

ESTUDO FITOQUÍMICO DE ESPÉCIMENS CULTIVADOS DE CUMARU (*Amburana cearensis* A. C. SMITH)Kirley Marques Canuto*[#] e Edilberto Rocha Silveira

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, CP 12200, 60021-940 Fortaleza - CE, Brasil

Antonio Marcos Esmeraldo Bezerra

Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, CP 12168, 60356-001 Fortaleza - CE, Brasil

Recebido em 19/6/09; aceito em 14/10/09; publicado na web em 25/2/10

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF CULTIVATED SPECIMENS OF CUMARU (*Amburana cearensis* A. C. Smith.). Due to the threat of extinction of *Amburana cearensis*, a tree of medicinal importance for the Northeastern Brazil, a phytochemical analysis was performed with specimens obtained by seed germination. Ten compounds were isolated and identified by spectroscopic methods and comparison with literature data. *p*-Hydroxybenzoic acid, ayapin, (*E/Z*)-melilotosides are being reported for the first time for the genus, besides coumarin, isokaempferide, vanillic acid, protocatechuic acid, amburosides A and B which have already been found in the trunk bark. Based on physical and NMR spectroscopy evidences the structures of several melilotosides already described in the literature have been suggested to be revised.

Keywords: *Amburana cearensis*; cultivated specimens; chemical composition.

INTRODUÇÃO

Amburana cearensis A. C. Smith (Fabaceae), conhecida popularmente por cumaru ou imburana-de-cheiro, é uma árvore de importância econômica, típica do sertão nordestino, onde é amplamente empregada em carpintaria, perfumaria e para fins farmacêuticos.^{1,2} A casca do caule, indicada para o tratamento de afecções respiratórias,^{2,3} é largamente utilizada na medicina popular no preparo de uma formulação caseira, chamada de “lambedor”, e também na produção industrial do fitoterápico “xarope de cumaru”.^{3,4}

A eficácia do uso popular de *A. cearensis* é comprovada por estudos farmacológicos a partir do extrato hidroalcoólico da casca do caule e de alguns de seus constituintes químicos, os quais demonstraram atividades analgésica, broncodilatadora e anti-inflamatória.^{3,4} Quimicamente, a casca do caule é basicamente constituída de cumarina (**1**), responsável pelo seu odor peculiar, dos flavonoides isocampferídio (**2**), campferol e afrormosina, pelos glicosídeos fenólicos amburosídeos A (**3**) e B (**4**), dos ácidos fenólicos ácido vanílico (**5**) e ácido protocatecuico (**6**), além de quantidades abundantes de sacarose.^{5,6} Estudos recentes revelaram que a cumarina (**1**), o isocampferídio (**2**) e o amburosídeo A (**3**) possuem efeitos anti-inflamatório, antioxidante e broncodilatador, sendo indicados como princípios ativos da planta.^{4,7-10} Por outro lado, a crescente demanda na exploração econômica de *A. cearensis*, causada pelo seu uso madeireiro e medicinal, tem provocado uma séria ameaça à sua sobrevivência, já que segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais - IUCN¹¹ esta espécie sofre risco de extinção. Além disso, sua congênera *A. acreana* consta na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção.¹² Diante deste cenário, ações de conservação e aproveitamento sustentável da espécie foram delineadas e estão sendo executadas possibilitando a domesticação de *A. cearensis* através de cultivo por semeadura.^{11,13} Em testes farmacológicos pré-clínicos, extratos etanólicos de espécimens cultivados de

A. cearensis demonstraram atividade anti-inflamatória equivalente ao da casca do caule.¹³

Tendo em vista as propriedades terapêuticas de *A. cearensis*, contudo considerando-se o extrativismo predatório sofrido por esta espécie, foi desenvolvida uma investigação fitoquímica com espécimens cultivados, e ainda jovens, de *A. cearensis* (parte aérea e xilopódio), a fim de se buscar mais evidências científicas que apoiem a substituição da planta silvestre, na produção de preparações medicinais/farmacêuticas de *A. cearensis*. O presente estudo proporcionou o isolamento de dez compostos, dos quais quatro foram identificados pela primeira vez no táxon *Amburana*, enquanto que os demais já haviam sido relatados para a casca do caule.^{5,6}

