

CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS CASCAS DO CAULE DE *Cenostigma macrophyllum*: OCORRÊNCIA DE COLESTEROL

Hilris Rocha e Silva, Carmem Cícera Maria da Silva, Laurentino Batista Caland Neto, José Arimatéia Dantas Lopes, Antonia Maria das Graças Lopes Citó e Mariana H. Chaves*

Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina – PI, Brasil

Recebido em 28/9/06; aceito em 27/4/07; publicado na web em 25/10/07

CHEMICAL CONSTITUENTS FROM BARK OF *Cenostigma macrophyllum*: CHOLESTEROL OCCURRENCE. Phytochemical investigation of the bark of *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae) resulted in the isolation and identification of valoneic acid dilactone, ellagic acid, lupeol, alkyl ferulate, four free sterols (cholesterol, campesterol, stigmasterol and sitosterol), a mixture of sitosteryl ester derivatives of fatty acids, sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside, stigmasterol-3-O- β -D-glucopyranoside and saturated and unsaturated fatty acids. The structures of the isolated compounds were identified by ^1H and ^{13}C NMR spectral analysis and comparison with literature data. The mixtures of 3- β -hydroxysterols and fatty acids were analysed by GC/MS.

Keywords: *Cenostigma macrophyllum*; Caesalpinioideae; steroids.

INTRODUÇÃO

A família Leguminosae Adams é composta pelas subfamílias Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae totalizando aproximadamente, 650 gêneros e 18.000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo^{1,2}. As espécies desta família são particularmente ricas em flavonóides e compostos biossinteticamente relacionados, como rotenóides e isoflavonóides². Alcalóides, terpenóides e esteróides são exemplos de outras classes de substâncias que ocorrem em muitos exemplares da família¹. Os taninos têm frequência muito baixa se comparada aos flavonóides, tendo sido relatadas poucas ocorrências em Caesalpinioideae^{1,3}.

O gênero *Cenostigma* Tul. (Caesalpinioideae) é formado por quatro espécies denominadas *C. tocantinum*, *C. gardnerianum*, *C. macrophyllum* e *C. sclerophyllum*, as quais apresentam hábitos arbóreos e arbustivos, distribuídas nas formações de mata, cerrado e caatinga das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil^{4,5}.

Cenostigma macrophyllum Tul. var. *acuminata* Teles Freire é conhecida popularmente por caneleiro, canela-de-velho, maraximbé ou fava-do-campo e ocorre nos estados de Mato Grosso, Pará, Rondônia, Tocantins, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia e Piauí. Sua beleza, decorrente de flores amarelas que lembram uma orquídea, a faz ser empregada como planta ornamental, sobretudo na região da grande Teresina – PI, onde foi escolhida, através de decreto municipal, como a árvore símbolo da cidade⁴.

Em levantamento etnobotânico, realizado na região do semi-árido piauiense (dados não publicados), consta que as cascas do caule, folhas e flores da *C. macrophyllum* são usadas popularmente para o tratamento de doenças estomacais e intestinais. Estudos com extrato de folhas desta espécie revelaram a presença de atividades antioxidante⁵, antiinflamatória, antinociceptiva, antibacteriana, antiulcerogênica e hepatoprotetora e a ocorrência de triterpenóides e biflavonas⁶.

Este artigo relata o estudo fitoquímico das cascas do caule de *C. macrophyllum*, descrevendo o isolamento e a identificação estrutural do triterpenóide lupeol, quatro esteróides livres (colesterol, campesterol, sitosterol e stigmasterol), ferulato de alquila, uma

mistura de ésteres derivados de ácidos graxos e sitosterol, uma mistura de 3-O- β -D-glicopiranosídeo do sitosterol e 3-O- β -D-glicopiranosídeo do stigmasterol, ácido elágico, dilactona do ácido valoneico e ácidos graxos saturados e insaturados.

Embora a maioria dos esteróides de plantas e fungos apresente um grupo alquila (metila ou etila) em C-24, adicionados via transmetilação dependente de S-adenosilmetionina (SAM), a ocorrência do colesterol em plantas, esteróide sem alquilação em C-24 e predominante em animais, já foi confirmada por meio de estudos que demonstraram a existência de uma enzima capaz de controlar os níveis deste metabólito⁷. O conteúdo de colesterol em plantas pode somar até um quarto de todos os esteróides presentes e acumula às custas do sitosterol⁷.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Brüker modelo Avance DRX-500 e DPX 300, operando respectivamente a 500 e 300 MHz (^1H), 125 e 75 MHz (^{13}C), utilizando DMSO- d_6 ou CDCl_3 como solventes e TMS como referência interna. O espectro de massas com ionização por electrospray (IES-EM) foi obtido em espectrômetro AP QTrap-LC/MS. Os espectros de absorção foram obtidos em espectrofotômetro UV-Vis Hytachi U-3000 e Bolmem FT-IR, modelo MB-102 utilizando partilhas de KBr. As placas cromatográficas foram preparadas utilizando uma mistura de gel de sílica 60 G Vetec e 60 GF₂₅₄ Fluka (1:1) e as revelações das cromatoplacas foram feitas por nebulização com solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ e com vapores de iodo. Os solventes, etanol, metanol, hexano, acetato de etila e diclorometano, utilizados na preparação dos extratos e fracionamentos, foram todos de grau analítico obtidos da Vetec. Nas separações por cromatografia em coluna foram empregadas gel de sílica 60 (0,2-0,5 mm) da Merck, Sephadex LH-20 e Amberlite XAD-2 da Sigma. Os padrões dos esteróides: colesterol (26740), stigmasterol (85860) e sitosterol contendo 10% de campesterol (85451) foram obtidos da Fluka.

