

PATRÍCIA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO

**ESTUDO QUÍMICO DAS RAÍZES DE *GALIANTHE THALICTROIDES*
(RUBIACEAE) GUIADO PELA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO*
FRENTE A LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS**

CAMPO GRANDE

2010

PATRÍCIA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO

**ESTUDO QUÍMICO DAS RAÍZES DE *GALIANTHE THALICTROIDES*
(RUBIACEAE) GUIADO PELA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO*
FRENTE A LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS**

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

Orientador: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez

Colaboradora: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Cepa Matos

CAMPO GRANDE

2010

Aos meus pais,

*Paulo Roberto de Figueiredo e Olga Teresinha de Oliveira Figueiredo,
os orientadores da minha vida, em reconhecimento ao esforço e
dedicação em favor da minha educação.*

Aos meus irmãos,

*Aline de Oliveira Figueiredo e Vinícius de Oliveira Figueiredo, pelo
amor, amizade e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus:

Por ter me dado as condições físicas e psicológicas para que eu chegasse até aqui;

Por ter me dado uma família amorosa que incentivou e investiu na minha educação;

Por ter colocado no meu caminho pessoas especiais e imprescindíveis para a realização e conclusão desta jornada.

A essas pessoas, abaixo citadas, também deixo o meu **MUITO OBRIGADA** em sinal do merecido reconhecimento de seus esforços.

Ao Prof. Dr. Walmir Silva Garcez, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, apoio e amizade;

À Luzinátia Ramos Soares, pelo apoio e incentivo, pelos ensinamentos (foram tantos!) e, acima de tudo, pela valiosa amizade. Por mais belas que sejam as palavras aqui escritas, serão insuficientes para expressar minha gratidão e meu carinho por você;

À Alene Cortes de Queiroz e Silva, pelo auxílio na execução de algumas etapas deste trabalho e pela agradável companhia e amizade;

À Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Cepa Matos, pelos conhecimentos transmitidos e pela colaboração na realização deste trabalho. Agradeço também às suas alunas Renata Trentin Perdomo (aluna de doutorado) e Lyara Meira Marinho Queiróz (aluna de iniciação científica);

À Ana Lúcia Batista, pela paciência e disposição em me ensinar os ensaios de avaliação antifúngica e antibacteriana. Sua contribuição foi fundamental!

À Prof^a. Dr^a. Marilene Rodrigues Chang por conceder a estrutura de seu laboratório de pesquisas para a realização dos ensaios antimicrobianos;

À Prof^a.Dr^a. Fernanda Rodrigues Garcez, à Prof^a. Dr^a. Lidilhone Hamerski e ao Prof. Dr. Joaquim Corsino, pela colaboração;

Ao pesquisador Airton José Silva Garcez, que realizou a coleta das raízes de *Galianthe thalictroides* e ao Prof. Dr. Arnildo Pott, pela identificação da planta;

À técnica Luciana Marçal Ravaglia, ao Prof. Dr. Joaquim Corsino e ao Prof. Dr. Walmir Silva Garcez, que realizaram os experimentos de RMN;

Ao técnico Luíz Leonardo de Souza Viana, que realizou os experimentos de espectrometria de massas e de espectroscopia de infravermelho;

À Edilene Delphino Rodrigues, pelo apoio (técnico e psicológico!) e amizade;

À minha irmã Aline de Oliveira Figueiredo, pelas caronas, pela paciência de me esperar no carro por períodos de tempo muitas vezes “consideráveis” quando eu estava terminando algum procedimento no laboratório e por me ajudar nos ensaios de quantificação de taninos;

À Fabiana Mesquita Roesse, querida amiga, por todos os momentos de apoio durante a realização deste trabalho e, principalmente, pela sua valiosa amizade;

Ao Brunno Benites Barbosa, pelo amor, companheirismo, apoio e (muita!) paciência;

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela estrutura e a todos os professores da pós-graduação, pelos ensinamentos ministrados nas disciplinas;

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela estrutura e pelo ambiente de convivência tão agradável;

A todos os colegas do LP-1, pelo companheirismo, pela troca de experiências e pela agradável convivência;

À CAPES, pela bolsa concedida e ao CNPq, pelo suporte financeiro ao laboratório LP-1;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho.

Muito obrigada!

Deixar tudo nas mãos de Deus não significa deixar as coisas correrem sem desempenharmos a nossa parte na suposição de que Deus fará tudo por nós.

Mokiti Okada

RESUMO

Figueiredo PO. **Estudo químico das raízes de *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae) guiado pela atividade citotóxica *in vitro* frente a linhagens de células tumorais.** Campo Grande; 2010. [Dissertação – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O Cerrado, o mais brasileiro dos biomas sul-americanos, possui em sua vegetação heterogênea uma biodiversidade maior que a da floresta Amazônica, com mais de 7.000 espécies de plantas vasculares nativas. Essa característica tem despertado um crescente interesse em suas plantas medicinais como fonte de compostos bioativos, cujo uso popular tem passado de geração a geração no decorrer dos séculos. Este bioma é o principal centro de diversidade do gênero *Galianthe* (Rubiaceae), onde muitas das espécies existentes são endêmicas e sobre as quais se nota uma escassez de estudos fitoquímicos e farmacológicos. Raízes da espécie *Galianthe thalictroides* (K.Schum.) E. L. Cabral têm sido popularmente utilizadas para o tratamento de variados tipos de câncer. Considerando-se a ausência de critérios científicos no uso desta planta decidiu-se realizar o estudo químico do extrato etanólico das raízes de *Galianthe thalictroides*, guiado pela atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais, a fim de encontrar resultados que comprovem ou refutem o seu uso popular. Adicionalmente, realizou-se a avaliação antimicrobiana das frações obtidas da partição do extrato etanólico frente a algumas cepas fúngicas e bacterianas, uma vez que existem informações na literatura de várias espécies de rubiáceas que possuem este tipo de atividade. No presente trabalho, as raízes secas e moídas de *G. thalictroides* foram submetidas à extração em temperatura ambiente com etanol. O resíduo obtido do extrato etanólico foi particionado entre metanol/água 9:1 e hexano, metanol/água 1:1 e clorofórmio e metanol/água 1:1 e acetato de etila. Estas frações foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade *in vitro* com sulforrodamina B (SRB) frente a linhagens de células tumorais padrão B16-F10, HEp-2 e MCF-7 e à avaliação das atividades antifúngica e antibacteriana utilizando-se o método da microdiluição em caldo frente a duas cepas fúngicas padrão (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*) e quatro cepas padrão de bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Todas as frações apresentaram atividade citotóxica, sendo que a fração clorofórmica foi a mais ativa e teve o seu estudo químico continuado, o qual resultou na obtenção de oito subfrações, todas ativas frente ao ensaio de citotoxicidade. O estudo químico monitorado pelo ensaio de citotoxicidade *in vitro* prosseguiu na subfração BGTRC-6, resultando no isolamento, até o momento, de um alcalóide indol-monoterpênico inédito chamado (*rel*)-[(1S, 2R, 5R)-1-(hidroximetil)-2-(1-hidróxi-1-metiletil)-5-(5-metóxi)-9H- β -carbolin-1-il]-ciclopentanol]. O ensaio com SRB desta substância revelou potente atividade citotóxica frente às linhagens testadas B16-F10, MCF-7, 786-0 e UACC62, de modo que se trata de um promissor agente inibidor de tumores, cuja viabilidade como futuro quimioterápico será investigada. A avaliação antimicrobiana das frações do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* apontam as frações acetato de etila (BGTRA) e hidrometanólica (BGTRHM) como dotadas de atividade biológica mais potente, o que possivelmente está associado com o alto teor de taninos encontrado nestas frações.

PALAVRAS-CHAVE: RUBIACEAE, *GALIANTHE*, ATIVIDADE CITOTÓXICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

ABSTRACT

Figueiredo PO. **Chemical study of the roots of *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae) guided by *in vitro* cytotoxic activity against tumor cell lines.** Campo Grande, 2010. [Master thesis - Faculty of Medicine, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

The Cerrado, the most Brazilian biome of South America, has in its heterogeneous vegetation a greater biodiversity than the Amazon rainforest, with more than 7,000 species of native vascular plants. This feature has attracted a growing interest in their medicinal plants as source of bioactive compounds, whose popular use has been passed from generation to generation over the centuries. This biome is the main center of diversity of gender *Galianthe* (Rubiaceae), where many of the existing species are endemic and have few phytochemical and pharmacological studies. Roots of *Galianthe thalictroides* (K. Schum.) E. L. Cabral species has been popularly used for treating various cancers. Considering the absence of scientific criteria in the use of this plant, the chemical study of the ethanolic extract of *Galianthe thalictroides* roots, guided by the cytotoxic activity against tumor cell lines, was performed in order to find results that prove or refute its popular use. Additionally, it was carried out the evaluation of antimicrobial fractions obtained from the partition of ethanolic extract against some fungal and bacterial strains, since there is literature information about Rubiaceae species with this type of activity. In this paper, dried and ground roots of *G. thalictroides* were extracted at room temperature with ethanol. The residue obtained from the ethanol extract was partitioned between methanol/water 9:1 and hexane, methanol/water 1:1 and chloroform and methanol/water 1:1 and ethyl acetate. These fractions were subjected to *in vitro* cytotoxicity sulforhodamine B (SRB) assay against standard tumor cell lines B16-F10, HEp-2 and MCF-7 and to evaluation of antifungal and antibacterial activity using the microdilution method against two fungal standard strains (*Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*) and four standard strains of bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). All fractions showed cytotoxic activity, and the chloroform fraction was the most active and had his chemical investigation continued, which resulted in eight cytotoxic active subfractions. Chemical studies monitored by cytotoxicity test *in vitro* were continued in subfraction BGTRC-6, resulting in isolation, until now, of a novel monoterpene-indole alkaloid named (*rel*)-[(1S, 2R, 5R) -1 - (hydroxymethyl) -2 - (1-hydroxy-1-methylethyl) -5 - (5-methoxy)-9H- β -carboline-1-yl)-cyclopentanol]. The SRB assay with this substance revealed potent cytotoxic activity against the tested lines B16-F10, MCF-7, 786-0 and UACC62, so this is a promising inhibitor of tumor, whose viability as a future chemotherapeutic will be investigated. The evaluation of antimicrobial fractions of ethanol extract of the roots of *G. thalictroides* showed the ethyl acetate fraction (BGTRA) and hydromethanolic fraction (BGTRHM) as the most biologically actives, which is associated with high levels of tannins found in these fractions.

KEYWORDS: RUBIACEAE, *GALIANTHE*, CYTOTOXIC ACTIVITY, ANTIMICROBIAL ACTIVITY.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micromoléculas antibacterianas e antifúngicas segundo a origem (Newman e Cragg, 2007)	21
Tabela 2 - Frações obtidas da filtração da fase clorofórmica (3,8846 g) em funil de vidro sinterizado (\varnothing 7,0 cm x 6,5 cm) sob pressão reduzida.....	34
Tabela 3 - Linhagens celulares utilizadas na avaliação citotóxica das frações, subfrações e substância pura de <i>Galianthe thalictroides</i> (Rubiaceae).....	40
Tabela 4 - Resultados da avaliação do potencial antibacteriano das frações do extrato etanólico das raízes de <i>G. thalictroides</i> e das subfrações tanantes e não tanantes de BGTRA e BGTRHM.....	44
Tabela 5 - Resultados da avaliação do potencial antifúngico das frações do extrato etanólico das raízes de <i>G. thalictroides</i> e das subfrações tanantes e não tanantes de BGTRA e BGTRHM.....	45
Tabela 6 - Resultados quantitativos da determinação do teor de taninos nas raízes de <i>G.thalictroides</i> e nas frações BGTRA e BGTRHM (% equivalente ao ácido tânico).....	46
Tabela 7 - Efeito citotóxico (IC_{50}) das frações orgânicas do extrato etanólico das raízes de <i>Galianthe thalictroides</i> em células neoplásicas após período de incubação de 48 horas.....	48
Tabela 8 – Porcentagem de inibição de crescimento das frações BGTRH, BGTRC e BGTRA frente à linhagem MCF-7 nas concentrações de 25 μ g/mL e 250 μ g/mL.....	49
Tabela 9 - Efeito citotóxico (IC_{50}) das subfrações da fração BGTRC após cromatografia em coluna com sílica C-18.....	51
Tabela 10 - Dados de RMN de 1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz) e correlações HSQC e HMBC da Substância 1 ($CDCl_3$).....	54
Tabela 11 - Efeito citotóxico (IC_{50}) da Substância 1 e da subfração antecessora BGTRC-6.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Estruturas químicas de alguns compostos anticâncer originados ou derivados de plantas.....	20
Figura 2 - Micromoléculas anticâncer descobertas no período de 01/1981 – 06/2006, segundo a origem (N = 81). Adaptado de: Newman e Cragg (2007).....	21
Figura 3 - Comparação entre o número de espécies nas famílias: A - Asteraceae (21000 spp.); B - Orchidaceae (17500 spp.); C - Fabaceae: (16500 spp.); D - Rubiaceae (13000 spp.); E - Rutaceae (8000 spp.) e F - Mammalia (5000 spp.).....	24
Figura 4 - Diversidade química e distribuição dos principais constituintes químicos nas quatro subfamílias: Ixoroideae (IXO), Cinchonoideae (CIN), Rubioideae (RUB) e Antirheoideae (ANT) pertencentes à família Rubiaceae (BOLZANI <i>et al.</i> , 2001).....	25
Figura 5 - Exemplares de rubiáceas e alguns de seus metabólitos secundários de importância econômica.....	26
Figura 6 - Exemplares de espécies pertencentes ao gênero <i>Ixora</i> , <i>Mussaendra</i> e <i>Gardenia</i> . Essas plantas são frequentemente utilizadas na ornamentação e paisagismo.	26
Figura 7 - Estruturas moleculares dos componentes químicos isolados de <i>G. brasiliensis</i>	27
Figura 8 - Estrutura molecular dos alcaloides β -carbolínicos isolados de <i>G. ramosa</i>	28
Figura 9 - Esquema da metodologia utilizada no estudo químico das raízes de <i>G. thalictroides</i>	33
Figura 10 - Representação da microplaca de 96 poços indicando o protocolo utilizado para a execução da avaliação antimicrobiana das frações do extrato etanólico de <i>G. thalictroides</i>	37
Figura 11 - Curva de calibração de taninos totais – concentração de ácido tânico em $\mu\text{g/mL}$ versus Absorbância (ABS); Equação da reta: Absorbância = a.c+b; Erro do ajuste: 0,9996.....	46
Figura 12 - Possibilidades estruturais para a parte aromática da Substância 1.....	52
Figura 13 - Algumas correlações HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) observadas no núcleo β -carbolínico da Substância 1.....	53
Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (CDCl_3 , 300 MHz).....	55
Figura 15 - Espectro de RMN ^{13}C da Substância 1 (CDCl_3 , 75 MHz).....	56
Figura 16 - Espectro de RMN DEPT 135° da Substância 1 (CDCl_3 , 75 MHz).....	57

Figura 17 - Espectro de RMN HSQC da Substância 1 (CDCl ₃ , 300/75 MHz).....	58
Figura 18 – Espectro de RMN HMBC da Substância 1 (CDCl ₃ , 300/75 MHz).....	59
Figura 19 – Espectro de RMN COSY (¹ H- ¹ H) da Substância 1 (CDCl ₃ , 300 MHz)...	60
Figura 20 - Propostas de estruturas para a porção não aromática da Substância 1.....	61
Figura 21 - Espectros de RMN ¹ H da Substância 1 e da Substância 1 acetilada (CDCl ₃ , 300 MHz).....	62
Figura 22 - Proposta da estrutura química da Substância 1.....	63
Figura 23 - Espectro de RMN NOESY da Substância 1 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	64
Figura 24 - Ampliação do espectro de RMN NOESY da Substância 1 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	65
Figura 25- Ampliação do espectro de RMN NOESY da Substância 1 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	65
Figura 26 - Proposta de configuração relativa da estrutura química da Substância 1...	66
Figura 27 - Espectro de massas da Substância 1 (Impacto de elétrons - 70eV).....	66
Figura 28 - Espectro de Infravermelho da Substância 1.....	66
Figura 29 - Primeiras etapas na biossíntese dos alcalóides indol-monoterpênicos.....	67
Figura 30 - Biossíntese da secologanina (Connor e Maresh, 2006).....	68
Figura 31 - Proposta de biossíntese da Substância 1.....	69
Figura 32 - Alcalóides β-carbolínicos isolados de rubiáceas.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

786-0	Linhagem celular de carcinoma de rim
ABS	Absorbância
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AGRAER-MS	Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	<i>American Type of Culture Collection</i>
B16-F10	Linhagem celular de melanoma murino
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C33A	Linhagem celular de carcinoma de cérvix
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CCD18Lu	Linhagem celular de fibroblastos do epitélio pulmonar
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
Ce ₂ (SO ₄) ₃	Sulfato de Cério IV
CHCl ₃	Clorofórmio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	Dióxido de Carbono
COSY (¹ H- ¹ H)	<i>Correlation Spectroscopy</i> (¹ H- ¹ H)
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DEPT 135°	<i>Distortionless Enhancement of Polarization Transfer using a 135 degree decoupler pulse</i>
DFB	Departamento de Farmácia-Bioquímica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H ₂ O	Água

HeLa	Linhagem celular de carcinoma epitelióide de cérvice
HEp-2	Linhagem celular de carcinoma de laringe
HLL	Linhagem celular de fibroblastos humanos
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC ₅₀	Inibição do Crescimento de 50% das células
K562	Linhagem celular de leucemia linfóide
MCF-7	Linhagem celular de carcinoma de mama
MeOH	Metanol
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)-Propanosulfônico
MS	Mato Grosso do Sul
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NCIADR	Linhagem celular de carcinoma de ovário resistente
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
OVCAR	Linhagem celular de carcinoma de ovário
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por Minuto
S-180	Linhagem celular de sarcoma 180
SRB	Sulforrodamina B
SW480	Linhagem celular de carcinoma de cólon
TCA	Ácido Tricloroacético
UACC62	Linhagem celular de melanoma humano
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
cm	Centímetro
g	Gramma
Hz	Hertz
Kg	Quilograma
m/z	Relação massa/carga
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
Ø	Diâmetro
δ	Deslocamento Químico

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 A importância das plantas como fontes de substâncias bioativas	19
2.2 A Família Rubiaceae	24
2.2.1 <u>O gênero <i>Galianthe</i> e a espécie <i>Galianthe thalictroides</i></u>	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivos Gerais	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODO	31
4.1 Obtenção do material vegetal	31
4.2 Métodos espectrométricos	31
4.2.1 <u>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) de Carbono-13 (RMN ¹³C)</u>	31
4.2.2 <u>Espectrometria de massas</u>	31
4.2.3 <u>Espectroscopia de Infravermelho</u>	31
4.3 Métodos cromatográficos	32
4.4 Estudo químico do extrato etanólico das raízes de <i>G. thalictroides</i> guiado pela atividade citotóxica <i>in vitro</i> frente a linhagens de células tumorais	32
4.4.1 <u>Estudo químico da subfração BGTRC-6: isolamento da Substância 1</u>	34
4.5 Avaliação da atividade antifúngica e antibacterina das frações obtidas na partição do extrato etanólico das raízes de <i>G. thalictroides</i>	34
4.5.1 <u>Microrganismos utilizados</u>	34
4.5.2 <u>Meios de cultura</u>	35
4.5.3 <u>Preparo do inóculo bacteriano</u>	35
4.5.4 <u>Preparo do inóculo dos fungos leveduriformes</u>	36
4.5.5 <u>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</u>	36
4.5.6 <u>Frações do extrato etanólico das raízes de <i>G. thalictroides</i> que foram testadas na avaliação antimicrobiana</u>	38

4.5.7 <u>Metodologia de quantificação de taninos</u>	38
4.6 Avaliação citotóxica das frações e subfrações do extrato etanólico das raízes de <i>G. thalictroides</i>: ensaio com Sulforrodamina B.	39
4.6.1 <u>Linhagens celulares utilizadas</u>	39
4.6.2 <u>Procedimento da avaliação citotóxica das frações e subfrações do extrato etanólico das raízes de <i>G. thalictroides</i>.</u>	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Avaliação antifúngica e antibacteriana das frações do extrato etanólico de <i>G. thalictroides</i>: método da microdiluição em caldo	43
5.2 Avaliação citotóxica das frações e subfrações do extrato etanólico de <i>G. thalictroides</i>: ensaio com Sulforrodamina B (SRB)	48
5.2.1 <u>Elucidação estrutural e avaliação do potencial citotóxico da Substância 1</u>	51
5.2.1.1 <u>Avaliação da atividade citotóxica da Substância 1 frente a linhagens de células tumorais</u>	70
6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, as plantas têm sido utilizadas terapêuticamente no tratamento e alívio dos sintomas de diversas moléstias que já assolaram e que continuam assolando a humanidade (PINTO *et al.*, 2002). Inicialmente, a forma de aplicação restringia-se ao uso de chás e cataplasmas sendo que, com o decorrer dos anos, começaram a surgir modos de preparo mais elaborados, além da ampliação do conhecimento sobre as propriedades medicinais dos vegetais e a consequente aplicação em doenças específicas.

Essas descobertas têm sido divulgadas oralmente entre várias gerações e, ainda hoje, usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram acumuladas durante os séculos (MACIEL *et al.*, 2002).

Este tipo de cultura medicinal constitui uma importante fonte de informações que servem como ponto de partida na busca de substâncias ativas, as quais poderão ser utilizadas como princípios ativos ou protótipos na elaboração de medicamentos.

Neste contexto, uma metodologia utilizada na busca de princípios ativos de origem vegetal é o estudo biomonitorado ou *screening*, o qual visa ao isolamento de compostos bioativos por meio do estudo químico das frações e subfrações de um extrato que apresentarem resultados positivos no teste biológico para o qual a planta está sendo investigada (YOUNES *et al.*, 2007).

A utilização dessa metodologia tende a render preciosos frutos no Brasil, um país dotado de uma biodiversidade ímpar e que desperta interesse na investigação de suas plantas medicinais como fonte de compostos bioativos. É o caso da notável diversificação florística do Cerrado, que possui em sua vegetação heterogênea uma biodiversidade maior que a da floresta Amazônica (GUARIN NETO E MORAIS, 2003), com mais de 7.000 espécies de plantas vasculares nativas (KLINK E MACHADO, 2005). O Domínio Cerrado, o segundo maior do Brasil, com cerca de dois milhões de km², é o mais brasileiro dos biomas sul-americanos, uma vez que, excetuando-se algumas pequenas áreas na Bolívia e no Paraguai, encontra-se totalmente inserido no território nacional (GUARIN NETO E MORAIS, 2003). Este bioma é um dos principais centros de diversidade do gênero *Galianthe* (Rubiaceae), onde muitas das espécies existentes são endêmicas (CABRAL, 2001) e sobre as quais nota-se uma escassez de estudos fitoquímicos e farmacológicos.

Raízes da espécie *Galianthe thalictroides* (K.Schum.) E. L. Cabral têm sido utilizadas

pela população do município de Bonito – Mato Grosso do Sul (MS) para o tratamento de variados tipos de câncer. Considerando-se a ausência de critérios científicos no uso desta planta decidiu-se realizar no Laboratório de Pesquisas de Química de Produtos Naturais (LP-1) e com a parceria do Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares, ambos pertencentes à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), o estudo químico do extrato etanólico das raízes da espécie *Galianthe thalictroides*, guiado pela atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais, a fim de encontrar resultados que comprovem ou refutem o seu uso popular.

Adicionalmente, realizou-se a avaliação antimicrobiana das frações obtidas da partição do extrato etanólico frente a algumas cepas fúngicas e bacterianas, por meio da parceria entre o LP-1 e o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Farmácia-Bioquímica (DFB) localizado na UFMS, uma vez que existem informações na literatura de várias espécies de rubiáceas que possuem este tipo de atividade (KLOUCEK *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008; FABRI *et al.*, 2009). Esta avaliação visa fornecer subsídios para o estudo da espécie com essa finalidade, lembrando que os mecanismos de resistência dos microrganismos aos antibióticos estão cada vez mais refinados e difíceis de serem superados, o que é agravado pela emergência das infecções oportunistas fatais associadas à AIDS, à quimioterapia antineoplásica e aos transplantes e consequente uso de imunossupressores (PENNA *et al.*, 2001).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A importância das plantas como fontes de substâncias bioativas

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Para algumas comunidades e grupos étnicos, o conhecimento sobre as propriedades medicinais dos vegetais constitui o único recurso terapêutico e, até mesmo nas grandes cidades brasileiras, são comercializados em feiras livres, mercados populares e encontrados em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002).

