

RENATA GARCIA DUSI

Isolamento, identificação e caracterização das substâncias de
Rapanea guianensis Aubl. (Myrsinaceae) e *Diospyros hispida* A. DC. (Ebenaceae)
inibidoras de células de câncer

Brasília, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

RENATA GARCIA DUSI

Isolamento, identificação e caracterização das substâncias de
Rapanea guianensis Aubl. (Myrsinaceae) e *Diospyros hispida* A. DC. (Ebenaceae)
inibidoras de células de câncer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espindola

Brasília, 2017

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Laila Salmen Espindola, por compartilhar sua sabedoria, conhecimento e ética, pela orientação, pelos ensinamentos e por proporcionar grandes oportunidades. Por acreditar no meu potencial e me fazer querer sempre crescer.

Ao Dr. Kirk Gustafson, por permitir minha ida ao NCI e por me co-orientar lá.

Ao Dr. John Beutler, por auxiliar na obtenção de todas as informações e dados adicionais essenciais para a execução deste projeto. À Dr^ª Sarah Long, por me ajudar durante e após minha volta do NCI, principalmente por ajudar na preparação de amostras para testes adicionais e auxiliar na interpretação de alguns espectros. À Dr^ª Amanda Waters e Ana Sofia Valdeira por todo o auxílio, especialmente na preparação, execução e interpretação de espectros e corridas de HPLC. À Dr^ª Susanna Chan por sempre ajudar com minhas dúvidas. À Dr^ª. Heidi Bokesch e Lauren Krump pelo HRMS. Ao Dr. Brice Wilson pelos ensaios em p38 e conversas adicionais. Ao Dr. Carter Mitchell por permitir que usasse sua balança supersensível e pelo alto astral de sempre. À Laura Cartner por organizar os testes biológicos. À Lana Crutchley, por desempenhar com maestria a gestão do laboratório com respostas (muito) rápidas a todas as demandas. À toda equipe do NCI que diretamente e indiretamente ajudaram durante e após minha estadia no Molecular Targets Laboratory.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz Filho pela interpretação dos espectros de RMN e atribuição das estruturas.

Às estudantes e servidoras do Laboratório de Farmacognosia, às Prof^ª Mariana e Prof^ª Lorena pela ajuda e convivência. Aos ex-alunos por terem colaborado na construção do Laboratório.

À equipe da Central Analítica do Instituto de Química da UnB, especialmente ao Luiz Eduardo Benedito, ao Alan Mól e à Prof^ª. Aline.

À Prof^ª. Dr^ª. Aline de Oliveira, Prof^ª. Dr^ª. Leticia Lotufo e Prof^ª. Dr^ª. Mariana Castro por aceitarem participar da banca.

Ao Prof. José Elias de Paula (*in memoriam*) pelo legado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, especialmente ao Alessandro e sua equipe da Secretaria por não pouparem esforços em fazer tudo funcionar. Aos servidores e funcionários terceirizados que garantem a limpeza, segurança e manutenção da Universidade, permitindo nossos estudos. Obrigada.

Ao apoio financeiro da CAPES e dos meus pais, que permitiu minha estadia no NCI.

Aos meus amigos, especialmente Táris, Gabriel e Jéssica pelas discussões científicas e por me manterem sã. À toda minha família, por compartilharem o lado leve da vida.

À minha mãe, Rúbia, ao meu pai, Roberto e ao meu irmão, Ramon, por serem meus primeiros e eternos professores. O apoio de vocês é fundamental para que eu consiga alcançar meus objetivos.

Ao meu companheiro Raynner por ter estado sempre ao meu lado. Seu amor, companheirismo, respeito e cuidado são essenciais na minha vida.

