

CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS GALHOS DE *Simaba guianensis* subesp. *ecaudata* (Cronquist)[#]

Rita de Cássia Saraiva Nunomura*

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gal. Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000 Manaus – AM, Brasil

Angelo C. Pinto

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Bl. A, Cidade Universitária, 21945-970 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Sergio Massayoshi Nunomura e Adrian Martin Pohlit

Coordenação de Tecnologia e Inovação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2936, 69083-000 Manaus – AM, Brasil

Ana Cláudia Fernandes Amaral

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/Farmanguinhos), Rua Sizenando Nabuco, 100, 21041-250 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 26/5/12; aceito em 27/9/12; publicado na web em 26/10/12

CHEMICAL CONSTITUENTS FROM STEMS OF *Simaba guianensis* subesp. *ecaudata* (Cronquist). *Simaba guianensis* subesp. *ecaudata* (Simaroubaceae) is a tree found in the Brazilian Amazon. This work describes for the first time the fractionation of stems of this species that resulted in the isolation of the cytotoxic triterpene piscidinol A, the alkaloid 9-methoxycanthin-6-one, caryophyllene oxide, also isolated for the first time from this species and a new alkaloid (6-methoxy-(9H- β -carbolin-1-il)-(Z)-2-propenoic acid). Quantification of 9-methoxycanthin-6-one in different extracts and fractions of stems of *S. guianensis* by high performance liquid chromatography was also performed. The concentration of 9-methoxycanthin-6-one in methanolic and aqueous extracts were inferior to the known cytotoxic concentration of this compound.

Keywords: piscidinol A; 9-methoxycanthin-6-one; HPLC.

INTRODUÇÃO

A família Simaroubaceae é caracterizada por árvores e arbustos distribuídos em regiões tropicais e subtropicais. Várias espécies dessa família são conhecidas por apresentarem princípios amargos com notáveis propriedades medicinais e são utilizadas popularmente como vermífugas, antivirais e no combate a febres, entre outras propriedades.¹

O gênero *Simaba* é o segundo maior gênero da família, com aproximadamente 35 espécies que ocorrem na América do Sul. As espécies desse gênero são encontradas em ambientes bastante diversificados como mata úmida, alagável ou de terra firme, e apresentam interesse por suas propriedades medicinais, devido às substâncias fortemente amargas nelas encontradas, conhecidas como quassinoides.²⁻⁴

Apesar do grande número de espécies desse gênero, poucas espécies de *Simaba* foram estudadas quimicamente. Dentre as já estudadas, podem-se destacar as espécies *S. cedron*, *S. orinocensis*, *S. cuspidata*, *S. cuneata*, *S. multiflora*, *S. guianensis* e *S. polyphylla*. De espécies do gênero *Simaba* foram isolados alcaloides piridoindóis do tipo cantinona, cumarinas, antraquinonas, flavonoides, esteroides, triterpenos e quassinoides. Estes últimos são resultantes da degradação de triterpenos.⁵ A presença de quassinoides e alcaloides do tipo cantinona em espécies desse gênero são de particular importância como marcadores químicos do gênero e da família Simaroubaceae.⁶

As propriedades medicinais das espécies do gênero *Simaba* foram confirmadas experimentalmente para algumas atividades, entre elas citotóxica, antitumoral (*S. cedron*, *S. multiflora*, *S. cuspidata*), antimalárica (*S. cedron*, *S. guianensis*), antiviral (*S. africana* ou *Quassia africana*), antimicrobiana (*S. undulata*) e antiúlcera (*S. ferruginea*).⁵

A espécie *Simaba guianensis* subesp. *ecaudata* (Cronquist) é caracterizada como um arbusto ou uma pequena árvore de até 10 m de altura, nativa da região amazônica.⁷ Essa espécie caracteriza-se com folíolos cartáceos, de cor verde-amarelada, brilhantes, com margem levemente ondulada. As suas flores possuem odor agradável, ráquis de inflorescência verde-claro aveludada; pedicelos, pétalas, estames e anteras verde-amareladas. Esses arbustos costumam ser encontrados em matas de terra firme, de solo argiloso.

Visando contribuir para o conhecimento da composição química de espécies do gênero *Simaba* que ocorrem na Amazônia, este trabalho descreve o isolamento do sesquiterpeno óxido de cariofileno (1), o triterpene piscidinol A (2), o alcaloide 9-metóxi-cantín-6-ona (3) também isolado de *S. polyphylla*⁸ e, pela primeira vez, o alcaloide 6-metóxi-(9H- β -carbolin-1-il)-(Z)-prop-2-enoico (4) de *Simaba guianensis* subesp. *ecaudata* (Figura 1). A dosagem de 9-metóxi-cantín-6-ona também foi realizada, considerando-se sua significância biológica e quimiotaxonômica.⁶

PARTE EXPERIMENTAL

Equipamentos

Para obtenção de pontos de fusão foi utilizado o aparelho Mel-Temp II (Lab. Devices Inc., EUA). Os valores não foram corrigidos.

Os espectros de infravermelho foram obtidos em aparelho Nicolet Magna IR 760, com pastilhas comprimidas em KBr anidro. Os espectros foram calibrados com filmes de poliestireno de 0,05 mm de espessura.

Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Bruker, modelo DRX-200, operando a 200 MHz para RMN ¹H e a 50 MHz para RMN ¹³C, no aparelho DRX-300, operando a 300 MHz para RMN ¹H e a 75 MHz para RMN ¹³C e no aparelho de modelo DRX-500, operando

*e-mail: ritasn@ufam.edu.br

[#]Artigo em homenagem ao Prof. Otto R. Gottlieb (31/8/1920-19/6/2011)

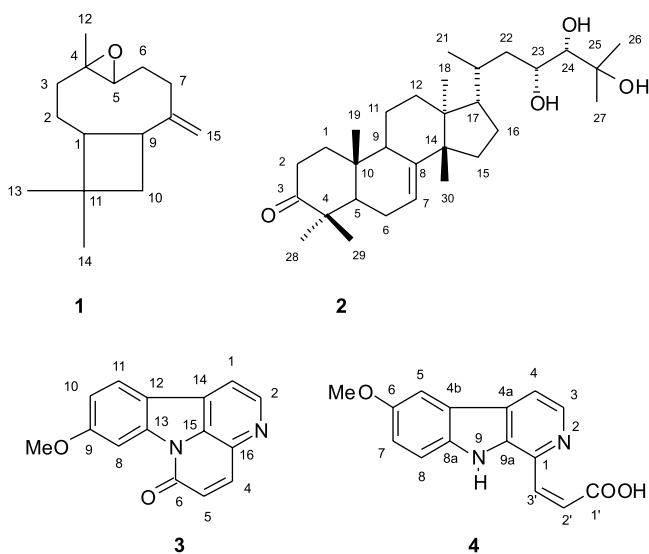


Figura 1. Substâncias isoladas de *S. guianensis* subsp. *ecaudata*

a 500 MHz para RMN ^1H e 125 MHz para RMN ^{13}C .

Para a obtenção dos espectros de massas de alta resolução foi utilizado o cromatógrafo gás-líquido Hewlett-Packard 6890 Series GC System acoplado ao espectrômetro de massas do tipo Hewlett-Packard HP 5973 Mass Selective Detector. Foi utilizada a coluna DB-5, com 25 m x 0,2 mm x 0,11 μm de espessura de filme. Temperatura do injetor: 270 $^\circ\text{C}$ com divisor de fluxo (1/20); gás de arraste: He. Temperatura inicial do forno 80 $^\circ\text{C}$, rampa de aquecimento a 8 $^\circ\text{C}/\text{min}$ até 290 $^\circ\text{C}$ permanecendo nessa temperatura por 5 min. O espectro de massas foi obtido por impacto de elétrons a 70 eV. Também foi utilizado, para a análise da substância 4, o espectrômetro de massas TSQ-Thermo, com analisador do tipo triplo-quadrupólo e fonte de ionização tipo APCI.

O fracionamento por cromatografia líquida de média pressão foi realizado em aparelho de MPLC Chromatography Pump Büchi 688 Gradient Former Büchi 687 com detector de UV/VIS Filter-Photometer Büchi e coletor de frações Büchi 684. Utilizou-se coluna em fase reversa de RP-18 Lichroprep RP-18 (Merck) com partículas de 40-63 μm .

A dosagem de 9-metóxi-cantinin-6-ona por CLAE foi realizada em aparelho Shimadzu, modelo LC-10, equipado com bomba quaternária, detector de ultravioleta SPD-10AVP, válvula de injeção Rheodyne e Chemstation (CLASS-VP, versão 6.1) e coluna LiChrospher 60 RP-Select B (5 μm) 250 x 4 mm, da Merck.

Coleta do material botânico

As partes aéreas de dois espécimes de *Simaba guianensis* subsp. *ecaudata* (Cronquist) foram coletadas no dia 16/2/2002 (período de chuvas), na Reserva Florestal Adolpho Ducke do INPA, localizada na rodovia AM-010 a 23 km de Manaus. As exsiccatas dos espécimes encontram-se no herbário do INPA, identificadas com os números 3861 e 3859. O material vegetal foi seco à sombra e depois separado em galhos e folhas para posterior moagem em moinho de facas.

Preparação dos extratos

Foram extraídos, com hexano a frio, 2,0 kg de galhos moídos por um período de 7 dias. O procedimento foi repetido por mais duas vezes com a mesma serragem. Os extratos foram reunidos e concentrados em rotaevaporador, resultando em 8,9 g de extrato. Após extração em hexano, o resíduo foi extraído a frio com MeOH também por 7 dias.

O procedimento foi repetido por mais duas vezes. A massa resultante do extrato metanólico após concentração em rotaevaporador foi de 63,1 g. Foram separados 58,0 g desse extrato. Esse foi submetido a um fracionamento por partição líquido-líquido com CHCl_3 e AcOEt.

Preparação dos extratos aquosos

Foram obtidos por infusão, adicionando-se ao material vegetal 400 mL de água fervente e aguardando-se por 15 min. Em seguida, os extratos foram filtrados e concentrados em rotaevaporador e liofilizados.

