



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CARINA DENNY

ATIVIDADE ANTICÂNCER DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS ATIVOS
OBTIDOS DE *Virola sebifera* (MYRISTICACEAE)

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de Doutor
em Odontologia. Área de Farmacologia,
Anestesiologia e Terapêutica.

PIRACICABA

2006

i

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP



CARINA DENNY
farmacêutica



ATIVIDADE ANTICÂNCER DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS ATIVOS
OBTIDOS DE *Viola sebifera* (MYRISTICACEAE)

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia. Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Co-Orientador: Profa. Dra. Mary Ann Foglio

Banca Examinadora:

Titulares:

Profa. Dra.: Aparecida Erica Bighetti

Profa. Dra.: Patrícia Corrêa Dias

Prof. Dr.: Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Prof. Dr.: Severino Matias Alencar

Suplentes:

Profa. Dra.: Marta Cristina Teixeira Duarte

Prof. Dr.: Fernando de Sá Del Fiol

Prof. Dr.: Pedro Luiz Rosalen

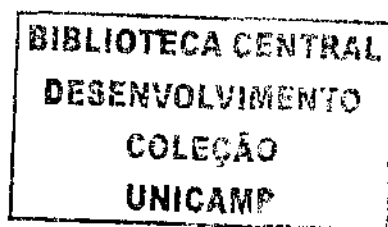
exemplar foi devidamente corrigido,
conforme a resolução COPG 036/83


Assinatura do Avaliador

PIRACICABA

2006

ii



UNIDADE BC
Nº CHAMADA 1/UNICATIP
20428a
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 68.369
PROC 16-P.00123.06
C _____
PREÇO 11,00
DATA 10/05/06
Nº CPD _____
BIB ID - 348954

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecário: Sueli Ferreira Julio de Oliveira - CRB-8ª. / 2380

D428a Denny, Carina.
Atividade anticâncer de extratos e princípios ativos
obtidos de
Virola sebifera (Myristicaceae). / Carina Denny. --
Piracicaba, SP :
[s.n.], 2006.

Orientadores: João Ernesto de Carvalho, Mary Ann
Foglio.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Plantas Medicinais. 2. Lignanas. 3. Alcalóides. 4. Cultura de
células I. Carvalho, João Ernesto de. II. Foglio, Mary Ann. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. IV. Título.

(sfjo/fop)

Título em inglês: Anticancer activity of extracts and active principles from *Virola sebifera*
(Myristicaceae)

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. Plants Medicinal. 2. Lignans. 3. Alkaloids.
4. Cell culture.

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

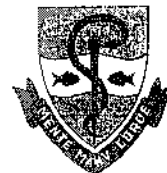
Titulação: Doutor em Odontologia

Banca examinadora: Aparecida Erica Bighetti, João Ernesto de
Carvalho, Patrícia Corrêa Dias, Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues,
Severino Matias Alencar.

Data da defesa: 24/01/2006.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 24 de Janeiro de 2006, considerou a candidata CARINA DENNY aprovada.

PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

PROFa. DRa. APARECIDA ÉRICA BIGHETTI

PROFa. DRa. PATRÍCIA CORRÊA DIAS

PROF. DR. SEVERINO MATIAS DE ALENCAR

PROF. DR. RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES

2006 09499

DEDICATÓRIA

Ao Mauro por todo seu apoio, compreensão e amor verdadeiro.

À Gabriela e ao Leonardo, que ao nascerem, tornaram-se a razão de toda a minha vida.

Aos meus pais, Odair e Rosali que sempre estiveram ao meu lado, orientando-me com amor, carinho e exemplo de bondade e perseverança.

Ao Moisés e à Marilena pelo apoio, carinho e amor em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pela oportunidade em desenvolver esse trabalho, pelo apoio e orientação, e acima de tudo pelo exemplo de ética e competência em sua vida profissional. Agradeço sua amizade, atenção e respeito que tem nos acompanhado nesses anos de estudo.

À minha co-orientadora Profa. Dra Mary Ann Foglio que acreditou nesse projeto, lutou pelo apoio financeiro que o ajudou a ser concretizado e identificou os compostos isolados, por sua disponibilidade de auxiliar em todos os momentos e sua amizade sincera.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Coordenador Geral da Pós-Graduação, FOP-UNICAMP. Por sua valiosa amizade e por ter me oferecido a oportunidade de trabalhar ao seu lado em minha primeira experiência em pesquisa.

À minha querida amiga e companheira nesse trabalho Marcela meu muito obrigado por sua dedicação e amizade.

À minha querida amiga Maria Carolina que me acompanhou fielmente em todos os momentos.

À minha querida amiga Sirlene por sua competência técnica e intelectual, mas principalmente por sua disposição em ajudar em todos os momentos.

Aos amigos queridos do laboratório de farmacologia e toxicologia do CPQBA: Alik, Ana, Cristiana, Erica, Karin, Juliana, Luciana, Lucianinha, Márcia, Marina, Patrícia, pela participação nesse trabalho, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Aos amigos queridos do CPQBA: Adilson, Ana Paula, Ariane, Eduardo, Glaucia, Ilza, Marily, Rodney, Vera pela amizade e participação nesse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas por meio do Magnífico Reitor: Prof. Dr. José Tadeu Jorge.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por meio do Excelentíssimo Diretor: Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP), por meio da Diretora: Profa. Dra. Anita Jocelyn Marsaioli, onde esse trabalho foi realizado e onde tive a oportunidade de adquirir um importante rumo ao crescimento científico e profissional.

À CAPES, Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal Especializado, pela concessão de bolsa de estudos que permitiu a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, FOP-UNICAMP.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia pela colaboração em minha formação científica.

À Maria Elisa dos Santos, secretária da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, pela sua dedicação.

À Érica Alessandra Pinho, secretária da Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pela presteza dos seus serviços.

Aos professores Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz, Francisco Carlos Groppo e Vera Lúcia Garcia Rehder, por suas importantes contribuições a esse trabalho.

SUMÁRIO

	página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
PROPOSIÇÃO.....	11
CAPÍTULO 1.....	12
CAPÍTULO 2.....	26
DISCUSSÃO GERAL.....	42
CONCLUSÃO GERAL.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS.....	52

RESUMO

Modelos de avaliação da citotoxicidade têm proporcionado a obtenção de importantes dados preliminares, ajudando a selecionar extratos de plantas com propriedade antitumoral para estudos futuros. Como parte de um programa de *screening* de plantas medicinais brasileiras e produtos naturais com propriedades anticâncer, o presente trabalho apresenta a atividade da *Virola sebifera* (Myristicaceae), uma árvore endêmica do Cerrado brasileiro. O objetivo geral desse trabalho foi avaliar as propriedades *in vitro* e *in vivo* de amostras da *V. sebifera*, além de isolar e identificar seus compostos ativos. O primeiro estudo descreve a atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas de duas lignanas e dois policetídeos isolados das folhas da *V. sebifera*. Assim, reportamos o isolamento e elucidação estrutural de um novo policetídeo 3,5-diidro-2-(1'-oxo-3'-hexadecenil)-2-ciclohexano-1-ona com alta atividade antiproliferativa contra 8 linhagens de células tumorais humanas. No segundo estudo, purificamos a fração ativa (FR4) a partir do extrato bruto diclorometânico, com atividade *in vitro* (IC_{50} = 5,19–10,57 μ g/mL – ensaio do SRB) para as mesmas linhagens celulares. Para avaliar a atividade *in vivo* da fração ativa utilizamos o ensaio da *hollow fiber*. Assim, foram estabelecidas as condições de crescimento para as linhagens celulares MCF-7, NCI-ADR e OVCAR03 em fibras (*hollow fibers*) implantadas no abdômen (i.p.) e no dorso (s.c.) de camundongos imunocompetentes. Os animais foram tratados com FR4 (500mg/kg), doxorubicina (6mg/kg) ou veículo intraperitonealmente. Após 14 dias de tratamento, as fibras foram retiradas, seguindo-se a coloração do MTT para determinação da densidade de células viáveis. A fração FR4 demonstrou efeito significativo contra células de mama (MCF-7) e ovário (OVCAR03). A confirmação das propriedades anticâncer *in vitro* e *in vivo* da *Virola sebifera* apresentadas nesse estudo, nos permite avançar em pesquisas futuras, orientando a seleção de outros modelos e estudos de mecanismo de ação.

Palavras-chave: anticâncer, plantas medicinais, imunocompetentes, *Virola sebifera*.

ABSTRACT

Cytotoxicity screening models provide important preliminary data to help select plant extracts with potential antitumor properties for future work. As part of a screen program searching for Brazilian medicinal plants and natural products with anticancer properties, the present investigation reports the anticancer activity the *Virola sebifera* (Myristicaceae), an endemic tree from the Brazilian Cerrado. The overall aim of this work was the evaluation of *in vitro* and *in vivo* properties of samples from *V. sebifera*, there for the isolation and identification of the active compounds. The first study describes the antiproliferative properties against human cell lines of two lignans and two polyketides isolated from leaves of *V. sebifera*. Herein we report the isolation and structure elucidation of a novel polyketide 3,5-dihydro-2-(1'-oxo-3'-hexadecenyl)-2-cyclohexen-1-one with high antiproliferative activity against 8 human cancer cell lines. In the second study, we purified the active fraction (FR4) from the crude dichloromethanic extract with *in vitro* activity ($IC_{50}=5.19 - 10.57 \mu\text{g/mL}$ - SRB assay) against the same cell lines. In addition, the hollow fiber assay was used to study the effect *in vivo* of the active fraction (FR4). Using this model, we have established growth conditions for MCF-7, NCI-ADR and OVCAR03 cells implanted at the intraperitoneal (i.p.) and subcutaneous (s.c.) compartments of immunocompetent mice. Then, the animals were treated with FR4 (500 mg/kg), doxorubicin (6mg/kg) or vehicle only intraperitoneally. After 14 days the fibers were retrieved, followed by determination of living cell density by MTT staining. FR4 showed significant effect against breast (MCF-7) and ovarian (OVCAR03) tumor cells. The anticancer properties of *Virola sebifera* *in vitro* and *in vivo* was confirmed in this study. These findings may guide future studies in other models and detailed studies on the mechanisms of action.

Palavras-chave: anticancer, medicinal plants, immunocompetent, *Virola sebifera*.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o interesse na pesquisa de produtos naturais tem sido intensificado principalmente para a busca de novas substâncias mais eficazes contra o câncer (Rates, 2001; Phillipson, 2001). Na maioria dos países desenvolvidos o câncer constitui a segunda causa de morte da população, antecedido somente pelas doenças do sistema cardiovascular (Brasil, 2005). Em virtude da baixa seletividade dos antineoplásicos atualmente em uso, a ocorrência de efeitos colaterais é muito freqüente e para que o paciente se recupere desses efeitos, o intervalo entre as sessões de quimioterapia é muito longo. Isso acaba propiciando o aparecimento de resistência aos medicamentos, que conduz o tratamento para o uso combinado de drogas aumentando a probabilidade de efeitos colaterais tóxicos (Calabresi & Chabner, 1996; Newman et al., 2003).

O CPQBA-Unicamp, através de projetos financiados pelo CNPq (nº 000521449/94), FAPESP (nº 95/09607-5 e nº 01/04872-5) e verbas obtidas com a prestação de serviços, desenvolveu dois projetos de avaliação do potencial anticâncer de espécies vegetais da Amazônia e do Cerrado do Estado de São Paulo. Os extratos produzidos pela Divisão de Fitoquímica do CPQBA foram inicialmente enviados ao Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), onde a atividade antiproliferativa foi avaliada em um painel composto por sessenta linhagens tumorais humanas. Já no CPQBA esses extratos foram avaliados em um painel de seis linhagens tumorais. A *Virola sebifera* (Figura 1) foi uma das espécies do Cerrado cujos extratos apresentaram atividade antiproliferativa significativa.

Em 1969, Corothie & Nakano identificaram na casca da *Virola sebifera* duas lignanas, seis alcalóides, um terpeno e alguns derivados de ácidos graxos; iniciando assim, o estudo fitoquímico dessa espécie (Martinez et al., 1999). Atualmente grupos de pesquisadores têm dado continuidade ao estudo fitoquímico do gênero, extraíndo diversas substâncias ou grupos de substâncias como terpenos, flavonóides, lignóides, taninos e policetídeos (Lopes et al., 1984; Blumenthal et al., 1997; Simões et al. 1999).

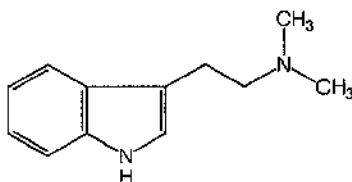


Virola sebifera

Figura 1 : *Virola sebifera* (Bittrich, 2002, Lorenzi, 1998).

As sementes da *Viola sebifera* possuem grandes quantidades de trimiristina e laurodimiristina, substâncias graxas de alta consistência utilizadas na produção de sabonetes e velas. As cascas têm uso popular como antiulcerogênico e na Venezuela, essa espécie é utilizada popularmente no tratamento do reumatismo (Martínez et al., 1999). A população indígena principalmente de regiões amazônicas utiliza as cascas de várias espécies de *Viola*, em preparações consumidas em rituais religiosos. O efeito alucinógeno atribuído a essas preparações é consequência da presença de alcalóides indólicos triptaminérgicos (Agurrel et al., 1969; Lai et al., 1973; Lopes et al., 1982).

Dentre os compostos com maior número de indicação de atividade farmacológica estão os alcalóides. Na pesquisa em câncer, muitos alcalóides têm apresentado elevada citotoxicidade. Drogas utilizadas na quimioterapia atual como a vincristina e vinblastina, isoladas da *Catharantus roseus* (Simões et al., 1999) são exemplos da importância da investigação dessa classe. Foram identificados nas cascas da *Viola sebifera* N,N-dimetiltriptamina (Figura 2) e derivados, além de β -carbolinas (Corothie & Nakano, 1969; Kawanishi & Hashimoto, 1987). Dessa forma a pesquisa de atividade anticâncer dos alcalóides encontrados nessa espécie, pode resultar na descoberta de novos agentes para essa patologia.



I

Figura 2: I, alcalóide (N,N – dimetiltriptamina) identificado em *Viola sebifera* (Corothie & Nakano, 1969; Kawanishi et al., 1987).