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ¹H e ¹³C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelos Avance DPX-300 e/ou Avance DRX-500 (CENAUREMN-UFC), operando na frequência do hidrogênio a 300,13 e 500,13 MHz, e na frequência do carbono a 75,47 e 125,75 MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em solventes deuterados (0,6 mL) e analisadas em tubos de 5 mm. Os deslocamentos químicos (δ), expressos em partes por milhão (ppm), foram referenciados pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas (RMN ¹H) e pelos picos centrais dos carbonos-13 (RMN ¹³C) dos solventes empregados. Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, utilizando-se pastilhas de KBr para análise das amostras. Os espectros de massa (EM-IE) foram registrados em espectrômetro Shimadzu, modelo QP 5000/DI-50, através de impacto eletrônico a 70 eV. Os pontos de fusão (p.f.), não corrigidos, foram determinados em equipamento da Mettler Toledo, composto por uma placa aquecedora FP82HT e uma unidade de processamento FP90, a uma taxa de aquecimento de

*e-mail: kirley@cnpat.embrapa.br

[#]Endereço atual: Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, Brasil.

2 °C/min. As rotações ópticas foram determinadas em polarímetro Perkin-Elmer, modelo 341, sendo as medidas realizadas a 589 nm (25 °C). As cromatografias de adsorção foram realizadas em coluna sobre gel de sílica 60 da Vetec (\varnothing μ m 63-200). Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals. As separações foram monitoradas por cromatoplas cobertas por gel de sílica 60 (\varnothing μ m 2-25) Sigma Chemical CO (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm). A revelação das frações e substâncias foi produzida por exposição à luz UV (254 e 366 nm) em aparelho Spectroline, modelo ENF-240 C/F, e por aspersão com solução ácida de vanilina, seguida de aquecimento. As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram desenvolvidas em um cromatógrafo Waters-1525, composto por um sistema de bomba binária munido de injetor manual Rheodyne, acoplado a um detector de arranjo de fotodiodo Waters-2996 (λ = 254 nm). As separações foram realizadas em colunas XTerra RP-18, mantidas em forno termostático a 35 °C, utilizando-se as seguintes condições: para fins analíticos (4,6 x 250 mm, 5 μ m, *loop* = 20 μ L, fluxo de 1,0 mL) e preparativos (4,6 x 250 mm, 10 μ m, *loop* = 200 μ L, fluxo de 4,8 mL). Os solventes empregados apresentavam grau HPLC MeOH e H₂O de procedência Tedia e Milli Q, respectivamente, e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 μ m (Phenomenex) e degaseificados por sonicação a vácuo durante 5 min. As amostras foram dissolvidas na fase móvel e filtradas através de membranas de teflon com porosidade de 0,45 μ m (Waters). As extrações em fase sólida (EFS) foram efetuadas em cartuchos de fase reversa C-18 (Sep-Pak®, Waters), contendo 500 mg de adsorvente.

Material vegetal

Amburana cearensis A. C. Smith, foi cultivada no setor de Horticultura da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza-CE), em julho de 2001. A propagação das plantas foi feita por sementeira, utilizando-se sementes adquiridas no comércio local.¹³ Os espécimens jovens foram colhidos após 7 meses de plantio.

Extração e isolamento dos constituintes químicos

Espécimens jovens de *A. cearensis* foram manualmente separados em partes aéreas e xilopódios. As partes aéreas (1,2 kg) e os xilopódios (3,6 kg) foram separadamente secos e triturados mecanicamente, e extraídos por maceração com etanol durante 24 h. Após destilação do solvente sob pressão reduzida, foi obtido um extrato sólido verde escuro das partes aéreas (ACPA-E: 64,3 g, R = 5,4% p/p) e um outro, de cor marrom, do xilopódio (ACX-E: 68,5 g, R = 1,9% p/p).

Uma alíquota do extrato ACPA-E (29,8 g) foi solubilizada em água (200 mL) e particionada com AcOEt (120 mL, 3x). Após destilação do solvente, a fração Fpa-AcOEt (18,7 g) foi dissolvida em MeOH: H₂O 4:1 (200 mL) e extraída com CH₂Cl₂ (120 mL, 3x). A fração Fpa-CH₂Cl₂ (12,2 g) foi submetida à cromatografia em gel de sílica, utilizando-se mistura binária em ordem crescente de polaridade, gerando seis frações: hexano/CH₂Cl₂ 10% (F1- 300 mL), hexano/CH₂Cl₂ 25% (F2- 300 mL), hexano/CH₂Cl₂ 50% (F3- 700 mL), hexano/CH₂Cl₂ 75% (F4- 400 mL), CH₂Cl₂ (F5- 500 mL), CH₂Cl₂/AcOEt 50% (F6- 500 mL). As frações F3 a 6 foram reunidas, após comparação por CCD. A fração CH₂Cl₂ F3-6 (1,8 g) foi dissolvida em 10 mL de MeOH e submetida à cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20 (60 g, \varnothing_{int} = 3,5 cm), obtendo-se 15 frações de 30 mL. Análise por CCD permitiu reunir as seguintes frações idênticas: F'2-3, F'4-6 e F'9-13. A fração CH₂Cl₂ F3-6 (F'2-3) foi tratada com CH₂Cl₂ e filtrada, resultando na obtenção de um sólido amarelo (258,8 mg), identificado como sendo o ácido vanílico (**5**) através de análise

