

ESTUDO FITOQUÍMICO DAS CASCAS DO CAULE DE *DUGUETIA GLABRIUSCULA* - ANNONACEAE, BIOMONITORADO PELO ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE A *ARTEMIA SALINA* LEACH
João Máximo de Siqueira*, **Maria Graziela Ziminiani**

DFB, CCBS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CP 549, 79070-900 Campo Grande - MS

Ubirazilda Maria Resende

DBI, CCBS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CP 549, 79070-900 Campo Grande - MS

Maria Amélia Diamantino Boaventura

Departamento de Química, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 702, 31270-901 Belo Horizonte - MG

Recebido em 3/3/00; aceito em 2/8/00

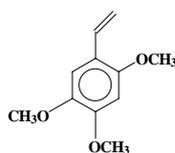
ACTIVITY-GUIDED ISOLATION OF THE CONSTITUENTS FROM BARK OF STEM OF *DUGUETIA GLABRIUSCULA* - ANNONACEAE, USING BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSL). The extract obtained from stem bark of *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae was evaluated by Brine Shrimp Lethality test (BSL). The bioactive compounds, oxobufoline and lanuginosine, two oxoaporphine alkaloids were isolated by activity-guided fractionation. In addition, the compounds asaraldehyde, (+)-allo-aromadendrane-10 β , 14-diol, and two aporphine alkaloids, polyalthine and oliveridine were also obtained.

Keywords: Annonaceae; *Duguetia glabriuscula*; *Artemia salina*; oxoaporphine alkaloids.

INTRODUÇÃO

Dando continuidade ao estudo fitoquímico biomonitorado das espécies nativas da família Annonaceae em Mato Grosso do Sul com a utilização do ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*¹, TAS, serão apresentados os dados referentes à espécie *Duguetia glabriuscula*. O TAS, por ser um ensaio biológico rápido, de baixo custo e simples tem sido amplamente utilizado e demonstrando uma boa correlação com a atividade antitumoral², sendo então indicado na avaliação preliminar de extratos vegetais³.

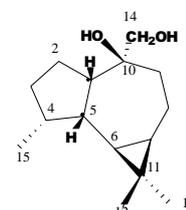
Na família Annonaceae, o gênero *Duguetia* está representado, até o momento, por 70 espécies, mas não está entre os mais estudados fitoquimicamente. O estudo fitoquímico tem se concentrado nos gêneros *Annona* (120 espécies catalogadas), *Goniothalamus* (115), *Monodora* (20), *Rollinia* (65), *Uvaria* (150) e *Xylopia* (100-150)⁴. Diversos alcalóides já foram isolados de várias espécies de *Duguetia*⁵ e, pelo estudo fitoquímico biomonitorado de *D. panamensis*, utilizando o ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*, foi obtida como substância ativa o 2,4,5-trimetoxiestireno (**1**), porém apresentando baixa toxicidade frente a esse microcrustáceo e também fraca atividade antitumoral⁶.



(1)

Duguetia glabriuscula é um arbusto de pouco exemplares em Mato Grosso do Sul. Desta espécie vegetal foi isolado, inicialmente, do extrato hexânico das folhas e agora também isolado das cascas do caule, o (+)-10 β ,14-allo-aromadendranodiol, (**2**), essa substância apresentou-se inativa para o microcrustáceo⁷,

mas com atividade antimicrobiana considerável⁸. Devido a abundância do referido sesquiterpeno, o mesmo foi submetido a algumas modificações na porção funcional da molécula, conduzindo a produtos de baixa atividade antimicrobiana e com atividade frente a *Artemia salina*, ainda que pouco significativa⁷.



(2)

O objetivo do presente trabalho é o isolamento de substâncias biologicamente ativas do extrato etanólico 95% ativo, em água, obtido das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, pelo estudo cromatográfico biomonitorado, utilizando a *Artemia salina* como organismo teste.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico 95% das cascas do caule de *D. glabriuscula* apresentou atividade sobre o microcrustáceo, TAS, DL₅₀ = 131,7 (76,3-227,5)[†] μ g/mL. Este extrato então foi submetido a partição entre CHCl₃ e MeOH/H₂O. A atividade se concentrou na fração clorofórmica (TAS, DL₅₀ = 56,6 μ g/mL), como descrito na Tabela 1.

