

## CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS CASCAS DO CAULE DE *Vochysia thyrsoidea* Pohl. (Vochysiaceae) E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E INIBITÓRIA FRENTE AS CATEPSINAS B E K

Lorena Ramos Freitas de Sousa<sup>a</sup>, Jame's A. da Silva<sup>a</sup>, Paulo Cezar Vieira<sup>a</sup>, Maísa Borges Costa<sup>b</sup>, Mirley Luciene dos Santos<sup>b</sup>, Aline Borba Sbardelotto<sup>c</sup>, Cláudia do Ó Pessoa<sup>c</sup>, Manoel Odorico de Moraes<sup>c</sup> e Antônio Carlos Severo Menezes<sup>\*b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, Km 235, 13565-905 São Carlos – SP, Brasil

<sup>b</sup>Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Br. 153, 3.105, 75132-903 Anápolis – GO, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, 60431-970 Fortaleza – CE, Brasil

Recebido em 05/09/2013; aceito em 19/09/2013; publicado na web em 24/10/2013

CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE STEM BARK OF *Vochysia thyrsoidea* POHL. (VOCHYSIACEAE) AND EVALUATION OF THEIR CYTOTOXICITY AND INHIBITORY ACTIVITY AGAINST CATHEPSINS B AND K. A new flavonoid, catechin-3-*O*-(3''-*O*-*trans*-cinnamoyl)- $\alpha$ -rhamnopyranoside, along with known compounds, catechin-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranoside, 3-oxo-urs-12-en-28-oic acid, 2,4,6-trimethoxybenzoic acid, 2-butyl-D-fructofuranoside and 1-butyl-D-fructofuranoside, has been isolated from the stem bark of *V. thyrsoidea*. These compounds were assayed for inhibition of protease activity (cathepsins B and K) and against cancer cell lines. Catechin-3-*O*-(3''-*O*-*trans*-cinnamoyl)- $\alpha$ -rhamnopyranoside showed moderate inhibitory activity ( $IC_{50}$  = 62.02  $\mu$ M) against cathepsin B while 2-butyl-D-fructofuranoside was the most potent against a strain of CNS (SF-295) and human leukemia (HL-60) with  $IC_{50}$  = 36.80  $\mu$ M and  $IC_{50}$  = 25.37  $\mu$ M, respectively.

Keywords: *Vochysia thyrsoidea*; Vochysiaceae; catechin derivatives.

### INTRODUÇÃO

*Vochysia thyrsoidea* Pohl., conhecida como gomeira, pau-de-goma, casca-doce, árvore do vinho, vinheiro-do-campo, goma-arábica, goma-arábica-da-lagoa-santa, é uma Vochysiaceae encontrada em abundância no cerrado brasileiro e campos cerrados de altitude, usada na medicina popular como expectorante.<sup>1</sup>

O estudo prévio relacionado à caracterização química dos constituintes desta espécie revela o isolamento de dois ácidos elágicos (ácidos 3,3',4-tri-*O*-metilêlágico e 3,3',4,4'-tetra-*O*-metilêlágico) e das duas quinonas (1,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metilntra-quinona e 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona).<sup>2</sup> Poucos estudos desta planta são descritos e não houve anteriormente avaliações de atividades biológicas para esta espécie.

Este trabalho relata as atividades citotóxica e inibitória da atividade das catepsinas B e K de extratos (folhas e cascas) e compostos isolados das cascas do caule de *V. thyrsoidea*, bem como o isolamento e elucidação estrutural de duas catequinas (**1-2**) e de dois derivados butil-D-frutofuranosídeo (**3-4**) (Figura 1), além do ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico e ácido 3-oxo-urs-12en-28-oico.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Instrumentação e procedimentos gerais

