

Jacaranda micrantha Cham.: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO
DE 1-HIDRÓXI-4-OXO-2,5-CICLOHEXADIEN-1-ACETATO
DE ETILA, ENSAIOS ANTINEOPLÁSICOS,
ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚRGICOS

Maria Cladis Mezzomo da Silva

Departamento de Química. Centro de Ciências Naturais e Exatas.UFSM.
Santa Maria, RS.

Luiz Bauer

Departamento de Produção de Matéria Prima. Faculdade de Farmácia.
UFRGS. Porto Alegre, RS.

RESUMO

A partir do extrato clorofórmico de folhas de *Jacaranda micrantha* Cham., isolou-se um fitoquinol sendo o mesmo identificado como 1-hidrôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila.

O composto isolado foi testado, com a finalidade de verificar uma possível atividade antibacteriana e antifúngica. Os testes foram negativos contra os fungos *Aspergillus niger* ATCC 16404 e *Candida albicans* ATCC 10231, demonstrando, por outro lado, atividade de contra as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

O extrato clorofórmico foi testado com respeito a sua atividade antineoplásica, obtendo-se resultados negativos.

SUMMARY

SILVA, M.C.M., and BAUER, L., *Jacaranda micrantha* Cham.: Isolation and identification of 1-hydroxy-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-ethylacetate. Antitumor, antibacterial and antifungal analysis. *Ciência e Natura*, 5:7-18.

A phytoquinol from chloroform extract *Jacaranda micrantha* Cham. leaves was isolated and identified as a 1-hydroxy-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1 ethyl acetate compound.

The composition was analysed to check for possible antifungi and antibacteria activity. The tests resulted negative on *Aspergillus niger* fungi (ATCC 16404) and on *Candida albicans* (ATCC 10231) but uncovered antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Chloroformic extract was tested as to its antineoplastic activity. The test resulted negative.

INTRODUÇÃO

Jacaranda micrantha Cham., vulgarmente conhecida como caroba, carobão ou paraparaí é uma árvore de 10 a 25 m de altura. A

sua ocorrência natural se estende desde o Estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, sendo também encontrada no Paraguai e na região de Misiones, na Argentina (15).

Na literatura há referências de várias substâncias isoladas do gênero *Jacaranda*. Neste gênero, foram encontrados compostos fenólicos tais como ácido cafêico (7), hidroquinona e flavonóides. Entre os flavonóides, é apontada a presença de quercetina (7) e escutelareína-7-glicuronosídeo (18). Ainda foram encontradas triterpenos pentacíclicos, enquadrados no grupo da α -amirina e do lupeol. Os triterpenos pertencentes ao grupo da α -amirina são: ácido ursólico isolado das folhas da *Jacaranda caucana* (12) e dos frutos de *Jacaranda acutifolia* (18), ácido jacarândico (12) e ácido jacumárico (13). Estes dois últimos compostos foram encontrados, também, na *Jacaranda caucana* (12).

No grupo do lupeol, encontramos o ácido betulínico, isolado das cascas da *Jacaranda caucana* (12) e a lupenoma, das cascas de *Jacaranda mimosaefolia* (8).

Em 1976, OGURA *et alii*, isolaram da *Jacaranda caucana* um éster metílico do p-benzoquinol, a jacaranona, a qual apresentou ação inibidora contra a leucemia linfocítica P 388, tanto *in vitro* como *in vivo* (11) (I).

Em *Jacaranda mimosaefolia* foi identificado o éster etílico do p-benzoquinol (17) (II) sendo isolado por Borges, das folhas de *Jacaranda puberula*. Entretanto, este quinol não apresentou atividade antineoplásica como a jacaranona (3).

Além da atividade antineoplásica evidenciada pela jacaranona, anteriormente citada, são referenciadas outras ações farmacológicas das benzoquinonas em geral.

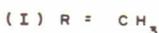
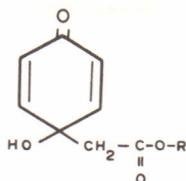
Deste modo, a benzoquinona e a quinonazina possuem atividade molusquicida, agindo contra os caramujos planorbídeos, hospedeiros intermediários de diversas espécies de *Shistosoma* (9).

