

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA  
BIFLORINA, *o* - NAFTOQUINONA ISOLADA DAS  
RAÍZES DE *Capraria biflora* L.**

**MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS**

**FORTALEZA**

**2007**

**MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS**

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA  
BIFLORINA, *o* - NAFTOQUINONA ISOLADA DAS  
RAÍZES DE *Capraria biflora* L.**

*Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.*

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo

**FORTALEZA  
2007**

V448e Vasconcellos, Marne Carvalho de

Estudo do potencial antineoplásico da biflorina, *o*-naftoquinona isolada das raízes de *Capraria biflora* L. / Marne Carvalho de Vasconcellos – Fortaleza, 2007

181 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza – CE, 2007

1. Farmacologia 2. Teste de mutagenicidade 3. Toxicidade.

I. Moraes Filho, Manoel Odorico de (orient.) II. Título

CDD 615.1

**MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS**

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA  
BIFLORINA, *o* - NAFTOQUINONA ISOLADA DAS  
RAÍZES DE *Capraria biflora* L.**

Tese aprovada em 14 de dezembro de 2007

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho  
Orientador  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo  
Co-Orientadora  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart  
Universidade Federal de Alagoas

## DEDICATÓRIA

*“Dedico esta tese a meus pais  
Lena e Mário Vasconcellos  
com todo meu amor.”*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar presente em todos os segundos de minha vida, me dando força principalmente nos momentos de desânimo.

Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes, meu orientador, que ainda quando aluna de Farmácia, em Manaus, me deu a oportunidade de vir pra cá e durante todos esses anos aqui em Fortaleza, sempre me incentivou e me orientou a continuar.

A Dra. Letícia Veras Costa Lotufo que sempre foi muito mais que uma co-orientadora, em todos os momentos fosse fácil ou difícil me recebeu e apoiou, pela amizade e compreensão constantes pela troca científica ao longo desses anos e por todas as broncas também.

A Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes pela constante participação na minha formação acadêmica no Laboratório de Oncologia Experimental ou na Unidade de Farmacologia Clínica, pelo voto de confiança além de seu apoio e compreensão em todas as horas.

Ao Dr. João Antônio Pegas Henriques pela oportunidade de conviver em seu laboratório na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por toda sua orientação, carinho e apoio sem os quais parte desse trabalho não se realizaria.

A Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart por aceitar participar da minha banca, pela simpatia constante e oportunidade de colaboração nesse trabalho.

Ao Dr. Fernando Antonio Frota Bezerra pela orientação, pelo convívio, com seu maravilhoso senso de humor e a paz de espírito que transmitia nas horas difíceis e claro pela malacagem compartilhada.

A Dra. Claudia do Ó Pessoa, pelo apoio e incentivo constantes, ainda que em momentos difíceis o meu muito obrigada, por todos esses anos de convívio.

A Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves pela incansável disponibilidade, pela amizade e carinho em todas as horas.

A Dra. Maria Rosa Lozano Borrás, pela constante torcida, carinho e amizade dispensada desde a graduação até hoje.

Ao Dr. Rommel Burbano pela oportunidade de conviver e aprender em seu laboratório na Universidade Federal do Pará.

A Dra. Telma Leda Gomes de Lemos pela oportunidade de poder trabalhar com a biflorina.

A Dra. Jenifer Saffi pelo agradável convívio em Porto Alegre.

Aos amigos do LOE, Diego, Helton, Hemerson, Gardênia, Hélio, Patrícia Bonavides, Patrícia Marçal, Paulo Michel, Danilo, Ivana, Carla, Bruno, Zé Roberto, Delano, Jérsia, Arinice, Washington e Felipe por compartilharem suas experiências e amizade.

Aos amigos da Unidade de Farmacologia, André, Demétrius, Ismael, Ismênia, Ana, Vagnaldo, Aline e Pacífica.

Aos companheiros, Cynthia, Kristiana, Cecília, Dayse, Silvéria e até o Carlinhos, por nossas caranguejadas.

À Silvana pela imensurável ajuda neste trabalho.

Aos técnicos, Luciana, Adriano, Fátima, Evanir, Raimundo e Paulo sempre prontos a ajudar.

Às secretárias Fábria, Maria Tereza, Flávia, Malu, Aura, Joana, Sheila e Adelânia que sempre davam “um jeito” em tudo.

Aos professores da Pós-Graduação em Farmacologia pelos ensinamentos.

À Íris, Fernando, Chiquinho, Mônica, Vilanir, Alana, Carlos, Sílvio, Dona Bia, Sr. Francisco, Sr. Aroldo, Sr. Dantas e demais funcionários da UNIFAC e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, por fornecerem sempre boas condições de estudo e trabalho.

Ao Aluísio Marques Fonseca pela paciência e disponibilidade incansáveis sempre que lhe pedia mais biflorina.

Aos amigos Márcia e Antônio Barroso, pelo agradável convívio, amizade e carinho constantes.

Aos amigos Tércio, Emília e Cecília pela salutar convivência durante o doutorado, pelo carinho e amizade.

Aos amigos que fiz na UFRGS, Renato, Dinara, Giovanni, Albanin, Miriana, Izabel, Anas, Nicolas, Santos, Fernanda, Mirian, Márcia, Knulp, Jack, Cassiana, Bacana, Renata e Fabrício.

Aos amigos que fiz na UFPA, Patrícia, Dani Baiana, Dani, Drica, Aline, Taís e André.

Na UFAL a Aline pela grande colaboração e paciência que teve comigo durante nosso recente convívio.

Ao povo do Labomar, Janise, Janaína, Jeanylle, Lucas, Josi e Marcionília.

Ao amigo Daniel Pereira Bezerra o qual sem seu dinamismo e desprendimento com os animais com certeza esse trabalho não se realizaria, valeu!!!

Ao amigo Marcio Pinho Pereira, por estar sempre presente e disposto a me ajudar em todas as horas, por sua amizade, carinho, compreensão e por todos os seriados que assistimos juntos.

À amiga Paula Christine Jimenez, por sempre estar por perto, pelo carinho, amizade e acolhida em todas as horas difíceis, mas também nas horas lúdicas compartilhando de



agradáveis momentos como em nossas incansáveis partidas de buraco ao lado da tia Susana e da tia Simone tomando caldo verde, com a Nágela peruando.

A amiga Isabelle Arthaud, outra companheira de carteador, dos seriados e de tantas outras coisas, pelo carinho e amizade.

A amiga Raquel Carvalho Montenegro, por sua amizade, carinho e compreensão, ao longo desses anos.

A meus tios e padrinhos Carlos (*in memoriam*) e Maria Sidney, por todo apoio durante esses anos.

Aos meus irmãos Marla e Marcel, e ao meu cunhado Marcos que durante a minha ausência, compartilharam comigo o incentivo carinhoso deles contido.

Agradeço também ao apoio financeiro da CAPES e do Instituto Claude Bernard, sem os quais não poderia realizar este trabalho.

## RESUMO

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA BIFLORINA, o - NAFTOQUINONA ISOLADA DAS RAÍZES DE *Capraria biflora* L.** Marne Carvalho de Vasconcellos. Orientador: Manoel Odorico de Moraes Filho. Co-orientadora: Leticia Veras Costa Lotufo. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2007.

A biflorina é uma 1,4 – orto-naftoquinona isolada de raízes de *Capraria biflora*, que possui uma ampla distribuição nas américas do Sul e do Norte. O objetivo desse trabalho foi avaliar se a biflorina apresentava um potencial citotóxico e antitumoral utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. O presente estudo também avaliou a genotoxicidade dessa molécula em linfócitos periféricos humanos e em outros modelos como células V79, bactérias, leveduras bem como em medula óssea de camundongos. Frente a dezesseis linhagens tumorais, dentre elas 15 humanas e 1 murina, a biflorina mostrou-se bastante citotóxica, uma vez que teve sua  $CI_{50}$  variando de 0,43 e 14,61  $\mu\text{g/mL}$ . Para avaliar sua seletividade, ela foi testada também em linfócitos humanos estimulados com fitohemaglutinina, onde se pode concluir que ela não é seletiva. A biflorina não foi capaz de inibir o desenvolvimento de ovos de ouriço-do-mar e nem causar ruptura na membrana de hemácias de camundongos. Para avaliar seu mecanismo de ação e seu potencial antitumoral *in vivo* a linhagem B16 (Melanoma) foi escolhida para que os testes *in vitro* e *in vivo* pudessem ser realizados com a mesma célula. Os estudos *in vitro* realizados por coloração diferencial e por citometria de fluxo sugerem que a biflorina induz morte celular por apoptose, uma vez que as células tratadas apresentaram redução do volume nuclear, condensação de cromatina e formação de corpos apoptóticos. A citometria de fluxo confirmou a fragmentação de DNA induzida na maior concentração de biflorina e demonstrou que as células tratadas apresentaram despolarização da mitocôndria significativa. Além disso, por citometria a integridade de membrana não foi alterada e não exibiu aumento da porcentagem de células não viáveis, sendo o mesmo observado com as células avaliadas por exclusão por azul de tripan. A atividade *in vivo* da biflorina foi avaliada em três modelos, sarcoma 180, carcinoma de Erlich e melanoma B16. A biflorina inibiu o crescimento dos tumores dos animais transplantados com sarcoma 180 e carcinoma de Erlich, bem como foi capaz de aumentar a resposta antitumoral e diminuir a toxicidade sistêmica do 5-FU quando associada com ele. Nos animais transplantados com B16 a sobrevida dos animais tratados com biflorina aumentou significativamente. Foi demonstrado também que a biflorina possui ação imunoadjuvante aumentando a produção de anticorpos contra ovalbumina, o que pode estar relacionada com suas propriedades antitumorais. Também foi estudada a interação da biflorina com o DNA de fita dupla e de fita simples, mostrando que ela inibe diretamente o DNA, mas não inibe Topoisomerase I, sugerindo que outro mecanismo deve estar associado a essa interação, podendo estar relacionado à indução de dano ao DNA. Contudo a biflorina mostrou-se genotóxica apenas no teste do cometa, onde a frequência e o índice de danos em linfócitos humanos aumentaram significativamente, sem, no entanto induzir efeito clastogênico pelo teste de aberrações cromossômicas. Por outro lado, por sua comprovada atividade antioxidante, possivelmente associada à remoção de grupos hidroxil, a biflorina demonstrou ter uma atividade antimutagênica, contra células V79 e linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , quando usada em baixas concentrações, além de não causar peroxidação lipídica bem como diminuir a peroxidação lipídica medida pelos níveis de TBARS em células V79. Ainda para descartar quaisquer dúvidas em relação a não indução de mutagenicidade pela biflorina, outros dois testes sugeridos pelos protocolos internacionais como testes padrão para comprovação de segurança de muitos químicos incluindo biocidas e fármacos, foram realizados os testes de Ames em *Salmonella thyphimurium* e o teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos, ambos com resultados negativos. Todos esses dados compilados sugerem que a biflorina é uma droga com uma potente atividade citotóxica em células neoplásicas, antitumoral, atividade imunoadjuvante, potencial antioxidante que interage diretamente com DNA de fita simples e de fita dupla, mas não inibe topoisomerase, porém mostra-se genotóxica, mas não mutagênica quando testada em vários modelos biológicos.

**Palavras chave:** Biflorina, citotoxicidade, atividade antitumoral e antimutagenicidade.

## ABSTRACT

**ANTINEOPLASTIC POTENTIAL OF BIFLORIN, *o* - NAFTOQUINONE ISOLATED FROM THE ROOTS OF *Capraria biflora* L.** Marne Carvalho de Vasconcellos. Advisor: Manoel Odorico de Moraes Filho. Co-advisor: Leticia Veras Costa Lotufo. Doctorate Thesis. Graduate Program on Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Federal University of Ceara, 2007.

Biflorin is a 1,4 - *o*-naftoquinone isolated from the roots of *Capraria biflora*, which has an ample distribution among North and South América. The goal of this study was to evaluate the antineoplastic potential of biflorin *in vitro* and *in vivo* models. Genotoxic effects in human peripheral lymphocytes and other cell models, such as V79, bacteria and yeasts, as well as in mice bone marrow. Was also accessed biflorin was highly cytotoxic against 15 human tumor cell lines and 1 murine cell line, with IC<sub>50</sub> ranging from 0.43 to 14.61 µg/mL. Cell selectivity was not observed, since it was equally toxic to normal human lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. No inhibitory effect on sea-urchin egg development or lysis of mouse erythrocyte was observed following biflorin treatment. Mode of action studies and antitumor potential was evaluated on the B16 melanoma cell line, which enables *in vitro* and *in vivo* studies. The *in vitro* data suggests that biflorin induces cell death by apoptosis, as treated cells showed a decrease in nucleus size, chromatin condensation and formation of apoptotic bodies. Flow cytometry confirmed DNA fragmentation and a significant mitochondrial depolarization on the highest concentration tested. Membrane integrity disruption was not observed when analyzed by flow cytometry and no increase in non viable cells was registered. The later result was also seen on the trypan blue exclusion cell count. *In vivo* antitumor activity was evaluated in three tumor models: Sarcoma 180, Erlich's Carcinoma and Melanoma B16. Biflorin inhibited tumor growth in S-180 and Erlich transplanted animals and increased the antitumor effect of 5-FU where decreasing its toxicity. On B16 transplanted animals, survival span of biflorin-treated animals increased significantly. It was demonstrated that biflorin possess immune-adjuvant properties, increasing the production of anti-albumin antibodies, which can be related to its antitumor activity. Interaction of biflorin with single and double stranded DNA was confirmed, but was shown that it does not inhibit topoisomerase I, suggesting that a different mechanism is associated with this interaction, probably DNA damage induction. Biflorin showed genotoxicity only on the comet assay, in which frequency and damage index towards human lymphocytes were significantly increased, without, however, inducing clastogenic effect on chromosome aberration assessment. On the other hand, due to its antioxidant effect, possibly associated to removal of hydroxyl groups, biflorin, in lower concentrations, showed antimutagenic activity towards V79 cells and *Saccharomyces cerevisiae* treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Moreover, it does not induce lipidic peroxidation, thus reducing this effect in V79 cells, as seen by assessment of TBARS levels. To discard any doubts on biflorin's non-mutagenic properties; the Ames test in *Salmonella thyphimurium* and the micronucleus assay on mouse bone marrow was carried out, both presenting a negative result. Taken together, these results suggest that biflorin is a strong cytotoxic compound against neoplastic cells as possess antitumor, immune-adjuvant and antioxidant potential, interacts directly with single and double stranded DNA, but not topoisomerase I, has a genotoxic but not mutagenic effect and increases survival rate in treated mice.

**Keywords:** Biflorin, cytotoxicity, antitumor activity and antimutagenicity.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>&amp;</b>	E
<b>&lt;</b>	Maior que
<b>&gt;</b>	Menor que
<b>AcOH</b>	Ácido acético
<b>Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup></b>	Eletrodo de referência – Fio de prata imerso em solução de cloreto de prata
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance (Análise de Variância)
<b>AOLW</b>	Absorbância de comprimento de onda baixo
<b>AOWH</b>	Absorbância de comprimento de onda alto
<b>BrdU</b>	Bromodeoxiuridina
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração efetiva
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória média
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico (ADN)
<b>Dox</b>	Doxorrubicina
<b>dsDNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)
<b>SEM</b>	Etil Metano Sulfonato
<b>EMEA</b>	The European Medicines Agency
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>G</b>	Gramas
<b>H</b>	Hora
<b>H/E</b>	Hematoxilina/Eosina
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água destilada
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HST</b>	High –throughput screening

<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LA/BE</b>	Laranja de acridina/ Brometo de etídio
<b>L</b>	Litro
<b>mg</b>	Miligramas
<b>Min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MMS</b>	Metil Metano Sulfonato
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)2,5-difenil-2H tetrazolina bromido
<b>NaOAc</b>	Acetato de sódio
<b>Nm</b>	Nanômetro
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>PBS</b>	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>q.s.p.</b>	Quantidade suficiente para
<b>RNM</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>ssDNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico em fita simples (ou simples hélice)
<b>TBS</b>	Tris buffer solution (Tampão de tris)
<b>TBARS</b>	Espécies reativas de tiobarbitúricos
<b>US-NCI</b>	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
<b>VPD</b>	Voltametria de pulso diferencial
<b>X</b>	Vezes
<b>µL</b>	Microlitro

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Agentes anticâncer utilizados na clínica derivados de plantas.
- Tabela 2** Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.
- Tabela 3** Efeito inibitório da biflorina e doxorubicina sobre células neoplásicas humanas pelo método MTT.
- Tabela 4** Atividade antimitótica da biflorina e doxorubicina sobre o desenvolvimento de ovos de ouriço-do-mar.
- Tabela 5** Taxa de inibição tumoral dos animais tratados com biflorina e 5-fluorouracil transplantados com Sarcoma 180.
- Tabela 6** Taxa de inibição tumoral dos animais tratados com biflorina e 5-fluorouracil transplantados com Carcinoma de Erlich.
- Tabela 7** Valores de velocidade de varredura ( $v$ ), potenciais de pico catódico ( $E_{pc}$ ), potenciais de pico anódico ( $E_{pa}$ ) e variação entre potencial anódico e catódico ( $E_{pa} - E_{pc}$ ) da Biflorina.
- Tabela 8** Protocolos de tratamento da biflorina aplicados a linfócitos humanos em curtos tempos de cultura.
- Tabela 9** Aberrações cromossômicas (ACs) e índice mitótico em cultura de linfócitos tratados com biflorina durante as fases G1 e G1/S do ciclo celular.
- Tabela 10** Aberrações cromossômicas (ACs) e índice mitótico em cultura de linfócitos tratados com biflorina durante a fase S do ciclo celular.
- Tabela 11** Aberrações cromossômicas (ACs) e índice mitótico em cultura de linfócitos tratados com biflorina durante a fase G2 do ciclo celular.
- Tabela 12** Atividade retiradora de radicais livres da biflorina no sistema DPPH.
- Tabela 13** Dano no DNA pelo teste cometa em células V79 expostas a biflorina mais  $H_2O_2$  por 1h a  $37^\circ C$  com subsequente tratamento com tampão, endonuclease III e formamidopirimidina DNA – glicosilase.
- Tabela 14** Indução de mutação na linhagem XV-18514C de *S. cerevisiae* após 3h de tratamento com biflorina.
- Tabela 15** Indução de mutação na linhagem XV-18514C de *S. cerevisiae* após o tratamento com peróxido de hidrogênio em células na fase estacionária pré-incubadas com biflorina por 3h em condições de não crescimento.
- Tabela 16** Indução de crossing-over (*/cyh2*) e conversão gênica (*leu1-1/leu1-12*) na linhagem diplóide XS2316 de *S. cerevisiae* após tratamento com biflorina durante a fase de crescimento exponencial e o efeito desse pré-tratamento sobre a indução de recombinação pelo peróxido de hidrogênio.
- Tabela 17** Indução de revertentes de *his+* em linhagens de *Salmonella typhimurium* pela biflorina com e sem atividade metabólica.
- Tabela 18** Indução de revertentes de *his+* em linhagens de *Salmonella typhimurium* pela biflorina com e sem atividade metabólica.
- Tabela 19** Indução de revertentes de *his+* em linhagens de *Salmonella typhimurium* pela biflorina com e sem atividade metabólica.
- Tabela 20** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados dos animais tratados com biflorina em 24 e 48h.

**Tabela 21** Resumo dos resultados obtidos com a biflorina.



## Lista de Figuras

- Figura 1** Esquema das bases moleculares da formação do câncer.
- Figura 2a** Representação espacial das taxas brutas de incidência em homens.
- Figura 2b** Representação espacial das taxas brutas de incidência em mulheres.
- Figura 3** Classificação de antineoplásicos segundo Calabresi e Chabner.
- Figura 4** Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular.
- Figura 5** Representação do DNA, em fita dupla e em fita simples.
- Figura 6** Estrutura química do DNA de fita dupla.
- Figura 7** Representação do modo de operação do biossensor de DNA.
- Figura 8** Distribuição da origem dos medicamentos anticâncer que estão no mercado nos últimos 25 anos.
- Figura 9** Estrutura química das quinonas usando-se como critério o anel quinoidínico.
- Figura 10** Estrutura química de diferentes naftoquinonas.
- Figura 11a** Foto da *Capraria biflora*.
- Figura 11b** Foto das raízes de *Capraria biflora*.
- Figura 12** Estrutura química da biflorina.
- Figura 13** Fluxograma da obtenção dos extratos das raízes de *Capraria biflora*.
- Figura 14** Esquema representativo do método MTT.
- Figura 15** Esquema representativo do método antitumorigênico em ovos de ouriço-do-mar.
- Figura 16** Esquema representativo do método de hemólise em eritrócitos de camundongos.
- Figura 17** Esquema representativo do método de exclusão por azul de tripan.
- Figura 18** Esquema representativo do método de coloração hematoxilina/eosina.
- Figura 19** Esquema representativo do método de coloração laranja de acridina/brometo de etídio.
- Figura 20** Esquema representativo do método do BrDU.

- Figura 21** Esquema representativo do citômetro de fluxo.
- Figura 22** Esquema representativo dos protocolos antitumorais em camundongos.
- Figura 23** Esquema representativo do protocolo de sobrevivência dos animais transplantados com melanoma B16.
- Figura 24** Esquema representativo do método imunoadjuvante em animais.
- Figura 25** Voltamograma de Pulso Diferencial (Carbono Vítreo) para a mistura das bases guanina e adenina.
- Figura 26** Esquema representativo do método Alamar Blue.
- Figura 27** Esquema representativo do método do cometa.
- Figura 28** Representação esquemática dos danos do cometa observados ao microscópio.
- Figura 29** Esquema representativo do método de aberrações cromossômicas em linfócitos.
- Figura 30** Esquema representativo dos testes em bactérias e leveduras.
- Figura 31** Esquema representativo da formação de micronúcleos.
- Figura 32** Esquema representativo do método de micronúcleos *in vivo*.
- Figura 33** Determinação da viabilidade celular por azul de tripan das células B16 tratadas com biflorina após 24 h de incubação.
- Figura 34** Fotomicrografia das células B16 tratadas com biflorina após 24 h de incubação, coradas por H/E.
- Figura 35** Determinação da viabilidade celular por LA/BE das células B16 tratadas por 24 h com biflorina utilizando coloração por microscopia de fluorescência.
- Figura 36** Inibição do 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) incorporado pelas células B16 tratadas por 24 h com biflorina.
- Figura 37** Histogramas de ciclo celular das células B16 tratadas por 24 h com biflorina.
- Figura 38** Determinação da fragmentação internucleossomal do DNA de células B16 por citometria de fluxo.
- Figura 39** Determinação do efeito da biflorina sobre o potencial transmembrana em células B16 por citometria de fluxo usando rodamina 123.
- Figura 40a** Fotomicrografia dos órgãos dos animais tratados com biflorina e 5-FU.
- Figura 40b** Fotomicrografia dos órgãos dos animais tratados com biflorina e 5-FU.

- Figura 41** Efeito imunoadjuvante sobre camundongos saudáveis imunizados biflorina e ovalbumina.
- Figura 42** Curva de sobrevivência dos animais transplantados com células de melanoma B16 tratados com biflorina e dacarbazina.
- Figura 43** Efeito sobre o volume tumoral dos grupos controle e tratados com biflorina transplantados com células B16 no experimento de sobrevivência.
- Figura 44** Efeito imunoadjuvante sobre camundongos B57CL/6 transplantados com células B16 imunizados com biflorina e ovalbumina.
- Figura 45** Voltametria cíclica da biflorina.
- Figura 46a** Voltametria quadrada da biflorina.
- Figura 46b** Voltametria de pulso diferencial da biflorina.
- Figura 47** Voltametria de pulso diferencial da biflorina.
- Figura 48** Voltametria de pulso diferencial do biossensor de dsDNA em presença da biflorina.
- Figura 49** Voltametria de pulso diferencial do biossensor de ssDNA em presença da biflorina.
- Figura 50a** Frequência de dano do efeito da biflorina ou doxorrubicina no teste do cometa em linfócitos humanos.
- Figura 50b** Índice de dano do efeito da biflorina ou doxorrubicina no teste do cometa em linfócitos humanos.
- Figura 51** Efeito da biflorina na autooxidação do ácido oléico. A oxidação do ácido oléico.
- Figura 52** Inibição da geração de espécies reativas de oxigênio pela biflorina no sistema hipoxantina-xantina oxidase
- Figura 53** Sobrevivência clonogênica de células V79 após o tratamento com biflorina em diferentes concentrações por 3 horas.
- Figura 54** Sobrevivência clonogênica de células V79 pré-tratadas com doses não tóxicas de biflorina por 3 h em meio sem SBF e exposto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h.
- Figura 55** TBARS em células V79 pré-tratadas com biflorina e expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Figura 56a** Frequência de dano do efeito da biflorina ou doxorrubicina no teste do cometa em células V79.
- Figura 56b** Índice de dano do efeito da biflorina ou doxorrubicina no teste do cometa em células V79.
- Figura 57a** Frequência de micronúcleos dos animais tratados com biflorina ou EMS por 24 horas.
- Figura 57b** Frequência de micronúcleos dos animais tratados com biflorina ou EMS por 48 horas.

# SUMÁRIO

Dedicatória	
Agradecimentos	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Resumo	
Abstract	
<b>1. Introdução</b>	<b>22</b>
1.1. Câncer	22
Modelos antitumorais não clínicos utilizados no desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos	33
1.2. Produtos Naturais	35
1.3. Naftoquinonas	40
<b>2. Objetivos</b>	<b>48</b>
2.1. Geral	
2.2. Específicos	
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>49</b>
3.1. Material Utilizado	49
Equipamentos	49
Soluções	51
Reagentes	53
Fármacos	53
3.2. Metodologia Experimental	54
3.2.1. Obtenção da Biflorina	54
Coleta e informações sobre a planta	
Obtenção dos extratos das raízes de <i>Capraria biflora</i>	
Obtenção de CBR-2 a partir de EEP	
Obtenção de CBR-2 a partir de EEE	
Coleta e informações sobre a planta	
3.2.2. Estudo da citotoxicidade <i>in vitro</i>	55
3.2.2.1. Linhagens Celulares Utilizadas	55

3.2.2.2. Manutenção das Células	56
3.2.2.3. Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> – Ensaio do MTT	56
3.2.3. Avaliação da atividade antimitótica nos ovos do ouriço-do-mar	57
3.2.4. Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss	59
3.3. Estudo de mecanismo de ação no modelo de melanoma murino <i>in vitro</i>	60
3.3.1. Viabilidade celular – Exclusão por azul de tripan	60
3.3.2. Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina	62
3.3.3. Análise morfológica – Coloração diferencial por Laranja de Acridina / Brometo de Etidio	63
3.3.4. Inibição da síntese de DNA por incorporação de BrDU	64
3.3.5. Análises por citometria de fluxo	66
3.3.5.1. Integridade da membrana plasmática	66
3.3.5.2. Ciclo celular e fragmentação de DNA	67
3.3.5.3. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria	68
3.4. Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	70
3.4.1. Avaliação do efeito da biflorina em camundongos transplantados com os tumores Sarcoma 180 e Carcinoma de Erlich	70
3.4.2. Efeito na biflorina na sobrevida de animais transplantados com o tumor Melanoma B16	72
3.4.3. Avaliação da Atividade Imunoadjuvante	73
3.5. Avaliação da interação da biflorina com o DNA	75
3.5.1. Interação com DNA por eletroquímica	75
3.5.2. Inibição da enzima Topoisomerase I	77
3.6. Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e clastogênico <i>in vitro</i> em linfócitos humanos	77
3.6.1. Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> – Ensaio do Alamar Blue	77
3.6.2. Teste Cometa	79
3.6.3. Avaliação de Aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico	82
3.7. Avaliação do potencial antioxidante	83
3.7.1. Autoxidação do ácido oléico	83
3.7.2. Atividade antioxidante para determinação da remoção de radicais livres por DPPH	84
3.7.3. Hipoxantina/Xantina Oxidase	84

3.8. Atividade biológica e genotóxica em células V79	85
3.8.1. Cultura de células V79	85
3.8.2. Avaliação da citotoxicidade a partir da sobrevivência clonal	85
3.8.3. Avaliação da peroxidação lipídica	85
3.8.4. Teste cometa	86
3.9. Potencial genotóxico em diferentes sistemas biológicos	86
3.9.1. Detecção da atividade citotóxica, mutagênica e antimutagênica em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
3.9.2. Teste em <i>Salmonella thiphymurium</i> – teste de Ames	88
3.9.3. Micronúcleos de medula óssea de camundongos	90
Preparo dos animais para o teste do micronúcleo	
<b>4. Resultados</b>	95
4.1. Atividade citotóxica <i>in vitro</i>	95
4.1.1. Teste de citotoxicidade em células de linhagens tumorais – Teste do MTT	95
4.1.2. Teste da atividade antimitótica em ovos de ouriço-do-mar	97
4.1.3. Atividade hemolítica	97
4.2. Estudo do mecanismo de ação no modelo de melanoma murino <i>in vitro</i>	98
4.2.1. Análise da Viabilidade celular – Exclusão por azul de tripan	98
4.2.2. Análise morfológica – Coloração por hematoxilina/eosina	99
4.2.3. Análise morfológica – Coloração diferencial por Laranja de Acridina/Brometo de Etídio	101
4.2.4. Síntese de DNA por incorporação de BrDU	102
4.2.5. Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA	103
4.2.6. Potencial transmembrana	105
4.3. Atividade antitumoral em modelos animais <i>in vivo</i>	106
4.3.1. Modelo murino em animais transplantados com Sarcoma 180 e Carcinoma de Erlich	106
4.3.1.1. Toxicidade Sistêmica em camundongos <i>Swiss</i>	106
4.3.2. Atividade imunoadjuvante em animais <i>Swiss</i> saudáveis	112
4.3.3. Modelo murino em animais transplantados com Melanoma B16	112
4.3.3.1 Sobrevida dos animais e inibição tumoral	112
4.3.3.2 Atividade Imunoadjuvante	114
4.4. Avaliação da interação da biflorina com o DNA	115

4.4.1. Fita Dupla <i>dsDNA</i>	118
4.4.2. Fita Simples <i>ssDNA</i>	119
4.4.3. Inibição de Topoisomerase I	119
4.5. Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e clastogênico <i>in vitro</i> em linfócitos humanos	120
4.5.1. Avaliação da citotoxicidade pelo método do Alamar Blue	120
4.5.2. Avaliação da genotoxicidade – Teste Cometa	120
4.5.3. Avaliação da clastogenicidade – Teste de Aberrações Cromossômicas	122
4.6. Avaliação do potencial antioxidante	125
4.6.1. Autoxidação do ácido oléico	125
4.6.2. Xantina Oxidase	126
4.6.3. Efeito retirador de radicais livres pelo método DPPH	126
4.7. Atividade biológica e genotóxica em células v79	128
4.7.1. Sobrevivência Clonogênica e Peroxidação Lipídica em células V79	128
4.7.2. Potencial genotóxico em células V79	131
4.8. Potencial genotóxico em diferentes sistemas biológicos	134
4.8.1. Leveduras	134
4.8.2. Teste de Ames em <i>Salmonella thyphimurium</i>	138
4.8.3. Avaliação do potencial clastogênico da biflorina em medula óssea de camundongo	142
<b>5. Discussão</b>	145
<b>6. Considerações Finais</b>	165
<b>7. Conclusão</b>	166
<b>8. Referências</b>	167
<b>9. Anexos</b>	
Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais	
Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	
Anexo 3 – Trabalhos Publicados	

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CÂNCER

Nos organismos vivos, a informação genética encontra-se na molécula de DNA. O DNA, ou ácido desoxirribonucléico codifica os genes responsáveis pela estrutura e função dos organismos e permite a transmissão das características das espécies para a progênie na forma de genes (FERREIRA & ROCHA, 2004). Os genes servem como moldes para a síntese das moléculas de RNA, que por final são utilizadas para sintetizar polipeptídeos, os componentes básicos para todas as proteínas (READ, 2002).

A molécula de DNA não é estável e está sujeita à formação de lesões, as quais se caracterizam como alterações químicas da molécula original. Tais alterações são denominadas mutações que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA. Essas alterações químicas são diversas e resultantes de três causas principais: lesões espontâneas devido à instabilidade inerente das ligações químicas específicas dos nucleotídeos em condições fisiológicas de temperatura e pH; o ataque de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; e, por fim, lesões ambientais resultantes de interações da molécula de DNA com diferentes agentes físicos e compostos químicos presentes no meio ambiente (HOEIJMAKERS, 2001).

A frequência com que alterações espontâneas ocorrem no DNA é relativamente alta: 25 mil bases por dia em uma célula humana contendo o seu genoma total ( $3 \times 10^9$  pb) (FRIEDBERG, 2001). Lesões persistentes no DNA acarretam o funcionamento celular incorreto e em aumento da mutagênese devido a uma maior probabilidade de ocorrerem erros quando da replicação de um molde alterado do DNA. Muitas das mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular e, por consequência, também não são detectáveis. Apenas um pequeno número de mutações como as que ocorrem em genes específicos e alteram o código genético inicial podem resultar em processos de tumorigênese levando ao aparecimento do câncer (TORNATELLI & HANAWALT, 1999).

A palavra câncer é de origem latina (*Cancer*) que significa “caranguejo”, a qual deve ter sido empregada em analogia entre a morfologia do crustáceo e ao modo de crescimento infiltrante do tumor (DE ALMEIDA, 2005).



Durante a vida do indivíduo, as células normais dividem-se rapidamente até atingir a fase adulta do mesmo. Já as células cancerosas diferem das células normais, pelo fato de continuarem a crescer e se dividir, não obedecendo ao controle biológico natural do organismo (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Dividindo-se rapidamente, estas células adquirem novas características genéticas que as tornam mais agressivas, determinando a formação de tumores primários ou neoplasias malignas ou câncer, com propriedades de invasão e destruição do tecido adjacente, bem como de metastização (HANAHAN & WEINBERG, 2000, INCA - Instituto Nacional do Câncer, 2007).

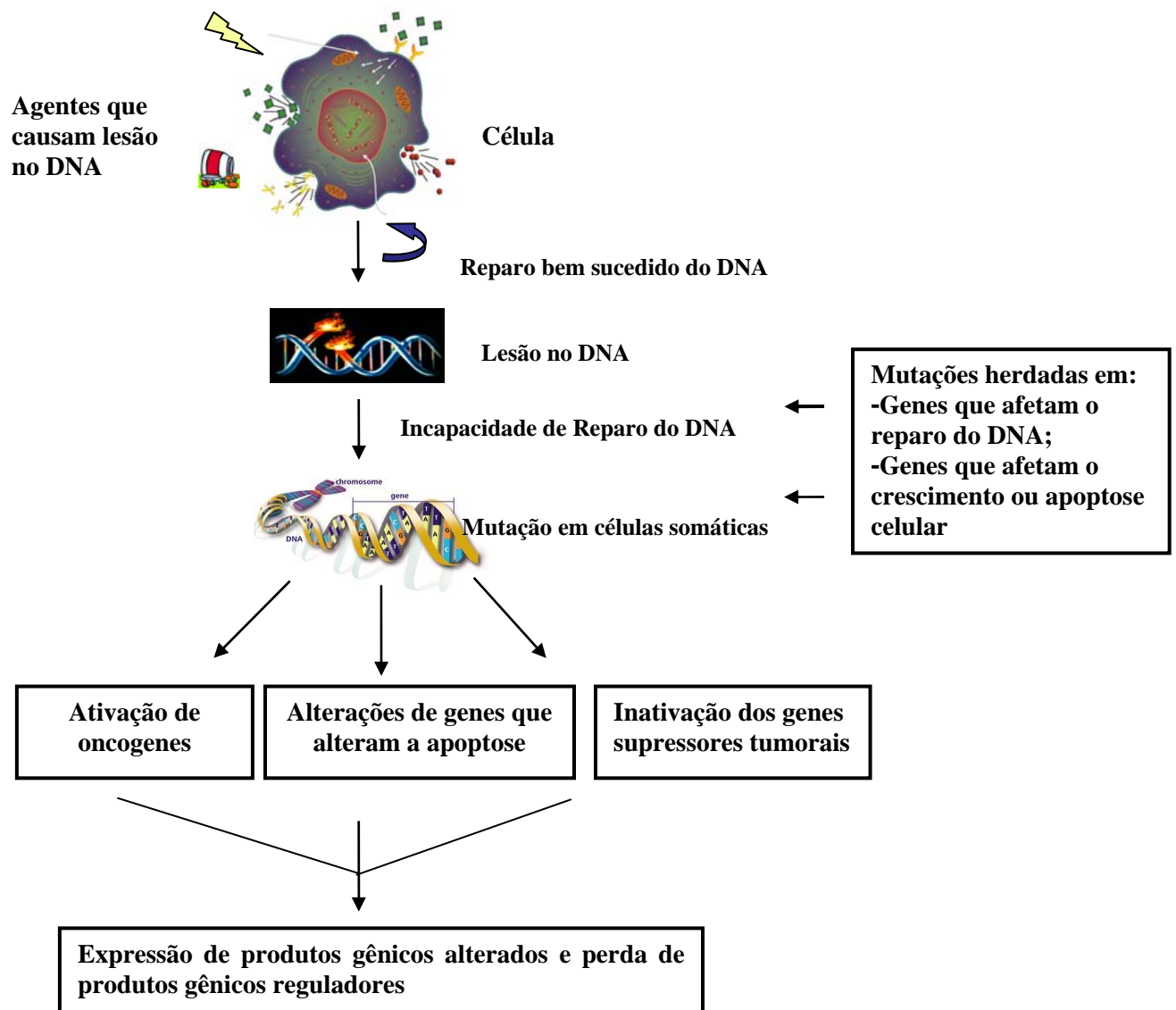
As evidências mais antigas referentes ao câncer foram encontradas em tumores ósseos fossilizados de múmias humanas do antigo Egito. Os restos ósseos revelaram um sugestivo crescimento tumoral ósseo ou destruição craniana óssea vista nos cânceres de cabeça e pescoço. Já a descrição mais antiga para o câncer foi encontrada no Egito por volta de 1600 a.C. O papiro de Edwin Smith descrevia oito casos de tumores ou ulcerações da mama as quais eram tratadas com cauterização e relatadas como não tendo tratamento.

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas, na maioria das vezes geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2007). Os fatores ambientais podem ser atribuídos a: hidrocarbonetos policíclicos, poluentes (no ar, na água, no trabalho), dieta alimentar, agentes infecciosos, radiações ionizantes, entre outros. Já os fatores genéticos tais como: mutações espontâneas, diferenças herdadas de genes envolvidos com a proliferação celular, apoptose e/ou sistema de reparo do material genético, ou ainda alterações somáticas na expressão destes genes, entre outros, agem em conjunto com os fatores ambientais e com a susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer (PERERA, 1997)

Nesse âmbito, o câncer é uma doença genética complexa cuja iniciação e progressão envolvem passos em que o DNA acumula uma série de lesões. Essas alterações simultâneas geralmente ocorrem em genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular. Dentre as evidências experimentais que corroboram esta teoria está o fato de que a célula cancerosa é capaz de transmitir as suas características fenotípicas às células “filhas” (BALMIAN *et al.*, 2003). O processo de oncogênese

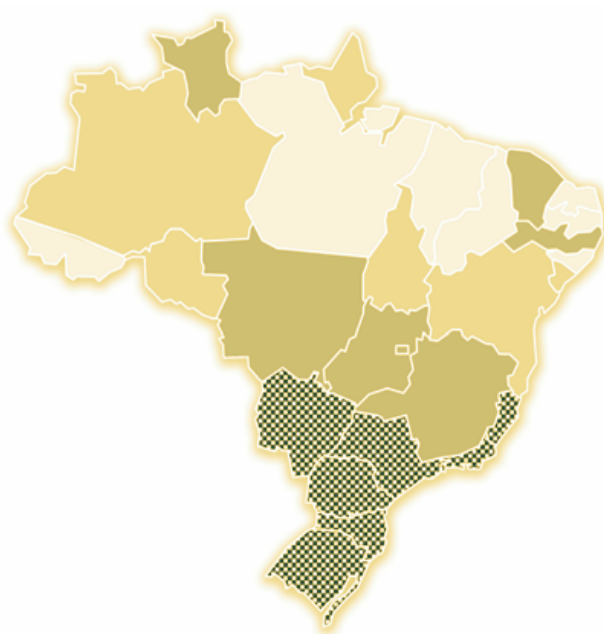
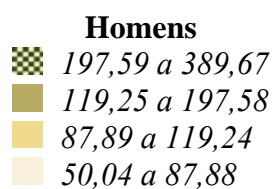
resultante destas alterações culmina com o crescimento de sucessivas populações ou clones celulares nos quais as mutações se acumularam em um processo denominado expansão clonal (SILVA, 2004). A figura 1 mostra esquematicamente como esse processo ocorre.

Na tentativa de evitar que o câncer se espalhe, existem três tipos principais de tratamento; cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Com o objetivo de erradicar o câncer, normalmente se utiliza mais de um tipo de tratamento. A massa tumoral originada a partir de um único clone celular é constituída por uma população de células heterogêneas. As subpopulações de células diferem em relação a vários atributos fenotípicos, como cariótipo, responsividade hormonal e suscetibilidade a agentes antineoplásicos. Por exemplo, tumores com baixa fração de crescimento como o câncer de mama e de colo do útero possuem uma menor suscetibilidade à quimioterapia, bem como a ausência de antigenicidade das células proporciona uma maior resistência ao ataque imunológico (KUMMAR *et al.*, 2004). Assim, no âmbito da quimioterapia, cujo objetivo primário é destruir as células neoplásicas preservando as células normais, apesar do considerável arsenal de drogas já existentes para o tratamento do câncer, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado por causa de falhas nos esquemas terapêuticos, altos índices de recidivas e redução da sobrevida. Como os agentes quimioterápicos em sua maioria possuem um mecanismo de ação não específico, lesando células neoplásicas e normais, o aparecimento de efeitos colaterais como náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções, torna-se comum. E ainda que o organismo se recupere após o tratamento, faz-se necessário que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável uma vez que esse reflete a segurança relativa de um medicamento estimulando, assim, a procura por novos fármacos (SALMONM, 1998).

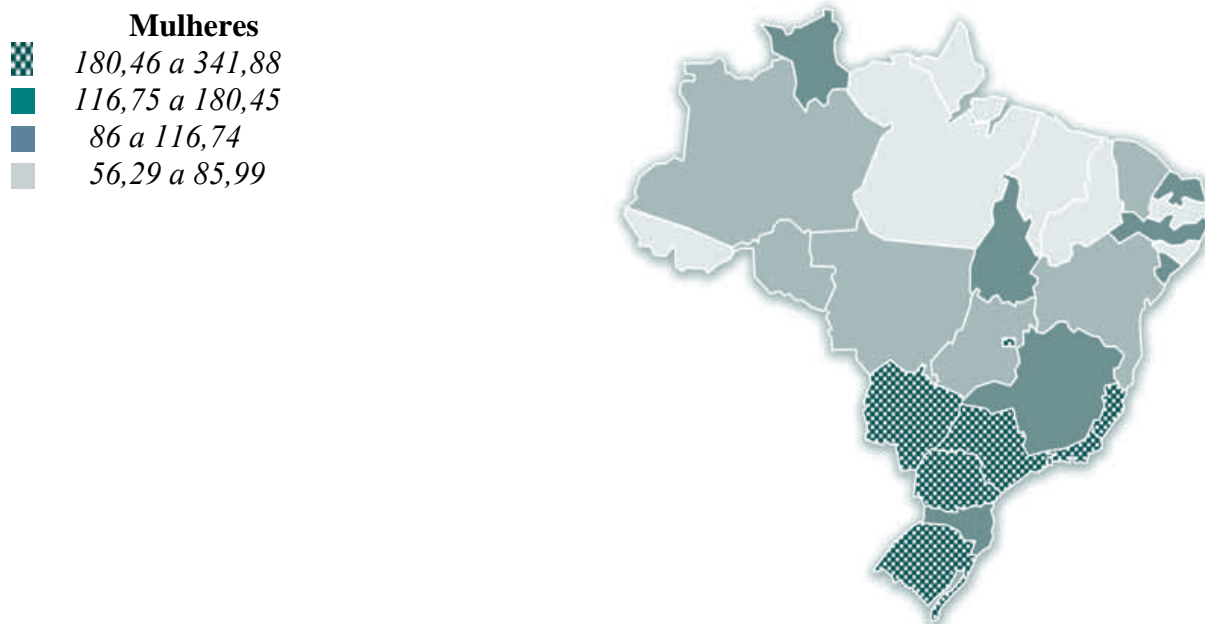


**Figura 1:** Esquema das bases moleculares da formação do câncer. *Kummar, 2004* adaptado.

Mesmo considerando a diversidade de tratamentos e de quimioterápicos antineoplásicos em uso clínico, a mortalidade decorrente do câncer continua inaceitavelmente alta. No Brasil, segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), a morbidade hospitalar de neoplasias malignas (CID 10-032-052) no período de agosto de 2006 a julho de 2007 foi 547.790 casos (DATASUS, 2007), o que reflete uma alta incidência de câncer na população brasileira, uma vez que este se apresenta como a terceira causa de morte, precedido apenas pelas mortes ocasionadas por acidentes e pelas doenças cardiovasculares. Os dados o Instituto do Câncer mostram como se comporta a distribuição dos casos de câncer no Brasil (Figuras 2a e 2b).



**Figura 2a:** Representação espacial das taxas bruto de câncer em homens no ano 2006, segundo a Unidade da Federação (total).