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D foram obtidos em espectrômetro Bruker modelos ARX 100 MHz e DRX 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD e acetona-d<sub>6</sub> como solventes e TMS como referência interna. O espectro de massas de alta resolução foi realizado em um equipamento da Bruker Daltonics, modelo micrOTOF - Q II – ESI – TOF. As separações cromatográficas em coluna à pressão atmosférica foram realizadas em sílica gel 60 (230 a 700 Mesh) da Merck

e Sephadex LH-20 da Amersham Pharmacia Biotech AB. As placas usadas para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram de cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F<sub>254</sub> da Merck. As revelações das cromatoplasmas foram feitas através de luz UV (254 e 365 nm) e por borrifamento com solução de vanilina sulfúrica. Os

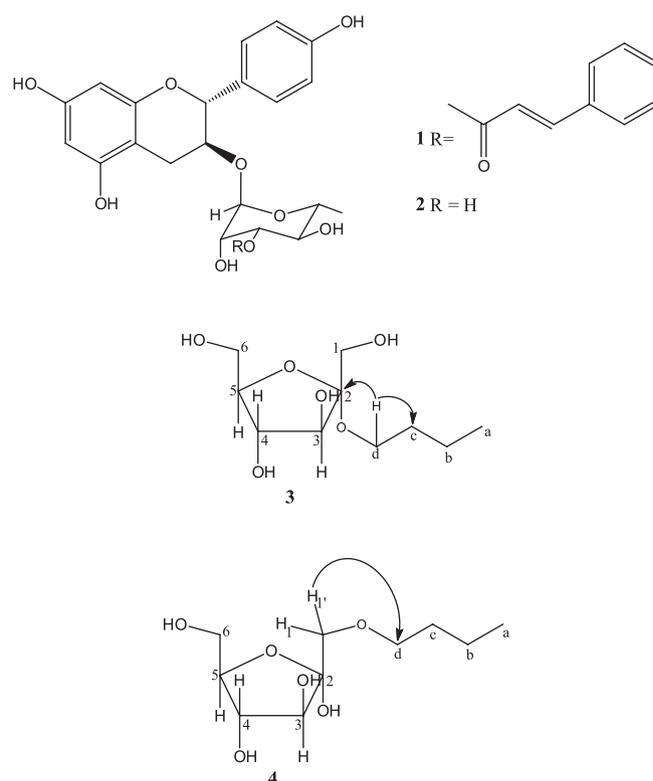


Figura 1. Constituintes químicos isolados das cascas do caule de *Vochysia thyrsoidea*

\*e-mail: amenezes@ueg.br

solventes (etanol, metanol, hexano, acetato de etila, diclorometano e *n*-butanol) utilizados na preparação dos extratos e fracionamentos cromatográficos foram todos de grau analítico.

### Material vegetal

O material botânico de *V. thyrsoidea* foi coletado na Serra dos Pirineus, Pirenópolis - GO, em março de 2010 e identificado pela Dr<sup>a</sup>. Mirley Luciene dos Santos. A exsiccata (nº7051) encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Goiás, Campus Henrique Santillo, Anápolis - GO.

### Isolamento dos constituintes químicos

As cascas do caule (Cc; 1.465 g) e folhas (F; 1.140 g) de *V. thyrsoidea*, após secagem em estufa a 40 °C e moagem, foram extraídas com etanol. Após eliminação dos solventes sob pressão reduzida, os extratos brutos foram obtidos [Cc (23,0 g) e F (150,0 g)]. O extrato oriundo das cascas do caule foi particionado com MeOH-H<sub>2</sub>O (1:3) e solventes de diferentes polaridades [hexano (1,5 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,3g), AcOEt (7,3 g), *n*-BuOH (1,0 g) e hidroalcoólico (10,8 g)] enquanto que o das folhas foi fracionado com celulose microcristalina D, fornecendo os extratos em hexano (5,6 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15,8 g), AcOEt (52,3 g) e MeOH (50,7 g).