Isolamento dos constituintes químicos

O extrato hexânico dos galhos de *Simaba guianensis* (8,9 g) foi submetido a uma separação em coluna de gel de sílica com sistema gradiente de hexano/AcOEt. Foram obtidas 69 frações, que foram reunidas em 13 frações após análise em CCD. A fração 1-12 foi submetida a uma separação em coluna de sílica *flash* com gradiente hexano/AcOEt (0 a 100% de AcOEt) obtendo-se 22 frações que, após análise por CCD, foram reunidas em 7 frações. A fração 4 (103,0 mg) eluída em hexano foi identificada como sendo o óxido de cariofileno (1), após análises espectroscópicas.

A fração 64-69 do extrato hexânico dos galhos também foi submetida a uma separação em coluna de sílica gel, utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ como sistema gradiente de eluição, até chegar à concentração de 10% de MeOH, que após análise por CCD resultou em 10 frações. Em seguida, a fração 3 obtida desse fracionamento foi recristalizada em AcOEt. Os cristais incolores (164,7 mg) após análise de espectros de RMN mono e bidimensionais, EM e IV foram identificados como o triterpene piscidinol A (2).

A fração clorofórmica resultante do fracionamento do extrato metanólico dos galhos de *Simaba guianensis* subsp. *ecaudata* (20,6 g) foi inicialmente submetida a uma separação simples em coluna filtrante de gel de sílica. O eluente inicial foi hexano 100%, seguido de clorofórmio 100%, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3), $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5), $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3) e MeOH 100%, respectivamente. Foram recolhidas 15 frações e a fração 7 indicou a presença de alcaloides, por análise em CCD quando revelado com reagente de Dragendorff. Essa fração foi dissolvida em uma mistura de MeOH/ H_2O (9:1) e particionada com hexano. A fração hidroalcoólica, 3,15 g, foi fracionada por MPLC em coluna de fase reversa (RP-18) com sistema de eluição em EtOH/ H_2O de 0 a 70% de EtOH. Após análise em CCD, as frações iguais foram reunidas em 39 frações. A fração 19 foi recristalizada em MeOH resultando no isolamento de 62,8 mg do alcaloide 9-metóxi-cantinin-6-ona (3), solúvel em CHCl_3 , e 16,9 mg de outro alcaloide com ponto de fusão 232 $^\circ\text{C}$ identificado como 6-metóxi- β -carbolin-(Z)-propenoico (4), solúvel em MeOH. A fração 30 foi recristalizada em MeOH a quente e resultou na formação de um material cristalino incolor (29,0 mg) identificado como o triterpene piscidinol A (2).

Determinação do teor de 9-metóxi-cantinin-6-ona por CLAE-DAD

Os extratos metanólicos, aquosos e as frações clorofórmicas dos galhos de *S. guianensis* foram submetidos a uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para avaliação da concentração de 9-metóxi-cantinin-6-ona, presente nesses extratos. As condições de análise foram modo isocrático ACN/solução aquosa de TFA 0,05% (30:70) por 35 min, fluxo de 1,0 mL/min em coluna LiChrospher 60 RP-Select B (5 μm) 250 x 4 mm, da Merck. Todas as injeções foram realizadas com volume de *loop* de 20 μL . A detecção foi feita por ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm.

Curva de calibração

A quantificação de 9-metóxi-cantin-6-ona foi realizada usando padrão externo, a partir de uma curva de calibração obtida pela injeção de 5 diferentes concentrações (0,0625; 0,125; 0,250; 0,500 e 1,000 µg/mL) do padrão, em CLAE, nas mesmas condições de análise utilizadas para os extratos e frações dos espécimes estudados. O padrão utilizado foi isolado conforme descrito anteriormente e apresentou grau de pureza de 98,55% determinado por CLAE a 254 nm (método de normalização de área).

Preparação das amostras para análise em CLAE

Os extratos metanólicos e aquosos foram submetidos a um pré-tratamento por extração em fase sólida antes da análise. As frações clorofórmicas dos galhos de cada um dos espécimes foram apenas solubilizadas em metanol, na concentração de 0,125 mg/mL.

Tratamento dos extratos metanólicos

Os extratos metanólicos dos galhos *S. guianensis* analisados foram inicialmente solubilizados em uma mistura de MeOH/H₂O (1:1) na concentração de 1,0 mg/mL e volume total de 2,0 mL. Em seguida, foi eluída num cartucho de extração em fase sólida (EFS) de fase reversa (Seppak da Waters Inc.) com 10,0 mL de solução MeOH/H₂O (1:1) gerando a fração 1, contendo as substâncias mais polares. Em seguida, eluiu-se a amostra com 2,0 mL da solução MeOH/AcOEt (7:3) gerando a fração 2, contendo o analito. Ao final, foi feita uma lavagem de 10,0 mL da mesma solução, gerando a fração 3.

Os extratos aquosos dos galhos dos espécimes em estudo foram preparados por infusão. A partir dos extratos secos, preparou-se uma solução de 5,0 mg/mL no volume total de 10,0 mL, que foi submetida a um tratamento por EFS com o mesmo tipo de cartucho empregado anteriormente. Após a eluição da solução do extrato aquoso, que gerou a fração 1, a amostra foi eluída com 10,0 mL da mistura MeOH/H₂O (1:1), gerando a fração 2. A fração 3, contendo o analito, foi gerada pela eluição de 1,0 mL da mistura MeOH/AcOEt (7:3) e, em seguida, foi realizada a lavagem do cartucho com 10 mL da mesma mistura para obtenção da fração 4.