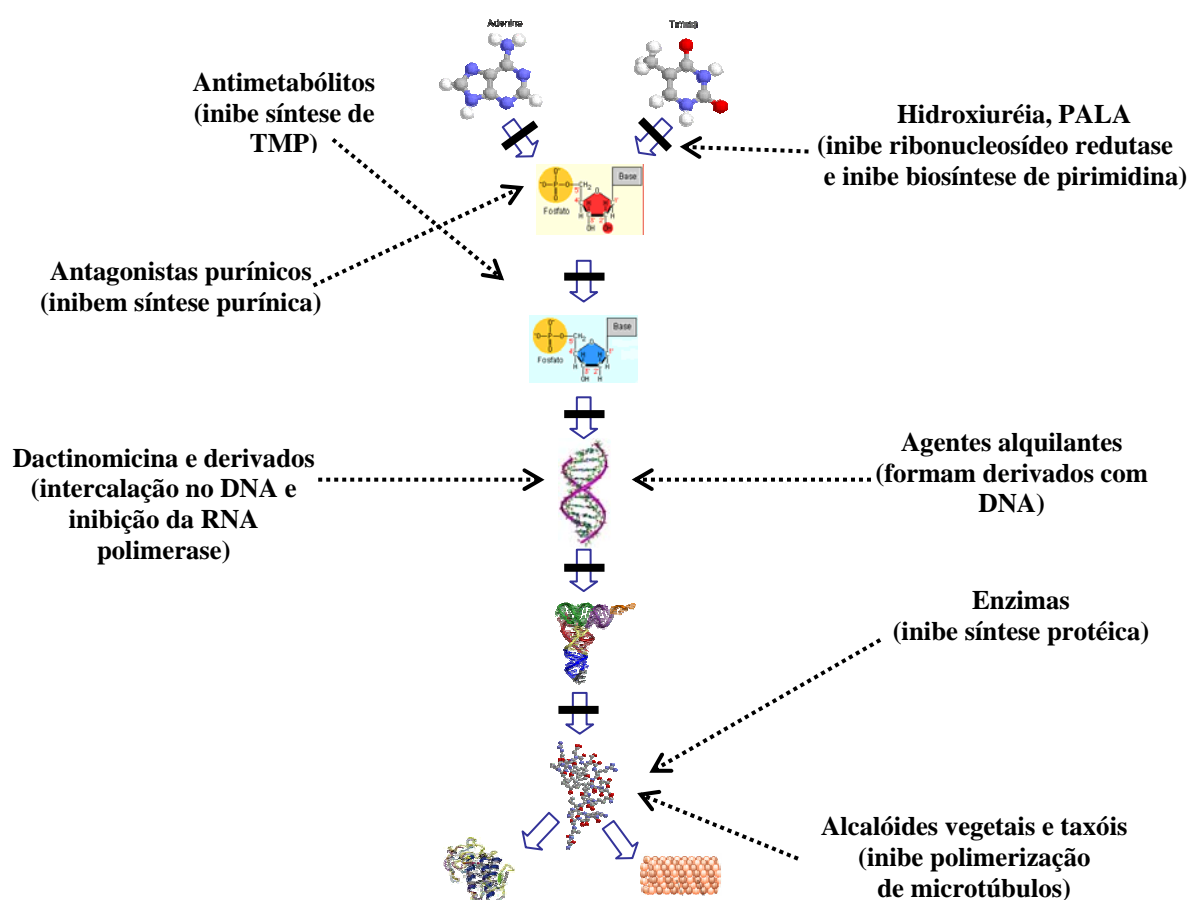
Fonte: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br), acessado em 11.11.07

**Figura 2b:** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres, estimadas para o ano 2006, segundo a Unidade da Federação (todas as neoplasias, exceto pele não melanoma)

As primeiras observações de regressão tumoral induzida por fármacos datam do início da década de 1940 e foram feitas com as mostardas nitrogenadas. Com o passar do tempo, novos fármacos quimioterápicos foram adicionadas ao arsenal da terapia antineoplásica. Apesar de maior atividade antitumoral e menor toxicidade, o fundamento racional da ação dessas novas moléculas estava baseado em conceitos relativamente antigos do ciclo celular. A ação se caracterizava por interromper ou perturbar etapas importantes de proliferação celular, levando as células em fase de duplicação à morte. Atualmente uma nova geração de fármacos tem-se desenvolvido rapidamente. Esses agentes, atuando na membrana celular ou no ambiente intracelular, induzem a morte da célula neoplásica com pouco ou nenhum efeito deletério sobre outras células. Fazem parte dessa nova classe, fármacos como anticorpos monoclonais, inibidores da enzima tirosino-quinase, entre muitos outros (SAMPAIO FILHO *et al.*, 2006).

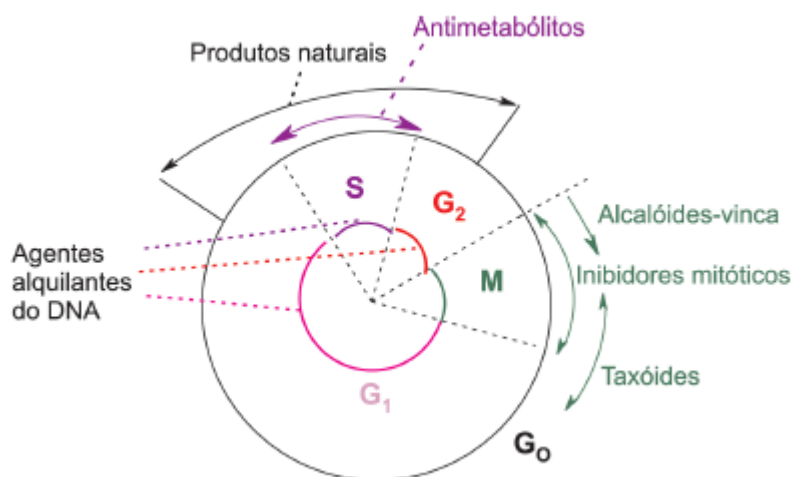
A investigação pelo mecanismo de ação de fármacos com atividade anticâncer tem sido objeto de muita atenção. A literatura revela muitas vias que são estudadas para atacar a célula neoplásica (KOVACIC, 2007). Contudo, a variedade dos tipos de

compostos quimioterápicos é tão grande que Chabner e Calabresi (1995) fizeram uma classificação no mecanismo de ação dos quimioterápicos nas diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e tradução (Figura 3). Entretanto, muitos autores discordam desta classificação, pois, outros fármacos, como por exemplo, agentes hormonais e produtos naturais ciclo-celular específicos, não são classificados dessa forma.



**Figura 3:** Classificação de antineoplásicos segundo Chabner e Calabresi (1995) *adaptado*.

Pela diversidade de mecanismos existentes na transformação da célula normal em célula maligna, a compreensão do ciclo celular se torna indispensável, haja vista que há correlação aproximada dos ciclos metabólicos com os agentes antineoplásicos mais comuns como demonstrado na figura 4.



**Figura 4:** Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular. Fonte: De almeida, 2005.

O ciclo celular é regulado por sinais extracelulares como fatores de crescimento e disponibilidade de nutrientes. A célula que não está se replicando, apresenta-se na fase G<sub>0</sub> ou está em quiescência. Em G<sub>0</sub> o DNA apresenta-se super-enovelado, com atividade nuclear baixa. Quando as células passam para a fase G<sub>1</sub>, ocorre à preparação da célula para a multiplicação, com a produção de fatores de crescimento celulares que são essenciais para a formação da nova célula, além de preparação para a síntese de DNA, que ocorrerá na fase subsequente, fase S. Na fase G<sub>2</sub> há a síntese de componentes para a mitose (divisão celular com manutenção do número de cromossomos específico da espécie) como a produção do fuso mitótico que é feita na fase M. Após a divisão do material nuclear há a citocinese (que é a separação da célula mãe, formando as duas células filhas com suas organelas e demais constituintes celulares), finalizando o ciclo de replicação celular (retorna à fase G<sub>0</sub>). A célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna à fase G<sub>0</sub>), assim passa da fase M para nova fase G<sub>1</sub>.

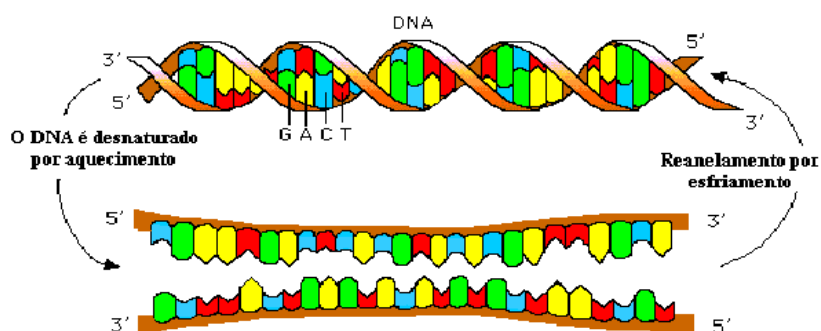
Nas fases do ciclo celular, diversos fármacos irão atuar afetando a multiplicação celular, esses fármacos que exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, são denominados ciclo-celular específicos. Outro grupo de agentes

denominados de ciclo-celular não específico tem a capacidade de agir sobre as células tumorais independentes de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso (fase G<sub>0</sub>).

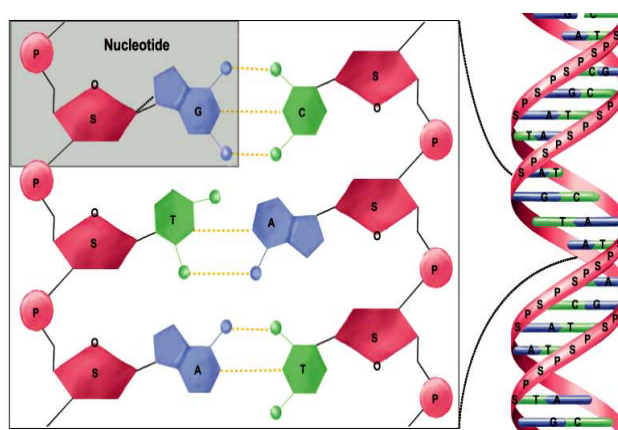
Considerando as características químicas e os mecanismos farmacológicos dos agentes antineoplásicos, podemos considerá-los fármacos tão heterogêneos quanto os tumores envolvidos. Os agentes antineoplásicos mais antigos e mais usados são conhecidos como agentes alquilantes que interagem com o DNA e não são ativos somente no processo de divisão celular. Ainda que outros alvos sejam estudados como fármacos antitumorais, o DNA ainda é um dos alvos mais estudados (de ALMEIDA *et al.*, 2005).

O estudo da interação de fármacos com o DNA é considerado um dos mais importantes aspectos em descoberta de fármacos e em processos de desenvolvimento farmacêutico. A primeira possibilidade de interação ocorre pelo controle dos fatores de transcrição e de polimerases, nos quais os fármacos interagem com proteínas que se ligam ao DNA. A segunda possibilidade faz-se através da ligação com RNA tanto com a dupla hélice do DNA, formando tripla hélice, ou com a fita simples, com a formação de híbridos, que podem interferir na atividade de transcrição. Na terceira e última possibilidade, há interação de pequenas moléculas diretamente com a estrutura do DNA. A interação promovida por uma modificação covalente do DNA por agentes citotóxicos representa uma lesão bioquímica grave. Nesse caso, as interações podem ser eletrostáticas, geralmente inespecíficas, com o envolvimento do arcabouço negativo (açúcar-fosfato), via intercalação entre os pares de bases e/ou interação covalente (RAUF *et al.*, 2005). A habilidade em medir níveis de modificação covalente de DNA *in vivo* pode ser vista como uma forma eficiente de monitorar a eficiência terapêutica de fármacos. (RAUF *et al.*, 2005) (Figuras 5 e 6).





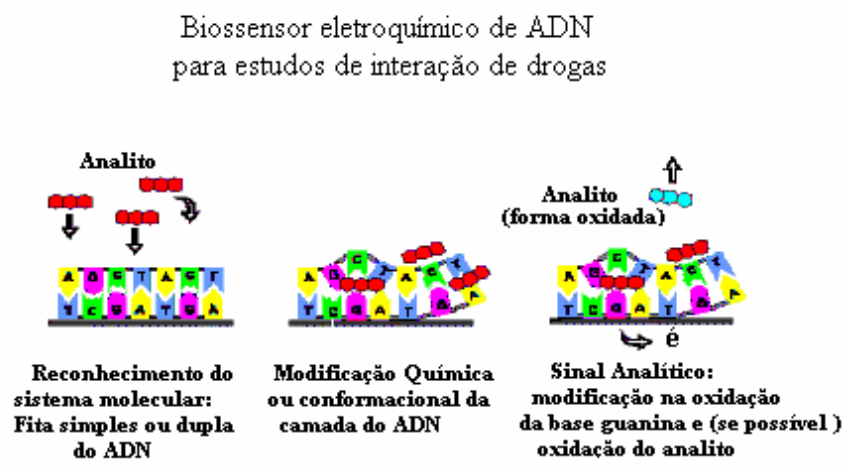
**Figura 5:** Representação do DNA, em fita dupla e em fita simples, evidenciando suas bases constituintes, guanina (G), adenina (A), citosina (C) e timina (T).



**Figura 6:** Estrutura química do *dsDNA* à direita. Bases púricas (guanina – G ; adenina – A) e pirimídicas ( timina – T e citosina – C); açúcares – S e grupamentos fosfatos – P.

Estudos em biossensores de DNA (de ABREU, BRETT & GOULART, 2002; RAUF *et al.*, 2005) são um dos modelos úteis para clarificar o mecanismo biológico de ação de fármacos que atuam interagindo com o DNA, uma vez que nos últimos anos, os eletrodos modificados com DNA foram aplicados com sucesso tanto como superfícies modificadas para determinação eletroanalítica de fármacos (RAUF *et al.*, 2005), quanto para o estudo da interação dos mesmos com o ácido desoxirribonucléico (DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ *et al.*, 2004; RAUF *et al.*, 2005). Eles permitem avaliar e prever interações com prejuízos celulares, através de experimentos eletroquímicos (voltametria

de pulso diferencial e de onda quadrada, em eletrodos de carbono vítreo modificados com DNA em fita dupla e simples) baseados na observação da ligação das moléculas-teste com ácidos nucleicos, tornando-se uma ferramenta para pesquisa de novas moléculas, como os antineoplásicos que interagem com o DNA (Figura 7).



**Figura 7:** Representação do modo de operação do biossensor de DNA. O analito entra entre as fitas do DNA, modifica sua conformação, o que leva à exposição de suas bases, passíveis de oxidação anódica.

### ***Modelos experimentais utilizados no desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos***

Para se obter informações a cerca da farmacodinâmica, farmacocinética e da toxicologia dos fármacos em desenvolvimento, é necessário que vários testes não clínicos sejam realizados para que se possa estimar uma dose inicial a ser administrada em seres humanos e identificar parâmetros que devam ser monitorados para identificar prováveis efeitos adversos (DORATO & BUCKLEY, 1998).

Grande número de moléculas candidata a fármacos não são aprovados nessa triagem, uma vez que os riscos detectáveis nesses ensaios não clínicos são muitas vezes inaceitáveis para serem testados em seres humanos. Esses parâmetros, no entanto, para serem mensurados devem ser aplicados em modelos animais adequados, levando-se em consideração as similaridades e diferenças entre o perfil farmacocinético no animal e no homem.

A quimioterapia do câncer no século XX foi dominada pelo desenvolvimento de drogas genotóxicas, iniciadas pelo descobrimento de propriedades anticâncer da mostarda nitrogenada nos anos de 1940 e da aminopterina, derivada do ácido fólico (BAGULEY, 2002).

Nos anos de 1930-1960, foi reconhecido que modelos tumorais eram mais produtivos se fossem induzidos em linhagens de camundongos puros, e o desenvolvimento de linhagens puras de camundongos levou ao uso de tumores transplantados para o *screening* de um amplo número de compostos, naturais e sintéticos (CORBETT *et al.*, 1997).

Tumores transplantáveis de hamsters, porco da índia, camundongos, coelhos e ratos foram durante muitos anos fornecidos pelo *National Cancer Research Center* no *National Cancer Institute (NCI)* na divisão de tratamento de câncer, *Frederick Research Center* em Frederick, MD. Porém, ao longo dos anos, o camundongo se tornou claramente o animal favorito na descoberta de drogas, o custo e a necessidade de grandes quantidades de agentes caros, eliminaram os roedores maiores da maioria dos programas de pesquisa nos anos de 1970 inclusive no programa do NCI (CORBETT *et al.*, 1997).

As técnicas de cultura de células, por sua vez, exercem um papel chave no desenvolvimento de drogas anticâncer pela imposição adicional de limitações pela captação e efluxo das drogas, interação com outros receptores celulares e metabolismo celular. Ensaios clonogênicos, integrando múltiplas vias de morte celular, são

particularmente usados na mensuração da sobrevivência celular seguida pela exposição a drogas citotóxicas. Por outro lado, microculturas, combinadas com outros métodos colorimétricos na avaliação de efeitos antiproliferativos, têm sido à base do *screening* em grande escala de drogas citotóxicas e citostáticas. O programa do NCI tornou possível utilizar 60 ou mais linhagens celulares para comparar os perfis de inibição de crescimento celular de novas drogas potenciais com os das dezenas de milhares de compostos previamente testados, fornecendo informações sobre mecanismo de ação e atividade antiproliferativa. No entanto, tais ensaios refletem tanto mudanças citocinéticas como efeitos citotóxicos, e esforço adicional é necessário para desenvolver métodos de cultura adequados para modelar as características de sobrevivência dos tumores sólidos submetidos à ação de fármacos antitumorais *in vivo*. Algumas das novas abordagens mais promissoras incluem a utilização de culturas celulares tridimensionais para permitir a medida das taxas de difusão de drogas, bem como a avaliação da sensibilidade dos efeitos das drogas sobre as células e o microambiente tumoral (BAGULEY *et al*, 2002).

Com o passar dos anos, as pesquisas *in vitro* e *in vivo*, passaram por constantes adequações às exigências do mercado farmacêutico, que constantemente traz novas drogas que se inserem melhor no cotidiano das pessoas, com drogas que melhoram a sobrevida dos pacientes, aumentando a expectativa de vida da população (LUCCHESI, 2001). Porém, juntamente a esse processo, há necessidade de avaliação dos riscos que estão inseridos nesse avanço tecnológico e dessa forma, as agências regulatórias norte-americana (FDA – *Food and Drug Administration*) e europeia (EMA – *European Medicines Agency*), exigem a avaliação toxicológica de estudos não clínicos de fármacos antineoplásicos, pois com o auxílio das regulamentações observa-se um evidente progresso na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. No Brasil, no entanto, não existe um processo acelerado de regulamentação como no FDA ou EMA, o que faz com que seja necessário seguir guias específicos oriundos de agências regulatórias internacionais ou outras entidades como a Organização Mundial de Saúde.

## 1. 2. PRODUTOS NATURAIS

As primeiras descrições de plantas medicinais remontam das primeiras escrituras e o papiro de Ebers, o qual enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal. Antes da era cristã, a “história natural” foi relatada por vários filósofos. Sobressaíram-se Hipócrates, o pai da medicina, que se consagrou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios (*Natura medicatrix*), e Treosfato, discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história e utilização das plantas, como o uso da *Papaver sonniferum*, cujo princípio ativo é a morfina (VALLE, 1978).

No século I da era cristã, Dioscórides, médico grego, lança sua obra sobre medicina e farmácia intitulada *De Materia Medica*, usada há mais de 15 séculos, em cinco volumes, com mais de 500 produtos de origem vegetal, descrevendo o emprego terapêutico de muitas delas que serviu como ensinamento até a época do Renascimento (MAHRAN, 1977).

Claudius Galenus, Galeno, nascido em Pérgamo, Ásia Menor, em meados de 161-180 d.C iniciou sua carreira como médico dos gladiadores em Alexandria, e mais tarde foi o médico particular do Imperador Marco Aurélio, em Roma. Considerado o “pai das ciências farmacêuticas”, desenvolveu a ciência de preparação de medicamentos. Até os nossos dias, preparações de origem natural são classificadas como “galênicas” (GUILLÉM, 1987; MARGOTTA, 1998).

Os árabes, que foram os primeiros a distinguir a medicina da farmácia, contribuíram muito para a difusão de diversas plantas medicinais nas costa do Mediterrâneo (França, Itália e Espanha). Dentre os principais médicos árabes que se ocuparam das plantas medicinais estão, Avicena (978-1036), que se tornou tão famoso quanto Hipócrates e Galeno, e Ibn Baithar, que em sua obra *Kitabal-Dschamial Kabu* (grande compilação de medicamentos e alimentos simples) trata de 1.400 drogas, das quais 200 citadas ineditamente. Deve-se aos árabes os primeiros cultivos de açafrão, cana-de-açúcar, arroz, algodão e algarroba (GUILLÉM, 1987).

Desde a colonização do Brasil, os europeus, principalmente médicos portugueses que aqui estiveram, foram obrigados a perceber a importância dos remédios indígenas, os quais foram chamados de “as árvores e ervas da virtude”, por Gabriel Soares de Souza, em “Tratado Descritivo no Brasil” de 1857 (PINTO, 1995).

Em 1808, a “Abertura dos portos às nações amigas” e a vinda da Corte Real para o Brasil estão entre os primeiros marcos históricos na ciência brasileira. Foi a partir do decreto de D. João VI que começaram a chegar ao Brasil às primeiras expedições científicas, cujo principal objetivo era dar conhecimento da exuberância da fauna e flora brasileiras (FREEDBERG, 1986).

De fato, por ser o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do mundo, o Brasil, não pode abrir mão de estudar os produtos naturais que fazem parte de seu vasto território (PINTO *et al.*, 2002).

O primeiro alcalóide natural isolado, na história da química, sob a forma pura foi a cinchonina. O médico que a isolou a partir das cascas da quina foi Bernardino Antônio Gomes, que prestou serviço durante vários anos no Brasil na armada Portuguesa. Na mesma expedição em que se encontrara Bernardino Antônio Gomes, o médico Carl Friederich von Martius e o zoólogo Johann Baptist Spix, iniciaram o estudo sistemático da flora e fauna do Brasil. Através de von Martius, o jovem farmacêutico alemão Theodoro Peckolt, em 1847, veio ao Brasil estudar sua flora, ganhando, então, o título de pai da fitoquímica, através de um estudo fantástico executado na época. Dentre seus muitos trabalhos, destaca-se o isolamento da substância da *Plumeia lancifolia*, denominada agoniadina, primeiro iridóide a ser isolado na natureza em forma pura. Ainda, Ezequiel Correia dos Santos obteve o primeiro alcalóide puro a ser isolado no Brasil, a pereirina (COSTA 1986; MYERS *et al.*, 2000).

Ao final do século XIX o desenvolvimento da química de produtos naturais abriu caminho para a pesquisa dos princípios farmacológicos ativos obtidos de fontes naturais (PINTO *et al.*, 2002).

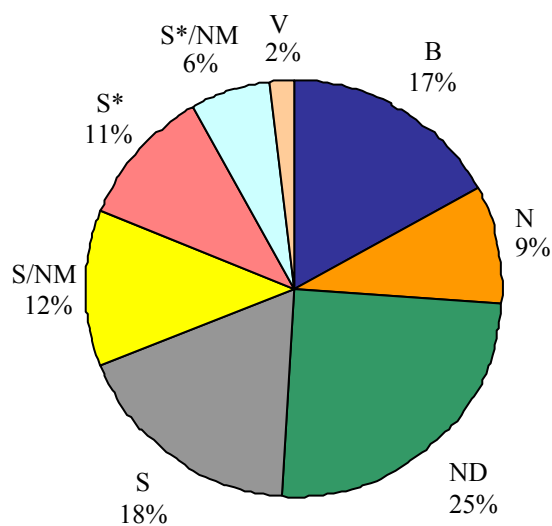
Já no século XX, após a criação da Academia Brasileira de Ciências (1916), começaram a ser fundadas as Sociedades Científicas, como por exemplo, a primeira Sociedade Brasileira de Química (homônima da atual) 1922, tendo sido, os anos 20, considerada a década da “criação” e das mudanças (RHEINBOLDT, 1955).

O desenvolvimento de novos fármacos e as indústrias química e agroquímica exigem uma completa investigação da eficácia e segurança das substâncias por elas estudadas. O potencial de risco e benefício dessas substâncias é cuidadosamente considerado, de modo que os benefícios do uso da nova molécula superem os efeitos colaterais existentes (KRISHNA *et al.*, 1998). O entusiasmo em relação ao estudo de plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo na assistência à saúde em função de

sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo. Grande parte da população mundial utiliza a medicina popular para seus cuidados primários em relação à saúde, e se presume que a maior parte dessa terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou seus princípios ativos (FARNSWORTH *et al.*, 1985; KAUR *et al.*, 2005).

As plantas constituem uma importante fonte de compostos para a terapia do câncer e cerca de 60% dos agentes anticâncer utilizados na clínica, sejam as moléculas puras ou derivados sintéticos ou semi-sintéticos, são obtidos de fontes naturais, incluindo as plantas, organismos marinhos e microorganismos (CRAGG *et al.*, 2005; NEWMAN *et al.*, 2003). A pesquisa com plantas como fonte de agentes anticâncer iniciou-se na década de 50 com o descobrimento e o desenvolvimento de alcalóides da vinca, vimblastina e vincristina e o isolamento das podofilotoxinas. Como resultado, o Instituto de Câncer dos Estados Unidos (NCI) iniciou uma extensa coleção de plantas em 1960, focada principalmente nas regiões temperadas, estendendo-se mais tarde, 1986, a uma nova coleção de plantas e outros organismos, desta vez oriundos de regiões tropicais e subtropicais (CASSADY e DOUROS, 1980; CRAGG e NEWMANN, 2005). Isso levou ao descobrimento de vários quimiotipos com atividades citotóxicas como os taxanos e camptotencinas. A Tabela 1 mostra os agentes anticâncer derivados de plantas. É interessante, no entanto, ressaltar que após o encerramento dessas coletâneas, nenhum novo agente derivado de planta, encontra-se em uso clínico, porém apenas em desenvolvimento pré-clínico (CRAGG e NEWMAN, 2005).

De acordo com Cragg & Newman (2007), nos últimos 25 anos, os medicamentos anticâncer utilizados na clínica médica podem ser divididos a partir de sua origem de acordo com a figura abaixo:




---



---

#### Categorias usadas para definir a origem dos medicamentos anticâncer

B – Uso biológico, como peptídeos ou proteínas isolados de algum organismo ou linhagem celular.

N – Produto Natural

ND – Derivado de produto natural por modificação semi-sintética

S – Totalmente sintético

S/NM – São derivados sintéticos que imitam os produtos naturais

S\* - Totalmente sintético, mas na farmacopéia diz ser de origem natural

S\*/NM – São derivados sintéticos que imitam os produtos naturais

V – Vacina

---

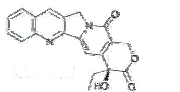
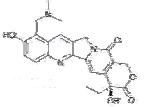
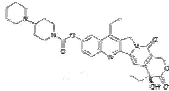
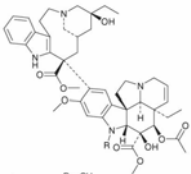
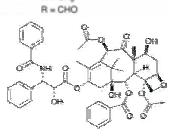
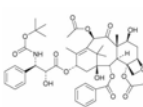
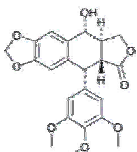
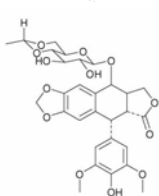
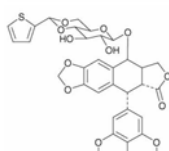
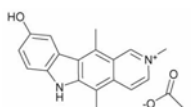
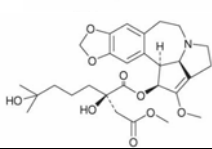


---

**Figura 8:** Distribuição da origem dos medicamentos anticâncer que estão no mercado nos últimos 25 anos. Fonte: dados obtidos de *Newmann & Cragg, 2007*.



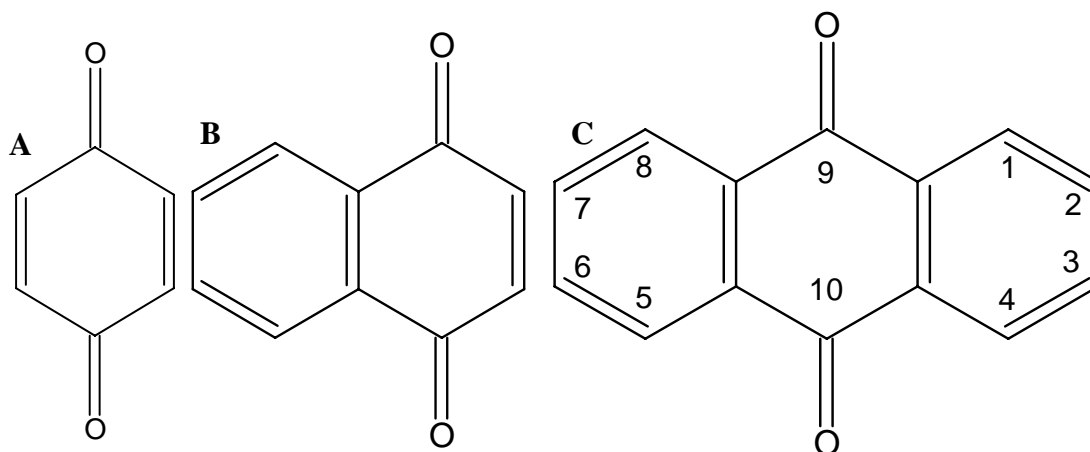
Tabela 1 - Agentes anticâncer utilizados na clínica derivados de plantas.

<i>Origem</i>	<i>Princípio Ativo</i>	<i>Estrutura química</i>	<i>Mecanismo de ação</i>
<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptotencina		Inibição da enzima Topoisomerase I (DA SILVA, <i>et al</i> , 2003)
Derivado da camptotencina	Topotecano		Inibição da enzima Topoisomerase I (DA SILVA, <i>et al</i> , 2003)
Derivado da camptotencina	Irinotenaco		Inibição da enzima Topoisomerase I (LI <i>et al</i> , 2006)
<i>Catharantus roseus</i>	Vimblastina Vincristina		Inibição do fuso mitótico, interrompendo a divisão celular na metáfase (DE ALMEIDA <i>et al</i> , 2005)
<i>Taxus breviflora</i> <i>Taxus canadensis</i> <i>Taxus baccata</i>	Paclitaxel		Impede a despolimerização da tubulina (SOUZA, 2004)
Conversão semi-sintética do taxol	Docetaxel		Impede a despolimerização da tubulina (SOUZA, 2004)
<i>Podophyllum pelatum</i> <i>Podophyllum emodii</i>	Podofilotoxina		Bloqueio das fases S e G <sub>2</sub> do ciclo celular e inibição da enzima topoisomerase II (DE ALMEIDA <i>et al</i> , 2005)
Derivado semi-sintético da epipodofilotoxina (isômero da podoxfilotoxina)	Etoposídeo		Inibição da enzima Topoisomerase II (MCCLENDON & OSHEROFF, 2007)
Derivado semi-sintético da epipodofilotoxina (isômero da podoxfilotoxina)	Tenoposídeo		Inibição da enzima Topoisomerase II (MCCLENDON & OSHEROFF, 2007)
<i>Bleekeria vitensis</i>	Elliptinun		Intercalação com o DNA (DUGUE, <i>et al</i> 1986)
<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	Homoharrington		Inibição da síntese de proteínas e indução de diferenciação (KANTARJIAN <i>et al</i> , 2001)

### 1.3. NAFTOQUINONAS

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural (THOMPSON, 1997). Destaca-se sua importância em processos bioquímicos vitais e em estudos farmacológicos, nos quais elas têm apresentado variadas atividades, sobressaindo-se as propriedades antitumorais, microbicidas, tripanomicidas, viruscidas e inibidoras de sistemas celulares reparadores atuando de diferentes formas como, por exemplo, ao induzirem a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio, levando ao estresse oxidativo celular. Outra atividade marcante dessas moléculas tem sido a inibição do complexo das topoisomerases (DA SILVA *et al.*, 2003). As topoisomerases são enzimas que modulam o estado topológico do DNA através da quebra transitória de uma ou ambas as fitas da dupla hélice do DNA, e vem sendo estudada como um alvo para várias drogas usadas no tratamento do câncer (POMMYER *et al.*, 2003).

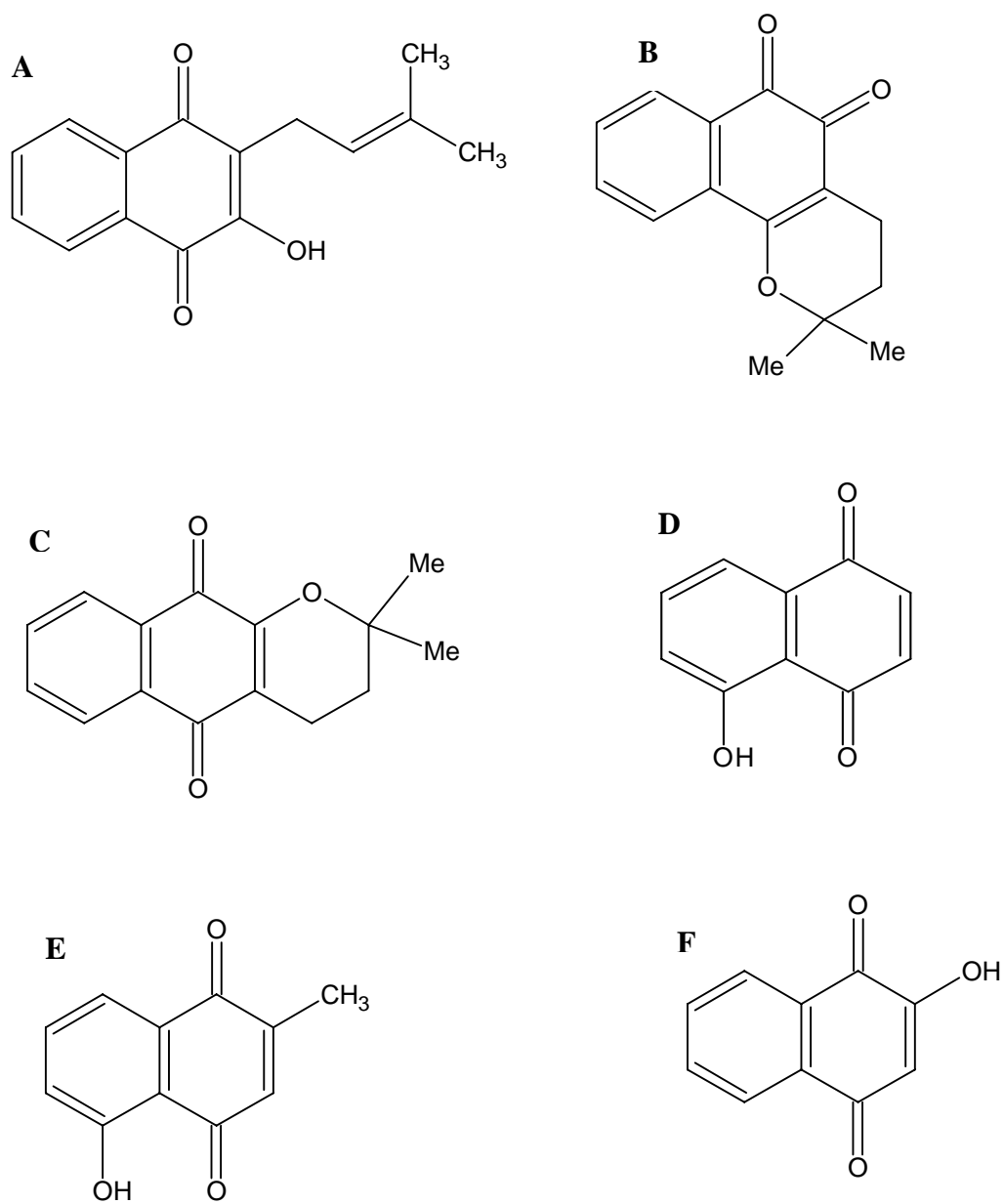
Quimicamente as quinonas podem ser divididas em vários grupos por suas diferenças moleculares, usando-se como critério o tipo de anel quinonoídico: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas – um anel naftalênico; antraquinonas – um anel antracênico linear ou angular (Figura 9). Em decorrência de diferentes arranjos isoméricos, pode-se ter com um mesmo anel e com carbonilas em diferentes posições, diferentes quinonas. Estas formas isoméricas diferem muito em suas propriedades físicas, químicas e quanto à sua atuação biológica. Numa observação mais apurada sobre a importância das quinonas, pode-se citar o grande número de drogas neste grupo que possuem aplicações práticas reconhecidas (DA SILVA *et al.*, 2003). Algumas, inclusive, chegaram à produção industrial, como por exemplo, a vitamina K, as mitomicinas e as antraciclínas (RUTTIMANN, 1986).



**Figura 9:** A) 1,4 *p*- benzoquinona; B) 1,4-naftoquinona; C) 9,10-antroquinona.

A citotoxicidade das quinonas leva à especulação de que existe uma propriedade química intrínseca na unidade quinonoídica, associada a outros fatores estruturais, que são responsáveis pela intensidade das atividades antitumorais (BRAND AND FISHER, 1990). Foi observado que muitas quinonas possuem um grupo de saída que pode ser ativado por redução das carbonilas quinonoídicas, gerando intermediários alquilantes (LIN, 1984) (agentes antineoplásicos biorredutores). De acordo com vários autores, o estresse oxidativo levando a danos no DNA e alquilação de nucleófilos celulares nucleares são os dois principais mecanismos da citotoxicidade das quinonas (BOLTON *et al.*, 2000).

As naftoquinonas, representadas, principalmente, pela  $\beta$ -lapachona e pelo lapachol, que é conhecido desde 1858 e pode ser considerado um dos principais representantes do grupo de quinonas das tabebuias, têm sido encontradas como constituintes de várias plantas das famílias Bignoniaceae, Verbenaceae e Proteaceae e constituem um grupo promissor devido as suas propriedades citotóxicas e antitumorais. Lima e colaboradores (1972) estudaram e demonstraram a existência da atividade antitumoral de várias outras naftoquinonas, como a juglona, lawsona e plumblagina (Figura 10).



**Figura 10:** Estrutura química das naftoquinonas: A) Lapachol, B) Beta-lapachona, C)Alfa-Lapachona, D) Juglona, E)Plumbagina e F) Lawsonia

A *Capraria biflora* L. (figura 11 A) é uma planta variável, herbácea ou arbustiva, cujo caule é ramoso, até 150 cm de altura, ereto; possui ramos alternos, cilíndricos, pubescentes ou hirsutos. Suas folhas são alternas, oblongo-lanceolado-agudas, irregularmente serradas, inteiras na base, cuneadas e estreitando para o pecíolo, até 8 cm de comprimento, peninervadas, sendo a nervura média saliente na página inferior, a planta possui flores pediceladas, auxiliares, germinadas, raramente solitárias ou fasciculadas, pequenas, brancas campanuladas; seu fruto possui cápsula ovado-oblonga, glabra, contendo sementes escuras oblongo-cuneadas, rugosas (CORRÊIA 1984).



**Figura 11:** A) *Capraria biflora* L.; B) raízes da *C. biflora*.

A *Capraria biflora* é uma espécie pertencente à família Schrophulariaceae, originária das Antilhas e América do Sul, que habita zonas temperadas e áreas de clima tropical. A espécie é amplamente distribuída no continente americano. Na América do Sul é encontrada em países como Venezuela, Peru, Guiana Francesa e Brasil (encontra-se nos estados de Goiás, Minas Gerais e na faixa litorânea entre o Piauí, até o Espírito Santo). Na América Central pode ser encontrada em El Salvador, Trinidad-Tobago, Bahamas, Panamá, Curaçao, Guatemala e Porto Rico; na América do Norte: Estados

Unidos e México; na Ásia: Índia e China. No continente europeu é muito usada como ornamento. (CORREA, 1931; MATOS, 1988).

Esta planta é conhecida no Brasil como: balsaminha, chá-da-balsaminha, chá-do-méxico, chá-da-martinica, chá-de-goteira, chá-do-rio, chá-das-antilhas, chá-de-lima, chá-do-maranhão, chá preto, chá-de-boi, chá-bravo, chá-de-calçada, chá-da-terra, chá-da-américa, chá-de-marajó (CORRÊIA, 1984; LORENZI & MATOS, 2002).

As folhas secas e raízes da *Capraria biflora* são usadas na medicina popular para substituir o chá-da-índia em problemas estomacais ou no tratamento de desordens dermatológicas em geral, afecções do aparelho urinário, febrífuga e estimulante, vômitos, recuperação de parto, diarreia e inflamações, bem como analgésico, especificamente em dores menstruais e pós-parto, contra otite, desordens reumáticas e hemorróidas. Evita-se fazer infusão em doses elevadas podendo provocar debilidade. Além disso, suas raízes possuem propriedades anti-sépticas e antimicrobianas (AYENSU, 1981; HONYCHURCH, 1986; MATOS, 2002; MORAIS *et. al.*, 1995, SCOFIELD 2002).

O infuso das folhas e extremidades florais é utilizado, principalmente no Brasil, no combate a dores estomacais, como sudorífero, febrífugo e para afecções do trato urinário (LORENZI & MATOS, 2002). Em países da América do Sul, como Trinidad, Peru e Guiana Francesa, o infuso das folhas de *C. biflora* é empregado para combater a febre, gripe, dismenorréia, urticária, vômitos, sarampo e para lavagens oftálmicas (LUU, 1975). O seu decocto, por via oral, é utilizado como estimulante, colagogo, adstringente, estupefaciente e na cura de feridas e paralisia muscular (LUU,1975; RAMIREZ *et al.*,1988).

Além desses usos, a decocção das folhas, em países das Américas Central e do Norte, como Guatemala, Bahamas, Curaçao e México, são indicados para o tratamento de edemas e câimbras nas pernas. A infusão das folhas é indicada em casos de indigestão, diarreia e afecções ovarianas. O extrato aquoso quente das folhas é utilizado para diabetes, diarreia, gonorréia, debilidade geral e para perda de memória (MORTON, 1968). Na Índia, usa-se o extrato quente para casos de febre, diarreia e dismenorréia (AYENSUN, 1981). A infusão e decocção das folhas são usadas para diabetes e no intuito de apressar o parto, diminuindo a dor (MORTON, 1968).

O extrato aquoso das folhas de *C. biflora*, usado em camudongos no teste da chapa quente nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg, revelou a existência de uma

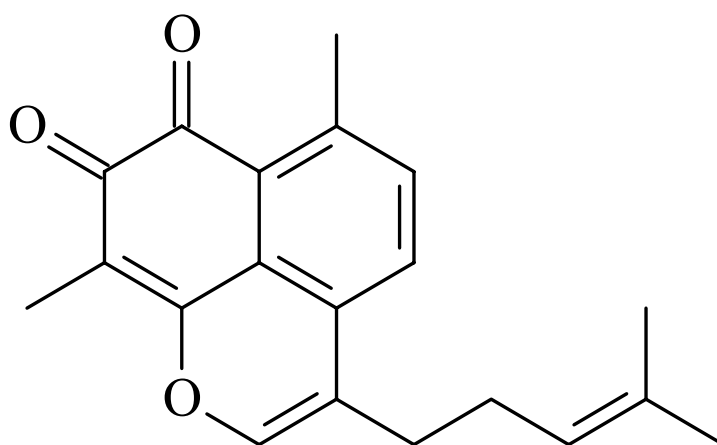
relativa propriedade analgésica da planta quando comparada com a morfina na dose de 3 mg/kg (ACOSTA *et al.*, 2003a).

Acosta e colaboradores (2003b) demonstraram também, que o extrato aquoso das folhas possui uma forte atividade antiinflamatória na concentração de 200 mg/kg em relação à indometacina no teste do edema de pata induzido por carragenina. O edema foi significativamente reduzido nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg, para 38,75, 35,96 e 27,94% respectivamente. A peritonite induzida por carragenina também confirmou a atividade antiinflamatória. Na concentração de 200 mg/kg a inibição da inflamação foi de 58,76%.

Além da utilização de partes da planta, há relatos do emprego de *C. biflora* em associação a outras plantas, como diurético, calmante, bem como para o tratamento de afecções no aparelho urinário (CORDEIRO *et al.*, 1996).

Como referido anteriormente, a propriedade antimicrobiana da *C. biflora* é oriunda de suas raízes, de onde, Gonçalves de Lima e colaboradores (1953) isolaram um princípio ativo que denominaram de biflorina.

A biflorina, objeto de nosso estudo, (Figura 12) é uma *o*-naftoquinona (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-piran-7,8-diona) prenilada de origem natural que pode ser facilmente obtida das raízes da *Capraria biflora* L. (Figura 11 B), foi isolada pela primeira vez em 1953 por Gonçalves de Lima e colaboradores e seus dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram registrados pela primeira vez por Fonseca e colaboradores (2002).



**Figura 12:** Estrutura química da biflorina (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-piran-7,8-diona).

A biflorina mostrou como primeira atividade relatada, um potencial antimicrobiano frente a bactérias Gram-positivas, álcool-ácido-resistentes e alguns fungos (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1958, 1962, SERPA 1958).

A atividade da biflorina contra microorganismos foi testada por Gonçalves de Lima e colaboradores (1958), que verificaram que a pureza da substância, estava diretamente relacionada com sua atividade. Em 1958, os dois ensaios realizados com diferentes graus de pureza da substância, mostraram que com a biflorina mais pura o valor da Concentração Mínima Inibitória (CMI) era menor. Em 1962, Gonçalves de Lima e colaboradores, com um novo método de extração da biflorina, demonstraram que ocorreu um aumento da CMI para vários microorganismos testados. Este fato pode, no entanto, estar associado à fotossensibilidade da biflorina, cujos dois produtos de sua degradação (um solúvel e o outro insolúvel em éter de petróleo), também possuem atividade antimicrobiana menor, em relação à própria biflorina. Outros ensaios frente a fungos dermatófitos e leveduras, utilizando principalmente cepas de *Candida albicans*, revelaram uma atividade dose-dependente frente aos microorganismos sobre os quais ela possui alguma atividade (LYRA JÚNIOR, 1999).

Ainda em 1958, há registro de um relato de caso, onde foi preparada uma pasta com 1% de biflorina cristalizada, que foi utilizada num paciente de 14 anos, do sexo masculino, que apresentava uma “lesão eritematosa peribucal, abrangendo a parte externa dos lábios, a qual se estendia para cima até a altura do nariz, para baixo em toda a região mentoniana e lateralmente, sobre a face, até uns 5 cm além da comissura labial. A pele da área atingida apresentava-se edematosa com uma coloração vermelho forte e deixava exudar constantemente líquido claro e de cheiro pútrido em face do que o paciente mantinha constantemente um lenço sobre a lesão. No caso, o paciente queixava-se de forte sensação de ardência e prurido na zona afetada” (SERPA, 1958).

A pasta de biflorina a 1% foi usada duas vezes ao dia. Após dois dias de tratamento, a pele que se apresentava edematosa de coloração vermelha forte, com exudato constante de coloração clara e odor fétido, já se encontrava com coloração rósea, sem exudação de líquido e sem odor. No sexto dia de aplicação da pasta a pele já possuía um aspecto quase normal. Coletas em pontos diferentes da área edematosa possibilitaram isolar o fungo *Trichosporon margaritipherum*. Inicialmente, o paciente usou a pasta veiculada em vaselina e lanolina, posteriormente por possuir uma melhor penetração, o veículo foi trocado por polietilenoglicol, onde se constatou que em uma



semana não havia sequer vestígio de eritema (SERPA, 1958). Não existem relatos posteriores a esse.

