



# Novas isoflavonas isoladas das folhas de *Vatairea guianensis* Aubl. e atividade antiprolifetariva

New isoflavones isolated from *Vatairea guianensis* Aubl. leaves and antiprolifetarive activity

G. A. da Silva<sup>1\*</sup>; R. F. de Souza<sup>2</sup>; V. H. S. Marinho<sup>1</sup>; W. B. Pinheiro<sup>1</sup>; L. C. Pinto<sup>3</sup>; R. C. Montenegro<sup>3</sup>; A. C. Arruda<sup>1</sup>; M. N. da Silva<sup>1</sup>; M. S. P. Arruda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário do Guamá, 66075-970, Belém-Pará, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Naturais, Universidade do Estado do Pará, 68860-000, Salvaterra-Pará, Brasil

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário do Guamá, 66075-970, Belém-Pará, Brasil

\*geilsonalcantara@gmail.com

(Recebido em 02 de abril de 2020; aceito em 10 de novembro de 2020)

A espécie *Vatairea guianensis* Aubl, tem grande importância e aplicação na medicina tradicional no tratamento de doenças causadas por fungos dermatofíticos, sendo uma espécie promissora de moléculas bioativas, como antioxidantes, antifúngica dentre outras. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi realizar o estudo fitoquímico e testar a atividade citotóxica em linhagens tumorais. O fracionamento do extrato etanólico das folhas levaram ao isolamento e identificação estrutural de cinco metabólicos secundários pertencentes a classe das isoflavonas. Destacam-se dois: Vatairenona A (S1) e Vatairenona B (S2), que são novos produtos naturais. A elucidação estrutural foi realizada utilizando dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D, e em comparação com os dados da literatura. A substância Lupiwighteona (S3) apresentou citotoxicidade seletiva nas linhas de mama (MCF-7) e melanoma (SK-MEL-19), com valores  $IC_{50}$   $3,971 \pm 0,153$  e  $4,677 \pm 0,328 \mu M$ , sem causar hemólise em eritrócitos de camundongos, avaliada pelo método MTT *in vitro*. Os resultados são promissores, sendo o primeiro estudo do gênero *Vatairea* com atividade citotóxica de isoflavonas de produtos naturais.

Palavras-chave: *Vatairea guianensis*, atividade antiprolifetariva, isoflavonas

The species *Vatairea guianensis* Aubl, has great importance and application in traditional medicine in the treatment of diseases caused by dermatophytic fungi, being a promising species of bioactive molecules, such as antioxidants, antifungal among others. In this context, the objective of this study was to carry out the phytochemical study and to test the cytotoxic activity in tumor strains. The fractionation of the ethanolic extract of the leaves led to the isolation and structural identification of five secondary metabolic agents belonging to the isoflavone class. Two stand out: Vatairenone A (S1) and Vatairenone B (S2), which are new natural products. Structural elucidation was performed using 1D and 2D NMR spectroscopic data, and in comparison with literature data. The substance Lupiwighteona (S3) showed selective cytotoxicity in the breast (MCF-7) and melanoma (SK-MEL-19) lines, with  $IC_{50}$  values  $3.971 \pm 0.153$  and  $4.677 \pm 0.328 \mu M$ , without causing hemolysis in erythrocytes from mice, evaluated by the MTT method *in vitro*. The results are promising, being the first study of the genus *Vatairea* with cytotoxic activity of isoflavones from natural products.

Keywords: *Vatairea guianensis*, antiprolifetarive activity, isoflavones

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são exploradas pelo homem há mais de 5 mil anos na forma de extratos, elixires, emplastos, chás, banhos, e garrafadas entre outras formulações farmacêuticas, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. As antigas civilizações usavam extratos de plantas como fontes de fármacos naturais, para tratamento, cura e prevenção de diversos males de diversas etiologias causadas ao homem, sem qualquer conhecimento da composição química destes extratos [1] e também, sem nenhuma evidência científica de sua eficácia. Ainda hoje, populações tradicionais (índios, caboclos, população rural, ribeirinhos e quilombolas) utilizam as

plantas medicinais para este fim, baseadas apenas na experimentação empírica, envolvendo a miscigenação de conhecimentos europeus, indígenas e africanos [2], sendo pouco esclarecido o mecanismo de ação nos sistemas biológicos, visto a carência de estudos nessa área [3].

No Brasil, cerca de 80% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, a maioria tendo como base o conhecimento da medicina tradicional indígena, quilombola e comunidades tradicionais e/ou através de transmissão oral entre gerações, ou até mesmo recebem orientações de uso nos sistemas oficiais de saúde, como prática de cunho científico orientada pelos princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS). É válido ressaltar que esta prática incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social [4].

Neste contexto, surge o interesse em estudar a espécie *Vatairea guianensis* Aubl. conhecida na Amazônia como “faveira, fava de impigem, fava bolacha e anelím do igapó”, faz parte da família Faboideae, sendo amplamente distribuída em toda região, em destaque para o Brasil (Estados do Amazonas, Macapá e Pará). Muito utilizada na medicina tradicional no tratamento de doenças causadas por fungos dermatofíticos *Tinea corporea* e *Pitiríase versicolor* [5].

Em estudos anteriores com a espécie, resultaram na identificação de bioativos como: taninos, antocianinas, flavonoides, esteroides, triterpenos, isoflavonas e ausência de alcaloides [5, 6]. São relatados ainda ensaios biológicos com extratos dos frutos (antiparasitário, antifúngico, anti-inflamatório) e alburno (antioxidante) [7, 8]. Nenhum registro de estudo *in vitro* foi encontrado sobre a espécie, relatando a atividade antiproliferativa, tanto para extratos quanto para metabólitos secundários isolados, tornando necessária a procura de novos agentes antitumorais [9, 10].

O câncer é um problema de saúde pública e uma das doenças que afeta milhares de pessoas em todo o Mundo, no Brasil o número de casos cresce a cada ano. Atualmente as principais causas são fatores externos como: tabagismo, alcoolismo, exposição excessiva ao sol, alguns microorganismos e inatividade física; e internos: condições imunológicas, mutações genéticas e hormonais. O câncer pode surgir em qualquer parte do corpo, entretanto, alguns órgãos são mais afetados do que outros; e cada órgão, por sua vez, pode ser acometido por tipos diferenciados de tumor, mais ou menos agressivos [11].

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele) e tem predominância em adultos brancos, representa apenas 4,6% das neoplasias malignas da pele, sendo o tipo mais grave em razão da sua alta possibilidade de metástase. Os tumores do estômago apresentam-se, predominantemente, na forma de dois tipos histológicos: adenocarcinoma (responsável por 95% dos tumores) e linfoma (diagnosticado em cerca de 3% dos casos). O câncer de mama é o tipo mais comum nas mulheres, as taxas de incidência são influenciadas, dentre outros fatores, pela idade, história reprodutiva da mulher, predisposição genética, doença benigna prévia, estilo de vida, se diagnosticado e tratado precocemente o prognóstico é bom [11].

Desta forma, este trabalho teve por objetivo descrever o isolamento de dois novos produtos naturais pertencentes a classe das isoflavonas além de avaliar os efeitos citotóxicos do extrato etanólico, fração acetato de etila e metabólito isolado das folhas da espécie *V. guianensis* frente as linhagens celulares tumorais humanas: SK-MEL-19 (Melanoma humano), AGP-01 (Ascite gástrica), MCF-7 (Mama humano).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e identificação do material botânico

As folhas (3 Kg) da espécie *V. guianensis* Aubl. (Figura 1), foram coletados pelo Sr. Manoel Cordeiro dos Reis (Embrapa Amazônia Oriental), na cidade de Belém/Pará, na área do lote 15, próximo da Feira da Ceasa. A exsiccata encontra-se depositada no Herbário da Instituição e identificada com as seguintes informações: Herbário IAN – nº de registro – 187050.



Figura 1: *Vatairea guianensis* - (A) árvore, (B) folhas, (C) frutos.

