

THAÍS NICHIKUMA HARADA

**CORRELAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM
ARTEMIA SALINA LEACH E ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA SOBRE
LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS PARA ALGUMAS CLASSES
DE PRODUTOS NATURAIS**

CAMPO GRANDE

2009

THAÍS NICHIKUMA HARADA

**CORRELAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM
ARTEMIA SALINA LEACH E ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA SOBRE
LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS PARA ALGUMAS CLASSES
DE PRODUTOS NATURAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Máximo de Siqueira
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo

CAMPO GRANDE
2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor, pelo exemplo de luta, por me guiarem, me apoiarem e vibrarem comigo a cada conquista.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por todos os dias.
- Ao orientador, Prof. Dr. João Máximo de Siqueira.
- Ao co-orientador, Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo, por sua crença na realização do que parecia perdido, pela ajuda, conhecimento técnico e perseverança.
- À Prof^a Dra. Maria de Fátima Cepa Matos, pelos ensinamentos das técnicas de cultura de células e colaboração.
- À CAPES/Fundect, pela bolsa de Mestrado.
- À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, através do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.
- Ao aluno de Iniciação Científica Luiz Fabrício Gardini Brandão, pelo companheirismo, ajuda e interesse.
- Às alunas do Laboratório de Cultura de Células da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em especial à farmacêutica Danielle Bogo, pelos ensinamentos e pela amizade.
- Aos técnicos de laboratório que contribuíram e me incentivaram.
- À minha família pelo apoio e compreensão incondicionais.
- Aos amigos que torceram, incentivaram e me acompanharam.
- Ao meu namorado, pela paciência e companhia.
- A todos, que de alguma forma deixaram suas marcas.

*“Uma vida transcorrida cometendo erros
não só é mais honrada, mas também
mais útil do que uma vida sem fazer
nada.”*

(George Bernard Shaw)

RESUMO

Harada TN. Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais. Campo Grande; 2009. [Dissertação – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O objetivo deste estudo foi correlacionar qualitativa e quantitativamente a concentração letal necessária para o teste citotóxico em *A. salina* com a concentração inibitória para o crescimento de linhagens celulares tumorais, utilizando dez substâncias puras previamente conhecidas. Estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, no Brasil, apontam a ocorrência de 466.730 casos novos de câncer, perfazendo o cenário indicativo da necessidade de descoberta de compostos que visem o tratamento dessa doença. A biodiversidade brasileira contribui para a identificação de produtos com utilização econômica, sendo as plantas fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos. Dentre os bioensaios simples e rápidos para avaliar a toxicidade de produtos e extratos vegetais está o do microcrustáceo marinho *Artemia salina* Leach, considerado um bioensaio preliminar no estudo de citotoxicidade e indicativo para testes mais específicos, como o teste em linhagens celulares de mamíferos (antitumoral). Substâncias oriundas de vegetais e pertencentes às seguintes classes de produtos naturais foram avaliadas quanto à sua atividade citotóxica: alcalóides, flavonóides e quinonas. Os ovos de *A. salina* são eclodidos em solução salina e as larvas utilizadas em estágio náuplio nas concentrações de 250; 125; 61,5 e 31,3 µg/mL para as dez substâncias testadas: boldina, duguetina, aloina, emodina, rutina, quercetina, lapachol, β -lapachona, *N*-nitrosoanonaina e *N*-nitrosoxilopina. Células das linhagens Hep₂ (carcinoma de laringe) e B16-F10 (células de melanoma) são cultivadas em placas de micropoços e a viabilidade avaliada pelo método da coloração com sulforrodamina B após 48h de exposição às substâncias-teste. Dentre as três classes de produtos naturais avaliadas, as quinonas mostraram-se as mais ativas frente aos dois bioensaios, sendo a β -lapachona a substância com a menor CI₅₀ para ambas as linhagens tumorais e a duguetina, um alcalóide, a mais citotóxica em *A. salina*. Os resultados confirmam o bioensaio da *A. salina* como indicativo da atividade antitumoral, porém não é possível estabelecer uma correlação quantitativa segura entre a DE₅₀ e a CI₅₀ dos testes.

PALAVRAS-CHAVE: atividade citotóxica, *Artemia salina*, ensaio antitumoral SRB, alcalóides, flavonóides, quinonas

ABSTRACT

Harada TN. Correlation between the citotoxicity assays in *Artemia salina* Leach and antineoplastic activity on tumoral cell lines for some natural products groups. Campo Grande; 2009. [Dissertation – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

The aim of this study was to correlate qualitative and quantitatively the lethal concentration needed for the citotoxic test on *Artemia salina* with the inhibitory concentration for the growth of tumoral cell lines using ten pure substances already known. Estimates for the year 2008 and also valid for the year 2009, in Brazil, show the occurrence of 466.730 new cases of cancer. It makes necessary the development of compounds that aim the treatment of this disease. The Brazilian biodiversity contributes with the identification of products with economic uses and plants are the important sources of biologically active natural products. The *A. salina* Leach brine shrimp assay is among the simple and fast bioassays used to evaluate the toxicity of products and plant extracts. It is considered a preliminary bioassay in citotoxicity studies and an indicative test for more specific ones like the bioassay with mammalian cell lines (antitumoral). Substances extracted from plants and belonging to the following groups of natural products were evaluated for their citotoxic activity: alkaloids, flavonoids and quinones. The *A. salina* eggs are hatched in artificial seawater and used in the nauplii stage to test ten substances in concentrations of 250, 125, 61.5 and 31.3 µg/mL: Boldine, Duguetine, Aloin, Emodin, Rutin, Quercetin, Lapachol, β -Lapachone, *N*-Nitrosoanonaine e *N*-Nitrosoxylopine. Hep₂ (larynx carcinom) and B16-F10 (murine melanoma) cell lines are cultivated in 96-well plates and the viability evaluated with the sulforhodamine B stain method after 48 hours of exposure to the tested substances. The quinones were the most active among the three natural products classes evaluated in both bioassays, *A. salina* and antitumoral. β -Lapachone was the substance with lower IC₅₀ for both tumoral cell lines and Duguetine, an alkaloid, the most citotoxic to *A. salina*. The results confirm the *A. salina* bioassay as an indicative of antitumoral activity although it is not possible to establish a secure quantitative correlation between ED₅₀ and IC₅₀ from these tests.

KEY WORDS: citotoxic activity, *Artemia salina*, SRB assay, alkaloids, flavonoids, quinones

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Dose efetiva (DE₅₀) de dez substâncias e dos controles positivos em ensaio de toxicidade em *A. salina* com intervalo de confiança de 95% determinado pelo programa Probitos 51
- Tabela 2 - Concentração inibitória (CI₅₀) de dez substâncias e do controle positivo em células humanas neoplásicas, linhagens B16-F10 e Hep₂ em período de incubação de 48h, e intervalos de confiança55
- Tabela 3 - Alcalóides e atividades em *A. salina*, após 24h de exposição, e em linhagens de células tumorais B16-F10 e Hep₂, em período de incubação de 48h, respectivos controles positivos de cada bioensaio e intervalos de confiança 57
- Tabela 4 - Flavonóides e atividades em *A. salina*, após 24h de exposição, e em linhagens de células tumorais B16-F10 e Hep₂, em período de incubação de 48h, respectivos controles positivos de cada bioensaio e intervalos de confiança 59
- Tabela 5 - Quinonas e atividades em *A. salina*, após 24h de exposição, e em linhagens de células tumorais B16-F10 e Hep₂, em período de incubação 48h, e seus respectivos controles positivos de cada bioensaio e intervalos de confiança 62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da duguetina	28
Figura 2 - Estrutura química da boldina	29
Figura 3 - Estrutura química da <i>N</i> -nitrosoanonaina e <i>N</i> -nitrosoxilopina	30
Figura 4 - Estrutura química da rutina	33
Figura 5 - Estrutura química da quercetina	33
Figura 6 - Estrutura química da aloina	37
Figura 7 - Estrutura química da emodina	39
Figura 8 - Estrutura química do lapachol	40
Figura 9 - Estrutura química da β -lapachona	42
Figura 10 - Esquema do ensaio de citotoxicidade em <i>A. salina</i>	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	linhagem celular tumoral de mama ou de adenocarcinoma de pulmão
B16 e B16BL6	linhagem celular de melanoma murino
B16-F10	linhagem celular de melanoma
BEL-7402	linhagem celular de carcinoma hepatocelular
Calu-1	linhagem celular de carcinoma de pulmão humano
CH27	linhagem celular de câncer de células escamosas de pulmão humano
CI ₅₀	concentração inibitória necessária para inibir o crescimento de 50% dos organismos-teste
CI _{k50}	concentração necessária pra diminuir a constante de crescimento em 50%
CL ₉₀	concentração inibitória necessária para inibir o crescimento de 90% dos organismos-teste
CL5	linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar humano
Col115	linhagem celular de adenoma de cólon humano
DE ₅₀	dose efetiva necessária para provocar a morte de 50% dos organismos-teste
DMEM	meio de cultura celular Dulbecco's Modified Eagle's
DMSO	dimetilsulfóxido
EC/CUHK1	linhagem celular de carcinoma esofágico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	United States Food and Drug Administration
H460	linhagem celular de carcinoma de pulmão
HCT-15	linhagem celular de câncer de cólon
HCT-116	linhagem celular de câncer de cólon humano
HEK-293	linhagem celular de fígado embrionário humano
Hep2	linhagem celular de carcinoma de laringe
HepG2	linhagem celular de hepatocarcinoma
HepG2/C3A	linhagem celular de hepatoma humano
HeLa	linhagem celular de carcinoma cervical
HeLaS3	linhagem celular de carcinoma uterino humano
HMEC	linhagem celular epitelial de mama humana
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography

HSC5	linhagem celular de carcinoma escamoso de pele
HUVE	linhagem celular endotelial de veia umbilical humana
HUVEC	linhagem celular endotelial da veia de cordão umbilical humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K562	linhagem celular de eritroleucemia
LLC	linhagem celular de carcinoma Lewis de pulmão
LNCaP	linhagem celular tumoral de próstata
MC3T3E1	linhagem celular de calvária osteoblástica de rato não transformada
MCF-7	linhagem celular de câncer de mama humana
MCF-10A	linhagem celular epitelial imortalizada de mama humana
MDA-MB-231	linhagem celular de câncer de mama
MDA-MB-453	linhagem celular de câncer de mama humano
MIC ₅₀	concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento de 50% dos organismos-teste
MKN-45	linhagem celular de adenocarcinoma gástrico humano
MTT	brometo de difeniltetrazólio - microtetrazólio
NCI	National Cancer Institute
NCI-H460	linhagem celular de câncer de pulmão humano
NO	óxido nítrico
PBS	tampão fosfato-salino
PC3	linhagem celular tumoral de próstata
PLC/PRF/5	linhagem celular de hepatoma humano
Raji	linhagem celular de eritroleucemia
RPMI 1640	meio de cultura celular Roswell Park Memorial Institute
SF-268	linhagem celular de câncer do sistema nervoso central humano
SK-HEP-1	linhagem celular de hepatoma humano
SKMEL-2	linhagem celular de melanoma
SK-OV-3	linhagem celular de câncer de ovário
SRB	sulforrodamina B
SW480	linhagem celular de adenoma de cólon humano
TCA	ácido tricloroacético
TIG-1	linhagem celular de fibroblastos pulmonares de embrião humano
UMR-106	linhagem celular de osteosarcoma de camundongo
VERO	linhagem celular de rim de macaco verde africano

VHSV	vírus da septicemia hemorrágica viral
XF498	linhagem celular de câncer do sistema nervoso central
XTT	hidróxido de tetrazólio
Walker 256	tumor sólido – carcinosarcoma
Wish	linhagem celular epitelial transformada

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
h	hora(s)
kg	quilograma
L	litro
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromol
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimol
nm	nanômetro
W	watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Uso de plantas medicinais	18
2.2 Câncer	19
2.3 Ensaio biológicos – bioensaios	21
2.3.1 <u>Artemia salina</u> Leach	21
2.3.2 <u>Ensaio antitumoral na avaliação da atividade antineoplásica</u>	26
2.4 Alcalóides	27
2.4.1 <u>Duguetina e boldina</u>	27
2.4.2 <u>N-nitrosoanonaina e N-nitrosoxilopina</u>	30
2.5 Flavonóides	31
2.6 Quinonas	35
2.6.1 <u>Aloina e emodina</u>	35
2.6.2 <u>Lapachol e β-lapachona</u>	39
2.7 Produtos naturais e o câncer na atualidade	44
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo Geral	46
3.2 Objetivos Específicos	46
4 METODOLOGIA	47
4.1 Drogas	47
4.2 <i>Artemia salina</i>	47
4.3 Ensaio antitumoral	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 <i>Artemia salina</i>	51
5.2 Ensaio antitumoral	54
5.3 Atividade de substâncias da classe dos alcalóides em ensaio de <i>A. salina</i> e ensaio antitumoral	57
5.4 Atividade de substâncias da classe dos flavonóides em ensaio de <i>A. salina</i> e ensaio antitumoral	58

5.5 Atividade de substâncias da classe das quinonas em ensaio de <i>A. salina</i> e ensaio antitumoral	61
6 CONCLUSÕES	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

Estima-se a existência de mais de dois milhões de espécies de plantas, animais e microorganismos ocorrentes na biodiversidade brasileira, o que contribui para o aumento das oportunidades de identificação de produtos com possível utilização econômica. Afirma-se, ainda, que as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, constituindo-se em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (GUERRA; NODARI, 2007).

Estudos têm demonstrado que as áreas da botânica e da medicina estão relacionadas. Com isso, as ações farmacológicas de flavonóides, lignanas, alcalóides, cumarinas, dentre outras substâncias extraídas de plantas, têm sido extensivamente estudadas (NG *et al.*, 2000) por indústrias e grupos de pesquisa para obtenção de protótipos farmacêuticos para tratamento de diversos males.

Houghton *et al.* (2007) afirmam que uma parte significativa das descobertas de drogas nos últimos quarenta anos tem sido focada em agentes para prevenir ou tratar o câncer, já que na maioria dos países desenvolvidos e, cada vez mais nos países em desenvolvimento, o câncer está entre as três causas mais comuns de morte e morbidade. Como formas de tratamento para esta doença estão a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e, freqüentemente, uma combinação de duas ou das três é empregada, fazendo com que a descoberta de drogas eficazes diminua o tempo de tratamento e impeçam a reincidência.

Atualmente, ervas medicinais, especialmente as ditas anticâncer, têm chamado atenção de institutos farmacêuticos à medida que cientistas percebem que elas são uma fonte quase infinita para o desenvolvimento de drogas e que a toxicidade destas é muito baixa, sem apresentar efeito colateral (WANG *et al.*, 2006). Enquanto drogas sintéticas contra o câncer causam uma morte não específica das células, alguns produtos de origem vegetal oferecem ações protetoras e terapêuticas, com baixa citotoxicidade e benefícios para pessoas imunocomprometidas (REDDY *et al.*, 2003). Portanto, drogas anticâncer em amplo uso clínico são fundamentalmente citotóxicas e agem principalmente inibindo a proliferação celular através de diferentes mecanismos (HOUGHTON *et al.*, 2007).

Como ferramenta útil na determinação de drogas contra o câncer, avaliações para atividade biológica, utilizando bioensaios simples e rápidos têm sido adicionadas para obtenção de uma melhor indicação da utilidade de plantas. Assim, separações fitoquímicas são, hoje, rotineiramente direcionadas por bioensaios que garantem o isolamento de princípios

bioativos, sem determinar se eles pertencem a certa classe de compostos ou não (SAID *et al.*, 1998).

Os bioensaios oferecem vantagem especial na padronização e controle de qualidade de produtos de origem vegetal (MCLAUGHLIN; ROGERS, 1998) e, de uma maneira geral, podem envolver organismos inferiores, como microrganismos e microcrustáceos, ensaios bioquímicos visando alvos moleculares, como enzimas e receptores e cultura de células animais ou humanas. O que determinará o teste adequado é a doença alvo a ser estudada (MACIEL *et al.*, 2002).

Dentre os ensaios mais citados estão aqueles de letalidade em organismos simples, como o microcrustáceo marinho *Artemia salina* Leach, que permite avaliar a toxicidade geral, sendo considerado um bioensaio preliminar no estudo de extratos e metabólitos especiais com potencial atividade biológica (MACIEL *et al.*, 2002).

A. salina, comumente conhecida como o “camarão de água salgada”, é um pequeno crustáceo que tem sido objeto de estudos fisiológicos de zoologistas por muitos anos. Devido à sua alta sensibilidade a ampla série de compostos, a possibilidade de estocar seus ovos por anos em temperatura ambiente e a obtenção de grande quantidade de larvas em 24-48h, seu uso tem sido promovido como organismo teste para bioensaios (CEPLEANU, 1993). McLaughlin e Rogers (1998) encontraram dados que mostram ser o bioensaio da *A. salina* tão preciso ou até mesmo superior a ensaios em linhagens tumorais humanas, sugerindo-o como uma pré-avaliação em detrimento de ensaios mais caros, além de ser um método de avaliação de pesticidas.

Outro teste citotóxico, porém mais específico, é o baseado em uma ou mais linhagens celulares de mamíferos (antitumoral), cultivadas sob condições que promovem o efetivo crescimento e a divisão mitótica. Células são cultivadas em placas de micropoços e a taxa de multiplicação e crescimento é medida pela formação de cor, cuja intensidade é diretamente proporcional ao número de células presentes (HOUGHTON *et al.*, 2007).

Assim, o estudo biomonitorado e biodirecionado contribui para a descoberta e a análise de candidatos potenciais ao uso farmacêutico, unindo-se aos ensaios mais complexos que indicam características a serem exploradas e/ou modificadas na elaboração de fármacos derivados de produtos naturais da flora brasileira.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Uso de plantas medicinais

O Brasil detém aproximadamente um terço da flora mundial, considerando sua extensão e diversidade como fatores determinantes de seu privilégio na potencialidade de novos fitoterápicos (YUNES *et al.*, 2001).

Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma ampla gama de produtos de importância econômica e representam uma vasta fonte de substâncias naturais biologicamente ativas. Dentre eles destacam-se os fitofármacos, substâncias extraídas de plantas que apresentam atividade(s) farmacológica(s), as quais podem ter aplicação terapêutica (GUERRA; NODARI, 2007) e se tornarem modelos para a síntese de um grande número de fármacos.

A utilização de matéria-prima extraída de fontes naturais para a síntese de substâncias bioativas tem sido amplamente relatada ao longo do tempo (BARREIRO *et al.*, 2007), porém a ação antrópica aliada ao ritmo natural de extinção das espécies coloca em perigo a diversidade biológica existente e ocasiona a perda de potencialidades ainda inexploradas quanto ao seu uso benéfico para a sociedade.

Para subsidiar a exploração racional de produtos bioativos, pesquisas fitoquímicas são vistas como um primeiro passo no descobrimento de drogas úteis em florestas tropicais, sendo estas identificadas como fontes potenciais devido à sua flora diversificada (SAID *et al.*, 1998). Além disso, a tendência global de procura por fontes alternativas à industrialização e a necessidade da preservação ambiental têm contribuído para que a floresta tropical seja alvo de tais atividades, junto com o medo do esgotamento causado por desmatamento e pela constante ampliação das fronteiras agrícolas.

A pesquisa por novos agentes anticâncer de fontes naturais tem obtido sucesso em todo o mundo, onde se coloca o conhecimento etnofarmacológico como aliado na busca de plantas com potenciais atividades citotóxicas (GÁLVEZ *et al.*, 2003). O uso medicinal de plantas e substâncias naturais geralmente se inicia pelo conhecimento ou crença de que seu uso, pelo homem e por animais domésticos, está associado a efeitos benéficos à saúde.

Ozaki e Duarte (2006) enfatizaram tal importância das plantas na medicina humana e na veterinária, pois seu uso vem se mantendo através de ensinamentos propagados pelas gerações e podendo ser usadas simultaneamente ou em substituição a fármacos clássicos.

Aliado a isso, soma-se a melhoria da qualidade de vida e a eficiência na prevenção e no tratamento de doenças.

Na América Latina, apesar do crescente acesso da população urbana a modernos remédios alopáticos e várias terapias alternativas, ainda é massivo e fortemente enraizado em culturas locais (SPEISKY; CASSELS, 1994) o uso de plantas medicinais, em especial em regiões pobres e em grandes cidades brasileiras, onde são comercializadas ou encontradas em quintais de residências (MACIEL *et al.*, 2002).

Dentre os produtos botânicos de maior interesse e mais visados, principalmente pela indústria farmacêutica, estão aqueles que atuam em múltiplos alvos anticâncer, uma vez que contêm uma variedade de estruturas químicas. Uma vantagem potencial dos produtos de origem natural é que eles podem atuar através de múltiplas vias e reduzir o desenvolvimento de resistência pelas células cancerosas (YANCE; SAGAR, 2006).

Várias razões são colocadas para explicar o sucesso dos produtos naturais na descoberta de drogas: sua alta diversidade química, os efeitos da pressão evolutiva em criar moléculas biologicamente ativas e a similaridade estrutural dos alvos protéicos entre várias espécies (HARVEY, 2007).

Assim, o uso de substâncias ou extratos obtidos de plantas, particularmente metabólitos secundários - compostos químicos que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas, encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas (VON POSER; MENTZ, 2007) – tem levado ao conhecimento, descoberta e corroborado o uso de produtos naturais de uso popular com grande potencialidade para aplicação farmacêutica. Com isso, estudos de preservação e manejo sustentável de áreas biodiversas e ameaçadas fazem-se necessários no âmbito da pesquisa biológica e farmacêutica.

2.2 Câncer

Existe um público considerável e um interesse científico no uso de produtos naturais presentes na dieta para o combate de doenças humanas, especialmente as duas que comumente mais matam em países desenvolvidos: doenças cardiovasculares e câncer (SHARMA *et al.*, 2005).

