



RELATÓRIO FINAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA PIBIC 2023-2024

TÍTULO: “Estudo químico das fases hexânica e diclorometânica dos frutos de *Combretum mellifluum* Eichler: busca de potenciais agentes antitumorais”

ORIENTADOR: Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Figueiredo

ESTUDANTE: Miryã Alves de Lima Ribeiro

ATIVIDADES PLANEJADAS NO PLANO DE TRABALHO DO ESTUDANTE:

Dar continuidade ao estudo químico das fases hexânica e diclorometânica bioativas dos frutos de *Combretum mellifluum*. Isolar, purificar e caracterizar os constituintes majoritários das fases, particularmente os triterpenoides existentes em misturas complexas, para serem submetidos posteriormente a ensaios de atividade citotóxica frente a linhagens de células neoplásicas.

DESCREVER SE HOUE ALTERAÇÕES NO PLANO DE TRABALHO DO ESTUDANTE E AS DIFICULDADES APRESENTADAS:

Não houve.

RESUMO

O gênero *Combretum*, composto por cerca de 250 espécies, é distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo assim o maior na família Combretaceae. Espécies de *Combretum*, particularmente as do continente africano, têm se destacado pelas diversas propriedades biológicas de seus extratos e compostos obtidos, incluindo atividades anticancerígenas. No entanto, espécies brasileiras deste gênero têm sido pouco investigadas como fontes potenciais de substâncias bioativas. Em um trabalho anterior realizado pelo grupo de pesquisa PRONABio visando a busca de potenciais agentes antineoplásicos em plantas do Cerrado de Mato Grosso do Sul, foram isolados dos galhos, raízes e folhas de *Combretum mellifluum* Eichler duas lignanas tetrahidrofurânicas inéditas e um seco-triterpenoide com esqueleto lupano que se destacaram por suas atividades citotóxicas frente a linhagens de células neoplasias humanas, além de outras 15 substâncias. Foi dada continuidade à avaliação do potencial antineoplásico desta espécie, conhecida popularmente como “pombeiro do Cerrado”, onde o extrato etanólico dos frutos apresentou atividade citotóxica no ensaio com sulforodamina B frente a linhagens de carcinoma de

mama (MCF7) e de próstata (PC-03), com valores de GI_{50} de 0,25 e 27,67 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Após ser submetido à partição com solventes, verificou-se que a atividade citotóxica concentra-se nas fases hexânica e diclorometânica. Estas foram submetidas a processos cromatográficos de separação, incluindo cromatografia em coluna de sílica gel (70-230 e 230-400 mesh) e Sephadex LH-20, os quais levaram ao isolamento de 13 compostos, sendo dois triterpenos cicloartânicos inéditos (mellifluenos A e B), além de triterpenos com esqueletos dos tipos cicloartano, lupano, oleanano e ursano (lupenona, ácidos norquadrangulárico A, quadrangulárico K, quadrangulárico M, 24-epiquadrangulárico M, betulínico, ursólico e oleanólico), ácido 3,3',4-tri-O-metilelágico, β -sitosterol e estigmasterol. No presente estudo, a fase hexânica bioativa passou por separações cromatográficas sucessivas em sílica gel 60 (70-230/230-400 mesh) e Sephadex LH-20, as quais levaram ao isolamento de 3 novos triterpenos: quadrangularoato M de metila, 24-epiquadrangularoato M de metila e melliflueno C, sendo este último um nortriterpeno inédito na literatura. Os resultados obtidos até o momento reforçam o potencial de *C. mellifluum* como fonte de compostos com potencial para o tratamento do câncer.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas na medicina popular perdura há séculos, o que é uma das principais provocações para que a ciência investigue a composição química. Para isso existe a química de produtos naturais: não só para identificar e classificar substâncias presentes em plantas; mas também compreender as atividades, tanto positivas quanto negativas, dessas substâncias. Devido a singularidade dos biomas sul-mato-grossenses, expande-se as possibilidades de atuação científica nessa área.

A família Combretaceae, formada por mais de 20 gêneros, possui distribuição pantropical, sendo que a maioria de suas espécies ocorrem na África [1]. O uso medicinal popular de combretáceas é extremamente vasto ao longo de todo o continente africano, de forma a estimular a investigação científica, tanto que, não só já existem estudos sobre o potencial antineoplásico de algumas espécies da família, como os resultados foram promissores [2].

Atualmente o câncer é uma das doenças mais fatais do mundo, com cerca de 9,6 milhões de óbitos por ano [3]. No Brasil o número de casos ultrapassa 600 mil por ano, e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), esse número pode aumentar em 77% até

2050 [4]. Representa um conjunto de mais de 100 doenças, as quais possuem como característica comum e principal o crescimento desordenado de células. O tratamento ocorre principalmente pela quimioterapia, radioterapia e intervenção cirúrgica, e, apesar de 60% a 68% dos tipos de câncer possuem cura, devido aos efeitos colaterais existe uma ampla busca por formas alternativas [3].

Apesar do gênero *Combretum* ser o maior da família, com cerca de 250 espécies, menos de 20% de suas espécies foram estudadas [5]. Popularmente conhecida por “Jacarezinho”, “Mofumbo” ou “Pombeiro do Cerrado”, a *Combretum mellifluum* Eichler, ainda que não seja encontrada unicamente no Cerrado brasileiro, possui poucos estudos de sua composição química na literatura.

Um estudo previamente realizado no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (PRONABio/INQUI/UFMS) com as folhas, galhos e raízes de *C. mellifluum* [6] resultou no isolamento de duas lignanas tetrahydrofurânicas inéditas e um seco-triterpenoide com esqueleto lupano, os quais se destacaram por suas atividades citotóxicas frente a linhagens de células neoplásicas humanas, além de outras 15 substâncias. Os ensaios biológicos foram realizados pelo Laboratório de Biologia Molecular e Cultura Celular (BioMol/FACFAN/UFMS).