## 2.2 Processamento do material vegetal, obtenção do extrato e fração

O material vegetal *in natura* foi seco em estufa com circulação de ar a 40 °C por 72 horas e pulverizado em moinho de facas, em seguida, um total de 1,2 Kg foi extraído a temperatura ambiente por maceração com etanol 95 °GL com renovação de solvente a cada 48 horas. O solvente foi eliminado em evaporador rotativo a 50 °C sob pressão reduzida, fornecendo o extrato etanólico das folhas (EEFol m=180 g). Parte desse extrato (60 g) foi dissolvida em etanol:água (1:1 v/v) e submetida à partição com dois litros de hexano (Hex) e dois litros de acetato de etila (AcOEt), após a evaporação dos solventes foram obtidas as frações: hexânica das folhas (FhexFol m=9,6 g) e acetato de etila das folhas (FACOEtFol m=27,6 g).

## 2.3 Isolamento dos constituintes químicos

Uma alíquota de 2 g da fração (FACOEtFol) foi submetida a uma coluna cromatográfica (CC), utilizando sílica gel 60 e eluentes em gradiente crescente de polaridade hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), obtendo-se assim, 7 frações. A fração F2-3 (Hex/AcOEt 30%/40%), foi submetida à nova CC, totalizando 8 subfrações, as subfrações R3 (H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1) e R5-6 (H<sub>2</sub>O/MeOH 7:3 e 8:2), foram purificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando coluna Gemini C<sub>18</sub> (250 mm x 10 mm, 5 μm), em um comprimento de onda de 260 nm, com fluxo de 4,7 mL/min e um volume de injeção de 500 μL e 15 mg de massa injetada além de H<sub>2</sub>O:MeOH 45%; as quais levaram ao isolamento dos metabólitos: S1 (30 mg); S3 (35 mg), S4 (15 mg) e S5 (50 mg), respectivamente. A fração F4-5, foi submetida a CC, com os solventes Hex/AcOEt/MeOH, totalizando 188 frações, as frações 71 a 119 foram reunidas, dando origem a subfração (G71-119), sendo purificada por CLAE, com a mesma metodologia descrita acima, resultando no isolamento de S2 (35 mg).

## 2.4 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) foi realizado para mensurar a viabilidade celular [12]. Foram usadas as linhagens celulares tumorais humanas: SK-MEL-19 (Melanoma humano), AGP-01 (Ascite gástrica), MCF-7 (Mama humano), todas as células foram cultivadas em meio (DMEM) (Gibco<sup>®</sup>), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco<sup>®</sup>) e 100 μg /mL de penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina (Gibco<sup>®</sup>) e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C.

O extrato etanólico das folhas (EEFol) e a fração acetato de etila (FrACOEtF) de *V. guianensis* foram previamente solubilizados em DMSO e dissolvidos em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco<sup>®</sup>) em dose única na concentração 50 μg/mL, enquanto que a substância S3 foi dissolvida para obtenção de uma curva de 0 μM (controle negativo com o solvente DMSO 0,01%) até 20 μM e posteriormente incubados por 72 horas. A doxorrubina (uma droga anticâncer bem conhecida na clínica médica) foi utilizada como controle positivo.

O efeito do extrato e fração foi quantificado como percentuais de inibição em relação à absorbância do controle através de espectrofotometria, utilizando leitor de ELISA SpectraMax i3 (Molecular Devices Inc. - Sunnyvale, CA, USA) no comprimento de onda de 550 nm. A partir das

absorbâncias da curva de S3 (0-20  $\mu\text{M}$ ) foi calculada a  $\text{CI}_{50}$  no programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 8.0.1 (GraphPad Software Inc. – San Diego, CA, EUA). Todas as amostras foram testadas em triplicatas.

## 2.5 Atividade hemolítica em eritrócitos de camundongo

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços usando uma suspensão de eritrócitos de 2% em camundongos em 0,85% NaCl contendo 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . O metabólito foi testado em 200  $\mu\text{M}$ . Após incubação à temperatura ambiente por 1 hora e centrifugação o sobrenadante foi removido, e a hemoglobina liberada foi medida espectrofotometricamente a 540 nm. DMSO era usado como controle negativo, e Triton X-100 (1%) foi usado como controle positivo [13].

## 2.6 Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os dados obtidos foram submetidos às análises estatísticas utilizando software GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 8.0.1 (GraphPad Software Inc. – San Diego, CA, EUA). Os dados foram tratados por regressão não linear, adotando equação logística com 5 parâmetros e o resultado plotado em função da inibição dose resposta da atividade antiproliferativa do extrato e substâncias isoladas. Os dados foram analisados quanto as diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento e estimados pela correlação Spearman ( $\delta$ ). Todos os testes estatísticos foram realizados com significância de nível com  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Estudo fitoquímico

O fracionamento do extrato etanólico das folhas conduziram ao isolamento de dois novos produtos naturais, pertencentes a classe das isoflavonas: Vatairenona A (S1) e Vatairenona B (S2), juntamente a três substâncias já relatadas na literatura e identificadas como: Lupiwighteone (S3) [14], 3'-metoxi-8-prenilorobol (5,7,4'-triidroxi-8-(3,3-dimetilalil)-3'-metoxi-isoflavona) (S4) [15] e 5,7,3'-triidroxi-8-(3,3-dimetilalil)-4'-metoxi-isoflavona (S5) [16] (Figura 2).

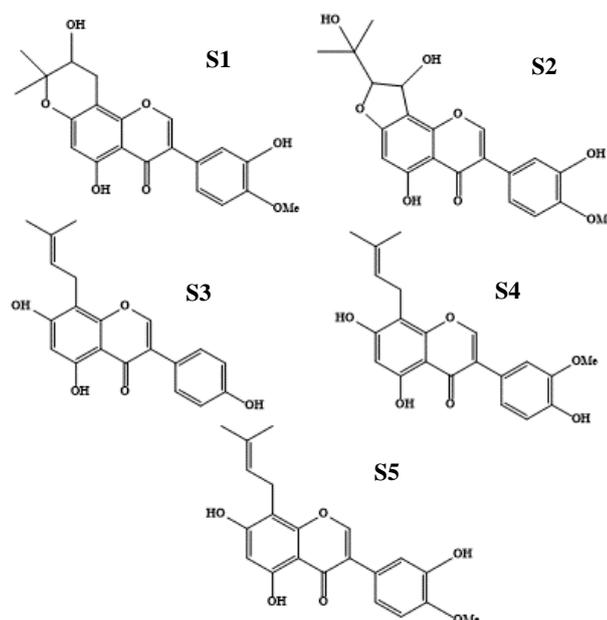


Figura 2: Estruturas das substâncias isoladas da fração acetato de etila das folhas (FrAcOEtFol) de *V. guianensis*.

O metabólito S1, apresentou-se como um sólido amarelo claro e solúvel em piridina, sua estrutura foi determinada com base na análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D e massa de alta resolução (HRESITOF-MS). Para facilitar o entendimento, o assinalamento segue abaixo:

- ✓ Um conjunto de sinais no RMN de  $^1\text{H}$  na região de hidrogênios aromáticos, um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,75 com acoplamento meta  $J = 2,1$  Hz; um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,32 com acoplamentos orto/meta  $J = 8,4$  e  $2,1$  Hz e um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,10 com acoplamento orto  $J = 8,4$  Hz, formando um sistema *AMX*, típico de anel aromático 1,3,4-trissubstituído, comumente relacionado ao anel B de flavonoide e relacionados aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5, respectivamente.
- ✓ Um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,65, no qual as multiplicidades e constantes indicam ao H-6 do anel A de flavonoide.
- ✓ Um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  8,19, relacionado a hidrogênio ligado a  $\text{Csp}^2$  oxigenado, típico de H-2 de isoflavonas [17].
- ✓ Um singlete referente ao grupo metoxila ( $\delta_{\text{H}}$  3,81) (OMe-4').
- ✓ Dois singletos em  $\delta_{\text{H}}$  1,57 e 1,60, integrando para seis hidrogênios cada, característicos de metilas.
- ✓ Um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  13,42, característico de hidroxila quelada à carbonila na posição C-4
- ✓ Dois duplos dubletos, um em  $\delta_{\text{H}}$  3,04 com constantes  $J = 5,1$  e  $16,2$  Hz e  $\delta_{\text{H}}$  3,21 com constantes  $J = 7,0$  e  $16,2$  Hz, típicos de hidrogênios metilênicos em acoplamento geminal e outro dubleto vicinal oximetínico em  $\delta_{\text{H}}$  4,17 com constante  $J = 5,7$  e  $7,0$  Hz (Figura 3).