Essa fração ativa foi fracionada em coluna, da qual foram obtidas os asaraldeído (**3**), oxobuxifolina (**4**), (+)-10,14 β -allo-aromadendranodiol (**2**), descrito anteriormente⁸, lanuginosina (**5**), polialtina (**6**) e oliveridina (**7**).

A substância **3** apresentou aspecto de um sólido branco amorfo. O espectro de RMN de ¹H exibe dois sinais simples

*E-mail: jmaximo@nin.ufms.br

[†]Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 1. Teste de toxicidade para a *Artemia salina* das frações e substâncias isoladas das cascas do caule de *D. glabruscula*.

	DL ₅₀ (µg/mL)	intervalo de confiança de 95% (µg/mL)
Cascas do caule		
Extrato etanólico	131,7	76,5-227,5
Fração clorofórmica	56,6	45,4-70,7
Asaraldeído (3)	> 1000	-
Oxobuxifolina (4)	10,4	8,2 - 13,3
Lanuginosina (5)	27,6	15,0 -50,6
Polialtina (6)	> 1000	-
Oliveridina (7)	> 1000	-

relativos a hidrogênios aromáticos em δ 7,31 e δ 6,48, três sinais de metoxilas aromáticas em δ 3,96, 3,91 e 3,86 e um sinal em δ 10,30, relacionado ao hidrogênio formila.

O espectro RMN de ¹³C de **3**, juntamente com os sinais encontrados no espectro de DEPT 135, evidenciam três sinais intensos relativos as metoxilas aromáticas em δ 56,19; δ 56,21 e δ 56,28. Seis sinais relativos a carbonos aromáticos, aparecem em δ 95,90, 108,98, 117,31, 143,55, 155,64, 158,77 e o sinal em δ 188,10 do carbono formila⁹. Foi obtido o mapa de contorno HMQC que confirma as correlações observadas para os hidrogênios aromáticos e formila dessa substância. O EM-IE é caracterizado por um pico de íon molecular intenso (sendo também o pico base) a *m/z* 196 e por um pico *M*⁺ -1 (34%).

As substâncias **4** e **5**, derivados de alcalóides oxaporfínicos, possuem espectros no RMN ¹H e ¹³C muito semelhantes. Uma outra observação importante é que quando adicionada à essas substâncias uma solução de ácido clorídrico a 5%, observa-se a formação de cor avermelhada⁵.

Os espectros de RMN de ¹H de **4** e **5** exibem, em cada um deles, 2 sinais de hidrogênios aromáticos (δ 8,15 e 8,85, em **4** e δ 7,77 e 8,75 em **5**) com constantes de acoplamentos, *J*, igual 5,2 Hz, comum em hidrogênios α e β do anel piridínico (anel B), em C-4 e C-5¹⁰, respectivamente. A diferença do deslocamento químico, δ para os hidrogênios em C-4 (δ 8,15 para **4** e 7,77 para **5**) é devido a presença de uma metoxila em C-3 (anel A) de **4**, que provoca um efeito γ -gauche sobre H-4 deslocando-o para maiores valores de δ . A mesma substituição não é observada em **5** e é confirmada pela presença de um singlete em δ 7,09, relativo ao H-3, completando o padrão de substituição de **4** e **5** nesse anel. Observa-se também um sinal simples referente aos hidrogênios do grupo metilenodioxí em δ 6,44 em **4** e 6,35 em **5**. Mais três sinais de hidrogênios aromáticos, juntamente com um outro sinal de metoxila aparecem em ambas as substâncias e foram atribuídos ao anel D e pelo deslocamento da metoxila e multiplicidade dos hidrogênios, foi possível determinar o padrão de substituição em **4** e **5** (vide dados experimentais).

Semelhanças espectrais também são observadas para as substâncias **6** e **7**, uma vez que são derivados de alcalóides aporfínicos-7-oxigenados. Basicamente, observa-se o mesmo padrão para as duas substâncias: a presença do grupo metilenodioxí, em C-1/C-2, que devido à torção do anel no sistema bifenílico, aparece como duplete (δ 6,05 e 5,92 em **6** e 6,08 e 5,96 em **7**, *J* = 1,2

