

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Instituto de Química de Araraquara

**Avaliação da atividade biológica de uma nova
naftoquinona extraída de *Paepalanthus latipes***

Rodrigo Rezende Kitagawa

Araraquara
2008

RODRIGO REZENDE KITAGAWA

**Avaliação da atividade biológica de uma nova
naftoquinona extraída de *Paepalanthus latipes***

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, com parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi

Araraquara
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

K62a Kitagawa, Rodrigo Rezende
Avaliação da atividade biológica de uma nova naftoquinona extraída de
Paepalanthus latipes / Rodrigo Rezende Kitagawa. - Araraquara : [s.n.], 2008
120 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Stella Gonçalves Raddi

1. Produtos naturais. 2. Atividade biológica. 3. Naftoquinona.
4. Antitumoral. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

RODRIGO REZENDE KITAGAWA

Avaliação da atividade biológica de uma nova naftoquinona extraída de
Paepalanthus latipes

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, com parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia

Araraquara, 09 de maio de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto

Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto

Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Wagner Vilegas
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

RODRIGO REZENDE KITAGAWA

1. Dados pessoais

1.1. **Nascimento:** 14/12/1976

1.2. **Naturalidade:** Araçatuba - SP

1.3. **Estado civil:** solteiro

1.4. **Filiação:** Luís Antônio Marques Kitagawa

Gilda Rezende Kitagawa

1.5. **Documento de Identidade:** 24266636-x

1.6. **Cadastro de Pessoa Física:** 254863928-26

2. Formação Acadêmica

2.1. Farmacêutico Bioquímico, curso de Farmácia-Bioquímica, concluído em dezembro de 1999, na Universidade Estadual de Maringá.

2.2. Mestrado em Biotecnologia, curso de Pós-graduação em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia, concluído dia 12/11/2002 no Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

3. Comunicações em congressos

KITAGAWA, R. R.; BONACORSI, C.; VILEGAS, W.; RADDI, M. S. G. Atividade anti-*Helicobacter pylori* de uma quinona extraída de *Paepalanthus latipes*, 2007, Araraquara - SP. **I Simpósio Paulista de Farmacognosia**, 2007.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F.; VILEGAS, W. Cytotoxicity activity of the 1,4-naphthoquinone and ascorbic acid combination, 2007, Ribeirão Preto - SP. **6th International Congress of Pharmaceutical Sciences**, 2007.

KITAGAWA, R. R.; FONSECA, L. M.; RADDI, M. S. G.; VILEGAS, W. Efeito de uma nova quinona no *burst* oxidativo de neutrófilos avaliado por quimiluminescência. In:

XIX SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2006, Salvador. **XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. 2006.

KITAGAWA, R. R.; BONACORSI, C.; RADDI, M. S. G.; FONSECA, L. M.; VILEGAS, W. Free radical scavenging activity from *Byrsonima* leaves extracts. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2006, Águas de Lindóia. **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq**. 2006.

GONÇALVES, R. C. R.; KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; SPONCHIADO, S. R. P. Evaluation of antiradical and chelating activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2006, Águas de Lindóia. **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq**. 2006.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; VILEGAS, W. Atividade antibacteriana de uma nova quinona extraída de *Paepalanthus latipes*. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos. 2005. **XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 2005.

GONÇALVES, R. C. R.; KITAGAWA, R. .R.; RADDI, M. S. G.; SPONCHIADO, S. R. P. Cytotoxic activity of the melanin extracted from *Aspergillus nidulans*. In: 5TH International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2005, Ribeirão Preto. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2005. v. 41, p. 130-130.

KITAGAWA, R. R.; SOARES, V. C. G.; VILEGAS, W.; RADDI, M. S. G. Citotoxicidade de uma nova quinona isolada de *Paepalanthus latipes*. In: VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 2003, São Pedro. **VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais**. 2003.

4. Trabalhos científicos publicados

VARANDA, E. A.; VARELLA, S. D.; RAMPAZO, R. A.; KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Mutagenic and cytotoxic effect of planifolin: A naphthopyranone dimer isolated from *Paepalanthus planifolius*. **Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association With BIBRA**, v. 20, n. 5, p. 664 - 668, 2006.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. A new cytotoxic naphthoquinone from *Paepalanthus latipes*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Japão, v. 52, n. 12, p. 1487 - 1488, 2004.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; KHALIL, N. M.; VILEGAS, W.; FONSECA, L. M. Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of the rats neutrophils. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Japão, v. 26, n. 6, p. 905 - 908, 2003.

5. Trabalhos científicos submetidos à publicação

KITAGAWA, R. R.; FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F.; KHALIL, N. M.; VILEGAS, W.; RADDI, M. S. G. Ascorbic acid potentiates the cytotoxicity of the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin. **Phytochemistry**. Submetido em setembro de 2007.

ALMEIDA, A. E.; KITAGAWA, R. R.; ALMEIDA, D. V.; RADDI, M. S. G. Evaluation *in vitro* of basal and metabolism-mediated cytotoxicity of solamargine and solasodine. **Food and Chemical Toxicology**. Submetido em dezembro de 2007.

À minha esposa *Rita*,

pelo amor, carinho, amizade, respeito.....

Por sempre me apoiar nos momentos difíceis, acreditar no meu potencial e gerar meus bens mais preciosos: João Pedro e Felipe.

Vocês representam a energia que alimenta minha vida,

Obrigado.

Aos meus pais, *Luís Antônio e Gilda*,
que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis.

Ensinaram-me que a sabedoria,
é o bem mais precioso que um homem pode ter.
Sempre me espelhei na dignidade, humildade e força de vocês.
Obrigado pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim.

À minha irmã, *Daniela*,
pela cumplicidade, carinho e amor que sempre demonstrou por mim.
E a minha querida sobrinha Ana Lua

Agradeço à *Deus*, por pertencer à esta família.

À *Stella*, minha orientadora,
Que foi sempre compreensível e amiga.
Meu crescimento científico se deve ao seu incentivo e sabedoria.
Obrigado.

COLABORADORES

A extração, isolamento e determinação estrutural da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina foram realizados no laboratório de fitoquímica do Instituto de Química de Araraquara (UNESP), sob a supervisão do Prof. Dr. Wagner Vilegas. Os experimentos para avaliação da resposta imune foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Os testes de mutagenicidade foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Os testes de quimiluminescência foram realizados sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) e os estudos da interação 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina e ácido ascórbico foram realizados sob a supervisão do prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes da Faculdade de Ciências de Bauru (UNESP).

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Wagner Vilegas* pela indispensável orientação no Laboratório de Química Orgânica, incentivo e prestatividade.

Ao *Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca* pela amizade, imensa colaboração, incentivo e sugestões.

Ao *Prof. Dr. Valdecir Ximenes Farias* pelo direcionamento e grande colaboração na etapa final do trabalho.

A *Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda* pela simpatia, apoio e suporte dado no teste de Mutagenicidade.

À *Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos* pela grande simpatia, prestatividade, colaboração e suporte nos ensaios imunológicos.

Aos *Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti* e *Profa. Dra. Maria Tereza Pepato* pela utilização do biotério.

Às grandes amigas *Cibele, Karina* e *Verônica* pelos bons momentos que vivemos juntos dentro e fora do laboratório.

À *Mariana* e *Beth* pela amizade, incentivo e apoio nos momentos difíceis.

À *Marisa* pela amizade, simpatia e grande auxílio no desenvolvimento experimental com macrófagos.

Ao amigo *Najeh* pela grande colaboração na etapa final desse trabalho com os espectros UV, incentivo e momentos de diversão.

Aos *professores da Universidade Estadual de Maringá* pela contribuição na minha formação acadêmica.

À *Maria do Carmo e Nancy* pela amizade, momentos de descontração e apoio principalmente com as células McCoy.

Às funcionárias *Rosemira, Márcia, Luzia e Rita* pela grande simpatia.

À *Cristina* pela revisão das referências.

À seção de pós-graduação: *Sandra, Célia e Patrícia* pela simpatia, atenção e prestatividade.

Ao *PADC* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara pelo auxílio concedido ao projeto integrado coordenado pela Prof. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi.

Ao *CNPq*, pela bolsa concedida.

RESUMO

Quinonas são substâncias orgânicas amplamente distribuídas na natureza, encontradas em plantas, fungos e bactérias, associadas à atividade antitumoral e antimicrobiana. Recentemente, uma quinona (5-metoxi-3,4-diidroantomegnina), estruturalmente semelhante à 1,4-naftoquinona, foi isolada dos capítulos de *Paepalanthus latipes*. O objetivo desse estudo foi avaliar atividades biológicas dessa quinona visando possível aplicação terapêutica. A 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina apresentou concentração inibitória mínima para *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (197 μ M), mas não para *Escherichia coli*. Essa quinona demonstrou significativo índice citotóxico para células McCoy quando comparado ao da cisplatina. Nos ensaios utilizando linhagens tumorais de adenocarcinoma de pulmão (LP07) e mama (LM2), a maior citotoxicidade da 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina foi para a linhagem LP07. A associação com ácido ascórbico aumentou a citotoxicidade da 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina para células McCoy, LM2 e LP07 devido a um redox cíclico com formação de peróxido de hidrogênio. Visto que alguns antineoplásicos somente apresentam efeito citotóxico após biotransformação, a citotoxicidade da 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina na presença do sistema microsomal S₉ foi avaliada e constatou-se que esse sistema de ativação metabólica não altera o potencial citotóxico da quinona. Óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) não foram detectados nos sobrenadantes de culturas de macrófagos tratados com 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina, portanto seu efeito tóxico, nesse sistema celular, não está relacionado com a produção desses mediadores. Entretanto, macrófagos tratados com essa quinona aumentaram significativamente a liberação de peróxido de hidrogênio. Nos testes de inibição dos mediadores NO e TNF- α foi demonstrado que a 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina inibe a liberação de NO, mas não de TNF- α em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS). Nos ensaios antioxidantes, conclui-se que a 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina interage, de forma dose-dependente, com os sistemas enzimáticos geradores de EROs (NADPH oxidase e MPO) demonstrada através dos ensaios de quimiluminescência, mas não com os oxidantes propriamente ditos (HOCl, radicais livres) confirmados nos testes de

cloração e DPPH. Os resultados dos ensaios de genotoxicidade em *Salmonella thyphimurium* (teste de Ames) demonstraram que a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina não apresenta propriedades mutagênicas para as linhagens testadas na ausência e presença do sistema de ativação metabólica. Neste contexto, o *screening* realizado para a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina isolada de *Paepalanthus latipes* aponta a atividade antitumoral e antiinflamatória como promissoras para a aplicação terapêutica dessa quinona.

ABSTRACT

Quinones are organic substances widely distributed in nature, found in plants, fungi and bacteria, associated with antitumoral and antimicrobial activities. Recently, a quinone (5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin), structurally similar to 1,4-naphthoquinone, was isolated of the capitula of *Paepalanthus latipes*. The objective of this study was to evaluate biological activities of this quinone aiming a possible therapeutical application. The 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin showed minimal inhibitory concentration for *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* (197 μ M), but not for *Escherichia coli*. This quinone showed significative cytotoxic index for McCoy cells when compared with cisplatin. In the assays using tumoral cell lines of adenocarcinoma of lung (LP07) and breast (LM2), the largest cytotoxicity of the 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin was for LP07 line. The association with ascorbic acid increased the cytotoxicity of the 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin for McCoy cells, LM2 and LP07 due to redox cycling with hydrogen peroxide formation. Since some antineoplastic only present cytotoxic effect after biotransformation, the cytotoxicity of the 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin in the presence of the microsomal system S9 was evaluated and it was found that this system does not change the cytotoxic potential of the quinone. Nitric oxide (NO) and tumoral necrosis factor- α (TNF- α) were not detected in supernatants of macrophages treated with 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin, therefore its toxic effect, in this cell system, is not related to the production these mediators. However, macrophages treated with 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin increased hydrogen peroxide liberation significantly. The tests of inhibition of the mediators NO and TNF- α demonstrated that the 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin inhibits the release of NO, but does not inhibit the TNF- α in macrophages activated for *E. coli* lipopolisacaride (LPS). In the antioxidant assays, it has been concluded that the 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin interacts, in a dose-dependent manner, with the generating enzymatic systems of ROS (NADPH oxidase and MPO) demonstrated by the chemiluminescence assays, but it does not interact with the oxidants (HOCl and free radicals) confirmed by the tests of chloration and DPPH. The results of the assays of genotoxicity in *Salmonella thyphimurium* (Ames test) have demonstrated that the 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin does not have mutagenic properties for the strains tested in the absence and presence of the metabolic activation system.

In this context, the screening carried out for the 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin isolated from *Paepalanthus latipes* indicates the antitumoral and antiinflammatory activity are promising for the therapeutical application of that quinone.

LISTA DE ABREVIATURAS

CC: cromatografia em coluna clássica
CCCD: cromatografia em camada delgada comparativa
CIM: concentração inibitória mínima
CLMP: cromatografia líquida de média performance
DCM: diclorometano
DMSO: dimetilsulfóxido
DPPH: 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
DTNB: ácido 5-5'-ditio(2-nitrobenzóico)
EROs: espécies reativas de oxigênio
LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*
MPO: mieloperoxidase
mV: milivolts
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
O₂⁻: ânion superóxido
¹O₂: oxigênio *singlet*
OH·: radical hidroxil
PMA: acetato de forbol miristato
PMN: neutrófilo
QL: quimiluminescência
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SOD: superóxido dismutase
TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TNF-α: fator de necrose tumoral-α
UV: ultravioleta
VN: vermelho neutro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Material vegetal	33
3.2	Reagentes e soluções.....	33
3.3	Obtenção da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina.....	34
3.4	Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	36
3.5	Determinação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> para as linhagens celulares McCoy, LP07 e LM2.....	37
3.6	Determinação da atividade citotóxica após associação com ácido ascórbico para as linhagens celulares McCoy, LP07 e LM2.....	39
3.7	Determinação da atividade citotóxica para células McCoy na presença de sistema microssomal.....	40
3.8	Estudo de mecanismo de ação citotóxica da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina após associação com ácido ascórbico.....	40
3.8.1	Determinação da atividade citotóxica na presença de catalase.....	40
3.8.2	Ensaio espectrofotométrico (UV – VIS).....	40
3.8.3	Espectrometria de massas.....	41
3.9	Ensaio antioxidante.....	41
3.9.1	Ensaio quimiluminescente.....	41
3.9.2	Teste de cloração.....	43
3.9.3	Teste com DPPH.....	43
3.10	Testes de resposta imunológica.....	44
3.10.1	Obtenção de macrófagos peritoneais.....	44
3.10.2	Determinação da indução de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	45
3.10.3	Determinação da indução de óxido nítrico (NO).....	46

3.10.4	Determinação da indução de fator de necrose tumoral (TNF- α).....	47
3.10.5	Teste de inibição da liberação de H ₂ O ₂	49
3.10.6	Teste de inibição da liberação de NO.....	49
3.10.7	Teste de inibição da liberação de TNF- α	50
3.11	Determinação da atividade mutagênica <i>in vitro</i> da 5-metoxi-3,4- diidroxantomegnina.....	50
3.12	Análise estatística.....	51
4	RESULTADOS	52
4.1	Isolamento da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina.....	52
4.2	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	53
4.3	Citotoxicidade <i>in vitro</i> da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina.....	54
4.3.1	Índice citotóxico basal para as linhagens McCoy, LP07 e LM2.....	54
4.3.2	Índice citotóxico após associação com ácido ascórbico para as linhagens McCoy, LP07 e LM2.....	56
4.3.3	Índice citotóxico para células McCoy na presença de sistema microssomal.....	57
4.4	Avaliação da citotoxicidade na interação da 5-metoxi-3,4- diidroxantomegnina e ácido ascórbico.....	58
4.4.1	Índice citotóxico na presença de catalase.....	58
4.4.2	Perfil espectrofotométrico (UV – VIS).....	61
4.4.3	Espectrometria de massas.....	64
4.5	Atividade antioxidante	65
4.5.1	Efeito no <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos através de técnica quimiluminescente.....	65
4.5.1.1	Quimiluminescência do sistema PMN/luminol/zimosan na presença da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina.....	67
4.5.1.2	Quimiluminescência do sistema PMN/lucigenina/PMA na presença de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina.....	70

4.5.2	Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina no teste de cloração.....	73
4.5.3	Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina no teste com DPPH.....	74
4.6	Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina na resposta imunológica.....	75
4.7	Atividade mutagênica.....	81
5	DISCUSSÃO	84
6	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS.....	95
	APÊNDICE	108

1 INTRODUÇÃO

Substâncias químicas obtidas de plantas têm proporcionado à indústria farmacêutica uma das mais importantes fontes de compostos para a pesquisa de novos fármacos. A importância histórica dessas substâncias, como protótipo de categorias terapêuticas, data do século XVIII com a descoberta da digitoxina e, no século seguinte, da morfina, quinina, atropina, efedrina, cocaína e tubocurarina (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003). No início do século XX, inúmeras classes de diferentes produtos naturais foram empregadas como matéria-prima para a síntese de diferentes substâncias bioativas, entre elas os derivados 4-hidróxi-cumarínicos que originaram o dicumarol, um anticoagulante que interfere na ação da vitamina K, sintetizado pela indústria farmacêutica Abbott e Lilly (BARREIRO; FRAGA; ARAÚJO JÚNIOR, 2003).

Na década de 60, o aparente esgotamento de protótipos, e mesmo o esgotamento das possibilidades de modificações químicas dos protótipos já conhecidos, favoreceu o abandono dessa linha de pesquisa, havendo um decréscimo no interesse e investimento por parte das indústrias farmacêuticas. Os altos custos e o lento processo para obtenção dos componentes ativos, juntamente com os trabalhosos métodos de separação, purificação, elucidação estrutural e ensaios fármaco-toxicológicos, foram associados a esse desinteresse (KINGSTON, 1996).

O progresso tecnológico, principalmente a partir dos anos 80, alcançado por técnicas cromatográficas e de elucidação estrutural [ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM)] e, mais recentemente, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à RMN e EM permitiram maior rapidez na busca de novas substâncias. O desenvolvimento de bioensaios simplificados, novos métodos de *screening*, introdução de testes *in vitro* que mimetizam situações análogas *in vivo*, entre tanto outros, determinaram o ressurgimento do interesse na investigação de produtos naturais como possíveis fontes de protótipos. Especificamente em relação a plantas medicinais, a incorporação de novos antitumorais à terapêutica tem sido apontada como argumento demonstrativo dessa potencialidade e, de fato, nas últimas décadas, as descobertas de maior impacto nessa área têm origem na investigação de produtos

de origem vegetal, tendo fornecido um número significativo de substâncias ativas que chegaram à fase de ensaios clínicos. Alguns dos compostos avaliados são atualmente de uso clínico como a vincristina, vimblastina, vindesina, etoposídeo, teniposídeo, topotecano, irinotecano, paclitaxel e docetaxel (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003).

Os metabólitos secundários, produtos derivados do metabolismo primário, são substâncias sintetizadas para a preservação do vegetal e, em muitos casos, como resposta a alguns estímulos incluindo o ataque por microrganismos, insetos e herbívoros. Estima-se que cerca de 100.000 desses produtos sejam produzidos pelas diferentes espécies. Hipóteses mais recentes sugerem que essa forma de defesa induza à produção de substâncias de elevada toxicidade (DI STASI, 1996; SIMÕES et al., 2003).

A família *Eriocaulaceae* possui cerca de 1.200 espécies com distribuição pantropical (HENSOLD; GIULIETTI, 1991). Plantas dessa família são comuns na região da Serra do Cipó em Minas Gerais e, popularmente, conhecidas como “sempre-vivas” porque, mesmo após o corte, conservam cor e forma por vários anos (GIULIETTI et al., 1988). *Paepalanthus* é o maior gênero dessa família com aproximadamente 500 espécies, sendo que mais de 400 espécies ocorrem no Brasil (GIULIETTI; HENSOLD, 1990). Um aspecto importante relacionado às sempre-vivas é o papel sócio econômico que elas desempenham na região de Minas Gerais onde são coletadas. Sua exportação emprega grande quantidade de mão-de-obra, tendo em vista que o processo de comercialização (coleta, triagem, armazenamento e enfardamento) é manual (TEIXEIRA, 1987). Embora as sempre-vivas sejam exportadas com finalidade ornamental para os Estados Unidos e países europeus, a literatura relata a utilização de rizomas e flores de muitas espécies de *Eriocaulaceae* no tratamento de úlceras da epiderme, infecções bacterianas e hanseníase (HOEHNE, 1939).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é decorrente da presença de substâncias fenólicas (COWAN, 1999). A determinação do teor de fenóis totais em vários membros da família *Eriocaulaceae*, realizada por SALATINO et al (1990), indicou que o subgênero *Platycaulon*, do gênero *Paepalanthus*, apresenta alto conteúdo desses compostos. Nesse gênero estão incluídas as

espécies *P. vellozioides*, *P. latipes* e *P. bromelioides* de cujos capítulos foi isolada a isocumarina 9,10-dihidroxi-5,7-dimetoxi-1H-nafto(2,3c)pirano-1-ona, denominada Paepalantina (VILEGAS, 1990), que demonstrou *in vitro* atividade antimicrobiana, mutagênica, citotóxica e antioxidante (VILEGAS et al., 1990; VARANDA et al., 1997; TAVARES, et al., 1999; KITAGAWA, et al., 2003). COELHO et al (2000) isolaram, em extrato diclorometano e clorofórmico de *P. bromelioides*, um dímero da paepalantina que foi denominado de 8,8'-paepalantina dímero. Posteriormente, do extrato diclorometano foi obtida a vioxantina, uma isocumarina dimérica semelhante a 8,8'-paepalantina dímero, cujo isolamento já havia sido relatado por PROVOST e GARCIA (1990) em outras espécies de *Paepalanthus*. O interesse na avaliação de propriedades biológicas das paepalantinas é decorrente de relatos etnofarmacológicos descritos por HOEHNE (1939) e da semelhança estrutural com outros fármacos com atividade antimicrobiana. Dentre seis isocumarinas naturais e semi-sintéticas avaliadas por DEVIENNE (2000), apenas a paepalantina e 8,8'-paepalantina dímero apresentaram promissora atividade antimicrobiana. Posteriormente, uma quinona (5-metoxi-3,4-diidroxi-antemegina), estruturalmente semelhante à 1,4-naftoquinona, foi isolada dos capítulos de *Paepalanthus latipes* (KITAGAWA et al., 2004).

Quinonas são compostos orgânicos que podem ser considerados produtos da oxidação de fenóis cuja forma reduzida também pode originar correspondentes fenólicos (SIMÕES et al., 2003). Essa classe de substâncias, amplamente distribuída na natureza, é encontrada em plantas, fungos e bactérias e foi associada a atividades antitumoral e antimicrobiana (HUANG et al., 2002). Estruturalmente, as quinonas possuem anéis aromáticos, com duas substituições cetona altamente reativas. A atividade antitumoral é relatada predominantemente em três principais grupos de quinonas naturais: benzoquinona, naftoquinona e antraquinona. Mitomicina e estreptonigrina, usadas na clínica médica, são *p*-benzoquinonas com grupos heterocíclicos e as antraciclina, doxorubicina e daunorubicina são antraquinonas. Algumas naftoquinonas com atividade antibacteriana, como lapachol e lapinona, são citotóxicas para células tumorais (INBARAJ, et al., 1999).

Nos últimos anos, foram isoladas quinonas com diversas atividades biológicas, como por exemplo, a naftoquinona trimérica conocurvona (de

Conospermum incurvum Lindley, Proteaceae), que apresenta atividade inibidora da replicação do vírus HIV (SIMÕES et al., 2003). Naftoquinonas presentes em gêneros das famílias *Ebenaceae*, *Bignoniaceae* e *Plumbaginaceae* apresentam ação anti-*Leishmania* (IWU et al., 1994). Outras naftoquinonas de extratos de *Kigelia pinnata* são antibacterianas, antifúngicas e antitumorais (SIMÕES et al., 2003). A naftoquinona menadiona ou vitamina K₃ é um derivado sintético da vitamina K₁ e exibe atividade antiproliferativa contra uma variedade de linhagens de células tumorais. Alguns estudos em variedades de linhagens celulares de carcinomas demonstraram que a co-administração de ácido ascórbico (vitamina C) e 2-metil-1,4-naftoquinona (vitamina K₃ ou menadiona), na razão de 100:1, resulta em atividade antineoplásica 10 a 50 vezes maior que quando essas vitaminas são administradas isoladamente (GILLOTEAUX et al., 2004).

Várias substâncias químicas com atividade antimicrobiana não são utilizadas no tratamento de infecções por não apresentarem toxicidade seletiva, sendo empregadas como drogas antineoplásicas (FONSECA, 1984). As atividades antitumoral e citotóxica de agentes químicos estão intimamente relacionadas. Citotoxicidade é um complexo evento *in vivo* cuja expressão pode ser manifestada através de um amplo espectro de efeitos, desde aberrações metabólicas com alterações funcionais até morte celular (FRESHNEY, 1994). Vários estudos demonstram que o tipo de linhagem celular e os métodos utilizados para a determinação da citotoxicidade basal *in vitro* possuem pouca influência na correlação entre os índices tóxicos (SHRISVASTAVA et al., 1992). Linhagens de células tumorais, como por exemplo, as linhagens LP07 e LM2 derivadas de tumor de pulmão e adenocarcinoma mamário de camundongos BALB/c, respectivamente, constituem importantes ferramentas para o estudo da biologia do tumor e na descoberta de novos quimioterápicos (URTREGGER et al., 2001; GALLI et al., 2000).

O câncer é basicamente uma doença caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle da proliferação e diferenciação celulares. Muitas substâncias citotóxicas potentes atuam em fases específicas do ciclo celular e, conseqüentemente, só exercem sua atividade contra células que se encontram em processos de divisão. Assim sendo, neoplasias malignas humanas que são mais susceptíveis ao tratamento quimioterápico possuem alta porcentagem de células em

processo de divisão. Os tumores sólidos que apresentam divisão celular relativamente lenta, tais como carcinomas de pulmão, cólon e mama, respondem pouco aos agentes quimioterápicos existentes (OLIVEIRA; ALVES, 2002). A neovascularização observada durante o crescimento do tumor resulta em uma rede de vasos sanguíneos ineficiente, com significativa proporção de células em hipóxia (Figura 1) (DENNY, 2001). A hipóxia parece ser uma propriedade comum e única dos tumores sólidos que poderia ser explorada no desenvolvimento de agentes antineoplásicos (biorredutíveis), os quais só se tornariam citotóxicos após metabolização, geralmente pelo sistema redox celular (DENNY, 2001; OLIVEIRA; ALVES, 2002). O conceito de ativação biorredutiva de substâncias em células em hipóxia tem sido extensivamente estudado, principalmente para substâncias que possuem função quinona. Desde o final dos anos 50, quinonas apresentando porções alquilantes em sua estrutura representam uma classe de substâncias que tem recebido considerável interesse como antitumorais. As enzimas mais importantes envolvidas na ativação dessas quinonas são a NADPH:citocromo P450 redutase e a NAD(P)H:quinona oxidoreductase (DT-diaforase), que estão elevadas em tumores sólidos, atuando, portanto, seletivamente (GUTIERREZ, 2000; RAUTH; MELO; MISRA, 1998; OLIVEIRA; ALVES, 2002).

