-se 9,2 mg do alcalóide identificado como epiuleína.

As frações 30-36 (0,542 g) foram recromatografadas em coluna de sílica-gel da qual foi isolado um sólido branco identificado como uleína (12 mg).

Perfil cromatográfico e identificação por CLAE dos alcalóides isolados nas cascas de *A. parvifolium*

Instrumentação e parâmetros de separação em CLAE

As análises foram feitas em um cromatógrafo líquido HP 1090 com detector de diodo-array HP 1040 em coluna de fase reversa de sílica RP-18 (12,5 cm x 1 cm) usando como fase móvel um gradiente linear de acetonitrila (ACN) com ac. hexanosulfônico e água (5-90% de acetonitrila) em 50 min; fluxo 1 mL/min e detecção no UV a 210 nm.

Preparação das substâncias de referência

As substâncias de referência foram obtidas do extrato etanólico, conforme o esquema da Figura 4. Para injeção no cromatógrafo foram preparadas soluções de 1,0 mg/mL de cada um dos alcalóides isolados uleína, epiuleína e aparicina. Foram injetados no cromatógrafo 5 µl de cada uma das soluções. Na Figura 2 estão representados os cromatogramas obtidos por CLAE e os espectros no UV obtidos "on line" para estes alcalóides.

Preparação dos extratos para injeção em CLAE

Três g da casca de *A. parvifolium* pulverizada foram extraídas em Soxhlet, por 12 h, com etanol. O extrato etanólico foi concentrado a vácuo, fornecendo um resíduo de 0,649 g. O resíduo foi dissolvido em acetonitrila e filtrado, completando o volume para um balão volumétrico de 5 mL. Uma parte deste extrato foi novamente filtrado em Sep Pak RP-18 e 5 µl foram injetados em CLAE. O cromatograma do extrato etanólico está representado na Figura 3.

Dados físico-químicos das substâncias isoladas das cascas de *A. parvifolium*

Uleína (**1**): Sólido cristalino branco: faixa de pf 78-85 °C em CH₂Cl₂ (75 – 100 °C)⁵. UV (λ max., nm): 209, 240 e 309 em CLAE em acetonitrila/água (Figura 2). IV (νmax., KBr, cm⁻¹): 3040, 1620, 870, 730. EM m/z: 266 u (M⁺ 100%), 237 (20), 223(12), 209 (42), 194 (14), 180 (12). RMN¹H (CDCl₃, 360 MHz) δ: 0,85 (3H, t, J=7,4Hz, 3H-18); 1,15 (2H, q, J=7,4Hz, 2H-19); 1,7 (H, m, H-20);

2,05 (2H, m, 2H-14); 2,30 (3H, s, 3H-5); 2,7 (H, d, J=3,0 Hz, H-3); 2,45 (H, m, H-3); 3,5 (H, s, H-15); 4,10 (H, d, J=3Hz, H-21); 5,0 (H, s, H-17); 5,27 (H, s, H-17); 7,55 (H, d, J=8Hz, H-12); 7,35 (H, d, J=8Hz, H-9); 7,2 (H, t, J=7,8Hz, H-11); 7,1 (H, t, J=7,8Hz, H-10); 8,25 (H, s, H-1).

Epiuleína (2): Sólido amorfo amarelo: pf 122-124 °C em CH₂Cl₂ (122-129 °C)¹⁰. UV (λ max., nm): 209, 240 e 309 em CLAE em acetoneitrila/água (Figura 2). EM *m/z*: 266 u (M⁺ 100%), 237 (58); 223 (30); 209 (72); 194 (60); 180 (60); 167 (25). RMN¹H (CDCl₃, 360 MHz) δ: 1,08 (3H, t, J=7,4 Hz, 3H-18); 1,25 (2H, t, 2H-19); 2,0 (2H, m, 2H-14); 2,25 (3H, s, 3H-5); 2,4 (H, m, H-3); 2,65 (H, m, H-3); 4,0 (H, s, H-21); 4,95 (H, s, H-17); 5,2 (H, s, H-17); 7,3 (H, d, J=7,8 Hz, H-9); 7,55 (H, d, J=8,0 Hz, H-12); 7,15 (H, t, J=8,0 Hz, H-11); 7,1 (H, t, H-10); 8,25 (H, s, H-1).

Aparicina (3): Sólido branco cristalino: pf 188-192 °C em CH₂Cl₂ (192-194 °C)⁸. UV (λ max., nm): 209, 240 e 309 nm em CLAE em acetoneitrila/água (Figura 2). EM *m/z*: 264 u (M⁺ 100%), 249 (20); 235 (28); 222 (28); 208 (37); 207 (20); 194 (17). RMN¹H (CDCl₃, 360 MHz) δ: 1,47 (3H, d, J=1Hz, 3H-18); 1,9 (2H, m, 2H-14); 3,98 (H, s, H-15); 4,27 (H, d J=17,7Hz, H-6); 4,47 (H, d, J=17,7Hz, H-6); 5,3 (H, s, H-17); 5,4 (H, s, H-17); 5,3 (H, s, H-19); 3,8 (H, d, J=16Hz, H-21); 3,2 (H, d, J=16Hz, H-21), 3,1(H, m, H-3); 3,4 (H, m, H-3); 7,3 (H, d, J=8Hz, H-9); 7,4 (H, m, J=8Hz, H-12); 7,2 (H, t, J=7Hz, H-10); 7,1(H, t, J=7Hz, H-11); 7,95 (H, s, H-1).

