

Mauro César Cafundó de Moraes

**BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS EM
MODELOS CELULARES DE CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE,
APOPTOSE E QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER**

Araraquara – SP

2012

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Departamento de Análises Clínicas

**BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS EM
MODELOS CELULARES DE CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE,
APOPTOSE E QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER**

Mauro César Cafundó de Moraes

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, como pré-requisito para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

Araraquara – SP

2012

DEDICATÓRIA

Para minha mãe, Profa. Emília J. M.
Moraes, por me ensinar a pensar,
valorizar a educação e a ciência.

“Não se pode enganar a Natureza.”

– Richard Feynman

“Se eu tivesse mil ideias por ano e apenas uma fosse boa, eu estaria satisfeito.”

– Alfred Nobel

“A melhor maneira de se ter boas ideias é tendo muitas ideias.”

– Linus Pauling

“Um grama de prevenção vale mais do que um kilo de cura.”

– Benjamin Franklin

“Faça do teu alimento o teu medicamento.”

– ditado popular

“Prevenir é melhor do que remediar.”

– ditado popular

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, José Carlos Cafundó de Moraes e Emília Joaquina de Moura Moraes, que tanto trabalharam para garantir minha educação e conhecimento.
- A minha amada Marina Célia E. Silva, por todo carinho, amor e compreensão que me ajudaram a vencer este desafio.
- A minha tia Sônia, a meu avô Ten. Marino Cafundó e a vó Isaura, que com pequenos gestos me deram muita felicidade e me ensinaram a importância de compartilhar.
- Agradeço a minha orientadora Profa. Christiane Pienna Soares, que tanto me estimulou e garantiu as condições para seguir em frente com esse projeto.
- Agradeço ao Prof. John M. Pezzuto, Ph.D. e seus colaboradores Laura, Beau, Suaib, Noo, Talysa, Eun-Jung “Amy”, Elizabeth e Tamara, do *College of Pharmacy, University of Hawai’i at Hilo*, por me mostrar o caminho da quimioprevenção do câncer e estimular cientificamente nessa área. *Mahalo nui loa!*
- Aos meus colegas do laboratório de Citologia e Biologia Celular e todos aqueles que passaram por lá, Maísa, Camila, Roberta, Aline, Tarsia, Elaine, Dani, Felipe, Juliana, Flávio, Belzinha, Belzona e Valéria com quem compartilhamos frustrações e muito aprendi sobre cultura de células.
- Aos colegas e colaboradores do Instituto de Química de Araraquara, Maicon S. Petrônio, Patrícia F. Souza, Daniara C. Fernandes, Dr. Luís Octávio Regasini, Profa. Dra. Dulce H. S. Silva e Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani por me mostrarem o caminho dos produtos naturais.
- Aos colegas e colaboradores do Laboratório de Farmacognosia do departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicológicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Prof. Dr. André G. dos Santos e Gabrielle Alexandre, por me ajudar a entender melhor os óleos essenciais.
- A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pelo trabalho e esforço que indiretamente contribuíram para a minha formação acadêmica.

- Aos moradores e agregados da República Diretoria de Araraquara, Ariel, Felipe, Arrombado, Al Jazeera, Dy, Fuinha, Jontex, Xupisco, Gargamel, Zé, João, Nissin, Maricón, Xaveco, Alfinete, Margarida, Whiskey e Bife, por ser a minha segunda família durante todos esses anos e cuidarem da nossa casa.
- Ao pessoal da T.W.R., Alessandro, André, Boris, Diego, Eduardo, Fernando, Heitor, Ricardo, Júlio, Kaio, Henrique, Raul e Rafael, pelo excesso de amizade e por todos os momentos de descontração que passamos juntos.
- Aos *senseis* Tadashi Kimura, Marcos Francisco da Silva e John Masuhara, por me ensinar a levantar depois de cada queda e ser persistente, instruindo os princípios do judô. どうもありがとうございました！
- Às agências FAPESP e CAPES pelas bolsas de estudo de doutorado direto e doutorado sanduíche (FAPESP n. 2010/12579-5 e CAPES PDEE 0087-11-4); e suporte financeiro ao projeto (FAPESP 2009/52716-4).

RESUMO

A quimioprevenção do câncer é definida como o uso de produtos naturais ou sintéticos para atrasar, bloquear ou reverter o processo de carcinogênese. Produtos naturais apresentam uma diversidade de estruturas químicas que servem de modelo para o desenvolvimento de novos princípios ativos antitumorais e quimiopreventivos. Alcaloides guanidínicos presentes nas folhas de *Pterogyne nitens* apresentam atividade antitumoral e foram selecionados para os ensaios. O ácido gálico foi escolhido como modelo e seus derivados tiveram atividade quimiopreventiva descrita por ser produto natural antioxidante presente nas folhas de *Alchornea glandulosa*. Uma coleção de 70 substâncias foi classificada em 6 grupos de acordo com sua estrutura. Derivados de ácidos fenólicos, alcaloides guanidínicos, fenamatos, carvonas, xantonas, flavonas e chalconas preniladas foram avaliadas em ensaios de citotoxicidade por SRB em células MCF-7 e MDA-MB-231, e a atividade quimiopreventiva por meio de indução da enzima quinona-redutase (NQO1) em células Hepa 1c1c7, inibição *in vitro* de aromatase (CYP19), inibição de NF-κB ativado por TNFα e inibição da produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas por LPS. Além disso, alcaloides guanidínicos nitensidina A (**NTA**), nitensidina B (**NTB**) e nitensidina T (**NTT**) foram avaliados pelo ensaio de MTT e a indução de apoptose por coloração com Hoechst 33342 e iodeto de propídio, ambos em células HepG2. A genotoxicidade do ácido gálico (**GA**) e galato de metila (**G1**) foi avaliada em células HepG2 pelo ensaio do cometa. **GA** e **G1** apresentaram inibição de NF-κB ($CI_{50} = 19,8 \mu\text{M}$ e $12,1 \mu\text{M}$, respectivamente), sendo que **GA** provocou quebras de DNA significantes ($P < 0,05$) nas concentrações de $12 \mu\text{M}$ e $40 \mu\text{M}$ verificados pelo ensaio do cometa. Galato de propila (**G3**) e galato de butila (**G4**) inibiram a produção de NO ($CI_{50} = 7,9 \mu\text{M}$ e $2,0 \mu\text{M}$, respectivamente). Galato de butila e galato de pentila (**G5**) inibiram CYP19 em aproximadamente 60% a $90 \mu\text{M}$, permitindo uma relação estrutura-atividade. As substâncias análogas do ácido fenâmico **AB4** e **AB5** apresentaram inibição de NF-κB a $50 \mu\text{M}$ (73,0% e

72,6%, respectivamente). O análogo de xantona **X9** apresentou indução de enzima NQO1 (CD = 41,0 μ M). Os análogos da (+)-carvona (**C+**) apresentaram inibição de NF- κ B a 50 μ M, exceto a (-)-hidroxidiidrocarvona (**H-**) que não inibiu o fator de transcrição. Os alcaloides guanidínicos **NTA** e **NTB** foram citotóxicos em todos os modelos celulares (CI₅₀ = 2,6 μ M e 3,2 μ M em HepG2, respectivamente), e o análogo **NTT** apresentou indução de NQO1 de maneira bifuncional (CD = 11,7 μ M). **NTA** e **NTB** inibiram CYP19 (67,0% e 68,2%, respectivamente), demonstrando que a presença do nitrogênio guanidínico é essencial para essa atividade. O alcaloide **NTB** induz apoptose tardia em células HepG2 após 24 h de tratamento (P < 0,05). A 6-hidroxiavone (6**Fla**) induziu enzima NQO1 (CD = 6,5 μ M) e a pedalitina (**PED**) inibiu CYP19 (CI₅₀ = 0,3 μ M). A 2-O-isoprenilchalcona (**2OIch**) apresentou indução de NQO1 (CD = 1,3 μ M), inibição de NF- κ B (CI₅₀ = 10,8 μ M) e inibição da produção de NO (CI₅₀ = 7,9 μ M). Além disso, inibiu a expressão de iNOS, mas não COX-2, no nível de proteína a 16,7 μ M. Produtos naturais apresentam-se como uma fonte de moléculas bioativas para quimioprevenção do câncer. Modificações na estrutura molecular, como alquilação de ácidos fenólicos ou prenilação de chalconas e flavonas, são suficientes para aumentar a atividade de uma substância.

Palavras-chave: galatos de alquila, alcaloides guanidínicos, flavonas preniladas, chalconas preniladas, quinona-redutase, NF- κ B, iNOS, COX-2.

ABSTRACT

Cancer chemoprevention is defined as the use of natural or synthetic products to delay, block or reverse the carcinogenesis process. Natural products presents a diversity of chemical structures that serve as template for the development of new active antitumor and chemopreventive agents. Guanidine alkaloids from the leaves of *Pterogyne nitens* have antitumor activity and were selected for the assays. Gallic acid, an antioxidant natural product present in the leaves of *Alchornea glandulosa*, was selected as template and its derivatives chemopreventive activity is reported. A collection of 70 compounds were classified into six groups according to their structure. Phenolic acid derivatives, guanidine alkaloids, fenamates, carvones, xanthones, prenylated flavones and chalcones were evaluated in cytotoxicity assays through SRB in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines, and chemopreventive activity by means of quinone-reductase (NQO1) induction in Hepa 1c1c7 cell line, *in vitro* aromatase (CYP19) inhibition, TNF α -activated NF- κ B inhibition and NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Guanidine alkaloids nitensidine A (**NTA**), nitensidine B (**NTB**) and nitensidine T (**NTT**) were evaluated through MTT assay and apoptosis induction with Hoechst 33342 and propidium iodide stain, both in HepG2 cell line. Genotoxicity of gallic acid (**GA**) and methyl gallate (**G1**) was evaluated in HepG2 cells by the comet assay. **GA** and **G1** presented NF- κ B inhibition (IC₅₀ = 19.8 μ M and 12.1 μ M, respectively), and it resulted in significant (P < 0.05) DNA strand breaks at 12 μ M and 40 μ M as verified by the comet assay. Propyl gallate (**G3**) and butyl gallate (**G4**) inhibited NO production (IC₅₀ = 7.9 μ M e 2.0 μ M, respectively). Butyl gallate and pentyl gallate (**G5**) inhibited CYP19 in approximately 60% at 90 μ M, allowing a structure-activity relationship. Fenamic acid analogs **AB4** and **AB5** presented NF- κ B inhibition at 50 μ M (73.0% and 72.6%, respectively). Xanthone analog **X9** presented NQO1 induction (CD = 41.0 μ M). (+)-carvone (**C+**) analogs presented NF- κ B inhibition at 50 μ M, with the exception of (–)-hidroxydihydrocarvone (**H–**) wich didn't inhibited the transcription

factor. Guanidine alkaloids **NTA** and **NTB** were cytotoxic in all cell models ($IC_{50} = 2.6 \mu M$ and $3.2 \mu M$ in HepG2, respectively), and the **NTT** analog presented NQO1 induction in a bifunctional manner ($CD = 11.7 \mu M$). **NTA** and **NTB** inhibited CYP19 (67.0% and 68.2%, respectively), showing that the presence of guanidine nitrogen is essential for this activity. The alkaloids **NTB** induced late apoptosis in HepG2 cells after 24 h of treatment ($P < 0.05$). 6-hydroxyflavone (**6Fla**) induced NQO1 ($CD = 6.5 \mu M$) and pedalitin (**PED**) inhibited CYP19 ($IC_{50} = 0.3 \mu M$). The 2-*O*-isoprenylchalcone (**2OIch**) presented NQO1 induction ($CD = 1.3 \mu M$), NF- κ B inhibition ($IC_{50} = 10.8 \mu M$) and NO production inhibition ($IC_{50} = 7.9 \mu M$). Furthermore, it has inhibited iNOS expression, but not COX-2, in protein level at $16.7 \mu M$. Natural products are presented as a source of bioactive molecules for cancer chemoprevention. Structural modifications, such as phenolic acid alkylation or chalcones and flavones prenylation, are enough to raise compounds activity.

Key-words: alkyl gallates, guanidine alkaloids, prenylated flavones, prenylated chalcones, quinone-reductase, NF- κ B, iNOS, COX-2.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS EM MODELOS CELULARES DE CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE, APOPTOSE E QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER	20
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Quimioprevenção do câncer	21
1.2. Produtos naturais e sintéticos utilizados na indução de enzimas destoxificadoras ..	23
1.3. O fator de transcrição NF-κB e a oncogênese	25
1.4. O papel da inflamação no câncer	30
1.5. Inibição da aromatase	32
1.6. Morte celular – apoptose e necrose	33
1.7. Genotoxicidade	35
1.8. Bioprospecção	37
1.9. Plantas do cerrado de interesse em bioprospecção.....	38
1.9.1. <i>Pterogyne nitens</i>	38
1.9.2. <i>Alchornea glandulosa</i>	40
2. OBJETIVO GERAL	43
2.1. Objetivos específicos.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1. Substâncias avaliadas nos ensaios.....	44
3.2. Cultura de células	49
3.3. Citotoxicidade	50

3.3.1 Ensaio de MTT	50
3.3.2. Ensaio de SRB.....	50
3.4. Ensaio do “cometa”	51
3.5. Ensaio de apoptose (Hoechst 33342 e iodeto de propídio).....	52
3.6. Ensaio de quimioprevenção do câncer	53
3.6.1. Indução da quinona-redutase (NQO1).....	53
3.6.2. Atividade de NQO1	54
3.6.3. Inibição da aromatase	56
3.6.4. Inibição de NF-κB ativado por TNFα.....	58
3.6.5. Inibição de NO	60
3.6.6. Análise da expressão de iNOS e COX-2	61
3.6.6.1. Ensaio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)	61
3.6.6.2. Ensaio de western blot	62
3.7. Análise estatística.....	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1. Atividade de ácidos fenólicos e ésteres derivados de GA e PA.....	64
4.1.1. Genotoxicidade do ácido gálico e galato de metila	71
4.2. Atividade de análogos do ácido fenâmico	72
4.3. Atividade de análogos da xantona.....	73
4.4. Atividade de (+)-carvona e análogos.....	73
4.5. Atividade de alcaloides guanidínicos de <i>P. nitens</i> e análogo sintético	76
4.5.1. Indução de apoptose por alcalóides guanidínicos e análogo sintético.....	78

4.6. Atividade de outros produtos naturais e flavonas preniladas	79
4.6.1. Atividade de chalcona e análogos prenilados	81
4.6.2. Estudo do mecanismo de ação da 2OICH	84
5. CONCLUSÕES	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
CAPÍTULO II – TRABALHOS PUBLICADOS E RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estágios da carcinogênese química e ensaio de quimioprevenção do câncer	23
Figura 2: Mecanismo de regulação da resposta de genes de fase 2	25
Figura 3: Estruturas dos fatores de transcrição da família NF- κ B	26
Figura 4: Ativação do NF- κ B pelo TNF- α	28
Figura 5: Biossíntese de NO a partir de L-arginina na presença de iNOS	31
Figura 6: Biossíntese de estradiol e estradiona a partir de testosterona e androstenediona, respectivamente, pela enzima aromatase	32
Figura 7: Representação esquemática da via de morte celular por caspase 3 e 7.....	34
Figura 8: Imagens dos cometas em células HepG2 ampliadas 200x.....	36
Figura 9: Estrutura química de alcaloides guanidínicos presentes nas folhas de <i>P. nitens</i>	40
Figura 10: Estrutura química do ácido gálico e ésteres derivados sintéticos	42
Figura 11: Estrutura química do ácido protocatecuico e ésteres derivados sintéticos.....	43
Figura 12: Estrutura química de nitensidina T, análogo sintético de nitensidina A.....	44
Figura 13: Estruturas químicas do ácido fenâmico e análogos sintéticos	45
Figura 14: Estruturas químicas da xantona e análogos sintéticos	46
Figura 15: Estruturas químicas de outros produtos naturais, flavonas e chalconas preniladas	47
Figura 16: Estruturas químicas da (+)-carvona e análogos sintéticos	48
Figura 17: Princípio do ensaio da quinona-redutase.....	54
Figura 18: Conversão do DBF em fluoresceína pela CYP19.....	56
Figura 19: Princípio do ensaio da aromatase.....	57
Figura 20: Princípio do método para ensaio de NF- κ B/Luciferase	59

Figura 21: Estruturas químicas dos controles positivos adotados nos ensaios de citotoxicidade, apoptose e quimioprevenção	63
Figura 22: Inibição <i>in vitro</i> da enzima aromatase pelas substâncias G4 , G5 e NAR	68
Figura 23: Inibição da atividade de NF- κ B por GA , G1 e G2	69
Figura 24: Inibição da produção de NO por G3 e G4	70
Figura 25: Genotoxicidade do ácido gálico e galato de metila	71
Figura 26: Ensaio de viabilidade celular por MTT tratadas com nitensidina A, nitensidina B, nitensidina T e doxorubicina	76
Figura 27: Indução da enzima quinona-redutase pela substância NTT e relação com sobrevivência celular	77
Figura 28: Apoptose pelo ensaio de HO/IP após tratamento com NTA , NTB e NTT	79
Figura 29: Inibição da produção de NO por 3OFCh , 2OICH e 2OFCh	83
Figura 30: Inibição da atividade de NF- κ B por 3OFCh , 2OICH e 2OFCh	84
Figura 31: Efeito de 2OICH nos níveis de expressão de proteínas e níveis de mRNA de iNOS e COX-2	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade do ácido gálico (GA) e ésteres derivados.....	66
Tabela 2: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade do ácido protocatecuico (PA) e ésteres derivados.....	67
Tabela 3: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade dos análogos do ácido fenâmico..	74
Tabela 4: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade dos análogos da xantona.	75
Tabela 5: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade da (+)-carvona (C+) e análogos. .	75
Tabela 6: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade de produtos naturais e derivados semi-sintéticos.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

4'BF – 4'-bromoflavona

A-431 – células de carcinoma epidermóide

AINE – anti-inflamatório não-esteroidal

BSA – albumina sérica bovina

CHO-Aux-B1 – células B1 auxiliadoras de ovário de hamster chinês

CI₅₀ – concentração inibitória de 50% da atividade

COX-2 – cicloxigenase 2 (E.C. 1.14.99.1)

CYP19 – aromatase (E.C. 1.14.14.1)

DAF – diacetato de fluoresceína

DBF – dibenzilfluoresceína

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – dimetilsulfóxido

DOX – doxorubicina

GA – ácido gálico; ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico

h – horas

HBSS – solução salina de Hank

HeLa – células de carcinoma cervical humano infectadas com HPV-18

HEK293 – célula renal embrionária humana 293

HepG2 – células de hepatocarcinoma humano

HIF – fator induzido por hipóxia

HRE – elemento de resposta HIF

HO – Hoechst 33342

I κ B – inibidor de NF- κ B

IKK – I κ B-quinase

IL – interleucina

INF – interferon

iNOS – óxido nítrico sintase induzida (E.C. 1.14.13.39)

IP – iodeto de propídio

IR – índice de indução da enzima NQO1

IRF3 – fator de resposta a interferon

L-132 – células de fibroblastos humanos

L-NMMA – *N*⁰-monometil-L-arginina

LPS – lipopolissacarídeo bacteriano

Mal – Proteína adaptadora do receptor TRL4 (*MyD88 adapter like*)

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*)

MCF-7 – células de adenocarcinoma mamário

MDA-MB-231 – células de adenocarcinoma mamário

min – minutos

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazo-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

MyD88 – Proteína adaptadora do receptor TRL4 (*myeloid differentiation marker*)

NAR – naringenina

NCI460 – células tumorais humanas de pulmão

NF-κB – fator de transcrição nuclear κB

NO – óxido nítrico

NQO1 – naftoquinona oxidoreductase 1; quinona-redutase (E.C. 1.6.5.2)

PKA – proteína quinase A

PMSF – fluoreto de fenilmetanosulfonila

PVDF – polivinilideno difluoreto

RAW 264.7 – células de macrófago de camundongos imortalizadas com vírus de leucemia

RH – domínio homólogo Rel

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real

s – segundos

SDS-PAGE – gel de eletroforese com poliacrilamida-dodecila sulfato de sódio

SRB – sulforrodamina B

TBST – tampão Tris com tween-20 0,1%

TCA – ácido tricloroacético

TLR4 – receptor de LPS (*toll-like receptor 4*)

TNF α – fator de necrose tumoral α

TPCK – *N*-Tosil-l-fenilalanil-clorometilcetona

UACC62 – células de melanoma humano

UV – ultravioleta

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial

***CAPÍTULO I – BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS EM MODELOS CELULARES DE CITOTOXICIDADE,
GENOTOXICIDADE, APOPTOSE E QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER***

1. INTRODUÇÃO

1.1. Quimioprevenção do câncer

O câncer é a terceira maior causa de morte no mundo (OMS, 2008), representando um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. Dados da Organização Mundial de Saúde apontam 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes por câncer em 2008 (FERLAY et al., 2010). No Brasil, a estimativa para o ano de 2012 é de mais de 257 mil novos casos, sendo o câncer de próstata mais comum entre homens, e o câncer de mama mais frequente em mulheres (BRASIL, 2011).

A etiologia do câncer é variada, podendo ser classificadas como externa e interna, estando ambas inter-relacionadas. As causas internas são geneticamente pré-determinadas, ocasionadas por fatores hormonais e imunológicos que ativam oncogenes (ALBERTS et al., 1999). Mutações pontuais provocadas por esses fatores podem resultar na troca de um aminoácido na proteína, que conseqüentemente perde sua função original (BLUME-JENSEN & HUNTER, 2001). A mutação em proteínas RAS é uma das alterações mais comuns observadas em tumores humanos (MILLER & MILLER, 2011). As causas externas são aquelas advindas do meio ambiente, consistem de exposição a fatores de risco como poluentes, infecções, medicamentos, estilo de vida (p. ex.: tabagismo, alcoolismo, hábitos alimentares, abuso de drogas), exposição à radiação e outros fatores ocupacionais (OLIVEIRA et al., 2007). Esses fatores atuam de maneira conjunta aumentando o risco de desenvolvimento da carcinogênese química (GREENWALD et al. 1995). Como cerca de 70% a 80% dos casos de câncer são de origem externa, podemos considerá-los passíveis de prevenção (GREENWALD et al. 1995; ALBERTS et al., 1999; PEZZUTO et al., 2005).

A quimioprevenção do câncer consiste em usar produtos naturais, sintéticos ou biológicos com o objetivo de prevenir, atrasar ou reverter o processo de carcinogênese (SONG et al.

1999; SPORN et al., 2000; REDDY et al., 2003). Diversos bioensaios foram elaborados para prospectar e determinar os mecanismos de ação de produtos naturais ou sintéticos (Figura 1) (PEZZUTO et al., 2005; OYAMA et al., 2009). Essas abordagens tiveram grandes avanços clínicos nos últimos anos (MEYSKENS et al., 2011; WU et al., 2011). O desenho racional de novos fármacos, baseados em estruturas de produtos naturais que já são conhecidas por terem atividade farmacológica potente e segura, é uma nova área importante da química medicinal. A atividade de substâncias fitoquímicas pode aumentar milhares de vezes com modificações estruturais (SPORN, 2011).

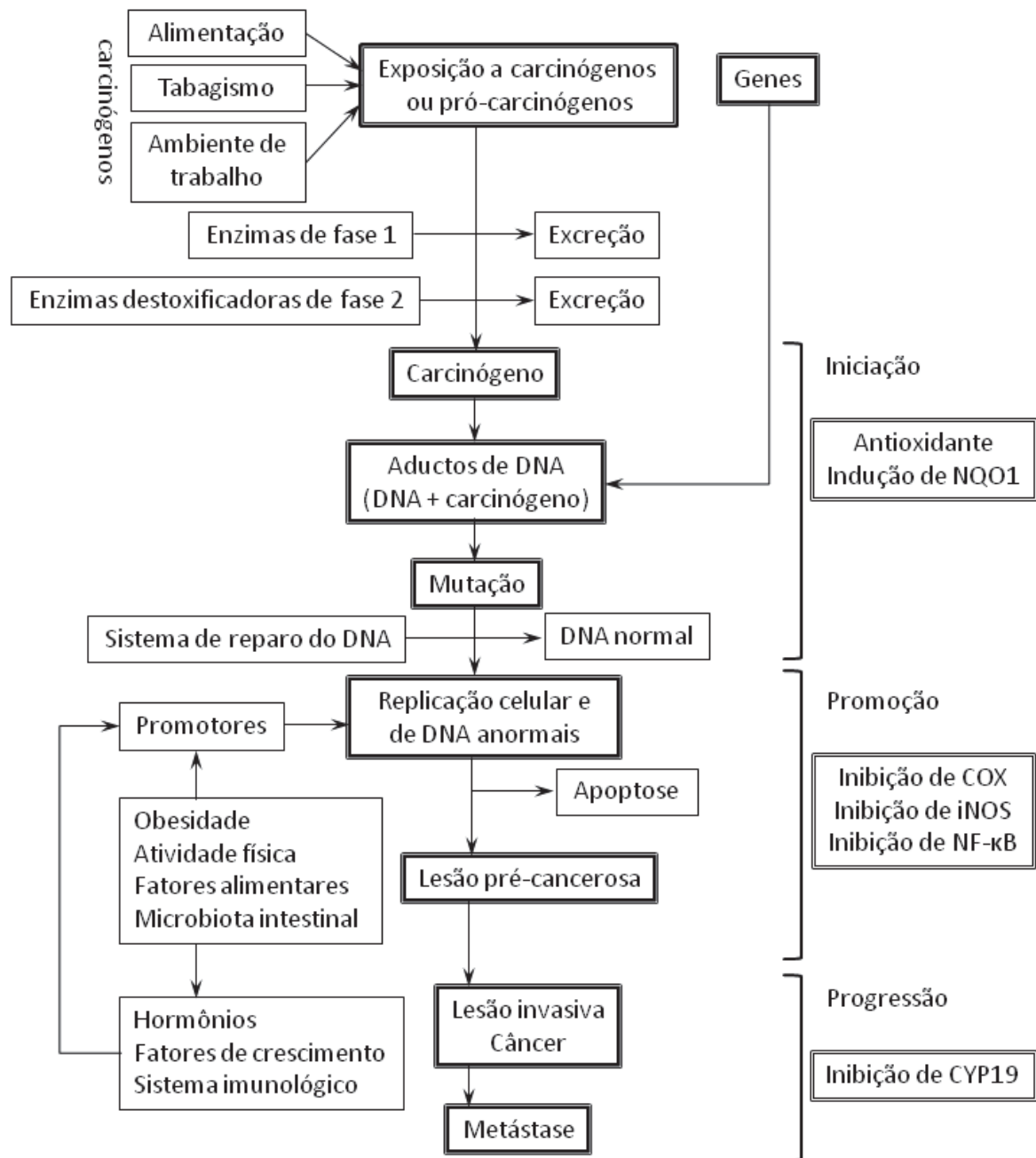


Figura 1: Estágios da carcinogênese química e ensaio de quimioprevenção do câncer (adaptado de MÄNNISTÖ, 1999).

1.2. Produtos naturais e sintéticos utilizados na indução de enzimas destoxificadoras

Produtos naturais são capazes de alterar o metabolismo de carcinógenos através da indução de enzimas microssomais envolvidas na destoxificação do organismo. A carcinogênese, portanto, pode ser evitada por uma série de substâncias de diferentes classes como

flavonóides, chalconas, cumarinas, tiocarbamatos, antioxidantes fenólicos e isotiocianatos, dentre outras (DINKOVA-KOSTOVA et al., 1999; MIRANDA et al., 2000; FAHEY et al., 2002). A propriedade comum entre essas substâncias é elevar a atividade destoxicadora por um aumento na síntese e/ou diminuição da degradação das enzimas (DINKOVA-KOSTOVA et al., 2001). Dessa forma, indutores enzimáticos atuam inibindo os estágios iniciais do processo de carcinogênese (SEO et al., 2008).

Tanto as enzimas de fase 1 quanto as enzimas de fase 2 são responsáveis pela destoxificação do organismo frente a carcinógenos do ambiente. Por outro lado, enzimas de fase 1 participam do processo de produção de espécies reativas de oxigênio e atuam na ativação de carcinógenos. Uma das estratégias para a proteção contra a carcinogênese, utilizando produtos naturais, envolve a inibição de enzimas de fase 1 enquanto aumentam enzimas de fase 2. As chamadas substâncias indutoras bifuncionais são aquelas que induzem enzimas de fase 1 e enzimas de fase 2. Este é o caso de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) que se ligam ao receptor de aril-hidrocarbonetos (AhR) com grande afinidade (CUENDET et al., 2006). As substâncias monofuncionais induzem seletivamente apenas as enzimas de fase 2, ativando a região de elemento de resposta anti-oxidante (ARE) pela via Keap1-Nrf2. O fator de transcrição Nrf2 se encontra no citoplasma ligado a Keap1, que por sua vez está anexado ao citoesqueleto de actina. Os indutores podem romper com o complexo Keap1-Nrf2 e, então, Nrf2 migra para o núcleo onde forma heterodímeros com outros fatores de transcrição que se ligam à região ARE de genes de fase 2 e aceleram sua transcrição (Figura 2) (DINKOVA-KOSTOVA et al., 2002). A redução de quinonas eletrofílicas pela quinona-redutase (NQO1; E.C. 1.6.5.2) é uma importante via de destoxificação (TALALAY et al., 1988; GERHÄUSER et al., 1997).

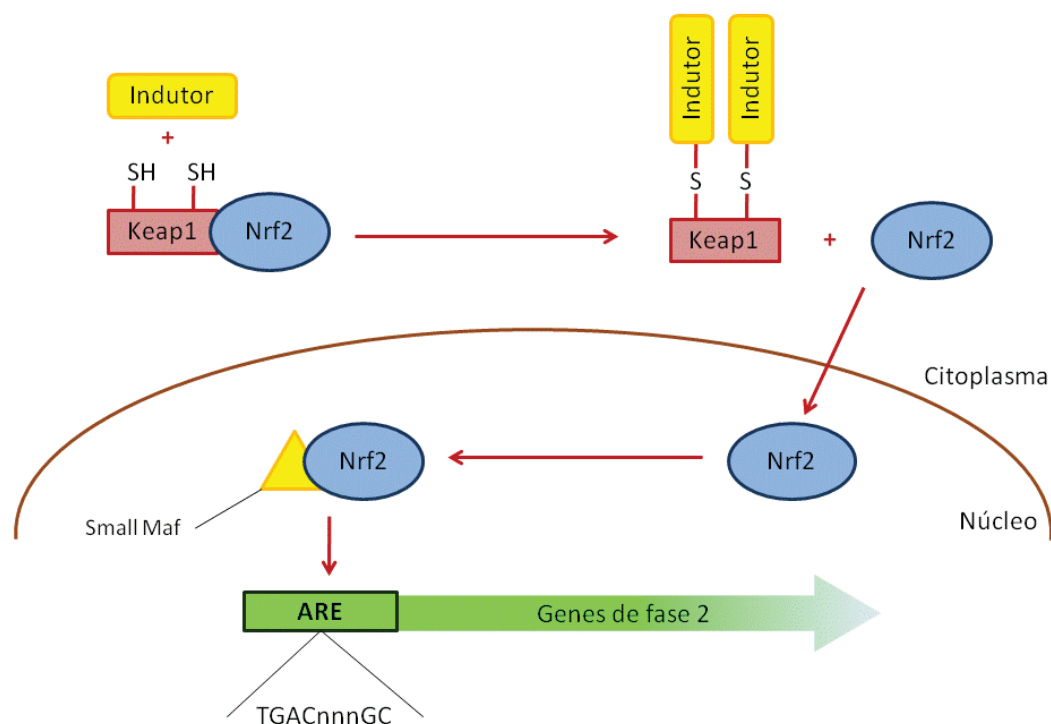


Figura 2: Mecanismo de regulação da resposta de genes de fase 2. Nrf2 fica ancorado no citoplasma por ligação à Keap1, que está anexado ao citoesqueleto de actina. Indutores rompem o complexo Keap1-Nrf2 e, então, Nrf2 migra para o núcleo onde forma heterodímeros com outros fatores de transcrição que se ligam a regiões ARE de genes de fase 2 e aceleram sua transcrição (adaptado de DINKOVA-KOSTOVA et al., 2002).

Diversos agentes presentes na terapia anticancer foram obtidos a partir de prospecção de produtos naturais de origem vegetal, microbiana e organismos marinhos (ROCHA et al. 2001; NEWMAN & CRAGG, 2012). Outra maneira para a detecção de substâncias quimiopreventivas do câncer consiste em avaliar a inibição do fator de transcrição NF- κ B, responsável pela transcrição de genes responsáveis pela oncogênese e inibição da apoptose (BALDWIN, 2001; NAKANISHI & TOI, 2005).

