

WENDEL MATTOS POMPILHO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE TRÊS ESPÉCIES  
VEGETAIS NATIVAS DA FLORESTA ATLÂNTICA

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

WENDEL MATTOS POMPILHO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE TRÊS ESPÉCIES  
VEGETAIS NATIVAS DA FLORESTA ATLÂNTICA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de Fevereiro de 2011.

\_\_\_\_\_  
Prof. Aloísio da Silva Pinto  
(Coorientador)

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Marisa Alves Nogueira Diaz

\_\_\_\_\_  
Pesq. Emílio de Castro Miguel

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientadora)

Dedico este trabalho aos meus Pais, Maria Aparecida e Ilson!

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Ilson e Maria Aparecida, pelo apoio e motivação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia, pela orientação e confiança nestes quatro anos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola pela oportunidade concedida.

Às amigas do Biofármacos, Anna Paula, Luana, Priscila pelo carinho e amizade. Ao Hécio pela força na reta final deste trabalho.

Aos amigos e companheiros do Programa de Bioquímica Agrícola, Larissa, Luciana, Rafael, Ritinha, Rony, Patrícia.

Ao Eduardo, secretário da pós-graduação em Bioquímica Agrícola, pelas orientações nos trâmites burocráticos.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Milton Kanashiro do laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) da Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro (UENF) pela coorientação e oportunidade de utilizar a infra-estrutura de seu laboratório.

Ao amigo Franz pelo grande auxílio na aquisição de novos conhecimentos em cultura de células. Por não medir esforços para me ajudar na realização dos experimentos. A Thais pela sua colaboração nos experimentos com a LDH.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maura da Cunha do laboratório de Biologia Celular (LBCT – Setor de Biologia Vegetal) da UENF pela amizade e por abrir as portas de seu laboratório.

Ao grande amigo Emílio, pelo companheirismo, e principalmente pelas contribuições indispensáveis na realização desse trabalho.

Ao Lúcio Leoni pelo auxílio na coleta e identificação das espécies vegetais.

Aos amigos da Universidade Iguaçu – *Campus V*.

À todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a concretização desse trabalho e cujos nomes não foram citados aqui.

Por fim agradeço a Deus, pela saúde e força nestes anos.

**Obrigado a todos!**

## BIOGRAFIA

Nascido em São João do Meriti, Rio de Janeiro, 14 de novembro de 1979, filho de Maria Aparecida Mattos Pompilho e Ilson Lacerda Pompilho.

Graduado em Ciências Biológicas – Modalidade Biociências – Ênfase em Biologia Celular pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em fevereiro de 2004. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Química Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) desenvolvendo projeto na área de bioquímica e fisiologia de insetos.

Em maio de 2006, concluiu o Mestrado em Biociências & Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular, pela UENF. Durante o mestrado, desenvolveu projeto na área de metabolismo de lipídeos em insetos.

Em 23 de fevereiro de 2007, foi admitido no Doutorado do programa de pós-graduação em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, onde apresentou tese intitulada: *Avaliação in vitro* da Atividade Antitumoral de Três Espécies Vegetais Nativas da Floresta Atlântica, em 25 de fevereiro de 2011.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
<b>1 – Introdução</b> .....	1
<b>2 – Revisão de Literatura</b> .....	3
2.1 - Câncer: Definição, dados epidemiológicos e fatores relacionados à sua origem .....	3
2.1.1 – Tumores Benignos e Malignos .....	5
2.1.2 – O Ciclo Celular .....	8
2.1.3 – Protooncogenes e Genes Supressores de Tumor .....	10
2.1.4 – Apoptose .....	12
2.2 – A Busca de Novos Fármacos com Atividade Antineoplásicas .....	19
2.2.1 – A Importância das Plantas Medicinais na Consolidação dos Modelos experimentais <i>in vitro</i> .....	19
2.2.2 – Metabólitos Secundários de Plantas com Propriedades Antineoplásicas .....	21
2.2.2.1 – Alcalóides: Estrutura, Função e Propriedades Antineoplásicas .....	23
2.2.2.2 – Acetogeninas: Estrutura, Função e Propriedades Antineoplásicas .....	27
2.2.2.3 – Lignanas: Estrutura, Função e Propriedades Antineoplásicas .....	28
2.2.2.4 – Flavonóides: Estrutura, Função e Propriedades Antineoplásicas .....	29
2.3 - Floresta Atlântica .....	34
2.3.1 - <i>Trigynaea oblongifolia</i> Schltld (Annonaceae) .....	35
2.3.2 - <i>Ottonia frutescens</i> Trel (Piperaceae) .....	36
2.3.3 - <i>Bathysa australis</i> (St Hill) Hooz (Rubiaceae) .....	38
<b>3 – Objetivos</b> .....	40
3.1 - Objetivo Geral .....	40
3.2 – Objetivos Específicos .....	40

<b>4 – Materiais e Métodos</b> .....	42
4.1 - Área de coleta do material botânico .....	42
4.2 - Material Botânico .....	42
4.3 – Microscopia do material botânico .....	42
4.3.1 - Microscopia Óptica .....	42
4.3.2 – Histoquímica .....	43
4.3.2.1 – Compostos ácidos e básicos .....	43
4.3.2.2 – Proteínas totais .....	44
4.3.2.3 – Lipídios .....	44
4.3.2.4 – Compostos Fenólicos .....	44
4.3.2.5 – Compostos Pécnicos .....	44
4.3.2.6 – Alcalóides .....	44
4.3.2.7 – Compartimentos Ácidos .....	45
4.3.3 – Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	45
4.3.4 – Microscopia Eletrônica de Varredura .....	45
4.3.4 – Preparação do Extrato Vegetal .....	46
4.3.5 – Prospecção fitoquímica dos extratos .....	46
4.3.6 – Avaliação da atividade antioxidante pelo teste do DPPH .....	47
4.3.7 – Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> .....	48
4.3.8 – Cultura da linhagem de célula de origem tumoral .....	50
4.3.9 – Avaliação <i>in vitro</i> da atividade biológica dos extratos frente às células tumorais .....	50
4.3.10 – Avaliação do efeito citotóxico dos extratos frente às células tumorais .....	50
4.3.11 – Quantificação da Lactato desidrogenase (LDH) liberada pelas células após incubação com os extratos .....	51
4.3.12 – Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência .....	51
4.3.13 – Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) .....	53
4.3.14 – Avaliação da toxicidade dos extratos frente às Células Mononucleares do Sangue Periférico .....	54
4.3.15 – Análise estatística .....	54
<b>5 – Resultados</b> .....	55
5.1 – Descrição da lâmina foliar .....	55

5.1.1 – Micromorfologia .....	55
5.1.2 - Anatomia foliar .....	57
5.1.3 – Histoquímica Foliar .....	59
5.1.4 – Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	62
5.2 - Estimativas de rendimento de matéria verde, seca e teor de água ...	64
5.3 - Prospecção fitoquímica .....	64
5.4 - Determinação da atividade antioxidante dos extratos .....	65
5.5 – Análise Toxicológica dos Extratos Frente ao Microcrustáceo <i>Artemia salina</i> .....	65
5.6 – Efeito dos Extratos na Viabilidade Celular .....	68
5.7 – Quantificação da Lactato Desidrogenase – LDH .....	70
5.8 - Avaliação da indução de apoptose e necrose em linhagens de células tumorais frente aos extratos .....	73
5.9 – Determinação da concentração letal 50 dos extratos .....	79
<b>6 – Discussão</b> .....	80
<b>7 – Conclusões</b> .....	99
<b>8 – Referências Bibliográficas</b> .....	100

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estimativas de casos novos de câncer em 2011, válidas para o sexo masculino .....	4
<b>Figura 2:</b> Estimativas de casos novos de câncer em 2011, válidas para o sexo feminino .....	4
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo das fases do ciclo celular .....	8
<b>Figura 4:</b> Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose .....	13
<b>Figura 5:</b> Mecanismo apoptótico em <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	14
<b>Figura 6:</b> Ativação da via extrínseca da apoptose .....	14
<b>Figura 7:</b> Ativação da via intrínseca da apoptose .....	15
<b>Figura 8:</b> Esquema representando a sinalização completa das seqüências de eventos da apoptose .....	16
<b>Figura 9:</b> Esquema mostrando as vias de síntese dos flavonóides .....	23
<b>Figura 10:</b> Classificação dos Alcalóides .....	26
<b>Figura 11:</b> Asitrocina - Acetogenina de Annonaceae .....	28
<b>Figura 12:</b> Estrutura química da podofilotoxina .....	29
<b>Figura 13:</b> A - Estrutura básica dos flavonóides e B - Estrutura básica dos flavonóides com grupo carbonila no C-4 .....	31
<b>Figura 14:</b> Microscopia de Fluorescência de células U937 .....	52
<b>Figura 15:</b> Microscopia eletrônica de varredura das folhas de <i>Bathysa australis</i> , <i>Ottonia frutescens</i> e <i>Trigynaea oblongifolia</i> .....	56
<b>Figura 16:</b> Microscopia óptica da lâmina foliar de <i>Bathysa australis</i> , <i>Ottonia frutescens</i> e <i>Trigynaea oblongifolia</i> .....	58
<b>Figura 17:</b> Microscopia óptica dos cortes da lâmina foliar, submetidos aos testes histoquímicos, de <i>Bathysa australis</i> , <i>Ottonia frutescens</i> e <i>Trigynaea oblongifolia</i> .....	60
<b>Figura 18:</b> Microscopia eletrônica de transmissão da folha de <i>Trigynaea oblongifolia</i> , <i>Bathysa australis</i> e <i>Ottonia frutescens</i> .....	63
<b>Figura 19:</b> Taxas de mortalidade de náupilos de <i>Artemia salina</i> em função da concentração de extrato <i>Ottonia frutescens</i> .....	66
<b>Figura 20:</b> Taxas de mortalidade de náupilos de <i>Artemia salina</i> em função da concentração de extrato <i>Trigynaea oblongifolia</i> .....	67

<b>Figura 21:</b> Taxas de mortalidade de náupilos de <i>Artemia salina</i> em função da concentração de extrato <i>Bathysa australis</i> .....	67
<b>Figura 22:</b> Efeito citotóxico dos extratos de <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> , e <i>Bathysa australis</i> frente linhagem de células leucêmicas humanas U937 após 24 horas de incubação .....	69
<b>Figura 23:</b> Efeito citotóxico dos extratos de <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> , e <i>Bathysa australis</i> frente linhagem tumoral de células de COLO 205 após 24 horas de incubação .....	69
<b>Figura 24:</b> Efeito citotóxico dos extratos de <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> , e <i>Bathysa australis</i> frente às células humanas normais (PBMC) após 24 horas de incubação .....	70
<b>Figura 25:</b> Efeito citotóxico dos extratos de <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> , e <i>Bathysa australis</i> frente às células leucêmicas U937 após 24 horas de incubação .....	71
<b>Figura 26:</b> Efeito citotóxico dos extratos de <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> , e <i>Bathysa australis</i> frente as frente linhagem tumoral de células de COLO 205 após 24 horas de incubação .....	72
<b>Figura 27:</b> Efeito citotóxico dos extratos de <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> , e <i>Bathysa australis</i> frente as frente às células humanas normais (PBMC) após 24 horas de incubação .....	72
<b>Figura 28:</b> Porcentagem de apoptose induzida pelos extratos <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> e <i>Bathysa australis</i> frente a duas linhagens de células humanas U937 e COLO 205 .....	75
<b>Figura 29:</b> Porcentagem de necrose induzida pelos extratos <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> e <i>Bathysa australis</i> frente a duas linhagens de células humanas U937 e COLO 205 .....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas de <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> e <i>Bathysa australis</i> .....	47
<b>Tabela 2:</b> Histoquímica da lâmina foliar de <i>Bathysa australis</i> , <i>Ottonia frutescens</i> e <i>Trigynaea oblongifolia</i> .....	61
<b>Tabela 3:</b> Rendimento do material botânico .....	64
<b>Tabela 4:</b> Resultado da prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos das folhas de <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> , <i>Bathysa australis</i> .....	64
<b>Tabela 5:</b> Porcentagem da atividade antioxidante dos extratos metanólicos de folhas de <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> , <i>Bathysa australis</i> .....	65
<b>Tabela 6:</b> Concentração letal 50 dos extratos de <i>Ottonia frutescens</i> , <i>Trigynaea oblongifolia</i> e <i>Bathysa australis</i> .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCD – cromatografia em camada delgada  
CDKs – Ciclinas  
CK-2 – caseína quinase-2  
CL<sub>50</sub> – concentração letal  
D.O. – Densidade Óptica  
DPPH - 1,1-difenil-2-picrilidrazil  
G0 - A fase em que as células estão fora do ciclo celular  
G1 - *Gap1*  
G2 - *Gap2*  
IARC – International Agency for Research on Cancer  
INCA – Instituto Nacional do Câncer  
LDH – Lactato desidrogenase  
MaB – Man and Biosphere  
MAPs – Microtubule associated proteins  
MTT – [3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5- difenil-2-H-brometo de tetrazolium]  
ONU – Organização Mundial de Saúde  
PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico  
PBS – Tampão Salina Fosfato  
PKA – proteína kinase A  
S - *synthesis (fase de síntese do ciclo celular)*  
SUS – Sistema Único de Saúde  
TNF – fator de necrose tumoral  
UNESCO – Organização das Nações Unidas para a Educação Ciência e Cultura  
WHO – World Health Organization

## RESUMO

POMPILHO, Wendel Mattos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2011. **Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral de três espécies vegetais nativas da Floresta Atlântica.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientadores: Tanus Jorge Nagem, Milton Masahiko Kanashiro e Aloísio da Silva Pinto.

O câncer tem por principal característica o crescimento desordenado e difuso de células anormais. É uma das maiores causas de mortalidade no mundo e, neste contexto, a cada dia aumenta o número de trabalhos relatando a importância das plantas como fonte de compostos farmacologicamente ativos. Sendo assim, neste trabalho foram selecionadas três espécies de plantas nativas da Floresta Atlântica, a saber: *Trigynaea oblongifolia* Schltidl (Annonaceae), *Ottonia frutescens* Trel (Piperaceae), *Bathysa australis* (St Hill) Hooz (Rubiaceae). Para cada uma das espécies foi caracterizada a anatomia e ultraestrutura de sua lâmina foliar; bem como avaliado, *in vitro*, toxicidade de seus extratos metanólicos (das folhas) frente ao microcrustáceo *Artemia salina*; e a citotoxicidade em linhagens de células tumorais humanas - U937 e COLO 205, e células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC). Os extratos tiveram seu potencial antioxidante avaliado e a composição de metabólitos secundários identificada. Os principais resultados foram: A anatomia da lâmina foliar das três espécies apresenta características condizentes aos seus respectivos gêneros. OS extratos de *O. frutescens* e *B. australis* apresentaram as seguintes classes de metabólitos secundários: Alcalóide, Antraquinonas, Cumarinas, Polifenóis (Taninos), Saponina. Nos extratos de *T. oblongifolia*, além dos metabólitos citados anteriormente foi detectada a presença de Flavonóides. A atividade antioxidante, observada em 30 minutos, na Concentração 24 µg/mL de extrato foi de: *O. frutescens* - 38,3%, *T. oblongifolia* - 32,3%, e *B. australis* - 32,1%. A Concentração Letal, CL<sub>50</sub>, dos extratos em *Artemia salina* foi de: *O. frutescens* - 149,75 ± 1,02 µg/mL, *T. oblongifolia* - 148,8 ± 1,74 µg/mL, e *B. australis* - 684 ± 9,04 µg/mL. Os extratos induzem apoptose em células tumorais de maneira dose dependente. Sendo que, em 36 horas a concentração de 400 µg/mL induziu necrose nas células COLO 205. Neste contexto, é importante destacar que

espécies nativas da Floresta Atlântica apresentam grande valor na bioprospecção de moléculas ativas no combate ao câncer.

## ABSTRACT

POMPILHO, Wendel Mattos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Evaluation of *in vitro* antitumor activity of three plant species native to the Atlantic Forest.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-advisers: Tanus Jorge Nagem, Milton Masahiko Kanashiro and Aloísio da Silva Pinto.

Cancer whose main characteristic diffuse and uncontrolled growth of abnormal cells. It is a major cause of mortality worldwide and in this context, each day increases the number of papers reporting the importance of plants as a source of pharmacologically active compounds. Thus, this study selected three species of plants native to the Atlantic Forest, as follows: *Trigynaea oblongifolia* Schltld (Annonaceae), *Ottonia frutescens* Trel (Piperaceae), *Bathysa australis* (St Hill) Hooz (Rubiaceae). For each species was characterized anatomy and ultrastructure of its leaf, as well as evaluated *in vitro* toxicity of their methanol extracts (from leaves) compared to *Artemia salina*, and cytotoxicity in human tumor cell lines - U937 and COLO 205, and peripheral blood mononuclear cells of human (PBMC). The extracts were assessed its antioxidant activity and composition of secondary metabolites identified. The main results were: The anatomy of the leaf blade of the three species has characteristics suitable to their respective genres. Extracts of *O. frutescens* and *B. australis* showed the following classes of secondary metabolites: An alkaloid, anthraquinones, coumarins, polyphenols (tannins), Saponin. In extracts of *T. oblongifolia*, besides the aforementioned metabolites detected the presence of flavonoids. The antioxidant activity was observed in 30 minutes, the concentration 24 µg/mL extract was: *O. frutescens* - 38.3%, *T. oblongifolia* - 32.3%, and *B. australis* - 32.1%. The lethal concentration, LC50, extracts of brine shrimp was: *O. frutescens* - 149.75 ± 1.02 µg/mL, *T. oblongifolia* - 148.8 ± 1.74 µg/mL, and *B. australis* - 684 ± 9.04 µg/mL. The extracts induce apoptosis in tumor cells in a dose-dependent. Since, in 36 hours the concentration of 400 µg/mL induced necrosis in COLO 205 cells. In this context it is important to note that species native to the Atlantic Forest have great value in bioprospecting of molecules active in fighting cancer.

## 1 – Introdução

O câncer tem por característica o crescimento desordenado e difuso de células anormais, causado por diversos fatores, sendo eles externos (como produtos químicos, tabaco, radiações e infecções por microorganismos) ou internos (como mutações herdadas, hormônios, condições imunológicas e mutações que podem ocorrer durante o metabolismo). Fatores como esses podem promover o início da carcinogênese, atuando juntos ou em sequência (COTRAN *et al.*, 2000).

A carcinogênese é um processo complexo envolvendo alterações genéticas nos proto-oncogenes e nos genes supressores de tumor, tais genes estão envolvidos no controle da proliferação celular, evitando o comportamento maligno das células. Sem a ação adequada destes sistemas de controle a célula mutante sofre uma proliferação anormal que leva a formação de uma população de células tumorais que crescem ativamente (ALBERTS *et al.*, 2009; WEINBERG, 2008).

No processo de progressão tumoral, algumas células do tumor primário perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, entram na circulação, e formam áreas de proliferação em outros tecidos. Esse processo é denominado metástase (WEINBERG, 2008).

Para o ano de 2008, a Organização Mundial de Saúde estimou que ocorressem 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão, mama, cólon e reto. Para América do Sul, América Central e Caribe, estimou-se que em 2008 cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos (WHO, 2009).

Diante desse cenário, fica clara a necessidade de investimentos em pesquisas que busquem moléculas bioativas que atuem no combate ao câncer.

A diversidade biológica disponível na natureza é uma fonte inesgotável de compostos farmacologicamente ativos (ROCHA *et al.*, 2001). O Brasil é detentor de uma megadiversidade biológica disponível em vários biomas, dentre eles destacamos a Floresta Atlântica brasileira como um potencial fornecedor de novos agentes terapêuticos contra câncer.

A análise da literatura revela que o metabolismo secundário de plantas representa uma importante fonte de moléculas bioativas no combate ao câncer (BOYD & PAULL, 1995; ERDEMOGLU, *et al.*, 2004; HOLBECK, 2004; MANN, 2002; PARDHASARADHI *et al.*, 2005).

A elucidação dos componentes ativos presente nas plantas, bem como o seu mecanismo de ação, é um grande desafio enfrentado pela química farmacêutica, bioquímica e farmacologia, entre outras ciências. As plantas contêm inúmeros constituintes químicos e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (WATTENBERG, 1985).

Uma etapa obrigatória antes dos estudos clínicos de um potencial agente antitumoral é a demonstração de sua capacidade de inibir o crescimento tumoral em modelos *in vitro* e *in vivo*. Desta forma é importante ressaltar que o domínio das técnicas de cultura celular oriundas de tumores humanos contribuiu para o desenvolvimento das técnicas de triagem de produtos naturais *in vitro* (SKEHAN, *et al.*, 1990; MONKS, *et al.*, 1991; RUBINSTEIN, *et al.*, 1991).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo, caracterizar a anatomia e a ultraestrutura de folhas de *Trigynaea oblongifolia* Schltdl (Annonaceae), *Ottonia frutescens* Trel (Piperaceae), *Bathysa australis* (St Hill) Hooz (Rubiaceae) e avaliar *in vitro* a atividade citotóxica de extratos das folhas frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach, bem como em células de origem tumoral humana, e células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC).

## 2 - Revisão de Literatura

### 2.1 – Câncer: Definição, dados epidemiológicos e fatores relacionados à sua origem

A origem do termo câncer vem do latim *cancris*, que significa caranguejo. Este nome foi dado a essa doença devido à semelhança com que este crustáceo se adere firmemente à sua presa, assim como o tumor se adere ao local do corpo onde se desenvolve (BOLD *et al.*, 1997).

Provavelmente, o mais antigo reconhecimento da ocorrência de câncer em seres humanos refere-se à descrição encontrada em papiros do antigo Egito, datados de 1500 a.C, referentes às úlceras cutâneas resistentes a tratamentos. Ao longo dos anos, marcos importante no estudo do câncer foram registrados, como a classificação de Galeno, no ano de 150 de nossa era, que incluía os hoje conhecidos tumores benignos e malignos (DAGLI, 1989).

O câncer pode ser genericamente definido como tumor ou neoplasma. Neoplasma (do grego *neos* – novo; e *plasma* – algo formado) significa "novo crescimento" (HARRISON *et al.*, 2008). Neoplasia é uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excede e não está coordenada ao crescimento dos tecidos normais e que persiste mesmo cessada a causa que a provocou (BAAK *et al.*, 2003).

Todos os anos são relatados inúmeros casos de Câncer no Mundo. No Brasil, as estimativas para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil observado para toda América Latina (BRASIL, 2009).

Em 2011, são esperados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), colorretal (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (BRASIL, 2009).

Os tumores mais incidentes para o sexo masculino (Figura 1) serão devidos ao câncer de pele não melanoma (53 mil casos novos), próstata (52 mil), pulmão (18 mil), estômago (14 mil) e colorretal (13 mil). Para o sexo feminino (Figura 2), destacam-se os tumores de pele não melanoma (60 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (18 mil), colorretal (15 mil) e pulmão (10 mil) (BRASIL, 2009).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	52.350	53,84	14.050	66,25
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.800	18,37	4.980	23,53
Estômago	13.820	14,25	3.490	16,48
Cólon e Reto	13.310	13,73	4.570	21,61
Cavidade Oral	10.330	10,64	2.920	13,74
Esôfago	7.890	8,12	1.610	7,37
Leucemias	5.240	5,40	1.440	6,84
Pele Melanoma	2.960	3,04	850	3,72
Outras Localizações	59.130	61,01	18.590	87,67
<b>Subtotal</b>	<b>182.830</b>	<b>188,66</b>	<b>52.500</b>	<b>247,59</b>
Pele não Melanoma	53.410	55,12	11.880	55,97
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>236.240</b>	<b>243,77</b>	<b>64.380</b>	<b>303,50</b>

**Figura 1: Estimativas de casos novos de câncer em 2011, válidas para o sexo masculino.** Incidência por 100 mil das taxas brutas. Os números foram arredondados para 10 ou múltiplos de 10 (BRASIL, 2009).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	49.240	49,27	17.540	74,56
Colo do Útero	18.430	18,47	5.280	22,50
Cólon e Reto	14.800	14,80	5.530	23,54
Traqueia, Brônquio e Pulmão	9.830	9,82	3.130	13,37
Estômago	7.680	7,70	2.340	9,94
Leucemias	4.340	4,33	1.330	5,52
Cavidade Oral	3.790	3,76	1.090	4,48
Pele Melanoma	2.970	2,92	860	3,38
Esôfago	2.740	2,69	660	2,55
Outras Localizações	78.770	78,83	28.510	121,33
<b>Subtotal</b>	<b>192.590</b>	<b>192,74</b>	<b>66.270</b>	<b>282,03</b>
Pele não Melanoma	60.440	60,51	12.800	54,45
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>253.030</b>	<b>253,23</b>	<b>79.070</b>	<b>336,52</b>

**Figura 2: Estimativas de casos novos de câncer em 2011, válidas para o sexo feminino.** Incidência por 100 mil das taxas brutas. Os números foram arredondados para 10 ou múltiplos de 10 (BRASIL, 2009).

Os principais fatores que favorecem o aparecimento do câncer são: influências ambientais (poluição do ar e água), e agentes físicos (radiação ultravioleta e ionizante); químicos (aflatoxinas); e biológicos (vírus). Existindo também as influências culturais (alimentação, estresse e tabagismo); raciais

(predisposição genética); e principalmente fatores como a idade e a hereditariedade que podem culminar em sucessivas mutações, contribuindo para o aparecimento de diversas neoplasias (COTRAN *et al.*, 2000; MADELAINE & ZALCMAN, 2005; GRIFFITHS, *et al.*, 2008).

A dieta possui uma grande contribuição na etiologia e prevenção do câncer. A literatura reconhece que os fatores dietéticos representam cerca de 30% das causas de câncer e, no caso de câncer de cólon, essa porcentagem sobe para 80%. Quando se adiciona consumo de álcool e cigarro à dieta, ocorre um aumento para 60%. Predisposição genética ao câncer está associada a 20% dos casos (GREENWALD *et al.*, 2001; PADILHA & PINHEIRO, 2004).

Existem, aproximadamente, 200 tipos de câncer que correspondem aos vários tipos de células do corpo, e diferenciam-se pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (WEINBERG, 2008). Tal capacidade permite a classificação dos tumores em benignos e malignos.

### **2.1.1 – Tumores Benignos e Malignos**

Os tumores são classificados de acordo com o tecido embrionário dos quais são derivados: os carcinomas são originários de células epiteliais, derivadas de qualquer uma das três camadas germinativas: ectodérmica, mesodérmica e endodérmica. Logo, os carcinomas com padrão microscópico de crescimento glandular são definidos como adenocarcinomas. Os sarcomas são derivados de tecido mesenquimatoso como osso, cartilagem e gordura. Os linfomas são neoplasias originárias de tecido linfóide, enquanto que as leucemias são de células hematopoéticas de origem medular (COTRAN *et al.*, 2000).

É importante destacar que, geralmente, o sufixo – oma – é empregado para designar tumores benignos enquanto que tumores malignos recebem o nome do tipo de tecido do qual se desenvolveu seguido da palavra sarcoma (Ex.: Osteossarcoma, lipossarcoma, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, histiocitoma maligno fibroso, fibrossarcoma, sarcoma sinovial, angiossarcoma, condrossarcoma) (WEINBERG, 2008).

Segundo Brentani *et al.*, (1988) as características que diferenciam neoplasias benignas e malignas podem convenientemente ser discutidas sob quatro aspectos: diferenciação e anaplasia, taxa de crescimento, invasão local e metástase.

Diferenciação e anaplasia referem-se ao grau de semelhança entre as células tumorais e as células normais comparáveis morfológica e funcionalmente. Tumores benignos são bem diferenciados. Tumores malignos compostos de células indiferenciadas são ditos anaplásicos, pois, literalmente no sentido da palavra, “regridem”, indicando uma reversão de um alto nível de diferenciação para um nível inferior. A falta de diferenciação ou anaplasia é marcada por várias alterações morfológicas e funcionais como pleomorfismo (variação de tamanho e forma tanto das células como dos núcleos), os núcleos apresentam uma abundância de DNA e são normalmente escuros (hipercromáticos). A forma nuclear é geralmente muito variável e a cromatina frequentemente está aglomerada e distribuída ao longo da membrana nuclear. Grandes nucléolos, geralmente, estão presentes nestes núcleos. Os tumores indiferenciados em geral possuem um grande número de mitoses, refletindo a maior atividade proliferativa das células parenquimatosas (BRENTANI *et al.*, 1988; WEINBERG, 2008).

Na invasão local, a maioria dos tumores benignos cresce como massas coesivas em expansão, permanecendo situadas em seu local de origem, sem a capacidade de se infiltrarem, invadirem ou metastatizarem para locais distantes, como ocorre nos tumores malignos. Nos tumores malignos o crescimento é acompanhado de infiltração progressiva, invasão e destruição do tecido vizinho (BRENTANI *et al.*, 1988; WEINBERG, 2008).

O termo metástase (*meta* - além; *stasis* - parar) neste processo as células tumorais são distribuídas via vasos sanguíneos e linfáticos, formando colônias tumorais no local onde são depositadas (WEINBERG, 2008). A instalação deste processo é a principal causa de morte e falhas no tratamento de pacientes com câncer (COTRAN *et al.*, 2000; HARRISON *et al.*, 2008; WEINBERG, 2008).

A metástase é o resultado final de várias etapas interdependentes, um processo multifacetado que inclui uma complexa interação entre o tumor e organismo hospedeiro. De um modo geral, o processo metastático ocorre da

seguinte forma: após o crescimento e a vascularização do tumor original, as células (ou uma massa celular) devem inicialmente separar-se da massa tumoral; invadir localmente a matriz tecidual adjacente; adentrar a parede de vasos sanguíneos ou linfáticos e sobreviver na circulação sanguínea ou linfática; ligar-se ao endotélio capilar do tecido em que se estabelecerá; iniciar agregação plaquetária; atravessar a parede capilar; invadir o tecido local e então proliferar (WEINBERG, 2008).

E importante ressaltar, que o processo de entrada da célula tumoral no tecido vascular pode ocorrer de forma passiva, pelos vasos neoformados que irrigam a massa tumoral, ou de forma ativa, atravessando o endotélio e a membrana basal (BRENTANI *et al.*, 1988).

Em geral, as localizações anatômicas de tumores primários diferem do sítio inicial de metástase. As células neoplásicas que sobrevivem, multiplicam-se e extravasam para o parênquima dos órgãos, formando novos focos tumorais (HARRISON *et al.*, 2008). Alterações genéticas influenciam a adesividade celular, favorecendo o desprendimento das células do tumor primário, além da neovascularização, que não só serve para manter as necessidades metabólicas inerentes ao desenvolvimento do tumor, como também para prover uma rota de fuga pela qual as células neoplásicas podem deixar o tumor primário e adentrar o sistema linfático ou circulatório, caracterizando a disseminação linfática e hematogênica, respectivamente (TANAKA *et al.*, 2002; HARRISON *et al.*, 2008).

A pressão exercida pelo tumor é um mecanismo passivo em que as células tumorais se valem para invadirem tecidos adjacentes. Isso pode ocorrer devido a mecanismos enzimáticos, alterações no citoesqueleto celular; diminuição do número de junções intercelulares, ou um decréscimo na biossíntese de componentes da matriz extra-celular (DAGLI, 1989).

Outro fator importante para a invasão de células neoplásicas no organismo é a atividade do citoesqueleto, particularmente, sua formação, desintegração, contração e relaxamento de feixes de filamentos de actina. Associados a eles, existem diferentes proteínas que, na maioria das vezes, são reguladas diretamente por concentrações de  $Ca^{+2}$  ou, indiretamente, via calmodulina (WEINBERG, 2008).

O sistema imunológico muitas vezes não reconhece as células tumorais como uma perigosa ameaça que deve ser eliminada, pois essas células, mesmo transformadas, possuem um fenótipo muito similar aos das células normais. Dessa forma, as células tumorais acabam por induzir tolerância imunológica através de diversos mecanismos, o que impede o sistema imunológico de produzir uma resposta imune eficaz contra o tumor, permitindo assim, que a massa de células transformadas cresça sem nenhum controle imunológico efetivo (MAPARA & SYKES, 2004).

Desta forma, o potencial metastático é influenciado pelo micro ambiente local, angiogênese, interações tumor-estroma, liberação de citocinas pelo tecido local, e mais significativamente por seu genótipo molecular (HARRISON *et al.*, 2008).

Mutações nos genes responsáveis pela expressão de proteínas ligadas a regulação, controle e reparo de erros ao DNA durante o ciclo celular é o principal evento que resulta em metástase.

### **2.1.2 – O Ciclo Celular**

Ciclo celular é definido como o período entre as duas divisões mitóticas. O intervalo entre o final de uma divisão mitótica e o início de outra é chamado interfase. Este período é classicamente dividido em três estágios: G1 (*Gap1*), S (*synthesis*) e G2 (*Gap2*). A fase em que as células estão temporária ou permanentemente fora do ciclo celular (quiescentes) é denominada G0. Durante o estágio G1, as células aumentam em tamanho, sintetizam RNA e proteínas. Um mecanismo importante de controle do ciclo celular é ativado durante este período (*G1 checkpoint* ou ponto de restrição - Ponto R) para certificar que todo o material para a síntese de DNA esteja pronto (Figura 3) (ALBERTS *et al.*, 2009).

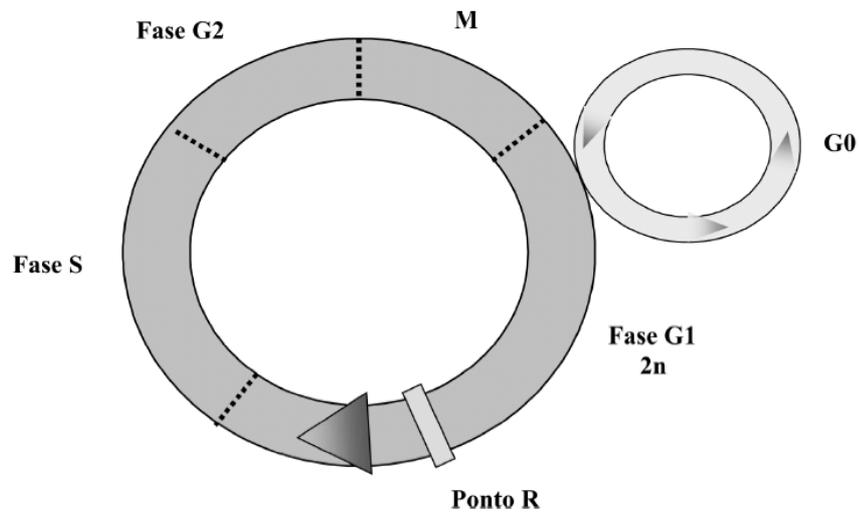


Figura 3: Esquema representativo das fases do ciclo celular (Adaptado de BERNARD *et al.*, 2008).

Nutrientes, mitógenos e fatores de crescimento extracelulares induzem a transcrição de genes que são necessários para a síntese de DNA e a célula passa para o estágio seguinte, no qual ocorre a replicação do DNA (fase S). Durante o intervalo entre a síntese de DNA e a mitose (G2), a célula continua a crescer e sintetizar novas proteínas. Ao final deste intervalo, outro mecanismo de controle do ciclo celular (*G2 checkpoint*) verifica a necessidade de reparo dos erros da replicação do DNA antes da célula entrar em mitose. A perda do controle no *checkpoint* resulta instabilidade genômica, acúmulo de lesões no DNA e proliferação celular não controlada, fenômenos que têm sido relacionados à progressão tumoral (WEINBERG, 2008; ALBERTS *et al.*, 2009).