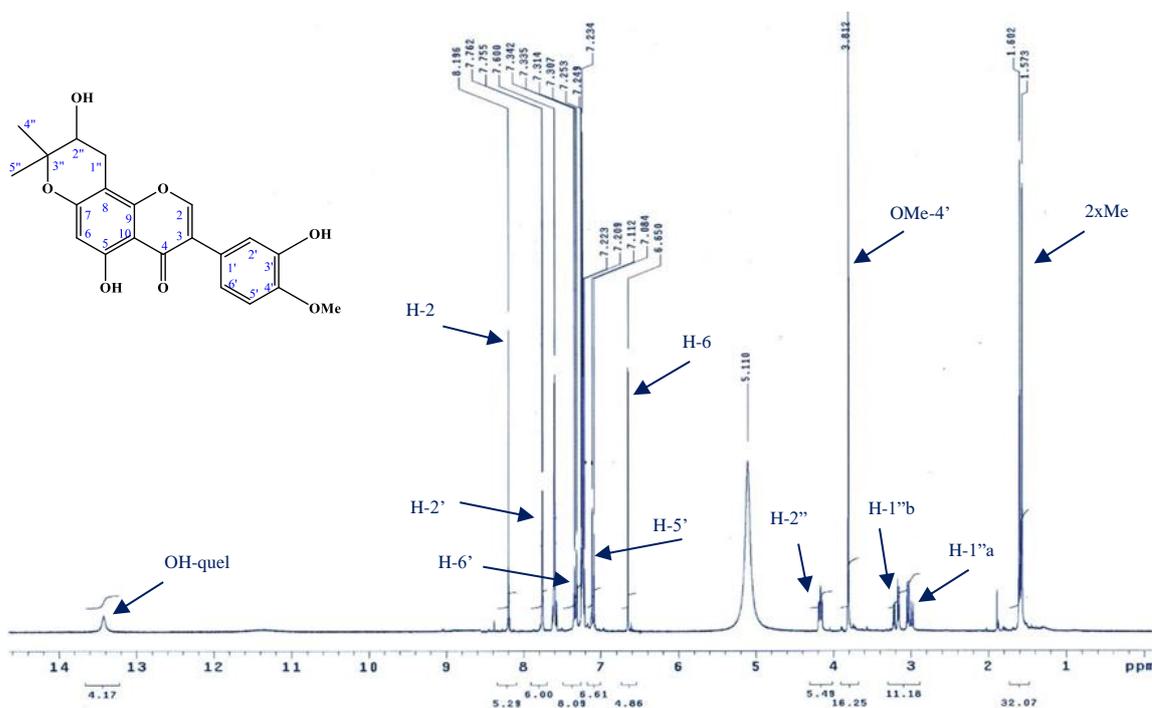


Figura 3: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de S1.

De acordo com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância S1, foi observado a presença de 21 carbonos, valor este igual ao número de carbono presente na estrutura, dentre eles seis carbonos metínicos (CH), três metílicos ( $\text{CH}_3$ ) e onze não hidrogenados. O sinal mais desblindado em 181,5 ppm atribuído ao carbono carbonílico (C-4), os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  161,3 (C-7), 160,1 (C-5), 155,8 (C-9), 149,2 (C-4') e 148,4 (C-3') foram atribuídos aos cinco átomos de carbono aromáticos oxigenados (Figura 4).

A confirmação das atribuições aos carbonos hidrogenados, foi realizada através do experimento bidimensional HETCOR, nesse mapa foi observado uma correlação entre o sinal em 153,9 ppm (C-2) e o hidrogênio H-2 (8,19 ppm). E entre os sinais: 117,9 (C-2'), 112,6 (C-5'), 120,6 (C-6'), 100,4 (C-6), 26,1 (C-4'') e 21,5 (C-5'') com os hidrogênios 7,75 (H-2'), 7,10 (H-5'), 7,32 (H-6'), 6,65 (H-

6), 1,57 (H-4'') e 1,60 (H-5''), respectivamente. Além dos sinais em 26,1 ppm (C-1'') com os hidrogênios geminais em H-1''a (3,04 ppm) e H-1''b (3,21 ppm) e vicinal em 68,5 ppm (C-2'') com H-2'' (4,17 ppm) (Figura 5).

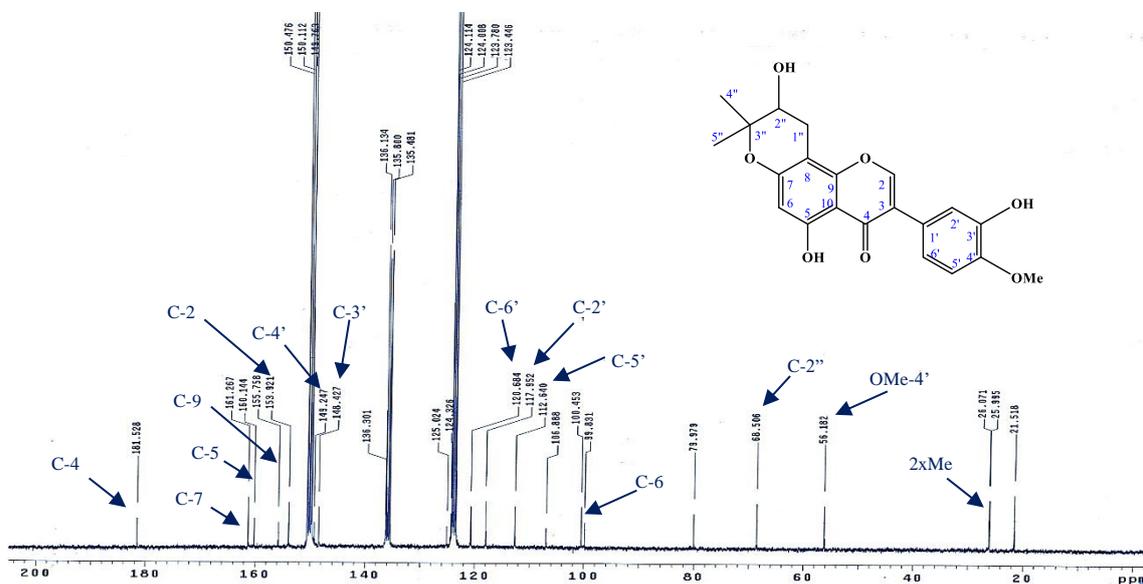


Figura 4: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de S1.

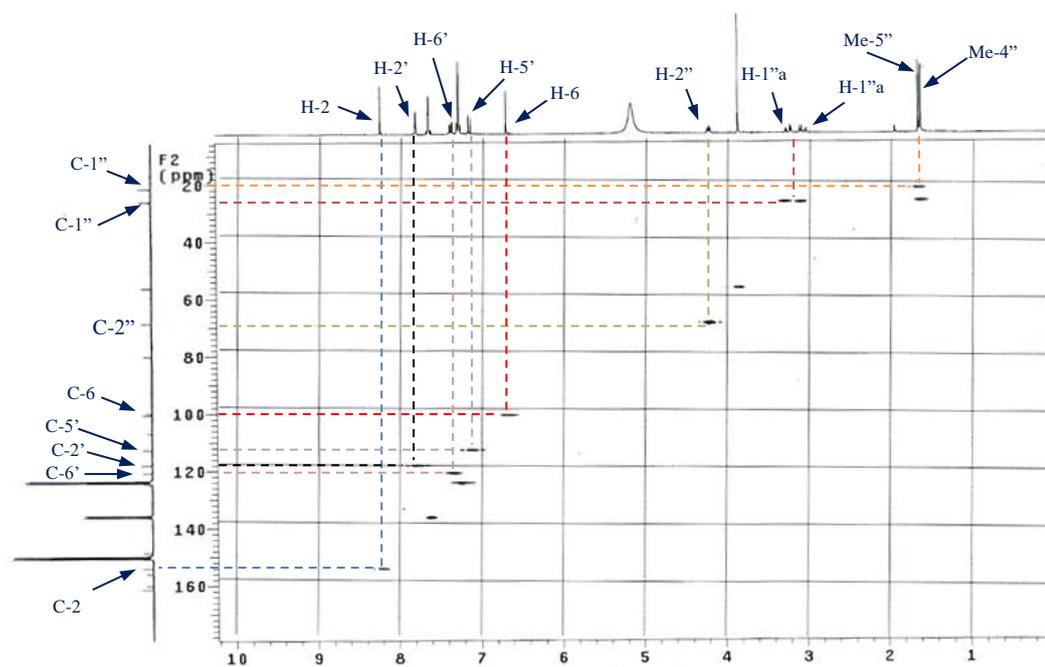


Figura 5: Mapa de correlação HETCOR (300 x 75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de S1.