Hz)⁵; a presença de um singlete (δ 6,54) em **7** relativo ao hidrogênio em C-3 e para **6**, nessa mesma posição, observa-se um singlete de metoxila (δ 4,01). Uma informação importante que pode ser obtida no espectro de RMN ¹H para esse tipo de alcalóide 7-oxigenado é a definição da estereoquímica *cis* ou *trans* dos hidrogênios H-6a e H-7. Na espécie *Duguetia spixiana*, dentre outras espécies da família Annonaceae⁵, os alcalóides 7-oxigenados apresentam configuração *trans* e o sinal do espectro é constituído de dupletos com constantes de acoplamento de 9 a 12 Hz (mais comum, 12 Hz)^{11,12}. Na estereoquímica *cis*, o *J* observado foi de 2 a 3 Hz, como descrito para alcalóides isolados do gênero *Stephania* (Menispermaceae)⁵. O padrão de substituição no anel D, caracterizado em ambas moléculas pela presença de um substituinte em C-9 (metoxila) e os deslocamentos químicos e multiplicidade observados para de H-8, H-10 e H-11.

A substância **2** foi descrita anteriormente⁸.

De todas as substâncias citadas a atividade sobre a *Artemia salina* convergiu para as **4** e **5**, como demonstrado na Tabela 1.

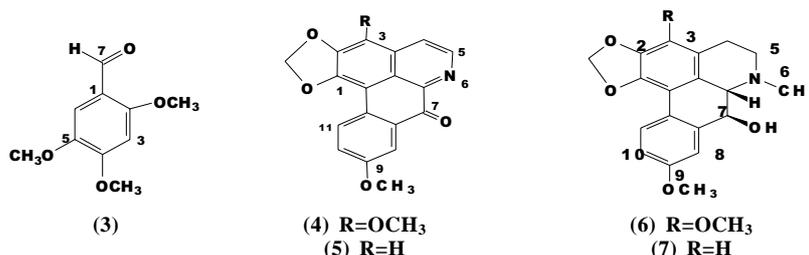
O estudo fitoquímico biomonitorado das cascas do caule de *D. glabruscula* convergiu para as frações ativas ao microcrustáceo das quais foram isolados representantes dos alcalóides oxaporfínicos. Os oxaporfínicos têm sido avaliados em diferentes atividades biológicas, entre elas: atividade citotóxica¹³⁻¹⁵, anti-agregante plaquetário¹⁶, antimicrobiana e antifúngica¹⁷, e tem sido sugerido, para esse grupo de alcalóides, a predominância da atividade citotóxica¹⁶. Assim, se o TAS tem como interesse convergir para substâncias com atividade citotóxica, presente em um determinado extrato, o estudo fitoquímico biomonitorado das cascas do caule de *D. glabruscula* foi efetivo, pois foram isoladas substâncias como a oxobuxifolina e a lanuginosina, ativas ao TAS e merecedoras de testes mais específicos³.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos Experimentais Gerais: Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C, de 300 e 75MHz, respectivamente, foram registrados em espectrômetro DPX-300-Bruker. Os deslocamentos químicos, δ , relativos ao sinal do tetrametilsilano ($\delta=0,0$). Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro de massas TRIO-1000 através de injeção direta. Os solventes e reagentes utilizados tiveram grau de pureza P.A. Para as cromatografias em camada delgada (CCD) analítica e preparativa utilizou-se sílica-gel 60 G MERCK.

Ensaio biológico: O ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* (TAS) foi executado de acordo com a metodologia proposta por Meyer². Diluições das amostras e do controle positivo foram feitos pelo método de diluições aritméticas em solução aquosa de sal marinho sintético (38g/L, Enterprise Co.) com 1% DMSO (v/v). Todas as etapas foram acompanhadas utilizando-se o sulfato de quinidina como controle positivo² e cada avaliação foi repetida pelo menos duas vezes. Utilizou-se o método Probitos de análise para obtenção das DL₅₀ e respectivos intervalos de confiança. Os extratos foram considerados ativos quando TAS <1000ppm.

Material vegetal: As cascas do caule de *Duguetia glabruscula* R. E. Fries (R. E. Fries) - Annonaceae - foram coletadas no município de Jardim/MS. A amostra botânica foi identificada pelo Prof R. de Mello-Silva. A exsicata foi depositada no Herbário da UFMS (Campo Grande, Mato Grosso do Sul) sob o número 4769.



Obtenção dos extratos vegetais: As cascas do caule foram extraídas exaustivamente com etanol 95% por maceração a 40°C, concentrados à pressão reduzida e testados (vide Tabela 1). Esse extrato foi então solubilizado em metanol:água 9:1 e submetido a partição entre clorofórmio. A fração clorofórmica, ativa, foi fracionada em coluna cromatográfica (sílica gel, CHCl₃:CH₃OH-gradiente).