RESUMO

O câncer é um conjunto de doenças relacionadas entre si, cuja característica é a proliferação descontrolada de células com capacidade de invasão de outros tecidos e órgãos. Atinge crianças e adultos, homens e mulheres, todas as etnias e classes sociais. Traz prejuízos à saúde pessoal e pública, na esfera econômica e social, tornando-se um alvo para pesquisas de grupos do mundo inteiro. Cerca de 60% dos quimioterápicos utilizados na clínica são produtos naturais ou derivados de produtos naturais. A complexidade química encontrada na natureza, fruto de bilhões de anos de evolução tem sido importante fonte na busca de alternativas terapêutica. A biodiversidade do Cerrado brasileiro se traduz em uma grande e pouco explorada quimiodiversidade, o que o torna uma interessante fonte de novos fármacos. Neste trabalho, o extrato etanólico da madeira da raiz de *Rapanea guianensis* e o extrato acetato de etila da raiz (madeira com casca) de *Diospyros hispida* foram submetidos a fracionamento bioguiado após demonstrarem atividade no painel de 60 linhagens do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI60). A partir do extrato de *R. guianensis* foi isolada a saponina Ardisiacrispin A (**1**) e a lignana (-)-lyoniresinol 3-O- β -D-glucopyranoside (**2**). A saponina (**1**) foi ativa em cinco diferentes linhagens com IC₅₀ de 1,1 μ M a 46,32 μ M e também teve atividade na via de sinalização RasRaf. Já a lignana (**2**) não foi ativa em nenhuma linhagem e nem na Topoisomerase I. Do extrato de *D. hispida* foram isoladas três quinonas diméricas: um derivado clorado de isodiospirina que ainda não havia sido reportado - nomeado brazisodiospirina (**3**), isodiospirina (**4**) e habibona (**5**), além dos fitoesteróis lupeol (**6**), β -sitosterol (**7**) e estigmasterol (**8**). Todas as naftoquinonas exibiram atividade nas linhagens testadas, mas isodiospirina foi a mais ativa, especialmente na linhagem de câncer renal UO31 com IC₅₀ de 6,5 μ M.

Palavras-chave: Cerrado. *Rapanea guianensis*. Myrsinaceae. *Diospyros hispida*. Ebenaceae. Atividade antitumoral. Saponina. Naftoquinona. Isodiospirina.

ABSTRACT

Cancer is a series of related diseases in which cells proliferate without control and have the ability to invade other tissues and organs. It is concerning for both children and adults, men and women, all ethnicities and social classes. It damages personal and public health, the economic and social sphere, becoming a target for research of academics from all over the globe. Around 60% of all chemotherapeutics are of natural origin or derived from a natural product. The chemical complexity of natural products, which is a result of billions of years of evolution, has been an important source in the search for alternative therapeutics. The biodiversity of the Brazilian Cerrado translates into a great and poorly explored chemodiversity, which makes it a useful source of new drugs. In this work, the ethanolic extract of *Rapanea guianensis* root wood and the ethyl acetate extract of the root (wood with bark) of *Diospyros hispida* were submitted to bioguided fractionation after demonstrating activity in the panel of 60 cell lines screening of the National Cancer Institute of U.S. (NCI60). From the extract of *R. guianensis* was isolated the saponin Ardisiacrispin A (1) and the lignan (-) - lyoniresinol 3-O- β -D-glucopyranoside (2). Saponin (1) was active in five different strains with IC₅₀ from 1.1 μ M to 46.32 μ M and also had activity on the RasRaf signaling pathway. The lignan (2) was not active in any strain or Topoisomerase I assay. Three dimeric quinones were isolated from *D. hispida* extract: a chlorinated derivative of isodiospirin that had not yet been reported (3), isodiospirin (4) and habibone (5) as well as the phytosterols lupeol (6), β -sitosterol (7) and stigmasterol (8). All of the naphthoquinones exhibited activity in the tested strains, but isodiospirin was the most active, especially in the renal cancer strain UO31 with IC₅₀ of 6.5 μ M.