Em sequência, iniciou-se o estudo químico dos frutos de *C. mellifluum*. Após o processo de extração etanólica, o extrato etanólico foi submetido a avaliação citotóxica e seletividade para células de câncer de mama, cólon, rim e próstata também realizados pelo BioMol. Como resultado, o extrato apresentou atividade citotóxica no ensaio com sulforodamina B frente a linhagens de carcinoma de mama e de próstata, com valores de GI_{50} de 0,25 e 27,67 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente [7]. Devido aos resultados positivos para ação antiproliferativa, realizou-se a partição líquido-líquido do extrato, resultando nas fases hexânica, diclorometânica e acetato de etila. Além disso, as fases hexânica e diclorometânica foram avaliadas quanto ao seu potencial antineoplásico para linhagens de carcinoma de mama, próstata, cólon, rim e leucemia, sendo que a fase hexânica apresentou valores positivos de GI_{50} de 4,62 a 29,40 $\mu\text{g/mL}$, e a diclorometânica de 4,54 a 31,96 $\mu\text{g/mL}$ [7]. As fases bioativas foram submetidas a procedimentos cromatográficos, incluindo CC Sílica (70-230 e 230-400 *mesh*) e Sephadex LH-20, levando ao isolamento de 13 substâncias.

Destaca-se que os triterpenos melliflueno A e melliflueno B encontrados nos frutos nunca haviam sido relatados na literatura [7], já os ácidos quadrangulárico K e

24-epiquadrangulárico M foram isolados previamente apenas das folhas de *C. quadrangulare* [8] enquanto o ácido quadrangulárico M ocorre em *C. quadrangulare* e *Acalypha wilkesiana* (Euphorbiaceae) [9].

Figura 1 - *Combretum mellifluum*.



FONTE: KOLLET, LG, Estudo da composição química dos frutos de *Combretum mellifluum* e de seu potencial antineoplásico. Defesa de TCC apresentado ao curso de química (bacharelado) da UFMS. 2020.

A partir desses resultados, propôs-se o aprofundamento na composição química dos frutos de *C. mellifluum*, tanto com o propósito de purificar misturas obtidas, quanto para verificar a presença dos triterpenos já identificados ou de novas substâncias que possam estar compartimentadas nos frutos.

2. METODOLOGIA

Os estudos prévios de *C. mellifluum* realizados no grupo PRONABio consistiram não só na obtenção do extrato e suas fases, mas também no isolamento de 13 substâncias. Da fase hexânica foram isolados dois triterpenos, um deles com esqueleto do tipo lupano já relatado na literatura (lupenona) e o outro inédito na literatura, com esqueleto do tipo cicloartano e denominado melliflueno A, além dos esteroides sitosterol e estigmasterol. Da fase diclorometânica foram obtidos cinco triterpenos de esqueleto cicloartano, compreendendo quatro substâncias conhecidas (ácidos norquadrangulárico A, quadrangulárico K, quadrangulárico M e 24-*epi*-quadrangulárico) e uma inédita (melliflueno B), além dos triterpenos conhecidos ácidos betulínico, ursólico e oleanólico (com esqueletos dos tipos lupano, ursano e oleanano, respectivamente) e de um derivado do ácido elágico, ácido

3,3',4-tri-*O*-metilelágico. Estes resultados foram obtidos em nosso grupo de pesquisa e são relatados no trabalho de conclusão de curso de Kollet, LG [7].

O processo de extração etanólica a partir do material vegetal coletado dos frutos é descrito pela Figura 2.

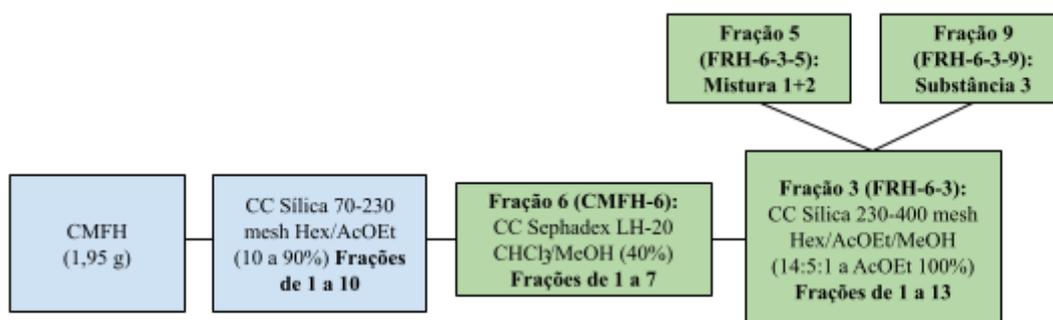
Figura 2 - Obtenção do extrato etanólico bruto dos frutos de *C. mellifluum* e subsequente obtenção de suas fases por partição líquido-líquido.



2.1 Fracionamento cromatográfico da fase hexânica

A fase hexânica (CMFH) foi submetida a procedimentos cromatográficos sequenciais, descritos pela Figura 3; sobretudo através das técnicas: Coluna Cromatográfica (CC) Sílica (70-230/230-400 mesh) e CC Gel de Sephadex® LH-20.

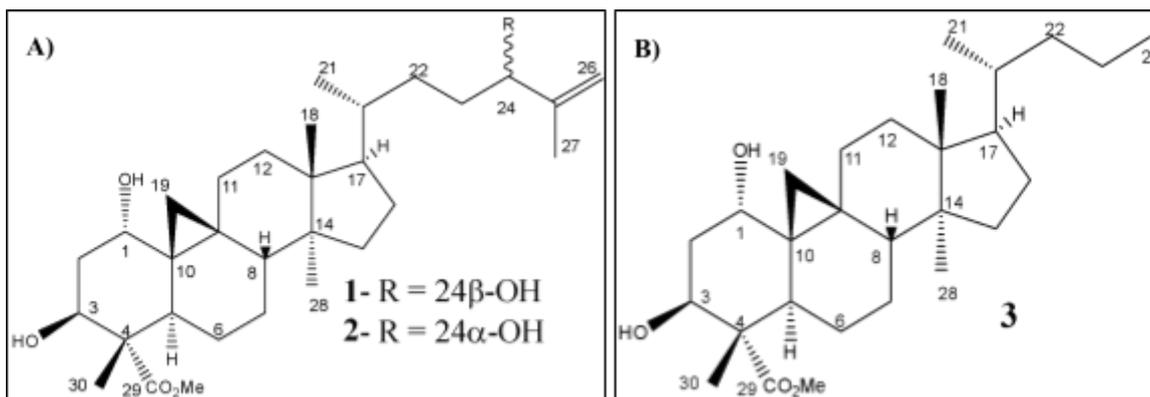
Figura 3 - Procedimentos cromatográficos realizados com CMFH.



