



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

POTENCIAL ANTITUMORAL DE FLAVONÓIDES ISOLADOS
DE PLANTAS DO NORDESTE BRASILEIRO: ESTUDOS
PRELIMINARES DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE
CITOTÓXICA

GARDENIA CARMEN GADELHA MILITÃO

Fortaleza - CE
2005

rá

Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE FLAVONÓIDES ISOLADOS DE PLANTAS
DO NORDESTE BRASILEIRO: ESTUDOS PRELIMINARES DA RELAÇÃO
ESTRUTURA-ATIVIDADE CITOTÓXICA**

Gardênia Carmen Gadelha Militão

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Leticia Veras Costa Lotufo

Fortaleza - CE

Janeiro, 2005

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE FLAVONÓIDES ISOLADOS DE PLANTAS
DO NORDESTE BRASILEIRO: ESTUDOS PRELIMINARES DA RELAÇÃO
ESTRUTURATIVIDADE CITOTÓXICA**

Gardênia Carmen Gadelha Militão

Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Aprovada em 14 de Janeiro de 2005.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Letícia Veras Costa Lotufo
Universidade Federal do Ceará
- Orientadora -

Prof Dr. Edilberto Rocha Silveira
Universidade Federal do Ceará

Prof^a Dr^a Cláudia do Ó Pessoa
Universidade Federal do Ceará

À minha mãe pelo exemplo de coragem.

Ao meu pai por sempre acreditar em mim.

À Dra. Leticia Lotufo pela ajuda durante esse período que foi tão curto.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Letícia Veras Costa Lotufo pela orientação deste trabalho, pela ajuda, incentivo e pela amizade;

Ao Dr. Edilberto Rocha Silveira, pela colaboração neste trabalho e pela amizade;

À Dra. Mary Anne Sousa Lima pela colaboração neste trabalho através do isolamento de alguns dos compostos testados;

À Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa pela colaboração neste trabalho;

À Dra. Claudia do Ó Pessoa, por todas as dúvidas esclarecidas no desenvolver da pesquisa;

Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes pela contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental;

À Profa. Ana Paula Negreiros, pelos esclarecimentos sobre patologia;

À Dra. Gilvandete Pinheiro Santiago pela orientação na iniciação científica e pela amizade;

Ao Dr. Rui Curi que me recebeu muito bem no Laboratório na USP e me deu condição de fazer vários experimentos que contribuíram para esta dissertação;

À Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes, coordenadora da Unidade de Farmacologia Clínica, pela colaboração.

À Tais que me ajudou em todos os experimentos em São Paulo;

Ao Sávio por ter isolado alguns dos compostos testados e por ter atendido todos os meus telefonemas com paciência;

À amiga Ivana que me ajudou nos experimentos, na viagem a São Paulo e nas *baladinhas*;

Às amigas Sâmia, Érika e Jane para que nosso grupinho da graduação não seja esquecido e à Fernanda que me ajudou bastante no mestrado;

À amiga Tatiana por todas as brincadeiras de criança, conversas de adolescente e agora de adulto;

À amiga Alessandra que apesar do pouco tempo no laboratório também ajudou em alguns experimentos;

Aos pós-graduandos do LOE: Bruno, Daniel, Hélio, Hemerson, Marne, Márcio, Paula, Patrícia, Raimundo e Raquel pela ajuda todos os dias e pela amizade;

Aos alunos da graduação que participam das atividades do LOE: Juliana, Marcelle, Clarissa, Ana Raquel, Hidelbrando, Lícia, Sabrina, Ryuga, Sâmia, Michele e Diego pela amizade;

Aos colegas Adriano e Márcia pela colaboração e sugestões diárias;

Aos técnicos Silvana, cuja dedicação é essencial para o laboratório, Fátima e David pela ajuda;

Aos meus pais, que se dedicaram para dar oportunidades aos filhos, e juntamente com meu irmão formam minha família;

Às tias Elodia, Marta e Vera pelo apoio desde o colégio e os primos Rachel, Rafael e Tânia pelo incentivo;

Às funcionárias do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Sílvia, Áurea e Rose, que tentam resolver ou indicar o melhor caminho para os problemas do dia a dia.

Ao CNPq e CAPES pelo financiamento da pesquisa.

ÍNDICE

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xv
INTRODUÇÃO	1
1. Produtos naturais	1
2. A importância da relação estrutura-atividade	4
3. Flavonóides	9
OBJETIVOS	19
1. Geral	19
2. Específicos	19
MATERIAIS E MÉTODOS	20
1. Materiais Utilizados	20
1.1. Equipamentos	20
1.2. Soluções	21
1.3. Reagentes	24
1.4. Fármacos	24
1.5. Modelos Biológicos Experimentais	24
2. Metodologia Experimental	25
2.1. Extração e isolamento dos flavonóides.....	25
2.1.1. Isolamento das flavonas de <i>Alibertia myrciifolia</i>	30
2.1.2. Isolamento das flavonas de <i>Eupatorium ballotaefolium</i> ...	31
2.1.3. Isolamento da quercetina de <i>Lippia sidoides</i>	31
2.1.4. Isolamento dos pterocarpanos de <i>Platymiscium floribundum</i>	32
2.1.5. Isolamento do pterocarpano faseolidina de <i>Erythrina velutina</i>	33
2.1.6. Isolamento dos pterocarpanos de <i>Harpalyce brasiliiana</i>	34
2.2. Estudo da atividade citotóxica dos flavonóides.....	35

2.2.1. Avaliação da atividade antimetabólica nos ovos do ouriço-do-mar.....	35
2.2.1.2 Análise dos dados	37
2.2.2 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais <i>in vitro</i>	37
2.2.2.1 Análise dos dados	38
2.3 Estudo do mecanismo de ação	38
2.3.1 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán	38
2.3.1.2 Análise dos dados	39
2.3.2 Análise morfológica – Coloração por Hematoxilina/eosina	39
2.3.2.1. Análise dos Dados	39
2.3.3 Inibição da síntese de DNA – BrDU.....	40
2.3.3.1. Análise dos Dados	40
2.3.4 Indução de apoptose	41
2.3.4.1 Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo - viabilidade celular.....	41
2.3.4.2 Fragmentação do DNA por citometria de fluxo.....	42
2.3.4.3 Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria por citometria de fluxo.....	42
2.3.4.4. Análise dos Dados	43
RESULTADOS	44
1. Teste de atividade antimetabólica dos Ovos do Ouriço do Mar.....	44
2. Ensaio de atividade citotóxica em células de linhagens tumorais - teste do MTT.....	48
3. Análise dos efeitos celulares em HL-60.....	50
3.1 Ensaio de determinação da viabilidade celular por exclusão do azul de Tripán.....	50
3.2 Inibição da síntese do DNA - Incorporação do BrDU.....	53
3.3 Análise Morfológica – Coloração diferencial por H/E.....	55
3.4 Estudo sobre indução de apoptose.....	58
3.4.1. Estudo da integridade da membrana celular por citometria de fluxo....	58
3.4.2 Determinação da fragmentação do DNA por citometria de fluxo.....	61
3.4.3. Determinação do potencial transmembrânico por citometria de fluxo..	64

DISCUSSÃO	66
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas químicas do paclitaxel (1) e do docetaxel (2).....	5
Figura 2	Estruturas químicas da podofilotoxina (3), etoposido (4) e tenoposido (5)	6
Figura 3	Estruturas químicas da camptotecina (6), topotecan (7) e irinotecan (8)	7
Figura 4	Estruturas químicas da vincristina (9), vimblastina (10) e vinorelbina (11)	8
Figura 5	Núcleo fundamental dos flavonóides	10
Figura 6	Biossíntese das diferentes classes dos flavonóides (Tahara & Ibrahim, 1995)	10
Figura 7	Estrutura química dos flavonóides com atividade biológica	11
Figura 8	Núcleo fundamental dos pterocarpanos	15
Figura 9	Estrutura química dos pterocarpanos com atividade biológica	17
Figura 10	Fotos da plantas utilizadas nesse trabalho.	26
Figura 11	Estrutura química dos flavonóides utilizadas neste estudo	27
Figura 12	Estrutura química dos pterocarpanos utilizados neste estudo	28
Figura 13	Microfotografias das primeiras fases do desenvolvimento embrionário do ouriço <i>Lytechinus variegatus</i> .	36
Figura 14	Microfotografias mostrando o efeito de 2,3,9-trimetoxi-pterocarpano isolado de <i>Platymiscium floribundum</i> no desenvolvimento dos ovos do ouriço-do-mar.	47
Figura 15	Gráficos mostrando a viabilidade por azul de tripan.	52
Figura 16	Microfotografias das células HL-60 mostrando as características morfológicas das células por coloração com H/E.	56
Figura 17	Gráficos mostrando a integridade da membrana celular por	59

	citometria de fluxo.	
Figura 18	Histograma do desvio da luz (FSC x SSC) obtido por citometria de fluxo.	60
Figura 19	Gráfico mostrando a fragmentação do DNA avaliada por citometria de fluxo.	62
Figura 20	Histograma da fragmentação do DNA obtida por citometria de fluxo.	63
Figura 21	Gráficos mostrando a despolarização da mitocôndria por citometria de fluxo.	65

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1</u>	Relação das espécies de plantas estudadas, respectivas famílias e locais de coleta.	25
<u>Tabela 2</u>	Relação das espécies e compostos isolados	29
<u>Tabela 3</u>	Atividade antimitótica dos flavonóides sobre o desenvolvimento dos ovos do ouriço-do-mar.	46
<u>Tabela 4</u>	Atividade citotóxica de pterocarpanos em linhagens de células tumorais.	49
<u>Tabela 5</u>	Inibição da incorporação de BrdU pelas células HL-60 tratadas e não tratadas. 24h de incubação.	54
<u>Tabela 6</u>	Características morfológicas das células HL-60 tratadas e não tratadas com droga. Coloração por H/E. 24h de incubação	55

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
&	E
χ^2	Teste do qui-quadrado
μL	Microlitro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
[]	Concentração
<	Menor que
>	Maior que
AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Analisis of Variance (Análise de variância)
BrdU	Bromodeoxiuridina
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CO ₂	Dióxido de carbono (gás carbônico)
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
HEPES	Ácido hidroximetil piperazina etanossulfônico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
EtOH	Álcool etílico
G	Gramas
H	Hora
H/E	Hematoxilina/Eosina
H ₂ O	Água destilada
IC	Intervalo de confiança
L	Litro
M	Molar
MeOH	Álcool metílico
Mg	Miligrama
Min	Minuto

MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromido
nM	Nanomolar
n°	Número
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNM	Ressonância Magnética Nuclear
Rpm	Rotações por minuto
TBS	Tris buffer solution (Tampão tris)
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
X	Vezes

POTENCIAL ANTITUMORAL DE FLAVONÓIDES ISOLADOS DE PLANTAS DO NORDESTE BRASILEIRO: ESTUDOS PRELIMINARES DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE CITOTÓXICA Dissertação de Mestrado. Autor: Gardenia Carmen Gadelha Militão. Orientadora: Dra. Letícia Veras Costa Lotufo. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Aprovada em 14 de Janeiro de 2005.

RESUMO

Na busca por compostos obtidos de plantas com potencial antitumoral, dezoito flavonóides foram avaliados quanto a atividade citotóxica, seus resultados foram comparados a fim de compreender quais grupamentos conferem uma maior atividade da molécula. O grupo dos flavonóides foi dividido em flavonas e pterocarpanos. Inicialmente, a atividade citotóxica foi avaliada em células tumorais através do método do MTT e no desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço do mar. O grupo dos pterocarpanos foi mais ativo que as flavonas em ambos os ensaios utilizados. No grupo das flavonas algumas observações sobre a relação estrutura-atividade podem ser citadas: a) a hidroxila no lugar da metoxila em C4' e C5' melhora a atividade; b) a hidroxila e o açúcar em C3 diminui a atividade; c) A metoxila em C3 e em C7 aumenta a atividade. No grupo dos pterocarpanos a metoxila em C2 potencializa a atividade citotóxica. Como o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano apresentou os melhores resultados em ambos os ensaios, foram realizados ensaios para estudo do mecanismo de ação apenas dos pterocarpanos não prenilados, na tentativa de entender a influência dos grupos sobre a atividade. Todos os pterocarpanos testados reduziram a viabilidade celular por azul de tripan nas concentrações testadas, exceto o composto 3,10- dihidroxi-9-metoxipterocarpano na concentração de 12,5 µg/mL. Também inibiram a síntese de DNA e causaram alterações morfológicas nas células sugestivas de apoptose para o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano. Nos ensaios que avaliam a indução da apoptose o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano causou fragmentação do DNA, despolarização da mitocôndria e manutenção da integridade da membrana celular, achados característicos da apoptose. Já os outros compostos induziram, além de fragmentação do DNA, perda da integridade da membrana plasmática nas maiores

concentrações, indicando morte celular por necrose. Com base nesses resultados podemos concluir que o grupamento metoxila em C2 constitui uma importante unidade farmacofórica para os pterocarpanos, que apontam como um grupo com elevado potencial antitumoral.

ANTITUMOR POTENTIAL OF FLAVONOIDS DERIVED FROM NORTHEASTERN BRAZILIAN PLANTS: PRELIMINARY STUDIES ON STRUCTURE-CYTOTOXIC ACTIVITY RELATIONSHIP. Master's Dissertation.

Author: Gardenia Carmen Gadelha Militão. Advisor: Dra. Letícia Veras Costa Lotufo. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Approved on January 14th, 2005.

ABSTRACT

In searching for anticancer compounds derived from plant sources, 18 flavonoids were assayed for their cytotoxic potentials and the results were compared for structure-activity relationship purposes. The flavonoid group was subdivided in flavones and pterocarpanes. The cytotoxic activity was initially evaluated on tumor cell lines, through the MTT assay, and on sea urchin eggs development. The pterocarpanes showed a consistently higher activity on both assays. For the flavones, some structure-activity observations can be highlighted: a) a hydroxyl instead of a methoxyl group on C4 and C5 positions increases activity; b) a hydroxyl and a sugar on C3 position decreases activity and, by the data acquired, it can be emphasized that the methoxyl on C3 increases activity and c) the methoxyl on C7 position increases activity. The pterocarpanes, a methoxyl group on C2 position increases the cytotoxic activity. Since the 2,3,9- trimethoxypterocarpan showed the best results in both assays, mode of action studies were conducted for the non-prenylated pterocarpanes as an attempt to understand the influence of these groups over their bioactivity. All pterocarpanes tested reduced cell viability, as indicated by the trypan blue assay, except for the 3,10-dihydroxy-9-methoxypterocarpan at 12,5 µg/mL. They also inhibited DNA synthesis and 2,3,9-trimethoxypterocarpan induced morphological cell alterations, which could be suggestive of apoptosis. On the assays for induction of cellular apoptosis this same compound caused DNA fragmentation and mitochondria depolarization, therefore maintaining membrane integrity, typical apoptotic signs. The other compounds, besides DNA fragmentation, there was noticeable loss of membrane integrity on higher concentrations, an indicative cell death by necrosis. Based on these observations, it is conclusive that the methoxyl group on C2 position is an important

pharmacophoric unit for pterocarpanes, which emerge as a potential class of anticancer chemicals.

INTRODUÇÃO

1. Produtos naturais

A existência de compostos bioativos em plantas e outras fontes naturais é conhecida há milênios. Os índios da América do Sul, por exemplo, usavam o curare, uma mistura de alcalóides, encontrado em diversas plantas dessa região, na ponta das flechas para paralisar a presa (Rang *et al.*, 2001). O uso medicinal de produtos naturais também é bastante antigo, datando de, pelo menos, mil anos antes de Cristo, quando o uso de plantas para tratar o câncer já era citado no Papiro de Ebers (Kingston, 1996).

Analisando historicamente o número de medicamentos obtidos a partir de plantas, bem como a quantidade de prescrições efetuadas com esses medicamentos, pode-se perceber a importância dos produtos naturais na descoberta de drogas. Uma análise das prescrições dispensadas nos Estados Unidos de 1959 a 1980 mostrou que 25% das prescrições continham extratos de plantas ou princípios ativos derivados de plantas, e pelo menos 119 substâncias químicas, derivadas de 90 espécies de plantas podiam ser consideradas como importantes drogas usadas em um ou mais países (Cragg & Newman, 1999). Em 1990, o valor arrecadado com esses produtos foi de aproximadamente US\$ 15,5 bilhões de dólares (Pezzuto, 1997). Dos 25 medicamentos mais vendidos em 1991, metade eram produtos naturais ou derivados (Kingston, 1996) e dos 20 medicamentos mais receitados em 1996, mais de seis eram produtos naturais (Phillipson, 2001). Em 1999, nove dentre as vinte drogas mais vendidas eram derivadas ou desenvolvidas a partir dos produtos naturais, e o total anual de vendas foi superior a 16 bilhões de dólares (Harvey, 2000).

A importância dos produtos naturais é particularmente evidente nas áreas de câncer e doenças infecciosas, onde 60% e 75% das drogas, respectivamente, são de origem natural (Newman *et al.*, 2003). O paclitaxel (1, Taxol®), por exemplo, usado para o tratamento de câncer de ovário e mama, é o agente antineoplásico mais vendido, com arrecadação de mais de um bilhão e meio de dólares no ano de 2000 (Mann, 2002). Existem vários outros

exemplos de drogas obtidas de produtos naturais como a vincristina, vinblastina, etoposido, tenoposido e topotecan.

De aproximadamente 500 novas substâncias ativas aprovadas por autoridades regulatórias ao redor do mundo na década passada, perto da metade é de fontes naturais (Cragg *et al.* 1997). Ao analisar a taxa de aprovação das novas substâncias ativas nos anos 2000 e 2001, verifica-se que o campo dos produtos naturais produziu aproximadamente 50% de todas as pequenas moléculas, apesar dos esforços durante muitos anos da indústria farmacêutica no *screening* predominantemente de produtos da química combinatória. Vale ressaltar que muitas companhias farmacêuticas, particularmente nos Estados Unidos, descontinuaram seus programas de pesquisa com plantas durante o período de 1960-1985 (Kingston, 1996), alegando que a pesquisa com produtos naturais era lenta, cara e ineficiente, devido ao processo de isolamento e determinação estrutural ser difícil com resultados imprevisíveis, pois o composto isolado poderia já ser conhecido na literatura e, portanto, não podendo ser patenteado (Ortholand *et al.*, 2004). Sendo assim, a indústria optou pelo uso da química combinatória, em que os compostos sintéticos eram obtidos mais rapidamente do que os derivados de plantas. Utilizando esse caminho, grandes bibliotecas de peptídeos, oligonucleotídeos e pequenas moléculas orgânicas foram sintetizadas e avaliadas (Mans *et al.*, 2000). Entretanto, os resultados obtidos até agora não preencheram as expectativas, principalmente porque a maioria dos peptídeos e oligonucleotídeos não apresentaram propriedades farmacológicas, além da diversidade química dos pequenos compostos orgânicos ser muito menor do que se esperava (Mans *et al.*, 2000).

A diversidade estrutural é certamente outro ponto de extrema relevância na pesquisa de produtos naturais como protótipos de medicamentos. A natureza produz uma fonte de compostos com grande diversidade química. Essas substâncias são achadas em milhões de espécies de plantas, animais, organismos marinhos e microorganismos (Rocha *et al.*, 2001). A pressão evolutiva contribuiu para a diversidade estrutural, uma vez que a produção de substâncias bioativas aumenta o sucesso evolutivo das espécies (Firn & Jones, 2003) Além da diversidade estrutural, os produtos naturais também apresentam atividades biológicas altamente específicas baseadas em novos mecanismos de ação. Isso pode ser ilustrado pelos inibidores da hidroximetilglutamil-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase),

lovastatina, e os estabilizadores de microtúbulos, paclitaxel. Essas atividades não teriam sido descobertas sem os produtos naturais como moléculas protótipo (Kingston, 1996).

As propriedades dos produtos naturais favorecem a interação com os alvos biológicos. Eles tendem a ter uma composição molecular diferente, contendo pouco nitrogênio, halogênio e enxofre, mas são ricos em oxigênio, comparando com as moléculas da química combinatória (Ortholand *et al.*, 2004). Os grupos hidroxila desempenham um importante papel na interação ligante-receptor, já que para ocorrer a ligação da droga ao alvo é necessário uma série de forças atrativas, e esses grupos podem atuar tanto doando como recebendo hidrogênio nas ligações tipo ponte. Além disso, os compostos de origem natural apresentam mais sistemas de anéis e maior grau de insaturação resultando numa estrutura mais rígida, que confere à molécula maior força de ligação devido a uma menor perda entrópica. A rigidez também deve contribuir, em alguns casos, para a mudança na conformação do receptor, o que é importante para a função da droga como agonista ou antagonista (Feher & Schmidt, 2003).

Os produtos naturais apresentam uma grande quantidade de centros quirais. Os processos biológicos, nos quais reagentes estereoespecíficos são mais comuns, freqüentemente geram moléculas ativas com grande número de centros quirais. Em muitos casos, a presença desses centros contribui para a seletividade dessas moléculas para seus locais de ligação (Feher & Schmidt, 2003).

A utilização dos métodos de *screening* e o avanço das técnicas analíticas também contribuíram para a retomada na pesquisa em produtos naturais. Recentemente o desenvolvimento de sistemas de *screening* robotizados possibilitou processar 50.000 amostras por dia. Os teste têm como alvo enzimas específicas de rotas biossintéticas animais ou microbiológicas, receptores ou algum composto envolvido na transcrição dos genes (Phillipson, 2001). Características comuns desses testes são rapidez, quantificação, facilidade de realização e automação, além de serem relativamente mais baratos quando comparados aos testes em animais usados há poucas décadas. Esse tipo de ensaio, juntamente com os testes antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antiparasitas e citotóxicos *in vitro* tornaram possível o *screen* de um grande número de substâncias (Borris, 1996). Por causa disto, a capacidade de testar substâncias em muitas companhias é significativamente

maior do que suas próprias bibliotecas de compostos químicos, aumentando a atração por produtos naturais (Kingston, 1996).

Apesar do avanço tecnológico nos testes era também necessário o desenvolvimento de técnicas de isolamento e determinação estrutural mais eficientes. As dificuldades estão sendo resolvidas pelo uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC), para realizar o isolamento das substâncias e pelo uso de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massa para elucidar a estrutura química do composto (Kingston, 1996).

O produto natural não precisa ser necessariamente o melhor composto para o uso farmacêutico (Kingston, 1996). Esses compostos podem servir como protótipo para o *design* e desenvolvimento de uma segunda geração de agentes com características melhoradas, como o aumento da eficácia e da estabilidade, a melhora das propriedades farmacocinéticas e a diminuição dos efeitos colaterais (Ortholand *et al.*, 2004). A obtenção de análogos é um processo comumente utilizado para descobrir os grupamentos essenciais à atividade biológica, através do uso da relação entre a estrutura e atividade biológica.