As observações populares sobre o uso e a eficácia curativa das plantas contribuem de forma relevante para a divulgação de suas virtudes medicinais, apesar de, em muitos casos, não terem seus diversos constituintes químicos conhecidos e nem a comprovação científica das atividades terapêuticas atribuídas.

A complexidade dos extratos vegetais pode ter certa vantagem sobre os medicamentos convencionais, se considerada a possibilidade dos vários constituintes químicos atuarem sinergicamente, favorecendo a necessidade de pequenas quantidades das substâncias ativas para resultarem numa atividade benéfica e reduzindo a possibilidade de ocorrência de efeitos colaterais. Os medicamentos convencionais geralmente contêm um único princípio ativo, o que pode tornar necessário o uso de doses mais elevadas, provocando efeitos colaterais (BRISKIN, 2000).

Por outro lado, os extratos vegetais também podem fornecer, por meio de metodologias de isolamento e identificação/elucidação estrutural, substâncias bioativas utilizadas como princípios ativos ou modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos, tais como as substâncias com atividade anticâncer vimblastina, vincristina, podofilotoxina, os análogos etoposídeo e teniposídeo, paclitaxel, combretastatinas, maitansina, camptotecina e derivados (Figura 1).

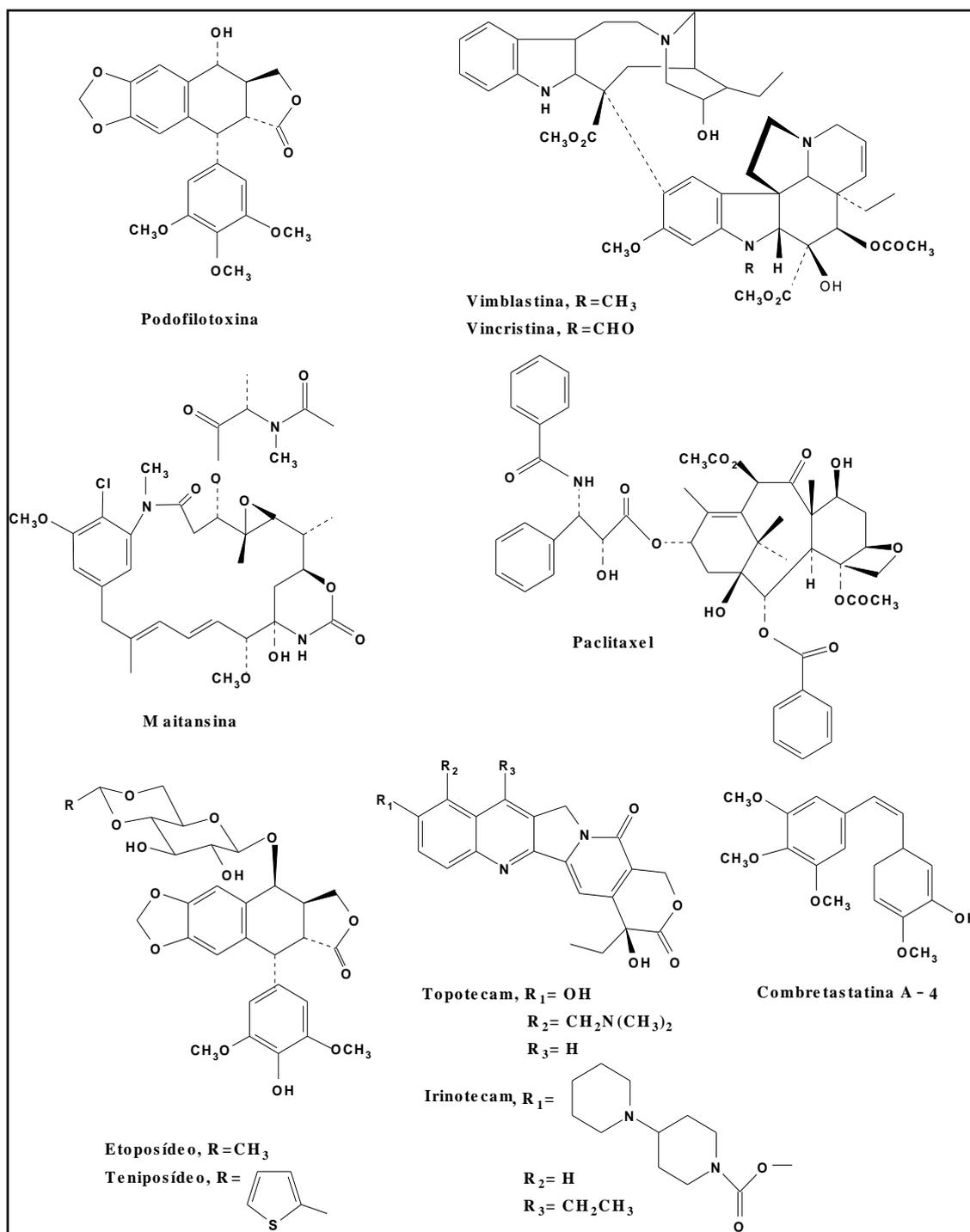


Figura 1– Estruturas químicas de alguns compostos anticâncer originados ou derivados de plantas.

No período de 1981 a 2006 foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) 1184 novas entidades químicas das quais 70% são derivadas, relacionadas ou diretamente obtidas de produtos naturais, principalmente de origem vegetal. No que diz respeito às substâncias anticâncer, considerando-se apenas as micromoléculas, das 81 novas entidades químicas relacionadas, apenas 22% são de origem exclusivamente sintética, de modo que o restante possui algum tipo de relação com os produtos de origem natural: 11% são de

origem natural (N), 31% são derivadas de produtos naturais (ND), 15% são de origem sintética, mas mimetizam algum produto natural (S/NM), 14% são de origem sintética, mas possuem o farmacóforo de um produto natural (S*) e 7% são de origem sintética, mas mimetizam e possuem o farmacóforo de um produto natural (S*/NM) (NEWMAN E CRAGG, 2007) (Figura 2).

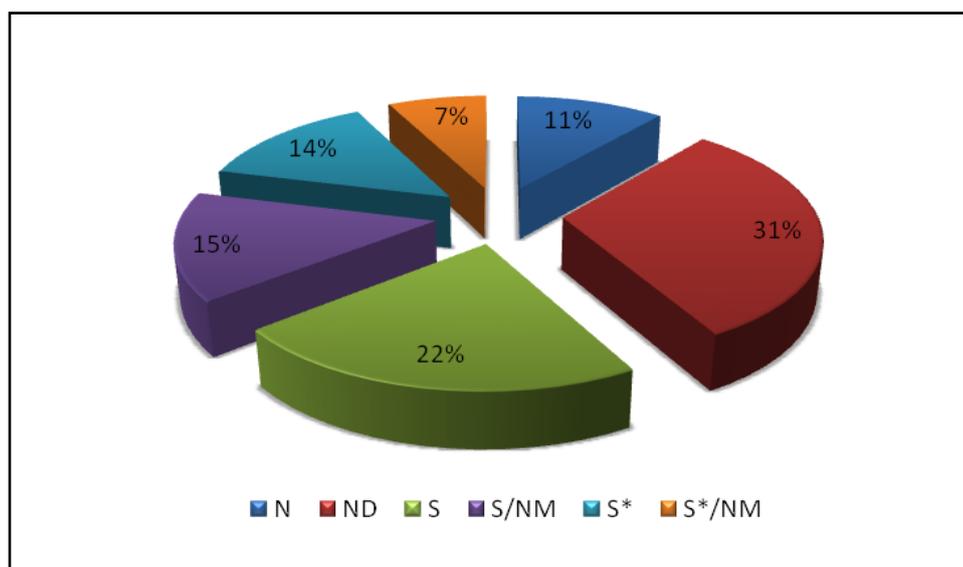


Figura 2 – Micromoléculas anticâncer descobertas no período de 01/1981 – 06/2006, segundo a origem (N = 81). Adaptado de: Newman e Cragg (2007).

Na área antibacteriana, das 98 micromoléculas relatadas por Newman e Cragg (2007), 23% são de origem exclusivamente sintética, predominantemente quinolonas, sendo a maior porcentagem correspondente a substâncias obtidas diretamente ou derivadas de produtos naturais. Já na área antifúngica, o perfil é inverso, de modo que a grande maioria das micromoléculas é de origem sintética (78,6%) e o restante derivado de produtos naturais (Tabela 1).

Tabela 1 – Micromoléculas antibacterianas e antifúngicas segundo a origem (Newman e Cragg, 2007).

Indicação	Total	N	ND	S	S/NM	S*	S*/NM
Antibacteriano	98	10	64	23	-	-	1
Antifúngico	29	-	3	22	3	-	-

N= origem natural, ND= derivados de produtos naturais, S= origem exclusivamente sintética, S/NM= origem sintética, mas mimetizam algum produto natural, S*= origem sintética, mas possuem o farmacóforo de um produto natural, S*/NM= origem sintética, mimetizam e possuem o farmacóforo de um produto natural.

A busca por novas opções terapêuticas para os diferentes tipos de câncer e de infecções fúngicas e bacterianas é um dos assuntos de maior interesse na atualidade da

pesquisa de moléculas vegetais, uma vez que a resistência adquirida frente aos medicamentos anticancerígenos e antimicrobianos é encontrada em grande parte dos pacientes, sendo responsável por problemas clínicos que limitam a eficácia do tratamento (COHEN, 1992; GANGEMI *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2009).

Apesar dos grandes avanços ocorridos nas opções de tratamento quimioterápico do câncer, infelizmente, as substâncias até então obtidas só proporcionam maior sucesso de tratamento frente a tumores de rápida proliferação, tais como leucemias infantis, tumores testiculares e linfomas não Hodgkin. Tumores sólidos, que possuem taxa de crescimento inferior, como os de câncer de pulmão, mama e cólon, ainda respondem fracamente à quimioterapia (DEWICK, 2002). Adicionalmente, células sadias de rápida proliferação, como as da medula óssea e do epitélio gastrointestinal, sofrem os efeitos tóxicos da droga administrada, o que justifica que os principais efeitos colaterais da quimioterapia sejam leucopenia, náuseas, vômitos, além de alopecia, plaquetopenia e esterilidade (DEWICK, 2002). Para amenizar um pouco esses problemas, um coquetel com baixas dosagens dos quimioterápicos é frequentemente utilizado no lugar da dosagem da substância isoladamente (HOUGHTON *et al.*, 2007).

Consequentemente, a busca de novos protótipos de medicamentos anticâncer na natureza tem sido cada vez mais estimulada, visando à descoberta de substâncias mais eficientes, seletivas e menos agressivas às células sadias.

No que diz respeito às substâncias antimicrobianas, o surgimento de uma série de novos princípios ativos nas últimas três décadas (Tabela 1) foi insuficiente para fazer das doenças infecciosas um tema sem importância para a saúde pública. A resistência dos microrganismos aos antimicrobianos relaciona-se a vários fatores, a começar pela própria habilidade genética destes, com plasmídeos e transposons que os tornam capazes de adquirir e transmitir mecanismos de resistência, como mutação, transdução, transformação e conjugação (COHEN, 1992).

Somadas a este favorecimento genético estão a pressão seletiva que o uso indiscriminado dos medicamentos causa nos microrganismos, resultando na sobrevivência e multiplicação dos mais resistentes, e a emergência das doenças infecciosas oportunistas fatais associadas à AIDS e ao uso de imunossupressores em pacientes transplantados, com doenças auto-imunes e em quimioterapia antineoplásica (PENNA, 2001; YOUNES, 2007).

Assim, a resistência dos microrganismos aos medicamentos permanece como um problema de saúde pública, uma vez que a redução da eficácia dos medicamentos antimicrobianos disponíveis tem exigido o uso de fármacos mais onerosos e,

consequentemente, de difícil acesso aos programas de atenção primária à saúde. Para atenuar esta situação, estratégias visando à redução da exposição das pessoas aos antimicrobianos por meio do uso racional dos medicamentos têm sido realizadas numa tentativa de evitar a seleção de cepas resistentes (SMITH E COAST, 2002).

Os pesquisadores de produtos naturais também possuem um papel crucial na solução desse problema, sendo responsáveis pela busca de novos agentes antimicrobianos em animais e vegetais com propriedades terapêuticas potenciais para o tratamento das doenças e com menor toxicidade para os pacientes.

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido realizados em diferentes países com a finalidade de provar a eficiência dos extratos das plantas bem como de seus metabólitos secundários neste propósito. Algumas classes de metabólitos vegetais já são, inclusive, conhecidas como dotadas de propriedades antimicrobianas, como é o caso de alguns compostos fenólicos obtidos de óleos essenciais e os taninos (BUTLER e BUSS, 2006).

Com base nessas informações e devido à escassez de estudos sobre o gênero *Galianthe*, decidiu-se avaliar o potencial citotóxico, antifúngico e antibacteriano das frações do extrato etanólico das raízes da rubiácea *G. thalictroides* com o intuito de verificar se há fundamento no uso popular dessa planta como um remédio para o tratamento do câncer e se há potencial antimicrobiano nas frações do extrato etanólico dessa espécie, considerando que muitas rubiáceas possuem este tipo de atividade (KLOUCEK *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008; FABRI *et al.*, 2009).

2.2 A Família Rubiaceae

Rubiaceae, também conhecida como a família do café, é a quarta maior família das angiospermas (Figura 3), compreendendo cerca de 13.000 espécies distribuídas em aproximadamente 650 gêneros (National Botanic Garden of Belgium. Acesso em abr./2010).

No Brasil está representada por 101 gêneros e 1.010 espécies, as quais se encontram nas mais representativas vegetações do país: Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado (BOLZANI *et al.*, 2001).

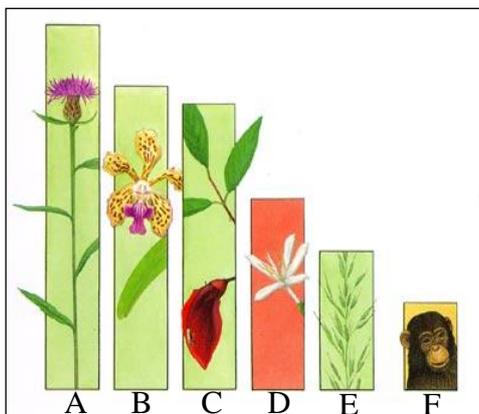


Figura 3 – Comparação entre o número de espécies nas famílias: A - Asteraceae (21000 spp.); B - Orchidaceae (17500 spp.); C - Fabaceae: (16500 spp.); D - Rubiaceae (13000 spp.); E - Rutaceae (8000 spp.) e F - Mammalia (5000 spp.).

Fonte: <http://www.br.fgov.be/RESEARCH/PROJECTS/rubiaceae.php>.
Acessado em: 10/04/2010.

A divisão taxonômica dos indivíduos pertencentes a esta família é bastante complexa e tem sofrido muitas modificações com o passar dos anos. Isto acontece em decorrência da grande quantidade de gêneros e espécies com difícil identificação e por apresentarem caracteres morfológicos pouco distintivos e com gradações de complexa separação (ROBBRECH, 1988). Considerando-se o perfil químico desta família, existem muitas espécies sem quaisquer estudos, o que dificulta ainda mais aos taxonomistas realizarem as divisões na família e subfamílias (BOLZANI *et al.*, 2001).

Uma das primeiras classificações aconteceu em 1891 (SCHUMANN, 1891 *apud* ROBBRECHT e MANEN, 2006) quando Rubiaceae foi dividida nas subfamílias Cinchonoideae e Coffeoidae. Em 1988, um estudo baseado em caracteres distintivos, tais como placentação, morfologia e anatomia de frutos e sementes, reformulou a distribuição de subfamílias e tribos e Rubiaceae foi dividida nas quatro subfamílias Ixoroideae, Cinchonoideae, Antirrhoideae e Rubioideae (ROBBRECHT, 1988). A classificação mais

atual da família Rubiaceae, resultado do trabalho de Robbrecht e Manen (2006), consiste, novamente, na existência de apenas duas subfamílias, Rubioideae e Cinchonoideae, sendo que a subfamília Rubioideae, na qual está incluída *Galianthe thalictroides*, permaneceu praticamente inalterada.

Uma grande diversidade de metabólitos secundários já foi isolada de rubiáceas brasileiras tais como iridóides, alcalóides indólicos, antraquinonas, flavonóides, derivados fenólicos, triterpenos, diterpenos e outros tipos de alcalóides (BOLZANI *et al*, 2001). A correlação destes dados com o estudo de Robbrecht em 1988 resultou em diferentes perfis químicos para cada uma das quatro subfamílias (Figura 4). Convertendo-se estas informações para a classificação atual, ou seja, considerando que a atual subfamília Rubioideae permaneceu praticamente inalterada e que a atual subfamília Cinchonoideae seria constituída pelas antigas subfamílias Cinchonoideae, Ixoroideae e Antirheoideae, é possível inferir que, enquanto em Rubioideae as antraquinonas representam a principal classe de metabólitos secundários, em Cinchonoideae são encontrados principalmente iridóides e alcalóides indólicos. Estas três classes de metabólitos secundários são consideradas marcadoras quimiotaxonômicas da família e, conseqüentemente, são as mais estudadas na tentativa de comprovar a correlação filogenética entre a química e a taxonomia de Rubiaceae (BOLZANI *et al.*, 2001).

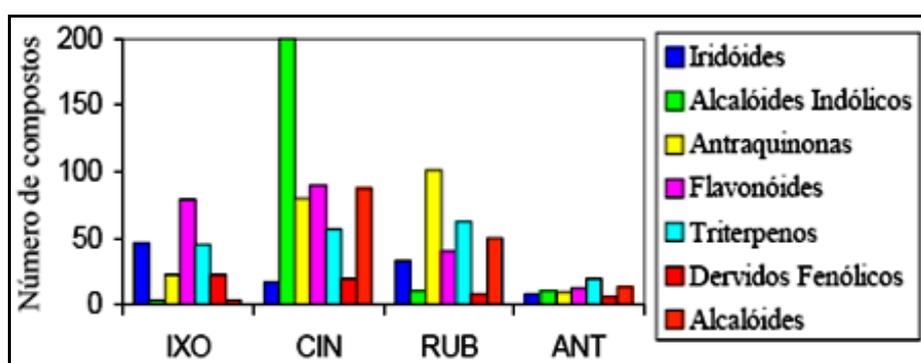


Figura 4 - Diversidade química e distribuição dos principais constituintes químicos nas quatro subfamílias: Ixoroideae (IXO), Cinchonoideae (CIN), Rubioideae (RUB) e Antirheoideae (ANT) pertencentes à família Rubiaceae (BOLZANI *et al.*, 2001).

Rubiaceae também se destaca por apresentar espécies contendo metabólitos secundários de considerável expressão econômica, como a cafeína (*Coffea arabica*), utilizada em diversos medicamentos; a emetina, isolada de *Cephaelis ipecacuanha*, com atividade emética e anti-amebicida; a quinidina (*Cinchona ledgeriana*), usada como antiarrítmico; a quinina (*Cinchona ledgeriana*), utilizada por suas propriedades antimalárica e tônica; a

ioimbina (*Pausinystalia yoiimba*), com efeito afrodisíaco (CORDELL *et al.*, 2001) (Figura 5). Destacam-se também as plantas *Ixora* spp., *Mussaenda* spp. e *Gardenia* spp., apreciadas pela beleza de suas flores e utilizadas na ornamentação e paisagismo (Figura 6).

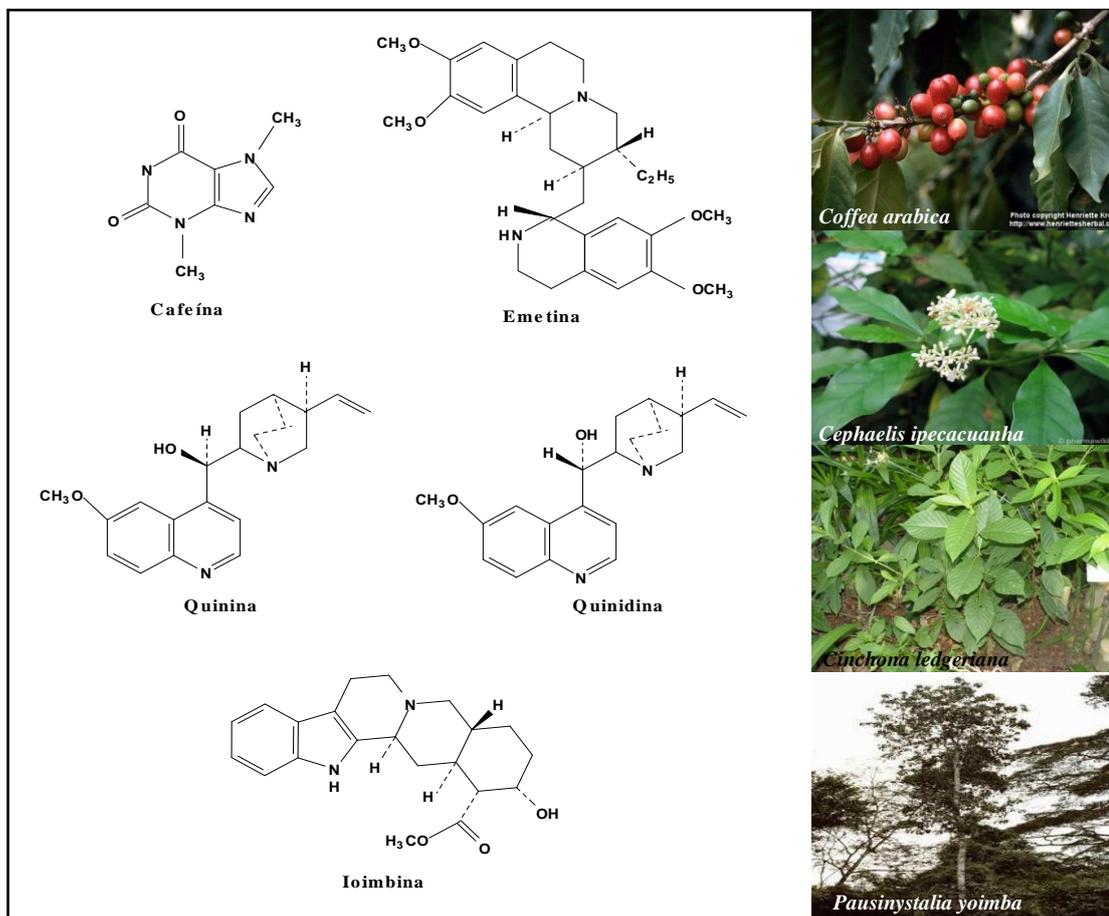


Figura 5 – Exemplares de rubiáceas e alguns de seus metabólitos secundários de importância econômica.

Fonte:

http://www.henriettesherbal.com/files/images/photos/c/co/pi2000-04-01_coffea-arabica.jpg;

http://www.pharmawiki.ch/wiki/media/Ipecacuanha_1.jpg

<http://images.google.com/images?gbv=2&hl=pt-PT&sa=1&q=Cinchona+ledgeriana>

<http://www.entheology.org/edoto/articlefiles/284-yohimbe-tree.jpg>



Figura 6 – Exemplares de espécies pertencentes ao gênero *Ixora*, *Mussaendra* e *Gardenia*. Essas plantas são frequentemente utilizadas na ornamentação e paisagismo.

Fonte:

<http://www.mgonlinestore.com/IMaui/IxoraMaui02.jpg>

<http://images-3.redbubble.net/img/art/size:large/view:main/118991-11-mussaendra-flowers.jpg>

<http://asinamirror.files.wordpress.com/2009/07/gardenia.jpg>

A rubiácea *Galianthe thalictroides* têm se destacado pelo seu uso popular como remédio anticâncer, entretanto, não existem quaisquer estudos sobre esta planta, sejam eles fitoquímicos ou de avaliação de atividade biológica, além de serem escassas as informações sobre o gênero, as quais serão abordadas a seguir.

2.2.1 O gênero *Galianthe* e a espécie *Galianthe thalictroides*

O gênero americano *Galianthe* está constituído por 49 espécies distribuídas em dois subgêneros: *Galianthe* (39 espécies) e *Ebelia* (10 espécies). O subgênero *Galianthe*, ao qual pertence *Galianthe thalictroides*, é exclusivamente sul-americano, sendo encontrado no Peru, Brasil e Argentina e ocorrendo uma maior concentração no planalto central e no planalto meridional brasileiro além de um setor do Paraguai oriental (CABRAL, 2001).

