

## ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE *Sloanea garckeana* K. Schum.

Adriano Lopes Romero, Álvaro Fontana e Cleuza Conceição da Silva

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 1590, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Maria Conceição de Souza

Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 1590, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

João Ernesto de Carvalho

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrárias, CP 6171, 13083-970 Campinas - SP, Brasil

Emiret O. Faria, Lucilia Kato e Cecília M. A. de Oliveira\*

Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, CP 131, Campus II, Samambaia, 74001-970 Goiânia – GO, Brasil

Recebido em 12/6/07; aceito em 15/2/08; publicado na web em 31/7/08

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF *Sloanea garckeana* K. Schum. The crude methanol extract and hexane, ethyl acetate, chloroform and methanol fractions from leaves of *S. garckeana* were examined *in vitro* for their antiproliferative activity on MCF-7, NCI-ADR, NCI-460, UACC-62, 786-0, OVCAR-03, PCO-3 and HT-29 human cancer cell lines. Among the assayed fractions, the ethyl acetate fraction showed to be cytotoxic against 786-0, UACC-62, OVCAR-03 and NCI-ADR cell lines with  $IC_{50}$  values of 12  $\mu\text{g/mL}$ , 42  $\mu\text{g/mL}$ , 53  $\mu\text{g/mL}$  and 51  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Through fractionation and isolation procedures compound (1) was obtained from the EtOAc fraction and its structure was elucidated by spectral techniques.

Keywords: *Sloanea garckeana*; Elaeocarpaceae; 3-O-methyl ellagic acid-4'-O- $\alpha$ -L-rhamnoside.

## INTRODUÇÃO

Elaeocarpaceae é uma família de plantas florais compreendendo 12 gêneros e aproximadamente 600 espécies de árvores e arbustos, os quais estão distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais.<sup>1</sup> Os gêneros *Aristotelia*, *Peripentadenia* e *Elaeocarpus* estão entre os mais estudados dentro da família e são conhecidos como fonte de metabólitos ativos derivados de ácido elágico,<sup>2</sup> além de alcalóides pirrolidínicos<sup>3</sup> e indolizidínicos.<sup>4,5</sup> No Brasil, a família Elaeocarpaceae é representada pelos gêneros *Sloanea* e *Crinodendron*, cuja fitoquímica é bem pouco conhecida. Somente uma espécie de cada gênero foi investigada e ambas são descritas como fonte de curcubitacinas citotóxicas.<sup>6,7</sup> Como parte de um programa de colaboração interdisciplinar que tem como objetivo o estudo de plantas medicinais, selecionamos para investigação o extrato bruto de *Sloanea garckeana*, com base no perfil fitoquímico e na atividade citotóxica exibidos por algumas espécies da família. Neste trabalho, descrevemos a atividade antiproliferativa do extrato bruto e das frações de *S. garckeana* assim como o isolamento de um derivado do ácido elágico (1). A estrutura do composto isolado foi elucidada com base nas análises dos dados espectrais e por comparação com dados da literatura.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto metanólico das folhas de *S. garckeana* foi submetido à avaliação da atividade antiproliferativa em culturas de células tumorais humanas de UACC-62 (melanoma), NCI-460 (pulmão tipo não pequenas células), MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama que expressa o fenótipo de resistência MDR), HT-29 (cólon), OVCAR (ovário), C786-0 (rim) e PCO-3 (próstata) e mostrou-se ativo em concentrações abaixo de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 1) para todas as linhagens

testadas. Com base neste resultado, o extrato bruto foi fracionado em ordem crescente de polaridade resultando nas frações hexano,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH.

As frações assim obtidas foram avaliadas frente às mesmas células descritas acima e a análise dos dados obtidos permitiu identificar a fração AcOEt (Figura 2, Tabela 1) como a mais ativa entre as quatro frações testadas, sendo predominantemente ativa, com efeito citocida (morte celular), para a linhagem C786-0 (rim) e UACC-62 (melanoma), com valor de  $IC_{50}$  12 e 42  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A fração apresentou ainda, efeito citostático para as linhagens OVCAR (ovário) e NCI-ADR com valores de  $IC_{50}$  de 53 e 51  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Além disso, a fração  $\text{CHCl}_3$  apresentou efeito citocida para a linha-

