

**Blainvillea rhomboidea: CONSTITUENTES QUÍMICOS E ATIVIDADE CITOTÓXICA****Regina Ferreira Gomes, Hélcio Silva dos Santos e Maria Rose Jane R. Albuquerque\***

Coordenação de Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, CP D-3, 62040-340 Sobral - CE, Brasil

**Otília Deusdênia L. Pessoa**

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, CP 12200, 60021-970 Fortaleza - CE, Brasil

**Letícia V. Costa Lotufo, Claudia do Ó Pessoa, Manoel Odorico de Moraes e Felipe A. R. Rodrigues**

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, CP 3157, 60430-270 Fortaleza - CE, Brasil

Recebido em 13/9/09; aceito em 21/1/10; publicado na web em 3/5/10

*Blainvillea rhomboidea*: CHEMICAL CONSTITUENTS AND CYTOTOXIC ACTIVITY. The phytochemical investigation of the ethanol extract from the aerial parts of *Blainvillea rhomboidea* (Asteraceae) resulted in the isolation and characterization of 8 $\beta$ -tigloyloxy-grazielia acid, together with the flavonoids derrone, acacetin, luteolin and luteolin 7-methyl ether, and *p*-(1-methyl-ethan-1-ol)-phenol. The structures of all compounds were determined by spectroscopic methods ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and HREIMS) and comparison with published spectral data. The flavonoids luteolin and 7-O-metyl-luteolin, isolated from the active dichloromethane fraction, showed moderate cytotoxic activity.

Keywords: *Blainvillea rhomboidea*; Asteraceae; flavonoids.**INTRODUÇÃO**

O gênero *Blainvillea*, pertencente à família Asteraceae, tribo Heliantheae, subtribo Ecliptinae, é representado por apenas 10 espécies de dispersão pantropical.<sup>1-3</sup> Destas, apenas cinco têm sido investigadas quanto a sua composição química: *B. acmella*, *B. gayana*, *B. dichotoma*, *B. latifolia* e *B. rhomboidea*. De acordo com estes estudos, as plantas deste gênero são produtoras em potencial de lactonas sesquiterpênicas de diferentes tipos esqueléticos, tais como melampolidos, germacranolidos e guaianolidos.<sup>1-3</sup> Classes de compostos, como diterpenos,<sup>4</sup> derivados acetilênicos,<sup>5</sup> triterpenos e esteroides,<sup>6</sup> também são relatadas.

*Blainvillea rhomboidea*, conhecida popularmente como erva-palha ou picão grande é uma planta anual, de porte herbáceo com ramos geralmente marrom-avermelhados, medindo cerca de 80 a 160 cm de altura.<sup>7</sup> Esta espécie, como normalmente se desenvolve em grandes populações, é considerada indesejável, invasora de plantações e pastos. Inicialmente, estudou-se a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas e flores de exemplares desta espécie. Dos 18 componentes identificados nos óleos, 5-indanol (14,5%), *p*-cimen-8-ol (10,1%),  $\beta$ -cariofileno (9,6%) e óxido de cariofileno (9,6%) foram os principais constituintes.<sup>8</sup> O óleo essencial das flores, cujo principal componente foi o indanol, ausente no óleo das folhas, mostrou atividade antimicrobiana.<sup>8</sup> Concluindo o estudo químico de *B. rhomboidea*, descreve-se neste trabalho o resultado obtido com a prospecção química do extrato etanólico das partes aéreas. Concomitante ao estudo fitoquímico foi investigada a atividade citotóxica dos extratos hexânico e etanólico de frações provenientes dos extratos ativos e de alguns constituintes químicos isolados.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O extrato etanólico da parte aérea de *B. rhomboidea* foi submetido à partição líquido-líquido utilizando os solventes hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e

