

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Esenbeckia almawillia* KAASTRA (RUTACEAE)

Bartholomeu A. Barros-Filho, Fátima M. Nunes, Maria da Conceição F. de Oliveira*, Manoel Andrade-Neto e Marcos C. de Mattos

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CP 6044, 60450-970 Fortaleza - CE, Brasil

Francisco G. Barbosa

Faculdade de Educação de Itapipoca, Universidade Estadual do Ceará, Av. Monsenhor Tabosa, s/n, 62500-000 Itapipoca - CE, Brasil

Jair Mafezoli

Curso de Farmácia, Universidade de Fortaleza, Av. Washington Soares, 1321, CP 1258, 60811-905 Fortaleza - CE, Brasil

José R. Pirani

Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, CP 11.461, 05422-970 São Paulo - SP, Brasil

Recebido em 31/7/06; aceito em 1/2/07; publicado na web em 30/7/07

SECONDARY METABOLITES FROM *Esenbeckia almawillia* KAASTRA (RUTACEAE). The phytochemical investigation of the roots of *E. almawillia* is reported for the first time. Chromatographic fractionation of the methanol extract allowed the isolation of the alkaloids 3,3-diisopentenyl-*N*-methyl-2,4-quinoldione (**1**), maculine (**2**) and 3'-methoxygraveoline (**3**), (*E*)-*N*-isobutyl-3-methoxy-4,5-methylenedioxycinnamoyl amide (**4**), the flavones gardenine B (**5**) and nevadensin (**6**), and the sesquiterpene intermediol (**7**). Structure elucidation was based on the analysis of their spectrometric data (uni- and bidimensional ¹H and ¹³C NMR, MS and IR) and comparison with literature data. Compounds **3-7** are being reported as constituents of *Esenbeckia* species for the first time.

Keywords: Rutaceae; *Esenbeckia almawillia*; quinolone alkaloid.

INTRODUÇÃO

Esenbeckia Kunth compreende aproximadamente 30 espécies, distribuídas na América tropical, na qual o Brasil e o México são considerados os principais centros de diversidade^{1,2}. Este gênero pode ser facilmente confundido com *Metrodorea* devido à similaridade entre suas flores e troncos³. Algumas atividades biológicas são relatadas para espécies de *Esenbeckia*^{4,5}. A presença de metabólitos secundários tóxicos em *E. leiocarpa* foi associada ao comportamento inesperado de *Brachyteles arachnoides* (espécie de macaco brasileiro) de não se alimentar das folhas desta planta, mesmo esta sendo uma das espécies mais abundantes em seu habitat⁴. A espécie *E. yahxoob*, comumente conhecida no México como “tankas-ché”, é empregada no tratamento de gastroenterites por muitas comunidades mexicanas⁵.

A investigação fitoquímica de *Esenbeckia* encontra-se restrita a oito espécies, das quais uma ampla variedade de metabólitos secundários foi isolada. Dentre eles, os alcalóides do tipo quinolônicos, quinolônicos e indólicos, e as furocumarinas são considerados marcadores químicos deste gênero^{2,4-33}. Dando continuidade ao estudo químico de *Esenbeckia*, este trabalho relata a primeira investigação química das raízes de *E. almawillia*, como contribuição ao estudo quimiosistemático do gênero, bem como da família Rutaceae.

A espécie *E. almawillia* encontra-se distribuída no Brasil em toda a região Amazônica e nos estados da Bahia, Minas Gerais e Maranhão, onde é comumente conhecida como “laranjinha branca” e “burangica”^{2,3}. Na investigação dos constituintes voláteis desta espécie foram identificados mono- e sesquiterpenos, além do alcalóide 3,3-diisopentenil-*N*-metil-2,4-quinoldiona (**1**)⁶. Nos estudos da composição não volátil, restritos à casca do caule⁷ e cau-

