

Estudo da fração hexânica de *Cattleya purpurata* e avaliação da atividade antiproliferativa

Julia Abuhamad de Campos (PIBIC/CNPq/FA/UEM)¹, Diego Luis Lucca (Coorientador)¹, Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi², Silvana Maria de Oliveira¹, Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierrez³, Armando Mateus Pomini¹ (Orientador), e-mail: ra112293@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, 1 Departamento de Química. 2 Departamento de Análises Clínicas 3. Departamento de Biologia. Avenida Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, Paraná.

Ciências Exatas e da Terra (1.00.00.00-3), Química (1.06.00.00-00), Química Orgânica (1.06.01.00-7), Química de Produtos Naturais (1.06.01.05-8).

Palavras-chave: Orchidaceae, produtos naturais, 9,10-dihidrofenantreno

Resumo:

A química de produtos naturais apresenta uma grande importância principalmente na área medicinal. Dentro da família Orchidaceae, o gênero *Cattleya* possui poucos registros de estudos fitoquímicos na literatura. Esse trabalho busca contribuir com o conhecimento sobre esse gênero, com a espécie *Cattleya purpurata* nativa do sul do Brasil e o estudo de sua fração hexânica e avaliação de atividade citotóxica. A realização do trabalho teve como resultado o isolamento de um 9,10-dihidrofenantreno, que apresentou atividade citotóxica contra as células cancerosas. Isolou-se e caracterizou-se também um triterpeno. Ambos os compostos foram obtidos utilizando métodos clássicos de separação cromatográfica (CCD), aliados às análises estruturais por ressonância magnética nuclear.

Introdução

A família Orchidaceae, com aproximadamente 35.000 espécies e vários híbridos, é considerada a maior e a mais evoluída família do reino vegetal (HOSSAIN, 2011). O gênero *Cattleya*, engloba cerca de 114 espécies e inúmeras variedades e híbridos, amplamente comercializados devido à beleza de suas flores (VAN DEN BERG, 2014). A espécie de interesse *Cattleya purpurata*, é uma orquídea endêmica do sul e sudeste do Brasil e não foram encontrados na literatura estudos químicos para esta espécie. O objetivo do presente trabalho foi, portanto, realizar o primeiro estudo químico desta espécie, focando na fração hexânica do extrato bruto metanólico das raízes, folhas e pseudobulbos, seguido de ensaios antiproliferativos contra células cancerosas humanas.

Materiais e métodos

Estudo da fração hexânica

O extrato bruto metanólico da planta, a fração hexânica e demais frações foram obtidos durante o projeto de doutorado do M.Sc. Diego L. Lucca, no laboratório Fitosín, UEM (em andamento), ao qual está inserido e vinculado o presente projeto de pesquisas de iniciação científica. A fração hexânica foi fracionada em uma coluna cromatográfica filtrante em sílica gel 60, utilizando solventes de diversas polaridades, em ordem crescente de polaridade hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Após análise dos resultados do fracionamento por cromatografia em camada delgada (CCD) de todas as frações, a fração em polaridade 100% CHCl_3 , apresentou o perfil mais interessante, assim, ela foi submetida a uma nova purificação por coluna cromatográfica em sílica gel. Posteriormente, foi realizada a junção das amostras, utilizando os resultados de CCD dessas. A junção das frações 118-123 foi submetida a uma purificação por coluna cromatográfica em sílica. Posteriormente, foi realizada a junção das amostras, utilizando os resultados de CCD, resultando no isolamento de uma substância na junção 8-13 e identificada como o fenantreno phocantona (substância CP1). As junções das frações 47-77 foram submetidas a uma purificação por coluna cromatográfica em sílica. Posteriormente, foi realizada a junção das amostras, utilizando os resultados de CCD, resultando no possível isolamento de uma substância, identificada como o triterpeno 24-metilenocicloartenol (substância CP2).

Teste de citotoxicidade

As células da linhagem cancerosa HeLa e não cancerosa VERO foram cultivadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 em meio Eagle modificado por Dulbecco. Após atingir 80% de confluência em um frasco de cultura de células, as células foram suspensas em uma solução que continha ácido etilendiaminotetracético tripsina a 25%. A concentração de células foi ajustada para 2×10^5 células / mL em DMEM sem penicilina / estreptomicina, e a suspensão foi adicionada a placas de 96 poços. Antes do teste de citotoxicidade, os poços foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato e as células foram expostas as amostras do extrato bruto metanólicos, e partições do extrato em concentrações de 1–100 $\mu\text{g/mL}$. Como controles, as células foram expostas às respectivas quantidades de diluente (PBS, DMSO e P / F-127) sem as amostras. O teste foi realizado após 24 horas de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . A citotoxicidade foi medida como a redução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H tetrazólio em DMEM sem vermelho de fenol. Após 3 h de incubação no escuro, a absorvância de formazan foi lida a 490 nm usando um aparelho ASYS. A porcentagem de viabilidade celular (% CV) foi calculada pela fórmula $\% \text{ CV} = (\text{At} / \text{Ac}) \times 100$, onde At e Ac se referem à absorvância da substância de teste e controle,

respectivamente. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada como a média de três experimentos independentes.

Resultados e Discussão

A substância CP1 foi identificada como a phocantona (Figura 1), com base em comparações de dados espectroscópicos de RMN com dados da literatura (LI et al., 2017) apresentados na Tabela 1. O composto se apresentou na forma de um sólido roxo.