Na literatura, constam estudos químicos e biológicos de apenas duas espécies deste gênero: *Galianthe brasiliensis* e *Galianthe ramosa*. O estudo das partes aéreas de *G. brasiliensis* levou ao isolamento do triterpeno ácido ursólico, dos esteroides sitosterol, estigmasterol, campesterol e de quatro iridoides glicosilados conhecidos: asperulosídeo, deacetilasperulosídeo e uma mistura dos metil-ésteres Z- e E-6-O-*p*-coumaroilescandosídeo (Figura 7) (MOURA *et al.*, 2005; MOURA *et al.*, 2006).

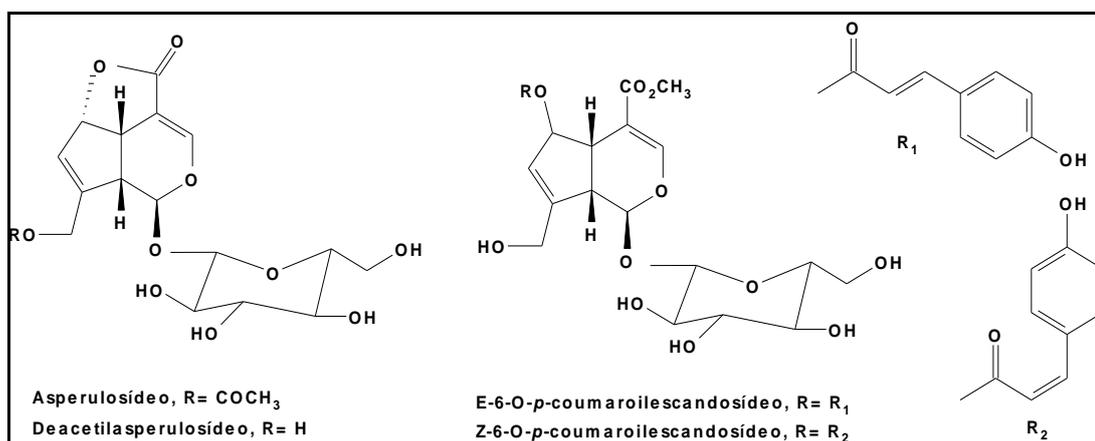


Figura 7 – Estruturas moleculares dos componentes químicos isolados de *G. brasiliensis*.

A atividade citotóxica do extrato metanólico *G. brasiliensis* em culturas de células tumorais humanas resultou em efeito citostático de 100, 70 e 53% na concentração de 250 µg/mL frente às linhagens de carcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de ovário (OVCAR) e carcinoma de ovário resistente (NCIADR), respectivamente, além de efeito citostático de 66%

para a linhagem de leucemia linfóide (K562) na concentração de 25 µg/mL e efeito citocida de 65% na concentração de 250 µg/mL. A atividade antiproliferativa foi relacionada, em parte, às substâncias isoladas ácido ursólico e asperulosídeo, que possuem comprovada atividade antitumoral (MOURA *et al.*, 2006).

Em relação à espécie *G. ramosa*, foi realizada a avaliação citotóxica do seu extrato metanólico frente às linhagens de células tumorais K562 e S-180 (sarcoma-180). O extrato não apresentou ação citotóxica, uma vez que, nas concentrações testadas, foi relatada uma alta porcentagem de proliferação das linhagens celulares utilizadas. Os maiores índices de proliferação foram 78% (K562) e 83% (S-180), obtidos na concentração de 1000 µg/mL (AGUIAR *et al.*, 2008). Segundo Fernandes-Filho *et al.* (2008), o índice de proliferação do extrato bruto metanólico de *G. ramosa* frente a K-562 foi equivalente a 92%.

O estudo químico do referido extrato de *G. ramosa* resultou no isolamento de dois alcalóides β-carbolínicos ligados a uma unidade tetrahydrofurano (Figura 8) (SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

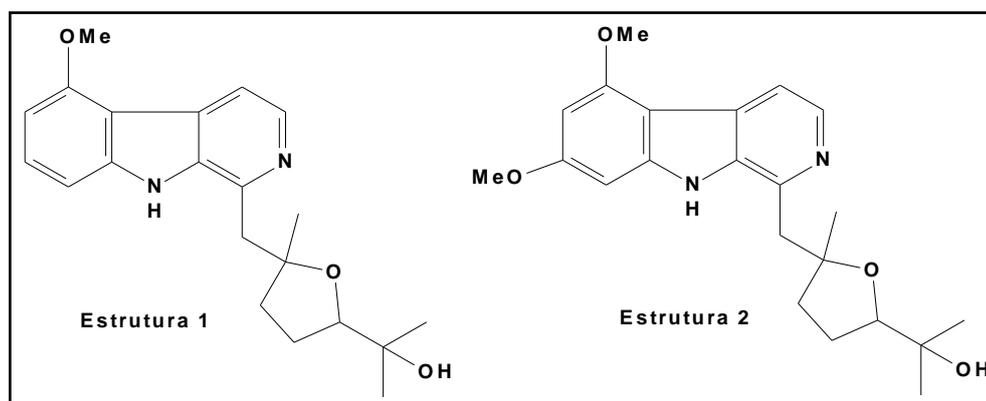


Figura 8 – Estrutura molecular dos alcalóides β-carbolínicos isolados de *G. ramosa*.

Galianthe thalictroides é uma planta de distribuição restrita no planeta, havendo no Missouri Botanic Garden (<http://mobot.org>) e no Global Biodiversity Information Facility (www.gbif.net) referência a apenas três coletas, sendo uma na Argentina e duas no Paraguai. Segundo Cabral (2009) esta espécie encontra-se distribuída na Argentina (Misiones e Corrientes), Brasil (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo), Paraguai (Amambay, Caaguazu) e Uruguai. Delprete e Cortés-B (2006) realizaram uma listagem preliminar das espécies de rubiáceas dos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e, das seis espécies do gênero *Galianthe* relatadas, nenhuma era *Galianthe thalictroides* sendo este, portanto, o primeiro relato da espécie no estado de Mato Grosso do Sul.

Raízes de *Galianthe thalictroides* têm sido utilizadas em Bonito-MS como tratamento alternativo do câncer. A forma de uso consiste no preparo de extratos aquosos - chás, “garrafadas” - e também acrescentando raízes da planta a erva do tereré, bebida bastante tradicional na região. Este extrato também é utilizado por pessoas não diagnosticadas com câncer que fazem uso da planta com a intenção de prevenirem-se da doença.

O uso indiscriminado, o desconhecimento da composição química e a falta de comprovação científica sobre as propriedades medicinais dessa espécie acentuam a necessidade do seu estudo, o qual trará benefícios para várias áreas de conhecimento como, por exemplo, oncologia, farmacologia, fitoquímica e botânica, além de incentivar a pesquisa da espécie para outras finalidades terapêuticas, tais como atividade antifúngica e antibacteriana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- Realizar o estudo químico das raízes da planta *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae) coletada no município de Bonito – MS, visando caracterizar as atividades biológicas de seus extratos, frações e substâncias deles purificadas.

3.2 Objetivos Específicos

- Coletar e identificar as raízes de *G. thalictroides*;
- Preparar o extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides*;
- Fracionar o extrato etanólico *G. thalictroides* através de partição líquido-líquido;
- Realizar os ensaios de avaliação da atividade citotóxica *in vitro* frente a linhagens de células tumorais das frações obtidas nas partições do extrato etanólico;
- Fracionar o material obtido das partições com atividade positiva no bioensaio de citotoxicidade utilizando métodos cromatográficos e realizar os bioensaios com as subfrações obtidas;
- Isolar e identificar ou elucidar a estrutura dos constituintes citotóxicos do extrato;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do material obtido através das partições frente a linhagens fúngicas e bacterianas;
- Quantificar os taninos presentes nas raízes de *G. thalictroides*.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Obtenção do material vegetal

As raízes de *Galianthe thalictroides* foram coletadas pelo pesquisador Airton J. S. Garcez (AGRAER-MS) no município de Bonito-MS, no mês de abril de 2008. A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. Arnildo Pott, do Departamento de Biologia da UFMS e a exsicata nº 29003 encontra-se depositada no herbário CGMS localizado no Departamento de Biologia da UFMS.

4.2 Métodos espectrométricos

4.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono-13 (RMN ^{13}C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ^{13}C) unidimensionais e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Bruker DPX-300, a 300 MHz e 75 MHz para RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente, localizado no Departamento de Química da UFMS. Como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente para RMN de ^1H e do solvente e/ou tetrametilsilano (TMS) para RMN de ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em CDCl_3 comercializado pela companhia Aldrich.

4.2.2 Espectrometria de massas (EM)

O espectro de massas de baixa resolução da substância isolada foi obtido por impacto eletrônico a 70 eV em espectrômetro de massas Shimadzu, modelo QP 5000, DI-50 localizado no Departamento de Química da UFMS.

4.2.3 Espectroscopia de Infravermelho

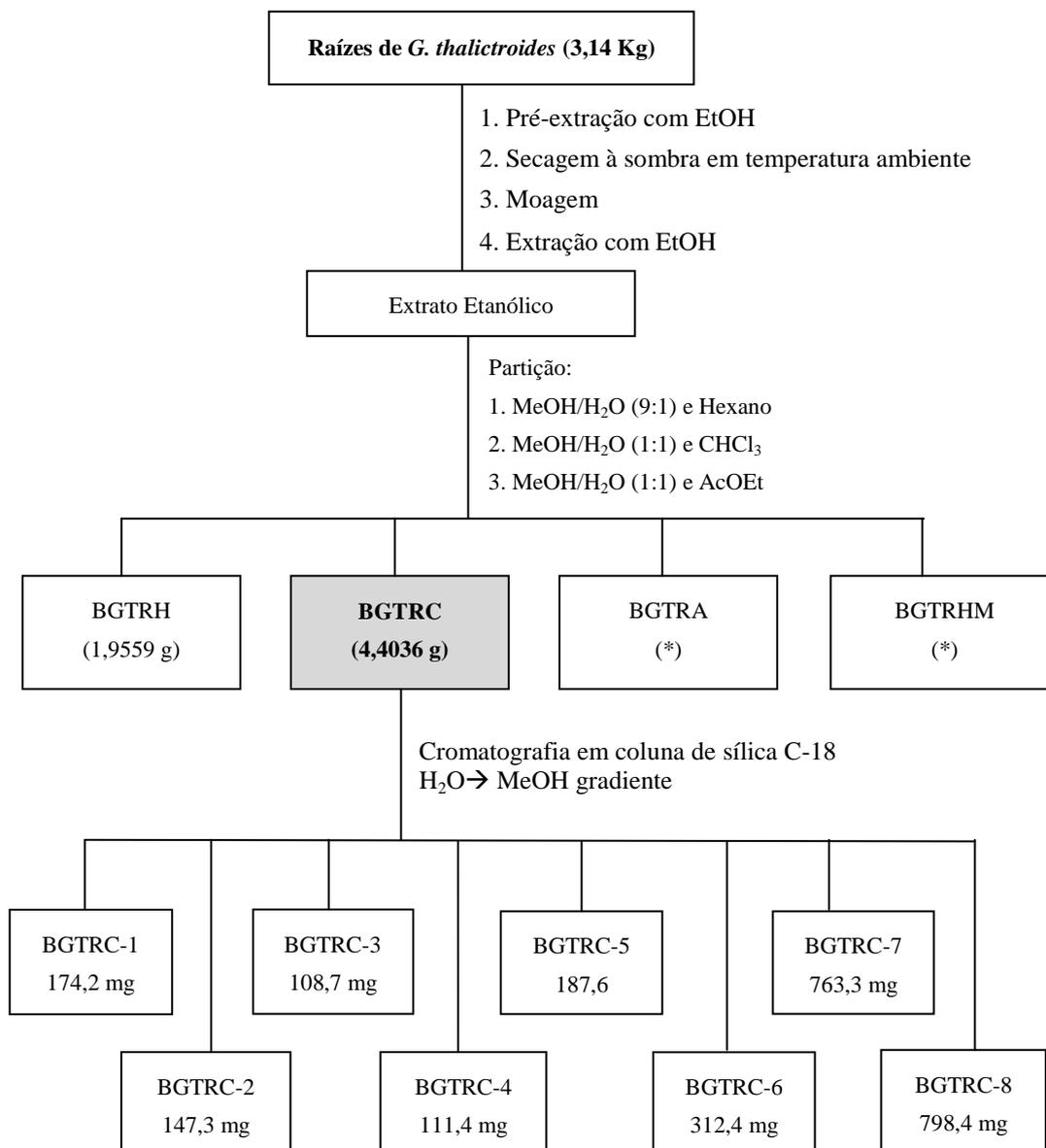
O espectro de infravermelho foi obtido em espectrômetro Bomem Hartmann & Braun, modelo B-100 localizado no Departamento de Química da UFMS.

4.3 Métodos cromatográficos

Foram realizados procedimentos cromatográficos utilizando-se como fase estacionária sílica gel C-18 de Ø 40-63µm (Merck) (Figura 9). Para a realização da CCDA foram utilizadas cromatoplasas de sílica gel 60 sobre alumínio com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm (Merck). O eluente utilizado foi clorofórmio/metanol 95:05. A revelação das substâncias nas cromatoplasas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) realizada em aparelho Mineralight modelo UVGL-25 e por aspersão com solução de $Ce_2(SO_2)_4$, seguido de aquecimento a uma temperatura de aproximadamente 150 °C em chapa de aquecimento com tela de amianto por tempo suficiente para o aparecimento das manchas dos componentes analisados.

4.4 Estudo químico do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* guiado pela atividade citotóxica *in vitro* frente a linhagens de células tumorais

As raízes de *G. thalictroides* (3,14 Kg) foram limpas, cortadas e submetidas a uma pré-extração à temperatura ambiente com etanol. Este material foi filtrado e submetido à secagem ao ar livre em temperatura ambiente e moído em moinho de quatro facas (Manesco e Ranieri Ltda, modelo Willey). As raízes pulverizadas foram maceradas com etanol à temperatura ambiente e o extrato resultante foi filtrado, reunido com o extrato obtido na pré-extração e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em rotaevaporador até a obtenção de um extrato de consistência xaroposa. O extrato bruto etanólico obtido foi particionado entre MeOH/H₂O 9:1 e hexano, MeOH/H₂O 1:1 e clorofórmio e MeOH/H₂O 1:1 e acetato de etila (Figura 9), resultando nas frações BGTRH (hexânica), BGTRC (clorofórmica), BGTRA (acetato de etila) e BGTRHM (hidrometanólica). BGTRH, BGTRC e BGTRA foram submetidas ao bioensaio de avaliação citotóxica frente a linhagens de células tumorais (MCF-7, HEp-2, B16-F10).



*Estas frações foram mantidas em solução para evitar a degradação de seus constituintes químicos devido à presença de compostos fenólicos da classe dos taninos.

Figura 9- Esquema da metodologia utilizada no estudo químico das raízes de *G. thalictroides*.

A fração clorofórmica (BGTRC- 4,4036 g) foi submetida a cromatografia em coluna (Ø 7,0 cm x 6,5 cm) com sílica C-18 [Ø 40-60µm (139,8 g)] e sob pressão reduzida e, deste processo, foram obtidas oito subfrações (Tabela 2), as quais foram testadas no bioensaio de avaliação citotóxica frente a linhagens de células tumorais (MCF-7, HEP-2, B16-F10).

Tabela 2 - Subfrações obtidas da cromatografia em coluna (Ø 7,0 cm x 6,5 cm) da fase clorofórmica (3,8846 g) em sílica C-18 e sob pressão reduzida.

FRAÇÃO	ELUENTE	VOLUME (mL)	MASSA (mg)
BGTRC-1	H ₂ O	500	174,2
BGTRC-2	H ₂ O /MeOH 8:2	500	147,3
BGTRC-3	H ₂ O /MeOH 6:4	500	108,7
BGTRC-4	H ₂ O /MeOH 4:6	500	111,4
BGTRC-5	H ₂ O /MeOH 2:8	300	187,6
BGTRC-6	H ₂ O /MeOH 1:9	500	312,4
BGTRC-7	MeOH	500	763,3
BGTRC-8	AcOEt	500	798,4

As frações e subfrações citotóxicas com valores de IC₅₀ (Inibição do Crescimento de 50% das células) ≤ 30 µg/mL foram selecionadas para a continuidade do estudo químico biomonitorado.

4.4.1 Estudo químico da subfração BGTRC-6: isolamento da Substância 1

A subfração BGTRC-6 foi submetida a CLAE semi-preparativa em coluna cromatográfica C-18 (absorção em 254nm e fluxo de 14 mL/min), onde a mistura H₂O/ACN 85% foi utilizada como eluente, resultando no isolamento de uma substância (Substância 1 – 116,3 mg), que teve sua estrutura molecular elucidada e o seu potencial citotóxico avaliado frente a linhagens de células tumorais (OVCAR, B16-F10, MCF-7, 786-0 e UACC62).

4.5 Avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana das frações obtidas na partição do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides*

4.5.1 Microrganismos utilizados

Os bioensaios de atividade antimicrobiana foram realizados com cepas padronizadas do *American Type of Culture Collection* (ATCC-USA), disponíveis no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Farmácia da UFMS o qual está sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Marilene Rodrigues Chang. Nos testes da atividade antibacteriana foram utilizadas três cepas, sendo duas gram-positivas [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29218)] e duas gram-negativas [*Escherichia coli* (ATCC 25922) e

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)], enquanto na avaliação antifúngica foram usadas cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045).

4.5.2 Meios de Cultura

Para o ensaio da atividade antibacteriana foi empregado o meio caldo Mueller-Hinton preparado de acordo com as instruções do fabricante e com pH ajustado de 7,2 a 7,4 em temperatura ambiente.

No teste de avaliação antifúngica foram utilizados os meios caldo Sabourand e RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador de vermelho de fenol) tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico] numa concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0.

4.5.3 Preparo do inóculo bacteriano

O preparo do inóculo bacteriano foi realizado conforme a norma M7-A6 do NCCLS (2003). Cada cepa-estoque bacteriana foi transferida do meio de manutenção para um tubo contendo caldo de cérebro e coração (Brain Heart Infusion – BHI) (Merk) e incubada por 18 horas a 35°C. Alíquotas das suspensões bacterianas foram transferidas para placas de Petri com ágar Mueller-Hinton (Merck) e incubadas a 35°C, por aproximadamente 24 horas, visando o isolamento de colônias jovens. Passado o período de incubação, 4 a 5 colônias foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina estéril (0,85%) e homogeneizadas. A turvação da suspensão celular foi ajustada de modo a obter uma turbidez óptica semelhante à da solução-padrão McFarland de 0,5 o que corresponde a aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Esta solução foi então diluída (1:10) para obter o inóculo com concentração de 10⁷ UFC/mL. Esta suspensão foi diluída em caldo de modo que a concentração final de bactérias do teste resultou em, aproximadamente, 5x10⁵ UFC/mL ou 5x10⁴ UFC/poço (NCCLS - NORMA M7-A6, 2003).

4.5.4 Preparo do inóculo dos fungos leveduriformes

Foi realizado de acordo com a norma M27-A2 do NCCLS (2002). Para assegurar a pureza e viabilidade das culturas jovens, as leveduras foram repicadas em ágar Sabourad dextrose (Merck) por, no mínimo, duas vezes e, em seguida, incubadas a 37°C durante 24 horas para as espécies de *Candida* e por 48 horas para *C. neoformans*. Foram selecionadas entre 4 a 5 colônias de leveduras de, aproximadamente, 1 mm de diâmetro, as quais foram suspensas em 5 mL de solução salina a 0,85% e agitadas vigorosamente de modo a se obter uma turbidez óptica comparável à da solução-padrão McFarland de 0,5 (correspondente a $1 \text{ a } 5 \times 10^6$ células/mL). Em seguida, foi realizada uma diluição 1:50 e depois 1:20 da suspensão padrão com meio líquido RPMI 1640 para se obter uma concentração de $1 \text{ a } 5 \times 10^3$ UFC/mL. Cem microlitros desse inóculo foram adicionados aos poços das microplacas, resultando em uma diluição (1:1) a qual resultou na concentração desejada de inóculo de $0,5 \text{ a } 2,5 \times 10^3$ UFC/mL (NCCLS - NORMA M27-A2, 2002).

4.5.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As amostras foram inicialmente dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a se obter uma concentração de 20.000 µg/mL. Estas soluções foram diluídas em meio de cultura adequado na proporção de 1:10 (2000 µg/mL) e 100 µL foram adicionados, em duplicata, aos poços das colunas 3 e 4 das microplacas conforme ilustrado na Figura 10. As soluções 2000 µg/mL que foram adicionadas aos poços da coluna 4 foram diluídas para 1000 µg/mL devido a adição prévia de 100 µL de meio de cultura nos poços das colunas 4 a 10. Assim, a partir dos poços da coluna 4 foram realizadas diluições sucessivas das amostras resultando nas concentrações de 1000,0; 500,0; 250,0; 125,0; 62,5; 31,2; 15,6 µg/mL. Em seguida, foram adicionados 100 µL da suspensão do inóculo nos poços da coluna 3 a 10, resultando nas concentrações finais de 1000, 500, 250, 125, 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 µg/mL, respectivamente. Os poços da coluna 1 (controle de esterilidade) continham apenas 200 µL do meio de cultura em questão, enquanto os poços da coluna 2 foram destinados ao controle de turbidez, onde foram adicionados a amostra (100 µL) e o meio de cultura em questão (100 µL) e tinha por finalidade observar a ocorrência de alguma turbidez ou precipitação provocada pela amostra. Os poços da coluna 11 foram destinados ao controle padrão com os antimicrobianos cloranfenicol (no teste antibacteriano) e anfotericina B (no

teste antifúngico) e, finalmente, os poços da coluna 12 foram destinados ao controle de crescimento, o qual continha 100 μL do meio + 100 μL do inóculo.

As placas foram incubadas à temperatura de 35°C, sendo que o tempo de incubação dependeu da cepa testada, variando de 24 horas para as cepas bacterianas, 48 horas para a cepa fúngica de *Candida albicans* e 72 horas para a cepa fúngica de *Criptococcus neoformans*. Após o período de incubação, procedeu-se à leitura visual para determinação da CIM, a qual consiste na menor concentração da amostra que impediu o crescimento visível do microorganismo no teste. Frações que apresentaram CIM $\leq 1000\mu\text{g/mL}$ foram consideradas ativas.

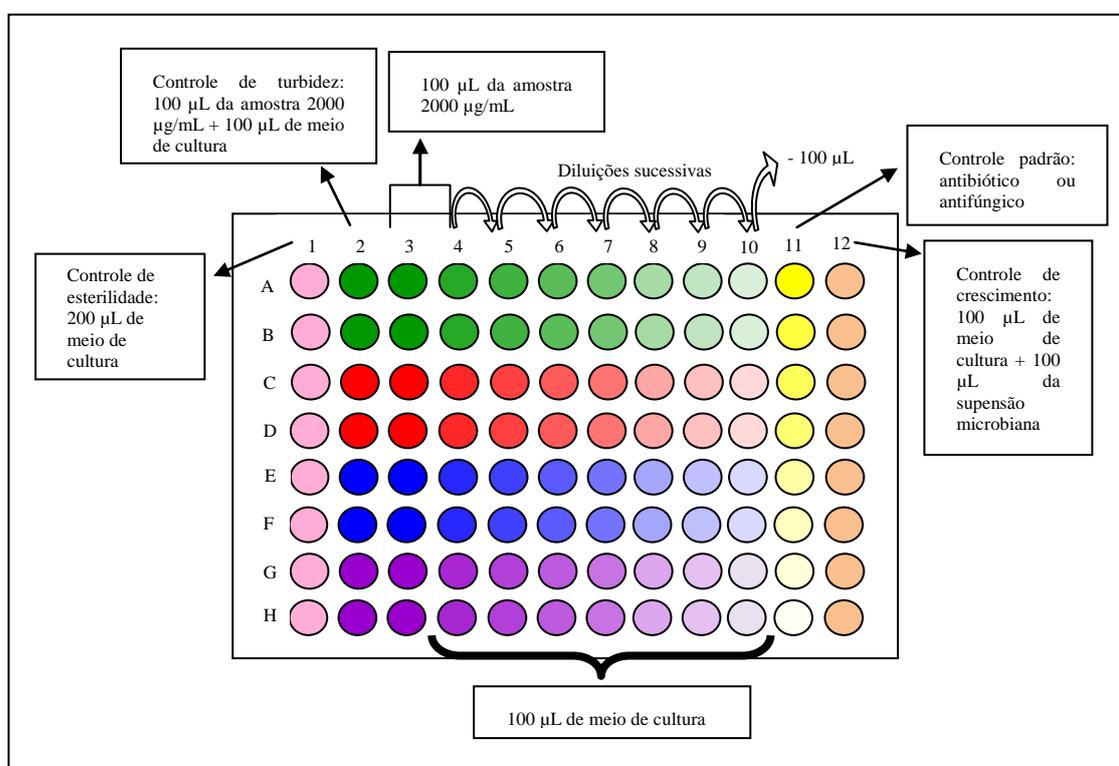


Figura 10 - Representação da microplaca de 96 poços indicando o protocolo utilizado para a execução da avaliação antimicrobiana das frações do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides*.