Outra classe de especial interesse na pesquisa do câncer são as lignanas. No final de 1940 foram isoladas duas lignanas de espécies do gênero *Podophyllum*, que eram utilizadas pelas populações nativas da América e da Ásia no tratamento do câncer de pele e

verrugas. Mais tarde, foram obtidos por semi-síntese, dois derivados, a ectoposida e a teniposida, cujos estudos experimentais permitiram a introdução dessas drogas na terapia do câncer (Cragg & Newman, 1999) e vêm sendo estudadas como inibidores da topoisomerase II (Apers et al., 2003). Lignanas, assim como outros fitoestrógenos, têm demonstrado atividade como inibidores de câncer de mama (*in vitro* e *in vivo*). Além disso, em diversas áreas onde a população consome fitoestrógenos em grandes quantidades na alimentação, a incidência de câncer de mama tem sido consideravelmente menor (Magee et al., 2004). Diversos lignóides (lignanas e neolignanas) foram isolados também de várias espécies de *Virola* (Figura 3) com atividade antiinflamatória, antimicrobiana, neuroléptica, hepatoprotetora e antitumoral (Barata et al., 2000; Martínez et al. 1999). Diversas lignanas do tipo dibenzilbutirolactonas e furânicas têm sido isoladas do pericarpo (Lopes et al., 1982 e 1983), assim como ariltetralonas das sementes (Lopes et al., 1984). Dessa forma, os lignóides presentes na *Virola sebifera* teriam grande probabilidade de serem os responsáveis pela atividade anticâncer.

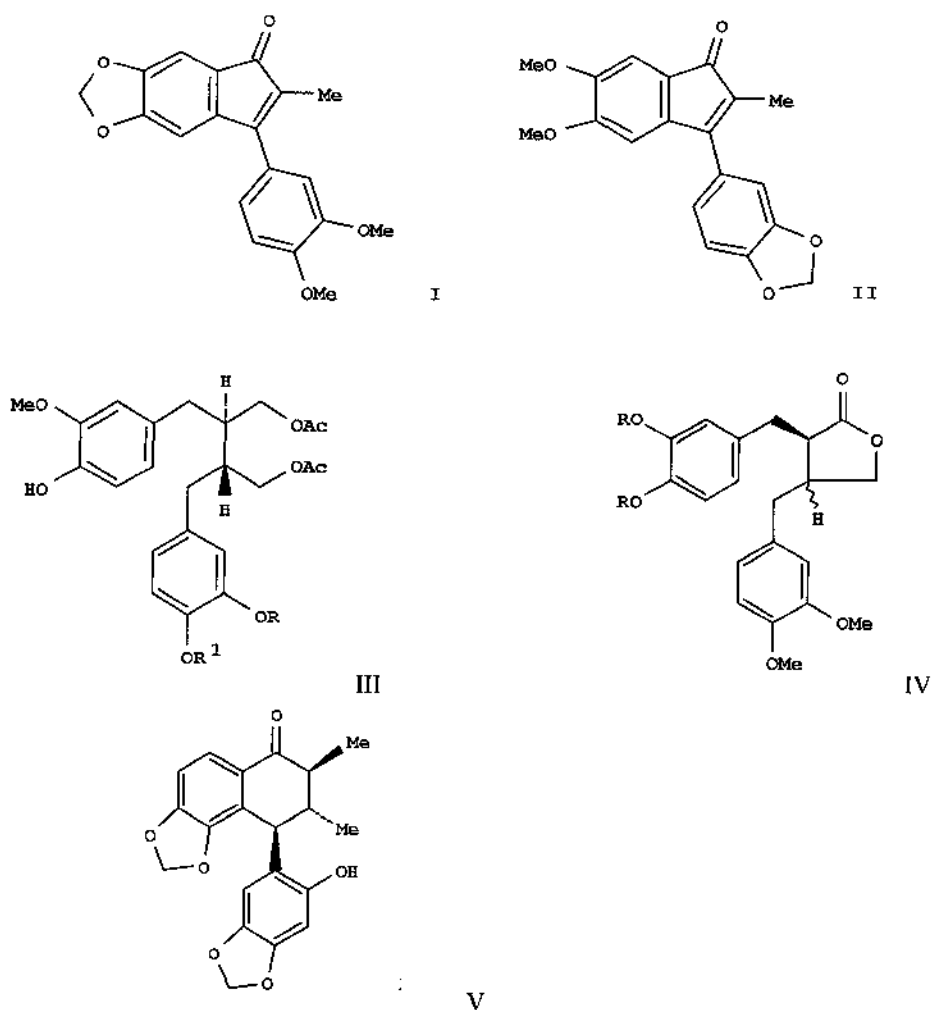


Figura 3: Neolignanas e lignanas identificadas na *Virola sebifera*: neolignanas, **I** e **II** (Harrowen et al., 1998), dibenzilbutirolactonas, **III** (Martinez et al., 1999) e **IV** (Lopes et al., 1983) e ariltetralona, **V** (Rezende et al., 2002).

Policetídeos também já foram isolados de *Virola sebifera* (Figura 4) (Lopes et al., 1982, Kato et al., 1985). Um exemplo dessa classe estrutural de compostos com atividade antitumoral é a hiperforina (Gurevich et al., 1971), extraído do *Hypericum perforatum* e o nemorosone (Oliveira et al., 1999) extraído de diversas espécies de *Clusia* (Cuesta-Rubio et al., 2001 e 2002).

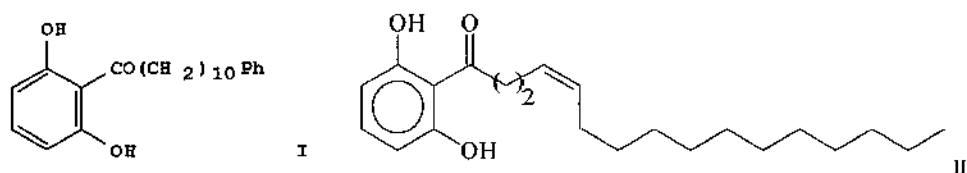


Figura 4: Policetídeos identificados na *Virola sebifera*, I (Lopes et al., 1982) e II (Kato et al., 1985).

Outros grupos de substâncias presentes na *Virola sebifera* como terpenos, flavonóides e taninos que também possuem indicação de atividade antitumoral, são encontrados em outras espécies vegetais (Simões et al., 1999), e podem, portanto ser o princípio ativo procurado nessa espécie.

Considerando os efeitos preliminares dos extratos da *Virola sebifera* em cultura de células tumorais humanas, esse projeto teve como um dos principais objetivos isolar e identificar os compostos responsáveis pela atividade anticâncer. Outro objetivo do trabalho foi avaliar a atividade anticâncer em modelo experimental utilizando animais de laboratório (*in vivo*). Dessa forma esse estudo foi conduzido em duas etapas com objetivos e parâmetros de avaliação específicos para cada modelo utilizado. A primeira etapa do trabalho foi o fracionamento dos extratos e a purificação dos compostos, sendo biomonitorados pelo ensaio *in vitro*, e seu resultado final está representado no **capítulo 1**. A segunda etapa foi avaliar a atividade *in vivo* de uma fração ativa da *Virola sebifera* e está representada no **capítulo 2**.

O ensaio *in vitro*, selecionado para a triagem das substâncias com possível atividade anticâncer foi uma metodologia desenvolvida e utilizada pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), na triagem de drogas antitumorais.

Com o aprimoramento da cultura de células foi possível, no final da década de 80, o desenvolvimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, que possibilitaram o desenvolvimento da metodologia para triagem *in vitro*. O NCI desenvolveu um painel de células cancerígenas que, atualmente, conta com 70 linhagens

oriundas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia). Dessa maneira, essa metodologia permite a avaliação das drogas em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade. Outra vantagem dessa metodologia é a rapidez e eficiência do método, que em apenas quatro dias pode avaliar um número elevado de drogas (Hamburger, 1981; Skehan et al., 1990; Suggitt & Bibby, 2005).

Nesse modelo após a incubação das células tumorais na presença das drogas é realizado o doseamento de proteínas coradas com sulforrodamina B (SRB). O corante utilizado é uma aminoxantina de cor rosa brilhante e com dois grupos sulfônicos que, em solução fracamente ácida, são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com ácido tricloroacético. Os parâmetros utilizados para seleção das drogas avaliadas foram: atividade antiproliferativa concentração dependente, inibição do crescimento celular acima de 50% e seletividade (Skehan et al., 1990).

As drogas ativas em modelos utilizando cultura de células tumorais devem confirmar sua eficácia *in vivo* em um ou mais modelos. Esses modelos necessitam de uma quantidade considerável de materiais, animais de laboratório, amostras teste, além de tempo e custos para avaliar se uma determinada droga possui um mínimo de atividade antitumoral (Hassan et al., 2001). Desde 1995, quando Hollingshead et al., criaram a metodologia utilizando fibras semipermeáveis (*hollow fibers*), inúmeros compostos tem sido selecionados com atividade antitumoral. Nesse modelo as drogas selecionadas pelo método *in vitro* são avaliadas em camundongos imunodeficientes que sofreram implante de fibras semipermeáveis (*hollow fibers*) no abdômen e no dorso, contendo linhagens tumorais humanas. Essa metodologia, além de econômica, permite avaliar a atividade das drogas em até três linhagens tumorais diferentes, em um único grupo de animais. Para atuar sobre as linhagens implantadas no dorso do animal (s.c.), a droga precisa passar pelo processo de absorção e de distribuição. Outra vantagem dessa metodologia é a observação dos efeitos gerais e a seletividade de ação (Hollingshead et al., 1995). Recentemente outro estudo demonstrou a eficiência do método comparando seus resultados aos obtidos em modelos xenográficos (Decker et al., 2004).

A porosidade dessas fibras permite a passagem dos nutrientes necessários para o crescimento das células, das drogas em estudo e dos fatores responsáveis pela angiogênese, produzidos pelas células tumorais. No entanto o tamanho do poro não permite a saída das células e nem a entrada de células do hospedeiro (Hollingshead et al., 1995, Suggitt & Bibby, 2005). Essa característica de não causar rejeição, possibilita a implantação dessas fibras em animais imunocompetentes, diminuindo significativamente os custos desses testes. Pesquisas comprovaram essa possibilidade através do implante de células obtidas de tumores humanos em ratos imunocompetentes (Chu et al., 1998; Jonsson et al., 2000 e 2001). Dessa forma esse trabalho empregou essa metodologia utilizando camundongos imunocompetentes.

PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo experimental foi avaliar a atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais humanas de extratos, frações e compostos obtidos de *Virola sebifera*. Isolar e identificar os compostos anticâncer, além da aplicação de metodologia em modelo animal para a avaliação da eficácia.

Esse trabalho foi realizado em formato alternativo, conforme deliberação da Comissão Central de Pós-Graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) n. 001/89.

CAPÍTULO 1

ANTIPROLIFERATIVE PROPERTIES OF POLYKETIDES ISOLATED FROM *Viola sebifera* LEAVES.

Carina Denny ^{†‡}, Marcela Engelbrecht Zacharias [†], Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz [†], Maria do Carmo E. do Amaral [§], Volker Bittrich [§], Luciana Konecny Kohn[†], Arianny do Nascimento Santos [†], Ilza Maria de Oliveira Sousa [†], Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues [†], João Ernesto de Carvalho ^{†‡}, Mary Ann Foglio ^{†‡*}

[†] Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, P.O. Box 6171, 13083-970, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP – Campinas - SP, Brazil

[‡] Departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, P.O. Box 52, 13414-903, UNICAMP – Piracicaba - SP, Brazil

[§] Departamento de Botânica, P.O. Box 6109, 13084-971, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP – Campinas - SP, Brazil

*Corresponding author:

e-mail: foglioma@cpqba.unicamp.br

Esse trabalho foi submetido ao periódico *J. Nat. Prod.* (Anexo 1).

Bioassay-guided fractionation of the CH₂Cl₂ extract of *Virola sebifera* leaves afforded a new polyketide, 3,5-dihydro-2-(1'-oxo-3'-hexadecenyl)-2-cyclohexen-1-one (**3**), and the known lignans (2R,3R)-2,3-di-(3,4-dimethoxybenzyl)-butyrolactone (**1**) and (2R,3R)-3-(3,4-dimethoxybenzyl)-2-(3,4-methylenedioxy-benzyl)-butyrolactone (**2**) besides (4'Z)-1-hexadec-4'-enoyl-2,6-dihydroxybenzene (**4**). Their structures were elucidated by extensive spectral analysis. The new polyketide showed antiproliferative activity against human UACC62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI 460 (lung, non-small cells), OVCAR03 (ovarian), PC0 3 (prostate), HT-29 (colon), 786-0 (renal) and NCI-ADR (breast expressing phenotype multiple drugs resistance) cell lines.

A vast amount of studies have been mentioned for *Virola sebifera* Aubl. a common Myristicaceae species found throughout Central America to the South of Brazil (Azevedo et al., 1997; Martínez et al., 1999; Rezende and Kato, 2002). Folk medicine has employed this species for gastric-intestinal disorders, to relieve toothache, as anti-inflammatory and for memory enhancement (Azevedo et al., 1997). *Virola sebifera* is an important source of raw material for cosmetic and soap industries due to the high contents of triglycerides found in the seeds (Rezende and Kato, 2002). Amazonian Indian communities have employed the tree's bark for the preparation of hallucinogenic snuffs (Martínez et al., 1999). Studies on this species date back to 1969 when Corothei and Nakato began investigating the bark's content. Since then, several secondary compounds were isolated and identified (Martínez et al., 1999; Rezende and Kato, 2002). Many lignans, neolignans and polyketides were isolated from the fruits (Lopes et al., 1983; Kato et al., 1985; Harrowen et al., 1998). Lignoids showed a specific accumulation, e.g. dibenzylbutyrolactone and furofuran lignans in pericarps (Lopes et al., 1983) and aryltetralone lignans in seeds (Lopes et al., 1984). The leaves showed chemical composition very similar to that of pericarps (Kato et al., 1985). This paper describes the antiproliferative properties of two lignans, dehydro hexadecanoyl resorcinol and a polyketide isolated from leaves of *Virola sebifera*. From the fruits this dibenzylbutyrolactones (**1** and **2**) were previously isolated and identified by Lopes et al. (1983) and the dehydro hexadecanoyl resorcinol (**4**) was described by Kato et al. (1985). Herein we report the isolation and structure elucidation of a novel polyketide (**3**) with antiproliferative activity.

Four compounds were isolated from the active fraction obtained from crude dichloromethane extract of *V. sebifera*. Compounds **1**, **2** and **4** were identified as (2R,3R)-2,3-di-(3,4-dimethoxybenzyl) butyrolactone, (2R,3R)-3-(3,4-dimethoxybenzyl)-2-(3,4-methylenedioxy-benzyl)-butyrolactone and (4'Z) 1-hexadec-4'-enoyl-2,6-dihydroxybenzene by comparison of their spectral data (IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, MS and IR) with those of the literature (Lopes et al., 1983 and Kato et al., 1985).