Desmetiluleína (1b): Sólido branco: pf 143 °C em CH₂Cl₂⁸. EM *m/z*: 252 u. (M⁺100%), 223 (34); 209 (20); 194 (23); 180 (20). RMN¹H (CDCl₃, 360 MHz) δ: 0,85 (3H, t, J=7,4 Hz, 3H-18); 1,15 (2H, m, 2H-19); 1,65 (H, m, H-20); 1,85 (H, s, H-5); 2,05 (2H, m, 2H-14); 2,6 (H, d, H-15); 2,75 (H, d, J=2,8 Hz, H-3); 2,65 (H, m, H-3); 5,3 (H, s, H-17); 5,0 (H, s, H-17); 4,4 (H, d, J=2,2 Hz, H-21); 8,2 (H, s, H-1); 7,55 (H, d, J=7,8 Hz, H-12); 7,45 (H, d, J=7,8 Hz, H-9); 7,1 (H, t, J=8 Hz, H-10); 7,2 (H, t, J=8 Hz, H-11).

Lupeol (APN - F 6-10): Sólido branco: pf 165-170 °C (160-162 °C). IV (νmax., KBr, cm⁻¹): 3340, 2940, 2860, 1640. EM *m/z*: 426 u. RMN¹H (CDCl₃, 360 MHz) δ: 0,8 - 1,8 (CH₂, CH₃); 4,55 (H, s, H-29); 4,65 (H, s, H-29); 3,6 (H, m, H-3). RMN¹³C (CDCl₃, 360 MHz) δ: 38,76 (C-1); 27,38 (C-2); 78,98 (C-3); 38,84 (C-4); 55,26 (C-5); 18,30 (C-6); 34,24 (C-7); 40,80 (C-8); 50,40 (C-9); 37,14 (C-10); 20,90 (C-11); 25,10 (C-12); 38,01 (C-13); 42,80 (C-14); 27,42 (C-15); 35,56 (C-16); 43,00 (C-17); 48,26 (C-18); 47,97 (C-19); 150,98 (C-20); 29,82 (C-21); 40,00 (C-22); 28,07 (C-23); 15,36 (C-

24); 16,11 (C-25); 15,95 (C-26); 14,53 (C-27); 17,99 (C-28); 109,31 (C-29); 19,29 (C-30)¹⁵.

Estigmasterol (APN - F 11-20): Sólido branco: pf 136 °C. EM *m/z*: 412 u, 397 (70%), 383 (100%), 351 (9%), 300 (14%), 273 (19%), 255 (40%), 213 (7%). RMN¹H (CDCl₃, 360 MHz) δ: 0,7 - 2,0 (CH₂, CH₃); 3,5 (H, m, H-3); 5,0 (H, m); 5,3 (H, m); 5,4 (H, s). RMN¹³C (CDCl₃, 360 MHz) δ: 37,22 (C-1); 31,62 (C-2); 71,79 (C-3); 42,25 (C-4); 140,72 (C-5); 121,7 (C-6); 31,87 (C-7); 31,87 (C-8); 50,10 (C-9); 36,48 (C-10); 21,06 (C-11); 39,74 (C-12); 42,19 (C-13); 56,84 (C-14); 24,34 (C-15); 28,91 (C-16); 56,02 (C-17); 12,03 (C-18); 19,38 (C-19); 40,49 (C-20); 21,06 (C-21); 138,31 (C-22); 129,24 (C-23); 51,21 (C-24); 31,87 (C-25); 21,20 (C-26); 18,96 (C-27); 25,39 (C-28); 12,24 (C-29)¹⁴.

AGRADECIMENTOS

Ao KFA Deutsches Forschungszentrum Juelic GmbH pela bolsa de estudos e ao CNPq pela passagem concedida.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira Neto, W. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1988.
2. Bolzani, L.; Serur, L. M.; Matos, F. J. A.; Gottlieb, O. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1987**, *15*, 187.
3. Correa, M. P.; *Dicionário das plantas úteis do Brasil*, Ministério da Agricultura: Rio de Janeiro, 1984, vol. 5, p.451.
4. Lorenzi, H.; *Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil*, Ed. Plantarum: São Paulo, 1992, p. 24.
5. Büchi, G.; Warnhoff, E. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4433.
6. Ohashi, M.; Joule, J. A.; Djerassi, C.; *Tetrahedron Lett.* **1964**, *51*, 3899.
7. Manske, R. H. F.; Rodrigo, R.; *The alkaloids*, Academic Press: New York, 1965, vol.8.
8. Joule, J. A.; Monteiro, H.; Durham, L. J.; Gillbert, B.; Djerassi, C.; *J. Chem. Soc.* **1965**, 4773.
9. Joule, J. A.; Ohashi, M.; Gilbert, B.; Djerassi C.; *Tetrahedron* **1965**, *21*, 1717.
10. Gaskell, A. J.; Joule, J.; *Chem. Ind.* **1967**, *24*, 1089.
11. Büchi, G.; Gould, S. J.; Näf, F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2492.
12. Borris, R. P.; Lankin, D. C.; Cordell, G.; *J. Nat. Prod.* **1983**, *46*, 200.
13. Massiot, G.; Zeches, M.; Thépenier, P.; Jacquier, M.-J.; Le Men-Olivier, L.; Delaude, C.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 768.
14. Dey, P. M.; Harbone, J. B.; *Methods in plant biochemistry terpenoids*, Academic Press: London, 1991, vol. 7.
15. Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.