

DERIVADOS CITOTÓXICOS DE VITANOLIDOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Acnistus arborescens*

Sandro Minguzzi*

Curso de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade de Naviraí, Rua Emílio Máscoli, 275, 79950-000 Naviraí - MS, Brasil

Lauro E. S. Barata

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas - SP, Brasil

Geoffrey A. Cordell

Natural Products Inc., 60203 Evanston - IL, USA

Recebido em 8/3/10; aceito em 10/9/10; publicado na web em 7/1/11

CYTOTOXIC DERIVATIVES OF WITHANOLIDES ISOLATED FROM THE LEAVES OF *Acnistus arborescens*. In view of anticancer activity of 7 β -acetoxywithanolide D (**2**) and 7 β -16 α -diacetoxywithanone D (**3**), isolated from the leaves of *Acnistus arborescens* (Solanaceae), five withanolide derivatives were obtained and their structures were determined by NMR, MS and IR data analysis. The *in vitro* anticancer activity of these derivatives was evaluated in a panel of cancer cell lines: human breast (BC-1), human lung (Lu1), human colon (Col2) and human oral epidermoid carcinoma (KB). Compounds **2a** (acetylation of **2**), **3b** (oxidation of **3**) and **2c** (hydrogenation of **2**) exhibited the highest anticancer activity against human lung cancer cells, with ED₅₀ values of 0.19, 0.25 and 0.63 μ g/mL, respectively.

Keywords: *Acnistus arborescens*; withanolides derivatives; human lung cancer.

INTRODUÇÃO

As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais; além disso, fornecem modelos para modificações estruturais e organização de propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo de inspiração para químicos orgânicos na construção de novos arranjos moleculares naturais.¹ Dentro do grupo dos esteroides naturais com atividades citotóxicas se encontram os vitanolidos, que formam o grupo mais abundante de compostos que possuem uma δ lactona em sua cadeia lateral. Estes foram primeiramente citados na literatura em 1962, mas sua elucidação estrutural só aconteceu em 1966 com a descrição estereoquímica da vitaferina **1** (Figura 1) isolada das folhas de *Withania somnifera*, popularmente conhecida na Índia como *Ashwagandha*.² Os vitanolidos têm sido isolados de plantas de vários gêneros, como exemplo podem ser citados: *Acnistus*,³⁻⁸ *Datura*,⁹ *Jaborosa*,¹⁰ *Physalis*¹¹ e *Withania*,^{12,13} todos da família Solanaceae, e despertam interesse por apresentarem diversas atividades biológicas, algumas delas como antitumoral,⁴⁻⁸ diurética,¹³ indução de quinona redutase^{5,14} e imunossupressora.¹⁵

Outros esteroides que são encontrados na família *Solanaceae* incluem glicosídeos e alcaloides esteroidais, compostos presentes nos gêneros *Cestrum* e *Solanum*, sendo este último gênero o que possui o maior número de espécies catalogadas.^{16,17} Os primeiros trabalhos sobre a atividade farmacológica de vitanolidos em *Acnistus arborescens* foram feitos sobre inibidores de tumores; em um deles, utilizando-se do extrato alcoólico das folhas, observou-se significativa atividade biológica *in vitro* contra células de carcinoma humano da nasofaringe e *in vivo* contra sarcoma 180 em ratos; a ação farmacológica foi atribuída à vitaferina **1**.³

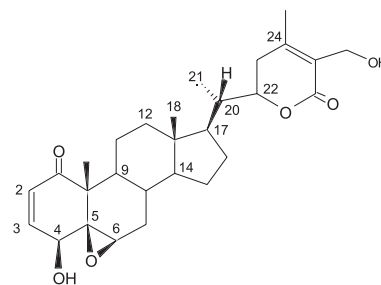


Figura 1. Estrutura da vitaferina **1**

Acnistus arborescens conhecida popularmente como marianeira ou esporão de galo falso apresenta-se distribuída pelas Américas do Sul e Central; nesta espécie têm sido relatados vários compostos da classe dos vitanolidos incluindo vitacnistas,³ vitafisalin^{6,7} e derivados do vitanolido D: 12 β -acetoxi-4-deoxi-5,6-deoxi- Δ^5 -vitanolido D,⁸ 7 β -acetoxivitanolido D **2**, 7 β ,16 α -diacetoxivitanolido D **3** e 4-deoxi-7 β ,16 α -diacetoxivitanolido D.⁵ A atividade citotóxica de alguns destes compostos foi verificada contra células tumorais *in vitro*, destacando-se as substâncias **2** e **3** contra células de cólon (LNCaP) com ED₅₀ de 0,03 e 0,08 μ g/mL, respectivamente.⁵

Levando-se em conta a potencial atividade anticâncer dos vitanolidos, este trabalho se focou na obtenção de cinco derivados a partir dos vitanolidos **2** e **3**, com a realização de testes de citotoxicidade em células cancerosas de maior incidência em humanos.

