

ESTUDO QUÍMICO DOS GALHOS DA ESPÉCIE *Piptocarpha axillaris* (ASTERACEAE)

José Victor Szpak (PIBIC-AF-IS)¹, José Guilherme de Souza Corrêa (PG)¹, Mirelli Bianchin (PG)¹, Ana Lucia Tasca Gois Ruiz (PQ)², Silvana Maria de Oliveira Santin (Orientador)¹, e-mail: smoliveira@uem.br.

¹ Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR

² Universidade Estadual de Campinas / Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)/ Campinas, SP

Ciências Exatas e da Terra 10000003- Química Dos Produtos Naturais 10601058

Palavras-chave: *Piptocarpha*, Asteraceae, Fenólicos totais.

Resumo:

O gênero *Piptocarpha*, pertencente à família **Asteraceae**, compreende 50 espécies, sendo nove encontradas no Paraná. Para este gênero são descritos o isolamento de substâncias bioativas das classes dos terpenoides e flavonoides, contudo são poucos os trabalhos desenvolvidos com seus representantes. Em virtude da importância do gênero na busca de novas biomoléculas e ausência de estudos químicos com os galhos da espécie *Piptocarpha axillaris*, esse trabalho objetivou avaliar o potencial químico e farmacológico da espécie. Por meio do estudo químico de *Piptocarpha axillaris*, tornou-se possível isolar os terpenoides, estigmasterol, β -sitosterol, estigmasterol glicosilado, daucosterol e lupeol. Na determinação do teor de fenólicos totais pelo método espectrofotométrico de Follin-Ciocalteau foi observado um valor de $70,96 \pm 8,41$ mg GAE/g para o extrato bruto. Foi realizado o ensaio de atividade antiproliferativa frente a linhagens de células tumorais pelo método colorimétrico com sulforrodamina B, sendo observada potente atividade da fração clorofórmica frente a linhagem de pulmão, além de moderadas respostas das frações clorofórmica e acetato de etila frente a linhagem de mama.

Introdução

O gênero *Piptocarpha* está inserido na família **Asteraceae** e sua distribuição natural é neotropical, sendo encontrado na região sul do Brasil, norte da Argentina até a América Central. Este gênero abriga aproximadamente 50 espécies, sendo nove encontradas no Paraná (Grokoviski, Cervi, Tardivo, 2009). São escassos os trabalhos desenvolvidos com espécies desse gênero, entretanto são descritos os isolamentos de terpenoides, especialmente lactonas sesquiterpênicas e triterpenos de esqueletos ursano, oleanano e lupano, além de flavonoides. Do ponto de vista farmacológico, são relatadas atividades antimicrobianas, larvicida e citotóxica (Rodrigues et al., 2006). Do estudo químico com as folhas de *Piptocarpha axillaris* foram descritos isolamento de terpenoides e flavonoides (Pereira et al, 2019) contudo não são descritos estudos químicos e farmacológicos com os galhos desta espécie. Sendo assim, esse trabalho objetivou verificar a composição química dos galhos da espécie *Piptocarpha axillaris* e avaliar o seu potencial antiproliferativo frente a três diferentes linhagens de células tumorais.