Participam desse processo proteínas denominadas ciclinas, em que durante o curso do ciclo celular possuem período de síntese crescente seguido por outro de rápida degradação, e as quinases quando ativadas por ciclinas (CDKs) fosforilam as moléculas necessárias para a divisão celular. A ação das CDKs é regulada negativamente pelas CDKIs, proteínas que impedem a formação do complexo ativo ciclina/quinase. Entre estes inibidores destacam-se as proteínas p27, p21 e p16 (WEINBERG, 2008; ALBERTS *et al.*, 2009).

Entre os períodos G1/S e G2/M, a produção da proteína p53, que atua na transcrição do gene codificante da proteína p21 (CDKI), é ativada. A proteína p53 não é necessária para a progressão do ciclo celular, sendo, no

entanto, importante regulador (*checkpoint*) durante a progressão G1-S (WEINBERG, 2008).

Radiação ultravioleta, oncogenes e substâncias químicas lesivas ao DNA ativam proteínas, como ATM, Chk1 e Chk2, que fosforilam p53 em sítios da região amino-terminal. Uma vez ativada, a proteína p53 induz ao aumento da expressão da proteína p21Cip/Kip, um inibidor do complexo ciclina/quinase, e as células sofrem, então, um bloqueio nesta fase, desta forma permitindo que seja efetivado o reparo do DNA. Este bloqueio é de fundamental importância para permitir o reparo do DNA danificado antes que ocorra sua duplicação na fase S (ALBERTS *et al.*, 2009).

Durante a divisão celular, o alinhamento dos cromossomos metafásicos deve ser devidamente processado. Caso todos os cromossomos não estejam ligados ao fuso mitótico, as células filhas não serão idênticas. Como resultados dessa instabilidade, ocorrem ganhos e perdas cromossômicas, bem como rearranjos e ampliações de determinadas regiões. Acredita-se que as regiões cromossômicas que sofrem ampliações podem conter potenciais protooncogenes, e as que sofreram deleções, genes supressores tumorais (WEINBERG, 2008; ALBERTS *et al.*, 2009).

A vida da célula normalmente necessita da expressão equilibrada dos genes proliferativos que favorecem o desencadeamento da divisão e diferenciação celular (protooncogenes), e dos genes antiproliferativos (supressores de tumores) os quais, inibem o ciclo celular ou induzem apoptose (WEINBERG, 2008; ALBERTS *et al.*, 2009).

Sendo assim, o câncer é decorrente das transformações celulares que promovem a quebra neste equilíbrio.

### **2.1.3 – Protooncogenes e Genes Supressores de Tumor**

Uma das causas relacionadas ao desenvolvimento neoplásico é o funcionamento inadequado de genes reguladores da proliferação celular. Em condições normais, o crescimento celular é controlado por duas classes de genes: os protooncogenes e os genes supressores de tumor que codificam proteínas capazes de regular o crescimento celular, evitando o comportamento maligno das células (WEINBERG, 2008; ALBERTS *et al.*, 2009).

Os protooncogenes são genes celulares que promovem o crescimento e diferenciação normal da célula. Estes genes quando mutados tornam-se amplificados no número de cópias e funcionam como promotores da expansão clonal da célula tumoral, passando a ser denominados de oncogenes (do grego *onkós*, tumor, e *gene*, origem). Nestas condições, as oncoproteínas codificadas por estes genes são responsáveis pela proliferação anormal das células que, uma vez desreguladas, superam a parada do ciclo celular no *checkpoint*. Assim, se houver dano ao genoma, não haverá tempo para atuação das enzimas de reparo do DNA, nem tempo para a célula danificada entrar no processo de apoptose. Deste modo, as alterações do genoma serão herdadas pelo clone celular após a divisão, perpetuando os danos no DNA (WEINBERG, 2008; ALBERTS *et al.*, 2009).

Células do corpo que se dividem rapidamente são mais susceptíveis a carcinogênese devido à menor oportunidade do DNA ser reparado antes da divisão celular (REDDY *et al.*, 2003).

Segundo Zornig *et al.* (2001), para ocorrer a transformação maligna de células em cultura, requerem-se duas ou mais alterações de oncogenes e frequentemente são necessárias quatro a seis diferentes genes alterados para o crescimento tumoral.

Estudos são realizados, buscando esclarecer o papel dos oncogenes na carcinogênese em vários tecidos. Atualmente, já foram identificados e isolados aproximadamente 100 oncogenes, mas, apesar do conhecimento que se tem alcançado no campo da biologia molecular pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desses genes (HARRISON *et al.*, 2008).

Não só a ativação dos oncogenes é capaz de dar origem a uma célula tumoral. A inativação dos chamados genes supressores de tumor pode ser considerada como um dos eventos iniciais da carcinogênese. Esses genes agem ora interrompendo o ciclo celular, ora levando a célula a apoptose, o que impede, portanto, a perpetuação de mutações incompatíveis com o funcionamento da célula (WEINBERG, 2008; ALBERTS *et al.*, 2009).

Embora em número reduzido, aproximadamente 30 já foram identificados, os genes supressores de tumor são vistos como os mais significativos na carcinogênese. A perda ou inativação destes genes permite à

célula apresentar algum dos vários fenótipos da transformação neoplásica (WEINBERG, 2008).

Os produtos dos genes supressores de tumor são componentes das vias de sinalização intercelular, os quais permitem à célula receber e processar sinais inibidores da proliferação celular lançados ao seu redor. Quando a célula perde componentes críticos desta rede de sinalização, ela perde a capacidade de responder aos sinais extracelulares, mesmo que o mensageiro ainda esteja presentes no meio (HARRISON *et al.*, 2008).

Como relatado anteriormente, uma etapa chave no estabelecimento do processo de carcinogênese ocorre quando a célula perde a capacidade de responder aos estímulos de apoptose.

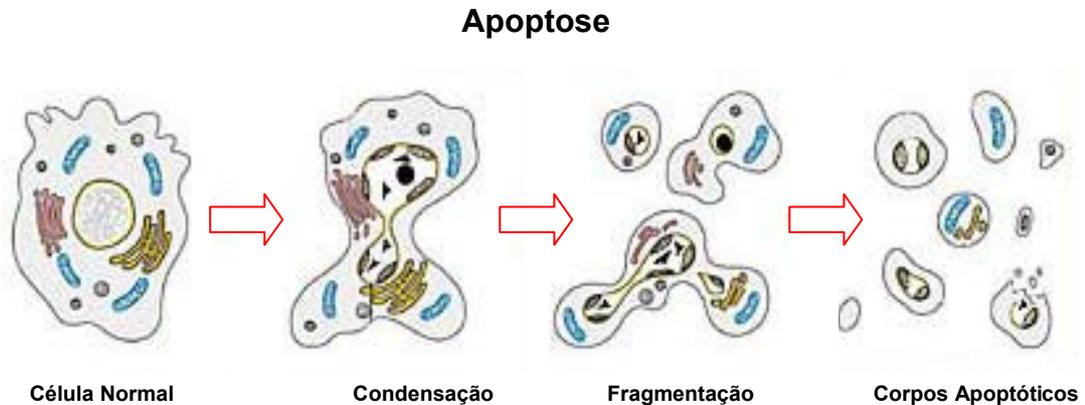
#### **2.1.4 - Apoptose**

Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Em 1972, foi adotado o termo apoptose (grego *apo* – para longe; *ptósis* – queda) para indicar esse tipo de morte celular (ANDREAS, 2006).

A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (ANDREAS, 2006).

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. É um fenômeno bastante rápido, o qual ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e os núcleos se desintegram em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são

denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (WEINBERG, 2008) (Figura 4).



**Figura 4: alterações morfológicas no processo de morte celular por apoptose.** O processo apoptótico envolve: alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular e formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas (Adaptado de ANAZETTI & MELO, 2007).

Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base (ANDREAS, 2006).

A apoptose é extremamente regulada e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (ANDREAS, 2006).

Os estudos envolvendo a participação de genes no controle da apoptose iniciaram-se com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. A morte fisiológica nesses organismos é controlada, principalmente, por três genes da família *ced* (*cell death abnormal*): *ced-3*, *ced-4* e *ced-9*, além de outras proteínas (ANDREAS, 2006; WEINBERG, 2008).

Nesses organismos, o gene supressor de apoptose *ced-9* (homólogo ao gene humano Bcl-2) sempre está associado ao gene *ced-4* (homólogo à proteína humana fator de ativação de protease associada à apoptose 1 [APAF-1]), o que impede a ativação de *ced-3* (pró-apoptótica). Quando a apoptose é

iniciada, a proteína EGL-1 (homóloga à proteína humana Bax) se associa ao ced-9, liberando o ced-4 e levando à ativação do ced-3 (Figura 5) (ANDREAS, 2006; WEINBERG, 2008).

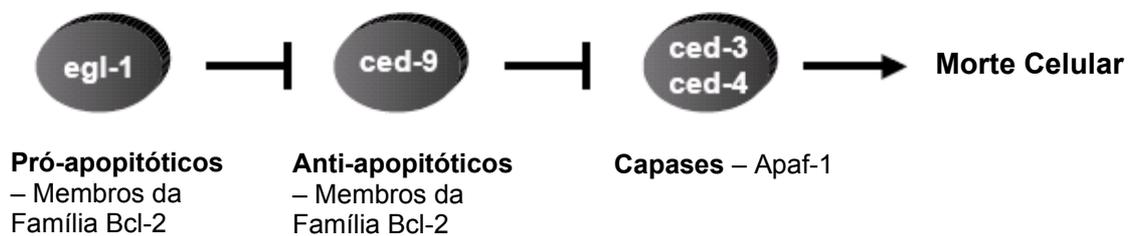


Figura 5: Mecanismo apoptótico em *Caenorhabditis elegans* (Adaptado de ANDREAS, 2006).

Em humanos, o processo é muito semelhante ao que ocorre com *C. elegans*, ou seja, a proteína Bax se associa à Bcl-2 induzindo a liberação da APAF-1, ativando a caspase 9, induzindo a apoptose 3 (ANDREAS, 2006).

Os mecanismos bioquímicos para morte celular programada ocorrem através de duas vias principais, a via extrínseca e a intrínseca (ANDREAS, 2006). Pela via extrínseca, ocorrerá a ativação de receptores de membrana transmitindo sinais para o interior da célula e ativando, inicialmente a caspase-8 ou caspase-10 (Figura 6) (ANDREAS, 2006).

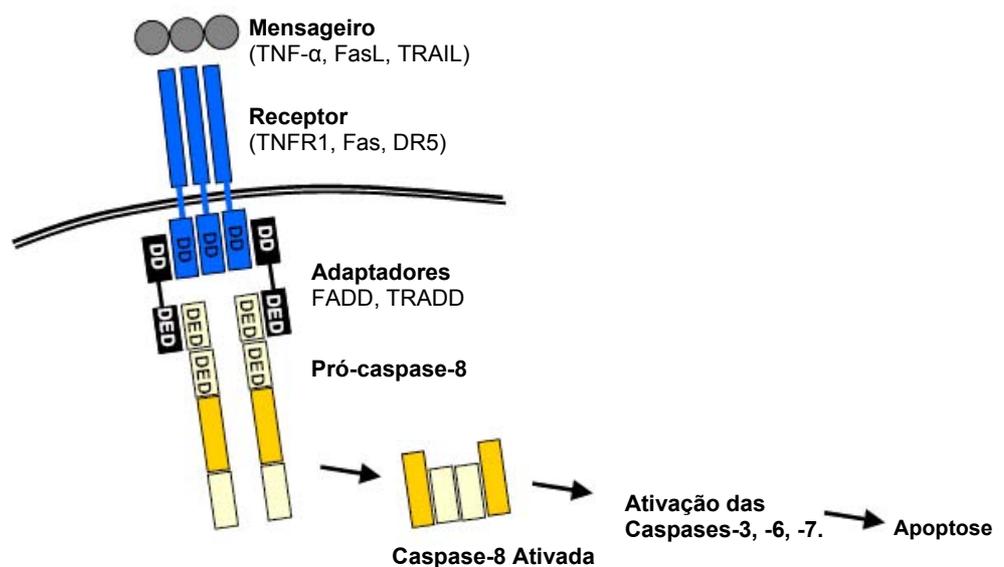


Figura 6: Ativação da via extrínseca da apoptose (Adaptado de ANDREAS, 2006).

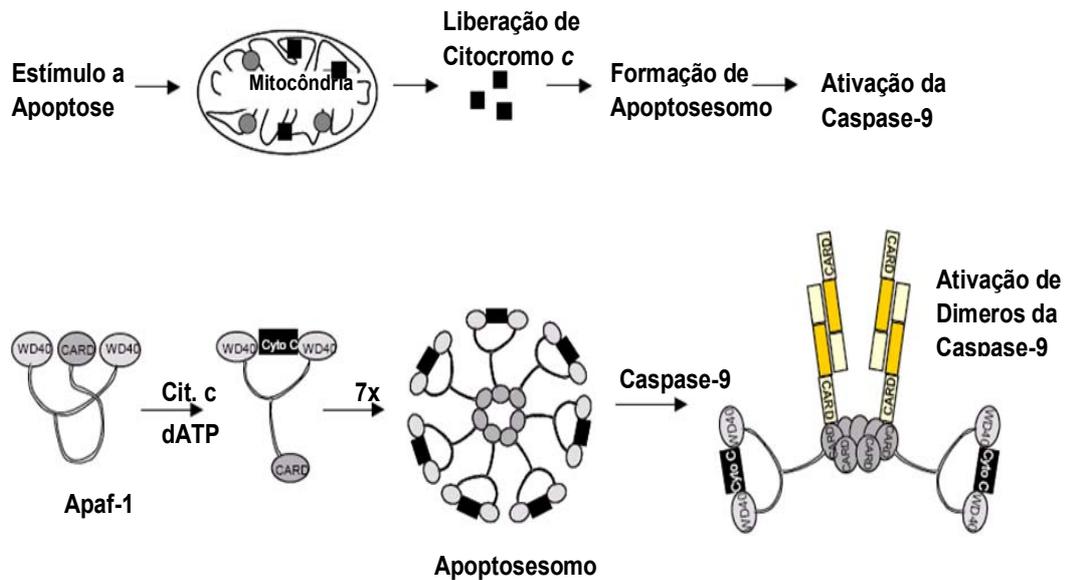


Figura 7: Ativação da via intrínseca da apoptose (Adaptado de ANDREAS, 2006).

A via intrínseca, ativada por estresse celular, é mediada pela liberação do citocromo c pela mitocôndria, levando a ativação da caspase-9 (Figura 7). Essas duas vias levam a ativação das caspases efetoras, as caspases-3, 6 e 7 (ANDREAS, 2006).

A família das caspases caracteriza-se como a principal via de regulação da morte celular programada. Diferentes tipos de caspases são expressos na maioria das células vivas, localizados no citossol, na sua forma inativa. Acredita-se que as caspases causem a apoptose quebrando ou degradando diversos substratos celulares considerados importantes na homeostasia da célula (ANDREAS, 2006).

As caspases estão associadas a diferentes aspectos da morte celular. Elas são sintetizadas como pró-enzimas de 30 a 50 kDa que necessitam de um processo proteolítico para serem ativadas (LI & YUAN, 2008).

As caspases podem ser caracterizadas como iniciadoras e efetoras. As iniciadoras, representadas pelas caspases 8 e 9, caracterizam a primeira caspase a ser ativada durante a sinalização para a execução da apoptose. A ativação proteolítica das iniciadoras, geralmente, envolve a autoclivagem e autoativação, seguida da clivagem e ativação das caspases efetoras (ANDREAS, 2006; LI & YUAN, 2008).

A liberação do citocromo c pela mitocôndria caracteriza uma importante via para ativação das caspases. O citocromo c liga-se ao Apaf-1, formando complexo citosólico que recruta a pró-caspase 9, clivando-a em caspase 9. A qual quando liberada do complexo apresenta capacidade de clivar e ativar as caspases efetoras, 3 e 7. A caspase-3, considerada a mais prevalente nas células, caracteriza-se como responsável pela maioria dos efeitos apoptóticos, como a quebra de muitas proteínas importantes tais como as enzimas nucleares poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). No entanto, recebe suporte de outras, como a caspase-6 e caspase-7. Juntas, referidas como as caspases de execução ou efetoras, possuem importante função no controle da morte celular programada (Figura 8) (ALBERTS *et al.*, 2009; LI & YUAN, 2008; ANDREAS, 2006).

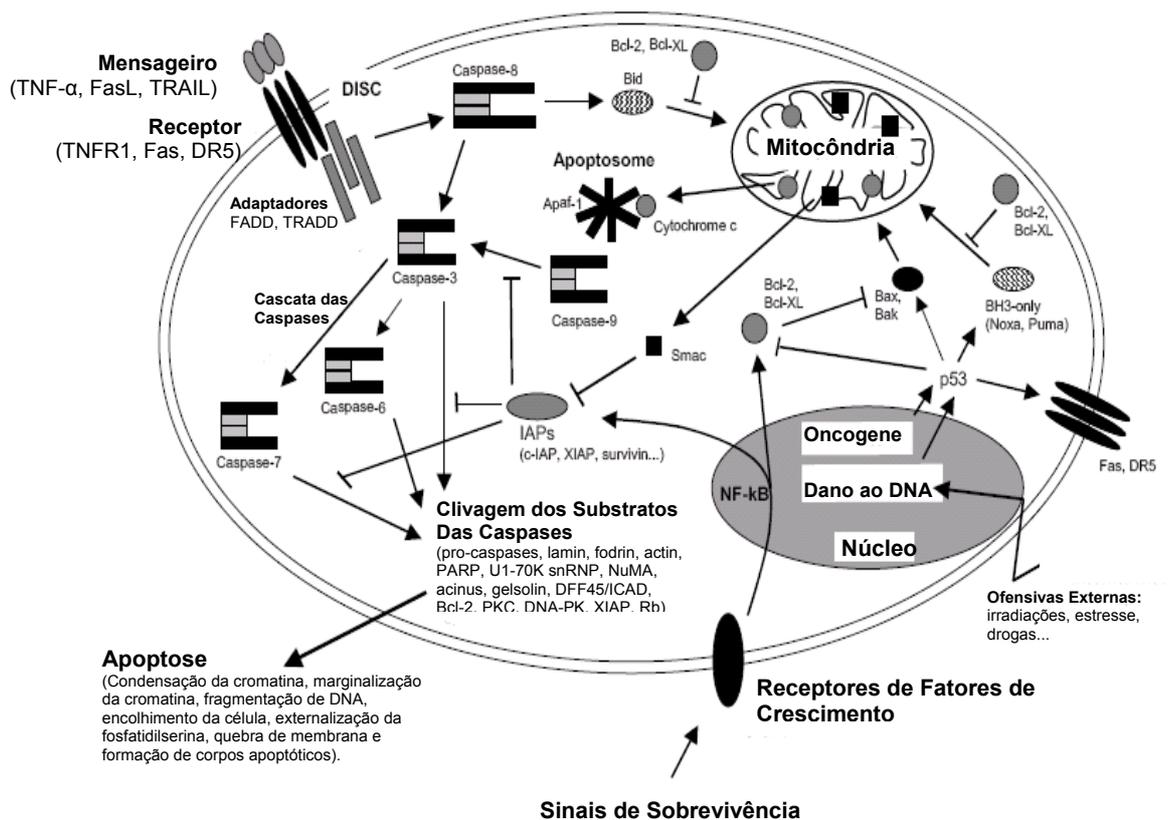


Figura 8: Esquema representando a sinalização completa da sequencia de eventos da apoptose (Adaptado de ANDREAS, 2006).

A adequada regulação da apoptose mostra-se importante para o desenvolvimento e manutenção dos tecidos normais. Os distúrbios apoptóticos são considerados o primeiro evento em alguns tipos de câncer e leucemia, permitindo maior sobrevivência a células malignas, desta forma contribuindo para que ocorra a expansão neoplásica (ANDREAS, 2006).

Embora o câncer exiba características muito heterogêneas, como relatado anteriormente, os tumores malignos adquiriram a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. Portanto, apesar da enorme diversidade de câncer, evidências demonstram que a resistência a apoptose é uma das características mais marcantes na maioria dos tumores malignos (MADELAINE & ZALCMAN, 2005).

A análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral. Entre estes, a resistência à morte por apoptose em células que escaparam do controle do crescimento e da diferenciação normais exercidos por fatores solúveis ou por contatos célula-célula ou célula-matriz extracelular, até aquela induzida por lesões no DNA, por hipóxia ou por espécies reativas do oxigênio (ANDREAS, 2006).

Na prática clínica, a apoptose é alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia. A elucidação de alguns dos mecanismos bioquímicos e moleculares da apoptose abriram perspectivas de modulação desses processos. Diversos estudos clínicos e pré-clínicos com drogas que têm por alvo membros da família Bcl-2 estão em andamento. A redução na atividade do Bcl-2 e Bcl-XL é suficiente para induzir a célula a entrar em apoptose (KANG & REYNOLDS, 2009).

O Oblimersen (G3139, Genasense, Genta, Berkeley Heights, NJ) é um oligonucleotídeo antisense anti Bcl-2 que está sendo testado em estudos clínicos de fase III, tendo demonstrado alguns resultados positivos. Outro agente promissor é o ABT737, uma pequena molécula que inibe as proteínas Bcl-2, Bcl-XL e Bcl-w. Em estudo pré-clínico, o ABT737 levou à completa

regressão de uma linhagem celular tumoral proveniente de pulmão (KANG & REYNOLDS, 2009).

Neste contexto, a busca por produtos naturais com a capacidade de induzir apoptose é um desafio enfrentado por vários grupos de pesquisa em todo mundo (BOYD & PAULL, 1995).

## **2.2 – A Busca de Novos Fármacos com Atividade Antineoplásica**

### **2.2.1 – A Importância das Plantas Medicinais na Consolidação dos Modelos Experimentais *in vitro***

Ao longo dos anos, os esforços foram direcionados para a descoberta de novos agentes antineoplásicos baseados na identificação de alvos protéicos, específicos, envolvidos no controle do crescimento celular (BRIDGES, 1996). Entretanto, uma etapa obrigatória, antes de se iniciar os estudos clínicos de um potencial agente antitumoral, é a demonstração de sua habilidade de inibir o crescimento tumoral em modelos *in vivo* e *in vitro*.

Nos últimos cinquenta anos, a pesquisa de novas drogas antineoplásicas introduziu na terapêutica cerca de 70 medicamentos, investigadas através de métodos de triagem de metabólitos secundários vegetais com atividade antitumoral. Entre 1955 e 1975, a triagem de novas drogas anticâncer era realizada através de modelos experimentais de leucemias murinas *in vitro* (L1210 e P388). Após 1975, a triagem passou a ser realizada em dois estágios. No primeiro estágio, as drogas eram selecionadas através de modelo de leucemia murina (P388) e, no segundo, as drogas passavam por modelos utilizando animais imunodeficientes, com implante de células tumorais humanas. Nessa segunda etapa, eram utilizadas de quatro a oito linhagens humanas. Durante esse período (1955 – 1985), foram avaliadas cerca de 600 mil substâncias que resultaram na maioria das drogas que hoje são utilizadas na quimioterapia anticâncer (HOLBECK, 2004; MANN, 2002; BOYD & PAULL, 1995).

A análise dos resultados obtidos, pelos métodos de triagem utilizados até 1985, revela que a maioria das drogas desenvolvidas são úteis em tumores de crescimento rápido, tais como leucemias e linfomas. Realmente, o sucesso da quimioterapia é maior quando os tumores pertencem ao sistema hematopoiético, enquanto que para os tumores sólidos as alternativas são mais escassas. Essa alta seletividade para leucemias e linfomas sugere que os métodos usados foram tendenciosos, orientando a descoberta de agentes para essas doenças, desta forma limitando o número de drogas para o tratamento de tumores sólidos. Além de uma seleção tendenciosa, a triagem de drogas

anticâncer utilizando tumores murinos, revelou que a transposição para o homem dos resultados obtidos em animais falhou. Dessa forma, ficou evidente a necessidade de modelos de triagem para drogas orientada para os tumores sólidos e com metodologia utilizando células originárias de câncer humano (BOYD & PAULL, 1995).

Apesar da maior parte das drogas citotóxicas clinicamente disponíveis atualmente terem sido descobertas utilizando-se tumores transplantáveis em camundongos, linhagens celulares em cultura vêm desempenhando importante papel na descoberta e estudo de diversos agentes (FRESHNEY, 2005; PERES & CURI, 2005).

O aprimoramento da metodologia de cultura de células possibilitou o desenvolvimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, desta forma colaborando para o desenvolvimento da metodologia de triagem *in vitro*. Com esse objetivo, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos desenvolveu um painel de células cancerígenas que, atualmente, conta com 60 linhagens oriundas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia). Dessa maneira, essa metodologia permite a avaliação em diversos tipos de células tumorais, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade. Outra vantagem dessa triagem é a rapidez e eficiência do método, que em poucos dias pode avaliar um número elevado de drogas (SIGMA, 2008; MONKS, *et al.*, 1991; RUBINSTEIN, *et al.*, 1990; SKEHAN, *et al.*, 1990).

Entre os anos de 1990 e 1996, aproximadamente, vinte agentes anticâncer, os quais incluem produtos naturais puros ou modificações semissintéticas de material natural, foram aprovados para o mercado nos Estados Unidos. Dentre estes se destacam: vimblastina (Velban<sup>®</sup>) e vincristina (Oncovin<sup>®</sup>) e seus análogos vindesina (Eldisine<sup>®</sup>) e vinorelbina (Navelbine<sup>®</sup>); o paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) e o análogo docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos<sup>®</sup>) e teniposídeo (Vumon<sup>®</sup>); e a camptotecina e os análogos, topotecano (Hycamtin<sup>®</sup>) e irinotecano (Camptosar<sup>®</sup>). Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (MUKHERJEE *et al.*, 2001).

No entanto, uma das desvantagens quanto à utilização de culturas celulares é a possibilidade da perda de características importantes originalmente apresentadas *in vivo* (BAGULEY & MARSHALL, 2004). Neste sentido, culturas primárias, em relação a linhagens tumorais, apresentam menos alterações em relação aos tumores dos quais se originaram, pelo menos em relação a alguns parâmetros, tais como a duração do ciclo celular (BAGULEY & MARSHALL, 2004).

Atualmente os métodos de triagem *in vitro*, utilizando-se da cultura de células tumorais humanas, são os mais utilizados na descoberta e desenvolvimento de novas drogas. E, aproximadamente, 50% dos quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer são provenientes, direta ou indiretamente, de fontes naturais, como plantas, microrganismos e organismos marinhos (MANN, 2002).

O estudo das plantas medicinais tem desenvolvido importante papel na terapia anticâncer e, os mecanismos de interação entre metabólitos secundários e células tumorais é extensivamente estudado, sendo responsável por disponibilizar várias classes de compostos com propriedades antineoplásicas (MUKHERJEE *et al.*, 2001).

### **2.2.2 – Metabólitos Secundários de Plantas com Propriedades Antineoplásicas**

As células vegetais apresentam uma grande capacidade de produzir moléculas complexas, a partir de moléculas simples como gás nitrogênio, gás carbônico e água. Essas moléculas são metabolizadas, por vias específicas, em compostos primários ou secundários, os quais variam em concentração de acordo com as necessidades do organismo. Metabólitos primários são moléculas com funções vitais, tais como, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos enquanto os metabólitos secundários são moléculas necessárias à sobrevivência e perpetuação dos organismos no seu ecossistema (TAIZ & ZEIGER, 2008; SIMÕES, *et al.* 2007).

Os metabólitos secundários apresentam um papel importante na adaptação das plantas ao ambiente, contribuindo para interação planta-planta e mesmo planta-ecossistema. Os produtos do metabolismo secundário

aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim, tais como: antibióticos, antifúngicos e antivirais atuantes na proteção das plantas contra patógenos; fitoalexinas, apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas a outras plantas. Além disso, alguns destes metabólitos constituem importantes compostos que absorvem a luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas (TAIZ & ZEIGER, 2008; SIMÕES, *et al.* 2007).

A origem de todos os metabólitos secundários é iniciada com o metabolismo da glicose, sendo os dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina dos aminoácidos aromáticos, precursores dos metabólitos secundários aromáticos (Figura 9).

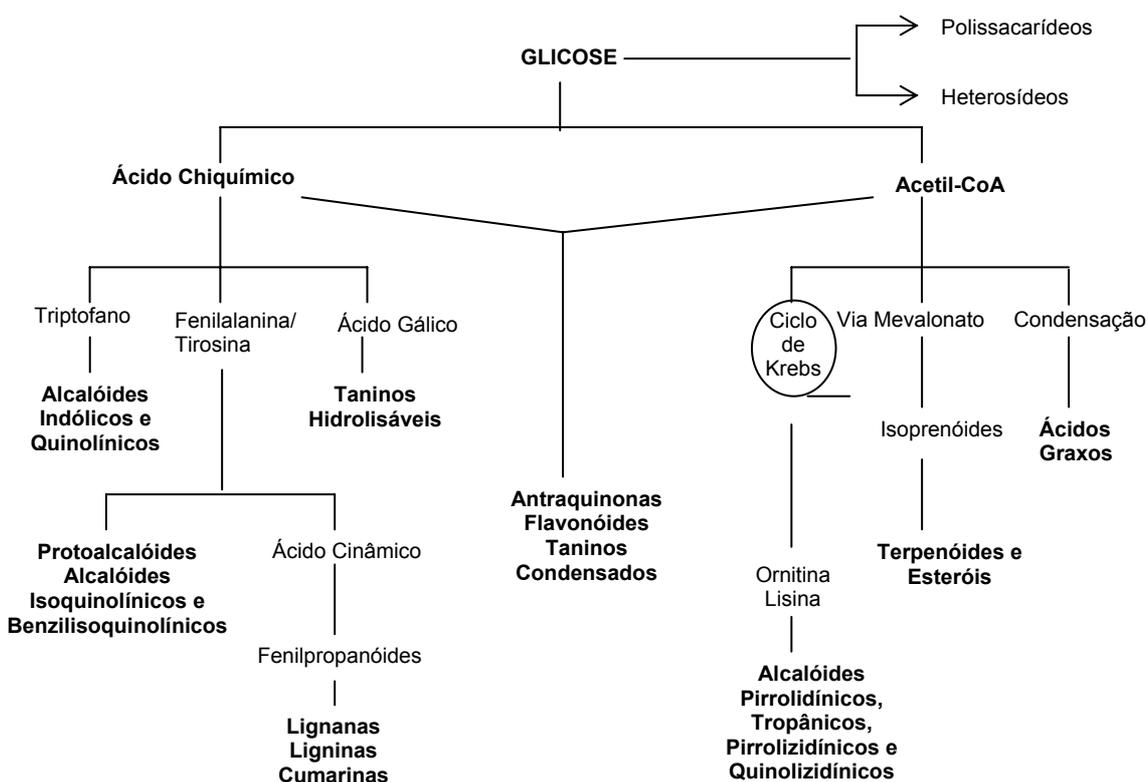


Figura 9: Esquema mostrando as vias de síntese dos flavonóides (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

Os derivados do acetato podem ser classificados conforme as seguintes vias metabólicas: Ciclo do ácido cítrico; Mevalonato; Produtos da condensação do acetato.

Alguns metabólitos secundários derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como é o caso das antraquinonas, flavonóides, e taninos condensados (SIMÕES, *et al.* 2007).

Um grande número de produtos naturais tem sido estudado quanto à sua atividade antitumoral, em vários modelos experimentais. Isto resultou no surgimento de várias drogas anticâncer efetivas (RAMAKRISHNA *et al.*, 1984).

Paralelamente a isso, o campo de pesquisa terapêutica vem se desenvolvendo no sentido de testar novas formas de tratamento, bem como, novas substâncias potencialmente eficazes contra o câncer (SAAD-HOSSNE *et al.*, 2004).

Por incluírem uma grande variedade de compostos atuando por vários mecanismos, os agentes quimioterápicos disponíveis manifestam toxicidade significativa sobre os tecidos normais, acarretando maior complicação ao seu uso, devendo-se considerar criteriosamente o risco versus benefício quando se prescrevem estes agentes (MUKHERJEE *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 1984;).

Como relatado anteriormente, os agentes anticâncer, atualmente, em uso incluem um grande número de moléculas retiradas de vegetais, neste sentido, nos próximos tópicos discutiremos sobre algumas classes de metabólitos secundários com propriedade antitumoral cientificamente comprovada. Dentre esses destacamos, alcalóides, acetogeninas, lignanas, e flavonóides.

#### **2.2.2.1 – Alcalóides: Estrutura, Função e Propriedades Antineoplásicas**

Os alcalóides constituem uma classe grande e estruturalmente variada de metabólitos secundários. Quimicamente são definidos como compostos orgânicos cíclicos contendo nitrogênio em um estado de oxidação negativo (SIMÕES *et al.*, 2007). São classificados de acordo com os sistemas de anéis

que constituem a principal parte de suas estruturas, os quais, por sua vez, podem ser divididos de acordo com o aminoácido precursor (Figura 10). Em sua maioria, são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina) e alifáticos (ornitina e lisina) e recebem contribuição estrutural de compostos terpênicos e esteroidais, provenientes de outras vias metabólicas, justificando a diversidade estrutural destes compostos (SIMÕES *et al.*, 2007).

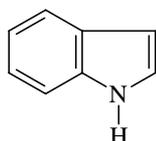
Atualmente, são conhecidas 77 famílias de vegetais produtoras de alcalóides. Estes compostos representam cerca de 20% das substâncias bioativas descritas, podendo ser encontrados em todas as partes do vegetal, concentrados em um ou mais órgãos (sementes, raízes, rizomas, cascas, folhas). A concentração destes compostos pode variar desde 0,1 a 15% nas em diferentes espécies e épocas do ano. Seu sítio de síntese é o retículo endoplasmático rugoso, concentrando-se em vacúolos. Após, são transportados para sítios de armazenamentos diferentes daqueles de síntese, podendo sofrer modificações químicas secundárias, refletindo a variedade estrutural (TAIZ & ZEIGER, 2008).

## ALCALÓIDES

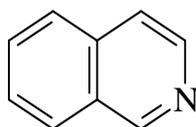
### ALCALÓIDES DERIVADOS DOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS

#### Derivados do Triptofano

Indólicos

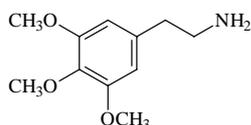


Quinolínicos

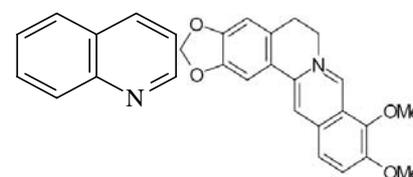


#### Derivados de Fenilalanina/Tirosina

Protoalcalóides



Isoquinolínicos



Benzilisoquinolínicos

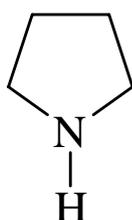
OS

S

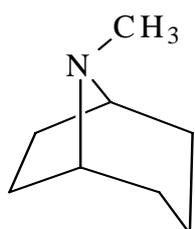
### ALCALÓIDES DERIVADOS DOS AMINOÁCIDOS ALIFÁTICOS

#### Derivados da Ornitina

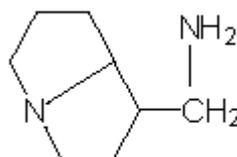
Pirrolidínicos



Tropânicos



Pirrolizidínicos



#### Derivados da Lisina

Quinolizidínicos

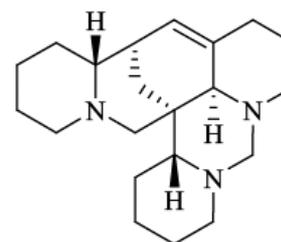


Figura 10: Classificação dos Alcalóides. Estrutura química das diversas classes de alcalóides.