AcOEt. O fracionamento cromatográfico da fração hexano resultou no isolamento dos flavonoides 5,4'-di-hidroxi-6,6-dimetil-4,5-di-hidropirano-[2,3:7,8]isoflavona (derrona) (**1**)<sup>9</sup> e acacetina (**2**).<sup>10</sup> Da fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  foi isolada uma lactona sesquiterpênica caracterizada como ácido 8 $\beta$ -tigloiloxi-grazielia (**4**), os flavonoides luteolina (**3**) e o éter 7-metil-luteolina (**6**)<sup>11</sup>, além do derivado fenólico, *p*-(1-metil-etan-1-ol)-fenol (**5**). As estruturas desses compostos foram determinadas por métodos espectroscópicos, em particular RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni- e bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC e NOESY) e comparação com dados da literatura.

O composto **4** foi isolado como um óleo incolor. O espectro de massas de alta resolução, no modo negativo, forneceu o pico em  $m/z$  359.1495  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , permitindo determinar a fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$ , indicando 9 insaturações. Seu espectro no infravermelho exibiu uma banda larga centrada em 3505  $\text{cm}^{-1}$  compatível com deformação axial de grupo -OH de ácido carboxílico, bandas intensas em 1762 e 1711  $\text{cm}^{-1}$  compatíveis com grupos carboxilas de ácido carboxílico e éster, além de absorções na faixa de 1256 a 1038  $\text{cm}^{-1}$  características de ligação C-O.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou sinais correspondentes a três grupos metilas ligados a carbono  $\text{sp}^2$ , em  $\delta$  1,85 (s, 3H-15), 1,75 (s, 3H-5') e 1,73 (d,  $J = 7,0$  Hz, 3H-4'), os quais no espectro HSQC mostraram correlação com os sinais de carbono em  $\delta$  17,5; 14,4 e 12,2, respectivamente. Os sinais em  $\delta$  6,12 (d,  $J = 3,0$  Hz, H-13a) e 5,63 (d,  $J = 3,0$  Hz, H-13b), ambos correlacionados ao sinal de carbono em  $\delta$  120,2, revelaram a presença de uma dupla ligação gem-dissubstituída, enquanto os sinais em  $\delta$  5,13 (d,  $J = 8,0$  Hz, H-5), 5,92 (dd,  $J = 12,8$  e 4,3 Hz, H-1) e 6,77 (q,  $J = 7,0$  Hz, H-3'), correlacionados aos sinais de carbono em  $\delta$  126,5, 148,9 e 138,3, respectivamente, foram atribuídos a duplas ligações, incluindo a de um grupo tigloila, corroborando com a feição quarteto exibida pelo sinal em  $\delta$  6,77. Os sinais em  $\delta$  5,82 (d,  $J = 6,3$  Hz, H-8) e 5,14 (m, H-6) foram compatíveis com hidrogênios oximetínicos. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD apresentou sinais correspondentes a 20 átomos de carbono, cujo padrão de hidrogenação foi determinado através do espectro DEPT 135. Com base nas duas técnicas determinou-se: sete

\*e-mail: rjane\_7@hotmail.com

carbonos não hidrogenados, todos com hibridação  $sp^2$ , incluindo os sinais em  $\delta$  169,9 (C-12), 168,9 (C-14) e 166,9 (C-1') os quais foram atribuídos às carboxilas conjugadas de lactona, ácido carboxílico e éster, respectivamente. Três carbonos metilênicos, um dos quais em  $\delta$  120,2; seis carbonos metínicos, sendo três  $sp^2$  em  $\delta$  148,9; 126,5 e 138,3 e dois oxigenados em  $\delta$  76,5 e 71,0, além de três metilas. Estes dados foram compatíveis com a estrutura de uma lactona sesquiterpênica, esterificada com um grupo tigloila, cuja posição foi definida através da correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  5,82 (H-8) com o carbono em 166,9 (C-1'), no espectro HMBC. A posição do grupo ácido carboxílico foi confirmada através da correlação observada entre o sinal em 5,92 (H-1) com o carbono em 168,9 (C-14). Todos os dados espectrais acima discutidos levaram à estrutura do ácido 8 $\beta$ -tigloiloxi-grazielia, previamente isolado de *B. rhomboidea*, cuja estrutura foi determinada utilizando-se apenas dados de RMN  $^1H$ . Portanto, este é o primeiro trabalho onde os dados de RMN de C-13 são atribuídos para este composto (Tabela 1).