le⁸, foram isolados alcalóides quinolônicos, furocumarinas e derivados do ácido cinâmico. O fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das raízes de *E. almawillia* permitiu isolar e identificar os alcalóides 3,3-diisopentenil-*N*-metil-2,4-quinoldiona (**1**), maculina (**2**) e 3'-metoxigraveolina (**3**), a (*E*)-*N*-isobutil-3-metoxi-4,5-metilenodioxycinnamoylamida (**4**), as flavonas gardenina B (**5**) e nevadensina (**6**) e o sesquiterpeno intermediol (**7**). O isolamento de alcalóides quinolônicos e furocumarinas de *E. almawillia* tem relevância quimiotaxonômica para o gênero, uma vez que estes metabólitos já foram isolados também de outras espécies de *Esenbeckia*. A presença de flavonas, da amida derivada do ácido cinâmico e do intermediol em *Esenbeckia* está sendo relatada pela primeira vez na literatura e estão de acordo com o perfil de metabólitos secundários presentes em Rutaceae.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato metanólico das raízes de *E. almawillia* foi submetido ao particionamento líquido-líquido com hexano, CH₂Cl₂ e AcOEt. O fracionamento cromatográfico da fração hexano levou ao isolamento do alcalóide 3,3-diisopentenil-*N*-metil-2,4-quinoldiona (**1**) e do sesquiterpeno intermediol (**7**). Da fração CH₂Cl₂ foram isolados os alcalóides maculina (**2**) e 3'-metoxigraveolina (**3**), a (*E*)-*N*-isobutil-3-metoxi-4,5-metilenodioxycinnamoylamida (**4**) e as flavonas gardenina B (**5**) e nevadensina (**6**).

O composto **1** foi identificado como sendo a 3,3-diisopentenil-*N*-metil-2,4-quinoldiona, um alcalóide do tipo 2-quinolônico isolado anteriormente de *E. flava*¹¹ e do óleo essencial⁶ e do caule⁸ de *E. almawillia*. Sua estrutura foi estabelecida de forma inequívoca através do emprego de RMN ¹H e ¹³C uni- e bidimensionais⁸. Derivados deste alcalóide foram preparados e tiveram suas atividades antitumoral e antimicobacteriana relatadas³⁴.

*e-mail: mcfo@ufc.br

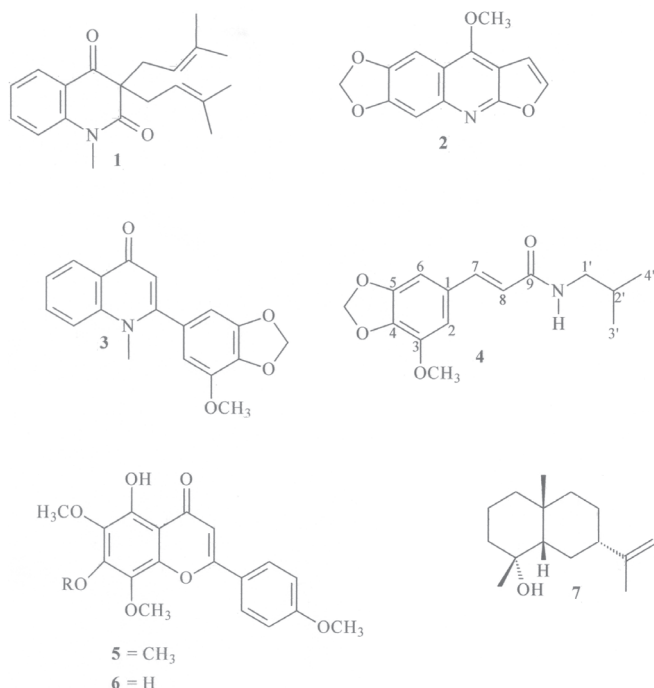


Figura 1. Metabólitos secundários isolados das raízes de *E. almawillia*

A substância **2** foi identificada como sendo o alcalóide furoquinolínico maculina, isolado anteriormente de *E. grandiflora*⁹ e de outras espécies de Rutaceae^{7,9,11,35-37}. Recentemente, este alcalóide teve a atribuição dos deslocamentos químicos de RMN ¹³C corrigidos na literatura⁹.

