

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Melaleuca alternifolia* (MYRTACEAE)[#]

Tatiana R. Vieira, Luiz C. A. Barbosa* e Célia R. A. Maltha

Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa - MG

Vanderlúcia F. Paula

Departamento de Química e Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 45200-000 Jequié - BA

Evandro A. Nascimento

Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 38401-136 Uberlândia - MG

Recebido em 2/4/03; aceito em 20/2/04; publicado na web em 27/05/04

CHEMICAL CONSTITUENTS FROM *Melaleuca alternifolia* (MYRTACEAE). The first chemical study of non-volatile constituents from the bark and stem of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) led to the isolation and identification of 3,3'-dimethylellagic acid (**1**) and five pentacyclic triterpenes: 2 α ,3 β ,23-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid (arjunolic acid, **2**), 3 β -hydroxyulup-20(29)-en-27,28-dioic acid (melaleucic acid, **3**), betulinic acid (**4**), betuline (**5**), 3 β -O-acetylurs-12-en-28-oic acid (**6**), a mixture of fatty acids and esters, and several hydrocarbons. For 2 α ,3 β ,23-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid (**2**) and 3 β -O-acetylurs-12-en-28-oic acid (**6**) a first detailed assignment of ¹H NMR is presented.

Keywords: *Melaleuca alternifolia*; triterpenes; 3,3'-O-dimethylellagic acid.

INTRODUÇÃO

Espécies da família Myrtaceae encontram-se distribuídas em regiões tropicais e subtropicais¹, sendo divididas em duas subfamílias: Myrtoidea, de ampla ocorrência na América tropical e Leptospermoideae, que ocorre, principalmente, na Austrália, Malásia e Polinésia. O gênero *Melaleuca*, pertencente à subfamília Leptospermoideae, inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico². *Melaleuca alternifolia* Cheel é comumente conhecida na Austrália como “árvore de chá”, florescendo principalmente em áreas de pântano, próximas de rios³.

A constituição química do óleo essencial das folhas de *M. alternifolia* é bem conhecida³⁻⁷, sendo este rico em terpinen-4-ol, principal responsável por suas propriedades medicinais, principalmente antifúngicas e antibacterianas, garantindo-lhe importância comercial há mais de 60 anos³.

Embora vários trabalhos relatando a composição química de óleos essenciais de folhas de *M. alternifolia* sejam encontrados na literatura, nenhum estudo químico de outras partes desta planta foi ainda descrito. Entretanto, para outras espécies deste gênero, tais como *M. raphiophylla*⁸, *M. leucadendron*⁹⁻¹⁵, *M. quinquernea*^{16,17} e *M. huegelii*¹⁸, vários estudos foram descritos, nos quais observou-se uma predominância de flavonóides e triterpenos.

O presente trabalho relata o primeiro estudo químico do caule e da casca de *M. alternifolia*, que levou ao isolamento de um derivado metilado do ácido elágico e cinco triterpenos pentacíclicos, dentre eles o ácido 2 α ,3 β ,23-trihidroiolean-12-en-28-óico (ácido arjunólico, **2**) e o ácido 3 β -O-acetylurs-12-en-28-óico (**6**). Para estes dois ácidos foram feitas as atribuições detalhadas dos espectros de RMN de ¹H. Foram também identificados por CG-EM onze outros compostos, além de vários ácidos e ésteres graxos.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação e procedimentos gerais

Para as separações cromatográficas em coluna, foram utilizadas sílicas gel 70 a 230 Mesh e 230 a 400 Mesh. Nas análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de sílica gel 60 F₂₅₄, com 0,25 mm de espessura¹⁹. As temperaturas de fusão, não corrigidas, foram determinadas em um aparelho Microquímica MQAPF-301. Os espectros no Infravermelho (IV) foram registrados em espectrômetro Perkin Elmer, utilizando-se pastilhas de KBr. Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos em aparelho Bruker WM 400 (400 MHz), Bruker WM 500 (500 MHz) e Varian Mercury 300 (300 MHz). Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro V.G. Analytical ZAB-IF a 70 eV. As análises dos ácidos graxos e triacilglicerídeos por cromatografia em fase gasosa foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu GC 17-A, acoplado a um registrador C-R7A Chromatopac. As análises por CG-EM foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu GC 17-A, com detector seletivo de massas, modelo QP 5050 (Shimadzu).

Material vegetal, extração e isolamento das substâncias

O caule e a casca de *M. alternifolia* Cheel foram coletados no Setor de Dendrologia do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. A exsicata correspondente ao material coletado foi depositada no Herbário VIC, da mesma Instituição, sob o número 26046.

