



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**

Iasmin Rosanne Silva Ferreira

**Avaliação da citotoxicidade de fitoquímicos em células V79 e
inibição do crescimento celular em células leucêmicas humanas**

LIMEIRA
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

Iasmin Rosanne Silva Ferreira

**Avaliação da citotoxicidade de fitoquímicos em células V79 e
inibição do crescimento celular em células leucêmicas
humanas**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de
Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Área de Concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo

LIMEIRA

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

F413a Ferreira, lasmin Rosanne Silva, 1988-
Avaliação da citotoxicidade de fitoquímicos em células V79 e inibição do crescimento celular em células leucêmicas humanas / lasmin Rosanne Silva Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Patricia da Silva Melo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Fitoquímicos. 2. Células leucêmicas. 3. Citotoxicidade. I. Silva Melo, Patricia da. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of cytotoxicity of phytochemicals in V79 cells and inhibition of cell growth in human leukemic cells

Palavras-chave em inglês:

Phytochemicals

Leukemic cell

Cytotoxicity

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Patricia da Silva Melo [Orientador]

Lázaro Alessandro Nunes

Cintia Maria Cereda

Data de defesa: 31-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

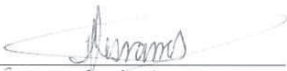
Limeira, 31 de janeiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patricia Silva Melo


Assinatura

Prof. Dr. Lázaro Alessandro Nunes


Assinatura

Profa. Dra. Cíntia Maria Cereda


Assinatura

Profa. Dra. Ana Beatriz Albino de Almeida

Assinatura

RESUMO

Compostos encontrados na natureza, mostram uma enorme gama de diversidade em termos de estrutura e atividades farmacológicas. Apesar dos avanços na síntese química, as plantas se mostram cada vez mais eficientes na busca de novos tratamentos contra o câncer. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar seis fitoterápicos pertencentes à classe de lignoides (dimethoxymagnolol, grandisina e iangambina) e riparinas (I, II e III), com e sem suplementação de glutathione (GSH - 1mM) em três linhagens de células leucêmicas K562, U937 e HL60. A viabilidade celular foi avaliada por ensaio de redução de MTT em células leucêmicas tratadas com os fitoquímicos (com ou sem suplementação de GSH). Nas células U937 foram encontrados valores de IC₅₀ de 100 µM, 30 µM e 500 µM em células tratadas com dimethoxymagnolol, grandisina e iangambina, respectivamente, e 60, 25 e 15 µM (riparina I, II e III, respectivamente). Nas células K562, o tratamento com riparinas foi o mais eficaz dos compostos estudados, uma vez que foram determinados valores de IC₅₀ de 125, 27 e 15 µM (riparina I, II e III, respectivamente). Diferentes valores foram encontrados em células HL60 tratadas com riparinas (140, 100 e 75 µM para riparina I, II e III, respectivamente). A suplementação com GSH amenizou apenas os efeitos tóxicos após tratamento das células U937 com riparina II, uma vez que não foram observados resultados diferentes em outras linhagens celulares tratadas com os compostos estudados com a suplementação de GSH. A citotoxicidade desses fitoquímicos também foi avaliada em linhagem de células de fibroblasto de pulmão permanente (V79), que são células de cultura utilizadas para os estudos de citotoxicidade. Todos os fitoquímicos investigados, com exceção da iangambina, foram menos tóxicos para células V79 do que para as células leucêmicas. Estes resultados se mostram positivos, uma vez que a atividade farmacológica foi maior nas células leucêmicas do que nas células V79. Todos os compostos estudados neste trabalho apresentaram efeitos anti-tumorais, no entanto, o mecanismo de ação da riparina II é diferente em células U937 já que a suplementação com GSH foi eficaz contra os efeitos tóxicos. Provavelmente, a riparina II provocou a morte celular por estresse oxidativo.

Palavras – chave: fitoquímicos, células leucêmicas, citotoxicidade.