Caracterização do óxido de cariofileno (1)⁹

Óleo incolor, IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3.066, 2.950, 2.932, 2.861, 1.629. EM-IE (*m/z*): de 220 (M⁺), 205 (4), 177 (10), 149 (14), 121 (33), 93 (79), 79 (95), 69 (61) e 41 (100). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,75 (t; 9,6 Hz; 9,4 Hz, H-1); 1,29 (sl, H-2); 2,10 (m, H-3), 1,08 (d; 5,7 Hz, H-3), 2,86 (dd; 3,9 Hz; 10,5 Hz, H-5); 2,10 (m, H-6); 2,29 (m, H-6); 2,10 (m, H-7); 2,30 (m, H-7); 2,60 (m, H-9); 1,60 (d; 2,2 Hz, H-10); 1,18 (s, H-12); 0,99 (s, H-13); 0,97 (s, H-14); 4,85 (d; 1,32 Hz, H-15); 4,96 (d; 1,32 Hz, H-15); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 50,9 (C-1); 30,3 (C-2); 39,3 (C-3); 59,6 (C-4); 63,7 (C-5); 29,9 (C-6); 30,0 (C-7); 151,9 (C-8); 48,8 (C-9); 39,9 (C-10); 34,0 (C-11); 17,0 (C-12); 27,3 (C-13); 21,9 (C-14); 112,9 (C-15).

Caracterização do piscidinol A (2)^{10,11}

Cristais incolores, P.F. 198-200 °C, [α]_D = -62,1° (CH₂Cl₂; c 0,024); IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3.570, 3.374, 2.881, 2.982, 1.697. EM-IE (*m/z*): *m/z* 476 [M+2]⁺, 457 (21), 441 (19), 398 (11), 384 (22), 369 (100), 365 (13), 351 (18), 325 (33), 205 (20) e 59 (35). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,40 (m, H-1); 1,96 (m, H-1); 2,20 (t; 3,3 Hz; 14,4 Hz, H-2); 2,71 (dd; 5,4 Hz; 14,4 Hz, H-2); 1,73 (m, H-5); 2,06 (m, H-6); 5,29 (dd; 3,3 Hz; 10,5 Hz, H-7); 2,25 (m, H-9); 1,51 (m, H-11); 1,62 (m, H-12); 1,82 (m, H-12); 1,45 (m, H-15); 1,47 (m, H-16); 2,00 (m, H-16); 1,48 (m, H-17); 0,81 (s, H-18); 1,00 (s,

H-19); 1,34 (m, H-20); 0,91 (d; 6,0 Hz, H-21); 1,18 (m, H-22); 1,84 (m, H-22); 4,09 (m, H-23); 3,15 (d; 8,1 Hz, H-24); 1,30 (s, H-26); 1,28 (s, H-27); 1,03 (s, H-28), 1,10 (s, H-29); 0,99 (s, H-30); 2,82 (sl, OH); 2,78 (sl, OH); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 38,5 (C-1); 34,9 (C-2); 217,0 (C-3); 47,8 (C-4); 52,3 (C-5); 24,3 (C-6); 117,9 (C-7); 145,7 (C-8); 48,4 (C-9); 35,0 (C-10); 18,3 (C-11); 33,8 (C-12); 43,5 (C-13); 51,2 (C-14); 34,0 (C-15); 28,4 (C-16); 53,8 (C-17); 22,0 (C-18); 12,8 (C-19); 33,7 (C-20); 18,9 (C-21); 40,5 (C-22); 69,7 (C-23); 75,0 (C-24); 74,3 (C-25); 27,4 (C-26); 26,2 (C-27); 24,5 (C-28); 21,6 (C-29); 27,4 (C-30).

Caracterização da 9-metóxi-cantin-6-ona (3)^{8,12}

Cristais amarelos, P.F. 175-176 °C (lit¹² 175-176 °C), IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1.667, 1.633, 1.608, 1.493, 1.275, 1.223, 1.152, 1.030, 844, 815, 619, 547. EM-IE (*m/z*): 250 [M⁺] (100), 235 (1,3), 221 (21,3), 207 (32,0), 192 (4,0), 179 (17,3), 153 (9,3), 126 (6,6), 125 (8,0). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7,83 (d; 5,2 Hz, H-1); 8,75 (d; 5,2 Hz, H-2); 8,00 (d; 10,0 Hz, H-4), 6,94 (d; 10,0 Hz, H-5); 8,18 (d; 2,4 Hz, H-8); 7,06 (dd; 2,4 Hz; 8,5 Hz, H-10); 7,93 (d; 8,5 Hz, H-11); 3,98 (s, OMe); RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 115,7 (C-1); 146,1 (C-2); 140,0 (C-4); 128,7 (C-5); 159,9 (C-6); 101,5 (C-8); 162,7 (C-9); 114,3 (C-10); 123,5 (C-11); 117,3 (C-12); 141,4 (C-13); 130,7 (C-14); 132,5 (C-15); 135,8 (C-16); 56,1 (OMe).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A separação cromatográfica do extrato hexânico dos galhos de *Simaba guianensis* subsp. *ecaudata* resultou no isolamento de 103,0 mg de uma substância incolor identificada como óxido de cariofileno. O espectro de IV mostrou as absorções em 3.066 cm⁻¹, indicando estiramento C-H de carbonos insaturados, 2.950, 2.932 e 2.861 cm⁻¹ (estiramento C-H de carbonos saturados), 1.629 cm⁻¹ referentes ao estiramento C=C. As análises dos espectros de RMN ¹H e ¹³C e bidimensionais COSY, HMQC e HMBC estão de acordo com os dados publicados para o óxido de cariofileno.⁹

O fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos galhos de *S. guianensis* subsp. *ecaudata* resultou no isolamento de 164,7 mg de uma substância cristalina e incolor, com P.F. 198-200 °C e [α]_D = -62,1° (CH₂Cl₂; c 0,024), que estão de acordo com os dados publicados para o triterpeno piscidinol A (2).^{10,11} A identificação foi confirmada pela análise do espectro de IV que indicou absorções em 3.570 e 3.374 cm⁻¹ de estiramento O-H, 2.881 a 2.982 cm⁻¹ de estiramento C-H de alifáticos e 1.697 cm⁻¹ intenso, sugerindo estiramento de carbonila de cetona. As análises dos espectros de RMN ¹H e ¹³C e bidimensionais COSY, HMQC e HMBC permitiram confirmar a substância isolada como sendo o piscidinol-A.^{10,11}

O fracionamento cromatográfico da fração clorofórmica também resultou no isolamento de um alcaloide identificado como 9-metóxi-cantin-6-ona (3).¹² O alcaloide apresentou-se como cristais amarelos com P.F. 175-176 °C e espectro de massas compatíveis com dados descritos na literatura.^{8,12} As análises dos espectros de RMN ¹H e ¹³C e bidimensionais COSY, HMQC e HMBC permitiram confirmar a substância isolada como sendo 9-metóxi-cantin-6-ona.

No fracionamento que levou ao isolamento da 9-metóxi-cantin-6-ona foi isolada outra substância, um sólido de cor amarelo-laranja, solúvel em MeOH, com ponto de fusão bem distinto da 9-metóxi-cantin-6-ona (decompõe a 232 °C) e que também testou positivo para alcaloides na análise por CCD com o reagente de Dragendorff.

O espectro de IV apresentou uma banda intensa em 3.447 cm⁻¹, característica de presença de grupamento hidroxila, frequências de estiramento C-H de carbono insaturado em 3.096 e 3.021 cm⁻¹, estiramento de carbonila α-insaturada em 1.660 cm⁻¹, estiramento C=C em 1.619 cm⁻¹ e uma absorção intensa em 837 cm⁻¹ de deformação

angular característica de substâncias aromáticas. O espectro de UV (MeOH) apresentou λ_{\max} (log e) em 206 (3,00), 216 (1,81), 309 (0,40) e 355 (0,56).

No espectro de RMN ^1H foi observado um sinal em δ 3,90 que correlaciona no HMQC com o sinal em δ 56,5, sendo característico de uma metoxila. O hidrogênio em δ 7,74 correlaciona com o carbono em δ 102,1 no HMQC e acopla em relação *meta* com o hidrogênio em δ 6,96. Este acopla em relação *orto* com o hidrogênio em δ 7,89 e correlaciona no HMBC com o sinal em δ 164,3. Esse carbono corresponde ao carbono ligado à metoxila, pois também correlaciona a longa distância com o hidrogênio em δ 3,90. Apesar de não ser observado um sinal típico de hidrogênio de ácido, acima de δ 12,0, o espectro de IV mostra claramente a presença de uma função hidroxila na molécula através da banda em 3.447 cm^{-1} , que sugere se tratar de um alcaloide β -carbolínico com carbonila α -insaturada de ácido.

O hidrogênio em δ 6,88 acopla com o hidrogênio em δ 7,93 com constante de acoplamento em 9,5 Hz, confirmado por correlação no espectro de COSY, sugerindo que estes estejam em relação *cis*. O hidrogênio com δ 6,88 apresenta correlação no HMBC com o carbono em δ 160,3 que corresponde a uma carbonila. Todos os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono são descritos na Tabela 1, juntamente com as correlações correspondentes observadas a longa distância no espectro de HMBC.

Tabela 1. Deslocamentos químicos de RMN ^1H (500 MHz), RMN ^{13}C (125 MHz) e correlações C-H J^1 (HMQC) e J^{3-4} (HMBC) para a substância (4) (em MeOD-d4)

Posição	δ ^{13}C	δ ^1H (m, J (Hz))	HMBC (J^{2-3})
4	117,4	7,94 (d, 5,0)	145,3; 133,0
3	145,3	8,62 (sl)	-
3'	134,4	7,93 (d, 9,5)	-
2'	130,3	6,88 (d, 9,5)	160,3; 134,4
1'	160,3	-	-
8	125,4	7,89 (d, 8,5)	142,4; 117,8
7	115,1	6,96 (dd, 8,5, 2,0)	164,3; 102,1
6	164,3	-	-
5	102,1	7,74 (d, 2,0)	164,3; 142,4; 115,1; 117,8
4b	117,8	-	-
8a	142,4	-	-
4a	133,0	-	-
9a	132,5	-	-
1	134,4	-	-
OMe	56,5	3,90 (s)	164,3

Os deslocamentos químicos observados sugerem a posição da metoxila em C-6, através das constantes de acoplamento entre os hidrogênios H-7 (2,0 Hz) e H-5 (2,0 Hz) e ainda o acoplamento com relação *orto* do hidrogênio H-7 (8,5 Hz) com H-8 (8,5 Hz). As correlações heteronucleares C-H a longa distância entre o hidrogênio H-7 e C-6, H-5 e C-6 sugerem tratar-se do ácido 6-metóxi-(9H- β -carbolin-1-il)-(Z)-2-propenoico, isolado pela primeira vez como um produto natural.