Levando-se em consideração o fato dessa planta ser estudada, nos seus aspectos, fitoquímicos e ter conhecida atividade antimicrobiana, desde a década de 50. Faz-se necessário que os estudos farmacológicos sejam continuados. Em particular no caso de uma naftoquinona propõe-se avaliar suas propriedades, citotóxicas, antitumorais e genotóxicas, tomando por base as demais quinonas amplamente estudadas e conhecidas na literatura como é o caso principalmente do Lapachol e Beta-lapachona, como descrito anteriormente. É de suma importância caracterizar a biflorina em relação a outras bioatividades.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar o potencial antineoplásico da biflorina em modelos tumorais e não tumorais *in vitro* e *in vivo*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a citotoxicidade da biflorina em linhagens tumorais humanas e murina *in vitro*;

2.2.2 Avaliar o potencial antimitótico da biflorina em ovos de ouriço-de-mar;

2.2.3 Avaliar a atividade hemolítica da biflorina em eritrócitos de camundongos;

2.2.4 Avaliar o mecanismo de ação da biflorina em células de melanoma murino *in vitro*;

2.2.5 Avaliar o potencial antitumoral da biflorina nos modelos animais murinos, sarcoma 180, carcinoma de erlich e melanoma;

2.2.6 Avaliar a sobrevivência dos animais transplantados com melanoma B16;

2.2.7 Avaliar o potencial imunoadjuvante da biflorina;

2.2.8 Avaliar a atividade antioxidante da biflorina em modelos *in vitro*;

2.2.9 Estudar o potencial genotóxico e mutagênico da biflorina em células V79 e linfócitos *in vitro* e em *Salmonella thiphymurium*, *Saccharomices cereviseae* e medula óssea de camundongos;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS UTILIZADOS

---

##### EQUIPAMENTOS

---

Agitador de placa MLW modelo Thys 2

Agitador Vortex – AD8850

Aquário Marinho

Balança Analítica GEHAKA AG200

Balança pra pesar animais – Filizola

Banho-Maria – MOD. 105 DI DELLA

Centrífuga Centimicro FANEM Modelo 212

Centrífuga de lâminas Shandon Shouthern Cytospin

Centrífuga de placas Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga Excelsa Baby I FANEM Modelo 206

Citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini

Contador Manual – Blood Cell Counter Export – DB – Division of Bexton, Dickinson and Company

Cuba de Eletroforese – Bio Rad (DNA sub cell gel)

Deonizador de água Mili-Q

Espectrofotômetro de placas – DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter

Fluxo Laminar VECO

Fonte Modelo 250 – Life technologies

Forno de Microondas – Panasonic

Freezer – Prosdócimo

Geladeira – Prosdócimo

High-throuput screeing - biomek 3000 - Beckman Coulter

---

---

Incubadora de células (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator) NUAIRES TS Autoflow

Microscópio de Fluorescência Olympus BX41

Microscópio óptico de inversão Nikon Diaphot

Microscópio óptico Metripex Hungray PZO-Labimex Modelo Studar lab

Micrótomo – SLEE - MANZ BR1

Milli Q – Millipore

Potenciostato/Galvanostato mod. AutoLab PGSTAT20

Shaker PSU-2T Plus

Termomixer eppendorf

---

---

**SOLUÇÕES**


---

<b>NOMES</b>	<b>CONCENTRAÇÕES</b>	<b>MARCA</b>
Acridina laranja	100 µg/mL	Fluka
Água do mar filtrada	-	-
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU Anticorpo Anti - BrdU BSA 5% q.s.p. 500 µL de solução	Sigma Dako
Azul de tripan	10%	Sigma
BrdU	10mM	Sigma
Brometo de etídio	100 µg/mL	Sigma
Diaminobenzidina (DAB)	5µL DAB 1 mL de Tris-Hcl (Tris 0,05M) pH=7,6 2 µL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Imunotech Proquímios Proquímios
DMSO	10%	Vetec
Eosina	0,5%	Vetec
Estreptavidina -peroxidase	1 µL em BSA 5% q.s.p. 100 µL de solução	Dako Dako
Etanol	70%	
Formalina neutra	10%	Vetec
Gentamicina	5mg/mL	
Hematoxilina	0,1%	Doles
Iodeto de propídeo (PI)	50 µg/mL	Sigma
Iodeto de propídeo (PI)	50 µg/mL + triton X-100 0,2% e citrato de sódio 0,1%	Sigma
KCl	0,5M	Labsynth
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada, filtrado e complementado com 10% SBF, 1% glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75%) e 25mM de HEPES	Cultilab
MTT	5 mg/mL	Sigma
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I/mL Streptomicina 10mg/mL	Cultilab

---

<b>NOMES</b>	<b>CONCENTRAÇÕES</b>	<b>MARCA</b>
Rodamina 123	1 mg/mL	Sigma
Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70% 2x SSC (pH=6,5-7,5 a 70°C)	Vetec
Solução salina	0,85% + CaCl <sub>2</sub> 10mM	Vetec
Solução salina	0,9%	Vetec
Soro fetal bovino	-	Cultilab
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5M Citrate de sódio 0,15M H <sub>2</sub> O	Labsynth Grupo Química
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,276 g de NaHPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	Labsynth
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Tris 0,5 M (pH= 7,6) H <sub>2</sub> O	
Tripsina	0,25%	Cultilab
Triton X -100	1%	Isofar

---

**REAGENTES**

---

Ácido Acético – Merck  
Ácido Oléico – Merck  
Ácido Clorídrico – Merck  
Ácido 2,5 – dihidroxibenzóico – Acros Organics  
Ácido 2,3 – dihidroxibenzóico – Acros Organics  
Agarose baixo ponto de fusão – Gibco  
Agarose ponto de fusão normal – Gibco  
Alamar Blue – Sigma  
Bicarbonato de Sódio – Dinâmica  
Butilhidroxitolueno – Acros Organics  
Brometo de Etídio – Sigma  
Cloreto de sódio – Vetec  
DMSO – Vetec  
Etanol – Vetec  
Etilmetanosulfonato – Sigma  
Ficoll – Sigma  
Formaldeído – Dinâmica  
Hipoxantina – Merck  
Formamida – Vetec  
Laranja de Acridina – Sigma  
Metilmetanosulfonato – Sigma  
Parafina – Synth  
Peróxido de Hidrogênio – Merck  
Vitamina C – Acros Organics  
Xantina Oxidase – Merck  
Xileno P.A. – Vetec  
1,1 – difenil – 2- picrilhidrozil – Acros Organics

---

---

**FÁRMACOS**

---

5 – Fluorouracil – Sigma  
Dacarbazina – Eurofarma Laboratórios Farmacêuticos  
Doxirubicina – Sigma

---

## 3.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 3.2.1. Obtenção da Biflorina

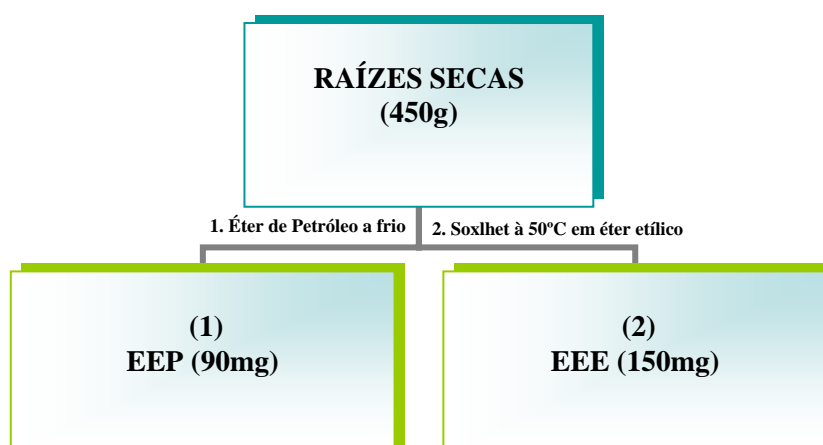
#### Coleta e informações sobre a planta

A planta foi coletada em 2001, em uma plantação no município de Fortaleza, foi identificada pelo professor Edson de Paula Nunes (Universidade Federal do Ceará). A exsicata (n° 30.849) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

#### Obtenção dos extratos das raízes de *Capraria biflora* O (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (EEE), éter de petróleo (EEP), CHCl<sub>3</sub> (ECR) e EtOH (EER).

As 450g de raízes secas e moídas foram divididas em duas partes de 225g, onde foi extraída com éter etílico em aparelho soxhlet à 50°C(EEE), obtendo 200 mg e a outra com éter de petróleo (EEP) à frio, obtendo 90 mg, ambos na ausência de luz.

Os 90 mg obtidos a partir do extrato éter de petróleo foram aquecidos à 60°C e posteriormente recristalizados e filtrados à vácuo, obtendo-se cristais agulha de cor vermelho-escuro, solúveis em CHCl<sub>3</sub>, com ponto de fusão variando de 154-158°C (FONSECA *et al.*, 2003). Esse procedimento foi realizado várias vezes para a obtenção da biflorina.



**Figura 13:** Fluxograma da obtenção da biflorina das raízes de *Capraria biflora*.



### 3.2.2. ESTUDO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

#### 3.2.2.1. Linhagens celulares utilizadas

As linhagens celulares utilizadas estão listadas quanto ao tipo histológico, origem e fonte na tabela 2.

**Tabela 2: Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.**

<b>Linhagem</b>	<b>Tipo Histológico</b>	<b>Origem</b>	<b>Fonte</b>
HL-60	Leucemia	humano	Children's Mercy Hospital de Kansas City – USA
CEM	Leucemia	humano	Children's Mercy Hospital de Kansas City – USA
K 562	Leucemia	humano	NCI
MCF-7	Mama	humano	Children's Mercy Hospital de Kansas City – USA
MDA MB 231	Mama	humano	NCI
MX 1	Mama	humano	NCI
NCI H266	Pulmão	humano	NCI
NCI H23	Pulmão	humano	NCI
M14	Pele	humano	NCI
UACC – 257	Pele	humano	NCI
UACC – 62	Pele	humano	NCI
MDA MB 435	Pele	humano	NCI
B16	Pele	murino	NCI
HCT-8	Cólon	humano	Children's Mercy Hospital de Kansas City – USA
PC3	Próstata	humano	NCI
SF295	Sistema Nervoso	humano	NCI

### 3.2.2.2. Manutenção das Células

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e/ou DMEM, suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37° C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio era trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células despregassem-se das paredes das garrafas.

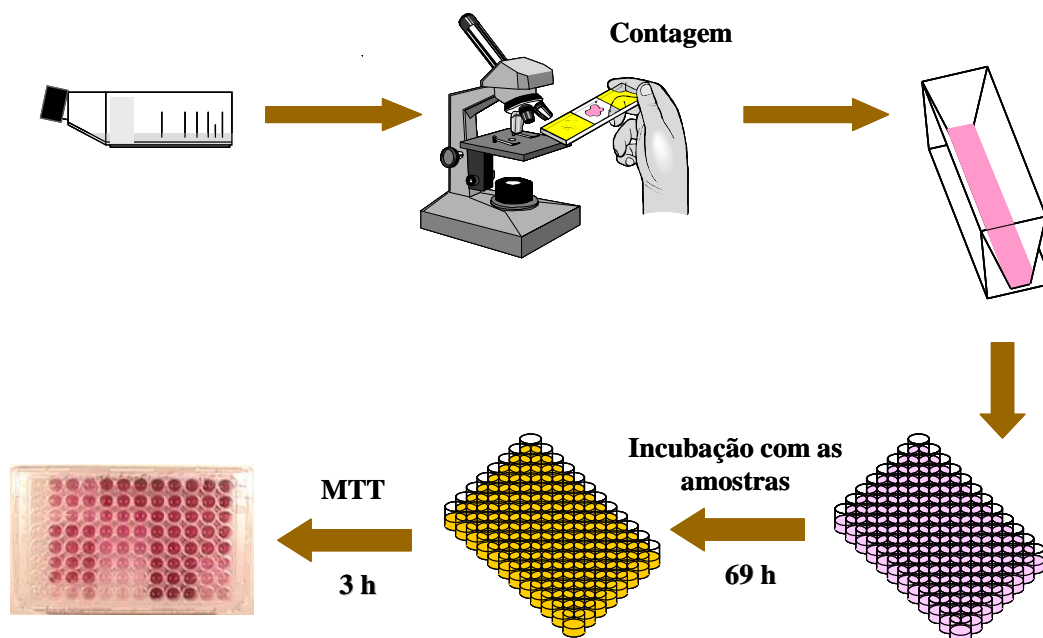
### 3.2.2.3. Teste de citotoxicidade *in vitro* – Ensaio do MTT

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em múltiplas de 96 cavidades numa densidade de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, para células suspensas e  $0,6 \times 10^5$  células/mL para células aderidas. A substância teste foi incubada 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/15min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 µL da solução de MTT (10% de meio RPMI 1640) e foi reincubada por 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuscitado em 150 µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as substâncias foram lidas com o auxílio de um espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm (figura 14). Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo, bastante útil para avaliar a citotoxicidade (MOSMANN, 1983).

### Análise dos dados

As drogas foram testadas em diluição seriada, em triplicata. Foi registrado o gráfico absorbância X concentração e determinados suas CI<sub>50</sub> (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de

confiança (IC 95%) realizado a partir da regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software).



**Figura 14:** Esquema representativo do método MTT.

### 3.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana 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, apresenta 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 desenvolvimento dos ovos (como descrito em JIMENEZ *et al.*, 2003).

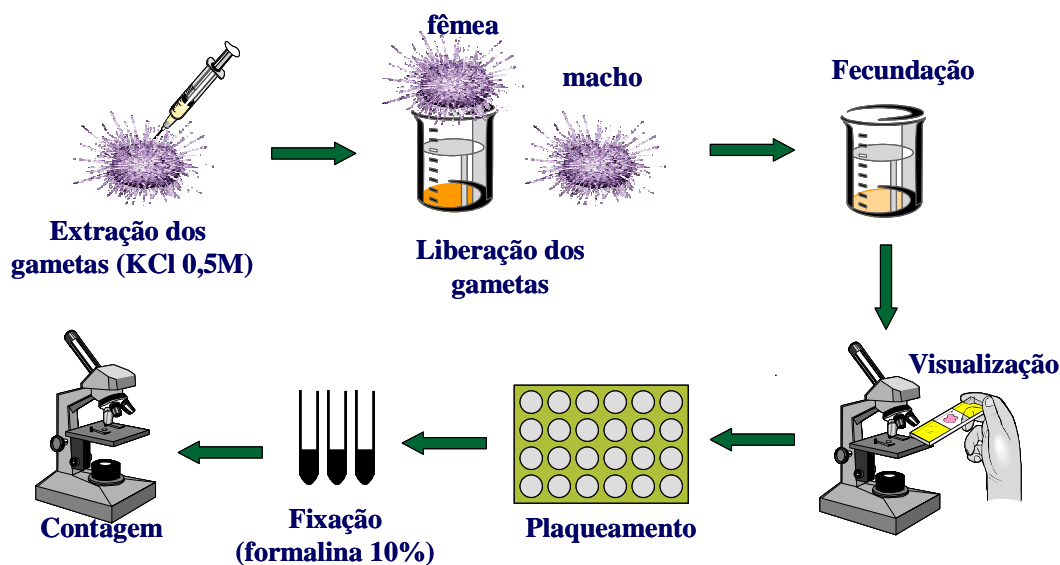
#### Procedimento Experimental

A eliminação dos gametas foi induzida pela injeção de até 3 mL de KCl 0,5M na cavidade celômica (perivisceral) dos ouriços. 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 (50mL). Após cerca de dois minutos, a fecundação foi confirmada pela presença da membrana da fecundação através da observação de uma amostra das células em microscópio óptico. Os ovos (1 mL) foram distribuídos numa placa de 24 cavidades, contendo a biflorina em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo do experimento nas concentrações de 0,1, 0,3, 1, 3, e 10 µg/mL. Os ovos foram incubados num volume final de 2 mL, mantidos à temperatura ambiente (26 ± 2°C) sob agitação constante. Nos intervalos correspondentes a primeira e terceira divisões foram fixadas alíquotas de 0,2 mL em formalina 10%. Já na blástula, 0,1 mL de formaldeído foi adicionado ao volume restante na placa. Cem embriões foram contados em cada amostra para obtenção da porcentagem de células divididas (figura 15) (como descrito por JIMENEZ *et al.*, 2003).

### **Análise dos dados**

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média dos experimentos. Os cálculos 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 4.0 (GraphPad Software). 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 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15:** Esquema representativo do método antimitótico em ovos de ouriço-do-mar.

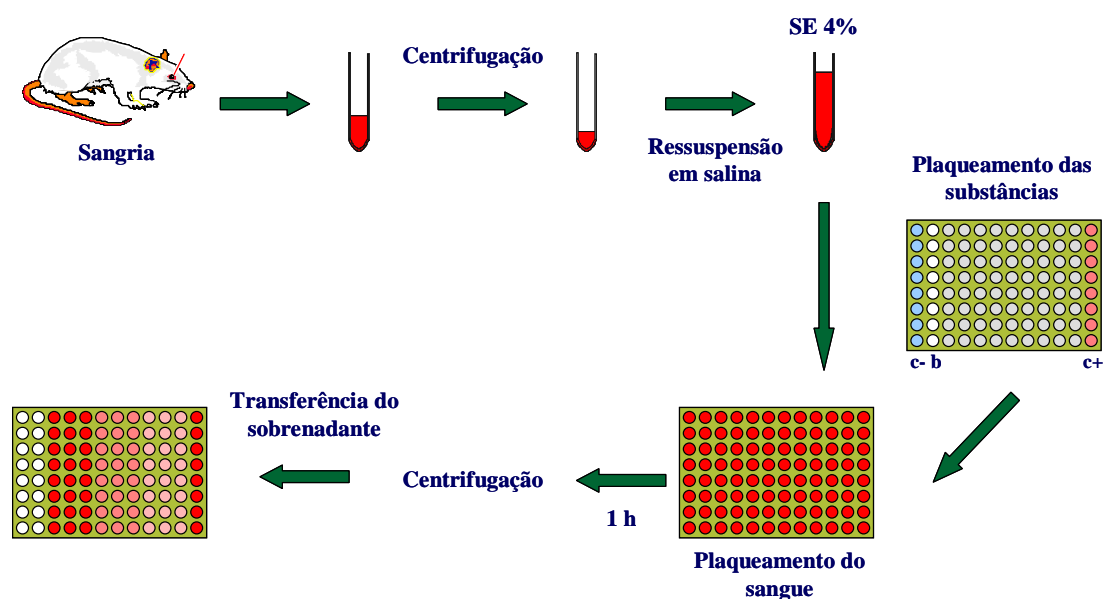
### 3.2.4. Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos Swiss

A avaliação da atividade hemolítica permitiu avaliar o potencial da biflorina em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da membrana (DRESCH *et al.*, 2005).

#### Procedimento Experimental

Foi coletado o sangue de três camundongos (*Mus musculus* Swiss) por via orbital (animais previamente anestesiados com éter etílico) sendo diluído em 1:30 de solução salina (NaCl 0,85 + CaCl<sub>2</sub> 10mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (5000 rpm/3 min.) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os ensaios foram realizados em placas de 96 cavidades. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL de biflorina em suspensão com DMSO. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X – 100 a 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo

para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 1,56 a 200 µg/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação por 1 hora. Sob agitação constante à temperatura ambiente ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/3min.) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância da hemoglobina no espectrofotômetro de placas a 540 nm (figura 16). A atividade da biflorina foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo.



**Figura 16:** Esquema representativo do método de hemólise em eritrócitos de camundongos.

### 3.3. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO NO MODELO DE MELANOMA MURINO *IN VITRO*

Para os estudos *in vitro* na linhagem B16, as células, na concentração de ( $0,5 \times 10^5$ ) foram incubadas por 24 horas com biflorina e examinadas ao microscópio de inversão. A concentração utilizada foi estimada a partir da  $CI_{50}$  encontrada no método do MTT nesta linhagem celular.

#### 3.3.1. Viabilidade celular – Exclusão por azul de tripan

O teste de exclusão por azul de tripan permitiu quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as

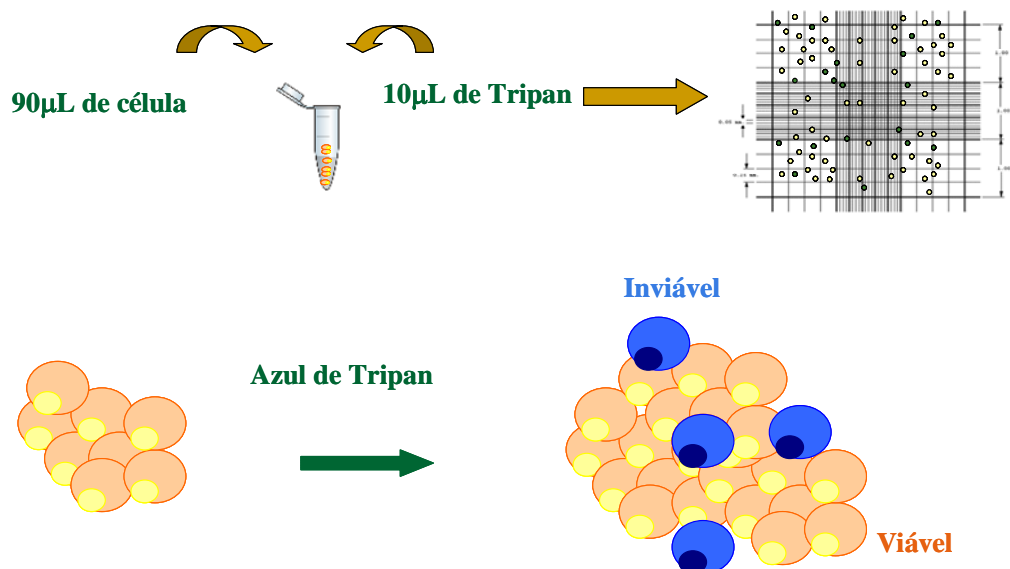
células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível dessa maneira, observar uma coloração azulada nas células metabolicamente inativas.

### Procedimento experimental

A alíquota de 90  $\mu\text{L}$  da suspensão de células adicionam-se 10  $\mu\text{L}$  do azul de tripan. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer, contando-se as células de dois quadrantes diagonalmente opostos (figura 17). A Doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi usada como controle positivo (Renzi *et al.*, 1993).

### Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 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% ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17:** Esquema representativo do método de exclusão por azul de tripan.

### 3.3.2. Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina

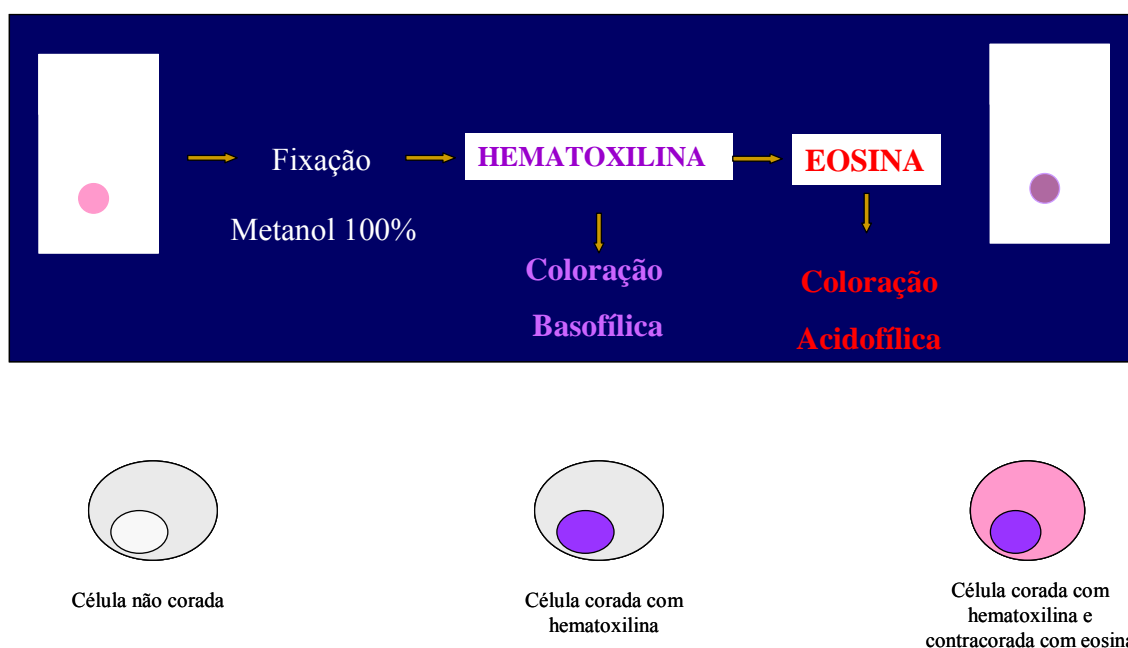
A coloração por hematoxilina/eosina permite a análise da integridade nuclear, bem como alterações existentes no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade por ácidos e pelas proteínas nucleares, conferindo ao núcleo uma coloração azul e a eosina por sua vez, é um corante basofílico e liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea.

#### Procedimento experimental

Para observar a morfologia celular, foi utilizada uma alíquota de 50  $\mu$ L da suspensão celular, a qual foi adicionada a uma centrífuga de lâminas (cytospin). Após a adesão das células nas lâminas elas foram fixadas em etanol absoluto por 1 min., sendo seu excesso retirado em água corrente antes de efetuar a coloração com hematoxilina, seguido de eosina (figura 18).

#### Análise dos dados

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, para avaliação de suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.



**Figura 18:** Esquema representativo do método de coloração hemtaoxilina/eosina.



### **3.3.3. Análise morfológica – Coloração diferencial por Laranja de Acridina / Brometo de Etídio**

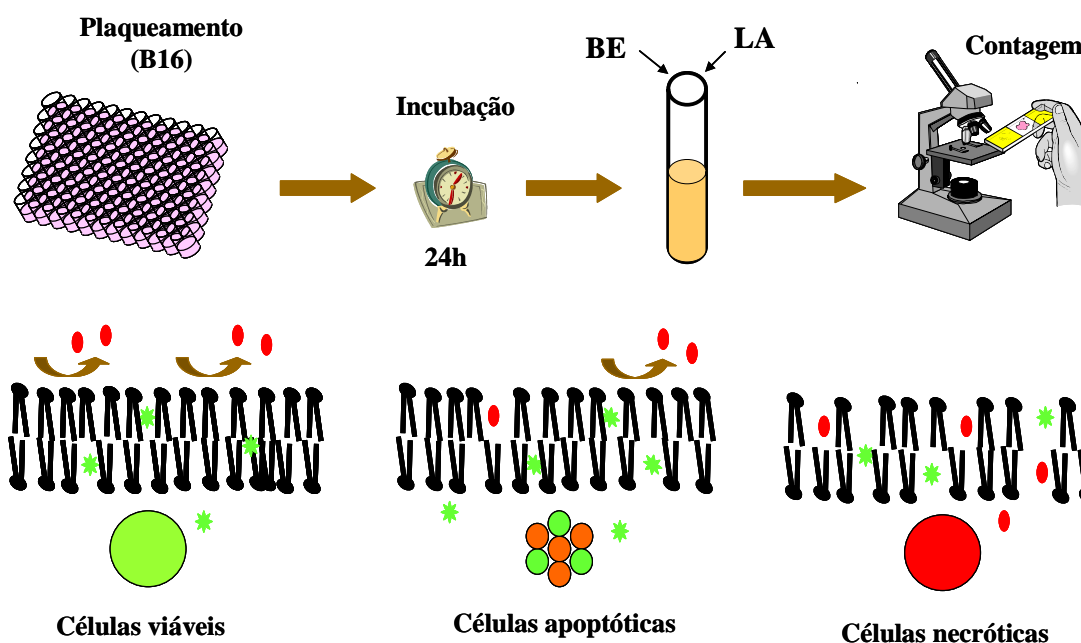
O método de contagem diferencial laranja de acridina /brometo de etídio (MCGAHON *et al.*, 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da contagem diferencial por fluorescência. Este método baseia-se na revelação das células (controle e tratadas) com a coloração por brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA) no núcleo. A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. O BE marca muito fracamente e às vezes não marca, pois não atravessa a membrana íntegra. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE. Foram observadas as alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão na membrana) apresentaram um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos. Possivelmente as membranas plasmáticas permaneçam intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios quando são permeáveis aos solutos normalmente retidos (KUMMAR *et al.*, 2004).

#### **Procedimento experimental**

A suspensão de células controle ou tratadas com biflorina foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 3 min em baixa rotação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 20 µL de solução de PBS. Em seguida, 1 µL da solução de BE:LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células foi transferida para uma lâmina e montado com lamínula para, em seguida, ser contada considerando cada evento celular de interesse (figura 19) (como descrito em GENG *et al.*, 2003).

## Análise dos dados

Foram contadas 300 (trezentas) células, em duplicata, cada amostra para quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas). As lâminas foram montadas e fotografadas para registro visual dos efeitos. Para verificação de ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19:** Esquema representativo do método de coloração laranja de acridina/brometo de etídio.

### 3.3.4. Inibição da síntese de DNA por incorporação de BrDU

A bromodeoxiuridina (BrDU) é uma base nitrogenada análoga da Timina. Quando as células estão sintetizando DNA o BrDU é incorporado no lugar da timina. A detecção de BrDU incorporado nas células é feita por técnicas de imunohistoquímica.

### **Procedimento experimental**

O BrDU é adicionado 3h antes do término do período de incubação com a droga (21h), para que seja incorporado ao DNA das células em mitose. Após o período de três horas, lâminas foram preparadas e colocadas para secar ao ar livre por 2h. 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 (formamida) por 90 minutos a 60°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 biotinado por 20 minutos e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. Foi adicionado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 1-5 minutos e em seguida, removido com água destilada (figura 20). A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harrys a 0,1% (Pera *et al.*, 1977).

### **Análise dos resultados**

Foram contadas as 200 (duzentas) primeiras células observadas em microscópio óptico. Consideraram-se positivas para proliferação as células de núcleo corado com DAB (coloração marrom) as que incorporaram o BrDU e, negativas as células de núcleo corado com hematoxilina (coloração azul). A proporção de células marcadas em marrom e não-marcadas entre os diferentes grupos foi comparada pelo teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

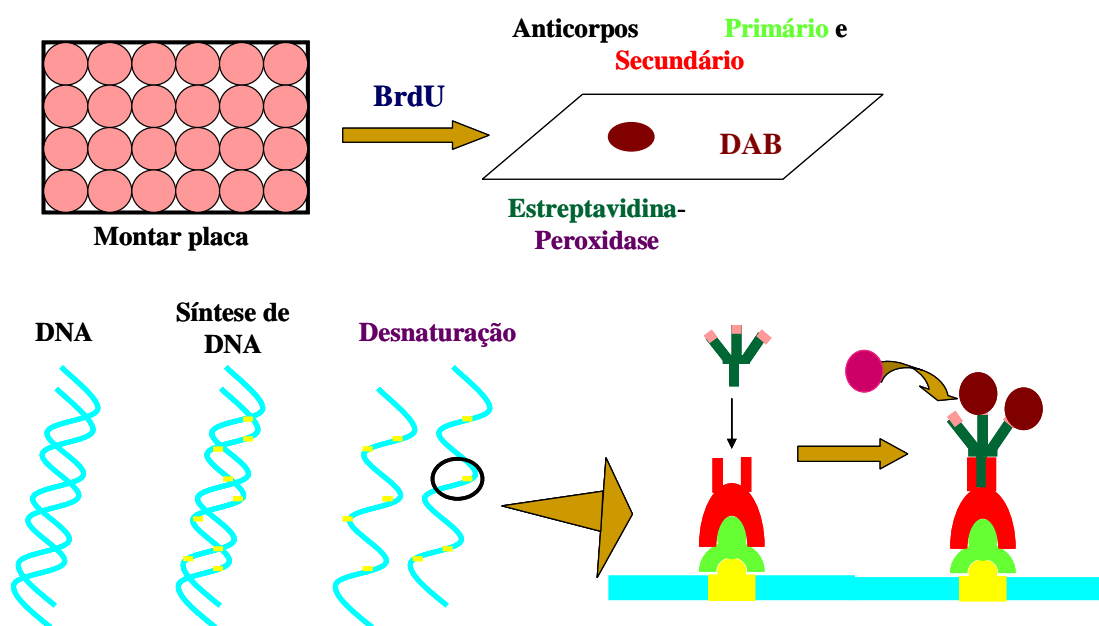


Figura 20: Esquema representativo do método do BrDU.

### 3.3.5. Análises por citometria de fluxo

Os estudos utilizando citometria de fluxo (figura 21) foram realizados em células B16 não tratadas ou tratadas por 24h com biflorina (1,5, 3 ou 6  $\mu\text{g/mL}$ ) ou doxorubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 3.3.5.1. Integridade da membrana plasmática

As células em apoptose mantêm suas membranas íntegras durante quase todo o processo até a sua morte, diferentemente daquelas necróticas. Este ensaio se baseia na capacidade de o iodeto de propídeo (PI), hidrofílico, penetrar apenas nas células cujas membranas estejam rompidas e emitir alta fluorescência vermelha somente quando excitado pelo laser de argônio (488 nm) e estiver ligado ao DNA. As células cujas membranas permanecem íntegras emitem menor fluorescência. Deste modo, este método permite avaliar a viabilidade celular através da verificação da integridade da membrana plasmática.

## **Procedimento Experimental**

Alíquotas de 100  $\mu$ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foram incubadas com 100  $\mu$ L de uma solução de PI a 50  $\mu$ g/mL (diluído em PBS). Após 5 minutos, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Foram obtidas informações acerca da integridade da membrana celular utilizando-se o filtro para o espectro do vermelho.

## **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 por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) no programa GraphPad Prism versão 5.0.

### **3.3.5.2. Ciclo celular e fragmentação de DNA**

Esse ensaio igualmente se baseia na capacidade de o iodeto de propídio (PI) se ligar ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática foi lisada para que o PI pudesse se ligar a todo o DNA das células. A intensidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional a quantidade de DNA existente na célula, permitindo assim diferenciar DNA celular (e suas diferentes nas fases do ciclo - G1, S e G2) de DNA fragmentado.

## **Procedimento experimental**

Alíquotas de 100  $\mu$ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foram adicionadas 100  $\mu$ L de uma solução de PI a 50  $\mu$ g/mL (diluído em PBS) contendo triton X-100 a 0,2% e citrato de sódio a 0,1%. Após 30 minutos de incubação na ausência de luz, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo utilizando o filtro vermelho.

## **Análise dos dados**

Os histogramas de ciclo celular plotados como intensidade de fluorescência vermelha (eixo x) *versus* número de células (eixo y) foram analisados no programa ModFit LT 3.1 com a ferramenta *synchronization wizard*.

### **3.3.5.3. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria**

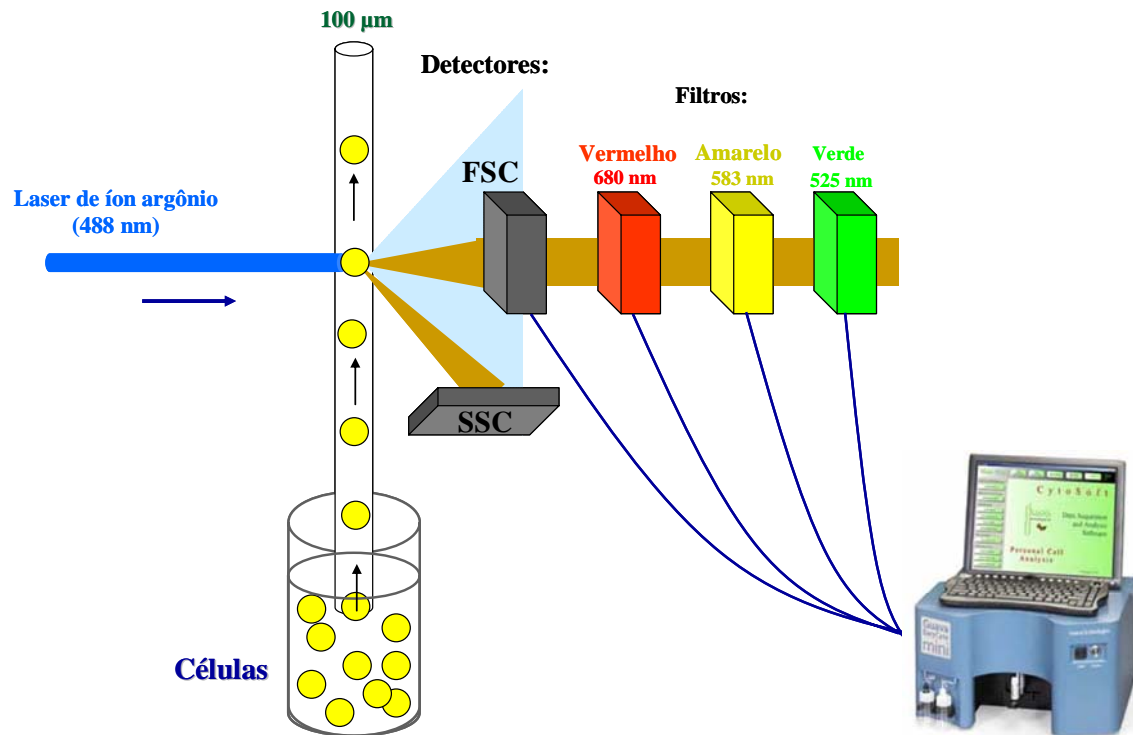
A mitocôndria é responsável pela iniciação da via intrínseca da apoptose. A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, é seqüestrado pra dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência. Deste modo, este ensaio foi utilizado para a investigação da ativação da via apoptótica intrínseca por parte da substância em estudo através da observação da alteração do potencial transmembrânico mitocondrial.

## **Procedimento experimental**

A uma alíquota de 100 $\mu$ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foi adicionado 200 $\mu$ L de uma solução de rodamina 123 diluída na concentração de 1  $\mu$ g/mL (diluído em PBS). Após 15 minutos de incubação na ausência de luz a 37°C, as amostras foram lavadas com PBS, reincubadas por 30 minutos e então analisadas por citometria de fluxo utilizando o filtro verde.

## **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 por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) no programa GraphPad Prism versão 5.0.



**Figura 21:** Esquema representativo do citômetro de fluxo.

### **3.4. ATIVIDADE ANTITUMORAL EM MODELOS ANIMAIS *IN VIVO***

#### **3.4.1. Avaliação do efeito da biflorina em camundongos transplantados com os tumores Sarcoma 180 e Carcinoma de Erlich**

A avaliação da atividade antitumoral está relacionada à regressão total de tumores nos animais, à redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto ou ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparando-se aos não tratados. Ficou demonstrado que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral (SCHABEL *et al.*, 1977). Um dos tumores utilizados, o Sarcoma 180, foi descoberto em 1914 no *Crocker Laboratory (Columbia University, New York)*. Originalmente, este é um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos e foi primeiramente classificado como carcinoma mamário. Após vários transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa, por volta de 1919. O carcinoma de Erlich na forma sólida foi detectado em 1907, em Frankfurt, por Paul Erlich, que relatou a existência de diversos tumores transplantáveis. O tumor transplantável de Erlich atual não provém de neoplasma primário único como fonte, embora a maioria dos tumores seja derivada de glândula mamária.

#### **Procedimento Experimental**

A avaliação da atividade antitumoral foi realizada utilizando os tumores sólidos Sarcoma 180 e Carcinoma de Erlich, com 10 dias de implantação na região axilar direita. O animal doador, ou da manutenção, foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizada uma assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparado uma suspensão de células com 5,0mL de solução de Ringer-lactato, 0,2mL de gentamicina (5mg/mL) e 0,5mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas  $2 \times 10^6$  céls/0,5mL na região axilar esquerda dos camundongos (*Mus musculus* Swiss). Nestes experimentos, foram utilizados 10 animais por grupo, num total de 6 grupos para cada tumor, sendo todas fêmeas, apresentando massa corpórea variando entre 25-30 g. Vinte e quatro horas após a inoculação do tumor foi iniciado o



tratamento por 7 dias consecutivos utilizando as doses de 25 ou 50 mg/kg de biflorina, 10 ou 25 mg/kg do quimioterápico 5 - Fluorouracil, a associação de 25 mg/kg de biflorina com 10 mg/kg de 5 - Fluorouracil e o veículo de diluição das substâncias (DMSO 10%). Vinte e quatro horas após o término do tratamento os animais foram sacrificados e retirados os tumores, rins, fígado e baço para pesagem e análise histológica (figura 22).

O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

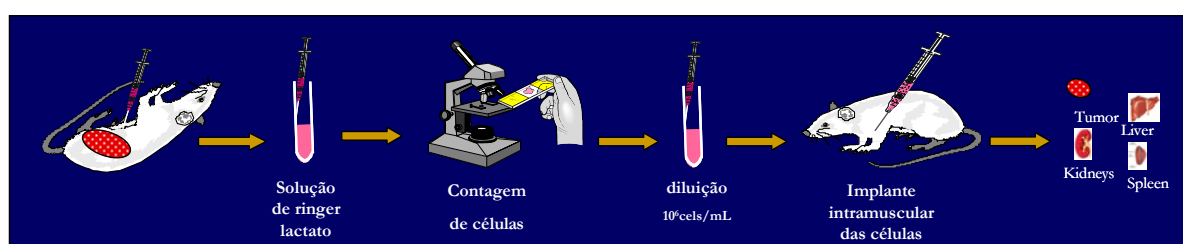
Onde:

A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

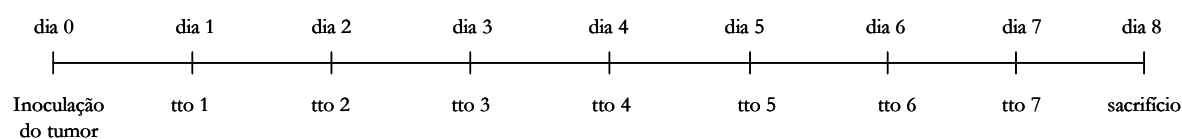
B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

### Análise dos resultados

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% ( $p < 0,05$ ).



### Esquema de tratamento com a biflorina:



**Figura 22:** Esquema representativo dos protocolos antitumorais em camundongos.

### **3.4.2. Efeito na biflorina na sobrevida de animais transplantados com o tumor Melanoma B16**

O Melanoma B16 no início dos anos de 1970 foi estabelecido como modelo tumoral em pesquisa de metástase em animais e foi quando começou a ser cultivado *in vitro*. O desenvolvimento e uso do melanoma B16 foi incorporado a um amplo escopo da pesquisa oncológica (TEICHER, 1997).

#### **Procedimento Experimental**

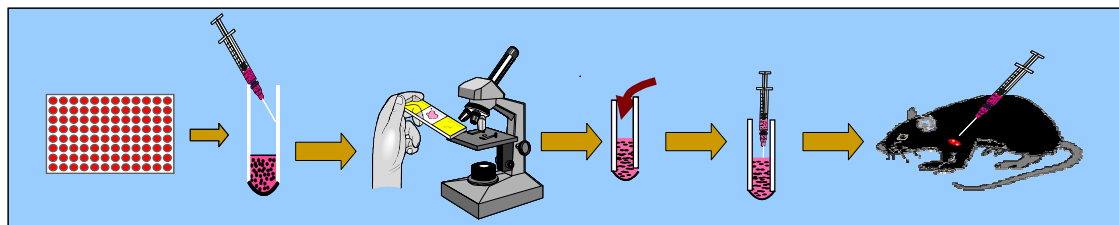
As células de Melanoma B16 foram mantidas e crescidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37° C em garrafas para cultura Corning 75 cm<sup>3</sup> em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). O crescimento celular foi acompanhado diariamente com a utilização de microscópio de inversão. O meio de cultura foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para a renovação de nutrientes. Para expansão da cultura e remoção das células da garrafa, foi utilizado solução de tripsina 0,25% para soltá-las das paredes. O transplante do tumor foi realizado pela inoculação de 10<sup>6</sup> células/0,5mL subcutaneamente na região axilar de camundongos *Mus musculus* B57CL/6.

Para este experimento, foram utilizados 10 animais por grupo, num total de 4 grupos, sendo todas fêmeas, apresentando massa corpórea variando entre 25-30 g. Vinte e quatro horas após a inoculação do tumor foi iniciado o tratamento por 10 dias consecutivos utilizando as doses de 25 mg/kg de biflorina, 25 mg/kg do quimioterápico Dacarbazina, a associação de 25 mg/kg de biflorina com 25 mg/kg de Dacarbazina e o veículo de diluição das substâncias (DMSO 10%). Ao término do tratamento, os animais foram deixados com água e alimento *ad libidum* e observados diariamente para monitoramento dos animais e registro dos óbitos, até o último, vindo a morrer ao 66° dia após a inoculação do tumor (figura 23). Outros parâmetros avaliados, além da sobrevida, foram o volume do tumor e a variação de peso do animal durante o período de tratamento.

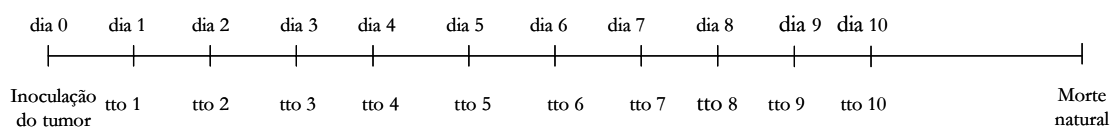
#### **Análise dos dados**

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% ( $p < 0,05$ ). Para análise de sobrevida foi realizada a análise de Kaplan-Meyer, e a ocorrência de diferenças significativas foi verificada através do teste do  $\chi^2$  (qui-quadrado).



### Esquema de tratamento com a biflorina:



**Figura 23:** Esquema representativo do protocolo de sobrevida dos animais transplantados com melanoma B16.

### 3.4.3. Atividade Imunoadjuvante

Para avaliar se a biflorina tem alguma atividade imunoadjuvante, foi realizado o experimento de imunização subcutânea em animais para se obter o soro dos camundongos imunizados e submetê-los a quantificação de anticorpos totais (Ig Total).

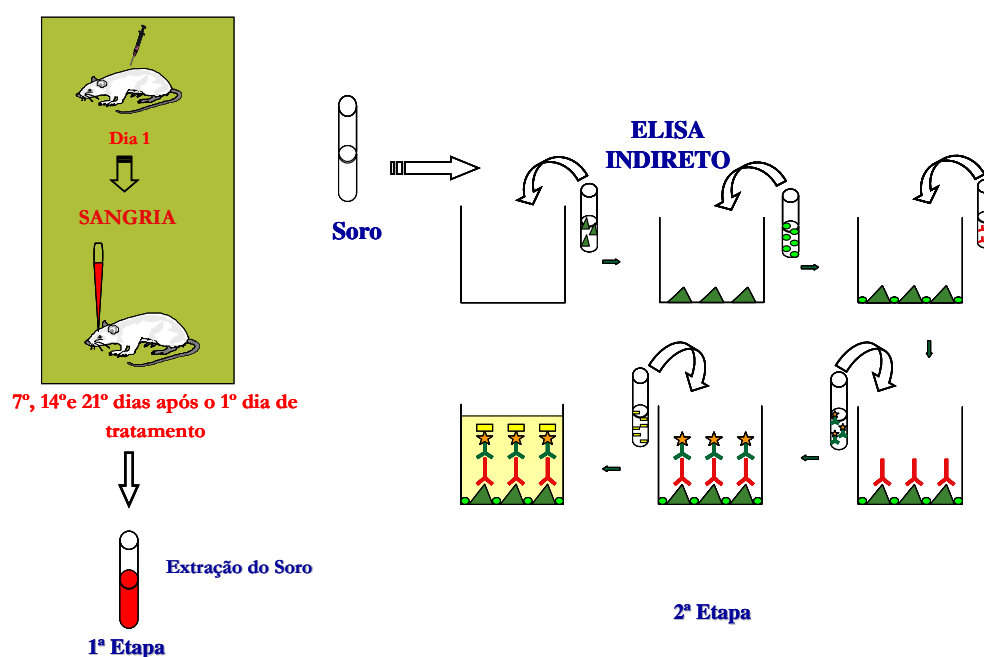
### Procedimento experimental

Esse ensaio foi realizado duas vezes, a primeira vez em camundongos saudáveis Swiss e a segunda em camundongos B57CL/6 transplantados com melanoma B16. Ambos os ensaios tiveram dois grupos experimentais, um grupo tratado com biflorina e outro com biflorina e ovalbumina. No primeiro caso se utilizou 1mg de biflorina por animal e 50 $\mu$ g de ovalbumina, no segundo caso, os animais receberam 25mg/Kg de biflorina e 50 $\mu$ g de ovalbumina. Os animais saudáveis foram sangrados com 7, 14 e 21 dias após imunização única. Os animais com tumor foram imunizados por 10 dias e foram sangrados apenas no 21<sup>o</sup> dia. O sangue foi obtido pelo plexo orbital dos animais

para se obter o soro dos animais. Os anticorpos Ig total (IgM, IgA e IgG) foram detectados por reação enzimática através do ensaio de imunoadsorção (ELISA). Cinquenta microgramas (50  $\mu$ g) de ovalbumina purificada foram diluídos em solução salina e um volume de 100  $\mu$ L foi usado e colocado em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 1 h, lavadas três vezes com 0,05% de tween-PBS. As placas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em 10 mM de PBS, pH7,2, com 0,9% de NaCl por 2h a 37°C, foram lavados novamente e o soro diluído em PBS (1:10-1:1280) foi adicionado (100  $\mu$ L) e a placa foi reincubada por 2 h a 37°C. As placas foram então, novamente lavadas com Tween-PBS e tratadas com imunoglobulinas conjugadas anti-mouse rabbit (100  $\mu$ L/poço, diluição final 1:1000) por 2 h a temperatura ambiente. As placas foram subsequentemente lavadas com Tween-PBS. A reação foi desenvolvida pela adição de orto-fenilenediamina seguido de incubação por 20 min a 37° C. O resultado da intensidade de coloração foi lida a 450 nm (figura 24).