4.5.6 Frações do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* que foram testadas na avaliação antimicrobiana

As frações BGTRH (hexânica), BGTRC (clorofórmica), BGTRA (acetato de etila) e BGTRHM (hidrometanólica) resultantes da partição do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* foram submetidas à avaliação de seus potenciais antimicrobianos pelo método da microdiluição em caldo.

A suspeita da presença de compostos fenólicos da classe dos taninos nas frações acetato de etila e hidrometanólica motivou a realização de um procedimento de extração de taninos das mesmas, bem como a avaliação da atividade antimicrobiana das subfrações tanantes e não tanantes. Para isso, 500 mg das frações BGTRA e BGTRHM foram solubilizados em 50 mL de água destilada e deixados sob agitação durante 30 minutos com 2 g de pó de pele (Merck). Passado este período, as soluções foram filtradas em papel de filtro e os filtrados foram submetidos a uma nova agitação durante 30 minutos com mais 2 g de pó de pele. Os filtrados foram concentrados até *secura*, originando as subfrações não tanantes BGTRA-NT e BGTRHM-NT uma vez que, no caso da existência de taninos nas frações, estes ficariam aderidos ao pó de pele. As subfrações não-tanantes tiveram os seus potenciais antimicrobianos avaliados a fim de determinar se, no caso de atividade antimicrobiana positiva nas frações acetato de etila (BGTRA) e hidrometanólica (BGTRHM), esta seria atribuída às subfrações não-tanantes ou aos taninos (que ficariam aderidos ao pó de pele).

4.5.7 Metodologia de quantificação de taninos

Optou-se também por realizar a quantificação de taninos nas frações BGTRA, BGTRHM e nas raízes de *G. thalictroides*. Um segundo extrato, produzido a partir de 79 g de raízes de *G. thalictroides* foi preparado por meio de um procedimento mais adequado para a extração de taninos. As raízes da planta foram secadas à temperatura ambiente e, em seguida, moídas. A extração foi realizada exaustivamente com acetona/água (3:1), a uma temperatura de aproximadamente 50°C. O extrato obtido foi filtrado ainda quente em papel de filtro e, em seguida, concentrado sob pressão reduzida, em evaporador rotatório, até a eliminação de toda acetona. O extrato aquoso concentrado (500 mL), chamado de GTE2, foi armazenado sob refrigeração até o momento da quantificação.

O método de quantificação foi realizado em duas etapas: a determinação dos polifenóis totais e a determinação dos polifenóis não tanantes.

Durante a determinação dos polifenóis totais, preparou-se uma solução 160 µg/mL da amostra BGTRHM, uma solução 80 µg/mL da amostra BGTRA e uma solução 1:125 da amostra GTE2. A 0,5 mL das soluções adicionou-se 0,5 mL do reativo de Folin-Denis e 5mL de solução de carbonato de sódio 20%. Após 20 minutos, as medidas de absorvância das soluções foram determinadas em espectrofotômetro (Biospectra, modelo SP22) a 660 nm. As concentrações das soluções das amostras foram determinadas após várias tentativas de diluições, de modo a se obter, após a reação de quantificação de polifenóis totais, uma absorvância na faixa de 0,3 a 0,6. Para a obtenção da equação da reta, utilizou-se como padrão uma solução de ácido tânico a 100 µg/mL.

Para se determinar o teor em polifenóis não tanantes, foram utilizadas soluções cinco vezes mais concentradas que as soluções empregadas na determinação dos polifenóis totais. A 10 mL das soluções mais concentradas foram adicionados 100 mg de pó de pele (Merck). A mistura permaneceu sob agitação durante 1 h. Após este período, os materiais foram filtrados em papéis de filtro e os filtrados obtidos foram então diluídos numa razão 1:5. Estas soluções tiveram seus conteúdos de polifenóis não adsorvidos no pó de pele (não tanantes) determinados de maneira idêntica aos polifenóis totais.

A diferença entre o teor em polifenóis totais e o teor em polifenóis não tanantes, corresponde aos polifenóis que ficaram adsorvidos no pó de pele, ou seja, ao teor de substâncias tanantes no extrato e frações analisados.

4.6 Avaliação citotóxica das frações e subfrações do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides*: ensaio com Sulforrodamina B

Os testes foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares localizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Maria de Fatima Cepa Matos conforme metodologia já padronizada (SIMIONATTO *et al.*, 2009; BOGO *et al.*, 2010).

4.6.1 Linhagens celulares utilizadas

A linhagem celular HEP-2 foi adquirida no Instituto Adolpho Lutz e a linhagem B16-F10 foi doada pelo Prof. Dr. Auro Nomizo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. As outras linhagens foram doadas pelo Prof. Dr. João Ernesto de

Carvalho do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA-Unicamp (Tabela 3).

Tabela 3 - Linhagens celulares utilizadas na avaliação citotóxica das frações, subfrações e substância pura de *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae).

Origem da célula	Nome	Procedência	Meio de cultura
Carcinoma de mama	MCF-7	ATCC-HTB-22	RPMI
Carcinoma de laringe	HEp-2	ATCC-CCL-23	DMEM
Carcinoma de ovário	OVCAR03	ATCC-HTB-161	RPMI
Carcinoma de rim	786-0	ATCC-CRL-1932	RPMI
Células de melanoma murino	B16-F10	ATCC-CRL-6322	RPMI
Células de melanoma	UACC-62	-	RPMI

Todas as linhagens celulares foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido (-196°C). Para a realização dos ensaios, cada linhagem foi descongelada e cultivada em frascos estéreis na presença de meio de cultura DMEM ou RPMI 1640 (Tabela 6), contendo 10 % de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina (meio completo) e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (FRESHNEY, 2005; VICHAI E KIRTIKARA, 2006).

4.6.2 Procedimento da avaliação citotóxica das frações e subfrações do extrato etanólico de *G. thalictroides*

As células foram removidas das garrafas com a adição de solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4 e transferidas para tubos cônicos contendo meio de cultura completo. Após centrifugação (1000 rpm por 4 minutos), o meio de cultura e a tripsina foram desprezados e as células decantadas foram ressuspensas em meio completo. Para a determinação do número de células viáveis, a suspensão celular foi diluída em solução de Trypan Blue[®] 0,4% e contada em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico invertido (Zeiss, modelo Axiovert 25). Em cada cavidade da placa de 96 poços foi depositado um volume de 100 µL de meio de cultura completo contendo 12.000 células (120.000/mL).

Após 24 horas foram adicionadas as amostras dos extratos e frações previamente solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a se obterem concentrações finais de 250,00; 25,00; 2,50 e 0,25 µg/mL. A maior concentração de DMSO não excedeu 0,40%.

No controle negativo, as células cresceram na ausência de qualquer composto e contendo somente meio de cultura. Em todos os testes foi utilizado como controle positivo Cisplatina [cis-diclorodiamino-platinum (II)] (Sigma) e/ou Doxorubicina (Eurofarma). Todas as placas foram novamente mantidas na mesma incubadora a 37 °C, até o final do período de exposição das células aos compostos-testes (48 h). Passado este período, o meio foi removido e substituído por 100 µL de TCA 20%. As placas foram incubadas por 30 minutos a 4 °C em geladeira e, posteriormente, a solução TCA foi removida e as placas lavadas 5 vezes com água corrente. Adicionou-se aos orifícios das placas 50 µL de SRB 0,1% (diluída em ácido acético 1%) e estas foram novamente incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a remoção da solução de SRB, as placas foram lavadas 4 vezes com ácido acético 1% e secadas. Adicionou-se então aos orifícios das placas 100 µL de Tris Base 10mM (Sigma) com subsequente agitação durante 15 minutos para a dissolução das proteínas coradas. A absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas (Thermoplate, modelo Tp Reader).

Foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e então a inibição de crescimento de 50% (I₅₀) de cada amostra foi calculada a partir das fórmulas abaixo (MONKS *et al.* 1991):

- T > C, a droga estimulou o crescimento, portanto, não é possível o cálculo da IC₅₀;
- Se T ≥ T₀ e < C, (efeito citostático): $IC_{50} = 100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$;
- Se T < T₀ (efeito citocida): $IC_{50} = 100 \times [(T-T_0)/(T_0)]$.

Sendo que T é a média da absorbância das células tratadas com as amostras, C é a média da absorbância das células não tratadas e T₀ é a média da absorbância do controle das células no dia da adição das amostras. A IC₅₀ foi determinada graficamente em programa para gráficos e análises de dados (Microcal Origin Versão 6.0) e Microsoft Office Excel 2007. Frações que apresentaram IC₅₀ ≤ 30µg/mL foram selecionadas para dar continuidade ao estudo químico biomonitorado, segundo protocolo do *American National Cancer Institute* (NCI) para ensaios preliminares (SULFNESS e PEZZUTO, 1990 *apud* ITHARAT *et al.*, 2004; MONKS *et al.*, 1991).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em experimentos preliminares observou-se que o extrato etanólico das raízes de *G.thalictroides*, após evaporação do solvente, sofria acelerada degradação, resultando em material sólido resinoso (empedrado). Esta transformação é comumente observada em extratos contendo elevado teor de taninos.

Para evitar a degradação, o extrato etanólico produzido teve seu volume reduzido e, sequencialmente, foi submetido a cromatografia líquido-líquido (item 4.4, p.32) com a finalidade de separar seus constituintes químicos por grau de polaridade, evitando uma possível complexação dos taninos com os componentes químicos de baixa e média polaridade. Portanto, a avaliação do potencial antimicrobiano das raízes de *G.thalictroides*, bem como o seu estudo químico monitorado pela atividade citotóxica *in vitro*, foram realizados a partir das frações do extrato etanólico.

Foi realizado o teste de prospecção para detecção e classificação de taninos utilizando-se solução de cloreto férrico, cujo resultado foi positivo. Na presença dessa solução, os taninos hidrolisáveis produzem uma forte coloração azul, enquanto que os taninos condensados exibem uma forte coloração verde (SANTOS E MELLO, 2004). O teste químico do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* indicou a presença de taninos condensados.

Os taninos possuem a habilidade de formar complexos insolúveis com proteínas, gelatinas e alcaloides (SANTOS e MELLO, 2004) e, possivelmente, foram responsáveis pela degradação do extrato durante a secagem. Além disso, a capacidade de complexação dos taninos com alcaloides é indesejada no estudo químico biomonitorado de *G.thalictroides*, considerando que a família Rubiaceae destaca-se por possuir vários representantes produtores de alcaloides, muitos dos quais são bioativos. Segundo Cordell *et al.* (2001), foram estudados até o ano de 2001, 57 gêneros e 181 espécies dessa família, o que resultou no isolamento de cerca de 680 alcaloides. Rubiaceae produz alcaloides pertencentes a mais de dez classes diferentes, onde se destacam os isoquinolínicos, com 44 substâncias elucidadas; os quinolínicos com 70 alcaloides; e os indólicos, com 391 compostos isolados (CORDELL *et al.*, 2001).

5.1 Avaliação antifúngica e antibacteriana das frações do extrato etanólico de *G. thalictroides*: método da microdiluição em caldo

A atividade antimicrobiana das frações do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* foi avaliada pelo método da microdiluição em caldo (Norma M27-A2: NCCLS, 2002; Norma M7-A6: NCCLS, 2003) e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4 e na Tabela 5. Conforme relatado no item 4.4 (p. 32), o fracionamento do extrato etanólico resultou nas frações BGTRH (hexânica), BGTRC (clorofórmica), BGTRA (acetato de etila) e BGTRHM (hidrometanólica), as quais tiveram seus potenciais antibacterianos testados frente à *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e seus potenciais antifúngicos testados frente à *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

Em relação à atividade antibacteriana, as frações BGTRH e BGTRC foram ativas na concentração de 1000 µg/mL: BGTRH frente a *E. faecalis* e *E. coli* e BGTRC frente a *E. coli*. Apesar de essas frações apresentarem atividade na maior concentração testada, a continuidade do estudo químico visando à busca de compostos antibacterianos é viável, considerando que as frações podem conter substâncias antagonistas, as quais, se separadas durante o procedimento de fracionamento dos componentes químicos, poderiam revelar subfrações e/ou substâncias puras mais ativas.

A fração BGTRA apresentou CIM= 500µg/mL frente a *S. aureus* e CIM= 1000µg/mL frente a *P. aeruginosa*, enquanto a fração BGTRHM mostrou atividade antibacteriana frente a todas as cepas testadas. Para esta última fração, *E. faecalis* foi a cepa mais sensível (CIM=62,5 µg/mL), seguida por *S. aureus* (CIM=125 µg/mL) (Tabela 4).

Nota-se que nas frações acetato de etila e hidrometanólica, as cepas Gram-positivas foram mais suscetíveis do que as Gram-negativas. Isto pode estar relacionado ao fato das bactérias Gram-negativas possuírem uma membrana externa, que constitui uma barreira resistente à penetração de vários agentes antimicrobianos, além de um espaço periplasmático que contém enzimas, as quais são capazes de inativar alguns antibióticos e a presença de bombas de efluxo, que expulsam substâncias estranhas para fora das células (RANG *et al.*, 2004). Estes mecanismos, conseqüentemente, tornam esses microrganismos mais resistentes.

Suspeitou-se de que a atividade antimicrobiana das frações de maior polaridade (acetato de etila e hidrometanólica) poderia estar relacionada com a presença de compostos

fenólicos da classe dos taninos. O teste de prospecção de BGTRA e BGTRHM utilizando-se solução de cloreto férrico indicou a presença de taninos condensados.

Tabela 4 - Resultados da avaliação do potencial antibacteriano das frações do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* e das subfrações tanantes e não tanantes de BGTRA e BGTRHM.

Amostras	Concentração Inibitória Mínima (CIM) µg/mL			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
BGTRH	I*	1000,0	1000,0	I
BGTRC	I	I	1000,0	I
BGTRA	500,0	I	I	1000,0
BGTRA-NT	I	I	I	I
BGTRHM	125,0	62,5	500,0	1000,0
BGTRHM-NT	I	I	I	I
Cloranfenicol	1,0	0,5	0,5	8,0

*Inativo

Assim, BGTRA e BGTRHM sofreram um procedimento de extração de taninos (item 4.5.6, p.38) e as subfrações não tanantes (BGTRA-NT e BGTRHM-NT) foram avaliadas quanto à atividade antibacteriana.

Foi observado que as bactérias que apresentaram sensibilidade frente às frações BGTRA e BGTRHM foram resistentes às respectivas subfrações não tanantes. Essa constatação indica que os taninos presentes em BGTRA e BGTRHM, os quais ficaram retidos no pó de pele, são os responsáveis pela atividade antimicrobiana frente às cepas sensíveis a BGTRA e BGTRHM. Este resultado está em concordância com Scalbert (1991) e Chung *et al.* (1998), que comprovaram o potencial antimicrobiano dos taninos.

A avaliação do potencial antifúngico das amostras também foi realizada pelo método da microdiluição em caldo e os resultados encontram-se listados na Tabela 5. Em relação à cepa de *C. albicans*, apenas a fração clorofórmica foi capaz de inibir o seu crescimento (CIM= 1000 µg/mL), indicando que os compostos de média polaridade desta fração são os responsáveis por esta atividade. *C. neoformans*, por outro lado, apresentou sensibilidade frente a quase todas as amostras testadas.

Tabela 5 - Resultados da avaliação do potencial antifúngico das frações do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* e das subfrações tanantes e não tanantes de BGTRA e BGTRHM.

Amostras	Concentração Inibitória Mínima (CIM) µg/mL	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>
BGTRH	I*	125,00
BGTRC	1000,00	250,00
BGTRA	I	250,00
BGTRA-NT	I	I
BGTRHM	I	31,25
BGTRHM-NT	I	I
Anfotericina B	0,25	0,25

*Inativo

A fração BGTRHM apresentou CIM= 31,25 µg/mL frente a *C. neoformans*, enquanto a fração BGTRA apresentou CIM=250 µg/mL. As subfrações não tanantes dessas frações foram inativas frente a este microrganismo indicando que, possivelmente, os taninos que ficaram aderidos ao pó de pele são os responsáveis pela atividade antifúngica observada.

Considerando-se a importância atribuída aos taninos nos resultados apresentados e a constatação da degradação do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* durante o processo de secagem, decidiu-se determinar o teor desta classe de substâncias nas raízes de *G.thalictroides* e nas frações BGTRA e BGTRHM (item 4.5.6, p.38).

Para a determinação do teor de taninos totais nas raízes e nas frações utilizou-se a equação da curva de calibração: $y=0,0072x+0,0042$, obtida a partir das diferentes concentrações de ácido tânico padrão. Este padrão foi utilizado por caracterizar os taninos totais no método espectrofotométrico (PANSERA *et al.*, 2003). A curva de calibração obtida encontra-se na Figura 11.

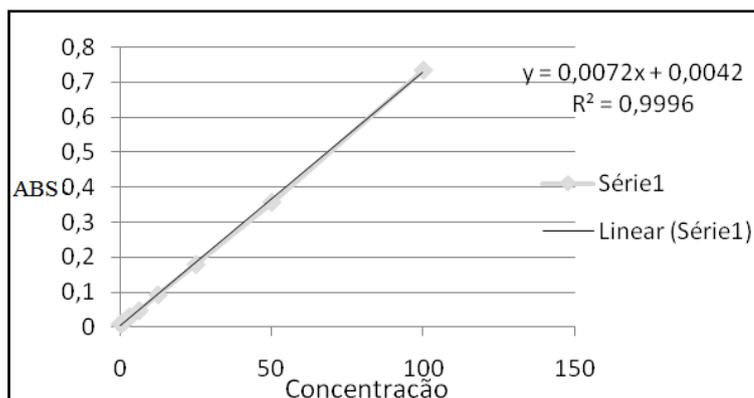


Figura 11 - Curva de calibração de taninos totais – concentração de ácido tânico em µg/mL versus Absorbância (ABS); Equação da reta: Absorbância = a.c+b; Erro do ajuste: 0,9996.

Em relação ao método de extração para a quantificação dos taninos nas raízes de *G. thalictroides*, empregou-se um procedimento visando o máximo de extratibilidade. As raízes foram secas ao ar livre e à sombra, de modo a se obter uma maior preservação do teor desses compostos. A acetona foi selecionada como um dos solventes extratores por ser capaz de bloquear a associação tanino-proteína e a água, o outro solvente extrator, por aumentar o rendimento da extração dos compostos fenólicos (SANTOS e MELLO, 2006).

A Tabela 6 mostra os valores resultantes da quantificação dos taninos totais (% equivalente em ácido tânico) presentes nas raízes de *G.thalictroides* e nas frações BGTRA e BGTRHM.

Tabela 6 - Resultados quantitativos da determinação do teor de taninos nas raízes de *G.thalictroides* e nas frações BGTRA e BGTRHM (% equivalente ao ácido tânico).

Amostra	Polifenóis totais (g%)	Polifenóis não tanantes (g%)	Teor de taninos (g%)
Raízes de <i>G.thalictroides</i>	5,04	0,72	4,32
BGTRA	75,54	21,61	53,93
BGTRHM	35,54	4,44	31,10

O teor de taninos determinado nas raízes de *G. thalictroides*, equivalente a 4,32g% é suficiente para justificar a degradação observada quando da secagem do extrato etanólico. Considerando-se que as fibras são constituintes da parede celular de tecidos associados a caules, folhas e raízes de todas as plantas vasculares, inclusive as herbáceas, e que uma considerável porção destas é insolúvel - e, portanto não compõe os extratos obtidos para os estudos fitoquímicos – pode-se inferir que a concentração de taninos em g% no extrato

preparado para o experimento de quantificação de taninos nas raízes de *G. thalictroides* apresentará uma teor ainda maior do que aquele determinado no peso seco das raízes.

A quantificação do teor de taninos nas frações BGTRA e BGTRHM mostrou que BGTRA concentrou a maior parte dos taninos presentes nas raízes da planta, como pode ser observado pelo teor determinado de 53,93 g%. A fração BGTRHM também apresentou um alto teor de taninos, correspondente a 31,10 g%. Assim, os potenciais antimicrobianos mais expressivos em BGTRA e BGTRHM estão em concordância com os teores elevados de taninos observados nestas frações. É possível observar também que, apesar do maior teor de taninos na fração BGTRA, aqueles encontrados na fração BGTRHM apresentaram uma maior atividade antimicrobiana, constatado pela comparação das CIMs dessas frações.

Acredita-se que os possíveis modos de ação que justificam as atividades antifúngicas e antibacterianas dos taninos estão relacionados a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois grupos, condensados e hidrolisáveis (HASLAM, 1996):

- Complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros);
- Atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres;
- Habilidade de complexar com outras moléculas, como proteínas e polissacarídeos.

Segundo Zhu *et al.* (1997) os taninos também podem atuar de forma seletiva, ligando-se especificamente a receptores.

A viabilidade do uso dessa classe de substâncias como futuros medicamentos é bastante controversa. Os taninos são considerados agentes antinutricionais por consequência das características supracitadas (precipitação de proteínas, polissacarídeos, complexação de íons metálicos) entre outras, tais como inibição de enzimas digestivas. Há relatos da relação dessas substâncias com alguns tipos de câncer e, ainda, hepatotoxicidade. Por outro lado, os taninos também estão relacionados com atividades antimutagênica, anticarcinogênica, antifúngica, antibacteriana e antiviral (inclusive anti-HIV) (CHUNG *et al.*, 1998).

Portanto, ainda é preciso estabelecer com maior clareza a quantidade e qualidade de taninos responsáveis por efeitos desejáveis ao organismo humano daquelas responsáveis pelas atividades nocivas. Este discernimento trará grandes avanços e novas perspectivas para diversas áreas da saúde, como a infectologia, que carece de novas opções terapêuticas para o tratamento de doenças fúngicas, bacterianas e virais.

5.2 Avaliação citotóxica das frações e subfrações do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides*: ensaio com Sulforrodamina B (SRB)

A avaliação citotóxica das frações do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* foi realizada pelo ensaio colorimétrico com SRB. O teste de citotoxicidade adotado baseia-se na ligação dos dois grupos sulfônicos da SRB às proteínas das células tumorais viáveis, as quais são fixadas nos poços da microplaca por meio da precipitação das proteínas pelo ácido tricloroacético. Trata-se de um ensaio sensível, simples, reprodutível e mais rápido do que os ensaios de citotoxicidade realizados com sais de formazan (MONKS *et al.*, 1991, HOUGHTON *et al.*, 2007).

As frações cuja avaliação do potencial citotóxico *in vitro* resultou em $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ foram selecionadas para dar prosseguimento ao estudo químico biomonitorado. Este critério foi utilizado por ser o mesmo adotado pelo NCI nos testes preliminares de citotoxicidade visando à busca de substâncias anticâncer (MONKS *et al.*, 1991; SUFFNESS e PEZZUTO, 1990 *apud* ITHARAT *et al.*, 2004). Assim, dentre as frações BGTRH (Hexânica), BGTRC (Clorofórmica) e BGTRA (Acetato de Etila), somente BGTRC e BGTRA apresentaram $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ frente às células para as quais foram testadas: melanoma murino (B16-F10), carcinoma de mama (MCF-7) e carcinoma de laringe (HEp-2) (Tabela 7).