Asaraldeído ou 2,4,5-Trimetoxi-benzaldeído (3): Sólido branco amorfo. I.V. $\nu_{\text{máx}}$ (KBr, cm⁻¹): 2962, 2920, 2850, 1660, 1609, 1520, 1479, 1292, 1219, 1129, 1027, 864, 823. RMN ¹H: (300 MHz, δ): 10,30 (H-7); 7,31 (H-6) e 6,48 (H-3) (s, 1 H cada); 3,96; 3,91; 3,86 (s, 3H cada). RMN ¹³C (75 MHz, δ) 188,10 (C-7); 158,64 (C-2); 155,77 (C-4); 143,55 (C-5); 117,31 (C-1); 108,98 (C-6); 95,90 (C-3); 56,28; 56,21; 56,19 (metoxilas). EMIE m/z (int. rel.): 197 [M+1]⁺ (10); 196 (100); 195 [M-1]⁺ (34); 181 (68); 150 (53); 125 (84); 69 (91).

Oxobuxifolina (4): Sólido microcristalino alaranjado. U.V γ (CH₃OH, nm) 245, 281, 320(ombro), 382, 457; [+ HCl, 1N, 1 gota]; 265, 283, 320 ombro, 408, 530. RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz): 8,85 (d, $J = 5,2$ Hz, H-5), 8,48 (d, $J = 8,8$ Hz, H-11), 8,15 (d, $J = 5,2$ Hz, H-4), 7,77 (d, $J = 3,0$ Hz, H-8), 7,43 (dd, $J = 8,8$ e 3,0 Hz, H-10), 6,44 (s, OCH₂O em C-1/C-2), 4,21 e 3,93 (OCH₃ em C-3 e C-9, respectivamente). RMN de ¹³C (DMSO-d₆, 75 MHz): 180,90 (C-7), 158,61 (C-9), 149, 28 (C-1), 146,10 (C-6), 144,11 (C-5), 137,54 (C-2), 134,93 (C-3), 131,63 (C-11a), 130,20 (C-3a), 128,24 (C-11), 126,04 (C-7a), 124,70 (C-11b), 122,18 (C-10), 121,36 (C-11c), 119,01 (C-4), 109,75 (C-8), 103,29 (OCH₂O em C-1/C-2), 60,27 (OCH₃), 55,48 (OCH₃ em C-9). EMIE, m/z (int. rel.) M⁺ 335 (100), 320 [M⁺-CH₃] (73%), 305 [M⁺-CH₂O] (36%).

Lanuginosina (5): Sólido microcristalino alaranjado. RMN ¹H: (300 MHz, CDCl₃/MeOD) δ : 8,75 (d, $J = 5,2$ Hz, H-5); 8,43 (d, $J = 8,9$ Hz, H-11); 7,90 (d, $J = 2,9$ Hz, H-8); 7,77 (d, $J = 5,2$ Hz, H-4); 7,23 (dd, $J = 8,9$ e $J = 2,9$ Hz, H-10); 7,09 (s, H-3); 6,35 (s, OCH₂O em C-1/C-2) e 3,96 (s, OCH₃ em C-9). EMIE, m/z (int. rel.) M⁺ 305 (100), 304 [M⁺-1] (82), 290 [M⁺-CH₃] (11).

Polialtina (6): sólido amorfo castanho: U.V λ (CH₃OH, nm) 215; 239; 283; [+NaOH, 01N, 1 gota] sem alteração. RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) 7,88 (d, $J = 8,6$ Hz, H-11), 7,29 (sl, H-8), 6,84 (dd, $J = 8,6$ e 2,4 Hz, H-10), 6,05 e 5,92 (dupletos, $J = 1,4$ Hz, OCH₂O em C-1/C-2), 4,63 (d, $J = 12,2$ Hz, H-6a), 4,01 e 3,85 (s, OCH₃ em C-3 e C-9, respectivamente), 3,65 (d, $J = 12,2$ Hz, H-7), 2,65 (s, NCH₃). EMIE, m/z (int. rel.) 355 (90), 337 [M⁺ - H₂O] (27), 324 [M⁺ - OCH₃] (38) e 312 [M⁺ - CH₂NCH₃] (31), 43 (100%).

