

RENATA TRENTIN PERDOMO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E DA INIBIÇÃO DAS
TOPOISOMERASES POR EXTRATOS, SUBSTÂNCIAS PURAS E SEMI-
SINTÉTICAS OBTIDAS DE PRODUTOS NATURAIS**

CAMPO GRANDE
2011

RENATA TRENTIN PERDOMO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E DA INIBIÇÃO DAS
TOPOISOMERASES POR EXTRATOS, SUBSTÂNCIAS PURAS E SEMI-
SINTÉTICAS OBTIDAS DE PRODUTOS NATURAIS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez

CAMPO GRANDE
2011

DEDICATÓRIA

A DEUS

*Diante desta preciosa conquista, não posso deixar de olhar para trás e agradecer!
Obrigada por seres o colo que me consolou nos momentos difíceis
Obrigada por seres a luz que me guiou quando parecia não haver saída...
Obrigada por seres a sabedoria presente durante todos os momentos deste trabalho.
Mas acima de tudo, Deus, obrigada por seres o amor de todos os que me apoiaram
para chegar até aqui e acreditar que posso ainda mais.*

*Aos meus pais **Idalino e Cleuza***

*Deus me deu vocês para que eu tivesse exemplo de vida, de amor, de amizade, de sonho, de realização .
Deus me deu vocês para partilhar meu coração e minha alma, para trazer-me coragem e esperança, para ensinar-me o significado do Amor Incondicional.
Tudo que sou e espero ser, devo a vocês.*

*A minha família, essência da minha vida, meus amores **Everton, Luiza e Letícia**
Ao Everton, amor incondicional, marido companheiro e pai apaixonado.
As nossas filhas, amor incondicional, luz e alegria.
Felizmente Deus me colocou no caminho certo, onde pude encontrar uma pessoa maravilhosa, que mudou a minha vida, e deu a ela novo sentido, me incentivando e compartilhando na busca dos meus sonhos.
A você Everton, que traz alegria de viver, carinho, companheirismo e principalmente amor, meus sinceros agradecimentos, por fazer parte de mais este, que no momento se realiza.*

*As minhas irmãs **Carla e Fábí**a e ao meu sobrinho e sobrinha **Victor e Sofia**,
Pelo apoio sempre presente que me transformou em gigante, capaz de lutar e ir adiante, apesar das dificuldades, buscando sempre a conquista dos meus ideais.*

EU AMO TODOS VOCÊS...

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos coordenador e secretárias do Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, pelo financiamento do Projeto de Pesquisa e pela concessão da bolsa de estudo.

A minha orientadora profa. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos, sempre presente nos meus caminhos profissionais, direta ou indiretamente, na graduação, no mestrado, no doutorado... E com certeza por muito mais tempo. Muito Obrigada por me deixar acompanhar alguns dos seus passos e me ensinar o sentido de profissionalismo, ética e amizade.

A minha co-orientadora profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez, ao prof. Dr. Walmir Silva Garcez, do departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo direcionamento científico e pela parceria, fornecendo os extratos, frações e substâncias puras no estudo biomonitorado e pela colaboração e paciência nos valiosos ensinamentos. Obrigada aos alunos e alunas responsáveis pelas amostras vegetais, Eder Bisoli, Ivana Violante, Patrícia Figueiredo, Aymee Portela, Lillyam May, Maria José Camargo, Carlos Henrique Miguita, Ana Camila Micheletti.

Aos professores Dr. João Ernesto de Carvalho e Dra. Ana Lúcia Ruiz da Universidade Estadual de Campinas pelos valiosos ensinamentos e treinamentos sobre culturas celulares e pela doação das linhagens de células usadas neste estudo. Obrigada a todos os alunos e técnicas do Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas, Divisão de Farmacologia e Toxicologia que me acolheram no período em estive lá.

As amigas do Laboratório de Culturas Celulares da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Lyara Meira , Danielle Bogo , Julia Saboia, Marillin Castro, Vanessa Farell, Laura Verão.

As amigas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Manoel, Andressa, Mayara, kelli e todos que lá desenvolvem suas atividades.

Sinceros agradecimentos às técnicas Regininha, Liliane, Rita e Débora, pelo grande apoio.

Às minhas queridas e admiradas amigas e suas famílias, Marta, Carlos Henrique, Gabriel e Rodrigo, à Paola, Juliano, Julia e Maitê, à minha amiga Ana Tereza, amizade verdadeira e companheira desde os tempos de faculdade.

As pessoas que tanto me apoiaram e que amo, minha sogra Maria Fernanda, meu sogro Otacílio (in memoriam), cunhadas e família Evelin e Erica. Aos companheiros e conselheiros Felipe e Edna e seus e filhos

Por fim, a todos que contribuíram para que a realização deste trabalho, Muito Obrigada!

RESUMO

As DNA Topoisomerasas são classes de enzimas que controlam a topologia do DNA e são expressas de 25 a 300 vezes mais em tecidos tumorais sendo alvos importantes no desenvolvimento de drogas anti-câncer. Importantes quimioterápicos anti-câncer inibidores das topoisomerasas I e II são originados de plantas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiproliferativa de extratos e substâncias puras obtidas das espécies *Combretum laxum*, *Hyptis crenata*, *Ocotea lancifolia*, *Aiouea trinervis*, *Guarea kunthiana*, *Nymphaea amazonum*, *Galianthe thalictroides*, *Pogonopus tubulosus* e *Parmotrema lichexantonicum*, e a atividade inibitória sobre as topoisomerasas I e II humanas, bem como avaliar o índice de seletividade nas células neoplásicas. O teste de citotoxicidade pelo corante sulforrodamina B foi realizado em 9 linhagens de células neoplásicas e 2 de células normais. Os compostos da raiz de *Combretum laxum* apresentaram potente atividade antiproliferativa em células de mama (MCF-7) e a metoxicoelonina foi mais seletivo em células de melanoma humano. O ácido carnósico e o ácido carnosólico isolados da planta *Hyptis crenata* apresentaram atividade moderada e seletividade em células B16-F10. Os dois alcalóides RC6-2 e RC6-5 da espécie *Galianthe thalictroides* apresentaram potente atividade frente as linhagens MCF-7 e B16-F10, bem como a fração 6 de origem. A atividade inibitória das topoisomerasas foi avaliada em extratos, frações e substâncias puras que apresentaram valor de TGI < 30 µg/mL. A topoisomerase II foi inibida totalmente pela xantona 17 e alcalóide β-carbolínico RC6-2 e RC6-5 (100 µM) e parcialmente pelas xantonas 15 e 16 (200 µM), metoxicoelonina, ácido carnosólico e o alcalóide PGC12 (100 µM). A topoisomerase I foi inibida por alcalóides β-carbolínicos RC6-2 e RC6-5, ácido pisiférico e a xantona 17. Estes resultados indicam que a potente citotoxicidade foi mediada por inibição das topoisomerasas e que esses compostos são candidatos a estudos terapêuticos do tratamento do câncer.

Palavras-chave: citotoxicidade, topoisomerasas, atividade anti-câncer

ABSTRACT

DNA topoisomerases are classes of enzymes that control DNA topology. Because their expression is 25 to 300 fold higher in tumor tissues, they are valuable targets for the development of anti-cancer drugs. A number of important anticancer chemotherapeutic agents capable of inhibiting topoisomerases I and II are derived from plants. The purpose of this study was to evaluate the antiproliferative activity of extracts and pure compounds obtained from the species *Combretum laxum*, *Hyptis crenata*, *Ocotea lancifolia*, *Aiouea trinervis*, *Guarea kunthiana*, *Nymphaea amazonum*, *Galianthe thalictroides*, *Pogonopus tubulosus*, and *Parmotrema lichexantonicum*, as well as to assess their inhibitory activity on human topoisomerases I and II and determine selectivity indices against neoplastic cells. Cytotoxicity tests based on sulforhodamine B dye were performed on 9 lines of neoplastic cells and 2 lines of normal cells. The compounds obtained from *Combretum laxum* roots exhibited potent antiproliferative activity against breast cells (MCF-7). Methoxycoelonin proved more selective against human melanoma cells. Carnosic acid and carnosolic acid isolated from *Hyptis crenata* showed moderate activity and selectivity against B16-F10 cells. RC6-2 and RC6-5, two alkaloids from *Galianthe thalictroides*, exhibited potent activity against the MCF-7 and B16-F10 cell lines, as did fraction 6 of the original extract. Topoisomerase-inhibiting activity was assessed in extracts, fractions, and pure compounds with TGI values lower than 30 µg/mL. Topoisomerase II was totally inhibited by xantone 17 and alkaloids β-carboline RC6-2 and RC6-5 (100 µM) and partially inhibited by xantone 15 and 16 (200 µM), methoxycoelonina (CP8), carnosolic acid, and the alkaloid PGC12 (100 µM). Topoisomerase I was inhibited by alkaloids β-carboline RC6-2 and RC6-5, pisiferic acid, and xantone 17. These results indicate that the potent cytotoxicity detected is mediated by topoisomerase inhibition, a feature that renders these compounds suitable candidates for cancer treatment trials.

Keywords

cytotoxicity, topoisomerases, anti-cancer activity

Lista de abreviaturas

ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovino
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
GI ₅₀	Concentração para Inibir de crescimento de 50% das células
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
kDNA	DNA de cinetoplasto
LC ₅₀	Concentração para matar 50% das células
NCI	Instituto Nacional do Câncer – Estados Unidos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino (Phosphate buffered saline)
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforrodamina B
T0	Tempo zero
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Concentração para inibir 100% das células
U.V	Ultra violeta

Lista de Tabelas	Página
Tabela 1 - Classificação das enzimas topoisomerases.....	29
Tabela 2 - Valores de TGI (µg/mL) dos extratos e compostos da espécie <i>Combretum laxum</i> e da cisplatina (controle positivo).....	45
Tabela 3 - Valores de TGI (µg/mL) dos extratos, frações e compostos isolados da fração diclorometânica da espécie <i>Hyptis crenata</i> e da doxorrubicina (controle positivo).....	49
Tabela 4 - Valores de TGI (µg/mL) das fases obtidas do extrato etanólico da espécie <i>Galianthe thalictroides</i>	52
Tabela 5 - Valores de TGI (µg/mL) das frações obtidas da partição clorofórmica do extrato etanólico da espécie <i>Galianthe thalictroides</i>	52
Tabela 6 - Valores de TGI (µg/mL) das substâncias puras isoladas da fração RC-6	53
Tabela 7 - Valores de TGI (µg/mL) dos extratos, frações e compostos isolados da espécie <i>Pogonopus tubulosus</i> (<i>Rubiaceae</i>) e da doxorrubicina (controle positivo)..	55
Tabela 8 - Valores de TGI (µg/mL) dos extratos etanólicos das espécie <i>Aiouea trinervis</i> – AT (<i>Lauraceae</i>) e <i>Guarea kunthiana</i> – GK (<i>Meliaceae</i>) e da doxorrubicina (controle positivo).....	56
Tabela 9 - Valores de TGI (µg/mL) do extrato etanólico e fases da espécie <i>Ocotea lancifolia</i> (<i>Lauraceae</i>) e da doxorrubicina (controle positivo).....	57
Tabela 10 - Valores de TGI (µg/mL) do extrato etanólico e fases da espécie <i>Nymphaea amazonum</i> (<i>Nimphaceae</i>) e da doxorrubicina (controle positivo).....	58
Tabela 11 - Valores de GI ₅₀ (µg/mL) dos compostos obtidos da liquexantona extraída da espécie <i>Parmotrema lichexanthonicum</i>	59
Tabela 12 - Compostos, frações e extratos vegetais testados no ensaio de inibição da atividade das enzimas topoisomerases I e II humanas.....	60

Lista de Figuras	Página
Figura 1 - Quimioterápicos anti-câncer obtidos de plantas e derivados semi-sintéticos.	20
Figura 2 - Atividade dos quimioterápicos em cada fase do ciclo celular.....	21
Figura 3 - Reações catalisadas por topoisomerases.....	28
Figura 4 - Ilustração dos produtos de relaxamento do DNA plasmidial pela topoisomerase em gel de agarose.....	31
Figura 5- Produtos da reação de decatenação de DNA de cinetoplasto pela atividade da enzima.....	32
Figura 6- Modelo de mecanismo de ação do inibidor de topo I, demonstrando desde a formação das super-hélices (a), o relaxamento do DNA pela ação da topo I (b) e a interação molecular da topo I e posteriormente da camptotecina inibindo a re-ligação da fita clivada (c).....	33
Figura 7 - Células neoplásicas da linhagem Hep ₂ . A esquerda o controle negativo; a direita, o controle positivo, cisplatina (5,0 µg/mL).....	39
Figura 8- Modelo gráfico das variáveis, inibição de 50% do crescimento (GI ₅₀), inibição total do crescimento (TGI) e concentração necessária para matar 50% das células (LC ₅₀).....	44
Figura 9 - Composto extraído da fase diclorometânica da partição do extrato de caule de <i>C. laxum</i>	45
Figura 10 - Atividade antiproliferativa do composto CP8, isolado da fase diclorometânica resultante da partição do extrato bruto da raiz <i>C.laxum</i>	47
Figura 11 - Atividade antiproliferativa da fase diclorometânica (DCM) da partição do extrato etanólico de caule da planta <i>Hyptis crenata</i> frente a linhagens de células neoplásicas.....	48
Figura 12 - Substâncias puras isoladas da fase diclorometânica (1 a 7) da fase	49

hexânica (8) da espécie <i>H. crenata</i>	
Figura 13 - Atividade antiproliferativa das substâncias puras com melhor atividade, isoladas da fase diclorometânica, frente a linhagem de células neoplásicas.....	51
Figura 14 – Atividade antiproliferativa do ácido carnosólico, substância pura obtida da fase hexânica de caule de <i>H. crenata</i> , frente a linhagem de células neoplásicas.....	51
Figura 15 - Substâncias puras isoladas da fração RC-6 produto da fase clorofórmica do extrato etanólico de <i>G. thalictroides</i>	53
Figura 16 - Atividade antiproliferativa das substâncias puras isoladas da fração RC-6, frente a linhagem de células neoplásicas.....	54
Figura 17 – Atividade antiproliferativa dos alcaloides isolados da fração alcaloídica, frente a linhagem de células testadas.....	56
Figura 18 - Derivados da liquexantona obtida do líquen <i>Parmotrema lichexanthonicum</i>	58
Figura 19 - Produtos do relaxamento do DNA plasmidial com extrato nuclear (topo II) após eletroforese em gel de agarose.....	61
Figura 20 - Produtos do relaxamento DNA plasmidial e topo II após eletroforese em gel de agarose.....	62
Figura 21 - Produtos da decatenação do DNA de cinetoplasto (kDNA) com topo II purificada, após eletroforese em gel de agarose.....	63
Figura 22 - Produtos da decatenação do DNA de cinetoplasto (kDNA) com topo II purificada após eletroforese em gel de agarose.....	63
Figura 23 – Produtos do relaxamento do DNA plasmidial com extrato nuclear (topo I), após eletroforese em gel de agarose.....	64
Figura 24 - Produtos do relaxamento do DNA plasmidial com topo I purificada, após eletroforese em gel de agarose.....	65

Figura 25 - Produtos de relaxamento do DNA plasmidial com topo I purificada,
após eletroforese em gel de agarose.

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
Câncer e Plantas Medicinais.....	19
Enzimas DNA topoisomerases.....	26
Reações de topoisomerização <i>in vitro</i> usando DNA plasmidial (pBR322) e DNA de cinetoplasto (kDNA).....	30
Câncer e Topoisomerases.....	32
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
Obtenção dos extratos e substâncias vegetais.....	36
Avaliação da atividade antiproliferativa.....	36
Cultivo celular	37
Preparo das amostras.....	37
Teste de citotoxicidade	37
Teste de inibição das topoisomerases	39
Obtenção do extrato nuclear.....	39
Teste de inibição da topoisomerase I humana.....	40
Teste de inibição da topoisomerase II alfa humana.....	41
Índice de Seletividade (IS).....	42
5. RESULTADOS	43
Atividade Antiproliferativa <i>in vitro</i> das amostras obtidas dos extratos de galho e de raiz da planta <i>Combretum laxum</i>	45
Atividade Antiproliferativa <i>in vitro</i> das amostras obtidas da planta <i>Hyptis</i>	

<i>Crenata</i>	47
Atividade Antiproliferativa <i>in vitro</i> das amostras obtidas da planta <i>Galianthe thalictroides</i>	51
Atividade Antiproliferativa <i>in vitro</i> das amostras obtidas da planta <i>Pogonopus tubulosus</i>	54
Atividade Antiproliferativa <i>in vitro</i> das amostras obtidas das plantas <i>Aiouea trinervis</i> , <i>Ocotea lancifolia</i> e <i>Guarea kunthiana</i>	56
Atividade Antiproliferativa <i>in vitro</i> das amostras obtidas da planta <i>Nymphaea Amazonum</i>	57
Atividade Antiproliferativa <i>in vitro</i> das amostras obtidas do líquen <i>Parmotrema lichexanthonicum</i>	58
Resultados do teste de inibição das topoisomerasas I e II humanas.....	59
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÕES.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
9. APÊNDICE.....	92

1. INTRODUÇÃO

O Estado de Mato Grosso do Sul possui em seu território dois biomas peculiares do Brasil, o Pantanal e o Cerrado. Estes dois biomas apresentam características muito particulares e as espécies que os habitam desenvolveram mecanismos para adaptação e defesa fazendo uso de seu metabolismo secundário.

Os metabólitos secundários são os principais compostos com atividade biológica. Muitas destas substâncias já foram modelos para o desenvolvimento de medicamentos como procaína, cloroquina, ou de fármacos imprescindíveis para o tratamento do câncer.

Neste contexto, a biodiversidade da região Centro-Oeste revela ótimas oportunidades para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. A investigação química monitorada por ensaios de atividade biológica das plantas pode conduzir à descobertas de novas substâncias com atividades anti-câncer dentre outras atividades, que podem ser empregados ou servir como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos.

Deste modo, foi realizado estudo guiado para *screening* de substâncias anti-câncer a partir de extratos, frações e subfrações obtidos de plantas do Cerrado do Estado de Mato Grosso do Sul (MS), na busca de substâncias com potencial atividade anti-câncer.

Alguns extratos e compostos foram obtidos por estudo guiado neste trabalho e outros com prévio conhecimento acerca da atividade antiproliferativa em plantas das famílias Lauraceae, Combretaceae, Lamiaceae, Rubiaceae, Parmeliaceae coletadas também no Cerrado de MS (FIGUEIREDO *et al.*, 2011; MICHELETTI *et al.*, 2011; GARCEZ *et al.*, 2011; 2006; 2000; GARCEZ *et al.*, 2009).

A atividade anti-câncer foi avaliada *in vitro* pelo modelo de culturas de células neoplásicas. Modelo este que apresenta diversas vantagens como: 1. o estudo do comportamento das células em condições controladas, 2. teste com amostras em concentração conhecida e 3. alternativa para a redução dos ensaios *in vivo*, na etapa de triagem, corroborando com os princípios éticos da utilização de animais em experimentos. Estas vantagens garantem que a cultura de células seja insubstituível no desenvolvimento de drogas anti-câncer. Outro fator positivo é que são muito utilizadas como métodos alternativos aos testes farmacológicos em órgãos isolados (CINGI *et al.*, 1991; HAMBURGER E HOSTETTMANN, 1991).

Neste estudo a inclusão de células normais no modelo de citotoxicidade *in vitro*, possibilitou a obtenção da seletividade para as células neoplásicas em relação às normais. A busca desta seletividade justifica-se pelo fato de que mesmo quimioterápicos de uso corrente na terapêutica apresentam citotoxicidade em células normais *in vitro* (GONÇALVES *et al.*, 2006, HENRIKSSON *et al.*, 2006) e *in vivo* (KATZUNG, 2010).

Assim, a busca de produtos naturais bioativos para uso direto ou empregando-se os produtos derivados obtidos por modificações estruturais no intuito de aumentar a efetividade e a absorção ou diminuir a toxicidade com seletividade para as células tumorais pode fornecer subsídios no desenvolvimento de novos agentes anti-câncer.

A fim de elucidar um possível mecanismo de ação das amostras com atividade antiproliferativa, foi padronizado e realizado o teste de inibição das enzimas topoisomerases I e II humanas. Estudo inovador para a equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

O modelo da cultura de células neoplásicas contribuiu tanto para evidenciar a atividade antiproliferativa de produtos naturais, quanto para a obtenção de enzimas e extratos nucleares que no futuro poderá também contribuir para a área de biotecnologia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O uso de produtos naturais para o tratamento de doenças que acometem o ser humano é uma prática empregada há muito tempo. Antigos registros descritos por chineses e egípcios, ou ainda a própria Bíblia descrevem a utilização de produtos naturais para fins medicinais, os quais eram usados de forma habitual por vários povos (GRUNWALD, 1995; CRAGG *et al.*, 1997; CALIXTO, 2000). Vários filósofos são destacados por suas obras sobre história natural. Dentre eles, destacam-se Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que acreditou na natureza como guia de escolha dos remédios (*Natura medicatrix*) e Teofrasto (372 aC), que escreveu vários livros sobre a história das plantas. É deste o registro da espécie botânica *Papaver somniferum*, o ópio, cujo princípio ativo é a Morfina (PINTO *et al.*, 2002).

A prática da cura pelas plantas continua e o uso das plantas medicinais muitas vezes é o único recurso terapêutico para várias comunidades e grupos étnicos. Segundo dados da Organização mundial de Saúde (OMS, 2002) cerca de 80% da população mundial preferem as terapias tradicionais nos cuidados primários da saúde, seja por fatores culturais, financeiros ou geográficos. A maior parte das terapias tradicionais envolve o uso de plantas *in natura* ou produtos manufaturados a partir de seus extratos e princípios ativos.

No Brasil, a concepção de que as plantas devem ser usadas com fins terapêuticos e que a pesquisa com plantas deve ser incentivada foi ratificada a partir de 2006 quando foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Os objetivos específicos deste Projeto foram voltados para produção, distribuição e uso de plantas medicinais e fitoterápicos a partir dos modelos e experiências existentes no Brasil e em outros países.

É importante que haja incentivo para os estudos que buscam elucidar as atividades biológicas das espécies vegetais, pois o uso domiciliar de plantas com fins terapêuticos tem aumentado conforme constatado pelos trabalhos realizados em diversas regiões brasileiras, onde é comum a comercialização de plantas em feiras livres e mercados populares (MACIEL *et al.*, 2002; AZEVEDO E SILVA, 2006; MAIOLI-AZEVEDO; FONSECA-KRUEL, 2007).

Desta forma, as pesquisas com o propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas, ou de aprimorar os fitoterápicos já existentes vêm assumindo um papel importante nas últimas décadas. A maioria (65%) dos fármacos comercializados no mundo é de origem natural ou de produtos sintéticos baseados em produtos naturais (CALIXTO *et al.*, 2001).

Neste contexto, 30% dos medicamentos produzidos pelos países desenvolvidos são provenientes de recursos naturais. No período de 1981 a 2002, dos 90 fármacos analisados pela *Annual Reports of Medicinal Chemistry*, 61 foram derivados semi-sintéticos de plantas e 9 oriundas de produtos naturais. Estima-se que 25% dos fármacos prescritos no mundo provém de plantas.