PARTE EXPERIMENTAL

Aspectos gerais

Os espectros de RMN foram registrados em equipamento Varian Inova-500 (500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C), utilizando-se o

*e-mail: sming@uems.br

sinal do solvente como referencial interno. Os espectros de massa foram obtidos através de injeção direta em espectrômetro VG Auto-espec High Resolution Mass Spectrometer (Micromass Company). Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos na forma de filmes em espectrofotômetro Perkin Elmer 1600 (FTIR Series). Nas separações por cromatografia em coluna foi utilizada sílica gel 70-230 da Merck. As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatoplasas PF254 (Merck) e as manchas com vitanolidos foram reveladas com revelador ácido sulfúrico/MeOH (1:1) ou com irradiação no UV a 254 nm.

Isolamento dos constituintes

As folhas de *Acnistus arborescens* (1,3 kg) foram secas, moídas e submetidas à extração através de maceração com etanol (5 L). Após evaporação do solvente procedeu-se à partição entre acetato de etila/EtOH:H₂O (6:4). A fração acetato de etila foi filtrada em Celite e após evaporação, fracionada em coluna cromatográfica empacotada com sílica gel 70-230 da Merck e eluída com misturas de hexano/AcOEt. Foram recolhidas 74 frações de 50 mL que foram agrupadas posteriormente em 16 frações, através de monitoramento por CCD. A fração 36-40 eluída com hexano:AcOEt (30:70) foi submetida repetidas vezes à separação em cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando-se hexano:AcOEt (20:80) como eluente e obtendo-se **2** (1,0 g) com 0,07% de rendimento. O composto **3** (300 mg) foi obtido por CCDP usando a fração 40-55 eluída com hexano:AcOEt (30:70), seguida de separação em CCDP, obtendo-se um rendimento de 0,02% desta substância nas folhas.

7 β -acetoxi-4 β ,20R-di-hidroxi-5 β ,6 β -epoxi-1-oxo-vita-2,24-dienolido (**2**). Cristais incolores e inodoros. P.F.= 151-153 °C. Dados espectrométricos similares aos da literatura.⁴

7 β ,16 α -diacetoxi-4 β ,20R-di-hidroxi-5 β ,6 β -epoxi-1-oxo-vita-2,24-dienolido (**3**). Cristais incolores e inodoros. P.F.= 163-166 °C. Dados espectrométricos similares aos da literatura.⁵

Obtenção dos derivados

Acetilação de **2** e **3**

O vitanolido **2** (20 mg) foi dissolvido em 2 mL de acetato de etila e, então, adicionado a um balão de 50 mL, adicionando-se 1 mL de anidrido acético-piridina (1:1), iniciando-se agitação e deixando-se reagir por 3 h, sendo monitorada a formação do produto por CCD, obtendo-se 18 mg de **2a**, com rendimento de 83%. O mesmo procedimento foi adotado para o vitanolido **3**, obtendo-se 17 mg de **3a**, com rendimento de 85%.

4 β ,7 β -diacetoxi-20R-hidroxi-5 β ,6 β -epoxi-1-oxo-vita-2,24-dienolido (**2a**). Óleo incolor e inodoro. λ max. cm⁻¹: 3440, 1721, 1703, 1682. EIMS (intensidade relativa): 586 (M⁺, não detectado), 461 [M-125]⁺ (13), 401 [M-125-HOAc]⁺ (75), 341 [M-125-2HOAc]⁺ (25), 169 [C₉H₁₃O₃]⁺ (40), 126 [C₇H₁₀O₂]⁺ (100). RMN ¹H [500 MHz, (ppm), CDCl₃]: 6,25 (d, 9,8 Hz, H-2), 7,00 (dd, 5,5 e 9,8 Hz, H-3), 4,65 (d, 5,5 Hz, H-4), 3,35 (d, 1,9 Hz, H-6), 4,85 (dd, 1,9 e 9,3 Hz, H-7), 4,15 (dd, 3,2 e 12,5 Hz, H-22), RMN ¹³C [125 MHz, (ppm), CDCl₃]: 201,0 (C-1), 134,0 (C-2), 140,0 (C-3), 71,0 (C-4), 64,0 (C-5), 60,5 (C-6), 74,5 (C-7), 34,0 (C-8), 44,0 (C-9), 48,0 (C-10), 21,8 (C-11), 39,0 (C-12), 44,0 (C-13), 55,5 (C-14), 25,4 (C-15), 28,0 (C-16), 53,8 (C-17), 13,3 (C-18), 15,5 (C-19), 75,2 (C-20), 20,5 (C-21), 80,7 (C-22), 31,8 (C-23), 148,2 (C-24), 122,0 (C-25), 166,0 (C-26), 12,4 (C-27), 20,7 (C-28), 169,0 (4-OAc-C=O), 20,6 (4-OAc-CH₃), 171,0 (7-OAc-C=O), 21,3 (7-OAc-CH₃).