Keywords: Cerrado. *Rapanea guianensis*. Myrsinaceae. *Diospyros hispida*. Ebenaceae. Antitumor activity. Saponin. Naphthoquinone. Isodiospirin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Rapanea guianensis</i> Aubl. (Myrsinaceae). Fonte: Acervo do Laboratório de Farmacognosia.....	19
Figura 2- <i>Diospyros hispida</i> A. DC (Ebenaceae). Fonte: ALBERNAZ, 2010.....	21
Figura 3- Fluxograma geral do fracionamento bioguiado.	28
Figura 4- Cartuchos de diol com amostras a serem pré-fracionadas.	29
Figura 5- Aplicação sequencial do sistema eluente. A cada troca de sistema eluente, os cartuchos são inseridos nas posições subsequentes da placa, permitindo a separação de cada fração.....	29
Figura 6- Sistema montado para o pré-fracionamento dos extratos. O sistema possui receptáculo para cada cartucho, e como se trata de um sistema a vácuo, todas as posições devem estar fechadas seja com tampas (vermelhas) seja com os cartuchos do fracionamento.	30
Figura 7- A- Transferência das frações coletadas para secagem. B- Sistema de secagem de amostras com Nitrogênio gasoso. C- Capela química com saída de Nitrogênio usado para secagem a frio das amostras.	30
Figura 8- Sistema completo para cromatografia em coluna de Sephadex LH20. A - Coluna com Sephadex LH20 durante fracionamento. B - Coletor de frações com detector UV. C - Frações coletadas a cada 300 gotas. D - Cromatograma da coluna sendo registrado em papel.	31
Figura 9- Resultado do teste NCI60 realizado a 100 µg/mL de A: <i>Diospyros hispida</i> e B: <i>Rapanea guianensis</i>	36
Figura 10- Resultado relativo do teste NCI60 feito com 100 µg/mL de A: <i>Diospyros hispida</i> e B: <i>Rapanea guianensis</i>	39
Figura 11- Resultados do teste NCI60 dose-resposta separados por tecido de origem, a concentrações de 0,01 - 100 µg/mL de A: <i>Diospyros hispida</i> e B: <i>Rapanea guianensis</i>	40
Figura 12- Resultados do teste NCI60 dose-resposta em todas as linhagens a concentrações de 0,01 - 100 µg/mL de A: <i>Diospyros hispida</i> e B: <i>Rapanea guianensis</i>	42
Figura 13- Resultados do teste NCI60 dose-resposta em todas as linhagens, com valores de IC ₅₀ , ITC e CL ₅₀ para A: <i>Diospyros hispida</i> e B: <i>Rapanea guianensis</i>	45

Figura 14- Recipiente com o extrato de <i>R. guianensis</i> parcialmente solubilizado.	48
Figura 15- Espectros de ¹ H RMN das amostras 167A004A e 167A007A em MeOD.	49
Figura 16- Espectros de ¹ H RMN das amostras 167A007B, 167A007C, 167A007D e 167A007E em MeOD.	51
Figura 17- Resultado da atividade das frações 167A007A – 167A007E nas linhagens MG63 e MG63.3 de osteossarcoma.	52
Figura 18- Resultado da atividade das frações 167A007A – 167A007E nas linhagens A498 e UO31 de tumor renal.	52
Figura 19- Cromatograma obtido no fracionamento de 167A007D em coluna de Sephadex LH20.	53
Figura 20- Resultado da atividade das frações 167A027A – 167A027F nas linhagens UO31 e A498 de tumor renal.	54
Figura 21- Resultado da atividade das frações 167A027A – 167A027F nas linhagens MG63 e MG63.3 de osteossarcoma.	54
Figura 22- Espectros de ¹ H RMN das amostras 167A027B, 167A027C, 167A027D, 167A027E e 167A027F em MeOD.	56
Figura 23- Resultados da análise de 167A027B em LC-MS. A: Cromatograma e espectro de massas obtidos em modo negativo. B: Cromatograma e espectro de massas obtidos em modo positivo.	57
Figura 24- Espectro de ¹³ C (125 MHz) da fração 167A027B em piridina d-5.	58
Figura 25- Espectro de massas de alta resolução de 1 , Ardisiacrispin A.	60
Figura 26- Estrutura proposta da Ardisiacrispin A isolada (composto 1).	61
Figura 27- Atividade de Ardisiacrispin A em linhagens de câncer de cólon, osteossarcoma e rim.	61
Figura 28- A- Atividade do extrato de <i>R. guianensis</i> em RasRaf. B- Atividade do composto 1 e de um composto seletivo para P-MEK (proteína MEK fosforilada).	63
Figura 29- Resultados da análise de 167A027C em LC-MS. Cromatograma (superior) e espectro de massas obtidos em modo positivo (meio) e em modo negativo (inferior) do pico a 13,75 minutos.	64
Figura 30- Cromatograma de 167A027C (superior) e espectro de massas obtidos em modo negativo (meio) e em modo positivo (inferior) do pico a 9,49 minutos.	65