O composto **3** foi caracterizado através da análise dos dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C uni- e bidimensionais e identificado como sendo o alcalóide 3'-metoxigravolina, do tipo 2-arilquinolin-4-ona, isolado anteriormente da casca do caule de *E. almawillia*⁷.

O espectro de RMN ¹H de **4** apresentou sinais em δ 0,96 (6H, d, J = 6,7 Hz), 1,85 (1H, m) e 3,22 (2H, dd, J = 6,3 e 6,3 Hz) que sugeriram a presença de um grupo isobutila (2-metilpropila) com hidrogênios metilênicos ligados a um heteroátomo (O ou N). Foram ainda observados um singlete em δ 3,91, atribuído a uma metoxila; um singlete largo em δ 5,71, associado a um hidrogênio ligado a um nitrogênio; um sinal em δ 6,00 (2H, s), indicativo da presença de um grupo metilenodioxí; dois dubletos em δ 6,25 (1H, J = 15,5 Hz) e 7,51 (1H, J = 15,5 Hz), atribuídos a dois hidrogênios olefínicos vicinais *trans*, além de sinais em δ 6,67 (1H, s) e 6,72 (1H, s), referentes a dois hidrogênios de anel aromáticos. Através do sinal em δ 47,4, observado no espectro de RMN ¹³C, foi possível verificar que o carbono metilênico do grupo isobutila encontrava-se ligado a um átomo de nitrogênio. Os sinais em δ 56,8 e 102,0 corroboraram a presença dos grupos metoxila e metilenodioxí na molécula. O sinal em δ 166,3 confirmou a presença de uma carbonila de amida. Com base nestes dados foi possível sugerir para **4** a estrutura da (*E*)-*N*-isobutil-3-metoxi-4,5-metilenodioxicinamomilamida, isolada anteriormente de espécies de *Piper*³⁸. O espectro de RMN bidimensional HMBC de **4** mostrou, dentre outros, os acoplamentos a longa distância do hidrogênio em δ 0,96 (6H, d, J = 6,7 Hz) com os carbonos δ 28,9 (² J , CH, C-2') e 47,4 (³ J , CH₂, C-1') e em δ 1,85 (H-2', 1H, m) com os carbonos δ 20,4 (² J , CH₃, C-3'/C-4') e 47,4 (² J , CH₂, C-1'), permitindo confirmar a presença do grupo isobutila na molécula. Os acoplamentos do hidrogênio em δ 6,25 (1H, d, J = 15,5 Hz) com os carbonos δ 130,0 (³ J , C, C-1) e 166,3 (² J , C, C-9) e em δ 7,51 (1H, d, J = 15,5 Hz) com os carbonos δ 101,1 (³ J , CH, C-6), 109,3 (³ J , CH, C-2) e 166,3 (³ J , C,

C-9) confirmaram a localização da ligação dupla. Embora Guilhon e colaboradores² tenham relatado o isolamento do éster metílico do ácido 3-metoxi-4,5-metilenodioxicinâmico de *E. almawillia*, o isolamento do derivado isobutilamida no gênero *Esenbeckia*, bem como seus dados de RMN ¹³C estão sendo descritos pela primeira vez na literatura.

As substâncias **5** e **6** foram identificadas como sendo as flavonas gardenina B³⁹ e nevadensina⁴⁰, respectivamente, após análise dos seus espectros de RMN ¹H e ¹³C uni- e bidimensionais, e comparação com dados da literatura. O isolamento destas duas flavonas de *Esenbeckia* está sendo descrito pela primeira vez na literatura.

