

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**PESQUISA DE ATIVIDADE ANTITUMORAL E
MUTAGÊNICA *IN VITRO* DE PRODUTOS NATURAIS**

JULIANA PIZARRO MARTINS GOMES

Orientador: Prof. Dr. WAGNER VILEGAS

ARARAQUARA - SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**PESQUISA DE ATIVIDADE ANTITUMORAL E
MUTAGÊNICA *IN VITRO* DE PRODUTOS NATURAIS**

JULIANA PIZARRO MARTINS GOMES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. WAGNER VILEGAS

ARARAQUARA - SP

2008

BANCA EXAMINADORA

- 1) Prof. Dr. Wagner Vilegas – orientador
- 2) Profa. Dra. Dionéia Camilo Rodrigues de Oliveira
- 3) Profa. Dra. Chung Man Chin

***“O único conhecimento realmente válido ao homem é aquele
que de alguma forma possa ser compartilhado.”***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador *Prof. Dr. Wagner Vilegas*, pela oportunidade concedida, incentivo e energia desprendida para superar as adversidades.

À *Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda*, pela colaboração com os ensaios de mutagenicidade, pela amizade e incentivo.

À *Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos* pela colaboração com os ensaios de citotoxicidade.

À *Marisa Campos Polesi Placerdes*, por compartilhar com tanta simplicidade de sua valiosa experiência.

À *Dra. Mariana Frigieri*, por compartilhar seus conhecimentos, pela amizade e carinho.

Aos amigos do laboratório de fitoquímica: *Marcelo, Daniel, Carolina, Juliana Severi, Juliana Rodrigues, Ana Lúcia, Márcio, Clenilson, Cláudia, Adriana, Tâmara, Profa. Dra. Lourdes*, pelos bons momentos de convivência e ajuda nas dificuldades.

À *Irani*, bibliotecária da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela colaboração na pesquisa e correção das referências bibliográficas.

Às funcionárias da seção de pós-graduação *Cláudia, Sônia e Laura* pela atenção e colaboração.

Ao *Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq)* pela bolsa concedida.

À *minha família* pelo apoio e incentivo durante todos os momentos.

Ao *meu marido Robson*, pela cumplicidade, paciência e por não medir esforços para me auxiliar no que fosse possível durante a elaboração deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de abreviaturas e símbolos.....	v
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas.....	ix
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Produtos naturais.....	02
1.2 O câncer.....	03
1.3 Ensaios biológicos.....	09
1.4 Fármacos antitumorais e produtos naturais.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
3. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	
3.1 Materiais, soluções e linhagens celulares.....	18
3.2 Metodologia.....	20
3.3 Análise dos dados.....	23
3.4 Resultados.....	23
4. ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	
4.1 Materiais.....	31
4.2 Métodos.....	31
4.3 Resultados.....	32
5. ENSAIOS DE MUTAGENICIDADE	
5.1 Substâncias testadas.....	38
5.2 Materiais, soluções e linhagens celulares.....	38

5.3 Metodologia.....	40
5.4 Análise dos dados.....	41
5.5 Resultados.....	42
6. DISCUSSÃO	
6.1 Pristimerina e tingenona.....	47
6.2 Plumericina.....	56
6.3 Demais substâncias ensaiadas.....	58
7. CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

Resumo

O presente trabalho avaliou a citotoxicidade *in vitro* de produtos naturais (terpenos, iridóides e derivados fenólicos) em linhagens celulares de adenocarcinoma murino de mama (LM3) e de pulmão (LP07), buscando uma possível correlação entre estrutura molecular e atividade antitumoral.

A ordem de citotoxicidade na linhagem LM3 foi tingenona> pristimerina> plumericina> cromeno> paclitaxel> escandenina> acetato de bauerenila> ácido *p*-cumárico> ácido clorogênico. Na linhagem LP07, a exceção é a inversão de posição entre os ácidos clorogênico e *p*-cumárico e escandenina e paclitaxel. Pristimerina, tingenona, plumericina e o cromeno foram mais ativos que o controle positivo, taxol.

Os *nor*-triterpenos pentacíclicos quinonametídeos tingenona ($IC_{50}=0,002 \mu\text{mol/mL}$ em LP07 e $0,003 \mu\text{mol/mL}$ em LM3) e pristimerina ($IC_{50}=0,005 \mu\text{mol/mL}$ em LP07 e LM3) apresentaram a maior citotoxicidade nas linhagens tumorais. A avaliação da relação estrutura e atividade indicaram os anéis A e B essenciais para o efeito citotóxico, devido à cetona α,β -insaturada.

A interação de pristimerina e tingenona com *N*-acetilcisteína foi confirmada por métodos espectrofotométricos e biológicos, constituindo um provável mecanismo de ação das substâncias.

A atividade mutagênica das moléculas mais promissoras, pristimerina, tingenona e plumericina foi avaliada *in vitro* na presença e ausência de ativação metabólica (S9) e não demonstraram mutagenicidade (RM<2).

Abstract

This study evaluates the *in vitro* cytotoxicity of natural products such as terpenes, iridoids, and phenolic derivatives in the cell lines of adenocarcinoma murine of the breast (LM3) and lung (LP07). The study attempted to identify possible correlations between the molecular structure of these natural products and anticancer activity.

The sequence for cytotoxic activity in the LM3 line was tingenone> pristimerin> plumericine> cromene> paclitaxel> scandenine> bauerenyl acetate> *p*-coumaric acid> chlorogenic acid. This sequence was similar to the LP07 cell line, however the exception was the inverse order between chlorogenic and *p*-coumaric acid and between scandenine and taxol. Pristimerine, tingenone, plumericine and cromene were more potent than taxol, the positive control substance in this study in all cell lines.

The quinone-methide triterpene tingenone ($IC_{50}=0,002 \mu\text{mol/mL}$ in LP07 and $0,003 \mu\text{mol/mL}$ in LM3) and pristimerin ($IC_{50}=0,005 \mu\text{mol/mL}$ in LP07 and LM3) showed the largest level of cytotoxicity in the cell lines. The structure-activity relationship suggests that rings A and B containing an α , β -unsaturated carbonyl group are essential for the observed cytotoxic activity.

The interaction between pristimerin and tingenone with *N*-acetylcysteine was proved by biological and spectrophotometric methods, establishing a likely action mechanism to these compounds.

The *in vitro* mutagenic activity was evaluated for the most promising compounds: pristimerine, tingenone and plumericine, and they did not show mutagenic potential ($RM<2$).

Lista de abreviaturas e símbolos

λ	Comprimento de onda
ABS	Absorbância
Ac	Acetil
AMG	Agar Mínimo Glicosado
ANOVA	Análise de Variância
CCDO	Ácido-28-(2-ciano)-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dienóico
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
FDA	Food and Drugs Administration (EUA)
INCA	Instituto Nacional do Câncer (Brasil)
IC₅₀	Índice de citotoxicidade para 50% da população em estudo
<i>i</i>-PrOH	Isopropanol
M	Média
MEM	Minimum Essential Medium (meio de cultura)
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 digeniltetrazolium ou thiazolyl blue
<i>n</i>-hex	<i>n</i> -hexano
NPD	4-nitrofenilenodiamina
PBS	Phosphate Buffered Saline (solução salina de tampão fosfato)
RM	Razão de Mutagenicidade
ROS	Reactive Oxygen Species (espécies reativas de oxigênio)
Thr	Treonina

Lista de figuras

Figura 1.1: O câncer no mundo.....	03
Figura 1.2: Números de casos de câncer estimados para a população brasileira para 2008, com exceção de pele não melanoma.....	04
Figura 1.3: Esquema simplificado de patogenia do câncer.....	06
Figura 1.4: Principais antineoplásicos e sítios de ação.....	08
Figura 1.5: <i>Taxus brevifolia</i> e paclitaxel.....	10
Figura 1.6: Dois alcalóides de origem natural com atividade anticâncer: vinblastina e vincristina.....	11
Figura 1.7: Redução do MTT por enzimas mitocondriais.....	12
Figura 1.8: Controle positivo, negativo e espontâneo respectivamente, em linhagem TA98.....	13
Figura 3.1: Células LM3 (à esquerda) e LP07 (à direita).....	21
Figura 3.2: Células LM3, em câmara de Neubauer, coradas com azul de Tripán. Em destaque as células mortas coradas em roxo (à esquerda) e as vivas refringentes (à direita).....	21
Figura 3.3: Demonstrativo de um dos experimentos de citotoxicidade de DMSO em LP07.....	24
Figura 3.4: Demonstrativo de um dos experimentos de citotoxicidade de DMSO em LM3.....	24
Figura 3.5: Valores de IC ₅₀ (μmol/mL) obtidos da linhagem LM3.....	26
Figura 3.6: Valores de IC ₅₀ (μmol/mL) obtidos da linhagem LP07.....	26
Figura 3.7: Gráfico comparativo entre os valores de IC ₅₀ (μmol/mL) para as linhagens tumorais de mama (LM3) e de pulmão (LP07).....	27

Figura 3.8: Gráfico comparativo entre os valores de IC ₅₀ (μmol/mL) em LM3 na presença e ausência de <i>N</i> -acetilcisteína.....	28
Figura 3.9: Gráfico comparativo entre os valores de IC ₅₀ (μmol/mL) em LP07 na presença e ausência de <i>N</i> -acetilcisteína.....	29
Figura 4.1: Espectro UV-visível de <i>N</i> - acetilcisteína, 0,07g/mL.....	32
Figura 4.2: Espectro UV-visível de tingenona, 0,02g/mL.....	33
Figura 4.3: Espectro UV-visível de pristimerina, 0,02g/mL.....	33
Figura 4.4: Espectro UV-visível da reação de pristimerina com <i>N</i> -acetilcisteína na proporção 1:5 (mol/mol), 30 minutos de reação.....	34
Figura 4.5: Espectro UV-visível da reação de pristimerina com <i>N</i> -acetilcisteína na proporção 1:10 (mol/mol), 30 minutos de reação.....	34
Figura 4.6: Espectro UV-visível da reação de tingenona com <i>N</i> -acetilcisteína na proporção 1:5 (mol/mol), 30 minutos de reação.....	35
Figura 4.7: Espectro UV-visível da reação de tingenona com <i>N</i> -acetilcisteína na proporção 1:10 (mol/mol), 30 minutos de reação.....	35
Figura 4.8: espectro UV-visível da reação de pristimerina com <i>N</i> -acetilcisteína na proporção 1:10 (mol/mol), 20 horas de reação.....	36
Figura 4.9: espectro UV-visível da reação de tingenona com <i>N</i> -acetilcisteína na proporção 1:5 (mol/mol), 20 horas de reação.....	36
Figura 6.1: <i>Maytenus ilicifolia</i> (Celastraceae) conhecida popularmente no Brasil como espinheira santa.....	48
Figura 6.2 : Mecanismos intrínsecos e extrínsecos de indução à apoptose.....	50
Figura 6.3: Numeração e análise da suscetibilidade nucleofílica da pristimerina.....	51
Figura 6.4: Estruturas canônicas de ressonância de tingenona e pristimerina.....	52

Figura 6.5: Estruturas tridimensionais de CCDO e pristimerina.....	53
Figura 6.5: Representação da reação de Michael entre <i>N</i> -acetilcisteína e a posição 6 da tingenona ou pristimerina.....	54
Figura 6.7: Espécies da família Apocynaceae.....	56
Figura 6.8: Conformações mais estáveis da plumericina.....	58

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Substâncias avaliadas.....	13
Tabela 3.1: Médias e desvios dos IC ₅₀ obtidos após administração de cada substância nas linhagens tumorais.....	25
Tabela 3.2: Médias e desvios dos IC ₅₀ após administração de cada substância na presença de <i>N</i> -acetilcisteína para as linhagens tumorais de mama (LM3) e de pulmão (LP07).....	28
Tabela 5.1: Atividade mutagênica de pristimerina nas linhagens TA98, Ta97a, TA100 e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> , em ausência e presença de ativação metabólica (S9).....	43
Tabela 5.2: Atividade mutagênica de tingenona nas linhagens TA98, Ta97a, TA100 e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> , em ausência e presença de ativação metabólica (S9).....	44
Tabela 5.3: Atividade mutagênica de plumericina nas linhagens TA98, Ta97a, TA100 e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> , em ausência e presença de ativação metabólica (S9).....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais

A evolução do conhecimento do homem sobre a terapêutica de origem natural é gradual e paralela à evolução da história humana (AQUINO *et al*, 1996). Inumeráveis são os exemplos de espécies utilizadas na prática tradicional que fornecem à farmacologia os princípios ativos em uso, ciência conhecida como etnofarmacologia. A própria Organização Mundial da Saúde reconhece a importância da prática e encoraja todas as nações a preservarem e promoverem o emprego racional do conhecimento derivado da medicina popular (AKERELE, 1992).

Plantas produzem uma grande variedade de metabólitos que estão ganhando importância devido a suas aplicações terapêuticas e biotecnológicas. Os níveis de produção desses metabólitos são induzidos por fatores ambientais e genéticos. A habilidade para sintetizar compostos tóxicos está relacionada com a defesa de patógenos (bactérias ou fungos), herbívoros como animais ou insetos ou suprimir o crescimento de espécies vizinhas competitivas (SINGH *et al*, 2003).

Tais metabólicos possuem grandes potencialidades como princípios ativos, podem ser utilizados diretamente na terapia, como precursores na semi-síntese quimiofarmacêutica ou em modelos para síntese de novos princípios de uso terapêutico (VIEGAS *et al*, 2006).

Assim, apesar dos avanços da química tradicional e da farmacologia em produzir substâncias efetivas, o reino vegetal pode prover uma rica fonte de novos fármacos e medicamentos (SINGH *et al*, 2003).

1.2 O câncer

O câncer é uma das doenças que, ainda nos dias atuais, mais causa mortes no mundo (Figura 1.1) (SEUNG *et al*, 2004).



Figura 1.1: O câncer no mundo (INCA, 2007)

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes (INCA, 2008). No Brasil, o Instituto nacional do Câncer (INCA) estima que em 2008 ocorrerão 466.730 novos casos de câncer. A estimativa é válida também para o ano de 2009 (INCA, 2008). Os tipos de câncer mais incidentes na população brasileira estimados para o ano de 2008, com exceção de pele não melanoma, são demonstrados na Figura 1.2.

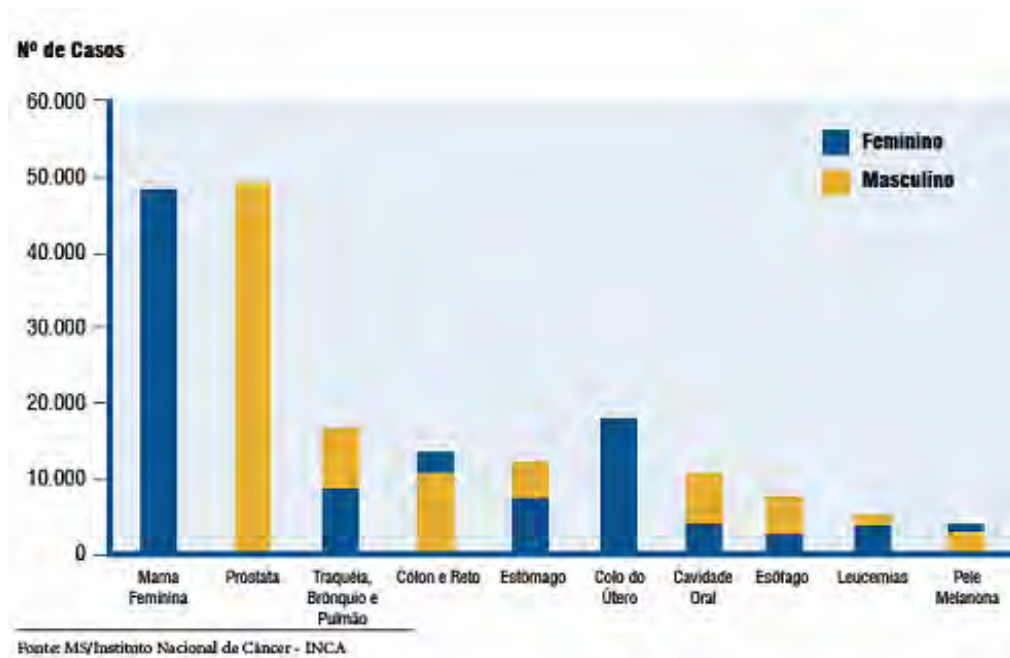


Figura 1.2: Números de casos de câncer estimados para a população brasileira para 2008, com exceção de pele não melanoma (INCA,2008).