Compound **3** was deduced as having an elemental formula of C₂₂H₃₆O₄, by HREI-MS (obsd M⁺ = 364.23556; required M⁺ =) which indicated five insaturation sites. Infrared absorptions at 3398, 1651, a 556 and 1455 cm⁻¹ provided evidences for hydroxyl, conjugated carbonyl, conjugated chelated carbonyl and vinyl functionalities. The ¹H NMR spectrum showed a typical 2,5-disubstituted-cyclohexane-1,3-dione moiety [δ 4.40 (*tt*, *J* = 6.4, 3.6 Hz, H₅), 2.64 (*dd*, *J* = 16.5, 6.4 Hz, H_{6a}), 2.75 (*dd*, *J* = 16.5, 3.4 Hz, H_{6b}), 2.79 (*dd*, *J* = 18, 6.4 Hz, H_{4a}), 2.94 (*dd*, *J* = 18, 4.5 Hz, H_{4b})]. A α -methylene resonance of a ketone [δ 3.05 (*t*, *J* = 3.4 Hz, H_{2'})], and signals of alkyl long chain moiety [δ 1.34-2.04 (20H, *m*, H_{5'}-_{15'})] were also observed. The carbons determined by COSY and HMBC to be allylic to the double bond both appeared at δ 27.17 and 26.86, corresponding to known chemical shifts of carbons allylic to *cis* double bonds (δ 27.2) and differing significantly from carbon shifts of positions allylic to *trans* double bonds (δ 32.5) (Seeram et al., 2000). The ¹H NMR spectrum of **3** (Table 1) contained a singlet at δ 18.34 owing to a chelated hydroxyl group and an unchelated hydroxyl group was observed at δ 3.70. Compound **3** was present in CDCl₃ solution as a tautomeric pair. This interconversion at room temperature was slow enough for the absorption peaks of both tautomeric forms to be observed. The keto/enol ratio was determined from the relative areas of the keto and enol CH₃ peaks (Silverstein and Webster, 2002). The tautomeric ratio of compound **3** was approximately 1:1, as evidenced by two sets of methyl ¹³C NMR signals, at δ 14.1 and δ 14.0. Analysis of the 1D and 2D NMR spectra in CDCl₃ with homo and heteronuclear direct and long-range correlations allowed assignment of ¹H and ¹³C NMR signals for compound **3** as listed in Table 1. An alkoxy group at the double bond polarizes the π system having a net β π shielding effect (Breitmaier and Voelter, 1987). This explains the upfield shift observed at

δ 63.25 for C-5 in compound **3**. The proposed structure for compound **3** lacks assignment specifying the peaks for the two tautomeric forms and the correct double bond position, but further NMR measurements, as well as synthesis of the mentioned structure and analogs are being studied for proper carbon assignment. Peaks at m/z 183 and 137 suggested the presence of a 5-hydroxy-acyl-cyclohexane-1,3-dione fragments [$M^+ - C_{13}H_{27}$] and $C_7H_5O_3^+$, respectively. The fragments at m/z 127 ($C_6H_7O_3^+$), and 155 ($C_7H_7O_4^+$), also confirmed the basic moiety as 2-acylcyclohexane-1,3-dione. The fragment at m/z 170 ($C_{12}H_{26}^+$) suggested that the side chain insaturation was β to C_1 .

Many lignans and neolignans have served as lead compounds for the development of new drugs (Apers et al., 2003; Magee et al., 2004). In spite of the great amount of citations of lignans and neolignans with antitumoural activity, compounds **1** and **2** did not exhibit antiproliferative activity when evaluated on the bioassay mentioned herein, whereas compounds **3** and **4** inhibited all human cancer strains tested.

The antiproliferative properties of compound **4** are reported herein for the first time, and showed activity in all cell lines (IC_{50} 24.00-77.60 μ g/mL) evaluated. Compound **3** displayed antiproliferative activity against the cancer cells tested in a concentration-dependent way (IC_{50} 4.36-17.59 μ g/mL). It is noteworthy that compound **3** (IC_{50} 4.36 μ g/mL) proved to be three-fold more potent for breast cancer cells that express multidrug resistance phenotype (NCI-ADR) than doxorubicin (DOX) (IC_{50} 15.49 μ g/mL) (Table 2). This is an important point, moreover, because acquired drug resistance is a major factor in the failure of doxorubicin-based chemotherapy in breast cancer (Panasci et al., 1996).

Experimental Section

General Experimental Procedures. IR spectra were measured on a JASCO-FT/IR-410 spectrometer. 1D and 2D NMR spectra were performed on a INOVA 500 instrument, 1H was observed at 499.88 MHz and ^{13}C at 125.70 MHz. Chemical shifts of the compounds were recorded in $CDCl_3$ solutions and were quoted relative to TMS for 1H - NMR (δ 0.0) and to $CDCl_3$ (δ 77.0) for ^{13}C NMR . Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (0.063 - 0.200 mm Merck®). TLC (thin layer chromatography) was performed on

precoated plates (1.05554 Merck®), detection at UV light (254 and 365 nm) and with anisaldehyde solution. HREIMS was performed on VG-AutoSpec High Resolution Mass Spectrometer (70 eV), direct probe.

Plant Material. Leaves of *Virola sebifera* were collected at Reserva Experimental de Mogi-Guaçu - São Paulo State. Voucher specimens were deposited at the Universidade Estadual de Campinas Herbarium (UEC). M.C.E. Amaral and V. Bittrich were responsible for the identifications (voucher Amaral & Bittrich #97/258).

Isolation of Constituents. The air-dried milled leaves (1 Kg) were extracted by maceration with dichloromethane at room temperature yielding 80g of crude dichloromethane extract. A portion of 1g of the crude extract was submitted to dry column chromatography with a mixture of dichloromethane - methanol (99:1). The column was cut in three portions and each fraction was extracted with methanol. Evaporation of the solvents gave fractions 1 (less polar), 2 (medium polarity), and 3 (polar), which were submitted to antiproliferative trials to determine which fraction should continue purification process. The active one (fraction 2) was purified repeatedly by silica gel column chromatography with dichloromethane - methanol gradients affording **1**, **2**, **3** and **4**.

3,5-dihydro-2-(1'-oxo-3'-hexadecenyl)-2-cyclohexen-1-one (**3**), oil, $[\alpha]_D - (2.5 \pm 0.6)^\circ$ (c 0.0100, CHCl_3); IR ν_{max} 3399, 1651, 1556, 1455 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 1; EIMS m/z 364 $[\text{M}]^+$ (13), 183 (100), 170 (43); HREIMS m/z 364.2356 (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$).

Biological Activity. Cell lines of different histological origin were used in the present study. Human tumour cell lines UACC62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI 460 (lung, non-small cells), OVCAR03 (ovarian), PCO3 (prostate), HT-29 (colon), 786-0 (renal) and NCI-ADR (breast expressing phenotype multiple drugs resistance) were kindly provided by National Cancer Institute (NCI). Stock cultures were grown in a medium containing 5 mL of RPMI 1640 (GIBCO BRL, Life Technologies) and supplemented with 5% of fetal bovine serum (GIBCO BRL, Life Technologies). Gentamicine (50 $\mu\text{g/mL}$) was added to the experimental cultures. Cells in 96-well plates (100 μL cells/well) were exposed to various

concentrations of samples in DMSO/RPMI (0.25, 2.5, 25 and 250 µg/mL) at 37°C, 5% of CO₂ in air for 48h. The final concentration of DMSO did not affect the cell viability. Then, a 50% of TCA (trichloroacetic acid solution) was added and after incubation for 30 min at 4°C, washing and drying, the cell proliferation was determined by spectrophotometric quantification (540 nm) of the cellular protein content using sulforhodamine B assay described by Skehan et al. (1990).

Acknowledgements

We would like to thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, (01/04872-5) for the support of this research. CD, MEZ and MCEA wish to thanks CAPES, FAPESP and CNPq respectively for research fellowship.

References

- Apers, S.; Vlietinck, A.; Pieters, L. *Phytochemistry Rev.* **2003**, *2*, 201-217.
- Azevedo, N. R.; Santos, S. C.; Miranda, E. G.; Ferri, P. *Phytochemistry* **1999**, *46*, 1375-1377.
- Breitmaier, E.; Voelter, W. *Carbon-13 NMR Spectroscopy High Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry*, 3^o Edition, VCH Verlagsgesellschaft, 1987; p 209.
- Corothie, E. and Nakano, T. *Planta Med.* **1969**, *17*, 184-188.
- Harrowyen, D. C.; Newman, N. A.; Knight, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6757-6760.
- Kato, M. J.; Lopes, L. M. X.; Fo, H. F. P.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. R. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 533-536.
- Lopes, L. M. X.; Yoshida, M.; Gottlieb, O.R. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1516-1518.
- Lopes, L. M. X.; Yoshida, M.; Gottlieb, O.R. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2021-2024.
- Magee, P. J.; McGlynn, H.; Rowland, I. R. *Cancer Lett.* **2004**, *208*; 35-41.
- Martinez, V. J. C.; Aldana, J. M. I.; Cuca, S. L. E. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 883-886.
- Panasci, L.; Jean-Claude, B. J.; Vasilescu, D.; Mustafa, A.; Damian, S.; Damian, Z.; Georges, E.; Liu, Z.; Batist, G.; Leyland-Jones, B. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 1097-102.
- Rezende, R. K. and Kato, M. J. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 427-432.
- Silverstein, R.M.; Webster, F.X. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, In: John Wiley & Sons, Inc. (6 edition), *Magnetic Ressonance Spectrometry*, Delhi, India, 2002, pp. 144-274.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1118.
- Seeram, N. P.; Lewis, A. W.; Jacobs, H.; Nair, M. G.; McLean, S.; Reynolds, W. F. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 399-402.

Legends:

Figure 1: Compounds isolated from *Virola sebifera*.

Figure 2: Graphical representation of growth percent of cancer cells lines after 48h exposure to compounds **3**, **4** and Doxorubicin (positive control).

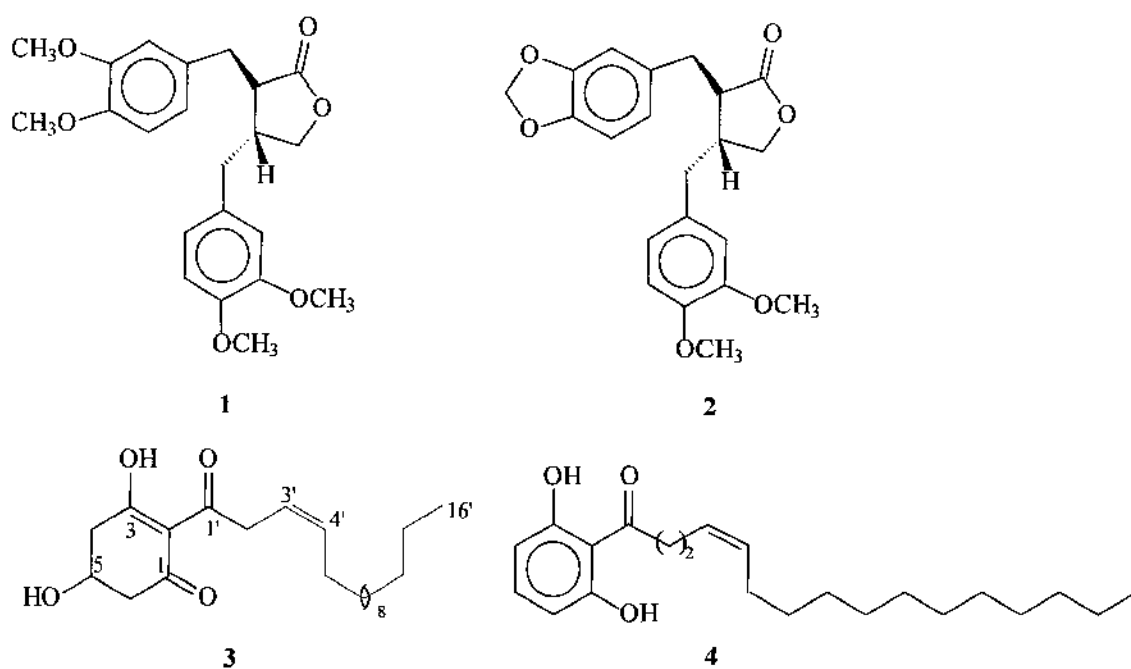
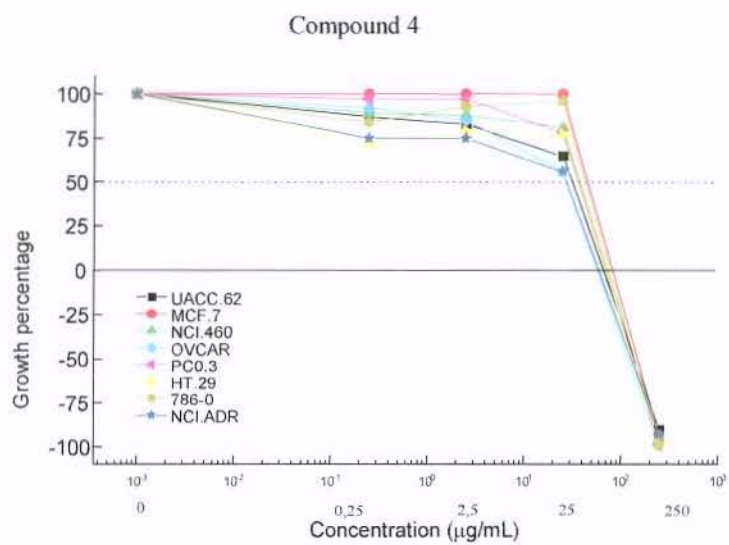
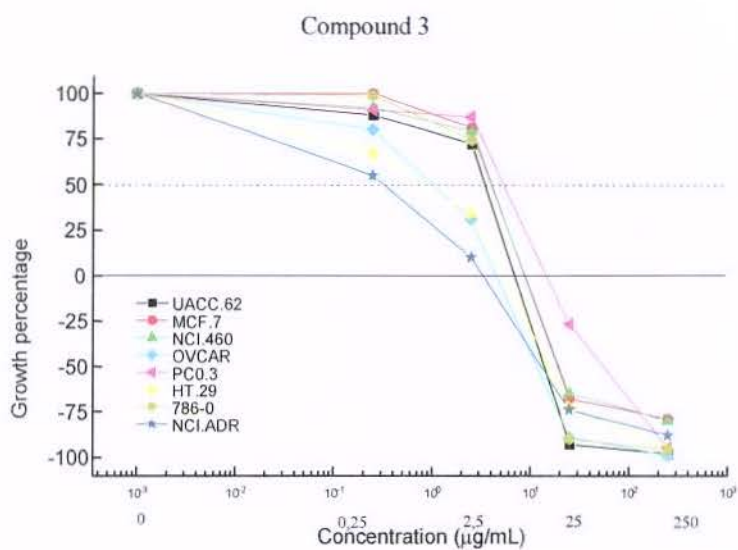
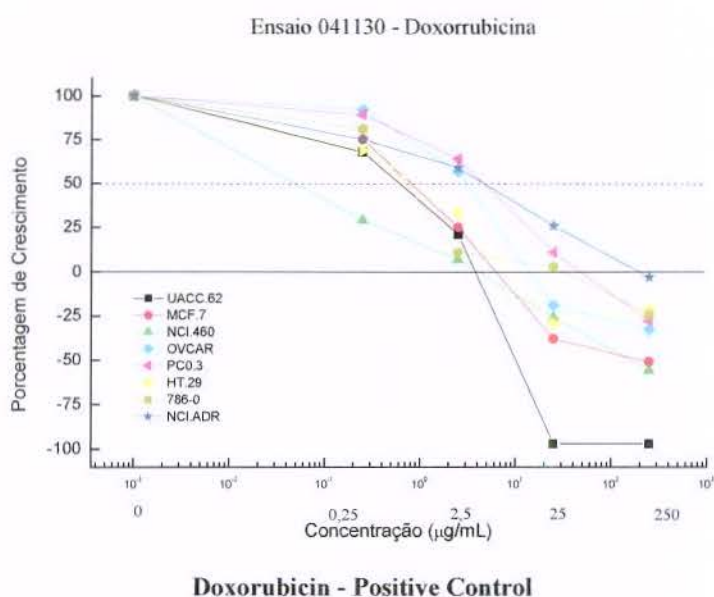


Figure 1:





Legend: UACC62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI 460 (lung, non-small cells), OVCAR03 (ovarian), PCO3 (prostate), HT-29 (colon), 786-0 (renal) and NCI-ADR (breast expressing phenotype multiple drugs resistance). Positive values in relation to y-axis correspond to cytostatic activity while the others refer to cytotoxic (cellular death) activity. Data were obtained from a representative experiment carried out in triplicate.