ABSTRACT

Compounds found in nature, show an enormous range of diversity in terms of structure and pharmacologic activities. Plants play a surprisingly important source of new treatments for cancer, despite advances in chemical synthesis. Thus the aim of this study was to evaluate six phytomedicine belonging to the class of lignoid (dimethoxymagnolol, grandisin and yangambin) and riparins (I, II and III) with and without glutathione supplementation (GSH – 1mM) in three leukemic lines, K562, U937 and HL60. The cell viability was evaluated by MTT reduction assay in leukemic cells treated with the phytochemicals (with or without GSH supplementation). In the U937 cell IC_{50} values found were 100 μ M, 30 μ M and 500 μ M in the cells treated with dimethoximagnolol, grandisin and yangambin, respectively and 60, 25 and 15 μ M (riparin I, II and III, respectively). In K562 cells the treatment with riparins were the most effective class of compounds studied since it was determined IC_{50} values of 125, 27 and 15 μ M (riparin I, II and III, respectively). Different values were determined in the HL60 cells treated with riparins (140, 100 and 75 μ M for riparin I, II and III, respectively). GSH ameliorated only the toxic effects evaluated in U937 cell treated with riparin II, since it was not observed different results in the others cell lines treated with the studied compounds plus GSH. The cytotoxicity of phytochemicals was also assessed in a permanent lung fibroblast cell line (V79) culture that are cells commonly used for cytotoxicity studies. All the phytochemicals investigated, with the yangambin exception, were less cytotoxic to V79 cells than to leukemic cells. These results indicate a positive pharmacologic application since the leukemic activity was major than to the toxic effects evaluated in the V79 cells. All the compounds investigated in this work has antitumoral effects, however the action mechanism of riparin II is different on U937 cell since GSH supplementation protected the toxic effects. Probably, riparin II triggered cell death by stress oxidative pathway.

Key Words: phytochemicals, leukemic cell, cytotoxicity

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
DEDICATÓRIA.....	xi
AGRADECIMENTOS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURA.....	xv
INTRODUÇÃO.....	17
OBJETIVOS.....	36
CAPÍTULO 1- <i>Artigo</i>	37
Abstract	38
Introduction	39
Experimental	41
Results and Discussion	45
Acknowledgements	47
References	48
Figures	51
Table 1	52
Table 2	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
Participações em Congressos	75
Artigos Publicados	76

Dedico este trabalho.

Ao meu marido, Vinicius, por estar ao meu lado desde o início me apoiando e ajudando em todos os momentos. Pelo amor, dedicação e paciência sempre.

A minha família, que sempre acreditou e confiou em mim e em meu trabalho. Pelo amor e paciência que me dedicaram durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida e por me permitir ter encontrado pessoas maravilhosas em minha trajetória.

A minha orientadora Prof Dra Patricia Silva Melo por me aceitar antes mesmo da faculdade como sua estagiária. Pela amizade, dedicação e paciência. Por me ouvir e sempre estar ao meu lado. E por fim, por acreditar que eu seria capaz de realizar esse trabalho e se dispor a me orientar.

Ao meu marido, Vinicius, pelo amor e dedicação comigo sempre. Por ser meu melhor amigo desde que nos conhecemos. Por cuidar de mim e me fazer a pessoa mais feliz do mundo.

À minha mãe, Dilene, por ser sempre tão dedicada e ter me dado a oportunidade de crescimento com todo esforço que sempre fez para eu pudesse sempre me tornar alguém melhor.

À minha Vó Nena por todo amor que sempre dedicou a mim, e com isso pude chegar onde estou.

À minha irmã Fernanda e minha sobrinha Isadora por todas as risadas e todo apoio que deram a vida toda.

À família de meu marido, meus sogros e cunhados pelos bons momentos e conselhos durante o trabalho.

Aos meus amigos Leandro e Larissa pela amizade, bons momentos e as risadas durante nossos sábados.

Às companheiras de laboratório Paula, Jéssica e Ana Claudia que me ajudaram na realização desse trabalho e também pela amizade, ótimos momentos e apoio sempre.

Aos companheiros de laboratório Diego, Anderson, Deborah, Karla, Paula e Jéssica pelo companheirismo e amizade de todos os dias.

À Faculdade Metrocamp por me permitir realizar os experimentos.

À Faculdade de Ciências Aplicadas pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao suporte financeiro da CAPES e CNPq.

LISTA DE ABREVIATURAS

DL ₅₀	Dose letal que mata 50% da população
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathione
HL60	Linhagem de células da leucemia promielocítica humana
IC ₅₀	Concentração que inviabiliza 50% das células
K562	Linhagem de células da leucemia eritrocítica humana
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium
PAF	Antagonista do receptor do fator de agregação plaquetária
RNA	Ácido ribonucleico
U937	Linhagem de células da leucemia monocítica humana

INTRODUÇÃO

O câncer é a principal causa de morte no mundo, sendo esta uma das razões para a busca de novos agentes anticancerígenos, principalmente de origem natural, que tornou-se uma abordagem de pesquisa importante (Wen Tan et al., 2011). As investigações *in vitro* sobre a leucemia mielóide (LMA) utilizando linhagens de células cultivadas contribuíram para a caracterização deste tipo de leucemia, aumentando os conhecimentos sobre a diferenciação e morte celular por apoptose e, principalmente, para a compreensão dos efeitos da quimioterapia (Bruserud e Wendelboe, 2001). As linhagens de células humanas derivadas de leucemias mielóides têm sido largamente utilizadas como modelos para estudar o controle molecular da proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas. Desta forma, a realização de triagens *in vitro*, a fim de descobrir agentes citotóxicos contra células tumorais (linhagens ou culturas primárias) continua a ser um dos principais objetivos da pesquisa anticâncer.