O caule (3.250 g) e a casca (700 g), após secagem à temperatura ambiente, foram moídos e submetidos a extrações com hexano (casca) e etanol (casca e caule) em aparelho do tipo Soxhlet. A destilação dos solventes foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, fornecendo 10,5 g de extrato hexânico e 71,0 g de extrato etanólico da casca e 81,0 g de extrato etanólico do caule.

O extrato etanólico do caule de *M. alternifolia* foi fracionado por cromatografia em coluna (CC) de sílica gel, utilizando-se inicialmente uma mistura hexano/acetato de etila (4:1) como eluente,

*e-mail: lcab@ufv.br

[#] Parte da dissertação de Mestrado apresentada pelo primeiro autor ao Departamento de Botânica da UFV em 2002.

sendo a polaridade desta mistura aumentada gradativamente. Este fracionamento resultou em 240 frações de 200 mL cada, que foram reunidas em dezoito grupos após análise por cromatografia em camada delgada (CCD). Sucessivos fracionamentos por CC dos grupos 4, 7, 11 e 14 levaram à obtenção dos compostos **4+5** (0,28 g), **3** (1,65 g), **1** (0,02 g) e **2** (0,39 g), respectivamente. Do grupo 1 foi obtido um óleo (1,58 g) e do grupo 2, um material sólido (3,5 g), os quais foram submetidos à transesterificação com MeOH/MeONa e esterificação com $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$, respectivamente, de acordo com as metodologias descritas por Christie²⁰. Os ésteres metílicos obtidos foram analisados por cromatografia em fase gasosa (CG), nas condições experimentais descritas na literatura²¹. Do grupo 6 foi obtido um óleo (0,42 g), o qual foi submetido à análise por CG-EM, nas condições descritas na literatura²².

O extrato hexânico da casca foi submetido à CC de sílica gel, utilizando-se inicialmente uma mistura de hexano/éter dietílico (3:1), sendo a polaridade desta mistura aumentada gradativamente. Foram coletadas 400 frações, as quais foram reunidas em 8 grupos. Após sucessivos fracionamentos dos grupos 3 e 6, por CC de sílica gel, obteve-se o composto **6** (1,04 g), uma mistura dos compostos **4** e **5** (1,85 g), na proporção aproximada de 95:5, de acordo com a análise do espectro de RMN de ^1H , e um material oleoso (Grupo 6.1, 0,76 g), o qual foi analisado por CG, nas condições descritas na literatura²¹.

Ácido 3,3'-*O*-dimetililágico (1). Sólido branco amorfo, $T_f > 300^\circ\text{C}$ (lit.²³: 332-335 $^\circ\text{C}$). Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C em concordância com os descritos na literatura²³.

Ácido 2 α ,3 β ,23-triidroxiolean-12-en-28-óico (ácido arjunólico, 2). Sólido branco, T_f 240-242 $^\circ\text{C}$ (lit.²⁴: 245-247 $^\circ\text{C}$). RMN de ^1H : Tabela 1.

Ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-en-27,28-dióico (ácido melalécico, 3). Sólido branco amorfo, $T_f > 300^\circ\text{C}$ (lit.²⁵: 363-364 $^\circ\text{C}$). Os dados de RMN de ^{13}C foram compatíveis com aqueles da literatura²⁶ para o seu éster dimetilílico.

Ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-en-28-óico (ácido betulínico, 4). Sólido branco, T_f 310-315 $^\circ\text{C}$ (lit.²⁵: 315-321 $^\circ\text{C}$). Os dados de RMN de ^{13}C foram compatíveis com aqueles da literatura²⁶.

Ácido 3 β -*O*-acetilurs-12-en-28-óico (6). Sólido branco, T_f 214-217 $^\circ\text{C}$. $\text{IV } \nu_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 3300-2500, 2918, 2849, 1734, 1692, 1463, 1367, 1250, 1039. EM m/z (%): 498.2932 (M^+ , 28, $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_4$ requer 498.3696), 480 (30), 455(42), 452(100), 438(60). Dados de RMN de ^1H : Tabelas 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico do caule de *Melaleuca alternifolia* resultou no isolamento e identificação do ácido 3,3'-*O*-dimetililágico (**1**) (Figura 1), três triterpenos pentacíclicos, (ácido 2 α ,3 β ,23-triidroxiolean-12-en-28-óico (ácido arjunólico, **2**), ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-en-27,28-dióico (ácido melalécico, **3**) e ácido betulínico (**4**), além de alguns ácidos e ésteres graxos. Da casca foram isolados os triterpenos pentacíclicos ácido betulínico (**4**), betulina (**5**) e ácido 3 β -*O*-acetilurs-12-en-28-óico (**6**), além de vários