comparativa por CCD.⁶ A fração CH₂Cl₂ F3-6 (F'4-6) (380 mg) foi submetida à cromatografia em gel de sílica (40 g) numa coluna de 125 mL. A eluição seguiu esta ordem, coletando-se porções de 100 mL: hexano/CH₂Cl₂ 80% (F''1), CH₂Cl₂ (F''2-4), CH₂Cl₂/AcOEt 10% (F''5-7), CH₂Cl₂/AcOEt 25% (F''8-10), CH₂Cl₂/AcOEt 40% (F''11-12), CH₂Cl₂/AcOEt 50% (F''13-14). As frações F''1 (104 mg, cristais brancos) e F''10 (5,4 mg, sólido amarelo) foram identificadas por CCD como sendo cumarina (**1**) e isocampferídio (**2**), respectivamente,⁶ enquanto que a fração F''3-4 (62,5 mg, cristais incolores) foi caracterizada por técnicas espectrométricas como sendo aiapina (**8**) (62,5 mg).¹⁴ A fração CH₂Cl₂ F-3 (F'9-13) (52,2 mg) foi submetida à cromatografia em cartucho de EFS (500 mg) por eluição com MeOH/H₂O, recolhendo-se alíquotas de 2 mL. Frações F''1 (5 mg) e F''4 (23 mg), ambos sólidos de cor marrom, foram caracterizadas como ácido *p*-hidroxi-benzóico (**7**) e amburosídio B (**4**), após análises espectrométricas de RMN.^{5,15}

A fração aquosa Fpa-H₂O (10,5 g), depois de liofilizada, foi submetida à cromatografia em Sephadex LH-20 (60 g, \varnothing_{int} = 3,5 cm), empregando-se H₂O/MeOH 50%, resultando em 10 frações de 20 mL. A fração F7 (137,0 mg) foi aplicada em um cartucho de EFS (500 mg) e eluída com uma mistura de MeOH:H₂O, seguindo uma ordem decrescente de polaridade, obtendo-se 7 frações de 3 mL. A fração H₂O F7 (F'2) (65,0 mg) foi submetida à CLAE, em uma coluna de fase reversa, adotando-se uma fase móvel composta de H₃PO₄ (pH=3)/MeOH. O gradiente de eluição variou de 30 para 50% de MeOH em 10 min de corrida, resultando no isolamento de um sólido branco (24,0 mg; *t_R* = 7,20), identificado como o ácido (*E*)-*o*-cumárico glicosilado (**9**).¹⁷ A fração H₂O F-7 (F'7') (30,0 mg) foi caracterizada como sendo o amburosídio B (**4**).

Uma alíquota do extrato ACX-E (30,7 g) foi submetida ao mesmo esquema de partição descrito para o extrato ACPA-E, resultando em três frações: aquosa (9,2 g, Fx-H₂O), hidrometanólica (11,7 g, Fx-H₂O/MeOH) e diclorometano (7,0 g, Fx-CH₂Cl₂). A fração aquosa Fx-H₂O (9,2 g) foi submetida à cromatografia em Sephadex LH-20 (60 g, \varnothing_{int} = 3,5 cm), empregando-se H₂O/MeOH 50% como fase móvel, gerando 6 frações. A fração F-3 (3,9 g) foi dissolvida em H₂O (25 mL) e particionada com *n*-butanol (3 x 15 mL). A fração solúvel em *n*-butanol (124,0 mg) foi submetida à CLAE, em coluna de fase reversa, utilizando-se como fase móvel uma mistura de H₃PO₄ (pH=3) e MeOH. O gradiente de eluição variou de 20 para 50% de MeOH em 10 min de corrida, fornecendo um sólido amarelo (12,0 mg; *t_R* = 7,87 min), caracterizado como sendo o ácido (*Z*)-*o*-cumárico glicosilado (**10**).^{17,18}