BGTRC foi fortemente citotóxica, apresentando IC_{50} inferior à cisplatina (controle positivo) frente à B16-F10 ($IC_{50}=0,01 \mu\text{g/mL}$) e MCF-7 ($IC_{50}=0,01 \mu\text{g/mL}$), além de ter sido ativa frente à HEp-2 ($IC_{50}=7,6 \mu\text{g/mL}$). A fração BGTRA foi ativa frente à HEp-2 ($IC_{50}=11,9 \mu\text{g/mL}$) e MCF-7 ($IC_{50}=28 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 7 - Efeito citotóxico (* IC_{50}) das frações orgânicas do extrato etanólico das raízes de *Galianthe thalictroides* em células neoplásicas após período de incubação de 48 horas. * IC_{50} : Dose que inibe 50% do crescimento celular (microgramas /mL), média.

Amostras	Efeito citotóxico (* IC_{50}) $\mu\text{g/mL}$		
	B16-F10	Hep-2	MCF-7
BGTRH	66,50	126,00	41,30
BGTRC	0,01	7,60	0,01
BGTRA	71,90	11,90	28,00
Cisplatina	6,40	1,50	6,30

Constam na literatura estudos químicos e biológicos de apenas duas espécies pertencentes ao gênero *Galianthe* (item 2.2.1, p. 27), sendo que ambas foram submetidas à avaliação do potencial citotóxico *in vitro* frente a linhagens de células tumorais (MOURA *et*

al., 2006; AGUIAR *et al.*, 2008). O extrato metanólico bruto das partes aéreas de *G. brasiliensis* apresentou atividade citostática (inibição do crescimento celular) na concentração de 250 µg/mL frente às linhagens MCF-7 (carcinoma de mama), OVCAR (carcinoma de ovário) e NCIADR (carcinoma de ovário resistente), expressa em porcentagem de inibição de crescimento (100, 70 e 53%, respectivamente). Na concentração de 25 µg/mL o mesmo extrato foi responsável por uma inibição de crescimento equivalente a 66% frente à linhagem K-562 (leucemia linfóide), sendo que na concentração de 250 µg/mL foi relatado um efeito citocida (morte celular) de 65% (MOURA *et al.*, 2006). O extrato metanólico das flores da espécie *G. ramosa* apresentou baixa ação citotóxica, pois, na maior concentração testada (1000 µg/mL), inibiu fracamente a proliferação das linhagens celulares tumorais avaliadas: 22% (K-562) e 17% (S-180) (AGUIAR *et al.*, 2008).

Os resultados da avaliação citotóxica *in vitro* das frações de *G. thalictroides* foram expressos na forma de IC₅₀, conforme protocolo do NCI (MONKS *et al.*, 1991; SUFFNESS e PEZZUTO, 1990 *apud* ITHARAT *et al.*, 2004). Porém, para fins comparativos com os resultados obtidos no estudo de *G. brasiliensis*, foi determinada a porcentagem de inibição do crescimento celular das frações do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* frente à linhagem MCF-7. Esta linhagem foi selecionada por ter sido testada nas duas espécies (*G. brasiliensis* e *G. thalictroides*) e os resultados encontram-se listados na Tabela 8.

Tabela 8 - Porcentagem de inibição de crescimento das frações BGTRH, BGTRC e BGTRA frente à linhagem MCF-7 nas concentrações de 25µg/mL e 250µg/mL.

Amostras	% de Inibição do Crescimento (=100 - % de crescimento)	
	25µg/mL	250µg/mL
BGTRH	28,44±3,90 (citostático)	68,24±6,70 (citocida)
BGTRC	59,67±2,10 (citocida)	57,00±1,10 (citocida)
BGTRA	48,00±3,00 (citostático)	3,40±2,50 (citocida)

As frações BGTRH, BGTRC e BGTRA foram consideravelmente mais ativas que o extrato metanólico das partes aéreas de *G. brasiliensis*, uma vez que BGTRC (nas concentrações de 25 e 250µg/mL), BGTRH e BGTRA (nas concentrações de 250µg/mL) apresentaram atividade citocida, uma vez que houve uma redução na absorbância (T) referente à medição da quantidade de proteínas (as quais indicam a quantidade de células viáveis presentes no teste) ao final do período de incubação das amostras em relação à quantidade de proteínas presentes no início do teste (T₀), ou seja, T<T₀. O efeito máximo relatado para o extrato metanólico de *G. brasiliensis* foi uma inibição do crescimento da

linhagem celular (efeito citostático) de 100% ($T=T_0$) na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$.

BGTRC apresentou efeito citocida de aproximadamente 60% em ambas concentrações apresentadas na Tabela 9, o que está em concordância com o valor de sua IC_{50} (0,01 $\mu\text{g/mL}$), indicativo de uma potente atividade citotóxica. A fração BGTRH apresentou um efeito citocida superior ao de BGTRC na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, entretanto, na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, BGTRH foi fracamente ativa, uma vez que inibiu apenas 28,44% do crescimento celular. Segundo o critério seguido pelo NCI para estudos preliminares de extratos e frações, a fração BGTRH não é considerada suficientemente citotóxica frente à MCF-7 para que seja dada continuidade ao seu estudo químico monitorado pela atividade citotóxica ($IC_{50}>30 \mu\text{g/mL}$). Mesmo assim, os resultados obtidos para esta fração apontam um efeito citotóxico mais potente do que o apresentado para o extrato metanólico das partes aéreas de *G. brasiliensis*.

Devido à potente atividade citotóxica apresentada, a fração BGTRC foi selecionada para dar continuidade ao estudo químico. Esta amostra foi submetida à cromatografia em sílica C-18 (item 4.4, p. 32) (Figura 9, p.33; Tabela 2, p.34) e as subfrações resultantes tiveram seus potenciais citotóxicos avaliados frente às linhagens B16-F10, HEp-2 e MCF-7 (Tabela 9, p.50).

Dentre as linhagens testadas, a subfração BGTRC-1 apresentou seletividade frente à MCF-7 ($IC_{50}= 4,40 \mu\text{g/mL}$), sendo inativa para as outras linhagens testadas, enquanto BGTRC-2 apresentou atividade citotóxica potente ($IC_{50}= 1,05 \mu\text{g/mL}$) frente à linhagem MCF-7, além de apresentar atividade frente à B16-F10 ($IC_{50}= 11,00 \mu\text{g/mL}$). A fração BGTRC-8 foi ativa frente às linhagens B16-F10 e MCF-7 ($IC_{50}= 14,60$ e $15,10 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), mostrando-se inativa em HEp-2 ($IC_{50} > 30,00 \mu\text{g/mL}$). As subfrações BGTRC-3 e BGTRC-7 foram mais citotóxicas que o controle positivo (cisplatina) frente às linhagens MCF-7 e B16-F10, enquanto BGTRC-4, BGTRC-5 e BGTRC-6 foram mais citotóxicas que o controle positivo frente a todas as linhagens testadas.

BGTRC-6 também foi mais citotóxica ($IC_{50}\leq 0,01\mu\text{g/mL}$) do que a fração antecessora BGTRC, de modo que, possivelmente, os componentes ativos de BGTRC concentraram-se nesta subfração, resultando em um efeito citotóxico sinérgico. Este resultado levanta a hipótese de que BGTRC-6 contenha os principais componentes ativos relacionados com a possível atividade anticâncer de *G. thalictroides*.

A análise dos resultados observados evidenciou a existência de fundamento no uso popular de *G.thalictroides* como remédio anticâncer, o que a torna, portanto, uma fonte

promissora de novos protótipos de agentes quimioterápicos.

Todas as subfrações obtidas apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais num grau moderado ($10,00 < IC_{50} \leq 30,00 \mu\text{g/mL}$) a elevado ($IC_{50} \leq 10,00 \mu\text{g/mL}$) e, portanto, continuarão sendo estudadas quimicamente com a finalidade de isolar e identificar os componentes químicos responsáveis pelas atividades citotóxicas observadas.

Tabela 9 - Efeito citotóxico (IC_{50}) das subfrações da fração BGTRC após cromatografia em coluna com sílica C-18.

Amostras	Efeito citotóxico (IC_{50}) $\mu\text{g/mL}$		
	B16-F10	Hep-2	MCF-7
BGTRC-1	>250,000	>250,000	4,400
BGTRC-2	11,000	9,700	1,050
BGTRC-3	0,140	9,700	0,380
BGTRC-4	0,020	1,000	0,020
BGTRC-5	0,040	0,960	0,070
BGTRC-6	0,005	0,010	0,007
BGTRC-7	0,090	4,900	1,610
BGTRC-8	14,600	111,500	15,100
Cisplatina	6,40	1,50	6,30

5.2.1 Elucidação estrutural e avaliação do potencial citotóxico da **Substância 1**

A fração BGTRC-6 apresentou atividade citotóxica potente frente às linhagens celulares testadas e em CCDA apresentou um constituinte majoritário. Esta fração foi submetida à CLAE semipreparativa com a finalidade de isolar e identificar os constituintes químicos presentes (item 4.4.1, p. 34). Este experimento resultou, até o momento, na purificação de uma substância (Substância 1), a qual se apresentou como um sólido amorfo amarelo e cuja análise em CCDA, revelada com solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, mostrou uma mancha de coloração avermelhada.

O espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (Figura 15) apresentou cinco sinais relativos a hidrogênios de anel aromático: quatro dubletos em δ 6,66 ($J= 8,1\text{Hz}$), 7,12 ($J= 8,1\text{Hz}$), 8,29 ($J=5,3 \text{ Hz}$) e 8,05 ($J=5,3 \text{ Hz}$) - os dois últimos sugestivos de prótons de uma molécula tipo piridina - e um tripleto em δ 7,44 ($J= 8,1\text{Hz}$). Os três sinais de $J= 8,1\text{Hz}$ indicam três hidrogênios ligados a carbono de anel aromático em sequência, ou seja, em padrão de substituição 1,2,3. Também foram observados um singleto largo em δ 10,14, sugestivo de hidrogênio ligado a nitrogênio, dois dubletos relativos a hidrogênios carbinólicos

em δ 3,59 ($J=12,5$ Hz) e 3,92 ($J=12,5$ Hz), três singletos relativos a metilas em δ 1,39, 1,41 e a uma metoxila aromática em δ 4,06 e sinais entre δ 1,50 e 4,0.

A análise dos dados do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 16) e DEPT 135° (Figura 17) evidenciou sinais para vinte e um carbonos, destacando-se onze carbonos de anel aromático, sendo seis não ligados a hidrogênio - entre estes um sugestivo de carbono oxigenado (δ 156,90) - e cinco CH (δ 100,31, 104,45, 116,08, 129,29 e 137,82). Foram observados também sinais relativos a três metilas em δ 25,68, 29,12 e 55,46, dois carbonos quaternários oxigenados em δ 80,09 e 91,34, dois CH em δ 51,76 e 50,00, três carbonos metilênicos (CH_2), sendo um carbinólico em δ 62,09 e os outros em δ 22,11 e 29,08.

O conjunto dos sinais referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos e o singletto largo em δ 10,14 são compatíveis com a presença de um núcleo β -carbolínico, onde os sinais relativos ao anel benzênico são os dubletos em δ 6,66 e 7,12 e o triplete em δ 7,44, enquanto os relativos ao núcleo piridínico são os dubletos em δ 8,05 e 8,29.

Considerando que o padrão de substituição para o anel benzênico é 1,2,3 trissubstituído, pôde-se, preliminarmente, propor as possibilidades abaixo para a parte aromática da substância 1 (Figura 12).

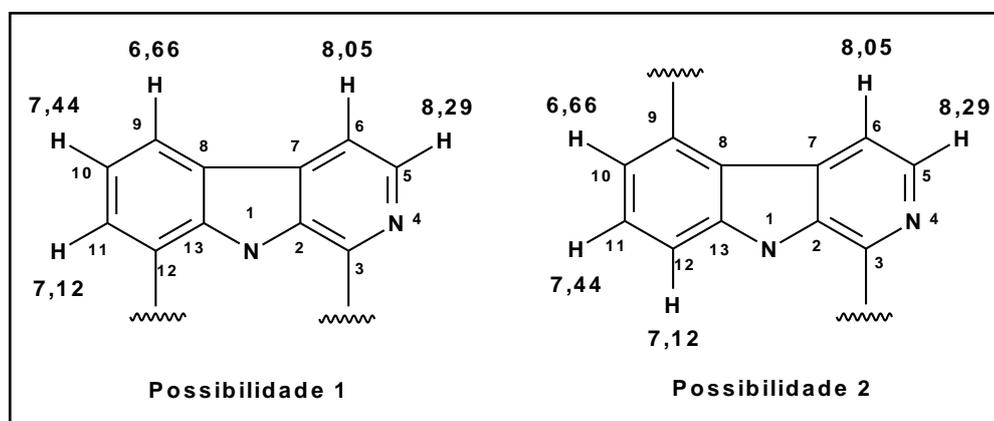


Figura 12 - Possibilidades estruturais para a parte aromática da Substância 1.

No experimento HMBC (Figura 19; Tabela 10) foram observadas correlações intensas entre o hidrogênio referente ao sinal em δ 7,44 (*t*) e os carbonos a δ_{C} 156,90 – ligado à metoxila – e δ_{C} 141,56 – ligado ao nitrogênio. Esta observação define a possibilidade 2 para o núcleo β -carbolínico da substância 1, visto que a possibilidade 1 exigiria o acoplamento com C-8, o que é incompatível com o deslocamento químico 141,56. Outras correlações importantes foram observadas entre o hidrogênio referente ao sinal em δ 6,66 ligado no carbono correspondente ao sinal em δ 100,31 (C-10) e os carbonos C-8 (δ 112,00) e C-12 (δ

104,45); entre o hidrogênio (δ 7,12) ligado no carbono referente ao sinal em δ 104,45 (C-12) e os carbonos C-8 (δ 112,00), C-10 (δ 100,31). Estes dados permitiram, portanto, definir a possibilidade 2 como sendo a correspondente à parte aromática da molécula, bem como atribuir os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da mesma.

No experimento HMBC também foi possível observar correlações importantes entre o hidrogênio (δ 10,14) ligado ao átomo de nitrogênio e os carbonos C-8 (δ 112,00), C-7 (δ 128,03), C-2 (δ 134,44) e C-13 (δ 141,36) e a correlação entre os hidrogênios da metoxila (δ 4,06) e o carbono C-9 (δ 156,90). Estas informações são compatíveis com a proposta do núcleo β -carbolínico metoxilado na posição 9 (Possibilidade 2 da Figura 13).

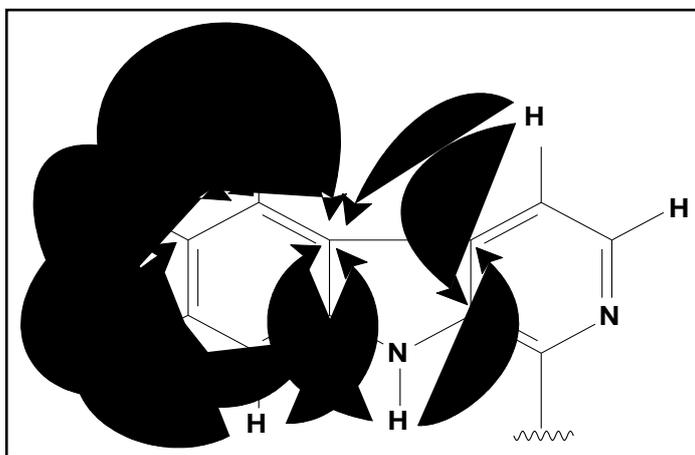


Figura 13 – Algumas correlações HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) observadas no núcleo β -carbolínico da Substância 1.

Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz) e correlações HSQC e HMBC da Substância 1 (CDCl_3).

C	SUBSTÂNCIA 1		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC (H→C)
OMe	55,46	4,06 (3H; s)	C-9
2	134,44	-	-
3	140,36	-	-
5	137,82	8,29 (1H; <i>d</i> , 5,3 Hz)	C-6; C-7; C-3; C-2; C-8
6	116,08	8,05 (1H; <i>d</i> , 5,3 Hz)	C-2; C-8; C-5; C-3
7	128,03	-	-
8	112,00	-	-
9	156,90	-	-
10	100,31	6,66 (1H; <i>d</i> , 8,1 Hz)	C-8; C-12; C-9; C-11; C-13
11	129,19	7,44 (1H; <i>t</i> , 8,1 Hz)	C-9; C-13; C-12; C-8; C-10
12	104,45	7,12 (1H; <i>d</i> , 8,1 Hz)	C-8; C-10; C-11; C-9
13	141,56	-	-
14	51,76	4,01 (1H; <i>sl</i>)	C-18; C-3; C-15; C-16; C-20; C-17; C-2
15	22,11	2,03 (1H; <i>m</i>)	-
		2,69 (1H; <i>m</i>)	-
		1,50 (1H; <i>m</i>)	-
16	29,08	1,57 (1H; <i>m</i>)	-
		2,80 (1H; <i>sl</i>)	C-16; C-20; C-14; C-15
17	50,00	2,80 (1H; <i>sl</i>)	C-16; C-20; C-14; C-15
18	91,34	-	-
19	62,09	3,59 (1H; <i>d</i> , 12,5 Hz)	C-14; C-18; C-20
		3,92 (1H; <i>d</i> ; 12,5 Hz)	C-14; C-18
20	80,09	-	-
21	25,68	1,39 (3H; s)	C-22; C-20; C-17
22	29,12	1,41 (3H; s)	C-21; C-20; C-17
NH	-	10,14 (1H; <i>s</i>)	C-8; C-7; C-2; C-13

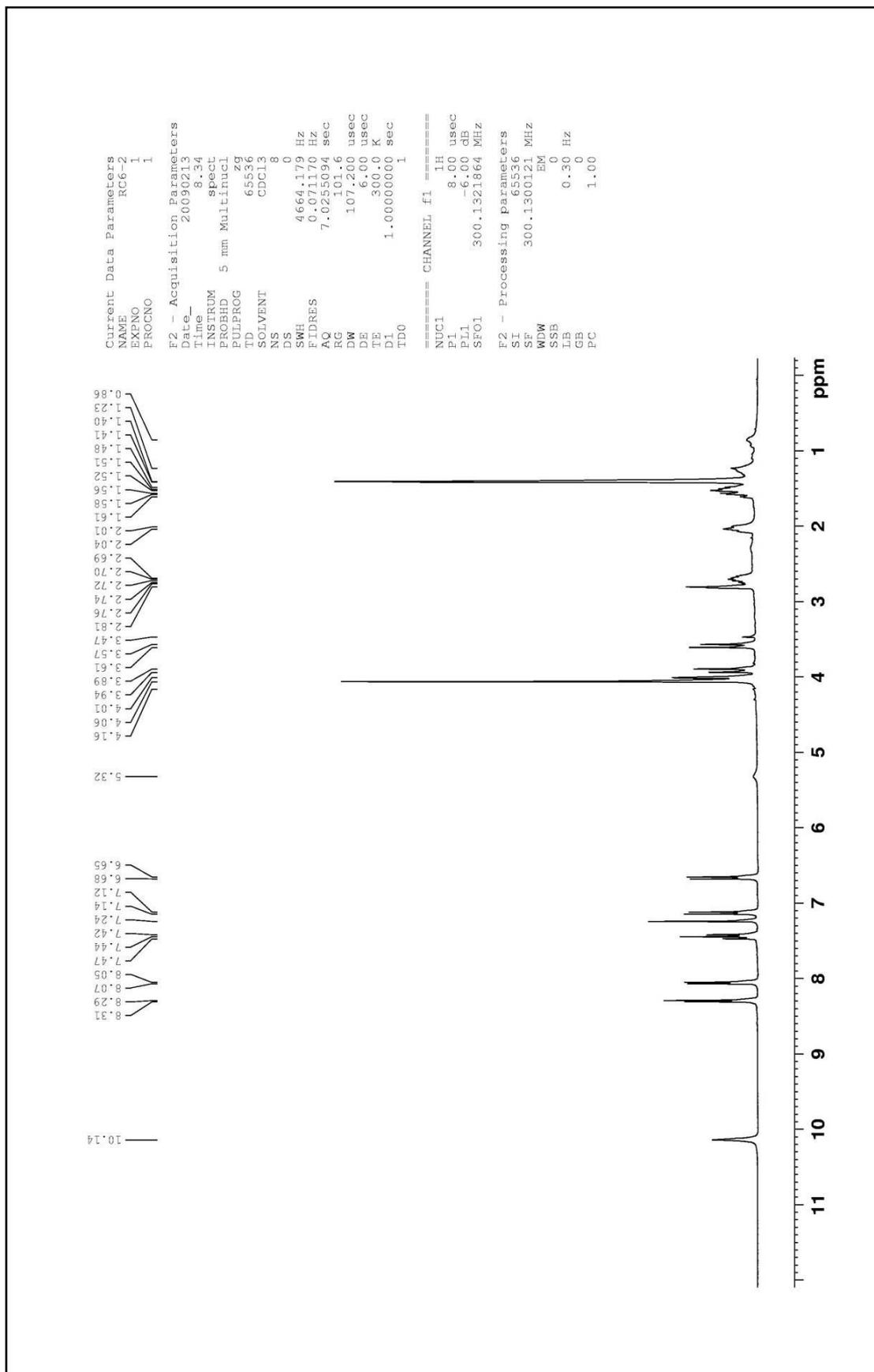


Figura 14 – Espectro de RMN de ¹H da Substância 1 (CDCl₃, 300 MHz).

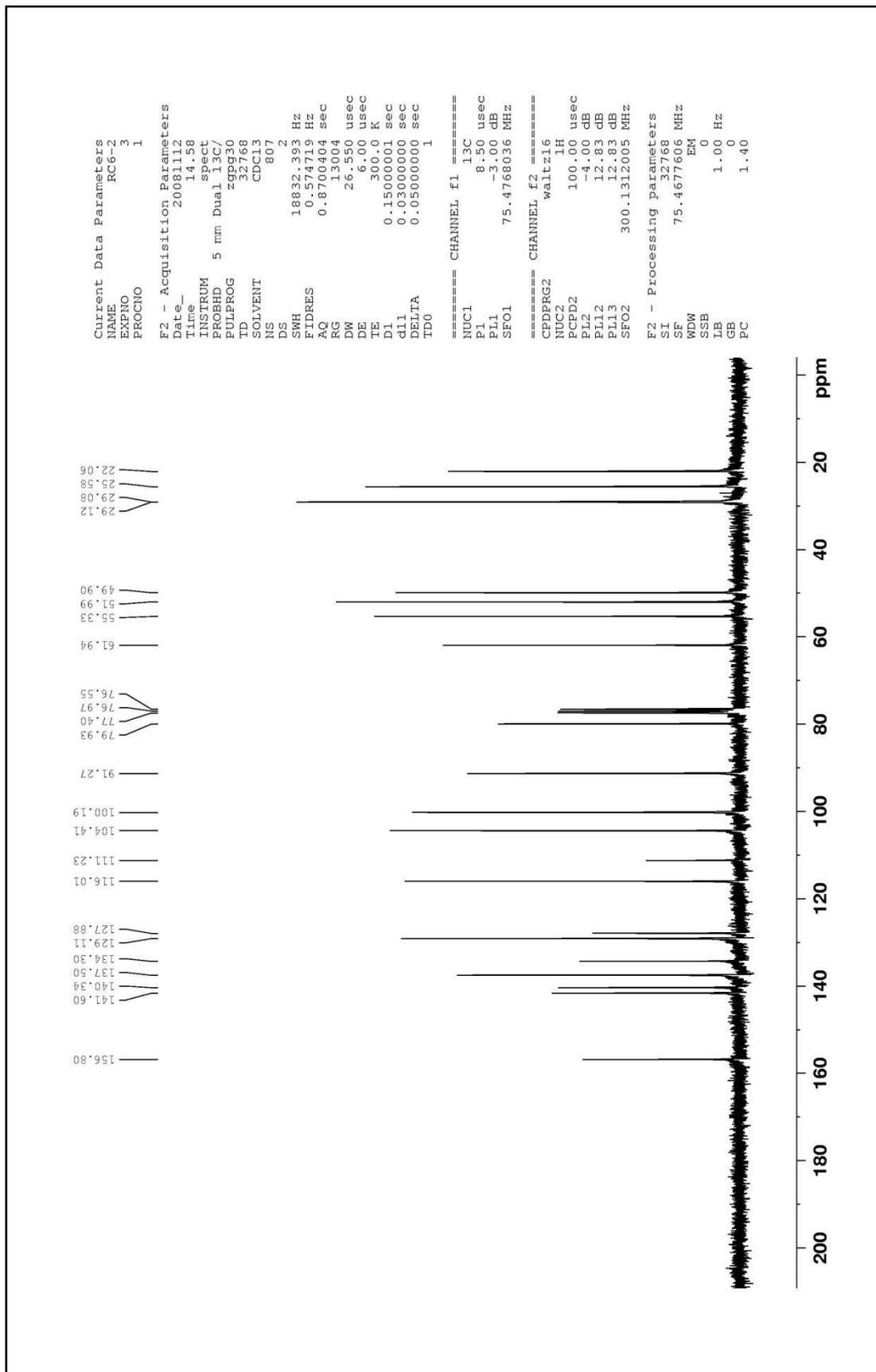


Figura 15 – Espectro de RMN ^{13}C da Substância 1 (CDCl_3 , 75 MHz).