4 β ,7 β ,16 α -triacetoxi-20R-hidroxi-5 β ,6 β -epoxi-1-oxo-vita-2,24-dienolido (**3a**). Óleo incolor e inodoro. IV ν_{max} cm⁻¹: 3440, 1718, 1709, 1682. EIMS (intensidade relativa): 644 (M⁺, não detectado), 524[M-2HOAc]⁺ (32) 519 [M-125]⁺ (13), 501[M-125-H₂O]⁺ (8), 399[M-125-2HOAc]⁺(17), 169[C₉H₁₃O₃]⁺(35), 126[C₇H₁₀O₂]⁺(100). RMN ¹H [500 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 6,25 (d, 10,1 Hz, H-2), 7,0 (dd, 5,7 e 10,1 Hz, H-3), 4,7 (d, 5,7 Hz, H-4), 3,4 (d, 1,8 Hz, H-6), 4,85 (dd, 1,8 e 9,3 Hz, H-7), 4,2 (dd, 3,6 e 13,0 Hz, H-22), 5,35 (m, H-16), RMN ¹³C [125 MHz, (ppm), CDCl₃]: 201,0 (C-1), 134,0 (C-2), 140,1 (C-3), 71,0 (C-4), 64,0 (C-5), 60,8 (C-6), 74,5 (C-7), 33,5 (C-8), 43,0 (C-9), 47,5 (C-10), 21,0 (C-11), 40,0 (C-12), 43,5 (C-13), 53,0 (C-14), 34,0 (C-15), 75,5 (C-16), 59,5 (C-17), 14,7 (C-18), 16,0 (C-19), 75,6 (C-20), 20,9 (C-21), 81,0 (C-22), 30,5 (C-23), 149,0 (C-24), 122,5 (C-25), 166,0 (C-26), 12,5 (C-27), 20,7 (C-28), 170,0 (4-OAc-C=O), 21,0 (4-OAc-CH₃), 170,5 (7-OAc-C=O), 21,6 (7-OAc-CH₃), 171,4 (16-OAc-C=O), 21,2 (16-OAc-CH₃).

Oxidação de **2** e **3**

Inicialmente foi necessária a obtenção de óxido de manganês (MnO₂) ativado, uma vez que o óxido de manganês comercial não é adequado para síntese. Preparou-se uma solução contendo 5 g de KMnO₄ em 10 mL de água, que foi adicionada a uma solução contendo 5 g de MnSO₄ em 20 mL de água, numa temperatura de 90 °C. A mistura foi mantida em agitação por 20 min, seguindo-se então a filtração do óxido de manganês (composto de cor marrom avermelhada) em papel de filtro. O precipitado foi lavado com 90 mL de água e, em seguida, com 90 mL de acetona. O sólido obtido foi seco em estufa a 100 °C. O óxido de manganês preparado por este método é ativo por até 1 mês, desde que guardado em frasco vedado em dessecador.¹⁸

A partir desta etapa iniciou-se a reação em um balão de 50 mL adicionando-se 50 mg do vitanolido **2** dissolvido em 20 mL de acetona, seguido da adição de 200 mg de MnO₂; a reação foi feita sob agitação à temperatura ambiente, com acompanhamento por CCD. Após filtração, evaporação do solvente e recristalização com metanol obteve-se 20 mg de **2b**, com 40% de rendimento. A partir de 20 mg de **3** e seguindo-se o mesmo procedimento anterior, obteve-se 7 mg de **3b**, com 35% de rendimento.

7 β -acetoxi-20R-hidroxi-5 β ,6 β -epoxi-1,4-dioxo-vita-2,24-dienolido (**2b**). Cristais incolores, translúcidos e inodoros. P.F.= 137-140 °C. λ max cm⁻¹: 3435, 1720, 1712, 1686. EIMS (intensidade relativa): 526 (M⁺, não detectado), 466[M-HOAc]⁺ (7) 401 [M-125]⁺ (13), 383[M-125-H₂O]⁺ (18), 169[C₉H₁₃O₃]⁺ (26), 126[C₇H₁₀O₂]⁺ (100). RMN ¹H [500 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 6,85 (s, H-2 e H-3), 3,45 (d, 1,9 Hz, H-6), 4,82 (dd, 1,9 e 9,3 Hz, H-7), 4,13 (dd, 3,0 e 12,3 Hz, H-22), RMN ¹³C [125 MHz, (ppm), CDCl₃]: 202,0 (C-1), 139,0 (C-2), 142,0 (C-3), 193,0 (C-4), 65,0 (C-5), 63,8 (C-6), 74,0 (C-7), 33,5 (C-8), 43,3 (C-9), 48,8 (C-10), 22,3 (C-11), 39,8 (C-12), 42,8 (C-13), 55,5 (C-14), 24,0 (C-15), 27,0 (C-16), 53,9 (C-17), 13,5 (C-18), 19,2 (C-19), 75,0 (C-20), 20,6 (C-21), 81,1 (C-22), 31,5 (C-23), 148,0 (C-24), 122,5 (C-25), 167,0 (C-26), 12,5 (C-27), 21,0 (C-28), 172,1 (7-OAc-C=O), 21,5 (7-OAc-CH₃).