A fração diclorometânica das cascas do caule (1,3 g) foi cromatografada em duas etapas utilizando cromatografia de adsorção em gel de sílica, ambas em eluição isocrática com Hex:AcOEt (8,5:1,5). Desta última etapa cromatográfica foram obtidas 11 frações, dentre as quais a segunda fração foi identificada por comparação dos dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C com a literatura como o triterpeno ácido 3-oxo-urs-12en-28-oico (2,0 mg).<sup>3</sup>

A fração 7 (190,0 mg) foi refracionada por cromatografia de coluna de gel de sílica no modo isocrático Hex:AcOEt (7:3), trazendo o isolamento do ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico (5,2 mg), cuja estrutura foi proposta com base em dados espectrais de de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e comparação com a literatura.<sup>4</sup>

O fracionamento do extrato de AcOEt das cascas do caule (7,3 g) foi feito através de cromatografia em coluna (CC) de gel de sílica, usando como fase móvel os solventes AcOEt:MeOH com gradiente de eluição em ordem crescente de polaridade. Desta coluna obteve-se 85 frações, que foram submetidas à análise por CCDA e então reunidas em 4 frações.

A segunda fração (1,0 g) foi submetida à CC de gel de sílica, usando como fase móvel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (4:1) no modo isocrático de eluição, o qual proporcionou o isolamento da substância 1 (3,0 mg).

Após sucessivos fracionamentos desta fração 2 por cromatografia de exclusão (Sephadex LH-20) e eluição em MeOH 100%, obteve-se a substância 2 (3,0 mg) identificada por RMN 1D/2D.<sup>5</sup>

**Catequin-3-O-(3''-trans-cinamoil)- $\alpha$ -raminopiranosídeo (1).** HRESIMS *m/z*: 549,1755 [M - H]<sup>-</sup> (calc. para C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>O<sub>10</sub>, 550,1839) RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C: Tabela 1.

**Catequin-3-O- $\alpha$ -ramnpiranosídeo (2).** RMN <sup>1</sup>H(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_H$  (*mult.*; *J* em Hz; H): 7,22 (*d*; *J*=8,5; H-2' e H-6'); 6,78 (*d*; *J*=8,5; H-3' e H-5'); 5,93 (*d*; *J*=2,4; H-6); 5,84 (*d*; *J*=2,4; H-8); 4,65 (*d*; *J*=8,0; H-2); 4,25 (*d*; *J*=1,6; H-1''); 3,95 (*m*; H-3); 3,70 (*m*; H-3''); 3,68 (*m*; H-4''); 3,62 (*dd*; *J*=3,2 e 9,2; H-2''); 3,20 (*m*; H-5''); 2,91 (*dd*; *J*=16,5 e 6,0; H-4 $\alpha$ ); 2,64 (*dd*; *J*=16,4 e 8,4; H-4 $\beta$ ); 1,24 (*d*; *J*=6,4; H-6''). HSQC e HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_C$ : 145,0 (C-5); 130,0 (C-1'); 129,0 (C-2' e C-6'); 116,3 (C-3' e C-5'); 102,0 (C-1'' e C-10); 96,2 (C-6); 95,0 (C-8); 81,0 (C-2); 76,2 (C-3); 72,5 (C-2''); 71,8 (C-3''); 71,5 (C-4''); 70,0 (C-5''); 31,0 (C-6''); 28,3 (C-4).

A fração *n*-butanólica das cascas do caule foi fracionada por CC de gel de sílica com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9:1) no modo isocrático de

eluição, fornecendo 48 frações que foram reagrupadas em 5 novas frações após análise por CCDA. A segunda fração (300,0 mg) foi cromatografada por CC de gel de sílica no modo isocrático usando Hex:AcOEt (7:3), gerando 16 subfrações. Dentre estas, as subfrações 8 e 11 foram identificadas como substância 3 (20 mg) e 4 (10 mg), respectivamente.

**1-Butil-D-frutofuranosídeo (3).** RMN <sup>1</sup>H(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_H$  (*mult.*; *J* em Hz; H): 4,10 (*d*; *J*=8,1; H-3); 3,91 (*t*; H-4); 3,82-3,86 (*m*; H-5); 3,60-3,80 (*m*; H-6); 3,70 (*d*; *J*=12; H-1) e 3,62 (*d*; *J*=12; H-1'); 3,47 (*dd*; *J*=6,7 e *J*=9,1; OCH<sub>2</sub>); 1,51 (*quinteto*; 2H, CH<sub>2</sub>); 1,38 (*sexteto*; 2H, CH<sub>2</sub>); 0,92 (*t*; 3H, CH<sub>3</sub>). HSQC e HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_C$ : 103,0 (C-2); 83,3 (C-5); 78,5 (C-3); 77,3 (C-4); 65,0 (OCH<sub>2</sub>); 62,3 (C-6); 62,0 (C-1); 33,5 (CH<sub>2</sub>); 20,5 (CH<sub>2</sub>); 14,4 (CH<sub>3</sub>).

