

FEOFORBÍDEO (ETOXI-PURPURINA-18) ISOLADO DE *Gossypium mustelinum* (MALVACEAE)

Tania Maria Sarmiento Silva* e Celso Amorim Camara

Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife - PE, Brasil

José Maria Barbosa-Filho

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, CP 5009, 58051-970 João Pessoa - PB, Brasil

Ana Maria Giulietti

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44031-640 Feira de Santana - BA, Brasil

Recebido em 6/3/09; aceito em 28/8/09; publicado na web em 11/1/10

ETHYL ESTER PURPURIN-18 FROM *Gossypium mustelinum* (MALVACEAE). The phaeophorbide ethyl ester named Purpurin-18 and the flavonoids quercetin and kaempferol were obtained by chromatographic procedures from the chloroform fraction of aerial parts of *Gossypium mustelinum*. The structure of these compound was determined by NMR, IR and mass spectra data analysis. This is the first occurrence of this compound in Angiosperm.

Keywords: *Gossypium mustelinum*; phaeophorbide; ethyl ester purpurin-18.

INTRODUÇÃO

O gênero *Gossypium* L. (Malvaceae) apresenta cerca de 50 espécies (45 espécies diploides e cinco alelotetraploides),¹ distribuídas, principalmente, na África, Austrália, Peru, México, Arábia e Brasil. O Brasil é considerado um importante centro de distribuição de três espécies (*G. barbadense* L., *G. barbadense* var. *brasiliense* Hutch. e *G. hirsutum* var. *Marie galante* Hutch.) e o centro de origem da espécie *Gossypium mustelinum*, conhecido popularmente como “algodão bravo”, que é uma espécie de algodoeiro selvagem, alelotetraploide, arbórea, endêmica do semiárido, no nordeste do Brasil.² Em nosso trabalho anterior com a fração clorofórmica das partes aéreas desta espécie foi mostrado o isolamento de três feofitinas: faeofitina B, 17³-etoxifaeoforbídeo A e faeoforbídeo A.³

Substâncias naturais que estão relacionadas com a clorofila são relativamente raras na natureza, devido, provavelmente ao alto potencial fotodinâmico destes pigmentos.⁴ A diversidade estrutural das feofitinas/feoforbídeos e as atividades biológicas que apresentam têm despertado muito interesse, principalmente na terapia fotodinâmica do câncer, sendo um novo método de tratamento com drogas menos tóxicas (sensibilizadores) que utiliza a luz visível e do infravermelho próximo (VIS/NIR) combinadas para gerar espécies citotóxicas derivadas de oxigênio (ROS) em um lugar selecionado do tratamento.⁵

Dando continuidade ao estudo químico de *G. mustelinum* é descrito neste trabalho o isolamento e a completa determinação estrutural da etoxi-purpurina-18.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico das partes aéreas de *G. mustelinum* foi submetido à partição com solventes orgânicos.³ A fração clorofórmica foi submetida à cromatografia com Sephadex LH-20 e sílica gel e forneceu o feoforbídeo **1** e os flavonoides **2** (quercetina) e **3** (kanferol). A substância **1** foi isolada como um sólido amorfo preto azulado. A análise obtida através de CL-EM-ESI (ionização por *electrospray*) no modo positivo mostrou o pico do íon molecular em *m/z* 593,42 [M+H]⁺. A fórmula molecular C₃₅H₃₆N₄O₄ foi deduzida pelos dados obtidos da CL-EM, RMN ¹H e ¹³C-APT (Tabela 1) correspondendo a

20 graus de insaturação. O espectro de IV (KBr) apresentou absorções em 3433 (NH), 1723 (C=O), 1631 (C=C) cm⁻¹. A cor preta azulada característica indicou a presença de um grande cromóforo que pode estar relacionado com a clorofila ou seus derivados.

O espectro de RMN ¹H mostrou absorções características para a substância do tipo feoforbídeo ou seus derivados⁶ pela presença de três grupos metilas ligadas a anel aromático (δ_{H} 3,68; 3,32 e 3,08), três sinais de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 9,44; 9,27 e 8,54, e um grupo vinila (δ_{H} 6,25; 5,15 e 7,83) com um padrão característico para metileno, além da ausência da cadeia fitila, uma vez que o envelope característico de sinais na região alifática de grupos metilenos das feofitinas se encontra ausente.⁶

O espectro de APT junto com HMQC mostrou a presença de seis metilas, cinco grupos metilenos (quatro alifáticos e um olefínico), seis metínicos (dois alifáticos e quatro olefínicos) e dezoito carbonos quaternários (15 olefínicos e três carbonilas). Os dados de RMN e EM (ESI), associados com os graus de insaturação permitiram estabelecer a estrutura como um anidrido cíclico conjugado de seis membros, supostamente presente entre os carbonos C-13¹-C-13² no anel E, com dois valores de carbonila em δ_{C} 164,17 e 159,36, além de um grupo etoxila (δ_{C} 60,40 e 14,2), provavelmente no lugar da cadeia fitila.