As análises dos ésteres metílicos e da mistura de esteróides por CG/EM foram feitas com o uso de um cromatógrafo gasoso CG 17-A

*e-mail: mariana@ufpi.br

com detector de massas Shimadzu, modelo GC/MS-QP 5050A, gerenciado pelo software Class-5000, usando-se coluna capilar de sílica fundida DB-5 (95% de metilpolisiloxano e 5% de fenilpolisiloxano) de 50 m de comprimento, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. As condições de operação da análise cromatográfica dos ésteres metílicos foram as seguintes: temperatura programada de coluna de 150 °C por 2 min, taxa de aquecimento a 5 °C/min até 230 °C permanecendo por 7 min, taxa de aquecimento a 4 °C/min até 260 °C permanecendo por 10 min; a temperatura do injetor foi 230 °C e da interface, 250 °C; o gás de arraste foi o hélio, com fluxo de 0,6 mL/min. A corrida com detector de massa foi feita no modo scan, com tempo de aquisição de 42:50 min e corte do solvente em 5 min; faixa de massas: 40 a 400 daltons. Os compostos foram identificados através de comparação com os espectros de massas da biblioteca Wiley 229.

As condições para a análise dos 3β-hidroxiesteróides foram as seguintes: temperatura programada de coluna: 200 °C por 4 min, taxa de aquecimento a 10 °C/min até 290 °C permanecendo por 15 min, taxa de aquecimento a 2 °C/min até 305 °C permanecendo por 10 min; a temperatura do injetor foi 250 °C e a da interface, 306 °C; o gás de arraste foi o hélio com fluxo de 1 mL/min. A corrida com detector de massa foi feita no modo scan, com tempo de aquisição de 42:50 min e corte do solvente em 5 min; faixa de massas: 40 a 600 daltons.

Material vegetal

As cascas do caule de *C. macrophyllum* foram coletadas no Campus da Universidade Federal do Piauí em julho de 2004. A identificação foi realizada no Herbário Graziela Barroso - UFPI, onde se encontra depositada uma exsiccata da espécie, com o número TEPB 10374.

Isolamento dos constituintes

As cascas secas e moídas (1,7 kg) de *C. macrophyllum* foram extraídas cinco vezes com etanol. O extrato etanólico foi parcialmente concentrado em evaporador rotativo até um volume de 700 mL, sendo, em seguida, adicionados 1300 mL de água e efetuada partição com éter etílico, obtendo-se as frações aquosa (70,6 g) e etérea (47,5 g). A fase etérea, depois de concentrada, foi suspensa em MeOH-H₂O (9:1) e particionada com hexano, obtendo-se as frações hexânica (7 g) e hidroalcoólica (35 g), além dos sólidos A (1,7 g) e B, suspensos, respectivamente, nas fases hidroalcoólica e hexânica. O sólido B foi separado do sobrenadante e exaustivamente lavado com hexano e mistura de CHCl₃-MeOH (1:1) fornecendo a dilactona do ácido valoneico (2,1,6 g).

Uma amostra da fração hidroalcoólica (1,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna de Amberlite XAD-2, empregando-se como eluentes água, água-metanol (7:3), água-metanol (1:1) e metanol. A fração eluída com metanol apresentou um precipitado que foi separado do sobrenadante resultando no isolamento do ácido elágico (1, 50 mg).

Parte da fração hexânica (6,5 g) foi cromatografada em coluna de gel de sílica (155 g) eluída com hexano, hexano-AcOEt e AcOEt-MeOH, em polaridades crescentes, fornecendo 104 frações (125 mL cada), sendo coletadas como segue: frações 1-4 (hexano 100%), 5-33 (hexano-AcOEt, 98:2), 34-60 (hexano-AcOEt, 95:5), 61-75 (hexano-AcOEt, 9:1), 76-84 (hexano-AcOEt, 8:2), 85-92 (hexano-AcOEt, 7:3), 93-97 (hexano-AcOEt, 6:4), 98-101 (AcOEt 100%) e 102-104 (AcOEt-MeOH, 1:1). Após evaporação do solvente em evaporador rotativo e análise por CCDC, as frações recolhidas foram reunidas em 22 grupos.