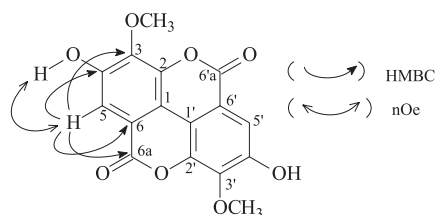
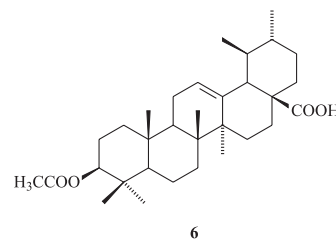
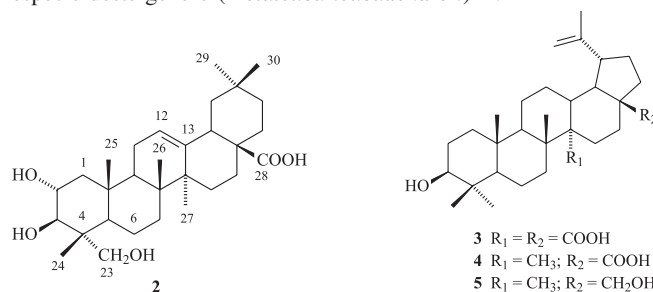


Figura 1. Correlações C-H e H-H observadas por meio de experimentos HMBC e nOe, respectivamente, para o composto **1**

hidrocarbonetos e outros compostos conhecidos. Dentre os compostos **1-6**, apenas **2**, **3** e **4** já haviam sido isolados a partir de uma única espécie deste gênero (*Melaleuca leucadendron*)^{9,11}.



O composto **1** apresentou em seu espectro no infravermelho, bandas em 3391 e 3185 cm^{-1} (O-H), em 1729 e 1695 cm^{-1} (C=O), em 1604, 1580 e 1490 cm^{-1} (C=C aromático). O espectro de RMN de ^1H de **1** apresentou simpletos em $\delta = 7,18$ (2H, H-5/H-5'), $\delta = 6,37$ (2 x OH) e em $\delta = 4,04$ (6H, 2 x OCH_3), característicos de um ácido *O*-dimetililágico²⁷. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou um sinal em $\delta = 60,89$, confirmando a presença de metoxila, e em $\delta = 158,45$ atribuído à carbonila, conforme observado no espectro no infravermelho. Apresentou, ainda, outros seis sinais na região de carbonos aromáticos observados em $\delta = 152,43$ (C4/C4'); 141,09 (C2/C2'); 140,27 (C3/C3'); 111,97 (C6/C6'); 111,49 (C1/C1') e 111,41 (C5/C5'). Pela análise do espectro DEPT verificou-se que dos seis carbonos aromáticos, apenas um ($\delta = 111,97$) referia-se a carbono hidrogenado. Com base nestas informações, foi proposta a estrutura do ácido 3,3'-*O*-dimetililágico para o composto **1**, sendo que o padrão de substituição no anel aromático foi determinado por HMBC e as posições da metoxila e da hidroxila determinadas por experimentos de nOe, conforme mostrado na Figura 1. Para confirmação da estrutura proposta, os dados de RMN de ^{13}C foram comparados com valores da literatura²³ e apresentaram-se de acordo com aqueles obtidos para o ácido 3,3'-*O*-dimetililágico.

A análise detalhada dos espectros de massas, IV, RMN de ^1H e de ^{13}C (uni- e bidimensionais), além de comparação com dados da literatura, permitiram a identificação dos triterpenos **2-6** como ácido 2 α ,3 β ,23-triidroxiolean-12-en-28-óico (ácido arjunólico)^{11,24,28}, ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-en-27,28-dióico (ácido melalécico)¹¹, 3 β -hidroxilup-20(29)-en-28-óico (ácido betulínico)²⁶, betulina²⁶ e ácido 3 β -*O*-acetilurs-12-en-28-óico²⁹, respectivamente. As atribuições completas dos sinais de RMN de ^1H para o composto **2** e **6** são apresentadas na Tabela 1.

O espectro no infravermelho da fração denominada grupo 1 sugeriu que esta era constituída de uma mistura de triacilglicerídeos, devido às bandas de absorção observadas em 3015 (=C-H), em 2955, 2924 e 2853 (-C-H), em 1738 (C=O, éster) e em 723 cm^{-1} ($[\text{CH}_2]_n$, $n > 6$). Após transesterificação da mesma com MeOH/MeONa, foram identificados, por cromatografia gasosa, os seguintes ésteres metílicos: palmitato (Tr = 3,34 min; 24,1%), estearato (Tr = 4,90, 2,1%), oleato (Tr = 5,19; 21,9%), linoleato (Tr=5,81; 35,3%) e linolenato (Tr = 6,77; 4,0%).