O completo assinalamento da estrutura do núcleo porfirina da feoforbida **1** foi realizada através dos assinalamentos a longa distância ^{2,3}J_{CH} das metilas aromáticas 3H-12¹, 3H-2¹ e 3H-7¹ e uma alifática 3H-18¹, que mostraram correlações entre os quatro anéis pirrólicos (Figura 1). O sinal da metila 2¹ (δ_{H} 3,32) mostrou correlação com os carbonos C-1, C-2 e C-3 (anel A), a metila 7¹ correlacionou com C-7 e C-8 (anel B). No anel C verificou-se a correlação da metila 12¹ com os carbonos C-11, C-12 e C-13 e, finalmente, a metila 18¹ correlacionou-se com C-17, C-18 e C-19 (anel D). A correlação ²J_{CH} entre os hidrogênios δ_{H} 17⁴ (4,03), 17²-B (δ_{H} 2,37) e 17²-A (2,66) com a carbonila em C-17³ (δ_{C} 173,25) confirmou a presença do grupo etoxi ligado à carboxila terminal em C-17.

A configuração relativa em C-17 e C-18 foi determinada como sendo *trans*, devido à interação espacial observada através do espectro de NOESY do H-17 (δ_{H} 5,13) com a metila 3H-18¹ (δ_{H} 1,72), e a comparação com os dados da literatura aponta que a configuração absoluta mais provável seria 17-S e 18-S,⁶ (Figura 1). A análise de todos os dados permitiu identificar **1** como sendo a etoxi-purpurina-18. Esta substância está sendo isolada pela primeira vez como uma substância natural. Existe somente um relato na literatura da existência deste composto como produto de síntese.⁷

*e-mail: taniasarmento@dq.ufrpe.br

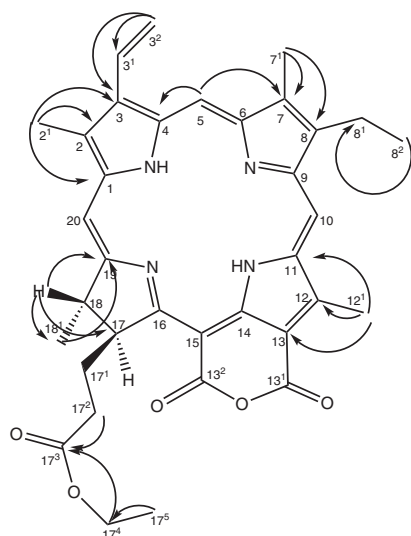


Figura 1. Estrutura do composto **1** e principais correlações observadas no espectro de HMBC

As purpurinas-18 ocorrem naturalmente somente em organismos marinhos e em sedimentos.⁸⁻¹² São biossintetizadas nos próprios organismos marinhos, apresentando atividade antioxidante.⁸ Seus derivados são alvo de muito interesse devido à sua utilização como anticancerígeno.¹³⁻¹⁵

O isolamento de mais um feoforbídeo de *G. mustelinum* nos conduz à suposição de que esta é uma substância que ocorre naturalmente, e não um artefato produzido durante o processo de isolamento. De acordo com o estudo realizado anteriormente,³ é possível que estes pigmentos ocorram naturalmente na planta. Observando-se a espécie vegetal *in natura* alguns “pontos” de forte pigmentação escura (“pretos”) são visíveis em toda parte vegetal. A hipótese de que estes pontos sejam regiões de concentração de pigmentos desta natureza e qual é a sua função precisa de maior fundamentação. Assim, é possível que os pigmentos presentes em *G. mustelinum* ocorram naturalmente, mas a hipótese de que sejam produtos de transesterificação e/ou alomerização, formados durante o processo de extração/isolamento, não pode ser inteiramente descartada. Outras espécies vegetais coletadas na região semiárida, como *Anisacanthus brasiliensis*¹⁶ e *Sida galheirensis*,¹⁷ também apresentaram a presença de feofitinas.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