Oliveridina (7): sólido amorfo castanho: U.V λ (CH₃OH, nm) 215; 239; 283; [+NaOH, 01N, 1 gota] sem alteração. RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 7,94 (d, $J = 9,0$ Hz, H-11), 7,34 (dl, $J = 2,0$ Hz, H-8), 6,87 (dd, $J = 9,0$ e 2,0 Hz, H-10), 6,54 (s, H-3), 6,08 e 5,96 (dupletos, $J = 1,2$ Hz, OCH₂O em C-1/C-2), 4,73 (d, $J = 12,5$ Hz, H-6a), 3,65 (d, $J = 12,5$ Hz, H-7), 3,86 (s, OCH₃ em C-9), 2,79 (s, NCH₃). RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 159,16 (C-9), 147,6 (C-2), 141,14 (C-7a), 140,60 (C-1), 127,54 (C-11), 127,23 (C-3a), 121,98 (C-3b), 121,38 (C-11a), 116,48 (C-11b), 113,40 (C-10), 109,11 (C-8), 106,66 (C-3), 100,80 (OCH₂O em C-1/C-2), 69,62 (C-7), 64,39 (C-6a), 59,57 (OCH₃ em C-9), 48,90 (C-5), 40,00 (NCH₃), 22,75 (C-4).

AGRADECIMENTOS

À PROPP/UFMS pelo apoio financeiro. Aos Depto de Química/CCET/UFMS (docentes, corpo técnico) e Chemistry Department of University of Liverpool - UK por terem gentilmente facilitado as análises das substâncias aqui descritas (RNM ¹H ¹³C, IV e Espectros de massas, respectivamente). À Maria da Conceição Guerra de Souza (Lab. de Farmacognosia, DFB, CCBS, UFMS) pelo apoio técnico durante a execução da parte experimental desse trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Siqueira, J. M. de; Pereira, N. F.; Bomm, M. D.; Garcez, W. S.; Boaventura, M. A. D.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 557.
2. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E. J.; McLaughlin, J. L.; *Planta Medica* **1982**, *45*, 31.
3. McLaughlin, J. L.; Chang, C-J.; Smith, D. L.; Simple Bench-Top Bioassays (BS & PD) for Discovery of Plant Antitumor Compounds - Review of Recent Progress In *Human Medicinal Agents from Plants*, Ed. Kinghorn & Balandrini, Nova Iorque, 1993, p. 112-137.
4. Leboeuf, M.; Cave, A.; Bhaumik, P. K.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R.; *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2783.
5. Cavé, A.; Leboeuf, M.; Waterman, P. G. In *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Ed. S. William Pelleiter (John Wiley & Sons), v. 5, cap. 3, New York, 1987, p.133-627.
6. Wang, Z-W.; Ma, W-W.; McLaughlin, J. L.; Gupta, M. P.; *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 382.
7. De Lima, D. P.; Beatriz, A.; Ramos, A. A.; De Siqueira, J. M.; De Oliveira, C. C.; Marques, R.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 616.
8. Siqueira, J. M.; Boaventura, M. A. D.; Garcez, F.; Garcez, W. S.; Oliveira, C. C.; *Fitoterapia* **1997**, *68*, 89.
9. Pouchert, C. J.; Behnke, J. In *The Aldrich Library of 13C and 1H FT-NMR*, Ed. Aldrich Chemical Cia, Inc., **1993**, *2*, 969.
10. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 5a. Ed. Guanabara Koogan ed., Rio de Janeiro, 1994.
11. Debourges, D.; Roblot, F.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 664.
12. Razamizafy, S.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Fournet, A.; *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 674.
13. Sonnet, P. E.; Jacobson, M.; *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60*, 1254.
14. Wu, Y-C.; Chang, G-Y.; Yih, C.; Duh, C-Y.; Wang, S-K.; *Phytochemistry* **1993**, *33*, 497.
15. Wijeratne, E. M. K.; Gunatilaka, A. A. L.; Kingston, D. G. I.; Halthiwanger, R. C.; Eggleston, D. S.; *Tetrahedron* **1995**, *51*, 7877.
16. Chen, K-S.; Ko, F-N.; Teng, C-W.; Wu, Y-C.; *Planta Medica* **1996**, *62*, 133.
17. Hufford, C. D.; Sharma, A. S.; Oguntinein, B. O.; *J. Pharm. Sci.* **1980**, *69*, 1180.
18. Finney, D. J.; *Probit Analysis, A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve*. University Press, Cambridge, 1974.
19. Ferrigni, N. R.; McLaughlin, J. L.; Powell, R. G.; Smith, JR., C. R.; *J. Nat.Prod.* **1984**, *47*, 347.