2. A importância da relação estrutura-atividade

Vários exemplos de análogos dos antineoplásicos obtidos de plantas podem ser citados. O paclitaxel (**1**, Taxol®) foi primeiramente isolado da *Taxus brevifolia*, na década de sessenta como um agente citotóxico, sendo descoberto depois que atuava como um estabilizador de microtúbulos, impedindo a despolimerização dos microtúbulos e divisão celular (Kingston, 1996). Apesar das dificuldades de isolamento e formulação, bem como do baixo rendimento, em 1977 o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) investiu em larga escala nos testes pré-clínicos do taxol como um agente anticâncer. Vale ressaltar que para a realização destes primeiros testes clínicos, foram necessárias 4000 árvores que forneceram 360g de taxol (**1**) (Mann, 2002). Em 1992, o taxol (**1**) foi aprovado para o tratamento de câncer de ovário resistente a drogas e em 1994 foi aprovado para o tratamento do câncer de mama levando ao sacrifício de 38000 árvores (Kingston, 2000; Mann, 2002).

O fornecimento da droga só foi solucionado quando da descoberta de um precursor não citotóxico, 10-deacetilbaccatin III, extraído de folhas do teixo europeu, *Taxus Baccata*, uma fonte renovável, que poderia ser facilmente convertido ao taxol e a derivados mais potentes. Modificações na cadeia lateral ligada ao C13 do anel dos taxanos levou ao desenvolvimento de um análogo semi-sintético do taxol, o docetaxel (2) (Chabner *et al.*, 1996). A potência do docetaxel (2) é maior do que a do paclitaxel (1) (Korolkovas, 1998; Mann, 2002).

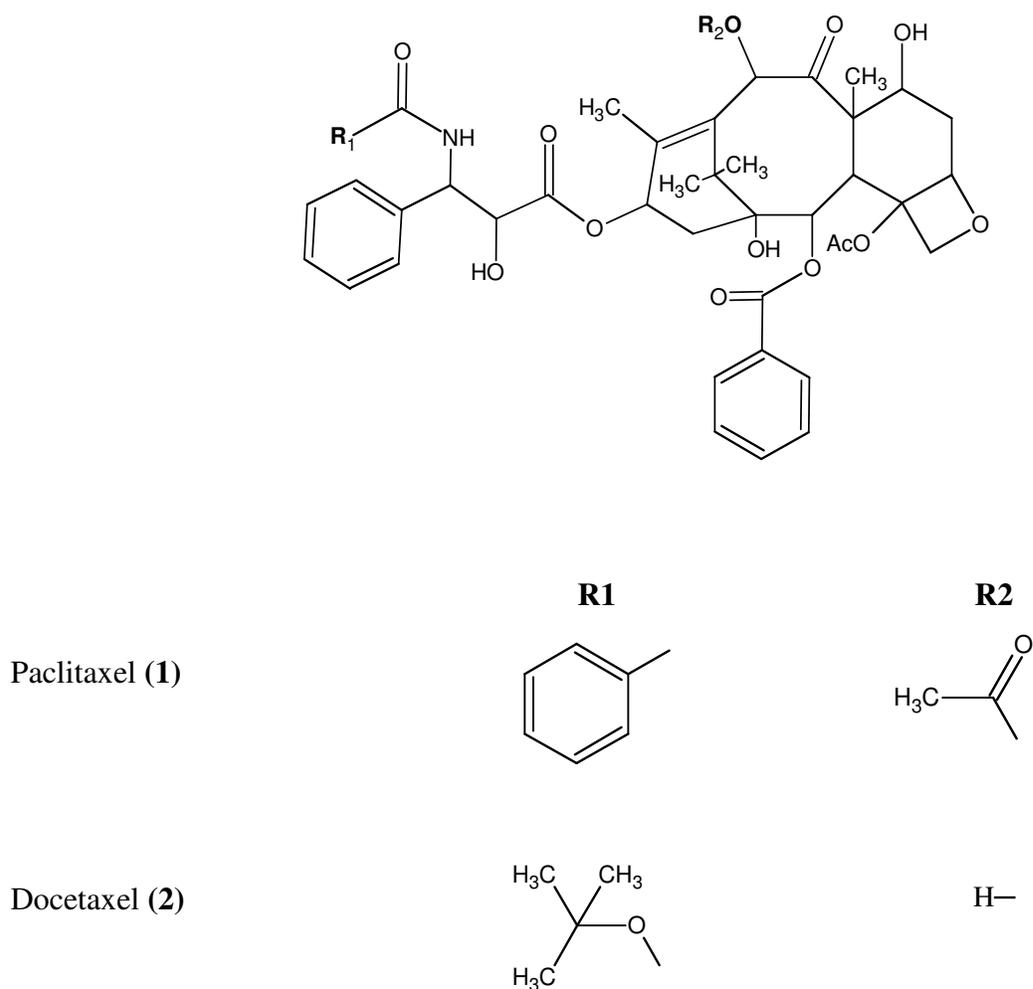


Figura 1 – Estruturas químicas do paclitaxel (1) e do docetaxel (2).

A podofilotoxina (**3**) é conhecida há muitos anos como o agente citotóxico encontrado no rizoma da planta *Podophyllum peltatum* (Korolkovas, 1998). De fato, os índios americanos já utilizavam o extrato das raízes de *P. peltatum* no tratamento do câncer de pele e verrugas (Mann, 2002). Análogos semi-sintéticos da podofilotoxina (**3**), o etoposido (**4**) e o tenoposido (**5**) foram obtidos através do estudo da relação estrutura-atividade. Esses compostos diferem somente pela presença do grupo metil (**4**) no lugar do grupo tenillidíno (**5**) no açúcar piranosídico (Bohlin & Rosen 1996). Esse grupo tem como mecanismo de ação a inibição da topoisomerase II.

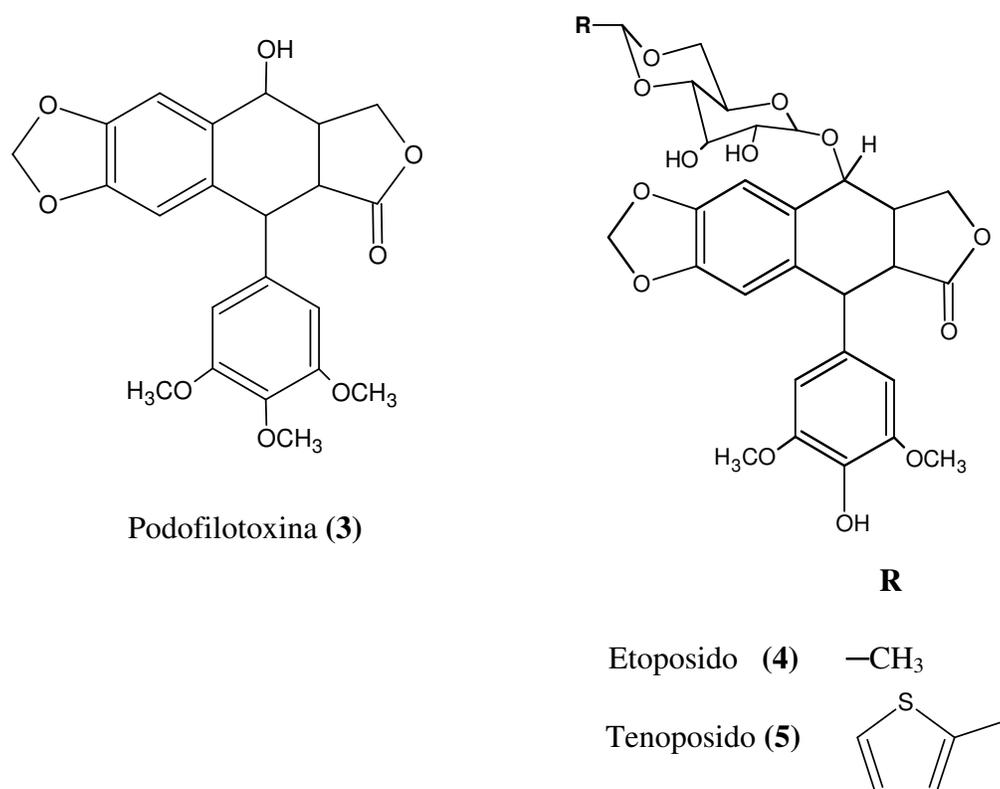


Figura 2 – Estruturas químicas da podofilotoxina (**3**), do etoposido (**4**) e do tenoposido (**5**).

A camptotecina (**6**) é um alcalóide pentacíclico presente na árvore chinesa *Camptotheca acuminata* que mostrou uma atividade impressionante contra leucemia e contra uma variedade de tumores sólidos. Apesar da camptotecina apresentar propriedades farmacocinéticas inadequadas devido sua reduzida solubilidade e de seus derivados na

forma de sal sódico terem sido retirados de estudos clínicos devido uma série de efeitos tóxicos, uma série de derivados foram aprovados para o uso clínico, como o topotecan (7) e o irinotecan (8), ou estão em estudos clínicos (Barreiro & Fraga, 2001). Esses compostos causam inibição da topoisomerase I.

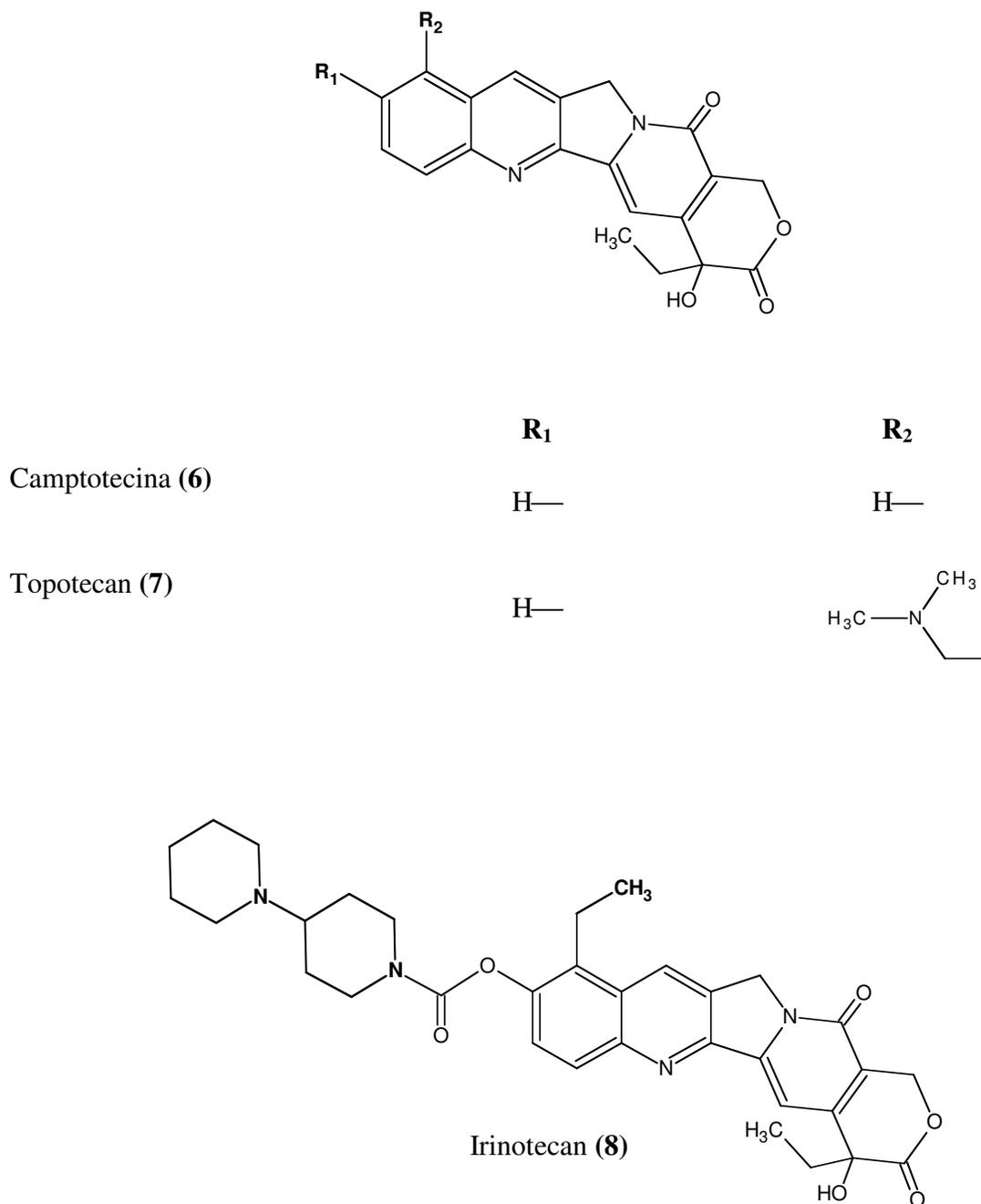


Figura 3- Estruturas químicas da camptotecina (6), do topotecan (7) e do irinotecan (8).

Os alcalóides da vinca, vincristina e vimblastina (**9** e **10**), são extraídos da planta *Catharanthus roseus*. Esses compostos atuam inibindo a polimerização de microtúbulos, bloqueando a formação do fuso mitótico, resultando na parada do processo de mitose na metáfase. Embora tenham estrutura química e mecanismo de ação semelhantes, apresentam diferente espectro de efeitos adversos (O'Marcaigh & Betcher, 1995). Essas características geraram interesse na pesquisa de novos análogos com o objetivo de identificar compostos mais ativos e com menor toxicidade exibindo um espectro de atividade citotóxica maior (Kruczynski & Hill, 2001).

A vinorelbina (**11**), um exemplo de derivado da vimblastina, é um composto semi-sintético com espectro de ação similar a vincristina e vimblastina que apresenta menor neurotoxicidade do que a vincristina (Reents, 1996). Os estudos da relação estrutura atividade dos alcalóides da vinca demonstraram que a remoção de alguns grupamentos acaba com a atividade biológica. A retirada do grupamento acetil no carbono C4 da vimblastina elimina a atividade antileucêmica, assim como a acetilação dos grupos hidroxila (Chabner *et al.*, 1996).

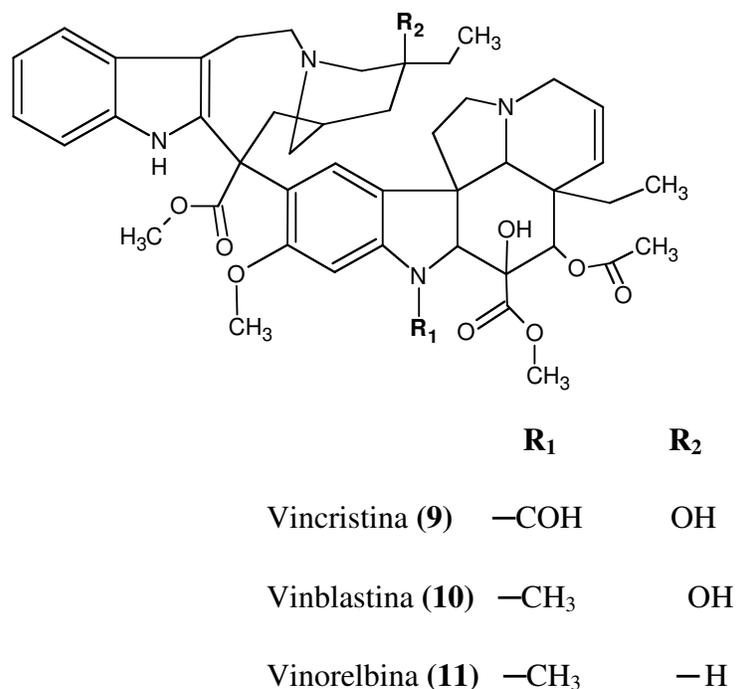


Figura 4 – Estruturas químicas da vincristina (**9**), da vimblastina (**10**) e da vinorelbina (**11**).

Várias drogas usadas na terapia anticâncer foram desenvolvidas a partir de produtos naturais obtidos de fontes microbianas e marinhas. Exemplos de drogas obtidas de microorganismos que já foram aprovadas para uso clínico são: actinomicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, mitomicina C e estreptozocina (Rocha *et al.*, 2001). Quanto aos organismos marinhos, cerca de 3000 novos compostos foram isolados dessa fonte e essas novas moléculas vêm demonstrando atividade citotóxica contra diversos tipos de tumores (Rinehart, 2000) A citarabina é um exemplo de composto aprovado como agente antineoplásico obtido de organismos marinhos.

Diante de tantos exemplos de drogas obtidas de produtos naturais, é válido continuar a busca por substâncias com atividade biológica tanto para servir como droga utilizada na terapêutica como uma possível ferramenta farmacológica no auxílio a pesquisa pré-clínica.

3. Flavonóides

Os flavonóides são um grupo diverso de produtos naturais produzidos por plantas que desempenham um importante papel no crescimento, desenvolvimento e defesa da planta contra microorganismos e pestes (Dixon & Steele, 1999). São achados em frutas, vegetais, sementes, ervas, condimentos, caule e flores, assim como em chás e vinho tinto (Middleton *et al.*, 2000). O núcleo fundamental (figura 5) dos flavonóides é composto de dois anéis benzênicos (A e B) ligados por um anel pirano ou pireno, quando esse possui uma ligação dupla (Middleton *et al.*, 2000). Modificações biossintéticas extensivas geraram diversas estruturas (figura 6) com múltiplas funções fisiológicas (Shimada *et al.*, 2000). A presença de uma enzima, a isoflavona sintase, por exemplo, encontrada em muitas plantas leguminosas, catalisa a migração do grupamento fenil ligado na posição 2 do pirano, que caracteriza a estrutura dos flavonóides, para a posição 3 do mesmo anel, formando uma nova classe de flavonóides, os isoflavonóides (Middleton *et al.*, 2000). Os flavonóides são freqüentemente hidroxilados na posição 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. As formas metiladas e aciladas dos grupos hidroxilas também ocorrem na natureza. Quando os glicosídeos são formados, a

ligação do grupo glicosídico está normalmente localizada na posição 3 ou 7 (Havsteen, 1983)

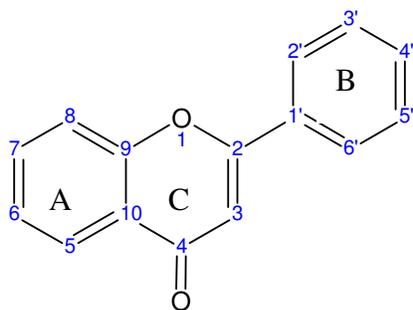


Figura 5 - Núcleo estrutural das flavonas.

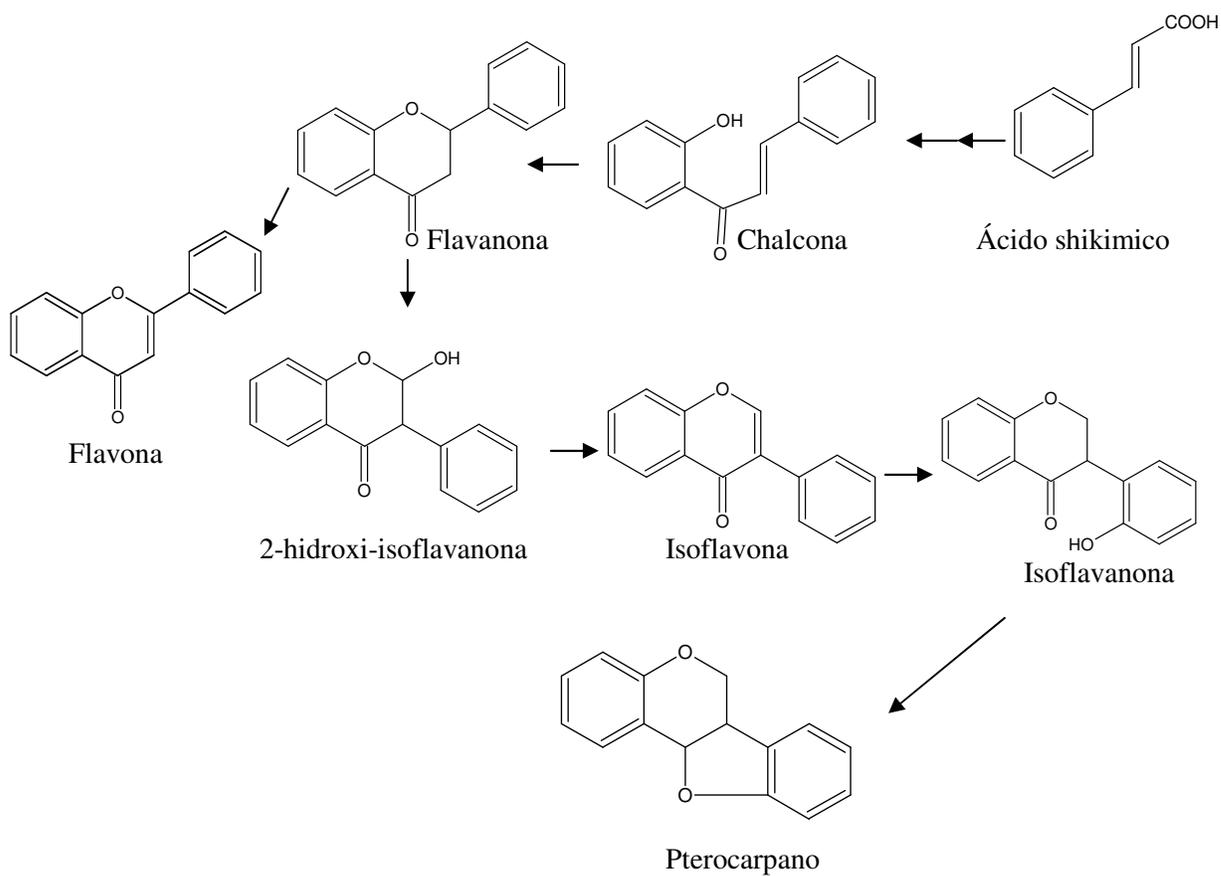
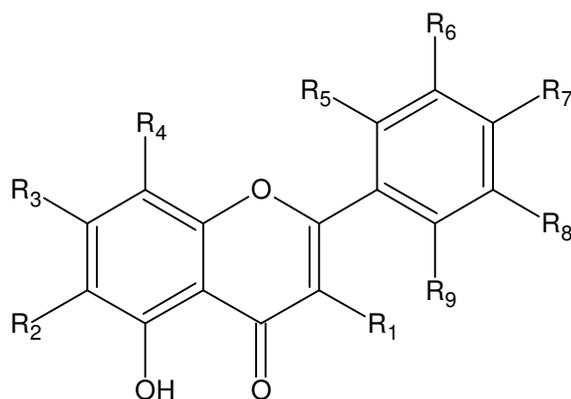


Figura 6 - Biossíntese de algumas classes de flavonóides e isoflavonóides (Tahara & Ibrahim, 1995)



- (12) $R_1 = R_3 = R_6 = R_7 = OH, R_2 = R_4 = R_5 = R_8 = R_9 = H$
- (13) $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_9 = H, R_3 = R_6 = R_7 = R_8 = OH$
- (14) $R_1 = R_7 = R_8 = OH, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = R_9 = H$
- (15) $R_3 = R_6 = R_7 = OH, R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_8 = R_9 = H$
- (16) $R_1 = R_4 = R_5 = R_8 = R_9 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = R_6 = R_7 = OH$
- (17) $R_1 = R_4 = R_5 = R_8 = R_9 = H, R_2 = R_6 = OCH_3, R_3 = R_7 = OH$
- (18) $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = R_8 = R_9 = H, R_3 = R_7 = OH$
- (19) $R_1 = R_2 = R_4 = R_7 = R_8 = R_9 = H, R_3 = R_5 = R_6 = OH$
- (20) $R_1 = R_2 = R_6 = R_7 = R_8 = H, R_3 = R_4 = OCH_3, R_5 = R_9 = OH$
- (21) $R_1 = R_2 = R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = R_9 = H, R_3 = OH, R_4 = OCH_3$
- (22) $R_1 = OCH_3, R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = R_8 = R_9 = H, R_3 = R_7 = OH$
- (23) $R_1 = R_3 = R_7 = OH, R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = R_8 = R_9 = H$
- (24) $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_8 = R_9 = H, R_3 = R_6 = OCH_3, R_7 = OH$
- (25) $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = R_8 = R_9 = H, R_3 = OH, R_7 = OCH_3$
- (26) $R_1 = R_2 = R_6 = R_7 = R_8 = R_9 = H, R_3 = OH, R_4 = (4\text{-}3\text{-hidroxi-1-metilpiperidil}), R_5 = Cl$

Figura 7 - Estrutura química dos flavonóides com atividade biológica.

