

MATEUS GANDRA CAMPOS

**ATIVIDADE ANTIMELANÓTICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS E EXTRATOS  
HIDROALCOÓLICOS DE *INGA SUBNUDA* E *ROLLINIA DOLABRIPETALA* E AÇÃO  
ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C198a  
2013

Campos, Mateus Gandra, 1984-

Atividade antimelanótica de compostos fenólicos e extratos hidroalcoólicos de *Inga submuda* e *Rollinia dolabripetala* e ação antibacteriana e antioxidante / Mateus Gandra Campos. – Viçosa, MG, 2013.

xv, 94 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Tânia Toledo de Oliveira.

. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 76-94

1. Bioquímica. 2. *Inga submuda*. 3. *Rollinia dolabripetala*.  
4. Fenóis. 5. Agentes antineoplásicos. 6. Câncer. 7. Bactérias gram-positivas. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola.  
II. Título.

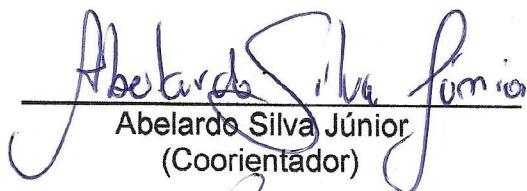
CDD 22. ed. 572

MATEUS GANDRA CAMPOS

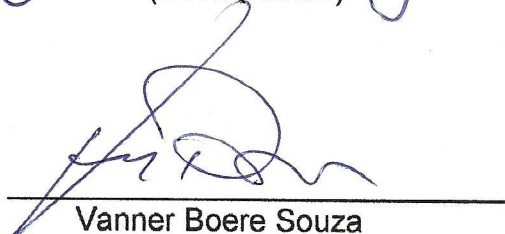
**ATIVIDADE ANTIMELANÓTICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS E EXTRATOS  
HIDROALCOÓLICOS DE *INGA SUBNUDA* E *ROLLINIA DOLABRIPETALA* E AÇÃO  
ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE**

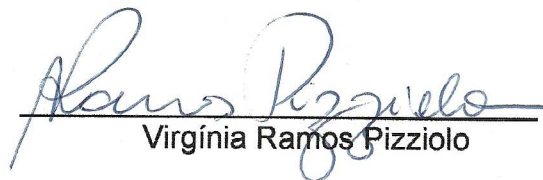
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

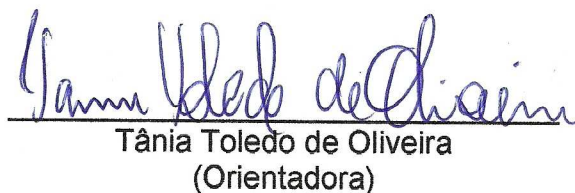
Aprovado em 31 de julho de 2013

  
Abelardo Silva Júnior  
(Coorientador)

  
Leandro Licursi de Oliveira

  
Vanner Boere Souza

  
Virginia Ramos Pizzolo

  
Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientadora)

Dedico esse trabalho aos meus  
queridos pais Paulo Tadeu de Almeida  
Campos e Virgínia Maria Gandra  
Campos

“Sempre há o que aprender, ouvindo, vivendo e, sobretudo trabalhando. Mas só aprende quem se dispõe a rever suas certezas.”

Darcy Ribeiro

"Se todos chegassem a compreender a preciosidade do tempo, certamente cada um se esforçaria ao máximo em usá-lo com sabedoria!"

Francesco Forgione (Pietrelcina)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades de contínuo crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, Paulo Tadeu e Virgínia, pelo incentivo e apoio incondicional aos meus estudos. Meus sinceros agradecimentos pelo amor, compreensão e exemplo de dignidade.

Aos meus irmãos Paulo e Tiago, minha cunhada Mayume, juntamente com meu sobrinho Pedro, pelo carinho e amizade, mesmo que o convívio não tenha sido tão freqüente.

Aos meus primos Luiz Gandra, Carolina Gandra e minha Tia Cirbélia Gandra pelo apoio, carinho e auxílio.

À Universidade Federal de Viçosa e aos Departamentos de Bioquímica e Biologia Molecular e de Veterinária pela acolhida e apoio institucional, acadêmico e financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Professora Tânia Toledo pela excelente orientação, ensinamentos, amizade e conselhos e por me receber no Laboratório Biofármacos.

Ao professor Abelardo Silva Junior, pela coorientação, apoio, paciência e aconselhamentos, por me receber no Laboratório de Virologia (LVA/DVT) e pela composição da comissão examinadora deste trabalho.

Aos professores Leandro Licursi e Virgínia Pizzolo pelo auxílio na escolha de ensaios, bem como ao professor Vanner Boere pela composição da comissão examinadora desse trabalho.

Ao professor José Humberto pela amizade, auxílio e dedicação. Ao Gean, técnico do laboratório de ensino DBB, pela paciência e ajuda em diversas etapas.

A todos os colegas do Laboratório Biofármacos que contribuíram de alguma forma, para o desenvolvimento deste trabalho, principalmente Geisla Teles, Marcelo Filardi e Dr. Marcelo Costa.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia Animal e Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) que contribuíram de alguma forma para a

realização desse trabalho, especialmente Otávio Valério, Caroline Ferreira, Hanna Ferreira, Janine Paiva, Luis Bulos, Daniele Mendes, Matheus Bastos, Thiago Onofre, Vitor Oliveira e Marcus Rebolsas, Andressa Antunes e Joana Gasperazzo.

Aos colegas do DBB pela ajuda contínua e apoio, em especial Fernanda Rodrigues e Christiane Souza.

A todos do Herbário da Universidade Federal de Viçosa pela ajuda no preparo e identificação das exsicatas. Em especial aos taxonomistas José Martins e Marcus Simão, e à Fernanda Gotti.

Aos amigos da Pequena Via e Acampamento Maanaim pela ajuda contínua e compreensão. Todos são muito especiais, mas pelo auxílio mais incisivo agradeço especialmente Lívia Lopes, Mariá Braga, Eliane Silveira, Lucas Silveira, Maurício Macedo, Rafael Perácio, Renato, André, Hilda Simone e Marcos Nunes, Cida e José Márcio.

A todos meus amigos vinculados ou não aos locais mencionados e que desempenharam importância igual para a realização desse trabalho em especial Rodrigo Barros, Alexandre Gori, Débora Lopes e Priscila Tomaz. Perto ou longe, saber que posso contar com vocês é sempre muito bom.

Ao Luiz Carlos, Marcos Salgado, Batalha, Dagoberto, José e a todos os funcionários do laboratório Biofármacos e Departamento de Veterinária pelo auxílio tantas vezes imprescindível para o desenvolvimento deste estudo e pela amizade construída com tantos.

À minha namorada Hanna Ferreira pelo carinho, compreensão, apoio e auxílio principalmente nos momentos finais desse projeto

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	IX
LISTA DE TABELAS .....	XI
RESUMO .....	XII
ABSTRACT .....	XIV
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 O CÂNCER.....	3
2.1.1 O câncer de pele.....	5
2.2 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA .....	6
2.3 BIOQUÍMICA DO CÂNCER DE PELE.....	8
2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DE MELANOMA <i>IN VITRO</i> .....	9
2.5 PLANTAS MEDICINAIS E CÂNCER.....	10
2.6 INGÁ - FAMÍLIA <i>FABACEAE</i> .....	12
2.6.1 <i>Inga subnuda subsp. Luschnathiana (Benth.) T.D.Penn.</i> .....	12
2.7 FAMÍLIA <i>ANNONACEA</i> .....	14
2.7.1 <i>Rollinia dolabripetala (Raddi) R.E. Fr.</i> .....	14
2.7.2 <i>Atividade biológica das anonáceas</i> .....	16
<b>FIGURA 4 - ESTRUTURA GERAL DAS ACETOGENINAS (VILLO, 2008) .....</b>	<b>16</b>
2.8 FLAVONÓIDES, CÂNCER E QUIMIOPREVENÇÃO .....	18
2.8.1 <i>Quimioprevenção do Câncer</i> .....	21
2.8.2 <i>Morina</i> .....	23
2.8.3 <i>Naringina</i> .....	24
2.8.4 <i>Xantona; 1,7-dioxixantona e câncer</i> .....	25
2.8.5 <i>5-Fluoracil e câncer</i> .....	28
2.9 INFECÇÕES BACTERIANAS GRAM E CÂNCER.....	30
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>32</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO .....	33

4.2	MATERIAL BOTÂNICO .....	33
4.3	PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO .....	35
4.1	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	36
4.1.1	<i>Fenóis e taninos</i> .....	36
4.1.2	<i>Flavonóides</i> .....	36
4.1.3	<i>Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas</i> .....	37
4.1.4	<i>Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas</i> .....	37
4.1.5	<i>Saponinas</i> .....	37
4.1.6	<i>Antraquinonas</i> .....	37
4.2	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH) .....	38
4.2.1	<i>Porcentagem antioxidante</i> .....	39
4.3	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	40
4.3.1	<i>Teste de peroxidação em lipossomos- Determinação de malondialdeído (MDA)</i> .....	41
4.4	CULTIVO CELULAR .....	42
4.4.1	<i>Curva de crescimento celular</i> .....	42
4.4.2	<i>Teste de citotoxicidade</i> .....	43
4.4.2.1	Capacidade de inibir 50% do cultivo celular (GI <sub>50</sub> ) .....	43
4.4.2.2	Teste de viabilidade celular .....	44
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	45
4.5.1	<i>Microrganismo indicador</i> .....	45
4.5.2	<i>Padronização do microrganismo indicador</i> .....	45
4.5.3	<i>Ensaio qualitativo</i> .....	45
4.5.3.1	Cicloprix olamina.....	46
4.5.4	<i>Determinação da concentração inibitória mínima</i> .....	46
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
5.1	PREPARO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS.....	48
5.1.1	<i>Estimativas de rendimento de matéria verde, seca e perda de umidade</i> .....	48
5.2	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	49
5.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS.....	50
5.3.1	<i>Método do DPPH</i> .....	50
5.3.2	<i>Método da peroxidação lipídica</i> .....	50
5.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS .....	52
5.4.1	<i>Técnica de difusão em ágar</i> .....	52

5.4.2	<i>Técnica de concentração inibitória mínima</i> .....	54
5.5	TESTE DE CITOTOXICIDADE .....	55
5.5.1	<i>Determinação da concentração letal mínima – GI (“Growth inhibition”)</i> .....	55
5.5.2	<i>Determinação das concentrações citotóxicas</i> .....	62
5.5.3	<i>Determinação das concentrações com maior eficácia</i> .....	63
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
6.1	ENSAIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR.....	66
6.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	68
6.2.1	<i>Método do DPPH</i> .....	68
6.2.2	<i>Método da peroxidação lipídica</i> .....	69
6.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	70
6.3.1	<i>Teste de difusão em ágar</i> .....	70
6.3.2	<i>Teste da concentração inibitória mínima</i> .....	70
6.4	ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	71
6.4.1	<i>Inga subnuda</i> .....	71
6.4.2	<i>Rollinia dolabripetala</i> .....	71
6.4.3	<i>1,7-dihidroxixantona</i> .....	72
6.4.4	<i>Morina</i> .....	73
6.4.5	<i>5-Fluoracil</i> .....	73
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>76</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Equação 1 – Equação usada para o cálculo do rendimento do extrato liofilizado. ....	35
Equação 2 – Equação usada para cálculo da atividade sequestrante pelo ensaio do DPPH. ...	39
Equação 3 – Equação usada para cálculo da inibição da atividade peroxidativa. ....	41
Figura 1 – Perfil dos gastos federais com hospitais para procedimentos relacionados a neoplasias.....	4
Figura 2 - Foto da exsicata de <i>Inga subnuda</i> . ....	13
Figura 3 – Foto da exsicata de <i>Rollinia dolabripetala</i> .....	15
Figura 4 - Estrutura geral das acetogeninas.....	16
Figura 5 – Estrutura do flavonol quercetina.....	20
Figura 6 – Estrutura da morina.....	23
Figura 7 –Estrutura da naringina.....	24
Figura 8 –Figura do núcleo xantônico.....	25
Figura 9 – Fórmula estrutural do 5-Fluoracil e seus análogos normais.....	28
Figura 10 - Esquema representativo da síntese de monofosfato de deoxitimidina (dTMP) a partir do composto monofosfato de deoxiuridina (dUMP). ....	29
Figura 11 - Estabilização do radical livre DPPH.....	38
Figura 12 Teste antibacteriano pela técnica de difusão em poço.....	53
Figura 13 – Teste de concentração inibitória mínima.....	54
Figura 14 - Gráfico comparativo da absorbância da cultura tratada com DMSO em relação ao controle negativo.....	55
Figura 15 – Gráfico do GI <sub>50</sub> do 5-Fluoracil. ....	57

Figura 16 – Gráfico do GI <sub>50</sub> do extrato de <i>Inga subnuda</i> .....	58
Figura 17 – Gráfico do GI <sub>50</sub> do extrato de <i>Rollinea dolabripetala</i> .....	58
Figura 18 – Gráfico do GI <sub>50</sub> da Morina. ....	59
Figura 19 – Gráfico do GI <sub>50</sub> da naringina. ....	59
Figura 20 – Gráfico do GI <sub>50</sub> da 1,7-dihidroxixantona. ....	60
Figura 21 – Gráfico do GI <sub>50</sub> da xantona. ....	60
Figura 22 – Gráfico das concentrações com maior eficácia em 24, 48 e 72 horas.....	64
Figura 23 – Fotografia de cultivo celular da linhagem B16-F10, sem tratamento. ....	65
Figura 24 – Fotografia de cultivo celular da linhagem B16-F10, tratadas por 24 horas com extrato de <i>Inga subnuda</i> .....	65
Figura 25 – Fotografia de cultivo celular da linhagem B16-F10, tratadas por 24 horas com extrato de <i>Rollinia dolabripetala</i> .....	65
Figura 26 – Reação de formação do complexo MDA – TBA .....	69
Figura 27 - Esquema representando a estrutura da 1,7-dihidroxixantona.....	72
Quadro 1 – Mecanismos gerais da quimioprevenção. ....	22
Quadro 2 - Mecanismos de ação dos derivados xantônicos com ação antitumoral.....	27
Quadro 3 – localização dos controles e concentrações testadas do extrato de <i>I. subnuda</i> pela técnica de concentração inibitória mínima (MIC). ....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento do material botânico (folhas/casca).....	48
Tabela 2 - Resultado da prospecção fitoquímica preliminar dos extratos das folhas de <i>Inga subnuda</i> e <i>Rollinia dolabripetala</i> .....	49
Tabela 3 – Atividade antioxidante dos extratos de <i>R. dolabripeta</i> e <i>I. subnuda</i> .....	50
Tabela 4 – Atividade antioxidante dos extratos de <i>R. dolabripeta</i> e <i>I. subnuda</i> .....	51
Tabela 5 – Halo de inibição em cultivo de três cepas de bactérias Gram positivas (valores em média $\pm$ desvio padrão).....	52
Tabela 6 – Valores de GI50 das substâncias testadas e 5-Fluoracil (controle positivo) testadas em período de incubação de 72 horas. ....	56
Tabela 7 – Concentração de proporção de diluente DMSO nas soluções estoque substâncias testadas e o 5-Fluoracil.....	57
Tabela 8 - Valores da inibição da proliferação celular em 24, 48 e 72 horas (valores em %; média $\pm$ desvio padrão).....	61
Tabela 9 - Valores da inibição da proliferação celular (valores em %). ....	62
Tabela 10 - Valores da inibição da proliferação celular (valores em %). ....	62
Tabela 11 - Valores da inibição da proliferação celular (valores em %). ....	63
Tabela 12 – Valores das concentrações com maior eficácia em 24, 48 e 72 horas (valores em %; média $\pm$ desvio padrão).....	63

## RESUMO

CAMPOS, Mateus Gandra, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013.  
**Atividade antimelanótica de compostos fenólicos e extratos hidroalcoólicos de *Inga subnuda* e *Rollinia dolabripetala* e ação antibacteriana e antioxidante**  
Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior, Carla de Oliveira Barbosa Rosa e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

Diante do contínuo aumento mundial de doenças como o câncer do tipo melanoma e infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina, a pesquisa por novos fármacos tem ganhado importância cada vez maior no mundo científico. O Brasil é um dos países com maior biodiversidade vegetal no mundo. Entretanto, muito pouco ainda se sabe sobre as propriedades terapêuticas desse patrimônio vegetal. O objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, o potencial citotóxico dos extratos hidroalcoólicos de *Inga subnuda* subsp. *Luschnathiana* (Benth.) T.D.Penn. (ingá) e *Rollinia dolabripetala* (Raddi) R.E. Fr. (araticum, marolo), dos flavonóides naringina e morina e de xantonas, sobre o câncer de pele do tipo melanoma, realizando um comparativo com a atividade do fármaco comercial 5-Fluoracil (5-FU). Os extratos também tiveram sua eficácia testada, *in vitro*, quanto ao seu potencial antioxidativo e potencial bactericida principalmente em cepas Gram-positivas. A avaliação da citotoxicidade foi baseada na linhagem B16F10 submetida ao ensaio colorimétrico do MTT. O extrato de *I. subnuda* apresentou ação bactericida contra todas as cepas bacterianas testadas, enquanto o extrato de *R. dolabripetala* apresentou atividade apenas contra *S. aureus* ATCC 29213. O extrato de *I. subnuda* desempenhou atividade antioxidante estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ) que os extratos de *Ginkgo biloba* (controle) e *R. dolabripetala*, tanto no teste do DPPH quanto no de peroxidação lipídica. No teste de citotoxicidade, a naringina foi considerada uma substância inativa para este tipo de câncerpatologia e a morina promoveu maior citotoxicidade no período de 72 horas ( $98,48\% \pm 0,71$ ) com diferença significativa em relação ao controle ( $\alpha < 0,05$ ). Contudo, assim como a 1,7-dihidroxixantona, o potencial uso terapêutico da morina dificilmente será considerado devido a alta concentração necessária para desempenhar atividade citotóxica relevante ( $1,25 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ ). Assim, o extrato de ingá foi considerado o mais efetivo por, no tempo

de 24, 48 e 72 horas, desencadear mais de 80% de citotoxicidade com a menor concentração (78,13 µg/mL). Os resultados indicam que ambos os extratos apresentam atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica, mas estudos posteriores são necessários para uma melhor compreensão das promissoras atividades biológicas dos extratos.

## ABSTRACT

CAMPOS, Mateus Gandra, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Antimelanomic activity of phenolic compounds and hydroalcoholic extracts of *Inga subnuda* and *Rollinia dolabripetala* and antioxidant and antibacterial activity**  
Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-advisers: Abelardo Silva Júnior, Carla de Oliveira Barbosa Rosa and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

The increasing world-wide rates of diseases such as melanoma skin cancer and infections caused by methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* has historically attracted the attention of researchers about the development of new drugs. Brazil has one of the world's greatest biodiversity; nevertheless, the majority of plants with therapeutic potential still unclear. The aim of present study was to evaluate the *in vitro* antiproliferative activity of naringin, morin, xanthenes and hydroalcoholic extracts of *Inga subnuda* subsp. *Luschnathiana* (Benth.) T.D.Penn. and *Rollinia dolabripetala* (Raddi) R.E. Fr., compared of Fluorouracil (5-FU). Both extracts were evaluated about their antioxidant capability and about their antimicrobial activity mainly against Gram-positive bacterias. The cytotoxicity test methodology was based on the MTT colorimetric assay and was performed on B16-F10 melanoma cells. The *I. subnuda* extract was effective against the three strains of bacteria, whereas the *R. dolabripetala* extract was effective just against *S. aureus* ATCC 29213. The *I. subnuda* extract performed a statistical higher antioxidant activity ( $p < 0,05$ ) than the *Gingko biloba* (control) and *R. dolabripetala* extracts in both antioxidative tests. The naringin was considered as inactive substance against this cancer cell and the morin bring about the higher citotoxicity in 72 hours ( $98,48\% \pm 0,71$ ) with statistically significant difference compared to the control group ( $\alpha < 0,05$ ). On the other hand, as 1,7-dihydroxyxanthone, the therapeutic use of the morin for this purpose could be disregarded due the high concentration required for relevant citotoxicity activity ( $1,25 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$  of both). Thus, the *I. subnuda* extract was regarded as the most effective tested substance by his up to 80% citotoxicity capability under all treatment periodo (24, 48, 72 hours). Moreover, the citotoxicity test of *I. subnuda* extract required the lowest concentration for a effective result ( $78,13 \mu\text{g/mL}$ ). The experiments reported tha both extracts play a role as an antioxidant,

an antibacterial and a cytotoxic agent. However, further studies are required for a better understanding about their biological activities.

## 1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INCA - ESTIMATIVA, 2012).

Nas últimas décadas, o câncer vem se apresentando como um problema de saúde pública mundial, despertando o interesse urgente na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral. Na avaliação da atividade antiproliferativa, os testes de citotoxicidade *in vitro* com células neoplásicas são os mais amplamente utilizados (HOLBECK, 2004; SKEHAN *et al.*, 1990). Neste ensaio é possível avaliar grande número de substâncias em pouco tempo, possibilitando a descoberta de novas drogas anticâncer (SUGGITT *et al.*, 2005). Um dos modelos mais utilizados em estudos de atividade antitumoral é o de melanoma murino (B16F10), permitindo a avaliação de substâncias quanto ao seu potencial antitumoral.

Grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utiliza práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% desta utiliza plantas ou preparações destas (YUNES *et al.*, 2001). O Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta, além da rica diversidade étnica e cultural, que detém o conhecimento na utilização das ervas e plantas medicinais (SCHENKEL *et al.*, 1999; ROCHA, 2007).

Dentre as vantagens do uso de extratos vegetais na farmacoterapêutica, pode-se citar que estes podem ser tão ativos quanto um fármaco sintético e apresentar maior segurança de uso (ROCHA, 2007). Parte disso deve-se a menor concentração dos compostos ativos em drogas vegetais ou extratos se comparado a um medicamento contendo apenas um fármaco, pois frequentemente os compostos ativos atuam de maneira sinérgica entre eles e com outros componentes do complexo fitoterápico (YUNES *et al.*, 2001; VAGNER, 2009).

Considerando as diretrizes do Ministério da Saúde que se propõe a inserir o uso de plantas medicinais e fitoterápicos durante a quimioterapia, torna-se de real importância analisar comparativamente extratos de extratos vegetais com esse potencial (BVSMS – Ministério da Saúde).