**2-Butil-D-frutofuranosídeo (4).** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_H$  (*mult.*; *J* em Hz; H): 4,06 (*d*; *J*=4,8; H-3); 3,91 (*dd*; *J*=7,6 e *J*=8,0; H-4); 3,76-3,80 (*m*; H-5); 3,60-3,80 (*m*; H-6); 3,65 (*d*; *J*=12; H-1) e 3,52 (*d*; *J*=12; H-1'); 3,51 (*dd*; *J*=6,4 e *J*=9,2; OCH<sub>2</sub>); 1,53 (*quinteto*; 2H, CH<sub>2</sub>); 1,41 (*sexteto*; 2H, CH<sub>2</sub>); 0,93 (*t*; 3H, CH<sub>3</sub>). HSQC e HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_C$ : 103,0 (C-2); 82,9 (C-5 e C-3); 78,1 (C-4); 62,0 (C-1, C-6 e OCH<sub>2</sub>); 33,3 (CH<sub>2</sub>); 20,1 (CH<sub>2</sub>); 14,0 (CH<sub>3</sub>).

### Ensaio toxicológico

Baseado na metodologia de Meyer *et al.* (1982), com algumas adaptações, foi preparado um ambiente adequado para o desenvolvimento da *Artemia salina*.<sup>6</sup>

Os extratos brutos e particionados da casca do caule e das folhas de *V. thyrsoidea* foram solubilizados em água salina e DMSO 1%, e partindo-se de soluções padrão efetuaram-se diluições.

Foram separadas 10 larvas por tubo de ensaio contendo 10 mL das soluções nas concentrações de 125, 250 e 500  $\mu$ g/mL em triplicata. Cada teste foi acompanhado de um controle negativo, solução salina, do veículo usado para diluir os extratos (DMSO 1%) e do controle positivo com K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (DL<sub>50</sub> = 20 a 40 ppm). As larvas *A. salina* em testes foram mantidas à temperatura ambiente (26 °C) sob iluminação artificial por um período de 24 horas. Após este período, foram realizadas leituras da contagem do número de larvas sobreviventes e mortas.

A obtenção da dose que causa letalidade de 50% dos náuplios (DL<sub>50</sub>) foi feita por cálculos do método PROBIT de análise, por meio do software STATPLUS® 2005 (95% de confiança).

### Ensaio de atividade citotóxica *in vitro*

As análises da citotoxicidade foram realizadas no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará por meio do método de MTT, que consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes em células metabolicamente ativas.

As linhagens utilizadas, MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon humano), SF-295 (sistema nervoso central) e HL-60 (leucemia), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (USA), tendo sido cultivadas em frascos plásticos para cultura, utilizando o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina).

As células foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda do microscópio de inversão a cada 24 horas. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 1,0 x 10<sup>5</sup> céls/100  $\mu$ L.

As substâncias foram diluídas em DMSO puro e estéril na concentração de 5 µg/mL (dose única) e adicionadas em placas de 96 poços (100 µL/poço), onde a análise de cada amostra foi feita a partir de dois experimentos realizados em duplicata, tendo como controle positivo o quimioterápico doxorubicina.

Após um período de incubação de 72 horas, a absorbância foi lida em um espectrofotômetro de placas (DTX 880 Multimode Detector) a um comprimento de onda de 550 nm.<sup>7</sup> Os resultados foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios-padrão no programa *GraphPad Prism*.

### Ensaio de inibição enzimática: catepsinas B e K

Os ensaios de inibição enzimática frente à catepsina B e K foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, usando-se as mesmas condições experimentais para ambas as catepsinas.