Os flavonóides possuem importância farmacológica, resultando de propriedades atribuídas a alguns representantes da classe, como por exemplo: antioxidante, antiinflamatória, antiviral, antitumoral, entre outras (Simões *et al.*, 2003).

A atividade antioxidante dos flavonóides decorre de sua capacidade de reduzir a formação de radicais livres e neutralizar as espécies oxidantes. Muitos estudos foram feitos para estabelecer a relação entre a estrutura do flavonóide e sua atividade antioxidante. As características da estrutura dos flavonóides que conferem uma maior atividade antioxidante são: (a) a presença do grupo catecol no anel B, que tem uma maior capacidade doadora de elétrons; (b) a ligação dupla entre C2 e C3 conjugada com o grupamento 4-oxo; (c) a presença do grupo 3-OH no anel C. Com relação aos testes *in vivo*, tanto os flavonóides quanto seus metabólitos podem mostrar atividade (Pietta, 2000). A quercetina (**12**) (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona) e três flavonóides com estruturas semelhantes miricetina (**13**) (5,7,3',4',5'-pentahidroxi-flavona), fisetina (**14**) (3,5,4',5'-tetrahidroxi-flavona) e luteolina (**15**) (5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavona) mostraram atividade citoprotetora *in vitro* em modelos de apoptose induzida H₂O₂ em células PC12 (Dajas *et al.* 2003).

Os flavonóides podem exercer efeito antiinflamatório através da inibição das enzimas ciclooxigenase (COX) e/ou lipoxigenase. Os compostos 5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavona (**16**) e 5,7,4'-trihidroxi-6,3'-dimetoxiflavona (**17**) inibiram tanto a enzima ciclooxigenase quanto a lipoxigenase. Outros flavonóides simples com atividade antiinflamatória são a apigenina (**18**) (5,7,4'-trihidroxi-flavona) e a quercetina (**12**), sendo a apigenina (**18**) capaz de inibir o crescimento dos fibroblastos (Harbone & Williams, 2000).

A apigenina (**18**) também inibe a produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos em resposta a ativação por lipopolissacarídeos. Algumas características estruturais influenciam nessa atividade: a) o grupo 3-hidroxila diminuiu a atividade; b) a dupla ligação entre o carbono C2 e C3 aumenta a atividade; c) os flavonóides glicosilados são menos ativos que suas agliconas correspondentes; d) a presença do grupo 4'-hidroxila aumenta a atividade das flavonas e dos flavonóis; e) o grupo 5-OH tende a aumentar a atividade (Matsuda *et al.*, 2003).

A atividade citotóxica tem sido demonstrada em muitos trabalhos. Sonoda *et al.* (2004) testaram dezessete flavonóides em leucemia humana (HL60), dentre eles, dez inibiram a proliferação das células leucêmicas *in vitro*. O composto 2',3',5,7 – tetrahidroxi flavona (**19**) apresentou maior atividade (CI₅₀ de 9,5 µM) seguido por apigenina (**18**), viscidulina III (**20**) (5,2',6'-trihidroxi-7,8-dimetoxiflavona), wogonina (**21**) (5,7-dihidroxi-8-metoxiflavona) e luteolina (**15**). Gálvez *et al.* (2003) mostraram a atividade citotóxica da luteolina (**15**) também em melanoma com CI₅₀ de 10 µg/ml.

Dois flavonóides isolados da *Amburana cearensis*, o isocampferídeo (**22**) (3-metoxi-5,7,4'-trihidroxiflavona) e o caempferol (**23**) (3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona) apresentaram atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais com CI₅₀ variando de 2,6 a 5,5 µg/mL e 11,5 a 22,7 µg/mL, respectivamente. A única diferença na estrutura desses compostos é a presença da metoxila no carbono 3 do anel C, no lugar de uma hidroxila, demonstrando que a metoxila aumenta a atividade citotóxica (Banskota *et al.*, 2000, Costa-Lotufó *et al.*, 2003).

Blank *et al.* (2004) avaliaram a atividade antiproliferativa de vários flavonóides naturais e sintéticos *in vitro* contra carcinoma cervical humano. Os derivados mais potentes foram 2'-nitroflavona e 2',6-dinitroflavona ambos com IC₅₀ de aproximadamente 3 µM. O estudo da relação entre a estrutura e atividade nesse trabalho foi útil para definir quais grupos contribuam para melhorar a atividade citotóxica. A introdução dos átomos de flúor, cloro e bromo e dos grupos nitro e metil no C6 do núcleo das flavonas não modificou a atividade biológica, enquanto que as substituições em C3', C4' ou C3 pareceram mais favoráveis. A adição dos grupos nitro na posição 2' e/ou 2' e 6 aumentou a atividade citotóxica. A introdução de bromo em C3 diminuiu a atividade.

Em um ensaio da atividade citotóxica de 79 flavonas, seguida do estudo sobre a polimerização dos microtúbulos, Bleutler *et al.* (1996) mostraram que o composto com grupamento 3-metoxi foi o mais ativo com relação à atividade antiproliferativa e que esse grupo é essencial para a atividade inibitória da polimerização da tubulina, já que compostos com hidroxila e hidrogênio no carbono 3 não apresentaram efeito significativo sobre a polimerização da tubulina.

Velutina (**24**) (5,4'-dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavona), um flavonóide isolado da *Lethedon tamaensis* exibiu atividade citotóxica em carcinoma de nasofaringe humano (KB) *in vitro* (CI₅₀ de 1,5 µg/mL) e em leucemia murina P-338 (CI₅₀ de 10 µg/mL). A atividade citotóxica na linhagem KB teve correlação com a inibição da topoisomerase I (Zahir *et al.*, 1996).

A apigenina (**18**), causou inibição dose-dependente da viabilidade celular em leucemia promielocítica humana (HL60) com IC₅₀ de 50 µM após 12h de incubação. Esse composto, bem como outros flavonóides estruturalmente relacionados, induziram apoptose em HL60, através do estímulo à liberação do citocromo c, ativação da caspase-3 e caspase-9 e perda do potencial transmembrana mitocondrial quando tratados com 60 µM, na seguinte ordem: apigenina (**18**) > miricetina (**13**) > quercetina (**12**) > caempferol (**23**). O grupo 3-hidroxil inibe a capacidade de induzir apoptose, uma vez que a apigenina mostrou-se mais ativa que o caempferol (Wang *et al.*, 1999).

A acacetina (**25**) (5,7-dihidroxy-4'-metoxiflavona), outro flavonóide com capacidade de induzir apoptose, inibiu a proliferação do carcinoma de fígado humano (Hep G2) com tratamento de 48 h apresentando IC₅₀ de 10,44 µg/mL (HSU *et al.*, 2004).

O flavopiridol (**26**) [5,7-dihidroxi-8-(4-3-hidroxi-1-metilpiperidil)-2'-cloroflavona], uma flavona sintética derivada do alcalóide obtido de planta *Amoora rohituka*, inicialmente mostrou potente efeito antiproliferativo (CI₅₀ em torno de 66 nM) no painel de 60 linhagens de células tumorais do NCI e já se encontra em estudos clínicos de fase I/II. Esse composto tem como mecanismo de ação, a inibição das quinases dependente de ciclina, sendo o protótipo desse grupo (Rocha *et al.*, 2001; Daí & Grant, 2003). Estudos de relação estrutura atividade mostraram que alterações no núcleo da flavona tanto para quinol-4-ona ou para um núcleo isocumarina resultaram em perda da atividade, observou-se também que a presença das hidroxilas em C5 e C7 são críticas para a atividade inibitória da quinase (Murthi *et al.*, 2000).

Os isoflavonóides também apresentam atividades biológicas sendo as mais importantes, as atividades antifúngica e antibacteriana, a atividade estrogênica das isoflavonas, e as propriedades inseticidas dos rotenóides. Essa classe apresenta uma diversidade estrutural importante: além das isoflavonas, isoflavononas, isoflavenos e aril-3-

cumarinas, encontram-se estruturas ciclizadas como os pterocarpanos (Simões *et al.*, 2003). Os pterocarpanos (Figura 8) representam a maior classe de isoflavonóides, depois das isoflavonas. Apresentam um núcleo tetracíclico derivado do núcleo fundamental das isoflavanonas (Simões *et al.*, 2003).

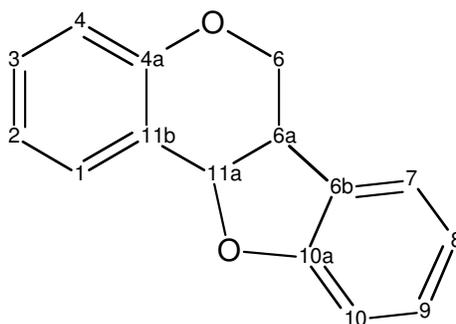


Figura 8 – Núcleo estrutural dos pterocarpanos

Muitos pterocarpanos mostraram atividade biológica potente contra vírus, micróbios e sistemas celulares animais (Engler *et al.*, 1993). Podem ser produzidos pela planta como um mecanismo de defesa contra o ataque de fungos (Macias *et al.*, 1999). A concentração dos pterocarpanos medicarpina (**27**) (3-hidroxi-9-metoxipterocarpano) e mackiaina (**28**) (3-hidroxi-8,9-metilenodioxipterocarpano) nas raízes do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) aumentam na presença de duas cepas do fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* causando resistência à infecção (Stevenson *et al.*, 1997).

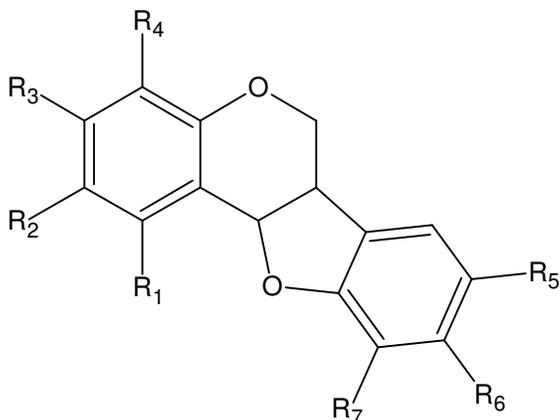
A atividade antimicrobiana de alguns pterocarpanos foi descrita por Mitscher *et al.* (1988), mostrando que os compostos ericristina (**29**) (2,10-diprenil-3-hidroxi-9-metoxipterocarpano) e eritrabissina-II (**30**) (2,10-diprenil-3,9-dihidroxipterocarpano) são ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis*. O pterocarpano 1-metoxi-3,9-dihidroxi-10-prenilpterocarpano (**31**) mostrou atividade anti-*Helicobacter pylori*, contra cepas resistentes a claritromicina, a amoxicilina e cepas sensíveis à associação de claritromicina+amoxicilina. *H. pylori* é uma bactéria que habita o estômago e

o intestino, sendo geralmente reconhecida como agente etiológico da úlcera péptica e do câncer gástrico (Fukai *et al.*, 2002).

A atividade antiviral foi descrita por Engler *et al.* (1993). Nesse trabalho, vários pterocarpanos foram avaliados contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV-I) e muitos mostraram atividade significativa. O estudo da relação estrutura-atividade mostrou que os pterocarpanos que continham um grupo metoxi em C-3, uma hidroxila em C-8 e um substituinte metoxi em C-9 exibiram maior atividade do que aqueles compostos em que faltava algum desses grupos.

Existem alguns exemplos de pterocarpanos que apresentam atividade antineoplásica. Três pterocarpanos isolados das flores da *Petalostemon purpureos* apresentaram atividade em carcinoma nasofaríngeo humano (KB). O composto (+)-3,4-dihidroxi-8,9-metilenodioxipterocarpano (**32**) mostrou-se ativo com CI_{50} de 0,9 $\mu\text{g/mL}$, já os compostos (+)-4-hidroxi-3-metoxi-8,9-metilenodioxipterocarpano (**33**) e maackiaina (**28**) mostraram-se moderadamente citotóxicos, com CI_{50} de 4,0 e 5,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A presença do catecol parece ser responsável pelo aumento da atividade citotóxica (Chaudhuri *et al.*, 1995).

O composto 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**27**) também apresenta atividade citotóxica nas células KB com CI_{50} de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ (Seo *et al.*, 2001). Além desses compostos, dois pterocarpanos prenilados demonstraram atividade antiploriferativa: a faseolidina (**34**) (3,9-dihidroxi-10-prenil-pterocarpano) que mostrou-se moderadamente ativa em CHOC (wild-type Chinese hamster ovary cells) e CHOC-PGO (P-glycoprotein overproducing Chinese hamster ovary cells) com CI_{50} de 4,0 e 7,6 μM , respectivamente; e a cristacarpina (3,6a-dihidroxi-9-metoxi-10-prenilpterocarpano) que exibiu atividade contra CHOC com CI_{50} de 4 μM (Dagne *et al.*, 1993).



- (27) $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_7 = H$, $R_3 = OH$, $R_6 = OCH_3$
 (28) $R_1 = R_2 = R_4 = R_7 = H$, $R_3 = OH$, $R_5 = R_6 = O-CH_2-O$
 (29) $R_1 = R_4 = R_5 = H$, $R_2 = R_7 = \text{prenil}$, $R_3 = OH$, $R_6 = OCH_3$
 (30) $R_1 = R_4 = R_5 = H$, $R_2 = R_7 = \text{prenil}$, $R_3 = R_6 = OH$
 (31) $R_1 = OCH_3$, $R_2 = R_4 = R_5 = H$, $R_3 = R_6 = OH$, $R_7 = \text{prenil}$
 (32) $R_1 = R_2 = R_7 = H$, $R_3 = R_4 = OH$, $R_5 = R_6 = O-CH_2-O$
 (33) $R_1 = R_2 = R_7 = H$, $R_3 = OCH_3$, $R_4 = OH$, $R_5 = R_6 = O-CH_2-O$
 (34) $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$, $R_3 = R_6 = OH$, $R_7 = \text{prenil}$

Figura 9 - Estrutura química dos pterocarpanos com atividade biológica

O câncer é um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. As estatísticas mundiais mostram que no ano de 2000, ocorreram 5,3 milhões de novos casos de câncer em homens e 4,7 milhões em mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2004).

No Brasil, a importância do câncer para as autoridades de saúde tem aumentado através dos anos desde que outras doenças têm sido controladas e as técnicas de diagnóstico melhoraram. De acordo com as estimativas, mais de 300.000 novos casos de câncer são esperados cada ano (Ministério da Saúde, 1999-2000). Apesar de grandes avanços na terapêutica, 6,2 milhões de pessoas morreram por essa causa no mundo em 2000 e 100.000 mortes ocorreram no Brasil nesse mesmo ano (Instituto Nacional do Câncer 2004 e Ministério da Saúde, 1999-2000). Na região nordeste, o câncer representa a terceira causa de morte, correspondendo a 6,34% do total de mortos, e somente 0,02 pontos abaixo das doenças infecciosas.

Nesse contexto a busca por agentes antineoplásicos continua sendo necessária, pois as drogas disponíveis até o momento não são suficientes para controlar a doença. Além disso, muitos medicamentos apresentam efeitos colaterais pronunciados que limitam o uso da droga. Diante de vários flavonóides isolados a partir da flora brasileira, particularmente a cearense, é necessário conhecer o potencial farmacológico dessas substâncias com o objetivo de descobrir uma nova molécula guia no tratamento do câncer, que pode inclusive, apresentar novo mecanismo de ação.

OBJETIVOS

1. Geral

Avaliar o potencial antitumoral de flavonas e pterocarpanos isolados de plantas do nordeste brasileiro a partir da determinação de suas atividades citotóxicas em modelos *in vitro*.

2. Específicos

2.1. Determinar e comparar a atividade citotóxica de 8 flavonas e 8 pterocarpanos em células tumorais e no desenvolvimento embrionário do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*.

2.2. Estabelecer uma relação entre a estrutura química e atividade, visando conhecer quais grupamentos são essenciais para a atividade citotóxica.

2.3. Determinar o possível mecanismo pelo qual as substâncias mais ativas desempenham a atividade, usando as células HL60 como modelo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais utilizados

1.1 Equipamentos

Agitador de placa MLW Modelo Thys 2

Aquário marinho

Centrífuga Centimicro FANEN Modelo 212

Centrífuga Excelsa Baby I FANEN Modelo 206

Centrífuga de placas Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga de lâminas Shandon Southern Cytospin

Citômetro de fluxo FACSCalibur, Becton, Dickinson and company, New Jersey, USA

Deonizador de água Milli-Q

Espectrofotômetro de placas Packard Spectra Count

Fluxo laminar VECO

Frascos para cultura de células Corning

Incubadora de células (CO₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow

Microscópio óptico Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab

Microscópio óptico de inversão Nikon Diaphot

1.2 Soluções

Água do mar filtrada	-	-
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU	Sigma
	BSA 5% q.s.p. 500 µL de solução	Dako
Anticorpo biotinilado anti- imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo anti-imunoglobulina	Sigma
	BSA 5% q.s.p. 100 µL de solução	Dako
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan	Sigma
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-
BrdU 10mM	-	Sigma
Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB	Immunotech
	1 mL de Tris-HCl (Tris 0,05M) pH= 7,6	Proquímios
	2 µL de H ₂ O ₂	Proquímios
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina	Doles
	80 mL de EtOH	Vetec
	0,5 mL de Ácido acético	Vetec
	20 mL de H ₂ O	-
Estreptavidina - peroxidase	1 µL de Estreptavidina – peroxidase	Sigma
	BSA 5% q.s.p. 100 µL de solução	Dako

Formalina neutra 10%	100 mL de Formaldeído 37%	Vetec
	4 g de Fosfato de sódio monobásico	Labsynth
	6,5 g Fosfato de sódio dibásico	Labsynth
	H ₂ O q.s.p. 900 mL	-
Hematoxilina 0,1%	0,5 g de Hematoxilina	Doles
	10 mL de Glicerina	Labsynth
	25 g de Sulfato de alumínio	Labsynth
	0,1 g de Iodeto de potássio	Labsynth
	H ₂ O q.s.p. 500 mL de solução	-
Iodeto de propídeo 1mg/mL	1mg de iodeto de propídeo	Boehringer
	PBS q.s.p.	
KCl 0,5M	37,3 g de Cloreto de potássio	Labsynth
	H ₂ O q.s.p 1 L de solução.	-
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro millipore – 0,22 mm – e complementado com 10% SBF, 1% de glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75%) e 25 mM de HEPES	Cultilab
MTT	20 mg de MTT	Sigma
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-
Penicilina - estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	Cultilab
	Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab

Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70 % 2x SSC (pH=6,5 – 7,5 a 70°C)	Vetec
Soro fetal bovino	-	Cultilab
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Citrato de sódio 0,15 M H ₂ O	Labsynth Grupo Química -
Rodamina 123 5mg/mL	Rodamina 123 5mg Etanol q.s.p	Vetec
Tampão de incubação (para análise de anexina-V)	HEPES 10 mM Cloreto de sódio 140 mM Cloreto de cálcio 5 mM (pH= 7,4.) H ₂ O	Reagen Labsynth Reagen -
Tampão de lise (para análise da fragmentação do DNA)	0,1 g de citrato de sódio 0,1 mL de Triton X-100 200 mg de iodeto de propídeo 100 mL de H ₂ O	Grupo Química Isofar Boehringer
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O 0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O	Labsynth Labsynth Labsynth

	H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	Labsynth
	Tris 0,5 M (pH= 7,6)	Proquímios
	H ₂ O	-
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5%	Cultilab
	0,125 g de EDTA	Proquímios
	450 mL de PBS	-
Triton X -100 1%	1 mL de Triton X-100	Isofar
	H ₂ O q.s.p. 100 mL de solução	-

1.3 Reagentes

Ácido Acético Vetec

Ácido Clorídrico Vetec

DMSO Vetec

1.4. Fármacos

Doxorrubicina Zodiac (fornecida pela farmácia do Instituto do Câncer do Ceará – ICC)

1.5 Modelos biológicos experimentais

Linhagens celulares tumorais cultivadas (detalhadas na página 35)

Ovos do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

2 Metodologia Experimental

2.1 Extração e isolamento dos flavonóides

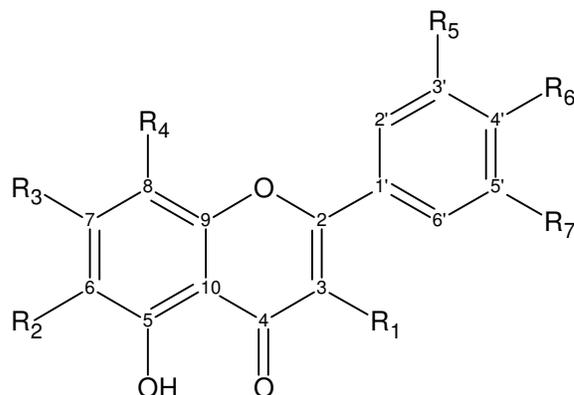
Para obtenção dos compostos puros, tanto as flavonas, como os pterocarpanos foram isolados de seis plantas do nordeste brasileiro. A tabela 1 traz a lista das espécies e a figura 4 traz as fotos das plantas, bem como a família a que pertence e local de coleta das plantas que produziram os metabólitos utilizados nesse trabalho. A tabela 2 correlaciona as espécies de plantas com os compostos isolados. O estudo fitoquímico foi realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação dos professores Dr. Edilberto Rocha Silveira, Dra. Mary Anne S. Lima e Dra. Otília Deusdênia L. Pessoa.

Tabela 1 – Relação das espécies de plantas estudadas, respectivas famílias e locais de coleta

Espécie	Família	Foto	Local de coleta
<i>Alibertia myrciifolia</i> Spruce ex K Schum.	Rubiaceae	A	Chapada do Araripe, Crato-CE
<i>Eupatorium ballotaefolium</i> HBK	Asteraceae	B	Serra da Meruoca-CE
<i>Lippia sidoides</i> Cham	Verbenaceae	C	Mossoró-RN
<i>Platymiscium floribundum</i> Vog	Leguminosae	D	Acarape-CE
<i>Erythrina velutina</i> Willd	Fabaceae	E	Pacoti-CE
<i>Harpalyce brasiliiana</i> Benth	Papilionoidaea	F	Chapada do Araripe, Barbalha- CE

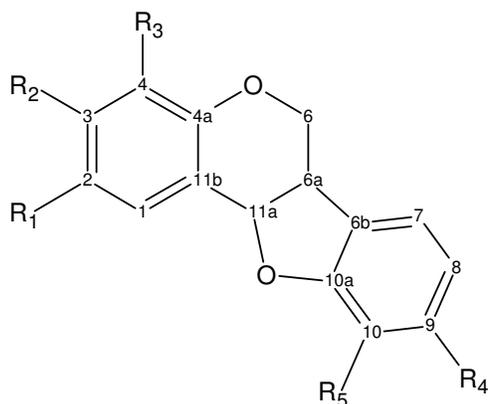


Figura 10 – Fotos da plantas utilizadas nesse trabalho: *Alibertia myrciifolia* (A), *Eupatorium ballotaefolium* (B), *Lipia sidoides* (C), *Platymiscium floribundum* (D), *Erythrina velutina* (E) e *Haparlyce brasiliana* (F). Fotos do Prof. Edilberto R. Silveira.