O padrão de substituição de S1 foi definido com base no mapa de correlações HMBC. No mapa foi observado correlações  $^3J_{\text{C,H}}$  entre os sinais de hidrogênios e carbonos, assinalados a seguir:

- ✓ Duas correlações a  $^3J_{\text{C,H}}$  entre o hidrogênio H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  8,19) e o metilênico H-1''b ( $\delta_{\text{H}}$  3,21) com um mesmo sinal de carbono aromático oxidado totalmente substituído em  $\delta_{\text{C}}$  155,8 (C-9), posicionando o anel 2,2-dimetil-pirano modificado entre os carbonos C-7 e C-8 do anel A do esqueleto isoflavônico [18].

- ✓ Uma correlação a  $^3J_{C,H}$  entre o sinal do hidrogênio H-1''b ( $\delta_H$  3,21) com outro sinal de carbono aromático oxidado totalmente substituído em  $\delta_C$  161,3 atribuído a C-7.
- ✓ Duas correlações a  $^2J_{C,H}$  com o sinal do hidrogênio H-6 ( $\delta_H$  6,65), com dois carbonos aromáticos oxidados, um atribuído a C-7 ( $\delta_C$  161,3) e outro em  $\delta_C$  160,1 atribuído C-5.
- ✓ Duas correlações  $^3J_{C,H}$  entre os sinais de H-6' ( $\delta_H$  7,32) e os hidrogênios da metoxila (OMe) ( $\delta_H$  3,81) com o sinal de carbono aromático oxidado em  $\delta_C$  149,2 atribuído a C-4' (Figura 6).

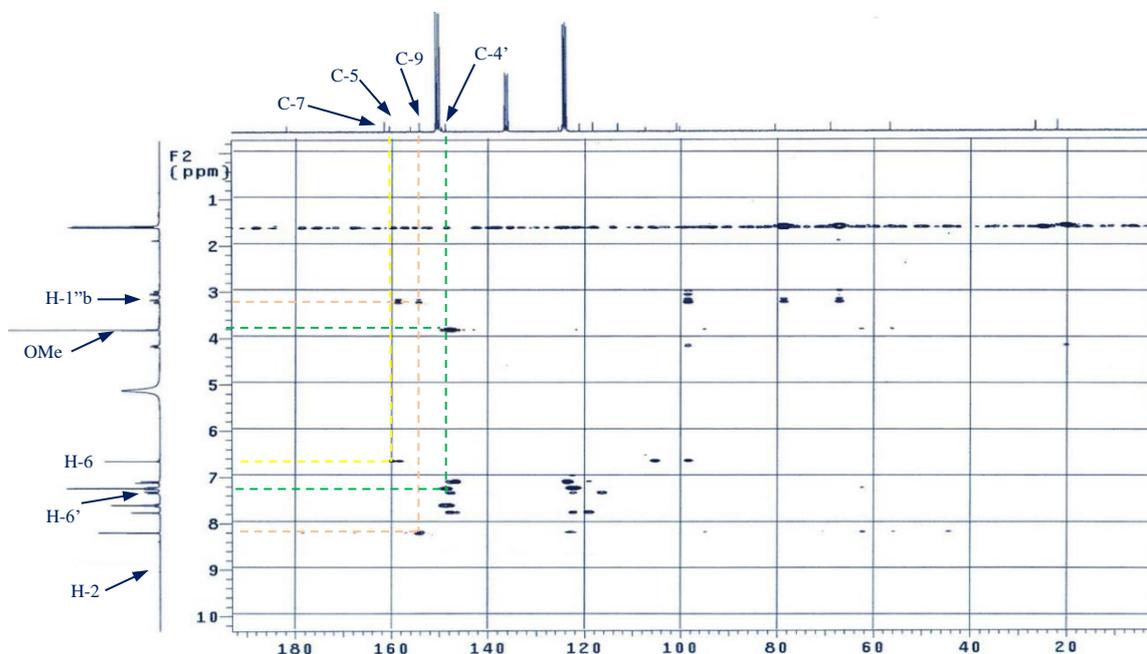


Figura 6: Mapa de correlação HMBC (300 x 75 MHz,  $C_5D_5N$ ) de S1.

A posição do grupo metoxila foi ratificada pela análise do mapa *NOESY*, quando os hidrogênios da metoxila OMe ( $\delta_H$  3,81) foram irradiados, observou-se o efeito *overhauser* no sinal atribuído a H-5' ( $\delta_H$  7,10) devido a aproximação espacial desses hidrogênios entre os sinais, corroborando com a ligação do grupo OMe na posição C-4' (Figura 7).

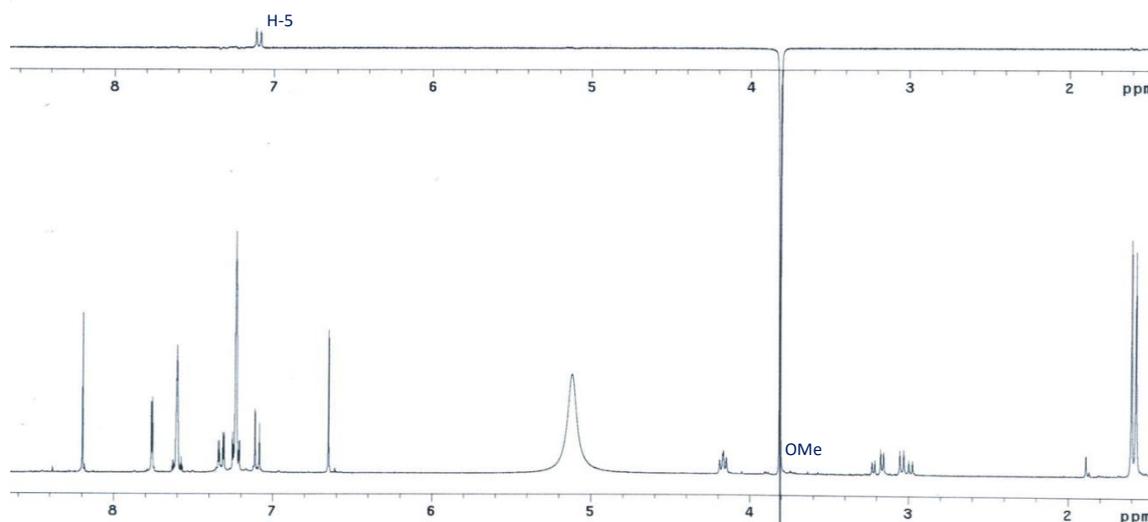


Figura 7: Espectro de NOESY (300 MHz,  $C_5D_5N$ ) de S1.

A elucidação final da estrutura de S1 foi obtida com base no espectro de massas de alta resolução, foi observado no espectro o pico do íon quasi-molecular  $[M+H]^+$  em  $m/z$  385,1288, correspondente à fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_7$  (Figura 8). A reunião de todos os dados discutidos levou à determinação da estrutura de S1, como um novo produto natural que recebeu o nome de Vatairenona A (Figura 9).