O composto **7** foi identificado como sendo o sesquiterpeno intermediol após análise dos seus dados espectrométricos (EM, IV, RMN ¹H e ¹³C) e posterior comparação com dados da literatura⁴¹. Este é o primeiro relato da presença de **7** em *Esenbeckia*.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000. Pastilhas de brometo de potássio (KBr) ou cloreto de sódio (NaCl) foram utilizadas para as análises das amostras sólidas e líquidas, respectivamente. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono-13 (RMN ¹³C) uni- e bidimensionais foram obtidos utilizando-se espectrômetros Bruker modelo Avance DPX-300 e modelo Avance DRX-500, que operam na frequência do hidrogênio-1 a 300 e 500 MHz e na frequência do carbono-13 a 75 e 125 MHz, respectivamente. Nas dissoluções das amostras utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelos picos do hidrogênio (7,27) e do carbono (77,23) pertencentes às moléculas residuais não deuteradas do clorofórmio. Os espectros de massa foram obtidos em espectrômetro de massa QP5050A da Shimadzu, operando com impacto eletrônico de 70 eV. Os pontos de fusão não corrigidos foram obtidos em um aparelho Mettler, com placa aquecedora modelo FP90/FP82H7.

Material vegetal

As raízes de *E. almawillia* foram coletadas na Fazenda Chapada, município Barra do Corda, estado do Maranhão. A identificação botânica foi realizada pelo Dr. J. R. Pirani e a exsicata (nr 32201) encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra (EAC), da Universidade Federal do Ceará.

Extração e isolamento

As raízes secas e trituradas (3,5 kg) de *E. almawillia* foram extraídas por maceração com metanol a frio. Após destilação do solvente sob pressão reduzida, o extrato metanol foi dissolvido em MeOH:H₂O (4:1) e submetido à partição líquido-líquido com hexano, CHCl₃ e AcOEt para fornecer as frações EA/H (43,6 g), EA/C (52,7 g) e EA/A (3,2 g), respectivamente. Uma porção da fração EA/H (18,7g) foi cromatografada sobre gel de sílica empregando-se gradiente de hexano→AcOEt. Após análise por CCDA, as frações obtidas foram agrupadas gerando oito novas frações: EA/H1 a EA/H8. A fração EA/H2 (9,5 g) foi recromatografada em gel de sílica através da eluição com gradiente de hexano→CH₂Cl₂ e forneceu onze frações (EA/H2-1 a EA/H2-11) após análise por CCDA. A fração EA/H2-8 (3,8 g) foi submetida à purificação por

cromatografia em coluna sobre gel de sílica tendo como eluente o gradiente hexano→AcOEt e forneceu 1,8 g da substância 1. A fração EA/H2-10 (110,0 mg) foi submetida ao mesmo processo de fracionamento cromatográfico e levou ao isolamento de 14,0 mg da substância 7.

Uma alíquota da fração EA/C (2,5 g) foi cromatografada sobre gel de sílica empregando-se gradiente hexano→AcOEt e gerou doze novas frações após análise por CCDA: EA/C1 a EA/C12. A fração EA/C4 (124,7 mg) foi purificada após dissolução das impurezas com a mistura hexano:AcOEt (1:1), gerando 9,5 mg da substância 5. De forma similar, a fração EA/C5 (134,5 mg) foi purificada após dissolução das impurezas com AcOEt, fornecendo 14,0 mg da substância 2. A fração EA/C6 (170,0 mg) foi cromatografada sobre gel de sílica empregando-se a mistura isocrática hexano: AcOEt (4:1) como eluente e forneceu sete frações (EA/C6-1 a EA/C6-7), dentre as quais a fração EA/C6-4 (10,2 mg) foi identificada como sendo composta exclusivamente pela substância 4. A fração EA/C6-6 (33,0 mg) foi purificada por cromatografia em coluna sobre gel de sílica, empregando-se hexano:AcOEt (9:1) como eluente e rendeu 8,5 mg da substância 6. Parte da fração EA/C11 (650,0 mg) foi cromatografada sobre gel de sílica por eluição com hexano:AcOEt (4:1) e forneceu 30,0 mg da substância 3.