O grupo H5 (frações 5-6, 1,2 g) foi recromatografado em coluna de gel de sílica com hexano/CH₂Cl₂ (95:5 e 9:1), fornecendo a mis-

tura M1, composta de ésteres derivados de ácidos graxos e sosterol (11-19, 946 mg). Uma amostra de M1 (31 mg) foi submetida à hidrólise alcalina com KOH (30 mg) em metanol (7,5 mL), sob refluxo por 1 h. Decorrido este período, o metanol foi evaporado, o volume inicial restabelecido com água e a mistura reacional foi extraída com éter etílico (10 mL), de acordo com procedimento usual, fornecendo o sosterol (7, 19 mg). A fase aquosa foi acidificada com ácido sulfúrico 30% até pH 4 e extraída com éter etílico obtendo-se a mistura de ácidos graxos que foi metilada com excesso de diazometano, em banho de gelo, fornecendo os ésteres metílicos (13 mg) dos ácidos laúrico (C12:0, 2,08%), mirístico (C14:0, 5,83%), palmitoleico (C16:1; Δ⁹; 6,16%), palmítico (C16:0; 45,07%), linoleico (C18:2; Δ^{9,12}; 0,50%), oleico (C18:1; Δ⁹; 9,88%), esteárico (C18:0; 27,34%), araquídico (C20:0; 0,79%) e lignocérico (C24:0; 2,35%), identificados por CG/EM.

O grupo H18 (frações H18-H32, 327 mg) foi analisado por RMN ¹H e ¹³C, identificando-se o lupeol (3). O grupo H37 (frações 37-40, 383 mg) foi recromatografado sucessivamente em coluna de Sephadex LH-20 com hexano-CH₂Cl₂ (1:4), fornecendo o ferulato de alquila (4, 50 mg) e uma mistura de ácidos graxos (M2, 60 mg). O tratamento de M2 com diazometano e análise do produto por CG/EM resultou na identificação dos ésteres metílicos dos ácidos palmítico (C16:0; 45,45%), palmitoleico (C16:1, Δ⁹; 0,04%), oleico (C18:1; Δ⁹; 31,97%), *cis*-vacênico (C18:1; Δ¹¹; 4,07%), esteárico (C18:0; 13,21%), araquídico (C20:0; 1,43%), behênico (C22:0; 1,06%) e lignocérico (C24:0; 2,77%).

O grupo H41 (frações H41-H60, 821 mg) foi analisado por RMN e CG/EM, identificando-se uma mistura M3 composta pelos esteróides 5-8. A identificação por CG/EM foi feita utilizando-se dados da biblioteca do aparelho e através de comparação dos tempos de retenção dos constituintes com os de padrões puros e por co-injeção.

Uma amostra (100 mg) do grupo H93 (frações H93-H101, 637 mg), contendo a mistura M4, foi dissolvida em piridina (2 mL) e anidrido acético (2 mL). A mistura reacional foi mantida em repouso, à temperatura ambiente, por 12 h. Após procedimento usual, obteve-se um resíduo (109 mg), que foi purificado em coluna de gel de sílica, empregando-se como eluente CHCl₃-MeOH, em ordem crescente de polaridade. O produto acetilado foi identificado como uma mistura dos tetraacetatos dos esteróides glicosilados 9 e 10.

Ácido elágico (1): sólido amarelo claro. RMN ¹³C [125 MHz, DMSO-d₆, δ (ppm)]: 112,4 (C-1, C-1'), 110,2 (C-5, C-5'), 107, 5 (C-6, C-6'), 139,7 (C-3, C-3'), 136,4 (C-2, C-2'), 148,5 (C-4, C-4'), 159,2 (C-7, C-7').

Dilactona do ácido valoneico (2): Sólido branco. PF 270 °C, com decomposição; IES-EM: m/z 471,4 [M+H]⁺. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 359 (4,05), 257,5 (4,72), 300 (ombro), 211 (4,45) nm. IV (KBr) ν_{max}: 3408, 1724, 1614, 1493, 1340, 1254, 1188, 1042 cm⁻¹.