A metodologia aplicada, com algumas modificações, consiste na determinação da inibição enzimática através da detecção do aumento da fluorescência que ocorre com a hidrólise do substrato fluorogênico Z-FRMCA, o qual é detectado em espectrofluorímetro com fenda de excitação ajustada para  $\lambda_{ex} = 380$  nm e emissão  $\lambda_{em} = 460$  nm.<sup>8</sup> O modelo do espectrofluorímetro utilizado neste ensaio foi da Molecular Devices Corporation – Spetra MAX M3 GEMINI XS. Os ensaios foram feitos em triplicatas, nos quais as amostras foram diluídas em DMSO, obtendo uma concentração final do composto de 125 µM.

Um volume de 5 µL foi transferido para cada poço das placas de ELISA (96 poços) e adicionou-se o MIX 1 e a enzima em concentração 3 mM em tampão (acetato de sódio 100 mM com 5 mM de

EDTA e pH de 5,5) pré-ativada com DTE (5,0 mM) aos analitos. A enzima ficou em contato com os compostos por 5 minutos e posteriormente foram adicionados 10 µM do MIX 2 (substrato fluorogênico Z-FRMCA em tampão), realizando-se a leitura em seguida.

Para os compostos que apresentaram inibição significativa (superior ou igual a 80%) frente às enzimas testadas foram determinados os valores de IC<sub>50</sub>. O potencial de inibição foi determinado utilizando-se dez diferentes concentrações do inibidor e construindo uma curva de concentração x resposta pelo método de regressão não-linear do programa Origin.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A substância **1** foi identificada pela análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H, HSQC e HMBC (Tabela 1) e massas de alta resolução (HRESIMS) em comparação com a literatura.<sup>5,9</sup>

O espectro de massas de alta resolução foi obtido no modo negativo, e exibiu um pico característico do íon em 549,1755 [M – H]<sup>-</sup>, sugerindo a fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>O<sub>10</sub>.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H a substância **1** apresentou sinais na região de hidrogênios alifáticos [ $\delta$  4,69 (*d*; *J* = 7,6 Hz), 3,98 (*m*),  $\delta$  2,97 (*dd*; *J* = 15,2 e 5,2 Hz) e 2,71 (*dd*; *J* = 15,6 e 8,4 Hz)], característicos dos hidrogênios H-2, H-3 e dos hidrogênios diastereotópicos H-4a e H-4b respectivamente. Na região de deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos os sinais em  $\delta$  5,95 (*d*) e 5,86 (*d*) com constante de acoplamento de *J* = 2,4 Hz referem-se ao acoplamento entre os hidrogênios H-6 e H-8. Os dois dubletos em  $\delta$  7,27 (*d*) e 6,80 (*d*) com *J* = 8,4 Hz foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6', H-3' e H-5' referente a um sistema de acoplamento de spins AA'XX'.

**Tabela 1.** Dados de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) e <sup>13</sup>C (100 MHz) de **1** em CD<sub>3</sub>OD, resultados de correlação heteronuclear. Deslocamentos químicos em  $\delta$  (ppm) e constantes de acoplamento (*J*) em Hz

