

ESTUDO QUÍMICO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA DA ESPÉCIE *Bifrenaria harrisoniae* (ORCHIDACEAE)

Lucas Hideo Kawamoto Macedo¹ (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Gredson Keiff Souza¹,
Melyssa Fernanda Norman Negri², Deisiany Gomes², Paula Derksen Macruz¹,
Eduardo Jorge Pilau¹ Armando Mateus Pomini¹ (Orientador). E-mail:
ampomini@uem.br.

1. Departamento de Química. 2. Departamento de Ciências Básicas da Saúde.

Palavras-chave: Orquídeas nativas, cromatografia, extrato bruto.

RESUMO

Com a finalidade dar continuidade ao estudo fitoquímico da espécie *Bifrenaria harrisoniae*, este projeto teve por objetivo o estudo da fração clorofórmio do extrato bruto (EB) desta espécie. Foram utilizadas técnicas clássicas de cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada, RMN de ¹H e UPLC-HR-MS/MS e, processamento dos dados utilizando a plataforma GNPS para isolamento e caracterização dos metabólitos. Portanto, o projeto contribui de forma significativa para o avanço do conhecimento acerca da caracterização química da espécie *B. harrisoniae*.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias do reino vegetal, destacando pela sua diversidade, sendo distribuídas em biomas como a Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, o que evidencia a sua importância para estudos nas áreas da química e biologia (Dressler, 1993). As orquídeas do gênero *Bifrenaria* apresentam espécies com plantas robustas com flores grandes (Cogniaux, 1902). A espécie *Bifrenaria harrisoniae* é uma orquídea com habitat terrestre característica de campos rupestres brasileiros, possuindo um grande potencial ornamental (Silva et al., 2010). Dessa maneira, o presente estudo busca ampliar o conhecimento acerca dos constituintes químicos da espécie *Bifrenaria harrisoniae*, com o propósito de expandir a compreensão sobre aspectos químicos de orquídeas nativas do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção, fracionamento e análise do extrato bruto e fração

O extrato bruto (EB) foi obtido e particionado em diferentes solventes, conforme descrito anteriormente (Macedo, 2024). O EB e a fração BHXCL14-20F4 foram analisados por UHPLC-QTOF-MS/MS por separação analítica realizada em uma coluna cromatográfica UCT Selectra C18 e a fonte de ionização por electrospray (ESI), operando nos modos de ionização positiva e negativa e os dados foram processados

utilizando a plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS). Substâncias isoladas foram submetidas a análises por espectroscópicas de RMN 1D e 2D. Os espectros de RMN foram obtidos por meio de espectrômetros Varian Mercury Plus, operando a 500 MHz em CDCl_3 .

Estudos da fração clorofórmica

O estudo da sub-frações provenientes da fração clorofórmica foi realizado por métodos clássicos de separação, dentre elas a cromatografia em coluna usando sílica-gel 60 e solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. A fração clorofórmica foi submetida em cromatografia em coluna com solventes de diferentes polaridades e foram obtidas 28 sub-frações. As frações BHxCl5 e BHxCl6 foram analisadas em RMN, realizando a caracterização de perfil de ácido graxo. A fração BHxCl-13 foi submetida a novos procedimentos de purificação, levando ao isolamento de uma molécula identificada como um monoacilglicerol após análises por técnicas de RMN 1D e 2D. Realizou-se lavagens nas demais frações, e foi feita a junção das frações 14 a 20, obtendo-se a fração BHCl-14a20. Desta nova fração foram obtidas outras sub-frações. As sub-frações BHxCl-14a20 (Hexano) I e BHxCl-14 a 20 (Hexano) II foram analisadas por RMN. Da fração BHxCl-14 a 20 (Hexano) II foi realizada uma purificação por CCD preparativa, obtendo-se 14 novas frações sendo a BHxCL14-24F4 foi submetida a análises por espectrometria de massas de alta resolução e RMN. As frações, BHxCl-21 (Acetato), BHxCl-22 (Hexano), BHxCl-24 (Acetato de Etila) e BHxCl-24 (Clorofórmio) também foram analisadas por RMN. A sub-fração BHxCl-8 foi submetida a análises de espectrometria de massas de alta resolução, apresentando sinais característicos de flavonoides e ácidos graxos, e em seguida foi realizada sua junção, resultando na BHCl-8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do EB por espectrometria de massas de alta resolução e processamento dos dados pela plataforma GNPS permitiu realizar a detecção putativa de seis substâncias. A substância (1) foi identificada como o flavonoide quercetina. As substâncias (2) e (3) foram identificadas como pinoquercetina e tricina, respectivamente. O composto luteolina-6-C-glicosídeo, detectado no modo negativo e a substância ácido 9,10,13-trihidroxi-octadecenoico correspondem às substâncias (4) e (5). Por fim, a substância (6) foi identificada como rhamnetina, um flavonol metoxilado estruturalmente relacionado à quercetina. Os dados são mostrados na Tabela 1 e as estruturas das substâncias na Figura 1.