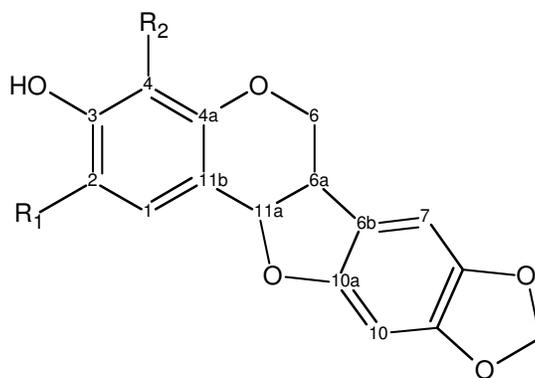


- (35) $R_1=R_2=R_4=H$, $R_3=R_5=R_6=R_7=OCH_3$ - 5-hidroxi-7,3',4',5'-tetrametoxiflavona
- (36) $R_1=R_2=R_4=H$, $R_3=R_5=R_6=OCH_3$, $R_7=OH$ - 5,5'-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona
- (37) $R_1=R_2=R_4=H$, $R_3=R_7=OH$, $R_5=R_6=OCH_3$ - 5,7,5'-trihidroxi-3',4'-dimetoxiflavona
- (38) $R_1=R_2=R_4=R_5=R_7=H$, $R_3=OH$, $R_6=OCH_3$ - 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona
- (39) $R_1=R_2=R_4=R_5=R_7=H$, $R_3=R_6=OH$ - 5,7,4'-trihidroxi-4'-metoxiflavona
- (40) $R_1=R_4=R_7=H$, $R_2=OCH_3$, $R_3=R_5=R_6=OH$ - 5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavona
- (41) $R_1=R_3=R_5=R_6=OH$, $R_2=R_4=R_7=H$ - 3,5,7,3',4'-pentahidroxi-6-metoxiflavona
- (42) $R_1=O\text{-glucosil}$, $R_2=R_4=R_7=H$, $R_3=R_5=R_6=OH$ - 3-O-glicosido-5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavona

Figura 11 - Estrutura química dos flavonóides utilizados neste estudo



- (43) $R_1=R_2=R_4 = \text{OCH}_3$, $R_3 = R_5=\text{H}$ - 2,3,9-trimetoxipterocarpano
- (44) $R_1 = R_3 = R_5=\text{H}$, $R_2=R_4 = \text{OCH}_3$ - 3,9-dimetoxipterocarpano
- (45) $R_1 = R_3 = R_5=\text{H}$, $R_2= \text{OH}$, $R_4 = \text{OCH}_3$ - 3-OH-9-metoxipterocarpano
- (46) $R_1 = R_5=\text{H}$, $R_2= R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OCH}_3$ - 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano
- (47) $R_1 = R_3=\text{H}$, $R_2= R_5= \text{OH}$, $R_4 = \text{OCH}_3$ - 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano
- (48) $R_1 = R_3=\text{H}$, $R_2= R_4 = \text{OH}$, $R_5= (\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2$ - 3,9-dihidroxi-10-prenilpterocarpano



- (49) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = -\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_3$ Cabnegrina A1
- (50) $R_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2\text{OH})\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $R_2=\text{H}$ Cabnegrina A2

Figura 12 - Estruturas químicas dos pterocarpanos utilizados neste estudo.

Tabela 2- Relação das espécies e compostos isolados.

Espécie	Compostos
<i>Alibertia myrciifolia</i>	5-hidroxi-7,3',4',5'-tetrametoxiflavon (35) 5,5'-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona (36) 5,7,5'-trihidroxi-3',4'-dimetoxiflavona (37) 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (38) 5,7,4'-trihidroxiflavona (39)
<i>Eupatorium ballotaefolium</i>	5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavona (40) 3-O-glicosideo-5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavona (42)
<i>Lippia sidoides</i>	3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona (41)
<i>Platymiscium floribundum</i>	2,3,9-trimetoxipterocarpano (43) 3,9-dimetoxipterocarpano (44) 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (45) 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (46) 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (47)
<i>Erythrina velutina</i>	3,9-dihidroxi-10-prenilpterocarpano (48)
<i>Harpalyce brasiliiana</i>	Cabnegrinas AI, 3-hidroxi-4-(1-hidroxi-4-isopentenil)-8(9)-metilenodioxipterocarpano (49) e cabnegrina AII, 3-hidroxi-2-(1-hidroxi-4-isopentil)-8(9)-metilenodioxipterocarpano (50)

2.1.1 Isolamento das flavonas (35, 36, 37, 38 e 39) de *Alibertia myrciifolia*.

As partes aéreas da *A. myrciifolia* foram coletadas em setembro de 2001 na chapada do Araripe, município do Crato, no estado do Ceará e identificadas pelo Dr. Elnatan B. de Souza (Universidade do Vale do Acaraú-Ceará). A exsicata (no. 31016) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

As partes aéreas (790.0g) da *A. myrciifolia* foram secas ao ar, pulverizadas e extraídas com hexano a temperatura ambiente. O solvente foi removido por pressão reduzida produzindo um extrato resinoso verde (6,6 g). O resíduo obtido após extração com hexano foi re-extraído com EtOH produzindo um precipitado, a filtração e recristalização em EtOH, produziu D-manitol (15 g). A evaporação do líquido mãe sob pressão reduzida produziu um sólido marrom-escuro (51.0 g), que foi adsorvido em Sílica gel e fracionado numa coluna por eluição com hexano, CHCl₃, EtOAc e BuOH. A fração hexânica (2.5 g) foi re-cromatografada em sephadex LH-20 pela eluição com MeOH, gerando vinte frações que foram reunidas por semelhança usando a cromatografia em camada delgada. A flavona 5-hidroxi-7,3', 4'5'-tetrametoxiflavona (corimbosina) (35) (6,5 mg) (Zahir *et al.*, 1996) foi obtida a partir da fração 11-18.

A fração clorofórmica também foi submetida a cromatografia em sephadex LH-20 produzindo onze frações. As frações F-4, F-6, F-8 e F-9 mostraram ser interessantes. A cromatografia em placa preparativa de sílica foi sucessivamente usada nessas frações. A cumarina escopoletina (2.0 mg) (Pouchert & Behnke, 1993) foi obtida da fração F-6, as flavonas 5,5'-dihidroxi-3',4',7-trimetoxiflavona (letedocina) (36) (6,1 mg) (Zahir *et al.*, 1996) e 5,5',7-trihidroxi-3',4'-dimetoxiflavona (apometzgerina) (37) (2.8 mg) (Rofi & Pomilio, 1985) da fração F-8 e 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina) (38) (9,5 mg) (Agrawal, 1989) e 4',5,7-trihidroxiflavona (apigenina) (39) (5,0 mg) (Agrawal, 1989) da fração F-9.

A determinação estrutural de todos metabólitos foi feita pela análise do espectro de massa e espectro de RMN de hidrogênio-1, carbono-13, uni e bidimensionis utilizando o aparelho Bruker DRX 500, seguida de comparação com dados e pontos de fusão das substâncias originais publicados (Luciano *et al.*, 2004)

2.1.2 Isolamento das flavonas (**40** e **42**) de *Eupatorium ballotaefolium*.

As partes aéreas do *E. ballotaefolium* foram coletadas em Julho de 2001 na Serra da Meruoca, estado do Ceará. O material botânico foi identificado pelo professor Edson P. Nunes do Departamento de Biologia. A exsicata (no. 27646) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

As partes aéreas (1,2 kg) da *E. ballotaefolium* foram secas ao ar, e extraídas com *n*-hexano seguido por EtOH à temperatura ambiente produzindo extratos de 21,6 e 50,3 g, respectivamente, após a evaporação do solvente, sob pressão reduzida. O extrato etanólico foi fracionado por cromatografia de coluna de Sílica gel usando CHCl₃, EtOAc e MeOH como eluentes. A fração CHCl₃ foi novamente cromatografada em Sílica gel, eluindo com *n*-hexano-EtOAc (100:0→0:100) produzindo 5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavona (nepetina) (**40**) (469,4 mg). A fração EtOAc foi cromatografada em coluna de Sílica gel eluída com CHCl₃-EtOAc (100:0→0:100) e metanol para produzir 3-O-glicosideo-5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavona (quercetina-3-O-glucosideo) (**42**) (27,8 mg). A estrutura dos compostos **40** e **42** foi determinada por análise espectroscopia e comparação dos dados com a literatura (Wenkert & Gottlieb, 1977; Agrawal, 1989).

2.1.3. Isolamento da flavona (**7**) de *Lippia sidoides*.

Exemplares de *Lippia sidoides* foram coletados em agosto de 1997, ESAM, Mossoró, Rio Grande do Norte. O material botânico foi identificado pelo professor Afrânio Gomes Fernandes (Universidade Federal do Ceará). A exsicata (no. 25149) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

O talo (3.0 kg) foi moído e extraído com etanol a temperatura ambiente. O solvente foi removido por pressão reduzida produzindo 51,0 g de extrato. Esse extrato foi cromatografado em Si gel usando como eluente hexano, CHCl₃, EtOAc e MeOH. A fração clorofórmica produziu 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol (quercetina) (**41**) (168,0 mg) por cromatografia em Sephadex LH-20 (Costa *et al.*, 2001).

2.1.4 Isolamento dos pterocarpanos (43,44,45,46 e 47) de *Platymiscium floribundum*.

P. floribundum Vog foi coletada no município de Acarape, estado do Ceará, e identificada pelo professor Afrânio Gomes Fernandes (Universidade Federal do Ceará). A exsicata (no. 31052) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

O lenho do caule da *P. floribundum* (1,7 kg) foi seco ao ar, pulverizado e extraído com hexano (4000 mL) a temperatura ambiente. O solvente foi removido por pressão reduzida produzindo um óleo viscoso marrom (7,0 g). O resíduo obtido após extração com hexano foi extraído com CHCl_3 (4000 mL) produzindo um extrato resinoso marrom (76,0g) e depois com EtOH produzindo outro extrato marrom resinoso (35,0 g).

Parte do extrato clorofórmico (50,0 g) foi adsorvido em Si gel (5,0 g) e cromatografado em coluna com Si gel (150 g) por eluição com hexano, CH_2Cl_2 , EtOAc e MeOH em misturas binárias de polaridade crescente, produzindo 10 frações reunidas por semelhança na cromatografia em camada delgada (solvente, volume, peso): A (hexano, 250 mL, 20.0 mg); B (hexano: CH_2Cl_2 7:3, 250 mL, 30.0 mg); C (hexano: CH_2Cl_2 1:1, 250 mL, 3.1 g); D (hexano: CH_2Cl_2 1:1, 500 mL, 6.9 g); E (CH_2Cl_2 , 350 mL, 39.0 mg); F (CH_2Cl_2 , 250 mL, 22.7 g); G (CH_2Cl_2 :AcOEt 1:1, 150 mL, 3.0 g), H (CH_2Cl_2 :AcOEt 1:1, 250 mL, 1.8 g), I (AcOEt, 350 mL, 1.2 g) e J (MeOH, 50 mL, 9.1 g). A partir da fração C (3.1g), um precipitado foi formado e filtrado, produzindo cristais incolores de 3,10-dihidroxi-9-metoxi-pterocarpano (**47**) m.p. 118-120 (lit. 121 °C) (Kurosawa *et al.*, 1978). Fração E (390.0 mg) foi recromatografada com Si gel (20g) por eluição com hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt and MeOH. Seis frações com polaridades crescentes, reunidas por semelhança na cromatografia em camada delgada, foram obtidas: E_1 (hexano, 125 mL, 38.0 mg), E_2 (CH_2Cl_2 , 125 mL, 20.0 mg), E_3 (CH_2Cl_2 /AcOEt 7:3, 100 mL, 0.19 g), E_4 (CH_2Cl_2 :AcOEt 1:1, 125 mL, 21.0 mg), E_5 (AcOEt, 25 mL, 20.0 mg) e E_6 (MeOH, 25 mL, 33.0 mg). A fração E_1 foi submetida à cromatografia por centrifugação (Cromatroton), usando uma mistura de hexano/AcOEt 1:1 como eluente para produzir um sólido amarelado 3,9-dimetoxi-pterocarpano (homopterocarpina) (**44**) (20.0 mg) m.p. 87.6-87.8 (lit. 83.0-85.0) (McMurry *et al.*, 1972). A fração E_3 foi purificada em sephadex LH-20 por eluição com

CHCl_3 / MeOH 1:1 produzindo dois sólidos amarelados, 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) (30.0 mg), m.p. 123-125 °C (lit. 122-124 °C) (Pueppke & VanEtten, 1975) e 3,4-dihidroxi-9-metoxi-pterocarpano, (**46**) (8.0 mg), m.p. 167.0-168.7 °C (lit. 168.0 °C) (Ingham, 1976). A fração G produziu um precipitado que foi separado do líquido sobrenadante produzindo 3-hidroxi-9-metoxi-pterocarpano (medicarpina) (**45**), m.p. 125.0-127.0 °C (lit. 123-125 °C) (Letchier & Shirley, 1976).

2.1.5. Isolamento do pterocarpano (48) de *Erythrina velutina*.

As cascas do caule da *Erythrina velutina*, coletadas em fevereiro de 2002, no município de Pacoti, estado do Ceará foram identificadas pelo professor Afrânio Gomes Fernandes (Universidade Federal do Ceará). A exsiccata (no. 16046) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra (EAC), Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

As cascas do caule de *E. velutina* (1,60 kg) foram trituradas e secas, e em seguida extraídas com solução hidroalcoólica (etanol/água 7:3) à temperatura ambiente. A evaporação do solvente sob pressão reduzida forneceu um precipitado escuro (56,24 g), denominado de EVCCHdP e uma solução aquosa marrom clara, que após liofilizada, resultou em um líquido viscoso (78,71 g), denominado de EVCCHdS.

Uma alíquota de EVCCHdP (25,01 g) foi suspensa em 80 mL de etanol. Após filtração, a solução obtida foi submetida a partição com os seguintes solventes: CHCl_3 (3 x 50 mL) e AcOEt (3 x 50 mL). Quinze gramas da fração CHCl_3 , denominada EVCCHdP-Cl (19,81 g) foi dissolvida em 60 mL de metanol e extraída com CHCl_3 (2 x 40 mL) em 15 mL de H_2O , resultando na fração EVCCHdPCl₂ (12,79 g).

Fracionamentos cromatográficos sucessivos em Sephadex LH 20 da fração EVCCHdPCl₂, usando metanol como eluente, produziu a fração EVCCHdP CA3(4). A partição líquido-líquido de EVCCHdP CA3(4) (771,7 mg) dissolvida em 10 mL de metanol, usando éter de petróleo, diclorometano e acetato de etila resultou na fração EVCCHdP CA3(4)DCl (691,3 mg) obtida com diclorometano. Após sucessivas cromatografias do tipo sílica flash (15 g) com os solventes, hexano, AcOEt, MeOH puros ou em combinação binária, obteve-se 19,2 mg de um sólido amarelado caracterizado espectroscopicamente como a faseolidina (**48**) (Rodrigues 2004).

2.1.6. Isolamento dos pterocarpanos (49 e 50) de *Harpalyce brasiliana*

Espécimens completos de *Harpalyce brasiliana* Benth, coletados no município de Barbalha, estado do Ceará, foram identificados pelo Prof. Edson de Paula Nunes (Universidade Federal do Ceará). A exsicata (no. 32525) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra (EAC), Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

A raiz de *Harpalyce brasiliana* (3,5 Kg) foi seca, triturada e extraída 3 vezes com etanol à temperatura ambiente. Após remoção do solvente sob pressão reduzida, obtiveram-se 260,36 g de um extrato viscoso marrom.

À solução alcoólica de uma alíquota de 107,31 g do extrato adicionou-se 100,0 mL de éter de petróleo e pequenas porções de água (70,0 mL) até a separação das fases. Depois de quatro extrações com 50,0 mL de éter de petróleo, adicionou-se 100,0 mL de clorofórmio à fase hidroalcoólica e pequenas porções de água (90,0 mL) até a separação das fases. Após quatro extrações de 50 mL, a fase hidroalcoólica foi rotaevaporada até metade do volume (~ 230,0 mL) e posteriormente, extraída com acetato de etila (100,0 mL + 4 x 50 mL). A fase hidroalcoólica, evaporada até a saída total dos solventes orgânicos (~ 160,0 mL), seguida da adição de 100,0 mL de n-butanol e porções de água (75 mL) até a separação das fases, foi submetida a mais quatro extrações com 50,0 mL de n-butanol. Ao final, obtiveram-se 5 frações: éter de petróleo (8,92 g), clorofórmio (57,66 g), acetato de etila (1,09 g), n-butanol (6,68 g) e a fase aquosa (23,64 g).

12,50 g da fração clorofórmio, divididos em quatro alíquotas de 3,12 g, 3,10 g, 3,15 g e 3,13 g, foram cromatografados em gel de SEPHADEX LH-20 (75,0 g), utilizando metanol como solvente. Foram coletados 28 frações de 20 mL, que após análise comparativa por CCD das frações obtidas e reunião das semelhantes, obtiveram-se 7 grupos: A (5,5 g), B (2,1 g), C (1,5 g), D (2,7 g), E (0,4 g), F (0,1 g) e G (0,2 g). A fração D foi submetida a cromatografia do tipo “flash” em gel de sílica (83,0 g), usando os solventes clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, seguindo um gradiente de polaridade. Análise comparativa por CCD permitiu a reunião das 270 frações (10,0 mL) em 20 grupos. O grupo 201-225 (490,0 mg) foi submetido à cromatografia do tipo “flash” em gel de sílica (17,8 g) com hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, seguindo um gradiente de polaridade. Análise comparativa por CCD das

60 frações obtidas (5,0 mL), levou a obtenção da fração 6-12 (296,0 mg), composta exclusivamente da mistura das duas cabenegrinas. Uma alíquota de 43,8 mg da fração 6-12 foi submetida à nova cromatografia do tipo “flash” em gel de sílica (43,8 g), usando tetracloreto de carbono, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas ternárias, seguindo um gradiente de polaridade, levando ao isolamento de 3-hidroxi-4-(1-hidroxi-4-isopentenil)-8(9)-metilenodioxipterocarpano, cabenegrinas A-I (**49**) (5,5 mg) e 3-hidroxi-2-(1-hidroxi-4-isopentil)-8(9)-metilenodioxipterocarpano, cabnegrina A-II (**50**) (5,5 mg).

2.2. Estudo da atividade citotóxica dos flavonóides

2.2.1. Avaliação da atividade antimitótica nos ovos do ouriço-do-mar.

Foram utilizados exemplares da espécie *Lytechinus variegatus*, coletados na praia da Lagoinha, litoral cearense. Esses animais são facilmente coletados e mantidos em aquários no laboratório. Além disso, apresentam ovos não muito pigmentados, facilitando a visualização dos estágios de desenvolvimento. Esse teste pode dar uma visão geral sobre o mecanismo de ação da droga, dependendo do estágio em que a droga inibe o ovo.

A eliminação dos gametas foi induzida pela injeção de até 3 mL de KCl 0,5 M na cavidade celômica (perivisceral) dos animais. Após o término da eliminação dos gametas, os óvulos foram lavados em uma proveta com água do mar filtrada. Esse processo foi repetido por mais duas vezes, para remoção da camada gelatinosa que envolve o óvulo. Após a última lavagem, os óvulos foram ressuspensos em 50 mL de água do mar filtrada. Os espermatozóides concentrados foram coletados e mantidos em baixa temperatura, 4°C, até o momento do uso. A fecundação foi realizada pela adição de 1 mL da suspensão de espermatozóides (0,05 mL de suspensão concentrada dos espermatozóides/ 2,45 mL de água do mar) à suspensão de óvulos (50 mL). Após cerca de dois minutos, a fecundação foi confirmada pela presença da membrana da fecundação (figura 11b), através da observação de uma amostra das células em microscópio óptico. Os ovos (1 mL) foram distribuídos numa placa com 24 cavidades, contendo a substância teste em diferentes concentrações. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Os ovos foram incubados num volume

final de 2 mL, mantidos à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) sob agitação constante. Nos intervalos correspondentes a primeira e terceira divisões (figuras 11c e 11e) foram fixadas alíquotas de 0,2 mL em formalina 10%, já na blástula (figura 11f) 0,1 mL de formaldeído foi adicionado ao volume restante na placa. Com embriões foram contados em cada amostra para obtenção da porcentagem de células normais.

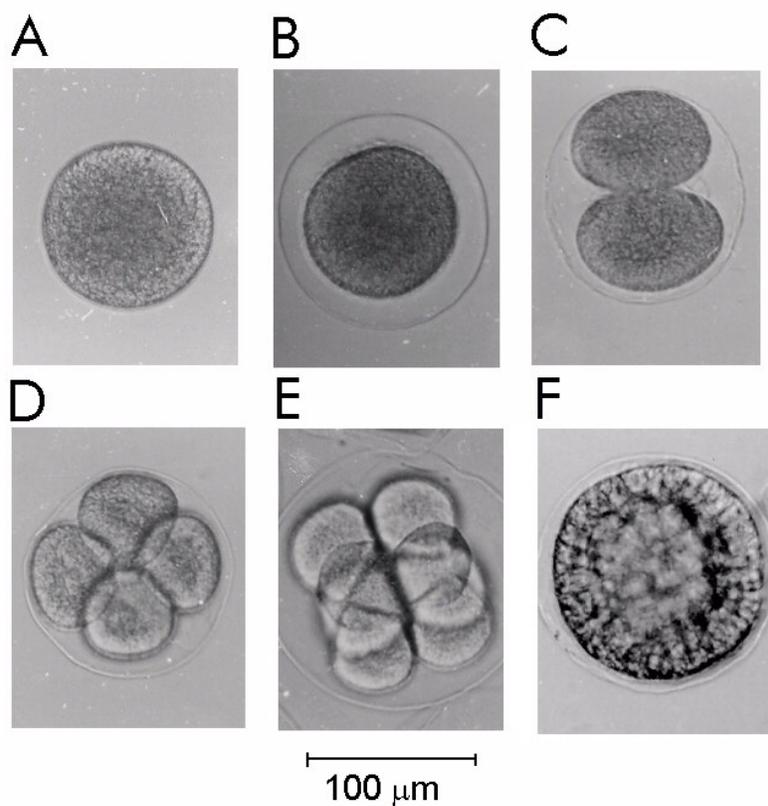


Figura 13 - Fotomicrografias das primeiras fases do desenvolvimento embrionário do ouriço *Lytechinus variegatus*. A - óvulo; B - ovo com membrana de fecundação; C - 1^a. divisão; D - 2^a. divisão; E - 3^a. divisão; F - blástula.