1.3. O fator de transcrição NF- κ B e a oncogênese

A família de proteínas do fator de transcrição NF- κ B é responsável pela regulação de genes que codificam citocinas, receptores de citocinas, moléculas relacionadas com a

arteriogenese, apoptose e adesão celular que guiam o sistema imune e a resposta inflamatória (BARKETT et al., 1999; BALDWIN, 2001). O NF- κ B pode ser ativado por diversos estímulos, entre eles citocinas (TNF α , IL-1, IL-2, IL-6), lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), proteínas virais, estimulantes antigênicos para os receptores de células T e B, exposição à luz ultravioleta (UV), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio e outros agentes oxidantes (SHEHATA, 2005).

São conhecidos cinco membros da família NF- κ B, na forma de homodímeros ou heterodímeros: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) e NF- κ B2 (p52/p100); que estão relacionados por um domínio altamente conservado chamado de domínio homólogo Rel (RH) (Figura 3). Essa região de NF- κ B possui aproximadamente 300 aminoácidos e contém a sequência essencial para ligação ao DNA, dimerização, transporte nuclear e interação com outros alvos (BRASIER, 2006).

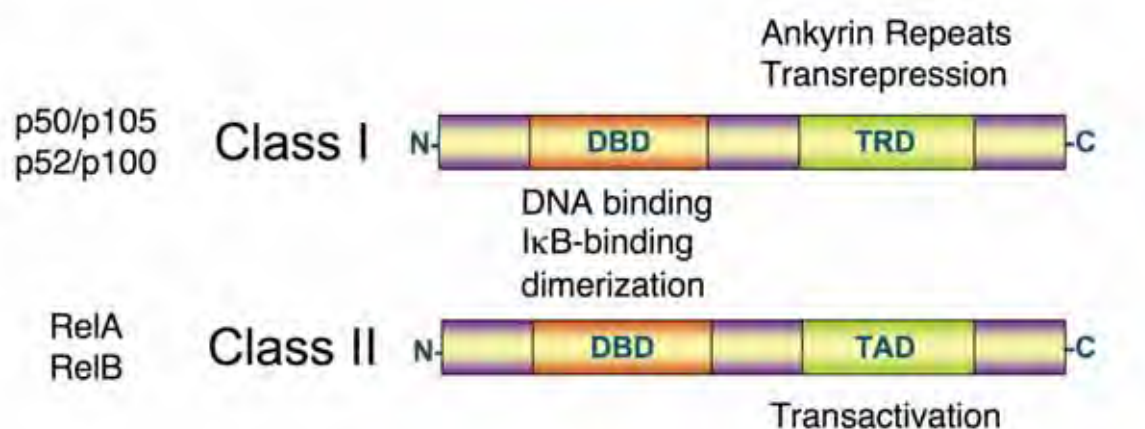


Figura 3: Estruturas dos fatores de transcrição da família NF- κ B. Estrutura geral de duas classes dos fatores de transcrição Rel. Todos possuem um domínio conservado de dimerização/ligação ao DNA chamado de domínio homólogo Rel, que também tem sequências para localização nuclear e ligação ao inibidor I κ B. Proteínas de Classe I tem na porção C-terminal domínios inibitórios da transcrição (transrepressão) contendo repetições de ankyrina. A porção C-terminal de proteínas Rel de Classe II, por outro lado, possuem domínios de ativação transcricional (transativação) (GILMORE, 2006).

Em células normais, o NF- κ B é encontrado principalmente no citoplasma e sua atividade é regulada por moléculas inibitórias conhecidas como I κ B, que se ligam ao domínio Rel e impedem a translocação do fator de transcrição para o núcleo (GHOSH et al., 1998). Quando a célula recebe o estímulo adequado, como por exemplo, o contato de TNF α com seu receptor, o complexo de grande peso molecular I κ B-quinase (IKK) é formado e então, I κ B é fosforilado em dois resíduos de serina localizados na região N-terminal. Ao ser fosforilado pelo complexo I κ B-quinase, I κ B é rapidamente ubiquitinizado e consequentemente degradado pelo complexo proteassoma 26S (ZANDI et al., 1999). Assim, NF- κ B é liberado e translocado para o núcleo, onde será ativado pela proteína quinase A (PKA). Essa ativação acontece com a fosforilação do resíduo de serina 276 na subunidade p65 do NF- κ B (RelA) (ZHONG et al., 1998). Após ativação e o acúmulo no núcleo, NF- κ B liga-se a sítios de 10 pares de bases no DNA (sítios κ B) e ocorre a transcrição de genes alvo (Figura 4).

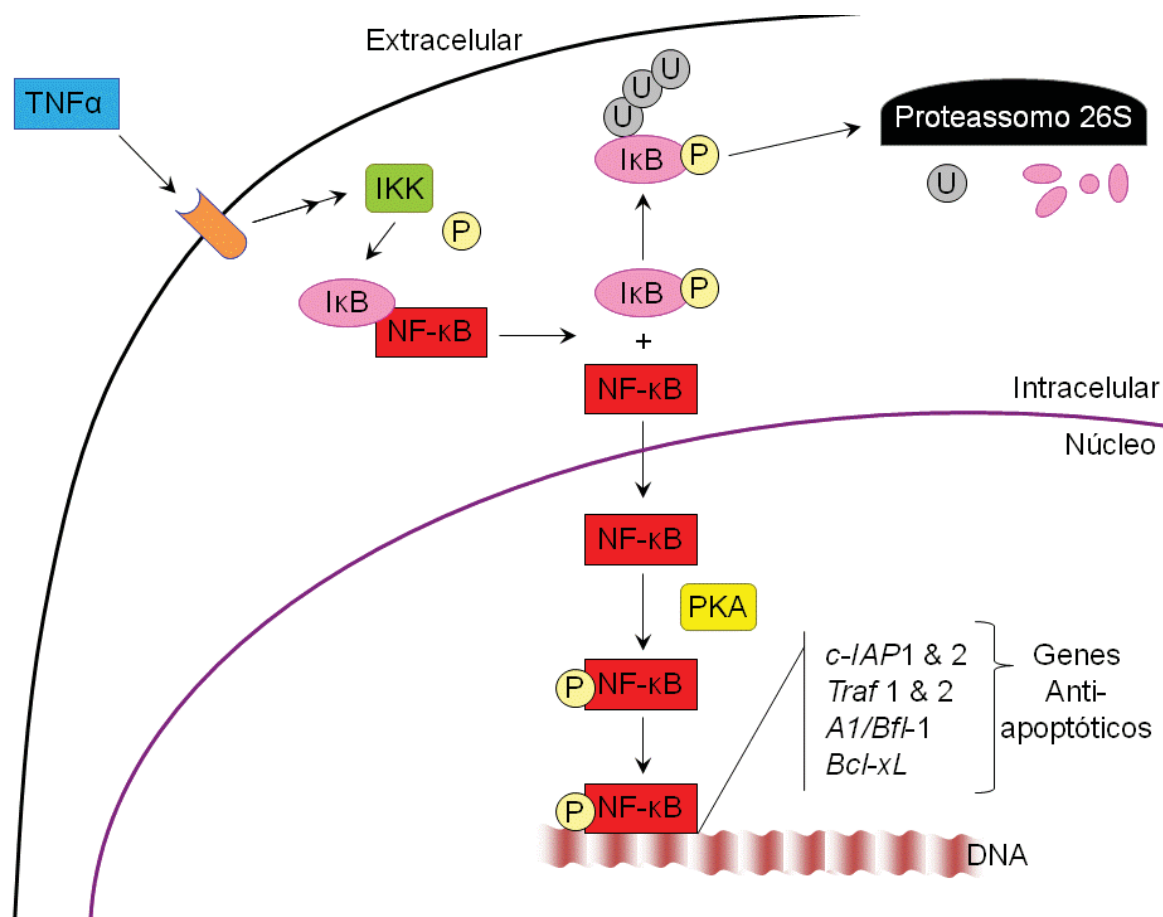


Figura 4: Ativação do NF- κ B pelo TNF- α . Após receber estímulo, ocorre a formação do complexo IKK, que fosforila I κ B, liberando o fator de transcrição. I κ B é posteriormente ubiquitinizada e degradada pelo complexo proteassoma 26S. NF- κ B é transportado para o núcleo, onde é fosforilado pela enzima proteína quinase A. Após ativação, ocorre a transcrição dos genes alvo.

Dessa forma, NF- κ B é responsável pela transcrição de diversos genes anti-apoptóticos e pró-proliferativos, tais como c-IAP1 e 2, Traf1 e 2, A1/Bfl-1 e Bcl-xL (BALDWIN, 2001). NF- κ B também assume papel no controle da expressão de genes de proteínas pró-inflamatórias como ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (KIM et al., 2006). COX-2 promove a quebra do ácido araquidônico para produzir uma série de prostaglandinas, que são mediadores fundamentais na resposta inflamatória. Dessa maneira, elevados níveis de COX-2 causam aumento da proliferação celular e supressão da apoptose, contribuindo para a progressão do tumor em diversos modelos (KUNDU & SURH, 2008).

Porém, diferentes complexos NF- κ B podem ser induzidos em diferentes tipos de células e através de sinais distintos, que podem interagir de maneira também distinta com outros fatores de transcrição e proteínas regulatórias, podendo regular a expressão de diferentes grupos de genes (BARKETT et al., 1999; SHEHATA, 2005).

A atividade de NF- κ B se encontra desregulada em diversos tipos de câncer. NF- κ B pode estar ativado na transformação maligna de células mamárias e em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (SHEHATA, 2005).

A ativação de NF- κ B está associada com a resistência do tumor à quimioterapia por suprimir o potencial pró-apoptótico dos medicamentos (SHEHATA, 2005). Células tumorais quimioresistentes, transfectadas com I κ B α super-repressora, tornam-se mais sensíveis para entrar em apoptose quando tratadas com agente quimioterápico em comparação a células não-transfectadas (WANG et al., 1999). Isso demonstra que a inibição da ativação de NF- κ B resulta no aumento da susceptibilidade de células tumorais ao efeito pró-apoptótico de agentes anticâncer. Aparentemente, o bloqueio da ativação de NF- κ B pode alterar o equilíbrio de sobrevivência / morte celular em favor da apoptose (NAKANISHI & TOI, 2005).

Produtos naturais como resveratrol, miricetina e quercetina apresentam atividade anti-inflamatória, proteção contra doenças cardiovasculares e ação quimiopreventiva do câncer através da inibição da atividade do NF- κ B (KONDRATYUK et al., 2011; YANG et al., 2011). Portanto, podem contribuir para a apoptose em células transformadas (YAMAMOTO & GAYNOR, 2001). Diversos inibidores de NF- κ B, como inibidores de proteassoma, a isoflavona da soja (genisteína), o flavopiridol e a gliotoxina aprimoram o efeito citotóxico de agentes anticâncer (TAKADA & AGGARWAL, 2004). Também foi demonstrado que fármacos anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais (AINEs), bem como inibidores da cicloxigenase 2, bloqueiam a ativação do NF- κ B em outros pontos dessa via (KARIN et al., 2004). Diversos inibidores da via sinalização de NF- κ B possuem potencial para entrar em

desenvolvimento clínico, uma vez que essas substâncias são capazes de bloquear o crescimento tumoral por diversos mecanismos, como a inibição de IKK e prevenção da ativação de NF- κ B (TIEDEMANN et al., 2009; MILLER et al., 2010)

1.4. O papel da inflamação no câncer

Sabe-se que existe uma ligação entre a resposta inflamatória e o aparecimento de câncer. Diversos produtos de genes pró-inflamatórios foram identificados por desempenharem um papel crucial no bloqueio da apoptose, proliferação, angiogenese, invasão e metástase (AGGARWAL et al., 2006). Nesse sentido, as enzimas COX-2 e iNOS se encontram envolvidas na carcinogênese. A superexpressão de COX-2 é encontrada em diversos tipos de câncer, inclusive em lesões pré-malignas (YANG et al., 1998; ZHA et al., 2004; HARRIS, 2009). Além disso, substâncias com atividade anti-inflamatória possuem um potencial na prevenção e tratamento do câncer. Está demonstrado que o uso regular de AINEs reduz significativamente o risco de aparecimento de câncer de próstata, mama, cólon e pulmão (SCHOTTENFELD et al., 2006; HARRIS, 2009). As prostaglandinas, produtos de COX-2, atuam em seus respectivos receptores complementando a sobrevivência celular e estimulando a angiogênese (FOSSLIEN, 2001).

Ainda nesse sentido, a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é expressa em câncer de diversas origens (SINGH & GUPTA, 2011). Sua indução pode ocorrer em condições de hipóxia pela ativação do elemento de resposta HIF (HRE), localizado na região promotora para iNOS (TENDLER et al., 2001). Seu produto, o óxido nítrico (NO), tem sido associado ao grau do tumor, taxa de proliferação e expressão de elementos associados ao desenvolvimento do câncer (XU et al, 2002).

A expressão de iNOS também é regulada por citocinas como INF γ , IL-1, TNF α e LPS (HIBBS, 1991). O LPS se liga ao receptor TLR4. Isso induz a dimerização de TLR4 que em consequência recruta proteínas adaptadoras MyD88 e Mal ao complexo do receptor. Essa

sinalização leva à ativação inicial das vias MAP quinase e NF- κ B com consequente produção de TNF α , COX-2 e IL-18. Uma ativação tardia, e independente de MyD88, leva à ativação de IRF3 e à produção de INF β (PÅLSSON-McDERMOTT & O'NEILL, 2004).

A produção de NO ocorre pela oxidação de L-arginina em L-citrulina catalisada por iNOS (Figura 5) (STUEHR, 1999). Este por ser um gás, se difunde rapidamente pelos tecidos e reage com componentes celulares, outros radicais livres e oxigênio molecular formando nitrito, nitrato e peroxinitrito. Os efeitos de NO no organismo são mediados por seus metabólitos. NO pode causar danos ao DNA pela formação de peroxinitrito (NO $_3^-$) e trióxido de dinitrogênio (N $_2$ O $_3$). O peroxinitrito oxida o DNA e promove quebras de fita-simples reagindo com as ligações fosfodiéster. O N $_2$ O $_3$ forma N-nitrosaminas, que então, alquilam o DNA com subsequente desaminação e cruzamento das fitas de DNA (XU et al., 2002). De mesmo modo NO estimula a produção do VEGF no microambiente do tumor, de maneira concentração-dependente, e ativa COX-2, que com a produção de prostaglandinas inibe a apoptose e promove a angiogênese (CAHLIN et al., 2000; ICHINOE et al., 2004; SINGH & GUPTA, 2011).

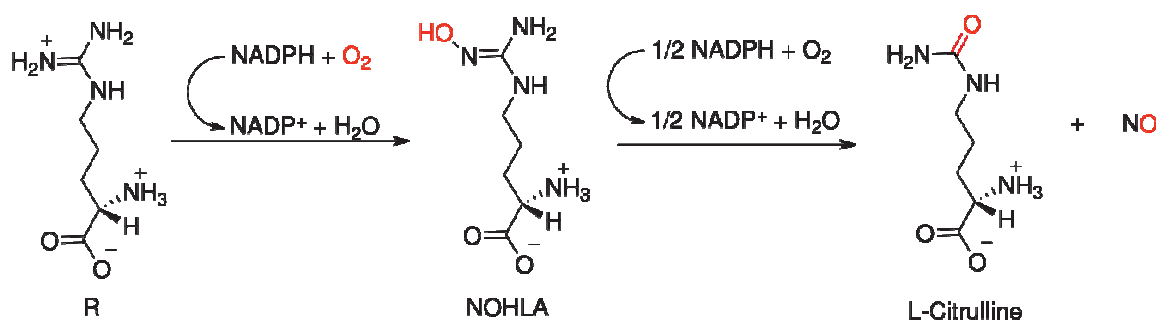


Figura 5: Biossíntese de NO a partir de L-arginina na presença de iNOS. iNOS produz NO catalisando a reação de 5 elétrons de um nitrogênio guanidínico da L-arginina (R). A oxidação da L-arginina em L-citrulina ocorre via duas reações sucessivas de monooxigenação produzindo N o -hidroxi-L-arginina (NOHLA) como intermediário. Dois mols de oxigênio (O $_2$) e 1,5 mol de NADPH são consumidos por mol de NO formado (Adaptado de STUEHR, 1999).

1.5. Inibição da aromatase

A terapia que visa reduzir os níveis de hormônios estrogênicos ou limitar sua ação é uma boa estratégia para a quimioprevenção do câncer de mama (MASTRO et al., 2007). A aromatase (CYP19; E.C. 1.14.14.1) é uma enzima do complexo citocromo P450 que cataliza a última etapa da biossíntese de estrogênios. Essa enzima é responsável pela conversão de hormônios andrógenos em estrógenos (Figura 6) (NJAR & BRODIE, 1999; PEZZUTO et al., 2005). Portanto, inibidores da aromatase possuem um importante papel na prevenção do câncer de mama.

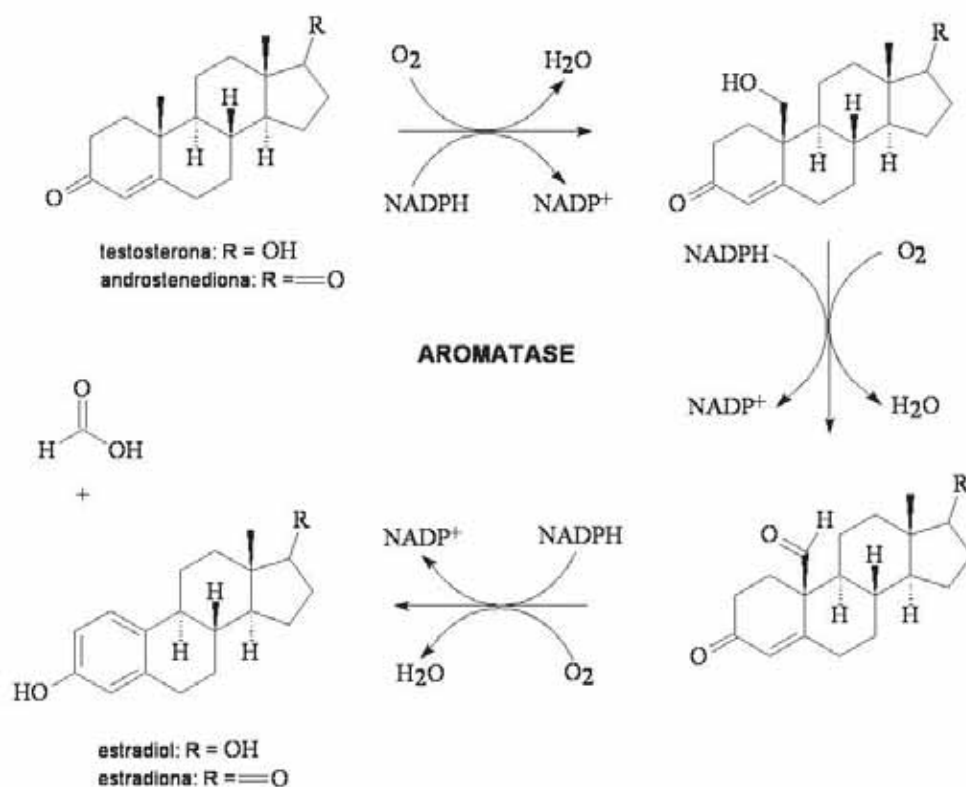


Figura 6: Biossíntese de estradiol e estradiona a partir de testosterona e androstenediona, respectivamente, pela enzima aromatase (CYP19). Três moles de oxigênio molecular são consumidos e três moles de NADPH são necessários para converter um mol do C₁₉ andrógeno em C₁₈ estrógeno, resultando na eliminação do ácido fórmico e aromatização do anel A (adaptado de PEZZUTO et al., 2005).

Produtos naturais e drogas sintéticas que são inibidores da aromatase podem ser classificados de acordo com sua estrutura, como esteroidais ou não-esteroidais. Algumas substâncias não esteroidais possuem um átomo de nitrogênio que é capaz de promover uma reação de coordenação com o ferro heme do citocromo P450 (SÉRALINI & MOSLEMI, 2001). Entretanto, outras substâncias não esteroidais, como flavonóides e demais fitoestrógenos, também apresentam uma potente inibição da enzima CYP19. Tais substâncias são capazes de inibir a atividade da aromatase devido à estrutura planar com elétrons π disponíveis que coordenam com grupamento heme do citocromo P450 (JEONG et al., 1999; POUGET et al., 2002; LINARES et al., 2004; MORIARTY et al., 2006; MAITI et al., 2007).

1.6. Morte celular – apoptose e necrose

A apoptose é uma forma de morte celular rigorosamente controlada, de maneira que complementa o ciclo e crescimento celular. É desencadeada por excesso ou falta de estímulos de crescimento celular, proliferação e até mesmo dano celular. Portanto, a apoptose é de fundamental importância para o controle do crescimento de órgãos e tecidos e na manutenção da vida (BRAS et al., 2005). A perda no controle dos mecanismos de apoptose é uma das características de células tumorais e quimioresistência (HANAHAN et al., 2011).

Existem diversas classificações para o processo de morte celular programada. A maioria delas envolve observação da célula quanto ao fenótipo nuclear, organização do citoesqueleto e alteração de organelas. Em nível molecular, a liberação de citocromo c pela mitocôndria, que forma complexos com fatores de ativação de apoptose e procaspase 9, forma o apoptossomo, responsável pelo início da morte celular controlada (BRAS et al., 2005).

A célula em apoptose caracteriza-se por uma diminuição no tamanho, fragmentação do DNA e condensação da cromatina, levando ao aparecimento de núcleo picnótico, formação de vacúolos autofágicos, dilatação de organelas citoplasmáticas como mitocôndria e complexo de Golgi. Isso demonstra que a mitocôndria está ligada em coordenar os sinais de morte

celular. Por fim, ocorre uma desintegração controlada da membrana formando os corpos apoptóticos (BRAS et al., 2005).

Outro evento intracelular característico da apoptose é a ativação de enzimas conhecidas como caspases. Dentro desse contexto, a mitocôndria desempenha um papel fundamental na apoptose (GREEN et al., 2004). A ativação das enzimas efetoras, as caspases 3 e 7, são responsáveis pela liberação de fatores indutores de apoptose pela mitocôndria. Além disso, amplificam o sinal de morte inicial, contribuindo para uma maior liberação de citocromo c e como consequência, a perda do potencial de membrana da mitocôndria é uma das características da apoptose. (LAKHANI et al., 2006) (Figura 7).

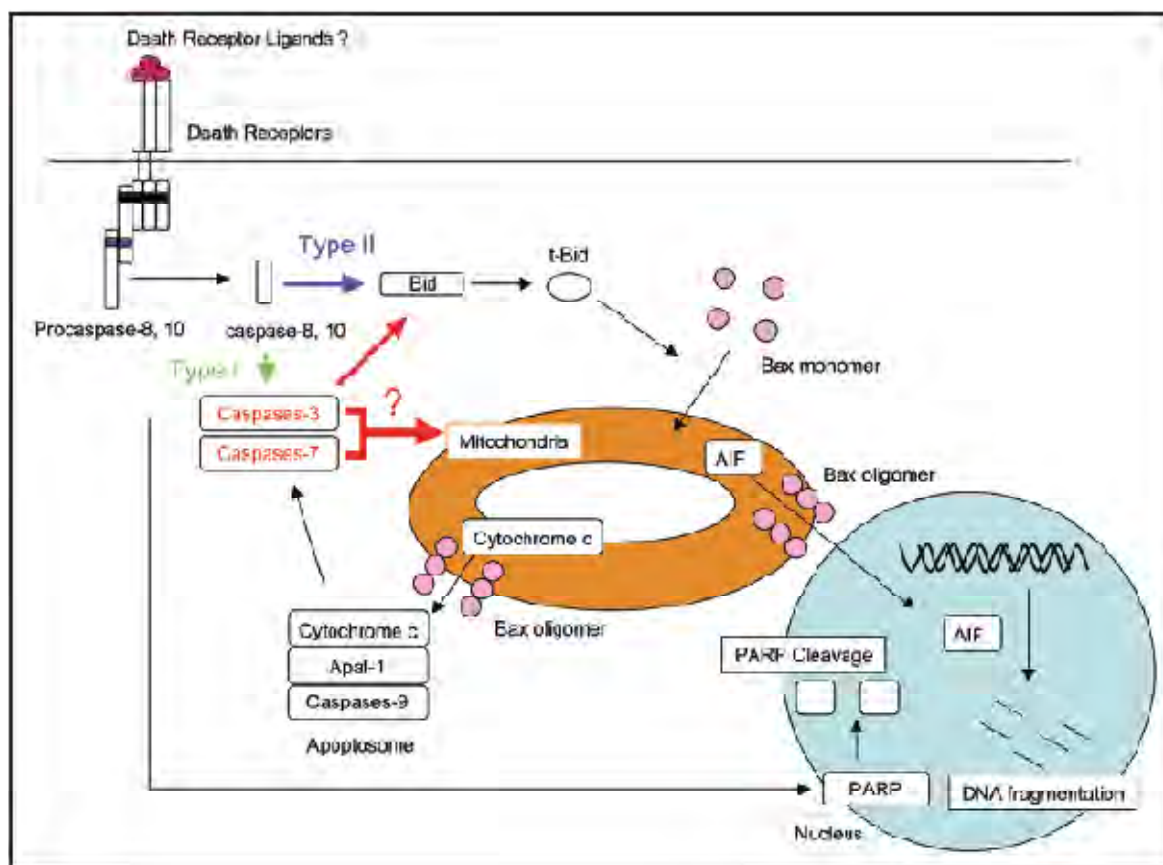


Figura 7: Representação esquemática da via de morte celular por caspase 3 e 7 (KURIBAYASHI et al., 2006).

Por outro lado, o processo causado por um estímulo intenso que resulta na perda de controle por parte da célula, na rápida interrupção dos processos de manutenção da

integridade celular, no rompimento da membrana plasmática, na destruição do citoplasma e, como consequência, na morte celular, é chamado de necrose (BRAS et al., 2005).

Corantes fluorescentes como a bisbenzidina Hoechst 33342 (HO) que possuem a característica de emitir fluorescência quando se ligam ao DNA, são usados para determinar a concentração de DNA e corar núcleos. O HO é permeável nas membranas celulares e se une a ligações adenina-timina, sendo utilizado na avaliação de ciclo celular, apoptose e quantificação de células viáveis. Este corante é usado após tratamento de células com substâncias indutoras de apoptose (KIECHLE et al., 2003). Ele é rapidamente absorvido pelas células durante as fases iniciais da apoptose, enquanto que a membrana citoplasmática íntegra permanece impermeável a outros corantes, como iodeto de propídio (IP). Fases tardias da apoptose apresentam corpos apoptóticos e são acompanhadas pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, o que permite a entrada de IP nas células. Desta forma, a combinação do HO e IP é utilizada para a diferenciação dos estágios de apoptose precoce, apoptose tardia e necrose, quando observados em microscopia de fluorescência.

Também, adiciona-se o corante diacetato de fluoresceína (DAF) que marca células com membrana celular intacta, marcando o citoplasma. Assim sendo, um ensaio de três espectros coloridos diferentes. As células são avaliadas de acordo com a coloração e morfologia. Células viáveis apresentam citoplasma verde e núcleo azul intacto; Células em apoptose precoce apresentam núcleo azul condensado e fragmentado; células em apoptose tardia apresentam núcleo vermelho condensado e fragmentado; e células em necrose apresentam núcleo intacto vermelho (HASHIMOTO et al., 2003).

1.7. Genotoxicidade

Danos causados ao DNA por mutagênicos ambientais podem ser nocivos para diversos organismos, incluindo seres humanos. O acúmulo de mutações está relacionado com o desenvolvimento da maioria dos tumores malignos e doenças degenerativas, o mesmo ocorre

com a idade e com algumas anomalias genéticas (CUZZOCREA et al., 2001; MIGLIORE et al., 2002). A fim de prevenir o risco genotóxico, é pertinente tanto identificar os agentes mutagênicos e diminuir a exposição a eles, bem como aumentar a exposição a agentes antígenotóxicos (NOGUEIRA et al., 2006; JEONG et al., 2006). Desta maneira, ao avaliarmos substâncias isoladas ou sintéticas, cujo mecanismo de ação ainda é desconhecido, faz-se necessário avaliar o potencial genotóxico, buscando melhor caracterizar tais mecanismos.

O ensaio do cometa pertence à classe de testes indicadores, pois é capaz de detectar danos de DNA que podem futuramente originar mutações. Em relação a outros ensaios de genotoxicidade, as vantagens deste teste incluem: sua aplicabilidade a vários tecidos e/ou tipos celulares; a grande sensibilidade em detectar pequenos níveis de danos no DNA; utiliza um pequeno número de células por amostra; fácil execução; o curto tempo necessário para completar um experimento e obter resultados; e o seu relativo baixo custo (TICE et al., 2000).

Em sua forma mais simples, o ensaio do cometa se baseia na adição de células a uma lâmina recoberta por agarose. Então, ocorre lise das células e membranas nucleares por meio de uma solução, e o DNA exposto é submetido a uma eletroforese alcalina. Por fim, o DNA é observado por microscopia de fluorescência após a coloração das células (Figura 8). Resumidamente, o DNA migra porque contém quebras que podem sofrer arraste, e esses danos aumentam frente à exposição a agentes genotóxicos (MOLLER, 2005).

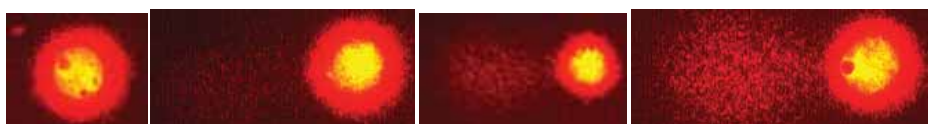


Figura 8: Imagens dos cometas em células HepG2 ampliadas 200x. DNA marcado com brometo de etídio. Quanto maior o dano genotóxico, maior será o arraste do DNA no gel e consequentemente, maior será a “cauda” do cometa.

Ainda, o ensaio cometa pode ser utilizado para avaliar danos genéticos *in vitro* em cultura de linfócitos ou em células de hepatocarcinoma humano metabolicamente ativas (HepG2) ou

adicionando frações microssomais as células não competentes para a metabolização (MERSCH-SUDERMANN et al., 2004). Pelo ensaio cometa pode-se avaliar o potencial genotóxico de produtos naturais ou sintéticos.

1.8. Bioprospecção

A prospecção de moléculas ativas baseada em bioensaios (bioprospecção) visa encontrar novos princípios ativos, e complementar estudos sobre a biodiversidade brasileira, com informações sobre o potencial medicinal de produtos naturais (RAMESHA et al., 2011). O Brasil apresenta a flora mais diversificada do mundo, tendo esta temática alcançada um ponto de destaque (SCARANO, 2007). Por um lado, a ciência aumenta em quantidade e em qualidade o conhecimento sobre a biodiversidade, e por outro, a destruição do habitat nos grandes biomas brasileiros se mantém em taxas elevadas (SUFFREDINI et al., 2006; SCARANO, 2007). O programa BIOTA-FAPESP vem contribuindo com dados para a formulação de políticas públicas de proteção ao meio ambiente e identificação de moléculas ativas de interesse econômico através do programa *BIoprospecTA* (JOLY et al., 2010).

Entre os biomas brasileiros, a Mata Atlântica que possui exuberante vegetação localizada em uma paisagem fragmentada, representando apenas 4% da área original (MYERS et al., 2000), sendo cerca de 10 % desta vegetação protegida em reservas ecológicas no estado de São Paulo (FRANÇA et al., 2005).

Outro bioma importante é o Cerrado Central Brasileiro. De vegetação predominantemente de savana, representa uma das maiores regiões biogeográficas do mundo com mais de 7000 espécies nativas de plantas vasculares (HIRUMA-LIMA et al., 2006). Comumente muitas dessas plantas são usadas como remédios naturais pelos moradores da região para tratar doenças (ALMEIDA et al., 1998; HIRUMA-LIMA et al., 2006).

Grandes cidades brasileiras estão localizadas em áreas que eram cobertas por estas florestas. Por estas razões, inúmeras espécies têm desaparecido desde a descoberta do Brasil,

e continuam a desaparecer sem terem sido relatadas. Com elas, importantes informações relacionadas à ecologia, farmacologia, botânica e outros campos, desapareceram (GAZZANEO et al., 2005).