O câncer é definido como uma doença na qual uma desordem ocorre no processo normal de divisão celular, controlada pelo material genético (DNA) da célula (REDDY *et al.*, 2003). Em complemento a tal definição, Moura *et al.* (2001) colocam o câncer como uma

coleção de doenças caracterizadas por células malignas que proliferam de maneira incontrolada, invadem tecidos adjacentes e disseminam-se para órgãos distantes para formar colônias-irmãs (tumores secundários ou metástase).

A maioria dos tipos de câncer humano resulta da exposição à carcinógenos ambientais, o que inclui os produtos químicos naturais e os produzidos pelo homem, radiação e vírus, além de outros fatores, como a predisposição genética, rearranjo cromossômico, genes supressores de tumores e transformação espontânea (REDDY *et al.*, 2003).

Um dos tecidos celulares que mais sofrem a ação de carcinógenos ambientais são as células epiteliais, as quais estão naturalmente expostas a várias fontes exógenas de radicais livres, tais como poluição e radiação UV, fatores que fazem das linhagens de melanoma um alvo para estudos de extratos, frações e substâncias puras como possíveis agentes anticâncer. Calliste *et al.* (2001) utilizaram a linhagem de melanoma (B16), derivada de células de tumor espontâneo de pele de camundongo, para avaliar o efeito citotóxico de extratos de plantas.

Estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, no Brasil, apontam a ocorrência de 466.730 casos novos de câncer (à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, estimado em 115 mil novos casos), sendo os mais comuns o câncer de próstata e o de pulmão, no sexo masculino, e o câncer de mama e o de colo de útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil observado no mundo (INCA, 2008).

Na busca pela cura dessa doença, a pesquisa por drogas anticâncer obtidas de produtos naturais começou por volta de 1950, com a descoberta e desenvolvimento dos alcalóides da vinca: vimblastina e vincristina (BROWER, 2008), extraídas de *Catharanthus roseus* (SCHENKEL *et al.*, 2007), bem conhecidas e com uso clínico principal em tratamento de linfoma de Hodgkin e leucemia linfoblástica aguda infantil, respectivamente. O mecanismo de ação dos alcalóides da vinca é através da inibição da mitose, sendo seu alvo a tubulina, uma proteína necessária à divisão celular (ITOKAWA *et al.*, 2008). Outro exemplo de sucesso na descoberta de drogas anticâncer são os taxanos paclitaxel e docetaxel, isolados de *Taxus brevifolia* e que apresentam uma impressionante atividade, principalmente sobre tumores de mama e ovário (DA ROCHA *et al.*, 2001).

Para o estudo e desenvolvimento de drogas capazes de aumentar a cura dessa doença de alta incidência mundial, a atividade citotóxica de extratos e frações de plantas, medida por meio de ensaios de viabilidade celular laboratoriais em diversas linhagens tumorais humanas, é comumente realizada para o direcionamento e descoberta de princípios ativos, como demonstrado no trabalho de Alfonso *et al.* (2006).

2.3 Ensaios biológicos - bioensaios

O bioensaio pode ser definido como uma estimativa da concentração ou da potência de determinada substância através de uma resposta biológica produzida pela mesma. Dentre suas utilizações está a medição da atividade de substâncias novas ou quimicamente não definidas (RANG *et al.*, 2001).

Para o desenvolvimento de novas drogas, a atividade de um composto precisa ser comparada em vários sistemas de testes, utilizando outros já conhecidos (padrão). Os testes escolhidos devem ser simples e rápidos e também, na medida do possível, específicos para o tipo de atividade biológica a investigar (RANG *et al.*, 2001).

Portanto, a seguir é feita uma revisão acerca de dois bioensaios utilizados na determinação da atividade biológica de extratos, frações e compostos extraídos de vegetais: o bioensaio simples de letalidade da *A. salina*, indicativo do segundo bioensaio apresentado, o antitumoral, este, mais específico.

2.3.1 *Artemia salina* Leach

O uso de invertebrados como bioindicadores ou bioacumuladores é implementado em testes antes do uso de vertebrados, mas sua aplicação ainda é marginal e envolve, dentre os resultados primários, a avaliação da toxicidade e genotoxicidade dos compostos testados (KANWAR, 2007).

A letalidade *in vivo* de um simples organismo zoológico, pode, segundo McLaughlin e Rogers (1998), ser usado como um instrumento conveniente de avaliação e fracionamento no descobrimento e monitoramento de produtos naturais bioativos. O microcrustáceo *A. salina* Leach (Artemiidae) é um invertebrado de ecossistemas aquáticos salinos e marinhos usado em ensaio laboratorial de toxicidade e outras ações de estimativa da dose letal (AYO *et al.*, 2007). Pertence ao Filo Arthropoda, Classe Crustacea (PELKA *et al.*, 2000). O estágio de larvas de *A. salina* mais usado em testes laboratoriais compreende o período de vida de 24 a 48h depois da eclosão. Identificação da dose efetiva para 50% de mortalidade das larvas (DE₅₀) acontece depois de seis horas de exposição, fazendo deste um teste rápido e simples (KANWAR, 2007).

O microcrustáceo adulto é um animal extremamente bem conhecido devido a sua importância como fonte de alimento para peixes e crustáceos criados em aquários domésticos, sistemas de aquicultura e em laboratórios (PELKA *et al.*, 2000). Os ovos de *A. salina* Leach são comercializados em lojas de animais a um baixo custo e permanecem viáveis por anos se

armazenados em condições ideais. Quando colocados em água marinha, os ovos eclodem dentro de 48h e geram um grande número de larvas (fase náuplio) para o uso experimental, o que confere vantagens a esse tipo de ensaio biológico (MCLAUGHLIN; ROGERS, 1998), além de poder ser utilizado como bioindicador e biomonitor da qualidade da água, como por exemplo, na determinação da citotoxicidade de pesticidas organofosforados (VARÓ *et al.*, 2002).

Outra indicação do bioensaio da letalidade sobre *A. salina* é seu uso em avaliações de extratos de plantas, considerado por Pimenta *et al.* (2003) como um teste eficiente, rápido, barato e que requer uma quantidade pequena de amostra (2-20 mg). A DE_{50} para valores encontrados em teste com o microcrustáceo é geralmente dez vezes a concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (CI_{50}) em testes antitumorais (MCLAUGHLIN E ROGERS, 1998). Parra *et al.* (2001) também colocam o teste da *A. salina* como sendo útil para predizer a toxicidade *in vivo*, já que os testes de 20 extratos de plantas cubanas apresentaram uma boa correlação entre o estudo em *A. salina* e em ratos. Entretanto, apesar das vantagens apresentadas pelo primeiro método, tais como simplicidade e não utilização de animais, este ainda não é um método laboratorial validado.

Outra vantagem oferecida por esse ensaio está relacionada à comunidade científica, preocupada e sensível com as questões de bem-estar animal, considerando como os animais são usados em pesquisa biomédica e em testes para avaliar o potencial toxicológico de vários tipos de substâncias. Apesar de alternativas aos métodos baseados no uso de animais não satisfazerem todos os requisitos e necessidades da pesquisa biomédica e de testes toxicológicos, alternativas ao uso de vertebrados estão sendo desenvolvidas e avaliadas quanto a sua utilidade.

Porém, o ensaio com invertebrados não é de uso exclusivo como pré-avaliação no estudo farmacêutico e toxicológico de extratos vegetais e substâncias puras naturais e sintéticas. Pelka *et al.* (2000) objetivaram ajustar o ensaio citotóxico de *A. salina*, em micropoços, às demandas de testes de toxicidade de materiais dentários, pois esses ensaios são muito baratos em comparação aos métodos de cultura de células para tal fim. *A. salina* foi utilizada por Svensson *et al.* (2005) inclusive para testar a toxicidade de águas de chorume de diferentes aterros municipais contendo altas concentrações de íons cloreto, uma vez que esse microcrustáceo é um organismo tolerante a concentrações salinas. Os resultados encontrados indicaram que amônia e íons amônio e/ou íons metálicos são responsáveis por uma grande porção da toxicidade aguda do material testado. *A. salina* também mostrou ser um organismo conveniente ao teste de metabólitos fúngicos tóxicos (HARWIG; SCOTT, 1971).

Uma das metodologias mais citadas e usadas originalmente e em adaptações do ensaio para *A. salina* em extratos e compostos de produtos naturais é o proposto por Meyer *et al.* (1982). Este trabalho pode ser considerado como uma referência na tentativa de associar a atividade citotóxica sobre o microcrustáceo ao ensaio de atividade antitumoral. A partir de então, outros autores usaram tal metodologia como referência para avaliação de frações, extratos e substâncias puras de origem vegetal e testes de citotoxicidade gerais (MCLAUGHLIN E ROGERS, 1998; MOREIRA *et al.*, 2003; NOLDIN *et al.*, 2003; LHULLIER *et al.*, 2006; STEFANELLO *et al.*, 2006; GRAMINHA *et al.*, 2008). Porém, estudos específicos para uma correlação quantitativa e qualitativa entre o bioensaio da *A. salina* e o bioensaio antitumoral, encontrada por Meyer *et al.* em 1982, não foram, desde então, conduzidos com o objetivo específico de estabelecer e/ou reafirmar o uso seguro do primeiro como indicativo e quantitativo da presença de atividade do segundo bioensaio. Trabalhos partindo de resultados positivos em testes com *A. salina* são encontrados como forma de triagem de substâncias candidatas a testes específicos e mais dispendiosos, como o bioensaio antitumoral.

Uma das substâncias estudadas em nosso trabalho foi adotada por Cunha (2002) como controle positivo em teste de extratos e frações obtidos de três espécies da família Annonaceae em toxicidade de *A. salina*: o lapachol. Em tal estudo, os extratos vegetais das espécies *Rollinia laurifolia*, *Annona crassiflora* e *Annona nutans* apresentaram toxicidade nos testes com *A. salina* e passaram para a próxima etapa da estratégia de triagem adotada pelo autor: a determinação da concentração inibitória sobre linhagens celulares tumorais e uma normal. Isso mostra a importância da atividade sobre o microcrustáceo como pré-requisito para avaliações mais dispendiosas, exemplificado pelos ensaios antitumorais.

Dentre os extratos aquosos de 118 plantas medicinais indianas testadas em *A. salina* por Krishnaraju *et al.* (2006), dois deles, obtidos das espécies *Polygonum cuspidatum* e *Syzygium cumini*, mostraram-se mais promissores, com valores de DE₅₀ de 13,5 e 20 µg/mL, respectivamente. O grau de letalidade mostrou ser diretamente proporcional à concentração do extrato e confirmou o uso medicinal tradicional das espécies citadas quanto à sua atividade antitumoral.

A. salina foi utilizada na condução dos seguintes estudos biodirecionados: extrato metanólico bruto e as substâncias puras cinaropicrina e cinarosídio obtidos da espécie *Cynara scolymus* L. (alcachofra) (NOLDIN *et al.*, 2003); extrato acetato de etila do talo da folha, metanólico da raiz, hexânico do talo da folha e da raiz e as substâncias puras estigmast-4-en-6 β -ol-3-ona e 3 β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol obtidas de *Euterpe precatoria* Mart. (açai)

(GALOTTA; BOAVENTURA, 2005). Além disso, extratos de diferentes partes vegetais de *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) - uma árvore de manguezal - indicados por Kabaru e Gichia (2001) como uma fonte potencial de inseticidas botânicos foram testados em *A. salina* e também a fração aquosa, a *n*-butanol, a acetato de etila e as substâncias puras praeruptorinas A e B extraídas de *Peucedanum praeruptorum* Dunn. foram testadas por Lu *et al.* (2001) tanto frente a *A. salina* como quanto à suas atividades antimicrobianas e toxicidade em ratos, sendo o controle positivo usado no teste do microcrustáceo, a podofilotoxina, uma lignana com comprovado efeito antitumoral (DAVID *et al.*, 2001).

Na literatura, são encontrados vários exemplos de estudos que envolvem *A. salina* como um pré-ensaio de substâncias isoladas de partes de plantas avaliadas para determinar sua citotoxicidade e sugerir futuras investigações para o uso como protótipos de novos fármacos (TIEW *et al.*, 2002). Mojica e Micor (2007) testaram o extrato aquoso das sementes de *Barringtonia asiatica* e encontraram uma relação dose dependente (atividade e concentrações utilizadas), sugerindo uma potencial ação biológica dos compostos da espécie, que poderiam ser usados no tratamento de câncer ou tumor. Também David *et al.* (2004) usaram *A. salina* para avaliar a citotoxicidade tanto de extratos brutos como de substâncias isoladas do caule de *Maprounea guianensis* Aublet (Euphorbiaceae) obtidas por isolamento e posterior elucidação estrutural.

Além de extratos e produtos obtidos de plantas, *A. salina* foi usada para avaliação de extratos etanólicos de 19 espécies de algas marinhas (filos Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta) do litoral brasileiro catarinense e, como resultado, observaram que, 25 extratos dos 26 testados apresentaram toxicidade em pelo menos uma das concentrações (200 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL) (LHULLIER *et al.*, 2006).

Piccardi *et al.* (2000) testaram cinquenta linhagens de cianobactéria do gênero *Nostoc*, obtidas de diferentes habitats e conhecidas por produzirem uma grande variedade de metabólitos secundários com atividade antibiótica e citotóxica. As biomassas foram liofilizadas e extraídas de forma a obter os extratos brutos hidrofílico e lipofílico, testados quanto às suas atividades antifúngica, antibacteriana e citotóxica. Doze linhagens mostraram toxicidade sobre *A. salina*, sendo tal atividade associada aos extratos hidrofílicos avaliados, enquanto a atividade antifúngica mostrou-se comum entre os extratos lipofílicos. Lee *et al.* (1999) também avaliaram amostras de cianobactérias obtidas de tanques de aquicultura e reservatórios tailandeses (espécies *Microcystis aeruginosa* Kützinger e *Coelosphaerium kuetzingianum* Naegeli). Microcistinas (cianotoxinas causadoras de hepatotoxicidade) foram testadas pelos autores em *A. salina* como meio de comparação entre tal ensaio e o teste em

ratos injetados intraperitonealmente. *A. salina* mostrou ser um ensaio menos sensível que o segundo, porém, mais uma vez, um ensaio mais simples por requerer menos equipamentos laboratoriais e ser menos problemático do ponto de vista ético, mostrando ser conveniente na detecção da toxicidade de microcistinas (LEE *et al.*, 1999). Tal alternativa é confirmada em teste com o alcalóide cilindrospermopsina obtido de seis linhagens de *Cylindrospermopsis raciborskii* em comparação com a atividade da microcistina obtida de *Microcystis sp* (METCALF *et al.*, 2002).

Peróxido de hidrogênio produzido pela alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), um organismo ictiotóxico responsável pela maré vermelha e associado à mortalidade de peixes na indústria de aquicultura, foi avaliado sobre *A. salina* e sobre duas linhagens de células de vertebrados: HEK-293 (fígado embrionário humano) e UMR-106 (osteosarcoma de camundongo) (TWINER *et al.*, 2001), reafirmando a utilidade desses ensaios nos variados grupos de organismos e espécies.

A. salina é utilizada para testes de toxicidade de compostos sintéticos, como por exemplo, de 1,3,5-triazinas substituídas, compostos sintéticos heterocíclicos (N), os quais possuem várias atividades biológicas, incluída dentre estas, a anticâncer (CAVALCANTE *et al.*, 2000) e em testes de toxicidade e antimicrobiano de derivados de 1,2,4 oxadiazóis contendo substituintes fenilclorados (MACHADO *et al.*, 2005).

Complexos de ferro (III) com tiosemicarbazona piridinoformamida e seus derivados foram obtidos e analisados por Graminha *et al.* (2008) sendo que as tiosemicarbazonas e seus complexos $[\text{Fe}(\text{2Am4DH})_2]\text{Cl}$ e $[\text{Fe}(\text{2Am4Me})_2]\text{Cl}$ apresentaram toxicidade sobre *A. salina* em baixas concentrações, sugerindo a presença de propriedades antineoplásicas, já que esse bioensaio possui uma boa correlação com a atividade citotóxica em tumores sólidos humanos.

Um dos aspectos levados em conta por alguns autores em seus trabalhos foi a idade das larvas de *A. salina*. Esse fator influenciou diretamente a toxicidade atribuída aos quatro carbamatos testados por Barahona e Sánchez-Fortún (1999). Os microcrustáceos com 72h de vida foram mais sensíveis aos pesticidas do que aqueles testados com 24h, o que, segundo os autores, ocorre usualmente. Portanto, larvas com 48h de vida, já em estágio náuplio, são as mais utilizadas nos ensaios.

De acordo com David *et al.* (2001) a classificação de substâncias puras obtidas de extratos de plantas, quanto à sua atividade citotóxica em *A. salina* pode ser assim atribuída: substâncias que apresentam $\text{DE}_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ são consideradas inativas e aquelas com $\text{DE}_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ são muito ativas, comparáveis à camptotecina e ao sulfato de vincristina, substância usada no tratamento de leucemia (SCHRIPEMA *et al.*, 2007). Substâncias

medianamente ativas, comparáveis ao ácido hipúrico, apresentam $DE_{50} \geq 100 \mu\text{g/mL}$ e $\leq 1000 \mu\text{g/mL}$.

O ensaio da *A. salina* é, portanto, uma ferramenta útil na avaliação e fracionamento monitorado para bioatividades, levando ao isolamento de diversos produtos naturais, incluindo membros de várias classes, tais como flavonóides, triterpenos, esteróis e compostos aromáticos simples, poupando a necessidade de ensaios antitumorais mais caros ou em animais (CEPLEANU, 1993). Encontra-se ainda, na literatura, *A. salina* sendo usada em várias outras avaliações biológicas, confirmando sua sensibilidade e versatilidade como elemento em estudos de toxicidade.

2.3.2 Ensaio antitumoral na avaliação da atividade antineoplásica

Testes de quimiosensibilidade em células aderentes a microplacas têm sido amplamente utilizados para avaliação de drogas anticâncer (PAPAZISIS *et al.*, 1997), consistindo em um teste mais específico, porém, também mais complexo e com maiores gastos.

Existem diferentes tipos de ensaios colorimétricos disponíveis comercialmente (HENRIKSSON *et al.*, 2006). Os ensaios mais citados nos artigos encontrados para a revisão bibliográfica deste trabalho foram o MTT (microtetrazólio) e o SRB (sulforrodamina B). O método MTT quantifica a habilidade de células viáveis reduzirem o sal de tetrazólio, de coloração amarela, em cristais púrpuras, através da atividade metabólica mitocondrial. Já o ensaio SRB cora as proteínas das células, ou seja, após a fixação daquelas que se mantiveram aderidas depois da adição e incubação com as drogas testadas, o corante SRB é adicionado e a lise das células é provocada, o que possibilita a quantificação do corante liberado, detectado pela leitura da absorbância de acordo com a intensidade da cor.

Segundo Itharat *et al.* (2004), o método SRB é utilizado em ensaios citotóxicos de extratos aquosos e etanólicos de plantas tradicionalmente usadas em preparações medicinais, oferecendo um suporte científico ao uso de tais plantas contra o câncer. O mesmo método é tido como prático, pois após a fixação da monocamada de células com TCA, coloração pelo SRB e secagem, as placas podem ser armazenadas indefinidamente. Além disso, pelo seu alto grau de sensibilidade, adaptabilidade ao formato de placas de 96 poços e estabilidade indefinida, o ensaio SRB é adequado às avaliações em larga escala e à pesquisa (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Tais vantagens e o fato de ser a metodologia utilizada em testes realizados pelo programa de descobrimento de drogas anticâncer do Instituto Nacional do

Câncer dos Estados Unidos, subsidiam a utilização do ensaio SRB na avaliação da atividade antineoplásica.

Para realização deste trabalho de correlação de ensaios biológicos foram selecionadas dez substâncias pertencentes a três classes químicas diferentes: alcalóides, flavonóides e quinonas. A seguir, é apresentada uma revisão das substâncias avaliadas, referenciando suas potencialidades em bioensaios e atividades já conhecidas.

2.4 Alcalóides

2.4.1 Duguetina e boldina

Alcalóides formam um vasto grupo de metabólitos com enorme diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas (HENRIQUES *et al.*, 2007).

O termo alcalóide é considerado por Robbers *et al.* (1997) como de difícil definição, sendo comumente aplicado a compostos nitrogenados básicos de origem vegetal que tenham atividade fisiológica sobre o organismo e os sistemas de mamíferos, constituindo importantes agentes terapêuticos usados para tratar doenças que vão desde a malária até o câncer.

Segundo descrição de Stévigny *et al.* (2005), alcalóides são metabólitos secundários abundantes em plantas e com registros de múltiplas e variadas propriedades farmacológicas. Em seu trabalho de revisão de potencialidades citotóxicas e antitumorais de alcalóides aporfínicos, a família Annonaceae e a boldina são citadas como fortes candidatas a agentes anticâncer. Os autores ainda propõem que aporfínicos com pouca ou nenhuma atividade citotóxica poderiam ser usados como agentes adjuvantes em tratamentos anticâncer ou como agentes quimiopreventivos contra compostos indutores de tumores.

Extratos e frações de uma espécie da família Annonaceae foram testadas por Pimenta *et al.* (2003) que concluíram, através do bioensaio da *A. salina* e de análise cromatográfica, que as acetogeninas dessa espécie são potenciais agentes pesticidas e antitumorais. Acetogeninas obtidas da família Annonaceae foram isoladas por fracionamento biodirecionado pelo ensaio de letalidade da *A. salina* e posteriormente avaliados quanto à citotoxicidade em linhagens celulares tumorais humanas (YE *et al.*, 1996).

A fração alcaloídica de *Duguetia furfuracea* obtida por Fischer *et al.* (2004) mostrou atividade sobre a linhagem Palo Alto cloroquina-sensível de *Plasmodium falciparum*, indicando que plantas contendo alcalóides isoquinolínicos poderiam ser avaliadas quanto à atividade antimalária.