De acordo com as análises do perfil cromatográfico através de Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), as frações foram selecionadas para análise através da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C uni e

bi-dimensionais. Após a aquisição dos dados espectrais, realizou-se a elucidação estrutural das frações resultantes da fase hexânica, confirmando o isolamento de três novas substâncias (Figura 4): mistura das substâncias **1** e **2** (quadrangularoato M de metila e 24-epiquadrangularoato M de metila, respectivamente), e a substância **3** (melliflueno C), sendo esta inédita na literatura.

Figura 4 - Estruturas químicas das substâncias **1**, **2** e **3**.



A) Quadrangularoato M de metila (**1**) e 24-epiquadrangularoato M de metila (**2**); B) melliflueno C (**3**).

3. RESULTADOS FINAIS

Para que as estruturas fossem determinadas, foi realizada uma análise conjunta dos dados espectrais das substâncias obtidas, incluindo RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bi-dimensionais. A identificação das estruturas químicas destas substâncias é discutida a seguir:

3.1. Mistura de **1** + **2** (FRH-6-3-5)

Os dados espectrais de RMN de ^1H de FRH-6-3-5 (Figura 5) mostrou a presença de uma região congestionada entre δ 0,8 a 1,7, dentre estes, quatro simpletos integrados para 3 hidrogênios cada a δ 0,91 e 0,93, 1,10, e 1,71 característicos de metilas, sendo este último, referente a uma metila vinílica. Um duplete ($J = 5,9$ Hz) integrado a três hidrogênios a δ 0,87 também foi atribuído a uma metila. A presença de dois dupletos em δ 0,50 e 0,73 ($J = 4$ Hz) indicaram a presença de hidrogênios de anel ciclopropânico, característicos em triterpenos cicloartanos. Também foram observados três sinais referentes a hidrogênios oximetínicos a δ 3,58 (simpleto largo), 4,01 (tripleto; $J = 6,2$ Hz) e 4,54 (duplo-duplete; $J = 12,1$ e 3,8 Hz). Um simpleto a δ 3,72 referente a três hidrogênios foi atribuído a uma metoxila. A presença de dois simpletos largos em δ 4,82

e 4,91 indicaram a presença de uma olefina na estrutura deste triterpeno. Observou-se que o sinal δ 4,91 se duplica, sugerindo-se que FRH-6-3-5 seja composto de uma mistura epimérica.

Os dados espectrais de ^{13}C indicaram a presença de mais de 30 sinais de carbonos, sugerindo que a amostra se tratava de uma mistura triterpênica, particularmente de uma mistura epimérica. Neste espectro destacaram-se sinais de uma carboxila acima de δ 177,5, um par duplicado de carbonos olefínicos em δ 111,6/147,8 e 111,1/147,5, sugestivo de mistura epimérica e carbonos oximetínicos em δ 76,9/76,4 (sinal duplicado), 73,2 e 70,6. Esses, e os demais sinais listados na Tabela 1, assim como o auxílio dos dados bidimensionais HSQC e HMBC, permitiram identificar FRH-6-3-5 como sendo a mistura dos triterpenos cicloartanos quadrangularoato M de metila (**1**) e 24-epiquadrangularoato M de metila (**2**), dos quais os dados obtidos foram compatíveis com os da literatura [10]. Essa mistura foi recentemente encontrada nas folhas de *C. mellifluum* [10] estudada no estado de Piauí (bioma Caatinga) e ainda não foi relatada em outras espécies vegetais.

Figura 5 - Espectro de RMN de ^1H das substâncias 1 + 2, em CDCl_3 .