Entre os medicamentos usados atualmente, cerca de 40% são de origem natural. Isso é ainda mais relevante em alguns grupos, como o caso de medicamentos anticâncer, em que 74,8% das drogas disponíveis são de origem natural ou derivados diretos de produtos naturais (SAMUELSON et al., 2009; NEWMAN & CRAGG, 2012). A pesquisa de produtos naturais contribui para o crescimento do tratamento de doenças e é de grande importância econômica. Estima-se que o mercado mundial de fármacos de origem vegetal é de US\$ 12,4 bilhões e, no Brasil, 25% do faturamento da indústria farmacêutica seja derivado de medicamentos de origem vegetal (GARCIA, 1996). A diversidade da flora brasileira apresenta uma importante fonte de princípios ativos. Os gastos do Brasil com a importação de matéria prima de medicamentos pode chegar a três bilhões de dólares por ano. Essa dependência externa pode ser superada com a pesquisa e busca de princípios ativos naturais na flora brasileira (VARANDA, 2006). Dentro desse contexto, duas plantas do cerrado ganham destaque na busca de princípios ativos naturais por serem de interesse ambiental e econômico (BOLZANI et al., 1999; URREA-BULLA et al., 2004).

1.9. Plantas do cerrado de interesse em bioprospecção

1.9.1. Pterogyne nitens

Entre as espécies que correm risco de extinção a *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae) que vem apresentando uma redução do número de indivíduos em ocorrência natural no Estado de São Paulo (NASCIMENTO et al., 2006), sendo portanto, necessária a sua conservação genética (SIQUEIRA et al., 1992; NASCIMENTO et al., 2006).

P. nitens é popularmente conhecida como “amendoim-do-campo”, “amendoim-bravo”, “bálsamo”, “yvi-raró”, “cocal”, “tipa”, etc. Essa espécie arbórea pode alcançar a altura de 5 a

12 m e ocorre desde o Ceará até o Paraná, bem como em outros países latino-americanos tais como Argentina, Bolívia e Paraguai (LORENZI, 2000a).

A madeira do “amendoim-bravo” é densa e de resistência física, sendo empregada na construção civil (CARVALHO, 1994; COLETTI et al., 2010). Além da utilização comercial, sua madeira também é recomendada para plantios mistos em áreas degradadas e de preservação permanente devido à rusticidade e rápido crescimento de suas árvores (BOLZANI et al., 1995; LORENZI, 2000a). Contudo, esta espécie possui valor ornamental muito grande, não somente pela beleza de suas flores, bem como de sua folhagem brilhante e frutificação, que apresenta tons variáveis à medida que amadurecem, sendo recomendada para arborização de vias urbanas e rodovias e, na reposição de mata ciliar em locais com inundações periódicas. Esta espécie habita os remanescentes do cerrado brasileiro e da mata atlântica e encontra-se sob o risco de extinção (NASSIF & PEREZ, 2000), fazendo parte da lista das espécies nativas recomendadas para o programa de recomposição de florestas em áreas de preservação permanente do Estado de São Paulo (LORENZI, 2000b; NASSIF & PEREZ, 2000; TONIN et al., 2005, REGASINI et al., 2009). Mesmo com sua importância econômica, são relatados poucos dados na literatura que permitam fornecer informações para sua conservação e uso sustentável (SALIS et al., 2006).

A literatura apresenta dados das aplicações medicinais e da constituição química de *P. nitens*. Estudos etnofarmacológicos em comunidades guaranis do nordeste da Argentina revelam o uso das cascas do caule no tratamento do “tacho”, nome popular de *Ascaris lumbricoides* (CRIVOS et al., 2007). Em trabalhos fitoquímicos anteriores, foram isolados cinco alcalóides guanidínicos das folhas e caules de *P. nitens* (Figura 9), os quais mostraram atividade citotóxica sobre linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* e células B1 auxiliaadoras de ovário de hamster chinês (CHO-Aux-B1), sugerindo uma potencial ação antitumoral dessas substâncias (BOLZANI et al., 1995). Frações obtidas do extrato etanólico

de *P. nitens* apresentaram atividade antioxidante (VELLOSA, 2005) e antifúngica. Estudos químicos realizados por Bolzani et al. (1995) relataram o isolamento de alcalóides guanidínicos, flavonas e flavonois de *P. nitens*, purificados da fração butanólica e seus efeitos são estudados desde então (REGASINI et al., 2008; FERNANDES et al., 2008; REGASINI et al., 2009).

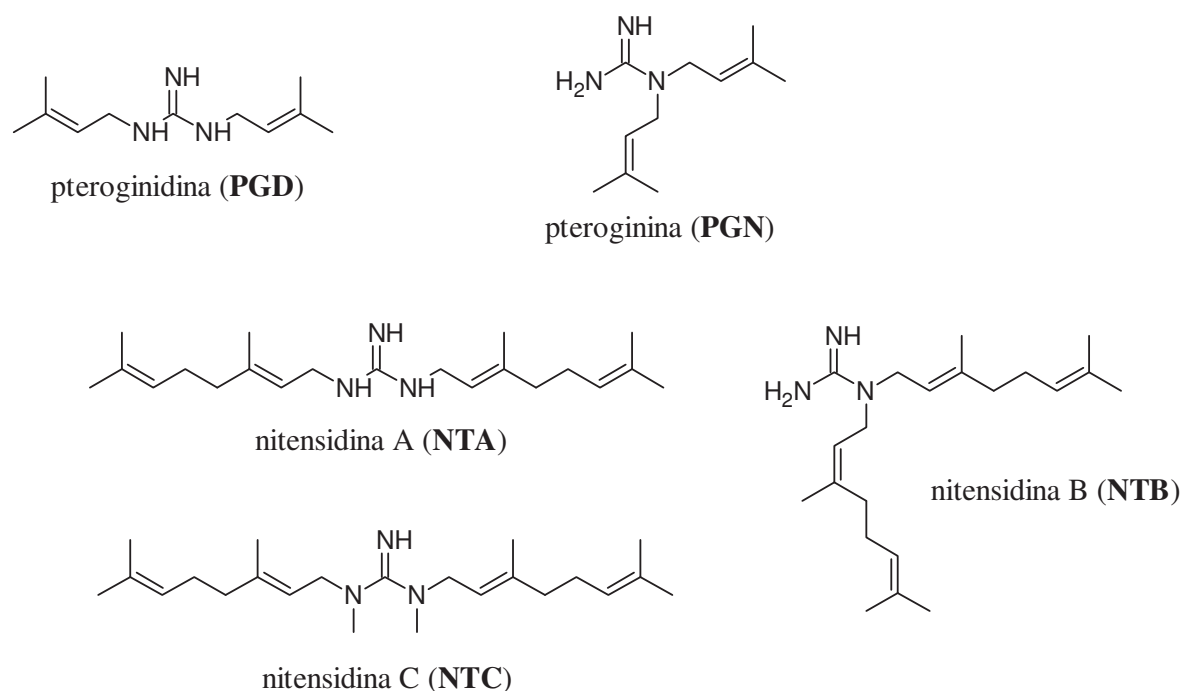


Figura 9: Estrutura química de alcaloides guanidínicos presentes nas folhas de *P. nitens*.

1.9.2. *Alchornea glandulosa*

Espécies do gênero *Alchornea* são usadas popularmente como agentes antidiarreico, anti-inflamatório, antirreumático e no tratamento de lepra e de doenças cutâneas (TONA et al., 1998). Estudo com extratos da casca do caule de *A. cordifolia* revelou atividade antibacteriana (AJALI, 2000). Outro estudo do extrato bruto das folhas de *A. latifolia* apresentou atividade citotóxica em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231), e carcinoma epidermoide (A-431), bem como atividade antimicrobiana (SETZER et al., 2000).

A espécie *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl. (Euphorbiaceae) é uma árvore de 10-20 metros com caules tortuosos, e é popularmente conhecida como “tapiá”, “tanheiro de folha redonda”, “tanheiro”, “canela-raposa” ou “amor seco”, sendo encontrada nas regiões sul e sudoeste do Brasil, principalmente na Mata Atlântica e florestas ciliares (LORENZI, 2000a). Estudo do extrato bruto de *A. glandulosa* apresentou atividade citotóxica em células tumorais humanas de pulmão (NCI460), melanoma (UACC62), e mama (MCF-7), bem como atividade antibacteriana e antifúngica (CONEGERO et al., 2003), razão pela qual foi selecionada para os ensaios no presente estudo. O estudo químico revelou a presença de substâncias fenólicas como, por exemplo, o ácido gálico, constituinte do extrato metanólico (CALVO et al., 2007).

O ácido gálico (**GA**) é um metabólito secundário presente em quase todos os vegetais, em sua forma livre ou de taninos hidrolizáveis. É conhecido por apresentar atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e propriedades citotóxicas em células de carcinoma cervical infectadas com HPV-18 (HeLa) e fibroblastos humanos (L-132) (FIUZA et al., 2004; KUBO et al., 2004; ARUOMA et al., 1993; KROES et al., 1992). A partir de **GA** como substrato, foram preparadas outras substâncias derivadas que foram avaliadas no presente trabalho (Figura 10).

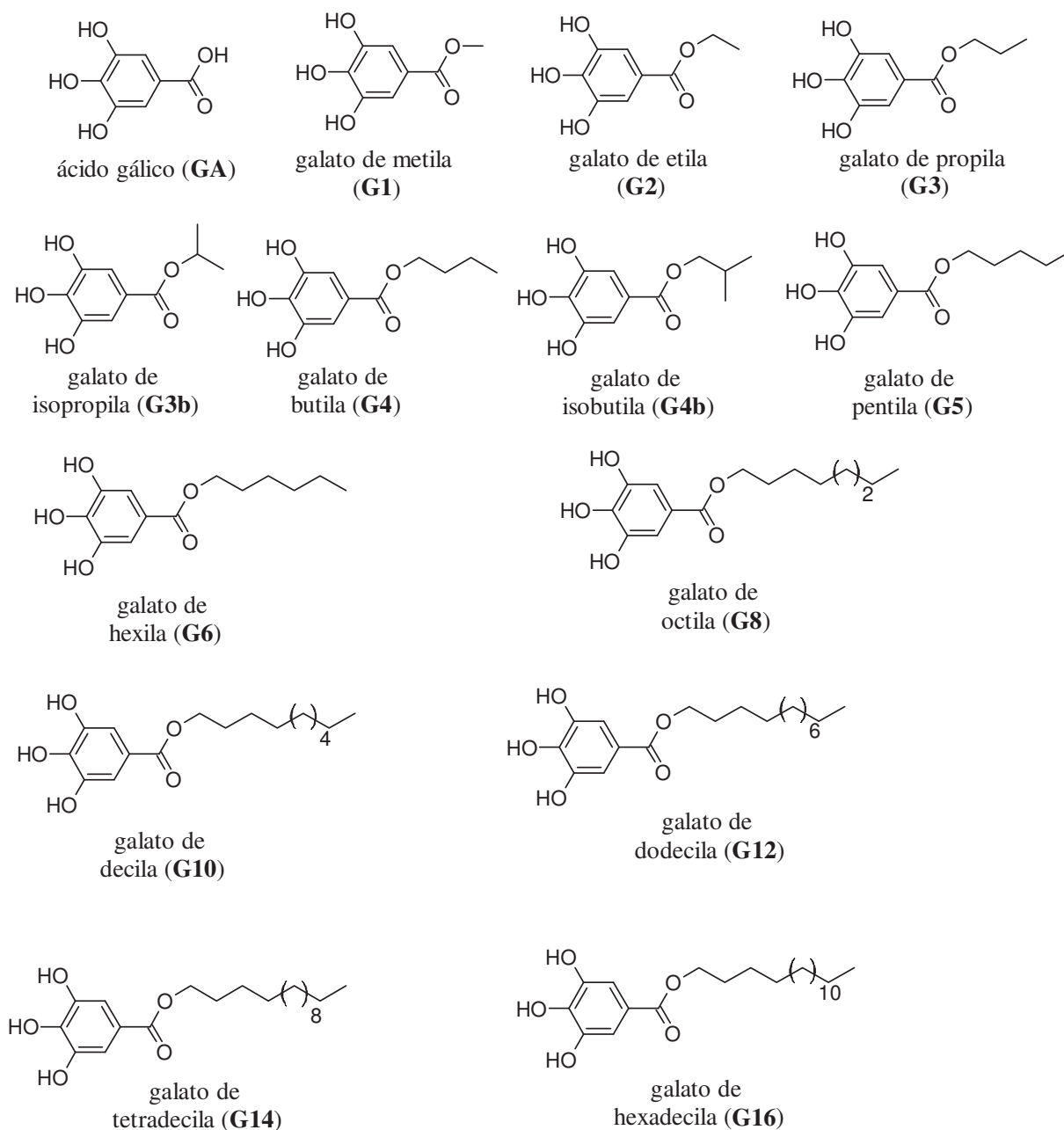


Figura 10: Estrutura química do ácido gálico (**GA**) e ésteres derivados sintéticos.

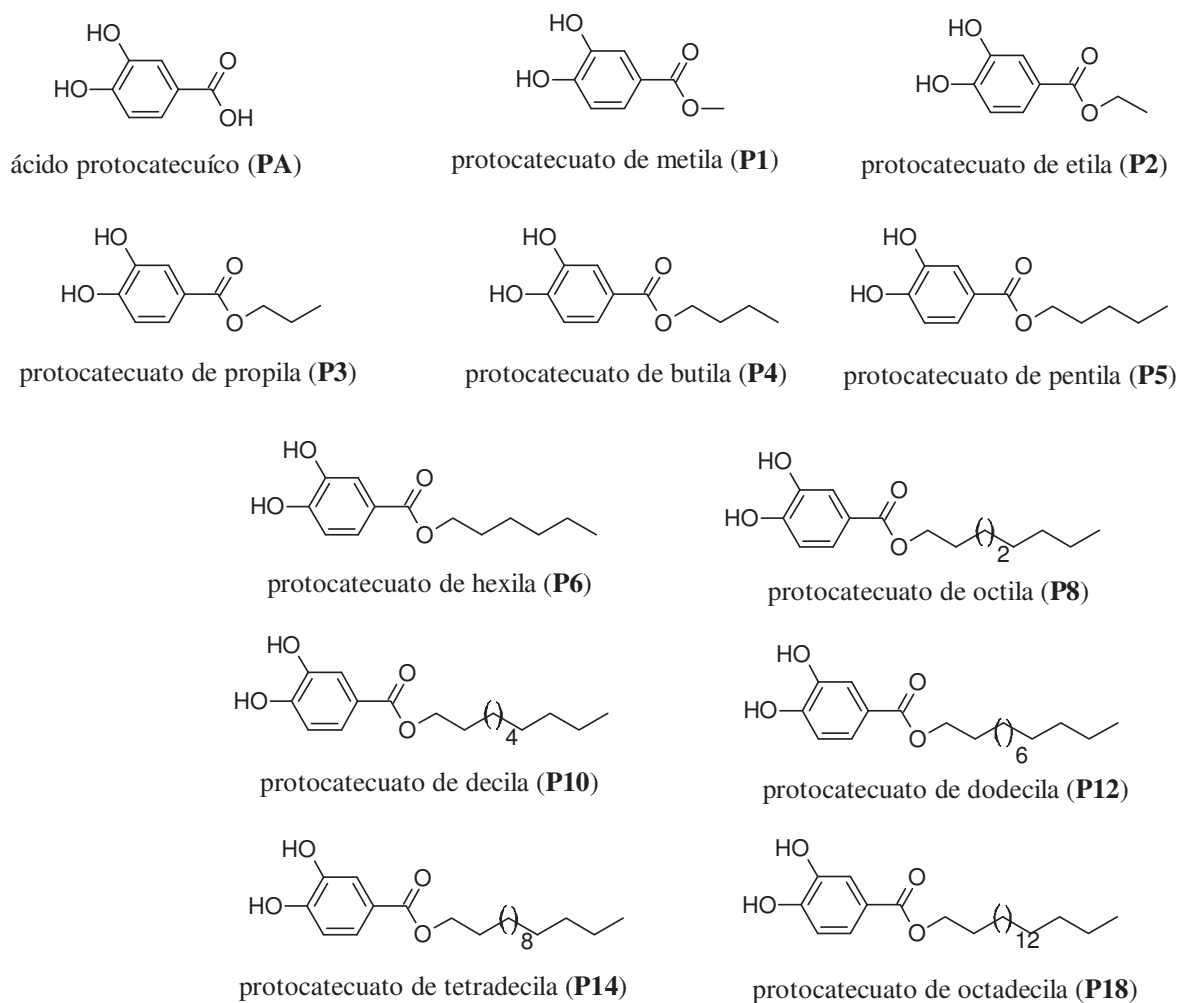


Figura 11: Estrutura química do ácido protocatecuico (**PA**) e ésteres derivados sintéticos.

2. OBJETIVO GERAL

Considerando as atividades de quimioprevenção do câncer e a biodiversidade como fonte de produtos naturais bioativos, o presente estudo teve como objetivo fazer uma bioprospecção de substâncias naturais e sintetizadas, avaliando em modelos celulares sua atividade citotóxica, além de definir um perfil genotóxico, indução de apoptose e potencial quimiopreventivo pelos ensaios de bioprospecção dessas substâncias.

2.1. Objetivos específicos

- I. Avaliar a citotoxicidade de substâncias isoladas e sintetizadas através de ensaio de MTT em linhagem HepG2 e ensaio de SRB em linhagem MCF-7 e MDA-MB-231 e determinar a concentração inibitória de 50% das células (CI_{50}).
- II. Avaliar a genotoxicidade do **GA** e **G1** das substâncias através do ensaio do cometa.

- III. Avaliar o efeito de indução de apoptose de alcalóides guanidínicos (**NTA** e **NTB**) e análogo nitensidina T (**NTT**) através do ensaio de coloração com Hoechst 33342 e iodeto de propídio.
- IV. Avaliar o efeito de quimioprevenção da coleção de substâncias, através do ensaio de inibição do fator de transcrição NF-κB, inibição da produção de nitrito, inibição de aromatase e indução de quinona-redutase.
- V. Avaliar o efeito inibitório de **2OICh** sobre a expressão de produtos do fator de transcrição NF-κB (iNOS e COX-2) em níveis de mRNA e proteína por RT-PCR e *western blot*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Substâncias avaliadas nos ensaios

As substâncias foram classificadas em seis grupos distintos com base em sua estrutura:

I. Alcaloides guanidínicos e análogo sintético: Os alcalóides guanidínicos nitensidina A (**NTA**) e nitensidina B (**NTB**) foram obtidos das folhas *P. nitens* por sucessivas técnicas cromatográficas, e tiveram sua estrutura molecular identificada por técnicas espectrométricas (REGASINI et al., 2009). A partir de **NTA** como protótipo, foi sintetizado o análogo nitensidina T (**NTT**) (Figura 12).

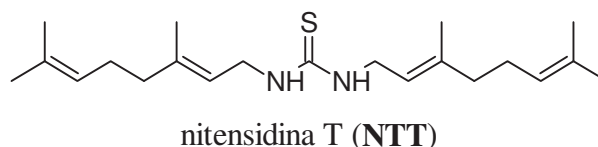


Figura 12: Estrutura química de nitensidina T (**NTT**), análogo sintético de nitensidina A.

II. Ácidos fenólicos e derivados: Os ácidos fenólicos, ácido gálico (**GA**) e ácido protocatecuico (**PA**), presentes nas folhas de *A. glandulosa*, foram usados como modelo para a síntese de 24 ésteres derivados (Figuras 10 e 11) (XIMENES et al., 2010).

III. Análogos do ácido fenâmico: Foram sintetizados 17 derivados do ácido fenâmico [ácido 2-(fenilamino)benzoico] com metoxilas nas posições 3, 4, 5, 3', 4' e 5' (Figura 13) para avaliação nos ensaios de quimioprevenção.

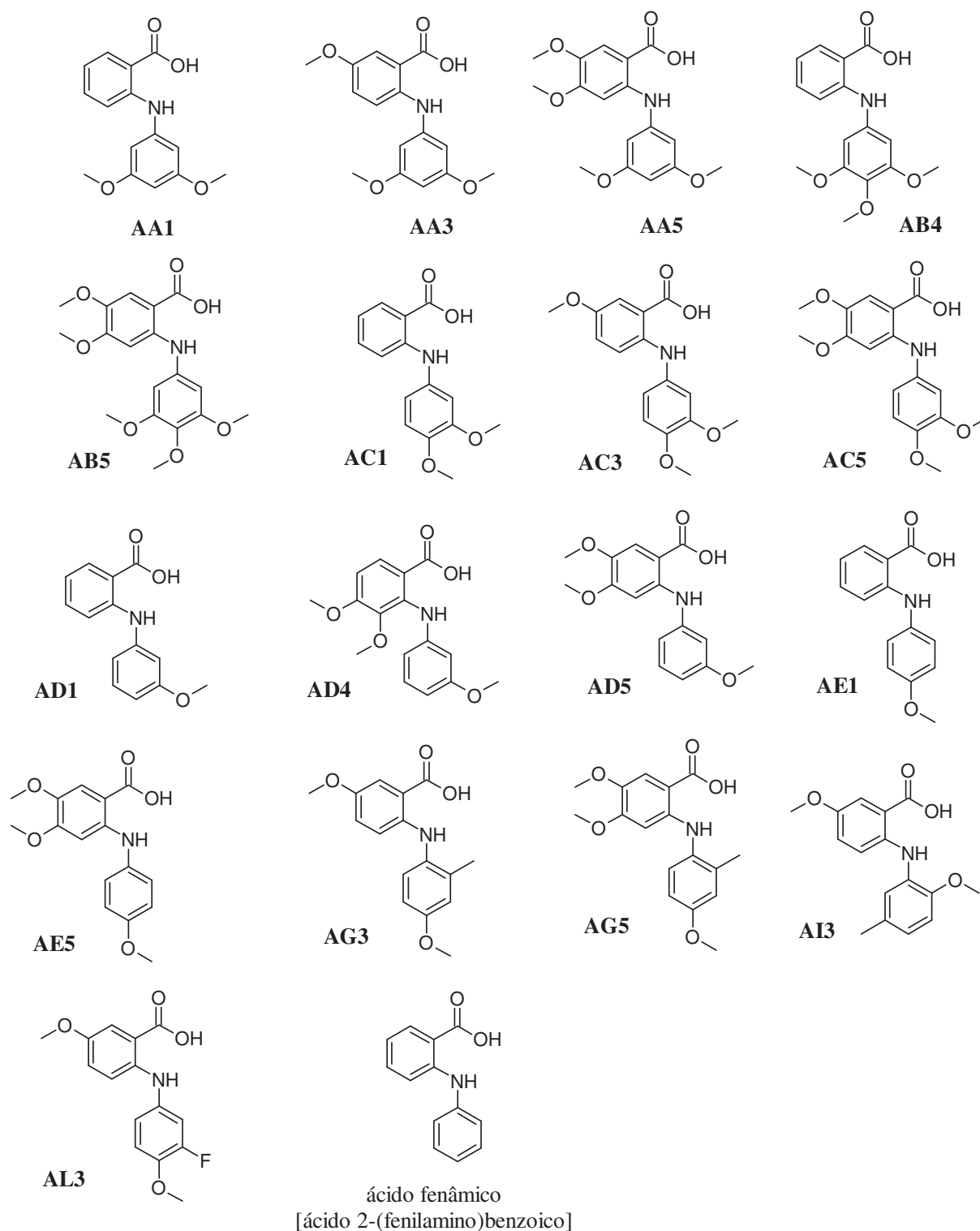


Figura 13: Estruturas químicas do ácido fenâmico e análogos sintéticos.

IV. Análogos da xantona: A xantona é conhecida por diversas atividades biológicas. A partir dela como protótipo, foram sintetizadas 5 substâncias análogas (Figura 14) para avaliação nos ensaios de quimioprevenção do câncer.

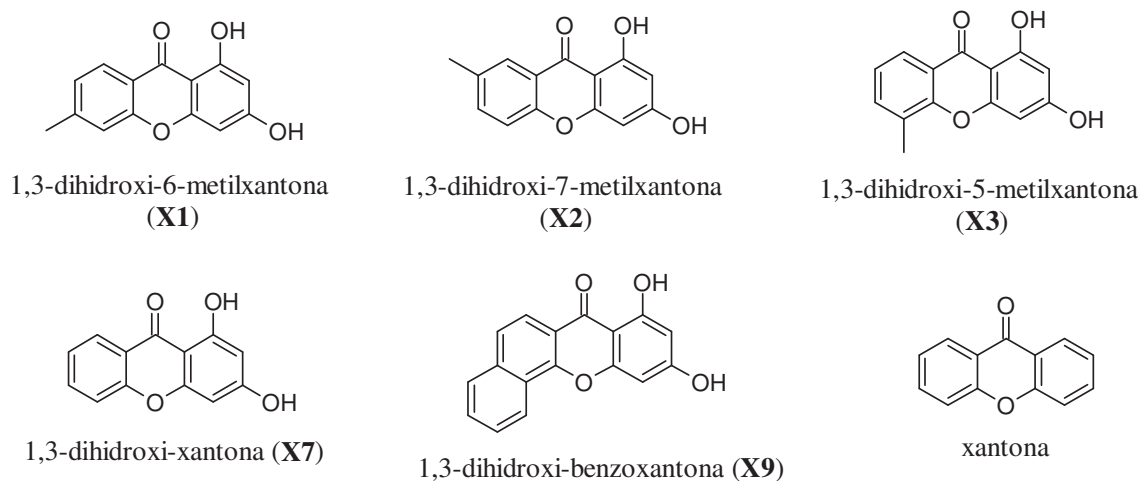


Figura 14: Estruturas químicas da xantona e análogos sintéticos.

V: Outros produtos naturais, flavonas e chalconas preniladas: Foram obtidos para os ensaios de quimioprevenção os produtos naturais: ácido oleanólico (**OLE**); piperina (**PIP**); pedalitina (**PED**); umbeliferona (**UMB**); morina (**MOR**); flavona (**Fla**) e chalcona (**Ch**), um precursor de flavonoides que não apresenta anel C em sua estrutura. A partir da flavona e chalcona como protótipos, foram sintetizados análogos prenilados (Figura 15).

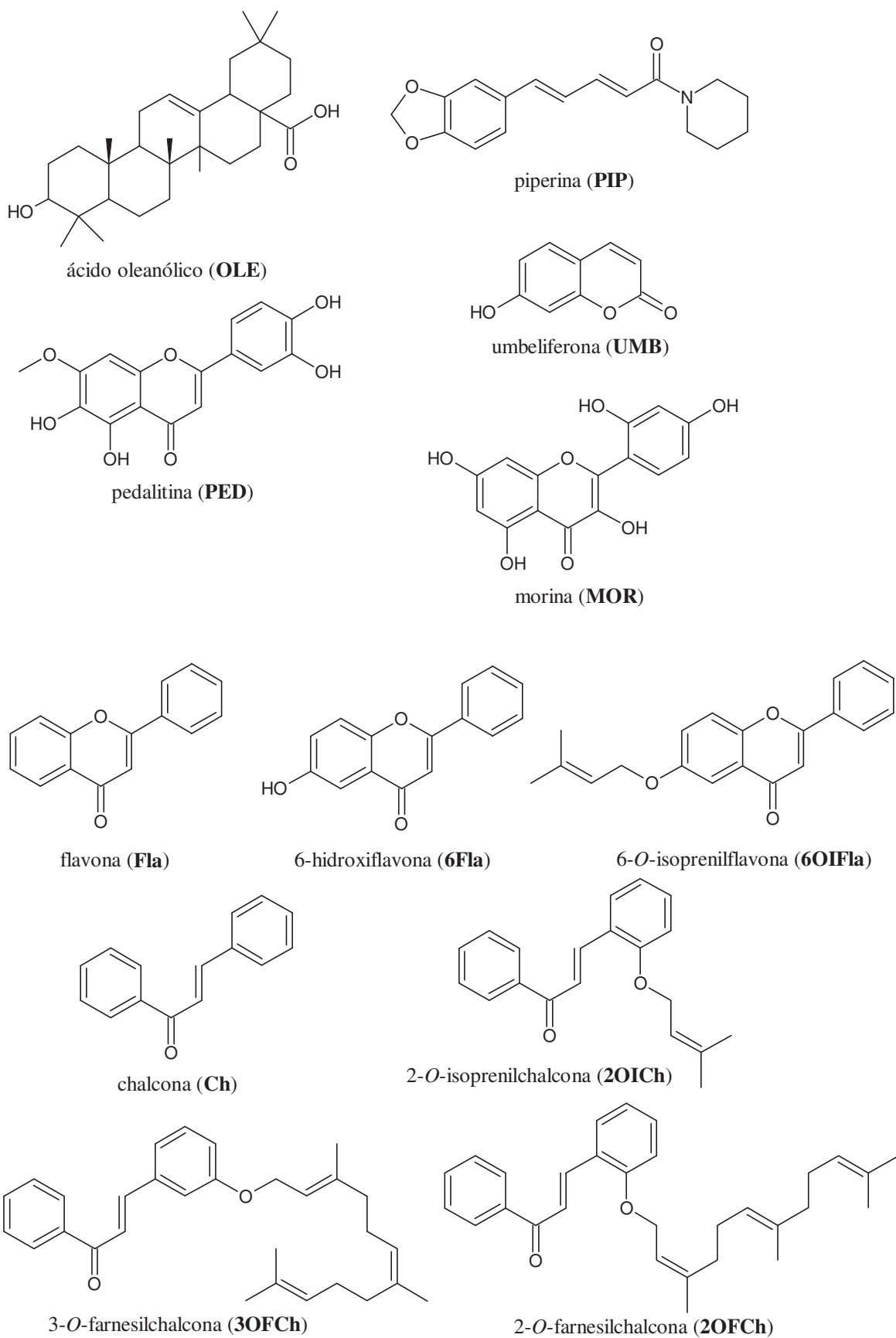


Figura 15: Estruturas químicas de outros produtos naturais, flavonas e chalconas preniladas.

O processo de obtenção dessas substâncias foi realizado nas dependências do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) sob supervisão do Dr. Luis Octávio Regasini.

VI. Carvonas e análogos: A (+)-carvona (**C+**) e substâncias análogas (Figura 16) foram fornecidas pelo Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos do Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicológicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, com o intuito de verificar o efeito da quiralidade estrutural dessas substâncias nos ensaios de quimioprevenção do câncer.

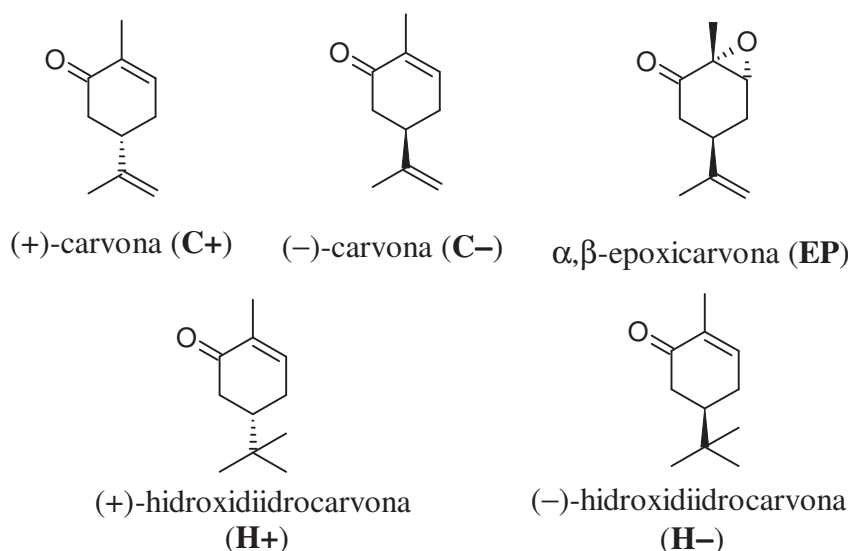


Figura 16: Estruturas químicas da (+)-carvona (**C+**) e análogos sintéticos.

Todas as substâncias ficaram armazenadas como solução estoque a 10 mM em congelador a -20 °C dissolvidas em DMSO 100% e avaliadas a 50 μ M e 120 μ M em meio de cultura (concentração máxima de DMSO 0,5%) de acordo com os ensaios. As substâncias que apresentaram atividade maior que 70% em relação ao controle (DMSO 0,5%) nos ensaios de inibição do NO, inibição de NF- κ B, inibição de CYP19 foram testadas em diversas concentrações (0,01 μ M – 50 μ M) para determinação da concentração inibitória 50% (CI₅₀) para a respectiva atividade com base na curva de concentração-resposta. Em paralelo a cada ensaio de bioprospecção foi realizado um ensaio de viabilidade celular. As substâncias que

apresentaram 50% ou mais de inibição do crescimento celular foram consideradas citotóxicas e, portanto não recomendadas para a quimioprevenção. Não foi verificado o grau de pureza e estabilidade das substâncias antes dos ensaios.