Vários alcalóides indólicos possuem atividade antitumoral como a elipticina isolada de *Ochrosia* sp., (Apocynaceae) e olivacina isolada de várias espécies dos gêneros *Aspidosperma* sp. e *Tabernaemontana* sp., (Apocynaceae). Esses compostos inibem a síntese de DNA, RNA e proteínas, provavelmente por intercalação na dupla hélice do DNA e por ligação com ácidos nucleicos. Devido à alta toxicidade, esses compostos não são usados na terapêutica (HOLBECK, 2004; MANN, 2002).

Os alcalóides diméricos da *Vinca rósea*, vincristina e vimblastina apresentam resultados eficientes no combate a vários tipos de câncer. Vincristina é usado no tratamento da leucemia e doença de Hodgkin, bem como outros tipos de linfomas. Vimblastina é principalmente usado no tratamento da doença de Hodgkin, câncer testicular, câncer mama, sarcoma de

Kaposi e outros tipos de linfomas. Esses alcalóides causam parada na divisão celular durante a metáfase devido à sua ligação específica com a tubulina, inibindo a sua polimerização (HOLBECK, 2004; MANN, 2002).

Nas células tumorais o alvo dos alcalóides da vinca são os microtúbulos. Os microtúbulos são estruturas tubulares rígidas compostas por um esqueleto de tubulina e MAPs – “microtubule associated proteins”. Tais moléculas determinam a forma celular; desempenham papéis importantes na divisão celular, mobilidade, migração, transporte celular e transdução de sinais (ALBERTS *et al.*, 2009).

A  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina são peptídeos com aproximadamente 50 kDa, e combinam-se estequiometricamente para formar dímeros de tubulina (ALBERTS *et al.*, 2009).

A ação dos fármacos antitumorais interferentes nas funções dos microtúbulos foi elucidada durante a última década. Os alcalóides da vinca foram os primeiros agentes ligantes de tubulina usados como antimitóticos, os quais exercem efeitos citotóxicos despolimerizando microtúbulos, e aumentando a quantidade de tubulina solúvel. Em condições onde é encontrada uma concentração de alcalóide da vinca menor que a de tubulina, não ocorre despolimerização dos microtúbulos apenas uma redução em sua capacidade de crescer e encurtar. Em elevadas concentrações de alcalóides da vinca estes compostos ligam-se estequiometricamente às subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de tubulina. Isso ocorre durante a fase S do ciclo celular, conseqüentemente a tubulina não polimeriza, resultando em ausência de estruturas microtubulares (HOLBECK, 2004; MANN, 2002).

O contato de uma célula em divisão com os alcalóides da vinca, causa o desaparecimento do fuso mitótico, indicando que o equilíbrio químico é mantido através da troca constante de subunidades entre os microtúbulos do fuso e tubulina livre (HOLBECK, 2004; MANN, 2002).

O rompimento temporário dos microtúbulos do fuso mitótico mata, preferencialmente, as células que se dividem de forma anormal. Sendo assim, drogas antimitóticas como a vimblastina e vincristina, são amplamente utilizados no tratamento do câncer (HOLBECK, 2004; MANN, 2002).

### 2.2.2.2 - Acetogeninas: Estrutura, Função e Propriedades Antineoplásicas

Acetogeninas são metabólitos secundários derivados da condensação de unidade de acetato (via biossintética do acilpolimalonato). A estrutura comum mais encontrado é constituída de 32 ou 34 carbonos de ácidos graxos com ligações duplas e triplas, sem ramificações e no final desse uma  $\gamma$ -lactona. Algumas desta estruturas apresentam grupos funcionais oxigenados como: hidroxilas, cetonas, epóxi, tetra-hidrofurano e tetra-hidropirano (Figua 11) (BERMEJO *et al.*, 2005).

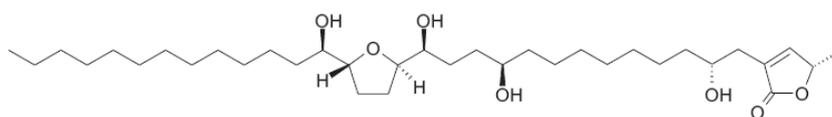


Figura 11: Asitrocina - Acetogenina de Annonaceae (Adaptado de KRAUSS, *et al.*, 2007)

Essa diversidade de grupos funcionais confere uma grande atividade biológica, com propriedades citotóxicas, antiparasitárias, pesticidas, antimicrobianas, imunossupressora e antitumoral (BERMEJO *et al.*, 2005).

Bermejo *et al.* (2005) reportam o isolamento de 417 acetogeninas em espécies desta família, sendo que a predominância dos compostos descritos era para espécies do gênero *Annona*.

As espécies de *Annona* mais estudadas até o momento são: *A. muricata*, onde foram isoladas inúmeras acetogeninas tetra-hidrofurânicas com atividade antiparasitária (DI STASI *et al.*, 2002). Os extratos (orgânico e aquoso) das sementes de *A. squamosa* exibiram potente atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais de mama (MCF-7) e leucemia (K-562), sendo as acetogeninas responsáveis pela indução de apoptose nessas células (PARDHASARADHI *et al.*, 2005). A esquamocina, isolada de *A. squamosa*, foi capaz de induzir a apoptose na linhagem celular HL-60 de leucemia. Outras espécies como *A. coriaceae*, *A. nutans*, *A. reticulata*, *A. bullata*, *A. montana*, *A. glabra*, *A. crassiflora*, tiveram vários tipos de acetogeninas isoladas, alguns compostos que apresentam atividade biológica (BERMEJO *et al.*, 2005).

### 2.2.2.3 – Lignanas: Estrutura, Função e Propriedades Antineoplásica

As lignanas são amplamente distribuídas no reino vegetal. Fazem parte da constituição das paredes celulares nestes organismos, onde tem por função conferir rigidez. A quantidade de lignanas existente na superfície da terra é imensa, inferior apenas à de carboidratos (SIMÕES *et al.*, 2007).

O termo lignóide é uma designação genérica, que caracteriza micromoléculas, cujo esqueleto é formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico (6C – 3C)<sub>n</sub>. Os lignóides podem ser subdivididos em: lignanas; neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignóides, heterolignóides (SIMÕES *et al.*, 2007).

As lignanas são dímeros formados através do acoplamento oxidativo de alcoóis cinâmicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos (SIMÕES *et al.*, 2007).

Algumas lignanas possuem atividades farmacológicas e/ou imunológicas, podendo possuir propriedades antiinflamatória, antitumoral, antimitótica, antiviral e citotóxica (MacRAE & TOWERS, 1984).

Dentre as lignanas, a podofilotoxina (Figura 12) possui um efeito antitumoral comprovado.

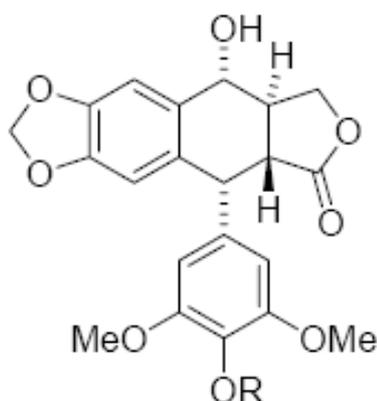


Figura 12: Estrutura química da podofilotoxina. BRANCO *et al.*, 2001.

O maior efeito citotóxico da podofilotoxina é a inibição celular na metafase, detendo a duplicação dos cromossomos, resultando na retenção da divisão celular no estado mitótico do ciclo celular. Porém, devido ao fato destes efeitos atingirem tanto células normais como células cancerígenas, o seu uso é

limitado. No entanto, os derivados da podofilotoxina, como o etoposideo e teniposideo, não exibem nenhum efeito intracelular, mas induzem a quebra das ligações simples e duplas do DNA (ERDEMOGLU, *et al.*, 2004).

O etoposideo (4-dimetil-7-[4,6-O-etilideno b-D-glicopiranosil *epi*podofilotoxina]) e o teniposideo (4-dimetil-7-[4,6-O-tenilideno-b-D-glicopiranosil *epi*podofilotoxina]) são dois derivados semi-sintéticos que foram desenvolvidos em 1970 na tentativa de preparar derivados da podofilotoxina que não possuíssem efeito tóxico gastro-intestinal iguais ao desta substância. Essas moléculas inibem a progressão do ciclo celular na fase de transição S/G<sub>2</sub>, e introduzem quebras na fita do DNA, após a interferência na atividade da topoisomerase II (ERDEMOGLU, *et al.*, 2004).

A topoisomerase II é uma enzima nuclear com função crítica na replicação, transcrição e recombinação de DNA (ALBERTS *et al.*, 2009). Essa enzima tem a capacidade de introduzir quebras transitórias na fita dupla de DNA com subsequente translocação e religação no ponto de junção, alterando a topologia do DNA (ALBERTS *et al.*, 2009; STRYER, 2008). Os intermediários essenciais destas reações são complexos DNA/topoisomerase II. O teniposideo estabiliza estes complexos, que resultam na formação de quebras na fita de DNA associadas ao seu efeito citotóxico (ERDEMOGLU, *et al.*, 2004).

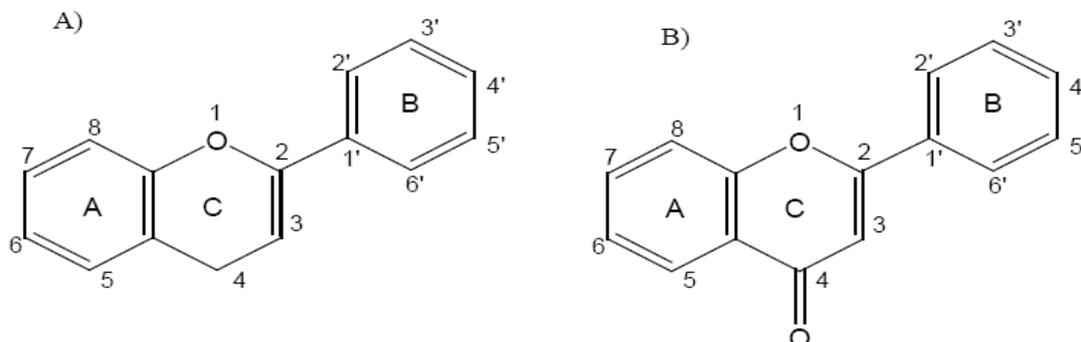
O etoposideo e o teniposideo destacam-se no tratamento quimioterápico do câncer.

#### **2.2.2.4 – Flavonóides: Estrutura, Função e Propriedades Antineoplásicas**

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída no reino vegetal (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

Os flavonóides são encontrados em diversas formas estruturais, entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos

números seguidos de uma linha (') para o núcleo B. O anel C pode ter forma cíclica piranóica (núcleo flavonóide básico) ou ainda conter um grupo carbonila na posição 4 (figura 13) (MANN, 2002).



**Figura 13: A - Estrutura básica dos flavonóides e B - Estrutura básica dos flavonóides com grupo carbonila no C-4** (Adaptado de ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

São conhecidas mais de 9.000 estruturas de flavonóides sendo possível a ocorrência de diferentes moléculas na mesma espécie vegetal. Flavonóides encontrados nas folhas podem ser estruturalmente diferentes daqueles presentes nas flores, nos caules ou ramos, raízes ou frutos de uma mesma espécie vegetal. O mesmo composto ainda pode ocorrer em diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal em que se encontra (HARBORNE & WILLIAMS, 2000; WILLIAMS & GRAYER, 2004).

A variação estrutural no anel C subdivide os flavonóides em seis principais classes, são elas: flavonóis contendo uma hidroxila na posição 3 e carbonila na posição 4 do anel C; flavonas contendo apenas a carbonila na posição 4; flavanóis contendo apenas a hidroxila no C-3, porém sem a dupla ligação entre os C-2 e C-3; flavanonas contendo apenas a carbonila no C-4, também sem a dupla ligação entre os C-2 e C-3; antocianidinas apenas contendo a hidroxila no C-3; isoflavonas em que o anel B está localizado na posição C-3 do anel C (ROSS & KASUM, 2002).

Glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, etc., são mecanismos importantes para modular a polaridade, toxicidade, solubilidade e direcionamento intracelular dos flavonóides, estocados nos vacúolos das células vegetais. A forma conjugada contribui para a extraordinária variação na

distribuição, propriedades e funções destes (AHERNE & O'BRIEN, 2002; EDREVA, 2005).

Os flavonóides são encontrados em plantas principalmente na forma conjugada como glicosídios, no qual pelo menos 8 monossacarídeos diferentes ou combinações desses (di ou trissacarídeos) podem ligar-se aos diferentes grupos hidroxilas do flavonóide aglicona, resultando no grande número de flavonóides conhecidos. Os açúcares mais comuns incluem D-glucose e L-ramnose. Os glicosídeos são normalmente O-glicosídeos, com a molécula de açúcar ligada ao grupo hidroxila na posição C-3 ou C-7 (ERLUND, 2004).

A abundância e diversidade estrutural dos flavonóides sugerem que sejam importantes para as plantas superiores. Contudo, não está claro que também o sejam para o homem. De fato, pode-se inferir que os seres humanos ingerem muitas gramas de flavonóides diariamente, sendo encontrados com frequência nas frutas e em muitas outras espécies vegetais, no vinho, em cereais e ocasionalmente em corantes alimentares (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

O emprego terapêutico de plantas contendo flavonóides é vasto e, em muitos casos, ainda empírico. Alguns medicamentos são elaborados a partir de flavonóides, em particular o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e agindo como cofator de vitamina C. Outras pesquisas sugerem que alguns flavonóides são responsáveis por ação antitumoral considerável, podendo ainda agir como antivirais, anti-hemorrágicos, hormonais, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

Em função de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, os flavonóides podem ser aplicados a muitas outras patologias, as quais estão intimamente ligadas aos processos oxidativos e inflamatórios como: câncer, diabetes, doenças vasculares (aterosclerose), doenças neurodegenerativas, doenças reumáticas, hepatopatias, entre outros (YOKOMIZO & MORIWAKI, 2005; HAVSTEEN, 2002).

Reddy *et al.* (2003) relatam que a propriedade antioxidante dos flavonóides faz com que eles tenham a propriedade de inibir vários tipos de câncer.

Estudos *in vivo* e *in vitro* apontam os flavonóides como moléculas supressoras da carcinogênese. As classes que têm apresentado estes efeitos

são: chalconas, flavanonas, flavanóis, flavonas, flavonóis e isoflavonas. Atualmente, existe um grande interesse nestas moléculas, pois mostram efeitos benéficos em vários mecanismos envolvidos no desenvolvimento de câncer (RUSAK *et al.*, 2005).

Dados da literatura revelam que os possíveis mecanismos de inibição da carcinogênese por polifenóis estão relacionados com o aumento da expressão de superóxido dismutase (MANSON, 2003); inibição da cicloxigenase e lipoxigenase (SAKATA *et al.*, 2003); indução de apoptose e repressão do ciclo celular, como demonstrado em células carcinogênicas humanas *in vitro* (MANSON, 2003).

Existem diferentes mecanismos de ação desempenhados pelos flavonóides como agentes anti-mutagênicos. Certos flavonóides podem influenciar diretamente a atividade enzimática envolvida no reparo do DNA e/ou modular expressão de genes (FERGUSON, 2001).

O flavonóide quercetina bloqueou o ciclo celular na fase G1/S de células de câncer colorretal e gástrico. Já em linhagens de células de mama e laringe, esse flavonóide mostrou bloquear a fase G2/M do ciclo celular. O metabolismo rápido da quercetina forma o metabólito metilado isorhamnetina, que possui efeito no retardamento das fases G0-G1 do ciclo celular em baixas concentrações em linhagens de células HepG2 (hepatocarcinoma). A isorhamnetina e o flavonóide miricetina, em diferentes concentrações, afetaram as diferentes enzimas envolvidas na transdução de sinais, dessa forma interromperam o ciclo celular em estágios específicos (RUSAK *et al.*, 2005).

Alguns flavonóides como apigenina, luteolina e quercetina induzem a apoptose por mecanismos dependentes do gene p-53. A proteína p-53 funcional apresenta meia vida curta (10 a 20 minutos) e atua na regulação do ciclo celular, reparo de DNA e, como relatado anteriormente, na indução de apoptose das células geneticamente instáveis, mantendo desta forma a integridade do genoma (ALBERTS *et al.*, 2009; SCHULTZ & HARRINGTON, 2003; JUNIOR, 2002;).

Evidências *in vitro* mostraram que a quercetina pode inibir a proliferação celular através do bloqueio da atividade da ornitina carboxilase e da incorporação da timidina ao DNA, além de modular a apoptose em cultura de células. Resultados mostraram ainda que a quercetina inibiu tanto a mitose

quanto a apoptose em cultura de células glomerulares. O mecanismo molecular envolvido no efeito antimitótico e antiapoptótico da quercetina são desconhecidos, mas investigações sugerem que os flavonóides inibem a tirosina quinase e MAP quinase, podendo ser estes os possíveis alvos farmacológicos (MARCHAND, 2002).

Segundo Williams *et al.* (2004), flavonóides possuem a capacidade de ligarem-se aos sítios de ligação do ATP de um grande número de proteínas, incluindo ATPase mitocondrial, proteína quinase A, proteína quinase C e topoisomerase.

As proteínas quinases regulam e controlam muitas atividades fisiológicas, conseqüentemente interferem nas enzimas que estão associadas ao crescimento tumoral (STRYER, 2008).

Flavonóides podem inibir a promoção do tumor através de efeitos inibitórios na fosforilase C e proteína quinase. A atividade da proteína tirosina quinase foi inibida pelo flavonóide quercetina em tumores mamários de ratos induzidos pelo (DMBA) 9,10 dimetil-1,2-benzantraceno. Diversos flavonóides como epicatequina, epicatequina galato, epigallocatequina e quercetina vêm sendo pesquisados como citoprotetores nas rotas de sinalização do ciclo celular. Uma ação citoprotetora importante desses compostos está envolvida na inibição da caspase-3 e ativação de proteínas MAP quinases que são pró-apoptóticas (WILLIAMS *et al.*, 2004).

Os flavonóides hesperidina e naringenina apresentam atividade inibitória de numerosas proteínas quinases. Essa inibição é mediada via ligação dos flavonóides ao sítio de ligação do ATP, presumivelmente por causar trocas na estrutura tridimensional das quinases levando à sua inatividade. Flavonóides também podem interagir com a mitocôndria, interferindo em passos do metabolismo intermediário e/ou baixa regulação da expressão de adesão de moléculas (WILLIAMS *et al.*, 2004).

Flavonóides produzem diferentes efeitos biológicos, dentre eles, a capacidade de induzir apoptose. A quercetina é um flavonol que induz a morte celular de células tumorais predominantemente por mecanismos apoptóticos, via ativação das caspase-3 e caspase-9, em diversas linhagens de células tumorais (WILLIAMS *et al.*, 2004).

A naringenina causa citotoxicidade e apoptose via indução da atividade de caspase-3/ CPP32, mas não da atividade da caspase-1, em linhagens de células leucêmicas humanas (HL-60) (SCHULTZ & HARRINGTON, 2003).

Neste contexto, é importante ressaltar, que a diversidade biológica disponível na Floresta Atlântica brasileira é uma potencial reserva natural de metabólitos secundário com propriedades farmacológicas no combate e tratamento de várias enfermidades, dentre elas, o câncer.

### 2.3 - Floresta Atlântica

A Floresta Atlântica pode ser definida como um bioma tropical extremamente heterogênea em sua composição que engloba diversos tipos de vegetação, como florestas ombrófilas densas ou mistas, florestas estacionais e outros biomas associados como restingas e manguezais (GUEDES-BRUNI, 1998) que originalmente estendia-se de forma contínua ao longo da costa brasileira, penetrando até o leste do Paraguai e nordeste da Argentina em sua porção sul (RIBEIRO *et al.*, 2009). No passado, cobria mais de 1,5 milhões de km<sup>2</sup> (92% desta área no Brasil). Atualmente, restam menos de 11,7% da vegetação original (RIBEIRO *et al.*, 2009; ROCHA & FELDMANN, 2006).

A Floresta Atlântica é um dos 35 *hotspots* mundiais de biodiversidade (FONSECA *et al.* 2004), embora grande parte tenha sido destruída, ela abriga mais de 8.000 espécies endêmicas de plantas vasculares, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (MYERS *et al.*, 2000) e potencial pra aumentar em muito esse número. No Brasil, com base na distribuição de vertebrados terrestres e plantas, são reconhecidas pelo menos cinco áreas de endemismos, a saber: Brejos Nordestinos, Pernambuco, Bahia Central, Costa da Bahia e Serra do Mar (SILVA *et al.*, 2004).

É importante ressaltar que a maioria das espécies oficialmente ameaçadas de extinção no Brasil habita a Floresta Atlântica. Atualmente, a lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, relaciona 472 espécies, sendo este o bioma com maior número, com 276 espécies, seguido pelo Cerrado com 131 e a Caatinga com 46 espécies ameaçadas. A Amazônia possui 24 espécies, o Pampa com 17 e o Pantanal 2 espécies ameaçadas (BRASIL, 2008).

A Floresta Atlântica foi considerada Patrimônio Nacional pela Constituição de 1988 e reconhecido internacionalmente como Reserva da Biosfera pelo programa MaB (*Man and Biosphere*) da UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação Ciência e Cultura), Patrimônio Mundial declarado pela ONU e atualmente é um dos conjuntos de ecossistemas mais ameaçados do planeta (ROCHA & FELDMANN, 2006).

Dentre a imensa diversidade biológica da Floresta Atlântica foram selecionadas três espécies para execução deste trabalho, a saber: *Trigynaea oblongifolia* Schltidl (Annonaceae), *Ottonia frutescens* Trel (Piperaceae) e *Bathysa australis* (St Hill) Hooz (Rubiaceae). Seleção de tais espécies teve como base relatos de atividade biológica em indivíduos pertencentes a essas famílias e a análise da literatura, também, revelou que existem poucos registros de estudos fitoquímicos e ensaios biológicos para as três espécies selecionadas.

### **2.3.1 - A família Annonaceae e *Trigynaea oblongifolia* Schltidl (Annonaceae)**

A família Annonaceae compreende 2300 espécies, submetidos a aproximadamente 130 gêneros (HUTCHINSON, 1973). Sua distribuição geográfica ocorre quase que exclusivamente em regiões tropicais (HEYWOOD, 1985) sendo que, no neotrópico, está representada por aproximadamente 40 gêneros e 900 espécies (CHATROU *et al.*, 2004). No Brasil, segundo Maas *et al.* (2001), são encontrados 26 gêneros (sete endêmicos) com cerca de 260 espécies.

Annonaceae é conhecida principalmente por seus frutos comestíveis, tais como a fruta do conde ou ata (*Annona squamosa* L.) e a graviola (*A. muricata* L.). Além disso, algumas espécies fornecem madeira própria para carpintaria e raízes utilizáveis como cortiça (*A. glabra* L., *A. crassiflora* Mart.); outras são consideradas medicinais (*A. spinescens* Mart., *A. foetida* Mart.) e ornamentais (*A. Cacans* Warm. e *Xylopia sericea* A.St.-Hil.) (CORRÊA, 1984).

São arbustos, arvoretas ou árvores. Folhas alternas, simples, dísticas, com tricomas simples, escamiformes ou estrelados. Possuem uma flor ou inflorescência, axilar, extra-axilar, opositifolia, caulinar ou em ramo flageliforme;

sépalas três; pétalas seis, em dois ciclos; estames poucos a numerosos, conectivo dilatado em forma de disco; carpelos poucos a numerosos, livres ou soldados na base. Fruto apocárpico, pseudosincárpico ou sincárpico; carpídios deiscentes ou indeiscentes. Sementes com endosperma ruminado e embrião diminuto (MAAS *et al.*, 2002; MAAS *et al.*, 2001 ).

A família Annonaceae é muito pesquisada devido ao isolamento e caracterização de diversas classes de metabólitos secundários farmacologicamente ativos, principalmente as acetogeninas (denominada também de policetídeos ou poliacetatos). Também é possível encontrar a presença de terpenoides (principalmente diterpenos), alcaloides (principalmente derivados isoquinolínicos), além de óleos essenciais cuja composição é predominantemente de monoterpenos e sesquiterpenos (LEBOEUF *et al.*, 1982).

Vulgarmente conhecida como pinhão, a espécie *Trigynaea oblongifolia* é endêmica do Brasil com domínios fitogeográficos de Floresta Atlântica. É encontrada em altitudes de 600-1200 m distribuída pelo Sudeste brasileiro, onde possui ocorrência catalogada para Carangola - MG, Magé - RJ, Parati - RJ e Cubatão - SP. São árvores ou arbustos com 3 – 4 m de altura. Folhas alternas, oblongo-elíptica, 10-20 x 4-6 cm, nervura principal impressionado ao ligeiramente levantada no lado superior, folhas jovens densamente cobertas de pêlos no lado inferior; Corola amarelada. Flores aromáticas. Número de sementes desconhecido (LEONI, 2002; MAAS *et al.*, 2001).

### **2.3.2 - A família Piperaceae e *Ottonia frutescens* Trel (Piperaceae)**

A família Piperaceae com ampla distribuição no mundo é composta por 10 gêneros contendo em torno de 2000 espécies. As plantas desta família são eretas ou escandentes, arbustos ou arvoretas, terrestres ou epífitas; Folhas estipuladas, alternas, opostas ou verticiladas, inteiras, sésseis ou pecioladas de consistência e formatos variados, e indumento diversificado. No Brasil esta família está representada por cinco gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Potomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis*, com um total de 450 espécies (YUNCKER, 1973).

O gênero *Ottonia* é representado por 23 espécies, onde a maioria pode ser encontrada no Brasil (YUNCKER, 1973) e produzem um efeito anestésico-picante e sialogogo (salivação) (CUNICO *et al.*, 2003).

As raízes e as partes aéreas destas plantas são empregadas popularmente no tratamento de odontalgias, *in natura*, na forma de fragmentos ou alcoolaturas e como promovem alívio imediato essas plantas são conhecidas como anestesia (CUNICO *et al.*, 2003).

Este gênero, característico de regiões tropicais e subtropicais, encontra-se distribuído no Brasil nas regiões Sul e Sudeste, em lugares sombreados (GUIMARÃES *et al.*, 1978). As espécies constituídas do gênero *Ottonia* apresentam as seguintes características botânicas: são arbustos ou subarbustos ramosos, podendo atingir até 2 m de altura. Suas folhas são curto-pecioladas. Lâmina elíptico-ovalada assimétrica, de base arredondada ou subarredondada, é levemente acuminada no ápice. Bractéolas são sacodogaleadas. As flores com pedicelo pode ultrapassar o comprimento do ovário. O ovário é ovalado-tetragonal. Os estigmas são comumente quatro. Os frutos são tetragonais mais ou menos sulcados. As plantas deste gênero são criófitas e seletivamente higrófitas; ocorrem principalmente nas planícies aluviais, nos inícios das encostas, bem como em solos de acive pouco acentuado (GUIMARÃES *et al.*, 1978; YUNCKER, 1973).

As espécies, *Ottonia anisum* Sprengel (Falso jaborandi), *Ottonia carpunga* Miq (Alfavaca carpunga), *Ottonia eucalyptophyllum* Kunth (Nhandu-mirim), *Ottonia propinqua* Kunth (Jaguarandi e Jaborandi), *Ottonia warakabacoura* Miq. (Nhambi) são empregadas na medicina popular, principalmente, como anestésico local (CUNICO *et al.*, 2003).

O gênero *Ottonia* destaca-se por apresentar em sua composição química uma grande diversidade de metabólitos secundários bioativos. Porém, vários estudos fitoquímicos realizados com espécies deste gênero indicam que são constituídas, principalmente, de amida piperovatina (ANTUNES *et al.*, 2001).

A piperovatina foi isolada das raízes e caules de *Ottonia frutescens* e dados experimentais comprovaram um efeito de dormência e salivação, que persistiram por 35 minutos após contato com esse composto (MAKAPUGAY *et al.*, 1983).

Facundo *et al.* (2004) isolaram do extrato etanólico de folhas da *O. corcovadensis* ácido caféico e os flavonóides 3',4',5,5',7-pentametoxiflavona, 3',4',5,7-tetrametoxiflavona e 5-diidroxi-3',4',5,7-tetrametoxiflavona. Além disso, comprovou no óleo essencial da folha a presença de 15 terpenóides (b-pineno, felandreno, p-cimeno, limoneno, a-cubebeno, b-elemeno, *trans*-cariofileno, (Z)-b-farneseno, aloaromadendreno, *epi*-biciclosesquifelandreno, biciclogermacreno, b-bisaboleno, g-cadineno, d-cadineno, germacreno B). Das raízes foram isoladas piperovatina e chingchengenamida.

### 2.3.3 – A família Rubiaceae e *Bathysa australis* (St Hill) Hooz (Rubiaceae)

A família Rubiaceae inclui aproximadamente 637 gêneros, dentre eles o gênero *Bathysa*, e cerca de 10.700 espécies (ROBBRECHT, 1988), que ocorrem principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, atingindo regiões temperadas e frias na Europa e norte do Canadá (BARROSO *et al.*, 1986). As espécies desta família são identificadas pelas seguintes características botânicas: folhas simples, opostas e estípulas interpeciolares.

As espécies do gênero *Bathysa* ocupam sempre ecossistemas florestais. No Brasil estão praticamente restritas à Mata Atlântica do sul e sudeste do país, ocorrendo predominantemente em mata de encosta, mais raramente em mata de altitude (GERMANO-FILHO, 1999).

Algumas espécies de *Bathysa* são incluídas entre as falsas quinas que segundo Cunha (1937) englobam todas as plantas que contenham cascas de sabor amargo, de coloração avermelhada, amarelada ou acinzentada, capazes de fornecer uma alcoolatura ou decocto, usados como tônico ou febrífugo. As verdadeiras quinas diferem por possuir o quinino e ainda assim em percentagem mínima prevista pelo código farmacêutico.

Correa (1984) afirma que as cascas constituem tônicos que são freqüentemente empregados no tratamento de anemias, caquexias, febres palustres, ancilostomíase, convalescência, etc, além de fornecerem matéria corante.

A espécie *Bathysa australis* é amplamente distribuída pelo território brasileiro, ocorrendo no Distrito Federal, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, em matas de

encosta ou de tabuleiro, sendo característica do estrato arbóreo inferior (GERMANO-FILHO, 1999). Exemplos dessa espécie apresentam árvores com até 14m; extremidade dos ramos vilosa, estriada, quadrangular, espessa; folha simples, oposta, estípula livre, triangular, bainha persistente, com pelo menos 7cm compr., pecíolo quadrangular, 7 X 0,5cm, tomentoso, lâmina elíptica a elíptico-oval, ápice acuminado, base atenuada, 49-63 X 22-34cm, margem inteira, levemente irregular, ciliada, sub-cartácea, 19 pares de nervuras secundárias, paralelas, conspícuas, terciária formando retículo conspícuo na face abaxial, face adaxial tomentulosa, abaxial denso-tomentulosa, tricomas adensados nas nervuras, quando jovem tomentosa (GERMANO-FILHO, 1999).

A análise da literatura revela estudos fitoquímicos apenas para a espécie *Bathysa meridionalis*, de onde foi isolado o paeonol (WEEKS *et al.*, 1977). O paeonol é um ácido fenólico encontrado na *Paeonia suffruticosa*, uma planta medicinal chinesa, capaz de induzir apoptose em células SEG-1 e Eca 109 (câncer de esôfago) (SUN *et al.*, 2008).

Estudos com extrato etanólico e fração diclorometânica de folhas de *B. cuspidata* mostraram possuir atividade antinociceptiva e antiinflamatória, em camundongos albinos tratados previamente por via oral com o veículo (tween 80, 1%) e 1000mg/Kg de extrato etanólico e com 500mg/kg de fração diclorometânica, podendo estes resultados explicar o uso popular desta espécie para doenças que envolvem inflamação e dor (VANDERLINDE *et al.*, 2001).

Leoni (1995) relatou que a mucilagem de *Bathysa australis* é empregada como cicatrizante pelos moradores do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG.

### 3 – Objetivos

#### 3.1 - Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a anatomia e a ultraestrutura de folhas de *Trigynaea oblongifolia* Schltdl (Annonaceae), *Ottonia frutescens* Trel (Piperaceae), *Bathysa australis* (St Hill) Hooz (Rubiaceae) e avaliar *in vitro* a atividade citotóxica de extratos das folhas frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach, bem como em células de origem tumoral humana e células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC).

#### 3.2 – Objetivos Específicos

- Descrever a anatomia e ultraestrutura das folhas de *Trigynaea oblongifolia*, *Ottonia frutescens* e *Bathysa australis* por microscopia óptica e eletrônica de varredura e transmissão;
- Caracterizar histoquimicamente as folhas de *Trigynaea oblongifolia*, *Ottonia frutescens* e *Bathysa australis*;
- Realizar a prospecção fitoquímica em cromatografia de camada delgada dos extratos, utilizando reveladores e padrões para as principais classes de metabólitos secundários;
- Avaliar a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH dos extratos de *Trigynaea oblongifolia*, *Ottonia frutescens* e *Bathysa australis*;
- Avaliar os efeitos dos extratos no bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach;
- Avaliar os efeitos dos extratos na viabilidade celular;
- Quantificar a enzima desidrogenase láctica liberada pelas células (U937, COLO 205 e PBMC) após incubação com os compostos;

- Avaliar a indução de apoptose frente às células de origem tumoral humana, U937 e COLO 205;
- Determinar a toxicidade dos compostos frente às células U937, COLO 205 e mononucleares do sangue periférico humano (PBMC).

## 4 - Materiais e Métodos

### 4.1 - Área de coleta do material botânico

O material botânico foi coletado no fragmento de Floresta Atlântica encontrado na fazenda Sana Rita, situada na Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, na Zona da Mata Leste do Estado de Minas Gerais. Esta fazenda localiza-se entre os municípios de Carangola e Faria Lemos (20° 46' S e 42°02' W). Os desníveis altimétricos da fazenda variam entre 500 e 750 metros. O solo é representado pelos tipos Cambissolos, Latossolos e Podzólicos. A temperatura anual varia de 16° a 28 °C e pluviosidade média anual de 2.268 mm. A vegetação local é reconhecida como Floresta Ombrófila Densa (LEONI, 2002).

A coleta de material vegetal nos fragmentos florestais foi feita sob a forma de caminhada aleatória, adentrando-se pelo fragmento florestal e em suas bordas. As espécies foram localizadas e identificadas por Lúcio Leoni.

### 4.2 - Material Botânico

Folhas de indivíduos adultos de *Trigynaea oblongifolia* Schltld (ANNONACEAE), *Ottonia frutescens* Trel (PIPERACEAE), *Bathysa australis* (St Hill) Hooz (RUBIACEAE) foram coletadas com o auxílio de tesoura de poda. Amostras testemunhas estão depositadas no herbário "Guido Pabst" – GFJP no Município de Itaperuna RJ, sob os números de registro 943 GFJP (*T. oblongifolia*), 204 GFJP (*O. frutescens*), e 1749 GFJP (*B. australis*).