De acordo com Silva *et al.* (2007), espécies do gênero *Duguetia*, pertencente à família Annonaceae são invasoras de pastagens e prejudicam a economia regional baseada no agronegócio praticado no Centro-Oeste, possuidor do bioma predominante Cerrado. Em estudo fitoquímico da casca do caule e madeira de *D. furfuracea* foram obtidos o óleo volátil, extratos éter de petróleo e alcaloídico que, quando avaliados quanto à sua citotoxicidade, mostraram letalidade sobre larvas de *A. salina* (valores de DE₅₀: 2,6; 6,1 e 36,9 µg/mL, respectivamente). Tal atividade foi atribuída à presença de alcalóides e substâncias previamente estudadas por Carollo *et al.* (2006).

Duguetina também foi encontrada em folhas e casca do caule secos de *Duguetia flagellaris* Huber (Annonaceae) em seu extrato etanólico (FECHINE *et al.*, 2002).

Duguetina possui a fórmula C₂₀H₂₁O₅N e a seguinte estrutura química:

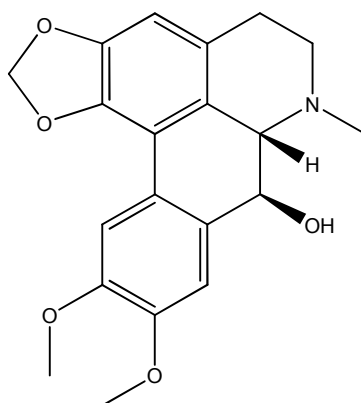


Figura 1 – Estrutura química da duguetina.

Poucos dados acerca dessa substância são encontrados na literatura, o que reforça a necessidade de estudos quanto às suas possíveis atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, principalmente devido aos seus resultados promissores e pela característica do grupo fitoquímico ao qual pertence.

Um exemplo de planta nativa e tradicionalmente usada por seu efeito terapêutico é citado por Speisky e Cassels (1994): boldo (*Peumus boldus* Mol.), que tem despertado interesse devido ao acúmulo de ampla base de conhecimento químico de seus constituintes alcaloídicos e a percepção cultural como planta medicinal eficaz para o tratamento de distúrbios digestivos e hepatobiliares. De acordo com os autores, alcalóides foram reconhecidos como compostos ativos do boldo e a boldina (C₁₉H₂₁NO₄), seu princípio ativo, tem atraído atenção dentre os vários metabólitos secundários identificados na espécie. Boldina é o alcalóide majoritário nas folhas e caule do arbusto de boldo chileno, encontrado

abundantemente nos ecossistemas mais úmidos da região de clima Mediterrâneo do Chile central e porção norte do distrito chuvoso do lago Chileno (O'BRIEN *et al.*, 2006).

Guinaudeau *et al.* (1988) em ampla revisão acerca dos alcalóides, citam como fontes da boldina, as famílias botânicas: Annonaceae, Hernandiaceae, Lauraceae, Monimiaceae.

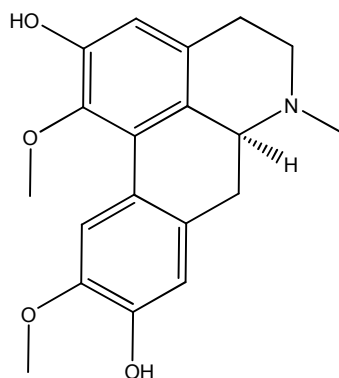


Figura 2 - Estrutura química da boldina.

Aterosclerose, hepatotoxicidade induzida por drogas, doenças autoimunes e inflamatórias, algumas formas de câncer e doenças neurodegenerativas estão entre as mencionadas por Speisky e Cassels (1994) como alvo para intervenção com antioxidantes como a boldina. A propriedade antioxidante, mais citada entre os artigos sobre a boldina, foi demonstrada por Loghin *et al.* (2003) em ensaio *in vitro*, onde a boldina mostrou uma CI_{50} de $4,35 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$, enquanto Trolox[®] - antioxidante de referência, análogo da vitamina E - apresentou $CI_{50} > 8,18 \mu\text{g/mL}$. Segundo Speisky e Cassels (1994), evidências sugerem que alcalóides aporfínicos possuem atividade antioxidante devido ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono benzílico perto do átomo básico de nitrogênio, além da contribuição das funções fenólicas à habilidade varredora de radicais.

De acordo com O'Brien *et al.* (2006) e Youn *et al.* (2002), atividades farmacológicas, tais como: citoprotetora, antitumoral, antiinflamatória, antipirética e antiplaquetária têm sido associadas à habilidade da boldina em varrer radicais livres reativos. Além dessas, boldina mostra um efeito insignificante em teste *in vitro* sobre o vírus da poliomielite humana e em células VERO hospedeiras (BOUSTIE *et al.*, 1998), esta, uma linhagem estabelecida a partir de células do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (ESTACIA *et al.*, 2004) e, portanto, indicativo da ausência de toxicidade em células normais.

O interesse em tal substância é gerado pelo fato de chás e ervas contendo boldina serem amplamente consumidos na América do Sul e folhas de boldo serem continuamente exportadas para alguns países europeus para posterior processamento farmacológico e produção de fitoterápicos contendo a substância (O'BRIEN *et al.*, 2006). Além disso, o conhecimento, a cultura popular e a comercialização disseminada do boldo proporcionam à espécie um fácil acesso e o uso indiscriminado como “remédio caseiro” para diversos males, alguns sem comprovação científica. É interessante observar, portanto, que estudos toxicológicos sugerem uma moderação e cuidado no consumo de chá de boldo, principalmente no primeiro trimestre da gravidez e no uso por tempo prolongado, uma vez que há grandes indícios de teratogenia e hepatotoxicidade (RUIZ *et al.*, 2008).

2.4.2 *N*-nitrosoanonaina e *N*-nitrosoxilopina

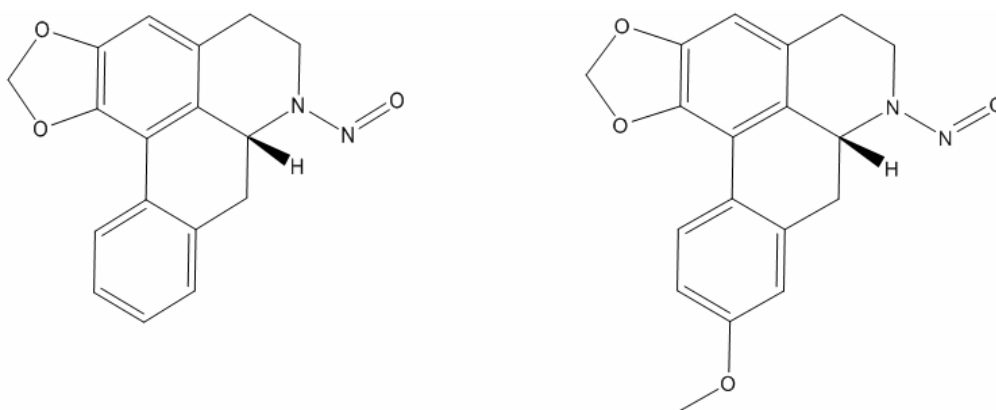


Figura 3 – Estrutura química da *N*-nitrosoanonaina e *N*-nitrosoxilopina.

N-nitrosanonaina ($C_{17}H_{14}N_2O_3$) e *N*-nitrosoxilopina ($C_{18}H_{16}N_2O_4$) foram obtidos, pela primeira vez por Carollo *et al.* (2006) como dois novos alcalóides da espécie *Duquetia furfuracea* contendo uma funcionalidade *N*-nitroso (NO). Tais substâncias não possuem testes biológicos relatados na literatura e suas características físico-químicas são pouco conhecidas.

Porém, a identificação de atividade fisiológica de óxido nítrico (NO) tem gerado interesse devido à sua capacidade de regulação de várias funções fisiológicas importantes em organismos vivos e como um sistema de carreamento de fármacos. Portanto, para fins medicinais, é desejável a descoberta de compostos doadores de NO com liberação controlada (OWHADA *et al.*, 2001).

Óxido nítrico é uma molécula reativa - um radical livre - com atividades em vários processos fisiológicos no organismo, incluindo a inibição da proliferação celular tumoral (TARAPHDAR, 2001). É sintetizado pela oxidação da L-arginina por uma família de óxido nítrico sintases, um potente mediador biológico envolvido nos processos fisiológicos de vasorelaxamento, neurotransmissão e defesa imunológica (LEPILLER *et al.*, 2007; SCHARSACK *et al.*, 2003).

Alcalóides, uma classe de compostos naturais com atividade antitumoral de ocorrência em plantas encontradas no bioma Cerrado e da qual fazem parte a *N*-nitrosoanonaina e a *N*-nitrosoxilopina, com sua função NO, despertam interesse na descoberta de atividades biológicas.

2.5 Flavonóides

Flavonóides constituem, de acordo com Santos (2007), um grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza, sendo que sua presença nos vegetais parece relacionar-se às funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta, ações antifúngica e antibacteriana) e atração de polinizadores.

A atividade protetora de frutas e vegetais contra câncer e doenças cardiovasculares tem sido atribuída a vários antioxidantes, dentre eles os flavonóides contidos nesses alimentos (CAO *et al.*, 1997). Existe ampla evidência que uma dieta rica em flavonóides pode promover boa saúde e prover proteção contra doenças relacionadas à idade, porém permanecem incertas as condições e os níveis de ingestão necessários para produzir um dano potencial à saúde. Dadas a ampla e a variada distribuição dos flavonóides na dieta humana, suas bioatividades potenciais podem ser subestimadas, particularmente no seu uso como suplementos alimentares (SKIBOLA; SMITH, 2000).

Várias plantas que contêm flavonóides são conhecidas por possuírem altas atividades antioxidantes em comparação com moléculas de referência, tais como a vitamina E e seu derivado hidrossolúvel, Trolox[®] (TROUILLAS *et al.*, 2003). Além de frutas e vegetais, bebidas populares, tais como vinho, chá e café são as principais fontes de flavonóides incluídos na dieta, contribuindo para a existência de relatos de tais compostos agindo como antioxidantes e protetores de vários tipos de células contra estresse oxidativo mediado por lesão celular (MATSUO *et al.*, 2005).

Os flavonóides exibem atividades antioxidante e varredora de radicais livres (NG *et al.*, 2000) - radicais livres oxigenados estão envolvidos com a fisiopatologia de várias

doenças, tais como inflamação, doenças cardíacas isquêmicas, câncer e várias outras (TROUILLAS *et al.*, 2003). São conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes, como por exemplo, o ânion superóxido O_2^{2-} , radical hidroxila ou radical peróxido. Outros flavonóides conseguem se ligar a íons metálicos, impedindo-os de atuar na produção de radicais livres (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Os flavonóides de origem natural são, frequentemente, oxigenados e com uma grande parte ocorrendo conjugados com açúcares (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). Rutina é a forma glicosídea (3-O-ramnoglicosídeo) principal da quercetina, o flavonol mais abundante em vegetais e frutas (MANACH *et al.*, 1995). A glicosilação do grupo hidroxil, como o presente na rutina, reduz consideravelmente a capacidade varredora de radicais (PIETTA, 2000).

A fração flavonol obtida de *Beta vulgaris* foi separada em coluna HPLC e, de uma de suas frações obtida em menor quantidade, foi extraída a mistura de cinco compostos: rutina, quercetina 7-glucuronida, isorhamnetina, apigenina 7-rutinosida e um flavonol-glicosídeo desconhecido. Esse conjunto mostrou uma atividade antimitótica sobre células cancerígenas de mama (linhagem MCF-7), segundo metodologia de incorporação de timidina, nove vezes maior do que a molécula predominante, vitexina-2"-O-ramnosídeo, obtida como um dos componentes da fração fenólica da espécie (NINFALI *et al.*, 2007).

Cunha (2002) adotou a rutina como controle negativo em teste de extratos e frações obtidos de espécies da família Annonaceae em *A. salina*, mostrando ser esta, uma substância inativa. Tal resultado pode ser atribuído ao caráter hidrofílico da substância (MATSUO *et al.*, 2005). Por outro lado, Cepleanu (1993) testou alguns compostos puros para validar o método por ele modificado de teste de citotoxicidade em *A. salina* e elegeu, dentre outras substâncias já de uso e/ou citotoxicidade conhecidas, a rutina, cisplatina, taxol e vimblastina, todas citotóxicas. Porém, o autor alerta que a atividade no homem não necessariamente indica uma atividade no microcrustáceo e vice-versa, já que os dois organismos são fisiologicamente e farmacologicamente diferentes.

Em trabalho de Ng *et al.* (2000), rutina apresentou uma ação antioxidante equipotente ao controle positivo em ensaio de peroxidação lipídica *in vitro* usando tecido cerebral homogeneizado de rato. O potencial protetor contra danos ao DNA celular parece depender da lipofilicidade da substância em conjunto com a sua atividade antioxidante (LIMA *et al.*, 2006). Tal ação protetora da rutina contra danos peroxidativos é corroborada por Calabrò *et al.* (2005).

Além das atividades citadas, à rutina é atribuída a ação tônico-venosa, já que essa substância é empregada no tratamento de enfermidades caracterizadas por hemorragias e fragilidade capilar e comercializada no Brasil e em países europeus, como medicação para o tratamento de alguns distúrbios circulatórios (ZUANAZZI E MONTANHA, 2007).

A rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$) possui a seguinte estrutura molecular:

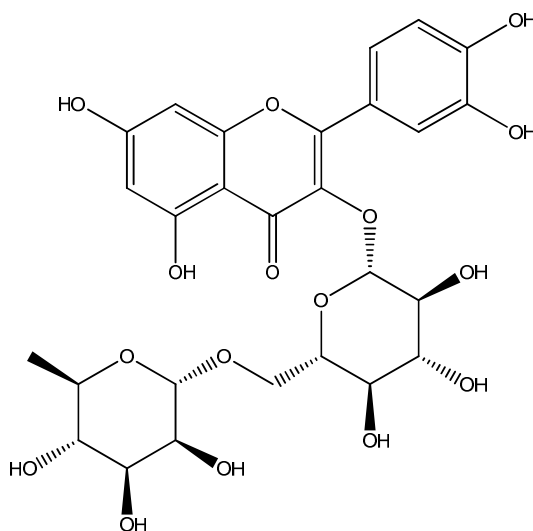


Figura 4 – Estrutura química da rutina.

A quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$) corresponde à parte aglicona da rutina, possuindo a seguinte estrutura química:

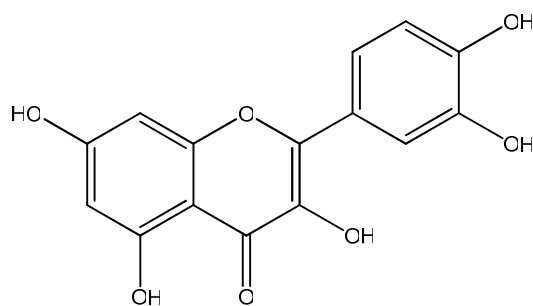


Figura 5 - Estrutura química da quercetina.

Harwood *et al.* (2007) realizaram revisão bibliográfica acerca da segurança da quercetina na dieta humana, já que, devido ao amplo interesse no seu efeito antioxidante, ao consumo diário em produtos tradicionais e à permissão de uso como aditivo alimentar, tal substância tem sido de grande interesse quanto ao seu mecanismo de ação, metabolização,

genotoxicidade, mutagenicidade, toxicidade e carcinogenicidade, sendo uma das várias substâncias que ocorrem naturalmente e constantemente como flavonol na dieta humana.

Diversas espécies são possuidoras de flavonóides e sua descoberta é efetuada através de estudos fitoquímicos clássicos. Folhas secas de *Helenium atacamense* Cabr., uma espécie encontrada no norte do Chile, foram examinadas usando o bioensaio da letalidade da *A. salina* e o teste antitumoral (ensaio MTT) como guias para o fracionamento do seu extrato etanólico (MORALES *et al.*, 2006), levando ao isolamento da quercetina e outros dois compostos.

Quercetina suprime o crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo*, com várias características que a tornam um composto anticâncer potencial (TAN *et al.*, 2003). Tais estudos demonstram que o seu uso oral parece ser seguro e possivelmente útil no tratamento do câncer, o que é visto no estudo dos autores e reforçado em revisão de Yance e Sagar (2006), enfatizando o caráter antiangiogênico da substância.

Os efeitos de extratos hidro-alcóolicos de 16 plantas encontradas em território francês e possuidoras de substâncias fenólicas e flavonóides foram avaliados com relação à ação antioxidante, antiinflamatória e citotóxica. Dois extratos tiveram resultados comparáveis à quercetina, usada como controle quanto à ação antioxidante. No ensaio citotóxico utilizando células de melanoma de camundongo, linhagem B16, e a metodologia azul de tripan, seis extratos mostraram um efeito anti-proliferativo significativo quando utilizados em altas concentrações (> 0,5 mg/mL) (TROUILLAS *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos por Saija *et al.* (1995) mostram a quercetina, dentre quatro flavonóides estudados, como possuidora da mais alta propriedade antiradicalar, fato atribuído às suas características estruturais. A rutina, por sua vez, apresentou um efeito antioxidante comparável ao da quercetina. Por outro lado, em condições experimentais com grandes quantidades de íons metálicos, a mesma pareceu não interagir com membranas, o oposto da quercetina e da naringenina, ambas com forte interação com a bicamada lipídica celular.

Outros resultados reforçam a quercetina como agente antitumoral, mostrando seu efeito inibitório, avaliado em células derivadas de osteosarcoma de camundongo (UMR106) e de calvária osteoblástica de rato não transformada (MC3T3E1) com ajuda do corante cristal violeta (FERRER *et al.*, 2006). Além disso, ensaio antitumoral SRB mostrou uma sensibilidade de células humanas normais à quercetina, o que aconteceu em menor intensidade no teste com linhagens tumorais gástrica, pulmonar e hepática (TAN *et al.*, 2003).

Dentre as diferentes fontes de obtenção da quercetina, uma delas foi avaliada por Hakimuddin *et al.* (2004). O efeito de três diferentes flavonóides extraídos de frações obtidas de vinho tinto foram avaliados quanto ao seu efeito antiproliferativo celular na linhagem

MCF-7, MCF-10A (linhagem de células epiteliais imortalizadas de mama humana) e HMEC (linhagem de células epiteliais de mama humana) através de ensaio SRB. Na presença dos flavonóides, as linhagens de células normais cresceram normalmente, enquanto que a linhagem cancerígena sofreu uma mudança em sua morfologia e se tornou apoptótica.

Quercetina suprime a síntese de DNA de uma maneira dose-dependente e, 48h após a adição da substância *in vitro*, o crescimento das células de câncer gástrico decaiu para aproximadamente 70%, 23% e 10% do nível do controle em tratamento com 3,0; 9,0 e 21,16 µg/mL da substância, respectivamente (YOSHIDA *et al.*, 1990).

Além da atividade contra linhagens tumorais, a atividade antioxidante *in vitro* e efeitos hepatoprotetores da quercetina foram analisados, por Lima *et al.* (2006), usando a linhagem celular HepG2 (hepatocarcinoma) e o *t*-BHP, um hidroperóxido orgânico tóxico, e o ensaio MTT para determinar a viabilidade celular.

Para reafirmar o uso da quercetina em diversas atividades biológicas, os resultados obtidos por Willain Filho (2005) mostram que ela apresenta uma importante ação antinociceptiva quando administrada via intraperitoneal e oral em camundongos, destacando-se sua marcada e prolongada ação contra a dor induzida por ácido acético, quando administrada intraperitonealmente. Em comparação com analgésicos tradicionais, a quercetina mostrou ser de três a quatro vezes mais potente do que a aspirina e o paracetamol em mesmo modelo de dor.

2.6 Quinonas

2.6.1 Aloina e emodina

As quinonas naturais são de vital importância para vegetais superiores, artrópodes, fungos, líquens, bactérias, algas e vírus. Devido a essa distribuição em variados organismos, suas funções biológicas são múltiplas, agindo de forma notável em seus diversos ciclos bioquímicos (SILVA *et al.*, 2003).

Em estudos farmacológicos, as quinonas mostram variadas atividades, dentre elas as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas. Uma atividade marcante é a inibição do complexo das topoisomerasas, o que provoca o início da apoptose celular e, conseqüentemente, tem despertado a atenção na criação de estratégias para o combate de neoplasias, principalmente relacionadas ao câncer de próstata (SILVA *et al.*, 2003).

Baseado na estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular (SILVA *et al.*, 2003).

De acordo com Cichewicz *et al.* (2004), numerosas antraquinonas têm sido relatadas como inibidoras de células tumorais e têm sido usadas clinicamente como agentes anticâncer.

Plantas do gênero *Aloe* têm sido tradicionalmente aplicadas na prática medicinal por milhares de anos em várias culturas do mundo e fazem parte do uso popular como tratamento cosmético e fitoterapêutico, sendo conhecida, nesse gênero, a classe de compostos ativos antraquinona, da qual fazem parte aloina e emodina.

Devido ao fato de plantas e ingredientes botânicos contendo aloina serem amplamente utilizados na medicina tradicional e em produtos vendidos no varejo (suplementos alimentares e cosméticos), suas propriedades toxicológicas têm sido amplamente estudadas (WAMER *et al.*, 2003).

Aloina é identificada como um dos principais compostos do gênero *Aloe*, exibindo efeito antioxidante significativo em concentrações de 0,38 a 0,92 µg/mL, através de ensaio de quimioluminescência (TIAN; HUA, 2005).

Resultados obtidos na avaliação de sucos de folhas das espécies *Aloe ferox* Miller e *Aloe arborescens* Miller mostraram ser estas capazes de acelerar a progressão do fechamento de ferimentos provocados experimentalmente em ratos e coelhos. A administração tópica das mesmas preparações, possuidoras de aloina, dentre outras substâncias, inibiu o crescimento das quatro linhagens de bactérias testadas, além de mostrarem ser fungitóxicas à espécie *Cryptococcus neoformans* (JIA *et al.*, 2008).