Dos 252 fármacos considerados básicos pela OMS, 11% são exclusivamente de origem vegetal e vários outros são substâncias extraídas de plantas e usadas como protótipos (BRANDÃO, 2010; RATES, 2001). A classe de medicamentos derivados de plantas contempla os quimioterápicos anti-câncer onde até 2003, 61% das substâncias introduzidas como fármacos derivaram de produtos naturais e esse valor sobe para 74% na área anti-câncer (ROUHI, WASHINGTON, 2003).

2.1 Câncer e Plantas Medicinais

O câncer é uma doença multifatorial que tem se destacado pela crescente prevalência que o caracterizou como problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2002 foram 10 milhões de novos casos e 6 milhões de mortes. Para 2020, as estimativas indicam que serão 15 milhões de casos novos e 12 milhões de mortes por câncer.

No Brasil, as estimativas são de 489 mil casos novos de câncer para 2011 e a previsão para 2020 é de 300 mil mortes (BRASIL, 2009). Os povos das nações em desenvolvimento devem ser mais acometidos pelo câncer. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) considera dois aspectos importantes para justificar este fato, primeiro a mudança na pirâmide etária que levará ao envelhecimento da população e o segundo, o estilo de vida cada vez menos saudável.

Muitos fármacos utilizados para o tratamento de câncer são obtidos de plantas, originados ou derivados delas (Figura 1). Destacando-se os alcalóides vegetais como os alcalóides da vinca (vimblastina e vincristina), cujo efeito antiproliferativo se dá pela inibição do fuso mitótico, interrompendo a divisão celular na metáfase. O taxol, éster alcalóide derivado do teixo ocidental (*Taxus brevifolia*) e do teixo europeu (*Taxus baccata*), (conhecido comercialmente como Paclitaxel®) apresenta ação semelhante aos alcaloides da vinca, inibindo o fuso mitótico, dimerização da tubulina e estabilização dos túbulos, protegendo-os da despolimerização o que resulta na perda da viabilidade celular (CORRÊA, 1995).

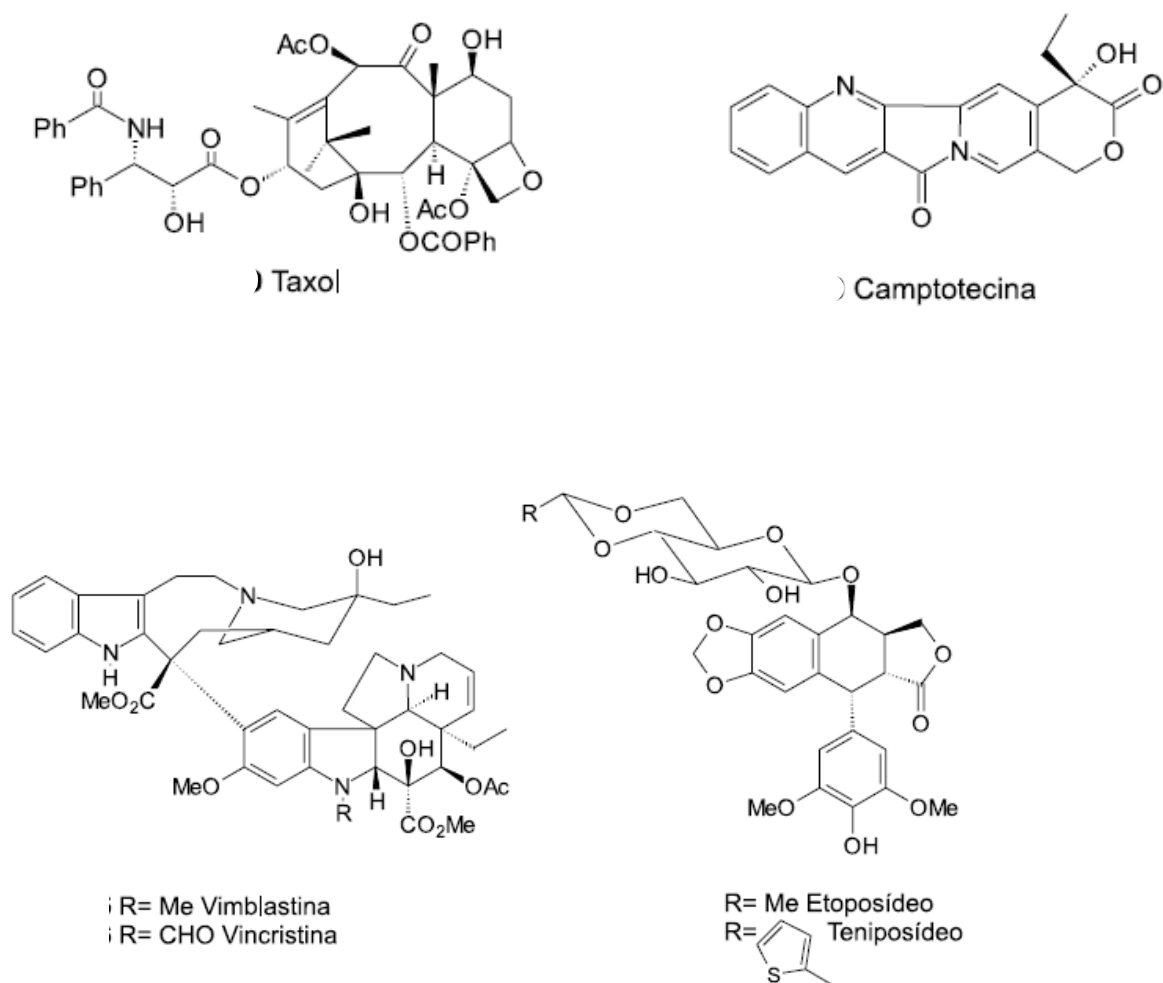


Figura 1 - Quimioterápicos anti-câncer obtidos de plantas e derivados semi-sintéticos.

Fonte: GRANADA *et al.*, 2007

Outros alcaloides usados no tratamento anti-câncer com diferente mecanismo de ação são as podofilotoxinas (ou epipodofilotoxinas), extraídas da raiz do podofilo (*Podophyllum peltatum*), cujos derivados semi-sintéticos são o etoposídeo e o teniposídeo e apresentam ação pelo bloqueio das células nas fases S e G2 e inibição da enzima topoisomerase II. Há ainda a camptotecina, alcalóide proveniente do arbusto *Camptotheca acuminata* e seus derivados irinotecan e topotecan que inibem a enzima topoisomerase I, influenciando negativamente nas etapas de replicação e transcrição o que promove lesão no DNA (GRANADA *et al.*, 2007; MANTLE, LENNARD, PICKERING, 2000).

Na fig. 2 estão evidenciadas as fases do ciclo celular onde cada classe de fármacos anti-tumoral atua, destacando-se os alcaloides supracitados, que atuam nas fases S e G2.

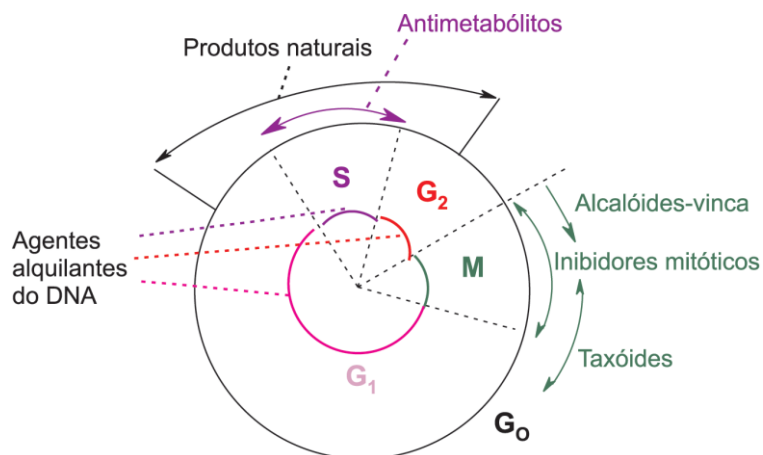


Figura 2 - Atividade dos quimioterápicos em cada fase do ciclo celular animal.
Fonte: ALMEIDA et al., 2005

Pesquisas norte-americanas demonstraram que 118 dos 150 fármacos mais prescritos foram originalmente derivadas de organismos vivos: 74% de plantas, 18% de fungos, 5% de bactérias e 3% de vertebrados (ASSAD *et al*, 2005). No período de 1981 a 2006 a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou 1184 novas entidades químicas das quais 70% são derivados de produtos naturais, principalmente de origem vegetal. Das substâncias anticâncer apenas 22% das 81 novas entidades químicas relatadas são de origem exclusivamente sintética e a maioria restante tem origem natural, seja como protótipo, apresentando o grupo farmacóforo de origem natural ou mimetizando a ação deles (NEWMAN; CRAGG, 2007).

No Brasil, muitas espécies vegetais são usadas como medicamento de forma empírica sem respaldo científico, o que infere a necessidade de estudos, uma vez que o Cerrado Brasileiro é considerado um *hotspot*¹ mundial, uma região que concentra alto nível de biodiversidade (FOGLIO *et al.*, 2006).

A erradicação de tumores constitui um dos grandes desafios da medicina contemporânea, e resultados promissores têm sido obtidos com diversas espécies vegetais no Brasil (ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2002).

¹ *Hotspot* é toda área prioritária para conservação devido a ameaça de extinção no mais alto grau, com pelo menos 1500 espécies endêmicas de plantas e que tenha perdido mais de ¾ de sua vegetação original. O conceito *hotspot* foi criado em 1988 pelo ecólogo inglês Norman Myers para resolver um dos maiores dilemas dos conservacionistas que era determinar quais as áreas mais importantes para preservar a biodiversidade na Terra, pois não está igualmente distribuída no planeta. No ano 2000, existiam 25 *hotspots*, até 2006 aumentaram para 34.

No Estado de Mato Grosso do Sul, há uma variedade de espécies vegetais que foram estudadas quanto a atividade biológica com resultados positivos para potencial atividade anticâncer (SIMIONATTO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2007; GARCEZ *et al.*, 2006; MATOS *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2005).

O conhecimento prévio da atividade antiproliferativa de compostos obtidos de espécies vegetais e de suas famílias, nos guiou para a seleção das espécies que foram estudadas neste trabalho. São elas: *Combretum laxum* (Combretaceae), *Hyptis crenata* (Lamiaceae), *Ocotea lancifolia* e *Aiouea trinervis* (Lauraceae), *Guarea kunthiana* (Meliaceae), *Pogonopus tubulosus*, *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae), *Nymphaea amazonum* (Nymphaeaceae) e *Parmotrema lichexanthonicum*.

Família Lamiaceae

A família Lamiaceae (antiga Labiatae, Adanson - ou Labiadas) compreende, atualmente de 236 a 258 gêneros e de 6970 a 7193 espécies, subdividida em 7 subfamílias. Há cerca de 23 gêneros e 232 espécies nativas do Brasil. São cosmopolitas, porém têm como centros de origem as regiões mediterrâneas, o Oriente Médio e as montanhas subtropicais.

Muitas espécies são importantes, entre outros usos, para extração de óleos essenciais (*Mentha*, *Lavandula*, *Marrubium*, *Nepeta*, *Ocimum*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus*), tanto para uso cosmético, como condimentar, aromático e/ou medicinal. Há também o uso caseiro de várias espécies, tanto para chás, condimentos e/ou como algum outro uso tradicional, não podendo faltar nas hortas caseiras. Há algumas espécies que são invasoras de outras culturas agrícolas (ex. gêneros *Leonotis*, *Leonurus*), apesar de apresentarem propriedades medicinais.

Alguns gêneros apresentaram bioatividades importantes, como no caso da planta *Marrubium cilleneum* que apresentou atividade citotóxica com as células de carcinoma humano de mama (MCF-7), de cervix (HeLa), de leucemia linfoblástica aguda (MOLT-4), de K562 (leucemia mielóide crônica) e de melanoma (FM3) (KARIOTI *et al.*, 2007).

O gênero *Hyptis* se destaca por apresentar plantas com atividade antiproliferativa (LAMBLIN *et al.*, 2008), como a espécie *H. matiusii* (DA ARAÚJO *et al.*, 2006; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2004) e *H. pectinata*, oriunda do México (FRAGOSO-SERRANO *et al.*, 2005).

Família Lauraceae

A família Lauraceae compreende 54 gêneros e cerca de 2500 espécies, as quais são predominantemente arbóreas, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta e estendendo-se a regiões de clima temperado. No Brasil, esta família é representada por 19 gêneros e aproximadamente 390 espécies (JOLY, 1975).

Trata-se de uma família importante como fonte de produtos naturais, destacando-se os pertencentes às seguintes classes: neolignanas e lignanas, alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos, mono- e sesquiterpenos, pironas e γ -lactonas (BATISTA, 2001; GARCEZ *et al.*, 2001; MORAIS *et al.*, 1999; LOPES *et al.*, 1996; GARCEZ *et al.*, 1995).

A literatura também relata atividades biológicas significativas para diversos metabólitos secundários isolados de Lauraceae. Compostos como γ -lactonas, neo-lignanas, alcaloides e flavonóides demonstraram atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais, tais como P-388 (leucemia murina), A549 (carcinoma de pulmão humano) e HT-29 (carcinoma de cólon humano) (YE *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1998; TSAI *et al.*, 1987; CHENG *et al.*, 2001; TSAI *et al.*, 2001; KNOW *et al.*, 2000).

Alguns alcaloides do tipo aporfínico apresentaram significativa inibição de crescimento de células do tipo HuH-7 de hepatoma humano, inibindo também a biossíntese de macromoléculas de DNA e RNA (HUANG *et al.*, 1998). Vale mencionar também a atividade antiplaquetária demonstrada por extratos de *Neolitsea* genus, *N. parvigemma*, *N. aurata*, *N. vilosa* (CHANG *et al.*, 2002) e atividade antitrombina detectada com *Laurus azorica* (DE MEDEIROS *et al.*, 2000), bem como a atividade citotóxica detectada por estudos com as plantas *Laurus nobilis*, *Lindera megaphylla* e *Ocotea corymbosa* nas células MCF-7 (mama) e K562 (leucemia), respectivamente (HUANG *et al.*, 1998; TELES *et al.*, 2005)

Com relação à atividade antiviral, há relatos de flavonóides ativos contra vírus do herpes simples do tipo 1 (HSV-1) e adenovírus do tipo 3 (AD-3) *in vitro* (ALMEIDA *et al.*, 1998) e de lignanas e sesquiterpenos responsáveis pela inibição da replicação do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) (ZHANG *et al.*, 2001). A literatura também registra atividade antifúngica de pironas, dienos e hidrocarbonetos de cadeia longa obtidos de espécies de Lauraceae (CARMAN; HANDLEY, 1999; DOMERGUE *et al.*, 2000).

Família Combretaceae

A família Combretaceae compreende dezoito gêneros e cerca de 600 espécies, de distribuição tropical e subtropical na superfície terrestre, alguns dos quais com ocorrência em Mato Grosso do Sul (JOLY, 1975).

Além da utilização de um grande número de espécies desta família na medicina tradicional de alguns países, notadamente na Índia e no continente africano (BABA-MOUSSA *et al.*, 1999; FYHRQUIST *et al.*, 2002), há que se destacar as espécies pertencentes aos gêneros *Combretum* e *Terminalia*, como fonte de substâncias bioativas de grande interesse.

Pode-se citar, por exemplo, o isolamento das Combretastatinas (derivados fenantrênicos, bibenzílicos e estilbênicos), que possuem atividade antineoplásica, de *Combretum caffrum* (PETIT *et al.*, 1987; 1989; 1995). A substância denominada Combretastatina A-4, o mais potente inibidor de crescimento de células cancerígenas desta série de compostos, encontra-se em fase de testes pré-clínicos (PETIT *et al.*, 1995; BIBBY, 2002). Outras espécies do gênero *Combretum* têm fornecido substâncias com atividades antibacteriana e hepatoprotetora (MARTINI *et al.*, 1998; ADNYANA *et al.*, 2001^a, 2001^b). Com relação às espécies representantes do gênero *Terminalia*, sabe-se que pelo menos sete têm sido empregadas na medicina popular para o tratamento de câncer (FYHRQUIST *et al.*, 2002). Em conformidade com tais informações, ácido gálico, galato de etila e luteolina foram identificados como os constituintes responsáveis pela atividade de inibição de crescimento celular apresentada por *T. arjuna* (PETIT *et al.*, 1996), assim como taninos com ação anticâncer foram identificados nesta espécie e também em *T. cattapa* (KANDILL *et al.*, 2001). Da mesma maneira, ácido gálico e seu éster etílico foram caracterizados como potentes agentes antimicrobianos presentes em *T. chebula* (SATO *et al.*, 1997).

Vale mencionar também as atividades farmacológicas demonstradas por extratos de *Terminalia pallida* (atividade antibacteriana) [GUPTA *et al.*, 2002], *T. bellerica* e *T. arjuna* (redução dos níveis de lipídeos em animais) [SHAILA *et al.*, 1995; KHANNA *et al.*, 1996], *T. chebula* (atividade antiprotozoária e antibacteriana) [SOHNI *et al.*, 1995; MALEKZADEH *et al.*, 2001], *T. alata* (atividade antiviral) (TAYLOR *et al.*, 1996) e *Combretum molle* (anti-protozoária) (ASRES *et al.*, 2001).

Família Nymphaeaceae

A família Nymphaeaceae possui seis gêneros, totalizando 50 espécies (BURKAET *et al*., 1987), das quais 40 são do gênero *Nymphaea* (COOK, 1990). Apresentam-se amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas de todo o mundo; é constituída de plantas aquáticas de folhas flutuantes, às vezes submersas.

Dois gêneros de Nymphaeaceae ocorrem no Pantanal, *Nymphaea* (7 espécies) e *Victoria* (1 espécie). As espécies encontradas no Pantanal são *Victoria amazonica*, *Nymphaea amazonum* (Mart. & Zucc), *N. belophylla* Trickett, *N. gardneriana* Planch., *N. jame soniana* Planch., *N. linguLata* Wiersema, *N. oxypetaLa* Planch. e *N. proLifera* Wiersema (POTT, 1998).

A espécie *Nymphaea amazonum* (Mart. & Zucc) apresenta os nomes populares: lagartixa (pronúncia regional largatixa); camalote-da-meia-noite, dama-da-noite, batata-d'água e pata-de-boi.

As plantas desse gênero contêm alcaloides com efeito coagulante. Já o rizoma contém tanino, glicose, resina, metarabina, amido, legumina e celulose (POTT E POTT, 2000).

Com relação a atividades biológicas, foram isolados alcaloides sesquiterpenos da planta *Nuphar pumilum* que apresentaram atividade citotóxica em células de leucemia humana (U937), melanoma murino (B16-F10) e também em fibroblastos humanos (HISASHI *et al.*, 2006), bem como, atividade antiviral (GUO *et al.*, 2006).

Família Rubiaceae

A família Rubiaceae é a quarta maior das dicotiledôneas, após Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae, com aproximadamente 650 gêneros e 13.000 espécies (DELPRETE, 2004). Segundo Bremer *et al* (1995) e Rova *et al* (2002), a Rubiaceae se subdivide em três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae. Representada por árvores, arbustos e ervas, a família Rubiaceae encontra-se distribuída, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, concentrando-se em 30% na América do Sul (DELPRETE, 2004; NASCIMENTO, 2005).

No Brasil, a família Rubiaceae possui aproximadamente 2.000 espécies divididas em 110 gêneros, amplamente distribuídos nos ecossistemas do Cerrado, Floresta Amazônica, Floresta Atlântica, Caatingas e Restingas (DELPRETE, 1998; SILVA *et al.*, 2006; NASCIMENTO, 2005). A família é conhecida devido à importância econômica e terapêutica

de suas espécies, sendo utilizadas para diversos fins medicinais em todo mundo (CARDOSO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006). Estudos de espécies desta família revelaram a presença de uma grande diversidade de metabólitos secundários, tais como iridóides (MOURA *et al.*, 2006), alcalóides (HENRIQUES *et al.*, 2004), antraquinonas (LING *et al.*, 2002), flavonóides, derivados fenólicos, triterpenos, diterpenos, cumarinas (LUCIANO *et al.*, 2004), sendo que todos eles apresentam alto potencial biológico (CARDOSO *et al.*, 2004).

O gênero americano *Galianthe* está constituído de 49 espécies distribuídas em dois subgêneros: *Galianthe* e *Ebelia*. O primeiro, ao qual pertence a espécie *Galianthe thalictroidess* é exclusivamente sul-americano, sendo encontrado nos países, Peru, Brasil e Argentina. A ocorrência desta espécie é maior no planalto central e no planalto meridional brasileiro, além de um setor do Paraguai oriental (CABRAL, 2001).

As espécies do gênero *Galianthe* são pouco estudadas a cerca da atividade biológica. Constam na literatura, estudo químico e biológico de apenas duas espécies deste gênero, a planta *Galianthe brasiliensis* e *Galianthe ramosa*.

Da espécie *G. brasiliensis* foi isolado um triterpeno – ácido ursólico, dois esteróides sitosterol – estigmasterol, campesterol e quatro iridoides glicosilados – asperulosídeo, deacetilasperulosídeo. O ácido ursólico e o asperulosídeo apresentaram atividade anti-tumoral (MOURA *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2005).

Considerando as atividades biológicas identificadas em estudos com espécies vegetais, e a ocorrência em Mato Grosso do Sul de várias espécies vegetais, cujas famílias foram ou estão sendo estudadas sob o ponto de vista fitoquímico e farmacológico, justifica-se, portanto, a proposta de avaliação da atividade antiproliferativa de espécies das famílias Combretáceas, Lauráceas, Lamiaceas, Nymphaeaceas e Parmeliaceas, visando no futuro o isolamento e elucidação estrutural de seus metabólitos secundários com potente atividade anti-câncer e também foi objetivo deste trabalho o teste de inibição das enzimas topoisomerases para as amostras que evidenciaram atividade antiproliferativa de elevada potência. A inibição das topoisomerases é uma proposta de mecanismo de ação de citotoxicidade conhecido por alguns quimioterápicos de uso na terapêutica moderna anti-câncer.

Para elucidar a importância do estudo destas enzimas, importantes conceitos e informações a respeito das topoisomerases, *in vivo* e *in vitro* serão apresentados seguir.

2.2 Enzimas DNA Topoisomerases

O ácido desoxirribonucléico (DNA) consiste em duas longas fitas helicoidais espiraladas em torno de um eixo comum formando dupla-hélices. O DNA atinge até mil vezes o tamanho do diâmetro da própria célula, medindo até 2 metros de uma ponta a outra da fita. No entanto, o material genético tem diâmetro de apenas 20 Å. Desta forma, para monitorar os processos de divisão celular desta grande quantidade de DNA, estas moléculas podem enovelar-se e curvar-se no espaço, levando a alterações da topologia (WALKER, 1999).

A alteração topológica mais freqüente ocorre quando durante o desemparelhamento da dupla fita. A tensão induzida para desemparelhar é atenuada pela torção da dupla-hélice em si mesma, formando super-hélices que geram características de DNA super-enovelado. Estas estruturas são formadas principalmente durante as etapas de replicação e transcrição na divisão celular (LODISH et al., 2002).