Frente a estas considerações, este trabalho visa avaliar a atividade antiproliferativa do extrato hidroalcoólico de *Inga subnuda* e *Rollinia dolabripetala*, duas plantas encontradas em fragmentos da Mata atlântica. Pouco se sabe sobre essas plantas, mas com base no conhecimento popular, elas são potencialmente ativas no combate ao câncer e a agente microbianos. Assim o objetivo deste trabalho foi a avaliação da atividade citotóxica, bactericida e antioxidante de dois extratos hidroalcoólicos de *I. subnuda* e *R. dolabripetala*, plantas pertencentes à flora brasileira, em linhagem de células tumorais B16F10, bem como a avaliação da atividade citotóxica da morina, naringina e xantonas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O câncer

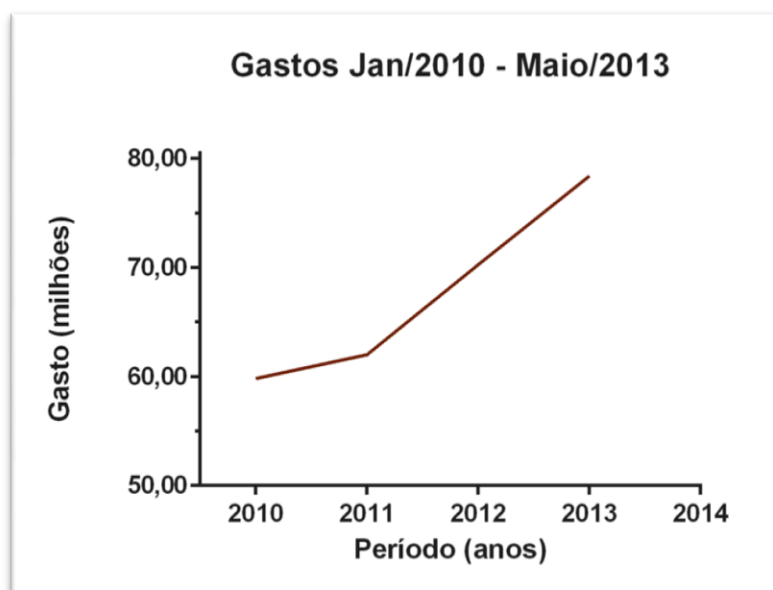
O câncer é uma doença do tipo crônico-degenerativa e foi definida pelo patologista Rupert Willis, 1930, como uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excede ao crescimento dos tecidos saudáveis e que persiste mesmo depois da interrupção dos estímulos que originaram a mudança. A persistência dos tumores resulta de alterações genéticas hereditárias que vão desde a progênie das células tumorais. Hipócrates (460 a 370 a.C.) usou o termo "carcinomas" para descrever certos tipos de tumores. Em grego, quer dizer "caranguejo", pelo aspecto do tumor, uma vez que as projeções e vasos sanguíneos ao seu redor fazem lembrar as patas do crustáceo (KUMAR *et al.*, 2005).

O início dessa patologia é resultante de alterações genéticas, ou seja, que causam modificações na estrutura do DNA (ácido desoxirribonucléico), ou epigenéticas, que são capazes de alterar a constituição química do DNA não alterando diretamente a sequência de nucleotídeos. Geralmente, os genes atingidos estão relacionados aos processos de indução e controle do ciclo de divisão celular e/ou um desequilíbrio no controle da morte celular programada. (ALBERTS *et al.*, 2004; COOPER, 2001; DEVLIN, 2007).

Inicialmente, essa patologia foi considerada uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos (INCA - ESTIMATIVA, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes em decorrência dessa doença e 75 milhões de pessoas vivas, mas com essa patologia. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média rendas (WHO - FACT SHEET: CÂNCER, 2013).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de algum tipo de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema

do câncer no país. No ano de 2013 (Jan. – Maio) foram registrados mais de 22 milhões de óbitos no país, aumento de 13% que o mesmo período em 2012 (DATA SUS). Observa-se um aumento contínuo nos investimentos para o tratamento dessa patologia De acordo com os valores liberados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), nos últimos três anos (maio/2010 a maio/2013) houve um aumento de 55% nos gastos federais em procedimentos hospitalares referentes a neoplasias (DATA SUS) (figura 1).



**Figura 1** – Perfil dos gastos federais com hospitais para procedimentos relacionados a neoplasias. . Dados retirados de: CID-10: II. Neoplasias (tumores), Período: Jan/2010 - Maio/2013. (DATA SUS)

### 2.1.1 O câncer de pele

No que se refere ao câncer de pele, pode-se classificá-lo principalmente em duas diferentes formas: melanoma e não-melanoma. Os do tipo não melanoma é uma doença que acomete preferencialmente as populações de pele clara de países tropicais, como Brasil, África do Sul e Austrália, as quais apresentam a tendência de se queimar, mas não se bronzear à luz solar. A exposição à luz ultravioleta (UV), geralmente de origem solar, é o principal fator de risco associado a essa patologia. Esse tipo de câncer pode ser classificado como carcinoma escamocelular ou basocelular, dependendo do tipo de célula, e raramente sofre metástase. Contudo, em alguns casos em que há demora no diagnóstico, o mesmo pode levar a ulcerações nas regiões afetadas e deformidades físicas graves (INCA - ESTIMATIVA, 2012).

Diferentemente, o câncer do tipo melanoma é uma forma muito agressiva que se desenvolve a partir dos melanócitos, um tipo de célula epitelial que contém uma pigmentação chamada melanina, e possui poucas opções eficazes de tratamento. O prognóstico dessa variedade de câncer de pele sofre a interferência de diversas variáveis, incluindo a idade do paciente, sexo, local do tumor primário, espessura do tumor, ulceração do tumor, taxa de mitose das células tumorais, presença de invasão linfovascular, presença de linfócitos infiltrados e presença de metástases nos linfonodos, na pele ou em outros órgãos (LOTZE *et al.*, 2001). Entre estes fatores, a espessura tumoral, a presença de ulcerações e de metástases são considerados como os melhores indicadores para prognóstico (BALCH *et al.*, 2001).

A neoplasia do tipo melanoma tem como principais fatores de risco a exposição excessiva ao sol (tanto radiações UVA quanto UVB), principalmente entre os horários de 12 horas às 16 horas; câmaras de bronzamento; histórico pessoal ou familiar desse tipo de patologia, ou doença genética dérmica (ex.: xerodermia pigmentosa); sensibilidade da pele ao sol; doenças imunossupressoras (ex.: lúpus); exposição ocupacional (ex.: trabalhadores rurais) (INCA - ESTIMATIVA, 2012).

Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrados no País, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, apesar de ser o mais grave devido à sua alta

possibilidade de metástase (INCA - ESTIMATIVA, 2012). A quimioterapia tem-se demonstrado inefetiva no aumento da sobrevida global de apenas uma minoria dos pacientes. A cirurgia ainda é o tratamento mais indicado para essa patologia. Essa escolha, por parte dos médicos, tem levado a boas taxas de cura, quando o tumor é detectado e retirado em estágio inicial. Entre os pacientes com melanoma metastático, estágio disseminado, o procedimento cirúrgico é ineficaz e o tempo mediano de sobrevida estimado é em torno de 8 meses; menos de 10% dos pacientes sobrevivem 5 anos desde o diagnóstico (BALCH *et al.*, 2003). Nesses casos a estratégia de tratamento deve ter então como objetivo aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (LOTZE *et al.*, 2001; RODRIGUEZ-VICENTE *et al.*, 1998).

## **2.2 Radiação ultravioleta**

A luz do sol é a principal fonte de radiação na superfície terrestre. O espectro de ultravioleta (UV) solar é dividido em três principais componentes, baseados nos seus comprimentos de ondas e efeitos biológicos (MUKHTAR & ELMETS, 1996; BALIGA & KATIYAR, 2006; KATIYAR *et al.*, 2007):

- a) Ondas grandes - UVA (320 – 400 nm);
- b) Ondas médias - UVB (290 – 320 nm);
- c) Ondas curtas - UVC (200-290 nm).

O espectro UV que atinge a superfície da terra consiste de aproximadamente 5% UVB e 95% UVA. A maior parte da fração UVC do espectro ultravioleta solar é bloqueado pela camada de ozônio terrestre. A radiação UVA pode penetrar profundamente na epiderme e derme da pele e sua exposição extensiva pode permitir a formação inicial de tumor (BACHELOR & BOWDEN, 2004; WANG *et al.*, 2001). A exposição da pele às ondas do tipo UVA induz a geração de radicais livres de oxigênio e grupos hidroxil, que podem causar danos a várias macromoléculas celulares, como proteínas, lipídeos e DNA (DIGIOVANNI, 1992). O estresse oxidativo induzido pela radiação UVA pode desenvolver o processo de “photoaging” na forma de flacidez da

pele, ao invés de rugas (KRUTMANN, 2001) e também pode suprimir algumas das funções imunológicas.

As radiações UVB são mutagênicas e carcinogênicas naturalmente e são responsáveis por uma variedade de doenças de pele. Radiações UVB podem penetrar na epiderme da pele, possibilitando indução de estresse oxidativo, imunossupressão, danos do DNA, envelhecimento precoce da pele e câncer de pele dos tipos melanoma e não-melanoma (KATIYAR *et al.*, 2007; DE GRUIJL & VAN DER LEUN, 1994).

Por fim, a radiação UVC possui alto nível de energia, é naturalmente mutagênica e, comparativamente, apresenta consequência de maior gravidade que as radiações UVA e UVB juntas.

A radiação seja ela solar ou ionizante, é o mais importante carcinógeno físico. O mecanismo da carcinogênese pela radiação reside na sua capacidade de induzir mutações. Tem sido muito difícil encontrar uma assinatura genética definitiva para os efeitos da radiação ultravioleta na formação de melanoma e outros cânceres de pele, mas mutações em alguns genes como os que codificam p53, p16 e RAS, têm sido detectadas (MATSUMARA & ANATHASWAMY, 2002). Os melanócitos humanos normais aderem à membrana basal da epiderme e com seus dendritos, alcançam os queratinócitos nas camadas superiores da epiderme para distribuir seu pigmento, a melanina, que fornece a proteção contra os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta (UV) presente na luz solar cuja síntese ocorre no interior dos melanócitos, tendo a tirosina como precursor (LOTZE *et al.*, 2001).

### 2.3 Bioquímica do câncer de pele

A proliferação de melanócitos está relacionada à presença de fatores de crescimento como FGF-2, M-SCF, endotelinas e HGF/SF. Tais fatores são produzidos pelos queratinócitos e fibroblastos presentes na pele, principalmente quando estimulados pela radiação UV. A alteração no processo de síntese desses fatores por algum agente carcinogênico ou radiação UV, decorrente de mutação celular, resulta em uma das etapas do processo de carcinogênese (LOTZE *et al.*, 2001)

Esse processo tem início em uma mutação podendo ser ela na sequência do DNA, na grande maioria, ou alteração no padrão epigenético (padrão de metilação responsável pela silenciamento de genes). Geralmente, os genes atingidos estão relacionados aos processos de indução e controle do ciclo de divisão celular e/ou um desequilíbrio no controle da morte celular programada. Essa lesão, causada em muitos casos por um agente carcinogênico, pode ser chamada de estágio de iniciação. A célula que sofreu a mutação inicial deve sofrer outras alterações ao longo do tempo e transmiti-las às suas descendentes para que se torne um câncer, desenvolvendo-se de forma lenta e gradual. Nessa etapa (estágio de promoção), em geral, o agente carcinogênico continua a agir sobre as células do tecido afetado. O último estágio, o de progressão, caracteriza-se pela instalação do câncer e proliferação descontrolada das células do tumor (FERREIRA & ROCHA, 2004; ALBERTS *et al.*, 2004).

A desordem genética que origina o câncer é caracterizada por envolver genes do controle do ciclo celular e da regulação do processo de morte celular programada. Os proto-oncogenes são genes nos quais mutações ou ganho de função levam a formação do câncer, sendo os mutantes hiperativos denominados oncogenes. Já os genes supressores de tumor são aqueles em que a perda de função leva ao câncer (KLUG & CUMMINGS *et al.*, 1983). As alterações estruturais e/ou funcionais de genes controladores do ciclo celular podem ser decorrentes da amplificação e ativação de proto-oncogenes, ou mutações que levem à perda ou inativação de genes supressores de tumor. A inativação desses genes, por sua vez, pode causar a proliferação celular descontrolada e juntamente com uma falha na sinalização para apoptose, levar à

formação do câncer (FERREIRA & ROCHA, 2004; PASTERNAK, 2002; ALBERTS *et al.*, 2004).

Para o desenvolvimento do câncer, as células tumorais necessitam sobreviver a condições extremas. Por crescerem mais rápido que os vasos sanguíneos, os tumores sólidos são incapazes de obter, de modo eficiente, o oxigênio. Dessa forma, o tumor tem a maior parte do seu suprimento energético obtido exclusivamente da glicólise, tornando o metabolismo fermentativo a principal fonte de adenosina trifosfatado (ATP). Isso permite que o tumor sobreviva até que ocorra a angiogênese (BERG *et al.*, 2004). É esse processo que facilita a disseminação das células tumorais para outros órgãos, o que caracteriza o processo de metástase (SILVA *et al.*, 2007). Além disso, as células cancerígenas são geralmente menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Sendo assim, os tecidos invadidos acabam perdendo progressivamente sua função, o que acarreta uma disfunção orgânica que pode levar à falência do órgão e em alguns casos a morte do paciente (ALMEIDA *et al.*, 2005).

## **2.4 Modelos Experimentais para Estudo de Melanoma *in vitro***

O modelo de culturas de células neoplásicas é amplamente usado pela comunidade científica, pois apresenta muitas vantagens que o torna essencial para o estudo da atividade anticâncer. Entre elas citam-se: condições controladas para o estudo do comportamento das células, o baixo custo em relação aos testes *in vivo* e teste com amostras em concentração conhecida, “screening” de drogas. Nessa metodologia, são feitas muitas replicatas e testes com inúmeros compostos (FRESHNEY, 2005).

A linhagem de melanoma murino B16 é altamente tumorigênica e frequentemente usadas como modelo de crescimento tumoral. Dentre suas sub linhagens a habilidade de formar metástases aumenta segundo a ordem: B16-F0, B16-F1 e B16-F10. As células de melanoma murino B16-F10 foi estabelecida por Fidler (1973) oriunda de melanoma de ocorrência natural em camundongos C57BL/6 por meio de seleção progressiva. Essa linhagem constitui uma ferramenta experimental muito

utilizada para o estudo do melanoma, cujo crescimento se dá tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo desenvolvido em camundongos C57/BL6. (NAKAMURA *et al.*, 2002).

## 2.5 Plantas medicinais e câncer

Desde os tempos antigos, produtos naturais, ervas e temperos têm sido utilizados para prevenir diversas doenças e, concomitantemente, vários extratos botânicos têm sido amplamente considerados como fonte de fármacos utilizáveis. Estudos indicam que aproximadamente 62% dos medicamentos comercializados nos últimos anos têm origem dos produtos naturais (CRAGG *et al.* 1997). Tais produtos desempenham um importante papel como tratamento direto ou como modelos (compostos líderes) que são modificados para o tratamento de doenças humanas. Os exemplos mais comuns de medicamentos advindos da sabedoria popular sobre plantas medicinais é o agente anticarcinogênico taxol, um diterpeno retirado da *Taxus brevifolia* (*Taxaceae*) descoberto por WANI *et al.* (1971) e que atualmente é usado para o tratamento de câncer ovariano em estágio avançado. Outros exemplos são: camptotecina, derivada da *Camptotheca acuminata* (*Nyssaceae*) (WALL *et al.* 1966); podofilotoxina derivado da *Podophyllum peltatum* (HARTWELL & SCHRECKER, 1951); vincristina e vinblastina, derivados da *Vinca rosea* (NEUSS *et al.* 1964).

Devido a similaridade de muitas vias bioquímicas, os agentes fitoquímicos que possuem propriedade antiinflamatória, imunomodulatória e antioxidante são também os mais promissores a serem explorados como agentes quimiopreventivos. Alguns exemplos são a curcumina (obtido do açafrão da Índia, *Curcuma longa* Linn), o resveratrol (inicialmente encontrado na casca da uva vermelha ou roxa, *Vitis sp.*) e o [6]-gingerol (obtido do gengibre - *Zingiber officinale*) que desempenham concomitantemente atividade quimiopreventiva e anti-inflamatória mediado pela via da MAP kinase (MAP kinase 5-fosfatase) (NONN *et al.*, 2007)

Recentes avanços nos entendimentos em nível celular e molecular da carcinogênese têm permitido o desenvolvimento de novas estratégias para a quimioprevenção dessa patologia. Esse tipo de prevenção é fundamentada no uso de

específicas substâncias químicas, naturais ou sintéticas que podem suprimir retardar ou reverter o processo de carcinogênese e, assim, oferecer uma estratégia real para o controle do risco da doença. Diversos estudos têm mostrado o potencial quimiopreventivo de muitos compostos presentes em fitoterápicos, como os polifenóis, retinóis, e procianidinas; contra os efeitos adversos da radiação UV (BALIGA & KATIYAR, 2006; SURH, 1999, 2003; PINNEL, 2003; KATIYAR & ELMETS, 2001).

Estudos mostram que a maior parte das drogas com atividades antitumorais não são seletivas ao tipo de tumor e, algumas vezes, causam desordens hematopoiéticas e resistência ao quimioterápico em uso. Dessa forma, faz-se necessária a descoberta de novas drogas que possuam, concomitantemente, eficácia antimetastática e baixa toxicidade em tecidos normais. O tratamento de várias doenças utilizando como base produtos naturais é observado há muitos anos na medicina popular. Partindo desta tradição a utilização de medicamentos produzidos a partir de plantas no tratamento do câncer tornou-se uma constante, confirmada pelo fato de cerca de 60% de drogas comercializadas para o tratamento do câncer entre 1983 e 1994 serem de origem natural (RAVELO *et al.*, 2004).

## 2.6 Ingá - Família *Fabaceae*

O ingá, também chamado ingazeira, é uma árvore do gênero *Inga*, subfamília *Mimosoideae*, família *Fabaceae*. "Ingá" também designa o fruto da árvore Ingazeira: uma longa vagem que contém sementes envolvidas por uma polpa utilizada em muitas regiões, como alimento.

São conhecidas cerca de 300 espécies desse gênero. Seu atual centro de diversidade é a floresta amazônica, mas possui representantes no México, Antilhas e em toda a América do Sul, sendo exclusivamente neotropical. São plantas encontradas preferencialmente às margens dos rios, devido à grande quantidade de sementes levadas e depositadas nas várzeas pelas enchentes.

Da polpa do fruto prepara-se um xarope usado na medicina caseira contra bronquites e a decocção da casca é empregada na cura de feridas e diarreias. A casca é rica em tanino e serve para curtume (PRANCE & SILVA, 1975). Apesar da ampla divulgação da cultura popular das espécies dessa família como plantas medicinais, ainda pouco se sabe sobre sua verdadeira eficácia.

A figura 2 ilustra a identificação botânica da *I. subnuda*, espécie utilizada no presente estudo.

### 2.6.1 *Inga subnuda* subsp. *Luschnathiana* (Benth.) T.D.Penn.

Em suas folhas foram identificados alguns compostos fenólicos, ácido gálico, taninos, catequina, epicatequina, quercetina-3-O-a-L-glucopiranosídeo, quercetina-3-O-a-L-ramnopiranosídeo e miricetina-3-O-a-L-ramnopiranosídeo. Entretanto esses compostos representam apenas 10% do total dos compostos fenólicos (SOUZA *et al.*, 2007). Nas raízes, foram identificados: 5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-metoxiflavona, 6,3',4'-tri-hidroxiaurona e 5,7,4'-tri-hidroxi-6,8-dimetilflavonona (CORREA *et al.*, 1995). Pesquisas indicam importante atividade biológica dos taninos na inibição do desenvolvimento de fungos e bactérias (FERNANDES *et al.*, 2005), bem como atividade anticarcinogênica, antiinflamatória e cicatrizante (MONTEIRO *et al.*, 2005).



Figura 2 - Foto da exsicata de *Inga subnuda* depositada no herbário da Universidade Federal de Viçosa.

## 2.7 Família *Annonacea*

A família *Annonacea* inclui aproximadamente 50 gêneros, em que dois deles são comercialmente importantes: o gênero *Annona*, que compreende cerca de 100 espécies, e *Rollinia*, com cerca de 50 espécies. Dentre as espécies do gênero *Annona* comercialmente importantes, têm-se *Annona cherimoya* Mill, a híbrida *A. atemoya* (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.), *A. squamosa* L. e *Annona muricata* L. (RASAI, 1995). A figura 3 ilustra a identificação botânica da *R. dolabripetala*, espécie utilizada no presente estudo. Pouco se sabe sobre muitas espécies dessa família, pois a maior parte das informações está dispersa e está relacionada, em sua maior parte, em conhecimento popular. Dessa forma, os principais estudos existentes são baseados em algumas poucas espécies mais conhecidas da mesma família (ALMEIDA *et al.*, 2005)

### 2.7.1 *Rollinia dolabripetala* (Raddi) R.E. Fr.

A *R. dolabripetala*, popularmente chamada de araticum ou marolo e pertence à família das *Annonaceae*, família de plantas pertencente à ordem *Magnoliales*, de distribuição tropical em todo o mundo e composta principalmente por árvores.

Os componentes químicos identificados na família das anonáceas são, principalmente baseados, no trabalho de CAVÉ & LÉBOUEF, nos alcalóides benzilisoquinolina (LÉBOUEF, 1982). Posteriormente, em decorrência dos estudos da fitoquímica das espécies de anonáceas indígenas da floresta tropical da África, foram isolados grande parte dos diterpenos (DE MESQUITA *et al.*, 2009). Outros terpenos, flavonóides e alguns componentes terpenóides, também são encontrados na família.



Figura 3 – Foto da exsicata de *Rollinia dolabripetala* depositada no herbário da Universidade Federal de Viçosa

## 2.7.2 Atividade biológica das anonáceas

As Anonáceas caracterizam-se por apresentarem a acetogenina como um de seus principais metabólitos secundários (figura 4). Tais compostos exibem expressiva atividade biológica e têm sido considerados como importantes alternativas para o desenvolvimento de drogas antitumorais. Esses compostos derivados de ácidos graxos de cadeia longa ( $C_{35}$ - $C_{37}$ ), combinados com uma unidade 2-propanol, são formados pela via bioquímica policetídica do acetato e são caracterizados por uma longa cadeia alifática com um anel terminal  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturado. Tais estruturas podem apresentar, ou não, anéis tetrahydrofuranos localizados ao longo da cadeia hidrocarbônica, onde podem ser encontradas também funções oxigenadas (hidroxilas, acetoxilas, cetonas, epóxidos, tetrahydrofuranos e tetrahidropiranos) (WANG *et al.*, 2002; BERMEJO *et al.*, 2005, LEITE, 2009).

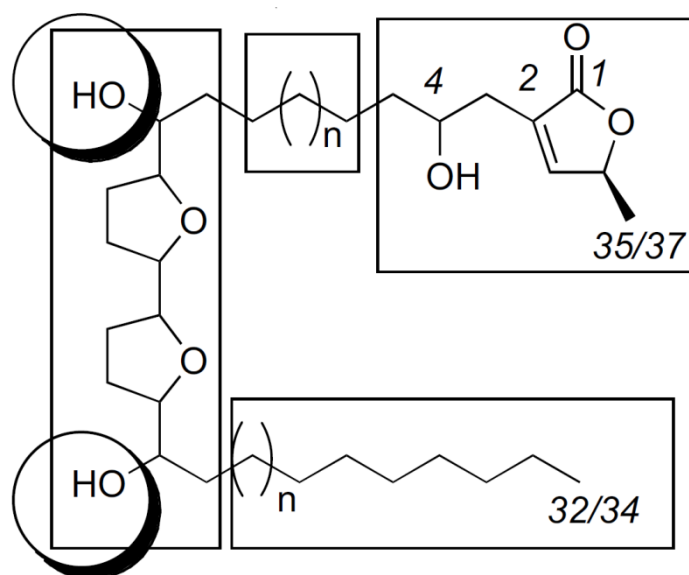


Figura 4 - Estrutura geral das acetogeninas (VILLO, 2008)

Análises fitoquímicas do extrato etanólico das folhas de *A. squamosa* revelam presença forte de alcalóides, flavanonas, triterpenóides, esteróides, concentrações moderadas de saponinas e taninos e traços de flavonas, flavonóis e xantonas (BRITO *et al.*, 2008). No Brasil, 76 flavonóides foram isolados e identificados nas folhas de 31

espécies de anonáceas nativas, prevalecendo os flavonóis, dentre os quais, o canferol, ramnocitrina, 6-hidroxihamnocitrina, quercetina, isoramnetina e ramnetina; com relação às flavonas, foram identificadas a apigenina, a escutelareína, a hispidulina e a luteolina (SANTOS & SALATINO, 2000).