2.2.1.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n experimentos. O cálculo da CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seu respectivo intervalo de confiança (IC) 95% foi realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software).

2.2.2 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais *in vitro*.

A citotoxicidade foi obtida através do método do MTT (Mosmann, 1983) utilizando as seguintes linhagens celulares: CEM (leucemia – humana), HL-60 (leucemia – humana), HCT-8 (côlon – humana), MCF-7 (mama – humano) e B-16 (melanoma – murino) obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD). O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (Mosmann, 1983), permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão); utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas, quando necessário as células foram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ céls/ mL (Butler & Dawson, 1992).

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de 0,3 x 10⁶ células/mL, para células suspensas, 0,7 x 10⁵ células/mL para HCT-8 e MCF-7 e 0,6 x 10⁵ células/mL para B-16. As substâncias testes foram incubadas durante 72 horas juntamente com a suspensão de células. A doxorrubicina

foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 μ L da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuscitado em 150 μ L de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

2.2.2.1 Análise dos dados

As drogas foram testadas em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. Foi registrado o gráfico absorbância x concentração e determinado suas CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software).

2.3 Estudo do mecanismo de ação

2.3.1 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível dessa maneira observar uma coloração azulada nas células mortas.

Células da linhagem HL-60, na concentração de 0.3×10^6 células/mL, foram incubadas por 24 h com as drogas e examinadas ao microscópio de inversão. A concentração utilizada foi estimada a partir do valor da CI₅₀ encontrada no método do MTT

para esta mesma linhagem celular. Foi retirado 90 μL da suspensão de células e adicionado a 10 μL do azul de tripan. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Newbauer. A Doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi usada como controle positivo.

2.3.1.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

2.3.2 Análise morfológica – Coloração por hematoxilina/eosina

A coloração utilizada nesse experimento permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea.

Células da linhagem HL-60, plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ cél/mL, foram incubadas por 24h com as drogas e examinadas ao microscópio de inversão. A concentração utilizada foi estimada a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. Para observar a morfologia, 50 μL da suspensão de células foram adicionadas a centrífuga de lâmina (cytospin). Após a adesão das células na lâmina a fixação foi feita com etanol 96% por 5 minutos e a coloração primeiramente utilizada foi a hematoxilina, seguida pela eosina.

2.3.2.1 Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

2.3.3 Inibição da síntese de DNA – BrDU

A bromodeoxiuridina (BrDU) é uma base nitrogenada análoga a Timina. Quando as células estão sintetizando DNA o BrDU é incorporado no lugar da timina. A detecção do BrDU incorporado nas células é feita por técnicas imunohistoquímicas. O BrDU é adicionado 3h antes do término do período de incubação, para que esse seja incorporado ao DNA das células em mitose. Em seguida são adicionados os anticorpos e um cromógeno específico, a diaminobenzidina (DAB). Para corar as células não marcadas pelo cromógeno, utiliza-se Hematoxilina (0,1%). São contadas as 200 (duzentas) primeiras células observadas em microscópio óptico. Considera-se positivas para proliferação, as células de núcleo corado pelo DAB (cor marrom) e, negativas, as células de núcleo corado com Hematoxilina (cor azul).

Três horas após a adição do BrDU na cultura de células HL60 ($0,3 \times 10^6$), lâminas para cada amostra foram preparadas e postas para secar por 2 h. Após o período de secagem foram fixadas em metanol: ácido acético (7:1,5) por 5 minutos. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos a 70°C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuladas com caneta hidrofóbica e incubadas com anticorpo primário e deixadas na geladeira durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotinado por 20 minutos e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. Foi adicionado o cromógeno DAB por 1-5 minutos e, em seguida, removido com água destilada. A contracoloração das células foi realizada com hematoxilina da Hanks a 0,1%.

2.3.3.1 Análise dos dados

Duzentas células foram contadas diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporaram o BrDU) e não-marrom. A proporção de células marcadas em marrom e não

–marcadas entre os diferentes grupos foi comparada pelo teste χ^2 com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

2.3.4 Indução de apoptose

Em todos os experimentos em que se investigou a apoptose, as células da linhagem HL-60, na concentração de $0,3 \times 10^6$ cél/mL, foram incubadas por 24 h e examinadas ao microscópio de inversão. A concentração da droga utilizada foi estimada a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular após incubação por 72 horas, o solvente dimetilsulfóxido PA (DMSO), também foi testado no volume de 20 μ L em 2 mL de suspensão de células no poço. O composto 3,10-dihidroxipterocarpano-9-metoxipterocarpano não foi submetido a esses ensaios devido sua quantidade ser insuficiente.

Nesses ensaios foi utilizado o citômetro de fluxo, FACSCalibur (Becton, Dickinson and company, New Jersey, USA), usando programa CellQuest para leitura e análise das amostras na qual o aparelho contava dez mil eventos. A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para se determinar diferentes características das partículas biológicas.

Os citômetros analisam as células ou partículas em meio líquido que passam através de uma fonte de luz. O desvio da luz, que está relacionado diretamente com a estrutura e morfologia das células e a fluorescência são determinados para cada partícula que passa pela fonte de excitação. Após a aquisição do desvio da luz e fluorescência de cada partícula, a informação resultante pode ser analisada utilizando-se um computador com programa específico acoplado ao citômetro. A redução do tamanho das células resulta na diminuição do desvio da luz para frente (FSC) e a condensação nuclear causa inicialmente um aumento transitório no desvio da luz para o lado (SSC) seguido de uma diminuição da SSC durante os estágios finais da apoptose (Shapiro, 1995).

2.3.4.1 Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo - viabilidade celular

O teste se baseia na capacidade do iodeto de propídeo penetrar nas células cuja membrana esteja rompida e após a ligação ao DNA emitir alta fluorescência quando é excitado pelo laser. As células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência.

As células foram recolhidas (500µL) e depositadas em um tubo para centrifugação a 2000 rpm/5min. O sobrenadante foi descartado e 500µL de PBS foi adicionado, 50µL do PI (2µg/mL em PBS) também foi adicionado 5 minutos antes da leitura no citômetro de fluxo.

2.3.4.2 Fragmentação do DNA por citometria de fluxo

Esse teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática das células é lisada por um detergente para que o PI possa se ligar ao núcleo. Células com o núcleo íntegro emitirão alta fluorescência, já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos PI e por isso emitem menor fluorescência sugestivo de apoptose.

As células foram recolhidas (1,5 mL) e depositadas em um tubo para centrifugação a 5000 rpm/2min. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de Triton X-100 e 2 µg/mL iodeto de propídeo em PBS) foi adicionada. Após um período de período de 30 minutos onde os tubos permaneceram no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

2.3.4.3 Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria por citometria de fluxo.

Esse teste baseia-se na capacidade da mitocôndria seqüestrar a rodamina 123, um corante fluorescente, quando esta apresenta potencial transmembrânico inalterado, as células com rodamina emitem alta fluorescência quando atingidas pelo laser. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitirão menor fluorescência comparado com as células que possuem mitocôndrias normais .

As células foram recolhidas (1 mL) e depositadas em um tubo para centrifugação a 2000 rpm/5min. O sobrenadante foi descartado e 500 µL do solução de rodamina 1µg/mL foi adicionada. Após 15 minutos de incubação no escuro, a suspensão de células foi novamente centrifugada por 2000 rpm/5min. Para efetuar a leitura no citômetro de fluxo, o sobrenadante foi descartado e 500 µL de PBS foram acrescentados por 30 minutos.

2.3.4.4. Análise dos dados obtidos no citômetro de fluxo.

Todos os dados obtidos no citometro de fluxo foram apresentados como a média e o desvio padrão da média de n experimentos e analisados pela análise de variância (ANOVA) seguido por Student Newman-Keuls, com o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

1. Teste de atividade antimetabólica nos Ovos do Ouriço do Mar

O ensaio avaliou o potencial antimetabólico dos flavonóides (tabela 3). No grupo das flavonas, a apigenina e a nepetina mostraram-se mais ativas com CI_{50} variando de 3,1 a 12,2 $\mu\text{g/mL}$ enquanto que a corimbosina e a quercetina-3-*O*-glucoside, não apresentaram atividade ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). A ordem de potência desses compostos foi 5,7,4-trihidroxi-flavona (apigenina, **39**) = 5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavona (nepetina, **40**) > 5,5',7-trihidroxi-3',4'-dimetoxiflavona (apometzgerina, **37**) > 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, **38**) > 5-hidroxi-7,3',4',5'-tetrametoxiflavona (letedocina, **36**) > 5,7,3',4',-tetrahidroxiflavonol (quercetina, **41**) > 5-hidroxi-7,3',4',5'-tetrametoxi-flavona (corimbosina, **35**) = quercetina-3-*O*-glucoside (**42**).

Com relação ao outro grupo de flavonóides, os pterocarpanos, todos apresentaram atividade nesse ensaio. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) mostrou-se extremamente ativo com CI_{50} variando de 0,004 a 0,003 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 3). A faseolidina (**47**), por outro lado, foi menos ativa na primeira e terceira divisão, já na blástula a CI_{50} teve um valor próximo aos outros pterocarpanos. A ordem de atividade para esse grupo na 1ª divisão foi: 2,3,9- trimetoxipterocarpano (**43**) > 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) > 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) > cabenegrina A1 (**49**) > 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) \geq 3,10-dihidroxi-9- metoxipterocarpano (**47**) > cabenegrina A2 (**50**) > faseolidina (**48**) e na blástula a ordem foi: 2,3,9 trimetoxipterocarpano (**43**) > 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) > 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) > cabenegrina A1 (**49**) \geq 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) > faseolidina (**48**) \geq 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**47**) \geq cabenegrina A2 (**50**). Os pterocarpanos foram mais ativos que as flavonas. A figura 14, mostra o efeito do 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) nas fases de 1ª divisão e blástula do desenvolvimento dos ovos do ouriço. Pode-se observar que a completa

inibição das clivagens observada na primeira divisão evolui para ocorrência de divisões anômalas na blástula.

Tabela 3. Atividade antimitótica dos flavonóides sobre o desenvolvimento dos ovos do ouriço-do-mar. Os dados são apresentados como valores de CI_{50} com um intervalo de confiança de 95% para a primeira, terceira e blástula obtidos por regressão não-linear.

Substâncias	1ª divisão µg/mL (µM)	3ª Divisão µg/mL (µM)	Blástula µg/mL (µM)
Doxorrubicina	6,3 (10,8) 4,3 – 9,1	0,3 (0,6) 0,16 – 0,73	0,54 (0,93) 0,27 – 1,07
Corimbosina (35)	>100 (279,1)	>100 (279,1)	>100 (279,1)
Letedocina (36)	>100 (290,4)	17,8 (51,7) 14,3-22,1	27,6 (80,2) 26,6-28,7
Apometzgerina (37)	21,5 (65,1) 16,7-27,6	9,1 (27,5) 8,2-10,2	10,0 (30,3) 8,9-11,2
Acetina (38)	>100 (370,0)	13,2 (48,8) 11,0-15,9	30,7 (113,6) 25,1-37,5
Apigenina (39)	11,0 (40,7) 3,8-32,2	3,9 (14,4) 1,3-11,3	3,8 (14,1) 1,1-13,5
Nepetina (40)	12,0(40,0) 9,0-16,1	3,1 (10,5) 2,1-4,8	3,8 (12,7) 2,7-5,4
Quercetina (41)	94,7 (330,0) 85,2-105,4	54,3 (189,2) 47,6-62,0	44,2 (153,9) 25,1-77,9
Quercetina-3-O-glucoside (42)	>100,0 (230)	>100,0 (230)	>100,0 (230)
2,3,9 trimetoxipterocarpano (43)	0,003 (0,009) 0,002-0,003	0,004 (0,013) 0,003-0,005	0,003 (0,010) 0,003-0,003
3,9-dimetoxipterocarpano (44)	0,12 (0,47) 0,10-0,15	0,05 (0,18) 0,04-0,06	0,04 (0,14) 0,02-0,06
3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (45)	0,03 (0,13) 0,03-0,04	0,02 (0,06) 0,01-0,02	0,03 (0,13) 0,028-0,04
3,4-dihidroxi-9-metoxiprerocarpano (46)	3,17 (11,08) 2,99-3,36	2,1 (7,03) 1,57-2,98	0,44 (1,54) 0,33-0,57
3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (47)	2,16 (7,54) 1,70-2,72	1,98 (6,93) 1,64-2,40	2,01 (7,02) 1,46-2,78
Faseolidina (48)	39,10 (120,0) 35,40-43,3	19,78 18,43-21,0	1,03 0,96-1,11
Cabnegrina A1 (49)	1,50 (4,00) 1,25-1,82	0,52 (1,40) 0,46-0,58	0,43 (1,10) 0,30-0,60
Cabnegrina A2 (50)	5,18 (13,90) 3,64-7,30	2,10 (5,70) 1,83-2,56	1,70(4,60) 1,39-2,11

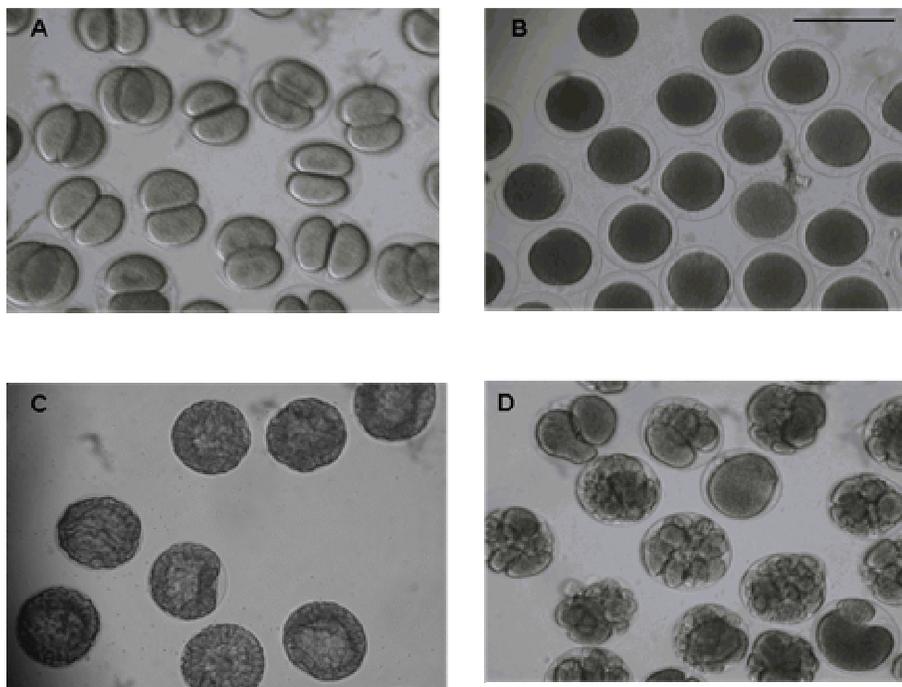


Figura 14 - Microfotografias mostrando o efeito do pterocarpano 2,3,9-trimetoxipterocarpano isolado da *Platymiscium floribundum* no desenvolvimento dos ovos do ouriço-do-mar. A e C são controles na primeira divisão e blástula, respectivamente; B and D, foram tratados com 0,3 μM . Barra horizontal = 100 μm .

2. Ensaio de atividade citotóxica em células de linhagens tumorais - teste do MTT.

A atividade antiproliferativa dos flavonóides foi avaliada pelo método do MTT e está representada na tabela 4. No grupo das flavonas, a apigenina (**39**) foi o composto mais ativo com CI_{50} variando de 4,9 a 12,3 $\mu\text{g/mL}$, já a corimbosina (**35**), a apometzgerina (**37**) e a quercetina-3-*O*-glucoside (**42**) não apresentaram atividade ($CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$). A quercetina (**41**) apresentou toxicidade seletiva para a linhagem B16 (CI_{50} de 8,54 $\mu\text{g/mL}$). A ordem de potência desses compostos foi apigenina (**39**) > nepetina (**40**) > acacetina (**38**) > letedocina (**36**) > quercetina (**41**) > apometzgerina (**37**) = corimbosina (**35**) = quercetina-3-*O*-glucoside (**42**).

Os pterocarpanos em geral mostraram-se mais ativos que as flavonas, exceto a faseolidina (**48**) que apresentou $CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$ em todas as linhagens. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) apresentou CI_{50} muito baixas com valor menor que 1 $\mu\text{g/mL}$ em todas as linhagens humanas, e igual a 2,7 $\mu\text{g/mL}$ em B16.

Tabela 4 -Atividade citotóxica de pterocarpanos em linhagens de células tumorais. Os resultados são apresentados em valores de CI_{50} com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear para leucemia (HL-60 e CEM), carcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de cólon (HCT-8) e melanoma murino (B16).

Substâncias	CEM µg/mL (µM)	HL-60 µg/mL (µM)	HCT-8 µg/mL (µM)	MCF-7 µg/mL (µM)	B-16 µg/mL (µM)
Doxorrubicina	0,02 (0,03)	0,02 (0,03)	0,04 (0,07)	0,20 (0,34)	0,03 (0,05)
	0,01 – 0,02	0,01 – 0,02	0,03 – 0,05	0,17 – 0,24	0,02 – 0,04
Corimbosina (35)	>25 (69,8)	>25 (69,8)	>25 (69,8)	>25 (69,8)	>25 (69,8)
Letedocina (36)	11,2 (32,4)	>25 (72,6)	>25 (72,4)	12,5 (36,3)	22,2 (64,4)
	7,0 – 17,7			9,5 – 16,5	18,5 – 26,6
Apometzgerina (37)	>25 (75,7)	>25 (75,7)	>25 (75,7)	>25 (75,7)	>25 (75,7)
Acacetina (38)	7,5 (27,8)	21,2 (78,4)	17,6 (65,1)	8,9 (32,9)	9,9 (36,6)
	4,3 – 13,0	9,6 - 46,5	15,6 - 19,9	7,3 - 10,7	8,8 - 11,1
Apigenina (39)	5,8 (21,5)	9,2 (34,0)	12,3 (45,5)	6,0 (22,2)	4,9 (18,2)
	4,8 – 7,2	8,2 – 10,2	11,1 – 14,2	5,5 – 6,6	4,3 – 5,6
Nepetina (40)	8,2 (27,4)	6,4 (21,4)	7,2 (23,9)	14,2 (47,2)	9,4 (31,3)
	6,3-10,7	5,5-7,5	5,7-9,1	13,3-15,1	8,9-9,9
Quercetina (41)	>25 (87,0)	>25 (87,0)	>25 (87,0)	>25 (87,0)	8,5 (29,7)
					5,9-14,4
Quercetina-3-O-glucosideo (42)	>25 (57,5)	>25 (57,5)	>25 (57,5)	>25 (57,5)	>25 (57,5)
2,3,9-trimetoxipterocarpano (43)	0,6 (2,1)	0,1 (0,5)	0,6 (1,9)	0,7 (2,4)	2,9 (9,9)
	0,05-0,7	0,1-0,2	0,2-1,6	0,4-1,4	1,6-5,3
3,9-dimetoxipterocarpano (44)	10,4 (38,5)	10,4 (38,5)	14,9 (55,4)	19,5 (72,1)	7,1(26,3)
	8,9-12,1	8,9-12,0	12,6-17,8	15,6-24,2	6,0-8,4
3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (45)	5,5 (19,2)	3,9 (13,7)	6,4 (22,5)	18,8 (65,2)	5,2 (18,4)
	4,4-6,7	2,6-5,7	3,9-10,5	17,8-19,2	3,7-7,3
3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (46)	7,3 (25,6)	6,9 (24,2)	12,4 (43,2)	10,3 (35,9)	2,7(9,4)
	6,8-7,8	4,4-10,8	9,7-15,8	8,1-13,1	1,9-3,7

3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (47)	13,8 (48,3) 12,0-15,9	20,4 (71,5) 17,2-24,4	>25 (87,4)	>25 (87,4)	9,9 (34,5) 4,9-19,7
Faseolidina (48)	>25(77,0)	>25(77,0)	>25(77,0)	>25(77,0)	>25(77,0)
Cabnegrina A1 (49)	20,6 (56,0) 5,4-77,8	16,2 (44,0) 4,4-59,2	16,8 (45,7) 10,4-27,0	8,8 (23,9) 6,9-11,2	13,6 (36,9) 9,6-19,4
Cabnegrina A2 (50)	>25(67,1)	>25 (67,1)	10,8 (29,0) 9,2-12,7	20,7 (55,6) 19,6-21,8	12,9(34,3) 6,7-24,7

3. Análise dos efeitos celulares em HL-60.

Visto que os pterocarpanos mostraram-se mais ativos tanto nos ovos do ouriço quanto nas células tumorais, esse grupo foi selecionado para os ensaios de identificação do mecanismo de ação em HL60. Sendo o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**), o composto mais ativo dentre os testados, foram testados apenas os pterocarpanos não prenilados, na tentativa de entender a influência dos grupamentos sobre a atividade.

3.1. Ensaio de determinação da viabilidade celular por exclusão do azul de Tripán.

Nesse ensaio, as células HL60 podem ser diferenciadas em viáveis (transparente) e não-viáveis (azul), o que permitiu quantificar a redução da viabilidade nas células tratadas, mostrando uma diminuição do crescimento. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) foi testado em concentrações dez vezes menores que os outros compostos devido sua CI_{50} em HL60 ser muito inferior as outras drogas. Este composto reduziu o no de células viáveis em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$), sem no entanto, induzir morte celular.

Todos os demais pterocarpanos testados reduziram significativamente o número de células viáveis nas concentrações testadas, inclusive na concentração mais baixa. Na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, o pterocarpano 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) foi o composto mais ativo com redução do número de células em 72,1%, seguida por 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) 57%, 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) 52,5% e 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**47**) 8,8%. A doxorrubicina foi testada como controle

positivo na concentração de 0,3 µg/mL causando 50,8% de redução no número de células viáveis (Figura 15). Já na maior concentração testada, todos esses compostos levaram a um aumento significativo de células não-viáveis ($P < 0,05$).