### 4.3 – Microscopia do material botânico

#### 4.3.1 - Microscopia Óptica

Fragmentos das folhas das três espécies foram fixados em solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5 %, formaldeído 4,0 % diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH ~ 7,2, sob temperatura ambiente, durante 2

horas. Após serem lavados por 45 minutos no mesmo tampão, os fragmentos foram pós-fixados em solução aquosa contendo tetróxido de ósmio 1,0 % diluído em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH ~ 7,2, temperatura ambiente, durante 1 hora na ausência de luz. Após três lavagens de 45 minutos no mesmo tampão, os fragmentos foram submetidos à série cetônica ascendente [50 %, 70 %, 90 %, 100 % (3X)], durante 1 hora em cada etapa, para desidratação. Então, os fragmentos foram infiltrados com resina epóxi (Epon Polibed), utilizando-se serie crescente de resina em propanona. A polimerização da resina foi realizada a 60 °C. Cortes semifinos, aproximadamente 1 µm de espessura, foram obtidos com navalhas de vidro em ultramicrótomo (REICHERT ULTRACUT-S®). A coloração foi realizada com solução aquosa de azul de toluidina 1,0 %, acrescido de 0,1% de Bórax. Lâminas permanentes foram montadas com Entellan®. A documentação digital foi realizada em microscópio óptico Axioplan ZEISS (Oberkochen, Germany). As imagens foram obtidas através da câmera Cannon Power Shot 14 mpixel (acoplada ao microscópio) com o auxílio do programa Axiovision (Zeiss).

### **4.3.2 – Histoquímica**

Os testes histoquímicos das folhas das três espécies foram realizados em cortes a mão livre de material recém coletado. A documentação digital foi realizada conforme descrito anteriormente.

O material seccionado foi disposto em lâminas e submetido a diferentes corantes/reagentes, a saber:

#### **4.3.2.1 – Compostos ácidos e básicos**

Os cortes foram submetidos a uma solução aquosa de azul de toluidina a 0,05% por 10 segundos a um pH de 6,8 (O'BRIEN *et al.*, 1965). Através da reação de metacromasia revelada pelo corante, os compostos ácidos adquirem uma coloração azul clara e os compostos básicos adquirem uma coloração roxa/azul escura.

#### **4.3.2.2 – Proteínas totais**

Proteínas totais foram evidenciadas em cortes expostos a solução aquosa de Azul Brilhante de Coomassie G 0,25 % contendo 5 % de ácido acético, durante trinta minutos. Este procedimento foi seguido de lavagem em solução aquosa de ácido acético 5 % por três vezes, durante 5 minutos em cada etapa. Lâminas semipermanentes foram montadas com glicerina 50% (JOHANSEN, 1940).

#### **4.3.2.3 – Lipídios**

Para detecção de lipídeos foram feitos testes com Sudan IV 0,03%, onde o material foi submetido ao corante por 5 min (PEARSE, 1980).

#### **4.3.2.4 – Compostos Fenólicos**

Para a detecção de compostos fenólicos cortes da lâmina foliar foram submetidos a uma solução aquosa a 10% de cloreto férrico por 5 minutos para observação de coloração verde-azulada ou negro azulado ao microscópio óptico (JOHANSEN, 1940).

#### **4.3.2.5 – Compostos Pécnicos**

Para avaliar a presença de compostos pécnicos, os cortes foram submetidos a uma solução aquosa de vermelho de rutênio 0,05% por 10 segundos (JOHANSEN, 1940).

#### **4.3.2.6 – Alcalóides**

Na detecção de alcalóides os cortes foram submetidos ao reagente de dragendorff (COSTA, 1982) durante 5 a 10 minutos em seguida rapidamente lavados em nitrato de sódio a 5%; e posteriormente lavados em água.

#### 4.3.2.7 – Compartimentos Ácidos

Para observar a presença de compartimentos ácidos, os cortes foram submetidos a uma solução aquosa de laranja de acridina 0,01% por 5 minutos (JOHANSEN, 1940).

#### 4.3.3 – Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para microscopia eletrônica de transmissão foram utilizados os mesmos procedimentos que para microscopia óptica (item 4.3.1), exceto a ultramicrotomia e a contrastação. Cortes ultrafinos, com aproximadamente 70 nm de espessura, foram obtidos, utilizando-se navalha de diamante (Diatome<sup>®</sup>) em ultramicrotomo (REICHERT ULTRACUT-S<sup>®</sup>); os cortes foram coletados em grades de cobre de 300 *mesh*. A contrastação foi realizada em solução aquosa saturada de acetato de uranila, durante 40 minutos, seguida de lavagem em água destilada e de 5 minutos em citrato de chumbo 1% (REYNOLDS, 1963). Os cortes foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (ZEISS EM 900), operando a uma aceleração de voltagem de 80 kV. A documentação foi realizada com o auxílio do programa iTEM (Olympus).

#### 4.3.4 – Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram utilizados para a microscopia eletrônica de varredura os procedimentos para microscopia eletrônica de transmissão como descrito anteriormente. Após a desidratação, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico de CO<sub>2</sub> utilizando o aparelho CPD-030 BAL-TEC (Liechtenstein). Fragmentos secos das folhas foram aderidos com fita adesiva de carbono dupla-face (3M) e cola de carbono em suportes adequados. As amostras foram cobertas por *sputtering* com uma camada de aproximadamente 20 nm de ouro, utilizando-se aparelho SCD-050 BAL-TEC (Liechtenstein). Amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (DSM 962 e EVO 40 – ZEISS), a uma aceleração de voltagem de 15 kV ou 25 kV.

#### 4.3.5 – Preparação do Extrato Vegetal

Folhas de *T. oblongifolia*, *O. frutescens*, e *B. australis* foram submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada, sob temperatura constante de 40°C até estabilização do peso, desta forma foi obtido a matéria seca para cada uma dos materiais supracitados.

O material desidratado foi triturado com gral e pistilo em presença de nitrogênio líquido, neste procedimento foram utilizadas 350g de folhas de *O. frutescens*, 850g *T. oblongifolia* e 900g de *B. australis*. O material com granulometria reduzida foi depositado em um frasco âmbar e submetido a uma extração por maceração em metanol 10% (p/v) por sete dias, à temperatura ambiente. O período para a extração exaustiva foi de 21 dias. A cada sete dias o líquido extrator foi filtrado e um novo líquido extrator foi adicionado. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo sob temperatura controlada entre 40 e 50° C. O processo de secagem do extrato das folhas foi finalizado sob ventilação direta, com temperatura controlada entre 40 e 50 °C, dando origem a um material seco. Ao final, foi verificado o rendimento dos extratos e os mesmos foram armazenados em recipiente plástico opaco, em presença de agente dessecante.

#### 4.3.6 – Prospecção fitoquímica dos extratos

A análise fitoquímica dos extratos metanólicos das folhas de *O. frutescens*, *T. oblongifolia*, e *B. australis* foi realizada em cromatografia em camada delgada (CCD) (WAGNER *et al.*, 1984). Foi avaliada a presença dos seguintes grupos de metabólitos secundários: Alcalóide, Antraquinonas, Cardiotônicos, Cumarinas, Flavonóides, Polifenóis (Taninos), Saponina, Triterpeno.

No processo cromatográfico foram usados fases móveis, reveladores e padrões de referência específicos para cada uma das classes de metabólitos secundários (Tabela 1) (WAGNER *et al.*, 1984).

**Tabela 1:** Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas de *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia* e *Bathysa australis*.

Classe de metabólito	Fase móvel	Revelador	Padrão
Alcalóides	Acetato de etila-metanol-água (100:14:10)	Reagente de Dragendorff	Quinina
Antraquinonas	Acetato de etila-metanol-água (100:17:13)	Solução KOH 5% em etanol	1,8-diidroxiantraquinona
Cardiotônicos	Acetato de etila-metanol-água (81:11:8)	Reagente de Kedde	Digitoxina
Cumarinas	Ácido acético-tolueno-éter dietílico-água (50:25:25:5)	Solução KOH 5% em etanol	Benzopirona
Flavonóides	Acetato de etila-ácido-fórmico-ácido acético-água (55:5:5:1)	Solução AlCl <sub>3</sub> 5% em etanol	Rutina
Polifenóis (Taninos)	Tolueno-butanol-ácido acético (80:40:16)	Reagente de Barton	Ácido pirogálico
Saponinas	Clorofórmio-ácido acético glacial-metanol-água (15:8:3:2)	Anisaldeído sulfúrico	18-β-glicirretínico

#### 4.3.7 – Avaliação da atividade antioxidante pelo teste do DPPH

A capacidade de eliminar radicais livres dos três extratos foi determinada utilizando o radical estável DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Nesta metodologia, caso o extrato tenha compostos com propriedade antioxidante, este reage com o DPPH, reduzindo-o, acarretando em uma mudança na coloração, de violeta para amarelo claro (SILVA, et al., 1999).

O procedimento ocorreu da seguinte forma, sendo que as amostras foram diluídas em metanol em cinco diferentes concentrações, a saber: 30, 60, 120, 180, 240 µg/mL. Foram adicionados 300 µL de cada uma das cinco concentrações das três amostras em 2,7 mL de uma solução metanólica de DPPH a 60µM. A concentração final das amostras foi de 3, 6, 12, 18, 24 µg/mL.

A solução de DPPH foi preparada diariamente, armazenada ao abrigo da luz e mantida a 4°C até o momento da utilização.

O controle foi preparado da seguinte forma: 2,7 mL da solução metanólica de DPPH acrescidos de 300 µL de metanol. Para o branco foram preparadas cinco soluções, ou seja, uma para cada concentração de extrato. O preparo destas soluções deu-se da seguinte forma: 300 µL de amostra (concentração: 30, 60, 120, 180, 240 µg/mL) foram diluídos em 2,7 mL de metanol. A concentração final dos controles foi de 3, 6, 12, 18, 24 µg/mL.

O meio da reação foi mantido ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. A absorvância das amostras foram medidas nos tempos: zero, 15, 30 e 45 minutos o comprimento de onda usado foi de 515 nm em cubetas de quartzo. A atividade antioxidante da amostra, em porcentagem de captação do DPPH, foi calculada em relação à absorvância do controle (maior absorvância) e à absorvância da solução contendo a amostra, através da fórmula:

$$\%AA = \frac{ABS_{controle} - (ABS_{amostra} - ABS_{branco})}{ABS_{controle}} \times 100$$

Foi calculada a CL<sub>50</sub> para o experimento, utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. por meio de uma curva de regressão não linear, a partir dos dados obtidos no experimento. A CL<sub>50</sub> é concentração necessária para que o extrato testado reduza em 50% a concentração de DPPH utilizada.

#### 4.3.8 – Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade dos extratos foi realizado conforme o método descrito por Meyer *et al*, (1982) (Adaptado) utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* Leach.

Os extratos de *O. frutescens*, *T. oblongifolia* e *B. australis* foram dissolvidos em solução de Dimetil sulfoxido - DMSO 2,5% e água marinha sintética.

Ovos de *Artemia salina*, adquiridos comercialmente, foram colocados em um béquer contendo uma solução de sal marinho (38g/L), pH 8, essa solução foi denominada água marinha sintética. Foi utilizado um borbulhador para manter a solução em agitação constante. A temperatura foi mantida entre 20°C a 25°C em banho-maria. Após 24 horas os ovos de *A. salina* eclodiram em náupilos.

Em microplacas de 96 poços foram preparadas concentrações de 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800 e 1000 µg/mL para cada um dos extratos e a cada uma delas foram adicionados 10 náupilos do microcrustáceo, e novamente incubadas em banho-maria (20 °C a 25 °C) por 24 horas.

Após este período, o número de microcrustáceos vivos e mortos em cada concentração foi contado, com auxílio de um estereoscópio binocular E. Leitz Wetzlar (20 vezes). Foram consideradas mortas aquelas larvas que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos. O ensaio foi realizado em triplicata.

Como controle positivo, foi utilizado uma solução de dicromato de potássio nas concentrações de 400, 600 e 800 g/mL. Para o controle negativo, 200 µL de água marinha. Foram acrescentados controles com DMSO 2,5 %. O experimento foi validado somente quando nos controles positivos foi observada a morte e no controle negativo a sobrevivência de todos os indivíduos.

Para o cálculo da CL<sub>50</sub>, utilizou-se o método de Probitos de análise, que é definido como a concentração necessária para causar a morte de 50 % das larvas de *Artemia salina*, no período de 24 horas.

Os cálculos foram realizados no programa computacional estatístico "MICRO PROBIT". Com confiança de 95%.

Os compostos foram considerados altamente tóxicos quando a CL<sub>50</sub> foi menor que 80 µg/mL; entre 80 µg/mL e 250 µg/mL foram considerados moderadamente tóxicos; e com CL<sub>50</sub> maior que 250 µg/mL, com baixa toxicidade ou não tóxicos (PARRA *et al.*, 2001).

#### 4.3.9 – Cultura da linhagem de célula de origem tumoral

As células U937, (leucemia de origem linfóide), COLO-205 (adenocarcinoma colorretal) foram cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As culturas foram replicadas a cada 2 dias e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada.

#### 4.3.10 – Avaliação *in vitro* da atividade biológica dos extratos frente às células tumorais

As células foram plaqueadas em volume de 100 µL/poço (1x10<sup>6</sup> cels/mL) em placas de 96 poços, tratadas com os extratos de *O. frutescens*, *T. oblongifolia* e *B. australis* nas concentrações finais de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL para os testes de viabilidade celular com MTT (- 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5- difenil-2-H-brometo de tetrazolium). As células foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada. No tempo de 24 horas as células foram avaliadas quanto à inibição de crescimento (MTT) e quanto ao índice da enzima desidrogenase láctica liberada, e após 12, 24 e 36 horas quanto à taxa de apoptose e necrose por microscopia de fluorescência. Como controles negativos todas as células foram incubadas com meio DMEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL), para os extratos as células foram incubadas com DMSO (SIGMA®) a 1%.

#### 4.3.11 – Avaliação do efeito citotóxico dos extratos frente às células tumorais

Após tratamento como no item 4.3.10, a viabilidade celular foi determinada através do microensaio colorimétrico utilizando MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5- difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MOSMANN, 1983). As células foram incubadas por 24 horas com os extratos e após o tempo

determinado foram adicionados 10 $\mu$ L de MTT (Sigma, 5mg/mL) para cada 100 $\mu$ L de cultivo. As placas foram mantidas na estufa por quatro horas. Após esse período foram retirados 150 $\mu$ L do sobrenadante de cada poço e depois adicionados 100 $\mu$ L de uma solução de HCl com isopropanol, homogeneizando bem até a completa dissolução dos cristais de sal formados. A placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX) utilizando o comprimento de onda de 570nm. Os resultados foram analisados através da absorbância de cada poço e os experimentos realizados em triplicatas.

#### **4.3.12 – Quantificação da Lactato desidrogenase (LDH) liberada pelas células após incubação com os extratos.**

Após tratamento como no item 4.3.10, a viabilidade celular foi determinada através da dosagem da Lactato desidrogenase (LDH). A determinação da LDH é proporcional ao número de células lisadas por necrose. Para quantificação da LDH foi utilizado o KIT DOLES de mensuração. As células foram plaqueadas com os extratos por 24 horas, após o tempo de incubação 50 $\mu$ M do sobrenadante foram transferidos para outra placa onde foram adicionados 100 $\mu$ M da solução A (250 $\mu$ M de alúmen férrico + 400 $\mu$ M de substrato) e incubadas em estufa por 3 minutos. Posteriormente foram adicionados 100 $\mu$ M da solução B (225 $\mu$ M de FMS/NAD + 4275 $\mu$ M de água destilada) e incubadas em estufa por 7 minutos. A placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX) à 492nm.

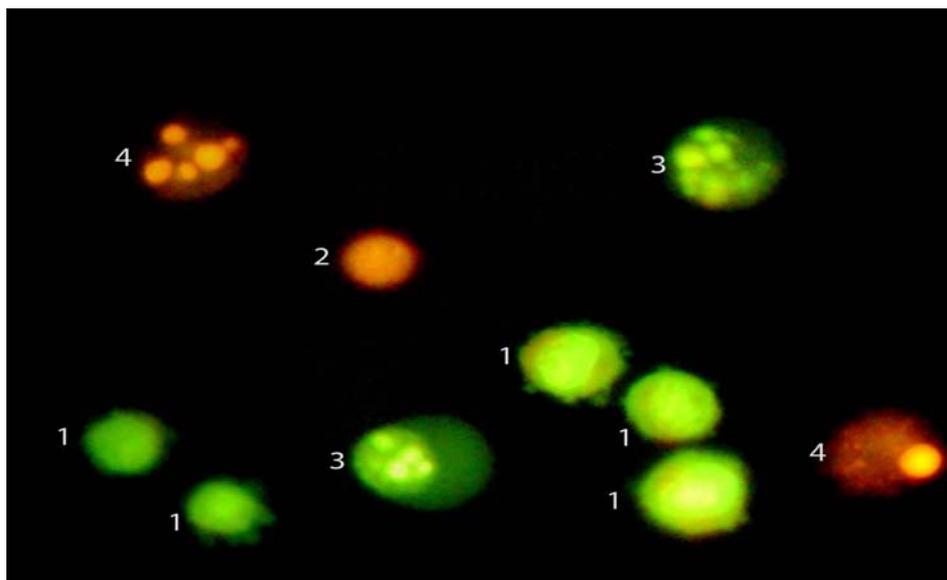
#### **4.3.13 – Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência**

As células cultivadas com os compostos conforme os tempos e concentrações indicados (12, 24 e 36 horas) foram coradas com uma solução de 10  $\mu$ g/mL laranja de acridina (Sigma) e 10  $\mu$ g/mL de brometo de etídio (Sigma). Após a montagem em lâmina e lamínulas, as células foram levadas ao microscópio de fluorescência (Axioplan – Zeiss) e contadas aproximadamente 300 células em vários campos escolhidos aleatoriamente, discriminando-se as

células apoptóticas, necróticas e normais. Foram feitas duplicatas para cada condição e os experimentos repetidos pelo menos duas vezes.

Foram adotados padrões convencionais com relação à morfologia e coloração das células (Figura 14):

- Células vivas: possuem morfologia do núcleo intacta, DNA corado por laranja de acridina (cor verde).
- Células apoptóticas: condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por laranja de acridina (cor verde), que reflete a membrana plasmática intacta e não permeável ao brometo de etídio.
- Células necróticas-primárias: morfologia do núcleo necrótico, corado por brometo de etídio (cor vermelha).
- Células necróticas-secundárias: condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por brometo de etídio (cor vermelha) e laranja de acridina, que demonstra a permeabilização necrótica da membrana plasmática que permite a entrada do brometo de etídio.
- A porcentagem de cada população celular – células normais, apoptóticas e necróticas – em relação ao total foi calculada. Foram consideradas para o cálculo da porcentagem de apoptose as células apoptóticas e as necróticas secundárias, também chamadas de apoptose-necrose.



**Figura 14: Microscopia de Fluorescência de células U937.** Legenda: 1 – Normais, 2 – Necrose, 3 – Apoptose Primária e 4 – Apoptose-necrose (necrose secundária).

#### 4.3.14 – Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

Voluntários saudáveis do Laboratório de Biologia do Reconhecer (UENF) foram submetidos à coleta de sangue venoso com sistema de tubos "Vacutainer TM" (*Becton Dickinson*) contendo heparina sódica, para a obtenção das células; foram coletados 20 mL de sangue por voluntário.

O sangue total coletado foi lentamente adicionado sobre o Ficoll-Paque™ Plus (1,08g/mL), na proporção de 2:1 (20 mL de sangue para 10 mL de Ficoll) em tubos cônicos de 50 mL, e submetido à centrifugação de fracionamento (500g, à temperatura de 20°C, durante 40 minutos). O fracionamento dos componentes do sangue ocorre por diferença de densidade dos mesmos.

O plasma, que compõe a primeira camada do gradiente obtido, foi descartado. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) formam a camada logo abaixo do plasma e das plaquetas, em forma de anel que se dispõe acima do colchão de Ficoll. Abaixo do Ficoll, há o tapete de células polimorfonucleares, que compreende os granulócitos, e abaixo deste estão os eritrócitos formando o sedimento no fundo do tubo.

As PBMC coletadas foram lavadas com meio RPMI-1640 (Meio HEPES modificado – GIBCO-BRL) através de três centrifugações de 500g, a 4°C durante 10 minutos, cada. Após o processo de lavagem, as células foram ressuspendidas em RPMI. A partir desta suspensão, uma alíquota foi retirada e diluída em Azul de Tripán (0,2%), para a realização da contagem do número de células e avaliação da viabilidade. As contagens foram feitas em câmara de Neubauer. As células foram colocadas em garrafas de cultivo (25 cm<sup>2</sup>, Corning) para que os monócitos aderissem. Após 2 horas, o sobrenadante, sem os monócitos, foi colhido e as células plaqueadas como descrito no próximo item.

Toda a manipulação com o sangue e PBMC, exceto a contagem das células, foi feita em condições estéreis, em capela de fluxo laminar.

#### **4.3.15 – Avaliação da toxicidade dos extratos frente às Células Mononucleares do Sangue Periférico**

As PBMCs separadas como no 4.3.14 foram cultivadas em placas de 96 poços, nas quais foram distribuídas numa quantidade aproximada de  $1,0 \times 10^6$  células/poço. O meio utilizado para cultura e para diluição dos compostos foi RPMI – 1640 (GIBCO BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino e com antibiótico Gentamicina 20µg/mL (GIBCO BRL). As células foram cultivadas na presença dos compostos e na presença do ativador inespecífico enterotoxina B estafilocócica (SEB – 0,25µg/mL). A avaliação da viabilidade das células mononucleares do sangue periférico foi feita também através do ensaio com MTT como no 4.3.10 e dosagem da LDH como no 4.3.11 nas mesmas concentrações e tempos utilizados para as células tumorais.

#### **4.3.16 – Análise estatística**

Os resultados foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão, analisados de forma independente. Os ensaios foram analisados por ANOVA - One-way - seguido de Tukey utilizando o programa Graph Pad versão 5.0. As diferenças significativas foram consideradas como  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ .

## 5 – Resultados

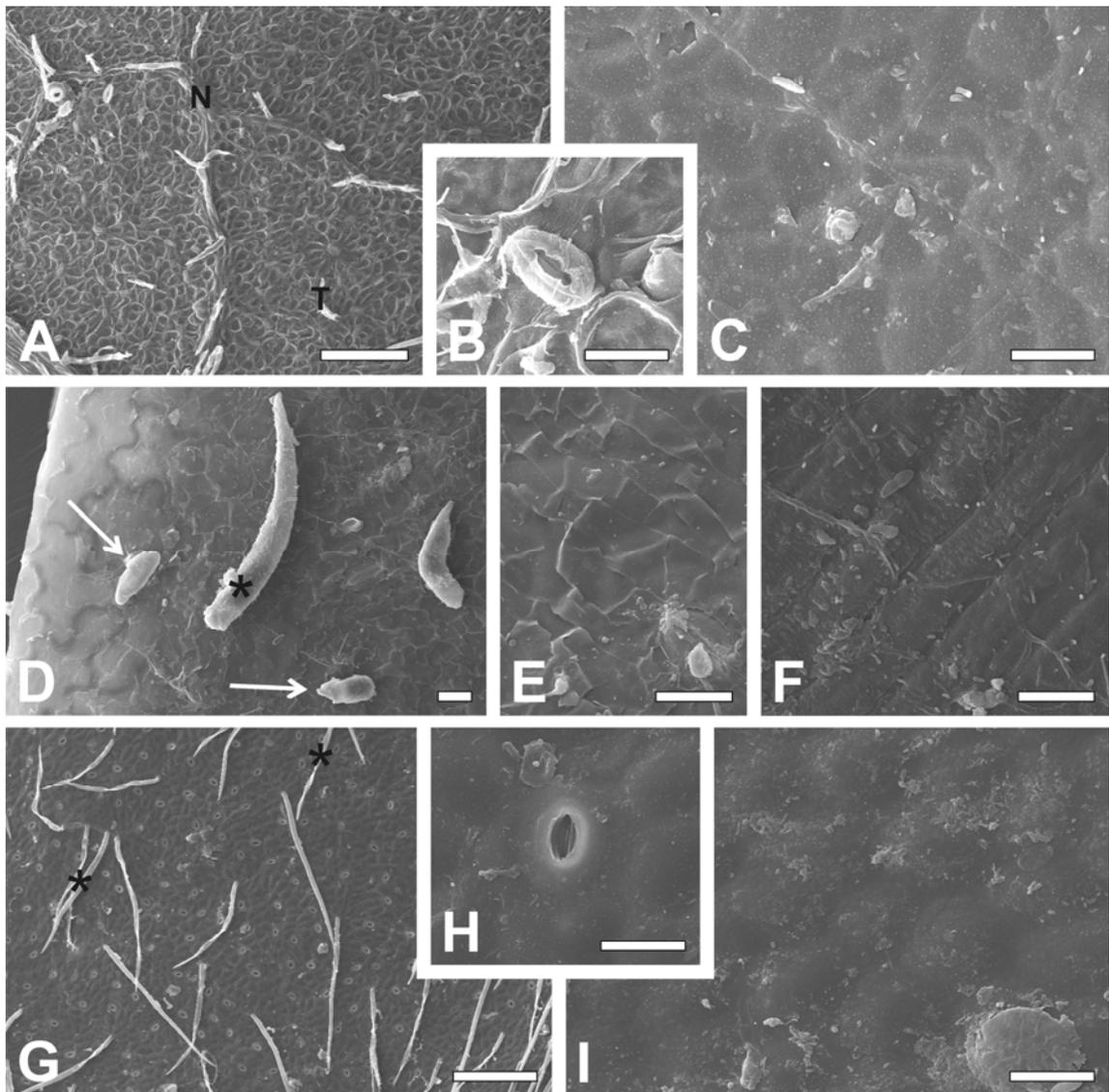
### 5.1 – Descrição da lâmina foliar

#### 5.1.1 - Micromorfologia

A microscopia eletrônica de varredura revelou que *B. australis* apresenta uma superfície abaxial irregular com células epidérmicas com as paredes periclinais externas côncavas e paredes anticlinais de contorno irregular e sem evidente ornamentação de cera epicuticular (Figura 15 A). Tricomas tectores unisseriados multicelulares foram notados preferencialmente nas nervuras secundárias (Figura 15 A). Raros estômatos paracíticos foram notados acima do nível da epiderme (Figura 15 B). A superfície adaxial é regular e glabra, com paredes periclinais e anticlinais, com aparente cobertura de cera epicuticular levemente granular (Figura 15 C).

*Ottonia frutescens* mostra superfície abaxial regular, com células epidérmicas com parede anticlinais de contorno irregular e parede periclinal externa reta com cera epicuticular em camadas e notável presença de tricomas tectores multicelulares e secretores (Figura 15 D,E). Raros estômatos paracíticos foram notados no nível da epiderme. A superfície adaxial é glabra apresentando, com paredes periclinais e anticlinais com cobertura de cera lisa com algumas áreas apresentando leve granulação (Figura 15 F).

*Trigynaea oblongifolia* exibiu superfície abaxial regular com presença de muitos estômatos e tricomas tectores pluricelulares (Figura 15 G). Os estômatos anomocíticos se localizam abaixo do nível da epiderme (Figura 15 H). Ambas as superfícies são lisas raras ornamentações na cera epicuticular (Figura 15 I).



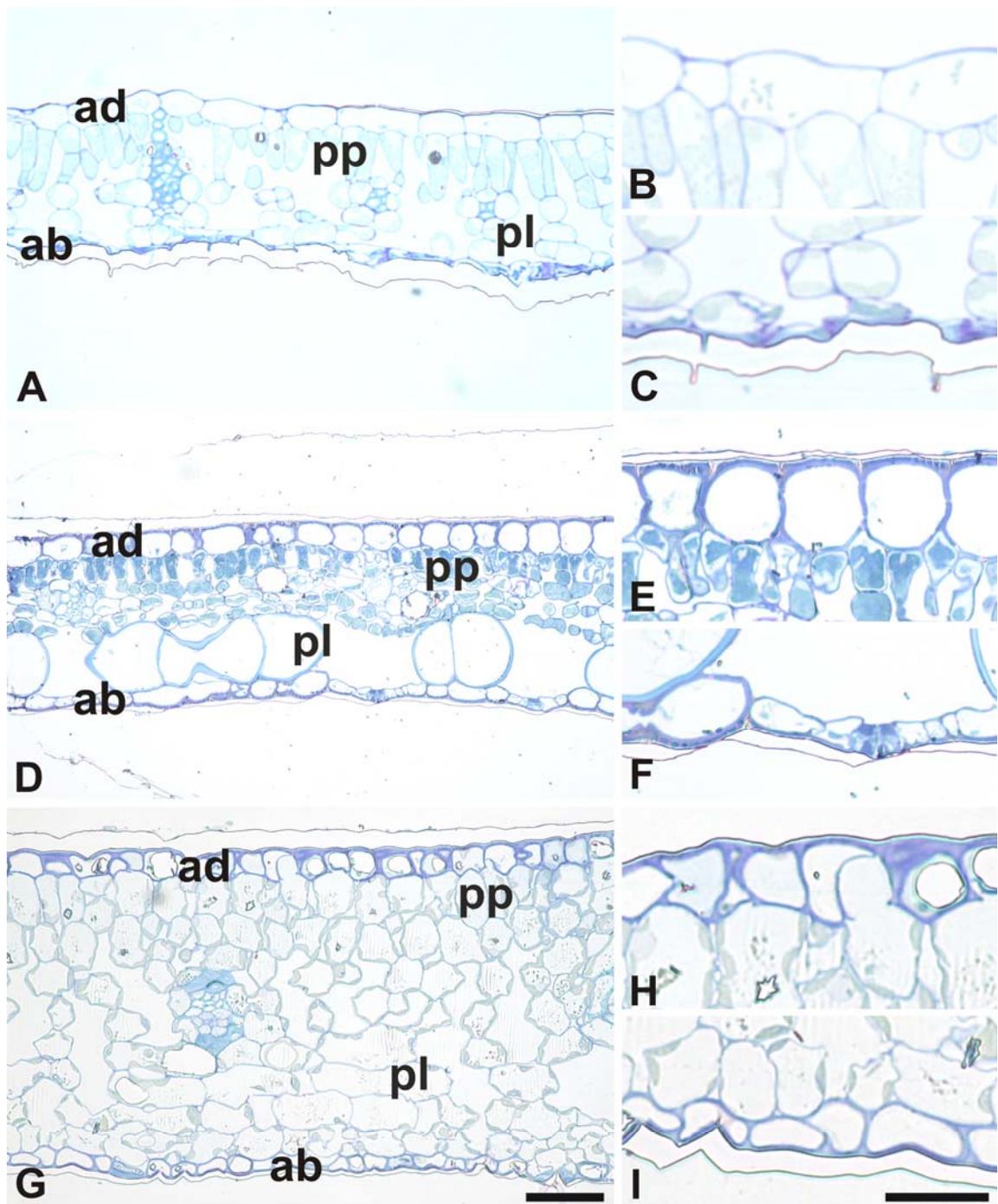
**Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura das folhas de *Bathysa australis* (A, B e C), *Ottonia frutescens* (D, E e F) e *Trigynaea oblongifolia* (G, H e I). A – Vista frontal da epiderme abaxial mostrando nervuras secundárias (N) e tricomas tectores pluricelulares (T); B – Detalhe de um estômato; C – Vista frontal da epiderme adaxial mostrando superfície com cera levemente granular; D – Vista frontal da epiderme abaxial mostrando evidenciando a presença de tricomas do tipo tector multicelular (\*) e tricomas secretores (→); E – Detalhe da superfície abaxial recoberta por cera em camadas; F - Superfície adaxial recoberta por cera lisa a levemente granular; G - Vista frontal da epiderme abaxial mostrando a presença de muitos tricomas tectores multicelulares (\*) e estômatos; H – Detalhe do estômato do tipo anomocítico presente na superfície abaxial; I – Detalhe da superfície adaxial mostrando cera do tipo lisa. Barras: A,E-200µm; B,C,D,H,I- 20µm; F-10µm; G-400µm.**

### 5.1.2 - Anatomia foliar

Em cortes transversais da lâmina foliar de *B. australis*, revelou-se epiderme uniestratificada nas faces adaxial e abaxial (Figura 16 A). A face adaxial apresenta células isodiamétricas e uniformes com paredes periclinais retas a levemente côncavas e recobertas por uma fina camada de cutícula (Figura 16 B). A epiderme adaxial é constituída de células achatadas com paredes periclinais côncavas, com tamanho variado (Figura 16 C). O mesófilo é dorsiventral constituído por parênquima paliçádico e lacunoso. O parênquima paliçádico esta voltado para face adaxial e parênquima lacunoso na face abaxial. O parênquima paliçádico possui uma ou duas camadas. O parênquima lacunoso é constituído por três a cinco camadas de células irregulares com grandes espaços intercelulares (Figura 16 A).

A lâmina foliar de *O. frutescens*, apresentou ambas as epidermes constituídas por uma única camada de células isodiamétricas com tamanhos variados e parede periclinal retas, sendo as células da face abaxial menores que às observadas na face adaxial (Figura 16 D, 16 E, 16 F). O mesófilo é dorsiventral constituído de parênquima paliçádico e parênquima lacunoso. O parênquima paliçádico é constituído por uma camada celular, rica em cloroplastos. O parênquima lacunoso é constituído por 4 a 6 camadas células isodiamétricas com pequenos espaços intercelulares (Figura 16 D).

Anatomicamente, a lâmina foliar de *T. oblongifolia* apresentou epiderme adaxial com uma única camada de células isodiamétricas regulares com parede periclinal externa reta a levemente convexa (Figura 16 G). A epiderme abaxial exibiu células menores, com contorno irregular e parede côncava (Figura 16 G, 16 H, 16 I). O parênquima paliçádico é constituído por duas a três camadas celulares, rica em cloroplastos. O parênquima lacunoso é constituído por 6 a 8 camadas células isodiamétricas com pequenos espaços intercelulares (Figura 16 D).



**Figura 16:** Microscopia óptica da lâmina foliar de *Bathysa australis* (A, B e C), *Ottonia frutescens* (D, E e F) e *Trigynaea oblongifolia* (G, H e I). A – Corte transversal da lâmina foliar de *B. australis* mostrando a epiderme adaxial unisseriada, os parênquimas paliçádico e lacunoso e a epiderme adaxial; B – Detalhe da epiderme adaxial; C – Detalhe da epiderme abaxial; D – Corte transversal da lâmina foliar de *O. frutescens* mostrando a epiderme adaxial unisseriada, os parênquimas paliçádico e lacunoso e a epiderme adaxial; E – Detalhe da epiderme adaxial; F – Detalhe da epiderme adaxial; G – Corte transversal da lâmina foliar de *T. oblongifolia* mostrando a epiderme adaxial unisseriada, os parênquimas paliçádico e lacunoso e a epiderme adaxial; H – Detalhe da epiderme adaxial; I – Detalhe da epiderme adaxial. **ad** – superfície adaxial; **ab** – superfície abaxial; **pp** - parênquima paliçádico; **pl** – parênquima lacunoso. Barras: A,D,G-50µm; B,C,E,F,H,I-25µm.

### 5.1.3 – Histoquímica foliar

Em linhas gerais, o teste com o azul de comassie revelou marcação mais intensa de proteínas no parênquima paliçádico e no parênquima lacunoso em todas as espécies estudadas, como mostrado para *B. australis* (Figura 17 A) e para *T. oblongifolia* (Figura 17 E).

O teste com o cloreto férrico também exibiu marcação principalmente nesses dois tecidos, conforme mostrado para *O. frutescens* (Figura 17 C).

Assim como exposto para os reagentes anteriores, a marcação do reagente de Dragendorff também realçou o parênquima paliçádico, o parênquima lacunoso, nas espécies estudadas.