Um dos grandes interesses em investigar o mecanismo de ação dessa grande quantidade de AGEs encontradas está relacionado ao conhecimento sobre o processo envolvido na morte de células tumorais. Membros dessa classe de compostos naturais são reconhecidos como candidatos “potenciais” para gerações futuras de drogas anticarcinogênicas e, por isso, tem se tornado uma das classes mais interessantes de produtos naturais da atualidade (LIAW *et al.*, 2010).

## 2.8 Flavonóides, câncer e quimioprevenção

Os flavonóides são uma grande família de metabólitos secundários polifenólicos com estruturas químicas semelhantes, biossintetizados a partir das vias do acetato e do chiquimato. Eles existem nas diversas estruturas das plantas incluindo frutos, vegetais, sementes, castanhas, ervas, flores e cascas. Juntamente aos carotenóides são reconhecidos como os pigmentos responsáveis pela coloração de folhas, especialmente no outono. Cerca de 5.000 diferentes tipos de flavonóides foram identificados até o presente momento, sendo classificados em pelo menos 10 grupos químicos. Os mesmos são categorizados como flavonas, flavonóis, flavononas antocianinas e isoflavonas frequentemente encontradas em nossa dieta humana (NAFISI *et al.*, 2009).

Recentemente, tem-se procurado estabelecer uma correlação entre a ingestão de flavonóides e a incidência de patologias tais como doenças coronarianas, (CESPEDES *et al.*, 2008) e câncer. Diversos estudos *in vivo* correlacionam elevado consumo de flavonóides com menor risco de desenvolvimento de câncer, estando em concordância com estudos *in vitro* que evidenciam a capacidade de determinados flavonóides em inibir a carcinogênese pela modulação de vias celulares (WILLIAMS *et al.*, 2004, HAVSTEEN, 2002; REN *et al.*, 2003; ARTS & HOLLMAN, 2005).

Estudos têm demonstrado que a estrutura dos flavonóides tem grande importância na determinação de sua possível eficácia como inibidor de proteínas quinases ou mesmo tirosina quinase (AGULLO *et al.*, 1997; FERRIOLA & MIDDLETON, 1989) (figura 5).

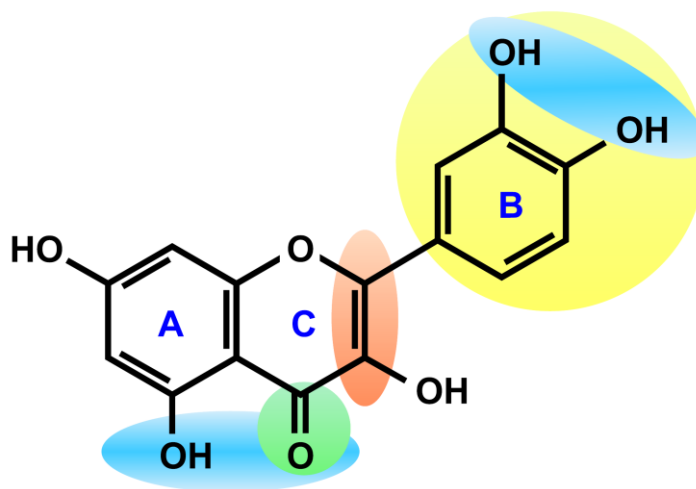
A inibição *in vitro* da proliferação celular e a indução de apoptose em diversas linhagens celulares pelos flavonóides não são bem estabelecidas (HSU *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2004), estando, possivelmente, relacionados à fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) (GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999; BONDAR *et al.*, 2002). Sabe-se que a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) tem papel essencial na sinalização e regulação de um grande número de funções celulares, incluindo-se proliferação, diferenciação e apoptose (GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999; BONDAR *et al.*, 2002). Além da efetividade no câncer, a relação estrutura/atividade também está relacionada à

atividade bactericida dessa classe de metabólitos. Estudos recentes indicam que a 2',4'-dihidroxilação do anel B na estrutura da flavanona tem importância significativa na atividade antimicrobiana. Já a substituição de um grupo sulfo na posição 5' no anel fenil lateral amplia a atividade dos flavonóides no combate a *Staphylococcus* (WOŹNICKA *et al.*, 2013).

A posição, número e substituição do grupo hidroxil no anel B e a saturação da ligação entre os C2-C3 são fatores importantes para inibição da PI-3 quinase pelos flavonóides. É demonstrado, ainda, que existe uma similaridade nas necessidades estruturais para que os flavonóides exerçam uma potente inibição da PI-3 quinase e para que interajam em alguma etapa dos processos bioquímicos mitocondriais, ou seja, a presença de 2 duplas-ligações no anel C e a ausência de substituição dos grupos hidroxil (AGULLO *et al.*, 1997; GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999).

Muito do que se associa ao efeito anticarcinogênico dos flavonoides se refere à quimioprevenção, principalmente relacionado à inibição do estresse oxidativo

Um dos mecanismos conhecidos é sua interação com a mitocôndria, por exemplo, pela modulação do poro de transição mitocondrial (mPT), o qual controla a liberação do citocromo C durante a apoptose, ou pela modulação de outro fator associado a mitocôndria com atividade pró-apoptótica. A variação estrutural dos flavonóides os permite mimetizar ligantes de diversos sítios promovendo ações celulares como inibição de proteína quinase e topoisomerase (Boege *et al.*, 1996), inibição da expressão de moléculas de adesão (Soriani *et al.*, 1998), ou mesmo ativação de vias apoptóticas, como as mediadas por caspases ou fragmentação de núcleo e cromatina.



**Figura 5** – Estrutura do flavonol quercetina mostrando as regiões com características importantes na determinação do clássico potencial antioxidante dos flavonóides. A mais importante dessa estruturas é o catecol ou anel B dihidroxilado (sombreado de amarelo). Outra importante característica inclui a presença de insaturação no anel C (sombreado de vermelho) e a presença da função 4-oxo no anel C (sombreado em verde). O grupo catecol e outras funções podem também atribuir uma habilidade quelante de metais de transição como cobre e ferro (sombreado de azul). (SPENCER *et al.*, 2003)

Muitos polifenóis, como os encontrados no chá verde, desempenham importante papel antitumoral ao provocar forte inibição da atividade de AP-1 (proteína relacionada à sinalização celular e possui importante papel nas vias apoptóticas). A mutação no gene RAS, que ocorre frequentemente em muitos tipos de câncer, incluindo o câncer de pele, ativa ininterruptamente a via de transdução do sinal de crescimento e está associada com grandes níveis endógenos de AP-1 (WILLIAMS *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2011).

A via de sinalização MAPK (“Mitogen Activated Protein Kinases” ou “Microtubule Associated Protein Kinases”) tem com função regular o crescimento celular, sobrevivência e migração através de transdução de sinais proliferativos gerados pelos receptores da superfície celular e componentes de sinalização citoplasmática até o núcleo, através de eventos de fosforilação (SMALLEY, 2010). A sinalização da MAPK inicia-se pelos sinais extracelulares que se ligam nos receptores de tirosina quinases (RTK) e subsequente ativação do RAS, uma GTPase ligada à membrana (FECHER *et al.*, 2008; SMALLEY, 2010). O RAS ativa a proteína RAF, uma serina/treonina proteína quinase, que fosforila e ativa as MEK1 e MEK2 (MAP quinase - quinases reguladas por sinais extracelulares), que por sua vez fosforilam e ativam ERK1 e ERK2 (quinases reguladas por sinais extracelulares). O ERK ativado regula expressão gênica pela

fosforilação de inúmeros fatores de transcrição nuclear ou indiretamente atingindo moléculas sinalizadoras intracelulares.

As mutações no RAS são encontradas em cânceres de cólon e pancreático, bem como em melanomas, sendo o NRAS a isoforma mais comumente mutada em melanoma. As mutações do BRAF, pertencente a família RAF, foram encontradas em uma variedade de tumores com a maior incidência em Melanoma, carcinomas do cólon e de ovário. Especificamente, as mutações BRAF são comuns em melanomas cutâneos decorrentes a exposição solar intermitente. Já as proteínas do tipo ERK, em melanoma, têm apresentado aumento de atividade nos estágios iniciais até os avançados da doença. (MANDALÀ & VOIT, 2013).

### **2.8.1 Quimioprevenção do Câncer**

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos, com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese, ou seja, o desenvolvimento de neoplasias (WATTEMBERG, 1992; KELLOFF *et al.*, 2000).

Os flavonóides são importantes agentes quimiopreventivos que estão amplamente distribuídos na alimentação humana. Sua ingestão média é de cerca de 25 mg/dia em muitos países da Europa, com variações em função dos hábitos alimentares. Como exemplo, é possível citar as laranjas e seus sucos como alimentos que dispõem de grande quantidade de flavonóides (cerca de 40 mg/100g) (ALIMENTOS FUNCIONAIS, 2001). O quadro 1 apresenta vários mecanismos de ação dos agentes quimiopreventivos, muitos deles descritos em flavonóides como a morina e a naringina. Muito do que se associa ao efeito anticarcinogênico dos flavonóides se refere à quimioprevenção, principalmente relacionado à inibição do estresse oxidativo.

**Quadro 1 – Mecanismos gerais da quimioprevenção.**

<b>Principais mecanismos quimiopreventivos dos flavonóides</b>	
<b>Antimutagênese</b>	
Inibição da recarga de carcinógeno	Ligantes de ácidos biliares
Inibição da bioativação do carcinógeno	Inibidores da enzima Citocromo P450
Detoxificação do carcinógeno	Indutores dos sistemas GSH e GST hepáticos
Bloqueio da ligação carcinógeno-DNA	Inibidores da enzima Citocromo P450
Aumento dos níveis de reparo do DNA	Indutores da enzima Poli (ADP-ribosil) transferase
<b>Antiproliferação / Antiprogessão</b>	
Modulação da atividade de fatores de crescimento e hormônios	Antagonistas de receptores hormonais, inibidores da aromatase de esteróides, inibidores da esteróide a 5-redutase e IGF-I*
Inibição da atividade de oncogenes	Inibidores da transferase da proteína Farnesil
Inibição da atividade de oncogenes	Inibidores da atividade da ornitina descarboxilase
Indução de diferenciação	Indutores de TGF- $\beta$
Recrutamento da resposta imunológica	Inibidores de COX, indutores de linfócitos NK e células de Langherans
Aumento da intercomunicação celular	Indutores de expressão da conexina 43
Resgate da função supressora tumoral	Indutores da expressão do gene p53
Indução de apoptose	Indutores de TGF- $\beta$ , inibidores de Telomerase, ativadores de Caspases
Inibição da angiogênese	Inibidores de COX-2 e Trombomodulina
Inibição da degradação da membrana basal	Inibidores de Colagenases tipo IV
Inibição da síntese de DNA	Inibidores de Glicose-6-fosfato desidrogenase

. \*Fator de crescimento sérico análogo à insulina. Adaptado de KELLOFF *et al.* (1994).

## 2.8.2 Morina

A morina (3,5,7,2',4'-pentahidroxi-flavona) (figura 6) é um dos principais componentes das tradicionais ervas medicinais e foi, originalmente, isolada de espécies da família *Moraceae*. Esse bioflavonóide é um constituinte abundante em muitas ervas, folhas de goiabeira (espécie *Psidium guajava*, família *Myrtaceae*), cebola (espécie *Allium cepa*, Lineu, família *Liliáceas*), frutas, e vinhos.

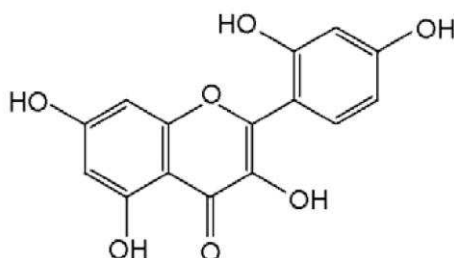


Figura 6 – Estrutura da morina (NAFISI *et al.*, 2009)

Estudos indicam diversas atividades antioxidantes desse composto, que protegem as células contra os danos dos radicais de oxigênio. A atividade antioxidante da morina é direcionada para captura e inibição dos grupos OH e do ânion superóxido, espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica. Ela inibe, moderadamente, a xantina oxidase (enzima geradora de radicais livres); exerce função através da regulação da ativação ou modificação da estrutura de enzimas; tem ação quelante de alguns íons metálicos (ex.:  $Fe^{2+}$ ) na formação do radical oxil, age como modulador a atividade de algumas enzimas metabólicas incluindo o citocromo P450; e atua como agente quimiopreventivo contra a carcinogênese *in vitro*. (MENDOZA-WILSON *et al.*, 2011; DE MARTINO *et al.*, 2012, DE KAPOOR & KAKKAR, 2012).

### 2.8.3 Naringina

A naringina (4',5,7-trihidroxi-flavona-7-ramglicosídeo) (glicosídeo de flavona naringenina) (figura 7) é um dos flavonóides com maior distribuição entre as plantas, principalmente na casca das frutas cítricas. Nos últimos anos, esse composto tem chamado a atenção dos pesquisadores por desempenhar atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-mutagênicas, anticancerígenas, reduzir o nível de proteína citocromo P450 1A2 e por inibir a peroxidação lipídica das membranas biológicas. Estudos revelam que esse flavonóide suprime a citotoxicidade e apoptose em células P388 de leucemia de rato expostos a um típico pró-oxidante,  $H_2O_2$  (KIM *et al.*, 2003; PURI & BANERJEE *et al.* 2000).

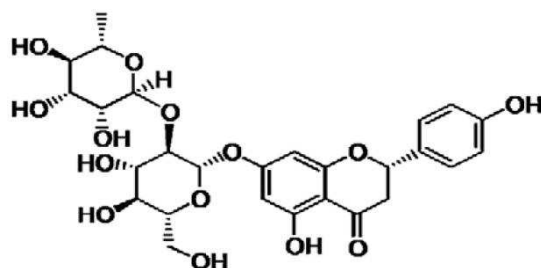


Figura 7 –Estrutura da naringina (NAFISI *et al.*, 2009).

#### 2.8.4 Xantona; 1,7-dioxixantona e câncer

As xantonas compreendem uma importante classe de heterocíclicos moleculares que possuem um esqueleto dibenzo-  $\gamma$ -pironas, podendo ser obtidos tanto por meios sintéticos quanto naturais (figura 8). No entanto, a grande maioria das xantonas conhecidas é de procedência natural ocorrendo como metabólitos secundários bastante comuns em várias famílias de fungos, líquens e, principalmente, plantas. Os compostos xantônicos de origem natural são classificados e subdivididos de acordo com a natureza de seus substituintes. Recente classificação divide as xantonas em seis grandes grupos: xantonas simples, xantonas glicosiladas, xantonas preniladas, xantonolignóides, bisxantonas e xantonas miscelâneas (VIEIRA & KIJJOA, 2005).

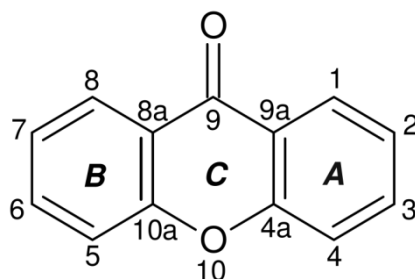


Figura 8 –Figura do núcleo xantônico numerado. (CORRÊA, 2009)

As xantonas provenientes de espécies de plantas são majoritariamente xantonas simples, mais especificamente as oxigenadas. Estas apresentam pelo menos um átomo de oxigênio, que pertence a um grupo hidroxila, metoxila ou ambos, ligado diretamente no anel. As xantonas oxigenadas são subdivididas de acordo com a quantidade de átomos de oxigênio substituídos no anel nas posições de 1-4 e de 5-8 e têm sido isoladas de várias famílias de plantas, principalmente, das localizadas em território brasileiro. As principais fontes desses produtos naturais são plantas de pequeno a médio porte que pertencem à família *Guttiferae*, *Gentianaceae*, *Moraceae* e *Polygalaceae*. Outras famílias de plantas de grande porte que produzem derivados xantônicos também são: *Betulaceae*, *Caryophyllaceae*, *Gesneriaceae*, *Iridaceae*, *Loganiaceae*, *Lytraceae* e *Polypodiaceae* (PERES *et al.*, 2000). Das famílias de plantas

que fazem parte da biodiversidade brasileira mencionadas acima, destaca-se a *Guttiferae* por ser a mais difundida e a maior fonte de derivados xantônicos.

Os compostos fenólicos hidroxilados, como no caso das xantonas, têm-se mostrado ativos contra diversos microrganismos. O número e a posição dos grupos OH no anel fenólico estão relacionados com sua atividade. Estudos indicam que o aumento de hidroxilações resulta em elevada toxicidade para as células microbianas e quanto mais oxidado os compostos, maior é o efeito inibitório. Os mecanismos responsáveis pela toxicidade podem atuar na inibição de processos enzimáticos através de oxidação, que pode ocorrer em grupos sulfidril ou através de interações com proteínas (COWAN, 1999). Pouco descrito na literatura, PEDRO *et al.* (2002) descreveram a seletividade de algumas xantonas com dois grupos OH sobre células cancerígenas. Destacaram a seletividade das 1,2-dihidroxi-xantona, 2,3-dihidroxi-xantona, 3,4-dihidroxi-xantona e 2,3-dihidroxi-xantona sobre células do melanoma (UACC-62) em relação às células cancerígenas renais (TK-10) e de câncer de mama (MCF-7). Nesse caso, nota-se que a presença de hidroxilas adjacentes nestes compostos pode ser uma explicação para a seletividade para o melanoma.

Estudos *in vitro* mostram que as xantonas também possuem atividade anticarcinogênica, ativando a via da caspase 9 e 3, mas não a 8 em células da linhagem HL60, ou ocasionando o travamento do ciclo celular. Tais trabalhos reportaram que alguns derivados das xantonas (como os presentes no pericarpo do mangostão, *Garcinia mangostana* Linn) desencadearam disfunção mitocondrial, como perda de potencial de membrana, redução do nível intracelular de ATP e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (MATSUMOTO *et al.*, 2004; AKAO *et al.*, 2008). O quadro 2 apresenta algumas mecanismos de ação dos derivados xantônicos com ação antitumoral.

**Quadro 2** - Mecanismos de ação dos derivados xantônicos com ação antitumoral (PINTO *et al.* 2005).

Mecanismo	Derivados xantônicos / substituintes																
Indução da apoptose pela ativação da via da caspase 3	Prenil, glicosil, metilenocarboxi, extrato de <i>Gacinia mangostana</i> (prenil)																
Inibição da aromatase	Imidazol, triazol																
Ligante de DNA	Pirano, amino, oxigenado																
Quebra de DNA e ligação cruzada DNA-proteína	Epoxi, policíclico, dialquilamina, oxigenado, furano.																
Inibição da 11-β-hidroxilase	Xantona-antraquinona																
Inibição da 17-α-hidroxilase/C17,20-liase	Imidazol, triazol																
Imunomodulação, indução das citocinas	Metilenocarboxil																
Modulação das quinases:																	
<table border="1"> <tbody> <tr> <td>1)</td> <td>Caseína quinase 2</td> </tr> <tr> <td>2)</td> <td>"Mitogen-activated protein kinases" (MAPKs)</td> </tr> <tr> <td>3)</td> <td>Proteína quinase A</td> </tr> <tr> <td>4)</td> <td>Proteína quinase c</td> </tr> </tbody> </table>	1)	Caseína quinase 2	2)	"Mitogen-activated protein kinases" (MAPKs)	3)	Proteína quinase A	4)	Proteína quinase c	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>1)</td> <td>Dihidroxi, dihidroxi/nitro</td> </tr> <tr> <td>2)</td> <td>Prenil</td> </tr> <tr> <td>3)</td> <td>Prenil</td> </tr> <tr> <td>4)</td> <td>Prenil, formil, hidroxil, xantonolignoids, axigenado</td> </tr> </tbody> </table>	1)	Dihidroxi, dihidroxi/nitro	2)	Prenil	3)	Prenil	4)	Prenil, formil, hidroxil, xantonolignoids, axigenado
1)	Caseína quinase 2																
2)	"Mitogen-activated protein kinases" (MAPKs)																
3)	Proteína quinase A																
4)	Proteína quinase c																
1)	Dihidroxi, dihidroxi/nitro																
2)	Prenil																
3)	Prenil																
4)	Prenil, formil, hidroxil, xantonolignoids, axigenado																
Inibição da fosfolipase C	Xantona-cromo, tetra-oxigenado																
Interferência no reparo pós replicação	Oxigenado																
Receptores E2 de prostaglandina (PG)	Prenil, carboxil																
Supressão da proteína sintase	Epoxi																
Supressão da síntese de RNA	Epoxi																
Inibição da transdução do sinal em oncogene Ha-ras	Epoxi																
Inibição da esfingomielinase	Prenil																
Inibição da topoisomerase I e II	Furano, sterigmatocistina																
Aumento da expressão gênica do gene transformador do fator-β de crescimento (TGF-β)	glicosil																
Inibição do mimetismo vasculogenico	Metileno arboxil																

### 2.8.5 5-Fluoracil e câncer

O 5-Fluoracil (5-FU) é um agente quimioterápico classificado como antimetabólito, pertencente à classe dos fármacos análogos da pirimidina. Esse composto é análogo do uracil e também da timina, que apresentam um átomo de flúor ligado ao carbono 5, em substituição ao átomo de H ou ao grupo metil, característicos dessas bases nitrogenadas (figura 9).