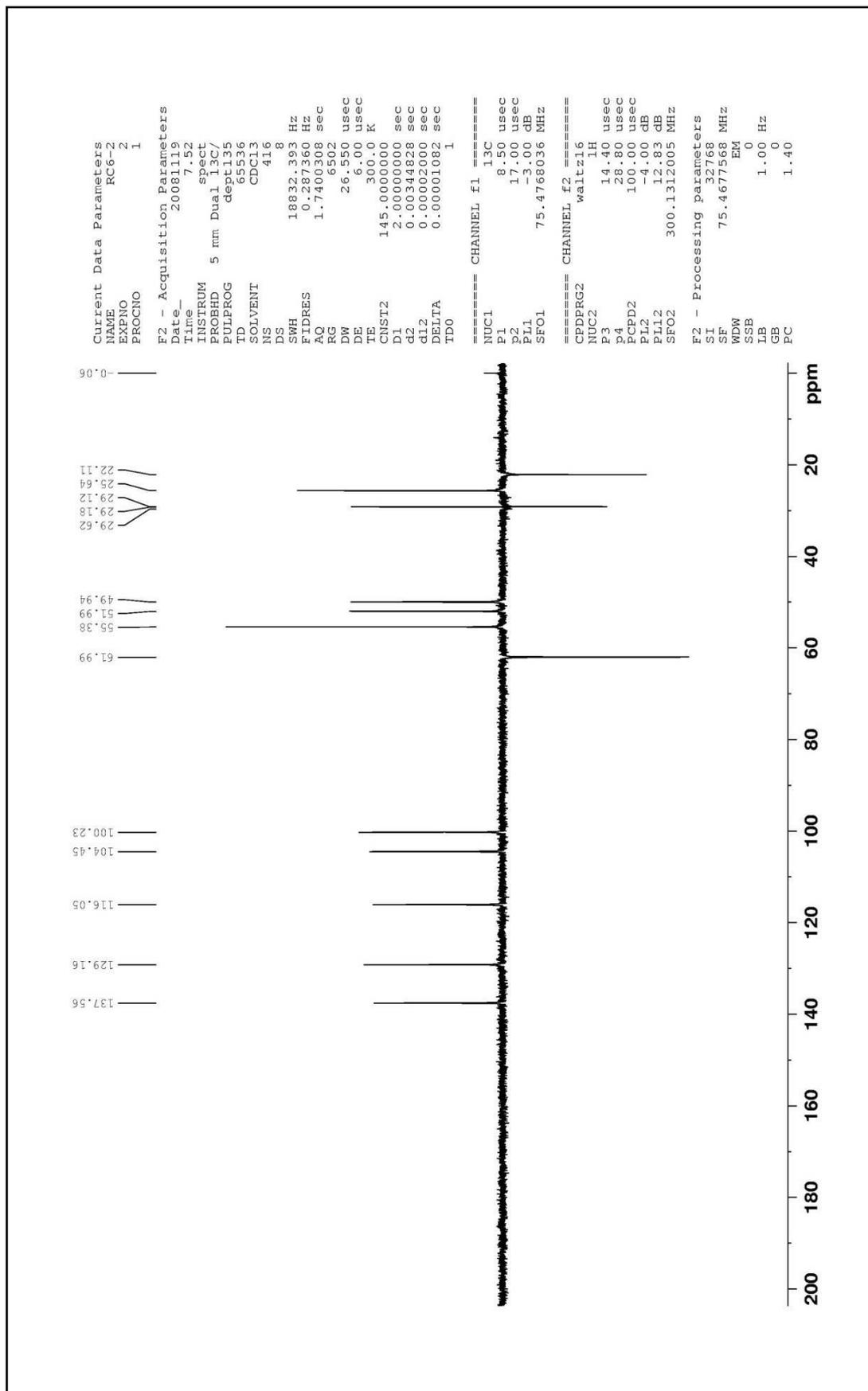


Figura 16 - Espectro de RMN DEPT 135° da Substância 1 (CDCl₃, 75 MHz).

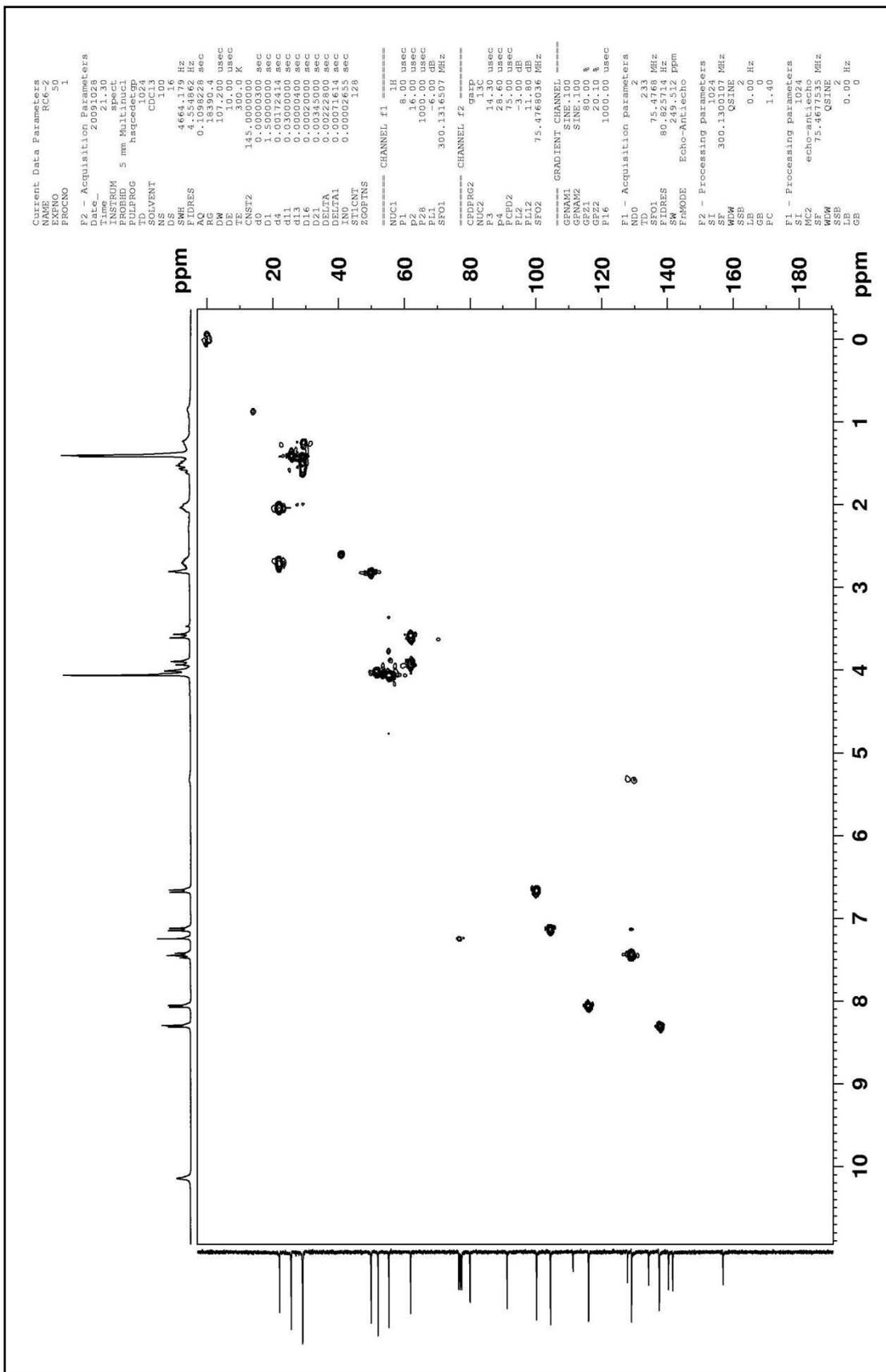


Figura 17 - Espectro de RMN HSQC da Substância 1 (CDCl₃, 300/75 MHz).

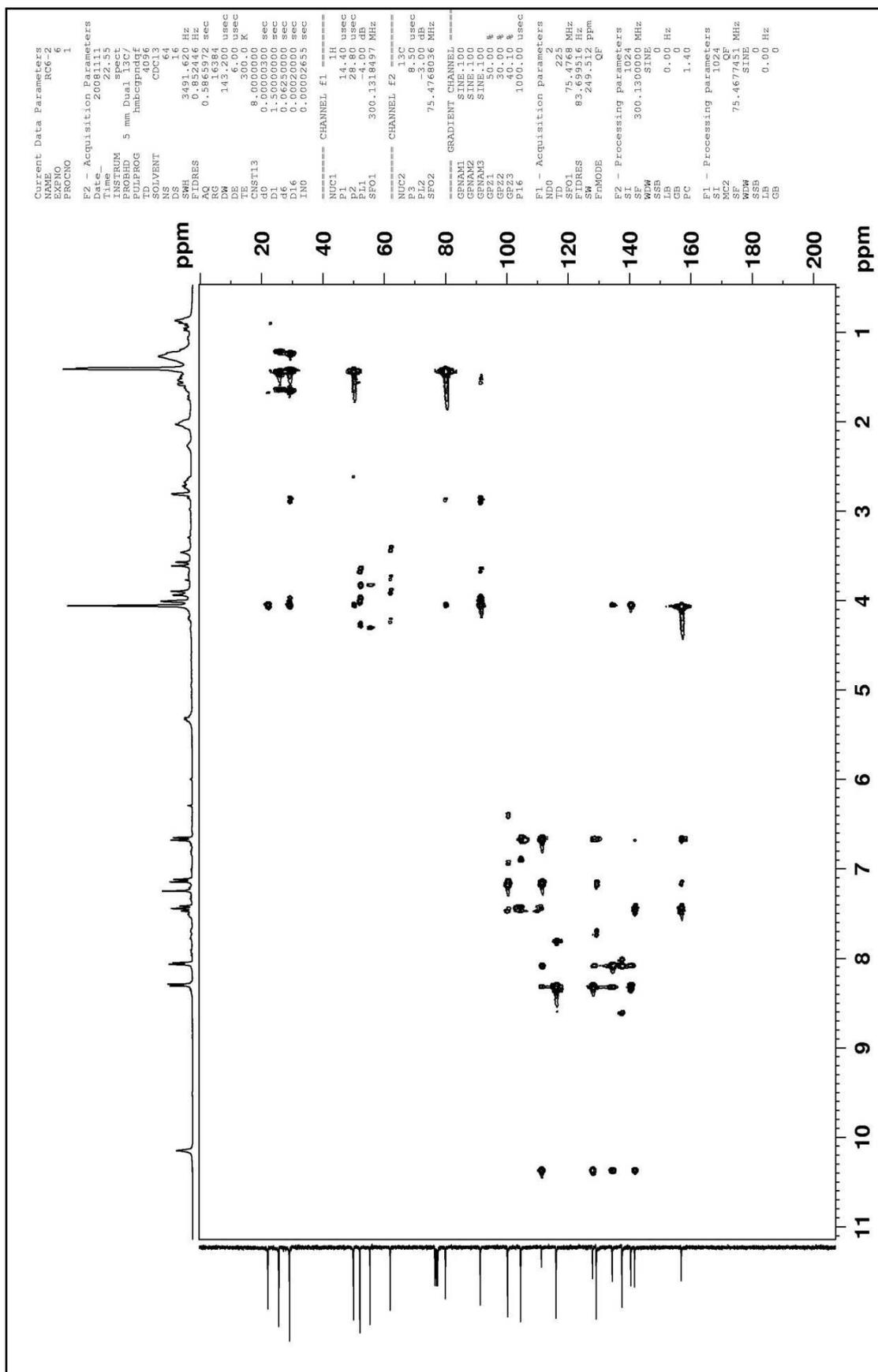


Figura 18 - Espectro de RMN HMBC da Substância 1 (CDCl₃, 300/75 MHz).

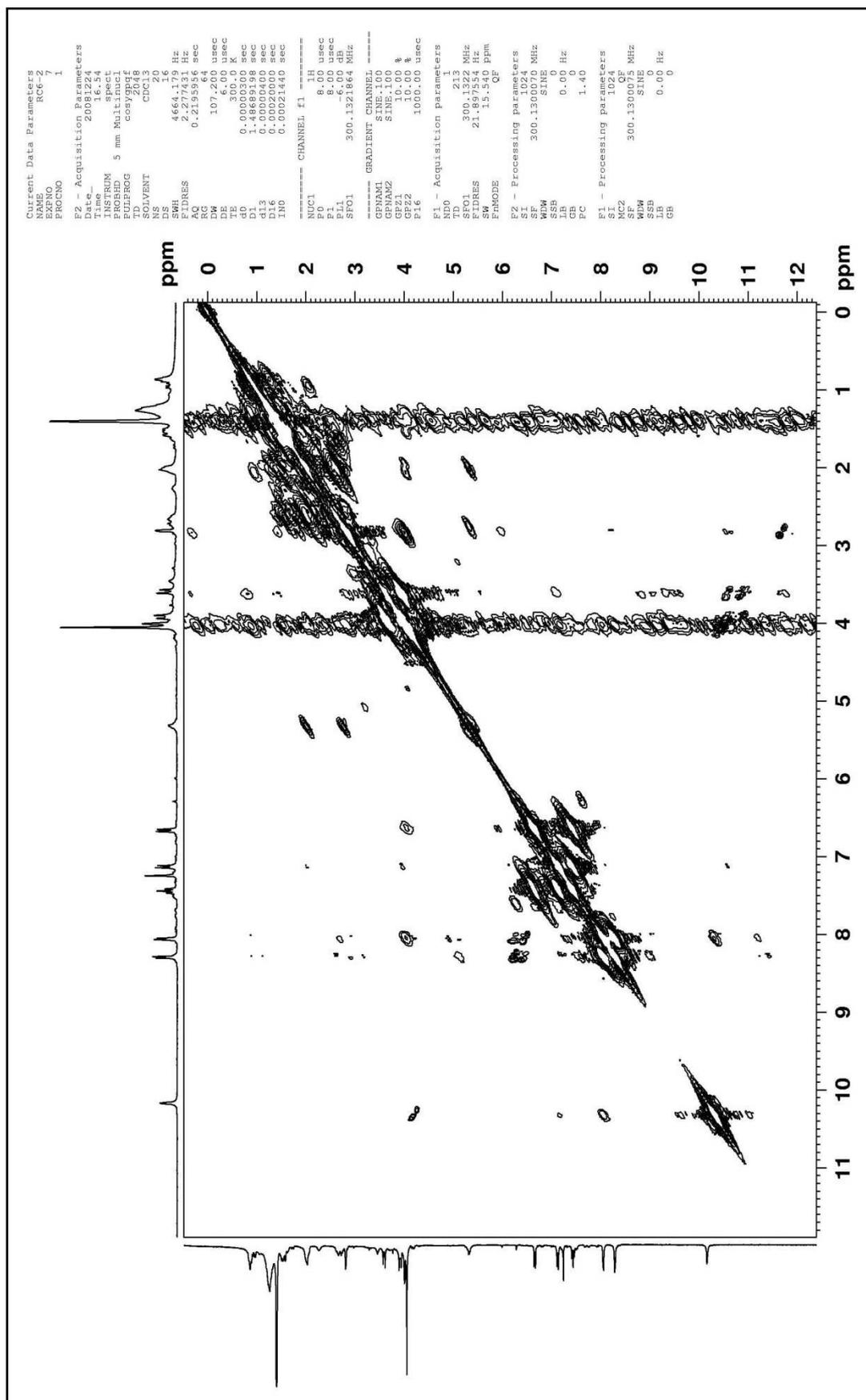


Figura 19 - Espectro de RMN COSY (¹H-¹H) da Substância 1 (CDCl₃, 300 MHz).

Além dos sinais relativos ao núcleo β -carbolínico, os espectros de RMN mostram um conjunto de sinais de uma parte alifática presente na molécula, ligada ao C-3.

Observaram-se no experimento HMBC correlações entre o hidrogênio (δ 4,01) ligado ao carbono correspondente ao sinal em δ 51,76 (C-14) e os carbonos C-18 (δ 91,34), C-3 (δ 140,36), C-16 (δ 29,08) e C-15 (δ 22,11); entre o hidrogênio (δ 2,80) ligado ao carbono referente ao sinal em δ 50,00 (C-17) e os carbonos C-16 (δ 29,08), C-20 (δ 80,09), C-14 (δ 51,76) e C-15 (δ 22,11). Também foram observadas correlações dos hidrogênios das metilas relativas aos sinais em δ 1,39 (δ_C 25,68 - C-21) e 1,41 (δ_C 29,12 - C-22) com os carbonos em δ 80,09 (C-20) e 50,00 (C-17). Considerando estas observações, têm-se as duas possibilidades abaixo para a estrutura parcial da porção não aromática da molécula.

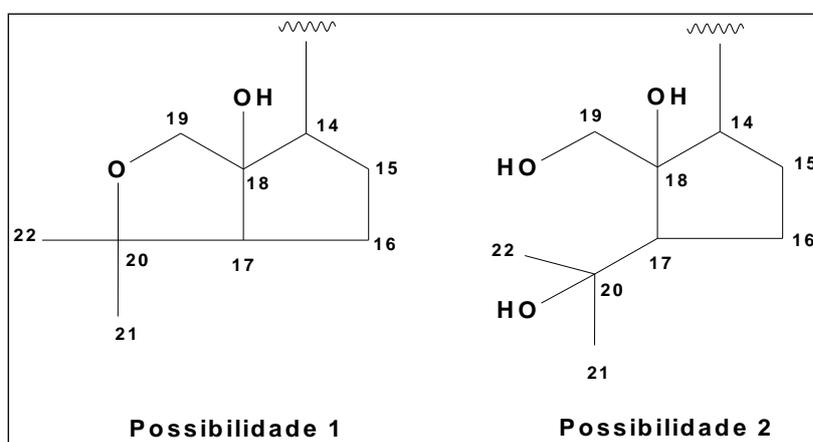


Figura 20 – Propostas de estruturas para a porção não aromática da Substância 1.

Na tentativa de definir a possibilidade mais compatível, realizou-se a acetilação da Substância 1 e, no espectro de RMN de ^1H desta, observou-se uma desproteção de 0,87 ppm nos hidrogênios (δ 3,92 e 3,59) ligados a C-19 (δ 62,09) em comparação com os dados de RMN de ^1H de 1 (Figura 21). Esta comparação permitiu definir que a estrutura da parte alifática da molécula corresponde à possibilidade 2.

A correlação observada no experimento HMBC entre o hidrogênio (δ 4,01), ligado ao carbono correspondente ao sinal em δ 51,76 (C-14), e o carbono referente ao sinal δ 140,36 (C-3) confirma que a porção não aromática está ligada ao C-3 do núcleo β -carbolínico por meio de C-14 (Figura 22).

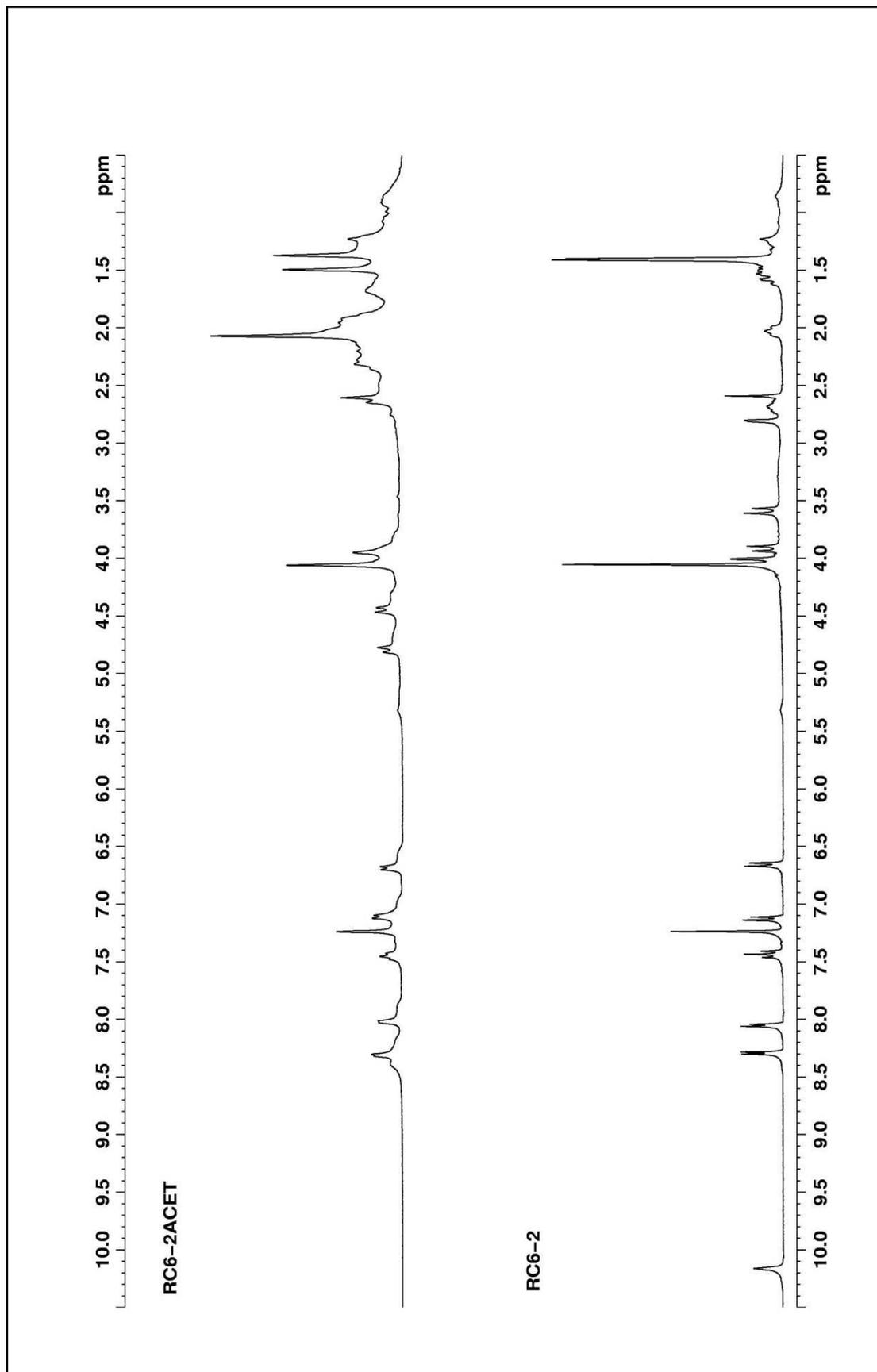


Figura 21 - Espectros de RMN ^1H da Substância 1 e da Substância 1 acetilada (CDCl_3 , 300 MHz).

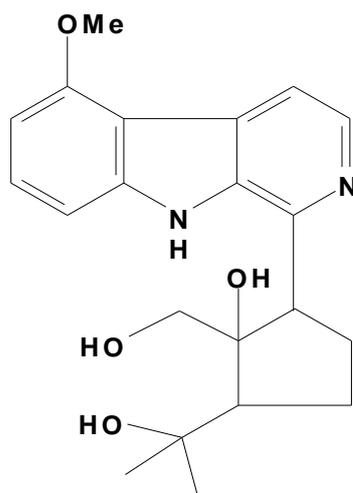


Figura 22 – Proposta da estrutura química da Substância 1.

Essa proposta de estrutura é compatível com as informações fornecidas pelas correlações existentes no espectro COSY ^1H - ^1H de **1** (Figura 20).

No experimento NOESY (Figura 23) foi observada uma correlação importante entre o hidrogênio correspondente ao sinal em 4,01 (ligado a C-14, δ 51,76) com os hidrogênios das metilas H_{21} e H_{22} , correspondentes aos sinais δ 1,39 e 1,41, indicando que estes se encontram espacialmente próximos (Figura 24). Assim foi possível definir a relação *cis* entre o grupo isopropila e o hidrogênio de C-14.