A substância CP2 (Figura 1) apresentou em seu espectro de RMN ^1H (Figura 2) apresentou sinais característicos (LEE et al., 2010) do triterpeno 24-metilenocicloartenol. O composto apresentou-se na forma de um sólido branco.

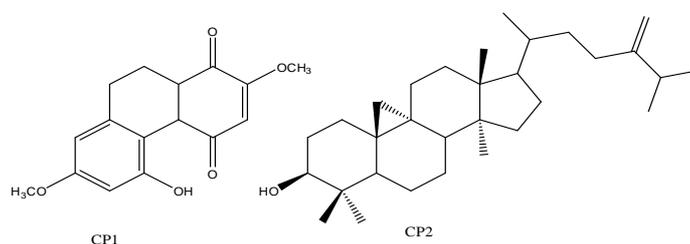


Figura 1 – Estruturas químicas da phocantona (CP1) e do triterpeno 24-metilenocicloartenol (CP2).

Tabela 1 Dados espectroscópicos de RMN de H e ^{13}C da substância CP1, em comparação com dados da literatura.

C	CP1*		Li et al, 2017*	
	δC	δH (mult.; J Hz)	δC	δH (mult.; J Hz)
1	180,69		180,5	
2	158,99		158,7	
3	108,11	6,01	107,9	6,01 (s)
4	192,23		192,0	
4a	139,38		139,1	
4b	110,81		110,6	
5	157,84		157,6	
6	102,69	6,43 (d; 2,75)	102,4	6.42 (d; 2.7)
7	162,98		162,7	
8	108,65	6,38 (d; 2,75)	108,4	6.38 (d; 2,7)
8a	142,65		142,4	
9	29,25	2,66	29,1	2,66
10	21,37	2,66	21,1	2,66
10a	140,60		140,4	
5-OH		10,40		10,4 (s)
2-OCH3	56,81	3,90	56,6	3,90 (s)
7- OCH3	55,55	3,82	55,3	3, 82 (s)

* CDCl_3

No teste de citotoxicidade não foi possível determinar o CC50% do extrato bruto e frações, pois a viabilidade celular foi acima de 50% na maior concentração testada de cada amostra para ambas as linhagens celulares HeLa e VERO, mostrando ausência de atividade biológica significativa.

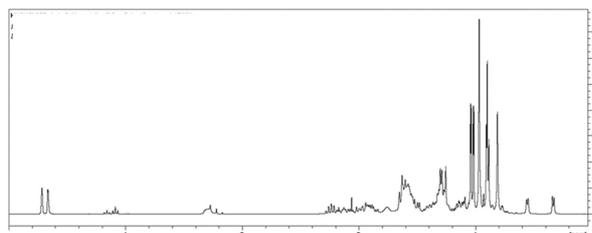


Figura 2 – Espectro RMN ^1H do triterpeno 24-metilenocicloartenol isolado de *Cattleya purpurata*.

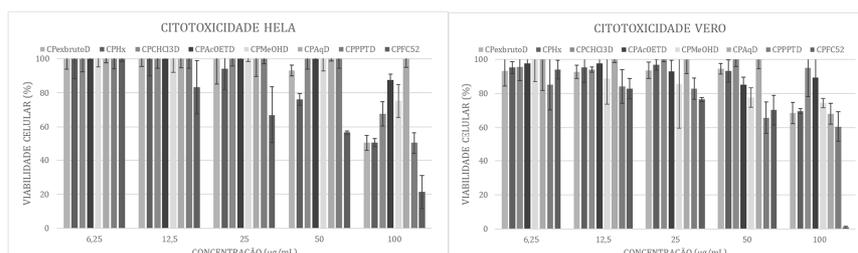


Figura 3 – Avaliação da citotoxicidade contra células HeLa e VERO do extrato bruto (CPexbrutoD), fração hexânica (CPHx), fração clorofórmica (CPCHCL3D), fração acetato de etila (CPAcOETD), fração aquosa (CPAqD), fração precipitado (CPPPTD) e fração aquosa (CPAqD) da orquídea *Cattleya purpurata*.

Conclusões

O trabalho resultou no isolamento de duas moléculas, sendo elas o fenantreno phocantona e o triterpeno 24-metilenocicloartenol, além da realização do teste de citotoxicidade do extrato bruto e frações, dessa forma, contribuindo para o enriquecimento do conhecimento a respeito do gênero *Cattleya*, que, atualmente, possui poucos registros na literatura.

Agradecimentos

Laboratório FitoSín, CNPq, Capes e Fundação Araucária.

Referências

- HOSSAIN, M. M. **Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances — An overview**. Fitoterapia, Vol. 82, 102–140, 2011.
- LEE, S.Y.; CHOI, S. U.; LEE, J. H.; LEE D. U.; LEE K. R. **A new phenylpropane glycoside from the rhizome of *Sparganium stoloniferum***. Archives of Pharmacol Research. v. 33, n. 4, p. 515-521, 2010.
- LI, B.; ALI, Z.; CHAN, M.; LI, J.; WANG, M.; ABE, N.; WU, C.; KHAN, I.A.; WANG, W.; LI, S.X. **Chemical constituents of *Pholidota cantonensis***. Phytochemistry. v. 137, p. 132-138, 2017.
- VAN DEN BERG, C. **Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (Epidendreae; Epidendroideae; Orchidaceae)**. Phytotaxa, Vol. 186, No 2, 75-86, 2014.