Ferulato de alquila (4): sólido branco. RMN ¹³C [75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]: 127,2 (C-1), 109,5 (C-2), 146,8 (C-3), 147,9 (C-4), 115,8 (C-5), 123,0 (C-6), 144,6 (C-7), 114,8 (C-8), 167,1 (C-9), 56,0 (H₃C=O), 64,6 (C-1'), 31,9 (C-2'), 26,0 (C-3'), 29,3-29,6 [-(CH₂)_n-], 28,8 (C-n+4), 31,9 (C-n+5), 22,7 (C-n+6), 14,1 (C-n+7).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partição do extrato etanólico das cascas do caule da *C. macrophyllum* forneceu as fases hexânica, hidroalcoólica, AcOEt, aquosa e dois sólidos A e B. Este último foi identificado como a dilactona do ácido valoneico (2). O fracionamento cromatográfico da fase hidroalcoólica forneceu o ácido elágico (1) e da fase hexânica o lupeol (3), o ferulato de alquila (4), três misturas de esteróides M1 (11-19), M3 (5-8) e M4 (9-10) e uma mistura de ácidos graxos saturados e insaturados (M2). As substâncias 1-4 e 7-10 foram identificadas por

meio de análise dos dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com os registrados na literatura e os constituintes das misturas M1, M2 e M3 foram identificados por CG/EM. As estruturas das substâncias identificadas são mostradas na Figura 1.

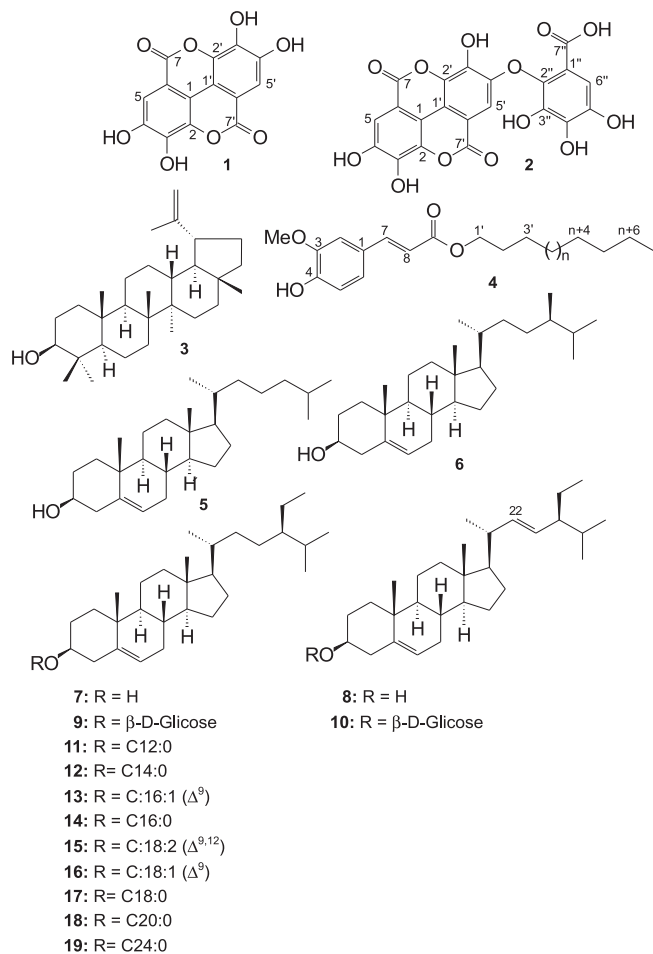


Figura 1. Estrutura das substâncias isoladas da *C. macrophyllum*

As substâncias **1** e **2** têm estruturas relacionadas a taninos elágicos. O espectro de RMN ^1H de **1** apresentou um único sinal em δ 7,47 que sugeriu tratar-se de um derivado do ácido gálico. Esta observação foi sustentada pela análise do espectro de RMN de ^{13}C -BB ^1HD , uma vez que este apresentou sete sinais, sendo um correspondente a CH (δ 110,2) e os demais a carbonos não hidrogenados, dos quais um foi atribuído a carbono de carbonila (δ 159,2). Os dados observados mostraram-se consistentes com a estrutura do ácido elágico⁸.

O espectro de RMN ^1H de **2** (Tabela 1) apresentou três simpletos em δ 7,49; 6,99 e 6,91, sugerindo a presença de três unidades de ácido gálico. O espectro de RMN de ^{13}C -BB ^1HD (Tabela 1) mostrou 21 sinais, dos quais 14 apresentaram valores de deslocamento químico bastante semelhantes aos de **1**. Os 7 sinais restantes foram atribuídos a um carbono metínico a δ 108,4 (o qual correlacionou com um simpleto a δ 6,99), seis carbonos não hidrogenados, dos quais, cinco são oxigenados e destes um é referente a carbono carbonílico (δ 165,7). Estes dados sugeriram para a substância **2** uma estrutura contendo o ácido elágico eterificado, por meio de acoplamento oxidativo, com o ácido gálico. O espectro COSY ^1H - ^{13}C - HMBC (Tabela 1) mostrou correlações dos sinais de hidrogênio em δ_{H} 6,91, 7,49 e 6,99 com os sinais de carbono carbonílico a δ_{C} : 159,0, 159,1 e 165,7, respectivamente, sendo os dois primeiros referentes ao resíduo do ácido elágico. Por comparação com dados

