

## ESTUDO QUÍMICO DAS FRAÇÕES APOLARES DAS FLORES DE *Leandra aurea* (Melastomataceae)

Karen Lorraine Oliveira Cruz (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Mirelli Bianchin (Co-orientadora), Silvana Maria de Oliveira (Orientadora), e-mail: smoliveira@uem.br.

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

**Ciências Exatas e da Terra 1000003- Químicas Dos Produtos Naturais 10601058**

**Palavras-chave:** *Melastomataceae*, fitoquímica, atividade antitumoral

### Resumo:

As plantas da família Melastomataceae biossintetizam um diversificado número de metabólitos com reconhecida atividade antitumoral, porém existem espécies que nunca foram estudadas do ponto de vista químico e farmacológico, como é o caso da *Leandra aurea*. Portanto, nesse trabalho realizou-se o estudo fitoquímico das frações hexânica (FH) e clorofórmica (FC) das flores de *L. aurea* e determinou-se capacidade antiproliferativa dessas frações e do extrato bruto frente as linhagens tumorais mama (MCF-7), glioma (U251) e pulmão, tipo não pequenas células (NCI-H460). Da FH foram isolados a flavanona mateucinol e os triterpenos ácido 3-*epi*-ursólico e ácido pomólico, os quais foram identificados com base dos seus dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O extrato bruto (EB) e suas frações apresentaram potencial antiproliferativo para as linhagens avaliadas, com destaque para EB, que exibiu potente atividade antiproliferativa ( $\text{GI}_{50}$ ) frente as linhagens glioma ( $5,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e mama ( $5,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A fração FH foi moderadamente ativa às linhagens de mama ( $12,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e glioma ( $26,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e a FC foi ativa apenas para as células de mama ( $23,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### Introdução

As espécies da família Melastomataceae são ricas em metabolitos secundários das classes dos triterpenos de esqueletos ursano e oleanano, dos flavonoides, dos esteroides e de compostos fenólicos. Embora vários estudos reportem uma diversidade de compostos isolados, apenas algumas espécies dessa família foram extensivamente estudadas. O gênero *Leandra*, por exemplo, possui 200 espécies catalogadas e apenas 3 espécies (*L. lacunosa*, *L. chaetodon* e *L. dasytricha*) foram estudadas quimicamente. Desses poucos estudos foram isoladas substâncias com promissora atividade farmacológica, como por exemplo, o ácido ursólico e os flavonoides canferol, quercetina e luteolina. Portanto, esse trabalho teve como objetivo realizar pela primeira vez o estudo fitoquímico das frações apolares das flores da espécie *Leandra aurea* e avaliar o potencial antiproliferativo do extrato bruto e dessas frações frente a três células tumorais humanas.

### Materiais e métodos

A espécie *Leandra aurea* foi coletada em setembro de 2017 no Parque Estadual do Guartelá (Tibagi-PR). As flores, previamente secas e moídas

(150 g), foram submetidas a maceração exaustiva com metanol (9 vezes) para a obtenção do extrato bruto (EB- 41,85 g). Parte do EB (37,30 g) foi solubilizado em MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) e particionado com solventes orgânicos de diferentes polaridades. Deste processo foram obtidas as frações hexânica (FH- 2,08 g), clorofórmica (FC- 2,44 g), acetato de etila (FAC- 7,05 g) e a remanescente hidrometanólica (FHM- 25,53 g). Parte da fração FH (1,684 g) foi submetida à cromatografia em coluna (CC) em gel de sílica 60 (80 g,  $\phi$  = 4,4 cm; h= 15 cm) com os eluentes (Hex, AcOEt, MeOH e H<sub>2</sub>O), obtendo-se 24 subfrações. A fração FH-5 (150,0 mg) foi submetida à CC em gel sílica 60 (13 g,  $\phi$  = 1,4 cm; h= 22 cm), utilizando os eluentes Hex, AcOEt e MeOH em gradiente de polaridade, resultando em 12 novas subfrações. Da subfração FH-5-4 (129 mg), após sucessivas cromatografias em CC em gel de sílica 60, utilizando-se como eluente Hex:AcOEt, AcOEt e AcOEt:MeOH em gradiente de polaridade, isolou-se a substância **LA1**. A fração FH-8 (99,0 mg) foi submetida a CC em sílica gel 60 (9,30 g,  $\phi$ =0,9 cm; h=21 cm) com Hex, AcOEt e MeOH em gradiente de polaridade. Após a análise em CCD, estas foram reunidas 13 novas subfrações. Das subfrações FH-8-2 e FH-8-3 foram obtidas as substâncias codificadas como **LA2** e **LA3**. As amostras **LA1**, **LA2** e **LA3** foram submetidas a análise de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### - Atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais humanas

A atividade antiproliferativa do extrato bruto e das frações FH e FC, frente às linhagens tumorais de glioma (U251), mama (MCF-7) e pulmão, tipo não pequenas células, (NCI-H460), foi avaliada pelo método colorimétrico com sulforrodamina B (SRB) utilizando doxorubicina como controle positivo<sup>1</sup>. Os resultados foram expressos em GI<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular).