Figure 2:

Table 1: ^1H NMR and ^{13}C NMR Data for compound **3** (11 Tesla, CDCl_3).

Position	δ_{C}	δ_{H} (mult; $J_{\text{H,H}}$ in Hz)	COSY	HMBC
1'	205.6	-		2', OH-1
3	196.3	-		5, 2', OH-1
1	193.4	-		5, 2', OH-1
2	112.8	-		4, 6, 2', OH-1
3'	129.9-129.8	5.35 (t, 5.0)		5', 6'
4'	129.8	5.34 (t, 5.0)		5', 6'
5	63.3	4.40 (tt, 6.4, 3.4)	4 (2.78), 6 (2.95)	4,6, OH-5
6	47.1	2.64 (dd, 16.5; 6.4), 2.75 (dd, 16.5; 3.4)	5, 6 (2.82)	6
4	41.4	2.79 (dd, 18.0, 6.0) 2.94 (dd, 18.0, 4.5)	4 (2.64), 5	OH-1
2'	40.3	3.05 (t, 3.4)		OH-1
5'	27.2- 26.9	2.04	6'	
6'- 13'	28.9 - 29.7	1.34		
14'	31.8	1.20-1.40		
15'	22.8	1.61 (q, 7.4)		
16'	14.1 - 14.0	0.90		
OH-1		18.34		1, 3,6, 1', 2'
OH-5		3.70		5

Table 2: Antiproliferative activity of compounds **3** and **4** against cancer cell lines*.

Cell Line	IC ₅₀ (µg/mL)**		
	Compound 3	Compound 4	Doxorubicin
MCF-7	7.19	33.27	3.00
NCI-ADR	4.36	NC	15.49
NCI 460	7.90	66.86	12.47
UACC62	7.02	74.05	4.43
786-0	6.49	77.60	0.64
OVCAR03	4.76	55.38	4.86
PCO3	17.59	24.00	13.12
HT-29	6.68	NC	2.84

* Assessed by the SRB assay; ** IC₅₀ values (concentration eliciting 50% inhibition) were determined through non-linear regression analysis; NC could not be determined; dose range tested: 0.25 to 250µg/mL.

CAPÍTULO 2

Anticancer properties of *Virola sebifera* (Myristicaceae) extract and active fraction [#]

Carina Denny^{1,2*}, Marcela Engelbrecht Zacharias¹, Maria Carolina Bayeux¹, Ana Possenti¹, Sirlene Valério Tinti¹, Mary Ann Foglio^{1,2}, João Ernesto de Carvalho^{1,2}

¹ Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP- São Paulo, Brazil

² Departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP- São Paulo, Brazil

***Corresponding author:**

Carina Denny,

CPQBA-UNICAMP

CP 6171; 13081 - 970, Campinas, São Paulo, Brazil

Email: dennycarina@hotmail.com

Esse trabalho será submetido ao periódico Phytomedicine.

Abstract

The cytotoxicity assay was used to screen samples of *Virola sebifera* (Myristicaceae), an endemic tree from the Brazilian Cerrado, against 8 human cancer cell lines. The crude dichloromethanic extract (CDE) exhibited interesting cytotoxicity activity *in vitro* (IC_{50} =8.50 – 37.00 μ g/mL) and the fraction FR4 showed high activity (IC_{50} =5.19 – 10.57 μ g/mL) with selectivity for the lines UACC-62, MCF-7, NCI-460 and OVCAR03. The hollow fiber assay has been developed for the preliminary *in vivo* assessment of cancer chemotherapeutic efficacy. Using this model, we have established growth conditions for MCF-7, NCI-ADR and OVCAR03 cells implanted at the intraperitoneal (i.p.) and subcutaneous (s.c.) compartments of immunocompetent mice. The animals were treated with FR4 (500mg/kg), doxorubicin (6mg/kg) or vehicle only intraperitoneally. After 14 days the fibers were retrieved and the cell density was evaluated. FR4 showed activity against MCF-7, 40% (s.c), 45% (i.p.), and OVCAR03, 31% (i.p.) - growth inhibition. The confirmation of *in vivo* activity in breast and ovarian tumor cells allows us to advance in our studies. Therefore, the link between anticancer activity and hormone receptors interaction will be investigate and the actives substances will be isolated and identified.

Key words- medicinal plants, tumor, *in vivo*, *in vitro*, immunocompetent

Introduction

The genera *Virola* has been widely used by local communities all over the Neotropical region for treatment of rheumatism and gastric ulcer (Lopes et al., 1982). Studies of *Virola sebifera*, an endemic tree from the Brazilian Cerrado, date back to 1969 when Corothie and Nakato, 1969 began investigating the bark's content. Since then, alkaloids, terpenes, lignans, neolignans and polyketides were identified (Martínez et al., 1999; Rezende and Kato, 2002). Investigation of *V. sebifera* reported the occurrence of alkaloids in the bark resin as the active principle of hallucinogenic snuffs (Rezende and Kato, 2002). The presence of the secondary compounds, well known for their use in the treatment of several solid tumors, inspired the bio-monitory study of this species. Moreover, two polyketides were isolated from the leaves of *V. sebifera* and showed high antiproliferative activity against human tumor cells (Denny et al., 2006).

Research in the development of a new anticancer drug is divided in two phases: the first involves preclinical tests for pharmacological and toxicological activity performed in animals and cell cultures before testing a new compound in clinical tests (second phase). The preclinical program usually involves *in vitro* evaluation against several cell lines followed by *in vivo* evaluation mostly in mice bearing xenograft tumors (Hassan et al., 2001).

To date, at the US National Cancer Institute (NCI), about 85000 compounds have been screened against an *in vitro* cell line panel in a short-term assay, using the non-clonogenic protein stain sulforhodamine B assay (Skehan et al., 1990) to determine cell viability. Each compound is tested over different concentration against each of 60 different cell lines in a 2-day assay. These data generate a characteristic profile of cellular response, that is used to select compounds for a secondary *in vivo* testing (hollow fiber assay) (Suggitt and Bibby, 2005). In brief, this assay involves the short-term growth of tumor cells within biocompatible hollow fibers implanted at both the subcutaneous (s.c.) and intraperitoneal (i.p.) sites of immuno-compromised mice. The hollow fiber assay does not fully mimic classical xenograft systems, where a range of complex interactions occur when human tumor cells are growing in and interacting with the host (Decker et al., 2004). In

1995, due to the feasibility of growing over 50 human tumor cell lines within biocompatible hollow fibers and the relatively rapid and cost-effective demonstration of *in vivo* activity compared with xenograft models, the NCI employed the hollow fiber assay (HFA) as a routine preliminary *in vivo* screening assay (Suggitt and Bibby, 2005). Since the development of this methodology, other groups have used this assay to independently demonstrate drug activity (Hassan et al., 2001, Mi et al., 2002).

Recently, pharmacokinetics studies have been demonstrated using the hollow fiber assay (Jonsson et al., 2000). Other researches have proposed that the HFA can be used as a short-term *in vivo* model to demonstrate specific pharmacodynamic end points at an early stage in an evaluation of a drug (Hall et al., 2000, Suggitt and Bibby, 2005).

In 1997, our laboratory at the CPQBA – UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), established a research program in order to identify natural products with potential anticancer activity. The cytotoxicity assay has been used for drug screening by the *in vitro* 9-tumor cell lines (Nogueira et al., 2003; de Fatima et al., 2005). Currently, with the introduction of the hollow fiber assay, in the present study we demonstrated the anticancer properties of the crude dichloromethanic extract and the active fraction of *V. sebifera* *in vitro* and *in vivo*.

Material and Methods

Plant Material

Leaves of *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae) were collected at Experimental Reserve of Cerrado at Mogi-Guaçu, São Paulo, Brazil. The voucher species was deposited (#97/258) at the Universidade Estadual de Campinas (UEC) Herbarium. *V. sebifera* is an endemic tree species from the Cerrado of Brazil and it is common all over its distribution (Lorenzi, 1998).

Extract and fractions preparation

Dry, milled leaves (1kg) had been extracted with dichloromethane at room temperature yielding, after solvent elimination, 80g residue named crude dichloromethane extract (CDE). A portion of 20g of CDE was submitted to column chromatography, eluted with a mixture of dichloromethane/methanol (99:1). The column was splitted into four portions; each one was extracted with dichloromethane/methanol (99:1). Evaporation of the solvents gave FR1 (less polar), FR2 (medium polarity), FR3 (polar) and FR4 (polar), which were submitted to cytotoxicity trials.

IN VITRO ASSAY

Cell lines

Human tumor cell lines UACC62 (melanoma), MCF-7 (breast carcinoma), NCI-460 (lung carcinoma, non-small cells), OVCAR03 (ovarian), PCO3 (prostate), HT-29 (colon), 786-0 (renal carcinoma) and NCI-ADR (breast expressing the phenotype of multiple drugs resistance) were kindly provided by National Cancer Institute (NCI). Stock cultures were grown in a medium containing 5 mL of RPMI 1640 (GIBCO BRL, Life Technologies) and supplemented with 5% or of fetal bovine serum (FBS) (GIBCO BRL, Life Technologies).

Cytotoxicity assay (Skehan et al., 1990)

The cytotoxicity assay was performed to assess growth inhibition by a colorimetric assay which estimates cell number indirectly by staining total cellular protein with the dye SRB. All the adherent cell lines were detached from culture flasks by addition of 0.5 mL of trypsin (Nutricell Nutrientes Celulares). Thereafter, trypsin was inactivated by addition of 5mL of RPMI/5% FBS. Gentamicine (50µg/mL) was added to the experimental cultures. Cells in 96-well plates (100 µL cells/well) were exposed to various concentrations of samples in DMSO/RPMI (0.25, 2.50, 25.00 and 250.00 µg/mL) at 37°C, 5% of CO₂ in air for 48h. The final concentration of DMSO did not affect the cell viability. Then

adherent cell cultures were fixed by adding 50 μ L of 50% trichloroacetic acid solution (TCA). After incubation for 30 minutes at 4°C the supernatant was then discarded, and the plates were washed five times with deionized water and dried. One hundred microliters of SRB solution (0.4% wt/v in 1% acetic acid) was added to each well, and the culture was incubated for 10 minutes at room temperature. Unbound SRB has been removed by washing five times with 1% acetic acid. Then the plates have been air-dried. Bound stain was solubilized with Tris buffer (Sigma), and the optical densities were read on an automated spectrophotometric plate reader at a single wavelength of 540 nm.

Data Analysis

The background optical measurements were subtracted from appropriated control well values and the appropriate drug-blank measurements. Cellular responses were calculated for growth stimulation, test substance effect and growth inhibition. Three measurements were run at: time zero (T₀) value of SRB protein content at the beginning of test substance incubation, control value (C) at the end of the test substance incubation, and a set of test substance-treated test values (T) at the end of the test substance incubation period. If, (T) was greater than or equal to (T₀) the calculation was $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$. If (T) was less than (T₀), cell killing occurred and was calculated from $100 \times (T-T_0)/T_0$. The IC₅₀ values were calculated from the GraphPad Prism software obtained by plotting the percentage of survival versus the concentrations, by non-linear regression analysis. According to National Cancer Institute guidelines (Suffness and Pezzuto, 1990) extracts with IC₅₀ values < 30 μ g/mL were considered active.

IN VIVO ASSAY

Animals

The pharmacological activity was evaluated on male immunocompetent Balbc/c mice (25-30g) obtained from the University's animal facilities. During the seven-day adaptation period until the experiment was through, they were submitted to a 12-hour light-dark cycle and $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ room temperature. Animal's welfare guidelines were adopted during maintenance period and experimentation (Porter, 1996).

Hollow fiber assay

Polyvinylidene fluoride (PVDF) hollow fibers (500,000 Da molecular weight cut-off, 1.0 mm ID; Spectrum Medical Industries, Houston, TX) were used in these studies. The fibers were individually flushed and filled with 70% ethanol and incubated in 70% ethanol for 72h. Following washes with deionized water, the fibers were autoclaved. On the filling day, the fibers were washed with RPMI (20% FBS). Fibers filled with cells (MCF-7, NCI-ADR, OVCAR03, concentration 1×10^6 cells/mL) were incubated in six-well plates overnight at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Mice were anesthetized with an i.p. injection of a mixture of ketamine (13.3 mg/100g body weight) and xylazine (1.3 mg/kg body weight). Each mouse hosted up to six fibers, which were cultured in two physiologic compartments. For intraperitoneal implants, a small incision was made through the skin and musculature of the dorsal abdominal wall of the mouse, the fiber samples were inserted into the peritoneal cavity. For the subcutaneous implants, a small skin incision was made at the nape of the neck (Hollingshead et al., 1995).

For treatment protocols, drugs were dissolved in saline. Mice were randomized into saline vehicle control group (6-8 mice per group) and treatment groups (FR4 and doxorubicin) (6-8 mice per group). FR4 (500mg/kg) was administrated daily by intraperitoneal injection after three days of implantation. Doxorubicin (6mg/kg) was administrated twice times on days five and ten after implantation. Body weights were determined daily. On day fourteen, mice were sacrificed by cervical dislocation; and fibers excised, wiped to remove excess host tissue, and placed into six well plates, each well containing 2 mL of fresh, prewarmed culture medium (with 20% FBS), and allowed to equilibrate for 30 min at 37°C .