da literatura, o sinal a δ_{C} 165,7 foi atribuído à carbonila da unidade galofila⁹, o que pode ser confirmado pela sua correlação no espectro HMBC com o simpleto a δ_{H} 6,99, atribuído a H-6''. Os deslocamentos químicos dos sinais observados no espectro de RMN ^{13}C de **2** apresentaram-se consistentes com os relatados por Barakat¹⁰ para a dilactona do ácido valoneico (Tabela 1), no entanto, com base em correlações observadas no espectro HMBC, os deslocamentos químicos de C-4' com C-4 e de C-7' com C-7 devem estar invertidos. Hirano¹¹ também relatou os dados de RMN ^{13}C para a dilactona do ácido valoneico, porém atribuiu equivocadamente os deslocamentos químicos de vários sinais, inclusive aos carbonos metínicos. Este derivado de elagitanino não é de ocorrência comum, tendo sido relatado em *Epilobium hirsutum* (Onagraceae)¹⁰, *Shorea laevifolia* (Dipterocarpaceae)¹¹, *Mallotus japonicus* (Euphorbiaceae)¹², espécies de *Quercus* (Fagaceae) e *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. (Lythraceae)¹³. Esta substância apresenta ação inibitória sobre as enzimas 5α -redutase¹¹ e xantina oxidase¹².

Tabela 1. Dados de RMN ^{13}C da dilactona do ácido valoneico (**2**) (DMSO- d_6 , 75 MHz)

C	* δ_{C}	δ_{H}	^1H - ^{13}C - HMBC, nJ (n=2 e 3)	** δ_{C} ¹⁰
1'	113,8		H-5' (3J)	114,1
1	111,9		H-5 (3J)	112,1
6''	108,4	6,99 (s)		108,6
5'	108,4	6,91 (s)		108,5
5	110,5	7,49 (s)		110,6
6'	106,8 ^a			107,0
6	108,1 ^a			108,3
1''	114,7			114,8
2''	139,1		H-6'' (3J)	139,4
2'	136,2 ^b			136,4
2	136,6 ^b			136,8
4''	135,2		H-6'' (3J)	135,4
3''	139,4			139,7
3	139,5		H-5 (3J)	139,8
3'	140,6		H-5' (3J)	140,8
5''	142,9		H-6'' (3J)	143,2
4'	148,5		H-5' (2J)	149,6 [†]
4	149,4			148,7 [†]
7'	159,0		H-5' (3J)	159,4 [‡]
7	159,1		H-5 (3J)	159,3 [‡]
7''	165,7		H-6'' (3J)	166,1

*Atribuição deduzida pelos espectros 2D HMQC e HMBC e por comparação com substâncias modelos. Valores marcados com a mesma letra podem ser permutados. **Dados obtidos em DMSO. †Atribuições invertidas. Dados de RMN de **2** relatados por Hirano¹¹ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ_{H} 6,93; 7,01 e 7,51; (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ_{C} 106,9 (C-6''); 108,0; 108,2; 108,4 (C-6, C-6', C-1''); 110,5; 111,9 (C-1, C-1'); 113,8; 114,6 (C-5, C-5'); 135,1; 136,1; 136,5; 139,1; 139,4; 139,5; 140,4; 142,9; 148,4; 149,3 (C-2, C-3, C-4, C-2', C-3', C-4', C-2'', C-3'', C-4''); 159,0; 159,0 (C-7, C-7'); 165,6 (C-7'').

A análise dos dados espectrais de RMN ^1H da substância **3**, juntamente com a observação, no espectro de RMN ^{13}C , da presença de sinais relativos a carbonos oximetínico (δ 78,7) e olefínicos (δ 109,1 e 150,7), associada à comparação com dados descritos na literatura permitiu identificá-la como sendo o lupeol¹⁴.

O espectro de RMN ^1H de **4** mostrou sinais característicos de grupo *trans*-ferulofila¹⁵. Dentre estes, destaca-se um simpleto em δ 3,95 atribuído à metoxila e dois dupletos em δ 6,32 e 7,63 ($J=15,9$ Hz), indicativos de hidrogênios olefínicos com configuração *trans*