Aloina extraída de *Aloe excelsa*, planta usada no tratamento de vários males cutâneos, estomacais e usada como laxativa, mostrou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo ser comparada a espécies já comercialmente exploradas (COOPOOSAMY; MAGWA, 2006).

Aloina (C₂₁H₂₂O₉) foi testada em linhagens tumorais humanas e mostrou possuir efeito antiproliferativo (NIĆIFOROVIĆ *et al.*, 2007), citotóxico em linhagens de câncer de mama humanas (ESMAT *et al.*, 2006), porém, em células leucêmicas, aloina mostrou ser destituída de atividade antitumoral (GRIMAUDO *et al.*, 1991).

Larvas de *Artemia franciscana* foram expostas ao extrato obtido de gel de *Aloe vera*, contendo aloina e outras antraquinonas e resultou em uma DE₅₀ de 1,44 µg/mL após exposição por 24h (COCK; RUEBHART, 2008).

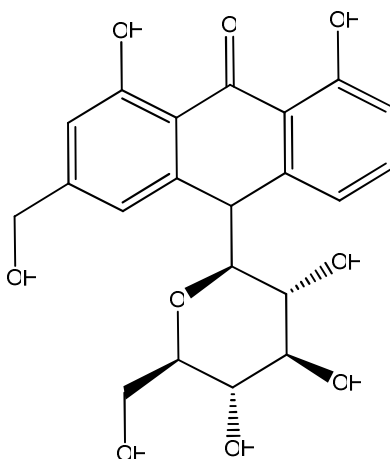


Figura 6 – Estrutura química da aloina.

Emodina ($C_{15}H_{10}O_5$) é uma substância ativa de várias drogas oriundas de ervas laxativas, tais como aloe, senna e ruibarbo (raiz e rizoma de *Rheum palmatum* L.) (WANG *et al.*, 2001), além de ser um corante amplamente distribuído entre fungos e líquens (TEICH *et al.*, 2004). Hidroxiantraquinonas possuem, segundo Wang *et al.* (2001), várias atividades, tais como: antiviral, anticâncer e vasorelaxante.

Yang *et al.* (2003) sugeriram a utilização da emodina como novo agente larvicida de ocorrência natural e ativo sobre larvas dos mosquitos *Aedes aegypti*, *Aedes togoi* e *Culex pipiens pallens*, pois em seu experimento, a substância extraída de *Cassia obtusifolia* apresentou DE_{50} de aproximadamente 1,9; 2,2 e 1,4 mg/L, respectivamente para as espécies citadas. Além disso, um outro resultado encontrado foi que a emodina possui uma potente atividade antimutagênica e uma atividade antigenotóxica muito eficaz (LEE *et al.*, 2005).

A habilidade da emodina se incorporar e atravessar bicamadas fosfolipídicas foi testada por Alves *et al.* (2004) para determinar o coeficiente de partição fosfolipídeo-água usando modelos de membranas. Foi estudada também a eficácia da emodina como antibacteriana e/ou antiviral quando incorporada em membranas fosfolipídicas comparada com a observada na forma livre. A capacidade bacteriostática da emodina em inibir o crescimento de *Escherichia coli* (DH5a) - MIC_{50} - foi de 0,59 $\mu\text{g/mL}$ quando incorporada a lipossomos, enquanto que emodina completamente solubilizada em soluções aquosas em concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ não mostrou atividade, provavelmente devido a sua baixa solubilidade. Emodina pode, ainda, ser considerada um agente viruscida, pois mostrou inibição total sobre vírus VHSV (vírus da septicemia hemorrágica viral) quando adicionado 8h após a infecção (ALVES *et al.*, 2004).

Devido à importância da interrupção no processo de adesão celular na metástase, Huang *et al.* (2006) examinaram o efeito da emodina, mostrando ser a substância uma forte inibidora da adesão nas linhagens humanas: MDA-MB-231 (câncer de mama), HeLa (carcinoma cervical humano), HepG2 (hepatocarcinoma) e HSC5 (carcinoma escamoso de pele), sugerindo que tal efeito não é tipo celular-dependente.

Outro fator importante no desenvolvimento tumoral é a apoptose celular. De acordo com Lee (2001b), a emodina causa morte de células CH27 (linhagem de células cancerígenas escamosas de pulmão) através de apoptose química e receptor-induzida. Em seu trabalho, as alterações morfológicas causadas pela substância foram identificadas em tal linhagem celular: em tratamento de 4h com 13,51 µg/mL de emodina apareceram vesículas nas células e, em 16h, houve um arredondamento e eventual desprendimento das células do substrato.

A citotoxicidade após tratamento das linhagens celulares tumorais humanas: A549 (pulmão), SK-OV-3 (ovário), SKMEL-2 (melanoma), XF498 (sistema nervoso central) e HCT-15 (cólon) foi determinada *in vitro* pelo método SRB através da estimativa da taxa de inibição da proliferação celular depois de contínua exposição, por 48h, à emodina e outras substâncias testadas em triplicata, com cisplatina como controle positivo (LEE *et al.*, 2005). Porém, o mecanismo molecular do efeito quimioterapêutico pronunciado da emodina permanece sem explicação. A determinação do seu modo de ação pode ser importante para o desenvolvimento de sua aplicação (SU *et al.*, 2005).

A emodina e uma série de derivados foram avaliados quanto à atividade antitumoral e afinidade óssea para pesquisa de compostos mais eficientes e menos tóxicos. Todos mostraram afinidades em diferentes graus e, em ensaio MTT, emodina apresentou uma taxa de inibição celular *in vitro*, em células de osteosarcoma, de $24,9 \times 10^{-5}$ mol/L (CHEN *et al.*, 2007).

De forma a corroborar a atividade antitumoral encontrada *in vitro*, Yang *et al.* (2004), em dose de 30 mg/kg/dia, mostraram que a emodina, injetada intraperitonealmente durante 18 dias, possui atividade em camundongo inoculado subcutaneamente com células EC/CUHK1 (linhagem derivada de carcinoma esofágico).

Além disso, dentre quatro antraquinonas, emodina apresentou a atividade supressora mais alta na proliferação celular de seis linhagens de células tumorais (linhagens K562 e Raji – eritroleucemias; VERO; Calu-1 – carcinoma de pulmão humano; HeLa; Wish – linhagem epitelial transformada) testadas por Kuo *et al.* (1997). Tal atividade inibidora no crescimento de células tumorais foi relatada para os compostos presentes na espécie testada: *Polygonum hypoleucum* Owhi, tradicionalmente usada na medicina chinesa.

Outras linhagens susceptíveis à ação da emodina foram mostradas na inibição da proliferação de três linhagens celulares de hepatoma humano, avaliadas pelo ensaio de redução do sal XTT-tetrazólio: HepG2/C3A, PLC/PRF/5 e SK-HEP-1 e que uma alta dose da substância, 16,21 $\mu\text{g/mL}$, resulta na indução de apoptose em células HepG2/C3A (SHIEH *et al.*, 2004).

Lee (2001b) investigou os mecanismos pelos quais aloe-emodina e emodina induzem citotoxicidade em linhagens celulares de carcinoma de pulmão (CH27 e H460) e confirmaram que a atividade antitumoral da emodina é baseada na morte celular por apoptose. A exclusão pelo corante azul de tripan mostrou que a morte celular é significativa na concentração de 13,51 $\mu\text{g/mL}$ e considerada tempo e dose-dependente (0 a 72h de exposição e 0,27 a 13,51 $\mu\text{g/mL}$ de emodina).

Por fim, emodina apresentou uma das características necessárias à função antiangiogênica, inibindo a proliferação de células endoteliais da veia de cordão umbilical humano (HUVECs) (KANESHIRO *et al.*, 2006). Em concentração de 5,4 $\mu\text{g/mL}$ de emodina, houve inibição de 50% do crescimento celular, o que, juntamente com outros estágios angiogênicos principais, incluindo proliferação, migração e formação do tubo, mostraram que a emodina é capaz de inibir tal atividade *in vitro* e também suprimi-la *in vivo*.

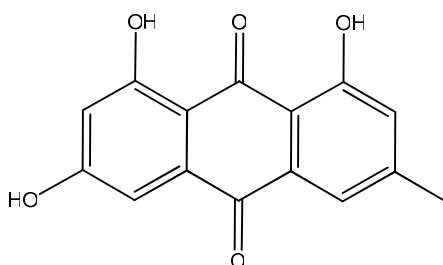


Figura 7 – Estrutura química da emodina.

2.6.2 Lapachol e β -lapachona

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol que pode ser considerado um dos principais representantes do grupo das quinonas das *Tabebuias* (SILVA *et al.*, 2003), planta usada como diurética, adstringente e também como remédio popular na prevenção e tratamento de câncer (FUJIMOTO *et al.*, 1991).

O lapachol ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$) possui a seguinte estrutura química:

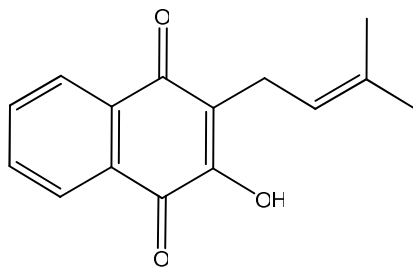


Figura 8 - Estrutura química do lapachol.

De uma maneira geral, lapachol possui uma extensa lista de atividades biológicas: antitumorais, anti-metastática, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória, anti-parasítica, leishmanicida e moluscicida, segundo revisão recente de Hussain *et al.* (2007).

A atividade citotóxica *in vitro* do lapachol contra o carcinoma Ehrlich é reportada por Esteves-Souza *et al.* (2007), através do ensaio da viabilidade celular (MTT), inibindo 30% do crescimento celular a uma concentração de 12,11 µg/mL. Em mesmo estudo, derivados da substância comprovaram ser inibidores de crescimento, dose-dependente, de células leucêmicas K562. Em tumor sólido Walker 256 (carcinosarcoma), lapachol mostrou uma redução de 92% no crescimento do tumor quando administrado oralmente em ratos em dose diária de 150 mg/kg (LINARDI *et al.*, 1975).

O sal de potássio de lapachol é um moluscicida ativo sobre massas de ovos de *Biomphalaria glabrata* (caramujo que participa do ciclo de vida do parasita transmissor da esquistossomose), porém, consideravelmente menos tóxico a *Tilapia nilotica*, em ensaio piscicida. Também, lapachol mostrou ser um ativo cercaricida (concentração de 2 µg/mL) sobre *Schistosoma mansoni*, matando 90% das cercárias de ratos infectados intraperitonealmente (LIMA *et al.*, 2002).

Derivados nitrogenados sintéticos do lapachol tiveram suas ações sobre larvas de *Aedes aegypti*, *A. salina* e células tumorais de mama (linhagem A549) comparados por Oliveira *et al.* (2002). Este trabalho mostrou ser o lapachol o mais ativo larvicida de *Aedes aegypti* e sobre larvas de *A. salina*.

Lima *et al.* (2004) conduziram um estudo para avaliar a atividade *in vitro* do lapachol e análogos sobre duas espécies de *Leishmania*: *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Tais substâncias apresentaram CI_{50} variando entre 1,6±0,0 a 7,8±0,3 µg/mL para a primeira espécie e 3,4±0,5 a 54,0±9,0 µg/mL para a segunda. O derivado acetilisolapachol mostrou ser o mais ativo *in vivo* em camundongos suíços infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis*.

e *in vitro* sobre *L. braziliensis* e não ser prejudicial à célula hospedeira, em concentração equivalente à CI_{50} para a espécie.

Lapachol mostrou, ainda, um efeito citotóxico significativo como um potencial herbicida, causando um efeito fitotóxico sobre o sistema radicular de plantas de *Hyptis suaveolens* (71,43%) em bioensaios em vasos (FERREIRA *et al.*, 2000).

Devido a sua atividade antitumoral, o lapachol é um candidato ideal a modificações sistemáticas para um melhor entendimento da sua relação estrutura-atividade e, eventualmente, desenvolvimento de análogos com melhor atividade biológica (HUSSAIN *et al.*, 2007).

Estudos conjuntos de lapachol e β -lapachona podem ser encontrados na literatura, como o de Salas *et al.* (2008), no qual as duas substâncias, em conjunto com alguns derivados, foram avaliadas quanto à inibição de crescimento de formas epimastigotas (formas replicativas presentes no tubo digestivo do inseto vetor) de *Trypanosoma cruzi*, apresentando CI_{k50} (concentração necessária para diminuir a constante de crescimento em 50%) de $7,6 \pm 2,42 \times 10^{-3}$ e $5,1 \times 10^{-2} \pm 2,42 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A viabilidade de formas tripomastigotas (formas encontradas no sangue de mamíferos e que são, portanto, alvo de drogas anti-chagásicas) foi expressa em porcentagem de viabilidade em relação ao controle (100% de tripomastigotas viáveis) e foram: 41,7% em tratamento com lapachol e 4,8% com β -lapachona em concentrações equivalentes às encontradas para CI_{k50} .

O efeito do lapachol em metástase experimental de células de melanoma murino B16BL6 no pulmão de ratos sugere que altas doses da substância (80 e 100 mg/kg) promovem metástase. Porém, baixas doses de lapachol (0,5; 5; 10 e 20 mg/kg) administrado oralmente inibiram de maneira fraca, mas ainda significativamente a metástase, sugerindo um possível uso como agente anti-metastático (MAEDA *et al.*, 2008).

De acordo com Silva *et al.* (2003), em seu trabalho de revisão, as quinonas estão distribuídas em vários organismos, o que poderia explicar as múltiplas funções biológicas e a ação em diversos ciclos bioquímicos. Algumas quinonas possuem atividade antibiótica e antitumoral já usadas clinicamente, sendo citada como exemplo de formas isoméricas que diferem quanto às propriedades físicas, químicas e atuação biológica, uma outra naftoquinona, a β -lapachona, a qual possui atividade pronunciada sobre *Trypanosoma cruzi*, contrariamente ao seu isômero natural, a α -lapachona.

A β -lapachona é uma orto-naftoquinona obtida do ipê (*Tabebuia* sp.), nativa da América Central e do Sul (HUSSAIN *et al.*, 2007). Possui a fórmula química $C_{15}H_{14}O_3$ e a seguinte estrutura química:

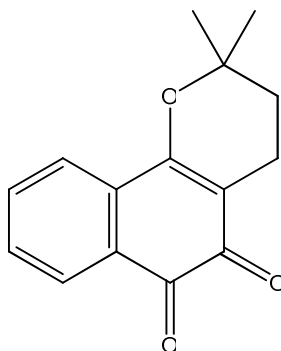


Figura 9 - Estrutura química da β -lapachona.

Em seu trabalho de revisão sobre as atividades biológicas de lapachol e β -lapachona, Hussain *et al.* (2007) relatam suas atividades antiangiogênica, antiinflamatória e antitumoral.

β -lapachona tem demonstrado atividade antineoplásica significativa sobre linhagens celulares de câncer humano, em concentrações na faixa de 0,24 a 2,42 $\mu\text{g/mL}$ (valores de CI_{50}) quando utilizada isoladamente (ABREU *et al.*, 2007). Tal atividade pode ser atribuída ao seu caráter lipofílico (SCHAFFNER-SABBA *et al.*, 1984), um facilitador da passagem através da membrana celular.

O alto grau de seletividade da β -lapachona, a qual induz apoptose em células transformadas, mas não interfere na proliferação de células normais (linfócitos estudados), é reportado por Li *et al.* (2003), mostrando não ser esta um agente antiproliferativo geral, uma propriedade não compartilhada por agentes quimioterápicos convencionais. A β -lapachona induz também apoptose em células MCF-7 (WUERZBERGER *et al.*, 1998).

O efeito citotóxico da β -lapachona no crescimento de células de hepatocarcinoma (linhagens HepG2 e Hep3B) foi determinado através do ensaio MTT. Tal estudo identificou ser a β -lapachona forte inibidora da proliferação celular, de maneira dose-dependente e, ainda, numa concentração de 0,85 $\mu\text{g/mL}$, retardatória da motilidade celular nas linhagens estudadas, demonstrado em experimento de cicatrização de ferimento *in vitro*, indicando um potencial supressor de metástase e divisão celular (KIM *et al.*, 2007).

A forma de atuação *in vitro* da β -lapachona no ciclo celular foi evidenciada por Kumi-Diaka (2002) através da ação sinérgica de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ da substância com uma concentração de genisteína (isoflavona) variando entre 0 e 70 $\mu\text{g/mL}$ em linhagens tumorais de próstata (PC3 e LNCaP). β -lapachona age nos pontos de checagem G1 e S do ciclo celular. Tanto em tratamento isolado ou combinado, β -lapachona inibiu o crescimento e diminuiu a

sobrevivência das linhagens celulares, determinado por ensaio MTT após 48h de incubação com a substância em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. A porcentagem de células mortas atingiu seu ápice numa concentração de 0,73 µg/mL.

β-lapachona foi utilizada em frangos infectados intraperitonealmente com vírus do sarcoma de Rous (31,3 ou 15,6 mg/kg, via oral) e mostrou-se que houve um prolongamento significativo do tempo de sobrevivência dos animais, bem como com a administração da β-lapachona (125 mg/kg, via oral, por cinco dias por semana durante quatro semanas) em ratos Balb/c infectados com vírus da leucemia Rauscher. Entretanto, uma dose mais elevada de 250 mg/kg via oral causou encurtamento do tempo de sobrevivência e aumento no número de células sanguíneas leucêmicas (SCHAFFNER-SABBA *et al.*, 1984).

Rinacantona, uma 1,2-piranonaftoquinona e um derivado de 1,4-furanonaftoquinona mostraram-se ativas frente a linhagem celular Hela (carcinoma cervical humano). A β-lapachona é uma 1,2-naftoquinona estruturalmente relacionada à rinacantona, o que explicaria a atividade antitumoral dessas substâncias e seus derivados pelos mesmos mecanismos de ação (apoptose por inibição da DNA topoisomerase I e II) (KONGKATHIP *et al.*, 2003).

No estudo de Gupta *et al.* (2002), foi demonstrado, através de ensaio MTT, que a β-lapachona (concentração 2,4 µg/mL) possui uma atividade antitumoral significativa (CI₅₀ = 0,97-1,94 µg/mL) em linhagens quimiosensíveis a dexametasona, quimioresistentes e de pacientes primários de melanoma múltiplo. Essa forte atividade elege a β-lapachona como controle positivo em ensaios com linhagens cancerígenas (HAYASHI *et al.*, 2004).

A CI₅₀ da β-lapachona (controle positivo) em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e a concentração citotóxica que levou à morte de 50% das células VERO (linhagem celular de mamífero) foram estudadas para comparar os valores com os encontrados para derivados da substância. Os parasitas e as células foram incubados com os compostos variando em concentrações de 12,11 a 7,3x10⁻² µg/mL e os valores experimentais encontrados foram: CI₅₀ igual a 0,22 µg/mL para a atividade tripanocida e < 0,75 µg/mL para a atividade citotóxica celular, corados com cristal violeta (FERREIRA *et al.*, 2006).

De acordo com os dados observados durante o levantamento bibliográfico, os produtos naturais perfazem uma fonte promissora de novos compostos antitumorais, sendo alvo de diversas pesquisas quanto a outras diversas formas de atividades biológicas. Uma contextualização da atual situação destas pesquisas é apresentada a seguir.

2.7 Produtos naturais e o câncer na atualidade

Nas últimas décadas ocorreu um aumento significativo da expectativa de vida mundial, principalmente de países desenvolvidos, o que resulta em um aumento da população idosa. Este fenômeno, considerado um dos responsáveis pela maior ocorrência de diversos tipos de câncer, como observado por Jemal *et al.* (2006), coloca a doença como a causa principal das mortes entre mulheres de 40 a 79 anos de idade e entre homens de 60 a 79 anos.

Os fármacos existentes para o tratamento do câncer ainda apresentam efeitos farmacológicos moderados e um alto índice de efeitos colaterais, o que é um reflexo do baixo índice terapêutico observado para esta classe de compostos. Além disso, de acordo com a Agência Reguladora Americana - FDA, para alguns tipos de câncer existe apenas uma opção terapêutica disponível, como no caso do câncer de rim, que é tratado classicamente com doxorrubicina, e de melanoma, tratado com Interferon alfa-2b adjuvante ao tratamento cirúrgico (US Food and Drug Administration, 2008), acarretando, em caso de insucesso do tratamento ou rejeição por parte do paciente, na morte deste. Assim, a necessidade pela busca de novos compostos com atividade antineoplásica torna-se uma necessidade premente.

Em uma revisão realizada por Newman e Cragg (2007), reafirmada por Brower (2008) e Gordaliza (2007) foi observado que entre os fármacos para o tratamento do câncer, aproximadamente 60% são derivados de produtos naturais, sendo que mais de cem compostos obtidos a partir destes, estão, atualmente, em ensaios clínicos e pelo menos cem projetos similares estão em desenvolvimento pré-clínico (HARVEY, 2008), mostrando a importância desta classe de compostos na busca de outros para o tratamento de câncer. Neste contexto, o Brasil apresenta-se como um importante celeiro para busca de novos fármacos, pois se encontra entre os países de maior biodiversidade mundial. Porém, este potencial ainda não é totalmente explorado devido ao fato de diversos grupos de pesquisa que trabalham com produtos naturais, não possuírem infra-estrutura para realizar ensaios citotóxicos clássicos utilizando a avaliação em cultura de células. Assim, o estabelecimento de uma correlação mais clara entre a atividade citotóxica em *A. salina* e o ensaio com células tumorais para substâncias puras naturais, visa fornecer uma maior segurança na busca de novos protótipos para o tratamento do câncer. Por ser o primeiro um ensaio simples, de baixo custo, de fácil implementação e com uso de um organismo vivo e o segundo de caráter complexo, com técnicas dispendiosas que exigem treinamento para manuseio de equipamentos e execução de metodologia detalhada, uma avaliação aprofundada desta correlação possibilita uma economia de tempo, material utilizado e quantidade de substância necessária. Além disso, torna possível a execução deste *screening* inicial por diversos grupos de pesquisa brasileiros, os quais se

encontram distribuídos por todo o território nacional e exploram diferentes biomas que compõe nossa flora, aumentando consideravelmente a possibilidade de descoberta de novos fármacos com potentes atividades antineoplásicas e gerando divisas para o país através da exploração racional da biodiversidade brasileira.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Correlacionar qualitativa e quantitativamente a concentração letal necessária no teste citotóxico em *A. salina* e a concentração inibitória para o crescimento de linhagens celulares tumorais, utilizando dez substâncias puras previamente conhecidas, pertencentes a três classes diferentes de produtos naturais.