As quinonas possuem propriedades fungicida, antihelmíntica e antimicrobiana, contra germes gram positivos (14).

O presente estudo teve por finalidade, o isolamento e a identificação de um componente quinol das folhas da *J. micrantha*, bem como a verificação através de métodos microbiológicos, da atividade antibacteriana e antifúngica do respectivo composto. Outrossim, observou-se a atividade antineoplásica do extrato clorofórmico das folhas do referido vegetal.

EXPERIMENTO

A partir de 230 g de folhas do vegetal, secas ao ar, foi feita uma extração preliminar com etanol, em Soxhlet. A solução eta



nôlica obtida, foi concentrada até pequeno volume de consistência xaroposa. Adicionou-se 250 ml de água. Esta solução aquosa foi esgotada com éter de petróleo e depois com clorofórmio. A fase clorofórmica, após ser concentrada foi enviada ao National Cancer Institute (U.S.A.) para ser submetida a ensaios antineoplásicos realizados de acordo com os procedimentos normalmente empregados por aquela entidade (5, 10). Foram efetuados testes *in vivo* em camundongos possuidores de leucemia linfocítica P 388 (ensaio 3PS31), medindo-se através destes ensaios, o aumento de vida dos animais testados, em relação ao do grupo controle. O resultado é expresso pela razão T/C que é a relação entre o tempo médio de sobrevivência dos animais tratados e o tempo médio de sobrevivência dos animais do grupo controle, multiplicado por 100. O teste é positivo para um T/C igual ou superior a 130%.

A seguir, procedeu-se o isolamento do composto, utilizando-se 5,5 kg de vegetal. Seguiu-se o procedimento descrito por OGURA *et alii.* (11). A Figura 1 mostra o esquema dos procedimentos utilizados até a obtenção do composto isolado. Com a substância isolada foram realizados espectros UV, IV, RM¹H, RMN¹³C e EM.

Acetilação do quinol

50 mg do composto foram acetilados com uma mistura de anidrido acético: piridina (1:2) (3 ml) (11). Obteve-se um óleo amarelo claro, que foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa de sílica gel. Com o acetato obtido foi realizado espectro infra-vermelho.

Testes antibacterianos e antifúngicos da substância isolada

Para estas avaliações usou-se os seguintes microorganismos:

- *S. aureus* (ATCC 6538 P)
- *S. aureus* (ATCC 25923)
- *Aspergillus niger* (ATCC 10231)
- *Candida albicans* (ATCC 16404)

