

DERIVADO CINAMÓLICO COM ATIVIDADE NO REPARO DE DNA E OUTRAS SUBSTÂNCIAS DE *Cinnamomum australe* (LAURACEAE)
Carlos Alberto Carbonezi, Márcia Nasser Lopes, Dulce Helena Siqueira Silva, Ângela Regina Araújo e Vanderlan da Silva Bolzani*

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14801-970 Araraquara - SP

Maria Claudia Marx Young e Marcelo Rogério da Silva

Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, CP 4005, 01061-970 São Paulo - SP

Recebido em 17/1/03; aceito em 17/9/03

DNA-DAMAGING ACTIVITY OF A CINNAMATE DERIVATIVE AND FURTHER COMPOUNDS FROM *Cinnamomum Australe* (LAURACEAE). The bioactive compound *trans*-3'-methylsulphonyllallyl *trans*-cinnamate (**1**) along with the inactive irylliptin (**2**) and (7*R*,8*S*,1'*S*)- Δ^8 -3',5'-dimethoxy-1',4'-dihydro-4'-oxo-7.0.2',8.1'-neolignan (**3**) were isolated from the leaves of *Cinnamomum australe*. The structures of these compounds were assigned by analysis of 1D and 2D NMR data and comparison with data registered in the literature for these compounds. The DNA-damaging activity of **1** is being described for the first time.

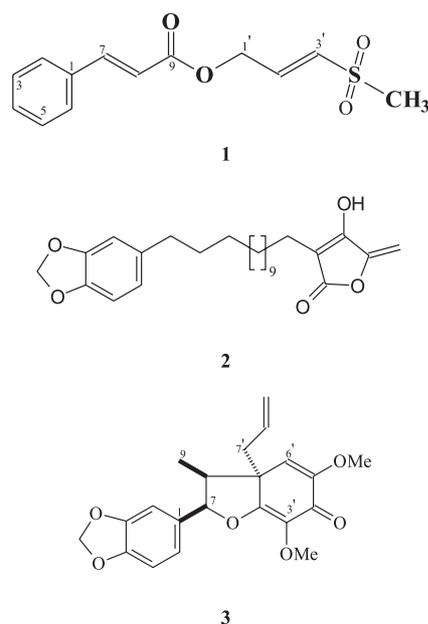
Keywords: *Cinnamomum australe*; Lauraceae; DNA-damaging activity.

INTRODUÇÃO

As espécies de Lauraceae são conhecidas pelo acúmulo de derivados fenilpropanóidicos, sendo as lignanas e as neolignanas seus principais marcadores químicos¹. Plantas dessa família são encontradas nas florestas equatoriais e tropicais; na Mata Atlântica, onde sua ocorrência é marcante, são conhecidas popularmente como canela². Na região de Cunha, situada no estado de São Paulo, ainda se encontra Mata Atlântica, de altitude, bastante preservada e, dentre as inúmeras famílias de Angiospermae ali representadas, destacam-se várias espécies de Lauraceae sem nenhum estudo químico e/ou biológico. Como parte de um estudo de bioprospecção com plantas de Cerrado e de Mata Atlântica de São Paulo, espécies desta família foram testadas contra linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, objetivando a busca de substâncias com ação na reparação do DNA deficiente-proficiente³. Dentre as espécies selecionadas, *Cinnamomum australe*, coletada na Reserva Ecológica de Cunha, apresentou atividade na reparação do DNA de *S. cerevisiae*, indicativo de uma atividade antitumoral potencial. Fracionamento bio-guiado do extrato etanólico de *C. australe* levou ao isolamento do derivado bioativo *trans*-cinamato de *trans*-3'-metilsulfonilalila (**1**) juntamente com erieliptina (**2**) e (7*R*,8*S*,1'*S*)- Δ^8 -3',5'-dimetoxi-1',4'-diidro-4'-oxo-7.0.2',8.1'-neolignana (**3**). O presente artigo descreve o isolamento, caracterização dos derivados **1-3** e a atividade no reparo de DNA de **1**.

PARTE EXPERIMENTAL
Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram registrados em um espectrômetro Bruker DRX-300 operando a 300 e a 76 MHz, respectivamente, utilizando-se CDCl₃ como solvente e TMS como referência interna. As constantes de acoplamento (*J*) foram expressas em Hz. Para a obtenção dos espectros no ultravioleta foi utilizado um equipamento Beckman DU-65. Os espectros de massas foram



obtidos em espectrômetro FISIONS-Modelo VG Plattform II, operando a 70 eV, no modo "electrospray" e em espectrômetro HP5988A Hewlett Packard (quadrupolo), por inserção direta e impacto eletrônico a 70 eV. Os espectros no IV foram registrados em aparelho FT-IR 1750 Perkin Elmer, na forma de filmes em nujol utilizando janelas de NaCl. Para as cromatografias em coluna utilizou-se sílica gel 60 (0,063-0,200 mm e 0,230-0,400 mm, Merck) e Sephadex LH-20 (Sigma). Nas cromatografias em placa utilizou-se sílica gel 60 GF₂₅₄ e PF₂₅₄ (Merck). As placas foram observadas sob luz UV 254 – 366 nm e reveladas com vapores de iodo ressublimado ou solução de H₂SO₄/EtOH (anidro) 1:1, seguida de aquecimento.