Quando as super-hélices são formadas com torção para trás da forquilha de desemparelhamento, são denominadas negativas, e quando a torção é para frente é denominada super-hélice positiva. Embora a dupla hélice se mantenha globalmente intacta, um forte superenrolamento negativo pode resultar em modificações locais da estrutura secundária do DNA, originando regiões desemparelhadas, estruturas cruciformes, Z-DNA, e H-DNA. A conformação super-enovelada negativa, que o DNA assume *in vivo*, é de extrema importância em processos que requerem energia, como a transcrição e a replicação (PRAZERES, 2001).

As variações na topologia do DNA são controladas pelas enzimas específicas denominadas topoisomerases. As DNA topoisomerases são classes de enzimas nucleares que controlam a topologia ou a geometria tridimensional do DNA sem mudança na estrutura química subjacente do DNA. Desta forma, as topoisomerases catalisam a isomerização topológica do DNA através da quebra transitória, antes da união 5'-3' das duas extremidades, e re-ligação da fita de DNA gerando ou eliminando super-hélices (CHAMPOUX, 2001).

A quebra do DNA pelas topoisomerases é acompanhada pela formação de uma ligação fosfodiéster transiente entre um resíduo de tirosina específico da proteína e uma das extremidades da fita clivada. A partir desta distinção, surgem as classes e subclasses de topoisomerase I e topoisomerase II.

A Topo I relaxa o DNA super- enovelado em moléculas de fita simples pela clivagem ou quebra transitória e re-ligamento de uma fita de DNA circular ou se a molécula de fita dupla circular apresentar uma das fitas clivada. A topo II também relaxa o DNA por sua clivagem transitória, porém, nas duas fitas de DNA em reação dependente de ATP. Todas desempenham a função de clivar e religar as fitas de DNA regulando o super-enovelamento do DNA e desenrolando segmentos de cromossomo (POSTOW *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 1983).

Neste contexto, diferentes tipos de reações são catalizadas pelas topoisomerases. A reação que gera mudanças no grau de super-enovelamento do DNA, isto é, a conversão de moléculas de DNA relaxadas em moléculas de DNA super-enoveladas (reação executada somente pelas topo II bacterianas) e o relaxamento de moléculas super-enoveladas (Figura 3a) (reação catalisada pelas topoI e topoII, tanto bacterianas quanto eucarióticas). As topoisomerases do tipo II podem também catalisar a formação e a dissolução de estruturas em forma de nó (*knots*) (Figura 3b) bem como a concatenação e decatenação de moléculas circulares (Figura 3c). As topoisomerases do tipo I podem realizar as duas reações descritas anteriormente somente em moléculas circulares de fita simples ou se a molécula de DNA de fita dupla circular possuir uma das fitas clivada.

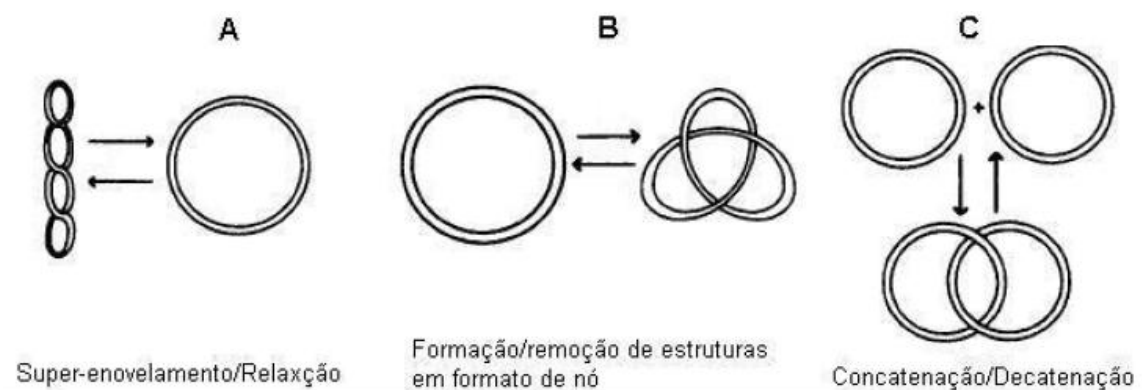


Figura 3 – Reações catalisadas por topoisomerases.

Fonte: Champoux (2001).

A topoisomerase I (topo I), no curso da reação cliva somente uma fita de uma dupla hélice de DNA e depois a re-liga. Esta classe é dividida em 2 subfamílias: A subfamília IA e a subfamília IB (Tabela 1). As topoisomerases IA (bacterianas) se ligam ao terminal 5' fosfato do corte no DNA, enquanto que as topoisomerases IB (representada pela topo I eucariótica) se ligam ao terminal 3' fosfato do corte do DNA (WANG, 1996).

Tabela 1 – Classificação das enzimas topoisomerases.

Subfamília	DNA topoisomerases
IA	DNA topoisomerases I e III Bacterianas DNA topoisomerase III de leveduras DNA topoisomerases III α e III β de <i>Drosophila melanogaster</i> DNA topoisomerases III α e III β de mamíferos
IB	DNA topoisomerases I eucarióticas DNA topoisomerase I mitocondrial de mamíferos DNA topoisomerase de poxvírus
IIA	DNA girase bacteriana DNA topoisomerase IV bacteriana DNA topoisomerase do fago T4 DNA topoisomerase II de levedura DNA topoisomerases II de <i>Drosophila melanogaster</i> DNA topoisomerases II α e II β de mamíferos
IIB	DNA topoisomerase VI de <i>Sulfolobus shibatae</i>

Fonte: Wang,(2002).

A topo I eucariótica, depois que se liga a uma molécula de DNA, a enzima corta uma fita, gerando simultaneamente uma ligação fosfoéster covalente entre terminal 3' liberado no DNA e um resíduo tirosina na enzima. A formação dessa ligação fosfotirosina não precisa de ATP ou de outra fonte de energia. A extremidade 5'-hidroxila do DNA é mantida sem covalência pela enzima. A fita de DNA que não foi clivada atravessa então a quebra na fita única. A fita clivada é então liberada, formando uma estrutura com as mesmas ligações químicas que o DNA de início, mas com uma super-hélice negativa de uma vez.

Diferente da topo I, as enzimas topo II necessitam do ATP para realizar a quebra transitória das duas fitas da dupla hélice do DNA. A ação catalítica da enzima inicia com o corte no DNA e para que na sequência haja a ligação da enzima ao fragmento 5'. Ocorre então o desenrolamento de uma fita pela quebra no DNA e posterior re-ligação das fitas. Estas enzimas hidrolisam ATP como parte do ciclo da reação catalítica. Esta energia necessária é naturalmente encontrada na bioquímica celular.

Recentemente, foi proposta a hipótese de que energia livre é necessária para manipular interações proteína-proteína para manter um elevado grau de estabilidade da enzima durante a formação do dímero enzima-DNA e a reação de quebra transitória (BATES, BERGER, MAXWELL, 2011) .

As topo II se dividem em topo IIA e topo IIB. A primeira é encontrada em humanos e apresenta-se em duas isoformas, a topo II α (alfa) e a topo II β (beta). Elas apresentam diferentes formas de expressão e diferentes funções (CORBETT; BERGER, 2004). A topo II alfa está primordialmente envolvida na regulação do enovelamento do DNA durante as fases de replicação e na catenação durante a fase de segregação cromossômica. Enquanto a topo II beta regula a transcrição do DNA (JU, *et al.* 2006).

As topoisomerases do tipo IIA, desempenham um papel fundamental na segregação dos cromossomos durante a divisão celular, desvinculando as cromátides irmãs concatenadas, permitindo assim que as células-filhas recebam os cromossomos adequadamente (WANG, 2002). Elas também são necessárias para reduzir o nível de nós do DNA, que é esperado que ocorra pela alta compactação do DNA. Estas formas de nó são nocivos se ficarem acumulados.

As reações de topoisomerização, ou seja, o relaxamento do DNA enovelado ou super-helicoidal e a decatenação do DNA catenado podem ser estudadas *in vitro* com o uso dos substratos para a topoisomerase, como o DNA plasmidial (pDNA) para topoI e topo II e com o uso de DNA de cinetoplasto (kDNA) para reações específicas para topo II (STRAUSS e WANG, 1990).

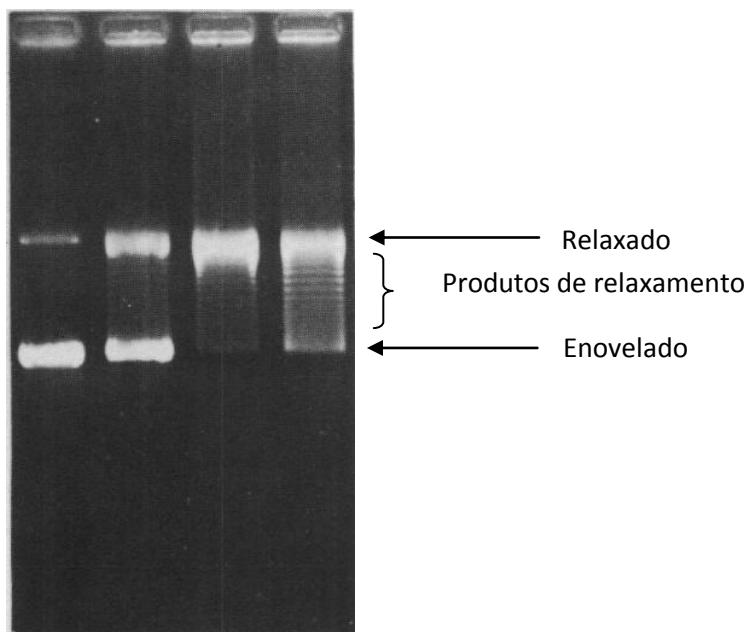
Reações de topoisomerização *in vitro* usando DNA plasmidial (pBR322) e DNA de cinetoplasto (kDNA)

Como todas as moléculas de DNA de cadeia dupla, um plasmídeo (pDNA) é constituído por duas cadeias lineares de desoxirribonucleotídeos ligados entre si por pontes de hidrogênio estabelecidas entre purinas e pirimidinas. No caso particular do pDNA, as duas extremidades da molécula encontram-se ligadas covalentemente, isto é, os dois esqueletos fosfodiéster encontram-se intactos, formando, assim, um *loop* fechado onde assume forma de grandes alças, cujas extremidades são fixadas por macromoléculas. Deste modo, a molécula de DNA fica impedida de girar sobre o eixo da própria hélice, gerando uma nova estrutura conformacional mais compacta, o DNA circular super-enovelado (WALKER e PAPLEY, 1999).

A quebra, química ou enzimática, de uma ligação fosfodiéster numa das fitas do DNA vai permitir que a cadeia quebrada rode sobre a cadeia intacta, dissipando assim a tensão imposta pelo super- enovelamento. O resultado é uma molécula com uma forma circular, mas

sem qualquer super-enovelamento. Esta isoforma é denominada circular aberta ou relaxada se não existir qualquer quebra nas cadeias do DNA. Quando o corte ocorre em ambas as cadeias da dupla hélice, o pDNA adquire uma conformação linear (LODISH et al., 2002)

É possível observar estas diferentes isoformas do mesmo plasmídeo recorrendo a eletroforese em géis de agarose. Devido à sua natureza polianiónica, as moléculas de DNA migram em direção ao ânodo (carregado positivamente). Por outro lado, e uma vez que o gel de agarose é poroso, as moléculas mais compactas irão migrar mais rapidamente. Assim, a molécula super-enovelada, sendo a mais compacta de todas as isoformas, migra mais, seguida da isoforma linear, enquanto a conformação circular aberta surge mais próxima do pólo negativo (Figura 4).



Fonte: Trask e Muller (1983)

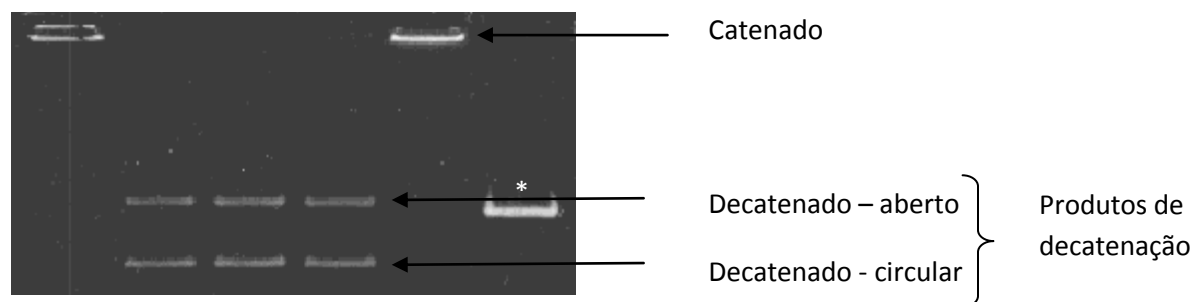
Figura 4 - Ilustração dos produtos de relaxamento do DNA plasmidial pela topoisomerase em gel de agarose.

Além da forma super-enovelada, o DNA pode assumir outras conformações que podem ser visualizadas *in vitro* como bandas de DNA que são produtos da reação de pDNA com topoisomerasas ou produto da reação de kDNA (DNA de cinetoplasto) com topoisomerase II.

O DNA de cinetoplasto contém uma rede de anéis de DNA topologicamente ligados que diferem em dois tamanhos, chamados mini e maxi-círculos. O aprisionamento de

complexos covalentes de DNA-topoisomerase em *Trypanosoma equiperduin* e em *C. fasciculata* mostrou que ambas as classes de anéis estão associados a uma enzima do tipo II (WANG, 1996). Desta forma ficou evidenciado que apenas a enzima topoisomerase II possui a habilidade de decatenar este tipo de DNA e gerar monômeros de DNA. Além do mais, a reação de decatenação é específica para ensaios com topo II (OSHEROFF, 1989).

Também é possível observar as formas de DNA catenado e decatenado recorrendo a eletroforese em gel de agarose. Devido à sua natureza polianiônica, as moléculas de DNA migram em direção ao ânodo (carregado positivamente). Por outro lado, e uma vez que o gel de agarose é poroso, os produtos de DNA decatenado irão migrar mais rapidamente que a forma catenada que fica muito próximo ao ponto de aplicação (Figura 5). As redes maiores de kDNA permanecem no poço do gel, e os minicírculos liberados migram para o gel, geralmente como uma banda discreta. Complexos intermediários em vários estágios de decatenação podem ser vistos quando a atividade da topoisomerase é menor do que a atividade catalítica ideal da topoisomerase II.



*marcador de DNA linear

Figura 5- Produtos da reação de decatenação de DNA de cinetoplasto pela atividade da enzima DNA topoisomerase II. Fonte: topoGen®, 2007;

Câncer e topoisomerases

As topoisomerases, durante a proliferação celular, participam da manutenção e replicação do DNA. Quando estas funções são desativadas, as células ficam vulneráveis. Além disso, tecidos tumorais expressam maior concentração de DNA-Topo I e II do que células e metabolismo normal (Kellner et al., 1997). Assim, as topoisomerases são alvos importantes no desenvolvimento de novas drogas, principalmente para as que apresentam atividade anticâncer.

O câncer, ou cientificamente denominado neoplasia é uma doença que se caracteriza pela presença de células anômalas que se proliferam mais rapidamente do que as células de metabolismo normal, sem a necessidade de fatores de crescimento específicos para tal tecido (LODISH et al., 2002)

Essas células alteradas passam então a se comportar de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada. A manutenção e o acúmulo de massa dessas células formam os tumores malignos e elas também podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e de migrarem, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através destes, disseminarem-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases.

Grande número de fitofármacos tem demonstrado ação anticâncer em diversos modelos experimentais através de alterações na via de transdução de sinais que modula a expressão gênica, a progressão do ciclo celular, a proliferação, a morte celular, o metabolismo e a apoptose (HEMAISWARYA; DOBLE, 2006). Exemplos são a camptotecina e seus derivados semi-sintéticos (topotecan e irinotecan), que atua na inibição da topoisomerase I e atualmente é utilizada no tratamento de câncer de ovário e cólon e a podofilotoxina e seus derivados (etoposídeo e teniposídeo), substâncias inibidoras da topoisomerase II.

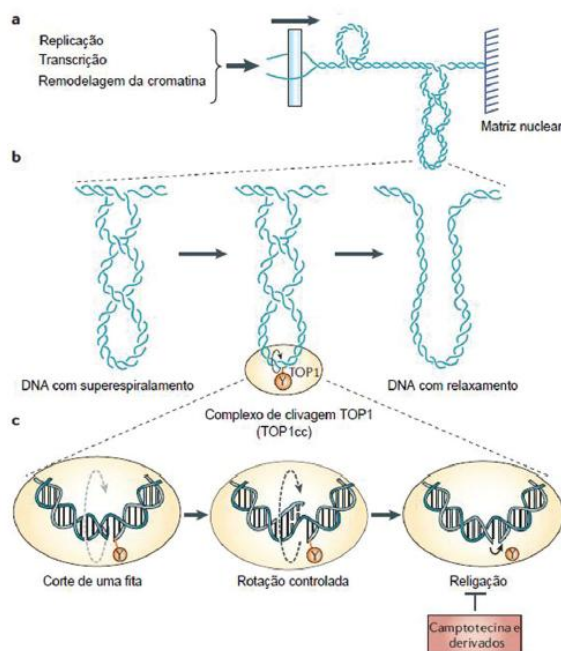


Figura 6- Modelo de mecanismo de ação do inibidor de topo I, demonstrando desde a formação das super-hélices (a), o relaxamento do DNA pela ação da topo I (b) e a interação molecular da topo I e posteriormente da camptotecina inibindo a re-ligação da fita clivada (c).
Fonte: POMMIER, 2006.

Os inibidores da topo II eucariótica podem ser divididos em duas categorias: os que se ligam, mas não se intercalam ao DNA e aqueles que são fortes agentes intercalantes do DNA. Representando o primeiro grupo, estão as podofilotoxinas e o derivado tenoposídeo e etoposídeo, já o segundo grupo, é composto de drogas como a elipticina e a adriamicina (LIU, 1989). Todos esses inibidores afetam a DNA topoisomerase II de uma maneira específica, formando complexos com o DNA e a enzima durante a reação de clivagem do DNA.

Os mecanismos que geram os efeitos citotóxicos causados pelos inibidores de topoisomerase estão relacionados com a formação do complexo droga-DNA-enzima que pode bloquear o movimento da forquilha de replicação, inibindo a síntese e levando à fragmentação do DNA (D'ARPA *et al.*, 1990; ZHANG, D'ARPA, LIU, 1990).

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiproliferativa e a inibição das topoisomerases I e II humanas por extratos, substâncias puras e semi-sintéticas obtidas de produtos naturais

Objetivos Específicos

- 1- Realizar e avaliar a atividade antiproliferativa de extratos e substâncias puras obtidas de *Combretum laxum* (Combretaceae), *Hyptis crenata* (Lamiaceae), *Ocotea lancifolia* e *Aiouea trinervis* (Lauraceae), *Guarea kunthiana* (Meliaceae), *Pogonopus tubulosus*, *Galianthe thalictroidess* (Rubiaceae), *Nymphaea amazonum* (Nymphaeaceae) e *Parmotrema lichexanthonicum* (Parmeliaceae) em cultura de células tumorais humanas e murinas e em células normais.
- 2- Avaliar a seletividade das amostras-teste em células tumorais.
- 3- Avaliar o efeito inibitório dos extratos e substâncias puras com potente atividade antiproliferativa sobre as topoisomerases I e II humanas, pelo teste de inibição das enzimas topoisomerases.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos extratos e substâncias vegetais.

Os extratos vegetais e substâncias puras foram obtidas a partir das espécies *Hyptis crenata*, *Ocotea acutifolia*, *Ocotea lancifolia*, *Aiouea trinervis*, *Nymphaea amazonum*, *Combretum laxum*, *Guarea kunthiana*, *Pogonopus tubulosus* e *Galianthe thalictroides* e *Parmotrema lichexanthonicum* foram fornecidos pela equipe dos Profs. Dra. Fernanda R. Garcez, Dr. Walmir S. Garcez e Neli K. Honda

Estas espécies foram selecionadas e estão sendo estudadas com relação à sua composição química no LP-1 do Departamento de Química da UFMS e fazem parte de Dissertações de Mestrado em Química da UFMS, Teses de Doutorado Multiinstitucional em Química(UFMS/UFG/UFU) ou Teses de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS.

Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

Para avaliar a atividade antiproliferativa foram utilizadas as linhagens de células neoplásicas humanas: Hep2 (ATCC-CCL-23, de carcinoma de laringe), MCF7 (ATCC-HTB-22, carcinoma de mama), 786 (ATCC-CRL-1932, carcinoma de rim), OVCAR-3 (ATCC-HTB-161, carcinoma de ovário), NCI/ADR-RES (carcinoma de ovário resistente), UACC-62 (melanoma humano), PC-3 (ATCC-CRL-1435, carcinoma de próstata) HT-29 (ATCC HTB-38 carcinoma de cólon) e neoplasia murina: B16- F10 (ATCC-CRL6322 melanoma murino). Também foram utilizadas duas linhagens de células normais, VERO (ATCC-CCL-81, rim de macaco verde africano) e NIH/NIH/3T3 (ATCC-CRL 1658, fibroblasto murino) para a determinação do Índice de Seletividade (BÉZIVIN *et al.*, 2003).

As células Hep-2 e VERO foram adquiridas do Instituto Adolpho Lutz, São Paulo (SP), as demais doadas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho – Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) UNICAMP. A linhagem de célula normais NIH/NIH/3T3 (ATCC-CRL 1658, fibroblasto murino) foi adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro.

Cultivo Celular

Todas as linhagens celulares estavam armazenadas em nitrogênio líquido. Para os testes de citotoxicidade as células foram descongeladas e transferidas para um tubo cônico de 15 mL com 9 mL de meio RPMI 1640 ou DMEM contendo gentamicina 50 µg/mL e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) das marcas Soral (Campo Grande-MS) ou Cultilab (Campinas-SP) e centrifugadas por 4 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* de células foi ressuspensionado com 5mL de meio. A suspensão de células foi transferida para 1 frasco de manutenção de 25 cm² e incubada a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até formação da monocamada com aproximadamente 80% de confluência (FRESHNEY, 2005). Para a obtenção de um número de células adequado para o experimento, as células foram repicadas ao atingir 80% de confluência na monocamada. Assim, após aspiração do meio de cultura, adicionou-se 0,5mL de tripsina-EDTA 2,5 g/L por 3 a 5 minutos em incubadora, para o desprendimento das mesmas. A suspensão de células é transferida para tubo cônico com meio completo (antibiótico, SFB (10%)) 3X o volume de tripsina utilizada, para a neutralização desta após centrifugação por 4 minutos a 1000 rpm. O *pellet* é ressuspensionado em meio completo para a contagem das células.

Preparo das amostras-teste liofilizadas

As amostras-teste foram ressuspensionadas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL. Para a adição na cultura de células, as soluções foram diluídas em meio de cultura completo para que a maior concentração de DMSO utilizada não fosse maior que 0,4 %.

Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade para a avaliação da atividade antiproliferativa, foi realizado com o corante sulforrodamina B (SRB) e baseia-se na afinidade deste composto pelas proteínas básicas presentes nas células íntegras, fixadas pelo ácido tricloroacético (SKEHAN *et al.*, 1990).