MTT assay

To define the viable cell mass contained within the intact hollow fibers, a MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] dye conversion assay was used. Briefly, 1mL of prewarmed culture medium (20% FBS) containing 1mg MTT/mL was added to each dish. After incubating at 37°C for 4 hours, the culture medium was removed by aspiration, 2 mL of normal saline containing 2.5% protamine sulfate solution was added to each well, and the plates were stored at 4°C for 24 hours. Protamine sulfate solution was then removed by aspiration, 2mL of protamine sulfate solution was added for a second wash, and the plates were stored at 4°C for at least 4 hours. To assess the optical density of the samples, the fibers were transferred to 24-well plates, cut in half, and allowed to dry overnight. The formazan was extracted from each sample with DMSO (250μL/well) for 4 hours at room temperature. Aliquots (150μL) of extracted MTT formazan were transferred to individual wells of 96-well plates and assessed for optical density at a wavelength of 540 nm. The MTT assay was made in fibers on the implantation day, for calculated the percent net growth.

Data Analysis

The cell densities of the retrieved fibers from the animals were expressed as net growth (%), defined as:

$$\frac{(\text{absorbance on the retrieved day} - \text{mean absorbance on the implantation day}) \times 100}{\text{mean absorbance on the implantation day}}$$

Hence, a net growth of - 100% represents total cell kill, while a value greater than 0% represents a growth of the cells in the fiber compared with implantation day. The results were submitted to one way analysis of variance followed by Duncan test, with the level of significance set at $p < 0.05$ for all tests.

Results and Discussion

Phytochemistry studies of *Virola sebifera* were bio-monitored throughout the cell growth percentages analysis on the cytotoxicity assay. The selection criteria for samples was growth percentage below 50% (negative values meaning cell death) and/or selective activity on a type of cell line, with a profile of concentration-dependent antiproliferative activity. Moreover, in according to NCI, the extracts of $IC_{50} < 30\mu\text{g/mL}$ are considered active. The results of *in vitro* activity of crude dichloromethanic extract (CDE), fraction FR4 and doxorubicin are found in **Table 1**. The CDE showed values inside to this criteria, for the line of MCF-7 ($IC_{50}=16.00\mu\text{g/mL}$); NCI-460 ($IC_{50}=8.50\mu\text{g/mL}$); OVCAR03 ($IC_{50}=37.00\mu\text{g/mL}$) and NCI-ADR ($IC_{50}=20.70\mu\text{g/mL}$). Crude dichloromethanic extract was fractionated into four fractions. The most polar fraction FR4 presented the best antiproliferative activity with selectivity for the line UACC-62 ($IC_{50}=5.19\mu\text{g/mL}$); MCF-7 ($IC_{50}=6.89\mu\text{g/mL}$); NCI-460 ($IC_{50}=6.91\mu\text{g/mL}$) and OVCAR03 ($IC_{50}=10.57\mu\text{g/mL}$).

Advancement of potential anticancer agents from discovery using *in vitro* screens to preclinical development requires the demonstration of efficacy in one or more animal models. Most of such models require considerable quantities of test compound, as well as substantial time and resources. Since the development of the hollow fiber assay, several studies have used this methodology to independently demonstrate drug activity (Hassan et al., 2001, Mi et al., 2002).

The current NCI HFA protocol involves the use of nude mice as host animals. The implantation of hollow fibers has been demonstrated in immunocompetent rats without causing immune destruction by the host or impeding the growth of tumor cells (Jonsson et al., 2000 and 2001; Hassan et al., 2001; Chu et al., 1998; Phillips et al., 1998). Rats have been used often because it gives the opportunity to draw blood samples for monitoring hematological toxicity and drugs pharmacokinetics. However, mice may be a better choice of host animal as they require a smaller amount of test drug (Jonsson et al., 2001). Thus, immunocompetent mice Balbc/c were used in this study.

The anticancer effect was determined in MCF-7, NCI-ADR and OVCAR03-containing fibers (**Figure 1 and 2**). The effect of FR4 treatment *in vivo* (500mg/kg) reduced the MCF-7 cell density in 45% when the fibers were implanted at abdomen. Doxorubicin (6mg/kg), the standard drug, showed similar reduction (40%) in cell density. In the subcutaneous fibers, FR4 showed a reduction of 40%, while the treatment of doxorubicin by 44%. FR4 and doxorubicin demonstrated no significant effect in NCI-ADR fibers. This kind of breast cancer cells expressing the phenotype of multiple drugs resistance. In the ovarian cancer FR4 reduced cell density of 31% in intraperitoneal fibers, while doxorubicin showed a reduction of 46%. No significant effect of FR4 or doxorubicin on the growth of the OVCAR03 was found when cells were in subcutaneous fibers (**Figure 2**).

Phillips et al. (1998) showed that total time *in vivo* of 6 days (NCI protocol) may be insufficient time for angiogenesis occur. In the present study, the fibers were implanted at both the s.c. and i.p. sites, and after 14 days, blood vessel development in the s.c. site was observed. Both FR4 and doxorubicin inhibited the growth of MCF-7 cells implanted in the subcutaneous.

Based on data generated by hollow fiber tests, conventional *in vivo* drug development resources can be focused on those samples that have the greatest promise for use as chemotherapeutic agents (Mi et al., 2002). The confirmation of *in vivo* activity of the FR4 in breast and ovarian tumor cells allows us to advance in our studies. As breast cancer (Thomas et al., 1997) and ovarian cancer (Harvey, 1998) are hormone dependent the results point to this possible line of research. Therefore the link between anticancer activity and hormone receptors interaction will be investigate and the actives substances will be isolated and identified.

Acknowledgements

We would like to thank the Fundação de Amparo para Pesquisas do Estado de São Paulo, FAPESP (01/04872-5) for the support of this research. CD and MEZ wish to thanks CAPES and FAPESP respectively for research fellowship.

References

- Chu MY, Lipsky MH, Yee LK, Eptein J, Whartenby KA, Freeman S, Chen TM, Chu E, Forman EN, Calabresi P. Predictive sensitivity of human cancer cells in vivo using semipermeable polysulfone fibers. **Pharmacology**. 1998; 56(6): 318-26.
- Corothie E, Nakano T. Constituents of the bark of *Virola sebifera*. **Planta medica**. 1969; 17: 184-188.
- de Fatima A, Kohn LK, Antonio MA, de Carvalho JE, Pilli RA. (R)-Goniothalamine: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 2005; 15, 13(8): 2927-33.
- Decker S, Hollingshead M, Bonomi CA, Carter JP, Sausville EA. The hollow fiber model in cancer drug screening; the NCI experience. **European Journal of Cancer**. 2004; 40: 821-826.
- Denny C, Zacharias ME, Amaral MCE et al. Anticancer properties of novel 5-hydroxy-2-acylcyclohexane-1, 3-dione isolated from *Virola sebifera* Aubl. **Phytochemistry**. 2005. in review
- Hall LA, Krauthausen CM, Wexler RS, Hollingshead MG, Slee AM, Kerr JS. The hollow fiber assay: continued characterization with novel approaches. **Anticancer Research**. 2000; 20(2A): 903-911.
- Harvey AR. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. **Journal of the National Cancer Institute**. 1998; 90(23): 1774- 1786.

-
- Hassan SH, Torre M, Nygren P, Karlsson MO, Larsson R, Jonsson E. A hollow fiber model for in vitro studies of cytotoxic compounds: activity of the cyanoguanidine CHS 828. **Anti-Cancer Drugs**. 2001; 12: 33-42.
- Hollingshead MG, Alley MC, Camalier RF, Abbot BJ, Mayo JG, Malspeis L, Grever MR. In vivo cultivation of tumor cells in hollow fibers. **Life Sciences**. 1995; 57(2): 131-141.
- Jonsson E, Friberg L E, Karlsson M O, Hassan S B, Freijs A, Hansen K, Larsson R. Determination of drug effect on tumour cells, host animal toxicity an drug pharmacokinetics in a hollow-fibre model in rats. **Cancer of Chemotherapy Pharmacology**. 2000; 46: 493-500.
- Jonsson E, Friberg LE, Karlsson MO, Hassan SB, Nygren P, Kristensen J, Tholander B, Binderup L, Larsson R. In vivo of CHS 828 on hollow-fibre cultures of primary human tumour cells from patients. **Cancer Letters**. 2001 162(2): 193-200.
- Lopes LMX, Yoshida M, Gottlieb OR. 1,11-diarylundecan-1-one and 4-aryltetralone neolignanas from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 1982; 21(3): 751-755.
- Lorenzi, H. **Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. vol. I, 2 ed. 1998.
- Martinez VJC, Aldana JMI, Cuca SLE. Dibenzylbutane lignans from *Virola sebifera* leaves. **Phytochemistry**. 1999; 50: 883-886.
- Mi Q, Lantvit D, Lim ER et al. Evaluation of the Potential Cancer Chemotherapeutic Efficacy of Natural Product Isolates Employing in Vivo Hollow Fiber Tests. **Journal of Natural Products**. 2002; 65: 842-850.
- Nogueira MA, Magalhaes EG, Magalhaes AF, Biloti DN, Laverde A, Pessine FB, Carvalho JE, Kohn LK, Antonio MA, Marsaioli AJ. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. **Farmaco**. 2003; 58(11): 1163-9.
- Phillips RM, Pearce J, Loadman PM, Bibby MC, Cooper PA, Swaine DJ, Double JA. Angiogenesis in the hollow fiber tumor model influencer drug delivery to tumor cells: implications for anticancer drug screening programs. **Cancer Research**. 1998; 58: 5263-5266.
- Porter W. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Nacional Academy Press, Washington, 1996: 82-23.

-
- Rezende RK, Kato MJ. Dibenzylbutane and arytetralone lignans from seeds of *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 2002; 61(4): 427-432.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**. 1990; 82: 1107-1118.
- Suffness M, Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K (Ed.), **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. vol. 6. Academic Press, London, pp. 71-133, 1990.
- Suggitt M and Bibby MC. 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target driven approaches. **Clinical Cancer Research**. 2005; 11: 971-981.
- Thomas HV, Reeves GK, Key TJA. Endogenous estrogens and pos menopausal breast cancer: a quantitative review. **Cancer Causes and Control**. 1997; 8(6): 922-928.

Table 1: Efficacies of crude dichloromethanic extract (CDE) and the FR4 from *Virola sebifera* as well a positive control doxorubicin against human tumoral cell lines*.

Cell lines	IC ₅₀ (µg/mL)**		
	CED	FR4	Doxorubicin
UACC-62	75.90	5.19	3.24
MCF-7	16.00	6.89	1.90
NCI-460	8.50	6.91	52.70
OVCAR03	37.00	10.57	0.44
PCO3	50.16	ND	1.90
HT-29	104.00	42.20	1.80
786-0	44.00	37.46	5.00
NCI-ADR	20.70	52.76	3.37

* Assessed by the SRB assay; ** IC₅₀ values (concentration eliciting 50% inhibition) were determinated through non-linear regression analysis; ND could not be determined; dose range tested: 0.25 to 250µg/mL. For comparison, the positive control was Doxorubicin.

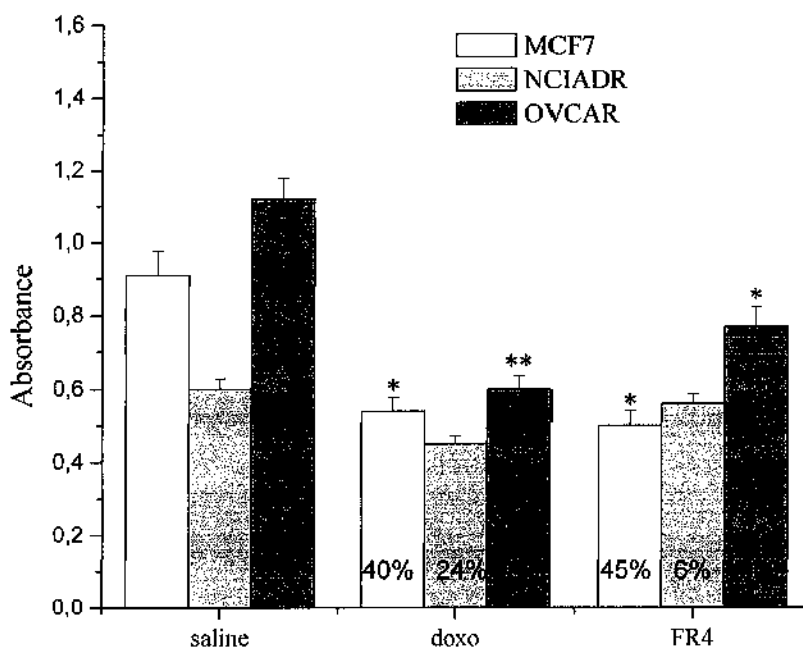


Figure 1: *In vivo* hollow fiber studies conducted with MCF-7, NCI-ADR and OVCAR03 cell lines implanted at the i.p. (intraperitoneally) compartment of Balbc/c mice. Treatments: saline (10mL/kg), doxo (doxorubicin) (6mg/kg) and FR4 (500mg/kg). ANOVA: MCF7: $F_{(14,2)}=3.505$, OVCAR: $F_{(16,2)}=6.98$ Duncan test * $p<0.05$ and ** $p<0.01$.

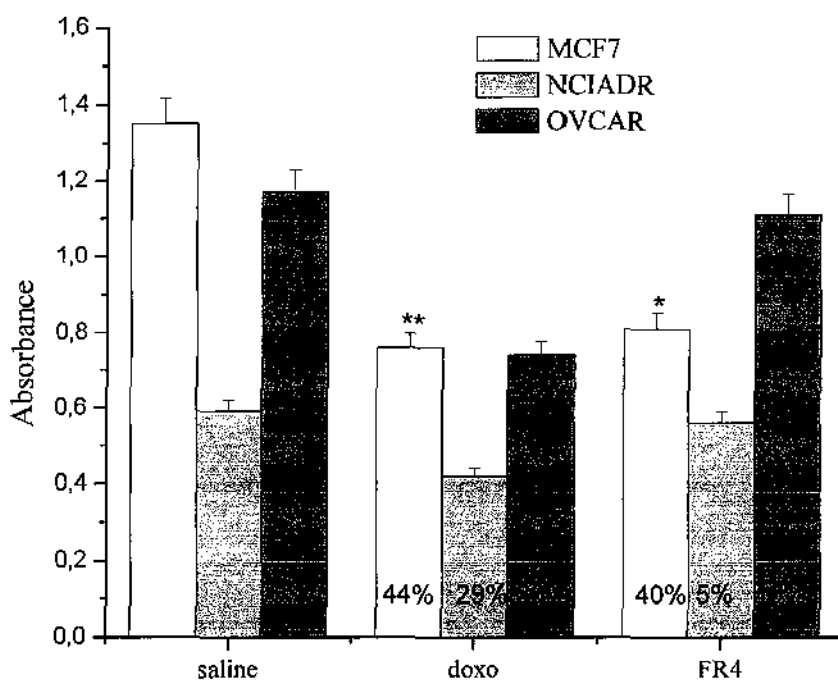


Figure 2: *In vivo* hollow fiber studies conducted with MCF-7, NCI-ADR and OVCAR03 cell lines implanted at the s.c. (subcutaneous) compartment of Balbc/c mice. Treatments: saline (10mL/kg), doxo (doxorubicin) (6mg/kg) and FR4 (500mg/kg). ANOVA: MCF7: $F_{(15,2)} = 5.659$ Duncan test * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

DISCUSSÃO GERAL

O estudo biomonitorado de extratos, frações e compostos obtidos da *Virola sebifera* foi realizado através do modelo de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas. Inicialmente a obtenção dos extratos das folhas da *V. sebifera* foi realizada por diferentes procedimentos, com o objetivo de selecionar a metodologia de extração mais vantajosa e o extrato mais ativo. O extrato bruto diclorometânico a frio das folhas secas (EBD), foi selecionado para a continuidade do estudo. O processo de secagem das folhas não alterou o efeito antiproliferativo e facilitou a manipulação do material para as futuras obtenções dos extratos (Anexo 5).

