

Mariana Laundry de Mesquita

Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas
do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do
mecanismo de ação da atividade citotóxica

Brasília-DF
2009



Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Mariana Laundry de Mesquita

Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas
do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do
mecanismo de ação da atividade citotóxica

**Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas da Universidade
de Brasília**

Orientadora: Prof^a Dr^a Laila Salmen Espindola

**Brasília-DF
2009**

Dedicatórias

À minha família e ao meu marido Ricardo, minha gratidão pelo amor e incentivo

À minha orientadora, professora e amiga, Laila, pelos seus ensinamentos, confiança e
amizade

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Laila Salmen Espíndola, pelo exemplo de profissional a ser seguido e pela sua orientação exemplar.

Ao Prof. Dr. José Elias de Paula, pela coleta e identificação botânica das plantas utilizadas neste trabalho, parte fundamental para a realização do mesmo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacognosia da UnB, Alice, Nashira, Lorena, Everton, Ellen, Phelippe, «meninas do PIBIC», pelo companheirismo, compreensão, e amizade durante todas as etapas de realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Edilberto Rocha Silveira e Dr^a Renata Mendonça do Laboratório de Química Orgânica e CENAUREM da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Raimundo Braz Filho da Universidade Estadual do Norte Fluminense, pelo auxílio na elucidação estrutural de substâncias isoladas de *Kielmeyera coriacea* e *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*.

À professora Dr^a Letícia Veras Costa-Lotufo, ao Dr Daniel Pereira Bezerra e a toda equipe do Laboratório de Oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará pela realização dos ensaios sobre as células de câncer e pelo auxílio na realização dos ensaios de mecanismo de ação sobre células HL-60.

Aos professores Dr. François TILLEQUIN e Dr^a Sylvie MICHEL, pela oportunidade de ter realizado tão proveitoso estágio em seu laboratório, além da orientação durante o desenvolvimento do trabalho em Paris.

Aos professores do Laboratório de Farmacognosia da faculdade de farmácia Paris V, Brigitte DEGUIN, Hanh DUFAT, François- Hugues PORÉE, Marie-Christine LALLEMAND e Xavier CACHET pela agradável convivência no laboratório, além do apoio durante a execução do trabalho.

Aos colegas de trabalho e amigos do Laboratório de Farmacognosia da faculdade de farmácia Paris V, Rana, Sylvia, Chi, Inanah, Ludovic, Christelle, Marlise, Missam, Nicolas, Mariangella, Teodora, Julien e todos os outros pelo companheirismo durante toda minha estada em Paris.

À Maryse ROUXEL e Olivier HERMET pelo apoio técnico fundamental para a execução do trabalho.

Ao professor Dr. Raphael GROUGNET pela orientação e ensinamentos, e por aceitar compor a banca examinadora deste trabalho.

Ao professor Dr. Célio Lopes Silva por aceitar compor a banca examinadora deste trabalho.

À Professora Dr^a Eloísa Dutra Caldas por aceitar compor a banca examinadora deste trabalho.

Ao professor Dr. José Carlos Tavares Carvalho por ter participado da banca de qualificação, e por aceitar compor a banca examinadora deste trabalho.

À coordenação, professores e secretariado do Curso de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, pela oportunidade de ter aprimorado meus conhecimentos.

À Capes, pelas bolsas de doutorado, e doutorado-sanduíche.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio incondicional, paciência, e amor.

Muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
SÍNTESE	XVII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XX
LISTA DE TABELAS	XXIV
LISTA DE FLUXOGRAMAS	XXV
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	XXVI
OBJETIVOS	XXVIII
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	29
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
1 Câncer.....	31
1.1 A célula cancerosa.....	31
1.2 A progressão tumoral.....	33
1.3 Tipos de câncer (classificação).....	34
1.4 Tipos de tratamento disponíveis.....	35
1.4.1 Medicamentos antitumorais de origem vegetal.....	37
1.4.1.1 <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don – Apocynaceae.....	37
1.4.1.2 <i>Camptotheca acuminata</i> Decne. – Nyssaceae.....	40
1.4.1.3 <i>Podophyllum peltatum</i> L. e <i>P. emodi</i> Wallich ex Hook. f. & Thomson – Berberidaceae	43
1.4.1.4 <i>Taxus brevifolia</i> Nutt. – Taxaceae.....	46
1.4.2 Medicamentos antitumorais de origem microbiana e marinha.....	48
1.5 Dificuldades na terapia anticâncer.....	49
1.6 A incidência de câncer no Brasil.....	51
2 A pesquisa de novas moléculas vegetais anticâncer.....	53
3 O Cerrado como fonte de novos medicamentos.....	64
3.1 Espécies do Cerrado selecionadas no estudo.....	66

3.1.1 <i>Simarouba versicolor</i> St. Hil. – Simaroubaceae.....	66
3.1.2 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi var. <i>Radiannus</i> Engl. – Anacardiaceae.....	68
3.1.3 <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. – Clusiaceae.....	71
3.1.4 Outras espécies.....	75
3.1.4.1 <i>Annona crassiflora</i> Mart. – Annonaceae.....	75
3.1.4.2 <i>Himatanthus obovatus</i> (Müll. Arg.) Woodson – Apocynaceae.....	77
3.1.4.3 <i>Magonia pubescens</i> A.St. -Hil. – Sapindaceae.....	78
3.1.4.4 <i>Pouteria torta</i> Radlk. – Sapotaceae.....	79
3.1.4.5 <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess. – Clusiaceae.....	80
3.1.4.6 <i>Renealmia alpinia</i> (Rottboel) Maas – Zingiberaceae.....	84
3.1.4.7 <i>Serjania lethalis</i> A.St. -Hil. – Sapindaceae.....	86
3.1.4.8 <i>Cupania vernalis</i> Cambess. – Sapindaceae.....	87
3.1.4.9 <i>Xylopia aromatica</i> Mart. – Annonaceae.....	88
3.1.4.10 <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>língua</i> (Cambess) Eichler. - Flacourtiaceae.....	90
MATERIAIS E MÉTODOS	93
1 Material vegetal.....	93
1.1 Extratos brutos vegetais.....	93
1.2 Espécies vegetais selecionadas para estudo químico	93
1.2.1 <i>Simarouba versicolor</i> St. Hil.....	93
1.2.2 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi. var <i>radiannus</i> Engl.....	93
1.2.3 <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.....	94
2 Métodos cromatográficos.....	94
2.1. Cromatografia de adsorção.....	94
2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	95
3 Métodos espectrométricos.....	95
3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H) e de Carbono-13 (^{13}C).....	95

3.2. Espectrometria de massa (EM).....	97
3.3. Acetilação.....	98
3.3.1 Procedimento Experimental.....	98
4 Isolamento dos constituintes químicos de <i>Simarouba versicolor</i>	99
4.1 Obtenção do extrato hexânico da casca da raiz de <i>Simarouba versicolor</i>	99
4.2 Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico da casca da raiz de <i>Simarouba versicolor</i>	99
4.3 Isolamento de SV-1 do extrato hexânico da casca da raiz de <i>Simarouba versicolor</i> (EHCRSV).....	99
5 Isolamento dos constituintes químicos de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i>	101
5.1 Obtenção do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i>	101
5.2 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> (EDFST).....	101
5.2.1 Isolamento de ST-1 do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> (EDFST).....	101
5.2.2 Isolamento de ST-2 e ST-3 do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> EDFST.....	101
5.2.3 Isolamento de ST-4 do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> EDFST.....	102
5.2.4 Isolamento de ST-5 e ST-6 do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> EDFST.....	102
5.2.5 Isolamento de ST-7 do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> EDFST.....	102
6 Isolamento dos constituintes químicos de <i>Kielmeyera coriacea</i>	103
6.1 Obtenção do extrato hexânico da casca da raiz de <i>Kielmeyera coriacea</i>	103

6.2 Fracionamento biomonitorado do extrato hexânico da casca da raiz de <i>Kielmeyera coriacea</i> (EHCRKC).....	103
6.2.1 Isolamento de KC-1 do extrato hexânico da casca da raiz de <i>Kielmeyera coriacea</i> (EHCRKC).....	103
7 Linhagens celulares e manutenção das células.....	104
8 Estudo da atividade citotóxica dos extratos brutos e substâncias isoladas	104
8.1 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais <i>in vitro</i>	104
8.1.1 Procedimento Experimental.....	104
8.1.2 Análise dos dados.....	105
9 Estudo do mecanismo de ação das substâncias isoladas em células leucêmicas.....	106
9.1 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán.....	106
9.1.1 Procedimento Experimental.....	106
9.1.2 Análise dos dados.....	107
9.2 Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina.....	107
9.2.1 Procedimento Experimental.....	107
9.2.2 Análise dos dados.....	108
9.3 Análise morfológica – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina.....	109
9.3.1 Procedimento Experimental.....	109
9.3.2 Análise dos dados.....	110
9.4 Inibição da síntese de DNA – BrdU.....	111
9.4.1 Procedimento Experimental.....	111
9.4.2 Análise dos dados.....	112
9.5 Indução de apoptose.....	112
9.5.1 Distribuição do ciclo celular e fragmentação do DNA internucleosomal	113
9.5.1.1 Procedimento Experimental.....	113

9.6 Viabilidade Celular - Determinação da Integridade da Membrana por citometria de fluxo.....	114
9.6.1 Procedimento Experimental.....	114
9.7 Determinação do Potencial Transmembrânico da Mitocôndria por citometria de fluxo.....	115
9.7.1 Procedimento Experimental.....	116
9.7.2 Análise dos dados obtidos no citômetro de fluxo.....	116
RESULTADOS	117
1 Extratos brutos vegetais.....	117
2 Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i> – teste do MTT.....	122
2.1 Atividade citotóxica dos extratos brutos e seus compostos isolados em células de linhagens tumorais	122
3 Estudo químico-biológico de <i>Simarouba versicolor</i>	126
3.1 Fracionamento químico biomonitorado do extrato hexânico da casca da raiz de <i>Simarouba versicolor</i> (EHCRSV).....	126
3.2 Isolamento de SV-1 do extrato hexânico da casca da raiz de <i>Simarouba versicolor</i> (EHCRSV).....	129
3.3 Determinação estrutural de SV-1, isolado de <i>Simarouba versicolor</i>	129
3.4 Atividade citotóxica de glaucarubinona em células de linhagens tumorais.....	134
4 Estudo químico-biológico de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i>	135
4.1 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> (EDFST).....	135
4.2 Isolamento de ST-1 do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> (EDFST).....	136
4.2.1 Determinação estrutural de ST-1.....	136
4.2.2 Atividade citotóxica de ST-1 em células de linhagens tumorais.....	136

4.3 Isolamento de ST-2 do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> (EDFST).....	137
4.3.1 Determinação estrutural de ST-2.....	137
4.3.2 Atividade citotóxica de ST-2 em células de linhagens tumorais.....	137
4.4 Isolamento de ST-3 do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> (EDFST).....	138
4.4.1 Determinação estrutural de ST-3.....	138
4.5 Isolamento de ST-4 do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> (EDFST).....	138
4.5.1 Determinação estrutural de ST- 4.....	139
4.5.2 Atividade citotóxica de ST-4 em células de linhagens tumorais.....	139
4.6 Isolamento de ST-5 e ST-6 do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> (EDFST).....	140
4.6.1 Determinação estrutural de ST-5.....	140
4.6.2 Atividade citotóxica de ST-5 em células de linhagens tumorais.....	140
4.6.3 Determinação estrutural de ST-6.....	141
4.6.4 Atividade citotóxica de ST-6 em células de linhagens tumorais.....	142
4.7 Isolamento de ST-7 do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> (EDFST).....	142
4.7.1 Determinação estrutural de ST-7.....	142
4.7.2 Atividade citotóxica de ST- 7 em células de linhagens tumorais.....	144
5 Estudo químico-biológico de <i>Kielmeyera coriacea</i>	147
5.1 Fracionamento biomonitorado do extrato hexânico da casca da raiz de <i>Kielmeyera coriacea</i>	147
5.2 Isolamento de KC-1.....	148
5.3 Determinação estrutural de KC-1.....	150

5.4 Atividade citotóxica de KC-1 e frações obtidas de <i>Kielmeyera coriacea</i> em células de linhagens tumorais.....	162
5.5 Estudo do mecanismo de ação de KC-1 em célula leucêmica (HL-60).....	164
5.5.1 Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripan.....	164
5.5.2 Inibição da síntese de DNA - Incorporação de BrdU.....	165
5.5.3 Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina.....	166
5.5.4 Análise morfológica – Coloração diferencial por Brometo de etídeo (BE)/Laranja de acridina (LA).....	168
5.5.5 Estudo da integridade da membrana celular por citometria de fluxo.....	169
5.5.6 Determinação da fragmentação do DNA por citometria de fluxo.....	170
5.5.7 Determinação do potencial transmembrânico por citometria de fluxo.....	172
DISCUSSÃO	173
CONCLUSÃO	178
PERSPECTIVAS	179
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	180
ANEXOS	206

RESUMO

O Câncer é uma doença, que atinge mais ou menos 200 tipos de células, caracterizada pelo desvio no controle da proliferação, diferenciação e morte celular, com multiplicação desordenada das células, podendo invadir órgãos e tecidos. As dificuldades encontradas no seu tratamento são a resistência medicamentosa, toxicidade, baixa especificidade, além da maioria das formulações serem injetáveis, pois são moléculas insolúveis em água, causando edemas e necrose. As substâncias de plantas do Cerrado podem constituir modelos interessantes para o desenvolvimento de novas moléculas anticancerígenas. Neste estudo foi realizada uma triagem com quatrocentos e doze extratos de plantas do bioma Cerrado sobre três linhagens celulares de câncer humano: MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon), e SF-295 (glioblastoma). Como resultados, 28 extratos inibiram significativamente as células, a uma concentração de 50 µg/mL, e tiveram seus valores de CI_{50} (concentração inibitória para 50% das células) sobre as células MDA-MB-435, HCT-8, SF-295 e HL-60 (leucemia promielocítica) determinados. Os extratos que apresentaram $CI_{50} < 20$ µg/mL, em no mínimo três linhagens, foram considerados muito ativos, dentre eles os extratos hexânicos da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea* e *Simarouba versicolor* e o extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*. Estes extratos foram submetidos a estudo químico biomonitorado, e substâncias com atividade anticancerígena foram isoladas. Do extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor* obteve-se a glaucarubinona substância com atividade anticancerígena importante. O fracionamento químico do extrato diclorometânico de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* resultou no isolamento de cinco compostos, em fase de elucidação estrutural, além de um alquil resorcinol isolado pela primeira vez desta espécie, e do beta-sitosterol. Do extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea* foi obtida uma mistura contendo o derivado da vitamina E, δ -tocotrienol e seu peróxido-dímero. Estudos de mecanismo de ação com essa mistura sobre a linhagem HL-60 foram conduzidos. A mistura demonstrou possuir efeito citotóxico e antiproliferativo sobre essas células, causando alterações no ciclo

celular como inibição na síntese de DNA e indução de morte por apoptose e necrose, sendo dessa forma uma amostra promissora para a investigação da relação estrutura-atividade.

Palavras-chave: Cerrado, *Kielmeyera coriacea*, *Simarouba versicolor*, *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*, glaucarubinona, delta-tocotrienol, células cancerígenas

ABSTRACT

Cancer is an ailment that affects more or less 200 different types of cells. Its major characteristic is the lack of proliferation control, differentiation and apoptosis, with an uncontrolled multiplication of cells, with the ability of invading organs and tissues. There are many difficulties in the cancer treatment, with the most frequent being the drug resistance, toxicity and low specificity. As most of the molecules are water insoluble, the administration of the drug in the blood stream may cause edema and necrosis. The substances obtained from the Brazilian Cerrado plants are interesting models for the development of new anticancer molecules. The present study investigated the cytotoxic potential of 412 Cerrado plant extracts against three human cancer cell lines: MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (colon) and SF-295 (glioblastoma). Of the tested extracts, 28 demonstrated a substantial antiproliferative effect, inhibiting significantly the tumor cell proliferation at 50 $\mu\text{g/ml}$. Complete dose-response curves were generated and IC_{50} values (concentration causing 50% inhibition of parasite growth) were calculated for these extracts against four cell lines MDA-MB-435, HCT-8, SF-295 and HL-60 (Promyelocytic Leukemia). The extracts that showed IC_{50} values $< 20 \mu\text{g/ml}$, in at least three cell lines were considered very actives. Among them, the hexane extracts of *Kielmeyera coriacea* and *Simarouba versicolor* root bark, and the dichloromethane extract of *Schinus terebinthifolius* var. *raddianus* leaves. These extracts were submitted to a bioassay-guided fractionation and anticancer substances were isolated. From the hexane extract of *Simarouba versicolor* root bark we isolated the glaucarubinone, a substance with remarked anticancer activity. The bioassay-guided fractionation of the dichloromethane extract of *Schinus terebinthifolius* var. *raddianus* leaves resulted in the isolation of five compounds, including an alkyl resorcinol obtained for the first time from this species, and beta-sytosterol. From the hexane extract of *Kielmeyera coriacea* root bark were obtained a mixture of the vitamin E derivative, δ -tocotrienol and its peroxy-dimer. This mixture showed antiproliferative and cytotoxic effects against the cells, through

DNA synthesis inhibition and induction of cell death by apoptosis and necrosis. It is a promising sample to have its structure-activity relationship investigated.

Keywords: Cerrado, *Kielmeyera coriacea*, *Simarouba versicolor*, *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*, glaucarubinone, cancer cells

SÍNTESE DO TRABALHO

Apesar dos avanços científicos na compreensão e no tratamento do câncer, a terapia é dificultada por problemas como resistência, baixa seletividade, toxicidade e insolubilidade em água dos medicamentos disponíveis. Assim, novos medicamentos são necessários para tentar contornar esses problemas.

O Brasil detém a maior biodiversidade do mundo, e as plantas são fonte importante de moléculas ativas. A maioria dos medicamentos anticancerígenos utilizados hoje na clínica foram obtidos a partir de produtos naturais ou desenvolvidos utilizando suas estruturas químicas em semi-síntese ou síntese. Dentre eles, podemos citar a vincristina e vimblastina (*Vinca rosea*), paclitaxel e docetaxel (*Taxus brevifolia*) e etoposídeo e teniposídeo (*Podophyllum peltatum* e *P. emodi*).

A partir do Cerrado, segundo maior bioma brasileiro, com espécies endêmicas e grande diversidade química, foi criado o banco de extratos de plantas do bioma Cerrado (Laboratório de Farmacognosia/UnB).

Neste estudo, quatrocentos e doze extratos desse banco foram testados *in vitro*, utilizando o teste do MTT em concentração única de 50 µg/mL, sobre três linhagens de câncer humano: MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon), SF-295 (glioblastoma). Destes, 28 foram considerados ativos (inibição > 85% nas 3 linhagens testadas), sendo selecionados para a determinação da CI_{50} sobre as linhagens MDA-MB-435, HCT-8, SF-295 e HL-60 (leucemia promielocítica). De acordo com os critérios do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, um extrato com $CI_{50} < 30$ µg/mL é considerado ativo e deve ser investigado química e biologicamente (Suffness & Pezzuto, 1990). Quatorze extratos apresentaram $CI_{50} < 20$ µg/mL nas quatro linhagens testadas, portanto considerados muito ativos. Dentre eles os extrato hexânicos da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea* (EHCRKC) e *Simarouba versicolor* (EHCRSV) e o extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*.

Do EHCRSV foi isolada a substância glaucarubinona com importante atividade anticancerígena sobre as linhagens celulares estudadas CI_{50} de 0,07 $\mu\text{g/mL}$ (HL-60), 0,31 $\mu\text{g/mL}$ (MDA-MB-435), 0,15 $\mu\text{g/mL}$ (HCT-8) e 0,24 $\mu\text{g/mL}$ (SF-295).

Do EDFST obtivemos sete compostos, cinco deles encontram-se em fase de elucidação estrutural e os outros dois, com base na análise dos dados obtidos e comparação com dados encontrados na literatura demonstraram tratar-se do beta-sitosterol e do 1,3-dihidroxi-5-(tridec-4',7'-dienil) benzeno alquil resorcinol isolado previamente de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (Anacardiaceae) e isolado pela primeira vez dessa espécie.

O extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea* foi submetido a um estudo biomonitorado em coluna cromatográfica aberta de sílica, e uma amostra com marcante atividade citotóxica foi obtida. A identificação e a caracterização dessa amostra foi realizada com o auxílio de técnicas espectroscópicas, Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massa, na Universidade Federal do Ceará. Após análise dos dados podemos concluir que trata-se de uma mistura contendo o δ -tocotrienol, relatado pela primeira vez nessa espécie, e seu peróxido-dímero aparentemente inédito.

Ensaio foram realizados com células HL-60 a fim de se entender o possível mecanismo de ação dessa mistura. Dentre eles: exclusão por azul de tripan (viabilidade celular), coloração diferencial por hematoxilina/eosina, e por brometo de etídio/laranja de acridina (análise morfológica), inibição da síntese de DNA (BrdU), fragmentação do DNA internucleosomal, determinação da integridade da membrana e determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria.

Verificou-se que a mistura possui efeito citotóxico e antiproliferativo sobre células de leucemia (HL-60) causando alterações no ciclo celular como inibição na síntese de DNA e indução de morte por apoptose e necrose.

As substâncias isoladas neste trabalho serão testadas sobre outras linhagens de câncer humano a fim de identificar se existe especificidade de ação sobre determinado tipo

de câncer, submetidas a ensaios de mecanismo de ação sobre as células HL-60, e de relação estrutura-atividade.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Ciclo celular no câncer	32
FIGURA 2 - <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don ou <i>Vinca rosea</i> L. – Apocynaceae.....	37
FIGURA 3 - Alcalóides anti-cancerígenos naturais (vimblastina e vincristina) e semi-sintéticos (vindesina e vinorelbina) de <i>Catharanthus roseus</i>	38
FIGURA 4 - Mecanismo de ação dos alcalóides da <i>Vinca</i>	39
FIGURA 5 - <i>Camptotheca acuminata</i> Decne. – Nyssaceae	40
FIGURA 6 - Camptotecina, isolada de <i>Camptotheca acuminata</i> , e seus derivados semi-sintéticos Irinotecano e Topotecano	41
FIGURA 7 - Mecanismo de ação da camptotecina e derivados	42
FIGURA 8 - Podofilina obtida do gênero <i>Podophyllum</i>	43
FIGURA 9 - Podofilotoxina de <i>P. emodi</i> e <i>P. peltatum</i> e os derivados semi-sintéticos teniposídeo e etoposídeo.....	44
FIGURA 10 - Mecanismo de ação das podofilotoxinas	45
FIGURA 11 - <i>Taxus brevifolia</i> Nutt. e <i>T. baccata</i> – Taxaceae	46
FIGURA 12 - 10-desacetilbaccatina III isolado de <i>T. baccata</i> , Paclitaxel (taxol) e docetaxel (taxotere).....	47
FIGURA 13 - Mecanismo de ação dos taxanos	48
FIGURA 14 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens , estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação (todas as neoplasias, exceto as de pele não melanoma)	51
FIGURA 15 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres , estimadas para o ano de 2008	52
FIGURA 16 – Extensão do Cerrado no Brasil.....	64
FIGURA 17 - Foto de <i>Simarouba versicolor</i>	66
FIGURA 18 - Foto do material depositado em herbário de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i>	68
FIGURA 19 – Foto de <i>Kielmeyera coriacea</i> com frutos.....	72
FIGURA 20 - Foto de <i>Annona crassiflora</i> com frutos.....	75
FIGURA 21 - Foto de <i>Himatanthus obovatus</i> com flores.....	77
FIGURA 22 - Foto de <i>Magonia pubescens</i> com fruto.....	78

FIGURA 23 - Foto de <i>Pouteria torta</i> com frutos.....	79
FIGURA 24 - Foto de <i>Calophyllum brasiliense</i>	80
FIGURA 25 - Foto de <i>Renegalmia alpinia</i> com inflorescência.....	84
FIGURA 26 - Foto de <i>Cupania vernalis</i> com flores.....	87
FIGURA 27 - Foto de <i>Xylopia aromatica</i> com flores.....	88
FIGURA 28 - Foto de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i>	90
FIGURA 29 – Metodologia experimento citotoxicidade <i>in vitro</i> – MTT.....	105
FIGURA 30 - Metodologia experimento exclusão por Azul de Tripán.....	107
FIGURA 31 - Metodologia experimento coloração diferencial por hematoxilina/eosina.....	108
FIGURA 32 - Metodologia Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina.....	110
FIGURA 33 - Metodologia experimento Inibição da síntese de DNA – BrdU.....	112
FIGURA 34 - Metodologia fragmentação do DNA internucleosomal.....	114
FIGURA 35 - Metodologia Determinação Integridade da Membrana por citometria de fluxo.....	115
FIGURA 36 - Metodologia Determinação Potencial Transmembrânico da Mitocôndria.....	116
FIGURA 37 - Espectro de RMN ¹ H de SV-1 [300 MHz, CDCL ₃ , δ (ppm)].....	129
FIGURA 38 - Espectro de RMN ¹³ C – BB de SV-1 [125 MHz, CDCL ₃ , δ (ppm)].....	130
FIGURA 39 - Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135 ⁰ de SV-1 [125 MHz, CDCL ₃ , δ (ppm)].....	130
FIGURA 40 - Diagrama de contorno do espectro COSY de SV-1.....	131
FIGURA 41 - Diagrama de contorno do espectro HSQC de SV-1.....	131
FIGURA 42 - Diagrama de contorno do espectro HMBC de SV-1.....	132
FIGURA 43 - SV-1: Glaucarubinona isolada de <i>Simarouba versicolor</i>	134
FIGURA 44 - Sugestão de estrutura para ST-2.....	137
FIGURA 45 - ST-3: Beta-sitosterol isolado de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i>	138
FIGURA 46 - ST-4: 1,3-dihidroxi-5-(tridec-4',7'-dienil) benzeno isolado de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i>	139
FIGURA 47 - Sugestão de estrutura de ST-5.....	140
FIGURA 48 - Sugestão de estrutura para ST-6.....	141

FIGURA 49 - Sugestão de estrutura para ST-7.....	144
FIGURA 50 - Placa de cromatografia em camada delgada (CCD) de G3 e G4.....	147
FIGURA 51 - Espectro RMN ¹ H de KC-1 (500 MHz, CDCL ₃ , δ (ppm)).....	150
FIGURA 52 - Espectro RMN ¹³ C de KC-1 (125 MHz, CDCL ₃ , δ (ppm)).....	150
FIGURA 53 - Espectro de RMN ¹³ C-DEPT de KC-1 (125 MHz, CDCL ₃ , δ (ppm)).....	151
FIGURA 54 - Diagrama de contorno do espectro HSQC de KC-1.....	151
FIGURA 55 - Diagrama de contorno do espectro COSY de KC-1.....	152
FIGURA 56 - Diagrama de contorno do espectro NOESY de KC-1.....	152
FIGURA 57 - Diagrama de contorno do espectro HMBC de KC-1.....	153
FIGURA 58 - Espectro de Massas de KC-1.....	155
FIGURA 59 - Proposta hipotética de formação de alguns fragmentos no espectrômetro de massa.....	156
FIGURA 60 - Delta-tocotrienol.....	157
FIGURA 61 - Peróxido-dímero de delta-tocotrienol.....	157
FIGURA 62 - Cromatograma (265 nm) obtido por CLAE da fração SG4-2.....	157
FIGURA 63 - Cromatograma (265 nm) obtido por CLAE da fração SG4-2- P-1.....	158
FIGURA 64 - Cromatograma (265 nm) obtido por CLAE da fração SG4-2- P-2.....	158
FIGURA 65 - Cromatograma (265 nm) obtido por CLAE da fração SG4-2- P-3.....	159
FIGURA 66 - Cromatograma (265 nm) obtido por CLAE da fração SG4-2- P-4.....	159
FIGURA 67 : Espectro RMN ¹ H da fração clorofórmica resultante da acetilação do pico 4..	160
FIGURA 68 : Espectro RMN ¹³ C da fração clorofórmica resultante da acetilação do pico 4.....	161
FIGURA 69 - Atividade de KC-1, obtido de <i>K. coriacea</i> sobre a viabilidade das células HL-60 determinada pela coloração por azul de tripan após 24 h de incubação.....	164
FIGURA 70 - Porcentagem de inibição da incorporação de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) pelas células HL-60 tratadas com KC-1, obtido de <i>K. coriacea</i>	165
FIGURA 71abc - Fotomicrografia das células HL-60 coradas com hematoxilina/eosina....	167

- FIGURA 72** - Efeito de KC-1, obtido de *K. coriacea*, em células HL-60, analisados por brometo de etídeo/laranja de acridina (BE/LA) após 24 h de incubação.....168
- FIGURA 73** - Efeito de KC-1, obtido de *K. coriacea*, sobre a integridade da membrana celular das células HL-60.....169
- FIGURA 74** - Efeito de KC-1, obtido de *K. coriacea* na fragmentação do DNA internucleosomal das células HL-60.....171
- FIGURA 75** - Efeito de KC-1, obtido de *K. coriacea*, sobre o potencial transmembrânico da mitocôndria das células HL-60.....172

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Atividade citotóxica de substâncias naturais vegetais sobre células SF-295.....	55
TABELA 2 - Atividade citotóxica de substâncias naturais vegetais sobre células HL-60.....	55
TABELA 3 - Atividade citotóxica de substâncias naturais vegetais sobre células MDA-MB-435.....	60
TABELA 4 - Atividade citotóxica de substâncias naturais vegetais sobre células HCT-8.....	60
TABELA 5 – Espécies vegetais do bioma Cerrado avaliadas <i>in vitro</i> sobre as linhagens de câncer humano - MDA-MB-435, HCT-8 e SF-295.....	118
TABELA 6 – Citotoxicidade <i>in vitro</i> de extratos de plantas sobre linhagens celulares de câncer humano mensurada pelo teste do MTT.....	124
TABELA 7 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico da casca da raiz de <i>Simarouba versicolor</i> (EHCRSV).....	126
TABELA 8 - Atividade citotóxica das frações EHCRSV-3,1 a EHCRSV-3,10.....	127
TABELA 9 - Dados de RMN ¹³ C e RMN ¹ H para SV-1.....	133
TABELA 10 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> (EDFST).....	135
TABELA 11 - Dados de RMN ¹³ C e RMN ¹ H de ST-7.....	143
TABELA 12 - Atividade citotóxica de compostos isolados de <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> e <i>Simarouba versicolor</i> em linhagens de células tumorais humana.....	146
TABELA 13 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico da casca da raiz de <i>Kielmeyera coriacea</i> (EHCRKC).....	147
TABELA 14 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do grupo EHCRKC-4.....	148
TABELA 15 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do grupo EHCRKC-4,6.....	148
TABELA 16 - Dados de RMN ¹³ C e RMN ¹ H de delta-tocotrienol e seu dímero.....	154
TABELA 17 – Atividade citotóxica de KC-1 obtido de <i>K. coriacea</i> sobre as linhagens de células de câncer humano HL-60, HCT-8, SF-295 e MDA-MB-435.....	162
TABELA 18 - Atividade citotóxica dos picos obtidos de KC-1.....	163
TABELA 19 - Efeito de KC-1, obtido de <i>K. coriacea</i> , na distribuição do ciclo celular das células HL-60 determinado por citometria de fluxo.....	170

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1 - Isolamento de SV-1.....	128
FLUXOGRAMA 2 - Isolamento de ST-1, ST-2, ST-3, ST-4, ST-5, ST-6, ST-7.....	145
FLUXOGRAMA 3 - Isolamento de KC-1.....	149

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

δ Deslocamento químico

% Porcentagem

& E

μg Micrograma

μM Micromolar

$^{\circ}\text{C}$ Graus Celsius

< Menor que

> Maior que

ANOVA Analysis of Variance (Análise de variância)

BrdU Bromodeoxiuridina

BE/LA Brometo de etídio / laranja de acridina

CDCl_3 Clorofórmio deuterado

CG/MS Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

CI_{12} Concentração da amostra em $\mu\text{g}/\text{mL}$ necessária para produzir uma zona de inibição de 12 mm de diâmetro

CI_{50} Concentração inibitória média

CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência

CO_2 Dióxido de carbono (gás carbônico)

COSY Correlation spectroscopy

DAB Diaminobenzidina

DEPT 135° Distortionless Enhancement by polarization transfer com ângulo de nutação de 135°

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido desoxirribonucléico

DPPH Solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EDFST extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*

EHCRKC extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea*

EHCRSV extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor*

E.P.M. Erro padrão da média

g Grama

h Hora

H^+ Íons hidrogênio

H/E Hematoxilina/Eosina

HCT-8 Linhagem celular de cólon
HL-60 Linhagem celular de leucemia
HMBC Heteronuclear bond multiple correlation
HSQC Heteronuclear multiple quantum coherence
IC Intervalo de confiança
J Constante de acoplamento
L Litro
LD₅₀ Dose letal média
MC₁₀₀ Concentração mínima para matar todas as formas epimastigotas de *T. cruzi*, no período de incubação de 24 h, à 26 °C.
MDA-MB-435 Linhagem celular de melanoma
mg Miligrama
MIC Concentração inibitória mínima
min Minuto
ml Mililitro
MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromido
n° Número
PBS Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
pH Potencial hidrogeniônico
RMN ¹³C-BB Ressonância magnética nuclear de carbono 13 broad band
RMN ¹H Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SF-295 Linhagem celular de sistema nervoso central (glioblastoma)
TBS Tris buffer solution (Tampão tris)
US-NCI United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)

OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de extratos e substâncias vegetais do bioma Cerrado sobre células de câncer humano

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar extratos de plantas do Cerrado ativos *in vitro* sobre diferentes linhagens de células de câncer humano (melanoma, cólon, SNC, leucemia)
- Realizar o fracionamento químico biomonitorado dos extratos selecionados
- Identificar e caracterizar substâncias puras responsáveis pela atividade
- Realizar estudos de mecanismo de ação das substâncias ativas isoladas

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil detém a maior diversidade vegetal do mundo, e as plantas têm sido desde a antiguidade fonte importante de medicamentos. As moléculas vegetais, seus derivados semi-sintéticos ou seus modelos moleculares sintetizados são fonte importante de medicamentos antitumorais como os alcalóides vimblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina de *Catharanthus roseus* - Apocynaceae (LEVÊQUE *et al.*, 2007; MAGNOTTA *et al.*, 2007; AKAY *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 1963), ellipticina e derivados de *Ochrosia elliptica* – Apocynaceae (FANG *et al.*, 2008; GOODWIN *et al.*, 1959); irinotecano e topotecano de *Camptotheca acuminata* - Nyssaceae (CHOI *et al.*, 2008; SANTANA *et al.*, 2005; WALL *et al.*, 1966) ou os derivados das lignanas, teniposídeo e etoposídeo de *Podophyllum peltatum* e *P. emodi* – Berberidaceae (CHOI *et al.*, 2008; ALLEN *et al.*, 2005; STAHELIN, 1973); os terpenóides Taxol - Paclitaxel[®] e Taxotere - Docetaxel[®] de *Taxus brevifolia* – Taxaceae (KINGSTON *et al.*, 2007; KELLAND 2005; WANI *et al.*, 1971), e ainda os retinóides como a tretinoína - Vesanoid[®] (RYNINGEN *et al.*, 2008; WARRELL *et al.*, 1993). Estes compostos são utilizados na terapia medicamentosa do câncer, e muitos destes fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2006, 2002).

A busca por novas opções terapêuticas para os diferentes tipos de câncer é um dos assuntos de maior interesse na atualidade da pesquisa de moléculas vegetais. A resistência adquirida aos medicamentos anticancerígenos é encontrada em grande parte dos pacientes, sendo responsável por problemas clínicos que limitam a eficácia do tratamento.

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando 2 milhões de Km² (KLINK & MACHADO 2005). A grande diversidade de espécies vegetais, pouco avaliadas biologicamente, proporciona inúmeras possibilidades de estudos na busca de moléculas bioativas. O “Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado” (Laboratório de Farmacognosia-UnB), criado a partir de espécies coletadas no vasto bioma brasileiro, possui uma importante coleção de extratos brutos que vêm sendo avaliados *in vitro* sobre agentes

infecciosos, vetores e células cancerígenas (SILVA *et al.*, 2008, ESPINDOLA, 2007; de MESQUITA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2006; NAPOLITANO *et al.*, 2005; de MESQUITA *et al.*, 2005a, de MESQUITA *et al.*, 2005b; RODRIGUES *et al.*, 2005; ESPINDOLA *et al.*, 2004).

Dentro desta perspectiva, o objetivo deste trabalho é buscar substâncias de origem vegetal ativas sobre as células de câncer humano MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon), HL-60 (leucemia promielocítica) e SF-295 (glioblastoma), e avaliar seus mecanismos de ação.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Câncer

O termo câncer é a tradução latina do grego carcinoma (de karkinos = crustáceo, carangueijo). Essa terminologia foi utilizada pela primeira vez por Galeno a fim de descrever um tumor maligno na mama, com veias superficiais túrgidas e ramificadas, semelhando-se às patas de um carangueijo (FLECK 1992). Atualmente, esse termo é utilizado como sinonímia de neoplasia maligna.

Neoplasia pode ser entendida como proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma, ou seja fora do controle dos mecanismos que regulam a multiplicação celular. As células reduzem ou perdem a capacidade de se diferenciar, em consequência de alterações nos genes que regulam o crescimento e a diferenciação celular (Figura 1) (BOGLIOLO & BRASILEIRO FILHO 2006).

1.1 A célula cancerosa

As principais características das células cancerosas são: a perda da inibição por contato; independência com relação aos fatores de crescimento; imortalidade, tumorigenese, desvio no controle da apoptose e potencial replicativo ilimitado. Como características gerais têm-se que a célula guarda um certo grau de diferenciação característico do tecido original (HANAHAN & WEINGERG 2000).

As características morfológicas mais marcantes deste tipo de células são anormalidades no núcleo, tais quais volumoso, múltiplos, nucléolos visíveis, hiperploídia; anormalidades no tamanho das células: heterogêneas; anormalidades citoplasmáticas: aumento da relação citoplasma-núcleo; anormalidades da membrana citoplasmática: perda da inibição por contato, modificação da adesividade, modificação dos antígenos de superfície (APTSIAURI 2007).

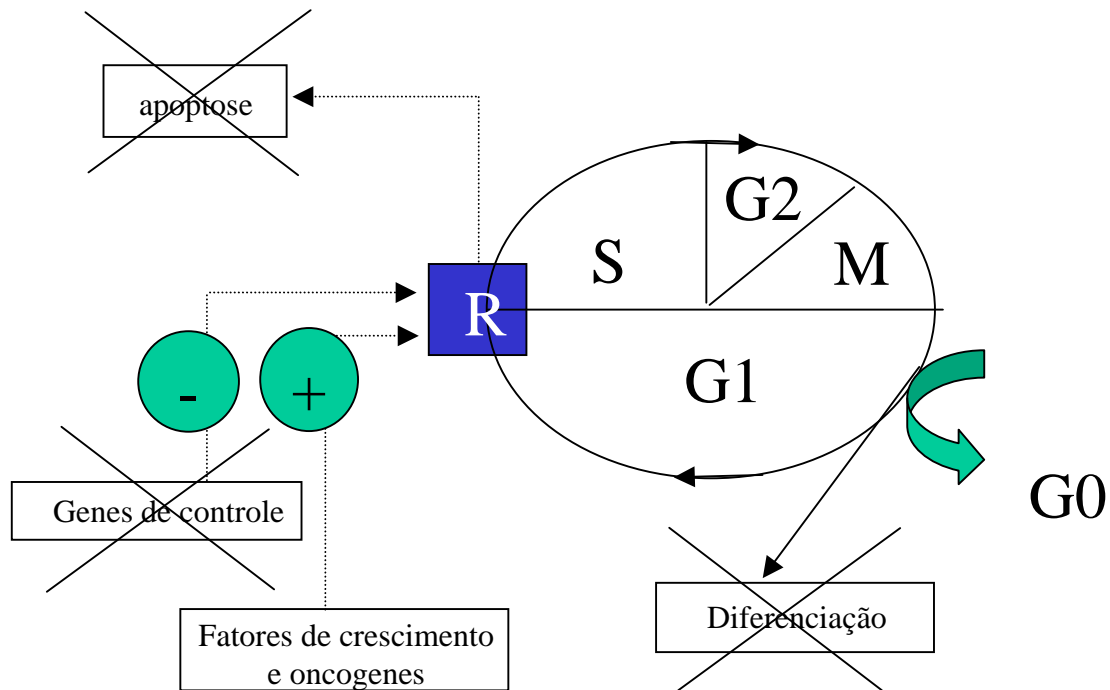


FIGURA 1 - Ciclo celular no câncer. A célula normal segue uma sequência de eventos controlados por fatores externos e internos denominada ciclo celular. Na fase G1 ocorre o crescimento celular, após a passagem pelo primeiro ponto de checagem entre G1 e S a célula começa a sintetizar DNA que resulta na duplicação do conteúdo de DNA. Em G2 a célula se prepara para entrar na mitose onde ocorre a divisão em células idênticas. Durante esse ciclo existem três eventos importantes: a diferenciação celular, o balanço entre os genes de controle e fatores de crescimento e oncogenes e finalmente a apoptose. No entanto, na célula do câncer nenhum desses três eventos acontece, dessa forma as células não se diferenciam, há um aumento dos fatores de crescimento e oncogenes com relação aos genes de controle, e células defeituosas não entram em apoptose.

FONTE: Adaptado de (<http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/POLY.Chp.22.2.html>)

1.2 A progressão tumoral

A formação e o desenvolvimento das neoplasias, denominado de carcinogênese, é um processo complexo que ocorre em três etapas consecutivas: iniciação, promoção, e progressão.

A iniciação acontece com uma desregulação genômica, devido a um agente carcinogênico, ou agente oncoiniciador, que provoca modificações permanentes em alguns de seus genes e transforma a célula. Uma célula iniciada torna-se menos responsiva a fatores que inibem o crescimento celular, ou aos indutores de diferenciação celular ou à apoptose. Os agentes oncoiniciadores são substâncias eletrofilicas, tendo muita afinidade por compostos nucleofílicos, como são as proteínas, RNA e DNA. Exemplos de agentes carcinógenos: sulfato de dimetila, metilnitrosuréia, cloreto de vinila, aflatoxinas, dimetilnitrosamina e benzopireno (BOGLIOLO & BRASILEIRO FILHO 2006; KUMMAR, 2005).

A promoção acontece por uma série de interações entre citoquinas, fatores de crescimento e seus receptores, consistindo na proliferação, ou expansão das células iniciadas. Há uma perda da homeostasia tissular e o surgimento de clones celulares transformados, pelo efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato muitas vezes interrompe o processo nesse estágio, pois a ação do promotor é reversível. Os promotores são substâncias que têm em comum a propriedade de irritar os tecidos e de provocar reações inflamatórias e proliferativas. O promotor mais conhecido é o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (BOGLIOLO & BRASILEIRO FILHO 2006), além de ésteres de forbol e fenóis (SILVA & HARTMANN 2006).

Após seu surgimento, o câncer sofre, com frequência, modificações biológicas que o tornam, em geral, cada vez mais agressivo e mais maligno. Esse fenômeno é denominado de progressão tumoral. Essa etapa dá origem ao fenômeno de disseminação metastática,

caracterizando-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. A doença já está instalada, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas. Além da aquisição de novas características intrínsecas das células tumorais, a progressão dos tumores depende também de fatores do paciente, como o estado hormonal e sua resposta imunitária.

1.3 Tipos de câncer (classificação)

Os tumores podem ser classificados de acordo com vários critérios: (1) pelo comportamento clínico (benignos ou malignos); (2) pelo aspecto microscópico (critério histomorfológico) e (3) pela origem da neoplasia (critério histogenético). O critério mais frequentemente adotado é o histomorfológico, ou seja, aquele que identifica a neoplasia pelo tecido ou célula que está proliferando. Nesse sentido, algumas regras são importantes: (1) o sufixo “oma” é empregado na denominação de qualquer neoplasia, benigna ou maligna; (2) a palavra carcinoma indica tumor maligno que reproduz epitélio de revestimento; indica malignidade quando usada como sufixo (ex: adenocarcinoma); (3) o termo sarcoma refere-se a uma neoplasia maligna mesenquimal; usado como sufixo, indica tumor maligno de determinado tecido (ex: fibrossarcoma, lipossarcoma); (4) a palavra blastoma pode ser usada como sinônimo de neoplasia e, quando empregada como sufixo, indica que o tumor reproduz estruturas com características embrionárias (ex: nefroblastoma) (BOGLIOLO & BRASILEIRO FILHO 2006).

Em resumo, para se denominar um tumor, toma-se o nome da célula, tecido ou órgão afetado e acrescentam-se os sufixos – oma ou – sarcoma. Além disso, o nome de um tumor pode conter outros termos para identificar certas propriedades da lesão ou sua diferenciação: carcinoma epidermóide (ex: epitélio neoplásico com diferenciação semelhante à da epiderme). Ainda existem os casos onde epônimos são utilizados na denominação da lesão, como por exemplo, tumor de Wilms, linfoma de Hodgkin e tumor de Burkitt (BOGLIOLO & BRASILEIRO FILHO 2006).

1.4 Tipos de tratamento disponíveis

Com o objetivo de tratar o câncer com maior eficácia, esquemas terapêuticos utilizando cirurgia, radioterapia e quimioterapia têm sido cada vez mais prevalentes (REINER *et al.*, 2008; GUIDA *et al.*, 2008; TEICH & FRANKS 1990).

A cirurgia oncológica com o intuito curativo, realiza a remoção do tumor, de sua drenagem linfática, dos linfonodos locais e do tecido normal, em quantidade suficiente, a fim de manter uma adequada margem de segurança (TEICH & FRANKS, 1990).

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). A radioterapia emprega as técnicas básicas de irradiação interna e externa. A irradiação externa geralmente aplica radiações de alta energia (megavoltagem) obtidas a partir de aceleradores lineares, fontes de cobalto, e raios gama. Já a irradiação interna (braquiritoterapia) se baseia no uso de doses locais de radiação emitida por fontes como rádio e irídio implantadas diretamente nos tumores, ou colocadas em cavidades do corpo (TEICH & FRANKS 1990).

A quimioterapia consiste na utilização de medicamentos a fim de destruir as células cancerosas bloqueando o seu desenvolvimento. A maior parte destes medicamentos são derivados de plantas, organismos marinhos e microrganismos. Esses agentes incluem uma grande variedade de compostos que atuam por diversos mecanismos.

A cirurgia e a radioterapia são efetivas no tratamento de tumores sólidos, mas no tratamento de tumores disseminados atuam somente como paliativos. Nesses casos, a quimioterapia permanece o tratamento de escolha, mas seu efeito tóxico sobre tecidos normais geralmente limitam seu uso (Baxevanis *et al.*, 2009).

As células de câncer freqüentemente expressam antígenos associados que podem ser reconhecidos pelas células T de defesa. Essa condição proporciona o emprego de imunoterapias para o tratamento de diversos tipos de câncer (Bruserud *et al.*, 2008), com o intuito de aumentar as respostas imunes antitumorais (Baxevanis *et al.*, 2009).

As estratégias possíveis de imunoterapia para o tratamento do câncer incluem várias formas de vacinas, como as de peptídeo ou células dendríticas pulsadas com lisados de células ou transfectadas com RNA das células de câncer (Yu & Finn 2005).

Essas vacinas têm sido testadas em diversos ensaios clínicos, principalmente fase I e II (Dalglish & Whelan 2006), como tratamento único para o câncer, no entanto no futuro elas devem ser utilizadas como parte integrante dos esquemas terapêuticos, incluindo quimioterapia inicial, podendo ser combinada com cirurgia e radioterapia, a fim de reduzir o tumor e facilitar a apresentação do antígeno (Bruserud *et al.*, 2008).

1.4.1 Medicamentos antitumorais de origem vegetal

Os compostos derivados de plantas têm sido uma fonte de moléculas clinicamente úteis no tratamento do câncer (CRAGG & NEWMAN 2005), e atuam por diversos mecanismos.

1.4.1.1 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

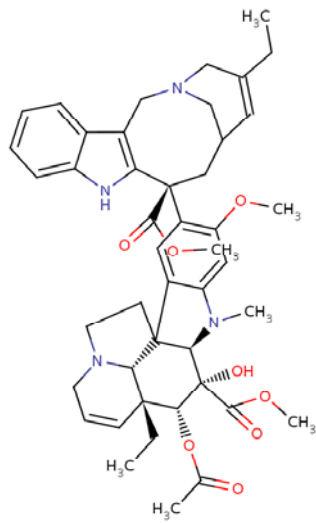
Das partes aéreas da espécie *Catharanthus roseus* ou *Vinca rosea*, da família Apocynaceae (Figura 2), isolou-se primeiramente os alcalóides vimblastina e vincristina. Através de simples modificações estruturais obteve-se os outros alcalóides anticancerígenos vindesina e vinorelbina (LEVÊQUE *et al.*, 2007; MAGNOTTA *et al.*, 2007; AKAY *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 1963).



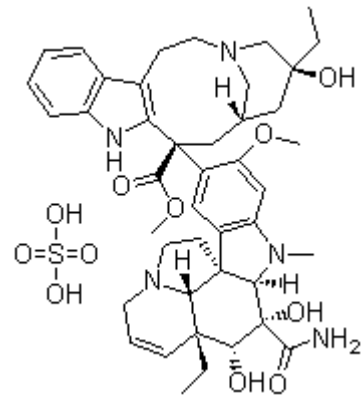
FIGURA 2 - *Catharanthus roseus* (L.) G. Don ou *Vinca rosea* L. - Apocynaceae

Espectro de ação

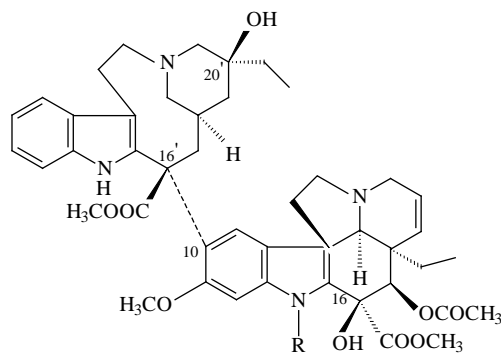
Os alcalóides da *Vinca* e seus derivados (Figura 3) possuem estruturas semelhantes, entretanto espectro de atividade e toxicidade diferente. A vincristina é mais efetiva sobre linfomas não-Hodgkin`s, Hodgkin`s e tumores sólidos infantis. A vinorelbina é mais efetiva sobre o câncer de mama e pulmão. A vimblastina é utilizada no câncer de testículo, mama, bexiga, cérvico-uterino e linfomas não Hodgkin`s (DING *et al.*, 2005).



Vinorelbina



Vindesina



Vimblastina (VLB): R = CH₃

Vincristina (VCR): R = CHO

FIGURA 3 - Alcalóides anti-cancerígenos naturais (vimblastina e vincristina) e semi-sintéticos (vindesina e vinorelbina) de *Catharanthus roseus*

Mecanismo de ação

A vimblastina bloqueia a mitose em metáfase, fixando-se sobre as subunidades α e β da tubulina, na fase S do ciclo celular, impedindo a sua polimerização e a formação de microtúbulos do fuso (Figura 4), além de reduzir a biossíntese dos ácidos nucléicos nas células cancerosas e diminuir a produção de energia celular, inviabilizando dessa forma a divisão celular (HAIT *et al.*, 2007). Os estudos da relação estrutura-atividade com os alcalóides da *Vinca* demonstraram que a remoção de alguns grupamentos químicos nas duas moléculas naturais, vimblastina e vincristina, modifica a atividade biológica. A retirada do grupamento acetil do carbono C4 da vimblastina elimina a atividade antileucêmica, assim como a acetilação dos grupamentos hidroxila (Chabner *et al.*, 1996). Esses ensaios permitiram a obtenção dos derivados semi-sintéticos vindesina e vinorelbina.

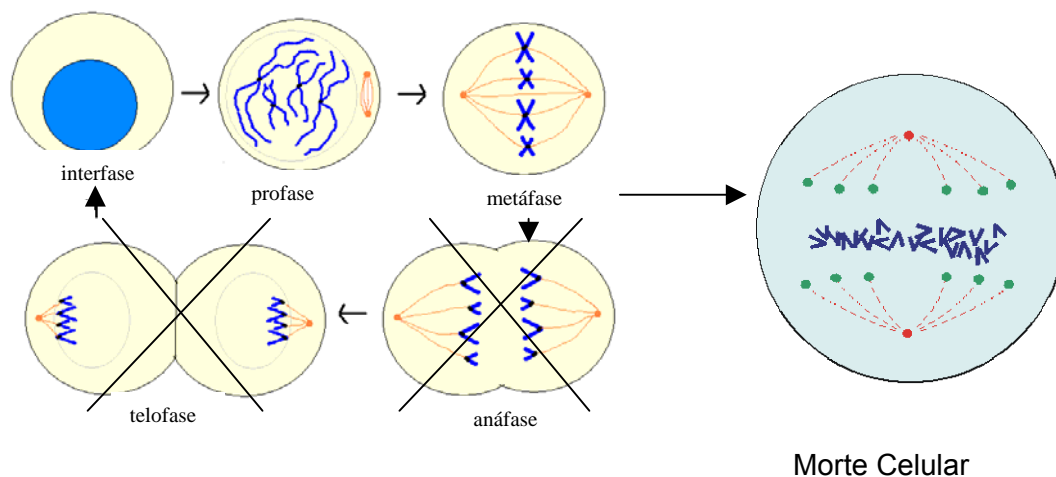


FIGURA 4 - Mecanismo de ação dos alcalóides da *Vinca*. Sobre o efeito desses alcalóides existe uma desorganização dos cromossomos no momento da mitose. Dessa forma, a célula não entra em anáfase e nem em telófase, não havendo, portanto a telocinese (divisão da célula em duas células-filha), levando a célula à morte. FONTE: Modificado de http://www.oncoprof.net/Generale2000/g09_Chimiotherapie/g09_ct12.html

1.4.1.2 *Camptotheca acuminata* Decne.

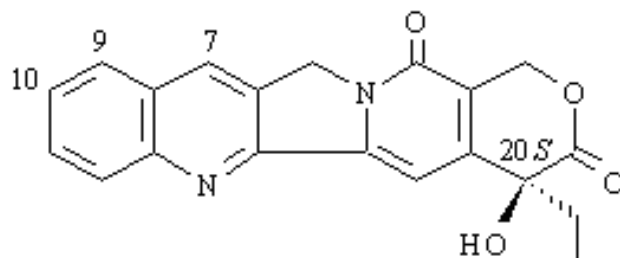
Da casca e madeira do caule da espécie *Camptotheca acuminata* Decne da família Nyssaceae (Figura 5) encontrada no Tibet e China, isolou-se a camptotecina (Figura 6), um alcalóide quinoléico cuja ação anticâncer foi descoberta em 1958 (WALL *et al.*, 1966). A fim de obter-se derivados com menos efeitos tóxicos, a camptotecina foi semi-sintetizada em irinotecano e seu modelo permitiu ainda a síntese do topotecano (Figura 6) (CHOI *et al.*, 2008; SANTANA *et al.*, 2005; WALL *et al.*, 1966).



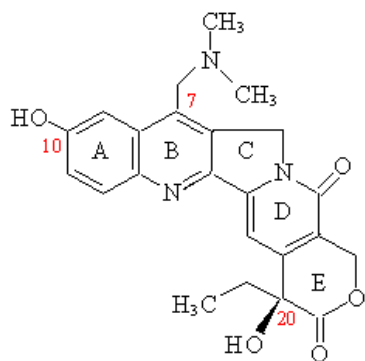
FIGURA 5 - *Camptotheca acuminata* Decne. – Nyssaceae

Espectro de ação

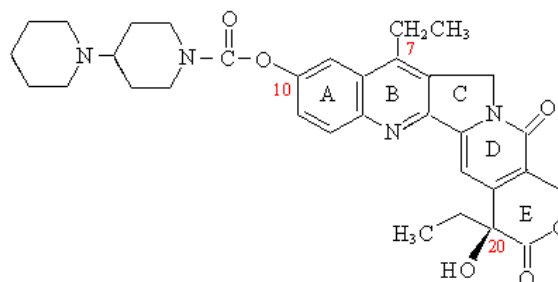
Topotecano é utilizado no tratamento do câncer de ovário metastático, e no câncer de pequenas células de pulmão (GORDALIZA 2007; DENNIS *et al.*, 1997). O irinotecano age como um pró-medicação e é utilizado no tratamento do câncer colorretal metastático combinado com fluorouracil e oxaliplatina (GORDALIZA 2007; CERSISIMO 1998).



Camptotecina



Topotecano



Irinotecano

FIGURA 6 - Camptotecina, isolada de *Camptotheca acuminata*, e seus derivados semi-sintéticos Irinotecano e Topotecano

Mecanismo de ação

A camptotecina e seus derivados inibem a topoisomerase I, estabilizando determinados complexos intermediários que são produzidos durante a síntese de DNA (Figura 7). Dessa forma a replicação é evitada, assim como a proliferação celular.

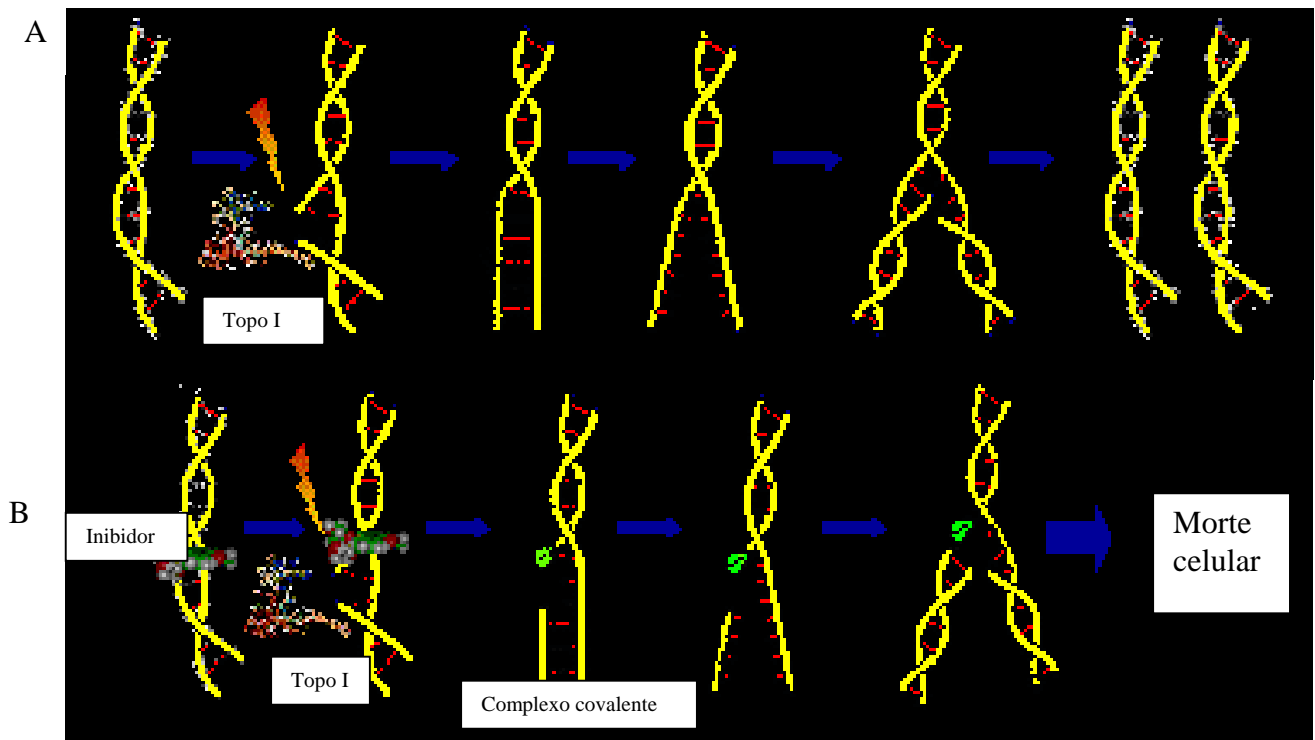


FIGURA 7 - Mecanismo de ação da camptotecina e dos derivados irinotecano e topotecano. Em A, célula seguindo seu curso normal. Em B, na presença do inibidor (camptotecina e seus derivados), a topoisomerase I não consegue exercer a sua função, levando a célula à morte celular.

