

ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO DA ORQUÍDEA *Oeceoclades maculata*

Paula Cristina Perin (PIBIC/CNPq/UEM)*, Beatriz Vesco (IC), Silvana Maria de Oliveira (PQ), Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierrez (PQ), Melyssa Norman Negri (PQ), Armando Mateus Pomini (Orientador), e-mail: paulac.perin@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / *Centro de Ciências Exatas / DQI / Maringá, PR

Ciências Exatas e da Terra - Química

Palavras-chave: Produtos naturais, *Oeceoclades maculata*, fitoquímica, Vero

Resumo:

Realizou-se o estudo fitoquímico da fração hexânica do extrato da orquídea *Oeceoclades maculata* (*Orchidaceae*), bem como ensaios antiproliferativos contra células Vero. O material vegetal foi coletado no Parque do Ingá, no município de Maringá, triturado e submetido a extrações exaustivas com metanol, obtendo o extrato bruto. Em seguida, o extrato bruto foi particionado por meio de lavagem com solventes em gradiente de polaridade. A fração hexânica foi submetida a técnicas clássicas de purificação por cromatografia e para identificação e caracterização dos metabólitos secundários isolados foram utilizadas técnicas espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Da fração Hexânica foram isolados e caracterizados um triterpeno cicloartano, o ciclolaudenol, e os esteroides campesterol, sitosterol e estigmasterol, sendo este o primeiro relato destas substâncias nesta espécie de orquídea. Ensaios antiproliferativos mostraram baixa atividade biológica para o extrato bruto e fração hexânica contra células Vero.

Introdução

Os produtos naturais sempre estiveram presentes na vida humana. Ao longo de todo o desenvolvimento da civilização, o ser humano buscou na natureza produtos para sua alimentação e fármacos (DEWICK, 2001). A aplicação das orquídeas na medicina tradicional é histórica no velho mundo, de modo que há 365 espécies publicadas na Matéria Médica Chinesa (KONG, 2003). Porém, existe uma grande escassez de informação a respeito do uso de orquídeas presentes nas Américas como plantas medicinais, assim como seu perfil fitoquímico (HOSSAIN, 2011).

Portanto, o objetivo deste trabalho consistiu em isolar e caracterizar quimicamente as substâncias produzidas pela espécie *Oeceoclades maculata* (*Orchidaceae*, Figura 1) e presentes em sua fração hexânica, afim de aprofundar o conhecimento de nossa flora, já que esta é uma orquídea presente em várias regiões do Brasil. Outrossim, ensaios antiproliferativos com o extrato bruto e fração hexânica desta espécie foram realizados contra células Vero.



Figura 1 - Espécie *Oeceoclades maculata*.

Materiais e métodos

O material vegetal (*O. maculata*) foi coletado em 2017, no Parque do Ingá, no município de Maringá, pela Profa. M. A. M. Gutierre (DB, UEM). O material vegetal fresco (3,1 kg) foi lavado, triturado e submetido a extrações exaustivas com metanol a temperatura ambiente, obtendo 79,0 g de extrato bruto após evaporação sob pressão reduzida. Em seguida, o extrato bruto foi particionado por meio de agitação com solventes em gradiente de polaridade, sendo utilizados hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água (ALMEIDA et al., 2014) obtendo-se as respectivas frações. Parte da fração hexânica (FH), massa de 5,23 g, foi submetida a cromatografias em coluna, que foram realizadas utilizando como fase estacionária sílica gel 60, variando a quantidade de sílica e o diâmetro da coluna de acordo com a quantidade de amostra e eluições com solventes orgânicos hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Os perfis das frações coletadas foram analisados por meio da cromatografia em camada delgada, sendo as placas cromatográficas preparadas com fase estacionária sílica-gel 60G, com 0,25 mm de espessura. Para melhor visualização das substâncias nas placas cromatográficas foi utilizado o revelador anisaldeído, seguido de aquecimento. Para identificação e caracterização dos metabólitos secundários foram utilizadas técnicas espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) em 1-D (^1H em 300 MHz e 500 MHz, ^{13}C em 75 MHz e 125 MHz, e DEPT) e em 2-D (COSY, HMBC, HSQC).

As avaliações das atividades citotóxicas foram realizadas no laboratório de cultura e tecido (DAB-UEM). Lavou-se as garrafas contendo as células Vero (linhagem de células de rim de macaco verde africano) com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), e adicionou-se 1ml de tripsina - ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) GIBCO– Gibco para desprender as células das paredes da garrafa. Logo após, todo o conteúdo foi transferido para um falcon e realizou-se a contagem das células em câmara de Neubauer e ajustado para 2×10^5 células/ml com RPMI 1640 tamponado com 2g/L de bicarbonato de sódio, contendo 5% de soro fetal bovino, 0,5% de anfotericina B e 0,5% de penicilina/estreptomicina. Em placas de 96 poços, distribuíram-se 200 μl do inóculo, sendo realizado o ensaio em duplicata. Incubou-se a placa em estufa de CO_2 a 25 °C por 24 horas. Testaram-se as amostras extrato bruto e fração hexânica nas concentrações das 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ em RPMI sem soro e sem antibióticos. A placa foi novamente incubada em estufa de CO_2 por 24 e 48 horas. Lavou-se cada poço com 200 μl de PBS e adicionou-se 100 μl de MTT (Invitrogen, USA) (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -5- [3-

carboximetilfenil] -2- [4-sulfofenil] -2H-tetrazólio) diluído (1:10 em Demem sem fenol). Após 3 horas o meio foi retirado dos poços contendo as células e então foi transferido para novos poços e realizou-se uma leitura em ELISA a 492 nm.