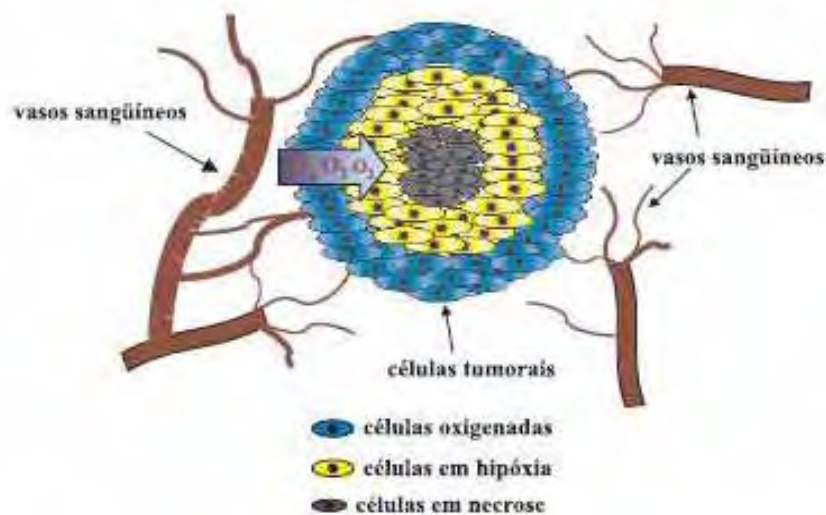


Figura 1 – Secção de um tumor sólido, mostrando a diminuição da concentração de oxigênio em relação à distância capilar (Retirado de OLIVEIRA; ALVES, 2002)

Câncer é causado por séries de mutações em genes que regulam o crescimento celular e apoptose. Espécies reativas de oxigênio (EROs) são conhecidas por causarem mutações. O radical hidroxil, por exemplo, sendo altamente reativo, é capaz de reagir com bases nucleotídicas formando uma variedade de bases modificadas que é uma importante causa de alteração pré-mutagênica. EROs são oxidantes produzidos pelo metabolismo aeróbio normal, onde 2 – 5% do oxigênio consumido pela mitocôndria é convertido em EROs como: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, radical peroxil (LOPACZYNSKI; ZEISEL, 2001).

Células eucarióticas produzem, continuamente, radicais livres como produto de reações de transferência de elétrons, sendo as mitocôndrias importantes fontes intracelulares de EROs (WISSING; MOURITZEN; JAATTELA, 1998). Uma fração do O₂ disponível para a cadeia respiratória sofre redução incompleta, gerando o radical superóxido, o qual é dismutado a H₂O₂ (BOVERIS; CHANCE, 1973). Apesar dessa freqüente exposição a EROs, as células são capazes de driblar a agressão através de uma variedade de mecanismos protetores e reparadores, incluindo os níveis de glutathione (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001). Em situações onde a capacidade protetora e reparadora das células ficam comprometidas e/ou a extensa produção de EROs excede a capacidade celular em superar tais agressões ocorre citotoxicidade. O *burst* oxidativo de neutrófilos também gera EROs, incluindo o ácido hipocloroso (HOCl) que é produzido por oxidação catalisada pela mieloperoxidase envolvendo Cl⁻ e H₂O₂ (BABIOR, 2000). O HOCl, como as demais EROs, ataca uma ampla ordem de moléculas fisiologicamente importantes, como nucleotídeos e aminoácidos (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).

Substâncias com propriedade antioxidante protegem as células do dano ao DNA mediado por EROs, que poderia resultar em mutação e, subsequente, mutagênese (LOPACZYNSKI; ZEISEL, 2001). Mecanismos de defesa antioxidantes limitam os níveis de EROs. Enzimas e antioxidantes podem inibir a produção de radicais livres quelando metais de transição catalisadores, quebrando reações em cadeia e capturando EROs (ARUOMA, 1996).

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que previne ou retarda um pró-oxidante (espécie reativa) de iniciar a oxidação do substrato

(PRIOR; CAO, 1999). Pró-oxidantes e antioxidantes podem ser estudados em sistemas biológicos através de ensaios que medem a produção de EROs (radical peroxil, OH^\cdot , HOCl , H_2O_2 , O_2^\cdot , entre outros), como, por exemplo, em ensaios quimiluminescentes (YILDIZ; DEMIRYÜREK, 1998; PRIOR; CAO, 1999)

A técnica de quimiluminescência é um método sensível e simples, que permite o monitoramento contínuo da produção de EROs diferenciando estágios metabólicos através da utilização de diferentes sondas quimiluminescentes. A utilização de sondas, como luminol e lucigenina, aumenta a sensibilidade da reação, pois amplificam a quimiluminescência, propiciando a detecção de baixos níveis de emissão de luz (TRUSH, 1987; STITES, 1994). Vários estudos propõem que a emissão de luz de sondas quimiluminescentes representa a interação sonda-EROs de maneira distinta, bem como em diferentes compartimentos celulares. Assim, luminol monitora a produção de espécies reativas de oxigênio formada no meio intra e extracelular, como o HOCl , H_2O_2 , O_2^\cdot e $^1\text{O}_2$, e lucigenina, por ser impermeável à membrana celular, monitora a produção de O_2^\cdot extracelular (PARIJ et al., 1998). Um antioxidante reduz ou não permite que EROs oxidem o substrato (sonda), resultando na diminuição da quimiluminescência do sistema (HIRAYAMA et al., 1997).

O uso de controles apropriados livres de células, utilizando sistemas químicos com oxidantes e radicais livres, pode auxiliar na caracterização do alvo de ação da droga. O teste de cloração é um ensaio alternativo para verificar a atividade antioxidante de uma substância que envolve a captura do HOCl (HALLIWELL, 1995). Neste teste, uma substância é considerada boa seqüestradora de HOCl quando é capaz de competir com TNB pela oxidação desse ácido (CHING et al., 1994; MARSHALL et al., 1996). Outro teste utilizado para verificar a propriedade antioxidante de substâncias consiste em avaliar a capacidade destas em seqüestrar radicais livres. O ensaio espectrofotométrico utilizando o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) permite fazer uma avaliação indireta da capacidade antioxidante da substância em análise. O DPPH apresenta coloração violeta e quando se encontra reduzido amarela. Esta redução é devida à ação de algumas substâncias capazes de doar hidrogênio radicalar ao DPPH, formando assim um radical estável, o qual é associado à propriedade antioxidante (Figura 2) (FENGLIN et al., 2004).

1994). Todavia, o descontrole na síntese de NO está envolvido na patogênese de doenças cardiovasculares, autoimunidade, rejeição de transplantes, sépsis, doenças cerebrais degenerativas, indução de câncer, genotoxicidade e na inflamação (COSTA et al., 2003). Os macrófagos murinos são capazes de produzir grandes quantidades de NO sob condições apropriadas, tendo sido uma das primeiras células descritas contendo a enzima NO sintase que converte a L-arginina em NO e L-citrulina (MORRIS; BILLIAR, 1994; NATHAN, 1992). Três isoenzimas participam da produção de NO e são denominadas de neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). A iNOS foi originalmente purificada e clonada a partir de macrófagos ativados, embora células musculares cardíacas, de músculo liso vascular e da glia também produzam NO a partir da iNOS (SARIH et al., 1993; LOPES-FARRÉ et al., 1998).

A geração de H_2O_2 parece ser um processo celular natural, resultante de várias reações de oxidases e de hidrogenases essenciais à atividade celular (RAMASARMA, 1990). O H_2O_2 é formado por uma seqüência coordenada de reações bioquímicas que é iniciada por um aumento no consumo de oxigênio seguido da redução de um elétron para formar ânion superóxido (O_2^-), numa reação catalisada por NADPH oxidase. O O_2^- é, subsequente, convertido a H_2O_2 pela ação da superóxido dismutase (SOD) (PICK; KEISARI, 1980). O H_2O_2 possui uma variedade de ações no corpo humano como, por exemplo, molécula sinalizadora, agente citotóxico no sistema de defesa e causador de doenças (HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000). A liberação de quantidades consideráveis de H_2O_2 induz a quebra da fita do DNA e/ou perturbação do citoesqueleto da membrana levando a morte celular. O papel dessa molécula na toxicidade intra e extracelular foi estabelecida por Ramasarma (1990).

O $TNF-\alpha$ é uma citocina multifuncional com ações centrais na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções (PALLADINO et al., 2003). Como mediador da resposta inflamatória aguda, o $TNF-\alpha$ atua no início da resposta imune, regula a cascata de citocinas durante a resposta inflamatória e está envolvido em eventos locais e sistêmicos (MARKHATADZE, 1998; BEUTLER; CERAMI, 1986). Sua principal função é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção, ativando estas células a eliminar os microorganismos. O $TNF-\alpha$ também atua como um pirogênio endógeno, induzindo

febre por aumentar a síntese de prostaglandinas (BEUTLER, 1995). Essa citocina, como mediador citostático, é responsável pela destruição de células tumorais através de ação citotóxica que induz danos teciduais, sendo também iniciadora de uma cascata de eventos que resulta em apoptose celular. Assim, substâncias que estimulam a indução de quantidades moderadas desse mediador podem ter sua aplicação como estimuladores de resposta biológica não específica (ROIT; BROSTOFF; MALE, 1999).

Testes de genotoxicidade *in vitro* são de grande importância no desenvolvimento de novos fármacos, tendo em vista que 83% das indústrias farmacêuticas liberam um novo agente terapêutico com base nos resultados desses testes (PURVES et al, 1995). É bem documentado que mutações gênicas atuam em etapas do processo de carcinogênese e que ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial aos seres humanos. Substâncias genotóxicas têm em comum propriedades químicas e físicas que permitem suas interações com os ácidos nucleicos. Devido à sua alta reatividade, essas substâncias podem levar a defeitos congênitos através de mutações em células germinativas e, quando a mutação ocorre em células somáticas, a consequência mais comum é a formação de tumores benignos ou malignos. Recentemente, foi proposto que as mutações em células somáticas podem também estar envolvidas na patogênese de algumas doenças crônicas tais como cardiovasculares, neurodegenerativas em adição ao processo de carcinogênese (ANDREASSI et al., 2000; ARUOMA, 2003; ROSS; MARGOLIS, 2005).

Para avaliação da atividade mutagênica existem diversos ensaios, contudo, destaca-se o teste de Ames (*Salmonella / Mammalian Microsome Mutagenesis Assay*), no qual são usados os ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium*. É um teste que tem sido amplamente utilizado para identificar mutágenos entre substâncias puras, misturas complexas e amostras ambientais. Esse teste caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *S. typhimurium* sensíveis a substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens revertem seu caráter de auxotrofia para a síntese de histidina e passam a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido em sistemas com e sem metabolização (ZEIGER,

2001; VARELLA et al., 2004). As linhagens utilizadas com maior frequência são TA 100, TA 98 e TA 102, as quais são capazes de detectar produtos químicos que causam mutações por deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituição dos pares de bases do DNA (*base pair*). Embora não se tenha evidência direta de que a exposição a agentes químicos seja responsável por modificações genéticas, muitos experimentos mostram que substâncias podem produzir mutações gênicas e cromossômicas. Um número considerável de mutágenos, detectados primeiramente pelo teste de Ames, mostraram-se carcinogênicos em testes *in vivo* (MARON; AMES, 1983).

A biotransformação é um mecanismo através do qual o organismo converte um fármaco em uma substância diferente da originalmente administrada, objetivando o aumento da hidrofiliabilidade para que seja excretado. Esse processo pode modificar o fármaco em pontos fundamentais de sua estrutura diminuindo a interação com tecidos susceptíveis. A biotransformação de xenobióticos em metabólitos mais hidrofílicos é, portanto, essencial para o término de sua atividade biológica, bem como para sua eliminação. Esse processo também pode ser uma forma de indução de compostos bioativos. São conhecidos inúmeros exemplos onde o fármaco administrado (denominado "pró-fármaco") é um produto inativo, o qual é, *in vivo*, convertido na forma farmacologicamente ativa, por exemplo, a ciclofosfamida, que é um agente antineoplásico que requer ativação metabólica por enzimas hepáticas do sistema citocromo P-450, pois somente os metabólitos formados são responsáveis pela atividade antitumoral e efeitos colaterais (RANG et al., 2003; CHU; SARTORELLI, 2005). Assim, para a terapêutica é de extrema importância a avaliação da biotransformação de substâncias químicas em metabólitos ativos e a análise de seus efeitos antes de serem administrados *in vivo* (RANG et al, 2003). Sistemas de ativação metabólica *in vitro* vêm sendo utilizados para demonstrar se um determinado composto necessita ser metabolizado para torna-se tóxico ou se possui ação direta sobre componentes celulares na sua forma original. O sistema composto por fração microssomal S₉ e cofatores é amplamente empregado para biotransformação de substâncias químicas (BARILE, 1994). A fração microssomal hepática S₉, faz parte de um grupo de enzimas do citocromo P-450 localizadas no fígado, sendo responsáveis pelas reações de biotransformação (PARKINSON, 1998). O citocromo P450 é responsável por reações de oxidação e

redução que fazem parte do grupo de reações de biotransformação de fase I que causam aumento da polaridade da substância a ser metabolizada e ancoram grupos para subseqüentes reações de conjugação (WERMUTH, 2003; THOMAS, 2003).

A descoberta de novos agentes químicos de aplicação terapêutica é sem dúvida uma atividade multidisciplinar, onde os estudos sobre eficácia, mecanismos de ação, potencial tóxico e genotóxico dependem de bioensaios *in vitro* e *in vivo* para que essas substâncias possam ser validadas como fármacos. Apesar dos testes *in vitro* não substituírem testes em animais para avaliação da atividade biológica de diversas substâncias, inicialmente, esses testes são aplicados em estudos pilotos de novos fármacos servindo como um modelo econômico para uma rápida triagem. Nesse contexto, a avaliação biológica da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina através de testes *in vitro*, *in vivo* e, posteriormente, investigação clínica, poderá viabilizar a utilização dessa substância com matéria-prima ou protótipo para síntese de um novo fármaco.

2 OBJETIVOS

Visto o potencial farmacológico das quinonas, avaliou-se a ação da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, isolada e identificada no Instituto de Química de Araraquara, quanto à atividade:

- a) antibacteriana;
- b) citotóxica (basal, pós-ativação metabólica e em associação com ácido ascórbico);
- c) antioxidante em sistema celular e em sistema químico livre de células;
- d) imunomoduladora;
- e) mutagênica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Paepalanthus latipes Silv. (Fig. 3), catalogada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP, sob referência CFSC 13846, foi coletada na Serra do Cipó, em Minas Gerais. Após processos de secagem e moagem, a 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina foi extraída dos capítulos da planta (VILEGAS et al., 1990). Os instrumentos e técnicas utilizados são descritos a seguir, assim como a preparação dos extratos e frações.



Figura 3 – *Paepalanthus latipes* Silv. – vista superior (cedida pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas)

3.2 Reagentes e soluções

D-Glicose (SYNTH), extrato de levedura, triptona (ACUMEDIA), meio Eagle, tripsina, Versene (Instituto Adolf Lutz), soro fetal bovino (Cultilab), meio Agar McConkey (DIFCO), KH_2PO_4 , NaCl , MgCl_2 , KCl , $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaOH , ácido acético, etanol absoluto, dimetilsulfóxido (DMSO), ácido ascórbico, mercaptoetanol, N-(1-naftil)-etilenodiamino, sulfonilamida (MERCK), vermelho neutro (Neutralrot Redox-Indikator – Riedel-de-Haën AG Seelze-Hannover – cod. 326.60), fração S_9 de fígado de rato Sprague Dawley (Moltox Molecular Toxicology, USA), D-glicose-6-fosfato, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

(SIGMA), ciclofosfamida (SIGMA cod. C0768), , catalase (EC 1.11.1.7 - SIGMA), ácido 5-5'-ditio(2-nitrobenzóico) (DTNB) (SIGMA cod. D8130), zimosan (SIGMA cod. Z4250), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (SIGMA cod. P-8139), luminol (SIGMA cod. A4685), lucigenina (SIGMA cod. M8010), 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) (SIGMA cod. 43180), trolox (ACROS ORGANICS), RPMI – 1640 (SIGMA cod. R-7755), HEPES (SIGMA cod. H-0763), penicilina (SIGMA cod. P-3414), estreptomicina (SIGMA cod. S-9137), glutamina (SIGMA cod. G-5763), meio tioglicolato (DIFCO cod. 0236-17), vermelho de fenol (SIGMA), peroxidase tipo II (HRP) (SIGMA cod. P-8250), lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* sorotipo O111:B4 (SIGMA cod. L-2630), actinomicina D (SIGMA cod. A-1410), e ácido ortofosfórico (MALLINCKRODT CHEMICAL), 4-o-nitrofenilenodiamina, 2-antramine, azida sódica, mitomicina C, 2-aminofluoreno (SIGMA).

3.3 Obtenção da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina

3.3.1 Instrumentos e técnicas utilizadas

- Para separações em coluna cromatográfica clássica (CC), utilizou-se sílica gel 60 (MERCK, 70-130 Mesh ASTM) como adsorvente e coluna de 33,0 cm x 2,5 d.i.
- Cromatografia líquida de média performance (CLMP) realizada em sistema BAECKSTRON SEPARO AB, coluna de vidro 10,0 x 1,5 cm, empacotada à seco com sílica 60H (MERCK, 40-63 Mesh ASTM) como suporte sólido e bomba FMI – 50 QD-O SSY, BS/BS com fluxo contínuo de 10 mL/minuto.
- Cromatografia em camada delgada comparativa (CCCD) realizada sobre placas de vidro 5,0 x 1,0 ou 20,0 x 20,0 cm contendo suspensão de sílica gel G (MERCK) em água destilada, na proporção de 1:2 (p/v), obtendo-se 0,25 mm de espessura de adsorvente. Após a preparação, as placas foram deixadas em repouso por cerca de 6 horas, à temperatura ambiente e em estufa a 120°C por cerca de 30 minutos.
- Luz ultravioleta (UV) em comprimento de onda de 254 – 366 nm (Chromatovue) utilizada para análise visual das placas.
- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) realizada em cromatógrafo Waters, equipado com injetor U6K; detector de UV/ visível Waters 486 operado em comprimento de onda 254 nm; integrador/registrator Waters 746; coluna Supelco C-18 (4,6 x 25 x 5µm). Antes da injeção, as amostras foram filtradas

através de membranas filtrantes de polietileno 0,45 μ m Millex conectadas a uma seringa plástica marca Hamilton (10 μ L). O volume injetado foi de 10 μ L, com fluxo de 1mL/min.

3.3.2 Preparação de extratos brutos

Extratos da planta seca e moída foram obtidos por maceração durante uma semana, utilizando solventes orgânicos em polaridade crescente. Ao final de cada extração a solução foi filtrada, em filtro de papel comum, e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se os extratos hexânico e diclorometânico (DCM). O extrato hexânico foi desprezado e o DCM utilizado para extração da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina. A seqüência para a preparação dos extratos está esquematizada na Figura 4.

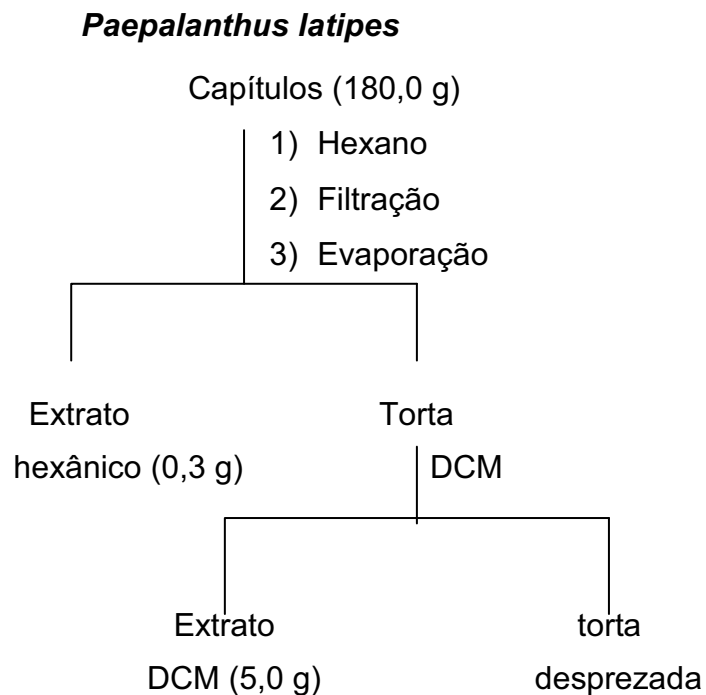


Figura 4 - Preparação de extratos de *Paepalanthus latipes*

3.3.3 Fracionamento e purificação

CC e CLMP foram utilizados para o fracionamento e purificação do extrato diclorometano e CCCD e CLAE para análise de pureza:

1. Cromatografia em coluna clássica (CC):- inicialmente, a eluição foi feita com tolueno puro, em seguida, aumentando-se a polaridade da mistura com adição de acetato de etila mais 0,5% de ácido acético até obtenção da proporção 6:4.
2. Cromatografia líquida de média performance (CLMP):- Uma mistura 9:1 de tolueno / acetato de etila mais 0,5% de ácido acético foi utilizada como solvente. A polaridade do sistema foi aumentada, gradativamente, com adição de acetato de etila.
3. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCCD):- todas as frações obtidas foram analisadas por CCCD, utilizando o sistema eluente 8:2:0,5 de tolueno/acetato de etila/ácido acético e agrupadas quando necessário. Após eluição, as placas foram reveladas sob luz ultravioleta (UV) e, posteriormente, com iodo. Frações que continham a 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, juntamente com outras impurezas, foram submetidas à CLMP e analisadas novamente.
4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): - a confirmação da pureza da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina foi realizada por CLAE. O sistema de eluentes utilizado foi acetonitrila (ACN) e ácido acético/água 2% e as condições de análise foram:
 - 8 minutos – 70% ACN + 30% ácido acético/água;
 - 22 minutos – 70% ACN + 30% ácido acético/água;
 - 10 minutos – 20% ACN + 80% ácido acético/água.

3.4 Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*

3.4.1 Soluções

- Meio de crescimento (MC): 1,0 g de glicose; 2,5 g de extrato de levedura; 5,0 g de triptona/L. Distribuir em tubos. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Substância teste: A solução de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina foi preparada na concentração de 1,0 mg/mL em meio de crescimento, as quais foram, posteriormente, submetidas às diluições seriadas e seqüenciadas no mesmo meio em concentrações que variaram de 1582 a 1,5 µM.

3.4.2 Manutenção dos microorganismos

Staphylococcus aureus ATCC 25913, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541 foram semeados em placas contendo Agar sangue de carneiro 5%, *Escherichia coli* ATCC 25922 em Agar MacConkey sendo, posteriormente, incubadas a 37°C. Após 24hs, colônias foram repicadas para tubos contendo MC e incubados overnight. Uma alíquota dessa cultura foi semeada no mesmo meio e incubado a 37°C até turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland para obtenção de crescimento em fase exponencial.

3.4.3 Procedimento

Orifícios de microplacas foram preenchidos com 100 µL de MC, contendo concentrações variadas da substância teste, sobre os quais foram adicionados 100 µL de cultura dos diferentes microorganismos em crescimento exponencial. As placas foram submetidas à leitura espectrofotométrica em 620 nm e, a seguir, incubadas a 35-37°C. Após 24 horas, as mesmas foram homogeneizadas e nova leitura realizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os testes foram realizados em triplicata e acompanhados de crescimento controle. A primeira leitura espectrofotométrica foi realizada para eliminar a coloração de fundo, servindo de branco do teste, dessa maneira somente o crescimento bacteriano foi computado nos experimentos.

3.4.4 Concentração inibitória mínima

A CIM foi determinada através da relação direta entre a absorbância do crescimento bacteriano e concentração da substância teste. A CIM foi definida, graficamente, como sendo a menor concentração do composto que induziu a um brusco declínio no valor da absorbância, o qual foi mantido nas concentrações seguintes e próximos a zero. Teoricamente, CIM é definida como a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano (DEVIIENNE, RADDI, 2002).

3.5 Determinação da atividade citotóxica *in vitro* para as linhagens celulares McCoy, LP07 e LM2

3.5.1 Linhagens celulares: células McCoy (ATCC 1696), células de adenocarcinoma murino LP07 (pulmão) e LM2 (mama).

3.5.2 Meio de cultivo e soluções

- Meio de cultivo: constituído por meio Eagle adicionado de 7,5% de soro fetal bovino.

- Tampão PBS: solução A: 0,908 g de KH_2PO_4 /100 mL; solução B: 0,9475 g de KH_2PO_4 /100 mL. Misturar 28,5 ml de solução A para 71,5 mL de solução B. Acrescentar 0,85 g de NaCl. Ajustar pH = 7,2 – 7,4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

- Solução de Vermelho Neutro: solução estoque do corante vermelho neutro (0,4% em tampão PBS) foi diluída a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em meio Eagle sem soro. Após 24 horas de incubação, a 37°C, a solução foi submetida à centrifugação (1500 rpm – 10 minutos), para remoção dos cristais remanescentes.

- Mistura de ácido acético/etanol (1:50): inicialmente, foi preparado álcool etílico 50%. Para a preparação de mistura, adicionou-se 1 mL de ácido acético glacial a 99 mL de álcool 50%.

- Substância teste: a solução da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina foi preparada nas concentrações de 10, 20, 40, 79, 158 e 316 μM , utilizando-se o meio de crescimento como diluente.

3.5.3 Procedimento

Células McCoy B, LP07 e LM2 foram mantidas em meio Eagle. Após tripsinização (2 mL de solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%), as células foram contadas em câmara de Neubauer e 200 μL do meio contendo aproximadamente 10^4 – 10^5 células/mL foram inoculados em microplacas (96 orifícios) para cultura de tecido (Corning cod. 25860) as quais foram incubadas a 35 – 37°C. Após 24 horas, o meio foi removido e cada orifício tratado com diferentes concentrações das substâncias teste. Após incubação por 24 horas, as placas foram preparadas para o teste do Vermelho Neutro (VN) (BORENFREUND & PUERNER, 1985). Os testes

foram acompanhados de crescimento controle, realizados em triplicata e repetidos no mínimo 3 vezes.

- Técnica do VN

200 µl da solução de VN foram adicionados aos orifícios das microplacas, as quais foram incubadas a 35 -37°C, por 3 horas. Após esse período, os orifícios foram lavados rapidamente com solução tampão PBS e 200 µL da mistura ácido acético/etanol foram adicionados a cada orifício. As placas foram deixadas em repouso por 10 minutos para extração do corante, homogeneizadas e leituras espectrofotométricas foram realizadas em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm (BORENFREUND; PUERNER, 1985).