**Tabela 1.** Deslocamentos químicos de RMN  $^1H$  (500 MHz) e  $^{13}C$  (125 MHz) de **4**, em acetona- $d_6$

| No | $\delta_C$ | $\delta_H$                                | $^2J_{C-H}$ | $^3J_{C-H}$       |
|----|------------|-------------------------------------------|-------------|-------------------|
| 1  | 148,9      | 5,92 (dd, $J = 4,3$ e 12, 8)              | 2,37        | 3,46              |
| 2  | 26,7       | 2,37 (m, 2H)                              |             |                   |
| 3  | 39,7       | 3,46 (m, 2H)                              |             | 1,85 e 5,92       |
| 4  | 144,6      |                                           | 1,85        | 2,37              |
| 5  | 126,5      | 5,13 (d, $J = 8,0$ )                      | 5,14        | 1,85              |
| 6  | 76,5       | 5,14 (m)                                  | 3,21        |                   |
| 7  | 53,3       | 3,21 (m)                                  | 5,14 e 5,82 |                   |
| 8  | 71,0       | 5,82 (d, $J = 6,3$ )                      | 3,21        |                   |
| 9  | 39,2       | 3,46 (dd, $J = 14,9$ e 6,3)/2,37 (m)      |             |                   |
| 10 | 129,1      |                                           |             |                   |
| 11 | 139,1      |                                           | 6,12        | 5,82              |
| 12 | 169,9      |                                           |             | 5,63 e 6,12       |
| 13 | 120,2      | 6,12 (d, $J = 3,0$ )/5,63 (d, $J = 3,0$ ) |             |                   |
| 14 | 168,9      |                                           |             | 5,92 e 2,37       |
| 15 | 17,5       | 1,85 (s)                                  |             |                   |
| 1' | 166,9      |                                           |             | 1,75, 5,82 e 6,77 |
| 2' | 127,9      |                                           | 1,75        | 1,73              |
| 3' | 138,3      | 6,77 (q, $J = 7,0$ )                      | 1,73        | 1,75              |
| 4' | 12,2       | 1,73 (d, $J = 7,0$ )                      |             |                   |
| 5' | 14,4       | 1,75 (s)                                  |             | 6,77              |

Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm. Multiplicidades e constantes de acoplamento ( $J$ ), em Hz, entre parênteses.

Paralelo ao estudo fitoquímico, investigou-se o potencial citotóxico das frações resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato EtOH (Tabela 2), assim como dos compostos isolados.

O resultado da avaliação citotóxica mostrou que na concentração de 50  $\mu g/mL$  a fração diclorometano apresentou inibição do crescimento celular nas duas linhagens celulares testadas - HCT-8 e MDAMB-435 - correspondentes a 58,75 e 46,65%, respectivamente (Tabela 2). Todas as frações, com exceção da fração MeOH, obtidas com o fracionamento cromatográfico da fração diclorometano ativa apresentaram um forte percentual de inibição sobre as duas linhagens celulares testadas (Tabela 2). A fração MeOH, por sua vez, mostrou inibição somente na linhagem de melanoma (MDA-MB 435). Todos os compostos obtidos das frações ativas foram testados, mas somente os flavonoides luteolina (**3**) e o éter 7-metil-luteolina (**6**) apresentaram citotoxicidade. A luteolina apresentou valores de  $IC_{50}$  que variaram de 3,37  $\mu g/mL$  em HCT-8 a 18,10  $\mu g/mL$  em MDA-MB-435, enquanto