O câncer, também denominado de neoplasia maligna e tumor maligno, é uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontroladas no corpo de formas anormais das próprias células corporais. A proliferação destas células não é controlada pelos processos que normalmente regulam a divisão celular e o crescimento dos tecidos. Em suma, os tumores apresentam, em graus variáveis, quatro características peculiares:

- desdiferenciação e perda da função;
- proliferação descontrolada;
- poder de invasão sobre tecidos adjacentes;
- metástases, processo de disseminação do tumor para locais distantes, dando origem a novos tumores (LEMKE & WILLIANS, 2008)

A carcinogênese é um processo complexo, surge em decorrência de uma série de alterações genéticas e epigenéticas (Figura 1.3). Já está estabelecido que duas classes de genes reguladores normais, os *proto-*

oncogenes promotores do crescimento e os *genes supressores do crescimento canceroso* (*anti-oncogenes* ou *genes supressores tumorais*) são os alvos principais do dano genético. Há uma crescente evidência de que uma terceira categoria de genes, os que controlam a morte celular programada, ou *apoptose*, também sejam importantes na carcinogênese.

Os proto-oncogenes são transformados em oncogenes por duas grandes categorias de alterações:

- alterações na estrutura do gene, resultando na síntese de um produto gênico anormal (oncoproteína) tendo uma função aberrante;
- alterações na regulação da expressão gênica, resultando no aumento ou produção imprópria da proteína promotora de crescimento estruturalmente normal (ROBBINS *et al*, 1996).

Os danos genéticos podem ser pontuais ou mais grosseiros, resultados de rearranjos cromossômicos. O oncogene *ras* representa o melhor exemplo de ativação por mutações de ponto. Um grande número de tumores humanos possui tais mutações (ROBBINS *et al*, 1996). O cromossomo Filadélfia, característico de leucemia mielóide crônica é formado pela translocação dos cromossomos 9 e 22, o que resulta na fusão do proto-oncogene *c-abl* (no cromossomo 9) com *bcr* (no cromossomo 22) gerando o oncogene *c-abl-bcr* (RIBEIRO *et al*, 2003).

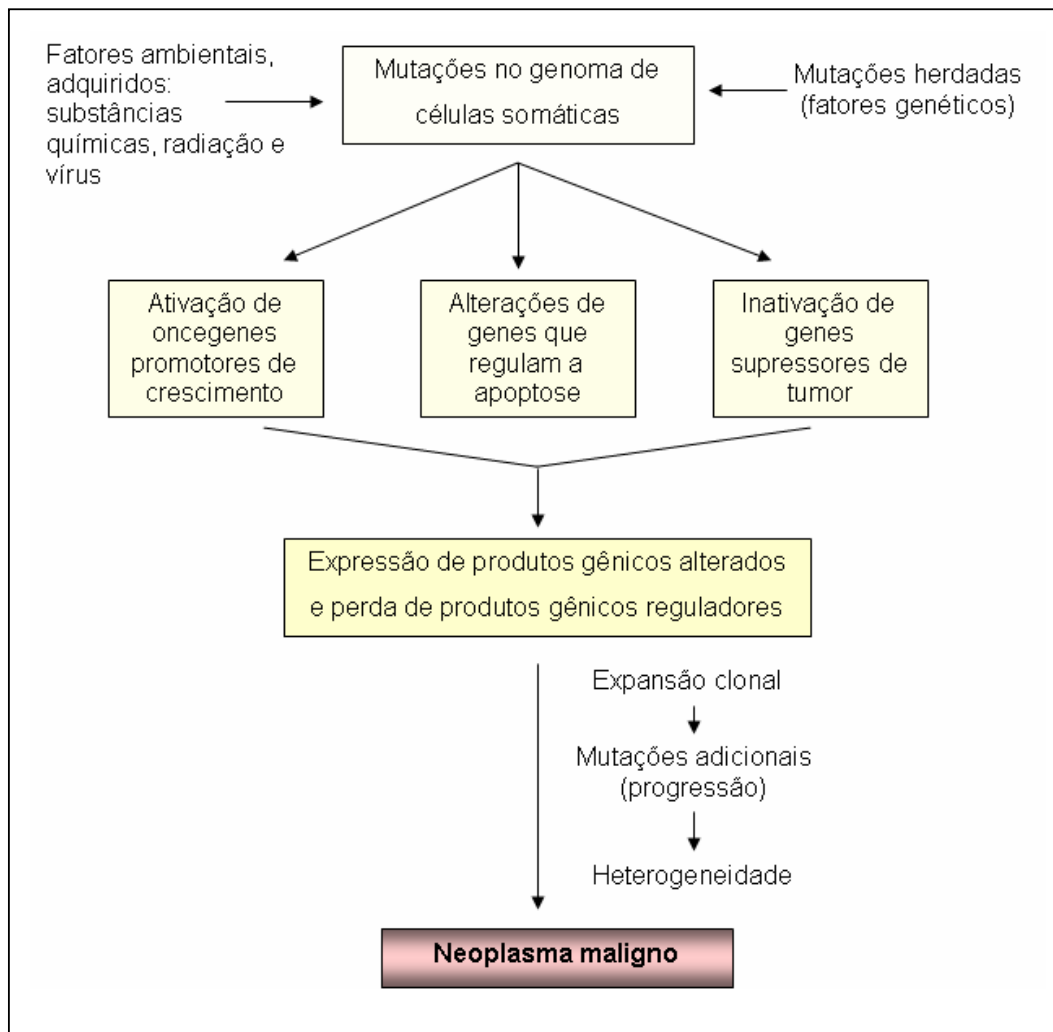


Figura 1.3: Esquema simplificado de patogênese do câncer (adaptado de ROBBINS *et al*, 1996).

Os produtos dos genes supressores de tumor freiam a proliferação celular. A função fisiológica destes genes é regular o crescimento da célula, e não impedir a formação de tumor. Em vista de a perda destes genes ser um evento importante em muitos tumores humanos (e talvez em todos), e como sua descoberta resultou do estudo dos tumores, o nome supressor de tumor ou antioncogene persiste. O gene supressor de tumor *p53* é o alvo isolado mais comum de alterações genéticas em humanos (ROBBINS *et al*, 1996).

Diferentemente dos proto-oncogenes, em que mutações em somente um alelo conferem ganho de função, para que os genes supressores de tumor percam sua função, ambos os alelos têm que estar afetados (RIBEIRO *et al*, 2003).

Estudos sobre a carcinogênese tem mostrado que as células iniciadas não são passivas ao acúmulo de danos causados por agentes químicos e físicos. Elas reagem por, pelo menos três mecanismos:

- reação contra espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pelo injúria provocada por stress oxidativo (luz UV, radiações ionizantes);
- eliminação das células lesadas (mutadas ou instáveis), promovendo apoptose ou morte celular durante a mitose;
- estimulação de sistemas de reparo de DNA.

Soma-se a estes sistemas de defesa a habilidade de comunicação intercelular, capaz de detectar células vizinhas defeituosas e induzir apoptose nestas células (TUBIANA, 2008).

As razões que levam os genes que regulam o ciclo celular a perderem suas funções são complexas e multifatoriais. Dentre estas razões podem-se citar predisposições genéticas hereditárias e agentes físicos, químicos e biológicos. Os riscos herdados para desenvolver determinados tumores podem, muitas vezes, ser identificados através de alterações moleculares precisas, como na doença de retinoblastoma infantil, ligados a mutações no gene supressor de tumor *Rb*. Porém, com exceção talvez do câncer colo-retal hereditário não poliplóide, o impacto destes tipos de câncer para a saúde pública como um todo é limitado, uma vez que acometem somente 2-5% do número total de tumores humanos (RIBEIRO *et al*, 2003).

O processo de carcinogênese, em geral se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. O câncer é mais comum em pessoas de idade avançada, devido ao acúmulo de mutações e outros danos oxidativos nas células. Soma-se ainda o declínio da atividade antioxidante e do sistema imune, o que compromete o combate às células mutadas (HEGEDUS, 2000).

Um resumo dos principais fármacos atualmente empregados na terapêutica do câncer e seus pontos de ação no ciclo celular é apresentado na Figura 1.4.

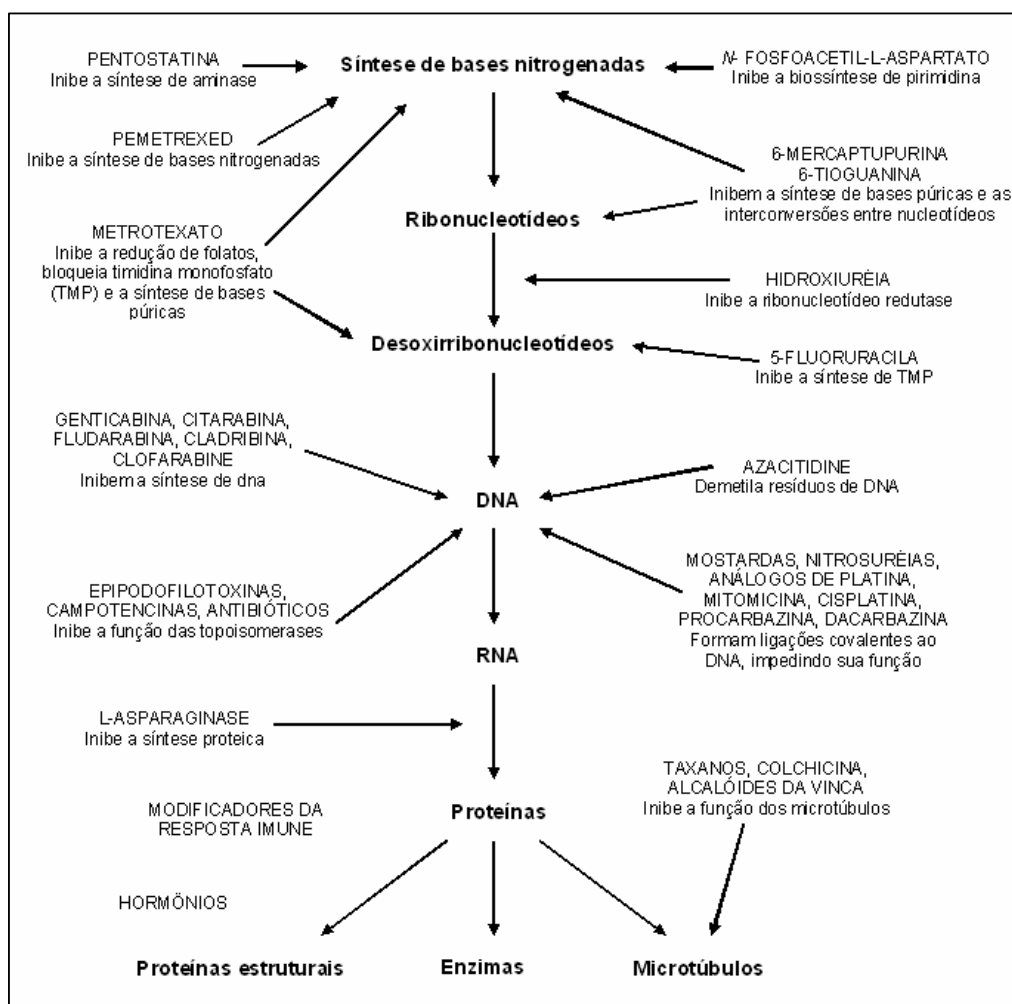


Figura 1.4: Principais antineoplásicos e sítios de ação (adaptado de LEMKE & WILLIAMS, 2008).

1.3 Ensaios biológicos:

Durante os anos 60 o *National Cancer Institute* (EUA) realizou uma extensiva pesquisa com extratos de plantas com atividade antitumoral (MONKS *et al*, 2002). Desde então, tem aumentado o interesse na pesquisa de compostos isolados de plantas medicinais, como uma rica fonte de novos fármacos antitumorais.

Devido ao rápido desenvolvimento e emprego de técnicas e equipamentos analíticos e aos avanços tecnológicos, muitas drogas extraídas de fontes naturais com potencial anti-câncer têm sido desenvolvidas (TSAI, 2001). Uma das técnicas empregadas atualmente como preliminares ao estudo de atividade antitumoral de produtos sintéticos e naturais é o *screening* sob células tumorais de diversas linhagens *in vitro*, o que possibilita a análise de grande número de amostras simultaneamente, representa metodologia mais simples comparativamente aos ensaios *in vivo* e é realizado em vários laboratórios em todo o mundo (NEIDLE *et al*, 2005).

Os métodos colorimétricos que quantificam a proliferação celular de células em cultura são considerados rápidos e baratos para a avaliação de atividade antitumoral e antiviral de um vasto número de extratos de produtos naturais, permitindo facilmente guiar o isolamento e purificação de seus produtos ativos (BETANCUR-GAVIS *et al*, 1999).

Um dos ensaios colorimétricos para a avaliação de proliferação celular ou citotoxicidade (IC_{50}) mais comumente utilizados na atualidade é o ensaio de MTT descrito por Mosmamm (1983). O princípio do método é a redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazolium MTT, por enzimas mitocondriais resultando em um produto azul/roxo (Figura 1.5). Desta forma esta reação ocorre somente em células vivas e que estejam com suas mitocôndrias

ativas, configurando-se assim um ensaio versátil e quantitativo (MOSMAMM, 1983).

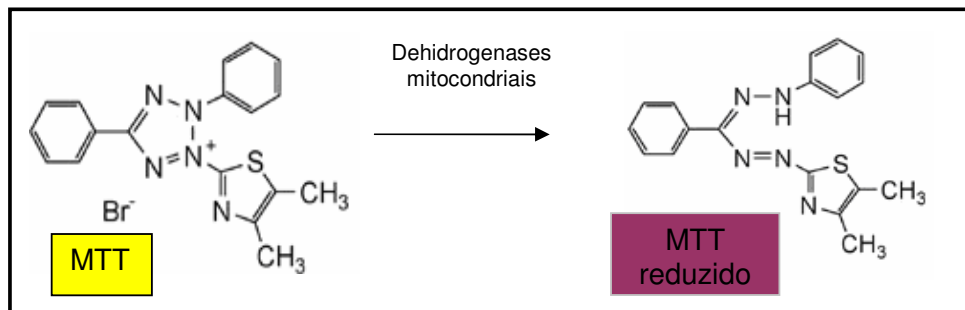


Figura 1.5: Redução do MTT por enzimas mitocondriais.

O dano ao DNA é um evento fundamental no processo da carcinogênese e mutagênese. Muitas substâncias químicas podem ser avaliadas por sua ação mutagênica em bactérias (MACIEL *et al*, 2002). A metodologia atualmente mais utilizada para avaliação da atividade mutagênica foi descrita por Moran e Ames (MORAN & AMES, 1983).

O método consiste na utilização de linhagens mutantes de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA97a, TA100, TA102), incapazes de crescerem na ausência de histidina. Essas bactérias na presença de drogas mutagênicas sofrem novas mutações, acarretando na reversão da mutação original proporcionando a síntese de histidina permitindo assim, o crescimento bacteriano em meios desprovidos deste aminoácido. Esse ensaio pode ser realizado na presença ou ausência de homogenato de fígado de mamífero ou da fração microssomal (S9). O uso de fração S9 permite inferir se uma substância é mutagênica em sua forma original ou se necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica.

A mutagenicidade é calculada pelo número de bactérias que foram revertidas em relação ao controle, levando-se em consideração as bactérias

revertidas espontaneamente (controle espontâneo) e as revertidas na presença somente do solvente, DMSO (controle negativo). O controle positivo consiste na utilização de substâncias conhecidamente mutagênica a cada linhagem em estudo (Figura 1.6).



Figura 1.6: Controle positivo, negativo e espontâneo respectivamente, em linhagem TA98.

1.4 Fármacos antitumorais e produtos naturais:

Dentre as classes de compostos já testadas com pronunciada atividade anti-câncer, podemos citar os terpenos (sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos), alcalóides, cumarinas, lignanas, flavonóides, taninos, stilbenos, curcuminóides, polissacarídeos (CAI *et al*, 2004). Na literatura, existem também relatos de famílias de plantas, que já tiveram seus extratos e/ou seus compostos isolados testados com atividade anti-câncer (CAI *et al*, 2004; SEUNG *et al*, 2004; VOGT *et al*, 2005; WATASE *et al*, 2004; HAZRA *et al*, 2005; PEI-WEN *et al*, 2005).

O paclitaxel, extraído de *Taxus brevifolia* (Figura 1.7), despertou intenso interesse na década de 80. Foi questionada a viabilidade de seu futuro emprego terapêutico face à complexidade de sua estrutura e à relativa escassez da sua fonte natural, problema comumente enfrentado quanto se

trabalha com produtos naturais. Partiu-se para a busca de precursores e análogos com maior disponibilidade no vegetal, levando a rotas semi-sintéticas até a síntese total da molécula anunciada em 1994 por Holton e Nicolau. Tal síntese foi recentemente otimizada e é método eficiente de sua obtenção em escala industrial, sendo a rota do taxol disponível no mercado (VIEGAS *et al*, 2006). Atualmente é o medicamento mais empregado no tratamento de câncer de mama e ovário.