A marcação com o vermelho de rutênio e laranja de acridina foram notadas principalmente nas epidermes abaxial e adaxial, conforme mostrado para *B. australis*, *T. oblongifolia* e *O. frutescens* (Figuras 17 B, 17 D e 17 F, respectivamente).

Os dados mais detalhados de cada um dos tecidos em cada uma das espécies estudadas encontra-se na tabela 2.

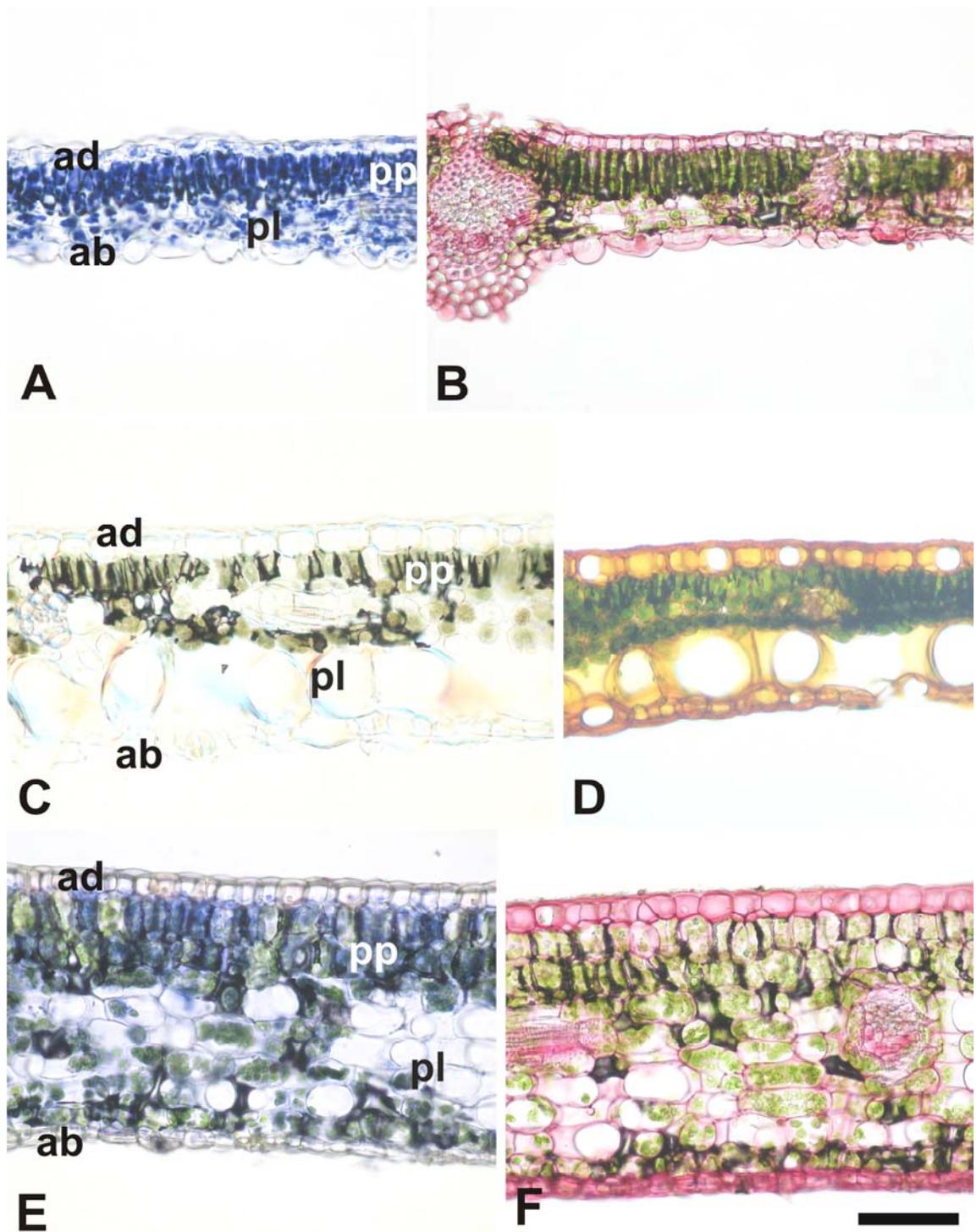


Figura 17: Microscopia óptica dos cortes da lâmina foliar, submetidos aos testes histoquímicos, de *Bathysa australis* (A e B), *Ottonia frutescens* (C e D) e *Trigynaea oblongifolia* (E e F). A – Corte submetido à coloração com azul brilhante de comassie. Note intensa marcação no mesofilo; B - Corte submetido à coloração com vermelho de rutênio. Note marcação nas epidermes; C - Corte submetido à coloração com cloreto férrico. Marcação predominante no paliçádico; D - Corte submetido à coloração com laranja de acridina, predomínio da marcação nas epidermes e lacunosos; E - Corte submetido à coloração com azul brilhante de comassie, predomínio da marcação no mesofilo; F - Corte submetido à coloração com vermelho de rutênio. Marcação predominante nas epidermes. **ad** – superfície adaxial; **ab** – superfície abaxial; **pp** - parênquima paliçádico; **pl** – parênquima lacunoso. Barras: 50µm.

**Tabela 2:** Histoquímica da lâmina foliar de *Bathysa australis*, *Ottonia frutescens* e *Trigynaea oblongifolia*

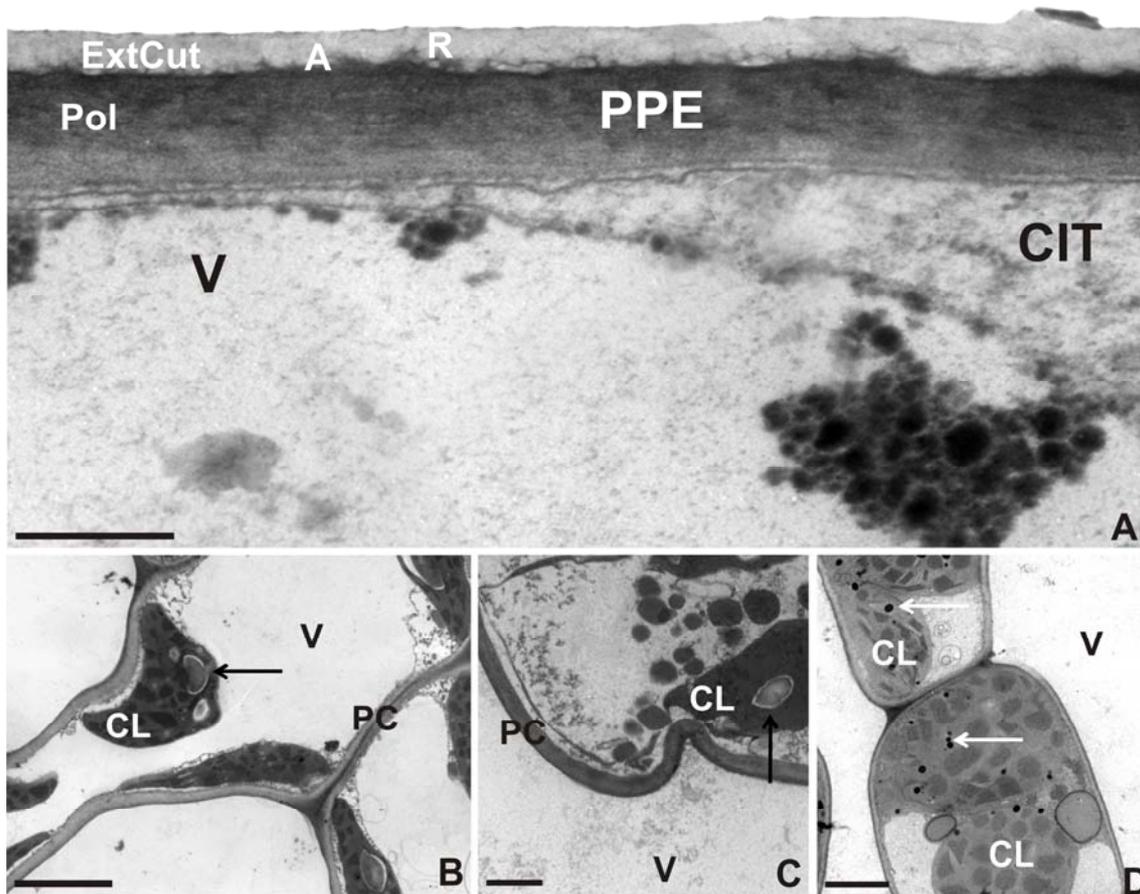
Reagente	Composto Alvo	Mesofilo											
		Epiderme Adaxial			Parênquima Paliçádico			Parênquima Lacunoso			Epiderme Abaxial		
		<i>Bathysa</i>	<i>Ottonia</i>	<i>Trigynaea</i>	<i>Bathysa</i>	<i>Ottonia</i>	<i>Trigynaea</i>	<i>Bathysa</i>	<i>Ottonia</i>	<i>Trigynaea</i>	<i>Bathysa</i>	<i>Ottonia</i>	<i>Trigynaea</i>
Azul de Coomassie	Proteínas	+	-	-	+++	++	++	++	++	-	-	+	-
Cloreto Férrico	Compostos Fenólicos	-	-	-	++	+++	++	++	++	++	-	-	-
Dragendorff	Alcalóides	-	-	-	+++	+++	++	+++	+++	++	-	-	+
Laranja de Acridina	Compartimentos ácidos	+++	+++	+++	++	-	++	++	+	++	+++	+++	+++
Vermelho de Rutênio	Pectinas	+++	++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
Sudan IV	Lipídios	+	+	+++	++	+	+	+	+	-	+	+	+++

Legenda: +++ Marcação Muito forte; ++ Marcação Forte; + Marcação Fraca; - Sem marcação

#### **5.1.4 – Microscopia eletrônica de transmissão**

Em microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar que a parede periclinal externa das três espécies estudadas são divididas em uma camada basal polissacarídica, seguida por extratos cuticulares divididos em arborescente (mais próximo à camada polissacarídica) e reticulada (mais acima deste extrato). Foi possível observar ainda a presença de uma fina camada de cutícula (Figura 18 A).

A observação do protoplasto das células de mesofilo das espécies estudadas revelou características comuns como a presença de grandes vacúolos centrais, citoplasma ocupando um volume relativamente pequeno e periférico e a presença de abundantes cloroplastos. As espécies 1 e 2 mostraram acúmulo de amido nos cloroplastos (Figura 18 B, 18 C) enquanto a espécie 3 mostrou acúmulo de lipídios (Figura 18 D).



**Figura 18:** Microscopia eletrônica de transmissão da folha de *Trigynaea oblongifolia* (A e D), *Bathysa australis* (B) e *Ottonia frutescens* (C). **A** - Parede periclinal externa (PPE) mostrando organização da camada basal de polissacarídeos (Pol) e extratos cuticulares (ExtCut) divididos em arborescente (A) e reticulado (R); **B** - Célula do parênquima lacunoso mostrando um grande vacúolo (V), parede celular fina (PC) e cloroplastos com acúmulo de amido (seta preta); **C** - Célula do parênquima lacunoso mostrando um grande vacúolo (V), parede celular fina (PC) e cloroplastos com acúmulo de amido (seta preta); **D** - Célula do parênquima lacunoso mostrando um grande vacúolo (V), parede celular fina (PC) e cloroplastos com acúmulo de lipídeos (seta branca). Barras: A e D- 2µm; B- 5 µm; C- 1 µm.

## 5.2 - Estimativas de rendimento de matéria verde, seca e teor de água

Após a identificação botânica, o material coletado (folhas) foi processado e seco em estufa a 40°C até a estabilização do peso. A matéria seca foi submetida à extração com metanol. A tabela 3 revela os valores encontrados para matéria verde coletada no campo, teor de água, matéria seca obtida e rendimento do extrato para cada uma das três espécies estudadas. O rendimento dos extratos foi calculado em relação à quantidade do material vegetal seco utilizado na extração.

**Tabela 3:** Rendimento do material botânico (folhas).

Nome da Espécie	Matéria Verde	Teor de Água	Matéria Seca	Rendimento do Extrato (%)
<i>Ottonia frutescens</i>	350g	68,58	110g	5,39g (4,90)
<i>Trigynaea oblongifolia</i>	850g	81,40	158g	7,86g (4,98)
<i>Bathysa australis</i>	900g	81,67	165g	6,68g (4,05)

## 5.3 - Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos das folhas de *O. frutescens*, *T. oblongifolia* e *B. australis* está apresentada na tabela 4.

Os extratos avaliados apresentaram uma composição fitoquímica semelhante em relação às principais classes de metabólitos secundários. Porém, a presença de flavonóides foi detectada apenas no extrato de *T. oblongifolia*. Ficou constatada a ausência dos metabólitos cardiotônicos e triterpeno em todos os extratos.

**Tabela 4:** Resultado da prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos das folhas de *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia*, *Bathysa australis*. (-) negativo e (+) positivo.

Classe de Metabólito	Nome da Espécie		
	<i>Ottonia frutescens</i>	<i>Trigynaea oblongifolia</i>	<i>Bathysa australis</i>
Alcalóide	+	+	+
Antraquinonas	+	+	+
Cardiotônicos	-	-	-
Cumarinas	+	+	+
Flavonóides	-	+	-
Polifenóis (Taninos)	+	+	+
Saponina	+	+	+

#### 5.4 - Determinação da atividade antioxidante dos extratos

Na avaliação da atividade antioxidante dos extratos utilizou-se como solvente de diluição metanol; solução metanólica de DPPH a 60 $\mu$ M e, apenas, o tempo de leitura de 30 minutos.

Os dados obtidos na análise da atividade antioxidante dos extratos estão presentes na Tabela 5. Os valores, expressos em porcentagem, representam a média  $\pm$  desvio padrão, obtido por meio de triplicata.

De modo geral, nas concentrações testadas, os extratos apresentaram baixa atividade antioxidante (Tabela 5). Porém, o extrato de *O. frutescens* na concentração final de 24  $\mu$ g/mL foi aquele que apresentou uma melhor atividade antioxidante.

**Tabela 5:** Porcentagem da atividade antioxidante dos extratos metanólicos de folhas de *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia*, *Bathysa australis*.

Nome da Espécie	Concentração de extrato ( $\mu$ g/mL)				
	3	6	12	18	24
<i>Ottonia frutescens</i>	2,7 $\pm$ 0,7	9,6 $\pm$ 0,6	12,5 $\pm$ 0,6	31,2 $\pm$ 0,8	38,3 $\pm$ 0,6
<i>Trigynaea oblongifolia</i>	14,4 $\pm$ 3,8	16,3 $\pm$ 0,1	19,3 $\pm$ 0,6	24,4 $\pm$ 0,5	32,3 $\pm$ 0,8
<i>Bathysa australis</i>	6,2 $\pm$ 0,3	13,1 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,3	27,6 $\pm$ 0,3	32,1 $\pm$ 0,6

**Observação:** Tempo 30 minutos. O valor da média  $\pm$  desvio padrão foram obtidos por meio de triplicata.

A CL<sub>50</sub> para todos os extratos foi maior que 24  $\mu$ g/mL.

#### 5.5 – Análise Toxicológica dos Extratos Frente ao Microcrustáceo *Artemia salina* Leach

Segundo Parra *et al.* (2001) e conforme descrito anteriormente para os testes de letalidade com *A. salina* os compostos podem ser considerados: altamente tóxicos aqueles com CL<sub>50</sub> menor que 80  $\mu$ g/mL; moderadamente tóxicos com CL<sub>50</sub> de 80  $\mu$ g/mL a 250  $\mu$ g/mL; e com baixa toxicidade ou não tóxicos com CL<sub>50</sub> maior que 250  $\mu$ g/mL. Nas figuras 19, 20 e 21 encontram-se os resultados que foram obtidos nos ensaios com *A. salina* para os extratos metanólicos de *O. frutescens*, *T. oblongifolia* e *B. australis*, respectivamente.

Conforme os resultados de  $CL_{50}$ , os extratos de *O. frutescens* e *T. oblongifolia* foram considerados moderadamente tóxicos frente ao teste de toxicidade em *A. salina*, pois apresentaram  $CL_{50}$  de  $149,75 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$  e  $148,8 \pm 1,74 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O extrato de *B. australis* não apresentou resultados de toxicidade significativa frente aos náupilos de *Artemia salina*, com uma  $CL_{50}$  de  $684 \pm 9,04 \mu\text{g/mL}$ .

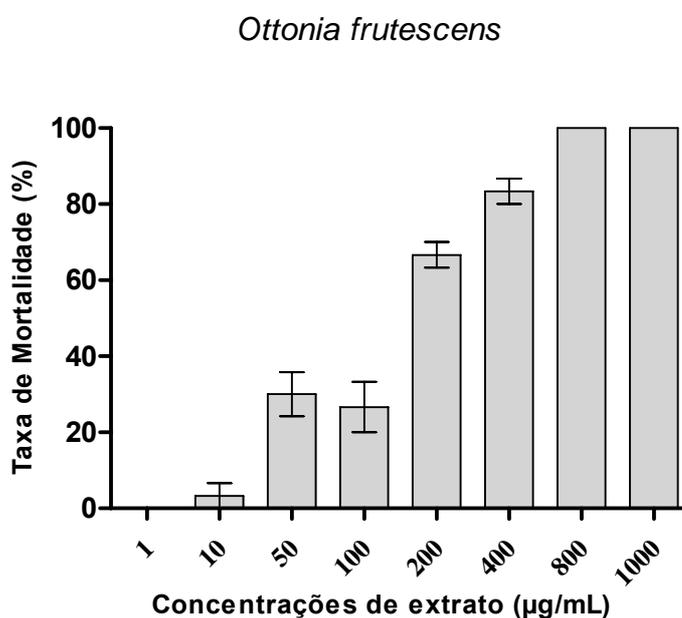


Figura 19: Taxas de mortalidade de náupilos de *Artemia salina* em função da concentração de extrato *Ottonia frutescens*.  $CL_{50}$   $149,75 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$

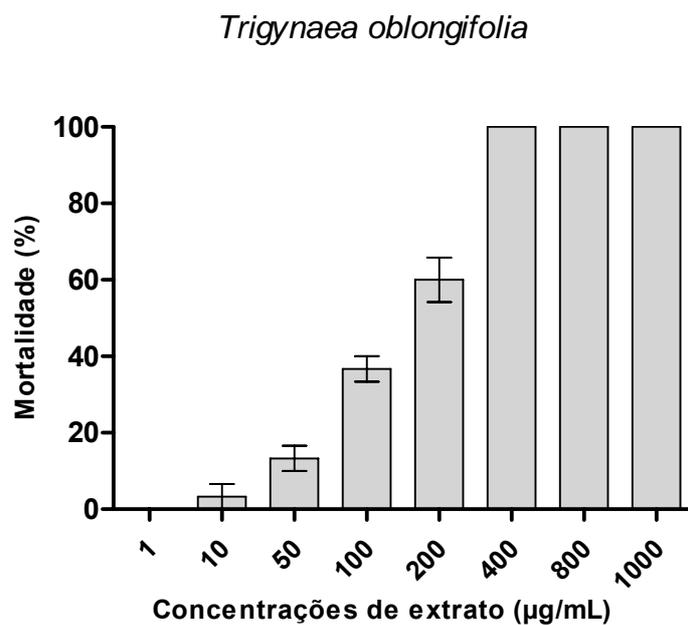


Figura 20: Taxas de mortalidade de náupilos de *Artemia salina* em função da concentração de extrato *Trigynaea oblongifolia*.  $CL_{50}$   $148,8 \pm 1,74$  µg/mL.

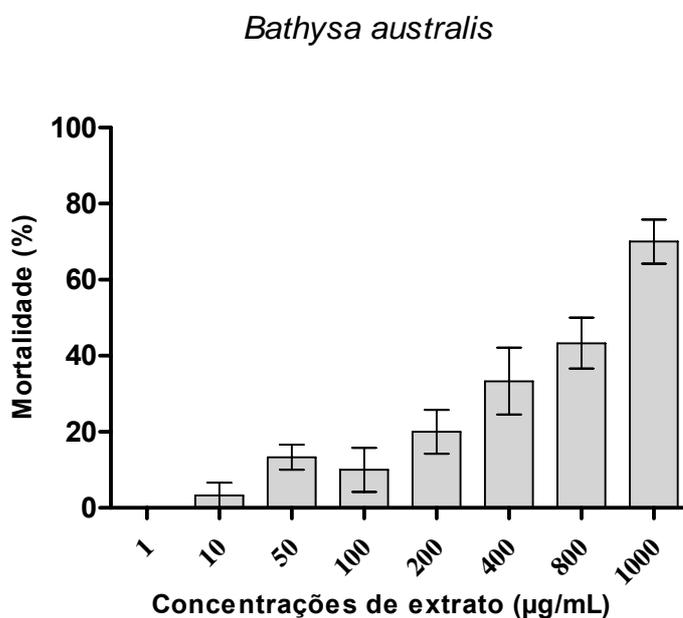


Figura 21: Taxas de mortalidade de náupilos de *Artemia salina* em função da concentração de extrato *Bathysa australis*.  $CL_{50}$   $684 \pm 9,04$  µg/mL.

## 5.6 – Efeito dos Extratos na Viabilidade Celular

A avaliação do efeito citotóxico ou citostático dos extratos foi realizada através do microensaio colorimétrico utilizando MTT – [3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5- difenil-2-H-brometo de tetrazolium]. Este ensaio depende da atividade da enzima succinato desidrogenase, componente do ciclo do ácido cítrico. Esta enzima reside na membrana mitocondrial interna, necessitando de um sistema de transporte de elétrons para a sua função. Desta maneira, a atividade desta enzima é uma medida da viabilidade mitocondrial e celular. A atividade desta enzima é medida pela sua capacidade de converter o 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5- difenil-2-H-brometo de tetrazolium a um composto cristalizado de coloração azul. A quantidade de cristais formados é determinada pela mensuração da densidade óptica por espectrofotometria (MOSMANN, 1983).

Células de linhagens tumorais (U937 e COLO 205) foram incubadas nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/mL para cada um dos três extratos.

É possível observar na figura 22 que todas as concentrações testadas dos extratos de *O. frutescens*, *T. oblongifolia* e *B. australis* foram eficientes em reduzir a viabilidade celular da linhagem U937. Porém, quando comparado aos extratos de *O. frutescens* e *T. oblongifolia*, o extrato de *B. australis* teve um efeito citotóxico discreto.

Quando desafiada com os mesmos extratos, a linhagem COLO 205 revelou ser resistente as concentrações de 50 e 100 µg/mL dos extratos de *O. frutescens*, e a concentração de 50 µg/mL do extrato de *T. oblongifolia*. Notadamente, o extrato de *B. australis* teve um efeito citotóxico apenas na maior concentração de extrato (400 µg/mL) (Figura 23).

Para avaliar a toxicidade dos extratos *in vitro*, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos normais foram incubadas com os extratos. Após 24 horas a citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo ensaio colorimétrico com MTT.

A figura 24 revela que os extratos de *O. frutescens* e *B. australis* interferiram menos na viabilidade celular, apenas a concentração de 400 µg/mL destes extratos teve uma diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Porém, o extrato de *T. australis* foi citotóxico em todas as concentrações testadas.

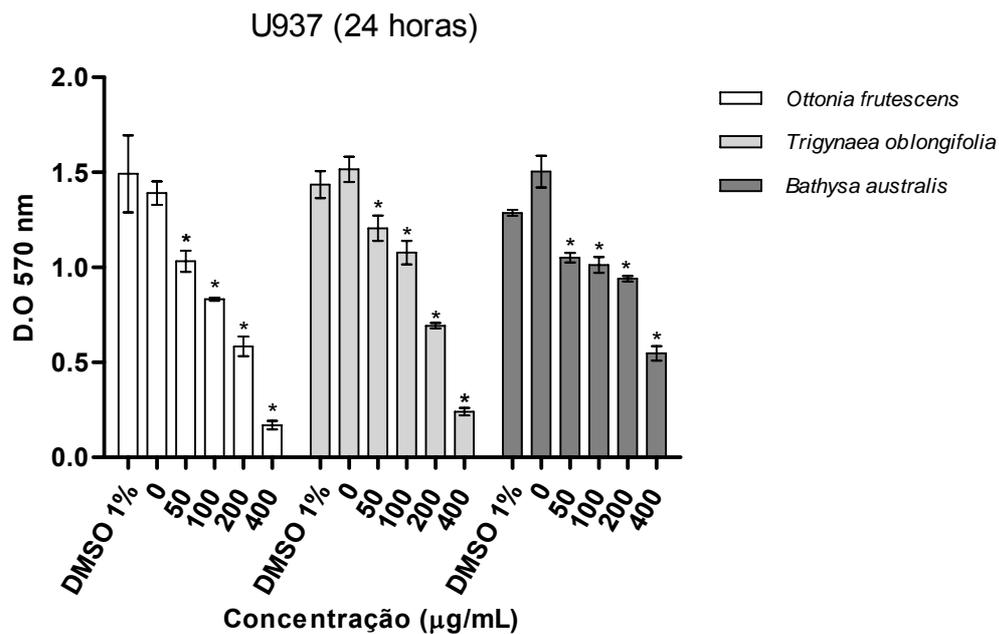


Figura 22: Efeito citotóxico dos extratos de *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia*, e *Bathysa australis* frente linhagem de células leucêmicas humanas U937 após 24 horas de incubação. A avaliação foi feita através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. n = 3; \*P<0,05. ANOVA - One-way - seguido de Tukey.

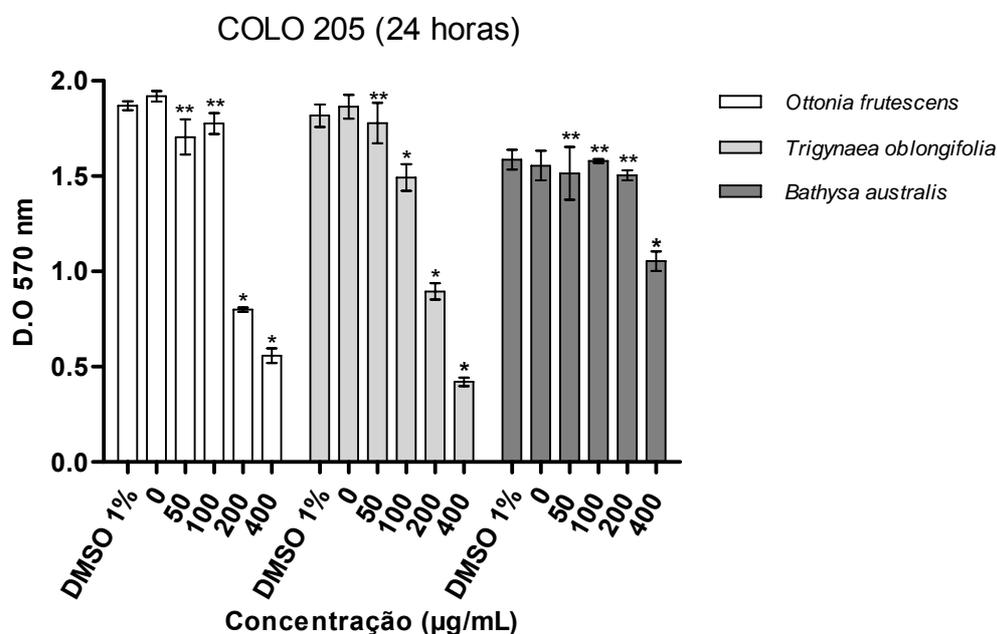


Figura 23: Efeito citotóxico dos extratos de *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia*, e *Bathysa australis* frente linhagem tumoral de células de COLO 205 após 24 horas de incubação. A avaliação foi feita através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. n = 3; \*P<0,05; \*\*P>0,05. ANOVA - One-way - seguido de Tukey.

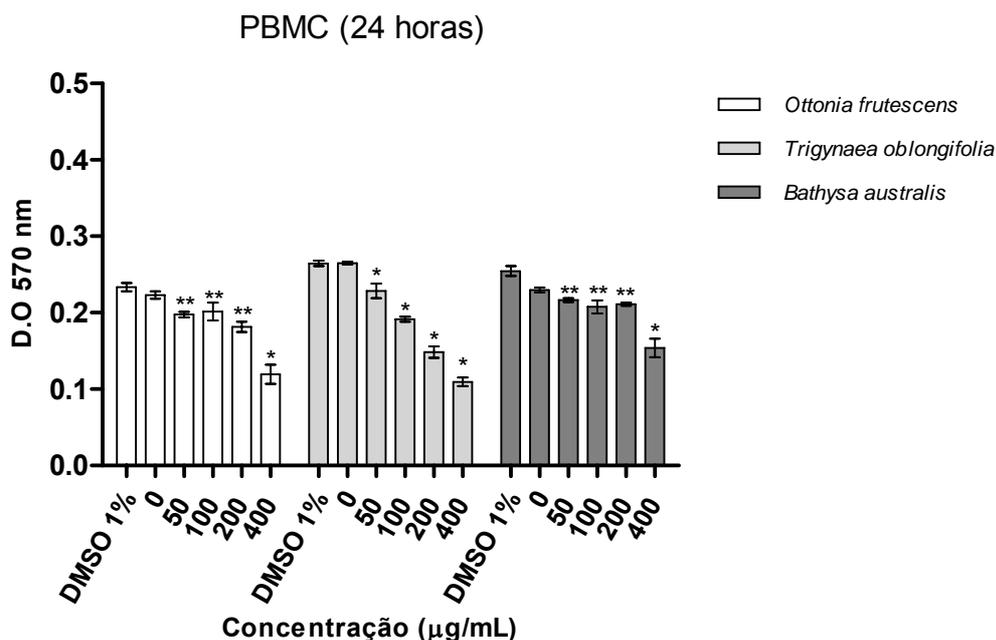


Figura 24: Efeito citotóxico dos extratos de *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia*, e *Bathysa australis* frente às células humanas normais (PBMC) após 24 horas de incubação. A avaliação foi feita através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. n = 3; \*P<0,05; \*\*P>0,05. ANOVA - One-way - seguido de Tukey.

## 5.7 – Quantificação da Lactato Desidrogenase - LDH

A quantificação de LDH é uma técnica que possibilita a diferenciação entre apoptose e necrose. Esta enzima, em condições aeróbicas, catalisa a redução de piruvato em L-lactato. O citoplasma de todas as células de mamíferos tem LDH (BAYNES & DOMINICZAK, 2007).

A ocorrência de necrose desencadeia a desintegração, celular desta forma o conteúdo citoplasmático das células fica exposto (ALBERTS *et al.*, 2009; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). No entanto, na apoptose são formados os corpos apoptóticos sem desintegração das membranas celulares (ANDREAS, 2006). Sendo assim, a quantificação da LDH pode ser um indicativo de que o processo de morte celular esteja ocorrendo por necrose.

Células de linhagens tumorais (U937 e COLO 205), da mesma forma que para o ensaio com MTT, as células foram incubadas com as concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/mL para cada um dos três extratos testados.

Comparado ao grupo controle apenas a concentrações de 400 µg/mL dos extratos de *O. frutescens*, *T. oblongifolia* e *B. australis* apresentaram valores

estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ) de LDH para as células da linhagem U937 (Figura 25).

Quando testadas com os mesmos extratos a linhagem celular COLO 205, apresentou resultados estatisticamente significativos nas seguintes condições: 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$  do extrato de *O. frutescens*; 100, 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$  do extrato de *T. oblongifolia*; 400  $\mu\text{g/mL}$  do extrato de *B. australis* (Figura 26).

A atividade da LDH de células humanas normais (PBMC) também foi dosada. Quando desafiadas com os extratos as PBMC, apresentaram resultados estatisticamente significativos para todas as concentrações do extrato de *O. frutescens* e *T. oblongifolia*; e nas concentrações 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$  do extrato de *B. australis* (Figura 27).

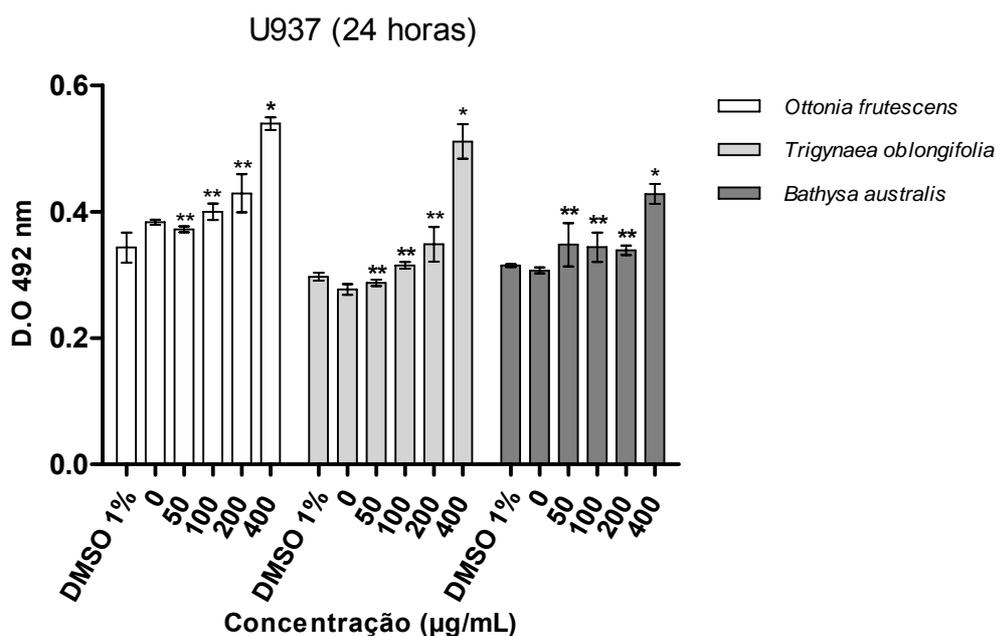


Figura 25: Efeito citotóxico dos extratos de *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia*, e *Bathysa australis* frente às células leucêmicas U937 após 24 horas de incubação. A avaliação foi feita através da Dosagem da LDH em Células.  $n = 3$ ; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P > 0,05$ . ANOVA - One-way - seguido de Tukey.

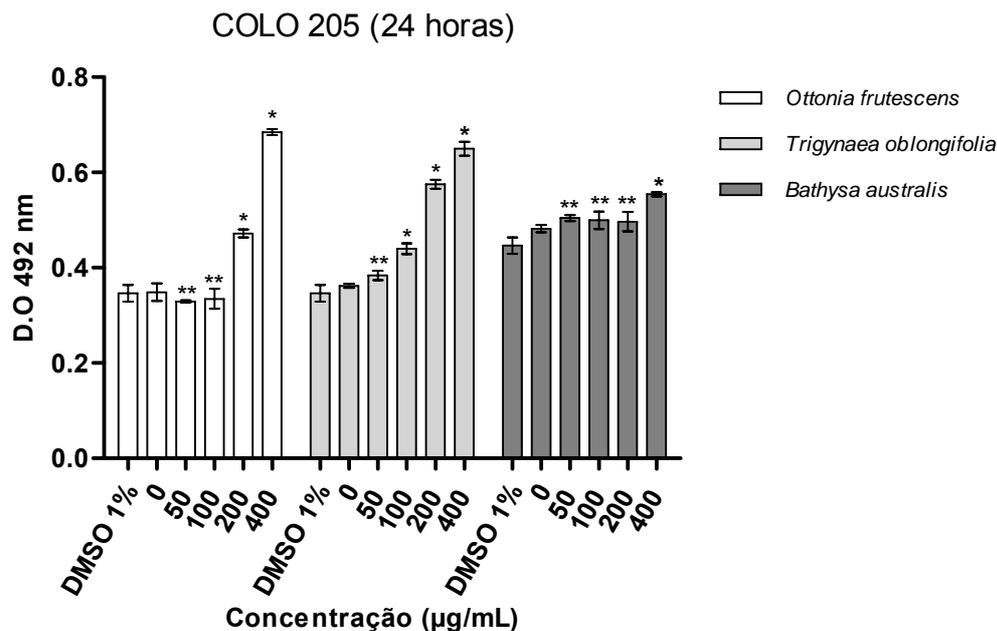


Figura 26: Efeito citotóxico dos extratos de *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia*, e *Bathysa australis* frente as frente linhagem tumoral de células de COLO 205 após 24 horas de incubação. A avaliação foi feita através da Dosagem da LDH em Células. n = 3; \*P<0,05; \*\*P>0,05. ANOVA - One-way - seguido de Tukey.