3.5.4 Determinação do Índice Citotóxico (IC₅₀)

Os IC₅₀ para a 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina foram determinados através da análise de regressão linear, juntamente com outros conceitos estatísticos. Esse índice significa a concentração do agente que diminuiu em 50% a viabilidade celular.

3.5.5 Análise estatística

Os dados da análise estatística de regressão, juntamente com os apresentados na tabela ANOVA (análise de variância), podem avaliar se o modelo de regressão linear é adequado para a compilação, validação e significância dos resultados. A curva dose-resposta da substância foi obtida através do gráfico de dispersão *xy* contendo as observações (concentração x absorvância) e a reta de regressão (BARILE, 1994; LAPPONI, 1997).

3.6 Determinação da atividade citotóxica após associação com ácido ascórbico para as linhagens celulares McCoy, LP07 e LM2

Células McCoy, LP07 e LM2 foram tratadas com diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina adicionada de ácido ascórbico na proporção 1:20. Após incubação por 24 horas, as placas foram preparadas para o teste do VN. Os testes foram acompanhados de crescimento controle, realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, 3 vezes. Testes de citotoxicidade foram realizados

com as substâncias isoladas (5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina e ácido ascórbico) nas mesmas concentrações ensaiadas.

3.7 Determinação da atividade citotóxica para células McCoy na presença de sistema microssomal

Seguindo a metodologia descrita anteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações da substância teste, previamente submetidas à ativação metabólica a 10%, cujo sistema é composto por 4% de fração S₉ de fígado de rato tratado com Aroclor 1254, 1% de solução cloreto de magnésio 0,4 M, 1% solução cloreto de potássio 1,65M, 0,5% de D-glicose-6-fosfato 1M, 4% de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M, 50% de tampão fosfato 0,2 M (81% de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e 19% de fosfato de sódio monobásico 0,2 M) e 39,5% de água destilada estéril. Após incubação por 24 horas, o meio foi removido e a placa tratada para o teste do VN. Os testes foram acompanhados de crescimento celular sem substância teste, na presença de 10% de sistema de ativação metabólica, na presença de DMSO (com ativação metabólica) e com ciclofosfamida (controle da reação de metabolização). Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, 3 vezes.

3.8 Estudo de mecanismo de ação citotóxica da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina após associação com ácido ascórbico

3.8.1 Determinação da atividade citotóxica na presença de catalase

Células McCoy foram tratadas com diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina adicionada de ácido ascórbico, como descrito anteriormente, e catalase 1160U. Após incubação por 24 horas, as placas foram preparadas para o teste do VN. Os testes foram acompanhados de crescimento controle, realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, 3 vezes.

3.8.2 Ensaios espectrofotométricos (UV – VIS)

Para o ensaio espectrofotométrico foi utilizado espectrofotômetro DIODE ARRAY - HEWLET PACKARD (8452 A) com cubetas de caminho ótico de 1 cm. As concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina e ácido ascórbico

utilizadas nos ensaios foram 0,316 mM e 4,96 mM. Os estudos cinéticos do sistema 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina/ácido ascórbico foram realizados em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 à 37°C, com leituras de absorvância a cada 1 minuto, por 10 minutos.

3.8.3 Espectrometria de massas

Nos ensaios de avaliação da massa molecular de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina após a adição de ácido ascórbico foi utilizado espectrômetro de massas marca MICROMASS modelo QUATTROMICRO. As substâncias foram submetidas à ionização eletrospray operado de modo positivo. As amostras foram dissolvidas em metanol e injetadas diretamente no espectrômetro de massas através de injetor MICROMASS. O limite de massas analisado foi de 300 a 350 Da. A concentração de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina utilizada nos testes foi de 3 µM e do ácido ascórbico foi de 0,14 mM em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4.

3.9 Ensaios antioxidantes

3.9.1 Ensaios quimiluminescentes

3.9.1.1 Obtenção de neutrófilos (PMN) para ensaio quimiluminescente

a) *Indução de exsudato celular* – Dez mL de uma solução de glicogênio de ostra a 0,5% (p/v) em NaCl a 0,85% (p/v) foram injetados, via intraperitoneal, em rato macho (*Rattus albinus norvegicus*) com peso médio de 250 g. Após 12 horas, o animal foi sacrificado e a cavidade abdominal lavada com 20 mL de tampão PBS-Dulbecco (PBS-D) (Apêndice), contendo 10 UI heparina/mL. O lavado foi coletado por sucção, com seringa e agulha, transferido para tubo cônico siliconizado e centrifugado a 200 x g, por 3 minutos. Após 2 lavagens com tampão PBS-D sem cálcio, realizou-se a separação dos PMN.

b) *Separação e quantificação de PMNs por gradiente de densidade* - Em tubos siliconizados cônicos, com capacidade para 15 mL, foram adicionados 5 mL de histopaque 1083 e, vagarosamente, o mesmo volume da suspensão celular. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 700 x g, o sedimento lavado 2 vezes em tampão PBS-D sem cálcio e ressuspensionado para obtenção de suspensão contendo 1×10^6 células/mL (contagem realizada em câmara de NEUBAUER). A suspensão

celular foi mantida em banho de gelo durante os experimentos. A verificação da eficácia da separação foi realizada através da contagem diferencial das células, em esfregaços obtidos em citocentrífuga (FANEN), após coloração pelo método de LEISHMAN. Foram observadas 500 células em cada preparação, em microscópio óptico comum (X 1000).

c) *Viabilidade dos PMNs na presença de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina* - Cem μL de tampão PBS contendo, aproximadamente, 6×10^6 células/mL foram semeados em microplaca para cultura de tecido e incubados por 60 minutos à 35-37°C, em estufa de CO_2 à 5%. A seguir, PBS contendo diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina foi adicionado em cada orifício. Após incubação por 1 hora, a placa foi revelada pela técnica do VN. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos no mínimo 3 vezes. Esse teste permitiu determinar a viabilidade dos PMNs na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina após o tempo das reações.

3.9.1.2 Ensaio Quimiluminescentes

As reações seguiram recomendações descritas por Silva (2000), realizadas em luminômetro BioOrbit modelo 1251, dotado de dispensadores automatizados. O aparelho está interfaceado a um microcomputador e os resultados foram processados através do software Multiuse versão 2.0. Em tubo de reação foram adicionados suspensão de PMNs a $1,0 \times 10^6/\text{mL}$, luminol 2×10^{-5} M ou lucigenina 2×10^{-5} M e tampão PBS pH 7,4, o qual foi incubado por 10 minutos a 37°C, no próprio aparelho. Os ensaios objetivaram verificar a influência da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina no burst respiratório de PMNs ativados por zimosan através do luminol e por PMA através de lucigenina. Concentrações da substância química variando de 2 a 64 μM foram adicionadas ao tubo de reação.

3.9.1.3 Cálculo da variação da quimiluminescência (ΔQL)

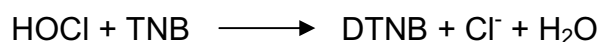
A variação da quimiluminescência expressa a intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE), após correção com a linha de base (células sem estímulo), representada da seguinte forma:

$$\Delta QL_M = \text{IME das células estimuladas} - \text{IME das células sem estímulo}$$

$$\Delta QL_C = \text{ICE das células estimuladas} - \text{ICE das células sem estímulo}$$

3.9.2 Teste de cloração

O método da cloração baseia-se na oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) pelo HOCl formando o ácido 5-5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), conforme a seguinte reação (CHING et al., 1994):



A absorvância do TNB a 412 nm diminui na presença de HOCl pela formação do DTNB que absorve em 325 nm. Nesse teste, incubou-se o HOCl (25 μM) com diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina por 1 minuto e, posteriormente, adicionou-se o TNB (50 μM).

3.9.3 Teste com DPPH

Neste ensaio espectrofotométrico utilizou-se uma solução de DPPH a 0,004% em metanol. A cada 50 μL da amostra em diversas concentrações foi adicionado 100 μL da solução de DPPH, sendo as absorvâncias determinadas a 540 nm em espectrofotômetro multicanal (TECAN SPECTRA) após 30 minutos de reação. Como referência de máxima absorção foi utilizada a leitura obtida com 100 μL da solução de DPPH adicionado de 50 μL de DMSO. Através dos valores das absorvâncias, foi plotado um gráfico de variação da absorvância, em porcentagem, pela concentração da amostra. A equação utilizada para verificação da porcentagem de inibição (% Δ) está demonstrada abaixo, onde A_0 é a absorvância do DPPH sem a substância teste e A corresponde a absorvância verificada com a adição da substância teste após 30 minutos de reação. Como referência da atividade antioxidante foi utilizado o trolox.

$$\% \Delta = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

3.10 Testes de resposta imunológica

3.10.1 Obtenção de macrófagos peritoneais

3.10.1.1 Meios de cultivo, soluções e reagentes

- Tampão PBS estoque: Solução A: 27,4 g de $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /386 mL de água deionizada; Solução B: 7,875 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /114 mL de água deionizada. Solução A e B foram misturadas, o pH ajustado a 7,2 com NaOH 4N e o volume completado para 1000 mL. A solução foi esterilizada a 121°C por 15 minutos e armazenada a 4°C.

- Tampão PBS 0,01 M: Acrescentou-se 8,5 g de NaCl a 40 mL de tampão PBS estoque e o volume completado para 1000 mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado a 7,2, esterilizada a 121°C por 15 minutos e armazenada a 4°C.

- Meio RPMI: Constituído por 10,3 g de RPMI – 1640/1000 mL de água Milli-Q acrescido de 2,38 g de HEPES e 2,0 g de bicarbonato de sódio. O pH foi ajustado a 7,2 com HCl 5 N, esterilizado em membrana Millipore 0,22 μm e acrescido de 5% soro fetal bovino inativado. No momento do uso, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, 2 mM de glutamina e 50 mM de mercaptoetanol foram adicionados.

- Meio Tioglicolato a 3%. Preparado em água deionizada, distribuído em tubos (4 mL/tubo), esterilizado a 121°C por 15 minutos e armazenados no escuro a temperatura ambiente.

3.10.1.2 Procedimento

Camundongos *Swiss* machos, pesando cerca de 20 a 30 gramas, foram inoculados, intraperitonealmente, com 3 mL de meio tioglicolato. Após 3 a 4 dias, os animais foram sacrificados e os macrófagos coletados através da lavagem peritoneal com 5 mL de PBS 0,01 M (BARILE, 1994 - modificado). A suspensão celular foi transferida para tubos de rosca estéreis e lavada 3 vezes com 1 mL de tampão PBS por centrifugação (250g, 5 minutos a 4°C). Os macrófagos foram

ressuspendidos em meio RPMI para a realização dos testes de indução e inibição de H_2O_2 , NO e TNF- α pela 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina.

3.10.2 Determinação da indução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

3.10.2.1 Soluções e reagentes

- Solução de vermelho de fenol 1%: Preparada em água Milli-Q, submetida à lavagem ultrassônica por 30 minutos para dissolução do pó e armazenada a 4°C.
- Tampão fosfato glicosilado: Constituído por 1,361 g de KH_2PO_4 , 2,282 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 8,182 g de NaCl e 0,991 g de glicose/L de água deionizada. O pH foi ajustado a 7,4 com solução de NaOH 4N, a solução esterilizada a 121°C por 15 minutos e armazenada a 4°C.
- Peroxidase tipo II (HRP): Preparada na concentração de 1mg/mL em tampão fosfato, distribuída em *ependorfs* (100 μ L) e armazenada a -20°C.
- Tampão Completo: Constituído por 9,6 mL de tampão fosfato glicosilado, 0,2 mL de solução de vermelho de fenol e 0,2 mL de peroxidase.
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA): PMA foi ressuspendido em DMSO na concentração 1 mM, aliquoteado em *ependorfs* (10 μ L) e armazenados a -70°C, ao abrigo da luz. Concentração final utilizada nos testes foi de 200 nM em tampão completo.
- Substância teste: A solução estoque da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina foi diluída em tampão completo e as concentrações finais utilizadas nos ensaios foram de 9,8, 19,75, 39,5, 79, 158 e 316 μ M.
- Solução de VN: preparado como descrito no item 3.5.2.
- Mistura ácido acético/etanol (1:50): preparado como descrito no item 3.5.2.

3.10.2.2 Procedimento

Suspensão de macrófagos peritoneais contendo 4×10^6 células/mL em meio RPMI foi adicionada (100 μ L) em microplaca de 96 orifícios (Corning cod. 25860). Após incubação em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 1 hora a 37°C, a placa foi vertida, os macrófagos tratados com 100 μ L de diferentes concentrações das substâncias teste e reincubada por 1 hora. Dez microlitros de NaOH 1N foram adicionados a cada orifício e, após 3 minutos, leitura espectrofotométrica foi realizada em 620 nm (PICK; MIZEL, 1981; PICK, 1986). A quantidade de H₂O₂ (nmol de H₂O₂) no sobrenadante foi determinada através de curva padrão (Apêndice). Os testes foram acompanhados de controle negativo (macrófagos sem estímulo ou tratamento), controle positivo (estimulação imunológica com PMA) e controle de viabilidade celular pós-experimentos através da técnica do VN (BORENFREUND; PUERNER, 1985). Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, com 3 animais.

3.10.3 Determinação da indução de óxido nítrico (NO)

3.10.3.1 Soluções e reagentes

- Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* sorotipo O111:B4: Preparado em solução estoque na concentração de 1000 μ g/mL em RPMI e armazenado a -20°C, sendo de 5 μ g/mL em RPMI a concentração final utilizada nos testes.
- Reagente de Griess: Constituído por 1,0 g de sulfanilamida, 0,1 g de naftiletilenodiamina, 2,5 g de ácido orto-fosfórico/ 100 mL de água Milli-Q e armazenado a 4°C.
- Substância teste: A solução estoque de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina foi diluída em RPMI e as concentrações finais utilizadas nos testes foram de 19,75, 39,5, 79, 158 e 316 μ M.
- Solução de vermelho neutro: preparado como descrito no item 3.5.2.
- Mistura ácido acético/etanol (1:50): preparado como descrito no item 3.5.2.

3.10.3.2 Procedimento

Suspensão de macrófagos peritoneais (100 μL), contendo 5×10^6 células/mL em RPMI, foi adicionada em microplacas de 96 orifícios (Corning cod. 25860) juntamente com 100 μL de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, as quais foram incubadas em estufa contendo 5% de CO_2 a 37°C , por 24 horas. Cem microlitros do sobrenadante da cultura foram transferidos para uma nova microplaca e 100 μL de reagente de Griess foram adicionados e a absorbância determinada em espectrofotômetro, comprimento de onda de 540 nm, após 15 minutos (FEDER, LASKIN, 1994; LASKIN et al, 1994; GREEN et al., 1982). A quantidade de óxido nítrico (μmol de nitrito) no sobrenadante foi determinada através de curva padrão (Apêndice). Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, com 3 animais. Os ensaios foram acompanhados de controle negativo (macrófagos sem estímulo ou tratamento), de controle positivo (estimulação imunológica com LPS) e controle da viabilidade de celular pós-experimentos através da técnica do VN (BORENFREUND; PUERNER, 1985).

3.10.4 Determinação da indução de fator de necrose tumoral (TNF- α)

3.10.4.1 Soluções e reagentes

- Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* sorotipo O111:B4: Preparado em solução estoque na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em RPMI e armazenado a -20°C . Concentração final utilizada nos testes 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em RPMI.
- Substância teste: A solução estoque da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina foi diluída em meio RPMI e as concentrações finais utilizadas nos experimentos foram de 39,5, 79 e 158 μM .
- Actinomicina D: Preparada em solução estoque na concentração de 10 mg/mL em água destilada estéril, aliqüotada em *eppendorfs* (50 μL) e estocada a -20°C . A concentração final utilizada no teste foi de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em RPMI-1640.
- Solução de vermelho neutro: preparado como descrito no item 3.5.2.

- Mistura ácido acético/etanol (1:50): preparado como descrito no item 3.5.2.

3.10.4.2 Procedimento

3.10.4.2.1 Indução da produção de TNF- α

Suspensão de macrófagos (1 mL), contendo 5×10^6 células/mL, foi adicionada em microplaca de 24 orifícios e incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, por 1 hora. A placa foi vertida para retirada do sobrenadante e 1,0 mL de meio RPMI contendo diferentes concentrações da quinona foi adicionado a cada orifício. Após 24 horas de incubação nas mesmas condições atmosféricas, o sobrenadante foi transferido para *ependorfs* estéreis e centrifugados a 4°C por 10 minutos.

3.10.4.2.2 Detecção da produção de TNF- α

Células L-929 (fibrosarcoma murino sensível ao TNF- α) foram mantidas em meio RPMI-1640. Após tripsinização (2 mL de solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%), 5 – 6 mL de suspensão celular foram transferidos para nova garrafa e 5 mL de meio foram adicionados. Após 30 horas de incubação (5% CO₂ a 37°C), nova tripsinização foi realizada e 100 μ L de meio, contendo 4×10^5 células/mL, foram adicionados em microplacas de 96 orifícios (Corning cod. 25860) para cultura de tecido, as quais foram incubadas por 18 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. O meio foi removido e cada orifício tratado com 100 μ L de actinomicina D e 100 μ L dos diferentes sobrenadantes obtidos dos macrófagos tratados, sendo a placa novamente incubada nas mesmas condições. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e o tapete celular tratado através da técnica do VN (BORENFREUND; PUERNER, 1985). TNF- α induzido foi determinado através da citotoxicidade funcional sobre células L-929. A atividade de TNF- α é expressa em U/mL, onde 50% de lise celular de L-929 correspondem a 1U dessa citocina (KIRIKAE et al, 1996). Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, com 4 animais. Os testes foram acompanhados de controle negativo (macrófagos e L-929 sem estímulo), controle positivo (estimulação imunológica com LPS).

3.10.5 Teste de inibição da liberação de H₂O₂

Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar a capacidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina de inibir a produção de H₂O₂. Foram utilizadas células do exsudato celular na concentração de 4 x 10⁶ células/mL. Após a aderência, as células foram incubadas na presença de 50 µL de PMA (0,2 µM) e 50 µL de concentrações da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina. A quantidade de H₂O₂ (nmol de H₂O₂) no sobrenadante foi determinada conforme descrito no item 3.10.2.2. Os cálculos das porcentagens de inibição foram feitos através de comparação com os controles utilizando a equação abaixo:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

A = absorvância na presença do estímulo (PMA ou LPS) sem a substância teste

B = absorvância na presença da substância teste

C = absorvância sem estímulo e sem substância teste

3.10.6 Teste de inibição da liberação de NO

Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar a capacidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina de inibir a produção de NO. Foram utilizadas células do exsudato celular na concentração de 5 x 10⁶ células/mL. Após a aderência, os macrófagos foram incubados na presença de 100 µL de solução de LPS (1 µg/mL) e 100 µL de cada concentração da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina. A incubação foi feita por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de 5% de CO₂. A produção de NO foi determinada espectrofotometricamente como descrito no item 3.10.3. Os cálculos das porcentagens de inibição foram feitos como descritos no item 3.10.5.

3.10.7 Teste de inibição da liberação de TNF- α

Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar a capacidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina de inibir a produção de TNF- α . Foram utilizadas a suspensão de macrófagos peritoneais na concentração de 5×10^6 células/mL e seguido como descrito no item 12.4. Após a aderência, os macrófagos foram incubados na presença de 25 μ L de solução de LPS (1 μ g/mL) e 25 μ L de cada concentração da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina. A incubação foi feita por 24 horas em estufa a 37°C com suprimento constante de 5% de CO₂. Posteriormente foram adicionados 100 μ L do sobrenadante sobre o tapete de células L-929 e, novamente, incubados a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 24 horas, a placa foi vertida e tratada para o teste do VN como descrito no item 3.10.4. Os cálculos das porcentagens de inibição foram feitos como descritos no item 3.10.5.

3.11 Determinação da atividade mutagênica *in vitro* da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina

Neste estudo foram utilizadas linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas em relação à histidina que detectam, preferencialmente, mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases do DNA. Linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 102 foram inoculadas em 30 mL de caldo nutriente, os quais foram incubados à 37°C por 14 horas, sob agitação, até obtenção de 1 a 2×10^9 células/mL. Diferentes concentrações da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (25, 50, 100, 200 e 400 μ M/placa) e 100 μ L de cultura bacteriana foram adicionadas a 2 mL de Top agar, homogeneizados e vertidos sobre placas de Petri contendo agar mínimo seletivo. Após solidificação do Top agar, as placas foram incubadas a 37°C. Após 48 horas, colônias histidina positiva (+his) foram contadas manualmente. Simultaneamente, a influência da ativação metabólica da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina foi testada sobre as mesmas linhagens de *S. typhimurium*, através da adição de 500 μ L de mistura S₉ ao Top agar, seguindo a metodologia descrita acima. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes para os ensaios sem ativação metabólica. Cada experimento foi acompanhado de controle de crescimento espontâneo, controle de DMSO (controle negativo) e controle da fração S₉ (quando

necessário). Para controle de mutagenicidade foram utilizadas as substâncias apresentadas abaixo:

<i>Linhagem</i>	<i>Mutágeno padrão</i>
TA 97a/-S ₉	NPD = 4-o-nitrofenilenodiamina (10 µg/placa)
TA 97a/+S ₉	ANTR = 2-antramina (1,25 µg/placa)
TA 100 / -S ₉	AS = azida sódica (1,25 µg/placa)
TA 100 / +S ₉	ANTR = 2-antramina (1,25 µg/placa)
TA 98 / -S ₉	NPD = 4-o-nitrofenilenodiamina (10 µg/placa)
TA 98 / +S ₉	ANTR = 2-antramina (1,25 µg/placa)
TA 102 / -S ₉	MITC = Mitomicina C (20 µg/placa)
TA 102 / +S ₉	AF = 2-aminofluoreno (10 µg/placa)

Uma substância é considerada mutagênica quando a razão de mutagenicidade (RM) for maior ou igual a 2, em pelo menos uma das doses testadas, e houver uma relação dose-resposta entre as concentrações avaliadas e o número de revertentes induzidos. RM é a razão entre a média do número de revertentes por placa teste (espontâneos e induzidos) e a média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos) (VALENT, 1993; VARGAS et al, 1993).

3.12 Análise estatística

Análise estatística descritiva foi realizada a fim de verificar a reprodutibilidade e validação dos resultados e análise por *t*-Student para averiguar diferenças estatisticamente significativa dos resultados obtidos após tratamento com a 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina e células controle (sem tratamento) (LAPPONI, 1997).

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antemegina

O fracionamento do extrato diclorometano (5,0 g) de *Paepalanthus latipes* levou a obtenção de 50 amostras, visualizadas através de CC. A análise preliminar por CCCD revelou a presença da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antemegina nas frações 11 à 14, obtendo-se em torno de 50 mg. A pureza das frações que continham a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antemegina foi avaliada primeiramente através de CCCD e confirmada, posteriormente, por CLAE (Fig. 5). A substância purificada foi submetida à determinação estrutural conforme descrito por KITAGAWA et al. (2004) (Fig. 6).

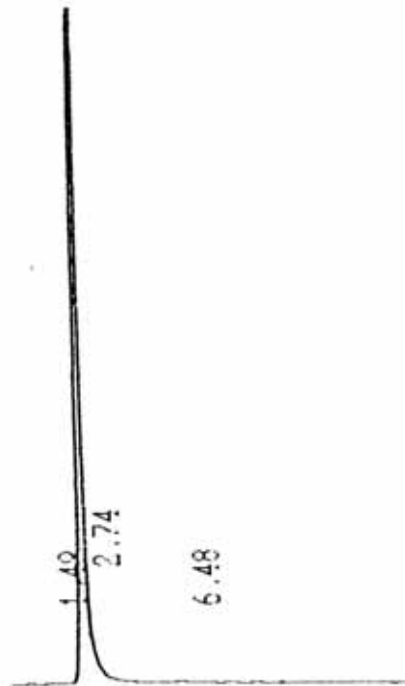


Figura 5 - Análise cromatográfica qualitativa da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antemegina por CLAE

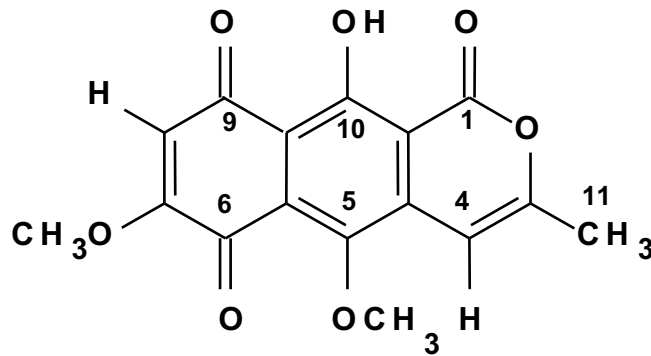


Figura 6 - Estrutura química da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina

4.2 Atividade antimicrobiana *in vitro*

O DMSO, utilizado para a dissolução da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, causa diminuição significativa do crescimento bacteriano a partir de solução a 12,5% (DEVIENNE, 2000). Nos ensaios realizados a concentração do solvente não ultrapassou 5%. Considerando as concentrações utilizadas, o valor de CIM da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina para *E. faecalis* e *S. aureus*, microrganismos Gram-positivos, foi de 197 μM e para *E. coli*, microrganismo Gram-negativo, não houve diminuição significativa do crescimento bacteriano nas concentrações ensaiadas. A Figura 7 apresenta o efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina sobre os microrganismos ensaiados, o qual foi demonstrado através da leitura de absorbância do crescimento bacteriano na ausência e presença de diferentes concentrações da substância teste. Os valores de variabilidade para cada concentração são apresentados no Apêndice.