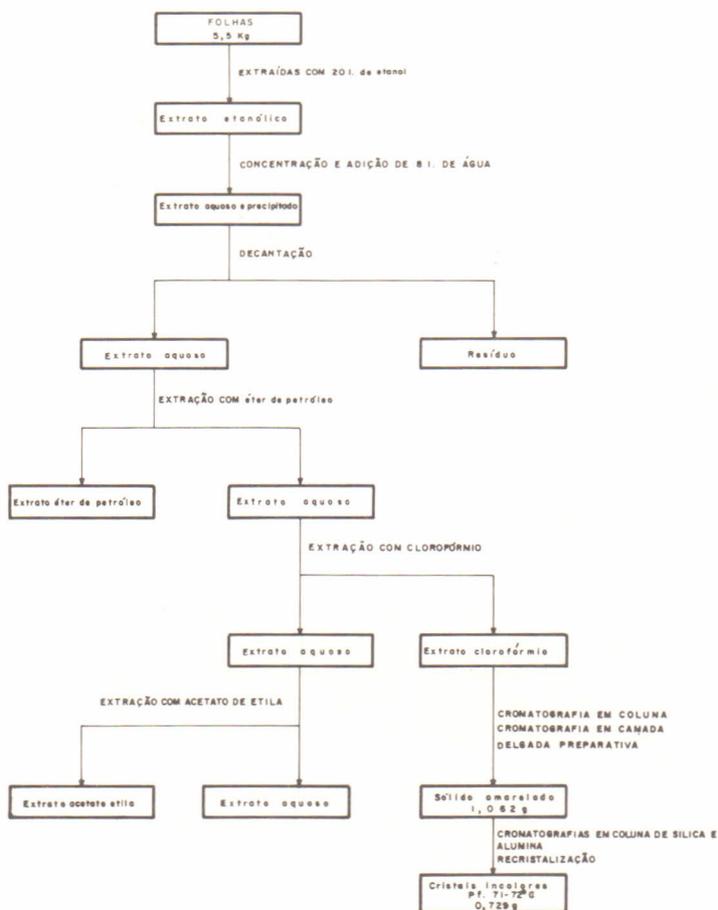


Figura 1. Diagrama da extração e isolamento de 1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila.

Este microorganismos foram escolhidos em função da bibliografia consultada (14) que indicou atividade contra germes gram positivos e fungos e, em razão de disponibilidades laboratoriais.

Para a determinação das atividades antibacteriana e antifúngica, foi usado o "Método por Difusão em Placas" preconizado pelo Code of Federal Regulation (4).

Usou-se padrões internacionais de antibióticos distribuídos pela Organização Mundial da Saúde (O.M.S.), para maior segurança na expressão dos resultados da análise da substância em estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A substância isolada de *Jacaranda mierantha* foi identi

cada como 1-hidrôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila, por comparação com amostra autêntica. A comparação foi realizada por ponto de fusão misto, co-cromatografia em camada delgada e dados espectroscópicos.

Sinonímia: 4-carboetôximetil-4-hidrôxi-2,5-ciclohexadien-1-ona (6) e 4-carboetôximetil-p-quinol (16).

Cistais incolores, p.f. 71 - 72°C (rec. em n-Hexano).

Fórmula molecular: $C_{10}H_{12}O_4$, P.M. (calc.): 196,20

Dados espectroscópicos

MeOH

λ : 226 nm (log = 4,109)

max

KBr

ν max. (cm^{-1}): 3260 (f, 1), 1725 (f), 1670 (f), 1620 (f),
1460 (m), 1379 (m), 1170 (f), 1069 (m) 865
(f)

RM^1H (100 MHz, $CDCl_3$): 1,26 (t, J 7 Hz, $-CH_2-CH_3$), 2,71 (s, $-CH_2-COO-$), 4,17 (qd, J 7 Hz, $-COO-CH_2-CH_3$), 4,43 (banda larga, $-OH$, que desaparece com D_2O), 6,14 (m, J 10 Hz, H-3 e H-5), 6,98 (m, J 10 Hz, H-2 e H-6).

EM: M^+ 196 (1,2%), m/e (%), 150 (15,5), 122 (16,6), 110 (8,8), 109 (100,0), 108 (5,7) 94 (6,4) 88 (67,1) 82 (11,5), 81 (24,0), 80 (6,3), 70 (10,3), 61 (17,2), 60 (39,8), 55 (7,3), 54 (7,3), 53 (10,3), 51 (7,7), 45 (8,3) 43 (23,3), 42 (20,8), 41 (5,2), 26 (28,0), 25 (6,3).

O acetato preparado com a substância isolada mostrou espectro infra-vermelho, similar ao acetato preparado com 1-hidrôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila. Portanto, 1-acetôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila apresentou as seguintes absorções ao IV:

KBr

ν (cm^{-1}): 3038 (f), 2980 (f), 2850 (f), 1730 (f), 1235 (f, 1)

max

Além dos espectros IV, UV, RMN^1H e EM realizou-se espectro de $RMN^{13}C$ do composto isolado de *Jacaranda mierantha*. (Figuras 2 e 3).

$RMN^{13}C^{a,b}$: 14,074 (q, 51), 44,16 (t, 68), 61,16 (t, 44), 67,19 (s, 34), 127,60 (d, 198), 149,94 (d, 158), 169,62 (s, 36), 185,24 (s, 28) (Figuras 2 e 3).