C	HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	<sup>2</sup> J <sub>CH</sub>	<sup>3</sup> J <sub>CH</sub>
2	82,0	4,69 ( <i>d</i> , 7,6)		H-2'/H-6'
3	76,0	3,98 ( <i>m</i> )	H-4a, H-4b	H-1''
4	28,5	2,97 ( <i>dd</i> , 15,2 e 5,2) 2,71 ( <i>dd</i> , 15,6 e 8,4)		H-2
5				
6	97,0	5,95 ( <i>d</i> , 2,4)		
7	157,2		H-8	
8	96,0	5,86 ( <i>d</i> , 2,4)		
9	157,4			H-4a, H-4b
10	102,0		H-4a, H-4b	
1'	130,0			H-3'/H-5'
2' 6'	129,0	7,27 ( <i>d</i> , 8,4)		H-2
3' 5'	116,5	6,80 ( <i>d</i> , 8,4)		
4'	160,0		H-3'/H-5'	H-2'/H-6'
1''	102,0	4,19 ( <i>d</i> , 1,8)		
2''	72,5	3,62 ( <i>dd</i> , 3,2 e 9,2)	H-1'', H-3''	
3''	73,5	5,02 ( <i>dd</i> , 3,3 e 10,0)		
4''	71,5	3,68 ( <i>m</i> )		
5''	70,0	3,70 ( <i>m</i> )		
6''	18,0	1,30 ( <i>d</i> , 6,4)		
1'''	136,0		H-7''', H-2'''/H-6'''	H-8''', H-4'''/H-5'''
2''' 6'''	130,0	7,61 ( <i>m</i> )	H-3'''/H-5'''	H-7''', H-4'''
3''' 4''' 5'''	129,0	7,40 ( <i>m</i> )		
7'''	146,0	7,76 ( <i>d</i> , 16,0)		H-2'''/H-6'''
8'''	119,4	6,58 ( <i>d</i> , 16,0)	H-7'''	
9'''	168,2		H-8'''	H-3''', H-7'''

A presença do resíduo de açúcar nesta estrutura foi observada pela presença dos sinais entre  $\delta$  3,62 e 4,19 de hidrogênios carbônicos. A caracterização da  $\alpha$ -ramnose foi então realizada com base no sinal do duplete em  $\delta$  1,30 ( $d$ ,  $J = 6,4$  Hz) referente ao acoplamento dos hidrogênios da metila (H-6'') com H-5'', bem como pelo duplete em  $\delta$  4,19 ( $J = 1,8$  Hz) referente ao acoplamento diequatorial de H-1'' e H-2''.<sup>5</sup>

A unidade *trans*-cinamoíla presente pôde ser observada pelo conjunto de sinais no espectro de RMN <sup>1</sup>H, onde na região de aromáticos um conjunto de dois dubletos em  $\delta$  7,76 e 6,58 (H-7''' e H-8'''), ambos com  $J = 16$  Hz integrando para um hidrogênio cada, caracterizou o acoplamento em *trans*. Os multipletos em [ $\delta$  7,61 ( $m$ ; H-2''' e H-6''') e 7,40 ( $m$ ; H-3''', H-4''' e H-5''')] apresentaram um padrão de acoplamento típico de anel aromático monossustituído.

No experimento de HMBC observou-se que o duplete em  $\delta_H$  4,19 referente ao hidrogênio anomérico da ramnose (H-1'') apresentou correlação com o sinal em  $\delta_C$  76,0 (C-3), confirmando que a unidade de ramnose encontra-se ligada à posição 3 do flavonoide. Também foi possível por este experimento observar as correlações do sinal em  $\delta_H$  7,76 (H-7''') com os sinais em  $\delta_C$  119,4 (C-8'''),  $\delta$  136,0 (C-1''') e  $\delta$  168,2 (C-9'''). A ligação da unidade cinamoíla ao oxigênio do carbono C-3'' ( $\delta_C$  73,5) da ramnose foi confirmada através dos sinais  $\delta_H$  5,02/  $\delta_C$  168,2 que correspondem à correlação do H-3'' e o carbono da carbonila (C-9''') (Figura 2).

Uma substância estruturalmente relacionada a este flavonoide (1), o canferol 3-*O*- $\alpha$ -L-(4''-*E*-*p*-cumaroil)-ramnosídeo foi relatada anteriormente em *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae).<sup>5</sup>

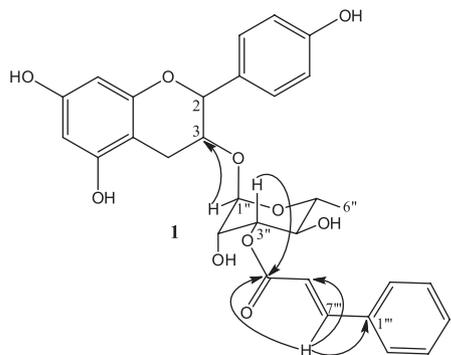


Figura 2. Correlações do experimento de HMBC para substância 1

Os frutofuranosídeos tiveram suas estruturas determinadas por meio da comparação da literatura com os dados experimentais de RMN <sup>1</sup>H, HSQC, HMBC, DEPT 135 e reação de acetilação utilizando DMAP como catalisador.<sup>10</sup>