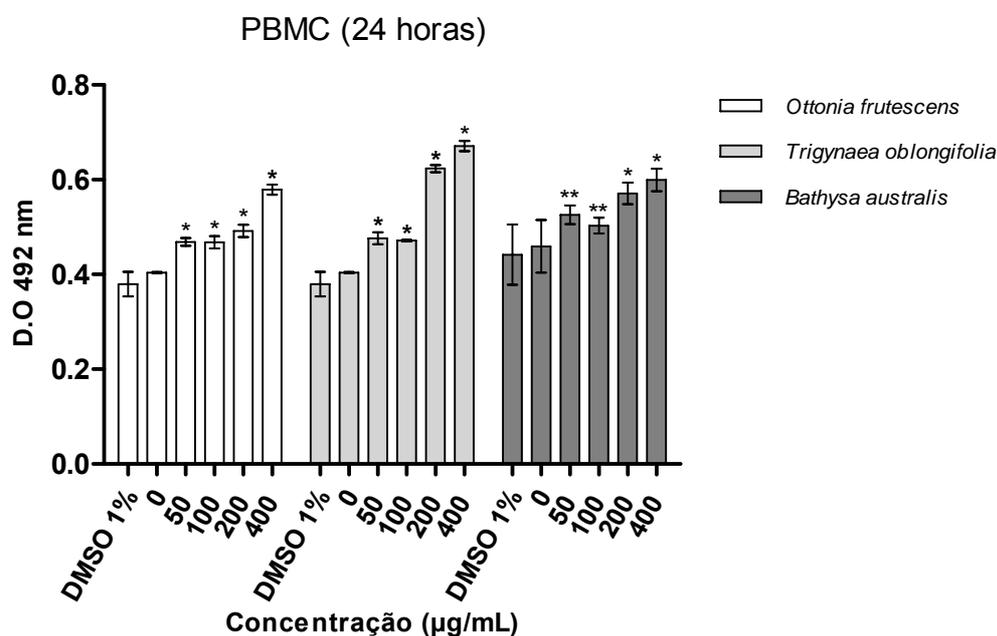


Figura 27: Efeito citotóxico dos extratos de *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia*, e *Bathysa australis* frente as frente às células humanas normais (PBMC) após 24 horas de incubação. A avaliação foi feita através da Dosagem da LDH em Células. n = 3; \*P<0,05; \*\*P>0,05. ANOVA - One-way - seguido de Tukey.

## 5.8 - Avaliação da indução de apoptose e necrose em linhagens de células tumorais frente aos extratos

Devido a indução de apoptose ser o resultado de diferentes mecanismos de ação de várias drogas antineoplásicas, como exemplo o taxol (BLAGOSKLONNY, *et al.*, 1996) e a cisplatina (GONZALEZ, *et al.*, 2001), a análise de indução de apoptose é usada como um método de triagem de compostos com ação antitumoral.

A taxa de apoptose induzida pelos três extratos foi analisada utilizando a microscopia de fluorescência, pelo método de coloração de células com os corantes de DNA, laranja de acridina e brometo de etídio. Laranja de acridina, um corante vital, entra nas células através da membrana intacta e interage com o DNA pelo intercalamento de bases ou interações eletrostáticas. Quando ligada ao DNA se torna espectralmente similar a fluoresceína, com um máximo de excitação em 502 nm e máximo de emissão em 525 nm, resultando em uma coloração verde. Ao contrário, o brometo de etídio é capaz de penetrar apenas em células com membrana rompida e deixa o núcleo com uma coloração alaranjada (KOSMIDER *et al.*, 2004).

Após a incubação com os extratos nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/mL, as células foram coradas, levadas ao microscópio de fluorescência e discriminadas em normais, apoptóticas e necróticas, segundo os parâmetros descritos no item 4.3.12.

A figura 28 revela a porcentagem de apoptose induzida pelos extratos de *O. frutescens*, *T. oblongifolia*, e *B. australis* frente as células U937 e COLO 205 após os tempos de 12, 24 e 36 horas.

De maneira geral, a linhagem U937 se mostrou bastante suscetível aos extratos testados. Na figura 28 (gráfico A) observamos que o extrato de *O. frutescens* induziu uma taxa maior que 90% de apoptose nas concentrações de 200 e 400 µg/mL a partir do tempo de 24 horas.

O extrato de *T. oblongifolia*, também foi efetivo nas concentrações de 200 e 400 µg/mL, a partir de 24 horas de tratamento, induzindo uma taxa de 90% de apoptose. Porém, é possível observar que em 36 horas a concentração de 100 µg/mL induz apoptose em 90% (Figura 28 – gráfico C).

Também, observamos na figura 28 (figuras A e C) que no tempo de 12 horas na concentração de 400 µg/mL os extratos de *O. frutescens* e *T. oblongifolia* foram capazes de induzir apoptose em mais de 90% da linhagem celular U937. O teste de Tukey revelou não ter diferença significativa entre as concentrações de 50 vs 100 no tempo de 12 horas dos dois extratos supra citados.

O extrato de *B. australis* foi mais eficaz frente à linhagem celular U937, pois na menor concentração testada (50 µg/mL) já havia induzido 60% de apoptose no tempo de 24 horas. Porém, em 12 horas a maior concentração do extrato foi capaz de induzir apenas 30% de apoptose, neste mesmo tempo não houve diferença significativa para as comparações 50 vs 100; 50 vs 200; 100 vs 200 (Figura 28 – gráfico E).

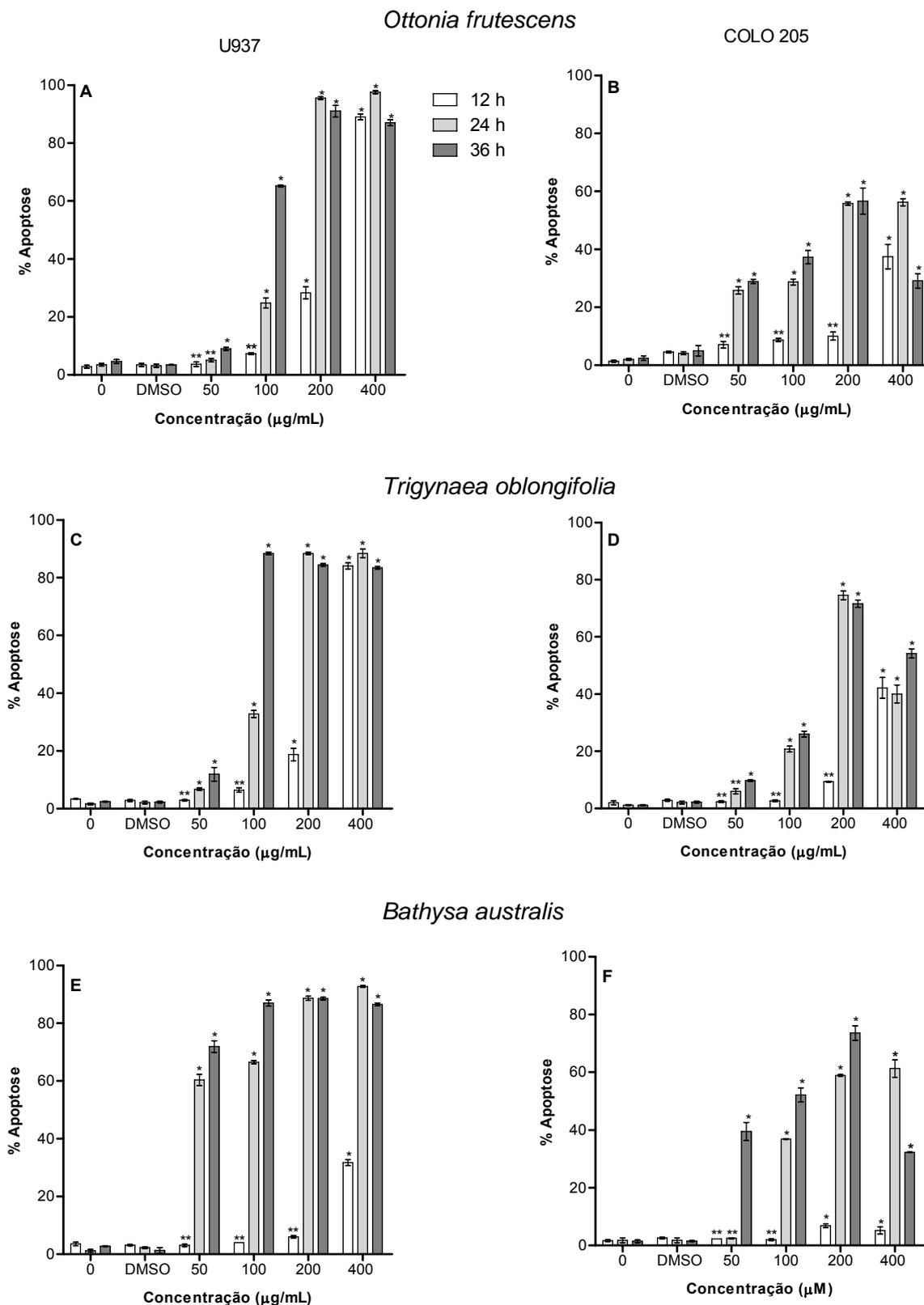
A linhagem COLO 205 revelou ser mais resistente quando desafiadas com os mesmos extratos. A figura 28 (gráfico B) revela, aproximadamente, 55% de indução de apoptose em 24 horas nas concentrações de 200 e 400 µg/mL do extrato de *O. frutescens*, da mesma forma que, notadamente em 36 horas a concentração de 200 µg/mL foi capaz de induzir 55% de apoptose. Na concentração de 400 µg/mL houve um decréscimo na indução de apoptose para 31%.

O extrato de *T. oblongifolia* foi capaz de induzir apoptose em 71% das células COLO 205 na concentração de 200 µg/mL, em 24 e 36 horas. Porém, houve um decréscimo deste valor quando a concentração foi aumentada para 400 µg/mL (Figura 28 – gráfico D).

Na figura 28 (figuras B e D) observamos que em 12 horas a concentração de 400 µg/mL dos extratos de *O. frutescens* e *T. oblongifolia* foi capaz de induzir apoptose em, aproximadamente, 41% das células de COLO 205. Segundo o teste de Tukey não houve diferenças significativas entre as comparações 50 vs 100; 50 vs 200; 100 vs 200 no tempo de 12 horas para extratos os de *O. frutescens* e *T. oblongifolia*.

Na concentração de 200 µg/mL, o extrato de *B. australis* foi capaz de induzir apoptose em 60% das células COLO 205 em 24 horas e 75% em 36 horas. Destaca-se, também, o fato de que no tempo de 36 horas na concentração de 400 µg/mL a porcentagem de indução de apoptose reduziu, chegando ao valor de 31%. Em 12 horas, a indução máxima de apoptose foi de 7% na concentração de 400 µg/mL, não

havendo diferenças significativas nas comparações 50 vs 100; 50 vs 200; 50 vs 400; 100 vs 200; 100 vs 400; 200 vs 400 (Figura 28 – gráfico F).



**Figura 28: Porcentagem de apoptose induzida pelos extratos *Ottonia frutescens*, *Trignyaea oblongifolia* e *Bathysa australis* frente a duas linhagens de células humanas U937 (Coluna da Esquerda) e COLO 205 (Coluna da Direita). Determinada por microscopia de fluorescência em três tempos diferentes, 12, 24 e 36 horas. n = 2; \*P<0,05, \*\*P>0,05. ANOVA - One-way - seguido de Tukey.**

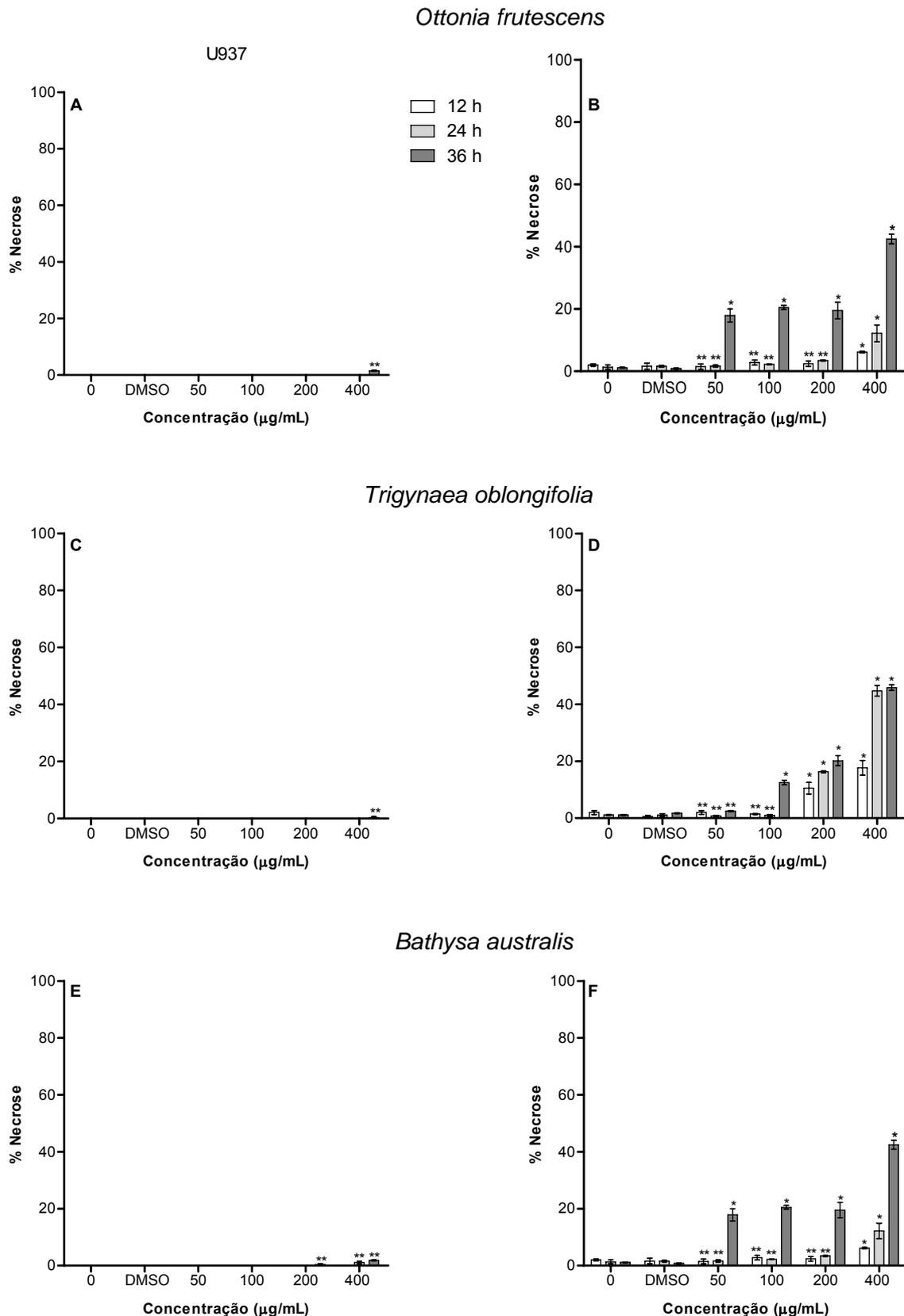
A figura 29 revela a porcentagem de necrose induzida pelos de extratos de *O. frutescens*, *T. oblongifolia* e *B. australis* frente células U937 e COLO 205, após 12, 24 e 36 horas.

As células U937 quando testadas contra os extratos de *O. frutescens*, *T. oblongifolia* e *B. australis* apresentaram uma taxa menor que 3% de necrose apenas na concentração de 400 µg/mL (Figura 29 – gráficos A, C e E).

Quando desafiadas com o extrato de *O. frutescens* as células COLO 205, apresentaram uma taxa de 46% de necrose na concentração de 400 µg/mL para o tempo de 36 horas. A análise estatística por Tukey revelou que nos tempos de 12 e 24 horas não apresentaram diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre as comparações: 50 vs 100; 50 vs 200; 50 vs 400; 100 vs 200; 100 vs 400; 200 vs 400. Em 36 horas a comparação 100 vs 200 não apresentaram diferenças significativas segundo o teste de Tukey (Figura 29 – gráfico B).

Segundo os dados apresentados na figura 29 (gráfico D) as células COLO 205 tiveram uma taxa de 45% de necrose na concentração de 400 µg/mL do extrato de *T. oblongifolia* nos tempos de 24 e 36 horas. A análise estatística revela, que: as comparações 50 vs 100; e 200 vs 400 no tempo de 12 horas, bem como, 50 vs 100 em 24 horas não foram significativas.

O extrato de *B. australis* foi capaz de induzir necrose em 40% das células COLO 205 na concentração de 400 µg/mL. Segundo o teste de Tukey as comparações: 50 vs 100; 50 vs 200; 00 vs 200; 100 vs 400; 200 vs 400 nos tempos de 12 e 24 horas, bem como 50 vs 100; 50 vs 200; 100 vs 200 no tempo de 36 horas não foram significativas.



**Figura 29: Porcentagem de necrose induzida pelos extratos *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia* e *Bathysa australis* frente a duas linhagens de células humanas U937 (Coluna da Esquerda) e COLO 205 (Coluna da Direita). Determinada por microscopia de fluorescência em três tempos diferentes, 12, 24 e 36 horas. n = 2; \*P<0,05, \*\*P>0,05. ANOVA - One-way - seguido de Tukey.**

## 5.9 – Determinação da concentração letal 50 dos extratos

A fim de facilitar a identificação das relações entre as respostas citotóxicas em modelos celulares tumorais (U937 e COLO 205), foi construída uma tabela comparativa dos resultados com as concentrações dos extratos testadas para cada linhagem celular. Comparando a atividade específica das substâncias testadas em cada tipo celular com 12, 24 e 36 horas de exposição ao extrato.

Foi determinada a concentração letal 50 para os três extratos. Concentração letal é a concentração de extrato capaz de induzir morte em 50% das células testadas. A  $CL_{50}$  foi determinada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. por meio de uma curva de regressão não linear, a partir dos dados apresentados nas figuras 26.

Conforme os dados de  $CL_{50}$  apresentados na tabela 6 os três extratos apresentaram atividade citotóxico, principalmente nos tempos de 24 e 36 horas, frente às células testadas.

Segundo os dados apresentados na tabela 6, em geral, a linhagem COLO 205 quando desafiada as várias concentrações do extrato de *O. frutescens* e *T. oblongifolia* revelou ser mais resistente que a linhagem celular U937. Os extratos de *O. frutescens* e *Bathysa australis* apresentaram-se mais citotóxicos para as células de PBMC quando comparadas com a linhagem celular U937. O extrato de *Trigynaeva oblongifolia* revelou ser mais citotóxico a linhagem celular U937.

**Tabela 6:** Concentração letal 50 dos extratos de *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia* e *Bathysa australis*.

<b><i>Ottonia frutescens</i> (µg/mL)</b>			
<b>Linhagem Celular</b>	<b>12 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>36 horas</b>
U937	230,9 ± 1,73	112,9 ± 1,47	86,34 ± 2,32
COLO 205	> 400	280,0 ± 1,19	257,5 ± 1,31
<b><i>Trigynaea oblongifolia</i> (µg/mL)</b>			
<b>Linhagem Celular</b>	<b>12 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>36 horas</b>
U937	> 400	110,8 ± 1,70	58,42 ± 1,04
COLO 205	> 400	146,4 ± 1,99	143,3 ± 1,87
<b><i>Bathysa australis</i> (µg/mL)</b>			
<b>Linhagem Celular</b>	<b>12 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>36 horas</b>
U937	> 400	188,2 ± 1,03	81,15 ± 1,23
COLO 205	> 400	155,3 ± 1,41	81,22 ± 1,46

## 6 – Discussão

O mau funcionamento dos sistemas de controle de uma célula, tais como, o *checkpoint* no ciclo celular e alterações em protooncogenes e genes supressores de tumor, são responsáveis pela origem do câncer e da progressão tumoral (ALBERTS *et al.*, 2009; WEINBERG, 2008).

A progressão tumoral é a principal causa de morte e falhas no tratamento de pacientes com neoplasias (COTRAN *et al.*, 2000). Segundo dados apresentados pelo INCA, no Brasil as estimativas para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Onde são esperados: 13.310 novos casos para o câncer colón e reto em homens (Figura 1) e 14.800 em mulheres (Figura 2). E ainda, em relação aos casos novos de leucemia são esperados: 5.240 no sexo masculino e 4.340 no sexo feminino (BRASIL, 2009).

A quimioterapia é amplamente utilizada no tratamento de vários tipos de tumores, sendo administrada sozinha ou associada a técnicas cirúrgicas. No entanto, o desenvolvimento de resistência dos tumores as drogas antitumorais é um grande obstáculo no sucesso da quimioterapia (KOHNO *et al.*, 2005). Neste sentido, existem diversas pesquisas em busca de novas drogas que possam atuar de forma mais eficaz no combate ao câncer. Entre as abordagens utilizadas na busca de novas drogas está à triagem de metabólitos secundários das plantas.

Como relatado anteriormente, o século XX apresentou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais derivados de plantas propiciando a descoberta de diversos fármacos utilizados atualmente no combate ao câncer. Aproximadamente, 60% dos fármacos anticâncer introduzida na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais (MUKHERJEE *et al.*, 2001).

No Brasil as fontes de produtos naturais estão disponíveis em abundância em sua megadiversidade biológica. O bioma Floresta Atlântica com, aproximadamente, 15.700 espécies vegetais das quais 7.155 são endêmicas (aproximadamente 40% de endemismo) (STEHMAN *et al.*, 2009), é uma fonte inesgotável de produtos naturais.

Mesmo com sua vasta diversidade biológica, o Brasil ainda gasta milhões de dólares na importação de fármacos antineoplásicos para suprir a indústria farmacêutica nacional. Além disso, os quimioterápicos anticâncer consomem uma

boa parte dos recursos destinados ao Sistema Único de Saúde (SUS). Portanto, é crucial e estratégico para o país que novas moléculas com propriedades antitumoral sejam descobertas e adequadamente testadas, desta forma viabilizando novas opções terapêuticas para o tratamento do câncer. Sendo assim, a bioprospecção de espécies endêmicas da Floresta Atlântica constitui uma fonte de novas moléculas.

No desenvolvimento deste trabalho foram selecionadas três espécies endêmicas da Floresta Atlântica brasileira, a saber: *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia* e *Bathysa australis*. A análise da literatura revelou uma carência de informações sobre a anatomia e ultraestrutura de folhas destas espécies. Neste contexto, foi realizado um estudo anatômico das folhas destas espécies.

A identificação botânica de uma espécie é de extrema importância em trabalhos que envolva atividade biológica de uma planta. Evitar erros nesta etapa do projeto garante a repetibilidade dos resultados em estudos posteriores. Em vários casos observações da morfologia externa das folhas são insuficientes para sua identificação para identificação da espécie, conseqüentemente, análises anatômicas e ultraestruturais são fundamentais (METCALFE & CHALK, 1985).

Estudos de morfoanatomia e ultraestrutura indicam características capazes de separar *taxa*, bem como, relacionar características estruturais ao ambiente em que vivem tais espécies (FONTENELLE *et al.*, 1994; ASSIS & GIULIETTI, 1999; BREDENKAMP & VAN WYK, 2000; KONG, 2001; PIRES *et al.*, 2003). As folhas são órgãos anatomicamente variáveis, e a variação é, por vezes, específicas para gêneros, espécies ou mesmo famílias (DICKISON, 2000).

Neste trabalho de um modo geral, as folhas de *O. frutescens*, *T. oblongifolia* e *B. australis* apresentam características anatômicas condizentes com espécies de mesmo gênero. Uma análise da literatura revelou dados publicados onde destacam-se a anatomia e a micromorfologia dos gêneros: *Ottonia* (TAKEMORI, *et al.*, 2003; ALBIERO, *et al.*, 2006) *Bathysa* (NASCIMENTO *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 2000) e *Trigynaea* (ALBARELLO *et al.*, 2001; KOEK-NOORMAN, 1992).

A folha é formada de pecíolo e lâmina foliar sendo estes constituídos pela epiderme, córtex no pecíolo e mesofilo na lâmina foliar, e sistema vascular. A epiderme constitui o sistema de revestimento da folha e representa o limite entre o ser vivo e o ambiente. As células epidérmicas estão relacionadas com a proteção contra a radiação intensa, desidratação e ataque de patógenos e predadores e, para

desempenhar estas funções elas apresentam características próprias que podem variar de acordo com as condições ambientais (FAHN, 1990).

A epiderme varia no número de camadas celulares, no formato, espessura, estrutura e composição da parede celular, nos tipos e localização de estômatos, na ocorrência de papilas e diversos tipos de tricomas (FAHN, 1990).

As paredes periclinais das células epidérmicas podem apresentar formatos diferentes que são relacionados com a absorção de luz pelo órgão (FAHN, 1990).

A microscopia eletrônica de varredura revelou que a espécie *B. australis* apresenta uma superfície abaxial irregular com células epidérmicas com as paredes periclinais externas côncavas e paredes anticlinais de contorno irregular (Figura 15 A). Em cortes transversais da lâmina foliar de *B. australis*, observados em microscopia de luz, revelou-se epiderme uniestratificada nas faces adaxial e abaxial (Figura 16 A). A face adaxial apresenta células isodiamétricas e uniformes com paredes periclinais retas a levemente côncavas e recobertas por uma fina camada de cutícula (Figura 16 B). A epiderme adaxial é constituída de células achatadas com paredes periclinais côncavas, com tamanho variado (Figura 16 C).

Em *O. frutescens*, a microscopia de varredura mostra uma superfície abaxial regular, com células epidérmicas com parede anticlinais de contorno irregular e parede periclinal externa reta (Figura 15 D, E) e a microscopia óptica a lâmina foliar de *O. frutescens*, apresentou ambas as epidermes constituídas por uma única camada de células isodiamétricas com tamanhos variados e parede periclinal retas, sendo as células da face abaxial menores que às observadas na face adaxial (Figura 16 D, 16 E, 16 F).

A espécie *T. oblongifolia* exibiu superfície abaxial regular e lisa (Figura 15 G, I) na análise feita por microscopia de varredura, e a microscopia óptica revelou que a lâmina foliar de *T. oblongifolia* apresentou epiderme adaxial com uma única camada de células isodiamétricas regulares com parede periclinal externa reta a levemente convexa (Figura 16 G). A epiderme abaxial exibiu células menores, com contorno irregular e parede côncava (Figura 16 G, 16 H, 16 I).

Segundo Haberlandt (1928), as células epidérmicas com paredes periclinais externas convexas ou papilosas e paredes periclinais internas planas, funcionam como lentes plano-convexas direcionando a luz incidente para o interior do mesofilo, tornando mais eficiente à captação da luz solar. Smith *et al.* (1997) sugerem que o

formato convexo dessas paredes pode ser favorável em ambientes sombreados por produzir uma maior área de captação de luz. Os traçados das paredes anticlinais das células epidérmicas também são variados podendo ser sinuosos ou retos. De acordo com Wilkinson (1979), a hipótese mais aceita sobre as causas do traçado das células epidérmicas referem-se às influências ambientais, assim para este autor, folhas que se desenvolvem expostas ao sol têm paredes retas ou quase retas.

Além das células epidérmicas a epiderme, também, apresenta estruturas e células especializadas como os estômatos e tricomas (ESAU, 1974; FAHN, 1990).

Os estômatos são estruturas responsáveis pela regulação da transpiração e pelas trocas gasosas entre a planta e o exterior (ESAU, 1974; FAHN, 1990).

São formados por um par de células estomáticas, que delimitam uma fenda através da qual ocorre a comunicação entre o interior do órgão e o ambiente externo (Figura 15 B). Associadas às células estomáticas estão às células subsidiárias ou anexas formando junto com o estômato o complexo estomático (FAHN, 1990; ALQUINI *et al.*, 2003).

De acordo com Dickison (2000), vários grupos taxonômicos podem ser caracterizados com base em um tipo de estômato ou na combinação de dois ou mais tipos. Desta forma, a espécie *B. australis* apresenta raros estômatos paracíticos observados acima do nível da epiderme (Figura 15 B); em *O. frutescens* foram observados raros estômatos paracíticos no nível da epiderme; e a espécie *T. oblongifolia* foi observada a presença de muitos estômatos anomocíticos localizados abaixo do nível da epiderme (Figura 15H).

Os tricomas são células especializadas da epiderme muito variáveis nas suas estruturas e funções (MAUSETH, 1988). Incluídos nesta diversidade estão vários tipos unicelulares e pluricelulares, tectores e glandulares. A morfologia e distribuição de tricomas podem fornecer pistas importantes sobre as relações entre espécies, gêneros, tribos e subfamílias. Em alguns casos, os tricomas apresentam valor diagnóstico para a taxonomia de determinadas famílias e gêneros (METCALFE & CHALK, 1950; DICKISON, 2000).

A microscopia eletrônica de varredura revelou que *B. australis* apresenta Tricomas tectores unisseriados multicelulares foram notados preferencialmente nas nervuras secundárias (Figura 15 A). *Ottonia frutescens* notável presença de tricomas

tectores multicelulares e secretores (Figura 15 D, E). *Trigynaea oblongifolia* presença de muitos estômatos e tricomas tectores pluricelulares (Figura 15 G).

Anatomicamente, o mesofilo está diferenciado em paliçádico e lacunoso podendo variar no número de camadas celulares (ESAU, 1974; FAHN, 1990; DICKISON, 2000; MENEZES *et al.*, 2003). A distribuição e formato das células e a presença ou ausência de espaços intercelulares podem ser características diagnósticas de espécies.

De acordo com Smith *et al.* (1997), a morfologia das células do mesofilo atua na distribuição da luz para os cloroplastos, tendo em vista que a fotossíntese é diretamente afetada pelas propriedades ópticas dos tecidos do mesofilo e do tecido de revestimento. Dickison (2000) afirma que o formato alongado da célula e sua disposição perpendicular à epiderme aumenta a eficiência da fotossíntese pela localização das células em um ângulo ótimo para a entrada dos raios solares. A formação dos espaços intercelulares no parênquima lacunoso é importante para os processos de trocas gasosas, pelo tecido fotossintético (ESAU, 1974).

Para observar a anatomia do mesofilo das espécies estudadas foram feitos cortes transversais da lâmina foliar de cada uma das espécies e observado em microscopia óptica. O mesófilo de *B. australis* é dorsiventral constituído por parênquima paliçádico e lacunoso. O parênquima paliçádico esta voltado para face adaxial e parênquima lacunoso na face abaxial. O parênquima paliçádico possui uma ou duas camadas, e o parênquima lacunoso é constituído por três a cinco camadas de células irregulares com grandes espaços intercelulares (Figura 16 A). A lâmina foliar de *O. frutescens*, apresentou mesófilo dorsiventral, onde parênquima paliçádico é constituído por uma camada celular, rica em cloroplastos, e o parênquima lacunoso é constituído por 4 a 6 camadas células isodiamétricas com pequenos espaços intercelulares (Figura 16 D). Em *T. oblongifolia* lâmina foliar apresentou parênquima paliçádico constituído por duas a três camadas de células, rica em cloroplastos. E o parênquima lacunoso constituído por 6 a 8 camadas células isodiamétricas com pequenos espaços intercelulares (Figura 16 D).

A cera epicuticular das três espécies estudadas foi observada (Figuras 15 C, F, I). A cera epicuticular atua como barreira contra a penetração de bactérias e fungos patogênicos, protege a planta contra radiação ultravioleta, restringe a perda de água pelo estômato e reduz a retenção de água na superfície minimizando a deposição de

poeira, pólen e gases poluentes (KUNST & SAMUELS, 2003). Além de participar na defesa da planta, as diversas formas em que as ceras epicuticulares se apresentam também possuem interesse na sistemática (BARTHLOTT, 1981; BARTHLOTT *et al.*, 1998). Neste sentido, cera epicuticular de *B. australis* apresenta-se levemente granular (Figura 15 C); de *O. frutescens* é lisa com algumas áreas apresentando leve granulação (Figura 15 F); e *T. oblongifolia* lisa e com raras ornamentações (Figura 15 I).

Estruturalmente, as paredes celulares são formadas por camadas de composições variadas. Segundo Tenberge (1992), a parede periclinal externa é dividida em cera epicuticular e três camadas distintas: a cutícula propriamente dita, os estratos cuticulares e a camada rica em polissacarídeos. Estudos citoquímicos tem sido realizados para identificar e localizar os componentes da parede periclinal externa de células epidérmicas (BARROS & MIGUENS, 1998; KLEIN *et al.*, 2004; MIGUEL *et al.*, 2010). Em microscopia eletrônica de transmissão foi observada a presença de uma fina camada de cutícula e que as paredes periclinais externas das três espécies estudadas são divididas em uma camada basal polissacarídica, seguida por extratos cuticulares divididos em arborescente e reticulada (Figura 18 A).

A observação do protoplasto das células de mesofilo das espécies estudadas revelou características comuns, tais como: a presença de grandes vacúolos centrais, citoplasma ocupando um volume relativamente pequeno e periférico e a presença de abundantes cloroplastos. As espécies *Trigynaea oblongifolia* e *Bathysa australis* mostraram acúmulo de amido nos cloroplastos (Figura 18 B, 18 C) enquanto a espécie *Ottonia frutescens* apresenta acúmulo de lipídios (Figura 18 D).

Ao término da descrição da anatomia da lâmina foliar o próximo passo foi a obtenção dos extratos para triagem fitoquímica, testes de atividade antioxidante e os ensaios biológicos.

Os extratos foram obtidos a partir das folhas secas de cada uma das três espécies. O rendimento obtido foi de 4,9% *O. frutescens*, *T. oblongifolia* 4,98% e *B. australis* 4,05% (Tabela 3). É importante ressaltar que fatores como a fertilidade e tipo do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura e poluição atmosférica podem influenciar na composição química dos vegetais, bem como as interações e as adaptações coevolutivas do ecossistema envolvido (SIMÕES, *et al.* 2007; TAIZ & ZEIGER, 2008).

Um ponto chave nesta etapa do trabalho é o processo de secagem do material coletado. Segundo Hansen (1993), a secagem de plantas tem por objetivo retirar uma porcentagem elevada de água livre das células e dos tecidos, impedindo os processos de degradação enzimática e garantindo a preservação do princípio ativo. Após a secagem do material ficou constado que o teor de água apresentado pelas folhas de *O. frutescens* foi de 68,58%, *T. oblongifolia* 81,40%, e *B. australis* 81,67% (Tabela 3). A partir do material seco foram preparados os extratos em metanol.

O extrato de folhas de uma única espécie vegetal pode conter diversas moléculas estruturalmente diferentes, e ainda, pertencentes a várias classes de metabólitos secundários (SIMÕES, et al. 2007). A investigação fitoquímica dos extratos foi realizada por CCD. O extrato de *T. oblongifolia*, espécie pertencente à família das Annonaceae, foi o único positivo para flavonóides (Tabela 4) e na concentração de 24 µg/mL apresentou uma atividade antioxidante, 32,3% (Tabela 5).