As medidas de ponto de fusão foram efetuadas em um aparelho munido de placa de Koeffler eletricamente alimentada e não foram corrigidas. Os espectros de infravermelho foram feitos em pastilhas de KBr em um espectrômetro Bomem/MB-102. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, ¹H e ¹³C (1D e 2D) foram registrados em espectrômetros Bruker DRX-500 (¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz) (CENAUREMN-UFC) e Bruker AC 200 (¹H 200 MHz e ¹³C 50,3 MHz) em CDCl₃ utilizando DMSO-d₆ ou CDCl₃ como solvente e TMS como referência interna. O CL-EM (LTF-UFPB) foi utilizado no modo *electrospray* positivo com um Quattro LC-Micromass (Waters). Silica gel 60 (Vetec) e Sephadex LH-20 (Sigma) foram utilizados para cromatografia em coluna. Usaram-se placas de sílica gel 60 PF₂₅₄ Merck para cromatografia em camada delgada analítica e como reveladores luz ultravioleta (254 e 366 nm), soluções de AlCl₃-EtOH (1%) e ácido difenilbórico etanolamina-MeOH (NP, 1%).

Tabela 1. Dados de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50,3 MHz) para substância **1** obtidos por espectros de 2D (HSQC e HMBC, 500 MHz) em CDCl₃. Deslocamentos químicos (δ, ppm) e constantes de acoplamento (J em Hz, parênteses)

	δ _C	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}
C				
1	144,1			3H-2 ¹
2	131,8		3H-2 ¹	
2 ¹	11,9	3,32 (s)		
3	137,7			3H-2 ¹ , 2H-3 ²
3 ¹	128,3	7,83 (18,0; 11,6)	2H-3 ²	
3 ²	123,7	(E) 6,25 (dl, 18,0) (Z) 6,25 (dl, 11,6)		
4	136,6		H-5	
5	103,1	9,27 (s)		
6	156,3			
7	136,6		3H-7 ¹	H-5
7 ¹	11,0	3,08 (s)		
8	145,9			3H-7 ¹
8 ¹	19,3	3,52 (m)	3H-8 ²	
8 ²	17,4	1,59 (t; 7,2)		
9	150,1			
10	107,6	9,44 (s)		
11	131,5			3H-12 ¹
12	139,1		3H-12 ¹	
12 ¹	12,3	3,68 (s)		
13	111,4			3H-12 ¹
13 ^{1*}	159,4			
13 ^{2*}	164,8			
14	139,9			
15	92,6			
16	177,6			
17	54,9	5,13 (dl)		3H-18 ¹
17 ¹	31,7	A 2,43 (m) B 1,98 (m)		H-18
17 ²	32,7	A 2,66 (m) B 2,37 (m)		
17 ³	173,3		2H-17 ²	2H-17 ⁴
17 ⁴	60,4	4,03 (7,2)	3H-17 ⁵	
17 ⁵	14,1	1,14 (t; 7,0)		
18	49,2	4,37 (dl)	3H-18 ¹	
18 ¹	23,8	1,72 (d; 7,2)	H-18	
19	176,6			H-18 ¹
20	94,9	8,54 (s)		

*Estes valores podem ser trocados

Material vegetal

As partes aéreas de *G. mustelinum* foram coletadas em Anhaguera, Bahia, Brasil, em março de 2002 e identificada pela Profa. A. M. Giulietti. Uma exsicata (A. M. Giulietti, 2044) está depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Extração e isolamento

O procedimento experimental é semelhante ao realizado em trabalho anterior.³ O pó seco e pulverizado (1,87 kg) foi extraído com EtOH em temperatura ambiente. O extrato foi concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida fornecendo 205,6 g do extrato etanólico. Uma porção deste extrato (190,0 g) foi suspensa com MeOH:H₂O (1:1) e