Fração BHxCL 14-20 F4

A fração *BHxCL 14-20 F4* mostrou-se a mais promissora em termos de metabólitos especializados, dentre as frações obtidas a partir da fração clorofórmica do extrato bruto. Esta foi submetida a análises por RMN e espectrometria de massas de alta resolução, bem como tratamento dos dados pela plataforma GNPS,

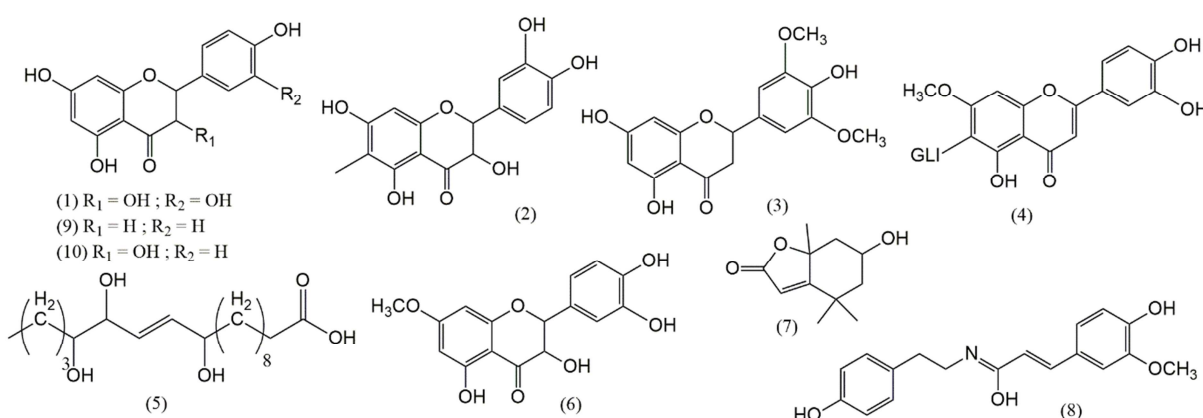
permitindo a análise conjunta dos dados resultantes das análises por ambas as técnicas. Este procedimento permitiu realizar a caracterização do monoterpene loliolide (7), do alcaloide feruloiltiramina (8), do flavonoide naringenina (9) e do flavonoide (2S,3S)-3,5,7-triidroxiflavanonol (10). Os resultados das análises por espectrometria de massas são mostrados na Tabela 1. As substâncias caracterizadas são mostradas na Figura 1.

Tabela 1. Compostos anotados em GNPS a partir do extrato bruto (1-6) e da Fração BHxCL 14-20 F4 (7-11) de *B. harrisoniae*.