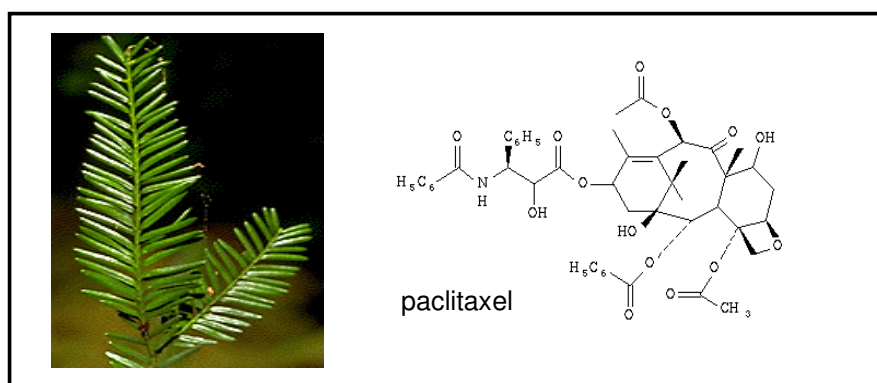


Figura 1.7: *Taxus brevifolia* e paclitaxel.

Dentre os grandes sucessos alcançados nos últimos 20 anos também se destacam os alcalóides vinblastina e vincristina (Figura 1.8), extraídos de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae).

Gullo *et al* (2006) relatam que dos novos fármacos descobertos para tratamento de câncer e doenças infecciosas, 60 e 75% respectivamente eram oriundos de fontes naturais.

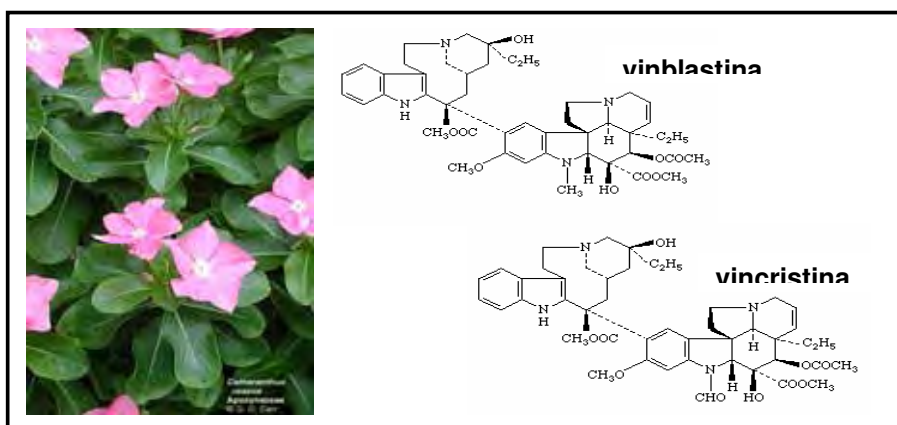
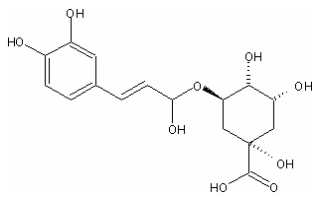
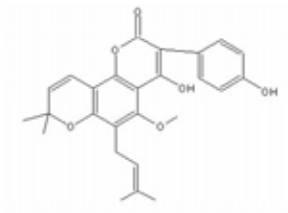
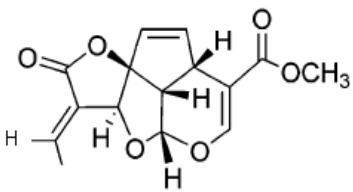
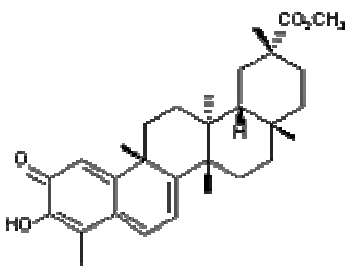
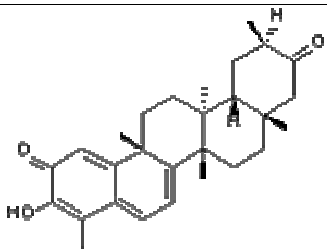
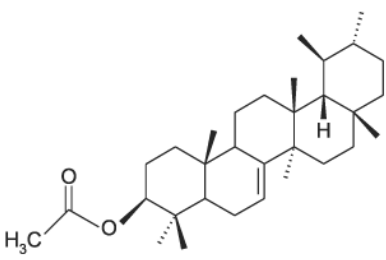


Figura 1.8: Dois alcalóides de origem natural com atividade anticâncer: vinblastina e vincristina.

Dentro deste contexto, foi realizado um levantamento das moléculas pertencentes à coleção de substâncias do Grupo de Produtos Naturais coordenado pelo prof. Dr. Wagner Vilegas. Tratam-se de substâncias isoladas pelo grupo ou doadas a ele, tendo em comum a origem a partir de diversas fontes vegetais. Todas as substâncias tiveram suas estruturas determinadas por métodos espectrométricos apropriados. Foram selecionadas substâncias com quantidade e grau de pureza adequados para a realização de ensaios de atividade antitumoral e mutagênica *in vitro* (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Substâncias avaliadas

Estrutura	Nomenclatura
	Cromeno 2,2-dimetil-4-oxo-3,4,6,8a-tetraidro-2H-cromeno-6-carboxilato de metila
	Ácido <i>p</i>-cumárico

	Ácido clorogênico
	Escandenina
	Plumericina
	Pristimerina
	Tingenona
	Acetato de bauerenila

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi:

1) avaliar a citotoxicidade *in vitro* de produtos naturais (terpenos, iridóides e derivados fenólicos) (Tabela 1.1) em linhagens celulares de adenocarcinoma murino de mama (LM3) e de pulmão (LP07);

2) buscar uma possível correlação entre estrutura molecular e atividade antitumoral;

3) avaliar a mutagenicidade *in vitro* das substâncias com significativo efeito citotóxico em linhagens tumorais.

3. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

3.1 Materiais, soluções e linhagens celulares:

- **Células LM3 e LP07:**

As linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama (LM3) e de pulmão (LP07), obtidas de adenocarcinomas espontâneos de Balb/c, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Lucas L. Colombo do Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina. As culturas foram mantidas em meio MEM completo a 37°C e 5% de saturação de CO₂.

- **Meio de cultura (meio MEM)**

Para o preparo deste meio de cultura foram utilizados 9,6 mg do preparado para meio de cultura MEM (Gibco), adicionou-se 2,2 mg de NaHCO₃ e H₂O suficiente para completar 1L. O pH foi ajustado, quando necessário, para um valor no intervalo de 7,0-7,2. Após, a solução foi filtrada sob pressão reduzida com membrana esterilizante, mantida 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para confirmação da esterilidade e, subsequentemente, armazenada em geladeira.

- **Meio MEM completo**

A cada 100 mL do meio MEM preparado como descrito anteriormente adicionou-se 10 mL de soro fetal bovino (Gibco, Brasil) e 100 µL do medicamento sulfato de gentamicina, comercialmente Garamicina (Mantecorp), ampolas para uso injetável de 80 mg/mL.

- **Solução de PBS**

Para o preparo desta solução tampão foram utilizados:

NaCl -----8 mg

KCl-----0,2 mg

Na₂HPO₄-----1,44 mg

KH₂PO₄-----0,42 mg

H₂O-----q.s.p. 1L

O pH da solução deve ser ajustado para 7,4 e depois autoclavada para obtenção da esterilidade.

- **Solução de MTT**

Para o preparo desta solução, 10 mg de MTT (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 2 mL de solução de PBS e mantidos em ultrassom por 10 minutos. Imediatamente antes do uso acrescentou-se 8 mL de meio MEM e a solução foi mantida ao abrigo da luz.

- **Aparelhos e materiais utilizados:**

Os ensaios foram realizados em fluxo laminar horizontal Classe 100 (Veco, Brasil). Todos os instrumentos utilizados foram estéreis.

As estufas para incubação das células operavam a 37°C e saturação de CO₂ a 5% (Forma Scientific, EUA).

As placas utilizadas para a incubação das células foram de 96 orifícios, estéreis e descartáveis, com capacidade de 200 µL/orifício (Corning Incorporated).

A leitura da absorbância no ensaio de MTT foi realizada em leitor de UV-visível da marca Labsystems, modelo Multiskan ascent, sob os filtros de

$\lambda = 540$ e 620 nm. O aparelho foi programado para agitação da placa por 10 segundos imediatamente antes de cada leitura, para homogeneização dos orifícios.

- **Controle positivo:**

O paclitaxel (Sigma, pureza >99%) foi eleito como controle positivo, devido a seu largo emprego na terapêutica, pela sua comprovada atividade antitumoral e por ser ativo *in vitro*.

- **Solução de *N*-acetilcisteína:**

Utilizou-se o medicamento Fluimucil (Zambon) 200 mg granulados, sabor laranja, como fonte de *N*-acetilcisteína. Para a realização dos experimentos os granulados foram diluídos diretamente no meio MEM completo.

- **Solução-mãe dos compostos testados:**

2,5 mg dos compostos a serem testados foram diluídos em 50 μ L de DMSO e adicionados a 9,95 mL ou 19,95 mL de meio MEM completo de acordo com suas solubilidades e armazenados a -80°C .

3.2 Metodologia:

As células murinas LM3 e LP07 (Figura 3.1) foram incubadas em meio MEM completo a 37°C e 5% de saturação de CO_2 .

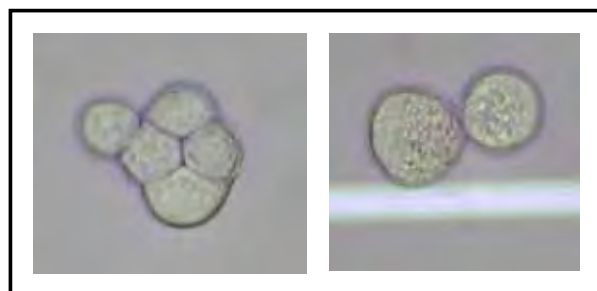


Figura 3.1: Células LM3 (à esquerda) e LP07 (à direita).

As células foram coradas com o corante Azul de Trypan a 0,04% (v/v) (Reagen, Brasil) e contadas em câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha) (Figura 3.2). A concentração foi ajustada para 5×10^4 células/mL. 200 μ L desta solução foram adicionadas a cada orifício de uma placa estéril de 96 orifícios e incubados por 24 horas a 37°C e 5% de saturação de CO₂ por 24 horas para formação do tapete celular.

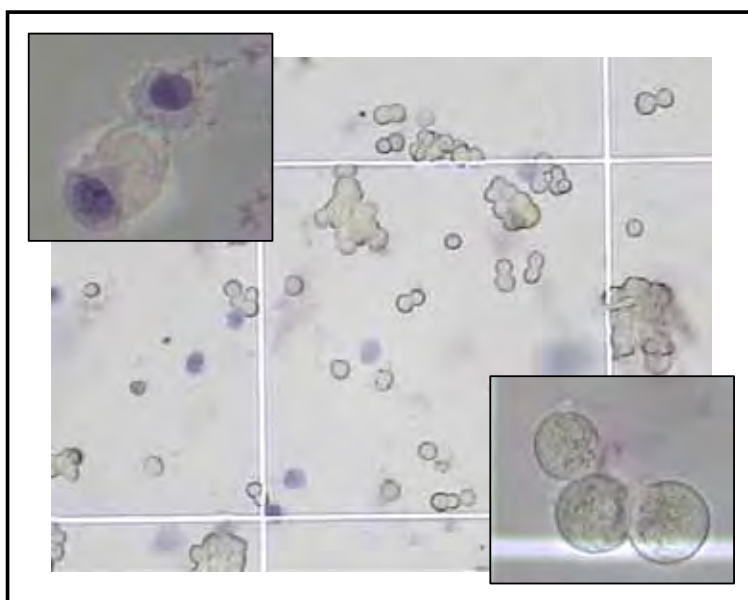


Figura 3.2: Células LM3, em câmara de Neubauer, coradas com azul de Trypan. Em destaque as células mortas coradas em roxo (à esquerda) e as vivas refringentes (à direita).

Após este período, o meio foi vertido e sob as células aderidas ao fundo da placa foram adicionados 200 μ L de soluções em diferentes concentrações das substâncias a serem testadas, preparadas pela diluição seqüencial das soluções mãe, descongeladas imediatamente antes do uso, com meio MEM completo. As placas foram incubadas sob as mesmas condições por mais 24 horas. A seguir o meio foi novamente vertido e adicionou-se 100 μ L de solução de MTT, incubou-se por mais 3 horas. Após o meio foi desprezado e acrescentou-se 100 μ L de *iso*-propanol (*i*-PrOH) e, imediatamente, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a λ = 540 nm com filtro de referência de λ = 620 nm.

O controle negativo, foi realizado com as células na presença somente de meio de cultura MEM completo. As substâncias sofreram diluições seqüenciais a partir de uma solução mãe, preparada com meio de cultura e DMSO e estocada a -80 °C, de modo que a concentração deste solvente em cada diluição subsequente não ultrapassasse a concentração limite de solvente que seja tóxica a estas células. Tal concentração foi determinada experimentalmente pela realização de ensaios com as células frente a diferentes concentrações de DMSO, pela mesma técnica descrita anteriormente neste item. O controle positivo foi diluído igualmente às demais substâncias.

Após da definição dos IC₅₀ das substâncias, testes complementares foram realizados para avaliar a citotoxicidade dos compostos pristimerina, tingenona, plumericina e acetato de bauerenila na presença de *N*-acetilcisteína, valendo-se da reação com MTT como descrito anteriormente. Adicionou-se à concentração teste de cada substância, solução de *N*-acetilcisteína atingindo a concentração final fixa de 0,5 μ mol/mL para cada

diluição das substâncias, imediatamente antes da adição às células, não houve pré-incubação. A toxicidade de *N*-acetilcisteína foi previamente avaliada.

3.3 Análise dos dados:

Os valores correspondentes à leitura da placa após a incubação com MTT nos comprimentos de onda estabelecidos foram respectivamente subtraídos. Com os módulos dos valores resultantes confeccionou-se um gráfico de viabilidade celular X concentração da substância teste, valendo-se do programa Excel. A partir dos dados da regressão linear deste gráfico extraiu-se o valor de IC_{50} correspondente adotando-se valor de $r^2 \geq 0,9$. Após a realização de 2 ou 3 ensaios independentes, realizou-se o cálculo da média e desvio padrão desta medida.

3.4 Resultados

- **Determinação da concentração máxima de DMSO**

Tendo-se em vista que a maioria das substâncias a serem investigadas quanto à citotoxicidade apresentaram baixa solubilidade no meio de cultura em que deveriam ser diluídas, uma alternativa foi a adição de DMSO para facilitar esta solubilização. Tornou-se necessário investigar a concentração do solvente que poderia ser utilizada causando o menor dano às linhagens celulares em estudo.

Foram realizados 3 experimentos independentes para o cálculo do IC_{80} do solvente nas linhagens LM3 e LP07 (Figuras 3.3 e 3.4).

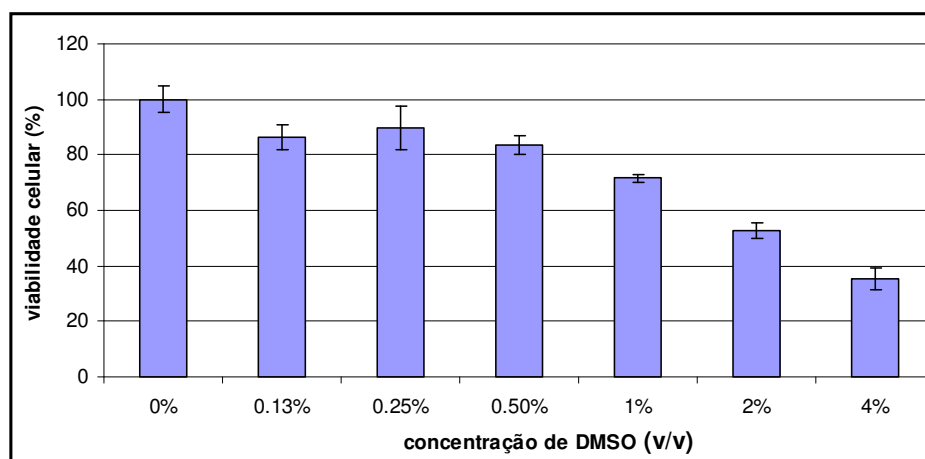


Figura 3.3: Demonstrativo de um dos experimentos de citotoxicidade de DMSO em LP07.

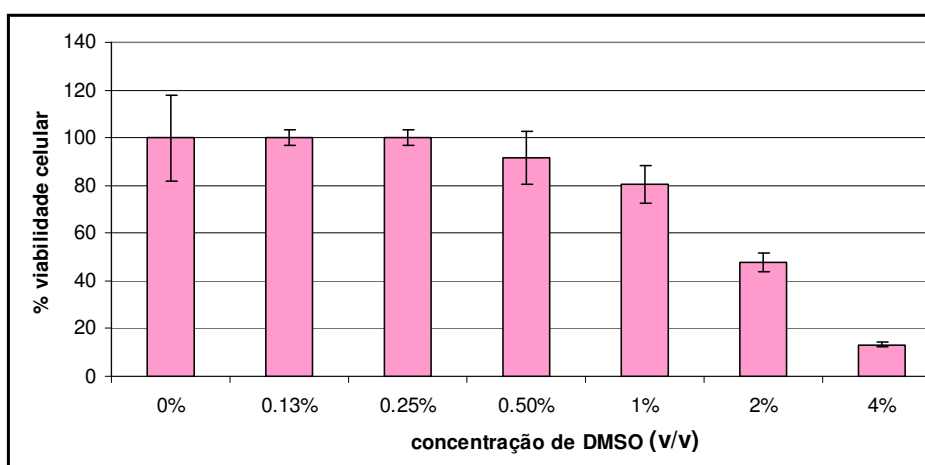


Figura 3.4: Demonstrativo de um dos experimentos de citotoxicidade de DMSO em LM3.