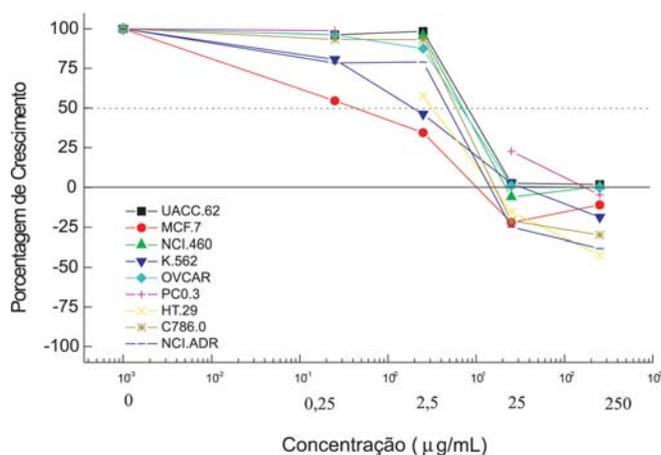
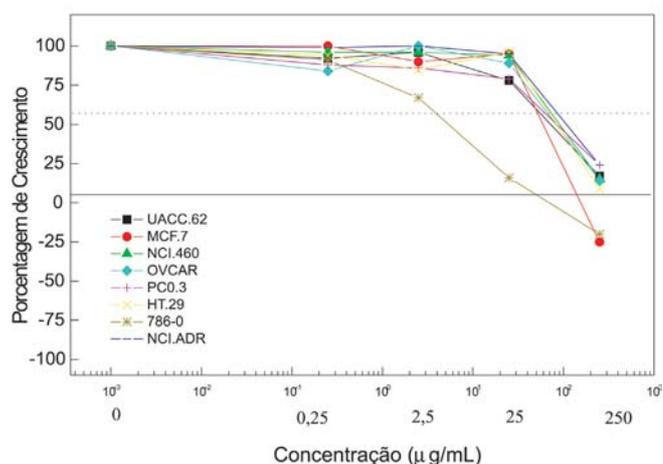


Figura 1. Porcentagem de crescimento de células em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato bruto metanólico das folhas de *S. garckeana*

\*e-mail: cecilia@quimica.ufg.br



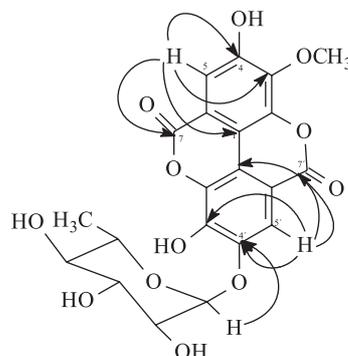
**Figura 2.** Porcentagem de crescimento de células em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) da fração AcOEt oriunda do extrato bruto metanólico das folhas de *S. garckeana*

gem C786-0 (rim) com valor de  $IC_{50}$  de 32 µg/mL e para a linhagem MCF-7 (mama) com valor de  $IC_{50}$  de 28 µg/mL.

Com base nestes resultados, o fracionamento foi direcionado para o isolamento das substâncias presentes na fração AcOEt, a qual foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 com metanol, resultando no isolamento do composto (1), como o constituinte majoritário da mistura.

A identificação do composto (1) foi realizada com base nos dados de RMN  $^{13}C$  e  $^1H$  uni e bidimensionais (Tabela 2) e por comparação com dados da literatura.<sup>8,9</sup> No espectro de RMN de  $^{13}C$ /DEPT-135°, são observados 21 sinais, dentre eles, 4 relativos a carbonos carbinólicos em  $\delta_c$  72,0, 70,3, 70,2, 70,1, um a carbono anomérico em  $\delta_c$  100,3 e um outro referente à metila em  $\delta_c$  18,1, os quais sugerem uma unidade ramnose. Dois sinais de carbonos metínicos em  $\delta_c$  111,9 e 111,7 e 10 de carbonos não ligados a hidrogênio na região de  $\delta_c$  107,7–152,9 indicam a presença de dois anéis aromáticos contendo apenas um hidrogênio cada. Duas carbonilas conjugadas em  $\delta_c$  158,9 e 159,0 são também observadas, além de um sinal referente a uma metoxila em  $\delta_c$  61,2. O espectro de RMN de  $^1H$  confirma a presença da unidade de ramnose através dos sinais entre  $\delta_H$  3,30 a 5,50, característicos de hidrogênios carbinólicos; do duplete em  $\delta_H$  5,47 ( $J = 1,2$  Hz), referente ao hidrogênio anomérico e do duplete em  $\delta_H$  1,11 ( $J = 6,0$  Hz), atribuído à metila. Adicionalmente, são observados dois simpletos em  $\delta_H$  7,73 e 7,52, com integração para um hidrogênio cada, um simpleto intenso de uma unidade de metoxila em  $\delta_H$  4,03, além de dois simpletos referentes a duas hidroxilas em  $\delta_H$  11,11 e  $\delta_H$  10,79. O espectro de HMQC permite confirmar a presença das unidades aromáticas, além da unidade glicosídica. O espectro  $^1H - ^1H$  COSY apresenta correlações