FONTE: Modificado de <http://ircl.univ-lille2.fr/francais/labos/laboratoire.html>

1.4.1.3 *Podophyllum peltatum* L. e *P. emodi* Wallich ex Hook. f. & Thomson – Berberidaceae

A podofilotoxina é a lignana mais abundante isolada da podofilina, uma resina obtida principalmente dos rizomas do gênero *Podophyllum* (Berberidaceae) (Figura 8). O *P. emodi* (*Podophyllum* indiano) fornece mais resina que o *P. peltatum* (*Podophyllum* americano) além de ser mais rico em podofilotoxina (GORDALIZA *et al.*, 2004; GIRI & LAKSHMI NARASU 2000). A podofilotoxina possui ação antitumoral, e os estudos da relação estrutura-atividade forneceram os derivados semi-sintéticos teniposídeo e etoposídeo (Figura 9) (CHOI *et al.* , 2008; ALLEN *et al.* , 2005; STAHELIN, 1973).



Podophyllum (A)



Resina (podofilina) (B)

FIGURA 8 – Dos rizomas do gênero *Podophyllum* (A) obtém-se a podofilina (B) de onde se extrai a podofilotoxina que a partir de semi-síntese fornece o teniposídeo e etoposídeo.

Espectro de ação

A podofilotoxina é efetiva no tratamento do tumor de Wilms, diferentes tipos de tumores genitais (carcinoma verrucoso) e linfomas não Hodking's, e câncer de pulmão. Seus derivados semi-sintéticos são utilizados sobre o câncer testicular e de células pequenas de pulmão, linfoma, leucemia e sarcoma de Kaposi (GORDALIZA *et al.*, 2007).

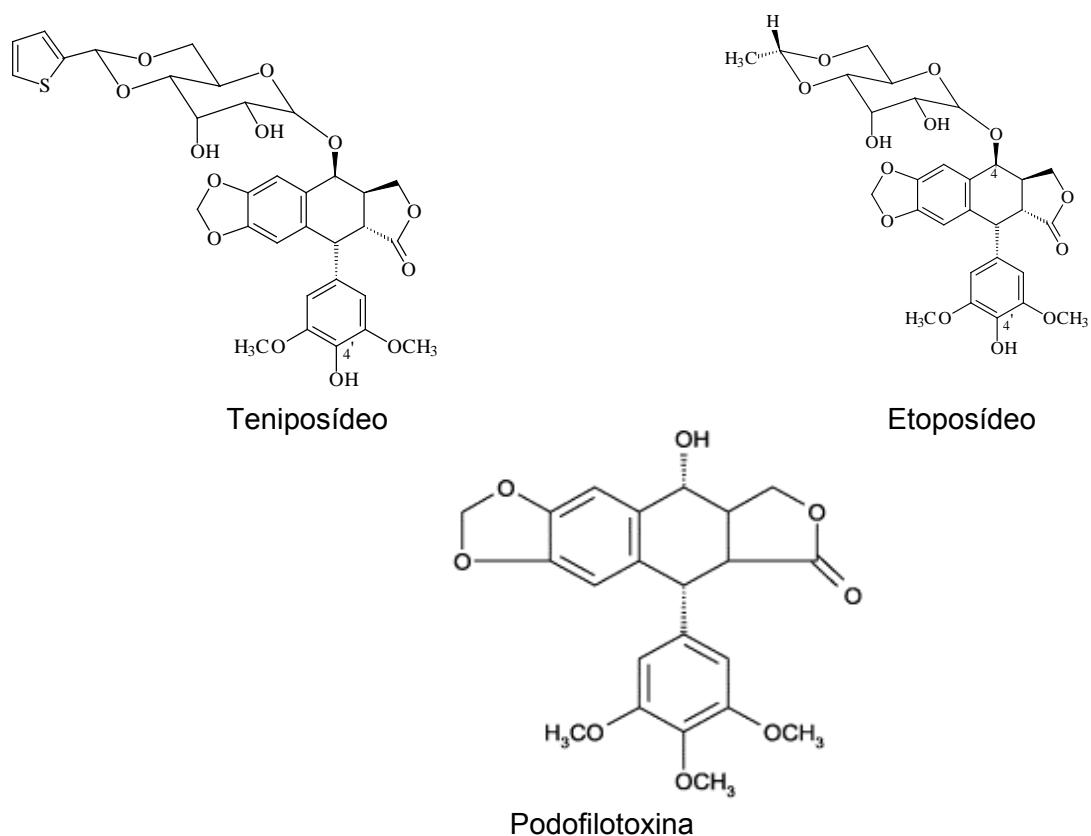
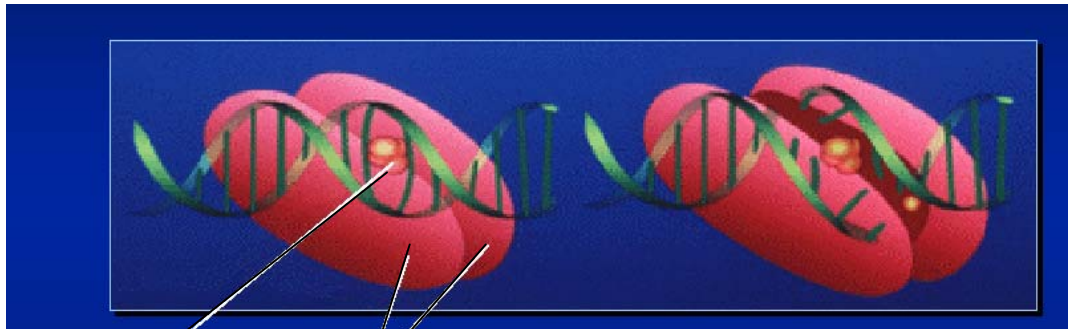


FIGURA 9 – Podofilotoxina de *Podophyllum emodi* e *P. peltatum* e os derivados semi-sintéticos teniposídeo e etoposídeo

Mecanismo de ação

A podofilotoxina atua ao inibir a polimerização dos microtúbulos, interrompendo o ciclo celular na metáfase (Figura 10), sendo o anel trimetoxilado o responsável por esse mecanismo (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). Porém, as modificações estruturais que produziram o etoposídeo e o teniposídeo também modificaram o mecanismo de ação, pois essas moléculas inibem a DNA topoisomerase II (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). Etoposídeo e teniposídeo diferem somente pela presença do grupo metil no lugar do grupo tenillidíno no açúcar piranosídico (Bohlin & Rosen 1996). Esse grupo é o responsável pelo mecanismo de ação de inibição da topoisomerase II.



Podofilotoxinas Topoisomerase II

FIGURA 10 - Mecanismo de ação das podofilotoxinas. A podofilotoxina e seus derivados permitem a fixação normal da topoisomerase II ao DNA. Há a passagem de uma dupla fita de DNA, mas como impedem a separação da enzima topoisomerase II e do DNA, criam complexos de clivagem, levando à célula à morte.

FONTE: Modificado de Université Paris Sud 11

1.4.1.4 *Taxus brevifolia* Nutt. – Taxaceae

Da casca do caule de *Taxus brevifolia* Nutt., da família Taxaceae (Figura 11), foi isolado o diterpeno paclitaxel (taxol). No entanto, como a quantidade de taxol encontrada no *Taxus brevifolia* é muito pequena, obtém-se das folhas de *Taxus baccata* L. (Figura 11), a 10-desacetil-baccatina III, que por semi-síntese dá origem ao paclitaxel (Figura 12). Também a partir de 10-desacetil-baccatina III obtém-se o docetaxel (taxotere), análogo não natural, com maior atividade e melhor solubilidade em água (Figura 12) (KINGSTON *et al.*, 2007; KELLAND, 2005; WANI *et al.*, 1971). Modificações na cadeia lateral ligada ao C13 do anel dos taxanos levaram ao desenvolvimento de um análogo semi-sintético do taxol, o docetaxel (Chabner *et al.*, 1996). O potencial terapêutico do docetaxel é maior que a do paclitaxel (Korolkovas 1998; Mann 2002).



Taxus brevifolia



Taxus baccata

FIGURA 11 - *Taxus brevifolia* e *T. baccata* - Taxaceae

Espectro de ação

O paclitaxel teve seu uso aprovado no U.S Food and Drug Administration (FDA) em 1992 para o tratamento do câncer de ovário metastático refratário. Apresentou ainda bons resultados em ensaios clínicos para o tratamento do câncer de pulmão, mama, cabeça e pescoço. O docetaxel é utilizado no câncer de mama metastático e no câncer de pequenas células do pulmão (NABHOLTZ & GLIGOROV 2005).

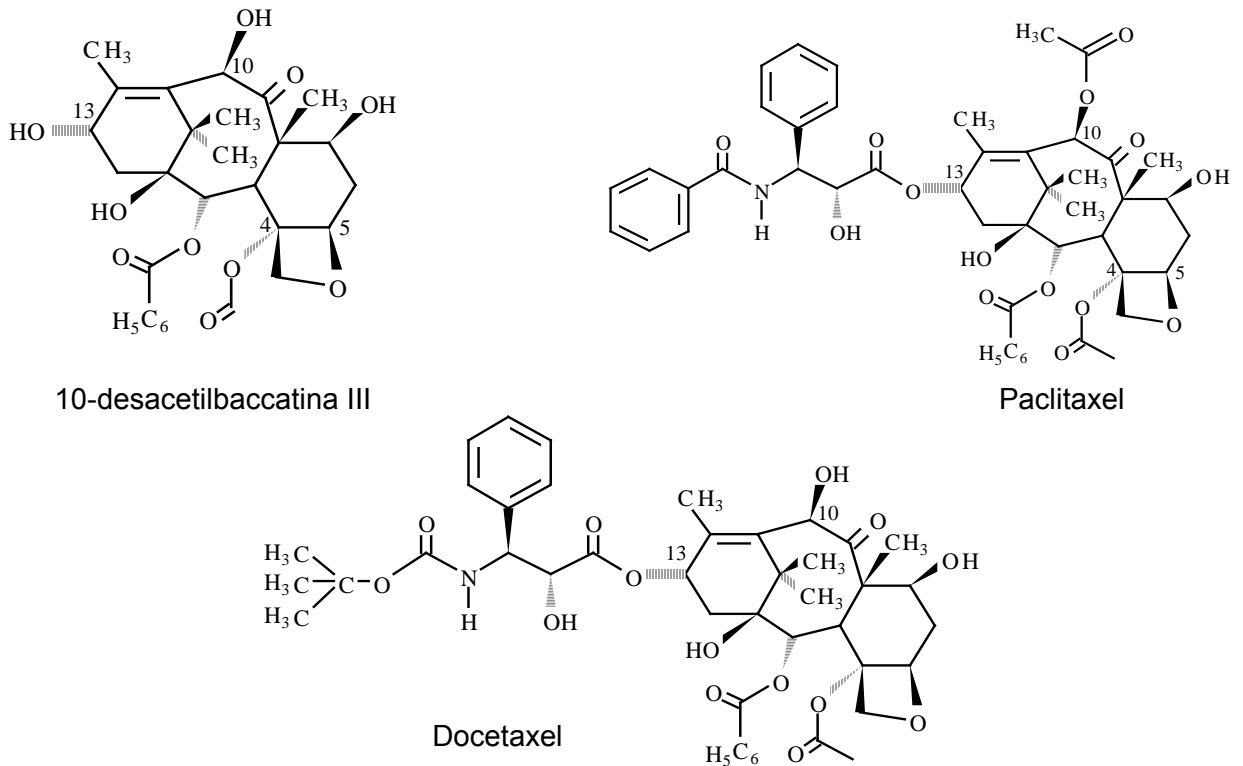


FIGURA 12 - 10-desacetilbaccatina III isolado de *Taxus baccata*, paclitaxel (taxol) e docetaxel (taxotere)

Mecanismo de ação

O mecanismo de ação desses medicamentos é único. Os taxanos impedem a ocorrência da mitose pela interferência no funcionamento normal dos microtúbulos (Figura 13). Eles agem como agentes estabilizadores da tubulina, favorecendo a sua polimerização, porém inibindo a despolimerização dos microtúbulos, levando à morte das células cancerosas (MALONGA *et al.*, 2005).

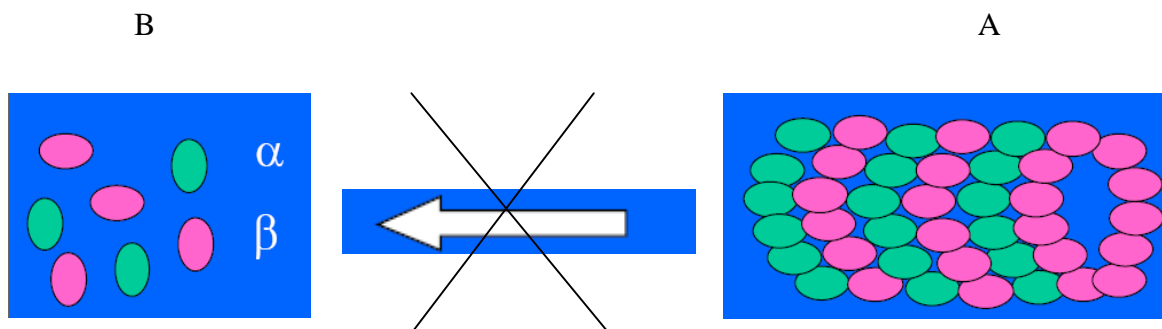


FIGURA 13 - Mecanismo de ação dos taxanos. Os taxanos provocam uma estabilização dos microtúbulos celulares (A) impedindo a liberação dos elementos da tubulina (B) levando as células à morte celular. FONTE: Modificado de <http://www.educ.necker.fr/cours/biologiecellulaire/bioceletcancersdiapo.pdf>

1.4.2 Medicamentos antitumorais de origem microbiana e marinha

Além dos fármacos vegetais têm-se os de fontes microbianas e marinhas. Vários medicamentos obtidos de microrganismos são utilizados na terapêutica como as antraciclinas obtidas pela fermentação de diferentes espécies de Actinomicetales do gênero *Streptomyces*, doxorubicina (*S. peucetius* var. *caesius* ou por semi-síntese a partir da daunorubicina), daunorubicina (*S. coeruleorubidus* e *S. peucetius* var. *carneus*), bleomicina (*S. verticillus*), mitomicina C (*S. caespitosus*), pirarrubina e epirrubina obtidas pela semi-síntese a partir da doxorubicina, e pirarrubina obtida por síntese total (de ALMEIDA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2001).

Quanto aos organismos marinhos, cerca de 3000 novos compostos com atividade citotóxica sobre diversos tipos de tumores foram isolados nas últimas três décadas, demonstrando o imenso potencial do meio marinho como fonte de novos fármacos. Alguns exemplos são briostatina I, dolastatina 10, halicondrina B, aplidina, e a citarabina que teve seu uso aprovado como agente antineoplásico (ROCHA *et al.*, 2001).

1.5 Dificuldades na terapia anticâncer

O fato dos medicamentos antineoplásicos atuarem nas células do organismo como um todo, ou seja nas células cancerosas e normais, provoca uma série de efeitos indesejáveis que podem ser específicos ou não-específicos da medicação utilizada. Alguns dos efeitos inespecíficos mais comuns são náuseas e vômitos, flebite, insuficiência renal, diarreia, alopecia, leucopenia (diminuição dos glóbulos brancos), anemia, plaquetopenia, esterilidade, dentre outros.

Como efeitos secundários específicos podemos citar toxicidade hepática, pulmonar, renal e digestiva para o metotrexato (MARDINI & RECORD 2005); toxicidade vesical para a ciclofosfamida (LAWSON *et al.*, 2008); toxicidade cardíaca para as antraciclinas (BARRY *et al.*, 2007), dentre outros.

Outro problema muito importante da terapia antineoplásica é a resistência adquirida aos medicamentos, podendo ocorrer também a resistência múltipla aos quimioterápicos, conhecida como fenótipo MDR, descoberta em 1970 (BIEDLER & RIEM, 1970). Entre os mecanismos que explicam o desenvolvimento de resistência estão: aumento do potencial anti-apoptótico das células antitumorais; incremento do mecanismo de reparo do DNA; e interferências no transporte do medicamento (MARIE *et al.*, 2004; STOIKA *et al.*, 2003; THOMAS & COLEY 2003) pelas proteínas de transporte (proteínas ABC) capazes de promover o efluxo do medicamento das células alvo. A glicoproteína P foi a primeira, e provavelmente a mais importante, proteína ABC descrita (JULIANO & LING, 1976), sendo responsável pelo fenótipo MDR, que é associado a uma baixa resposta medicamentosa (JI *et al.*, 2005; MARIE *et al.*, 2004). A atividade sobre a glicoproteína-P e o fenótipo MDR de extratos e substâncias oriundas de plantas vem sendo estudada (LIMTRAKUL *et al.*, 2007; FONG *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2006a).

No entanto, ensaios clínicos demonstraram que a inibição das proteínas de efluxo não melhora significativamente a quimioterapia dos pacientes, sugerindo a existência de outros mecanismos de resistência, tais como o fator de crescimento tumoral. Diversos

fatores de crescimento, incluindo bFGF, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fator de crescimento epidérmico têm demonstrado estar relacionados com a indução de resistência medicamentosa (Song *et al.*, 2000).

1.6 A incidência de câncer no Brasil

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (MINISTÉRIO DA SAÚDE), 466.730 novos casos de câncer são previstos para os anos de 2008 e 2009. Dentre os mais comuns têm-se o câncer de próstata e pulmão, no sexo masculino, e mama e colo de útero, no sexo feminino. Sendo o câncer do tipo não melanoma o mais incidente na população brasileira. Dando ênfase aos tipos de câncer abordados neste estudo, tem-se que em 2008 teríamos 12.490 novos casos de câncer de cólon e reto em homens, e 14.500 em mulheres, 5.220 novos casos de leucemia em homens, e 4.320 em mulheres; e 2.950 novos casos de câncer de pele do tipo melanoma em homens, e 2.970 em mulheres (Figuras 14 e 15) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

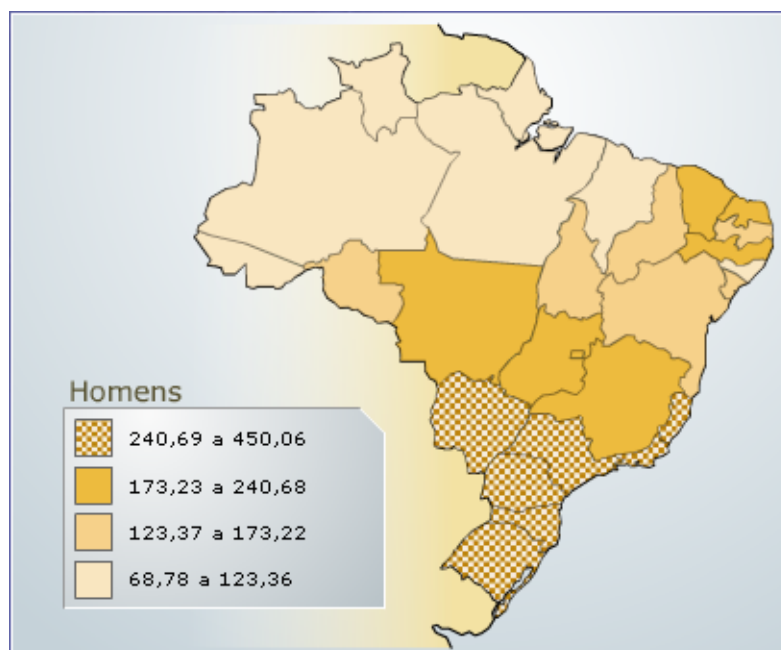


FIGURA 14 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil **homens**, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação (todas as neoplasias, exceto as de pele não melanoma).

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007

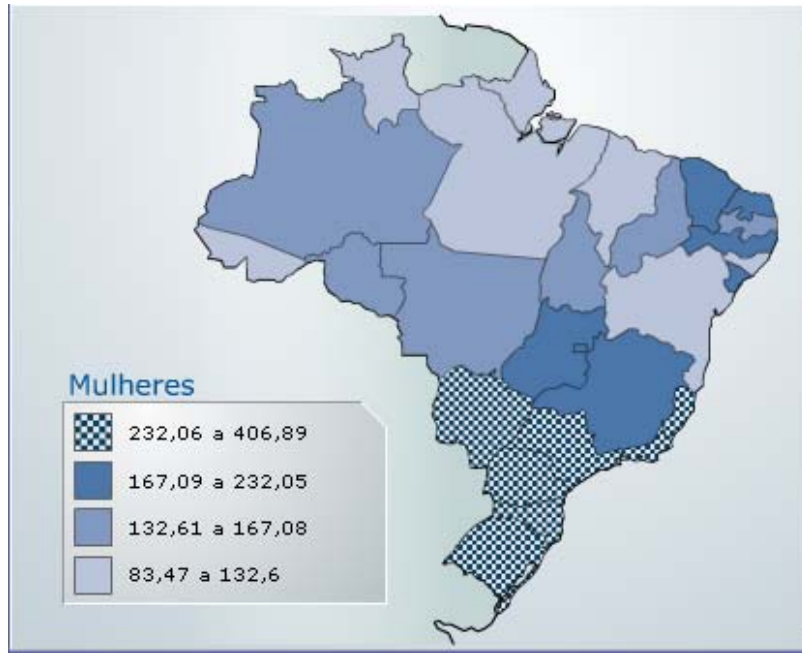


FIGURA 15 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil **mulheres**, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação (todas as neoplasias, exceto as de pele não melanoma).

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007

Ao observar a distribuição espacial das diferentes taxas brutas de incidência verifica-se que a distribuição dos casos novos de câncer segundo sua localização primária é bem heterogênea entre os Estados brasileiros. De uma forma geral, as regiões Sudeste e Sul apresentam as maiores taxas. O câncer é uma doença com causas multifatoriais, dessa forma somente suposições podem ser levantadas para justificar esse fato, como por exemplo, a existência de maior índice de casos relatados aos centros de saúde, ou devido ao estilo de vida e alimentação das pessoas que vivem nessas regiões, além das condições de stress e os efeitos da exposição crônica à diferentes formas de poluição.

2 A pesquisa de novas moléculas vegetais anticâncer

A busca por novas opções terapêuticas para os diferentes tipos de câncer é um dos assuntos de maior interesse na atualidade da pesquisa de moléculas vegetais. Com o intuito de se encontrar extratos vegetais e novas substâncias com atividade inibitória sobre diversos tipos de câncer vários trabalhos vêm sendo conduzidos.

Uma pesquisa bibliográfica na base de dados Scopus tendo como palavras-chave os termos «cancer plants and MDA-MB-435/SF-295/HL-60 e HCT-8» foi realizada a fim de se obter um panorama geral sobre as pesquisas conduzidas com as células estudadas neste trabalho (Tabelas 1, 2, 3 e 4). Foram considerados todos os artigos com substâncias isoladas de plantas relatando a CI_{50} ou % inibição sobre a referida linhagem celular, até o ano de 2008. Os dados foram agrupados em uma tabela com o nome da substância, espécie e família de onde foi extraída, CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$), método utilizado nos ensaios de citotoxicidade e a respectiva referência. Alguns dos resultados encontrados são relatados a seguir.

Três saponinas isoladas da casca do caule de *Albizia julibrissin* (Fabaceae), julibrosídeo J29, julibrosídeo J30 e julibrosídeo J31 apresentaram % de inibição de 84,47, 75,68 e 80,41, respectivamente e a proteína laticífera extraída de *Calotropis procera* apresentou CI_{50} de 1,36 $\mu\text{g/ml}$ sobre a linhagem de melanoma MDA-MB-435 (ZHENG *et al.*, 2006).

Saponinas do tipo oleanano isoladas de *Pithecellobium lucidum* (Leguminosae) apresentaram CI_{50} a partir de 4,24 $\mu\text{g/ml}$ (SHUANG *et al.*, 2008); sesquiterpenos do tipo cadenano isolados de *Eupatorium adenophorum* (Compositae) apresentaram CI_{50} a partir de 2 μM (HE *et al.*, 2008) e a cumarina rutamarina isolada de *Boenninghausenia sessilicarpa* (Rutaceae) apresentou CI_{50} de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (YANG *et al.*, 2007) sobre células de cólon HCT-8.

O sesquiterpeno isointermedeol extraído de *Cymbopogon flexuosus* (Poaceae) apresentou CI_{50} de 20 $\mu\text{g/ml}$ (KUMMAR *et al.*, 2008); fluorenonas isoladas de *Dendrobium chrysotoxum* (Orchidaceae) apresentaram CI_{50} a partir de 10,3 $\mu\text{g/ml}$ (CHEN *et al.*, 2008) e o

glicosídeo esteróidico hyuganin C isolado de *Peucedanum japonicum* (Umbelliferae) apresentou CI_{50} de 20 $\mu\text{g/ml}$ (JANG *et al.*, 2008) sobre a linhagem celular de leucemia promielocítica HL-60.

O esteróide 18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona obtido do organismo marinho (octoral) *Carijoa riisei* apresentou CI_{50} de 14,4 $\mu\text{g/ml}$ (KOSSUGA *et al.*, 2007) e uma proteína laticífera extraída de *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) CI_{50} de 0,42 $\mu\text{g/ml}$ sobre a linhagem celular SF-295 de glioblastoma (SOARES DE OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Alguns agentes de origem vegetal que passaram por ensaios *in vitro* como esses estão hoje em fase de ensaios clínicos sobre diversos tipos de tumores, como por exemplo a roscovitina, análogo da substância capaz de inibir quinases ciclino-dependentes, a olomucina, obtida de *Raphanus sativus* -Brassicaceae, sendo ainda mais potente que seu precursor (CRAGG & NEWMAN 2005), a combretastatina A4 análogo mais hidrossolúvel que a combretastatina, isolada de *Combretum caffrum* -Combretaceae, que possui ação anti-angiogênica (CRAGG & NEWMAN 2005) e o flavopiridol que foi selecionado a partir de um estudo de relação estrutura-atividade desenvolvido com a substância anti-inflamatória rohitukina isolada de *Dysoxylum binectariferum* -Meliaceae (CRAGG & NEWMAN 2005).

TABELA 1 - Atividade citotóxica de substâncias naturais vegetais sobre células SF-295

Classe	Substância	Planta/Organismo (Família)	Cl ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Esteróide	18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona	<i>Carijoa riisei</i>	14,40	MTT	Kossuga <i>et al.</i> , 2007
Proteína	Proteínas laticíferas	<i>Calotropis procera</i> (Asclepiadaceae)	0,42	MTT	Soares de Oliveira <i>et al.</i> , 2007

TABELA 2 - Atividade citotóxica de substâncias naturais vegetais sobre células HL-60

Classe	Substância	Planta (Família)	Cl ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Acetogenina	Tonkinelin	<i>Uvaria tonkinensis</i> (Annonaceae)	1 µM	MTT	Chen & Yu 1996
Composto fenólico	Quercetin	<i>Lactuca indica</i> (Compositae)	50 µM (48h)	azul de tripan	Chen <i>et al.</i> , 2007a
	Cafeic acid		91 µM (48h)		
	Rutin		187 µM (48h)		
Composto fenólico	Moscatin	<i>Bulbophyllum odoratissimum</i> (Orchidaceae)	46	MTT	Chen <i>et al.</i> , 2008
	7-Hydroxy-2,3,4-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene		9,76		
	Coelonin		> 100		
	Densiflorol B		0,08		
	Gigantol		8,19		
	Batatasin III		15,1		
	Tristin		5,02		
	Vanillic acid		> 100		
	Syringaldehyde		6,01		
	Éter diacetilênico spiroketal		Flosculin A		
Flosculin B		18,3 µM			
Flosculin C		16,7 µM			
Flavonóide	Sophoraflavanone G	<i>Sophora avescens</i> (Leguminosae)	12,5 µM	MTT	Ko <i>et al.</i> , 2000
	Kurarinone		18,5 µM		
	2'-methoxykurarinone		13,7 µM		
	Leachianone A		11,3 µM		
Flavonóide	Luteolin	<i>Tithonia diversifolia</i> (Compositae)	8,7	MTT	Kuroda <i>et al.</i> , 2007
	Nepetin		12,3		
	Hispidulin		8,0		

Classe	Substância	Planta (Família)	CI ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Polimetoxiflavonóide	2',3',5-trihidroxí-3,6,7-trimetoxiflavona	<i>Vitex rotundifolia</i> (Verbenaceae)	4,03 µM	MTT	Ko <i>et al.</i> , 2000
	Vitexicarpin		0,12 µM		
	Artemetin		30,98 µM		
Flavona	Xantomicol	<i>Dracocephalum kotschyii</i> (Labiatae)	0,88 ± 0,04	MTT	Jahaniani <i>et al.</i> , 2005
Fluorenona	1,4,5-Trihidroxí-7-metoxí-9-fluorenone	<i>Dendrobium chrysotoxum</i> (Orchidaceae)	10,30	MTT	Chen <i>et al.</i> , 2008b
	Dendroflorin		10-100		
	Denchrysan A		16,66		
Glicosídeo	22-homo-23-norcholestane glycoside	<i>Ornithogalum saundersiae</i> (Liliaceae)	21,0 nM	MTT	Hirano <i>et al.</i> , 1996
Glicosídeo esteróidico	2α,3β,16β -trihidroxí-5α -pregn 20(21)-ene-carboxylic acid γ-lactone 3-O-(O-β -O-glucopyranosyl - (1→2) - O - β glucopyranosyl (1→4)- β -D-galactopyranoside}	<i>Hosta plantaginea</i> var. <i>japonica</i> (Lamiaceae)	> 10	MTT	Mimaki <i>et al.</i> , 1997
	hyuganin C	<i>Peucedanum japonicum</i> (Umbelliferae)	13,2	SRB	Jang <i>et al.</i> , 2008
Secolignana	2-methylene-3-[(3',4',5'-trimetoxífenil)(5''-metoxí-3'',4''-metilenedioxiifenil)metil]butírolactone	<i>Peperomia pellucida</i> (Piperaceae)	1,4 µM	MTT	Xu <i>et al.</i> , 2006b
	2-metil-3-[(3'-hidroxí- 4',5'-dimetoxífenil)(5''-metoxí-3'',4''-metilenedioxiifenil)-metil]butírolactone		10,8 µM		
Proteína	Proteínas laticíferas	<i>Calotropis procera</i> (Asclepiadaceae)	0,86	MTT	Soares de Oliveira <i>et al.</i> , 2007
Saponina	1β,2α-dihidroxíspirosta-5,25(27)-dien-3β-yl O-a-l-rhamnopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→4)]- β-D-galactopyranoside	<i>Cestrum sendtnerianum</i> (Solanaceae)	7,7	MTT	Haraguchi <i>et al.</i> , 2000

Classe	Substância	Planta (Família)	Cl ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Saponina	Aculeoside A	<i>Ruscus aculeatus</i> (Liliaceae)	0,48	MTT	Mimaki <i>et al.</i> , 1998
Saponina triterpênica	Asterlingulatoside C	<i>Aster lingulatus</i> (Compositae)	8,8 µM	Timidina (síntese DNA)	Shao <i>et al.</i> , 1997
	Asterlingulatoside D		6,1 µM		
Saponina espirostanol	(25R)-22-O-methyl-5α-furostane-2α,3β,22ξ,26-tetrol 26-O-β-D- glucopyranoside	<i>Hosta plantaginea</i> var. <i>japonica</i> (Lamiaceae)	> 10	MTT	Mimaki <i>et al.</i> , 1997
	(25R)-5α-spirostan-2α,3β-diol (gitogenin) 3-O-{O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-β-D-galactopyranoside}		2,9		
	gitogenin 3-O-{O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(1 →3)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-β-D-galactopyranoside}		1,0		
	gitogenin 3-O-{O-β-D-glucopyranosyl - (1 →2) - O - [O - α - L - rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1 →4)-β-D-galactopyranoside}		1,7		
Saponina triterpênica	Giganteoside D	<i>Cephalaria gigantea</i> (Dipsacaceae)	3,15 µM	MTT	Tabatadze <i>et al.</i> , 2007
	Giganteoside E		6,80 µM	MTT	
Saponina	Hecogenin tetraglycoside	<i>Agave americana</i> (Agavaceae)	4,3	-	Yokosuka <i>et al.</i> , 2000
Estilbenóide	Gnemonol G	<i>Gnetum gnemonoides</i> , <i>G. gnemon</i> e <i>G. latifolium</i> (Gnetaceae)	10,0 µM (48h)	azul de tripan	Iliya <i>et al.</i> , 2006
	Gnetin I		12,2 µM (48h)		
	Gnetin C		13,0 µM (48h)		
	Gnemonol K		24,1 µM (48h)		
Estilbenóide	Gnemonol L	<i>Gnetum gnemonoides</i> , <i>G. gnemon</i> e <i>G. latifolium</i> (Gnetaceae)	24,1 µM (48h)	azul de tripan	Iliya <i>et al.</i> , 2006
	Mirabiloside B	<i>Welwitschia mirabilis</i> (Welwitschiaceae)	34,0 µM (48h)		

Classe	Substância	Planta (Família)	CI ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Tanino	1-O-galloyl castalagin	<i>Eugenia jambos</i> (Myrtaceae)	10,8 µM (48h)	MTT	Yang <i>et al.</i> , 2000
	Casuarinin		12,5 µM (48h)		
Diterpene Incorporated Sesquiterpene	Sugikurojins G	<i>Cryptomeria japonica</i> (Taxodiaceae)	35,4 µM	MTT	Yoshikawa <i>et al.</i> , 2006
Diterpeno	7β- methoxydeoxocryptojaponol		28,0 µM	MTT	Yoshikawa <i>et al.</i> , 2006
	5,6- dehydrosugiol		52,4 µM	MTT	Yoshikawa <i>et al.</i> , 2006
	Oridonin	<i>Isodon japonica</i> (Lamiaceae)	4,6 µM	-	Bai <i>et al.</i> , 2005
	Lasiokaurin		2,0 µM		
	Shikokianin		3,4 µM		
	6F	<i>Pteris semipinnata</i> (Pteridaceae)	0,09 µmol.L ⁻¹	MTT	Zhang <i>et al.</i> , 1999
Sesquiterpeno	Tirotundin	<i>Tithonia diversifolia</i> (Compositae)	7,1	MTT	Kuroda <i>et al.</i> , 2007
	Tirotundin 3-O-methyl ether		2,1		
	Tagitinin A		10,5		
	1α -hydroxytirotundin 3-O-methyl ether		13,0		
	Tagitinin C		1,1		
Sesquiterpeno	Deacetylviquestin		2,6	MTT	Kuroda <i>et al.</i> , 2007
	1β -methoxydiversifolin		0,13		
	Tagitinin F		3,0		
	1β -methoxydiversifolin		0,13		
	1β -methoxydiversifolin 3-O-methyl ether		1,5		
	1α -hydroxydiversifolin 3-O-methyl ether		6,6		
	4β ,10 α -dihydroxy-3-oxo-8β -isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide		5,7		
	4β ,10β -dihydroxy-3-oxo-8β -isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide		6,4		
Sesquiterpeno	Isotermedeol	<i>Cymbopogon flexuosus</i> (Poaceae)	20,0	MTT	Kumar <i>et al.</i> , 2008

Classe	Substância	Planta (Família)	CI ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Sesquiterpeno cíclico	Zerumbone	<i>Zingiber zerumbet</i> (Zingiberaceae)	22,29 (6h) 9,12 (12h) 2,27 (18h)	MTT	Huang <i>et al.</i> , 2005
	Ursolic acid	<i>Calluna vulgaris</i> (Ericaceae)	0,85 µM		
Triterpeno	3α,23-isopropylidenedioxyolean-12-en-27-oic acid	<i>Aceriphyllum rossii</i> (Saxifragaceae)	25,8 +- 2,0 µM	MTT	Lee <i>et al.</i> , 2007
	23-hydroxy- 3-oxoolean-12-en-27-oic acid		14,8 +- 1,5 µM		
	3-oxoolean-12-en-27-oic acid		13,3 +- 0,4 µM		
	3α -hydroxyolean- 12-en-27-oic acid		12,1 +- 0,1 µM		
	β -peltoboykinolic acid		12,3 +- 0,8 µM		
Triterpeno	Aceriphylic acid A	<i>Aceriphyllum rossii</i> (Saxifragaceae)	13,1 +- 0,9 µM	MTT	Lee <i>et al.</i> , 2007
	Oleanolic acid		> 100 µM		
	Gypsogenic acid		> 100 µM		
	Heteroclitallactone D	<i>Kadsura heteroclita</i> (Schizandraceae)	6,76 µM	-	Wang <i>et al.</i> , 2006
Triterpenodiol	3α, 24-dihydroxyurs-12-ene + 3α, 24-dihydroxyolean-12-ene	<i>Boswellia serrata</i> (Burseraceae)	12	MTT	Bhushan <i>et al.</i> , 2007
Xantona	1,3,7-trihydroxy-4-(1,1-dimethyl-2-propenyl)-5,6-(2,2-dimethylchromeno)-xanthone	<i>Cudrania tricuspidata</i> (Moraceae)	35,9 µM	MTT	Lee <i>et al.</i> , 2005
	Cudraxanthone C		40,8 µM		
	Cudraxanthone D		6,2 µM		
	Isocudraniaxantona B		45,2 µM		
	Isocudraniaxanthone B		32,8 µM		
	1,3,6,7-tetrahydroxy-4-(1, 1-dimethyl-2-propenyl)-8-prenylxanthone		8,6 µM		
	Cudraxanthone L		8,2 µM		
	Cudraxanthone M		29,5 µM		
Peperomins	Peperomin E	<i>Peperomia pellucida</i> (Piperaceae)	1,8 µM	MTT	Xu <i>et al.</i> , 2006b

Classe	Substância	Planta (Família)	CI ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Derivado de fenantreno	3,7-dihydroxy-2,4,6-trimethoxyphenanthrene	<i>Bulbophyllum odoratissimum</i> (Orchidaceae)	10,02	-	Chen <i>et al.</i> , 2007b
Vitafisalina	withaphysalin O	<i>Acnistus arborescens</i> (Solanaceae)	0,7 µM (72h)	azul tripan	Damasceno Rocha <i>et al.</i> , 2006
Vitafisalina	Withaphysalin M	<i>Acnistus arborescens</i> (Solanaceae)	2,3 µM (72h)		
	Withaphysalin N	<i>Acnistus arborescens</i> (Solanaceae)	2,7 µM (72h)		

TABELA 3 - Atividade citotóxica de substâncias naturais vegetais sobre células MDA-MB-435

Classe	Substância	Planta/Organismo (Família)	CI ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Esteróide	18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona	<i>Carijoa riisei</i> (Orcotal)	23,10	MTT	Kossuga <i>et al.</i> , 2007
Proteína	Proteína laticífera	<i>Calotropis procera</i> (Asclepiadaceae)	1,36	MTT	Soares de Oliveira <i>et al.</i> , 2007
Tocotrieno	α-Tocopherol	óleo de palma	> 1000	MTT	Guthrie <i>et al.</i> , 1997
	α-Tocotrienol		90		
	γ-Tocotrienol		30		
	δ-Tocotrienol		90		

TABELA 4 - Atividade citotóxica de substâncias naturais vegetais sobre células HCT-8

Classe	Substância	Planta (Família)	CI ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Aldeído	2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, 6-methoxy-2-methyl-4-carbaldehyde (cappamensin A)	<i>Capparis sikkimensis</i> subsp. <i>formosana</i> (Capparaceae)	3,6 (ED50)	SRB	Wu <i>et al.</i> , 2003
Cumarina	Rutamarin	<i>Boenninghausenia sessilicarpa</i> (Rutaceae)	2,497	-	Yang <i>et al.</i> , 2007
Flavona isoprenilada	Artochamin C	<i>Artocarpus chama</i> (Moraceae)	2,3	SRB	Wang <i>et al.</i> , 2004
	Artocarpin		3,8		
Flavona	Artonin E		3,3	SRB	Wang <i>et al.</i> , 2004
Glicosídeo	Plantasioside	<i>Fraxinus sieboldiana</i> (Oleaceae)	3,4 µM	MTT	Lin <i>et al.</i> , 2007
Lactona triterpênica	Pseudolarolide B	<i>Pseudolarix kaempferi</i> (Pinaceae)	0,73	MTT	Chen <i>et al.</i> , 1993

Classe	Substância	Planta (Família)	CI ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Lignana	Rostellulin A	<i>Rostellularia procumbens</i> (Acanthaceae)	> 5	-	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	Justin B		> 5		
	Justicidin C		> 5		
	Cilinaphthalide A		> 5		
	Justicidin A		> 5		
	(+)-lariciresinol 9- <i>p</i> -coumarate	<i>Larix olgensis</i> var. <i>koreana</i> (Pinaceae)	32,9	MTT	Yang <i>et al.</i> , 2005
Proteína	Proteína laticífera	<i>Calotropis procera</i> (Asclepiadaceae)	1,12	MTT	Soares de Oliveira <i>et al.</i> , 2007
Quassinóide	Bruceanols D	<i>Brucea antidysenterica</i> (Simaroubaceae)	0,09	-	Imamura <i>et al.</i> , 1993
	Bruceanols E		0,37		
	Bruceanols F		0,13		
Saponinas triterpênicas do tipo oleanano	Pithelucoside B	<i>Pithecellobium lucidum</i> (Leguminosae)	> 10	MTT	SHUANG <i>et al.</i> , 2008
	Pithelucoside C		4,24		
Saponina	Prosapogenin-10		1,50	MTT	SHUANG <i>et al.</i> , 2008
	Julibroside J29		1,50		
Diterpenóide dimérico	Yuexiandajisu D	<i>Euphorbia ebracteolata</i> Hayata (Euphorbiaceae)	2,66 µM	-	Fu <i>et al.</i> , 2006
Diterpenóide do tipo podocarpano	3β, 12-Dihydroxy-13-methyl-6,8,11,13-podocarpatetraen	<i>Securinega suffruticosa</i> (Euphorbiaceae)	21,8	MTT	Yuan <i>et al.</i> , 2005
	3β, 12-Dihydroxy-13-methyl-5,8,11,13-podocarpatetraen-7-one	<i>Securinega suffruticosa</i> (Euphorbiaceae)	22,0		
	1-(7-Hydroxy-2,6-dimethyl-1-naphthyl)-4-methyl-3-pentanone		23,1		
Sesquiterpeno	Laurebiphenyl	<i>Laurencia tristicha</i> (Rhodomelaceae)	1,77	MTT	Sun <i>et al.</i> , 2006
Sesquiterpeno	3β-acetoxy-6β-methoxyeremophila-7(11),9(10)-dien-12,8β-olide	<i>Ligularia duciformis</i> (Asteraceae)	> 200 µM	-	Wang <i>et al.</i> , 2008
	3β-acetoxy-8α-hydroxy-6β-methoxyeremophila-7(11),9(10)-dien-12,8β-olide		> 200 µM		

Classe	Substância	Planta (Família)	CI ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Sesquiterpeno	3β -acetoxo-10β -hydroxy-6β, 8β -dimethoxyeremophil-7(11)-en-12,8α-olide	<i>Ligularia duciformis</i> (Asteraceae)	> 200 µM	-	Wang <i>et al.</i> , 2008
	3β -acetoxo-6β,8β,10β -trihydroxyeremophil-7(11)-en-12,8α-olide		> 200 µM		
Sesquiterpeno cadinano	(+)-(5R,7S,9R,10S)- 2-oxocadinan-3,6(11)-dien-12,7-olide	<i>Eupatorium adenophorum</i> (Compositae)	> 5 µM	MTT	He <i>et al.</i> , 2008
	(+)-7,7'- bis[(5R,7R,9R,10S)-2-oxocadinan-3,6(11)-dien-12,7-olide		> 5 µM		
	(+)- (5R,7S,9R,10S)-7-hydroxy-7,12-epidioxycadinan-3,6(11)-dien-2- one		> 5 µM		
	(-)- (5R,6R,7S,9R,10S)-cadinan-3-ene-6,7-diol		2 µM		
Sesquiterpeno agarofurano	Reissantin A	<i>Reissantia buchananii</i> (Celastraceae)	> 20	SRB	Chang <i>et al.</i> , 2003
	Reissantin B		> 20		
	Reissantin E		> 20		
	Celastrol		0,23		
Triterpenóide	3-hydroxy-2-oxo-24-nor-friedela-1(10),3,5,7-tetraen- 29-oic acid methyl ester		0,15	SRB	Chang <i>et al.</i> , 2003
	6-oxo-pristimerol		14,1		
	5α-3β-hydroxyolean-12-enone + 5β -3β -hydroxyolean-12-enone		13,7		
	β-sitosterol		> 20		
o-naftoquinona	Biflorin	<i>Capraria biflora L.</i> (Scrophulariaceae)	0,88	-	Vasconcellos <i>et al.</i> , 2005
Classe	Substância	Planta (Família)	CI ₅₀ (µg/ml)	Método	Referência
Fenantrenoquinona	5-hydroxy-3,6,7-trimethoxy-1,4-phenanthrenequinone	<i>Calanthe arisanensis</i> (Orchidaceae)	0,20	-	Lee <i>et al.</i> , 2008

	(Calanquinone) A				
Dímero de acetofenona prenilado	Acrofolione A	<i>Acronychia trifoliolata</i> (Rutaceae)	4,3	-	Oyama <i>et al.</i> , 2003
Derivado de stirilpirona	Goniolactone B	<i>Goniothalamus cheliensis</i> (Annonaceae)	4,43 µM	MTT	Wang <i>et al.</i> , 2002
Derivado de Feoforbide	Pheophorbide a	<i>Clerodendrum calamitosum</i> (Verbenaceae)	1,5	SRB	Cheng <i>et al.</i> , 2001
	(10S)-Hydroxypheophorbide a		> 4		
	Purpurin 7 dimethyl ester		1,6		
	(10S)-hydroxypheophytin a		14,0		
Simaroubolídeo	Quassimarin	<i>Leitneria floridana</i> (Leitneriaceae)	0,012	SRB	Xu <i>et al.</i> , 2000
	Simalikalactone D		0,013		
β-carbolines	1-methoxycanthinone		3,6		Xu <i>et al.</i> , 2000
	5-methoxycanthinone		2,5		

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromido, SRB: sulforodamina B, WST-1: water soluble tetrazolium sal (sal de tetrazolium solúvel em água)

3 O Cerrado como fonte de novos medicamentos

O Cerrado, segundo maior bioma brasileiro, ocupa uma área de aproximadamente 2 milhões de Km², cobrindo cerca de 23% do território do país (Figura 16) (BRANNSTROM *et al.*, 2008), e em termos de área é superado apenas pela floresta amazônica, que ocupa aproximadamente 3 milhões de Km² (KLINK & MACHADO 2005; RATTER *et al.*, 1997). É um bioma com rica biodiversidade, contendo em torno de 160.000 espécies de plantas, animais e fungos (BRANNSTROM *et al.*, 2008; BRIDGEWATER *et al.*, 2004; RATTER *et al.*, 1997).

Situa-se no Planalto Central, sendo uma região com aproximadamente 44% de suas plantas endêmicas (BRANNSTROM *et al.*, 2008; BRIDGEWATER *et al.*, 2004; FERREIRA & HUETE 2004). No entanto, apenas cerca de 20% do Cerrado ainda possui vegetação nativa relativamente intacta (MYERS *et al.*, 2000; MANTOVANI & PEREIRA 1998), devido à monocultura intensiva de grãos, principalmente a soja, e a pecuária extensiva de baixa tecnologia (WWF 2000).

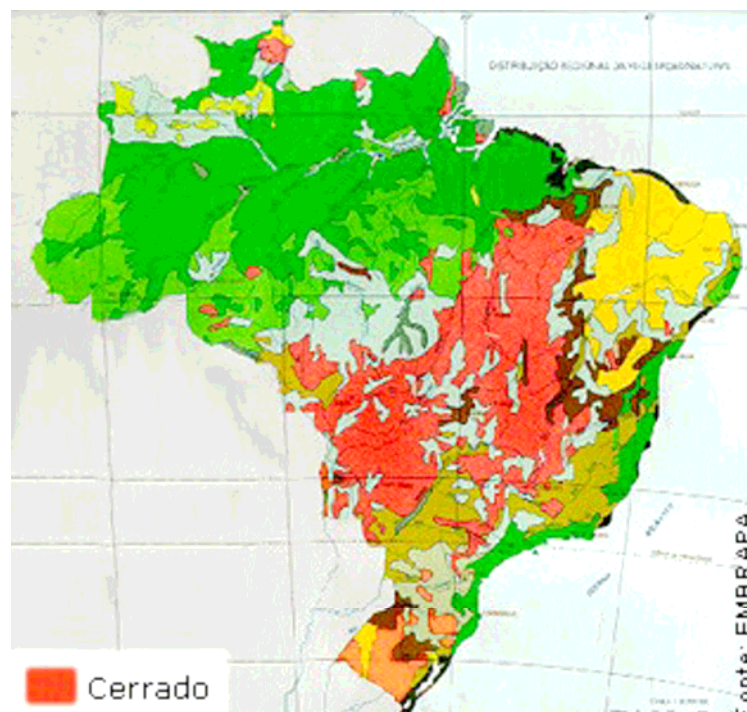


FIGURA 16. Extensão do Cerrado no Brasil. FONTE: Embrapa

As atividades biológicas das plantas do Cerrado ainda são pouco exploradas, apesar da grande diversidade de metabólitos secundários. Dessa forma, foi criado no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília um banco de extratos e substâncias isoladas de plantas do bioma Cerrado, a fim de se buscar novas moléculas com potencial medicamentoso. A pesquisa é realizada através da investigação científica nas áreas de agentes infecciosos, vetores e células cancerígenas.

3.1 Espécies do Cerrado selecionadas no estudo

3.1.1 *Simarouba versicolor* A. St. Hil. - Simaroubaceae

Nome comum: pau-paraíba

Descrição botânica

Árvore pequena, 4-5 metros de altura, ramos densamente folhosos; folhas coriáceas, glabras, de 15-20 cm de comprimento, imparipinadas; folíolos oblongos, até 6 cm de comprimento, quase sempre alternos, às vezes opostos, 5-6 cm de comprimento, 20-25 cm de largura; ápice obtuso, subtruncado ou emarginado, ferrugíneo-pilosa em baixo; panícula de 30-50 cm de comprimento; ramos eretos, patentes, frouxamente compostos-paniculados, ramos com 3-5 flores; brácteas oblongas ou linear-espatuladas; pedicelos de 2-4 mm, cálice com apenas 1 mm de comprimento; pétalas oblongas 3,5-4 mm de comprimento, 2 mm de largura, membranáceas, glabérrimas; drupa 1,5 cm de comprimento, dorso carenado. Ocorre em Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia, Ceará, Goiás e Piauí. Floresce em setembro e outubro (Figura 17) (CORREA, M.P., 1984).



FIGURA 17 - Foto de *Simarouba versicolor* A. St. Hil. - Simaroubaceae

Atividade biológica e composição química

O extrato aquoso de *Simarouba versicolor* apresentou efeito inibidor sobre a ovipostura do carrapato bovino *Boophilus microplus*, podendo ser uma alternativa para o controle deste ectoparasita, que já apresenta resistência a outros inseticidas (PIRES *et al.*, 2007).

Os extratos etanólicos de *S. versicolor*, *Guarea kunthiana*, *Guarea guidonia* e *Talauma ovata* causaram mortalidade importante sobre *Rodnius milesi* quando comparados aos controles, que não causaram mortalidade aos insetos (COELHO *et al.*, 2006).

A toxicidade aguda do extrato aquoso da casca de *S. versicolor* foi avaliada. A dose letal mediana (LD₅₀) encontrada sugeriu potencial toxicidade do extrato (FERNANDES *et al.*, 2004).

Arriaga e colaboradores isolaram quassinóides, triterpenóides, uma mistura de esteróides, o flavonóide kaempferol e um derivado do esqualeno 11,14-diacetoxi-7,10; 15,18-diepoxi-6,19-dihidroxi-6,7,10,11,14,15,18,19-octahidroesqualeno das raízes, caule e frutos de *Simarouba versicolor* (ARRIAGA *et al.*, 2002).

β -sitosterol, epilupeol, amarolideo-11-acetato, amarolideo-2,11-diacetato, ailanthinona e glaucarubinona foram isolados de *S. versicolor*. A atividade citotóxica e anti-leucêmica dos extratos desta planta é devido principalmente à glaucarubinona (GHOSH *et al.*, 1977).

Uso tradicional e popular

O decocto do caule e da raiz de *S. versicolor* é utilizado para combater a fraqueza (MENDES & CARLINI 2007).

A casca e frutos de *S. versicolor* são utilizados como anti-helmíntico e neutralizador de veneno de cobra, para diarréia, disenteria, dispepsia, febre e como anti-hemorrágico (Fernandes *et al.*, 2004).

3.1.2 *Schinus terebinthifolius* Raddi var. *radiannus* Engl.– Anacardiaceae

Nome comum: aroeira da mata

Características botânicas

Árvore de até 10 metros de altura (Figura 18). Casca fina com tanino viscoso avermelhado. Folhas compostas, imparipenadas com dois pares de folíolos membranáceos, 5 a 7 cm de comprimento por 2,5 a 3 cm de largura, com aroma. Flores abundantes, minúsculas, de cor bege, reunidas em panículas. Frutos abundantes, pequenos, avermelhados na maturação. Madeira dura pesada de múltipla utilização inclusive para a produção de carvão e lenha. Ocorre nas florestas (matas) ciliares e matas ciliares em galeria do Centro-Oeste, bem próximo do curso d'água.



FIGURA 18: Foto do material de *Schinus terebinthifolius* Raddi var. *radiannus* Engl. - Anacardiaceae depositado no Herbário da Universidade de Brasília

Atividade biológica e composição química

O extrato etanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* exibiu potencial antifúngico sobre *Candida glabrata* e *Sporothrix schenckii* (JOHANN *et al.*, 2007).

Flavonóides isolados desta planta geraram danos na molécula de DNA, além de apresentarem dano oxidativo em potencial (VARELA-BARCA *et al.*, 2007).

O óleo essencial extraído de *S. terebinthifolius* apresentou atividade antifúngica sobre *Trichophyton longifusus* e baixa atividade antibacteriana (MOUSTAFA 2007).

O extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolius* apresentou atividade antifúngica sobre *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* formando halos de inibição de 15 e 20 mm, respectivamente; e atividade leishmanicida sobre *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*, com CI_{50} de 55 e >250 $\mu\text{g/ml}$ (BRAGA *et al.*, 2007a).

O medicamento fitoterápico brasileiro - BPF é composto por pigmentos das plantas *Eucalyptus globulus*, *Peltodon radicans* e *S. terebinthifolius* em álcool à 13,3° GL. Este medicamento é popularmente usado no estado da Paraíba, Brasil desde 1889 como anti-séptico e antiinflamatório. Estudos utilizando modelos como edema de orelha em camundongos induzido por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) ou capsaicina e o edema de pata de rato induzido por carragenina comprovaram a atividade antiinflamatória do medicamento (MEDEIROS *et al.*, 2007).

O extrato etanólico da madeira do caule de *S. terebinthifolius* apresentou atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* (de LIMA *et al.*, 2006).

Queires e colaboradores isolaram de *S. terebinthifolius* polifenóis indutores de apoptose e autofagia sobre a linhagem celular DU145 (QUEIRES *et al.*, 2006).

O extrato aquoso de *S. terebinthifolius* mostrou-se ativo sobre *Candida albicans* com valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 120 ng/ml e zona de inibição de 15 mm (SCHMOURLO *et al.*, 2005).

Dantas e colaboradores avaliaram o potencial genotóxico do extrato da casca do caule de *S. terebinthifolius*. Os resultados indicaram que o extrato produz dano ao DNA e

mutações em bactéria, e que o dano oxidativo pode ser o responsável por sua genotoxicidade (de CARVALHO *et al.*, 2003).

Ensaio *in vivo*

Branco Neto e colaboradores avaliaram o efeito cicatrizante da administração tópica do extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* em feridas abertas na região dorsocostal de ratos. O extrato retardou a reepitelização das feridas da pele dos ratos (BRANCO NETO *et al.*, 2006).

Santos e colaboradores avaliaram o efeito cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* sobre a cicatrização de gastrorrafias de ratos. O extrato não alterou o processo de cicatrização do estômago quanto à avaliação macroscópica, tensiométrica e microscópica (dos SANTOS *et al.*, 2006).

Lucena e colaboradores avaliaram a ação cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* em bexigas de ratos. O uso do extrato mostrou efeito cicatrizante favorável nas cistotomias em ratos (LUCENA *et al.*, 2006).

A decocção, o gel e a emulsão preparados com *S. terebinthifolius* e *Myracadruon urundeuva* foram estudados. Os resultados dos ensaios pré-clínicos e clínicos obtidos levaram à produção comercial de um gel vaginal à base de *S. terebinthifolius* pelo laboratório Hebron Indústria Química e Farmaceutica S/A, sob o nome comercial Kronel® (da SILVA *et al.*, 2004).

A toxicidade aguda de *S. terebinthifolius* e *Piper nigrum*, que são muito utilizadas na culinária brasileira foi avaliada. Os resultados obtidos demonstraram que ambas as espécies possuem baixa toxicidade oral, quando administradas em camundongos (5 g/Kg, via oral) em doses 2500 vezes maior que a dose normalmente consumida pelos humanos diariamente (PIRES *et al.*, 2004).

A efetividade de alguns extratos oriundos de plantas medicinais como agentes antimicrobianos foi testada em microrganismos isolados de alveolite induzida ou não de

ratos. O extrato de *S. terebinthifolius* demonstrou boa atividade cicatrizante de feridas pelas análises histológicas (de MELO JUNIOR *et al.*, 2002).

Ceruks e colaboradores efetuaram o estudo fitoquímico da fase acetato de etila, oriunda do extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius* e monitoraram o potencial anti-radicalar pela análise em cromatografia em camada delgada revelada com o DPPH (solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila), o qual conduziu ao isolamento de galato de etila, miricetrina, quercitrina, galato de metila e miricetina, descritas pela primeira vez neste gênero (CERUKS *et al.*, 2007).