O processo de fracionamento culminou com o isolamento e identificação de quatro compostos os quais estão descritos no capítulo 1, assim como a atividade antiproliferativa de cada um deles. A elucidação estrutural dos compostos foi obtida pela análise dos dados de HREIMS e NMR (^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC, HMBC), comparando aos da literatura (Lopes et al., 1983, Kato et al., 1985).

Os compostos 1 e 2 foram identificados como lignanas já descritas pela literatura (Lopes et al., 1983), (2R,3R)-2,3-di-(3,4-dimethoxibenzil) butirolactona e (2R,3R)-3-(3,4-dimethoxibenzil)-2-(3,4-methylenedioxi-benzil)-butirolactona. Muitas lignanas e neolignanas de origem natural com atividade antitumoral, têm inspirado a pesquisa desses compostos no desenvolvimento de novas drogas ativas contra o câncer (Apers et al., 2003, Magee et al., 2004). Apesar do grande número de citações de lignanas com efeito anticâncer e a utilização de algumas delas na quimioterapia atual, como por exemplo os quimioterápicos derivados do *Podophyllum* (Cragg & Newman, 1999), os compostos 1 e 2 isolados no presente estudo, não apresentaram atividade antiproliferativa nas linhagens testadas.

O composto 4 foi identificado como (4'Z) 1-hexadec-4'-enoyl-2,6-dihydroxybenzene, um policetídeo já identificado nos frutos da *Virola sebifera* (Kato et al., 1985). A atividade antiproliferativa (IC_{50} 24-77 $\mu\text{g/mL}$) demonstrada em 8 linhagens de

tumores sólidos humanos foi descrita pela primeira vez nesse estudo (Tabela 2 – Capítulo 1).

O composto **3**, trata-se de um novo policetídeo de fórmula molecular $C_{22}H_{36}O_4$ e nomeado como 3,5-dihidro-2-(1'-oxo-3'-hexadecenyl)-2-cyclohexen-1-one. Esse composto demonstrou melhor atividade antiproliferativa (IC_{50} 4-17 μ g/mL) entre as substâncias isoladas da fração ativa e de maneira concentração-dependente. Além disso nas linhagens de mama resistente (NCI-ADR), pulmão (NCI-460) e ovário (OVCA 03) o composto **3** apresentou valores de IC_{50} inferiores aos do quimioterápico doxorubicina (Tabela 2 - Capítulo 1). Os dois policetídeos isolados (compostos **3** e **4**) são as substâncias majoritárias da fração ativa e os principais responsáveis pela atividade antiproliferativa.

A fim de realizarmos o estudo da eficácia de uma fração ativa em modelo animal, realizamos um novo fracionamento do extrato diclorometânico, obtendo material suficiente para um tratamento de 14 dias. Através da análise de cromatografia em camada delgada selecionamos uma fração contendo os compostos **3** e **4**.

Assim, o capítulo 2 demonstrou as propriedades anticâncer *in vitro* e *in vivo* (*hollow fiber assay*) de uma fração ativa (FR4) em modelos experimentais já bem estabelecidos e utilizados pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em *screening* de drogas antitumorais (Hassan et al., 2001; Mi et al., 2002).

No modelo animal selecionado, fibras semipermeáveis (*hollow fibers*) contendo linhagens tumorais humanas são implantadas geralmente, no abdômen e no dorso de camundongos imunodeficientes. O método permite avaliar a atividade de drogas em até três linhagens tumorais diferentes, em um único grupo de animais (Hollingshead et al., 1995).

A porosidade dessas fibras permite a passagem dos nutrientes necessários para o crescimento das células, das drogas em estudo e dos fatores responsáveis pela angiogênese, produzidos pelas células tumorais. No entanto o tamanho do poro não permite a saída das células e nem a entrada de células do hospedeiro (Hollingshead et al., 1995, Suggitt & Bibby, 2005). Essa característica de não causar rejeição, possibilita a implantação dessas fibras em animais imunocompetentes, diminuindo significativamente os custos desses testes (Chu et al., 1998; Jonsson et al., 2000 e 2001). Alguns trabalhos têm utilizado ratos, pela facilidade em se realizar simultaneamente, estudos de farmacocinética e toxicidade de

drogas, monitorados pela retirada de sangue ou outras amostras biológicas. Porém, camundongos podem ser uma excelente alternativa como animal hospedeiro, com a vantagem de não utilizarem grandes quantidades de droga (Jonsson et al., 2001). Dessa forma, camundongos imunocompetentes foram utilizados pela primeira vez em modelo de *hollow fiber* no presente estudo.

A FR4 manteve atividade *in vitro* conferida ao extrato (EBD), para as linhagens MCF-7 ($IC_{50}=6,89\mu g/mL$), NCI-460 ($IC_{50}=6,91\mu g/mL$) e OVCAR03 ($IC_{50}=10,57\mu g/mL$), além da linhagem de melanoma, UACC-62 ($IC_{50}=5,19\mu g/mL$).

O efeito anticâncer em modelo animal foi determinado em fibras contendo linhagens de mama, MCF-7, mama resistente, NCI-ADR e ovário, OVCAR03 (Capítulo 2 - Figuras 1 e 2). O tratamento *in vivo* utilizando a fração FR4 (500mg/kg) diminuiu o crescimento celular da linhagem MCF-7 em 45% quando as fibras foram implantadas no abdômen. O controle positivo doxorubicina (6mg/kg) demonstrou uma redução de 40% no crescimento celular. Nas fibras implantadas no dorso a fração FR4 demonstrou uma redução em 40%, enquanto a doxorubicina reduziu em 44%.

Phillips et al. (1998) demonstraram que o implante das fibras durante 6 dias (protocolo do NCI) seria tempo suficiente para a formação de novos vasos sanguíneos, o que facilitaria o acesso das drogas ao local de ação (células no interior da fibra, s.c.). Para atuar sobre as linhagens implantadas no dorso do animal (s.c.), portanto, a droga precisa passar pelo processo de absorção e de distribuição (Hollingshead et al., 1995). O efeito da FR4 contra células de mama (MCF-7) em fibras implantadas s.c., demonstrou que os princípios ativos presentes na fração ativa foram absorvidos e distribuídos.

A citotoxicidade *in vitro* da FR4 foi considerada baixa (Capítulo 2 - Tabela 1) e o tratamento *in vivo* também não apresentou efeito significativo no crescimento celular de NCI-ADR (Capítulo 2 – Figuras 1 e 2). Essa linhagem de mama expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

A FR4 reduziu o crescimento celular em 31% da linhagem de ovário (OVCAR03) nas fibras implantadas intraperitonealmente e a doxorubicina em 46%. Em células presentes nas fibras implantadas subcutaneamente não houve redução significativa. A ausência de efeito da FR4 em fibras implantadas s.c., preenchidas com OVCAR03,

poderia ser devido ao fato, dos princípios ativos presentes na FR4 responsáveis pelo efeito na linhagem de mama e a de ovário não ser os mesmos. Além disso, a dose de 500mg/kg talvez não tenha sido suficiente para inibir o crescimento celular de OVCAR03 implantada s.c.

Os resultados da administração da FR4 em MCF-7 e OVCAR03, sugerem a escolha de linhagens de mama e ovário em estudos futuros. Atualmente, o crescimento desses tumores demonstrou estar relacionado com a interação de receptores hormônio-dependentes (Thomas et al., 1997.; Harvey, 1998). Portanto, essa linha de pesquisa poderia ser uma sugestão em estudos do mecanismo de ação, de substâncias ativas que venham a ser isoladas de *Virola sebifera*.

O estudo fitoquímico inicial das folhas de *Virola sebifera*, foi realizado também por extrações ácido-base, sendo que a metodologia e os resultados desse processo encontram-se no Anexo 5 (Figura 1). A presença de alcalóides principalmente nas cascas dessa espécie inspirou a investigação dessa classe de substâncias na sua possível participação na atividade antiproliferativa. Foram identificados nas cascas de *Virola sebifera* N,N-dimetiltriptamina e derivados, além de β -carbolinas (Corothie & Nakano, 1969; Kawanishi et al., 1987). Na pesquisa de agentes eficazes contra o câncer, muitos alcalóides têm apresentado elevada citotoxicidade e alguns são utilizados na terapêutica atual (Simões et al., 2003).

Na revelação das cromatografias em camada delgada utilizamos o reagente de Dragendorff para verificar a possível presença de compostos nitrogenados. Esse reagente constitui uma solução de $K(BiI_4)$ em ácido diluído formando precipitados laranja avermelhados quando em contato com alcalóides e compostos nitrogenados. (Simões et al., 2003). As frações orgânicas F $CHCl_3$ e FO1 apresentaram positividade quando reveladas por esse método.

A F $CHCl_3$ apresentou atividade antiproliferativa com efeito citostático e citocida sobre todas as linhagens celulares e seletividade para a linhagem de pulmão (NCI-460) Anexo 5 (Figura 8). A seletividade F $CHCl_3$ por essa linhagem, manteve-se em outros três experimentos e em outra fração (FO1) de perfil cromatográfico semelhante. Apesar do resultado bastante interessante, considerando a positividade nos parâmetros de seleção das

amostras; atividade antiproliferativa concentração dependente, inibição do crescimento celular acima de 50% e seletividade (Skehan et al., 1990; Monks et al., 1991), a continuidade do fracionamento não foi possível devido ao baixo rendimento obtido. Partindo-se de 1000g da planta fresca, obtivemos apenas 660mg da fração F CHCl₃ (1,2%). Na tentativa de otimizar esse rendimento, não obtivemos resultados satisfatórios que levassem a continuidade na pesquisas dos princípios ativos através do processo de extração ácido-base.

A seletividade pela linhagem de pulmão também foi observada nos extratos diclorometânicos (Anexo 5), perdendo-se entretanto, à medida que os extratos eram purificados. Diferentes hipóteses poderiam explicar essa perda de seletividade, como o EBD e as frações F CHCl₃ e FO1 são misturas de inúmeras substâncias, a atividade para outras linhagens testadas pode não ter sido significativa. Quando ocorreu o processo de purificação, aumentou-se a citotoxicidade para as demais linhagens, desaparecendo a aparente seletividade. Outra hipótese seria a degradação dos princípios ativos no processo de extração, também alterando o resultado (Simões et al., 2003).

Futuramente, a pesquisa da atividade dessas frações orgânicas será retomada, na tentativa de identificar se essa seletividade poderia ser atribuída aos possíveis alcalóides ou outras substâncias presentes.

CONCLUSÃO GERAL

- As lignanas isoladas não apresentaram citotoxicidade, quando avaliadas no modelo de cultura de células tumorais humanas.
- Dos princípios com atividade foi identificado um novo policetídeo (composto 3). A atividade antiproliferativa da espécie *Virola sebifera* deve-se principalmente pela presença desse composto. O composto 3 a foi ativo contra todas as linhagens tumorais e essa ação inespecífica sugere a realização futura de uma avaliação toxicológica.
- A realização da metodologia em modelo animal, resultou na sua validação com fibras semipermeáveis implantadas em camundongos imunocompetentes. Concluímos que a padronização desse ensaio, representa uma economia de tempo, quantidade de amostras a serem administradas e os diversos recursos utilizados em pesquisas com animais imunodeficientes.
- Os resultados *in vivo* da administração intraperitoneal da fração ativa FR4 indicam ação contra linhagens de mama (MCF-7) e ovário (OVCAR03), comprovando sua eficácia através do modelo de *hollow fiber*. Portanto, a relação entre a atividade anticâncer e a interação entre receptores hormônio dependentes deverá ser futuramente investigada.
- A seletividade observada para a linhagem de mama, implantada no dorso, demonstra que a substância responsável por essa atividade passou pelo processo de absorção e distribuição.
- Além dos dois artigos produzidos nessa tese de doutorado, os resultados do presente trabalho *in vitro* relacionados no Anexo 5, indicam que a fração rica em alcalóides reproduziu a atividade do EBD com seletividade para linhagem de pulmão. Entretanto, o baixo rendimento obtido pelas metodologias testadas não permitiu a continuidade do fracionamento e investigação da atividade antiproliferativa dos alcalóides.