Segundo Santos & Salatino (2000) é possível encontrar nas folhas de *T. oblongifolia* os seguintes flavonóides: apigenina, canferol e quercetina.

Por agirem como antioxidantes, apigenina, canferol e quercetina exibem diversos efeitos benéficos à saúde humana, tais como antiinflamatório, antialérgico, antiviral bem como atividade antitumoral (NARAYANA et al., 2001).

A apigenina é um flavonóide comum na dieta humana. Este flavonóide apresenta diversos efeitos biológicos, dentre eles o combate ao câncer de próstata (SHUKLA & GUPTA, 2007), supressão de tumorigênese e angiogênese de melanoma (CALTAGIRONE et al., 2000), nos carcinomas de mama (WAY et al., 2004), pele (BIRT et al., 1997), e cólon (WANG et al., 2000).

Vários estudos sobre o efeito antitumoral da apigenina têm sido realizados em razão da sua capacidade de induzir apoptose em uma grande variedade de células tumorais humana (CALTAGIRONE et al., 2000). A ação antitumoral da apigenina ocorre através da ativação das caspases (WANG et al., 1999), inibição da síntese lipídica (BRUSSELMANS et al., 2005), inibição da atividade proteassômica (WANG et al., 1999), inibição da topoisomerase, e modulação da expressão de Bcl-2 e Bax (TANIGAWA et al., 2008). Além de modular negativamente quinases como PI3K, Akt, MAPK ERK<sub>1/2</sub>, caseína quinase-2 (CK-2) e outras quinases envolvidas no desenvolvimento e progressão do câncer (WAY et al., 2004).

O mecanismo de ação da apigenina é dependente do tipo celular. Em células de câncer de mama (linhagem SK-BR-3), a apigenina inibe o ciclo celular na fase G2/M a qual está associada à modulação de p21, cdc2 e ativação da apoptose dependente de p53 (CHOI & KIM, 2008). Em células de câncer de mama resistente ao estrógeno (MCF-7), a apigenina inibe o crescimento celular através da inibição de proteínas quinases, incluindo p38, proteína kinase A (PKA) e AKT (LONG *et al.*, 2008).

Dados da literatura revelam que o canferol inibe a proliferação de células tumorais pancreáticas pela indução de apoptose (ZHANG *et al.*, 2008) e estudos com linhagem celular de câncer ovariano revelou que a concentração de 20 mM de canferol foi capaz de inibir o crescimento em 91% das células OVCAR-3 e que na concentração de 40 mM a inibição foi de 94% no crescimento da linhagem celular A2780/CP70 (LUO *et al.*, 2009). O canferol induziu apoptose em células MCF-7 ativando as caspases-7 e 9, bem como um aumento da expressão gênica de Bax (SUSANTI *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2009). O crescimento de uma outra linhagem de células de câncer de mama, MDA-MB-453, também foi inibido pela ação do canferol. Quando as células foram expostas ao canferol ocorreu uma parada do ciclo celular na fase G2/M, causada pela regulação de CDK1 e das ciclinas A e B (CHOI & AHN, 2008).

A quercetina desempenha importante papel nos ensaios citotóxicos como mostra estudo realizado com dezesseis plantas medicinais sobre linhagens tumorais de câncer de próstata (PC-3), câncer de fígado (HepG2) e adenocarcinoma colorretal (COLO 205) (RAO *et al.*, 2007). Essa molécula atua como agente anticâncer por reduzir a expressão de oncogenes tais como H-ras, c-myc e K-ras (LEE *et al.*, 2008), induzir a fosforilação de p53 e aumentar o conteúdo total desta proteína (TANIGAWA *et al.*, 2008) e estimular a expressão de proteínas que controlam o ciclo celular, entre elas p21, p27, ciclina D1 (TANIGAWA *et al.*, 2008), favorecendo a parada no ciclo celular.

A quercetina, também, inibe diferentes proteínas tais como: tirosina, serina e treonina quinases, cujas atividades estão ligadas a vias que induzem a sobrevivência celular (SPENCER *et al.*, 2003).

Testes *in vitro* indicam que a quercetina induz apoptose (MOURIA *et al.*, 2002) aumentando a relação Bax/Bcl-2 (TANIGAWA *et al.*, 2008), aumentando a

liberação de citocromo-c da mitocôndria, aumentando a ativação de caspase-3 e caspase-9 (WANG *et al.*, 1999).

A quercetina tem se mostrado um inibidor de DNA polimerase (ONO & NAKANE, 1990) e topoisomerase I e II (CONSTANTINO *et al.*, 1995).

Apesar de pertencerem a grupos taxonômicos diferentes as três espécies, avaliadas, apresentaram certa semelhança entre as classes de metabólitos secundários, foram observadas as seguintes classes de moléculas: alcalóides, Antraquinonas, Polifenóis (Taninos), Saponina, porém não foi detectado a presença de Cardiotônicos, Triterpeno e Esteróides (Tabela 4). Como descrito anteriormente, em nosso estudo foram obtidos apenas informações sobre as classes de metabólitos secundários, porém é importante destacar que a análise da literatura revela uma grande quantidade de informações sobre o mecanismo de ação de várias moléculas representantes das classes. Neste sentido faz necessária uma breve descrição sobre os mecanismos de ação de algumas destas moléculas.

Como relatado na revisão de literatura, os alcalóides podem atuar como drogas antimitóticas, tais como a vimblastina e vincristina, as quais são amplamente utilizadas no tratamento do câncer (MANN, 2002; HOLBECK, 2004).

Segundo Reynolds & Dweck, (1999) a antraquinona aloe-emodina encontrada nas folhas de *Aloe vera*, espécie popularmente conhecida como Babosa, é capaz de promover apoptose e inibição do crescimento de células tumorais. Tal molécula é capaz de: induzir apoptose em células de carcinoma escamoso de pulmão humano (linhagem CH27) através do mecanismo que envolve a regulação da expressão de proteínas da família Bcl-2 (LEE *et al.*, 2001a); e decréscimo na quantidade e a atividade da proteína kinase C, bem como ativação da caspase-3 na linhagem CH27 e H460 (carcinoma de pulmão) (LEE *et al.*, 2001b); induzir apoptose em células de glioma (U-373MG) (ACEVEDO-DUNCAN *et al.*, 2004), além de inibir a progressão do ciclo celular em G2 em células de câncer de bexiga humano (T24) (LIN *et al.*, 2006).

A partir do *Calophyllum brasiliense* (Guanandi) foram isoladas três cumarinas que apresentaram antitumoral (RUIZ-MARCIAL *et al.*, 2007). Segundo ITO *et al.* (2006) as cumarinas calophyllolide e mammea B/BB induzem apoptose pela ativação das vias caspase-9 e caspase-3 em células de linhagem leucêmica (HL-60).

Dados da literatura evidenciam que os compostos fenólicos atuam na supressão do crescimento de células tumorais, por induzir a apoptose (SHAKIBAEI *et al.*, 2009). Os compostos polifenólicos são amplamente distribuídos nas folhas e casca dos frutos, o resveratrol é um bom exemplo de polifenóis (CREASY & COFFEE, 1988). O resveratrol pode inibir metástases, angiogênese, induzir apoptose, causar parada do ciclo celular, e senescência em diversos tumores (AGGARWAL *et al.*, 2004; HEISS *et al.*, 2007).

O resveratrol inibe o crescimento de vários tipos celulares através da modulação de produtos de genes regulatórios do ciclo celular, como RB, CDKs, ciclinas e c-myc (oncogene myc). Dados da literatura revelam o efeito antiproliferativo, desta molécula, em células U937 ocorre na fase S do ciclo celular (BRANDÃO, *et al.*, 2010). Este composto também é capaz de induzir apoptose através do aumento da atividade de p53 e da diminuição de produtos gênicos antiapoptóticos, como Bcl-2 e Bcl-xl (HEISS *et al.*, 2007; HARIKUMAR & AGGARWAL, 2008).

A propriedade antitumoral de diversas saponinas, advindas de espécies variadas de plantas, tem sido avaliada em diferentes tipos de tumores. Os ginsenosídeos, derivados da planta *Panax ginseng* (ginseng coreano), são as saponinas mais estudadas. Sua atividade sobre a proliferação de células tumorais está relacionada ao controle do ciclo celular e indução de apoptótica. Estudos em células de câncer de mama (MDA-MB-453) revelam que o controle da proliferação celular, em G1/S ocorre pela inibição de proteínas responsáveis pela progressão celular como as CDKs induzindo apoptose (MUJOO *et al.*, 2001) e estímulo de proteínas inibidoras de CDKs em células de carcinoma hepático (SK-HEP-1) (KIM *et al.*, 1999).

Lee *et al.* (2000) estudaram a ação de um novo ginsenosídeo em células HL-60 e observaram que esta molécula induziu apoptose via liberação do citocromo c. Como relatado na revisão de literatura, danos irreversíveis à membrana mitocondrial provocam a liberação do citocromo c para o citosol, ativando a apoptose via caspase-3.

Na literatura, também, existem estudos da ação antitumoral de saponinas extraídas de outras plantas, os quais mostraram que o controle da proliferação celular ocorre pelo aumento da citotoxicidade (DE TOMMASI *et al.*, 2000; MIMAKI *et al.*, 1999); pela inibição da síntese de DNA (PLOHMANN *et al.*, 1997) pela indução

apoptótica (WANG *et al.*, 2001; TIAN *et al.*, 2006) e pela ação antiinflamatória (MATSUZAKI *et al.*, 2003).

Cumprido ressaltar que, também, foram realizados testes histoquímicos da lâmina foliar das espécies estudadas. Neste sentido, foi possível observar a distribuição de algumas classes de metabólitos no tecido foliar (Tabela 2). Desta forma ficou constatado que o parênquima paliçádico e lacunoso das espécies estudadas exibiram forte marcação para taninos e alcalóides (Tabela 2). De posse destas informações partiu-se para os ensaios de atividade antioxidante.

A atividade antioxidante dos extratos foi confirmada através da técnica de mensuração da taxa de seqüestro do radical livre DPPH (Tabela 5).

Segundo Sies & Stahl (1995) antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações comparada a do substrato oxidável (Radicais livres), atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz.

Radicaís livres são espécies química que contém um ou mais pares de elétrons livres (SMITH, *et al.*, 2007). São altamente reativos e instáveis, possuindo vida curta; e sua formação ocorre naturalmente no organismo de todos os seres vivos, devido à exposição ao oxigênio molecular (SMITH, *et al.*, 2007). São produzidos por modificações químicas de proteínas, lipídios, carboidratos e nucleotídeos, resultando em uma variedade de conseqüências biológicas, incluindo lesão tecidual, mutação, carcinogênese (KONG & LILLEHEI, 1998), comprometimento do sistema imunológico, doenças e morte celular (POULSEN *et al.*, 1998).

A propriedade antioxidante dos vegetais está relacionada, principalmente, aos compostos fenólicos. Os compostos fenólicos estão disponíveis nas plantas como ácidos fenólicos, flavonóides, lignanas, estilbenos, cumarinas e taninos, os quais podem ser encontrados em todas as partes do vegetal. Os fenóis mais comuns são polímeros e ligninas insolúveis, e dentre os flavonóides mais encontrados estão quercetina e rutina (SHAHIDI & NACZK, 1995).

Com relatado anteriormente, mesmo com atividade positiva para polifenóis e cumarinas nos testes fitoquímicos os três extratos testados apresentaram uma atividade antioxidante moderada (Tabela 5). A CL<sub>50</sub> para os três extratos foi maior que 24 µg/mL. Um extrato com alto potencial em seqüestrar radicaís livres deve possuir um baixo valor de CL<sub>50</sub>.

É importante ressaltar que existem alguns fatores que influenciam na capacidade antioxidante dos extratos, tais como: o método de extração utilizado determina a composição química dos extratos, bem como a época em que foi realizada a coleta do material botânico. Outros fatores importantes a serem considerados são os métodos de avaliação da atividade antioxidante, e as concentrações de extrato utilizadas na experimentação. Todos esses fatores podem influenciar nos resultados da capacidade antioxidante de um extrato. Neste contexto, cumpre enfatizar a necessidade da realização de novos experimentos com os extratos. Desta forma, fazer uma análise comparativa entre metodologias e concentrações de extrato diferentes.

A literatura está repleta de relatos que indicam atividade farmacológica em benefício à saúde humana de várias classes de metabólitos secundários, porém muitos compostos que fazem parte da composição química das plantas podem ser tóxicos, quando ingeridos de forma indiscriminada (OLIVEIRA, *et al.*, 2003; COIMBRA, 2004).

Equivocadamente, a cultura popular acredita que fazer o uso exagerado de determinada planta não causa mal algum, pelo simples fato de ser de origem natural. Neste contexto é importante que estudos de toxicidade com plantas medicinais sejam realizados, principalmente avaliando sua ação em nível celular.

Os extratos das folhas de *O. frutescens*, *T. oblongifolia*, *B. australis* foram submetidos aos testes de letalidade contra *A. salina* (Figuras 19, 20 e 21). O procedimento experimental ocorreu como descrito no item 4.3.7 de materiais e métodos.

*Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada, muito utilizado como alimento vivo para peixes ornamentais. Os ovos deste microcrustáceo apresentam elevada taxa de eclosão e são facilmente encontrados em lojas especializadas em aquários. Os náupilos deste microcrustáceo são amplamente utilizados para estimar a toxicidade através da concentração letal (CL<sub>50</sub>) (MEYER *et al.*, 1982).

Por ser de fácil manuseio a *A. salina* é muito utilizada na avaliação inicial, simultaneamente, de toxicidade de um grande número de amostras (PARRA *et al.*, 2001; MEYER *et al.*, 1982). Diversos trabalhos correlacionam a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades, antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida (SOLIS *et al.*, 1993; SIQUEIRA *et al.*, 1998; SIQUEIRA *et al.*, 2001;

ALVES *et al.*, 2000; KANEGUSUKU *et al.*, 2002; PAYROL *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2003; ZUQUE *et al.*, 2004). Recentemente, este bioensaio tem sido muito utilizado na avaliação prévia de extratos de plantas com possível atividade antitumoral (NGOUMFO *et al.*, 2010; EL-MENSHAWI, *et al.*, 2010; GARCEZ *et al.*, 2005).

Conforme apresentado nas figuras 19, 20 e 21, e segundo a classificação de Parra *et al.* (2001) os extratos de *O. frutescens* e *T. oblongifolia*, com  $CL_{50}$   $149,75 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$  e  $148,8 \pm 1,74 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, foram considerados moderadamente, porém o extrato de *B. australis* não apresentou resultados de toxicidade significativa,  $CL_{50}$  de  $684 \pm 9,04 \mu\text{g/mL}$ .

É importante ressaltar que, o bioensaio frente *A. salina* é um teste de toxicidade preliminar havendo a necessidade de estudos complementares tais como: citotoxicidade frente a linhagens celular mantidas em cultura.

Os três extratos foram testados quanto sua citotoxicidade *in vitro* através do método do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) utilizando células de linhagem leucêmica (U937) e carcinoma colorretal (COLO 205), bem como células sadias (PBMC). Como descrito anteriormente, o ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT (amarelo) para formazan (púrpura), pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias das células viáveis, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas pela atividade mitocondrial (MOSMANN, 1983).

Na execução deste experimento, as células foram incubadas com os extratos nas concentrações de 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$ . A figura 22 revela que todas as concentrações testadas para os três extratos foram eficientes em reduzir a viabilidade celular da linhagem leucêmica U937. Nesta mesma figura, ainda observamos que o aumento na concentração dos extratos influencia diretamente na viabilidade destas células. Por outro lado, uma análise da figura 23 revela que as células de carcinoma colorretal foram resistentes as concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  dos extratos de *O. frutescens*, e na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  do extrato de *T. oblongifolia*. Notadamente, o extrato de *B. australis* teve um efeito citotóxico discreto, com uma atividade relativamente boa apenas na concentração de 400  $\mu\text{g/mL}$  do extrato.

Para efeito de uma melhor comparação da atividade apresentada pelos três extratos frente às células testadas foi calculada a dose letal DL<sub>50</sub> (concentração dos compostos capaz de induzir morte em 50% das células tratadas).

De um modo geral, a análise da tabela 6 revela que, nos tempos de 24 e 36h de tratamento com os extratos de *O. frutescens* e *T. oblongifolia*, as células de carcinoma colorretal foram mais resistentes que as células de linhagem leucêmica. É importante ressaltar, que as células COLO 205 tiveram pouca variação no valor da DL<sub>50</sub> entre os tempos de 24 e 36 horas de tratamento. No entanto, tal comportamento não foi observado nas células U937, as quais tiveram os valores de DL<sub>50</sub> reduzidos no tempo de 36 horas.

Em relação ao extrato de *B. australis* o comportamento das células ficou invertido, ou seja, com 24 horas de tratamento a linhagem celular U937 apresentou uma maior resistência frente a esse extrato quando comparada às células COLO 205 (Tabela 6). Porém, os valores da DL<sub>50</sub> praticamente se igualam com 36 horas de tratamento.

O grande desafio na descoberta de fármacos antitumorais é encontrar uma molécula pouco agressiva ao organismo humano e eficiente no combate às células tumorais. Neste sentido, para avaliar a toxicidade dos extratos *in vitro* foram realizados experimentos com células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC). Essas células foram obtidas do sangue de um doador sadio conforme descrito no item 4.3.13.

As PBMC foram incubadas com os três extratos, após 24 horas a citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo ensaio com MTT. A figura 24 revela que os extratos de *O. frutescens* e *B. australis* interferiu significativamente na viabilidade celular apenas na concentração de 400 µg/mL. Porém, o extrato de *T. oblongifolia* foi citotóxico em todas as concentrações testadas. Desta forma, evidenciado que o extrato de *T. oblongifolia* apresenta uma maior toxicidade frente às células de PBMC. Não foi calculado a DL<sub>50</sub> para os experimentos com PBMC.

Os extratos foram testados quanto sua capacidade de induzir apoptose ou necrose nas células de linhagem leucêmica U937 e nas células de carcinoma colorretal (COLO 205).

A necrose é um processo degradativo em que ocorre cariólise e aumento do volume celular, com formação de vacúolos citoplasmáticos, ruptura e desagregação

das organelas e da membrana celular (KERR *et al.*, 1972; MAJNO & JORIS, 1995; TRUMP *et al.*, 1997).

A perda da integridade da membrana celular e a liberação do conteúdo citoplasmático para o tecido circundante liberam sinais quimiotáticos, causando o recrutamento da resposta inflamatória (SAVILL & FADOK, 2000; KUROSAKA *et al.*, 2003).

A necrose é um processo descontrolado e passivo que afeta diversas células dentro de um tecido, enquanto a apoptose é um processo controlado que afeta uma única célula ou alguns grupos pequenos. A necrose em geral é desencadeada por dois mecanismos distintos: falta de energia metabólica ou dano direto à membrana celular (ZEISS, 2003).

É importante ressaltar que, os processos de necrose e apoptose podem ocorrer simultaneamente, e às vezes a célula inicia um processo apoptótico, porém acaba por morrer por necrose devido à falta de energia ou indisponibilidade de caspases (DENECKER *et al.*, 2001).

A quantificação da LDH (lactato desidrogenase) pode ser um indicativo de que o processo de morte celular esteja ocorrendo por necrose, pois a lise da membrana celular expõe o conteúdo citoplasmático, desta forma é possível dosar a atividade da LDH. O experimento baseia-se na redução de  $\text{NAD}^+$  a NADH pela LDH. Posteriormente, o NADH é usado na conversão de um substrato em um produto de cor, o qual é quantificado por espectrofotometria. Assim, quanto maior a perda de integridade da membrana celular, maior será o sinal espectrofotométrico. Caso não ocorra dano à membrana a LDH permanece no domínio intracelular e não ocorrendo reação.

Neste sentido, células de linhagens tumorais foram incubadas com os extratos nas concentrações de 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$ . É possível observar na figura 25 que apenas a concentração de 400  $\mu\text{g/mL}$  dos três extratos foi capaz de induzir as células U937 a liberar valores significativos de LDH, ou seja, elevadas concentrações de extrato induzem lesões nas membranas destas células, caracterizando um processo de necrose. Como é sabido na apoptose são formados os corpos apoptóticos sem desintegração das membranas celulares.

Da mesma forma, as concentrações 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$  do extrato de *Ottonia frutescens*; 100, 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$  do extrato de *Trigynaea oblongifolia*; e 400  $\mu\text{g/mL}$

do extrato de *Bathysa australis* foram responsáveis pela liberação de LDH em células COLO 205 (Figura 26).

Neste sentido, foi necessário quantificar as porcentagens de indução de necrose e apoptose acometidas pelos extratos nas linhagens U937 e COLO 205, porém antes cumpre relatar que os extratos induziram lesões nas membranas dos PBMC em todas as concentrações do extrato de *Ottonia frutescens* e *Trigynaena oblongifolia*; e nas concentrações 200 e 400 µg/mL do extrato de *Bathysa australis* (Figura 27).

A apoptose é a principal forma de morte celular e é central para diversos processos biológicos, podendo ser ativada em resposta a estímulos específicos ou a várias formas de injúria ou estresse celular (HANNUN, 1997).

A falha em ativar a apoptose representa o principal obstáculo no combate ao câncer com drogas antitumorais. Porém, na ausência de agentes antineoplásico, as falhas nos mecanismos de ativação da apoptose representam um importante papel na sobrevivência e proliferação de células neoplásicas, pois permitem que subpopulações de células geneticamente alteradas ou instáveis sobrevivam. O reconhecimento de anormalidades em células tumorais destaca a maquinaria apoptótica como um interessante alvo potencial para o desenvolvimento racional de drogas antitumorais (CUMMINGS *et al.*, 2004; KAMB & LASSOTA, 2004).

Neste trabalho as taxas de necrose e apoptose induzidas pelos três extratos foram analisadas utilizando a microscopia de fluorescência, pelo método de coloração de células com os corantes de DNA, laranja de acridina e brometo de etídio.

Nas seguintes condições os extratos de *Ottonia frutescens* e *Trigynaena oblongifolia* foram capazes de induzir apoptose em mais de 90% das células U937: em 12 horas na concentração de 400 µg/mL, em 24 horas nas concentrações de 200 e 400 µg/mL, e 36 horas na concentração de 100 µg/mL (Figura 28 – gráficos A e C).

O extrato de *Bathysa australis* revelou ser mais agressivo frente à linhagem celular U937, pois na menor concentração testada (50 µg/mL) já havia induzido 60% de apoptose em 24 horas (Figura 28 – gráfico E). As células U937, quando desafiada com os extratos, apresentaram uma taxa de necrose apenas na maior concentração, a qual não ultrapassou 2% do total de células observadas (Figura 29 – gráficos A, C e E).

A linhagem celular COLO 205 revelou ser mais resistente quando desafiadas com os mesmos extratos. Em 12 horas a concentração de 400 µg/mL dos extratos de *Ottonia frutescens* e *Trigynaea oblongifolia* foi capaz de induzir apoptose em, aproximadamente, 41%, já o extrato de *Bathysa australis* induziu apoptose em apenas 7% das células de COLO 205 (Figura 28 – Gráficos B, D e F).

A figura 28 (gráfico B) revela, aproximadamente, 55% de indução de apoptose em 24 horas nas concentrações de 200 e 400 µg/mL do extrato de *Ottonia frutescens*. O extrato de *Trigynaea oblongifolia* foi capaz de induzir apoptose em 71% na concentração de 200 µg/mL, e nos tempos de 24 e 36 horas (Figura 28 – gráfico D). Na concentração de 200 µg/mL, o extrato de *Bathysa australis* induziu apoptose em 60% em 24 horas e 75% em 36 horas (Figura 28 – gráfico F).

Nos testes com as células COLO 205 foi observado um decréscimo na indução de apoptose na concentração de 400 µg/mL para os três extratos (Figura 28 – gráficos A, C e E). Tal fato é justificado pela observação do aumento na porcentagem de indução de necrose na mesma concentração (Figura 29 – gráficos B, D e F). Assim como ocorreu com as células de linhagem leucêmica as células de carcinoma colorretal também sofrem um aumento na porcentagem de necrose, tais informações são endossadas pela dosagem da LDH (Figura 26). Assim como a DL<sub>50</sub>, também não foram calculadas as porcentagens de necrose e apoptose para os experimentos com PBMC.

A análise dos resultados revela que os extratos avaliados foram bons indutores de apoptose em células U937 e COLO 205, ou seja, uma amostra que inibiu indiscriminadamente duas linhagens de células tumorais distintas. Porém, como observado na tabela 4 esses extratos são misturas complexas de vários metabólitos secundários e é possível que a indução de apoptose seja atribuída a uma única molécula presente nestes extratos, neste contexto cumpre ressaltar a necessidade de experimentos de fracionamento e purificação de moléculas, experimentos que devem ser guiados pela atividade biológica de cada uma das frações ou novas moléculas descobertas.

## 7 – Conclusões

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que:

- A preservação da biodiversidade vegetal da Floresta Atlântica é fundamental aos programas de bioprospecção de moléculas ativas no combate ao câncer;
- As folhas de *O. frutescens*, *T. oblongifolia* e *B. australis* apresentam características anatômicas condizentes ao seus respectivos gêneros;
- O rendimento do extrato foi de: *O. frutescens* - 4,9%, *T. oblongifolia* - 4,98%, e *B. australis* - 4,05%;
- Nos extratos de *O. frutescens* e *B. australis* foi detectada a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: Alcalóide, Antraquinonas, Cumarinas, Polifenóis (Taninos), Saponina. Nos extratos de *T. oblongifolia*, além dos mesmos metabólitos observados para *O. frutescens* e *B. australis*, foi detectada a presença de Flavonóides;
- A atividade antioxidante, observada em 30 minutos, na Concentração 24 µg/mL de extrato foi de: *O. frutescens* - 38,3%, *T. oblongifolia* - 32,3%, e *B. australis* - 32,1%;
- A Concentração Letal, CL<sub>50</sub>, dos extratos em *Artemia salina* foi de: *O. frutescens* - 149,75 ± 1,02 µg/mL, *T. oblongifolia* - 148,8 ± 1,74 µg/mL, e *B. australis* - 684 ± 9,04 µg/mL;
- Os três extratos testados induzem efeitos citotóxicos frente às linhagens celulares testadas, mesmo na menor concentração após 36 horas;
- Os três extratos induzem apoptose em células tumorais de maneira dose dependente. Sendo que, em 36 horas a concentração de 400 µg/mL induziu necrose nas células COLO 205.

## 8 – Referências Bibliográficas

- ACEVEDO-DUNCAN, M.; RUSSELL, C.; PATEL, S.; PATEL, R. Aloe-emodin modulates PKC isozymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. *Int Immunopharmacol.*, 20; 4(14): 1775 - 84, 2004.
- AGGARWAL, B.B.; BHARDWAJ, A.; AGGARWAL, R.S.; SEERAM, N.P.; SHISHODIA, S.; TAKADA, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* v. 24, p. 2783-2840. 2004.
- AHERNE, A. S & O'BRIEN, N. M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition.* 18:75-81, 2002.
- ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L.; VIANA, V.R.C & NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, vol.4, nº 1. p.35-46. 2001.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Biologia Molecular da Célula.* 5.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2009.
- ALBIERO, A. L.M.; PAOLI, A. A.S.; SOUZA, L. A.; MOURAO, K.S.M.. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). *Rev. bras. farmacogn.* vol.16, n.3, pp. 379-391. 2006.
- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M. R. T.; COSTA, C. G.; BARROS, C. F. Epiderme. In: Appezato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S. M.. *Anatomia Vegetal.* UFV. p. 87-97. 2003.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian

- medicinal plants. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- ANAZETTI, M.C & MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. METROCAMP. 2007
- ANDREAS GEWIES. Introduction to Apoptosis. ApoReview. 2006.
- ANTUNES, P.A.; CHIERICE, G.O.; CONSTANTINO, R.F. Spectroscopic characterization of N-isobutyl-6-(p-metoxypenyl) 2E, 4E-hexadieneamide extracted Ottoni apropinqua. Vibrational Spectroscopy. V.27, p. 175-81, 2001.
- ASSIS M.C. & GIULIETTI. A. M. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipecacuanha” – *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (*Rubiaceae*). Revista brasileira de Botânica 22: 205- 216. 1999.
- BAAK, J.P.A., PATH, F.R.C., HERMSEN, M.A.J.A., MEIJER, G., SCHMIDT, J., JANSSEN, E.A.M. Genomics and proteomics in cancer. European Journal of Cancer, v.39, p.1199-1215, 2003.
- BAGULEY, B. C.; MARSHALL, E. S. In vitro modelling of human tumor behavior in drug discovery programmes. European Journal of Cancer, v. 40, p. 794-801, 2004.
- BARROS C. F. & MIGUENS. F. C. Ultrastructure of the epidermal cell of *Beilshmeidia rígida* (mez) kosterm (Lauraceae). Acta Microscopica 7: 1 – 11. 1998.
- BARROSO, G. M., PEIXOTO, A. L., COSTA, C. G, ICHASO, C. L. F., GUIMARÃES, E. F. & LIMA, H. C. Sistemática das Angiospermas do Brasil, 3, Imprensa Universitária UFV. Viçosa. 1986.

- BARTHLOTT W. Epidermal and seed surface characteristics of plants: Systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nordian Journal of Botany* 1(3): 345-354. 1981.
- BARTHLOTT W. NEINHUIS C. & CUTLER D. DITSCH F. & MEUSEL I.; THEISEN I. & WILHELMI H. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 237-260. 1998.
- BAYNES, JHON W & DOMINICZAR, MAREK H. *Bioquímica Médica*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2007.
- BERMEJO, A., FIGADÈRE, B., ZAFRA-POLO, M., BARRACHINA, I., ESTORNELL, E., & CORTES D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep*. v. 22, p.269-303, 2005.
- BERNARDO SILVEIRA VOLKWEIS; RICHARD RICACHENEVSKY GURSKI, TCBC-RS. Barrett's Esophagus: Physiopathological and Molecular Aspects of Metaplasia Dysplasia Adenocarcinoma Sequence – Review Article. *Rev. Col. Bras. Cir*. Vol. 35. Nº 2, 2008.
- BIRT, D. F., MITCHELL, D., GOLD, B., POUR, P., PINCH, H. C. Inhibition of ultraviolet light-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res*. 17, 85–91. 1997.
- BLAGOSKLONNY, M.V.; SCHULTE, T.W.; NGUYEN, P.; TREOEL, J.; NECKERS, L. TAXOL-induced apoptosis and phosphorylation of bcl-2 protein involves c-raf-1 and represents a novel c-raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Research*, Vol.56, 1851–1854. 1996.
- BOLD, R.J; TERMULEN, P.M; MACCONEY, D.J. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surgical Oncology*., v.6, n.3, p.133-142, 1997.

- BOYD, M & PAULL, K. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute *in vitro* anticancer drug discovery screen. Drug Development Research, v. 34, pp. 91-109, 1995.
- BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A. P.; DAVID, J. M. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. Quim. Nova, v. 33, n. 6, p.1359-1369, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Brasília. 2008.
- BREDENKAMP. C.L.; VAN WYK. A. E. The epidermis in *Passarina* (Thymelaeaceae): structure, function and taxonomic significance. Bothalia 30: 69- 86. 2000.
- BRENTANI, R. R., LOPES, J.D. JUNQUEIRA, L.C.U. Biology of metastasis. Braz. J. Med.Biol; Res. 21; 1-17, 1988.
- BRIDGES, A. J. The epidermal growth factor receptor family of tirosine kinases and cancer: can an atypical exemplar be a sound therapeutic target? Current Medicinal Chemistry, v. 3, p. 211-226, 1996.
- BRUSSELMANS, K., VROLIX, R., VERHOEVEN, G., SWINNEN, J.V. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. J. Biol. Chem. 280, 5636-5645. 2005.
- CALTAGIRONE, S., ROSSI, C., POGGI, A., RANELLETTI, F. O., NATALI, P. G., BRUNETTI, M., AIELLO, F.B., PIANTELLI, M. Flavonoids apigenin

and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int. J. Cancer* 87, 595–600. 2000.

CALTAGIRONE, S., ROSSI, C., POGGI, A., RANELLETTI, F.O., NATALI, P.G., BRUNETTI, M., AIELLO, F.B., PIANTELLI, M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 87: 595-600. 2000.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M.; SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. *Em Annonaceae (Soursop Family)*; Princeton University Press: New Jersey, 2004, p. 18.

CHOI, E.J. & AHN, W.S. Kaempferol induced the apoptosis via cell cycle arrest in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Nutr. Res. Pract.* 2, 322–325. 2008.

CHOI, E.J., KIM, G.H. Apigenin causes G(2)/M arrest associated with the modulation of p21(Cip1) and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. *J. Nutr. Biochem.* 2008.

COIMBRA, L. O. *Manual de Fitoterapia*. 2 Ed. Belém: CEJUP, 1994.

CONSTANTINO, A.; MEHTA, R.; RUNYAN, C.; RAO, K.; VAUGHAN, A.; MOON, R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure–activity relationships. *J Nat Prod.* v. 58, p. 217-225. 1995.

CORREA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas* 1.Min. Agric. Rio de Janeiro. 747 p. 1984.

CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional, 6: 777. 1984.

- COSTA, A. F. 1982. Farmacognosia. 2 ed., Lisboa, Fundação Calouste Gulbekian. V. 3.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins. Patologia Estrutural e Funcional. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.
- CREASY, L.L.; COFFEE, M. Phytoalexin production potential of grape berries. J Am Soc Hortic Sci. v. 113, p. 230-234. 1988. CUMMINGS, J.; WARD, .H.; RANSON, M.; DIVE, C. Apoptosis pathway-targeted drugs – from the bench to the clinic. Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1705, 53-66. 2004.
- CUNHA, N. S. Uma perícia farmacognóstica e falsas quininas do Brasil. Rev. da Associação brasileira de farmacêuticos R. J. 18(4): 156-168. 1937.
- CUNICO, M.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; MONTRUCCHIO, D.P.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Avaliação da atividade antibacteriana de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. Rev. Cienc. Farm., v.24, n.2, p.141-145, 2003.
- DAGLI, M.L.Z. Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental. São Paulo, USP, 1989, p.148. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo, 1989.
- DE TOMMASI, N.; AUTORE, G.; BELLINO, A.; PINTO, A.; PIZZA, C.; SORRENTINO, R.; VENTURELLA, P. Antiproliferative triterpene saponins from *Trevesia palmate*. Journal of Natural Products, v. 63, p. 308-314, 2000.
- DENECKER, G.; VERCAMMEN, D.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. Cell Mol Life Sci. v. 58, p. 356-370. 2001.

DI STASI, CLAÚDIO, L & LIMA H, AKIKO C. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica 2002, 2ª Ed. Editora UNESP.

DICKISON. W. C. Integrative plant anatomy. San Diego. Harcourt Academic Press. 533p. 2000.

EDREVA, A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. Agriculture Ecosystems & Environment. 106:135-146. 2005.

EL-MENSHAWI, B.S.; FAYAD, W.; MAHMOUD, K.; EL-HALLOUTY, S.M.; EL-MANAWATY, M.; OLOFSSON, M.H.; LINDER, S. Screening of natural products for therapeutic activity against solid tumors. Indian J Exp Biol. 48(3):258-64. 2010.

ERDEMOGLU, N., SENER, B., CHOUDHARY., M. I. Bioactivity of Lignans from *Taxus baccata*. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen. 2004.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. Nutrition Research. 24:851-874. 2004.