Resultados e Discussão

A partir do estudo da fração Hexânica foram isolados e identificados quatro compostos (Figura 2) inicialmente nomeados de Hx 1, Hx 2, Hx 3 e Hx 4.

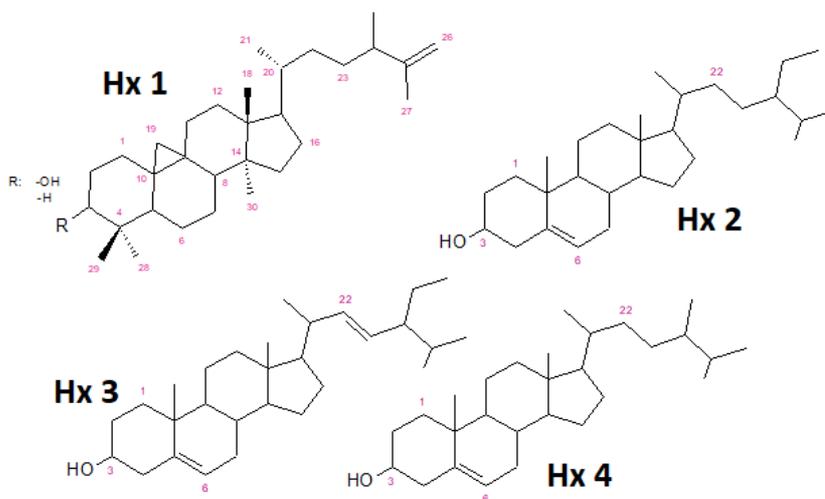


Figura 2 – Substâncias identificadas na orquídea *Oeceoclades maculata*.

A substância Hx1 foi isolada por meio de uma purificação por lavagem com acetona. Apresentou-se como um sólido cristalino solúvel em clorofórmio. O espectro de RMN de ^1H apresentou dois dupletos em δ_{H} 0,33 ($J = 4,26$ Hz) e δ_{H} 0,55 ($J = 4,26$ Hz), correspondentes aos dois hidrogênios característicos do esqueleto de cicloartanos, além do duplete de duplete em δ_{H} 3,29, que se refere ao hidrogênio ligado ao carbono carbonílico (C-3). No espectro de RMN de ^{13}C pode-se observar a presença do sinal em 79,05 ppm referente ao carbono carbonílico e os sinais em 152,63 ppm e 109,48 ppm referentes aos carbonos C-25 e C-26, respectivamente. Através da comparação dos dados obtidos no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C com os dados da literatura (CANTILLO-CIAU et al., 2001) concluiu-se que a substância Hx1 refere-se ao ciclolaudenol.

A mistura das substâncias Hx 2, Hx 3 e Hx 4, foi isolada mediante a purificação por lavagem com hexano, apresentando-se como um sólido cristalino branco solúvel clorofórmio. No espectro de RMN de ^1H foi observado um multiplete em δ_{H} 3,53 referente ao hidrogênio ligado ao carbono carbonílico (C-3). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou um sinal em δ_{C} 71,8, atribuído ao carbono carbonílico (C-3). Além disso, foram observados os sinais em δ_{C} 140,8, δ_{C} 121,7, δ_{C} 138,3 e δ_{C} 129,3 referente aos carbonos C-5, C-6, C-22 e C-23, respectivamente. Através da comparação dos dados obtidos no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C com os dados da

literatura (GOULART, 1993), foi possível determinar que a mistura continha os esteroides sitosterol, estigmasterol e campesterol, sendo inicialmente nomeados de Hx 2, Hx 3 e Hx 4, respectivamente.

Os ensaios contra células Vero mostraram baixa atividade biológica para as amostras extrato bruto e fração hexânica, com IC₅₀ de 66,54 e 81,13 µg/mL, respectivamente.

Conclusões

O estudo fitoquímico da fração hexânica da orquídea *Oeceoclades maculata* resultou no isolamento e caracterização de um triterpeno cicloartano, o ciclolaudenol, e dos esteroides campesterol, sitosterol e estigmasterol, sendo este o primeiro relato destas substâncias nesta espécie de orquídea. A fração hexânica e o extrato bruto da planta foram pouco ativos contra células Vero.

Agradecimentos

UEM, CNPQ e PIBIC/ CNPQ-FA-UEM

Referências

ALMEIDA, T. L.; MONTEIRO, J.A.; LOPESA, G. K. P.; CHIAVELLIA, L. U. R.; SANTIN, S. M. O.; SILVA, C. C.; KAPLUMB, V.; SCARIOT, D. B.; NAKAMURA, C. V.; RUIZ, A. L. T.G.; CARVALHO, J. E.; FARIA, R. T.; POMINI, A. M. **Estudos Químicos e atividades antiproliferativa, tripanocida e leishmanicida de *Maxillaria picta***. Química Nova, v. 37, p. 1151-1157, 2014.

CANTILLO-CIAU, Z.; BRITO-LOEZA, W.; QUIJANO, L. **Triterpenoids from *Tillandsia fasciculata***. Journal of Natural Products v. 64, p. 953-955, 2001.

DEWICK, P. M.; **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**, John Wiley & Sons: New York, 2ª ed. 2001.

DEWICK, P. M.; **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**, John Wiley & Sons: New York, 2ª ed. 2001.

GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CALVACANTE, S. **Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elleptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrofolanos A e B**. Química Nova, 16(2): 95-100, 1993.

HOSSAIN, M. M. **Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances - An overview**. Fitoterapia, v.82, p.102-140, 2011.

KONG, J.M.; GOH, N.K.; CHIA, T.F. **Recente advances in traditional plant drugs and orchids**. Acta Pharmacologica Sinica, v. 24, n. 1, p 7-21, 2003.