O valor de IC_{80} para a linhagem LP07 foi de $0,635 \pm 0,16\%$ (v/v) de DMSO e para a linhagem LM3 de $0,700 \pm 0,28\%$ (v/v).

Padronizou-se a concentração máxima a ser utilizada na diluição de ambas as linhagens como $0,500\%$ (v/v) de DMSO.

- **Análise das substâncias**

A Tabela 3.1 e as Figuras 3.5 e 3.6 reúnem os valores de IC₅₀ determinados.

Tabela 3.1: Médias e desvios dos IC₅₀ obtidos após administração de cada substância nas linhagens tumorais.

Substâncias testadas	IC ₅₀ (μmol/mL)	
	LM3	LP07
Cromeno	0,063± 0,010	0,134± 0,009
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,506± 0,010	3,075±0,275
Ácido clorogênico	0,942± 0,119	0,864± 0,351
Escandenina	0,127± 0,010	0,152± 0,013
Plumericina	0,032± 0,010	0,025±0,009
Pristimerina	0,005± 0,000	0,005± 0,000
Tingenona	0,003± 0,001	0,002± 0,001
Acetato de bauerenila	0,170± 0,047	0,852± 0,192
Paclitaxel	0,074± 0,000	0,191± 0,061

A ordem total de citotoxicidade na linhagem LM3 foi tingenona> pristimerina> plumericina> cromeno> paclitaxel> escandenina> acetato de bauerenila> ácido *p*-cumárico> ácido clorogênico. A sequência foi semelhante para a linhagem LP07 (Figura 3.7): tingenona> pristimerina> plumericina> cromeno> escandenina> paclitaxel> acetato de bauerenila> ácido *p*-cumárico> ácido clorogênico. A exceção foi a inversão de posição entre os ácidos clorogênico e *p*-cumárico, e escandenina e paclitaxel.

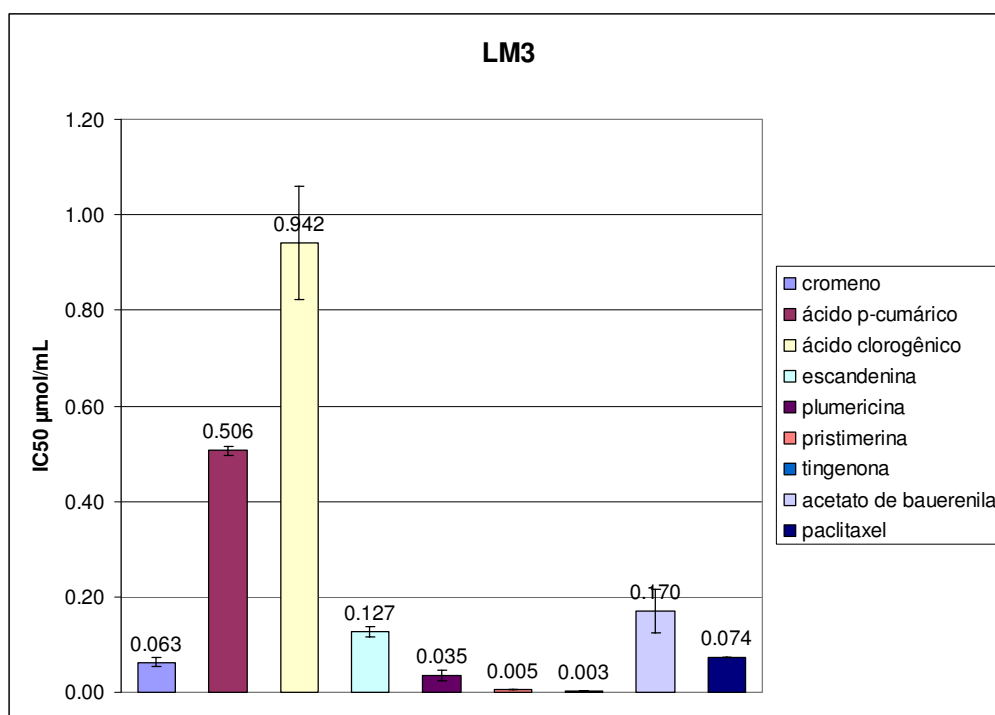


Figura 3.5: Valores de IC₅₀ (μmol/mL) obtidos da linhagem LM3.

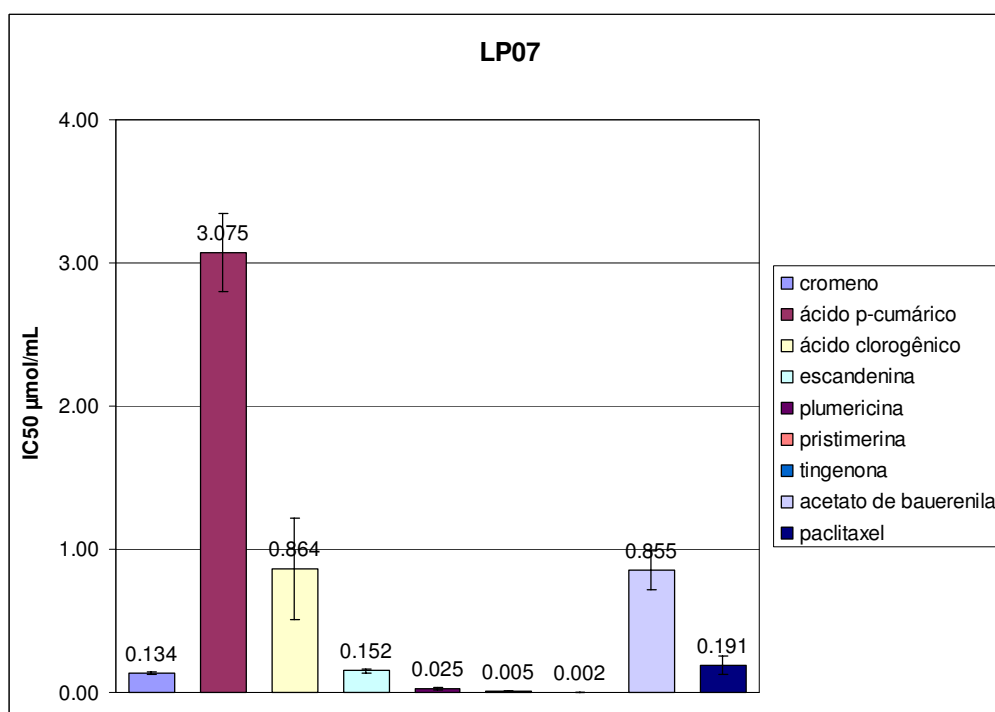


Figura 3.6: Valores de IC₅₀ (μmol/mL) obtidos da linhagem LP07.

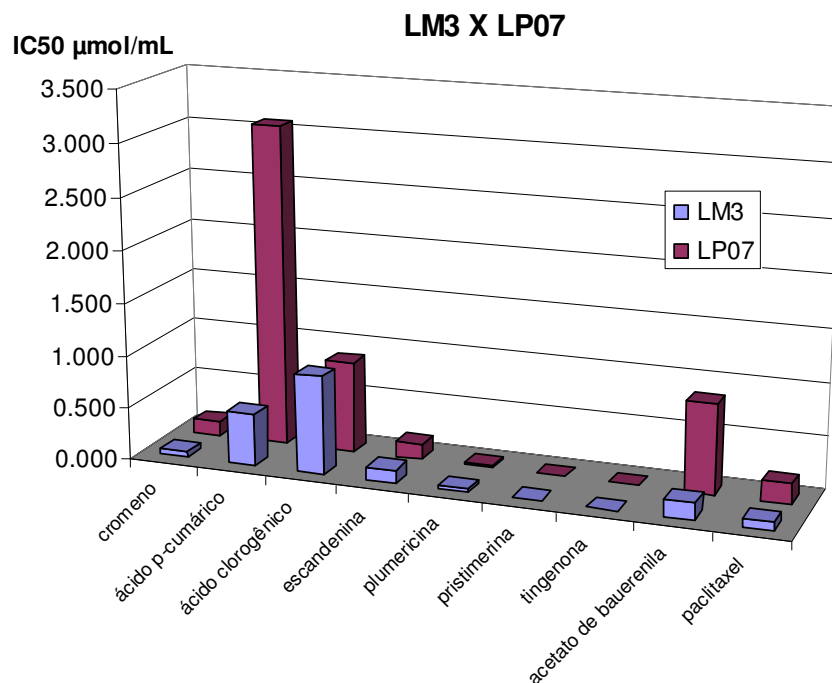


Figura 3.7: Gráfico comparativo entre os valores de IC₅₀ para as linhagens tumorais de mama (LM3) e de pulmão (LP07).

Pristimerina, tingenona, plumericina e o cromeno foram mais ativos que o controle positivo, paclitaxel em todas as linhagens estudadas.

Ensaio complementares foram realizados para a determinação do IC₅₀ de tingenona, pristimerina, plumericina e acetato de bauerenila na presença de concentração fixa de *N*-acetilcisteína (0,5 μmol/mL) nas linhagens tumorais LM3 e LP07 (Tabela 3.2). Observou-se que concentrações de 0,500 e 1,000 μmol/mL de *N*-acetilcisteína não apresentaram citotoxicidade sobre as linhagens celulares. Em linhagem LM3 a viabilidade celular das concentrações 0,500 e 1,000 μmol/mL foi de e 93,945 ± 5.245 e 90,481 ± 5,052% respectivamente. Em LP07 os valores foram 100,000 ± 4,041 e 95,603 ± 1,989%.

Tabela 3.2: Médias e desvios dos IC_{50} após administração de cada substância na presença de *N*-acetilcisteína para as linhagens tumorais de mama (LM3) e de pulmão (LP07).

Substâncias testadas	IC_{50} ($\mu\text{mol/mL}$)			
	LM3		LP07	
	Antes	Depois	Antes	Depois
Plumericina	0,032 $\pm$ 0,010	0,048 $\pm$ 0,009	0,025 $\pm$ 0,009	0,048 $\pm$ 0,001
Pristimerina	0,005 $\pm$ 0,000	0,010 $\pm$ 0,003	0,005 $\pm$ 0,000	0,009 $\pm$ 0,000
Tingenona	0,003 $\pm$ 0,001	0,012 $\pm$ 0,005	0,002 $\pm$ 0,001	0,034 $\pm$ 0,001
Acetato de bauerenila	0,170 $\pm$ 0,047	0,215 $\pm$ 0.054	0,852 $\pm$ 0,192	0,170 $\pm$ 0,040

Comparativamente, a presença de *N*-acetilcisteína induziu um aumento do valor de IC_{50} das substâncias pristimerina, tingenona e plumericina nas duas linhagens estudadas. Na presença de *N*-acetilcisteína, o acetato de bauerenila mostrou comportamento singular, sendo mais tóxico na presença do mesmo composto para a linhagem LP07 (Figuras 3.8 e 3.9).

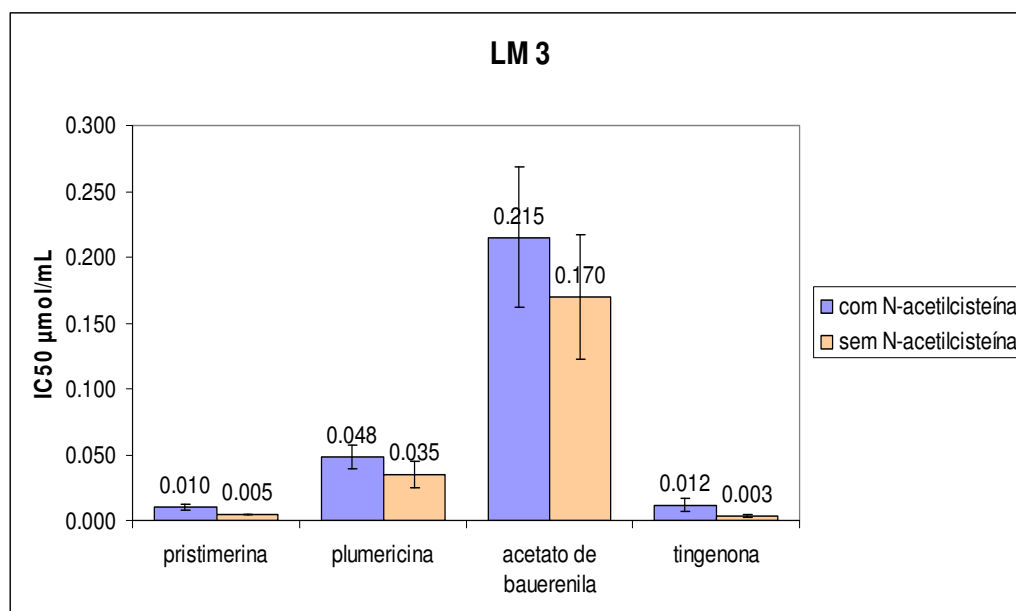


Figura 3.8: Gráfico comparativo entre os valores de IC_{50} ($\mu\text{mol/mL}$) em LM3 na presença e ausência de *N*-acetilcisteína.

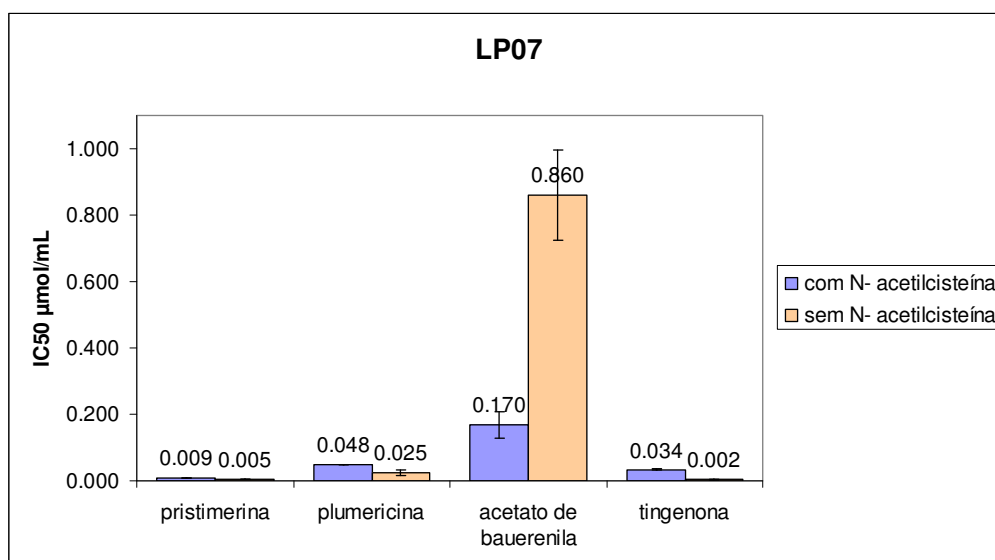


Figura 3.9: Gráfico comparativo entre os valores de IC_{50} ($\mu\text{mol/mL}$) em LP07 na presença e ausência de *N*-acetilcisteína.

Os valores demonstraram aumento no valor de IC_{50} de 100,000% para pristimerina, 283,333% para tingenona, 38,095% para plumericina e 26,471% para acetato de bauerenila na linhagem LM3. Na linhagem LP07 os aumentos foram de 80,000%, 1.575,000%, 90,000% e -80,291% respectivamente.

4. ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA

Visando confirmar a interação de pristimerina, tingenona, plumericina e acetato de bauerenila com *N*-acetilcisteína, procedeu-se a análise espectrofotométrica destas substâncias na presença e ausência da substância *N*-acetilcisteína.

4.1 Materiais:

- Substâncias testadas: pristimerina, tingenona, plumericina e acetato de bauerenila.
- *N*-acetilcisteína: Fluimucil 200 mg, granulado efervescente (Zambon).
- Solventes: utilizou-se metanol (MeOH) e *n*-hexano (*n*-hex) grau HPLC/spectro (Tedia). A água milli-Q utilizada foi proveniente de Direct-Q™ (Millipore).
- Espectrofotômetro UV-visível: DR/4000U Spectrophotometer (Hach).

4.2 Métodos:

Procedeu-se uma leitura da absorbância em $\lambda = 200-700$ nm para estabelecimento da curva controle para cada uma das substâncias nas concentrações:

- pristimerina e tingenona a 0,02 g/mL em MeOH;
- plumericina a 0,01 g/mL em MeOH;
- acetato de bauerenila a 1,00 g/mL em *n*-hex ;
- *N*-acetilcisteína a 0,07 mg/mL solubilizado em água milli-Q.