A fração Fx-H₂O/MeOH (11,7 g), adsorvida com 15 g de gel de sílica, foi eluída a vácuo com CH₂Cl₂ (F1- 150 mL), CH₂Cl₂/AcOEt (F2- 450 mL), AcOEt (F3- 800 mL) e MeOH (F4- 450 mL). Sucessivas cromatografias em Sephadex LH-20 (60 g, \varnothing_{int} = 3,5 cm) da fração F2 (1,7 g), utilizando-se MeOH como fase móvel e coletando-se alíquotas de 5 mL, forneceram um sólido rosado (52 mg) e cristais amarelos (11 mg), os quais foram identificados respectivamente como amburosídio A (**3**) e ácido protocatecuico (**6**), através de comparação por CCD com padrões autênticos.^{5,6}

Ácido (*E*)-*o*-cumárico glicosilado (**9**)

Sólido amorfo branco: p.f. 234,6-236,1 °C (Lit. 240-241 °C);¹⁵ $[\alpha]_D^{20}$ = -61,7°, MeOH (Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = -60,9°, EtOH 50%);¹⁵ IV (KBr, cm⁻¹) v: 3470, 3085, 2935, 1697, 1635, 1491, 1404, 1238 e 1076; RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ_H 8,12 (d, *J* = 16,2 Hz, H-7), 7,61 (d, *J* = 7,9 Hz, H-6), 7,37 (t, *J* = 7,9 Hz, H-4), 7,24 (d, *J* = 7,9 Hz, H-3), 7,05 (t, *J* = 7,9 Hz, H-5), 6,52 (d, *J* = 16,2 Hz, H-8), 5,00 (d, *J* = 7,8 Hz, H-1'), 3,89 (m, H-6'a), 3,71 (m, H-6'b), 3,57 (m, H-2'), 3,49 (td, H-3'), 3,46 (m, H-5'), 3,43 (m, H-4'); RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz) δ_C 171,2 (C-9), 157,6 (C-2), 141,6 (C-7), 133,0 (C-4), 129,0 (C-6),

125,5 (C-1), 123,7 (C-5), 119,7 (C-8), 117,1 (C-3), 102,5 (C-1'), 78,4 (C-5'), 78,3 (C-3'), 75,0 (C-2'), 71,4 (C-4') e 62,6 (C-6'); EM-IE m/z 326 ($[M]^+$), 164, 146, 118, 109, 91, 73, 57 e 44.

Ácido (*Z*)-*o*-cumárico glicosilado (**10**)

Sólido resinoso amarelo: p.f. 126,1-127,3 °C (Lit. 128 °C);¹⁷ $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$, MeOH (Lit. $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$, MeOH);¹⁹ IV (KBr, cm^{-1}) v: 3477, 3011, 1700, 1627, 1491, 1395, 1236 e 1073; RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz) δ_H 7,53 (d, $J = 7,9$ Hz, H-6), 7,31 (d, $J = 12,5$ Hz, H-7), 7,30 (t, $J = 7,9$ Hz, H-4), 7,19 (d, $J = 7,9$ Hz, H-3), 6,97 (t, $J = 7,9$ Hz, H-5), 5,97 (d, $J = 12,5$ Hz, H-8), 4,94 (d, $J = 7,4$ Hz, H-1'), 3,87 (m, H-6'a), 3,70 (m, H-6'b), 3,49 (m, H-2'), 3,46 (td, H-3'), 3,43 (m, H-5'), 3,40 (m, H-4'); RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) δ_C 170,4 (C-9), 156,7 (C-2), 139,7 (C-7), 131,7 (C-6), 131,5 (C-4), 126,9 (C-1), 122,9 (C-5), 121,4 (C-8), 116,6 (C-3), 102,7 (C-1'), 78,3 (C-5'), 78,2 (C-3'), 75,0 (C-2'), 71,4 (C-4') e 62,6 (C-6'); EM-IE m/z 326 ($[M]^+$), 164, 146, 118, 109, 91, 73, 57 e 44.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Partições líquido-líquido do extrato etanólico das partes aéreas de plantas jovens de *A. cearensis*, seguidas por cromatografias em Sephadex LH-20/gel de sílica da fração diclorometano (Fpa- CH_2Cl_2), conduziram à obtenção de cumarina (**1**), isocampferídio (**2**), amburosídeo B (**3**), ácido vanílico (**5**), ácido *p*-hidroxi-benzoico (**7**) e aiapina (**8**). Ácido (*E*)-*o*-cumárico glicosilado (**9**) e novamente amburosídeo B (**3**) foram isolados a partir da fase aquosa Fpa- H_2O , através de separações efetuadas por EFS e CLAE.