3.2 Objetivos Específicos

Confirmar o ensaio da *A. salina* como indicador da existência de atividade antitumoral.

Determinar a DE_{50} de dez substâncias em ensaio com *A. salina* e a CI_{50} para duas linhagens celulares tumorais em ensaio antitumoral através do método da sulforrodamina B.

Determinar a existência de uma correlação qualitativa e quantitativa entre o bioensaio de *A. salina* e o ensaio biológico antitumoral.

Estabelecer a relação qualitativa e quantitativa da DE_{50} para as larvas de *A. salina* e a CI_{50} para o crescimento das duas linhagens de células tumorais testadas.

4 METODOLOGIA

4.1 Drogas

Duguetina foi obtida através da extração alcaloídica da casca do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae) conforme metodologia descrita em Silva *et al.* (2007).

Boldina, aloina, emodina, quercetina e rutina foram adquiridas comercialmente como padrões Sigma-Aldrich.

Lapachol e β -lapachona foram extraídos da espécie *Tabebuia serratifolia* e gentilmente cedidos pelo Laboratório do professor Dr. Delio Soares Raslan, Departamento de Química - ICEX - da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, sendo a β -lapachona obtida por síntese a partir do lapachol.

Os dois alcalóides *N*-nitrosos (*N*-nitrosoanonaina e *N*-nitrosoxilopina) avaliados foram obtidos segundo metodologia descrita em Carollo *et al.* (2006).

4.2 *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* foi conduzido segundo metodologia descrita por Siqueira (1999), adaptada quanto à quantidade de ovos de *A. salina* para cada litro de solução salina e quanto às concentrações testadas.

A solução marinha foi preparada utilizando-se sal marinho sintético (Marinemix – Marine Enterprises International Inc.) e água destilada (38 g de sal/litro de água), sendo esta dividida em duas partes, uma para a eclosão dos ovos e a outra para a preparação das diluições das substâncias-teste, com pH variando entre 8-9. Em um litro de solução salina acondicionado em uma cuba de vidro foi adicionado aproximadamente 80 mg de ovos comerciais de *A. salina* (Maramar), submetidos a um choque de luz com lâmpada de 100 W, por duas horas. O sistema foi mantido em temperatura ambiente por mais 46h, protegido de poeira e insetos e aerado com uso de aerador comercial para aquário. O restante da solução salina foi acondicionado em outro recipiente e também submetido às mesmas condições de iluminação, temperatura e aeração (Figura 10).

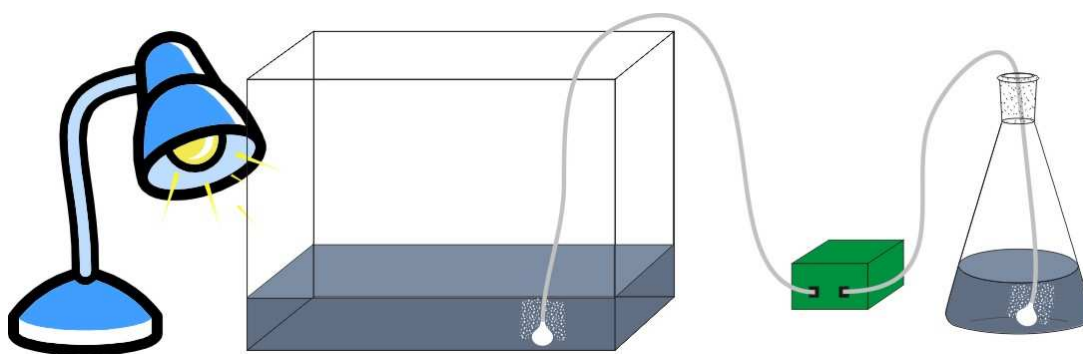


Figura 10 – Esquema do ensaio de citotoxicidade em *A. salina*

Sulfato de quinidina (controle positivo) - $DE_{50} = 215 \mu\text{g/mL}$ (MEYER *et al.*, 1982) e as substâncias avaliadas foram solubilizadas em DMSO 1% e acrescentada a solução salina aerada de forma a obter as seguintes concentrações: 250 $\mu\text{g/mL}$; 125 $\mu\text{g/mL}$; 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e 31,25 $\mu\text{g/mL}$. Tais concentrações foram inferidas pelos experimentos de Siqueira (1999) em estudo com extratos, óleo volátil e substâncias puras obtidas de *Duquetia glabriuscula* e *Unonopsis lindmanii*. O controle negativo foi feito com solução salina e DMSO 1%. Substâncias com baixa solubilidade foram levadas ao banho-maria e ultrassom.

Para cada diluição foram montadas triplicatas, sendo em cada frasco transparente de 10 ml adicionadas, com auxílio de uma pipeta Pasteur, dez larvas de *A. salina* em sua fase náuplio e 3 ml da diluição a ser testada. Um foco de luz produzido por lâmpada de 100 W (devido ao fototropismo positivo do microcrustáceo) e fundo escuro para contraste foram utilizados na transferência das larvas para o frasco-teste. Os frascos foram distribuídos aleatoriamente em uma bandeja e mantidos por 24h em temperatura e iluminação ambientes e protegidos de poeira e insetos.

Após tal período foi realizada a leitura com auxílio de lupa, foco de luz e fundo escuro de contraste, considerando-se mortos aqueles microcrustáceos que não se movimentaram durante a observação e nem com a leve agitação do frasco.

Todo o experimento foi conduzido no laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS.

Os resultados foram analisados através do programa Probitos para determinação da dose efetiva para matar 50% das larvas, com intervalo de confiança de 95%.

4.3 Ensaio antitumoral

O ensaio SRB é adotado pelo National Cancer Institute para avaliações em larga escala e descoberta de novas drogas antitumorais (NCI, 2008).

A inibição do crescimento celular, um indicador da citotoxicidade, causada pelos compostos que estão sendo avaliados quanto à atividade antineoplásica, foram visualizados em células Hep₂ (ATCC-CCL-23, de carcinoma de laringe) adquirida do Instituto Adolpho Lutz (São Paulo, SP), e B16-F10 (ATCC-CRL-6322, de células de melanoma) doada pelo Dr. Auro Nomizo, Prof. Dr. da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. As células foram cultivadas em frascos estéreis de 25 cm² na presença de meio de cultura, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's) para a linhagem Hep₂ e RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) para B16-F10, ambos contendo 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina; 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina (meio completo) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com CO₂ (5%). Foi utilizado microscópio invertido da ZEISS (Modelo Axiovert 25) em aumento de 400x para a observação do crescimento das células.

Uma vez que estas células são aderentes, é necessário fazer a remoção das mesmas com a solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos de 15 ou 50 mL contendo respectivos meios de cultura completo, de acordo com a linhagem testada. Após centrifugação a baixa rotação, o meio e tripsina foram desprezados e as células ressuspensas em pequeno volume de meio completo. Foi feita a contagem com uma alíquota dessas células em uma câmara de Neubauer para que em cada cavidade da placa de 96 poços fosse depositado um volume de 100 µL de meio contendo 10.000 ou 12.000 células, respectivamente para Hep₂ e B16 (100.000/mL ou 120.000/mL).

Após 20h, para permitir a fixação das células semeadas, o meio foi aspirado para a adição dos compostos a serem avaliados. Uma alíquota destes compostos, previamente dissolvidos em DMSO, foi diluída em meio de cultura, de tal forma que a concentração final do solvente (DMSO), não excedesse 0,5%. Foram utilizadas quatro concentrações de cada composto (entre 0,25 e 50 µg/mL), sendo cada concentração adicionada em três cavidades (triplicata). Para o controle negativo, as células cresceram na ausência de qualquer composto e contendo somente meio de cultura com DMSO 0,5% (o solvente utilizado para dissolver os compostos-teste). Em todos os testes foi utilizado um controle positivo, Cisplatina [cis-diclorodiamino-platinum (II)] da Sigma.

Todas as placas foram novamente mantidas na mesma incubadora a 37 °C e CO₂ 5%, até o final do período de exposição das células aos compostos-teste (48h).

O teste de citotoxicidade adotado baseia-se na coloração das proteínas, pelo corante SRB (Sigma). Este corante possui dois grupos sulfônicos e liga-se às proteínas das células fixadas na placa, que são precipitadas pelo ácido tricloroacético (TCA – Sigma). Após 48h, o meio foi removido e substituído por 100 µL de TCA 20%. As placas foram incubadas por meia hora a 4°C, em geladeira e, posteriormente, o TCA foi removido e as placas lavadas cinco vezes com água corrente. Após secagem ambiente, adicionou-se 50 µL de SRB 0,1% (diluído em ácido acético 1%) e novamente incubadas por meia hora em temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a remoção da solução de SRB, as placas foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1%, secas e foi adicionada Tris Base 10mM (Sigma). Em seguida, foram submetidas a uma agitação de dez minutos para a dissolução das proteínas coradas e a absorbância medida a 540 nm em leitor de microplacas.

A absorbância encontrada para o controle negativo correspondeu ao valor de 100% de sobrevivência. Como parâmetro para a citotoxicidade, foi utilizado o valor da CI₅₀, que representa a atividade antineoplásica das substâncias testadas. A CI₅₀ e o limite de confiança de 95% foram determinados em programa PROBITOS (FINNEY, 1971), a partir das diferenças de leituras de absorbância entre o controle negativo (sem tratamento) e o composto-teste (com tratamento). Os resultados expressos como média, resultam de dois ou três experimentos independentes.

Todo o experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia Molecular e Cultura Celular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Artemia salina*

A dose efetiva para matar 50% das larvas de *A. salina* destaca quatro, das dez substâncias testadas, como tóxicas à *A. salina* (Tabela 1), sendo três pertencentes à classe das quinonas e a de melhor atividade à classe dos alcalóides.

Tabela 1 – Dose efetiva (DE₅₀) de dez substâncias e dos controles positivos em ensaio de toxicidade em *A. salina* com intervalo de confiança de 95% determinado pelo programa Probitos.

Substância	DE ₅₀ (µg/mL)*	Intervalo de confiança 95% (µg/mL)
duguetina	20,8	9,80 – 44,09
boldina	>250	-
N-nitrosoanonaina	>250	-
N-nitrosoxilopina	>250	-
rutina	>250	-
quercetina	>250	-
aloína	>250	-
emodina	25,1	17,85 – 35,27
lapachol	137,8	113,07 – 167,97
β-lapachona	72,7	62,42 – 84,67
cisplatina	110,5	87,2 – 140,0
sulfato de quinidina	169,8	109,79 – 262,65

*DE₅₀: Dose efetiva para matar 50% das larvas de *A. salina* (µg/mL)

O ensaio da *A. salina* é comumente utilizado para avaliação da atividade de extratos vegetais (clorofórmico, metanólico, dentre outros) e substâncias puras, como verificado em Moreira *et al.* (2003). Já em 1982, Meyer *et al.* procuravam um teste geral que detectasse um largo espectro de atividades farmacológicas em plantas superiores e que pudesse ser aplicado por químicos de produtos naturais a um preço baixo, de forma simples e que guiasse *screenings* fitoquímicos e fracionamento de extratos. Assim, começaram a usar o microcrustáceo *A. salina* como um instrumento de bioensaio geral em sistema zoológico e indicativo de atividades farmacológicas específicas, fato este demonstrado pelos resultados encontrados nas Tabelas 1 e 2.

Tal ensaio da letalidade do microcrustáceo continuou a ser empregado em *screenings* e é considerado, hoje, como uma ferramenta útil na avaliação preliminar da citotoxicidade (MOJICA E MICOR, 2007). Além do seu uso na detecção da poluição aquática e em

micologia experimental e aplicada, seu uso é difundido na avaliação de extratos brutos, isolamento de compostos ativos, testes de toxicidade geral de compostos naturais puros e fracionamentos sem bioatividade guiada ou usando outro organismo-teste (CEPLEANU, 1993).

Para os testes biológicos em ratos, *A. salina* e antimicrobiano, as duas substâncias puras avaliadas por Lu *et al.* (2001) - praeruptorinas A e B - foram dissolvidas em DMSO a 5%, já que DMSO não interferiu nas respostas biológicas em testes preliminares. Porém, em nossos testes optamos pela concentração máxima de 1% de DMSO para dissolução das substâncias, evitando um possível resultado falso positivo.

Em trabalho de Siqueira *et al.* (1998) foi observada a validade e confiabilidade do bioensaio da *A. salina*, onde a toxicidade de frações de *Unonopsis lindmanii*, acusada por tal teste, convergiu para aquelas que continham substância reconhecidamente ativa sobre células tumorais *in vitro*. O ensaio da *A. salina* não é específico como indicativo antitumoral ou para qualquer ação fisiológica em particular, mas pode ser usado no monitoramento do fracionamento de extratos, como citado por Meyer *et al.* (1982), os quais mostraram que 18 extratos de sementes de 41 espécies de plantas da família Euphorbiaceae apresentaram citotoxicidade sobre as larvas do microcrustáceo. Porém, apenas seis espécies foram ativas sobre linhagem tumoral e, destas, somente duas mostraram atividade significativa. Portanto, as substâncias com $DE_{50} \leq 250 \mu\text{g/mL}$ calculadas em nosso experimento podem indicar a existência de outras atividades biológicas.

Dentre as dez substâncias testadas, cinco apresentaram DE_{50} maior que $250 \mu\text{g/mL}$: boldina, *N*-nitrosoanonaina, *N*-nitrosoxilopina, rutina e aloina. Dentre as três substâncias já conhecidas e estudadas na literatura, a boldina, tida como antioxidante (SPEISKY; CASSELS, 1994), é encontrada nas folhas de boldo, usado segundo o conhecimento popular contra males de estômago, fígado e como diurético. A ausência de citotoxicidade em um sistema biológico mostra a tolerância do organismo ao princípio ativo encontrado nas folhas da espécie.

Rutina é um flavonóide glicosilado com dois açúcares em sua estrutura molecular, o que a torna mais solúvel em água. Isso leva a uma característica de alta hidrofiliabilidade e uma fraca incorporação nas membranas celulares dos organismos testados (MATSUO *et al.*, 2005). Como possuidor de atividade antioxidante (NG *et al.*, 2000), sendo encontrado em frutas e verduras, como a maioria dos flavonóides, e sendo comercializado para o tratamento de distúrbios circulatórios (ZUANAZZI; MONTANHA 2007), é esperado que seu efeito tóxico aconteça em concentrações muito elevadas de administração da substância.

Como observado por estudos científicos e pela medicina popular, plantas do gênero *Aloe* são muito exploradas quanto aos seus aspectos farmacológicos, cosméticos e venda como suplemento alimentar (WAMER *et al.*, 2003). Isso faz da ausência da atividade em *A. salina*, uma característica desejável para assegurar o seu uso em doses moderadas em sistemas biológicos mais complexos.

N-nitrosoxilopina e *N*-nitrosoanonaina foram isoladas das partes aéreas de *Duguetia furfuracea* por Carollo *et al.* (2006) e suas características biológicas necessitam de maiores estudos para que se possa afirmar se sua ausência de atividade em *A. salina* é desejável para a aplicação dessas substâncias em outros tipos de atividades.

A ausência de atividade das cinco substâncias nas concentrações testadas ($DE_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$) mostram uma inviabilidade no uso destas como agente tóxico em determinadas atividades biológicas, como por exemplo, como uma potencial substância larvicida, já que sua eficiência fica muito abaixo do controle positivo. Porém, tal inatividade sugere uma boa tolerância *in vivo*, possibilitando sua exploração em outras atividades e mostrando uma segurança na sua administração. Stefanello *et al.* (2006) encontraram uma ausência de citotoxicidade de extratos brutos das folhas, cascas do caule e ramos de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* em éter de petróleo, diclorometano e etanol frente a *A. salina*. Tal ausência é, segundo os autores, um indicador de que a planta pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico e que a espécie avaliada, usada tradicionalmente contra doenças respiratórias é uma planta não tóxica.

Quatro substâncias apresentaram uma DE_{50} mais baixa que o controle positivo – sulfato de quinidina ($169,8 \mu\text{g/mL}$): duguetina, emodina, β -lapachona e lapachol. Dentre estas, destaca-se a duguetina, obtida de uma planta típica da região do Cerrado, a espécie *Duguetia furfuracea* e, portanto, forte candidata a estudos mais detalhados de suas atividades biológicas. Sua dose efetiva mostrou ser cerca de oito vezes menor que o sulfato de quinidina para matar 50% dos microcrustáceos. Dada a sua importância como invasora de pastagens (SILVA *et al.*, 2007) e interesse de plantas da família a qual ela pertence (família Annonaceae), fonte de acetogeninas e outros alcalóides, sua atividade em *A. salina* em concentrações baixas oferece subsídio à execução de ensaios biológicos mais específicos.

A segunda substância mais ativa foi emodina, possuidora de atividade larvicida sobre *Aedes* sp. e *Culex* sp. (YANG *et al.*, 2003) dentre outras já relatadas na literatura. Já para lapachol e β -lapachona, suas atividades frente ao microcrustáceo eram esperadas, pois ambas possuem relatos de variadas atividades biológicas, dentre elas a antitumoral (ESTEVES-

SOUZA *et al.*, 2007; MAEDA *et al.*, 2008; KUMI-DIAKA *et al.*, 2002; ABREU *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007).

Como forma de comprovar a correlação de atividade em ambos os testes, a cisplatina (controle positivo do ensaio antitumoral) foi utilizada em ensaio em *A. salina*. O resultado encontrado para a substância ($DE_{50} = 110,5 \mu\text{g/mL}$) indicou uma melhor atividade desta do que o controle positivo tradicionalmente usado frente ao microcrustáceo – sulfato de quinidina – que apresentou $DE_{50} = 169,8 \mu\text{g/mL}$, conforme dados da Tabela 1. Quando comparada quantitativamente aos resultados da substância como controle positivo nas duas linhagens avaliadas no ensaio antitumoral, cisplatina apresentou uma DE_{50} de aproximadamente dez vezes e meia a setenta e nove vezes maior em *A. salina* do que sua CI_{50} em Hep2 e B16-F10, respectivamente (Tabela 2, p. 55). Tais comparações afirmam a existência de uma correlação qualitativa entre os testes, porém não estabelece um padrão de correlação quantitativa entre ambos, o que dificulta uma possível previsão da dose necessária para atividade em linhagens de células tumorais partindo-se de doses efetivas encontradas para *A. salina* e vice-versa.

A possibilidade de se prever uma atividade específica de uma determinada substância a partir de um bioensaio geral facilita o direcionamento de estudos de prospecção de novas drogas. Portanto, a existência de uma correlação positiva entre um ensaio simples e de baixos custos e um segundo, mais complexo, dispendioso e específico permite uma avaliação prévia daquelas substâncias que devem ou não seguir em estudos mais aprofundados, fazendo com que os que apresentarem uma atividade detectável pelo primeiro sejam alvo de um segundo bioensaio. Além dessa correlação qualitativa, a existência de uma correlação quantitativa levaria a uma economia de material, tempo e uma maior praticidade na previsão de concentrações efetivas/inibitórias a serem testadas.

Em nosso trabalho, para comprovação da existência de uma correlação qualitativa entre o teste de *A. salina* com um outro ensaio biológico, procedeu-se ao teste antitumoral SRB, mais específico e tido como uma técnica mais cara e complexa (MEYER *et al.*, 1982).

5.2 Ensaio antitumoral

De acordo com Henriksson *et al.* (2006), cisplatina é uma droga quimioterápica alquilante usada contra vários tipos de câncer e, especificamente contra tumores de cabeça e pescoço. Pode ser usada em combinação com outras drogas ou com a radioterapia para atingir

o tratamento curativo, sendo por esses motivos eleita controle positivo neste ensaio antitumoral.

As concentrações inibitórias de cada substância testada variaram de acordo com a linhagem de células tumorais, não sendo possível afirmar que uma maior concentração é necessária para inibir o crescimento da linhagem B16-F10 ou de Hep₂, levando-se em conta a diferença de CI₅₀ encontrada para o controle positivo (Tabela 2) em B16 (1,4 µg/mL) e Hep₂ (10,5 µg/mL).

Tabela 2 - Concentração inibitória (CI₅₀) de dez substâncias e do controle positivo em células humanas neoplásicas, linhagens B16-F10 e Hep₂ em período de incubação de 48h, e intervalos de confiança.

Substância	CI ₅₀ (µg/mL)**	
	Atividade em B16-F10	Atividade em Hep ₂
duguetina	10,7 (10,2 - 11,1)	7,1 (6,6 - 7,7)
boldina	>50	>50
N-nitrosoanonaina	>50	>50
N-nitrosoxilopina	31,9 (28,7 - 36,2)	36,1 (33,1 - 39,3)
rutina	47,0 (44,6 - 49,6)	38,7 (37,0 - 40,3)
quercetina	6,5 (6,3 - 6,9)	18,9 (17,4 - 20,6)
aloina	45,6 (36,7 - 56,7)	38,4 (37,1 - 39,9)
emodina	2,2 (1,9 - 2,5)	1,7 (1,5 - 1,8)
lapachol	9,5 (8,7 - 10,5)	10,5 (9,6 - 11,5)
β-lapachona	0,7 (0,65 - 0,75)	0,3 (0,29 - 0,32)
cisplatina	1,4 (1,3 - 1,5)	10,5 (9,4 - 11,7)

** CI₅₀: Concentração que inibe 50% do crescimento celular (µg/mL)

β-lapachona possui comprovada atividade antitumoral (WUERZBERGER *et al.*, 1998; GUPTA *et al.*, 2002; ABREU *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007). Dentre as dez substâncias testadas pode-se atribuir a melhor atividade antitumoral à β-lapachona, mostrando ser esta a única com melhor atividade que a cisplatina - duas vezes superior à ela - em linhagem B16-F10. Em linhagem Hep₂, quatro substâncias mostraram-se tão ou mais eficazes que o controle positivo, destacando-se, mais uma vez, a β-lapachona, com uma CI₅₀ trinta e cinco vezes menor que o mesmo.