**Tabela 2.** Determinação do percentual de inibição do crescimento celular em linhagens celulares de tumores humanos da fração diclorometano FDFBR\* e frações resultantes do fracionamento cromatográfico da mesma

| Frações testadas     | HCT-8 | DP   | MDAMB-435 | DP   |
|----------------------|-------|------|-----------|------|
| FDFBR                | 58,75 | 1,60 | 46,65     | 3,59 |
| Fração Hex/AcOEt 20% | 100   | 0,16 | 97,82     | 1,21 |
| Fração Hex/AcOEt 50% | 100   | 0,00 | 99,80     | 0,47 |
| Fração Hex/AcOEt 75% | 100   | 0,57 | 98,22     | 1,03 |
| Fração AcOEt 100%    | 100   | 0,16 | 97,75     | 1,68 |
| Fração MeOH 100%     | 13,29 | 1,97 | 92,40     | 1,40 |
| Doxorubicina         | 94,58 | 1,66 | 98,76     | 1,54 |

\*FDFBR = fração diclorometano obtida da partição do extrato etanólico de *B. rhomboidea*

que éter 7-metil-luteolina exibiu valores  $IC_{50}$  variando de 2,71  $\mu g/mL$  em HCT-8 a 19,06 em SF-295 (Tabela 3). De fato, as propriedades anticâncer da luteolina já são amplamente discutidas na literatura, e seus efeitos citotóxicos já foram descritos para várias linhagens de células tumorais, estando relacionados ao bloqueio do ciclo celular em G2M seguido de apoptose, além de modular a atividade de várias proteínas celulares.<sup>12,13</sup> Além disso, a luteolina mostrou-se capaz de inibir a angiogênese, prevenir a carcinogênese e sensibilizar as células tumorais a agentes quimioterápicos.<sup>14,15</sup>

**Tabela 3.** Determinação da concentração inibitória média ( $CI_{50}$  em  $\mu g/mL$ ) dos compostos isolados de *B. rhomboidea* em linhagens celulares de tumores humanos<sup>a</sup>

| Composto     | HL-60                       | HCT-8                       | MDAMB-435                   | SF-295                      |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>1</b>     | 27,47                       | >50                         | >50                         | >50                         |
| <b>2</b>     | >50                         | >50                         | >50                         | >50                         |
| <b>3</b>     | 5,17<br>(4,076 a<br>6,564)  | 3,37<br>(2,327 a<br>4,882)  | 18,10<br>(13,22 a<br>24,77) | 12,44<br>(7,783 a<br>19,89) |
| <b>4</b>     | >50                         | >50                         | >50                         | >50                         |
| <b>6</b>     | 5,067<br>(4,025 a<br>6,379) | 2,713<br>(2,023 a<br>3,639) | 13,48<br>(10,85 a<br>16,73) | 19,06<br>(12,14 a<br>29,93) |
| Doxorubicina | 0,02<br>(0,01-0,02)         | 0,04<br>(0,03-0,05)         | 0,47<br>(0,35-0,65)         | 0,25<br>(0,17-0,36)         |

<sup>a</sup>Os dados apresentados em valores de  $IC_{50}$  ( $\mu g/mL$ ) foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%), obtidos em três experimentos independentes, com os desvios padrões são mostrados entre parênteses.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Instrumentação e material cromatográfico