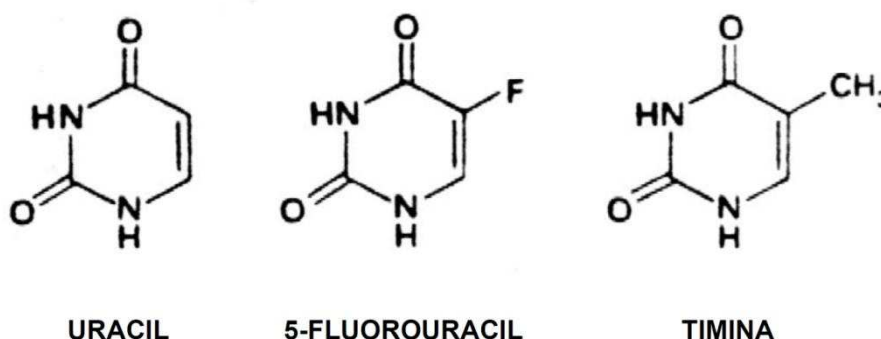


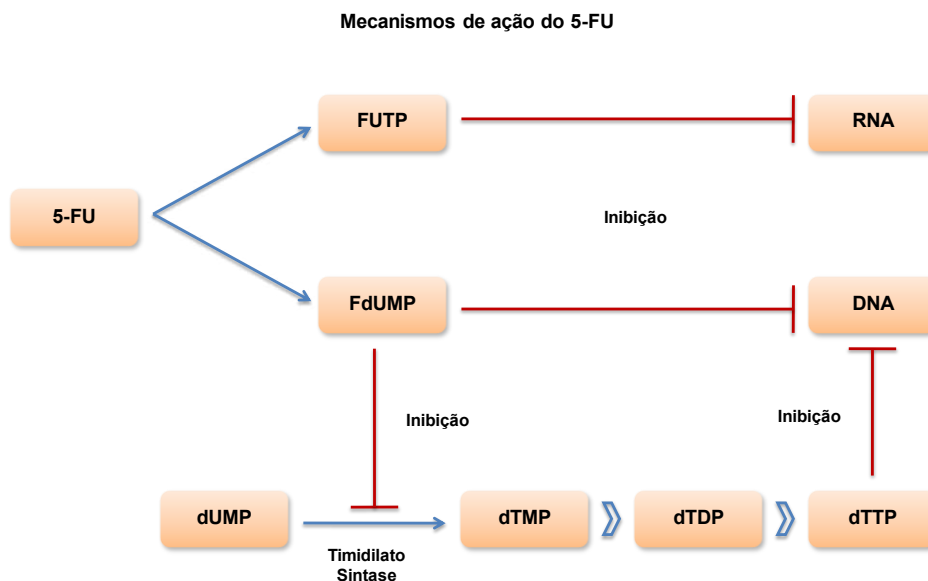
Figura 9 – Fórmula estrutural do 5-Fluoracil e seus análogos normais Timina e Uracil. Reproduzido de PETERS (2000).

Esse fármaco é comumente utilizado em diversos tumores sólidos especialmente em cânceres do trato gastrointestinal e em outros tipos de tumores, como o câncer epidermóide de cabeça e pescoço, mama, ovário, bexiga, próstata, pâncreas e fígado. Seu uso pode ser isolado ou combinado com outros agentes (LONGLEY *et al.*, 2003; KATZUNG, 2007).

As vias de anabolismo desse fármaco envolvem as mesmas enzimas e substratos da síntese *de novo* da uracilla. Sua atividade citotóxica é atribuída a três mecanismos distintos: inibição da enzima timidilato sintase relacionada à síntese de nucleotídeos; incorporação de fluorouracil trifosfato (FUTP) no RNA e incorporação de fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) no DNA genômico (NOORDHUIS *et al.*, 2004) (figura 10).

O 5-FU atua como potente inibidor da enzima TS, interferindo com isso na síntese de DNA e RNA. Uma vez que RNA e DNA são essenciais para a divisão e crescimento celular, o efeito desse fármaco pode gerar uma deficiência de timina provocando um

desequilíbrio no crescimento e morte da célula (MOSBY'S, 2002; RÉUS, 2006). No DNA além de causar inibição de sua síntese, gera quebras simples nas fitas nascentes de DNA e quebras duplas no DNA parenteral (NOORDHUIS *et al.*, 2004; DE ANGELS *et al.*, 2006). Já pela sua ação no RNA, ocorre diminuição de sua síntese, inibição da poliadenilação de RNA mensageiro e alteração na síntese protéica (NOORDHUIS *et al.*, 2004).



**Figura 10** - Esquema representativo da síntese de monofosfato de deoxitimidina (**dTMP**) a partir do composto monofosfato de deoxiuridina (**dUMP**). A enzima timidilato sintase (**TS**) junto ao cofator MTF (5,10-metilenotetrahidrofolato) converte dUMP a dTMP que por sua vez gera dTDP e, então, dTTP (trifosfato de deoxitimidina), componente essencial da molécula de DNA.

## 2.9 Infecções bacterianas e câncer.

A pele humana apresenta um ambiente diverso e habitado por um grande número de bactérias, entre elas várias espécies de *Staphylococcus*. *S. aureus* é um microrganismo Gram-positivo, oportunista, responsável por uma grande variedade de infecções no ser humano, incluindo bacteremia, endocardite, pneumonia e infecções de pele e ossos. Devido ao seu potencial patogênico, e a capacidade de se adaptar à pressão seletiva dos antibióticos, pode se disseminar rapidamente, sendo atualmente um patógeno emergente em várias partes do mundo (FEIL *et al.*, 2003)

A resistência das cepas de *S. aureus* a antibióticos  $\beta$ -lactâmico (penicilina) iniciou logo após a descoberta desses medicamentos e seu uso terapêutico. Com o propósito de tratar as infecções causadas por essas cepas, foi introduzida, na clínica, a penicilina semi-sintética com anel protegido (metecilina). (LOWY, 1998; LIVERMORE, 2000) Entretanto, cepas de *S. aureus* resistentes à metecilina (MRSA) rapidamente apareceram (BARBER, 1961). Além da resistência à metecilina, essa cepa bacteriana também é resistente a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (demais penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e aztreonam), uma vez que seu mecanismo de resistência interfere no mecanismo de ação geral desta classe de antimicrobianos (LIVERMORE, 2000). É notado, também, um aumento da resistência aos antibióticos, de cepas de *Staphylococcus* sp. ou mesmo *Streptococcus* sp. que acometem outros animais, que não humanos. O que intensifica atenção dada para esse problema.

O aumento da ocorrência das infecções por MRSA em toda a população mundial, especialmente nos pacientes hospitalizados, é uma preocupação considerável, atualmente. Fatores de risco estabelecidos para estas infecções incluem recente hospitalização, cirurgia, diálise e uso de dispositivos médicos e cateteres percutâneos permanentes (LOWY, 1998).

Pacientes durante período de radioterapia ou quimioterapia necessitam ir ao ambiente hospitalar continuamente para receberem tratamento. Em acréscimo, a terapêutica do câncer é muito agressiva e desequilibra completamente a homeostase da microbiota bacteriana corporal, facilitando infecções por patógenos oportunistas, como o *S. aureus*. Somado a isso, muitos tipos de câncer são tratados por meio de

processo cirúrgico associado ou não à quimioterapia, o que aumenta a vulnerabilidade do paciente a esses agentes patogênicos. Considerando que nos últimos anos, em hospitais brasileiros, MRSA é responsável por 35 - 45% das infecções causadas por estafilococos (DE ALMEIDA SILVA *et al.*, 2003; PEREZ *et al.*, 2007; SADER *et al.*, 2004), torna-se de grande importância a identificação de novas fontes com potencial antibacteriano.

Como já descrito, diversos estudos apontam componentes presentes nos extratos de *Inga subnuda* e *Rollinia dolabripetala* como atuantes no combate a agentes microbianos. Somado a esse fato, pesquisadores têm relatado a realidade de, nas últimas décadas, um crescente número de cepas bacterianas se tornarem resistentes a múltiplas drogas. Esse fato preocupante aumenta a importância da realização contínua de testes antimicrobianos em diferentes tipos de extratos vegetais a fim de que novas fontes bactericidas sejam encontradas. Isso é necessário, ainda que ambos os tipos de bactérias, Gram-positivo e Gram-negativo, demonstrem padrões de resistência a antibióticos.

### 3 OBJETIVO

Esse estudo visou avaliar, *in vitro*, o potencial quimiopreventivo dos extratos hidroalcoólicos de *I. subnuda* e *R. dolabripetala*, dos flavonóides naringina e morina e de xantonas sobre o câncer de pele do tipo melanoma, realizando um comparativo com a atividade do fármaco comercial 5-Fluoracil. Visou também avaliar as atividades antioxidante e bactericida dos extratos.

1. Avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Rollinia dolabripetala* e *Iga subnuda*.
2. Avaliar o efeito citotóxico desses extratos hidroalcoólicos e da naringina (Sigma - Aldrich<sup>®</sup>), morina (Sigma - Aldrich<sup>®</sup>), xantona (Extrasynthese<sup>®</sup>) e 1,7-dihidroxixantona (amostra sintetizada em laboratório de pesquisa) em células de melanoma murino (B16F10);
3. Avaliar o efeito citotóxico do 5-Fluoracil (Pharmanostra<sup>®</sup>) em células de melanoma murino, bem como comparar sua eficácia com as demais substâncias testadas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local de execução do experimento

Todas as atividades de preparo dos extratos, de atividade antioxidante e de atividade antibacteriana foram realizados nas dependências do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, especificamente no Laboratório Biofármacos I e II, Universidade Federal de Viçosa. As atividades de cultivo celular e teste de citotoxicidade foram realizadas nas dependências do Departamento de Veterinária, especificamente no Laboratório de Virologia animal, Universidade Federal de Viçosa.

### 4.2 Material botânico

O material botânico de *Inga subnuda* foi coletado em uma área de reserva natural de Mata Atlântica, do tipo Floresta Estacional Semi Decidual, localizado nas dependências do Embaúbas Tênis Clube, no município de João Monlevade, em Minas Gerais. João Monlevade está localizado na região leste do estado, nas coordenadas 19° 48' 36" S e 43° 10' 26" W, possuindo um clima classificado como tropical de altitude devido à sua localização à 900 metros de altitude. (WORLD MAP; IBGE, CIDADE).

O material botânico de *Rollinia dolabripetala* foi coletado em um fragmento da Mata Atlântica do tipo Floresta Tropical Subperenifólia, localizado nas dependências de uma propriedade privada rural, no município de Viçosa, em Minas Gerais. Mais especificamente, na região da Zona da Mata Mineira, entre as Serras da Mantiqueira, do Caparaó e da Piedade, nas coordenadas 20° 45' 14" S e 42° 52' 54" W, possuindo um clima classificado como tropical de altitude devido à sua localização a 649 metros de altitude. (WORLD MAP; IBGE, CIDADE).

As cascas de *Inga subnuda* foram colhidas entre abril e novembro de 2011 e as folhas de *Rollinia dolabripetala* foram coletadas em outubro/novembro e abril de 2011. As espécies vegetais foram identificadas no Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa, município de Viçosa, Minas gerais, pelos taxonomistas José Martins e Marcus

Simão, depositadas sob forma de exsicatas com os códigos de registro indicados abaixo:

*Inga subnuda* subsp. *Luschnathiana* (Benth.) T.D.Penn. VIC: 38.758

*Rollinia dolabripetala* (Raddi) R.E. Fr. VIC: 35.760

### 4.3 Preparo do extrato hidroalcoólico

Após identificação das espécies, as cascas de *I. subnuda* e folhas de *R. dolabripetala* foram coletadas, lavadas em água corrente, emergidas em hipoclorito de sódio 1%, dispostas em papéis absorventes para retirar o excesso de água e, posteriormente, alocadas em estufa à 45°C para secagem. O material vegetal foi considerado seco quando a variação de massa não ultrapassou 0,005 g em um período de 12 horas. Decorrido esse processo, o material foi submetido à moagem em moinho elétrico.

Os extratos hidroalcoólicos das cascas de *I. subnuda* e folhas de *R. dolabripetala* foram preparados através do método de remaceração (SIMÕES *et al.*, 2002). O farelo resultante da moagem do material vegetal das duas plantas foi, então, submetido a uma alcoolatura na proporção 1:1 (água e álcool etílico P.A.) durante 72 horas. Decorrido esse tempo, o sobrenadante foi, então, filtrado e separado, e uma nova solução alcoólica acrescida ao corpo de fundo. Esse procedimento foi repetido até a completa exaustão da matéria orgânica em liberar extrato. O filtrado teve, então, todo o solvente extraído pela metodologia de vaporização rotativa em temperatura constante de 50°C. Terminado esse processo, a solução aquosa foi congelada por 24 horas em freezer - 20°C, seguido por 24 horas em freezer - 80°C e, então submetidas ao processo de liofilização por 8 horas. O rendimento da extração foi calculado através da equação 1.

**Equação 1** – Equação usada para o cálculo do rendimento do extrato liofilizado.

$$\text{Rendimento \%} = \left( \frac{\text{Peso do extrato liofilizado}}{\text{Peso do material recém colhido}} \right) \times 100$$

## **4.1 Prospecção fitoquímica**

O estudo fitoquímico preliminar tem como importância a rapidez e baixo custo na identificação de classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico presente em diversos tipos de amostras (ARAÚJO *et al.*, 2010). Nesse ensaio, são detectadas as principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias (MATOS, 1997; SIMÕES *et al.*, 2002). Os testes foram realizados em triplicata.

### **4.1.1 Fenóis e taninos**

Foi feita a dissolução de 0,5 µg de extrato seco em 5 mL de água destilada e adição de uma ou duas gotas de solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> a 1%. O resultado foi observado pela presença ou não de mudança na coloração ou formação de precipitado.

### **4.1.2 Flavonóides**

Foi feita a dissolução de 0,5 µg de extrato seco em 10 mL de metanol e adição de cinco gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O resultado foi observado pela presença ou não de mudança na coloração.

Para a identificação de antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas, chalconas, auronas e foi feita a dissolução de 0,5 µg de extrato seco em 20 mL de água destilada. A solução foi transferida para três tubos de ensaio (3 mL/tubo). Um dos tubos foi acidulado até atingir pH 3 e os outros dois foram alcalinizados sendo um até pH 8.5 e o outro 11. O resultado foi observado pela presença ou não de mudança na coloração nas diferentes condições de cada tubo.

#### **4.1.3 Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas**

Adicionaram-se 3 mL da mesma solução preparada para identificação das classes de flavonóides, em dois tubos. Um deles foi acidulado com solução de HCl a pH 1 - 3 e o outro foi alcalinizado a pH 11, com solução de NaOH. Os dois tubos foram aquecidos com auxílio de uma lâmpada de álcool durante 2 a 3 minutos. O resultado foi observado pela presença ou não de mudança na coloração.

#### **4.1.4 Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas**

Foi feita a adição em dois tubos, 3mL da solução preparada para identificação das classes de flavonóides e acrescentar 0,5 µg de Magnésio em raspas juntamente com 0,5 mL de HCl concentrado. Decorrido todo o processo de efervescência, o resultado foi observado pela presença ou não de mudança na coloração.

#### **4.1.5 Saponinas**

Realizou-se a dissolução de 0,5 µg de extrato seco em 5 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi diluída em água, formando volume final de 15 mL. A solução final foi, então, agitada vigorosamente por dois minutos, em tubo fechado. O resultado foi avaliado pela observação da presença ou não de camada de espuma na superfície da solução, por um período superior a uma hora.

#### **4.1.6 Antraquinonas**

Realizou-se a dissolução de 0,5 µg de extrato seco em 5 mL de Tolueno e, posteriormente, adição de 2 mL de solução de NH<sub>4</sub>OH a 10%. O resultado foi avaliado pelo aparecimento, ou não de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa. Em seguida, foi realizada a fervura de 0,5 µg de extrato seco por 15 minutos, em 10 mL de solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10%. A solução foi transferida para um funil de decantação e foram adicionados 10 mL de água destilada. A extração ocorreu por duas vezes com

10 mL de tolueno. Os extratos de tolueno foram concentrados até 3 mL e, então, misturados a 3 mL de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10%. O resultado foi observado pela presença ou não de mudança na coloração.

#### 4.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

De acordo com BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995), o método do DPPH (radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico) é baseado na inativação ou estabilização do radical  $\text{DPPH}\cdot$  (2,2-difenil-1-picril hidrazina) por antioxidantes, o qual produz um decréscimo da absorbância a 517 nm. O composto DPPH apresenta um radical nitrogênio com um dos menores níveis de estabilidade disponível comercialmente (MACDONALD-WICKS *et al.*, 2006) e seu antioxidante é proporcional ao desaparecimento do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) nas amostras de teste (figura 11).

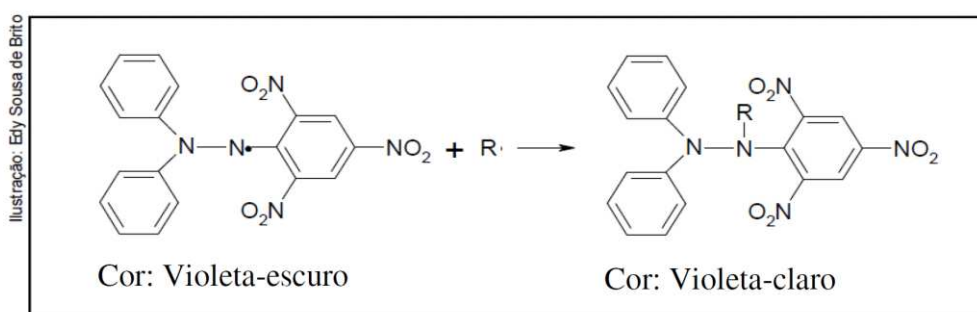


Figura 11 - Estabilização do radical livre  $\text{DPPH}\cdot$  (Rufino *et al.*, 2007)

#### 4.2.1 Porcentagem antioxidante

No presente estudo, foi analisada a porcentagem de moléculas do radical DPPH sequestrado após determinado tempo, de acordo com a metodologia da avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH, descrita por ESPIN *et al.* (2000) e PUKALSKAS *et al.* (2002) com modificações.

A solução de DPPH foi preparada na forma de uma solução de 0,1 mmolL • L<sup>-1</sup> de DPPH• em etanol:água 80% (v/v). Em seguida, 50 mg de cada extrato foi diluído em solução de água:álcool 80% (v/v) e, dessa solução estoque, 100 µL foram aliqüotados e diluídos na proporção de 1:120. Em um tubo de ensaio, foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL da fração das amostras (devidamente diluída para que ocorra a redução parcial do DPPH) e 3,5 mL da solução etanólica de DPPH á temperatura ambiente (25 ± 1°C). Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu), no tempo zero e no final da reação (estabilização do valor da absorbância). Todo o experimento foi realizado em ambiente desprovido de luz e a absorbância foi considerada estável quando o resultado teve variação inferior a 0,005. O resultado foi expresso em porcentagem de moléculas de radical DPPH sequestrado, a uma determinada diluição, pela equação 2 (OLIVEIRA, 2011).

**Equação 2** – Equação usada para cálculo da atividade sequestrante pelo ensaio do DPPH.

$$\% \text{ atividade sequestrante} = \left[ 1 - \frac{(DPPH)^f}{(DPPH)^o} \right] \times 100$$

. (DPPH)<sup>o</sup> – Absorbância no início da reação -amostra pura de DPPH; (DPPH)<sup>f</sup> – Absorbância no final da reação

### 4.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo método de peroxidação lipídica

A degradação oxidativa dos lipídeos é de grande importância para diversos tipos de pesquisa por ser atuante na alteração de comidas, na oxidação térmica, na autooxidação e na oxidação por espécies reativas de oxigênio (ROS). Como os lipossomos são similares às membranas biológicas, a peroxidação detectada em lipossomos mimetiza a peroxidação em membranas que é uma das principais formas de se produzir radicais livres no meio biológico (GODEVAC *et al.*, 2008).

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lípidos é o teste do malondialdeído (MDA  $C_3H_4O_2$ ) (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão beta dos AGPI peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos, que podem ser determinados por absorção no visível (532 nm). O teste padrão, introduzido por Kohn e Liversedge, em 1944, é bastante popular porque é simples e rápido, porém inespecífico. Consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e alta temperatura. Essa reação, chamada de “teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (SRATB), representa múltiplos métodos que utilizam o TBA, formando o complexo MDA:TBA (1:2),  $C_{11}H_8N_4S_2O_4 \cdot H_2O$ , que tem absorção máxima em 532 nm (JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

#### 4.3.1 Teste de peroxidação em lipossomos- Determinação de malondialdeído (MDA)

A metodologia utilizada para avaliar o efeito antiperoxidativo dos extratos de *I. subnuda* e de *R. dolabripetala* foi a descrita por BUEGE & AUST (1978), com modificações.

Foram adicionados 100 µL de cada extrato (0,2 mg/mL) dissolvidos em DMSO (dimetilsulfoxido), 100 µL de BHT (di-terc-butilmetilfenol), controle positivo, e 100 µL de DMSO, controle negativo aos tubos de ensaio, corretamente identificados, contendo 0,5 mL da solução de lipossomos (10 mM). A peroxidação lipídica foi induzida adicionando-se 125 µL de cloreto férrico FeCl<sub>3</sub> (0,2 mM) e 1 mL de ácido ascórbico (10 mM) em todos os tubos. Em seguida, estes foram incubados em um agitador à temperatura de 40°C durante 60 minutos. Decorrido o tempo, a reação foi interrompida adicionando 1 mL de ácido tiobarbitúrico TBA (0,375%) dissolvidos em TCA-HCl (15,0% ácido tricloracético em HCl 0,25 mol/L).

Os tubos foram, então, aquecidos em banho termostático a 80°C por 15 minutos e, posteriormente, centrifugados a 3.000 x g por 15 minutos a 15°C. Em seguida, a leitura da absorbância de todas as amostras foi feita em espectrofotômetro UV/visível a 532 nm, tendo como padrão de nivelamento o “branco”: água, cloreto férrico, ácido ascórbico e TBA.

O índice de peroxidação em TBA foi expresso em termos da porcentagem de inibição de peroxidação de cada extrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e, para o cálculo dos resultados utilizou a média das triplicatas. A porcentagem de inibição na oxidação lipídica foi calculada de acordo com a equação 3, utilizando água como controle:

**Equação 3** – Equação usada para cálculo da inibição da atividade peroxidativa.

$$\% \text{ Inibição} = \left( \frac{\text{abs.média final do controle} - \text{abs.média da amostra}}{\text{abs.média do controle}} \right) \times 100$$

## 4.4 Cultivo Celular

Todo o trabalho dessa etapa foi realizado em condições assépticas, em capela de fluxo laminar com lâmpada ultravioleta, com material estéril e descartável.

A linhagem celular selecionada para o experimento foi a variante F10 do melanoma murino B16 (ATCC - CRL-6475). As células da linhagem B16F10 foram mantidas em meio de cultura DMEM (Gibco) suplementado com L-glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL), NaHCO<sub>3</sub>, (2,2 g/L) e soro fetal bovino (Cultilab) 10% e em pH 7,2; incubadas em frascos de cultivo estéreis (25 cm<sup>2</sup> - 50 mL) a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% CO<sub>2</sub>, em estufa de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific modelo HEPA Class 100).

### 4.4.1 Curva de crescimento celular

Com o objetivo de ajustar a melhor quantidade de células a ser utilizada durante o período experimental, foi realizada uma curva de crescimento celular relativa aos períodos de coleta de dados: 24, 48, 72 e 96 horas.

Para realização da contagem, 20 µL das células foram adicionadas a outro microtubo contendo 20 µL do corante vital azul de tripan (0,25%) e 10 µL da mistura. As amostras foram analisadas em hemocitômetro (Neubauer Improved) de modo a estimar a quantidade total aproximada de células presentes no frasco de origem, em um volume conhecido. A partir desses dados, foram coletadas alíquotas da suspensão do frasco de modo a conter, em cada poço de uma placa de 96 cavidades (TPP<sup>®</sup>), os seguintes volumes de células, em sextuplicatas: 1,0 x 10<sup>3</sup>; 2,5 x 10<sup>3</sup>; 5,0 x 10<sup>3</sup>; 1,0 x 10<sup>4</sup>; 2,5 x 10<sup>4</sup>; 5,0 x 10<sup>4</sup>; 1,0 x 10<sup>5</sup>; 2,5 x 10<sup>5</sup>; 5,0 x 10<sup>5</sup> células. Tomou-se como base dados já encontrados na literatura sobre essa linhagem celular (JUNIOR, 2007; LUVIZON, 2008; ALBUQUERQUE, 2008; SHIN *et al.*, 2008).