Uso tradicional e popular

A infusão ou decocção de *S. terebinthifolius* é uma preparação muito utilizada pela medicina tradicional e popular no tratamento de lesões benignas do cérvix, cervicites, vaginites e cervico-vaginites (da SILVA *et al.*, 2004). Além de ser utilizada nas disfunções urinárias, bronquites e outros problemas de ordem respiratória, inflamação, hemorragias e menstruação com sangramento excessivo (BRAGA *et al.*, 2007a), cicatrização de feridas, inflamação e rituais religiosos (de ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). Suas folhas, galhos e flores são utilizadas para curar tumores e lepra (SCHMOURLO *et al.*, 2005).

S. terebinthifolius possui ação antiséptica, antiinflamatória, balsâmica, além de atividades hemostáticas. Essa planta é utilizada comumente para o tratamento de feridas, infecções urinárias e respiratórias (MELO JUNIOR *et al.*, 2002; SIMÕES *et al.* 1989; DELORME & MIOLLA 1979; BRAGA, 1953 *in de* LIMA *et al.*, 2006).

3.1.3 *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. - Clusiaceae

Nome comum: pau-santo

Características botânicas

Arbusto pequeno, de caule cilíndrico e contorcido; casca grossa, até 3 cm de espessura; ramos alternos; folhas terminais denso-aglomeradas no ápice dos ramos, quase

sésseis, lanceolado-obovadas, de 10-20 cm de comprimento e 3-10 cm de largura; coriáceas; flores brancas ou róseas, aromáticas, dispostas em panículas ferrugíneo-tomentosas; fruto cápsula ovóide (Figura 19), carnosa, triangular e trilocular; sementes comprimidas, sub-reniformes, aladas, imbricadas. Planta usada em banhos como emoliente. Cresce no Cerrado, desde o Piauí até São Paulo, Minas Gerais, Goiás, e Mato Grosso. Conhecida vulgarmente como: Pau de São José, Pau de Santo, Pau-santo (CORREA, M.P 1984).



FIGURA 19 - Foto de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. – Clusiaceae com frutos

Atividade biológica e composição química

Aucuparina e 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona, isoladas do extrato diclorometânico de *Kielmeyera coriacea* apresentaram atividade sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 3,12 e 12,5 µg/ml, respectivamente sobre *Bacillus subtilis*; e a aucuparina foi ativa sobre *Staphylococcus aureus* com MIC de 12,5 µg/ml (CORTEZ *et al.*, 2002).

Quatro xantonas e uma bifenila isoladas de *K. coriacea* exibiram atividade antifúngica sobre o fungo fitopatogênico, *Cladosporium cucumerinum*; e duas xantonas prenildas, extraídas da mesma planta, inibiram o crescimento de *Candida albicans* (CORTEZ *et al.*, 1998).

A toxicidade do extrato diclorometânico do caule de *K. coriacea* foi avaliada em ensaio com roedores. Os resultados demonstraram que a administração oral aguda e crônica desse extrato não apresentou toxicidade (OBICI *et al.*, 2008).

A fração diclorometânica do extrato hidroalcolico (9:1) do caule de *K. coriacea* foi estudado com relação ao envolvimento do neurotransmissor de serotonina (5-HT) na atividade antidepressiva. Os autores comprovaram o efeito antidepressivo da fração no teste do nado forçado em ratos, e sua interação com os ligantes do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (OTOBONE *et al.*, 2007).

Os efeitos do extrato hidroetanólico do caule de *K. coriacea* sobre o sistema nervoso central foram avaliados em ratos. Os resultados demonstraram que a atividade antidepressora do extrato estava relacionada com o sistema neurotransmissor serotoninérgico (GOULART *et al.*, 2007).

A ação do extrato hidroalcolico (9:1) de *K. coriacea* no metabolismo energético hepático foi avaliada. Os resultados sugeriram que o extrato impedia o metabolismo energético hepático atuando como inibidor de atividades enzimáticas associadas à cadeia respiratória. Essa ação pode levar ao aparecimento de efeitos adversos associados ao uso do extrato, mas também pode ser a base dos efeitos antiprotozoário e antifúngico (ZAGOTO *et al.*, 2006).

A ação antiúlcera do extrato hidroalcolico do caule de *K. coriacea* foi avaliado utilizando os modelos de estresse agudo, indometacina e etanol-ácido para induzir úlcera gástrica experimental. O tratamento com o extrato provocou proteção antiúlcera significativa nos modelos de úlcera induzida por indometacina e etanol-ácido, mas não no modelo de

estresse agudo. Esses resultados sugerem que o extrato aumenta a resistência a agentes necrosantes, promovendo um efeito protetor na mucosa gástrica (GOULART *et al.*, 2005).

O mesmo extrato foi avaliado com relação as suas propriedades psicotrópicas após sua administração orogástrica aguda e crônica em ratos. Os resultados demonstram que o extrato é efetivo como ansiolítico e antidepressivo (MARTINS *et al.*, 2004).

O efeito sobre o sistema nervoso central do extrato hidroalcoólico das folhas da mesma planta foi avaliado utilizando modelos como o nado forçado. O tratamento oral com 120 mg/kg da preparação por dia, durante 30 dias, exibiu um efeito ansiolítico significativo (AUDI *et al.*, 2002).

Os extratos dessa planta são ricos em xantonas (ZAGOTO *et al.*, 2006; AUDI *et al.*, 2002), triterpenos e bifenilas (AUDI *et al.*, 2002).

Oito xantonas e uma bifenila foram isoladas do extrato diclorometânico da casca do caule de *K. coriacea* utilizando as técnicas de cromatografia de partição centrífuga, e gel filtração em sephadex LH-20, com HPLC-UV monitorando as frações (CORTEZ *et al.*, 1999).

Uso tradicional e popular

O extrato aquoso de *K. coriacea* é utilizado tradicionalmente no Brasil, para o tratamento de diversas doenças tropicais, como a malária, esquistossomose e leishmaniose, além de infecções bacterianas e fúngicas (ZAGOTO *et al.*, 2006; AUDI *et al.*, 2002).

Os índios Kraho, do Brasil, utilizam essa planta em preparações que possuem ação no sistema nervoso central (RODRIGUES & CARLINI 2005).

3.1.4 Outras espécies

3.1.4.1 *Annona crassiflora* Mart. – Annonaceae

Nome comum: araticum



FIGURA 20: Foto de *Annona crassiflora* Mart. – Annonaceae com frutos

Atividade biológica *in vitro*

A atividade de extratos etanólicos de 51 plantas medicinais brasileiras foi avaliada sobre larvas de *Aedes aegypti* por de Omena e colaboradores. Dentre esses, os extratos da casca e da madeira da raiz de *Annona crassiflora* (Figura 20) foram um dos mais promissores com concentração letal média (LC_{50}) de 0,71 $\mu\text{g/ml}$ e 8,94 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (de OMENA *et al.*, 2007).

Os extratos etanólicos das sementes e cascas de *A. crassiflora* apresentaram atividade antioxidante com concentração inibitória média (CI_{50}) de 30,97 e 49,18 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (ROESLER *et al.*, 2007a; ROESLER *et al.*, 2006).

Os extratos etanólicos da casca do caule e casca da raiz de *A. crassiflora* foram testados sobre larvas de *Aedes aegypti* de terceiro estágio e apresentaram LC_{50} de 23,06 e 26,89 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Takahashi e colaboradores avaliaram a atividade antibacteriana de extrato de *A. crassiflora*, porém o extrato não apresentou efeito relevante (TAKAHASHI *et al.*, 2006).

Trinta e um extratos foram testados sobre formas promastigotas de *Leishmania donovani* e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O extrato etanólico da casca da raiz de *A. crassiflora* demonstrou ser um dos mais ativos, com CI_{50} de 3,7 $\mu\text{g/ml}$ sobre *L. donovani* e 5,9 $\mu\text{g/ml}$ sobre *T. cruzi* (de MESQUITA *et al.*, 2005).

Tempone e colaboradores avaliaram a atividade antiparasitária de extratos de alcalóides totais que possuem alcalóides isoquinoléicos em sua composição, e extratos etanólicos de nove plantas brasileiras. O extrato de alcalóides totais de *A. crassiflora* foi considerado um dos mais ativos inibindo o crescimento das formas amastigotas (25 $\mu\text{g/ml}$) e tripomastigotas (100 $\mu\text{g/ml}$) de *T. cruzi* em 86,1 e 100%, respectivamente. Sobre as formas promastigotas de *L. donovani* obteve-se EC_{50} de 24,89 $\mu\text{g/ml}$. O mesmo extrato apresentou EC_{50} de 23,79 $\mu\text{g/ml}$ sobre as células de macrófagos de murino (RAW 264.7) (TEMPONE *et al.*, 2005).

Dezoito extratos pertencentes a cinco espécies de *Annona*, foram submetidos ao ensaio de letalidade sobre *Artemia salina*. Todos os extratos apresentaram atividade em comparação com os compostos de referência e dados da literatura (SANTOS PIMENTA *et al.*, 2003).

O extrato etanólico das folhas de *A. crassiflora* foi testado sobre 52 cepas de *Candida albicans*, 4 de *C. tropicalis* e 3 de *C. krusei* isoladas de humanos com HIV, que apresentavam quadro de candidíase orofaríngea, usando o método de difusão em ágar. O extrato foi ativo sobre todos os microrganismos. À uma concentração de 64 $\mu\text{g/ml}$, esse extrato mostrou-se capaz de inibir o crescimento de 57 cepas em 96%, sobre 18 cepas 30%. Foram obtidos valores de MIC (concentração inibitória mínima) abaixo de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ sobre 10^6 UFC/ml (SILVA *et al.*, 2001).

Composição química

Os componentes polares dos extratos etanólicos da polpa, casca e sementes de *A. crassiflora* foram investigados com o auxílio da espectrometria por ionização electrospray (ESI-MS) modo íon negativo. Revelou-se a presença de importantes componentes bioativos antioxidantes tais como os ácidos ascórbico, caféico, quínico, ferúlico, cafeoiltartárico, além de xantoxilinarutina, cafeoil glucose (ROESLER *et al.*, 2007b).

Ainda do extrato etanólico das sementes, citotóxico, obteve-se o poliquetideo araticulina (SANTOS *et al.*, 1996a), grossamida e N-trans-cafeoil tiramina (SANTOS *et al.*, 1996b).

Uso tradicional e popular

A espécie *A. crassiflora* é utilizada para tratar diarreia, enquanto espécies de *Annona* ssp. são utilizadas como anti-helmíntico, para tratar reumatismo e doença de Chagas (RODRIGUES & CARVALHO 2001; QUEIROZ *et al.*, 1996 in TEMPONE *et al.*, 2005).

3.1.4.2 *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson – Apocynaceae

Nome comum: Tiborna



FIGURA 21: Foto de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson - Apocynaceae com flores
Fonte: www.iesambi.org.br/.../pau_de_leite3p.JPG

Atividade biológica *in vitro*

O extrato etanólico da madeira do caule de *H. obovatus* (Figura 21) mostrou-se promissor a partir de um *screening* realizado com espécies do Cerrado para averiguar a atividade dos mesmos sobre *L. donovani* e *T. cruzi*. O referido extrato apresentou CI_{50} de 15,7 e 7,5 $\mu\text{g/ml}$ sobre as formas amastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. donovani*, respectivamente (de MESQUITA *et al.*, 2005).

Os extratos diclorometano-metanol das folhas e diclorometânico do caule de *H. obovatus* apresentaram inibição de 97% sobre a proliferação de linfócitos após estimulação com fitohemaglutinina A (SOUZA-FAGUNDES *et al.*, 2002).

Uso tradicional e popular

A espécie *H. obovatus* é utilizada no tratamento do câncer, herpes e verminoses (de MESQUITA *et al.*, 2005), enquanto espécies de *Himatanthus* ssp. são utilizadas pela medicina tradicional e popular na América do Sul para tratar malária, mordidas de cobra, tumores, artrite, gastrite, verminoses, além de outras doenças (MILLIKEN 1997; ELISABETSKY & CASTILHOS 1990 *in* SOUZA-FAGUNDES *et al.*, 2002).

3.1.4.3 *Magonia pubescens* A. St. -Hil. - Sapindaceae

Nome comum: tingui, timbó do Cerrado



FIGURA 22: Foto de *Magonia pubescens* A. St. -Hil. - Sapindaceae com fruto

Fonte: www.arvores.brasil.nom.br

Atividade biológica *in vitro*

Taninos isolados do extrato etanólico das cascas do caule de *M. pubescens* (Figura 22), assim como o extrato etanólico dos troncos da mesma planta, apresentaram atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* (GARCIA DA SILVA *et al.*, 2004; ARRUDA *et al.*, 2003).

Uso tradicional e popular

A espécie *Magonia pubescens* é utilizada no preparo de sabão para dermatites, seborréia, ou para matar piolho ou como inseticida (de SOUZA & FELFILI 2006).

3.1.4.4 *Pouteria torta* Radlk. – Sapotaceae

Nome comum: guapeva, curiola, abiu do Cerrado, grão de galo



FIGURA 23: Foto de *Pouteria torta* Radlk. - Sapotaceae com frutos

Fonte: lh4.ggpht.com/.../XmIMlygxuug/DSCN0642.JPG

Atividade biológica e composição química

Proteínas isoladas das sementes de *P. torta* (Figura 23) apresentaram atividade antifúngica e inseticida com propriedades semelhantes às da lectina (BOLETI *et al.*, 2007). O extrato aquoso das folhas de *P. torta* apresentou dose letal média (LD₅₀) de 0,28 mg/ml sobre larvas de *Artemia salina* (PERFEITO *et al.*, 2005).

Um estudo fitoquímico do extrato metanólico de *P. torta* detectou a presença de triterpenos na amostra estudada. Foram isolados acetato de β -amirina, acetato de α -amirina, ácido betulínico e ácido ursólico (CHE *et al.*, 1980). Perfeito e colaboradores isolaram acetato de lupeol do extrato hexânico das folhas dessa espécie (PERFEITO *et al.*, 2005).

3.1.4.5 *Calophyllum brasiliense* Cambess. – Clusiaceae

Nome comum: guanandi ou guarandi



FIGURA 24: Foto de *Calophyllum brasiliense* Cambess. - Clusiaceae

Fonte: http://farm4.static.flickr.com/3033/2760384414_d28213be4c.jpg?v=0

Atividade biológica *in vitro* e composição química

O extrato diclorometânico das folhas de *C. brasiliense* (Figura 24), assim como a cumarina (-) mammea A/BB, isolada do mesmo, apresentaram atividade leishmanicida. A

cumarina apresentou CI_{50} de 3,0 e 0,88 $\mu\text{g/ml}$ sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, respectivamente, e nas mesmas concentrações não mostrou toxicidade sobre cultura de macrófagos de murino (J774G8) (BRENZAN *et al.*, 2007). Essa mesma cumarina havia sido isolada por Gasparotto e colaboradores do extrato hidroalcolóico das partes aéreas da mesma espécie e demonstrado sua atividade moluscicida ($LD_{50} = 0,67 \text{ ppm}$) (GASPAROTTO JR. *et al.*, 2005).

Três cumarinas isoladas de *C. brasiliense* apresentaram atividade antineoplásica, inibindo o crescimento das células BMK, induzindo apoptose e necrose, e diminuindo os tumores dos animais em 83% ao final do tratamento (RUIZ-MARCIAL *et al.*, 2007).

Dez cumarinas isoladas de *C. brasiliense* foram testadas sobre as células cancerígenas de leucemia HL-60. Dentre elas as cumarinas calophyllolide, e mammea B/BB foram as mais ativas, induzindo apoptose pela ativação das vias caspase 9 e caspase 3 (ITO *et al.*, 2006).

A cumarina tricíclica 5-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metil-1-oxo-2-butenil)-10-propil-2H,8Hbenzo[1,2-b;3,4-b']dipiran-8-ona, GUT-70, foi isolada da casca do caule de *C. brasiliense* e apresentou importante atividade sobre seis linhagens celulares de câncer humano, inclusive sobre a expressão da glicoproteína P (KIMURA *et al.*, 2005).

Quatro xantonas, um derivado acetilado e duas cumarinas (mammea A/BA e mammea C/OA) foram isoladas de *C. brasiliense* e testadas sobre a enzima H^+,K^+ -ATPase isolada de estômago de cachorro, a fim de avaliar a atividade gastroprotetora. As xantonas inibiram a enzima com valores de CI_{50} variando de 47 μM à 1,6 mM. E as cumarinas apresentaram valores de CI_{50} de 110 e 638 μM (REYES-CHILPA *et al.*, 2006).

As dipiranocumarinas calanolides A e B e soulattrolídeo isoladas das folhas de *C. brasiliense* apresentaram atividade anti-HIV (HUERTA-REYES *et al.*, 2004a).

Substâncias isoladas do extrato metanólico e de frações polares e apolares de diferentes partes de *C. brasiliense* apresentaram atividade sobre bactérias Gram-negativas,

sendo elas: ácidos brasiliênsico, protocatecuico e gálico, epicatequina, friedelina e 1,5-dihidroxixantona (PRETTO *et al.*, 2004).

Os extratos etanólicos das folhas e caule de *C. brasiliense* foram capazes de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) em 33,5 e 54,9% respectivamente, à uma concentração de 0,1 mg/ml (BRAGA *et al.*, 2007b).

O extrato aquoso das folhas e o extrato clorofórmio-metanol do caule de *C. brasiliense* inibiram em 100 e 33,56% respectivamente a linhagem celular KM-12 de adenocarcinoma de cólon (SUFFREDINI *et al.*, 2007).

Os extratos metanólicos das folhas e caule de *C. brasiliense* apresentaram MC_{100} , concentração mínima para matar todas as formas epimastigotas de *T. cruzi*, no período de incubação 24 h à 26 °C, de <125 e >500 µg/ml (Abe *et al.*, 2005).

A atividade antibacteriana de extratos brutos de plantas coletadas no México foi avaliada sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *C. brasiliense* destacou-se como uma das plantas mais ativas sobre *S. aureus* (MIC variando de 2 a 32 µg/ml). No mesmo trabalho, a cumarina mammea A/BA e o triterpeno friedelina foram extraídos de suas folhas (YASUNAKA *et al.*, 2005).

Extratos orgânicos das folhas de *C. brasiliense* possibilitaram o isolamento de cumarinas do tipo mammea, sendo elas: mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/OA, C/OB, B/BA ciclo F, B/BB ciclo F e isomammeigina, assim como dos triterpenóides friedelina e canofilol, o biflavonóide amentoflavona e os ácidos protocatecuico e siquímico. As cumarinas apresentaram boa atividade citotóxica sobre as linhagens de câncer humano K562, U251, e PC3 (REYES-CHILPA *et al.*, 2004).

O extrato hexânico das folhas de *C. brasiliense* foi capaz de inibir a enzima transcriptase reversa HIV-1, apresentando CI_{50} de 29,6 µg/ml, além de inibir a replicação viral, com ED_{50} de 37,1 mg/ml (HUERTA-REYES *et al.*, 2004b).

Seis ácidos derivados de cromanona foram isolados do caule de *C. brasiliense*. Os compostos apresentaram atividade moderada à importante sobre *Bacillus cereus* e *Staphylococcus epidermidis* (COTTIGLIA *et al.*, 2004).

Três xantonas, jacareubina, 6-deoxijacareubina, e 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3-metil-2-butenil) foram isoladas da madeira do caule de *C. brasiliense* e apresentaram atividade sobre *T. cruzi*, com MC₁₀₀ variando de 50 a >300 µg/ml sobre as formas epimastigotas e 15 a >200 µg/ml sobre as formas tripomastigotas (ABE *et al.*, 2004).

Três cumarinas substituídas denominadas brasimarinas A, B e C, isoladas da casca do caule de *C. brasiliense* foram efetivas na inibição do vírus Epstein-Barr (EBV-EA) (ITO *et al.*, 2003).

Da madeira do caule de *C. brasiliense* foram obtidas quatro xantonas 6-desoxijacareubina, jacareubina, 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona) e 1,3,5,6-tetra-hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona, e um derivado acetilado. Das folhas foram obtidas duas cumarinas, mammea A/BA e mammea C/AO. Três xantonas, um flavonóide e as cumarinas demonstraram ser substratos da enzima sulfotransferase SULT1A1, envolvida no metabolismo de compostos endógenos e xenobióticos (MESÍA-VELA *et al.*, 2001).

Ainda das folhas, Silva e colaboradores, isolaram cinco compostos fenólicos, hiperina (hiperosídeo), amentoflavona, quercetina, ácidos gálico e protocatético. Alguns compostos apresentaram atividade analgésica no ensaio de formalina (da SILVA *et al.*, 2001).

Estudos conduzidos com a fração diclorometânica do extrato hexânico da casca do caule de *C. brasiliense* demonstraram atividade gastroprotetora em modelos de úlcera induzidos por etanol, indometacina e estresse por frio (SARTORI *et al.*, 1999).

Uso tradicional e popular

A infusão e o banho preparado com a casca do caule de *C. brasiliense* são utilizados para o tratamento de reumatismo, varicose, hemorróidas e úlceras crônicas (CORREA, 1978

in SARTORI *et al.*, 1999) e as folhas são utilizadas para tratar processos inflamatórios (NOLDIN *et al.*, 2006).

A infusão da casca do caule é utilizada para diarreia, herpes e reumatismo (SUFFREDINI *et al.*, 2007). Outros estudos relatam o uso da planta também para diarreia e feridas intestinais (YASUNAKA *et al.*, 2005).

Essa planta é utilizada para tratar diversas doenças incluindo bronquite, distúrbios gástricos e hepáticos (SARTORI *et al.*, 1999), dores (LEWIS 1977), inflamação, diabetes, hipertensão (DUKE & MARTINEZ 1994), diarreia (VASQUEZ 1990), herpes e reumatismo (RUTTER & SHANKS 1990) in MESÍA-VELA *et al.*, 2001.

3.1.4.6 *Renealmia alpinia* (Rottboell) Maas - Zingiberaceae

Nome comum: pacova, pacoseroca



FIGURA 25: Foto de *Renealmia alpinia* (Rottboell) Maas - Zingiberaceae com inflorescência

Fonte: http://www.acguanacaste.ac.cr/paginas_especie/plantae_online/magnoliophyta/zingiberaceae/renealmia

Atividade biológica *in vitro* e composição química

Do óleo essencial das folhas, e frutos de *R. alpinia* (Figura 25) foram identificados diversos constituintes. Nas folhas os constituintes principais foram β -cariofileno (22,9%), β -pineno (12%), espatulenol (10%), aloaromadendreno (8,3%), γ -cadineno (5,3%) e germacreno D (5,1%); no galho: aloaromadendreno (15,7%), espatulenol (12,1%), germacreno D (9,9%), β -pineno (9,5%), γ -cadineno (9,1%), epi-cubebol (5,3%) e β -cariofileno (5,1%); nos frutos: β -felandreno (60,4%) e β -pineno (19,8%) (MAIA *et al.*, 2007).

Diterpenóides labdanos isolados de *R. alpinia* apresentaram atividade sobre o fungo Sc-7 de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo eles o diterpenóide 3, com CI_{12} (concentração da amostra em $\mu\text{g/ml}$ necessária para produzir uma zona de inibição de 12 mm de diâmetro) de 150 e 200 $\mu\text{g/ml}$, nos ensaios em duplicata (YANG *et al.*, 1999); ácido 16-oxo-8(17),12(E)-labdadien-15-oic com CI_{12} de 200 $\mu\text{g/ml}$, e 8(17),12(E)-labdadien-15,16-dial com CI_{12} de 46 $\mu\text{g/ml}$. O diterpeno 11-hidroxi-8(17),12(E)-labdadien-15,-16-dial11,15-hemiacetal apresentou CI_{12} de 3 $\mu\text{g/ml}$ sobre o fungo e CI_{50} de 2,6 $\mu\text{g/ml}$ sobre linhagem de carcinoma de pulmão de Madison (M109) (ZHOU *et al.*, 1997).

O extrato etanólico do rizoma de *R. alpinia* apresentou atividade moderada na neutralização do efeito hemorrágico causado pelo veneno da cobra *Bothrops atrox*, presente no nordeste da Colômbia (OTERO *et al.*, 2000a), entretanto combateu os efeitos letais *in vivo* do veneno da mesma cobra injetados em camundongos pesando de 18 a 20 g (OTERO *et al.*, 2000b).

Uso tradicional e popular

A espécie *R. alpinia* é utilizada no tratamento de mordida de cobra (NÚÑEZ *et al.*, 2004; LANS *et al.*, 2001) e suas folhas são utilizadas como febrífugo (ZHOU *et al.*, 1997).

3.1.4.7 *Serjania lethalis* A. St. –Hil. - Sapindaceae

Nome comum: timbó, timbó do Cerrado

Atividade biológica *in vitro* e composição química

Os extratos etanólicos da madeira e casca da raiz de *S. lethalis* foram testados sobre larvas de *Aedes aegypti* e apresentaram LC₅₀ de 404,16 e 285,76 µg/ml, respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2006).

O extrato etanólico da casca da raiz de *S. lethalis* foi testado *in vitro* sobre as formas promastigotas de *L. donovani*, com CI₅₀ de 5,2 µg/ml (de MESQUITA *et al.*, 2005).

Os extratos da folha (etanol) e caule (acetato de etila, etanol e hidrometanol) de *S. lethalis* apresentaram elevada atividade sobre as cepas resistentes e suscetíveis de *Staphylococcus aureus* (de LIMA *et al.*, 2006).

O extrato etanólico do caule de *S. lethalis* inibiu quase por completo a produção de óxido nítrico pelos macrófagos J774, com inibição de 97,4% (NAPOLITANO *et al.*, 2005).

Uso tradicional e popular

Na medicina tradicional, esta planta é empregada em uso externo como agente analgésico, antiinflamatório, e piscicida (NAPOLITANO *et al.*, 2005), além de possuir ação ictiotóxica (de MESQUITA *et al.*, 2005). Suas folhas são utilizadas como piscicida e também utilizadas em preparações tópicas para tratar a dor (de PAULA & ALVES 1997; CORRÊA & PENNA 1984; BALBACH 1963 *in de* LIMA *et al.*, 2006; NAPOLITANO *et al.*, 2005).

3.1.4.8 *Cupania vernalis* Cambess. – Sapindaceae

Nome comum: camboatã-vermelho, olho de cotia, arco de peneira, arco de pipa



Foto: Sérgio Augusto de Loreto Bordignon

FIGURA 26: Foto de *Cupania vernalis* Cambess. - Sapindaceae com flores

Fonte: <http://www.ulbra.br/palinologia/colecao/imagens/cupvernaliss.jpg>

Atividade biológica e composição química

O extrato hexânico das folhas de *C. vernalis* (Figura 26) apresentou forte atividade inibitória sobre a cepa FcB1 de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina, com CI_{50} de 0,9 $\mu\text{g/ml}$, no entanto inibiu em 100% as células de mamífero L-6 utilizadas na análise da citotoxicidade, o que diminuiu seu índice de seletividade (de MESQUITA *et al.*, 2007). O mesmo extrato apresentou CI_{50} de 7,1 $\mu\text{g/ml}$ sobre as formas promastigotas de *L. donovani* (de MESQUITA *et al.*, 2005).

O extrato etanólico inibiu em 95,74% a produção de óxido nítrico pelos macrófagos J774 numa concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$, e apresentou baixa citotoxicidade sobre células de mamífero (NAPOLITANO *et al.*, 2005).

Cavalcanti e colaboradores isolaram do extrato metanólico do caule de *C. vernalis* um diterpeno glicosídico denominado vernanolídeo, assim como a cumarina escopoletina

que apresentou atividade moderada sobre *Saccharomyces cerevisiae* (CAVALCANTI *et al.*, 2001).

Uso tradicional e popular

A espécie *C. vernalis* é utilizada na medicina tradicional para combater a febre e inflamação, e ainda é utilizado como tônico (de MESQUITA *et al.*, 2005; NAPOLITANO *et al.*, 2005).

3.1.4.9 *Xylopia aromatica* Mart. – Annonaceae

Nome comum: pimenta de macaco



FIGURA 27: Foto de *Xylopia aromatica* Mart. - Annonaceae com flores

Fonte: http://lh5.ggpht.com/_jYiZmG6UEHQ/R1cNOQOIOwI/AAAAAAAAAEIQ/ecEUrmzMnRM/s720/Flores%20121.jpg

Atividade biológica e composição química

Extratos das folhas e caule de *X. aromatica* (Figura 27) foram ativos sobre diversos parasitas, com CI_{50} variando de 20,8 a >100 $\mu\text{g/ml}$ sobre *Leishmania* sp.; 26,1 a >100 $\mu\text{g/ml}$ sobre *T. cruzi*; e 10,5 a 45,3 $\mu\text{g/ml}$ sobre *P. falciparum* (OSÓRIO *et al.*, 2007).

Os extratos da madeira do caule clorofórmio:metanol 1:1 e caule, aquoso, foram ativos sobre a linhagem de sangue periférico de pacientes portadores de mieloma múltiplo (RPMI-8226), com % de inibição de 94,4 e 75,2, respectivamente (SUFFREDINI *et al.*, 2007).

Os extratos hexânicos da madeira do caule e da raiz de *X. aromatica* apresentaram forte atividade sobre *P. falciparum* com CI_{50} de 4,7 e 6,8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. No entanto, o primeiro demonstrou baixa seletividade sendo citotóxico para as células L-6 e MRC-5 (de MESQUITA *et al.*, 2007). O extrato etanólico das partes aéreas da mesma espécie também mostrou-se muito ativo sobre *P. falciparum* com $CI_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$ (GARAVITO *et al.*, 2006).

A fração metanólica do extrato etanólico dos frutos de *X. aromatica*, contendo acetogeninas, apresentou atividade sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* com LC_{50} de 143,39 $\mu\text{g/ml}$ (VERGARA *et al.*, 2006).

O extrato etanólico de *X. aromatica* apresentou CI_{50} de 384,37 $\mu\text{g/ml}$ sobre larvas de *Aedes aegypti* (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Da casca do caule de *X. aromatica* foram extraídas as acetogeninas, 2,4-*cis*-venezinonas e 2,4-*trans*-venezinonas com atividade sobre seis linhagens de câncer humano (COLMAN-SAZARBITORIA *et al.*, 1996); asimicina, venezenina, (COLMAN-SAZARBITORIA *et al.*, 1995), xilopianina, xilopiacina, xilomaticina, (COLMAN-SAZARBITORIA *et al.*, 1994a), xilopieno, e xilomatenina ativas sobre larvas de *Artemia salina*, e sobre as linhagens celulares de câncer A-549 (pulmão), MCF-7 (mama) e HT-29 (cólon) (COLMAN-SAZARBITORIA *et al.*, 1994b; FOURNIER *et al.*, 1994).

Composição química

Do óleo essencial das folhas de *X. aromatica* foram extraídos biciclogermacreno (36,5%), espatulenol (20,5%) e limoneno (4,6%) (MAIA *et al.*, 2005); α -felandreno, α -mirceno, *p*-menta-1(7),8-dieno, e *p*-cimeno (STASHENKO *et al.*, 2004), além de α e β -pineno, limoneno e os sesquiterpenos biciclogermacreno e espatulenol (64,4%) (LAGO *et al.*, 2003; PINO, 2000).

Do caule de *X. aromatica* isolou-se o ácido 16-hidroxikauranóico (de MELO *et al.*, 2001); da casca do caule dois dímeros labdanos, seus ésteres metílicos, assim como o ácido *ent*-labda-8(17),13(16),14-trien-18-óico, sitosterol e estigmasterol (MARTINS *et al.*, 1999); e acetogeninas como aromina e aromicina (ALFONSO *et al.*, 1996); das folhas um dímero do tipo guaiane (MARTINS *et al.*, 1998).

Uso tradicional e popular

Na Colômbia, essa planta é utilizada no tratamento da malária (BLAIR *et al.*, 1991 *in* OSÓRIO *et al.*, 2007).

Suas sementes e a casca do caule possuem propriedades carminativa, estimulante, e afrodisíaca (SUFFREDINI *et al.*, 2007).

3.1.4.10 *Casearia sylvestris* var. *lingua* (Cambess.) Eichler. – Flacourtiaceae

Nome comum: gonçalinho

Características botânicas

Arbusto de até 3 metros de altura, com folhas de 3 a 5 cm, alternas, coriáceas, com pecíolos curtos. Flores axilares, minúsculas em fascículos axilares, de cor bege. Fruto globoso, vermelho e negro na maturação.



FIGURA 28: Foto de *Casearia sylvestris* var. *lingua* (Cambess.) Eichler. - Flacourtiaceae

Fonte: <http://www.unb.br/fs/farmacognosia>

Atividade biológica e composição química

Os extratos hexânicos das folhas, casca e madeira do caule e da raiz de *C. sylvestris* var. *lingua* (Figura 28) foram testados sobre a cepa FcB1 de *P. falciparum* e apresentaram CI_{50} variando de 0,9 a 2,3 $\mu\text{g/ml}$. No entanto, esses extratos demonstraram alta toxicidade sobre células de mamíferos, o que diminuiu o índice de seletividade (de MESQUITA *et al.*, 2007). Em outro estudo, esses extratos apresentaram CI_{50} variando de 0,3 a 5,6 $\mu\text{g/ml}$ sobre amastigotas de *T. cruzi* e 0,1 a 11,4 $\mu\text{g/ml}$ sobre promastigotas de *L. donovani* (de MESQUITA *et al.*, 2005).

À uma concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$, extratos hexânicos da casca da raiz e madeira do caule inibiram a produção de óxido nítrico em quase 100%, no entanto apresentaram toxicidade elevada sobre células de mamíferos J774 (NAPOLITANO *et al.*, 2005).

De um estudo realizado com 190 extratos de 27 espécies do Cerrado, 14 extratos se destacaram por possuírem alta atividade sobre larvas de *Aedes aegypti*, dentre eles o extrato de *C. sylvestris* var. *lingua* provocando mais de 65% de mortalidade das larvas em uma concentração de 232,4 $\mu\text{g/ml}$ (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Do extrato hexânico da casca da raiz de *C. sylvestris* var. *lingua* isolou-se um diterpeno denominado diterpeno 1 (rel-(2S,5R,6R,8S,9S,10R,18S,19R)-19-acetoxy-18,19-epoxy-6-hydroxy-18-butanoyloxy-2-(2-methylbutanoyloxy)cleroda-3,13(16),14-triene), que apresentou atividade anti-*T. cruzi* pronunciada com concentração inibitória mínima (MIC) de 0,59 $\mu\text{g/ml}$ (ESPINDOLA *et al.*, 2004).

Uso tradicional e popular

A espécie *C. sylvestris* é utilizada popularmente como analgésico, antiinflamatório, antibacteriano, anti-câncer (de MESQUITA *et al.*, 2005).

Tendo em vista a enorme riqueza demonstrada pelas atividades biológicas e uso tradicional e popular dessas espécies do Cerrado, o objetivo deste trabalho é buscar

substâncias de origem vegetal, a partir do banco de extratos de plantas do bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia (UnB) ativas *in vitro* sobre as células de câncer humano MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon), HL-60 (leucemia promielocítica) e SF-295 (glioblastoma), e avaliar seus mecanismos de ação.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 Material vegetal

1.1 Extratos brutos vegetais

O Laboratório de Farmacognosia da UnB possui uma extensa coleção de extratos brutos em um “Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado”, processo CGEN/MMA n. 02000.002272/2006-73. As espécies vegetais foram coletadas e identificadas juntamente com o botânico Prof. José Elias de Paula - UnB. Exsicatas foram mantidas no Herbário (UB)/UnB. Os diferentes órgãos vegetais foram separados (casca e madeira do caule e da raiz, fruto, sementes e folhas), dessecados, estabilizados e pulverizados. O pó do material vegetal foi submetido a extrações por maceração com solventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano, etanol e solução hidroalcolica. A pré-filtração com um tecido à base de fibras de viscose aderido ao recipiente onde se encontra o macerado e a filtração com papel de filtro permitiram a obtenção da solução extrativa, que foi concentrada em rotaevaporador, fornecendo os diferentes extratos brutos.

1.2 Espécies vegetais selecionadas para estudo químico

1.2.1 *Simarouba versicolor* A. St. Hil.

Simarouba versicolor, espécie arbórea pertencente à família Simaroubaceae foi coletada no bioma Cerrado, ecossistema Cerrado *sensu stricto*, nos arredores de Brasília, Distrito Federal, Brasil, em 11-09-2003. A exsicata foi depositada no Herbário sob o código J. Elias de Paula (UB) 3724.

1.2.2 *Schinus terebinthifolius* Raddi var. *radiannus* Engl.

Schinus terebinthifolius var. *radiannus*, espécie arbórea pertencente à família Anacardiaceae, foi coletada no bioma Cerrado, ecossistema Mata Ciliar, nos arredores de Brasília, Distrito Federal, Brasil, em 28-07-2006. A exsicata foi depositada no Herbário sob o código J. Elias de Paula (UB) 3753.

1.2.3 *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

Kielmeyera coriacea, espécie arbórea pertencente à família Clusiaceae, foi coletada no bioma Cerrado, ecossistema Cerrado *sensu stricto*, nos arredores de Brasília, Distrito Federal, Brasil, em 12-05-2005. A exsicata foi depositada no Herbário sob o código J. Elias de Paula (UB) 3745.

2 Métodos cromatográficos

2.1. Cromatografia de adsorção

Nas cromatografias de adsorção foi empregada gel de sílica 60 de Φ 63-200 μm e gel de sílica 60 para cromatografia “flash” de Φ μm 40-63, da marca Merck. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas. As colunas utilizadas na cromatografia de adsorção sob pressão média (cromatografia flash) foram de vidro resistente à pressão e continham bulbos no ápice, para armazenamento do solvente.

Para cromatografia de camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60 (Φ μm 2-25) sobre poliéster T-6145 da Sigma Chemical CO (com indicador de fluorescência na faixa de 254 ηm).

Os eluentes utilizados foram: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em proporções crescentes de polaridade.

A revelação das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 ηm) realizada em aparelho Spectroline modelo ENF-240 C/F e/ou por aspensão com solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) e ácido perclórico (HClO_4) em etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), seguido de aquecimento em estufa a 100 $^\circ\text{C}$ por aproximadamente 5 minutos.

2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em aparelho Waters-1525, constituído de uma bomba binária e um detector UV PDA Waters-2996 a 254 nm. As separações foram efetuadas em colunas XTerra® RP-18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) e XTerra® RP-18 (10 x 250 mm, 10 µm), mantidas num forno termostático a 35 °C. As amostras foram eluídas com hexano e acetato de etila, adotando-se fluxos de 1 mL/min (coluna analítica) e 4,72 ml/min (coluna semi-preparativa).

Os solventes empregados apresentavam grau HPLC e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Phenomenex) e degaseificados por sonicação a vácuo durante 10-15 min. As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0,45 µm (Waters).

3 Métodos espectrométricos

3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ¹³C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300 e/ou modelo Avance DRX-500, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC), ou espectrômetros Bruker, modelo AC-300 e/ou modelo Avance 400 pertencentes à Faculdade de Farmácia, Universidade de Paris V, Paris-França.

O espectrômetro Bruker Avance DRX-300, equipado com sonda de detecção inversa de 5 mm e magneto de 7,0 T, foi operado nas frequências de 300,13 e 75,47 MHz

para hidrogênio e carbono, respectivamente. Nos experimentos realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram aplicadas frequências de 500,13 MHz (^1H) e 125,75 MHz (^{13}C), sob um campo magnético de 11,7 T. O tipo de sonda variou conforme o tipo de técnica: 1- sonda dual de 5 mm com detecção direta (experimentos unidimensionais), 2- sonda multinuclear de 5 mm com detecção inversa (experimentos bidimensionais).

As amostras foram dissolvidas em alíquotas de 0,6 ml de solvente deuterado clorofórmio (CDCl_3), comercializado pelas companhias ACROS, Cambridge Isotope Laboratories, Merck ou Aldrich.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de prótio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (δ 7,27), metanol (δ 3,31), piridina (δ 8,74; 7,58; 7,22) e acetona (δ 2,05). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (δ 77,23), metanol (δ 49,17), piridina (δ 150,35; 135,91; 123,87) e acetona (δ 206,68 e 29,92).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (tripleto), q (quarteto), m (multiplete).

Nos experimentos unidimensionais de ^1H e de ^{13}C foram estabelecidos os seguintes valores para os parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 24 e 260 ppm, tempo de relaxação de 1 segundo e largura de pulso de 90° de 9,60 μs (0 dB) e 10,90 μs (-3 dB) para ^1H e ^{13}C , respectivamente. Para todos os experimentos unidimensionais foram utilizados 65356 pontos para a aquisição e 32768 para o processamento, enquanto para os experimentos bidimensionais foram utilizados 2048 x 256 pontos para a matriz de dados de aquisição e 2048 x 1024 pontos para o processamento. Predição linear para o processamento 2D, utilizando 80 coeficientes, foi usada quando

necessária. O número de transientes variou de 8, para ^1H , a 16384, para ^{13}C , para os experimentos unidimensionais, e 2^n ($n \geq 2$) para bidimensionais, dependendo do experimento e quantidade de amostra disponível.

Os microprogramas utilizados para a aquisição dos dados foram: ^1H (zg), ^{13}C -CPD (zgp), ^{13}C -DEPT135 (dept135), gs-COSY (cosygp), gs-NOESY (noesygp), gs-HSQC (hsqcgpph) e gs-HMBC (hmbclpndqf).

A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulos de nutação de 135° , CH e CH_3 com amplitudes em oposição aos CH_2 , e 90° , somente CH, foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C , descrito segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico ou metilidênico) e CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135 do espectro BB.

Os experimentos bidimensionais de correlação homonuclear (COSY e NOESY) e heteronuclear (HMQC, HSQC e HMBC), realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram efetuados em sonda multinuclear de 5 mm, com detecção inversa, empregando-se gradiente de campo, posicionado no eixo z e magnitude de 10 A. Os valores de J utilizados para os experimentos pertinentes foram $^1J_{\text{H,C}} = 145$, $^nJ_{\text{H,C}} = 7$, onde $n \geq 2$.

3.2. Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massa de baixa resolução das substâncias isoladas, foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV em espectrômetro de massas SHIMADZU, modelo QP 5000, DI-50 (DQOI/UFC).

3.3. Acetilação

A acetilação é uma reação utilizada para amostras com hidroxilas, com o objetivo de tornar a amostra menos polar, pois troca a hidroxila por acetil, e para quantificar o número de hidroxilas do composto em questão.

3.3.1 Procedimento Experimental

10,0 mg das frações foram dissolvidas em 1,0 mL de piridina e 2,0 mL de anidrido acético, a mistura foi transferida para um balão e mantida sob agitação por 2 h. Foi adicionado 30 mL de solução de sulfato de cobre (1M) à mistura reacional, que foi posteriormente particionada com clorofórmio. A fração clorofórmica resultante foi analisada por RMN de ^1H e ^{13}C .

4 Isolamento dos constituintes químicos de *Simarouba versicolor*

4.1 Obtenção do extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor*

A casca da raiz dessecada, estabilizada e pulverizada (425,34 g) de *S. versicolor* foi submetida a extrações sucessivas com hexano por um processo de maceração. O extrato bruto foi obtido após a evaporação do solvente, sob pressão reduzida, à 40 °C, em um rotaevaporador.

4.2 Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor*

Uma alíquota desse extrato foi submetido a uma coluna filtrante em sílica gel (24,48 g), com hexano, seguido de clorofórmio, acetato de etila e metanol. Os grupos obtidos foram testados, sobre as células cancerígenas, e tiveram suas CI_{50} calculadas.

O grupo considerado ativo foi recromatografado em coluna aberta de sílica gel (4,10 g) com um gradiente de hexano, acetato de etila e metanol (50:50:0, 25:75:0, 0:100:0, 0:0:100).

Os subgrupos ativos foram reunidos (200 mg) por apresentarem o mesmo perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada (CCD) e foram submetidos a uma nova coluna aberta de sílica gel (5,5 g) com um gradiente de hexano, acetato de etila e metanol (50:50:0, 25:75:0, 20:80:0, 0:100:0, 0:0:100). Destes, alguns subgrupos foram recromatografados (70 mg) em sílica gel (4 g) com um gradiente de hexano, acetato de etila e metanol (60:40:0, 58:42:0, 100:90:0, 25:75:0, 10:90:0, 0:90:10).

4.3 Isolamento de SV-1 do extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor* (EHCRSV)

O subgrupo 4 (42,7 mg) foi submetido a ensaios de cristalização com ciclohexano/diclorometano por uma vez e ciclohexano/acetato de etila por 9 vezes, a fim de obter-se o produto mais polar isolado. Uma dessas frações, oriunda dos ensaios de

cristalização, foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa. O eluente utilizado para a primeira eluição foi ciclohexano/acetato de etila 50:50, em seguida a placa foi eluída uma segunda e terceira vez com ciclohexano/acetato de etila 60:40.

Após o tratamento da placa de cromatografia delgada preparativa de sílica, que consiste na raspagem da placa para a obtenção do produto de interesse, o produto foi submetido a análises de uma e duas dimensões em ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa.

5 Isolamento dos constituintes químicos de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*

5.1 Obtenção do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*

As folhas dessecadas, estabilizadas e pulverizadas (1, 970 g) de *S. terebinthifolius* var. *radiannus* foram submetidas a extrações sucessivas com diclorometano por um processo de maceração. O extrato bruto foi obtido após a evaporação do solvente, sob pressão reduzida, a 40 °C, em um rotaevaporador.

5.2 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

Uma alíquota desse extrato (20 g) foi fracionado em coluna aberta de sílica gel à média pressão (MPLC), e eluído em um gradiente de ciclohexano, acetato de etila e metanol (95:5:0, 90:10:0, 85:15:0, 80:20:0, 75:25:0, 70:30:0, 65:35:0, 60:40:0, 55:45:0, 50:50:0, 45:55:0, 40:60:0, 35:65:0, 30:70:0, 25:75:0, 20:80:0, 15:85:0, 10:90:0, 5:95:0, 0:100:0, 0:99:1, 0:98:2, 0:97:3, 0:95:5, 0:90:10, 0:80:20, 0:70:30, 0:50:50, 0:0:100) que gerou as frações, reunidas em grupos com base nos perfis obtidos em CCD.

5.2.1 Isolamento de ST-1 do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

De um dos grupos (414,9 mg) obteve-se uma amostra (ST-1), que foi submetida a análises de uma e duas dimensões em ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa.

5.2.2 Isolamento de ST-2 e ST-3 do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

Outro grupo (2,01 g) foi recromatografado em sílica gel (16,6 g) com um gradiente de ciclohexano, acetato de etila, éter de petróleo, e metanol (10:1:1:0, 10:25:3:0, 10:50:3:0,

0:0:0:100), gerando os subgrupos que possibilitaram a obtenção das amostras (ST-2 e ST-3).

5.2.3 Isolamento de ST-4 do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

Novamente, outro grupo (176,6 mg) foi recromatografado em coluna aberta de sílica gel (6 g) com um gradiente de ciclohexano, acetato de etila, éter de petróleo e metanol (10:1:1:0, 10:2:1:0, 10:25:3:0, 10:50:3:0, 0:100:0:0, 0:0:0:100), gerando o sub-grupo que possibilitou a obtenção da amostra (ST-4).

5.2.4 Isolamento de ST-5 e ST-6 do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

Um outro grupo (177,2 mg) foi recromatografado em coluna aberta de sílica gel (9,0 g) com um gradiente de ciclohexano e acetato de etila (90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 50:50, 25:75), gerando os subgrupos que possibilitaram a obtenção das amostras (ST-5 e ST-6), que foram submetidas a análises de uma e duas dimensões em ressonância nuclear magnética e espectrometria de massa.

5.2.5 Isolamento de ST-7 do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

E por último, um outro grupo (231,7 mg) foi recromatografado em coluna aberta de sílica gel (7 g) com um gradiente de ciclohexano, acetato de etila, ácido acético e metanol (20:80:1:0, 15:85:1:0, 10:90:1:0, 0:100:1:0, 0:0:0:100), gerando o sub-grupo que possibilitou a obtenção da amostra (ST-7).

6 Isolamento dos constituintes químicos de *Kielmeyera coriacea*

6.1 Obtenção do extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea*

A casca da raiz dessecada, estabilizada e pulverizada (340 g) de *K. coriacea* foi submetida a extrações sucessivas com hexano por um processo de maceração. O extrato bruto foi obtido após a evaporação do solvente, sob pressão reduzida, a 40 °C, em um rotaevaporador.

6.2 Fracionamento biomonitorado do extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea* (EHCRKC)

Uma alíquota desse extrato foi fracionado em coluna aberta de sílica gel (120 g), e eluído em um gradiente de ciclohexano e acetato de etila (100:0, 98:2, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 40:60, 20:80, 10:90, 0:100) que gerou as frações, reunidas em grupos com base nos perfis obtidos em cromatografia em camada delgada (CCD). Os grupos foram testados, e um grupo considerado ativo foi recromatografado em coluna aberta de sílica gel (70,2 g) com um gradiente de hexano, diclorometano e metanol (100:0:0, 50:50:0, 0:100:0, 0:50:50, 0:0:100), gerando os subgrupos.

6.2.1 Isolamento de KC-1 do extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea* (EHCRKC)

O subgrupo 6 foi cromatografado em coluna aberta de sílica gel (65,86 g) com um gradiente de hexano, clorofórmio e metanol (75:25:0, 0:100:0, 0:0:100), possibilitando a obtenção de uma amostra relativamente pura em cromatografia em camada delgada, e considerada ativa nos ensaios com as células de câncer.

Essa amostra foi analisada utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando fase estacionária de sílica e as misturas de solvente hexano/acetato de etila (1:1/v:v), com detecção em arranjo de fotodiodos, gerando diferentes picos. Em seguida, a mesma amostra foi submetida à uma reação de acetilação.

7 Linhagens celulares e manutenção das células

As linhagens celulares cancerígenas utilizadas neste trabalho, MDA-MB-435 (melanoma - humana), HCT-8 (cólon - humana), HL-60 (leucemia promielocítica - humana), SF-295 (glioblastoma - SNC – humana), foram cedidas pelo National Cancer Institute (Bethesda, MD, EUA). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, e mantidas em estufa à 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

8 Estudo da atividade citotóxica dos extratos brutos e substâncias isoladas

8.1 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais *in vitro*

A citotoxicidade foi obtida através do método do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5- difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) (MOSMANN, 1983) utilizando as linhagens: HL-60, MDA-MB-435, HCT-8 e SF-295. O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT (amarelo) para formazan (púrpura), pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas (Figura 29).

8.1.1 Procedimento Experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de 10⁵ células/poço para células aderentes e 0,5 x 10⁵ células/poço para células suspensas em 100 µl de meio de cultura. Após 24 h, os extratos a uma concentração única de 50 µg/ml, ou as substâncias isoladas a uma concentração decrescente de 25 a 0,02 µg/ml foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), e adicionados nas cavidades com o auxílio do equipamento HTS - high-throughput screening (biomek 3000 - Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Califórnia, EUA), e incubados por 72 h. A doxorubicina (Sigma-Aldrich Co. - St. Louis, MO/USA) foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,3 µg/ml. Ao término do período de incubação, as placas foram centrifugadas, e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 µl da solução

de MTT à 10% em meio de cultura, e as placas foram reincubadas por 3 h. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas à 30 g/10 min, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensão em 150 μ l de DMSO. Para a quantificação do sal MTT reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, EUA), no comprimento de onda de 550 nm (Figura 29). Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

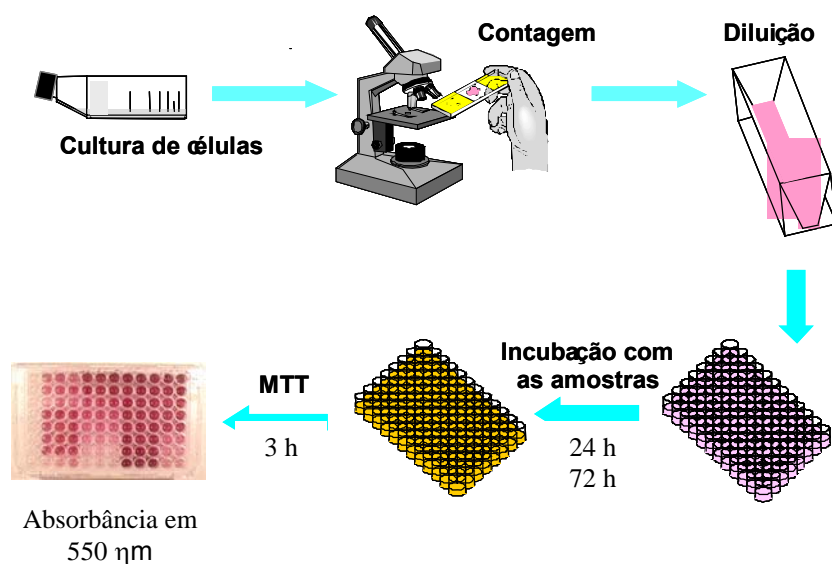


FIGURA 29 - Metodologia experimento citotoxicidade *in vitro* - MTT

8.1.2 Análise dos dados

Os extratos e as substâncias isoladas foram testados em duplicata, ou em diluição seriada, respectivamente. Para a triagem inicial com os extratos, o percentual de inibição da proliferação tumoral foi determinado considerando o controle negativo como 100% de proliferação. Aqueles extratos que causaram inibição maior que 85% nas linhagens testadas foram submetidos aos ensaios de determinação da concentração que causa 50% de inibição da proliferação (CI_{50}).

A porcentagem de inibição x log da concentração foi registrada e suas CI_{50} e respectivos intervalos de confiança (IC 95%) determinados a partir de regressão não-linear

utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

9 Estudo do mecanismo de ação das substâncias isoladas em células leucêmicas

Experimentos foram realizados para o entendimento dos possíveis mecanismos envolvidos na atividade citotóxica de substâncias isoladas sobre células HL-60. O ensaio de exclusão por azul de tripan foi realizado antes de cada experimento a fim de se avaliar a viabilidade celular. A doxorrubicina, a uma concentração de $0,3 \mu\text{g/ml}$, foi utilizada como controle positivo.

9.1 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripan

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível dessa maneira observar uma coloração azulada nas células mortas (Figura 30).

9.1.1 Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60, na concentração de 3×10^5 células/ml, foram incubadas por 24 h com as substâncias de origem vegetal isoladas em uma concentração de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ e examinadas ao microscópio de inversão. Foi retirado 90 μl da suspensão de células e adicionado a 10 μl do azul de tripan. As células viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer (Figura 30). A doxorrubicina, a uma concentração de $0,3 \mu\text{g/ml}$ foi usada como controle positivo, como descrito em VERAS *et al.*, 2004.

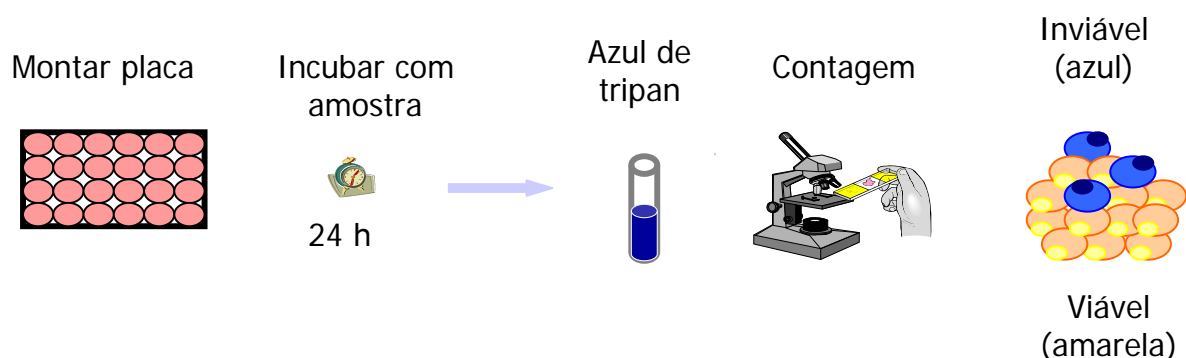


FIGURA 30 - Metodologia experimento exclusão por Azul de Tripán

9.1.2 Análise dos dados

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

9.2 Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina

A coloração utilizada nesse experimento permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea (Figura 31).

9.2.1 Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60, foram distribuídas em placas de 96 cavidades na concentração de 3×10^5 células/ml, incubadas por 24 h com as substâncias de origem vegetal isoladas e examinadas ao microscópio de inversão. As concentrações utilizadas, 5 e

10 $\mu\text{g/ml}$, foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada na curva de crescimento para esta mesma linhagem celular. Para observar a morfologia, 50 μl da suspensão de células tratadas e não-tratadas foram adicionados à centrífuga de lâmina (cytospin). Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com metanol por 1 minuto e a coloração primeiramente utilizada foi a hematoxilina, seguida pela eosina (Figura 31). A doxorubicina, a uma concentração de 0,3 $\mu\text{g/ml}$, foi usada como controle positivo, como descrito em VERAS *et al.*, 2004.

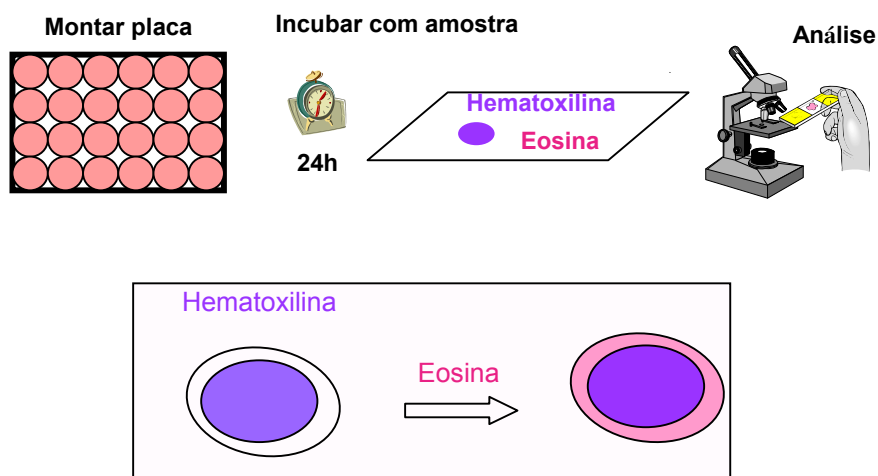


FIGURA 31 - Metodologia experimento coloração diferencial por hematoxilina/eosina

9.2.2 Análise dos dados

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

9.3 Análise morfológica – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA)

O método de coloração pelo brometo de etídio/laranja de acridina (MCGAHON *et al.*, 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose, através da coloração diferencial por fluorescência. Este método baseia-se na revelação das células controle e tratadas com a coloração por brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA) no núcleo. O corante laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. E o corante brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis, com instabilidade de membrana, intercalando-se ao DNA e corando-o de laranja; ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. E como o BE não atravessa a membrana íntegra, esta não é marcada ou marcada muito fracamente. As células em apoptose inicial, com a membrana ainda intacta, apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo, devido a condensação da cromatina e não são marcadas por BE; morfológicamente observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose, com lesão de membrana apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos. Possivelmente, as membranas plasmáticas permanecem intactas durante o fenômeno apoptótico, até os últimos estágios, quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos (Figura 32) (KUMMAR *et. al.*, 2005).