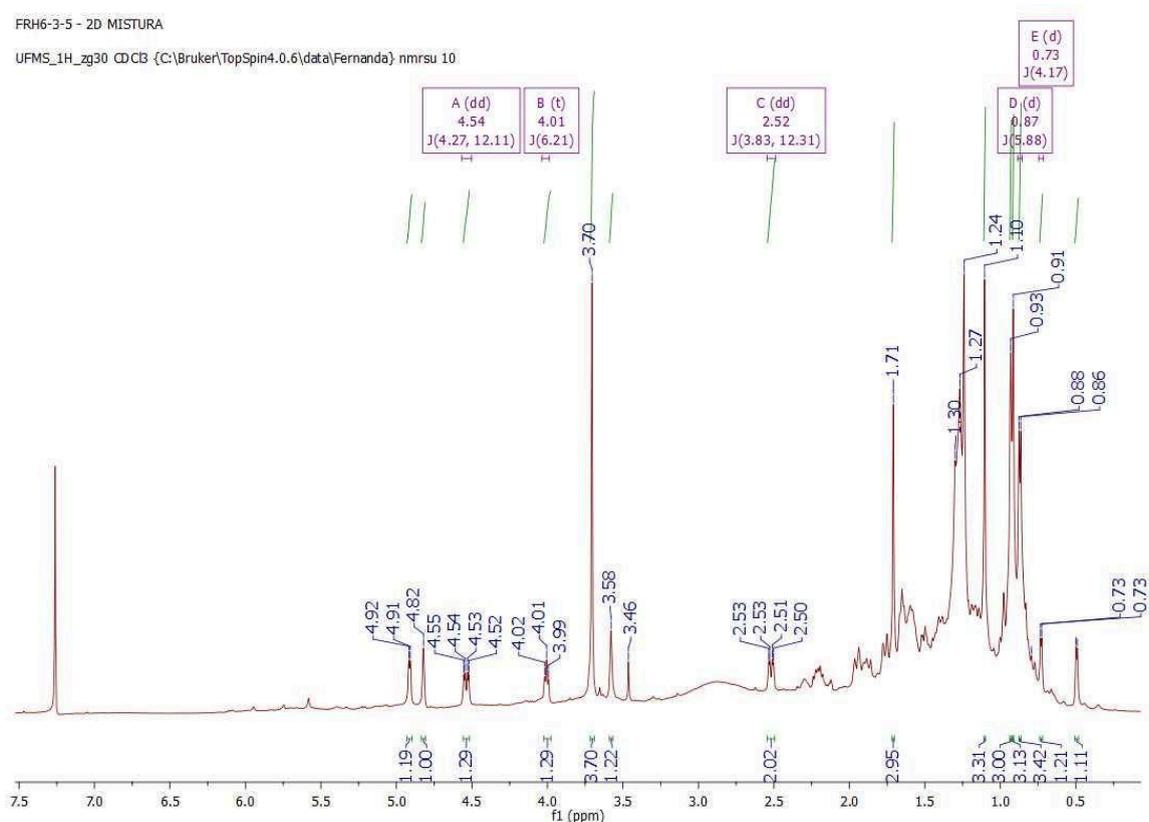


Figura 6 - Espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 1+2 (CDCl_3).

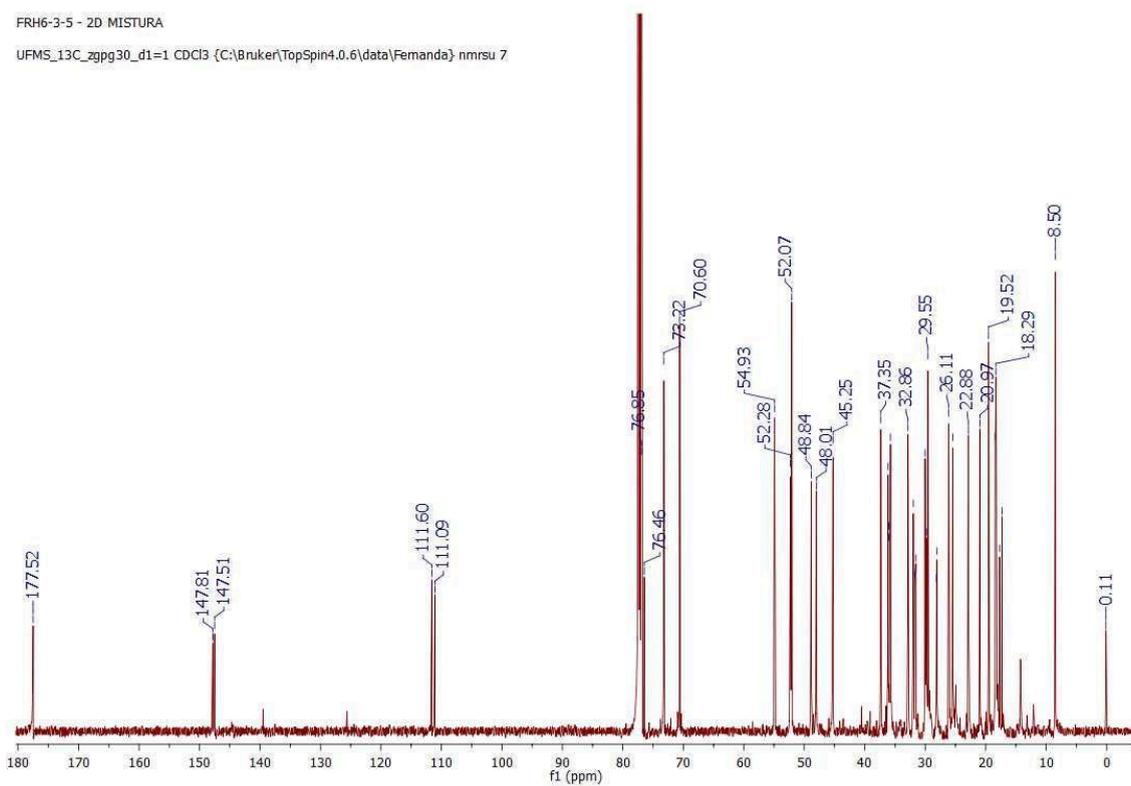


Figura 7 - Mapa de contorno do experimento HSQC das substâncias 1+2, em CDCl_3 .