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 3 apresentou um tripleto bastante intenso em  $\delta$  0,92 ( $t$ ; 3H) referente aos hidrogênios da metila; um sexteto em  $\delta$  1,38 integrando para dois hidrogênios e um quinteto em  $\delta$  1,51 referente aos hidrogênios metilênicos H-b e H-c. O duplo-dublete em  $\delta$  3,47 ( $dd$ ;  $J = 6,7$  e  $9,1$  Hz) indicou a presença de uma unidade *O*-glicosídica que provocou a desblindagem destes hidrogênios metilênicos da cadeia alquílica (H-d). A substância 4 também apresentou na região entre 0,9-3,5 ppm o mesmo padrão de multiplicidade de sinais encontrados na substância 3, que juntamente com o número de hidrogênios estimados pela integral confirmaram também a presença de um grupo butila. Nestes espectros observou-se ainda a presença de sinais na região entre  $\delta$  3,40-4,2 referente à presença de uma unidade de açúcar.

No experimento de DEPT 135° foram observados quatro sinais positivos (CH e CH<sub>3</sub>) e cinco sinais negativos (CH<sub>2</sub>), os quais foram atribuídos aos respectivos carbonos pela comparação com os deslocamentos químicos assinalados anteriormente (HSQC).

Os sinais em  $\delta_C$  62,3 e 62,0 pertencem aos carbonos C-6 e C-1 do açúcar confirmando a frutofuranose pela presença de dois grupos metilênicos. O sinal negativo em  $\delta_C$  65,0 refere-se ao C-d (OCH<sub>2</sub>) e os outros dois sinais em  $\delta_C$  33,5 e 20,5 correspondem aos grupos CH<sub>2</sub> da cadeia alquílica.

O sinal em  $\delta_C$  14,4 é referente à metila da cadeia alquílica (C-a) e os outros três sinais ( $\delta_C$  83,3, 78,5 e 77,3) são respectivamente dos carbonos do açúcar C-5, C-3 e C-4.

A posição do grupo alquila ligado à unidade de açúcar foi determinada por meio do experimento de HMBC, que apresentou a correlação entre os sinais  $\delta_C$  65,0/ $\delta_H$  3,70 e 3,62 atribuídos, respectivamente, aos H-1 e H-1' e o C-d da cadeia alquílica.

A substância 4 foi diferenciada da substância 3 com base nos sinais de carbono projetados no espectro de HMBC. A correlação do H-d ( $\delta_H$  3,51) e o C-c ( $\delta_C$  33,3), bem como a correlação deste hidrogênio (H-d) e o C-2 ( $\delta_C$  103,0) confirmaram a ligação da cadeia alquílica à unidade de açúcar no C-2.<sup>10</sup>

## Ensaios biológicos

A análise dos resultados do teste TAS, segundo Meyer,<sup>6</sup> foi realizada por meio de uma relação entre a dose letal média, DL<sub>50</sub>, e o grau de toxicidade, nos quais consideram-se tóxicos valores de DL<sub>50</sub> < 1000 µg/mL. Todos os extratos testados, exceto o hexânico das folhas (DL<sub>50</sub> < 1000 µg/mL), apresentaram toxicidade frente a *A. salina* [cascas do caule: 283,94 (EtOH), 499,60 (hexano), 288,33 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) e 476,58 (AcOEt) µg/mL; folhas: 209,08 (EtOH), 921,47 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 32,06 (AcOEt) e 151,90 (MeOH) µg/mL].

Os ensaios de toxicidade frente a esta espécie de microcrustáceo apresentam correlação com diversas atividades biológicas,<sup>11</sup> e baseando-se nas substâncias obtidas no estudo fitoquímico foram realizados ensaios de inibição enzimática e de citotoxicidade.