9.3.1 Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60 foram distribuídas em placas de 96 cavidades na concentração de 3×10^5 células/ml, e incubadas por 24 h com as substâncias de origem vegetal isoladas. As concentrações utilizadas de 5 e 10 µg/ml foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada na curva de crescimento para esta mesma linhagem celular. A suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 5 min em

baixa rotação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25 µl de solução tampão PBS. Em seguida, 1 µl da solução aquosa de brometo de etídio:laranja de acridina (BE/LA), a uma concentração de 100 µg/ml foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferida para a montagem da lâmina. A observação dos eventos celulares foi realizada em um microscópio de fluorescência (Olympus, Tokyo, Japão) (Figura 32). A doxorubicina, a uma concentração de 0,3 µg/ml foi usada como controle positivo (como descrito em GENG *et al.*, 2003).

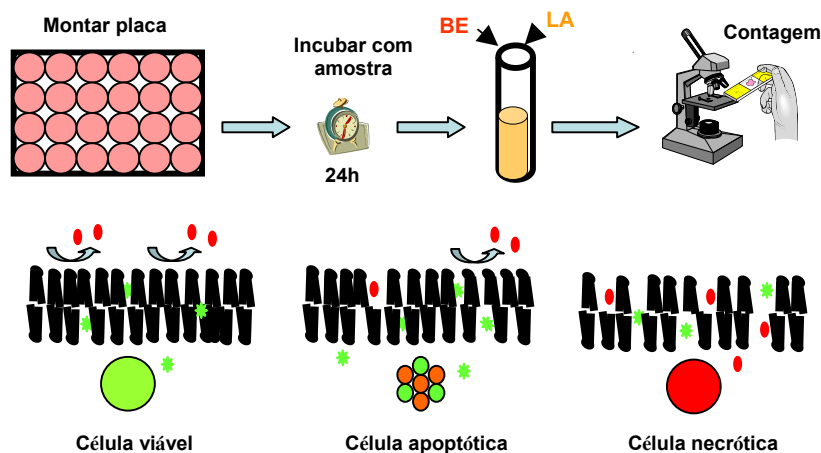


FIGURA 32 - Metodologia Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

9.3.2 Análise dos dados

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

9.4 Inibição da síntese de DNA – BrdU

A 5- bromo-2-deoxiuridina (BrdU) é uma base nitrogenada análoga à timidina que é incorporada ao DNA das células em proliferação. A detecção do BrdU é realizada por técnicas de imuno-histoquímica, onde se ligam anticorpos monoclonais e um cromógeno específico, a diaminobenzidina (DAB), que confere coloração marrom ao núcleo das células que incorporam a BrdU, ou seja as células que continuam sintetizando DNA. Este ensaio permite avaliar o efeito da substância-teste sobre a síntese de DNA (Figura 33) (VERAS *et al.*, 2004).

9.4.1 Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60 foram distribuídas em placas de 96 cavidades na concentração de 3×10^6 células/ml, e incubadas por 24 h com as substâncias de origem vegetal isoladas. As concentrações utilizadas de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada na curva de crescimento para esta mesma linhagem celular. Três horas após a adição do BrdU, na concentração de 0,01 μM na cultura de células HL-60, lâminas para cada amostra foram preparadas e colocadas para secar por 2 h. Após o período de secagem foram fixadas em metanol por 1 minuto. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos à 60 °C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuladas com caneta hidrofóbica e incubadas com anticorpo primário e deixadas na geladeira durante a noite em câmara úmida. Após este período, as células foram incubadas com anticorpo secundário biotilado por 20 minutos e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. Foi adicionado o cromógeno DAB por 1-5 minutos e, em seguida, removido com água destilada. A contracoloração das células foi realizada com hematoxilina de Hanks à 0,1%. Duzentas células foram contadas por amostra a fim de se determinar a porcentagem de células positivas (Figura 33). A doxorubicina, a uma concentração de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ foi usada como controle positivo, como descrito em VERAS *et al.*, 2004.

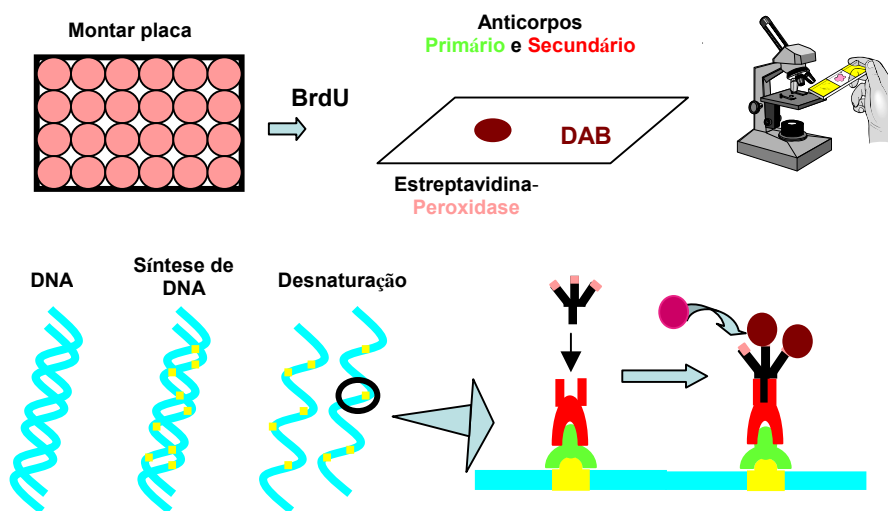


FIGURA 33 - Metodologia experimento Inibição da síntese de DNA – BrdU

9.4.2 Análise dos dados

Duzentas células foram contadas diferenciando-as entre núcleo marrom, ou seja as células que incorporaram o BrdU, e não-marrom. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

9.5 Indução de apoptose

Os ensaios de verificação da indução de apoptose foram realizados com o auxílio do citômetro de fluxo Guava® EasyCyte™ Mini System cytometer (Guava Technologies, Inc. Industrial Blvd. Hayward, CA, USA), usando o programa CytoSoft 4.1 software para a leitura e análise das amostras. A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para determinar diferentes características de partículas biológicas.

Os citômetros analisam as células ou partículas em meio líquido que passam através de uma fonte de luz. O desvio da luz, que está relacionado diretamente com a estrutura e morfologia das células e a fluorescência são determinados para cada partícula que passa pela fonte de excitação. Após a aquisição do desvio de luz e fluorescência de cada partícula,

a informação resultante pode ser analisada utilizando-se um computador com programa específico acoplado ao citômetro. A redução do tamanho das células resulta na diminuição do desvio da luz para frente (*Forward Scatter* - FSC) e a condensação nuclear causa inicialmente um aumento transitório no desvio da luz para o lado (*Side scatter* - SSC) seguido de uma diminuição da SSC durante os estágios finais da apoptose (SHAPIRO, 1995).

9.5.1 Distribuição do ciclo celular e fragmentação do DNA internucleosomal

Esse teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (PI) se ligar ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática das células é lisada para que o PI possa se ligar ao núcleo das células. Células com o núcleo íntegro emitirão alta fluorescência. Os núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menor quantidade de PI, emitindo, assim, menor fluorescência, sugerindo apoptose (Figura 34).

9.5.1.1 Procedimento Experimental

Baseando-se no procedimento de Nicolletti e colaboradores (1997), células HL-60 foram distribuídas em placas de 96 cavidades na concentração de 3×10^5 células/ml e incubadas por 24 h à 37 °C, no escuro, com uma solução de lise contendo 0,1% de triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e 50 µg/ml de iodeto de propídeo. Após 30 minutos de incubação, no escuro, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies) no filtro vermelho (Figura 34). Cinco mil eventos foram avaliados por experimento, e restos celulares foram omitidos das análises.

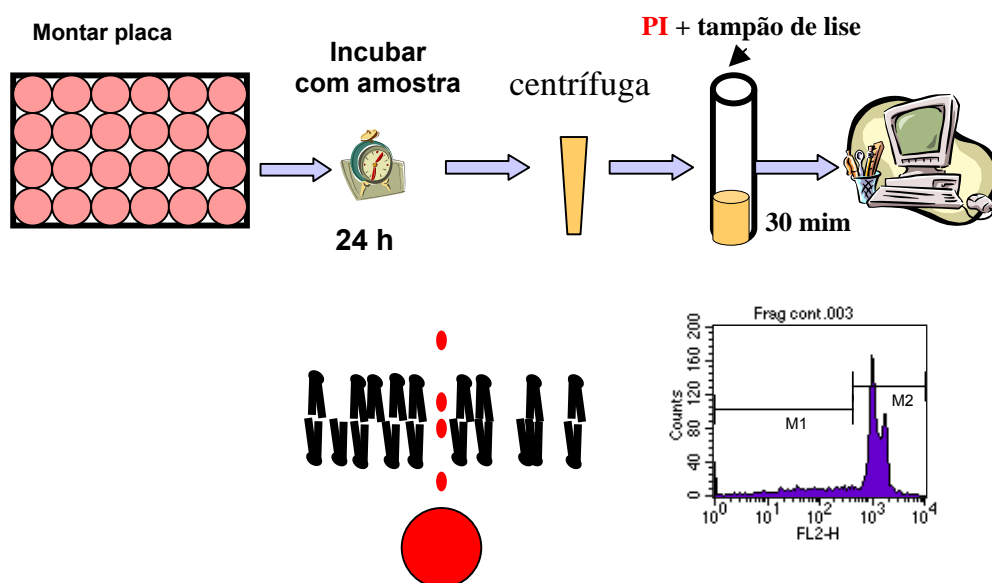


FIGURA 34 - Metodologia fragmentação do DNA internucleosomal

9.6 Viabilidade Celular - Determinação da Integridade da Membrana por citometria de fluxo

As células em apoptose mantêm suas membranas íntegras durante quase todo o processo até a sua morte, diferentemente daquelas necróticas. Este ensaio se baseia na capacidade do iodeto de propídeo (PI), hidrofílico, penetrar apenas nas células cuja membrana plasmática esteja rompida e se ligar ao DNA e assim emitir alta fluorescência vermelha somente quando excitado pelo laser de argônio (488 nm). As células cuja membrana permanece íntegra emitem menor fluorescência (Figura 35).

9.6.1 Procedimento Experimental

Uma alíquota de 100 µl de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 µl de uma solução de PI a 50 µl, diluído em tampão fosfato. Após 5 minutos, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies) (Figura 35). Foram obtidas informações sobre a morfologia celular, tais como o espalhamento frontal

– tamanho relativo entre as células - e lateral – granulosidade relativa entre as células, além da avaliação da integridade de membrana utilizando-se o filtro para o vermelho.

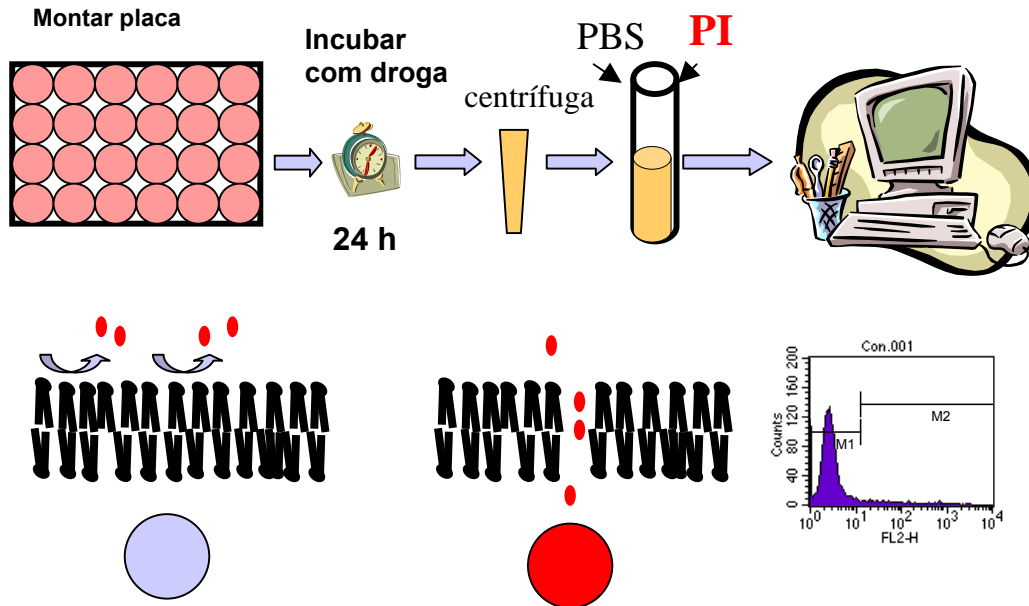


FIGURA 35 - Metodologia Determinação Integridade da Membrana por citometria de fluxo

9.7 Determinação do Potencial Transmembrânico da Mitocôndria por citometria de fluxo

A mitocôndria está envolvida em diversas vias apoptóticas intrínsecas. O citocromo C solto da membrana externa da mitocôndria irá contribuir para desdobramento de rotas apoptóticas e o espaço liberado funcionará como poro. Através destes poros formar-se-á um influxo de íons H^+ , induzindo uma alteração de seu potencial transmembrânico. A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, é seqüestrado para dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, as células viáveis emitem alta fluorescência verde devido a maior quantidade de rodamina ligada às cargas negativas internas, enquanto as mitocôndrias das células apoptóticas têm menos afinidade pelo corante, gerando eventos que emitem menor fluorescência (Figura 36).

9.7.1 Procedimento Experimental

O potencial transmembrânico da mitocôndria foi determinado pela retenção mitocondrial da rodamina 123 nas células HL-60. As células foram lavadas com o tampão PBS, incubadas com a rodamina 123, a uma concentração de 5 µg/ml à 37 °C por 15 minutos no escuro, e lavadas duas vezes. As células foram então novamente incubadas em PBS à 37 °C por 30 minutos no escuro, e a fluorescência foi então calculada por citometria de fluxo (Figura 36). Cinco mil eventos foram avaliados por experimento e os restos celulares foram omitidos das análises.

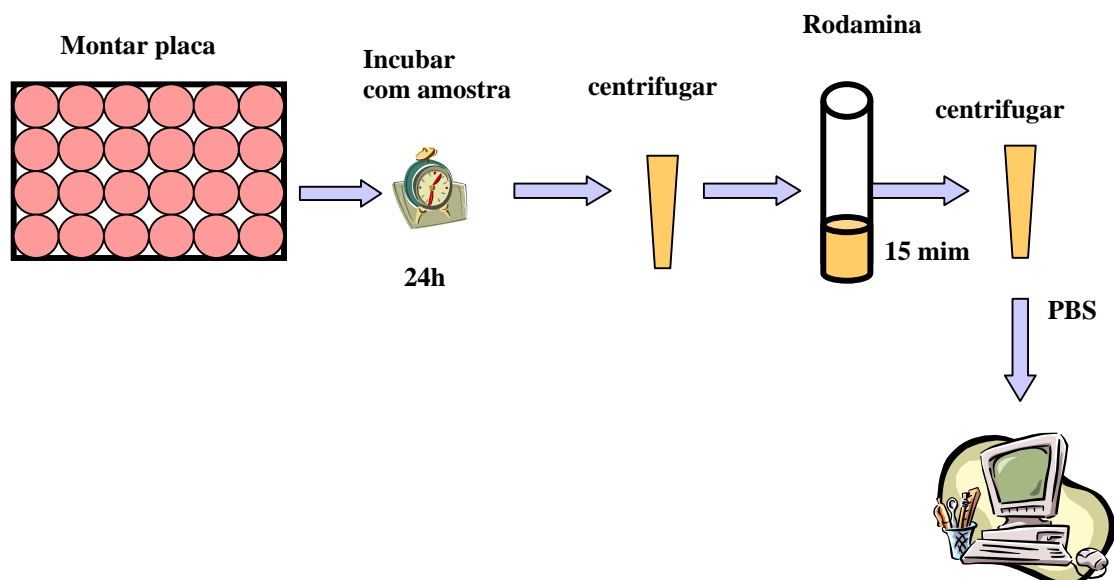


FIGURA 36 - Metodologia Determinação Potencial Transmembrânico da Mitocôndria

9.7.2 Análise dos dados obtidos no citômetro de fluxo

Todos os dados obtidos no citômetro de fluxo foram apresentados como a média e o desvio padrão da média de n experimentos e analisados pela análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), com o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

1 Extratos brutos vegetais

Foram obtidos 412 extratos brutos oriundos de espécies vegetais, pertencentes a 21 famílias (Tabela 5). Dentre esses, 195 eram hexânicos, 41 diclorometânicos, 142 etanólicos, e 34 hidroalcoólicos. Quanto aos órgãos vegetais, 98 extratos foram produzidos com as folhas, 62 com a madeira do caule, 66 com a casca do caule, 25 com o caule (madeira + casca), 49 com a madeira da raiz, 48 com a casca da raiz, 32 com a raiz (madeira + casca), 3 com os rizomas, 21 com os frutos, 6 com os frutos + sementes e 2 com os capítulos florais (Tabela 5). Dos 412 extratos testados, 28 apresentaram % de inibição > 85% nas três linhagens testadas (Tabela 6) sendo selecionados dessa forma para o cálculo da Concentração Inibitória Média (Tabela 6).

Desses, 14 apresentaram $CI_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$ em quatro linhagens celulares de câncer, sendo então selecionados para o fracionamento cromatográfico. Dentre esses, o extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor*, o extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* e o extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea*.

Foram obtidos 7,35 g do extrato hexânico da casca da raiz de *S. versicolor*, o que corresponde a um rendimento de 1,64%.

Foram obtidos 31,84 g do extrato diclorometânico das folhas de *S. terebinthifolius* var. *radiannus*, correspondendo a um rendimento de 1,61%.

Foram obtidos 28,85 g do extrato hexânico da casca da raiz de *K. coriacea*, correspondendo a um rendimento de 8,48%.

TABELA 5 – Espécies vegetais do bioma Cerrado avaliadas *in vitro* sobre as linhagens de câncer humano - MDA-MB-435, HCT-8 e SF-295

Família	Parte da planta testada	Número	do
Nome científico	(Solventes) ^k	Herbário	
Alismataceae			
<i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunth) Micheli	F ^a (h,Sh,d)	(UB)	3752
Anacardiaceae			
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi var. <i>radiannus</i> Engl.	F(h,Sh,d), MC ^b (h,Sh,d), CC ^c (h), CR ^e (h), MR ^d (h,Sh,d)	(UB)	3753
Annonaceae			
<i>Annona crassiflora</i> Mart.	F(h,e), MC(h,e), CC(h,e), MR(e), CR(e)	(UB)	3700
<i>Cardiopetalum calophyllum</i> Schldl.	F(h,e), MC(h,e), CC(h,e), MR(e), R ^f (h,e)	(UB)	3703
<i>Duguetia furfuracea</i> (A. St.-Hil.) Saff.	F(h,e), MR(h,e), CR(h,e), C ^g (h,e)	(UB)	3679
<i>Xylopia aromatica</i> Mart.	F(h,e), MC(h,e), CC(h,e), MR(h,e), CR(h,e)	(UB)	3699
<i>Xylopia emarginata</i> Mart.	F(h,e), MC(h,e), CC(h,e), MR(h,e), CR(h,e)	(UB)	3690
Apocynaceae			
<i>Aspidosperma macrocarpon</i> Mart.	F(h,e), MC(h,e), CC(h,e), MR(h,e), CR(h,e)	(UB)	3692
<i>Aspidosperma tomentosa</i> Mart.	F(h,d,Sh), MC(h,d,Sh), CC(h,d,Sh), C(h), R(h,d)	(UB)	3744
<i>Condylocarpon isthmicum</i> (Vell.) A. DC.	F(h,e), MC(h,e), CC(h,e)	(UB)	3663
<i>Hancornia pubescens</i> Nees & Mart.	F(h,e), MR(h,e), CR(h,e)	(UB)	3677
<i>Himatanthus obovatus</i> (Müll. Arg.) Woodson	F(h,e), MR(h,e), CR(h,e)	(UB)	3678

<i>Peschiera affinis</i> var. <i>campestris</i> Rizzini	MC(h,e), CC(h,e), R (h,e)	(UB) 3717
Asteraceae		
<i>Eremanthus glomerulatus</i> Less.	F(h,e), MC(h,e), CC(h,e), MR(h,e), CR(h,e)	(UB) 3721
<i>Eremanthus sphaerocephalus</i> (DC. ex Baker)	CF(h,e)	(UB) 3708
<i>Piptocarpha macropoda</i> (DC.) Baker	F(h,e), CC(h,e)	(UB) 3680
<i>Piptocarpha rotundifolia</i> Baker	F(h,e), CC(h,e), MR(h,e), CR(h,e)	(UB) 3676
Bignoniaceae		
<i>Anemopaegma arvense</i> Stellfed ex J.F.Souza	F(h,e), C(h,e), R(h,e), Fr ^h (h,e)	(UB) 3691
<i>Anemopaegma chamberlaynii</i> Bureau & K.Schum.	C(h,e)	(UB) 3715
<i>Arrabidaea florida</i> DC.	F(h,Sh,d,e), FS ⁱ (h,d), C(h,d), R(h,Sh,d)	(UB) 3714
<i>Cybistax antisiphilitica</i> (Mart.) Martius	F(h,e), C(h,e), MC(h,e), CC(h,e), Fr(h,e)	(UB) 3696
<i>Tabebuia caraiba</i> (Mart.) Bureau	F(h,e), MC(Sh,h,e,d), CC(h,e), MR(e), CR(h,e)	(UB) 3701
Burseraceae		
<i>Protium heptaphyllum</i> March.	F(h,e), MC(h,e), CC(h,e), MR(h,e), CR(h,e)	(UB) 3689
<i>Protium ovatum</i> Engl.	F(h,e), CC(h), R(h,e), C(h), Fr(h,e)	(UB) 3694
Clusiaceae		
<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.	F(h,Sh,d), MC(h,Sh,d), CC(h,Sh,d), CR(h,d), R(h,Sh,d)	(UB) 3754
<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.	F(h,d), MC(h), MR(h,d), CR(h), CC(h,Sh,d), Fr(h)	(UB) 3745
Flacourtiaceae		

<i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i> (Cambess.) Eichler.	F(h,e), MC(h), CC(h,e), MR(h,e), CR(e), Fr(h,e)	(UB) 3693
Magnoliaceae		
<i>Talauma ovata</i> A.St.-Hil.	F(h,e), CC(h,e), MC(h,e)	(UB) 3738
Malpighiaceae		
<i>Byrsonima crassa</i> Nied.	F(h,Sh,d), CC(h,Sh,d), MC(h,Sh,d), CR(h), MR(h)	(UB) 3743
Meliaceae		
<i>Guarea guidonea</i> Sleumet.	F(h,e), C(h,e), R(h,e)	(UB) 3712
<i>Guarea kunthiana</i> A.Juss.	F(h,e), Fr(h,e), C(h,d,e), R(e)	(UB) 3710
Mimosaceae		
<i>Enterolobium ellipticum</i> Benth.	F(h,Sh,d), C(h,Sh,d),MC(h), CC(h), CR(h), MR(h,Sh,d)	(UB) 3739
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	F(h,Sh,d), Fr(h), CC(h,d), MC(h,Sh,d), CR(h), MR(h)	(UB) 3740
Monimiaceae		
<i>Siparuna cujabana</i> A.DC.	F(h,e), Fr(h,e), C(h,e), R(h,e)	(UB) 3737
<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	F(h,e), CC(h,e), MC(h,e)	(UB) 3712
Rubiaceae		
<i>Palicourea rigida</i> H.B. & K.	F(h,Sh,d), C(h), CC(h), R(h)	(UB) 3722
<i>Sabicea brasiliensis</i> Wernham	Fr(h,e), R(h,e)	(UB) 3709
Sapindaceae		
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	F(h,e), MC(h,e), CC(h,e), R(e), MR(h,e), CR(h,e)	(UB) 3695

<i>Magonia pubescens</i> A.St. -Hil.	F(h,e), CC(h,e), R(h,e), Fr(h,e), CR(h,e), MR(h,e)	(UB) 3702
<i>Matayba guianensis</i> Aubl.	MC (h, e), CC (h, e), CR(h,e), MR(h,Sh,d)	(UB) 3697
<i>Serjania lethalis</i> A.St. -Hil.	F(h,e), MC(h,e), CC(h,e), CR(h,e)	(UB) 3716
Sapotaceae		
<i>Cryosophyllum soboliferum</i> Rizzini	F(h,e)	(UB) 3733
<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	F(h,e), MC(h,e), R(h,e), MR(h,e), CR(h,e)	(UB) 3672
<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.	F(h,e), MC(h,e), CC(h,e), MR(h,e), CR(h,e)	(UB) 3671
<i>Pouteria torta</i> Radlk.	F(h,e), MC(e), CR(h), MR(h,e)	(UB) 3674
Simaroubaceae		
<i>Simarouba versicolor</i> St. Hil.	F(h,e), Fr(h,e), C(e), CC(h,e), CR(h,e)	(UB) 3724
Solanaceae		
<i>Solanum licocarpum</i> A.St.-Hil.	F(h)	(UB) 3720
Vochysiaceae		
<i>Qualea grandiflora</i> Mart.	F(h,Sh,d), C(d), CC(h), MC(h,Sh,d,e), R(h,Sh,e), CR(Sh,d), FS(h,Sh,d)	(UB) 3746
<i>Qualea parviflora</i> Mart.	Fr(h), CC(h,Sh,d), MC(h), CR(h,Sh), MR(h,Sh,d), FS(h)	(UB) 3742
Zingiberaceae		
<i>Renalmia alpinia</i> (Rottboel) Maas	F(h,e), RZ ^j (h,Sh,d)	(UB) 3719

^aF: Folha; ^bMC: Madeira do caule; ^cCC: Casca do caule; ^dMR: Madeira da raiz; ^eCR: Casca da raiz; ^fR: Raiz (madeira + casca); ^gC: Caule (madeira + casca); ^hFr: Fruto; ⁱFS: Fruto+semente; ^jRZ: Rizoma; CF : Capítulo Floral ; ^kSolventes: h: hexano; Sh: sol. hidroalcolóica; d: diclorometano; e: etanol

2 Estudo da atividade citotóxica *in vitro* – teste do MTT

2.1 Atividade citotóxica dos extratos brutos e seus compostos isolados em células de linhagens tumorais

Dos 412 extratos testados (Tabela 5) sobre as células de linhagens tumorais humanas, MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon) e SF-295 (glioblastoma), 28 foram considerados ativos (inibição > 85% nas 3 linhagens testadas) na triagem utilizando o teste do MTT em concentração única de 50 µg/ml (Tabela 6). Estes foram selecionados para a determinação da CI_{50} .

Dos 28 extratos ativos pertencentes a 13 espécies de 9 famílias vegetais, selecionados para a determinação da CI_{50} (Tabela 6), 14 apresentaram $CI_{50} < 20$ µg/ml nas quatro linhagens testadas, MDA-MB-435, HCT-8, SF-295 e HL-60 (leucemia promielocítica – humana), portanto considerados muito ativos.

O extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor* com valores de CI_{50} de 1,5 µg/ml para MDA-MB-435, de 0,5 µg/ml para HCT-8, 1,1 µg/ml para HL-60; e 0,7 µg/ml para SF-295; e o extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* com valores de CI_{50} de 2,3 µg/ml para MDA-MB-435, de 4,2 µg/ml para HCT-8, 1,1 µg/ml para HL-60; e 41,8 µg/ml para SF-295 demonstraram ser bastante promissores (Tabela 6).

Além desses, o extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea*, apresentou importante atividade citotóxica sobre as células cancerígenas com valores de CI_{50} de 10,6 µg/ml sobre as células de melanoma, MDA-MB-435; 5,2 µg/ml sobre as células de câncer de cólon HCT-8; 15,4 µg/ml sobre as células leucêmicas HL-60, e 6,4 µg/ml sobre células de glioblastoma SF-295.

Dessa forma, esses extratos foram selecionados para o fracionamento cromatográfico biomonitorado. Esse critério foi escolhido, tendo em vista que o Instituto

Nacional do Câncer Americano (NCI) considera um extrato com $CI_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ interessante para o fracionamento cromatográfico.

TABELA 6 – Citotoxicidade *in vitro* (CI₅₀) dos extratos que apresentaram % inibição > 85% sobre linhagens celulares^a de câncer humano mensurada pelo teste do MTT

Família Nome científico	Parte planta	Solvente ^b	Toxicidade sobre linhagens celulares cancerígenas (CI ₅₀)- µg/ml			
			SF-295	HCT-8	MDA-MB-435	HL-60
Anacardiaceae						
<i>Schinus terebinthifolius</i>	var. F ^c	h	28,9	5,4	1,9	1,1
	<i>radiannus</i>	F	d	41,8	4,2	2,3
Annonaceae						
<i>Annona crassiflora</i>	CR ^d	e	8,2	14,9	9,5	6,0
	MR ^e	e	15,2	24,9	13,3	13,4
<i>Xylopiya aromatica</i>	MR	h	14,6	17,1	19,1	5,9
Apocynaceae						
<i>Himatanthus obovatus</i>	F	e	21,8	28,8	27,6	40,4
	MR	e	12,9	11,9	10,9	25,0
Clusiaceae						
<i>Calophyllum brasiliense</i>	R ^f	d	17,6	4,7	3,0	6,4
<i>Kielmeyera coriacea</i>	CC ^g	h	22,8	16,3	34,9	26,1
	MC ^h	h	17,3	7,8	>50	10,1
	MR	h	9,7	5,4	14,1	17,9
	CR	h	6,4	5,2	10,6	15,4
Flacourtiaceae						
<i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i>	F	h	1,7	3,2	2,1	1,4
	CC	h	0,9	0,1	1,2	1,3
	CR	e	21,9	32,7	18,0	26,2

	MR	h	1,6	1,7	1,1	3,3
	FR ⁱ	h	28,0	31,2	18,2	33,7
	MC	h	0,9	1,3	0,5	2,1
Sapindaceae						
	<i>Cupania vernalis</i>	F	8,9	14,2	4,0	6,8
	<i>Magonia pubescens</i>	MR	23,5	15,3	7,9	15,4
	<i>Serjania lethalis</i>	CC	9,4	8,0	11,2	9,3
		CR	13,6	20,9	15,4	28,9
Sapotaceae						
	<i>Pouteria torta</i>	MR	30,2	37,9	21,0	31,7
Simaroubaceae						
	<i>Simarouba versicolor</i>	CR	0,7	0,5	1,5	1,1
		CR	0,1	0,1	0,5	0,2
		FR	5,0	4,3	16,6	8,2
Zingiberaceae						
	<i>Renealmia alpinia</i>	RZ ^j	5,9	>50	26,9	-
		RZ	10,5	33,4	28,4	-

^aResultados determinados a partir de três experimentos independentes; ^bSolventes utilizados na extração: h: hexano, e: etanol; d: diclorometano; ^cF: Folha; ^dCR: Casca da raiz; ^eMR: Madeira da raiz; ^fR: raiz (madeira + casca); ^gCC: Casca do caule; ^hMC: Madeira do caule; ⁱFR: Fruto; ^jRZ: Rizoma; (-) não testado

3 Estudo químico-biológico de *Simarouba versicolor*

3.1 Fracionamento cromatográfico biomonitorado do extrato hexânico da casca da raiz de *S. versicolor* (EHCRSV)

Uma alíquota do EHCRSV (1,0 g) foi fracionado em coluna filtrante de sílica gel, que gerou 4 grupos: hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanol, denominados respectivamente grupos EHCRSV-1, EHCRSV-2, EHCRSV-3 e EHCRSV-4 (Fluxograma 1 e Tabela 7).

TABELA 7 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor* (EHCRSV)

Eluente	Frações	Grupo	Peso (mg)	Código
Hexano	1-5	1	300	EHCRSV-1
Clorofórmio	6-14	2	250	EHCRSV-2
Acetato de etila	15-17	3	263,1	EHCRSV-3
Metanol	18-19	4	152,8	EHCRSV-4
			965,9	

Os grupos EHCRSV-3 e EHCRSV-4 apresentaram baixa CI_{50} com valores de 0,22 e 1,29 $\mu\text{g/ml}$ sobre as células HL-60, 0,23 e 0,98 $\mu\text{g/ml}$ sobre SF-295, 0,24 e 0,55 $\mu\text{g/ml}$ sobre HCT-8, e 0,79 e 2,63 $\mu\text{g/ml}$ sobre MDA-MB-435, respectivamente.

O grupo EHCRSV-3 (263,1 mg) foi recromatografado em coluna aberta de sílica, gerando 10 subgrupos (EHCRSV-3,1 a EHCRSV-3,10) que foram testados sobre as células de câncer (Tabela 8), sendo os subgrupos EHCRSV-3,9 e EHCRSV-3,10 os mais ativos.

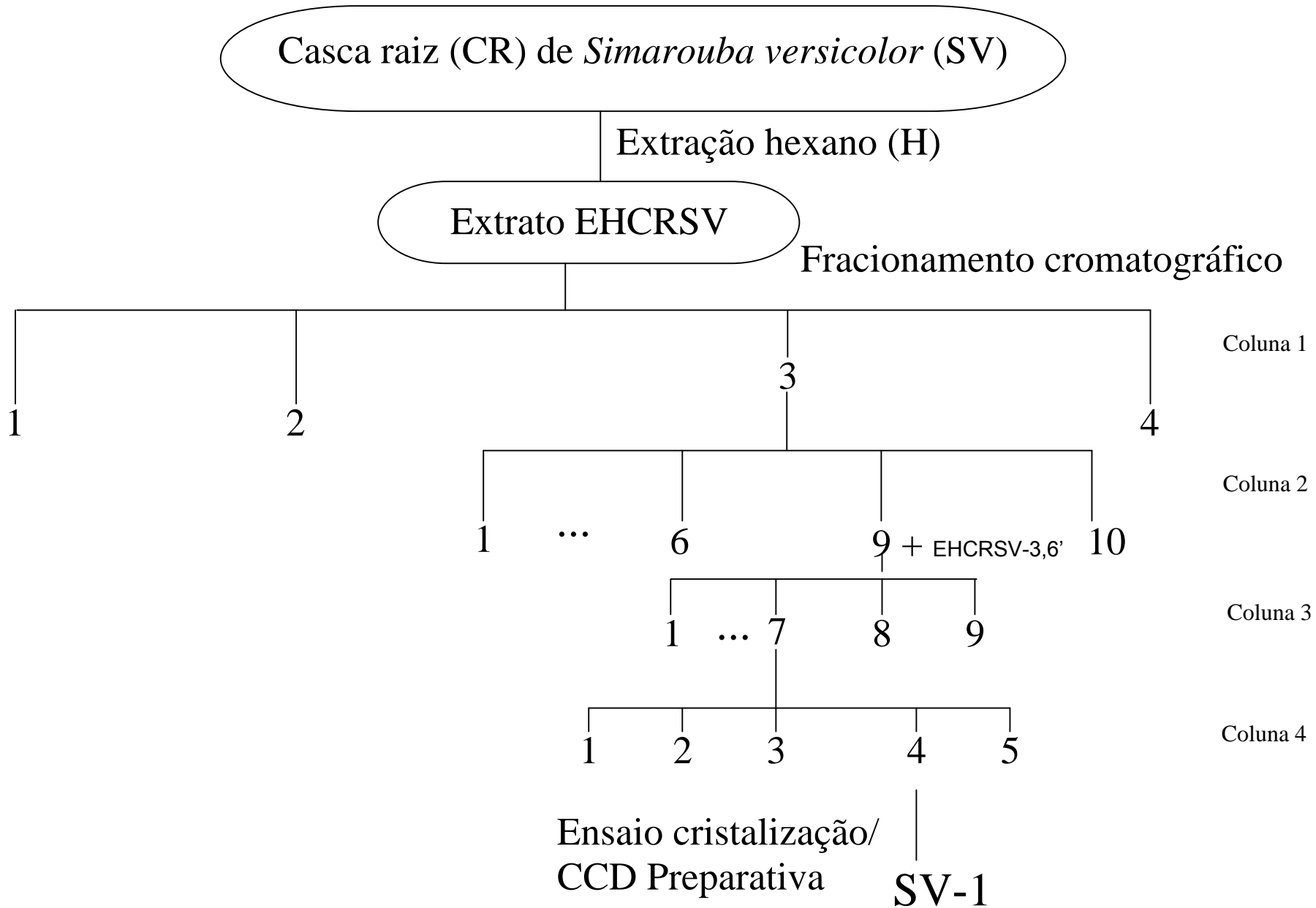
TABELA 8 - Atividade citotóxica das frações EHCRSV-3,1 a EHCRSV-3,10. Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) de dois experimentos independentes realizado em duplicata pelo método do MTT, para as células HL-60, HCT-8, SF-295 e MDA-MB-435 obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prism®.

Frações	Linhagens celulares			
	HL-60 ($\mu\text{g/ml}$)	SF-295 ($\mu\text{g/ml}$)	HCT-8 ($\mu\text{g/ml}$)	MDA-MB-435 ($\mu\text{g/ml}$)
EHCRSV-3,1	>25	>25	>25	>25
EHCRSV-3,2	>25	>25	>25	>25
EHCRSV-3,3	>25	>25	>25	>25
EHCRSV-3,4	>25	>25	>25	>25
EHCRSV-3,5	>25	>25	>25	>25
EHCRSV-3,9	0,01 0,002 – 0,59	0,06 0,03 – 0,15	0,06 0,03 – 0,13	2,38 1,09 – 5,20
EHCRSV-3,10	2,72 1,92 – 3,85	2,26 1,38 – 3,69	3,02 1,55 – 6,07	8,91 6,97 – 11,39

Uma nova coluna filtrante do extrato bruto foi realizada para a obtenção de uma quantidade maior do grupo acetato de etila, EHCRSV-3. Esse foi recromatografado (645 mg) em coluna aberta de sílica gel, gerando 8 subgrupos, denominados EHCRSV-3,1' a EHCRSV-3,8'.

Os subgrupos EHCRSV-3,9 e EHCRSV-3,6' (200 mg) por possuírem o mesmo perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada (CCD) foram reunidos e submetidos a uma nova coluna aberta de sílica gel, gerando 9 subgrupos. Desses, o subgrupo 7 foi recromatografado (70 mg) em coluna aberta de sílica gel, gerando 5 subgrupos (Fluxograma 1).

Fluxograma 1- Isolamento de SV-1



3.2 Isolamento de SV-1 do extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor* (EHCRSV)

O subgrupo 4 (42,7 mg) foi submetido a ensaios de cristalização, a fim de obter-se o produto mais polar isolado. A última fração oriunda desses ensaios de cristalização quando submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa, e após tratamento da placa permitiu a obtenção do produto mais polar puro (SV-1).

3.3 Determinação estrutural de SV-1, isolado de *Simarouba versicolor*

O composto isolado (SV-1) foi submetido a experimentos de ressonância magnética nuclear de uma e duas dimensões, tais como ^1H (Figura 37), ^{13}C (Figura 38), Dept-135 (Figura 39), Cosy (Figura 40), HSQC (Figura 41) e HMBC (Figura 42).

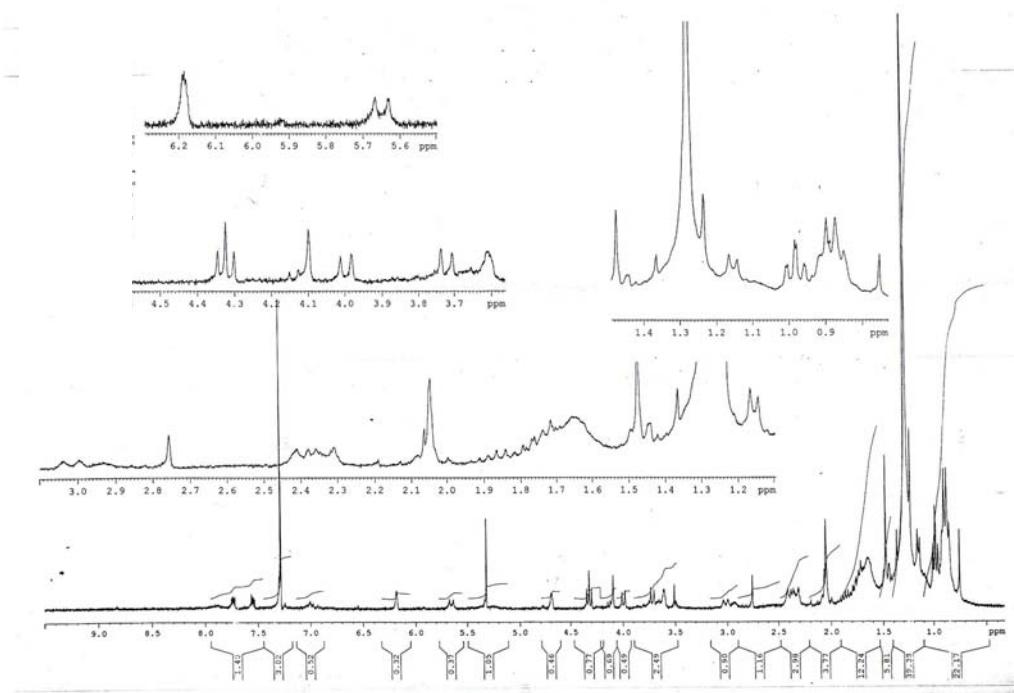


FIGURA 37 - Espectro de RMN ^1H de SV-1 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

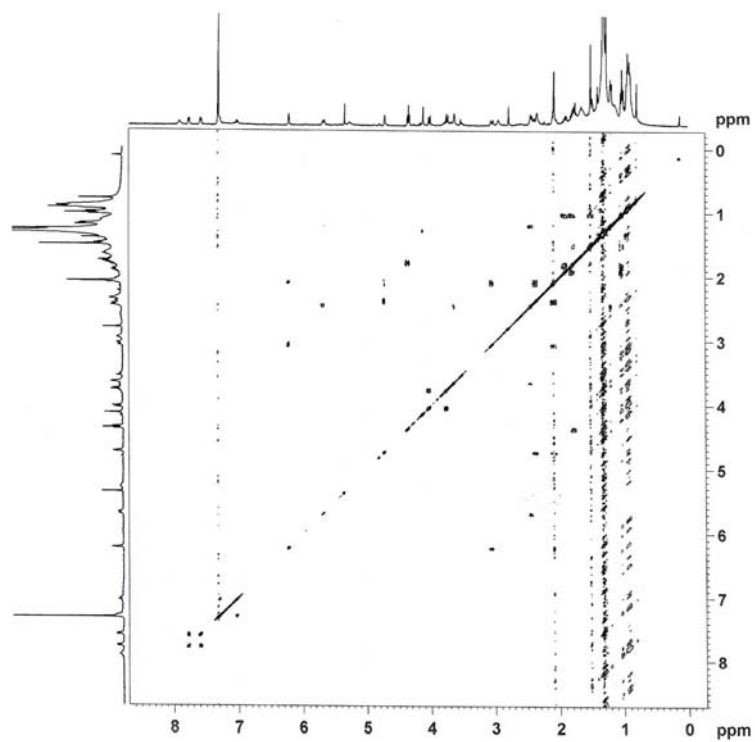


FIGURA 40 - Diagrama de contorno do espectro COSY de SV-1

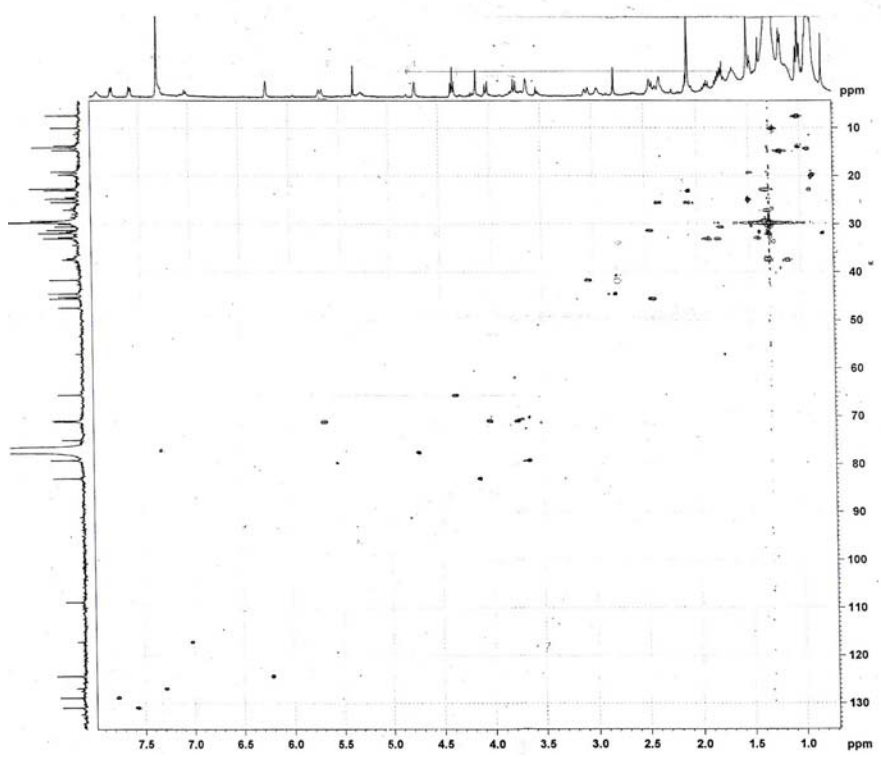


FIGURA 41 - Diagrama de contorno do espectro HSQC de SV-1

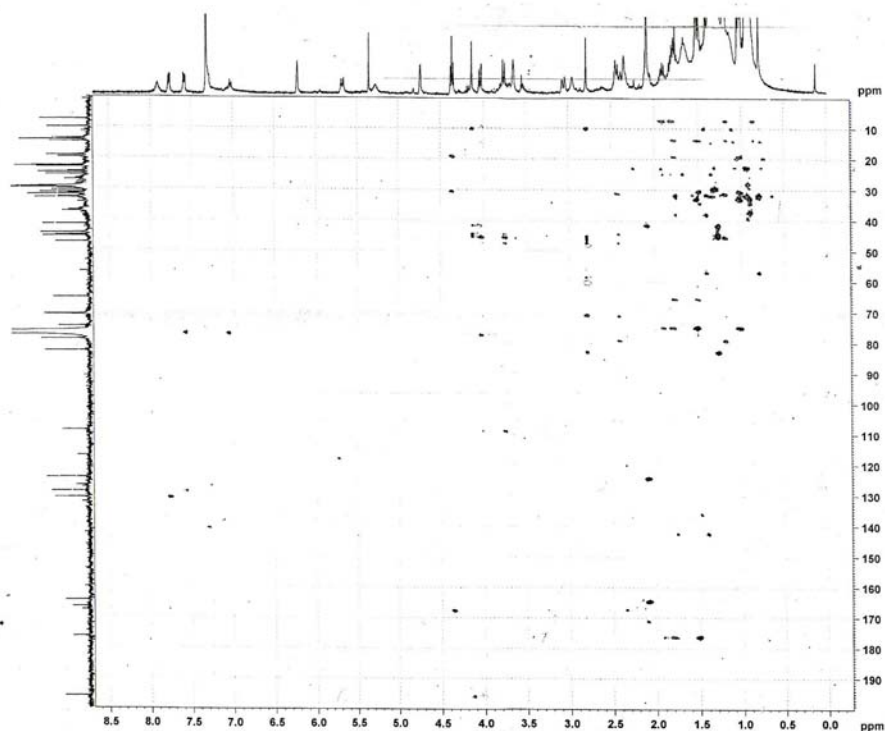


FIGURA 42 - Diagrama de contorno do espectro HMBC de SV-1

A análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear bidimensional de correlações heteronucleares, HSQC de SV-1 (Figura 41), possibilitou relacionar os carbonos observados no espectro de RMN¹³C-BB (Figura 38) com seus respectivos hidrogênios, que juntamente com o espectro bidimensional HMBC (Figura 42), permitiu a identificação da vizinhança de cada carbono analisado, resultando na elaboração da Tabela 9.

TABELA 9 - Dados de RMN¹³C e RMN¹H para SV-1

	HSQC		HMBC	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
C				
2	195.87	-	H-1	
4	164.54	-	3H-29	
8	47.44	-	H-9; 2H-30	
10	45.23	-	H-1; H-9; 3H-19	
11	108.84	-		
16		-		
1'	176.34	-		2H-2'; 3H-5'
2'	74.99	-	2H-3'; 3H-5'	3H-4'
CH				
1	82.97	4.15 (s)		H-9; 3H-19
3	124.38	6.23 (sl)		3H-29
5	41.67	3.10 (dl)		H-1; 3H-19; 3H-29
7	77.52	4.70 (m)		H-30a
9	44.50	3.76 (s)		H-1; 3H-19
12	79.19	3.60 (m)	3H-18	
13	31.90	2.43 (m)		
14	45.54	2.41 (m)		H-9; 3H-18; 2H-30
15	71.19	5.65 (d)		
CH₂				
6	25.46	2.36, 2.12		
30	70.95	4.00 (d), 3.80 (d)		H-9
3'	33.00	1.75, 1.70		
CH₃				
18	14.72	1.14 (d)		
19	10.08	1.22 (s)		H-1; H-9
29	23.01	2.10 (sl)		
4'	7.52	0.97 (t)	2H-3'	
5'	24.78	1.46 (s)		

Com base nas análises dos dados obtidos de Ressonância Nuclear Magnética e Espectrometria de Massa (dado não apresentado) e comparação com dados encontrados na literatura (GRIECO *et al.*, 1993; POLONSKY *et al.*, 1975) a substância SV-1 mostrou se tratar da glaucarubinona (Figura 43).

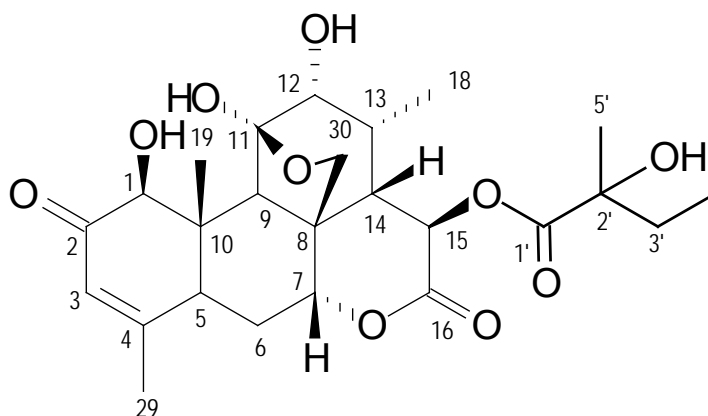


FIGURA 43 – SV-1: Glaucarubinona isolada de *Simarouba versicolor*

3.4 Atividade citotóxica de glaucarubinona em células de linhagens tumorais

O ensaio de atividade da glaucarubinona sobre as quatro linhagens de câncer humano utilizando-se o ensaio do MTT mostrou que essa substância inibe significativamente o crescimento celular. A substância apresentou CI_{50} de 0,07 (HL-60), 0,15 (HCT-8), 0,24 (SF-295) e 0,31 (MDA-MB-435) $\mu\text{g/mL}$, resultados comparáveis aos do controle positivo (doxorubicina), que apresentou CI_{50} de 0,02 (HL-60), 0,01 (HCT-8), 0,24 (SF-295) e 0,48 (MDA-MB-435) $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 12).

4 Estudo químico biológico de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*

4.1 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

Uma alíquota do EDFST (20 g) foi fracionado em coluna aberta de sílica gel à média pressão (MPLC), gerando 88 frações, reunidas em 33 grupos denominados EDFST-1 a EDFST-33 (Tabela 10).

TABELA 10 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST) em coluna de sílica (MPLC)

Eluente	Frações	Grupo	Peso (mg)	Código
C 100%, C/A 5%	1	1	165,0	EDFST-1
C/A 10%, 15%, 20%	2-6	2	30,6	EDFST-2
C/A 20%	7-10	3	1273,0	EDFST-3
C/A 25%	11	4	102,8	EDFST-4
C/A 30%	12	5	414,9	EDFST-5
C/A 30%	13	6	1752,0	EDFST-6
C/A 30%	14-15	7	2013,0	EDFST-7
C/A 30%	16	8	428,9	EDFST-8
C/A 30%, C/A 35%	17-18	9	520,2	EDFST-9
C/A 35%	19	10	176,6	EDFST-10
C/A 35%	20	11	120,1	EDFST-11
C/A 40%	21-22	12	132,3	EDFST-12
C/A 45%	23-25	13	152,0	EDFST-13
C/A 45%	26-27	14	91,3	EDFST-14
C/A 50%	28-29	15	76,4	EDFST-15
C/A 55%	30-31	16	68,4	EDFST-16
C/A 55%	32-33	17	57,2	EDFST-17
C/A 60%, C/A 65%	34-38	18	177,2	EDFST-18
C/A 70%	39-40	19	80,8	EDFST-19
C/A 70%	41-42	20	50,7	EDFST-20
C/A 75%	43-46	21	98,6	EDFST-21
C/A 80%	47-49	22	113,1	EDFST-22
C/A 85%	50-51	23	36,0	EDFST-23
C/A 90%	52-54	24	28,4	EDFST-24
C/A 95%	55-58	25	30,8	EDFST-25
A 100%	59-61	26	20,7	EDFST-26
A 100%, A/M 1%	62-63	27	15,1	EDFST-27
A/M 1%, A/M 2%	64-67	28	36,5	EDFST-28
A/M 3%	68-70	29	21,2	EDFST-29
A/M 3%, A/M 5%	71-75	30	46,8	EDFST-30
A/M 10%	76-78	31	63,7	EDFST-31
A/M 20%, A/M 30%	79-83	32	231,7	EDFST-32
A/M 50%, M 100%	84-88	33	735,6	EDFST-33
			4323,6	

C: ciclohexano; C/A: ciclohexano/acetato de etila; A/M: acetato etila/metanol ; M: metanol

4.2 Isolamento de ST-1 do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

Do grupo EDFST-5 obteve-se a amostra ST-1 (Fluxograma 2).

4.2.1 Determinação estrutural de ST-1

O composto obtido (ST-1) foi submetido aos experimentos de ressonância magnética nuclear de uma e duas dimensões ^1H (Anexo 1), ^{13}C (Anexo 1), Dept-135 (Anexo 1), Cosy (Anexo 1), HSQC (Anexo 1) e HMBC (Anexo 1).

A análise dos espectros de Ressonância não foi suficiente para a elucidação da estrutura de ST-1, necessitando-se da obtenção do espectro de massas para a confirmação.

4.2.2 Atividade citotóxica de ST-1 em células de linhagens tumorais

O ensaio de atividade de ST-1 sobre as quatro linhagens de câncer humano utilizando-se o ensaio do MTT, mostrou que ST-1 inibe significativamente o crescimento celular. ST-1 apresentou CI_{50} de 0,78 (HL-60), 3,72 (HCT-8), 6,15 (SF-295) e 1,09 (MDA-MB-435) $\mu\text{g/mL}$, resultados comparáveis aos do controle positivo (doxorubicina), que apresentou CI_{50} de 0,02 (HL-60), 0,01 (HCT-8), 0,24 (SF-295) e 0,48 (MDA-MB-435) $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 12).

4.3 Isolamento de ST-2 do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

O grupo EDFST-7 (2,0 g) foi cromatografado em coluna aberta de sílica gel, gerando 12 subgrupos possibilitando a obtenção de ST-2 do sub-grupo 3 (Fluxograma 2).

4.3.1 Determinação estrutural de ST-2

Os espectros obtidos para ST-2 são idênticos aos de ST-1, podendo se tratar do mesmo composto. No entanto, a confirmação desta hipótese e a confirmação da proposição seguinte (Figura 44) necessita da obtenção do espectro de massas.

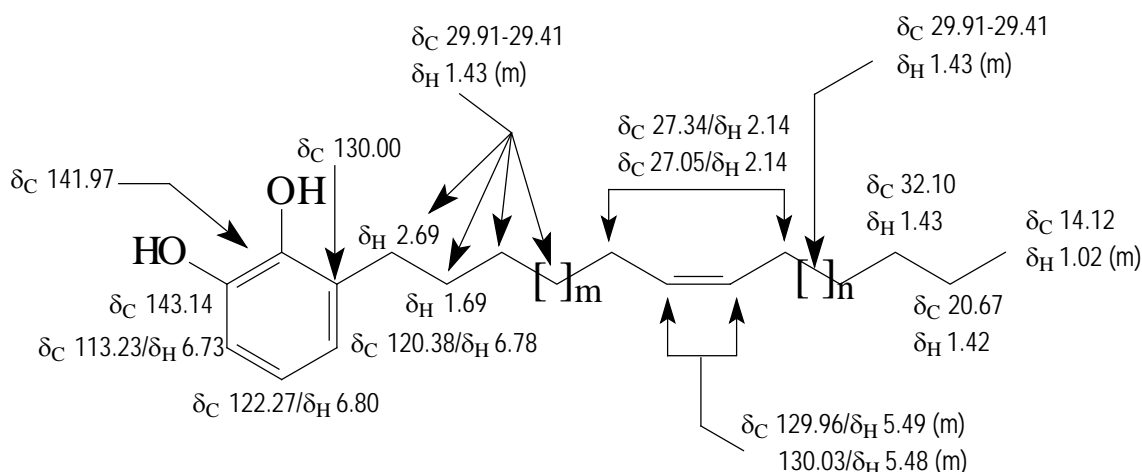


FIGURA 44 - Sugestão de estrutura para ST-2

4.3.2 Atividade citotóxica de ST-2 em células de linhagens tumorais

O ensaio de atividade sobre as quatro linhagens de câncer humano utilizando o ensaio do MTT mostrou que ST-2 inibe significativamente o crescimento celular apresentando CI_{50} de 1,72 (HL-60), 8,57 (HCT-8), 7,7 (SF-295) e 1,46 (MDA-MB-435) $\mu\text{g/ml}$. Já o controle positivo (doxorubicina) apresentou CI_{50} de 0,02 (HL-60), 0,01 (HCT-8), 0,24 (SF-295) e 0,48 (MDA-MB-435) $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 12).

4.4 Isolamento de ST-3 do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

O grupo EDFST-7 (2,0 g) foi cromatografado em coluna aberta de sílica gel, gerando 12 subgrupos possibilitando o isolamento de ST-3 do sub-grupo 6 (Fluxograma 2).

4.4.1 Determinação estrutural de ST-3

O composto isolado (ST-3) foi submetido aos experimentos de ressonância magnética nuclear de uma e duas dimensões, ^1H (Anexo 2), ^{13}C (Anexo 2) e Dept-135 (Anexo 2).

Com base nas análises dos dados obtidos e comparação com dados encontrados na literatura (YAO *et al.*, 2007; SHANG-JIANG *et al.*, 1986) pode-se propor que a substância ST-3 trata-se do β -sitosterol (Figura 45).

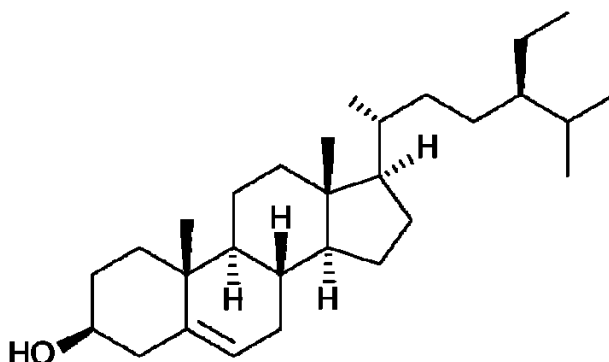


FIGURA 45 – ST-3: Beta-sitosterol isolado de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*

4.5 Isolamento de ST- 4 do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

O grupo EDFST-10 (176 mg) foi cromatografado em coluna aberta de sílica gel, gerando 13 sub-grupos. Do sub-grupo 4 foi isolada a substância ST-4 (Fluxograma 2).