Materiais e métodos

Isolamento dos constituintes químicos e teor de fenólicos totais

O material vegetal foi coletado em setembro de 2017, no Parque Estadual do Guartelá (Tibagi- PR). Os galhos secos e moídos (700 g) foram submetidos à extração exaustiva por maceração com metanol a temperatura ambiente, obtendo-se o extrato bruto metanólico (EB- 49,17 g). Parte do EB (40,0 g) foi suspenso em água:metanol (1:1– 120 mL) e particionado com diferentes solventes orgânicos (hexano, clorofórmio e acetato de etila), obtendo-se as frações hexânica (FH- 3,94 g), clorofórmica (FC- 2,04 g), acetato de etila (FAC- 5,71 g) e remanescente hidrometanólica (FHM- 32,2 g). A fração FH (3,00 g) foi submetida a cromatografia em coluna (CC) em gel de sílica 60 (90 g, Θ = 3,0 cm; h= 20 cm) com hex, hex.AcOEt, AcOEt, AcOEt:MeOH, MeOH e MeOH.H₂O em diferentes proporções e volumes fixos (200 mL) obtendo-se 11 sub-frações. A sub-fração PAFH9 (82,9 mg) foi purificada por lavagem com acetona resultando na substância PA-1 (17,0 mg). A sub-fração PAFH3 (954,0 mg) foi submetida a CC em gel de sílica 60 (60 g, Θ = 2,5 cm; h= 30 cm), empregando hex, hex.AcOEt e AcOEt, obtendo-se 32 sub-frações reunidas de acordo com o perfil cromatográfico. A sub-fração PAFH3.6 (48,4 mg) e PAFH3.9 (67,8 mg) foram purificadas por lavagem com acetona, fornecendo as substâncias PA-2 (20,0 mg) e PA-3 (30,0 mg). O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer, Lamuela (1999) utilizando-se ácido gálico como padrão, para esse experimento foi empregado o extrato bruto metanólico dos galhos de *Piptocarpha axillaris*.

Atividade antiproliferativa em células tumorais humanas

Para avaliação do crescimento celular foi utilizado o método colorimétrico com sulforrodamina B (SRB) de acordo com o protocolo padrão descrito pelo Instituto Nacional do Cancer (do inglês *National Cancer Institute- NCI*) empregando doxorrubicina como controle positivo (Monks et al., 1991). Foram avaliadas o extrato bruto (EB) e as frações FH, FC, FAC e FHM e os resultados foram expressos em GI₅₀, sendo a concentração necessária para inibir a proliferação celular em 50%. Foram avaliadas as linhagens tumorais U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células).

Resultados e Discussão

Do estudo químico da fração hexânica obtida do extrato bruto metanólico dos galhos de *Piptocarpha axillaris* foram isoladas as substâncias PA-1, PA-2 e PA-3, nas quais foram caracterizadas com base dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C e 2D e comparações com a literatura.

O espectro de RMN de ¹H da substância **PA-1** indicou sinais típicos de mistura de esteroides glicosilados. Foi observado um duplete em δ_H 5,32 (d; J = 5,1 Hz) atribuído aos hidrogênios olefínicos (H-6) dos dois núcleos esteroidais, dois duplos dupletos em δ_H 5,15 (dd; J = 15,3 e 8,8 Hz) e 5,02 (dd; J = 15,0 e 8,9 Hz) referente aos hidrogênios olefínicos 22 e 23 da estrutura **PA-1.1**, além do multiplete em δ_H 3,40 (m) típico dos hidrogênios carbinólicos H-3. Os sinais do núcleo glicosídico

foram observados como um duplete em δ_H 4,21 (*d*; $J = 7,74$ Hz) atribuído ao hidrogênio anomérico (H-1'). Os sinais em δ_H 2,89 (*m*); 3,12 (*m*); 3,07 (*m*); 3,02 (*m*); 3,64 (*m*) e 3,47 (*m*) foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-3', H-5', H-6'a e H-6'b, respectivamente. Os dados de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura e foram concordantes com os esteroides estigmasterol glicosilado (**PA-1.1**) e daucosterol (**PA-1.2**) (Ridhay et al., 2012; Gangwal et al., 2010).

Por meio dos dados espectroscópicos de RMN de 1H e ^{13}C da substância **PA-2** e comparações com a literatura tornou-se possível caracterizar a mistura de esteroides estigmasterol (**PA-2.1**) e β -sitosterol (**PA-2.2**) (Chaturvedula, 2012).

O espectro de RMN de 1H da substância **PA-3** indicou sinais de hidrogênios olefinicos em δ_H 4,66 (*d*) e δ_H 4,64 (*m*) que correlacionaram com os carbonos em δ_C 109,5 (C-29) e δ_C 151,2 (C-20), sendo correlações típicas de triterpenos de esqueleto lupano. Foi observado ainda, um multiplete em δ_H 3,1 (*m*) que apresentou correlação com o carbono em 79,2 (C-3), sendo típico de hidrogênio e carbono carbinólico. Os demais deslocamentos químicos de 1H e ^{13}C foram comparados com a literatura e foram concordantes com o triterpeno lupeol (Mahato, Kundu, 1994).