Material vegetal

Folhas de *Cinnamomum australe* Walt. foram coletadas na Reserva Ecológica de Cunha, São Paulo, em maio de 2000. O material

*e-mail: bolzaniv@iq.unesp.br

foi identificado pela Dra. I. Cordeiro, Curadora do Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, SP; uma exsiccata encontra-se aí depositada, sob o n°. Cord 1203.

Extração e fracionamento

As folhas de *C. australe* (650 g), secas e moídas, foram extraídas com metanol a frio (3 L). O extrato alcoólico foi evaporado completamente e uma alíquota deste extrato foi submetida ao bioensaio, indicando atividade moderada. O extrato foi dissolvido em metanol-água (80%) e, em seguida, submetido a sucessivas partições com 800 mL de solventes de diferentes polaridades, fornecendo as frações hexânica (3,0 g), diclorometânica (9,8 g) e em acetato de etila (4,5 g). A fração diclorometânica bioativa foi cromatografada em coluna de sílica gel (5x50 cm, 400 g) utilizando-se misturas de hexano/AcOEt, com aumento de polaridade (1:1, 1:2, 2:3), fornecendo 14 frações de 300 mL. Todas as frações foram submetidas ao bioensaio com *S. cerevisiae* e as frações 10-14, bioativas, foram escolhidas para fracionamento e purificação. Estas frações, após análise usual por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), foram reunidas F-10-14 (102 mg) e, em seguida, o material resultante desta reunião foi submetido a uma filtração em gel de Sephadex LH-20, utilizando-se uma mistura de diclorometano-metanol (4:1, 1:1 e 1:4) e metanol. Deste procedimento foram coletadas seis frações (F-1 a F-6), das quais F-5 (38,0 mg) e F-6 (12,0 mg) mantiveram a atividade. A purificação da fração F-5 foi realizada em coluna cromatográfica de Si gel (1x30 cm), eluída com misturas de CHCl₃/MeOH com aumento gradual de polaridade. Foram recolhidas frações de 3 mL, agrupadas posteriormente em dez frações, de acordo com o perfil cromatográfico monitorado por CCDC. Das duas primeiras frações resultantes deste procedimento, foram isoladas as substâncias **1** (3,2 mg) e **2** (16,0 mg). Análise por cromatografia por CCDC, das demais frações impuras, revelou que a F-5-8 era constituída de dois componentes. Esta mistura foi lavada várias vezes com acetona e o sólido remanescente foi purificado por recristalização em CCl₄, fornecendo a substância **3** (8 mg). A fração F-6, após lavagem com éter e recristalização em EtOH, apresentou-se como um sólido cristalino com ponto de fusão 98-99 °C e foi também identificada como **1**.

trans-cinamato de *trans*-3'-metilsulfonilalila (**1**): Cristais, P. F. = 98-99 °C (lit.⁴ 97-98 °C, em EtOH). IV, $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1700, 1637, 1570, 1300, 1127, 780. UV, $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) 279 (4.30), 224 (4.0), EM *m/z* (rel. int.) 266 (50), 187 (35), 131 (100) 103(54); análise elementar (%): C = 58,6, H = 5,2, O = 12,02, S = 24,0 correspondendo à fórmula molecular C₁₃H₁₄O₄S. Dados de RMN de ¹H, ¹³C, COSY e HMBC, ver Tabela 1.

irieliptina (**2**) Cristais, P. F. = 82-84 °C, CCl₄ (lit.⁵ 81-83 °C, em C₆H₆). Dados espectrométricos idênticos aos descritos na literatura⁵.

(7*R*,8*S*,1'*S*)- Δ^8 -3',5'-dimetoxi-1',4'-diidro-4'-oxo-7.0.2', 8.1'-neolignana (**3**): Cristais, P. F. = 137-139 °C, similar ao descrito na literatura⁶. Dados espectroscópicos idênticos aos publicados anteriormente para esta substância⁶.