Os pontos de fusão foram determinados em equipamento de microdeterminação digital da Mettler Toledo com placa aquecedora FP82HT e uma central de processamento FP90. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2  $^{\circ}C/min$  e não foram corrigidas. Os espectros de absorção na região de IV foram registrados em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000 com transformada de Fourier, utilizando pastilhas de KBr para amostras sólidas e filmes para substâncias oleosas. Os espectros de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ , uni- e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DRX-300 (300 MHz para  $^1H$  e 75 MHz para  $^{13}C$ ) e Avance DRX-500 (500 MHz para  $^1H$  e 125 MHz para  $^{13}C$ ). O espectro de massa de alta resolução foi obtido em um LCMS-IT-TOF equipado com fonte de ionização por *electrospray* da Shimadzu. Nas cromatografias de adsorção utilizou-se gel de sílica 60 da Vetec ( $\phi$   $\mu m$  70-230 mesh, para cromatografias gravitacionais) e Merck ( $\phi$   $\mu m$  230-400 mesh,

para cromatografias sobre pressão), enquanto nos fracionamentos cromatográficos por exclusão molecular foi empregado Sephadex LH-20. As cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas com gel de sílica 60, ( $\varnothing$  µm 5-40, Merck) com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm ( $F_{254}$ ). As substâncias foram reveladas com solução de vanilina/ácido perclórico/EtOH, seguida de aquecimento em estufa (~ 100 °C), por aproximadamente 5 min.

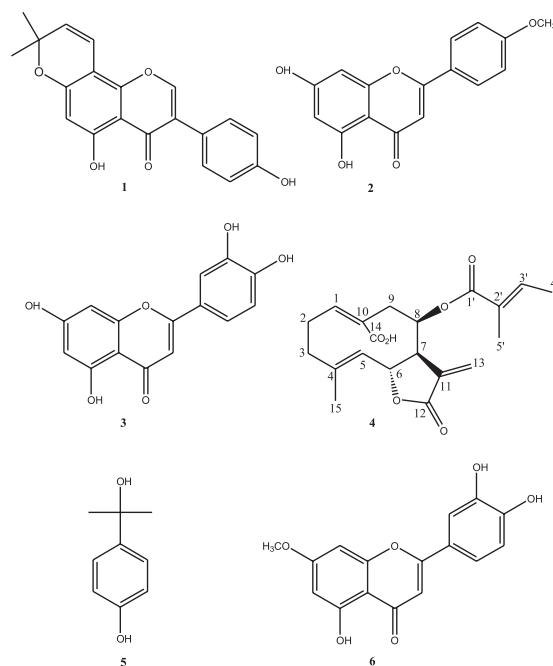
## Material vegetal

*Blainvillea rhomboidea* foi coletada no período de floração, no Campus da Universidade Federal do Ceará, em junho de 2005. A identificação botânica foi realizada pelo Prof. E. P. Nunes, Departamento de Biologia da UFC. A exsiccata da planta, correspondente a coleta, encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra (EAC) do Departamento de Biologia – UFC, sob o número de registro 33.879.