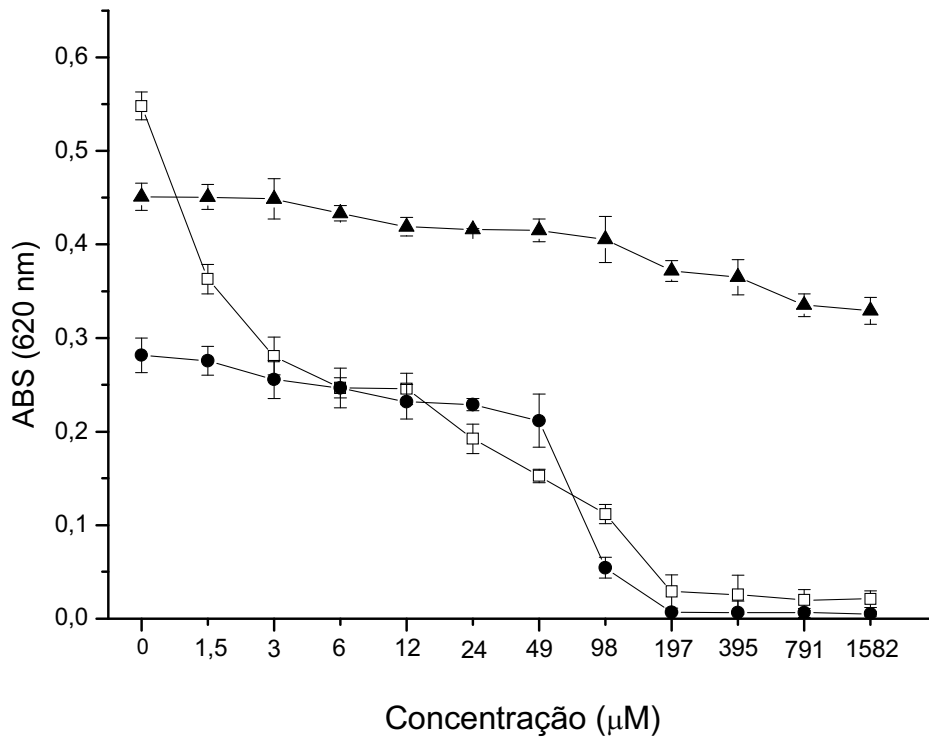


Figura 7 – Relação dose-resposta do crescimento de *S. aureus* (-□-), *E. faecalis* (-●-) e *E. coli* (-▲-) para 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina

4.3 Citotoxicidade *in vitro* da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina

4.3.1 Índice citotóxico basal para as linhagens McCoy, LP07 e LM2

A Figura 8 apresenta comparativamente a curva dose-resposta para células McCoy, LP07 e LM2, pela técnica do Vermelho Neutro (VN), da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, representativa de 3 experimentos, realizados separadamente, por análise de regressão linear (analisados em triplicata). O valor do índice citotóxico (IC_{50}) da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina para as linhagens celulares descritas acima, obtido no teste do VN é apresentado na Tabela 1 como média \pm desvio padrão.

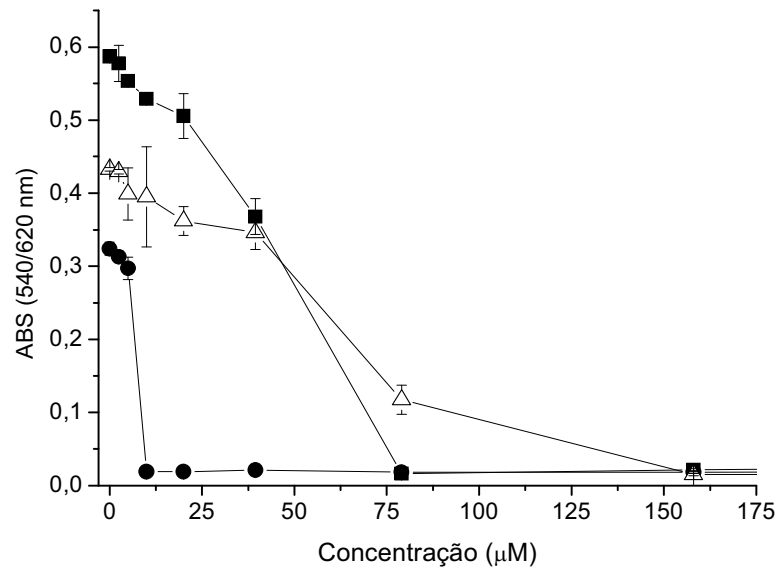


Figura 8 – Curva dose-efeito de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina sobre células McCoy (-■-), LP07 (-●-) e LM2 (-△-)

Tabela 1 – Índice citotóxico da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina para algumas linhagens celulares

<i>Linhagem celular</i>	<i>IC₅₀ (µM)</i>
McCoy	42,47 ± 1,25
LP07	6,2 ± 0,36
LM2	74,6 ± 1,9

4.3.2 Índice citotóxico após associação com ácido ascórbico para as linhagens McCoy, LP07 e LM2

A Figura 9 mostra, comparativamente, a citotoxicidade da 5-metoxi-3,4-diidroxiacetona associada ao ácido ascórbico. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes. A Tabela 2 apresenta a média e o desvio padrão dos índices citotóxicos (IC_{50}) da 5-metoxi-3,4-diidroxiacetona/ácido ascórbico para as linhagens McCoy, LP07 e LM2, obtidos nos testes do VN.

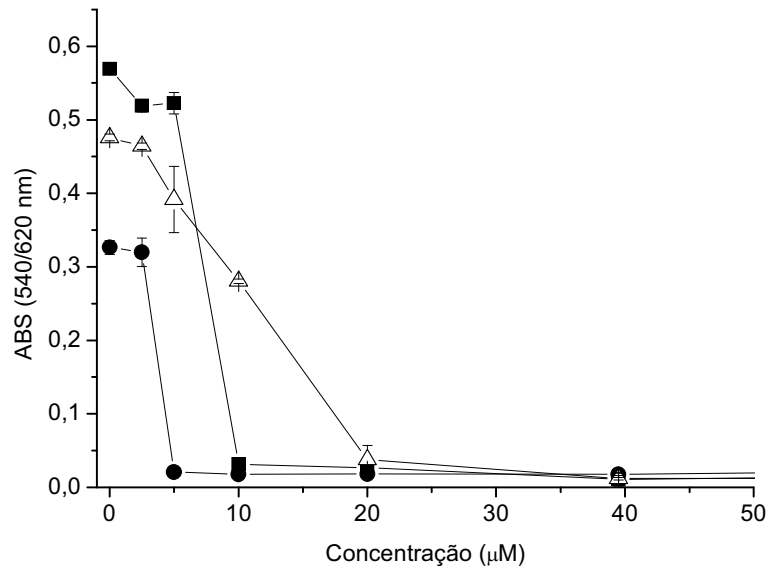


Figura 9 - Curva dose-efeito de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxiacetona associada ao ácido ascórbico sobre células McCoy (-■-), LP07 (-●-) e LM2 (-Δ-)

Tabela 2 – Índice citotóxico da associação 5-metoxi-3,4-diidroxiacetona e ácido ascórbico para algumas linhagens celulares

<i>Linhagem celular</i>	<i>IC₅₀ (µM)</i>
McCoy	5,9 \pm 0,19
LP07	3 \pm 0,1
LM2	17,6 \pm 0,47

4.3.3 Índice citotóxico para células McCoy na presença de sistema microssomal

Inicialmente, diferentes concentrações do sistema de ativação metabólica, composto por fração microssomal S₉, foram avaliadas sobre células McCoy. Meio Eagle contendo 2, 4 e 10% desse sistema demonstraram não alterar a viabilidade celular, portanto os testes foram realizados com a maior concentração de fração S₉ (10%). Visto que DMSO poderia tornar-se mais tóxico na presença desse sistema, a concentração máxima do solvente foi determinada previamente. Os resultados demonstraram que não há diferença significativa na citotoxicidade de células tratadas com DMSO na ausência e presença de sistema de ativação metabólica (10%).

A relação dose-resposta para células McCoy tratadas com a 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina na ausência e presença de sistema de ativação metabólica é apresentada na Figura 10. Diferentes concentrações de ciclofosfamida, um pró-fármaco que na presença de sistema de ativação metabólica torna-se extremamente citotóxico, foram utilizadas como controle do teste. A 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina na presença ou ausência do sistema de metabolização reduz a viabilidade celular de modo similar. Os resultados de IC₅₀ da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina na presença e ausência da fração S₉ foram de $42,27 \pm 1,2 \mu\text{M}$ e $42,47 \pm 1,25 \mu\text{M}$, respectivamente, média \pm desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes.

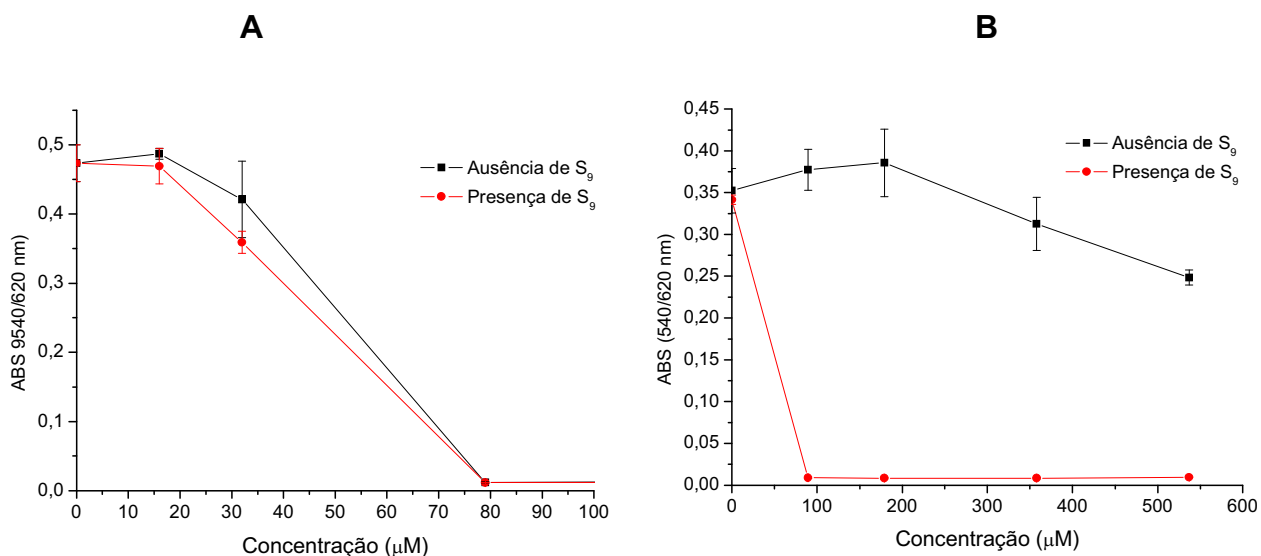


Figura 10 – Curva dose-efeito de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (A) e ciclofosfamida (B) na ausência e presença de sistema de ativação metabólica sobre células McCoy

4.4 Avaliação da citotoxicidade na interação da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina e ácido ascórbico

4.4.1 Índice citotóxico na presença de catalase

A Figura 11 apresenta a curva dose-resposta para células McCoy tratadas com 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina/ácido ascórbico, 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina/ácido ascórbico/catalase e ácido ascórbico, respectivamente, representativa de 3 experimentos em triplicata, realizados separadamente, por análise de regressão linear. A Tabela 3 apresenta a média e o desvio padrão dos índices citotóxicos (IC_{50}) da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina/ácido ascórbico, 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina/ácido ascórbico/catalase e ácido ascórbico obtidos nos testes do VN. A Figura 12 mostra, comparativamente, a citotoxicidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, sua associação com o ácido ascórbico e esse sistema na presença de catalase. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes.

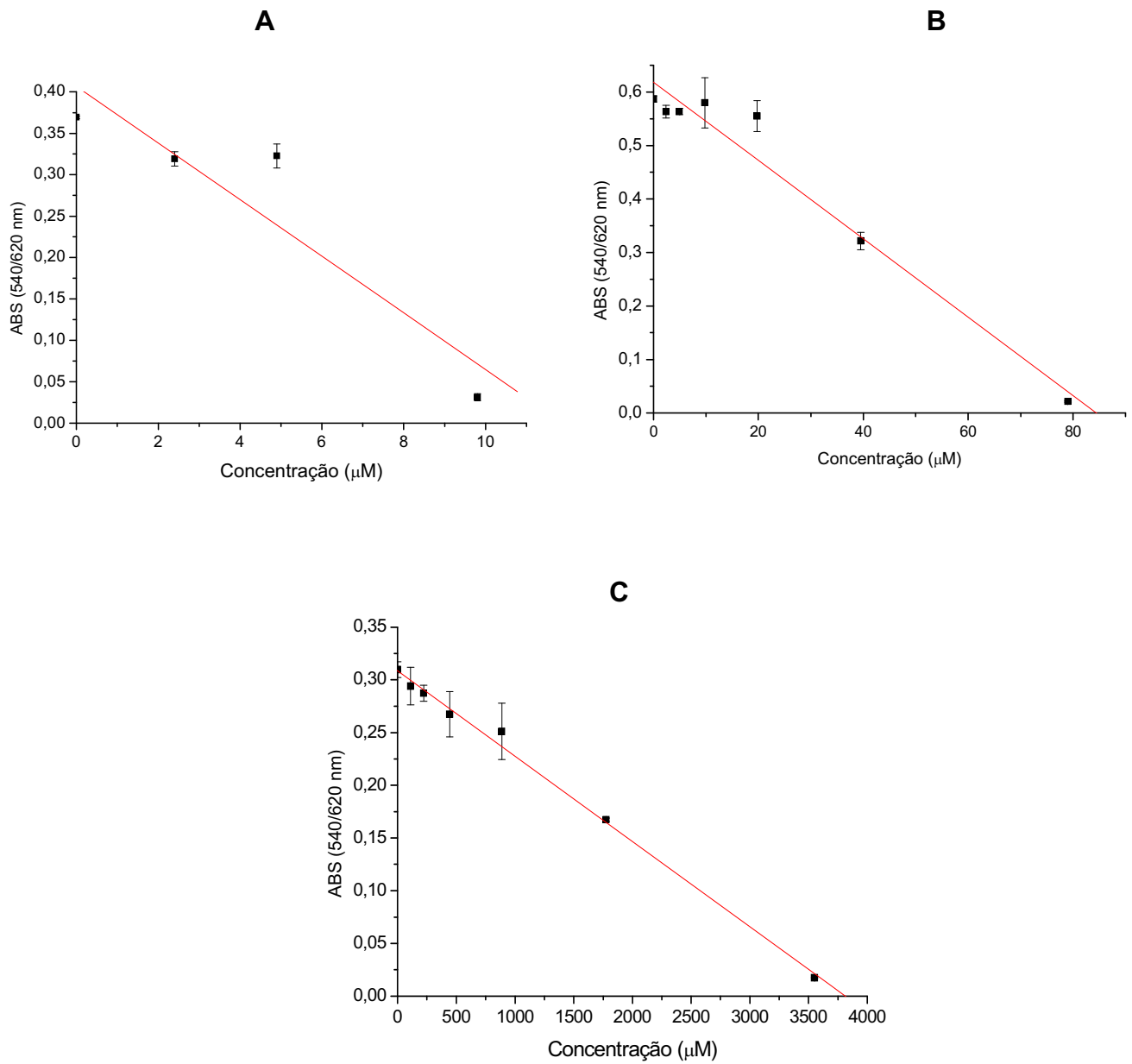


Figura 11 – Curva dose-resposta da 5-metoxi-3,4-dihydroxantomegnina/ácido ascórbico (A), 5-metoxi-3,4-dihydroxantomegnina/ácido ascórbico/catalase (B) e ácido ascórbico (C) sobre células McCoy pela técnica do VN

Tabela 3 – Índice Citotóxico (IC_{50}) da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina e sua associação com o ácido ascórbico pela técnica do VN

Substâncias	IC_{50} (μM)
5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina	$42,47 \pm 1,25$
5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina /ác. ascórbico	$5,9 \pm 0,19$
5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina /ácido ascórbico/catalase	$42,67 \pm 0,38$
Ácido ascórbico	$3534 \pm 18,58$

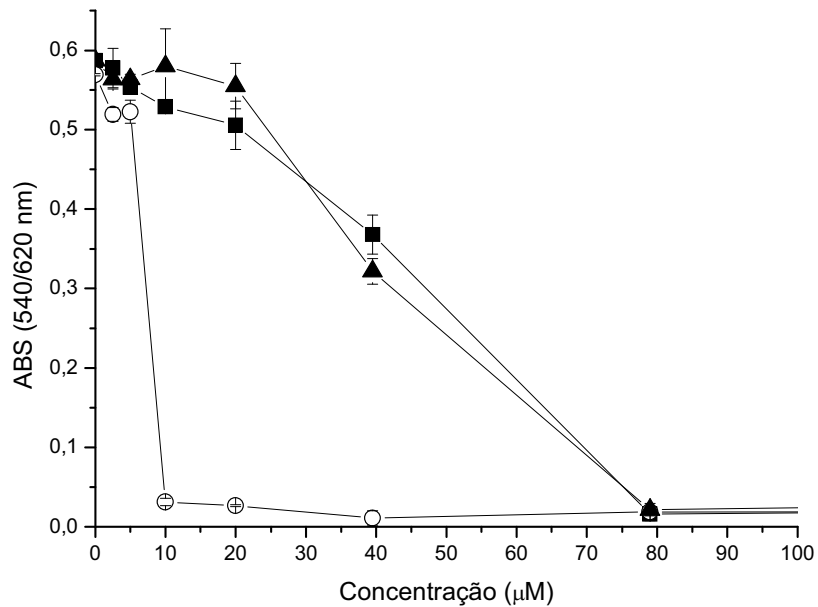


Figura 12 – Curva dose-efeito de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (-■-), 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina/ácido ascórbico (-○-) e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina/ácido ascórbico/catalase (-▲-) sobre células McCoy

4.4.2 Perfil espectrofotométrico

Pelo fato da maior citotoxicidade observada para a associação 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina/ácido ascórbico, procurou-se avaliar, através de análise espectral, a interação entre essas duas substâncias. As Figuras 13, 14 e 15 mostram, respectivamente, o espectro de absorção da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, ácido ascórbico e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina/ácido ascórbico. A monitoração das absorbâncias características da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, assim como do produto formado pela interação com ácido ascórbico, é mostrada na Figura 16.

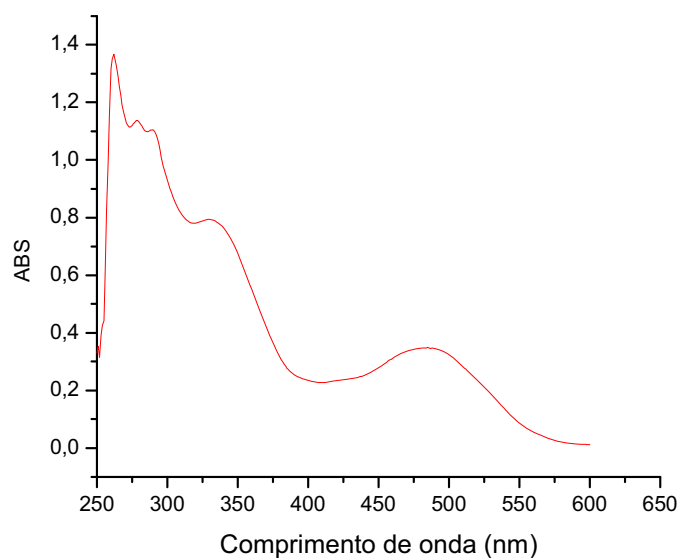


Figura 13 – Espectro da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina em tampão fosfato, pH 7,4 a 37°C

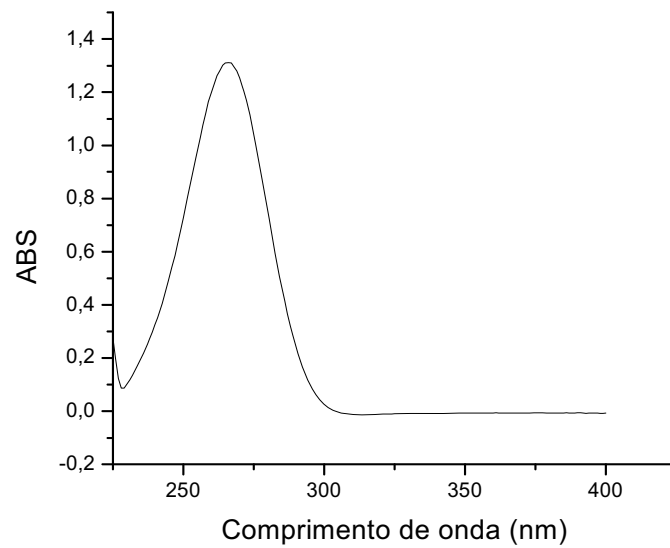


Figura 14 – Espectro do ácido ascórbico em tampão fosfato, pH 7,4 a 37°C

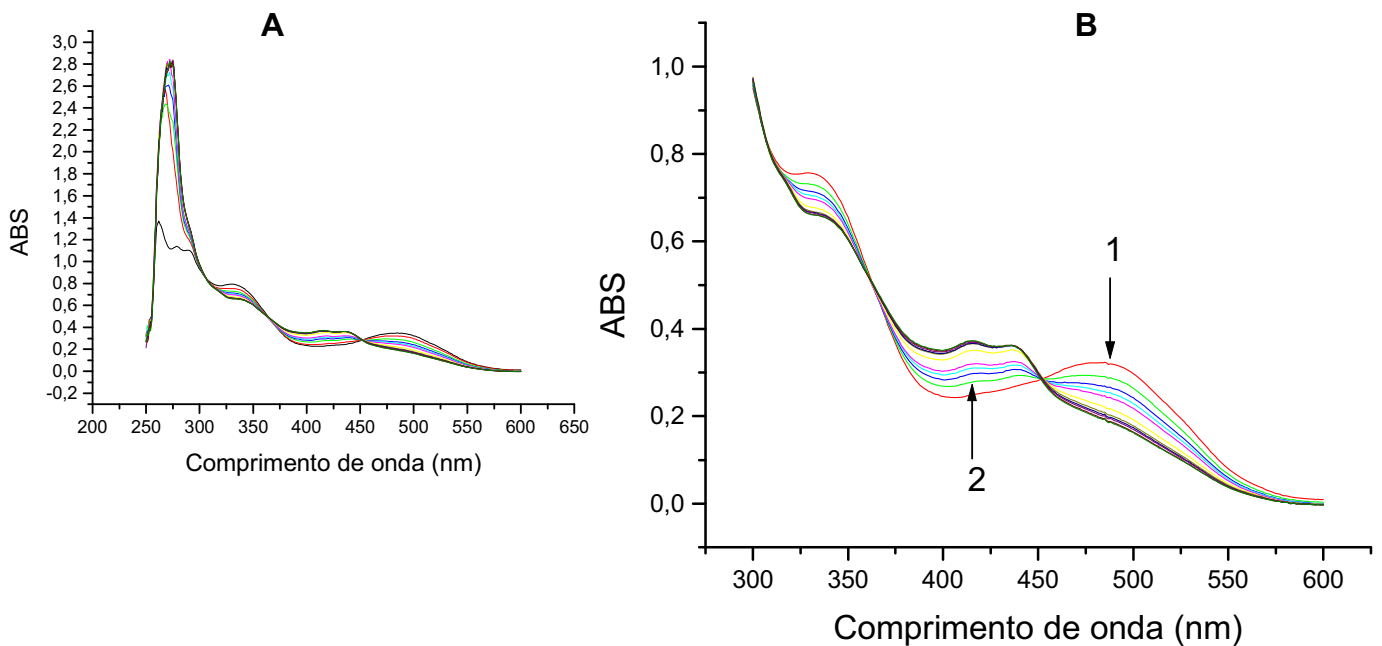


Figura 15 – (A) Efeito do ácido ascórbico sobre o espectro da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, (B) Detalhe mostrando o espectro de absorção entre 300 a 600 nm: 1) espectro da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (0,316 mM); 2) após adição de ácido ascórbico (4,96 mM). Os espectros foram registrados em intervalos de 1 minuto por 10 minutos

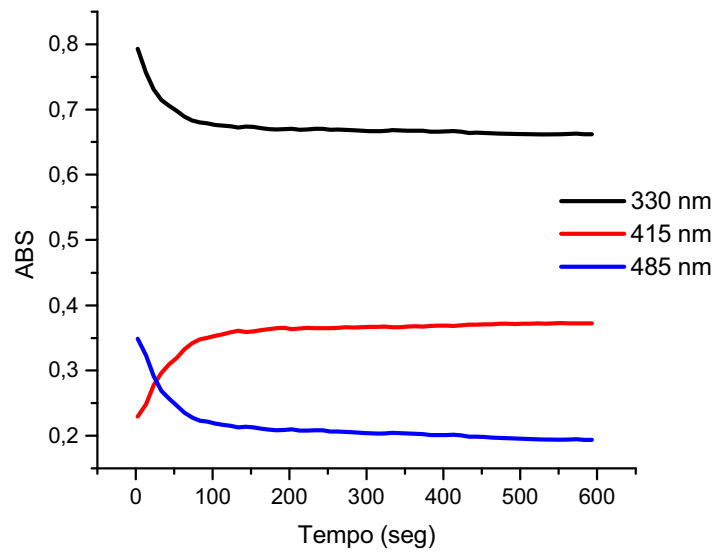


Figura 16 – Absorbâncias características da 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina (330 e 485 nm) e formação de novo produto (415 nm), em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4

4.4.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi realizada para avaliar se houve redução da 5-metoxi-3,4-dihidroxantomegnina na presença do ácido ascórbico. As Figuras 17 e 18 mostram o espectro de massas da 5-metoxi-3,4-dihidroxantomegnina e o espectro de massas após a interação com o ácido ascórbico, respectivamente.

1 micrograma

QUIN-01-POSITIVO 1 (0.170)

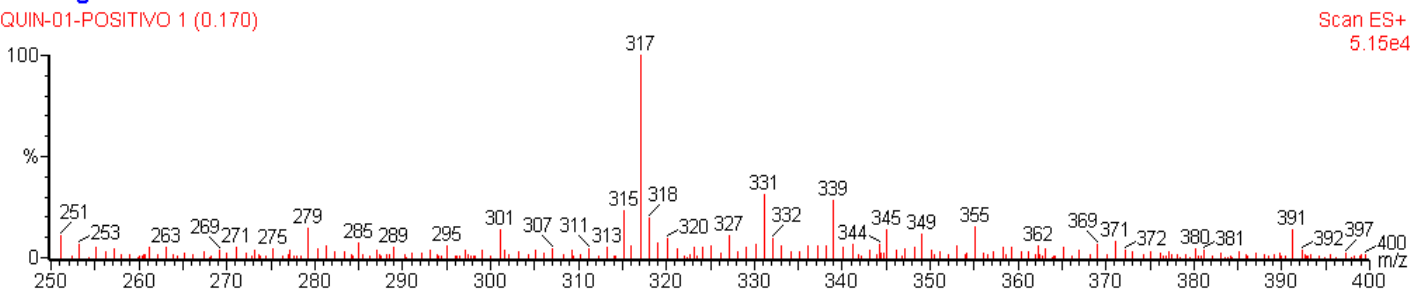


Figura 17 – Espectro de massas da 5-metoxi-3,4-dihidroxantomegnina 3 μ M em metanol. PM: 316

1 micrograma + ac asc

QUIN-12-POSITIVO 1 (0.085)

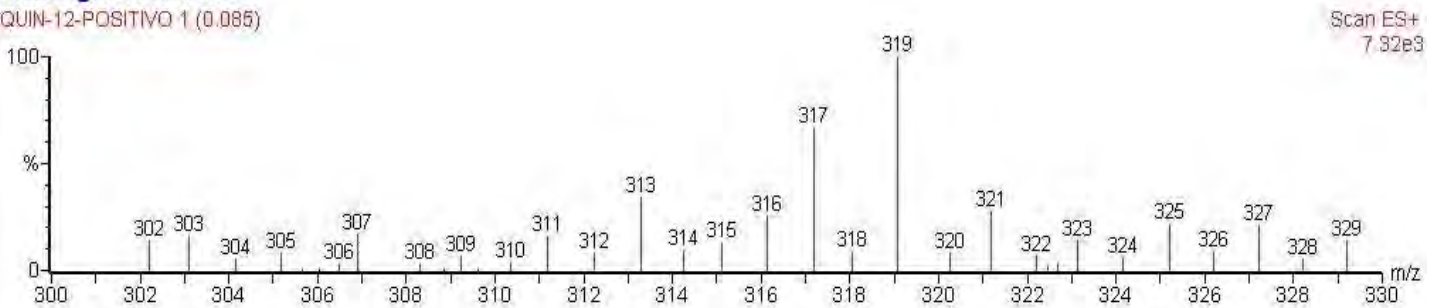


Figura 18 – Efeito no espectro de massas da 5-metoxi-3,4-dihidroxantomegnina 3 μ M após a adição de ácido ascórbico 0,14 mM em tampão fosfato, pH 7,4, após 2 horas

4.5 Atividade antioxidante

4.5.1 Efeito no *burst* oxidativo de neutrófilos através de técnica quimiluminescente

Inicialmente para a padronização do ensaio quimiluminescente, foi avaliada a possibilidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina metanolamina emitir luz em diferentes sistemas, utilizando as sondas luminol e lucigenina, bem como o efeito do DMSO no sistema PMN/luminol/zimosan, pelo fato da 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina metanolamina (quinona) estar dissolvida em DMSO.