e α,β à carbonila. A presença de um duplete em δ 6,94 ($J=8,0$ Hz), juntamente com um duplete largo em δ 7,09 ($J=8,2$ Hz) e um simpleto largo em δ 7,06 evidenciaram a existência do anel aromático 1,3,4-trissubstituído. O espectro de RMN ^1H apresentou ainda, na região de hidrogênios alifáticos, um tripleto em δ 4,21 (2H, $J=6,6$ Hz) referente a hidrogênios oximetilênicos de éster (C-1'), dois tripletos em δ 1,68 (CH_2) e 0,73 (CH_3) e um simpleto largo em δ 1,27 característico de cadeia hidrocarbônica longa. Nos espectros de RMN ^{13}C -BB ^1HD e DEPT 135° foram observados os sinais correspondentes ao resíduo *trans*-ferulolila, incluindo os de carbonos metínicos olefínicos em δ 144,6, 115,8 e um de carbonila em δ 167,1, atribuídos a C-7, C-8 e C-9, respectivamente. O espectro COSY ^1H - ^{13}C -HMBC confirmou a ligação deste resíduo à cadeia alquílica, por meio da correlação observada entre os sinais em δ 4,22 (H-1') e em δ 167,1 (C-9) e deste último com os sinais em δ 7,63 (H-7) e 6,32 (H-8). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **4** estão de acordo com os relatados na literatura para ferulatos de alquila¹⁵. Com o objetivo de se determinar a dimensão da cadeia alquílica, preparou-se o derivado siliado de **4** e o produto obtido foi analisado por CG/EM¹⁶. Nas condições analisadas, não se observou nos espectros de massas pico a m/z 249 correspondente a íon de fragmento derivado de ácido ferúlico siliado¹⁶, sugerindo que os ferulatos podem possuir cadeia alquílica extensa e por esta razão não foram volatilizados. Ferulatos de alquila ocorrem normalmente em mistura, cuja cadeia hidrocarbônica contém números pares de carbono e, dependendo da espécie vegetal, têm a seguinte composição: (C_{20} - C_{28})¹⁵, (C_{14} - C_{28})¹⁷ e (C_{16} - C_{30})¹⁶, embora haja o registro do isolamento do ferulato de octacosanila (C_{28}) em *Tecomella undulata*¹⁸.

Três misturas de esteróides foram isoladas da *C. macrophyllum*, sendo M1 constituída de ésteres derivados de ácidos graxos e sitosterol, M3 de esteróides livres e M4 de esteróides glicosilados.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C de M1 apresentaram sinais que evidenciaram a presença de um núcleo esteroidal identificado e confirmado por comparação com dados da literatura como sendo do sitosterol esterificado com ácidos graxos^{19,20}. A hidrólise básica de M1 forneceu o sitosterol, identificado por RMN, e uma mistura de ácidos graxos que após metilação com diazometano, seguida de análise por CG/EM dos ésteres metílicos correspondentes, possibilitou identificar nove carboxilatos **11-19**, com predominância do palmitato de sitosterila (**14**).

Os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C do produto acetilado de M4, em comparação com os relatados da literatura, permitiram identificar os tetracetatos de 3-O- β -D-glicopiranosídeo do sitosterol e 3-O- β -D-glicopiranosídeo do estigmasterol (**9-10**)²¹.

A análise de M3 por RMN ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura²⁰ mostrou a presença de sitosterol e estigmasterol (**7+8**)

na proporção de 84:16; no entanto, o cromatograma de íons totais da análise por CG/EM (Figura 2) mostrou 4 picos com tempos de retenção 23,1; 25,9; 26,8; 28,7 min e área integrada de 1,01; 10,96; 27,00; 61,03%, respectivamente. A comparação do espectro de massas correspondente a cada pico, com os da biblioteca do aparelho sugeriu tratar-se dos esteróides colesterol (**5**), campesterol (**6**), estigmasterol (**8**) e sitosterol (**7**), com índice de similaridade de 84, 95, 92 e 95%, respectivamente. O espectro de massas correspondente ao colesterol apresentou picos a m/z 386 (M^+), 275 (M^+-111) e 301 (M^+-85), consistentes com o padrão de fragmentação do espectro de massas relatado para este esteróide²². Colesterol, campesterol e sitosterol constituem uma série homóloga e, conseqüentemente, eluem com o tempo de retenção aumentando gradativamente, refletindo o decréscimo na pressão de vapor ocasionada pelo aumento do número de carbonos. Embora a estrutura

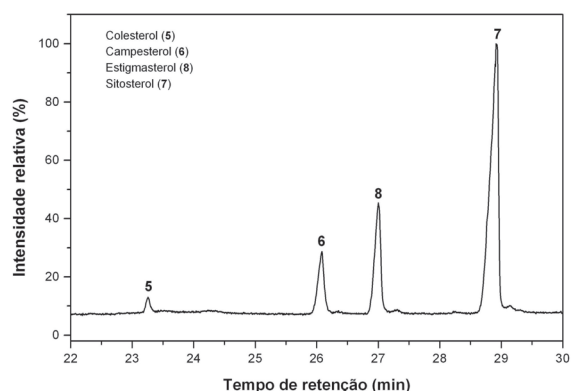


Figura 2. Cromatograma de íons totais (CG/EM) dos 3- β -hidroxiesteróides da *C. macrophyllum*