## Extração e isolamento

A parte aérea (1,5 kg) de *B. rhomboidea* foi seca à temperatura ambiente, triturada e, em seguida, submetida à extração (3 x 8 L) com etanol a frio. As soluções obtidas foram destiladas sob pressão reduzida, resultando no extrato etanólico (85,9 g) o qual foi dissolvido em 150 mL da mistura MeOH/H<sub>2</sub>O (7:3) e submetido à partição com os solventes hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e AcOEt (5 vezes 100 mL de cada solvente). As frações obtidas foram secas com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtradas e concentradas sob pressão reduzida, fornecendo as frações hexânica (3,9 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (29,0 g) e AcOEt (1,9 g), além do resíduo (6,9 g). A fração hexano (3,9 g) foi submetida à cromatografia sobre 40 g de gel de sílica utilizando os solventes hexano e AcOEt, puros ou em misturas binárias, seguido por MeOH. Deste fracionamento foram obtidas as frações hexano/AcOEt 9,5:0,5 (1,4 g), 9:1 (0,48 g), 8:2 (0,40 g), 7:3 (0,69 g), 6:4 (0,43 g), 3,5:6,5 (0,30 g), AcOEt (0,03 g) e MeOH (0,093 g). A fração hexano/AcOEt 8:2 (0,40 g) foi submetida a uma cromatografia sobre pressão e eluída com a mistura binária de hexano/AcOEt 9:1 fornecendo 125 frações de 8 mL. Após monitoramento em CCD, estas frações foram reunidas em 5 grupos: (A-I a A-V). O grupo A-IV (Frações 73-121, 72,0 mg) após cromatografia em gel de sílica (5,0 g) utilizando misturas de hexano e AcOEt em gradiente crescente de polaridade resultou no isolamento de **1** (6,0 mg; p. f. 220-223 °C; lit. 216-218 °C)<sup>9</sup>. A fração hexano/AcOEt 7:3 (0,69 g) foi sujeita à cromatografia em gel de sílica (2,0 g) e eluída com a mistura binária hexano/CHCl<sub>3</sub> em gradiente de polaridade, seguido de AcOEt. Foram obtidas 69 frações de 10 mL que, após serem analisadas por CCD, foram reunidas em 6 grupos (B-I a B-VI). O grupo IV (Frações 35-46, 61,0 mg) após cromatografia por exclusão molecular, em Sephadex LH-20 empregando acetona/MeOH 1:1 como fase móvel, culminou no isolamento de **2** (11,0 mg; p. f. 256-257 °C; lit. 254-256 °C)<sup>10</sup>. A fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (29,0 g), oriunda do fracionamento cromatográfico inicial, foi fracionada sobre 47,0 g de gel de sílica utilizando os solventes hexano e AcOEt puros ou em misturas binárias, seguido de MeOH. Ao final foram obtidas as seguintes frações: hexano/AcOEt 9:1 (0,02 g); 8:2 (0,33 g); 7:3 (0,96 g), 1:1 (2,0 g), 3,5:6,5 (6,8 g); AcOEt (9,1 g) e MeOH (9,2 g). A fração hexano/AcOEt 1:1 (2,0 g) foi submetida à cromatografia em gel de sílica (41,0 g) e eluída com os solventes CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH, puros ou em gradiente de polaridade, resultando em 9 frações de 100 mL, as quais após concentradas sob pressão reduzida e analisadas por CCD foram reunidas em 7 grupos (C-I a C-VII). A fração C-IV (frações CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 1:1, 370,0 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico sobre Sephadex LH-20 e eluída com acetona/MeOH 1:1, resultando no isolamento de **3** (15,0 mg; p.f. 322-324; lit. > 320 °C)<sup>11</sup>. A fração hexano/AcOEt 3,5:6,5 (6,8 g) foi sujeita à cromatografia sobre gel de sílica (44,0 g) utilizando um sistema binário constituído de CHCl<sub>3</sub>/AcOEt, aumentando-se a concentração de 20 em 20%, seguido de AcOEt e MeOH. As frações obtidas após concentração do solvente resultaram nas frações CHCl<sub>3</sub> (3,7 g), CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 8:2 (1,0 g), 6:4 (650,0 mg), 4:6 (642,0 mg), 2:8 (410,0 mg), AcOEt (191,0 mg) e MeOH (320,0 mg). A fração CHCl<sub>3</sub> (3,7 g) foi submetida à cromatografia sobre 42,3 g de gel de sílica, empregando os solventes hexano e AcOEt, puros ou em misturas binárias seguido de MeOH. Foram coletadas 27 frações as quais após análise em CCD foram reunidas em 11 grupos (D-I a D-XI). Os grupos D-III (frações 8-9, 151,9 mg) e D-VI (frações 10-11, 465,1 mg), após comparação em CCD, mostrou conter as substâncias **1** e **2**, respectivamente. A fração D-V (fração 12, 691,0 mg) foi submetida à cromatografia sobre gel de sílica (7,9 g) utilizando os solventes hexano, AcOEt e MeOH, em gradiente de polaridade. Desta coluna obtiveram-se 110 frações, as quais após análise por CCD foram reunidas em 10 grupos (E-I a E-10). O grupo E-II (frações 24-30, 209,0 mg) após cromatografias por exclusão molecular sobre Sephadex LH-20, empregando o sistema de solvente acetona/MeOH 1:1, culminou no isolamento de **4** (57,4 mg). A fração CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 8:2 (1,0 g), foi acondicionada sobre 16,5 g de gel de sílica e submetida a fracionamento cromatográfico, utilizando um gradiente constituído de hexano/AcOEt (8:2 a 2:8) seguido de AcOEt, resultando em 82 frações de 8 mL. A análise por CCD permitiu reuni-las em 7 grupos (F-I a F-VII). O grupo F-III (frações 36-52, 65,0 mg) após fracionamento cromatográfico sobre Sephadex LH-20 utilizando o sistema de solvente acetona/MeOH 1:1, forneceu a substância **5** (7,4 mg). O grupo F-V (430,0 mg) após ser submetido a procedimento cromatográfico semelhante ao anterior resultou no isolamento da substância **6** (11,0 mg) (Figura 1).