O teor de compostos fenólicos totais encontrados no extrato bruto dos galhos de *P. axillaris* foi de $70,96 \pm 8,41$ mg GAE/g extrato bruto, sendo esse a primeira descrição para o gênero *Piptocarpha*. A avaliação da atividade antiproliferativa frente a três diferentes linhagens de células tumorais indicou que a fração FC foi a mais ativa, com $GI_{50} = 9,5 \mu g mL^{-1}$ para a linhagem de pulmão, tipo não pequenas células (NCI-H460). Observou-se ainda uma resposta moderada para as frações FC e FAc frente a linhagem de mama (MCF-7). As demais frações não apresentaram resultados significativos até a máxima concentração avaliada.

Tabela 1: Avaliação do potencial antiproliferativo frente a linhagens de células tumorais do extrato bruto e frações de *Piptocarpha axillaris*

Amostra	GI_{50} ($\mu g mL^{-1}$)		
	U251	MCF-7	NCI-H460
Dox	0,053	<0,025	<0,025
EB	>250	130,0	>250
FH	>250	>250	>250
FC	36,3	26,9	9,5
FAc	32,8	30,8	>250
FHM	>250	>250	>250

U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células).

Inativo: Atividade moderada: $10 < GI_{50} < 30 \mu g mL^{-1}$, Potente atividade: $GI_{50} < 10 \mu g mL^{-1}$ (N'Da, Smith, 2014)

Conclusões

O estudo químico dos galhos de *Piptocarpha axillaris* resultou no isolamento e caracterização dos terpenoides, estigmasterol, β -sitosterol, estigmasterol glicosilado, daucosterol e lupeol. O teor de compostos fenólicos foi determinado e esta sendo a primeira descrição para o gênero. O ensaio de atividade antiproliferativa indicou resultados significativos para as frações, especialmente as frações clorofórmica e acetato de etila.

Agradecimentos

Fundação Araucária, CNPq e FitoSín

Referências

CHATURVEDULA, V. S. P.; PRAKASH, I. Isolation of stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. **International Current Pharmaceutical Journal**. Atlanta, v. 1, n. 9, p. 239-242, 2012

GANGWAL, A.; PARMAR, S. K.; SHETH, N. R. Triterpenoid, flavonoids and sterols from *Lagenaria siceraria* fruits. **Der Pharmacia Lettre**, Rajkot, v. 2, n. 1, p. 307-317, 2010.

GROKOVISKI, L.; CERVI, A. C.; TARDIVO, R. C. O gênero *Piptocarpha* R. Br. (Asteraceae: Vernonieae) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 486-498, 2009.

MAHATO, S. B., KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids- A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, Calcutta, v. 37, p. 1517-1575, 1994.

MONKS, A.D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**. Frederick, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

N'DA, D.; SMITH, P.J. Synthesis, *in vitro* antiplasmodial and antiproliferative activities of a series of quinolone-ferrocene hybrids. **Medicinal Chemistry Research**, Potchefstroom, v. 23, p. 1214-1224, 2014.

PEREIRA, I.S.P.; Vega, M.R.G.; Mathias, M.S.; Ramos, A.C.; Oliveira, R.R.; Paes, M.M.; Kanashiro, M.M. Phytochemical and biological studies *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Campos dos Goytacazes, v. 85, p. 24-30, 2019.

RIDHAY, A., NOOR, A., SOEKAMTO, N. H., HARLIM, T., ALTENA, I. V. A stigmasterol glycoside from the root wood of *Melochia umbellata*. **Indonesian Journal of Chemistry**. Palu, v. 12, p. 100-103, 2012.

RODRIGUES, M. S.; PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J. F.; ESPINDOLA, L. S. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**. Brasília, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods of Enzymology**. New York, v. 299, p.152-178, 1999.