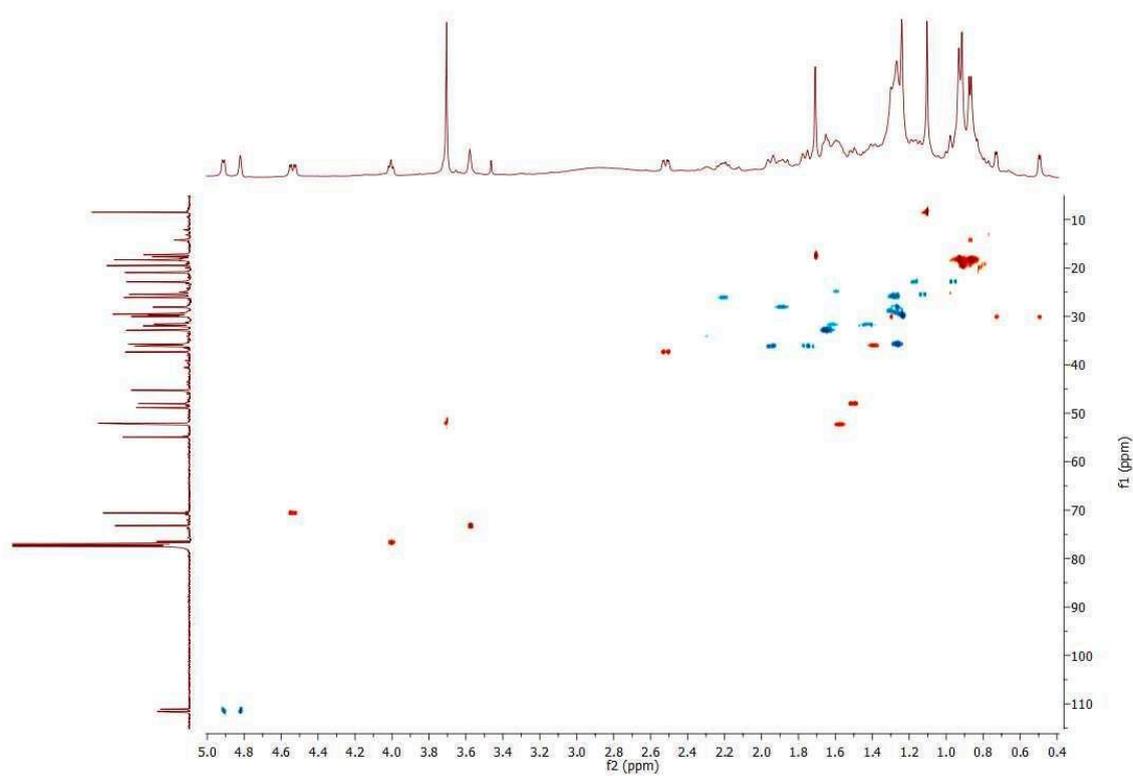


Figura 8 - Mapa de contorno do experimento HMBC das substâncias 1+2, em CDCl_3 .

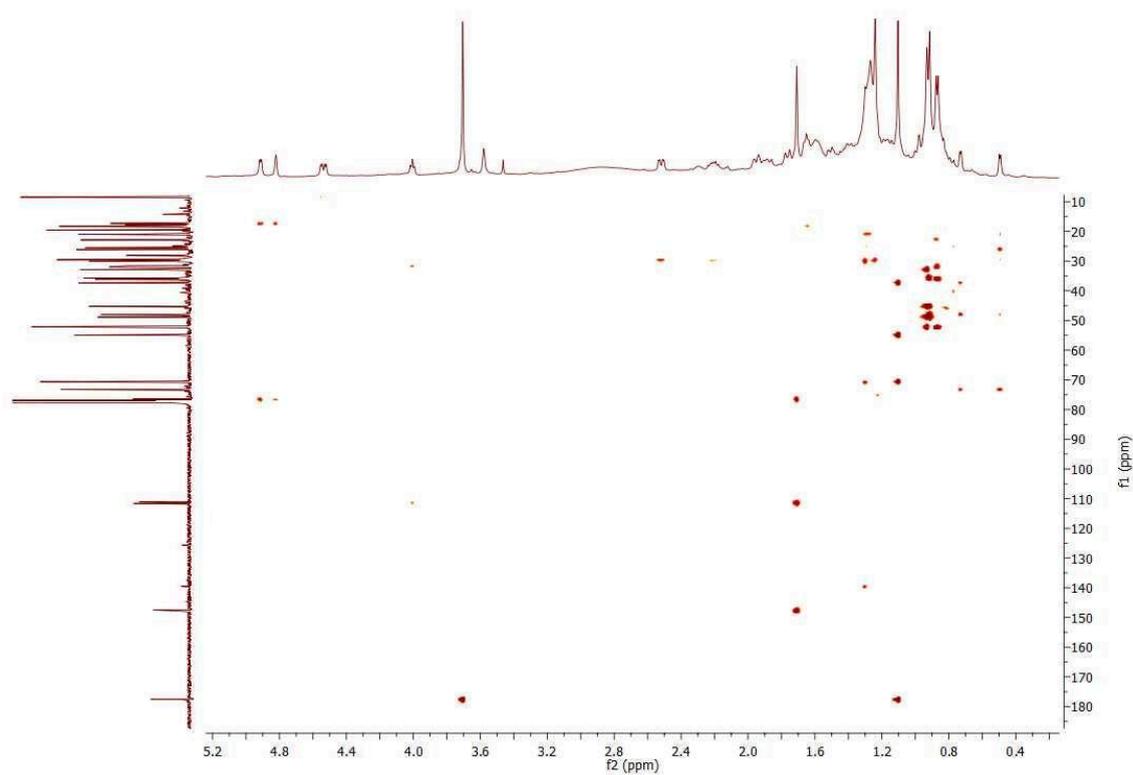


Tabela 1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 1+2 comparados com dados da literatura.

Substância 1+2				
Posição	$\delta^{13}\text{C}^*$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}^*$	$\delta^1\text{H}$
1	73,2	73,2	3,59 (t, 2,6)	3,58 (br t)
2	36,1	36,1	1,96	1,95 e 1,75 (m)
3	70,6	70,6	4,56 (dd, 12,3 e 4,6)	4,54 (dd, 12,1 e 4,3)
4	55	54,9	-	-
5	37,3	37,3	2,54 (dd, 12,5 e 4,3)	2,52 (dd, 12,3 e 3,8)
6	22,9	22,9	-	-
7	28,1	28,1	1,84	1,90 e 1,26 (m)
8	48	48	1,46	1,5 (m)
9	21	21	-	-
10	29,6	29,6	-	-
11	26,2	26,1	2,13	2,21 (m)
12	32,9	32,9	-	-
13	45,3	45,2	-	-
14	48,9	48,8	-	-
15	35,7	35,7	-	-
16	25,5	25,5	-	-
17	52,3	52,3	-	1,6
18	18,4	18,4	0,94 (s)	0,93 (s)
19	29,8	30	0,51 e 0,75 (d, 4,6)	0,50 e 0,73 (d, 4,2)
20	36	36	-	-
21	18,3	18,3	0,88 (d, 6,5)	0,87 (d, 5,9)
22	31,6	31,6	-	-
23	35,8	36	-	-
24	75,5/76,9	76,5/76,9	4,02 (t, 6,4)	4,01 (t, 6,2)
25	147,6/147,9	147,5/147,8	-	-
26	111,1/111,6	111,1/111,6	4,83 (br s) e 4,93/4,92 (br s)	4,82 (br s) e 4,92/4,91 (br s)
27	17,3/17,7	17,3/17,7	1,72 (s)	1,71 (s)
28	8,52	8,5	1,12 (s)	1,10 (s)
29	177,3	177,5	-	-
30	19,5	19,5	0,92 (s)	0,91 (s)
31	52,1	52,1	3,72 (s)	3,70 (s)

*Apresenta dados da substâncias Quadrangularoato M de metila (1) e 24-epiquadrangularoato M de metila (2) relatados na literatura (SANTOS, *et al.* 2022).