tografia sobre gel de sílica (44,0 g) utilizando um sistema binário constituído de CHCl<sub>3</sub>/AcOEt, aumentando-se a concentração de 20 em 20%, seguido de AcOEt e MeOH. As frações obtidas após concentração do solvente resultaram nas frações CHCl<sub>3</sub> (3,7 g), CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 8:2 (1,0 g), 6:4 (650,0 mg), 4:6 (642,0 mg), 2:8 (410,0 mg), AcOEt (191,0 mg) e MeOH (320,0 mg). A fração CHCl<sub>3</sub> (3,7 g) foi submetida à cromatografia sobre 42,3 g de gel de sílica, empregando os solventes hexano e AcOEt, puros ou em misturas binárias seguido de MeOH. Foram coletadas 27 frações as quais após análise em CCD foram reunidas em 11 grupos (D-I a D-XI). Os grupos D-III (frações 8-9, 151,9 mg) e D-VI (frações 10-11, 465,1 mg), após comparação em CCD, mostrou conter as substâncias **1** e **2**, respectivamente. A fração D-V (fração 12, 691,0 mg) foi submetida à cromatografia sobre gel de sílica (7,9 g) utilizando os solventes hexano, AcOEt e MeOH, em gradiente de polaridade. Desta coluna obtiveram-se 110 frações, as quais após análise por CCD foram reunidas em 10 grupos (E-I a E-10). O grupo E-II (frações 24-30, 209,0 mg) após cromatografias por exclusão molecular sobre Sephadex LH-20, empregando o sistema de solvente acetona/MeOH 1:1, culminou no isolamento de **4** (57,4 mg). A fração CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 8:2 (1,0 g), foi acondicionada sobre 16,5 g de gel de sílica e submetida a fracionamento cromatográfico, utilizando um gradiente constituído de hexano/AcOEt (8:2 a 2:8) seguido de AcOEt, resultando em 82 frações de 8 mL. A análise por CCD permitiu reuni-las em 7 grupos (F-I a F-VII). O grupo F-III (frações 36-52, 65,0 mg) após fracionamento cromatográfico sobre Sephadex LH-20 utilizando o sistema de solvente acetona/MeOH 1:1, forneceu a substância **5** (7,4 mg). O grupo F-V (430,0 mg) após ser submetido a procedimento cromatográfico semelhante ao anterior resultou no isolamento da substância **6** (11,0 mg) (Figura 1).