O espectro de massas da substância obtido inicialmente por CG-EM com impacto eletrônico a 70 eV não apresentou o íon molecular, apenas as fragmentações com m/z de 250 (100), 235 (7), 221 (30), 207 (54), 192 (19), 179 (57) e 153 (27). A ausência do íon molecular no espectro de massas pode ser explicada pela facilidade de perda de uma

molécula de água durante a fragmentação da molécula, gerando o pico base de m/z 250. Posteriormente, uma análise por CL-EM empregando um espectrômetro de massas com ionizador do tipo triplo quadrupolo com ionização tipo APCI permitiu a visualização do íon quase molecular com m/z 267,20, acompanhado do íon fragmentário m/z 250,52, resultante da perda de H_2O (Figura 2). Esses dados confirmam a substância como sendo o ácido 6-metóxi-(9H- β -carbolin-1-il)-(Z)-2-propenoico. Esse ácido é um precursor hipotético de alcaloides do tipo cantinona. De acordo com os nossos levantamentos, é o primeiro relato da ocorrência natural dessa substância.

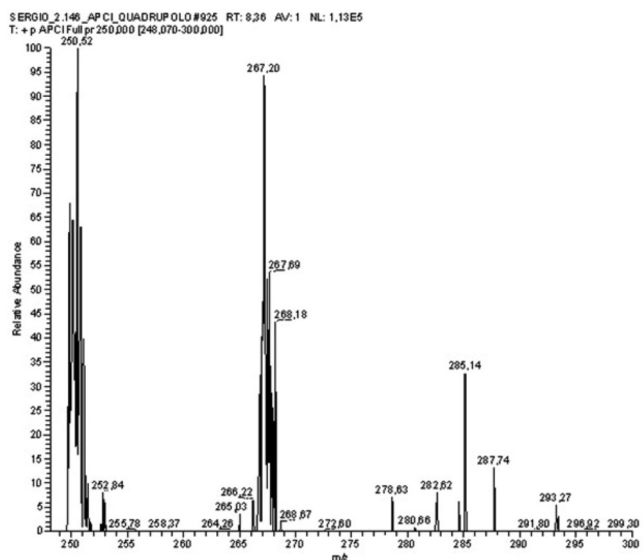


Figura 2. Espectro de massas do ácido 6-metóxi-(9H- β -carbolin-1-il)-(Z)-2-propenoico, obtido em triplo quadrupolo com fonte de ionização tipo APCI

Quantificação de 9-metóxi-cantin-6-ona em extratos e frações dos galhos de *S. guianensis* subsp. *ecaudata*

A análise quantitativa por CLAE de constituintes químicos isolados de plantas é uma ferramenta de grande auxílio, não somente para a verificação dos componentes de uma planta como para a validação da planta quando esta é utilizada tradicionalmente na medicina popular.

Os alcaloides do tipo cantinona são importantes marcadores quimiotaxonômicos das espécies de Simaroubaceae, em especial para espécies do gênero *Simaba*. Previamente, o grupo do Prof. Otto R. Gottlieb iniciou uma série de publicações em *The Chemistry of Brazilian Simaroubaceae*, relatando os constituintes químicos de espécies de Simaroubaceae, com a descrição de 8-metóxi-cantin-6-ona e 3-metóxi-cantin-2,6-diona.¹¹ Posteriormente, Saraiva e colaboradores⁸ descreveram a presença de 9-metóxi-cantin-6-ona de *S. polyphylla*. Mais recentemente, Almeida e colaboradores¹³ descreveram a presença de 4-metóxi-cantin-6-ona de *S. ferruginea*.

A partir do isolamento de 9-metóxi-cantin-6-ona foi realizada a sua quantificação em diferentes extratos de *S. guianensis*, devido à sua importância quimiotaxonômica e sua significativa atividade citotóxica, determinada em ensaios *in vitro* contra células tumorais tipo MCF-7 (câncer de mama) e A-549 (câncer de pulmão), nas concentrações de 4,5 e inferior a 2,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.¹⁴

O padrão da substância 9-metóxi-cantin-6-ona foi purificado diretamente da fração clorofórmica dos galhos de *S. guianensis* subsp. *ecaudata*, empregando-se técnicas cromatográficas e de recristalização. A Figura 3 apresenta a identificação do padrão isolado no extrato aquoso de *S. guianensis* pelo método de adição de padrão.