3.2. Substância 3 (FRH-6-3-9)

Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **3** mostraram certa semelhança com os dados espectrais da mistura de **1 + 2**, indicando que **3** também se trata de um triterpeno cicloartano. Pode-se destacar nos dados de RMN de ^1H a presença de dois dupletos em δ 0,51 e 0,75 ($J = 4,6$ Hz) referentes a um hidrogênio cada, sugerindo anel ciclopropânico de cicloartanos. Três simpletos em δ 0,93; 0,94 e 1,12 e um duplete a δ 0,88 ($J = 6,0$ Hz), integrados para três hidrogênios cada, indicaram a presença de metilas. Um duplo-duplete em δ 4,56 ($J = 12,2$ e 4,5 Hz) e um simpleto largo em δ 3,59 indicaram duas oxigenações na estrutura de **3**. Também foi observada uma metoxila pelo simpleto integrado a três hidrogênios em δ 3,72. Diferente do obtido para **1 + 2**, o espectro de **3** é notado pela ausência dos hidrogênios referentes à olefina.

No espectro de RMN de ^{13}C observa-se a presença de menos de 30 sinais, indicando que **3** trataria-se então de um nortriterpeno. A ausência de sinais duplicados, observados em **1 + 2**, indicou que **3** não se tratava de mistura uma epimérica e que as principais diferenças de **3** com **1 + 2** seria na cadeira lateral (C-20 a C-27). Observou-se a presença de uma carboxila acima de δ 177,4 e carbonos oximetínicos em δ 73,2 e 70,7. Para auxiliar na identificação da estrutura química de **3**, foram obtidos dados de RMN bidimensionais como HSQC e HMBC. Estes dados permitiram identificar que **3** era idêntico a **1 + 2** no que diz respeito anéis A-D, diferindo apenas na cadeia lateral, a qual tem 3 carbonos a menos, tratando-se de um tri-nortriterpeno, nomeado neste trabalho como melliflueno C. O ácido norquadrangulárico A, um tri-nortriterpeno similar ao melliflueno C, foi obtido anteriormente nos estudos com os frutos de *C. mellifluum* [7], essa substância difere apenas pela presença de mais uma carboxila em C-24 e pela ausência da metoxila. O melliflueno C é inédito na literatura.

Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H da substância 3, em CDCl_3 .

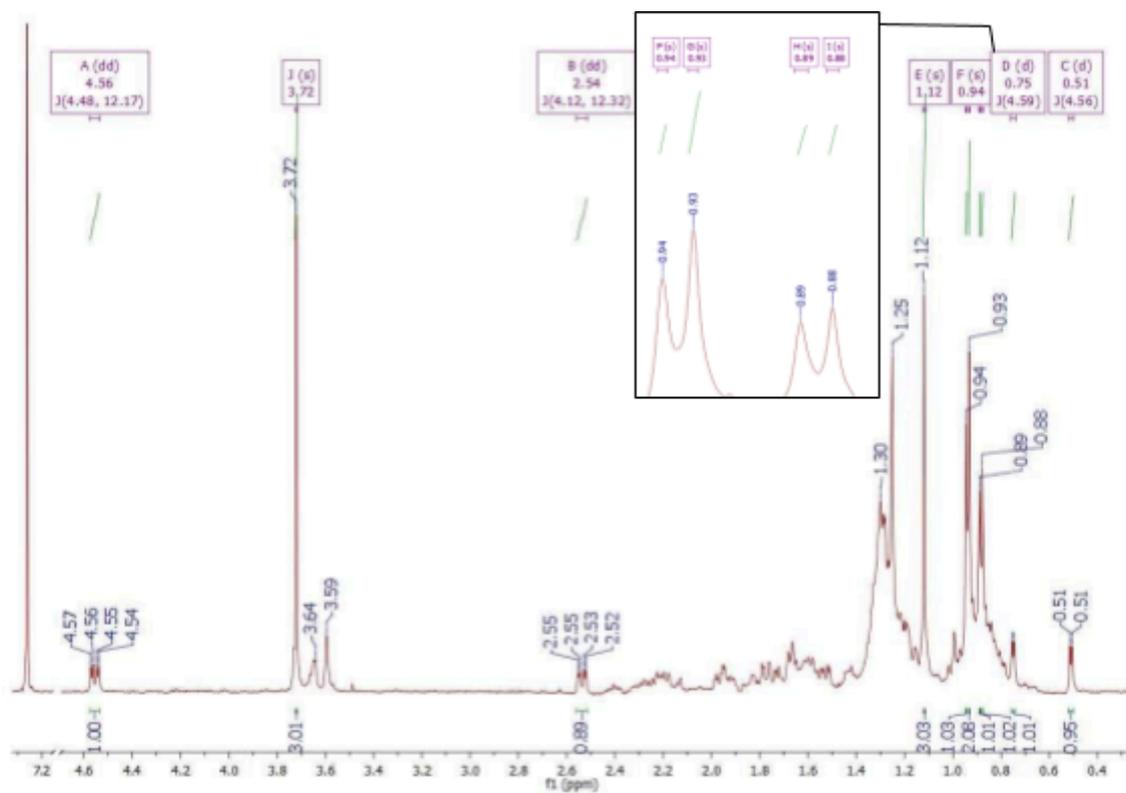


Figura 10 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3, em CDCl_3 .