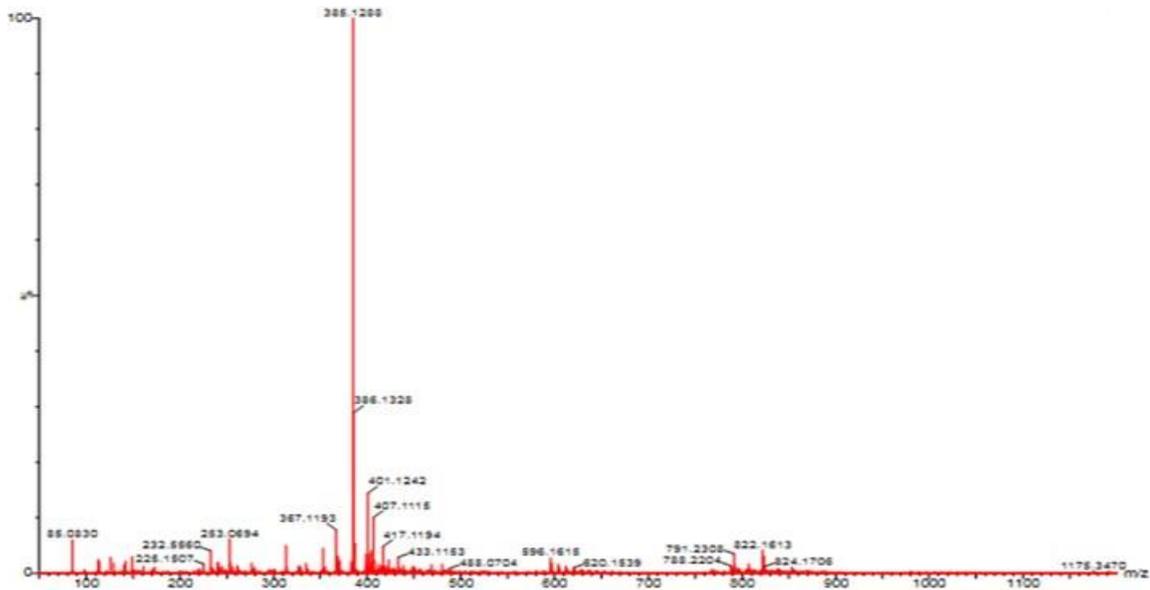


Figura 8: Espectro de HRESITOF-MS de S1.

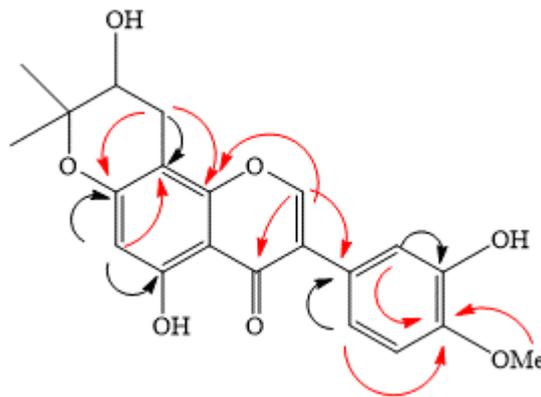


Figura 9: Correlações  $^{2,3}J_{C,H}$  observadas no espectro de HMBC de S1.

O metabólito S2, apresentou-se como um sólido amorfo marrom e solúvel em metanol, sua estrutura foi determinada com base na análise dos espectros de RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$ , 2D e massa de alta resolução (HRESITOF-MS). Conforme o assinalamento segue abaixo:

- ✓ Um conjunto de sinais no RMN de  $^1H$  na região de hidrogênios alifáticos, sendo dois singletos em  $\delta_H$  1,26 e 1,28 relacionados à duas metilas.
- ✓ Um singlete em  $\delta_H$  3,88, típico de uma metoxila ligada ao anel aromático.
- ✓ Um singlete em  $\delta_H$  8,12, catacterístico de H-2 de isoflavonas.
- ✓ Dois dubletos em  $\delta_H$  5,54 e 4,40 com constante de acoplamento de  $J = 3,0$  Hz, comumente relacionados aos hidrogênios do anel diidrofurano condensado ao anel aromático.

- ✓ Dois singletos largos em  $\delta_H$  7,05 e 6,98, com deslocamentos químicos compatíveis com estruturas que apresentam um núcleo flavonoídico 1',3',4'-trissubstituído do tipo ABX para o anel B.
- ✓ Um singlete em  $\delta_H$  6,30, característico de anel A de isoflavonoide pentasubstituído (Figura 10).

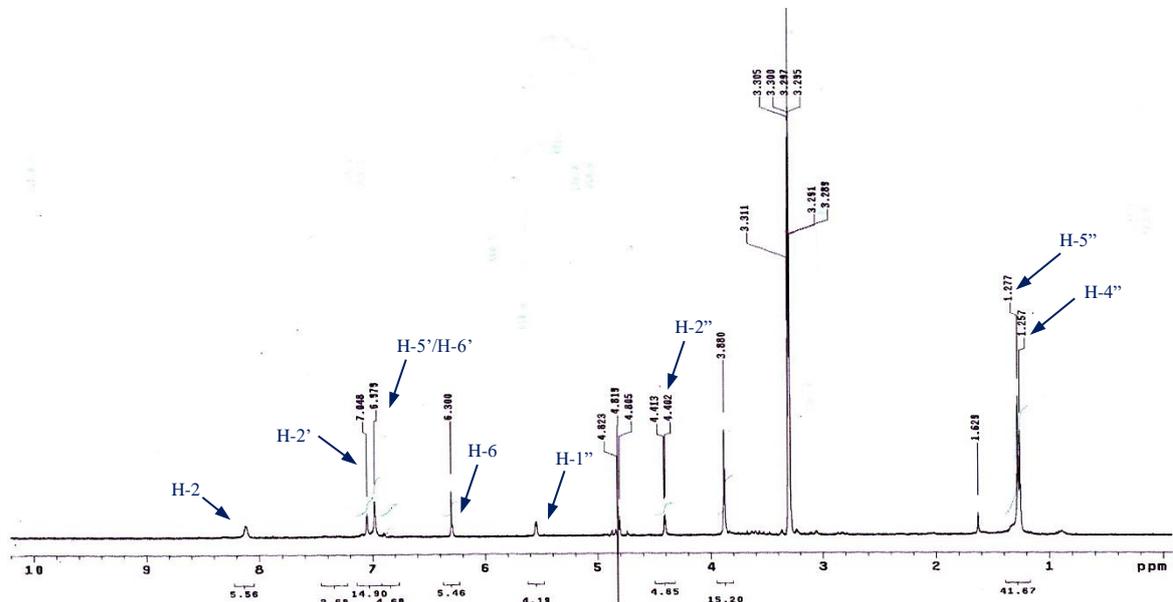


Figura 10: Espectro de RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CD_3OD$ ) de S2.

De acordo com o espectro de RMN  $^{13}C$  da substância S2, foi observado a presença de 21 carbonos, valor este igual ao número de carbono presente na estrutura de S1, dentre eles sete carbonos metínicos (CH), três metílicos ( $CH_3$ ) e onze não hidrogenados. O sinal mais desblindado em 182,1 ppm atribuído ao carbono carbonílico (C-4), os sinais em  $\delta_C$  168,6 (C-7), 166,0 (C-5), 155,4 (C-9), 149,4 (C-4') e 147,5 (C-3') foram atribuídos aos cinco átomos de carbono aromáticos oxigenados totalmente substituídos (Figura 11).