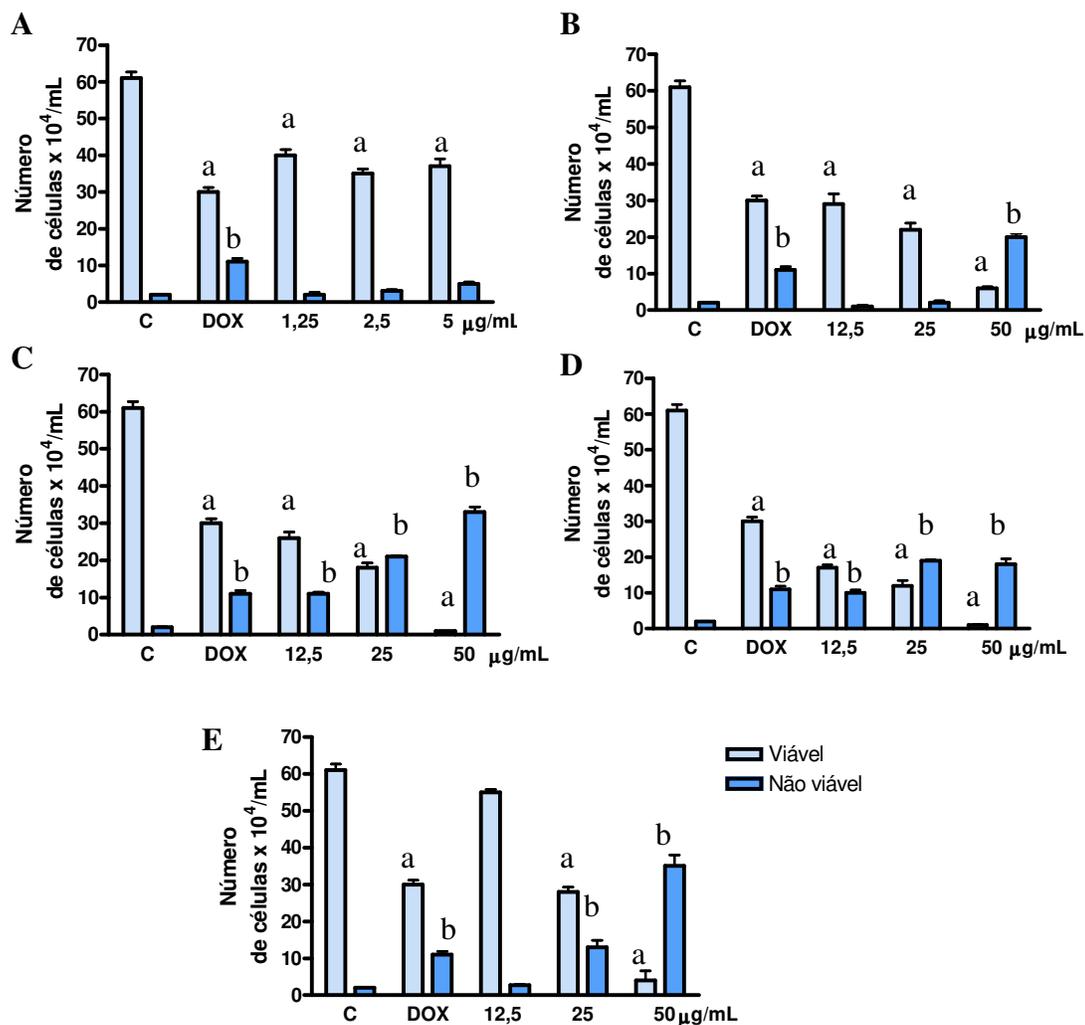


Figura 15 - Viabilidade por azul de tripan. Gráfico A: 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**), B: 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**), C: 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**), D: 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**), E: 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**47**). a e b, $p < 0,05$ com relação ao controle, ANOVA seguida de Student Newman Keuls.

3.2. Inibição da síntese do DNA - Incorporação do BrDU

Esse ensaio foi utilizado para observar a síntese de DNA nas células tratadas e controle. A incorporação do BrDU, um análogo da timina, às células é compatível com a síntese do DNA. Houve redução na síntese de DNA nas células tratadas com todos os pterocarpanos identificada pela redução na incorporação do BrDU. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) provocou 37, 38 e 56% de inibição da síntese do DNA nas concentrações de 1,25; 2,5 e 5 µg/mL, respectivamente. O 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) provocou 22, 26 e 56% de inibição nas concentrações de 12,5; 25 e 50 µg/mL, respectivamente. O 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) inibiu a proliferação em 46 e 80% nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL, respectivamente, e na concentração de 50 µg/mL não foi possível analisar devido a destruição das células. O 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) provocou 64 e 82% de inibição nas concentrações de 5 e 12,5 µg/mL, respectivamente, enquanto que o 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**47**) causou 25, 24 e 63% de inibição nas concentrações de 5, 12,5 e 25 µg/mL respectivamente. A doxorrubicina foi testada como controle positivo na concentração de 0,3 µg/mL causando inibição de 41% (tabela 5). O composto 2,3,9- trimetoxipterocarpano (**43**) (concentração 1,25 µg/mL) causou efeito semelhante ao 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) numa concentração 10 vezes maior (concentração 12,5 µg/mL). Nesse ensaio, o composto 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) teve a mesma atividade que o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) na concentração de 5 µg/mL ($p > 0,05$).

Tabela 5. Inibição da incorporação de BrdU pelas células HL-60 tratadas e não tratadas. 24h de incubação. *, p< 0,05 quando comparado ao controle pelo teste χ^2 .

Amostra	Concentração µg/mL	Incorporação de BrDU (%)	Tratado/Controle
Controle	-	73	
Doxorrubicina	0.3	43 *	0.59
2,3,9- trimetoxipterocarpano (43)	1.2	46 *	0.63
	2.5	45 *	0.62
	5	32 *	0.44
3,9- dimetoxipterocarpano (44)	12.5	57 *	0.78
	25	54 *	0.74
	50	49 *	0.67
3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (45)	12.5	40 *	0.54
	25	15 *	0.20
	50	n.d	-
3,4-dihidroxi-9- metoxipterocarpano (46)	5	27 *	0.36
	12.5	13 *	0.18
	25	n.d.	-
3,10-dihidroxi-9- metoxipterocarpano (47)	5	55 *	0.75
	12.5	56 *	0.76
	25	27 *	0.37

3.3. Análise Morfológica – Coloração diferencial por H/E

As características observadas para as células tratadas com cada uma das drogas estão relacionadas na tabela 6.

Tabela 6: Características morfológicas das células HL-60 tratadas e não tratadas. Coloração por H/E. 24h de incubação.

Características observadas	Droga	Concentração
Condensação da cromatina	2,3,9-trimetoxipterocarpano (43)	1,25; 2,5; 5,0 µg/mL
Núcleo picnótico	3,9-dimetoxipterocarpano (44)	50 µg/mL
Desestabilização da membrana plasmática	3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (46)	12,5; 25 e 50 µg/mL
	3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (47)	12,5; 25 e 50 µg/mL
Vacuolização do citoplasma	3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (46)	12,5 µg/mL
	3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (45)	12,5 e 25 µg/mL
	3,9-dimetoxipterocarpano (44)	12,5 e 25 µg/mL
Volume celular reduzido	3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (45)	25 e 50 µg/mL
	3,9-dimetoxipterocarpano (44)	50 µg/mL
Vacúolos apoptóticos	2,3,9-trimetoxipterocarpano (43)	5 µg/mL

FOTOS

FOTOS – prancha 2

3.4. Estudo sobre indução de apoptose

3.4.1. Estudo da integridade da membrana celular por citometria de fluxo.

Nesse ensaio, as células tratadas e controle são incubados com iodeto de propídeo, que emite fluorescência e é capaz de se ligar ao DNA, desde que a membrana plasmática da célula esteja danificada permitindo a entrada desse composto para o citoplasma. Dessa maneira somente as células com dano na membrana podem emitir fluorescência que é detectada numa faixa de comprimento de onda de 560-580 nm. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) foi testado em concentrações dez vezes menores e o composto 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) não foi testado na concentração de 50 µg/mL devido a pequena quantidade de droga disponível. O composto 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) causou dano na membrana celular em todas as concentrações (figura 17), já o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) não reduziu a viabilidade celular, observada a partir da integridade de membrana. As células tratadas com 12,5 µg/mL dos compostos 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**), 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) e 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) apresentaram 90,5%, 74,3% e 45% de viabilidade, respectivamente, evidenciando a maior potência desse último. Os resultados estão apresentados na figura 17.

Os dados do desvio da luz obtidos no citômetro de fluxo após a incidência do laser sobre as células podem ser utilizados para detectar alterações na morfologia da célula. Quando não há perda da integridade da membrana, a redução no volume celular e a condensação da cromatina são indicativos de células em apoptose inicial e tardia, o que pode ser observado na figura 18, após o tratamento com concentrações crescentes de 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**).

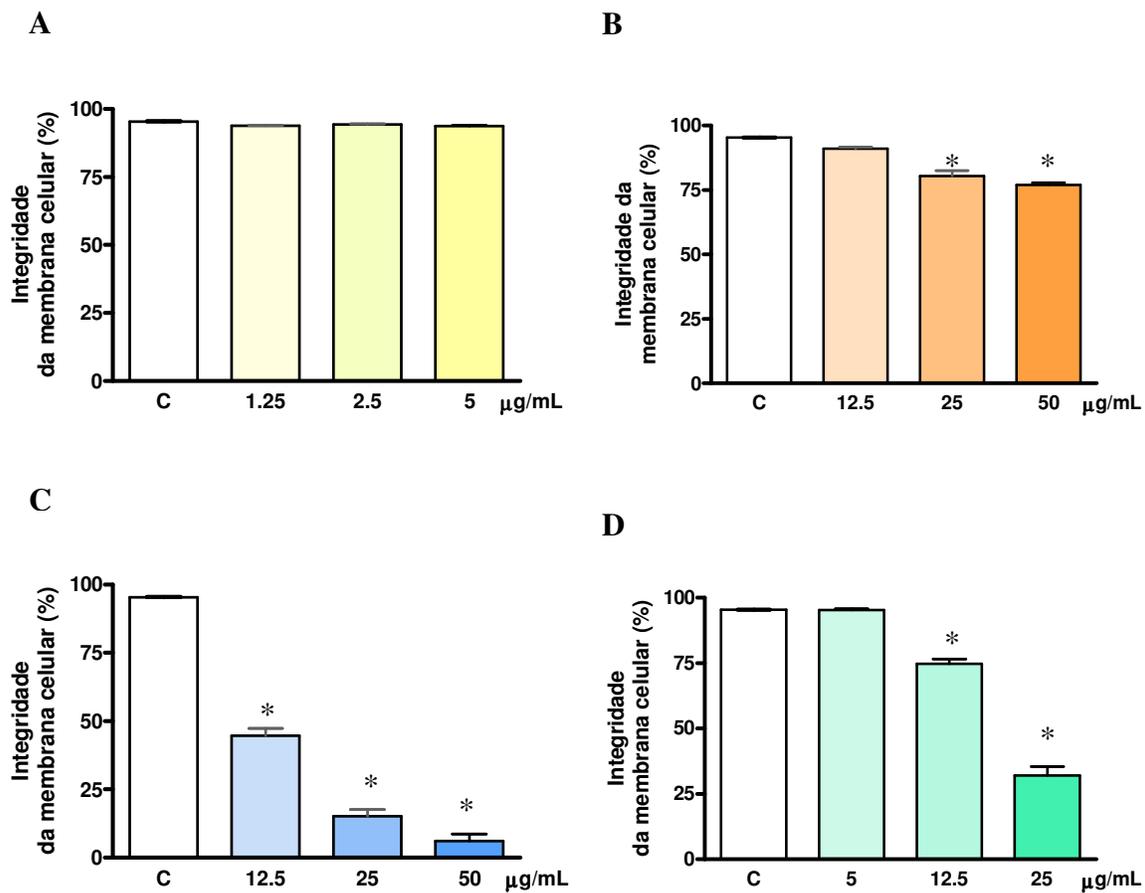


Figura 17 - Avaliação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo. Dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. A: 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) ; B: 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**); C: 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**); D: 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**); Os resultados foram mostrados como a média e o erro obtidos de 4 a 6 experimentos. * $p < 0,05$, ANOVA seguida de Student Newman Keuls.

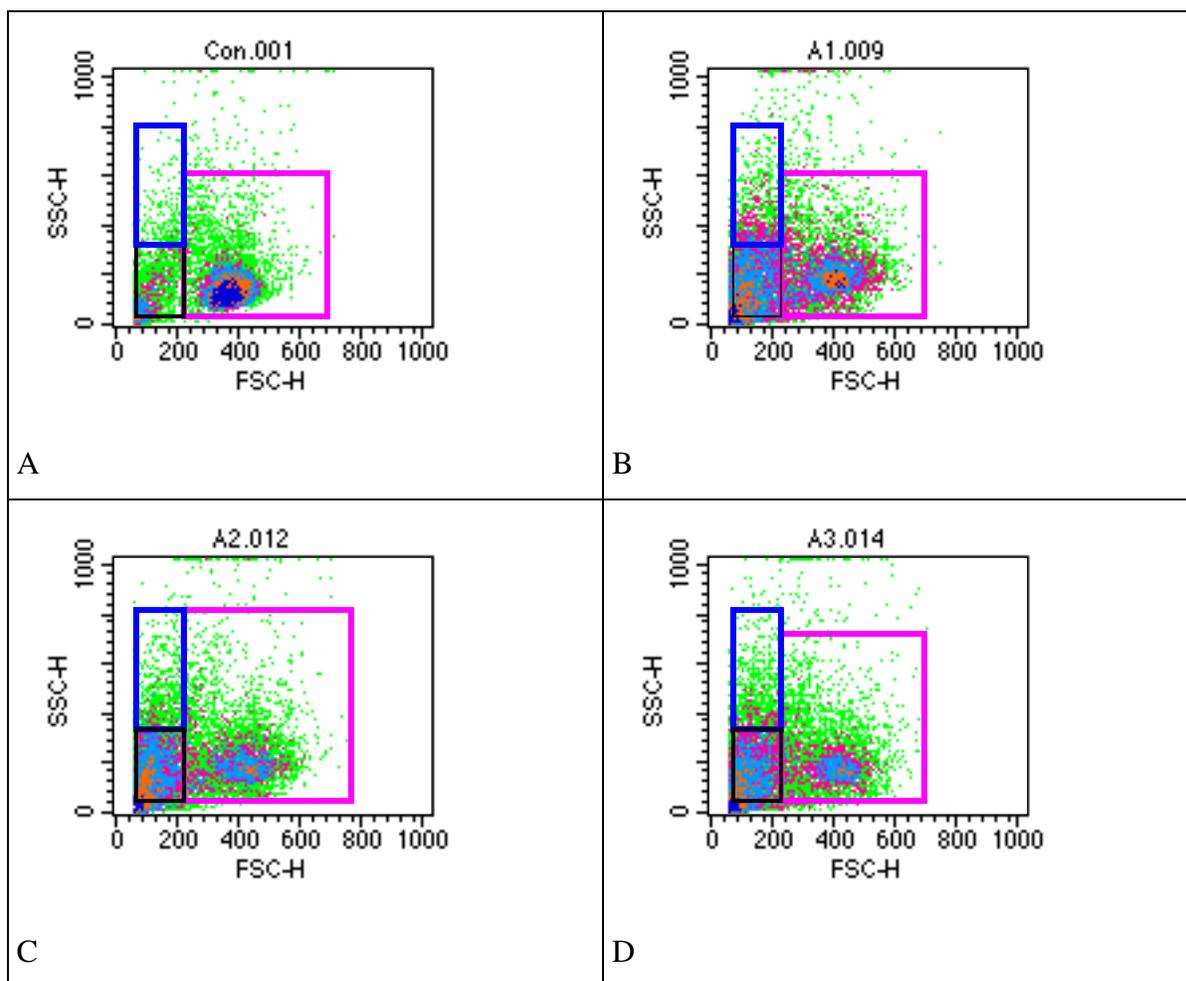


Figura 18 - Avaliação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo. Dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. A: controle; B: 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) 5 µg/mL; C: 2,5 µg/mL; D: 1,25µg/mL. FSC: desvio da luz para frente; SSC: desvio da luz para o lado. Quadrado róseo: células normais; Retângulo azul: células em apoptose inicial; Retângulo preto: células em apoptose tardia.

3.4.2 Determinação da fragmentação do DNA por citometria de fluxo.

Nesse ensaio as células controle e tratadas são incubadas com uma solução contendo triton X-100 e iodeto de propídeo. O triton lisa a membrana celular das células e o iodeto de propídeo se liga no DNA. As células contendo núcleos íntegros emitem alta fluorescência e as células com condensação da cromatina e DNA fragmentado emitem baixa fluorescência. Todas as drogas induziram a fragmentação do DNA, inclusive na menor concentração. O composto 2,3,9 trimetoxi-pterocarpano (**43**) mostrou-se mais potente pois causou 49,5% de fragmentação do DNA na dose de 1,25 µg/mL, enquanto os compostos 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**), 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) e 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) apresentaram 37%, 44,2% e 46,2% de fragmentação do DNA, respectivamente, na dose de 12,5 µg/mL. Os resultados são apresentados na figura 19. O gráfico obtido no citômetro de fluxo mostra a parada em G2/M nas células tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) em todas as concentrações, bem como nas células tratadas com 12,5 µg/mL de 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) (figura 20).

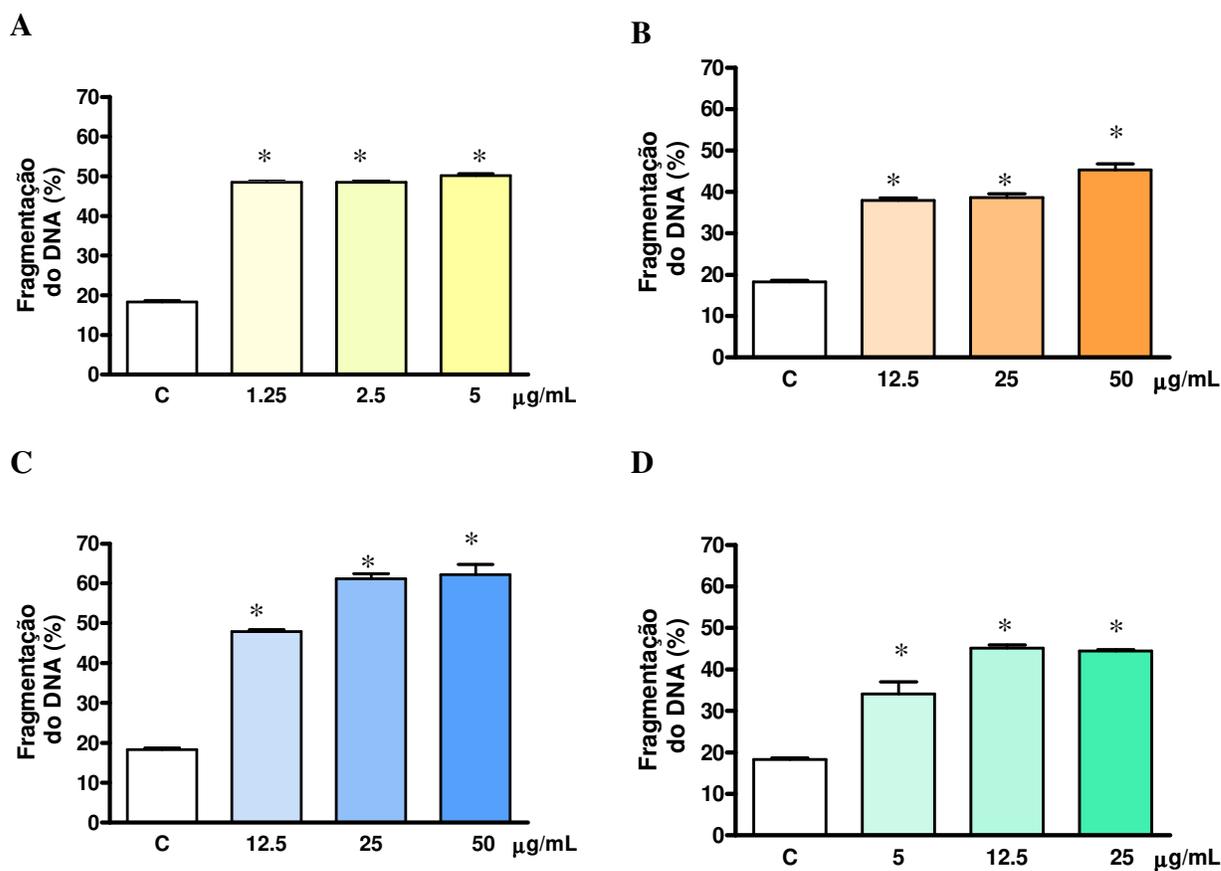


Figura 19 - Fragmentação do DNA avaliada pela fluorescência nuclear usando iodeto de propídeo, triton X-100 e citrato detectado por citometria de fluxo. A: 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**); B: 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**); C: 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**); D: 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**). Os resultados foram mostrados como a média e o erro obtidos de 4 a 6 experimentos. * $P < 0,05$ comparada ao controle por ANOVA seguida de Student Newman Keuls.

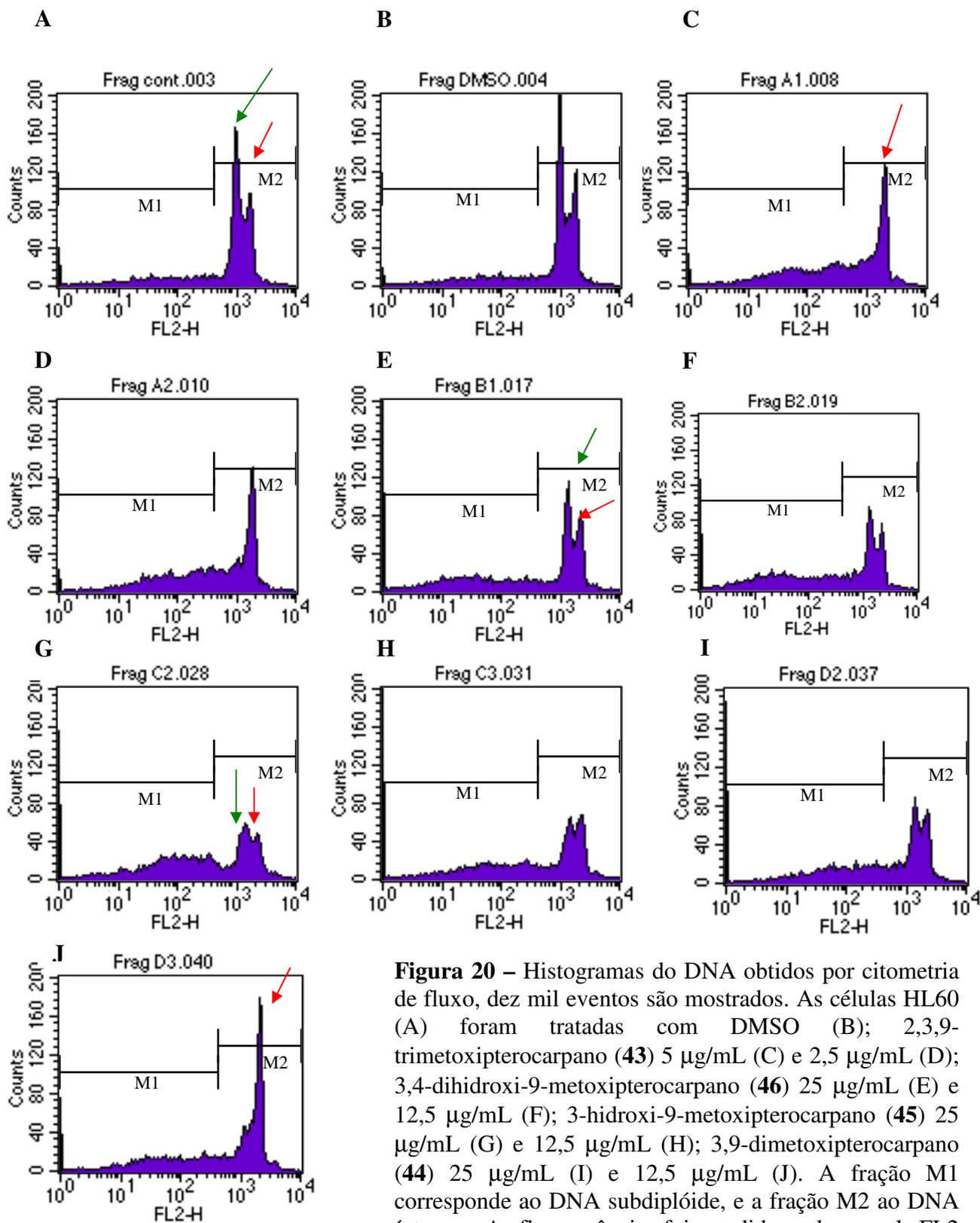


Figura 20 – Histogramas do DNA obtidos por citometria de fluxo, dez mil eventos são mostrados. As células HL60 (A) foram tratadas com DMSO (B); 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) 5 $\mu\text{g/mL}$ (C) e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (D); 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) 25 $\mu\text{g/mL}$ (E) e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (F); 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) 25 $\mu\text{g/mL}$ (G) e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (H); 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) 25 $\mu\text{g/mL}$ (I) e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (J). A fração M1 corresponde ao DNA subdiploide, e a fração M2 ao DNA íntegro. A fluorescência foi medida pelo canal FL2 (585/42 nm) que captura a fluorescência laranja-avermelhado do iodeto de propídeo. Seta verde 2N e seta vermelha 4N.