Na análise por CLAE dos extratos metanólicos, foi necessário realizar um tratamento por extração em fase sólida (EFS), conforme

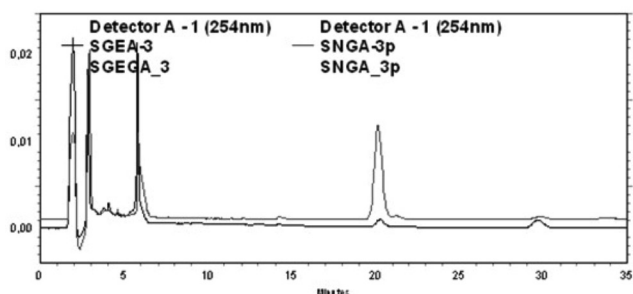


Figura 3. Cromatogramas da fração 3 do extrato aquoso de *Simaba guianensis* subsp. *ecaudata* com (cinza) e sem co-injeção (preto) de padrão 9-metóxi-cantin-6-ona

descrito anteriormente. As três frações obtidas através do tratamento por EFS foram analisadas por CLAE e foi possível detectar a 9-metóxi-cantin-6-ona apenas na fração eluída com mistura MeOH/AcOEt (7:3) (Figura 4).

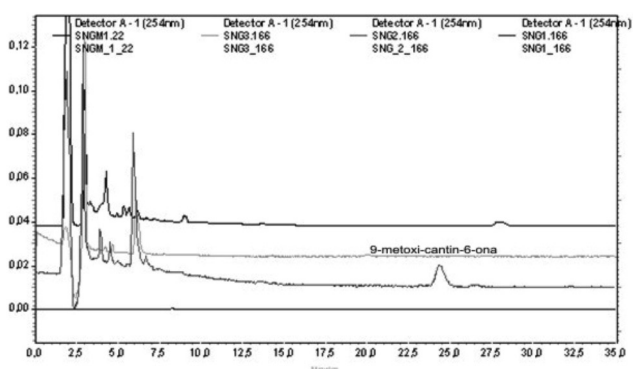


Figura 4. Cromatogramas dos extratos metanólicos dos galhos de *Simaba guianensis* subsp. *ecaudata*; SNGM_1_22, corresponde ao extrato metanólico sem tratamento por EFS, as demais após tratamento por EFS: SNG3_166 - fração eluída com 10 mL MeOH/H₂O (1:1) (constituintes polares); SNG2_166 - fração eluída 2 mL de MeOH/EtOAc (7:3) (fração com 9-metóxi-cantin-6-ona); SNG1_166 - fração eluída com 10 mL de MeOH/EtOAc (7:3) (fração apolar)

Amostras do extrato aquoso dos galhos (5,0 mg/mL) de *S. guianensis* também foram submetidas ao tratamento por EFS, antes de ser analisado por CLAE, que resultaram em quatro frações analisadas. As análises das frações eluídas com 1,0 mL de MeOH/AcOEt (7:3) confirmaram a presença de 9-metóxi-cantin-6-ona na fração 3 e essa fração foi utilizada na análise quantitativa do alcaloide no extrato aquoso (Figura 5).

A fração clorofórmica dos galhos de *S. guianensis* foi analisada diretamente por CLAE, sem necessidade de pré-tratamento por EFS.

A curva de calibração obtida para a quantificação de 9-metóxi-cantin-6-ona apresentou excelente linearidade ($R^2 = 0,9997$), nas faixas de concentrações analisadas ($n = 5$). A precisão da análise (expressa em CV %) foi bastante satisfatória (Tabela 2), mesmo para as amostras submetidas a tratamento por EFS. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, calculando-se em seguida o valor médio das áreas obtidas de cada amostra.

Em seguida, a 9-metóxi-cantin-6-ona presente nos diferentes extratos e frações analisados foi quantificada e os valores expressos em percentuais de peso (peso cantinona/peso seco de extrato ou fração).

As concentrações de 9-metóxi-cantin-6-ona obtidas foram baixas, especialmente no extrato aquoso. O extrato metanólico e fração clorofórmica apresentaram quantidades maiores de 9-metóxi-cantin-6-ona. Esses resultados já eram esperados devido à menor polaridade

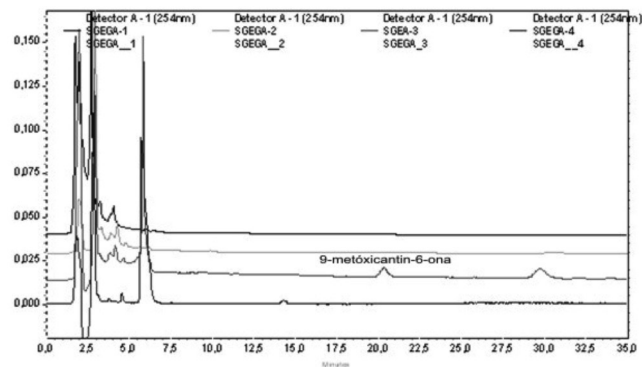


Figura 5. Cromatogramas das frações de EFS obtidas do extrato aquoso dos galhos de *S. guianensis* subsp. *ecaudata*. SGEA_1 - fração 1 eluída com 10 mL de H₂O; SGEA_2 - fração 2 eluída com 10 mL de MeOH/H₂O (1:1); SGEA_3 - fração 3 eluída com 1 mL do sistema MeOH/AcOEt (7:3) (fração com 9-metóxi-cantin-6-ona); SGEA_4 - fração 4 eluída com 10 mL de lavagem com MeOH/AcOEt (7:3)

Tabela 2. Resultado da quantificação por EFS-CLAE de 9-metóxi-cantinona presente nos extratos e frações dos galhos de *S. guianensis* subsp. *ecaudata*