3.2. Cultura de células

As linhagens celulares foram cultivadas em ambiente esterilizado nos frascos de cultura de célula utilizando meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) (Cultilab, Campinas, SP) e solução de antibiótico/antimicótico (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 37° C em atmosfera com CO₂ 5%, sem a presença de hormônios ou conforme especificado. As células foram mantidas em condições de cultivo até se obter o número ideal para os ensaios e colhidas com solução tripsina 0,5% (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) em solução salina de Hank (HBSS) (v/v). Células HepG2 (ATCC n. HB-8065) foram gentilmente cedidas pela Dra. Dayse Maria Favero Salvadori do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina – UNESP, Campus Botucatu. Células de hepatocarcinoma murino Hepa 1c1c7, BP^rc1 e TAOc1 (ATCC n. CRL-2026; CRL-2217 e CRL-2218, respectivamente) foram gentilmente cedidas pelo Prof. John M. Pezzuto do *College of Pharmacy, University of Hawai'i at Hilo* e cultivadas em meio αMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). As linhagens de câncer mamário MCF-7 e MDA-MB-231 (ATCC n. HTB-22 e HTB-26, respectivamente); células renais embrionárias humanas (HEK293) transfectadas com plasmídeo contendo gene relator NF-κB/*Luc*, adquiradas da comercialmente (Panomics n. RC0014) (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA); e macrófagos de camundongos imortalizados com vírus de leucemia (RAW 264.7) (ATCC n. TIB-71) foram cultivadas no laboratório do Prof. Dr. John M. Pezzuto para os respectivos ensaios.

3.3. Citotoxicidade

3.3.1 Ensaio de MTT

Através do ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) pode-se determinar a atividade metabólica da mitocôndria e correlacionar com as células viáveis após tratamento com o agente quimioterápico. Trata-se de um ensaio colorimétrico baseado na capacidade das células viáveis reduzirem o sal de MTT, por ação da succinato desidrogenase mitocondrial, e formar cristais de azul de formazana (MOSMANN, 1983).

Foram incubadas por 24 h, 100 µL da suspensão de células HepG2 a 10^5 células/mL em placas de 96-poços. Após a incubação, as células foram tratadas por 24h com as substâncias nas condições descritas anteriormente. Doxorrubicina (**DOX**) (Libbs Farmacêutica, São Paulo, SP) foi usada como controle positivo (Figura 20) (CI_{50} em HepG2 = $5,0 \pm 0,3$ µM). Depois do tratamento, descartou-se o meio de cultura da placa e colocou 10 µL de MTT, a 5 mg/mL em PBS, em cada poço. Incubou-se a placa por mais 3 h nas mesmas condições de cultivo para ocorrer a redução do sal. Então, solubilizou-se o sal de formazana com 100 µL de isopropanol e fez-se a leitura em espectrofotômetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) no comprimento de onda 570 nm, descontando a absorbância a 655 nm. A estimativa de células vivas é obtida pela fórmula:

$$\% \text{ cels. vivas} = \frac{A_{570}(\text{Teste}) - A_{570}(\text{Branco})}{A_{570}(\text{Controle}) - A_{570}(\text{Branco})} \times 100$$

Onde $A_{570}(\text{Controle})$ é a média da absorbância dos poços com controle (DMSO 0,5%), $A_{570}(\text{Branco})$ é a média da absorbância dos poços com branco (sem células) e $A_{570}(\text{Teste})$ é a média da absorbância dos poços com a substância testada. Foram feitos três ensaios independentes, com duplicatas, e calculou-se a média $\pm$ erro padrão ($M \pm SE$).

3.3.2. Ensaio de SRB

O ensaio de sufórrodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) consiste em um método colorimétrico adequado para a avaliação da viabilidade celular baseado na marcação de células previamente fixadas em placas de 96-poços (SKEHAN et al., 1990; VOIGT, 2005).

Foram incubadas uma suspensão de células MCF-7 e MDA-MB-231, a 5×10^5 células/mL por 72 h em placas de 96-poços (200 µL/poço) contendo as substâncias a serem testadas. Doxorrubicina (**DOX**) foi usada como controle positivo (CI_{50} em MCF-7 = $0,5 \pm 0,07$ µM) (Figura 21). Após a incubação, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 10% (m/v) (TCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por 30 minutos a 4° C. Após a fixação, as placas foram lavadas quatro vezes com água para a remoção de TCA, proteínas do soro, etc. e secas em temperatura ambiente. Uma solução de 50 µL contendo SRB 0,4% em ácido acético 1% foi utilizada para corar as células. Após 30 min, o corante não ligado a proteínas foi removido lavando-se as placas quatro vezes com ácido acético 1% e secas em temperatura ambiente. O corante nas células foi solubilizado com 200 µL de solução Tris-base 10 mM, pH 10,5 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e após 5 min sob agitação a densidade óptica foi medida a 570 nm. A viabilidade celular foi obtida pela fórmula:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{A_{570}(\text{Teste})}{A_{570}(\text{Controle})} \times 100$$

Onde $A_{570}(\text{Controle})$ é a média da absorbância dos poços com controle (DMSO 0,5%) e $A_{570}(\text{Teste})$ é a média da absorbância dos poços com a substância testada. Foram feitos três ensaios independentes, com duplicatas, e calculou-se a média $\pm$ erro padrão ($M \pm SE$).

3.4. Ensaio do “cometa”

O teste do cometa foi realizado segundo protocolo estabelecido anteriormente com modificações (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000). Células HepG2 foram tratadas com ácido gálico (**GA**) e galato de metila (**G1**) em diversas concentrações em meio de cultura sem SFB por 24 h. Peróxido de hidrogênio 0,1 mM foi adotado como controle positivo ($TM = 82,0 \pm 3,6$) por formar espécies reativas de oxigênio indutoras de danos ao DNA (SAVI et al.,

2005). Após tratamento, as células foram colhidas com tripsina e suspensas em 200 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em PBS livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺(m/v). Foram adicionados 100 µL da suspensão de células em lâminas previamente cobertas com solução de agarose ponto de fusão normal 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em PBS livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺(m/v) e cobertas com lamínula. As lâminas foram armazenadas a 4 °C por 15 min e então transferidas para a solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, tampão Tris-HCl 10 mM, pH 10, Triton X-100 1% e DMSO 10%) onde foram mantidas por 12 h a 4 °C. Após a lise, as lâminas foram lavadas com PBS e submetidas à eletroforese alcalina (pH > 13) por 20 min (25 V, 280 mA). Então, as lâminas foram neutralizadas com Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5), fixadas com etanol absoluto e armazenadas a 4 °C para a análise. As lâminas foram coradas com brometo de etídio 20 µg/mL (Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) e observadas com filtro de 590 nm em microscópio de fluorescência Eclipse 50i (Nikon, Japão) com aumento de 400×. As imagens foram capturadas com câmera digital Nikon DS-Ri1-U2 (Nikon, Japão) e analisadas com *software* TriTek CometScoreTM v1.5 (TriTek Corporation, Sumerduck, VA, EUA). Os dados apresentados correspondem a média do *Tail Moment* (TM) de 50 nucleóides ± erro padrão (M ± SE) (SCOLASTICI et al., 2008).

$$Tail\ moment\ (TM) = \frac{\% \text{ DNA na cauda}}{\% \text{ DNA total}} \times \text{comprimento da cauda}$$

3.5. Ensaio de apoptose (Hoechst 33342 e iodeto de propídio)

A avaliação de células apoptóticas e necróticas pelo método de coloração com Hoechst 33342 e iodeto de propídio (exclusão por fluorocromos) foram feitas adicionando-se 10 µL de uma solução fluorescente (DAF 0,75 mg/mL, IP 0,25 mg/mL e HO 0,1 mg/mL em PBS) em suspensão de 100 µL de células que foram previamente tratadas com nitesidina A, nitensidina B e nitensidina T (NTA, NTB e NTT, respectivamente) a 15 µM por 24 h. Foi adotada **DOX** a 50 µM como controle positivo por ser uma substância amplamente utilizada na clínica, com

atividade citotóxica em células tumorais e indutora de apoptose (Apoptose = $18,9 \pm 10,1\%$ / Necrose = $7,0 \pm 3,5\%$ / Apoptose precoce = $17,3 \pm 11,0\%$ / Apoptose tardia = $1,6 \pm 1,2\%$) (CHANG et al., 2011). A reação foi incubada por 5 min a 37 °C e as células observadas imediatamente após o tratamento em microscopia de epifluorescência, em espectro de absorção de 360 nm e 538 nm.

Uma avaliação qualitativa e quantitativa foi feita, estabelecendo-se a porcentagem de células em apoptose (precoce e tardia), necrose e porcentagem de células normais, levando-se em consideração a morfologia e coloração das células. Foram analisadas 300 células por grupo. As células observadas foram classificadas de acordo com a cor e características morfológicas em: normais (núcleo azul esférico corado pelo HO, citoplasma verde, em espectro de absorção 360 nm), apoptose precoce (núcleo azul com corpos apoptóticos corado pelo HO, citoplasma verde, em espectro de absorção 360 nm), apoptose tardia (corpos apoptóticos corados em vermelho, em espectro de absorção 538 nm) e necrótica (núcleo vermelho esférico corado pelo IP em espectro de absorção 538 nm) (HASHIMOTO et al., 2003).

3.6. Ensaios de quimioprevenção do câncer

3.6.1. Indução da quinona-redutase (NQO1)

Produtos naturais podem induzir a quinona-redutase (NQO1). O ensaio de indução da (NQO1) constitui um método simples, para uma rápida detecção e avaliação de indução dessa enzima, que destoxifica carcinógenos (enzima de fase 2), baseando-se na medida direta da atividade da NQO1 em células de hepatoma murino (Hepa 1c1c7) cultivadas em placas com 96-poços (PROCHASKA et al., 1992). A quinona-redutase catalisa a redução da menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) a menadiol. Esta reação é mediada por NADPH como doador de elétrons. O MTT é então reduzido não enzimaticamente pelo menadiol, resultando na formação de sal precipitado com cor azul (azul de formazana) que pode ser quantificado em

leitor de absorvância de microplacas (Figura 17) (PROCHASKA et al.,1988; FAHEY et al., 2004).

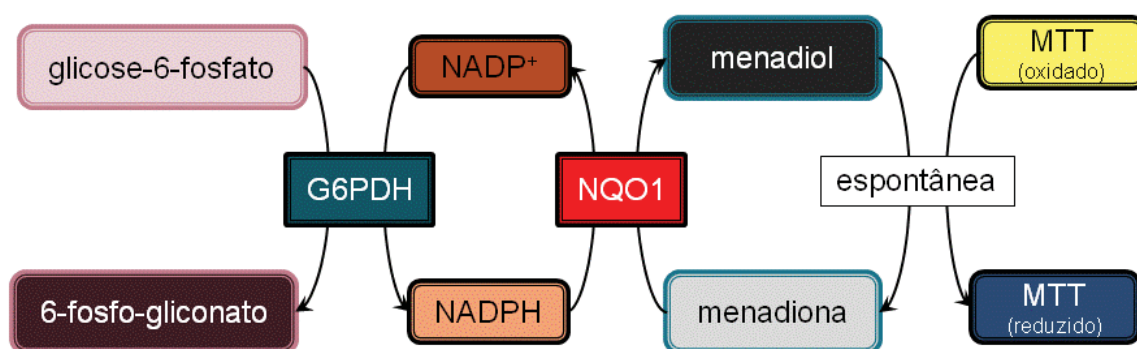


Figura 17: Princípio do ensaio da quinona-redutase: glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) geram NADPH continuamente. Este NADPH é usado pela NQO1 para transferir elétrons a menadiona. O menadiol então formado reduz espontaneamente o MTT ao azul de formazana que pode ser medido em um amplo alcance de comprimentos de onda (490 a 640 nm). Ambos NADPH e menadiona são regenerados, o que evita problemas de depleção dos substratos (FAHEY et al., 2004).

A linhagem Hepa 1c1c7 contém quantidades de NQO1 induzíveis e facilmente mensuráveis, que fornece um confiável sistema de detecção de indutores de enzimas de fase 2 (PROCHASKA et al., 1988; FAHEY et al., 2004; CUENDET et al., 2006).

Para determinar se uma substância é considerada monofuncional ou bifuncional, pode-se comparar a capacidade de indução de uma substância na linhagem selvagem Hepa 1c1c7 com o perfil da indução em duas linhagens mutantes. A linhagem TAOc1 é defeituosa no receptor Ah, enquanto a linhagem BP^c1 é incapaz de translocar o complexo ligante-receptor para o núcleo (GERHÄUSER et al., 1997). Portanto, as substâncias que possuem o mesmo padrão de indução tanto na linhagem selvagem, quanto nas linhagens mutantes, são considerados indutores monofuncionais (CUENDET et al., 2006).

3.6.2. Atividade de NQO1

Células Hepa 1c1c7 foram semeadas em placas de 96-poços (10^4 células/mL, 200 μ L/poço) e incubadas por 24 h antes da indução. Após 48 h de indução com as substâncias, o

meio de cultura foi removido e as células foram permeabilizadas com 50 µL de digitonina 0,8% em EDTA 2 mM (pH 7,8) por 10 min a 37 °C. Adicionaram-se 200 µL de uma mistura de reação (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4; glicose-6-fosfato 1 mM; menadiona 50 µM; NADPH 30 µM; FAD 5 µM; albumina sérica bovina 0,07% (m/v); MTT 0,03% (m/v); Tween-20 0,01% (v/v) e glicose-6-fosfato desidrogenase 2 U/mL) e a absorbância foi medida a 595 nm após 5 min em agitação a temperatura ambiente (KANG et al., 2004). Uma placa foi feita em paralelo com as substâncias para se determinar a concentração de proteína coradas com violeta cristal 0,2% (m/v) em etanol 2% (YANG & LIU, 2009). Como controle positivo foi utilizado o indutor 4'-bromoflavona (**4'BF**) (CD = 0,01 µM), por induzir enzimas destoxificadoras pela via Keap1-Nrf2-ARE (Figura 21) (LEE et al., 2005). Reagentes foram obtidos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

A atividade específica de NQO1 é definida como nmol de sal azul de formazana formado por mg de proteína e por min (SA). O índice de indução (IR) foi estabelecido pela relação entre as atividades específicas de células tratadas com indutores e células tratadas com o controle de solvente (GROSS et al., 2000). Do gráfico do índice de indução em função da concentração do indutor usado determinamos o valor da concentração necessária para duplicar a atividade da enzima (CD) para as substâncias que apresentaram IR >2 (KANG et al., 2004). Algumas substâncias possuem o índice de indução enzimático muito próximo da concentração citotóxica. Para contornar esse problema, calculou-se o índice de quimioprevenção (CI) dessas substâncias dividindo a CI₅₀ pelo CD (FAHEY et al., 2004).

$$SA = \frac{A_{595}(MTT)/5 \text{ minutos}}{A_{595}(\text{Controle})} \times 3247 \text{ nmol/mg}$$

Onde $A_{595} (MTT)/5 \text{ min}$ é a média de absorbância nos poços com substância testada dividido por 5, obtidas com a mistura de reação de MTT, $A_{595} (\text{Controle})$ é a média de absorbância dos poços com substância testada obtidas com coloração de violeta cristal e 3247

nmol/mg é uma constante de proporcionalidade do violeta cristal pelo coeficiente de degradação do MTT a 595 nm.

$$IR = \frac{SA \text{ tratamento}}{SA \text{ controle}}$$

Onde *SA tratamento* é a atividade específica dos poços com células tratadas com substância indutora e *SA controle* é a atividade específica dos poços com células que receberam controle DMSO 0,5%.

3.6.3. Inibição da aromatase

A avaliação da inibição da aromatase pode ser feita através de um simples e rápido ensaio fluorimétrico *in vitro*, que permite busca por substâncias ativas em extratos de plantas orientando o fracionamento (STRESSER et al., 2000). A aromatase catalisa a redução do substrato dibenzilfluoresceína (DBF) (Figura 18) na presença de NADPH e oxigênio, formando fluoresceína. Então, a inibição da aromatase é quantificada medindo-se a intensidade de luminosidade emitida pela fluoresceína em leitor de fluorescência de placas (Figura 19). Portanto, quanto menor a atividade enzimática (pouca fluoresceína formada), maior a inibição da enzima pela substância testada.

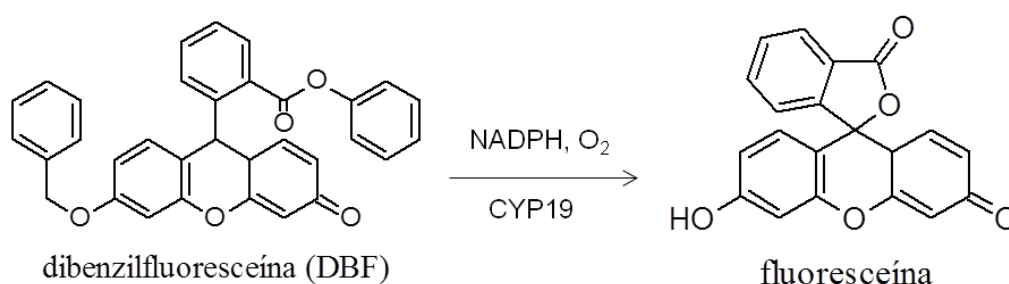


Figura 18: Conversão do DBF em fluoresceína pela CYP19.

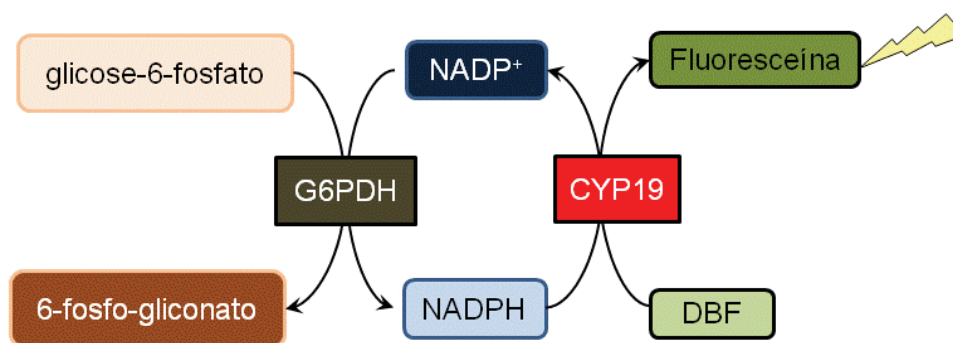


Figura 19: Princípio do ensaio da aromatase: glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) geram NADPH continuamente. Este NADPH é usado pela enzima CYP19 para converter DBF em fluoresceína, que pode ser medida pela intensidade de luminescência formada.

Em uma placa preta opaca de 384-poços foram adicionados 3,5 μL das substâncias nas concentrações e controles (DMSO 0,5%) em 30 μL de solução co-fator (NADP^+ 2,6 mM; glicose 6-fosfato 7,6 mM; glicose 6-fosfato desidrogenase 0,8 U/mL; MgCl_2 13,9 mM e BSA 1 mg/mL em tampão K_2PO_4 50 mM, pH 7,4). O controle negativo apresentou total atividade da enzima (máxima luminescência), e no controle branco não foi adicionada enzima (mínima luminescência). Naringenina (**NAR**) foi adotada como controle positivo ($\text{CI}_{50} = 2,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$) por apresentar atividade estrogênica em células de câncer de mama e inibição da CYP19 determinada por diversos mecanismos (Figura 21) (VAN MEEUWEN et al. 2007; VAN MEEUWEN et al. 2008). Agitou-se por cerca de 10 s e incubou-se a placa por 10 min a 37 °C, a fim de pré-aquecer o tampão e a placa. Adicionaram-se 33 μL da solução de enzima-substrato (DBF 0,8 mM; CYP19 1 nmol/mL; BSA 4 mg/mL e tampão K_2PO_4 50 mM, pH 7,4) em todos os poços, exceto no controle branco. Agitou-se a placa por 30 s e incubou-se a placa a 37 °C para ocorrer a reação de hidrólise da DBF. Após 30 min, adicionaram-se 25 μL de NaOH 2M em todos os poços para parar a reação. Então, colocaram-se 33 μL de solução de enzima-substrato nos poços de controle branco e agitou-se a placa por 5 min. Incubou-se a placa por 2 h a 37 °C antes de fazer a leitura para diminuir o ruído de fundo (ENDRINGER et

al., 2008). Finalmente, a fluorescência foi medida com excitação a 485 nm e emissão a 530 nm em leitor de placas fluorescentes Synergy IItm (BioTek Instruments Inc., Vermont, USA).

A porcentagem de inibição da enzima é determinada pela fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{M_{amostra} - M_{branco}}{M_{controle} - M_{branco}} \times 100 \right)$$

Onde $M_{amostra}$ é a média da fluorescência emitida nos poços com amostra, M_{branco} é a média da fluorescência emitida nos poços sem atividade da enzima, ou seja, 100% de inibição; e $M_{controle}$ é a fluorescência emitida nos poços com máxima atividade da enzima, ou seja, 0% de inibição. Reagentes obtidos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. DBF foi obtida de Discovery Laboratories Inc., Totowa, NJ, EUA. A enzima recombinante CYP19 foi obtida de BD Biosciences, Gentest, San Jose, CA, EUA.

3.6.4. Inibição de NF-κB ativado por TNFα

Células renais embrionárias humanas (HEK293) foram usadas para monitorar alterações na via NF-κB. Esta linhagem celular contém integrado ao seu cromossomo um gene de luciferase (*luc*) regulado pelo fator de transcrição NF-κB. Os fatores de transcrição se ligam à região promotora do gene *luc* quando estimulados por certos agentes, como TNFα, permitindo a transcrição do gene da luciferase. Em seguida, prepara-se um lisado de células e o produto do gene *luc* (enzima luciferase) reage com o substrato luciferina. Como resultado da reação, tem-se a formação de oxiluciferina e a emissão de luz, que pode ser detectada usando um luminômetro (ASOLKAR et al., 2009) (Figura 20). Portanto, se NF-κB está ativado, ocorre alta emissão de luz. Se sua atividade está inibida ou reduzida, observa-se uma baixa emissão de luz.

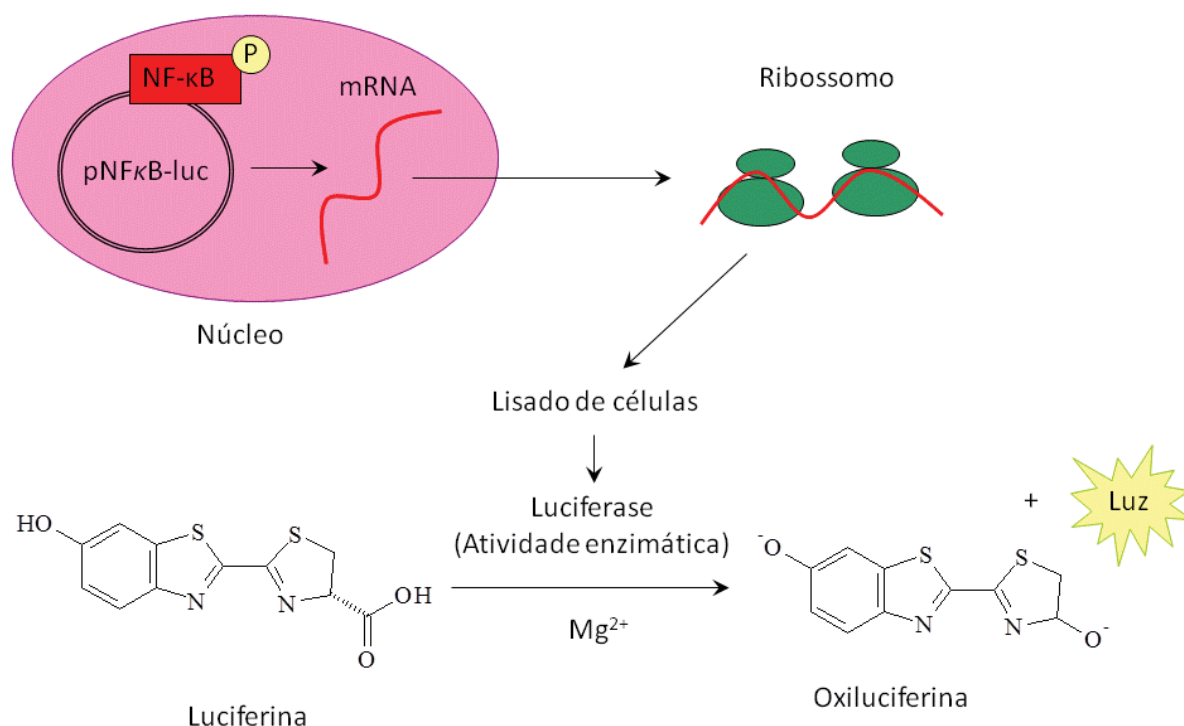


Figura 20: Princípio do método para ensaio de NF-κB/Luciferase. O NF-κB se liga na região promotora do gene *luc* e promove a transcrição em mRNA de luciferase. A enzima produzida é obtida através do lisado de células HEK sendo luciferina seu substrato. Como resultado, detecta-se a emissão de luz como produto da reação (Adaptado de PARK et al., 2002).

Células HEK293 foram cultivadas em meio com higromicina 100 µg/mL para seleção. Foram semeadas 10⁵ células/mL (200 µL/poço) em placa opaca branca com 96-poços. Após 48h de cultivo, as células foram tratadas com as substâncias em meio sem higromicina por 6h. Adicionaram-se 5 µL de TNFα 5 µg/mL (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) junto ao tratamento para ativar o NF-κB. *N*-tosil-l-fenilalanil clorometilcetona (**TPCK**) foi adotado como controle positivo (CI₅₀ = 5,1 ± 1,5 µM), exibindo 98,5 ± 0,5% de inibição do NF-κB a 30 µM (Figura 21) (KONDRATYUK, et al., 2011). O inibidor do sítio serina protease **TPCK** pode causar um bloqueio completo da atividade de NF-κB. **TPCK** inibe o processamento das subunidades de NF-κB e a degradação de IκB (MELLITIS et al., 1993). Foi demonstrado também que o **TPCK** inibe replicação do DNA por prender o crescimento celular em G₀-G₁ e

assim, promover apoptose por outros estímulos citotóxicos (KIRILLOVA et al., 1999). Após o tratamento, o meio foi removido e as células lavadas cuidadosamente com PBS. Então foram adicionados 50 µL do tampão de lise 1× (Promega, Madison, WI, EUA) em cada poço. Agitou-se a placa por 5 min em temperatura ambiente e, então, foram armazenadas a -80 °C, por 30 min para lise. Depois de lisadas as células foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C por 3 min e, então, foi feita a leitura. O luminômetro é programado para dispensar 25 µL do substrato reagente em cada poço, de acordo com as especificações do fabricante do Kit Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, EUA). Um ensaio de citotoxicidade com SRB foi feito em paralelo nas mesmas condições para avaliar viabilidade de células HEK293. Foi medida a luminosidade de cada poço para o cálculo da porcentagem de inibição de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{M_{teste}}{M_{controle}} \times 100$$

Sendo que M_{teste} é a média da luminosidade dos poços com as substâncias testadas e $M_{controle}$ é a média da luminosidade dos poços de controle (DMSO 0,5%).

3.6.5. Inibição de NO

A concentração de nitrito, produto da oxidação do NO, foi determinada como medida direta da produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas por LPS (Sigam-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Uma suspensão de 10^4 células/mL foi semeada em placa de 96-poços (200 µL/poço) e incubada por 24 h. O meio foi removido e substituído por DMEM sem vermelho de fenol com SFB 2% contendo as substâncias testadas por 15 min. A produção de nitrito foi estimulada com LPS 1 µg/mL. Após 20 h, a concentração de nitrito no meio de cultura foi medida com reagente de Griess (mistura 1:1 (v/v) de sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 5% e diidrocloreto de *N*-(1-naftil)etilenodiamina). Nitrito de sódio foi usado como padrão e a absorbância foi medida a 540 nm (PARK et al., 2011). Como controle positivo foi adotado *N*^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA) (CI₅₀ = 29,5 ± 1,2 µM) por atuar diretamente como

inibidor de iNOS, enzima induzida por LPS responsável pela produção de NO (Figura 21) (HONG et al., 2005). Um ensaio de citotoxicidade com SRB foi feito em paralelo nas mesmas condições para avaliar viabilidade de células RAW 264.7.

3.6.6. Análise da expressão de iNOS e COX-2

3.6.6.1. Ensaio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

Células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 6-poços (10^5 células/mL), e tratadas por 15 min com a substância **2OICH** e então estimuladas com LPS 1 µg/mL em meio DMEM sem vermelho de fenol. Após 6 h de tratamento, o RNA total foi extraído com reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante, e então, dissolvido em 30 µL de água sem RNase. A concentração e pureza do RNA foi estimada com espectrofotômetro BioSpec-nano (Shimadzu-Scientific Instruments, Columbia, MD, EUA) a 230, 260 e 280 nm. A quantidade de 0,7 µg do RNA total foi incubada com reagente de eliminação de DNA genômico a 42 °C, por 5 min. Em seguida, foi feita transcrição reversa para cDNA nas condições de 42 °C, 15 min e 95 °C por 5 min usando o *RT² First Strand Kit C-03* (SA Biosciences, Frederick, MD, EUA) no termociclador ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A amplificação do cDNA alvo foi feita com Power SyBR® Green PCR Master Mix (MgCl₂, dNTPs, DNA polimerase, corante SYBR Green I e tampão estabilizador) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA):

- iNOS
frente: 5'-GGAGCGAGTTGTGGATTGTC-3'
verso: 5'-GTGAGGGCTTGGCTGAGTGAG-3'
- COX-2
frente: 5'-GAAGTCTTTGGTCTGGTGCCTG-3'
verso: 5'-GTCTGCTGGTTTGGGAATAGTTGC-3'
- β-actina
frente: 5'-GCTACAGCTTCACCACCACAG-3'
verso: 5'-GGTCTTTACGGATGTCAACGTC-3'

Após desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, a PCR foi conduzida em 50 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 57 °C por 30 s e elongação a 72 °C por 30 s. A fluorescência foi medida após cada ciclo e mudanças na expressão de cada gene foram calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizando os dados com a expressão do gene controle (β -actina) (ZHAO et al., 2010). A curva de dissociação com a temperatura de desnaturação de cada iniciador foi usada como controle de amplificação para cada gene. Os dados se referem a média de três experimentos $\pm$ erro padrão ($M \pm SE$).

3.6.6.2. Ensaio de western blot

O efeito de **2OICH** nos níveis de expressão de COX-2 e iNOS em células RAW 264.7 foram avaliados por western blot. Células foram previamente cultivadas por 24 h em placas de 6-poços (10^5 células/mL), tratadas por 15 min e então estimuladas com LPS 1 μ g/mL por 20 h em meio DMEM sem vermelho de fenol com SFB 2%. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e coletadas com 50 μ L de tampão de lise celular 1 $\times$ (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA) e fenilmetanosulfonil fluoreto 1,0 mM (PMSF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células foram colocadas no sonicador por 5 s e então centrifugadas a $\times 14.000$ g e 4 °C por 10 min. O total de proteína foi avaliado com solução de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) (BRADFORD, 1976) no sobrenadante e armazenado a -80 °C até o momento do uso. Uma quantidade de 10 μ g de proteína foi transferida em gel de eletroforese poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio 10% (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e aplicada corrida por 100 V por 10 min e então 150 V por 45 min. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas eletricamente (15 V por 1 h) para membranas de polivinilideno difluoreto (PVDF) (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, EUA) previamente ativadas com metanol 100% por 5 min.

As membranas foram lavadas três vezes por 5 min em tampão Tris com tween-20 0,1% (TBST) e recortadas nas bandas das proteínas iNOS (160 kDa), COX-2 (74 kDa) e β -actina

(45 kDa), seguindo o marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em TBST (m/v) por 1 h em temperatura ambiente para bloquear ligação de proteínas inespecíficas. Depois, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho correspondente (COX-2 e β -actina de Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA; iNOS de Abcam, Cambridge, MA, EUA) em leite desnatado 3% em TBS (m/v) (1:1000-1:2000) durante a noite a 4 °C. Após lavar três vezes com TBST por 5 min, as membranas foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA). As membranas foram lavadas mais três vezes com TBST e os imunocomplexos foram observados com kit de detecção ECL (GE, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). As imagens foram adquiridas usando Gliance 1000 Imager (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA).