Figura 31- Espectros de RMN de ^1H (superior) e ^{13}C (inferior) da amostra 167A076E em MeOD.....	66
Figura 32- Espectro de massas de alta resolução do composto 2 (167A076E).	67
Figura 33- Estrutura química proposta para 2 (167A076E).	68
Figura 34- Atividade de (-)-lyoniresinol 3-O- β -D-glucopyranoside (2) em linhagens de câncer de cólon, rim e osteossarcoma.	68
Figura 35- Atividade de 2 na enzima Topoisomerase I.	69
Figura 36- Fluxograma do isolamento de 1 e 2 a partir do extrato de <i>R. guianensis</i> . 71	
Figura 37- Espectros de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) das frações 167A045A, 167A045B, 167A045C, 167A045D e 167A045E.....	73
Figura 38- Atividade das frações 167A045A a 167A045E em linhagens de câncer renal.....	74
Figura 39- Atividade das frações 167A045A a 167A045E em linhagens de osteossarcoma.	75
Figura 40- Cromatograma obtido da coluna de Sephadex LH20 com 167A045B.	76
Figura 41- Atividade biológica em linhagens de osteossarcoma das frações 167A080A a 167A080L provenientes da coluna de Sephadex LH20 de 167A045B.	77
Figura 42- Atividade biológica em linhagens de câncer renal das frações 167A080A a 167A080L provenientes da coluna de Sephadex LH20 de 167A045B.	77
Figura 43- Estrutura química proposta para 3 (167A128I).....	79
Figura 44- Espectro de massas de alta resolução de 167A128I obtido por Eletron Spray e as propostas estruturais correspondentes aos principais picos e sem ignorar as outras possibilidades de localização do H^+ e do Na^+	80
Figura 45- Espectro de massas de baixa resolução de 167A128I obtido através de ionização por Elétron Spray e as propostas estruturais correspondentes aos principais picos e sem ignorar as outras possibilidades de localização do H^+	80
Figura 46- Espectros de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) de 167A128I	81
Figura 47- Espectro heteronuclear bidimensional HSQC editado de 167A128I	83
Figura 48- Posicionamento equatorial da hidroxila em 167A128I	83
Figura 49- Espectros de ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) de 167A128I	84
Figura 50 - Espectro bidimensional homonuclear COSY de 167A128I	84
Figura 51- Espectro heteronuclear bidimensional HMBC editado de 167A128I	85

Figura 52- Possibilidades da estrutura de 3 (167A128I), segundo interpretação dos espectros obtidos.....	86
Figura 53- Regressão linear calculada para os deslocamentos químicos experimentais e calculados para as duas possibilidades estruturais de 167A128I.....	87
Figura 54- Atividade biológica de 167A128I nas linhagens A498 e UO31 de câncer renal, COLO205 e KM12 de câncer de cólon e MG63 e MG63.3 de osteossarcoma.....	89
Figura 55- Cromatograma obtido no fracionamento de 167A045A em Sephadex LH20.....	89
Figura 56- Espectros de ¹ H RMN das frações 167A119B a 167A119H.....	92
Figura 57- Cromatografia em camada delgada das frações 167A119B a 167A119G.....	92
Figura 58- Estrutura química proposta para 4 (167A124B).....	93
Figura 59- Espectro de ¹ H RMN (600 MHz, CDCl ₃) do composto 4 , 167A124B.....	94
Figura 60- Atividade de 4 em linhagens de osteossarcoma, câncer renal e de cólon.....	96
Figura 61- Atividade do composto 4 (167A124B) no NCI60. Fonte: Acervo do NCI.....	97
Figura 62- Comparativo da atividade do extrato de <i>D. hispida</i> e isodiospirina (4) no NCI60.....	98
Figura 63- Estrutura química proposta para a substância 5 (167A124N).....	99
Figura 64- Espectro de ¹ H RMN 600 MHz de 5 (167A124N) em CDCl ₃	99
Figura 65- Atividade de 5 (167A124N) nas linhagens de osteossarcoma, câncer renal e de cólon.....	101
Figura 66- Estrutura das substâncias 3 , 4 e 5 , isoladas a partir do extrato de <i>D. hispida</i>	101
Figura 67- Estrutura de 167A123F, substância 6 (lupeol).....	102
Figura 68- Estrutura do β-sitosterol (7) e estigmasterol (8), encontrados como uma mistura na fração 167A123H.....	103
Figura 69- Fluxograma do isolamento de 3 , 4 , 5 , 6 , 7 e 8 a partir do extrato de <i>D. hispida</i>	104