A Figura 4, mostra dados comparativos dos espectros de $RMN^{13}C$ de jacaranona (11) e de 1-hidrôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-

acetato de etila. Nota-se que os carbonos comuns apresentam sinais em regiões muito próximas nos espectros.

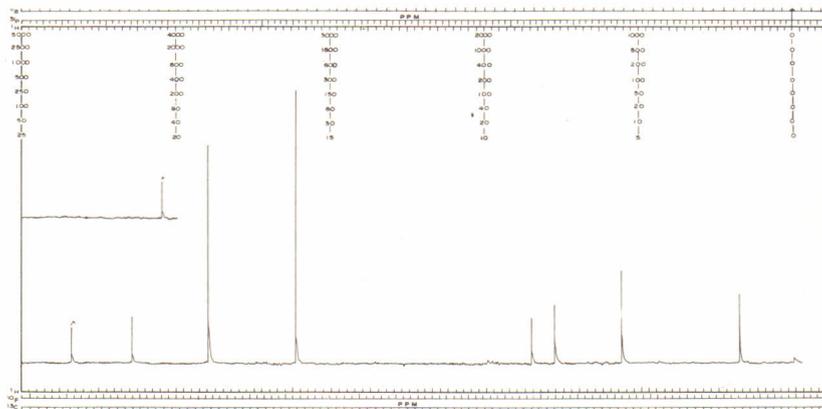


Figura 2. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C de 1-hidróxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila.

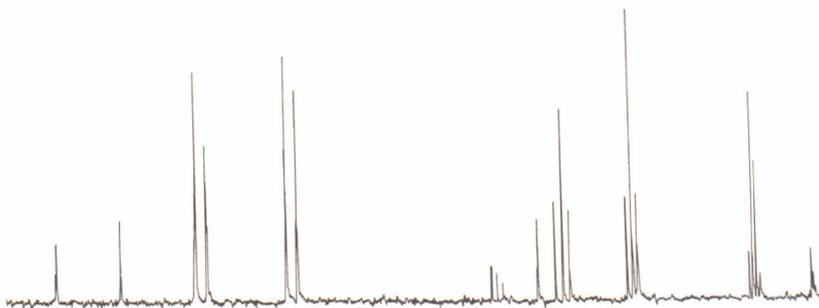


Figura 3. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C de 1-hidróxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila. (SFORD)

C-1 1-hidróxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila	185,24 ppm
jacaranona	185,00 ppm
C-2,C-6 1-hidróxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila	127,60 ppm

- a) Espectro realizado em CDCl_3 a 25,2 MHz em espectrômetro Varian XL-100, TF.
- b) As letras entre parênteses referem-se a multiplicidade do sinal obtido pela técnica SFORD. S= singleto, d=dubleteo, t= tripleteo, q= quadrupleteo.

	jacaranona	128,20 ppm
C-3,C-5	1-hidrôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila	149,94 ppm
	jacaranona	149,00 ppm
C-4	1-hidrôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila	67,19 ppm
	jacaranona	67,30 ppm
C-7	1-hidrôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila	44,16 ppm
	jacaranona	43,40 ppm
C-8	1-hidrôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila	169,62 ppm
	jacaranona	171,00 ppm

As bandas em 16,16 ppm e 14,07 ppm pertencem ao grupo etila do éster, sendo que o metileno é responsável pelo pico em 61,16 ppm (triplete no espectro SFORD), o qual está dentro da faixa de carbonos sp^3 ligados a átomo eletronegativo (Figura 4).

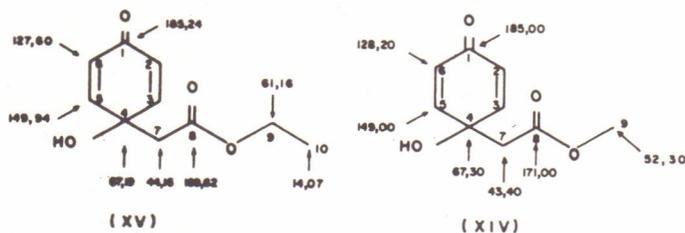


Figura 4. Dados comparativos dos espectros de RMN ^{13}C de 1-hidrôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila (XV) e de jacaranona (XIV). Numeração de acordo com o trabalho de OGURA e colaboradores (16).