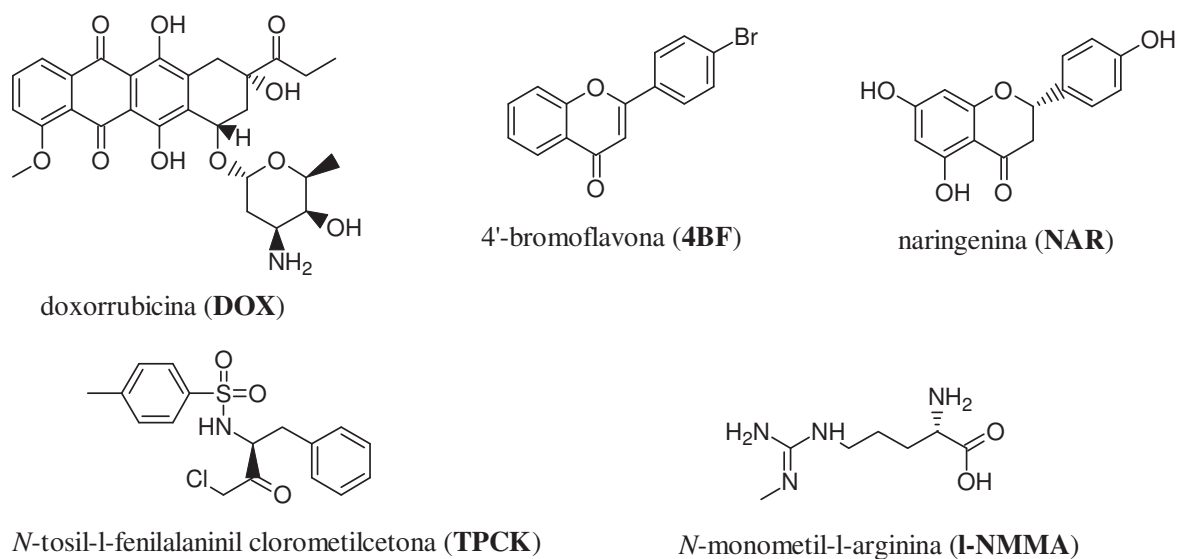


Figura 21: Estruturas químicas dos controles positivos adotados nos ensaios de citotoxicidade, apoptose e quimioprevenção.

3.7. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios de prospecção (citotoxicidade, indução da NQO1, inibição de NF- κ B, medida da produção de nitrito e inibição da aromatase), foi aplicado o teste de análise de variância *one-way* (ANOVA) e pós-teste de

Tukey. Para análise dos resultados de genotoxicidade foi realizado teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn entre as concentrações testadas e controle. Para os ensaios de apoptose (coloração co HO e IP), análise de expressão de iNOS e COX-2 (RT-PCR) foi aplicado o teste de *t*-Student em relação ao controle.

Os cálculos para a determinação da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) da atividade foi feito com base na curva de concentração-resposta pelo software TableCurve 2D™ Version 4 (Systat Software Inc., La Jolla, CA, EUA). As análises foram feitas baseados na média de três experimentos $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$) com *software* GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA) e consideradas as diferenças estatísticas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade de ácidos fenólicos e ésteres derivados de GA e PA

As substâncias fenólicas derivadas do ácido gálico, produto natural encontrado nas folhas de *A. glandulosa*, (**GA** – **G10**) não apresentaram citotoxicidade significante nas concentrações testadas ($P > 0,05$), tanto nos ensaios de MTT como nos ensaios de SRB. O **GA** apresentou uma porcentagem de células vivas de $77,1 \pm 8,8\%$, na concentração de 120 μM em células HepG2 e não afetou significativamente a viabilidade em células MCF-7 e MDA-MB-231 no ensaio de SRB a 50 μM . Esses dados confirmam relatos na literatura de que **GA** não é citotóxico (AN et al., 2005; RAO et al., 2006; GARCÍA-RIVERA et al., 2011; OSKOEIAN et al., 2011). Porém, foi observado que os derivados de maior cadeia apresentaram maior citotoxicidade de maneira proporcional, inclusive para os ésteres derivados do ácido protocatecuico (Tabelas 1 e 2). As células RAW 264.7 apresentaram um perfil mais sensível a essas substâncias, mesmo em um tempo de exposição menor (20 h). Foram observadas alterações morfológicas e diminuição da viabilidade celular a 50 μM (dado não apresentado).

Não foi observada indução significativa de NQO1 nas concentrações testadas, para o ácido gálico e derivados. Em estudo realizado por FAHEY et al. (2002), o ácido gálico apresentou CD de 290 μ M. Além disso, um estudo mais recente (YANG & LIU, 2009), demonstrou que **GA** não é capaz de induzir quinona-redutase na concentração de 200 μ M. Também não foi observada indução de NQO1 pelo ácido protocatecuico (**PA**), confirmando outros dados da literatura (GERHÄUSER et al., 2002).

A relação entre a inibição de CYP19 e a concentração das substâncias **G4**, **G5** e **NAR**. **GA** e alguns ésteres análogos não apresentaram inibição significativa da enzima aromatase (Figura 22). Por outro lado, estudo realizado por SATOH et al. (2008) nos mostrou que **GA** inibe aromatase com um CI_{50} de 0,34 μ M, porém esse resultado foi demonstrado pelo método de ELISA a partir de enzimas microsossomais obtidas de ovário de ratos e pode representar uma inibição não específica para CYP19.

Tabela 1: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade do ácido gálico (**GA**) e ésteres derivados.

Substância	Inibição de NF-κB		Inibição de NO		Inibição de CYP19		Indução de NQO1		Citotoxicidade CI ₅₀ (μM)	
	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	IR	CD (μM)	MCF-7	MDA-MB-231
GA	83,7 ± 10,4	19,8 ± 17,2	24,5	NA	20,7	NA	0,8	NA	NC	NC
G1	85,2 ± 11,5	12,1 ± 3,1	64,0	NA	31,5	NA	0,7	NA	NC	NC
G2	87,0 ± 6,9	38,6 ± 16,1	68,6	NA	35,4	NA	0,5	NA	NC	NC
G3	73,3 ± 5,6	37,1 ± 2,8	80,8 ± 2,9	7,9 ± 0,4	14,5	NA	0,6	NA	NC	NC
G3b	77,3 ± 4,2	25,6 ± 12,9	62,7	NA	22,6	NA	1,3	NA	NC	NC
G4	66,0	NA	90,4 ± 1,2	2,0 ± 0,7	69,5 ± 1,5	34,6 ± 1,0	0,5	NA	NC	NC
G4b	67,5	NA	92,8 ± 3,1*	NA	48,4	NA	0,8	NA	NC	NC
G5	68,0	NA	93,9 ± 1,7*	NA	72,1 ± 2,6	28,1 ± 10,3	0,8	NA	NC	NC
G6	40,2	NA	97,1 ± 1,6*	NA	48,6	NA	0,3	NA	NC	NC
G8	26,0	NA	95,3 ± 2,5*	NA	15,8	NA	0,2	NA	NC	NC
G10	2,6	NA	97,4 ± 1,0*	NA	16,4	NA	0,2	NA	7,0 ± 1,4	6,2 ± 1,4
G12	0,0	NA	96,7 ± 2,1*	NA	12,4	NA	0,2	NA	3,5 ± 0,5	7,1 ± 2,1
G14	78,2*	NA	99,5 ± 0,2*	NA	8,4	NA	0,2	NA	2,5 ± 0,7	4,0 ± 0,8
G16	74,8*	NA	96,0 ± 0,7*	NA	5,8	NA	0,3	NA	12,0 ± 1,7	15,4 ± 0,8
Controles (CI₅₀)	TPCK	5,1 ± 1,5	L-NMMA	29,5 ± 1,2	NAR	2,0 ± 0,5	4BF	0,01	DOX	0,5 ± 0,07

NA: não ativa (CI₅₀ > 50 μM). Substâncias consideradas ativas apresentaram mais de 70% de atividade em relação ao controle.

NC: não citotóxica. Substâncias consideradas citotóxicas apresentaram menos de 50% de viabilidade celular.

* substância apresentou citotoxicidade na concentração ativa, portanto não é recomendada para quimioprevenção.

Tabela 2: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade do ácido protocatecuico (**PA**) e ésteres derivados.

Substância	Inibição de NF-κB		Inibição de NO		Inibição de CYP19		Indução de NQO1		Citotoxicidade CI ₅₀ (μM)	
	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	IR	CD (μM)	MCF-7	MDA-MB-231
PA	49,6	NA	15,4	NA	8,3	NA	1,2	NA	NC	NC
P1	68,7	NA	78,6 ± 2,0	14,0 ± 4,0	32,9	NA	0,3	NA	NC	NC
P2	61,9	NA	92,2 ± 1,6	1,4 ± 0,5	35,3	NA	0,3	NA	NC	NC
P3	53,6	NA	85,5 ± 2,8	7,7 ± 3,6	24,8	NA	0,3	NA	NC	NC
P4	23,4	NA	92,5 ± 1,6	1,5 ± 0,4	42,7	NA	0,3	NA	NC	NC
P5	0,0	NA	92,6 ± 3,3*	NA	40,2	NA	0,2	NA	NC	NC
P6	0,0	NA	95,6 ± 1,6*	NA	22,2	NA	0,3	NA	7,6 ± 2,2	11,4 ± 0,7
P8	69,6	NA	98,9 ± 0,6*	NA	6,9	NA	0,1	NA	5,3 ± 2,4	12,7 ± 1,1
P10	86,2 ± 5,4*	NA	88,9 ± 9,3*	NA	0,0	NA	0,2	NA	NC	NC
P12	94,4 ± 3,7*	NA	98,9 ± 0,5*	NA	6,4	NA	0,1	NA	11,5 ± 2,2	12,5 ± 1,6
P14	95,7 ± 3,2*	NA	99,6 ± 0,4*	NA	10,7	NA	0,2	NA	10,5 ± 1,0	12,9 ± 1,3
P18	42,1	NA	59,7	NA	16,5	NA	0,3	NA	13,5 ± 3,6	31,8 ± 3,1
Controles (CI₅₀)	TPCK	5,1 ± 1,5	L-NMMA	29,5 ± 1,2	NAR	2,0 ± 0,5	4BF	0,01	DOX	0,5 ± 0,07

NA: não ativa (CI₅₀ > 50 μM). Substâncias consideradas ativas apresentaram mais de 70% de atividade em relação ao controle.

NC: não citotóxica. Substâncias consideradas citotóxicas apresentaram menos de 50% de viabilidade celular.

* substância apresentou citotoxicidade na concentração ativa, portanto não é recomendada para quimioprevenção.

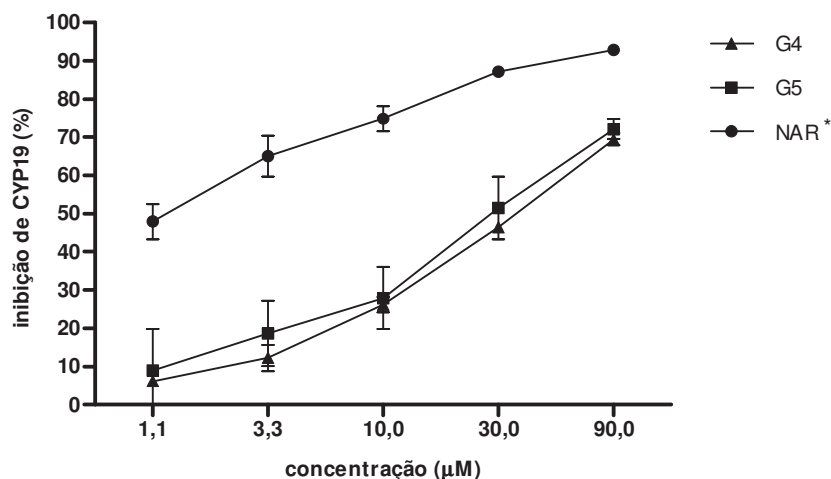


Figura 22: Inibição *in vitro* da enzima aromatase (CYP19) pelas substâncias **G4** (▲), **G5** (■) e **NAR** (●). Os dados referem-se às médias de dois experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$); * $P < 0,05$ em relação ao controle (DMSO 0,5%), *One-way* ANOVA.

As substâncias galato de butila (**G4**) e galato de pentila (**G5**) apresentaram valores de CI_{50} $34,6 \pm 1,0 \mu M$ e $28,1 \pm 10,3 \mu M$ de inibição da enzima aromatase, respectivamente. Embora essas substâncias não apresentem atividade significativa quando comparadas com o padrão **NAR**, são consideradas promissoras. A substância é considerada ativa quando a inibição for maior que 90% na concentração de $100 \mu M$ (MORIARTY et al., 2006). Estas substâncias são ésteres de ácido gálico com núcleo aromático, o que confere a elas a capacidade de realizar interação hidrofóbica do tipo π - π no sítio de ação da enzima, inibindo-a mesmo não sendo esteróide (LINARES et al., 2004; ENDRINGER et al., 2008). Por essa razão, o ácido gálico (**GA**) e outros ésteres análogos provavelmente não são hidrofóbicos o suficiente para interagir com o sítio de ação da enzima e inibi-la. Não foram encontrados trabalhos na literatura onde está relatada a atividade de inibição da enzima aromatase por ésteres análogos do ácido gálico, com essa metodologia. A substância galato de isobutila (**G4b**) também apresenta núcleo aromático lipofílico, porém sua cadeia ramificada provavelmente causa um bloqueio do acesso da substância ao sítio ativo da enzima, não inibindo a atividade. Não foi observada inibição da aromatase por ácido protocatecuico (**PA**) e derivados. A ausência de hidroxila na

posição 5 do anel aromático provavelmente diminui a capacidade de realizar uma interação no sítio de ação da enzima.

A prevenção da aterosclerose, do câncer, a atividade antiplasmodial e antioxidante de um grupo de substâncias derivadas de galatos foram descritas, bem como sua relação estrutura-atividade quanto a propriedade citotóxica (MURASE et al., 1999; FIUZA et al., 2004; NA et al., 2006; PETRÔNIO et al., 2007; JAGAN et al., 2008; LOCATELLI et al., 2008; SAXENA et al., 2008). A figura 23 apresenta a porcentagem de inibição de NF- κ B pelo ácido gálico e análogos (GA, G1 e G2).

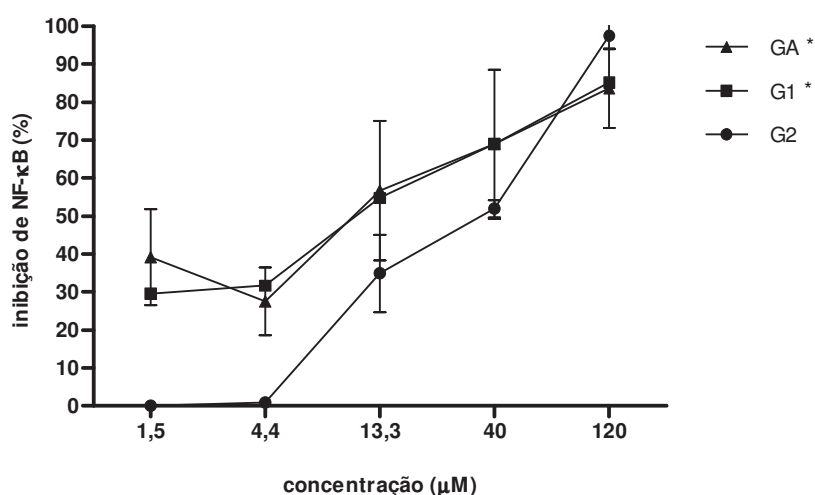


Figura 23: Inibição da atividade de NF- κ B ativado por TNF α 50 ng/mL em células HEK293/Luciferase em relação ao controle (DMSO 0,5%), por GA ($\blacktriangle$), G1 ($\blacksquare$) e G2 ($\bullet$). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão ($M \pm SE$) de dois experimentos independentes; * $P < 0,05$ em relação ao controle, *One-way* ANOVA.

Entre os inibidores de NF- κ B, salicilatos, aspirina (KOPP et al. 1994), apigenina e curcumina (GERRITSEN et al., 1995; SINGH et al., 1996) foram relatados como capazes de suprimir a ativação de NF- κ B por prevenir a degradação do inibidor de NF- κ B (I κ B), e portanto NF- κ B fica retido no citoplasma. O presente resultado nos fornece evidências de que alguns galatos podem atuar como inibidores de NF- κ B. Galato de metila (G1) apresentou a melhor atividade ($CI_{50} = 12,1 \pm 3,1 \mu M$). A atividade inibitória dos galatos não parece resultar

de uma toxicidade celular não específica, mas sim devido à transcrição de genes dependentes de NF- κ B. Em outro estudo, foi demonstrado que galatos podem inibir a translocação nuclear de NF- κ B, induzida por TNF α , por uma via independente da degradação de I κ B (MURASE et al., 1999).

Não foi observada inibição significativa da produção de nitrito por **GA** e **PA** em células de macrófago murino (RAW 264.7) estimuladas por LPS (inibição de 24,5% e 15,4% em relação ao controle, respectivamente). Em estudo publicado por TSAO e colaboradores (2008), **GA** não inibiu iNOS a 50 μ M em células da microglia murina (BV2) estimuladas com LPS. Em outro estudo, **GA** apresentou um CI₅₀ de 63 μ M em cultura primária de macrófagos murinos (MATSUDA et al., 2000).

Com valores de CI₅₀ de $7,9 \pm 0,4$ μ M e $2,0 \pm 0,7$ μ M, as substâncias galato de propila (**G3**) e galato de butila (**G4**) inibiram a produção de NO em células de RAW 264.7 estimuladas por LPS (Figura 24). Outros ésteres derivados do ácido gálico, apesar de forte inibição (> 90%), reduziram significativamente a viabilidade celular após 20 h de tratamento (< 40 %).

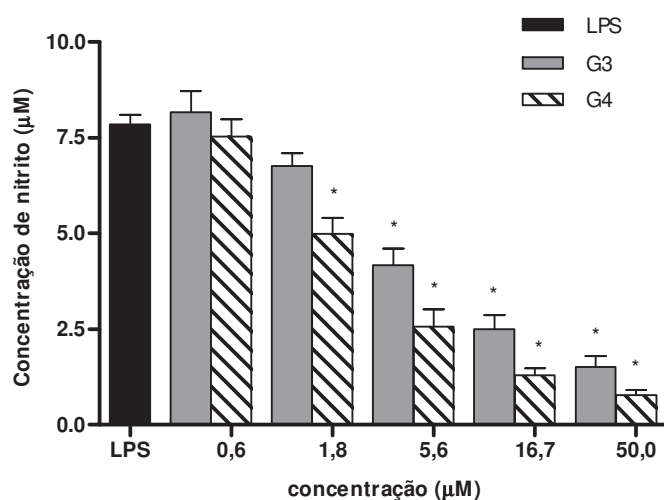


Figura 24: Inibição da produção de NO estimulado por LPS 1 μ g/mL, em células RAW 264.7 em relação ao controle (DMSO 0,5%) por **G3** e **G4**. Os resultados estão expressos

como média $\pm$ erro padrão ($M \pm SE$) de três experimentos independentes; * $P < 0,05$ em relação ao estímulo (LPS 1 $\mu\text{g/mL}$), *One-way* ANOVA e pós teste de Tukey.

4.1.1. Genotoxicidade do ácido gálico e galato de metila

O nível de dano ao DNA em células HepG2 foi avaliada após exposição de diversas concentrações de ácido gálico (**GA**) e galato de metila (**G1**) por 24 h utilizando o ensaio do cometa. A quantificação dos dados do cometa está relatada na forma de *Tail moment* (TM) (Figura 25).

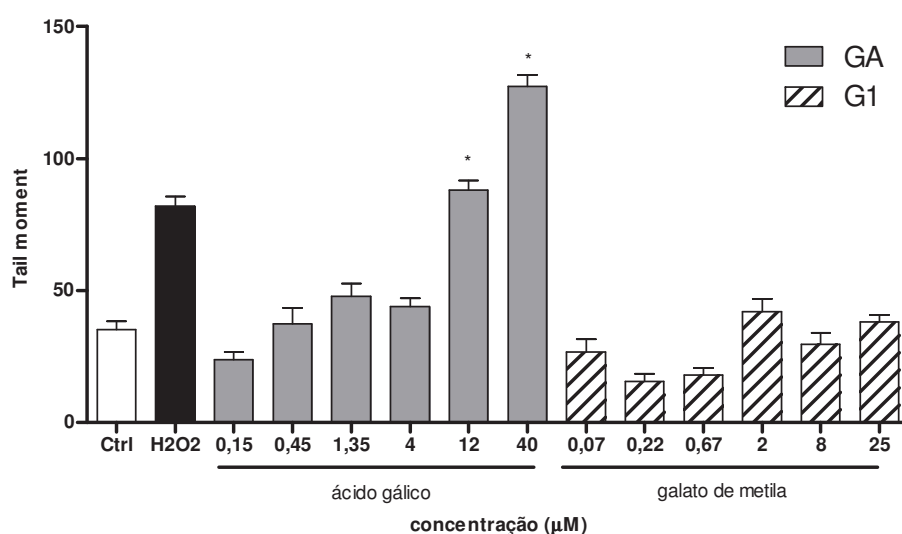


Figura 25: Genotoxicidade do ácido gálico (**GA**) e galato de metila (**G1**) pelo ensaio do cometa em células HepG2 tratadas por 24h. Ctrl: controle (DMSO 1%); H₂O₂: peróxido de hidrogênio 100 μM . Os dados referem-se à média da contagem de 50 nucleóides $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), * $P < 0,05$ em relação ao controle, Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

O maior valor de TM foi de $127,1 \pm 4,4$ a 40 μM após exposição ao **GA**. Foi observada uma diferença estatística significativa dos valores de TM entre os tratamentos de 12 μM e 40 μM em relação ao controle (DMSO 1%) ($P < 0,001$), sugerindo que **GA** pode adentrar no núcleo e provocar danos ao DNA da célula nessas concentrações. O dano oxidativo ao DNA observado nessas condições pode ter sido provocado pela formação de radicais hidroxila. Devido à alta reatividade deste radical este mecanismo só é possível se as hidroxilas se formarem próximas ao DNA (SAVI et al., 2005). Os danos ao DNA observados foram

provocados por um provável efeito indutor de apoptose por **GA** (LIU et al., 2011). Por outro lado, outro estudo demonstrou que **GA** apresentou um efeito protetor contra danos ao DNA provocados por H₂O₂ em células de leucemia mielogênica crônica humana a concentrações mais elevadas (ABDELWAHED et al., 2007). Além disso, **GA** não causa quebras nas fitas de DNA em baixas concentrações (WU et al., 2004).

O galato de metila (**G1**), produto natural encontrado nas folhas de *A. glandulosa*, tem demonstrado efeito antioxidante em uma variedade de experimentos (HSIEH et al., 2004). Neste estudo, **G1** teve sua genotoxicidade avaliada pelo ensaio do cometa (Figura 25). O maior valor de TM observado foi de $38,0 \pm 2,8$ a 25 μ M. Porém, sem diferença significativa entre o este tratamento e o controle (DMSO 0,5%) ($P > 0,05$). Isso demonstra que **G1** não causa danos ao DNA de células HepG2 nessas condições. No que diz respeito à propriedade antigenotóxica do ácido gálico e ésteres derivados, esta depende do tipo de estímulo usado para a produção de espécies reativas de oxigênio e a estrutura da molécula desempenha um papel fundamental como agente protetor ao DNA (BONACORSI et al., 2012). Portanto, outros ensaios são necessários para melhor caracterizar a ação de galatos e o significado biológico do dano observado.

4.2. Atividade de análogos do ácido fenâmico

O ácido fenâmico pertence à classe dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e seus análogos apresentam atividade de inibição das isoenzimas ciclooxigenase (COX) (KALGUTKAR et al., 2000). O uso regular de inibidores de COX-2 apresenta efeitos benéficos sobre o trato gastrointestinal e redução do risco de câncer de cólon (LANAS, 2009). Nesse sentido, foram sintetizados 17 análogos do ácido fenâmico e avaliados em ensaios de quimioprevenção do câncer (Tabela 3). Os análogos **AB4** e **AB5** apresentaram inibição de NF- κ B de $73,0 \pm 5,2\%$ e $72,6 \pm 1,6\%$ a 50 μ M, respectivamente. Isso indica que a presença de metoxilas nas posições 3', 4' e 5' pode ser essencial para esse tipo de atividade. Por outro

lado, apenas a substância **AB5** inibiu a produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas com LPS 1 µg/mL ($CI_{50} = 28,2 \pm 3,1 \mu M$).

4.3. Atividade de análogos da xantona

Xantonas são conhecidas por uma variedade de atividades biológicas tais como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral e imunomoduladora (PINTO et al., 2005). Análogos de xantonas foram sintetizados e avaliados em ensaios de quimioprevenção (Tabela 4). Apenas a benzoxantona (**X9**) apresentou atividade relevante no ensaio de indução da enzima quinona-redutase com um valor de $CD = 41,0 \pm 6,1 \mu M$.

4.4. Atividade de (+)-carvona e análogos

A (+)-carvona (**C+**) é um monoterpene com odor característico presente no óleo essencial de diversas plantas (CARVALHO et al., 2006). Apresenta atividade biológica como agente antimicrobiano e imunomodulador, aumentando a contagem de leucócitos em camundongos Balb/c (MCGEADY et al., 2002; RAPHAEL et al., 2003). A **C+** e análogos foram fornecidos pelo Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, e testadas em ensaios de quimioprevenção do câncer e citotoxicidade em células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Nenhuma das substâncias avaliadas apresentou atividade significativa nas concentrações testadas (Tabela 5). Devido a cetona α,β -insaturada da carvona, era esperado um efeito indutor de quinona-redutase (ZHENG et al., 1992). Por outro lado, tal efeito não foi observado ($IR = 1,1$). Em estudo prévio, foi demonstrado que **C+** pode induzir glutathione-S-transferase, outra enzima detoxificadora usada como marcador de quimioprevenção, em camundongos A/J (ZHENG et al 1992). Provavelmente o efeito indutor de enzimas detoxificadoras da **C+** acontece por uma via independente de Keap1-Nrf2-ARE e outros estudos são necessários para esclarecer seu mecanismo.

Tabela 3: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade dos análogos do ácido fenâmico.

Substâncias	Inibição de NF-κB		Inibição de NO		Inibição de CYP19		Indução de NQO1		Citotoxicidade CI ₅₀ (μM)	
	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	IR	CD (μM)	MCF-7	MDA-MB-231
AA1	0,0	NA	7,2	NA	9,7	NA	1,1	NA	NC	NC
AA3	69,2	NA	11,8	NA	3,2	NA	1,1	NA	47,4 ± 2,1	NC
AA5	48,9	NA	14,5	NA	13,6	NA	1,2	NA	NC	NC
AB4	73,0 ± 5,2	ND	43,7	NA	14,2	NA	1,0	NA	NC	NC
AB5	72,6 ± 1,6	ND	86,6 ± 3,8	28,2 ± 3,1	19,9	NA	1,4	NA	NC	NC
AC1	23,7	NA	14,9	NA	15,5	NA	0,9	NA	NC	NC
AC3	0,0	NA	19,4	NA	11,5	NA	1,6	NA	NC	NC
AC5	0,0	NA	21,6	NA	10,2	NA	1,3	NA	NC	NC
AD1	0,0	NA	20,2	NA	10,0	NA	1,7	NA	NC	NC
AD4	50,1	NA	7,5	NA	6,8	NA	0,7	NA	NC	NC
AD5	71,1 ± 8,2	ND	24,3	NA	9,2	NA	1,4	NA	NC	NC
AE1	61,8	NA	0,0	NA	11,6	NA	1,0	NA	NC	NC
AE5	59,9	NA	1,1	NA	14,1	NA	1,1	NA	NC	NC
AG3	44,8	NA	59,3	NA	15,0	NA	0,7	NA	NC	NC
AG5	0,0	NA	21,7	NA	8,9	NA	1,4	NA	NC	NC
AI3	0,0	NA	58,7	NA	2,2	NA	1,0	NA	NC	NC
AL3	32,7	NA	27,6	NA	0,0	NA	0,9	NA	NC	NC
Controles (CI₅₀)	TPCK	5,1 ± 1,5	L-NMMA	29,5 ± 1,2	NAR	2,0 ± 0,5	4BF	0,01	DOX	0,5 ± 0,07

NA: não ativa (CI₅₀ > 50 μM). Substâncias consideradas ativas apresentaram mais de 70% de atividade em relação ao controle.

NC: não citotóxica. Substâncias consideradas citotóxicas apresentaram menos de 50% de viabilidade celular.

ND: não determinado

* substância apresentou citotoxicidade na concentração ativa, portanto não é recomendada para quimioprevenção.

Tabela 4: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade dos análogos da xantona.

Substâncias	Inibição do NF-κB		Inibição do NO		Inibição de CYP19		Indução de NQO1		Citotoxicidade CI ₅₀ (μM)	
	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	IR	CD (μM)	MCF-7	MDA-MB-231
X1	38,1	NA	53,7	NA	39,0	NA	0,6	NA	NC	NC
X2	1,1	NA	65,4	NA	55,8	NA	0,6	NA	NC	NC
X3	0,0	NA	91,1 ± 5,1*	NA	50,4	NA	0,8	NA	NC	NC
X7	43,6	NA	39,6	NA	17,4	NA	1,0	NA	NC	NC
X9	60,1	NA	10,2	NA	12,7	NA	2,3 ± 0,05	41,0 ± 6,1	NC	NC
Controles (CI₅₀)	TPCK	5,1 ± 1,5	L-NMMA	29,5 ± 1,2	NAR	2,0 ± 0,5	4BF	0,01	DOX	0,5 ± 0,07

NA: não ativa (CI₅₀ > 50 μM). Substâncias consideradas ativas apresentaram mais de 70% de atividade em relação ao controle.

NC: não citotóxica. Substâncias consideradas citotóxicas apresentaram menos de 50% de viabilidade celular.

* substância apresentou citotoxicidade na concentração ativa, portanto não é recomendada para quimioprevenção.

Tabela 5: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade da (+)-carvona (**C+**) e análogos.

Substâncias	Inibição de NF-κB		Inibição do NO		Inibição de CYP19		Indução de NQO1		Citotoxicidade CI ₅₀ (μM)	
	% a 50 μM	IC ₅₀ (μM)	% a 50 μM	IC ₅₀ (μM)	% a 50 μM	IC ₅₀ (μM)	IR	CD (μM)	MCF-7	MDA-MB-231
C+	65,1	NA	7,4	NA	11,5	NA	1,1	NA	NC	NC
C-	62,2	NA	15,4	NA	14,4	NA	1,3	NA	NC	NC
EP	62,7	NA	11,2	NA	17,8	NA	1,2	NA	NC	NC
H+	32,1	NA	19,7	NA	15,7	NA	1,5	NA	NC	NC
H-	0,0	NA	22,4	NA	11,5	NA	1,1	NA	NC	NC
Controles (CI₅₀)	TPCK	5,1 ± 1,5	L-NMMA	29,5 ± 1,2	NAR	2,0 ± 0,5	4BF	0,01	DOX	0,5 ± 0,07

NA: não ativa (CI₅₀ > 50 μM). Substâncias consideradas ativas apresentaram mais de 70% de atividade em relação ao controle a 50 μM.

NC: não citotóxica. Substâncias consideradas citotóxicas apresentaram menos de 50% de viabilidade celular em relação ao controle a 50 μM.

4.5. Atividade de alcaloides guanidínicos de *P. nitens* e análogo sintético

Foi avaliada a citotoxicidade das substâncias nitensidina A (NTA), nitensidina B (NTB) e nitensidina T (NTT) solubilizados em meio de cultura através do ensaio de MTT em células HepG2. Para os alcalóides guanidínicos foi observada uma elevada citotoxicidade. A figura 26 apresenta a relação entre a concentração e a porcentagem de células vivas observadas após 24 h de tratamento.