Após a formação da monocamada, as células são descoladas das garrafas por ação da tripsina, adicionadas em tubo cônico com meio de cultura completo (3X o volume de tripsina) e centrifugado por 4 minutos a 1000 rpm. Ao *pellet* foi adicionado 2 ml de meio de cultura e desta suspensão foi retirada a alíquota para diluir em trypan blue (1:5) para evidenciar as

células não viáveis, que são excluídas da contagem. Esta etapa foi realizada em contador manual (Câmara de Neubauer) para a obtenção de uma suspensão de células com número determinado de células por 100 µL semeado em cada cavidade na placa de 96 cavidade. Neste momento também foi preparada uma placa com triplicata de suspensão celular de cada linhagem e triplicata de meio de cultura. Esta placa é denominada T0. Estas placas ficam incubadas por 24h. Após a incubação, foi adicionado na placa teste, triplicata de 4 concentrações de amostra-teste, 0,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL, tanto para os extratos quanto para as substâncias puras (amostras-teste), durante 48hs. Neste momento a placa T0 foi levada para procedimento de leitura da mesma forma que as placas teste, porém estas somente após 48h.

Após este período o volume das cavidades foi aspirado, permanecendo apenas as células aderidas, ou seja, as viáveis. Foi adicionado 100µL de ácido tricloroacético (TCA) 20% em cada cavidade e as placas permaneceram por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, a placa lavada em água corrente e seca para adição de 50µL de SRB (Sigma, USA) 0,1% diluída em ácido acético 1% por 30 minutos em temperatura ambiente.

Após 5 lavagens com ácido acético 1% para retirar o excesso de corante livre, à placa seca adicionou-se 100µL de tampão Trizma Base (10mM, pH 10,5) (Sigma, USA) para solubilizar o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas. O resultado foi obtido em absorbância em 540nm. Foram obtidas as absorbâncias das amostras-teste (T), controle negativo (CN), controle positivo, branco das amostras e a leitura do início da incubação, ou seja, antes da adição das amostras, denominada (TO).

O controle positivo é um parâmetro de controle de qualidade da reação, uma vez que na cavidade da placa com maior concentração deverá conter menor número de células do que o controle negativo, inferindo a ocorrência de atividade citocida (Figura 7), que pode ser visualizada em microscópio óptico invertido.

Os primeiros testes foram realizados com o controle positivo cisplatina (Sigma) nas concentrações de 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL. Posteriormente foi usado doxorrubicina (Europharma) nas concentrações de 0,025µg/mL, 0,25 µg/mL, 2,5 µg/mL e 25 µg/mL.

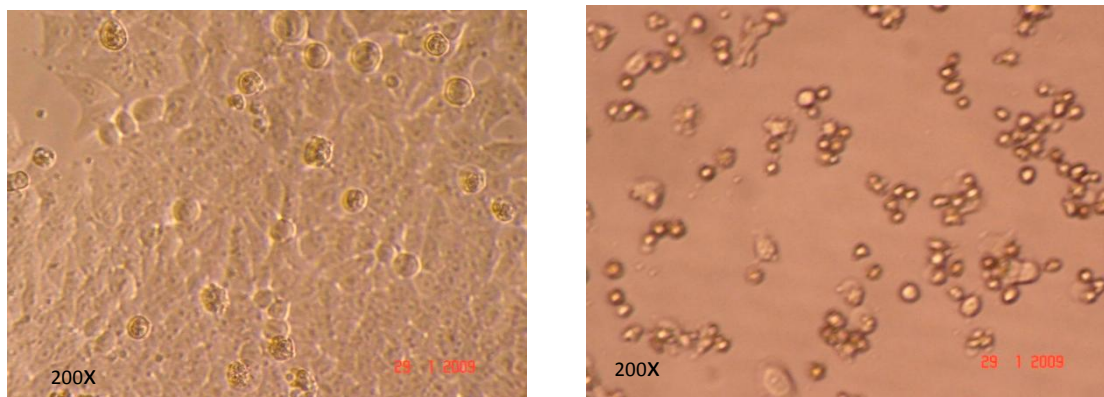


Figura 7 - Células neoplásicas da linhagem Hep₂. A esquerda o controle negativo; a direita, o controle positivo, cisplatina (5,0 µg/mL).

A porcentagem de crescimento (%) de cada amostra-teste, foi calculada em programa Excel 2003/2007, utilizando-se as fórmulas segundo Monks *et al.* (1991):

T > CN a droga estimulou o crescimento, não é possível o cálculo da IC.

Se $T \geq T_0$ e < CN, (efeito citostático): $IC = 100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$

Se $T < T_0$ (efeito citocida): $IC = 100 \times [(T-T_0)/(T_0)]$

A dose que inibe 100% do crescimento celular (TGI) foi determinada em programa para gráficos e análises de dados (Origin Versão 6.0). As amostras-teste com forte atividade antiproliferativa foram avaliadas quanto ao mecanismo de ação, pela inibição das enzimas topoisomerases I e II alfa humanas.

Teste de Inibição das Topoisomerases (MILLER *et al.*, 1981; MULLER *et al.* 1988; TRASK *et al.*, 1984).

O teste de inibição das topoisomerases I e II humanas foi realizado utilizando duas enzimas, separadamente. A topoisomerase purificada (Sigma, USA) e a enzima no extrato nuclear (adaptado de TopoGen, 2007).

Obtenção do extrato nuclear

Os extratos nucleares foram obtidos de cultura de células neoplásica de intestino – HT-29 (ATCC HTB-38 carcinoma de cólon). Para isto, as células cultivadas em uma garrafa de 150cm², após monocamada com aproximadamente 80% de confluência, foram raspadas e

lavadas com PBS gelado e centrifugadas por 10 minutos a 150 x g. As células foram ressuspensas com 5mL de tampão TEMP (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, MgCl₂ 4 mM, PMSF 0,5mM), homogeneizando com pipetagem (2 vezes esta etapa). A suspensão permaneceu em gelo por 10 minutos e foi levada para agitação moderada para expor os núcleos. Após centrifugação em 1500 xg por 10 minutos a 4 °C, o *pellet* de núcleos foi obtido. O *pellet* foi ressuspendido e homogeneizado em 1mL de tampão TEMP gelado e transferido para microtubo que foi levado para centrifugação a 1500 xg por 10 minutos a 4 °C . O sobrenadante foi descartado e realizado *spin* para obter o máximo de *pellet* sem sobrenadante. Posteriormente foi adicionado 4 volumes do *pellet* de tampão TEP (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, 4 mM, PMSF 0,5mM) e igual volume de NaCl 1M e agitado em vortex por no até 1 minuto e reservado por 30 a 60 minutos em gelo. Após este período, o microtubo foi levado para ultracentrifugação em 100,000 xg por 1h a 4 °C (ou 12-15,000 xg por 30 minutos a 4 °C, embora a ultracentrifugação seja melhor). O sobrenadante foi recolhido, pois nele estavam as enzimas topoisomerases I e II.

Uso do extrato nuclear: Normalmente com 5 µL de extrato foi possível visualizar a atividade da enzima frente o DNA plasmidial, porém, com manchas de arraste provavelmente causados por excesso de cloreto de sódio. No entanto, pode ser feito uma diluição 1:100 com tampão TEMP para diminuir a concentração de sal (NaCl) e para que não haja concentração excessiva do extrato nuclear na reação limitando a reação da amostra testada ou até mesmo da droga usada como controle positivo (irinotecan e etoposídeo).

Teste de inibição da topoisomerase I humana

A atividade catalítica da topoisomerase I foi avaliada pela conversão do DNA plasmidial super-enovelado (0,152µg de pBR322), em DNA relaxado quando incubado com 5 µL de extrato nuclear ou 4U de enzima topoisomerase I purificada (Sigma, USA) por 30 minutos a 37°C em tampão Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM EDTA, 1.5 M NaCl, 1% Albumina de Soro Bovino (BSA), 1 mM espermidina, 50% glicerol na presença ou ausência de amostras-testes com concentrações de 50 a 200 µM para compostos e 100 a 200 µg/mL para extratos. A reação foi interrompida com a adição, no gelo, de 4µL de solução contendo 5% de dodecilsulfato de sódio (SDS) , 0,025% de azul de bromofenol e 40% de glicerol. (ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2006; GRYNBERG *et al.*, 2002)

A atividade da enzima foi analisada pela presença das bandas de DNA após eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X por 45 minutos a 80V (2,0V/cm), e visualizadas em luz U.V pela presença do intercalante no DNA (*Gel Red*TM 10X, diuído 1:500).

Teste de inibição da topoisomerase II alfa e substrato plasmídeo pBR322

A atividade catalítica da topoisomerase II foi avaliada pela conversão de 0,25µg de DNA plasmidial superenovelado (Invitrogen, Cat. No. 15367-014), ou em DNA relaxado quando incubado com 5 µL de extrato nuclear ou 4U de enzima topoisomerase II (Sigma, USA) por 1h a 37°C em tampão (Tris-HCl 50mM pH 8,0 contendo KCl 120Mm, MgCl₂ 10Mm, DTT 0,5Mm e ATP 10mM) na presença ou ausência de amostras-testes com concentrações de 50 a 200µM para compostos e 100 a 200µg/mL para extratos. A reação foi interrompida com a adição, no gelo, de 4µL de solução contendo 5% 5% de dodecilsulfato de sódio (SDS) , 0,025% de azul de bromofenol e 40% de glicerol.

A atividade da enzima foi analisada pela presença das bandas de DNA após eletroforese gel de agarose 1%, tampão TBE 1X por 45 minutos a 80V (2,0V/cm), e visualizadas em luz U.V pela presença do intercalante no DNA (*Gel Red*TM 10X, diuído 1:500, 0,025% final).

Teste de inibição da topoisomerase II alfa e substrato kDNA

A atividade da enzima topoisomerase II foi analisada pela conversão do DNA superenovelado de *Crithidia fasciculata* (kDNA) em minicírculos de DNA (decatenado), usando um kit de ensaio para DNA topoisomerase II (TopoGEN, catalog#1001-1). O relaxamento do DNA ocorreu por incubação de 0,164 ng de kDNA e 5 µL de extrato nuclear ou 2U de enzima topoisomerase II por 1h a 37°C em tampão (Tris-HCl 50mM pH 8,0 contendo KCl 120mM, MgCl₂ 10mM, DTT 0,5mM e ATP 10 mM) na presença ou ausência de amostras-testes com concentrações de 20 a 200 µM para compostos e 100 a 200 µg/mL para extratos. A reação foi parada com a adição, no gelo, de 4µL de solução contendo 5% de sarcosil, 0,0025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol.

A atividade da enzima foi analisada pela presença e intensidade das bandas de kDNA após eletroforese em gel de agarose 1%, tampão TBE 1X por 45 minutos a 80V (2,0V/cm), e

visualizadas em luz U.V pela presença do intercalante no DNA (*Gel Red*TM 10X, diluído 1:500).

Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos. Assim, neste estudo, o IS corresponde a divisão entre o valor da GI_{50} de cada composto-teste na linhagem de células normais VERO e o valor da GI_{50} de cada composto na linhagem de células neoplásicas. ($IS = GI_{50} \text{ Vero} / GI_{50} \text{ células neoplásicas}$). Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991), ou seja, este valor significa que o composto é duas vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais (VERO).

5. RESULTADOS

Os extratos vegetais, partições e compostos isolados a partir das espécies selecionadas *Hyptis crenata*, *O. lancifolia*, *Aiouea trinervis*, *Combretum laxum*, *Guarea kunthiana*, *Nymphaea amazonum*, *Pogonopus tubulosus*, *Galianthe thalictroides* e *Parmotrema lichexanthonicum* bem como, purificação e elucidação estrutural foram fornecidos pela equipe dos Profs. Dra. Fernanda R. Garcez, Dr. Walmir S. Garcez e Dra. Neli K. Honda.

A resposta da célula a um determinado estímulo capaz de inibir a proliferação celular *in vitro*, como por exemplo, um agente anti-câncer, é denominada atividade antiproliferativa ou anti-câncer, sendo o teste de citotoxicidade o ensaio utilizado para esta avaliação (FOUCHE *et al.*, 2008; HOUGHTON *et al.*, 2007, FRESHNEY, 2005).

O comportamento citotóxico contempla os efeitos citostático (inibição celular) ou citocida (morte celular) das amostras-teste é apresentado em gráficos que correlacionam a porcentagem de crescimento (100% a -100%), onde o 100% corresponde ao número de células do controle negativo, o zero corresponde ao número de células no tempo zero – T₀, os valores negativos (abaixo do zero) correspondem a % de células que morreram com a concentração das amostras testadas em cultura de células.

Nestes gráficos, os valores abaixo de 100% e acima de 0% representam inibição de crescimento (efeito citostático), enquanto os valores negativos (abaixo de 0%) representam morte celular (efeito citocida), pois a quantidade de células (aferida pela absorbância no final do experimento) é menor do que aquela do início do tratamento com as amostras (T₀). No presente trabalho os valores de inibição do crescimento estão apresentados em TGI, isto é, inibição total do crescimento, que é o local onde o gráfico corta o eixo x em 0% (HOLBECK, 2004).

O estudo fitoquímico foi biomonitorado até o composto isolado por meio da GI₅₀, uma vez que a TGI poderia induzir resultados falso-negativos e levar a perda de amostras-teste com atividade moderada, uma vez que a concentração para inibir 100% do crescimento celular é maior que para inibir 50%.

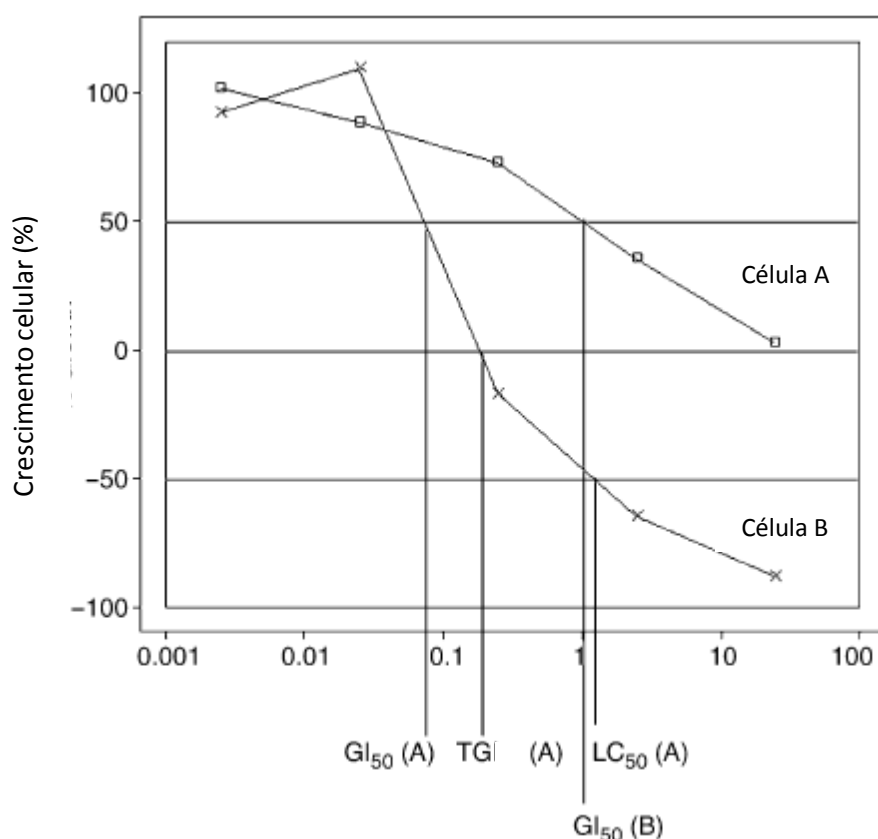


Figura 8- Modelo gráfico das variáveis, inibição de 50% do crescimento (GI_{50}), inibição total do crescimento (TGI) e concentração necessária para matar 50% das células (LC_{50}). Fonte: (HOLBECK, 2004).

Neste exemplo a linhagem de células A é muito mais sensível do que a linhagem B. Esta última nunca alcança os pontos TGI e LC_{50} , nesta faixa de concentração.

A atividade antiproliferativa de cada amostra-teste foi obtida a partir do teste de citotoxicidade. Os parâmetros numéricos adotados para a análise desta atividade foram baseados nos estudos do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em seu programa de triagem de drogas anti-câncer (FOUCHET et., al., 2008). Esta padronização considera a atividade antiproliferativa como inativa ($TGI > 50 \mu\text{g/mL}$), fraca atividade ($15 \mu\text{g/mL} < TGI < 50 \mu\text{g/mL}$), moderada atividade ($6.25 \mu\text{g/mL} < TGI < 15 \mu\text{g/mL}$) e potente atividade ($TGI < 6.25 \mu\text{g/mL}$).

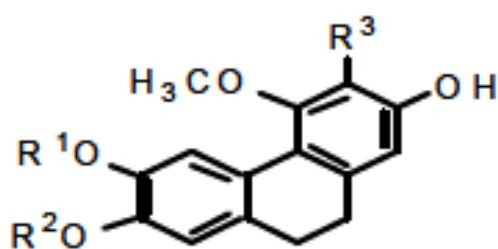
As amostras testadas serão referidas em códigos ao invés do nome químico, para melhor análise dos dados. Porém, constam no apêndice 1, todas as amostras com suas especificações, como família, espécie, nome popular, nome químico, código e classificação química.

Atividade Antiproliferativa *in vitro* das amostras obtidas dos extratos de galho e de raiz da planta *Combretum laxum* (Combretaceae).

Foram testadas amostras obtidas da raiz e dos galhos da planta, totalizando 12 amostras: 2 amostras de extrato etanólico de galhos de 2 diferentes datas de coleta (coleta 1 em 2004 – EG 161 e coleta 2 em 2007 - EG 166). 1 amostra de extrato de raiz – ER. 9 substâncias puras isoladas de partições da fase diclorometânica do extrato de raiz: códigos: CP5, CP8, CP10, CP11, CP13, DH-3 E D5-30, ácido betulínico e ácido arjunólico.

Os galhos e as raízes foram coletados na Base de Estudos do Pantanal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no município de Corumbá-MS. A coleta dos galhos foi realizada pela primeira vez em outubro de 2004 e da segunda vez em julho de 2007 quando foram coletadas as raízes. Ambas as partes vegetais foram identificadas por Msc. Ubirazilda Maria Resende e as Excicatas depositadas no Herbário UFMS, sob numeração 1802.

Os extratos de galho e de raiz foram testados no ensaio de citotoxicidade em linhagens de células neoplásicas (SKEHAN *et al.*, 1990; FOUCHET *et al.*, 2008). O extrato de galho apresentou fraca atividade antiproliferativa. O extrato etanólico de raiz da planta *Combretum laxum* apresentou moderada atividade antiproliferativa e seletividade para células de melanoma, sendo então selecionado para o estudo biomonitorado. Deste extrato resultaram 9 substâncias puras, das quais a CP8 (Figura 9) apresentou moderada atividade para a maioria das das linhagens celulares testada. Esta substância foi identificada pela primeira vez na América (BISOLI, 2008), em Combretaceae.



R1: CH₃; R2: H; R3: H

(2,7-diidroxi-4,6-dimetoxi-9,10-diidrofenantreno)

Figura 9 - Composto extraído da fase diclorometânica da partição do extrato de caule de *C. laxum*. Fonte: (Bisoli, 2008)

O derivado fenantrênico , CP8, apresentou potente atividade citotóxica para UACC-62 (melanoma) e moderada para MCF-7 e seletividade de 33 em células de melanoma. Os demais apresentaram fraca atividade citotóxica e não foram seletivos (Tabela 2).

As demais substâncias puras apresentaram atividade moderada para uma linhagem de célula, sendo que as substâncias codifigadas como CP5, CP-8, CP10 e CP13 apresentaram o mesmo perfil de citotoxicidade frente a células de mama (MCF-7).

Tabela 2 - Valores de TGI ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos e compostos da espécie *Combretum laxum* e da cisplatina (controle positivo)

	EG	ER	CP-5	CP-8	CP-10	CP-11	CP-13	CIS
786-0	> 250	>250	137,8	29,1	146,9	167,7	157,3	7,1
UACC-62	245,0	21,8	NT	2,1	NT	195,0	145,7	3,0
PC-3	222,8	>250	42,2	195,8	>250	>250	37,4	5,2
MCF-7	198,5	246,9	25,0	24,7	26,7	163,4	26,6	3,0
ADR	>250	>250	122,4	26,8	196	225,0	192,9	22,3
VERO	>250	>250	NT	183,1	153,0	210,0	203,0	10,2

EG: extrato de casca; ER: extrato de raiz; CP-5 a CP-13: substâncias isoladas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato bruto da raiz; CIS: Cisplatina (controle positivo). NT: Não testadas devido a baixo rendimento de extração

A figura 10 retrata o comportamento da substância pura (CP8), de maior atividade antiproliferativa isolada da planta *C. laxum* em teste de citotoxicidade com linhagens de células neoplásicas. É possível inferir que houve atividade citocida na dose de 25 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem mama (MCF-7) e na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ para células de melanoma humano onde a seletividade do composto CP8 é maior.

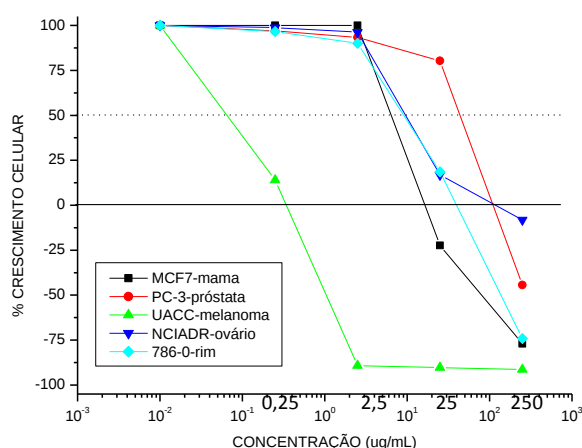


Figura 10 - Atividade antiproliferativa do composto CP8, isolado da fase diclorometânica resultante da partição do extrato bruto da raiz *C.laxum*

Atividade Antiproliferativa *in vitro* das amostras obtidas da planta *Hyptis crenata* (Lamiaceae)

A espécie *Hyptis crenata* foi coletada em agosto de 2008, no cerrado da região Centro-oeste, município de Cuiabá, Mato Grosso. A identificação foi realizada pela Msc Vali Joana Pott, e a exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil, sob o número de registro 28.968.

O estudo fitoquímico foi realizado com um total de 14 amostras: 1 extrato etanólico, 4 fases, 1 óleo essencial e 8 isolados (7 da fase diclorometânica e 1 da fase hexânica).

Os testes tiveram início com o extrato etanólico do caule da planta fornecido pela doutoranda Ivana P. Violante do Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina da UFMS. O extrato foi particionado e obtidas fases: acetato de etila, hexânica, etanólica e diclorometânica. Além destas fases, também foi obtido o óleo essencial.

Estas fases e o óleo essencial foram testados no ensaio de citotoxicidade para as linhagens de células neoplásicas de rim (786-0), de mama (MCF-7), melanoma (UACC-62), laringe (Hep-2), ovário (OVCAR) e próstata (PC-03). A fase diclorometânica (DCM) foi a mais ativa. Esta fase apresentou atividade de 2 a 4 vezes maior em células neoplásicas do que em células normais (IS)

A atividade citocida foi observada na dose de 25 µg/mL para as células de câncer de melanoma, mama e ovário, com a maior seletividade para a linhagem de melanoma (UACC-62) (Figura 11).