**Figura 1.** Estruturas dos constituintes químicos isolados das partes aéreas de *B. rhomboidea*

## Avaliação da atividade citotóxica

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em 4 linhagens tumorais, usando a análise de redução do 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo tetrazolína (MTT)<sup>16</sup> (Sigma Aldrich Co. - St. Louis, USA). Para o experimento, as células foram distribuídas em placas de 96 poços (10<sup>5</sup> células/poço para células aderentes ou 3 x

10<sup>5</sup> células/poço para células em suspensão em 100 µL de meio). As frações foram testadas em concentração única de 50 µg/mL para determinação do percentual de inibição do crescimento celular, enquanto os compostos puros foram diluídos em concentrações que variaram de 0.09 a 50 µg/mL em DMSO 1%. Cada composto foi adicionado em cada poço usando-se HTS (*high-throughput screening*, biomek 3000, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California, USA) e posteriormente incubado por 72 h. O grupo controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Depois de 69 h de incubação, o sobrenadante foi aspirado e acrescentado à solução do MTT (0,5 mg/mL). Três horas depois, o produto formado do MTT, o formazan, foi dissolvido em 150 µL de DMSO e a absorbância foi lida a 595 nm (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California, USA). Como controle positivo usou-se a doxorubicina (0,01 a 5 µg/mL) obtida da Sigma Aldrich Co. - St. Louis, MO/USA.

## CONCLUSÃO

A prospecção química de *B. rhomboidea* culminou no isolamento de quatro flavonoides e de uma lactona sesquiterpênica. Embora flavonoides sejam bastante comuns em plantas superiores, inclusive na família Asteraceae, este é o primeiro relato sobre o isolamento deste tipo de composto em uma planta do gênero *Blainvillea*, por outro lado, as lactonas sesquiterpênicas são os constituintes mais comuns no gênero, inclusive em plantas de origem brasileira.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Os espectros e RMN e EM estão disponíveis em <http://quimica-nova.sbq.org.br>, em arquivo .PDF, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

À FUNCAP e PRONEX pelo apoio financeiro, ao CNPq pelas bolsas de estudo e de pesquisa, ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) e Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste (LEMANOR) pela obtenção dos espectros.

## REFERÊNCIAS

1. Spring, O.; Zipper, R.; Vogler, B.; Lopes, J. L. C.; Vichnewski, W.; Dias, D. A.; Cunha, W. R.; *Phytochemistry* **1999**, 52, 79.
2. Singh, P.; Sharma, A. K.; Joshi, K. C.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; *Phytochemistry* **1985**, 24, 2023.
3. Bohlmann, F.; Ziesche, J.; King, R. M.; Robinson, H.; *Phytochemistry* **1981**, 20, 263.
4. Singh, P.; Bhala, M.; Jain, R.; Jakupovic, J.; *Phytochemistry* **1988**, 27, 609.
5. Krishnar, V.; Gupta, G. S.; Singh, P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1999**, 76, 689.
6. Adityachaudhury, N.; Chowdhury, A.; *Phytochemistry* **1972**, 11, 3544.
7. Lorenzi, H.; Matos, F. J. A.; *Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*, Plantarum: São Paulo, 2002.
8. Pires, A. M. L.; Albuquerque, M. R. J. R.; Nunes, E. P.; Melo, V. M. M.; Silveira, E. R.; Pessoa, O. D. L.; *Nat. Prod. Commun.* **2006**, 1, 391.
9. Chibber, S. S.; Sharma, R. P.; *Phytochemistry* **1980**, 19, 1857.
10. Costa, F. J.; Bandeira, P. N.; Albuquerque, M. R. J. R.; Pessoa, O. D. L.; Silveira, E. R.; Braz-Filho, R.; *Quim. Nova* **2008**, 31, 1691.
11. Agrawal, P. K.; *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Elsevier: Amsterdam, 1989.
12. Zhang, Q.; Zhao, X. H.; Wang, Z. J.; *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 2042.
13. Zhang, Q.; Zhao, X. H.; Wang, Z. J.; *Toxicol. in Vitro* **2009**, 23, 797.
14. López-Lázaro, M.; *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, 9, 31.
15. Lin, Y.; Shi, R.; Wang, X.; Shen, H. M.; *Curr. Cancer Drug Targets* **2008**, 8, 634.
16. Mosmann T.; *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.