Após se realizou a reação de 1 mol de pristimerina ou tingenona a 5 mols (1:5) e 10 mols (1:10) de *N*-acetilcisteína. A leitura foi realizada após 30 minutos e 20 horas de incubação à temperatura ambiente, utilizando MeOH

como solvente. A concentração dos reagentes obedeceu a utilizada para a confecção da curva controle.

4.3 Resultados:

Plumericina e acetato de bauerenila não apresentaram espectro com bandas bem definidas nos limites de $\lambda = 200\text{-}700\text{ nm}$. Portanto, não foram testados com *N*-acetilcisteína.

N-acetilcisteína apresentou bandas em $\lambda = 212,05\text{ nm}$ e $278,31\text{ nm}$ (Figura 4.1).

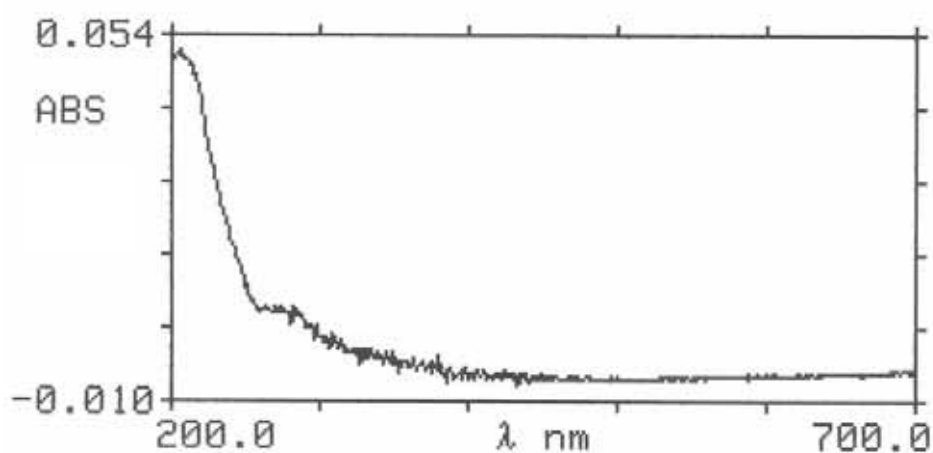


Figura 4.1: Espectro UV-visível de *N*-acetilcisteína, 0,07mg/mL.

Tingenona e pristimerina apresentaram bandas em $\lambda = 254\text{ nm}$, pristimerina apresentou mais uma banda em $\lambda = 428,9\text{ nm}$ e tingenona em $\lambda = 416,87\text{ nm}$ (Figuras 4.2 e 4.3).

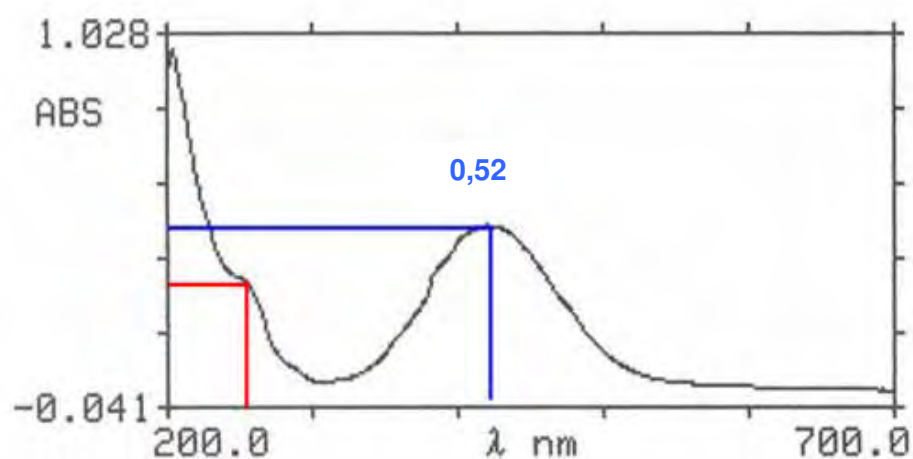


Figura 4.2: Espectro UV-visível de tingenona, 0,02g/mL.

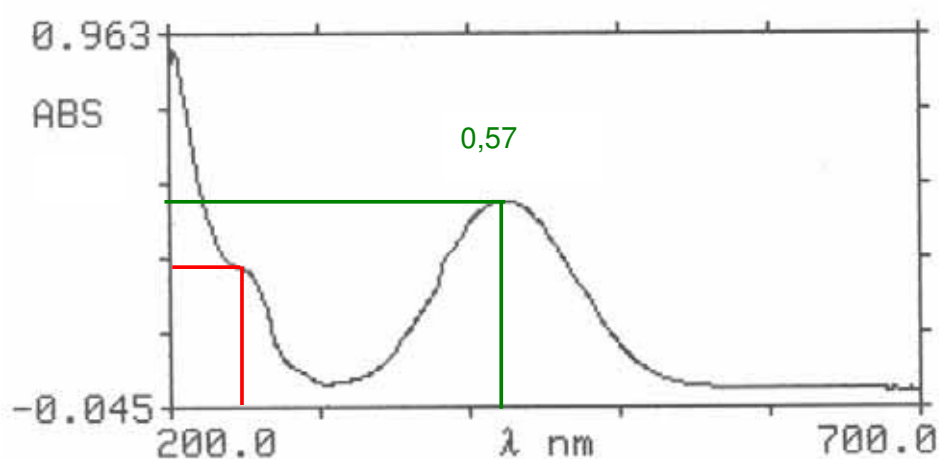


Figura 4.3: Espectro UV-visível de pristimerina, 0,02g/mL.

Após a reação de pristimerina e tingenona com *N*-acetilcisteína, o espectro mostra que não há deslocamento das bandas, mas observa-se efeito hipocrômico acentuado, diminuição da absorbância, na banda da região de $\lambda = 420\text{nm}$, utilizando-se a mesma concentração inicial dos compostos.

O estudo comparativo das proporções de 1:5 e 1:10 (mol:mol) não mostrou diferenças significativas nos espectros após 30 minutos de reação, tanto para pristimerina (Figuras 4.4 e 4.5), quanto para tingenona (Figuras 4.6 e 4.7).

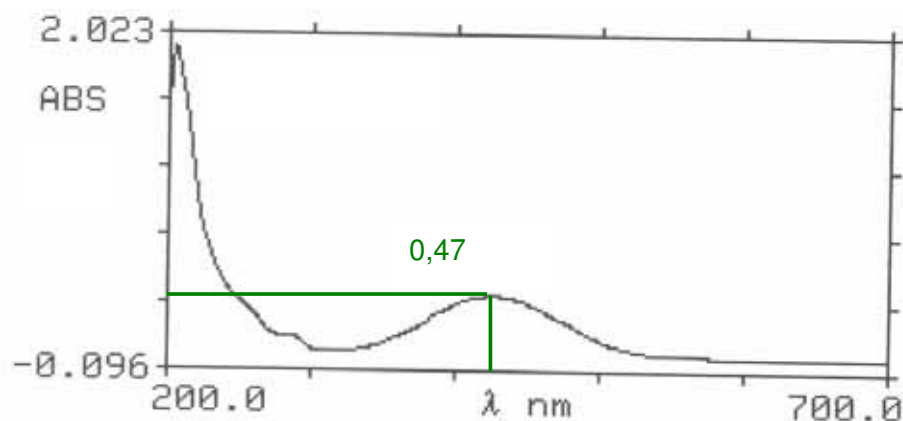


Figura 4.4: Espectro UV-visível da reação de pristimerina com *N*-acetilcisteína na proporção 1:5 (mol/mol), 30 minutos de reação.

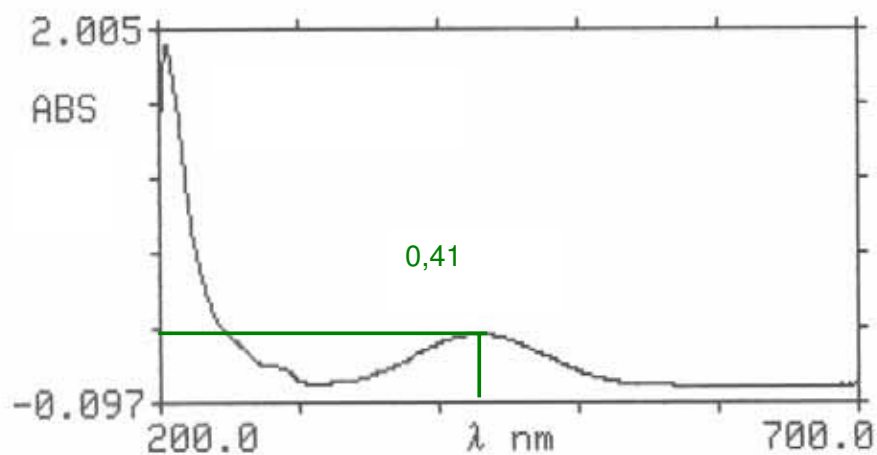


Figura 4.5: Espectro UV-visível da reação de pristimerina com *N*-acetilcisteína na proporção 1:10 (mol/mol), 30 minutos de reação.

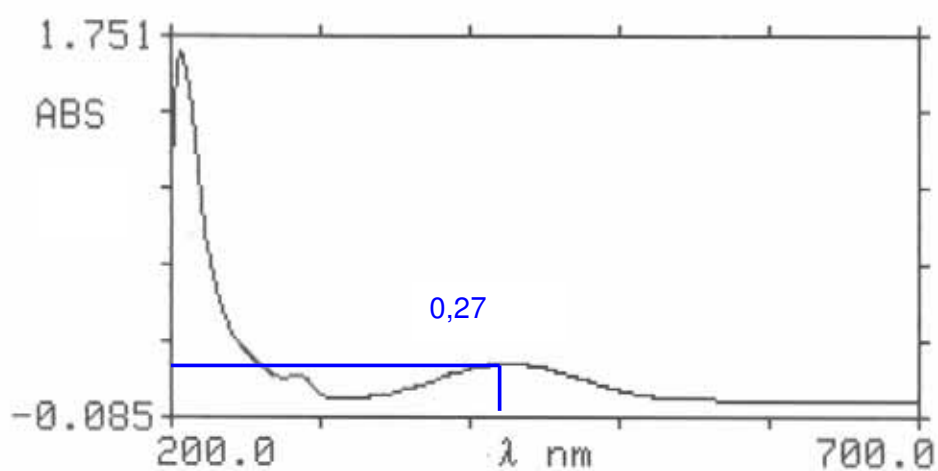


Figura 4.6: Espectro UV-visível da reação de tingenona com *N*-acetilcisteína na proporção 1:5 (mol/mol), 30 minutos de reação.

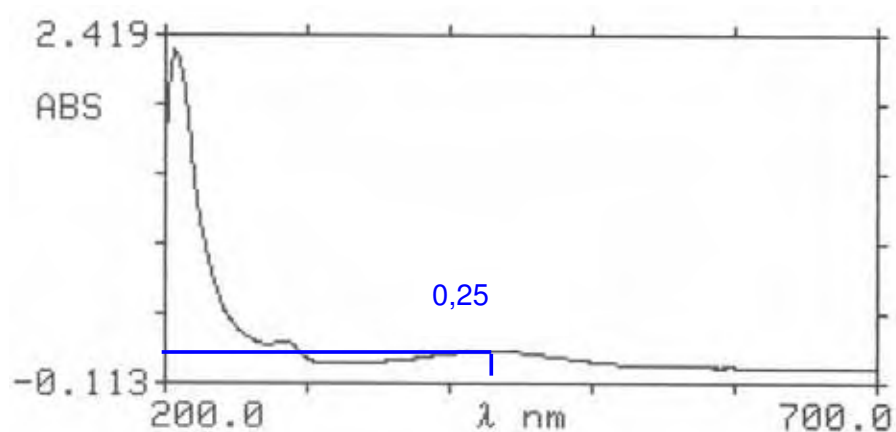


Figura 4.7: espectro UV-visível da reação de tingenona com *N*-acetilcisteína na proporção 1:10 (mol/mol), 30 minutos de reação.

Após 20 horas de reação realizou-se leitura do meio reacional, e observou-se sensível diminuição da absorbância na região de 420nm para pristimerina (1:10)(Figura 4.8), e tingenona (1:5) (Figuras 4.9).

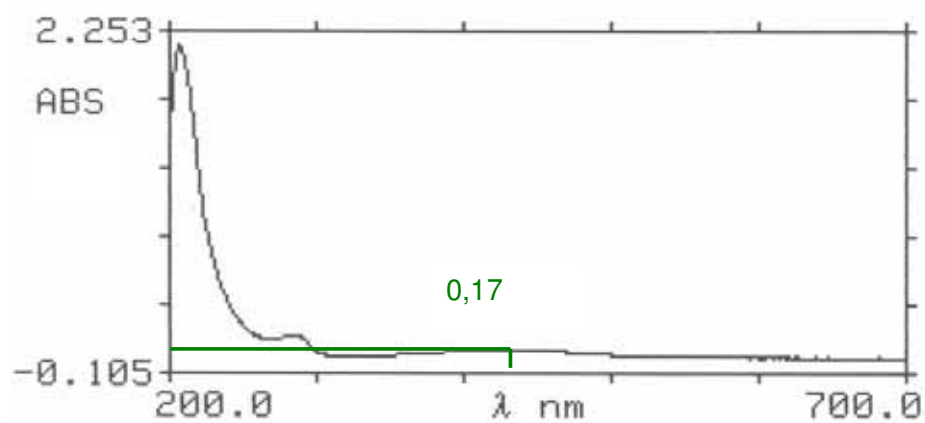


Figura 4.8: Espectro UV-visível da reação de pristimerina com *N*-acetilcisteína na proporção 1:10 (mol/mol), 20 horas de reação.

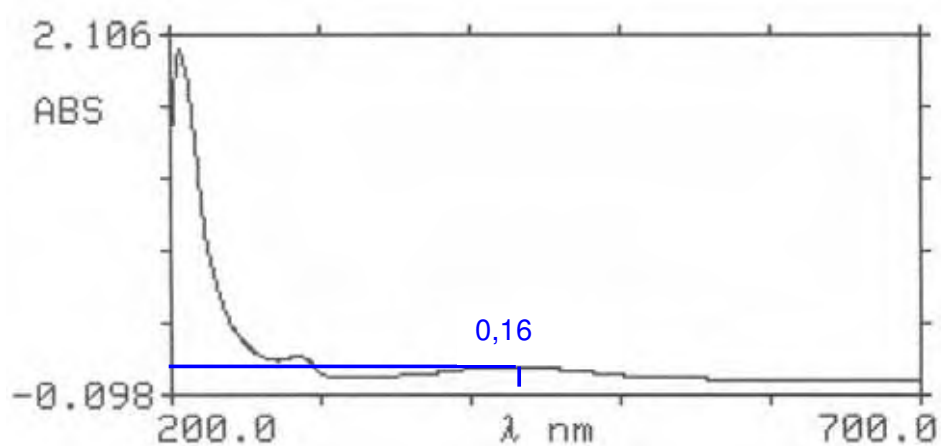


Figura 4.9: Espectro UV-visível da reação de tingenona com *N*-acetilcisteína na proporção 1:5 (mol/mol), 20 horas de reação.

O conjunto dos experimentos demonstra que ocorreu interação entre *N*-acetilcisteína e tingenona/pristimerina, e que essa interação já foi significativa após 30 minutos da adição do reagente.

5. ENSAIOS DE MUTAGENICIDADE

5.1 Substâncias testadas:

As substâncias testadas quanto à atividade mutagênica *in vitro* foram: pristimerina, tingenona e plumericina; pois apresentaram significativo efeito citotóxico dentre as linhagens celulares tumorais estudadas.

5.2 Materiais, soluções e linhagens celulares:

- **Linhagens utilizadas:**

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100, TA102 de *Salmonella typhimurium* gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, USA.

1) A cepa TA98 apresenta mutação no gene hisD (hisD3052) que codifica para a histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para a reversão oito resíduos repetitivos de GC e detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA.

2) A cepa TA97a também detecta mutágenos do tipo *frameshift* e apresenta mutação no gene his D6610 e alvo para mutação os resíduos GC.

3) A mutação hisG46 presente na cepa TA100 ocorre no gene que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, através da substituição do códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CTC) – leucina. Assim, essa cepa detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste par G-C.

4) A cepa TA102 contém a mutação ochre TAA no gene hisG e detecta eficientemente mutágenos como formaldeído, glioxal, vários hidroperóxidos, bleomicina, fenilidrazina, raios-X, luz UV, estreptonigrina e agentes cross-link, como mitomicina-C (MARON & AMES, 1983).

- **Manutenção e estoque das cepas de *S. typhimurium*:**

As cepas de *S. typhimurium* foram mantidas em tubos para congelamento (1,5 mL) à -70°C para que se mantivessem inalteradas todas as suas características genéticas. Para cada 0,9 mL de cultura foi adicionado 0,1 mL de DMSO substância crioprotetora. As características genéticas das cepas foram checadas rotineiramente.