(*E*)-*N*-isobutil-3-metoxi-4,5-metilenodioxicinamoilamida (4): Sólido amorfo. $IV v_{\max} (\text{cm}^{-1})$: 601; 696; 820; 926; 965; 1042; 1096; 1139; 1201; 1238; 1285; 1322; 1438; 1512; 1543; 1624; 1653; 2907; 2959; 3291. EM (IE) m/z (%): 277 (M^+ , 65); 200 (92,5); 205(100); 175 (37,5); 125 (15); 147 (17,5); 119 (20); 91 (12,4); 76 (15). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,96 (d, $J = 6,7$ Hz, H-3'/4'); 1,85 (m, H-2'); 3,22 (dd, $J = 6,3$ e $6,3$ Hz, H-1'); 3,91 (s, OCH_3 -3); 5,71 (sl, NH); 6,00 (s, OCH_2O); 6,25 (d, $J = 15,5$ Hz, H-8); 6,68 (s, H-2); 6,72 (s, H-6); 7,51 (d, $J = 15,5$ Hz, H-7). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 20,4 (C-3'/C-4'); 28,9 (C-2'); 47,4 (C-1'); 56,9 (OCH_3 -3); 101,1 (C-6); 102,0 (OCH_2O); 109,3 (C-2); 119,5 (C-8); 130,0 (C-1); 137,0 (C-5); 141,0 (C-7); 143,9 (C-3); 149,5 (C-4); 166,3 (C-9).

AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) e ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Pronex) pelo suporte financeiro, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado de B. A. Barros-Filho.