Os sistemas PMN/luminol/quinona, PMN/PBSD/quinona, luminol/PBSD/quinona e PBS/D/quinona (Fig. 19), PMN/lucigenina/quinona, lucigenina/PBSD/quinona (Fig. 20) e diferentes concentrações de DMSO no sistema PMN/luminol/zimosan (Fig. 21) demonstraram que 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina metanolamina e DMSO (nas concentrações testadas) não interferem na reação quimiluminescente. A porcentagem de DMSO para a maior concentração de 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina metanolamina utilizada não ultrapassou 0,2%. A viabilidade dos PMNs foi avaliada em relação ao tempo do ensaio quimiluminescente e para as concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina metanolamina utilizadas. A viabilidade celular manteve-se acima de 90% na presença de todas as concentrações testadas por período de 1 hora. Os testes foram realizados pela técnica do VN, em triplicata e repetidos 3 vezes.

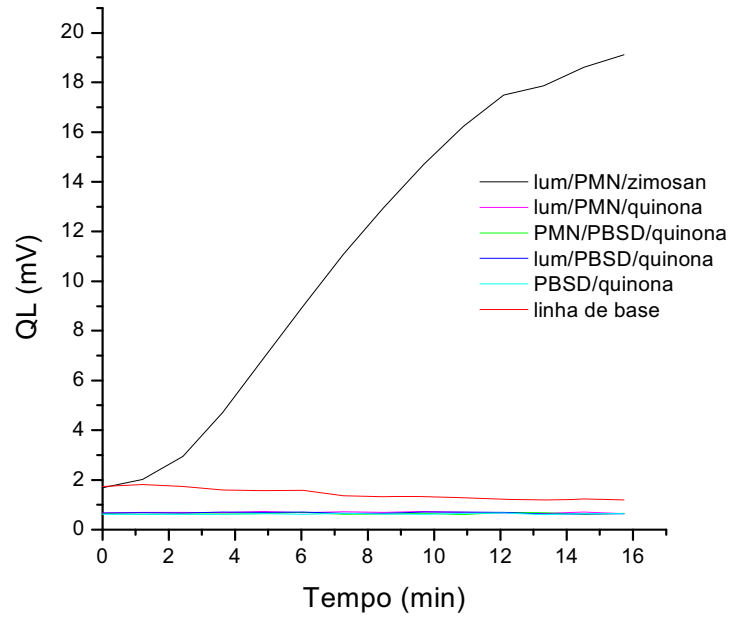


Figura 19 – Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (quinona) na quimiluminescência (QL) de diferentes sistemas utilizando luminol

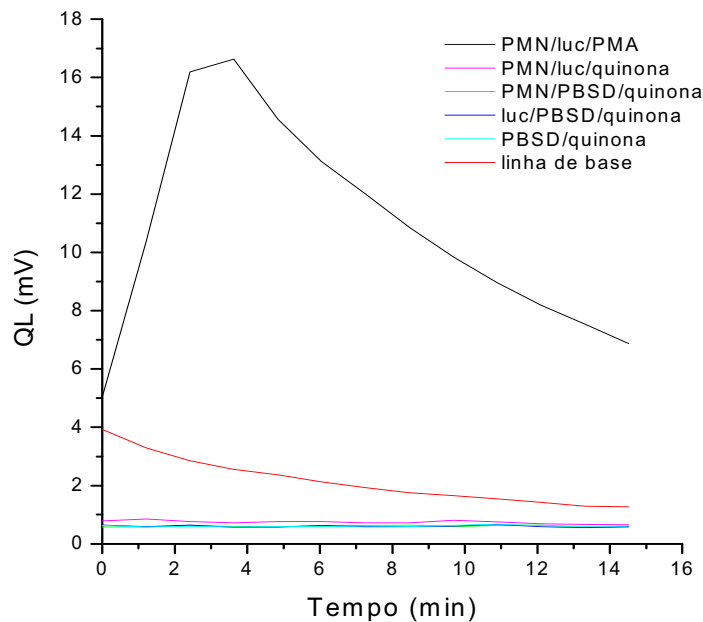


Figura 20 – Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (quinona) na quimiluminescência (QL) de diferentes sistemas utilizando lucigenina

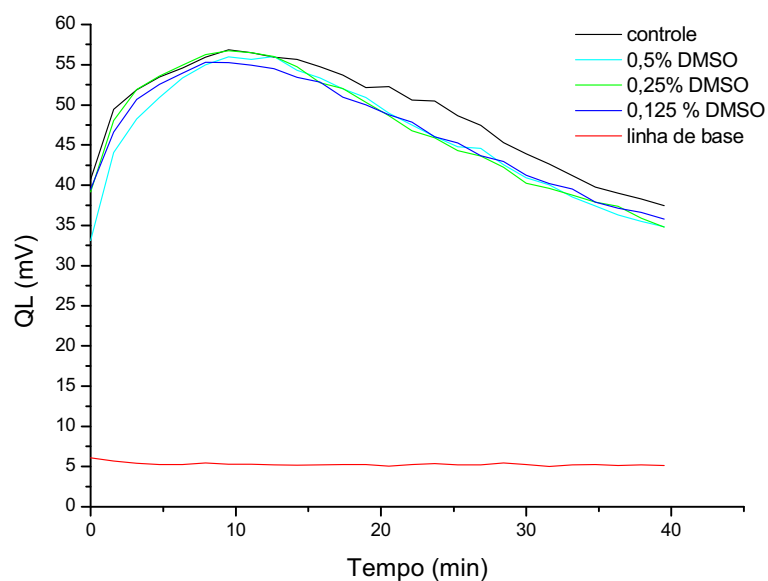


Figura 21 – Quimiluminescência (QL) do sistema PMN/luminol/zimosan na presença diversas concentrações de DMSO

4.5.1.1 Quimiluminescência do sistema PMN/luminol/zimosan na presença da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina

A diminuição da quimiluminescência do sistema PMN/luminol/zimosan na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina é demonstrada na Figura 22, sendo esse efeito dose-dependente. As Tabelas 4 e 5 mostram os valores da ΔQL para intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE). A Tabela 6 apresenta o percentual de decaimento de emissão de luz na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina.

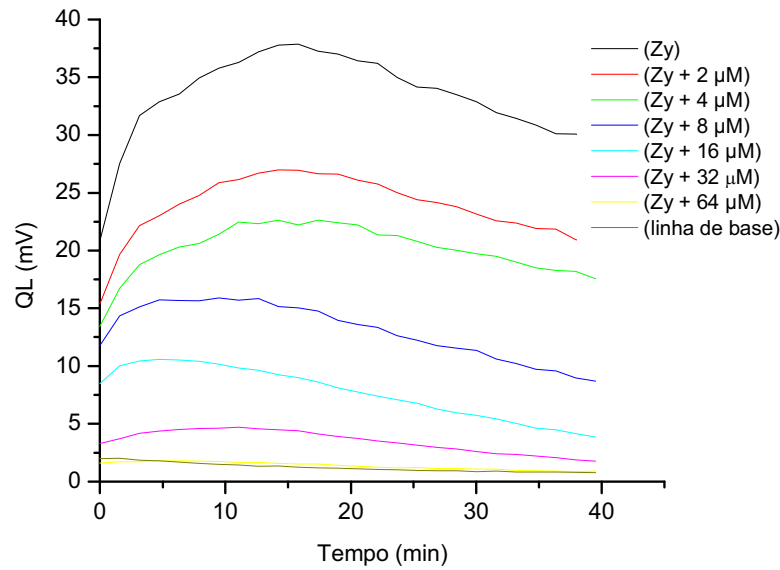


Figura 22 – Quimiluminescência (QL) do sistema PMN/luminol/zimosan (Zy) na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM)

Tabela 4 – Variação da quimiluminescência (ΔQL) para intensidade máxima de emissão (IME) do sistema PMN/luminol/zimosan na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina

5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM)	ΔQL para IME (mV)	valor-P
64	0,1 + 0,14	0,0028795*
32	2,5 + 0,7	0,003013*
16	10,65 + 2,33	0,0041081*
8	15,98 + 1,86	0,0042927*
4	21,85 + 2,89	0,0211931*
2	26,7 + 2,54	0,1455684
Controle ^a	37,95 + 7,7	-

^a sistema PMN/luminol/zimosan na ausência da droga
* $p < 0,05$

Tabela 5 – Variação da quimiluminescência (ΔQL) para integral da cinética de emissão (ICE) do sistema PMN/luminol/zimosan na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina

5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM)	ΔQL para ICE	valor-P
64	2164,5 \pm 3061	0,0131029*
32	29495 + 417132	0,0132585*
16	1459049 + 2063407	0,0144099*
8	10537593 + 2826751	0,0210406*
4	24400616 + 984963	0,0379479*
2	36674844 + 7387458	0,1286402
Controle ^a	46159795 + 12975054	-

^a sistema PMN/luminol/zimosan na ausência da droga; *p<0,05

Tabela 6 – Percentual do decaimento da emissão de luz para integral da cinética de emissão (ICE) do sistema PMN/luminol/zimosan na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina em relação ao controle

5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM)	Decaimento de emissão de luz em relação ao controle* (%)
64	99,96 \pm 0,05
32	95,4 \pm 0,6
16	74,36 \pm 5,6
8	57,3 \pm 8,16
4	44,1 \pm 6,9
2	28,4 \pm 3,15

* sistema PMN/luminol/zimosan na ausência da droga (100%)

4.5.1.2 Quimiluminescência do sistema PMN/lucigenina/PMA na presença de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina

Nesse ensaio avaliou-se o efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina na quimiluminescência dependente de lucigenina, que monitora a produção de O_2^- . A Figura 23, representativa de 3 experimentos, demonstra diminuição da quimiluminescência do sistema PMN/lucigenina/PMA na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, sendo esse efeito dose-dependente. As Tabelas 7 e 8 mostram os valores da ΔQL para intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE) e a Tabela 9 apresenta o percentual de decaimento de emissão de luz na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina.

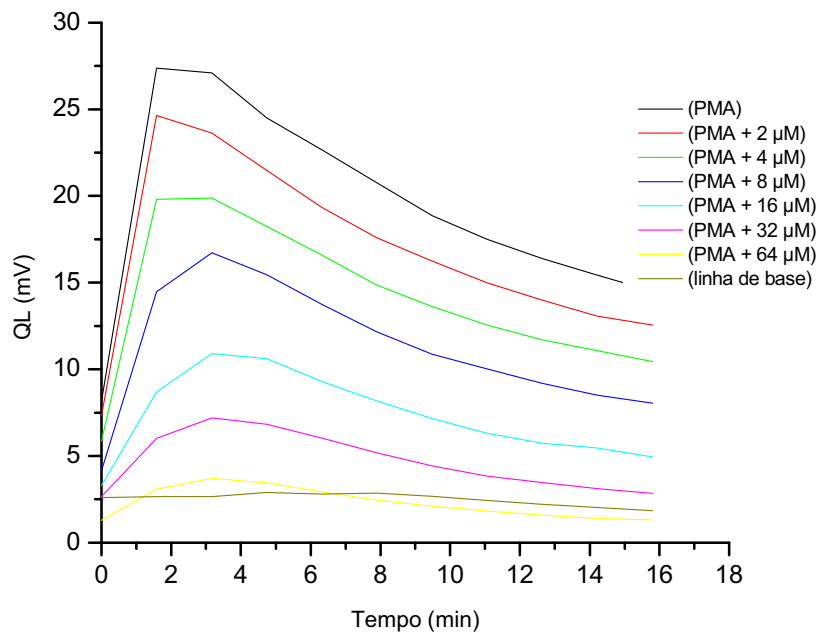


Figura 23 – Quimiluminescência (QL) do sistema PMN/lucigenina/PMA na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM)

Tabela 7 – Variação da quimiluminescência (ΔQL) para intensidade máxima de emissão (IME) do sistema PMN/lucigenina/PMA na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina

5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM)	ΔQL para IME (mV)	valor-P
64	1,4 \pm 2,09	9,616E-06*
32	5,5 \pm 2,46	4,341E-05*
16	12,9 \pm 3,38	0,0012867*
8	18,3 \pm 4,94	0,0359374*
4	20,4 \pm 5,02	0,0994743
2	24,1 \pm 5,9	0,5186354
Controle ^a	26,5 \pm 5,32	-

^a sistema PMN/lucigenina/PMA na ausência da droga

*p<0,05

Tabela 8 – Variação da quimiluminescência (ΔQL) para integral da cinética de emissão (ICE) do sistema PMN/lucigenina/PMA na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina

5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM)	ΔQL para ICE	valor-P
64	277640 \pm 596153	1,122E-06*
32	2316120 \pm 1629191	4,826E-06*
16	8287379 \pm 2227434	0,0001443*
8	13548132 \pm 3272938	0,0100401*
4	15656647 \pm 3557388	0,0533784
2	18487616 \pm 4012967	0,3834733
Controle ^a	20666997 \pm 3439545	-

^a sistema PMN/lucigenina/PMA na ausência da droga

*p<0,05

Tabela 9 – Percentual de decaimento da emissão de luz para integral da cinética de emissão (ICE) do sistema PMN/lucigenina/PMA na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina em relação ao controle

5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (μM)	Decaimento de emissão de luz em relação ao controle* (%)
64	95,48 \pm 3,28
32	78,5 \pm 8,5
16	52,78 \pm 9,25
8	32,8 \pm 7,9
4	23,6 \pm 9,37
2	11,08 \pm 6,08

* sistema PMN/lucigenina/PMA na ausência da droga (100%)

4.5.2 Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina no teste de cloração

A 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina, em todas as concentrações testadas, permitiu a formação do DTNB, devido a diminuição da absorbância do sistema químico a 412 nm (Fig. 24), caracterizando que nessas condições essa quinona não captura o HOCl. A Tabela 10 mostra o percentual de TNB não oxidado na presença de 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina.

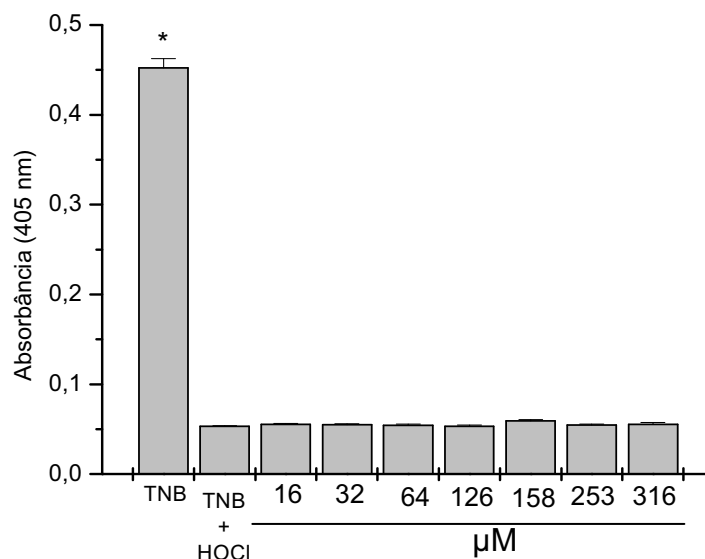


Figura 24 – Absorção do TNB no sistema TNB/HOCl na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina *p <0,05

Tabela 10 – Percentual de TNB não oxidado pelo HOCl na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroantomegnina

5-metoxi-3,4-diidroantomegnina (µM)	TNB não oxidado (%)	valor – P
16	12,2 ± 0,26	5,5E-11*
32	12,1 ± 0,45	4,92E-10*
64	11,96 ± 0,47	5,54E-10*
126	11,7 ± 0,5	6,85E-10*
158	13,1 ± 0,52	9,16E-10*
253	12,06 ± 0,45	4,61E-10*
316	12,23 ± 0,7	2,85E-09*
Ausência	11,7 ± 0,17	9,87E-12*

*p<0,05 em relação à absorbância do TNB (100%)

4.5.3 Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxi-7-metilflavona no teste com DPPH

O DPPH apresenta coloração violeta, tendo assim uma absorção em 540 nm, quando se encontra reduzido torna-se amarelo, diminuindo a absorbância. Esta redução é devida à ação de algumas substâncias capazes de doar hidrogênio radicalar ao DPPH, formando um radical estável, o qual é associado à propriedade antioxidante. A 5-metoxi-3,4-diidroxi-7-metilflavona apresentou baixa porcentagem na variação da absorbância nas concentrações testadas quando comparada ao trolox, demonstrando baixa capacidade de reduzir o DPPH (Figura 25).

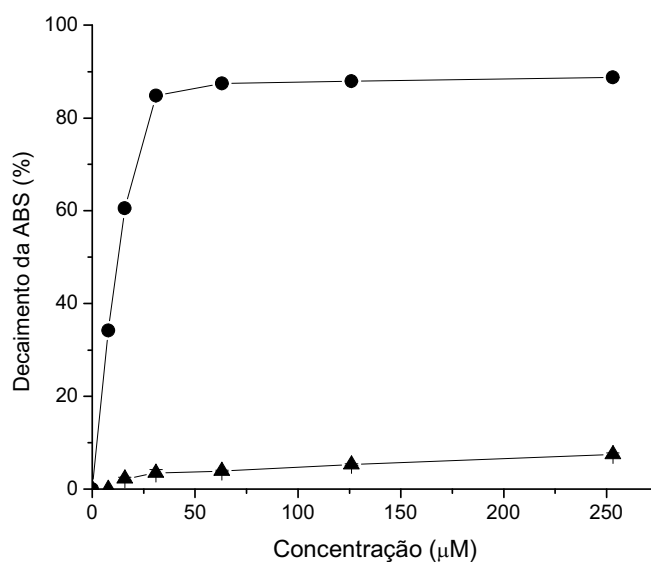


Figura 25 - Porcentagem de decaimento da absorbância (%) para diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-7-metilflavona (-▲-) e trolox (-●-)

4.6 Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina na resposta imunológica

A concentração máxima de DMSO, PMA e LPS utilizada nos experimentos foi previamente determinada, visto que essas substâncias poderiam influenciar na viabilidade dos macrófagos. DMSO 2%, PMA 200 nM e 5 µg/mL de LPS não reduzem a viabilidade. DMSO, nessa concentração, também não induz produção e liberação de mediadores inflamatórios.

Visto a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina ser uma substância citotóxica para células de linhagem contínua (KITAGAWA et al., 2004), verificamos, previamente, o efeito dessa substância sobre macrófagos murino. Os resultados demonstram que a porcentagem de viabilidade dessas células permanece maior que 80% na maior concentração ensaiada (316 µM) (Figura 26). Os ensaios para verificação da liberação de H₂O₂ demonstraram que a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina produz esse mediador no tampão completo na ausência de macrófagos em todas as concentrações ensaiadas (Figura 27). Todavia, na presença de macrófagos as concentrações de 158 e 316 µM demonstraram induzir a produção de H₂O₂ (Figura 28). Os resultados dos experimentos utilizando 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina para detecção da indução dos mediadores celulares NO e TNF-α demonstram não haver diferenças significativas entre o controle negativo e as concentrações da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina ensaiadas, mostrando que essa substância não é capaz de estimular macrófagos murino a produzirem NO e TNF-α (Figuras 29 e 30). Para os ensaios de inibição da liberação de mediadores por macrófagos na presença de estímulo e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, NO e TNF-α foram avaliados, e observou-se que a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina inibe a liberação de NO (Figura 31) e não inibe a liberação de TNF-α (Figura 32). As Tabelas 11 e 12 mostram, respectivamente, a porcentagem de inibição para a liberação de NO e TNF-α. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes. A análise estatística é apresentada no Apêndice.

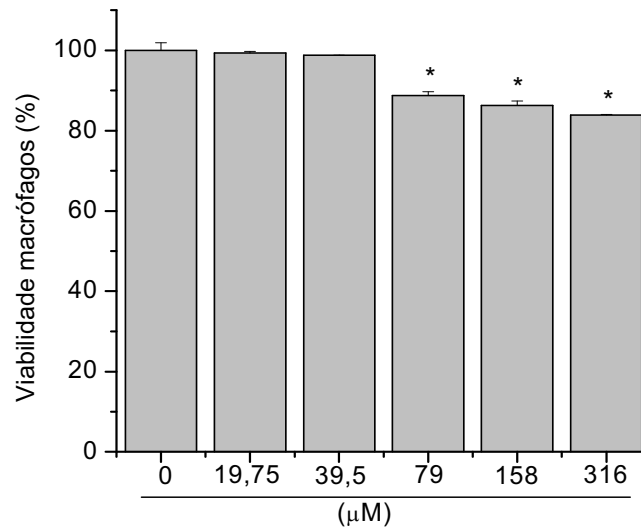


Figura 26 – Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM) na viabilidade de macrófagos. Resultados apresentados como média ± desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes *p<0,05

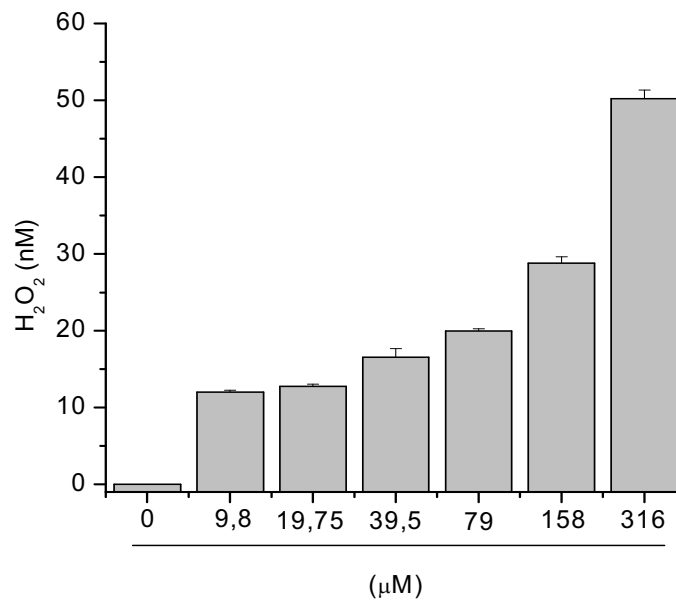


Figura 27 – Determinação de H₂O₂ pela 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM) na ausência de macrófagos (5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina e tampão completo). Resultados apresentados como média ± desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes

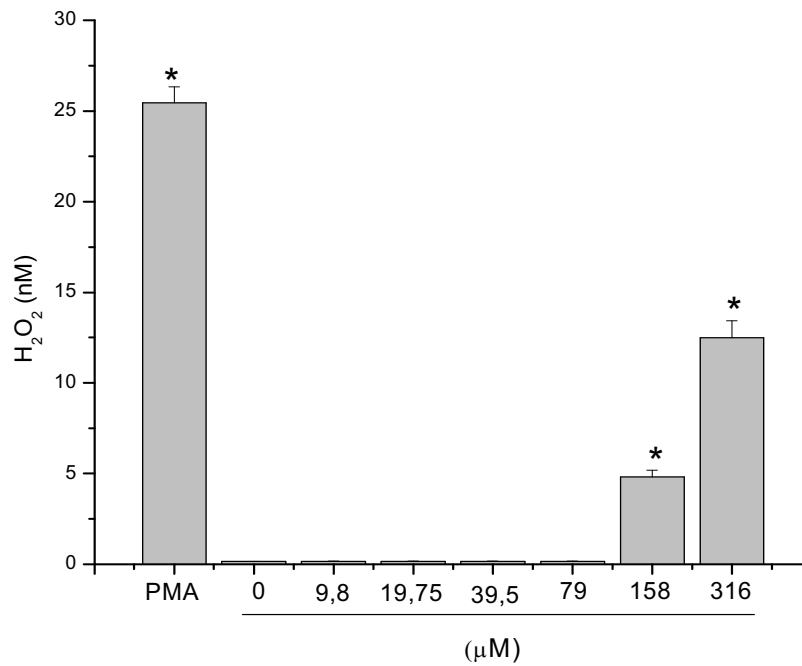


Figura 28 – Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (µM) na liberação de H₂O₂. Resultados apresentados como média ± desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes *p < 0,05

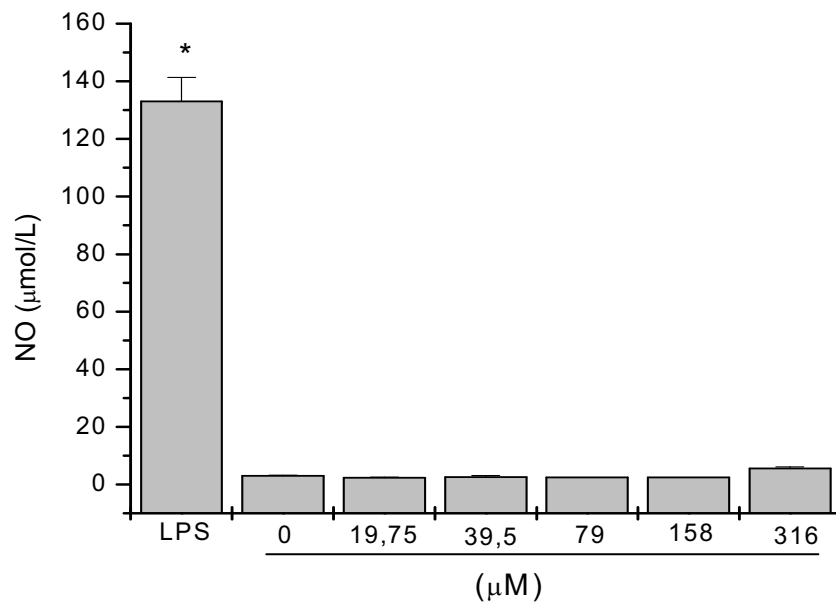


Figura 29 – Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (µM) na liberação de NO. Resultados apresentados como média ± desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes *p < 0,05