As células foram plaqueadas em 50 µL de meio de cultura suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o meio de cultivo das cavidades foi substituído por um novo meio (2,5% SFB) e as células permaneceram em incubação pelos quatro dias seguintes. Diariamente, a avaliação da

confluência celular foi realizada sob microscópio ótico invertido e a quantidade definida de células para condução dos ensaios foi de  $3 \times 10^3$  célula/poço.

#### **4.4.2 Teste de citotoxicidade**

A análise da atividade citotóxica dos extratos foi baseado na avaliação colorimétrica do MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium]. O MTT é um sal de tetrazólio hidrossolúvel, de cor amarelada em solução aquosa. Quando em contato com células viáveis com função mitocondrial preservada, o anel tetrazólico presente em sua estrutura é reduzido por redutases mitocondriais. O produto desta reação é o formazan que, por ser insolúvel em água, acumula-se sob a forma de cristais. Esses cristais são então coletados e diluídos em DMSO, resultando numa solução de coloração púrpura, cuja intensidade de cor é medida por espectrofotometria em uma faixa de a 492 nm. Dessa forma, a intensidade de púrpura dessa solução é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazan formados que, por sua vez, é proporcional à quantidade de células viáveis. (MOSMANN, 1983).

A realização desse teste depende da atividade da enzima succinato desidrogenase, componente do ciclo do ácido cítrico. Essa enzima reside na membrana mitocondrial interna, necessitando de um sistema de transporte de elétrons para a sua função. Dessa maneira, a atividade desta enzima é uma medida da viabilidade mitocondrial e celular. A atividade desta enzima é medida pela sua capacidade de converter o 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5- difenil-2-H-brometo de tetrazolium a um composto cristalizado de coloração azul. A quantidade de cristais formados é determinada pela mensuração da densidade óptica por espectrofotometria (MOSMANN, 1983).

##### **4.4.2.1 Capacidade de inibir 50% do cultivo celular ( $GI_{50}$ )**

A capacidade de inibir 50% do cultivo celular ( $GI_{50}$ ), dos compostos testados foi calculada mediante o resultado do teste do MTT. Os valores da absorbância de 12 concentrações distintas de cada substância foram tabelados e, então, analisados pelo

programa GraphPad Prim 5.0. Este após o cálculo indicou os valores dos GI<sub>50</sub>, bem como seus respectivos gráficos.

#### 4.4.2.2 Teste de viabilidade celular

As células de melanoma da linhagem B16F10 foram avaliadas segundo a sua viabilidade por meio de coloração com azul de tripan (item 4.6.2.1) e, então, semeadas na concentração de  $3 \times 10^3$  células/mL (células viáveis) em placas de cultura de 96 cavidades (TPP<sup>®</sup>), contendo meio de cultura DMEM. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por outro meio contendo concentrações crescentes dos flavonóides Morina e Naringina, de xantona 1,7-dihidroxixantona, de 5-Fluoracil e de extratos de *I. subnuda* e de *R. dolabripetala*. Todos eles foram inicialmente diluídos em DMSO. Após 72 h de tratamento, o meio de cultura foi retirado e as cavidades foram lavadas duas vezes com PBS (100 µL/poço). Um novo meio de cultura foi adicionado, dessa vez contendo MTT (0,5 mg/mL) (Sigma - Aldrich<sup>®</sup>), e incubado por 3 horas e 30 minutos a 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% CO<sub>2</sub>. Decorrido esse período, o meio foi novamente retirado, sendo adicionados 100 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan produzidos durante a incubação com MTT. As placas foram então levadas a um agitador de placas por 1 hora e, em seguida, avaliadas por meio de um leitor de Elisa (Thermo Plate. Leitora de microplaca TP-reader), a 550 nm, para estabelecer a relação linear do número médio de células por poço no ensaio do MTT (adaptado de MOSMANN, 1983). Nessa primeira etapa, foi calculada a concentração inibitória de 50% das células de melanoma, sendo os ensaios realizados sempre em triplicatas.

Os extratos que apresentaram atividade inibitória de pelo menos 50% foram avaliados quatro concentrações distintas que delimitavam a melhor faixa de mortalidade celular. Os mesmos foram, então, testados em triplicatas nos períodos de 24, 48 e 72 horas, seguindo a metodologia do ensaio do MTT.

## **4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana**

### **4.5.1 Microrganismo indicador**

Como microrganismo indicador para atividade antibacteriana, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 4075 (isolado de mastite bovina, embrapa/CNPGL, Juiz de fora) e *S. bovis* 01 (isolado de mastite bovina, embrapa/CNPGL, Juiz de fora).

### **4.5.2 Padronização do microrganismo indicador**

O microrganismo indicador foi cultivado em caldo infusão de cérebro-coração (BHI), por 24 h a 37°C, de onde foi transferido posteriormente para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina esterilizada. Essas suspensões foram padronizadas, comparando-as com a escala de McFarland (0,05 mL de cloreto de bário a 1,0% + 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1,0%) (CLSI, M7-A6). Obteve-se, assim, um inóculo contendo aproximadamente  $10^8$  células/mL denominada “suspensão concentrada”, sendo adicionada ao meio Mueller Hinton – MH (Difco) na proporção de 2%. Essas suspensões foram mantidas em banho-maria a aproximadamente 50°C até o momento do uso, não ultrapassando 60 minutos

### **4.5.3 Ensaio qualitativo**

Para o ensaio qualitativo, foi utilizada a técnica de difusão em poço. O teste antimicrobiano dos extratos foi realizado em cultivo de cepa bacteriana de *S. aureus* (como descrito no item 4.7.1). As bactérias foram cultivadas “overnight” e uma suspensão contendo  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> foram incorporadas em ágar Müeller-Hinton (Himedia®). Os poços foram feitos no ágar com aproximadamente 6 x 3 mm e cada poço foi preenchido com 8 µL (microlitros) de uma solução concentrada de cada extrato, todos na concentração de 100 mg/mL. Como controle positivo foi utilizado ciclopirox olamina (Uci-Farma®) 10mg/mL. Decorrido o período de incubação, as zonas

de inibição foram medidas com o auxílio de régua milimetrada, no que diz respeito ao halo (diâmetro da área com ausência de desenvolvimento microbiano) (FERNANDES *et al.*, 2005). Os extratos que apresentaram uma melhor atividade antimicrobiana foram selecionados para a realização da determinação da concentração inibitória mínima.

#### **4.5.3.1 Ciclopirox olamina**

O ciclopirox olamina é um fungicida de amplo espectro, com alto poder de penetração. É altamente eficaz praticamente contra todos os agentes patogênicos causadores de micoses cutâneas superficiais. Possui atividade fungicida *in vitro* contra *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Candida albicans*. Além disso, apresenta efeitos antiflogísticos e antibacterianos concomitantes sobre patógenos Gram-positivos e Gram-negativos (CICLOPIROX OLAMINA - BULÁRIO MEDLEY). Esse fármaco se distingue dos demais agentes antifúngicos por apresentar atividade antibacteriana mais uniforme e com maior espectro de ação. Sua ação é parcialmente por complexação de íons metálicos e, conseqüentemente, sua atividade *in vitro* depende da concentração de íons metálicos livres no meio utilizado para a cultura. A atividade da ciclopirox olamina contra bactérias é particularmente relevante nos casos de infecções por *Tinea pedis*, que geralmente associam-se ao crescimento de bactérias principalmente Gram-negativas (GUPTA & PLOTT, 2004).

#### **4.5.4 Determinação da concentração inibitória mínima**

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) as cavidades de uma microplaca de 96 cavidades (TPP®) foram preenchidas com 100 µL de meio uller-Hinton (Himedia®) e uma suspensão bacteriana ajustada para concentração final de 10<sup>6</sup> UFC/mL. Em seguida, as substâncias que apresentaram atividade biológica no teste de difusão em ágar foram adicionadas à microplaca e mantidas a 37 °C por 24 h. Decorrido esse período, foi, então, realizado o ensaio do MTT. Nessa atapa foram acrescentados

a cada poço 100 µL de MTT na concentração 1,0 mg/mL. A placa foi, então, novamente encubada por um período de 3 horas para, assim, ter o resultado analisado. A CIM foi determinada como a menor concentração na qual não foi visualmente observada turbidez do meio ou crescimento bacteriano (LECHNER *et al.*, 2004). Todos os testes foram realizados em triplicata e como controle negativo foi utilizado meio BHI acrescido de DMSO.

#### **4.6 Análise estatística**

Os resultados dos coeficientes de inibição em 50% (GI50) foram analisados pelo programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas por ANOVA. Uma vez que os resultados apresentavam diferença estatística no teste de variância (teste F), os valores obtidos pelos tratamentos foram comparados entre si pelo teste de comparações múltiplas – teste de Tukey –, sendo os valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) a condição para as diferenças serem consideradas estatisticamente significantes. A comparação dos tratamentos com o grupo controle foi feita utilizando o teste de Dunnett, sendo os valores de  $\alpha$  menores que 0,05 ( $\alpha < 0,05$ ) a condição para as diferenças serem consideradas estatisticamente significativas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Preparo dos extratos hidroalcoólicos

#### 5.1.1 Estimativas de rendimento de matéria verde, seca e perda de umidade

Após a identificação botânica, o material coletado (folhas e casca) foi processado e seco em estufa a 40°C até a estabilização do peso. A matéria seca foi submetida à extração hidroalcoólica. A tabela 1 revela os valores encontrados para matéria verde coletada no campo, perda de umidade, matéria seca obtida e rendimento do extrato para cada uma das duas espécies estudadas. O rendimento dos extratos foi calculado segundo a equação 1.

**Tabela 1** - Rendimento do material botânico (folhas/casca)

<b>Nome da Espécie</b>	<b>Matéria Verde</b>	<b>Perda de umidade</b>	<b>Matéria Seca</b>	<b>Rendimento</b>
<i>Inga subnuda</i>	395,00g	36,72%	250,00	4,21g (1,07%)
<i>Rollinia dolabripetala</i>	1.237,00g	64,43%	440,00g	28,57g (2,31%)

## 5.2 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos das cascas de *Inga subnuda* e folhas de *Rollinia dolabripetala* estão apresentadas na tabela 2.

Os extratos avaliados não apresentaram uma composição fitoquímica semelhante em relação à presença de antraquinonas, flavonóides, taninos e saponinas. As xantonas foram encontradas somente no extrato de *R. dolabripetala* enquanto que as saponinas apenas no extrato de *I. subnuda*.

**Tabela 2** - Resultado da prospecção fitoquímica preliminar dos extratos das folhas de *Inga subnuda* e *Rollinia dolabripetala*.

Metabólitos	Nome da espécie	
	<i>I. Subnuda</i>	<i>R. dolabripetala</i>
Antocianidinas	+	-
Antocianina	+	-
Antraquinonas	+	-
Flavanona	+	-
Flavanonóis	+	-
Flavonóis	-	+
Saponinas	+	-
Taninos	+	+
Xantonas	-	+

. (-) negativo e (+) positivo.

### 5.3 Determinação da atividade antioxidante dos extratos

A análise da atividade antioxidante de frutos e extratos é de grande importância em trabalhos que buscam avaliar o potencial farmacológico de determinada planta uma vez que muitas doenças crônicas degenerativas estão relacionadas à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, no organismo.

#### 5.3.1 Método do DPPH

Na avaliação da atividade antioxidante dos extratos, utilizou-se o metanol com solvente de diluição (60  $\mu$ M) tanto para as amostras como para o DPPH. Como os extratos utilizados no presente estudo não foram fracionados, esse teste teve como intuito apenas avaliar o perfil da capacidade antioxidante do extrato, como demonstrado na tabela 3. Para tanto, realizou-se a análise apenas na concentração de 5,0  $\mu$ g/mL.

Tabela 3 – Atividade antioxidante dos extratos de *R. dolabripetala* e *I. subnuda*.

Atividade antioxidante - método do DPPH			
	Controle ( <i>Ginkgo biloba</i> )	<i>R. dolabripetala</i>	<i>I. subnuda</i>
Ação antioxidante (%)	36,70% $\pm$ 1,03	22,82% $\pm$ 0,11*	67,93% $\pm$ 0,08*

. Valores calculados segundo a equação 2. *Ginkgo biloba* – Pharmanostra®  
Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )  
(\* ) diferença estatística em relação ao grupo controle positivo pelo teste de Dunnett ( $\alpha = 5\%$ ).

#### 5.3.2 Método da peroxidação lipídica

Como apresentado na tabela 4, os extratos de *I. subnuda* e *R. dolabripetala* promoveram atividade antiperoxidativa de 34,28% e 24,78% enquanto os controles 1 e 2 apresentaram 80,90% e 28,66%, respectivamente.

O BHT (butilhidroxidotuleno) é um antioxidante sintético comumente utilizado na indústria alimentícia para aumentar a vida de prateleira de alimentos típicos ou que contenham lipídeo em sua composição (BARREIROS, 2006). Devido a essa propriedade, normalmente esse antioxidante é amplamente utilizado como padrão

positivo em ensaios que avaliam a peroxidação lipídica como o apresentado nesse estudo.

Como o presente trabalho utiliza extratos brutos, foi utilizado, também, o *Gingko biloba* (controle nº2). O extrato dessa planta é um dos medicamentos mais vendidos em lojas de produtos naturais em todo o mundo (BREVOORT, 1998). Seus efeitos antioxidantes estão relacionados a diversos elementos químicos com essas propriedades antioxidantes, sendo os flavonóides e os terpenóides os mais bem descritos (SMITH *et al.*, 1996). Por esse motivo, extrato de *Gingko biloba* é comumente utilizado como padrão positivo em ensaios que envolvam extratos naturais.

**Tabela 4** – Atividade antioxidante dos extratos de *R. dolabripeta* e *I. subnuda*.

<b>Atividade antioxidante - método peroxidativo</b>			
<b>Controle nº1 (BHT)</b>	<b>Controle nº2 (<i>Gingko biloba</i>)</b>	<b><i>R. dolabripeta</i></b>	<b><i>I. subnuda</i></b>
80,90%	28,66%	24,78%	34,28%

. Valores calculados segundo a equação 3. *Gingko biloba* – Pharmanostra®  
 Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)  
 (\*) diferença estatística em relação ao grupo controle positivo pelo teste de Dunnett (α = 5%).

## 5.4 Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos

### 5.4.1 Técnica de difusão em ágar

Para essa metodologia, descrita anteriormente, foram utilizadas três cepas de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 29213; *S. aureus* 4075, *S. bovis* 01). Os resultados dos halos de inibição para as três cepas bacterianas estão indicados na figura 12 bem como na tabela 5.

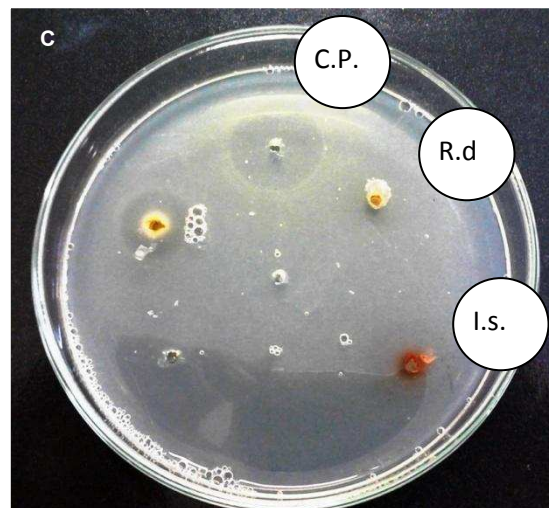
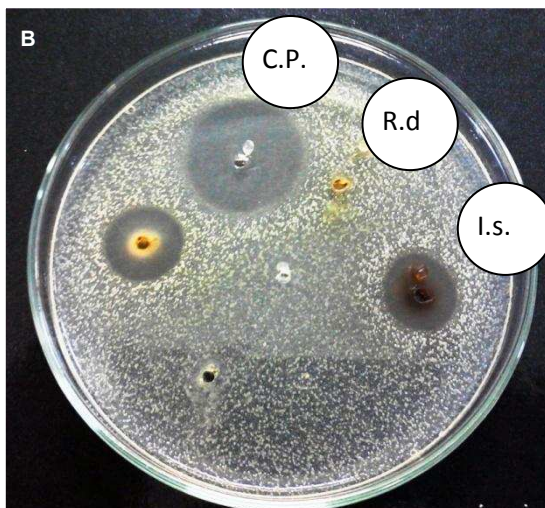
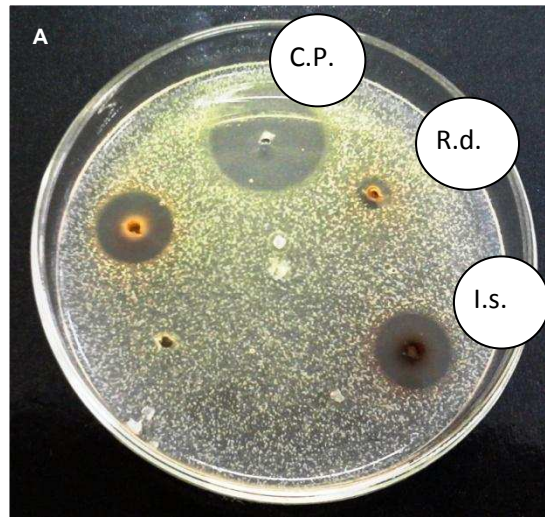
**Tabela 5** – Halo de inibição em cultivo de três cepas de bactérias Gram positivas (valores em média  $\pm$  desvio padrão).

Cepa	Ciclopirox amina (controle positivo)	<i>I. subnuda</i>	<i>R. dolabripetala</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	24,00 $\pm$ 1,00	14,00 $\pm$ 1,02	7,00 $\pm$ 0,38
<i>S. aureus</i> 4075	22,67 $\pm$ 0,58	13,00 $\pm$ 1,73	0,00
<i>S. bovis</i> 01	20,00 $\pm$ 0,10	10,00 $\pm$ 0,90	0,00

. Valores em média  $\pm$  desvio padrão.

. Halos com diâmetro igual ou superior a 7 mm são considerados válidos (NASCIMENTO *et al.*,2000).

ATCC: "American Type Culture Collection" – (USA)



**Figura 12** - Teste antibacteriano pela técnica de difusão em poço. C.P. significa controle positivo, I.S. significa extrato de *Inga subnuda* e R.d. significa extrato de *Rollinia dolabripetala*

**A**– Halos de inibição pela técnica de difusão em ágar; cepa de *S. aureus* ATCC 29213.

**B** – Halos de inibição pela técnica de difusão em ágar; cepa de *S. aureus* 4075

**C** – Halos de inibição pela técnica de difusão em ágar; cepa de *S.bovis* 01..

### 5.4.2 Técnica de concentração inibitória mínima

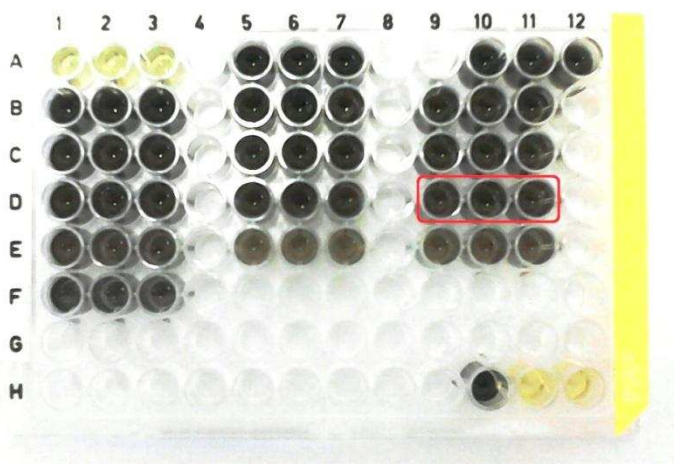
Devido ao fato de o extrato de *R. dolabripetala* ter apresentado baixa atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar, apenas o extrato de *I. subnuda* foi considerado para a técnica de microdiluição em caldo BHI. O quadro 3 indica a localização da distribuição do extrato de *I. subnuda* em cultivo bacteriano de *S. aureus* ATCC 29213.

**Quadro 3** – localização dos controles e concentrações testadas do extrato de *I. subnuda* pela técnica de concentração inibitória mínima (MIC).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	C.P	C.P	C.P		C.N	C.N	C.N			5,00	5,00	5,00
<b>B</b>	4,00	4,00	4,00		3,00	3,00	3,00		2,00	2,00	2,00	
<b>C</b>	1,00	1,00	1,00		0,90	0,90	0,90		0,80	0,80	0,80	
<b>D</b>	0,70	0,70	0,70		0,60	0,60	0,60		0,50	0,50	0,50	
<b>E</b>	0,40	0,40	0,40		0,30	0,30	0,30		0,20	0,20	0,20	
<b>F</b>	0,10	0,10	0,10									
<b>G</b>												
<b>H</b>										S+MTT	BHI	BHI

. **C.P.** = Controle Positivo; **C.N.** = Controle negativo; **S+MTT** = teste com suspensão bacteriana em meio de cultivo acrescido de MTT; **BHI** = meio nutritivo utilizado para cultivo bacteriano.

De acordo com a metodologia proposta, a concentração inibitória mínima foi de 0,50 mg/mL, como apresentado na figura 13.



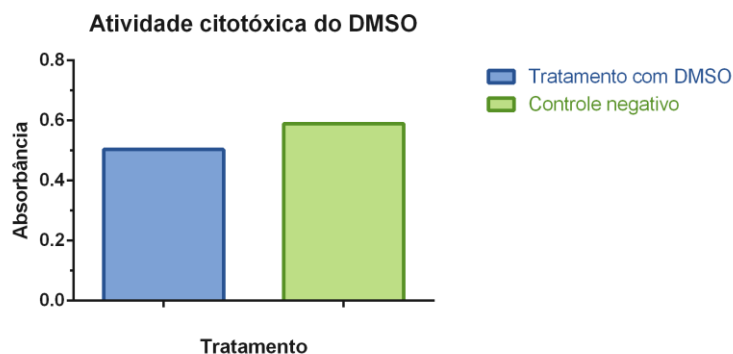
**Figura 13** – Teste de concentração inibitória mínima (ver quadro 3).

## 5.5 Teste de citotoxicidade

Ensaio de toxicidade celular são entre os métodos de bioensaio, os primeiros a serem realizados para prever a toxicidade de substâncias a vários tecidos. A principal vantagem da avaliação de toxicidade em culturas de células em relação aos ensaios tradicionais de toxicidade *in vivo*, é uma resposta mais simples, sensível, econômica e homogênea (FERNANDES *et al.*, 2005).

### 5.5.1 Determinação da concentração letal mínima – GI (“Growth inhibition”)

A citotoxicidade dos extratos de *Inga subnuda*, *Rollinia dolabripetala*, dos flavonóides naringina e morina, da 1,7-dihidroixantona e xantona foi avaliada na linhagem de célula neoplásica B16F10, em períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas. Em uma primeira etapa, foi feito um “screening” em 72 horas do diluente DMSO para identificar o limite de concentração a partir da qual este não exerceria nenhum efeito citotóxico sobre as células em cultivo. Em concentrações inferiores a 0,50% v/v, o diluente não exerceu atividade estatisticamente significativa sobre o cultivo celular ( $P = 0,1697$ ) e, por isso, todos os compostos usados respeitaram esse limite de concentração do diluente (figura 14).



**Figura 14** - Gráfico comparativo da absorvância da cultura tratada com DMSO ( $0,50\% \pm 0,06$ ) em relação ao controle negativo ( $0,589 \pm 0,0618$ ).