4.5.1 Determinação estrutural de ST-4

O composto isolado (ST-4) foi submetido aos experimentos de ressonância magnética nuclear de uma e duas dimensões: ^1H (Anexo 3), ^{13}C (Anexo 3), Dept-135 (Anexo 3), Cosy (Anexo 3), HSQC (Anexo 3) e HMBC (Anexo 3).

Com base nas análises dos dados obtidos e comparação com dados encontrados na literatura pode-se propor que a substância ST-4 trata-se do alquil resorcinol, 1,3-dihidroxi-5-(tridec-4',7'-dienil) benzeno (Figura 46), isolado pela primeira vez de *S. terebinthifolius* var. *radiannus*, e previamente obtido de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (Anacardiaceae) (LÓPEZ *et al.*, 2005).

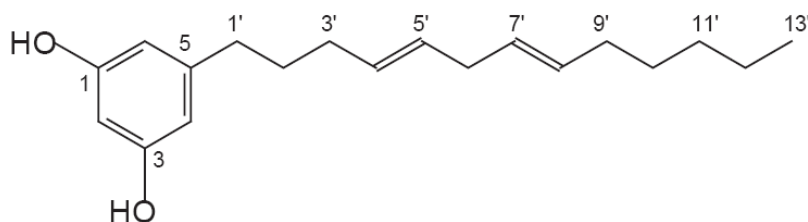


FIGURA 46 – ST-4: 1,3-dihidroxi-5-(tridec-4',7'-dienil) benzeno isolado de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*

4.5.2 Atividade citotóxica de ST-4 em células de linhagens tumorais

O ensaio de atividade de ST-4 sobre as quatro linhagens de câncer humano, mostrou que ST-4 apresenta atividade moderada. A Tabela 12 mostra os valores de CI_{50} obtidos, valores que variaram de 23,95 (MDA-MB-435) a > 25 (HL-60, HCT-8 e SF-295) $\mu\text{g/ml}$.

4.6 Isolamento de ST-5 e ST-6 do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

O grupo EDFST-18 (150 mg) foi cromatografado em coluna aberta de sílica gel, gerando 23 subgrupos. Desses, os sub-grupos 12 e 17, possibilitaram a obtenção das amostras ST-5 e ST-6 (Fluxograma 2).

4.6.1 Determinação estrutural de ST- 5

A amostra obtida (ST-5) foi submetida aos experimentos de ressonância magnética nuclear de uma e duas dimensões: ^1H (Anexo 4), ^{13}C (Anexo 4), Dept-135 (Anexo 4), Cosy (Anexo 4), HSQC (Anexo 4) e HMBC (Anexo 4).

A análise dos espectros de ressonância não foi suficiente para a elucidação da estrutura de ST-5, necessitando-se da obtenção do espectro de massas para a confirmação da proposição seguinte (Figura 47):

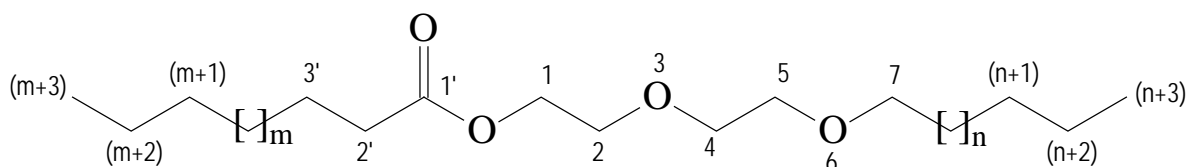


FIGURA 47 - Sugestão de estrutura de ST-5 isolado do EDFST

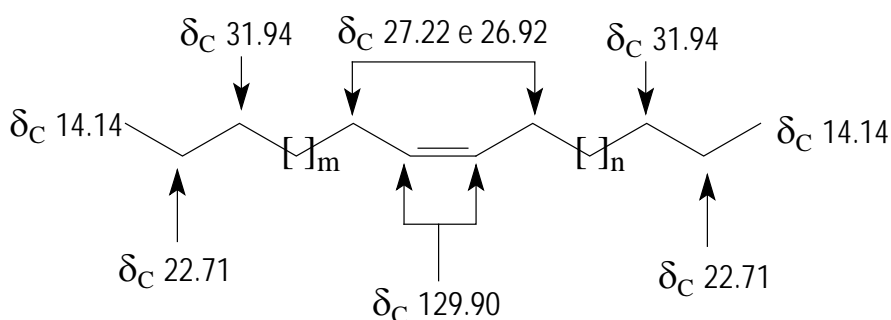
4.6.2 Atividade citotóxica de ST-5 em células de linhagens tumorais

O ensaio de atividade de ST-5 sobre as linhagens de câncer humano SF-295, HCT-8 e MDA-MB-435, mostrou que ST-5 apresenta baixa atividade, com % de inibição de 17,04; 0,82 e 4,29 sobre as respectivas células.

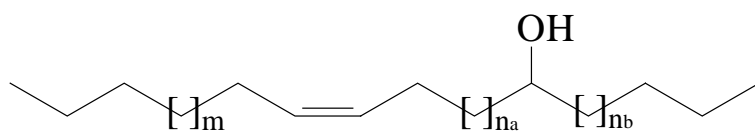
4.6.3 Determinação estrutural de ST-6

A amostra obtida (ST-6) foi submetida aos experimentos de ressonância magnética nuclear de uma e duas dimensões: ^1H (Anexo 5), ^{13}C (Anexo 5), Dept-135 (Anexo 5), Cosy (Anexo 5), HSQC (Anexo 5) e HMBC (Anexo 5).

A análise dos espectros de ressonância não foi suficiente para a elucidação da estrutura de ST-6, necessitando-se da obtenção do espectro de massas para a confirmação da proposição seguinte (Figura 48):



- 1) m/z 457 ($[M+Na^+] = 457 - 23 = m/z$ 434
 $14(m+n) = m/z$ 434 - 140 = 294
 $(m+n) = 294/14 = 21$;
- 2) $43 + 14m + 14 + 26 + 14 + 14n + 43 = m/z$ 616
 $14(m+n) = m/z$ 616 - 140 = 448/14 = 34
 $(m+n) = 34$



$$43 + 14m + 14 + 26 + 14 + 14n_a + 30 + 14n_b + 43 = m/z$$

$$618$$

$$14(m+n_a+n_b) = 618 - 43 - 54 - 30 - 43$$

$$(m+n_a+n_b) = m/z$$

$$448/14 = 32$$

FIGURA 48 - Sugestão de estrutura para ST-6 isolado do EDFST

4.6.4 Atividade citotóxica de ST- 6 em células de linhagens tumorais

O ensaio de atividade de ST-6 sobre as linhagens de câncer humano SF-295, HCT-8 e MDA-MB-435, mostrou que ST-6 apresenta baixa atividade, com % de inibição de 24,39; 17,05 e 4,48 sobre as respectivas células.

4.7 Isolamento de ST-7 do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

O grupo EDFST-32 (200 mg) quando cromatografado em coluna aberta de sílica gel, gerou 14 subgrupos. Desses, o sub-grupo 6 possibilitou a obtenção de ST-7 (Fluxograma 2).

4.7.1 Determinação estrutural de ST-7

A amostra obtida (ST-7) foi submetida aos experimentos de ressonância magnética nuclear de uma e duas dimensões: ^1H (Anexo 6), ^{13}C (Anexo 6), Dept-135 (Anexo 6), Cosy (Anexo 6), HSQC (Anexo 6) e HMBC (Anexo 6).

A análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear bidimensional de correlações heteronucleares, HSQC de ST-7 (Anexo 6), possibilitou relacionar os carbonos observados no espectro de RMN ^{13}C -BB (Anexo 6) com seus respectivos hidrogênios, que juntamente com o espectro bidimensional HMBC (Anexo 6), permitiu a identificação da vizinhança de cada carbono analisado, resultando na elaboração da Tabela 11.

TABELA 11 - Dados de RMN¹³C e RMN¹H de ST-7

	HSQC		HMBC	
	δ_c	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
C				
1''	173.50	-	2H-2''	2H-3''
1'''	173.84	-	2H-2'''	2H-3'''
CH				
2	70.15	5.35	2H-1	
1'	104.02	4.27 (d, 7.1)		2H-1
2'	71.35	3.75 (m)		
3'	73.44	3.65 (m)	H-2'	
4'	69.26	4.04 (sl)	H-5'	
5'	74.50	3.55 (m)		H-3'
(m+2)/(n+2)	128.30/128.22	5.34/5.34		2H-(m+4)/ 2H-(n+4)
(m+3)/(n+3)	127.76	5.32		2H-(m+1)/ 2H-(n+1)
(m+5)/(n+5)	127.10	5.32		2H-(m+7)/ 2H-(n+7)
(m+6)/(n+6)	131.96/130.20	5.39/5.39	2H-(m+7)/ 2H-(n+7)	2H-(m+8)/ 2H-(n+8); 2H-(m+4)/ 2H-(n+4)
CH₂				
1	68.20	3.98, 3.71		
3	62.84	4.30 (dd), 4.21 (dd)		
6'	62.14	3.98, 3.75	H-5'	
2''/2'''	34.27/34.12	2.32 (m)/2.32 (m)	2H-3''/2H-3'''	
3''/3'''	24.87/24.85	1.61 (m)/1.61 (m)	2H-2''/2H-2'''	
[CH ₂] _m	29.72-29.08	1.26-1.19		
[CH ₂] _n	29.72-29.08	1.26-1.19		
(m+1)/(n+1)	27.22	2.08		
(m+4)/(n+4)	25.61/25.52	2.82 (m)/2.82 (m)		
(m+7)/(n+7)	20.52	2.10 (m)	3H-(m+8)/ 3H-(n+8)	
CH₃				
(m+8)/(n+8)	14.29	0.96 (t)	2H-(m+7)/ 2H-(n+7)	

A análise dos espectros de ressonância não foi suficiente para a elucidação da estrutura de ST-7, necessitando-se da obtenção do espectro de massas para a confirmação da proposição seguinte (Figura 49):

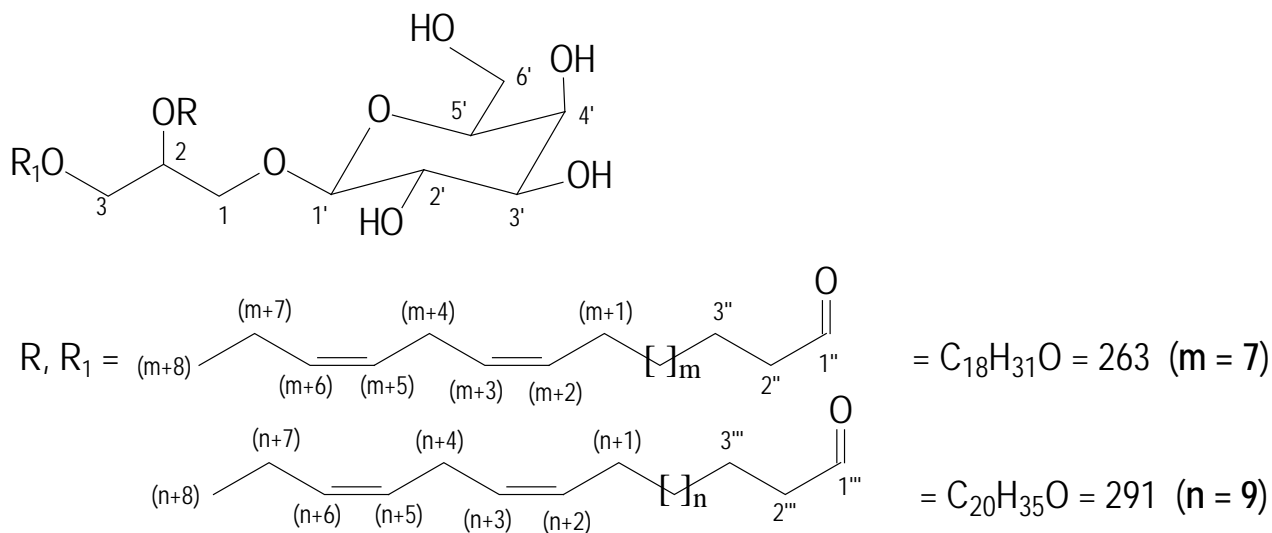


FIGURA 49 -- Sugestão de estrutura para ST-7 isolado de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*

4.7.2 Atividade citotóxica de ST- 7 em células de linhagens tumorais

O ensaio de atividade de ST-7 sobre as linhagens de câncer humano SF-295, HCT-8 e MDA-MB-435, mostrou que ST-7 apresenta baixa atividade, com % de inibição de 28,06; 19,62 e 6,49 sobre as respectivas células.

Fluxograma 2 - Isolamento de ST-1, ST-2, ST-3, ST-4, ST-5, ST-6, ST-7

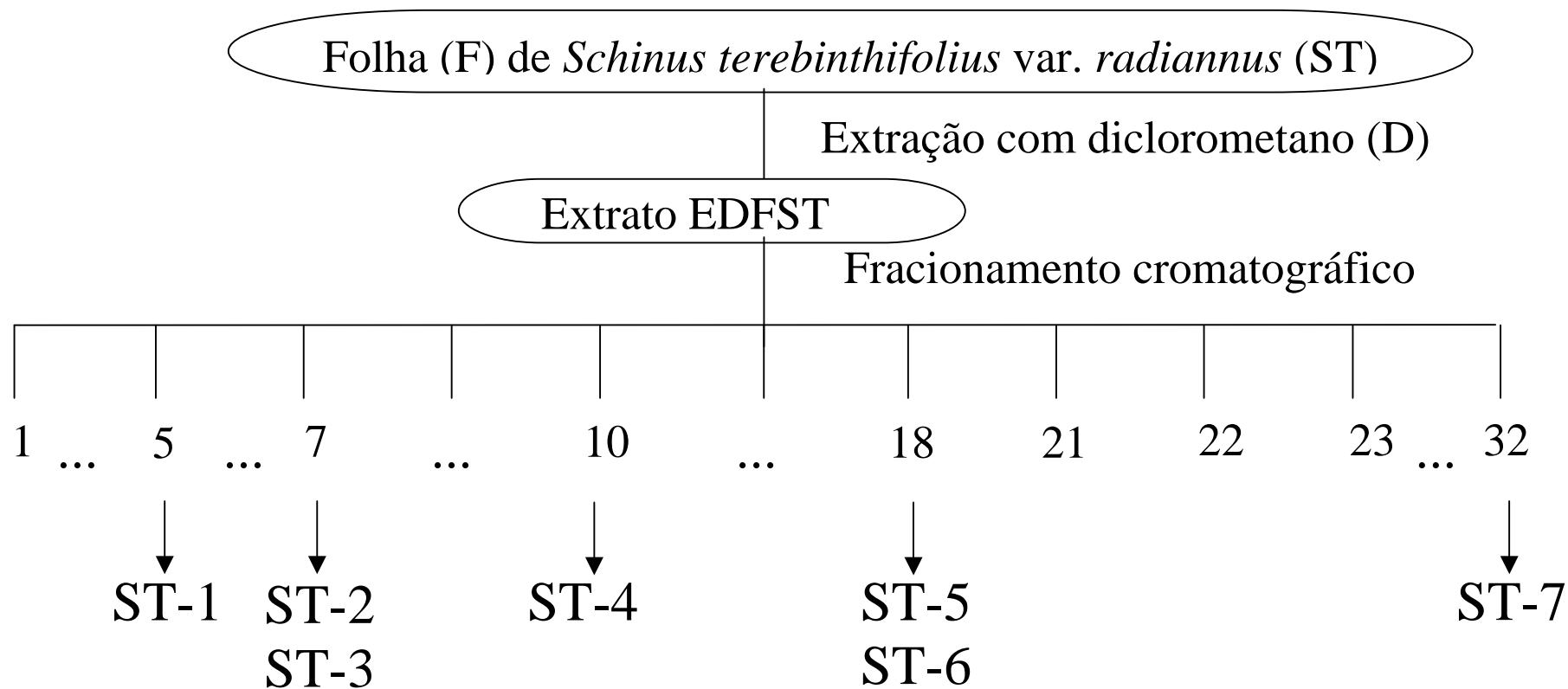


TABELA 12 - Atividade citotóxica de compostos isolados de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* e *Simarouba versicolor* em linhagens de células tumorais humana, com valores de CI_{50} (concentração inibitória de 50%) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) realizado pelo método do MTT após 72 horas de incubação para as células HL-60 (leucemia promielocítica), MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (carcinoma de cólon) e SF295 (glioblastoma), obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prism®. A doxorubicina foi usada como controle positivo.

Amostra	Linhagens celulares			
	HL-60	MDA-MB-435	HCT-8	SF295
	CI_{50} (µg/ml) IC95%	CI_{50} (µg/ml) IC95%	CI_{50} (µg/ml) IC95%	CI_{50} (µg/ml) IC95%
	0,78	1,09	3,72	6,15
ST-1	0,49 – 1,26	0,78 – 1,52	1,68 – 8,17	4,08 – 9,29
ST-2	1,72 0,94 – 3,13	1,46 0,85 – 2,50	8,57 2,66 – 27,60	7,70 4,61 – 12,87
ST-4	>25	23,95 12.75 - 35.00	>25	>25
SV-1	0,07 0,05 – 0,09	0,31 0,23 – 0,42	0,15 0,09 – 0,23	0,24 0,17 – 0,33
Doxorrubicina	0,02 0,01-0,02	0,48 0,34 – 0,66	0,01 0,01-0,02	0,24 0,17 – 0,36

SV-1 (glaucarubinona) isolada de *Simarouba versicolor* e ST-1, ST-2 e ST-4 isolados de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus*

5 Estudo químico-biológico de *Kielmeyera coriacea*

5.1 Fracionamento biomonitorado do extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea*

Uma alíquota do extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea* (4 g) foi fracionado em coluna aberta de sílica gel, e gerou 54 frações, reunidas em 10 grupos (G1-G10) (Tabela 13).

TABELA 13 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea* (EHCRKC)

Eluente	Frações	Grupo	Peso (mg)	Código
C 100%, C/A 2%	1-12	1	120	EHCRKC -1
C/A 2%, C/A 5%	13-17	2	300	EHCRKC -2
C/A 10%	18-20	3	300	EHCRKC -3
C/A 10%, C/A 20%	21-23	4	1001	EHCRKC -4
C/A 20%, C/A 40%	24-27	5	1580	EHCRKC -5
C/A 40%	28-30	6	540	EHCRKC -6
C/A 60%, C/A 80%	31-39	7	400	EHCRKC -7
C/A 90%, A 100%	40-45	8	140	EHCRKC -8
M 100%	46-50	9	260	EHCRKC -9
M 100%	51-54	10	130	EHCRKC -10
			4780	EHCRKC -11

C: ciclohexano; C/A: ciclohexano/acetato de etila; A: acetato de etila; M: metanol

Os grupos foram testados, e dois deles, G3 e G4 (Figura 50), apresentaram elevada porcentagem de inibição à 50 µg/ml, sobre as células SF-295 (95,87% e 78,83%), HCT-8 (96,94% e 80,39%), e MDA-MB-435 (98,87% e 96,02%), respectivamente.

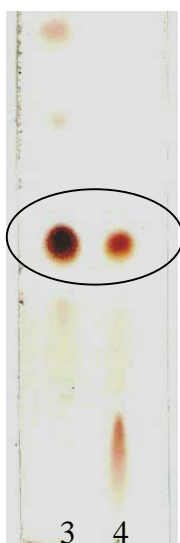


FIGURA 50: Placa de cromatografia em camada delgada (CCD) de G3 e G4. A banda circulada corresponde à substância de interesse que está presente nos dois grupos.

O grupo quatro (G4) (1 g) foi recromatografado em coluna aberta de sílica gel, e gerou 14 subgrupos (EHCRKC-4,1 a EHCRKC-4,14) (Tabela 14).

TABELA 14 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do grupo EHCRKC-4 em coluna de sílica (fase normal)

Eluente	Frações	Grupo	Peso (mg)	Código
H 100%	1-10	1	6,5	EHCRKC-4,1
H 100%	11-20	2	2,5	EHCRKC-4,2
H 100%	21-27	3	2,8	EHCRKC-4,3
H/D 50%	28	4	2,2	EHCRKC-4,4
H/D 50%	29	5	19,1	EHCRKC-4,5
H/D 50%	30-31	6	220,6	EHCRKC-4,6
H/D 50%	32-33	7	71,8	EHCRKC-4,7
H/D 50%	34-38	8	71,6	EHCRKC-4,8
H/D 50%	39-43	9	34,5	EHCRKC-4,9
D/M 50%	44-45	10	74,9	EHCRKC-4,10
D/M 50%	46-52	11	130	EHCRKC-4,11
D/M 50%	53-58	12	42,2	EHCRKC-4,12
D/M 50%	59	13	274	EHCRKC-4,13
M 100%	60-68	14	134,5	EHCRKC-4,14
			1009	

5.2 Isolamento de KC-1

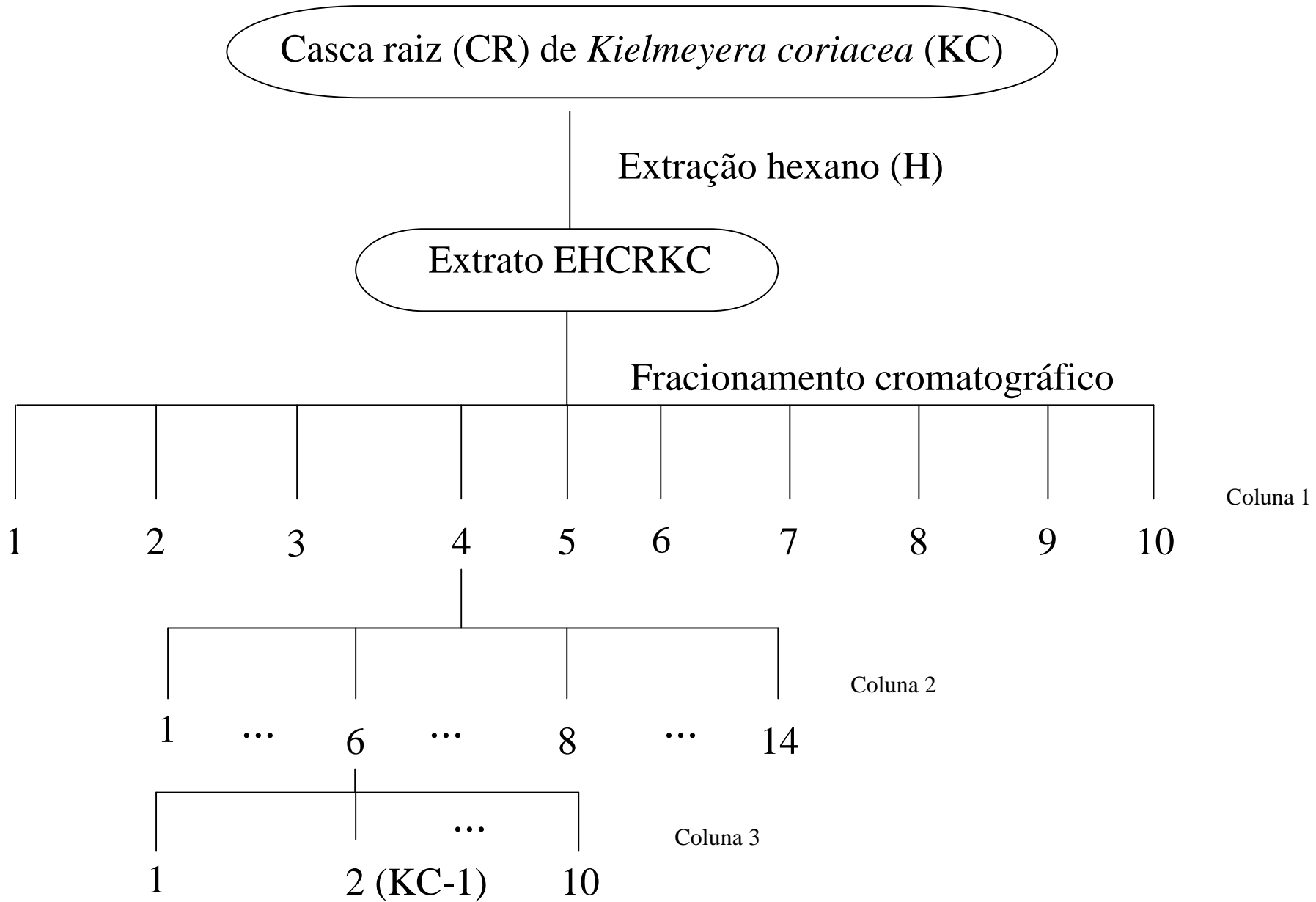
O subgrupo EHCRKC-4,6 foi recromatografado gerando 10 subgrupos (Tabela 15). O subgrupo 2 pela cromatografia em camada delgada apresentou-se como um produto puro sendo denominado de KC-1 (Fluxograma 3).

TABELA 15 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do grupo EHCRKC-4,6

Eluente	Frações	Grupo	Peso (mg)	Código
H 100%	1-4	1	15,2	EHCRKC-4,6,1
H 100%	5-14	2	5,8	KC-1
H 100%	15-16	3	4,3	EHCRKC-4,6,3
H/D 50%	17-33	4	30,5	EHCRKC-4,6,4
H/D 50%	34-35	5	8,3	EHCRKC-4,6,5
H/D 50%	36-41	6	1,7	EHCRKC-4,6,6
H/D 50%	42	7	-	EHCRKC-4,6,7
H/D 50%	43	8	24,3	EHCRKC-4,6,8
H/D 50%	44	9	0,5	EHCRKC-4,6,9
D/M 50%	45-48	10	0,4	EHCRKC-4,6,10
			91	

H: hexano; H/D: hexano/diclorometano; D/M: diclorometano/metanol

Fluxograma 3- Isolamento de KC-1



5.3 Determinação estrutural de KC-1

O composto KC-1 foi submetido aos experimentos de ressonância magnética nuclear de uma e duas dimensões: ^1H (Figura 51), ^{13}C (Figura 52), Dept-135 (Figura 53), HSQC (Figura 54), Cosy (Figura 55), Noesy (Figura 56) e HMBC (Figura 57), além de espectrometria de massa (Figura 58 e 59).

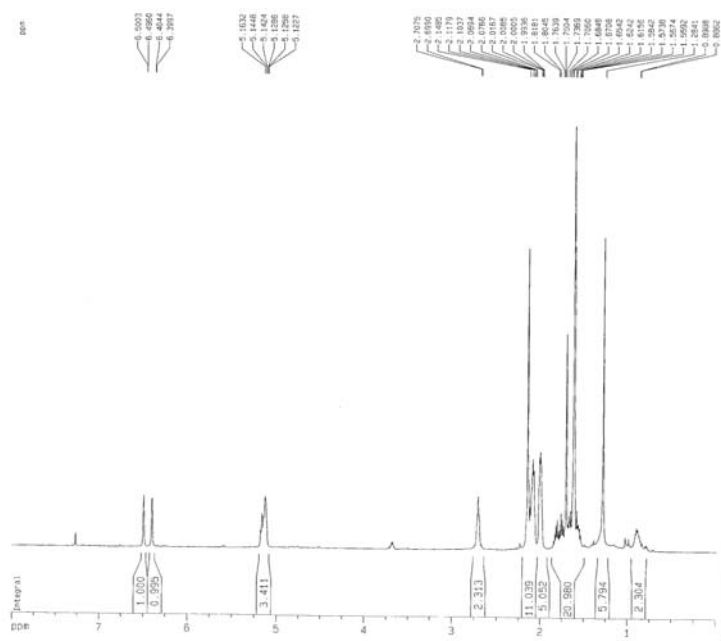


FIGURA 51 - Espectro RMN ^1H de KC-1 (500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm))

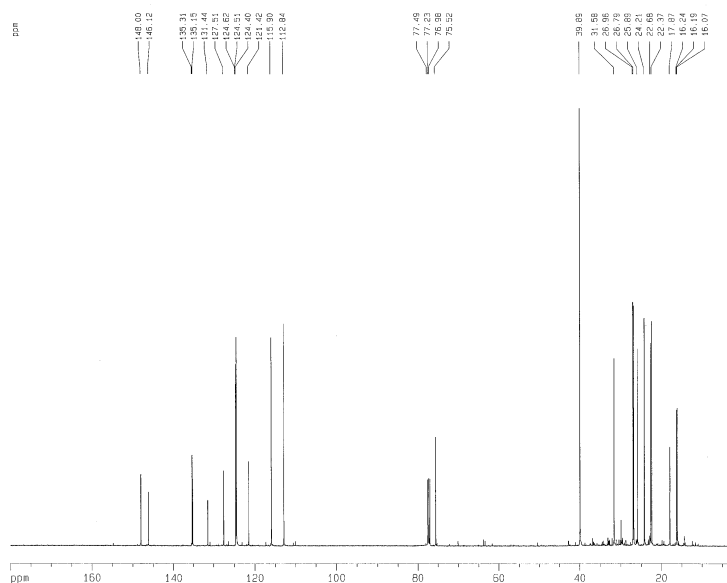


FIGURA 52 - Espectro RMN ^{13}C de KC-1 (125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm))

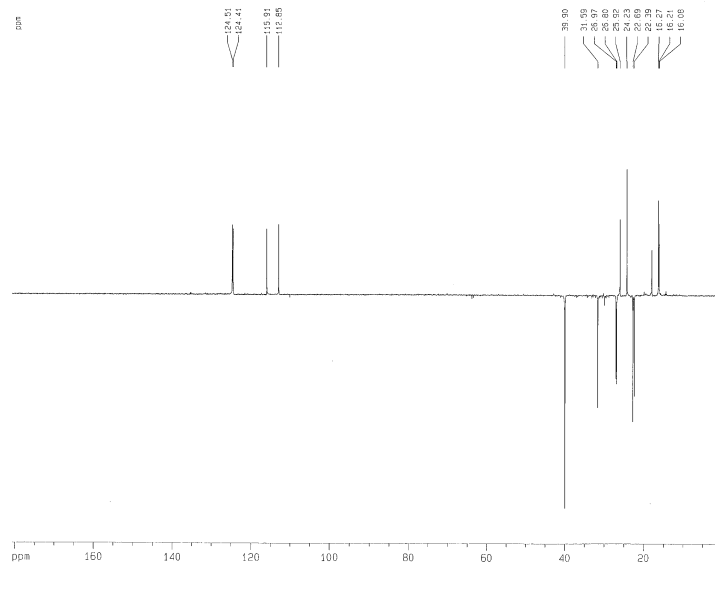


FIGURA 53 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de KC-1 (125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm))

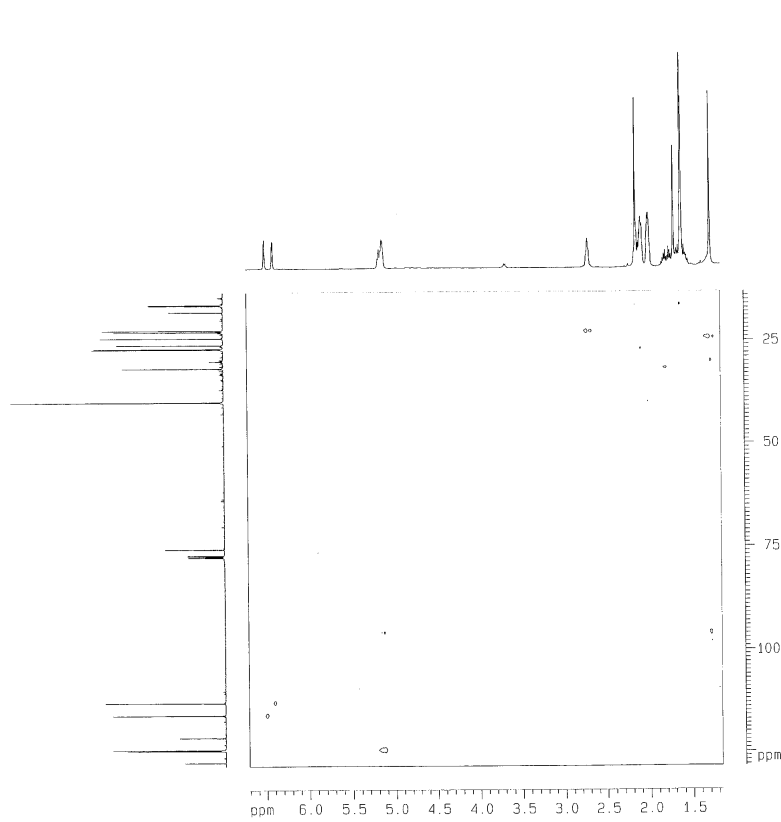


FIGURA 54 - Diagrama de contorno do espectro HSQC de KC-1

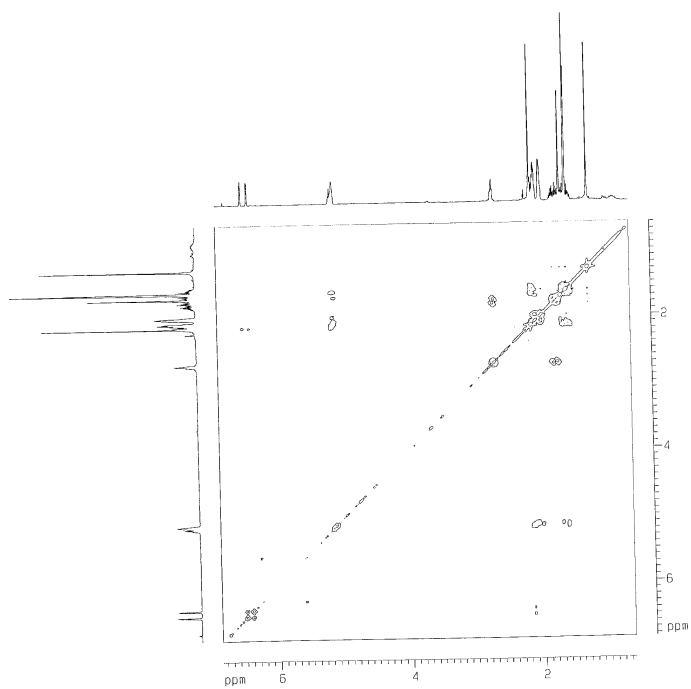


FIGURA 55 - Diagrama de contorno do espectro COSY de KC-1

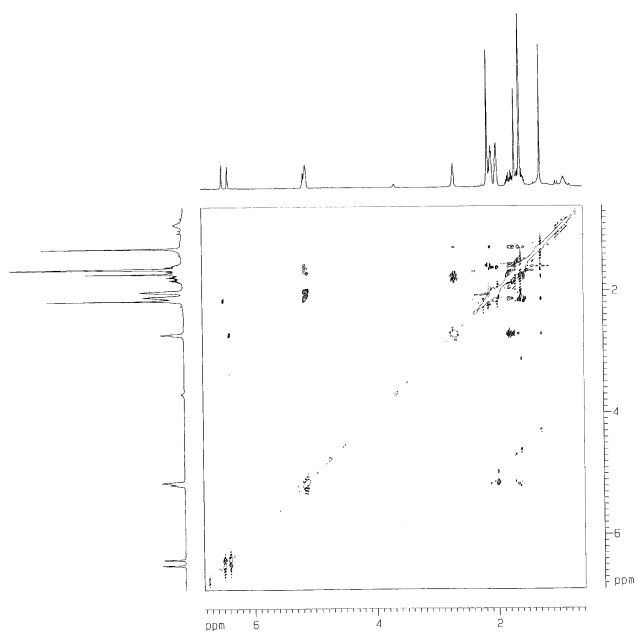


FIGURA 56 - Diagrama de contorno do espectro NOESY de KC-1

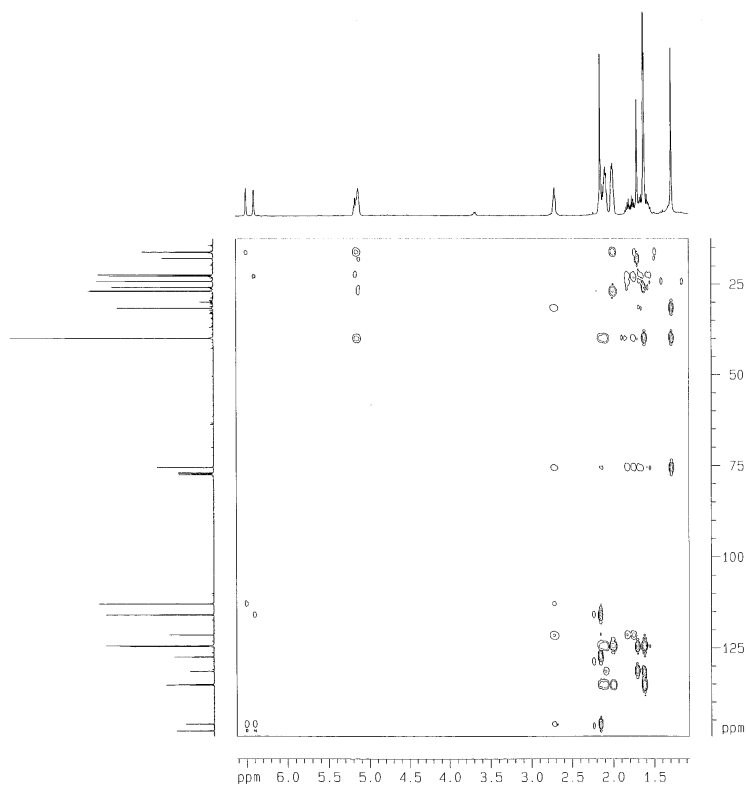


FIGURA 57 - Diagrama de contorno do espectro HMBC de KC-1

A análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear bidimensional de correlações heteronucleares, HSQC de KC-1 (Figura 54), possibilitou relacionar os carbonos observados no espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 52) com seus respectivos hidrogênios, que juntamente com o espectro bidimensional HMBC (Figura 57), permitiu a identificação da vizinhança de cada carbono analisado, resultando na elaboração da Tabela 16.

TABELA 16 - Dados de RMN¹³C e RMN¹H de delta-tocotrienol e seu dímero

	HSQC		HMBC	
	¹³ C	¹ H	² J _{CH}	³ J _{CH}
C				
1	121.42	-	2H-7	2H-8; 3H-2
2	146.16	-		H-4; H-6; 2H-7; 3H-27
3	127.91	-	3H-27	
5	148.00	-	H-4; H-6	
9	75.52	-	2H-8; 2H-10; 3H-26	2H-7; 2H-11
13	135.15	-	2H-14; 3H-25	2H-11; 2H-15
17	135.31	-	3H-24; 2H-18	2H-15; 2H-19
21	131.44	-	3H-22; 3H-23	2H-19
CH				
4	115.90	6.49 (d, 2.6)		H-6; 3H-27
6	112.84	6.37 (d, 2.6)		H-4; 2H-7
12	124.51	5.16 (t)	2H-11	2H-14; 3H-25
16	124.50	5.12 (m)	2H-15	2H-14; 2H-18
20	124.62	5.12 (m)	2H-19	2H-18; 3H-22; 3H-23
CH₂				
7	22.68	2.70 (m)	2H-8	H-6
8	31.58	1.79 (m), 1.74 (m)	2H-7	3H-26
10	39.90	1.65 (m), 1.55 (m)	2H-11	2H-8; 3H-26
11	22.37	2.09 (m)	2H-10; H-12	
14	39.90	1.99 (m)		H-12; H-16; 3H-25
15	26.96	2.05 (m)	2H-14	
18	39.90	1.99 (m)		H-16; H-20
19	26.80	2.05 (m)	2H-18; H-20	
CH₃				
22	17.87	1.62 (s)		H-20; 3H-23
23	25.89	1.70 (s)		H-20; 3H-22
24	16.06	1.62 (s)		H-16; 2H-18
25	16.24	1.61 (m)		H-12; 2H-14
26	24.21	1.25 (s)		2H-8; 2H-10
27	16.19	2.14 (s)		H-4

O espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, Figura 51) apresentou sinais referentes a hidrogênios aromáticos meta-posicionados em δ 6,49 (H-4, d, J = 2,6 Hz) e 6,37 (H-6, d, J = 2,6 Hz). Um fragmento farnesila foi sugerido pela presença de sinais característicos em δ 1.61 (3H-25, m); δ 1.62 (3H-24 e 3H-25, s) e δ 1.70 (3H-23, s) referentes a quatro grupos metilas, sinais de hidrogênios metilênicos em δ 1,99 (2H-18 e 2H-14, m); 2,05 (2H-19 e 2H-

15, m) e 2,09 (2H-11, m) e três sinais de hidrogênios olefínicos em δ 5.12 (H-16 e H-20, m) e δ 5.16 (H-12, m).

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3 , Figura 52) mostrou 27 linhas espectrais. Quinze sinais foram compatíveis com a presença do substituinte farnesil C-10-25 sugerido no espectro de RMN ^1H . Foram observados 9 sinais C1 a C9 (δ 22,7; 31,6; 75,5; 115,9; 112,8; 121,42; 127,91; 146,12; 148,0 121,42) condizentes com a presença de um núcleo benzopirano e os outros três sinais foram associados a carbonos sp^3 , sendo dois metílicos e um metilênico.

A posição da metila C-27 no carbono C-3 foi estabelecida através das correlações observadas no espectro HMBC entre os hidrogênios 3H-27 a três ligações com os carbonos δ 146,2 (C-2) e 115,9 (C-4). De maneira análoga foi determinada a posição relativa da metila C-26, através dos acoplamentos dos hidrogênios 3H-26 com os carbonos δ 31,6 (C-8) e 39,9 (C-10).

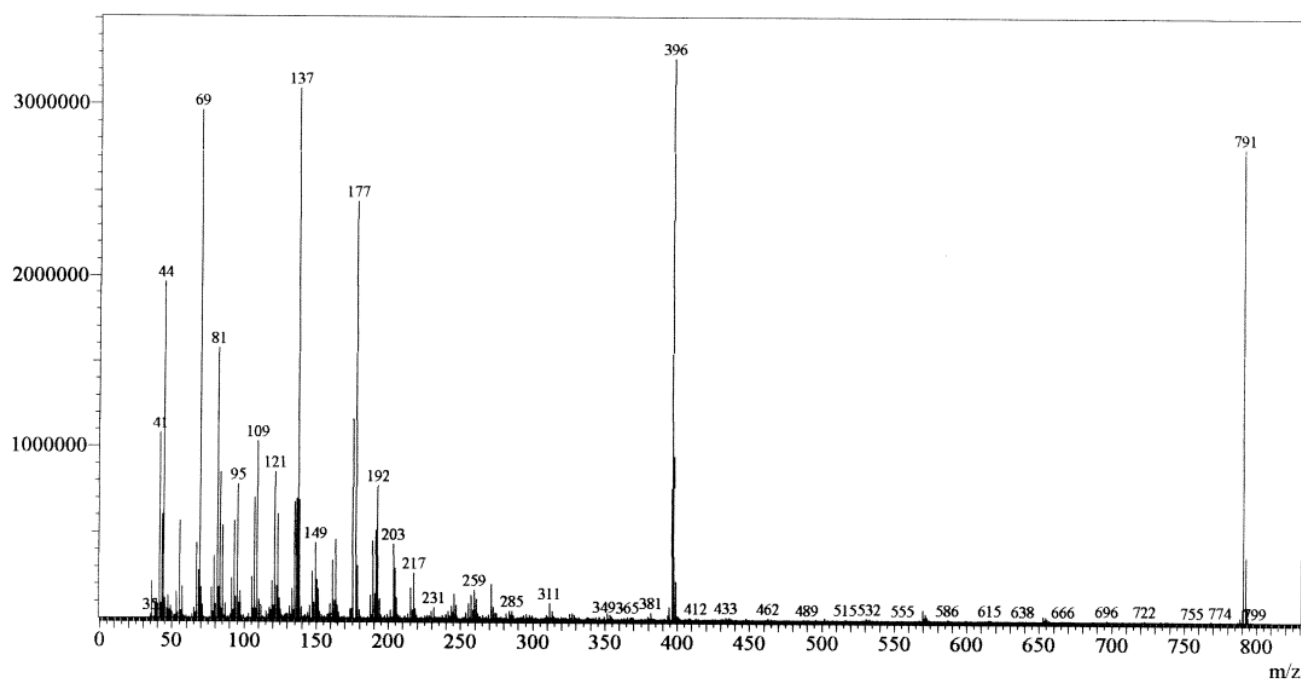


FIGURA 58 - Espectro de Massas de KC-1 obtido pelo sistema CG/MS

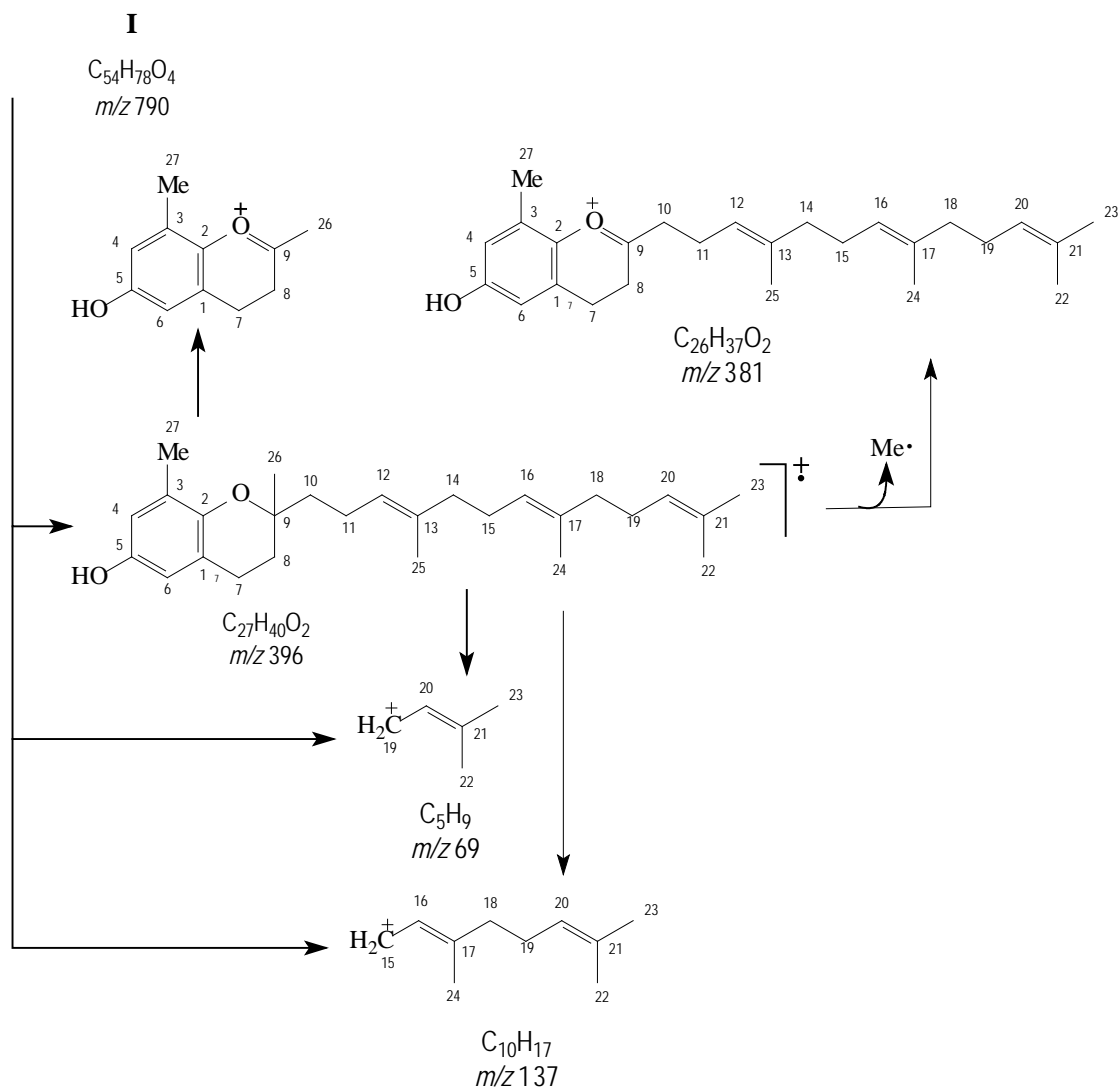
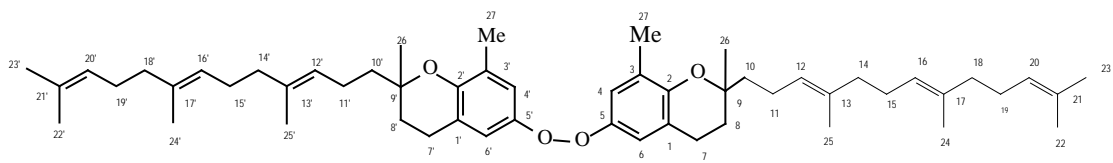


FIGURA 59 - Proposta hipotética de formação de alguns fragmentos no espectrômetro de massa.

De acordo com os dados obtidos e comparação com os dados da literatura (COULADOUROS *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2007), pode-se concluir que KC-1 trata-se da mistura binária de delta-tocotrienol e seu peróxido-dímero (Figuras 60 e 61).

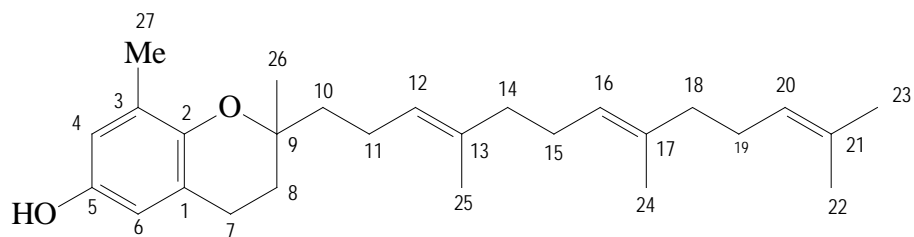


FIGURA 60. Delta-tocotrienol

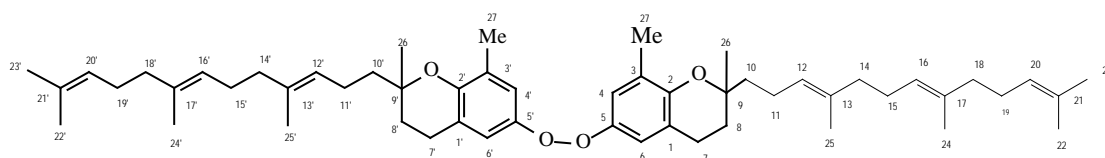


FIGURA 61. Peróxido-dímero de delta-tocotrienol

Em seguida, KC-1 foi submetido a uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando fase estacionária de sílica e as misturas de solvente hexano/acetato de etila (1:1/v:v), adotando-se fluxos de 1 mL/min (coluna analítica) e 4,72 mL/min (coluna semi-preparativa), com detecção em arranjo de fotodiodos, a fim de separar o monômero do dímero. A partir deste procedimento foram obtidas quatro frações correspondentes aos picos 1-4 ilustrados com o cromatograma (Figura 62). As quatro frações (picos 1-4) foram analisadas comparando-as por RMN ^1H e analisadas novamente em CLAE utilizando o mesmo método de isolamento (Figuras 63 a 66).

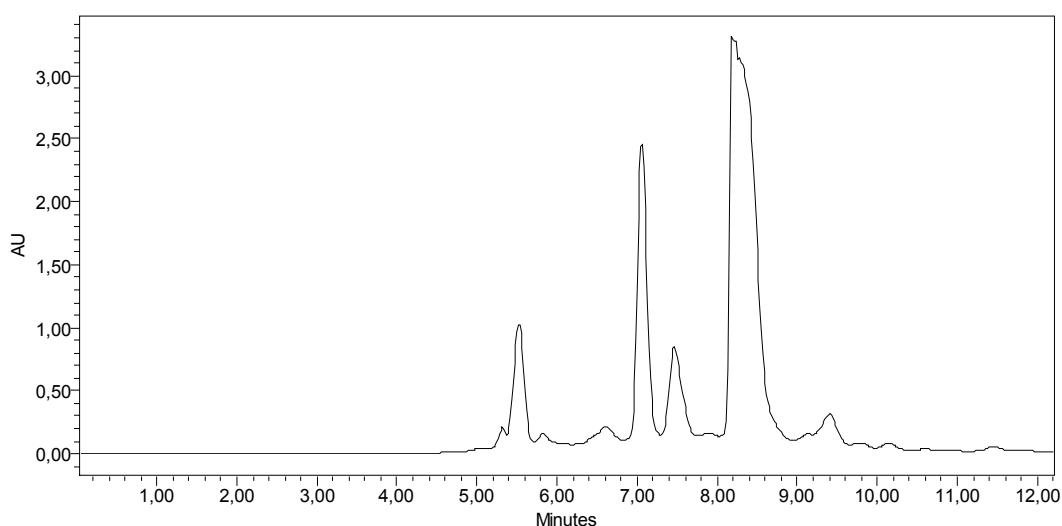


FIGURA 62- Cromatograma (265 nm) obtido por CLAE de KC-1

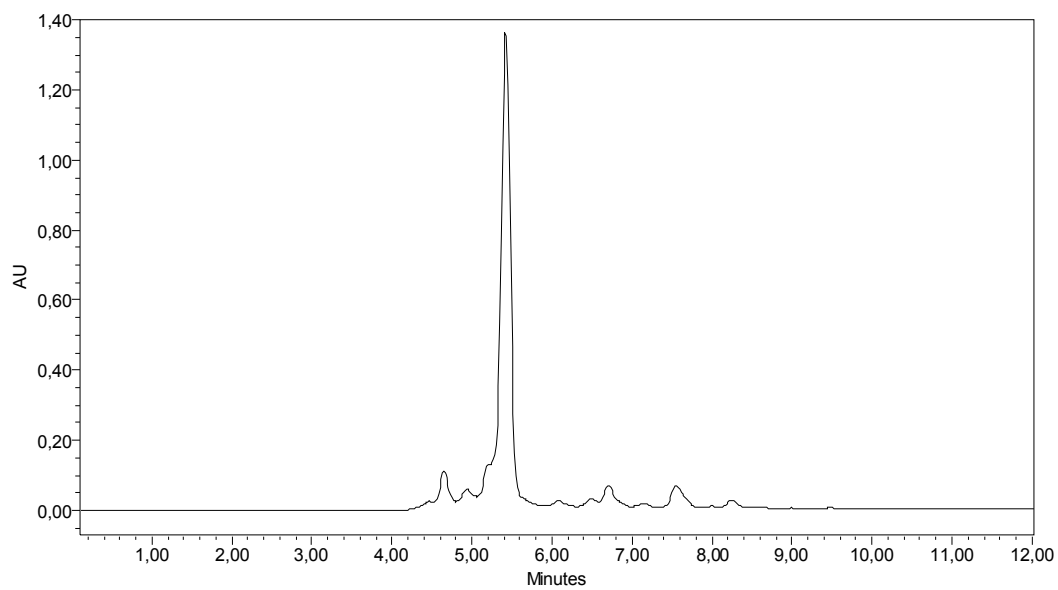


FIGURA 63- Cromatograma (265 nm) obtido por CLAE da fração KC-1- P-1

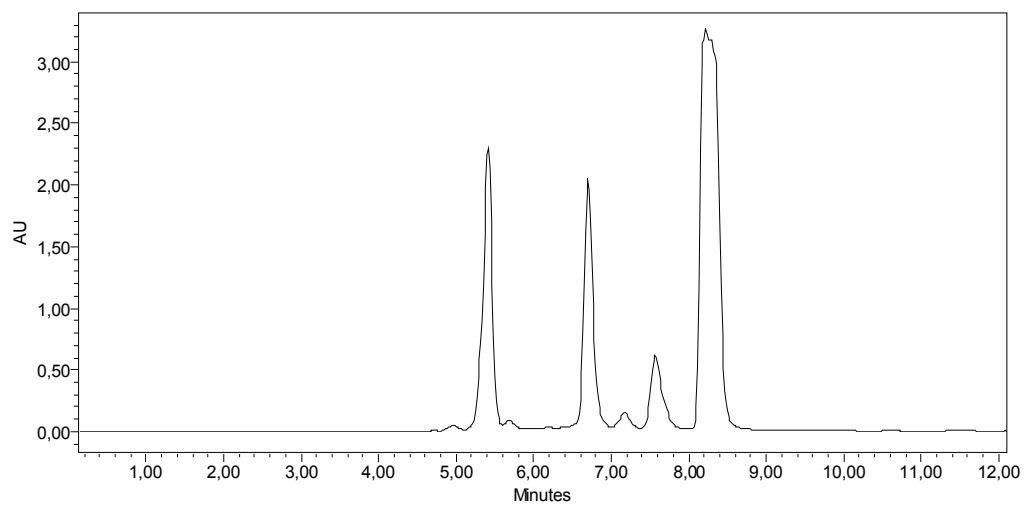


FIGURA 64- Cromatograma (265 nm) obtido por CLAE da fração KC-1- P-2

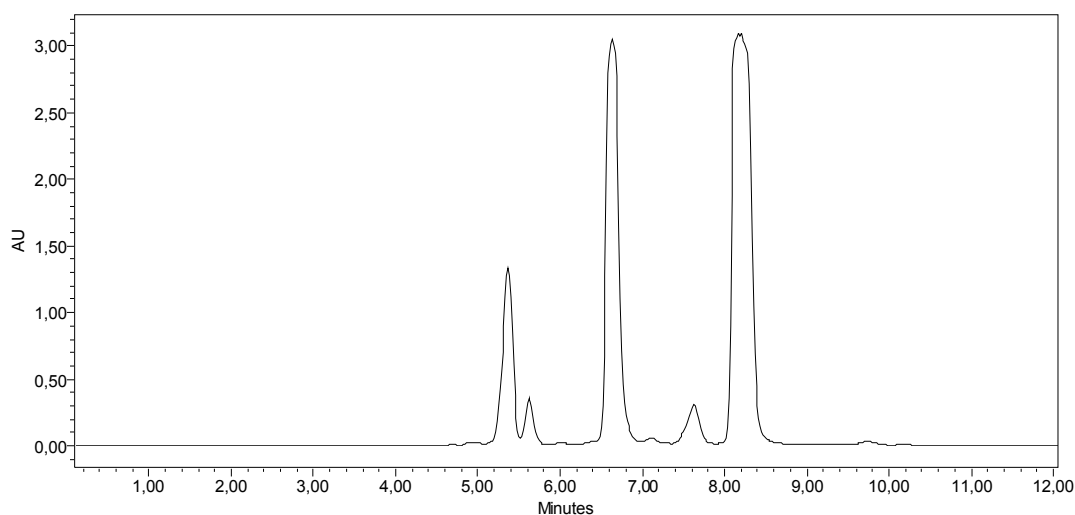


FIGURA 65- Cromatograma (265 nm) obtido por CLAE da fração KC-1- P-3

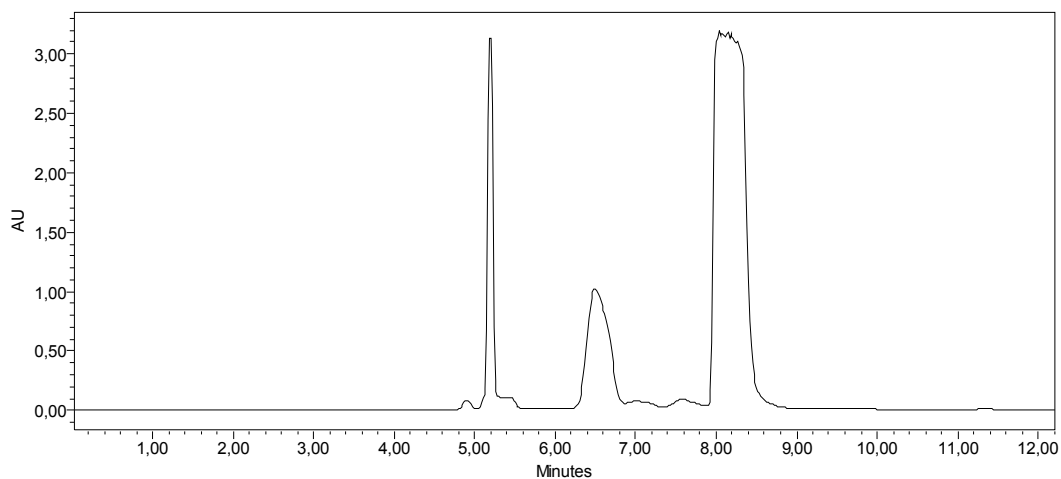


FIGURA 66- Cromatograma (265 nm) obtido por CLAE da fração KC-1- P-4

As frações KC-1- P-1 a 4 foram analisadas por RMN ^1H e CG/MS (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa). Observou-se que os picos 2-4 apresentaram o mesmo espectro de RMN ^1H e cromatogramas semelhantes CG e CLAE. O pico 1, no entanto apresentou espectro de RMN ^1H diferente dos demais (dados não apresentados).