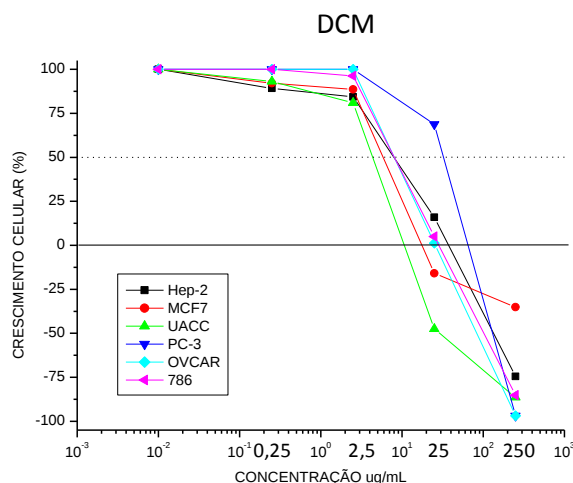


Figura 11 - Atividade antiproliferativa da fase diclorometânica (DCM) da partição do extrato etanólico de caule da planta *Hyptis crenata* frente a linhagens de células neoplásicas.

Da fase DCM foram isoladas 7 substâncias puras (Figura 8). O akhdardiol e o ácido carnósico foram os compostos mais ativos entre os isolados desta fase. O akhdardiol mostrou-se ativo e seletivo para as células de rim (786-0) e de mama (MCF-7), enquanto o ácido carnósico foi ativo e seletivo para células de melanoma murino (B16-F10) (Tabela 3). A substância pura ácido pisiférico não foi testada nas células neoplásicas pois o material foi perdido acidentalmente.

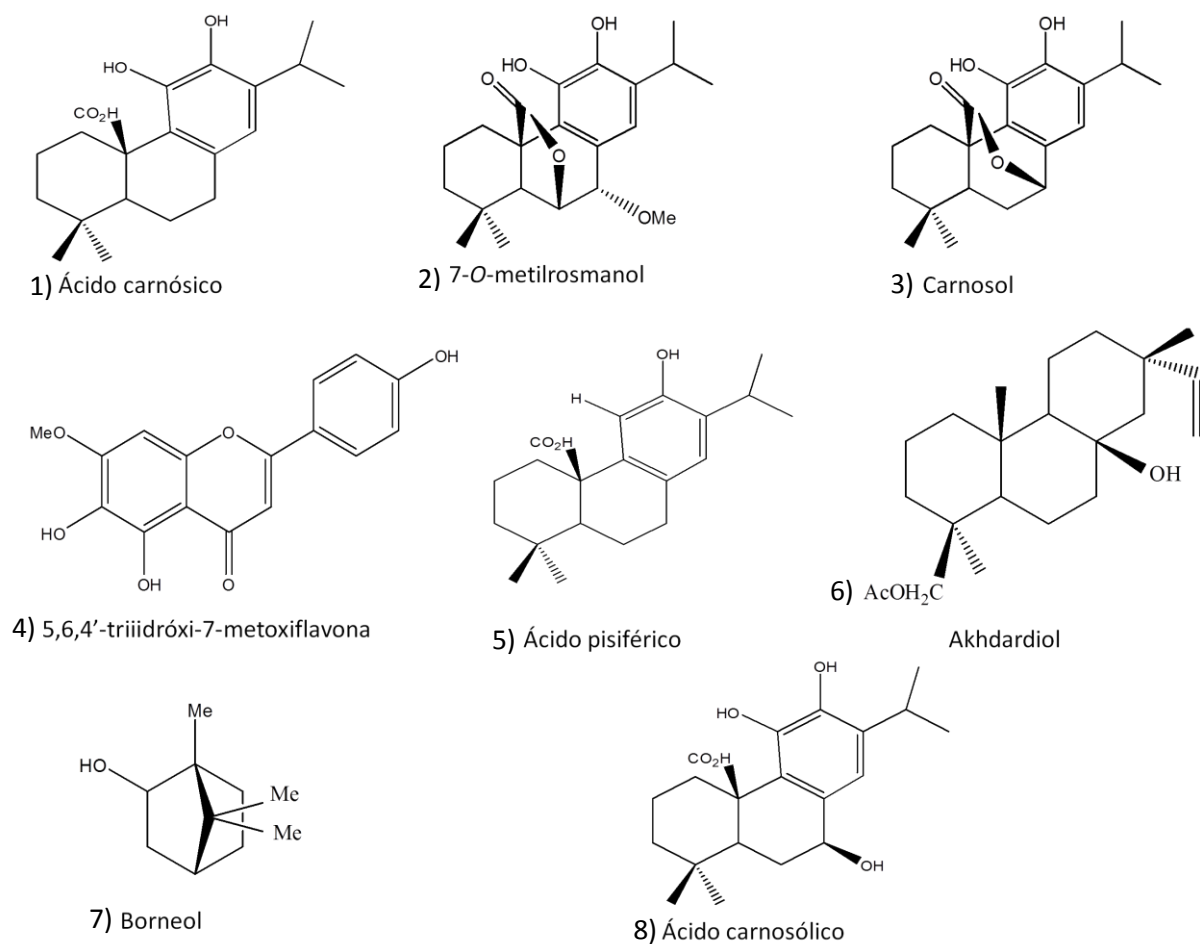


Figura 12 - Substâncias puras isoladas da fase diclorometânica (1 a 7) da fase hexânica (8) da espécie *H. crenata*.

A fase hexânica obtida também do extrato bruto de caule desta espécie apresentou fraca atividade no teste de citotoxicidade ($GI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$) e o estudo químico biomonitorado com esta fase resultou no isolamento do composto ácido carnosólico. Este foi o composto mais ativo isolado da espécie *H. crenata* com atividade antiproliferativa moderada em células de câncer de mama (MCF-7), de rim (786-0) e de próstata (PC-03) – Tabela 3.

Tabela 3. Valores de TGI ($\mu\text{g/mL}$) da fração diclorometânica e substâncias puras obtidas da espécie *Hyptis crenata* e valores da doxorubicina (controle positivo).

	DCM	ROSMANOL	FLAVONA	ÁCIDO CARNÓSIDO	CARNOSOL	BORNEOL	AKHDARDIOL	ÁCIDO CARNOSÓLICO*	DOXO
786-0	25,5	>250	>250	194,9	>250	>250	40,5	17,0	10,3
MCF-7	22,8	>250	>250	234,7	>250	>250	50,1	18,2	2,9
UACC-62	18,8	228,0	>250	224,1	>250	NT	NT	NT	1,5
PC-3	26,9	>250	>250	>250	>250	>250	203	18,4	2,1
B16-F10	NT	>250	>250	36,8	>250	>250	NT	NT	3,0
HEP-2	27,8	>250	>250	152,8	>250	NT	NT	NT	1,5
HT-29	NT	>250	>250	249,0	>250	>250	220,0	50,4	2,0
NIH/3T3	70,3	>250	>250	>250	>250	>250	200,0	24,3	1,6

DCM: fase diclorometânica obtida de extrato bruto de caule da espécie *H. crenata*

*isolado da fração hexânica

A substância akdardiol apresentou potente atividade antiproliferativa frente a linhagem celular PC-03 (carcinoma de próstata), com menor concentração para inibir 50% das células comparado com as demais células neoplásicas (figura 13). Porém para inibir totalmente as célula ou para atingir efeito citocida a concentração deve ser maior que 250 $\mu\text{g/mL}$.

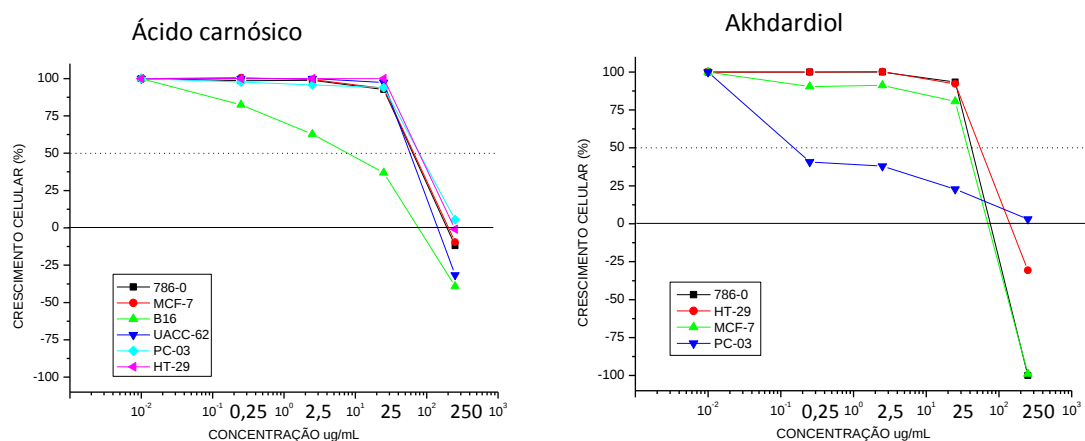


Figura 13 – Atividade antiproliferativa das substâncias puras com melhor atividade, isoladas da fase diclorometânica, frente a linhagem de células neoplásicas.

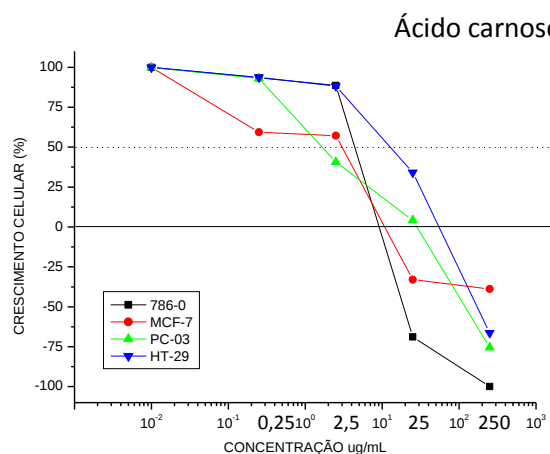


Figura 14 – Atividade antiproliferativa do ácido carnosólico, substância pura obtida da fase hexânica de caule de *H. crenata*, frente a linhagem de células neoplásicas

Atividade Antiproliferativa *in vitro* das amostras obtidas da planta *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae)

O estudo fitoquímico foi iniciado com o extrato etanólico das raízes da planta *Galianthe thalictroides* para obtenção das frações hexânica (BGTRH), clorofórmico (BGTRC) e acetato de etila (BGTRA) as quais foram submetidas ao teste de citotoxicidade por triagem em 3 linhagens de células neoplásica, de mama (MCF-7), laringe (Hep-2) e melanoma murino (B16-F10) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de TGI ($\mu\text{g/mL}$) das fases obtidas do extrato etanólico da espécie *Galianthe thalictroidess*.

	FASE CLOROFÓRMICA BGTRC	FASE HEXÂNICA BGTRH	FASE ACETATO DE ETILA BGTRA	Cisplatina
MCF-7	0,9	135,2	5,5	3,0
B16-F10	0,5	>250	2,8	14,0
HEP-2	50,1	>250	54,5	5,6

Uma vez que a fração clorofórmica foi a mais ativa, o estudo biomonitorado prosseguiu originando 8 subfrações que foram avaliadas nas mesmas linhagens (Tabela 5). Seis das oito frações apresentaram forte atividade citotóxica (RC-2 a RC-7).

Tabela 5. Valores de TGI ($\mu\text{g/mL}$) das frações obtidas da partição clorofórmica do extrato etanólico da espécie *Galianthe thalictroidess*.

	RC-1	RC -2	RC-3	RC-4	RC-5	RC-6	RC-7	RC-8	Cis
MCF-7	22,6	2,2	2,3	1,4	0,3	0,81	11,5	116,5	3,0
B16-F10	>250	20,8	42,6	2,9	0,24	2,9	3,6	248	14,0
HEP-2	>250	66,5	54,5	7,0	0,1	3,7	10	>250	5,6

Cis:cisplatina

A fração RC-6 apresentou atividade citotóxica potente e em cromatografia de camada delgada apresentou um componente majoritário, composto 1 – alcalóide indol monoterpênico (FIGUEIREDO *et al*, 2011), denominado RC6-2 e um outro componente RC6-5 (FIGUEIREDO, 2010) (Figura 13).

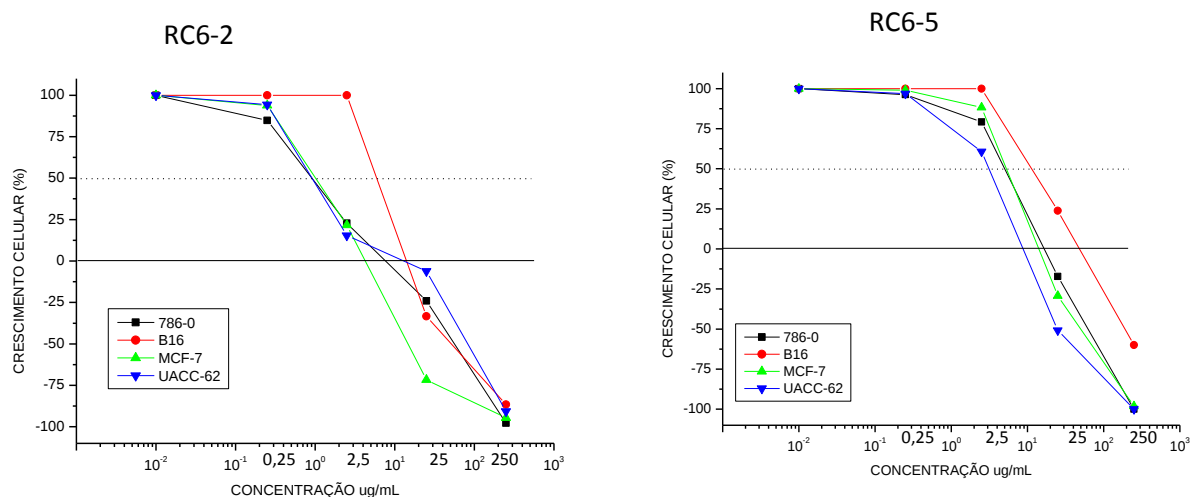


Figura 16 - Atividade antiproliferativa das substâncias puras isoladas da fração RC-6, frente a linhagem de células neoplásicas.

Atividade Antiproliferativa *in vitro* das amostras obtidas da planta *Pogonopus tubulosus* (Rubiaceae)

A espécie vegetal *Pogonopus tubulosus*, está sendo estudada pela mestrande Aymee Portella, do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no laboratório LP1 sob a orientação da profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez.

Esta espécie foi coletada em Aquidauana em 2006, obtidos o extrato etanólico do caule (PGet) e dos frutos (PEX), armazenados a -20°C até o início do estudo.

Foi realizado teste específico para identificação de alcalóides e observado que no extrato etanólico de caule (PGet) havia grande concentração destes metabólitos. Desta fração alcaloídica (PGal) foram isolados dois principais alcaloides (PGC12 e PGC14), cujas estruturas não estão totalmente elucidadas.

Estas amostras obtidas de caule da planta, PGet, PGal e PGC12 e PGC14, bem como a única amostra de frutos, PEX, foram avaliados quanto a atividade antiproliferativa no teste de citotoxicidade em células neoplásicas e em uma linhagem normal (Tabela 7).

Os extratos etanólicos, de frutos e de caule foram fortemente citotóxicos nas células testadas. A fração alcaloídica (PGal) também apresentou forte atividade citotóxica, da mesma forma que os compostos isolados PGC12 e PGC14. O extrato, frações e os 2 alcalóides foram seletivos (IS>2,0).

Observando os gráficos da atividade antiproliferativa dos alcaloides PGC12 e PGC14 (Figura 17) nota-se que ambos os compostos produziram atividade citocida para todas as linhagens de células. Portanto o composto PGC12 produziu morte celular a partir da concentração de 2,5µg/mL, inferindo potente toxicidade. O composto PGC14 também produziu morte celular a partir desta concentração, porém foi seletivo para as células de próstata (PC-03) e rim (786-0). Além disso este composto foi mais ativo para as células neoplásicas comparado com a atividade antiproliferativa frente as células normais (NIH/NIH/3T3).

Tabela 7- Valores de TGI (µg/mL) dos extratos, frações e compostos isolados da espécie *Pogonopus tubulosus* (Rubiaceae) e da doxorubicina (controle positivo)

	PEX	PGet	PGal	PGC12	PGC14	DOXO
PC	NT	16,1	2,2	0,24	0,56	2,3
B16	2,6	3,2	1,0	0,25	2,5	3,0
MCF7	6,1	2,2	1,6	2,0	2,5	2,9
HEP	NT	5,6	0,56	NT	NT	1,5
HT	2,2	2,1	0,24	0,24	2,4	1,9
786	NT	3,9	0,44	0,24	0,25	12,5
NIH/3T3	6,9	7,9	1,2	1,0	9,0	1,6

PEX: extrato bruto de fruto; PGet: extrato etanólico de caule; PGal: fração alcaloídica obtida do extrato bruto de caule por extração específica para alcaloides; PGC12 e PGC14: alcaloides isômeros obtidos de PGal.

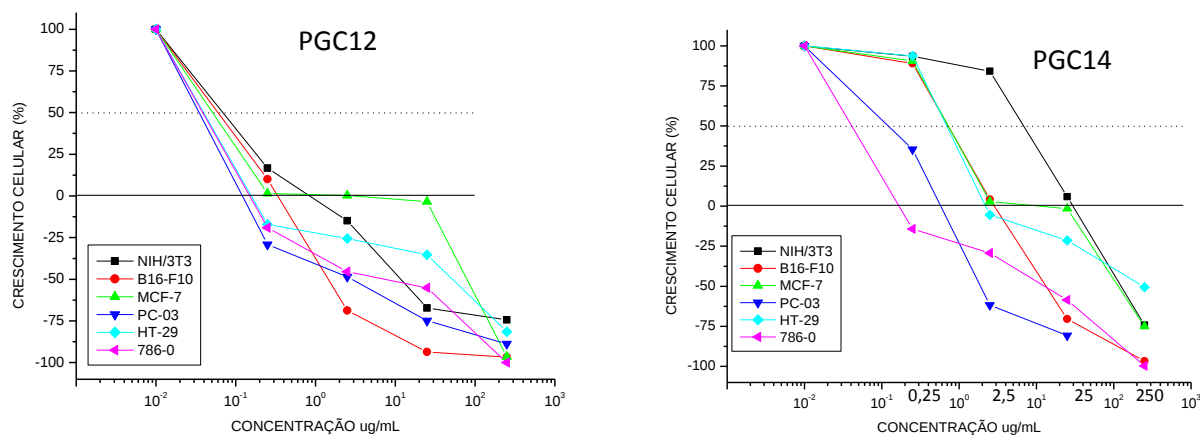


Figura 17 – Atividade antiproliferativa dos alcaloides isolados da fração alcaloídica, frente a linhagem de células testadas.

Atividade Antiproliferativa *in vitro* das amostras obtidas das plantas *Aiouea trinervis*, *Ocotea lancifolia* (Lauraceae) e *Guarea Kunthiana* (Meliaceae)

Os extratos etanólicos das plantas *Aiouea trinervis* (Lauraceae) fornecido por Lilliam May Grespan Estodutto da Silva (2010) e *Guarea Kunthiana* (Meliaceae) fornecido pelo aluno de iniciação científica Carlos Henrique Miguita (GARCEZ *et al.*, 2010) apresentaram baixa atividade citotóxica (Tabela 8)

Tabela 8 - Valores de TGI ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos etanólicos das espécie *Aiouea Trinervis* – AT (Lauraceae) e *Guarea Kunthiana* – GK (Meliaceae) e da doxorrubicina (controle positivo)

Linhagem celular	AT	Linhagem celular	GK	DOXO
786-0	>50	786-0	>50	7,1
MCF-7	>50	MCF-7	>50	2,9
UACC	>50	UACC	>50	1,5
OVCAR	>50	OVCAR	>50	3,6
B16	>50	HT	>50	3,5

HEP	>50	HEP	>50	1,5
------------	-----	------------	-----	-----

A espécie vegetal *Ocotea lancifolia* (Lauraceae) também foi avaliada quanto a atividade antiproliferativa. Os extratos e fases desta planta foram obtidos por Camargo, (2011) e apresentaram fraca atividade citotóxica (tabela 9)

Tabela 9 - Valores de TGI (µg/mL) do extrato etanólico e fases da espécie *Ocotea lancifolia* (Lauraceae) e da doxorrubicina (controle positivo).

Linhagem celular	OL1	OL2	OL3	OL4	OL5	DOXO
786-0	>50	>50	>50	>50	>50	7,1
MCF-7	>50	>50	>50	>50	>50	2,9
PC-3	>50	>50	>50	>50	>50	2,3
UACC	>50	>50	>50	>50	>50	1,5
OVCAR	>50	>50	>50	>50	>50	3,6

OL1: fase hidrometanólica de folhas; OL2: extrato etanólico de folhas; OL3: fase hexânica de folhas; OL4: fase aquosa de cascas; OL5: extrato etanólico de casca.

Atividade Antiproliferativa *in vitro* das amostras obtidas da planta *Nymphaea amazonum* (Nymphaeaceae).

A espécie *Nymphaea amazonum*, está sendo estudada pela doutoranda Rosana Gabriel, do Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina da UFMS. Os testes fitoquímicos ocorrem no laboratório LP1 sob a orientação da profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez.

Foram testados extrato etanólico das partes da planta: flor, caule, raiz e folha. Todos os extratos apresentaram fraca atividade citotóxica e o estudo guiado foi encerrado.

Tabela 10 - Valores de TGI ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico e fases da espécie *Nymphaea amazonum* (Nymphaeaceae) e da doxorubicina (controle positivo).

	NAF1	NAF2	NAD	NAR	NAC	DOXO
786-0	121,0	>250	>250	>50	>250	7,1
MCF-7	>250	76,6	>250	>250	>50	2,9
UACC	140,2	>250	>250	>250	>250	1,5
OVCAR	178,3	>250	>250	208,3	213,9	3,6
B16-F10	>250	>250	>250	>250	NT	3,5
NCI-ADR/RES	>250	>250	>250	>250	>250	17,2

NAF1: extrato etanólico de folha; NAF2: extrato etanólico de flor; NAD: fase diclorometânica; NAC: extrato etanólico de caule; NAR: extrato etanólico de raiz

Atividade Antiproliferativa *in vitro* das amostras obtidas do líquen *Parmotrema lichexanthonicum*

A liquexantona é uma xantona isolada do líquen *Parmotrema lichexanthonicum* e foi submetida a modificações químicas cujos produtos foram avaliados quanto a citotoxicidade em linhagens de células neoplásicas e normais visando estabelecer uma relação entre as características das cadeias laterais e a atividade biológica (MICHELETTI *et al.*, 2011). Da série de derivados aminoalcanolicos obtidos a partir da liquexantona, 3 compostos com grupo *N-tert*-butilamino (compostos 15, 16 e 17- Figura 18) apresentaram GI_{50} abaixo de 20 μM (aproximadamente 10 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 11) e foram selecionados a parte desta variável para avaliação no ensaio de topoisomerase.

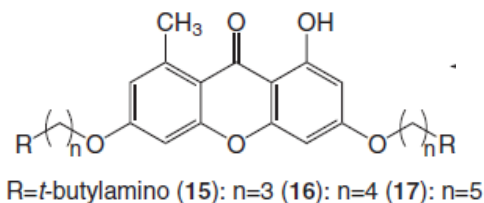


Figura 18- Derivados da liquexantona obtida do líquen *Parmotrema lichexanthonicum*.
Fonte: MICHELETTI *et al.*, 2011

Tabela 11 - Valores de GI₅₀ (µg/mL) dos compostos obtidos da liquexantona extraída da espécie *Parmotrema lichexanthonicum*.