7 β ,16 α -diacetoxi-20R-hidroxi-5 β ,6 β -epoxi-1,4-dioxo-vita-2,24-dienolido (**3b**). Cristais incolores, translúcidos e inodoros. P.F.= 140-143 °C. λ max cm⁻¹: 3437, 1718, 1708, 1682. EIMS (intensidade relativa): 584 (M⁺, não detectado), 524[M-HOAc]⁺(3), 459 [M-125]⁺ (25), 441[M-125-H₂O]⁺ (16), 169[C₉H₁₃O₃]⁺ (34), 126[C₇H₁₀O₂]⁺ (100). RMN ¹H [500 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 6,9 (s, H-2 e H-3), 3,6 (d, 1,9 Hz, H-6), 4,85 (dd, 1,9 e 9,3 Hz, H-7), 5,4 (t, 7Hz, H-16) 4,2 (dd, 3,4 e 12,7 Hz, H-22), RMN ¹³C [125 MHz, (ppm), CDCl₃]: 202,5 (C-1), 138,7 (C-2), 141,8 (C-3), 193,3 (C-4), 64,8 (C-5), 63,9

(C-6), 74,2 (C-7), 33,6 (C-8), 43,3 (C-9), 48,8 (C-10), 22,3 (C-11), 39,8 (C-12), 42,8 (C-13), 55,5 (C-14), 24,0 (C-15), 75,0 (C-16), 53,9 (C-17), 13,5 (C-18), 19,2 (C-19), 75,0 (C-20), 20,6 (C-21), 81,1 (C-22), 31,5 (C-23), 148,0 (C-24), 122,5 (C-25), 167,2 (C-26), 12,5 (C-27), 21,0 (C-28), 170,1 (7-OAc- C=O), 21,0 (7-OAc- CH₃), 171,4 (16- OAc- C=O), 21,2 (16-OAc- CH₃).

Hidrogenação de 2

O processo consiste da passagem de H₂ (g) gerado através de reação de alumínio metálico com solução aquosa de NaOH a 5%, na mistura contendo 50 mg de **2** dissolvido em 10 mL de acetato de etila e o catalisador Pd/C à temperatura ambiente. Após 90 min de reação procedeu-se à evaporação do solvente, seguida da purificação por CCDP, eluindo-se 3 vezes uma mistura de acetato/tolueno (8:2), e obtendo-se por métodos usuais de separação 30 mg de **2c**, com 60% de rendimento.

7β-acetoxi-4β,20R-di-hidroxi-5β,6β-epoxi-1-oxo-vita-24-enolido (**2c**). Cristais incolores, opacos e inodoros. P.F.= 140-143 °C. λ max cm⁻¹: 3430, 1720, 1712, 1686. EIMS (intensidade relativa): 530 (M⁺, não detectado), 405 [M-125]⁺ (45), 387[M-125-H₂O]⁺ (12), 169[C₉H₁₃O₃]⁺ (20), 126[C₇H₁₀O₂]⁺ (100). RMN ¹H [500 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 3,5 (t, 3,5, H-4), 3,3 (d, 1,7 Hz, H-6), 4,9 (dd, 1,7 e 8,3 Hz, H-7), 4,2 (dd, 3,4 e 12,7 Hz, H-22), RMN ¹³C [125 MHz, (ppm), CDCl₃]: 210,0 (C-1), 31,8 (C-2), 26,5 (C-3), 72,5 (C-4), 70,0 (C-5), 57,00 (C-6), 75,8 (C-7), 34,2 (C-8), 43,0 (C-9), 49,8 (C-10), 22,8 (C-11), 39,8 (C-12), 43,5 (C-13), 52,0 (C-14), 25,0 (C-15), 31,0 (C-16), 54,0 (C-17), 15,3 (C-18), 13,5 (C-19), 76,0 (C-20), 20,8 (C-21), 81,0 (C-22), 31,8 (C-23), 148,0 (C-24), 122,0 (C-25), 167,0 (C-26), 12,4 (C-27), 20,7 (C-28), 170,1 (7-OAc- C=O), 21,0 (7-OAc- CH₃).