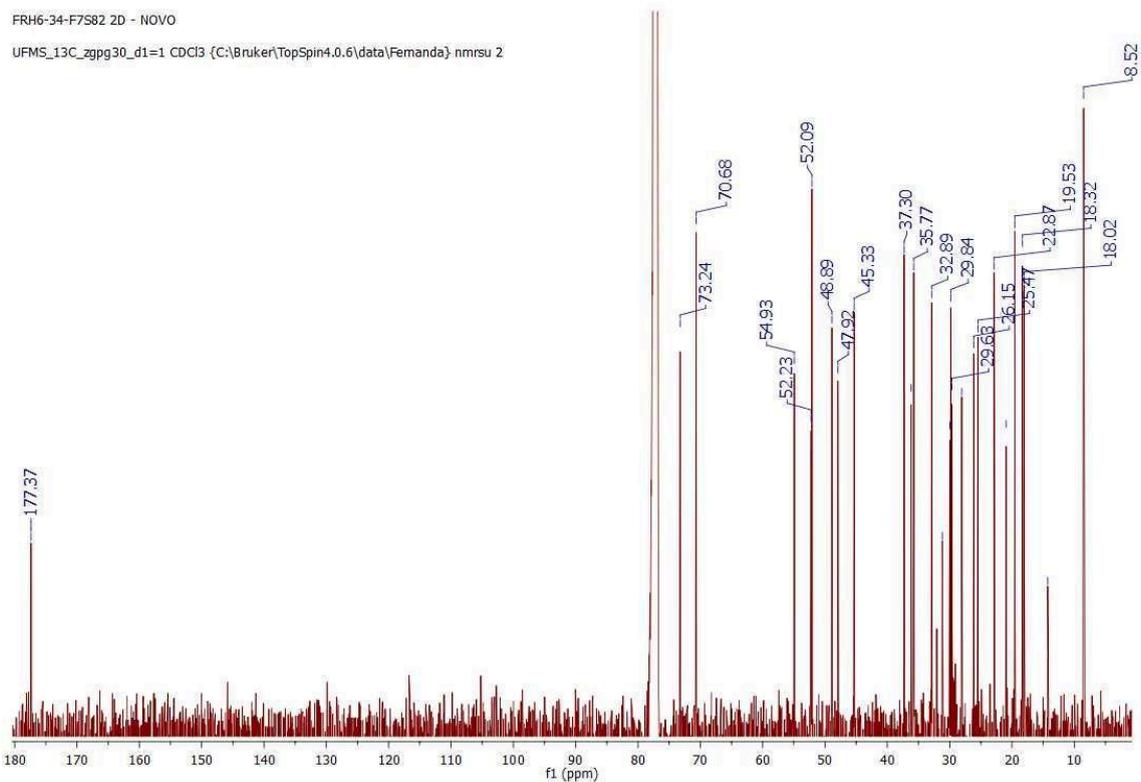


Figura 11 - Mapa de contorno do experimento HSQC da substância 3, em CDCl_3 .

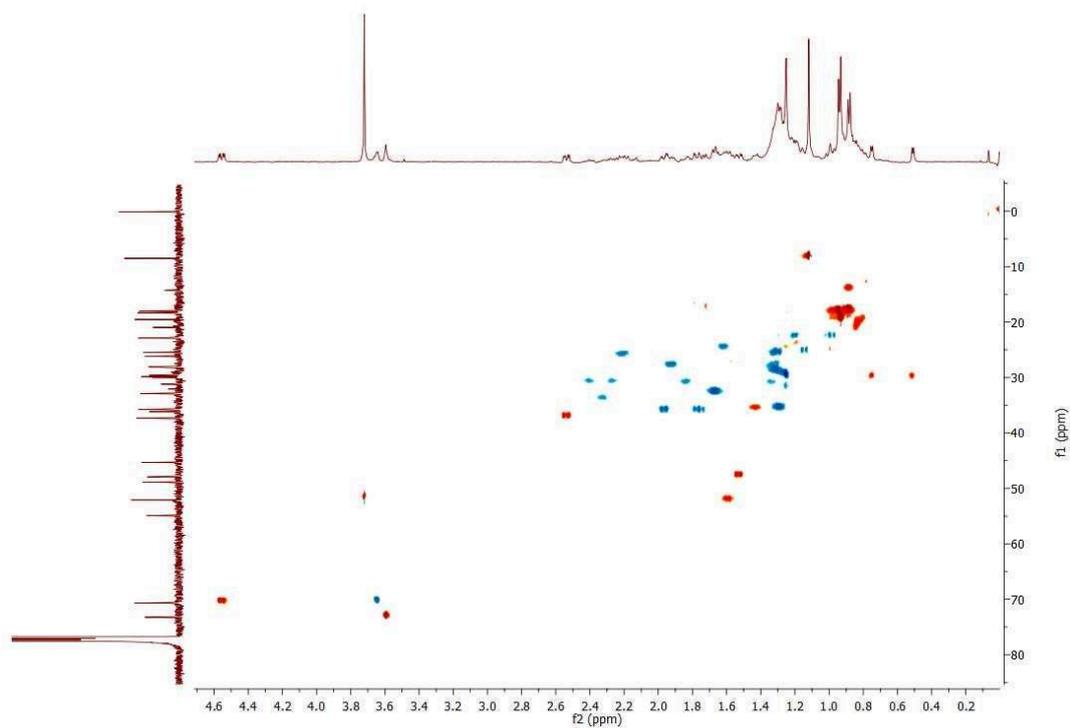
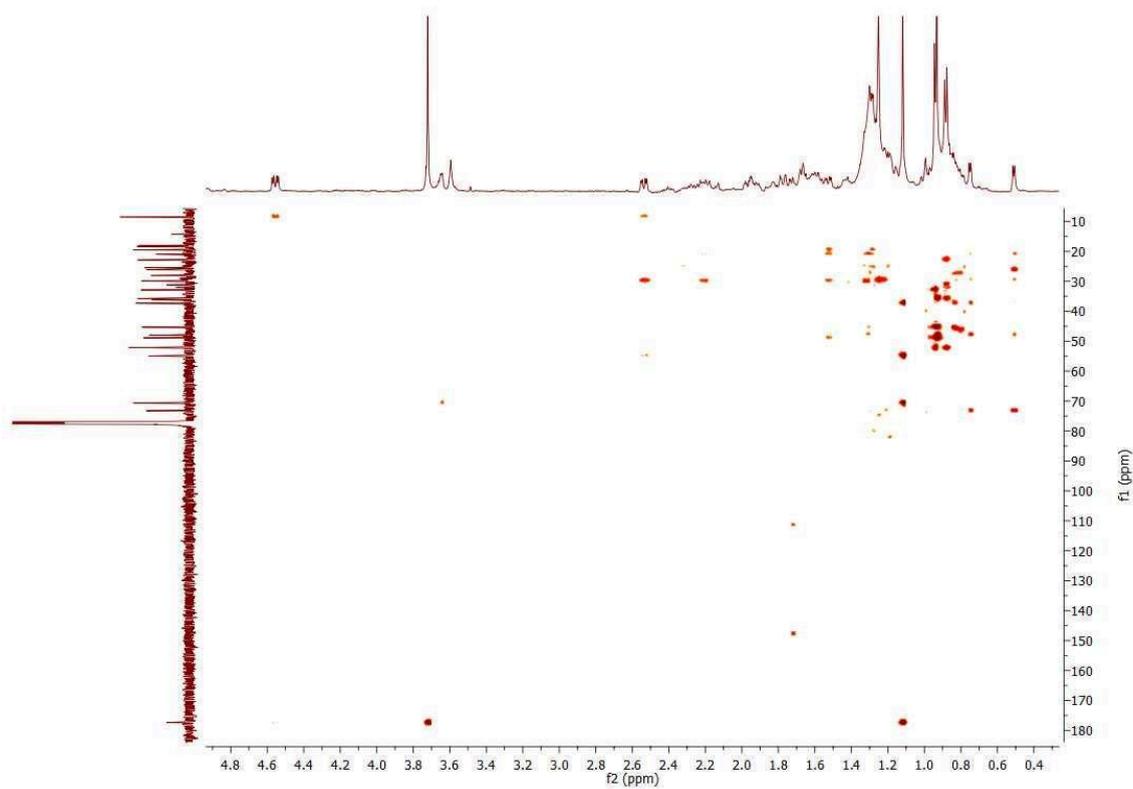