Duguetina, que apresentou a melhor atividade em *A. salina* destacou-se, desta vez, em atividade sobre Hep₂, com uma CI₅₀ quase uma vez e meia menor que cisplatina. Sua atividade foi, ainda, superior à do lapachol, relatado na literatura como citotóxico sobre carcinoma (ESTEVESSOUZA *et al.*, 2007), redutor do crescimento de tumor sólido (LINARDI *et al.*, 1975) e possível agente antimetastático (MAEDA *et al.*, 2008).

A atividade citotóxica *in vitro* do lapachol sobre o carcinoma Ehrlich é reportada por (ESTEVE-SOUZA *et al.*, 2007), através do ensaio da viabilidade celular MTT, inibindo 30% do crescimento celular a uma concentração de 12,11 µg/mL. Em mesmo estudo, derivados da substância comprovaram ser inibidores de crescimento, dose-dependente, de células leucêmicas K562 e também de carcinoma Ehrlich. Em tumor sólido Walker 256 (carcinosarcoma), lapachol mostrou uma redução de 92% no crescimento do tumor quando administrado oralmente em ratos em dose diária de 150 mg/kg (LINARDI *et al.*, 1975).

Algumas drogas podem alterar a adesão celular, mas sem, no entanto, matar as células (PAPAZISIS *et al.*, 1997). Emodina mostrou que seu efeito inibidor da adesão celular de linhagens tumorais não é tipo-dependente (HUANG *et al.*, 2006), além de ser indutora de apoptose (LEE, 2001a) e citotóxica (LEE *et al.*, 2005) sob condições semelhantes às aplicadas em nosso experimento. Sua concentração inibitória neste trabalho foi cerca de seis vezes menor que cisplatina, em linhagem Hep₂.

N-nitrosoanonaina juntamente com boldina apresentaram CI₅₀ maior que 50 µg/mL, mostrando ser a última uma substância inativa tanto nas linhagens tumorais por nós testadas como em células VERO usadas por Boustie *et al.*, 1998. Assim, boldina, considerada o principal alcalóide das folhas do boldo (*Peumus boldus*) (Ruiz *et al.*, 2008) não oferece riscos às células sadias em doses terapêuticas e não possui atividade antitumoral.

Produtos naturais contêm uma variedade de substâncias químicas orgânicas complexas que podem ter uma atividade sinérgica, interagindo com múltiplas vias, bem como possuindo atividades que interagem com a sinalização celular, a via apoptótica e na interação das células cancerígenas com o sistema imunológico. Por isso, uma alternativa seria avaliar substâncias naturais e alguns derivados químicos animais que poderiam influenciar nessas vias. Existem poucas pesquisas clínicas que avaliam o uso dessas substâncias como terapias adjuvantes no tratamento convencional com drogas citotóxicas e radioterapia (YANCE; SAGAR, 2006). *N*-nitrosoanonaina, por ser uma substância ainda pouco conhecida, pode ser citotóxica em outras linhagens tumorais e até mesmo um potencial adjuvante ou coadjuvante no tratamento do câncer. Outro fator relevante é que os dois testes utilizados neste trabalho, aos quais os compostos foram submetidos, não conseguem detectar atividades de pró-farmacos, o que pode ser o caso das substâncias avaliadas. Em tal situação, a substância perderia seu grupo NO *in vivo*, tornando-se ativa ou, ainda, liberaria este grupo no sítio de ação, causando um dano celular.

N-nitrosoxilopina, rutina, quercetina e aloina, as quais não mostraram atividade superior ao controle positivo em nenhuma das linhagens tumorais, porém não necessitam de

concentrações muito elevadas para detecção de atividade inibitória, sugerem que modificações estruturais e/ou uma possível combinação de drogas, como praticado na quimioterapia para o tratamento de câncer podem fazer destas substâncias um alvo de estudos e potenciais drogas antitumorais.

5.3 Atividade de substâncias da classe dos alcalóides em ensaio de *A. salina* e ensaio antitumoral

Alcalóides estão entre o vasto grupo de metabólitos secundários de plantas (STÉVIGNY *et al.*, 2005), com grande diversidade estrutural (HENRIQUES *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, importantes atividades fisiológicas sobre organismos de vários grupos biológicos (ROBBERS *et al.*, 1997).

Porém, em nosso trabalho, como mostrado pelos dados da Tabela 3, a classe dos alcalóides foi a que apresentou maiores DE₅₀ e CI₅₀ dentre as três testadas, sugerindo que a citotoxicidade em *A. salina* e a atividade antitumoral não se encontram dentre aquelas de destaque para a classe. Entretanto, é de grande importância e interesse o destaque exercido pela duguetina.

Tabela 3 – Alcalóides e atividades em *A. salina*, após 24h de exposição, e em linhagens de células tumorais B16-F10 e Hep₂ em período de incubação de 48h, respectivos controles positivos de cada bioensaio e intervalos de confiança.

Substância	<i>Artemia salina</i> DE ₅₀ (µg/mL)*	B16-F10 CI ₅₀ (µg/mL)**	Hep ₂ CI ₅₀ (µg/mL)**
duguetina	20,8 (9,80 - 44,09)	10,7 (10,2 - 11,1)	7,1 (6,6 - 7,7)
boldina	>250	>50	>50
N-nitrosoanonaina	>250	>50	>50
N-nitrosoxilopina	>250	31,9 (28,7 - 36,2)	36,1 (33,1 - 39,3)
sulfato de quinidina	169,8 (109,79 - 262,65)	-	-
cisplatina	110,5 (87,2 - 140,0)	1,4 (1,3 - 1,5)	10,5 (9,4 - 11,7)

*DE₅₀: Dose efetiva para matar 50% das larvas de *A. salina* (µg/mL)

**CI₅₀: Concentração que inibe 50% do crescimento celular (µg/mL)

Duguetina, estruturalmente semelhante à boldina, porém pouco estudada e de grande interesse ao Cerrado devido à sua ocorrência em plantas dessa região, mostrou-se muito ativa em todos os ensaios em relação aos outros alcalóides avaliados. Sua concentração para inibição de 50% do crescimento da linhagem B16-F10 mostrou ser aproximadamente duas vezes menor que a dose efetiva necessária para matar 50% das larvas do microcrustáceo. Já

para linhagem Hep₂ foi necessário uma quantidade quase três vezes menor que a DE₅₀ para alcançar o mesmo efeito inibitório que para a linhagem B16-F10. Em experimentos com extrato alcaloídico obtido de *D. furfuracea*, o valor de DE₅₀ foi de 36,9 µg/mL (SILVA *et al.*, 2007), podendo tal efeito ser atribuído à presença de duguetina e outros alcalóides agindo conjuntamente. Tais resultados fazem da duguetina um alvo para comprovação de sua atividade larvicida e inibição de crescimento de outras linhagens celulares tumorais.

A boldina é um alcalóide encontrado em folhas e tronco do boldo e possui atividade antiinflamatória, efeitos antipiréticos e habilidade antioxidante (YOUN *et al.*, 2002). Porém, apresentou fraca atividade citotóxica contra *A. salina* e fraca inibição do crescimento das linhagens B16-F10 e Hep₂, características importantes para um uso seguro dessa substância como princípio ativo presente no chá de boldo.

N-nitrosoanonaina e *N*-nitrosoxilopina, dois *N*-nitrosos isolados de *D. furfuracea* diferenciam-se por seus substituintes, sendo que *N*-nitrosoxilopina possui um grupo metoxil na posição nove. Ambos mostraram ser inativos nas concentrações testadas para *A. salina*. *N*-nitrosoxilopina apresentou uma CI₅₀ semelhante nas duas linhagens tumorais. Porém, levando-se em conta a maior sensibilidade da linhagem B16-F10 ao controle positivo, a CI₅₀ encontrada para Hep₂ mostra uma maior eficiência na inibição do crescimento celular comparado à CI₅₀ da cisplatina para essa linhagem.

Dentre as quatro substâncias reunidas no grupo dos alcalóides, três delas são pouco estudadas quanto às suas potencialidade como fármacos de origem natural e dentre elas, uma apresenta um bom potencial para exploração de atividades biológicas específicas – duguetina - partindo-se do princípio de que a atividade em *A. salina* é um indicativo de atividade antitumoral (SIQUEIRA, 1999; CEPLEANU, 1993; MEYER *et al.*, 1982), porém não específica de nenhuma atividade biológica (MEYER *et al.*, 1982).

5.4 Atividade de substâncias da classe dos flavonóides em ensaio de *A. salina* e ensaio antitumoral

Flavonóides são amplamente encontrados em frutas e vegetais, despertando interesse devido à sua comprovada atividade antioxidante, protetora contra males cardiovasculares (CAO *et al.*, 1997), além de resultados efetivos encontrados na literatura a respeito de atividade antitumoral (FERRER *et al.*, 2006).

Concentrações encontradas para a quercetina colocam-na como a melhor dentre os dois flavonóides testados em células tumorais, onde suas atividades para as linhagens Hep₂ e B16-F10 variaram de aproximadamente duas a sete vezes as da rutina (Tabela 4).

Tabela 4 - Flavonóides e atividades em *A. salina*, após 24h de exposição, e em linhagens de células tumorais B16-F10 e Hep₂, em período de incubação de 48h, respectivos controles positivos de cada bioensaio e intervalos de confiança.

Substância	<i>Artemia salina</i> DE ₅₀ (µg/mL)*	B16-F10 CI ₅₀ (µg/mL)**	Hep ₂ CI ₅₀ (µg/mL)**
rutina	>250	47,0 (44,6 - 49,6)	38,7 (37,0 - 40,3)
quercetina	>250	6,5 (6,3 - 6,9)	18,9 (17,4 - 20,6)
sulfato de quinidina	169,8 (109,79 - 262,65)	-	-
cisplatina	110,5 (87,2 - 140,0)	1,4 (1,3 - 1,5)	10,5 (9,4 - 11,7)

*DE₅₀: Dose efetiva para matar 50% das larvas de *A. salina* (µg/mL)

**CI₅₀: Concentração que inibe 50% do crescimento celular (µg/mL)

Rutina apresentou uma DE₅₀ maior que 250 µg/mL de acordo com dados de mortalidade das larvas de *A. salina*, resultado já esperado, pois tal substância apresentou uma DE₅₀ maior que 500 µg/mL em teste de toxicidade realizado por Cepleanu (1993). Em mesmo trabalho, quercetina, sob mesmas condições de incubação de rutina: escuro, DMSO 1%, larvas em estágio náuplio e 25°C apresentou DE₅₀ igual a 126 µg/mL (94-170 µg/mL), com intervalo de confiança de 95%. Em nossos estudos, porém, quercetina apresentou uma DE₅₀ elevada em *A. salina* e atividade inferior à cisplatina em células tumorais. Com isso, ambos flavonóides mostram-se fracamente ativos frente a sistemas biológicos complexos, podendo, inclusive, oferecer uma proteção ao organismo, devido a sua conhecida atividade antioxidante.

Rutina mostrou-se fracamente ativa sobre as duas linhagens tumorais testadas, com CI₅₀ igual a 47,0 µg/mL e 38,7 µg/mL para B16-F10 e Hep₂, respectivamente. Tais concentrações são muito superiores às encontradas para o controle positivo, porém, de acordo com dados encontrados por Matsuo *et al.* (2005), os quais utilizaram fibroblastos pulmonares de embrião humano (TIG-1) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVE) para teste de citotoxicidade de flavonóides em linhagens celulares normais. Os autores encontraram que rutina não apresenta toxicidade nas duas linhagens, corroborando a ausência de atividade frente a *A. salina*. A não toxicidade da rutina é justificada pelos autores devido a sua alta hidrofiliabilidade e, com isso, fraca incorporação na membrana celular lipídica.

Quercetina apresentou uma alta DE₅₀: > 250 µg/mL, mostrando ser fracamente ativa ao microcrustáceo. Em contraposição, em ensaio com células tumorais, mostrou uma boa

atividade inibitória de crescimento, com CI_{50} de 6,5 $\mu\text{g/mL}$ em B16-F10, fazendo desta, a quarta melhor substância dentre as testadas nessa linhagem. Sua CI_{50} de 18,9 $\mu\text{g/mL}$ em Hep₂ é menos de duas vezes a CI_{50} da cisplatina, podendo ser considerada, ainda, um bom agente antitumoral, motivo pelo qual a quercetina é usada como controle positivo em ensaios MTT de viabilidade celular contra carcinoma Ehrlich, com CI_{50} de 13,3 $\mu\text{g/mL}$, ao lado da vincristina, alcalóide tradicionalmente usado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda (SCHRIPSEMA *et al.*, 2007), em células leucêmicas K562 (ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2007). Porém, em células normais de fibroblastos pulmonares de embrião humano (TIG-1) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVE), os autores observaram que quercetina exibiu uma CI_{50} de 91,6 $\mu\text{g/mL}$ em TIG-1 e CI_{50} de 18,4 $\mu\text{g/mL}$ em HUVE avaliadas depois de 24h de exposição às substâncias e contagem celular por exclusão pelo corante azul de tripan. Assim, apesar de uma maior concentração ser necessária para matar 50% das células normais, sua citotoxicidade não é exclusiva de linhagens tumorais. Outros relatos na literatura procuram fazer uma correlação da atividade de flavonóides em células tumorais e células normais. Quercetina mostrou propriedades antitumorais potenciais, inibindo a proliferação de células da linhagem URM106 (osteosarcoma de rato) e praticamente não causou nenhum efeito em osteoblastos, medida pelo corante cristal violeta em concentração de 30,22 $\mu\text{g/mL}$ (FERRER *et al.*, 2006).

Generalidades dessa baixa sensibilidade de células normais não podem ser admitidas para todos os tipos celulares em relação às concentrações necessárias para atividade positiva, como mostra o trabalho de Tan *et al.* (2003), onde valores de CI_{50} encontrados através de ensaio SRB por exposição de quercetina por 72h em células endoteliais dermais microvasculares humanas e para células endoteliais da veia umbilical humana foram iguais a 8,8 e 7,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já linhagens tumorais MKN-45 (adenocarcinoma gástrico humano), A549 (adenocarcinoma de pulmão), BEL-7402 (carcinoma hepatocelular) apresentaram os seguintes valores de CI_{50} : 53,8; 12; 14,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, o que corrobora a maior sensibilidade de linhagens de células normais do que células tumorais.

Como mostram os resultados encontrados por Hakimuddin *et al.* (2004) a quercetina é um flavonol com forte efeito inibitório, sendo tal resultado obtido de maneira dose-dependente, com CI_{50} igual a 5 $\mu\text{g/mL}$ para linhagem HMEC; MCF-7 igual a 13 $\mu\text{g/mL}$ e MCF-10A sendo a mais tolerante, com CI_{50} igual a 32 $\mu\text{g/mL}$ em ensaios *in vitro* com exposição de 48h à substância analisada.

Para as quatro linhagens de células de câncer gástrico testadas por Yoshida *et al.* (1990), a CI_{50} variou de 9,7 a 16,6 $\mu\text{g/mL}$ para quercetina aplicada em cultura celular

continua por quatro dias após a inoculação e simultânea adição da substância, avaliada pela exclusão pelo corante azul de tripan. Assim, as concentrações que inibem o crescimento das diversas linhagens tumorais variam muito conforme o tipo celular testado, tornando-se difícil prever uma CI_{50} geral.

Fatores como a presença constante de flavonóides na dieta alimentar e o crescente interesse em suas propriedades antioxidantes, além de resultados de uma boa atividade antitumoral em linhagens celulares acrescentariam outras propriedades biológicas e possibilitariam o uso terapêutico dessa classe de compostos na medicina. Devido à semelhança estrutural entre as duas moléculas flavônicas estudadas, o fator diferencial entre a alta concentração necessária para o efeito positivo de uma e a menor concentração para a outra é a presença de dois açúcares na estrutura química da rutina, solubilizando-a na água e deixando-a menos disponível para a interação com a membrana celular. Isso se deve ao fato de fármacos e compostos de origem vegetal não serem, em sua maioria, estruturalmente semelhantes aos metabólitos celulares, fazendo com que sua velocidade de passagem através das membranas celulares, de natureza lipídica e protéica, seja determinada pela sua lipossolubilidade. Substâncias hidrofílicas, como o caso da rutina, têm mais dificuldade em atravessar a barreira imposta pela membrana celular, ao contrário de substâncias lipofílicas, que são mais facilmente incorporadas por ela (KOROLKOVAS, 1977).

5.5 Atividade de substâncias da classe das quinonas em ensaio de *A. salina* e ensaio antitumoral

As quinonas podem ser encontradas em várias classes de organismos vivos, gerando uma multiplicidade de funções biológicas e agindo de forma notável em seus diversos ciclos bioquímicos. Estudos farmacológicos de quinonas evidenciam variadas atividades, dentre elas: tripanossomicidas, viruscidas, inibidoras de sistemas celulares reparadores e, aquela de interesse em nosso trabalho, antitumorais (SILVA *et al.*, 2003).

Algumas quinonas estão presentes nas plantas e células animais, exercendo funções na respiração, fotossíntese, toxinas defensivas, e como elementos essenciais no processo de acoplamento energético (FERREIRA *et al.*, 2000).

Tabebuia impetiginosa (Bignoniaceae), popularmente conhecida como “ipê roxo”, está amplamente distribuída pelo Brasil e outros países sul-americanos, usada como diurético, adstringente e também como remédio caseiro na prevenção e tratamento do câncer

(FUJIMOTO *et al.*, 1991; SCHAFFNER-SABBA *et al.*, 1984), sendo de plantas desse gênero extraído o lapachol, usado em nossos testes.

Resultados apresentados na Tabela 5 evidenciam a classe das quinonas como a melhor dentre as três avaliadas em nossos experimentos.

Tabela 5 - Quinonas e controles positivos testados em relação à atividade em *A. salina*, após 24h de exposição, e em linhagens de células tumorais B16-F10 e Hep₂, em período de incubação 48h, e seus respectivos intervalos de confiança.

Substância	<i>Artemia salina</i> DE ₅₀ (µg/mL)*	B16-F10 CI ₅₀ (µg/mL)**	Hep ₂ CI ₅₀ (µg/mL)**
aloína	>250	45,6 (36,7 - 56,7)	38,4 (37,1 - 39,9)
emodina	25,1 (17,85 - 35,27)	2,2 (1,9 - 2,5)	1,7 (1,5 - 1,8)
lapachol	137,8 (113,07 - 167,97)	9,5 (8,7 - 10,5)	10,5 (9,6 - 11,5)
β-lapachona	72,7 (62,42 - 84,67)	0,7 (0,65 - 0,75)	0,3 (0,29 - 0,32)
sulfato de quinidina	169,8 (109,79 - 262,65)	-	-
cisplatina	110,5 (87,2 - 140,0)	1,4 (1,3 - 1,5)	10,5 (9,4 - 11,7)

*DE₅₀: Dose efetiva para matar 50% das larvas de *A. salina* (microgramas/mL)

**CI₅₀: Concentração que inibe 50% do crescimento celular (microgramas/mL)

Lapachol apresentou DE₅₀ de 137,8 µg/mL, muito superior ao encontrado em teste de letalidade de Khan e Mlungwana (1999) - DE₅₀ de 5 µg/mL - empregado como pré-ensaio antitumoral pelos autores. Foi encontrado uma CI₅₀ de 9,5 µg/mL para linhagem B16-F10, muito superior ao valor de CI₅₀ da cisplatina. Com uma CI₅₀ de 10,5 µg/mL, lapachol teve atividade igual ao controle positivo em Hep₂, mostrando possuir uma boa ação inibitória nessa linhagem, com uma equivalência de atividade entre as duas substâncias.

Outros dados da literatura mostram o uso do lapachol como controle positivo em mesmo teste inibitório tumoral, com uma CI₅₀ de 68,09 µg/mL (PIMENTA *et al.*, 2003). Cepleanu (1993) também testou a substância quanto à sua citotoxicidade frente a *A. salina* e encontrou uma DE₅₀ igual a 68 µg/mL (56-81) – intervalo de confiança de 95%, sob condições de incubação no escuro, DMSO 1%, estágio náuplio, 25°C, concentração menor que a obtida para a vimblastina, com conhecida atividade citotóxica e antitumoral, com DE₅₀ igual a 101 µg/mL (119-87). Em ensaio antitumoral com método MTT, houve comprovação de atividade tóxica, antitumoral, com o lapachol exibindo uma CI₅₀ igual a 2,7 µg/mL em linhagem Col115 e 1,7 µg/mL em linhagem SW480, ambas de células de adenoma de cólon humano.

Lapachol se mostrou ativo sobre larvas de *A. salina* apresentando DL₅₀ de 12,75 µg/mL – metodologia de McLaughlin (1991) - com uma concentração mais de dez vezes menor do

que a encontrada em nossas condições de experimento. Em mesmo estudo, Oliveira *et al.* (2002), através de ensaio MTT mostrou que o lapachol possui atividade sobre células tumorais de mama, linhagem A549, sob condições aeróbias e hipóxicas, com CI_{50} de 0,783 mM e 1,0 mM, respectivamente.