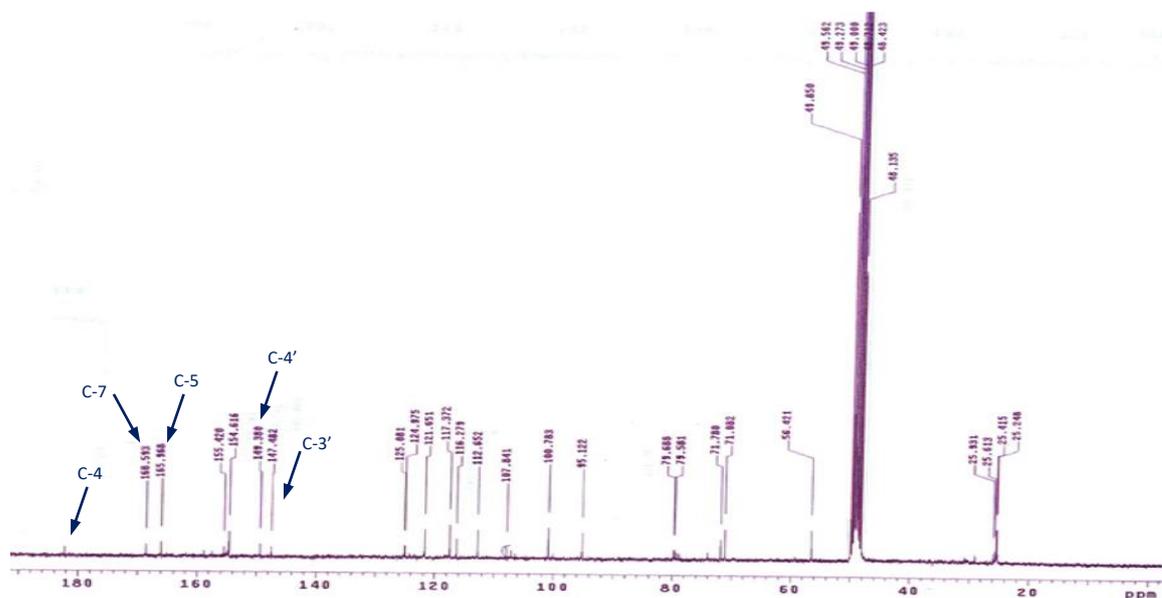


Figura 11: Espectro de RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CD_3OD$ ) de S2.

As atribuições aos carbonos hidrogenados, foi realizada através do experimento bidimensional HETCOR, nesse mapa foi observado uma correlação entre o sinal em 154,6 ppm (C-2) e o hidrogênio H-2 (8,12 ppm). Além das correlações entre os sinais: 117,4 (C-2'), 116,3 (C-5'), 112,6 (C-6'), 95,1 (C-6) com os hidrogênios 7,04 (H-2'), 6,97 (H-5'), 6,97 (H-6'), 6,30 (H-6), respectivamente. Os sinais em 71,1 (C-1'') com o hidrogênio em 5,54 (H-1'') e 100,8 (C-2'') com 4,40 (H-2'') do anel diidrofurano (Figura 12).

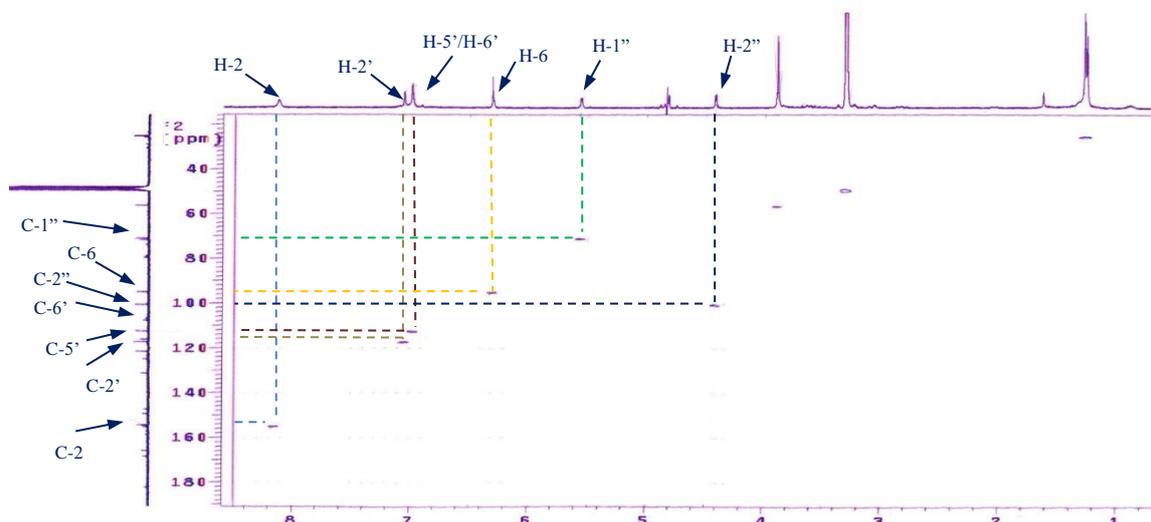


Figura 12: Mapa de correlação HETCOR (300 x 75 MHz,  $C_5D_5N$ ) de S2.

O padrão de substituição de S2 foi definido com base no mapa de correlações HMBC. No mapa foi observado correlações  $^3J_{C,H}$  entre os sinais de hidrogênios e carbonos, conforme descrição abaixo:

- ✓ Duas correlações a  $^3J_{C,H}$  entre o hidrogênio H-2 ( $\delta_H$  8,12) e H-1'' ( $\delta_H$  5,54) com um mesmo sinal de carbono aromático oxidado totalmente substituído em  $\delta_C$  155,4 (C-9), posicionando o anel diidrofurano entre os carbonos C-7 e C-8 do anel A do esqueleto isoflavônico [18].
- ✓ Outra correlação do sinal de H-1'' a  $^3J_{C,H}$  com outro carbono aromático oxidado, atribuído a C-7 (168,6).
- ✓ Duas correlações a  $^3J_{C,H}$  com o singlete H-6 (6,30) com dois carbonos aromáticos oxidados totalmente substituídos, atribuídos a C-7 (168,6) e C-5 (166,0), respectivamente (Figura 13).

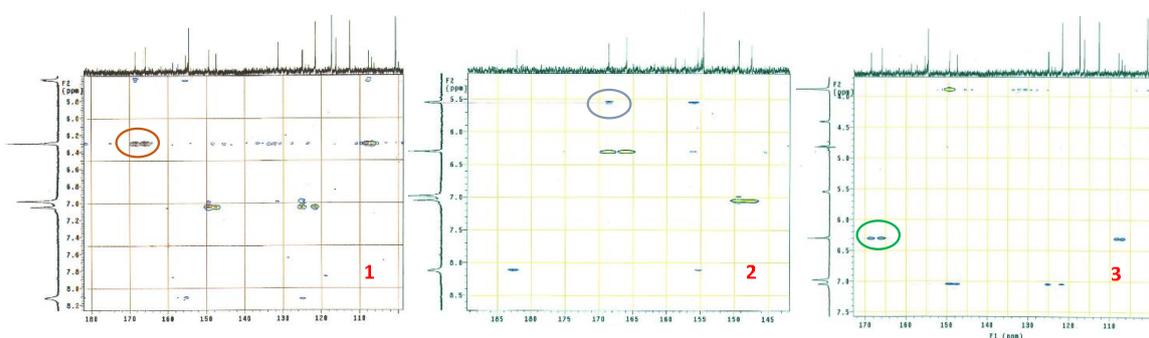


Figura 13: Mapas de correlações de HMBC (Expansões 1, 2 e 3) (300 x 75 MHz,  $C_5D_5N$ ) de S2.

A posição do grupo metoxila foi confirmada pela análise do mapa NOESY, quando os hidrogênios da metoxila OMe ( $\delta_H$  3,88) foram irradiados, observou-se o efeito *overhauser* no sinal atribuído a H-5'/H-6' ( $\delta_H$  6,98) devido a aproximação espacial desses hidrogênios entre os sinais, corroborando com a ligação do grupo OMe na posição C-4' (Figura 14).