REFERÊNCIAS*:

- Agurrel S, Holmstedt BO, Lindgren JE. Alkaloids in Certain Species of *Viola* and Other South American Plants of Ethnopharmacologic Interest. **Acta Chemica Scandinavica**. 1969; 23: 903-916.
- Apers S, Vlietinck A, Pieters L. Lignans and neolignans as lead compounds. **Phytochemistry Reviews**. 2003; 2: 201-217.
- Barata LES, Santos LS, Ferri PH, Phillipson JD, Paine A, Croft SL. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Viola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**. 2000; 55:589-595.
- Blumenthal EEA, Silva MS, Yoshida M. Lignoids, flavonoids and polyketides of *Viola surinamensis*. **Phytochemistry**. 1997; 46(4): 745-749.
- Brasil. Estimativa 2005. Incidência de Câncer no Brasil disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/> [2005 outubro 20]
- Calabresi P, Chabner BA. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Gilman AG, Goodman LS. **The Pharmacological Bases of Therapeutics**. 9. ed. New York: McGraw-Hill Companies, 1996. p. 1225-1232.
- Chu MY, Lipsky MH, Yee LK, Epstein J, Whartenby KA, Freeman S, Chen TM, Chu E, Forman EN, Calabresi P. Predictive sensitivity of human cancer cells in vivo using semipermeable polysulfone fibers. **Pharmacology**. 1998; 56(6): 318-26.
- Corothie E, Nakano T. Constituents of the bark of *Viola sebifera*. **Planta Medica**. 1969; 17: 184-188.
- Cragg GM, Newman DJ. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. **Cancer Investigation**. 1999; 17(2):153-163.
- Cuesta-Rubio O, Velez-Castro H, Frontana-Urbe BA, Cárdenas J. Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. **Phytochemistry**. 2001; 57 (2), 279-283.
- * De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver.
Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

-
- Cuesta-Rubio O, Frontana-Urbe BA, Ramirez-Apan TJ, Cardenas Z. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; Biological activity of nemorosone. **Zeitschrift fuer Naturforschung C- A Journal of Biosciences**. 2002; 57 (3-4): 372-378.
- Decker S, Hollingshead M, Bonomi CA, Carter JP, Sausville EA. The hollow fiber model in cancer drug screening; the NCI experience. **European Journal of Cancer**. 2004; 40: 821-826.
- Gurevich AI, Dobrynin VN, Kolosov MN, Poprako SA, Ryabova I, Chernov BK, Debrentzeva NA, Aizeman BE, Garagulya AD. **Antibiotiki (Moscow)**. 1971; 16: 510.
- Hamburger AW. Use of *in vitro* tests in predictive cancer chemotherapy. **Journal of the National Cancer Institute**. 1981; 66(6): 981-989.
- Harrowven DC, Newman NA, Knight CA. On the Identity of a Neo-lignan from the Fruits of *Virola sebifera* **Tetrahedron letters** 1998; 39:6757-6760.
- Hassan SH, Torre M, Nygren P, Karlsson MO, Larsson R, Jonsson E. A hollow fiber model for in vitro studies of cytotoxic compounds: activity of the cyanoguanidine CHS 828. **Anti-Cancer Drugs**. 2001; 12: 33-42.
- Hollinshead MG, Alley MC, Camalier RF, Abbot BJ, Mayo JG, Malspeis L, Grever ML. In vivo cultivation of tumor cells in hollow fibers. **Life Sciences**. 1995; 57(2): 131-141.
- Jonsson E, Friberg LE, Karlsson MO, Hassan SB, Freijls A, Hansen K, Larsson R. Determination of drug effect on tumour cells, host animal toxicity and drug pharmacokinetics in a hollow-fibre model in rats. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**. 2000; 46: 493-500.
- Jonsson E, Friberg LE, Karlsson MO, Hassan SB, Nygren P, Kristensen J, Tholander B, Binderup L, Larsson R. In vivo of CHS 828 on hollow-fibre cultures of primary human tumour cells from patients. **Cancer Letters**. 2001; 162(2): 193-200.
- Kato MJ, Lopes, LMX, Fo HFP, Yoshida M, Gottlieb OR. Acyresorcinols from *Virola sebifera* and *Virola Elongata*. **Phytochemistry**. 1985; 24(3), 533-536.
- Kawanishi K, Hashimoto Y. Long Chain Esters of *Virola* Species. **Phytochemistry**. 1987; 26(3): 749-752.

-
- Lai A, Tin-Wa M, Mika ES, Persinos GJ, Farnsworth NR. Phytochemical Investigation of *Virola peruviana*, A New Hallucinogenic Plant. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 1973; 62(9): 1561-1563.
- Lopes LMX, Yoshida M, Gottlieb OR. 1,11-diarylundecan-1-one and 4-aryltetralone neolignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 1982; 21(3): 751-755.
- Lopes LMX., Yoshida, M., Gottlieb, OR. Dibenzylbutyrolactone lignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 1983; 22(6), 1516-1518.
- Lopes LMX, Yoshida M, Gottlieb OR. Aryltetralone and arylindanone neolignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 1984; 23(9): 2021-2024.
- Magee PJ, McGlynn H, Rowland IR. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro*. **Cancer Letters**. 2004; 208: 35-41.
- Martinez VJC, Aldana JMI, Cuca SLE. Dibenzylbutane lignans from *Virola sebifera* leaves. **Phytochemistry**. 1999; 50: 883-886.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **Journal Natural Products**. 2003; 66: 1022-1037.
- Oliveira CMA, Porto ALM, Bittrich V, Marsaioli AJ. Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**. 1999; 50: 1073-1079.
- Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**. 2001; 53(6): 237-43.
- Rates SMK. Plants as source of drugs. **Toxicon**. 2001; 39: 603-613.
- Rezende RK, Kato MJ. Dibenzylbutane and arytetralone lignans from seeds of *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 2002; 61(4): 427-432.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** 1. ed. Editora da UFSC, 1999.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**. 1990; 82: 1107-1118.

-
- Suggitt M, Swaine DJ, Pettit GR, Bibby MC. Characterization of the hollow fiber assay for the determination of microtubule disruption *in vivo*. **Clinical Cancer Research**. 2004; 10: 6677-6685.
- Suggitt M, Bibby MC. 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target driven approaches. **Clinical Cancer Research**. 2005; 11: 971-981.
- Zoghbi MGB, Andrade EHA, Maia JGS. **Aroma de Flores na Amazônia**. Belém, 2001.

ANEXO 1

Comprovante de submissão à revista Qualis A Internacional – Capítulo 1:

Your manuscript np060013b, entitled "Antiproliferative properties of polyketides isolated from *Virola sebifera* leaves", has been assigned to the following Journal of Natural Products Editor:

A. Douglas Kinghorn

Email: <http://by112fd.bay112.hotmail.msn.com/cgi-bin/compose?curmbox=00000000-0000-0000-0000-000000000001&a=7c1ed956f815f7ff35daeee9d9b476228770664b3e943954c706e9abb67d1b41&mailto=1&to=jnatprod@osu.edu&msg=FF3D7184-3914-4DA7-B8E7-799FCA180159&start=0&len=3250&src=&type=x>

Mailing Address:

Medicinal Chemistry & Pharmacognosy
College of Pharmacy, The Ohio State Univ
500 W. 12th Ave.
L.M. Parks Hall, Rm. 446
Columbus
OH 43210-1291
USA
Fax: (614) 247-8117

ANEXO 2

Tabela 1: Linhagens celulares utilizadas nos experimentos, doadas pelo NCI.* linhagem celular resistente a drogas padrões.

Tipo celular	Código	Tipo de cultura
Cólon	HT-29	Aderida
Leucemia	K562	Suspensão
Pulmão	NCI-460	Aderida
Mama	MCF-7	Aderida
Mama	NCI-ADR*	Aderida
Rim	786-0	Aderida
Melanoma	UACC-62	Aderida
Ovário	OVCAR03	Aderida
Próstata	PCO3	Aderida

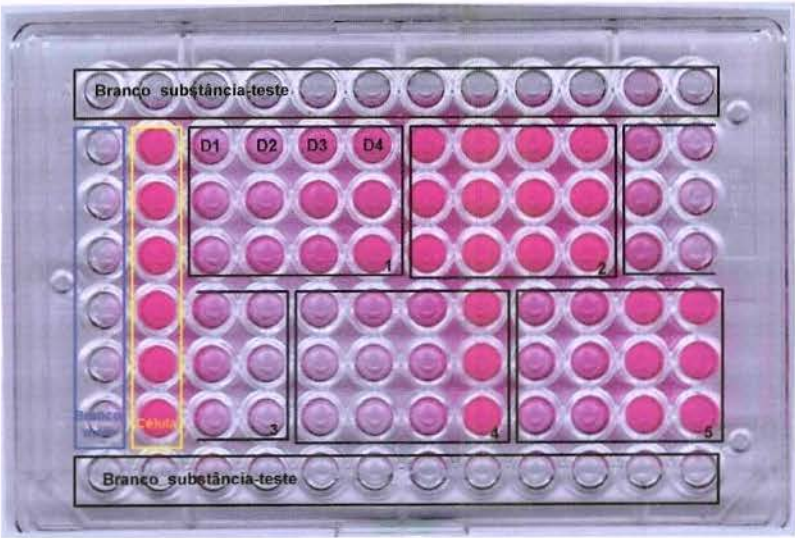


Figura 1: Esquema da placa teste (T1)

A Figura 2 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto diclorometânico planta fresca (EDF) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado. A curva demonstrou que esse extrato possui atividade antiproliferativa, concentração dependente, efeito citostático e citocida sobre todas as linhagens celulares, com seletividade para linhagem de pulmão (NCI-460).

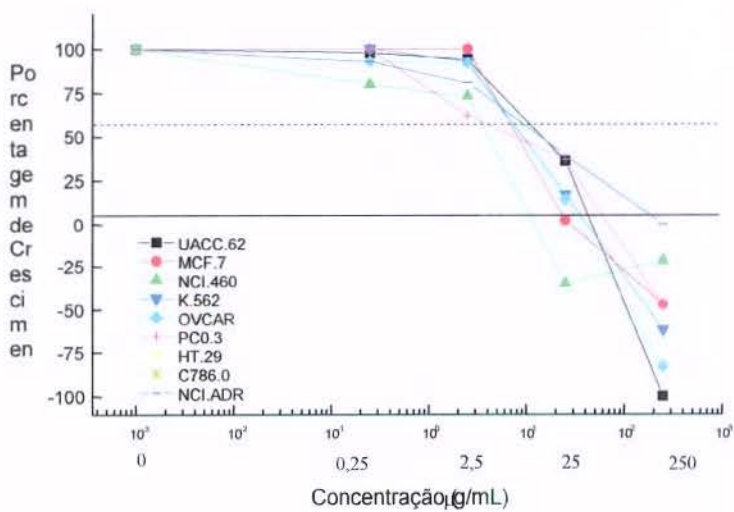


Figura 2: Atividade do EDF sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

ANEXO 3

1. Atividade antiproliferativa dos extratos brutos

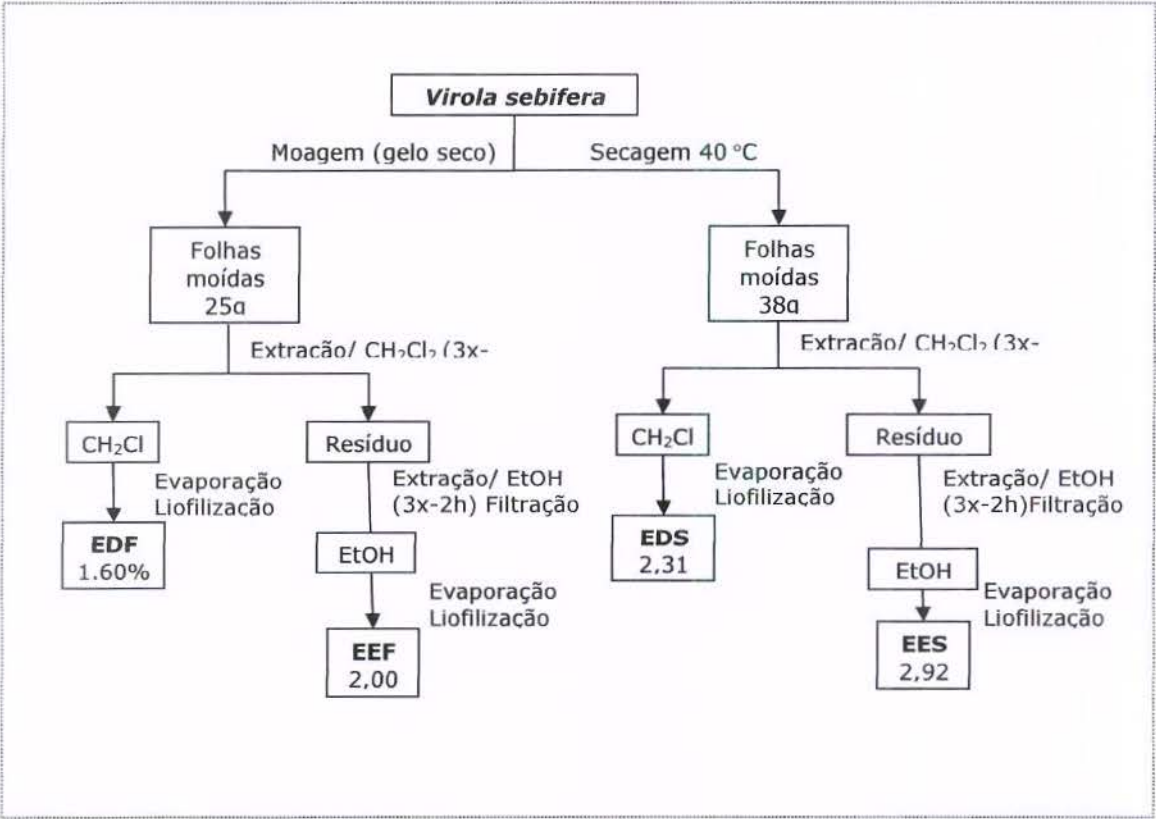


Figura 1: Fluxograma da Extração com diclorometano, seguida de extração com etanol.

A Figura 3 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto diclorometânico planta seca (EDS) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado. A atividade antiproliferativa desse extrato apresentou efeito citostático para a linhagem NCI ADR e efeito citostático e citocida para as demais linhagens, com nítida seletividade para a linhagem de pulmão (NCI 460).

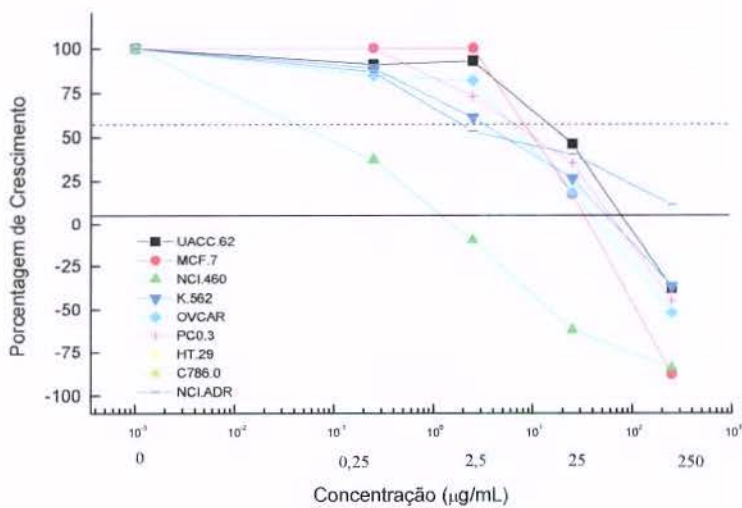


Figura 3: Atividade do EDS sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

A Figura 4 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto etanólico planta fresca (EEF) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado. A curva demonstrou que esse extrato apresentou atividade antiproliferativa seletiva apenas na maior concentração, com efeito citostático sobre a linhagem UACC.62 (melanoma).