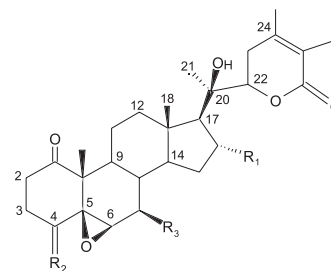
Avaliação do potencial citotóxico

Os derivados obtidos (Figura 2) foram avaliados na Universidade de Illinois em Chicago, de acordo com procedimentos padrões contra BC-1 (câncer de mama), Lu1 (câncer de pulmão), Col2 (câncer de cólon), KB (carcinoma epidermoidal oral) e LNCaP (câncer de próstata).¹⁹ Os resultados dos testes biológicos foram apresentados como ED₅₀ em µg/mL, Tabela 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de extração das substâncias das folhas de *Acnistus arborescens* foi o da extração sucessiva a frio com etanol, seguida de partição com solventes em ordem crescente de polaridade; a partir do extrato de acetato de etila foram isolados, através de técnicas cromatográficas, os vitanolidos **2** e **3**. Os vitanolidos foram identificados com base nos dados espectrais e por comparação com os dados de RMN já descritos na literatura.⁹ A partir do isolamento destas duas substâncias foram feitas reações para obtenção de derivados em reações de acetilação, oxidação e hidrogenação catalítica (Figura 2).

Em todos os derivados obtidos observou-se por EIMS o pico base *m/z* 126 (C₇H₁₀O₂) formado pela quebra da ligação C-20/C-22 com rearranjo de um H, indicando a presença de porção δ-lactona α,β insaturada; outro fragmento significativo nos derivados foi em *m/z* 169 (C₉H₁₃O₃) referente à clivagem da ligação C-17/C-20 que ocorre nos 20-hidroxi-vitanolidos. Nos espectros de IV dos derivados foram observadas similaridades com os precursores, com absorções em torno de 3450, 1720, 1710 e 1680 cm⁻¹ característicos de grupos carbonila de grupo acetoxi, lactona insaturada e cetona α,β insaturada, respectivamente.⁵ A acetilação de **2** e **3** foi feita utilizando-se anidrido acético e piridina à temperatura ambiente, levando aos derivados **2a** e **3a**. As reações foram acompanhadas por



- 2** - Δ², R₁ = H, R₂ = β-OH, α-H, R₃ = OAc
3 - Δ², R₁ = OAc, R₂ = β-OH, α-H, R₃ = OAc
4 - Δ², R₁ = OAc, R₂ = H₂, R₃ = OAc
5 - Δ², R₁ = H, R₂ = β-OH, α-H, R₃ = H
2a - Δ², R₁ = H, R₂ = β-OAc, α-H, R₃ = OAc
2b - Δ², R₁ = H, R₂ = O, R₃ = OAc
2c - R₁ = H, R₂ = β-OH, α-H, R₃ = OAc
3a - Δ², R₁ = OAc, R₂ = OAc, R₃ = OAc
3b - Δ², R₁ = OAc, R₂ = O, R₃ = OAc

Figura 2. Estruturas de **2**, **3**, **4**, vitanolido D (**5**) e dos derivados **2a**, **2b**, **2c**, **3a** e **3b**

Tabela 1. Atividade citotóxica dos compostos **2** e **3** e derivados **2a-2c**, **3a** e **3b**

Compostos	Cultura de células ^a				
	BC-1	Lu1	Col2	KB	LNCaP
2	0,2	1,3	0,03	0,4	0,2
3	0,4	2,1	0,08	0,5	0,2
2a	1,1	0,19	0,2	nt	nt
2b	nt ^c	7,9	1,1	0,8	1,9
2c	nt	0,63	3,7	10,6	13,1
3a	3	0,25	0,3	nt	nt
3b	nt	5	2	1,7	0,9
Taxol ^b	nt	0,002	0,004	0,0004	0,004
Camptotecina ^b	nt	0,01	0,02	0,008	0,01

^a Os resultados são expressos como valores de ED₅₀ (µg/mL). Código para as culturas de células testadas: BC-1 = câncer de mama humano; Lu1 = câncer de pulmão humano; Col2 = câncer de cólon humano; KB = carcinoma oral epidermoide humano; LNCaP = câncer de próstata hormônio-dependente humano. ^b Compostos antitumorais padrão.^{21,22} ^c nt= não testado

cromatografia em camada delgada (CCD) observando-se a formação dos produtos após 3 h de reação. Os compostos obtidos foram analisados por espectrometria de massas, RMN ¹H, COSY ¹H-¹H, RMN de ¹³C, DEPT e IV. A análise do espectro de massas de **2a** mostrou como picos importantes a *m/z* 126, 169, 401 (M-125-HOAc)⁺ e 461 (M-125)⁺ (Figura 3). No composto **3a**, o fragmento a *m/z* 519 (M-125)⁺, com 58 unidades a mais que o fragmento encontrado em **2a**, mostra a presença de grupo acetoxila adicional em **3a**.

O espectro de RMN ¹H de **2a** mostrou semelhança em relação ao espectro de RMN ¹H de **2**,⁵ a exceção do deslocamento do H-4 que passa de δ 3,8 em **2** para δ 4,65 em **2a**, desproteção esta causada pela mudança de hidroxila para um grupo acetato. No espectro de RMN ¹H de **3a** o H-4 aparece a δ 4,7 com uma desproteção de 0,9 ppm em relação ao H-4 em **3**.⁵ As correlações dos hidrogênios tanto em **2a** como em **3a** puderam ser confirmadas através de análise dos espectros COSY ¹H-¹H, e são destacadas na Figura 4.