O espectro no infravermelho da fração denominada grupo 2 apresentou-se característico de uma mistura de ácidos graxos, sendo a

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) dos Compostos **2** (MeOH-d_4) e **6** (CDCl_3)

H	2			6		
	δ ^1H	Mult./ $J(\text{Hz})$	Acoplamentos (COSY H-H)	δ ^1H	Mult./ $J(\text{Hz})$	Acoplamentos (COSY H-H)
1	0,89(α) 1,90(β)	m	1 β ,2 1 α ,2	1,60-1,52 1,14-1,08	m	—
2	3,70	ddd/ $J_1=J_2=9,7$; $J_3=3,3$	3, 1 α , 1 β	1,55(β) 1,00(α)	m	—
3	3,35	m	2 β	4,40	tl/ $J=10$	—
5	1,15	m	6 α , 6 β	0,76	m	—
6	1,30(β) 1,41(α)	m	5 α , 5 β , 6 α 5 α , 5 β , 6 β	1,30-1,35 1,41-1,50	m m	—
7	1,27(α) 1,52(β)	m	6 α , 6 β , 7 β 6 α , 6 β , 7 α	1,41-1,50	m	—
9	1,64	m	—	1,53	m	—
11	1,89(β) 1,93(α)	m	11 α , 12 11 β , 12	1,41- 1,50(α) 1,85(β)	m dd/ $J_1=9,1$; $J_2=3,4$	— 11 α , 12
12	5,25	tl/ $J=3,2$	11 α , 11 β , 18	5,19	m	11, 18
15	1,70(β) 1,05(α)	$J_1=12,9$; $J_2=J_3=4$	16 α , 16 β , 15 α 16 α , 16 β , 15 β	1,09(α) 1,81(β)	m dt/ $J_1=J_2=13,9$; $J_3=3,4$	15 β , 16 α , 16 β 15 α , 16 α , 16 β
16	1,59(α) 1,96(β)	m	15 α , 15 β , 16 β 15 α , 15 β , 16 α	1,68(α) 1,94(β)	m dt/ $J_1=J_2=13,9$; $J_3=3,4$	15 α , 15 β , 16 β 15 α , 15 β , 16 β
18	2,82	dd/ $J_1=12$; $J_2=3,6$	12, 19 α ,19 β	2,21	d/ $J=11,3$	12, 19
19	1,13(β) 1,61(α)	m	18, 19 α	1,33	m	18, 20, 29
20	—	—	—	0,87	m	—
21	1,18(β) 1,34(α)	m	22 α , 22 β , 21 α 22 α , 22 β , 21 β	1,46-1,41	m	—
22	1,54(α) 1,72(β)	m	21 α , 21 β , 22 β 21 α , 21 β , 22 α	1,74-1,65	m	—
23	3,32(α) 3,51(β)	d/ $J=11,6$ d/ $J=11,6$	23 β 23 α	0,81	s	—
24	0,75	s	—	0,78	s	—
25	1,00	s	—	0,89	s	—
26	0,78	s	—	0,69	s	—
27	1,14	s	—	1,03	s	—
29	0,90	s	—	0,79	d/ $J=6,1$	—
30	0,92	s	—	0,88	d/ $J=6,1$	—
32	—	—	—	1,97	s	—

mesma, então, esterificada por tratamento com $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$. A análise, por cromatografia gasosa, dos respectivos ésteres metílicos permitiu as suas identificações: palmitato ($\text{Tr} = 3,33$ min; 33,7% em área), estearato ($\text{Tr} = 4,77$; 23,6%) e linolenato ($\text{Tr} = 6,70$; 2,2%).

A fração denominada grupo 6 do extrato etanólico do caule, cuja análise por CCD revelou apenas uma mancha, ao ser submetida à análise por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas (CG-EM), nas condições descritas por Silva *et al.*²², mostrou-se bastante complexa, sendo constituída por mais de 30 componentes. Desse, foram identificados por meio da comparação dos respectivos espectros de massas com aqueles do banco de dados do aparelho os seguintes compostos: 4-metileptan-3-ona ($\text{Tr} = 31,67$ min; 7,5%), undecan-2-ona ($\text{Tr} = 36,08$; 5,0%), 3,4,5-trimetoxifenol ($\text{Tr} = 40,55$; 32,7%), hepta-2,4-dien-6-inal ($\text{Tr} = 52,92$; 4,7%) e 6-hidroxiexanoato de metila ($\text{Tr} = 52,60$; 5%).