Os sinais relativos aos hidrogênios de C-15 (δ 22,11) são δ 2,03 e δ 2,69, tendo sido atribuído este último valor ao hidrogênio que apresenta relação *cis* ($\text{H}_{15\beta}$), com a hidroxila ligada a C-18 em função do maior deslocamento químico. No experimento NOESY observou-se uma correlação entre o hidrogênio mais protegido de C-15 (δ 2,03) e as metilas do grupo isopropila (Figura 25). Estas observações permitiram definir a configuração relativa para a estrutura química de **1** mostrada na Figura 26.

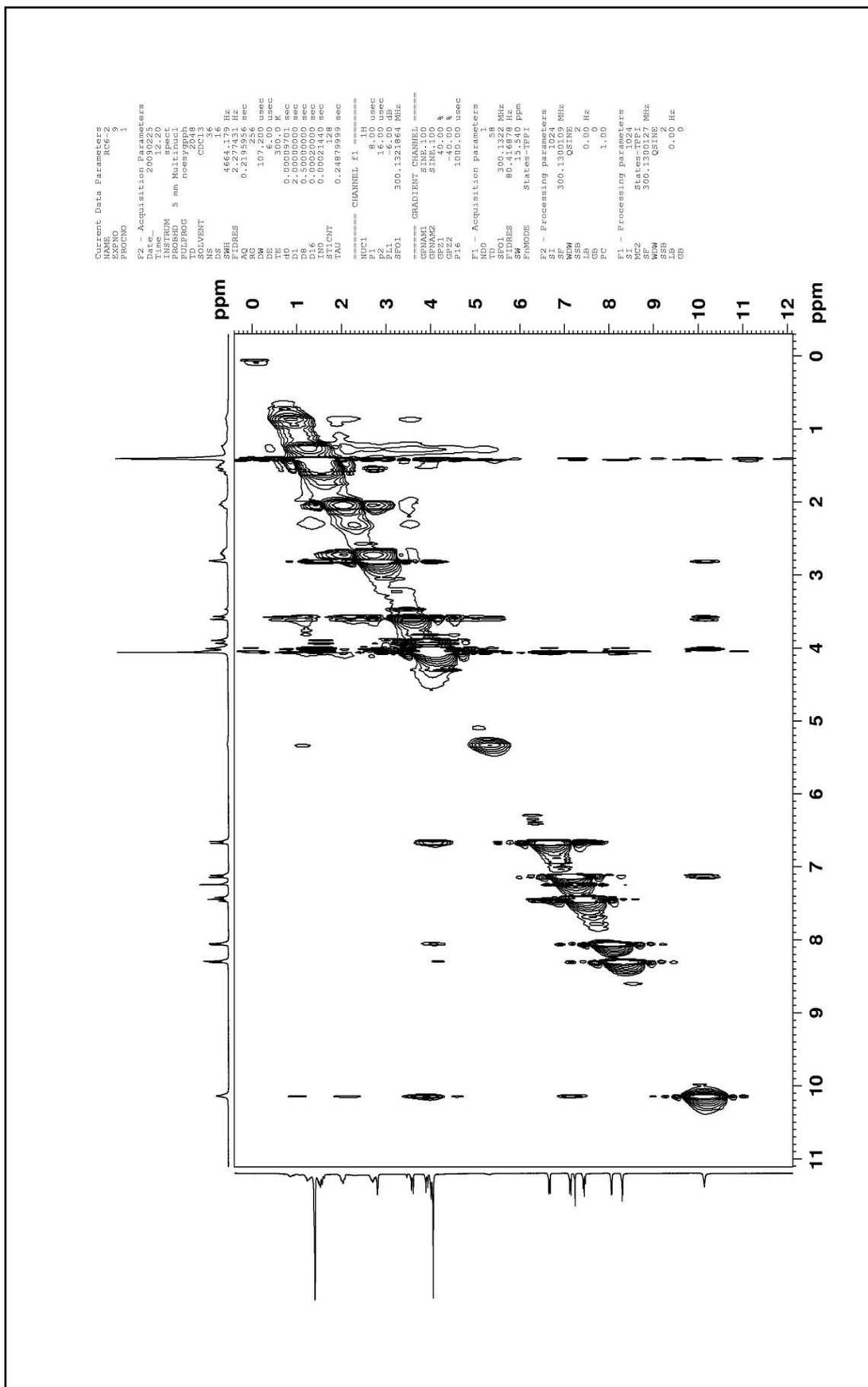


Figura 23 - Espectro de RMN NOESY da Substância 1 (CDCl₃, 300 MHz).

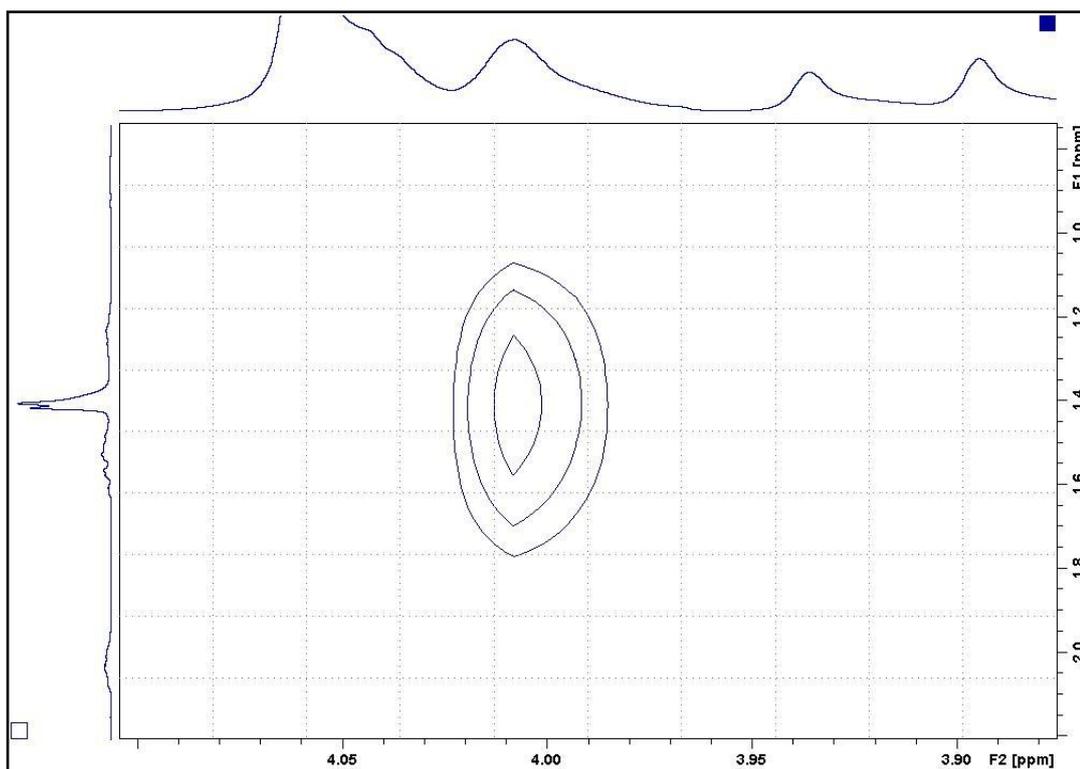


Figura 24 – Ampliação do espectro de RMN NOESY da Substância 1 (CDCl₃, 300 MHz).

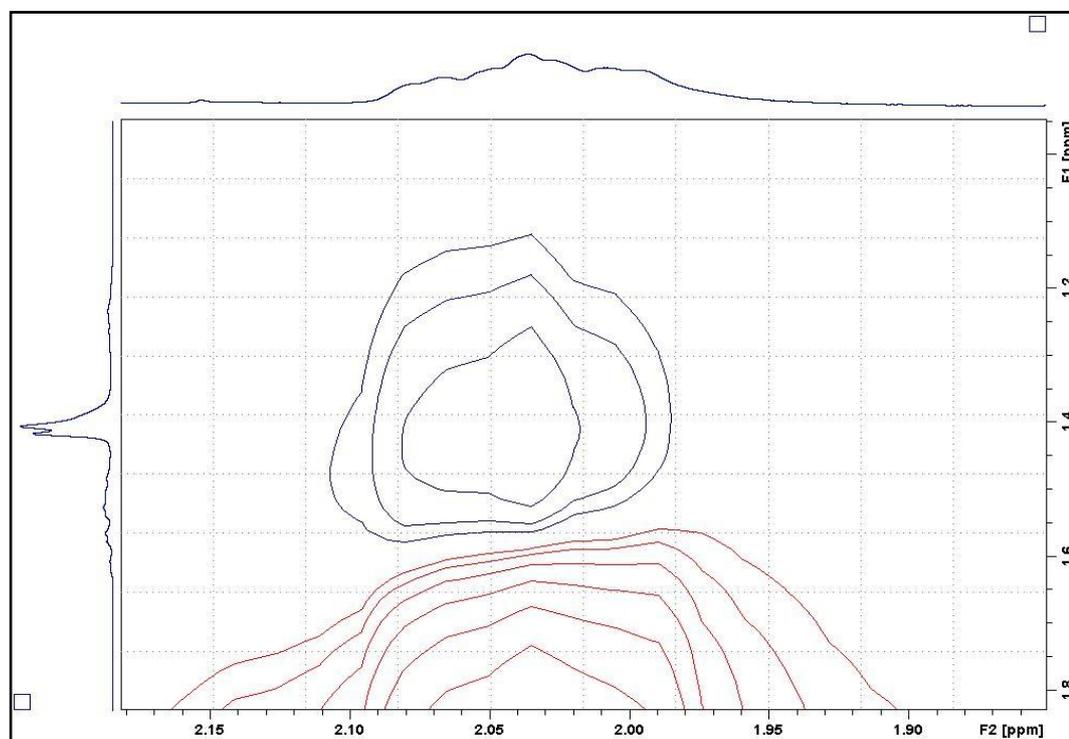


Figura 25 – Ampliação do espectro de RMN NOESY da Substância 1 (CDCl₃, 300 MHz).

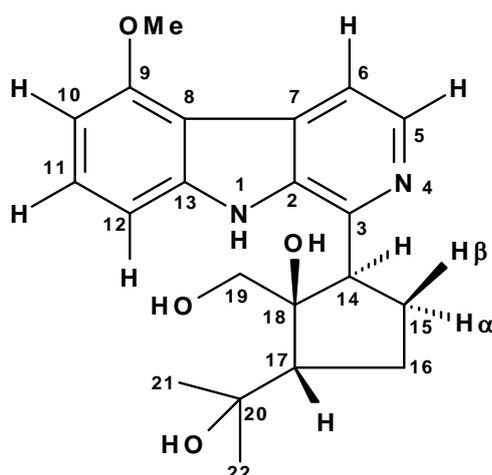


Figura 26 – Proposta de configuração relativa da estrutura química da Substância 1.

O espectro de massas de baixa resolução por impacto eletrônico (EI-MS) da Substância 1 (Figura 27) apresentou o pico a m/z 352, que corresponde ao $[M-H_2O]^+$. Assim o peso molecular da Substância 1 é 370, confirmando a fórmula molecular $C_{21}H_{26}N_2O_4$ determinada com base nos experimentos de RMN acima descritos.

A análise do espectro de infravermelho (Figura 28) também está em conformidade com a estrutura molecular atribuída à Substância 1.

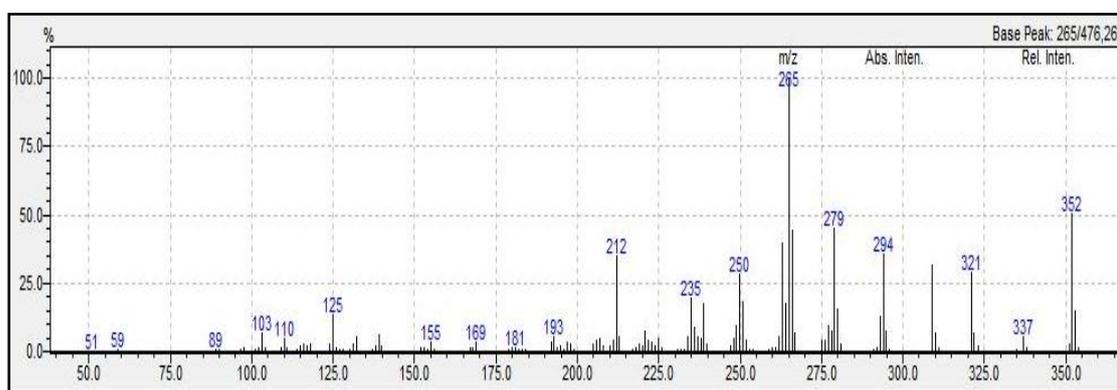


Figura 27 – Espectro de massas da Substância 1 (Impacto de elétrons - 70eV).

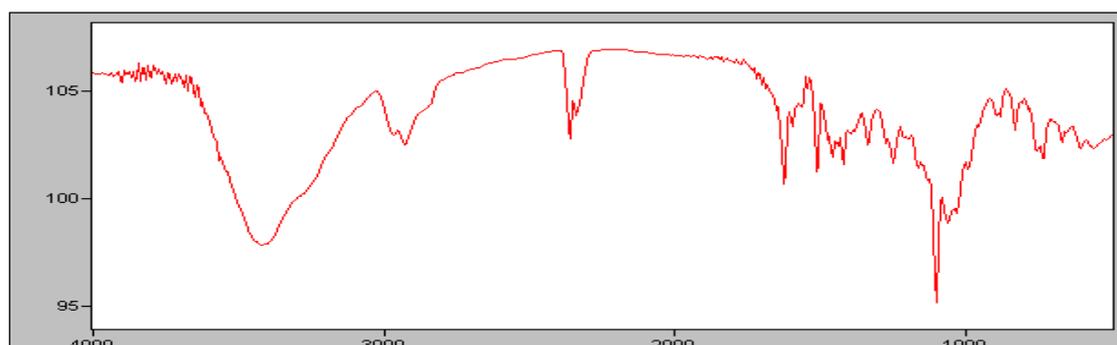


Figura 28 – Espectro de Infravermelho da Substância 1.

Assim, a avaliação dos dados espectrais acima descritos permitiram a elucidação estrutural e a identificação da substância 1 como sendo do alcalóide β -carbolínico denominado (*rel*)-[(1S, 2R, 5R)-1-(hidroximetil)-2-(1-hidróxi-1-metiletil)-5-(5-metóxi)-9H- β -carbolin-1-il)-ciclopentanol], que corresponde a uma substância inédita na literatura.

Os alcalóides indólicos compreendem um grupo de ampla ocorrência em produtos naturais com diversos padrões de estruturas químicas, como os alcalóides β -carbolínicos. Estes são definidos como compostos que contêm um sistema anelar tricíclico pirido-(5,6- β)-indólico com substituintes alquil- C_1 ligados ao carbono referente à posição 3 (C-3) (ALLEN e HOLMSTEDT, 1980) e são formados pela condensação da triptamina com um aldeído, como por exemplo um derivado do acetato (SCHRIPEMA *et al.*, 2003). Se o aldeído que participa desta condensação for um monoterpreno será formado um alcalóide β -carbolínico pertencente ao grupo dos alcalóides tipo indol-monoterpênico.

Segundo O'Connor e Maresh (2006), os alcalóides indol-monoterpênicos são derivados do aminoácido L-triptofano e do sesquiterpreno secologanina, este último formado a partir do monoterpreno pirofosfato de geranila. A condensação da triptamina com a secologanina é catalisada pela enzima estrictosidina sintase, formando estrictosidina, um alcalóide glicosilado. A eliminação da glicose presente na estrictosidina, catalisada pela estrictosidina glicosidase, forma um produto instável e que leva à formação das várias classes dos alcalóides indólicos monoterpênicos.

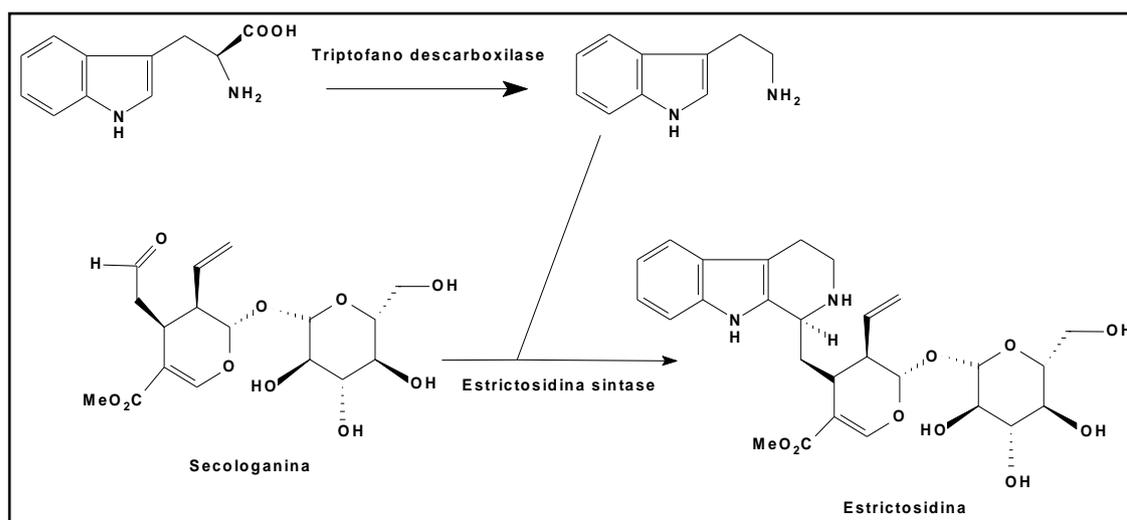


Figura 29 - Primeiras etapas na biossíntese dos alcalóides indol-monoterpênicos.

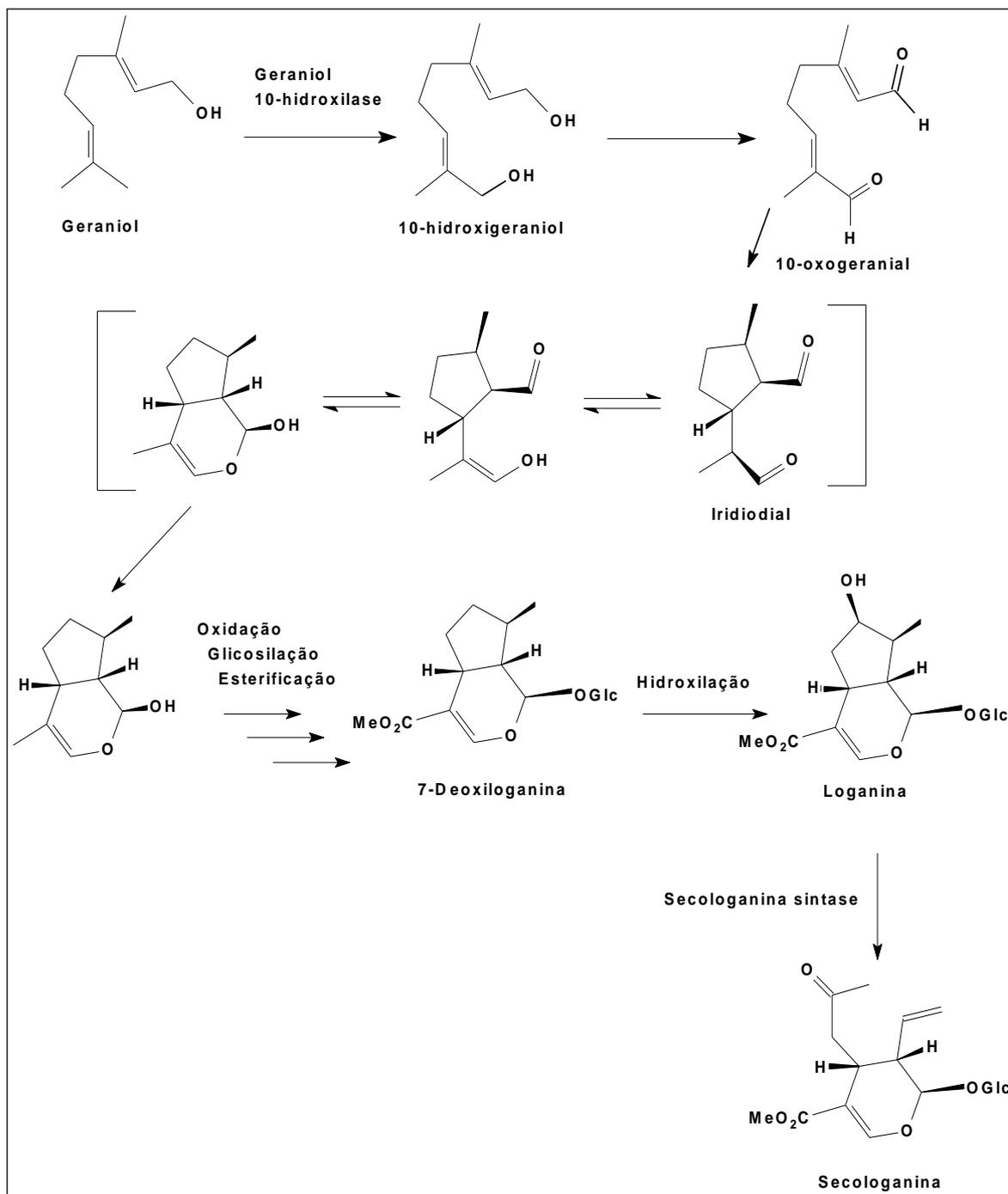


Figura 30 – Biossíntese da secologanina (Connor e Maresh, 2006).

A estrutura da Substância 1 mostra que se trata de um alcalóide indol-monoterpênico, porém a parte terpênica envolvida na biossíntese, apesar de também possuir um esqueleto iridano, não é a secologanina. A biossíntese da secologanina, incluindo a do esqueleto iridano, está mostrada na Figura 30, enquanto a proposta de sequência biossintética para a formação da Substância 1 é mostrada na Figura 31.

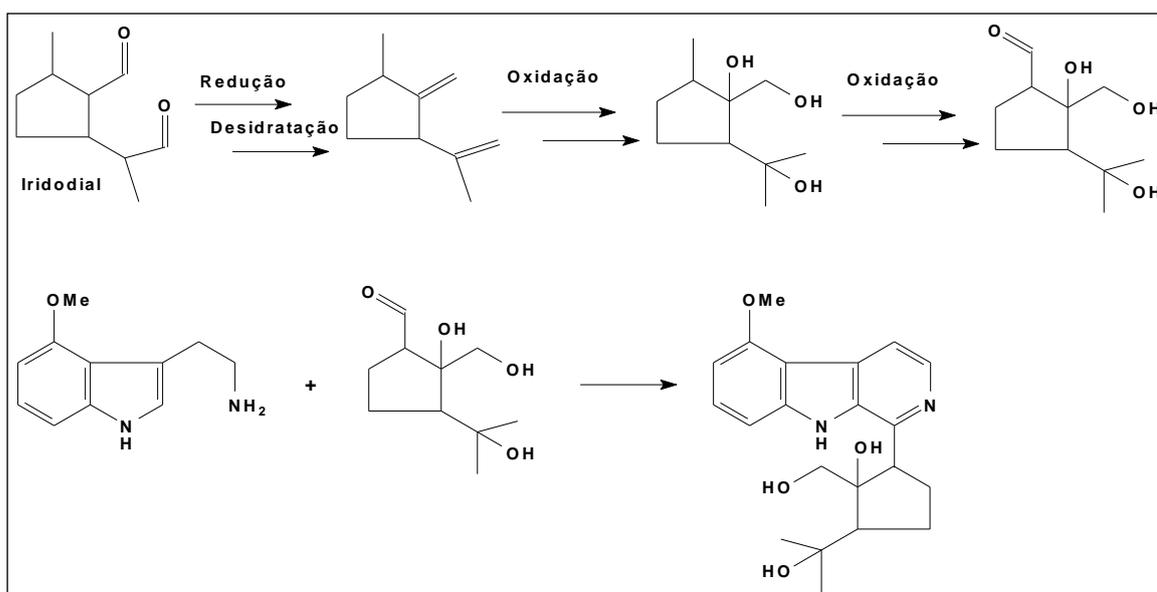


Figura 31 - Proposta de biossíntese da Substância 1.