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Linhagens celulares que compõe o teste do NCI 60 uma dose e dose resposta.24
- Tabela 2-** Atividade dos extratos nas oito linhagens de células tumorais testadas. Resultados são expressos pela viabilidade celular (%) após tratamento com os extratos a 20 µg/mL.32
- Tabela 3-** IC₅₀ (µg/mL) dos extratos em seis linhagens de células tumorais testadas.34
- Tabela 4-** Dados espectrais de **1** (¹H: 600 MHz; ¹³C: 150 MHz), incluindo resultados de experimentos 2D (HSQC e HMBC) e comparação com dados da literatura..
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 5-** Dados espectrais de **2** (¹H: 600 MHz; ¹³C: 150 MHz), incluindo resultados de experimentos 2D (HSQC e HMBC) e comparação com dados da literatura..
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 6-** Valores IC₅₀ (µg/mL) das frações de *D. hispida* nas linhagens renais e ósseas. **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 7-** Dados espectrais de **3** (¹H: 600 MHz; ¹³C: 150 MHz), incluindo resultados de experimentos 2D (HSQC e HMBC) e comparação com dados da literatura..
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 8-** Deslocamentos químicos calculados para a Possibilidade “a” e possibilidade “b” de 167A128I e os deslocamentos químicos experimentais.
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 9-** Dados espectrais de **4** (¹H: 600 MHz; ¹³C: 150 MHz), incluindo resultados de experimentos 2D (HSQC e HMBC) e comparação com dados da literatura.. 95
- Tabela 10-** Dados espectrais de **5** (¹H: 600 MHz; ¹³C: 150 MHz), incluindo resultados de experimentos 2D (HSQC e HMBC) e comparação com dados da literatura..
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 11-** Quadro comparativo das 8 substâncias isoladas com sua estrutura química e atividade nas linhagens de câncer. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl₃	Cloroformio deuterado
CGEN/MMA	Comissão de Gestão do Patrimnio Genético do Ministério do Meio Ambiente
CL₅₀	Concentrao Letal para 50%
COSY	Espectroscopia de correlao (correlated spectroscopy)
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfoxido
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography. CLAE (em português)- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HRMS	High Resolution Mass Spectrometer- Espectrmetro de Massas de Alta Resoluo
HSQC	Heteronuclear single-quantum coherence
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC₅₀	Concentrao Inibitória para 50%
ITC	Inibio Total do Crescimento
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrmetro de Massas
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
NCI	National Cancer Institute (EUA)
NCI60	Screening farmacológico do NCI com 60 linhagens tumorais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	Solid Phase Extraction. Em português extrao em fase sólida.
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid salt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 CÂNCER.....	13
1.1.1 Definição, bioquímica e fisiologia	13
1.1.2 Epidemiologia	15
1.1.3 Quimioterapia no câncer	17
1.2 A FAMÍLIA Myrsinaceae.....	18
1.2.1 A ESPÉCIE <i>Rapanea guianensis</i> Aubl.....	19
1.3 A FAMÍLIA Ebenaceae	20
1.3.1 A ESPÉCIE <i>Diospyros hispida</i> A. DC.	20
2. OBJETIVOS.....	22
3. MÉTODOS	22
3.1 Coleta dos materiais vegetais e preparação dos extratos.....	22
3.2 Testes de citotoxicidade.....	23
3.3 Teste citotoxicidade NCI 60.....	24
3.4 Teste <i>in vitro</i> RasRaf	26
3.5 Teste <i>in vitro</i> Topoisomerase I.....	27
3.6 Fracionamento bioguiado	27
3.7 Coluna com Sephadex LH20	30
3.8 Outras técnicas cromatográficas.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Atividade biológica dos extratos	32
4.2 Fracionamento bioguiado de <i>R. guianensis</i> e isolamento de 1 e 2.....	47
4.3 Fracionamento bioguiado de <i>D. hispida</i>	72
4.3.1 Isolamento de 3 - 167A128I	76
4.3.2 Isolamento de 4 e 5	89
4.3.3 Isolamento de 6 e da mistura de 7 e 8	102
5. CONCLUSÃO.....	105
6. REFERÊNCIAS.....	111
7. ANEXOS.....	117