### Resultados e Discussão

O espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância **LA1** apresentou sinais característicos de substância com núcleo flavonoídico, como os hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  7,36 (*d*, 2H, *J*= 7,8 Hz; H-2' e H-6') e 6,93 (*d*, 2H, *J*= 8,3 Hz; H-3' e H-5') e o simpleto em  $\delta_H$  12,25 referente ao hidrogênio de hidroxila fenólica em ligação intramolecular com o oxigênio da carbonila (C-4;  $\delta_C$  193,3). Os sinais em  $\delta_H$  2,79 (*m*, 1H), 3,02 (*dd*; 1H; *J*=13,50 Hz; *J*= 3,16 Hz) e em  $\delta_H$  5,32 (*d*, *J*=11,7 Hz) indicaram a presença de uma flavanona e foram atribuídos aos hidrogênios H-3 $\beta$ , H-3 $\alpha$  e H-2 do anel C. Além desses sinais, observou-se um simpleto em  $\delta_H$  3,81 (3H) atribuído aos hidrogênios de um grupo metoxila e dois simpletos em  $\delta_H$  2,03 e 2,05 referentes aos grupos metílicos. No espectro de RMN <sup>13</sup>C foi verificado a presença de 19 sinais, dentre eles 10 sinais de carbonos aromáticos em  $\delta_C$  159,3 (C5), 102,9 (C6), 160,8 (C7), 102,0 (C8), 160,8 (C9), 102,8 (C10), 131,0 (C1'), 159,8 (C4') e os sinais em 127,5 (C2'e C6') e 114,1 (C3' e C5'). O sinal em  $\delta_C$  196,6 foi atribuído ao carbono carbonílico (C-4). Os dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram comparados com os da literatura e foram concordantes para a substância 5,7-diidroxi-4'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (mateucinol)<sup>2</sup>. O espectro de RMN <sup>1</sup>H para a substância **LA2** exibiu diversos sinais entre  $\delta_H$  0,82 e  $\delta_H$  2,12 referentes a grupos metílicos e metilênicos e um tripleto em  $\delta_H$  5,13 (*t*, 1H), atribuído ao hidrogênio vínílico H-12. Esse hidrogênio, através de análise de HSQC, apresentou correlação com sinal em  $\delta_C$  124,5 (C-12), que juntamente com o sinal em  $\delta_C$  138,2 (C-13) e o duplete em  $\delta_H$  2,10 (*J*=11,6 Hz, H-18) possibilitou inferir a presença de um triterpeno de esqueleto ursano. No

espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , além dos carbonos vinílicos, foi observada a presença de 28 sinais, destacando-se os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  178,3; referente ao carbono carboxílico (C-28), em  $\delta_{\text{C}}$  76,8, referente ao carbono carbinólico (C-3) e sete sinais de carbonos metílicos em  $\delta_{\text{C}}$  28,7 (C-23); 16,9 (C-24); 16,0 (C-25); 15,2 (C-26); 23,2 (C-27); 17,0 (C-29) e 21,0 (C-30). Com base nos dados obtidos e comparação com os da literatura<sup>3</sup>, **LA2** foi identificada como o ácido 3-*epi*-ursólico. A substância **LA3** foi isolada em mistura com a substância ácido 3-*epi*-ursólico (**LA2**). Através do espectro de RMN  $^1\text{H}$  verificou-se sinais referentes a dois hidrogênios vinílicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,16 e 5,13; que quando integrados, indicaram uma mistura de duas substâncias em diferentes proporções: **LA2** (62,5%) e **LA3** (37,5%). Para a substância minoritária **LA3**, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  5,13 ( $J=3,4$  e  $6,8$  Hz) referente ao hidrogênio vinílico H-12, um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  3,00, atribuído ao H-3. O simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  2,36 apresentou correlações pelo mapa de contorno HSQC com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  53,1 e em HMBC ( $^2J$ ) com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  71,6 (C-19), sendo assim atribuído ao H-18. A multiplicidade desse sinal, suas correlações e o efeito de desblindagem observados nos deslocamentos químicos de C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  126,8) e C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  41,4) possibilitaram inferir um grupo hidroxila na posição C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  71,6). Assim, **LA3** foi identificada como o ácido pomólico<sup>4</sup>. Com relação a atividade antiproliferativa, EB exibiu potente atividade ( $\text{GI}_{50}$ ) frente as células tumorais de glioma ( $5,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e mama ( $5,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), inibindo aproximadamente 90% da proliferação dessas células na concentração de  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Entre as frações, FH foi mais ativa, possuindo moderada atividade ( $\text{GI}_{50}$ ) para as linhagens de mama ( $12,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e glioma ( $26,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e efeito citotóxica para as células de glioma na maior concentração testada ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A fração FC foi ativa apenas frente as células de mama ( $23,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As células tumorais de pulmão mostram-se resistentes as frações testadas, sendo que a FH apresentou fraca atividade ( $56,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e FC foi inativa ( $119,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As substâncias **LA1**, **LA2** e **LA3** foram previamente isoladas em Melastomataceae, mas esse é o primeiro relato do isolamento no gênero *Leandra*. Essas substâncias possuem reconhecidas atividades antitumorais. Os ácidos 3-*epi*-ursólico e pomólico reduzem a proliferação de células tumorais de mama e a viabilidade das células de glioblastoma, respectivamente. Mateucinol promove a morte celular de linhagens de glioblastoma, e *in vivo*, reduz o crescimento do mesmo<sup>5</sup>.

### Conclusões

O estudo químico das flores de *Leandra aurea* resultou no isolamento das substâncias mateucinol, ácido 3-*epi*-ursólico e ácido pomólico. Esse é o primeiro relato do isolamento destas substâncias no gênero *Leandra*. O EB apresentou potencial antiproliferativo para as três linhagens de células tumorais humanas testadas, enquanto as frações FH e FC foram ativas frente às células de glioma e mama. Esses resultados apontam que as flores de *L. aurea* são uma importante fonte de compostos bioativos e que seu extrato e frações apolares possuem capacidade antitumoral.

### Agradecimentos

Fundação Araucária, CNPq e FitoSín

### Referências

<sup>1</sup> MONKS, A.D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; 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*. v.83, n.11, p.757-766, 1991.

<sup>2</sup> SUYATNO, S.; SYARIEF, S.H.S.; NURUL, H.; RINANINGSIH, R; TORI, M., SHIMIZU, K.M. Phenolic Compounds Isolated from The Fern *Chingia sakayensis* (Zeiller) Holtt. **Journal ILMU DASAR**, v.10, n.1, p.22-29, 2009.

<sup>3</sup> PIERONI, L. G., REZENDE, F. M., XIMENES, V. F., DOKKEDAL, A. L. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. **Molecules**. v. 16, n. 11, p. 9439 – 9450, 2011.

<sup>4</sup> ZHAO, Y., KONGASTAD, K.T., LIU, Y., HEAB, C., STAERK, D. Unraveling the complexity of complex mixtures by combining high-resolution pharmacological, analytical and spectroscopic techniques: antidiabetic constituents in Chinese medicinal plants. **Faraday Discuss**, v.218, p.202-218, 2019.

<sup>5</sup> QAMAR, K.; FAROOQ, A.D.; SIDDIQUI, B.S.; KABIR, N.; BEGUM, S. Antiproliferative Effects of *Ocimum basilicum* Methanolic Extract and Fractions, Oleanolic Acid and 3-*epi*-Ursolic Acid. **Current Traditional Medicine**, v. 6, n. 2, p.134-146, 2020.; GUIMARÃES, L.P.T.P.; ROCHA, G.G.; QUEIROZ, R.M.; MARTINS, C.A.; TAKIYA, C. M.; GATTASS, C. R. Pomolic acid induces apoptosis and inhibits multidrug resistance protein MRP1 and migration in glioblastoma cells. **Oncology Reports**, v. 38, p. 2525-2534, 2017.; SILVA, A.G.; SILVA, V.A.O.; OLIVEIRA, R.J.S.; REZENDE, A.R.; CHAGAS, R.C.R.; PIMENTA, L.P.S.; ROMÃO, W.; SANTOS, H.B.; THOMÉ, R.G.; RIBEIRO, R.I.M.A. Matteucinol, isolated from *Miconia chamissois*, induces apoptosis in human glioblastoma lines via the intrinsic pathway and inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. **Investigational New Drugs**, v. 38, p. 1044-1055, 2020.