3.4.3. Determinação do potencial transmembrânico por citometria de fluxo.

Nesse ensaio as células foram incubadas com rodamina 123. As células que estão em apoptose apresentam dano na mitocôndria, que pode ser detectado pela alteração do potencial transmembrânico. Como a rodamina é um corante catiônico e permeável a membrana celular que é rapidamente seqüestrado pela mitocôndria emitindo assim alta fluorescência em células normais, alterações no potencial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitem menor fluorescência. O composto 2,3,9 trimetoxipterocarpano (**43**) mostrou-se mais potente pois causou 38,6% de despolarização mitocondrial na dose de 1,25 µg/mL, enquanto os compostos 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**), 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) e 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) apresentaram 24,2%, 40,6% e 21% de despolarização mitocondrial, respectivamente, na dose de 12,5 µg/mL (figura 21).

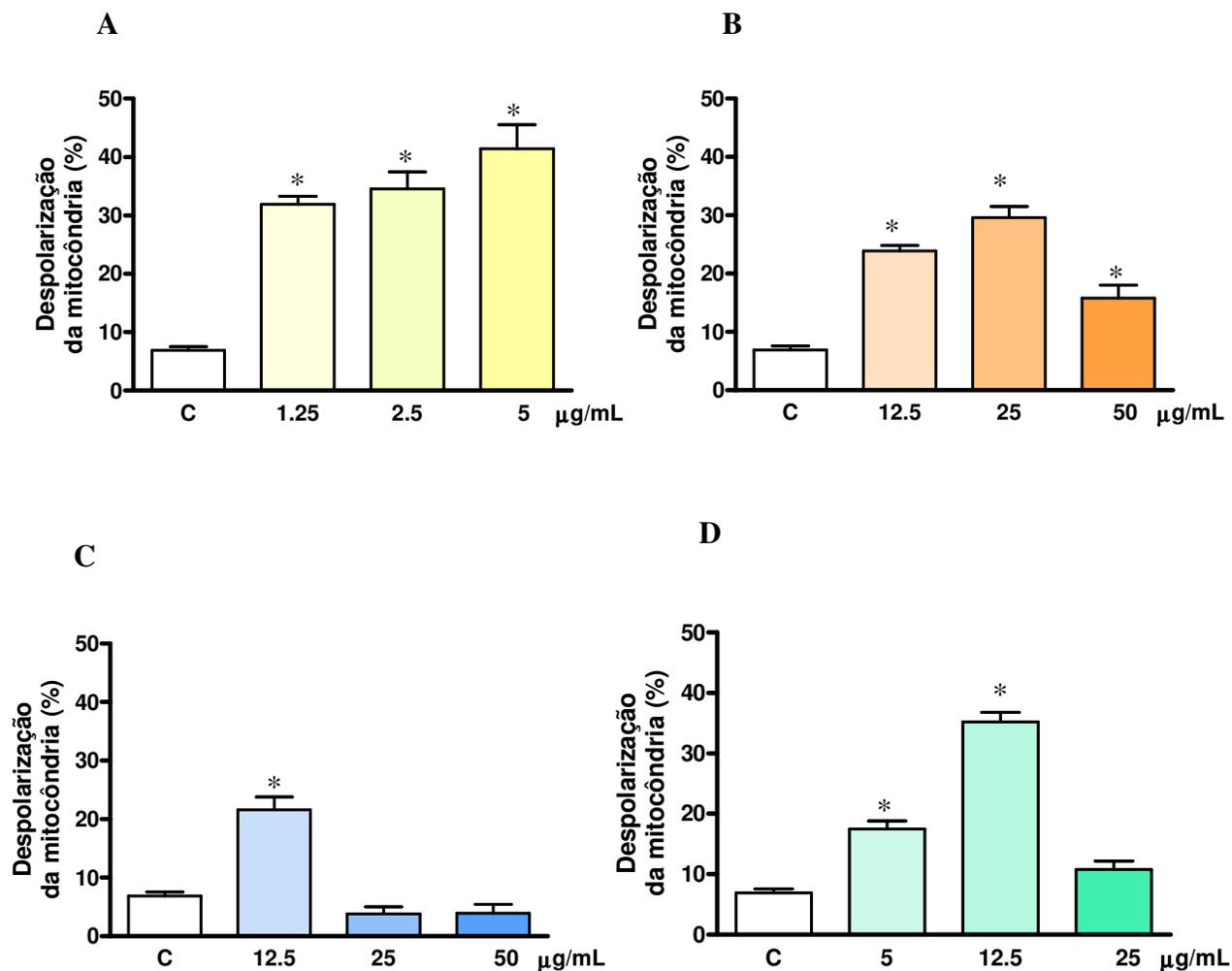


Figura 21 – Avaliação da despolarização da mitocôndria por citometria de fluxo. Dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. A: 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**); B: 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**); C: 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**); D: 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**). Os resultados foram mostrados como a média e o erro obtidos de 4 a 6 experimentos. * $p < 0,05$, ANOVA seguida de Student Newman Keuls.

DISCUSSÃO

Os flavonóides são amplamente distribuídos nas plantas superiores e exibem diversas atividades biológicas (Kim *et al.*, 2002). O longo período de interação das plantas produtoras de flavonóides com várias espécies animais deve ter contribuído na formação da ampla atividade bioquímica e farmacológica em mamíferos e em outros sistemas biológicos (Middleton *et al.*, 2000). Como componentes da dieta são seguros e exibem toxicidade muito baixa quando testado em animais (Middleton *et al.*, 2000, Havsteen, 1983).

Os flavonóides parecem exercer efeito benéfico em várias etapas bioquímicas envolvidas na patogênese do câncer (Marchard, 2002). De fato vários trabalhos mostraram a atividade antiproliferativa em células tumorais de flavonóides *in vitro* (Sonoda *et al.*, 2004; Costa-Lotufu *et al.*, 2003; Gálvez *et al.* 2003).

Células de mamíferos em cultura são uma importante ferramenta para avaliar a atividade citotóxica de compostos com atividade terapêutica (Pailard *et al.*, 1999). O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos desenvolve um programa de *screening* efetivo baseado num diverso painel de linhagens celulares tumorais. O *screen* utiliza 60 linhagens tumorais derivadas de nove tipos de câncer e organizadas em subpainéis representados por câncer de células brancas, pulmão, cólon, sistema nervoso central, pele, ovário, rim, próstata e mama. Inicialmente, um *pré-sceen* em três linhagens seleciona os compostos que irão ser testados nas linhagens restantes. Foi constatado que as três linhagens são capazes de detectar mais de 95% dos compostos ativos nas 60 linhagens (Cragg & Newman, 2000). Agentes que mostram atividade significativa nesse ensaio são selecionados para serem testados em vários ensaios *in vivo* (Cragg & Newman, 1999).

Outros modelos mais baratos podem ser utilizados para avaliar a atividade citotóxica de drogas, como o desenvolvimento embrionário dos ovos do ouriço. Segundo Jacobs & Wilson (1986), esse modelo é útil para detectar compostos citotóxicos,

antineoplásicos e teratogênicos. Assim como células tumorais, os ovos dividem-se rapidamente e apresentam uma sensibilidade seletiva a certos tipos de drogas (Munro *et al.*, 1987) além de uma série de peculiaridades no seu ciclo de desenvolvimento que o torna bastante elucidativo no estudo de drogas com potencial antitumoral. De acordo com Munro *et al.* (1987), compostos que inibem a mitose em ovos de ouriços devem ser, a seguir, estudados em testes *in vivo*, pois os resultados com esse bioensaio são bastante confiáveis. A inibição da divisão celular pode estar relacionada a vários eventos envolvidos nesse processo, como síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA), síntese protéica e polimerização de microtúbulos. No bioensaio dos ovos de ouriço do mar, esses processos podem, muitas vezes, ser analisados individualmente (Fusetani, 1987).

O presente trabalho avaliou inicialmente a atividade antiproliferativa de 16 flavonóides representados por 8 flavonas e 8 pterocarpanos isolados a partir de plantas do nordeste brasileiro utilizando dois modelos animais *in vitro*: a atividade citotóxica em células tumorais e a atividade antimitótica nos ovos do ouriço.

A atividade citotóxica nas células tumorais foi avaliada pelo método do MTT. No grupo das flavonas, a apigenina (**39**) mostrou-se mais ativa seguida pela nepetina (**40**) e acacetina (**38**). Com esse resultado pode-se observar que a hidroxila no lugar da metoxila, em C4' melhora a atividade citotóxica, já que essa é a única diferença entre a apigenina (**39**) e a acacetina (**38**). Estudos anteriores demonstraram que a quercetina (**41**), a luteolina (**15**) e apigenina (**39**) foram mais potentes na redução da viabilidade celular ($CI_{50} \sim 10 \mu M$) que os compostos 3,5,7-trihidroxi-flavona (galangina) e 5,7-dihidroxi-flavona (crisina), $CI_{50} > 20 \mu M$, que não apresentam hidroxila em C3' e C4' (Cipák *et al.*, 2003), corroborando os dados obtidos no presente trabalho.

No estudo da atividade citotóxica de flavonas isoladas da *Lethedon tannaensis*, Zahir *et al.* (1996) mostraram que os compostos que apresentaram uma hidroxila em C4' também foram mais ativos nas células do carcinoma nasofaríngeo. Dentre os compostos testados, as flavonas 5,4'-dihidroxi-7,3',5'-trimetoxiflavona (CI_{50} de 7,7 $\mu g/mL$), 5,4'-dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavona (CI_{50} de 1,5 $\mu g/mL$) e 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona (CI_{50} de 8,7 $\mu g/mL$) apresentaram CI_{50} menor que os compostos com a mesma estrutura química, mas que apresentam uma metoxila no lugar da hidroxila em C4': 5-hidroxi-7,3',4',5'-tetrametoxiflavona (CI_{50} de 19,4 $\mu g/mL$), 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona (CI_{50} de 19,4

$\mu\text{g/mL}$) e 5-OH-7,4'-dimetoxiflavona (CI_{50} de 16,4 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Por outro lado nos derivados 3-metoxi-flavonas, os compostos que tinham substituintes 3'-hidroxil-4'-metoxil foram muito mais citotóxicos do que os compostos que apresentavam 3'-metoxil-4'-hidroxil (Beutler *et al.*, 1998).

Uma hidroxila no lugar da metoxila na posição C5' também aumenta a atividade citotóxica das flavonas, pois a letedocina (**36**) é mais ativa que a corimbosina (**35**). A atividade citotóxica da quercetina (**41**) (CI_{50} 60 μM) testada por Beutler *et al.* (1998), foi inferior a flavona 3,5,7,3',4',5'-hexa-hidroxiflavona (CI_{50} 36 μM) reforçando os resultados acima citados.

De acordo com vários autores, a presença da metoxila em C3 aumenta a citotoxicidade dos flavonóides (Beutler *et al.*, 1996; Middleton *et al.*, 2000; Costa-Lotufo *et al.*, 2003). Costa-Lotufo *et al.* (2003) descreveu a citotoxicidade do caempferol (**23**) e de seu derivado 3-metoxil, isocaempferídeo (**22**), usando os mesmos ensaios deste trabalho, mostrando que o isocaempferídeo (**22**) era pelo menos três vezes mais ativo que o caempferol (**23**) nas linhagens tumorais. Os dados obtidos neste trabalho reforçam a importância do substituinte 3-metoxil para a atividade citotóxica nas células tumorais, já que a apigenina (**39**), que não possui substituintes em C3, foi menos ativa que o isocaempferídeo (**22**) (Valores de CI_{50} variando de 2,6 a 5,5 $\mu\text{g/mL}$ para o isocaempferídeo e de 4,9 a 12,3 $\mu\text{g/mL}$ para a apigenina). Por esses dados também é possível observar que a hidroxila em C3 reduz a atividade citotóxica pois a apigenina é mais ativa que o caempferol (**23**) cuja CI_{50} varia de 13,4 a 22,7 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com Wang *et al.* (1999), a citotoxicidade dos flavonóides está correlacionada com a capacidade de induzir apoptose, a potência desses compostos é dependente da falta do grupo hidroxila em C3.

A presença do açúcar no C3 acabou com a atividade citotóxica em melanoma da quercetina (**41**). Lin *et al.* (2001) estudaram a atividade citotóxica da 5,7,4',5'-tetra-hidroxiflavona (luteolina, **15**) e da luteolina 5-O- β -glucosídeo em hepatoma humano mostrando que a luteolina (**15**) reduziu em 41% a viabilidade celular enquanto sua forma glicosilada reduziu apenas 10% a viabilidade celular. Em geral, flavonóides com grupos hidroxila glicosilado (por exemplo, rutina e naringenina) não possuem um efeito antiproliferativo eficiente nas células de câncer do cólon, no caso da rutina, a falta de efeito não foi devido a impermeabilidade à membrana, já que a rutina foi detectada dentro da

célula (Kuo 1996). Segundo Matsuda *et al.* (2003), os flavonóides glicosilados eram menos ativos que as agliconas correspondentes com relação a inibição da produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos. Por outro lado, um flavonóide glicosilado, 5,7,3'.4',5',-penta-hidroxi-3-O-neohesperidosídeo flavona, isolado da *Physalis angulata*, apresentou potente atividade citotóxica *in vitro* contra P-338, KB e adenocarcinoma de pulmão (CI₅₀ variando de 0,0048-0,55) (Ismail & Alam 2001).

A letedocina (**36**) foi mais ativa que a apometzgerina (**37**) caracterizando a metoxila em C7 como um grupamento que melhora a atividade citotóxica. A atividade citotóxica da quercetina (**41**) (CI₅₀ de 60 µM) testada por Beutler *et al.* (1998), foi inferior a seu derivado 7-metoxil, 3,5,3',4'-tetra-hidroxi-7-metoxi-flavona (CI₅₀ de 8,9 µM) reforçando os resultados acima citados.

No ensaio da atividade antimetastática dos ovos do ouriço-do-mar, a apigenina (**39**) e a nepetina (**40**) foram os compostos mais ativos, confirmando os resultados do MTT. Já a apometzgerina (**37**) apresentou atividade no ouriço, sendo mais potente que a acacetina (**38**) e letedococina (**36**), diferenciando-se da atividade citotóxica em células tumorais. A quercetina (**41**) foi fracamente ativa, a quercetina-3-O-glucosídeo (**42**) e corimbosina (**35**) foram inativas. Alguns aspectos estruturais que influenciam na atividade do MTT também podem ser observadas neste modelo: a hidroxila em C5' e C4' melhora a atividade e o açúcar em C3 acaba com a atividade. Por outro lado, a hidroxila em C7 melhora a atividade no lugar da metoxila, o inverso do que foi observado no MTT.

Na classe dos pterocarpanos, o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) foi o composto mais ativo, tanto na atividade antimetastática nos ovos do ouriço quanto na atividade citotóxica em células tumorais, este resultado mostra que a metoxila em C2 potencializa ambas ações, pois o composto 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) apresentou CI₅₀ mais de dez vezes superior. Ao comparar os resultados da homopterocarpanina (**44**) com a medicarpina (**45**) é possível observar que a hidroxila em C3 no lugar da metoxila aumentou a atividade nos modelos testados. Engler *et al.* (1993) estudaram a atividade anti-HIV de pterocarpanos e concluiu que compostos que apresentavam uma metoxila em C3, exibiam uma maior atividade, porém nesse trabalho não foi testado um pterocarpano com hidroxila em C3, no lugar da metoxila. Em Chaudhuri *et al.* (1995), a metoxila no lugar da hidroxila em C3 do núcleo fundamental do pterocarpano também reduziu a atividade citotóxica na

linhagem KB. A hidroxila no C10 e no C4 reduziu a atividade do composto 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (45), dessa maneira, a metoxila livre no carbono nove, bem como a hidroxila livre no C3 confere uma maior atividade em ambos os ensaios.

De acordo com Jacobs *et al.* (1981), se uma substância promove 100% de inibição no ensaio de atividade antimitótica nos ovos do ouriço numa concentração de 16 µg/mL ou menos, pode ser considerada uma substância muito ativa e promissora como agente anti-câncer. É válido mencionar que os pterocarpanos testados inibiram completamente o desenvolvimento do ouriço em concentrações menores que 10 µg/mL, com exceção da faseolidina (48) que apresentou esse resultado somente na blástula, o último estágio do desenvolvimento analisado. Esse resultado foi compatível com a atividade citotóxica nas células tumorais, pois, a exceção da faseolidina (48) que já mostrou ser menos ativa, todos os outros pterocarpanos apresentaram atividade nesse ensaio. Porém de acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, uma substância considerada ativa para ser ensaiada em modelos *in vivo*, deve possuir uma CI_{50} menor que 1 µg/mL, resultado que foi obtido apenas para o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (43).

Como o grupo dos pterocarpanos mostrou-se mais ativo em ambos os ensaios e apresentou um composto com bons resultados, esse grupo foi selecionado para ensaios de determinação do mecanismo de ação, utilizando a linhagem HL-60 como modelo.

Modelos celulares são ferramentas úteis e necessárias para observar a toxicidade de um composto, traduzida, inicialmente, pela sua capacidade de induzir a morte celular, e a linhagem HL-60 está entre os modelos celulares de origem mielóide mais amplamente utilizados (Collins *et al.*, 1977; Gallagher *et al.*, 1979; Collins, 1987). As células da linhagem HL-60 são derivadas do sangue periférico de um paciente com leucemia promielocítica aguda, tendo sido caracterizada e sua cultura primeiramente estabelecida por Collins *et al.* (1977). Neutrófilos promielocíticos com proeminente assincronia na relação núcleo/citoplasma são predominantes nessa cultura, sendo que cerca de 10% das células cultivadas diferenciam-se espontaneamente para o estágio monocítico. Exibem atividade fagocitária e quimiotática, além de serem capazes de formar colônias em meio de cultura semi-sólido.

Os experimentos realizados com as células HL-60 foram: análise da viabilidade celular por exclusão de azul de tripan, síntese de DNA por incorporação do BrDU, análise

morfológica por coloração em hematoxilina/eosina e indução de apoptose por viabilidade celular, fragmentação do DNA e alteração no potencial transmembrânico da mitocôndria.

A exclusão por azul de tripan é útil para analisar viabilidade e proliferação celular. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) diminuiu o número de células viáveis, sem aumentar o número de células inviáveis, possivelmente seu efeito consiste no bloqueio da divisão celular. O composto 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) mostrou o mesmo padrão acima citado nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL, já na concentração de 50 µg/mL causou aumento no número de células inviáveis indicando uma ação imediata sobre a célula. Os pterocarpanos 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) e 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) mostraram redução do número de células viáveis e aumento do número de célula não viáveis em todas as concentrações sendo o primeiro mais potente, resultado que novamente indica uma diminuição da atividade quando existe a presença da hidroxila em C4. O composto 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**47**) foi ativo somente nas maiores concentrações, confirmando sua menor potência.

O ensaio da incorporação do BrDU fornece informação sobre a síntese de DNA. As células que estão duplicando o seu DNA para se dividir incorporam o BrDU, um análogo da timina, que é identificado por técnicas imuno-histoquímicas. Como as células HL-60 duplicam seu número num período de 24h, a incorporação do BrDU é facilmente observada nesse modelo. As células que não estão proliferando, não incorporam o BrDU.

Nesse ensaio todas as drogas testadas diminuíram a síntese de DNA nas concentrações testadas, resultando em menor número de divisão celular, o que complementa o MTT e a exclusão por azul de tripan. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) inibiu a síntese de DNA na mesma proporção que o composto 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) na concentração de 5 µg/mL, de fato esse composto foi bastante ativo nesse ensaio causando 82% de inibição na concentração de 12,5 µg/mL. A medicarpina (**45**) causou 80% de inibição na concentração de 25 µg/mL sendo mais potente que a homopterocarpano (**44**) e o composto 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**47**), resultado que confirma a ordem de potência para esses três compostos na viabilidade celular por exclusão de azul de tripan.

A coloração por H/E permite analisar as características morfológicas da célula, sendo útil para sugerir um mecanismo de ação da droga, seja por necrose ou apoptose.

Apoptose é uma forma de morte celular de fundamental importância em vários sistemas biológicos, desempenha um papel essencial no desenvolvimento dos tecidos e órgãos, na regulação da resposta imune e na eliminação de células senescentes. É identificada por uma série de alterações morfológicas na célula: diminuição do volume celular, perda de contato, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e alteração no potencial transmembranico da mitocôndria. A apoptose pode ser induzida por agentes químicos ou físicos. Drogas que induzem morte celular por apoptose em linhagens de células tumorais podem ser úteis na quimioterapia (Zamai *et al.* 2001; Brady 2004). A necrose ocorre por uma ação rápida da droga na célula e é caracterizada pelo aumento do volume celular inicial e perda da integridade da membrana plasmática (Darzynkiewicz Z *et al.*, 1992).

O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) causou condensação da cromatina e formação de vacúolos apoptóticos, características que indicam apoptose. Já os compostos 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) e 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**47**) causaram alterações na membrana plasmática com formação de contornos irregulares, bem como vacúolos no citoplasma, possivelmente por acúmulo de líquido, sugerindo morte por necrose. O 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) e o 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) induziram formação de vacúolos, redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, morfologia consistente com apoptose nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL, e na maior concentração causaram destruição total das células.

Com base nesses resultados os estudos para detectar apoptose foram realizados utilizando o citômetro de fluxo. A citometria de fluxo é um método rápido e preciso para acessar a potência e a especificidade do ciclo celular das drogas anti-câncer. Um grande número de métodos em citometria de fluxo identifica as células apoptóticas ao analisar mudanças morfológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem durante a apoptose. A viabilidade de milhares de células pode ser rapidamente analisada, quantificando a fluorescência basal da célula e a análise do ciclo celular pode ser feita usando agentes como o iodeto de propídeo que emite fluorescência ao intercalar com o DNA. Mudanças na morfologia das células apoptóticas como a redução do volume celular e condensação da cromatina são detectadas pelo desvio da luz incidida sobre a célula para frente e para o lado. A diminuição do potencial transmembrânico da mitocôndria é medido com vários

fluorocromos da família da rodamina ou carbocianina (Ramanathan 1997, Darzynkiewicz & Bedner 2000).