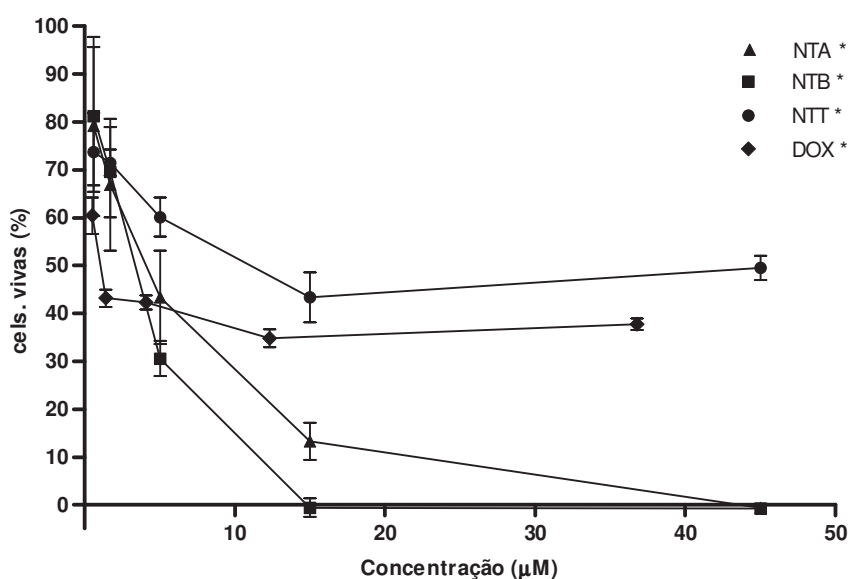


Figura 26: Ensaio de viabilidade celular por MTT em células HepG2 tratadas por 24h com nitensidina A (▲), nitensidina B (■), nitensidina T (●) e doxorrubicina (◆). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$); * $P < 0,05$ em relação ao controle (DMSO 0,5%), *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

As substâncias NTA e NTB apresentaram valores de CI_{50} de $5,0 \pm 0,1 \mu M$ e $5,3 \pm 0,2 \mu M$, respectivamente, e foram tão citotóxicas quanto doxorrubicina ($CI_{50} = 0,9 \pm 0,1 \mu M$) ($P > 0,05$) em células HepG2 após 24 h de tratamento.

Os valores de CI_{50} dos produtos naturais NTA e NTB foram $6,0 \pm 0,5 \mu M$ e $6,4 \pm 0,8 \mu M$ nas células Hepa 1c1c7 após 48 h de tratamento pelo ensaio de coloração com violeta cristal, respectivamente. Nenhuma indução de NQO1 foi observada em células de hepatoma murino

nas concentrações testadas (0,6 μM – 46,8 μM), provavelmente devido à sua elevada citotoxicidade.

Por outro lado, o análogo de alcalóide guanidínico nitensidina T (**NTT**) apresentou uma taxa da indução de $2,7 \pm 0,5$ -vezes maior em relação ao controle a 45 μM , e nos mostra uma CD de $11,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (Tabela 6). Entretanto, a citotoxicidade de **NTT** em células Hepa 1c1c7 (CI_{50} $24,1 \pm 11,6 \mu\text{M}$) nos resultou em um baixo índice de quimioprevenção (CI $2,1 \pm 1,1$) (Figura 27). Nenhuma das substâncias foi capaz de induzir a enzima quinona-redutase nas linhagens mutantes TAOc1BP^rc1 e BP^rc1. Dessa forma, **NTT** pode ser considerado um indutor bifuncional.

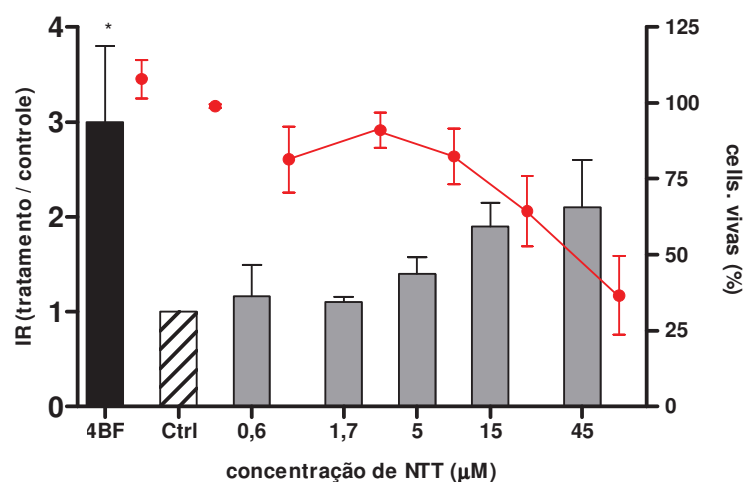


Figura 27: Indução da enzima quinona-redutase em células Hepa 1c1c7 tratadas por 48 h com a substância **NTT** (tratamento / controle) e relação com sobrevivência celular (%) pelo ensaio de violeta cristal (●). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$); * $P < 0,05$ em relação ao controle (Ctrl) (DMSO 0,5%), *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Aromatase possui um grupo porfirina com ferro no seu sítio ativo que apresenta conformação planar devido à extensa deslocalização π aromática (FAVIA et al. 2006). Estudos apontam que substâncias não-esteroidais com átomo de nitrogênio são capazes de coordenar com o ferro heme do citocromo P450 (SÉRALINI et al. 2001; POUGET et al.

2002). Os alcalóides guanidínicos **NTA** e **NTB** apresentaram $67,0 \pm 6,7 \%$ e $68,2 \pm 5,1 \%$ de inibição da enzima aromatase, respectivamente, na concentração de $45,0 \mu\text{M}$. Essas substâncias apresentam átomo de nitrogênio do núcleo guanidínico que seria capaz de interagir com o ferro do grupamento porfirina, alterando assim a conformação do sítio ativo da enzima.

Os alcalóides guanidínicos nitensidinas A e B apresentaram citotoxicidade para as células NF- κ B-luc e RAW 264.7, não podendo ser confirmada a inibição do NF- κ B e produção de NO por esses modelos (Tabela 6). O análogo sintético nitensidina T não apresentou inibição da atividade de NF- κ B, porém inibiu consideravelmente a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS ($\text{CI}_{50} = 11,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$).

4.5.1. Indução de apoptose por alcalóides guanidínicos e análogo sintético

Para se verificar a indução de apoptose das substâncias citotóxicas testadas, foi feita marcação de células HepG2 com Hoechst 33342 e iodeto de propídio (HO/IP) após 24 h de tratamento com as substâncias nitensidian A (**NTA**), nitensidina B (**NTB**) e nitensidina T (**NTT**) nas respectivas concentrações de CI_{50} observadas pelo ensaio de MTT.

Os alcalóides guanidínicos **NTA** e **NTB** apresentaram indução significativa de apoptose em relação ao controle (DMSO 0,5%) ($P < 0,05$). Foi observado um total de 32,2% e 48,5% de células em apoptose após tratamento com os alcalóides naturais, respectivamente (Figura 28.A). Nenhuma diferença significativa foi observada entre as substâncias testadas e o controle quando comparadas células em necróticas ($P > 0,05$). Além disso, quando comparamos as células em apoptose tardia, nota-se que a substância **NTB** apresentou uma diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,001$) (Figura 28.B). Isso pode ter sido ser provocado pela diferença da posição do grupamento geranil de **NTB** em relação aos isósteros **NTA** e **NTT**.

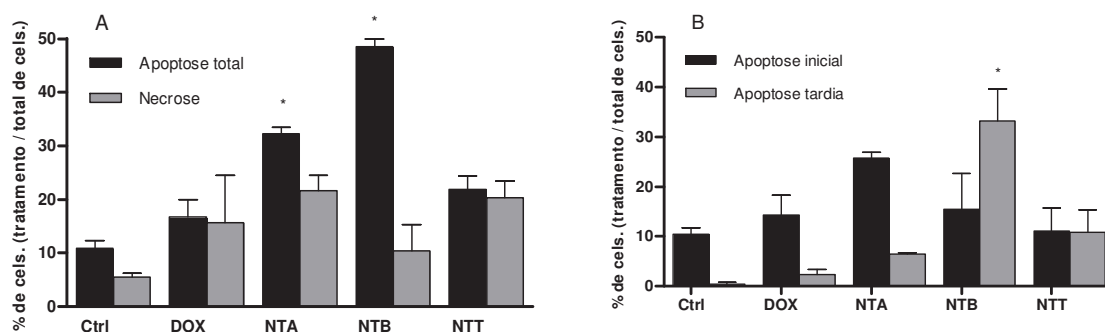


Figura 28: Apoptose pelo ensaio de HO/IP em células HepG2 após tratamento com NTA, NTB e NTT por 24 h. **A:** Comparação entre apoptose total e necrose. **B:** Comparação entre apoptose inicial e apoptose tardia. Ctrl: controle (DMSO 0,5%); **DOX:** doxorubicina 50 µg/mL. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes ± erro padrão (M ± EP). * P < 0,05 em relação ao controle, *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Outros alcalóides isolados de *P. nitens* são capazes de induzir morte celular por apoptose, conforme observado em linhagens de câncer de mama (DUARTE et al., 2010). Provavelmente, substâncias prenildas atuam como indutores de apoptose inibindo modificações pós-traducionais necessárias para a transformação celular (SUN et al, 1998; PHILIPS et al., 2007). Estudos adicionais são necessários para melhor caracterizar os eventos intracelulares e o papel desempenhado por **NTB** na apoptose.

4.6. Atividade de outros produtos naturais e flavonas prenildas

Foi avaliada a atividade de quimioprevenção do câncer e citotoxicidade de outras substâncias, sendo estas de origem natural e análogos sintéticos (Tabela 6). A flavona (**Fla**) apresentou $84,7 \pm 0,5\%$ de inibição da aromatase a 50 µM ($CI_{50} = 8 \mu M$) (BRUEGGEMEIER et al., 2001) e não induziu NQO1. A 6-hidroxiflavona (**6Fla**) apresentou um IR da enzima quinona-redutase de $4,1 \pm 0,5$ -vezes maior do que o controle ($CD = 6,5 \pm 0,8 \mu M$). E o derivado isoprenilado 6-*O*-isoprenilflavona não induziu NQO1 nas condições testadas (IR = 1,8). Isso indica que a hidroxila na posição 6 é essencial para indução da enzima por flavonas.

Tabela 6: Atividade de quimioprevenção e citotoxicidade de produtos naturais e derivados semi-sintéticos.

Substâncias	Inibição de NF-κB		Inibição de NO		Inibição de CYP19		Indução de NQO1		Citotoxicidade CI ₅₀ (μM)	
	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	% a 50 μM	CI ₅₀ (μM)	IR	CD (μM)	MCF-7	MDA-MB-231
Fla	0,0	NA	12,4	NA	84,7 ± 0,5	8	1,7	NA	NC	NC
6Fla	1,4	NA	66,9	NA	10,3	NA	4,1 ± 0,05	6,5 ± 0,8	NC	NC
6OIFla	29,3	NA	4,8	NA	6,7	NA	1,8	NA	NC	NC
OLE	0,0	NA	92,7 ± 3,9	40	15,7	NA	1,3	NA	NC	NC
PIP	63,0	NA	47,9	NA	23,2	NA	1,6	NA	NC	NC
PED	56,0	NA	40,0	NA	74,3 ± 2,3	0,3 ± 0,01	1,3	NA	NC	NC
UMB	0,0	NA	9,6	NA	27,6	NA	1,3	NA	NC	NC
MOR	0,0	NA	30,1	NA	0,0 ^a	NA	1,6	NA	NC	NC
Ch	70,7 ± 4,1	22,8 ± 1,4	50,6	NA	0,2	NA	0,3	NA	NC	NC
3OFCh	89,5 ± 6,6	16,2 ± 5,1	89,8 ± 2,0	17,6 ± 1,0	22,3	NA	1,9	NA	NC	NC
2OICCh	83,4 ± 2,1	10,8 ± 1,8	92,7 ± 4,2	7,9 ± 0,2	8,5	NA	3,1 ± 0,4	1,3	NC	NC
2OFCh	80,6 ± 3,7	9,3 ± 1,7	92,1 ± 0,6	7,2 ± 1,1	30,3	NA	2,4 ± 0,6	14,6	NC	NC
NTA	93,0 ± 1,7*	NA	97,8 ± 0,5*	NA	67,0 ± 6,7	NA	0,2	NA	6,6 ± 0,5	7,8 ± 2,3
NTB	90,3 ± 2,3*	NA	95,9 ± 1,5*	NA	68,2 ± 5,1	NA	0,5	NA	8,6 ± 1,8	6,4 ± 1,7
NTT	0,0	NA	88,9 ± 4,6	11,5 ± 0,2	15,1	NA	2,7 ± 0,5	11,7 ± 0,5	NC	NC
Controles (CI₅₀)	TPCK	5,1 ± 1,5	α-NMMA	29,5 ± 1,2	NAR	2,0 ± 0,5	4BF	0,01	DOX	0,5 ± 0,07

NA: não ativa (CI₅₀ > 50 μM). Substâncias consideradas ativas apresentaram mais de 70% de atividade em relação ao controle.

NC: não citotóxica. Substâncias consideradas citotóxicas apresentaram menos de 50% de viabilidade celular.

* substância apresentou citotoxicidade na concentração ativa, portanto não é recomendada para quimioprevenção.

^a a substância não pode ter sua atividade avaliada por este método devido a emissão de fluorescência.

O ácido oleanólico (**OLE**) é um triterpenoide pentacíclico com potencial atividade em quimioprevenção do câncer (HSU et al., 2005; BISHAYEE et al., 2011), inclusive apresentou moderada inibição de aromatase (GANSSE et al., 1995). Além disso, derivados sintéticos de **OLE** inibiram a produção de NO em células RAW 264.7 e foram até cem vezes mais potentes na inibição de enzimas iNOS e COX-2 (HONDA et al., 1997; MURAKAMI et al., 2007). No presente estudo, **OLE** apresentou inibição de $92,7 \pm 3,9\%$ na produção de NO a $50 \mu\text{M}$ nas condições testadas. **OLE** não induziu NQO1 a $50 \mu\text{M}$, conforme relatado anteriormente (GERHÄUSER et al., 2003). Os flavonoides pedalitina (**PED**) e morina (**MOR**) foram avaliados quanto à inibição da enzima aromatase (CYP19). **MOR** não pode ser avaliada para inibição de CYP19 através deste ensaio devido à fluorescência emitida quando excitada a 390 nm (STOCKERT et al., 1985). **PED** apresentou inibição de $74,3 \pm 2,3\%$ a $50 \mu\text{M}$ ($\text{CI}_{50} = 0,3 \pm 0,01 \mu\text{M}$) em CYP19. Em estudo realizado anteriormente foi demonstrado que **PED**, por apresentar dois grupamentos catecol (*orto*-dihidroxi), possui potencial antioxidante e inibe mieloperoxidase, enzima que também pertence ao complexo P450 e está envolvida no processo inflamatório (MIDDLETON et al., 2000; NASTASIJEVIĆ et al., 2008; FERNANDES et al., 2008). Não foi observada uma relevante inibição da produção de NO por **PED** em células RAW 264.7. Porém, em outro estudo quando células foram estimuladas com TNF- α e IL-12, foi observada uma inibição de 78% a $40 \mu\text{M}$, demonstrando que o mecanismo de inibição é dependente do tipo de estímulo usado (RAO et al., 2009).

4.6.1. Atividade de chalcona e análogos prenilados

A chalcona (**Ch**) é um bioprecursor de flavonoides com abertura no anel C, e a atividade de seus derivados vem sendo estudada em quimioprevenção do câncer (CHANG et al., 1997; MIRANDA et al., 2000; KO et al., 2003; KIM et al., 2007; CABRERA et al., 2010). Xantohumol, chalcona prenilada de *Humulus lupulus*, apresenta amplo espectro na inibição, promoção e progressão do tumor através de bloqueio do ciclo celular e indução de apoptose

(GERHÄUSER et al., 2003). Além disso, xanthohumol possui atividade de indução de NQO1 e efeito antioxidante (DIETZ et al., 2005). Em estudo prévio, chalconas com substituintes no anel B apresentaram atividade citotóxica em células MCF-7 a 100 μ M e tiveram a relação estrutura-atividade analisada (CABRERA et al., 2007). No presente estudo, foi avaliada a citotoxicidade da **Ch** e três novos derivados prenilados sintéticos – 3-*O*-farnesilchalcona, 2-*O*-isoprenilchalcona e 2-*O*-farnesilchalcona (**3OFCh**, **2OICH** e **2OFCh**), bem como em ensaios de quimioprevenção do câncer (Tabela 6).

Não foi observada citotoxicidade por ensaio de SRB em células de câncer mamário MCF-7 e MDA-MB-231 quando tratadas por 72 h com chalcona (**Ch**) e derivados prenilados a 50 μ M (viabilidade celular > 80%). Por outro lado, um estudo prévio mostrou que **Ch** pode exercer efeito citotóxico em células MCF-7 a 100 μ M (CI_{50} = 63 μ M). **Ch** não apresentou indução de NQO1 em células Hepa 1c1c7 a 50 μ M (IR = 0,3), provavelmente por mediar uma moderada citotoxicidade nestas concentrações em células de camundongos. Com valores de CD de 1,3 μ M e 14,6 μ M, as substâncias **2OICH** e **2OFCh** demonstraram que grupamentos isoprenilas na posição 2 do anel aromático A em chalconas pode contribuir para a indução de NQO1 em células Hepa 1c1c7.

Células RAW 264.7 estimuladas com LPS 1 μ g/mL apresentaram uma baixa produção de NO após 20 h de tratamento com chalconas preniladas a 16,7 μ M ($P < 0,05$), conforme demonstrado pela concentração de nitrito em meio de cultura (Figura 29). Com valores de CI_{50} de 17,6 μ M, 7,9 μ M e 7,2 μ M, as chalconas preniladas **3OFCh**, **2OICH** e **2OFCh** provavelmente inibiram a enzima iNOS, respectivamente.

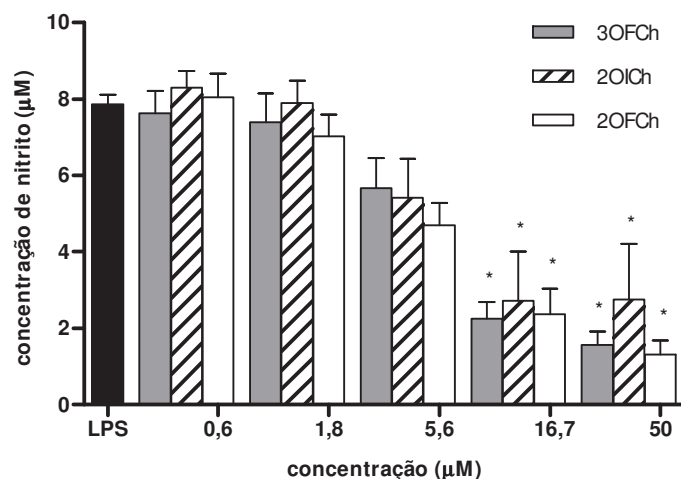


Figura 29: Inibição da produção de NO estimulado por LPS 1 µg/mL, em células RAW 264.7 em relação ao controle (DMSO 0,5%) por **3OFCh**, **2OICH** e **2OFCh**. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão ($M \pm SE$) de três experimentos independentes; * $P < 0,05$ em relação ao estímulo (LPS 1 µg/mL), *One-way* ANOVA e pós teste de Tukey.

Uma vez que a expressão de iNOS e outras enzimas pró-inflamatórias como COX-2 são controladas pelo fator de transcrição NF- κ B (LUQMAN et al., 2010), foram avaliadas a inibição da atividade de NF- κ B estimulado por TNF α 50 ng/mL em células HEK293 transfectadas com plamídeo contendo gene relator *luc* (HEK293/Luciferase). Com valores de CI_{50} de 16,2 µM, 10,8 µM e 9,3 µM; as chalconas preniladas **3OFCh**, **2OICH** e **2OFCh** inibiram significativamente a atividade de NF- κ B ($P < 0,05$), respectivamente (Figura 30). Isso demonstra que o mecanismo de quimioprevenção dessas substâncias pode resultar de uma ação sobre o controle de expressão de iNOS e COX-2.

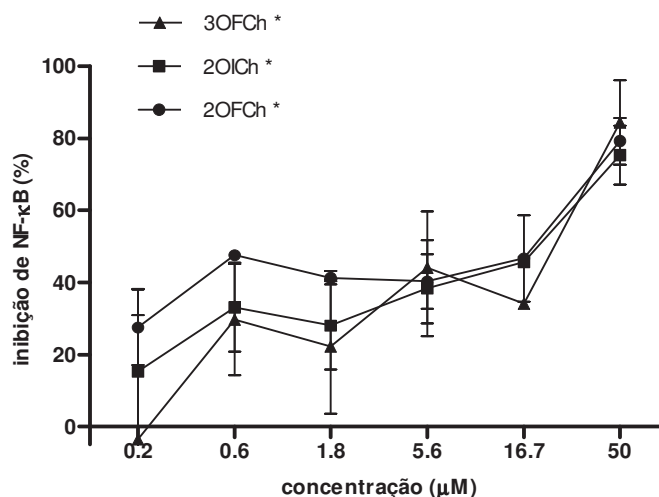


Figura 30: Inibição da atividade de NF-κB ativado por TNFα 50 ng/mL em células HEK293/Luciferase em relação ao controle (DMSO 0,5%), por **3OFCh** (▲), **2OICH** (■) e **2OFCh** (●). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão (M ± SE) de três experimentos independentes; * P < 0,05 em relação ao controle, *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

4.6.2. Estudo do mecanismo de ação da 2OICH

Diversos parâmetros são conhecidos por afetarem a produção de NO em células de macrófagos. Além da disponibilidade de L-arginina, como substrato para a enzima iNOS, e co-fatores específicos, também são necessário os níveis de expressão de mRNA e proteína (SUSCHEK et al., 2004). O aumento da produção de NO por células RAW 264.7 quando estimuladas por LPS acontece devido ao rápido aumento na expressão de iNOS. Para tanto, foi avaliada a expressão iNOS quando células RAW 264.7 foram previamente tratadas por 20 min com 2-*O*-isoprenilchalcona (**2OICH**) e então estimuladas com LPS 1 μg/mL por 20 h ou 6 h (Figura 31). Para verificar efeito anti-inflamatório também foram avaliados os níveis de expressão de COX-2. A expressão de um gene como controle interno (β-actina) foi usada como parâmetro para normalizar os dados e não foram observadas mudanças após tratamento.

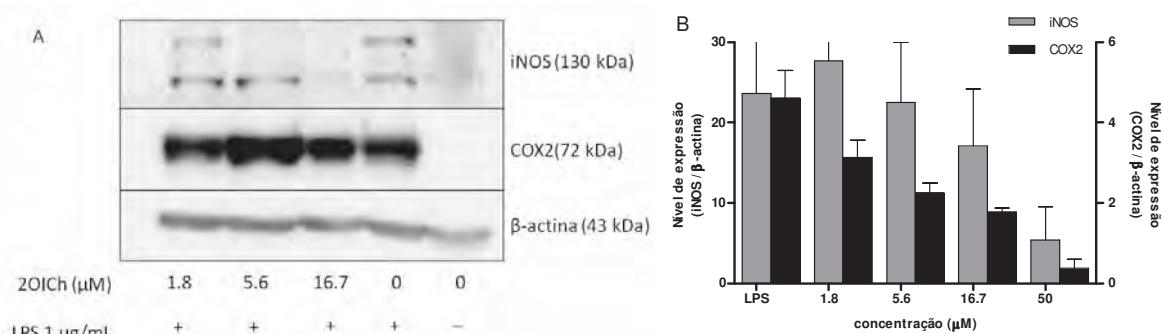


Figura 31: Efeito de **2OICH** nos níveis de expressão de proteínas e níveis de mRNA de iNOS e COX-2. **A:** Efeito inibitório de **2OICH** na expressão de proteína iNOS e COX-2 após 20 h de tratamento. **B:** Efeito inibitório de **2OICH** nos níveis de mRNA de iNOS e COX-2 após 6 h de tratamento. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão ($M \pm SE$) de dois experimentos independentes; * $P < 0,05$ em relação ao estímulo (LPS 1 $\mu\text{g/mL}$), teste de *t-Student*.

Os níveis de expressão de proteína iNOS foram suprimidos pela ação de **2OICH** a 16,7 μM , mas isso não afetou os níveis de COX-2 (Figura 31.A), demonstrando um efeito seletivo sobre a expressão dessa enzima. Foi observada uma inibição de maneira concentração-dependente nos níveis de mRNA para iNOS e COX-2 após 6 h de tratamento, porém sem significado estatístico ($P > 0,05$) (Figura 31.B). **2OICH** inibiu a produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas com LPS e, portanto, representa um promissor candidato para quimioprevenção do câncer e anti-inflamação.

Os inibidores seletivos de COX-2 devem ser avaliados considerando-se o risco de toxicidade cardiovascular apresentado por esse tipo de fármaco (HARRIS et al. 2009). Dessa forma, o efeito anti-inflamatório de **2OICH** parece resultar não de uma ação sobre a enzima COX-2, mas sim sobre iNOS. Contudo, são necessários outros experimentos para se determinar em quais pontos da via de sinalização de NF- κB ocorre a inibição, e substâncias preniladas podem desempenhar um importante papel no tratamento do câncer, atuando como inibidores da transformação de oncoproteínas (BERNDT et al., 2011).

5. CONCLUSÕES

O presente estudo fez uma bioprospecção de substâncias de origem natural e sintética em modelos celulares para atividade citotóxica, genotóxica, indutora de apoptose e quimiopreventiva do câncer.

Os ésteres derivados de ácido gálico e ácido protocatecuico com cadeia lateral longa (acima de 10 carbonos) mediaram uma inibição da proliferação celular de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Os alcalóides guanidínicos, nitensidina A e B, e o bioisómero nitensidina T apresentam citotoxicidade nas concentrações testadas em todos os modelos celulares adotados. Esses dados aprimoram resultados anteriores sobre alcalóides guanidínicos e demonstram que tais alcalóides são promissores para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

O ácido gálico, que não tem efeito citotóxico nas condições testadas, apresenta danos ao DNA em células HepG2 tratadas por 24h nas concentrações de 12 μ M e 40 μ M. Os danos observados provavelmente representam um efeito indutor de apoptose por ácido gálico. O galato de metila não apresenta efeito genotóxico nas concentrações testadas. Entre os alcalóides guanidínicos testados, nitensidina B apresentou indução de apoptose tardia em células HepG2 após tratamento de 24 h. Um estudo sobre os efeitos de nitensidina B no ciclo celular pode esclarecer seu papel na indução de apoptose e um mecanismo de ação mais preciso, como a fragmentação da cromatina e ativação de caspases efetoras.

O ácido gálico e seus ésteres derivados não induzem a enzima NQO1 em células Hepa 1c1c7 na concentração de 50 μ M. Os resultados relatados demonstraram que a substância galato de butila possui atividade inibitória de aromatase *in vitro*. Esta substância pode ser empregada como modelo para futuro desenvolvimento de novos fármacos, que podem resultar em novos agentes quimiopreventivos direcionados para o câncer de mama. Baseado nas respostas intracelulares foi observado que a supressão da atividade de NF- κ B por ésteres de

ácido gálico podem desempenhar um papel quimiopreventivo no câncer. Futuras investigações relacionadas com a atividade dos galatos na via de sinalização do NF- κ B, como a inibição de IKK e inibição da translocação nuclear, podem fornecer novas abordagens sobre suas propriedades quimiopreventivas. O ácido fenâmico pertence à classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e atua diretamente inibindo enzimas COX. Apenas os derivados sintéticos **AB4** e **AB5**, com metoxilas nas posições 4', 5' e 6', apresentam atividade de quimioprevenção de câncer. Seu efeito anti-inflamatório precisa ser caracterizado com outros estudos, como a ação direta sobre enzimas COX. Entre os análogos sintéticos de xantona, apenas benzoxantona (**X9**) possui atividade quimiopreventiva induzindo enzima quinona-redutase. São necessários outros estudos em células mutantes defeituosas no funcionamento do receptor Ah para melhor compreender o perfil de indução (mono- ou bifuncional) e seu mecanismo de ação intracelular, como a ativação do fator de transcrição Nrf2 ou ligação à região ARE. A (+)-carvona e seus análogos não apresentam efeito de quimioprevenção do câncer significativo no presente estudo. São necessários outros estudos para melhor caracterizar seu possível efeito anti-inflamatório e indução de enzimas detoxificadoras. Devido ao elevado potencial tóxico, os alcaloides guanidínicos não são recomendados para a quimioprevenção. Apenas o análogo nitensidina T apresenta indução da enzima quinona-redutase. Porém, esta se mostra citotóxica em células de hepatocarcinoma murino (Hepa 1c1c7) e seu perfil de indução como agente bifuncional, que induz tanto enzimas de fase 1 quanto enzimas de fase 2, a impede de ser um bom agente quimiopreventivo. Modificações moleculares, como a substituição dos grupamentos geranilas por isoprenilas e que mantenham o grupamento isotiocianato essencial para a atividade, poderão contribuir para uma melhor atividade quimiopreventiva pelo mecanismo de indução de enzimas protetoras e redução de sua toxicidade. As chalconas prenildas avaliadas neste trabalho mostraram efeito de quimioprevenção por inibição da produção de NO em células

estimuladas por LPS e inibição do fator de transcrição nuclear NF- κ B ativado. A substância 2-*O*-isoprenilchalcona atua também como indutora de quinona-redutase, podendo ser considerada uma substância pleiotrópica por atuar em mais de um estágio da carcinogênese (início e promoção do tumor). Os dados sugerem que 2-*O*-isoprenilchalcona é capaz de mediar um grande número de atividades biológicas relevantes para a saúde humana.

Uma vez que existe um aumento considerável no número de casos de câncer diagnosticados nos últimos anos, a quimioprevenção exerce um papel fundamental nesse contexto através da descoberta de novas moléculas ativas e auxilia a superar o problema de resistência das células tumorais. Produtos naturais apresentam ser uma fonte de moléculas bioativas para esse propósito e modificações na estrutura molecular, como alquilação de ácidos fenólicos ou prenilação de chalconas e flavonas, são suficientes para aumentar a atividade de uma substância. Apesar de serem encontradas muitas barreiras no avanço da quimioprevenção do câncer, outros estudos podem colaborar para a redução dos casos de câncer.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHED, A.; BOUHLEL, I.; SKANDRANI, I. *et al.* Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. Confirmation by microarray expression profiling. **Chemico-Biological Interactions**, v. 165, n. 1, p. 1–13, 2007.
- AGGARWAL, BHARAT B; SHISHODIA, S.; SANDUR, S. K.; PANDEY, M. K.; SETHI, G. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1605–1621, 2006.
- AJALI, U. Antibacterial activity of *Alchornea cordifolia* stem bark. **Fitoterapia**, v. 71, n. 4, p. 436–438, 2000.
- ALBERTS, D. S.; COLVIN, G. M.; CONNEY, A. H. Prevention of cancer in the next millennium: Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research. **Cancer Research**, v. 59, n. 19, p. 4743–4758, 1999.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. **EMPRAPA: Plantina**, p. 38–39, 1998.
- AN, R.-B.; OH, H.; KIM, Y.-C. Phenolic constituents of galla *Rhois* with hepatoprotective effects on tetracycline- and nitrofurantoin-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 11, p. 2155–2157, 2005.
- ARUOMA, O. I.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1880–1885, 1993.
- ASOLKAR, R. N.; FREEL, K. C.; JENSEN, P. R. *et al.* Arenamides A-C, cytotoxic NF- κ B inhibitors from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 3, p. 396–402, 2009.
- BALDWIN, A. S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 3, p. 241–246, 2001.
- BARKETT, M.; GILMORE, T. D. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6910–6924, 1999.
- BERNDT, N.; HAMILTON, ANDREW D; SEBTI, SAÏD M. Targeting protein prenylation for cancer therapy. **Nature Reviews. Cancer**, v. 11, n. 11, p. 775–791, 2011.
- BISHAYEE, A.; AHMED, S.; BRANKOV, N.; PERLOFF, M. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 16, p. 980–996, 2011.

BLUME-JENSEN, P.; HUNTER, T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 355–365, 2001.

BOLZANI, V. D. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive Guanidine Alkaloids from *Pterogyne nitens*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 11, p. 1683–1688, 1995.

BOLZANI, V. DA S.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M. *et al.* Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 2, p. 181–187, 1999.

BONACORSI, C.; RADDI, M. S. G.; FONSECA, L. M. DA; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Effect of *Byrsonima crassa* and Phenolic Constituents on *Helicobacter pylori*-Induced Neutrophils Oxidative Burst. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 133–141, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 70, n. 2, p. 231–239, 2005.

BRASIER, A. R. The NF-kappaB regulatory network. **Cardiovascular Toxicology**, v. 6, n. 2, p. 111–130, 2006.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2011.

BRUEGGEMEIER, R. W.; RICHARDS, J. A.; JOOMPABUTRA, S.; BHAT, A. S.; WHETSTONE, J. L. Molecular pharmacology of aromatase and its regulation by endogenous and exogenous agents. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 79, n. 1–5, p. 75–84, 2001.

CABRERA, M.; LAVAGGI, M. L.; CROCE, F. *et al.* Identification of chalcones as in vivo liver monofunctional phase II enzymes inducers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 14, p. 5391–5399, 2010.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G. *et al.* Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 3356–3367, 2007.