Amostra	CV (%)	C (µg/mL)	Relação p/p (%)
Extrato aquoso de <i>S. guianensis</i>	3,95	0,2664	0,00053
Extrato metanólico de <i>S. guianensis</i>	3,53	0,7096	0,14
Fração clorofórmica de <i>S. guianensis</i>	6,18	0,7757	0,62

de 9-metóxi-cantin-6-ona, que é extraída com maior facilidade com solventes orgânicos, tais como metanol e clorofórmio. Como citado anteriormente, a concentração em que 9-metóxi-cantin-6-ona apresenta atividade citotóxica é de 2,0 a 4,5 µg/mL.¹² Para que o extrato aquoso apresentasse atividade citotóxica seria necessário que esse alcaloide estivesse presente em concentrações em torno de 100 a 200 vezes maiores.

CONCLUSÃO

As substâncias isoladas dos galhos de *S. guianensis* subsp. *ecaudata* são conhecidas por apresentarem citotoxicidade descritas na literatura. O triterpeno piscidinol A apresenta atividade contra células P388 e KB com $CI_{50} = 1,2$ e 5,0 µg/mL, respectivamente, e o alcaloide 9-metóxi-cantin-6-ona mostrou-se citotóxico para células de câncer de mama e de pulmão.^{14,15}

O isolamento de um triterpeno do tipo tirucalano com insaturação na posição C-7, como registrado nesse trabalho, é comum em espécies da família Simaroubaceae, visto que triterpenos dessa classe são precursores de quassinoides, que são os principais marcadores quimiotaxonômicos dessa família.¹⁶ A presença de alcaloides do tipo cantinona e beta-carbolínicos também são comuns em espécies da família,¹⁷ contudo essa é a primeira vez que o alcaloide **4** é descrito.

A quantificação de 9-metóxi-cantin-6-ona nos extratos e frações dos galhos de *S. guianensis* subsp. *ecaudata* demonstra que a concentração desse alcaloide citotóxico não é suficiente para conferir toxidez ao extrato aquoso dessa espécie. Contudo, isto só pode ser confirmado através de ensaios de toxicidade aguda e crônica *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão de bolsas e auxílio à pesquisa pelos programas PNOGP/CNPq (Proc. N. 55026/01-3) e CT-Amazônia (Proc. N.

575503/2008-4 e Proc. N. 575625/2008-2). À M. Souza pela análise por CL-EM do ácido 6-metóxi-(9H- β -carbolin-1-il)-(Z)-prop-2-enoico.

REFERÊNCIAS

1. Ribeiro, J. E. L. S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. S.; Brito, J. M.; Souza, M. A. D.; Martins, L. H. P.; Lohmann, L. G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Procópio, L. C.; *Flora da Reserva Ducke – Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*, INPA: Manaus, 1999, p. 547-549.
2. Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; Rodrigues Filho, E.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1999**, *10*, 76.
3. Ozeki, A.; Hitotsuyanagi, Y.; Hashimoto, E.; Itokawa, H.; Takeya, K.; Alves, S. M.; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 776.
4. Muhammad, H.; Bedir, E.; Khan, S. I.; Tekwani, B. L.; Khan, I. A.; Takamatsu, S.; Pelletier, J.; Walker, L. A.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 772.
5. Barbosa, L. F.; Braz-Filho, R.; Vieira, I. J. C.; *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 2163.
6. Da Silva, M. F. G. F.; Gottlieb, O. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1987**, *15*, 805.
7. Cavalcante, P. B.; *Revisão taxonômica do gênero Simaba Aubl. (Simaroubaceae) na América do Sul*, Museu Paraense Emílio Goeldi: Belém, 1983, p. 85.
8. Saraiva, R. C. G.; Pinto, A. C.; Nunomura, S. M.; Pohlit, A. M.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 264.
9. Krebs, K. G.; Ruber, H. E.; *Arzneim. Forsch.* **1960**, *10*, 500.
10. Gray, A. I.; Bhandari, P.; Waterman, P. G.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1808.
11. Tinto, W. F.; Jagessar, P. K.; Ketwaru, P.; Reynolds, W. F.; McLean, S.; *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 972.
12. Giesbrecht, A. M.; Gottlieb, H. E.; Gottlieb, O. R.; Goulart, M. O. F.; de Lima, R. A.; Sant'ana, A. E. G.; *Phytochemistry* **1980**, *19*, 313.
13. Almeida, E. S. S.; Cechinel-Filho, V.; Niero, R.; Clasen, B. K.; Balogun, S. O.; Martins, D. T. O.; *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *134*, 630.
14. Kuo, P.; Shi, L.; Amooru, G. D.; Su, C.; Huang, C. Q. C.; Wu, J.; Lin, A.; Bastow, K. F.; Lee, K.; Wu, T.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1324.
15. Itokawa, H.; Kishi, E.; Morita, H.; Takeya, K.; *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1053.
16. Dewick, P. M.; *Medicinal Natural Products (A Biosynthetic Approach)*, John Wiley & Sons Ltd Ed.: Baffins Lane, Chichester, West Sussex, 1997, p. 195, 199, 207.
17. Ohmoto, T.; Koike, K.; *The Alkaloids*, Arnold Brom Ed: New York, 1989, p. 135.