### Análise dos dados

As leituras foram analisadas pelo programa Prisma 4.0. Os dados de  $n$  animais foram analisados pelo teste ANOVA-Newman Keuls ( $p < 0,05$ ).



**Figura 24** – Esquema representativo do método imunoadjuvante em animais.

### 3.5. AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA BIFLORINA COM O DNA

#### 3.5.1. Interação com DNA por eletroquímica

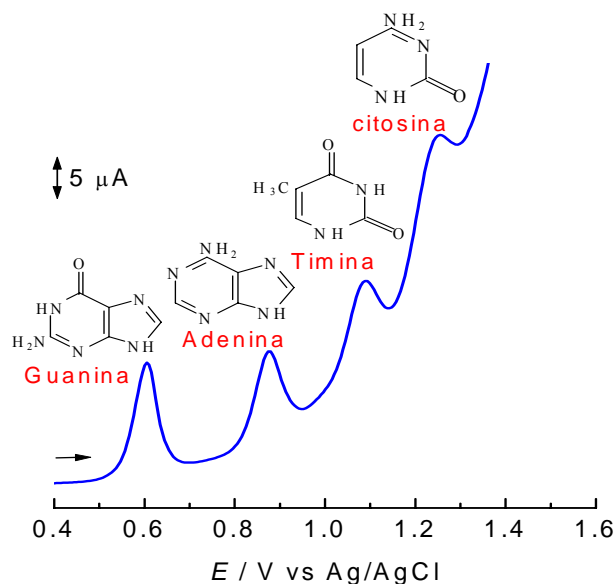
Foram realizados estudos eletroquímicos da Biflorina através de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada. A avaliação eletroquímica foi realizada previamente aos estudos em biossensor de DNA para determinação do perfil eletroquímico da *o*-naftoquinona.

Os estudos voltamétricos da biflorina foram realizados utilizando-se um sistema de três eletrodos – eletrodo de trabalho, auxiliar e de referência: carbono vítreo (BAS, área 7.065 mm<sup>2</sup>), platina e Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> 0,1 molL<sup>-1</sup> (em um tubo com capilar, Luggin, com Vycor<sup>®</sup> na extremidade), respectivamente. Foi utilizado N<sub>2</sub> em todas as análises (borbulhado na solução nos intervalos entre cada medida voltamétrica) para garantir a retirada do O<sub>2</sub> dissolvido no meio. Os experimentos foram carreados em meio prótico (solução aquoso-etanólica (7:3, v/v) tamponada, pH aparente de 4,5). Utilizando-se uma concentração de 3 mmol L<sup>-1</sup> de biflorina. A análise dos dados foi realizada a partir de gráficos obtidos nos experimentos, utilizando o programa Origin 6.0.

A técnica empregada para análise do comportamento eletroquímico do dsDNA e ssDNA é a Voltametria de Pulso Diferencial (VPD). As medidas eletroquímicas foram realizadas com o uso do equipamento AUTOLAB PGSTAT20 interligado a um microcomputador.

Biossensores são definidos como dispositivos analíticos incorporados a um material biológico (tecidos, microrganismos, organelas, enzimas, ácidos nucleicos, etc.), a um material derivado biologicamente ou material similar, intimamente associado ou integrado com um transdutor, que pode ser óptico, eletroquímico, termométrico, piezoelétrico ou magnético.

O *dsDNA* (DNA nativo, “double-strand” ou fita dupla) sempre apresenta menores correntes de eletrooxidação quando comparado ao *ssDNA* (DNA desnaturado, “single-strand” ou fita única), desnaturado termicamente (Figura 25), não só pelo fato de os sítios de oxidação estarem protegidos, porque envolvidos em ligações hidrogênio, como também por sua menor flexibilidade e maior dificuldade de adsorção.



**Figura 25:** Voltamograma de Pulso Diferencial (Carbono Vítreo) para a mistura das bases guanina e adenina ( $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ); timina e citosina ( $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ). Tampão fosfato pH 7,4.  $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude  $50 \text{ mV}^3$ .

### Procedimento experimental

O DNA utilizado foi do tipo I, altamente polimerizado de *calf thymus* (timo de bezerro), contendo 6,2% de Na e 13% de  $\text{H}_2\text{O}$ , dessecado e armazenado à  $8^\circ\text{C}$ . Usou-se pinça para sua fragmentação e pesagem. Para preparação do gel de dsDNA, 25 mg de dsDNA foram colocados em um microtubo juntamente com 2,0 mL de tampão acetato (pH 4,5). O gel foi armazenado sob refrigeração por 24 horas, para completa dissolução do DNA e formação do gel (o dsDNA não pode ser submetido ao ultra-som para não comprometer a integridade da dupla hélice). 20  $\mu\text{L}$  do gel foram colocados sobre a superfície limpa e condicionada do eletrodo de carbono vítreo (BAS 3 mm) e então seco com auxílio de um fluxo contínuo de nitrogênio. O eletrodo de carbono vítreo, após polimento com pasta de diamante (1 micra) e alumina (3 micra), foi condicionado em técnica de VPD ( $E_{\text{aplic.}} = 0$  a 1,4 V) a uma velocidade de  $5 \text{ mV s}^{-1}$  em vários ciclos até a completa estabilização da superfície do eletrodo (organização da dupla camada). Imediatamente após secagem do gel de DNA, sobre a superfície do eletrodo modificado,

foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  da solução ( $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) da substância-teste dissolvida em etanol, prosseguiu-se o mesmo procedimento de secagem e então se analisou o biossensor na região de  $E= 0$  a 1,4 V usando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Foi realizado um branco (controle), em triplicata, adicionando apenas etanol (20  $\mu\text{L}$ ) ao gel, para verificar se o etanol poderia interagir com o DNA. A medida eletroquímica foi realizada utilizando um eletrodo apropriado para acondicionar a pasta de carbono (Metrohm) modificada.

### **3.5.1. Inibição da enzima Topoisomerase I**

Os efeitos inibitórios da biflorina (5, 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ) em Topoisomerase I foram mensurados usando o kit para *screening* de drogas (TopoGEN, Inc.). Duzentos e cinquenta nanogramas (250 ng) de DNA foram incubados com 4 unidades de Topo I a 37 °C por 30 min em tampão de relaxamento e na ausência e presença de biflorina (5, 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ). Camptotecina (0,1mM) foi usada como controle positivo. A reação foi terminada pela adição de 10% de SDS (2  $\mu\text{L}$ ) e proteinase K (50  $\mu\text{g/mL}$ ) e incubada a 37°C por 30 min. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose por 90 min, a temperatura ambiente, e visualizadas com brometo de etídio.

## **3.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E CLASTOGÊNICO *IN VITRO* EM LINFÓCITOS HUMANOS**

### **3.6.1. Teste de citotoxicidade *in vitro* – Ensaio do Alamar Blue**

O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como com os sais de tetrazólio, o alamar Blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al.*, 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

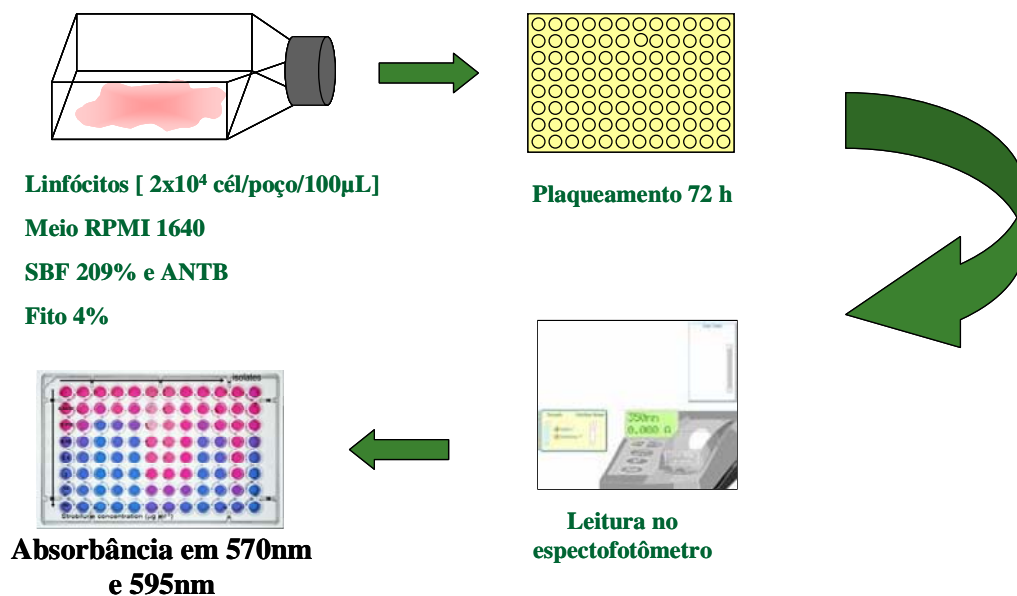
## Procedimento Experimental

Com o intuito de se investigar a seletividade da biflorina em célula normal, foi realizado o teste do Alamar Blue com linfócitos isolados de sangue periféricos de doadores saudáveis. Os linfócitos obtidos foram isolados a partir de uma amostra de cerca de 5 mL de sangue, acrescida de 5 mL de PBS. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 30 minutos de centrifugação a 1500rpm, e feita aspiração dos linfócitos, presentes na região intermediária entre as hemácias e o soro (“nuvem de linfócitos”). A suspensão de linfócitos foi transferida para um outro tubo ao qual foi acrescido PBS até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 20 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet de linfócitos foi ressuspensionado em 2 mL de PBS. Os linfócitos foram contados em câmara de Neubauer e expostos a droga por 72 h. Os linfócitos foram plaqueados em placas de 96 cavidades ( $2 \times 10^4$  células/poço em 100  $\mu$ L de meio). Após 24 h, (0,009-25  $\mu$ g/mL) de biflorina foi dissolvida em DMSO e adicionada em cada poço (usando o HTS-high-throughput screening) e incubado por 72 h. A Dox foi usada como controle positivo (0,009-5  $\mu$ g/mL). Os grupos controle receberam a mesma quantidade de DMSO. Vinte e quatro horas antes do final do tempo de incubação, 10  $\mu$ L da solução estoque de Alamar blue foi adicionado a cada poço da placa (figura 26).

## Análise dos dados

A absorbância foi medida usando um leitor de placas. O efeito da droga foi quantificado como a porcentagem da absorbância de controle em 570 nm e em 595 nm. A absorbância do Alamar blue no meio de cultura e a absorbância do meio de cultura sozinho é medido em um comprimento de onda mais alto e em um comprimento de onda mais baixo. A absorbância do meio sozinho é subtraída da absorbância do meio mais Alamar blue lido no comprimento de onda mais elevado. Esse valor é chamado AOHW. A absorbância do meio sozinho é subtraída da absorbância do meio mais Alamar blue, lido no comprimento de onda mais baixo. Esse valor é chamado AOLW. O fator de correção R0 pode ser calculado pelo AOWH e AOLW, onde  $R0 = AOLW/AOHW$ . A porcentagem da redução do Alamar blue é expressa por: % reduzida =  $AOLW - (AOHW \times R0) \times 100$ .





**Figura 26**– Esquema representativo do método Alamar Blue.

### 3.6.2. Teste Cometa

A análise do cometa alcalino (SINGH *et al.*, 1988), avalia a extensão da quebra ao DNA após exposição de linfócitos a drogas suspeitas de potencial genotóxico. O desenho experimental do estudo do cometa é determinado pela proposta da análise levando em consideração a investigação do dano.

### Procedimento Experimental

Os linfócitos foram obtidos de 4 voluntários saudáveis e isolados a partir de uma amostra de cerca de 3mL de sangue, acrescida de 5mL de PBS. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 30 minutos de centrifugação a 1500 rpm, e feita aspiração dos linfócitos, presentes na região intermediária entre as hemácias e o soro (“nuvem de linfócitos”). A suspensão de linfócitos foi transferida para um outro tubo ao qual foi acrescido com PBS até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 20 min a 1000rpm . O sobrenadante foi descartado e o pellet de linfócitos foi ressuspendido em 2 mL de PBS.

Foram usadas as concentrações de 15 e 30  $\mu\text{g/mL}$  de biflorina. Como controle positivo foi utilizado doxorubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ), incubada com linfócitos por quarenta minutos. Como controle negativo foram utilizados linfócitos sem a exposição de qualquer droga.

Das amostras dos linfócitos tratados com biflorina e as dos controles positivo e negativo, foi retirada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de linfócitos, a qual foi adicionada a 110  $\mu\text{L}$  de agarose 1,5%.

As lâminas foram previamente cobertas com 110  $\mu\text{L}$  de agarose (NMP) a 60° C, sendo mantida a temperatura ambiente por 24h até a solidificação da agarose.

As amostras estudadas foram colocadas sobre a lâmina, sendo, em seguida, cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material e mantidas a 4°C para solidificação da agarose.

As lâminas foram removidas da solução de lise, e neutralizadas por 15min na solução de neutralização. Em seguida foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com tampão de corrida por 40min para permitir o desempacotamento do DNA. A eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade por 20 min, usando 20 V (volts) e a corrente de 300 mA. Após eletroforese as lâminas, foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização durante 5 min, para neutralizar a alcalinidade.

As lâminas foram fixadas em etanol 100%. Posteriormente, aplicou-se 30 $\mu\text{L}$  da solução de Brometo de Etídio (20 $\mu\text{g/mL}$ ) e foram cobertas com lamínula, sendo analisadas em microscópio de fluorescência (figura 27).

### **Análise dos dados**

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (figura 28). Foram, contados 50 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a figura 28.

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 por Teste de Turkey, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

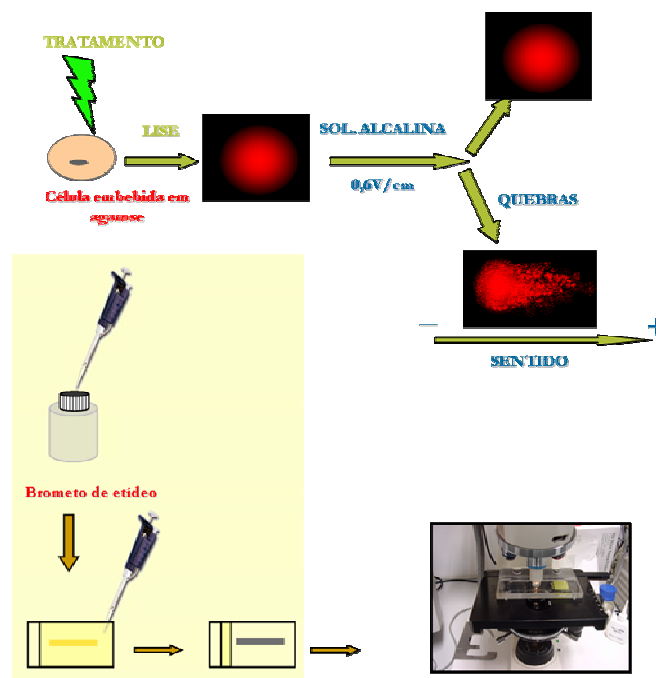


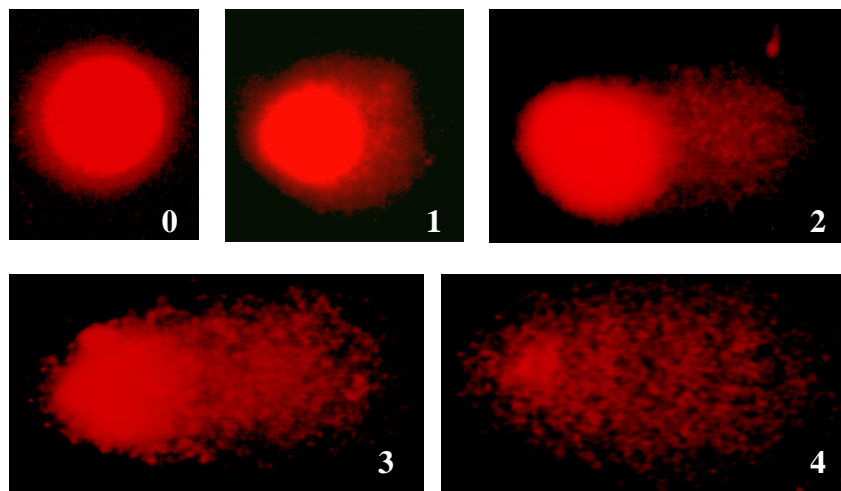
Figura 27– Esquema representativo do método do cometa.

0 = sem danos (<5%)

- 1 = baixo nível de danos (5 – 20%)
- 2 = médio nível de danos (20 – 40%)
- 3 = alto nível de danos (40 – 95%)
- 4 = dano total (95%)



O índice de dano (ID) foi obtido em pela seguinte fórmula:  $ID = 400 - \sum \text{Scores}$



Singh (1988), Pool-Zobel (1994), Speit (1995).

Figura 28: Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídeo e visualizados no microscópio de fluorescência, sendo indicado o escore atribuído para cada cometa de acordo com o dano.

### **3.6.3. Avaliação de Aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico**

Existem três níveis de mutações, as mutações gênicas, as aberrações cromossômicas estruturais como as deleções, duplicações, inversões e translocações e as aberrações cromossômicas em número (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2002). As aberrações cromossômicas estão intimamente relacionadas a doenças como neoplasia, na qual se verifica uma correlação positiva entre a frequência de aberrações cromossômicas nos linfócitos e o desenvolvimento do câncer e, com cerca de 50% dos abortos espontâneos, os quais apresentam algum tipo de aberração cromossômica (NATARAJAN, 2002).

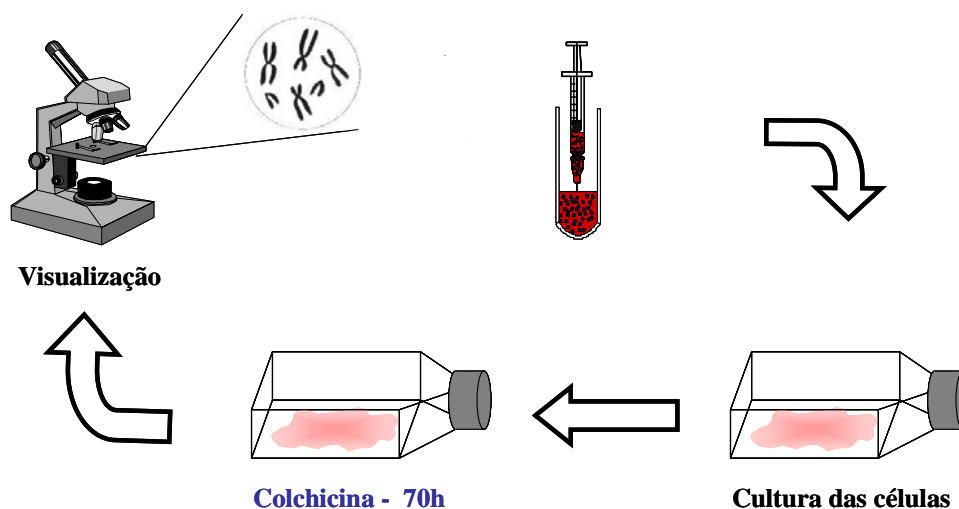
#### **Procedimento Experimental**

Os linfócitos foram obtidos de 4 voluntários adultos saudáveis, dos quais foram coletados 10mL de sangue periférico, em tubos heparinizados. Desse sangue foram feitas culturas em meio apropriado, suplementado com 20% de soro bovino fetal e 4% de fitoemaglutinina, o mitógeno que estimula o crescimento e divisão dos linfócitos, que foram colocados em garrafas de cultura mantidas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub>. A ação da biflorina foi avaliada nas fases G<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>/S, S e G<sub>2</sub> do ciclo celular. As células em cultura foram tratadas após 48 horas de estimulação com fitoemaglutinina. Aproximadamente 90 minutos antes do término das incubações foi adicionada uma solução de colchicina (0,016%) para interromper a divisão celular em metáfase. Após o término do tempo de incubação, as culturas foram centrifugadas e fixadas (3 metanol: 1 ácido acético) para a confecção das lâminas. As lâminas foram coradas com Giemsa diluído em tampão fosfato 0,06 M, pH 6,8, foram analisadas, sempre, em teste cego (figura 29).

#### **Análise dos dados**

A análise foi realizada em metáfases bem espalhadas, sem sobreposição e em células com 21±1 cromossomos. Foram analisadas pelo menos 100 metáfases por cultura em microscópio de luz e em objetiva de imersão. Foram feitas duplicatas de cada concentração, além dos controles negativo (veículo da preparação) e positivo (Doxorrubicina 0,01µg/mL). 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 por Teste de Turkey, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) no programa GraphPad Prism versão 4.0.



**Figura 29:** Esquema representativo do método de aberrações cromossômicas em linfócitos.

### 3.7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

#### 3.7.1. Autoxidação do Ácido oléico

A oxidação do ácido oléico [ácido 9(Z)-octadecenóico], um ácido de gordura monoinsaturado, o maior constituinte dos triglicerídeos, foi monitorado por seis dias, como descrito por Masuda e colaboradores (1992).

#### Procedimento experimental

Dois miligramas de biflorina foram diluídos em 4,0 mL de EtOH, 4,1 mL de ácido oléico(2,53%) diluído em EtOH, 8,0mL de tampão fosfato e 3,9mL de água destilada foi colocada em um frasco de 50mL com tampa e colocado em um forno a 40° C no escuro. A oxidação do ácido oléico foi monitorada da seguinte forma: para 0,1mL da amostra foi adicionada 9,7mL de EtOH (75%), 0,1mL de tiocianato de amônio (30%) e 0,1mL de cloreto ferroso (0,2nM) diluído em HCl (3,5%) para misturar a reação e após exatamente 3 min, foi lida a absorvância em 500nm, por dia durante seis dias.

### **3.7.2. Atividade antioxidante para determinação da remoção de radicais livres por DPPH (Método do radical livre DPPH)**

O ensaio do DPPH é uma das metodologias antioxidantes mais conhecidas e frequentemente utilizada. O DPPH (1,1-difenil - 2-picrilhidrazil) é um radical livre estável devido sua deslocalização de elétrons ao longo da molécula. Essa deslocalização promove uma coloração violeta em torno de 520nm. Quando uma solução de DPPH é misturada a um substrato agindo como um doador de hidrogênio o DPPH é obtido pela mudança simultânea da cor violeta para amarelo pálido (MOLYNEUX & SONGKLANAKARIN,2004).

#### **Procedimento experimental**

O efeito antioxidante da biflorina, assim como do Trolox® (vitamina E hidrossolúvel), Butil hidroxitolueno (BHT) e Vitamina C (ácido ascórbico) foi avaliado pela intensidade de emissão de fluorescência de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). DPPH a 60 µM foi misturado a três concentrações de Biflorina (250, 125 and 62.5 µg/mL) e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. A absorvância foi então medida a 520nm. A biflorina e o DPPH foram, então, dissolvidos em etanol e a porcentagem do efeito redutor foi obtida por comparação da absorvância da solução teste à solução controle. Trolox®, BHT® e Vitamina C foram usados como controles positivos.

### **3.7.3. Hipoxantina/xantina oxidase**

#### **Procedimento experimental**

Este ensaio foi utilizado para também avaliar o potencial antioxidante *in vitro* da biflorina e se baseou no método descrito por Owen *et al.*, 1996. Biflorina foi dissolvida no tampão experimental (1,0 mL - hypoxanthine, Fe (III), EDTA and salicylic acid) adicionado a hexano 2% e testada nas concentrações de 0,1 a 2 mg/mL. O hexano foi o diluente de escolha por o DMSO tem uma pronunciada ação antioxidativa. Um alíquota de 5µL de xantina oxidase (18mU) dissolvida em 3,2 M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> foi utilizada para iniciar a reação. Após incubação por 3h a 37 °C, 30µL da mistura reacional foi analisada por CLAE usando uma coluna cromatográfica C18 de fase reversa eluída com gradiente de metanol/água/ácido acético. A produção de dihidroxifenol (ácido 2,5-

dihidroxibenzóico e ácido 2,3-dihidroxibenzóico) pela reação de ácido salicílico aos radicais hidroxí ( $\text{OH}^\bullet$ ) liberados foi determinado por curvas padrão dos respectivos dihidroxifenóis.

### **3.8. ATIVIDADE BIOLÓGICA E GENOTÓXICA EM CÉLULAS V79**

#### **3.8.1. Cultura de células V79**

Fibroblastos de hamster chinês (células V79) foram cultivadas sob condições padrão em meio MEM com sais de Earle, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina e 1% de antibióticos (100 IU/mL penicilina e 100  $\mu\text{g/mL}$  estreptomicina). As células foram mantidas em frascos de cultura (Nunc, 25  $\text{cm}^2$ ) a temperatura de 37 °C e atmosfera umidificada a 5%  $\text{CO}_2$  e resgatadas com tripsina 0,15% e EDTA 0,08% diluídos em PBS.  $3 \times 10^5$  células foram plaqueadas com 5% de meio completo e crescidas por 2 dias antes do início do tratamento. A biflorina foi testada em 2,5, 5,0, 10,0 e 30,0  $\mu\text{g/mL}$  na ausência ou presença de peróxido de hidrogênio (100 mM). A concentração final de DMSO no meio foi mantida constante e inferior a 0,5% (v/v).

#### **3.8.2. Avaliação da citotoxicidade a partir da sobrevivência clonal**

Uma cultura logarítmica de células V79 foi crescida de acordo com o protocolo. Em seguida, as células foram tripsinizadas e 500 células foram plaqueadas em placas de 60 mm para determinar a habilidade de formação de colônia. Biflorina foi adicionada ao meio após a adesão das células. Após 5 dias de incubação, as células foram fixadas em etanol e as colônias com 50 ou mais células foram coradas com Giemsa, contadas e a porcentagem de sobrevivência foi calculada relativa ao controle.

#### **3.8.3. Avaliação da peroxidação lipídica**

A indução de peroxidação lipídica por biflorina foi avaliada a partir da reação de TBA com malondialdeído (MDA), um produto de peroxidação lipídica. Células V79 ( $3 \times 10^6$  cells) foram incubadas com biflorina em diferentes concentrações por 3h em meio livre de FBS, após lise com Tris-HCl (15mM por 1h). Dois mililitros (2 mL) de TBA (0,4 mg/mL) e HCl 0,25M foram adicionados ao lisado. Após incubação com TBA 6,7 mg/mL por 15 minutos a 100 °C, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 750G. TBA reage com produtos de peroxidação lipídica, distintos de MDA. Os

resultados foram expressos nos termos de espécies reativas de tiobarbitúricos (TBARS) como determinadas pela absorvância a 523 nm. TMP hidrolizado foi usado como padrão. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de proteínas.

### **Análise dos dados**

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste ANOVA-Tukey, comparando-se os tratamentos com o controle negativo. Foi considerado estatisticamente significativo  $P < 0,05$ .

#### **3.8.4. Teste Cometa**

Células V79 foram incubadas por 3h com diferentes concentrações de biflorina (2,5, 5,0, 10,0 and 30,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) com ou sem peróxido de hidrogênio (incubado por 1h) ou com uma pequena modificação, foram tratadas com ou sem as enzimas EndoIII e Fpg. As células foram lavadas com PBS gelado, removidas com 100  $\mu\text{L}$  de tripsina 0,15% e ressuspensas em meio completo. Em seguida, 20  $\mu\text{L}$  da suspensão de células ( $2 \times 10^6$  cells/mL) foi dissolvido em 0,5% em agarose com baixo ponto de fusão e imediatamente espalhada sobre uma lâmina pré-tratada com 1% de agarose com baixo ponto de fusão. O ensaio do cometa foi realizado como descrito anteriormente. A análise foi realizada por coloração com nitrato de prata e as células foram contadas em microscópio óptico.

## **3.9. POTENCIAL GENOTÓXICO EM DIFERENTES SISTEMAS BIOLÓGICOS**

### **3.9.1 Detecção da atividade citotóxica, mutagênica e antimutagênica em *Saccharomyces cerevisiae***

A levedura *S. cerevisiae* é um fungo unicelular do tipo ascomicete, com ciclo eucariótico típico e completo, e notavelmente semelhante às células de mamíferos no que se refere às macromoléculas, organelas e proteínas com homologia a proteínas humanas, tornando-a uma ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (COSTA E FERREIRA, 2001), podendo ser cultivado facilmente em condições adequadas, tanto na



fase haplóide como na diplóide. Em geral, o tempo de duplicação das leveduras a 28-30 °C, tendo glicose como fonte de carbono, é de aproximadamente 90 minutos.

### **Procedimento Experimental**

Para os ensaios de mutagênese e antimutagênese em leveduras foi utilizada a linhagem XV185-14c e para o ensaio de recombinação foi utilizada a linhagem XS2316 de *S. cerevisiae*. O crescimento das células de *Saccharomyces cerevisiae* foi feito em meio líquido completo (YEL) contendo 1% de extrato de levedura, 2% de bactopectona e 2% de glicose. Para determinação do número de células viáveis, ou seja, unidades formadoras de colônias foram feitas sementeiras em meio YEPD solidificado com 2% de bacto-agar.

Em frasco de Erlenmeyer contendo 30 mL de YEL foi inoculada uma colônia isolada dessa linhagem e colocada para crescer em 'shaker', a 180 rpm e 30°C, durante 48 horas, para atingir a fase estacionária. As culturas assim mantidas atingiram uma concentração de 2 a 4 x10<sup>8</sup> céls/mL. Posteriormente, esta suspensão foi passada para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm. Após esta primeira centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 20 mL de solução salina, seguida de centrifugação para lavagem das células. As células foram contadas em câmara de Neubauer no microscópio óptico e foram feitas as diluições necessárias para se obter a concentração celular desejada para o tratamento. Uma suspensão celular de 2x10<sup>8</sup> células/mL em fase estacionária foi incubada durante 20 horas a 30° C, sob agitação a 180 rpm, com doses crescentes (50-500 µL/mL de suspensão celular) da amostra. Foi determinada a sobrevivência através de sementeira em meio rico YEPD, após 3-5 dias de crescimento em estufa a 30° C. Para a detecção de mutação induzida (revertentes LIS, HIS ou HOM) as células foram incubadas em meio mínimo seletivo, durante 3-5 dias a 30° C. As células foram tratadas na presença e ausência de peróxido de hidrogênio para avaliar a capacidade antimutagênica da biflorina, quando as células após pré-tratamento com biflorina, fossem expostas aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio. A mutação *his1-7* é um alelo de sentido incorreto ou *missense*, do tipo não supressivo, e, portanto, as reversões são a consequência de mutações no próprio locus. Entretanto, o alelo *lys1-1* corresponde a uma mutação do tipo ocre sem sentido (*nonsense*), a qual pode ser revertida de forma locus específico ou através de mutação para frente (mutação forward) em um gene supressor. A diferença entre as reversões

verdadeiras e mutações supressoras (*forward*) no locus *lys1-1* está bem descrita por Schüller e Von Borstel (1974), onde o conteúdo de adenina reduzido no meio SC-lys mostra reversão no locus quando as colônias são vermelhas e mutações supressoras quando as colônias ficam brancas. Acredita-se que *hom3-10* contenha mutação do tipo deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift*, devido a sua resposta a uma série de agentes sabidamente mutagênicos.

Para avaliar a recombinação, a suspensão de ( $2 \times 10^7$  células / mL) de células diplóides na fase exponencial, foi incubada durante 18 horas a 30 ° C em PBS com diferentes concentrações de biflorina. Após o tratamento, as células foram diluídas em PBS, plaqueadas, em três diferentes meios de cultura (SC, SC - leu e SC + cyh) e incubadas durante 5-7 dias a 30° C. Quando o efeito protetor foi investigado, as células foram incubadas com biflorina, lavadas e expostas a 4 mM peróxido de hidrogênio a 30°C em PBS no escuro sob agitação. Após a exposição, as células foram contadas, diluídas e plaqueadas em meio específico. As colônias cultivadas em meio SC indicam a sobrevivência e as colônias de células cultivadas em SC - leu e SC + cyh indicam recombinação mitótica intragênica (transformação genética) e recombinação intergênica (crossing-over), respectivamente. A fim de medir a exata frequência de crossing-over para eliminar a possibilidade de que alguma colônia resistente a cicloheximida resultar em reversão no locus CYH2 legitimidade, bem como de monossomia do cromossomo VII. Portanto, as colônias resistentes a cycloheximida foram plaqueadas sobre uma série placas com meio SC - lys, SC - se reuniu e SC -, com posterior triagem desses marcadores para cyh2. Ensaios foram realizados em quatro placas em triplicata para cada dose.

### **Análise dos dados**

Os ensaios com *S. cerevisiae*, os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste ANOVA-Dunett, comparando-se os tratamentos com o controle negativo. Foi considerado estatisticamente significativo  $P < 0,05$ .

### **3.9.2. Teste em *Salmonella thiphymurium* – teste de Ames**

O teste *Salmonella*/microsoma, desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores na década de 70 (AMES 1975; 1979), é um ensaio bacteriano de curta

duração que busca identificar substâncias causadoras de danos genéticos que possam levar a mutações (MARON e AMES, 1983 e MORTELMANS E ZEIGER, 2000).

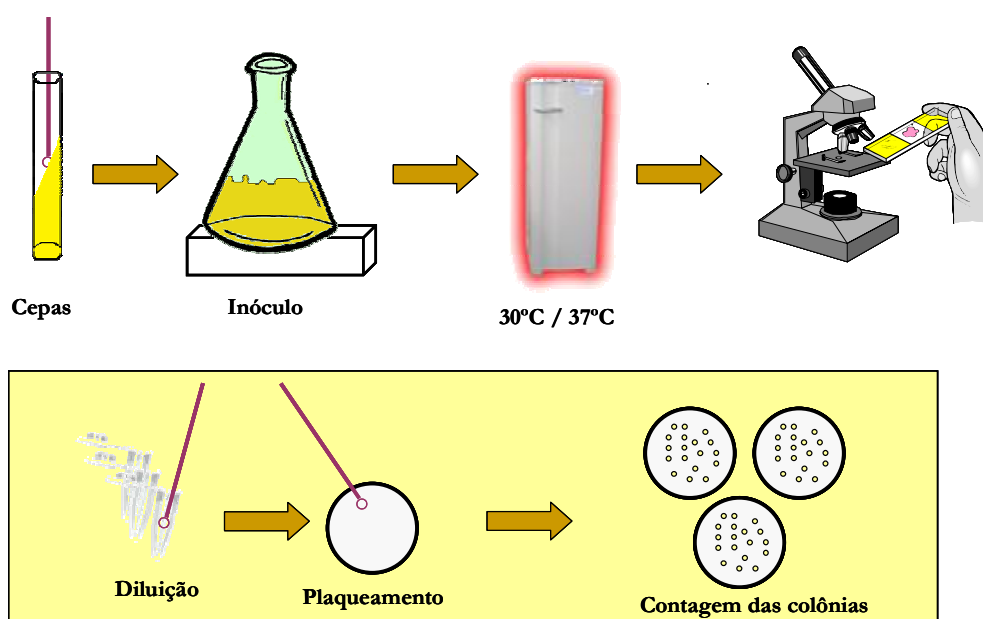
O teste usa linhagens de *Salmonella typhimurium* com mutações pré-existentes onde a bactéria fica impossibilitada de sintetizar o aminoácido histidina e não forma colônias na sua ausência no meio de cultura. Observa-se, porém que novas mutações nos sítios das mutações pré-existentes podem restaurar a função do gene para a síntese de histidina e formar colônias, conseqüentemente as células mutadas passam a crescer na ausência de histidina. Por esta razão este teste é referido como de mutação reversa (MARON e AMES, 1983; MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

### **Procedimento Experimental**

Foram utilizadas as linhagens TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA1535 de *Salmonella typhimurium*. Para cada experimento, as culturas das linhagens-teste cresceram pelo período de uma noite em caldo nutriente Oxoid N<sup>o</sup>2, até a densidade de  $1-2 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. As culturas foram colocadas em agitador (100rpm) a 37<sup>o</sup>C, ao abrigo de luz, por 11-14 horas. As doses foram selecionadas por um ranging find na cepa TA100. Onde foram escolhidas 5 doses para o teste, as amostras foram de 66,00 a 333,30 µg/placa. Foi utilizada a fração microsossomal - S9 que é composta por um homogenato de fígado de células de rato. A fração S9 é acrescida de co-fatores adequados e necessita de condições de pH específicas para que as reações de metabolização possam ocorrer. Para avaliar a atividade mutagênica foi utilizado o teste de incorporação em placas, que consiste na exposição da (s) linhagem (s) testadora (s) e a amostra a testar em placa de Agar glicose mínimo na presença e ausência de sistema de avaliação metabólica S9 (0,5 mL). Os diferentes componentes foram, primeiramente, adicionados aos tubos de teste esterilizados contendo 2 mL de Agar de superfície líquido suplementado com histidina e biotina, mantendo-os a temperatura de 45<sup>o</sup> C. Os conteúdos dos tubos foram misturados, homogeneizados e vertidos sobre a superfície de uma placa contendo Agar mínimo. Após solidificação do Agar de superfície, as placas foram incubadas invertidas e ao abrigo da luz, por 48h, a 37<sup>o</sup> C. O ensaio foi realizado em triplicata (GATEHOUSE *et al.*, 1994). Procedeu-se, então, a contagem do número de revertentes em todas as placas.

## Análise dos dados

Na análise do teste *Salmonella*/microssoma, os resultados são expressos em revertentes/placas ou pela razão de mutagenicidade (RM), também denominada de índice de mutagenicidade (IM) e o número de revertentes na placa-controle (espontâneos), permitindo comparação de resultados entre diferentes linhagens. Para o estudo da diferença entre doses e entre repetições, foi utilizada ANOVA, seguida de análise de regressão linear da curva dose-resposta.



**Figura 30:** Esquema representativo dos testes em bactérias e leveduras.

### 3.9.3. Micronúcleos de medula óssea de camundongos

O teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais.

O teste do Micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR *et al.*, 1987; HAYASHI *et al.*, 1994). Esse teste foi inicialmente

desenvolvido em eritrócitos de medula de camundongos, mas pode ser feito em medula de ratos.

As características gerais do teste são (1) o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos anucleados (PCEs); (2) o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos induzidos recentemente; (3) os micronúcleos são facilmente identificáveis e a sua distribuição é bem definida; e (4) a frequência de micronúcleo induzida em eritrócito policromático é dependente do tempo de amostragem (figura 31).

### **Preparo dos animais para o teste do micronúcleo**

Os animais foram expostos à substância teste por via intraperitoneal e sacrificados nos tempos de 24 e 48 horas após o tratamento para a retirada da medula óssea dos camundongos. Foram utilizados animais saudáveis, adultos jovens (entre 6 e 8 semanas de idade), distribuídos ao acaso, tanto para o grupo controle como para os grupos tratados. Os animais, identificados individualmente, foram aclimatados às condições do biotério por pelo menos 3 dias antes do início do estudo. A variação de peso dos animais foi mínima, não excedendo a 20% do peso médio de cada sexo. Em cada grupo controle e tratados com a substância teste, foram incluídos 5 animais de cada sexo, a temperatura da sala de manutenção dos animais foi de 22°C ( $\pm$  3°C) e um ciclo de luz 12h claro/12h escuro. Os animais foram mantidos em caixa de polipropileno em pequenos grupos (máximo 5), do mesmo sexo e em estantes ventiladas. Para a alimentação, foi utilizada água filtrada e ração para camundongos oferecidos sem restrição de quantidade. As substâncias foram dissolvidas em DMSO no momento do tratamento dos animais. Grupos de animais controles negativo e positivo foram incluídos em cada estudo e foram testados ao mesmo tempo em que os grupos tratados. Os animais do grupo controle negativo foram tratados somente com o solvente/veículo. Foi utilizado um grupo controle para cada tempo de amostragem.

## **Procedimento Experimental**

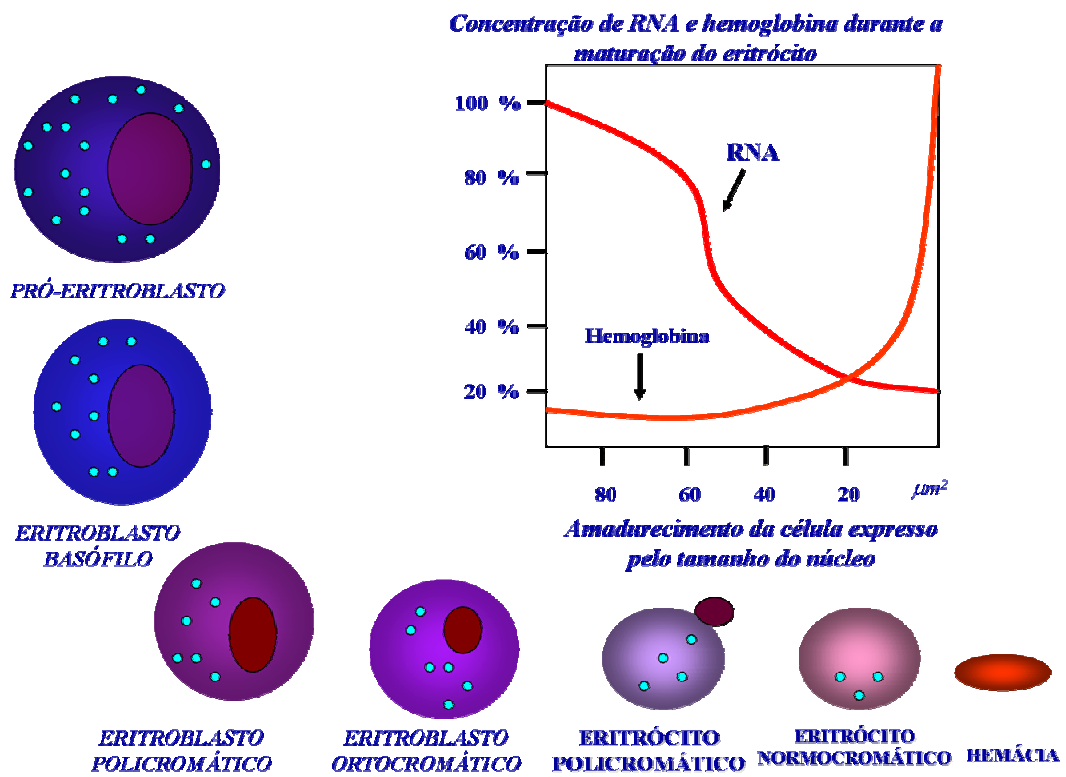
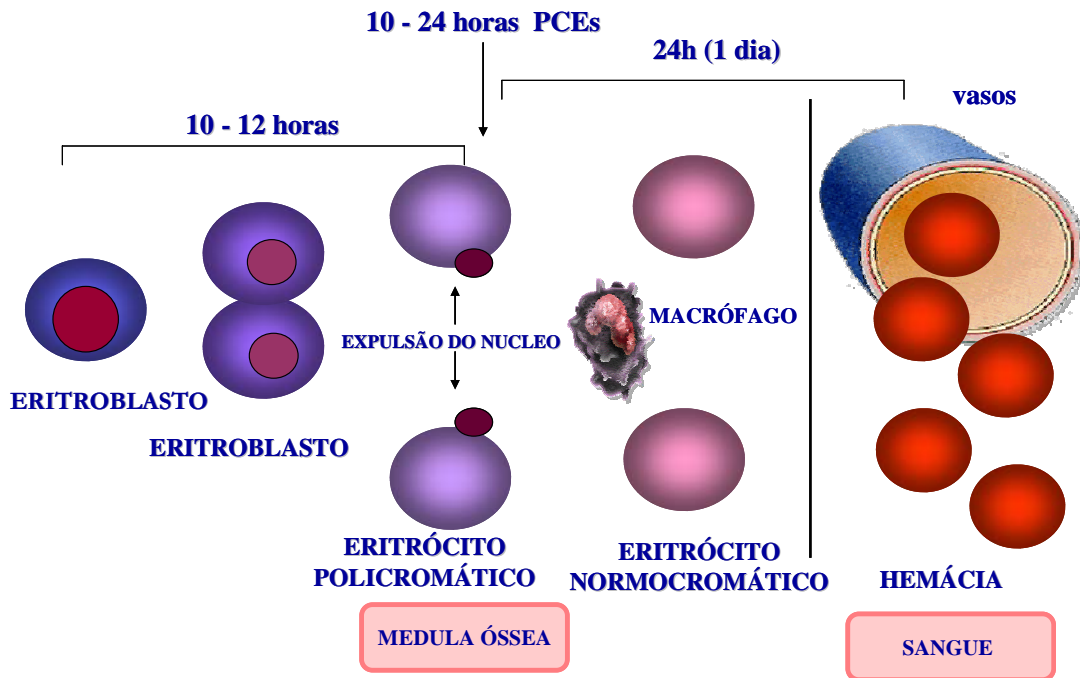
Os animais foram tratados com a substância teste uma única vez, as amostras de medula óssea foram coletadas em dois momentos após a administração da substância teste: 24 e 48h. Como controle positivo foi utilizado etilmetanosulfonato (EMS, CAS 62-50-0), 200mg/kg. Após o sacrifício do animal, uma amostra do material de medula óssea foi coletada dos fêmures, em uma pequena quantidade (3 mL) de soro bovino fetal. As preparações celulares foram coradas adequadamente com Leishman e analisadas para a presença de micronúcleos. Foram preparadas duas lâminas de cada animal (figura 32).

Todas as lâminas, incluindo aquelas do controle positivo e negativo, foram codificadas antes da análise. A proporção de eritrócitos imaturos (PCE) dentre o total de eritrócitos (PCE + NCE) foi determinada contando-se pelo menos 200 eritrócitos (PCE + NCE) por animal. Para avaliação de células micronucleadas, foram analisados pelo menos 2000 PCE por animal.