	Composto 15	Composto 16	Composto 17	DOXO
OVCAR	NT	3,7	NT	0,91
ADR	NT	>250	NT	13,2
MCF-7	2,1	>250	7,5	0,23
786-0	3,7	>250	7,1	0,51
B16-F10	7,6	>250	8,5	0,4
HT-29	4,1	5,8	8,3	1,3
VERO	8,5	6,7	15,3	2,3

Fonte: MICHELETTI *et al.*, 2011

Resultados do teste de inibição das topoisomerases I e II humanas

O ensaio de inibição da topoisomerase foi padronizado com as enzimas Topoisomerase I e Topoisomerase II purificadas e também com o extrato nuclear das Topoisomerases. O extrato nuclear foi usado para a triagem das amostras selecionadas devido ao custo elevado e pequeno volume da topoisomerase comercial e também porque as bandas de DNA ficam menos visíveis após exposição a luz U.V.

As amostras-teste que apresentaram valores de GI₅₀ <30µg/mL foram selecionadas para o teste da inibição das topoisomerases I e II (Tabela 12).

Tabela 12 – Compostos, frações e extratos vegetais testados no ensaio de inibição da atividade das enzimas Topoisomerases I e II humanas.

Família	Espécie	Amostra	Codificação
Combretaceae	<i>Combretum laxum</i>	Substância pura	CP8
Lamiaceae	<i>Hyptis crenata</i>	Fração Diclorometânica	DCM
		Substância pura	Borneol
		Substância pura	Carnosol
		Substância pura	Akhdardiol
		Substância pura	Ac. Carnosólico
Rubiaceae	<i>P. tubulosus</i>	Extrato EtOH fruto	PEX
		Extrato EtOH caule	PGet
		Ext. alcaloídico	PGal
		Substância pura	PGC12
		Substância pura	PGC14
	<i>G.thalictroides</i>	Substância pura	RC6-2
		Substância pura	RC6-5
Parmeliaceae	<i>P. lichexanthonicum</i>	Substância pura	Composto 15
		Substância pura	Composto16
		Substância pura	Composto 17

A avaliação da atividade inibitória das amostras sobre as topoisomerases foi realizada pela análise dos produtos de relaxamento do DNA plasmidial e do DNA de cinetoplasto.

Na figura 19 estão demonstrados os produtos de relaxamento do DNA plasmidial (pBR322) pela topoisomerase II extraída de núcleo de células neoplásicas de intestino (HT-29). Analisando comparativamente as bandas de DNA relaxado e enovelado, foi possível saber quando a amostra inibiu a topo II (presença de ambas as fitas), ou quando a inibição enzimática não aconteceu e a topo II relaxou a banda de DNA enovelado, diminuindo ou extinguindo esta banda.

Desta forma, pode-se afirmar que as substâncias puras: ácido carnosólico e composto 17 na concentração de 100 μM inibiram a topo II em extrato nuclear, enquanto os demais inibiram parcialmente ou não inibiram a enzima.

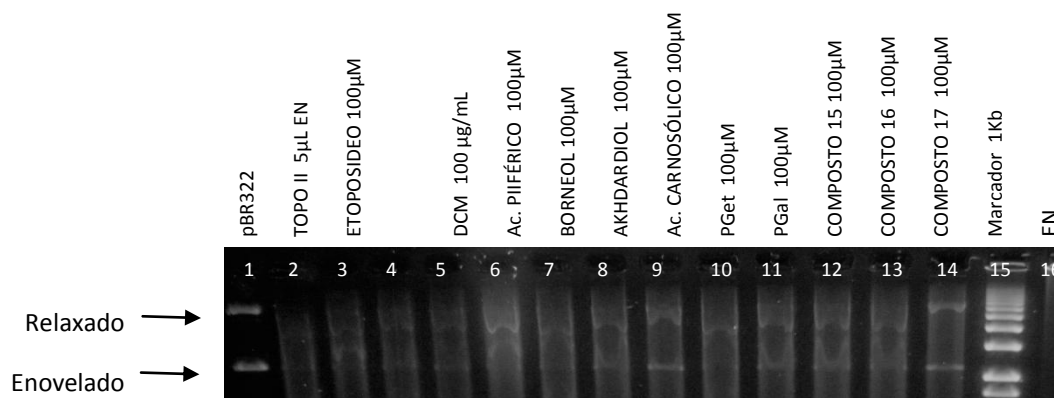


Figura 19 - Produtos do relaxamento do DNA plasmidial com extrato nuclear (topo II) após eletroforese em gel de agarose. Na linha 1 apenas 0,125 μg de pBR322, na linha 2: 0,125 μg de pBR322 + 5 μL de Extrato nuclear (EN), linha 3: 0,125 μg de pBR322 + 5 μL de EN + 100 μM de etoposídeo (controle positivo) e nas linhas 4 a 14 foi adicionado mais 100 μM de cada amostra-teste. Na linha 15 o marcador de tamanho de bases (1Kb) e na linha 16 apenas o extrato nuclear

Na figura 20 estão evidenciados os produtos de relaxamento do DNA plasmidial (pBR322) pela enzima topoII purificada. Da mesma forma que foi analisado a inibição na figura 19 foi interpretado o resultado na figura 20. A única diferença está na melhor nitidez das bandas quando a reação é realizada com a enzima purificada. Assim, pode-se afirmar que as substâncias puras RC6-2, RC6-5 e composto 17 e CP8 inibiram a topoisomerase II alfa.

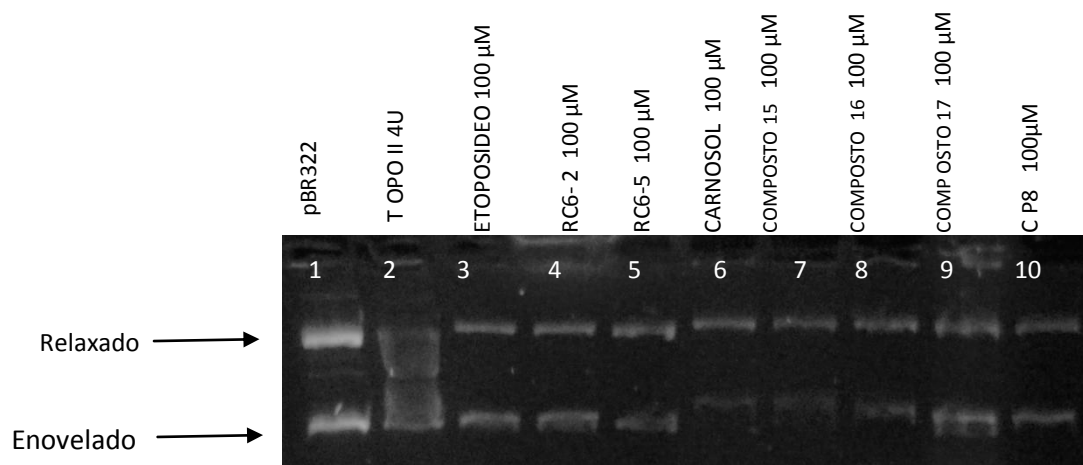


Figura 20 - Produtos do relaxamento do DNA plasmidial com topo II após eletroforese em gel de agarose. Na linha 1 apenas 0,125µg de pBR322, na linha 2: 0,125µg de pBR322 + 4U de topo II, na linha 3: 0,125µg de pBR322 + 4U de topo II + 100µM de etoposídeo (controle positivo) e nas linhas 4 a 10 foi adicionado mais 100 µM de cada amostra-teste, respectivamente.

A inibição da atividade da topo II, tendo por substrato o DNA de cinetoplasto (kDNA) é uma reação específica, ou seja, apenas a topoisomerase II possui esta propriedade. Como o kDNA apresenta-se na forma catenada, a ação da enzima sobre este substrato é denominada decatenação, ou seja, relaxamento do DNA catenado.

Nas figuras 21 e 22, estão representados os produtos de decatenação. Quando a enzima age sem inibição o DNA catenado gera bandas a mais e quando não atividade enzimática o DNA catenado permanece muito próximo da cavidade de aplicação da amostra no gel de agarose. Neste contexto, as substâncias puras RC6-2, RC6-5 e o composto 17 na concentração de 100 µM, inibiram a topo II na reação de decatenação. Já os compostos 15 e 16 inibiram a topo II somente quando na concentração de 200 µM. As substâncias puras, ácido carnosólico e o alcaloide PGC12 inibiram parcialmente a topo II. As substâncias metoxicoelonina (CP8), PGC14 produziram leve inibição da concentração de 100µM.

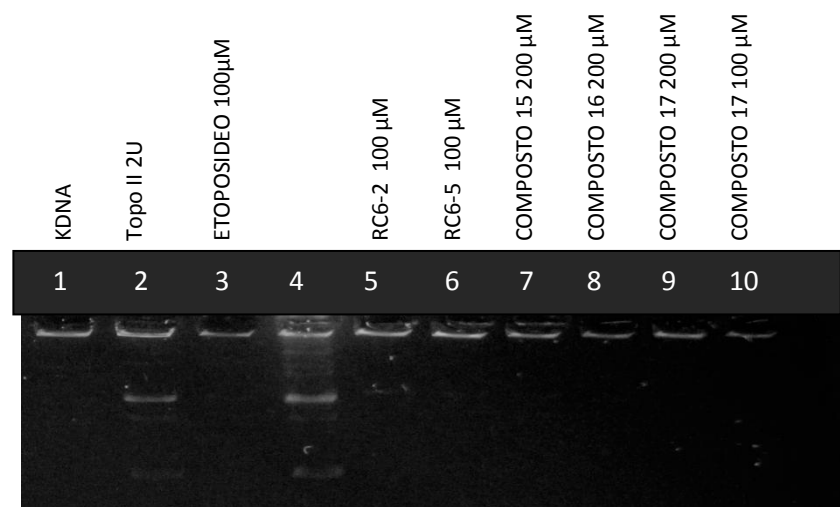


Figura 21 - Produtos da decatenação do DNA de cinetoplasto (kDNA) com topo II purificada, após eletroforese em gel de agarose. Na linha 1 apenas 164ng de kDNA, na linha 2: 164ng de kDNA + 2U de topo II, na linha 3: 164ng de kDNA + 2U de topo II + 100µM de etoposídeo (controle positivo) e nas linhas 4 a 10 foi adicionado mais 100 µM ou 200 µM da amostra-teste.

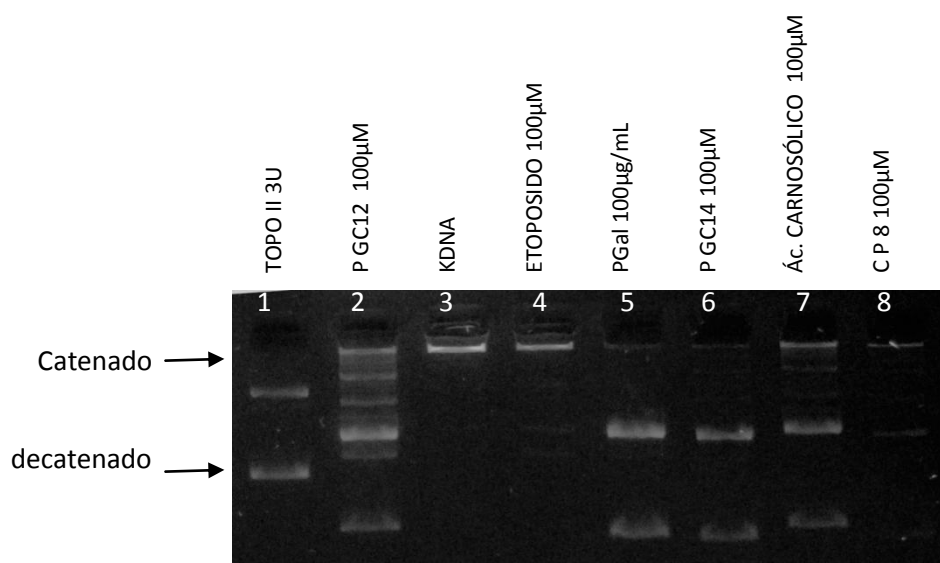


Figura 22 - Produtos da decatenação do DNA de cinetoplasto (kDNA) com topo II purificada após eletroforese em gel de agarose. Na linha 3 apenas 164ng de kDNA, na linha 1: 164 ng de kDNA + 2U de topo II, na linha 4: 164ng de kDNA + 2U de topo II + 100µM de etoposídeo (controle positivo) e nas linhas 5 a 8 foi adicionado mais 100 µM da amostra-teste, exceto na linha 5 - 100µg/mL.

A topoisomerase I relaxa o DNA enovelado, clivando uma fita da dupla hélice do DNA. *In vitro*, esta reação também é analisada em eletroforese de gel de agarose com o produto da reação da topo I com o substrato DNA plasmidial na presença ou ausência de amostras-teste.

Na figura 23 estão demonstrados os produtos de relaxamento do DNA plasmidial (pBR322) pela topoisomerase I extraída de núcleo de células neoplásicas de intestino (HT-29). Analisando as bandas de DNA relaxado e enovelado dos controles positivo (irinotecan) e negativo (produto do relaxamento do plasmídeo pela topo I), foi possível observar que a maioria das amostras apresentou inibição da enzima.

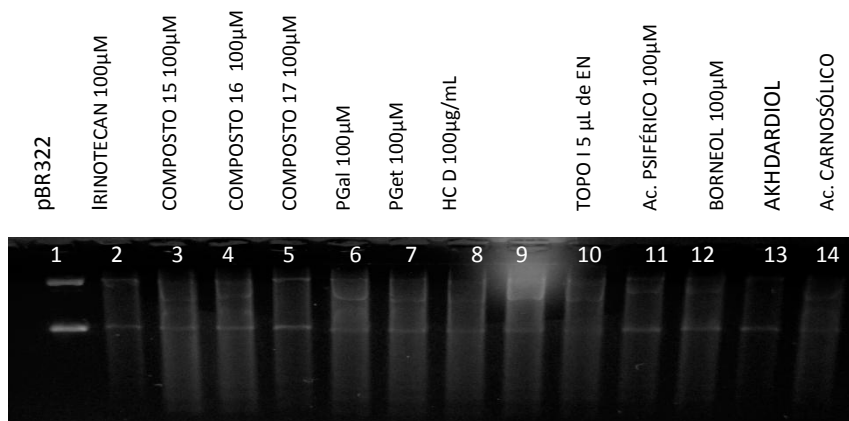


Figura 23 – Produtos do relaxamento do DNA plasmidial com extrato nuclear (topo I), após eletroforese em gel de agarose. Na linha 1 apenas 0,125µg de pBR322, na linha 10: 0,125µg de pBR322 + 5µL de extrato nuclear (topo I), na linha 2: 0,125µg de pBR322 5µL de extrato nuclear + 100µM de irinotecan (controle positivo) e nas linhas demais linha foi adicionado 100 µM de cada amostra-teste, exceto na linha 8: 100 µg/mL .

Nas figuras 24 e 25 estão evidenciados os produtos de relaxamento do DNA plasmidial pela topo I purificada. A inibição da topo I foi evidenciada pelas substâncias RC6-2, RC6-5 e pelo ácido pisiférico, as demais amostras apresentaram inibição parcial ou não a inibiram, como todas as amostras na figura 25.

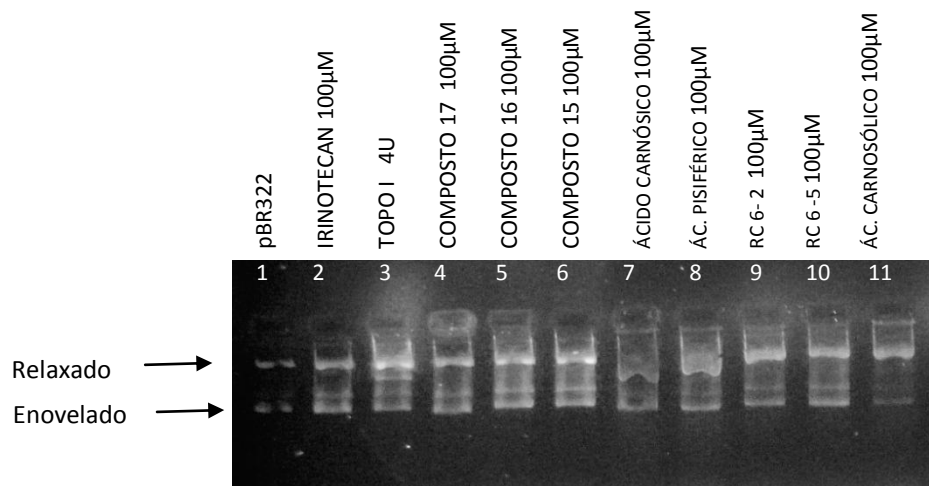


Figura 24 - Produtos do relaxamento do DNA plasmidial com topo I purificada, após eletroforese em gel de agarose. Na linha 1 apenas 0,125µg de pBR322, na linha 3: 0,125µg de pBR322 + 4U de topo I, na linha 2: 0,125µg de pBR322 + 4U de topo I + 100µM de etoposídeo (controle positivo) e nas linhas 4 a 11 foi adicionado 100µM de cada amostra-teste.

A figura 25 também apresenta o produto da reação sob as mesmas condições de reação apresentadas na figura 24.

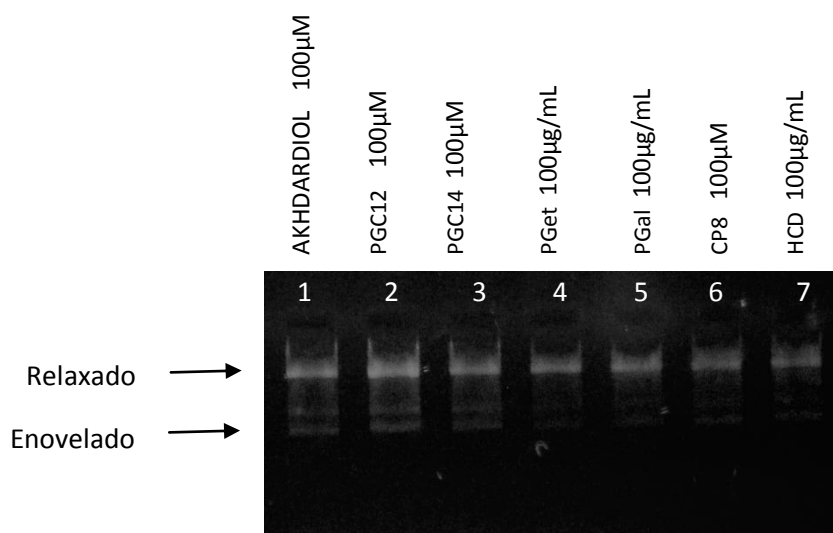


Figura 25 - Produtos da reação entre DNA plasmidial e topo I purificada, após eletroforese em gel de agarose. A reação contempla 0,25µg de pBR322 + 4 U de topo I purificada + amostra-teste (100µM ou 100µg/mL), seguindo mesmas condições das reações demonstradas na figura 24.

6. DISCUSSÃO

Muitos fármacos utilizados para o tratamento de câncer são obtidos de produtos naturais, incluindo aqueles de origem vegetal e consistiram em protótipos para o desenvolvimento de medicamentos anti-câncer, tais como, vimblastina, vincristina, taxol e mais recentemente os derivados da camptotecina e da epipodofilotoxina, já mencionados (MANTLE, LENNARD, PICKERING, 2000).

Porém, ainda não se descobriu uma droga que interfira somente nas células tumorais sem afetar as células normais, ou seja, drogas com alta seletividade. Desta forma o estudo de fitofármacos com atividade antiproliferativa associado à busca de mecanismos de ação promissores e mais seletivos tem sido o propósito da busca incessante por compostos anti-câncer.

Quanto ao mecanismo de ação, a inibição das topoisomerases é uma perspectiva promissora (MECZES *et al.*, 2008; GOODSEL, 2002), uma vez que as células neoplásicas possuem concentração de topoisomerases bem maior do que as células normais.

Para o estudo biomonitorado, inicialmente foram testados os extratos das plantas. Nesse contexto, o extrato etanólico resultante da partição do extrato bruto de raiz da planta *Combretum laxum* apresentou moderada atividade citotóxica e seletividade para células de melanoma. A partir deste, foi isolada a substância, metoxicoelonina (CP8), a qual foi responsável por aquela citotoxicidade, com forte atividade na mesma linhagem de células e alta seletividade (IS= 33). Porém não inibiu a atividade das enzimas topoisomerases. Os demais apresentaram moderada atividade citotóxica e não foram seletivos.

A planta *Hyptis crenata* da família Lamiaceae foi alvo de estudos para os testes de citotoxicidade e de inibição das topoisomerases. A fase diclorometânica (DCM) foi a mais ativa quanto à inibição da proliferação celular. Esta fase apresentou seletividade de 2 a 4 vezes maior em células neoplásicas do que em células normais, resultado favorável para a contínua busca de substâncias puras com atividade anti-câncer, ainda que a inibição das topoisomerases não tenha ocorrido com esta fase DCM.

Da fase diclorometânica foram isoladas 7 substâncias e a atividade antiproliferativa foi encontrada para o akhdardiol e ácido carnósico, este com seletividade para células de melanoma murino (B16–F10), da mesma forma que a fase DCM do qual foi isolado também não inibiu as topoisomerases.

O ácido carnósico já foi isolado da espécie *Salvia africana-lutea* (Labiaceae), e apresentou moderada atividade antiproliferativa também em células de câncer de mama ($GI_{50}=69\mu M$) Hussein *et al.*(2007). Esta concentração foi ligeiramente menor que a atividade frente a mesma linhagem de células no presente estudo (MCF-7, $GI_{50},135\mu M$).

O ácido carnósico já foi isolado anteriormente da mesma espécie, *H. crenata* e apresentou resultados diferentes de atividade antiproliferativa frente a várias linhagens de câncer de mama, o que foi atribuído a presença ou não do receptor de estrogênio. O composto foi mais ativo em células receptor de estrogênio negativo. A atividade ligeiramente menor encontrada no presente trabalho, pode ser devido ao uso da linhagem MCF-7, que é receptor de estrógeno positivo, conferindo desta forma maior resistência à amostra testada (PIOVESAN *et al.*, 2005).

A fase hexânica da mesma espécie, *H.crenata*, apresentou fraca atividade, entretanto, a partir dela foi obtido o ácido carnosólico, que foi o mais ativo entre todos os compostos isolados da espécie *H. crenata*, indicando que a mistura de compostos na fase hexânica pode ter levado a um efeito de antagonismo entre os constituintes da fase e quando isolado foi capaz de atravessar a membrana celular e produzir uma ação antiproliferativa.

Além disso, a atividade antiproliferativa do ácido carnosólico foi seletiva para as células de mama (MCF-7) e de rim (786-0), com efeito citocida em todas as linhagens testadas, inclusive nas células normais, demonstrando ser um composto com potencial atividade citotóxica. Este composto, inibiu a atividade a enzima topo II, o que indica a associação entre as atividades de inibição da enzima com a potente atividade antiproliferativa *in vitro* apresentada por este composto.