somente para a ramnose, porém o espectro HMBC permite conectar as duas unidades aromáticas através de correlações entre os hidrogênios H-5 ( $\delta_H$  7,52) e os carbonos C-1 ( $\delta_c$  111,6), C-3 ( $\delta_c$  140,4), C-4 ( $\delta_c$  152,9) e C-7 ( $\delta_c$  159,0); H-5' ( $\delta_H$  7,73) e os carbonos C-1' ( $\delta_c$  114,6), C-3' ( $\delta_c$  141,6), C-4' ( $\delta_c$  146,7) e C-7' ( $\delta_c$  158,9). Além disso, observa-se também uma correlação entre o hidrogênio anomérico H-1'' ( $\delta_H$  5,47) e o carbono C-4' ( $\delta_c$  146,7), o que confirma a ligação do resíduo de açúcar neste carbono (Figura 3).



**Figura 3.** Estrutura do derivado 3-O-metileláxico-4'-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (1) e principais correlações no espectro HMBC

A comparação da estrutura assim obtida com dados da literatura permitiu identificar o composto 1 como sendo o ácido 3-O-metileláxico-4'-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, o qual foi isolado anteriormente de *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae)<sup>8</sup> e *Potentilla discolor* (Rosaceae).<sup>9</sup> O ácido elágico e seus derivados glicosilados e não glicosilados são compostos fenólicos isolados de fontes naturais tais como frutas vermelhas, uvas, nozes e de outras espécies vegetais, sendo comumente associados ao potencial antioxidante destes alimentos.<sup>10</sup> Por outro lado, a atividade citotóxica apresentada pelo extrato AcOEt pode estar relacionada à presença do constituinte majoritário, 3-O-metileláxico-4'-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (1), visto que o ácido elágico na sua forma livre apresenta elevada atividade citotóxica e antiproliferativa para várias linhagens de células.<sup>11</sup>

## PARTE EXPERIMENTAL

### Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  foram obtidos em espectrômetro Varian Mercury Plus (300,6 MHz para  $^1H$  e 75,45 MHz para  $^{13}C$ ). Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o TMS ( $\delta = 0,0$  ppm). A cromatografia em coluna foi realizada em sílica gel 60 [(0,063–0,200 mm) (70–230 mesh ASTM)] e a filtração em Sephadex LH-20. A concentração que promove a inibição de 50% do crescimento celular ( $IC_{50}$ ) foi determinada por análise de regressão não-linear usando-se o programa GraphPad Prism.

**Tabela 1.** Valores de  $IC_{50}$  em µg/mL para as frações oriundas do extrato bruto metanólico das folhas de *S. garckeana* necessárias para inibir a proliferação de células tumorais<sup>a</sup>

Frações	UACC-62	MCF-7	NCI-460	OVCAR	PCO-3	HT-29	C786-0	NCI-ADR
Hexano	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorofórmio	> 100	28	>100	>100	>100	>100	32	>100
Ac. de etila	42	>100	>100	53	>100	>100	12	51
metanol	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

<sup>a</sup> Concentração que promove a inibição de 50% do crescimento celular ( $IC_{50}$ ). Os valores foram determinados por análise de regressão não linear utilizando-se o programa GraphPad Prism ( $r^2 > 0,9$ )

**Tabela 2.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300,6 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz) para o composto **1** em DMSO- $d_6$ 

C - (DEPT)	<b>1</b>	
	$\delta_c$	$\delta_H$
1 ( $\text{C}_0$ )	111,6	
2 ( $\text{C}_0$ )	136,4	
3 ( $\text{C}_0$ )	140,4	
4 ( $\text{C}_0$ )	152,9	
5 (CH)	111,7	7,52 (1H, s)
6 ( $\text{C}_0$ )	107,4	
7 ( $\text{C}_0$ )	159,0	
1' ( $\text{C}_0$ )	114,6	
2' ( $\text{C}_0$ )	142,1	
3' ( $\text{C}_0$ )	141,6	
4' ( $\text{C}_0$ )	146,7	
5' (CH)	111,8	7,73 (1H, s)
6' ( $\text{C}_0$ )	113,3	
7' ( $\text{C}_0$ )	158,9	
1'' (CH)	100,3	5,47 (1H, d, 1,2)
2'' (CH)	70,1	4,00 (1H, sl)
3'' (CH)	70,3	3,83 (1H, m)
4'' (CH)	72,0	3,30 (1H, m)
5'' (CH)	70,2	3,54 (1H, m)
6'' ( $\text{CH}_3$ )	18,1	1,11 (3H, d, 6,0)
$\text{OCH}_3(\text{CH}_3)$	61,2	4,03 (3H, s)