Ao contrário da DE_{50} encontrada para o lapachol, mais baixa que o sulfato de quinidina, portanto, duas substâncias ativas, o mesmo foi considerado, por Lima *et al.* (2002), não tóxico frente a *A. salina* (DE_{90} = 176,3 μ g/mL). Porém, lapachol, comparado à cisplatina, mostrou ser menos ativo em B16-F10. Além disso, presume-se que a atividade antitumoral do lapachol, quando existente, pode não ser tipo-celular dependente, já que as concentrações inibitórias encontradas foram semelhantes para as duas linhagens celulares, mesmo com ambas apresentando sensibilidades diferentes para o controle positivo.

β -lapachona é uma orto-naftoquinona, derivada do lapachol e amplamente estudada por sua atividade antitumoral. Apresentou DE_{50} mais de duas vezes menor que o controle positivo em *A. salina* - sulfato de quinidina - um indicativo de uma ótima atividade da substância contra as duas linhagens de células tumorais, confirmada por sua relação qualitativa com a CI_{50} : cerca de cem vezes menor em linhagem B16-F10 e cerca de duzentas e quarenta vezes em Hep₂. Apesar da maior resistência das células de carcinoma de laringe, mostrado pela CI_{50} de cisplatina em Hep₂ cerca de sete vezes e meia maior que em B16-F10, β -lapachona mostrou uma concentração inibitória mais baixa naquela linhagem. Dentre as quinonas avaliadas, essa foi a de maior destaque no ensaio antitumoral.

De acordo com dados de Kumi-Diaka (2002), estudos preliminares com β -lapachona mostram a sua CI_{50} variando entre 0,44-0,51 μ g/mL para linhagem PC3 e entre 0,47-0,67 μ g/mL para LNCaP, ambas de câncer de próstata, evidenciando sua boa atividade antitumoral e confirmando a β -lapachona como a melhor dentre as substâncias testadas em células de câncer (Tabela 2, p. 55).

β -lapachona usada como controle positivo por Hayashi *et al.* (2004) em fracionamento biodirecionado de extrato clorofórmico de *Lantana* sp. mostrou a atividade antitumoral da substância em linhagens tumorais de nasofaringe, pulmão, mama (CI_{50} igual a 0,19 μ g/mL) osso e glioblastoma numa concentração de 2,40 μ g/mL, em absorbância de 562 nm em método SRB.

Wuerzberger *et al.* (1998) encontraram uma CI_{50} igual a 0,6 μ g/mL para β -lapachona em linhagem MCF-7 tratada em concentrações que variavam de 0,06 a 2,40 μ g/mL por 4h e avaliadas conforme habilidade de formação de colônia, sugerindo o uso da substância como agente terapêutico direto ou complementar à radioterapia contra o câncer mamário. Dados de

Hayashi *et al.* (2004) e Wuerzberger *et al.* (1998) mostram que a concentração determinante da letalidade em mesma linhagem de células tumorais pode variar de acordo com as condições de experimento, metodologia de contagem, avaliação da mortalidade celular, bem como a origem das linhagens utilizadas.

Uma possível explicação para a boa atividade de β -lapachona, seria seu caráter lipofílico (SCHAFFNER-SABBA *et al.*, 1984), o que facilitaria sua interação com a bicamada lipídica da membrana das células. Já seu mecanismo de ação nas células tumorais e uma das características das naftoquinonas, especialmente lapachol e β -lapachona, é que ambas interferem no metabolismo do oxigênio da célula tumoral, bloqueando a respiração celular e gerando radicais livres oxigenados (HUSSAIN *et al.*, 2007).

Uma outra classe de quinonas avaliadas engloba as antraquinonas emodina e aloina. Antraquinonas isoladas de *Hemerocallis* spp. por Cichewicz *et al.* (2004) mostraram efeitos antitumorais *in vitro* sobre quatro linhagens de células tumorais humanas: mama (MCF-7), sistema nervoso central (SF-268), pulmão (NCI-H460) e cólon (HCT-116) usando o ensaio SRB e adriamicina como controle positivo.

Das quatro quinonas avaliadas, emodina, com atividade inibitória do crescimento de células tumorais amplamente relatado na literatura, apresentou o melhor efeito em *A. salina*, ($DE_{50} = 25,1 \mu\text{g/mL}$), refletindo-se em uma segunda melhor atividade em B16-F10 e Hep₂, com uma CI_{50} quase seis vezes menor que a concentração inibitória da cisplatina na segunda linhagem. A CI_{50} da emodina para B16-F10 e Hep₂ foi, respectivamente para as linhagens, de onze a quatorze vezes menor que a DE_{50} encontrada para *A. salina*, mostrando existir uma correlação qualitativa entre os ensaios, mas não uma correlação quantitativa segura e padronizada entre DE_{50} e CI_{50} .

Ayo *et al.* (2007) isolaram emodina das folhas de *Cassia nigricans*, usada tradicionalmente como erva medicinal no tratamento de algumas doenças de pele e distúrbios gastrointestinais. Foi considerada um componente altamente citotóxico através dos dados obtidos pelos autores em teste de citotoxicidade contra *A. salina*. Nas concentrações de 1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, emodina matou 100; 93,3; 86,7; 76,7 e 60%, respectivamente, das larvas do microcrustáceo. Em nossa concentração mais alta testada (250 $\mu\text{g/mL}$), emodina matou 100% das larvas de *A. salina*. Cepleanu (1993) obteve DE_{50} igual a 18 $\mu\text{g/mL}$ (21-16) para a substância testada – intervalo de confiança de 95% - em teste com o microcrustáceo, atividade superior à encontrada para a vimblastina. Em comparação entre a mortalidade do microcrustáceo com sua atividade frente as duas linhagens celulares de adenoma de cólon humano, emodina apresentou uma associação significativa entre ambas, exibindo uma CI_{50} de

2,3 µg/mL para linhagem Col115 e 3,3 µg/mL para SW480 com o método MTT (CEPLEANU, 1993), a mesma correlação qualitativa positiva encontrada para os nossos testes.

Outros estudos procuram mostrar a redução da viabilidade e a morte celular ao longo do tempo de exposição à droga testada. Lee (2001b) determinou o efeito da emodina na viabilidade celular através da exclusão pelo corante azul de tripan. Células cancerosas CH27 expostas a várias concentrações por 72h mostraram um decréscimo tempo e dose-dependente no número de células, porém, após 16h de tratamento, a fração de células viáveis já havia decaído para 8% comparado às não tratadas. Resultados semelhantes foram encontrados através da viabilidade celular pelo método MTT, o qual indicou que a parada da atividade metabólica celular é irreversível após o tratamento por 8h. A morte celular induzida pela substância foi mais pronunciada na dose de 13,5 µg/mL. A capacidade de adesão celular é determinante para o sucesso de uma cultura celular *in vitro* e sua utilização em ensaios antitumorais, bem como no crescimento da massa tumoral no organismo. Em mesmo estudo de Lee (2001b), após 24h de tratamento, houve uma extensa fragmentação celular e poucas células permaneceram aderidas. Como prova da morte das células desprendidas foi feita a inoculação em meio de cultura fresco, na ausência de emodina, por 24h, resultando em uma não fixação das células na placa de Petri.

Cha *et al.* (2005) encontraram dados, através do ensaio MTT e incorporação da timidina [H^3], que a emodina extraída de *Rheum palmatum* possui um efeito antiproliferativo em cultura de células, mesmo em baixas doses: $2,7 \times 10^{-3}$ µg/mL, mais significativa que genisteína e curcumina, duas substâncias fitoquímicas com atividade anticâncer.

Lee *et al.* (2005) isolaram da fração metileno-clorida de *Rumex acetosa* L. quatro antraquinonas conhecidas e sintetizaram dois derivados para avaliar e correlacionar suas estruturas-atividade quanto às ações antimutagênica e citotóxica. Dentre as antraquinonas obtidas, emodina mostrou ser o componente mais ativo, com uma $CI_{50} = 2,9$ a $3,6$ µg/mL frente as linhagens tumorais de pulmão, ovário, melanoma, sistema nervoso central e cólon através do método SRB, em triplicata, dados de CI_{50} superiores aos encontrados para as linhagens testadas neste trabalho.

Baixas concentrações (0,27-2,7 µg/mL) de emodina resultam em efeito citostático, mas não citotóxico em três linhagens de câncer de pulmão: A549, H460, CH27 em 48h. Tratamento com 6,7 µg/mL de emodina por 72h, lavagem e cultura por 14 dias em meio sem droga mostraram a redução na formação de colônias, quando comparado com controles não

tratados, através de ensaio clonogênico e colônias coradas com cristal violeta (SU *et al.*, 2005).

Kuo *et al.* (1997) fizeram estudo comparativo de quatro antraquinonas extraídas de *Polygonum hypoleucum* Ohwi em seis linhagens de células tumorais avaliadas pelo corante azul de tripan. Emodina apresentou CI_{50} variando de $1,5 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem de eritroleucemia a $8,9 \pm 1,0$ $\mu\text{g/mL}$, em linhagem de carcinoma de pulmão.

O tratamento de células CL5, adenocarcinoma pulmonar humano, com concentrações de 1,35 a 5,4 $\mu\text{g/mL}$ de emodina por 12 a 48h mostrou nenhum ou mínimo efeito na viabilidade celular avaliada pelo método MTT. Já o tratamento com 13,5 $\mu\text{g/mL}$ por 48h ou na concentração máxima do experimento: 27 $\mu\text{g/mL}$ da substância, por 24 e 48h causou 19, 15 e 46% de diminuição na viabilidade celular, respectivamente. Tais diminuições podem refletir, segundo Wang *et al.* (2001), um efeito citostático da emodina.

A linhagem celular de hepatoma humano HepG2/C3A apresentou CI_{50} mais baixa em teste de citotoxicidade induzida por emodina: 11,5 $\mu\text{g/mL}$. As demais linhagens de hepatoma humano testadas por Shieh *et al.* (2004) foram PLC/PRF/5 e SK-HEP-1, com $CI_{50} = 12,6$ $\mu\text{g/mL}$ e 14,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O controle positivo utilizado foi o 5-fluorouracil, o método de avaliação da proliferação celular foi o XTT e as concentrações de emodina foram 5,4; 10,8 e 16,21 $\mu\text{g/mL}$, por 48h.

Já Tan *et al.* (2006) classificaram emodina, comparada com seus derivados, como possuidora de citotoxicidade baixa ou insignificante, com CI_{50} igual a 14,9 $\mu\text{g/mL}$ em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e maior que 27 $\mu\text{g/mL}$ em linhagem de melanoma de camundongo (B16) e de carcinoma Lewis, de pulmão (LLC).

Além da inviabilização do crescimento das células, a morte celular é necessária para impedir uma volta da atividade de proliferação descontrolada depois de cessada a administração da droga. Zhang *et al.* (1998) mostraram que o efeito inibitório da emodina em células MDA-MB-453 (câncer de mama humano) é reversível. Tal linhagem celular foi tratada com 10,8 $\mu\text{g/mL}$ da substância por três dias e, a fração de células viáveis decaiu para 38% comparado com células não tratadas. Após os três dias, a emodina foi retirada e as células começaram a crescer em uma taxa similar às não tratadas por um mesmo período. Células tratadas com emodina por mais cinco dias mantiveram a inibição do crescimento.

Wang *et al.* (2006), em seu estudo eletroquímico do modo de ação da emodina mostraram que a substância pode impedir células cancerosas de se dividir e produzir mais células cancerígenas através da inibição da reprodução do DNA e simultaneamente exibir

efeito tóxico. Os resultados obtidos pelos autores indicam que a interação da substância com o DNA acontece por meio de intercalamento na dupla hélice.

Uma maior citotoxicidade dose-dependente de derivados da emodina em linhagem de HepG2 sugere que um entendimento da relação estrutura-atividade e modificação de compostos ativos levariam a uma maior atividade antitumoral da substância (WANG *et al.* 2007), o que poderia ser aplicado às demais substâncias que exibem um mínimo efeito inibitório do crescimento.

Outra antraquinona amplamente estudada e de grande interesse fitoquímico é derivada de plantas do gênero *Aloe*. O potencial antiproliferativo e citotóxico de aloina extraída de *Aloe vera* foi testada por Nićiforović *et al.* (2007) em células HeLaS3 (carcinoma uterino humano) e mostrou um pronunciado efeito antiproliferativo: $CI_{50} = 40,6 \mu\text{g/mL}$ e aumentou a apoptose celular para 24%. Aloina, inativa ou fracamente ativa frente a *A. salina* apresentou a CI_{50} mais alta dentre as quinonas: $45,6 \mu\text{g/mL}$ e $38,4 \mu\text{g/mL}$ para B16-F10 e Hep₂, respectivamente. Caso a CI_{50} para o controle positivo - cisplatina - seja levada em consideração, aloina é mais ativa em Hep₂, porém com uma concentração cerca de três vezes e meia maior que cisplatina.

Em outro estudo relatado na literatura, dentre duas linhagens de câncer de mama humanos, MCF-7 mostrou ser a mais sensível à aloina, demonstrado pelos ensaios MTT e clonogênico, no qual o valor da CI_{50} foi relatada como sendo $60 \mu\text{g/mL}$ (ESMAT *et al.*, 2006), ainda muito alta se comparada à atividade das demais antraquinonas.

De acordo com Houghton *et al.* (2007), a maioria das avaliações citotóxicas usam extratos de plantas sem levar em conta o fato que os componentes que ocorrem naturalmente podem não ser, por si só, ativos, e sim necessitarem de uma transformação para substâncias ativas através do sistema metabólico do corpo, o que explicaria seu uso tradicional. Isso tem se mostrado com diversas plantas medicinais, sendo citada como exemplo, a droga laxativa obtida de *Senna*, na qual os glicosídeos são hidrolisados pela flora intestinal para liberar as agliconas, que são compostos que causam alterações na permeabilidade à água na parede do intestino e aumentam o peristaltismo.

A atividade encontrada para as substâncias avaliadas é um forte indicativo de suas propriedades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo*, colocando-as como candidatas potenciais a estudos mais aprofundados e/ou a modificações estruturais. A indicação de inatividade, bem como a baixa atividade não significam, necessariamente, uma ausência total de uso como um possível fármaco, mas colocam tais substâncias como alvo de estudos para descoberta de pró-fármacos, onde sua ação estaria condicionada a uma ativação/transformação dentro do corpo. Como método simples, rápido e de baixo custo, o teste da *A. salina* cumpre seu papel de

indicação de atividade biológica, podendo seus resultados positivos para determinada substância serem extrapolados para a existência de outras atividades (neste estudo comprovado pela correlação qualitativa com a atividade antitumoral). Porém, para que exista e seja segura uma previsão da concentração necessária em um ensaio biológico para um determinado efeito inibitório ou eficaz na morte do objeto-teste – correlação quantitativa entre um ou mais bioensaios - são necessários maiores estudos e testes biológicos que envolvam as particularidades de cada sistema biológico testado, interações e características moleculares.

6 CONCLUSÕES

O teste em *A. salina*, um ensaio biológico mais simples, rápido e de baixo custo pode ser considerado como uma pré-avaliação para indicação de substâncias com potenciais atividades biológicas específicas.

Para as substâncias de origem vegetal pertencentes a diferentes classes de produtos naturais avaliadas neste trabalho, o bioensaio da *A. salina* e o bioensaio antitumoral mostraram correlacionar-se positivamente. Tal correlação, proposta por vários autores, foi confirmada através da atividade positiva de quatro substâncias - β -lapachona, emodina, duguetina e lapachol - testadas em *A. salina*, sendo que as mesmas foram as que apresentaram as mais baixas CI_{50} dentre as substâncias testadas nas duas linhagens de células tumorais. Podem, portanto, serem consideradas indicativas da atividade antitumoral. Além destas, boldina e *N*-nitrosoanonaina mostraram-se inativas nos dois bioensaios, acompanhadas de rutina e aloina que foram inativas frente ao microcrustáceo e fracamente ativas como inibidoras do crescimento das duas linhagens celulares tumorais, quando comparadas à cisplatina. A ausência e/ou baixa atividade das substâncias em ambos os bioensaios, corrobora, portanto, a correlação entre eles.

Porém, a determinação da correlação quantitativa, proposta neste trabalho, não pôde ser estabelecida para as substâncias testadas, pois as diferentes linhagens de células tumorais apresentaram sensibilidades diferentes frente ao controle positivo, mostrando que cada linhagem celular se comporta de maneira distinta frente às substâncias-teste. Além disso, as DE_{50} para as substâncias com atividade positiva não seguiram um padrão de correlação com suas respectivas CI_{50} . As doses necessárias para a atividade biológica não seguem a correlação quantitativa proposta pela literatura, porém cisplatina, testada nos dois bioensaios, foi a única com resultado próximo a essa correlação, com uma DE_{50} igual a aproximadamente dez vezes e meia a CI_{50} (para Hep₂). Quando avaliadas isoladamente, as classes de produtos naturais comportaram-se de maneira distinta umas das outras, porém de acordo com o esperado, baseado em atividades biológicas positivas ou negativas já relatadas na literatura e nos seus usos populares descritos.

Apesar de ser uma das mais numerosas neste trabalho, a classe dos alcalóides apresentou as atividades mais fracas em *A. salina* e linhagens celulares tumorais, exceto a duguetina, a mais citotóxica frente à *A. salina*.

A quercetina, pertencente à classe dos flavonóides, apesar de ter se mostrado inativa em *A. salina*, mostrou boa atividade inibitória do crescimento das linhagens de células tumorais, confirmando seu papel como controle positivo de ensaios biológicos descritos.

A classe das quinonas, com amplos relatos na literatura a respeito de atividades positivas em bioensaios, foi a que apresentou mais substâncias ativas frente a *A. salina* e sobre as duas linhagens celulares tumorais. Como destaques, β -lapachona e emodina, substâncias com as menores CI_{50} (mais forte inibidora que a cisplatina) e a segunda melhor citotoxicidade em *A. salina*, respectivamente.

Portanto, a atividade citotóxica positiva encontrada *in vitro* em teste em *A. salina* funciona como uma pré-avaliação de substâncias com potenciais farmacológicos a serem avaliados por outros bioensaios específicos. Além disso, tais produtos naturais e outros que porventura revelem baixa citotoxicidade podem subsidiar estudos de modificação estrutural e/ou serem, ainda, pró-fármacos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu FC, Ferreira DCM, Goulart MOF, Buriez O, Amatore C. Electrochemical activation of β -lapachone in β -cyclodextrin inclusion complexes and reactivity of its reduced form towards oxygen in aqueous solutions. *J Electroanal Chem.* 2007; 608(2):125–32.

Alfonso ANT, de Castro C, de Murcia TR, Torrenegra R. Efectos citotoxicos de extractos y fracciones de *Espeletia killipii* Cuatr. frente a lineas celulares tumorales humanos. *Rev Bras Farmacogn.* 2006; 16(1):12-6.

Alves DS, Pérez-Fons L, Estepa A, Micol V. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68(3):549–61.

Ayo RG, Amupitan JO, Zhao Y. Cytotoxicity and antimicrobial studies of 1,6,8-trihydroxy-3-methyl-anthraquinone (emodin) isolated from the leaves of *Cassia nigricans* Vahl. *AJB.* 2007; 6(11):1276-79.

Barahona MV, Sánchez-Fortún S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environ Pollut.* 1999; 104(3):469-76.

Barreiro EJ, Fraga CAM, Araújo Júnior JX. O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2007. p. 147-210.

Boustie J, Stigliani J-L, Montanha J, Amoros M, Payard M, Girre L. Antipoliiovirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. *J. Nat. Prod.* 1998; 61(4):480-4.

Brower V. Back to Nature: Extinction of medicinal plants threatens drug discovery. *JNCI.* 2008; 100(12):838-9.

Calabrò ML, Tommasini S, Donato P, Stancanelli R, Raneri D, Catania S, et al. The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 36(5):1019-27.

Calliste C-A, Trouillas P, Allais D-P, Simon A, Duroux J-L. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49(7):3321-27.

Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22(5):749-60.

Carollo CA, Siqueira JM, Garcez WS, Diniz R, Fernandes NG. *N*-Nitrosoanonaine and *N*-Nitrosoxylophine, aporphine alkaloids from *Duguetia furfuracea*. *J. Nat. Prod.* 2006; 69(8):1222-4.

Cavalcante MF, Oliveira MCC, Velandia JR, Echevarria A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Quim Nova.* 2000; 23(1):20-2.

Cepleanu F. Validation and application of three bench-top bioassays for screening of crude plant extracts and subsequent activity-guided isolation [Tese]. Lausanne: Faculdade de Ciências da Universidade de Lausanne; 1993.

Cha T-L, Qiu L, Chen C-T, Wen Y, Hung M-C. Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. *Cancer Res.* 2005; 65(6):2287-95.

Chen H, Wang Y, Leng L, Cheng MS, Yu PF, Zhang JZ. A new series of emodin derivatives with bone affinity. *Chin Chem Lett.* 2007; 18(2):141-4.

Cichewicz RH, Zhang Y, Seeram NP, Fair MG. Inhibition of tumor cell proliferation by novel anthraquinones from daylilies. *Life Sci.* 2004; 74(14):1791-9.

Cock IE, Ruebhart D. High performance liquid chromatographic separation and identification of a toxic fraction from *Aloe barbadensis* Miller leaf gel using the artemia nauplii bioassay. *The Internet Journal of Toxicology.* 2008; 4 (2). Disponível em: <http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijto/vol4n2/aloe.xml>

Coopoosamy RM, Magwa ML. Antibacterial activity of aloe emodin and aloin A isolated from *Aloe excelsa*. *AJB.* 2006; 5(11):1092-4.

Cunha MM. Avaliação da atividade citotóxica de frações contendo acetogeninas derivadas de extratos de plantas da família da Annonaceae [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2002.

da Rocha AB, Lopes RM, Schwartsmann G. Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2001; 1(4):364-9.

David JP, Silva EF, Moura DL, Guedes MLS, Assunção RJ, David JM. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. Quim Nova. 2001; 24(6):730-3.

David JP, Meira M, David JM, Guedes MLS. Triterpenos e ferulatos de alquila de *Maprounea guianensis*. Quim Nova. 2004; 27(1):62-5.