A diferença nos tempos de retenção entre os picos 2-4 e estrutura química idêntica determinadas pelas técnicas de RMN e CG/MS, foram associados à mistura de diastereoisômeros do δ -tocotrienol

A análise dos dados de CG/MS foi compatível também com a formação de dímeros das substâncias.

O pico 4 foi submetido à um processo de acetilação, a fim de identificarmos o número de hidroxilas na amostra, e sabermos se corresponde ao dímero isolado. A fração clorofórmica resultante foi analisada por RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 67 e 68).

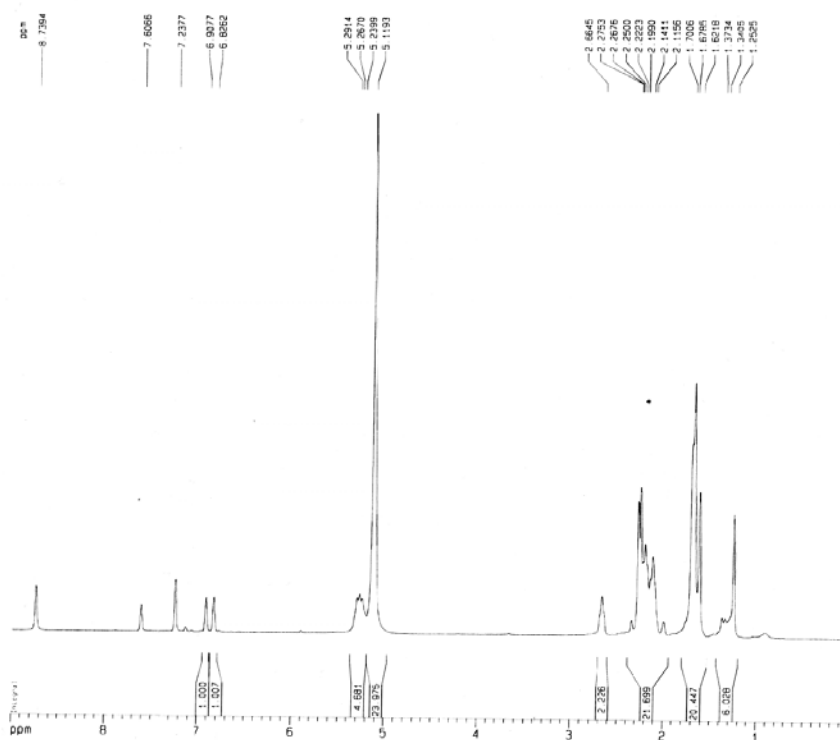


Figura 67: Espectro RMN ^1H da fração clorofórmica resultante da acetilação do pico 4

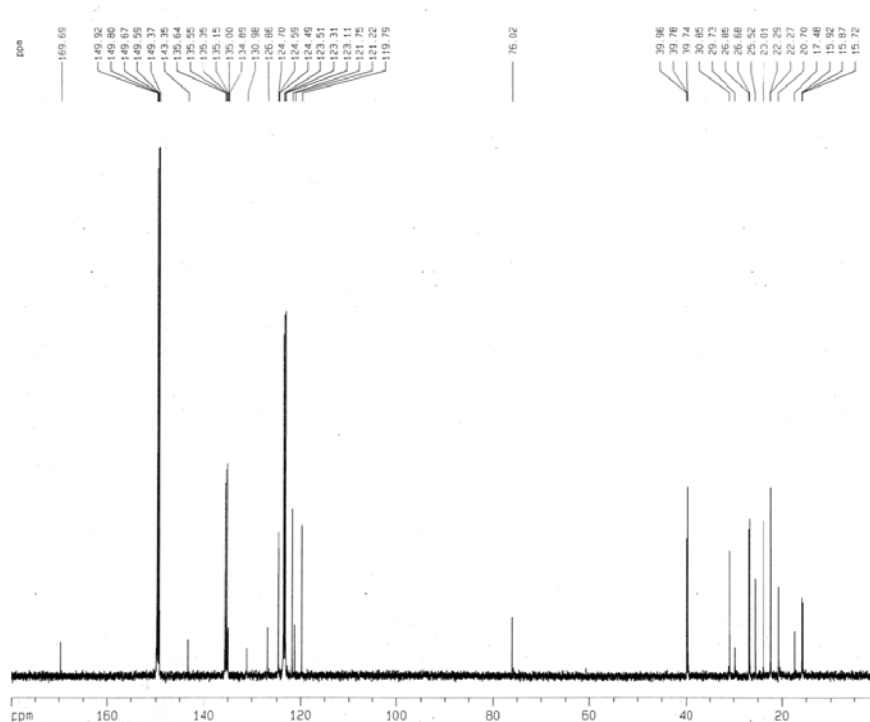


Figura 68: Espectro RMN ^{13}C da fração clorofórmica resultante da acetilação do pico 4

A reação de acetilação não apresentou resultados conclusivos da presença do dímero, pois este é muito instável, pelo fato de ser um peróxido, e monomeriza-se facilmente. Dessa forma, conclui-se que não foi possível isolar o monômero do dímero por CLAE.

5.4 Atividade citotóxica de KC-1 e frações obtidas de *Kielmeyera coriacea* em células de linhagens tumorais

A avaliação da atividade da mistura delta-tocotrienol e seu peróxido-dímero (KC-1) obtidos de *K. coriacea* sobre as quatro linhagens de câncer humano, utilizando-se o ensaio do MTT, mostrou que a mistura suprime significativamente o crescimento celular. A Tabela 17 mostra os valores de CI_{50} obtidos, valores que variaram entre 8,08 (HL-60), 13,02 (HCT-8), 16,39 (MDA-MB-435) e 23,58 $\mu\text{g/ml}$ (SF-295).

Os picos obtidos do fracionamento de KC-1 por CLAE também foram avaliados, sendo o pico quatro (P-4) o que apresentou a atividade mais importante com valores de CI_{50} de 1,23 $\mu\text{g/ml}$ para SF-295, 3,83 $\mu\text{g/ml}$ para HCT-8, 3,04 $\mu\text{g/ml}$ para MDA-MB-435, e 1,14 $\mu\text{g/ml}$ para HL-60 (Tabela 18). Os valores de CI_{50} variaram entre 1,14 $\mu\text{g/ml}$ para o pico 4 (HL-60) a 24,39 $\mu\text{g/ml}$ para pico 3 (HCT-8).

TABELA 17 – Atividade citotóxica de KC-1 obtido de *K. coriacea* sobre as linhagens de células de câncer humano HL-60, HCT-8, SF-295 e MDA-MB-435. Os dados correspondem aos valores de CI_{50} (média \pm E.P.M.) de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Linhagem celular	Histotipo	KC-1	Doxorrubicina
		CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) E.P.M	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
HL-60	Leucemia	8,08	0,02
	promielocítica	6,53 – 9,99	0,01 – 0,03
HCT-8	Cólon	13,02	0,01
		11,55 – 16,27	0,01 – 0,02
SF-295	SNC	23,58	0,24
		20,11 – 26,05	0,17 – 0,36
MDA-MB-435	Melanoma	16,39	0,48
		14,56 – 19,12	0,34 – 0,66

TABELA 18 - Atividade citotóxica dos picos obtidos de KC-1. A Tabela apresenta os valores de CI_{50} (concentração inibitória de 50%) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) realizado pelo método do MTT após 72 horas de incubação para as células HL-60 (leucemia promielocítica), MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (carcinoma de cólon) e SF295 (glioblastoma), obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prism®. A doxorubicina foi usada como controle positivo.

Pico	Linhagens celulares			
	HL-60	MDA-MB-435	HCT-8	SF295
	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
	IC95%	IC95%	IC95%	IC95%
P1	>25	>25	>25	>25
P2	7,44 3,28 – 16,91	15,26 8,02 – 29,04	>25	16,73 4,94 – 26,66
P3	3,26 2,09 – 5,10	12,52 6,07 – 25,86	24,39 19,16 – 34,96	14,61 8,57 – 29,81
P4	1,14 0,74 – 1,75	3,04 1,48 – 6,23	3,83 1,84 – 7,96	1,23 0,46 – 3,31
Doxorrubicina	0,02 0,01-0,02	0,48 0,34 – 0,66	0,01 0,01-0,02	0,24 0,17 – 0,36

5.5 Estudo do mecanismo de ação de KC-1 em célula leucêmica (HL-60)

O estudo do mecanismo de ação do monômero e seu dímero, isolados de *K. coriacea*, sobre a célula de leucemia promielocítica HL-60, teve o intuito de melhor compreender se a atividade citotóxica está relacionada à indução de apoptose e necrose. As análises de integridade da membrana celular, potencial transmembrânico da mitocôndria, coloração diferencial por hematoxilina-eosina e por brometo de etídeo (BE)/laranja de acridina (LA), realizadas nas concentrações de 5 e 10 µg/ml, contribuíram para esse entendimento.

5.5.1 Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán

Nas duas concentrações, a mistura monômero e dímero reduziu a viabilidade celular ($p < 0,05$), verificada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan (Figura 69), porém, apenas a concentração de 10 µg/ml causou um aumento significativo nas células não-viáveis ($p < 0,05$).

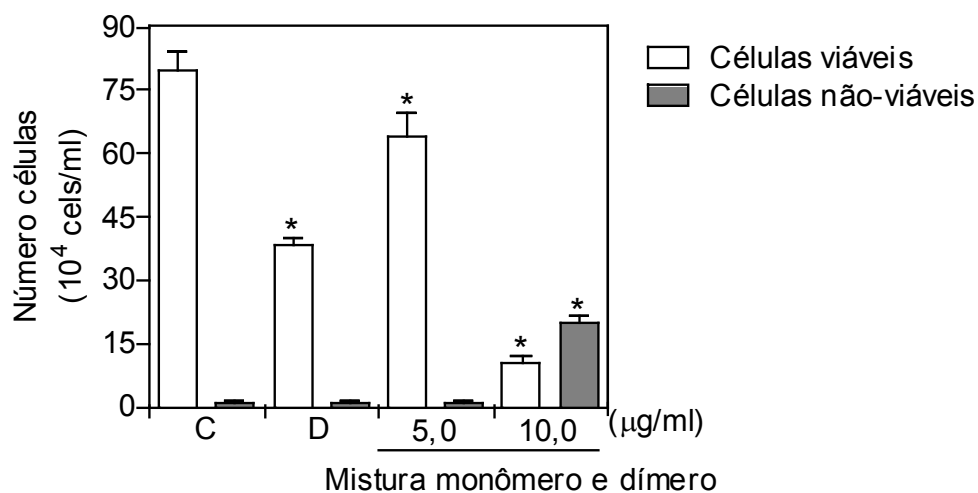


FIGURA 69: Atividade de KC-1, obtido de *K. coriacea* sobre a viabilidade das células HL-60 determinada pela coloração por azul de tripan após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir a substância testada (DMSO). A doxorrubicina (0,3 µg/ml) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem à

média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

5.5.2 Inibição da síntese de DNA - Incorporação de BrdU

O mecanismo do monômero e seu dímero em inibir a proliferação, foi determinado a partir da inibição da síntese de DNA com base na redução da incorporação de BrdU pelas células HL-60 (Figura 70). Nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$, a síntese de DNA foi significativamente reduzida ($p < 0,05$). A mistura inibiu a incorporação de BrdU em 23,4% e 95,9% nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, inibiu 47,9%.

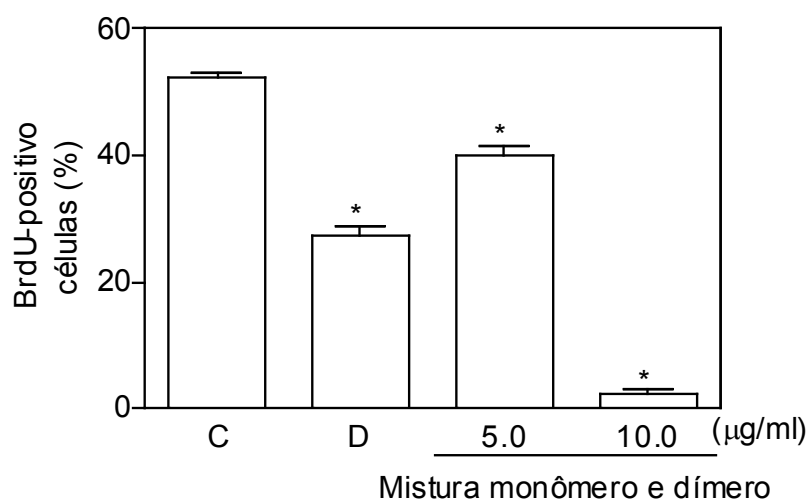


FIGURA 70: Porcentagem de inibição da incorporação de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) pelas células HL-60 tratadas com KC-1, obtido de *K. coriacea*. O controle negativo (C) foi tratado com DMSO, veículo usado para diluir a mistura. Doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/ml}$) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes, realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

5.5.3 Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina

As análises morfológicas das células HL-60, tratadas com o monômero e seu dímero e não-tratadas revelaram várias mudanças dependentes do tratamento. A coloração das células não-tratadas permitiu observar que estas se apresentam normais, com núcleos volumosos, após 24 h em cultura (Figura 71A). As células HL-60 tratadas com a mistura na concentração de 5 µg/ml apresentaram morfologia de células em apoptose, incluindo condensação da cromatina e fragmentação do núcleo (Figura 71C). No entanto, a concentração de 10 µg/ml, provocou redução no volume celular, desestabilização da membrana plasmática e núcleo picnótico, correspondendo à morfologia de células em necrose (Figura 71D). O controle positivo, doxorrubicina, também induziu redução no volume celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear (Figura 71B), correspondendo à morfologia de células em apoptose.

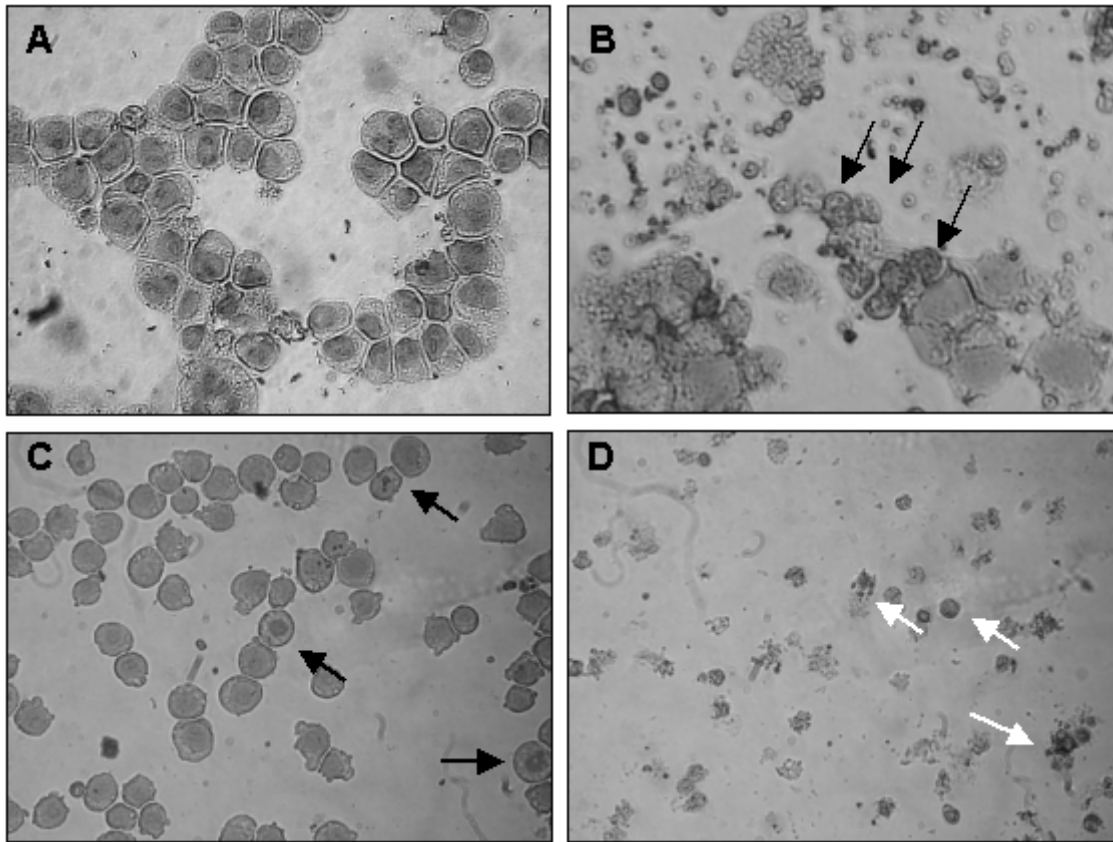


FIGURA 71: Fotomicrografia das células HL-60 coradas com hematoxilina/eosina. Células não-tratadas (A) e tratadas com a mistura monômero e dímero, isolados de *K. coriacea*, à 5 $\mu\text{g/ml}$, (C), e à 10 $\mu\text{g/ml}$ (D) analisadas por microscopia óptica (x400). Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/ml}$) foi usada como controle positivo (B). As setas pretas indicam fragmentação do núcleo e condensação da cromatina e as setas brancas indicam desestabilização da membrana plasmática ou núcleos picnóticos.

5.5.4 Análise morfológica – Coloração diferencial por Brometo de etídeo (BE)/Laranja de acridina (LA)

As análises morfológicas das células tratadas realizadas através da coloração por BE/LA para microscopia de fluorescência, permitiu calcular a porcentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas. No grupo controle, mais de 90% das células contadas apresentaram morfologias normais, coradas uniformemente de verde. Após o tratamento das células HL-60 com a mistura do monômero e seu dímero, nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$, por 24 h, foi observado um aumento no número de células apoptóticas e necróticas ($p < 0,05$, Figura 72). As células tratadas com doxorubicina também apresentaram características apoptóticas.

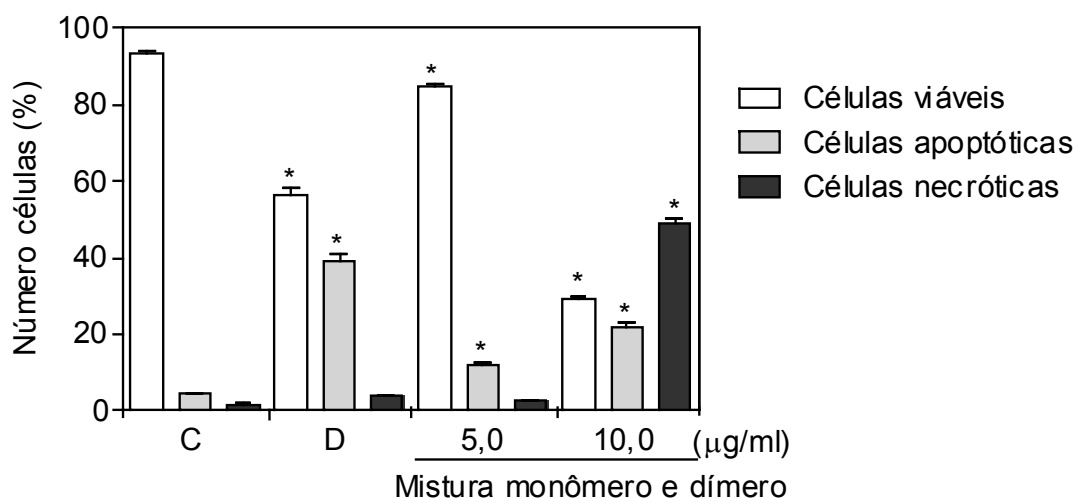


FIGURA 72: Efeito de KC-1, obtido de *K. coriacea*, em células HL-60, analisados por brometo de etídeo/laranja de acridina (BE/LA) após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo DMSO, utilizado para diluir a mistura. A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/ml}$) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes, realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

5.5.5 Estudo da integridade da membrana celular por citometria de fluxo

A análise da integridade da membrana celular foi determinada pela exclusão do iodeto de propídeo (Figura 73). A mistura monômero e o seu dímero, obtida de *K. coriacea* induziu uma quebra na integridade da membrana apenas na concentração de 10 µg/ml. A concentração de 5 µg/ml não provocou danos significativos na membrana ($p > 0,05$). Além disso, a mistura causou diminuição do volume celular nas duas concentrações testadas, constatada pela observação da diminuição do desvio da luz para frente (FSC), e condensação nuclear demonstrado pelo aumento transitório do desvio da luz para o lado (SSC), ambas modificações morfológicas compatíveis com células apoptóticas (dado não apresentado). As células tratadas com doxorrubicina também apresentaram características apoptóticas.

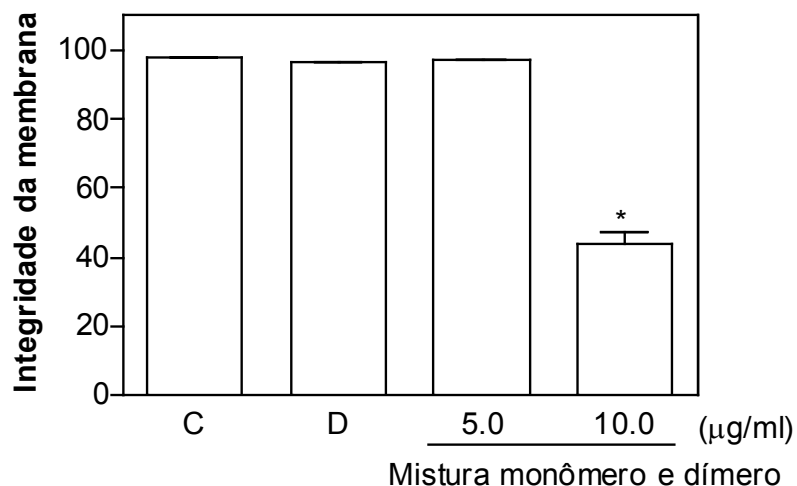


FIGURA 73: Efeito de KC-1, obtido de *K. coriacea*, sobre a integridade da membrana celular das células HL-60 determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo DMSO, utilizado para diluir a mistura testada. A doxorrubicina (0,3 µg/ml) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes, realizados em

triplicata. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

5.5.6 Determinação da fragmentação do DNA por citometria de fluxo

A progressão do ciclo celular das células HL-60 tratadas com a mistura monômero e seu dímero, isolados de *K. coriacea* foi examinado por citometria de fluxo, utilizando iodeto de propídeo. Todo DNA que estava em tamanho sub-diplóide (sub- G_1) foi considerado DNA com fragmentação internucleosomal. A Tabela 19 apresenta a distribuição do ciclo celular obtida.

TABELA 19 - Efeito de KC-1, obtido de *K. coriacea* na distribuição do ciclo celular das células HL-60 determinado por citometria de fluxo. O controle negativo corresponde às células tratadas com DMSO. A doxorrubicina, na concentração de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes, realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Fase do ciclo celular (%)		
		G_0/G_1	S	G_2/M
DMSO	-	56,84 \pm 1,25	18,12 \pm 0,43	15,49 \pm 1,04
Doxorrubicina	0,3	13,86 \pm 2,26*	1,17 \pm 0,18*	0,481 \pm 0,07*
KC-1	5,0	51,56 \pm 1,99	17,00 \pm 1,06	8,78 \pm 0,62*
	10,0	22,47 \pm 2,73*	2,00 \pm 0,51*	0,72 \pm 0,15*

No grupo controle, a porcentagem de células em fase G_0/G_1 foi de 56,84%, enquanto que em fase S foi de 18,12% e em G_2/M 15,49%, com fragmentação do DNA internucleosomal de 4,97% (Figura 74). À uma concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ da mistura, as

células em fase G₀/G₁ e S permaneceram constantes, no entanto algumas células estavam em fase G₂/M (8,78% sobre 15,49% do grupo controle). Na concentração de 10 µg/ml, todas as fases do ciclo foram diminuídas. Adicionalmente, a mistura causou fragmentação do DNA internucleosomal nas duas concentrações testadas ($p < 0,05$) (Figura 74). Com isso, podemos concluir que a mistura monômero e dímero atua mais nas células em G₂/M do que nas células em fase sub-G1. As células tratadas com doxorubicina também apresentaram fragmentação do DNA internucleosomal significativa (Figura 74).

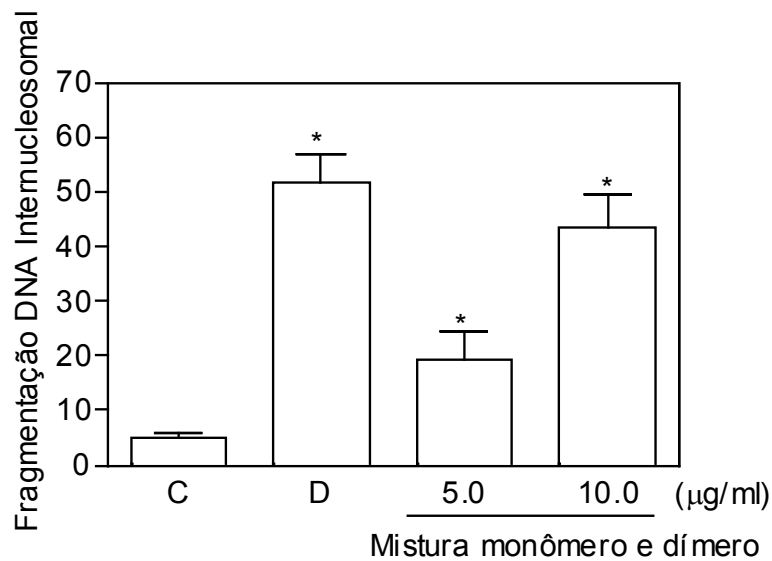


FIGURA 74: Efeito de KC-1, obtido de *K. coriacea* na fragmentação do DNA internucleosomal das células HL-60 determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, triton X-100 e citrato de sódio após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo DMSO, utilizado para diluir a mistura testada. A doxorubicina (0,3 µg/ml) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes, realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

5.5.7 Determinação do potencial transmembrânico por citometria de fluxo

Nos ensaios de determinação do potencial transmembrânico por citometria de fluxo as células foram incubadas com a rodamina 123, permitindo visualizar através da alteração do potencial transmembrânico, que as células que estão em apoptose apresentam dano na mitocôndria. Como a rodamina é um corante catiônico e permeável a membrana celular, ele é rapidamente sequestrado pela mitocôndria, emitindo assim alta fluorescência em células normais. As alterações no potencial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitem menor fluorescência. A mistura monômero e seu dímero, obtida de *K. coriacea* causou aproximadamente 26% e 45,5% de despolarização mitocondrial nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Figura 75).

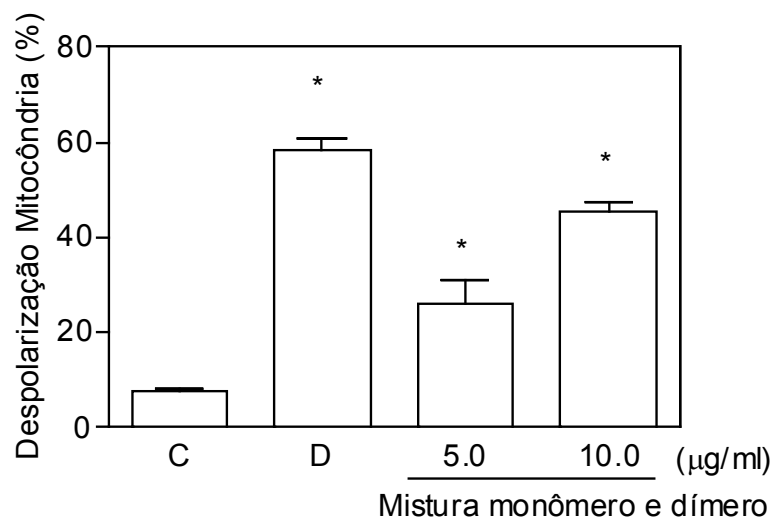


FIGURA 75: Efeito de KC-1, obtido de *K. coriacea*, sobre o potencial transmembrânico da mitocôndria das células HL-60 determinado por citometria de fluxo, utilizando rodamina 123, após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo DMSO, utilizado para diluir a mistura testada. A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/ml}$) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes, realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

DISCUSSÃO

Quatrocentos e doze extratos hexânicos, diclorometânicos, etanólicos, e hidroalcoólicos obtidos de 50 espécies pertencentes a 21 famílias de plantas (Tabela 5) foram testados sobre três linhagens de câncer humano: MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (glioblastoma) e HCT-8 (côlon). As espécies pertencentes às famílias Anacardiaceae, Clusiaceae, Flacourtiaceae e Simaroubaceae, demonstraram importante atividade citotóxica na triagem realizada, enquanto que as espécies pertencentes às famílias Alismataceae, Asteraceae, Bignoniaceae, Burseraceae, Magnoliaceae, Malphighiaceae, Meliaceae, Mimosaceae, Monimiaceae, Rubiaceae, Solanaceae e Vochysiaceae não demonstraram citotoxicidade significativa.

Dos 28 extratos que apresentaram importante atividade, com porcentagem de inibição maior que 85% nas três linhagens, 15 eram hexânicos, 10 etanólicos e 3 diclorometânicos, sugerindo maior possibilidade de encontrarmos moléculas anticancerígenas de polaridade média à baixa. A CI_{50} desses extratos ativos determinada sobre as linhagens MDA-MB-435, SF-295, HCT-8 e HL-60 (leucemia promielocítica) permitiu verificar atividade sobre as células tumorais alta, com valores de CI_{50} menores que 20 $\mu\text{g/ml}$ em quatro ou três linhagens, para os extratos diclorometânicos da raiz de *Calophyllum brasiliense*, e folha de *Schinus terebenthifolius* var. *radiannus*, extratos etanólicos da casca e madeira da raiz de *Annona crassiflora*, casca do caule de *Serjania lethalis*, casca da raiz e frutos de *Simarouba versicolor*, madeira da raiz de *Himatanthus obovatus* e madeira da raiz de *Magonia pubescens*; e extratos hexânicos da folha, casca e madeira do caule, e madeira da raiz de *Casearia sylvestris* var. *lingua*, folha de *Cupania vernalis*, casca e madeira da raiz e madeira do caule de *Kielmeyera coriacea*, casca da raiz de *Simarouba versicolor*, madeira da raiz de *Xylopiya aromatica*, e folha de *Schinus terebenthifolius* var. *radiannus*. Os resultados também indicaram valores de CI_{50} menores que 30 $\mu\text{g/ml}$ em quatro ou três linhagens, para o extrato hexânico da casca da raiz de *Serjania lethalis* e extrato etanólico da folha de *Himatanthus obovatus* sendo considerados portanto moderadamente ativos. De acordo com os critérios do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, para considerar um extrato bruto promissor para a posterior purificação e

caracterização de seus constituintes ativos, sua CI_{50} deve ser menor que 30 $\mu\text{g/ml}$ (Suffness & Pezzuto 1990).

A predominância de atividade sobre as células tumorais encontrada nos extratos de raiz e caule, onde entre os 28 extratos ativos, 19 eram oriundos desses órgãos vegetais, deve ser ressaltada, sugerindo possível síntese de metabólitos secundários de autodefesa nesses órgãos.

Até onde sabemos, a maioria das espécies vegetais aqui estudadas ainda não haviam sido avaliadas com relação à atividade sobre células tumorais. Entretanto, através da metodologia quimiotaxonômica de busca de novas moléculas ativas, alguns trabalhos corroboram com os resultados encontrados ao descreverem a atividade citotóxica de extratos e compostos isolados a partir de outras espécies pertencentes aos mesmos gêneros: *Annona reticulata* (Yuan *et al.*, 2006), *Annona glabra* (Zhang *et al.*, 2004), *Kielmeyera albopunctata* (Scio *et al.*, 2003) e *Simarouba glauca* (Rivero-Cruz *et al.*, 2005).

A busca por novas opções terapêuticas é de extrema importância para tentar contornar os problemas existentes na terapia atual do câncer, tais como a resistência medicamentosa, toxicidade, baixa especificidade, além da insolubilidade em água.

O fracionamento bioguiado do extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor* possibilitou o isolamento da substância glaucarubinona. Este composto, primeiramente isolado de *Simarouba glauca* por POLONSKY & GAUDEMER (1965), foi previamente isolado de *Simarouba versicolor* (Arriaga *et al.*, 2002; GHOSH *et al.*, 1977), e de outras espécies de Simaroubaceae, tais como *Pierrodendron kerstingii* (KUPCHAN & LACADIE 1975), *Odyendyca gabonensis* (WATERMAN & AMPOFO 1984), *Simarouba amara* (O'NEILL *et al.*, 1988), *Ailanthus excelsa* (JOSHI *et al.*, 2003).

Glaucarubinona demonstrou atividade sobre células de leucemia (GHOSH *et al.*, 1977), carcinoma epidermóide humano da nasofaringe (KB) (GUO *et al.*, 2005; WRIGHT *et al.*, 2003), e em camundongos infectados com leucemia linfocítica P-388 (PS) (GRIECO *et al.*, 1993). O mecanismo de ação proposto para os quassinóides, inclusive a glaucarubinona, está

relacionado à inibição da síntese protéica (GUO *et al.*, 2005; HALL *et al.*, 1983; HALL *et al.*, 1982; FRESNO *et al.*, 1978; LIAO *et al.*, 1976).

Estudos da relação estrutura-atividade citotóxica dos quassinóides detectaram que os seguintes grupamentos são necessários para a obtenção desta atividade: uma cetona α,β -insaturada e um grupo hidroxila vizinho à carbonila, no anel A; um esqueleto básico com quatro anéis, com o anel D lactônico; um grupo éster em C-15 e/ou C-6. Observou-se ainda que, a troca de posição da hidroxila no C-1 e carbonila no C-2 reduz a atividade sensivelmente e que os quassinóides glicosilados se mostram menos ativos que suas moléculas agliconas correspondentes (MURAKAMI *et al.*, 2004).

Outras atividades biológicas da glaucarubinona são descritas como atividade antiprotozoária (GUO *et al.*, 2005; WRIGHT *et al.*, 2003; ROBERT-GERO *et al.*, 1985), inseticida (POLONSKY *et al.*, 1989) e antilarval (LESKINEN *et al.*, 1984).

Do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* obteve-se cinco compostos ainda em fase de elucidação estrutural, além do beta-sitosterol e o alquil resorcinol 1,3-dihidroxi-5-(tridec-4',7'-dienil) benzeno, pela primeira vez isolado desta espécie, e testado sobre as células estudadas neste trabalho (MDA-MB-435, HCT-8, HL-60 e SF-295). A referida substância foi previamente testada sobre as células HEP-G2 (carcinoma hepatocelular), MCF-7 (mama) e H-292 (carcinoma pulmonar), no entanto não apresentou resultados significativos.

Neste trabalho, o efeito do extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea* e da mistura delta-tocotrienol e seu peróxido-dímero obtida do mesmo sobre quatro linhagens de células de câncer humano é descrito pela primeira vez, além da análise do mecanismo de ação da mistura monômero e seu dímero sobre células de leucemia promielocítica humana HL-60. Os experimentos mostraram que a mistura do monômero e seu dímero possui efeito antiproliferativo e citotóxico.

O peróxido-dímero do δ -tocotrienol é descrito pela primeira vez neste trabalho, assim como a ocorrência do monômero nesta espécie de *Kielmeyera*. O δ -tocotrienol é uma isoforma

da vitamina E, juntamente com α , β , γ e δ tocoferol e α , β , γ tocotrienol. Esse composto foi previamente obtido de *Hevea brasiliensis* (WHITTLE *et al.*, 1966), *Kielmeyera reticulata* (CRUZ *et al.*, 2002), *Cratoxylum sumatranum* (SEO *et al.*, 2002), *Pleodendron costaricense* (AMIGUET *et al.*, 2006), dentre outras espécies.

De acordo com os dados discutidos até o momento, podemos confirmar que a mistura em questão é composta pelo monômero do δ -tocotrienol, e seu peróxido-dímero.

No ensaio de investigação da influência da mistura sobre a síntese de DNA foi observado uma inibição da incorporação de BrdU, ou seja a mistura diminuiu a síntese de DNA nas duas concentrações testadas, de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$, resultando em menor número de divisões celulares. A síntese de DNA pode ser alterada por vários processos, inclusive por alterações na topologia do DNA. As enzimas topoisomerases I e II exercem um papel fundamental alterando a topologia do DNA em eventos como o superenrolamento e relaxamento da hélice. Com base nessas informações, um dos possíveis mecanismos de ação proposto, compatível com esse resultado, é a inibição da enzima topoisomerase, que pela alteração da topologia do DNA pode impedir a sua síntese. No entanto experimentos adicionais são necessários para a confirmação dessa hipótese. Vale a pena ressaltar que o medicamento utilizado como controle positivo nos experimentos, a doxorrubicina, é inibidor da topoisomerase II.

Como as enzimas topoisomerase I e II estão envolvidas em processos proliferativos como a replicação do DNA e a condensação cromossômica, são alvo importante para vários medicamentos anticancerígenos (Li & Liu 2001), tais como os inibidores da topoisomerase I, topotecano e irinotecano, análogos da camptotecina de *Camptotheca acuminata*, e inibidores da topoisomerase II, etoposídeo e teniposídeo, análogos da podofilotoxina de *Podophyllum peltatum* e *P. emodi*, acetato de eliptínio, análogo da elipticina de *Ochrosia elliptica*, e os análogos das antraciclinas produzidas pela fermentação de cepas de diferentes espécies de Actinomicetales do gênero *Streptomyces*.

As alterações na morfologia das células HL-60, após tratamento com a mistura monômero e seu dímero, isolados de *K. coriacea*, revelaram na concentração de 10 µg/ml sinais consistentes com o processo necrótico, incluindo núcleo picnótico e desestabilização da membrana plasmática. Os experimentos de exclusão por azul de tripan, e a coloração por Brometo de etídio/Laranja de acridina confirmam esse resultado, pois demonstram um aumento das células mortas, e das células necróticas, respectivamente.

Entretanto, na concentração de 5 µg/ml, as alterações morfológicas encontradas são típicas de células em apoptose, tais como condensação da cromatina e fragmentação do núcleo. Esse resultado foi confirmado pela coloração por BE/LA, demonstrando mais células em apoptose do que em necrose.

As células apoptóticas também exibem algumas modificação na sua morfologia detectáveis por citometria de fluxo, de acordo com as suas propriedades de desvio da luz (FSC/SCC) (Lecoeur *et al.*, 1997; Petit *et al.*, 1995). Redução no volume celular e aumento da granulosidade podem ser analisados respectivamente por FSC (diminuição da luz desviada para frente) e SCC (desvio da luz para o lado). Assim, as alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com a mistura monômero e seu dímero, isolados de *K. coriacea*, são compatíveis com o aumento das células apoptóticas. O tratamento com a mistura também induziu um aumento do DNA sub-diplóide, indicando uma quebra no DNA internucleosomal, confirmando o processo de células apoptóticas. Além disso, os histogramas da citometria de fluxo (dados não apresentados) indicam que a mistura causa uma parada no ciclo na fase G₂/M.

A alteração da função mitocondrial também está relacionada à apoptose. A diminuição do potencial transmembrânico da mitocôndria leva a uma diminuição da síntese de DNA pelas células (Pedersen, 1999). A despolarização da mitocôndria é refletida pela menor captação de rodamina 123 pela mitocôndria. Com base nesse princípio, dados de citometria de fluxo demonstraram que a mistura também alterou este parâmetro, indicando portanto uma indução de apoptose.

CONCLUSÃO

Após realizada a triagem com o banco de extratos de plantas do Cerrado do Laboratório de Farmacognosia/UnB, o extrato hexânico da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea* foi submetido a estudo químico biomonitorado, do qual foi obtido a mistura δ -tocotrienol e seu peróxido-dímero com importante atividade citotóxica. Após estudos de mecanismo de ação sobre células de leucemia promielocítica (HL-60), verificou-se que a mistura possui efeito citotóxico e antiproliferativo sobre essas células, causando alterações no ciclo celular como inibição na síntese de DNA e indução de morte por apoptose e necrose.

Do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* foram extraídas 5 substâncias em fase de elucidação estrutural, um alquil resorcinol inédito nesta espécie denominado 1,3-dihidroxi-5-(tridec-4',7'-dienil) benzeno e o β -sitosterol. Do extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor* isolou-se a glaucarubinona, substância extremamente ativa sobre as células de câncer, apresentando resultados inéditos sobre as células HL-60, SF-295 e HCT-8.

Dessa forma, esse estudo demonstra que o Cerrado, e as substâncias isoladas de suas plantas, possui potencial de estudo, possibilitando a continuação das investigações na busca de novas moléculas líderes, que possam compor o arsenal de medicamentos anticancerígenos, e contornar os fenômenos da resistência medicamentosa, toxicidade, baixa especificidade ou ainda problemas ligados à solubilidade e biodisponibilidade de moléculas.

PERSPECTIVAS

Concluir a elucidação estrutural das substâncias isoladas do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* e submetê-las a ensaios farmacológicos mais aprofundados, como os ensaios de mecanismo de ação sobre as células de câncer.

Utilizar outras técnicas cromatográficas com o intuito de separar o delta-tocotrienol de seu peróxido-dímero. Dessa forma, poderíamos repetir os ensaios sobre as células de câncer com as moléculas separadas a fim de avaliar a atividade de cada composto separadamente.

Submeter as moléculas isoladas de *Simarouba versicolor*, *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* e *Kielmeyera coriacea* a ensaios sobre outras linhagens de câncer humano, a fim de verificar se existe uma especificidade de ação sobre determinado tipo de câncer. Em seguida, as moléculas terão sua citotoxicidade avaliada sobre linfócitos humanos.

As moléculas com atividade mais importante serão submetidas a ensaios de modificação estrutural a fim de diminuir a toxicidade, se for o caso, melhorar a solubilidade, caso sejam apolares, e aumentar a ação sobre as células de câncer. Além disso, através das modificações estruturais poderemos identificar os grupos farmacofóricos destas substâncias, e entender a relação estrutura-atividade.

A fim de começarmos a consolidar o projeto de obtenção de um novo medicamento anti-câncer ensaios de síntese devem ser realizados, a fim de facilitar a obtenção das substâncias ativas em quantidade suficiente para posteriores estudos pré-clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ESTRADA-MUÑOZ, E.; HUERTA-REYES, M.; REYES-CHILPA, R. **Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense***. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v.27, p.141-143, 2004.
- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKAWA, M.; KINJO, J.; AKAHANE, H.; OGURA, T.; MARTINEZ-ALFARO, M.A.; REYES-CHILPA, R. **Trypanocidal constituents in plants 5. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana***. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v.28, p.1314-1317, 2005.
- AKAY, S.; KARASU, Z.; AKYILDIZ, M.; TOKAT, Y.; GOKER, E. **Successful treatment of liver transplant-associated Kaposi's sarcoma with long-term vincristine**. *Transplantation proceedings*, v.37, p.2188-2189, 2005.
- ALFONSO, D.; COLMAN-SAZARBITORIA, T.; ZHAO, GENG-XIAN.; SHI, GUOEN.; YE, QING.; SCHWEDLER, J.T.; MCLAUGHLIN, J.L. **Aromin and aromicin, two new bioactive annonaceous acetogenins, possessing an unusual bis-THF ring structure, from *Xylopia aromatica* (Annonaceae)** *Tetrahedron*, v 52, p.4215-4224, 1996.
- ALLEN, J.D.; DORT, S.C.V.; BUITELAAR, M.; TELLINGEN, O.V.; SCHINKEL, A.H. **Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by p-glycoprotein**. *Cancer research*, v.63, p.1339-1344, 2005.
- ALLEY, M.C.; SCUDIERO, D.A.; MONKS, A.; CZERWINSKI, M.; SHOEMAKER, R.H.; BOYD, M.R. **Validation of an automated microculture tetrazolium assay (MTA) to assess growth and drug sensitivity of human tumor cell lines**. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res*, v.27, p.389, 1996.
- AMIGUET, V.T.; PETIT, P.; TA, C.A.; NUÑEZ, R.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; ALVAREZ, L.P.; SMITH, M.L.; ARNASON, J.T.; DURST, T. **Phytochemistry and antifungal properties of the newly discovered tree *Pleodendron costaricense***. *Journal of Natural Products*, v.69, p. 1005-1009, 2006.
- APTSIAURI, N.; CABRERA, T.; MENDEZ, R.; GARCIA-LORA, A.; RUIZ-CABELLO, F.; GARRIDO, F. **Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression**. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.601, p.123-131, 2007.
- ARRIAGA, A.M.C.; DE MESQUITA, A.C.; POULIQUEN, Y.B.M.; DE LIMA, R.A.; CAVALCANTE, S.H.; DE CARVALHO, M.G.; DE SIQUEIRA, J.A.; ALEGRIO, L.V.; BRAZ-FILHO, R. **Chemical constituents of *Simarouba versicolor***. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 74, p. 415-424, 2002.

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.C. DA SILVA, I.G. **Toxicity of the ethanol extract of *Magonia pubescens* on larvae *Aedes aegypti*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36, p.17-25, 2003.

AUDI, E.A.; OTOBONE, F.; MARTINS, J.V.C.; CORTEZ, D.A.G. **Preliminary evaluation of *Kielmeyera coriacea* leaves extract on the central nervous system.** Fitoterapia, v.73, p.517–519, 2002.

BAI, S.-.; WEI, Q.-.; JIN, X.-.; WU, Q.-. YANG, L. **Two novel ent-kauranoid diterpenoids from *Isodon japonica* leaves.** Planta Medica, v.71, p. 764-769, 2005.

BALBACH, A. **As Plantas Curam.** Ed. Missionária, São Paulo, 22^a ed., 1963.

BARRY, E.; ALVAREZ, J.A.; SCULLY, R.E.; MILLER, T.L.; LIPSHULTZ, S.E. **Anthracycline-induced cardiotoxicity: Course, pathophysiology, prevention and management.** Expert Opinion on Pharmacotherapy, v.8, p. 1039-1058, 2007.

BAXEVANIS, C.N.; PEREZ, S.A.; PAPAMICHAIL, M. **Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy.** Cancer Immunology, Immunotherapy, v.58, p. 317-324, 2009.

BEZERRA, D.P.; MILITAO, G.C.; DE CASTRO, F.O.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.; ELMIRO, F.J.; COSTA-LOTUFO, L.V. **Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways.** Toxicology in vitro, v.21, p.1-8, 2007.

BHUSHAN, S.; KUMAR, A.; MALIK, F.; ANDOTRA, S.S.; SETHI, V.K.; KAUR, I.P.; TANEJA, S.C.; QAZI, G.N.; SINGH, J. **A triterpenediol from *Boswellia serrata* induces apoptosis through both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in human leukemia HL-60 cells.** Apoptosis, v.12, p. 1911-1926, 2007.

BIEDLER, J.; RIEHM, H. **Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster *in vitro*: cross resistance, radioautographic and cytogenetic studies.** Cancer Research, v.30, p.1174-1180, 1970.

BLAIR, S.; CORREA, A.; MADRIGAL, B.; ZULUAGA, C.B.; FRANCO, H.D. **Plantas antimaláricas, una revisión bibliográfica.** Ed.Universidad de Antioquia, Medellín, 1991.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo: patologia.* 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 1472 p, 2006.

BOHLIN, L.; ROSEN, B. **Podophyllotoxin derivatives: drug Discovery and development.** Drug Discovery today, v.1, p.343-351, 1996.

BOLETI, A.P.A.; FREIRE, M.G.M.; COELHO, M.B.; DA SILVA, W.; BALDASSO, P.A.; GOMES, V.M.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MACEDO, M.L.R. **Insecticidal and Antifungal Activity of a Protein from *Pouteria torta* Seeds with Lectin-like Properties.** J. Agric. Food Chem, v.55, p. 2653-2658, 2007.

- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste—Especialmente do Ceará**, Ed. Universitária da UFRN, Natal, 4^a ed., 1953.
- BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. **Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil** Journal of Ethnopharmacology, v.111, p. 396–402, 2007a.
- BRAGA, F.C.; SERRA, C.P.; VIANA JR, N.S.; OLIVEIRA, A.B.; CÔRTEZ, S.F.; LOMBARDI, J.A. **Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants** Fitoterapia, v.78, p.353–358, 2007b.
- BRANCO NETO, M.L.C.; RIBAS FILHO, J.M.; MALAFAIA, O.; DE OLIVEIRA FILHO, M.A.; CZECZKO, N.G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V.R.; TEIXEIRA, H.M.; DE AGUIAR, L.R.F. **Evaluation of hydroalcoholic extract of Aroeira (*Schinus Terebinthifolius* Raddi) in the healing process of wound skin in rats**. Acta Cirúrgica Brasileira, v.21, p. 17, 2006.
- BRANNSTROM, C.; JEPSON, W.; FILIPPI, M.A.; REDO, D.; XU, ZE.; GANESH, S. **Land change in the Brazilian Savanna (Cerrado), 1986–2002: Comparative analysis and implications for land-use policy**. Land Use Policy, v.25, p.579-595, 2008.
- BRENZAN, M.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M.C.M.; CORTEZ, D.A.G. **Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis***. Parasitology Research, v.101, p.715–722, 2007.
- BRIDGEWATER, S.; RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F. **Biogeographic patterns, b-diversity and dominance in the Cerrado biome of Brazil**. Biodiversity and Conservation, v.13, p.2295–2318, 2004.
- BRUSERUD, Ø.; ERSVÆR, E.; OLSNES, A.; GJERTSEN, B.T. **Anticancer immunotherapy in combination with proapoptotic therapy**. Current Cancer Drug Targets, v.8, p. 666-675, 2008.
- CASU, L.; BONSIGNORE, L.; PINNA, M.; CASU, M.; FLORIS, C.; GERTSCH, J.; COTTIGLIA, F. **Cytotoxic diacetylenic spiroketal enol ethers from *Plagius flosculosus***. Journal of Natural Products, v.69, p. 295-298, 2006.
- CAVALCANTI, S.B.T.; TELES, H.L.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; YOUNG, M.C.M.; BOLZANI, V.S. **New Tetra-acetylated Oligosaccharide Diterpene from *Cupania vernalis***. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.12, p. 413-416, 2001.
- CERSISIMO, R.J. **Irinotecan: a new antineoplastic agent for the management of colorectal cancer**. Ann Pharmacother, v.32, p.1324–1333, 1998.
- CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G. **Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)**. Química. Nova, v.30, p.597-599, 2007.

CHABNER, B.; ALLEGRA, C.J.; CURT, G.; CALABRESI, P. **Agentes antineoplásicos**. In: GOODMAN & GILMAN'S: As bases farmacológicas da terapêutica. Ed. By Goodman LS. McGraw-Hill, Rio de Janeiro, p-909-952, 1996.

CHANG, F.-.; HAYASHI, K.-.; CHEN, I.-.; LIAW, C.-.; BASTOW, K.F.; NAKANISHI, Y.; NOZAKI, H.; CRAGG, G.M.; WU, Y.-.; LEE, K.-. **Antitumor Agents. 228. Five New Agarofurans, Reissantins A-E, and Cytotoxic Principles from Reissantia buchananii**. Journal of Natural Products, v.66, p. 1416-1420, 2003.

CHE, C.-.; KOIKE, K.; CORDELL, G.A.; FONG, H.H.S.; DOBBEHSTETN, R.H. **Triterpenes of Pouteria Torta (Sapotaceae)**. Journal of Natural Products (Lloydia), v.43, p.420-421, 1980.

CHEN, G.-.; LI, Z.-.; PAN, D.-.; TANG, C.-.; HE, X.; XU, G.-.; CHEN, K.; LEE, K.-. **The isolation and structural elucidation of four novel triterpene lactones, pseudolarolides A, B, C, and D, from Pseudolarix kaempferi**. Journal of Natural Products, v.56, p. 1114-1122, 1993.

CHEN, Y. YU, D.Q. **Tonkinelin: A novel Annonaceous acetogenin from Uvaria tonkinensis**. Planta Medica, v.62, p. 512-514, 1996.

CHEN, S.-.; GAO, G.-.; LI, Y.-.; YU, S.-. XIAO, P.-. **Cytotoxic constituents from Aquilegia ecalcarata**. Planta Medica, v.68, p.554-556, 2002.

CHEN, Y.-.; CHEN, H.-.; HSU, C.-. YEN, G.-. **Induction of apoptosis by the Lactuca indica L. in human leukemia cell line and its active components**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.55, p.1743-1749, 2007a.

CHEN, Y.-.; XU, J.-.; YU, H.; QING, C.; ZHANG, Y.-.; LIU, Y. WANG, J.-. **3,7-dihydroxy-2,4,6-trimethoxyphenanthrene, a new phenanthrene from Bulbophyllum odoratissimum**. Journal of the Korean Chemical Society, v.51, p.352-355, 2007b.

CHEN, Y.; LI, Y.; QING, C.; ZHANG, Y.; WANG, L.; LIU, Y. **1,4,5-Trihydroxy-7-methoxy-9H-fluoren-9-one, a new cytotoxic compound from Dendrobium chrysotoxum**. Food Chemistry, v.108, p.973-976, 2008.

CHENG, H.-.; WANG, H.-.; ITO, J.; BASTOW, K.F.; TACHIBANA, Y.; NAKANISHI, Y.; XU, Z.; LUO, T.-.; LEE, K.-. **Cytotoxic pheophorbide-related compounds from Clerodendrum calamitosum and C. cyrtophyllum**. Journal of Natural Products, v.64, p. 915-919, 2001.

CHOI, H.J.; CHO, B.C.; SHIN, S.J.; CHEON, S.H.; JUNG, J.Y.; CHANG, J.; KIM, S.K.; SOHN, J.H. KIM, J.H. **Combination of topotecan and etoposide as a salvage treatment for patients with recurrent small cell lung cancer following irinotecan and platinum first-line chemotherapy**. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, v.61, p.309-313, 2008.

COELHO, A.A.M.; DE PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. **Insecticidal activity of Cerrado plant extracts on Rhodnius milesi Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions**. Neotropical Entomology, v.35, p.133-138, 2006.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; ZAMBRANO, J.; FERRIGNI, N.R.; GU, Z.M.; NG, JH, SMITH DL, MCLAUGHLIN JL. **Bioactive annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatica***. Journal of Natural products, v.57, p.486-93, 1994a.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; GU, Z.-M.; MCLAUGHLIN, JL. Two New Bioactive **Monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatica***. Journal of natural products, v.57, p.1661-1669, 1994b.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; GU, Z.M.; ZHAO, G.X.; ZENG, L.; KOZLOWSKI, J.F.; MCLAUGHLIN, J.L. **Venezenin: a new bioactive Annonaceous acetogenin from the bark of *Xylopia aromatica***. Journal of Natural products, v. 58, p.532-539, 1995.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; ALFONSO, D.; MCLAUGHLIN, J.L. **2,4-cis- and trans-venezinones: New bioactive ketolactone Annonaceous acetogenins, lacking tetrahydrofuran rings, from *Xylopia aromatica***. Phytochemical Analysis, v.7, p. 313-317, 1996.

CORDERO, C.P.; GOMEZ-GONZALEZ, S.; LEON-ACOSTA, C.J.; MORANTES-MEDINA, S.J.; ARISTIZABAL, F.A. **Cytotoxic activity of five compounds isolated from Colombian plants**. Fitoterapia, v.75, p. 225–227, 2004.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Volume III, 1978.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Volume V, 1978.

CORRÊA, M.P., PENNA, L.A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ed. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1984.

CORTEZ, D.A.G.; YOUNG, M.C.M.; MARSTON A.; WOLFENDER, J.-L.; HOSTETTMANN, K. **Xanthonés, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea***. Phytochemistry, v.47, p.1367-1374, 1998.

CORTEZ, D.A.G.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. **Separation of Xanthonés and a Biphenyl from *Kielmeyera coriacea* by Centrifugal Partition Chromatography**. Chromatographia, v.50, p.7-10, 1999.

CORTEZ, D.A.G.; ABREU FILHO, B.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. **Antibacterial Activity of a Biphenyl and Xanthonés from *Kielmeyera coriacea***. Pharmaceutical Biology, v.40, p.485 – 489, 2002.

COTTIGLIA, F.; DHANAPAL, B.; STICHER, O.; HEILMANN, J. **New Chromanone Acids with Antibacterial Activity from *Calophyllum Brasiliense***. Journal of Natural products, v.67, p.537-541, 2004.

COULADOUROS, E.A.; MOUTSOS, V.I.; LAMPROPOULOU, M.; LITTLE, J.L.; HYATT, J.A. **A short and convenient chemical route to optically pure 2-methyl chromanmethanols. Total asymmetric synthesis of β -, γ -, and δ -tocotrienols.** Journal of Organic Chemistry, v.72, p. 6735-6741, 2007.

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

CRUZ, F.G.; MOREIRA, L.D.M.; SANTOS, N.A.S.; GUEDES, M.L.S. **Additional coumarins from *Kielmeyera reticulata*.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v.13, p. 704-707, 2002.

DA SILVA, K.L.; DOS SANTOS, A.R.S.; MATTOS, P.E.O.; YUNES, R.A.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. **Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves.** Therapie, v.4, p.431-434, 2001.

DA SILVA, L.B.L.; ALBUQUERQUE, E.M., ARAÚJO, E.D.L., DE SANTANA, D.P. **Preliminary clinical evaluation of different aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) formulation for vaginal use.** Revista Brasileira de Medicina, v.61, p.381-384, 2004.

DALGLEISH, A.G.; WHELAN, M.A. **Cancer vaccines as a therapeutic modality: The long trek.** Cancer Immunology, Immunotherapy, v.55, p. 1025-1032, 2006.