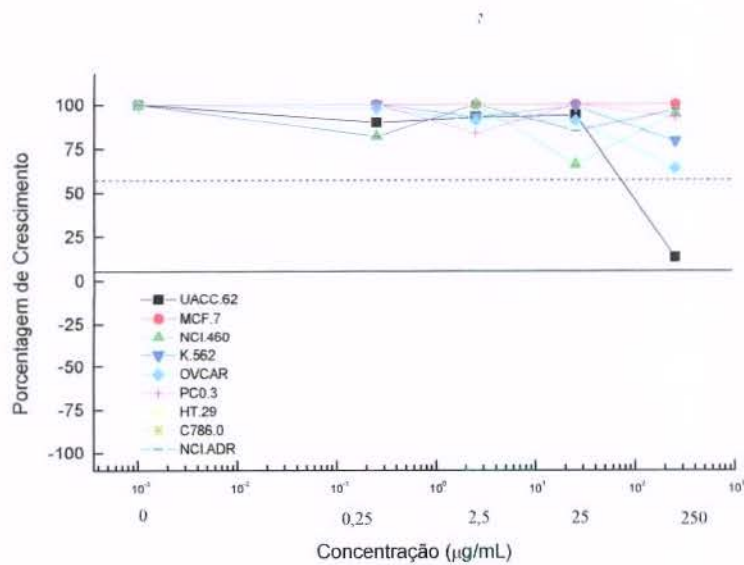


Figura 4: Atividade do EEF sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

A Figura 5 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto etanólico planta seca (EES) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado. A curva demonstrou que esse extrato apresentou atividade antiproliferativa apenas na maior concentração, com efeito citostático sobre todas as linhagens.

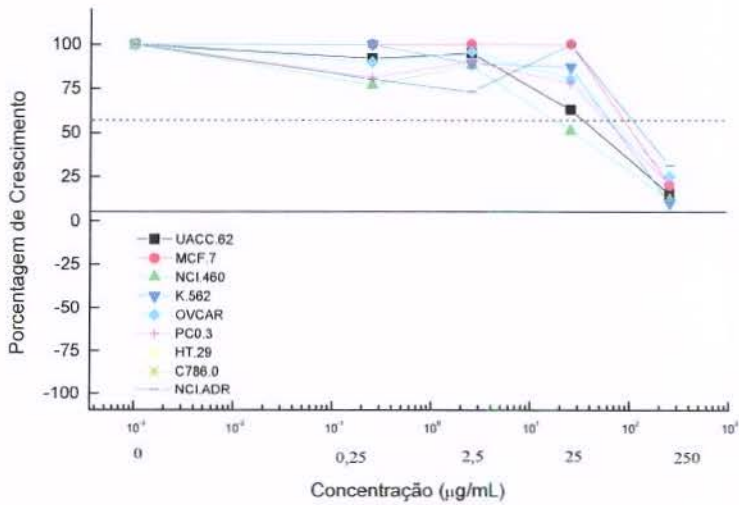


Figura 5: Atividade do EES sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

2. Atividade antiproliferativa das frações CHCl₃ e FO1.

2.1. Extração ácido-base (obtenção da fração CHCl₃) (Kawanishi et al., 1985)

Mil gramas (1000g) de folhas (frescas e moídas) foram submetidas à maceração dinâmica por um período de 6 horas, com 2000 mL de metanol (MeOH), (Dinâmica®) por 3 vezes consecutivas. Após os três períodos de extração realizou-se uma filtração em papel

e o filtrado foi submetido à evaporação a vácuo, sob temperatura de 40°C. O material foi ressuspensionado em ácido acético 5% (HOAc: H₂O destilada, 5: 95) e filtrado. O filtrado foi basificado com carbonato de sódio - Na₂CO₃ (pH=9,0) e extraído 3 vezes consecutivas, com clorofórmio (CHCl₃). A fase orgânica (CHCl₃) foi evaporada, e submetida à análise cromatográfica de camada delgada (fase móvel: Diclorometano: Metanol 99:1; revelador: Dragendorff).

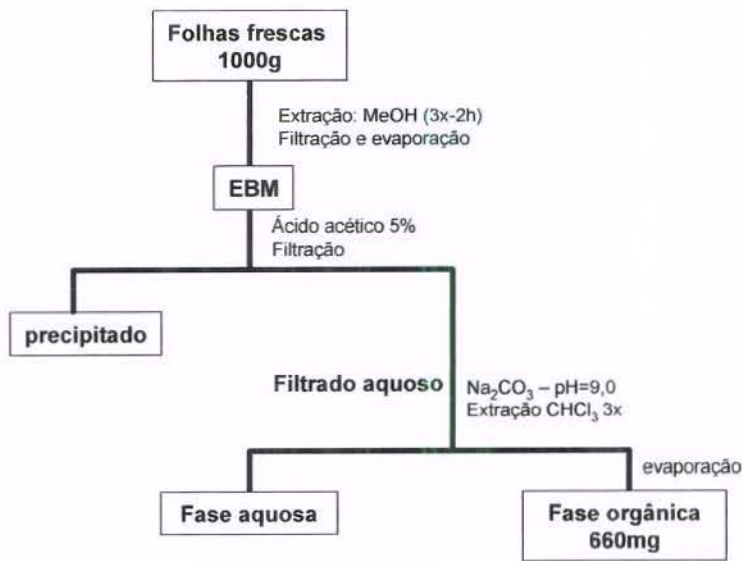


Figura 6: Fluxograma da obtenção da fração orgânica F CHCl₃.



Figura 7: Cromatografia em camada delgada da fração orgânica F CHCl₃. (fase móvel: Diclorometano: Metanol 99:1; revelador: Dragendorff).

A figura 8 representa a curva concentração-resposta da fração CHCl_3 (F CHCl_3) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da amostra utilizada. A curva demonstrou que a F CHCl_3 apresentou atividade antiproliferativa com efeito citostático e citocida sobre todas as linhagens celulares e seletividade para a linhagem de pulmão (NCI-460).

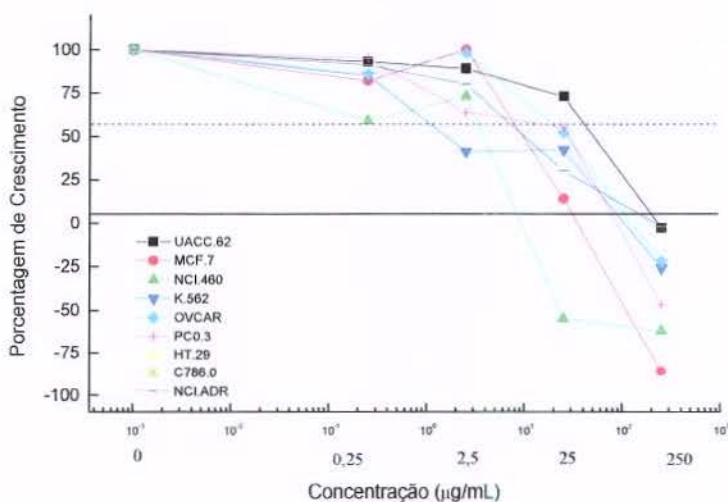


Figura 8: Atividade da fração F CHCl_3 sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

2.2. Fracionamento do Extrato Etanólico (Cromatografia em coluna filtrante) seguido por extração ácido-base (obtenção da fração FO1)

O extrato bruto etanólico foi fracionado em coluna filtrante a fim de obter uma fração enriquecida em compostos presentes na fração F CHCl_3 , antes de realizar uma extração ácido-base. A coluna filtrante forneceu 16 frações que foram agrupadas de acordo

com o perfil cromatográfico em F1 (frações de 2 a 5); F2 (frações 6 e 7); F3 (frações 8 e 9); F4 (frações de 10 a 12) e F5 (frações de 13 a 16).

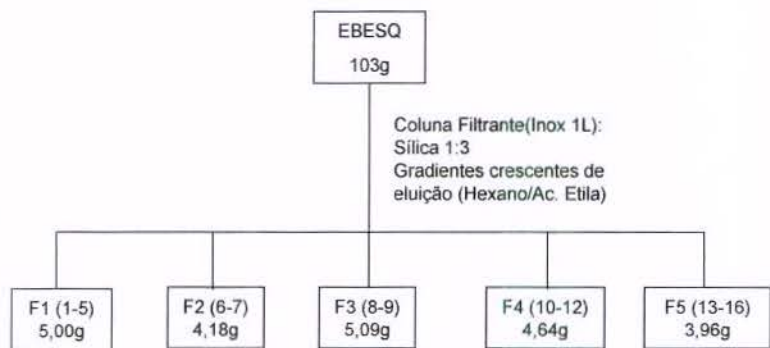


Figura 9: Fluxograma da cromatografia por coluna filtrante do EBESQ (Extrato Bruto Etanólico, planta seca, extração a quente).

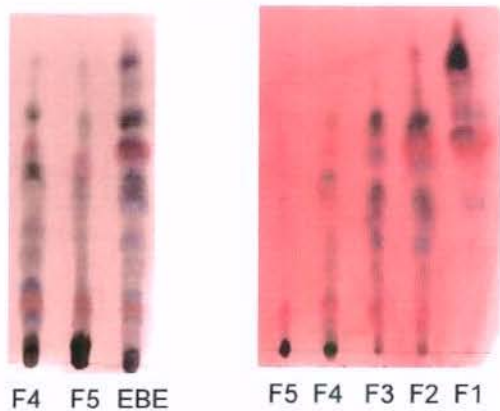


Figura 10: Monitoramento por cromatografia em camada delgada (eluente: CH₂Cl₂:MeOH 99:1; revelador: anisaldeído) das frações obtidas por coluna cromatográfica filtrante e do EBE.

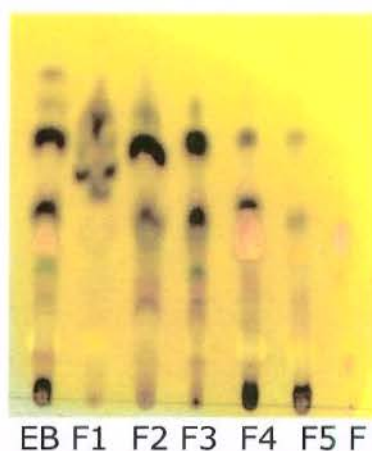


Figura 11: Monitoramento por cromatografia em camada delgada (eluente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 99:1; revelador: Dragendorff) das frações obtidas por coluna cromatográfica filtrante e do EBE.

2.3. Extração ácido-base apartir da fração F4

A fração F4 foi então submetida a uma extração ácido-base. Procedimento descrito no item 1 (Kawanishi et al., 1985).

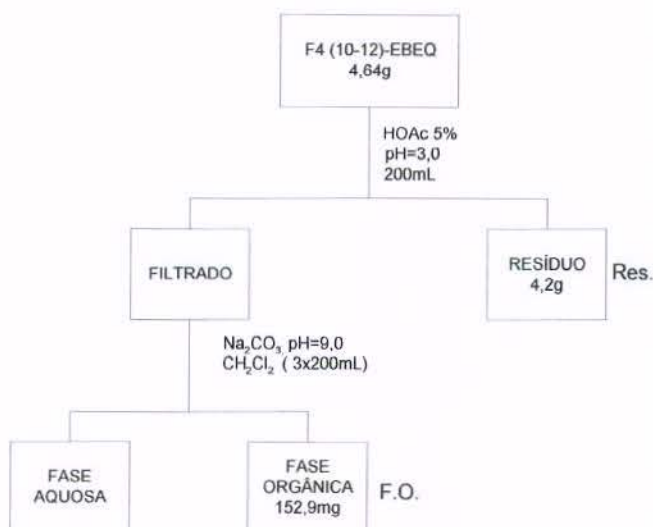


Figura 12: Extração ácido-base (solução 5% HAc) da fração F4.

Obteve-se um rendimento de 3,3% da fração orgânica (FO1), sendo superior ao procedimento anterior que deu origem à fração F CHCl_3 (rendimento de 1,2%). Portanto, esse resultado mostrou-se vantajoso, uma vez que, através de um procedimento rápido (coluna filtrante) obteve-se um maior rendimento na faixa de R_f de interesse. (Figura 13).

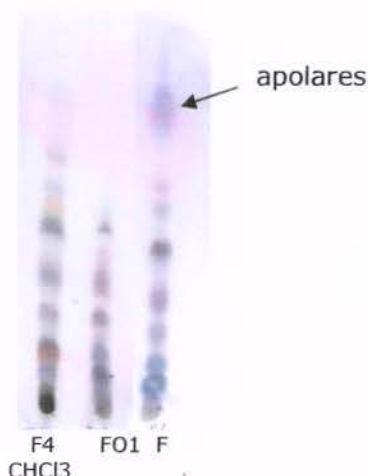


Figura 13: Monitoramento por cromatografia em camada delgada (eluente: CH_2Cl_2 :MeOH 99:1; revelador: anisaldeído) das frações: F4, FO1 e F CHCl_3 .

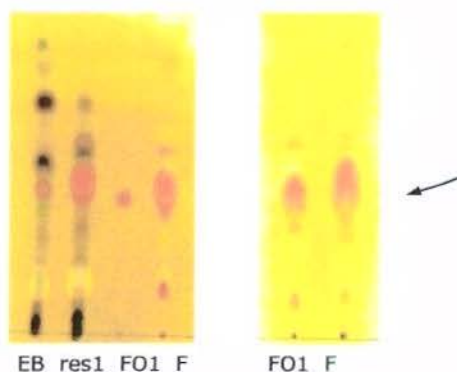


Figura 14: Monitoramento por cromatografia em camada delgada (eluente: CH_2Cl_2 :MeOH 99:1; revelador: Dragendorff) do EBE e das frações, FO1 e F CHCl_3 .

A Figura 15 representa a curva concentração-resposta da fração FO1 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da amostra utilizada. A curva demonstrou que a FO1 apresentou atividade antiproliferativa com efeito citostático e citocida sobre todas as linhagens celulares. Apresentou maior seletividade e eficácia para a linhagem de pulmão (NCI-460), repetindo o resultado obtido anteriormente pela fração F CHCl₃ (Figura 8).

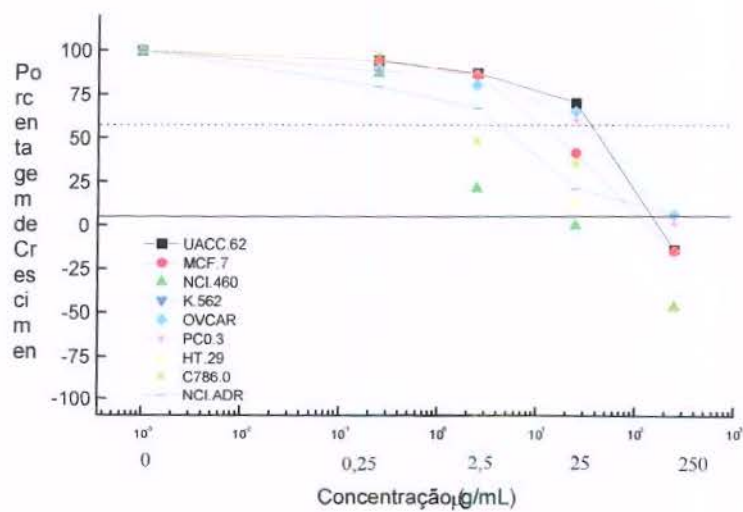


Figura 15: Atividade da fração orgânica I (FO1) sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.