Separações cromatográficas realizadas por Sephadex LH-20 e CLAE da fração aquosa do extrato etanólico do xilopódio (Fx- H_2O) resultaram no isolamento do estereoisômero *Z* do ácido *o*-cumárico glicosilado (**10**). Por outro lado, o amburosídeo A (**3**) e o ácido protocatecuico (**6**) foram isolados por fracionamento cromatográfico em gel de sílica e Sephadex LH-20 da fração hidrometanólica (Fx- $H_2O/MeOH$). Este é o primeiro relato de ocorrência dos compostos **7-10** no táxon *Amburana* (Figura 1).

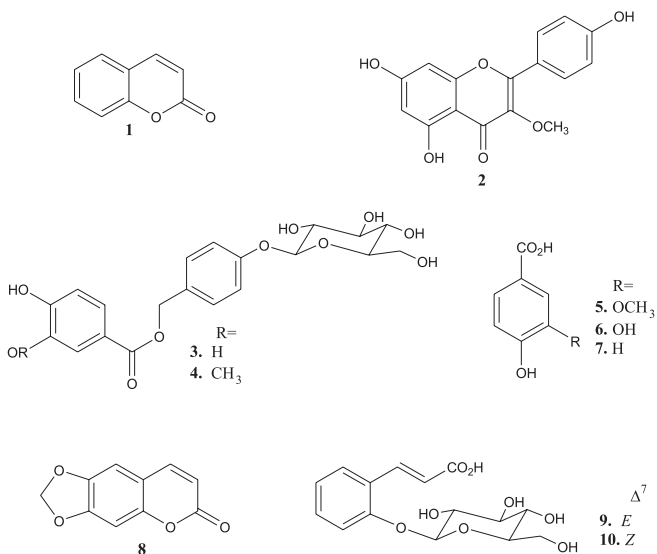


Figura 1. Estruturas químicas das substâncias isoladas de espécimens cultivados de *A. cearensis*

O composto **8** (cristais incolores; p.f. 222-224 °C) apresentou o pico do íon molecular com m/z 190, correspondendo à F.M. $C_{10}H_6O_4$. O espectro de RMN ^{13}C exibiu dez sinais, dos quais um foi compatível com carbonila de lactona α,β -insaturada (δ 161,4, C-2), enquanto que

o espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 registrou apenas metade destes sinais, sendo um deles referente a carbono metilenodioxí (δ 102,6). No espectro de RMN 1H , a presença de um par de dupletos em δ 7,58 e 6,28 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-4 e H-3), associados a hidrogênios *cis*-olefínicos, bem como de dois singletos coincidentes em δ 6,83 (2H, s, H-5 e H-8), relacionados a hidrogênios aromáticos *para*-posicionados, sugeriram a estrutura de uma cumarina 6,7-dissubstituída. No espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear HMQC, a correlação entre o sinal de carbono em δ 102,6 (6,7-O CH_2O) e o sinal de hidrogênio em δ 6,08 permitiu a caracterização do grupo metilenodioxí, revelando a estrutura da cumarina aiapina, uma fitoalexina fungitóxica.¹⁹ Além disso, seus dados de RMN estão em consonância com aqueles relatados na literatura.¹⁴