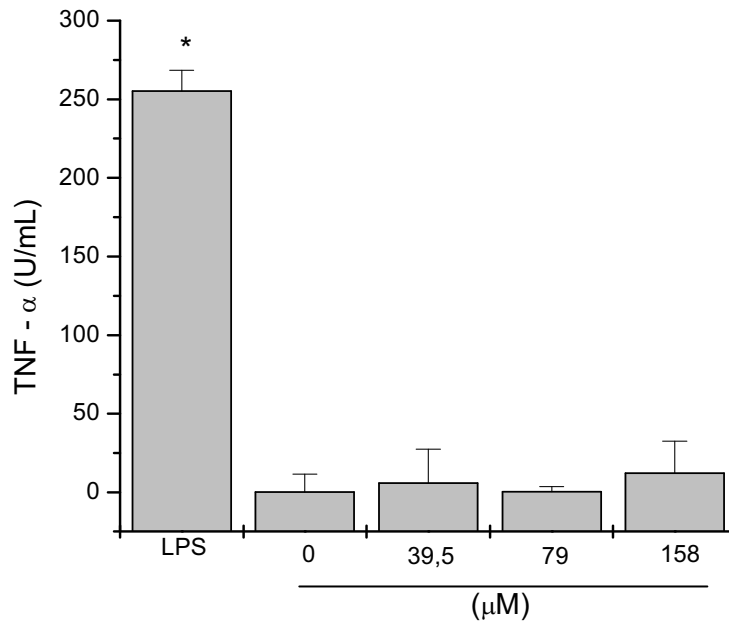


Figura 30 – Efeito da 5-metoxi-3,4-dihydroxantomegnina (μM) na liberação de TNF-α. Resultado apresentado como média ± desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes *p< 0,05

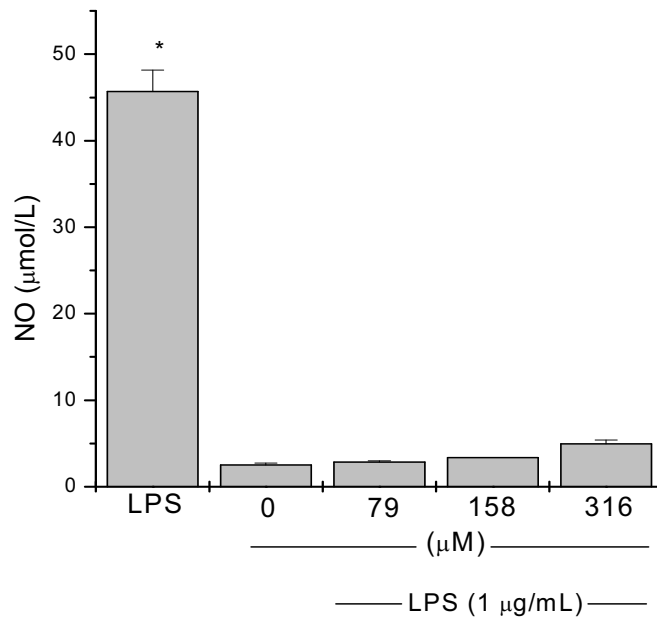


Figura 31 – Efeito da 5-metoxi-3,4-dihydroxantomegnina (μM) na liberação de NO em macrófagos estimulados por LPS. Resultados apresentados como média ± desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes *p< 0,05

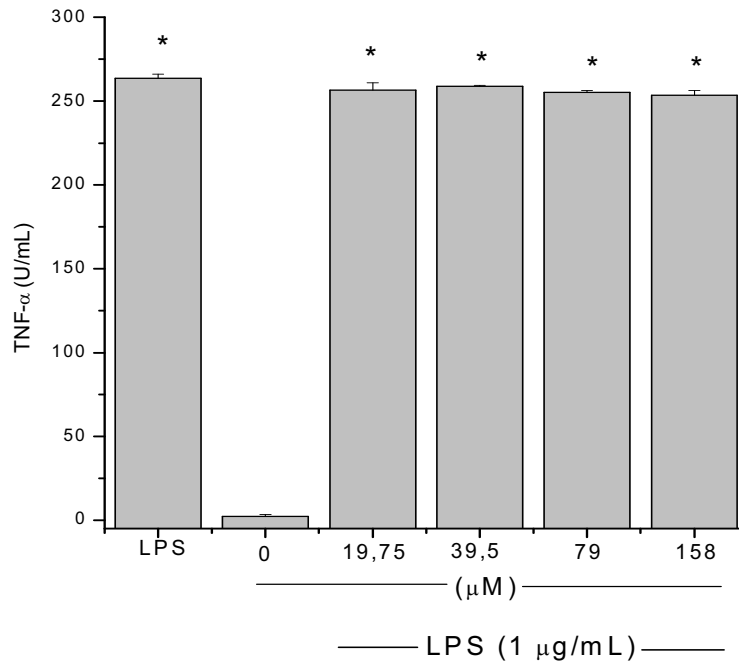


Figura 32 – Efeito da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (μM) na liberação de $\text{TNF-}\alpha$ em macr3fagos estimulados por LPS. Resultado apresentado como m3dia \pm desvio padr3o de, no m3nimo, 3 experimentos independentes $*p < 0,05$

Tabela 11 - Porcentagem de inibição da liberação de NO na presença do est3mulo LPS e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina em macr3fagos

5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (μM)	Inibição da liberação de NO^* (%)
79	$97,43 \pm 0,65$
158	$99,13 \pm 0,28$
316	$98,9 \pm 0,16$

* em relação ao controle negativo (macr3fagos sem est3mulo e sem droga)

Tabela 12 - Porcentagem de inibição da liberação de TNF- α na presença do estímulo LPS e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina em macrófagos

5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (μM)	Inibição da liberação de TNF-α * (%)
19,75	1,08 \pm 0,54
39,5	0,33 \pm 0,25
79	0,16 \pm 0,33
158	0,35 \pm 0,46

* em relação ao controle negativo (macrófagos sem estímulo e sem droga)

4.7. Atividade mutagênica

As Tabelas 13 e 14 apresentam os resultados dos ensaios realizados com 4 linhagens de *Salmonella typhimurium*, na presença e ausência de ativação metabólica da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina. Os valores de razão de mutagenicidade demonstraram que a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina não possui propriedades mutagênicas, visto que não foi observada razão de mutagenicidade igual ou superior a 2 (Tabelas 15 e 16).

Tabela 13 – Mutagenicidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina com e sem ativação metabólica para 4 linhagens de *S. typhimurium*

Revertentes/placa em linhagens de <i>S. typhimurium</i> *				
Tratamento ($\mu\text{M}/\text{placa}$)	TA 97a		TA 98	
	- S ₉	+S ₉	- S ₉	+S ₉
0	218 \pm 1,8	343 \pm 6	22 + 3	26 \pm 1
25	304 \pm 28	332 \pm 27	21 + 4	28 \pm 2
50	277 \pm 12	399 \pm 10	18 + 3	25 \pm 2
100	309 \pm 22	476 \pm 16	17 + 2	26 \pm 2
200	301 \pm 10	398 \pm 26	17 + 3	27 \pm 3
400	294 \pm 16	431 \pm 25	19 + 2	27 \pm 4
C+	1484 \pm 32	1521 \pm 31	1492 + 28	2002 \pm 60

*Valores apresentados como média + desvio padrão. A frequência de reversão espontânea não foi subtraída. 0 = DMSO; controle positivo (+): TA 97a (- S₉) - NDP; TA 97a (+ S₉) - ANTR; TA 98 (- S₉) - NDP; TA 98 (+ S₉) - ANTR

Tabela 14 – Mutagenicidade da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina com e sem ativação metabólica para 4 linhagens de *S. typhimurium*

Revertentes/placa em linhagens de <i>S. typhimurium</i>*				
Tratamento (μ M/placa)	TA 100		TA 102	
	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉
0	147 \pm 22	121 \pm 13	400 \pm 10	301 \pm 5
25	151 \pm 9	199 \pm 33	355 \pm 6	292 \pm 17
50	151 \pm 8	176 \pm 9	401 \pm 8	295 \pm 38
100	154 \pm 12	185 \pm 30	384 \pm 5	307 \pm 8
200	131 \pm 14	185 \pm 19	389 \pm 23	288 \pm 15
400	124 \pm 10	216 \pm 53	379 \pm 30	282 \pm 22
C+	957 \pm 24	973 \pm 10	1157 \pm 54	1348 \pm 66

* Valores apresentados como média + desvio padrão. A freqüência de reversão espontânea não foi subtraída. 0 = DMSO; controle positivo (+): TA 100 (- S₉) – AS; TA 100 (+ S₉) – ANTR; TA 102 (- S₉) – MITC; TA 102 (+ S₉) – AF

Tabela 15 – Razão de mutagenicidade obtida com linhagens de *S. typhimurium* tratadas com diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina

Razão de mutagenicidade				
Tratamento (μ M/placa)	TA 97a		TA 98	
	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉
25	1,2	1,05	1,23	1,27
50	1,12	1,26	1,05	1,13
100	1,25	1,51	1	1,18
200	1,21	1,26	1	1,22
400	1,19	1,36	1,11	1,22

Tabela 16 – Razão de mutagenicidade obtida com linhagens de *S. typhimurium* tratadas com diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina

Razão de mutagenicidade				
Tratamento (μ M/placa)	TA 100		TA 102	
	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉
25	1,08	1,32	0,93	0,92
50	1,08	1,17	1,05	0,93
100	1,10	1,23	1,01	0,96
200	0,94	1,23	1,02	0,90
400	0,88	1,44	1	0,88

5 DISCUSSÃO

O renascimento do interesse pelas plantas medicinais está relacionado, principalmente, às dificuldades na obtenção de novos fármacos sintéticos. A possibilidade de se encontrar um novo fármaco por *screening* ao acaso diminui, progressivamente, ano a ano. Estudos indicam que seria necessário, por exemplo, testar aproximadamente 400 mil compostos para se obter um novo anticonvulsivante e 400 milhões de compostos para se obter um novo antiviral por este método (YUNES; CALIXTO, 2001).

Como a diversidade estrutural é fundamental para atingir diferentes alvos biológicos, os cientistas voltaram-se para o estudo de produtos naturais considerando que, durante os milhões de anos da evolução biológica, a seleção natural realizou um processo de química combinatória inigualável (YUNES; CALIXTO, 2001). Embora tenham sido identificados cerca de 100 mil compostos oriundos de plantas e, aproximadamente, 20 mil compostos obtidos de microrganismos, as fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis quanto às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de importância química medicinal (GRAPE, 2001).

Neste contexto, seria necessário realizar *screening* de extratos vegetais, os quais são constituídos de misturas complexas de compostos. Cabe ressaltar que entre as 250 a 500 mil espécies existentes no planeta, apenas uma pequena porcentagem foi estudada (cerca de 15%) para algum efeito específico. Evidentemente, compostos estruturalmente definidos, podem ser rapidamente submetidos aos modernos métodos de *screening* (FERREIRA, 2001).

Os vegetais, em relação ao metabolismo secundário, possuem uma elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie. O elevado número e a grande diversidade de metabólitos secundários, entre eles as quinonas, têm despertado o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência, principalmente farmacêutica, que vêem neles uma fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (SIMÕES et al., 2003).

O potencial antimicrobiano é um dos principais alvos para novos fármacos, em decorrência do aumento da resistência bacteriana aos atualmente comercializados. A 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2,3-dihidro-2H-benzo[5,6-b]quinoxalina apresentou concentração inibitória mínima (CIM) para *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* de 197 μM , mas não apresentou CIM para *Escherichia coli* (Figura 7). Esses resultados demonstram atividade antimicrobiana para *S. aureus* similar a obtida por PEREIRA et al. (2006) para a naftoquinona α -lapachona, extraída de *Tabebuia avellanedae*, (CIM de 264 μM). Naftoquinonas naturais, como alcanina e chiconina e seus derivados, são em geral, ativas contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Bacillus subtilis* e inativas contra bactérias Gram-negativas. No entanto, o mecanismo de ação antimicrobiano das naftoquinonas ainda não foi totalmente elucidado (RIFFEL et al., 2002).

Quinonas sendo análogos da coenzima Q (ubiquinona, substância usada na transferência de elétrons na cadeia respiratória) competem com essa substância. Quando a cadeia respiratória é afetada, quinonas sofrem redox cíclico sob condições aeróbicas, resultando em aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e ânion superóxido, causando estresse oxidativo e, conseqüentemente, dano bacteriano. Muitos componentes celulares são sensíveis à oxidação por EROs produzidos no estresse oxidativo, conduzindo desarranjo estrutural com mudanças fisiológicas na superfície e citoplasma bacteriano (BOGDANOV et al., 1999; PEREIRA et al., 2006). O potencial antimicrobiano dessas substâncias pode ainda estar relacionado à capacidade de complexar-se irreversivelmente a aminoácidos nucleofílicos, induzindo a inativação e perda da função protéica (COWAN, 1999).

A literatura relata que muitas substâncias com atividade antimicrobiana não possuem toxicidade seletiva, podendo atuar em estruturas comuns presentes tanto em células eucariotas como procaríotas (TAVARES, 1996). Algumas quinonas, como a mitomicina C e porfiromicina, são antibióticos efetivos contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, mas também apresentam atividade antitumoral (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

Com base nas propriedades estruturais e biológicas, 1,4-naftoquinonas são consideradas estruturas privilegiadas pela química medicinal, devido

principalmente a presença de 2 grupos carbonilas que têm a capacidade de aceitar um e/ou dois elétrons para formar os correspondentes radicais ânion ou diânion (PÉREZ-SACAU et al., 2007; VERMA, 2006).

A bioquímica e citotoxicidade das quinonas vêm sendo extensivamente estudadas *in vitro*. Naftoquinonas, pela reação com agentes redutores celulares, sofrem oxidorredução cíclica formando espécies reativas de oxigênio. Átomos de carbono adjacentes a grupos carbonila são eletrofílicos, tornando as naftoquinonas, que não são totalmente substituídas no anel quinona, em agentes alquilantes. A produção de espécies reativas de oxigênio e alquilação têm sido implicadas na citotoxicidade *in vitro* de naftoquinonas (MUNDAY et al., 1995).

A 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina mostrou significativo índice citotóxico para células McCoy (IC_{50} 42,47 μ M) quando comparado ao da cisplatina (IC_{50} 140 μ M), substância utilizada na terapia antineoplásica e referência em muitos sistemas celulares. Nos ensaios utilizando linhagens tumorais de adenocarcinoma de pulmão (LP07) e mama (LM2) a maior potência citotóxica da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina foi para a linhagem LP07 (IC_{50} 6,2 μ M) (Figura 8 e Tabela 1), provavelmente devido a uma maior ativação biorredutiva. O metabolismo de quinonas em sistemas bioquímicos tem sido atribuído à redução de um ou dois elétrons catalisados por flavoenzimas na presença de elétrons doadores. Enzimas que catalisam a redução de um elétron incluem: NADPH-citocromo P450 redutase, NADH-citocromo b_5 redutase, NADH: ubiquinona oxidorredutase e ferredoxina-NADP⁺ redutase. A redução de dois elétrons é catalisada pela NAD(P)H quinona oxidorredutase (DT-diaforase), que varia sua atividade conforme o tipo de tecido, sendo elevada em tumores sólidos. Assim sendo, agentes que são bons substratos da DT-diaforase podem proporcionar seletivamente morte a células tumorais (GUTIERREZ, 2000). DT-diaforase catalisa a transferência de dois elétrons a quinona, sendo que esses elétrons são transferidos um por vez com a formação de hidroquinona. A ausência de semiquinona é esperada pelo fato da quinona não ser removida facilmente do centro ativo enzimático enquanto o segundo elétron é adicionado. A hidroquinona sofre redox cíclico e requer, inicialmente, a oxidação de um elétron para formar a semiquinona que transfere o elétron desemparelhado ao oxigênio, formando o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e quinona. O $O_2^{\cdot-}$ formado inicia

uma cascata de reações que resulta na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($\cdot OH$). Este ciclo continua até o sistema se tornar anaeróbico com a diminuição da produção de $O_2^{\cdot -}$ e acúmulo de semiquinona (GUTIERREZ, 2000; CADENAS, 1995; RAUTH; MELO; MISRA, 1998).

Visto que alguns antineoplásicos, como a ciclofosfamida, somente apresentam efeito citotóxico após biotransformação (DENNY, 2001; WERMUTH, 2003), a citotoxicidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina na presença do sistema microsomal S_9 foi avaliada. A relação dose-resposta para células McCoy tratadas com a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina na ausência e presença de sistema de ativação metabólica reduz a viabilidade celular de modo similar, ou seja, o sistema S_9 não altera o potencial citotóxico dessa quinona (Figura 10). Uma hipótese relacionada com a não alteração do potencial citotóxico da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina na presença do sistema microsomal S_9 é que essa quinona não seria substrato para o sistema enzimático, ou seja, não seria metabolizada ou, se metabolizada, os produtos dessa metabolização possuiriam a mesma citotoxicidade da substância de origem.

A citotoxicidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina associada ao ácido ascórbico na proporção 20:1, aumentou em cerca de 7, 4 e 2 vezes para células McCoy, LM2 e LP07, respectivamente (Figura 9 e Tabela 2). O ácido ascórbico potencializa drogas quimioterápicas como relatado por GILLOTEAUX et al (2006). A atividade citotóxica da combinação ácido ascórbico/quinona pode ser atribuída a um redox cíclico e possível geração de peróxidos e outras EROs. A geração de EROs foi demonstrada pela interação de ácido ascórbico e menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) com redução de elétrons para produzir radical semiquinona, radical ascorbato e aumento do redox cíclico formando $O_2^{\cdot -}$ (GILLOTEAUX et al., 2004; CAPE et al., 2006) conforme apresentado na Figura 33. Essas EROs danificam membranas e outras estruturas celulares ricas em lipídeos, acompanhada de oxidação de grupamentos sulfidrílica (-SH) e depleção de glutatona reduzida, induzindo danos irreversíveis a células cancerígenas (GILLOTEAUX et al., 2006; GILLOTEAUX et al., 2004).

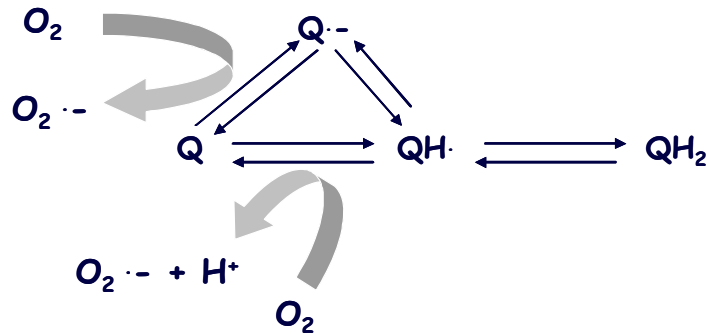


Figura 33 – Redox cíclico envolvendo formação de radical semiquinona (Q·⁻), quinona reduzida (QH₂) e ânion superóxido (O₂·⁻). Adaptado de CAPE et al., 2006

A potencialização da citotoxicidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina metilamina pelo ácido ascórbico conduziu-nos ao estudo da interação química entre as substâncias. Os ensaios espectrofotométricos realizados demonstram mudança no espectro de absorção da 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina metilamina com a formação de um novo produto, provavelmente a quinona reduzida, na presença de ácido ascórbico (Figura 15). Resultado similar foi relatado por SANTOS et al. (2005) na redução de rifampicina-quinona pelo ácido ascórbico. A evidência da redução da 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina metilamina foi obtida pela análise do espectro de massas demonstrados nas Figuras 17 e 18. O espectro de massas na Figura 18 mostra um novo pico de 319 (M+H⁺) o qual pode ser correlacionado com o peso molecular da 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina metilamina reduzida. A Figura 34 mostra a estrutura da 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina metilamina e seu derivado hidroquinona (duas unidades de massa a mais) obtida após redução não enzimática de dois elétrons com ascorbato.

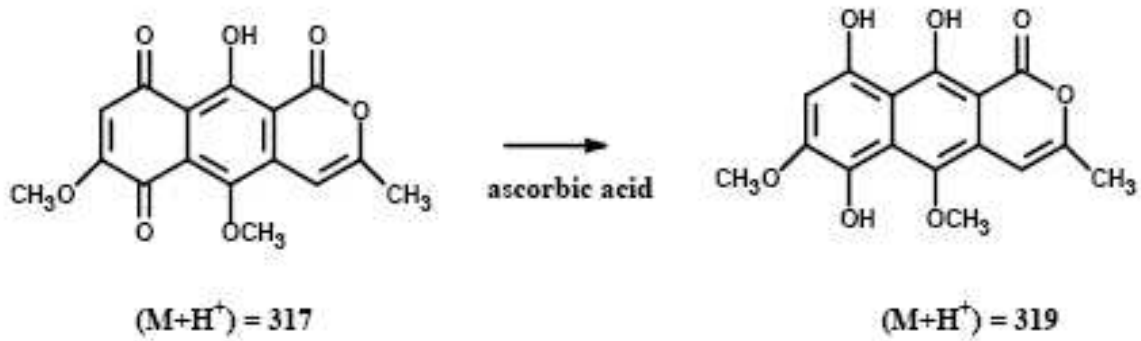


Figura 34 – Redução da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina após adição de ácido ascórbico

O mecanismo proposto para formação de peróxido de hidrogênio é apresentado na Figura 35, produto responsável pelo aumento da citotoxicidade observada quando o ácido ascórbico foi adicionado. Durante a redução da quinona pelo ascorbato um composto intermediário, radical semiquinona, é formado, sendo que parte dessa semiquinona também pode ser oxidada, em sistema aeróbico, pelo oxigênio molecular produzindo O_2^- e, subsequentemente, H_2O_2 .

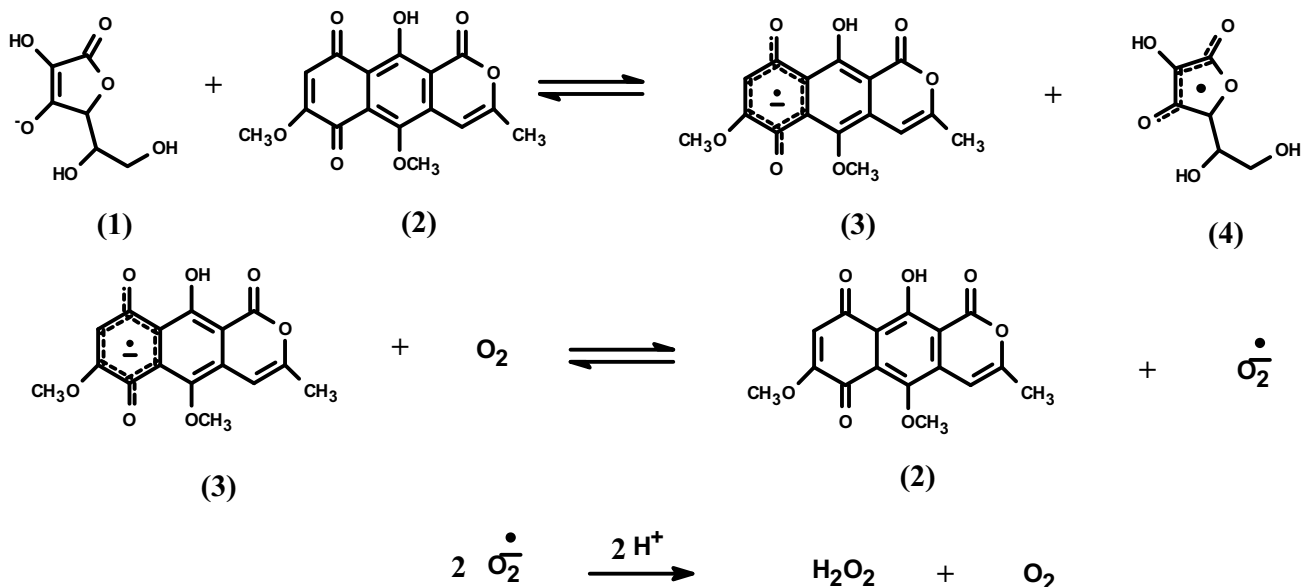


Figura 35 – Efeito do ácido ascórbico sobre a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina: (1) ascorbato, (2) 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, (3) semiquinona, (4) radical ascorbato

Entre as diferentes EROs que podem ser formadas durante o redox cíclico entre ascorbato e quinona, H_2O_2 é o principal agente oxidante envolvido no processo de citotoxicidade (VERRAX, 2005; VERRAX, 2006). A incubação das células McCoy na presença de 5-metoxi-3,4-diidroxi-5,6,7,8-tetrahidro-2H-benzo[5,6-b]quinoxaline-2,3-diol, ácido ascórbico e catalase, enzima que destrói H_2O_2 , o efeito do ácido ascórbico foi neutralizado (Figura 12), reforçando que o H_2O_2 gerado pelo redox cíclico (ácido ascórbico e 5-metoxi-3,4-diidroxi-5,6,7,8-tetrahidro-2H-benzo[5,6-b]quinoxaline-2,3-diol) é um importante agente citotóxico. Pelo fato de células cancerígenas serem deficientes em defesa antioxidante (BOROVIC et al., 2007; VERRAX, 2004) é esperado que sejam mais sensíveis ao estresse oxidativo gerado por ácido ascórbico/5-metoxi-3,4-diidroxi-5,6,7,8-tetrahidro-2H-benzo[5,6-b]quinoxaline-2,3-diol que células normais. Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade da citotoxicidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-5,6,7,8-tetrahidro-2H-benzo[5,6-b]quinoxaline-2,3-diol ser decorrente do intermediário radical semiquinona gerado no meio intracelular. Radicais semiquinona podem se ligar a pequenas moléculas nucleofílicas (como cisteína e glutathione reduzida) ou macromoléculas biológicas e induzir morte celular (TAYAMA; NAKAGAWA, 1991).

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio estão envolvidas na patogênese de várias doenças incluindo câncer, doenças neurodegenerativas, distúrbios reumáticos e doenças inflamatórias crônicas imunes e não imunes (PARIJ et al, 1998; LOPACZYNSKI; ZEISEL, 2001). Essas espécies, juntamente com enzimas granulares, causam danos fisiológicos importantes a células e tecidos, agravando a resposta inflamatória. Assim, terapia antioxidante pode se constituir em um importante mecanismo de diminuição da resposta inflamatória (PARIJ et al, 1998; DI STASI et al, 2004).

A atividade antioxidante de substâncias químicas, na maioria das vezes, é determinada por métodos de inibição, envolvendo EROs e PMNs estimulados, que avaliam indiretamente o poder antioxidante desses compostos (PRIOR; CAO, 1999). Nos ensaios quimiluminescentes, a 5-metoxi-3,4-diidroxi-5,6,7,8-tetrahidro-2H-benzo[5,6-b]quinoxaline-2,3-diol diminuiu a emissão de luz dos sistemas PMN/luminol/zimosan e PMN/lucigenina/PMA de maneira dose-dependente (Figura 22 e 23). A inibição de luz dependente de lucigenina pode ser decorrente da captura de O_2^- e/ou inibição da enzima NADPH-oxidase pela 5-metoxi-3,4-diidroxi-5,6,7,8-tetrahidro-2H-benzo[5,6-b]quinoxaline-2,3-diol. Essa substância inibindo a liberação e/ou produção de O_2^- suprime o *burst* respiratório de forma dose dependente impedindo danos às biomoléculas, visto esse radical ser fonte para a

produção de outras EROs. Nas reações dependentes de luminol, a atividade clorinante da MPO bem como do seu produto, o HOCl, deve ser considerada para a oxidação dessa sonda. A inibição de luz do sistema PMN/luminol/zimosan/quinona pode ser decorrente da inibição enzimática e/ou captura do ácido HOCl pela 5-metoxi-3,4-diidroxiacetoacridina.