Bioensaio

O teste preliminar para avaliação da atividade sobre as vias de reparo e/ou recombinação do DNA foi realizado de acordo com metodologia e protocolos bem estabelecidos³. Este ensaio foi desenvolvido com base na constatação de que a maioria das células tumorais têm falhas em sua capacidade de reparar danos no DNA quando comparadas com as células normais, sugerindo que agentes com toxidez seletiva para células deficientes no reparo do DNA poderiam ser agentes anticancerígenos potenciais. Confirmando este raciocínio foi de-

Tabela 1. Dados de RMN de ¹H e de ¹³C para o *trans*-cinamato de *trans*-3'-metilsulfonilalila (**1**)

Posição	δ_{C}	δ_{H}	COSY	HMBC (H→C)
1	135,0	-	-	-
2	129,0	7,42 m	-	C-1, C-4
3	129,9	7,42 m	-	C-1, C-4
4	131,3	7,42 m	-	C-2
5	129,9	7,42 m	-	C-1
6	129,0	7,42 m	-	C-1, C-2
7	146,2	7,76 d (16,0)	H-8	C-9, C-1, C-
2				
8	117,9	6,46 d (16,0)	H-7	C-1, C-2, C-
9				
9	166,0	-	-	-
1'	62,2	4,95 dd (1,0; 3,0)	H-2'	C-9, C-3'
2'	141,2	7,01 dt (3,0; 16,0)	H-1', H-3'	C-1', C-2'
3'	130,5	6,65 dt (1,0; 16,0)	H-2'	C-1', C-2', CH ₃ C-3'
-CH ₃	42,5	2,89 s	-	

Espectros registrados em CDCl₃, (300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono), deslocamentos químicos (δ) usando-se como padrão TMS. Atribuições feitas com base nos experimentos de DEPT 135 e HMQC.

monstrado que leveduras mutantes com esta deficiência são hipersensíveis à maioria dos agentes que causam dano ao DNA⁷. Dessa forma, a interpretação dos resultados deste bioensaio está fundamentada na resposta diferencial entre uma levedura com células normais, capazes de fazer reparos no DNA (Rad+), e células que não são capazes de reconstruir a seqüência do DNA (Rad 52Y), frente a uma determinada amostra (extrato bruto, fração e/ou substância pura). A linhagem Rad+ é definida como o tipo selvagem, enquanto Rad 52Y é a linhagem mutante produzida a partir de Rad+, apresentando deficiências relacionadas com uma das três maiores vias de reparo do DNA em leveduras. Rad 52 Y está associada ao reparo recombinacional do DNA, ou seja, apresenta deficiências na recombinação mitótica (na conversão e "crossing over") e na recombinação meiótica. O ensaio é conduzido pela medida do halo de inibição do crescimento das células deficientes (Rad 52Y), em comparação com as células tipo selvagem Rad+ (proficientes nas vias de reparo do DNA) e com o controle positivo camptotecina. Os resultados são expressos como valores de CI₁₂, concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$) requerida para produzir um halo de inibição de 12 mm de diâmetro, ao redor de uma cavidade de 100 μL , após um período de incubação de 48 h, a 30 °C.

Os ensaios foram feitos em triplicata e em diferentes concentrações para os extratos (4000, 2000, 1000 e 500 $\mu\text{g/mL}$) e substâncias puras (500, 200, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$). Os valores de CI₁₂ foram determinados das curvas de dose-resposta (log da concentração da amostra em $\mu\text{g/mL}$ vs. valor médio do diâmetro do halo de inibição, em mm).

Uma amostra é considerada ativa quando a CI₁₂ obtida para a levedura mutante é três vezes menor que a CI₁₂ obtida para a levedura normal (Rad+) e menor que 2000 $\mu\text{g/mL}$, para extratos, ou 200 $\mu\text{g/mL}$, para substâncias puras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico das folhas de *C. australe* apresentou atividade seletiva sobre a cepa mutante de *S. cerevisiae*, Rad 52Y (Tabela 2). A fração diclorometânica proveniente da partição líquido/líquido deste extrato manteve a atividade e, após os procedimentos usuais de fracionamento e purificação, forneceu os constituintes **1-3**.

Tabela 2. Valores de CI_{12} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos a partir dos ensaios com as linhagens Rad+ e Rad 52Y de *S. cerevisiae*

Amostras	Linhagens mutantes de <i>S. cerevisiae</i> *	
	Rad+	Rad 52Y
Extrato EtOH	>1000	600
Fração CH_2Cl_2	> 1000	500
1	>500	100
2	>500	>500
3	>500	>500
Camptotecina	20	5

* Concentração inicial do teste com substâncias puras 500 $\mu\text{g/mL}$).