CAHLIN, C.; GELIN, J.; DELBRO, D. *et al.* Effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on tumor growth in mouse tumor models with and without cancer cachexia related to prostanoids. **Cancer Research**, v. 60, n. 6, p. 1742–1749, 2000.

CALVO, T. R.; LIMA, Z. P.; SILVA, J. S. *et al.* Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 3, p. 451–459, 2007.

CARVALHO, C. C. C. R. DE; FONSECA, M. M. R. DA. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 413–422, 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPq, 1994.

CHANG, L C; GERHÄUSER, C; SONG, L. *et al.* Activity-guided isolation of constituents of *Tephrosia purpurea* with the potential to induce the phase II enzyme, quinone reductase. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 869–873, 1997.

CHANG, Y.-L.; LEE, H.-J.; LIU, S.-T. *et al.* Different roles of p53 in the regulation of DNA damage caused by 1,2-heteroannulated anthraquinones and doxorubicin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 12, p. 1720–1728, 2011.

COLETTI, J.; BONDUELLE, G. M.; IWAKIRI, S. Avaliação de defeitos no processo de fabricação de lamelas para pisos de madeira engenheirados com uso de ferramentas de controle de qualidade. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 135–140, 2010.

CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARINI, A. S. *et al.* Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 825–827, 2003.

CRIVOS, M.; MARTINEZ, M.; POCHETTINO, M. *et al.* Pathways as “signatures in landscape”: towards an ethnography of mobility among the Mbya-Guarani (Northeastern Argentina). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 1, p. 2, 2007.

CUENDET, M.; OTEHAM, C. P.; MOON, R. C.; PEZZUTO, JOHN M. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 460–463, 2006.

CUZZOCREA, S.; RILEY, D. P.; CAPUTI, A. P.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 135–159, 2001.

DIETZ, B. M.; KANG, Y.-H.; LIU, G. *et al.* Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* Inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, n. 8, p. 1296–1305, 2005.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 5, p. 911–914, 1999.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; MASSIAH, M. A.; BOZAK, R. E.; HICKS, R. J.; TALALAY, P. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect

against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 6, p. 3404–3409, 2001.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; HOLTZCLAW, W. D.; COLE, R. N. *et al.* Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 18, p. 11908–11913, 2002.

ENDRINGER, D. C.; GUIMARÃES, K. G.; KONDRATYUK, T. P.; PEZZUTO, JOHN M; BRAGA, F. C. Selective inhibition of aromatase by a dihydroisocoumarin from *Xyris pterygoblephara*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 6, p. 1082–1084, 2008.

FAHEY, J. W.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; STEPHENSON, K. K.; TALALAY, PAUL. The “Prochaska” Microtiter Plate Bioassay for Inducers of NQO1. **Quinones and Quinone Enzymes, Part B**. [S.l.]: Academic Press, 2004. v. Volume 382p. 243–258.

FAHEY, J. W.; STEPHENSON, K. K. Pinostrobin from Honey and Thai Ginger (*Boesenbergia pandurata*): A Potent Flavonoid Inducer of Mammalian Phase 2 Chemoprotective and Antioxidant Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7472–7476, 2002.

FAVIA, A. D.; CAVALLI, A.; MASETTI, M.; CAROTTI, A.; RECANATINI, M. Three-dimensional model of the human aromatase enzyme and density functional parameterization of the iron-containing protoporphyrin IX for a molecular dynamics study of heme-cysteinato cytochromes. **Proteins**, v. 62, n. 4, p. 1074–1087, 2006.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, v. 127, p. 2893–2917, 2010.

FERNANDES, D. C.; REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C. R. *et al.* Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 723–726, 2008.

FIUZA, S. M.; GOMES, C.; TEIXEIRA, L. J. *et al.* Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 3581–3589, 2004.

FOSSLIEN, E. Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 31, n. 4, p. 325–348, 2001.

FRANÇA, E. J.; NADAI FERNANDES, E. A. DE; BACCHI, M. A.; RODRIGUES, R R; VERBURG, T. G. Inorganic chemical composition of native trees of the Atlantic Forest. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 102, n. 1–3, p. 349–357, 2005.

GANSSER, D.; SPITELLER, G. Aromatase inhibitors from *Urtica dioica* roots. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 138–140, 1995.

GARCIA, E. S. **Fitoterápicos**. Campinas, SP, André Tosello, 1996, p. 17. Apud SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL E. P.; GOSMANN, G. MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, RS, Ed. da UFRGS, 2002, 833p.

GARCÍA-RIVERA, D.; DELGADO, R.; BOUGARNE, N.; HAEGEMAN, G.; BERGHE, W. V. Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of *Mangifera indica* L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 305, n. 1, p. 21–31, 2011.

GAZZANEO, L.; LUCENA, R. DE; ALBUQUERQUE, U. DE. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, n. 1, p. 9, 2005.

GERHÄUSER, C; ALT, A. P.; KLIMO, K; *et al.* Isolation and potential cancer chemopreventive activities of phenolic compounds of beer. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, n. 3, p. 369–377, 2002.

GERHÄUSER, C; YOU, M.; LIU, J. *et al.* Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. **Cancer Research**, v. 57, n. 2, p. 272–278, 1997.

GERHÄUSER, CLARISSA; KLIMO, KARIN; HEISS, E. *et al.* Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523-524, p. 163–172, 2003.

GERRITSEN, M. E.; CARLEY, W. W.; RANGES, G. E. *et al.* Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. **The American Journal of Pathology**, v. 147, n. 2, p. 278–292, 1995.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 225–260, 1998.

GILMORE, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6680–6684, 2006.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5684, p. 626–629, 2004.

GREENWALD, P.; KELLOFF, G.; BURCH-WITMAN, C.; KRAMER, B. S. Chemoprevention. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 45, n. 1, p. 31–49, 1995.

GROSS; DALEBOUT; GRUBB; ABEL. Functional detection of chemopreventive

glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 159, n. 2, p. 265–272, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARRIS, R. E. Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. **Inflammopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 55–67, 2009.

HASHIMOTO, Y.; SHIMADA, Y.; ITAMI, A. *et al.* Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 39, n. 15, p. 2239–2246, 2003.

HIBBS, J. B., Jr. Synthesis of nitric oxide from l-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. **Research in Immunology**, v. 142, n. 7, p. 565–569; discussion 596–598, 1991.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H. *et al.* *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 207–214, 2006.

HONDA, T.; FINLAY, H. J.; GRIBBLE, G. W.; SUH, NANJOO; SPORN, MICHAEL B. New enone derivatives of oleanolic acid and ursolic acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 13, p. 1623–1628, 1997.

HONG, J.; YOKOMAKURA, A.; NAKANO, Y. *et al.* Induction of Nitric Oxide Production by the Cytostatic Macrolide Apicularen A [2,4-Heptadienamide, N-[(1E)-3-[(3S,5R,7R,9S)-3,4,5,6,7,8,9,10-octahydro-7,14-dihydroxy-1-oxo-5,9-epoxy-1H-2-benzoxacyclododecin-3-yl]-1 propenyl]-, (2Z,4Z)-(9CI)] and Possible Role of Nitric Oxide in Apicularen A-Induced Apoptosis in RAW 264.7 Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 3, p. 968–977, 2005.

HSIEH, T.-J.; LIU, T.-Z.; CHIA, Y.-C. *et al.* Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis* (Meliaceae) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 42, n. 5, p. 843–850, 2004.

HSU, H.-F.; HOUNG, J.-Y.; CHANG, C.-L. *et al.* Antioxidant activity, cytotoxicity, and DNA information of *Glossogyne tenuifolia*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 6117–6125, 2005.

HU, X.; XUAN, Y. Bypassing cancer drug resistance by activating multiple death pathways--a proposal from the study of circumventing cancer drug resistance by induction of necroptosis. **Cancer Letters**, v. 259, n. 2, p. 127–137, 2008.

ICHINOE, M.; MIKAMI, T.; SHIRAISHI, H.; OKAYASU, I. High microvascular density is correlated with high VEGF, iNOS and COX-2 expression in penetrating growth-type early gastric carcinomas. **Histopathology**, v. 45, n. 6, p. 612–618, 2004.

JAGAN, S.; RAMAKRISHNAN, G.; ANANDAKUMAR, P.; KAMARAJ, S.; DEVAKI, T. Antiproliferative potential of gallic acid against diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinoma. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 319, n. 1-2, p. 51–59, 2008.

JEONG, H. J.; SHIN, Y. G.; KIM, I. H.; PEZZUTO, J. M. Inhibition of aromatase activity by flavonoids. **Archives of Pharmacal Research**, v. 22, n. 3, p. 309–312, 1999.

JEONG, J. T.; MOON, J.-H.; PARK, K.-H.; SHIN, C. S. Isolation and characterization of a new compound from *Prunus mume* fruit that inhibits cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2123–2128, 2006.

JOLY, C. A.; RODRIGUES, RICARDO R; METZGER, J. P. *et al.* Ecology. Biodiversity conservation research, training, and policy in São Paulo. **Science**, v. 328, n. 5984, p. 1358–1359, 2010.

KALGUTKAR, A. S.; CREWS, B. C.; ROWLINSON, S. W. *et al.* Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 2, p. 925–930, 2000.

KANG, Y.-H.; PEZZUTO, JOHN M. Induction of quinone reductase as a primary screen for natural product anticarcinogens. **Methods in Enzymology**, v. 382, p. 380–414, 2004.

KARIN, MICHAEL; YAMAMOTO, YUMI; WANG, Q. M. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 3, n. 1, p. 17–26, 2004.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 326, n. 1-2, p. 27–45, 2002.

KIM, H. J.; HAWKE, N.; BALDWIN, A. S. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 5, p. 738–747, 2006.

KIM, Y. H.; KIM, J.; PARK, H.; KIM, H. P. Anti-inflammatory activity of the synthetic chalcone derivatives: inhibition of inducible nitric oxide synthase-catalyzed nitric oxide production from lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1450–1455, 2007.

KIRILLOVA, I.; CHAISSON, M.; FAUSTO, N. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. **Cell Growth &**

Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research, v. 10, n. 12, p. 819–828, 1999.

KO, H.-H.; TSAO, L.-T.; YU, K.-L. *et al.* Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives. the potent inhibition of chemical mediators release. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 105–111, 2003.

KONDRATYUK, T. P.; PARK, E.-J.; MARLER, L. E. *et al.* Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 8, p. 1249–1265, 2011.

KOPP, E.; GHOSH, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 265, n. 5174, p. 956–959, 1994.

KROES, B. H.; BERG, A. J. VAN DEN; QUARLES VAN UFFORD, H. C.; DIJK, H. VAN; LABADIE, R. P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Medica**, v. 58, n. 6, p. 499–504, 1992.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K.; NIHEI, A. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1072–1076, 2004.

KUNDU, J. K.; SURH, Y.-J. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutation Research**, v. 659, n. 1-2, p. 15–30, 2008.

KURIBAYASHI, K.; MAYES, P. A.; EL-DEIRY, W. S. What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, n. 7, p. 763–765, 2006.

LAKHANI, S. A.; MASUD, A.; KUIDA, K. *et al.* Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5762, p. 847–851, 2006.

LANAS, A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase inhibition in the gastrointestinal tract: a trip from peptic ulcer to colon cancer. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 338, n. 2, p. 96–106, 2009.

LEE, J.-S.; SURH, Y.-J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 224, n. 2, p. 171–184, 2005.

LINARES, M.; PELLEGGATTI, A.; ROUSSEL, C. Theoretical study of the intramolecular CH/[pi] interaction effect on rotation energy barriers in 1-pentene, 2,2'-diisopropyl biphenyl and some amino and nitro derivatives. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 680, n. 1-3, p. 169–180, 2004.

LIU, K.-C.; HO, H.-C.; HUANG, A.-C. *et al.* Gallic acid provokes DNA damage and suppresses DNA repair gene expression in human prostate cancer PC-3 cells. **Environmental toxicology**, 2011.

LOCATELLI, C.; ROSSO, R.; SANTOS-SILVA, M. C. *et al.* Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 3791–3799, 2008.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2000a.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2000b. v. 2.

LUQMAN, S.; PEZZUTO, JOHN M. NF κ B: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. **Phytotherapy Research: PTR**, v. 24, n. 7, p. 949–963, 2010.

MAITI, A.; CUENDET, M.; CROY, V. L. *et al.* Synthesis and biological evaluation of (+/-)-abyssinone II and its analogues as aromatase inhibitors for chemoprevention of breast cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 2799–2806, 2007.

MÄNNISTÖ, S. Diet, Body Size and Risk of Breast Cancer – a case control study. 109f. Dissertação. Department of Applied Chemistry and Microbiology, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Helsinki: National Public Health Institute, 1999.

MASTRO, L.; CLAVAREZZA, M.; VENTURINI, M. Reducing the risk of distant metastases in breast cancer patients: role of aromatase inhibitors. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 8, p. 681–687, 2007.

MATSUDA, H.; KAGEURA, T.; MORIKAWA, T. *et al.* Effects of stilbene constituents from rhubarb on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 323–327, 2000.

MCGEADY, P.; WANSLEY, D. L.; LOGAN, D. A. Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 7, p. 953–955, 2002.

MEEUWEN, J. A. VAN; KORTHAGEN, N.; JONG, P. C. DE; PIERSMA, A. H.; BERG, M. VAN DEN. (Anti)estrogenic effects of phytochemicals on human primary mammary fibroblasts, MCF-7 cells and their co-culture. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 221, n. 3, p. 372–383, 2007.

MEEUWEN, J. A. VAN; NIJMEIJER, S.; MUTARAPAT, T. *et al.* Aromatase inhibition by synthetic lactones and flavonoids in human placental microsomes and breast fibroblasts--a comparative study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 228, n. 3, p. 269–276, 2008.

MELLITIS, K. H.; HAY, R. T.; GOODBOURN, S. Proteolytic degradation of MAD3 (IkBa) and enhanced processing of the NF-kB precursor p105 are obligatory steps in the activation of

NF- κ B. **Nucleic acids research**, v. 21, p. 5059–5066, 1993.

MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMÜLLER, S.; WU, X.-J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 329–340, 2004.

MEYSKENS, F. L., Jr; CURT, G. A.; BRENNER, D. E. *et al.* Regulatory approval of cancer risk-reducing (chemopreventive) drugs: moving what we have learned into the clinic. **Cancer Prevention Research**, v. 4, n. 3, p. 311–323, 2011.

MIDDLETON, E., Jr; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. **Mutation Research**, v. 512, n. 2-3, p. 135–153, 2002.

MILLER, S. C.; HUANG, R.; SAKAMURU, S. *et al.* Identification of known drugs that act as inhibitors of NF- κ B signaling and their mechanism of action. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 9, p. 1272–1280, 2010.

MILLER, M. S.; MILLER, L. D. RAS Mutations and Oncogenesis: Not all RAS Mutations are Created Equally. **Frontiers in genetics**, v. 2, p. 100, 2011.

MIRANDA, C. L.; APONSO, G. L.; STEVENS, J. F.; DEINZER, M. L.; BUHLER, D. R. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. **Cancer Letters**, v. 149, n. 1-2, p. 21–29, 2000.

MOLLER, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96 Suppl 1, p. 1–42, 2005.

MORIARTY, R. M.; GRUBJESIC, S.; SURVE, B. C. *et al.* Synthesis of Abyssinone II and related compounds as potential chemopreventive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 263–267, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 121, n. 11, p. 2357–2363, 2007.

MURASE, T.; KUME, N.; HASE, T. *et al.* Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, n. 6, p. 1412–1420, 1999.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. DA; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.

NA, H.-J.; LEE, G.; OH, H.-Y. *et al.* 4-O-Methylgallic acid suppresses inflammation-associated gene expression by inhibition of redox-based NF-kappaB activation. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 10, p. 1597–1608, 2006.

NAKANISHI, C.; TOI, M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 4, p. 297–309, 2005.

NASCIMENTO, W. M. O.; CRUZ, E. D.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Qualidade sanitária e germinação de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, p. 149–153, 2006.

NASSIF, S. M. L.; PEREZ, S. C. J. G. A. Efeitos da temperatura na germinação de sementes de amendoim-do-campo (*Pterogyne nitens* Tul.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 2000.

NASTASIJEVIĆ, B.; LAZAREVIĆ-PAŠTI, T.; DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S. *et al.* Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of *Gentiana lutea* extracts. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NJAR, V. C.; BRODIE, A. M. Comprehensive pharmacology and clinical efficacy of aromatase inhibitors. **Drugs**, v. 58, n. 2, p. 233–255, 1999.

NOGUEIRA, M. E. I.; PASSONI, M. H.; BISO, F. I. *et al.* Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA**, v. 20, n. 3, p. 361–366, 2006.

OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R. *et al.* Chemical carcinogenesis. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The global burden of disease: 2004 update**. Genebra, Suíça: WHO Press, 2008, 116p.

OSKOEIAN, E.; ABDULLAH, N.; AHMAD, S. *et al.* Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas* L. Kernel Meal Extract. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 5955–5970, 2011.

OYAMA, T.; YASUI, Y.; SUGIE, S.; TANAKA, T. Preclinical Assays for Identifying Cancer Chemopreventive Phytochemicals. **Scholarly Research Exchange**, v. 2009, p. 1-15, 2009.

PÅLSSON-MCDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 153–162, 2004.

PARK, E.-J.; CHEENPRACHA, S.; CHANG, LENG CHEE; KONDRATYUK, T. P.; PEZZUTO, JOHN M. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by 4-[(2'-O-acetyl- α -L-Rhamnosyloxy)Benzyl]Isothiocyanate from *Moringa oleifera*. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n. 6, p. 971–982, 2011.

PETRÔNIO, M. S.; REGASINI, LUIS OCTAVIO; PAULETTI, P. M. *et al.* **Potential antimalarial and antioxidant activities of gallic acid and its semi-synthetic esters**. São Paulo, SP, Brasil: [s.n.], 2007

PEZZUTO, J. M.; KOSMEDER, J. W.; PARK, E. J. *et al.* **Chapter 1: Characterization of Natural Product Chemopreventive Agents**. In.: KELLOFF, G. J.; HAWK, E. T.; SIGMAN, C. C. (Ed.). **Cancer Chemoprevention, Volume 2: Strategies for Cancer Chemoprevention**. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc., 2005, v. 2, cap. 1, p. 3-.

PHILIPS, M. R.; COX, A. D. Geranylgeranyltransferase I as a target for anti-cancer drugs. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1223–1225, 2007.

PINTO, M. M. M.; SOUSA, M. E.; NASCIMENTO, M. S. J. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 21, p. 2517–2538, 2005.

POUGET, C.; FAGNERE, C.; BASLY, J.-P. *et al.* Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 3, p. 286–291, 2002.

PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B. Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. **Analytical Biochemistry**, v. 169, n. 2, p. 328–336, 1988.

PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B.; TALALAY, P. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 6, p. 2394–2398, 1992.

RAMESHA, B. T.; GERTSCH, J.; RAVIKANTH, G. *et al.* Biodiversity and chemodiversity: future perspectives in bioprospecting. **Current drug targets**, v. 12, n. 11, p. 1515–1530, 2011.

RAO, K.; INDAP, M.; RADHIKA, S.; MOTIWALE, L. Anticancer activity of phenolic antioxidants against breast cancer cells and a spontaneous mammary tumor. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 4, p. 470, 2006.

RAO, Y. K.; FANG, S.-H.; HSIEH, S.-C.; YEH, T.-H.; TZENG, Y.-M. The constituents of

Anisomeles indica and their anti-inflammatory activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 292–296, 2009.

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Immunomodulatory activity of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene, and perillic acid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 25, n. 2, p. 285–294, 2003.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 1, p. 1–13, 2003.

REGASINI, LUIS OCTÁVIO; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S. *et al.* Cytotoxic Guanidine Alkaloids from *Pterogyne nitens*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 3, p. 473–476, 2009.

REGASINI, LUIS OCTÁVIO; VELLOSA, JOSÉ CARLOS REBUGLIO; SILVA, D. H. S. *et al.* Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1739–1744, 2008.

ROCHA, A. B. DA; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 364–369, 2001.

SALIS, S. M.; ASSIS, M. A.; CRISPIM, S. M. A.; CASAGRANDE, J. C. Distribuição e abundância de espécies arbóreas em cerradões no Pantanal, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 3, p. 339–352, 2006.

SAMUELSSON, G.; BOHLIN, L. **Drugs of Natural Origin: A Treatise of Pharmacognosy**. 6. ed. Stockholm, Sweden: Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press, 2009.

SATOH, K.; NONAKA, R.; ISHIKAWA, F.; OGATA, A.; NAGAI, F. In vitro screening assay for detecting aromatase activity using rat ovarian microsomes and estrone ELISA. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 357–362, 2008.

SAVI, L. A.; LEAL, P. C.; VIEIRA, T. O. *et al.* Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittel-Forschung**, v. 55, n. 1, p. 66–75, 2005.

SAXENA, H. O.; FARIDI, U.; SRIVASTAVA, S. *et al.* Gallic acid-based indanone derivatives as anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 14, p. 3914–3918, 2008.

SCARANO, F. R. Perspectives on biodiversity science in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 4, p. 439–447, 2007.

SCHOTTENFELD, D.; BEEBE-DIMMER, J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 56, n. 2, p. 69–83, 2006.

SCOLASTICI, C.; ALVES DE LIMA, R. O.; BARBISAN, L. F. *et al.* Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 2, p. 510–514, 2008.

SEO, J. Y.; LIM, S. S.; KIM, J. R. *et al.* Nrf2-mediated induction of detoxifying enzymes by alantolactone present in *Inula helenium*. **Phytotherapy Research: PTR**, v. 22, n. 11, p. 1500–1505, 2008.

SÉRALINI, G.; MOSLEMI, S. Aromatase inhibitors: past, present and future. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, n. 1-2, p. 117–131, 2001.

SETZER, W. N.; SHEN, X.; BATES, R. B. *et al.* A Phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 195–198, 2000.

SHEHATA, M. F. Rel/Nuclear factor-kappa B apoptosis pathways in human cervical cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 5, n. 1, p. 10, 2005.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SINGH, S.; DARNAY, B. G.; AGGARWAL, B. B. Site-specific tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha negatively regulates its inducible phosphorylation and degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 49, p. 31049–31054, 1996.

SINGH, S.; GUPTA, A. K. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 67, n. 6, p. 1211–1224, 2011.

SIQUEIRA, A. C. M. F.; NOGUEIRA, J. C. B. Essências brasileiras e sua conservação genética no Instituto Florestal de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, v. 4, p. 1187, 1992.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.

SONG, L. L.; KOSMEDER, J. W.; LEE, S. K. *et al.* Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. **Cancer Research**, v. 59, n. 3, p. 578–585, 1999.

SPORN, M B; SUH, N. Chemoprevention of cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 525–530, 2000.

SPORN, MICHAEL B. Phytochemicals as Scaffolds for New Drug Synthesis and Discovery. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 12, p. 81, 2011.

STOCKERT, J. C.; COLMAN, O. D.; CAÑETE, M. Fluorescence reaction of leukocyte granules by morin. **Acta Histochemica. Supplementband**, v. 31, p. 243–252, 1985.

STRESSER, D. M.; TURNER, S. D.; MCNAMARA, J. *et al.* A high-throughput screen to identify inhibitors of aromatase (CYP19). **Analytical Biochemistry**, v. 284, n. 2, p. 427–430, 2000.

STUEHR, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 217–230, 1999.

SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Cytotoxic molecules from natural sources: tapping the Brazilian biodiversity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 367–375, 2006.

SUN, J.; QIAN, Y.; HAMILTON, A D; SEBTI, S M. Both farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors are required for inhibition of oncogenic K-Ras prenylation but each alone is sufficient to suppress human tumor growth in nude mouse xenografts. **Oncogene**, v. 16, n. 11, p. 1467–1473, 1998.

SUSCHEK, C. V.; SCHNORR, O.; KOLB-BACHOFEN, V. The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 7, p. 763–775, 2004.

TALALAY, P; LONG, M. J. DE; PROCHASKA, H. J. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 21, p. 8261–8265, 1988.

TAKADA, Y.; AGGARWAL, B. B. Flavopiridol inhibits NF-kappaB activation induced by various carcinogens and inflammatory agents through inhibition of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclin D1, cyclooxygenase-2, and matrix metalloprotease-9. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 6, p. 4750–4759, 2004.

TENDLER, D. S.; BAO, C.; WANG, T. *et al.* Intersection of interferon and hypoxia signal transduction pathways in nitric oxide-induced tumor apoptosis. **Cancer Research**, v. 61, n. 9, p. 3682–3688, 2001.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000.

TIEDEMANN, R. E.; SCHMIDT, J.; KEATS, J. J. *et al.* Identification of a potent natural triterpenoid inhibitor of proteasome chymotrypsin-like activity and NF-kappaB with antimyeloma activity in vitro and in vivo. **Blood**, v. 113, n. 17, p. 4027–4037, 2009.

TONA, L.; KAMBU, K.; NGIMBI, N.; CIMANGA, K.; VLIETINCK, A. J. Antiamoebic and

phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 57–65, 1998.

TONIN, G. A.; GATTI, A. B.; CARELLI, B. P.; PEREZ, S. C. J. G. A. Influência da temperatura de condicionamento osmótico na viabilidade e no vigor de sementes de *Pterogyne nitens*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 35–43, 2005.

TSAO, C.-C.; SHEN, Y.-C.; SU, C.-R. *et al.* New diterpenoids and the bioactivity of *Erythrophleum fordii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9867–9870, 2008.

URREA-BULLA, A.; SUÁREZ M, M.; MORENO-MURILLO, B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3–4, p. 392–394, 2004.

VARANDA, E. A. Atividade Mutagênica de Plantas Medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v. 27, n. 1, p. 1–7, 2006.

VELLOSA, J. C. R. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase**. 2005, [s.n.]. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

VOIGT, W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. **Methods in Molecular Medicine**, v. 110, p. 39–48, 2005.

WANG, C. Y.; CUSACK, J. C., Jr; LIU, R.; BALDWIN, A. S., Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. **Nature Medicine**, v. 5, n. 4, p. 412–417, 1999.

WU, J.; LI, J.; CAI, Y. *et al.* Evaluation and Discovery of novel synthetic chalcone derivatives as anti-inflammatory agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2011.

WU, L. T.; CHU, C. C.; CHUNG, J. G. *et al.* Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 556, n. 1-2, p. 75–82, 2004.

XIMENES, V. F.; LOPES, M. G.; PETRÔNIO, M. S. *et al.* Inhibitory Effect of Gallic Acid and Its Esters on 2,2'-Azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-Induced Hemolysis and Depletion of Intracellular Glutathione in Erythrocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5355–5362, 2010.

XU, W.; LIU, L. Z.; LOIZIDOU, M.; AHMED, M.; CHARLES, I. G. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Research**, v. 12, n. 5-6, p. 311–320, 2002.

YAMAMOTO, Y; GAYNOR, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**,

v. 107, n. 2, p. 135–142, 2001.

YANG, J.-H.; KONDRATYUK, T. P.; JERMIHOV, K. C. *et al.* Bioactive Compounds from the Fern *Lepisorus contortus*. **Journal of natural products**, v. 74, n. 2, p. 129-136, 2011.

YANG, J.; LIU, R. H. Induction of phase II enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by grape extracts and selected phytochemicals. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 898–904, 2009.

YANG, V. W.; SHIELDS, J. M.; HAMILTON, S. R. *et al.* Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis. **Cancer Research**, v. 58, n. 8, p. 1750–1753, 1998.

ZANDI, E.; KARIN, M. Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 7, p. 4547–4551, 1999.

ZHA, S.; YEGNASUBRAMANIAN, V.; NELSON, W. G.; ISAACS, W. B.; MARZO, A. M. DE. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. **Cancer Letters**, v. 215, n. 1, p. 1–20, 2004.

ZHAO, L.; TAO, J.-Y.; ZHANG, S.-L. *et al.* N-butanol Extract from *Melilotus Suaveolens* Ledeb Affects Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines and Mediators. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 7, n. 1, p. 97–106, 2010.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Effects of carvone compounds on glutathione S-transferase activity in A/J mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 751–755, 1992.

ZHONG, H.; VOLL, R. E.; GHOSH, S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. **Molecular Cell**, v. 1, n. 5, p. 661–671, 1998.

CAPÍTULO II – TRABALHOS PUBLICADOS E RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

MORAIS, M. C. C. ; LUQMAN, S. ; KONDRATYUK, T. P. ; PETRONIO, M. S. ; REGASINI, L. O. ; SILVA, D. H. S. ; BOLZANI, V. S. ; SOARES, C.P. ; PEZZUTO, J. M. Suppression of TNF- α ; induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Natural Product Research**, v. 24, p. 1758, 2010.

MORAIS, M. C. C.; MARLER, L.; KONDRATYUK, T. P.; PETRONIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; PEZZUTO, J. M.; SOARES, C. P. Aromatase inhibition by compounds from *Pterogyne nitens* (FABACEAE) and semi-synthetic derivatives. In: **The 5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry**, Ouro Preto, MG, Brasil, 2010.

MORAIS, M. C. C.; TAVARES, R.S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; SOARES, C.P. Comparison of two cytotoxicity assays employing guanidine alkaloids and phenolic compounds from *Pterogyne nitens* (Fabaceae). In: **XXI Simpósio de Plantas Medicinais Brasileiras**, João Pessoa, PB, Brasil, 2010.

MORAIS, M. C. C.; MARLER, L.; LUQMAN, S.; KONDRATYUK, T. P.; PETRONIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; SOARES, C.P.; PEZZUTO, J. M. Chemopreventive potential of natural products isolated from *Alchornea glandulosa*, *Pterogyne nitens* and its semi-synthetic analogs. In: **7th International Congress of Pharmaceutical Sciences**, 2009, Ribeirão Preto, SP.

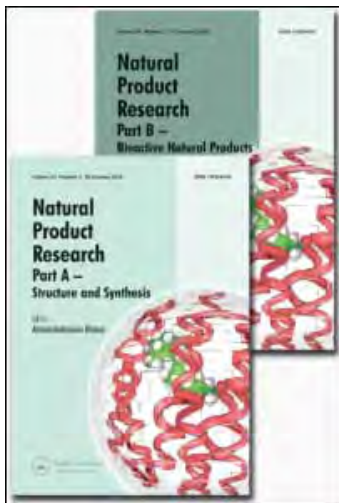
This article was downloaded by: [UNESP]

On: 19 November 2010

Access details: Access Details: [subscription number 919920837]

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Natural Product Research

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713398545>

Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention

Mauro C. C. Morais^{ab}; Suaib Luqman^{ac}; Tamara P. Kondratyuk^d; Maicon S. Petronio^d; Luis O. Regasini^d;

Dulce H. S. Silva^d; Vanderlan S. Bolzani^d; Christiane P. Soares^c; John M. Pezzuto^a

^a College of Pharmacy, University of Hawaii, Hawaii, Hilo 96720, USA ^b Department of Clinical Analyses, Cytology and Cellular Biology Laboratory, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University - UNESP, Araraquara-SP, Brazil ^c IUSSTF Fellow, Genetic Resources and Biotechnology Division, Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Council of Scientific and Industrial Research), Lucknow 226015, India ^d Department of Organic Chemistry, NuBBE-Nucleus of Bioassays, Biosynthesis and Ecophysiology of Natural Products, Institute of Chemistry, São Paulo State University - UNESP, 14801-970 CP 355, Araraquara-SP, Brazil

First published on: 21 April 2010

To cite this Article Morais, Mauro C. C. , Luqman, Suaib , Kondratyuk, Tamara P. , Petronio, Maicon S. , Regasini, Luis O. , Silva, Dulce H. S. , Bolzani, Vanderlan S. , Soares, Christiane P. and Pezzuto, John M.(2010) 'Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention', Natural Product Research, 24: 18, 1758 — 1765, First published on: 21 April 2010 (iFirst)

To link to this Article: DOI: 10.1080/14786410903335232

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/14786410903335232>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention

Mauro C.C. Morais^{ab†}, Suaib Luqman^{ac†}, Tamara P. Kondratyuk^a,
Maicon S. Petronio^d, Luis O. Regasini^d, Dulce H.S. Silva^d, Vanderlan S. Bolzani^d,
Christiane P. Soares^c and John M. Pezzuto^{a*}

^aCollege of Pharmacy, University of Hawaii, 34 Rainbow Drive, Hawaii, Hilo 96720, USA;

^bDepartment of Clinical Analyses, Cytology and Cellular Biology Laboratory, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University – UNESP, Rua Expedicionários do Brasil, n.1621, Centro, 14801-902, Araraquara-SP, Brazil; ^cIUSSTF Fellow, Genetic Resources and Biotechnology Division, Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Council of Scientific and Industrial Research), Lucknow 226015, India; ^dDepartment of Organic Chemistry, NuBBE-Nucleus of Bioassays, Biosynthesis and Ecophysiology of Natural Products, Institute of Chemistry, São Paulo State University – UNESP, Rua Prof. Francisco Degni, SN, Bairro Quitandinha, 14801-970 CP 355, Araraquara-SP, Brazil

(Received 14 September 2009; final version received 8 October 2009)

Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid), found in many plants either in free-form or part of tannins, is known to possess anti-microbial, antioxidant and cytotoxic properties. NF κ B regulates the expression of several genes involved in carcinogenesis. These include anti-apoptotic, cytokines and cell cycle-regulatory genes. It is well established that the transcriptional factor NF κ B is deregulated in many forms of cancer. Thus, agents that can suppress NF κ B activation have the potential of suppressing carcinogenesis. In the present investigation, gallic acid was isolated from *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae) and eight esters were synthesised. These compounds were evaluated against TNF- α -induced NF κ B activation with stably transfected 293/NF κ B-Luc human embryonic kidney cells. Gallates with IC₅₀ values in a range of 10–56 μ M mediated inhibitory activity higher than gallic acid (IC₅₀ 76.0 $\pm$ 4.9 μ M). In addition to inhibiting NF κ B activation, gallic acid mediated a modest cytotoxic effect, and some of the gallates affected cell viability at the tested concentrations. Based on these results, suppression of NF κ B activation by gallate esters could play a chemopreventive role in carcinogenesis.