Através de RMN ¹³C foi observado em **2a** que o grupo C-4 acetoxi causa um efeito de proteção de 1,6 ppm no grupo metila em C-19 a δ 15,5, quando comparado seu espectro com o de **2**.⁵ Esta proteção pode

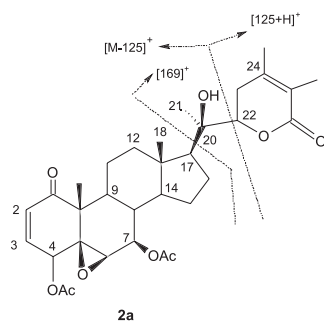


Figura 3. Fragmentação por espectrometria de massas de **2a**

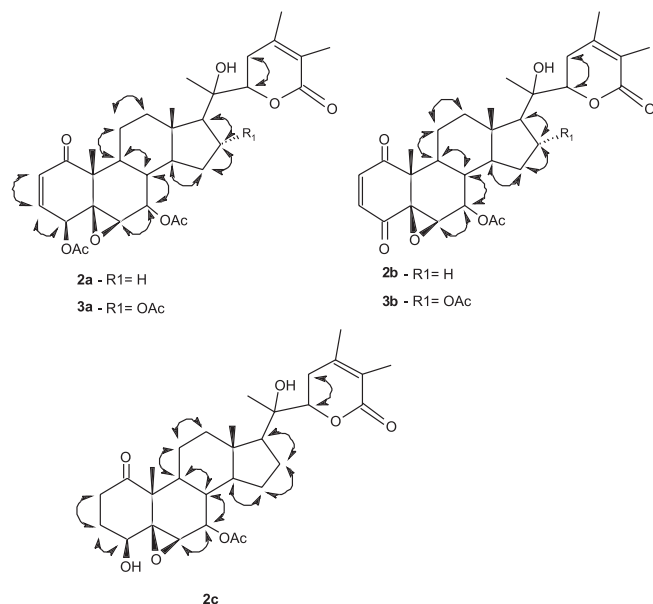


Figura 4. Correlações COSY ^1H - ^1H observadas para **2a**, **2b**, **2c**, **3a** e **3b**

ser explicada pela interação 1,3 diaxial entre C-4 acetoxi e o grupo metila em C-19. O deslocamento químico do C-4 (grupo acetoxi) em **2a** está mais desprotegido (1,7 ppm), quando comparado com o carbono correspondente ao seu precursor **2**, devido à mudança da função de hidroxila para acetoxila, este grupo CH a 71 ppm pode ser observado no DEPT de **2a**; aspectos semelhantes foram observados no espectro de **3a**. Nos espectros DEPT e RMN ^{13}C de **2a** e **3a** foram observadas adições de dois carbonos referentes à carbonila (169 e 170 ppm) e metila (20,6 e 21 ppm), respectivamente. As reações de oxidação de **2** e **3** foram feitas utilizando-se óxido de manganês ativado como agente oxidante.¹⁶ A confirmação das estruturas de **2a** e **3a** foi feita por espectrometria de massas, RMN ^1H , COSY ^1H - ^1H , RMN de ^{13}C , DEPT e IV. Na análise de RMN ^1H de **2b** e **3b**, em comparação com **2** e **3**, observam-se os desaparecimentos dos sinais dos hidrogênios vinílicos (H-2 em 6,2 ppm (d) e H-3 em 6,9 ppm (dd)), e o aparecimento de singlete a 6,85 ppm correspondente a 2H vinílicos (H-2 e H-3) para **2b** e um singlete em 6,9 ppm para **3b** correspondendo a 2H vinílicos (H-2 e H-3). Comparando-se a estrutura de **2b** com **2**, nota-se por RMN ^{13}C a presença de um sinal adicional a 193,2 ppm (C-4) com deslocamento típico de carbonila, o que confirma a oxidação do grupo OH em C-4, outro dado é a ausência de deslocamento correspondente à hidroxila secundária C-4 que se dá em δ 69,2 para **2**. A presença da carbonila no C-4 em **2b** libera a compressão estérica no grupo metila, já que agora existe um sistema π conjugado planar entre C-1 e C-4 causando um efeito de proteção de 2 ppm na metila C-19; aspectos semelhantes foram observados em **3b**.