extraída com hexano e CHCl_3 . Os solventes foram removidos em rotaevaporador fornecendo os extratos hexânico (89,5 g) e clorofórmico (3,8 g). A fração clorofórmica (2,1 g) foi submetida à coluna com Sephadex LH-20[®] usando como eluentes CHCl_3 :MeOH (1:1) fornecendo 21 frações. As frações 15-16 (10,0 mg) e 19-21 (15,0 mg) desta coluna apresentaram cristais amarelos revelados intensamente em CCDA com o reagente NP para flavonoides. A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C permitiu identificar as substâncias como sendo quercetina (**2**) e kanferol (**3**), respectivamente. As frações 3 e 4 foram resubmetidas à cromatografia em coluna de sílica gel e forneceram a feofitina B³. As frações de 5 a 7 foram purificadas em Sephadex LH-20 mostrando a presença de um precipitado identificado como 17³-etoxifaeoforbídeo A. As frações de 6-14 foram resubmetidas à cromatografia em coluna de sílica gel utilizando hexano e clorofórmio em ordem crescente de polaridade. Na fração 3 precipitou o metoxifaeoforbídeo A.⁶ A fração 7 mostrou a presença de uma substância microcristalina de cor preto azulada (35,0 mg), temperatura de fusão 145-146 °C, que foi submetida à análise espectroscópica (IV, CL-EM-ESI e RMN, incluindo 2D) e identificada como sendo a etoxipurpurina-18 (**1**).

Etóxi-purpurina-18 (**1**). Sólido amorfo; pf 145-146 °C; IV (KBr) ν_{max} 3433, 2934, 1723, 1631, 1462 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 500 e 200 MHz) (Tabela 1), RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,3 e 125 MHz) (Tabela 1), EM-ESI (pos) m/z 593,42 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4$).

AGRADECIMENTOS

IMSEAR-CNPq, FACEPE pelos auxílios e bolsas concedidas. Ao Prof. E. de J. Oliveira (LTF-UFPB) pela realização dos espectros de massas. Ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) - Programa de Pós-graduação em Química Orgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – Ceará, pelos espectros 1D e 2D de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e ^{13}C).

REFERÊNCIAS

1. Fryxell, P. A.; *Rheede* **1992**, 2, 108.
2. Barroso, P. A. V.; Freire, E. C.; Amaral, J. A. B. do; Silva, M. T.; *Zonas de exclusão de algodoeiros transgênicos para preservação de espécies de Gossypium nativas ou naturalizadas*, Embrapa Algodão: Campina Grande, 2005 (Embrapa Algodão, Comunicado técnico, 242).
3. Silva, T. M. S.; Camara, C. A.; Medeiros, F. D.; Oliveira, E. J.; Agra, M. F.; Harley, R. M.; Giulietti, A. M.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2006**, 34, 263.
4. Montforts, F. P.; Mueller, C. M.; Lincke, A.; *Liebigs. Ann. Chem.* **1990**, 415.
5. Brandis, A. S.; Salomon, Y.; Scherz, A. Em *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*; Grimm, B.; Porra, R. J.; Rüdiger, W.; Scheer, H., eds.; Springer: The Netherlands, 2006, cap. 25.
6. Buchanan, M. S.; Hashimoto, T.; Asakawa, Y.; *Phytochemistry* **1996**, 41, 1373.
7. Losev, A. P.; Kochubeeva, N. D.; *Khimicheskaya Fizika* **1990**, 9, 616. (CAN 114:23299).
8. Watanabe, N.; Yamamoto, K.; Ihshikawa, H.; Yagi, A.; Sakata, K.; Brinen, L. S.; Clardy, J.; *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 305.
9. Wegerski, C. J.; France, D.; Cornell-Kennon, S.; Crews, P.; *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 5631.
10. Squier, A. H.; Hodgson, D. A.; Keely, B. J.; *Org. Geochem.* **2002**, 33, 1655.
11. Louda, J. W.; Liu, L.; Baker, E. W.; *Org. Geochem.* **2002**, 33, 1635.
12. Ocampo, R.; Repeta, D. J.; *Org. Geochem.* **1999**, 30, 189.
13. Demberelnyamba, D.; Ariunaa, M.; Shim, Y. K.; *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, 9, 864.
14. Sharma, S.; Dube, A.; Bose, B.; Gupta, P. K.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, 57, 500.
15. Di Stefano, A.; Ettore, A.; Sbrana, S.; Giovani, C.; Neri, P.; *Photochem. Photobiol.* **2001**, 73, 290.
16. Dias, C. S.; Moura, M. D.; Cabral, A. G. S.; Mota, S. G. R.; Da-Cunha, E. V. L.; Silva, T. M. S.; Harley, A. M. G.; Barbosa-Filho, J. M.; *LABCIENCIA Not. Técn. Labor.* **2007**, 1, 14.
17. Silva, D. A.; Silva, T. M. S.; Lins, A. C. S.; Costa, D. A.; Matias, W. N.; Cavalcante, J. M. S.; Braz-Filho, R.; Vanderlei, M. F. S.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 1250.