DAMASCENO ROCHA, D.; GADELHA MILITÃO, G.C.; VERAS, M.L.; DEUSDÊNIA LOIOLA PESSOA, O.; ROCHA SILVEIRA, E.; NEGREIROS NUNES ALVES, A.P.; ODORICO DE MORAES, M.; PESSOA, C.; VERAS COSTA-LOTUFO, L. **Selective cytotoxicity of withaphysalins in myeloid leukemia cell lines versus peripheral blood mononuclear cells.** Life Sciences, v.79, p. 1692-1701, 2006.

DAS SARMA, M.; GHOSH, R.; PATRA, A.; HAZRA, B. **Synthesis and antiproliferative activity of some novel derivatives of diospyrin, a plant-derived naphthoquinonoid.** Bioorganic and Medicinal Chemistry, v.15, p.3672-3677, 2007.

DE ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; DE AMORIM, E.L. **Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil.** Journal of Ethnopharmacology, v.1, p.76-91, 2007.

DE ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; DE AMORIM, E.L. **Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil.** Journal of Ethnopharmacology, v.110, p.76-91, 2007.

DE ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; BARRETT REINA, L.D.C.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. **Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: An introduction.** Quimica Nova, v.28, p. 118-129, 2005.

DE CARVALHO, M.C.R.D.; BARCA, F.N.T.V.; AGNEZ-LIMA, L.F.; DE MEDEIROS, S.R.B. **Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi).** Environmental and molecular mutagenesis, v.42, p.185-191, 2003.

DE LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; DOS SANTOS, A.F.; DE ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J-P.; MÁRQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. **Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants**. Journal of Ethnopharmacology, v.105, p.137–147, 2006.

DE MELO, A.C.; COTA, B.B.; DE OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. **HPLC quantitation of kaurane diterpenes in Xylopiya species**. Fitoterapia, v.72, p.40-45, 2001.

DE MELO JÚNIOR, E.J.M.; RAPOSO, M.J.; LISBOA NETO, J.A.; DINIZ, M.F.A.; MARCELINO JÚNIOR, C.A.C.; SANT'ANA, A.E.G. **Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: Microbiological and microscopic analysis**. Phytomedicine, v.9, p.109–116, 2002.

DE MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; DE PAULA, J.E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. **Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.100, p.783-787, 2005b.

DE MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. **In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies**. Journal of Ethnopharmacology, v.110, p.165-170, 2007.

DE MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; BLOND, A.; BROUARD, J-P.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; MAMBU, L. **New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity**. Bioorganic and Medicinal chemistry, v.13, p.4499-4506, 2005a.

DE OMENA, M.C.; NAVARRO, D.M.A.F.; DE PAULA, J.E.; LUNA, J.S.; FERREIRA DE LIMA, M.R.; SANT'ANA, A.E.G. **Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants**. Bioresource Technology, v.98, p.2549–2556, 2007.

DE PAULA, J.E., ALVES, J.L.H. **Madeiras Naturais: Anatomia, Dendrologia, Dendrometria, Produção e Uso**. Ed. Fundação Mokiti Okada-MOA, Brasília, 1997.

DE SOUZA, C.D.; FELFILI, J.M. **Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil**. Acta botânica brasileira, v.20, p.135-142, 2006.

DELORME, R.J.; MIOLLA, H. **Pronto Socorro do Sertão - A Cura Pelas Plantas**, Ed. Grofosul, Porto Alegre, 1ª ed., 1979.

DENNIS, M.J.; BEIJNENE, J.H.; GROCHOW, L.B.; VAN WAMERDAM, L.J. **An overview of the clinical pharmacology of topotecan**. Semin Oncol. v.24, p.S5-12–S5-18, 1997.

DING, Y.F.; BAO, X.D.; AN, L.J. **Progress research of antitumor agents vinblastine analogues**. Chin J Pharm. v.26, p.424–428, 2005.

DOS SANTOS, O.J.; RIBAS FILHO, J.M.; CZECHKO, N.G.; CASTELO BRANCO NETO, M.L.; NAUFEL, C. JR, FERREIRA, L.M.; CAMPOS, R.P.; MOREIRA, H.; PORCIDES, R.D.; DOBROWOLSKI, S. **Evaluation of the arereira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in the healing process of surgical incision in the bladder of rats**. Acta Cir Bras. v.21, p.39-45, 2006.

DUKE, J.A.; MARTINEZ, R.V. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**. Ed. CRC Press. 1994.

ELISABETSKY, E.; CASTILHOS, Z.C. **Plants used as analgesics by Amazonian caboclos as a basis for selecting plants for investigation.** International Journal of Crude Drug Research, v.28, p. 309-320, 1990.

ESPINDOLA, L.S. **Cerrado: fonte de descoberta de novos medicamentos.** Brasília Médica, v.44, p.193-198, 2007.

ESPINDOLA, L.S.; VASCONCELOS, J. R. JR.; DE MESQUITA, M. L.; MARQUIÉ, P.; DE PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. **Trypanocidal activity of a new diterpene from Casearia sylvestris var. lingua.** Planta Medica, v.70, p.1093-1095, 2004.

FANG, K.; CHEN, S.P.; LIN, C.W.; CHENG, W.C.; HUANG, H.T. **Ellipticine-induced apoptosis depends on Akt translocation and signaling in lung epithelial cancer cells** Lung Câncer, 2008. *Article in press.*

FERNANDES, M.Z.L.C.M.; FERNANDES, R.M.; VIANA, G.E.N.; LOPES, J.B. **Determinação da toxicidade aguda (DL50) do extrato aquoso da Simarouba versicolor St. Hill, em camundongos.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.6, p.48-51, 2004.

FERREIRA, L.G.; HUETE, A. **Assessing the seasonal dynamics of the Brazilian Cerrado vegetation through the use of spectral vegetation indices.** International Journal of Remote Sensing, v.25, p.1837–1860, 2004.

FLECK, J. **Câncer- Integração clínico biológico.** Ed. Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, 1992.

FONG, W.-F.; WANG, C.; ZHU, G.-Y.; LEUNG, C.-H.; YANG, M.-S.; CHEUNG, H.-Y. **Reversal of multidrug resistance in cancer cells by Rhizoma Alismatis extract.** Phytomedicine, v.14, p.160-165, 2007.

FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; CHARLES, B.; FOURNIAT, J., LEBOEUF M, CAVÉ A **Chemical and biological studies of Xylopia aromatica stem bark and leaf oils.** Planta Medica, v.60, p.283-284, 1994.

FRESNO M.; GONZALES A.; VAZQUEZ D.; JIMENEZ A. **Bruceantin, a novel inhibitor of peptide bond formation.** Biochimica et biophysica acta v.518, p.104-112, 1978.

FU, G.-.; QIN, H.-.; YU, S.-.; YU, B.-. **Yuexiandajisu D, a novel 18-nor-rosane-type dimeric diterpenoid from Euphorbia ebracteolata Hayata.** Journal of Asian Natural Products Research, v.8, p. 29-34, 2006.

GARAVITO G, RINCÓN J, ARTEAGA L, HATA Y, BOURDY G, GIMENEZ A, PINZÓN R, DEHARO E **Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants.** Journal of Ethnopharmacology, v.107, p.460-462, 2006.

GARCIA DA SILVA, H.H.; GARCIA DA SILVA, I.; GERIS DOS SANTOS, R.M.; RODRIGUES FILHO, E. ELIAS, C.N. **Larvicidal activity of tannins isolated of Magonia pubescens St. Hil.**

(Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.37, p.396-399, 2004.

GASPAROTTO JR, ARQUIMEDES.; BREZZAN, M.A.; PILOTO, I.C.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; RODRIGUES FILHO, E.; FERREIRA, A.G. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* CMB (Clusiaceae).** Química Nova, v.28, p.575-578, 2005.

GAUDEMER, A.; POLONSKY, J. **Structure de la glaucarubinone nouveau principe amer isole de *Simaruba glauca*.** Phytochemistry, v.4, p. 149-153, 1965.

GENG, Y.J.; PHILLIPS, J.E.; MASON, R.P.; CASSCELLS, S.W. **Cholesterol crystallization and macrophage apoptosis: implication for atherosclerotic plaque instability and rupture.** Biochemical Pharmacology, v.66, p.1485-1492, 2003.

GHOSH, P.C.; LARRAHONDO, J.E.; LE QUESNE, P.W., RAFFAUF, R.F. **Antitumor plants. IV. Constituents of *Simarouba versicolor*.** Lloydia, v.40, p.364-369, 1977.

GIRI, A.; LAKSHMI NARASU, M. **Production of podophyllotoxin from *Podophyllum hexandrum*: a potential natural product for clinically useful anticancer drugs.** Cytotechnology, v.34, p.17-26, 2000.

GOODWIN, S.; SMITH, A.F.; HORNING, E.C. **Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill.** Journal of the American Chemical Society v.81, p.1903-1908, 1959.

GORDALIZA, M.; GARCÍA, P.A.; MIGUEL DEL CORRAL, J.M.; CASTRO, M.A.; GÓMEZ-ZURITA, M.A. **Podophyllotoxin: Distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives.** Toxicon, v.44, p.441-459, 2004.

GORDALIZA, M. **Natural products as leads to anticancer drugs.** Clinical and Translational Oncology, v.9, p.767-776, 2007.

GOULART, Y.C.F.; SELA, V.R.; OBICI, S.; MARTINS, J.V.C.; OTOBONE, F.; CORTEZ, D.A.; AUDI, E.A. **Evaluation of Gastric Anti-ulcer Activity in a Hydroethanolic Extract from *Kielmeyera coriacea*.** Brazilian Archives Of Biology and technology, v.48, p.211-216, 2005.

GOULART, Y.C.F.; MARTINS, J.V.C.; SANTOS, A.R.; MOREIRA, L.Y.; CALIXTO, J.B.; CORTEZ, D.A.G.; AUDI, E.A. **Involvement of Serotonin in the Antidepressant-like Effect of Extract from *Kielmeyera coriacea* Stems.** Pharmaceutical Biology, v.45, p.169-175, 2007.

GRIECO, P.A.; COLLINS, J.L.; MOHER, E.D.; FLECK, T.J.; GROSS, R.S. **Synthetic studies on quassinoids: Total synthesis of (-)-chaparrinone, (-)-glaucarubolone, and (+)-glaucarubinone.** Journal of the American Chemical Society, v.115, p. 6078-6093, 1993.

GUIDA, C.; MAIONE, P.; ROSSI, A.; BARESCINO, M.; SCHETTINO, C.; BARZAGHI, D.; ELMO, M.; GRIDELLI, C. **Combined chemo-radiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer: Current status and future development.** Critical Reviews in Oncology/Hematology, v.68, p. 222-232, 2008.

GUO, Z.; VANGAPANDU, S.; SINDELAR, R. W.; WALKER, L. A.; SINDELAR, R. D. **Biologically active quassinoids and their chemistry: Potential leads for drug design.** Current Medicinal Chemistry v.12, p.173-19, 2005.

GRIECO, P.A.; COLLINS, J.L.; MOHER, E.D.; FLECK, T.J.; GROSS, R.S. **Synthetic studies on quassinoids: total synthesis of (-)- chaparrinone, (-)- glaucarubolone, and (+)- glaucarubinone.** Journal of the American Chemical Society, v.115, p.6078-6093, 1993.

GUTHRIE, N.; GAPOR, A.; CHAMBERS, A.F.; CARROLL, K.K. **Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF-7 human breast cancer cells by palm oil tocotrienols and tamoxifen, alone and in combination.** Journal of Nutrition, v.127, p. 544S-548S, 1997.

HAIT, W.N.; RUBIN, E.; ALLI, E.; GOODIN, S. **Tubulin targeting agents.** Update Cancer Therapeutics, v.2, p.1–18, 2007.

HALL, I.H.; LIOU, Y.F.; OKANO, M.; LEE, K.H. **Antitumor agents XLVI: In vitro effects of esters of brusatol, bisbrusatol, and related compounds on nucleic acid and protein synthesis of P-388 lymphocytic leukemia cells.** Journal of pharmaceutical sciences v.71, p.345-348, 1982.

HALL, I.H.; LIOU, Y.F.; LEE, K.H.; CHANEY, S.G.; WILLINGHAM, W.JR. **Antitumor agents. LIX: Effects of quassinoids on protein synthesis of a number of murine tumors and normal cells.** Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 72, p.626-630, 1983.

HANAHAH, D.; WEINGERG, R.A. **The Hallmarks of cancer.** Cell, v.100, p.57-70, 2000.

HARAGUCHI, M.; MIMAKI, Y.; MOTIDOME, M.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y. **Steroidal saponins from the leaves of *Cestrum sendtnerianum*.** Phytochemistry, v.55, p.715-720, 2000.

HARWELLN, J.L.; SCHRECKER, A.W. **Components of podophyllin. V. The constitution of podophyllotoxin.** J Am Chem Soc. v.73, p.2909–2916, 1951.

HE, L.; HOU, J.; GAN, M.; SHI, J.; CHANTRAPROMMA, S.; FUN, H.-.; WILLIAMS, I.D. SUNG, H.H.-. **Cadinane sesquiterpenes from the leaves of *Eupatorium adenophorum*.** Journal of Natural Products, v.71, p.1485-1488, 2008.

HIRANO, T.; OKA, K.; MIMAKI, Y.; KURODA, M. SASHIDA, Y. **Potent growth inhibitory activity of a novel *Ornithogalum* cholestane glycoside on human cells: Induction of apoptosis in promyelocytic leukemia HL-60 cells.** Life Sciences, v.58, p.789-798, 1996.

HUANG, G.-.; CHIEN, T.-.; CHEN, L.-.; WANG, C.-. **Antitumor effects of zerumbone from *Zingiber zerumbet* in P-388D1 cells in vitro and in vivo.** Planta Medica, v.71, p. 219-224, 2005.

HUERTA-REYES, M.; BASUALDO, M.C.; ABE, F.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. **HIV-1 Inhibitory Compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves.** Biological Pharmaceutical Bulletin, v.27, p.1471-1475, 2004a.

HUERTA-REYES, M.; BASUALDO, M.C.; LOZADA, L.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. **HIV-1 Inhibition by Extracts of Clusiaceae Species from México.** Biology Pharmaceutical Bulletin, v.27, p.916-920, 2004b.

ILIYA, I.; AKAO, Y.; MATSUMOTO, K.; NAKAGAWA, Y.; ZULFIQAR, A.; ITO, T.; OYAMA, M.; MURATA, H.; TANAKA, T.; NOZAWA, Y.; IINUMA, M. **Growth inhibition of stilbenoids in Welwitschiaceae and Gnetaceae through induction of apoptosis in human leukemia HL60 cells.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, v.29, p. 1490-1492, 2006.

IMAMURA, K.; FUKAMIYA, N.; OKANO, M.; TAGAHARA, K. LEE, K.-. **Bruceanols D, E, and F. Three new cytotoxic quassinoids from *Brucea antidysenterica*.** Journal of Natural Products, v.56, p.2091-2097, 1993.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; CECHINEL FILHO, V.; ENJO, F.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. **Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of Three New Coumarins and Cancer Chemopreventive Activity of 4-Substituted Coumarins.** Journal of Natural Products, v.66, p.368-371, 2003.

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.

JAHANIANI, F.; EBRAHIMI, S.A.; RAHBAR-ROSHANDEL, N.; MAHMOUDIAN, M. **Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent.** Phytochemistry, v.66, p.1581-1592, 2005.

JANG, K.-.; KIM, S.-.; SONG, E.-.; UM, Y.-.; KIM, S.-., LEE, Y.-. **Isolation and identification of anticancer and anti-inflammatory substances in *Peucedanum japonicum* Thunb.** Acta Horticulturae, v.765, p.49-53, 2008.

JARRY, H.; THELEN, P.; CHRISTOFFEL, V.; SPENGLER, B.; WUTTKE, W. ***Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 inhibits proliferation of the human prostate cancer cell line LNCaP.** Phytomedicine, v.12, p.178-182, 2005.

JI, B-S.; HE, L.; LIU, G-Q. **Reversal of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance by CJX1, an amlodipine derivative, in doxorubicin-resistant human myelogenous leukemia (K562/DOX) cells.** Life Sciences, v.77, p.2221-2232, 2005.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M.G.; DONNICI, C.L.; DE RESENDE, M.A. **Antifungal properties of plants used in Brazilian Traditional Medicine against clinically relevant fungal pathogens.** Brazilian Journal of Microbiology, v.38, p.632-637, 2007.

JOHNSON, I.S.; ARMSTRONG, J.G.; GORMAN, M. **The *Vinca* alkaloids: a new class of oncolytic agents.** *Cancer Research*, v.23, p.1390-1397, 1963.

JOSHI, B.C.; PANDEY, A.; SHARMA, R.P.; KHARE, A. **Quassinoids from *Ailanthus excelsa*.** *Phytochemistry* v.62, p.579-584, 2003.

JULIANO, R.L.; LING, V. **A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.** *Biochim Biophys Acta*, v.455, p.152-162, 1976.

KARIOTI, A.; SKOPELITI, M.; TSITSILONIS, O.; HEILMANN, J.; SKAL TSA, H. **Cytotoxicity and immunomodulating characteristics of labdane diterpenes from *Marrubium cylleneum* and *Marrubium velutinum*.** *Phytochemistry*, v.68, p.1587-1594, 2007.

KELLAND, L.R. **Emerging drugs for ovarian cancer.** *Expert Opin Emerg Drugs*, v.10, p.413-424, 2005.

KIMURA, S.; ITO, C.; JYOKO, N.; SEGAWA, H.; KURODA, J.; OKADA, M.; ADACHI, S.; NAKAHATA, T.; YUASA, T.; CECHINEL FILHO, V.; FURUKAWA, H.; MAEKAWA, T. **Inhibition of Leukemic Cell Growth by a Novel Anti-Cancer Drug (GUT-70) from *Calophyllum Brasiliense* that Acts by Induction of Apoptosis.** *International Journal of Câncer*, v.113, p.158-165, 2005.

KINGSTON, D.G.; NEWMAN, D.J. **Taxoids: cancer-fighting compounds from nature.** *Curr Opin Drug Discov Devel.* v.10, p.130-144, 2007.

KLINK, A.C.; MACHADO, R.B. **A conservação do Cerrado brasileiro.** *Megadiversidade*, v.1, p.147-155, 2005

KO, W.G.; KANG, T.H.; LEE, S.J.; KIM, N.Y.; KIM, Y.C.; SOHN, D.H.; LEE, B.H. **Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells.** *Food and Chemical Toxicology*, v.38, p.861-865, 2000.

KOROKOLVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara.** Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1998.

KOSSUGA, M.H.; DE LIRA, S.P.; NASCIMENTO, A.M.; GAMBARDELLA, M.T.P.; BERLINCK, R.G.S.; TORRES, Y.R.; NASCIMENTO, G.G.F.; PIMENTA, E.F.; SILVA, M.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; TEMPONE, A.G.; MELHEM, M.S.C.; DE SOUZA, A.O.; GALETTI, F.C.S.; SILVA, C.L.; CAVALCANTI, B.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S. ROCHA, R.M. **Isolation and biological activities of secondary metabolites from the sponges *Monanchora* aff. *arbuscula*, *Aplysina* sp. *Petromica ciocalyptoides* and *Topsentia ophiraphidites*, from the ascidian *Didemnum ligulum* and from the octocoral *Carijoa riisei*.** *Quimica Nova*, v.30, p.1194-1202, 2007.

KUMAR, A.; MALIK, F.; BHUSHAN, S.; SETHI, V.K.; SHAHI, A.K.; KAUR, J.; TANEJA, S.C.; QAZI, G.N.; SINGH, J. **An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death**

receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions*, v.171, p. 332-347, 2008.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Disease.** Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 7^a ed., 2005.

KUPCHAN, S.M.; LACADIE, J.A. **Dehydroailanthinone, a new antileukemic quassinoid from *Pierreodendron kerstingii*.** *Journal of Organic Chemistry*, v.40, p. 654-656, 1975.

KURODA, M.; YOKOSUKA, A.; KOBAYASHI, R.; JITSUNO, M.; KANDO, H.; NOSAKA, K.; ISHII, H.; YAMORI, T.; MIMAKI, Y. **Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity.** *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.55, p.1240-1244, 2007.

LAGO, J.H.G.; DE ÁVILA JR.; P.; MORENO, P.R.H.; LIMBERGER, R.P.; APEL, M.A.; HENRIQUES, A.T. **Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopia aromatica* (Annonaceae).** *Biochemical Systematics and Ecology*, v.31, p.669-672, 2003.

LAMPRONTI, I.; MARTELLO, D.; BIANCHI, N.; BORGATTI, M.; LAMBERTINI, E.; PIVA, R. JABBAR, S.; CHOUDHURI, S. M. K.; KHAN, M. T. H.; GAMBARI, R. ***In vitro* antiproliferative effects on human tumor cell lines of extracts from the Bangladeshi medicinal plant *Aegle marmelos* Correa.** *Phytomedicine*, v.10, p.300–308, 2003.

LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K. BRIDGEWATER, E. **Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.1, 2001.

LAWSON, M.; VASILARAS, A.; DE VRIES, A.; MACTAGGART, P.; NICOL, D. **Urological implications of cyclophosphamide and ifosfamide.** *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, v.42, p. 309-317, 2008.

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

LEE, B.W.; LEE, J.H.; LEE, S.-.; LEE, H.S.; LEE, W.S.; JEONG, T.-.; PARK, K.H. **Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata*.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v.15, p. 5548-5552, 2005.

LEE, I.; YOO, J.K.; NA, M.; MIN, B.S.; LEE, J.; YUN, B.S.; JIN, W.; KIM, H.; YOUN, U.; CHEN, Q.C.; SONG, K.S.; SEONG, Y.H.; BAE, K. **Cytotoxicity of triterpenes isolated from *Aceriphyllum rossii*.** *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.55, p. 1376-1378, 2007.

LEE, C.-.; NAKAGAWA-GOTO, K.; YU, D.; LIU, Y.-.; BASTOW, K.F.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; CHANG, F.-.; WU, Y.-. LEE, K.-. **Cytotoxic calanquinone A from *Calanthe arisanensis***

and its first total synthesis. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v.18, p.4275-4277, 2008.

LESKINEN, V.; POLONSKY, J.; BHATNAGAR, S. **Antifeedant activity of quassinoids.** Journal of Chemical Ecology v.10, p.1497-1507, 1984.

LEVÊQUE, D.; JEHL, F. **Molecular pharmacokinetics of catharanthus (vinca) alkaloids.** J Clin Pharmacol. v.47, p.579-588, 2007.

LEWIS, W.H. **Medical Botany. Plants affecting man's health.** Ed. Wilbey Interscience Publication. 2a ed., 1977.

LI, T.K.; LIU, L.F. **Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs.** Annual review of pharmacology and Toxicology, v.41, p.53-77, 2001.

LI, T.Z.; ZHANG, W.D.; YANG, G.J.; LIU, W.Y.; LIU, R.H.; ZHANG, C.; CHEN, H.S. **New flavonol glycosides and new xanthone from Polygala japonica.** J Asian Nat Prod Res. v.8, p.401-409, 2006.

LIAO, L. L.; KUPCHAN, S. M.; HOROWITZ, S. B. **Mode of Action of the Antitumor Compound Bruceantin, an Inhibitor of Protein Synthesis.** Molecular Pharmacology v.12, p.167, 1976.

LIMTRAKUL, P.; SIWANON, S.; YODKEEREE, S.; DUANGRAT, C. **Effect of Stemona curtisii root extract on P-glycoprotein and MRP-1 function in multidrug-resistant cancer cells.** Phytomedicine, v.14, p.381-389, 2007.

LIN, S.; WANG, S.; LIU, M.; GAN, M.; LI, S.; YANG, Y.; WANG, Y.; HE, W. SHI, J. **Glycosides from the stem bark of Fraxinus sieboldiana.** Journal of Natural Products, v.70, p.817-823, 2007.

LÓPEZ, P.; RUFFA, M.J.; CAVALLARO, L.; CAMPOS, R.; MARTINO, V.; FERRARO, G. **1,3-dihydroxy-5-(tridec-4',7'-dienyl)benzene: A new cytotoxic compound from Lithraea molleoides.** Phytomedicine, v.12, p. 108-111, 2005.

LUCENA, P.L.; RIBAS FILHO, J.M.; MAZZA, M.; CZECZKO, N.G.; DIETZ, U.A.; CORREA NETO, M.A.; HENRIQUES, G.S.; SANTOS, O.J.; CESCHIN, A.P. THIELE, E.S. **Evaluation of the areira (Schinus terebinthifolius Raddi) in the healing process of surgical incision in the bladder of rats.** Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia, v.21, p.46-51, 2006.

MAGNOTTA, M.; MURATA, J.; CHEN, J. DE LUCA, V. **Expression of deacetylindoline-4-O-acetyltransferase in Catharanthus roseus hairy roots.** Phytochemistry, v.68, p.1922-1931, 2007.

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A.; DA SILVA, A.C.M.; OLIVEIRA, J.; CARREIRA, L.M.M.; ARAÚJO, J.S. **Leaf volatile oils from four Brazilian Xylopi** species. *Flavour and Fragrance Journal*, v.20, p. 474-477, 2005.

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A.; DA SILVA, A.C.M.; OLIVEIRA, J.; CARREIRA, L.M.M. ARAÚJO, J.S.; 2005. **Leaf volatile oils from four Brazilian Xylopi** species. *Flavour and Fragrance Journal*, v.20, p.474-477, 2007.

MALONGA, H.; NEAULT, J.F.; DIAMANTOGLU, S. TAJMIR-RIahi, H.A. **Taxol anticancer activity and DNA binding**. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v.5, p.307-311, 2005.

MANN, J. **Natural products in câncer chemotherapy: past, present and future**. *Natural reviews in câncer*, v.2, p.143-148, 2002.

MANTOVANI, J.E.; PEREIRA, A. **Estimativas da integridade da cobertura vegetal do Cerrado/Pantanal através de dados TM/Landsat**. *Anais do IX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Brasil*, 1998.

MARDINI, H.; RECORD, C.; **Detection assessment and monitoring of hepatic fibrosis: Biochemistry or biopsy?** *Annals of Clinical Biochemistry*, v.42, p. 441-447, 2005.

MARIE, J.-.; MARZAC, C. LEGRAND, O. **Cytostatic drug resistance mechanisms**. *EMC - Hematologie*, v.1, p.59-68, 2004.

MARTINS, D.; HAMERSKI, L.; ALVARENGA, S.A.V. ROQUE, N.F. **Labdane dimers from Xylopi atomatica**. *Phytochemistry*, v.51, p.813-817, 1999.

MARTINS, D.; OSSHIRO, E.; ROQUE, N.F.; MARKS, V. GOTTLIEB, H.E.; 1998. **A sesquiterpene dimer from Xylopi aromatica**. *Phytochemistry*, v.48, p.677-680, 1998.

MARTINS, J.V.C.; OTOBONE, F.J.; SELA, V.R.; OBICI, S.; TROMBELLI, M.A.; CORTEZ, D.A.G.; AUDI, E.A. **Activity of hydroethanolic extract from Kielmeyera coriacea stems on central nervous system in rats**. *Acta Scientiarum - Health Sciences*, v.26, p. 365-368, 2004.

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

MEDEIROS, K.C.P.; MONTEIRO, J.C.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A.; SILVA, B.A. PIUVEZAM, M.R. **Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: Eucalyptus globulus Labill, Peltodon radicans Pohl and Schinus terebinthifolius Radd in inflammatory models**. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.17, p.23-28, 2007.

MENDES, F.R. CARLINI, E.A. **Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil**. *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, p.493-500, 2007.

MESÍA-VELA, S.; SANÁCHEZ, R.I.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; ALAVEZ-SOLANO, D.; TORRES-SOSA, C.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. KAUFFMAN, F.C. **Natural products**

isolated from Mexican medicinal plants: Novel inhibitors of sulfotransferases, SULT1A1 and SULT2A1. *Phytomedicine*, v.8, p.481-488, 2001.

MILITÃO, G.C.G.; DANTAS, I.N.F.; PESSOA, C.; FALCÃO, M.J.C.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M.O. COSTA-LOTUFO, L.V.. **Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells.** *Life Sciences*, v.78, p.2409-2417, 2006.

MILLIKEN, W. **Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil.** *Economic Botany*, v.51, p. 212-237, 1997.

MIMAKI, Y.; KAMEYAMA, A.; KURODA, M.; SASHIDA, Y.; HIRANO, T.; OKA, K.; KOIKE, K.; NIKAIDO, T. **Steroidal glycosides from the underground parts of *Hosta plantaginea* var. *japonica* and their cytostatic activity on leukaemia HL-60 cells.** *Phytochemistry*, v.44, p.305-310, 1997.

MIMAKI, Y.; KURODA, M.; KAMEYAMA, A.; YOKOSUKA, A. SASHIDA, Y. **Aculeoside B, a new bisdesmosidic spirostanol saponin from the underground parts of *Ruscus aculeatus*.** *Journal of Natural Products*, v.61, p.1279-1282, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**, 2006.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J.Immunol. Methods*. v.65, p.55-63, 1983.

MOUSTAFA, A.M.Y. **Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Schinus terebenthifolius* of Egyptian origin.** *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, v.1, p.91-95, 2007.

MURAKAMI, C.; FUKAMIYA, N.; TAMURA, S.; OKANO, M.; BASTOW, K.F.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T.; NISHINO, H.; LEE, K. **Multidrug-resistant cancer cell susceptibility to cytotoxic quassinoids, and cancer chemopreventive effects of quassinoids and canthin alkaloids.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry* v. 12, p. 4963-4968, 2004.

MYERS, N.; MITTERMELER, R.A.; MITTERMELER, C.G.; DA FONSECA, G.A.B. KENT, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** *Nature*, v.403, p.853-858, 2000.

NABHOLTZ, J-M.; GLIGOROV, J. **The role of taxanes in the treatment of breast cancer.** *Exp Opin Pharmacother*. v.6, p.1073–1094, 2005.

NAGY, K.; COURTET-COMPONDU, M.-.; HOLST, B.; KUSSMANN, M. **Comprehensive analysis of vitamin E constituents in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry.** *Analytical Chemistry*, v.79, p. 7087-7096, 2007.

NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; DE SOUZA, M.A.; DE PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. ESPINDOLA, F.S.. **Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado.** Journal of Ethnopharmacology, v.99, p.37-41, 2005.

NGUYEN, T.M.; SITTISOMBUT, C.; BOUTEFNOUCHET, S.; LALLEMAND, M.C.; MICHEL, S.; KOCH, M.; TILLEQUIN, F.; MAZINGHIEN, R.; LANSIAUX, A.; DAVID-CORDONNIER, M.H.; PFEIFFER, B.; KRAUS-BERTHIER, L.; LEONCE, S.; PIERRE A. **Synthesis, antitumor activity, and mechanism of action of benzo[a]pyrano[3,2-h]acridin-7-one analogues of acronycine.** J Med Chem. v.49, p.3383-3394, 2006.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F. RICCARDI, C.. **A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.** Journal of Immunological Methods, v.139, p.271-279, 1991.

NOLDIN, V.F.; ISAIAS, D.B. CECHINEL FILHO, V. **Calophyllum genus: Chemical and pharmacological importance.** Quimica Nova, v.29, p.549-554, 2006.

NÚÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.; OSORIO, R.G.; QUINTANA, J.C. DÍAZ, A. **Inhibition of the toxic effects of Lachesis muta, Crotalus durissus cumanensis and Micrurus mipartitus snake venoms by plant extracts.** Pharmaceutical Biology, v.42, p.49-54, 2004.

OBICI, S.; OTOBONE, F.J.; SELA, V.R.D.S.; ISHIDA, K.; SILVA, J.C.D.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G. AUDI, E.A. **Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of Kielmeyera coriacea stems in mice and rats.** Journal of Ethnopharmacology, v.115, p.131-139, 2008.

O'NEILL, M.J.; BRAY, D.H.; BOARDMAN, P.; WRIGHT, C.W.; PHILLIPSON, J.D.; WARHURST, D.C.; GUPTA, M.P.; CORREYA, M.; SOLIS, P. **Plants as sources of antimalarial drugs, Part 6: Activities of Simarouba amara fruits.** Journal of Ethnopharmacology v.22, p.183-190, 1988.

OSORIO, E.; ARANGO, G.J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M.A.; GIMÉNEZ, A. ROBLEDO, S. **Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae.** Journal of Ethnopharmacology, v.111, p.630-635, 2007.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; OSORIO, R.G.; SALDARRIAGA, M. DÍAZ, A. **Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia - Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of Bothrops atrox venom.** Journal of Ethnopharmacology, v.73, p.233-241, 2000b.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S.L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R.G.; GARCÍA, M.E. DÍAZ, A. **Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part II:**

Neutralization of lethal and enzymatic effects of Bothrops atrox venom. Journal of Ethnopharmacology, v.71, p.505-511, 2000a.

OTOBONE, F.J.; SELA, V.R.; OBICI, S.; MOREIRA, L.Y.; CORTEZ, D.A.G. AUDI, E.A. **Role of 5-HT_{1A} receptors in antidepressant-like effect of dichloromethane fraction of Kielmeyera coriacea in rats subjected to the forced swim test.** Indian Journal of Pharmacology, v.39, p.75-79, 2007.

OYAMA, M.; BASTOW, K.F.; TACHIBANA, Y.; SHIRATAKI, Y.; YAMAGUCHI, S.; CRAGG, G.M.; WU, T.-.; LEE, K.-. **Antitumor agents 225. Acrofoliones A and B, two novel cytotoxic acetophenone dimers, from Acronychia trifoliolata.** Chinese Pharmaceutical Journal, v.55, p. 239-245, 2003.

PEDERSEN, P.L. **Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview.** Journal of Bioenergetics Biomembranes, v.31, p.291– 304, 1999.

PERFEITO, J.P.; SANTOS, M.L.; LÓPEZ, K.S.E.; PAULA, J.E.; SILVEIRA, D. **Characterization and biological properties of Pouteria torta extracts: a preliminary study.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.15, p.183-186, 2005.

PETIT, P.X.; LECOEUR, H.; ZORN, E.; DAUGUET, C.; MIGNOTTE, B. GOUGEON, M.-.. **Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis.** Journal of Cell Biology, v.130, p.157-167, 1995.

PINO, J.A. **Leaf oil of Xylopia aromatica (Lam.) Mart. from Cuba.** Journal of Essential Oil Research, v.12, p.751-752, 2000.

PIRES, O.C.; CORSI TAQUEMASA, A.V.; AKISUE, G.; DE OLIVEIRA, F. PULZ ARAUJO, C.E. **Preliminary comparative analysis of the acute toxicity and median lethal dose (LD₅₀) of the fruit of the Brazilian black pepper (Schinus terebinthifolius Raddi) and black pepper (Piper nigrum L.).** Acta Farmaceutica Bonaerense, v.23, p.176-182, 2004.

PIRES, J.E.P.; FERNANDES, R.M.; FERNANDES, M.Z.L.C.M.; VIANA, G.E.N.; DOURADO, J.C.L. SOUSA, S.A.A. **Determination of average inhibitory concentration (CI₅₀) aqueous extract of Simarouba versicolor St. Hill about the oviposition of the cattle tick (Boophilus microplus, Canestrine, 1887).** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.9, p.23-26, 2007.

POLONSKY, J.; BASKÉVITCH, Z.; GOTTLIEB, H.E.; HAGAMAN, E.W. WENKERT, E.. **Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectral analysis of quassinoid bitter principles.** Journal of Organic Chemistry, v.40, p.2499-2504, 1975.

Polonsky, J.; Bhatnagar, S.C.; Griffiths, D.C.; Pickett, J.A.; Woodcock, C.M. **Activity of quassinoids as antifeedants against aphids.** Journal of Chemical Ecology, v. 15, p.993-998, 1989.

PRETTO, J.B.; CECHINEL-FILHO, V.; NOLDIN, V.F.; SARTORI, M.R.K.; ISAIAS, D.E.B. CRUZ, A.B. **Antimicrobial activity of fractions and compounds from Calophyllum**

brasiliense (Clusiaceae/Guttiferae). Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, v.59, p.657-662, 2004.

QUEIRES, L.C.S.; FAUVEL-LAFÈVE, F.; TERRY, S.; DE LA TAILLE, A.; KOUYOUMDJIAN, J.C.; CHOPIN, D.K.; VACHEROT, F.; RODRIGUES, L.E.A. CRÉPIN, M. **Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (Schinus terebinthifolius, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells.** Anticancer Research, v.26, p.379-387, 2006.

QUEIROZ, E.F.; ROBLLOT, F.; CAVE, A.; PAULO, M.D.Q.; FOURNET, A. **Pessoine and spinosine, two catecholic berbines from Annona spinescens.** Journal of Natural Products, v.59, p. 438-440, 1996.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. **The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity.** Annals of Botany, v.80, p. 223-230, 1997.

REINER, T.; POZAS, A.D.L.; GOMEZ, L.A.; PEREZ-STABLE, C. **Low dose combinations of 2-methoxyestradiol and docetaxel block prostate cancer cells in mitosis and increase apoptosis.** Cancer Letters 2008. *Article in press.*

REYES-CHILPA, R.; BAGGIO, C.H.; ALAVEZ-SOLANO, D.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; KAUFFMAN, F.C.; SANCHEZ, R.I.; MESIA-VELA, S. **Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants.** Journal of Ethnopharmacology, v.105, p.167-172, 2006.

REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; RAMÍREZ APAN, T.; AMEKRAZ, B.; AUMELAS, A.; JANKOWSKI, C.K.; VÁZQUEZ-TORRES, M. **Cytotoxic effects of mammea type coumarins from Calophyllum brasiliense.** Life Sciences, v.75, p.1635-1647, 2004.

RIVERO-CRUZ, J.F.; LEZUTEKONG, R.; LOBO-ECHEVERRI, T.; ITO, A.; MI, Q.; CHAI, H.B.; SOEJARTO, D.D.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; SWANSON, S.M.; MORELLI, I.; KINGHORN, A.D. **Cytotoxic constituents of the twigs of Simarouba glauca collected from a plot in Southern Florida.** Phytotherapy Research, v.19, p.136-140, 2005.

ROBERT-GERO, M.; BACHRACH, U.; BAATNAGAR, S.; POLONSKY, J. **Inhibition in vitro of the growth of Leishmania donovani promastigotes by quassinoids.** C. R. Acad. Sci. Ser. II v.300, p.803–806, 1985.

ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARTSMANN, G. **Natural products in anticancer therapy.** Current Opinion in Pharmacology, v.1, p.363-369, 2001.

RODRIGUES, A.M.S.; DE PAULA, J.E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.F. ESPÍNDOLA, L.S.. **Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against Aedes aegypti.** Journal of the American Mosquito Control Association, v.22, p.314-317, 2006.

RODRIGUES, A.M.S.; DE PAULA, J.E.; ROBLLOT, F.; FOURNET, A. ESPÍNDOLA, L.S.. **Larvicidal activity of Cybistax antisiphilitica against Aedes aegypti larvae.** Fitoterapia, v.76, p.755-757, 2005.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E.A. **Ritual use of plants with possible action on the central nervous system by the Kraho Indians, Brazil.** *Phytotherapy Research*, v.19, p.129-135, 2005.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Levantamento Etnobotânico de plantas medicinais no Domínio do Cerrado na Região do Alto do Rio Grande—Minas Gerais.** *Cien. Agrotec.* v.25, p.102–123, 2001.

ROESLER, R.; CATHARINO, R.R.; MALTA, L.G.; EBERLIN, M.N. PASTORE, G. **Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry.** *Food Chemistry*, v.104, p.1048-1054, 2007b.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C. PASTORE, G. **Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum).** *Journal of Food Science*, v.71, p.C102-C107, 2006.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S. PASTORE, G.M. **Antioxidant activity of cerrado fruits.** *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v.27, p.53-60, 2007a.

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.

RUTTER, R.A.; SHANKS, A. **Catálogo de las Plantas Útiles de la Amazônia Peruana.** Ed.Linguístico de Verano. Yarinacocha, Iquitos, Peru. 2a ed., 1990.

RYNINGEN, A.; STAPNES, C.; PAULSEN, K.; LASSALLE, P.; GJERTSEN, B.T. BRUSERUD. **In vivo biological effects of ATRA in the treatment of AML.** *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v.17, p.1623-1633, 2008.

SANTANA, V.M.; FURMAN, W.L.; BILLUPS, C.A.; HOFFER, F.; DAVIDOFF, A.M.; HOUGHTON, P.J, STEWART, C.F. **Improved response in high-risk neuroblastoma with protracted topotecan administration using a pharmacokinetically guided dosing approach.** *J Clin Oncol.* v.23, p.4039-4047, 2005.

SANTOS PIMENTA, L.P.; PINTO, G.B.; TAKAHASHI, J.A.; SILVA, L.G.F.E. BOAVENTURA, M.A.D. **Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test).** *Phytomedicine*, v.10, p.209-212, 2003.

SANTOS, L.P.; BOAVENTURA, M.A.D.; SUN, N.-.; CASSADY, J.M. DE OLIVEIRA, A.B. **Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds.** *Phytochemistry*, v.42, p.705-707, 1996a.

SANTOS, L.P.; BOAVENTURA, M.A.D.; DE OLIVEIRA, A.B. CASSADY, J.M. **Grossamide and N-trans-caffeoyltyramine from *Annona crassiflora* seeds.** *Planta Medica*, v.62, p.76, 1996b.

SARTORI, N.T.; CANEPELLE, D.; DE SOUSA JR.; P.T. MARTINS, D.T.O. **Gastroprotective effect from Calophyllum brasiliense Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice.** Journal of Ethnopharmacology, v.67, p.149-156, 1999.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S. COSTA, S.S. **Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants.** Journal of Ethnopharmacology, v.96, p.563-568, 2005.

SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T.M.; ROMANHA, A.J.; SHIN, Y.G.; CORDELL, G.A.; ZANI, C.L. **New bioactive coumarins from Kielmeyera albopunctata.** Journal of Natural products, v.66, p.634-637, 2003.

SEO, E.-.; KIM, N.-.; WANI, M.C.; WALL, M.E.; NAVARRO, H.A.; BURGESS, J.P.; KAWANISHI, K.; KARDONO, L.B.S.; RISWAN, S.; ROSE, W.C.; FAIRCHILD, C.R.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D. **Cytotoxic prenylated xanthenes and the unusual compounds anthraquinobenzophenones from Cratoxylum sumatranum.** Journal of Natural Products, v.65, p. 299-305, 2002.

SHANG-JIANG, D.; GARIBOLDI, P.; JOMMI, G. **Constituents of Shashen (Adenophora axilliflora).** Planta Medica, v. 4, p. 317-320, 1986.

SHAO, Y.; HO, C.-.; CHIN, C.-. **Asterlingulatosides C and D, cytotoxic triterpenoid saponins from Aster lingulatus.** Journal of Natural Products, v.60, p. 743-746, 1997.

SHAPIRO, H.M. **Practical flow cytometry.** New York, Ed. Wiley-Liss, 3^a Ed., 1995.

SHUANG, G.M.; YOU, C.H.; SHI, S.Y.; ZHANG, Y.; XIAO, G.C.; LIU, J. YU, X.L. **Cytotoxic triterpenoid saponins acylated with monoterpenic acid from Pithecellobium lucidum.** Journal of Natural Products, v.71, p.41-46, 2008.

SILVA, H.T.H.; HARTMANN, A.A. **A relação do uso crônico de fenobarbital com áreas potencialmente pré-neoplásicas em fígado de ratos.** Arquivos de Gastroenterologia, v.43, p.121-124, 2006.

SILVA, F.M.E.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. **Evaluation of the antifungal potential of brazilian Cerrado medicinal plants.** Mycoses, 2008. *Article in press.*

SILVA, M.V.; COSTA, T.R.; COSTA, M.R.; FERREIRA, E.C.; FERNANDES, O.F.L.; SANTOS, S.C.; LIÃO, L.M.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R.; FERREIRA, H.D. SILVA, M.D.R.R. **Growth inhibition effect of Brazilian Cerrado plant extracts on Candida species.** Pharmaceutical Biology, v.39, p.138-141, 2001.

SIMÕES, C.M.; MENTEZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas Medicinais Populares do Rio Grande do Sul.** Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 3^a ed., 1989.

SIMON, A.; NAJID, A.; CHULIA, A.J.; DELAGE, C.; RIGAUD, M. **Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers**

(Calluna vulgaris). *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, v.1125, p. 68-72, 1992.

SOARES DE OLIVEIRA, J.; PEREIRA BEZERRA, D.; TEIXEIRA DE FREITAS, C.D.; DELANO BARRETO MARINHO FILHO, J.; ODORICO DE MORAES, M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V. RAMOS, M.V. **In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of Calotropis procera (Ait.) R. Br.** *Toxicology in Vitro*, v.21, p.1563-1573, 2007.

SONG, S.; GUILLAUME WIENTJES, M.; GAN, Y.; AU, J.L.-. **Fibroblast growth factors: An epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, p. 8658-8663, 2000.

SOUZA-FAGUNDES, E.M.; QUEIROZ, A.B.R.; MARTINS FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ALVES, T.M.A. ZANI, C.L. **Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, p.1207-1212, 2002.

SPENCE, R.A.J.; JONHSTON, P.G. **Oncology.** Oxford University Press, Oxford, 2000.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A.S.; KUMAR, J.K.; GUPTA, M.M. KHANUJA, S.P.S. **Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.13, p.5892-5908, 2005.

STÄHELIN, H. **Activity of a new glycosidic lignan derivative (VP 16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors.** *Eur J Cancer*, v.9, p.215-221, 1973.

STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E. MARTÍNEZ, J.R. **Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography.** *Journal of Chromatography A*, v.1025, p.105-113, 2004.

STOIKA, R.; YAKYMOVYCH, M.; SOUCHELNYTSKYI, S.; YAKYMOVYCH, I. **Potential role of transforming growth factor 1 in drug resistance of tumor cells.** *Acta Biochim Pol.* v.50, p.497-508, 2003.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M.. **Assays related to cancer drug discovery.** IN: HOSTETTMANN, K. (Ed.) *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, v.6, Academic Press, London, p.71 – 133, 1990.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; VARELLA, A.D. YOUNES, R.N. **In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia.** *Fitoterapia*, v.78, p.223-226, 2007.

SUN, J.; HAN, L.-.; SHI, D.-.; FAN, X.; WANG, S.-.; LI, S.; YANG, Y.-.; SHI, J.-. **Sesquiterpene components of *Laurencia tristicha*.** *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, v.37, p. 329-332, 2006.

TABATADZE, N.; ELIAS, R.; FAURE, R.; GERKENS, P.; DE PAUW-GILLET, M.C.; KEMERTELIDZE, E.; CHEA, A.; OLLIVIER, E. **Cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Cephalaria gigantea***. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.55, p. 102-105, 2007.

TAKAHASHI, J.A.; PEREIRA, C.R.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M.A.D. SILVA, L.G.F.E. **Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants**. Natural Product Research, v.20, p.21-26, 2006.

TAN, M.L.; SULAIMAN, S.F.; NAJIMUDDIN, N.; SAMIAN, M.R.; MUHAMMAD, T.S.T. **Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line** Journal of Ethnopharmacology, v.96, p.287–294, 2005.

TEICH, N.M.; FRANKS, L.M. **Introducao a biologia celular e molecular do cancer**. Ed. Roca, Sao paulo, 1^a ed., 1990.

TEMPONE, A.G.; TREIGER BORBOREMA, S.E.; DE ANDRADE JR.; H.F.; DE AMORIM GUALDA, N.C.; YOGI, A.; SALERNO CARVALHO, C.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V. FISCHER, D.C.H. **Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families**. Phytomedicine, v.12, p.382-390, 2005.

THOMAS, H. COLEY, H.M. **Overcoming multidrug resistance in cancer: An update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein**. Cancer Control, v.10, p.159-165, 2003.

TUNDIS, R.; DEGUIN, B.; LOIZZO, M.R.; BONESI, M.; STATTI, G.A.; TILLEQUIN, F.; MENICHINI, F. **Potential antitumor agents: flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf.** Bioorg Med Chem Lett. v.15, p.4757-4760, 2005.

VARELA-BARCA, F.N.T.; AGNEZ-LIMA, L.F. DE MEDEIROS, S.R.B. **Base excision repair pathway is involved in the repair of lesions generated by flavonoid-enriched fractions of pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) stem bark**. Environmental and Molecular Mutagenesis, v.48, p.672-681, 2007.

VASCONCELLOS, M.C.; MONTENEGRO, R.C.; MILITÃO, G.C.G.; FONSECA, A.M.; PESSOA, O.D.L.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. **Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L.** Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, v.60, p. 394-398, 2005.

VASQUEZ, M.R. **Useful plants of Amazonian Peru**. Ed. USDA's National Agricultural Library. 2a ed., 1990.

VERAS, M.L.; BEZERRA, M.Z.; LEMOS, T.L.; UCHOA, D.E.; BRAZ-FILHO, R.; CHAI, H.B.; CORDELL, G.A.; Pessoa, O.D. **Cytotoxic withaphysalins from the leaves of *Acnistus arborescens***. Journal of Natural products, v.67, p.710-713, 2004.

VERGARA, J.L.T.; HERNÁNDEZ, J.E.; CARVAJAL, G.A.V. RAMOS, J.D. **Trypanomicidal activity of etanol extract from *Xylopia aromatica* on *Tripasonoma cruzi***. Revista Cubana de Farmacia, v.40, 2006.

WALL, M.E.; WANI, M.C.; COOK, C.E. **Plant anti-tumor agents: I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*.** J Am Chem Soc. v.88, p.3888-3890, 1966.

WANG, S.; ZHANG, Y.-.; CHEN, R.-.; YU, D.-. **Goniolactones A-F, six new styrylpyrone derivatives from the roots of *Goniolobos cheliensis*.** Journal of Natural Products, v.65, p. 835-841, 2002.

WANG, Y.-.; HOU, A.-.; CHEN, L.; CHEN, D.-.; SUN, H.-.; ZHAO, Q.-.; BASTOW, K.F.; NAKANISHI, Y.; WANG, X.-.; LEE, K.-. **New isoprenylated flavones, artochamins A-E, and cytotoxic principles from *Artocarpus chama*.** Journal of Natural Products, v.67, p. 757-761, 2004.

WANG, W.; LIU, J.; HAN, J.; XU, Z.; LIU, R.; LIU, P.; WANG, W.; MA, X.; GUAN, S.; GUO, D. **New triterpenoids from *Kadsura heteroclita* and their cytotoxic activity.** Planta Medica, v.72, p. 450-457, 2006.

WANG, W.-.; DAI, X.; HONG, L.-.; LU, P.; FENG, J.-. JIAO, Y.-. **New sesquiterpenoids from *Ligularia duciformis*.** Helvetica Chimica Acta, v.91, p.1118-1123, 2008.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A.T. **Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*.** J. Am. Chem. Soc. v.93, p.2325-2327, 1971.

WARRELL JR, R.P.; DE THE, H.; WANG, Z.-.; DEGOS, L. **Acute promyelocytic leukemia.** New England Journal of Medicine, v.329, p.177-189, 1993.

WATERMAN, P.G.; AMPOFO, S.A.; **Cytotoxic Quassinoids from *Odyndyea gabonensis* Stem Bark: Isolation and High - Field NMR.** Planta medica v.50, p.261-263, 1984.

WHITTLE, K.J.; DUNPHY, P.J.; PENNOCK, J.F. **The isolation and properties of delta-tocotrienol from *Hevea latex*.** Biochemical Journal, v.100, p. 138-145, 1966.

WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; ALLEN, D.; PHILLIPSON, J.D.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; CHANG, H.R. **Quassinoids exhibit greater selectivity against *Plasmodium falciparum* than against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* or *Toxoplasma gondii* in vitro.** The Journal of eukaryotic microbiology v.40, p.244-246, 1993.

WU, J.-.; CHANG, F.-.; HAYASHI, K.-.; SHIRAKI, H.; LIAW, C.-.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K.F.; YU, D.; CHEN, I.-.; LEE, K.-. **Antitumor agents. Part 218: Cappamensin A, a new in vitro anticancer principle, from *Capparis sikkimensis*.** Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v.13, p. 2223-2225, 2003.

WWF BRASIL. **Expansão Agrícola e Perda da Biodiversidade no Cerrado.** v.7, 2000.

XU, Z.; CHANG, F.-.; WANG, H.-.; KASHIWADA, Y.; MCPHAIL, A.T.; BASTOW, K.F.; TACHIBANA, Y.; COSENTINO, M.; LEE, K.-. **Anti-HIV agents 451 and antitumor agents**

205.2 Two new sesquiterpenes, leitneridanins A and B, and the cytotoxic and anti-HIV principles from *Leitneria floridana*. Journal of Natural Products, v.63, p. 1712-1715, 2000.

XU, D.; LU, Q.; HU, X. **Down-regulation of P-glycoprotein expression in MDR breast cancer cell MCF-7/ADR by honokiol.** Cancer Letters v.243, p.274-280, 2006a.

XU, S.; LI, N.; NING, M.-.; ZHOU, C.-.; YANG, Q.-.; WANG, M.-. **Bioactive compounds from *Peperomia pellucida*.** Journal of Natural Products, v.69, p. 247-250, 2006b.

YANG, S.-.; ZHOU, B.-.; MALONE, S.; WERKHOVEN, M.C.M.; VAN TROON, F.; WISSE, J.H. KINGSTON, D.G.I. **A new labdane diterpenoid from *Renalmia alpinia* collected in the Suriname rainforest.** Journal of Natural Products, v.62, p.1173-1174, 1999.

YANG, L.-.; LEE, C.-.; YEN, K.-. **Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells.** Cancer Letters, v.157, p. 65-75, 2000.

YANG, Q.Y.; TIAN, X.Y.; FANG, W.S. **Bioactive coumarins from *Boenninghausenia sessilicarpa*** Nat Prod Res. v.9, p.59-65, 2007.

YAO, S.; LIU, R.; HUANG, X.; KONG, L. **Preparative isolation and purification of chemical constituents from the root of *Adenophora tetraphylla* by high-speed counter-current chromatography with evaporative light scattering detection.** Journal of Chromatography A, v.1139, p. 254-262, 2007.

YASUNAKA, K.; ABE, F.; NAGAYAMA, A.; OKABE, H.; LOZADA-PÉREZ, L.; LÓPEZ-VILLAFRANCO, E.; MUÑIZ, E.E.; AGUILAR, A. REYES-CHILPA, R. **Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes.** Journal of Ethnopharmacology, v.97, p.293-299, 2005.

YOSHIKAWA, K.; TANAKA, T.; UMEYAMA, A.; ARIHARA, S. **Three abietane diterpenes and two diterpenes incorporated sesquiterpenes from the bark of *Cryptomeria japonica*.** Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.54, p. 315-319, 2006.

YOKOSUKA, A.; MIMAKI, Y.; KURODA, M.; SASHIDA, Y. **A new steroidal saponin from the leaves of *Agave americana*.** Planta Medica, v.66, p. 393-396, 2000.

YU, M.; FINN, O.J. **DNA vaccines for cancer too.** Cancer Immunology, Immunotherapy, v.55, p. 119-130, 2006.

YUAN, W.; LU, Z.; LIU, Y.; MENG, C.; CHENG, K.-.; ZHU, P. **Three new podocarpane-type diterpenoids from callus of *Securinega suffruticosa*.** Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.53, p. 1610-1612, 2005.

YUAN, S.S.; CHANG, H.L.; CHEN, H.W.; KUO, F.C.; LIAW, C.C.; SU, J.H.; WU, YC. **Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways.** Life Science v.78, p.869-874, 2006.

ZAGOTO, J.N.; BRACHT, A.; PAGADIGORRIA, C.L.S.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; CORTEZ, D.A.G. YAMAMOTO, N.S. **Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy metabolism in the rat liver.** Journal of Ethnopharmacology, v.105, p.47-54, 2006.

ZHANG, X.; LI, J.; HE, C. **Study on the diterpenoid constituents and anticancer action of *Pteris semipinnata*.** Chinese Pharmaceutical Journal, v.34, p. 512-514, 1999.

ZHANG, Y.H.; PENG, H.Y.; XIA, G.H.; WANG, M.Y.; HAN, Y. **Anticancer effect of two diterpenoid compounds isolated from *Annona glabra* Linn.** Acta Pharmacol Sin. v.25, p.937-942, 2004.

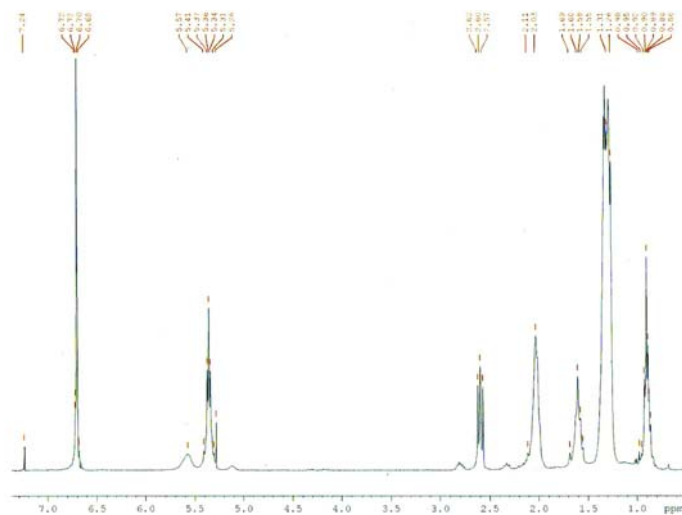
ZHANG, Y.; BAO, F.; HU, J.; LIANG, S.; ZHANG, Y.; DU, C.; ZHANG, C.; CHENG, Y. **Antibacterial lignans and triterpenoids from *Rostellularia procumbens*.** Planta Medica, v.73, p. 1596-1599, 2007.

ZHENG, L.; ZHENG, J.; ZHAO, Y.; WANG, B.; WU, L.; LIANG, H. **Three anti-tumor saponins from *Albizia julibrissin*.** Bioorg Med Chem Lett. v.16, p.2765-2768, 2006.

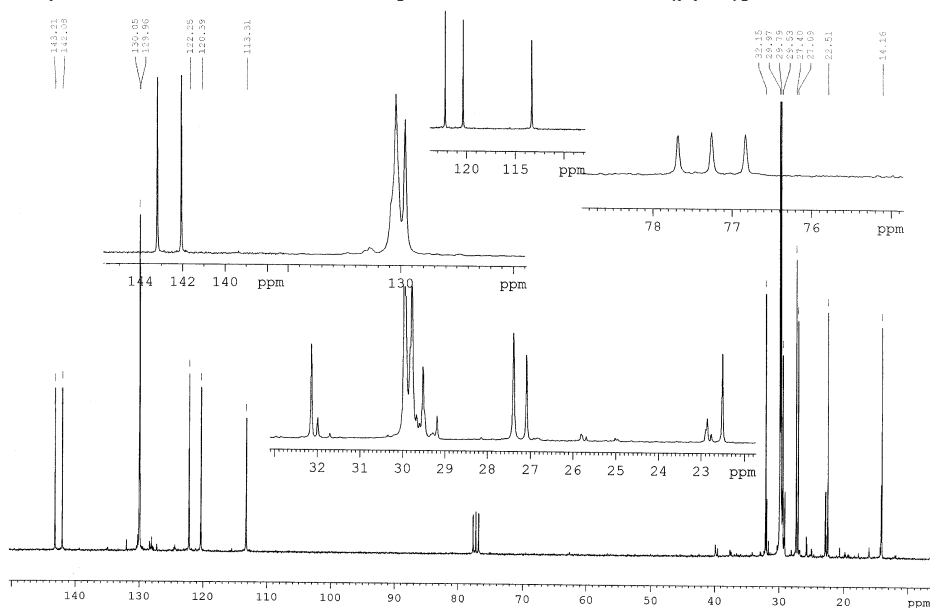
ZHOU, B.-.; BAJ, N.J.; GLASS, T.E.; MALONE, S.; WERKHOVEN, M.C.M.; VAN TROON, F.; DAVID, WISSE, J.H. KINGSTON, D.G.I. **Bioactive labdane diterpenoids from *Renealmia alpinia* collected in the suriname rainforest.** Journal of Natural Products, v.60, p.1287-1293, 1997.