- **Preparo dos inócuos de *S. typhimurium* utilizados nos ensaios:**

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade de cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid n.2), incubada a 37°C, por 12-16 horas, em banho maria (37°C) com agitação (160 rpm), de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL.

- **Meios de cultura:**

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983). Foi utilizado ágar mínimo glicosado (AMG), constituído de ágar glicose (20 g de glicose, 15g de Bacto ágar e 930 mL de água destilada) e meio Vogel Bonner “E” 50x concentrado (10 g de magnésio heptahidratado, 100 g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio e amônio, 500 g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água destilada) na proporção de 908 mL para 20 mL respectivamente.

O ágar superfície (“top-ágar”) foi composto de 0,5 g de cloreto de sódio, 0,6 g de Bacto ágar e 100 mL de água destilada, acrescido de 10 mL de uma solução de L-histidina 0,096 mg/mL (Sigma) e D-biotina 0,123 mg/mL (Sigma).

Os meios de cultura depois de preparados foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

- **Preparo da mistura de S9:**

Foi utilizada a fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, aracloror 1254). Essa fração foi obtida comercialmente da MOLTOX (Molecular Toxicology, Inc. USA). Para o preparo da mistura de S9, todas as soluções (cloreto de magnésio 0,4 M, cloreto de potássio 0,4 M, glicose-6-fosfato 1M, β -nicotinamida adenina dinucleotidifosfato 0,1 M, tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 e água destilada) inclusive a fração S9 hidratada, foram mantidos em banho de gelo durante todo o ensaio, preparadas sempre a fresco e utilizadas por um período de no máximo 3 horas.

5.3 Metodologia:

De acordo com a metodologia de pré-incubação desenvolvida por Moran e Ames (1983), diferentes concentrações das substâncias foram misturadas a 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,4; 0,1 mL de cultura de bactérias e incubadas 20-30 minutos a 37 °C. Nos ensaios com ativação metabólica, foram adicionados, em substituição ao tampão fosfato, 0,5 mL da mistura S9. Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de “top ágar”, contendo traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados à mistura presente nos tubos. O conteúdo de cada tubo, assim composto, foi levemente homogeneizado em vórtex e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “top ágar”, as placas

foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Após término deste período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O controle negativo foi realizado com DMSO, solvente utilizado nas soluções das substâncias. O controle positivo, para confirmação das propriedades de reversão e especificidade de cada cepa, para o ensaio sem ativação metabólica foi 4-nitrofenilenodiamina (NPD) para as linhagens TA98 e TA97a, azida sódica para a linhagem TA100 e mitomicina para a linhagem TA102. Nos ensaios com ativação metabólica foi empregado o composto 2-antramina para todas as linhagens.

5.4 Análise dos dados:

Os dados da mutagenicidade obtidos das substâncias pristimerina, tingenona e plumericina foram analisados pelo programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA, por intermédio da Dra. Maria Inês Sato (CETESB). Esse programa permite avaliar o efeito concentração-resposta através do cálculo da análise da variância (ANOVA) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para a análise dos dados foi o modelo Bernstein (BERNSTEIN *et al*, 1982).

Além da análise de variância foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada concentração analisada, que é o quociente entre as médias do número de revertentes por placa das concentrações testadas e o controle negativo (reversões espontâneas). As amostras foram consideradas com resultados positivo quando a RM foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma

das doses testadas e quando houve uma relação dose resposta entre as doses testadas e o número de revertentes induzidos. Por sua vez, as amostras foram consideradas negativas quando a mesma não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus RM foram todos menores que 2.

Quando houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o controle negativo, mas a RM for menor que 2, as amostras foram consideradas como causadoras de indícios de mutagenicidade. Isso significa dizer que a amostra apresenta capacidade de ocasionar danos ao DNA, mas nas condições empregadas, sua mutagenicidade não foi efetiva.

5.5 Resultados:

As Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3 reúnem os resultados dos ensaios de mutagenicidade. Observou-se após a análise dos dados, que nenhuma das concentrações das substâncias testadas em quaisquer das diferentes linhagens diferenciou-se estatisticamente dos respectivos controles negativos. Cada concentração analisada não induziu aumento significativo no número de revertentes, e seus RM foram todos menores que 2, indicando ausência de mutagenicidade de pristimerina, plumericina e tingenona na ausência ou presença de ativação metabólica (S9).

Tabela 5.1

Atividade mutagênica de pristimerina nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, em ausência e presença de ativação metabólica (S9).

pristimerina (μ mol/placa)		Número de revertentes/placa (RM) em linhagens de <i>S.typhimurium</i> (M $\pm$ DP)											
		TA98			TA97a			TA100			TA102		
		-S9	+S9	-S9	-S9	+S9	-S9	-S9	+S9	-S9	-S9	+S9	+S9
0,00 ^a		66,67 $\pm$ 3,21	29,33 $\pm$ 6,66	168,33 $\pm$ 31,34	199,33 $\pm$ 31,94	131,33 $\pm$ 21,03	127,00 $\pm$ 7,55	371,33 $\pm$ 12,22	291,33 $\pm$ 18,15				
0,01		66,33 $\pm$ 9,07 (0,99)	33,33 $\pm$ 6,43 (1,14)	201,67 $\pm$ 28,38 (1,20)	201,33 $\pm$ 28,45 (1,01)	157,33 $\pm$ 9,29 (1,20)	121,00 $\pm$ 8,19 (0,95)	381,67 $\pm$ 11,06 (1,03)	240,00 $\pm$ 34,22 (0,82)				
0,02		62,00 $\pm$ 3,19 (0,93)	36,33 $\pm$ 3,79 (1,24)	167,67 $\pm$ 9,02 (1,00)	203,67 $\pm$ 17,16 (1,02)	126,33 $\pm$ 8,62 (0,96)	108,00 $\pm$ 8,19 (0,85)	367,67 $\pm$ 32,35 (0,99)	276,67 $\pm$ 26,50 (0,95)				
0,04		69,50 $\pm$ 9,19 (1,04)	42,00 $\pm$ 8,19 (1,43)	178,00 $\pm$ 14,00 (1,06)	186,33 $\pm$ 16,50 (0,93)	123,67 $\pm$ 15,89 (0,94)	147,67 $\pm$ 41,36 (1,16)	399,00 $\pm$ 38,43 (1,07)	270,67 $\pm$ 45,8 (0,93)				
0,08		71,00 $\pm$ 4,24 (1,06)	33,33 $\pm$ 6,43 (1,14)	162,33 $\pm$ 4,62 (0,96)	174,67 $\pm$ 13,28 (0,88)	114,00 $\pm$ 20,88 (0,87)	117,33 $\pm$ 22,37 (0,92)	321,00 $\pm$ 8,72 (0,86)	306,00 $\pm$ 26,51 (1,05)				
0,12		58,33 $\pm$ 6,11 (0,87)	27,67 $\pm$ 8,08 (0,94)	160,67 $\pm$ 14,43 (0,95)	181,00 $\pm$ 15,72 (0,91)	110,33 $\pm$ 9,24 (0,84)	100,67 $\pm$ 18,18 (0,79)	382,67 $\pm$ 21,55 (1,03)	313,33 $\pm$ 21,55 (1,08)				
C- ^b		3342,00 $\pm$ 704,28	2227,00 $\pm$ 78,00	1617,33 $\pm$ 449,54	1250,00 $\pm$ 269,00	1323,33 $\pm$ 65,25	1638,00 $\pm$ 547,00	1986,00 $\pm$ 62,23	354,00 $\pm$ 41,00				

M $\pm$ DP= média $\pm$ desvio padrão. RM= razão de mutagenicidade.

^a Controle negativo: dimetilsulfóxido, 75 μ l/placa.

^b Controles positivos: 4-nitrofenilenodiamina, 10 μ g/placa (TA98 e TA97a); azida sódica, 2,5 μ g/placa (TA100); mitomicina 3,0 μ g/placa (TA102), em ausência de S9 e 2-antramina 3,0 μ g/placa (TA98, TA97a, TA100 e TA102) em presença de S9.

Tabela 5.2

Atividade mutagênica de tingenona nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, em ausência e presença de ativação metabólica (S9).

tingenona ($\mu\text{mol/placa}$)	Número de revertentes/placa (RM) em linhagens de <i>S.typhimurium</i> (M $\pm$ SD)									
	TA98		TA97a		TA100		TA102			
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0,00 ^a	66,67 $\pm$ 3,21	29,33 $\pm$ 6,66	168,33 $\pm$ 31,34	199,33 $\pm$ 31,94	131,33 $\pm$ 21,03	127,00 $\pm$ 7,55	371,33 $\pm$ 12,22	291,33 $\pm$ 18,15		
0,003	60,00 $\pm$ 1,00 (0,90)	32,00 $\pm$ 10,54 (1,09)	188,33 $\pm$ 14,36 (1,12)	192,00 $\pm$ 4,36 (0,96)	136,33 $\pm$ 5,69 (1,04)	116,00 $\pm$ 7,81 (0,91)	371,33 $\pm$ 31,09 (1,00)	237,00 $\pm$ 9,54 (0,81)		
0,006	59,00 $\pm$ 11,27 (0,88)	28,33 $\pm$ 4,04 (0,97)	177,00 $\pm$ 15,39 (1,05)	204,33 $\pm$ 17,21 (1,03)	152,67 $\pm$ 10,21 (1,16)	117,33 $\pm$ 7,51 (0,92)	344,67 $\pm$ 10,79 (0,93)	262,00 $\pm$ 26,85 (0,90)		
0,012	53,50 $\pm$ 0,71 (0,80)	38,00 $\pm$ 2,00 (1,3)	131,00 $\pm$ 22,87 (0,78)	170,33 $\pm$ 33,50 (0,85)	131,00 $\pm$ 9,00 (1,00)	110,67 $\pm$ 6,66 (0,87)	285,33 $\pm$ 20,98 (0,77)	275,67 $\pm$ 16,80 (0,95)		
0,024	62,00 $\pm$ 10,54 (0,93)	31,00 $\pm$ 7,21 (1,06)	85,67 $\pm$ 13,87 (0,51)	150,67 $\pm$ 6,03 (0,76)	121,33 $\pm$ 5,13 (0,92)	138,00 $\pm$ 36,29 (1,09)	147,33 $\pm$ 11,85 (0,40)	269,33 $\pm$ 36,47(0,93)		
0,031	68,50 $\pm$ 2,12 (1,03)	34,00 $\pm$ 2,00 (1,16)	79,00 $\pm$ 9,54 (0,47)	180,67 $\pm$ 12,34 (0,91)	117,33 $\pm$ 11,06 (0,89)	110,67 $\pm$ 4,04 (0,87)	130,00 $\pm$ 27,06 (0,35)	307,00 $\pm$ 7,07 (1,05)		
C- ^b	3342,00 $\pm$ 704,28	2227,00 $\pm$ 78,00	1617,33 $\pm$ 449,54	1250,00 $\pm$ 269,00	1323,33 $\pm$ 65,25	1638,00 $\pm$ 547,00	1986,00 $\pm$ 62,23	354,00 $\pm$ 41,00		

M $\pm$ DP = média $\pm$ desvio padrão.

^a Controle negativo: dimetilsulfóxido, 75 $\mu\text{l/placa}$. RM= razão de mutagenicidade.

^b Controles positivos: 4-nitrofenilenodiamina, 10 $\mu\text{g/placa}$ (TA98 e TA97a); azida sódica, 2,5 $\mu\text{g/placa}$ (TA100); mitomicina 3,0 $\mu\text{g/placa}$ (TA102), em ausência de S9 e 2-antramina 3,0 $\mu\text{g/placa}$ (TA98, TA97a, TA100 e TA102) em presença de S9.

Tabela 5.3

Atividade mutagênica de plumericina nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, em ausência e presença de ativação metabólica (S9).

plumericina ($\mu\text{mol/placa}$)		Número de revertentes/placa (RM) em linhagens de <i>S.typhimurium</i> (M $\pm$ SD)											
		TA98		TA97a		TA100		TA102					
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0,00 ^a		31,67 $\pm$ 6,43	29,33 $\pm$ 6,66	168,33 $\pm$ 31,34	199,33 $\pm$ 31,94	139,00 $\pm$ 1,41	127,00 $\pm$ 7,55	317,67 $\pm$ 43,98	291,33 $\pm$ 18,15				
0,001		33,00 $\pm$ 6,08 (1,04)	29,00 $\pm$ 4,58 (0,99)	234,00 $\pm$ 3,61 (1,39)	221,33 $\pm$ 46,09 (1,11)	138,00 $\pm$ 20,95 (0,99)	132,33 $\pm$ 34,79 (1,04)	382,00 $\pm$ 43,55 (1,20)	284,33 $\pm$ 5,51 (0,98)				
0,002		41,33 $\pm$ 4,04 (1,30)	34,00 $\pm$ 4,36 (1,16)	222,67 $\pm$ 24,58 (1,32)	241,00 $\pm$ 4,36 (1,21)	156,00 $\pm$ 22,63 (1,12)	129,00 $\pm$ 45,08 (1,02)	385,67 $\pm$ 17,21 (1,21)	274,67 $\pm$ 28,92 (0,94)				
0,004		30,00 $\pm$ 6,08 (0,95)	35,00 $\pm$ 16,37 (1,19)	230,33 $\pm$ 9,71 (1,37)	278,33 $\pm$ 43,10 (1,40)	139,00 $\pm$ 13,89 (1,00)	118,33 $\pm$ 16,17 (0,93)	408,00 $\pm$ 28,00 (1,28)	290,67 $\pm$ 8,02 (1,00)				
0,008		37,00 $\pm$ 3,00 (1,17)	26,33 $\pm$ 8,02 (0,90)	210,67 $\pm$ 3,21 (1,25)	274,00 $\pm$ 24,06 (1,37)	160,67 $\pm$ 29,50 (1,16)	141,00 $\pm$ 42,88 (1,11)	376,33 $\pm$ 11,93 (1,18)	295,00 $\pm$ 35,51 (1,01)				
0,014		32,00 $\pm$ 3,61 (1,01)	35,00 $\pm$ 1,73 (1,19)	209,00 $\pm$ 29,14 (1,24)	260,33 $\pm$ 7,23 (1,31)	112,00 $\pm$ 2,83 (0,81)	108,33 $\pm$ 9,50 (0,85)	365,00 $\pm$ 27,78 (1,15)	305,33 $\pm$ 17,21 (1,05)				
C+ ^b		1480,00 $\pm$ 243,29	2227,00 $\pm$ 78,00	1617,33 $\pm$ 449,54	1250,00 $\pm$ 269,00	992,00 $\pm$ 248,90	1638,00 $\pm$ 547,00	1736,67 $\pm$ 91,59	354,00 $\pm$ 41,00				

M $\pm$ DP = média $\pm$ desvio padrão. RM = razão de mutagenicidade.

^a Controle negativo: dimetilsulfóxido, 75 μ l/placa.

^b Controles positivos: 4-nitrofenilenodiamina, 10 μ g/placa (TA98 e TA97a); azida sódica, 2,5 μ g/placa (TA100); mitomicina 3,0 μ g/placa (TA102), em ausência de S9 e 2-antramina 3,0 μ g/placa (TA98, TA97a, TA100 e TA102) em presença de S9.

6. DISCUSSÃO

6.1 Pristimerina e tingenona

Pristimerina e tingenona apresentam-se como cristais amorfos alaranjados, pertencem à classe dos *nor*-triterpenos quinonametídeos. A estrutura da pristimerina foi elucidada por A. W. Johnson *et al* em 1963 e posteriormente confirmada por análise de raios-X por Ham *et al* em 1970 (HAM *et al*, 1970). Três anos após, a estrutura da tingenona foi descrita por métodos químicos e espectrais por Monache *et al* (MONACHE *et al*, 1973) e revisada por Gunatilaka *et al* em 1989 (GUNATILAKA *et al*, 1989).

São metabólitos secundários isolados de caules e raízes exclusivamente de plantas das famílias Celastraceae e Hippocrateaceae, sendo considerados marcadores taxonômicos destas famílias (ALVARENGA *et al*; 1999).

Algumas plantas da família Celastraceae (Figura 6.1) são utilizadas na medicina popular de diversas regiões da África (KHALID *et al*, 2007), América do Sul (ITOKAWA *et al*, 1993) e China (LUO *et al*, 2005). Um dos gêneros mais estudados é *Maytenus*, uma rica fonte de triterpenos quinonametídeos. Ao gênero foram atribuídas uma série de atividades biológicas, como antimicrobianas, antimaláricas, citotóxicas (KHALID *et al*, 2007), tratamento de artrites, câncer de pele, entre outras (LIBY *et al*, 2007).