A modificação *in vivo* na produção de oxidantes por fagócitos na presença de substâncias químicas nem sempre representa o efeito direto da droga no metabolismo celular. Entre as EROs, o HOCl pode ser considerado o oxidante mais tóxico e produzido em abundância por PMNs. Esse potente oxidante reage com uma variedade de moléculas, como tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos, ascorbato e ácidos graxos polinsaturados (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996). O teste de cloração demonstrou que o HOCl oxida TNB quando incubado na presença da 5-metoxi-3,4-diidroxiacetoacridina, formando o DTNB, portanto a 5-metoxi-3,4-diidroxiacetoacridina, nas concentrações testadas, não foi capaz de impedir a formação do DTNB (Figura 24 e Tabela 10).

No ensaio espectrofotométrico utilizando o radical livre DPPH, a 5-metoxi-3,4-diidroxiacetoacridina não foi capaz de doar hidrogênio radicalar ao DPPH, caracterizando que não possui atividade seqüestradora para essa molécula (Figura 25). Considerando os testes realizados, conclui-se que a 5-metoxi-3,4-diidroxiacetoacridina interage, de forma dose-dependente, com os sistemas enzimáticos geradores de EROs (NADPH oxidase e MPO) demonstrada através dos ensaios de quimiluminescência, mas não com os oxidantes propriamente ditos.

Os ensaios realizados com macrófagos murino demonstram que a 5-metoxi-3,4-diidroxiacetoacridina não estimula a produção de óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF- α), mas induz a produção de H₂O₂ (Figuras 28, 29 e 30). A geração de H₂O₂ é um processo celular natural, resultante de várias reações específicas essenciais à atividade celular. No entanto, a liberação de quantidades consideráveis de H₂O₂ induz a quebra de fita de DNA e/ou perturbação no citoesqueleto da membrana, levando à morte celular. Compostos capazes de induzir a liberação de H₂O₂ por macrófagos, em pequenas concentrações, são importantes, pois auxiliam na resposta imunológica atuando como agente microbicida (ALMEIDA et al., 2005; MALHOTRA et al., 1990). As concentrações de H₂O₂ liberadas pela 5-

metoxi-3,4-diidroxi-5-metiloxantomegnina são resultados relevantes, sendo essas concentrações menores que aquela liberada pelo padrão zimosan. Este fato é de grande importância, pois quaisquer concentrações de H_2O_2 próximos às aquelas produzidas pelo zimosan devem ser tratadas como concentrações tóxicas, pois se sabe que H_2O_2 em excesso no organismo pode destruir estruturas biológicas e provocar lesões irreversíveis (ALMEIDA et al., 2005).

Uma recente abordagem para a imunomodulação envolve o uso de inibidores de citocinas no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, incluindo doenças auto-imunes, choque séptico, colite ulcerativa, câncer e Aids (SCHÜMANN; TIEGS, 1999; BOUSHEY, 2003). Os resultados dos testes de inibição dos mediadores NO e TNF- α mostraram que a 5-metoxi-3,4-diidroxi-5-metiloxantomegnina inibe a liberação de NO em macrófagos ativados por LPS, mas não inibe a liberação de TNF- α (Figuras 31 e 32). A indução da iNOS é mediada por TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e interferon- γ (IFN- γ) (LI; HE; JIN, 2007), portanto a inibição da liberação de NO pode estar relacionada à ação da 5-metoxi-3,4-diidroxi-5-metiloxantomegnina sobre IL-1 β , IFN- γ ou iNOS. Essa inibição da liberação de NO pela 5-metoxi-3,4-diidroxi-5-metiloxantomegnina é um importante mecanismo para atividade antiinflamatória. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que vários componentes derivados de plantas com propriedades antiinflamatórias podem exercer seus efeitos através da modulação do sistema de citocinas, especialmente por inibirem a enzima iNOS e a síntese de óxido nítrico (CALIXTO, 2004; YUNES; CALIXTO, 2001). A inibição de citocinas pode também prevenir o aparecimento de câncer, uma vez que diversos tipos de câncer originam-se de sítios de infecção, irritação crônica e inflamação, tornando-se claro que o microambiente tumoral orquestrado por células inflamatórias é um participante importante no processo neoplásico (COUSSENS; WERB, 2002).

A importância da integração dos testes de genotoxicidade aos testes que avaliam propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas de novos fármacos, é enfatizada por KRISHNA et al (1998), uma vez que esses testes já são requeridos por vários órgãos, em todo mundo, para aprovação de novos produtos. Considerando que algumas quinonas utilizadas como agentes antineoplásicos formam aductos com DNA (MEDINA et al., 2008) o potencial genotóxico da 5-metoxi-3,4-diidroxi-5-metiloxantomegnina foi avaliado, sendo que os

resultados dos ensaios de genotoxicidade em *Salmonella typhimurium* revelaram que a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina não apresenta propriedades mutagênicas para as linhagens TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 102 na ausência e presença do sistema de ativação metabólica (Tabelas 15 e 16).

Alguns produtos químicos necessitam ser metabolizados *in vivo* para que seus derivados apresentem atividade mutagênica. Sistemas de ativação metabólica são comumente utilizados para realização de testes *in vitro* revelando se o composto teste necessita ser metabolizado para torna-se mutagênico (mutágeno indireto) ou se o mesmo tem ação direta sobre o material genético em sua forma original (mutágenos diretos), como descrito para as naftoquinonas naftazarina e plumbagina que induzem mutações em *S. typhimurium* cepa TA98 após ativação metabólica (OGA, 2003; MEDINA et al., 2008).

O emprego de produtos naturais na síntese de substâncias de interesse farmacêutico compreende uma estratégia útil na obtenção de compostos bioativos, representando uma atraente alternativa para a descoberta de novos protótipos, que, otimizados, viabilizarão uma nova entidade química (BARREIRO; FRAGA; ARAÚJO, 2003). Neste contexto o *screening* realizado para a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina isolada de *Paepalanthus latipes* demonstra que a atividade citotóxica e antiinflamatória devem ser exploradas para a aplicação terapêutica dessa quinona. A citotoxicidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina leva à constatação de que existe uma propriedade intrínseca na unidade quinonoídica, associada a outros fatores estruturais, que é responsável pela atividade antitumoral. A quimioterapia baseada num planejamento racional de fármacos tem no sistema redox das quinonas um bom modelo para estudos teóricos. O contexto de previsibilidade que estes estudos trazem auxilia na busca de agentes antineoplásicos baseados em planejamentos racionais, resultando na obtenção de substâncias com maior seletividade e eficiência antineoplásica (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

6 CONCLUSÃO

A análise dos resultados de diferentes ensaios biológicos *in vitro* permite-nos concluir que a 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina:

1. Apresenta concentração inibitória mínima para bactérias Gram positivas;
2. Demonstra atividade antioxidante, provavelmente por inibição enzimática e não por capturar EROs;
3. Possui ação imunomoduladora por estimular a produção de H_2O_2 e inibir a produção e/ou liberação de NO;
4. Apresenta citotoxicidade para as linhagens McCoy, LP07 e LM2;
5. Tem atividade citotóxica potencializada pelo ácido ascórbico devido ao ciclo redox com produção de H_2O_2 ;
6. Não apresenta alteração na citotoxicidade para células McCoy na presença do sistema microsomal S_9 ;
7. Não demonstra genotoxicidade em ensaios com *Salmonella typhimurium* na ausência e presença sistema microsomal S_9 ;

Esses dados permitiram-nos concluir que a 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina em associação com ácido ascórbico aumenta o potencial citotóxico, sendo a produção de H_2O_2 efetiva na participação nesse processo. Dessa forma, essa associação pode ser uma alternativa de seletividade para tumores sólidos deficientes em atividade antioxidante. A capacidade antioxidante e inibidora da produção e/ou liberação de NO reforçam a condução de estudos adicionais *in vivo* para avaliar a 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina como agente na terapia de doenças inflamatórias e neoplásicas.

REFERÊNCIAS

ALMEDIA, E. T.; MAURO, A. E.; SANTANA, A. M.; GODOY NETTO, A. V.; CARLOS, I. Z. Emprego de compostos organometálicos mononucleares de paládio (II) na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 405 - 408, 2005.

ANDREASSI, M. G.; BOTTO, N.; COLOMBO, M. G.; BIAGINI, A.; CLERICO, A. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases? **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 265 – 269, 2000.

ARUOMA, O. I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, n. 5, p. 675 - 705, 1996.

ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidante actions of bioactive components in plant foods. **Mutat. Res.**, v. 523, p. 9 - 20, 2003.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33 - 44, 2000.

BARILE, F. A. **Introduction to *in vitro* cytotoxicology**: mechanisms and methods. Boca Raton: CRC Press, 1994. 222p.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; ARAÚJO JÚNIOR, J. X. O uso de matérias-primas vegetais para a síntese de fármacos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2003. Cap. 8, p. 147 - 210.

BEUTLER, B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of past decade. **J. Invest. Med.**, v. 43, n. 3, p.227 - 234, 1995.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature**, v. 320, n. 6063, p. 584 - 588, 1986.

BOGDANOV, P. M.; DABBENE, V. G.; ALBESA, I.; BERTORELLO, M. M.; BRIÑÓN, M. C. Mechanism of antibacterial and degradation behavior of a chlorinated isoxazolylnaphthoquinone. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 263, n. 2, p. 301 - 307, 1999.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, v. 24, p. 119 - 124, 1985.

BOUSHEY, A. H. Drogas utilizadas na asma. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 20, p. 292 - 306.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effects of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.**, v. 134, p. 707 - 716, 1973.

BOROVIC, S.; CIPAK, A.; MEINITZER, A.; KEJLA, Z.; PEROVIC, D.; WAEG, G.; ZRKOVIC, N. Differential sensitivity to 4-hydroxynonenal for normal and malignant mesenchymal cells. **Redox Rep.**, v. 12, p. 50 - 54, 2007.

CADENAS, E. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 49, n. 2, p. 127 - 140, 1995.

CAPE, J. L.; BOWMAN, M. K.; KRAMER, D. M. Computation of redox and protonation properties of quinines: towards the prediction of redox cycling natural products. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1781 - 1788, 2006.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plants origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules. **Planta Med.**, v. 70, p. 93 - 103, 2004.

CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. **Anal. Biochem.**, v. 218, p. 377 - 381, 1994.

CHU, E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 55, p. 751 - 777.

COELHO, R. G.; VILEGAS, W.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 497 - 500, 2000.

COSTA, M. T.; FABENI, R. C.; APTEKMANN, K. P.; MACHADO, R. R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase em neoplasias. **Cienc. Rural**, v. 33, n. 5, p. 967 - 974, 2003.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860 - 867, 2002.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564 - 582, 1999.

DENNY, W. A. Prodrug strategies in cancer therapy. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 36, p. 577 - 595, 2001.

DERVORT, A. L. V. et al. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF- α production by human neutrophils. **J. Immunol.**, v. 152, p. 4102 - 09, 1994.

DEVIENNE, K. F. **Atividade biológica *in vitro* de substâncias químicas isoladas de plantas da família *Eriocaulaceae***. 2000. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, p. 166 - 168, 2002.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, 1996. 230p.

DI STASI, L. C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the

trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Med.**, v. 70, p. 315 - 320, 2004.

FEDER, L. S.; LASKIN, D. L. Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide production by GM-CSF, M-CSF and IL-1 β following acute endotoxemia. **J. Leukoc. Biol.**, v. 55, p. 507 - 13, 1994.

FENGLIN, H.; RUILI, L.; BAO, H.; LIANG, M. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected chinese medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, p. 14-25, 2004.

FERREIRA, S. H. Breve análise histórica da química de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 29.

FONSECA, A. L. **Antibióticos na clínica diária**. 2. ed. São Paulo: Publicações Médicas, 1984. 486p.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. 3rd ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 486p.

GALLI, S.; COLOMBO, L.; VANZULI, S.; DAROQUI, M. C.; VIDAL, M. C.; JASNIS, M. A.; LUSTIG, E. S.; EIJAN, A. M. Characterization of a fibroblastoid mammary carcinoma cell line (LM2) originated from a mouse adenocarcinoma. **Int. J. Oncol.**, v. 17, n. 6, p. 1259 - 1265, 2000.

GILLOTEAUX, J.; JAMISON, J. M.; LORIMER, H. E.; JARJOURA, D.; TAPER, H. S.; CALDERON, P. B.; NEAL, D. R.; SUMMERS, J. L. Autoschizis: a new form of cell death for human ovarian carcinoma cells following ascorbate: menadione treatment nuclear and DNA degradation. **Tissue Cell**, v. 36, p. 197 - 210, 2004.

GILLOTEAUX, J.; JAMISON, J. M.; ARNOLD, D.; NEAL, D. R.; SUMMERS, J. L. Morphology and DNA degeneration during autoschizic cell death in bladder carcinoma T24 cells induced by ascorbate and menadione treatment. **The Anatom. Rec.**, v. 288, p. 58 - 83, 2006.

GIULIETTI, N.; WANDERLEY, M. G. L.; LONGHI-WAGNER, H. M.; PIRANI, J. R.; PARRA, L. R. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 1, n. 2, p. 179 - 193, 1988.

GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N. C. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de *Eriocaulaceae*. **Acta Bot. Bras.**, v. 4, n. 1, p. 133 - 159, 1990.

GRAPE, U. Breve análise histórica da química de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 29.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytic. Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131 - 138, 1982.

GUTIERREZ, P. L. The role of NAD(P)H oxidoreductase (DT-diaphorase) in the bioactivation of quinine-containing antitumor agents: a review. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, n. 3-4, p. 263 - 275, 2000.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 49, n. 10, p. 1341 - 1348, 1995.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs Lett.**, v. 486, p. 10 - 13, 2000.

HENSOLD, N. C.; GIULIETTI, A. M. Revision and redefinition of the genus *Paepalanthus* Her Zog (*Eriocaulaceae*). **Ann. Miss. Bot. Gard.**, v. 7, p. 441 - 451, 1991.

HIRAYAMA, O.; TAKAGI, M.; HUKUMOTO, K.; KATOH, S. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. **Anal. Biochem.**, v. 247, p. 237 - 241, 1997.

HOEHNE, F. C. Outras monocotyledoneas tóxicas ou suspeitas. In: _____. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars, 1939. p. 97.

HUANG, S.; KUO, H.; HSIAO, C.; LIN, Y. Efficient synthesis of redox-switched naphthoquinone thiol-crown ethers and their biological activity evaluation. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 10, p. 1947 - 1952, 2002.

INBARAJ, J. J.; GANDHIDASAN, R.; MURUGESAN, R. Cytotoxicity and superoxide anion generation by some naturally occurring quinones. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, n. 9 - 10, p. 1072 - 1078, 1999.

IWU, M. M.; JACKSON, J. E.; SCHUSTER, B. G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v. 10, n. 2, p. 65-68, 1994.

KETTELER, M.; BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. 197 - 207, 1994.

KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: WERMUTH, C. **The practice of medicinal chemistry**. San Diego: Academic, 1996. p.101-114.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; KHALIL, N. M.; VILEGAS, W.; FONSECA, L. M. Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, n. 6, p. 905 - 908, 2003.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. A new cytotoxicity naphthoquinone from *Paepalanthus latipes*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52, n. 12, p. 1487 - 1488, 2004.

KOWALTOWISKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**, v. 495, p. 12 - 51, 2001.

KRISHNA, G.; URDA, G.; THIESS, J. Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies: a pharmaceutical industry perspective. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 32, n. 2, p. 115 - 120, 1998.

LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. **Gen. Pharmac.**, v. 27, n. 7, p. 1145 - 1147, 1996.

LAPPONI, J. C. **Estatística**: usando Excel 5 e 7. São Paulo: Lapponi Treinamento e Editora, 1997. 420p.

LASKIN, D. L.; HECK, D. E.; GARDNER, C. R.; FEDER, L. S.; LASKIN, J. D. Distinct patterns of nitric oxide production in hepatic macrophages and endothelial cells following acute exposure of rats to endotoxin. **J. Leukoc. Biol.**, v. 56, p. 751 - 758, 1994.

LI, C.; HE, L.; JIN, J. Atractylenolide I and antractylenolide III inhibit lipopolysaccharide-induced TNF- α and NO production in macrophages. **Phytother. Res.**, v. 21, p. 347 - 353, 2007.

LOPACZYNSKI, W.; ZEISEL, S. H. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. **Nutr. Res.**, v. 21, p. 295 - 307, 2001.

LOPES-FARRÉ, A.; RODRIGUEZ-FEO, J. A.; SÁNCHEZ DE MIGUEL, L.; RICO, L.; CASADO, S. Role of nitric oxide in the control of apoptosis in the microvasculature. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 30, n. 10, p. 1095 - 1106, 1998.

MALHOTRA, K.; SALMON, D.; LE BRAS, J.; VILDE, J. L. Potentiation of chloroquine activity against *Plasmodium falciparum* by the peroxidase-hydrogen peroxide system. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, n. 10, p. 1981 - 1985, 1990.

MARKHATADZE, N. J. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. **Hum. Immunol.**, v. 59, n. 9, p. 571 - 579, 1998.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mut. Res.**, v. 113, p. 173 - 215, 1983.

MARSHALL, K.; REITER, R. J.; POEGGELER, B.; ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin *in vitro*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 21, n. 3, p. 307 - 315, 1996.

MEDINA, L. F. C.; VIAU, C. M.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; STEFANI, V.; BRANDELLI, A.; HENRIQUES, J. A. P. Genotoxicity of aminohydroxynaphthoquinones in bacteria, yeast, and Chinese hamster lung fibroblast cells. **Mutat. Res.**, v. 650, p. 140 - 149, 2008.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, v. 43, p. 109 - 42, 1991.

MORRIS, S. M.; BILLIAR T. R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide syntase by aminoguanidine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 226, p. 829 - 39, 1994.

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

MOTOI, I. Jr. A proposed battery of tests for the initial evaluation of the mutagenic potential of medicinal and industrial chemical. **Mutat. Res.**, v. 205, p. 120 - 127, 1988.

MUNDAY, R.; SMITH, B. L.; MUNDAY, C. M. Toxicity of 2,3-dialkyl-1,4-naphthoquinones in rats: comparison with cytotoxicity *in vitro*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 19, n. 6, p. 759 - 765, 1995.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v. 6, p. 3051 - 3064, 1992.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 474p.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 6, p. 976 - 984, 2002.

PALLADINO, M. A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E. A.; MOLDAWER, L. L. Anti TNF- α therapies: the next generation. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 736 - 746, 2003.

PARIJ, N.; NAGY, A. M.; FONDU, P.; NEVE, J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 352, p. 299 - 305, 1998.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology**. The basic science of poisons. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1998. p. 113 - 186.

PEREIRA, E. M.; MACHADO, T. B.; LEAL, I. C. R.; JESUS, D. M.; DAMASO, C. R. A.; PINTO, A. V.; DEMARVAL, M. G.; KUSTER, R. M.; SANTOS, K. R. N. *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 5, n. 5, p. 1 - 7, 2006.

PÉREZ-SACAU, E.; DIAZ-PEÑATE, R. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; GARCIA-CASTELLANO, J. M.; PARDO, L.; CAMPILLO, M. Synthesis and pharmacophore modeling of naphthoquinone derivatives with cytotoxic activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. **J. Med. Chem.**, v. 50, p. 696 - 706, 2007.

PICK, E. Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immunoassay microplate reader. **Methods Enzymol.**, v. 132, p. 407 - 421, 1986.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. of Immun. Methods**, v. 38, p. 161 - 70, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, v. 46, p. 211 - 226, 1981.

PRIOR, R. L.; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, n. 11 - 12, p. 1173 - 1181, 1999.

PROVOST, J.; GARCIA, M. First report on the detection of vioxanthin from plant origin isolation from *Paepalanthus* species (*Eriocaulaceae*). **Planta Med.**, v. 56, p. 647, 1990.

PURVES, D.; HARVEY, C.; TWEATS, D.; LUMLEY, C. E. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**, v. 10, p. 297 - 312, 1995.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 904p.

RAUTH, A. M.; MELO, T.; MISRA, V. Bioreductive therapies: an overview of drugs and their mechanisms of action. **In. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 42, n. 4, p. 755 - 762, 1998.

RIFFEL, A.; MEDINA, L. F.; STEFANI, V.; SANTOS, R. C.; BIZANI, D.; BRANDELLI, A. *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 811 - 818, 2002.

ROIT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999. 422p.

ROSS, C. A.; MARGOLIS, R. L. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. **Clin. Neurosc. Res.**, v. 5, p. 3 - 14, 2005.
RAMASARMA T. H₂O₂ has a role in celular regulation. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 27, p. 269 - 74, 1990.

SALANTINO, A.; SALANTINO, M. L. F.; GIULIETTI, A. M. Contents of soluble phenolic compounds of capitula of Eriocaulaceae. **Quím. Nova**, v. 13, n. 4, p. 289 - 292, 1990.

SANTOS, F. J. dos; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M. da; FARIA OLIVEIRA, O. M. de; BRUNETTI, I. L. Horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of rifampicin: reaction rate enhancement by co-oxidation with anti-inflammatory drugs. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, p. 1822 - 1866, 2005.

SARIH, M.; SOUVANNAVONG, V.; ADAM, A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commum.**, v. 191, n. 2, p. 503 - 508, 1993.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2003. Cap. 15, p. 371 - 402.

SCHÜMANN, J.; TIEGS, G. Pathophysiological mechanisms of TNF during intoxication with natural or man-made toxins. **Toxicology**, v. 138, p. 103 - 126, 1999.

SHRISVASTAVA, R.; DELOMENIE, C.; CHEVALIER, A.; JOHN, G.; EKWALL, B.; WALUM, E.; MASSINGHAM, R. Comparison of *in vivo* acute lethal potency and *in vivo* cytotoxicity of 48 chemicals. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 8, n. 2, p. 157 - 170, 1992.

SILVA, I. M. **Avaliação de estímulos específicos no *burst* respiratório de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos de rato (*Rattus albinus norvegicus*), através das sondas quimiluminescentes luminol e lucigenina.** 2000. 107f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2003. 1102p.

STITES, D. P. Clinical laboratory methods for detection of cellular immunity. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLOW, T. G. **Basic clinical immunology.** 8 th ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1994. p. 195 - 215.

TAVARES, W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: _____. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos.** 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996. p. 3 - 13.

TAVARES, D. C.; VARANDA, E. A.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; TAKAHASHI, C. S. Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paepalantine *in vivo* and *in vitro* mammalian systems. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 115 - 120, 1999.

TAYAMA, S.; NAKAGAWA, Y. Sulfhydryl compounds inhibit the cyto- and genotoxicity of o-phenylphenol metabolites in CHO-K1 cells. **Mutat. Res.**, v. 259, p. 1 - 12, 1991.

TEIXEIRA, M. A. Sempre-vivas: folclore e verdade. **Ciênc. Hoje**, v. 5, p. 14 - 15, 1987.

THOMAS, G. **Química medicinal**: uma introdução. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413p.

TRUSH, M. A. Chemiluminescence as a probe to investigate chemical-cell interactions: a toxicological perspective. In: DYKE, K. V.; CASTRANOVA, V. **Cellular chemiluminescence**. Boca Raton: CRC Press, 1987. v. 3, p. 185 - 205.

URTREGER, A. J.; DIAMENT, M. J.; RANUNCOLO, S. M.; DEL C VIDAL, M.; PURICELLI, L. I.; DE KIER JOFFE, E. D. New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. **Int. J. Oncol.**, v. 18, n. 3, p. 639 - 647, 2001.

VALENT, G. V. Monitoring São Paulo state river in Brazil for mutagenic activity using the Ames test. **Environ, Toxicol. Water Qual.**, v. 8, p. 371 - 381, 1993.

VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G.; DIAS, F. L.; ARAÚJO, M. C. P.; GIBRAN, S. C. A.; TAKAHASHI, C. S.; VILEGAS, W. Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. **Terat. Car. Mutat.**, v. 17, p. 85 - 95, 1997.

VARELLA, S. D.; POZETTI, G. L.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 2029 - 2035, 2004.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P.; HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic activity detected by Ames test river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Res.**, v. 319, p. 31 - 45, 1993.

VERMA, R. P. Anti-cancer activities of 1,4-naphthoquinones: a QSAR study. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 6, p. 489 - 499, 2006.

VERRAX, J.; STOCKIS, J.; TISON, A.; TAPER, H. S.; CALDERON, P. B. Oxidative stress by ascorbate/menadione association kills K562 human chronic myelogenous leukaemia cells and inhibits its tumor growth in nude mice. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, p. 671 - 680, 2006.

VERRAX, J.; CADROBBI, J.; MARQUES, C.; TAPER, H.; HABRAKEN, Y.; PIETTE, J.; CALDERON, P. B. Ascorbate potentiates the cytotoxicity of menadione leading to an oxidative stress that kills cancer cells by a non-apoptotic caspase 3 independent form of cell death. **Apoptosis**, v. 9, p. 223 - 233, 2004.

VERRAX, J.; DELVAUX, M.; BEGHEIN, N.; TAPER, H.; GALLETZ, B.; BUC CALDERON, P. Enhancement of quinone redox cycling by ascorbate induces a caspase-3 independent cell death in human leukaemia cells. An *in vitro* comparative study. **Free Radic. Res.**, v. 39, p. 649 - 657, 2005.

VILEGAS, W.; ROQUE, N. F.; SALANTINO, A.; GIESBRECHT, A. M.; DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 299 - 301, 1990.

WATSON, R. R. ***In vitro* methods of toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 320p.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 2 nd ed. San Diego: Elsevier, 2003. 767p.

WISSING, D.; MOURITZEN, H.; JAATTELA, M. TNF-induced mitochondrial changes and activation of apoptotic proteases are inhibited by A20. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 25, p. 57 - 65, 1998.

YILDIZ, G.; DEMIRYÜREK, T. Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.**, v. 39, p. 179 - 184, 1998.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523p.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or fault tests? **Mutat. Res.**, v. 492, p. 9 - 38, 2001.

APÊNDICE

1 PREPARO DE SOLUÇÕES E REAGENTES

1.1 Agar sangue de carneiro 5%

Hidratar 40 g de Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco) em 1L de água deionizada ou destilada. Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C, resfriar o meio estéril para 45-50°C e assepticamente adicionar 5% de sangue estéril desfibrinado.