Os espectros de COSY ^1H - ^1H de **2b** e **3b** apresentaram grande semelhança com seus precursores **2** e **3**, a exceção dos 3H (H-2, H-3 e H-4) no anel A, que não estão correlacionados em **2b** e **3b** (Figura 4). No espectro de DEPT de **2b** foi observada a presença de 9 grupos CH, sendo dois deles vinílicos (139 e 142 ppm), 5 grupos CH_2 e 6 grupos CH_3 ; notou-se também o desaparecimento do sinal correspondente ao grupo CH a 69 ppm presente em **2**, e que foi transformado em uma carbonila em C-4 no composto **2b**; mudança semelhante ocorreu em **3b**.

O vitanolido **2c** foi obtido através de reação de hidrogenação, tendo como catalisador de reação Pd/C. As análises para identificação de **2c** foram feitas através de técnicas de RMN de ^{13}C e ^1H e espectrometria de massas. Inicialmente, observou-se que o espectro de massas de **2c** apresentou íons importantes a m/z 405(M-125) $^+$ e m/z 387 (M-125-H $_2\text{O}$) $^+$, auxiliando na confirmação estrutural da substância. A análise dos espectros de RMN ^1H e COSY ^1H - ^1H de **2c** (Figura 4) mostrou como diferenças principais em relação ao espectro de **2**: o desaparecimento de dois sinais de H-vinílicos a 6,2 e 6,8 ppm, o H-4 que em **2** aparecia como um dubleto a 3,8 ppm, apareceu como um tripleto a 3,5 ppm, correspondendo a um hidrogênio vizinho a um grupo metilênico a 2,1 ppm, o deslocamento do ^1H foi semelhante a dados da literatura com vitanolido apresentando a mesma composição anel A. No DEPT de **2c** percebe-se claramente o desaparecimento dos carbonos vinílicos (CH) a 132,0 e 142,0 ppm. Comparando-se o espectro de RMN ^{13}C de **2c** com **2** nota-se a presença de cinco sinais na região entre 122 e 210 ppm, e não sete como em **2**, devido ao desaparecimento de dois grupos CH vinílicos após a redução da dupla ligação C2-C3.

Os derivados obtidos visam levar a um aumento da atividade citotóxica em relação aos seus precursores **2** e **3**, que já haviam sido testados anteriormente contra vários tipos de células cancerosas.⁵ A diminuição da atividade biológica pode ser um indicativo da importância de determinada porção da molécula, orientando transformações posteriores. A atividade citotóxica dos derivados foi avaliada contra um grupo de células cancerosas humanas. De acordo com protocolo estabelecido pelo *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos,²⁰ valores de ED₅₀ maiores que 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ são considerados inativos contra células cancerosas; para uma análise em relação à potencial droga anticâncer são apresentados, na Tabela 1, os valores de ED₅₀ para agentes antitumorais Taxol e Camptotecina, utilizados terapeuticamente.^{21,22} Os derivados com valores de ED₅₀ no intervalo de 0,1-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram considerados fortemente ativos contra células cancerosas (Tabela 1). Os resultados mais significativos foram obtidos em células de câncer de pulmão, com os derivados **2c** e **3a** com ED₅₀ de 0,63 e 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, com valores próximos ao da Camptotecina (ED₅₀ = 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Comparando-se a atividade biológica de **2** com o derivado **2a** acetilado no C-4, percebe-se que a atividade diminui nos cânceres de mama e cólon, mas aumenta 7 vezes nas células de câncer de pulmão; comportamento semelhante foi observado quando se comparou o derivado **3a** com seu precursor **3**. Com relação aos derivados **2b** e **2c**, os resultados apresentados mostram que **2c** melhorou em 2 vezes a atividade para câncer de pulmão, mas a atividade caiu nos outros tipos de células. Os derivados **2b** e **3b**, que têm a incorporação de uma carbonila, não apresentaram nenhum aumento na atividade nas células testadas, entretanto percebe-se, tanto para **2b** como para **3b**, um decréscimo na atividade menos significativo para as células de câncer epidermoide bucal, o que mostra maior seletividade da substância neste grupo de células, podendo orientar transformações em outros centros da molécula.

A respeito dos resultados pudemos observar, para os derivados **2a** e **3a**, que a introdução de um grupo mais volumoso como o grupo acetato, com desaparecimento da hidroxila, que pode formar ligação

de hidrogênio, favoreceu a melhora na atividade biológica em células de câncer de pulmão. Nos derivados **2b** e **3b** a mudança da geometria tetraédrica em C-4 para trigonal plana levou a uma diminuição significativa de atividade em relação a células cancerosas de pulmão, mostrando a importância da realização de modificações estruturais em substâncias naturais.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os espectros de RMN ¹H, COSY, RMN ¹³C e DEPT de **2**, **3**, **2a**, **2b**, **2c**, **3a** e **3b** estão disponíveis, com acesso livre, na forma de arquivo PDF, em <http://quimicanova.s bq.org.br>.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsa e recursos financeiros. À *University of Illinois* em Chicago pela realização dos testes biológicos.