Os compostos **9** (sólido branco; p.f. 234,6-236,1 °C; $[\alpha]_D^{20} = -61,7^\circ$) e **10** (sólido resinoso amarelo; p.f. 98,7-100,0 °C; $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$) exibiram espectros de EM-IE idênticos, apresentando o pico do íon molecular com m/z 326, correspondente à F.M. $C_{15}H_{18}O_8$, revelando que os mesmos eram isômeros. Os espectros de RMN e IV mostraram estreita semelhança, com valores de deslocamentos químicos muito próximos. Quinze linhas espectrais foram observadas no espectro de RMN ^{13}C -CPD para cada composto, sendo uma delas pertencente à carbonila de ácido (δ 171,2/170,4, C-9) e uma referente a carbono aromático oxigenado (δ 157,6/156,7, C-2). Além disso, outras seis absorções foram atribuídas a um resíduo de β -D-glicose, δ 102,5/102,7 (C-1'); 78,4/78,3 (C-5'); 78,3/78,2 (C-3'); 75,0 (C-2'); 71,4 (C-4') e 62,6 (C-6'). Os espectros de RMN 1H demonstraram a existência de um sistema de dois dupletos em δ 7,61/7,53 e 7,24/7,19 (1H, $J = 7,9$ Hz, H-6 e H-3) e dois tripletos em δ 7,37/7,30 e 7,05/6,97 (1H, $J = 7,9$ Hz, H-4 e H-5), característicos de anel aromático *orto*-dissubstituído. Além disso, um duplete em δ 5,00/4,94 (1H, $J = 7,4$ Hz, H-1') ratificou a configuração β do resíduo de D-glicose. A única diferença significativa observada nos espectros de RMN 1H dos compostos **9** e **10** foi quanto aos valores das constantes de acoplamento, calculados para os seus respectivos pares de dupletos em δ 8,12 e 6,52 (1H, $J = 16,2$ Hz), δ 7,31 e 5,97 (1H, $J = 12,5$ Hz), os quais foram associados a hidrogênios olefínicos (H-7 e H-8) com configuração *cis* e *trans*, respectivamente, sugerindo estruturas estereoisoméricas de derivados glicosilados do ácido cinâmico. O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC mostrou a correlação entre o sinal de carbono aromático oxigenado em δ 157,6/156,7 (C-2) e o sinal de hidrogênio anomérico em δ 5,00/4,94 (H-1'), evidenciando a ligação heterosídica através do carbono 2. Portanto, os compostos foram identificados como sendo os estereoisômeros (*E*) e (*Z*) do ácido *o*-cumárico glicosilado (**9** e **10**), os quais são também conhecidos como melilotosídeos, em alusão ao gênero *Melilotus*, de cujas espécies estes compostos foram originalmente isolados, além disso o isômero *Z* pode ser denominado ácido *o*-cumárico glicosilado.^{17,20}

Calzada et al.¹⁷ relataram o isolamento de um melilotosídeo (p.f., 128 °C; $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$, $c = 0,3$, MeOH), e informaram que os dados de RMN 1H e ^{13}C , não fornecidos na publicação, são idênticos aos dados de Vasänge et al.¹⁸ Vasänge et al.¹⁸ relataram o isolamento do glicosídeo do ácido cumárico, disponibilizando os dados de RMN 1H e ^{13}C (dados físicos omitidos) e afirmaram que o mesmo é semelhante ao melilotosídeo isolado por Purohit et al.²¹ Purohit et al.²¹ relataram o isolamento do éster metílico do ácido *o*-cumárico glicosilado, ou seja, o derivado metilado da forma *E* do melilotosídeo, previamente isolado por Takaishi.²¹ Os dados de RMN 1H e ^{13}C foram semelhantes àqueles publicados por Vasänge et al.,¹⁸ principalmente com relação ao deslocamento químico do carbono anomérico δ 94,9 (δ 95,0 para Vasänge et al.). No entanto, o valor de J determinado para os hidrogênios da dupla do ácido cumárico foi 16,2 Hz, enquanto que para Vasänge et al. foi de 12,7 Hz. Isto indica que o melilotosídeo de Vasänge et al. é *Z* e não *E*, como o de Takaishi. Yang et al.²² também

relataram o isolamento de *cis* e *trans*-melilotosídeos (dados físicos e de RMN omitidos) e mencionaram serem estes idênticos aos dados de Vasänge *et al.*¹⁸ Sabe-se pela literatura que o deslocamento químico do carbono anomérico da glicose livre na forma β -glicopiranosídica é δ 96,7 enquanto que na forma α é δ 92,8 e que os derivados metilados correspondentes são δ 100,0 e 104,0, respectivamente.²³

Análise dos valores relatados na literatura para as formas piranosídicas livres e metiladas no carbono anomérico da glicose, manose e galactose revela que a desproteção dos carbonos anoméricos metilados é em torno de $\Delta\delta$ 7 ppm em relação às formas livres correspondentes.²³ Rasmussen *et al.*²⁴ registraram um valor de δ 100,8 para o carbono anomérico do ácido (*Z*)-*p*-cumárico glicosilado, isômero do (*Z*)-melilotosídeo. Desta forma, pode-se concluir que os valores relatados por Vasänge *et al.*,¹⁸ e por todos os outros que os referenciam,²² são incompatíveis com os deslocamentos químicos previstos para o resíduo de β -D-glicopiranosose substituído na posição 1, tal como existente na estrutura dos melilotosídeos. Schroeder *et al.*¹⁶ também relataram o isolamento de (*E*)-melilotosídeo e disponibilizaram os dados de RMN ¹H, entretanto a atribuição dos sinais dos hidrogênios etilênicos foi invertida e a do sinal do hidrogênio ligado ao carbono *orto* ao carbono oxigenado foi negligenciada.