REFERÊNCIAS

- Kaastra, R. C.; *Flora Neotropica: Monograph Number 33, Pilocarpinae (Rutaceae)*, The New York Botanical Garden: New York, 1982.
- Guilhon, G. M. S. P.; Baetas, A. C. S.; Maia, J. G. S.; Conserva, L. M.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1193.
- Pirani, J. R.; *Bot. Journ. Linn. Soc.* **1999**, *129*, 305.
- Nakatsu, T.; Johns, T.; Kubo, I.; Milton, K.; Sakai, M.; Chatani, K.; Saito, K.; Yamagiwa, Y.; Kamikawa, T.; *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1508.
- Mata, R.; Macias, M. L.; Rojas, I. S.; Lotina-Hennsen, B.; Toscano, R. A.; Anaya, A. L.; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 441.
- Barros-Filho, B. A.; Nunes, F. M.; Oliveira, M. C. F.; Mafezoli, J.; Andrade-Neto, M.; Silveira, E. R.; Pirani, J. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 817.
- Oliveira, F. M.; Santana, A. E. G.; Conserva, L. M.; Maia, J. G. S.; Guilhon, G. M. P.; *Phytochemistry* **1996**, *41*, 647.
- Nunes, F. M.; Barros-Filho, B. A.; Oliveira, M. C. F.; Mafezoli, J.; Andrade-Neto, M.; Mattos, M. C.; Silveira, E. R.; Pirani, J. R.; *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 180.
- Nunes, F. M.; Barros-Filho, B. A.; Oliveira, M. C. F.; Andrade-Neto, M.; Mattos, M. C.; Mafezoli, J.; Pirani, J. R.; *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 864.
- Rios, M. Y.; Delgado, G.; *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1307.
- Dreyer, D. L.; *Phytochemistry* **1980**, *19*, 941.
- Rios, M. Y.; Rosas-Alonso, E.; Aguilar-Guadarrama, A. B.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 367.
- Napolitano, H. B.; Silva, M.; Ellena, J.; Rodrigues, B. D. G.; Almeida, A. L. C.; Vieira, P. C.; Oliva, G.; Thiemann, O. H.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2004**, *37*, 1847.
- Vitagliano, J. C.; Comin, J.; *An. Asoc. Quím. Argent.* **1970**, *58*, 59.
- Vitagliano, J. C.; Comin, J.; *An. Asoc. Quím. Argent.* **1970**, *58*, 273.
- Oliveira, P. E. S.; Conserva, L. M.; Brito, A. C.; Lemos, R. P. L.; *Pharmaceut. Biol.* **2005**, *43*, 53.
- Oliveira, P. E. S.; Conserva, L. M.; Simone, C. A.; Pereira, M. A.; Malta, V. R. S.; Imbroisi, D. O.; *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **2004**, *60*, 900.
- Trani, M.; Carbonetti, A.; Monache, G. D.; Monache, F. D.; *Fitoterapia* **2004**, *75*, 99.
- Trani, M.; Monache, F. D.; Monache, G. D.; Yunes, R. A.; Falkenberg, D. B.; *Gazz. Chim. Ital.* **1997**, *127*, 415.
- García-Beltrán, O. J.; Cuca-Suarez, L. E.; *Actualidades Biológicas* **2005**, *27*, 71.
- Monache, F. D.; Trani, M.; Yunes, R. A.; Falkenberg, D.; *Fitoterapia* **1995**, *5*, 66.
- Suárez, L. E. C.; Barrera, C. A. C.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, *35*, 386.
- Monache, F. D.; Di Benedetto, R.; Souza, M. A. M.; Sandor, P.; *Gazz. Chim. Ital.* **1990**, *120*, 387.
- Rios, M. Y.; Aguilar-Guadarrama, A. B.; Delgado, G.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 977.
- Rios, M. Y.; Delgado, G.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3491.
- Rios, M. Y.; Delgado, G.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 697.
- Bevalot, F.; Fournet, A.; Moretti, C.; Vaquette, J.; *Planta Med.* **1984**, *50*, 522.
- Kubo, I.; Vieira, P. C.; Fukuhara, K.; *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, *13*, 2441.
- Kubo, I.; *J. Chromatogr.* **1991**, *538*, 187.
- Rios, M. Y.; Aguilar-Guadarrama, A. B.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 1006.
- Aguilar-Guadarrama, A. B.; Rios, M. Y.; *Planta Med.* **2004**, *70*, 85.
- Simpson, D. S.; Jacobs, H.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 841.
- Robert, A. W. J.; Malcolm, E. R.; *Tetrahedron* **1979**, *35*, 2169.
- Nunes, F. M.; Barros-Filho, B. A.; Oliveira, M. C. F.; Mattos, M. C.; Andrade-Neto, M.; Barbosa, F. G.; Mafezoli, J.; Pirani, J. R.; Montenegro, R. C.; Pessoa, C.; de Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Galetti, F. C. S.; Silva, C. L.; de Souza, A. O.; *Nat. Prod. Commun.* **2006**, *1*, 313.
- Biavatti, M. W.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Victor, S. R.; Pagnocca, F. C.; Albuquerque, S.; Caracelli, I.; Zukerman-Schpector, J.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 66.
- Monache, F. D.; Monache, G. D.; Souza, M. A. M.; Cavalcanti, M. S.; Chiappeta, A.; *Gazz. Chim. Ital.* **1989**, *119*, 435.
- Vaquette, J.; Pousset, J. L.; Cave, A.; *Plantes Medicinales et Phytotherapie* **1974**, *8*, 72.
- Achenbach, H.; Fietz, W.; Woerth, J.; Waibel, R.; Portecop, J.; *Planta Med.* **1986**, *1*, 12.
- Agrawal, P. K.; *Carbon-13 NMR of Flavonoids: Studies in Organic Chemistry* 39, Elsevier: Amsterdam, 1989.
- Liu, Y.; Wagner, H.; Bauer, R.; *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1203.
- Kesselmans, R. P. W.; Wijnberg, J. B. P. A.; Minnaard, A. J.; Walinga, R. E.; Groot, A.; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 7237.