A fração correspondente ao grupo 6.1 do extrato hexânico da casca também foi submetida à análise por CG-EM²², e revelou a pre-

sença de nove compostos, sendo identificados os seguintes hidrocarbonetos: decano ($\text{Tr} = 13,52$ min; 12,3%), 6-metildec-4-eno ($\text{Tr} = 16,71$; 2,0%), undecano ($\text{Tr} = 17,32$; 19,5%), dodecano ($\text{Tr} = 22,23$; 12,9%), tridecano ($\text{Tr} = 27,05$; 3,2%), tetradecano ($\text{Tr} = 31,68$; 3,8%).

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos à CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Pós-graduação (T. R. Vieira) e de Pesquisa (L. C. A. Barbosa), e pelo apoio financeiro. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro. Ao Prof. A. L. Pinheiro (UFV) pela coleta da planta e ao Dr. O. Howarth (University of Warwick, UK) pela obtenção de alguns espectros de RMN e discussões relativas à elucidação estrutural de alguns dos compostos.

REFERÊNCIAS

1. Barroso, G. M.; Peixoto, A. L.; Costa, C. G.; Ichaso, C. L.; Lima, H. C.; *Sistemática das angiospermas*. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 1991, vol. 2.
2. Cronquist, A.; *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia: New York, 1981.
3. Russel, M.; Southwell, I.; *Phytochemistry* **2002**, *59*, 709.
4. Brophy, J. J.; Davies, N. W.; Southwell, I.; Stiff, I. A.; Williams, L. R.; *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 1330.
5. Penfold, A. R.; Morrison, F. R.; *Aust. J. Pharm.* **1937**, *52*, 274.
6. Lis-Balchin, M.; Hart, S.; Deans, S. G.; *Phytotherapy Research* **2000**, *14*, 623.
7. Caboi, F.; Murgia, S.; Monduzzi, M.; Lazzari, P.; *Langmuir* **2002**, *18*, 7916.
8. Chopra, C. S.; Cole, A. R. H.; Theiberg, K. J. L.; *Tetrahedron* **1965**, *21*, 1529.
9. Yoshida, T.; Maruyama, T.; Nitta, A.; Okuda, T.; *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1171.
10. Kitanov, G. M.; Van, D. T.; Assenov, I.; *Fitoterapia* **1992**, *68*, 375.
11. Lee, C. K.; *J. Chin. Chem. Soc.* **1998**, *45*, 303.
12. Lee, C. K.; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 375.
13. Lee, C. K.; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1119.
14. Lee, C. K.; *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7255.
15. Lee, C. K.; Chang, M. H.; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1003.
16. El-Toumy, S. A. A.; Marzouk, M. S.; Moharram, F. A.; Aboutabl, E. A.; *Pharmazie* **2001**, *56*, 94.
17. Seligmann, O.; Wagner, H.; *Phytochemistry* **1981**, *37*, 2601.
18. Wollenweber, E.; Wehde, R.; Dörr, M.; Lang, G.; Stevens, J. F.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 965.
19. Casey, M.; Leonard, J.; Lygo, B.; Procter, G.; *Advanced Practical Organic Chemistry*, Chapman & Hall: New York, 1990.
20. Christie, W. W.; *Lipid Analysis*, 2nd ed., Pergamon Press: Oxford, 1987.
21. Paula, V. F.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Howarth, O. W.; Veloso, D. P.; *Quim. Nova* **1996**, *19*, 225.
22. Silva, A. F.; Barbosa, L. C. A.; Nascimento, E. A.; Casali, V. W. D.; *J. Essent. Oil Res.* **2000**, *12*, 725.
23. Sato, T.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2124.
24. Jayasingue, L.; Wannigama, G. P.; Macleod, J. K.; *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1111.
25. Silva, M.; Bittner, M.; Hoeneisen, M.; Becerra, J.; Campos, V.; Gonzalez, F.; Cespedes, C.; Marambio, O.; *Química de Los Terpenos*, Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Monografía n° 34, Washington: D. C., 1992.
26. Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.
27. Nduji, A. A.; Okwute, S. K.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1548.
28. Shao, Y.; Zhou, B. N.; Lin, L. Z.; Cordell, G. A.; *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1492.
29. Ahmad, V. U.; Rahman, A.; *Handbook of Natural Products Data, V2, Pentacyclic Triterpenes*, Elsevier: Amsterdam, 1994, p. 867.