Esmat AY, Tomasetto C, Rio MC. Cytotoxicity of a natural anthraquinone (aloin) against human breast cancer cell lines with and without erbB-2-topoisomerase II alpha coamplification. Cancer Biol Ther. 2006; 5(1):97-103.

Estacia P, Santos Jr AR, Genari SC. Avaliação do possível efeito tóxico de um alcano semifluorinado de uso oftalmológico sobre cultura de células Vero. Arq. Bras. Oftalmol. 2004; 67(6):905-10.

Esteves-Souza A, Figueiredo DV, Esteves A, Câmara CA, Vargas MD, Pinto AC, Echevarria A. Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. Braz J Med Biol Res. 2007; 40(10):1399-402.

Fechine IM, Navarro VR, da Cunha EVL, Silva MS, Maia JGS, Barbosa-Filho JM. Alkaloids and volatile constituents from *Duguetia flagellaris*. Biochem Syst Ecol. 2002; 30(3):267-9.

FDA - U.S. Food and Drug Administration [homepage na Internet]. Rockville, Estados Unidos. [acesso em 6 nov 2008]. Disponível em:
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/onctools/organ.cfm>

Ferreira ML, Barbosa LCA, Demuner AJ, da Silva AA, Pereira RC. Avaliação da atividade herbicida de algumas quinonas. Acta Scient. 2000; 22(4):999-1003.

Ferreira VF, Jorqueira A, Souza AMT, Silva MN, Souza MCBV, Gouvêa RM *et al.* Trypanocidal agents with low cytotoxicity to mammalian cell line: a comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2006; 14(16):5459-66.

Ferrer EG, Salinas MV, Correa MJ, Naso L, Barrio DA, Etcheverry SB *et al.* Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl (IV) complexes. *J Biol Inorg Chem.* 2006; 11(6):791-801.

Finney DJ. *Probit Analysis*. 3^a ed. Cambridge, England: Cambridge University Press; 1971.

Fischer DCH, Gualda NCA, Bachiega D, Carvalho CS, Lup FN, Bonotto SV *et al.* *In vitro* screening for antiplasmodial activity os isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. *Acta Trop.* 2004; 92(3):261-6.

Fujimoto Y, Eguchi T, Murasaki C, Ohashi Y, Kakinuma K, Takagaki H *et al.* Studies on the structure and stereochemistry of cytotoxic furanonaphthoquinones from *Tabebuia impetiginosa*: 5- and 8-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-diones. *J. Chem. Soc.* 1991; 1(10):2323-7.

Galotta ALQA, Boaventura MAD. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha de açaí (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). *Quim Nova.* 2005; 28(4):610-3.

Gálvez M, Martín-Cordero C, López-Lázaro M, Cortés F, Ayuso MJ. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *J Ethnopharmacol.* 2003; 88(2):125-30.

Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. Clin Transl Oncol. 2007; 9(12):767-776.

Graminha AE, Vilhena FS, Batista AA, Louro SRW, Ziolli RL, Teixeira LR, Beraldo H. 2-pyridinoformamide-derived thiosemicarbazones and their iron(III) complexes: potential antineoplastic activity. Polyhedron. 2008; 27(2):547–51.

Grimaudo S, Tolomeo M, Gancitano RA, D'Alessandro N, Aiello E. Effects of highly purified anthraquinoid compounds from *Aloe vera* on sensitive and multidrug resistant leukemia cells. Oncol Rep. 1997; 4(2):341-3.

Guerra MP, Nodari RO. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos (cap. 1). In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC; 2007. p. 13-28.

Guinaudeau H, Leboeuf M, Cave A. Aporphinoid alkaloids, IV. J. Nat. Prod. 1988; 51(3):389-474.

Gupta D, Podar K, Tai Y-T, Lin B, Hideshima T, Akiyama M, *et al.* β -lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. Exp Hematol. 2002; 30(7):711-20.

Hakimuddin F, Paliyath G, Meckling K. Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells. Breast Cancer Res Treat. 2004; 85(1):650-79.

Harvey A.L. Natural products as a screening resource. Curr Opin Chem Biol. 2007; 11(5):480-4.

Harvey A.L. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2008; 13(19-20):894-901.

Harwig J. Scott P.M. Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl Microbiol*. 1971; 21(6):1011-6.

Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45(11):2179–205.

Hayashi K-I, Chang F-R, Nakanishi Y, Bastow KF, Cragg G, McPhail AT *et al*. Antitumor agents. 233. Lantaluocratins A-F, new cytotoxic naphthoquinones from *Lantana involucrata*. *J Nat Prod* 2004; 67(6):990-3.

Henriksson E, Kjellén E, Wahlberg P, Wennerberg J, Kjellström JH. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill *in vitro* between colorimetric and cell count/colony assay. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2006; 42(10):320-3.

Henriques AT, Limberger RP, Kerber VA, Moreno PRH. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC; 2007. p. 765-92.

Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulforhodamine B assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. 2007; 42(4):377-87.

Huang Q, Shen HM, Shui G, Wenk MR, Ong C-N. Emodin inhibits tumor cell adhesion through disruption of the membrane lipid raft-associated integrin signaling pathway. *Cancer Res.* 2006; 66(11):5807-15.

Hussain H, Krohn K, Ahmad VU, Miana GA, Green IR. Lapachol: an overview. *Arkivoc.* 2007; part(ii):145-71.

INCA – Instituto Nacional do Câncer [homepage na Internet]. Rio de Janeiro. [acesso em 12 set 2008]. Disponível em:
http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2

Itharat A, Houghton PJ, Eno-Amooquaye E, Burke PJ, Sampson JH, Raman A. *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J Ethnopharmacol.* 2004; 90(1):33-38.

Itokawa H, Morris-Natschke SL, Akiyama T, Lee K-H. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *J Nat Med.* 2008; 62(3):263-80.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer Statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56(2):106-30.

Jia Y, Zhao G, Jia J. Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. *J Ethnopharmacol.* 2008; 120(2):181-9.

Kabaru JM, Gichia L. Insecticidal activity of extracts derived from different parts of the mangrove tree *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) Lam. against three arthropods. *AJST.* 2001; 2(2):44-9.

Kaneshiro T, Morioka T, Inamine M, Kinjo T, Arakaki J, Chiba I *et al.* Anthraquinone derivative emodin inhibits tumor-associated angiogenesis through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Eur J Pharmacol.* 2006; 553(1-3):46-53.

Kanwar AS. Brine shrimp (*Artemia salina*) – a marine animal for simple and rapid biological assays. *JCCM.* 2007; 2(4):236-240.

Khan RM, Mlungwana SM. 5-Hidroxylapachol: a cytotoxic agent from *Tectona grandis*. *Phytochemistry.* 1999; 50(3),439-42.

Kim SO, Kwon JI, Jeong YK, Kim GY, Kim ND, Choi YH. Induction of Egr-1 is associated with anti-metastatic and anti-invasive ability of β -lapachone in human hepatocarcinoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007; 71(9):2169-76.

Kongkathip N, Kongkathip B, Siripong P, Sagma C, Luangkamin S, Niyomdech M *et al.* Potent antitumor activity of synthetic 1,2-naphthoquinones and 1,4-naphthoquinones. *Bioorg Med Chem.* 2003; 11(4):3179-91.

Korolkovas, A. Fundamentos de farmacologia molecular: base para o planejamento de fármacos. 2 ed. São Paulo: EDART São Paulo Livraria e Editora; 1977.

Krishnaraju AV, Rao TVN, Sundararaju D, Vanisree M, Tsay H-S, Subbaraju GV. Biological screening of medicinal plants collected from Eastern ghats of India using *Artemia salina* (brine shrimp test). *Int J Appl Sci Eng.* 2006; 4(2):115-25.

Kumi-Diaka J. Chemosensitivity of human prostate cancer cells PC3 and LNCaP to genistein isoflavone and β -lapachone. *Biol Cell.* 2002; 94(1):37-44.

Kuo Y-C, Sun C-M, Ou J-C, Tsai W-J. A tumor cell growth inhibitor from *Polygonum hypoleucum* Owhi. Life Sci. 1997; 61(23):2335-44.

Lee T-H, Chen Y-M, Chou H-N. Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. Acta Zool Taiwan. 1999; 10(1):1-8.

Lee H-Z. Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. Br J Pharmacol. 2001a; 134(1):11-20.

Lee H-Z. Protein kinase C involvement in aloe-emodin and emodin induced apoptosis in lung carcinoma cell. Br J Pharmacol. 2001b; 134(5):1093 -103.

Lee N-J, Choi J-H, Koo B-S, Ryu S-Y, Han Y-H, Lee S-I, Lee D-U. Antimutagenicity and cytotoxicity of the constituents from the aerial parts of *Rumex acetosa*. Biol Pharm Bull. 2005; 28(11):2158-61.

Lepiller S, Laurens V, Bouchot A, Herbomel P, Solary E, Chluba J. Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diaminofluorescein probe. Free Radic Biol Med. 2007; 43(4):619-27.

Lhullier C, Horta PA, Falkenberg M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. Rev Bras Farmacogn. 2006;16(2):158-63.

Li Y, Sun X, LaMont JT, Pardee AB, Li CJ. Selective killing of cancer cells by β -lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. Proc Natl Acad Sci. 2003; 100(5):2674-8.

Lima NMF, Santos AF, Porfírio Z, Goulart MOF, Sant'Ana AEG. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. Acta Trop. 2002; 83(1):43-7.

Lima NMF, Correia CS, Leon LL, Machado GMC, Madeira MF, Santana AEG, Goulart MOF. Antileishmanial activity of lapachol analogues. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(7):757-61.

Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. Life Sci. 2006; 79(21):2056-68.

Linardi MCF, Oliveira MM, Sampaio MRP. A lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia P-388. J Med Chem. 1975; 18(11):1159-61.

Loghin F, Chagraoui A, Asencio M, Comoy E, Speisky H, Cassels, BK, Protais P. Effects of some antioxidative aporphine derivatives on striatal dopaminergic transmission and on MPTP-induced striatal dopamine depletion in B6CBA mice. Eur J Pharm Sci. 2003; 18(2):133–40.

Lu M, Nicoletti M, Battinelli L, Mazzanti G. Isolation of praeruptorins A and B from *Peucedanum praeruptorum* Dunn. and their general pharmacological evaluation in comparison with extracts of the drug. Farmaco. 2001; 56(5-7):417–20.

Machado SL, dos Santos LV, da Costa WF, Dias Filho BP, Sarragiotto MH. Synthesis, toxicity towards brine shrimp (*Artemia salina* Leach) and antimicrobial activity evaluation of 3,5-diphenylchlorinated-1,2,4-oxadiazoles. Acta Sci Technol. 2005; 27(2):107-10.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím Nova*. 2002; 25(3):429-38.

Maeda M, Murakami M, Takegami T, Ota T. Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 229(2):232–8.

Manach C, Morand C, Texier O, Favier M-L, Agullo G, Demigné C *et al*. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr*. 1995; 125(7):1911-22.

Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol. Pharm. Bull*. 2005; 28(2):253-9.

McLaughlin JL. Assays for Bioactivity. In: Hostettman K. *Method in plant biochemistry*. London: Academic Press; 1991. p. 1-32.

McLaughlin JL, Rogers LL. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J*. 1998; 32:513-24.

Metcalf JS, Lindsay J, Beattie KA, Birmingham S, Saker ML, Törökne AK, Codd GA. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon*. 2002; 40(8):1115-20.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen, LB, Nichols, DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 1982; 45(5):31-34.

Mojica E-RE, Micor JRL. Bioactivity study of *Barringtonia asiatica* (Linnaeus) Kurz. seed aqueous extract in *Artemia salina*. IJB. 2007; 3(3):325-8.

Morales G, Sierra P, Paredes A, Loyola LA, Borquez J. Constituents of *Helenium atacamense* Cabr. J Chil Chem Soc. 2006; 51(1):769-72.

Moreira F de PM, Coutinho V, Montanher ABP, Caro MSB, Brighente IMC, Pizzolatti MG. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre a *Artemia salina*. Quim Nova. 2003; 26(3):309-11.

Moura MD, Torres AR, Oliveira RAG, Diniz MFFM, Barbosa-Filho JM. Natural products inhibitors of models of mammary neoplasia. Brit J Phytotherapy. 2001; 5(3):124-45.

NCI - National Cancer Institute [homepage na Internet]. Bethesda, Estados Unidos [acesso em 8 ago 2008]. Disponível em: <http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 Years. J Nat Prod. 2007; 70(3):461-77.

Ng TB, Liu F, Wang ZT. Antioxidative activity of natural products from plants. Life Sci. 2000; 66(8):709-23.

Nićiforović A, Adzić M, Spasić SD, Radojčić MB. Antitumor effects of a natural anthracycline analog (aloin) involve altered activity of antioxidant enzymes in HeLaS3 cells. Cancer Biol Ther. 2007; 6(8):1200-5.

Ninfali P, Bacchiocca M, Antonelli A, Biagiotti E, Di Gioacchino AM, Piccoli G *et al.* Characterization and biological activity of the main flavonoids from Swiss Chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*). *Phytomedicine*. 2007; 14(2-3):216-21.

Noldin VF, Cechinel Filho V, Monache FD, Benassi JC, Christmann IL, Pedrosa RC, Yunes RA. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. *Quim Nova*. 2003; 26 (3):331-4.

O'Brien P, Carrasco-Pozo C, Speisky H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chem Biol Interact*. 2006; 159(1):1–17.

Oliveira MF, Lemos TLG, de Mattos MC, Segundo TA, Santiago GMP, Braz-Filho R. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. *An Acad Bras Cienc*. 2002; 74(2):211-21.

Ohwada T, Miura M, Tanaka H, Sakamoto S, Yamaguchi K, Ikeda H, Inagaki S. Structural features of aliphatic *N*-nitrosamines of 7-azabicyclo[2.2.1]heptanes that facilitate N-NO bond cleavage. *J Am Chem Soc*. 2001, 123(42):10164-72.

Ozaki AT, Duarte PC. Fitoterápicos utilizados na medicina veterinária em cães e gatos. *Infarma*. 2006; 18(11-12):14-21.

Papazisis KT, Gromichalos GD, Dimitriadis KA, Kortsaris AH. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *J Immunol Methods*. 1997; 208(2):151-8.

Parra AL, Yhebra RS, Sardiñas IG, Buella LI. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 2001; 8(5):395-400.

Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J Dent*. 2000; 28(5):341-5.

Piccardi R, Frosini A, Tredici MR, Margheri MC. Bioactivity in free-living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc*. *J Appl Phycol*. 2000; 12(3-5): 543-7.

Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000; 63(7):1035-42.

Pimenta LPS, Pinto GB, Takahashi JA, Silva L.G.F, Boaventura MAD. Biological screening of Annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine*. 2003; 10(2-3):209-12.

Rang HP, Dale MM, Ritter, JM. *Farmacologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001.

Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther*. 2003; 99(1):1-13.

Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. *Farmacognosia e Biotecnologia*. São Paulo: Editora Premier; 1997.

Ruiz ALTG, Taffarello D, Souza VHS, Carvalho JE. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(2):295-300.

Said IM, bin Din L, Samsudin MW, Yusoff NI, Latiff A, Ali RM, Hadi AHA. A phytochemical survey of Sayap-Kinabalu Park, Sabah. ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC); 1998 [acesso em 21 jul 2008]. Disponível em: www.arbec.com.my/pdf/july-6.pdf

Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo, D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. Free Radic Biol Med. 1995; 19(4):481-6.

Salas C, Tapia RA, Ciudad K, Armstrong V, Orellana M, Kemmerling U *et al.* *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. Bioorg Med Chem. 2008; 16(2):668-74.

Santos RI. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC; 2007. p. 403-34.

Schaffner-Sabba K, Aschmidt-Ruppin K, Wehrli W, Schuerch AR, Wasley JWF. β -lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. J Med Chem. 1984; 27(8):990-4.

Scharsack JP, Steinhagen D, Kleczka C, Schmidt JO, Körting W, Michael RD *et al.* The haemoflagellate *Trypanoplasma borreli* induces the production of nitric oxide, which is

associated with modulation of carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte functions. Fish Shellfish Immunol. 2003; 14(3):207–22.

Schenkel EP, Gosmann G, Petrovick PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC; 2007. p. 317-402.

Schripsema J, Dagnino D, Gosmann G. Alcalóides indólicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC; 2007. p. 819-46.

Sharma EA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer. 2005; 41(13):1955-68.

Shieh D-E, Chen Y-Y, Yen M-H, Chiang L-C, Lin C-C. Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells. Life Sci. 2004; 74(18):2279-90.

Silva MN, Ferreira VF, de Souza MCBV. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. Quim Nova. 2003; 26(3):407-16.

Silva DB, Tulli ECO, Garcez WS, Nascimento EA, Siqueira JM. Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). J Braz Chem Soc. 2007; 18(8):1560-65.

Siqueira JM, Bomm MD, Pereira NFG, Garcez WS, Boaventra MA. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. Quim Nova. 1998; 21(5):557-9.

Siqueira JM. Estudo fitoquímico de *Duguetia glabriuscula* R.E. Fries (R.E.Fries) e *Unonopsis lindmanii* R.E. Fries (R.E.Fries) – Annonaceae – biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1999.

Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. Free Radic Biol Med. 2000; 29(3-4):375-83.

Speisky H, Cassels BK. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. Pharmacol Res. 1994; 29(1):1-12.

Stefanello MEA, Salvador MJ, Ito IY, Macari PAT. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *fl occosa*. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16(4):525-30.

Stévigny C, Bailly C, Quetin-Leclercq J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. Curr Med Chem Anticancer Agents. 2005; 5(2):173-82.

Su Y-T, Chang H-L, Shyue S-K, Hsu S-L. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. Biochem Pharmacol. 2005; 70(2):229–41.

Svensson B-M, Mathiasson L, Mårtensson L; Bergström, S. *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. *Environ Monit Assess.* 2005; 102(1-3):309-21.

Tan W-F, Lin L-P, Li M-H, Zhang Y-X, Tong Y-G, Xiao D, Ding J. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. *Eur J Pharmacol.* 2003; 459(2-3):255-62.

Tan J-H, Zhang Q-X, Huang Z-S, Chen Y, Wang X-D, Gu L-Q, Wu JY. Synthesis, DNA binding and cytotoxicity of new pyrazole emodin derivatives. *Eur J Med Chem.* 2006; 41(9):1041-7.

Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK. Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. *Curr Sci.* 2001; 80(11):1387-96.

Teich L, Daub KS, Krügel V, Nissler L, Gebhardt R, Eger K. Synthesis and biological evaluation of new derivatives of emodin. *Bioorg Med Chem.* 2004; 12(22):5961-71.

Tian B, Hua Y. Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA. *Food Chem.* 2005; 91(3):413-8.

Tiew P, Puntumchai A, Kokpol U, Chavasiri W. Coumarins from the heartwoods of *Mansonia gagei* Drumm. *Phytochemistry.* 2002; 60(8):773-6.

Trouillas P, Calliste C-A, Allais D-P, Simon A, Marfak A, Delage C, Duroux J-L. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chem.* 2003; 80(3):399-407.

Twiner MJ, Dixon SJ, Trick CG. Toxic effects of *Heterosigma akashiwo* do not appear to be mediated by hydrogen peroxide. *Limnol Oceanogr.* 2001; 46(6):1400-5.

Varó I, Navarro JC, Amat F, Guilhermino L. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere.* 2002; 48(6) 563-9.

Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* 2006; 1(3):1112-6.

von Poser GL, Mentz LA. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC; 2007. p. 75-91.

Wamer WG, Vath P, Falvey DE. *In vitro* studies on the photobiological properties of aloe emodin and aloin A. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(2):233-42.

Wang H-W, Chen T-L, Yang P-C, Ueng T-H. Induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by emodin in human lung adenocarcinoma cell line CL5. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29(9):1229-35.

Wang L, Lin L, Ye B. Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 42(5):625–9.

Wang Z-D, Gu L-Q, Wu J-Y. Apoptosis-inducing activity of new pyrazole derivatives in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30(6):1113-6.

Willain Filho A. Potencial analgésico de flavonóides: estudo do mecanismo de ação da quercetina [Dissertação]. Itajaí: Universidade do vale do Itajaí; 2005.

Wuerzberger SM, Pink JJ, Planchon SM, Byers KL, Bornmann WG, Boothman DA. Induction of apoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by β -Lapachone. *Cancer Res.* 1998; 58(9):1876-85.

Yance Jr DR, Sagar SM. Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. *Integr Cancer Ther.* 2006; 5(1):9-29.

Yang Y-C, Lim M-Y, Lee H-S. Emodin isolated from *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) seed shows larvicidal activity against three mosquito species. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(26):7629-31.

Yang J, Li H, Chen Y-Y, Wang X-J, Shi G-Y, Hu Q-S *et al.* Anthraquinones sensitize tumor cells to arsenic cytotoxicity *in vitro* and *in vivo* via reactive oxygen species-mediated dual regulation of apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(12):2027-41.

Ye Q, Alfonso D, Evert D, McLaughlin JL. Longifolicin, longicoricin, and gigantetroneninone, three novel bioactive mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Asimina longifolia* (Annonaceae). *Bioorg Med Chem.* 1996; 4(4):537-45.

Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, Marui N, Matsumoto K, Fujioka A *et al.* The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett.* 1990; 260(1):10-3.

Youn YC, Kwon OS, Han ES, Song JH, Shin YK, Lee CS. Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. *Biochem Pharmacol*. 2002; 63(3):495-505.

Yunes RA, Pedrosa RC, Cechinel Filho V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim Nova*. 2001; 24(1):147-52.

Zhang L, Lau Y-K, Xi L, Hong R-L, Kim DSHL, Chen C-F *et al*. Tyrosine kinase inhibitors, emodin and its derivative repress HER-2/neu-induced cellular transformation and metastasis-associated properties. *Oncogene*. 1998; 16(22):2855-63.

Zuanazzi JAS, Montanha JA. Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC; 2007. p.577-614.