1.2 Meio de crescimento

Glicose.....1,0g
 Extrato de levedura.....2,5 g
 Triptona.....5,0 g
 Água destilada..... qsp.....1L

Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

1.3 Tampão Fosfato 0,2 M e pH 7,1

Solução A

Fosfato monobásico de sódio.....(Merck).....2,76 g
 Água destilada.....q.s.p.....100,0 mL

Solução B

Fosfato dibásico de sódio.....(Merck).....7,17 g
 Água destilada.....q.s.p.....100,0 mL

Solução A50,0 mL

Solução B50,0 mL

1.4 Tampão Fosfato 0,1 M e pH 7,1

Tampão fosfato 0,2 M e pH 7,1.....50,0 mL

Água destilada.....50,0 mL

1.5 Tampão PBSDulbecco (PBSD)

Preparou-se conforme a fórmula abaixo:

1. NaCl.....	8,00g
2. KCl.....	0,20g
3. Na ₂ HPO ₄	1,15g
4. KH ₂ PO ₄	0,20g
5. CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,10g
6. MgCl ₂ .6H ₂ O.....	0,10g
H ₂ O q.s.p.....	1000mL

Dissolveu-se os quatro primeiros sais em, aproximadamente, 700 mL de água deionizada. Em outro recipiente os sais 5 e 6 foram dissolvidos em aproximadamente 200 mL de água deionizada. Adicionou-se, vagarosamente, esta solução ao conteúdo da solução anterior e, posteriormente, o volume foi completado para 1000 mL. Ajustou-se o pH para 7,4. Esterilizou-se o tampão por filtração em milipore[®]. O tampão foi conservado a 4-8°C e, a qualquer sinal de contaminação fúngica ou bacteriana, a solução foi desprezada.

1.6 Solução 10⁻² M de Luminol-Na

Foi dissolvido 1,98 mg de Luminol-Na (Sigma cod. A4685) em 1,0 mL de DMSO. A solução estoque foi alíquotada em porções de 50 µL e mantida à -20°C. Para as reações completou-se o volume estocado para 5,0 mL com PBSD e conservou-se sempre ao abrigo da luz.

1.7 Solução 10⁻² M de lucigenina

Solução estoque foi preparada dissolvendo-se 0,015g de lucigenina (Sigma cod. M8010) em 3,0 mL de PBSD. Esta solução foi alíquotada em porções de 50 µL e mantida à -20°C. Para as reações completou-se o volume estocado para 5,0 mL com PBSD e conservou-se ao abrigo da luz.

1.8 Solução com Zimosan (35mg/mL)

Foi preparada uma suspensão de zimosan (Sigma cod. Z4250) em água e fervida em banho-maria até formação de uma pasta. Centrifugou-se por 1 minuto a 200 x g, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento para um volume final de 1 mL em PBS. A suspensão assim obtida foi aliquoteada e mantida à -20°C.

1.9 Acetato de forbol miristato (PMA) (3×10^{-6} M)

Dissolveu-se 5 mg de PMA em 8 mL de DMSO, obtendo-se uma solução a 1×10^{-3} M, aliquoteada em *ependorfes* e estocada a -20°C. No momento do uso, diluiu-se em PBS para concentração 3×10^{-6} M.

1.10 Solução de OCl⁻/HOCl

HOCl foi produzido a partir de NaOCl pH 12 (0,1 M de NaOH foi utilizado para corrigir o pH) $\epsilon_{295 \text{ nm}} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e diluído em tampão PBS.

1.11 Solução de ácido 5-tiobis-2-nitrobenzóico (TNB)

Solução de 1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma cod. D8130) foi preparada em tampão fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1} , pH 6,6, com 5 mmol.L^{-1} de EDTA. A esta solução foi adicionado boridreto de sódio 20 mmol.L^{-1} e incubado em banho maria por 30 minutos a 37°C. A concentração de TNB foi determinada através do coeficiente de extinção molar ($13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 412 nm). Após o uso a solução foi estocada a 4°C por uma semana (CHING et al., 1994).

1.12 Solução estoque de H₂O₂

A solução foi preparada em água MiliQ e a concentração final foi determinada, espectrofotometricamente, utilizando o coeficiente de extinção molar ($80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 230 nm).

2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Tabela 1 – Análise estatística do crescimento bacteriano para as diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina. Resultados apresentados como média da absorbância + desvio padrão

5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (μM)	Absorbância do crescimento bacteriano (620 m)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
0	0,548 \pm 0,03	0,255 \pm 0,04	0,415 \pm 0,01
1,5	0,363 \pm 0,03	0,229 \pm 0,01	0,448 \pm 0,05
3	0,280 \pm 0,06	0,275 \pm 0,02	0,450 \pm 0,05
6	0,246 \pm 0,02	0,232 \pm 0,04	0,419 \pm 0,008
12	0,245 \pm 0,01	0,281 \pm 0,03	0,451 \pm 0,04
24	0,192 \pm 0,01	0,246 \pm 0,06	0,433 \pm 0,001
49	0,152 \pm 0,01	0,211 \pm 0,02	0,405 \pm 0,01
98	0,111 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,416 \pm 0,02
197	0,029 \pm 0,01	0,006 \pm 0,006	0,371 \pm 0,01
395	0,055 \pm 0,02	-0,026 \pm 0,01	0,365 \pm 0,002
791	0,04 \pm 0,01	0,006 \pm 0,004	0,335 \pm 0,01
1582	0,061 \pm 0,01	0,084 \pm 0,002	0,329 \pm 0,05

3 ATIVIDADE CITOTÓXICA

As curvas dose-resposta de regressão linear da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina e sua associação com ácido ascórbico sobre diferentes linhagens celulares através do método do Vermelho Neutro (VN) são mostradas na Figuras 1 e 2, respectivamente. A associação 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina/ácido ascórbico/catalase e ácido ascórbico sobre células McCoy são mostradas na Figura 3 e na Figura 4 são apresentadas as curvas dose-resposta da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina e ciclofosfamida na ausência e presença de sistema S₉ para células McCoy.

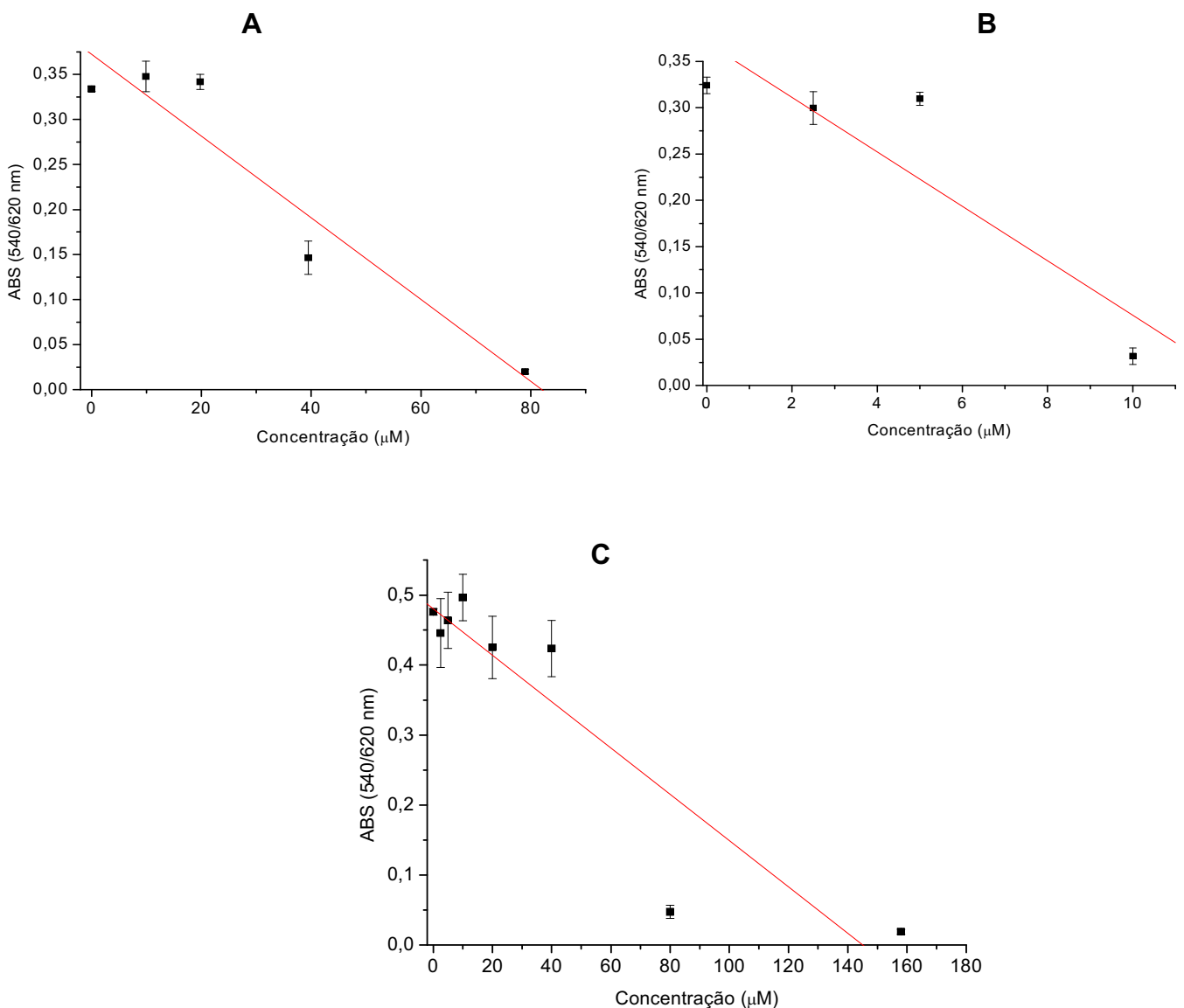


Figura 1 – Curva dose-resposta da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina sobre células McCoy (A), LP07 (B) e LM2 (C) pela técnica do VN

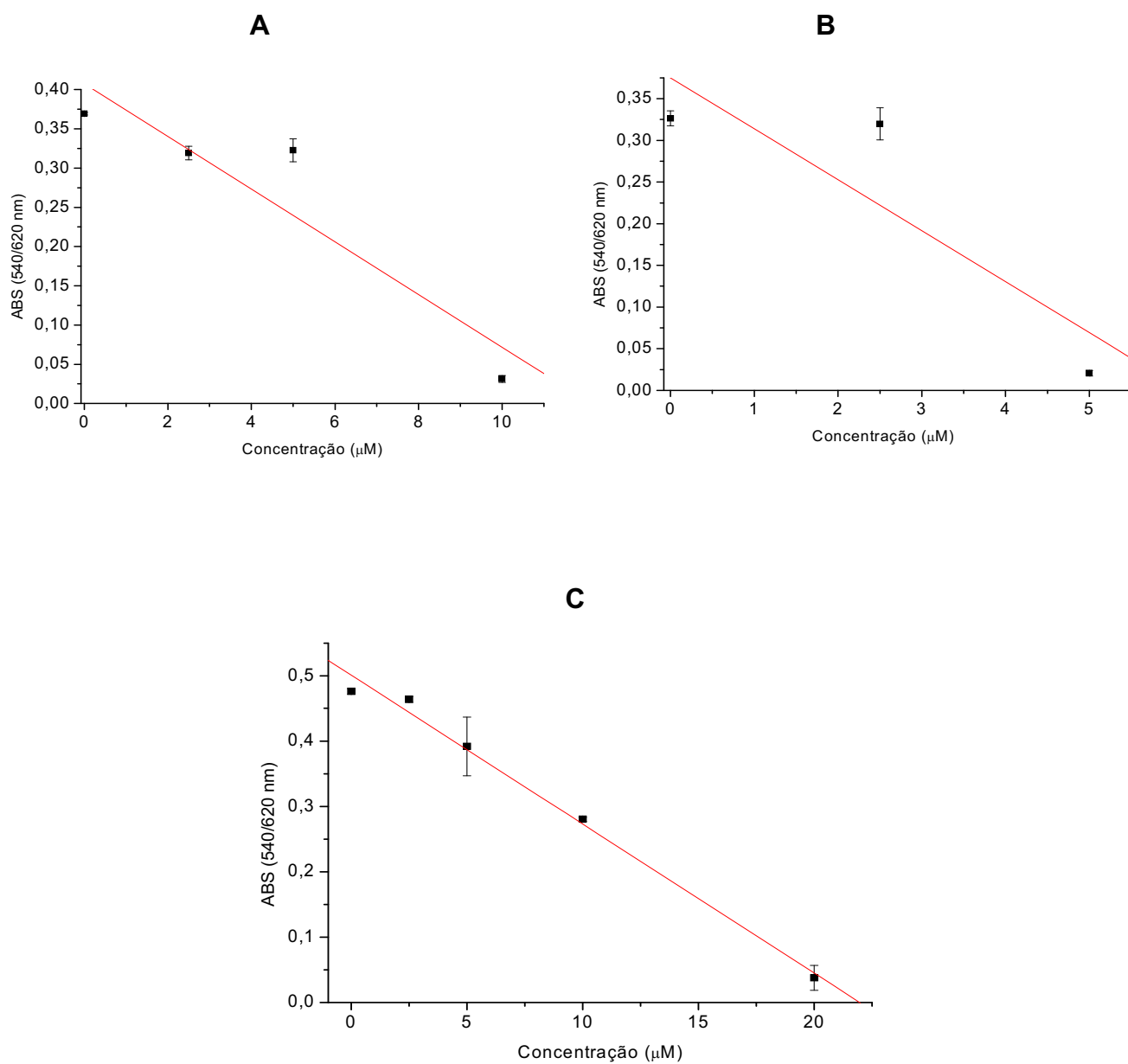


Figura 2 – Curva dose-resposta da 5-metoxi-3,4-dihidroantomegnina/ácido ascórbico sobre células McCoy (A), LP07 (B) e LM2 (C) pela técnica do VN

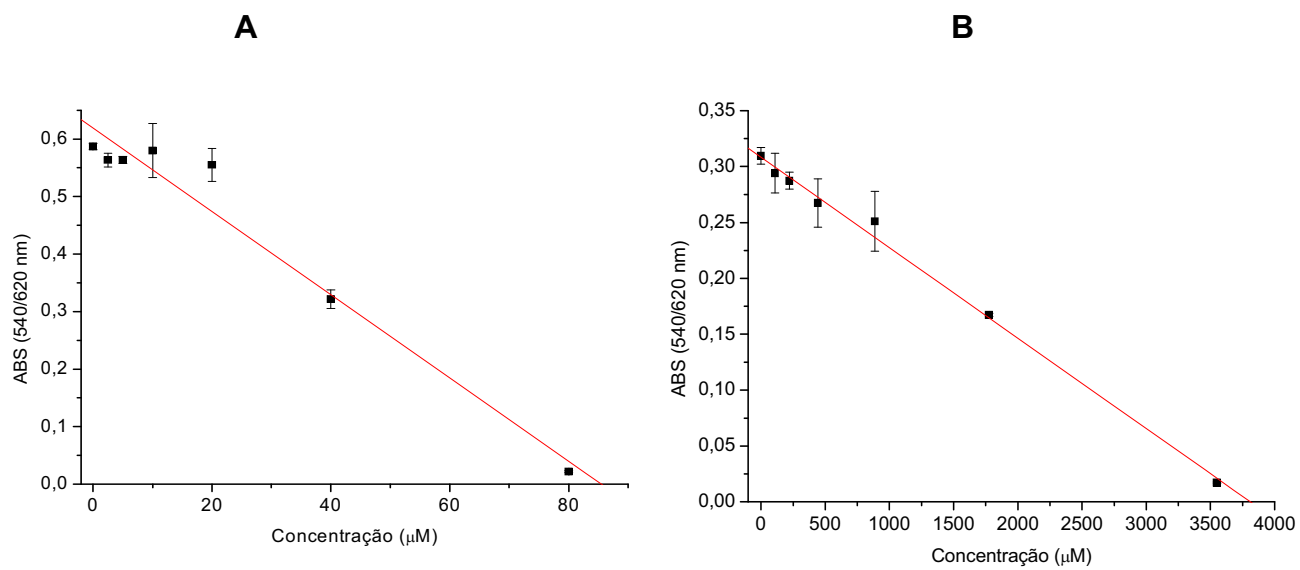


Figura 3 – Curva dose-resposta da 5-metoxi-3,4-dihydroxantomegnina/ácido ascórbico/catalase (A) e ácido ascórbico (B) sobre células McCoy pela técnica do VN

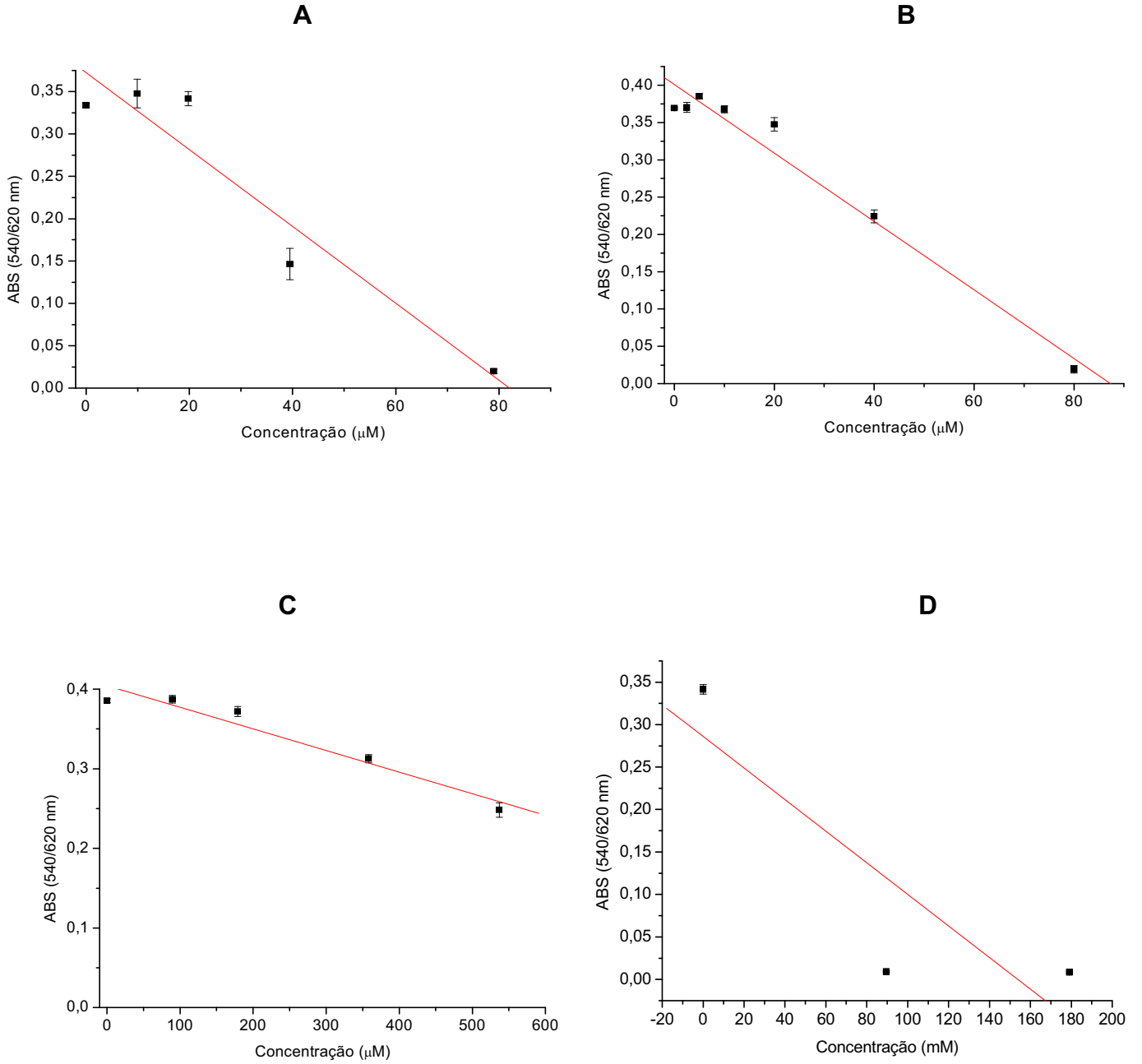


Figura 4 – Curva dose-resposta da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina na ausência (A) e presença (B) de S_9 e ciclofosfamida na ausência (C) e presença (D) de S_9 sobre células McCoy pela técnica do VN

4 TESTES IMUNOLÓGICOS

A Tabela 2 mostra o valor-*P* para diferentes concentrações no teste de citotoxicidade da 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina sobre macrófagos. A Figura 5 mostra a curva padrão para quantificação dos mediadores H₂O₂ e NO liberados por macrófagos murino. As Tabelas 3, 4 e 5 mostram os valores das concentrações de mediadores imunológicos liberados por macrófagos e o *valor-p* nos testes de indução pela 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina e as Tabelas 6 e 7 mostram o *valor-p* para os testes de inibição de mediadores imunológicos pela 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina em macrófagos ativados.

Tabela 2 - *Valor-P* obtido através de análise de variância para citotoxicidade de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina sobre macrófagos por 24 horas

5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM)	Macrófagos (<i>valor – P</i> ¹)
19,75	0,716316
39,5	0,478659
79	0,018733
158	0,013081
316	0,007373
Controle	-

¹em relação ao controle de 24 horas

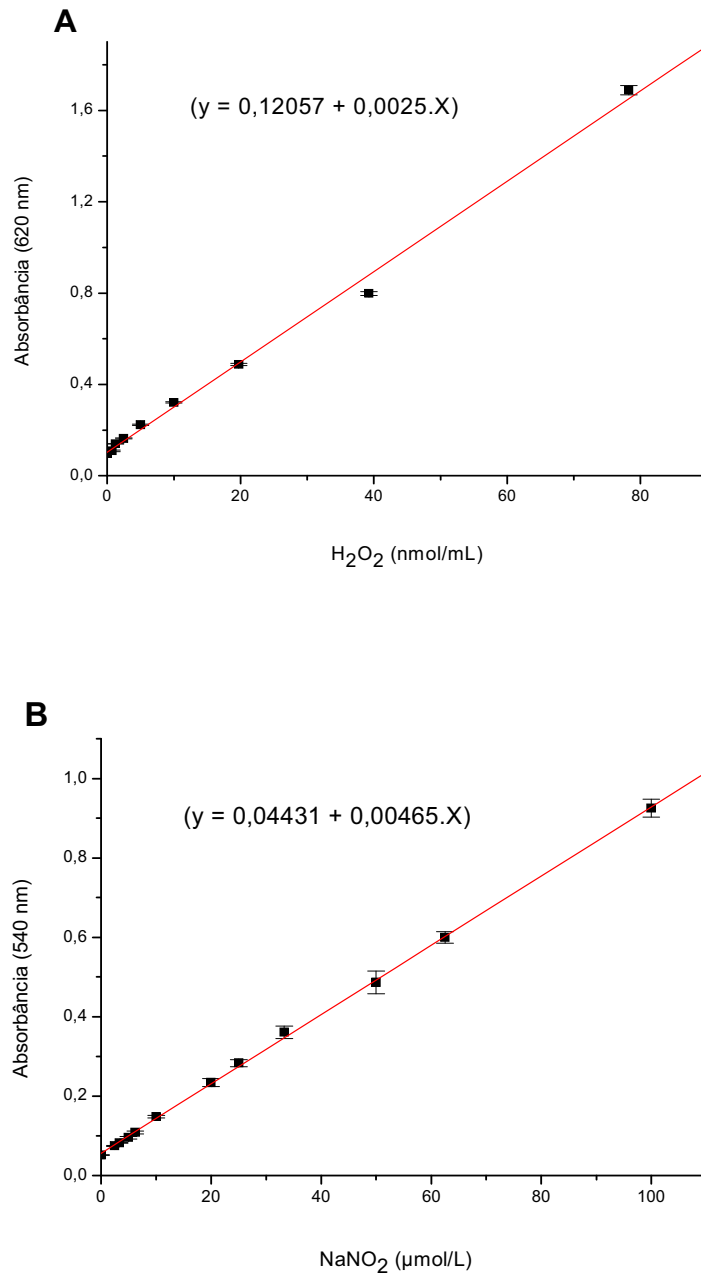


Figura 5 - Curva padrão para quantificação de mediadores liberados por macrófagos murino. Relação entre concentração de peróxido de hidrogênio (nmoles) e absorbância em comprimento de onda de 540 nm (A). Relação entre concentração de nitrito (µmol) e absorbância em comprimento de onda de 540 nm (B)

Tabela 3 - Produção de H₂O₂ por macrófagos peritoneais tratados com 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina

5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (µM)	H ₂ O ₂ (nmol/mL) ¹	valor-P ²
Controle	0,16 ± 0,04	-
9,8	0,16 ± 0,03	0,437502
19,75	0,16 ± 0,05	0,41443
39,5	0,16 ± 0,05	0,759835
79	0,15 ± 0,09	0,479527
158	5,5 ± 0,65	0,000147
316	12,47 ± 0,95	2,35E-05
PMA	25,43 ± 0,9	1,08E-06

¹Valor apresentado como média ± desvio padrão

²Obtido comparando-se a quantidade de H₂O₂ induzida por diferentes concentrações de quinona e 200 nM PMA com a determinada para o controle (macrófagos não estimulados)

Tabela 4 - Produção de NO por macrófagos peritoneais tratados com 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina

5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (µM)	NO/NO ₂ ⁻ (µmol/L) ¹	valor-P ²
Controle	2,94 ± 0,3	-
19,75	2,4 ± 0,15	0,154846
39,5	2,63 ± 0,45	0,492907
79	2,51 ± 0,01	0,183503
158	2,51 ± 0,02	0,183503
316	5,52 ± 0,60	0,052929
LPS	132,94 ± 8,36	0,002066

¹Valor apresentado como média ± desvio padrão

²Obtido comparando-se a quantidade de NO induzida por diferentes concentrações de quinona e 10 µg/mL de LPS com a determinada para o controle (macrófagos não estimulados)

Tabela 5 - Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais tratados com 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina

5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM)	TNF- α (U/mL) ¹	valor-P ²
Controle	0,26 \pm 11,13	-
39,5	5,62 \pm 21,86	0,724659
79	4,21 \pm 9,98	0,625006
158	1,44 \pm 4,04	0,871793
LPS	255 \pm 13,22	1,39E-05

¹Valor apresentado como média \pm desvio padrão

²Obtido comparando-se a quantidade de TNF- α induzido por diferentes concentrações de quinona e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS com o determinado para o controle (macrófagos não estimulados)

Tabela 6 - Valor-P obtido através de análise de variância para inibição da liberação de NO na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina sobre macrófagos estimulados com LPS

5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM)	valor - P ¹
79	0,020699
158	0,223795
316	0,733718
Controle	-

¹em relação ao controle (macrófagos sem a presença de estímulo)

Tabela 7 - *Valor-P* obtido através de análise de variância para inibição da liberação de TNF- α na presença de diferentes concentrações de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina sobre macrófagos estimulados com LPS

5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina (μM)	<i>valor - P</i>¹
19,75	1,18E-08
39,5	9,02E-07
79	3,25E-06
158	1,01E-08
Controle	-

¹em relação ao controle (macrófagos sem a presença de estímulo)