Neste trabalho são relatados os dados físicos e espectrais dos melilotosídeos (*Z*) e (*E*) (**9** e **10**), cujas estruturas foram determinadas inequivocamente usando sequências modernas de RMN bidimensional, que permitiram a correlação do hidrogênio do carbono anomérico da β -D-glicose com o carbono aromático oxigenado. Os dados físicos do composto **9** são semelhantes àqueles relatados pelo Merck Index para o estereoisômero *E*,¹⁵ enquanto que os do composto **10** são similares aos dados descritos por Calzada *et al.*¹⁷

Assim sendo, pode-se concluir que as estruturas propostas para os melilotosídeos, relatados por Vasänge *et al.*¹⁸ e todos os outros que os referenciam, necessitam ser revisadas para estruturas outras, em que a ligação glicosídica se faça via qualquer carbono que não seja o anomérico. Uma vez que o valor observado (δ 95,0) é compatível com a forma anomérica livre, isso indica que o oxigênio do carbono anomérico não é utilizado na formação da ponte etérea.

Os estereoisômeros do ácido *o*-cumárico glicosilado (**9** e **10**) são apontados como os precursores da cumarina (**1**), um dos constituintes majoritários de *A. cearensis*, visto que o estereoisômero (*E*) (**9**) poderia sofrer isomerização para a forma menos estável (*Z*) (**10**), quando exposto à radiação UV e, em seguida, sofrer lactonização enzimática para dar origem à cumarina (**1**), tal como já foi biossinteticamente comprovado em outra leguminosa, *Melilotus alba*.²⁰

CONCLUSÃO

A investigação fitoquímica de espécimens cultivados de *A. cearensis* conduziu ao isolamento de 10 compostos, dos quais 4 são inéditos no gênero [ácido *p*-hidroxi-benzoico (**7**), aiapina (**8**) e os estereoisômeros (*E*) e (*Z*) do ácido *o*-cumárico glicosilado (**9** e **10**)] e os outros são encontrados também na casca do caule [cumarina (**1**), isocampferídio (**2**), amburosídeos A (**3**) e B (**4**), ácido vanílico (**5**) e ácido protocatecuico (**6**)].^{5,6}

A descoberta da presença dos principais componentes da casca do caule de *A. cearensis* (parte tradicionalmente utilizada pela população e matéria-prima para a fabricação do “xarope-de-cumaru”) em espécimens cultivados representa um avanço importante no conhecimento científico sobre a espécie, visto que o uso medicinal de *A. cearensis* exige uma alternativa economicamente viável e ambientalmente aceitável (fonte renovável), em virtude da ameaça de extinção da planta silvestre. Desse modo, urge a realização de mais estudos químicos (ex.: metabólica, influência edafo-climática na composição dos extratos) e farmacológicos (ex.: uso de diferentes