O espectro de massas, obtido pela técnica “electrospray”, do derivado bioativo **1** apresentou um íon molecular $[M+Na]^+$ m/z 289 e os íons fragmentários m/z 210, 154 e 126 atribuídos a $[M+Na^+ - \text{MeSO}_2]$, uma unidade cinamofloxi $[\text{C}_9\text{H}_7\text{O}+\text{Na}^+]$ e ao fragmento resultante da perda de CO da unidade cinamofloxi $[\text{C}_8\text{H}_8+\text{Na}]$, respectivamente. Os dados obtidos de seus espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Tabela 1) indicaram claramente que uma parte da estrutura de **1** é formada por um grupo cinamofílico, confirmando a análise do espectro de massas. Análise detalhada dos dados de RMN indicou que a unidade que está ligada à parte cinamofílica corresponde a um sistema *trans*-1,2-dissubstituído, evidenciado pelos sinais em δ 4,95 dd ($J = 1,0; 3,0$ Hz), δ 7,01 dt ($J = 3,0; 16,0$ Hz) e 6,65 dt ($J = 16,0; 1,0$ Hz) e pelo sinal em δ 2,89 (s) referente a um grupo metílico. Estes dados, analisados em conjunto com aqueles obtidos do espectro de massas, análise elementar e comparação com a literatura^{4,8} permitiram concluir que **1** é a substância conhecida *trans*-cinamato de *trans*-3'-metilsulfonilalila. Em adição, as análises dos dados espectrais de RMN de ^{13}C e de HMBC permitiram atribuir de maneira inequívoca os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos 4 e 3' dessa substância (Tabela 1) uma vez que, no único registro encontrado na literatura⁴, esses valores foram obtidos por técnicas unidimensionais que não permitiram sua discriminação. Este é o terceiro registro do isolamento dessa substância e destaca-se que os registros anteriores foram também de espécies de Lauraceae (*Cinnamomum triplinervis*⁸ e *Phoebe brenesii*⁴).

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para irieliptina⁵ (**2**) indicaram tratar-se de um derivado do ácido tetrônico, já conhecido como um dos constituintes químicos isolados de *Iryanthera elliptica* Ducke⁵. A estrutura da substância **3** foi elucidada a partir de seus dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C que demonstraram tratar-se da neolignana (7*R*,8*S*,1'*S*)- Δ^8 -3',5'-dimetoxi-1',4'-diidro-4'-oxo-

7.0.2', 8.1'-neolignana já descrita na literatura como constituinte de *Ocotea catharinensis*⁶, uma Lauraceae comum na Mata Atlântica, conhecida vulgarmente como “canela preta”.

O derivado cinamofílico **1** mostrou atividade moderada (CI_{12} 100 $\mu\text{g/mL}$), em comparação com o agente anticancerígeno camptotecina (CI_{12} 5 $\mu\text{g/mL}$), porém seletiva contra a linhagem Rad 52Y (Tabela 2) enquanto que **2** e **3** mostraram-se inativos na dosagem testada (500 $\mu\text{g/mL}$). Este dado é de grande interesse porque indica que a substância **1** (CI_{12} 100 $\mu\text{g/mL}$) tem especificidade sobre as células deficientes nos mecanismos de reparo do DNA (Rad 52Y), inibindo o seu crescimento, mas atua muito pouco sobre o crescimento das células normais (CI_{12} >500 $\mu\text{g/mL}$), proficientes no reparo do DNA (Rad+). Essa característica é fundamental quando o interesse é a busca de agentes anticancerígenos, pois o que se deseja é a seleção de candidatos que sejam tóxicos para as células tumorais ou deficientes (Rad 52Y), impedindo a sua proliferação, mas que sejam inativos, ou atuem muito pouco, sobre o crescimento das células sadias (Rad+).

Esse é o primeiro registro na literatura dessa classe de substância, com atividade em *S. cerevisiae* geneticamente modificada (deficiência relacionada com uma das maiores vias de reparação do DNA)³. Substâncias com essa ação citotóxica seletiva nas células deficientes no reparo do DNA podem agir como um agente antitumoral potencial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP, programa Biota-FAPESP (Instituto Virtual da Biodiversidade, www.biota.org) e ao CNPq, pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas a V. da S. Bolzani e M. C. M. Young.

REFERÊNCIAS

- Gottlieb, O. R.; Yoshida, M. Em *Natural Product of Wood Plants*; Rowe, J. W., ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1989, p. 439-511.
- Pedralli, G.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 1982.
- Gunatilaka, A. A. L.; Kingston, D. G. I.; Johnson, R. K.; *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 68.
- Castro, O.; Lopez, J.; Vergara, A.; *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 640.
- Braz Filho, R.; Diaz, D. P. P.; Gottlieb, O. R.; *Phytochemistry* **1980**, *19*, 455.
- Haraguchi, M.; Motidome, M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. R.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 561.
- Eng, W.-K.; Faucette, L.; Johnson, R. K.; Stenglanz, R.; *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 775.
- Ripperger, H.; Diaz, M.; Schreiber, K.; *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1453.