A viabilidade celular por integridade da membrana plasmática pode ser avaliada por incorporação do iodeto de propídeo. Esse corante é muito hidrossolúvel e não atravessa a membrana intacta, porém penetra na célula com dano na membrana celular, se ligando ao DNA e emitindo fluorescência. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) não causou dano na membrana celular, resultado que também foi observado na coloração por H/E. Devido a manutenção da viabilidade nas células tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**), o desvio da luz incidida sobre a célula foi avaliado pelo citometro. A redução no volume celular resulta numa diminuição da luz desviada para frente (FSC) e a condensação da cromatina causa um aumento transitório do desvio da luz para o lado (SSC), seguido por uma redução da SSC nos estágios finais da apoptose. A análise da figura 18 mostrou que houve um aumento das células em apoptose inicial e também em apoptose tardia. O composto 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) reduziu a viabilidade celular por dano na membrana em todas as concentrações testadas, bem como o composto 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) nas concentrações de 12,5 e 25µg/mL com uma menor intensidade comparada a medicarpina (**45**). As células tratadas com a concentração de 5 µg/mL de 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) continuaram viáveis. Vale ressaltar que esse composto não foi testado na concentração de 50 µg/mL devido a pequena quantidade de droga disponível. Ao analisar os resultados obtidos nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL dos compostos 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**), 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) e 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) percebe-se que o primeiro causou mais dano na membrana que os dois compostos. Possivelmente essas drogas estão causando necrose, pois além da perda da integridade da membrana detectada pela citometria, o resultado obtido no teste de viabilidade celular por exclusão do azul de tripan no qual as células em apoptose mantém um sistema de transporte na membrana viável e não coram, ao contrario do que é visto na necrose, mostrou que os compostos 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**), 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) aumentaram o número de células inviáveis ou mortas, já o composto 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) induziu aumento no numero de células inviáveis somente na maior concentração. O ensaio com tripan não é tão sensível quanto o citômetro para detectar perda da viabilidade celular.

O desvio da luz incidida sobre as células não foi utilizado para análise dos compostos que induziram perda da integridade da membrana celular, pois não é possível diferenciar as alterações ocorridas no desvio da luz das células em apoptose ou necrose (Shapiro, 1995).

Um achado característico da apoptose é a quebra da cromatina em pequenos fragmentos. O DNA é clivado por endonucleases que fragmentam a cromatina em unidades nucleossômicas, oligômeros de aproximadamente 180 pares de bases (Brady 2004). O núcleo apoptótico pode ser distinguido pelo conteúdo de DNA hipodiploide, comparado com o conteúdo diplóide do DNA de células normais (Curi-Boaventura *et al.*, 2003). Nas células HL60 é possível observar dois picos do DNA correspondentes as células que estão na fase G0-G1 e nas células que estão em G2.

O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) induziu quebra do DNA em todas as concentrações, sem causar dano na membrana celular. Os compostos 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) e 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) também causaram fragmentação do DNA sem causar dano na membrana celular nas concentrações de 5 e 12,5 µg/mL, respectivamente. O tipo de morte induzido por essas drogas, provavelmente depende da concentração, ocorrendo necrose nas concentrações mais altas, de fato um agente citotóxico pode induzir apoptose ou necrose dependendo da concentração e do tempo de contato da droga com as células (Cotter *et al.*, 1992).

O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) causou parada do ciclo celular em G2/M em todas as concentrações e o composto 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) causou parada em G2/M somente na concentração de 12,5 µg/mL. A estrutura química da molécula parece estar influenciando no mecanismo de ação pois a única diferença entre esses dois compostos é a metoxila em C2, que potencializa a ação indutora de apoptose, bem como a parada do ciclo celular, pois mesmo na concentração de 1,25 µg/mL essa droga causa fragmentação do DNA, já o composto 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) numa concentração dez vezes superior causou 39% de fragmentação do DNA, o aumento da concentração desse composto causa perda da integridade da membrana e não ocorre parada do ciclo celular em G2/M, que pode estar acontecendo por causa da morte das células em G2/M por apoptose, diminuindo o número de células. O conceito de apoptose ciclo-mediada está ganhando atenção, os agentes que induzem apoptose por esse caminho oferecem menores

possibilidades de resistência a drogas, menor mutagenicidade e toxicidade (Gupta *et al.*, 2001). Nenhum outro composto causou interrupção do ciclo celular em G2/M, mas causaram fragmentação do DNA. A apigenina (**39**) também causou parada do ciclo celular em G2/M e apoptose nas células de adenocarcinoma CA-HPV-10 em 48h de tratamento (Gupta *et al.* 2001). Drogas antineoplásicas disponíveis na terapêutica como o paclitaxel (**1**) também induz acumulação em G2/M, seguida por apoptose (Gagandeep *et. al.*, 1999).

Existe evidências que a alteração da função mitocondrial está ligada a apoptose e uma diminuição do potencial transmembranico da mitocôndria é associado a disfunção mitocondrial, que libera fatores apoptogênicos do espaço intermembranoso para o citoplasma (Wang *et al.*, 1999; Brady, 2004). A perda do potencial transmembrânico da mitocôndria é refletida pela menor capacidade da mitocôndria acumular rodamina.

O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) causou despolarização da mitocôndria dose-dependente. Os compostos 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) e 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) causaram despolarização dose-dependente nas concentrações menores que 50 e 25 µg/mL, respectivamente. Provavelmente a destruição das células nas maiores concentrações impediu o acúmulo de rodamina na mitocôndria. O composto 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**) causou despolarização somente na menor concentração.

O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) induziu apoptose nas células HL60, enquanto que os compostos 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**) e 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**46**) apresentaram características da apoptose somente na menor concentração testada, 12,5 e 5 µg/mL, respectivamente. A metoxila no C2 potencializa a ação apoptótica do 3,9-dimetoxipterocarpano (**44**), enquanto que a hidroxila em C3 aumenta a capacidade do composto induzir necrose. A hidroxila no C4 atenua os efeitos do composto 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**45**), ou seja, menor tencência em produzir necrose.

Alguns flavonóides (apigenina **39**, miricetina **13**, quercetina **41** e caempferol **23**) também induzem apoptose em HL60, onde a perda do potencial transmembranico da mitocôndria, liberação do citocromo c e ativação das caspases 3 e 9 deve estar envolvida. A potência desses flavonóides em induzir apoptose na concentração de 60 µM foi: apigenina (**39**) > quercetina (**41**) > miricetina (**13**) > caempferol (**23**). O grupo 3-hidroxi inibe a

capacidade de induzir apoptose pois a potência foi: apigenina > quercetina (Wang *et al.*, 1999).

A acacetina (**38**) inibe a proliferação das células de câncer de fígado, Hep G2 por indução de apoptose (HSU *et al.*, 2004). A quercetina (**41**) induz apoptose em leucemia K562, a fragmentação característica da apoptose apareceu após um pequeno período de exposição (1h) numa concentração de 55 μ M (Csokay *et al.*, 1997).

Alguns flavonóides também aumentam a atividade de outros antineoplásicos. A quercetina (**41**) e a luteolina (**15**) potencializam a citotóxicidade da cisplatina ao aumentar a morte por apoptose. O aumento da eficácia da cisplatina induzida por flavonas deve depender da presença dos grupos hidroxila em C3' e C4' 9 (Cipak *et al.* 2003).

As flavonas são compostos bem caracterizados pela atividade citotóxica, já os pterocarpanos apontam como um grupo pouco estudado mas que oferece bons resultados, principalmente o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**43**) que mostrou ser um ótimo candidato para testes pré-clínicos *in vivo*.

CONCLUSÕES

O grupo dos pterocarpanos foi mais ativo que as flavonas nos ensaios da atividade antimetabólica nos ovos do ouriço e na atividade citotóxica em células tumorais. Desta maneira, os pterocarpanos apontam como um grupo com elevado potencial antitumoral, principalmente o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano que mostrou ser um ótimo candidato para testes pré-clínicos *in vivo*. Os testes que avaliaram o mecanismo de ação do 2,3,9-trimetoxipterocarpano mostraram que esse composto induziu parada do ciclo celular e morte por apoptose.

No grupo das flavonas algumas observações sobre a relação estrutura-atividade podem ser citadas: a) a hidroxila no lugar da metoxila em C4' e C5' melhora a atividade; b) a hidroxila e o açúcar em C3 diminui a atividade e com os dados obtidos pode-se reforçar que a metoxila em C3 aumenta a atividade; c) A metoxila em C7 aumenta a atividade. Já no grupo dos pterocarpanos, a metoxila em C2 é uma importante unidade farmacofórica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal PK (1989) Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, 564p.
- Ahmad V & Rahman A (1994) Handbook of Natural Products Data. Pentacyclic Triterpenoids. New York: Elsevier, v.2.
- Banskota AH, Tesuka Y, Tran KO, Tanaka K, Saiki I, Kadota S (2000) Methyl quadrangularatis A-D and related triterpenes from *Combretum quadrangulare*. Chemical Pharmaceutical Bulletin. 48:496-504.
- Barreiro E.J. & Fraga C.A.M. (2001) Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. São Paulo- ARTMED Editora Ltda.
- Beutler JA, Hamel E, Vlietinck AJ, Haemers A, Rajan P, Roitman JN, Cardellina II JH e Boyd MR (1998) Structure-Activity Requirements for Flavone Cytotoxicity and Binding to Tubulin. Journal of Medicinal Chemistry 41: 2333-2338.
- Blank VC, Poli C, Marder M, Roguin LP (2004) Antiproliferative activity of various flavonoids and related compounds: additive effect of interferon- α 2b. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14: 133-136.
- Bohlin L & Rosén B (1996) Podophyllotoxin derivatives: drug discovery and development. Drug Discovery Today 1(08): 343-351.
- Borris RP (1996) Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. Journal of Ethnopharmacology 51: 29-38.
- Brady H. J. M. (2004) Apoptosis Methods and Protocols. Humana Press: Totowa, New Jersey.
- Butler & Dawson, (1992) Cell culture. Blackwell, Scientific Publications.

- Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Calabressi P (1996) Agentes antineoplásicos. In: Goodman & Gilman's: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Ed. By Goodman LS. Mcgraw-Hill, Rio de Janeiro. pp. 909-952.
- Chaudhuri SK, Huang L, Fulias F, Brown DM, Wani MC, Wall ME (1995) Isolation and structure identification of an active DNA Strant-Scission Agent, (+)-3,4-di-hidroxy-8,9-methylenodioxpterocarpan. *Journal of Natural Products* 58(12): 1966-1969.
- Cipák L, Novotny L, Cipakova I, Rauko P (2003) Differential modulation of cisplatin and doxorubicin efficacies in leukemia cells by flavonoids. *Nutrition Reserch* 23: 1045-1057.
- Collins SJ (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70: 1233-1244.
- Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270 (5635): 347-349.
- Costa SMO, Lemos TLG, Pessoa OD, Pessoa C, Montenegro RC, Braz-Filho R (2001) Chemical Constituents from *Lippia sidoides* and Cytotoxic Activity. *Journal of Natural Products* 64: 792-795.
- Costa-Lotufo LV, Jimenez PC, Wilke DV, Leal LKAM, Cunha GMA, Silveira ER, Canuto KM, Vianna GSB, Moraes MO e Pessoa C (2003) Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis* A. C. Smith. *Zeitschrift für Naturforschung* 58: 1-5.
- Cotter TG, Glynn JM, Echeverri F, Green DR (1992) The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle. *Anticancer Research* 12: 773-780.
- Cragg GM & Newman DJ (1999) Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. *Cancer investigation* 17(2): 153-163.
- Cragg GM & Newman DJ (2000) Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 9 (12): 1-15.

- Cragg GM, Newman DJ, Snader KM (1997) Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* 60: 52-60.
- Csokay B, Prajda N, Weber G, Olah E (1997) Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sciences* 60(24): 2157-2163.
- Cury-Boaventura MF, Pompéia C, Curi R. (2003) Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. *Clinical Nutrition* 23(4): 721-732.
- Dagne E, Gunatilaka AAL, Kingston DGI (1993) Two Bioactive Pterocarpanes from *Erythrina Burana*. *Journal of Natural Products* 56(10): 1831-1834.
- Dai Y & Grant (2003) Cyclin-dependent Kinase Inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology* 3:362-370.
- Dajas F, Rivera-Megre F, Blastina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Costa G, Echeverry C, Lafon L, Heizen H, Ferreira M and Morquio A. Neuroprotection by flavonoids (2003). *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research* 36: 1613-1620.
- Darzynkiewicz Z & Bedner E (2000) *Methods in enzymology*. Ed. by Reed JC. Academic press: San Diego vol. 322 (apoptosis).
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorezyca W., Hertz MA, Lassota P, Traganos F (1992) Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. *Cytometry* 13: 795-808.
- Dixon RA & Steele CL (1999) Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Science* 4 (10) 394-399.
- Engler TA, Lynch KO, Reddy JP, Gregory GS (1993) Synthetic pterocarpanes with anti-HIV activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 3: 1229-1232.
- Feher M & Schmidt JM (2003) Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Science* 43: 218-227.

- Firn R.O & Jones C.G. (2003) Natural products – a simple model to explain chemical diversity. *Natural Products Reports*. 20: 382-391.
- Fukai T, Marumo A., Kaitou K, Kanda T. Terada S., Nomura T (2002) Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. *Life Sciences* 71 1449-1463.
- Fusetani N (1987) Marine metabolites which inhibit development of echinoderm embryos. In: Scheur, PJ (Ed.), *Bioorganic Marine Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Gagandeep S, Novikoff PM, Ott M, Gupta S (1999) Paclitaxel shows cytotoxic activity in human hepatocellular carcinoma cells lines. *Cancer letters* 136: 109-118.
- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54(3): 713-33.
- Gálvez M, Martín-Cordero C, López-Lázaro M, Cortes F, Ayuso MJ (2003) Cytotoxic effects of *Plantago* ssp. on cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 88: 125-130.
- Geng C-X, Zeng Z-C, Wang J-Y (2003) Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. *World Journal of Gastroenterology* 9(4): 696-700.
- Gupta S, Afaq F, Mukhtar H (2001) Selective Growth-Inhibitory, Cell-Cycle Deregulatory and Apoptotic Response of Apigenin in Normal versus Human Prostate Carcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287: 914-920
- Harbone JB & Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504.
- Harvey AL (2000) Medicines from Nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 196-198.

- Havsteen B (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology* 32: 1141-1148.
- Hsu Y-L, Kuo P-L, Lin C-C (2004) Acacetin inhibits the proliferation of Hep G2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 67: 823-829.
- Ingham LJ (1976) Fungal modification of pterocarpan phytoalexins from *Melilotus alba* and *Trifolium pratense*. *Phytochemistry* 15: 1489-95.
- Instituto Nacional do Câncer (2004). <http://www.inca.gov.br>. Capturado em 25 de outubro de 2004.
- Ismail N & Alam M (2001) A novel flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia* 72: 676-679.
- Jacobs RS, White S, Wilson L (1981) Selective compounds derived from marine organisms: effects on cell division in fertilized sea urchin eggs. *Federation Proceedings* 40: 26 -29.
- Jacobs RS, Wilson L (1986) Fertilized sea urchin egg as a model for detecting cell division inhibitors. In: *Modern analysis of antibiotics*. Ed. by A. Aszalor and Marcel Dekker, Inc., 481–493.
- Kim SR, Park MJ, Lee MK, Sung SH, Park Ej, Kim J, Kim SY, OH TH, Markelonis GJ, Kim YC (2002) Flavonoids of *Inula Britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate. *Free Radical Biology & Medicine* 32: 596-604.
- Kingston DGI (1996) Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: *The Practice of Medicinal Chemistry*. Ed. by Wermuth CG. Academic Press Limited, 102-114.
- Kingston DGI (2000) Recent advances in chemistry of taxol. *Journal of Natural Products*, 63: 726-734.

- Korolkovas A (1998) Dicionário Terapêutico Guanabara. Editora Guanabara, cap. 12, Rio de Janeiro.
- Kruczynski A & Hill BT (2001) Vinflunine, the latest vinca alkaloid in clinical development. A review of its preclinical anticancer properties. *Clinical Review in Oncology/Hematology* 40:159-173.
- Kuo S-M (1996) Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer letters* 110: 41-48.
- Kurosawa K, Ollis WD, Redman BT, Sutherland IO, Gottlieb OR (1978) Vestitol and Vesticarpan, isoflavonoids from *Machaerium vestitum*. *Phytochemistry* 17: 1413-15.
- Letchier MR & Shirley MI (1976) Phenolic compounds from the heartwood of *Dalbergia nitidula*. *Phytochemistry* 15: 354-355.
- Lin J-H, Lin Y-T, Huang Y-J, Wen K-C, Chen R-M, Ueng T-H, Liao C-H (2001) Isolation and Cytotoxicity of Flavonoids from *Daphnis Genkwae* Flos. *Journal of Food and Drug Analysis* 9(1): 6-11.
- Luciano JHS, Lima MAS, Souza EB, Silveira ER (2004) Biochemical Systematics and Ecology 32: 1227-1229.
- Macias FA, Simonet AM, Galindo JCG, Castellano D (1999) Bioactive phenolics and polar compounds from *Melilotus messanensis*. *Phytochemistry* 50: 35-46.
- Mann J. (2002) Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Natural Reviews in Cancer* 2: 143-148.
- Mans DRA, Rocha AB, Schwartzmann G (2000) Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist* 5: 185-198.
- Marchand LL (2002) Cancer preventive effects of flavonoids - a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56: 296-301.

- Matsuda H, Morikawa T, Ando S, Toguchida I, Yoshikawa M (2003) Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11: 1995-2000.
- Mcmurry TBH, Martin E, Donnely DMX, Thompson JC (1972) 3-hydroxy-9-methoxy and 3-methoxy-9-hydroxy-pterocarpan. *Phytochemistry* 11: 3283-6.
- Middleton EJr, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer 2000. *Pharmacological Reviews* 52: 673-751.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/ INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas da incidência por câncer no Brasil para o ano de 2000. Rio de janeiro : INCA/ 1999-2000.
- Mitscher LA, Gollapudi S, Gerlach DC, Drake SD, Veliz EA e Ward JA (1988) Erycristin, A new Antimicrobial Pterocarpan from *Erythrina Crista-Galli*. *Phytochemistry* 27(2): 381-385.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivor: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Munro MHG, Luibrand RT, Blunt JW (1987) The search for antiviral and anticancer compounds in marine organisms. In: Scheuer, PJ (Ed) *Bioorganic Marine Chemistry*. Ed. by Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Murthi KK, Dubay M, McClure C, Brixuela L, Boisclair MD, Worland PJ, Mansuri MM, and Pal K (2000) Structure-Activity Relationship Studies of Flavopiridol Analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10: 1037-1041.
- Newman JD, Cragg GM, Snader KM (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66: 1022-1037.
- O' Marcaigh AS & Betcher DL (1995) The vinca alkaloids. *Journal of Pediatric Oncology Nursing* 12(3): 140-142.
- Ortholand J-Y. & Ganesan A 2004. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology*. B:271-280.

- Pailard F, Finot F, Mouche I, Prenez A, Vericat JA (1999) Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new entities. *Toxicology In vitro* 13: 693-700.
- Pezzuto J.M (1997) Plant-Derived Anticancer Agents. *Biochemical Pharmacology* 53: 121-133.
- Phillipson JD (2001) Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 56: 237-243.
- Pietta P-G (2000) Antioxidante activity of flavonoids. *Journal of Natural Products* 63: 1035-1042.
- Pouchert CJ & Behnke J (1993) The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra. Milwaukee: Aldrich Chemical Company, 1^a ed., v.2.
- Pueppke SG & VanEtten HD (1975) Identification of three new pterocarpans (6a,11a-dihydro-6*H*-benzo-furo[3,2-*c*][1]benzopyrans) from *Pisum sativum* infected with *Fusarium solani* f. sp. *lisi*. *Journal of Chemical Society. Perkin transactions I*: 946-8
- Ramanathan M (1997) Flow cytometry application in pharmacodynamics and drug delivery. *Pharmaceutical Reserch* 14: 1106-1114.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM (2001) *Farmacologia: Quarta edição*. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro.
- Reents S (1996) *Clinical Pharmacology: An Eletronic Reference and Teaching Guide*. Gold Standart Multimedia Inc.
- Rinehart KL (2000). Antitumor coumpounds from tunicates. *Medicinal Reserch Reviews*, 20 (1): 4512-15.
- Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G (2001) Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology* 1: 364-369.
- Rodrigues A.C.P. (2004) Aspectos químicos do estudo químico-farmacológico de plantas do Nordeste do Brasil: *Erythrina velutina* e *Annona squamosa*. Dissertação.

- Rofi RD & Pomilio AB (1985) 5,7,3'-trihydroxy-4',5'-dimethoxyflavone and Other Phenolics from Poá huecu. *Phytochemistry* 9: 2131-2131.
- Seo E-K, Kim N-C, Mi Q, Chai H, Wall MO, Wani MC, Navarro H A, Burgess JP, Graham JG, Cabieses F, Tan GT, Farnsworth NR, Pezzuto JM, Kinghorn AD (2001) Macharistol, a New Cytotoxic Cinnamylphenol from the Stems of *Machaerium aristulatum*. *Journal of Natural Products* 64: 1483-1485.
- Shapiro, H. M. (1995) Practical flow cytometry. Terceira ed., New York: Wiley-Liss, 1995.
- Shimada N, Akashi T, Aoki T, Ayabi S-I (2000) Induction of Flavonoid pathway in model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis. *Plant Science* 160: 37-47.
- Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C.P., Mentz L.A. e Petrovick P.R. (2003) Farmacognosia da planta ao medicamento. Quinta ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS cap 23 pp 577-614.
- Sonoda M, Nishiyama T, Matsukawa Y, Moriyasu M (2004) Cytotoxic Activities from two Scutellaria plants in chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 91: 65-68.
- Stevenson PC, Turner HC & Haware MP (1997) Phytoalexin accumulation in roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings associated with resistance to fusarium wilt (*Fusarium oxysporium* f.sp. ciceri). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50:167-178.
- Tahara S & Ibrahim RK (1995) Prenylated isoflavonoids-an update. *Phytochemistry* 38 (5): 1073-1094.
- Tulp M & Bohlin L (2002) *Trends in Pharmacological Sciences* 23(5): 225-231.
- Wang IK, Lin-Shiau S-Y & Lin J-K (1999) Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in Leukaemia HL-60 Cells. *European Journal of Cancer* 35: 1517-1525.
- Wenkert E, Gottlieb HE (1977) Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoid and isoflavonoid compounds. *Phytochemistry* 16: 1811-1816.

Zahir A, Jossang A, Bodo B (1996) DNA Topoisomerase I Inhibitors: Cytotoxic Flavones from *Lethedon tannaensis*. *Journal of Natural Products* 59: 701-703.

Zamai L, Canonico B, Luchetti F, Ferri P, Melloni E, Guidotti L, Cappelline A, Cutroneo G, Vitale M, Papa S (2001) Supravital Exposure to Propidium Iodide Identifies Apoptoses on Adherent Cells. *Cytometry* 44:57-64.