## **Análise dos dados**

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de  $n$  animais. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Turkey, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

## PROCESSO DE MATURAÇÃO ERITROCITÁRIO



## FORMAÇÃO DE MICRONÚCLEOS

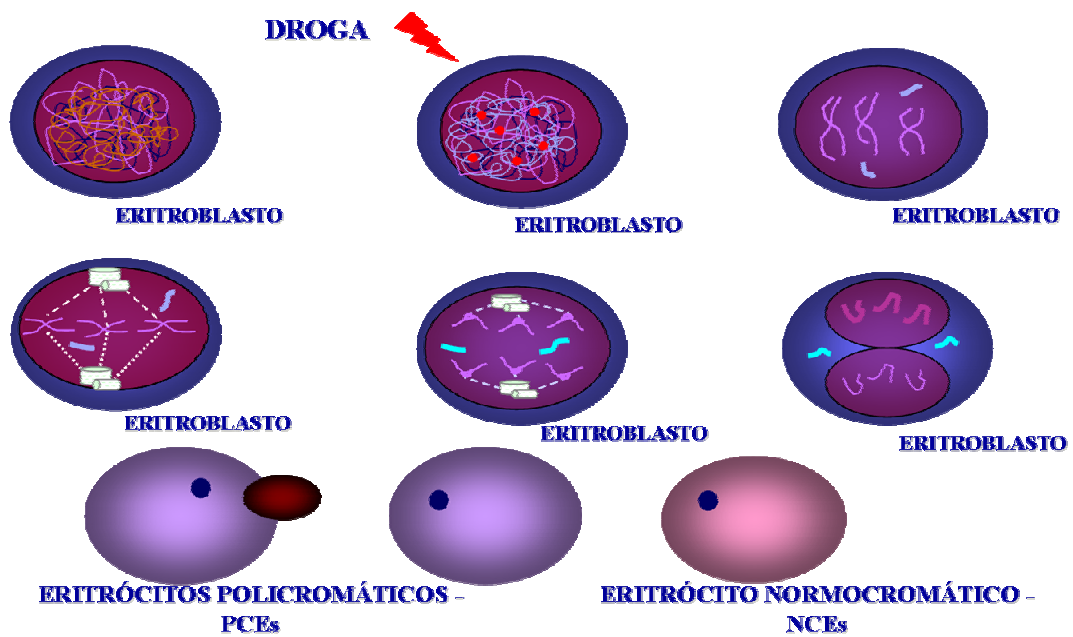


Figura 31: Esquema representativo da formação de micronúcleos.

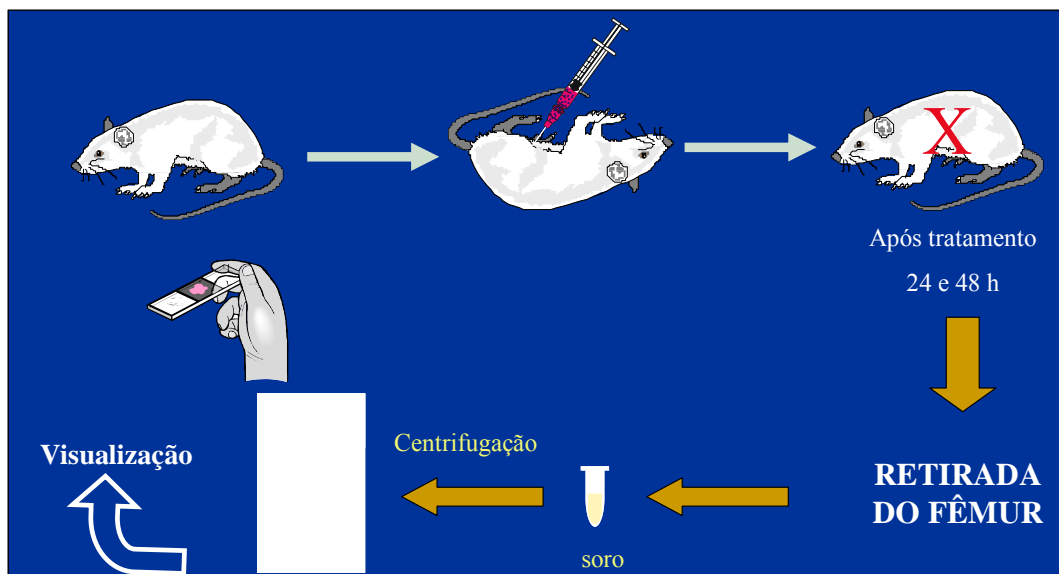


Figura 32: Esquema representativo do método de micronúcleos *in vivo*.



#### 4.1. ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO*

##### 4. 1. 1. Teste de citotoxicidade em células de linhagens tumorais – Teste do MTT

A atividade citotóxica da biflorina foi avaliada pelo método do MTT e os resultados estão representados na tabela 3. A biflorina mostrou-se inespecífica e com uma atividade citotóxica variada, porém com  $CI_{50}$  variando de 0,43 a 14,61  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 3 - Efeito inibitório da biflorina e da doxorrubicina (controle positivo) de células em cultura em 16 diferentes linhagens tumorais. Os valores apresentados referem-se a  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) e o intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear.**

LINHAGEM CELULAR	Biflorina $CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{M}$ )	Doxorrubicina $CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{M}$ )
<i>Linhagens Leucêmicas</i>		
HL-60	1,95 (6,30)	0,02 (0,03)
	1,26 – 2,69	0,01 – 0,02
CEM	1,02 (3,30)	0,02 (0,03)
	1,24 – 1,96	0,01 – 0,02
K 562	2,43 (7,86)	0,14 (0,24)
	1,41 – 2,372	0,09-0,22
<i>Linhagens de Mama</i>		
MCF-7	0,43 (1,30)	0,20 (0,34)
	1,28 – 1,768	0,17 – 0,24
MDA MB 231	14,61 (47,26)	0,22 (0,37)
	11,54-18,50	0,18-0,26
MX 1	1,11 (3,61)	0,076 (0,13)
	0,98 – 1,29	0,054-0,10

<i>Linhagens de Pulmão</i>		
<b>NCI H266</b>	0,86 (2,80)	0,15 (0,26)
	0,67 – 1,12	0,13-0,18
<b>NCI H23</b>	0,58 (1,88)	0,065 (0,11)
	0,51 - 0,6584	0,058 – 0,074
<i>Linhagens de Melanoma</i>		
<b>M14</b>	2,34 (7,02)	0,30 (0,15)
	1,85-2,95	0,16-0,55
<b>UACC – 257</b>	1,48 (4,44)	0,27 (0,45)
	n.d.	0,23-0,32
<b>UACC – 62</b>	1,67 (5,01)	0,09 (0,5)
	1,55-1,8	0,08-0,99
<b>MDA MB 435</b>	0,65 (2,10)	0,47 (0,81)
	1,726 – 3,451	0,34-0,65
<b>B16 (murino)</b>	10.12 (16.86)	0,03 (0,05)
	6,98 -14,67	0,02 – 0,04
<i>Outras Linhagens</i>		
<b>PC3 (Próstata)</b>	6,09 (19,7)	0,45 (0,77)
	4,17-8,89	0,38-0,68
<b>SF295 (SNC)</b>	0,63 (2,02)	0,16 (0,27)
	0,567 – 0,69	0,13-0,23
<b>HCT-8 (Cólon)</b>	0,88 (2,80)	0,04 (0,07)
	4,73 – 12,5	0,03 – 0,05

n.d. – não determinado

#### 4.1.2. Teste da atividade antimitótica em ovos de ouriço-do-mar

A biflorina não foi capaz de causar inibição do desenvolvimento de ovos de ouriço-do-mar, diferente do que ocorreu com o controle positivo (doxorrubicina), que inibiu o desenvolvimento embrionário em baixas concentrações (Tabela 4).

**Tabela 4 - Atividade antimitótica da biflorina e da doxorrubicina (controle positivo) em desenvolvimento de ovos de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*). Os dados mostram os valores da IC<sub>50</sub> (µg/mL) e o intervalo de confiança (IC 95%) na primeira e terceira clivagem e na blástula obtido por regressão não linear.**

Substância	1ª clivagem	3ª clivagem	Blástula
	CI <sub>50</sub> µg/mL (µM)	CI <sub>50</sub> µg/mL (µM)	CI <sub>50</sub> µg/mL (µM)
<i>Biflorina</i>	> 100,0 (194,5)	> 100,0 (194,5)	> 100,0 (194,5)
<i>Doxorrubicina</i>	6,28 (10,83) 4,34 – 9,09	0,34 (0,59) 0,16 – 0,73	0,54 (0,93) 0,27 – 1,07

#### 4.1.3. Atividade hemolítica

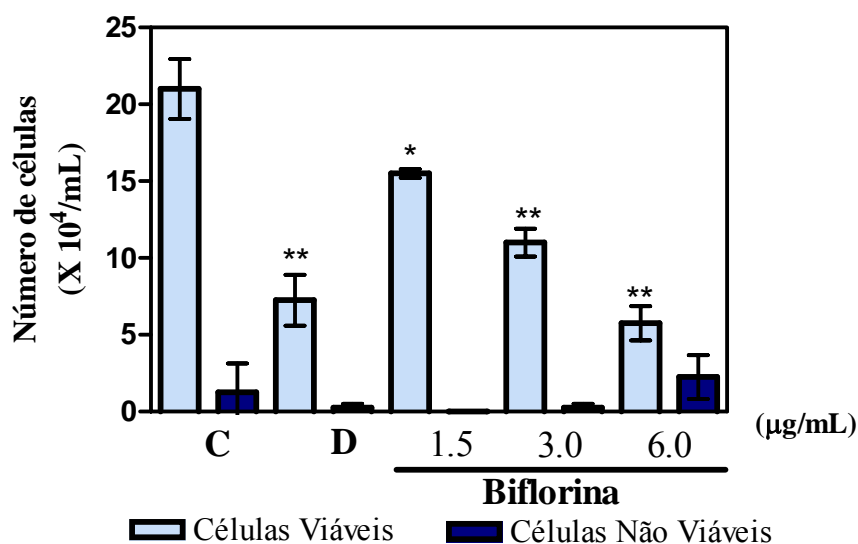
O efeito hemolítico da biflorina foi avaliado em eritrócitos de camundongos *Mus musculus*. Neste ensaio, observou-se ausência de atividade hemolítica nas concentrações testadas (1,5 a 200 µg/mL). São consideradas ativas aquelas substâncias que apresentaram CE<sub>50</sub> < 200 µg/mL.

## 4.2. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO NO MODELO DE MELANOMA MURINO *IN VITRO*

A linhagem de melanoma murino (B16), foi utilizada como modelo para avaliação de atividade do mecanismo de ação e inibição tumoral *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, pela possibilidade de poder usar a mesma célula em ambos os modelos.

### 4.2.1. Análise da Viabilidade celular – Exclusão por azul de tripan

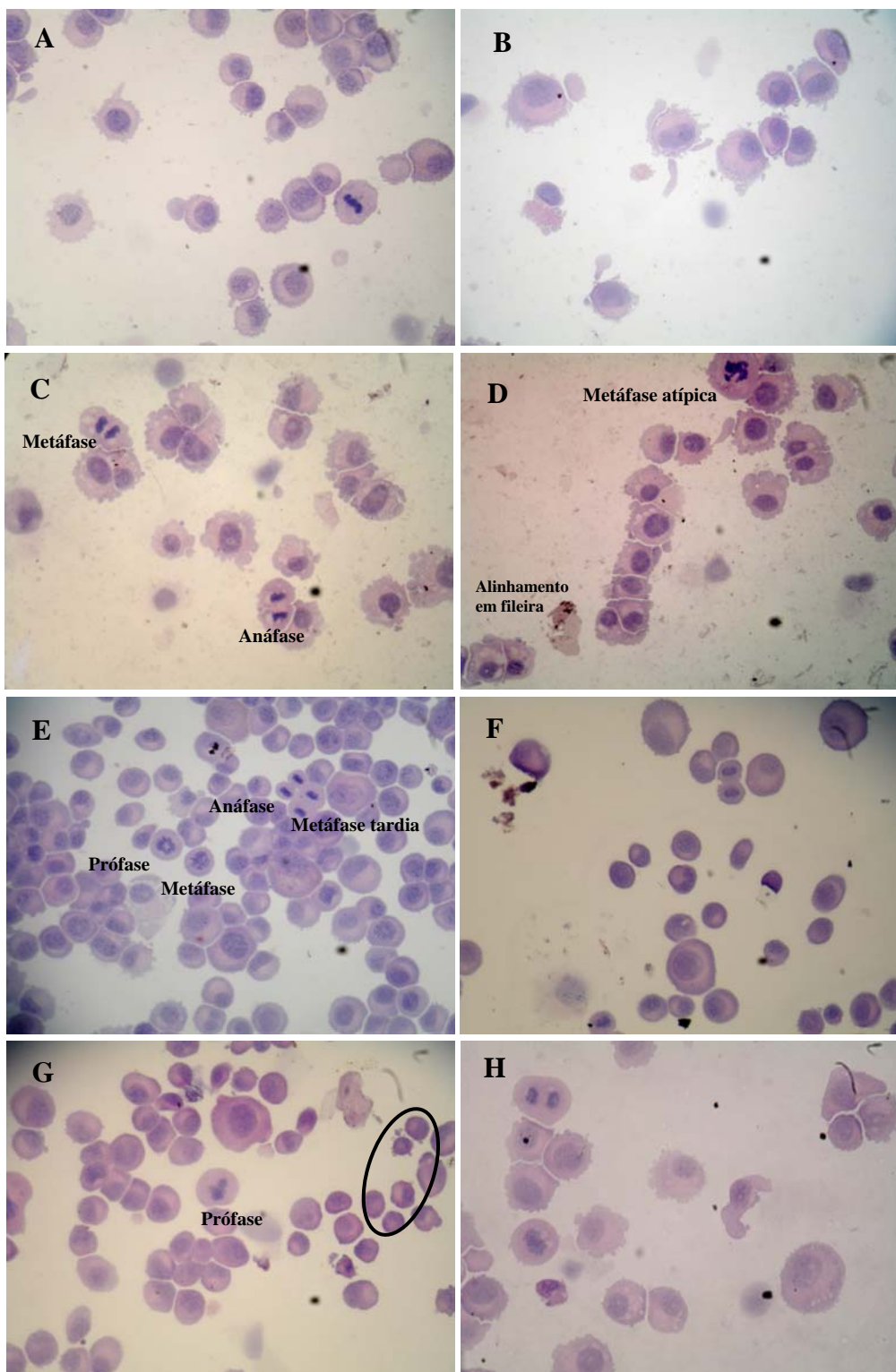
Os experimentos foram realizados em células B16, 24 horas após a incubação de biflorina, em concentrações correspondentes a 1,5, 3,0 e 6,0  $\mu\text{g/mL}$  com base no seu valor  $\text{CI}_{50}$  após 24 horas incubação (2,95  $\mu\text{g/mL}$ ). A exclusão pelo teste de azul de tripan foi realizada para avaliar a viabilidade celular (figura 33). Em todas as concentrações, a biflorina reduziu a viabilidade celular ( $p < 0,01$ ). No entanto, a biflorina não provocou aumento significativo no número de células não viáveis em nenhuma concentração testada (Figura 16) A doxorrubicina foi usada como controle positivo na concentração de 0,3  $\mu\text{g/mL}$  causando redução de 65,5% das células viáveis (figura 33).



**Figura 33:** Determinação da viabilidade celular analisada por azul de tripan das células B16 tratadas com biflorina após 24 h de incubação. Controle Negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. Doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usada como controle positivo (D). Os dados são apresentados como valor das médias  $\pm$  D.P. em dois experimentos independentes em duplicata ( $n=4$ ). \*,  $p < 0,01$  \*\*  $p < 0,001$  comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

#### **4.2.2. Análise morfológica – Coloração por hematoxilina/eosina**

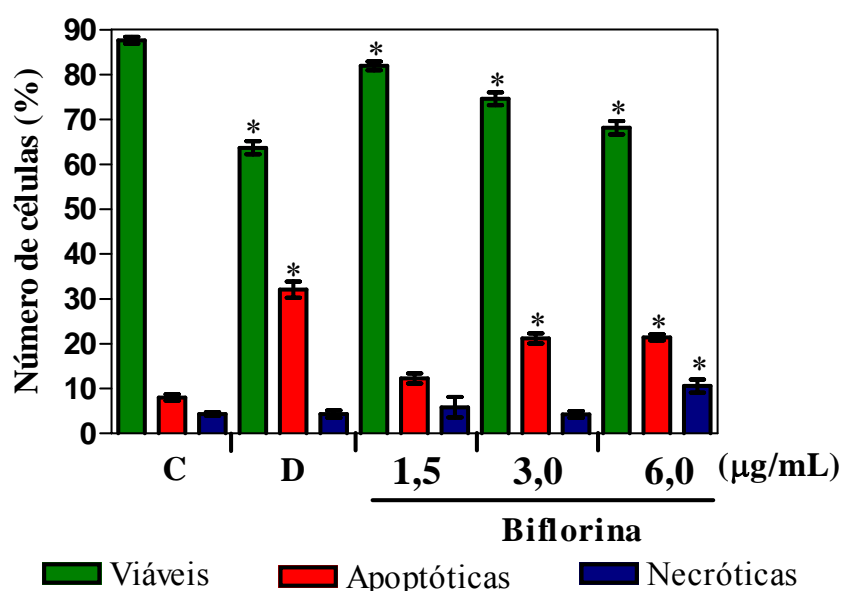
A análise morfológica das células B16, tratadas em relação às células não tratadas, revelou alterações mediadas pela biflorina (Figura 34). As células tratadas com biflorina, em todas as concentrações testadas (1,5, 3,0 e 6,0  $\mu\text{g/mL}$ ), apresentaram morfologia compatível com apoptose, incluindo uma redução de tamanho das células, vacúolos intracelulares e formação de “blebbings”. Além disso, a biflorina causou um aumento do número de figuras mitóticas em diferentes fases do ciclo celular, sugerindo um mecanismo de ação de droga, não-seletivo para as diferentes fases do ciclo celular. A doxorubicina também induziu redução das células, condensação de cromatina nuclear e fragmentação, morfologia compatível com apoptose.



**Figura 34:** **A** – Controle: Células viáveis exibindo irregularidades na membrana plasmática, núcleos vesiculosos, cromatina uniformemente distribuída. Células em metáfase. **B** - DOX: Rarefação celular / redução do tamanho das células / vacúolos na periferia do citoplasma / irregularidades da membrana plasmática. Rarefação celular / Vacúolos na periferia das células / Restos celulares. **C, D**: Biflorina 1,5µg/mL - Células com tamanho reduzido / Células aglomeradas e em fileira / Aumento de “bleebings” / Vacúolos na periferia / Figuras mitóticas. **E**: Biflorina 3,0 µg/mL - Células paradas em fases diferentes do ciclo celular (predomina em metáfase tardia e anáfase) / Diminuição do número de células / Aumento de células com “bleebings”/ Células com vacúolos periféricos. **F**: vacúolos no citoplasma B 6,0 µg/mL – HE Diminuição do número de células / células com tamanho pequeno / células em apoptose / vacúolos, bleebings/ células em metáfase tardia. **G,H**: células apoptóticas/ rarefação celular

#### 4.2.3. Análise morfológica – Coloração diferencial por Laranja de Acridina/ Brometo de Etídio

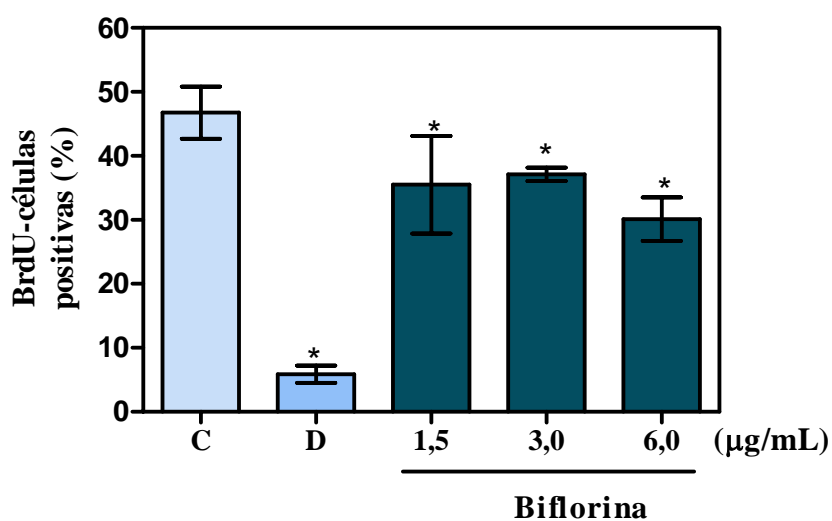
A morfologia de células tratadas foi investigada utilizando LA / BE coloração para microscopia fluorescente. Foi calculada a porcentagem de células viáveis, células apoptóticas e necróticas. Células uniformemente verdes com morfologia normal foram observadas no grupo controle atingindo mais de 90% das células contadas. As células tratadas com biflorina apresentaram um número crescente de células em apoptose nas concentrações de 3,0 e 6,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ , figura 35); apenas na maior concentração, foram encontradas células necróticas. Além disso, as células tratadas com doxorrubicina também mostraram características apoptóticas.



**Figura 35:** Determinação da viabilidade celular por laranja de acridina e brometo de etídio (LA/BE) das células B16 tratadas com biflorina utilizando coloração por microscopia de fluorescência. Controle Negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. Doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usada como controle positivo (D). Os dados são apresentados como valor das médias  $\pm$  D.P. em dois experimentos independentes em duplicata ( $n=4$ ). \*,  $p < 0,05$  comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

#### 4.2.4. Síntese de DNA por incorporação de BrdU

Neste ensaio, foi avaliada a capacidade proliferativa das células tratadas em comparação as não-tratadas pela incorporação de BrdU no DNA (figura 36). Em todas as concentrações testadas, a inibição da síntese do DNA foi significativamente diminuída ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo. A biflorina inibiu a incorporação do BrdU em 33,02%, 29,95% e 43,16%, nas concentrações de 1,5, 3,0 e 6,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A doxorubicina, que foi utilizado como controle positivo, e causou inibição de síntese de DNA em 88,92% das células.

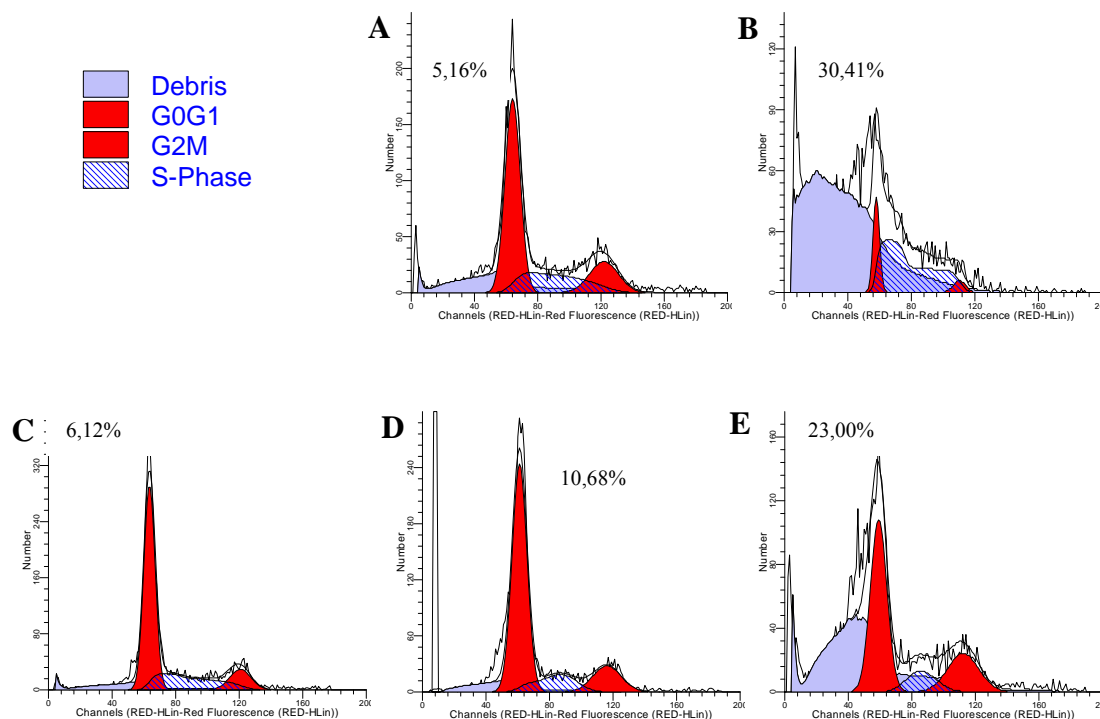


**Figura 36:** Inibição do 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) incorporado pelas células B16 tratadas com biflorina. Controle Negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. Doxorubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usada como controle positivo (D). Os dados são apresentados como valor das médias  $\pm$  D.P. em dois experimentos independentes em duplicata ( $n=4$ ), a porcentagem da positividade do BrdU em 200 células. \*,  $p < 0,05$  comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

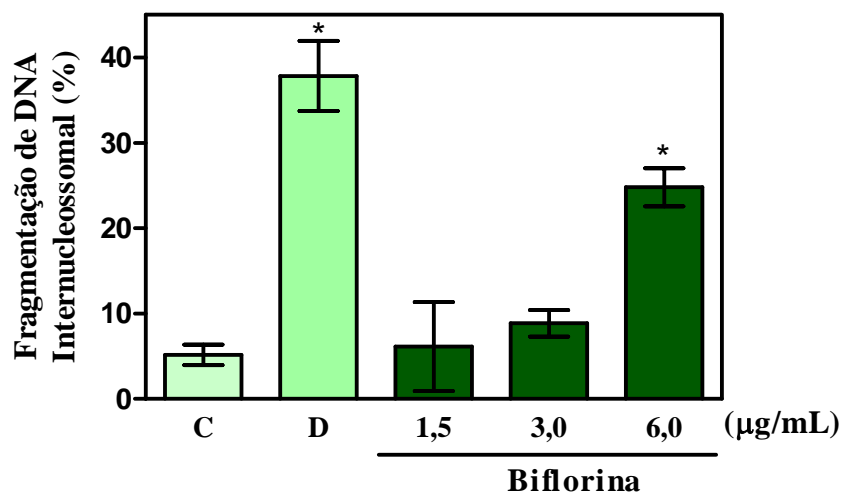


#### 4.2.5. Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA

A análise do ciclo celular das células tratadas com biflorina não evidenciou interferência em nenhuma fase específica em relação às células não tratadas (Figura 20). Contudo, foi observado um aumento na fragmentação de DNA de até 33,5 % na concentração de 6,0  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto havia 13% de DNA fragmentado no controle negativo (figuras 37 e 38).



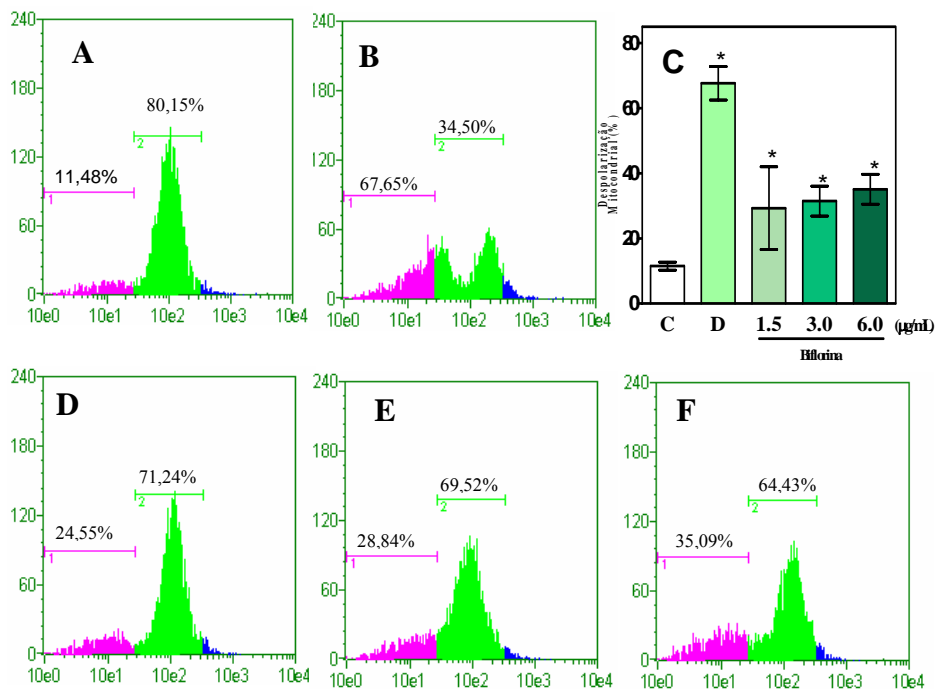
**Figura 37:** Histogramas de ciclo celular analisados no ModFit LT 3.1 pelo modelo Sync Wizard. Eixo x: intensidade de fluorescência e eixo y: números de células  $0,3 \times 10^5$  após 24 h de incubação. **A**, sem tratamento; **B**, doxorubicina a 0,3  $\mu\text{g/mL}$ ; **C**, **D** e **E** Biflorina nas concentrações de 1,5; 3,0 e 6,0  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Valores representados pela média  $\pm$  E.P.M.



**Figura 38:** Determinação da fragmentação internucleossomal do DNA de células B16 por citometria de fluxo usando iodeto de propídio, Triton X-100 e citrato após 24h de incubação com biflorina. Controle Negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. Doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (D). Os dados são apresentados como valor das médias ± E.P.M. em três experimentos independentes em triplicata (n=9). \*,  $p < 0,05$  comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

#### 4.2.6. Potencial transmembrana da mitocôndria

A análise do potencial transmembrana da mitocôndria das células tratadas com biflorina foi realizada por citometria de fluxo com coloração por rodamina 123. Foi observada despolarização da mitocôndria em todos os tratamentos 1,5, 3,0 e 6,0µg/mL (figura 39).



**Figura 39:** Determinação do efeito da biflorina sobre o potencial transmembrana em células B16 por citometria de fluxo usando rodamina 123 após 24 h de incubação. Controle Negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (B). (D) Dados das células tratadas com biflorina 1,5 µg/mL e (E) e (F) foram tratadas com biflorina 3,0 e 6,0 µg/mL respectivamente. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Os dados são apresentados como valor das médias  $\pm$  E.P.M. em três experimentos independentes em triplicata (n=9). \*,  $p < 0,05$  comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

### 4.3. ATIVIDADE ANTITUMORAL EM MODELOS ANIMAIS *IN VIVO*

#### 4.3.1. Modelo murino em animais transplantados com Sarcoma 180 e Carcinoma de Erlich

Os efeitos nos animais, tratados com biflorina e com biflorina + 5FU por 7 dias consecutivos, transplantados com Sarcoma180 e Carcinoma de Erlich, estão nas Tabelas 5 e 6. Foi observada uma significativa redução do peso do tumor em animais tratados com a biflorina em ambas as doses e em ambos os modelos tumorais ( $p < 0,05$ ). Pode-se

observar que quando a biflorina foi administrada com uma dose baixa de 5-FU (10mg/Kg), ocorreu um sinergismo entre os compostos, aumentando a inibição tumoral quando da associação feita.

#### **4.3.2. Toxicidade Sistêmica em camundongos *Swiss***

O valor referente ao peso corpóreo dos animais antes e após a administração da substância não sofreu alteração. Apenas o valor do peso do baço na dose de 25 mg/Kg nos animais transplantados com Sarcoma 180 e na dose de 50mg/Kg nos animais transplantados com Carcinoma de Erlich, mostrou-se significativamente aumentado quando comparado com o controle negativo, sugerindo a existência de alguma alteração microscópica. O tumor e os órgãos (fígado, baço e rim) retirados dos animais transplantados com os tumores foram retirados para análise histológica. Em ambos os tumores, o grupo controle negativo apresentou células pleomórficas poligonais e redondas com núcleos hipercromáticos e binucleados. Foram observados vários graus de pleomorfismos nuclear e celular, além de mitoses, invasão muscular e necrose de coagulação. Nos grupos tratados com biflorina 50mg/Kg, 5-FU 25mg/kg ou na associação de biflorina 25mg/Kg + 5-FU 10mg/Kg, foram observadas extensas áreas de necrose coagulativa enquanto que nos grupos tratados com biflorina 25mg/Kg e 5-FU 10mg/Kg isoladamente, houve apenas um discreto aumento das áreas de necrose coagulativa.

A análise histopatológica dos rins dos animais tratados com 5-FU (10 e 25mg/Kg), biflorina (25 e 50mg/Kg) ou a associação da biflorina com 5-FU, revelou degeneração hidrópica tubular proximal, mas a estrutura do glomérulo estava essencialmente preservada. Por outro lado, a análise histopatológica dos fígados, de todos os animais tratados inclusive o grupo controle negativo, apresentaram alterações como hiperplasia das células de Kuppfer, intensa degeneração hidrópica dos hepatócitos e congestão venosa centrilobular e portal. Além dessas alterações, os animais tratados com 5-FU (10 e 25mg/Kg), biflorina (25 e 50mg/Kg) ou a associação da biflorina com 5-FU apresentaram também, esteatose microvesicular, hemorragia sinusoidal e um infiltrado de células inflamatórias em foco crônico (Figura 40a).

No baço, a biflorina, mostrou um discreto aumento da polpa branca e ninhos de megacariócitos, sugerindo uma possível atividade imunomodulatória (Figura 40b).



Tabela 5 – Taxa de inibição tumoral dos animais tratados com biflorina e 5-fluorouracil transplantados com Sarcoma 180

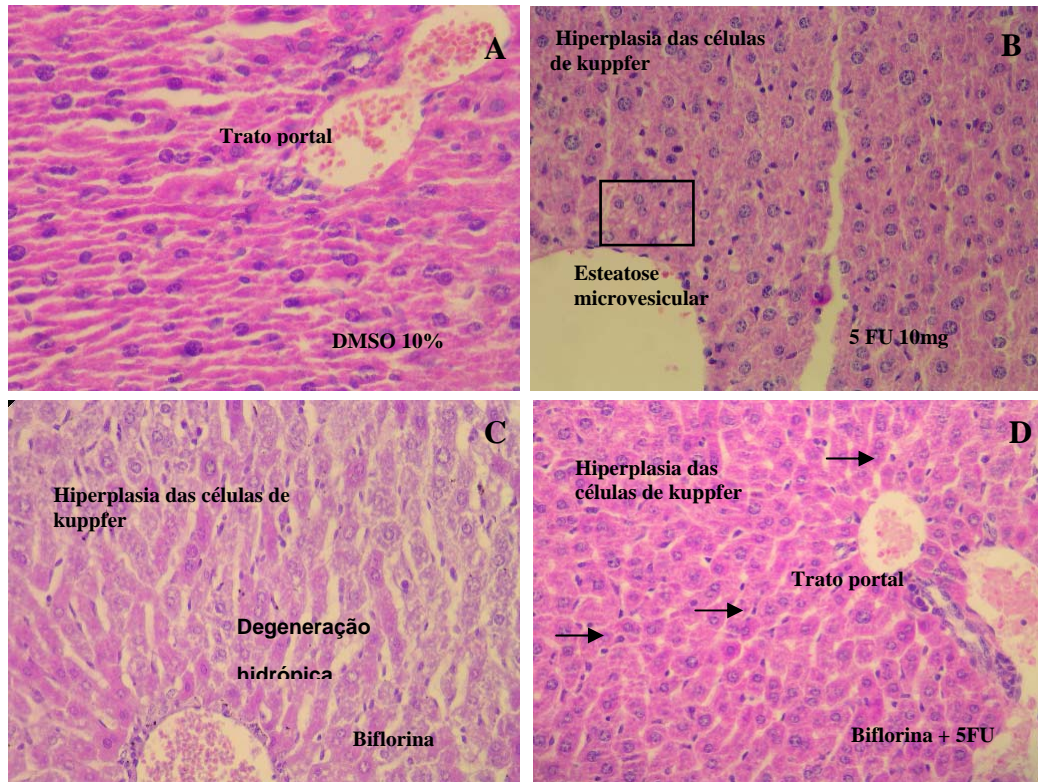
Droga	Dose (mg/kg/dia)	Fígado (g/100g peso corpóreo)	Baço (g/100g peso corpóreo)	Rins (g/100g peso corpóreo)	Tumor (g)	Inibição (%)	<i>n</i>
Controle	-	5,21 ± 0,16	0,65 ± 0,02	1,16 ± 0,04	1,78 ± 0,09	-	20
Biflorina	25	5,47 ± 0,19	0,78 ± 0,03 <sup>a)</sup>	1,25 ± 0,05	1,51 ± 0,07	14,89	14
	50	5,17 ± 0,10	0,71 ± 0,05	1,00 ± 0,04	0,88 ± 0,14 <sup>a)</sup>	50,53	10
Biflorina +5-FU	25 + 10	4,57 ± 0,28 <sup>b)</sup>	0,54 ± 0,04 <sup>a,b)</sup>	1,11 ± 0,13	0,61 ± 0,11 <sup>a,c)</sup>	65,83	10
5- FU	10	5,73 ± 0,30	0,50 ± 0,03 <sup>a)</sup>	1,25 ± 0,06	1,07 ± 0,10 <sup>a)</sup>	39,84	10
	25	5,12 ± 0,31	0,30 ± 0,03 <sup>a,b,c)</sup>	1,68 ± 0,08	0,46 ± 0,08 <sup>a)</sup>	74,19	13

Os dados apresentados são representados pela média ± SD de *n* experimentos. As diferenças significativas foram analisadas pelo teste ANOVA seguido por Newman Keuls: *a)*  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle. *b)*  $p < 0,05$  comparado com o grupo da biflorina 25/Kg/dia. *c)*  $p < 0,05$  comparado com o grupo biflorina 25mg/Kg/dia e 5-FU 10mg/Kg/dia administrados independentemente.

**Tabela 6 - Taxa de inibição tumoral dos animais tratados com biflorina e 5-fluorouracil transplantados com Carcinoma de Erlich**

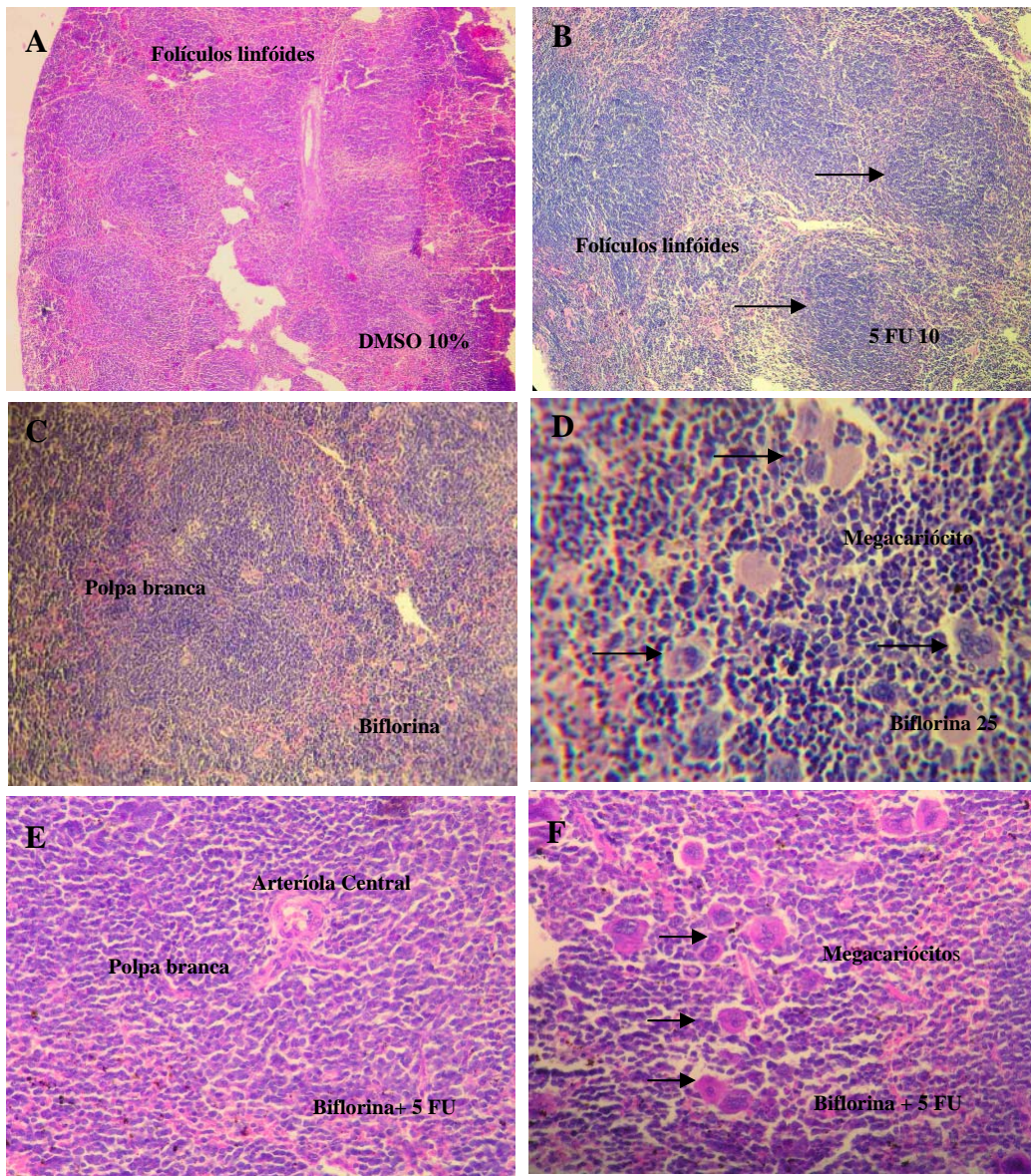
<b>Droga</b>	<b>Dose (mg/kg/dia)</b>	<b>Fígado (g/100g peso corpóreo)</b>	<b>Baço (g/100g peso corpóreo)</b>	<b>Rins (g/100g peso corpóreo)</b>	<b>Tumor (g)</b>	<b>Inibição (%)</b>	<b><i>n</i></b>
Controle	-	5,04 ± 0,18	0,78 ± 0,06	1,14 ± 0,03	1,89 ± 0,68	-	22
Biflorina	25	4,99 ± 0,20	0,69 ± 0,05	0,99 ± 0,05	1,99 ± 0,38	12,29	7
	50	5,92 ± 0,15 <sup>a,c,d)</sup>	0,96 ± 0,07 <sup>c,d)</sup>	1,32 ± 0,03	1,24 ± 0,33 <sup>a)</sup>	45,39	9
Biflorina +5-FU	25 + 10	4,69 ± 0,18	0,57 ± 0,05	1,13 ± 0,08	0,47 ± 0,19 <sup>a,c)</sup>	79,36	9
5- FU	10	4,92 ± 0,25	0,65 ± 0,07	1,26 ± 0,080	1,34 ± 0,51 <sup>a)</sup>	41,15	7
	25	4,09 ± 0,35	0,23 ± 0,03 <sup>a,b,c,d)</sup>	1,12 ± 0,03	0,58 ± 0,26 <sup>a)</sup>	74,57	9

Os dados apresentados são representados pela média ± SD de *n* experimentos. As diferenças significativas foram analisadas pelo teste ANOVA seguido por Newman Keuls: *a) p*<0,05 comparado com o grupo controle. *b) p*<0,05 comparado com o grupo da biflorina 25mg/Kg/dia. *c) p*<0,05 comparado com o grupo biflorina 25mg/Kg/dia e 5-FU 10mg/Kg/dia administrados independentemente. *d) p*<0,05 comparado com o grupo da biflorina 25mg/Kg/dia+5-FU 10mg/Kg/dia.



**Figura 40a:** Fígado dos animais tratados com **A** - DMSO 10% H/E 400X, **B** - 5 - FU H/E 400X, **C** - Biflorina 25 mg/Kg/dia H/E 400X, **D** - Biflorina 25 mg/Kg/dia + 5 FU 10 mg/Kg/dia HE 400X.

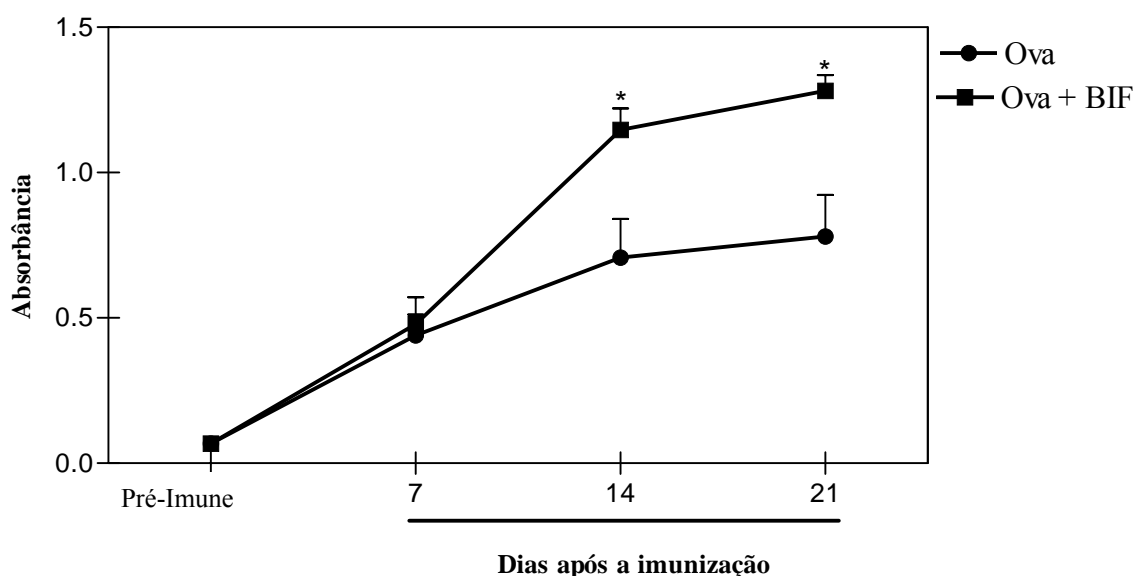




**Figura 40b:** Baço dos animais tratados com **A** - DMSO 10% H/E 100X, **B** - 5-FU 10 mg/Kg/dia H/E 200X, **C** - Biflorina 25mg/Kg/dia H/E 100X, **D** - Biflorina 25 mg/Kg/dia H/E 400X, **E** - Biflorina 25mg/Kg/dia H/E 400X, **F** - Biflorina 25 mg/Kg/dia + 5-FU 10mg/Kg/dia H/E 200X.

### 4.3.3. Atividade imunoadjuvante em animais Swiss saudáveis

Para investigar a indução da resposta imune humoral da biflorina, os animais que foram imunizados com ovalbumina (OVA) 50 $\mu$ g e com biflorina + OVA (1mg + 50 $\mu$ g), tiveram os níveis de anticorpos (Ig Total) medidos no soro obtido no tempo 0, 7, 14 e 21 dias após a administração das substâncias. A quantidade de Ig Total no soro dos animais tratados com biflorina aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (OVA) (figura 41).