Controle negativo: Cultivo de células que não foram submetidas a nenhum tratamento.

(\*) diferença estatística em relação ao grupo controle positivo pelo teste de Dunnett ( $\alpha = 5\%$ ).

Com base na faixa não citotóxica do diluente usado, analisou-se o perfil da atividade antitumoral dos compostos, o qual foi expresso em GI<sub>50</sub> (menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) no período de 72 horas, seguindo “screening”(tabela 6).

**Tabela 6** – Valores de GI<sub>50</sub> das substâncias testadas e 5-Fluoracil (controle positivo) testadas em período de incubação de 72 horas.

Tratamento	GI <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )
<i>Inga subnuda</i>	15,93x10 <sup>-1</sup>
<i>Rollinia dolabripetala</i>	47,04
Morina	11,94x10
Naringina	14,83x10 <sup>2</sup>
1,7-dihidroxixantona	97,96x10 <sup>-2</sup>
Xantona	33,77x10 <sup>-1</sup>
5-Fluoracil	2,40x10 <sup>-1</sup>

**GI<sub>50</sub>** (Concentração que promove 50% da máxima inibição da proliferação) foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 para Windows<sup>®</sup>.

As substâncias liofilizadas foram completamente dissolvidas com auxílio do DMSO de forma que se formassem soluções estoque com a maior concentração possível da substância (tabela 7). As substâncias-teste foram diluídas no momento do uso, sempre respeitando a faixa não citotóxica do diluente. O perfil da atividade antitumoral das substâncias-teste foi analisado e expresso em GI<sub>50</sub>, no período de 72 horas e seguindo “screening” (tabela 6).

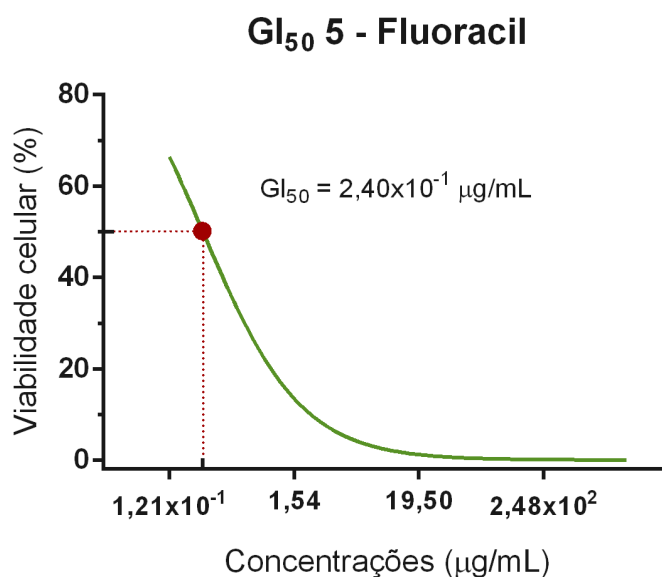
Como parâmetro de atividade, considera-se como potente atividade antineoplásica os compostos que apresentarem GI<sub>50</sub> ≤ 30 µg/mL (ITHARAT *et al.*, 2004). O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em seu programa de triagem de drogas anticâncer considera potente atividade antineoplásica valores GI<sub>50</sub> ≤ a 4,0 µg/mL. No presente estudo, os compostos foram considerados inativos quando GI<sub>50</sub> > 250 µg/mL. De acordo com a tabela 6, a naringina foi considerada inativa para esse tipo celular. Já a 1,7-dihidroxixantona foi escolhida preferencialmente em relação ao seu par xantona por desempenhar maior atividade antineoplásica (97,96x10<sup>-2</sup> frente a 33,77x10<sup>-1</sup>,

respectivamente). As figuras 15 – 21 mostram o perfil das curvas dos GI<sub>50</sub> apresentados na tabela 7.

**Tabela 7** – Concentração de proporção de diluente DMSO nas soluções estoque substâncias testadas e o 5-Fluoracil

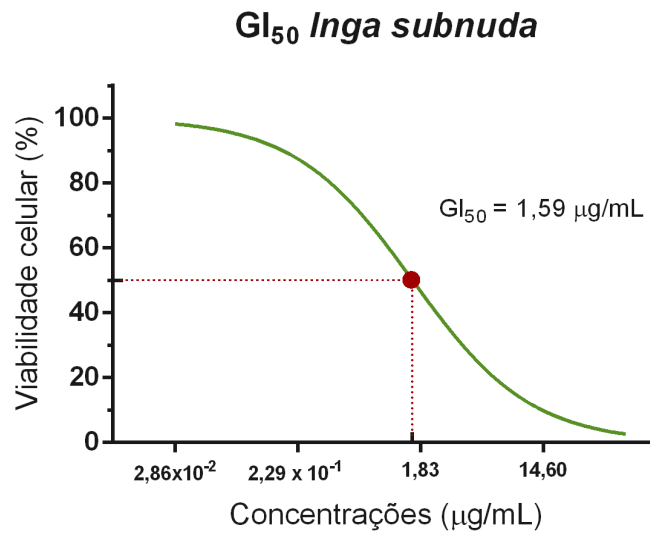
Substância	Concentração	Diluição em DMSO
<i>Inga subnuda</i>	80,00 mg/mL	0,4 %
<i>Rollinia dolabripetala</i>	160,00 mg/mL	0,8 %
Morina	222,22 mg/mL	100 %
Naringina	114,29 mg/mL	100 %
Di-OH-xantona	142,86 mg/mL	100 %
Xantona	32,97 mg/mL	100 %
5-Fluoracil	240,00 mg/mL	100 %

GI<sub>50</sub> (Concentração que promove 50% da máxima inibição da proliferação) foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 para Windows<sup>®</sup>.

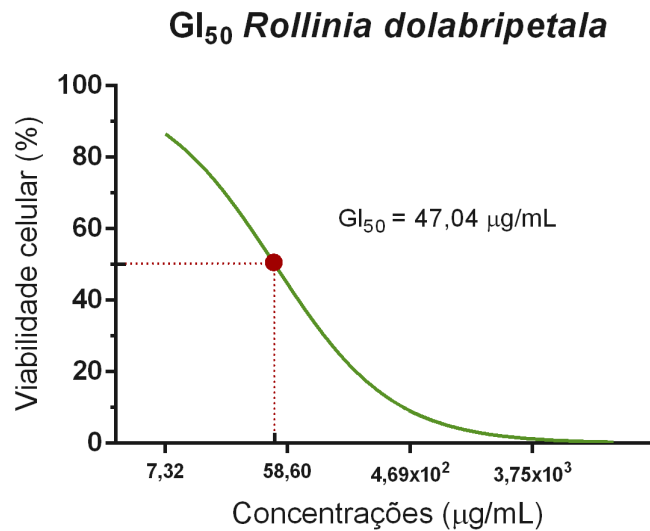


**Figura 15** – Gráfico do GI<sub>50</sub> do 5-Fluoracil (diluição em DMSO 100%).

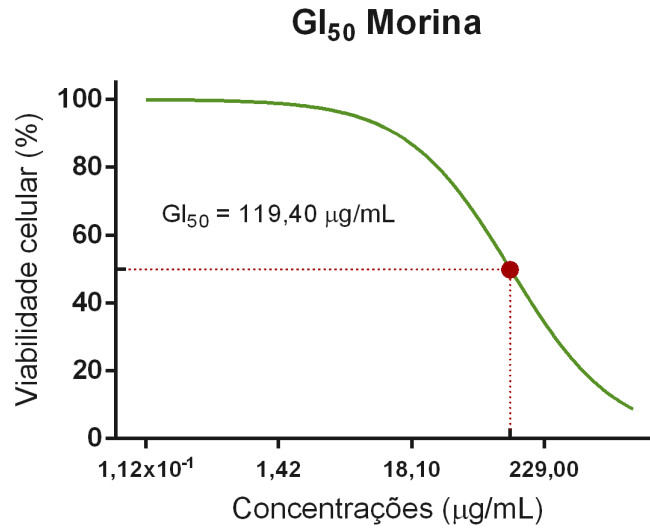
GI<sub>50</sub> (Concentração que promove 50% da máxima inibição da proliferação) foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 para Windows<sup>®</sup>.



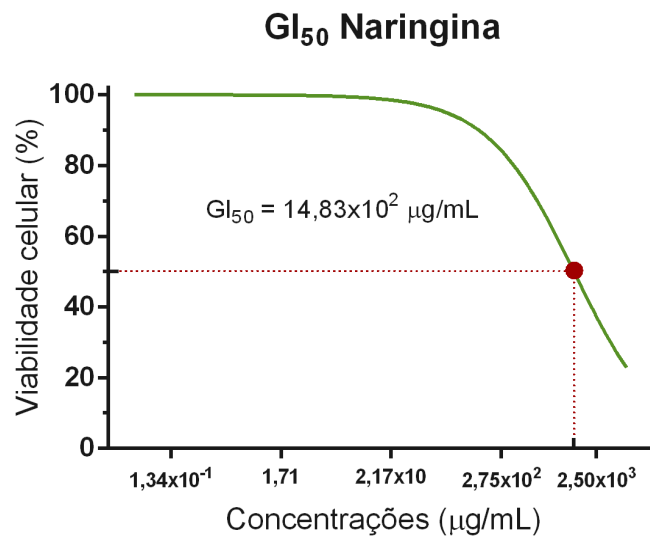
**Figura 16** – Gráfico do  $GI_{50}$  do extrato de *Inga subnuda*.  $GI_{50}$  (Concentração que promove 50% da máxima inibição da proliferação) foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism® 5 para Windows®.



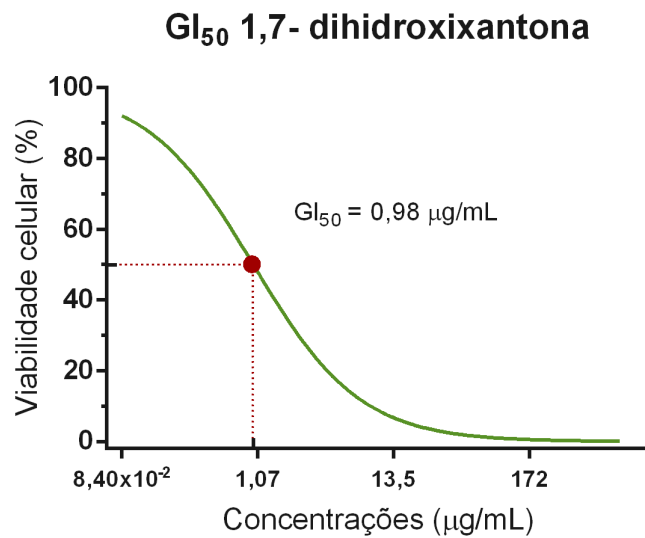
**Figura 17** – Gráfico do  $GI_{50}$  do extrato de *Rollinia dolabripetala*.  $GI_{50}$  (Concentração que promove 50% da máxima inibição da proliferação) foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism® 5 para Windows®.



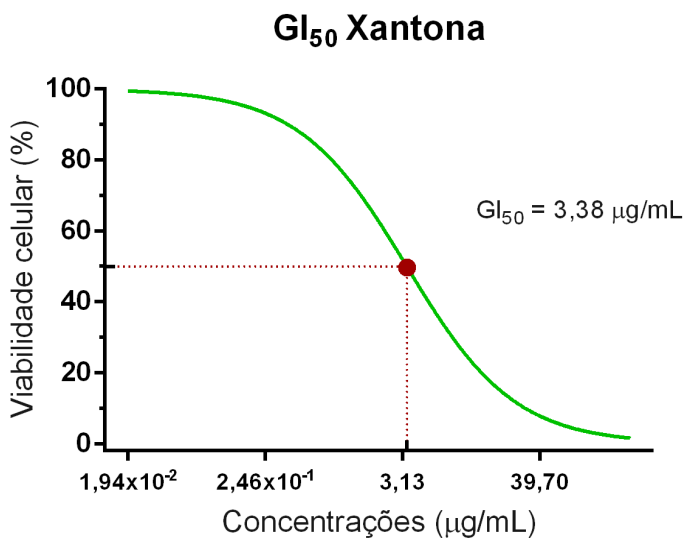
**Figura 18** – Gráfico do GI<sub>50</sub> da Morina.  
 GI<sub>50</sub> (Concentração que promove 50% da máxima inibição da proliferação) foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 para Windows<sup>®</sup>.



**Figura 19** – Gráfico do GI<sub>50</sub> da naringina.  
 GI<sub>50</sub> (Concentração que promove 50% da máxima inibição da proliferação) foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 para Windows<sup>®</sup>.



**Figura 20** – Gráfico do GI<sub>50</sub> da 1,7-dihidroxixantona. GI<sub>50</sub> (Concentração que promove 50% da máxima inibição da proliferação) foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 para Windows<sup>®</sup>.



**Figura 21** – Gráfico do GI<sub>50</sub> da xantona. GI<sub>50</sub> (Concentração que promove 50% da máxima inibição da proliferação) foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 para Windows<sup>®</sup>.

Pela análise do perfil do GI<sub>50</sub> do 5-FU, foi possível avaliar melhor faixa de atividade citotóxica para as células tumorais testadas. Quatro concentrações que compreenderam esse espectro foram selecionadas e testadas nos períodos de 24, 48 e 72h. A menor concentração testada e que exerceu maior inibição do crescimento celular foi selecionada como controle para os três períodos citados. Como apresentado na tabela 8, a concentração de 1,25x10<sup>3</sup> µg/mL foi selecionada como controle para os três períodos.

**Tabela 8** - Valores da inibição da proliferação celular em 24, 48 e 72 horas (valores em %; média ± desvio padrão).

Tempo (horas)	5-Fluoracil			
	1,80x10 <sup>3</sup> µg/mL	1,25x10 <sup>3</sup> µg/mL	899,63 µg/mL	599,75 µg/mL
24	21,09 ± 2,51	25,61 ± 5,83	29,62 ± 4,09	18,01 ± 3,78
48	54,39 ± 1,44	55,09 ± 3,13	56,80 ± 1,98	47,13 ± 3,63
72	93,58 ± 0,71	91,50 ± 3,06	91,08 ± 0,92	86,39 ± 4,04

. Valores em média ± desvio padrão.

### 5.5.2 Determinação das concentrações citotóxicas

Pela análise do  $GI_{50}$  de cada substância, foram selecionadas quatro concentrações que compreenderam sua maior faixa de atividade citotóxica. As células tumorais foram, então, desafiadas em 24, 48 e 72 horas por todas as concentrações definidas, usando para cada período seu respectivo controle (tabelas 9 – 11).

**Tabela 9** - Valores da inibição da proliferação celular (valores em %).

Teste de citotoxicidade - 24 horas					
Substâncias	$\mu\text{g/mL}$	m. $\pm$ d.p.	Substâncias	$\mu\text{g/mL}$	m. $\pm$ d.p.
<i>I. Subnuda</i>	78,13	82,69 $\pm$ 4,00	<i>R. dolabripetala</i>	$2,00 \times 10^4$	3,81 $\pm$ 2,20
	58,59	26,51 $\pm$ 2,14		$1,50 \times 10^4$	27,95 $\pm$ 5,70
	39,06	4,33 $\pm$ 3,32		$1,00 \times 10^4$	49,27 $\pm$ 5,69
	26,04	-5,14 $\pm$ 2,49		$6,67 \times 10^3$	32,92 $\pm$ 4,40*
Morina	$1,67 \times 10^3$	42,24 $\pm$ 3,58	1,7-dihidroxixantona	$1,25 \times 10^3$	60,76 $\pm$ 0,73
	$1,25 \times 10^3$	58,12 $\pm$ 2,23		937,11	46,75 $\pm$ 6,50
	832,99	76,29 $\pm$ 3,36		624,74	29,77 $\pm$ 4,04
	555,32	73,91 $\pm$ 1,65		416,49	36,79 $\pm$ 3,21
5-Fluoracil	$1,25 \times 10^3$	25,61 $\pm$ 5,83			

. m.  $\pm$  d.p. (média  $\pm$  desvio padrão).

**Tabela 10** - Valores da inibição da proliferação celular (valores em %).

Teste de citotoxicidade - 48 horas					
Substâncias	$\mu\text{g/mL}$	m. $\pm$ d.p.	Substâncias	$\mu\text{g/mL}$	m. $\pm$ d.p.
<i>I. Subnuda</i>	78,13	83,31 $\pm$ 4,00	<i>R. dolabripetala</i>	$2,00 \times 10^4$	14,66 $\pm$ 5,96
	58,59	35,20 $\pm$ 3,15		$1,50 \times 10^4$	78,34 $\pm$ 6,30
	39,06	16,97 $\pm$ 1,65		$1,00 \times 10^4$	91,99 $\pm$ 0,94
	26,04	13,11 $\pm$ 1,51		$6,67 \times 10^3$	89,04 $\pm$ 3,21
Morina	$1,67 \times 10^3$	71,84 $\pm$ 5,68	1,7-dihidroxixantona	$1,25 \times 10^3$	77,81 $\pm$ 9,97
	$1,25 \times 10^3$	84,87 $\pm$ 3,06		937,11	71,80 $\pm$ 6,11
	832,99	75,67 $\pm$ 5,00		624,74	60,34 $\pm$ 2,08
	555,32	83,01 $\pm$ 5,11		416,49	61,99 $\pm$ 0,78
5-Fluoracil	$1,25 \times 10^3$	55,09 $\pm$ 3,13			

. m.  $\pm$  d.p. (média  $\pm$  desvio padrão).

**Tabela 11** - Valores da inibição da proliferação celular (valores em %).

Teste de citotoxicidade - 72 horas					
Substâncias	µg/mL	m. ± d.p.	Substâncias	µg/mL	m. ± d.p.
<i>I. Subnuda</i>	78,13	89,94 ± 1,41	<i>R. dolabripetala</i>	2,00x10 <sup>4</sup>	75,54 ± 3,94
	58,59	92,10 ± 0,50		1,50x10 <sup>4</sup>	83,43 ± 3,20
	39,06	57,88 ± 5,28		1,00x10 <sup>4</sup>	87,88 ± 4,03
	26,04	49,73 ± 4,52		6,67x10 <sup>3</sup>	84,23 ± 6,44
Morina	1,67x10 <sup>3</sup>	98,48 ± 0,71	1,7-dihidroxixantona	1,25x10 <sup>3</sup>	95,78 ± 0,67
	1,25x10 <sup>3</sup>	98,90 ± 0,35		937,11	95,51 ± 0,34
	832,99	62,76 ± 5,51		624,74	95,41 ± 0,14
	555,32	76,53 ± 2,61		416,49	92,91 ± 1,48
5-Fluoracil	1,25x10 <sup>3</sup>	91,50 ± 3,06			

. m. ± d.p. (média ± desvio padrão).

### 5.5.3 Determinação das concentrações com maior eficácia

Essa etapa foi estabelecida de acordo com os resultados das tabelas 9 – 11. Para cada substância foi selecionada a menor concentração testada que apresentou a maior atividade citotóxica nos três tempos. Os dados foram analisados estatisticamente em relação ao fármaco controle em cada período e apresentados na tabela 12 e na figura 22.

**Tabela 12** – Valores das concentrações com maior eficácia em 24, 48 e 72 horas (valores em %; média ± desvio padrão)

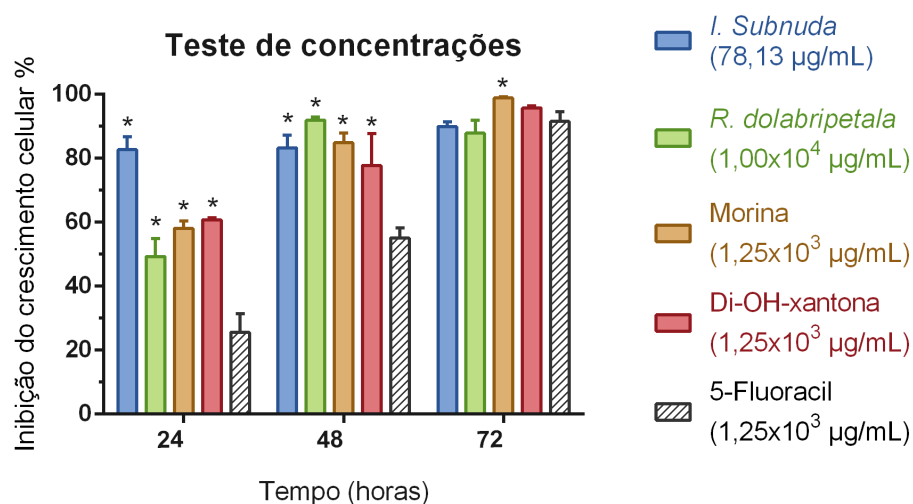
Teste de concentrações				
Tempo	<i>I. Subnuda</i>	<i>R. dolabripetala</i>	Morina	1,7-dihidroxixantona
Concentração (µg/mL)	78,13	1,00x10 <sup>4</sup>	1,25x10 <sup>3</sup>	1,25x10 <sup>3</sup>
24 horas	82,69 ± 4	49,27 ± 5,69	58,12 ± 2,23 <sup>a</sup>	60,76 ± 0,73 <sup>a</sup>
48 horas	83,31 ± 4 <sup>b</sup>	91,99 ± 0,94 <sup>b,c</sup>	84,87 ± 3,06 <sup>b,c,d</sup>	77,81 ± 9,97 <sup>b,d</sup>
72 horas	89,94 ± 1,41 <sup>e</sup>	87,88 ± 4,03 <sup>e</sup>	98,9 ± 0,35 <sup>f</sup>	95,78 ± 0,67 <sup>f</sup>

. Valores em média ± desvio padrão.

. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

O extrato de *I. Subnuda* desempenhou melhor atividade em relação aos seus pares, em 24 e 48 horas, sendo que no primeiro período foi significativamente maior que o controle. Já o extrato de *R. dolabripetala* desempenhou melhor atividade em

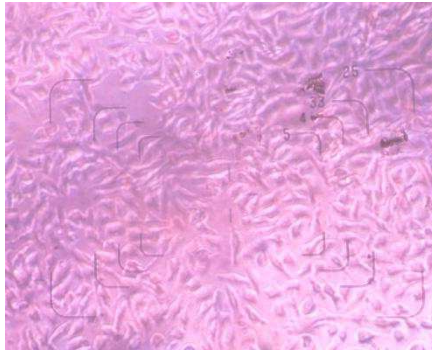
relação às outras substâncias testadas no período de 48 horas, promovendo efeito significativamente maior que o controle.



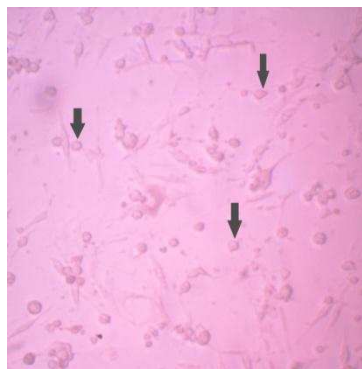
**Figura 22** – Gráfico das concentrações com maior eficácia em 24, 48 e 72 horas. (\*) diferença estatística em relação ao grupo controle positivo pelo teste de Dunnett ( $\alpha = 5\%$ ).

A morina exerceu melhor atividade em relação aos seus pares no período de 72 horas, ocasionando, inclusive, atividade citotóxica significativamente maior que o controle nesse período. Já a 1,7-dihidroxixantona apresentou melhor desempenho no período de 24 horas, exercendo atividade citotóxica significativamente maior que o controle nesse período.