Sub.	TR(s)	TR (min)	Scan	Massa Exp.	Massa Lit.	Massa Calc.	Erro (ppm)	Íon
1	511,8	8,53	1450	303,0499	302,0427	303,0506	-2,44	Negativo
2	592,5	9,88	1694	315,0489	316,0583	315,0504	-4,63	Negativo
3	608,7	10,14	1756	331,0800	332,0896	331,0817	-5,01	Positivo
4	400,0	6,67	2095	461,1071	462,1162	461,1083	-2,52	Negativo
5	607,9	10,13	1738	329,2312	330,2406	329,2327	-4,43	Negativo
6	531,0	8,85	1519	315,0493	316,0583	315,0504	-3,36	Negativo
7	407,3	6,79	1180	197,1179	196,1099	197,1178	0,30	Positivo
8	476,3	7,94	1383	314,1394	313,1314	314,1393	0,19	Positivo
9	519,9	8,67	1491	271,0611	272,0685	271,0606	1,99	Negativo
10	443,7	7,40	1268	287,0556	288,0634	287,0555	0,49	Negativo

* TR: tempo de retenção.

Figura 1. Estrutura molecular das substâncias anotadas a partir do extrato bruto e da Fração BHxCL 14-20 F4 de *B. harrisoniae*.



Avaliação biológicas do extrato bruto

O EB e frações foram submetidas a avaliações biológicas contra linhagens de células HeLa e VERO. Foi observado maior citotoxicidade nas células HeLa. A

fração clorofórmica do EB (com viabilidade celular variando entre 38,27 e 77,39%) e a fração metanólica (com viabilidade celular variando entre 36,46 e 89,42%) apresentaram CC_{50} próximos, com valores de 37,21 e 37,34 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, sendo as amostras mais citotóxicas. Já a fração acetato de etila (com viabilidade celular variando entre 48,45 e 75,15%) foi a amostra menos citotóxica para as células HeLa, com um CC_{50} de 83,23 $\mu\text{g/mL}$. Para as células VERO, em geral as amostras não apresentaram elevada citotoxicidade, sendo que a fração metanólica (com viabilidade celular variando entre 67,23 e 84,97%) com um CC_{50} de 110,8 $\mu\text{g/mL}$ e a fração clorofórmica (com viabilidade celular variando entre 59,28 e 84,51%) com CC_{50} de 130,56% foram as mais ativas. Já as frações acetato de etila, aquosa e hexânica apresentaram CC_{50} de 151,22; 500,59 e 149,11; respectivamente, contra células VERO, se mostrando pouco tóxicas.

CONCLUSÕES

O presente trabalho levou a anotação de seis compostos a partir dos dados obtidos pela análise por espectrometria de massas do EB da planta e quatro compostos a partir da fração BHXCL14-24F4, elucidadas também por RMN de ^1H . A avaliação de citotoxicidade contra células cancerosas humanas mostrou que a fração clorofórmica e metanólica foram mais tóxicas às células HeLa, enquanto para a cepa Vero a toxicidade foi baixa. Esta atividade pode decorrer da presença de flavonoides na fração clorofórmica. Este estudo é uma continuação do desenvolvimento do estudo fitoquímico da *B. harrisoniae*, contribuindo, portanto, para a ampliação para a ampliação do conhecimento disponível sobre a espécie.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa concedida e Fundação Araucária pelo apoio financeiro (NAPI RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA).

REFERÊNCIAS

- DRESSLER, R. L.. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge University Press, 1993.
- COGNIAUX, C. A.: **Bifrenaria em Flora Brasiliensis de C.F.P.** von Martius& auct. suc. eds.) vol.3 p. 5: 476, 1902.
- SILVA, M. F. F.; SILVA, J. B. F. **Orquídeas Nativas da Amazônia Brasileira II**. 2. ed. Rev. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2010.
- MACEDO, L. M. **Estudo químico da fração hexânica da espécie *Bifrenaria harrisoniae* (ORCHIDACEAE)**. In: Encontro Anual de Iniciação Científica, 2024. Anais [...]. Maringá:UEM, 2024.