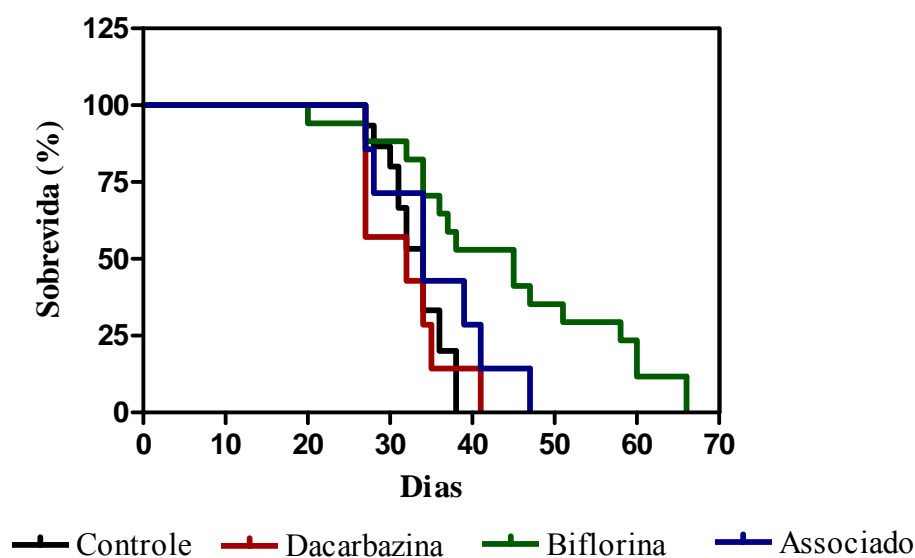
**Figura 41:** Efeito da biflorina e OVA + biflorina. Os camundongos foram imunizados subcutaneamente com OVA (50  $\mu$ g) ou OVA (50  $\mu$ g) + biflorina (1mg). O soro dos animais foi coletado antes da imunização, 7, 14 e 21 dias após imunização. Os anticorpos foram detectados por ELISA e a diluição usada foi de 1:40. Os dados são apresentados pela média  $\pm$  E.P.M de 10 animais. \* $P < 0,05$ , ANOVA seguido por teste de Newman Keuls.

### 3.3.4 Modelo murino em animais transplantados com Melanoma B16

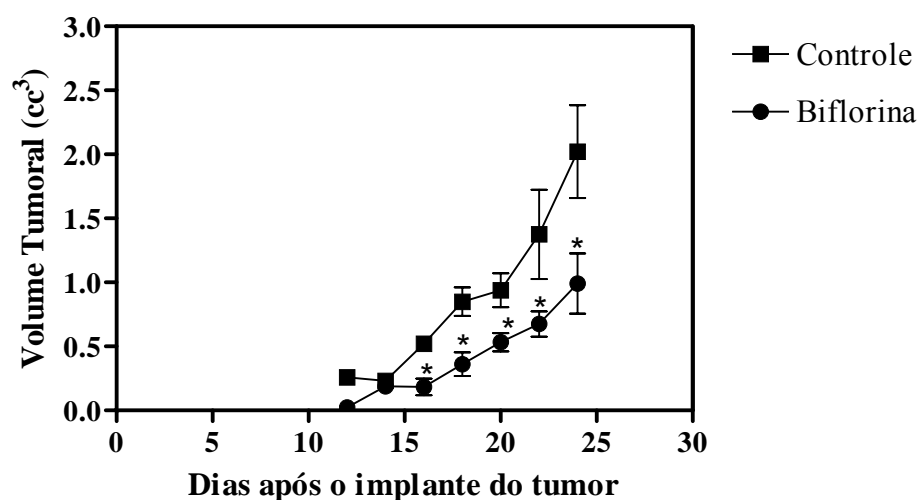
#### 3.3.4.1. Sobrevida dos animais e inibição tumoral

Os animais tratados com biflorina (25mg/Kg) tiveram uma sobrevida de até 66 dias, entretanto, os animais do grupo controle (DMSO 10%) sobreviveram apenas até o

38º dia e os grupos tratados com dacarbazina (25 mg/Kg) e dacarbazina mais biflorina sobreviveram até 41 e 47 dias respectivamente (figura 42). A biflorina diminuiu significativamente o tamanho do tumor dos animais tratados, em relação ao grupo controle (figura 43).



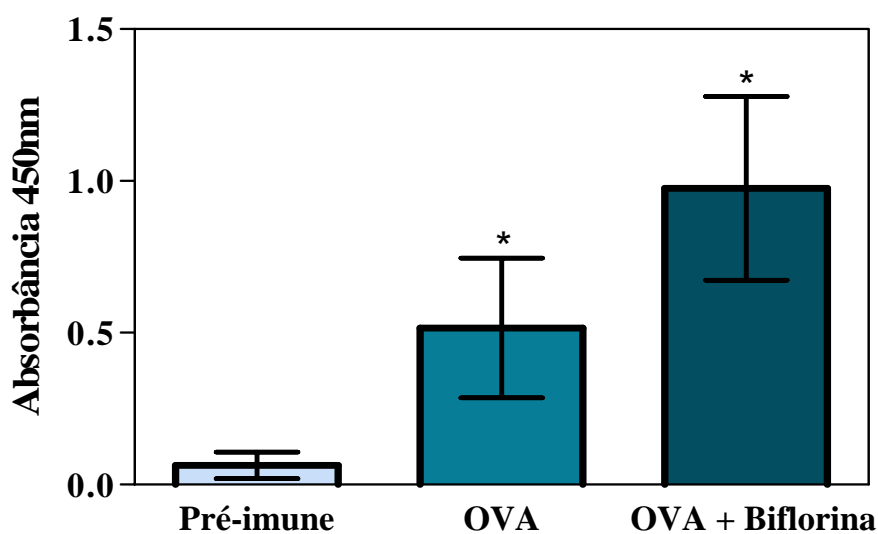
**Figura 42:** Curva de sobrevivência dos animais transplantados com células de melanoma B16 e tratados com: Controle (DMSO 10%), Dacarbazina 25mg/Kg/dia; Biflorina 25 mg/Kg/dia e Associado: Biflorina 25mg/Kg/dia + Dacarbazina 25 mg/Kg/dia com  $p < 0,05$ .



**Figura 43:** Efeito sobre o volume tumoral dos grupos controle e tratados com biflorina transplantados com células B16 no experimento de sobrevivência.

#### 4.3.3.2 Atividade Imunoadjuvante

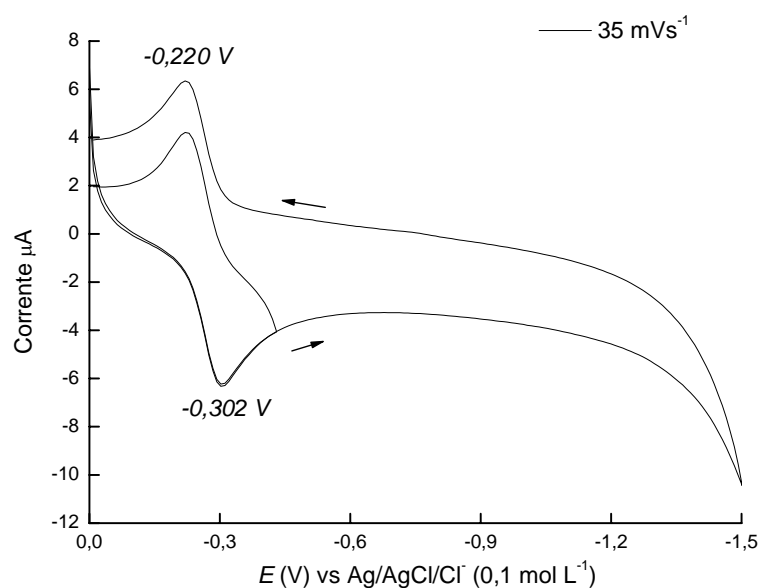
Nos animais transplantados com melanoma, também se pode investigar a indução da resposta imune humoral da biflorina, os animais que foram imunizados com ovalbumina (OVA) 50 $\mu$ g e com biflorina + OVA (25mg/Kg + 50 $\mu$ g), tiveram os níveis de anticorpos (Ig Total) medidos no soro após 21 da administração das substâncias. A quantidade de Ig Total no soro dos animais tratados com biflorina aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (OVA) (Figura 44). Não se pode concluir que essa resposta seja contra o tumor, mas sistemicamente o animal não apresentou imunidade reduzida, o que pode ter colaborado a manter os animais vivos por um período grande.



**Figura 44:** Efeito da biflorina e OVA + biflorina. Os camundongos foram imunizados subcutaneamente com OVA (50  $\mu$ g círculo fechado) ou OVA (50  $\mu$ g) + biflorina (25mg). O soro dos animais foi coletado antes da imunização e 21 dias após imunização. Os anticorpos foram detectados por ELISA e a diluição usada foi de 1:320. Os dados são apresentados pela média  $\pm$  E.P.M de 10 animais. \* $P < 0,05$ , ANOVA seguido por teste de Newman Keuls.

#### 4.4. AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA BIFLORINA COM O DNA

A voltametria cíclica da biflorina em meio prótico (figura 45), na velocidade de varredura ( $v$ ) de  $35 \text{ mVs}^{-1}$ , apresentou uma onda de redução em potencial  $E_{pc} = -0,302 \text{ V}$  com sua correspondente anódica em  $E_{pa} = -0,220 \text{ V}$ , demonstrando que a redução eletroquímica da biflorina, neste meio, tem características de reversibilidade, onde a espécie reduzida na varredura catódica é oxidada em seguida. O mesmo comportamento foi observado com a variação da velocidade de varredura, havendo apenas um discreto deslocamento do potencial de redução, para valores mais negativos, assim como uma maior variação entre potencial de pico anódico e potencial de pico catódico ( $E_{pa} - E_{pc}$ ) (Tabela 7), o que poderia indicar diagnóstico de processo quase-reversível, entretanto devem ser considerados fenômenos de queda ôhmica que possibilitam essas variações.

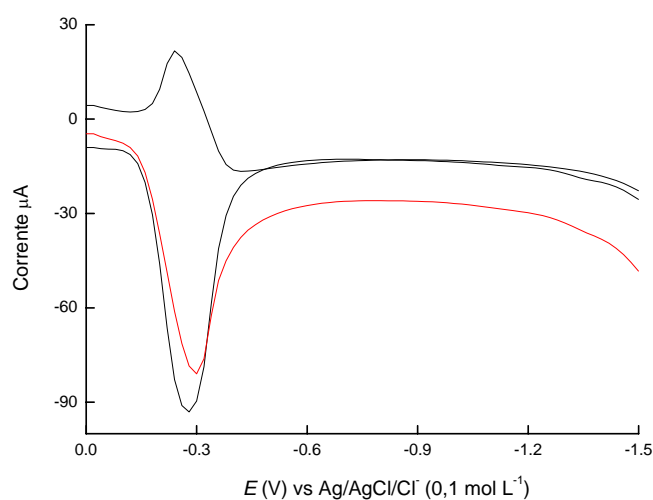


**Figura 45:** Voltametria cíclica da Biflorina ( $3 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em meio prótico, solução aquoso-etanólica (7:3), tampão acetato pH aparente de 4,5.  $v = 35 \text{ mVs}^{-1}$ .

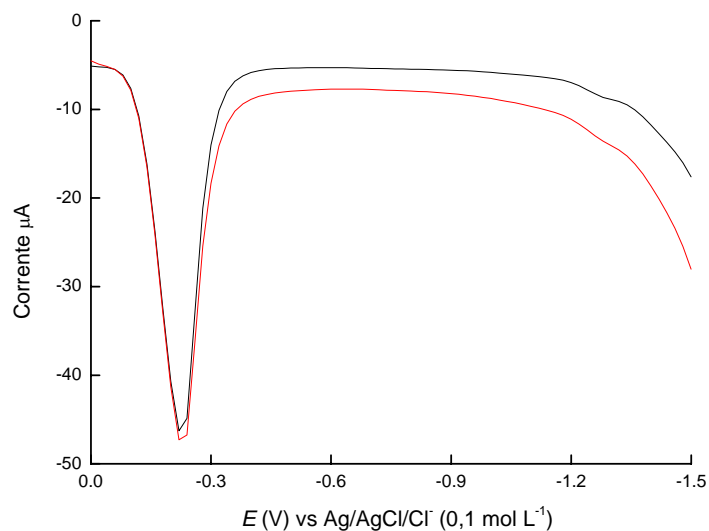
O comportamento voltamétrico da biflorina, avaliado pelas técnicas de onda quadrada e pulso diferencial (figuras 46a e b e 47), manteve-se reprodutível.

**Tabela 7:** Valores de velocidade de varredura ( $v$ ), potenciais de pico catódico ( $E_{pc}$ ), potenciais de pico anódico ( $E_{pa}$ ) e variação entre potencial anódico e catódico ( $E_{pa} - E_{pc}$ ) da Biflorina.

Velocidade varredura ( $v$ )/ $Vs^{-1}$	$E_{pc}$ I (V)	$E_{pa}$ I (V)	$E_{pa} - E_{pc}$ (mV)
0,035	-0,302	-0,221	81
0,050	-0,312	-0,214	98
0,075	-0,316	-0,208	108
0,100	-0,317	-0,213	104
0,200	-0,318	-0,204	114
0,300	-0,319	-0,200	119
0,400	-0,324	-0,197	127
0,500	-0,336	-0,174	162
0,750	-0,349	-0,162	187
1	-0,361	-0,141	220

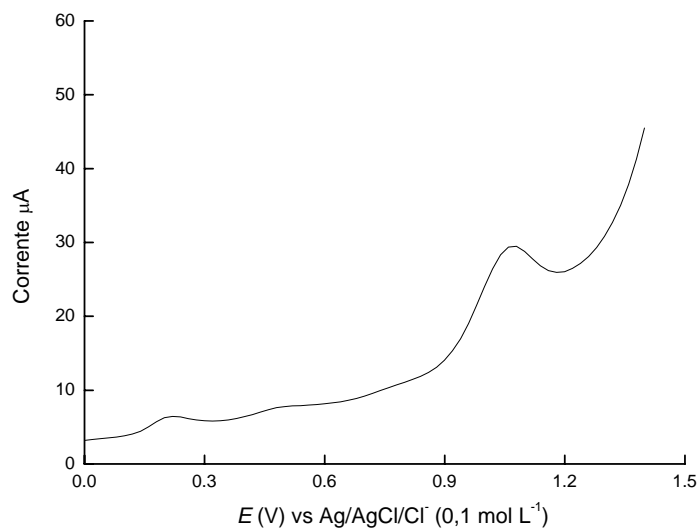


**Figura 46a:** Voltametria de onda quadrada da biflorina ( $3\text{mmol L}^{-1}$ ), na frequência de 20 Hz.



**Figura 46b:** Voltametria de pulso diferencial da biflorina ( $3\text{mmol L}^{-1}$ ).

A varredura anódica da biflorina, no mesmo meio e sistema de eletrodos que foi realizada a redução, utilizando-se técnica de pulso diferencial, apresentou uma onda de oxidação em potencial muito positivo ( $E_{pa} = +1,1\text{ V}$ ).



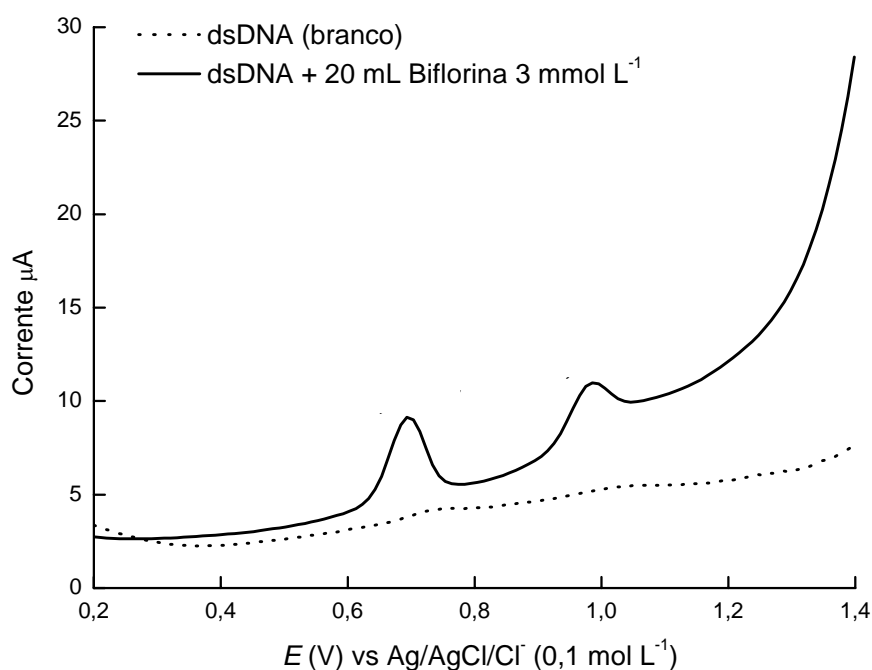
**Figura 47:** Voltametria de pulso diferencial da biflorina ( $3\text{mmol L}^{-1}$ ).

Conhecidos os parâmetros eletródicos da biflorina, caracterizou-se seu comportamento frente ao DNA através do biossensor eletroquímico, uma vez que a

possibilidade de interação de quinonas com o DNA e largamente citada e comprovadas (referências).

#### 4.1. Fita Dupla *dsDNA*

A voltametria de pulso diferencial do biossensor de *dsDNA* (figura 48) em presença de biflorina (20  $\mu\text{L}$  de uma solução 3  $\text{mmol L}^{-1}$ ) apresentou dois picos de oxidação referentes às bases nitrogenadas guanina e adenina, respectivamente. Demonstrando que houve interação da biflorina com o biossensor de *dsDNA*, pois não é possível observar sinais de oxidação relacionados às bases em *dsDNA* (DNA de fita dupla), pelo fato das mesmas estarem com seus sítios oxidáveis ocupados, mantendo assim a integridade do ácido desoxirribonucléico. Quando uma substância interage com o *dsDNA*, pode haver uma mudança na conformação do mesmo, e dessa forma, há uma exposição das bases à superfície eletródica, permitindo suas oxidações, o que foi observado com a biflorina.

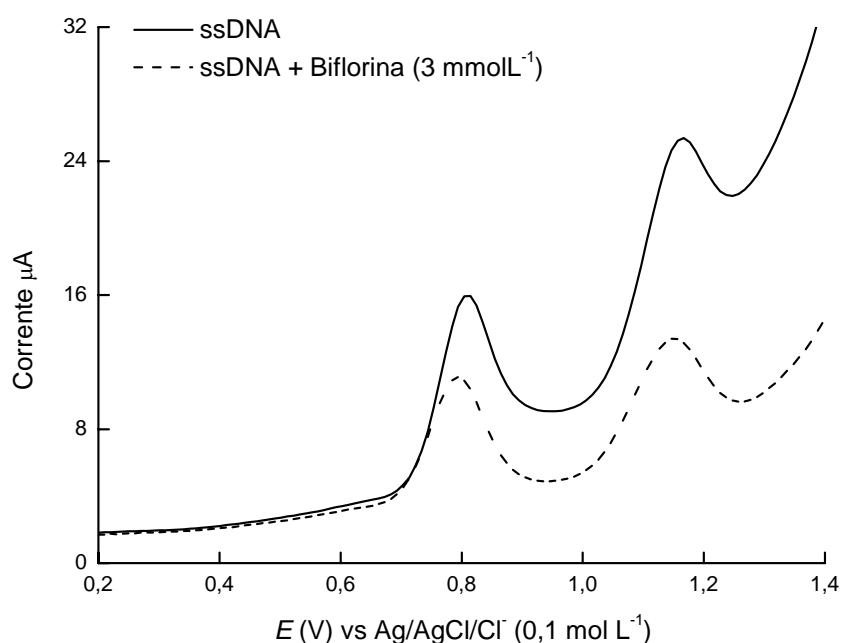


**Figura 48:** Voltametria de pulso diferencial do biossensor de *dsDNA* em presença da biflorina (3 $\text{mmol L}^{-1}$ ).



#### 4.4.2. Fita Simples ssDNA

O estudo eletroquímico da biflorina em solução de ssDNA (DNA de fita simples) demonstrou que a biflorina também interage com o ssDNA diretamente, uma vez que houve uma diminuição da intensidade de corrente anódica quando da adição de biflorina na solução de ssDNA (figura 49).



**Figura 49:** Voltametria de pulso diferencial do biossensor de ssDNA em presença da biflorina (3mmol L<sup>-1</sup>).

#### 4.4.3. Inibição de Topoisomerase I

O teste de inibição de topoisomerase I realizado em DNA purificado, foi realizado em decorrência do fato de ter se verificado a interação da biflorina com as fitas simples e duplas do DNA, entretanto, não é por inibição de topoisomerase I que este fenômeno ocorre, uma vez que nas doses de 5, 10 e 30µg/mL o resultado foi negativo.

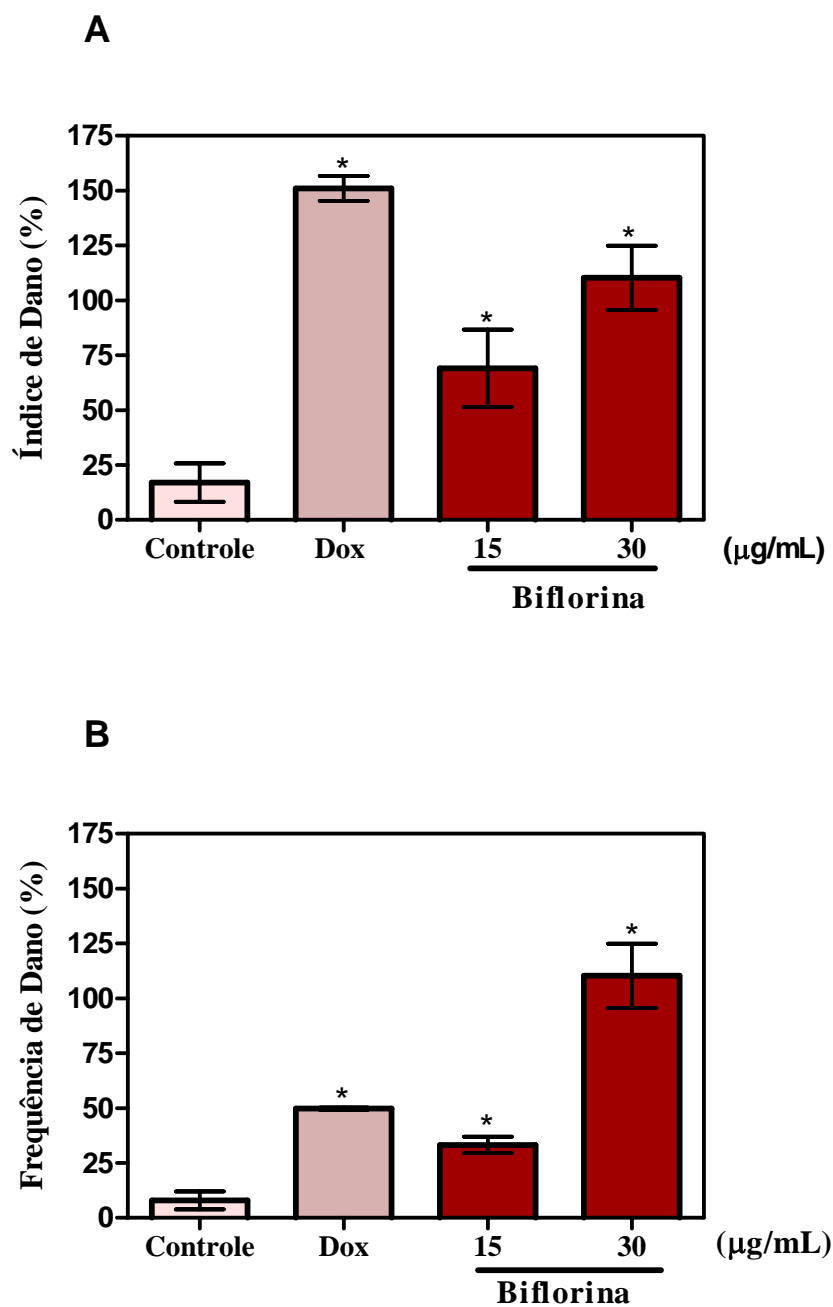
## **4.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E CLASTOGÊNICO *IN VITRO* EM LINFÓCITOS HUMANOS**

### **4.5.1. Avaliação da citotoxicidade pelo método do Alamar Blue**

Os valores da  $CI_{50}$  da biflorina obtidos pelo método do Alamar Blue em linfócitos humanos isolados de doadores saudáveis após 72 h de incubação foram 5,12  $\mu\text{g/mL}$  (4,28-6,12) e para doxorubicina (controle positivo) foi de 0,96  $\mu\text{g/mL}$  (0,52-1,80). Os valores apontam uma atividade moderada da biflorina em linfócitos humanos após 72 horas de exposição.

### **4.5.2. Avaliação da genotoxicidade – Teste Cometa**

A atividade genotóxica foi avaliada através do teste cometa. Os linfócitos foram isolados e incubados com 15 e 30  $\mu\text{g/mL}$  de biflorina e 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de dox (controle positivo). Em todos os tratamentos, a indução de dano ao DNA foi significativa em relação ao controle negativo. A biflorina apresentou um aumento no índice de dano (ID) de 4 a 6 vezes maior em relação ao controle negativo ( $ID_{\text{biflorina}} = 69 \pm 8,8$  e  $110 \pm 7,3$ ) nas doses de 15 e 30  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (figura 50a), além de nas mesmas concentrações aumentar 4.1 e 13 vezes, respectivamente, a frequência de dano em relação ao controle negativo (figura 50b). Com base nos resultados obtidos, a biflorina se revelou genotóxica em linfócitos humanos nas doses e tempo testados.



**Figura 50:** Paineis A e B – Índice de dano e Frequência de dano efeito da biflorina (15 e 30 µg/mL) ou doxorubicina 0,3 µg/mL (DOX) no teste do cometa em linfócitos humanos. As barras representam a média ± E.P.M. de três experimentos independentes. \* $p < 0,01$  vs. controle (ANOVA, Tukey test).

### 4.5.3. Avaliação da clastogenicidade - Teste de Aberrações Cromossômicas

Foi realizado, em linfócitos humanos obtidos a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis em, o teste de aberrações cromossômicas nas diferentes fases do ciclo celular (G1, G1/S, S, G2 tabelas 8, 9,10 e 11) nas concentrações de 15 e 30  $\mu\text{g/mL}$  de biflorina e 0,1 $\mu\text{g/mL}$  de dox, com o objetivo de avaliar o seu potencial clastogênico. No entanto, observou-se que a biflorina, não induz quebras cromossômicas ou alterações numéricas nas concentrações testadas, porém diminui o índice mitótico da fase S (Tabela 10), nos pulsos de 1 e 6 horas ( $p < 0,05$ ), o que sugere um potencial citotóxico nesses tempos de tratamentos, uma vez que a diminuição foi significativa em relação ao controle negativo. Todavia deve-se ressaltar que as doses testadas são três e seis vezes maiores que a  $\text{IC}_{50}$  da biflorina em linfócitos em uma exposição de 72 horas, sugerindo que a substância em questão poderá ser considerada segura.

**Tabela 8:** Protocolos de tratamento da biflorina aplicados a linfócitos humanos em curtos tempos de cultura.

<b>Tratamento</b>	<b>FITO</b>	<b>Biflorina</b>	<b>Lavagem</b>	<b>COL</b>	<b>RET. C</b>
G1	0 h	0 h	-	50 h	52 h
G1/S	0 h	24 h	-	50 h	52 h
S <sub>1</sub> (1 h pulso)	0 h	24 h	25 h	50 h	52 h
S <sub>6</sub> (6 h pulso)	0 h	24 h	30 h	50 h	52 h
G2	0 h	69 h	-	70 h	72 h

**FITO:** fitohemaglutinina; **COL:** colchicina; **RET. C:** retirada da cultura

**Tabela 9:** Aberrações cromossômicas (ACs) e índice mitótico em cultura de linfócitos tratados com biflorina durante as fases G1 e G1/S do ciclo celular.

Tratamento	IM (%)	ACs			Polip	End
		Gaps	Quebras	Total		
- Controle	2,8	4	0	4	0	0
G1	15,0 µg/mL	2,6	0	0	0	0
	30,0 µg/mL	4,2	1	0	1	3
	Dox	3,1**	5	4	9	2
- Controle	2,8	0	0	0	0	0
G1/S	15,0 µg/mL	3,6	0	0	0	0
	30,0 µg/mL	3,4	1	0	1	0
	DOX	3,2**	17	6	23	5

**Polip: Células poliplóides; End: endoreduplicação; DOX: Doxorubicina (controle positivo). \*\*p<0.01**

**Tabela 10:** Aberrações cromossômicas (ACs) e índice mitótico em cultura de linfócitos tratados com biflorina durante a fase S do ciclo celular.

Tratamento	IM (%)	ACs			Polip	End
		Gaps	Quebras	Total		
- Controle	2,8	0	0	0	0	0
1 h	15,0 µg/mL	0,94*	0	1	1	0
	30,0 µg/mL	0,95*	2	2	4	0
	Dox	2,4	10	7	17	1
- Controle	2,8	0	0	0	0	0
6 h	15,0 µg/mL	1,0*	3	0	3	0
	30,0 µg/mL	0,8*	1	2	3	0
	DOX	1,9	14	10	24	3

**Polip: Células poliplóides; End: endoreduplicação; DOX: Doxorubicina (controle positivo). \*p<0,05**

**Tabela 11:** Aberrações cromossômicas (ACs) e índice mitótico em cultura de linfócitos tratados com biflorina durante a fase G2 do ciclo celular.

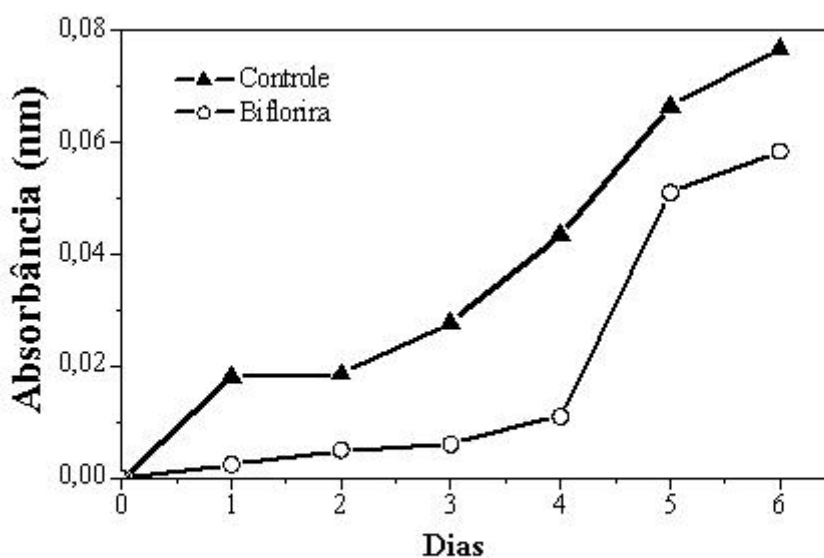
Tratamento	IM (%)	ACs			Polip	End
		Gaps	Quebras	Total		
- Controle	2,8	0	0	0	0	0
G2 15,0 µg/mL	2,9	0	0	0	0	0
30,0 µg/mL	2,6	1	0	0	0	0
Dox	5,2**	24	8	32	7	4

**Polip:** Células poliplóides; **End:** endoreduplicação; **DOX:** Doxorrubicina (controle positivo). \*\*p<0,01

## 4.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

### 4.6.1. Autoxidação do ácido oléico

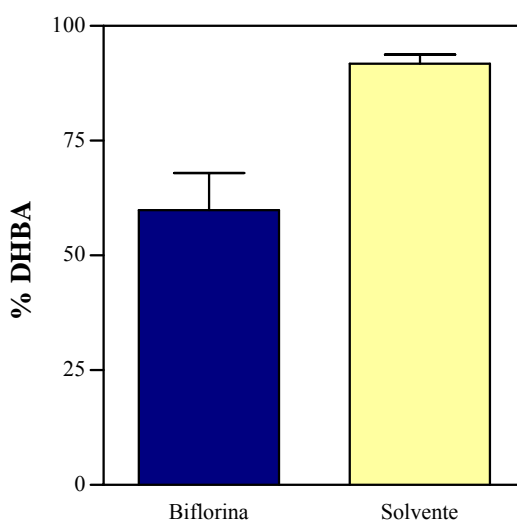
Para determinar as propriedades oxidativas da biflorina, a oxidação de ácido oléico foi doseada pelo método do tiocianato. A biflorina mostrou atividade antioxidante contra a autoxidação do ácido oléico no sistema água - álcool até quatro dias de incubação, entretanto no quinto e sexto dia, não se mostrou mais eficiente (figura 51). Estes dados sugerem fortemente que a citotoxicidade da biflorina não estava relacionada com a geração de espécies reativas de oxigênio.



**Figura 51:** Efeito da biflorina na autoxidação do ácido oléico. A oxidação do ácido oléico foi realizada pelo método do tiocianato, descrito na metodologia experimental.

#### 4.6.2. Xantina Oxidase

A capacidade antioxidante de biflorina foi determinada pelo acompanhamento da produção de ácido benzóico hidroxilado (DHBA) devido ao ataque de espécies reativas de oxigênio (ROS) no ensaio da xantina oxidase/ácido salicílico na hipoxantina. A redução do total dos produtos de oxidação assim como a quantidade de extrato acrescentado no ensaio é apresentada na Figura 35. Desta forma, a biflorina revelou uma significativa capacidade antioxidante de forma dose - dependente em concentrações elevadas, devido à sua capacidade capturadora de radicais hidroxila.



**Figura 52:** Inibição da geração de espécies reativas de oxigênio pela biflorina no sistema hipoxantina-xantina oxidase. Solvente (hexano) (círculo fechado) e biflorina (círculo aberto).

#### 4.6.3. Efeito retirador de radicais livres pelo método DPPH

Os resultados do efeito capturador de radicais livres da biflorina no sistema DPPH estão na tabela 12. Esses resultados demonstram uma atividade concentração-dependente da atividade antioxidante. O efeito capturador da biflorina foi de 79,30% na maior concentração (250µg/mL) e de 55,60 e 53,50% nas concentrações de 125 e 62,5 µg/mL respectivamente.



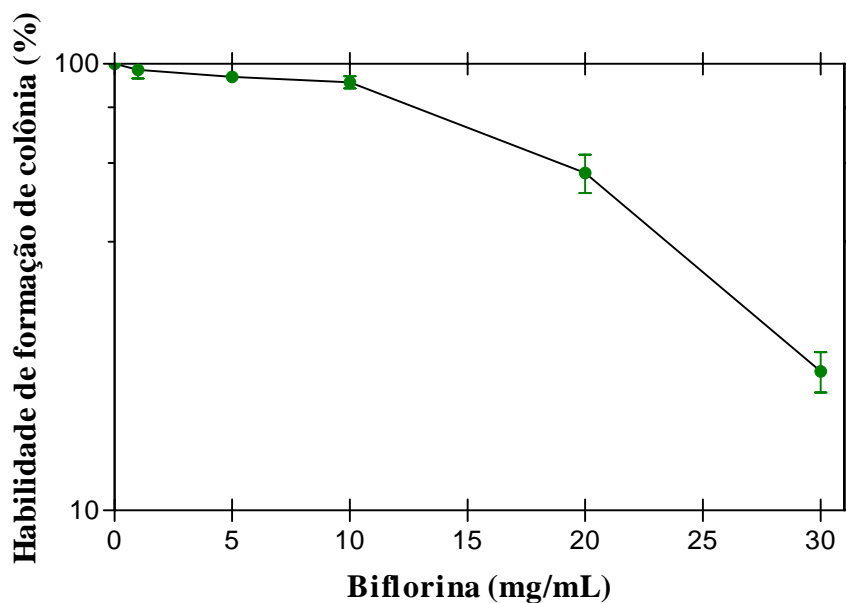
**Table 12:** Atividade retiradora de radicais livres da biflorina no sistema DPPH. O efeito foi medido pela absorbância do radical DPPH a 520 nm contendo uma amostra teste de 60  $\mu\text{M}$  de DPPH.

Tratamento	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
	0,25		0,125		0,0625	
	Atividade	%	Atividade	%	Atividade	%
<b>Controle</b>	0,2938 $\pm$ 0,00005	00,00	0,2938 $\pm$ 0,00005	00,00	0,2938 $\pm$ 0,00005	00,00
<b>Trolox<sup>®</sup></b>	0,0090 $\pm$ 0,00004	96,94	0,0170 $\pm$ 0,00005	94,21	0,0170 $\pm$ 0,00005	94,21
<b>BHT<sup>®</sup></b>	0,0408 $\pm$ 0,00005	86,12	0,0855 $\pm$ 0,00005	70,91	0,1169 $\pm$ 0,00005	60,22
<b>Vitamin C</b>	0,0080 $\pm$ 0,00005	97,28	0,0160 $\pm$ 0,00003	94,55	0,0180 $\pm$ 0,00005	93,87
<b>Biflorina</b>	0,0649 $\pm$ 0,00005	79,30	0,1306 $\pm$ 0,00003	55,60	0,1364 $\pm$ 0,00005	53,50

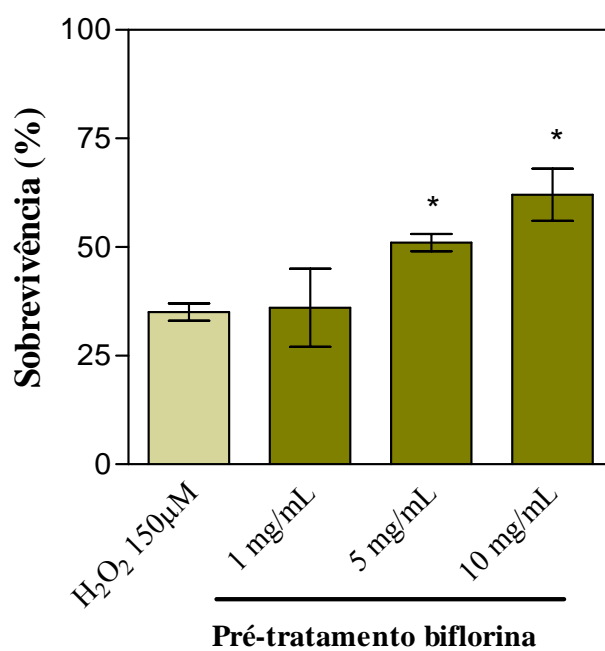
#### 4.7. ATIVIDADE BIOLÓGICA E GENOTÓXICA EM CÉLULAS V79

#### 4.7.1. Sobrevivência Clonogênica e Peroxidação Lipídica em células V79

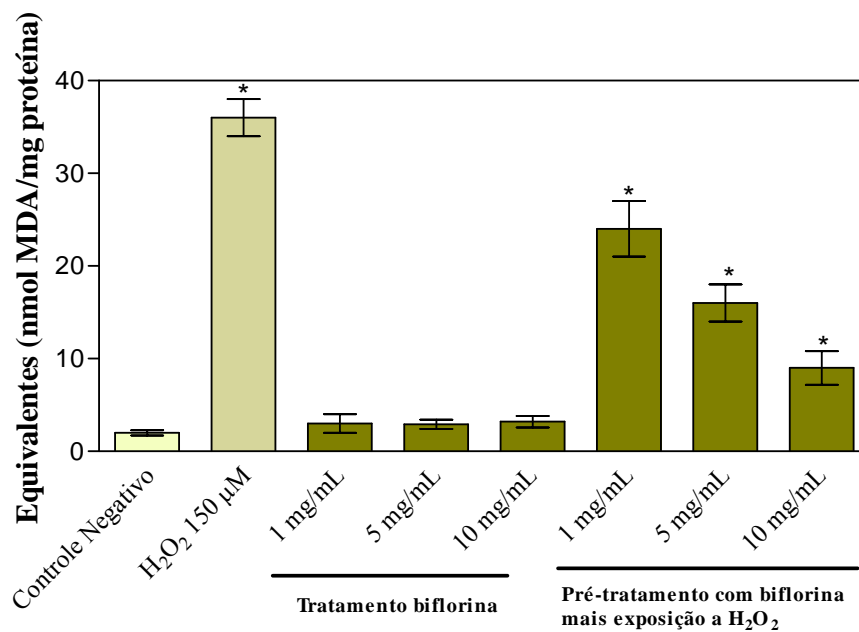
As células V79 foram selecionadas em nosso estudo, porque é uma linhagem normal, elas têm um cariótipo estável, duplicação em curto tempo e são fáceis de manter em cultura, além de serem utilizadas com frequência em estudos de citotoxicidade e genotoxicidade (ROSA *et al.*, 2007). A sobrevivência clonogênica foi realizada a fim de determinar o intervalo de concentrações citotóxicas da biflorina (figura 53). Abaixo de 10 µg/mL a biflorina não se mostrou citotóxica, portanto se utilizaram as concentrações de 1 a 10 µg/mL para os experimentos subsequentes. A análise da sobrevivência clonal nas concentrações não tóxicas de biflorina foi feita para avaliar a capacidade da biflorina em reduzir a toxicidade do peróxido de hidrogênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A figura 54, mostra que citotoxicidade induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi significativamente suprimida pelo pré-tratamento com biflorina nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Avaliou-se também os danos oxidativos acionados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da lipoperoxidação. Os resultados mostraram que as células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiveram um aumento dose-dependente na produção de TBARS, contudo as células pré-tratadas com biflorina apresentaram uma extensão menor de lipoperoxidação, sugerindo que sua capacidade antioxidante seja responsável por esse efeito, além da biflorina isoladamente não ser capaz de gerar aumento nos níveis de TBARS (figura 55).



**Figura 53:** Sobrevivência clonogênica de células V79 após o tratamento com biflorina em diferentes concentrações por 3 horas de incubação em meio sem SBF. Os resultados são expressos pela média  $\pm$  E.P.M.,  $n=9$ .



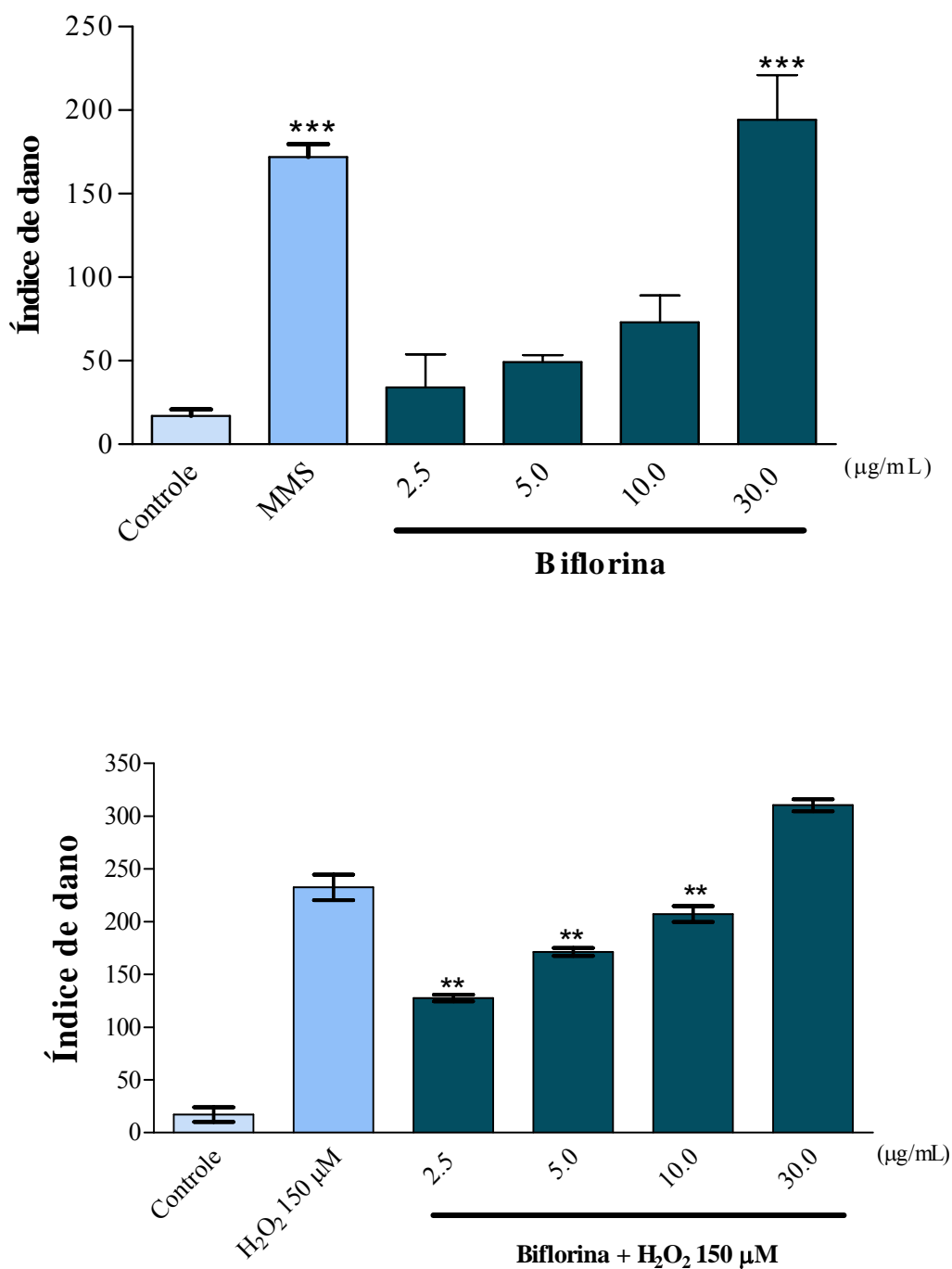
**Figura 54:** Sobrevivência clonogênica de células V79 pré-tratadas com doses não tóxicas de biflorina por 3 h em meio sem SBF e exposto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 μM) por 1 h a 37°C no escuro. Os dados são apresentados pela média  $\pm$  E.P.M.,  $n=9$ . \*  $p<0,05$ , analisados pelo teste ANOVA seguido de Tukey's multiple comparison teste. As células pré-tratadas com biflorina foram comparadas com as células expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 μM).



**Figura 55:** Determinação de substâncias reativas a ácido tiobarbitúrico (TBARS) em células V79 pré-tratadas com biflorina nas concentrações indicadas, por 3 h e subsequentemente submetidas à exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150µM). Os dados são apresentados pela média ± E.P.M., n=9. \*  $p < 0,05$  analisados pelo teste ANOVA seguido de Tukey's multiple comparison teste. As células pré-tratadas com biflorina foram comparadas com as células expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150µM).

#### 4.7.2. Potencial genotóxico em células V79

Para quantificar a indução e inibição de dano oxidativo, foi realizado o teste cometa *in vitro* versão alcalina (pH>13) em células V79, com enzimas que reconhecem os sítios específicos de lesões oxidativas em bases púricas e pirimidínicas. A biflorina quando avaliada isoladamente não induziu dano significativo nas doses mais baixas (2,5; 5,0 e 10 µg/mL), apenas a concentração citotóxica de 30 µg/mL induziu danos significativos em relação ao controle negativo (figura 56). Como esperado, as células tratadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiveram um significativo aumento nos índices de dano (Figura 38). Quando as células foram pré-tratadas com biflorina e depois expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a extensão do dano oxidativo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e reconhecidos pelas enzimas EndoIII e Fpg, diminuiu significativamente, como indicado na tabela 13, tornando evidente a atividade antioxidante da biflorina.



**Figura 56:** Paineis A e B: avaliação da genotoxicidade da biflorina usando teste cometa em células V79. Todos os tratamentos foram comparados com o controle negativo. Paineis A e B: Efeito do pré-tratamento com biflorina por 3 h e exposição por peróxido (150µM) induzindo dano no DNA em células V79 pelo ensaio cometa. As barras representam os valores das médias± E.P.M. de três experimentos independentes. Células pré-tratadas com biflorina foram expostas a (150µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O símbolo \*  $p < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ , pelo teste de ANOVA seguido por Tukey teste.

**Tabela 13:** Dano ao DNA pelo teste cometa em células V79 expostas a biflorina mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h a 37°C com subsequente tratamento com tampão, endonuclease III e formamidopirimidina DNA – glicosilase.