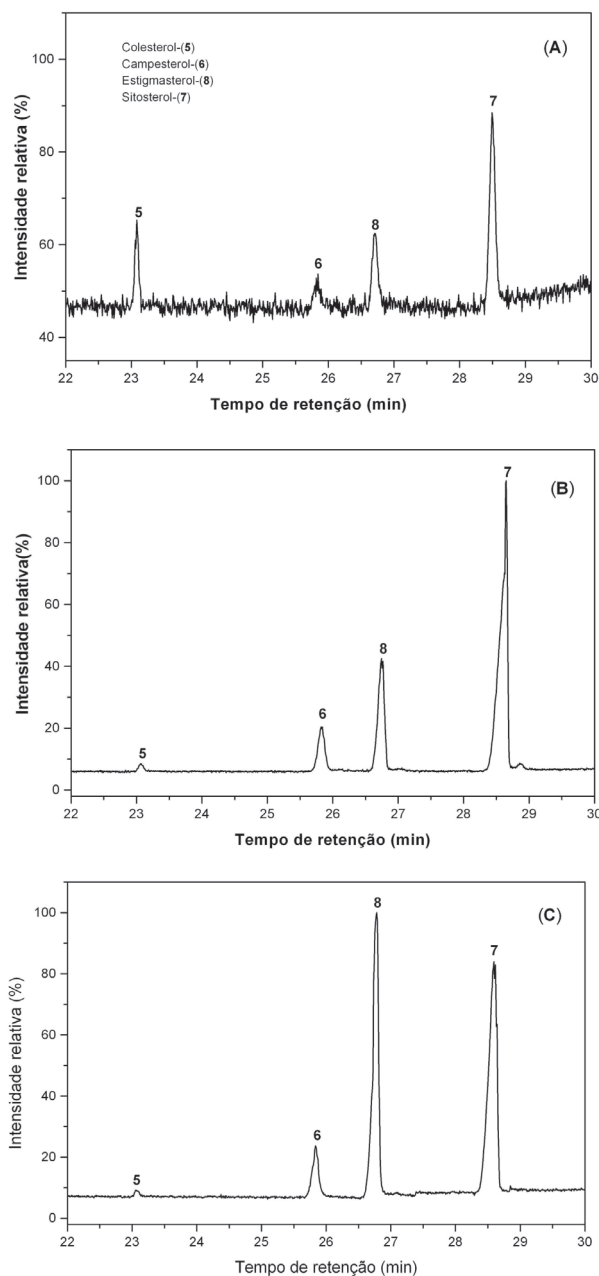


Figura 3. Cromatogramas de íons totais (CG/EM) dos 3- β -hidroxiesteróides da *C. macrophyllum* com co-injeção dos padrões: (A) colesterol, (B) sitosterol com 10% campesterol, (C) estigmasterol

do estigmasterol difere do sitosterol somente pela presença de uma ligação dupla em C-22 na cadeia lateral, esta característica ocasiona um deslocamento para um tempo de retenção consideravelmente menor. O cromatograma de íons totais desta análise apresentou a mesma composição de esteróides e na mesma ordem de eluição observada em estudo realizado com raízes e sementes de espécies de *Astragalus* (Leguminosae-Faboideae), cujos esteróides foram determinados como derivados sililados por cromatografia gasosa²³. Considerando a rara ocorrência de colesterol em plantas, realizou-se ainda co-injeções dos padrões de colesterol, estigmasterol e sitosterol com 10% de campesterol confirmando a presença destas substâncias, conforme mostrado na Figura 3.

A análise por CG/EM do produto da reação da mistura M2 com diazometano permitiu identificar nove ácidos graxos, sendo que esta mistura apresentou um perfil cromatográfico semelhante ao observado para os ácidos graxos presentes em **11-19**, com teor de ácido palmítico de aproximadamente, 45% do total dos ácidos graxos identificados.

O estudo fitoquímico da casca do caule da *C. macrophyllum* conduziu ao isolamento e identificação de três substâncias puras e quatro misturas mostrando uma predominância de esteróides e substâncias relacionadas a taninos. A identificação de colesterol nesta espécie, embora em pequena quantidade, associada a outros relatos da literatura contribuiu para desmistificar a afirmativa de que este esteróide ocorre somente em animais^{7,23,24}.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e CNPq pela bolsas de H. R. Silva e M. H. Chaves e pelo apoio financeiro (PROCAD N° 0014/01-0 e Universal 475070/2004-6), ao botânico M. T. Freire do Departamento de Biologia, UFPI, pela identificação do material botânico, ao Prof. Dr. C. R. D. Correia do IQ-UNICAMP pelo espectro de massas da dilactona do ácido valoneico, ao LAPETRO-UFPI pelas análises de CG/EM e ao CENAUREMN-UFC pelos espectros de RMN.