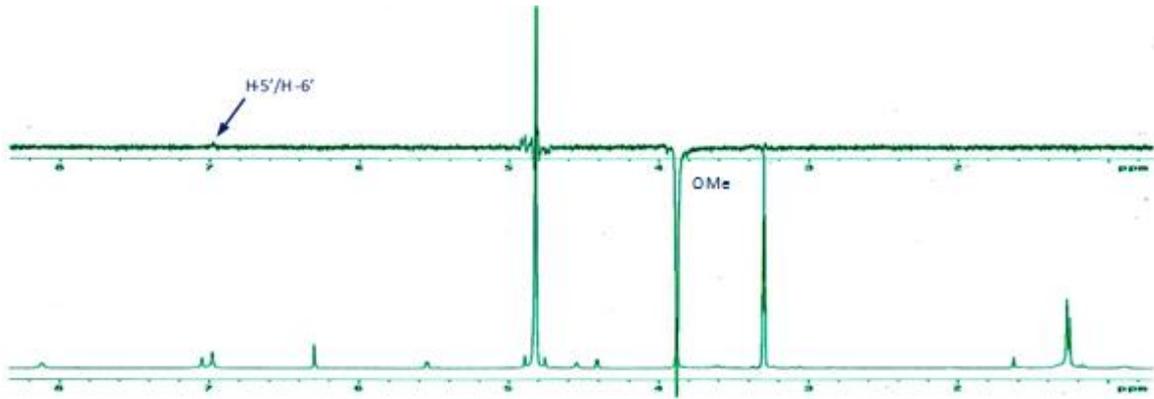


Figura 14: Espectro de NOESY (300 MHz,  $C_5D_5N$ ) de S2.

A elucidação final da estrutura de S2 foi obtida com base no espectro de massas de alta resolução, foi observado no espectro o pico do íon quasi-molecular  $[M+H]^+$  em  $m/z$  401,1241, correspondente à fórmula molecular  $C_{21}H_{21}O_8$  (Figura 15). A reunião de todos os dados discutidos conduziu a determinação da estrutura de S2, como um novo produto natural que recebeu o nome de Vatairenona B (Figura 16) (Tabela 1).

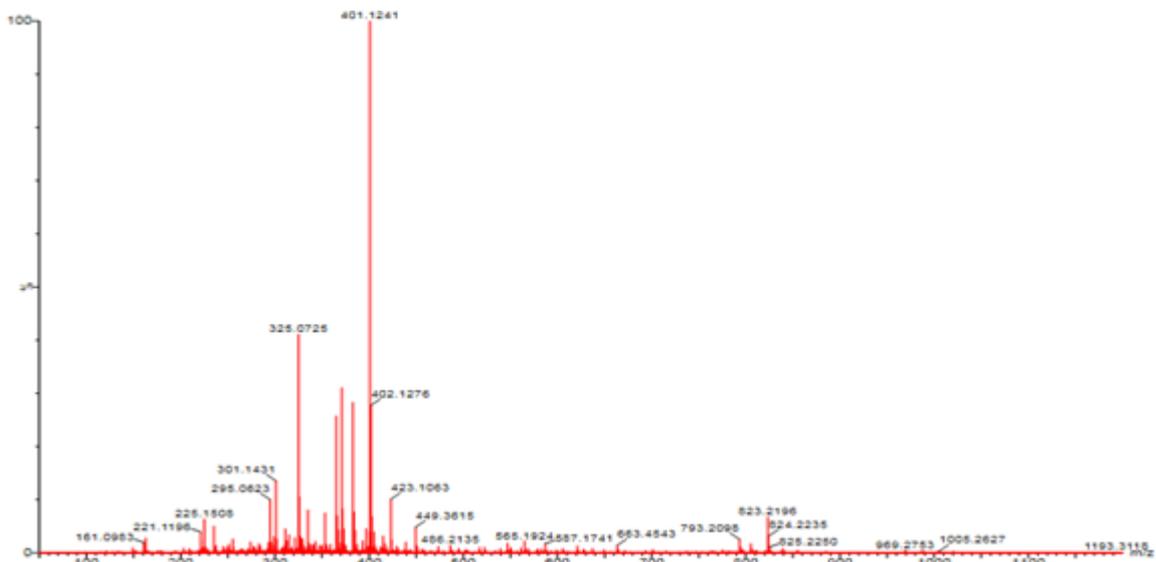


Figura 15: Espectro de HRESITOF-MS de S2.

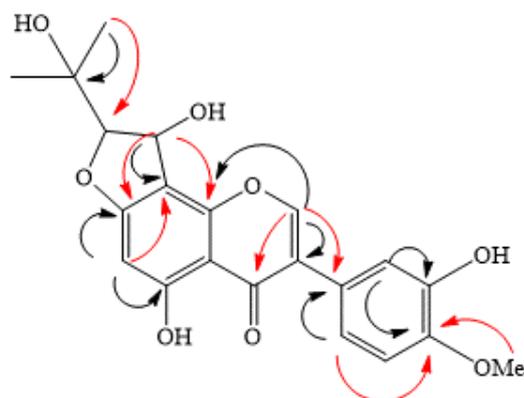


Figura 16: Correlações  $^{2,3}J_{CH}$  observadas no espectro de HMBC de S2.

Tabela 1: Dados de RMN  $^1\text{H}$  (300M Hz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de Vatairenona A (S1) ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) e Vatairenona B (S2) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Posição	S1 $\delta_{\text{H}}$	S1 $\delta_{\text{C}}$	S1 HMBC $^{2,3}J_{\text{C,H}}$	S2 $\delta_{\text{H}}$	S2 $\delta_{\text{C}}$	S2 HMBC $^{2,3}J_{\text{C,H}}$
2	8,19 (s)	153,9	C-9, C-1'	8,12 (s)	154,6	C-9, C-1', C-4
3	-	124,3	-	-	125,1	-
4	-	181,5	-	-	182,2	-
5	-	160,1	-	-	166,0	-
6	6,65 (s)	100,4	C-5, C-7, C-8, C-10	6,30 (s)	95,1	C-5, C-7, C-8
7	-	161,3	-	-	168,6	-
8	-	99,8	-	-	112,6	-
9	-	155,8	-	-	155,4	-
10	-	106,9	-	-	107,8	-
1'	-	125,0	-	-	125,0	-
2'	7,75 (d, J=2,1)	118,0	C-1', C-3', C-4'	7,04 (sl)	117,4	C-1', C-3', C-4'
3'	-	148,4	-	-	147,5	-
4'	-	149,2	-	-	149,4	-
5'	7,10 (d, J=8,4)	112,6	C-1', C-4'	6,97 (m)	116,3	C-1', C-4'
6'	7,32 (dd, J=2,1 e 8,4)	120,7	C-1', C-4', C-2'	6,97 (m)	121,6	C-1', C-4', C-2'
1''	-	-	-	5,54 (d, J=3)	71,1	C-7, C-8, C-9
1''a	3,04 (dd, J=5,1 e 16,2)	26,0	C-7, C-8, C-9	-	-	-
1''b	3,21 (dd, J=7,0 e 16,2)	26,0	C-2'', C-3''	-	-	-
2''	4,17 (dd, J=5,7 e 7,0)	68,5	C-1'', C-3''	4,40 (d, J=3)	100,8	C-1'', C-3''
3''	-	80,0	-	-	71,8	-
4'' (Me)	1,57 (s)	26,1	C-2'', C-3''	1,25 (s)	25,2 <sup>a</sup>	C-2'', C-3''
5'' (Me)	1,60 (s)	21,5	C-2'', C-3''	1,27 (s)	25,4 <sup>a</sup>	C-2'', C-3''
OMe-4'	3,81 (s)	56,2	C-4'	3,88 (s)	56,4	-
OH-quel	13,42 (s)	-	-	-	-	-

### 3.2 Atividade citotóxica

O extrato etanólico das folhas (EEFol) de *V. guianensis*, mostrou um percentual de inibição de crescimento celular maior que 50% frente às linhagens SK-MEL-19 e MCF-7, 54,16%  $\pm$ 0,81 e 59,33%  $\pm$ 0,92 respectivamente, enquanto a fração acetato de etila (FrAcOEtF) o maior percentual de inibição foi na linhagem MCF-7 com 64,72%  $\pm$ 0,51 (Tabela 2). A substância lupiwighteone (S3) exibiu um importante efeito inibitório nas linhagens SK-MEL-19 e MCF-7 com  $\text{IC}_{50}$  de 3,971  $\pm$ 0,153  $\mu\text{M}$  e 4,677  $\pm$ 0,328  $\mu\text{M}$ , respectivamente. As substâncias com  $\text{IC}_{50}$   $<$ 10  $\mu\text{M}$  foram consideradas ativas. Além disso, o extrato, fração e substância testadas não causaram hemólise em eritrócitos de camundongos ( $\text{IC}_{50}$   $>$ 200  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabelas 2 e 3).