REFERÊNCIAS

1. Braz-Filho, R.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 229.
2. Lavie, D.; Yarden, A.; *J. Chem. Soc.* **1962**, 2925; Lavie, D.; Greenfield, S.; Glotter, E.; *J. Chem. Soc.* **1966**, 1753; Glotter, E.; *Nat. Prod. Rep.* **1991**, *8*, 415.
3. Kupchan, S. M.; Anderson, W. K.; Bollinger, P.; Doskotch, R. W.; Smith, R. M.; Renauld, J. A. S.; Schnoes, H. K.; Burlingame, A. L.; Smith, D. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5805.
4. Barata, L. E. S.; Mors, W. B.; Kirson, I.; Lavie, D.; *An. Acad. Bras. Cienc.* **1970**, *42*, 401.
5. Minguzzi, S.; Barata, L. E. S.; Shin, G. S.; Chai, H. B.; Park, E. J.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A.; *Phytochemistry* **2002**, *59*, 635.
6. Veras, M. L.; Bezerra, M. Z. B.; Lemos, T. L. G.; Uchoa, D. E. A.; Braz-Filho, R.; Chai, H. B.; Cordell, G. A.; Pessoa, O. D. L.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 710.
7. Veras, M. L.; Bezerra, M. Z. B.; Braz-Filho, R.; Pessoa, O. D. L.; Montenegro, R. C.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Lotufo, L. V. C.; *Planta Med.* **2004**, *67*, 710.
8. Cordero, C. P.; Morantes, S. J.; Paez, A.; Rincón, J.; Aristizábal, F. A.; *Fitoterapia* **2009**, *80*, 364.
9. Manickam, M.; Awasthi, S. B.; Sinha-Bagchi, A.; Sinhá, S. C.; Ray, A. B.; *Phytochemistry* **1996**, *41*, 981; Manickam, M.; Srivastava, A.; Ray, A. B.; *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1427; Bratati, D.; *Fitoterapia* **2003**, *74*, 14; Bhat, B. A.; Dhar, K. L.; Puri, S. C.; Qurishi, M. A.; Khajuria, A.; Gupta, A.; Qazi, G. N.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6672.
10. Nicotra, V. E.; Gil, R. R.; Vaccarini, C. E.; Oberti, J. C.; Burton, G.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1471; Nicotra, V. E.; Ramacciotti, N. S.; Gil, R. R.; Oberti, J. C.; Feresin, G. E.; Guerrero, C. A.; Baggio, R. F.; Garland, M. T.; Burton, G.; *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 783; Nicotra, V. E.; Gil, R. R.; Oberti, J. C.; Burton, G.; *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 808.
11. Maldonado, E.; Torres, F. R.; Martínez, M.; Pérez-Castorena, A. L.; *Planta Med.* **2004**, *70*, 59; Lan, Y. H.; Chang, F. R.; Pan, M. J.; Wu, C. C.; Wu, S. J.; Chen, S. L.; Wang, S. S.; Wu, M. J.; Wu, Y. C.; *Food Chem.* **2009**, *116*, 462; Maldonado, E.; Amador, S.; Martínez, M.; Pérez-Castorena, A. L.; *Steroids* **2010**, *75*, 346.
12. Choudhary, M. I.; Shahwar, D.; Parveen, Z.; Jabbar, A.; Ali, I.; Rahman, A. U.; *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1243.
13. Benjumea, D.; Herrera, M.; Abdala, S.; Gutiérrez-Luis, J.; Quiñones, W.; Cardona, D.; Torres, F.; Echeverri, F.; *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *123*, 351.
14. Misico, R. I.; Song, L. L.; Veleiro, A. S.; Cirigliano, A. M.; Tettamanzi, M. C.; Burton, G.; Bonetto, G. M.; Nicotra, V. E.; Silva, G. L.; Gil, R. R.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M.; *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 677.
15. Huang, C. F.; Ma, L.; Sun, L. J.; Ali, M.; Arfan, M.; Liu, J. W.; Hu, L. H.; *Chem. Biodivers.* **2009**, *6*, 1415.
16. Pomilio, A. B.; Falzoni, E. M.; Vitale, A. A.; *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 593.
17. Silva, T. M. S.; Camara, C. A.; Freire, K. R. L.; Silva, T. G.; Agra, M. F.; Bhattacharyya, J.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 1048.
18. Counsell, R. E.; Klimstra, P. D.; Colton, F. B.; *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 248.
19. Likhitwitayawuid, K.; Angerhofer, C. K.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 30.
20. Ito, A.; Chai, H. B.; Shin, Y. G.; Mej, R. M.; Gao, Q.; Fairchild, C. R.; Lane, K. E.; Menendez, A. T.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, D.; *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6401.
21. Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.-S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. M.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Hieken, T. J.; Das Gupta, T. K.; Pezzuto, J. M.; *Nature* **1995**, *1*, 1046.
22. Hwang, B. Y.; Chai, H.; Kardono, L. B. S.; Riswan, S.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D.; *Phytochemistry* **2003**, *62*, 197.