Outros diterpenoides, isolados de planta das famílias, Verbenaceae e Labitae também apresentaram atividade citotóxica para as células de melanoma murino, leucemia murina, tumor gástrico e tumor de rim (LIU *et al.*,2008, AOYAGI *et al.*, 2006).

Outra espécie também estudada neste trabalho, da família Rubiaceae, a espécie *P. tubulosus* mostrou ser rica em metabólitos com atividade anti-proliferativa, tendo os extratos e os compostos apresentado forte atividade antiproliferativa para as células neoplásicas e para as células normais. Os compostos isolados, PGCP12 e PGCP14, são alcaloides, e já é conhecido que os alcaloides atingem rapidamente o interior das células devido a seu caráter básico e a limitada ionização ao pH fisiológico (CORDELL, 2009).

De fato, já foi evidenciada a atividade citotóxica dos alcalóides indólicos, isolados de variadas espécies de diferentes famílias de planta (PEREIRA *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que houve seletividade para as células de câncer de mama e melanoma murino (IS entre 3 e 4) tanto para os extratos quanto para os alcalóides isolados.

A atividade citotóxica apresentada por estes compostos não foi associada a inibição das enzimas topoisomerases. Desta forma o estudo do mecanismo de ação destes compostos com potente citotoxicidade pode ser alvo de estudos futuros, uma vez que são compostos com potencial atividade anti-câncer.

Outra espécie da mesma família Rubiaceae, a planta *G. talictritoides* também teve alcalóides isolados. Destes, o RC6-2 e o RC6-5 apresentaram potente atividade antiproliferativa em células neoplásicas e citotoxicidade semelhante a do controle positivo (doxorrubicina). As substâncias puras RC6-2 e RC6-5 são alcalóides indol-monoterpênicos da planta *G. talictritoideae* (FIGUEIREDO *et al.*, 2011). Oliveira e col. (2009) fizeram uma revisão sobre a atividade biológica dos alcalóides indólicos e evidenciaram muitas atividades farmacológicas consagradas na indústria farmacêutica com compostos como a ioimbina, a ergotamina que é um importante fármaco contra a migraína; a ajmalicina, fármaco usado em distúrbios do fluxo sanguíneo e a reserpina como agente hipotensor e também os quimioterápicos vimblastina e vincristina.

Os compostos RC6-2 e o RC6-5 tiveram atividade inibitória sobre a topoisomerase II, na mesma intensidade que aquela causada pelo etoposídeo – controle positivo do ensaio de inibição da Topo II e também inibiram a topoisomerase I assim como o controle positivo da reação o quimioterápico irinotecan.

Embora esses alcalóides tenham a mesma origem metabólica que a vimblastina, o mecanismo de ação da citotoxicidade não é o mesmo, uma vez que a vimblastina inibe a formação de microtúbulos no fuso mitótico. Há outros fatores que podem justificar esta diferença de ação, como o peso molecular da vimblastina que é 2X maior do que os alcalóides da *G.thalictroides*. É necessário que seja estudado por outros testes moleculares para que haja a elucidação da via de inibição da topoisomerase por este composto.

Estes compostos com potente atividade citotóxica não apresentaram seletividade (IS<2,0) uma vez que também foram citotóxicos em células normais (NIH/NIH/3T3). Esta citotoxicidade *in vitro* foi similar aquela evidenciada para o controle positivo doxorrubicina, quimioterápico amplamente utilizado no tratamento do câncer.

O estudo da planta *G. thalictroides* também retrata o perigo no uso indiscriminado e inadequado de plantas. Há relatos de que as raízes desta planta são comercializadas ilegalmente na forma de garrafadas e preparado na água usada para tereré (bebida esta que

virou patrimônio histórico de Mato Grosso do Sul). As garrafadas geralmente são constituídas de água, bebidas alcoólicas e ervas aromáticas. É importante ressaltar que o álcool é solvente universal para extração de metabólitos secundários que podem ser tóxicos mesmo em menor concentração.

A liquexantona isolada do líquen *Parmotrema lichexanthonicum* foi submetida a modificações químicas e os produtos foram avaliados quanto a citotoxicidade em linhagens de células neoplásicas e normais visando estabelecer uma relação entre as características das cadeias laterais e a atividade biológica (MICHELETTI *et al.*, 2011).

Destaca-se neste estudo a atividade citotóxica dos derivados poli-oxigenados obtidos a partir da liquexantona, com grupo N-*tert*-butilamino (compostos 15, 16 e 17), que apresentaram GI₅₀ menor que 20 µM (aproximadamente 10µg/mL).

No presente trabalho de ensaio da topoisomerase, o composto 17 inibiu as enzimas topo I e topo II. Em estudo realizado por Woo *et al.* (2007) com xantonas também poli-oxigenadas ficou evidenciado que este tipo de radical potencializou a atividade inibitória contra várias linhagens de células tumorais e inibiu a atividade enzimática da topoisomerase. Este último estudo fornece subsídios de que a atividade antiproliferativa do composto 17 ocorreu via inibição dessas enzimas, ratificando a importância das modificações químicas para aumento da atividade biológica.

Assim, ficou demonstrado neste estudo que a atividade inibitória sobre as topoisomerasas foi positiva para várias substâncias puras de diferentes classes químicas, como diidrofenantrenos, diterpenos e alcaloides e que as plantas das famílias Combretaceae, Lamiaceae, Rubiaceae e Parmeliaceae da região do Cerrado do Centro-Oeste, revelam ótimas oportunidades para pesquisa e descobertas de novos protótipos com atividade anti-câncer.

É importante que estas substâncias com potencial atividade anti-câncer relacionada a inibição das topoisomerasas, sejam avaliadas em testes toxicológicos pré-clínicos, onde há ferramentas associadas entre a bioquímica, a hematologia a imunologia e também a biologia molecular que permitem melhorar a avaliação destas substâncias e respectivos efeitos em modelo *in vivo*.

7. SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Síntese dos Resultados

1. O estudo fitoquímico de *C. laxum* (Combretaceae), biomonitorado pelo ensaio de atividade antiproliferativa resultou na identificação de 4 compostos ativos: os compostos CP5, CP8, CP10 e CP13 apresentaram seletividade, entre as células neoplásicas, para a linhagem de mama (MCF-7) e o composto metoxicoelonina (CP8), apresentou forte atividade antiproliferativa e alta seletividade em células de melanoma humano- UACC-62 (IS=33).
2. O estudo fitoquímico de *H. crenata* (Lamiaceae) biomonitorado pela atividade antiproliferativa abrangeu um total de 14 amostras, sendo a fase diclorometânica (DCM) a mais ativa e a mais seletiva com IS >2,0, resultando no isolamento de 7 substâncias puras, com atividade moderada das quais destacam-se o akhdardiol e o ácido carnósico com seletividade deste último em células de melanoma murino. A fase hexânica com fraca atividade resultou no composto ácido carnosólico, que foi o mais ativo dentre os compostos isolados desta espécie, e ainda o único dentre os isolados com potencial atividade para célula de próstata (PC-03).
3. Os extratos e frações de *Ocotea lancifolia* e *Aiouea trinervis* (Lauraceae) e de *Guarea kunthiana* (Meliaceae) apresentaram baixa atividade antiproliferativa.
4. O extrato etanólico, a fração alcaloídica e os alcaloides esteroisômeros (PGC12 e PGC14) isolados da planta *P. tubulosus* (Rubiaceae) apresentaram forte atividade antiproliferativa frente a todos as linhagens de células neoplásicas com seletividade maior que 2,0.
5. O estudo fitoquímico de *G. thatictroide* (Rubiaceae) biomonitorado pelo ensaio de atividade antiproliferativa resultou na identificação de 2 alcaloides B-carbolínicos

(RC6-2 e RC6-5) com forte atividade frente a todos as linhagens de células neoplásicas.

6. Dos compostos com atividade antiproliferativa selecionados para o teste de inibição das topoisomerasas, na mesma concentração de 100 μ M que o controle positivo etoposídeo, os alcalóides RC6-2, RC6-5 e a xantona (composto 17) inibiram totalmente a topoisomerase II, enquanto o ácido carnosólico e o alcaloide PGC12 inibiram a enzima parcialmente. Os compostos 15 e 16 inibiram totalmente a enzima somente na concentração de 200 μ M.
7. A inibição da topoisomerase I foi evidenciada para os alcaloides RC6-2 e RC6-5, o diterpeno ácido pisiférico e a xantona (composto 17).

Conclusões

A atividade antiproliferativa foi realizada para todas as espécies propostas. As espécies *Combretum laxum*, *Hyptis crenata*, *Galianthe thalictroides*, *Pogonopus tubulosus* e *Parmotrema lichexanthonicum* apresentaram potencial atividade antiproliferativa com substâncias puras promissoras para atividade anti-câncer. As demais espécies, *Ocotea lancifolia*, *Aiouea trinervis* e *Guarea kunthiana* apresentaram fraca atividade antiproliferativa.

As espécies *Combretum laxum* e *Hyptis crenata* apresentaram substâncias puras com alta seletividade em células neoplásicas.

As espécies *Combretum laxum*, *Hyptis crenata*, *Galianthe thalictroides* e *Parmotrema lichexanthonicum* apresentaram substâncias puras com potencial atividade inibitória sobre as enzimas topoisomerasas I e II humanas, sugerindo que esta via esteja relacionada com a potente atividade antiproliferativa destas substâncias.

Este estudo possibilitou o conhecimento da atividade anti-câncer destas espécies, pelo método de citotoxicidade *in vitro* e aprofundou o conhecimento sobre uma das vias relacionadas a potente atividade antiproliferativa evidenciada por algumas substâncias puras. Porém, foi observado substância com potencial atividade antiproliferativa

(*Pogonopus tubulosus*) que não está relacionada à via de inibição das topoisomerasas. Desta forma fica evidenciado que há ainda muitos estudos *in vitro* e *in vivo* que possibilitem a elucidação da atividade citotóxica e do mecanismo de ação destas substâncias.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADNYANA I.K.; TEZUKA, Y.; AWALE, S.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K.Q.; KADOTA, S. 1-O-galloyl-6-O-(4-hydroxy-3,5-dimethoxy)benzoyl-beta-D-glucose, a new hepatoprotective constituent from *Combretum quadrangulare*. *Planta Med.* v.67, p.370-371, 2001.
- ADNYANA I.K.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K.Q.; KADOTA, S. Three new triterpenes from the seeds of *Combretum quadrangulare* and their hepatoprotective activity. *J. Nat. Prod.* v.64, p.360-363, 2001.
- ALMEIDA, A. P.; MIRANDA, M.M.F.S.; SIMONI, M.D.; LAGROTA, M.H.C.; COSTA, S.S. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phytother. Res.* v.12, p.562-567, 1998.
- ALMEIDA, L.A.; LUNZ, J.N.; ESTEVES-SOUZA, A.; ECHEVARRIA, A.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. Inibição da DNA-topoisomerase I por Derivados do Diterpeno trans-Desidrocrotonina. *Acta Bot. Braz.* v.21, n.2, p.263-275, 2007.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-Celular específicos e ciclo-celular não epecíficos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova*, v. 28, n. 1, p.118-129, 2005.
- and DNA cross-linking study. *Bioorg Med Chem Letterss.* v. 17, p.1163–1166, 2007.
- AOYAGI, Y.; TAKAHASHI, Y.; SATAKE, Y.; TAKEYA, K.; AYAMA, R.; MATSUZAKI, T.; HASHIMOTO, S.; KURIHARA, T. Cytotoxicity of abietane diterpenoids from *Perovskia abrotanoides* and their semisynthetic analogues. *Bioorg. Med. Chem.* V. 14, p. 5285-91, 2006.
- ASRES, K.; BUCAR, F.; KNAUDER, E.; YARDLEY, V.; KENDRICK, H.; CROFT, S. L. *In vitro* antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. *Phytother. Res.* v.15, p. 613-617, 2001.

ASSAD, A.L.D.; FERRO, A.F.P. Biodiversidade e sua utilização na geração de fitoterápicos. *Farmacos e Med.* n.37, p.14-18, 2005.

AZEVEDO, S.K.S.; SILVA, I. M. Comercialização de plantas medicinais e de uso religioso no município do Rio de Janeiro. *Acta Bot. Bras.*v.20, n.1, p. 185-194, 2006.

BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, K.; BOUCHET, P. Antifungal activities of seven African Combretaceae used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* v.66, p.335-338, 1999.

BALUNAS, M.J.; JONES, W.P.; CHIN Y.W.; MI, Q.; FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D.; CORDELL, G.A.; SWANSON, S.M.; PEZZUTO, J.M.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project. *Chem Biodiversity*, v.3, n.8, p.897–915, 2006.

BATES, A.D.; BERGER, J.M.; MAXWELL, A. The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, p.1–13, 2011.

BATISTA, A. L. Estudo fitoquímico das folhas e casca de *Nectandra cuspidata* Nees. (Lauraceae). (2001) Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Química.

BIBBY, M. C. Combretastatin anticancer drugs. *Drug Future* v. 27, p.475-480, 2002.

BIELAWSKI, K.; WINNICKA, K.; BIELAWSKA, A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. *Biol. Pharm. Bull.* v.29, n.7, p.1493-1497 2006.

BISOLI, E.; GARCEZ, W.S.; HAMERSKI, L.; TIEPPO, C.; GARCEZ, F.R. Bioactive pentacyclic triterpenes from the stems of *Combretum laxum*. *Molecules*, v.13, p.2717-2728, 2008.

BRANCO, A.; PINTO, A.C.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, E.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Rubrofusarin, a natural polyketide as new human topoisomerase II- α inhibitor, *Rev. bras. farmacogn.* v.18, 2008.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO R.D.; NASCIMENTO, J.A.A.P. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas, *Quim. Nova*, v.33, n.6, p.1359-1369, 2010.

BRASIL, 2006. Presidência da República. Decreto no. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências.

BRASIL, 2009. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BREMER, B.; ERIKSSON, T. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *Int. J. Plant Sci.* v.170, n.6, p.766–793, 2009.

BREMER, B.; ANDREASEN, K.; OLSSON, D. Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on rbcL sequence data. *Annals of the Missouri Botanic Garden*, v. 82, p. 383-397, 1995.

CABRAL, E.L. Revisión del género *Galianthe* (Rubiaceae – Spermacoceae). In 52º Congresso Nacional de Botânica. Artigo; 2001 ago 22-27, João Pessoa – Paraíba, Brasil

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. ; SCHEIDT, C. ; OTUKI, M.F. ; SANTOS, A.R.S. Biological Activity of plants extracts: novel analgesic drugs.. *Expert Opinion in Emerging Drugs*, v. 6, p. 621-679, 2001.

CAMARGO, M.J. Estudo químico de plantas do cerrado: *Ocotea lancifolia* e *Alibertia sessilis* (2011). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Química.

CARMAN, R.M.; HANDLEY, P.N. Antifungal diene in leaves of avocado cultivars. *Phytochemistry*, v.50, p.1329-1331, 1999.

CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* v.70, p.369–413, 2001

CHEN, I.S.; LAI-YAUN, I.L.; DUH, C.Y. Cytotoxic butanolides from *Lisea akoensis*. *Phytochemistry* v.49, p.745-750, 1998.

CHENG, H.; LIN, W.; DUH, C.; LEE, K.; TSAI, I.; CHEN, I.; LIN, W. New cytotoxic butanolides from *Litsea acutivena*. *J. Nat. Prod.* v.64, p.1502, 2001.

CINGI, M.R.; DE ANGELIS, I.; FORTUNATI, E.; REGGIANI, D.; BIANCHI, V.; TIOZZO, R.; ZUCCO, F. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. *Toxicology in vitro*, v.5, p.119-125, 1991.

CORBETT, K.D.; BERGER, J.M.; Structure, molecular mechanisms and evolutionary relationships in DNA Topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* v.33, p.95–118, 2004.

CORDELL, G.A. The alkaloids: Chemistry and Biology.1^a ed. Academic Press, 2009.

CORONNELLO, M.; CICIANI, G.; MINI, E.; GUERRINI, G.; CACIAGLI, B.; SELLERI, S.; COSTANZO, A.; MAZZEI, T. Cytotoxic activity of 3-nitropyrzolo[5,1-c][1,2,4]benzotriazine derivatives: a new series of anti-proliferative agents. *Anticancer Drugs*, v. 16, p. 645-51, 2005.

CORREA, A.G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. *Quimica Nova*, v.18, n.5, 1995.

COSTA-LOTUFO, L.V.; ARAÚJO, E.C.; LIMA, M.A.; MORAES, M.E.; PESSOA, C.; SILVIERA, E.R.; MORAES, MO. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). *Pharmazie*. v.59, n.1, p.78-9, 2004.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod.* v.60, p.52-60, 1997.

D'ARPA, P.; BEARDMORE, C.; ZHANG, H.; LIU, L.F. Involvement of nucleic acid synthesis in topoisomerase II: effects on kinetoplast DNA maxicircles. *Mol Cell Biol.*v.14, n.9, p.5891-7, 1990.

DA ARAÚJO, E.C.; LIMA, M.A.; MONTENEGRO, R.C.; NOGUEIRA, M.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; de MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R. Cytotoxic abietane diterpenes from *Hypts martiusii* Benth. *Z Naturforsch C.* v.61, n.3, p.177-83, 2006.

DE MEDEIROS J. M. R.; MACEDO M.; CONTANCIA J. P.; NGUYEN C.; CUNNINGHAM G.; MILES D. H. Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. *J.ethnopharmacology*, v. 72, n.1-2, p. 157-165, 2000.

DELPRETE, P.G. Sinopse dos gêneros de Rubiaceae do Brasil. 49º Congresso Nacional de Botânica (26 Julho - 1 Agosto), Resumos, Salvador, Bahia, p. 85-86, 1998.

DELPRETE, P.G.; SMITH, L.B.; KLEIN, R.M. Rubiáceas. Pp. 1-344. In: Reis, A. (ed.). Flora Ilustrada Catarinensis. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues. v. I, 2004.

DOMERGUE, F.; HELMS, G. L.; PRUSKY, D.; BROWSE, J. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry* v.54, p.183-189, 2000.

ENGLUND, P.T.; MARINI, J.C. The replication of kinetoplast DNA. *Am J Trop Med Hyg.* v.29, supl.5, p.1064-9, 1980.

ESTEVES-SOUZA, A.; PISSINATE, K.; NASCIMENTO, M.G.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Synthesis, cytotoxicity, and DNA-topoisomerase inhibitory activity of new asymmetric ureas and thioureas. *Bioorg. Med. Chem.* v.14, p.492–499, 2006.

FALCÃO, D.C.; MENEZES, F.S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero Hyptis. *Rev Bras Farm* v.84, n.3, p. 69-74, 2003.

FIGUEIREDO P.O., GARCEZ, F.R., MATOS M.F.C., PERDOMO, R.T., QUEIROZ, L.M.M., POTT, A., GARCEZ, A.J.S., GARCEZ, W.S. A New Cytotoxic β -Carboline Alkaloid from *Galianthe thalictroides*. *Planta Med.*, v. 77, p. 1852–1854, 2011.

FIGUEIREDO, P.O De. Estudo químico das raízes de *Galianthe thalictroides* (rubiacaceae) guiado pela atividade citotóxica *in vitro* frente a linhagens de células tumorais. (Dissertação de mestrado) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande MS 2010.

FOGLIO, M. A. ; QUEIROGA, C. L. ; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R. A. F. . Plantas Medicinais Como fontes de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Multiciência (UNICAMP), v. 7, p. *****, 2006.

FOUCHE, G.; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. *J. Ethnopharmacol.*, v. 119, p.455–461, 2008.

FRAGOSO-SERRANO, M.; CIBBONS, S.; PEREDA-MIRANDA, R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. *Planta Med* v.71, n.3, p.278-80, 2005.

FRESHNEY, I.R. *Culture of animal cells. A manual of Basic Technique*. 5º ed. New York, Wiley-Liss, 2005.

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HILTUNER, R.; HAEGGSTROM, C. A.; UVORELA, H.; UVORELA, P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum*. *J. Ethnopharmacol.* v.79, p.169-177, 2002.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; MATOS, M. F. C.; GUTERRES, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; MISU, C. K.; NAKASHITA, S. T.. Cytotoxic and Genotoxic Butanolides and Lignans from *Aiouea trinervis*. *Planta Med*, v.71, p. 923-927, 2005.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; SANTANA A. L. B. D.; ALVES, M.. M.; MATOS, M. F. C. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.17, p.1223-1228, 2006.

GARCEZ, F.R.; BISOLI, E.; GARCEZ, W.S.; HAMERSKI, L.; QUEIROZ, L.M.M.; MATOS, M.F.C.; PERDOMO, R.T. Cytotoxic and antioxidative phenantrene derivatives and other aromatic compounds from the roots of *Combretum laxum*. In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products & XXVIII RESEM, São Pedro. Livro de resumos do 2nd BCNP e XXVIII RESEM, v.1. p.56 PS335-56, 2009.

GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; Barbosa, C.S.; Miguita, C.H. Protolimonoides dos frutos de *Guarea kunthiana*: substâncias para o controle do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: 33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindoia. Resumos da 33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2010. v. QPN. p. QPN 171.

GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; MARTINS, M.; CRUZ, A.C. A bioactive lactone from *Nectandra gardneri*. *Planta Med.* v. 65, p.775, 1999.

GARCEZ, F.R.; SILVA, A.F.G.; GARCEZ, W.S.; LINCK, G.; MATOS, M. F. C.; SANTOS, E.C.S.; QUEIROZ, L. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. *Planta Med*, v. 77, p. 383-387, 2011.

GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; MARTINS, D.; MARQUES, M. R.; PEREIRA, A.A.; PERUCA, A.D.; OLIVEIRA, L.A.; RONDON, J. N. Effect of spores of saprophytic fungi on phytoalexin accumulation in seeds of frog-eye leaf spot and stem canker-resistant and – susceptible soybean (*glycine max L.*) cultivars. *J Agric Food Chem*, v. 48, n. 8, p. 3662-3665, 2000.

GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; SANTANA, A.L.B.D.; ALVES, M.M.; MATOS, M.F. C.; SCALIANTE, A. M. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). *J Braz. Chem Soc*, v.17, p.1223-1228, 2006.

GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Benzyloquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry* v.39, p.815-816, 1995.

GARCEZ, WALMIR S.; GARCEZ, FERNANDA R.; DA SILVA, LILLIAM M.G.E.; HAMERSKI, LIDILHONE. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central region of Brazil. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6647-6650, 2009.

GONÇALVES, E.M.; VENTURA, C.A.; YANO T.; MACEDO, M.L.R.; GENARI, S.C. Morphological and growth alterations in Vero cells transformed by cisplatin *Cell Biology International* v.30, p.485-494, 2006.

GOODSELL, D.S. The Molecular Perspective: DNA Topoisomerases. *The Oncologist*, v. 7, p.381-382, 2002.

GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C.L.; NECKEL, G.L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.2, p.129-139, 2007

GRYNBERG, N.F; CARVALHO, M.G; VELANDIA, J.R; OLIVEIRA, M.C; MOREIRA, I.C; BRAZ-FILHO, R; ECHEVARRIA, A. DNA Topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea species*. *Braz. J. Med Biol Res* v.35, p.819-822, 2002.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*; Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.;

GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; 5ª ed.; Editora da UFRGS/Editora da UFSC; Porto Alegre/ Florianópolis, 2003.