À pristimerina e tingenona são atribuídas atividades biológicas potentes *in vitro*, a maioria delas relacionadas ao seu caráter citotóxico. Inúmeros artigos na literatura descrevem os valores de IC₅₀ contra os mais diversos parasitas e linhagens tumorais humanas e animais. A pristimerina mostrou ser mais potente (e a tingenona atividade similar) que o metronidazol contra *Giardia intestinalis* (MENA-RÉJON *et al*, 2007) e atua contra

Leishmania major e *Plasmodium falciparum* (KHALID *et al*, 2007; TAHIR *et al*, 2001), embora menos ativa que as drogas convencionais em uso (PAVANAD *et al*, 1989). Apresentou também ação antiinflamatória significativa em modelos experimentais animais (HUI *et al*, 2003).



Figura 6.1: *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), conhecida popularmente no Brasil como espinheira santa.

A tingenona mostrou ser forte modulador do sistema imunológico (MOREIRA *et al*, 2001) e ativa contra o *Trypanossoma cruzi* com inibição total do crescimento do parasita (GOJIMAN *et al*, 1985). Relata-se também que a tingenona, mesmo em baixas doses, inibe a síntese de proteínas e RNA (ANGELETI *et al*, 1974).

Gojiman *et al* (1985) apontaram o mecanismo mais provável da citotoxicidade de tingenona sua interação com DNA. Campanelli *et al* (1980) também relataram a interação com o DNA como provável mecanismo responsável pela ação antineoplásica do composto, embora esta evidência não tenha sido comprovada por métodos espectrais (CAMPANELLI *et al*, 1980). Tal interação também não foi comprovada pelo presente trabalho

através de método *in vitro*, para tingenona e pristimerina, através do estudo da atividade mutagênica, onde a interação das substâncias com o DNA bacteriano promove a reversão da mutação inicial das cepas. A ausência de mutagenicidade dos compostos e de seus metabólitos, obtidos pelo tratamento com S9, foi indício de ausência de interação com DNA, conferindo segurança ao emprego terapêutico dos compostos.

Na avaliação da citotoxicidade de pristimerina e tingenona frente às linhagens tumorais LM3 e LP07, estes compostos foram os mais ativos frente aos estudados; sendo mais ativos que o paclitaxel, composto de origem natural e atualmente empregado na terapêutica. Não se observou distinções significativas de IC₅₀ dos compostos frente a cada uma das linhagens (Figura 3.7).

WU *et al* (2005) realizaram a primeira investigação do mecanismo de ação da pristimerina, relatando a indução rápida de apoptose celular em estudo *in vitro* sob células de linhagem tumoral humana de mama (MDA-MB-231) causada pela substância. Nesse estudo, pristimerina se mostrou 3 vezes mais seletiva para células tumorais em relação às não tumorais. Conclui-se que a apoptose foi induzida não pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mas por desencadear mecanismo intrínseco celular, pela ação direta na mitocôndria. Induz à permeabilização da membrana, levando à apoptose dependente de caspase. Nenhuma consideração relacionando estrutura e atividade da molécula foi mencionada.

Caspases constituem uma família de proteases baseadas em cisteína, enzimas com um resíduo de cisteína capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico (*cysteine-aspartic-acid-protease*).

subunidade $\beta 5$ do proteossoma, outro mecanismo indutor de apoptose. Mostrou-se que o grupamento cetônico conjugado à ligação dupla do C_6 da pristimerina pode interagir com a porção *N*-terminal do aminoácido treonina (Thr) da subunidade $\beta 5$ proteossomal. Para melhor entendimento da interação entre a molécula de pristimerina e o proteossoma, a análise de susceptibilidade nucleofílica da pristimerina foi realizada pelo programa Quantum CAChe (Figura 6.3). A molécula mostrou-se altamente suscetível ao ataque nucleofílico no C_2 do anel A e no C_6 do anel B. Tais regiões constituem-se em pontos de interação entre a pristimerina e o grupo hidroxila (OH) da treonina *N*-terminal da subunidade $\beta 5$ (YANG *et al*, 2007).

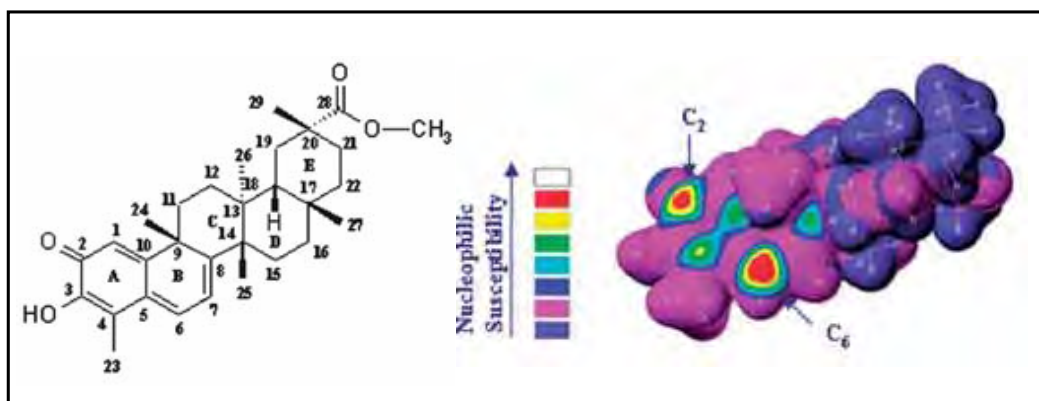


Figura 6.3: Numeração e análise da susceptibilidade nucleofílica da pristimerina. (YANG *et al*, 2007).

Liby *et al* (2007) descrevem a importância de grupamentos carbonila α,β -insaturados para a ação antiinflamatória de derivados sintéticos do ácido oleanólico (triterpenóides), levando à citoproteção. Um destes compostos é o ácido 28-(2-ciano)-3,12-dioxoleanan-1,9(11)-dienólico (CCDO). Embora o precursor ácido oleanólico seja fracamente antiinflamatório e antitumoral, os

derivados induziram apoptose seletivamente em linhagens humanas *in vitro*, promoveram diferenciação das células tumorais e suprimiram o crescimento tumoral. Acredita-se que o mecanismo de ação dos triterpenóides seja mediado pela adição de Michael com ataque nucleofílico a grupamentos de proteínas, como grupos sulfidríla (-SH) de resíduos de cisteína.

Comparativamente às moléculas dos referidos derivados, tingenona e pristimerina seriam ainda mais suscetíveis a estes ataques, acreditando-se ser este um possível mecanismo de ação destas substâncias. As 5 estruturas canônicas de ressonância demonstram que as moléculas são altamente suscetíveis a ataques nucleofílicos (Figura 6.4), sendo mais importantes as posições C₂ e C₆ (Figura 6.3).

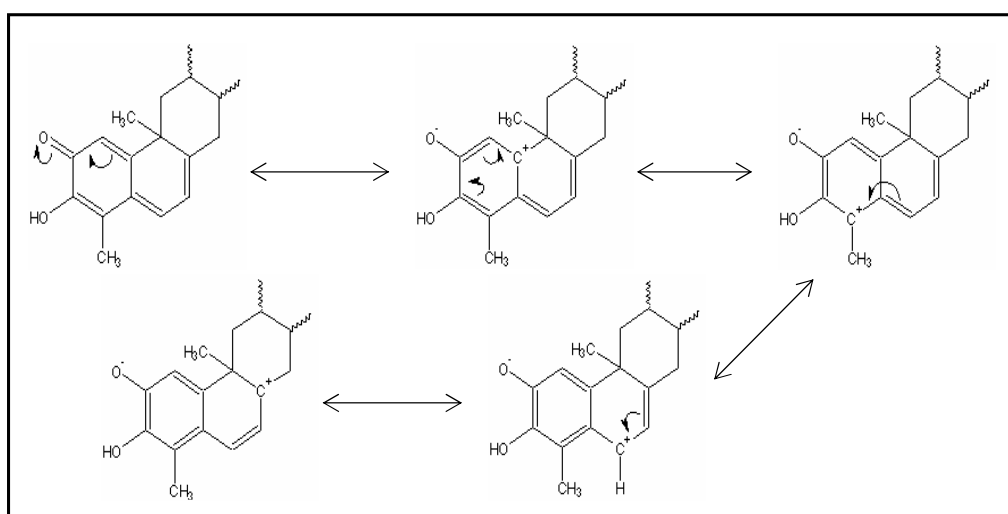


Figura 6.4: Estruturas canônicas de ressonância de tingenona e pristimerina.

Quando vislumbramos as moléculas em três dimensões otimizadas no programa ACD/ChemSketch 4.0, observamos um menor impedimento estérico de pristimerina (e da tingenona, cuja única modificação está no anel

E) em relação ao CCDO, devido à orientação planar dos anéis A e B (Figura 6.5).

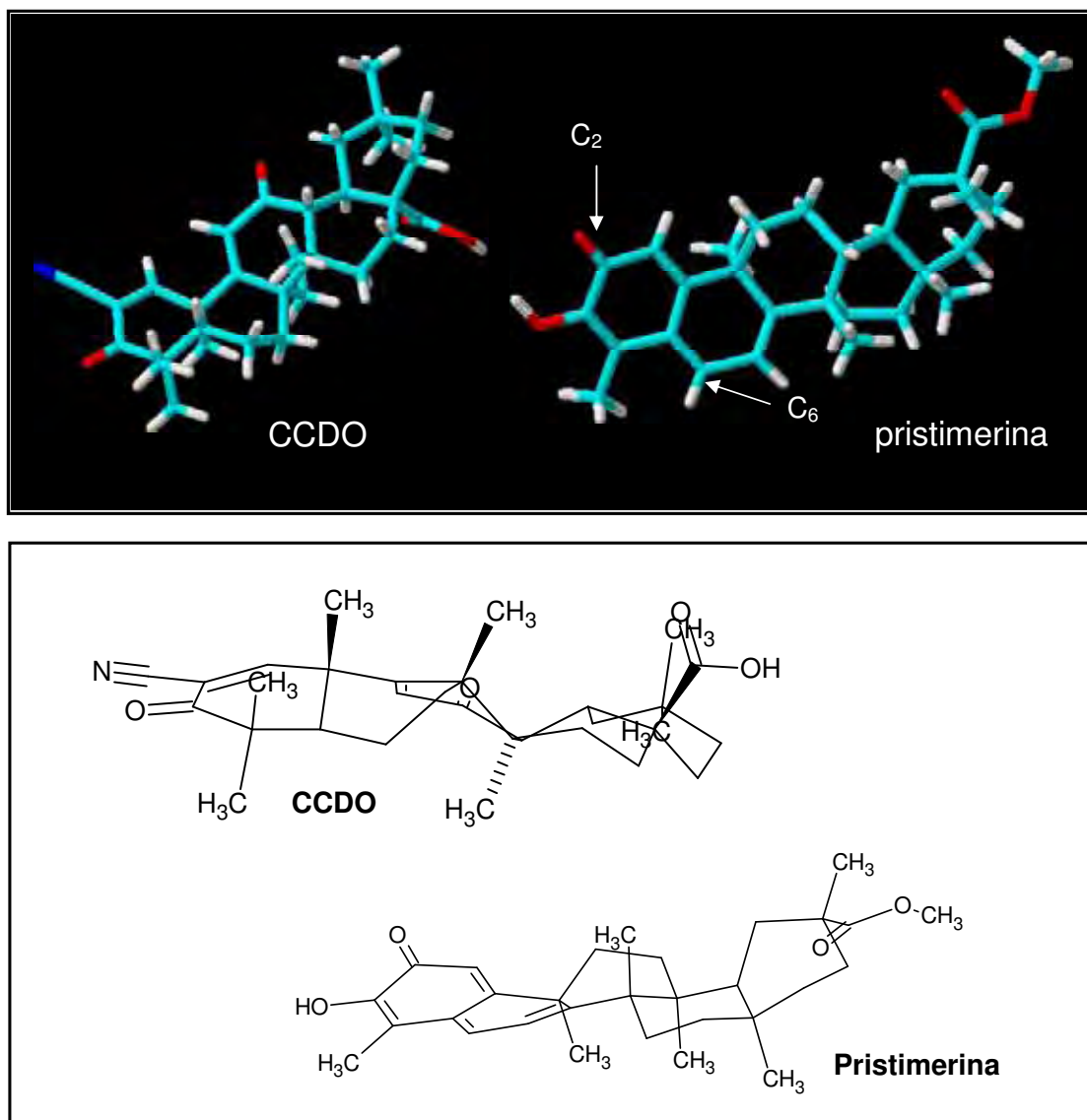


Figura 6.5: Estruturas tridimensionais de CCDO e pristimerina.

Como a reação de Michael é reversível (Figura 6.6), torna-se difícil o isolamento e identificação desse complexo. Entretanto, foi observado experimentalmente que o tratamento *in vitro* de linhagens celulares com CCDO na presença de compostos com grupamentos -SH como

N-acetilcisteína apresentou menor toxicidade em relação ao tratamento somente com CCDO (LIBY *et al*, 2007).

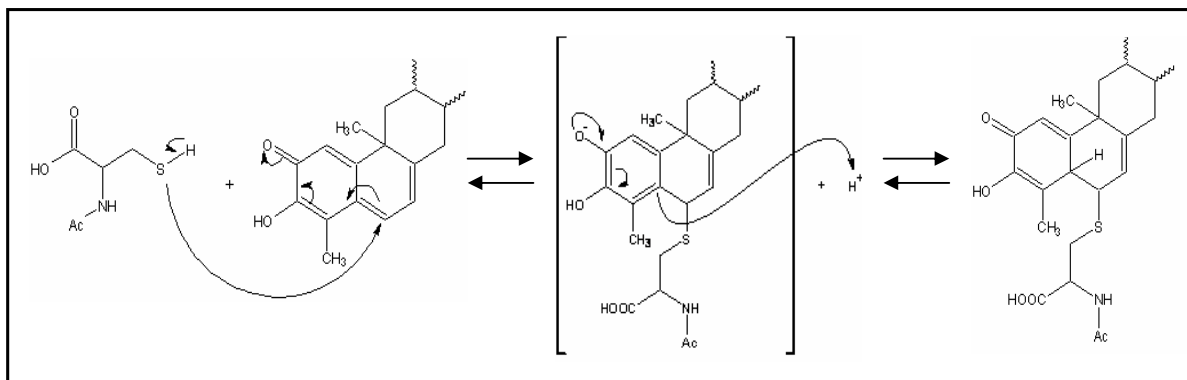


Figura 6.6: Representação da reação de Michael entre *N*-acetilcisteína e a posição 6 da tingenona ou pristimerina.

Resultado semelhante foi obtido no tratamento de pristimerina e tingenona na presença de *N*-acetilcisteína (Figura 3.8 e 3.9). Para ambas as linhagens estudadas (LM3 e LP07) houve queda na citotoxicidade, evidenciada pelo aumento do IC_{50} nos tratamentos em ausência e presença de *N*-acetilcisteína.

A queda da citotoxicidade ocorre porque os triterpenos são sequestrados quimicamente, ficando menos disponíveis para interações com as células.

Observou-se que esta hipótese foi confirmada pelos resultados observados na linhagem LM3: as substâncias com maior facilidade de interação com *N*-acetilcisteína apresentaram as maiores altas nos valores de IC_{50} , na seqüência tingenona >pristimerina >plumericina > acetato e bauerenila.

Entretanto, provavelmente outro mecanismo deve estar envolvido na toxicidade das substâncias frente à linhagem LP07, pois nenhuma correlação estrutural entre os aumentos de IC_{50} e as estruturas dos compostos pôde ser evidenciada. Pelo contrário, adição de *N*-acetilcisteína induziu a uma diminuição de cerca de 5 vezes no IC_{50} do acetato de baurenila.

Os resultados da análise espectroscópica confirmaram a interação entre *N*-acetilcisteína e os triterpenos. Após o tratamento com *N*-acetilcisteína, observou-se queda na absorbância para ambos os compostos na região de comprimento de onda próximo a 420 nm. Visto que a concentração dos triterpenos foi mantida constante para a confecção da curva-controle e no tratamento com *N*-acetilcisteína, a diminuição na absorção indica diminuição da concentração de triterpeno livre, confirmando a interação. Observou-se que a resposta ocorreu já após 30 minutos de reação.

Com base nos resultados e considerações apresentadas, o provável mecanismo de ação de pristimerina/tingenona é a indução de apoptose caspase dependente, via a interação das substâncias com o resíduo de cisteína da caspase.

Pristimerina e tingenona possuem potencial citotóxico evidenciado nas linhagens tumorais LM3 e LP07. Contudo, o teste de Ames demonstrou que não existe mutagenicidade, o que sugere que essas moléculas não interagem com o DNA.

Os anéis A e B parecem ser essenciais para esta atividade.

A aplicação dessas moléculas na terapêutica mostra-se um campo fértil, argumento confirmado pelas patentes depositadas:

1. utilização de celastróides como pristimerina e derivados para tratamento de reumatismo (WIEMANN,1992);
2. síntese de derivados de pristimerina para ação antiinflamatória e antitumoral (WANG, 2003);
3. utilização de celastróides para tratamento de doenças inflamatórias, neurodegenerativas e antineoplásicas (DEVLIN, 2004);
4. derivados de triterpenoquinonas e triterpenofenóis e suas aplicações para o tratamento de doenças tumorais e parasitárias (SANJUAN *et al*, 2007).