Alcalóides β -carbolínicos de origem indol-monoterpênica são naturalmente encontrados em rubiáceas, como os alcalóides capitelina, (-)-isociclocapitelina, (+)-ciclocapitelina e isocrisotricina, na espécie *Hedyotis capitellata* (PHUONG *et al.*, 1999), crisotricina, isolado em *H. capitellata* e *H. chrysotricha* (PENG *et al.*, 1997; PHUONG *et al.*, 1999), o alcalóide depeaninol, obtido de *Deppea blumenaviensis* (KAN-FAN *et al.*, 1995) e as estruturas 1 e 2, isoladas de *Galianthe ramosa* (SILVA, *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008) (Figura 33).

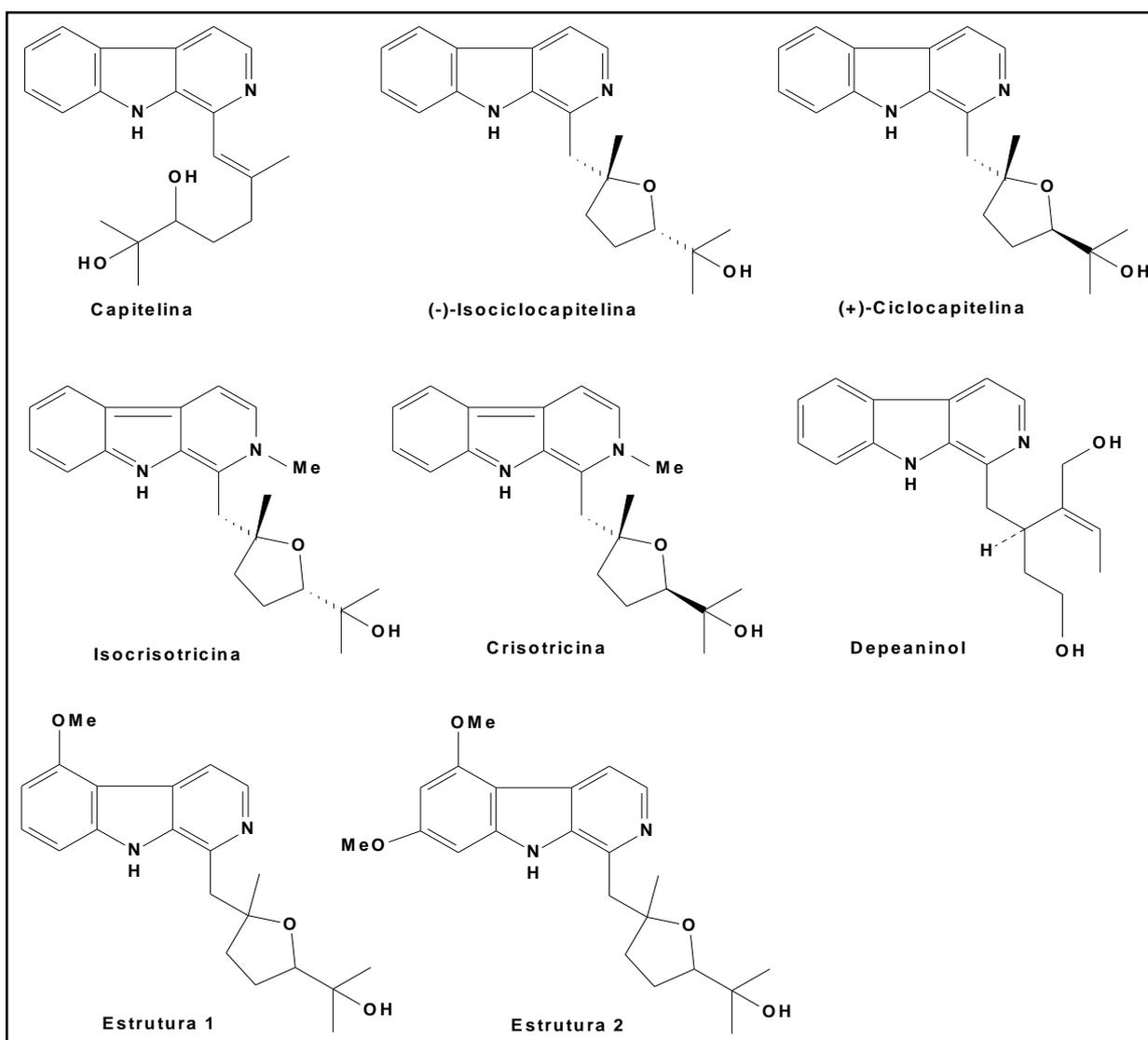


Figura 32 – Alcalóides β-carbolínicos isolados de rubiáceas.

A busca na literatura de informações acerca de (*rel*)-[(1*S*, 2*R*, 5*R*)-1-(hidroximetil)-2-(1-hidróxi-1-metiletil)-5-(5-metóxi)-9*H*-β-carbolin-1-il]-ciclopentanol] não encontrou relatos do seu isolamento e/ou síntese e, portanto, trata-se de uma substância inédita na literatura.

5.2.1.1 Avaliação da atividade citotóxica da Substância 1 frente a linhagens de células tumorais

A Substância 1 foi submetida à avaliação de seu potencial citotóxico *in vitro* frente às linhagens OVCAR, B16-F10, MCF-7, 786-0 e UACC62. Foi observada uma potente atividade citotóxica (mais potente que a atividade observada para o controle positivo cisplatina) frente à linhagem MCF-7 ($IC_{50}=1,6 \mu\text{g/mL}$), entretanto, inferior à observada na

subfração precursora BGTRC-6, cuja IC_{50} corresponde a $0,007\mu\text{g/mL}$ (Tabela 7). Esta constatação indica que a Substância 1 não deve ser o único nem o principal componente responsável pelo efeito citotóxico observado em BGTRC-6. Frente às linhagens 786-0 e UACC62, também foram observados valores potentes de IC_{50} ($1,5\ \mu\text{g/mL}$) - mais potentes que os valores de IC_{50} observados para o controle positivo cisplatina - revelando um amplo espectro de ação deste metabólito secundário (Tabela 11).

A Substância 1 também foi ativa frente à linhagem B16-F10 ($IC_{50}=10,9\ \mu\text{g/mL}$) porém, a potência dessa atividade foi inferior a da subfração BGTRC-6 (Tabela 11), o que pode estar associado a relações de sinergismo desta molécula com os outros componentes químicos presentes na subfração.

Tabela 11 - Efeito citotóxico (IC_{50}) da Substância 1 e da subfração antecessora BGTRC-6.

Amostra	Efeito citotóxico (IC_{50}) $\mu\text{g/mL}$				
	OVCAR	B16-F10	MCF-7	786-0	UACC62
BGTRC-6	NT*	0,005	0,007	NT	NT
Substância 1 (RC6-2)	163,600	10,900	1,600	1,500	1,500
Cisplatina	7,100	6,400	6,300	0,600	6,150

*Não Testado

Portanto, observou-se que a Substância 1, inédita na literatura, apresenta uma potente atividade citotóxica, sendo necessário prosseguir no seu estudo visando avaliar a possibilidade de aplicação como um quimioterápico para o tratamento do câncer. Os outros constituintes químicos de BGTRC-6, bem como as outras subfrações de BGTRC também devem ser estudados, o que poderá resultar na descoberta de novas substâncias citotóxicas.

A quimioterapia do câncer já conta com exemplares de alcalóides indol-monoterpênicos isolados de plantas e que apresentam atividade anticâncer, como é o caso dos alcalóides da vinca e da camptotecina. Os alcalóides da vinca representam uma das classes mais importantes de substâncias anticâncer em uso clínico. Os compostos naturalmente obtidos da espécie *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) são largamente utilizados na quimioterapia do câncer, bem como seus análogos semi-sintéticos vindesina e vinorelbina, desenvolvidos após intensos estudos de síntese e de relação estrutura-atividade. A camptotecina, isolada da planta *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) despertou grande interesse como pretense agente quimioterápico após a descoberta de que seu principal alvo molecular era a enzima topoisomerase I. Entretanto, esta molécula tinha a desvantagem de ser pouco solúvel em água, além de apresentar efeitos tóxicos ao organismo. Dois derivados

semi-sintéticos (topotecam e irinotecam) foram elaborados a partir dessa molécula, sendo que os mesmos encontram-se em uso clínico para o tratamento de tumores sólidos.

A camptotecina, também tem sido obtida de algumas espécies de rubiáceas (*Ophiorrhiza mungos*, *O. filistipula* e *O. pumila*), nas quais já foram isolados outros compostos que podem ser precursores dessa molécula (KITAJIMA, 2007). Esta constatação acentua a importância das rubiáceas como fonte de protótipos para substâncias com potencial anticâncer, uma vez que, além de serem possíveis fontes de análogos da camptotecina, caracterizam-se por produzirem uma grande variedade de alcalóides indólicos monoterpênicos, os quais podem ser dotados de bioatividade.

Alcalóides β -carbolínicos simples, como o harmano e nor-harmano são reconhecidos por apresentarem uma série de efeitos biológicos, tais como inibição da monoamina oxidase (KIM *et al.*, 1997), efeitos psicomiméticos e alucinógenos decorrentes da ligação destes a receptores de serotonina, benzodiazepínicos e dopamina (GLENNON *et al.*, 2000) e efeitos mutagênicos, por inibirem a atividade da DNA topoisomerase (FUNAYAMA *et al.*, 1996, DE MEESTER, 1995) resultando em alterações no processo de replicação e nas atividades enzimáticas de reparo do DNA (FUNAYAMA *et al.*, 1996).

Jiménez *et al.* (2008) observaram que o alcalóide β -carbolínico harmina apresentou um efeito inibitório na proliferação das linhagens celulares CCD18Lu (fibroblastos do epitélio pulmonar), HeLa (carcinoma epitelioide de cérvix), C33A (carcinoma de cérvix) e SW480 (carcinoma de cólon), sendo que esta última linhagem mostrou maior sensibilidade. Os autores relacionaram a atividade observada à propriedade atribuída a alguns alcalóides β -carbolínicos de ligarem-se às enzimas DNA-topoisomerasas, as quais são alvo de alguns agentes antitumorais, como a camptotecina, o etoposídeo e o teniposídeo. Cao *et al.* (2005) mostraram que a harmina e seus derivados inibem a topoisomerase I, assim como a camptotecina, e este pode ser o mecanismo de ação relacionado com o efeito citotóxico *in vitro* observado na Substância 1.

Os resultados obtidos na avaliação citotóxica da Substância 1 apontam-na como um promissor agente inibidor de tumores e, portanto, estudos visando à definição do mecanismo de ação responsável por seu efeito citotóxico bem como estudos toxicológicos precisam ser realizados buscando estabelecer a sua viabilidade como futuro quimioterápico.

6 CONCLUSÕES

A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* das frações do extrato etanólico das raízes de *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae) frente a linhagens de células tumorais revelou duas frações ativas: BGTRC (clorofórmica) e BGTRA (acetato de etila), sendo a primeira selecionada para a continuidade do estudo químico biomonitorado, considerando sua potente atividade citotóxica.

O fracionamento de BGTRC resultou na obtenção de oito subfrações, as quais apresentaram atividade citotóxica potente para uma ou várias linhagens celulares. Dentre essas subfrações, BGTRC-6 apresentou atividade citotóxica mais potente ($IC_{50} \leq 0,01 \mu\text{g/mL}$) sendo selecionada para a continuidade do estudo químico. O fracionamento cromatográfico desta subfração levou ao isolamento do constituinte majoritário, o alcaloide indol-monoterpênico (*rel*)-[(1S, 2R, 5R)-1-(hidroximetil)-2-(1-hidróxi-1-metiletil)-5-(5-metóxi)-9H- β -carbolin-1-il)-ciclopentanol], inédito na literatura.

A avaliação de atividade citotóxica para as linhagens OVCAR, B16-F10, MCF-7, 786-0 e UACC62 mostrou que esse alcaloide possui atividade potente frente a MCF-7 ($IC_{50}=1,6 \mu\text{g/mL}$), 786-0 ($IC_{50}=1,5 \mu\text{g/mL}$) e UACC62 ($IC_{50}=1,5 \mu\text{g/mL}$) e moderada frente a B16-F10 ($IC_{50}=10,9 \mu\text{g/mL}$). Portanto, é necessário dar prosseguimento ao estudo da substância isolada visando à possibilidade de sua aplicação como um quimioterápico para o tratamento do câncer. Os outros constituintes químicos de BGTRC-6, bem como as outras subfrações de BGTRC também devem ser estudados, o que poderá resultar na descoberta de novas substâncias citotóxicas.

A avaliação antimicrobiana das frações do extrato etanólico das raízes de *G. thalictroides* apontam as frações acetato de etila (BGTRA) e hidrometanólica (BGTRHM) como dotadas de atividade biológica mais potente. Esta ação foi associada à presença de metabólitos secundários da classe dos taninos nas raízes de *G. thalictroides* (4,32 g%) e ao teor elevado destes compostos nas referidas frações (53,9 e 31,1,g%, respectivamente). Esta conclusão é compatível com o fato de que as subfrações não tanantes (BGTRA-NT e BGTRHM-NT) mostraram-se inativas frente às cepas microbianas anteriormente sensíveis.

REFERÊNCIAS

- Aguiar SS, Mello FMS, Fernandes Filho MR, Pires WC, Lima AP, Pereira FC, Ribeiro ASBB, Vilanova-Costa CAST, Silveira-Lacerda EP. **Avaliação do potencial antitumoral e citotóxico do extrato bruto metanólico das fores de *Galianthe ramosa* E.L. Cabral (Rubiaceae) em células de leucemia mielóide crônica (K-562), sarcoma-180 (S-180) e fibroblastos humanos (HLL) *in vitro*.** In: I Congresso de genética do centro-oeste. Resumo; 2008 nov 8-9; Brasília-DF. Cod. C0039.
- Allen JRF, Holmstedt BR. **The simple β -carboline alkaloids.** *Phytochem.* 1980; 19(8): 1573-1582.
- Bogo D, Matos MFC, Honda NK, Pontes ERJC, Oguma PM, Santos ECS, Carvalho JE, Nomizo A . **In vitro Antitumour Activity of Orsellinates.** *Z. Naturforsch. C.* 2010; 65(1/2): p. 43-48.
- Bolzani VS, Young MCM, Furlan M, Cavalheiro AJ, Araújo AR, Silva DHS, Lopes MN. **Secondary metabolites from brazilian Rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance.** *Recent res. devel. phytochem.* 2001; 5: p. 19-31.
- Briskin DP. **Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health.** *Plant Physiol.* 2000; 124: p. 507–514.
- Butler MS, Buss AD. **Natural products – the future scaffolds for novel antibiotics?** *Biochem. Pharmacol.* 2006; 71(7): 919–929.
- Cabral EL. **Revisión del género *Galianthe* (Rubiaceae - Spermaceae).** In: 52º Congreso Nacional de Botánica. Artigo; 2001 ago 22-27; João Pessoa - Paraíba, Brasil.
- Cao R, Peng W, Chen H, Ma Y, Liu X, Hou X, Guan H, Xu A. **DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 338 (3): p. 1557–1563.

Chung KT, Lu Z, Chou MW. **Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria.** Food Chem. Toxicol. 1998; 36(12): p. 1053-1060.

Cohen ML. **Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era.** Science 1992; 257(5073): 1050-1055.

Cordell GA, Quinn-Beattieand ML, Farnsworth NR. **The potential of alkaloids in drug discovery.** Phytother.Res. 2001; 15(3): 183–205.

De Meester C. **Reviews in genetic toxicology genotoxic potential of β -carbolines: a review.** Mutat. Res. 1995; 339 (3): p. 139-153.

Delprete PG, Cortés RB. **A synopsis of the Rubiaceae of the states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, Brazil, with a key to genera, and a preliminary species list.** Rev. Biol. Neotrop. 2006; 3(1): 13-96.

Dewick PM. **The search for naturally derived anticancer agents.** In: Evans WC. **Trease and Evans pharmacognosy.** 15^a ed. London: WB Saunders; 2002. p. 416-424.

Fabri RL, Nogueira MS, Braga FG, Coimbra ES, Scio E. ***Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial and antioxidant effects.** Bioresource Technol 2009; 100:428–433.

Fernandes Filho MR, Aguiar SS, Pires WC, Mello FMS, Queiroz FJ, Lima AP, Pereira FC, Ribeiro ASBB, Vilanova-Costa CAST, Silveira-Lacerda EP. **Avaliação do potencial antitumoral do extrato bruto metanólico de *Galianthe ramosa* E.L.Cabral (Rubiaceae).** In: 54^o Congresso Brasileiro de Genética. Resumo; 2008 set 16-19; Bahia- Salvador.

Freshney IR. **Culture of animal cells. A manual of basic technique.** 5^a ed. New york, Wiley-Liss, 2005.

Funayama Y, Nishio K, Wakabayashi K, Nagao M, Shimoi K, Ohira T, Hasegawa S, Saijo N. **Effects of β - and γ -carboline derivatives on DNA topoisomerase activities.**

Mutat.Res. 1996;349(2): p. 183-191.

Gangemi R, Paleari L, Orengo AM, Cesario A, Chessa L, Ferrini S, Russo P. **Cancer Stem Cells: A New Paradigm for Understanding Tumor Growth and Progression and Drug Resistance.** Curr. Med. Chem. 2009; 16(14): 1688-1703.

Glennon RA, Dukat M, Grella B, Hong SS, Costantino L, Teitler M, Smith C., Egan C., Davis K., Mattson M.V. **Binding of β -carbolines and related agents at serotonin (5-HT₂ and 5-HT_{1A}), dopamine (D₂) and benzodiazepine receptors.** Drug Alcohol Depend. 2000; 60(2): 121–132.

Guarim Neto G, Morais RG. **Recursos medicinais de espécies do cerrado de mato grosso: um estudo bibliográfico.** Acta bot. bras. 2003; 17(4):561-584.

Haslam E. **Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action.** J. Nat. Prod. 1996; 59(2), 205-215.

Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands P J, Lee CC. **The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity.** Methods 2007; 42(4): 377-387.

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

Jiménez J, Riverón-Negrete L, Abdullaev F, Espinosa-Aguirre J, Rodríguez-Arnaiz R. **Cytotoxicity of the β -carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro.** Exp. Toxicol. Pathol. 2008;60(4/5): p.381–389.

Kan-fan C, Zuanazzi JÁ, Quirion JC, Husson HP, Henriques A. Deppeanol, a new β -carboline alkaloid from *Deppea blumenaviensis* (Rubiaceae). Nat. Prod. Res.: Formerly Nat. Prod. Lett. 1995; 7(4): p. 317-321.

Kim H, Sablin SO, Ramsay RR. **Inhibition of monoamine oxidase a by β -carboline derivatives.** Arch. Biochem. Biophys. 1997; 337(1): p. 137-142.

Kitajima M. **Chemical studies on monoterpenoid indole alkaloids from medicinal plant resources Gelsemium and Ophiorrhiza.** J. Nat. Med. 2007; 61(1): p. 14–23.

Klink CA, Machado RB. **A conservação do Cerrado brasileiro.** Megadiversidade 2005; 1(1):147-155.

Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. **Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District.** J.Ethnopharmacol 2005; 99(2):309–312.

Maciel MA, Pinto AC, e Veiga Júnior VF, Grynberg NF, Echevarria A. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Quim.Nova. 2002; 25(3):429-438.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. **Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines.** J. Nat Cancer Inst. 1991; 83(11): 757-766.

Moura VM, Santos AR, Nurnberga V, Souza MC, Santin SMO. **Iridoid glycosides from *Galianthe brasiliensis*.** Biochem.System.Ecol. 2005; 33(4): 451–453.

Moura VM, Santos DP, Oliveira SM, Carvalho JE, Foglio MA. **Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae).** Quim. Nova 2006; 29(3): 452-455.

National Botanic Garden of Belgium [homepage na Internet]. Bélgica: National Botanic Garden of Belgium [atualizada em 5 de janeiro de 2010; acesso em 10 abr 2010]. Disponível em: <http://www.br.fgov.be/RESEARCH/PROJECTS/rubiaceae.php>.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma Aprovada – 6ª ed.** Norma M7-A6 do NCCLS, v.23, n.2, Pennsylvania, Estados Unidos, 2003.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma Aprovada – 2ªed.** Norma M27-A2 do NCCLS, v.22, n.15, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002.

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

O'Connor SE, Maresh JJ. **Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis.** Nat.Prod.Rep. 2006; 23: 532–547.

Pansera MR, Santos ACA, Paese K, Wasum R, Rossato M, Rora LD, Pauletti GF, Serafini LA. **Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul.** Rev. Bras. Farmacog. 2003; 13(1): p. 17-22.

Peng JN, Feng XZ, Zheng QT, Liang XT. **A β -carboline alkaloid from *Hedyotis chrysotricha*.** Phytochem. 1997; 46(6): 1119-1121.

Penna C, Marino S, Vivot E, Cruaños MC, Muñoz JD, Cruaños J, Ferraro G, Gutkind G, Martino V. **Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*.** J Ethnopharmacol 2001; 77(1):37-40.

Phuong NM, Sung TV, Porzel A, Schmidt J, Merzweiler K, Adam G. **β -carboline alkaloids from *Hedyotis capitellata***. *Phytochem.* 1999; 52(8): 1725-1729.

Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio RA. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas**. *Quim. Nova* 2002; 25(1): 45-61.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. **Princípios básicos da quimioterapia**. In:_____.*Farmacologia*. Trad. PL Voeux, AJMS Moreira. 5 ed Trad. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p. 704-720.

Robbrecht E, Manen JF. **The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on *rbcL*, *rps16*, *trnL-trnF* and *atpB-rbcL* data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae**. *Syst. Geogr. Pl.* 2006; 76(1): 85-146

Robbrecht E. **Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contribution to a new subfamilial classification**. [Livro em CD-ROM]. Bélgica: Meise, Nationale Plantentuin van België; 1988. Versão eletrônica: 2006.

Santos SC, Mello JCP. **Taninos**. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFGRS/UFSC; 2004. p. 615-656.

Scalbert A. **Antimicrobial properties of tannins**. *Phytochem.* 1991; 30(12): p. 3875-3883.

Schipsema J, Dagnino D, Gosmann G. **Alcaloides indólicos**. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFGRS/UFSC; 2004. p. 819-846.

Silva LMA, Kato L, Oliveira CMA, Delprete PG, Silva CC, Tanaka CMA. **Alkaloid from *Galianthe ramosa* E. L. Cabral (Rubiaceae)**. In: 1st Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM). Anais; 2007 nov 4-7; São Paulo-São Pedro. BPS-181.

Silva LMA, Kato L, Oliveira CMA, Delprete PG, Silva CC, Tanaka CMA. **Novo alcalóide indólico de *Galianthe ramosa* E. L. Cabral**. In: 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Anais; 2008 mai 26-29; São Paulo-Águas de Lindóia. PN-185.

Silva VC, Giannini MJSM, Carbone V, Piacente S, Pizza C, Bolzani VS, Lopes, MN. **New antifungal terpenoid glycosides from *Alibertia edulis* (Rubiaceae)**. Helvetica Chim. Acta 2008; 91(7):1355-1362.

Simionatto E, Cancido ACS, Poppi NR, Peres MTLP, Oguma P, Santos ECS, Matos MFC, Hess SC, Bonani VFL, Carvalho JE, Diraimo DL. **Bioactivity and chemical composition of the essential oils of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae)**. JEOBP, 2009; 12(3): p. 250-261.

Smith RD, Coast J. **Antimicrobial resistance: a global response**. Bull. World Health Org. 2002; 80(2):126-133.

Suffness M, Pezzuto JM. **Assays related to cancer drug discovery**. In: Hostettmann, K. **Methods in Plant Biochemistry: Volume 6. Assays For Bioactivity**. London: Academic Press; 1990. p.71–133 *apud* Itharat A, Houghton PJ, Eno-Amooquaye E, Burke PJ, Sampson JH, Raman A. **In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat câncer**. J. Ethnopharmacol. 2004; 90(1): 33–38.

Vichai V, Kirtikara K. **Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening**. Nat. Protoc.2006; 1(3): p. 1112-1116.

Younes RN, Varella AD, Suffredini IB. **Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening.** Clinics 2007; 62(6):763-768.

Zhu M, Phillipson JD, Greengrass PM, Bowery NE, Cai Y. **Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to proteins?** Phytochem. 1997; 44(3): 441-447.

Wilson TR, Johnston PG, Longley DB. **Anti-Apoptotic Mechanisms of Drug Resistance in Cancer .** Curr. Cancer Drug Targets. 2009; 9(3): 307-319.