ESAU. K. Anatomia das plantas com sementes. Tradução: Berta Lange de Morretes. Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo. 231p. 1974.

FACUNDO, V.A.; MORAIS, S.M.; BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos de *Ottonia corcovadenis* Miq. da Floresta Amazônica – atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. Química Nova, v. 27, n1, p 78-83, 2004.

FAHN. A. Plant anatomy. Pergamon Press, Oxford. 558p. 1990.

- FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, v. 475, p. 89-111, 2001.
- FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; PAGLIA, A.P. & MITTERMEIER, R.A. 2004. Atlantic Forest. In: Mittermeier, R.A., P. Robles-Gil, M. Hoffmann, J.D. Pilgrim, T.M. Brooks, C.G. Mittermeier, and G.A.B. Fonseca. (Org.). *Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecosystems*. CEMEX, Agrupación Sierra Madre, S.C. México, pp. 84-88.
- FONTENELLE G.B.; COSTA C.G. & MACHADO RD. Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 115: 111- 133. 1994.
- FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Willey – Liss, 4. ed., 2005.
- G.-P. SUN; X. WAN; S.-P. XU; H. WANG; S.-H. LIU; Z.-G. WANG. Antiproliferation and apoptosis induction of paeonol in human esophageal cancer cell lines. *Diseases of the Esophagus*. v 21, p. 723–729, 2008.
- GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; MARTINS, M.; MATOS, M.F.; GUTERRES, Z.R.; MANTOVANI, M.S.; MISU, C.K.; NAKASHITA, S.T. Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*. *Planta Med.* 71(10):923-7. 2005.
- GERMANO-FILHO, P. Estudos Taxonômicos do gênero *Bathysa* C. Presl (Rubiaceae, Rondeletieae), no Brasil. *Rodriguésia* 50(76/77): 49-75. 1999.
- GOMES D. M. S.; ARRUDA, R. C. O.; GOMES, M.; VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Bathysa gymnocarpa* K. Schum., *B. mendonçaei* K. Schum., *B. cuspidata* (St. Hil.) Hook. F. e *B. australis* (St. Hil.) Hook. F. (Rubiaceae) da Mata Atlântica, RJ, Brasil. *Leandra* 15: 59-72. 2000.

- GONZALEZ, V.M.; FUERTES, M.A.; ALONSO, C.; PEREZ, J.M. Is Cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular Pharmacology*, Vol. 59, 657- 663. 2001.
- GREENWALD, P., CLIFFORD, C.K., MILNER, J.A. Diet and cancer prevention. *European Journal of Cancer*, v. 37, p.948-965, 2001.
- GRIFFITHS, A. J. F., WESSLER, S.R., LEWONTIN, R.C., GELBART, W. M., SUZUKI, D.T. *Introdução à Genética - 9ª Ed.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (Grupo GEN), 2008.
- GUEDES-BRUNI, R. R. 1998. Composição, estrutura e similaridade florística de dossel de 6 unidades de Mata Atlântica do Rio de Janeiro. Tese (doutorado em Ciências Biológicas) São Paulo – SP, USP. 231p.
- GUIMARÃES, E.F., ICHASO, C.L. & COSTA, C.G. Piperaceae. 1. Ottonia, 2. Sarcorrhachis, 3. Pothomorphe. In: R. Reitz (ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*, Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 1978.
- HABERLANDT, G. *Physiological plant anatomy*. Macmillan & Co. Ltd., London. 777p. 1928.
- HANNUM, Y. A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*,
- HANSEN, R. C.; KEENER, H. M.; ELSOHLY, H. N. Thin layer drying of cultivated taxus clippings. *Transactions of the ASAE*, v. 36, n. 5, p. 1387-1391. 1993.
- HARBORNE, J. B. & WILLIAMS, C. A., *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry* 55, 481–504. 2000.

HARIKUMAR, K.B.; AGGARWAL, B.B. Resveratrol: A multitargeted agent for age associated chronic diseases. *Cell Cycle*. v. 7, n. 8, p. 1020-1035. 2008.

HARRISON, TINSLEY RANDOLPH; FAUCI, ANTHONY S. *Harrison medicina interna*. 17. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2008.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96: 67-202, 2002.

HEISS, E.H.; SCHILDER, Y.D.; DIRSCH, V.M. Chronic treatment with resveratrol induces redox stress and ataxia telangiectasia mutated (ATM) dependent senescence in p53-positive cancer cells. *J Biol Chem*. v. 282, n. 37, p. 26759-26766. 2007.

HEYWOOD, V. H.; *Flowering plants of the world*, Oxford University Press: Oxford, 1985.

HOLBECK, S. L. Update on NCI *in vitro* drug screen utilities. *European J. Cancer* 40: 785-793, 2004.

HUTCHINSON, J.; *The families of flowering plants*, Clarendon Press: Oxford, p. 22-168; 1973.

ITO, C.; MURATA, T.; ITOIGAWA, M.; NAKAO, K.; KANEDA, N.; FURUKAWA, H. Apoptosis inducing activity of 4-substituted coumarins from *Calophyllum brasiliense* in human leukaemia HL-60 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.58, p.975-980, 2006.

JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw Hill Book.

JÚNIOR. C.B.G; KLUMBE. E.C; MAIA C.R. P53 and hematological malignancies *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48(3): 419-427, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.U., Carneiro, J. *Biologia celular e molecular*. 11<sup>a</sup> Ed. São Paulo/SP: Editora Guanabara Koogan, 2008.

KAMB, A.; LASSOTA, P. Disease models of cancer: apoptosis. *Drug Discovery Today: Disease Models*, Vol. 1, 31-36. 2004.

KANEGUSUKU, M.; BENASSI, J.C.; PEDROSA, R.C.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; MAIA, A.A.; SOUZA, M.M.; DELLE MONACHE, F.; NIERO, R. Cytotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). *Zeitschrift fuer Naturfoschung*, v. 57c, p. 272-276, 2002.

KANG M.H, REYNOLDS C.P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. : *Clin Cancer Res*. V. 15(4):p.1126-32. 2009.

KANG, G.-Y.; LEE, E.-R.; KIM, J.-H.; JUNG, J.W.; LIM, J.; KIM, S.K.; CHO, S.-G.; KIM, K.P. Downregulation of PLK-1 expression in kaempferol-induced apoptosis of MCF-7 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 611, 17–21. 2009.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* v. 26, p.239-257. 1972.

KIM, S. E.; LEE, Y. H.; PARK, J. H.; LEE, S. K. Ginsenoside-Rs3, a new diol type ginseng saponin, selectively elevates protein levels of p53 and p21WAF1 leading to induction of apoptosis in SK-HEP-1 cells. *Anticancer Research*, v. 19, n. 1A, p. 487-791, 1999.

KLEIN D.S.; GOMES V.M.; SILVA NETO S.J. & DA CUNHA M. The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany* 94: 733-740. 2004.

- KOEK-NOORMAN, J. Leaf anatomy Rollinia. In.: MAAS, P. J. M & WESTRA, L. Y. T. (eds.). *Flora Neotropica: Monograph 57, Rollinia*. New York: The New York Botanical Garden. 15-21. 1992.
- KOHNO, K.; UCHIUMI, T.; NIINA, I.; WAKASUGI, T.; IGARASHI, I.; MOMII, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, K.; MIYAMOTO, N.; IZUMI, H. A. Transcription factors and drug resistance. *European Journal of Cancer*, Vol. 41, 2577–2586. 2005.
- KONG H. Comparative morphology of leaf epidermis in the Chloranthaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 136: 279- 294. 2001.
- KONG, Q., LILLEHEI, K.O. Antioxidant inhibitors for cancer. *Med Hypotheses*. 51: 405-9. 1998.
- KOSMIDER, B.; ZYNER, E.; OSIECKA, R.; OCHOCKI, J. Induction of apoptosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutation research*. Vol. 563, 61-70. 2004.
- KRAUSS J, BRACHER F, SYNOWITZ K AND UNTERREITMEIER D. Design and Cytotoxic Evaluation of New Annonaceous Acetogenin Analogues. *J. Braz. Chem. Soc.*, V. 18. 2007.
- KUNST L.; SAMUELS. A. L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* 42: 51-80. 2003.
- KUROSAKA, K.; TAKAHASHI, M.; WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*. v. 171, p. 4672-4679. 2003.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R.; *Phytochemistry*, 21, 2783. 1982.

- LEE, H.Z. Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *British Journal of Pharmacology*. 134, 11 – 20, 2001a.
- LEE, H. Z. Protein kinase C involvement in aloe-emodin and emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell. *Br J Pharmacol* 134:1093-1103, 2001b.
- LEE, K.W.; KANG, N.J.; HEO, Y.S.; ROGOZIN, E.A.; PUGLIESE, A.; HWANG, M.K.; BOWDEN, G.T.; BODE, A.M.; LEE, H.J.; DONG, Z. Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. *Cancer Res*. v. 68, p. 946-955. 2008.
- LEE, S. J.; KO, W. G.; KIM, J. H.; SUNG, J. H.; LEE, S. J.; MOON, C. K.; LEE, B. H. Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease. *Biochemical Pharmacology, London*, v. 60, p. 677-685, 2000.
- LEMOS, M.L. Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *Ann Pharmacol*.35(9):1118-21, 2001.
- LEONI, L.S. Árvores ocorrentes em fragmento na mata da encosta Atlântica no município de Faria Lemos – Minas Gerais, Brasil. *Boletim do Herbário "Guido Pabst"*. 13. 2002.
- LEONI, S. L. Fitoterapia no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG. *Pabstia*. 7(1): 1-5. 1995.
- LI, J. & YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. V. 20;27(48):p.6194-206. 2008.
- LIN J-G, CHEN G-W, LI T-M, CHOUH S-T, TAN T-W AND CHUNG J-G. Aloe Emodin Induces Apoptosis in T24 Human Bladder Cancer Cells Through

the p53 Dependent Apoptotic Pathway. *The Journal of Urology*; 175, 343-347, 2006.

LONG, X., FAN, M., BIGSBY, R.M., NEPHEW, K.P. Apigenin inhibits antiestrogen-resistant breast cancer cell growth through estrogen receptor {alpha}-dependent and estrogen receptor-{alpha}-independent mechanisms. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2096 - 2108. 2008.

LUO, H.; RANKIN, G.O.; LIU, L.; DADDYSMAN, M.K.; JIANG, B.-H.; CHEN, Y.C. Kaempferol inhibits angiogenesis and VEGF expression through both HIF dependent and independent pathways in human ovarian cancer cells. *Nutr. Cancer*, 61, 554–563. 2009.

M. SHAKIBAEI, K.B. HARIKUMAR, B. B. Aggarwal, Resveratrol addiction: to die or not to die, *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 115 – 128. 2009.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. & RAINER, H. 2002. Annonaceae of eastern and south-eastern Brazil (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo & Rio de Janeiro). *Rodriguésia* 52(80): 61-94.

MAAS, P.J.M., KAMER. H. M., JUNIKKA, L., MELLO-SILVA, R., RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, 52(80): 65-98. 2001.

MACRAE, W. D. & TOWERS, G. H. N, Biological activities of lignans. *Phytochemistry* 23, p. 1207-1220, 1984.

MADELAINE. J; ZALCMAN. G. Biology of bronchial cancers. *EMC-Pneumologie* 2 9–31, 2005.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* v. 146, p. 3-15. 1995.

- MAKAPUGAY, H.; SOEJARTO, D.D.; KINGHORN, A.D. Piperovatine, the tongue-numbing principle of *Ottonia frutencens*. Journal of Ethnopharmacology. v.7, p 235-8. 1983.
- MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. Nature Reviews (Cancer) 2: 143-148, 2002.
- MANSON, M. Cancer prevention – the potencial for diet to modulate molecular signaling. Trends in Molecular Medicine. V.9, n.1, p. 11-18, 2003.
- MAPARA, M.; Sykes, M. Tolerance and Cancer: Mechanisms of Tumor Evasion and Strategies for Breaking Tolerance. Journal of Clinical Oncology. Vol. 22, 1136-1151, 2004.
- MARCHAND, L.L. Cancer preventive effects of flavonóides – a review. Biomed Pharmacother, v.56, p.296-301, 2002.
- MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S. C. S.; GÓRNIK, S. L.; DAGLI, M. L. Z. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascetic form. Life Sciences, v. 74, n. 5, p. 573-579, 2003.
- MAUSETH J. D. Plant anatomy. California, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 560 p. 1988.
- MENEZES, N. L.; SILVA, D. C.; PINNA, G. F. A. M. Folha. In: Appezzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S. M.. Anatomia Vegetal. UFV. p. 303-311. 2003.
- MESSIMA, M.J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. Am J Clin Nutr; 70 Suppl: 439-50, 1999.
- METCALFE C.R. & CHALK L. Anatomy of dicotyledons. vol I. Oxford: Clarendon Press. 1950.

- METCALFE C.R. & CHALK L. Anatomy of dicotyledons: wood structure and conclusion of the general introduction. vol II, 2nd edn. Oxford: Clarendon Press. 1985.
- MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents *Planta Med.* v. 45, p. 31-34, 1982.
- MIGUEL, E. C.; KLEIN, D. E.; OLIVEIRA, M. A.; DA CUNHA, M. Ultrastructure of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* K. Schum. and *B. stipulata* (Vell.) C, Presl. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 33: 455-466. 2010.
- MIMAKI, Y.; KUROKA, M.; ASANO, T.; SASHIDA, Y. Triterpene saponins and lignans from the roots of *Pulsatilla chinensis* and their cytotoxic activity against HL-60 cells. *Journal of Natural Products*, Pittsburgh, v. 62, p. 1279-1283, 1999.
- MONKS, A., SCUDIERO, D., SKEHAN, P., SHOEMAKER, R., PAULL, K., VISTICA, D., HOSE, C., LANGLEY, J., CRONISE, P., VAIGRO-WOLFF, A., GRAY-GOODRICH, M., CAMPBELL, H., MAYO, J., BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute* vol. 83, 757-766, 1991.
- MOREIRA, F.P.M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v 65, p. 55-63, 1983.
- MOURIA, M.; GUKOVSKAYA, A.S.; JUNG, Y.; BUECHLER, P.; HINES, O.J.; REBER, H.A.; PANDOL, S.J. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int J*
- MUJOO, K.; HARIDAS, V.; HOFFMANN, J. J.; WÄCHTER, G. A.; HUTTER, L. K.; LU, Y.; BLAKE, M. E.; JAYATILAKE, G. S.; BAILEY, D.; MILLS, G. B.; GUTTERMAN, J. U. Triterpenoid Saponins from *Acacia victoriae* (Bentham) Decrease Tumor Cell Proliferation and Induce Apoptosis<sup>1</sup>. *Cancer Research*, v. 61, n. 14, p. 5486–5490, 2001.
- MUKHERJEE, A.K.; et al. Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. *Current Medicinal Chemistry*, v.8, p. 1467-1486, 2001.
- MYERS, N., R.A. MITTERMEIER, C.G. MITTERMEIER, G.A.B. FONSECA & J. KENT. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-845. 2000.
- NARAYANA, K.R.; REDDY, M.S.; CHALUVADI, M.R.; KRISHNA, D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 2-16, 2001
- NASCIMENTO M.V.O.; GOMES D.M.S. & VIEIRA R.C. Anatomia foliar de *Bathysa stipulata* (Vell.) Presl. (Rubiaceae). *Revista Unimar* 18 (2): 387-401. 1996.
- NGOUMFO, R.M.; JOUDA, J.B.; MOUAFO, F.T.; KOMGUEM, J.; MBAZOA, C.D.; SHIAO, T.C.; CHOUDHARY, M.I.; LAATSCH, H.; LEGAULT, J.; PICHETTE, A.; ROY, R. *In vitro* cytotoxic activity of isolated acridones

- alkaloids from *Zanthoxylum leprieurii* Guill. et Perr. Bioorg Med Chem. 15;18(10):3601-5. 2010.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59: 368-373. 1965.
- OLIVEIRA, R. B., GODOY, S. A. P., COSTA, F. B. Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos, 2003. 64p
- ONO, K.; NAKANE, H. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. J Biochem. v. 108, n. 4, p. 609-613. 1990.
- PADILHA. C.P., PINHEIRO L.R. O Papel dos Alimentos Funcionais na Prevenção e Controle do Câncer de Mama. Revista Brasileira de Cancerologia, 2004; 50(3): 251-260.
- PARDHASARADHI, B. V. V., REDDY, M., MUBARAK, A, A., KUMARI, A, L and KHAR, A. Differential cytotoxic effects of *Annona squamosa* seed extracts on human tumour cell lines: Role of reactive oxygen species and glutathione. J. Biosci. V.30, p. 237–244, 2005.
- PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDIÑHAS, G.I; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomedicine, v. 8, n. 5, 395-400, 2001.
- PAYROL, J.A.; MARTINEZ, M.M.; CARRABEO, G.T.; GARCIA, O.C. Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromélia pinguin* L. (pina de ratón). Revista Cubana Farmacêutica, v. 35, n. 1, p. 56-60, 2001.

- PEARSE, A.G.E. 1980. Histochemistry, theoretical and applied: preparative and optical technology. 4th ed. Churchill Livingston, Edinburgh.
- PERES, C. M. & CURI, R. Como Cultivar Células. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- PIRES M. F. O.; SEMIR J.; PINNA G. F. A. M.; FELIX L. P. Taxonomic separation of the genera *Prosthechea* and *Encyclia* (Laeliinae: Orchidaceae) using leaf and root anatomical features. Botanical Journal of the Linnean Society 143: 293-303. 2003.
- PLOHMANN, B.; BADER, G.; HILLER, K.; FRANZ, G. Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponinas. Pharmazie, v. 52, n. 12, p. 953-957, 1997.
- PRENTICE, L.R. Future possibilities in the prevention of breast cancer fat and fiber and breast cancer research. Breast Câncer Res. 2(4):268-76. 2000.
- RAMAKRISHNA, Y.; MAHONOR, A.I.; MAMATA, P.; SHREEKANT, K.G. Plants and novel antitumour agents: A review. Indian Drugs, 21: 173-185, 1984.
- RAO, Y.; GEETHANGILI, M.; FANG, S.H.; TZENG, Y.M. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study. 23; 2007.
- REDDY, L., ODHAV, B., BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global prespective. Pharmacology & Therapeutics, v.99, p.1-13, 2003.
- REYNOLDS T, DWECK A.C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. J. Ethnopharmacol. Dec 15;68(1-3):3-37, 1999.
- REYNOLDS, E. S. The Use Of Lead Citrate At High Ph As An Electron-Opaque Stain In Electron Microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208-212. 1963.

- RIBEIRO, M. C.; METZGER J. P.; MARTENSEN A. C.; PONZONI F. J.; HIROTA M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153. 2009.
- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contribution to a new subfamilial classification. *Opera Bot. Belg.* 1: 1-272.
- ROCHA, A. B., LOPES, R. M., SCHWARTS, G. Natural products in anticancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1(4) : 364-369, 2001.
- ROCHA, A.A. & FELDMANN, F.J. A Mata Atlântica é aqui. E daí? História e luta da Fundação SOS Mata Atlântica. São Paulo, Terra Virgem. 2006.
- ROSS, J. A., KASUM, C. M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Reviews of Nutrition*, 22:19-34. 2002.
- RUBINSTEIN, L.V., SHOEMAKER, R.H., PAULL, K.D., SIMON, R.M., TOSINI, S., SKEHAN, P., SCUDIERO, D.A., MONKS, A., BOYD, M.R. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of National Cancer Institute* 82: 1113-1118, 1990.
- RUIZ-MARCIAL, C.; CHILPA, R.R.; ESTRADA, E.; REYES-ESPARZA, J.; FARIÑA, G.G. RODRÍGUEZ-FRAGOSO, L. Antiproliferative, cytotoxic and antitumour activity of coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.59, p.719-725, 2007.
- RUSAK, G., GUTZEIT, H., MULLER, J.L. Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycles progression and

apoptosis of human acute leukemia cells. *Nutrition Research*, v. 25, p.141-153, 2005.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSE, W.; PRADO, R. G.. Efeito da Solução Aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o Tumor Ascítico de Ehrlich. Estudo Experimental in vitro. *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol. 19 (1) , p. 56-58, 2004.

SAKATA, K., HIROSE, Y., QIAO, Z., TANAKA, T., MORI, H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Letters*, v. 199, p. 139-145, 2003.

SANTOS, D.Y.A.C., SALATINO, M.L.F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*. 55, 567 – 573, 2000.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. v. 407, p. 784-788. 2000.

SCHULTZ, D.R., HARRINGTON, W.J. Apoptosis: programmed Cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.32, n.6, p. 345-69, 2003.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effect, applications. Pennsylvania: Technomic, 1995.

SHUKLA, S., & GUPTA, S. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle* 6, 1102-1114. 2007.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

- SIGMA. Fundamental Techniques in Cell Culture...A Laboratory Handbook, SIGMA Laboratories, 2008.
- SILVA F.A.M., BORGES M.F.F., FERREIRA M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22(1), p. 94-103, 1999.
- SILVA, J.M.C., M.C. SOUSA & C.H.M. CASTELLETTI. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic Forest. *Global Ecology and Biogeography* 13: 85-92. 2004.
- SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Ver. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2007.
- SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.
- SIQUEIRA, J.M.; ZIMINIANI, M.G.; RESENDE, U.M.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo Fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriúscula* Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.
- SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*: 82, 1107-1118, 1990.
- SMITH W.K.; VOLGEMANN T.C.; DELUCIA E.H.; BELL D.T. & SHEPHERD K.A. Leaf form and photosynthesis. *BioScience* 47: 785-793. 1997.

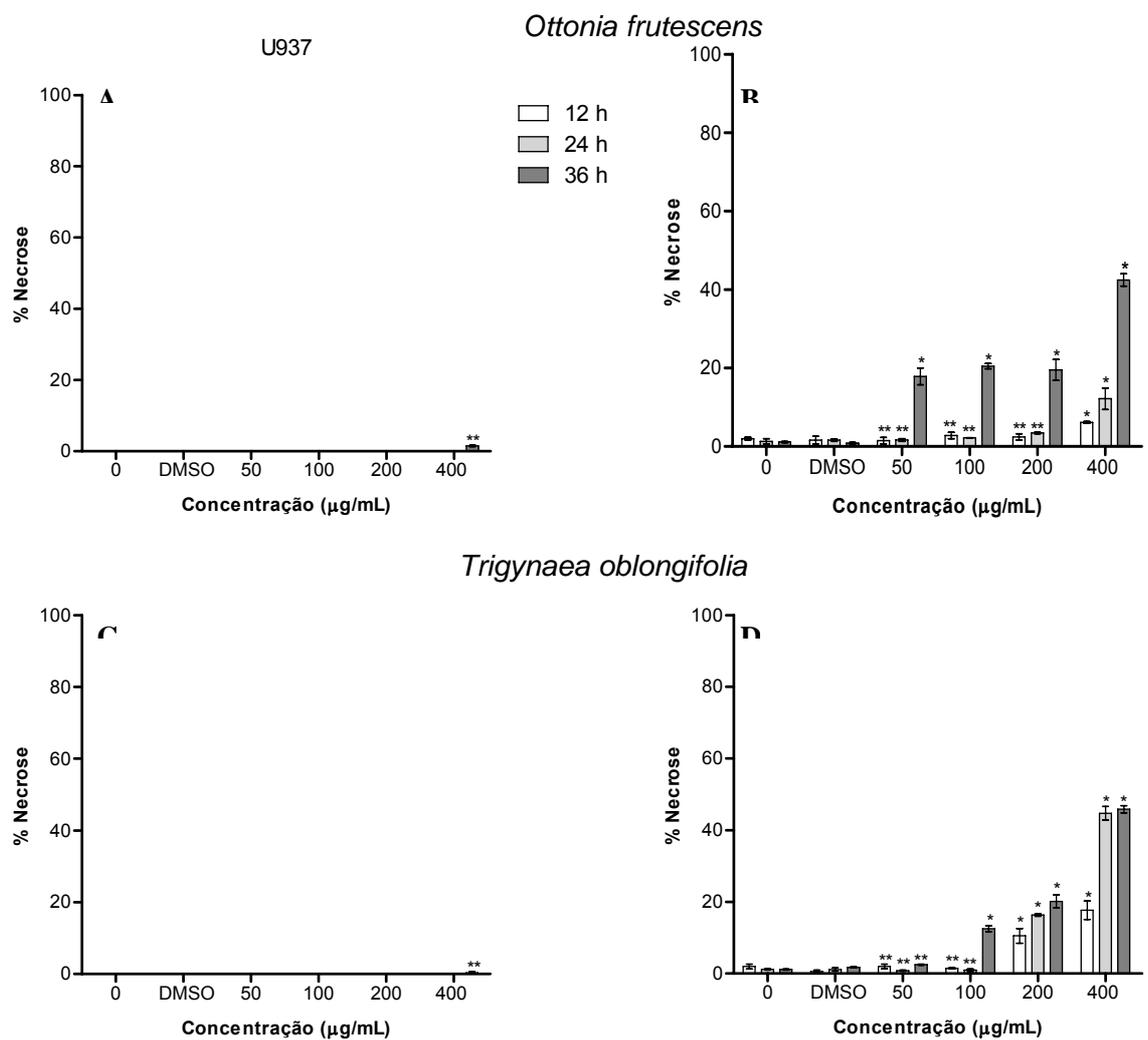
- SMITH, C.; MARKS, A.L.; LIEBERMAN, M. Bioquímica Médica Básica de Marks: Uma abordagem clínica. 2ª Ed. Porto Alegre: Editora artmed, 2007.
- SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GUPTA, M.P.; PHILLIPSON, D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Medica*, v. 29, p. 250-252, 1993.
- SPENCER, J.P.E., RICE-EVANS, C., WILLIAMS, R.J. Modulation of prosurvival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its *in vivo* metabolites underlie their action on neuronal viability. *J Biol Chem* 278:34783 – 34789. 2003.
- STEHMANN, J.R., FORZZA, R., SALINO, A., SOBRAL, M., COSTA, D.P., KAMINO, L.H.Y. 2009. Plantas da Floresta Atlântica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ. 516p.
- STRYER, L. Bioquímica. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.
- SUN, G.P., WAN, X., XU, S.P., WANG, H., LIU, S.H., WANG, Z.G. Antiproliferation and apoptosis induction of paeonol in human esophageal cancer cell lines. *Dis Esophagus* . 21: 723-729. 2008.
- SUSANTI, D.; SIRAT, H.M.; AHMAD, F.; ALI, R.M.; AIMI, N.; KITAJIMA, M. Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of *Melastoma malabachricum* L. *Food Chem.*, v. 103, p. 710 - 717, 2007.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- TAKEMORI, N. K., BONA, C., ALQUINI, Y. Anatomia Comparada das Folhas de Espécies de Peperômia (PIPERACEAE) - I. Ontogênese do Tecido Aquífero e dos Estômatos. *Acta bot. bras.* 17(3): 387-394. 2003.

- TANAKA, K.; SONOO, H.; KUREBA Y ASHI, J.; NOMURA, T.; OHKUBO, S.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, S. Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. *Clinical Cancer Research*, v. 8, p. 1125-1131, 2002.
- TANIGAWA, S.; FUJII, M.; HOU, D.X. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. v. 72, n. 3, p. 797-804. 2008.
- TENBERGE, K. B. Ultrastructure and development of the outer epidermal wall of spruce (*Picea abies*) needles. *Canadian Journal of Botany* 70: 1467 – 1487. 1992.
- TIAN, Z.; LIU, Y. M.; CHEN, S. B.; YANG, J. S.; XIAO, P. G.; WANG, L.; WU, E. Cytotoxicity of two triterpenoids from *Nigella glandulifera*. *Molecules*, v. 11, n. 9, p.693-699, 2006.
- TRUMP, B.F.; BEREZESKY, I.K.; CHANG, S.H.; PHELPS, P.C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol.* v. 25, p. 82-88. 1997.
- VANDERLINDE F. A., FILHO P. G., ALEGRIO L. V., ROCHA F. F., LORENZO M. A. DE, COSTA E SOUSA R. H. DA, SILVEIRA J. W. DE S. DA, JUNIOR A. M., MATOS L. G. DE, COSTA E. A. Antiinflammatory mechanism related to the antinociceptive activity of the ethanolic extract of the dichloromethane fraction from leaves of *Bathysa cuspidata* (Saint-Hilaire) Hooker. *Revista de Ciências Biológicas e Saúde*, vol. 2, n. 3. 2001.
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 1ª ed. Berlin: Springer Verlag. 320p., 1984.
- WANG, Z.; ZHOU, J.; JU, Y.; ZHANG, H.; LIU, M.; LI, X. Effects of two saponins extracted from the *Polygonatum zanlanscianense* pamp on the

- human leukemia (HL-60) cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 24, n. 2, p. 159-162, 2001.
- WANG, F. Cell cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol. Carcinog.* 28, 102–110. 2000.
- WANG, I.K.; LIN-SHIAU, S.Y.; LIN, J.K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome crelease and activation of caspase-9 and
- WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 45: 1-8, 1985.
- WAY, T.D., KAO, M.C., LIN, J.K. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 4479 – 4489. 2004.
- WEEKS R.A., DOBBERSTEIN R.H., FARNSWORTH N.R. Isolation of paeonol from *Bathysa meridionalis*. *Lloydia* 40: 515-518. 1977.
- WEINBERG, R. A. *A Biologia do Câncer*. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- WEISS, J.F., LANDAUER, M.R. Protection against radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. *Toxicology*, v. 189, p. 1-20, 2003.
- WILKINSON, H. P., The plant surface. In: Metcalfe, C. R. & Chalk, L.. *Anatomy of dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press. vol. 1, p. 97-165. 1979.
- WILLIAMS, C. A. & GRAYER, R. J. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Repopts* 21, 539–573. 2004.
- WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., EVANS, C.R. Flavonoids: antioxidant or signaling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Report, 2008. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2009.
- YANG, C.S., LANDAU, J.M., HUANG, M.T., NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annu. Rev. Nutr.* p.381 – 406. 2001
- YOKOMIZO, A. & MORIWAKI, M. Myricitrin degraded by simulated digestion inhibits oxidation of human low-density lipoprotein. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 69: 693-699, 2005.
- YUNCKER, T.C. The piperaceae of Brazil. *Hoehenea.* v.3. p.121-38. 1973.
- ZEISS, C.J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol.* v. 40, p. 481-495. 2003.
- ZHANG, Y.; CHEN, A.Y.; LI, M.; CHEN, C; YAO, Q. Ginkgo biloba extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *J. Surg. Res.*, v. 148, p. 17 - 23, 2008.
- ZORNIG, M., HUEBER, A.D., BAUM, W., EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.155, p. 1-37, 2001.
- ZUANAZZI, J.S.S & MONTANHA, J.A - Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Ver. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2007, p.577-614.
- ZUQUE, A.L.F.; WATANABE, E.S.; FERREIRA, A.M.T.; ARRUDA A.L.A.; RESENDE, U.M.; BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora*

Benth. (Chrysobalanaceae). *Rev. bras. farmacogn.* vol.14, n.2, pp. 129-136. 2004.



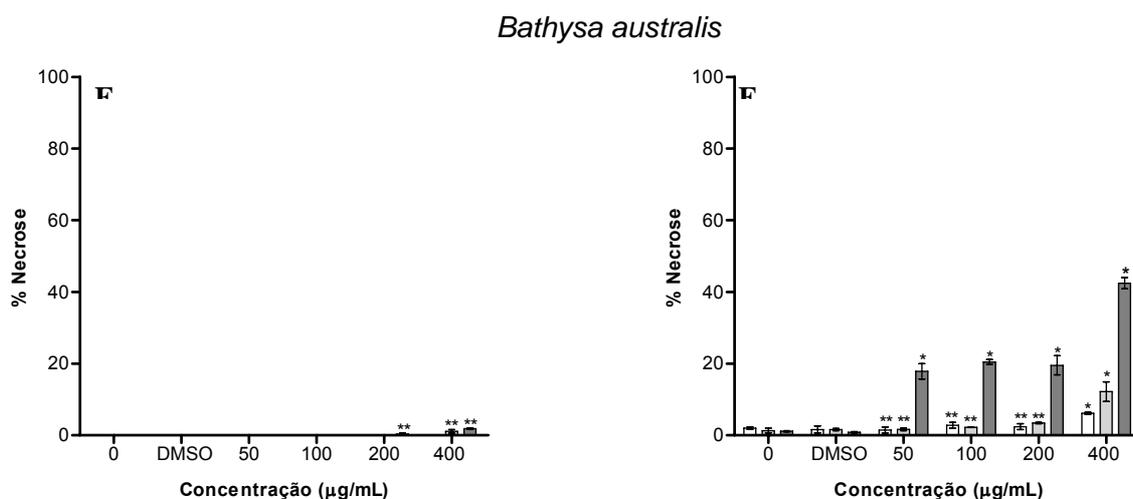


Figura 29: Porcentagem de necrose induzida pelos extratos *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia* e *Bathysa australis* frente a duas linhagens de células humanas U937 (Coluna da Esquerda) e COLO 205 (Coluna da Direita). Determinada por microscopia de fluorescência em três tempos diferentes, 12, 24 e 36 horas. n = 2; \*P<0,05, \*\*P>0,05. ANOVA - One-way - seguido de Tukey.

## 5.9 – Determinação da concentração letal 50 dos extratos

A fim de facilitar a identificação das relações entre as respostas citotóxicas em modelos celulares tumorais (U937 e COLO 205), foi construída uma tabela comparativa dos resultados com as concentrações dos extratos testadas para cada linhagem celular, comparando a atividade específica das substâncias testadas em cada tipo celular com 12, 24 e 36 horas de exposição ao extrato.

Foi determinada a concentração letal 50 para os três extratos. Concentração letal é a concentração de extrato capaz de induzir morte em 50% das células testadas. A CL<sub>50</sub> foi determinada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. por meio de uma curva de regressão não linear, a partir dos dados apresentados nas figuras 26.

Conforme os dados de CL<sub>50</sub> apresentados na tabela 6, os três extratos apresentaram atividade citotóxica, principalmente nos tempos de 24 e 36 horas, frente às células testadas.

Segundo os dados apresentados na tabela 6, em geral, a linhagem COLO 205 quando desafiada às várias concentrações do extrato de *O. frutescens* e *T. oblongifolia* revelou ser mais resistente que a linhagem celular

U937. Os extratos de *O. frutescens* e *Bathysa australis* apresentaram-se mais citotóxicos para as células de PBMC, quando comparadas com a linhagem celular U937. O extrato de *Trigynaea oblongifolia* revelou ser mais citotóxico para a linhagem celular U937.

**Tabela 6:** Concentração letal 50 dos extratos de *Ottonia frutescens*, *Trigynaea oblongifolia* e *Bathysa australis*.

<b><i>Ottonia frutescens</i> (µg/mL)</b>			
<b>Linhagem Celular</b>	<b>12 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>36 horas</b>
U937	230,9 ± 1,73	112,9 ± 1,47	86,34 ± 2,32
COLO 205	> 400	280,0 ± 1,19	257,5 ± 1,31
<b><i>Trigynaea oblongifolia</i> (µg/mL)</b>			
<b>Linhagem Celular</b>	<b>12 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>36 horas</b>
U937	> 400	110,8 ± 1,70	58,42 ± 1,04
COLO 205	> 400	146,4 ± 1,99	143,3 ± 1,87
<b><i>Bathysa australis</i> (µg/mL)</b>			
<b>Linhagem Celular</b>	<b>12 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>36 horas</b>
U937	> 400	188,2 ± 1,03	81,15 ± 1,23
COLO 205	> 400	155,3 ± 1,41	81,22 ± 1,46