Nos últimos anos, uma ampla variedade de compostos naturais fora usada como produtos tópicos para o tratamento e/ou prevenção do câncer de pele gerados pela exposição dos raios UV. Em estudos recentes, demonstrou-se o uso de isoflavonas na proteção aos efeitos causados a exposição ao UVB [19]. Segundo Halaby et al. (2017) [20] indivíduos que tem uma dieta rica em soja e pêssego que contém isoflavonas verificou-se uma proteção contra câncer de mama em estudos *in vitro* e *in vivo*. Silva et al. (2009) [21], relata que a forma aglicona de isoflavonas (que não possuem unidade de açúcar) têm grande poder de controle de células neoplásicas de mama, quando comparadas à sua forma glicosilada, corroborando com a classe de metabólitos isolados das folhas de *V. guianensis*.

Tabela 2: Atividade citotóxica do extrato, fração das folhas de *V. guianensis*.

Amostra	% de Inibição 50 µg/mL			Hemólise (µg/mL)
	SK-MEL-19	AGP01	MCF-7	
EEFol	54,16 ±0,81	19,07 ±0,69	59,33 ±0,92	>200
FrAcOEtF	47,23 ±0,36	26,20 ±0,27	64,72 ±0,51	>200
DOXO	87,77 ±0,45	64,99 ±1,02	83,68 ±0,62	>200

\*SK-MEL-19: melanoma; AGP-01: ascite gástrica; MCF-7: mama; EEFol: extrato etanólico das folhas; FrAcOEtF: fração acetato de etila das folhas; Doxo: controle positivo Doxorubicina; >200: hemólise não observada na concentração analisada.

\*\*Nota: Todos os experimentos apresentaram significância com  $p < 0,05$ .

Tabela 3: Atividade citotóxica da substância S3.

Amostra	IC <sub>50</sub> (µM)			Hemólise (µg/mL)
	SK-MEL-19	AGP01	MCF-7	
S3	3,971 ±0,153	>10	4,677 ±0,328	>200
DOXO	0,036 ±0,002	0,274 ±0,012	0,194 ±0,021	>200

\*S3: lupiwighteona; Doxo: controle positivo Doxorubicina; >10: atividade citotóxica não observada nas concentrações analisadas; >200: hemólise não observada na concentração analisada.

\*\*Nota: Os valores foram expressos pela concentração necessária para o decaimento de 50% das células. Todos os experimentos apresentaram significância com  $p < 0,05$ .

#### 4. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis*, conduziram ao isolamento de dois novos produtos naturais pertencentes a classe das isoflavonas: *Vatairenona A* e *Vatairenona B*, e portanto, trazem uma importante contribuição para o conhecimento da composição química da espécie.

Os resultados indicaram que no extrato etanólico e na fração contém metabólitos com efeito citotóxico, com destaque para a substância (S3), a qual apresentou importante atividade contra células de câncer de mama e melanoma humano, sendo o primeiro estudo do gênero *Vatairea* com atividade citotóxica de isoflavonas de origem natural. Pelo fato de não causar hemólise em eritrócitos, estudos futuros serão necessários para avaliar o mecanismo de ação e a citotoxicidade frente a linhagens saudáveis.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santos AS, Banna DADS, Deus RJA, Nunes FM, Arruda MSP, Guilhon GMSP, Xavier LP. Investigação da atividade antimicrobiana em folhas do cipó-de-alho. In: Souza Filho APS, Nascimento JLM, organizadores. Cipó-alhos: aspectos botânicos, químicos e moléculas bioativas. Belém-PA: Embrapa Amazônia Oriental; 2012. p. 144-155.
2. de la Cruz MG. Plantas medicinais de Mato Grosso: a farmacopéia popular dos raizeiros. Cuiabá: Carlini e Caniato; 2008. 224 p.
3. Bastos GNT, Oliveira KRM, Hamoy M, Macchi BM, Nascimento JLM. Óleo essencial de *Mansoa standleyi*: utilizações etnofarmacológicas. In: Souza Filho APS, Nascimento JLM, organizadores. Cipó-alhos: aspectos botânicos, químicos e moléculas bioativas. Belém-PA: Embrapa Amazônia Oriental; 2012. p. 157-165.
4. Rodrigues AG, de Simoni C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. Informe Agropecuário. 2010 Mar/Abr;31(255):7-12.
5. Souza RF. Estudo químico e avaliação de atividades biológicas da espécie *Vatairea guianensis* AUBL. (FABACEAE). [tese]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará; 2014. 180 p.
6. Silva CTL. Avaliação biológica dos extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis* AUBL. [dissertação]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará; 2011. 118 p.

7. Araújo NRR. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral. [dissertação]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará; 2010. 99 p.
8. Silva CTL, Medeiros BJS, Santos KC, Pereira R, Albuquerque RLC, Sousa PJC, Carvalho JCT. Topical healing activity of the hydroethanolic extract from the seeds of *Vatairea guianensis* (aublet). International J Pharm Sci Rev Res. 2011 May-Jun;8(2):1-8.
9. Silva, GA. Estudo químico e atividade antiproliferativa de isoflavonas isoladas das folhas de *Vatairea guianensis* AUBL (FABACEAE). [tese]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará; 2017. 131 p.
10. Pan L, Chai H, Kinghorn AD. The continuing search for antitumor agents from higher plants. Phytochem Lett. 2010 Mar;3(1):1-8, doi: 10.1016/j.phytol.2009.11.005.
11. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro (RJ): INCA; 2019 [acesso 2020 Out 23]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immun Methods. 1983 Jun;65(1):55-63, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
13. Forezi LSM, Tolentino NMC, Souza AMT, Castro HC, Montenegro RC, Dantas RF, Oliveira MEIM, Silva FP, Barreto LH, Burbano RMR, Vieira BA, Oliveira R, Ferreira VF, Cunha AC, Boechat FCS, Souza MCBV. Synthesis, cytotoxicity and mechanistic evaluation of 4-oxoquinoline-3-carboxamide derivatives: finding new potential anticancer drugs. Molecules. 2014 Mai;19(5):6651-6670, doi: 10.3390/molecules19056651.
14. Al-Maharik N, Botting N. Synthesis of lupiwightone via a p-Claisen-Cope rearrangement. Tetrahedron. 2003 Abr;59(23):4177-4181, doi: 10.1016/S0040-4020(03)00579-9.
15. Bohm BA, Choy JB, Lee AYM. Flavonoids of *Balsamorhiza* and *Wyethia*. Phytochemistry. 1989 Mai;28(5):501-503, doi: 10.1016/0031-9422(89)80041-X
16. Souza RF, Silva JKR, Silva GA, Arruda AC, Silva MN, Arruda MSP. Estudo químico e avaliação do potencial antioxidante do alburno de *Vatairea guianensis* Aubl. Rev Virtual Quim. 2015 Set;7(5):1893-1906, doi: 10.5935/1984-6835.20150110.
17. Bandeira PN, Farias SS, Lemos TLG, Filho RB, Santos HS, Albuquerque MRJR, Costa SMO. New isoflavone derivative and other flavonoids from the resin of *Amburana cearensis*. J Braz Chem Soc. 2011 Fev;22(2):372-375, doi: 10.1590/S0103-50532011000200025.
18. Takashima J, Ohsaki A. Brosimacutins A-I, nine new flavonoids from *Brosimum acutifolium*. J Nat Prod. 2002 May;65:1843-1847, doi: 10.1021/np020241f.
19. Oliveira MM, Malta DC, Guauche H, Moura L, Silva GA. Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil. Rev Bras Epidemiol. 2015 Dez;18(2):146-157, doi: 10.1590/1980-5497201500060013.3
20. Halaby R, Ziaei S. Dietary Isoflavones and breast cancer risk. Medicines. 2017 Abr;4(18):1-11, doi: 10.3390/medicines4020018
21. Silva MCP, Ladeira AM, Garcia D, Furlan MR. Isoflavonas. Thesis. 2009 Set;6(12):31-59.