Este quinol também foi encontrado em três espécies da família Compositae da tribo Senecionae - *Senecio abrotanifolius* L.(2), *Emilia coccinea* (Sims) G. Don e *E. sagittata* (Vahl) DC. (1), sendo isolado recentemente das folhas da *Jacaranda puberula* Cham.(3).

Relacionando as espécies já estudadas do Gênero *Jacaranda* Bignoniaceae, *J. caucana*, *J. puberula* e, agora, *J. micrantha*, comprovamos que estas apresentam compostos do tipo 4-carboalcoximetil-p-quinol, sendo que em *J. caucana*, ocorre o 4-carbometoximetil-p-quinol (jacaranona) e, em *J. puberula* e *J. micrantha*, o 4-carboetoxi-metil-p-quinol.

O extrato clorofôrmico não mostrou atividade antineoplásica *in vivo*, sendo que o melhor resultado foi a razão T/C de 106% pa

ra uma dose de 200 mg/kg. Do mesmo modo, o quinol isolado de *Jacaran da puberula*, revelou-se ineficaz contra a leucemia linfocítica P 338 (3).

Por outro lado, o fitoquinol isolado de *J. caucana* por OGURA *et alii*, apresentou atividade antineoplásica, tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo que a diferença entre estes dois quinóis se encontra na porção alcoólica da função éster (11).

Supõe-se que o grupo metoxila, na porção éster, foi significativo para a inibição da leucemia linfocítica P 388, *in vivo*, visto que a substituição deste grupo metoxila por uma etoxila eliminou a atividade antineoplásica.

OGURA *et alii* (11) relacionaram esta atividade também com a hidroxila terciária do quinol, pois, após a acetilação desta hidroxila não houve mais ação antineoplásica da jacaranona.

Com relação aos testes antibacterianos e antifúngicos da substância isolada, os valores encontrados para as zonas de inibição para o padrão e amostras ensaiadas nas condições descritas, encontram-se nas Tabelas I, II, III e IV, respectivamente, contra *S. aureus* ATCC 6538P e ATCC 25923. As retas de melhor ajuste estão expostas nas Figuras 5 e 6 e às concentrações na Tabela V.

TABELA I. VALORES ENCONTRADOS PARA A CURVA PADRÃO E AMOSTRA EXAMINADA*. ENSAIO CONTRA STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 6538P.

PRODUTO	CURVA PADRÃO			MÉDIA DA AMOSTRA
	0,5 mcg	1,0 mcg	2,0 mcg	mcg
Neomicina	12,60	14,60	15,27	13,93

* Respostas de quatro ensaios.

TABELA II. VALORES CALCULADOS PARA L E H.

Produto	L	H
Neomicina	12,82	15,49

Para os fungos testados e, nas condições do ensaio, empregando como antibiótico padrão, solução de nistatina, não foram obtidos halos de inibição de amostra, indicando com isso, ausência de atividade antifúngica da substância isolada. Esta substância, porém, apresentou atividade antibacteriana frente às espécies de *Staphylococcus* utilizadas no ensaio. Deste modo, comparando as Figuras 5 e 6,