Agente	Dose	Índice de dano (ID)		
		<i>Tampão</i>	<i>EndoIII</i>	<i>FPG</i>
Controle Negativo <sup>a</sup>				
Biflorina	2,5 µg/mL	29,5 ± 3,5	36,3 ± 6,5	37,5 ± 3,5
	5,0 µg/mL	39,5 ± 7,4	48,5 ± 1,7	48,5 ± 7,0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>c</sup>	150 µM	187,5 ± 9,5	238,5 ± 2,5	269,5 ± 4,5
Biflorina +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,5 µg/mL	118,5 ± 4,5*	133,0 ± 8,3*	143,0 ± 1,0*
	5,0 µg/mL	131,6 ± 1,52*	159,0 ± 3,4*	187,5 ± 3,5*

<sup>a</sup> Controle negativo.

<sup>b</sup> Os valores das médias e dos desvios padrão foram obtidos da contagem de 100 células por experimento – um total de três experimentos por concentração testada.

<sup>c</sup> Controle positivo.

\* Dados significantes em relação ao controle positivo (peróxido de hidrogênio). P<0,001 pelo teste ANOVA seguido por Tukey.

## **4.8. POTENCIAL GENOTÓXICO EM DIFERENTES SISTEMAS BIOLÓGICOS**

### **4.8.1. Leveduras**

Nos testes realizados em leveduras, a biflorina não induziu citotoxicidade nas fases estacionária e exponencial de culturas haplóides em levedura do tipo selvagem quando tratados em condições de não - crescimento até a concentração 0,25 mg/mL (Tabela 14). No que diz respeito à avaliação do potencial mutagênico, a mutação de ponto (HIS1 +, LYS1 +) e mutação frameshift (HOM3 +) durante o tratamento na fase estacionária e crescimento exponencial em condições de crescimento e não - crescimento não foi significativa (Tabela 14) o que indica ausência de mutagenicidade. Neste sentido, foi escolhido trabalhar com células em fase estacionária nos experimentos subseqüentes. Foi observado que no tratamento com biflorina em concentrações não - citotóxicas 0,125 mg/mL e 0,25 mg/mL, houve diminuição da freqüência de mutação induzida pelo peróxido de hidrogênio nos lócus his1, lys1 e hom3, indicando um potencial antimutagênico devido à propriedade antioxidante (Tabela 15). Os efeitos recombinogênicos da biflorina foram investigados em leveduras diplóides realizada sob as condições de crescimento e não - crescimento (tabela 16). Os resultados mostraram que a biflorina não induziu significativa a recombinogênese de *crossing over* e conversão gênica nas concentrações empregadas. Como esperado, o pré - tratamento com biflorina impediu a indução de eventos recombinogênicos pelo peróxido de hidrogênio, quando as células foram tratadas nas concentrações de 0,125 - 0,5 mg/mL.



**Tabela 14:** Reversão para o ponto de mutação (*his1-7*), para o alelo (*lys1-1*) em mutação frameshift (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV185-14c de *S. cerevisiae* após o tratamento com biflorina por 3h a 30°C.

Concentração	Sobrevivência (%)	<i>HIS1</i> revertentes/ 10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>a</sup>	<i>LYS1</i> revertentes/ 10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>b</sup>	<i>HOM</i> revertentes/ 10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>a</sup>	
<b>Tratamento em Condições de NÃO Crescimento em Fase Estacionária</b>					
CN <sup>c</sup>	0 µg/mL	100	12,1 ± 2,0	1,3 ± 0,7	2,2 ± 0,7
CP <sup>d</sup>	0,5 µg/mL	52,0	163,0 ± 11,6***	15,1 ± 2,1***	24,7 ± 0,6***
Biflorina	0	100	10,0 ± 0,0	3,0 ± 0,9	2,5 ± 0,1
	0,125 mg/mL	88,5	14,1 ± 1,9	2,5 ± 0,1	1,2 ± 0,0
	0,25 mg/mL	71,0	18,7 ± 0,9	1,8 ± 0,6	1,6 ± 1,0
	0,5 mg/mL	50,2	9,7 ± 3,2	2,4 ± 0,9	2,7 ± 1,0
	1 mg/mL	28,2	11,0 ± 1,4	3,3 ± 2,6	3,6 ± 1,3
	2 mg/mL	15,3	16,0 ± 4,6	1,8 ± 0,4	3,6 ± 0,4
<b>Tratamento em Condições de NÃO Crescimento em Fase Exponencial</b>					
CN <sup>c</sup>	0 µg/mL	100	18,7 ± 0,9	8,1 ± 1,3	6,7 ± 0,3
CP <sup>d</sup>	0,5 µg/mL	41,4	182,5 ± 8,0***	34,2 ± 11,1***	48,1 ± 0,7***
Biflorina	0	100	10,0 ± 1,0	7,8 ± 2,2	7,6 ± 0,4
	0,125 mg/mL	87,4	11,2 ± 1,2	6,3 ± 0,9	7,4 ± 1,5
	0,25 mg/mL	83,1	11,3 ± 1,0	6,8 ± 0,1	7,2 ± 0,4
	0,5 mg/mL	55,7	10,0 ± 0,4	5,1 ± 0,1	6,0 ± 2,0
	1 mg/mL	15,0	15,6 ± 1,5	4,5 ± 2,3	5,8 ± 0,1
	2 mg/mL	3,1	10,6 ± 1,3	6,9 ± 0,3	6,8 ± 2,1
<b>Tratamento em Condições de Crescimento</b>					
CN <sup>c</sup>	0 µg/mL	100	10,3 ± 0,9	3,0 ± 0,5	4,8 ± 0,9
CP <sup>d</sup>	0,5 µg/mL	51,4	160,5 ± 21,3***	24,9 ± 0,9***	26,3 ± 2,3***
Biflorina	0	100	11,0 ± 0,6	3,1 ± 0,9	3,8 ± 0,1
	0,125 mg/mL	88,0	12,4 ± 1,6	4,9 ± 2,2	4,9 ± 1,7
	0,25 mg/mL	60,9	10,1 ± 1,0	3,4 ± 0,6	4,8 ± 0,1
	0,5 mg/mL	55,4	14,4 ± 0,6	5,1 ± 1,4	3,9 ± 0,0
	1 mg/mL	38,6	13,2 ± 1,5	6,5 ± 2,3	5,1 ± 0,1
	2 mg/mL	2,9	14,4 ± 2,9	3,5 ± 0,7	4,6 ± 1,8

<sup>a</sup> Revertentes Locus - específico.

<sup>b</sup> Revertentes Locus não- específico.

<sup>c</sup> CN: controle negativo, dimetil sulfoxido usado como veículo.

<sup>d</sup> CP: controle positivo, 4-nitroquinoleína-N-óxido 0,5 µg/mL,

Os dados estão apresentados pela média e D.P. de três experimentos independentes; \*\*\* Dado significante em relação ao controle negativo, onde  $P < 0,001$ , analisado pelo teste ANOVA seguido por Tukey teste.

**Tabela 15:** Reversão para o ponto de mutação (*his1-7*), para o alelo (*lys1-1*) mutação frameshift (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV185-14c de *S. cerevisiae* após o tratamento com peróxido de hidrogênio em células na fase estacionária pré-incubadas com biflorina por 3h em condições de não crescimento.

	Concentração	Sobrevivência (%)	<i>HIS1</i> revertentes/ 10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>a</sup>	<i>LYS1</i> revertentes/ 10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>b</sup>	<i>HOM3</i> revertentes/ 10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>a</sup>
CN <sup>c</sup>	0	100	10,3 ± 0,9 <sup>e</sup>	3,0 ± 0,5 <sup>e</sup>	4,8 ± 0,9 <sup>e</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4 mM	41,0	41,4 ± 1,3***	37,7 ± 1,8***	36,0 ± 0,9***
Biflorina (pré-tratamento mais exposição a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 4 mM)	0,125 mg/mL	41,9	9,2 ± 0,5***	4,1 ± 0,4 ***	5,1 ± 1,1**
	0,25 mg/mL	40,8	14,1 ± 1,6**	5,5 ± 3,6***	7,9 ± 1,0 ***
	0,5 mg/mL	65,4	34,4 ± 7,9	43,4 ± 2,7	35,6 ± 3,7
	1 mg/mL	78,6	42,4 ± 2,6	40,9 ± 0,2	31,8 ± 3,9
	2 mg/mL	22,0	40,3 ± 6,9	37,9 ± 1,6	34,6 ± 1,8

<sup>a</sup> Revertentes Locus - específico.

<sup>b</sup> Revertentes Locus não- específico.

<sup>c</sup> CN: controle negativo, dimetil sulfoxido usado como veículo.

Os dados estão apresentados pela média e D.P. de três experimentos independentes; Dado significativo em relação ao controle negativo, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , analisado pelo teste ANOVA seguido por Tukey teste.

**Tabela 16:** Indução de crossing-over (*cyh2*) e conversão gênica (*leu1-1/leu1-12*) na linhagem diplóide XS2316 de *S. cerevisiae* após pré-tratamento com biflorina durante a fase de crescimento exponencial e o efeito do pré-tratamento sobre a indução de recombinação pelo peróxido de hidrogênio.

	Concentração	Sobrevivência (%)	Crossing over/ 10 <sup>5</sup> sobreviventes	Conversão gênica/ 10 <sup>5</sup> sobreviventes
CN	0 µg/mL	100	9,1 ± 0,8	1,5 ± 0,2
CP	0,5 µg/mL	67,0	185,0 ± 26,6***	49,0 ± 3,0***
Biflorina	0	100	12,1 ± 2,0	1,0 ± 0,4
	0,125 mg/mL	94,0	10,8 ± 1,0	1,5 ± 0,6
	0,25 mg/mL	91,0	9,7 ± 3,1	1,7 ± 0,3
	0,5 mg/mL	89,2	8,5 ± 3,8	1,9 ± 0,8
	1,0 mg/mL	86,5	12,4 ± 0,4	1,3 ± 0,6
	2,0 mg/mL	73,3	13,0 ± 1,3	1,9 ± 0,5
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4 mM	51,7	106,5 ± 18,4***
<b>Biflorina (pré-tratamento mais exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 mM)</b>				
	0,125 mg/mL	49,3	33,1 ± 9,3***	9,9 ± 1,3***
	0,25 mg/mL	63,0	55,0 ± 6,5***	12,0 ± 3,3***
	0,5 mg/mL	71,9	72,0 ± 8,4***	25,1 ± 4,1***
	1,0 mg/mL	85,3	95,1 ± 9,0	38,1 ± 5,2
	2,0 mg/mL	89,1	110,4 ± 22,1	46,5 ± 4,9

CN: controle negativo, dimetil sulfóxido usado como veículo.

CP: controle positivo, 4-nitroquinoleína-N-óxido 0,5 µg/mL,

Os dados estão apresentados pela média e D.P. de três experimentos independentes; \*\*\* Dado significativo em relação ao controle negativo, onde  $P < 0,001$ , analisado pelo teste ANOVA seguido por Tukey teste.

#### **4. 8.2. Teste de Ames em *Salmonella thyphimurium***

As doses estabelecidas, na linhagem TA100, para a avaliação do potencial mutagênico da biflorina em linhagens de *Salmonella thyphimurium*, foram de 66,00; 133,50, 200,10; 266,70 e 333,30  $\mu\text{g/mL}$ . Não foi observada mutagenicidade em nenhuma das cinco linhagens (TA98, TA97a, TA100, TA102 e TA1535) testadas na ausência ou presença de ativação metabólica, ou seja ela não induz mutação de deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base nas condições testadas, mostrando-se negativa para o teste de Ames.

**Tabela 17:** Indução de revertentes de *his+* em linhagens de *Salmonella typhimurium* pela biflorina com e sem atividade metabólica (S9 mix)

Substância	TA98				TA97a			
	-S9		+S9		-S9		+S9	
	rev/placa <sup>a</sup>	IM <sup>b</sup>	rev/placa	IM	rev/placa <sup>a</sup>	IM	rev/placa <sup>a</sup>	IM
CP <sup>c</sup>	383,66±93,32	-	724,00±142,00	-	875,66±471,46	-	1630,50±265,16	-
CN <sup>d</sup>	22,00±2,65	-	32,33±3,06	-	44,33±11,24	-	66,00±10,58	-
<b>Dose (µg per placa)</b>								
66,60	21,33±4,16	0,96	46,67±2,31	1,44	50,00±5,66	1,13	102,33±10,79	1,55
133,50	21,67±7,37	0,98	34,33±6,03	1,06	39,00±1,41	0,88	82,33±8,62	1,25
200,10	25,00±6,08	1,13	32,67±5,03	1,01	21,00±14,80	0,47	79,33±17,90	1,20
266,70	21,00±2,00	0,95	27,67±1,53	0,85	28,00±1,00	0,63	71,50±2,12	1,08
333,30	23,00±6,08	1,04	41,67±12,50	1,28	48,00±8,49	1,08	87,00±33,05	1,32

<sup>a</sup>Número de revertentes/placa: média de três experimentos independentes ± DP; <sup>b</sup>IM: Índice Mutagênico (nº. de *his+* induzida por amostra/nº. de espontâneas *his+* no controle negativo).

<sup>c</sup>CP: controle positivo (-S9) 4-NQO (5,0 µg/placa); (+S9) aflatoxina B1 (0,5 µg/placa).

<sup>d</sup>CN: controle negativo DMSO (25 µl) usado como solvente para biflorina.

**Tabela 18:** Indução de revertentes de *his+* em linhagens de *Salmonella typhimurium* pela biflorina com e sem atividade metabólica (S9 mix)

Substância	TA100				TA102			
	-S9		+S9		-S9		+S9	
	rev/placa <sup>a</sup>	IM <sup>b</sup>	rev/placa	IM	rev/placa <sup>a</sup>	IM	rev/placa <sup>a</sup>	IM
CP <sup>c</sup>	1922,00±402,07	16,5	1530,33±113,50	11,19	2115,60±502,14	5,73	1934,33±279,01	4,20
CN <sup>d</sup>	116,33±19,09	-	136,67±5,03	-	368,67±72,92	-	460,00±52,92	-
<b>Dose (µg per placa)</b>								
66,60	123,33±8,50	1,06	144,00±17,09	1,05	331,33±38,70	0,90	493,33±77,18	1,07
133,50	98,00±20,00	0,84	138,00±22,54	1,01	329,33±63,79	0,89	565,33±74,22	1,23
200,10	104,67±8,08	0,90	127,33±20,82	0,93	425,33±16,17	1,15	516,67±122,84	1,12
266,70	106,00±10,82	0,91	166,33±12,66	1,22	384,00±24,98	1,04	484,00±52,46	1,05
333,30	131,33±29,14	1,13	130,67±37,17	0,96	378,67±59,37	1,02	429,33±84,13	0,93

<sup>a</sup>Número de revertentes/placa: média de três experimentos independentes ± DP; <sup>b</sup>IM: Índice Mutagênico (nº. de *his+* induzida por amostra/nº. de espontâneas *his+* no controle negativo).

<sup>c</sup>CP: controle positivo (-S9) 4-NQO (5,0 µg/placa) para TA102 e azida de sódio (5,0 µg/placa) para TA100 (+S9) aflatoxina B1 (0,5 µg/placa).

<sup>d</sup>CN: controle negativo DMSO (25 µl) usado como solvente para biflorina.

**Tabela 19:** Indução de revertentes de *his+* em linhagens de *Salmonella typhimurium* pela biflorina com e sem atividade metabólica (S9 mix)

Substância	TA1535			
	-S9		+S9	
	rev/placa <sup>a</sup>	IM <sup>b</sup>	rev/placa <sup>a</sup>	IM
PC <sup>c</sup>	1595,00±220,53	-	105,60±1,15	-
NC <sup>d</sup>	10,00±1,00	-	13,00±1,73	-
<b>Dose (µg per placa)</b>				
66,60	11,33±2,89	1,13	11,33±5,13	0,87
133,50	11,67±4,04	1,16	15,00±3,61	1,15
200,10	11,67±0,58	1,16	12,67±2,52	0,97
266,70	6,67±3,06	0,66	16,33±4,04	1,25
333,30	12,33±5,51	1,23	10,33±5,51	0,79

<sup>a</sup>Número de revertentes/placa: média de três experimentos independentes ± DP; <sup>b</sup>IM: Índice Mutagênico (nº. de *his+* induzida por amostra/nº. de espontâneas *his+* no controle negativo).

<sup>c</sup>CP: controle positivo (-S9) azida de sódio (5,0 µg/placa); (+S9) aflatoxina B1 (0,5 µg/placa).

<sup>d</sup>CN: controle negativo DMSO (25 µl) usado como solvente para biflorina.

### 4.8.3. Avaliação do potencial clastogênico da biflorina em medula óssea de camundongo

Para completar a bateria de testes de mutagenicidade, a biflorina foi testada em camundongos nos tempos de 24 e 48 horas de exposição. Após esse período, os fêmures dos animais foram retirados para a análise dos eritrócitos normocromáticos (NCEs), policromáticos (PCEs) e eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs). O Teste do Micronúcleo foi considerado negativo para biflorina, uma vez não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle negativo em relação à frequência de PCEMNs em nenhum tempo de tratamento (Tabela 20). Os resultados obtidos então sugerem que a biflorina não induz dano cromossômico estrutural e/ou numérico nos eritrócitos dos camundongos Swiss, diferente do que ocorreu com os animais do grupo controle positivo tratados com EMS ( $p < 0,01$ ) (Figura 39).

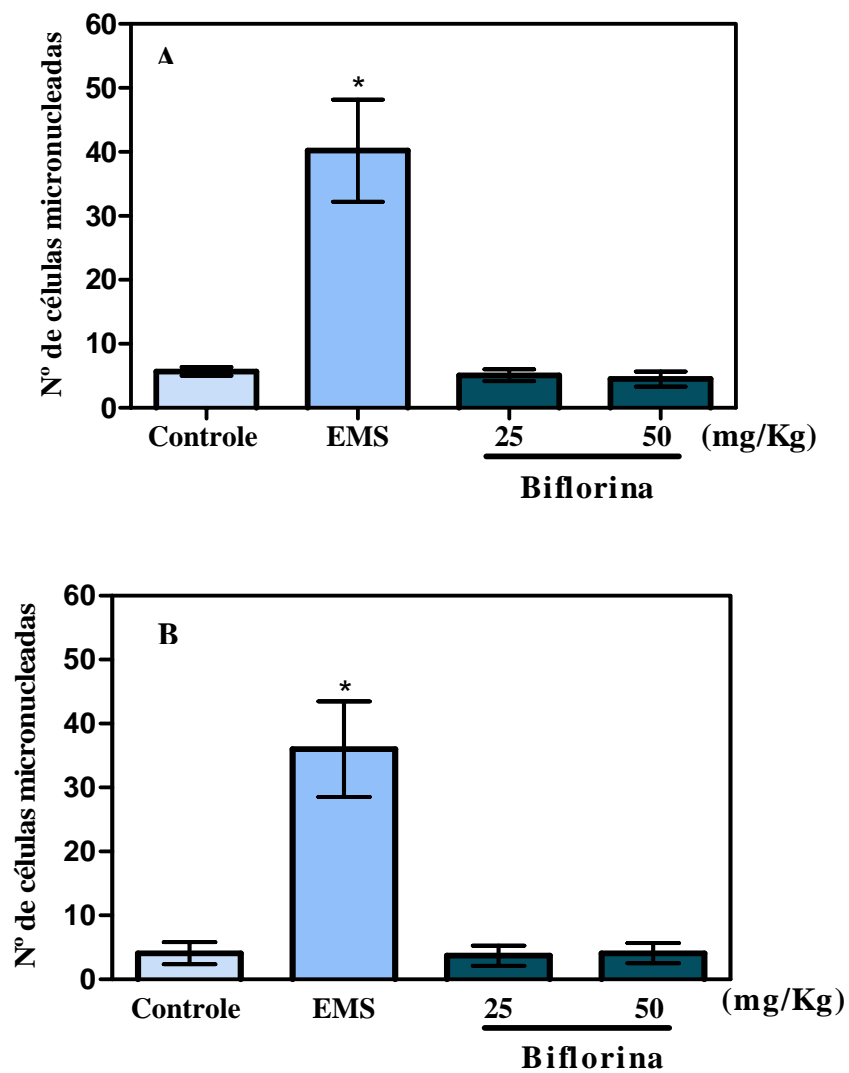
**Tabela 20 – Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos Swiss de ambos os sexos tratados com duas diferentes concentrações de biflorina.**

Tratamentos	Número de PCEs Analisados	PCEMNs		Relação PCE/NCE
		Nº	%	
<b>24 Horas</b>				
DMSO 10% <sup>a</sup>	20.000	57	0,28	4,01
EMS <sup>b</sup>	20.000	402*	2,01	2,83*
Biflorina 25mg/kg	20.000	45	0,22	3,90
Biflorina 50mg/kg	20.000	51	0,25	3,94
Tratamentos	Número de PCEs Analisados	PCEMNs		Relação PCE/NCE
		Nº	%	
<b>48 Horas</b>				
DMSO 10% <sup>a</sup>	20.000	41	0,20	3,92
EMS <sup>b</sup>	20.000	360*	1,80	2,87*
Biflorina 25mg/kg	20.000	37	0,18	3,79
Biflorina 50mg/kg	20.000	41	0,20	3,84

<sup>a</sup> Controle negativo, <sup>b</sup> Controle positivo.

\*  $p < 0,01$  (ANOVA, Tukey test).





**Figura 57** - Painel **A** – Frequência de micronúcleos dos animais tratados com biflorina ou EMS por 24 horas. Painel **B** – Frequência de micronúcleos dos animais tratados com biflorina ou EMS por 48 horas. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 10 animais por grupo, numa contagem de 2000 células policromáticas. \* $p < 0,01$  vs. controle (ANOVA, Tukey test).

**Tabela 21** – Resumo dos resultados obtidos com a biflorina versus controles positivos.

<b>ESTUDO</b>	<b>BIF.</b>	<b>C +</b>
<b>Atividade citotóxica <i>in vitro</i></b>		
Em células tumorais	+++	+++
Em linfócitos humanos	++	+++
Inibição do desenvolvimento de ovos de ouriço-do-mar	-	+++
Atividade Hemolítica	-	n.d
<b>Estudo do mecanismo de ação em células B16 <i>in vitro</i></b>		
Viabilidade celular por exclusão de azul de tripan	++	+++
Morfologia diferencial por Hematoxilina/Eosina	C.R.	C.R.
Morfologia diferencial por Laranja de acridina/Brometo de etídeo	C.R.	C.R.
Inibição da síntese de DNA	++	+++
Análise do ciclo celular	-	++
Indução de fragmentação de DNA	++	+++
Potencial transmembrana da mitocôndria	++	+++
<b>Atividade <i>in vivo</i></b>		
Efeito da biflorina sobre camundongos transplantados com Sarcoma 180	++	+++
Efeito da biflorina sobre camundongos transplantados com Carcinoma de Erlich	++	+++
Efeito da biflorina sobre camundongos transplantados com Melanoma B16	+	-
Sobrevida avaliada em camundongos transplantados com Melanoma B16	+++	+
Atividade Imunoadjuvante em camundongos saudáveis	+++	n.d
Atividade Imunoadjuvante em camundongos black (C57/BL)	+++	n.d
Toxicidade sistêmica nos camundongos transplantados com células tumorais	L	S
<b>Interação com o DNA</b>		
Por eletroquímica	+++	n.d
Inibição de Topoisomerase I	-	
<b>Genotoxicidade/Clastogenicidade em linfócitos humanos</b>		
Teste Cometa	G	G
Teste de Aberrações Cromossômicas nas diferentes fases do ciclo celular	N.C.	C
<b>Potencial Antioxidante</b>		
Autooxidação de ácido oléico	++	n.d
Xantina oxidase	++	n.d
Atividade frente ao DPPH	++	n.d
<b>Atividade Biológica e Genotóxica em Células V79</b>		
Sobrevivência clonogênica	+	-
Peroxidação lipídica	-	+++
Teste Cometa	++	+++
<b>Genotoxicidade/Mutagenicidade em outros sistemas</b>		
Em Leveduras	N.G.	G
Em Bactérias	N.M.	M
Em Medula óssea de camundongos	N.C.	C

(+) Fracamente ativa; (++) Ativa; (+++) Fortemente ativa; (-) Não ativa; (C.R.) – Corrobora os demais resultados; (L) – Leve; (S) – Severa; (G) - Genotóxico; (C) Clastogênico; (M) Mutagênico; (N.G) – Não genotóxico; (N.C.) – Não clastogênico; (N.M.) – Não mutagênico; (n.d) – Não Determinado

## 5. DISCUSSÃO

As quinonas são metabólitos amplamente distribuídos na natureza, apresentando participação crucial em vários processos bioquímicos vitais como a cadeia respiratória e a fotossíntese (DA SILVA *et al.*, 2003). Do ponto de vista farmacológico e terapêutico, estas moléculas são utilizadas como medicamentos antitumorais, antibacterianos e antimaláricos, e incluem drogas como antraciclinas, daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina e mitoxantrona, amplamente utilizadas na terapia de tumores sólidos (VERMA, 2006). Particularmente em relação às naftoquinonas, destacam-se moléculas como a  $\beta$  – lapachona e o lapachol, que constituem um grupo promissor de compostos com propriedades citotóxicas e antitumorais (ASCHE, 2005).

Nesse trabalho, nos propusemos a estudar a atividade antitumoral da biflorina, uma *orto*-naftoquinona, isolada das raízes de *Capraria biflora*, conhecida na literatura por suas propriedades antimicrobianas (LIMA *et al.*, 1958). Vale ressaltar ainda que a extração e o isolamento da biflorina envolvem procedimentos relativamente simples (D'ALBUQUERQUE *et al.*, 1962), possibilitando sua obtenção em larga escala, ressaltando seu potencial uso terapêutico.

Assim como o lapachol (2-hidroxi-3(3-metil-2-butenil)-1,4 naftoquinona e outros agentes quimioterápicos, a biflorina mostrou uma forte atividade citotóxica *in vitro* quando testada em linhagens tumorais humanas (HL60, CEM, K562, MCF-7, MX-1, MDA MB 231, MDA MB 435, M14, UACC257, UACC62, NCI H266, NCI H23, PC3, SF295 e HCT-8). A  $CI_{50}$  variou de 0,43  $\mu\text{g/mL}$  em células MCF-7 a 14,61  $\mu\text{g/mL}$  em células MDA-MB-431, ambas linhagens de mama. De acordo com a literatura, compostos puros podem ser considerados promissores para justificar novos estudos, quando apresentarem  $CI_{50}$  menor que 1  $\mu\text{g/mL}$  (PESSOA *et al.*, 2000). Considerando este valor, a biflorina mostrou-se bastante citotóxica contra 8 linhagens e

moderadamente ou pouco citotóxica frente a outras 8 linhagens, não sendo possível estabelecer nenhuma seletividade com relação a origem das células.

Em estudos anteriores com o extrato de *C. biflora*, Nascimento e colaboradores (1984) mostraram que esse extrato foi extremamente citotóxico contra células KB, com uma  $CI_{50}$  de  $3\mu\text{g/mL}$ . Os autores sugeriram que a biflorina seria a molécula responsável por esta atividade observada no extrato das raízes da planta. Nossos resultados corroboram com essa hipótese.

De acordo com vários autores, na avaliação do potencial antitumoral de uma droga, é de extrema importância a utilização de células normais a fim de se avaliar a seletividade para célula normal ou tumoral (ZUCO *et al.*, 2002; ANAZETTI *et al.*, 2003). A biflorina foi testada em linfócitos periféricos humanos estimulados com fitoemaglutinina, apresentando  $CI_{50}$  de  $5,12 (4,28 - 6,12) \mu\text{g/mL}$ . Este valor sugere uma baixa seletividade da biflorina. A doxorrubicina, por sua vez, apresentou  $CI_{50}$  neste modelo de  $0,96 (0,52 - 1,80) \mu\text{g/mL}$ .

Ainda para avaliar sua citotoxicidade, foram realizados experimentos subseqüentes para investigar a atividade em ovos de ouriço-do-mar e a capacidade de induzir hemólise em hemácias de camundongos. No ensaio do ouriço-do-mar, a biflorina não foi capaz de inibir o desenvolvimento de embriões mesmo na concentração mais alta testada ( $100\mu\text{g/mL}$ ), diferentemente do que foi observado com o quimioterápico doxorrubicina (controle positivo). Geralmente, substâncias citotóxicas testadas em ovos de ouriço-do-mar e células tumorais têm se mostrado ativas em ambos os ensaios, embora alguns compostos possam apresentar valores de  $CI_{50}$  em ovos de ouriço-do-mar maiores que em células tumorais, como observado para doxorrubicina e etoposídeo (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2003; MONTENEGRO *et al.*, 2004).

O estudo de alterações no desenvolvimento embrionário de ouriço-do-mar é um modelo adequado para avaliar atividade citotóxica, teratogênica e antineoplásica de novos compostos (JACOBS & WILSON, 1986; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002). Esse método pode detectar agentes seletivos como inibidores de síntese de DNA e RNA, inibidores de síntese de proteínas e avaliação de inibidores de microtúbulos (JACOBS *et al.*, 1981; BRANDHORST, 1985; JACOBS & WILSON, 1986, FUSETANI, 1987, GHISALBERTI, 1993).

No ensaio de hemólise, os resultados mostraram que a biflorina não causou dano à membrana das hemácias, sugerindo que a citotoxicidade da biflorina não está relacionada à ruptura inespecífica da membrana plasmática.

Uma vez avaliado o potencial citotóxico *in vitro* da biflorina, iniciou-se uma investigação mais detalhada para avaliar o mecanismo de ação citotóxica dessa substância. Para esse fim, foi utilizada a linhagem de melanoma murino B16, cedida pelo Instituto Norte Americano do Câncer (NCI-USA), uma vez que seria possível avaliar os efeitos da biflorina tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

O melanoma é uma neoplasia com um crescente aumento de incidência na população. Quando diagnosticado na fase inicial da doença, ele é curável. Porém quando avançado, os melanomas metastáticos são quase sempre fatais, e os pacientes com essa doença avançada têm sobrevida reduzida. Atualmente, a terapia quimioterápica sistêmica ainda não é satisfatória, pois apenas a pequena minoria dos pacientes responde de forma aceitável (GOGAS *et al.*, 2007). A literatura tem relatado a dificuldade em se obter drogas com mecanismos contra o tumor que não tragam tantos prejuízos aos pacientes. Em recente revisão, Gogas e colaboradores (2007) fizeram um apanhado de informações à cerca do papel da quimioterapia citotóxica no tratamento do melanoma metastático, discutindo os aspectos da quimioterapia de um único agente, da

quimioterapia combinada, das combinações da quimioterapia com agentes imunomoduladores e a combinação da quimioterapia com alvos direcionados e mostraram que os agentes em terapia única promovem <20% de respostas em pacientes com melanoma metastático. A dacarbazina (DCTI) que é o único quimioterápico citotóxico aprovado pela agência regulatória de medicamentos norte-americana (FDA) para tratamento de melanoma metastático (GOGAS *et al.*, 2007), produz taxas de resposta em 15-25% dos pacientes, com uma resposta média de 5 – 6 meses, mas apenas <5% das respostas são completas. E o tratamento em longo prazo com DCTI tem mostrado que <2% dos pacientes conseguem uma sobrevida de 6 anos. A temozolamida (TMZ) via oral, um congênere da DCTI, foi eficaz contra vários tumores sólidos, principalmente os tumores de sistema nervoso central (SNC) e tornou-se uma alternativa a DCTI, uma vez que esta é ineficaz para metástases no SNC. Em um estudo randomizado com 305 pacientes com melanoma avançado, a TMZ mostrou-se equivalente a DCTI em termos de taxa de resposta objetiva, tempo de progressão e tempo livre de doença. Nesse estudo, pacientes com metástase no SNC foram excluídos. O estudo foi desenhado para mostrar a superioridade da TMZ sobre a DCTI e de fato a TMZ foi muito bem tolerada e mostrou vantagens em relação à qualidade de vida dos pacientes, no entanto, o FDA não aceitou os resultados do ensaio para indicação de aprovação para o tratamento de melanoma, eles acharam que a administração de TMZ em múltiplas doses ao dia ou a sua administração prolongada pode como em algumas quimioterapias levar a mecanismos de resistência.

Outros agentes como cisplatina e carboplatina mostraram modesta atividade em pacientes com melanoma metastático, com sobrevida de 3 meses. Quando associados à aminofostina a sobrevida foi só de 4 meses. As nitrosurêias (carmustina, lomustina e semustina demonstraram grave mielosupressão (ATIKINS, 1997; KIRKWOOD &

ARGAWALA, 1993). Os alcalóides da vinca, particularmente vindesina e vimblastina tem mostrado aproximadamente resposta em 14% (QUAGLIANA, *et al.*, 1984) dos pacientes e os taxanos de 16 a 17% (AAMDAL *et al.*, 1994; BEDIKIAN *et al.*, 1995). Com base na DCTI nenhuma dessas drogas tem chegado a estudo de fase III, porque já em fase II, as respostas são inferiores a DCTI. Essas drogas raramente são usadas em tratamento como agentes únicos na terapia de melanoma metastático, mas são frequentemente incorporadas em combinação de quimioterapia ou bioquimioterapia. Com isso, têm sido feitas investigações com agentes citotóxicos em combinação com agentes com mínima eficácia imunomoduladora, e resultados similares entre a associação da DCTI com tamoxifen e DCTI com interferon  $\alpha$  tem sido observada. Uma taxa de 28% de sobrevida com média de 41 semanas de DCTI e tamoxifen foi alcançado em relação a 12% de sobrevida de DCTI sozinha e quando associada à interferon  $\alpha$  foram encontradas 12 repostas completas e 4 parciais em 30 pacientes e a DCTI sozinha mostrou 2 respostas completas e 4 parciais. Isso ressalta a necessidade de uma maior eficácia de agentes únicos, que, isoladamente ou em combinação com outros agentes poderá anular a resistência e também a necessidade de novos agentes que possuam vias que possam diminuir os efeitos colaterais com um impacto significativo nessa doença (GOGAS *et al.*, 2007).

Baseado nisso, foi dado seguimento as investigações no modelo melanoma B16, onde os resultados obtidos a partir da determinação da  $CI_{50}$  (3,0  $\mu\text{g/mL}$ ) da biflorina após 24 horas de exposição mostraram que a maioria das células B16 tratadas com biflorina sofreu morte celular por apoptose, sendo esta avaliada por coloração diferencial por Laranja de Acridina /Brometo de Etídio. A indução de apoptose de células tumorais é um benefício para a quimioterapia antineoplásica (LOS *et al.*, 2003). A apoptose é a morte celular programada da célula que envolve o controle genético de

eventos bioquímicos e morfológicos das células, incluindo a externalização da fosfatidilserina, liberação de citocromo c da mitocôndria, ativação de caspase, redução de volume nuclear das células, condensação de cromatina e fragmentação de DNA intranucleossomal (SCHULTZ & HARRINGTON, 2003). Alguns desses eventos puderam ser observados nos experimentos realizados pela coloração diferencial por hematoxilina/eosina. Ficou claro que a morfologia das células tratadas com diferentes concentrações de biflorina (1,5; 3,0 e 6,0  $\mu\text{g/mL}$ ) é sugestiva de apoptose, uma vez que podemos observar a redução do volume nuclear, condensação de cromatina, corpos apoptóticos e várias invaginações. Essas alterações morfológicas também foram observadas nas células tratadas com doxorubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ).

As informações de fragmentação de DNA e redução de volume celular tanto por observação direta por coloração diferencial H/E, quanto por citometria de fluxo, sugeriram indução de morte celular por apoptose. Inicialmente, para caracterização do tipo de morte celular causado pela biflorina, a avaliação da integridade de membrana por citometria não exibiu aumento da percentagem de células não viáveis, ou seja, daquelas coradas com iodeto de propídeo. As células não viáveis estão sujeitas ao mesmo princípio de coloração pelo brometo de etídeo quando utilizado para avaliar as células necróticas contadas na coloração com AL/BE. Essa diferença, embora não esperada, pode ser explicada em parte pelas diferentes sensibilidades dos ensaios em questão. Na citometria foram contadas 5.000 células para cada replicata, enquanto que na coloração com AL/BE são contadas 300 células para cada amostra.

Em seguida, o efeito da biflorina foi avaliado nas células B16 através de citometria de fluxo. Esta técnica foi utilizada por permitir uma quantificação mais precisa e confiável de indução de apoptose e de outros parâmetros, como avaliar se ocorre alguma interferência específica nas fases do ciclo celular das células (LECOEUR



*et al.*, 1997). A análise do ciclo celular permitiu observar que a biflorina não promove acúmulo de células em nenhuma das fases do ciclo celular.

A citometria de fluxo também confirmou as observações morfológicas a cerca da fragmentação de DNA. Enquanto as células não tratadas apresentaram 5% de DNA fragmentado, o tratamento com biflorina causou fragmentação de 23% na maior concentração (6,0 µg/mL). Foi avaliada também a viabilidade celular por citometria testando a integridade da membrana plasmática e contagem de células com morfologia normal. O percentual de células viáveis não mudou significativamente até a maior concentração testada (6,0 µg/mL).

Os estudos relacionados ao tipo de morte celular foram prosseguidos com objetivo de melhor caracterizar a via apoptótica envolvida. A mitocôndria desempenha papel chave na deflagração da apoptose em certas condições celulares. A via intrínseca da apoptose é também conhecida como via mitocondrial, tendo como o principal modulador dessa via, a proteína Bcl-2 da super família Bcl-2, que consiste de membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, e a interação do equilíbrio global entre o balanço dessas proteínas pode determinar o destino da célula (ORRENIUS, 2004). A alteração no potencial transmembrânico mitocondrial pode ser medida para verificação indireta da ativação da via intrínseca. A biflorina alterou significativamente o potencial mitocondrial desde a concentração 1,5 µg/mL, sugerindo o envolvimento da ativação da via apoptótica intrínseca. Modelos atuais sugerem que o Bax/Bak, que é um subgrupo de moléculas (Bax, Bak, Bok e Bcl-x<sub>5</sub>), com função pró-apoptótica central, são mantidas e verificadas pela proteína antiapoptótica Bcl-2. Essas moléculas são, por sua vez, inativadas pela “BH3-only”, uma família de proteínas como a Bim, Bid, Bik, Noxa e Puma. O “BH3-only” faz uma ligação hidrofóbica com as proteínas da família Bcl-2 e atua como sensor celular que regula a ativação da morte celular por apoptose na via

intrínseca (STRASSER, 2005). Esta via é ativada por uma multiplicidade de estímulos, incluindo drogas citotóxicas, estresse genotóxico, retirada de fatores de crescimento, dano no DNA, perda de ancoragem e pelos chamados modificadores de resposta imune como as imidazoquiloninas (LEVERKUS, 2004). Portanto, o controle das proteínas Bcl-2 é um ponto crítico que precisa ser superado para o tratamento eficiente do câncer. É importante que muitas proteínas sejam inativadas para expressão do Bax/Bak, para que estas, por sua vez, conduzam o processo da apoptose através da mitocôndria (CORY *et al.*, 2003). Os resultados obtidos sugerem que a indução de apoptose pela biflorina, de fato, envolve as vias dependentes da despolarização da mitocôndria. Outros estudos são necessários para averiguar de que forma a biflorina pode estar inativando as proteínas anti-apoptóticas ou ativando as proteínas pró-apoptóticas e conduzindo essas células à morte celular programada.

Os resultados da atividade citotóxica da biflorina nos levaram a investigar sua atividade antitumoral para uma melhor análise a cerca do seu efeito em animais. A literatura mostra vários trabalhos com o estudo de naftoquinonas contra tumores sólidos. Lima e colaboradores em 1972 estudaram a atividade antitumoral de naftoquinonas como a juglona, o lapachol, a lawsona e a plumbagina nos modelos Sarcoma 180, mostrando que esses compostos, com exceção do lapachol, inibiram o crescimento do tumor. Por outro lado, todas essas substâncias, inclusive o lapachol, foram ativas contra o carcinoma de Erlich. A beta-lapachona foi ativa contra sarcoma 180 *in vitro* e em sarcoma de Yoshida e carcinosarcoma de Walker 256 *in vivo* (SANTANA *et al.*, 1968; DO CAMPO *et al.*, 1979).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a biflorina apresentou atividade contra os tumores Sarcoma 180 e Carcinoma de Erlich com perfil bastante similar às outras naftoquinonas. Em adição a atividade antitumoral observada pela

biflorina administrada isoladamente, esse composto foi capaz de aumentar a resposta suscitada pelo 5-FU ( $P < 0,05$ ) em camundongos transplantados com sarcoma 180 e carcinoma de Erlich. Esse resultado mostra-se interessante, pois possibilita uma opção de melhora na eficácia da terapêutica antineoplásica cujo objetivo é desenvolver uma combinação de drogas que possa reduzir os efeitos colaterais durante o tratamento.

A análise histopatológica do baço, rim e fígado retirados dos animais tratados com biflorina revela apenas uma leve toxicidade, uma vez que os animais tratados apenas com DMSO 10% (grupo controle) apresentaram um perfil morfológico semelhante nesses órgãos. Algumas alterações como esteatose microvesicular acompanhadas de degeneração hidrópica de hepatócitos foram observados nos animais tratados com biflorina e com 5-FU. Esses efeitos, de acordo com a literatura, também podem estar relacionados com uma leve hepatotoxicidade (KUMMAR, 2004; TORTI *et al.*, 2001).

O fígado é um órgão com grande capacidade de regeneração por fenômeno adaptativo como o aumento no retículo endoplasmático produzido por longo tempo de tratamento com drogas anticonvulsivantes (KUMMAR, 2004).

A regeneração dos tecidos hepáticos ocorre em muitas doenças, com exceção das mais deletérias. Mesmo quando a necrose hepatocelular está presente, mas o tecido conjuntivo é preservado, a regeneração pode ser completa (KUMMAR, 2004). Além disso, as alterações observadas nos rins dos animais tratados com biflorina também podem ser consideradas discretas (SHULER & BENNET, 1995; TORTI *et al.*, 2001). Pode-se dizer que a biflorina exibiu efeitos antitumorais sobre os tumores sem uma expressiva toxicidade. Além disso, apesar da baixa potência observada para a utilização de biflorina isoladamente, ela aumentou a eficácia do 5-FU e diminuiu a toxicidade sistêmica induzida por 5-FU, quando a ele associada.

Os efeitos da biflorina no baço dos animais tratados incluíram aumento de peso do órgão, aumento da polpa branca e de ninhos de megacariócitos, suscitando a hipótese de que a atividade antitumoral desse composto possa estar relacionada a uma atividade imunoestimulante, juntamente com a já descrita toxicidade direta frente a células tumorais.

Para o estudo da atividade imunoadjuvante da biflorina, os animais foram tratados com ovalbumina (controle) ou biflorina associada à ovalbumina para investigação da síntese de anticorpos anti-OVA. Os resultados revelam um aumento da produção de anticorpos totais (IgG, IgA e IgM) anti-OVA em camundongos imunizados com ovalbumina em associação com a biflorina quando comparados ao grupo tratado apenas com ovalbumina, o que indica uma atividade imunoadjuvante humoral desse composto.

O sistema imunológico desempenha uma função de proteção do indivíduo contra microorganismos patogênicos, mas também é responsável pela manutenção de baixas taxas de crescimento de células neoplásicas ou lesões pré-cancerosas no organismo (BRANDLEIN *et al.*, 2003a; 2003b; 2004; VOLLMERS & BRANDLEIN, 2005a,2005b). Chamamos esse evento contínuo que impede a formação de tumores pelo sistema imunológico de vigilância imunológica. Com relação à imunidade humoral, a IgM parece ser o anticorpo mais envolvido na vigilância imunológica, pois consegue ligar-se em antígenos glicosilados que estão na superfície de células neoplásicas e ativar uma série de ações como: ativação do sistema complemento e lise de células cancerígenas, opsonização da célula alvo e quimiotaxia de células fagocíticas para o tumor (VOLLMERS AND BRÄNDLEIN, 2007). O aumento da síntese de anticorpos anti-OVA induzido pela biflorina, como demonstrado nos resultados desse trabalho, pode sugerir também que esse composto é capaz de aumentar a síntese de anticorpos

contra o tumor. É possível que esse aumento de anticorpos induza as ações descritas acima levando a diminuição da massa tumoral.

Um terceiro modelo tumoral foi utilizado com o intuito de avaliar se a biflorina promoveria alguma ação benéfica em relação à sobrevivência dos animais inoculados com o tumor. Como vários cânceres, incluindo Melanoma, são conhecidos por serem sensíveis à modulação imunitária (TUTHILL *et al.*, 2007), era de interesse avaliar os efeitos deste composto no melanoma murino B16, uma vez que os resultados obtidos apontaram uma atividade imunoadjuvante em animais suíços saudáveis.

Tuthill e colaboradores (2007), em estudo semelhante a esse realizado com a biflorina, testaram o SCV - 07 (D - gama - glutamyl - L - triptofano), um peptídeo sintético com efeito imunestimulante comprovado, e eficácia contra várias infecções virais e bacterianas, em camundongos B57CL/6 transplantados com células B16. Os resultados foram semelhantes aos obtidos com a biflorina, onde se observou redução do volume tumoral em relação ao controle negativo e ausência de toxicidade sistêmica. Além disso, também foi observada a sobrevivência e a atividade imunoadjuvante nos animais (B57CL/6) que receberam as células tumorais tratadas com biflorina. Novamente foi obtido mais um resultado interessante, pois a sobrevivência dos animais tratados com a *orto*-naftoquinona foi maior quando comparado aos demais grupos, inclusive em relação ao grupo controle positivo tratado com dacarbazina.

Nesse âmbito, buscando estudar qual seria o mecanismo de ação da *orto*-naftoquinona em estudo resolveu-se investigar as propriedades eletroquímicas da biflorina, e se ocorre interação direta com o DNA através da análise por biossensor de DNA. Sabe-se que quinonas podem exercer danos no DNA através de suas ações eletrofílicas, resultando em aductos covalentes no centro nucleofílico do DNA (PARDEE *et al.*, 2002; BENTLE *et al.*, 2006).

As propriedades eletroquímicas de algumas biomoléculas fornecem informações que podem, eventualmente, ser relacionadas às ações biológicas. A eletroquímica possui um papel relevante quando ocorre transferência de elétrons seguida de estresse oxidativo, gerando espécies oxigenadas reativas ou tóxicas, que podem gerar danos às células. O estudo dos potenciais de redução pode ser útil no entendimento do modo de ação de fármacos, enzimas e toxinas. O estudo em biossensores de DNA nos permite avaliar e prever interações com o DNA com base na sua ligação a ácidos nucleicos (KOVACIC *et al.*, 2000; ABREU *et al.*, 2002).

De fato, o perfil eletroquímico mostrou que a biflorina sofre redução e interage com o DNA de fita dupla e com o DNA de fita simples, sem a necessidade de nenhum intermediário reativo, ou espécie oxigenada.

Esses resultados estimularam a pesquisa sobre uma possível inibição de topoisomerase, bem como do potencial genotóxico da biflorina através da avaliação da indução de dano ao DNA detectada pelo teste do cometa e pela avaliação de aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico de voluntários saudáveis. Um balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto é um importante parâmetro quando avaliado seu potencial como droga farmacológica. A cultura celular pode ser usada para avaliar a citotoxicidade basal e o alvo de toxicidade orgânica (EKWALL & EKWALL, 1988; SEIBERT *et al.*, 1996).