### Material vegetal

*Sloanea garckeana* K. Schumam foi coletada em 12 de outubro de 2000, em Porto Rico-PR, pela Profa. Dra. M. C. de Souza (NU-PELIA/UEM). Uma exsicata (no. HUEM 13407) da espécie estudada encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá.

### Preparação e fracionamento do extrato bruto

As folhas secas e moídas (791,52 g) foram exaustivamente extraídas por maceração à temperatura ambiente com metanol. O extrato bruto obtido foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo à temperatura de 40 °C, obtendo-se 67,00 g de extrato bruto seco. Parte desse extrato (32,00 g) foi adsorvido em sílica gel e submetido ao pré-fracionamento em coluna cromatográfica utilizando-se os eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade, obtendo-se as frações hexânica (1,50 g); clorofórmica (3,20 g); acetato de etila (9,09 g) e metanólica (18,10 g). Parte da fração acetato de etila (1,30 g) foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 utilizando-se metanol, resultando no isolamento de 6,5 mg do composto (**1**) na forma de cristais brancos.

### Avaliação da atividade antiproliferativa

Para a realização da triagem *in vitro* foram selecionadas as linhagens: MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI-460 (pulmão), PCO-3 (próstata), HT-29 (cólon), OVCAR (ovário) e 786-0 (rím). A avaliação da atividade antiproliferativa do extrato bruto metanólico e das frações oriundas do mesmo foi realizada segundo metodologia descrita por Monks e colaboradores,<sup>12</sup> utilizando-se doxorubicina como controle positivo. Para o teste de atividade, foram plaqueados 100  $\mu\text{L}$  de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, em placas de 96 compartimentos. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Depois desse período uma placa controle foi fixada através da adição de ácido tricloroacético para determinação da quantidade de células no momento da adição das drogas. O extrato e as frações foram ensaiados nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e incubados por 48 h. Em seguida, as placas foram coradas pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do corante proteico sulforodamina B (SRB) a 0,4% (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1%, e incubadas a 4 °C, durante 30 min. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10  $\mu\text{M}$  e pH 10,5 por 5 min em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão das bolsas PIBIC de A. L. Romero e A. Fontana e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS

- Mabberley, D. J.; *The Plant Book*, 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge University Press: Cambridge, 2000.
- Elkhateeb, A.; Subeki, K.; Takahashi, K.; Matsuura, H.; Yamasaki, M.; Yamato, O.; Maede, Y.; Katakura, K.; Yoshihara, T.; Nabeta, K.; *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2577.
- Katavic, P. L.; Venables, D. A.; Rali, T.; Carroll, A. R.; *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 866.
- Katavic, P. L.; Venables, D. A.; Forster, P. I.; Guymer, G.; Carroll, A. R.; *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1295.
- Carroll, A. R.; Arumugan, G.; Quinn, R. J.; Redburn, J.; Guymer, G.; Grimshaw, P.; *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1889.
- Rodriguez, N.; Vasquez, Y.; Hussein, A. A.; Coley, P. D.; Solis, P. N.; Gupta, M. P.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1515.
- Bittner, M.; Poyser, K. A.; Poyser, J. P.; Silva, M.; Weldt, E.; Sammes, P. G.; *Phytochemistry* **1973**, *12*, 1427.
- Yazaki, Y.; Hillis, W. E.; *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1180.
- Xue, P-F.; Zhao Y-Y.; Wang, B.; Liang, H.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2006**, *34*, 825.
- Zafrilla, P.; Ferreres, F.; Tomas-Barberan, F. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3651; Colaric, M.; Veberic, R.; Solar, A.; Hudina, M.; Stampar, F.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6390; Cerda, B.; Tomas-Barberan, F. A.; Espin, J. C.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 227.
- Losso, J. N.; Bansode, R. R.; Trappey, A.; Bawadi, H.A.; Truax, R.; *J. Nutr. Biochem.* **2004**, *15*, 672.
- Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M.; *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757.