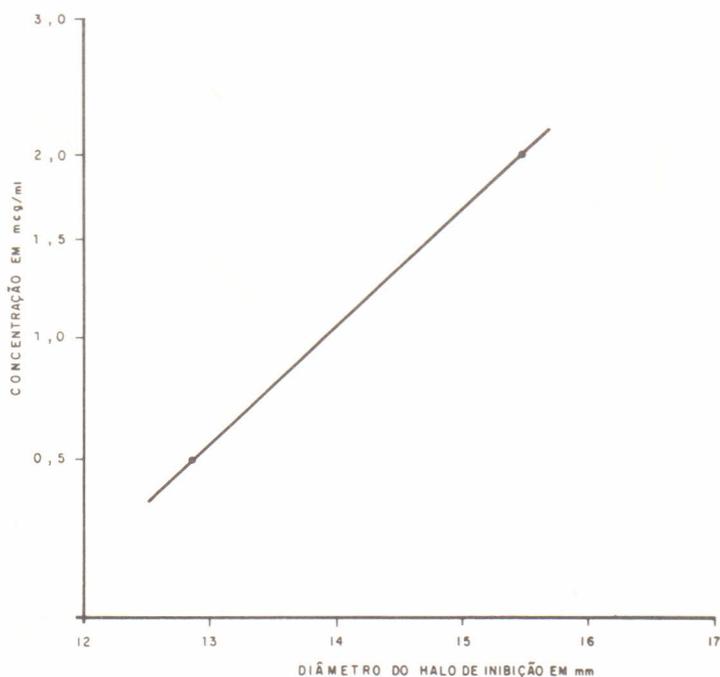


Figura 5. Curva padrão para Neomicina. Ensaio contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P.

TABELA III. VALORES ENCONTRADOS PARA A CURVA PADRÃO E AMOSTRA EXAMINADA*. ENSAIO CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923.

PRODUTO	CURVA PADRÃO			MÉDIA DA AMOSTRA
	0,5 mcg	1,0 mcg	2,0 mcg	mcg
Neomicina	13,80	14,90	16,67	15,92

* Respostas de quatro ensaios.

TABELA IV. VALORES CALCULADOS PARA L E H.

PRODUTO	L	H
Neomicina	13,69	16,56

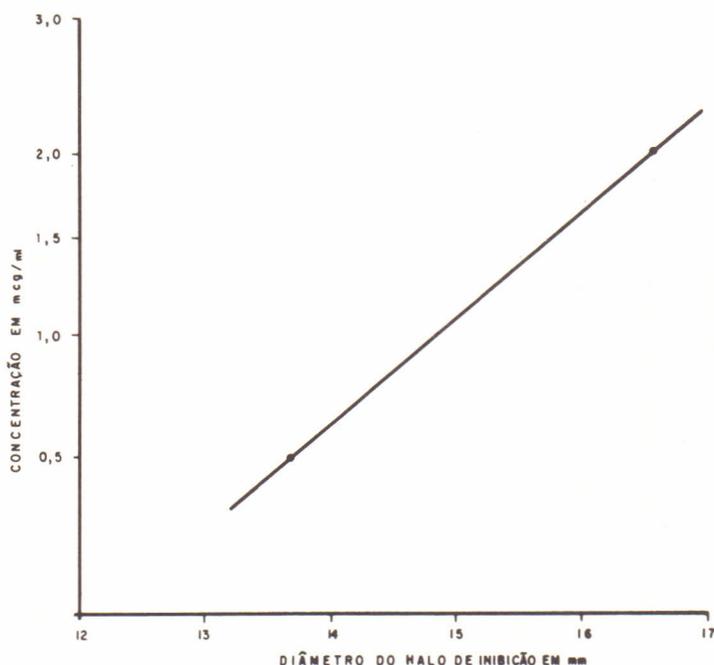


Figura 6. Curva padrão para Neomicina. Ensaio contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

TABELA V. CORRELAÇÃO ENTRE POTÊNCIA DO ANTIBIÓTICO E A QUANTIDADE DA AMOSTRA TESTADA.

MICROORGANISMOS TESTES	CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE NEOMICINA	CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRA
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P	0,8 mcg/ml	6000 mcg/ml
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1,56 mcg/ml	3000 mcg/ml

verifica-se que as amostras intercalam-se entre 0,5 e 2,0 mcg de antibiótico/ml, o que poderá possibilitar uma utilização do produto extraído como substância antibiótica.

CONCLUSÕES

O componente quinol, isolado do extrato clorofórmico de *J. micrantha* e o 1-hidrôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila, foi identificado por comparação com amostra autêntica, utilizando-se

ponto de fusão misto, co-cromatografia em camada delgada e métodos espectroscópicos.