Keywords: gallic acid; NF κ B pathway; cytotoxicity; 293/NF κ B cells; *Alchornea glandulosa*; cancer chemoprevention

1. Introduction

Phenolic acids are natural products which possess a wide spectrum of biological activity (Nazaruk, Czechowska, Markiewicz, & Borawska, 2008).

*Corresponding author. Email: pezzuto@hawaii.edu

[†]Both authors contributed equally to this paper.

Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid), a secondary metabolite accumulates in nearly all plants, either in free form or part of tannins, is known to possess antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxic properties (Aruoma, Murcia, Butler, & Halliwell, 1993; Fiuza et al., 2004; Kratz et al., 2008; Kroes, van den Berg, van Ufford, van Dijk, & Labadie, 1992; Kubo, Fujita, K. Nihei & A. Nihei, 2004). It is commonly used in the pharmaceutical industry as salts and esters. Some ointments used to treat psoriasis and external hemorrhoids contain gallic acid (García de Hombre & Pérez Peñate, 2006; Hatton, 2000). Gallic acid has two major functional groups, hydroxyls and a carboxylic acid, which can yield numerous esters and salt derivatives. Some galloyl compounds are used as antioxidants in food and can exhibit important roles in prevention of inflammatory and atherosclerosis responses by blocking activation of NF κ B (Murase et al., 1999).

NF κ B consists of homo and heterodimeric protein complexes acting as a transcription factor, and is found in many animal cell types. It is involved in regulation of immune response and inflammation, cell lineage development, cell apoptosis, cell-cycle progression and oncogenesis due to stimuli such as stress, cytokines, free radicals, ultraviolet irradiation, oxidised LDL and microbial antigens, and has been shown to regulate the expression of several genes, including bcl-2, bcl-xl, cIAP, survivin, TRAF, COX-2, MMP-9, iNOS and cell cycle-regulatory components, whose products are involved in tumourigenesis (Aggarwal, Sethi, Nair, & Ichikawa, 2006; Chen, Castranova, & Shi, 2001; Melisi & Chiao, 2007; Thanos & Maniatis, 1995). Most carcinogens, proinflammatory cytokines such as TNF and IL-1, or tumour promoters, including cigarette smoke, phorbol esters, okadaic acid, H₂O₂, have been shown to activate NF κ B, and resulting tumours have misregulated NF κ B activity (Baldwin, 2001). It is now well established that aberrant regulation of NF κ B, and the signalling pathways that control its activity, are involved in cancer development and progression, as well as in drug resistance, especially during chemotherapy and radiotherapy (Inoue, Gohda, Akiyama, & Semba, 2007). Blocking NF κ B can cause tumour cells to stop proliferating, undergo apoptosis, or to become more sensitive to the action of antitumour agents (Frydrych & Mlejnek, 2008; Yamamoto & Gaynor, 2001). Thus, agents that can suppress NF κ B activation have the potential to suppress carcinogenesis or tumourigenesis.

In the present investigation, gallic acid was isolated from *Alchornea glandulosa* Poepp and Endl. (Euphorbiaceae), and eight semi-synthetic esters were prepared. All the compounds were evaluated for cytotoxicity as well as potential to inhibit TNF- α -induced NF κ B activation with stably transfected 293/NF κ B-Luc human embryonic kidney cells.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Methanol, *n*-hexane, ethyl acetate and *p*-dioxane were of high performance liquid chromatography (HPLC) grade (JT Baker). Column chromatography was carried out over silica gel (0.06–0.20 mm, Acros Organics). Gel permeation chromatography (GPC) was performed using Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech). Preparative HPLC was carried out using a Varian Prep-Star 400 system and a Phenomenex C-18 (250 mm $\times$ 21.2 mm) column. The monodimensional NMR experiments were

recorded on a Varian INOVA 500 spectrometer (11.7 T) at 500 MHz (^1H) and 125 MHz (^{13}C), using CDCl_3 and $\text{DMSO}-d_6$ as solvent (Aldrich). Alkyl alcohols and DCC were purchased from Aldrich. Dimethyl sulphoxide (DMSO) and sulphorhodamine B (SRB) were purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), antibiotic-antimycotic, hygromycin B, and MEM sodium pyruvate were purchased from Invitrogen Co. (Carlsbad, CA). Reporter Lysis Buffer, Luciferase Assay System was purchased from Promega (Madison). Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α) was purchased from Calbiochem (Gibbstown, NJ). Alcohol was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ).

2.2. Isolation of gallic acid

The leaves of *A. glandulosa* were collected in the Biological Reserve and Experimental Station at Mogi Guaçu, São Paulo State, Brazil, in March 2005. A voucher specimen (SP319257) has been deposited in the herbarium of the Botanic Institute (São Paulo-SP, Brazil).

The shade-dried plant material (1.5 kg) was ground and defatted with *n*-hexane (3.5 L $\times$ 3) at room temperature and exhaustively extracted by maceration with MeOH (4.2 L $\times$ 3). The crude extract was concentrated under reduced pressure to yield 3.8 g of a syrup residue, which was diluted with MeOH:H₂O (4:1) and then successively partitioned with EtOAc and *n*-BuOH. After evaporation under reduced pressure, the partition phases yielded 2.5 g and 0.8 g, respectively. The part of EtOAc residue (2.0 g) was chromatographed by gel permeation over Sephadex LH-20 eluted with methanol to afford 11 fractions (A1–A11). Fraction A2 (730 mg) was purified by RP-HPLC [MeOH:H₂O:HOAc (7.5:92:0.5), UV detection at 265 nm; flow rate 15 mL min⁻¹] to give compound **1** (335 mg). Compound **1** was identified as gallic acid based on analysis of the ^1H and ^{13}C NMR data, as well as by comparison with authentic material in our laboratory (Figure 1).

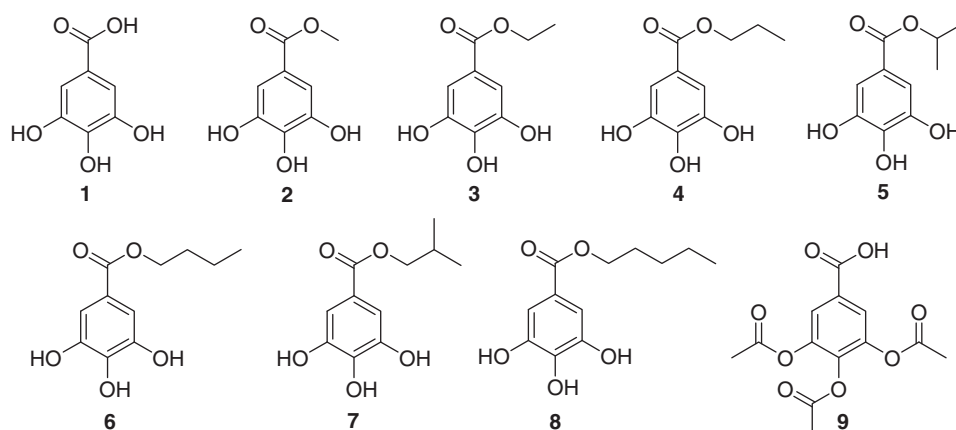


Figure 1. Molecular structures of gallic acid (**1**) and semi-synthetic esters (**2**–**9**).

2.3. Synthesis of esters 2–9

After being cooled at 5°C, the mixture of gallic acid (0.2 mmol) and alcohol (20 mmol) in *p*-dioxane (6.0 mL) was added to a solution of *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 1.0 mmol) in *p*-dioxane (3.0 mL). The solution was stirred for 48 h, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was partitioned three times with EtOAc and then filtered. The filtrate was washed successively with saturated aqueous citric acid solution (three times), saturated aqueous NaHCO₃ (three times), water (two times), dried over MgSO₄, and evaporated under reduced pressure. The crude products were purified over a silica gel column using an isocratic system of CHCl₃–MeOH (98:2) to give gallate esters 2–8. Structures of the semi-synthetic esters, methyl gallate (2), ethyl gallate (3), *n*-propyl gallate (4), isopropyl gallate (5), *n*-butyl gallate (6), isobutyl gallate (7), *n*-pentyl gallate (8) and 3,4,5-triacetoxybenzoic acid (9), were established by ¹H and ¹³C NMR spectral analysis (Figure 1).

For synthesis of ester 9, gallic acid (20 mmol) was dissolved in dry pyridine (5.0 mL) and anhydride acetic (5.0 mL) under hydrogen atmosphere. The mixture was stirred for 48 h at room temperature, carried to dryness under reduced pressure, and purified by column chromatography with a mixture of CHCl₃–MeOH (85:15) to give a product (9). The NMR spectroscopic data of 9 were compatible with 3,4,5-triacetoxybenzoic acid.

2.4. NFκB luciferase assay

NFκB inhibition assay was conducted using a luciferase reporter gene bioassay as previously described (Homhual et al., 2006). Human embryonic kidney cells (293/NFκB-Luc) were used to monitor alteration of the NFκB pathway. This cell line is stably transfected with a luciferase reporter construct regulated by the NFκB response element. Transcription factor can bind to the response element when stimulated by TNF-α, allowing transcription of the luciferase gene. Luciferase reacts with substrate, emitting light that was detected using a luminometer. Cells were seeded (10⁵ cells mL⁻¹) on sterile white walled 96-well plates and grown to approximately 80% confluence by incubating for 48 h. Gallic acid and alkyl gallates were tested at 20 μg mL⁻¹ following 1:3 serial dilutions. After treatment with tested compounds for 10 min, cells were incubated for an additional 6 h with or without TNF-α (5 ng mL⁻¹). The cells were gently washed with PBS and kept at –80°C with luciferase lysis buffer (Promega Corporation). The luciferase assay was performed using the Luc assay system from Promega following manufacturer instructions. Luciferase activity was monitored (LUMIstar Galaxy BMG), dose-response curves were constructed, and results were expressed as IC₅₀ values (i.e. concentration required to inhibit TNF-α induced NFκB activity by 50%).

2.5. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was determined by the method of Skehan et al. (1990). The cells were fixed with trichloroacetic acid and stained for 30 min with 0.4% (w/v) sulphorhodamine B (SRB) prepared in 1% acetic acid. Unbound dye was removed by washing with 1% acetic acid, and protein-bound dye was extracted with 10 mM Tris base

[tris (hydroxymethyl)aminomethane] for determination of optical density in a computer-interfaced, 96-well microtiter plate reader.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc.). Results were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA), and differences between means were located using Tukey's multiple comparison test. Differences between means at the 5% ($p < 0.05$) level were considered significant. The data are expressed as means $\pm$ standard error.

3. Results and discussion

Herein we report cytotoxic properties and suppression of TNF- α induced NF κ B activation of gallic acid (**1**) and eight esters (**2–9**) determined with stably transfected 293/NF κ B-Luc human embryonic kidney cells. Table 1 shows the concentrations of gallates **1–9** required to inhibit NF κ B-induced activation in 50% (IC₅₀). *N*-Tosyl-L-phenylalaninyl-chlormethylketone (TPCK) was adopted as positive control, exhibiting 98.5% $\pm$ 0.5% NF κ B inhibition at 30 μ M, with an IC₅₀ value of about 5 μ M. At the highest concentration tested (20.0 μ g mL⁻¹), gallic acid mediated a moderate cytotoxic effect (52.9% $\pm$ 3.5% survival), but none of the gallate esters significantly affected cell viability. The most cytotoxic compound evaluated was **6**, with 48.9% $\pm$ 3.3% cell survival.

Among inhibitors of NF κ B, salicylates, aspirin (Kopp & Ghosh, 1994), apigenin and curcumin (Gerritsen et al., 1995; Singh & Aggarwal, 1996) were reported to suppress activation of NF κ B by preventing the degradation of the NF κ B inhibitor (I κ B), and therefore NF κ B was retained in the cytosol.

The serine protease inhibitor TPCK can cause a complete block to NF κ B activation. TPCK inhibits NF κ B subunits processing and I κ B degradation (Mellitis, Hay, & Goodbourn, 1993). It has also been demonstrated that TPCK inhibits DNA replication by G₀–G₁ growth arrest and thus promotes apoptosis by other cytotoxic stimuli (Kirillova, Chaisson, & Fausto, 1999).

Table 1. Inhibition of TNF- α -induced NF κ B activity by gallic acid (**1**) and gallate esters (**2–9**).

Compound	IC ₅₀ (μ M)
1	76.0 $\pm$ 4.9
2	10.3 $\pm$ 1.1
3	54.6 $\pm$ 5.1
4	29.7 $\pm$ 3.1
5	31.1 $\pm$ 2.0
6	56.1 $\pm$ 5.9
7	37.2 $\pm$ 4.0
8	38.3 $\pm$ 4.1
9	48.0 $\pm$ 5.9
TPCK	5.09 $\pm$ 2.14

The present study provides evidence that some gallates can act as inhibitors of NF κ B. Methyl gallate (**2**) demonstrated the greatest activity. The inhibitory actions of gallates do not appear to result from non-specific cellular toxicity but rather are specific for NF κ B-dependent gene transcription. In another study, it has been demonstrated that gallates can inhibit TNF- α -induced nuclear translocation of NF κ B by way of a mechanism independent of I κ B degradation (Murase et al., 1999).

More recently, prevention of atherosclerosis, cancer, anti-plasmodial and antioxidant activity of a group of galloyl compounds was described, as well as structure-activity relationships yielding cytotoxic properties (Fiuza et al., 2004; Jagan, Ramakrishnan, Anandakumar, Kamaraj, & Devaki, 2008; Locatelli et al., 2008; Murase et al., 1999; Na et al., 2006; Petrônio et al., 2007; Saxena et al., 2008). Based on these encouraging intracellular responses, we suggest suppression of NF κ B activation by gallate esters could play a chemopreventive role in carcinogenesis, and further investigations related to the actions of gallates, especially in NF κ B signaling pathway and *in vivo* models, may provide new insights into the cancer chemopreventive ability.

Acknowledgements

This study is supported by a programme project P01 CA48112 awarded by the National Cancer Institute and project 04/07932-7 of the Biota-Bioprospecta Program funded by Sao Paulo State Research Foundation (FAPESP), Brazil. M.C.C. Morais is grateful to CAPES for a research fellowship. S. Luqman acknowledges the Indo-US Science and Technology Forum (IUSSTF), New Delhi for research fellowship.

References

- Aggarwal, B.B., Sethi, G., Nair, A., & Ichikawa, H. (2006). Nuclear factor- κ B: A holy grail in cancer prevention and therapy. *Current Signal Transduction Therapy*, 1, 25–52.
- Aruoma, O.I., Murcia, A., Butler, J., & Halliwell, B. (1993). Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1880–1885.
- Baldwin, A.S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *Journal of Clinical Investigation*, 107, 241–246.
- Chen, F., Castranova, V., & Shi, X. (2001). New Insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. *American Journal of Pathology*, 159, 387–397.
- Fiuza, S.M., Gomes, C., Teixeira, L.J., Girão da Cruz, M.J., Cordeiro, M.N.D.S., Milhazes, N., et al. (2004). Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties – A structure activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12, 3581–3589.
- Frydrych, I., & Mlejnek, P. (2008). Serine protease inhibitors N- α -tosyl-L-lysiny-chloromethylketone (TLCK) and N-tosyl-L-phenylalaniny-chlormethylketone (TPCK) are potent inhibitors of activated caspase proteases. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103, 1646–1656.
- García de Hombre, M.A., & Pérez Peñate, A. (2006). Topic usage of bismuth subgallate as a hemostatic in tonsillectomy. *Anales Otorrinolaringológicos Ibero-Americanos*, 33, 301–305.

- Gerritsen, M.E., Carley, W.W., Ranges, G.E., Shen, C.P., Phan, S.A., Ligon, G.F., et al. (1995). Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *American Journal of Pathology*, 147, 278–292.
- Hatton, R.C. (2000). Bismuth subgallate-epinephrine paste in adenotonsillectomies. *The Annals of Pharmacotherapy*, 34, 522–525.
- Homhual, S., Zhang, H.J., Bunyaphrathatsara, N., Kondratyuk, T.P., Santarsiero, B.D., Mesecar, A.D., et al. (2006). Bruguiesulfurol, a new sulfur compound from *Bruguiera gymnorrhiza*. *Planta Medica*, 72, 255–260.
- Inoue, J., Gohda, J., Akiyama, T., & Semba, K. (2007). NF- κ B activation in development and progression of cancer. *Cancer Science*, 98, 268–274.
- Jagan, S., Ramakrishnan, G., Anandakumar, P., Kamaraj, S., & Devaki, T. (2008). Antiproliferative potential of gallic acid against diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 319, 51–59.
- Kirillova, I., Chaisson, M., & Fausto, N. (1999). Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor κ B Activation. *Cell Growth & Differentiation*, 10, 819–828.
- Kopp, E., & Ghosh, S. (1994). Inhibition of NF κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science*, 265, 956–959.
- Kratz, J.M., Andrighetti-Fröhner, C.R., Kolling, D.J., Leal, P.C., Cirne-Santos, C.C., Yunes, R.A., et al. (2008). Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 437–442.
- Kroes, B.H., van den Berg, A.J., van Ufford, H.C., van Dijk, H., & Labadie, R.P. (1992). Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Medica*, 58, 499–504.
- Kubo, I., Fujita, K., Nihei, K., & Nihei, A. (2004). Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 1072–1076.
- Locatelli, C., Rosso, R., Santos-Silva, M.C., De Souza, C.A., Licinio, M.A., Leal, P., et al. (2008). Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 3791–3799.
- Melisi, D., & Chiao, P.J. (2007). NF-kappa B as a target for cancer therapy. *Expert Opinion Therapeutic Targets*, 11, 133–144.
- Mellitis, K.H., Hay, R.T., & Goodbourn, S. (1993). Proteolytic degradation of MAD3 (I κ B α) and enhanced processing of the NF- κ B precursor p105 are obligatory steps in the activation of NF- κ B. *Nucleic Acids Research*, 21, 5059–5066.
- Murase, T., Kume, N., Hase, T., Shibuya, Y., Nishizawa, Y., Tokimitsu, Y., et al. (1999). Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19, 1412–1420.
- Na, H.J., Lee, G., Oh, H.Y., Jeon, K.S., Kwon, H.J., Ha, K.S., et al. (2006). 4-O-Methylgallic acid suppresses inflammation-associated gene expression by inhibition of redox-based NF κ B activation. *International Immunopharmacology*, 6, 1597–1608.
- Nazaruk, J., Czechowska, S.K., Markiewicz, R., & Borawska, M.H. (2008). Polyphenolic compounds and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity of aqueous extracts from leaves of some *Cirsium* species. *Natural Product Research*, 22, 1583–1588.
- Petrônio, M.S., Regasini, L.O., Pauletii, P.M., Passalacqua, T.B., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V.S., et al. (2007). Potential antimalarial and antioxidant activities of gallic acid and its semi-synthetic esters. Paper presented at the 1st Brazilian Conference on Natural Products, São Paulo, Brazil.
- Saxena, H.O., Faridi, U., Srivastava, S., Kumar, J.K., Darokar, M.P., Luqman, S., et al. (2008). Gallic acid based indanone derivatives as anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 3914–3918.
- Singh, S., & Aggarwal, B.B. (1996). Activation of transcription factor NF κ B is suppressed by curcumin (diferulolylmethane). *Journal of Biological Chemistry*, 270, 24995–25000.

- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., et al. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *Journal of National Cancer Institute*, 82, 1107–1112.
- Thanos, D., & Maniatis, T. (1995). NF κ B: A lesson in family values. *Cell*, 80, 529–532.
- Yamamoto, Y., & Gaynor, R.B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 107, 135–142.

Aromatase inhibition by compounds from *Pterogyne nitens* (FABACEAE) and semi-synthetic derivatives

Morais, M.C.C.^{1,2}; Marler, L.²; Kondratyuk, T.P.²; Petronio, M.S.³; Regasini, L.O.³; Silva, D.H.S.³; Bolzani, V.S.³; Pezzuto, J.M.²; Soares, C.P.^{1,*}

1-School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University – UNESP, Rua Expedicionários do Brasil, n.1621, Centro, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil. 2-College of Pharmacy, University of Hawaii, 34 Rainbow Drive, Hilo, HI, 96720 USA. 3-NuBBE, Institute of Chemistry, São Paulo State University – UNESP, Rua Prof. Francisco Degni, SN, 14801-060, Araraquara, SP, Brazil. * corresponding author: soarescp@fcfar.unesp.br

Keywords: chemoprevention, aromatase, gallate esters, guanidine alkaloids, *Pterogyne nitens*

Introduction

Cancer chemoprevention involves the use of natural or synthetic compounds to reduce the risk of developing cancer. Therapy aimed at reducing the estrogenic hormone level and limiting its action is a valid strategy to breast cancer chemoprevention. Aromatase is a cytochrome P450 enzyme (CYP19) that catalyzes the last step of estrogenic hormone biosynthesis. Therefore, CYP19 inhibitors may play an important role in breast cancer chemoprevention.¹ In this study, we evaluated the chemopreventive potential of natural products and their semi-synthetic analogs using *in vitro* aromatase inhibition assays. In addition, a tentative structure-activity relationship (SAR) is discussed.

Results and Discussion

Gallic acid (**1**) and guanidine alkaloids, nitensidine A (**10**) and nitensidine B (**11**), were isolated from *Pterogyne nitens*, and alkyl gallates (**2–9**) were synthesized from the reaction of the corresponding alkyl alcohols with **1**, or from the reaction with acetic anhydride (Fig. 1). The thiourea-derivative, nitensidine T (**12**), a bioisoster of **10**, was synthesized from 1,1'-thiocarbonyl-di-imidazole and geranylamine. All substances were evaluated for *in vitro* aromatase inhibition using recombinant human enzyme and the fluorometric substrate dibenzylfluorescein (DBF).²

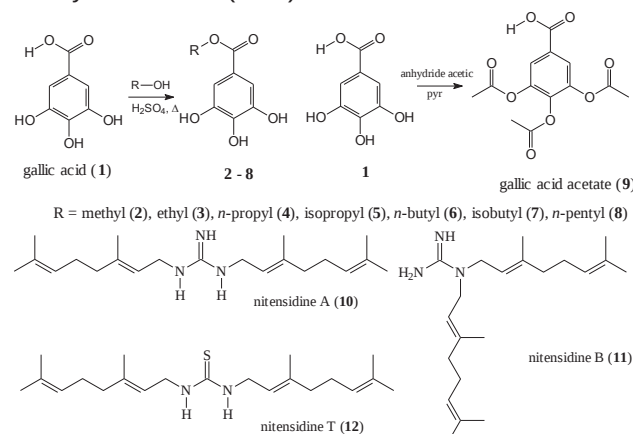


Figure 1. Synthesis of gallates **2 – 9** from **1**, and guanidine alkaloids **10 – 12**.

Compounds **6**, **8**, **10** and **11** exhibited aromatase inhibition and naringenin, used as positive control, displayed an IC₅₀ value of 6.8±1.0 µM (Fig. 2). Activity was observed for compounds **6** and **8** at 80 µM, probably due to their lipophilic side which may have led to enhanced enzymatic interaction.³ Interestingly, in compound **7**, steric hindrance by the branched side chain may have resulted in lower activity. Additionally, the guanidine core of compounds **10** and **11** may have interacted with the porphyrin system of CYP19 through N-H/π interactions, probably altering the conformation of the active site, which was not observed for compound **12**, due to the substitution of the nitrogen by sulphur.

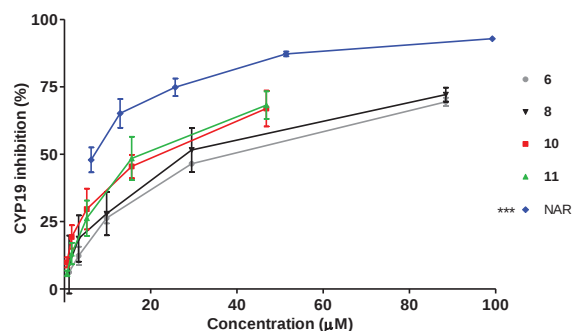


Figure 2. Aromatase inhibition by compounds **6**, **8**, **10** and **11**. NAR, positive control. (M±SE); One-way ANOVA, *** p < 0,001.

Conclusions

The results reported here demonstrate that compounds **6** and **8** mediate *in vitro* aromatase inhibitory activity. These compounds can be employed as prototypes for future drug development, which may result in new chemopreventive agents directed toward the prevention or treatment of breast cancer.

Acknowledgements

We acknowledge the support of CNPq for a research scholarship and program project P01 CA48112 funded by the National Cancer Institute.

¹ Del Mastro, L.; Clavarezza, M. & Venturini, M. *Cancer Treat. Rev.*, **2007**, 33, 681.

² Stresser, D.M. et al. *Anal. Biochem.*, **2000**, 284, 427.

³ Endringer, D.C., Guimarães, K.G., Kondratyuk, T.P., Pezzuto, J.M. & Braga, F.C. *J. Nat. Prod.*, **2008**, 71, 1082.

Código: **FAR207**

Área do Conhecimento: **6. Farmacologia / Toxicologia (estudos préclínicos e pesquisa clínica)**

Título: **COMPARISON OF TWO CYTOTOXICITY ASSAYS EMPLOYING GUANIDINE ALKALOIDS AND PHENOLIC COMPOUNDS FROM *PTEROGYNE NITENS* (LEGUMINOSAE)**

Mauro C. Cafundó de Moraes(a)

Rochane S. Tavares(a), Luis O. Regasini(b); Dulce H. S. Silva(b); Vanderlan S. Bolzani(b); Christiane P. Soares(a)

Cytotoxicity, Cristal violet assay, MTT assay, Alkaloids

6. Farmacologia / Toxicologia (estudos préclínicos e pesquisa clínica)

Poster

MAURO CÉSAR CAFUNDÓ DE MORAIS

(a)School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP; (b)Institute of Chemistry, Sao Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP.

INTRODUCTION: *Pterogyne nitens* Tul. (Leguminosae) is a native and medicinal tree in South America. Our previous studies have identified cytotoxic and antioxidant compounds, including alkaloids and phenolic compounds^{1,2}. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] is a simple and fast colorimetric assay widely used as screening method to measure cytotoxicity of natural products³, which is enzymatically reduced by living cells to an insoluble purple formazan product. Literature reports the interference of antioxidant compounds with the MTT assay, generating false positive results⁴. We evaluated the cytotoxicity of guanidine alkaloids and phenolic compounds from *P. nitens* and their semi-synthetic thiourea-derivative using the MTT assay and crystal violet (CV) staining against human hepatoma cells (HepG2), and reduction of MTT in the absence of cells. METHODS: The guanidine alkaloids nitensidines A and B (1 - 2), and phenolic compounds quercetin, isoquercitrin, rutin, and gallic acid (3 - 6) were isolated from *P. nitens*. The thiourea-derivative (7), a bioisoster-analogue of 1, was synthesized from 1,1'-thiocarbonyldiimidazole and geranylamine. Compounds were tested at 20µg/mL following 1:3 serial dilutions in HepG2 cells for cytotoxicity using MTT and CV staining. Doxorubicin was adopted as positive control. For reduction assay, compounds were incubated for 3h in PBS with MTT. The data were expressed as means±standard error of 3 independent experiments and one-way analysis of variance. RESULTS: Among the test compounds, 1, 2 and 7 were cytotoxic at tested concentrations in both assays and dose-response was observed (IC₅₀ values of 2.3±0.3, 2.0±0.2 and 2.2±0.4µg/mL, respectively, for MTT; and 2.2±0.1, 2.1±0.1 and 3.0±3.9 µg/mL, respectively, for CV). For compounds 1 and 2 a good correlation (r=0.957) between the assays was found, but not for 7 (r=0.214). Compounds 1, 2 and 7 didn't reduce MTT in the absence of cells. However, 6 showed a 32.0 ± 6.6 fold higher reduction of MTT than control, but no cytotoxicity in both assays. CONCLUSION: The MTT assay was more sensitive than CV staining to evaluate the cytotoxic effect of potential chemotherapeutics, depending of the class of the compound tested. ACKNOWLEDGMENT: The authors would like to thank FAPESP and CNPq for research and fellowship support. 1. REGASINI, L. O. et al. Phytochem., v69, p1739, 2008. 2. REGASINI, L.O. et al. J. Nat. Prod., v72, p473, 2009. 3. ULUKAYA, E. et al. Toxicol. In Vitro, v22, p232, 2008. 4. BRUGGISSER, R. et al. Planta Med., v68, p445, 2002.

CHEMOPREVENTIVE POTENTIAL OF NATURAL PRODUCTS ISOLATED FROM *ALCHORNEA GLANDULOSA*, *PTEROGYNE NITENS* AND ITS SEMI-SYNTHETIC ANALOGS

MAURO C. C. DE MORAIS^{1,2}; LAURA MARLER²; SUAIB LUQMAN^{2,3}; TAMARA P. KONDRATYUK²; MAICON S. PETRÔNIO⁴; LUIS O. REGASINI⁴; DULCE H. S. SILVA⁴; VANDERLAN S. BOLZANI⁴; CHRISTIANE P. SOARES¹; JOHN M. PEZZUTO²

¹School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil; ²College of Pharmacy, University of Hawaii, Hilo, USA; ³IUSSTF Fellow, Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants (CSIR), Lucknow, India; ⁴Institute of Chemistry, Sao Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil.

INTRODUCTION: Chemoprevention involves the use of natural or synthetic substances to reduce the risk of developing cancer. Gallic acid was found to possess several pharmacological activities, such as anti-oxidant and anti-inflammatory. Guanidine alkaloids display a broad spectrum of biological activities and its cytotoxic effect were well investigated. **OBJECTIVES:** The present study evaluated the chemopreventive potential of natural products and its semi-synthetic analogs using quinone reductase (QR) induction, aromatase inhibition and the suppression of NF κ B activity, which are well established strategies for screening compounds to cancer chemoprevention. **METHODS:** Gallic acid was isolated from *Alchornea glandulosa*, and alkyl gallates were prepared from the reaction of the corresponding alcohols with gallic acid or from the reaction with acetic anhydride. The guanidine alkaloids nitensidines A and B were isolated from *Pterogyne nitens*. All compounds were evaluated for QR induction using murine hepatoma cell line Hepa 1c1c7 and two mutant cell lines; for *in vitro* aromatase inhibition; and against TNF α -induced NF κ B activation with stable transfected 293/NF κ B-Luc human embryonic kidney cells. Compounds were tested at 20 μ g/mL following 1:3 serial dilutions. **RESULTS:** No QR induction was observed at tested concentrations. Nitensidine A and B showed aromatase inhibition (IC₅₀ 18,3 $\pm$ 8,7 μ M), but moderately cytotoxic to Hepa 1c1c7 cells (IC₅₀ 5,7 $\pm$ 0,6 μ M). With IC₅₀ values in a range of 10 to 50 μ M, all the gallic acid esters mediated NF κ B inhibitory activity. In addition, gallic acid mediated a modest cytotoxic effect, but none of the gallate esters affected cell viability at the tested concentrations. **CONCLUSION:** Based on these intracellular responses, we suggest that gallate esters are related to suppression of NF κ B activation, which it could play a chemopreventive role in carcinogenesis.

Acknowledgment: The authors would like to thank FAPESP and CNPq, for fellowship support. This work was supported in part by program project P01 CA48112 awarded by the National Cancer Institute (John M. Pezzuto, Project Director). SL acknowledge IUSSTF for research fellowship.