6.2 Plumericina

Plumericina é um iridóide extraído de espécies vegetais da família Apocynaceae, como *Allamanda sp.* e *Plumeria sp* (STEPHENS *et al*, 2007)(Figura 6.7).



Figura 6.7: Espécies da família Apocynaceae.

No presente estudo, a plumericina mostrou razoável efeito citotóxico nas linhagens utilizadas em relação às demais moléculas estudadas, com IC₅₀ de 0,035 µmol/mL na linhagem LM3 e 0,025 µmol/mL na linhagem LP07.

Contudo, diferentemente da pristimerina e tingenona, existem escassos relatos na literatura relacionados à atividade biológica desta substância. Citam-se atividades antifúngicas (BOLZANI *et al*, 1999) e algicida (KARDONO *et al*, 1990). Dados relacionados à atividade citotóxica *in vitro* em linhagens tumorais são controversos: Kader *et al* (1997) relatam a baixa atividade citotóxica da plumericina em linhagem tumoral humana Madison de pulmão (M109), enquanto que Kardono *et al* (1990) e Anderson *et al* (1988) apresentaram resultados mais promissores frente às linhagens estudadas, mas não destacam a molécula como promissora para atividade antitumoral.

O estudo da mutagenicidade da plumericina demonstrou ausência de atividade mutagênica da molécula e de seus metabólitos, gerados pelo tratamento com S9. Esse dado será uma contribuição valiosa para um futuro emprego do composto na terapêutica, pois se incrementa um fator de segurança à utilização da molécula.

Com base na estrutura da plumericina, observa-se que ela também possui dois grupamentos carbonílicos α,β -insaturados, que seriam susceptíveis a ataques nucleofílicos, o que poderia justificar um possível mecanismo de ação (Figura 6.8). Este argumento foi evidenciado pelo tratamento com *N*-acetilcisteína, devido ao aumento de IC₅₀, embora com menor magnitude que para pristimerina e tingenona.

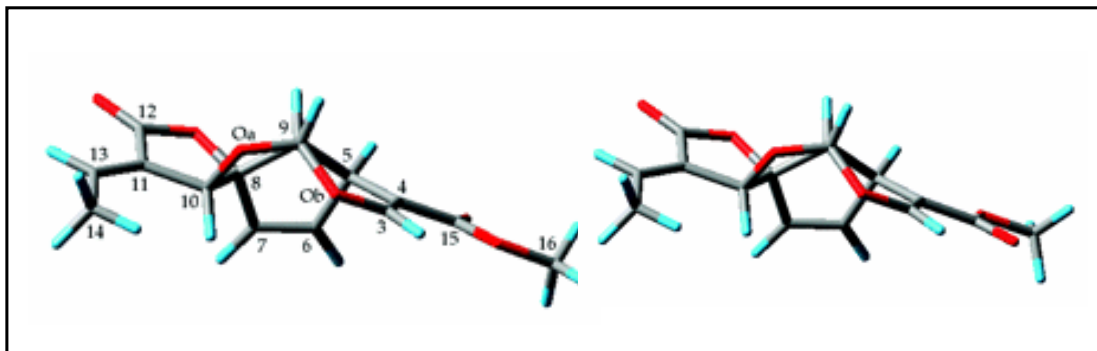


Figura 6.8: Conformações mais estáveis da plumericina (STEPHENS *et al*, 2007).

6.3 Demais moléculas

As demais moléculas se mostraram de 10 (cromeno) a 1000 (ácido clorogênico) vezes menos potentes que os compostos mais citotóxicos, tingenona e pristimerina. Em revisão bibliográfica, nenhum destes compostos se destaca por atividades antitumorais ou citotóxicas, o que confirma os resultados obtidos.

Apesar de o esqueleto carbônico do acetato de bauerenila (um triterpeno pentacíclico) ser semelhante ao da tingenona e pristimerina, os anéis A e B não apresentam grupamentos carbonila α,β -insaturados que tornam as moléculas suscetíveis a ataques nucleofílicos. Portanto, a similaridade dos IC_{50} entre pristimerina e tingenona e sua grande discrepância em comparação com o acetato de bauerenila reforça a importância dos anéis A e B na citotoxicidade. Assim, a menor citotoxicidade do acetato de bauerenila pode ser explicada pela menor interação da molécula com os resíduos de cisteína (Item 6.1). Apesar de menor que para os demais compostos testados, houve diminuição da citotoxicidade no

tratamento com *N*-acetilcisteína na linhagem LM3, embora sob mesmo tratamento a substância seja mais tóxica na linhagem LP07, sugerindo um outro mecanismo de toxicidade deste composto, ainda não desvendado.

Os demais derivados fenólicos estudados não apresentaram relação entre estrutura e atividade citotóxica. Os compostos ácido *p*-cumárico e ácido clorogênico apesar das semelhanças estruturais, não puderam ser relacionados, pois ácido *p*-cumárico foi mais citotóxico para a linhagem LM3 que o ácido clorogênico, embora este tenha sido mais citotóxico na linhagem LP07, assim a relação estrutural com a citotoxicidade resultou inconclusiva.

7. CONCLUSÕES

Através do presente estudo podemos chegar às seguintes conclusões:

- 1) Tingenona, pristimerina, plumericina e cromeno foram mais ativos que o controle positivo, taxol para as linhagens tumorais LM3 e LP07;
- 2) Os grupamentos carbonila α,β -insaturados dos anéis A e B de pristimerina e tingenona parecem ser mais importantes para a citotoxicidade das moléculas que o anel E, visto a similaridade dos IC_{50} entre pristimerina e tingenona e sua grande discrepância em comparação com o acetato de bauerenila;
- 3) A interação de pristimerina e tingenona com resíduos de cisteína é favorecida pela suscetibilidade a ataques nucleofílicos destes *nor*-triterpenos quinonametídeos, comprovada por métodos biológicos e espectrofotométricos, sugerindo um provável mecanismo de ação;
- 4) Tingenona, pristimerina e plumericina não exibem atividade mutagênica pelo teste de Ames, na presença ou ausência de ativação metabólica (S9);
- 5) Para os demais compostos não foi possível estabelecer relação entre estrutura e atividade citotóxica nas linhagens tumorais estudadas.

Com base nos resultados obtidos e no levantamento bibliográfico realizado, pristimerina e tingenona se mostraram as substâncias mais promissoras para estudos complementares posteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERELE, O. Who guidelines for assessment of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.63, p.99-104, 1992.

ALVARENGA, N. L.; VELÁSQUEZ, C. A.; CANELA, N. J.; BAZZOCHI, L.L.; FERM, E.A. A new antibiotic nortriterpeno quinone methide from *Maytenus catingarum*. **J. Nat. Prod.**, v.62, p.750-751, 1999.

ANDERSON, J. E.; CHANG, C. J.; McLAUGHLIN, J. L. Bioactive components of *Alamanda schottii*. **J. Nat. Prod.**, v. 51, p.307-308, 1988.

ANGELETI, P. U.; MARINI-BETOLLO, G. B. Effect of maitenine on RNA and protein synthesis in cell cultures. **Farmaco**, v.28, p.569-573, 1974.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: Informação e documentação: referências-elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AQUINO, R., DE FEO, V., DE SIMONE, F., DETOMASI, N. PIZZA. C. **Flora Officinale dell'America Latina**. Lancusi – Salerno: Litotipografia Gutenberg. Itália, 1996.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutat. Res.** v. 448, p.11-22, 2000.

BETANCUR-GALVIS, L. A.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J. E. Antitumor and antiviral activity of colombian medicinal plant extracts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p.531-535, 1999.

BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H.; LOPES, M. N. Search for anticancer compounds from native plant species of cerrado and Atlantic Forest. **An. Acad. Bras. Ciên.**, v.71, p.181-187, 1999.

CAI, Y., LUO, Q., SUN, M. CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sci.**, v. 74, p.2157-2184, 2004.

CAMPANELLI, A. R.; D'ALAGNI, M.; BETOLO, G. B. M.; Spectroscopic evidence for the interaction of tingenone with DNA. **FEBS Lett.**, v. 122, p.256-260, 1980.

DEVLIN, J. P. Derivatives of pentacyclic nortripterene quinone methides as compounds useful in the treatment of inflammatory, neurodegenerative, and neoplastic diseases. Patente USXXCO US 20042220267, 2004. Disponível em: < <http://www.freepatentsonline.com/20040220267.html>>. Acesso em 20 nov. 2007.

GODJIMAN, S. G.; TURRENS, J. F.; MARINI-BETTOLO, G. B.; STOPPANI, A. O. M. Effect of tingenone, a quinine triterpene, on growth and

macromolecule biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v.41, p.646-648, 1985.

GULLO, V. P.; McALPINE, J.; LAM, K. S.; BAKER, D.; PETERSEN, F. Drug discovery from natural products. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.33, p.523-531, 2006.

GUNATILAKA, A. A. L.; CHANDRASIRI, F.; TOHRU, K.; YASHURO, T. Proton and carbon-13 RMN analysis of three quinone-methide triterpenoides. **Mag. Resson. Chem.**, v.27, p.803-807, 1989.

HAZRA, B., KUMA, B., BISMAS, S., PANDEY, B.N., MISHA, K.P. Enhancement of the tumor inhibitory activity, in vivo, of diospyrin, a plant – derived quinonoid, through liposomal encapsulation. **Toxicol. Lett.**, v.157, p.109-117, 2005.

HAM P. J.; WHITING, D. A.; Structure and absolute configuration of the methylene-quinoid triterpene pristimerin: X-ray analysis of pristimerol di-p-bromobenzoate. **Chem. Ind.**, v.43, p.1379, 1970.

HEGEDUS, Z. L. The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side products in human diseases and aging. **Toxicology**, v.145, p.85-101, 2000.

HUI, B.; WU,Y.; WANG,H.;TIAN,X. Effect of pristimerin on experimental inflammation in mice rats. **Zhangguo Yaolixue Tongbao**, v. 19, p. 656-659, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em:
<<http://www.inca.gov.br>> Acessos em 20 jul. 2007 e 25 fev. 2008.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y. Structures of triterpene dimers and sesquiterpene polyesters from South American medicinal plants belonged to *Maytenus* sp. **Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Youshishu**, v.35, p.614-21,1993.

KADER, M. S. A.; WISSE, J.; EVANS, R.; WERFF, H.; KINGSTON, D. C. I. Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname rainforest. **J. Nat. Prod.**, v.60, p. 1294-1297, 1997.

KARDONO, L. B. S.; TSAURI, S.; PADMAWINATA, K.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonesia. **J. Nat. Prod.**, v. 53, p. 1447-1455, 1990.

KLAID, S. A.; FRIEDRICHSEN, G.EM; CHRISTENSEN, S. B.; EL TAHIR, A; SATTI, O. M. Isolation and characterization of pristimerine as the antiplasmodial and antileishmanial agent of *Maytenus senegasis* (Lam.) Excell. **Akivoc.**, v.9, p.129-134, 2007.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Principles of medicinal chemistry**. 6a. ed., Lippincott Williams & Wilkins, EUA, 2008, 1377p.

LIBY, K. T.; YORE, M. M.; SPORN, M. B. Triterpenoides and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, p.357-369, 2007.

LUO, D.; WANG,H.;TIAN,X.;SHAO,H.;LIU, J. Antifungal properties of pristimerin and celastrol isolated from *Celastrus hypoleucus*. **Pest Manag. Sci.**, v.61, p.58-90, 2005.

MACIEL, M. A. AM; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v.25, p.429-438, 2002.

MENA-RÉJON, G. J M.; ESPADAS, A. R. P.; MOO-PUC, R. E.; RIVIERA, R. C.; BAZZOCCHI, L. L.; DIAZ, I. A. J.; QUIJANO, L. Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of *Hippocratea excelsa*. **J. Nat. Prod.**, v.70, p.863-865, 2007.

MONACHE, F. D.; BETOLLO, G. B. M.; LIMA, O. G.; d'ALBUQUERQUE, I. L.; COELHO, J. S. B. Structure of tingenone, a quinoid triterpene related to pristimerin. **J. Chem. Soc.**, v. 22, p.2725-2728, 1973.

MONKS, N.R., BORDGON, S.A.L., FERRAZ, A., MACHADO, K.R., FARIA, D.H., LOPES, R.M., MONDIM, C.A., DE SOUZA, I.C.C., LIMA, M.F.S., DA ROCHA, A.B., SCHARSTSMANN, G. Anti-tumor screening of Brazilian plants. **Pharm. Biol.**, v. 40, p.603-616, 2002.

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

MOREIRA, R. R. D.; CARLOS, I. Z.; VILEGAS, W.; Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 24, p.201-204, 2001.

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

MOVASSAGH, M.; FOO, R. S. Y. Simplified apoptotic cascades. **Hearth Fail. Rev.** v. 13, p.11-119, 2008.

NEIDLE, S.; THURSTON, D. E. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. **Nat. Rev.**, v.5, p.285-296, 2005.

PAVANAND, K.; WEBSTER, H. K.; YONGVANITCHIT, K.; KUN-ANAKE, A.; DECHATIWONGSE, T.; NUTAKUL, W.; BANSIDDNI, J. Schizontocidal activity

of *Celastrus paniculatus* willd against *Plasmodium falciparum* *in vitro*.

Phytother. Res., v.3, p.136-139, 1989.

PEI-WEN, ZENG, LIEN-CHAI, CHIANG, CHUN-CHUNG, LIN. Apigenin induced apopyosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. **Life Sci.**, v.76, p.1367-1389, 2005.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. 1^a. ed., Ulbra, Canoas, 2003, 356p.

ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; SCHOEN, F. J. **Patologia estrutural e funcional**, 5^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 1.277p.

SANJUAN, J. C. L.; MOLINA, A. R.; CORONEL, M. B.; RAVELO, A. G.; BRAUN, A. E.; SIVEIRO, D. Y. M.; SACAÚ, E.P. Triterpenequinone and triterpenephénol derivatives and their application for the treatment of tumors and parasitic diseases. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spain; Universidad de La Laguna). Patente WO/2007/0700203, 144p., 2007.

Disponível em:

<<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2007077203&IA=WO2007077203&DISPLAY=DESC>>. Acesso em 10 out. 2007.

SEUNG, J.B., JONG-SILK, K., FEKIK, R.J., THOMAS, E.E.; MICHAEL, F.M.; SEONG-HO. L. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is

associated with growth inhibition and apoptosis and colon cancer cells.

Carcinogenesis, v.25 , p.2425-2432, 2004.

SINGH, B.; BHAT, T. K.; SINGH, B. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.5579-5597, 2003.

STEPHENS, P. J.; PAN, J. J.; DEVLIN, F. J. Determination of the configurations of natural products via density functional theory calculations of vibrational circular dichroism, electronic circular dichroism and optical rotation: the iridoids plumericin and isoplumericin. **J. Org. Chem.**, v.72, p. 3521-3536, 2007.

TAHIR, A. E.; SATTI, G. M. H.; SAMI, A. A novel antiplasmodial activity of pristimerin isolated from *Maytenus senegalensis* (Lam.) **J. Saudi Chem. Soc.**, v.5, p.157-163, 2001.

TSAI, T.H.. Analytical approaches for traditional chineses exhibiting antineoplastic activity. **J. Chromatogr. B**, v.764, p.27-48, 2001.

TUBIANA, M. Généralités sur la cancérogenèse. **C. R. Biol.** v. 331, p.114-125, 2008.

VIEGAS JR.,C.;BOLZANI,V.S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v.29, p. 326-337, 2006.

VOGT, A., TAMEWITZ, A., SKOKO, J., SIKORSKI, R.P., GIULIANO, A.K., LAZO, J.S. The benzo[c]phenanthridine alkaloid, sanguinarine is a selective, cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. **J. Biol. Chem.**, v.280 , p.19078-19086, 2005.

WANG, H.; TIAN, X.; PAN, Y. Synthesis of a series of pristimerin derivatives with antioxidative and antitumor activities. (Zhejiang University, People's Rep. China) Patente CNXXEV CN 1410434, 2003, 10pp.

WATASE , I., SUDO, H., YAMASAKI, M., SAITO, K. Regeneration of transformed *Ophiophriza pumila* plants producing camptothecin. **Plant Biotechnol.**, v.21, p.337-342, 2004.

WIEMANN, W. Treatment of rheumatism with celastrols. Patente GWXXBX DE 4117854. 1992, 3p.

WU, C.; CHAN, M.; CHEN, W.; TSAI, C.; CHANG, F.; WU, Y. Pristimerin induces caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells via direct effects on mitochondria. **Mol. Cancer Ther.**, v. 4, p.1277-1285, 2005.

YANG, H.; PIWOWAR, K. R. L.; LU, D.; YUAN, P.; REDDY, G. P. V.; YUAN, X.; DOU, Q. P. Pristimerin induces apoptosis by targeting the proteasome in prostate cancer cells. **J. Cell. Biochem.**, v.102, *in press*. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/114275330/HTMLSTART>> . Acesso em 01 nov. 2007.