Após avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do composto isolado, constatou-se que o mesmo apresentou atividade antibacteriana, sendo destituído de atividade antifúngica. O extrato clorofórmico da *J. micrantha* não mostrou atividade antineoplásica *in vivo* contra a leucemia linfocítica P 338.

O tipo de composto, 4-carboalcoximetil-p-quinol, isolado de *J. caucana*, *J. puberula*, *J. mimosaeifolia* e *J. micrantha* vem reforçar a relação quimiotaxonômica entre estas espécies da Família *Bigoniaceae*.

BIBLIOGRAFIA CITADA

1. BOHLMANN, F. & KNOLL, K. New acetylenic compounds from *Emilia* species. *Phytochemistry*, Oxford, 17(3): 577-8, 1978.
2. BOHLMANN, F. & SUWITA, A. Über die inhaltsstoffe von *Senecio abrotanifolius* L. *Chemische Berischte*, Berlin, 109(6):2014-20, 1976.
3. BORGES, P. A. L. Isolamento de 1-hidrôxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila de *Jacaranda puberula* Cham. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curso de Pós-graduação em Farmácia, 1980, 49f. Diss. mestr. farmácia.
4. CODE of federal regulations, Título 21, Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1978, p.223-35, 746.
5. GERAN, R. I. *et alii*. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemoterapy Reports*; Part 3, Washington D.C., 3 (2): 1-103, 1972.
6. GOODWIN, S. & WITKOP, B. Quinol intermediates in the oxidation of phenols and their rearrangements. *Journal of the American Chemical Society*, Washington D.C., 79(1): 179-85, 1957.
7. HEGNAUER, R. *Chemotaxonomie der pflanzen*. Basel, Birkhäuser, 1964, v.3, p.276.
8. JOSHI, K. C. *et alii*. Components of the stem barks of *Phyllarthron comorense* and *Jacaranda mimosaeifolia* and the roots of *Desmodium pulchellum*. *Indian Journal of Chemistry*, B, New Delhi, 13 (8): 869-70, 1975. Apud *Chemical Abstracts*, Columbus, 83(17):144550, 1975.
9. MINGOLA, Q. *Química farmacêutica*, São Paulo, Edgard Blücher, 1967. p. 677.
10. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Drug Evaluation Branch. *Screening date summary interpretation and outline of current screen; instruction 14*. Bethesda, 1978-9. p. 1-28.

11. OGURA, M. *et alii*. Potential anticancer agents. III. Jacaranone, a novel phytoquinoid from *Jacaranda caucana*. *Lloydia. Cinnatti*, 39 (4): 255-7, 1976.
12. _____ . Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae). *Lloydia, Cinnatti*, 40 (2): 157-68, 1977.
13. _____ . Jacoumaric acid, a new triterpene ester from *Jacaranda caucana*. *Phytochemistry*, Oxford, 16(2):286-7, 1977.
14. PARIS, R.R. & MOYSE, H. *Precis de matière medicale*. Paris, Masson, 1971. v.1, p. 78.
15. REITZ, R. *et alii*. *Projeto madeira de Santa Catarina*. Itajaí, *Su desul*, 1978. p.66-72.
16. SIEGEL, A. & KECKEIS, H. Über eine modifizierte form der reformatski-reaktion. *Monatshefte fuer Chemie*, Wien, 84:910-8, 1953.
17. SILVA, M.C.M. da *et alii*. 1-hidrõxi-4-oxo-2,5-ciclohexadieno-1-acetato de etila em *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don - Bignoniaceae. *Ciência e Natura*, Santa Maria, (3): 41-44, 1981.
18. SUBRAMANIAN, S.S. *et alii*. Flavonoids of eight bignoniaceus plants. *Phytochemistry*, Oxford, 11(4): 1499, Apr. 1972.
19. ZIRVI, K.A. & AMIR, F. Chemical investigation of *Jacaranda acutiifolia*. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, Karachi, 16 (5): 178, 1973. APud *Chemical Abstracts*, Columbus, 81 (3): 10958e, 1974.

Recebido em outubro, 1983; aceito em novembro, 1983.