Figura 12 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância 3, em CDCl_3 .



4- CONCLUSÕES FINAIS/PARCIAIS

Tais resultados não só provam a caracterização dos constituintes majoritários das fases, como também comprovam a possibilidade e eficiência de isolar substâncias utilizando métodos clássicos. A partir da técnica de RMN possibilitou-se elucidar as estruturas dos compostos isolados. Ressalta-se que não há relatos da substância 3, melliflueno C, na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OLIVEIRA, P. L. L.; OLIVEIRA, E. R.; LIMA, A. M. C. **Distribuição e diversificação das espécies de *Plutella* (Lepidoptera: Plutellidae) no Brasil.** *Acta Botanica Brasilica*, v. 23, n. 3, p. 738-750, 2009.
2. WATT, J.M.; BREYER-BRANDWIJK, M. G. **The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa.** *E. and S. Livingstone Ltd*, London, p. 194, 1962.
3. **MINISTÉRIO DA SAÚDE.** Biblioteca Virtual em Saúde. “27/11 - Dia Nacional de Combate ao Câncer”. Disponível em: <<https://bvsmms.saude.gov.br/27-11-dia-nacional-de-combate-ao-cancer-3/>>.
4. SILVA, Julio. “Casos de câncer podem aumentar em 77% até 2050, segundo a OMS”. **Jornal da USP**, 08 março 2024. Disponível em: <<https://jornal.usp.br/radio-usp/casos-de-cancer-podem-aumentar-em-77-ate-2050-segundo-a-oms/>>.
5. DAWE, A.; Pierre, S.; TSALA, D. E.; HABTEMARIAM, S. **Phytochemical Constituents of *Combretum Loefl.* (Combretaceae),** *Pharmaceutical Crops*, v. 4, p. 38-59, 2013.
6. MIROWSKI, P. S.; OJEDA, M.; KOLLET, L. G; FREIRE, T. V.; POTT, A.; GARCEZ, W. S.; PERDOMO, R. T.; GARCEZ, F. R. **Selective tumor cell growth inhibition by lignans and a seco-triterpenoid from *Combretum mellifluum*.** *Natural Product Research*, v. 36, n. 24, p. 6224-6231, 2022.
7. KOLLET, L. G. **Estudo da composição química dos frutos de *Combretum mellifluum* e de seu potencial antineoplásico.** Defesa de TCC apresentado ao curso de química (bacharelado) da UFMS. 2020.
8. BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; TRAN, K. Q.; TANAKA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. et al. **Thirteen Novel Cycloartane-Type Triterpenes from *Combretum quadrangulare*.** *Journal of Natural Products*, p. 57-64, 1999.
9. ANOKWURU, et al. **Antibacterial and antioxidant constituents of *Acalypha***

wilkesiana. *Natural Product Research*, p. 1180-1183, v. 29, n. 12. 2014..

10. SANTOS, J. S.; FERREIRA, E. L. F.; LIMA, A. M.; FARIAS, R. R. S.; ARAÚJO, B. Q.; QUILLES JÚNIOR, J. C.; SANTOS, R. R. L.; CARVALHO, F. A. A.; MAHENDRA, R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.. **Four new cycloartane-type triterpenoids from the leaves of *Combretum mellifluum* Eichler: assessment of their antioxidant and antileishmanial activities.** *Journal of toxicology and environmental health, part A*, v. 85, n. 9, p. 364–375, 2022.