Das frações do extrato bruto das cascas do caule e folhas de *V. thyrsoidea* avaliadas, nenhuma demonstrou potencial citotóxico relevante (percentual de inibição do crescimento tumoral maior que 80%) para as linhagens celulares tumorais testadas, MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon-humano), SF-295 (sistema nervoso central).

Dentre os compostos avaliados, o 2-butil-D-frutofuranosídeo apresentou valores significativos de toxicidade com IC<sub>50</sub> = 36,80 µM frente às células tumorais do sistema nervoso central (SF-295) e IC<sub>50</sub> = 25,37 µM em linhagem HL-60 (leucemia humana).

Os compostos testados não apresentaram inibição frente à catepsina K, entretanto frente à catepsina B obteve-se um resultado de inibição enzimática moderado, apresentado pelo composto catequina-3-*O*-(3''-*trans*-cinamoil)- $\alpha$ -ramnopiranosídeo (1), com IC<sub>50</sub> = 62,02 (+/-0,79 µM).

## CONCLUSÃO

O trabalho contribuiu com a caracterização fitoquímica da planta *V. thyrsoidea* através do isolamento do catequin-3-*O*-(3''-*trans*-cinamoil)- $\alpha$ -ramnopiranosídeo, catequin-3-*O*- $\alpha$ -ramnopiranosídeo, 1-butil-D-frutofuranosídeo, 2-butil-D-frutofuranosídeo, ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico e ácido 3-oxo-urs-12en-28-oico.

Dentre as substâncias isoladas, os flavonoides e os frutofuranosídeos são relatados pela primeira vez no gênero *Vochysia*, e a substância catequin-3-*O*-(3''-*trans*-cinamoil)- $\alpha$ -ramnopiranosídeo, a qual apresentou moderada atividade inibitória frente a catepsina B, foi descrita pela primeira vez na literatura.

Em relação à atividade citotóxica, o 2-butil-D-frutofuranosídeo foi a substância que apresentou o resultado mais significativo de inibição das células tumorais do sistema nervoso central e leucemia humana.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

As Figuras 1S à 17S estão disponíveis no site da Química Nova (<http://quimicanova.sbq.org.br>) em arquivo pdf, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. N. P. Lopes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP pelo espectro de massas de alta resolução e ao CNPq, CAPES e FAPEG pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Silva, M. C. J.; *100 Árvores do Cerrado: Guia de Campo*; Brasília, **2005**; Lorenzi, H.; *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil*; São Paulo, **1998**.
2. Corrêa, D. B.; Birchall, E.; Aguilar, J. E. V.; Gottlieb, O. R.; *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1138.
3. Gnoatto, S. C. B.; Klimpt, A. D.; Nascimento, S.; Galéra, P.; Boumediene, K.; Gosmann, G.; Sonnet, P.; Moslemi, S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1865.
4. Russell, K. M.; Molan, P. C.; Wilkins, A. L.; Holland, P. T.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 10.
5. Ayres, M. C. C.; Escórcio, S. P.; da Costa, D. A.; Chaves, M. H.; *Quim. Nova* **2008**, *6*, 1481; Lokvama, J.; Coley, P. D.; Kursar, T. A.; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 351.
6. Meyer, B. N.; Ferrigini, N. R.; Putnan, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L.; *Planta Med.* **1982**, *45*, 31.
7. Mossman, T.; *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
8. Bromme, D.; Steinert, A.; Friebe, S.; Fittkau, S.; Wiederanders, B.; Kirschke, H.; *Biochem. J.* **1989**, *264*, 475.
9. David, J. M.; Souza, J. C.; Guedes, M. L. S.; David, J. P.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 105; Kraft, C.; Siems, J. K.; Siems, K.; Solis, P. N.; Gupta, M. P.; Bienzle, U.; Eich, E.; *Phytochemistry* **2001**, *58*, 769.
10. Dudíková, J.; Mastihubová, M.; Mastihuba, V.; Kolarova, N.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *45*, 27.
11. Pisutthanan, S.; Plianbangchang, P.; Pisutthanan, N.; Ruanruay, S.; Muarrit, O.; *Naresuan Univ. J.* **2004**, *12*, 13.