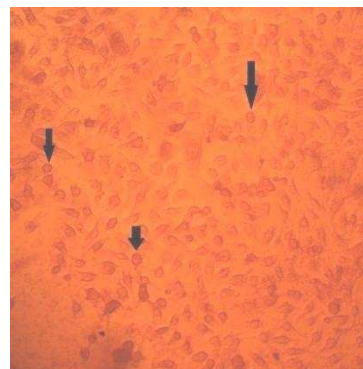
As figuras 23 – 25 mostram o tapete celular do grupo controle negativo (sem tratamento) e dos que receberam extratos de *I. subnuda* e *R. dolabripetala*.



**Figura 23** – Fotografia de cultivo celular da linhagem B16-F10, sem tratamento (objetiva de 10x). Observar o tapete celular aderido uniformemente e a boa definição entre as células. Microscópio invertido Olympus® IX70.



**Figura 24** – Fotografia de cultivo celular da linhagem B16-F10, tratadas por 24 horas com extrato de *Inga subnuda* (objetiva de 20x). Observar que o tapete celular não está aderido uniformemente. As setas apontam células mortas. Microscópio invertido Olympus® IX70.



**Figura 25** – Fotografia de cultivo celular da linhagem B16-F10, tratadas por 24 horas com extrato de *Rollinia dolabripetala* (objetiva de 20x). Observar que a delimitação entre as células começam a perder definição. As setas apresentam células mortas. Microscópio invertido Olympus® IX70.

## 6 Discussão

### 6.1 Ensaio fitoquímico preliminar

Pelo ensaio fitoquímico preliminar do extrato de *Inga subnuda*, identificou-se presença de fenóis, taninos, flavanona, flavanonóis antocianinas e antocianidinas, saponinas e antraquinonas (tabela 2). Grande parte desses achados estão em acordo com os resultados de SOUZA *et al.*, 2007. Já o teste com extrato de *Rollinia dolabripetala* demonstrou presença de flavonóis, taninos e xantonas. Esses resultados estão muito abaixo do número de compostos isolados por BRITO *et al.*, (2008) em suas pesquisas, considerando que a planta utilizada pelo pesquisador em questão era de diferente espécie nas da mesma família da planta do nosso estudo. A resposta para essa pergunta pode estar no tipo de solvente usado na extração e/ou no fato de existir pouco ou nenhum estudo dessa planta nessa área. BRITO *et al.* (2008) desenvolveram seu trabalho com folhas de *Annona squamosa* que, apesar de ser da mesma família da *Rollinia dolabripetala* (*Anonaceae*), não expressa condição suficiente para inferir que os padrões fitoquímicos sejam similares. Tanto o extrato de *R. dolabripetala* quanto o de *I. subnuda* apresentaram compostos fenólicos. Entretanto, pelas técnicas utilizadas no presente estudo não é possível elucidar a quantidade ou mesmo estrutura dessa classe de metabólitos. A presença desse metabólito no extrato de *I. subnuda* pode ajudar a entender o bom o resultado antiproliferativo que esse extrato teve. Entretanto, como a maior parte dos resultados anticarcinogênicos das antraquinonas estão relacionados a outros tipos de câncer diferentes do melanoma, não é possível chegar a uma conclusão. Entretanto o fracionamento do extrato e reavaliação da citotoxicidade em cada uma das frações poderá ajudar a esclarecer essa questão. A presença desse metabólito nos dois extratos pode ajudar a explicar a ação bactericida em pelo menos uma cepa bacteriana (figura 12). Entretanto, uso de extratos brutos em ensaios antibacterianos tende a não apresentar bons resultados devido à interação da variedade de metabólitos presentes. Da mesma forma, como algumas classes de taninos tiveram desempenho favorável no combate ao melanoma, possivelmente a

ação citotóxica dos extratos sobre as células B16F10 pode também estar relacionado a esses metabólitos.

Devido ao fato de a naringina e a morina terem desempenhado alguma atividade citotóxica sobre as células B16F10, isso está de acordo com muitos achados da literatura que indicam que essa classe de metabólitos secundários não age unicamente como agente quimiopreventivo (WILLIAMS *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2011; SMALLEY, 2010; FECHER *et al.*, 2008; MANDALÀ & VOIT, 2013). Assim, a presença desses metabólitos secundários nos dois extratos possivelmente corrobora com os resultados citotóxicos nas células de melanoma murino. Entretanto, o fato de o extrato de *I. sbnuda* ter maior variedade de flavonóides que o de *R. dolabripetala* poderia ajudar a explicar sua maior ação antioxidante (tabelas 3 e 4) e, eventualmente, bactericida (tabela 5) que seu par.

Outro achado importante pelo teste fitoquímico preliminar foi a presença de saponinas. Recentes estudos têm indicado a importante ação citotóxica que essa classe de metabólitos tem principalmente relacionada ao câncer humano ou modelos murinos, como os testes *in vitro* com B16F10. Testes com esse metabólito têm mostrado sua ação antiangiogênica em tecidos tumorais através da inibição de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e redução na produção de óxido nítrico (HARIDAS *et al.*, 2009, TUNDIS *et al.*, 2009). Tais resultados são promissores para quadros clínicos de cânceres muito agressivos e com altas taxas de metástase. Assim como observado em flavonóides, a literatura indica que muitas saponinas também são importantes na ativação das caspases 3 e 9 e ativação da cascata das proteínas MAPK, resultando em apoptose (PODOLAK *et al.*, 2010). Assim como a estrutura dos flavonóides, a estrutura das saponinas também está relacionada à sua bioatividade, o que reforça a importância de uma caracterização da estrutura desse composto (PODOLAK *et al.*, 2010).

As xantonas são conhecidas por suas propriedades antimicrobianas, principalmente contra *S. aureus* resistente à metilina (DHARMARATNE *et al.*, 1999; SIMÕES *et al.*, 2002; KIJOA *et al.*, 2000). Isso poderia explicar, em parte, a atividade do extrato de *Rollinia dolabripetala* sobre cepas de *S. aureus* no teste de difusão em ágar. Entretanto, é importante considerar que o halo de inibição apresentou o tamanho

mínimo proposto pela técnica para ser considerado efetivo e sua ação se restringiu a apenas uma das três cepas utilizadas. O fato de, no presente estudo ter, sido utilizado o extrato bruto ao invés de uma fração, poderia explicar esse resultado, em decorrência da interação entre os compostos presentes. Outro ponto importante é que as maiores partes das xantonas naturais são do tipo simples e as que geralmente desempenham alguma atividade biológica tendem a apresentar radicais como metil, hidroxil e prenil (SOOBRAATTEE *et al.* 2005, ; SATO *et al.*, 1992).

É sabido que as xantonas provenientes de espécies de plantas são majoritariamente xantonas simples seguido pelas que apresentam pelo menos um átomo de oxigênio, que pertence a um grupo hidroxila, metoxila ou ambos, ligado diretamente no anel. Pela correlação dos resultados apresentados nas tabelas 2 e 3 supõe-se que a xantona presente no extrato de *Rollinia dolabripetala* possivelmente não apresenta grupo hidroxil. Caso contrário exerceria melhor atividade nos testes antioxidantes. Assim, existe grande possibilidade de o efeito antitumoral desse extrato estar correlacionado a algum tipo de acetogenina. Entretanto, o teste fitoquímico aqui proposto não apresenta nenhuma sensibilidade na identificação desse composto. Em acréscimo, as informações sobre essa espécie de anonácea são vagas, inconclusivas e majoritariamente baseadas no conhecimento popular. Assim, baseado na família a qual essa árvore pertence, podemos apenas supor a sua presença.

## **6.2 Atividade antioxidante**

### **6.2.1 Método do DPPH**

A tabela 3 expressa os resultados da atividade antioxidante pelo método do DPPH. O extrato de *I. subnuda* (67,93%) apresentou atividade antioxidante superior a três vezes o potencial antioxidante que o extrato de *R. dolabripetala* (22,82%) e quase o dobro do controle utilizado (36,70%). Essa característica pode ter relação com a maior variedade de metabólitos secundários (em especial os flavonóides) encontrados na amostra vegetal de *I. subnuda*, em relação aos encontrados na amostra de *R.*

*dolabripetala*. Como os flavonóides apresentam a clássica capacidade de doar íon hidrogênio, uma maior quantidade de doadores presentes na solução promoveria uma maior oxidação do DPPH (agente oxidante). A escolha do *Gingko biloba* como controle é devido ao seu potencial antioxidante popularmente difundido e, por isso, tem sido apresentado em muitos trabalhos que aborda farmacognosia, como um padrão antioxidativo.

### 6.2.2 Método da peroxidação lipídica

A análise do estresse oxidativo por peroxidação lipídica se baseia na determinação de malondialdeído (MDA) devido à sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando uma coloração que pode ser detectada em espectrofotômetro (figura 26).

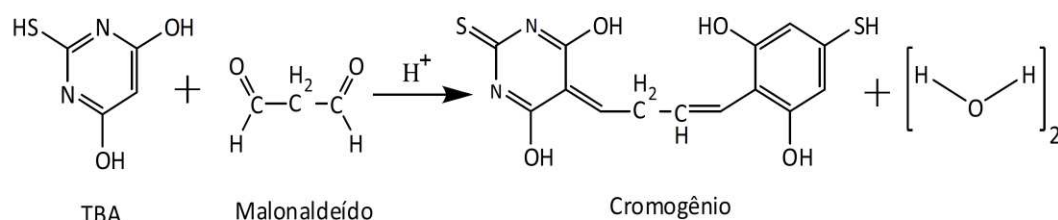


Figura 26 – Reação de formação do complexo MDA – TBA (PEIXE, 2010).

Também nessa técnica o extrato de *I. subnuda* teve desempenho superior ao *Gingko biloba*. Entretanto, foi inferior ao padrão sintético, também utilizado como controle. Esses dados indicam que em uma condição de estresse oxidativo *in vivo* (ex.: excesso de radicais livres por difusão tecidual em caso de patologias como o câncer), o extrato de *Inga subnuda* poderia ter um desempenho até melhor que o fitoterápico *Gingko biloba*. O estresse oxidativo tem efeito diverso na via de sinalização celular, particularmente na cascata da MAP quinase. Mudança nas condições do redox celular pode resultar na ativação de sinalização favorável à apoptose. Em adição, o estresse oxidativo pode afetar a mitocôndria por influenciar a transição do poro mitocondrial (mPT) e/ou promover a liberação do citocromo C que são eventos desencadeantes do processo apoptótico.

Entretanto, quatro fatores importantes devem ser considerados nesse teste: a influência das condições da reação e dos reagentes na resposta ao TBA; a não especificidade do TBA para a reação com o MDA; a não exclusividade do MDA como produto final da lipoperoxidação; a impossibilidade de se distinguir o complexo MDA:TBA dos outros produtos reativos ao TBA por espectrofotometria (JANERO, 1990; BENZIE, 1996). Assim, é de imensa importância que testes complementares sejam feitos principalmente com o fracionamento de ambos os extratos para uma melhor conclusão sobre a atividade antioxidante.

### **6.3 Atividade antibacteriana**

#### **6.3.1 Teste de difusão em ágar**

O teste de difusão em ágar (tabela 5) indicou uma nítida ação bactericida do extrato de *Inga subnuda*. Possivelmente, esse resultado é devido à presença de tanino, antraquinona e flavonóides encontrados nesse extrato.

Como o extrato de *Rollinia dolabripetala* apresentou o diâmetro mínimo do halo de inibição no teste de difusão em ágar, existe a possibilidade dos tipos de xantona e presentes nesse extrato não serem os mais eficazes contra agentes microbianos. É importante também ressaltar que a ação desse extrato se restringiu a apenas a cepa de *S. aureus* utilizada.

#### **6.3.2 Teste da concentração inibitória mínima**

A concentração inibitória mínima encontrada para o extrato de *Inga subnuda* pela metodologia proposta foi de 0,50 mg/mL (figura 13). Esse valor foi cerca de 1.000 vezes maior que o MIC encontrado por KOKJOHN *et al.* (2003) para o ciclopirox amina, fármaco utilizado como controle positivo na técnica de difusão em ágar. Ao analisar o resultado do teste de difusão em ágar, esperava-se que a diferença entre os valores de MIC fosse menor. Nesse caso, devem ser considerados a intensa turbidez e a forte

coloração que as soluções de *Iga subnuda* apresentam, dificultando, assim, uma identificação mais precisa do seu MIC por essa metodologia. Outra possibilidade é a própria diferença metodológica entre a utilizada no presente trabalho e a utilizada por KOKJOHN *et al.* (2003).

## **6.4 Atividade citotóxica**

### **6.4.1 *Inga subnuda***

Analisando os resultados apresentados na tabela 12, verifica-se que o extrato de *Inga subnuda* (89,94% ± 1,41), apesar de ser um extrato bruto, apresentou atividade citotóxica com desempenho muito próximo ao controle 5-FU (91,50% ± 3,06), mesmo em 72 horas de tratamento. A literatura não indica uma classe específica de metabólito isolada dessa planta, que tenha atividade antitumoral. Entretanto, a presença de grande variedade de flavonóides, bem como o indicativo de antraquinona taninos e saponinas poderia explicar o desempenho que esse extrato teve como agente bactericida (tabela 5) e anticarcinogênico, nos três períodos de tratamento (tabelas 9 – 11).

### **6.4.2 *Rollinia dolabripetala***

A atividade citotóxica do extrato de *Rollinia dolabripetala* pode ser associada à presença de tanino ou mesmo acetogeninas. Como apresentado no item 5.2, a presença de xantonas com radical hidroxil possivelmente teria permitido um desempenho maior no teste do DPPH, gerando, assim, dúvidas sobre o tipo presente no extrato. Como é essa mesma variação no anel aromático da estrutura das xantonas que promove uma ação mais eficaz no combate a células tumorais, dúvidas são formadas sobre sua real ação citotóxica. Todavia, nada pode ser concluído sem um estudo da estrutura molecular desse composto polifenólico. Apesar de todas as evidências que apontam a acetogenina como principal agente citotóxico a células tumorais nesse extrato, o presente estudo não pode promover essa conclusão. As

técnicas utilizadas não são adequadas para esse propósito, bem como o tipo de extrato não permite essa análise. Entretanto, os resultados desse estudo têm grande importância, uma vez que esse extrato promoveu a maior ação citotóxica sobre células tumorais de melanoma murino no tempo de 48 horas (figura 22).

### 6.4.3 1,7-dihidroxixantona

A 1,7-dihidroxixantona (figura 27) desempenhou relevante papel citotóxico quando testada na linhagem de melanoma murino, apesar de ter atingido o menor patamar entre as substâncias testadas. A presença de grupos OH, bem como sua disposição na molécula é uma possível resposta para esse achado. Segundo SANTOS *et al.* (2011), grupos hidroxil nas posições meta e para, em qualquer um dos dois anéis fenil, conferem aumento na reatividade antioxidante das xantonas. Assim, a posição e/ou número de grupos OH na estrutura são condições determinantes para uma maior eficácia desse metabólito, seja como antioxidante, bactericida ou mesmo agente citotóxico em células tumorais.

Apesar de, dentre as substâncias testadas, esta ter sido a de menor ação citotóxica (figura 22), nossos resultados estão de acordo com a literatura. PEDRO *et al.* (2002), em sua pesquisa, testaram várias xantonas oxigenadas em comparação à xantona não oxigenada. Como resultado, a xantona não oxigenada teve resultado menos significativo em relação a 1,7-dihidroxixantona. Entretanto, esta variedade de xantona oxigenada não teve, também, boa citotoxicidade contra células tumorais.

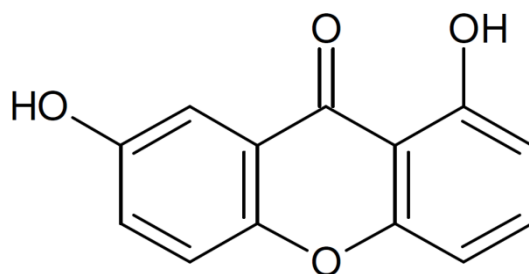


Figura 27 - Esquema representando a estrutura da 1,7-dihidroxixantona (XIAO *et al.*, 2008).

#### 6.4.4 Morina

A morina é um flavonóide com conhecida ação anticarcinogênica. Possivelmente a ação moduladora da atividade de algumas enzimas metabólicas incluindo o citocromo P450 seja a de maior valor para o presente estudo. Como se trata de uma linhagem de células transformadas, a ação quimiopreventiva associada a esse flavonóide não promoveria uma resposta como a observada na figura 22. Entretanto, a concentração mínima necessária para se promover um efeito citotóxico põe em xeque a viabilidade desse composto em modelos de tratamento *in vivo* para essa patologia. Segundo MITSCHER *et al.* (1972), um composto puro que não apresente atividade biológica até a concentração de 100µg/mL, dificilmente será empregado para uso clínico, devido á grande concentração necessária para que ele exerça sua atividade biológica.

#### 6.4.5 5-Fluoracil

Os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer são originalmente sintéticos, semi-sintéticos ou naturais, sendo divididos em cinco classes diferentes, agentes alquilantes, antimetabólitos, produtos naturais, agentes diversos e hormônios e antagonistas (GILMAN *et al.*, 2005).

O 5-FU é um importante antitumoral da classe dos antimetabólitos, utilizado em pacientes em tratamento quimioterápico. Apesar de sua ação em modelo celular de melanoma murino, ele não é o mais indicado para o tratamento do melanoma, e sim de outros cânceres, como o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Isso explica o motivo de seu maior efeito citotóxico não ter atingido 100%, mesmo tendo concentrações cerca de cinco mil vezes maiores que seu  $IG_{50}$  como as consideradas mais efetivas.

Como já mencionado anteriormente, o parâmetro de atividade, considera-se como potente atividade antineoplásica os compostos que apresentarem  $GI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ . Tal informação ressalta o papel do fármaco em questão como agente antitumoral. Por outro lado, também reforça a possibilidade de novos estudos com o extrato de *I. Subnuda*, em decorrência da sua atividade citotóxica comparada a este fármaco. Os agentes

quimioterápicos que têm sido amplamente utilizados no tratamento do melanoma metastático são agentes alquilantes (dacarbazina), análogos da platina, nitrosouréias (fotemustina) e toxinas tubulares (vinblastina) (LOTZE *et al.*, 2001). Assim, esses fármacos seriam mais adequados para serem usados como controle.

## 7 CONCLUSÕES

- A atividade antioxidante, observada na concentração 5,0 µg/mL pelo método de DPPH, foi de 67,93% em *I. subnuda* e de 22,82% em *R. dolabripetala*. Já pelo método de lipoperoxidação, em *I. subnuda*, 34,28%, e *R. dolabripetala*, 24,78%. Nos dois casos, o extrato de *I. subnuda* apresentou atividade antioxidante estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ) que os extratos de *Gingko biloba* (controle) e de *R. dolabripetala*;
- O extrato de *I. subnuda* possui atividade bactericida contra as cepas bacterianas *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 4075, *S. bovis* 01 . Já o extrato de *R. dolabripetala* possui atividade apenas contra *S. aureus* ATCC 29213. A concentração inibitória mínima em cultivo de *S. aureus* ATCC 29213, para o extrato de *I. subnuda*, foi de 0,50 mg/mL;
- A menor concentração letal mínima, GI<sub>50</sub>, das substâncias testadas foi desempenhada pela 1,7-dihidroxixantona. Entretanto, os melhores resultados nos tempos de tratamento (24, 48 e 72 horas) foi promovido pelo extrato de *I. subnuda*, principalmente no período de 24 horas (78,13 µg/mL);
- Os achados do presente estudo sugerem uma promissora possibilidade do uso do extrato de *I. subnuda* em formulações para tratamento *in vivo* do câncer e em formulações tópicas que tenham, entre outros intuitos, ações anti-sépticas. Este modelo de projeto não permite conclusões detalhadas sobre qual tipo metabólito presente nos de extratos de *I. subnuda* e *R. dolabripetala* são mais ativos para cada um dos testes realizados. Dessa forma, estudos posteriores envolvendo fracionamento do extrato e uso de técnicas como cromatografia em camana delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ajudarão a esclarecer alguns pontos relacionados às promissoras atividades biológicas dos extratos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; VIALA, C.; REMESY, C.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochem. Pharmacol.** v.53, p. 1649-1657, 1997.

AKAO, Y.; NAKAGAWA, Y.; LINUMA, M.; NOZAWA, Y. Anti-Cancer Effects of Xanthones from Pericarps of Mangosteen **Int. J. Mol. Sci.** v.9, p. 355-370, 2008

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula.** 4º ed., p. 1313-1362, 2004.

ALBUQUERQUE, I.O., **Citotoxicidade *In Vitro* da Terapia Fotodinâmica com Alumínio Clor-Ftalacianina Lipossomal em Melanoma Murino (B16F10).** 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, 2008.

ALIMENTOS FUNCIONAIS... O Maravilhoso Mundo dos Nutracêuticos. Revista Aditivos e Ingredientes. n. 17, p. 38-56, Nov/Dez 2001.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C. B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com DNA: uma introdução. **Química Nova.** v. 8(1), p. 118-129, 2005.

ARAÚJO, M.G.F.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (*Solanaceae*) **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v.31(2), p.205-209, 2010.

ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.81, p.317S–325S, 2005.

BACHELOR, M.A.; BOWDEN, G.T. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. **Semin. Câncer Biol.**, v.14, p.131-138, 2004.

BALCH, C.M.; GERSHENWALD, J.E.; SOONG, S.J.; THOMPSON, J.F.; ATKINS, M.B.; BYRD, D.R.; *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol.** v.27(36), p.199-206, 2009,

BALCH, C.M.; SOONG, S.J.; GERSHENWALD, J.E.; THOMPSON, J.F.; REINTGEN, D.S.; CASCINELLI, N.; URIST, M.; MCMASTERS, K.M.; ROSS, M.I.; KIRKWOOD, J.M.; ATKINS, M.B.; THOMPSON, J.A.; COIT, D.G.; BYRD, D.; DESMOND, R.; ZHANG, Y.; LIU, P.Y.; LYMAN, G.H.; MORABITO, A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. **J. Clin. Oncol.** v.19, p 3622-3634, 2001.

BALIGA, M.S.; KATIYAR, S.K. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. **Photochem Photobiol Sci** v.5, p.243–253, 2006.

BARBER, M. Methicillin-resistant staphylococci. **J Clin Pathol**; v.14, p.385-93, 1961.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, M. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica nova**, v.9, n1, p.113-123, 2006.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut**, v.47, p.233-261, 1996.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica** 5º ed. 2004.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Nat. Prod. Rep.**, v.22, n.2, p.269-303, 2005.

BOEGE, F.; STRAUB, T.; KEHR, A.; BOESENBERG, C.; CHRISTIANSEN, K.; ANDERSEN, A.; JAKOB, F.; KOHRLE, J. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. **J. Biol. Chem.** v.271 p.262-2270, 1996.

BONDAR, V.M.; SWEENEY-GOTSCH, B.; ANDREEFF, M.; MILLS, G.B.; MCCONKEY, D.J. Inhibition of the Phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT Pathway Induces Apoptosis in Pancreatic Carcinoma Cells in Vitro and In Vivo. **Molecular Cancer Therapeutics.** v.1, p. 989-997, 2002.