A Topoisomerase I (Top I) está envolvida em múltiplos eventos envolvidos com o DNA, como replicação do DNA, transcrição, condensação e descondensação cromossômica e provavelmente na recombinação através da clivagem e religação do DNA, que são normalmente acoplados para o relaxamento do DNA superespiralado durante a transcrição e replicação da cromatina (POMMIER *et al.*, 2003). A biflorina, no entanto, não causou inibição de topoisomerase, sugerindo que a interação que ocorre

com o DNA não é por esse mecanismo. Por outro lado, a beta-lapachona foi identificada como uma potente candidata a inibidora por sua ação direta com a enzima (DEGRASSI *et al.*, 1993; LI *et al.*, 1993). Lapachol e seus derivados apresentaram além da inibição dose-dependente de inibição de crescimento do carcinoma de Erlich e células leucêmicas K562 em cultura, inibição de topoisomerase I e II (ESTEVEZ-SOUZA, 2007). Esses resultados sugerem um mecanismo de ação para a biflorina diferente daquele descrito para outras naftoquinonas.

Além disso, a biflorina não induziu aberrações cromossômicas em linfócitos, porém em ambas as doses testadas, foi capaz de reduzir o índice mitótico na fase S do ciclo celular, ressaltando sua citotoxicidade. Essas concentrações correspondem a aproximadamente 3 a 5 vezes o valor da  $CI_{50}$  em linfócitos, calculada pelo teste do Alamar Blue, e ainda assim, não houve indução de efeito clastogênico pela biflorina.

Por outro lado, no teste cometa, nas mesmas concentrações houve um aumento dos níveis em dano ao DNA. Os danos mensurados correspondentes a escores de 0 a 4 são passíveis de reparo (TICE *et al.*, 2000), mas o desenho do estudo não permitiu prever se esse processo de reparo ocorre. De fato, algumas outras naftoquinonas são conhecidas por induzirem genotoxicidade. Vanni e colaboradores (1998) demonstraram que a  $\beta$ -lapachona é genotóxica em células CHO quando em eluição alcalina, causando quebras nas fitas de DNA, sendo seletiva mediante citotoxicidade na fase S do ciclo celular indicada pela análise em citometria de fluxo. Também foi encontrado que 2-metil-1,4-naftoquinona pode causar quebras nas fitas de DNA nas fases tardias dos estágios de desenvolvimento do camarão erva (KIM *et al.*, 2004).

O distúrbio do equilíbrio redox e a indução de dano ao DNA, principalmente quebras de fita simples e dupla, podem resultar em potencial citotoxicidade em células normais e células tumorais (ROSA *et al.*, 2007). De acordo com vários autores, o

estresse oxidativo levando ao dano do DNA e alquilação do nucleófilo celular são os dois prováveis mecanismos de citotoxicidade das quinonas (BOLTON *et al.*, 2000). Controversamente, a biflorina apresentou atividade antioxidante em baixas concentrações, isso foi verificado em três metodologias diferentes. Na autoxidação do ácido oléico, bem como o método utilizando o ensaio de hipoxantina/xantina oxidase e o método do DPPH para avaliar a habilidade da biflorina em remover radicais livres demonstraram que ao invés da biflorina apresentar atividade pró-oxidante como lapachol e  $\beta$ -lapachona, ela provavelmente protege as células dos danos causados por agentes oxidantes. Todos esses resultados somados fizeram com que outras perguntas fossem suscitadas e então as investigações a cerca da existência de atividade antioxidante, nos levaram a escolher outros modelos para explorar esse potencial.

As células V79 são bem caracterizadas e comumente utilizadas nos estudos de citotoxicidade e genotoxicidade (BRADLEY *et al.*, 1981). A biflorina não induziu citotoxicidade quando testada em doses baixas e teve efeito protetor contra o peróxido de hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio é uma substância com atividade genotóxica, capaz de induzir danos oxidativos no DNA, incluindo quebra de fitas e modificação básica no DNA. Os efeitos mutagênicos de ROS, em especial de  $H_2O_2$ , que induz lesões semelhantes aos causados por radiação ionizante, estão bem documentados em células V79 (LI *et al.*, 2000).

Células V79 quando foram expostas à biflorina na presença e ausência de peróxido de hidrogênio mostraram a redução dos danos induzidos pela peroxidação lipídica, mensurada pelos níveis de TBARS. A biflorina também foi capaz de diminuir danos ao DNA e mutação, desencadeada pelo peróxido de hidrogênio em levedura. Qualquer lesão detectável por uma enzima de reparo específica (que cliva o DNA



especificamente no seu sítio de lesão) pode ser avaliada pelo teste cometa (COLLINS *et al.*, 1993). Ao empregar as enzimas endonuclease III (endoIII) e Formamidopirimidina DNA-glicosilase (Fpg) para detectar danos oxidativos, através do ensaio cometa com modificações, verificou-se que a biflorina não induz dano oxidativo. Ao contrário, promoveu uma importante diminuição dos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio. No entanto, relativamente pouco se sabe dos efeitos da biflorina sobre dano oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio no DNA das células dos mamíferos.

A razão para esta proteção por biflorina em doses baixas não é óbvia, mas provavelmente reside na remoção de radicais livres. O  $H_2O_2$  gera radicais hidroxilas pela reação de Fenton, que atacam DNA, conduzindo assim a quebra de fitas (VALKO *et al.*, 2007).

Para os ensaios de mutagênese, a biflorina não induziu atividade mutagênica na linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae* nas doses testadas. Para os testes de antimutagenicidade, a substância protegeu significativamente de lesões induzidas por  $H_2O_2$  quando pré-tratadas, na dose de 0,25 mg/mL. Este efeito poderia ser atribuído a uma atividade desmutagênica, onde os agentes protetores atuariam diretamente sobre a ação do  $H_2O_2$ , inibindo a formação dos compostos que induzem mutações no DNA ou sequestrando as moléculas reativas, como o radical hidroxil. Por sua vez, Jamieson e colaboradores (1994) testaram a naftoquinona plumbagina em células de *S. cerevisiae*, sugerindo que sua ação tóxica seria devido à produção de ânions superóxido, o que ficou comprovado uma vez que na linhagem mutante no gene superóxido dismutase Cu/ZnSOD (*SOD1*) a plumbagina se mostrou extremamente sensível, inclusive 100 vezes mais sensível que na linhagem mutante em MnSOD (*SOD2*) sendo indistinta entre a *sod2* e o tipo selvagem.

Da mesma forma, na recombinação na linhagem XS2316, nas concentrações de 0,125 a 0,5 mg/mL de biflorina, os efeitos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram revertidos.

O padrão seguido internacionalmente para genotoxicidade, *Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals* – (ICH, 1997), recomenda uma bateria padrão de testes a ser realizada para a avaliação da genotoxicidade de drogas de um modo geral e de drogas antineoplásicas. Essa bateria de testes é composta por um teste em mutação genética de bactéria, um teste *in vitro* com avaliação citogenética de dano cromossomal com células de mamíferos e um teste *in vivo* para danos cromossomais usando células hematopoiéticas de roedores.

O teste de Ames é usado em primeira instância como triagem para determinar o potencial mutagênico de novos produtos químicos e drogas, os dados oriundos deste teste são submetido às agências regulatórias para o registro de muitos químicos, incluindo fármacos e biocidas (AULETTA *et al.*, 1993; FDA, 1993; KIRKLAND, 1993; SOFUNI, 1993). Os protocolos internacionais têm sido desenvolvidos para que as empresas e laboratórios possam assegurar a uniformidade dos estudos (ICH, 1995; OECD, 1997).

Com o intuito de contemplar as normas internacionais e descartar quaisquer dúvidas em relação à genotoxicidade da biflorina foram ainda utilizados o teste de micronúcleos em medula óssea de camundongo e o teste de mutação genética, com as linhagens de *Salmonella typhimurium*, ambos com o resultado negativo.

Estudos com a naftoquinona lawsona relatam que ela quando testada em medula óssea de camundongo, não mostrou efeito clastogênico após 24 e 48h de tratamento, porém após 72h observou-se um aumento da incidência de micronúcleos, os autores ressaltam que existe essa hematotoxicidade no tempo de 72h que pode estar associada à exposição ao veículo (DMSO), uma vez que a eritropoiese induzida por agentes

genotóxicos, leva a pequenos aumentos na frequência de micronúcleos, os dados sugerem que a resposta positiva produzida em 72h pela lawsona é consistente com a estimulação de hematopoiese subsequente a uma toxicidade hematológica da lawsona e não ao mecanismo de reatividade com o DNA (KIRKLAND & MARZIN, 2003). Com a biflorina, também não se observou clastogenicidade após 24 e 48h do tratamento. Não foram realizadas análises após 72h do tratamento.

No teste com *Salmonella typhimurium* os resultados obtidos com biflorina mostraram-se negativos com e sem ativação metabólica em todas as linhagens testadas. A literatura, no entanto, indica que quinonas não-substituídas normalmente não apresentam mutagenicidade, ao contrário das quinonas derivadas com um ou mais grupos hidroxila ou metila, as quais tem mostrado mutagenicidade nos testes com bactéria na presença de ativação metabólica (MATSUSHIMA *et al.*, 1986). Vários estudos foram feitos a cerca da mutagenicidade de quinonas pelo teste de Ames, e estas, de um modo geral, mostraram-se não mutagênicas para algumas linhagens e mutagênicas para outras, mas praticamente todas se mostraram negativas para as mesmas linhagens testadas contra biflorina. Num estudo com cinco naftoquinonas (chimaflina, 5,8-hidroxi-1,4-naftoquinona, juglona, plumbagina e menadiona) testadas em relação ao potencial antimutagênico contra mutagenicidade induzida por 2-nitrofurano, 3-nitrofluruaneto e 1-nitropireno, em *S. typhimurium* TA98, todas elas foram potentes agentes antimutagênicos em relação à presença de função metil e hidroxila, entretanto, a plumbagina, mostrou-se excepcionalmente antimutagênica (EDENHARDER & TANG, 1997), o que vem a corroborar com Farr e colaboradores (1985), que concluíram que a toxicidade da plumbagina é, em parte, função do dano causado ao DNA, porém, esse dano é diferente do tipo causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo as respostas celulares do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da plumbagina distintas.

Vários estudos de validação têm sido feitos para determinar a reprodutibilidade dos resultados dos testes de Ames intra e inter-laboratoriais (DUNKEL *et al.*, 1984,1985; MARGOLIN *et al.*, 1984; PURCHASE *et al.*, 1978). A preocupação tem sido a determinação da sensibilidade e a correlação do teste de Ames com estudos de carcinogenicidade. Eles, de fato, têm sido estabelecidos para que se possa prever a correlação entre uma resposta mutagênica positiva e a carcinogenicidade em roedores McCANN *et al.*, 1975; AMES & McCAN, 1976; SUGIMURA *et al.*, 1976; TENNANT *et al.*, 1987 ZEIGER *et al.*, 1988), que variam de 90 (McCANN *et al.*, 1975) a 77% (ZEIGER *et al.*, 1988), sendo as diferenças primárias, a composição química das substâncias avaliadas.

A biflorina, não apresentou mutagenicidade, porém existe a possibilidade de uma substância não genotóxica ser carcinogênica, como é o caso, por exemplo, o tetracloroetileno, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, fenobarbital, pentaclorofenol e o tetradecanoil forbol acetato (VAN DELFT *et al.*, 2004). No entanto, substâncias carcinogênicas não genotóxicas, embora não causem mutações, podem estimular a proliferação celular e desta forma estimulam a fixação de mutações espontâneas e conseqüente expansão clonal, pela acelerada proliferação celular, resultando em um segundo clone e assim por diante (GOMES-CARNEIRO *et al.*, 1997). Porém uma vez que a biflorina mostrou-se genotóxica em linfócitos, mas essa genotoxicidade não progrediu para uma mutação e o índice mitótico, indicativo de citotoxicidade diminuiu, duas coisas podem estar acontecendo; a célula está sendo levada a morte, provavelmente por apoptose ou o sistema de reparo da célula não está alterado, estando em perfeito funcionamento. A lesão ao DNA pode ter sido reparada e o ciclo celular ter continuado sem prejuízos, o que pode não ocorrer em linhagens tumorais, uma vez que algumas linhagens possuem deficiência no seu sistema de reparo. Niaga e

colaboradores (2007) mostraram que as linhagens tumorais de mama humana MCF-7 e HCC1937 são deficientes no sistema de reparo por excisão de quatro lesões induzidas por danos oxidativos, isso, o que pode ser visto como algo benéfico para o tratamento do câncer, na radioterapia, por exemplo, se as células tiverem os danos induzidos por radioterapia, reparados, isso pode resultar em falência do tratamento e recorrência da doença (JONES *et al.*, 2005).

Estudos realizados por Boorstein e Pardee (1983 e 1984) sugeriram que o co-tratamento de beta-lapachona com 3-aminobenzamida, uma droga conhecida por inibir PLD (“repair of potentially lethal damage”) (BURGMAN & KONINGS, 1989) inibem o reparo de dano ao DNA, bloqueando a replicação do DNA e atividade da timidilato sintase. Eles propuseram que a beta-lapachona inibe um passo de ligação do reparo do DNA. Em estudos mais recentes, foi proposto que a beta-lapachona inibe a reparação do DNA através da hiperativação do PARP-1. O PARP-1 é uma das mais abundantes enzimas das células eucarióticas e serve como um apelido das moléculas de sinalização que respondem a quebras das fitas do DNA, as duas porções terminais de zinco do PARP – 1 reconhecem e se ligam com alta afinidade, às quebras de fitas simples e duplas, contribuindo para facilitar a reparação das fitas pela via de reparo por excisão de bases (BER), bem como pela via de reparo por recombinação homóloga (HR). (DE MURCIA & MENISSIER DE MURCIA, 1994). A beta-lapachona, hiperativa o PARP-1, que depleta  $\text{NAD}^+$  e os níveis de ATP inativando a energia dependente do processo de reparo. Esse resultado acumula dano no DNA causado por NQO1 dependente da formação de espécies reativas de oxigênio, levando a inibição do reparo e morte celular.

Esses dados vêm descrevendo como as quebras de DNA de fita dupla e de fita simples podem ser um alvo para a prevenção e tratamento do câncer e abrem uma nova perspectiva de pesquisa em relação à investigação mecanismo de ação da biflorina.

Assim, pode-se estabelecer também que a biflorina interage diretamente com o DNA de fita dupla e de fita simples, mas não é uma molécula inibidora de Topoisomerase I. Dessa maneira, deixa-se em aberto boas perspectivas para futuros estudos onde se possa averiguar se o modo de ação da biflorina seria pela alquilação com o DNA, o que levaria a célula à morte, possivelmente por apoptose, sem, no entanto, permitir que um processo de mutagênese se estabeleça, impedindo assim o desenvolvimento da carcinogênese e tornando, esta molécula, um sério candidato à terapia do câncer.

A biflorina é uma molécula com grande potencial farmacológico, como foi demonstrado, e ainda é de fácil obtenção, com ênfase em ser esta uma molécula essencialmente brasileira. Tal qual a maioria das quinonas conhecidas e estudadas quanto à sua bioatividade, a biflorina é citotóxica *in vitro* e possui relevante atividade antitumoral *in vivo*. No entanto, diferentemente delas, a biflorina demonstrou um potencial imunoadjuvante e um significativo efeito antioxidante e protetor contra a citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e lipoperoxidação celular induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, o achado que deve ter maior destaque, o que torna esta molécula promissora, é o seu notável efeito no aumento significativo da sobrevida de animais portadores de melanoma B16, sendo ainda mais eficaz que o próprio controle positivo.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *o*-naftoquinona apresentou potencial citotóxico que não parece estar relacionado à ruptura de membrana ou a dano oxidativo. Quando avaliado seu mecanismo de ação verificou-se que a biflorina se comporta como uma substância citotóxica, não causa alterações no ciclo celular, mas inibe a síntese de DNA e interage diretamente com DNA de fita simples e DNA de fita dupla e induz morte celular por apoptose.

Em modelos tumorais *in vivo* a biflorina inibiu o crescimento tumoral do sarcoma 180 e do carcinoma de Erlich, bem como aumentou a sobrevivência dos animais transplantados com B16, o que parece estar relacionado ao potencial imunoadjuvante da molécula.

Quando avaliada quanto ao potencial genotóxico, mostrou-se citotóxica e genotóxica em linfócitos humanos, contudo sem causar mutação. Em células V79 e *S. cerevisiae* apresentou potencial antimutagênico relacionado à remoção de radicais hidroxil. Nos testes em *Salmonella thyphimurium* e medula óssea de camundongos igualmente não foi mutagênica, mostrando que quando metabolizada a biflorina também não é mutagênica.

## **7. CONCLUSÃO**

Considerando as atividades citotóxica, antitumoral e imunoadjuvante da biflorina, e o seu potencial antineoplásico, coroado com o aumento da sobrevivência dos animais, tornam esta uma promissora molécula para a terapia do câncer.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMDAL, S.; WOLFF, I.; KAPLAN, S.; PARIDAENS, J.; KERGER, J.; SCHACHTER, J.; WANDERS, J.; FRANKLIN, W.R.; VERWEIJ, J. Docetaxel (Taxotere) in advanced malignant melanoma: a phase II study of the EORTC early clinical trials group. **European Journal Cancer**, 30A, 1061-1064, 1994.

ACOSTA, S.L., MURO, L.V.; SACERIO, A.L.; MONTEAGUDO, G.L.; Pena, A.R. & Okwei, S.N. Anti-inflammatory Effects of an Aqueous Extract of *Capraria biflora* L. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 22: 53-5, 2003a.

ACOSTA, S.L., MURO, L.V.; SACERIO, A.L.; MONTEAGUDO, G.L.; Pena, A.R. & Okwei, S.N.. Analgesic properties of *Capraria biflora* leaves aqueous extract. **Fitoterapia**, v.74: p.686-8, 2003b.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

AMES, B.N.; MCCANN, J. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 73, p. 950-954, 1976.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v.188, p.261-274, 2003.

ATKINS, M.B. The treatment of metastatic melanoma with chemotherapy and biologics. **Current opinion in oncology**, v 9, p.205-213, 1997.

ASCHE, C. Antitumor Quinones. **Medicinal chemistry**, v.5, p. 449-467, 2005.

AULETTA, A.E.; DEARFIELD, K.L; CIMINO, M.C. Mutagenicity test schemes and guidelines: U.S. EPA Office of Pollution Prevention and Toxics and Office of Pesticide Programs. **Environmental and molecular mutagenesis**, n. 21, p. 38-45, 1993.

AYENSU, E. S. **Medicinal Plants of the West Indies**, Reference Publications, Algonac, Mich., p. 170, 1981.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. The genetics and genomics of cancer. **Nature genetics**, (supplement) v.33, p.238-244, 2003.

BAGULEY, B.C. A brief history of cancer chemotherapy. **Anticancer drug development**, San Diego, California, p.1, 2002.

BEDIKIAN, A.Y.; WEISS, G.R.; LEGHA, S.S.; BURRIS, H.A.; ECKARDT, J.R.; JENKINS, J.; ETON, O.; BUZAID, A.C.; SMETZER, L.; VON HOFF, D.D. Phase II trial of docetaxel in patients with advanced cutaneous malignant melanoma previously untreated with chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v.1 p. 2895-2899, 1995.

BENTLE, M.S.; BEY, E.A.; DONG, Y.; REINICKE, K.E.; BOOTHMAN, D.A. New tricks for old drugs: the anticarcinogenic potential of DNA repair inhibitors. **Journal of molecular histology**, v.37, p.203–218, 2006.

BERVELY, A.T. **Anticancer drug development guide pre clinical screening, clinical trials and approval** Totowa, New Jersey, p.397, 1997.

BERVELY, A.T. **Tumor models in cancer research** Totowa, New Jersey, p.397, 2002.

BOLTON, J.L.; TRUSH, M.A.; PENNING, G.; DRYHURST, G.; MONKS, T.J. Role of quinones in Toxicology. **Chemical research in toxicology**, v.13, p.135-160, 2000.

BOORSTEIN, R.J., PARDEE, A.B. (1983) Coordinate inhibition of DNA synthesis and thymidylate synthase activity following DNA damage and repair. **Biochemical and biophysical research communications** 117:30–36.

BOORSTEIN, R.J., PARDEE, A.B. (1984) Beta-lapachone greatly enhances MMS lethality to human fibroblasts. **Biochemical and biophysical research communications** 118:828–834.

BRADLEY, M.; BHUYAN, B.; FRANCIS, M.C.; LANGENBACH, R.; PETERSON, A.; HUBERMAN, E. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: a review and analysis of literature, **Mutation Research** v.87, p.81–142, 1981.

BRAND, D.J. AND FISHER, J.F. Reductive transformations of 10-deoxydaunomycinone. **Journal of Organic Chemistry** v. 55, p. 2518-2530.

BRANDLEIN, S.; LORENZ, J.; RUOFF, N.; HENSEL, F.; BEYER, I.; MÜLLER, J.; NEUKAM, K.; ECK, M.; ILLERT, B.; MULLER-HERMELINK, H. K.; AND VOLLMERS, H. P. Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients. **Human Antibodies**, v.11, p.107-119, 2002.

BRANDSHORT, B. Informational content of the echinoderm egg. In: Browder LW, ed. **Developmental Biology, a Comprehensive Synthesis. Oogenesis**. New York: Plenum Press 525-576, 1985.

BURGMAN, P.; KONINGS, A. W. T. Effect of Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase on the Radiation Response of HeLa S3 Cells, **Radiation Research**, v. 119, n. 2, p. 380-386, 1989.

CASSADY, J.M., DOUROS, J.D. (Eds.). **Anticancer Agents Based on Natural Product Models**. Academic Press, New York. 1980.

CHABNER, B.A.; CALABRESI, P. Antineoplásicos Em As Bases Farmacológicas da **Terapêutica**; Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, p.903-949, 1995.

COLLINS, A.R. Comet Assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p. 249-61, 2004.

CORBETT T.H.; POLIN, L.; ROBERTS, B.J.; LAWSON, A.J.; LEOPOLD III, W.R.; WHITE, K.; KUSHNER, J.; PALUCH, J.; HAZELDINE, S.; MOORE, R.; RAKE, J.; HORWITZ, J.P. Transplantable Synergic Rodent Tumours. **Solid Tumors in Mice**. Teicher, B.A. In: Tumor Models in Cancer Research, p. 41-70, 1997.

CORY, S.; HUANG, D.C.; ADAMS, J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene**, v.22, p.8590–8607, 2003.

COSTA, V.; FERREIRA, P.M. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 217-246, 2001.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p.1231-1234, 2002.

COSTA-LOTUFO, L.V.; JIMENEZ, P.C.; WILKE, D.V.; LEAL, L.K.A.M.; CUNHA, G.M.A.; SILVEIRA, E.R.; CANUTO, K.M.; VIANA, G.S.B.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A.C.Smith. **Z Naturforsch**, v.58c, p. 675-680, 2003.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brasil, v.2, pág. 205, 1984.

CRAGG, M.G. & NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.72-79, 2005.

DA SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Química Nova**, v.26, n.3, p.407-416, 2003.

DATASUS, Incidência de cancer no Brasil <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/>>. Acessado em 15.10.2007.

DAVIDOVIC, L.; VODENICHAROV, M.; AFFAR, E.B.; POIRIER, G.G. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. **Experimental Cell Research**, v.268, p.7–13. 2001.

DE ABREU, F.C.; BRETT, A.M.O.; GOULART, M.O.F. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-Biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v.17, p.913-919, 2002.

DE ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, v.28, p. 118-129, 2005.

DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, P.; LOBO-CASTAÑÓN, M.J.; MIRANDA-ORDIERES, A.J.; MUÑÓN-BLANCO, P. Electrochemistry of Nucleic Acids at Solid Electrodes and Its Applications. **Electroanalytical**, v.16, p.1193-1204, 2004.

DEGRASSI, F.; DE SALVIA, R.; BERGHELLA, L. The production of chromosomal alterations by beta-lapachone, an activator of topoisomerase I. **Mutation Research**, v.288, p.263-267, 1993.

DOCAMPO, R.; CRUZ, F. S.; BOVERIS, A.; MUNIZ, R. P.; ESQUIVEL, D. M.  $\beta$ -Lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells. **Biochemical Pharmacology** v. 28, p. 723-728, 1979

DRESCH, R.R.; HAESER, A.S.; LERNER, C.; MOTHES, B.; VOZÁRIHAMPE, M.M.; HENRIQUES, A.T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porífera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.15, p.16 - 22, 2005.

DUGUE, B.; AUCLAIR, C.; MEUNIER, B. Covalent Binding of Elliptinium Acetate (NSC 264137) to Nucleic Acids of L1210 Cells in Culture. **Cancer Research**, v.46, p. 3828-3833, 1986.

DUNKEL, V.C. ZEIGER, E.; BRUSICK, D.; MCCOY, E.; MCGREGOR, D.; MORTELMANS, K.; ROSENKRANZ, H.S.; SIMMON, V.F. Reproducibility of microbial mutagenicity assay: 1. Test with *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* using a standardized protocol. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, n. 2, p. 1-254, 1984.

DUNKEL, V.C; ZEIGER, E.; BRUSICK, D.; MCCOY, E.; MCGREGOR, D.; MORTELMANS, K.; ROSENKRANZ, H.S.; SIMMON, V.F. Reproducibility of microbial mutagenicity assays: II. Testing of carcinogens and noncarcinogens in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. **Environmental. Mutagenesis** v.7, n. 5, p. 1-248, 1985.

EDENHARDER, R.; TANG, X. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, p. 357-372, 1997.

ESTEVE-SOUZA, A.; FIGUEIREDO, D.V.; ESTEVES, A.; CÂMARA, C.A.; VARGAS, M.D.; PINTO, A.C.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p.1399-1402, 2007.

EKWALL, B.; EKWALL, H. Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing, **Alternatives to laboratory animals**, v.15, p.193–200, 1988.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL A.S.; SOEJARTO D.D.; GUO Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin World Health Organisation**, v.63, 965-981, 1985.

FONSECA, A. M.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G. Total assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora.*, **Magnetic resonance in chemistry.**, v. 41:p. 1038-40, 2002.

FONSECA, A. M., PESSOA, O. D. L., SILVEIRA, E. R., MONTE, F. J., BRAZ-FILHO, R. AND LEMOS, T. L. G. Total assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.41, p.1038-1040, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Toxicological Principles for the Safety Assessment of Direct Food Additives and Color Additives Used in Food “Redbook II”** [Draft]. FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington D.C., 1993.

FREEDBERG, D. **Ciência, Comércio e Arte em o Brasil dos Holandeses 1630-1654**, Herkenhoff, P., org.; GMT Editores Ltda.: Rio de Janeiro, 1999.

FRIEDBERG, E.C. How nucleotide excision repair protects against cancer. **Nature Reviews.**, v.1, p.22-33, 2001.

FUSETANI, N. **Marine metabolites which inhibit development of echinoderm embryos**. In: Scheur PJ, ed. *Biorganic Marine Chemistry*. Berlin: Springer-Verlag, p.61-92, 1987.

GATEHOUSE, D.; HAWORTH, T.; CEBULA, T.; GOCKE, E.; KIER, L.; MATSUSHIMA, T.; MELCION, C.; NOHMI, T.; OHTA, T.; VENITT, S.; ZEIGER, E. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutation Research**, n.312, p.217-233, 1994.

GHISALBERTI, E.L. Detection and isolation of bioactive natural products. In: Coletage, S.M. and Molyneaux, R.J. (eds), **Bioactive natural products: production, detection, isolation and structural determination**. Boca Raton, CRC Press, p.9-57, 1993.

GOGAS, H.J., KIRKWOOD, J.M., SONDAK, V.K. Chemoterapy for metastatic melanoma. Time for a change? **Cancer**, v. 109, p 445-464, 2007.

GOMES-CARNEIRO, M.R.; RIBEIRO-PINTO, L.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Caderno de Saúde Pública**, v.13, p.27-38, 1997.

GONÇALVES DE LIMA, O.; I. L. D'ALBUQUERQUE; P. LOUREIRO; C. L. CARMONA; M. Z. BERNARD. Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora* (Scrophulariaceae), **Revista de Química Industrial**, v. 22 (249), p.1-3, 1953a.

GONÇALVES DE LIMA, O.; I. L. D'ALBUQUERQUE; P. LOUREIRO. Novas observações sobre a biflorina-antibiótico isolado da *Capraria biflora* (Scrophulariaceae), **Anais da Sociedade Biologia Experimental**, XI (1), 3-9., 1953b.

GONÇALVES DE LIMA, O.; I. L. D'ALBUQUERQUE. Método simples de extração e purificação da biflorina, **Revista do Instituto de Antibióticos de Recife**, v.1 (1), p.7-9, 1958.

GONÇALVES DE LIMA, O.; I. L. D'ALBUQUERQUE; NAVARRO, M.C.P. Novo Método de Extração Purificação da Biflorina com Possibilidade Industrial, **Revista do Instituto de Antibióticos de Recife**, v.4 (1/2), p.79-81, 1962.

GONÇALVES DE LIMA, O.; MACIEL, G. M.; OLIVEIRA, L. L.; LACERDA, A. L.; MOREIRA, L. C.; MARTINS, D. G. **Revista do Instituto de Antibióticos de Recife**, v. 12, p. 3—12, 1972.

GUILLÉM, D.G. ALBARRACIN, A., ARQUIOLA, E., ERILL,S., MONTIEL L., PESET, J.L., ENTRALGO, P.L. **Historia del medicamentos**. 4.ed. Doyma. 1987.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HOEIJMARKERS, H.J.J. Genome maintenance mechanism for preventing cancer. **Nature**, v.411, p.366-374, 2001.

HONYCHURCH, P.N. **Caribbean Wild Plants and Their Uses**, Macmillan Publishers Ltd.: London, p. 84, 1986.

INTERNATIONAL COMMISSION ON HARMONIZATION (ICH). **Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals**. International Commission on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1995.

INCA. Incidência de Câncer no Brasil <[www.inca.gov.br/estimativa/2006](http://www.inca.gov.br/estimativa/2006)>. Acessado em 11 de novembro de 2007.

JACOBS, R.S.; WHITE, S.; WILSON, L. Selective compounds derived from marine organisms: effects on cell division in fertilized sea urchin eggs. **Fed Proc** **40**, 26-9, 1981.

JACOBS, R.S., WILSON, L. Fertilized sea urchin egg as a model for detecting cell division inhibitors. In: Aszalor A, ed. **Modern Analysis of Antibiotics**. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 481-493, 1986.

JAMIESON, D.J.; RIVERS, S.L.; STEPHEN, D.W.S. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. **Microbiology**, v.140, p. 3277-3283, 1994.

JIMENEZ, P. C.; FORTIER, S. C.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of experimental marine biology and ecology**, 287, 93 . 101, 2003.

JONES, R.K.; GEWIRTZ, D.A.; YANNONE, S.M.; ZHOU, S.; SCHATZ, D.G.; VALERIE, K.; POVIR, L. F. Radiosensitization of MDA-MB-231 breast tumor cells by adenovirus-mediated overexpression of a fragment of the XRCC4 protein. **Molecular Cancer Therapy**,v.4, p.1541-1547, 2005.

KAUR, S.; MICHAEL, H.; ARORA, S.; HÄRKÖNEN, P.L.; KUMAR, S. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. **Journal of Ethnopharmacology**,v.97 p.15-20, 2005.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research** v. 504, p. 137-148, 2002.

KIRKLAND, D.J. Genetic toxicology testing requirements: official and unofficial views from Europe. **Environmental Molecular and Mutagenesis**, n. 21, p. 8–14, 1993.

KIRKLAND, D.; MARZIN, D. An assessment of the genotoxicity of 2- hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye ingredient of henna. **Mutation Research**, v.573, p.183–199, 2003..

KOVACIC, P. Unifying mechanism for anticancer agents involving electron transfer and oxidative stress: clinical implications. **Medical Hypotheses**, v.69, n.3, p.510-516, 2007.

KRISHNA, G.; URDA, G.; THEISS, J. Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies: a pharmaceutical industry perspective. **Environmental Molecular and Mutagenesis**, v.32, p.115-120, 1998.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS; COTRAN. **Pathology Basis of Disease**, 7th ed. China: WB Saunders, 1552, 2004.

LECOEUR, H.; LEDRU, E.; PRÉVOST, M.C.; GOUGEON, M.L. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. **Journal of Immunological Methods**, v.209, p. 111–123, 1997.

LEVERKUS, M. Imiquimod: unexpected killer. **The Journal of investigative dermatology**, v.122, p. 15-16, 2004.

LI, C.J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A.B. Beta-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, p. 22463-22468, 1993.

LI, J.; CHEN, J.J.; ZHANG, F.; ZHANG, C. Ebselen protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HL- 60 cells, **Acta pharmacologica Sinica**, v.21, p. 455-459, 2000.

LI, QY.; ZU, Y.G.; SHI, R. Z.; LI, P.Y. Review Camptothecin: Current Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 2021-2039, 2006.

LIN, T.S.; ANTONINI, I.; COSBY, L.A.; SARTORELLI, A.C. 2,3-Dimethyl-1,4-naphthoquinone derivatives as bioreductive alkylating agents with cross-linking potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.27, p.813-815, 1984.

LINDAHL, T.; WOOD, R. D.; Quality control by DNA repair. **Science**, v.286, p.1897, 1999.

LOS, M.; BUREK, C.J.; STROH, C.; BENEDYK, K.; HUG, H.; MACKIEWICZ, A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as target for drug design. **Drug Discovery Today**, v. 8, p.67-77, 2003.

LORENZI, H.; F. J. A. MATOS. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, Instituto Plantarum, Nova Odessa-São Paulo, p. 434-435, 2002.

LYRA JÚNIOR, D.P. “Isolamento, Atividade Antifúngica e Validação do Método de Doseamento da 3-prenil-6,9-dimetil-7,8-dioxoquinona - Biflorina”, **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

LU, H.R.; ZHU, H.; HUANG, M.; CHEN, Y.; CAI, Y.J; MIAO, Z.H; ZHANG, J.S.; DING, J. Reactive oxygen species elicit apoptosis by concurrently disrupting topoisomerase II and DNA-dependent protein kinase. **Molecular Pharmacology**, v.68, p.983-994, 2005.

LUU, C. Notes on the traditional pharmacopeia of Fench Guyana. **Plantas Medicinales Phytoterapie**, v.9, p.125-135, 1975.

MACGREGOR, J. T., HEDDLE, J. A., HITE, M., MARGOLIN, B. H., RAMEL, C., SALAMONE, M. F., TICE, R.R. AND WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v.189 p.103-112, 1987.

MARGOTTA, R. **História ilustrada da medicina**. São Paulo, Manole, 1998.



MARZIN, D.; KIRKLAND, D. 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye of Henna, is non-genotoxic in the mouse bone marrow micronucleus test and does not produce oxidative DNA damage in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, v.560, p.41-47, 2004.

MAHRAN, G.; **Medicina Tradicional**, v.1, n.23, 1977.

MARGOLIN, B.H.; RISKO, K.J.; SHELBY M.D.; ZEIGER, E. Sources of variability in Ames' *Salmonella typhimurium* tester strains: analysis of the International Collaborative Study on "Genetic Drift". **Mutation Research**, n.130, p. 11-25, 1984.

MARON, D. M.; AMES, B. M. Revised Methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, n.113, p.173-215, 1983.

MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas-Sistema de Utilização de Plantas Medicinais Projetado Para Pequenas Comunidades**, 4ªedição, Editora UFC, Edições Sebrae, Fortaleza;CE, p.111-113, 2002.

MATSUSHIMA, T.; MURAMATSU, M.; YAGAME, O.; ARAKI, A.; TIKKANEN, L.; NATORI, S. **Mutagenicity and chemical structure relations of naturally occurring mutagens from plants**. In: Ramel, C.; Lambert, B.; Magnusson, J., eds., Progress in Clinical and Biological Research. Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis; 4th International Conference on Environmental Mutagens, Stockholm, Sweden, June 24-28, 1985. New York, Alan R. Liss, Inc., p. 133-140, 1986.

MCCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection of carcinogens in the *Salmonella*/microsome test. Assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.72, p. 5135–5139, 1975.

MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. M.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y., MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K. & GREEN, D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in Cell Biology**, v. 46, p. 153-185, 1995.

MCCLENDON, A.K. & OSHEROFF, N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. **Mutation Research**, v. 623, p.83-87, 2007.

MIAO, Z.H.; TONG, L.J.; ZHANG, J.S.; HAN, J.X.; DING, J. Characterization of salvicine-resistant lung adenocarcinoma A549/SAL cell line. **International Journal of Cancer**, v.110, p.627-632, 2004.

MIAO, Z.H.; TANG, T.; ZHANG, Y.X.; ZHANG, J.S.; DING, J.; Cytotoxicity, apoptosis induction and downregulation of MDR-1 expression by the anti-topoisomerase II agent, salvicine, in multidrug-resistant tumor cells. **International Journal of Cancer**, v.106, p.108–115, 2003.

MOLYNEUX, P.; Songklanakarin, J. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Science Technology**, v. 26, p. 211-219, 2004.

MONTENEGRO, R.C.; JIMENEZ, P.C.; FARIAS, R.A.F.; ANDRADE-NETO, M.; BEZERRA, F.S.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic activity of pisosterol, a triterpene isolated from *Pisolithus tinctorius* (Mich.: Pers.) Coker & Couch, 1928". **Z Naturforsch**, v. 59c, p.519-22, 2004.

MORAIS, N. M. T; NOGUEIRA, C. M. D; LOPES, M. F. G.; VASCONCELOS, N. M. S; SÁ, M. J. H. C.(1995) Estudo Inorgânico Analítico de Plantas Medicinais, **Anais Associação. Brasileira de. Química**, v. 44 (4), p. 14-19, 1995.

MORTON, J.F. **A Survey of Medicinal Plants of Curacao**, Economic botany., v. 22, p. 87-102, 1968.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, 16, 55-63, 1983.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, n. 455, p.29-60, 2000.

MURCIA, G.; MURCIA, M. J. Poly (ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. **Trends in Biochemical Science**, v.19, p.172-176, 1994.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853, 2000.

NASCIMENTO, S.C., J.F. MÉLLO & A.A. CHIAPPETA. Agentes citotóxicos experimentos com células KB. **Revista Instituto de Antibióticos de Recife**, v, 22: p.19-26, 1984.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberrations: past present and future. **Mutation Research** v.504, p.3-16, 2002.

NEWMAN, D.J. & CRAGG, M.G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural products**, v.70, p.461- 477, 2007.

NYAGA, S.G.; JARUGA, P.; LOHANI, A.; DIZDAROGLU, M.; EVANS, M.K. Accumulation of Oxidatively Induced DNA Damage in Human Breast Cancer Cell Lines Following Treatment with Hydrogen Peroxide. **Cell Cycle**, v. 6, p. 1472-1478, 2007.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). **Guideline for Testing of Chemicals**, Test Guideline 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD, Paris, France, 1997.

ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicology Letters**, v. 149, p.19, 2004.

PARDEE, A.B., LI, Y.Z.; LI, C.J. Cancer therapy with beta-lapachone. **Currents Cancer Drugs Targets**, v.2, p.227-242, 2002.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E.R.; LEMOS, T.L.G.; WETMORE, L.A.; MORAES, M.O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of northeast Brazil. **Phytotherapia Research**, v. 14, p.187-191, 2000.

PERA, F., MATTIAS, P., DETZER. Methods for determining the proliferation kinetics of cells by means of 5-bromodeoxyuridine. **Cell Tissue Kinetics** 10, 255-264, 1977.

PERERA, F.P. Enviroment and Cancer: Who are susceptible? **Science**. v.278, 1997.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, v.18, p. 608-615, 1995.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p.45-61, 2002.

POOL-ZOBEL B.L.; LOTZMANN, N; KNOLL, M; KUCHENMEISTER, F; LAMBERTZ, R; LEUCHT, U; SCHRODER, H.G.; SCHMEZER, P. Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. **Environmental Molecular and Mutagenesis**, v.24, n.1, p.23-45. 1994.

POMMIER, Y.; REDON, C.; RAO, V.A.; SEILER, J.A; SORDET, O.; TAKEMURA, H.; ANTONY, S.; MENG, L.; LIAO, Z.; KOHLHAGEN, G.; ZHANG, H.; KOHN, K.W. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. **Mutation Research**, v.27, Review, p.173-203, 2003.

PURCHASE, I.F.H.; LONGSTAFF, E.; ASHBY, J.; STYLES, J.A.; ANDERSON, D.; LEFEVRE, P.A.; WESTWOOD, F.R.; An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. **British Journal of Cancer**, v. 37, p. 873–959, 1978.

QUAGLIANA, J.M.; STEPHENS, R.L.; BAKER, L.H.; COSTANI, J.J. Vindesine in patients with metastatic malignant melanoma: **Journal of Clinical Oncology**, v 2, 316-319,1984

RABINOVIC, A.D.; LEWIS, D.A.; HASTINGS, T. Role of oxidative changes in the degeneration of dopamine terminals after injection of neurotoxic levels of dopamine. **Neuroscience**, v.101, p.67-76, 2000.

RAMIREZ, V.R.; MOSTACERO, L. J.; GARCIA, A. E.; MEJIA, C.F. Vegetales empregados em medicina tradicional norperuana. **Banco Agrio del Peru & Nacional Universidade Trujillo**, p. 54, 1988.

RAUF, S., GOODING, J.J., AKHTAR, K., GHOURI, M.A., RAHMAN, M., ANWAR, M.A., KHALID, A. M.: Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analytical.**, v.37, p.205, 2005.

RENZI, D., VOLTOLINA M., FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA.**, v. 21, p.89-96, 1993.

RHEINBOLDT, H. Em **As Ciências no Brasil**; Azevedo, F. de, ed.; Melhoramentos: São Paulo, v.2, cap. VIII, 1955.

ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; SILVA, A.C.R.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. **Mutation Research**, v. 631, p. 44–54, 2007.

RUTTIMANN, A. Recent advances in the synthesis of K-vitamins[J]. **Chimia**, v.40 p.290-306. 1986.

FERREIRA, C.G. & ROCHA, J.C. Em **Oncologia Molecular**, Atheneu, 2004

SALMONM, S.E. Em **Farmacologia Básica & Clínica**, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, p. 629-655, 1998.

SCOFIELD, D. <[http://www.cassiakeyensis.com/sofl\\_plants/med\\_Capriariabiflora.html](http://www.cassiakeyensis.com/sofl_plants/med_Capriariabiflora.html)>, 2002.

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology & Therapeutics**, v.1, p. 411 - 435, 1977.

SERPA, J. Cadidíase cutâneas na criança, **Anais da Faculdade de Medicina Universidade de Recife**, 18 (2), 275-88, 1958.

SCHULLER, R. C. AND VON BORSTEL, R. C. Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration. **Mutation Research**, v.24, p.17-23, 1974

SEIBERT, H.; BALL, M.; FENTEM, J.; BIANCHI, V.; CLOTHIER, R.; DIERICKX, P.; EKWALL, B.; GARLE, M.; GÓMEZ-LECHÓN, M.; GRIBALDO, L.; GULDEN, M.; LIEBSCH, M.; RASMUSSEN, V.; ROGUET, R.; SHRIVASTAVA, R.; WALUM, E. Acute toxicity testing in vitro and the classification and labeling of chemicals, **Alternatives to laboratory animals**, v.24, p.499-510, 1996.

SILVA, R.L.A. Oncogenes e Genes Supressores de Tumor. Em: **Oncologia Molecular**, p.29, 2004.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research** p.184-191, 1998.

SOFUNI, T. Japanese guidelines for mutagenicity testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 21, p. 2-7, 1993.

SOUZA, M.V.N.; Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v.27, p.308-312, 2004.

STRASSER, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.5, p.189-200, 2005.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). **Mutagenesis**, v.10, n.6, p.555-559, 1995.

SUGIMURA, T.; SATO, S.; NAGAO, M.; YAHAGI, T.; MATSUSHIMA, T.; SEINO, Y.; TAKEUCHI, M.; KAWACHI, T. Overlapping Of Carcinogens And Mutagens, In: P.N. Magee, S. Takayama, T. Sugimura, T. Matsushima (Eds.), **Fundamental of Cancer Prevention**, University Park Press, Baltimore, p.191-215, 1976.

TEICHER, B.A. In: **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, DeVita VT, Hellman S and Rosenberg SA (eds). Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, p. 405–418, 1997.

TENNANT, R.W.; MARGOLIN, B.H.; SHELBY, M.D.; ZEIGER, E.; HASEMAN, J.K.; SPALDING, J.; RESNICK, W.; STASIEWICZ, M.; ANDERSON, B.; MINOR, R. Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. **Science**. n.236, p.933–941, 1987.

THOMPSON, R. H. In: **Naturally Occuring Quinones IV: Recent Advances**; Champman & Hall: London, 1997.

TICE, R.R, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, MIYAMAE Y, ROJAS E, RYU J.C., SASAKI Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagen.**, v.35, p.206-221, 2000.

TORNATELLI, S.; HANAWALT, P.C. Effect of DNA lesions on transcription elongation. **Biochemie.**, v.81, p.133-146, 1999.

TORTI, V. R.; COBB, A.J.; EVERITT, I.J.; MARSHALL, M.W.; BOORMAN, G.A.; BUTTERWORTH, B. E. Nephrotoxicity and Hepatotoxicity Induced by Inhaled Bromodichloromethane in Wild-Type and p53-Heterozygous Mice. **Toxicological Science**, v.64, p 269-280, 2001.

TUTHILL, C. W.; LIU, Y.; CAI, Q.; WANG, H.; KUNG, A. Effect of the immune modulating peptide, SCV-07, in the murine B16 melanoma model. **Journal of Clinical Oncology**, ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. v.25, n.18, p. 13514, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VALLE, J. R.; **A Farmacologia no Brasil, Antecedentes e Perspectivas**, Academia de Ciências do Estado de São Paulo: São Paulo, 1978.

VANNI, A.; FIORE, M.; SALVIA, R.; CUNDARI, E.; RICORDY, R.; CECCARELLI, R.; DEGRASSI, F. DNA damage and cytotoxicity induced by b-lapachone: relation to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. **Mutation Research**, v. 401, p. 55-63, 1998.

VAN DELFT, J.H.M.; VAN AGEN, E.; VAN BREDA, S.G.J.; HERWIJNEN, M.H.; STAAL, Y.C.M.; KLEINJANS, J.C.S. Discrimination of genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling. **Carcinogenesis**, v. 25, p.1265-1276, 2004.

VOLLMERS, H.P.; BRANDLEINS, S. Death by stress: antibody induces apoptosis. **Methods and Findings Experimental Clinical pharmacology**, v.27, p.185, 2005.

VOLLMERS, H.P.; BRANDLEINS, S. Natural antibodies and cancer. **Journal of Autoimmunity**, v.29, p.295-302, 2007.

ZEIGER, E.; ANDERSON, B.; HAWORTH, S.; LAWLOR, T.; MORTELMANS, K.; SPECK, W. *Salmonella* mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals. **Environmental Mutagenesis**, v.9, p.100-110, 1987.

ZEIGER, E. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. **Regulatory toxicology and pharmacology**, n.28, p. 85-95, 1998

ZHANG, J.S.; DING, J.; TANG, Q.M.; LI, M.; ZHAO, M.; LU, L.J.; CHEN, L.J.; YUAN S.T.; Synthesis and antitumour activity of novel diterpenequinone salvicine and the analogs. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v.9, p.2731-2736, 1999.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S.C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, v.175, p.17-25, 2002.