REFERÊNCIAS

- Zaruchi, J. L.; *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, Chapman & Hall: London, 1994.
- Hegnauer, R.; Barkmeijer, R. J. G.; *Phytochemistry* **1993**, *34*, 3.
- Maisels, F.; Gauthierhion, A.; Gautier, J. P.; *Int. J. Primatol.* **1994**, *15*, 681; Bonnet, S. L.; Steyberg, J. P.; Bezuidenhout, C. B.; Saunders, C. M.; Ferreira, D.; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 215; Desmarchelier, C. J.; Bustamante, J. M.; Gil, R. R.; Coussio, J. D.; Ciccio, G. N.; *Pharmazie* **2001**, *56*, 573; Cintra, P.; Malaspina, O.; Bueno, O. C.; Petacci, F.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; da Silva, M. F. G. F.; *Sociobiology* **2005**, *45*, 141.
- Freire, F. M. T.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 1994.
- Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira Jr., G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 351.
- Santos, F. J. B.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Piauí, Brasil, 2001; Costa, A. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Piauí, Brasil, 2003; Costa, C. L. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Piauí, Brasil, 2005.
- Diener, A. C.; Li, H.; Zhou, W.; Whoriskey, W. J.; Nes, W. D.; Fink, G. R.; *Plant Cell* **2000**, *12*, 853.
- Li, X. C.; Elshohly, H. N.; Hufford, C. D.; Clark, A. M.; *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 856.
- Almeida, S. C. X.; Lemos, T. L. G.; Silveira, E. R.; Loiola, O. D.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 57.
- Barakat, H. H.; Hussein, S. A. M.; Marzouk, M. S.; Merfort, I.; Linscheid, M.; Nawwar, M. A. M.; *Phytochemistry* **1997**, *46*, 935; Nawwar, M. A. M.; Marzouk, M. S.; Nigge, W.; Linscheid, M.; *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 645.
- Hirano, Y.; Kondo, R.; Sakai, K.; *J. Wood Sci.* **2003**, *49*, 339.
- Hatano, T.; Yasurara, R.; Yoshihara, R.; Agata, I.; Noro, T.; Okuda, T.; *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1224.
- Kakuda, T.; Sugimoto, A.; Unno, T.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *93*, 391; Cantos, E.; Espín, J. C.; López-Bote, C.; Hoz, L.; Ordóñez, J. A.; Tomás-Barberán, F. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6248.
- Olea, R. S. G.; Roque, N. F.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 278; Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.
- David, J. P.; Meira, M.; David, J. M.; Guedes, M. L. S.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 62; Correia, S. J.; David, J. P.; David, J. M.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 36.
- Yunoki, K.; Renaguli, M.; Kinoshita, M.; Tazaki, H.; Oda, Y.; Ohnishi, M.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2004**, *68*, 2619.
- Bernards, M. A.; Lewis, N. G.; *Phytochemistry* **1992**, *10*, 3409.
- Joshi, K. C.; Alok, K. S.; Singh, P.; *Planta Med.* **1985**, *28*, 71.
- Parmar, S. V.; Jain, S. C.; Gupta, S.; Talwar, S.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Azim, A.; Malhotra, S.; Kumar, N.; Jain, R.; Sharma, N. K.; Tyagi, O. D.; Lawrie, S. J.; Errington, W.; Howarth, O. W.; Olsen, C. E.; Singh, S. K.; Wengel, J.; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1069.
- De-Eknamkul, W.; Potduang, B.; *Phytochemistry* **2003**, *62*, 389.
- Fang, J.-M.; Wang, K.-C.; Cheng, Y.-S.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3383.
- Wyllie, S. G.; Amos, B. A.; Töskés, L.; *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 725.
- Ebrahimzadeh, H.; Niknam, V.; Maassoumi, A. A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 393.
- Dinda, B.; Chatterjee, J.; Banerjee, J.; *J. Indian Chem. Soc.* **1987**, *LXIV*, 647; Toschi, T. G.; Caboni, M. F.; Penazzi, G.; Lercker, G.; Capella, P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *70*, 1017; Delbecque, J. P.; Beyond, P.; Chapuis, L.; Coriocostet, M. F.; *Eur. J. Entomol.* **1995**, *92*, 301; Brenac, P.; Sauvaire, Y.; *Phytochemistry* **1996**, *41*, 415; Stransky, K.; Nemeč, V.; Slama, K.; *Russ. J. Plant Physiol.* **1998**, *45*, 333; Ali, M. S.; Ahmad, F.; Ahmad, V. U.; Azhar, I.; Usmanghani, K.; *Turk. J. Chem.* **2001**, *25*, 107; Sivakumar, G.; Bati, C. B.; Perri, E.; Uccella, N.; *Food Chem.* **2006**, *95*, 525.