BREVOORT, P. The booming US botanical market – a new overview. **HerbalGram**, p. 44, v. 33-46, 1998.

BRITO, H.O.; NORONHA, E.P.; MARTINS, L.M. França. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). **Rev. Bras. Farm.**, v.89, n.3, p.180-184, 2008.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-310, 1978.

BVSMS - Biblioteca Virtual em saúde. Ministério da saúde. Disponível em: [http://BVSMS.saude.gov.br/bvs/controle\\_cancer/pub\\_palestras\\_congresso\\_nutricao.php](http://BVSMS.saude.gov.br/bvs/controle_cancer/pub_palestras_congresso_nutricao.php). Acesso em 16 de Jul 2013.

CESPEDES, C.; El-Hafidi, I.M.; Pavon, N.; Alarcon, J. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean black berry *Aristotelia chilensis* (*Elaeocarpaceae*), Maqui. **Food Chemistry**. v.107, p.820-829, 2008.

Ciclopirox olamina - Bulário MEDLEY. Disponível em: [http://www.MEDLEY.com.br/portal/bula/ciclopirox\\_olamina\\_sol\\_topica.pdf](http://www.MEDLEY.com.br/portal/bula/ciclopirox_olamina_sol_topica.pdf). Acesso em: 20 Jun 2013.

CLSI, M7-A6 - NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. CLSI Wayne, PA., 2003

COOPER, G.M. A célula – uma abordagem molecular. 2ed. Artmed, Porto Alegre, p.633-669, 2001.

CORRÊA, R.S. **Xantonas oxigenadas bioativas: cristalização, estrutura e suas interações intra e intermoleculares**. 2009. 182f. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade de São Paulo, 2009

CORREA, S.M.V.; CONSERVA, L.M.; MAIA, J.G.S. Constituents of roots of *Inga edulis* var. parviflora. **Fitoterapia**, v. 66, n.4, p.379, 1995

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.

DATA SUS – DATA SUS, informações de saúde (TABNET). Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>. Acesso em: 16 Jul 2013.

DE ALMEIDA SILVA, H.; STEFFEN ABDALLAH, V.O.; CARNEIRO, C.Lm. GONTIJO, P.P. Infection and colonization by *Staphylococcus aureus* in a high risk nursery of a Brazilian teaching hospital. **Braz J Infect Dis**. v.7(6): 381-6, 2003

DE GRUIJL, F.R.; VAN DER LEUN, J.C.; Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of a stratospheric ozone depletion. **Health Phys.** v.67, p.319-325, 1994.

DE MARTINO, L.; MENCHERINI, T.; MANCINI, E; AQUINO, R.P.; DE ALMEIDA, L.F.R.; DE FEO, V. *In Vitro* Phytotoxicity and Antioxidant Activity of Selected Flavonoids. **Int. J. Mol. Sci.** v.13(5), p.5406-5419, 2012.

DEVLIN, T.M. Manual de Bioquímica Química com Correlações Clínicas. São Paulo: Editora Blücher; p.1186, 2007.

DHARMARATNE, H.R., WIJENGHE, W.M., THEVANASEM, V. Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum* species, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, n.3, p.339-342, 1999.

DIGIOVANNI, J: Multistage carcinogenesis in mouse skin. **Pharmacol Ther** v.54, p.63-128, 1992.

ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCIA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for food stuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.48, p.1588-1592, 2000.

INCA – ESTIMATIVA 2012 – Incidência de Câncer no Brasil – INCA. Disponível em: <<http://www1.INCA.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em: 26 Maio 2012.

FECHER, L.A.; AMARAVADI, R.K.; FLAHERTY, K.T. The MAPK pathway in melanoma. **Curr Opin Oncol.** v 20(2), p.183-189, 2008.

FEIL, E.J.; COOPER, J.E.; GRUNDMANN, H.; ROBINSON, D.A.; ENRIGHT, M.C.; BERENDT, T.; PEACOCK, S.J.; SMITH, J.M.; MURPHY, M.; SPRATT, B.G.; MOORE, C.E.; DAY, N.P. How clonal is *Staphylococcus aureus*? **J Bacteriol.** v.185(11), 3307-16, 2003.

FERNANDES, M.J.B.; LIMAS, C.; ROSSI, M.H.; GONÇALVES, E.; SIMONI, I.C. Cytotoxicity of subfractions and compounds from *Polymnia sonchifolia*. **Braz. J. Microbiol.**, v.36, p.338-341, 2005.

FERNANDES, T.T.; FERNANDES, A. T.S.; PIMENTA, S.C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 113-122, 2005.

**FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. Oncologia Molecular.** Editora Atheneu. p.105-112. São Paulo. 2004

FERRIOLA, P.C.; CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr Protein kinase C inhibition by plant flavonoids: kinetic mechanisms and structure-activity relationships. **Biochem. Pharmacol.** v.38, p.1617-1624; 1989.

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

FRESHNEY, I.R. Culture of animal cells: a manual of basic techniques. (149-177) 4<sup>th</sup> ed. United States of America: Willey-Liss, Cap.11, 2000.

GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; GRATACAP, M-P.; TULLIEZ, J.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-Kinase. **General Pharmacology**, v.32, p.279-286, 1999.

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. As bases farmacológicas da terapêutica. (Ed.: Goodman & GILMAN), 10ed., p.502-22. Rio de Janeiro. 2005

GODEVAC, D., VUJISIC, L., MOJOVIC, M., IGNJATOVIC, A., SPASOJEVIC, I., VAJS, V. Evaluation of antioxidant capacity of *Allium ursinum* L. volatile oil and its effect on membrane fluidity. **Food Chemistry**. v.107, p.1692-1700, 2008.

GUPTA, A.K.; PLOT, T. Ciclopirox: a broad-spectrum antifungal with antibacterial and anti-inflammatory properties. **Internationa Journal of Dermatology**. v.43, Suppl.1, p.3-8, 2004.

HARIDAS, V.; NISHIMURA, G.; XU, Z-X.; *et al.* Avicin D: a protein reactive plant isopRENoid dephosphorylates Stat 3 by regulating both kinase and phosphatase activities. **PLoS One** ., v.5, p.1–13, 2009

HARLEV, E.; NEVO, E.; LANSKY, E.P.; OFIR, E.; BISHAYEE, A. Anticancer Potential of Aloes: Antioxidant, Antiproliferative, and Immunostimulatory Attributes **Planta Med**, v.78(09), p.843-852, 2012.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therap.**, New York, v.96, p.67-202, 2002.

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

HSU, Y.L.; KUO, P.L.; LIN, C.C Acacetin inhibits the proliferation of HepG2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, v.67, p. 823-829, 2004.

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.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biol. Med.**, v.9, p.515-540, 1990.

JUNIOR, J.M.S. **Atividade Antitumoral da Ddihidrocucurbitacina B, um Composto Isolado de *Wilbrandia ebracteata* Cogn: estudos *in vitro* e *in vivo***. 2007. 114f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

DE KAPOOR, R; KAKKAR, P. Protective Role of Morin, a Flavonoid, against High Glucose Induced Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Primary Rat Hepatocytes **PLoS One** v.7(8); 2012.

KATIYAR, S.K.; ELMETS, C.A. Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection (Review). **Int J Oncol**. v. 18: p. 1307-1313. 3, 2001.

KATIYAR, S.; ELMETS, C.A.; KATIYAR, S.K. Green tea and skin câncer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. **J. Nutr. Biochem.**, v. 18 p. 287-296, 2007.

KATZUNG, BERTRAM G. Farmacologia básica e clínica. 10.ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007.

KELLOFF, G.J., BOONE, C.W., STEELE, V.E., FAY, J.R., LUBET, R.A., CROWELL, J.A., SIGMAN, C.C. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development, **J. Cell Biochem.**, v. 20, p. 1–24, 1994.

KELLOFF, G.J., CROWELL, J.A., STEELE, V.E., LUBET, R.A., MALONE, W.A., BOONE, C.W., KOPELOVICH, L., HAWK, E.T., LIEBERMAN, R., 33 LAWRENCEE, J.A., ALI, L., VINER, J.L., SIGMAN, C.C. Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. **J. Nutr.**, v. 130, 467s-71s, 2000.

KIJOA, A.; GONZALEZ, M.J.; AFONSO, C.M.; PINTO, M.M.M.; ANANTACHOKE, C.; SILVA, A.M.S.; HERZ, W. Xanthones from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 833-836, 2000.

KIM, S.H.; ZO, J.H.; KIM, M.A.; HWANG, K.K.; CHAE, I.H.; KIM, H.S.; KIM, C.H.; SOHN, D.W.; OH, B.H.; LEE, M.M. Naringin suppresses the mitogenic effects of lysophosphatidylcholine on vascular smooth muscle cells, *Nutr. Res.* 23 p. 1671–1683, 2003.

KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R. Concepts of genetics 5ed PREntice hall Inc, Upper saddle River, New Jersey. **Genetics and Cancer**. V. 21, p. 591-613,1983.

KOKJOHN, K.; BRADLEY, M.; GRIFFITHS, B. Evaluation of in vivo activity of Ciclopiroxolamine, butenafine HCl and econazole nitrate against dermatophytes, yeasts and bacteria. *International Journal of Dermatology*, v. 42, p. 11-17, 2003.

KRUTMANN, J. The role of UVA rays in skin aging. **Eur. J. Dermatol.** V. 11, p. 170-171, 2001.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. Robbins & Cotran Patologia: bases patológicas das doenças. 7ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.

LEBOUEF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v.21, p.2783-2813, 1982.

LECHNER, D.; STAVRI, M.; OLUWATUYI, M.; PEREDA-MIRANDA, R.; GIBBONS, S. The anti-staphylococcal activity of *Angelica dahurica* (Bai Zhi). **Phytochemistry**. v.65, p.331-335, 2004.

LEE, Y-S.; CHOI, K-M.; CHOI, M.-H.; JI, S-Y.; LEE, S.; SIN, D-M.; OH, K-W.; LEE, Y-M.; HONG, J-T.; YUN, Y-P.; YOO, H-S. Serine palmitoyltransferase inhibitor myriocin induces growth inhibition of B16F10 melanoma cells through G<sub>2</sub>/M phase arrest. **Cell Proliferation**. v.44, p.320–329, 2011.

LEITE, J.P.V. Química dos Produtos Naturais: Uma Abordagem Biossintética. In: \_\_\_\_\_ (Ed.) **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**. Cap. 3, p. 47-97. Ed. Atheneu. 2009.

LIAW, C.C.; WU, T.Y.; CHANG, F.R.; WU, Y.C. Acetogenins from the Chemical Bench to Preclinical Trials. **Planta Med**. V.76: p.1390-1404, 2010.

LIVERMORE, D.M. Antibiotic resistance in staphylococci. **Int J Antimicrob Agents**. v16 Sup, 1:S3-10. 2000.

LONGLEY, D.B.; HARKIN, D.P.; JOHNSTON, P.G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Rev. Cancer**, v.3, p. 330–338, 2003.

LOTZE, M.T.; DALLAL, R.M.; KIRKWOOD, J.M.; FLICKINGER, J.C. Melanoma: Cutaneous melanoma. (editors: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A) In: **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, 6ed., Philadelphia, Pa: Lippincott WILLIAMS & Wilkins ; 2001.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **N Engl J Med**. v.339(8), 520-32, 1998.

LU, C.; WANG, H.; LV, W.; XU, P.; ZHU, J.; XIE, J.; LIU, B.; LOU, Z. Antibacterial properties of anthraquinones extracted from rhubarb against *Aeromonas hydrophila*. **Fisheries Science**. v.77(3), p.375-384, 2011

LUVIZON, A.C. **Modulação fenotípica induzida por guanosina em modelo de melanoma murino (B16F10)**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MACDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G.; GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **J. Sci. Food Agric**. V.86, p.2046–2056, 2006.

MANDALÀ, M.; VOIT, C. Targeting BRAF in melanoma: Biological and clinical challenges. **Crit Rev Oncol/Hematol**. v.29-2(13), S1040-8428, 2013,

MATOS, F.J. Introdução à fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC; 1997. 141p.

MATSUMOTO, K.; AKAO, Y.; YI, H.; OHGUCHI, K.; ITO, T.; TANAKA, T.; KOBAYASHI, E.; IINUMA, M.; NOZAWA, Y. Preferential target is mitochondria in  $\alpha$ -mangostin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. **Bioorg. Med. Chem**. v.12, p.5799-5806, 2004

MENDOZA-WILSON, A.M.; SANTACRUZ-ORTEGA, H.; BALANDRÁN-QUINTANA, R.R. Relationship between structure, properties, and the radical scavenging activity of morin. **J. Mol. Struct**. 995:134–141, 2011.

MITSCHER, L.A.; LEU, R.P.; BARTHALA, M.S.; WU-NAN, W.; BEAL, J.L. Antimicrobial agents from higher plants. **Lloydia**, v. 35, p. 157-166, 1972

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L., AMORIM, E.L.C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, n.5, p. 2005.

MOSBY'S DRUG CONSULT, Mosby, Inc. An Imprint of Elsevier Science St Louis, 2002.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and survival: Application to Proliferation and cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v65, p55, 1983.

MUKHTAR, H.; ELMETS, C.A. Photocarcinogenesis: Mechanisms, models and human health implications. **Photochem Photobiol.** 1996;63:355–447

NAFISI, S.H.; SHADALOI, A.; FEIZBAKSH, A., TAJMIR-RIahi, H.A. RNA binding to antioxidant flavonoids. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v.94, p.1–7, 2009

NAKAMURA, D.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sci.** v.70, p.791-798, 2002.

NCI. Nacional Cancer Institute. Disponível em: <http://www.cancer.gov/>. Acesso em 16 de julho de 2013.

NEUSS, N.; GORMAN, M.; HARGROVE, W.; CONE, N.J.; BIEMANN, K.; BUECHI, G. Manning RE. Vinca alkaloids. XXI. The structures of the oncolytic alkaloids vinblastine (VLB) and vincristine (VCR). **J Am Chem Soc.** v.86, p.1440–1442, 1964.

NONN, L.; DUONG, D.; PEEHL, D. M. Chemopreventive anti-inflammatory activities of curcumin and other phytochemicals mediated by MAP kinase phosphatase-5 in prostate cells. **Carcinogenesis** v.28(6), p1188-96, 2007

NOORDHUIS P.; HOLWERA U.; VAN DER WILT C.L.; VAN GROENINGEN C.J.; SMID K.; MEIJER S.; PINEDO H.M.; PETERS G.J. 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to Thymidilate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**. v.15, p.1025-1032, 2004.

OLIVEIRA, I.R.N. **Antocianinas Extraídas de Capim-gordura (Melinis minutiflora): Atividade antioxidante, microencapsulamento por atomização e estabilidade**. 2010. 162f. Dissertação. (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

PASTERNAK J.J. Genética Molecular Humana - Mecanismos das Doenças Hereditárias. Barueri: Manole, 2002

PEDRO, M.; CERQUEIRA, F.; SOUSA, M. E.; NASCIMENTO, M. S. J.; PINTO, M. Xanthones as Inhibitors of Growth of Human Cancer Cell Lines and Their Effects on the Proliferation of Human Lymphocytes In Vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v.10, p.3725–3730, 2002.

PERES, V.; NAGEM, T.J.; DE OLIVEIRA, F.F. Tetraoxygenated naturally occurring xanthones. **Phytochemistry**, v.55, n.7, p.683-710, 2000.

PEREZ, L.R.; ANTUNES, A.L; BARTH, A.L; D'AZEVEDO, P.A. Variations of agar screen tests for detection of methicillin resistance in staphylococci: focus on cefoxitin. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v.26(4), 267-70, 2007.

PINNELL, S.R. Photodamage and Oxidative Stress and Protection Provided by Topical Antioxidants. **J. Am. Acad. Dermatol**. v.48, p.1–19, 2003.

PODOLAK, I.; GALANTY, A.; SOBOLEWSKA, D. Saponins as cytotoxic agents: a review. **Phytochem Ver**. v.9, p.425–474, 2010.

PRANCE, G.T.; SILVA, M.F. Árvores de Manaus. **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**. 312 p. 1975.

PUKALSKAS, A.; BEEK, T. A. V.; VENSKUTONIS, R. P.; LINSSEN, J. P. H.; VELDHUIZEN, A. V.; DE GROOT, A. Identification of radical scavengers in sweet grass (*hierochioeodorata*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.50, p.2914 – 2919, 2002.

PURI, M; BANERJEE, U.C.; Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase, **Biotech. Adv.** v.18, p.207–217, 2000.

RASAI, S; GEORGE, A.P.; KANTHARAJAH, A.S. Tissue culture of Annona spp.(cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): A review. **Scientia Horticulturae**. v.62, p.1-14, 1995.

RAVELO, A.G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; CHÁVEZ-ORELLANA, H.; PÉREZ-SACAU, E.; MESA-SIVERIO, D. Recent studies on natural products as anticancer agents. **CurREnt Topics in Medicinal Chemistry**. v.4, p.1-25, 2004.

REN, W.; QIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.; ZHANG, L. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. **Medicinal Research Reviews**, v.23, p.519-534, 2003.

RÉUS, M. **Desenvolvimento e avaliação biofarmacêutica de sistemas coloidais como carreadores para a administração ocular do agente antitumoral 5-fluorouracil**. 2006. 105f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Estadual de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

ROCHA, L.M; MOREIRA, L.M.A. Diagnóstico laboratorial do albinismo oculocutâneo. **J Bras Patol Med Lab**. v.43(1), p.25-30, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURO-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH•+. **Comunicado Técnico on line**. ISSN 1679-6535. 2007

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C. SENTRY antimicrobial surveillance program report: latin american and brazilian results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis**. v.8(1): 25-79, 2004.

SANTOS, C.M.M.; SILVA, A.M. S. FELIPE, P.; SANTUS, R.; PATTERSON, L.K.; MAZIÈRE, J-C.; CAVALEIROA, J.A.S.; MORLIÈRE, P.; Structure–activity relationships in hydroxy-2,3-diaryl-xanthone antioxidants. Fast kinetics spectroscopy as a tool to evaluate the potential for antioxidant activity in biological systems. **Org. Biomol. Chem**. v.9, p.3965-3974, 2011.

SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, v. 55, p. 567-573, 2000.

SATO, T.; KAWAMOTO, A.; TAMURA, A.; TATSUMI, Y.; FUJII, T. Mechanism of antioxidant action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthonoid). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v.40, n.3, p.721-724, 1992.

SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES CMO *et al*. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFSC, p.291, 1999.

SHIN, D-H.; KIM, O-H; JUN, H-S., KANG, M-K. Inhibitory effect of capsaicin on B16-F10 melanoma cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/Rac1 signal pathway. **Experimental and Molecular Medicine**, v.40, n.5, p.486-494, 2008.

SILVA, T.H.A.; BURETA, A.P.; LEAL, D.H.S.; ALVES, R.J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina  $\alpha_3\beta_1$ . **Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas**. 43(1). 2007.

SIMÕES, C..M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed. Porto Alegre/Florianópolis:Editora Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2002.

SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, MONKS A, MCMAHON J, VISTICA D, WARREN JT, BOKESCH H, KENNEY S, BOYD MR. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. **Journal of The National Cancer Institute**. V.2(13), p.1107-1112, 1990.

SMALLEY, K.S. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. **J Invest Dermatol**. v.130(1), p.28-37, 2010.

SMITH, P.F., MACLENNAN, K., DARLINGTON, C.L. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to plateletactivating factor (PAF). **J. Ethnopharmacol.**, v. 50, p. 131-9, 1996.

SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutat Res**. v.579, n.1-2, p.200-213, 2005.

SORIANI, M.; RICE-EVANS, C.; TYRRELL, R. M. Modulation of the UVA activation of haem oxygenase, collagenase and cyclooxygenase gene expression by epigallocatechin in human skin cells. **FEBS Lett**. 439:253–257; 1998.

SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; SILVA, M.N.; ARRUDA, M.S.P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves **J. Braz. Chem. Soc**. v.18, n.6, pp.1276-1280, 2007.

SPENCER, J.P.E.; KUHNLE, G.G.; WILLIAMS, R.J.; RICE-EVANS, C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. **Biochem. J.** v.372 p.173– 181, 2003.

SUGGITT, M.; BIBBY, M.C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to targetdriven approaches. **Clinical Cancer Research.** v.11, p.971-981, 2005.

SUKPONDMA, Y.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S. Antibacterial caged-tetrapRENylated xanthenes from the fruits of *Garcinia hanburyi*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.53, n.7, p.850-852, 2005.

SURH, Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews**, v.3, p.768-79, 2003.

SURH, Y. J. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. **Mutat Res**, v.428, p.305–327, 1999.

TUNDIS, R.; BONESI, M.; DEGUIN, B.; LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F.; CONFORTI, F.; TILLEQUIN, F.; MENICHINI, F. Cytotoxic activity and inhibitory effect on nitric oxide production of triterpene saponins from the roots of *Physospermum verticillatum* (Waldst & Kit) (*Apiaceae*). **Bioorg Med Chem**, v.17, p.4542–4547, 2009.

VAGNER, H. Pesquisa fitomédica no novo milênio: tendências e mudanças. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. (orgs.) 2. ed. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí: Univali, 2009. p. 35-49.

VIEIRA, L. M. M.; KIJJOA, A. Naturally-occurring xanthenes: recent developments. **CurREnt Medicinal Chemistry**, v.12, n.21, p.2413-2446, 2005.

VILLO, P. Synthesis of Acetogenin Analogues. 2008, 47p. Master (Master Thesis in organic chemistry) - Univesity of Tartu, Tartu, 2008

WALL, M.E.; WANI, M.C.; COOK, C.E.; PALMER, K.H.; MCPHAIL, A.T.; SIM, G.A. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J Am Chem Soc**, v.88, p.3888–3890, 1966.

WANG, L.Q.; MIN, B.S.; LI, Y.; NAKAMURA, N.; QIN, G.W.; LI, C.J.; HATTORI, M. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10,p.561-565, 2002.

WANG, S.Q.; SETLOW, R.; BERWICK, M.; POLSKY, D.; MARGHOOB, A.A.; KOPF, A.W.; BART, R.S. Ultraviolet A and melanoma: a review. **J Am Acad Dermatol.**, v.44, p.837–846, 2001.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A.T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J Am Chem Soc**, v.93, p.2325–2327, 1971.

WATTEMBERG, L.W. Inhibition of carcinogenesis by minor nutrients constituents of the diet. **Proc. Nutr. Society**, v.49, p.173-83, 1990.

WHO - Fact sheet: câncer . Disponível em: <http://www.WHO.int/topics/cancer/en/>. Acesso em 14 de Março de 2013

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? **Free Radical Biol Med.**, v.36, p. 838–849, 2004.

WOŹNICKA, E.; KUŹNIAR, A.; NOWAK, D.; NYKIEL, E.; KOPACZ, M.; GRUSZECKA, J.; GOLEC, K. Comparative study on the antibacterial activity of some flavonoids and their sulfonic derivatives. **Acta Pol Pharm.**, v.70(3), p.567-71, 2013.

XIAO, Z.Y.; SHIU, W.K.P.; ZENG, Y.H.; MU, Q.; GIBBONS, S. A naturally occurring inhibitory agent from *Hypericum sampsonii* with activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutical Biology**, v.46, n.4, p.250-253, 2008.

YU, Z.; LI, W.; LIU, F. Inhibition and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. **Cancer Letters**, v. 215, p. 159-166, 2004.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim Nova.**, v.24(1), p.147-152, 2001.