GUERRERO, I.C.; ANDRÉS, L.S.; LEÓN, L.G.; MACHÍN, R.P.; PADRÓN, J.M.; LUIS, J.G.; DELGADILLO, J. Abietane Diterpenoids from *Salvia pachyphylla* and *S. clevelandii* with Cytotoxic activity against Human Cancer Cell Lines. *J. Nat. Prod.*, v. 69, p. 1803-05, 2006.

GUO, G.P.; PANG, J.; WANG, X.W.; SHEN, Z.Q.; JIN, M.; LI, J.W.; *In vitro* screening of traditionally used medicinal plants in China against enteroviroses. *World J. Gastroenterol.* v.12, n.25, p. 4078-81, 2006.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; MANIKANDAN, L.; BHATTACHARYA, S.; HALDAR, P.K.; ROY, S. Antibacterial activity of *Terminalia pallida*. *Fitoterapia* v.73, n.2, p.165-167, 2002.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. *Phytot. Res.*, v.20, n.4, p. 239–249, 2006.

HENRIKSSON, E.; KJELLÉN, E.; WAHLBERG, P.; WENNERBERG, J.; KJELLSTROM, J.H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill *in vitro* between colorimetric and cell count/colony assays. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal* v.42, p.320-323, 2006.

HISASHI, M.; YOSHIDA, K.; MIYAGAWA, K.; NEMOTO, Y.; ASAO, Y.; YOSHIKAWA, M. *Nuphar* alkaloids with immediately apoptosis-inducing activity from *Nuphar pumilum* and their structural requirements for the activity. *Bioorg Med Chem Lett.* v.16, n.6, p.1567-1573, 2006.

HOLBECK, S.L. Update on nci *in vitro* drug screen utilities. *Eur. J Cancer*, v. 40, p. 785–793, 2004.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detections and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Med*, v.63, p.2-10, 1997.

HOUGHTON, P; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* v. 42, p. 377–387, 2007.

HUANG, R. L.; CHEN, C. C.; HUANG, Y. L. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. *Planta Med.* v.64, p.212-215, 1998.

HUSSEIN, A.A., MEYER, J.J.M., JIMENO, M.L., RODRIGUEZ, B. Bioactive diterpenes from *Orthosiphon labiatus* and *Salvia Africana-lutea*. *J.Nat. Prod.* v.70, p.293-295, 2007.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H.; RAMAN, A. *In vitro* cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology.* v.90 p.33-38, 2004.

JOLY, A. B. Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo, EDUSP, 1975.

JU, B.G., LUNYAK, V.V., PERISSI, V., GARCIA-BASSETS, I., ROSE, D.W., GLASS, C.K., ROSENFELD, M.G. A topoisomerase II beta-mediated DNA break required for regulated transcription. *Science*, v.312, p.1798-1802, 2006.

KANDILL, F. E.; SOLIMAN, A. M.; SKODACK, S. R.; MABRY, T. J. Anti-cancer tannins part 3 - a new anticancer tannin and known tannins from *Terminalia cattapa*. *Asian J. Chem.* v.11, p.1001, 1999.

KARIOTI A.; SKOPELITI, M.; TSITSILONIS, O; HEILMANN J, SKALTSA H. Cytotoxicity and immunomodulating characteristics of labdane diterpenes from *Marrubium cylleneum* and *Marrubium velutinum*. *Phytochemistry*, v.68, n.11, p.1587 – 1594, 2007.

KATZUNG, BERTRAM G. Farmacologia Básica & Clínica - 10ª Ed. Editora: Mcgraw-hill Interamericana ,2010

KEAWPRADUB, N.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; Houghton, P.J. Cytotoxic activity of indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. *Planta Med*, v. 65, p. 311-315, 1999.

KELLNER U, HEIDEBRECHT HJ, RUDOLPH P, BIRSACK H, BUCK F, DAKOWSKI T, WACKER HH, DOMANOWSKI M, SEIDEL A, WESTERGAARD O, PARWARESCH R. Detection of human topoisomerase II alpha in cell lines and tissues: characterisation of five novel monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem.*, v. 45, p. 251 – 263, 1997.

KHANNA, A. K.; CHANDER, R.; KAPOOR, N. K. *Terminalia arjuna*: An ayurvedic cardiogenic, regulates lipid metabolism in hyperlipaemic rats. *Phytother. Res.* v.10, p.663-665, 1996.

KWON, H. C.; BAEK, N. I.; CHOI, S. U.; LEE, K. R. New cytotoxic butanolides from *Lindera obtusiloba* BLUME. *Chem. Pharm. Bull.* v.48, p.614-616, 2000.

LAMBLIN, F., HANO, C., FINIAUX, O., MESNARD, F., FLINIAUX, MA., LAINE, E. Interest of lignans in prevention and treatment of cancers. *Med Sci*, v.24, n.5, p.511-9, 2008. *Med Sci (Paris)*; v.24, p.511-520, 2008.

LING, S-K.; LOMORITA, A.; TANAKA, T.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K.; KOUNO, I. Iridoids and Anthraquinones from the Malaysian Medicinal Plant, *Saprosma scortechinii* (Rubiaceae). *Chem. Pharm. Bull.* v. 50, n. 8, p. 1035-1040, 2002.

LIU, L. F. DNA topoisomerases poisons as antitumor drugs. *Ann. Rev. Biochem.* v.58, p. 351-357, 1989.

LIU, LF; MILLER, K.G. Eucaryotic DNA topoisomerases: two forms of type I topoisomerases from Hela cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* v.78, p.3487-3491, 1981.

LIU, S.; ZHU, H.; ZHANG, S.; ZHANG, X.; YU, Q.; XUAN, L. Abietane diterpenoids from *Clerodendron bungei*. *J. Nat. Prod.* V. 71, p. 755-759, 2008.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSK, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. *Biologia celular e molecular*, ed.4, livraria e editora Revinter, Rio de Janeiro, 2002.

LOPEZ, J.A.; BARILLAS, W.; GOMEZ LAURITO, J.; LIN, F.T.; ALREHAILY A.J.; SHARAF, M.H.M.; SCHIFF, P.L. Aporphine alkaloids of *Ocotea brenesii*. *Int. J. Pharmacogn.* v.34, p.145-147, 1996.

LUCIANO, J. H. S.; LIMA, M. A. S.; SOUZA, E. B.; SILVEIRA, E. R. Chemical constituents of *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K. Schum. *Biocheml system. Ecol.*, v. 32, p. 1227-1229, 2004.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. & VEIGA, V.E. Plantas medicinais:a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 23, p.429-438, 2002

MAIOLI-AZEVEDO, V.; FONSECA-KRUEL, V.S. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul, *Acta bot. bras.* v.21, n.2, p. 263-275. 2007.

MALEKZADEH, F.; EHSANIFAR, H.; SHAHAMAT, M.; LEVIN, M.; COLWELL, R.R. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Ag.* v.18, p.85-88, 2001.

MANTLE, D.; LENNARD, T.W.J.; PICKERING, A. Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* v.19, n.3, p. 223-240, 2000.

MARTINI, N.; ELOFF, J.N. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J. Ethnopharmacol.* v.62, p.255-263, 1998.

MATOS, M. F. C.; MATSUBARA, M.H.; OGUMA P.M.; SIQUEIRA, J. M; SILVA, D. B; GARCEZ, F. R.; MARTINS, M. Evaluation of Antineoplastic Activity of Compounds Isolated from Annonaceae and Lauraceae. In: 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2005, Ribeirão Preto. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Braz JPharmac Scinces*, v.41, supl. 1, p.321, 2005.

MATOS, M.F.C.; LEITE, L.I.S.P.; BRUSTOLIM, D.; SIQUEIRA, J.M. DE; CAROLLO, C.A.; HELLMANN, A.R.; PEREIRA, N.F.G.; SILVA, D.B. DA. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. *Fitoterapia*, p.227-229, 2006.

MECZES EL, GILROY KL, WEST KL, AUSTIN CA. The Impact of the Human DNA Topoisomerase II C Terminal Domain on Activity. *The Human Topoisomerase II CTD*, V.3, 2008.

MICHELETTI, A.C., HONDA, N.K., LIMA, D.P., BEATRIZ, A., MATOS, M.F.C., QUEIRÓZ, L.M.M., BOGO, D., ZORZATTO, J.R. Chemical modifications of a natural xanthone and antimicrobial activity against multidrug resistant staphylococcus aureus and cytotoxicity against human tumor cell lines. *Quim. Nova*, v. 34, n.6, p.1014-1020, 2011.

MILLER, K.G.; LIU, L.F.; ENGLUND, P.T. A homogenous type II DNA topoisomerase from Hela cell nuclei. *J Biol Chem*. v. 256, n.17, p.9334-9, 1981.

Missouri Botanical Garden. <http://www.mobot.org>.

MOLLOY, M.J.; HALL, V.S.; BAILEY, S.I.; GRIFFIN, K.J.; FAULKNER, J.; UDEN, M. Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the plasmid isoforms thereby observed. *Nucleic Acids Res*. v.32, n.16, p.129.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAU, K.; VISTICA, D.; CURTIS, H.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst*. v. 83, n.11, p. 1991.

MORAIS, L.C.S.L.; ALMEIDA, R.N.; DA-CUNHA, E.V.L.; DA-SILVA, M.S.; BARBOSA, J. M.; GRAY, A.I. Further lignans from *Ocotea duckei*. *Pharm. Biol*. v. 37, p.144-147, 1999.

MOURA, V.M.; SANTOS, A.R.; NURNBERGA, V.; SOUZA, M.C.; SANTIN, S.M.O. Iridoid glycosides from *Galianthe brasiliensis*. *Biochem. System. Ecol.*, v.33, n.4, p. 451-453, 2005.

MOURA, V.M.; SANTOS, D.P.; OLIVEIRA, S.M.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). *Quim. Nova*, v.29, n.3, p.452-455, 2006.

MULLER, M.T.; SPITZNER, J.R.; DIDONATO, J.A.; MEHTA, V.B.; TSUTSUI, K.; TSUTSUI, K. Single-strand DNA cleavages by eukaryotic topoisomerase II. *Biochem* v.27, n.22, p. 8369-79, 1988.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.*,v.70, p.461-477, 2007.

OSHEROFF, N. Biochemical basis for the inhibition of type I and type II topoisomerases with DNA. *Pharmacol. Ther.* v.41, p.223-241,1989.

PEREIRA, J.O.L.; WOLTER, F.W.; WOLTER, E.; ZOGHBI, M.G.B.; SIQUEIRA, J.B.G.; PINHEIRO, C.C.S. Atividade biológica de um novo triterpeno isolado de *Guarea carinata* (Meliaceae). *Acta Amazônica* v.23, n.2-3, p.173-176, 1993.

PEREIRA, M.M.; JÁCOME, R.L.R.P.; ALCÂNTARA, A.F.C.; ALVES, B.; RASLAN, D.S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). *Quim. Nova*, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

PETTIT, G. R., SINGH, S. B., HAMEL, E., LIN, C. H., ALBERTS, D. S., GARCIA-KENDALL, D. Antineoplastic agents .145. Isolation and structure of the strong cell-growth and tubulin inhibitor combretastatin-A-4. *Experientia* v.45, p.209-211, 1989.

PETTIT, G.R., HOARD, M.S., DOUBEK, D.L., SCHMIDT, J.M., PETTIT, R.K., TACKETT, L.P., CHAPUIS, J.C. Antineoplastic agents 338. The cancer cell growth inhibitory constituents of *Terminalia arjuna* (Combretaceae). *J. Ethnopharmacol.* v.53, p.57-63, 1996.

PETTIT, G.R.; SINGH, S.B.; BOYD, M.R.; HAMEL, E.; PETTIT, R.K.; SCHMIDT, J. M.; HOGAN, F. Isolation and synthesis of Combretastatins A-4, A-5, and A-6. *J. Med. Chem.* v.38, p.1666-1672, 1995.

PINTO, A.C; SIQUEIRA, S. D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. *Quim. Nova.*, v. 25, n.1, p. 45-61, 2002.

PIOVESAN, A.C.; Estudo morfológico e molecular da mama de ratas castradas tratadas com isoflavona ou estrogênios. *Rev Bras Ginecol Obstet.* v.27, n.4, p. 204-9, 2005.

POMMIER, I. TOPOISOMERASE I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Rev. Câncer.* v.6, p.789-860, 2006.

POSTOW, L.; CRISONA, N.J.; PETER, B.J.; HARDY, C.D.; COZZARELLI, N.R. Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.98, p.8219–26, 2001.

POTT, V. J. A Família Nymphaeaceae no Pantanal, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta Bot. Bras.* v. 12, n.2, p.183-194, 1998.

POTT, V.J.; POTT, A. PLANTAS AQUÁTICAS DO PANTANAL. CORUMBÁ: EMBRAPA. 353P, 2000.

PRAZERES, D.M.; MONTEIRO, G.A.; FERREIRA, G.N.; DIOGO, M.M.; RIBEIRO, S.C.; CABRAL, J.M. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnol Annu Rev* v.7, p.1-30, 2001.

RATES , S.M.K. Plants as source of drugs, *Toxicon*, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001

ROUHI, A.M; WASHINGTON, C. Rediscovering natural products. *Chem. Eng. News.* v.81, n.41, p. 77-91, 2003.

ROVA, J. H. E.; DELPRETE, P. G.; ANDERSSON, L.; ALBERT, V. A. A trnL-F cpDNA sequence study of the Condamineae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. *American Journal of Botany.* v. 89, p. 145-159, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Agarose gel electrophoresis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York: v.7, p.43-45, 2001.

SANTOS, E. C. S. ; OGUMA, P. M. ; MATOS, M. F. C. ; SIMIONATTO, E. ; HAMERSK, L. ; HARADA, T. N. . Avaliação da atividade antitumoral de produtos naturais. In: IX Encontro de Iniciação Científica, 2008, Campo Grande/MS. CD-ROM IX Encontro de Iniciação Científica, 2008

SATO, Y.; OKETANI, H.; SINGYOUCHI, K.; OHTSUBO, T.; KIHARA, M.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T. Extraction and purification of effective antimicrobial constituents of *Terminalia chebula* Rets. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* v.20, p.401-404, 1997.

SHAILA, H.P.; UDUPA, A.L.; UDUPA, S.L. Preventive actions of *Terminalia belerica* in experimentally-induced atherosclerosis. *Int. J. Cardiol.* v.49, p.101-106, 1995.

SHAPIRO T.A.; ENGLUND P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol.* v.49, p.117-43, 1995.

SHAPIRO, T.A. Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.15, n.90, (16), p.7809-13, 1993.

SILVA, D.B.; MATOS, M.F.C.; NAKASHITA, S.T.; MISU, C.K.; YOSHIDA, N.C.; CAROLLO, C.A.; FABRI, J.R.; MIGLIO, H.S.; SIQUEIRA, J.M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. *Quím Nova*, v.30, p.1809 - 1812, 2007.

SILVA, J. R. DE A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C. ÉSTERES TRITERPÊNICOS DE HIMANTHUS SUCUUBA (SPRUCE) WOODSON. QUÍMICA NOVA. V. 21, N. 6, P. 702-704, 1998.

SIMIONATTO, E.; PERES, M.T.L.P.; HESS, S.C.; POPPI, N.R.; MATOS, M.F.C.; SANTOS, E.C.S.; OGUMA, P. M.; CARVALHO, J.E. Bioactivity and Chemical Composition of the Essential Oils of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). The *J.E.O.B.P.*,v..12, p..250-261, 2009.

SKEHAN, P.; STORENG. R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R.. New colorimetric cytotoxicity assay for anticâncer drug screening. *J Nat Cancer Inst* v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SOHNI, Y.R.; KAIMAL, P.; BHATT, R.M. The antiamebic effect of a crude drug formulation of herbal extracts against *Entamoeba histolytica* in-vitro and in-vivo. *J. Ethnopharmacol.* v.45, p.43-52,1995.

STRAUSS, P.R.; WANG, J.C. The TOP2 gene of *Trypanosoma brucei*: a single-copy gene that shares extensive homology with other TOP2 genes encoding eukaryotic DNA topoisomerase II. *Mol. Biochem.Parasitol.* v.38, p.141-50, 1990.
subfamilies, and tribes. *Int. J. Plant Sci.* v.170, n.6, p.766–793, 2009.

SUFFNESS, S.M.; PEZZUTO, J.M. Assays for cytotoxicity and antitumor activity. Cap.4. In: *Methods of Plant Biochemistry*, Vol. 9. (K. Hostettmann ed.). Academic Press, London, p.71-133, 1991.

SUNG KIM, J.; LEE, H.J.; SUH, M.E.; CHOO, H.Y.; LEE, S.K.; PARK, H.J.; PARK, S.W.;LEE, C.O. Synthesis and cytotoxicity of 1-substituted 2-methyl-1H-imidazol[4,5-g]phthalazine-4,9-dione derivatives. *Bioorg Med Chem*, v.12, p.3683-3686, 2004.

TADA K.; TAKIDO, M.; KITANAKA, S. Limonoids from of *Melia toodesan* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*, v.51, n.6, p.787-91, 1999.

TAYLOR, R.S. L.; HUDSON, J.B.; MANANDHAR, N.P.; TOWERS, G.H.N. Antiviral activities of medicinal plants of Southern Nepal. *J. Ethnopharmacol.* v.53, p.97-104, 1996.

TELES, H.L.; SILVA, G.H.; CASTRO-GAMBO,A. I.; BOLZANI, V.D.A. S.; PEREIRA, J.O.; COSTA-NETO, C.M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; YOUNG, M.C.; ARAÚJO,

A.R. Benzopyrans from *Curvularia* sp., an endophytic fungus associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae). *Phytochemistry*. v.66, n.19, p.2363-2367, 2005.

TIAN, Q.; MILLER, E.G.; AHMAD, H.; TANG, L.; PATIL, B.S. Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutr Cancer*, v.40, n.2, supl.2, p.180-4, 2001.

TRASK, D.K.; DIDONATO, J.A.; MULLER, M.T. Rapid detection and isolation of covalent DNA/protein complexes: application to topoisomerase I and II. *EMBO J*. v.3, n.3, p.671-6, 1984.

TSAI, I.L.; HUNG, C.H.; DUH, C.Y. Cytotoxic butanolides from the stem bark of formosan *Lindera communis*. *Planta Med*. v.67, p.865-867, 2001.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. v.1, n.3. p.1112-1116, 2006.

VIOLANTE, I.M.P. Estudo Químico e Avaliação de Atividades Biológicas de *Hyptis crenata* (2011) Tese de Doutorado em andamento. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Química.

WALKER, M.R.; RAPLEY, R. Guia de rotas na tecnologia do gene, ed.1, Atheneu editora, São Paulo, 1999.

WALL, M.E. Camptothecin and taxol: discovery to clinic. *Med Res Rev*. v.18, n.5, p.299-314, 1998.

WANG, J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, v.3, p.430-440, 2002.

WANG, J.C. DNA Topoisomerases . *Annual Rev. Biochem.* V.65, p.635-92, 1996.

WANG, J.C. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q Rev Biophys.* v.31, n.2, p.107-44, 1998.

WEINSTEIN, J.N.; MYERS, T.G.; O'CONNOR, P.M.; FRIEND, S.H.; FORNACE, A.J.J.R.; KOHN, K.W.; FOJO, T.; BATES, S.E.; RUBINSTEIN, L.V.; ANDERSON, N.L.; BUOLAMWINI, J.K.; VAN OSDOL, W.W.; MONKS, A.P.; SCUDIERO, D.A.; SAUSVILLE, E.A.; ZAHAREVITZ, D.W.; BUNOW, B.; VISWANADHAN, V.N.; JOHNSON, G.S.; WITTES, R.E.; PAULL, K.D. An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science*, v. 17, n.275 (5298), p.343-349, 1997.

WHITACRE, C.M., ZBOROWSKA, E., GORDON, N.H., MACKAY, W., BERGER, N. Topotecan increases topoisomerase α levels and sensitivity to treatment with etoposide in schedule-dependent process. *Cancer Res.* v.57, p.1425, 1997.

WOO, S.; JUNG, B.; LEE, C.; YOUNG, C.; KWON, J.; NAA, Y. Synthesis of new xanthone analogues and their biological activity test—Cytotoxicity, topoisomerase II inhibition,

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2002. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva.

YE, Q.; GU, Z. M.; ZENG L.; ZHAO, G. X.; CHANG, C. J.; MCLAUGHLIN, J. L.; SASTRODIHARDJO, S. *Persealide*: A novel, biologically active component from the bark of *Persea americana* (Lauraceae). *Int. J. Pharmacogn.* v.34, p.70-72, 1996.

ZHANG, H. J.; TAN, G. T.; HOANG, V. D. Natural anti-HIV agents - part II: *Litsea verticillata*. *Tetrahedron Lett.* v.42, p.8587-8591, 2001.

ZHOU, H., HAMAZAKI A, FONTANA JD, TAKAHASHI H, WANDSCHEER CB, FUKUYAMA Y. Cytotoxic limonoids from brazilian *Melia azedarach*, *Chem. Pharm. Bull.* v.53, n.10, p. 1362—1365, 2005.

8. Apêndice – tabela de identificação e especificações das amostras.

Família	Espécie	Nome popular	código	amostra	Parte da planta	Nome químico	Classificação química
Combretaceae	<i>Combretum laxum</i>	Pombeiro branco,	CP5	Substância pura	raiz	3,4-dihidroxi-3,4,5-trimetoxibenzila	Bibenzila
			CP8	Substância pura	raiz	2,7-dihidroxi-4,6-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno – (metoxicoclonina)	Diidrofenantreno
			CP10	Substância pura	raiz	calosina	Diidrofenantreno
			CP11	Substância pura	raiz	Siringaresinol	Lignana
			CP13	Substância pura	raiz	2,6-dihidroxi-3,4,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno	Diidrofenantreno
Lamiaceae	<i>Hyptis crenata</i>	hortelã-brava e salva-de-marajó	DH-3	Substância pura	raiz	2,6-dihidroxi-3,4,7-trimetoxifenantreno	Fenantreno
			D5-30	Substância pura	raiz	2,7-dihidroxi-4,6-dimetoxifenantreno	Fenantreno
			DCM	Fase diclorometânica	caule		
			ácido	Substância	caule	Ácido carnósico	Triterpeno
			carnósico	pura DCM			
			akhdardiol	Substância	caule	Akhdardiol	
				pura DCM			
			Rosmanol	Substância pura,	caule	7-O-metilrosmanol	Triterpeno
			Flavona	Substância pura	caule	5,6,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona	flavona
			Ácido pisiférico	Substância pura	caule	Ácido pisiférico	Triterpeno
			Borneol	Substância pura	caule	Borneol	Triterpeno
			Carnosol	Substância pura	caule	Carnosol	Triterpeno
Rubiaceae	<i>Galianthe talictroides</i>	Baicuru	Ácido	Substância pura,	caule	Ácido carnosólico	Triterpeno
			carnosólico				
			RC6-2	Substância pura	raiz	Alcaloide β-carbolínico - indol-monoterpênico	Alcaloide
Parmeliaceae	<i>Pogonopus tubulosus</i>		RC6-5	Substância pura	raiz	Alcaloide β-carbolínico - indol-monoterpênico	Alcaloide
			PC12	Substância pura	caule	Não elucidada	Alcaloide
			PC14	Substância pura	caule	Não elucidada	Alcaloide
			composto 15		liquen		xantona
			composto 16		liquen		xantona
	<i>Parmotrema lichexantonicum</i>		composto 17		liquen		xantona