modelos experimentais) que reforcem a possibilidade de substituição da planta silvestre por plantas jovens de *A. cearensis* cultivadas, obtidas por sementeira.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/CAPES/FUNCAP/PRONEX/FINEP/BNB pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Carvalho, P. E. R.; *Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira*, EMBRAPA: Brasília, 1994.
- Maia, G. N.; *Caatinga: Árvores e Arbustos e Suas Utilidades*, D & Z Editora: São Paulo, 2004.
- Leal, L. K. A. M.; Matos, M. E.; Matos, F. J. A.; Ribeiro, R. A.; Ferreira, F. V.; Viana, G. S. B.; *Phytomedicine* **1997**, *4*, 221.
- Leal, L. K. A. M.; Nechio, M.; Silveira, E. R.; Canuto, K. M.; Fontenele, J. B.; Ribeiro, R. A.; Viana, G. S. B.; *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 335.
- Bravo, J. A.; Sauvain, M.; Gimenez, A.; Muñoz, V.; Callapa, J.; Le Men-Olivier, L.; Massiot, G.; Lavaud, C.; *Phytochemistry* **1999**, *50*, 71.
- Canuto, K. M.; Silveira, E. R.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1241.
- Leal, L. K. A. M.; Nobre-Júnior, H. V.; Cunha, G. M. A.; Moraes, M. O.; Pessoa, C.; Oliveira, R. A.; Silveira, E. R.; Canuto, K. M.; Viana, G. S. B.; *Neurosci. Lett.* **2005**, *388*, 86.
- Leal, L. K. A. M.; Costa, M. F.; Pitombeira, M.; Barroso, V. M.; Silveira, E. R.; Canuto, K. M.; Viana, G. S. B.; *Life Sci.* **2006**, *79*, 98.
- Leal, L. K. A. M.; Fonseca, F. N.; Pereira, F. A.; Canuto, K. M.; Felipe, C. F. B.; Fontenele, J. B.; Pitombeira, M. V.; Silveira, E. R.; Viana, G. S. B.; *Planta Med.* **2008**, *74*, 497.
- Leal, L. K. A. M.; Canuto, K. M.; Costa, K. C. S.; Nobre-Júnior, H. V.; Vasconcelos, S. M.; Silveira, E. R.; Ferreira, M. V. P.; Fontenele, J. B.; Andrade, G. M.; Viana, G. S. B.; *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *104*, 198.
- Ramos, K. M. O.; Felili, J. M.; Fagg, C. W.; Sousa-Silva, J. C.; Franco, A. C.; *Acta. Bot. Bras.* **2004**, *18*, 351.
- Ministério do Meio Ambiente; Instrução Normativa nº 6 (23/09/2008), *Diário Oficial da União*, Imprensa Nacional: Brasília, 2008.
- Leal, L. K. A. M.; Pierdoná, T. M.; Góes, J. G. S.; Fonseca, K. S.; Canuto, K. M.; Silveira, E. R.; Bezerra, A. M. E.; Viana, G. S. B.; *Phytomedicine*, submetido.
- Debenedetti, S. I.; Nadinic, E. L.; Coussio, J. D.; Kimpe, N.; Bocykens, M.; *Phytochemistry* **1998**, *48*, 702.
- Budavari, S.; O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; Kinneary, J. F.; *The Merck Index- an Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals*, 12th ed., Merck Co: New Jersey, 1996; Pouchert, C. J.; Behnke, J.; *The Aldrich Library of ¹³C, ¹H FT NMR Spectra*, 1st ed., Aldrich Chemical Company: Milwaukee, 1993.
- Djerassi, C.; Connolly, J. D.; Faulkner, D. J.; Mori, K.; Nakanishi, K.; Ourisson, G.; Raphael, R. A.; Shamma, M.; Tamm, C. H.; *Dictionary of Natural Products*, 1st ed., Chapman & Hall: London, 1994; Schroeder, C.; Lutterbach, R.; Stockigt, J.; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 925.
- Calzada, F.; Velázquez, C.; Cedillo-Rivera, R.; Esquivel, B.; *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 731.
- Vasänge, M.; Liu, B.; Welch, C. J.; Rolfsen, W.; Bohlin, L.; *Planta Med.* **1997**, *63*, 511.
- Prats, E.; Bazzalo, M. E.; Leon, A.; Jokkin, J. V.; *Euphytica* **2006**, *147*, 451.
- Dewick, P. M.; *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*, 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 2002.
- Purohit, M. C.; Rawat, M. S. M.; Pant, G.; Nautiyal, A. K.; Sakakibara, J.; Kaiya, T.; *Phytochemistry* **1993**, *32*, 431.

22. Yang, L.; Han, H.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Wang, Z.; Xu, L.; *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 696; Cottiglia, F.; Bonsignore, L.; Casu, L.; Deidda, D.; Pompei, R.; Casu, M.; Floris, C.; *Nat. Prod. Res.* **2005**, *19*, 117; Vega, M. R. G.; Carvalho, M. G.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; *J. Nat. Med.* **2008**, *62*, 122.
23. Breitmaier, E.; Voelter, W.; *¹³C NMR Spectroscopy: methods and applications*, Verlag Chemie: Düsseldorf, 1974; Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C.; *Structure Determination of Organic Compounds- Tables of Spectral Data*, Springer-Verlag: Heidelberg, 2000.
24. Rasmussen, S.; Wolff, C.; Rudolph, H.; *Phytochemistry* **1996**, *42*, 81.