Anexos

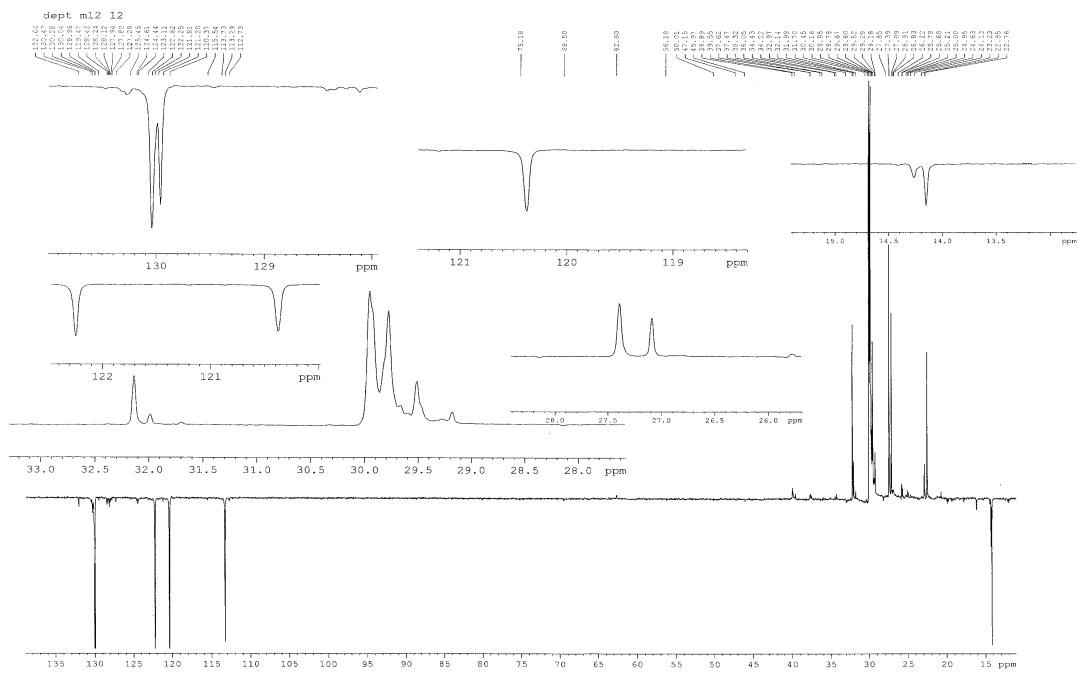
Anexo 1 Espectros de RMN de ST-1 isolado do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)



Espectro de RMN ^1H de ST-1 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]



Espectro de RMN ^{13}C – BB de ST-1 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]



Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ST-1 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

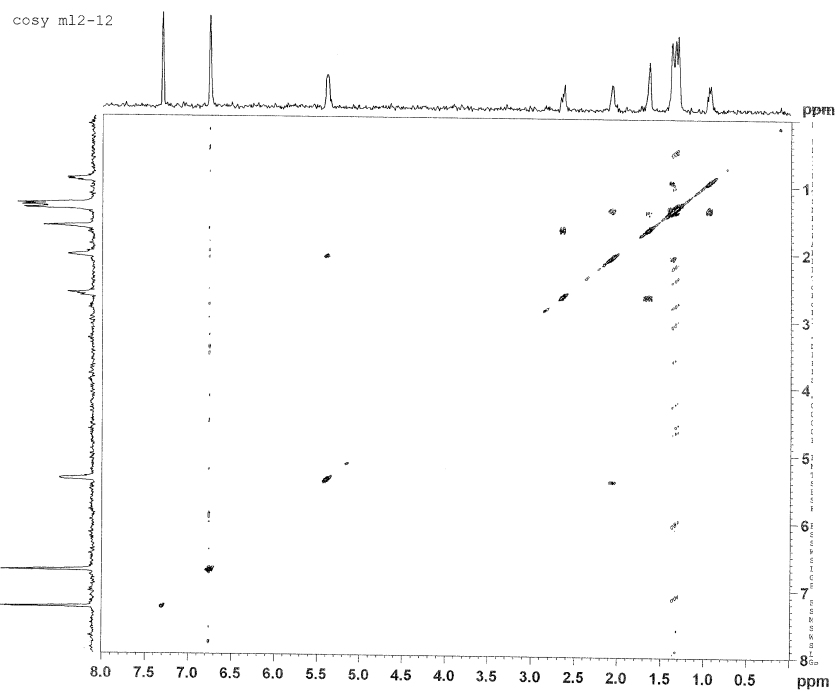


Diagrama de contorno do espectro COSY de ST-1

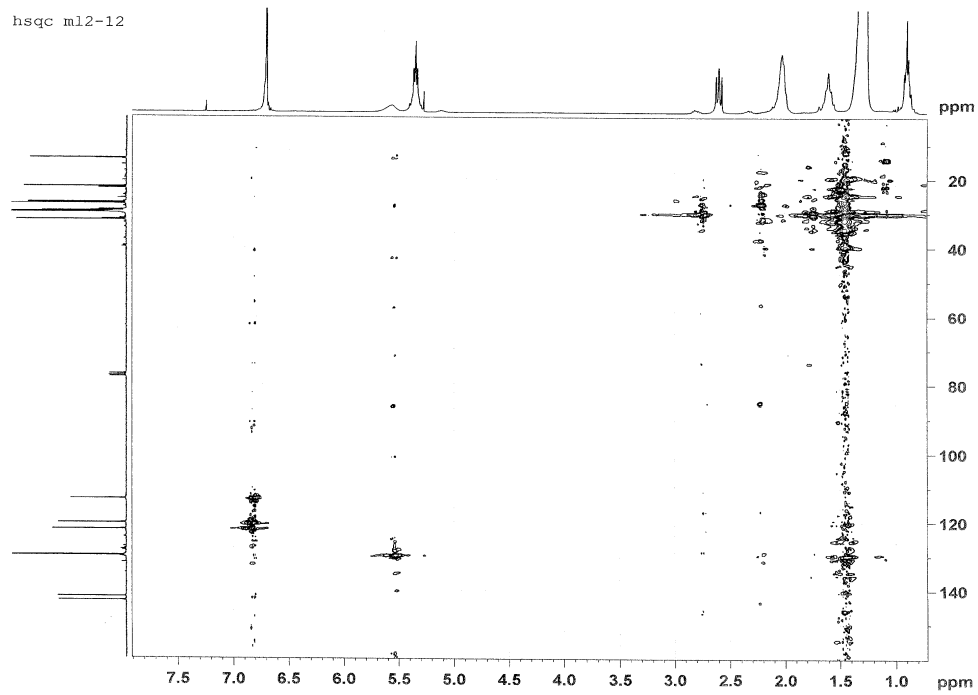


Diagrama de contorno do espectro HSQC de ST-1

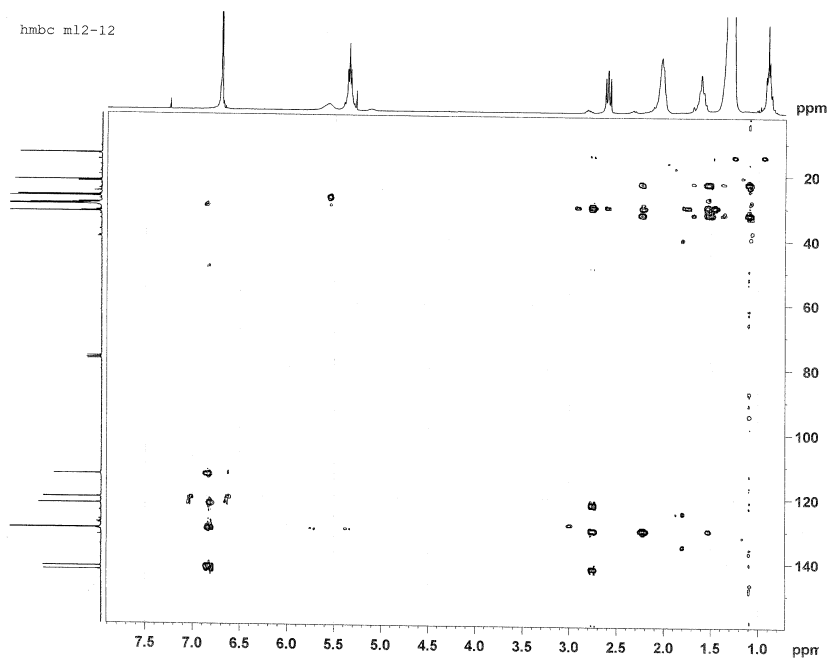
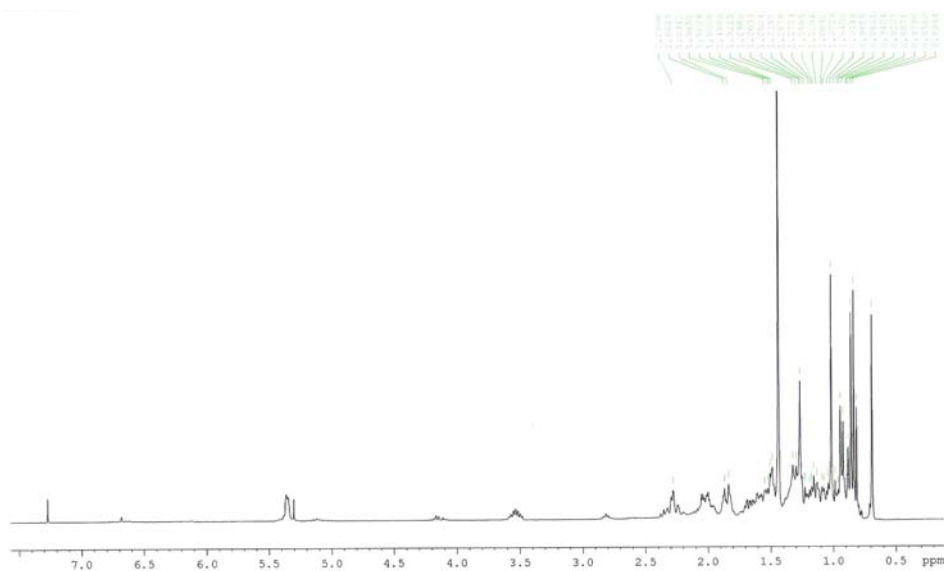
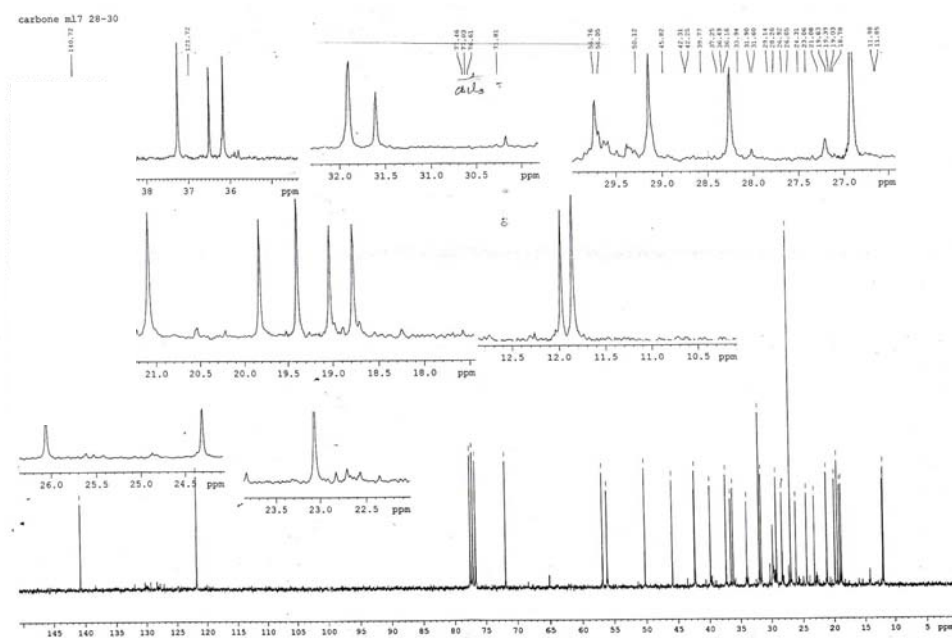


Diagrama de contorno do espectro HMBC de ST-1

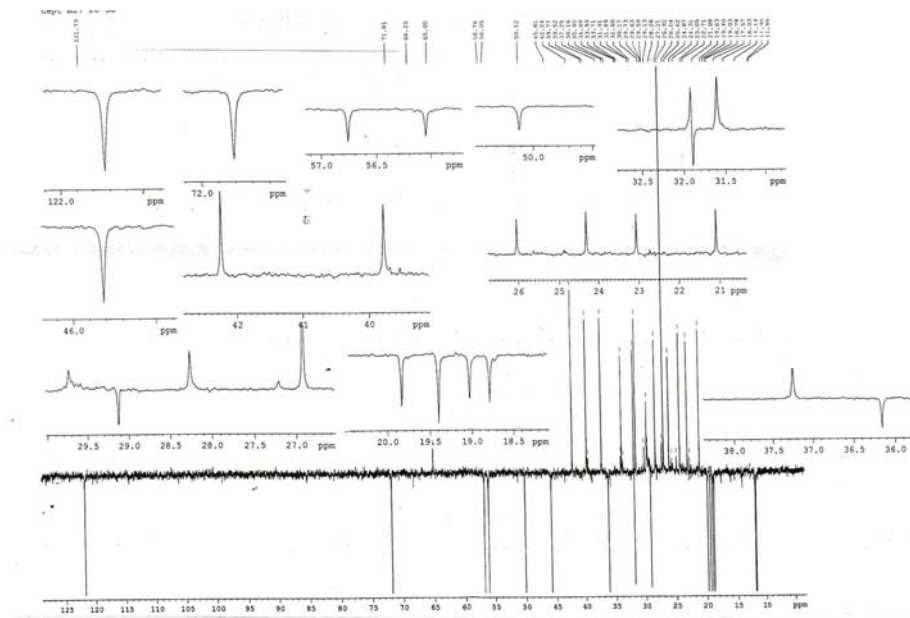
Anexo 2 Espectros de RMN de ST-3 isolado do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)



Espectro de RMN ^1H de ST-3 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

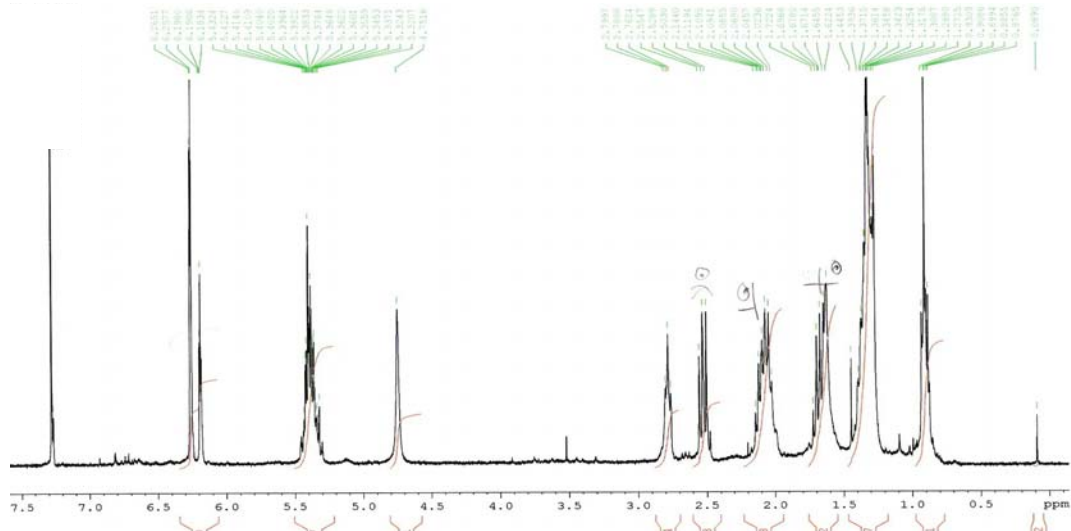


Espectro de RMN ^{13}C – BB de ST-3 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

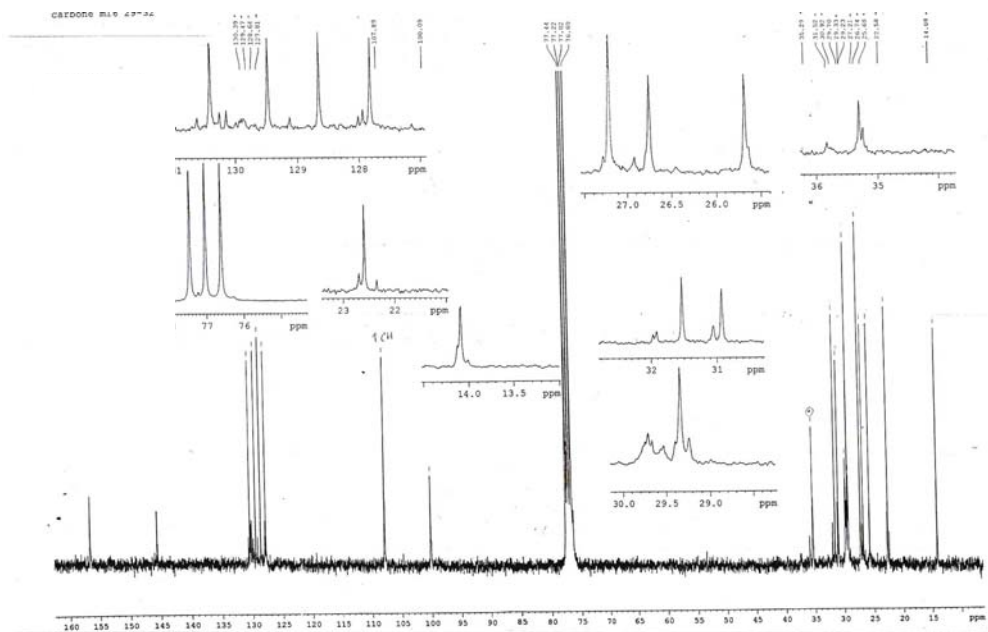


Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ST-3 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

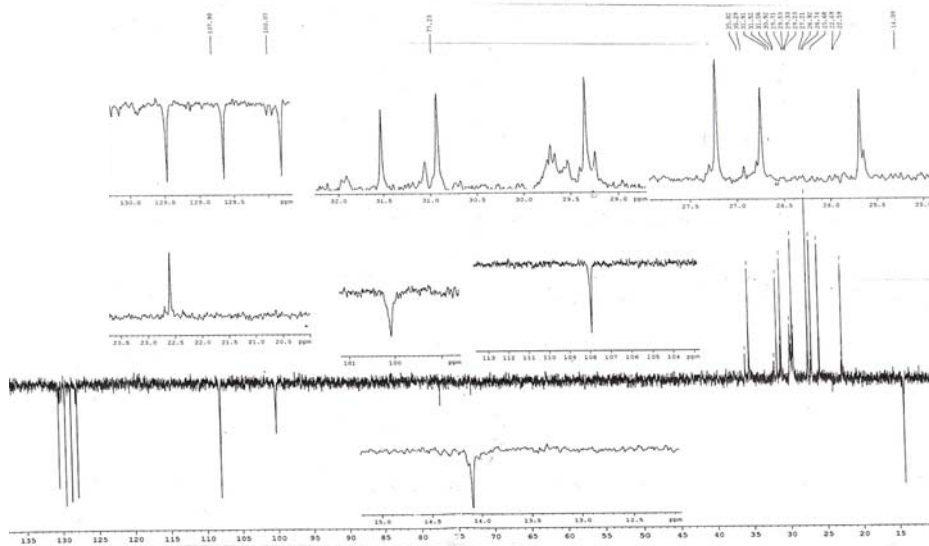
Anexo 3 Espectros de RMN de ST-4 isolado do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)



Espectro de RMN ^1H de ST-4 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]



Espectro de RMN ^{13}C – BB de ST-4 [75 MHz, CDCl_3 , CDCl_3 , δ (ppm)]



Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ST-4 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

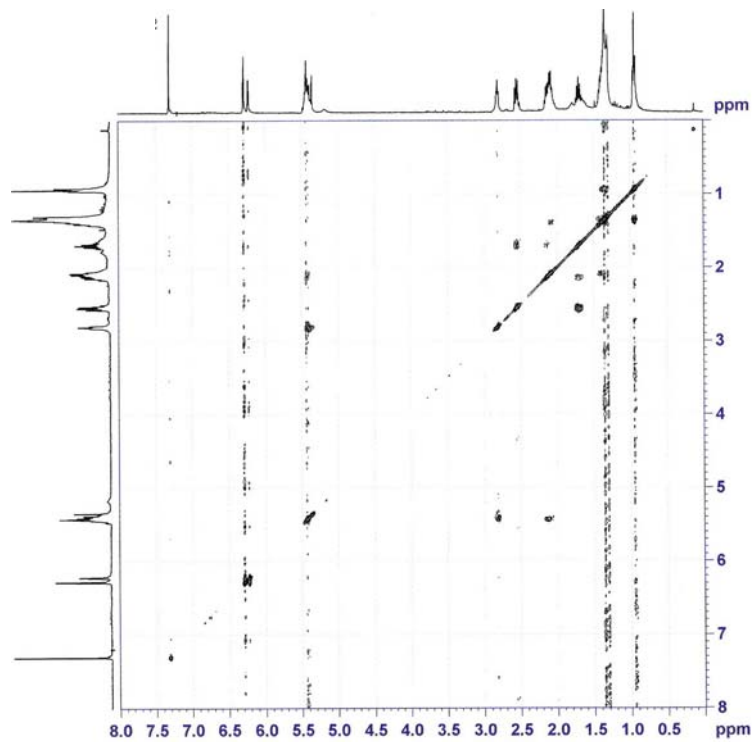


Diagrama de contorno Cosy de ST-4

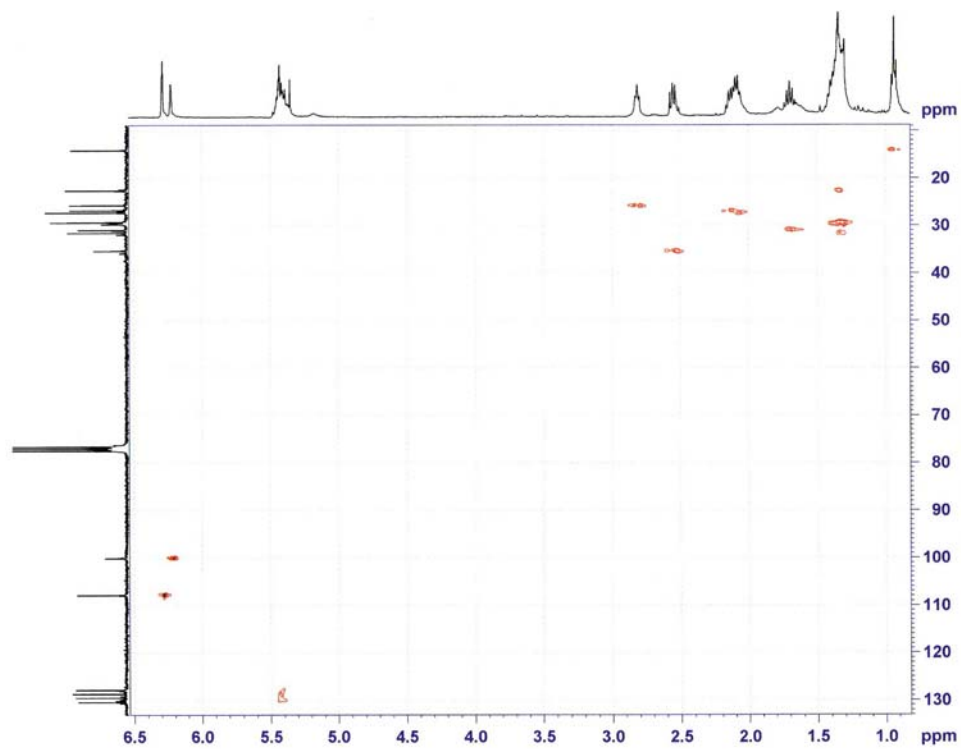


Diagrama de contorno HSQC de ST-4

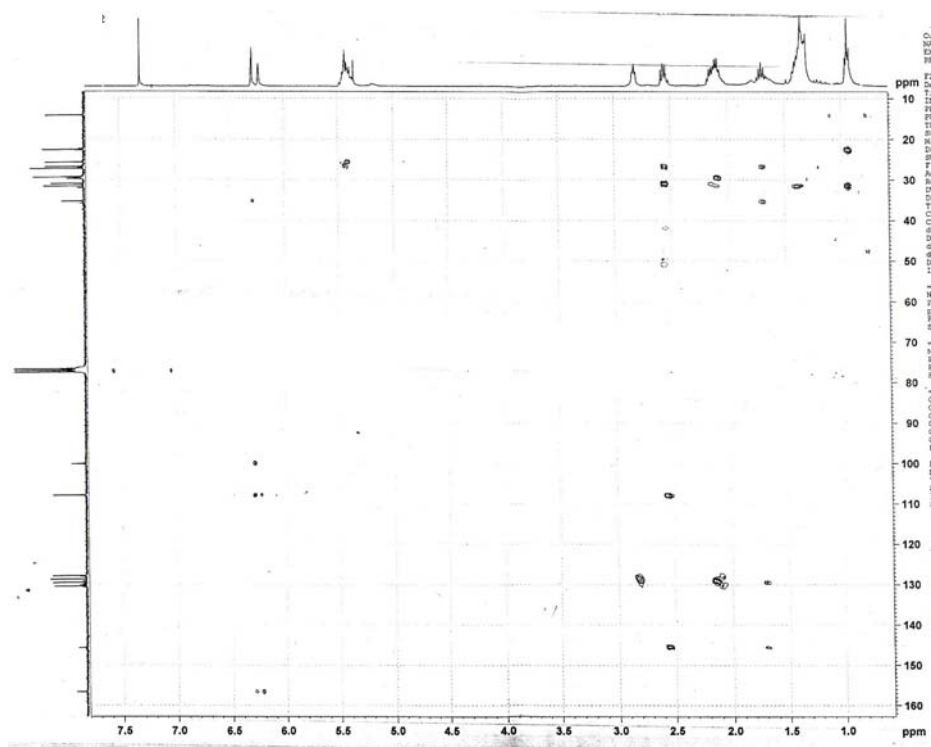
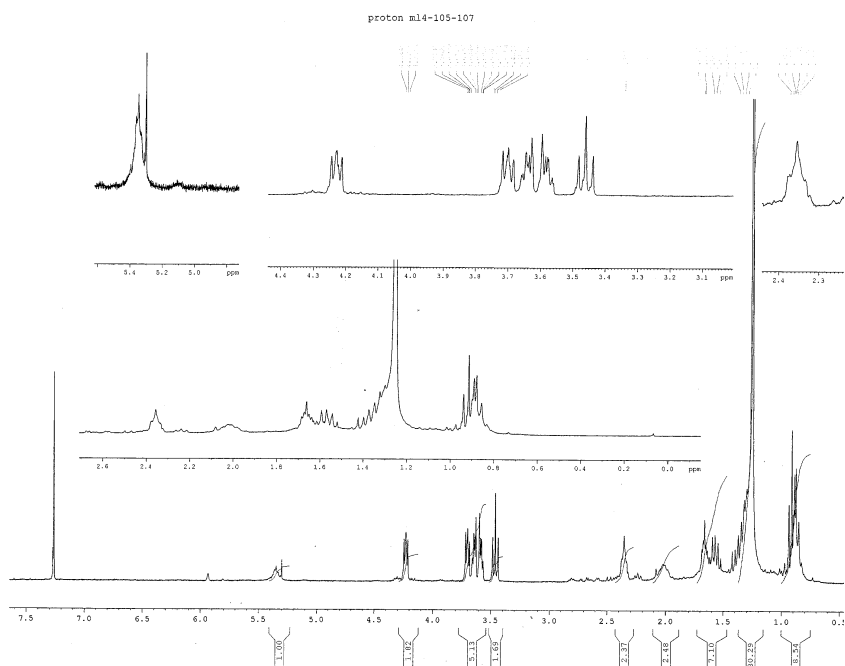
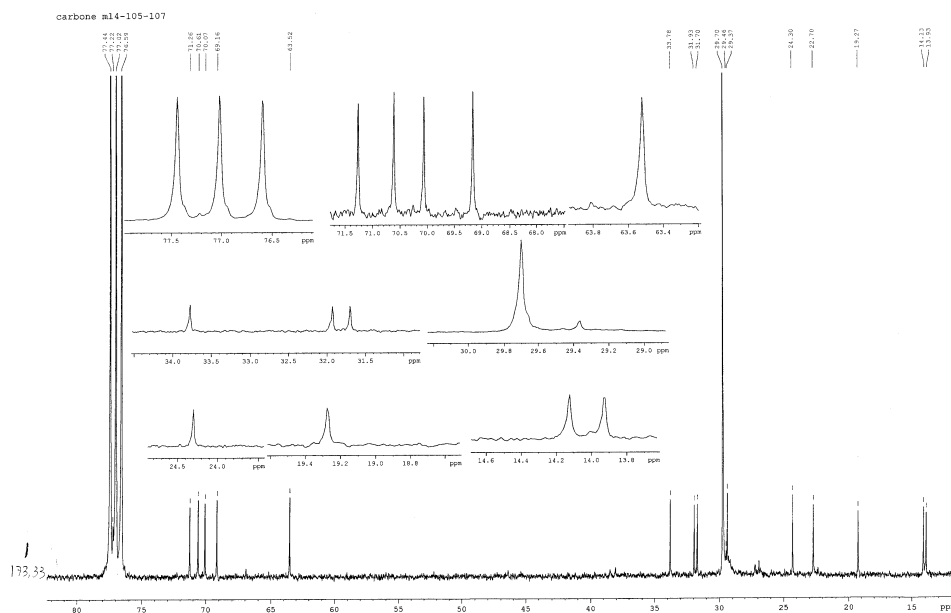


Diagrama de contorno HMBC de ST-4

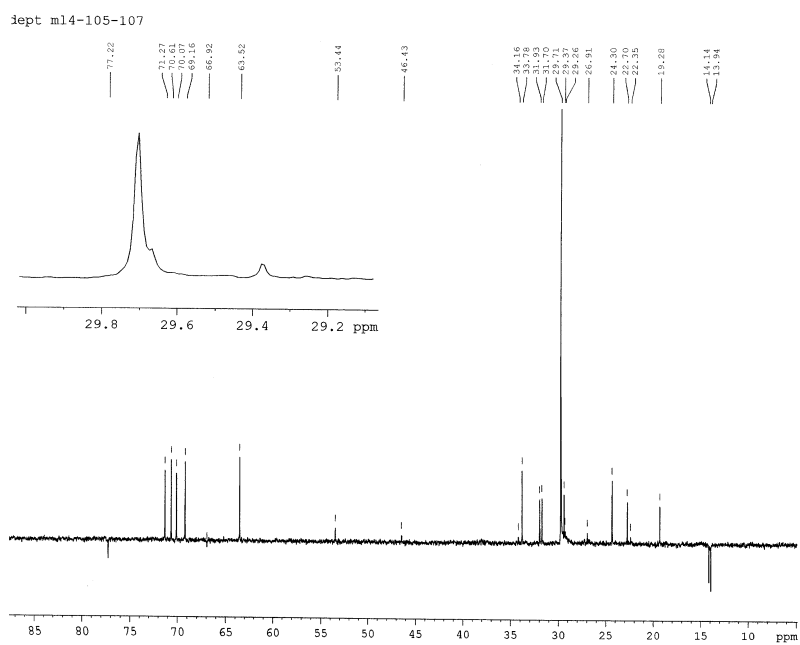
Anexo 4 Espectros de RMN de ST-5 isolado do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)



Espectro de RMN ^1H de ST- 5 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]



Espectro de RMN ^{13}C – BB de ST- 5 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]



Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ST-5 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

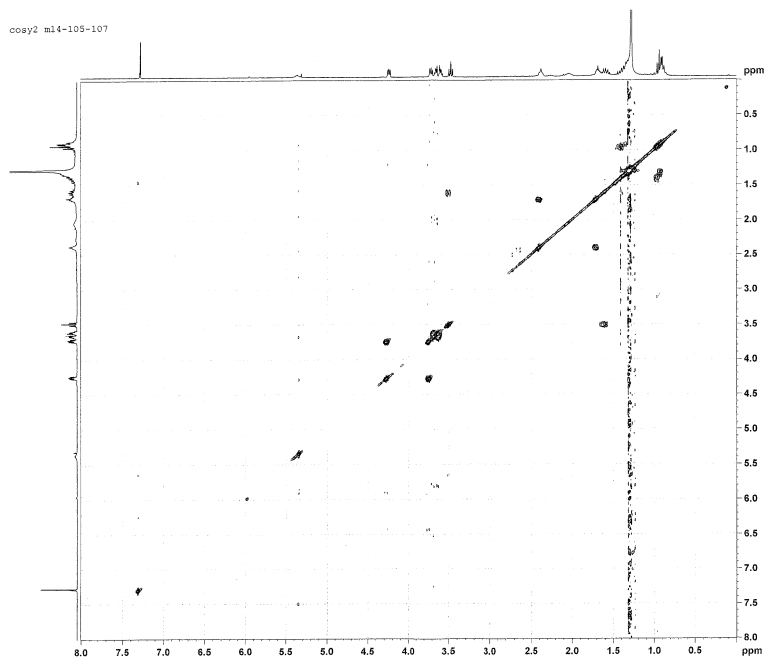


Diagrama de contorno COSY de ST-5

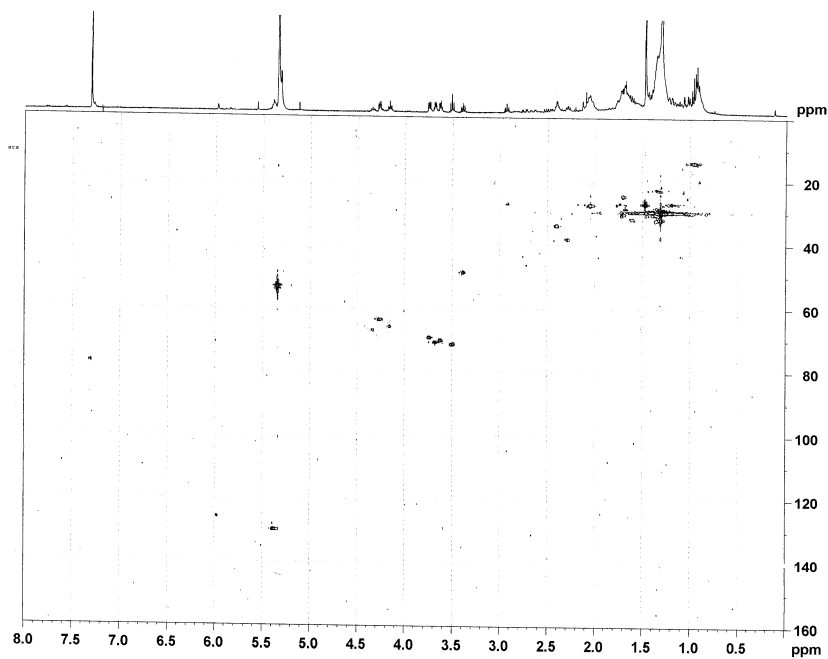


Diagrama de contorno HSQC de ST-5

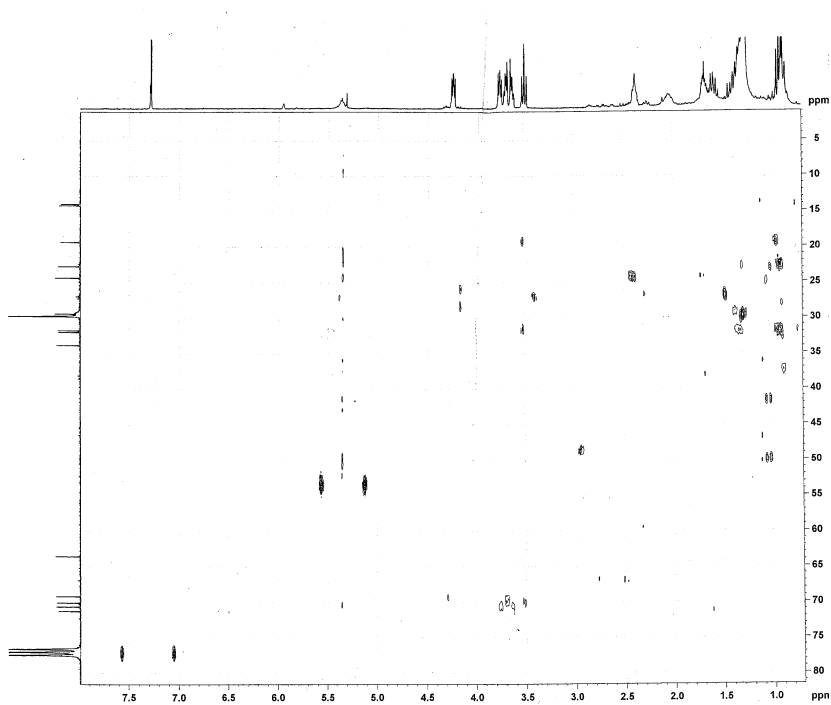
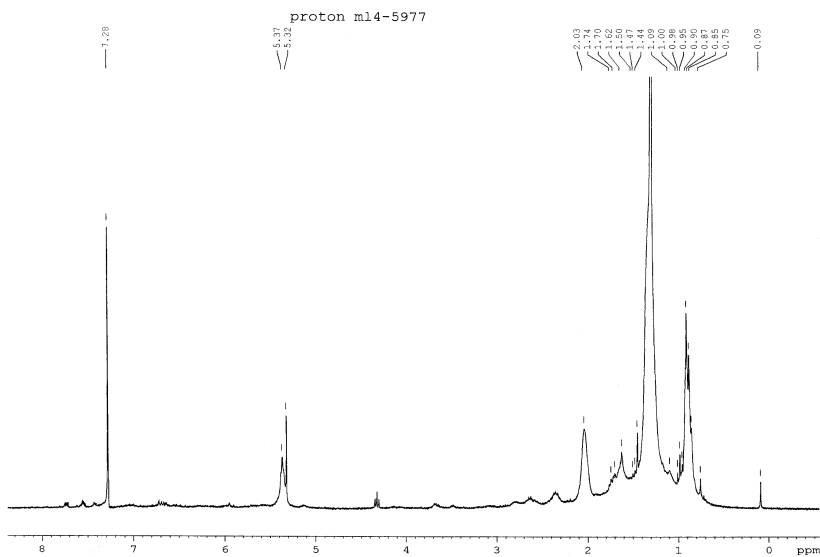
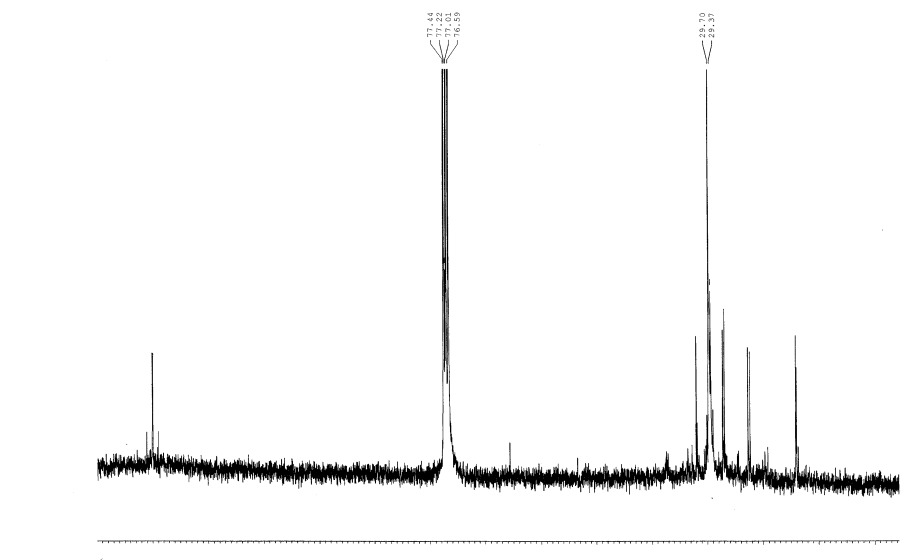


Diagrama de contorno HMBC de ST-5

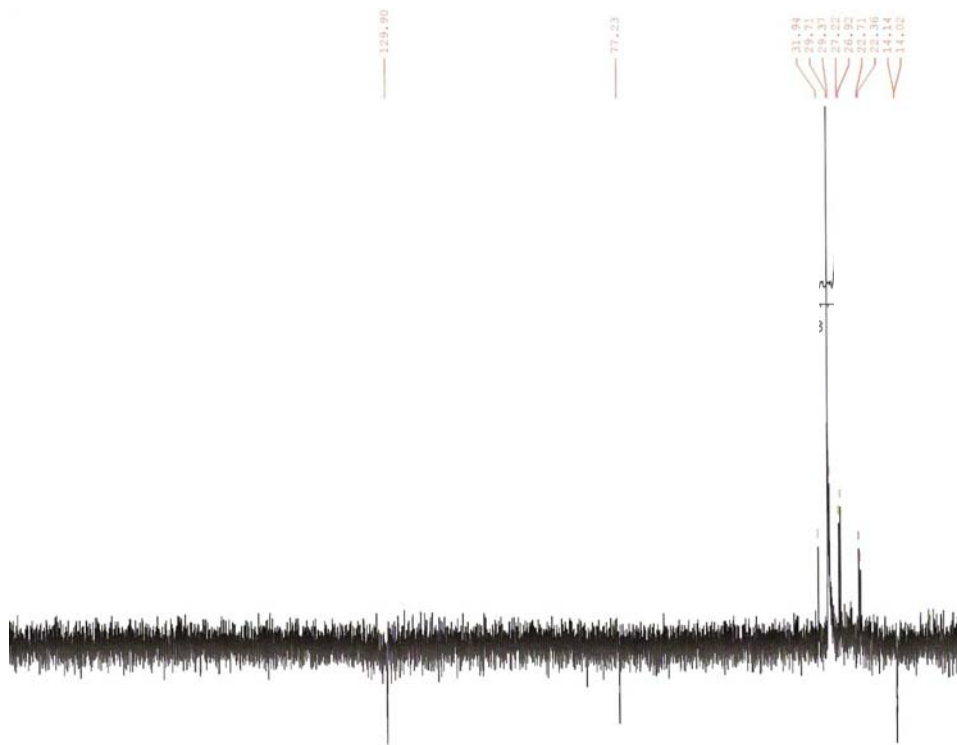
Anexo 5 Espectros de RMN de ST-6 isolado do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)



Espectro de RMN ¹H de ST-6 [300 MHz, CDCL₃, δ (ppm)]



Espectro de RMN ¹³C-BB de ST - 6 [75 MHz, CDCL₃, δ (ppm)]



Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135⁰ de ST-6 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

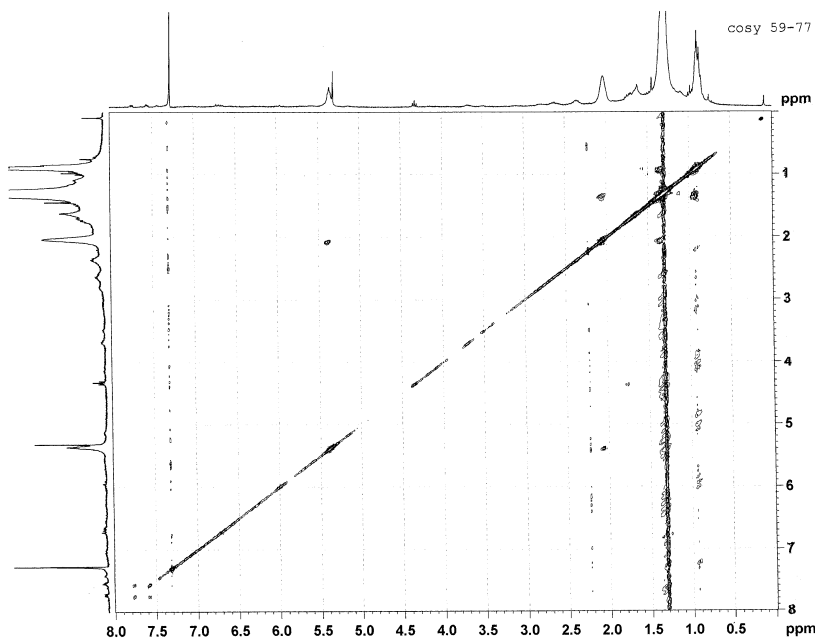


Diagrama de contorno do espectro COSY de ST – 6

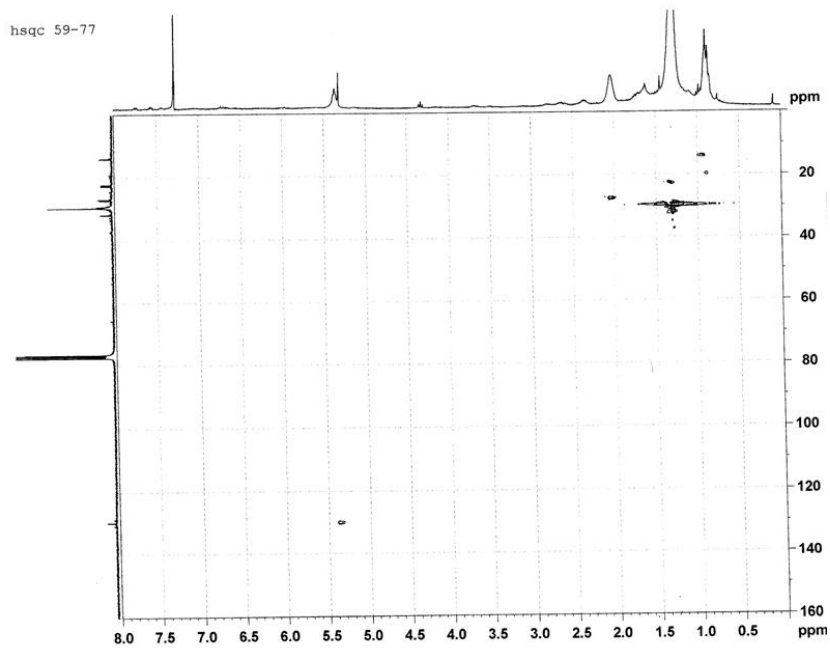


Diagrama de contorno do espectro HSQC de ST - 6

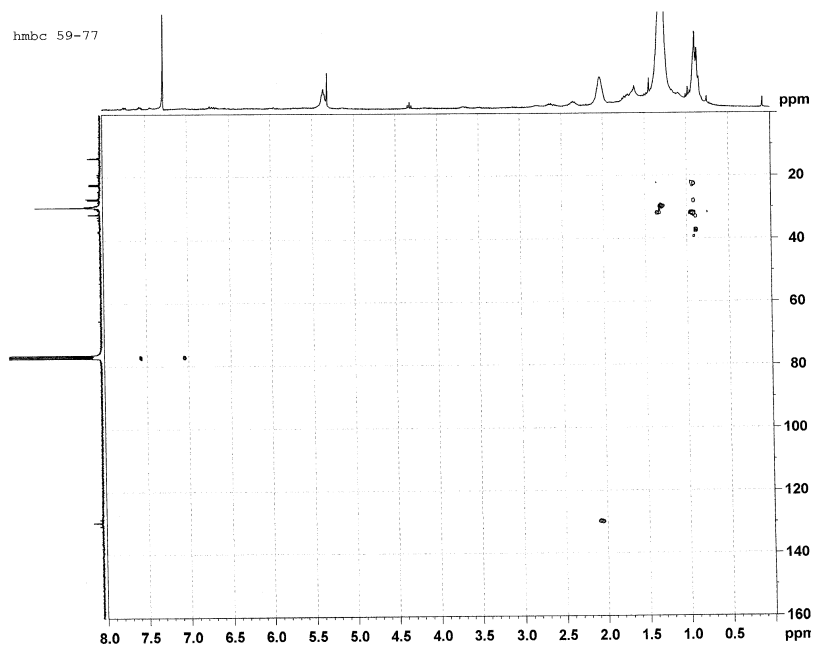
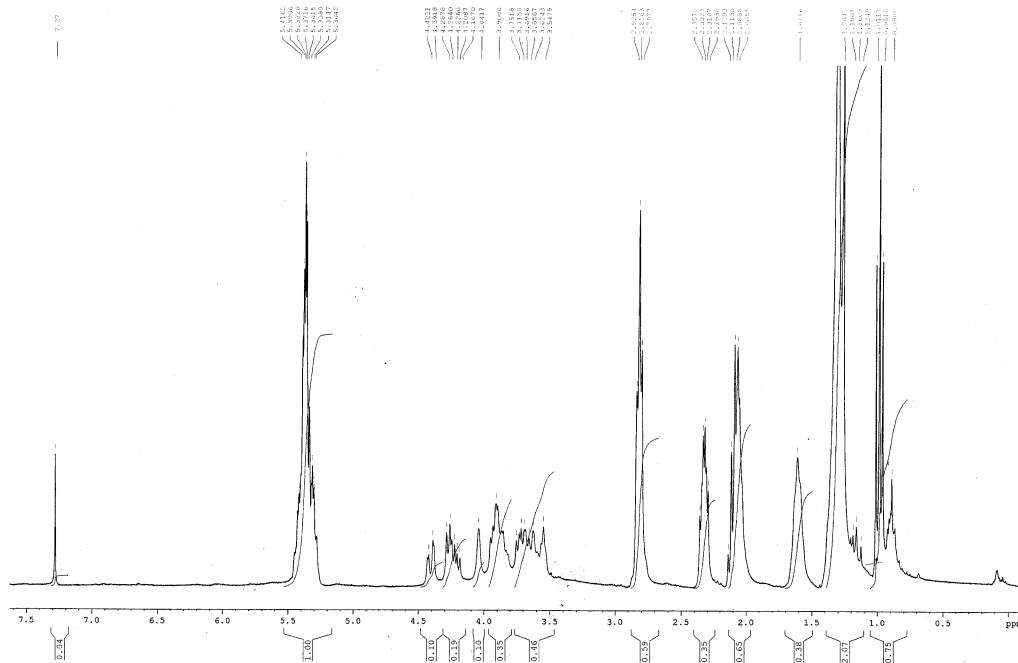
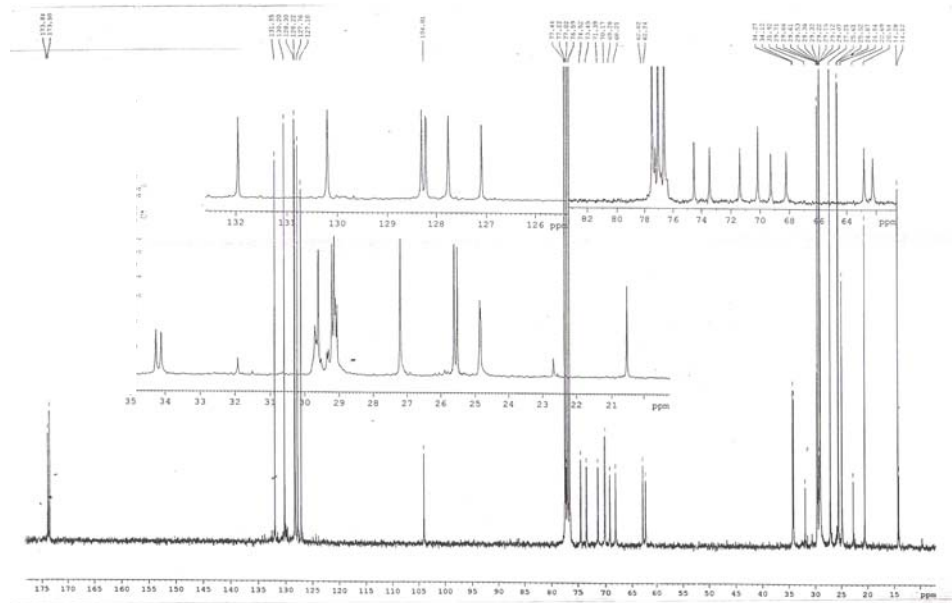


Diagrama de contorno do espectro HMBC de ST - 6

Anexo 6 Espectros de RMN de ST-7 isolado do extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (EDFST)

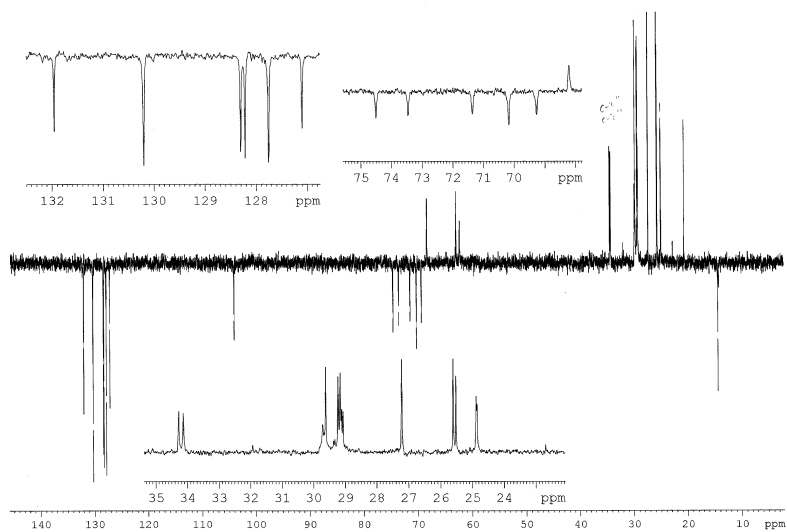


Espectro de RMN ^1H de ST-7 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]



Espectro de RMN ^{13}C – BB de ST-7 [75 MHz, CDCl_3 , CDCl_3 , δ (ppm)]

dept m15-14-16 sec



Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135⁰ de ST-7 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

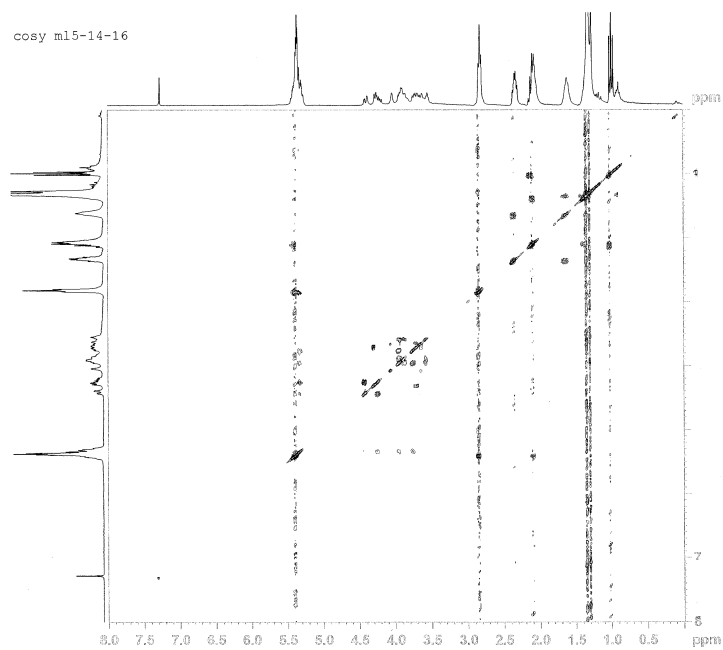


Diagrama de contorno Cosy de ST-7

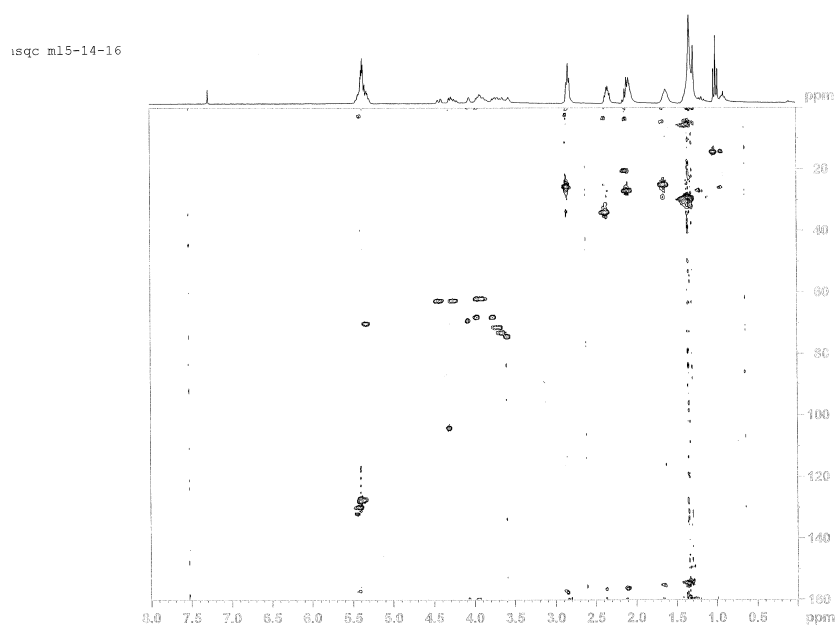


Diagrama de contorno HSQC de ST-7

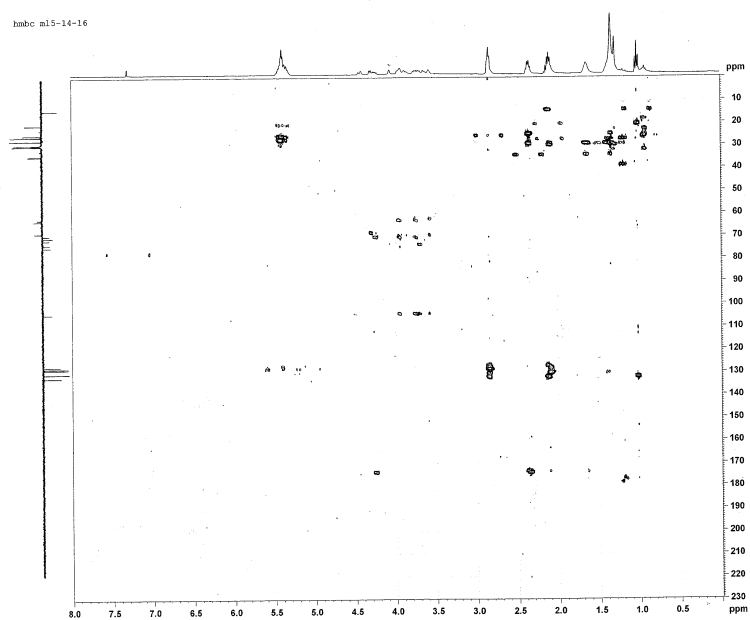


Diagrama de contorno HMBC de ST-7