Embora a quimioterapia seja um dos métodos mais estudados em terapias anti -câncer, a sua eficácia e segurança continuam a ser questionadas devido a toxicidade e outros efeitos secundários da quimioterapia serem tão graves. Além disso, o aparecimento de células cancerígenas com resistência a múltiplas drogas torna a busca por novas terapias um desafio ainda maior.

LEUCEMIA

A leucemia é uma neoplasia maligna, caracterizada pela produção excessiva de células na medula óssea e o envio dessas células imaturas para o sangue periférico. Essas células cancerosas podem acometer toda a medula óssea, chegando ao ponto de falência medular, o que ocasionaria quadros variáveis de sangramento, infecção e anemia. As leucemias são divididas em agudas e crônicas. O grupo das leucemias agudas é dividido em mieloblástica e linfocítica, tendo sua diferenciação feita na célula de origem de cada grupo. De forma geral as leucemias agudas apresentam uma evolução mais rápida em relação à crônica (Zago et al., 2001). São mais frequentes no sexo masculino, sendo maior o número de casos nos de raça branca. A idade de acometimento difere enormemente entre dois grupos, sendo a leucemia linfocítica aguda (LLA) muito comum até os 10 anos de idade e a leucemia mielóide aguda (LMA) muito comum na média de 65 anos de idade (Zago et al., 2001).

CULTURA CELULAR

Em 1911, o grupo do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NIH), manteve pela primeira vez células em multiplicação *in vitro*, apenas com o intuito de se detectar vírus. Entretanto, a partir dos anos quarenta, as culturas passaram a ter papel importante no diagnóstico das viroses. Atualmente a utilização

da cultura celular como ferramenta para proliferação viral e, conseqüentemente produção de vacinas encontra-se bem consolidada (Fresnhey, 2005; Harris, 2012).

A técnica foi amplamente reconhecida quando Enders, Weller e Robbins (1948) demonstraram que os vírus da pólio tipo II podiam replicar-se em cultura de tecidos de origem não nervosa de embriões humanos, determinando um defeito patogênico, de fácil percepção nas culturas infectadas, o qual podia ser bloqueado pelo uso do soro imune específico (Fresnhey, 2005).

A utilização da cultura de células desenvolveu-se e, atualmente, os sistemas celulares são amplamente usados, pois:

- O problema de contaminação foi reduzido com o uso da cabine de fluxo laminar;
- Constituem um sistema econômico em relação ao uso de animais;
- São relativamente fáceis de serem mantidas;
- Requerem pouco espaço físico;
- Permitiram novos avanços aos estudos da biologia molecular em relação ao esclarecimento de mecanismos da infecção viral e/ou bacteriana.

O conhecimento da utilização de culturas de células para avaliações toxicológicas encontra-se estabelecido dentro da comunidade acadêmica, porém apesar de apelos de ordem econômica, ética e da possibilidade de novas legislações regulamentando o uso de animais em experimentos, não houve ainda a

transferência desta tecnologia gerada a partir de projetos de pesquisa desenvolvidos na academia para o meio produtivo.

Os ensaios em culturas de células são realizados como avaliações iniciais da toxicidade, com a finalidade de extrapolar os resultados obtidos *in vitro* para prováveis efeitos *in vivo*.

LINHAGENS CELULARES

O uso de cultura de células é de grande valia na investigação das características toxicológicas no que tange aos estudos farmacológicos e ambientais, propiciando uma ferramenta fundamental na avaliação dos parâmetros biológicos e/ou terapêuticos *versus* os efeitos toxicológicos (Rosenkranz et al., 1992; Melo et al., 2004; Chandler et al., 2011).

V79

Das várias linhagens celulares, destacam-se as células V79, provenientes de fibroblastos de pulmão de Hamster Chinês, um tipo celular amplamente empregado na avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade (Katzer et al., 2002; Pfuhler et al., 2002; Cavalcanti et al., 2008; Ghosh et al., 2008). Esta linhagem celular possui elevada velocidade de proliferação e eficiência de clonagem, cariótipo estável e manutenção de suas propriedades iniciais após criopreservação (Wang et al., 2009). Em decorrência dessas propriedades, as células V79 têm sido utilizadas para a avaliação da toxicidade de novas formulações cosméticas, matérias primas, pesticidas, fármacos e resíduos tóxicos em geral (Rodriguez et al., 1999; Melo et al., 2000; Gimenez et al., 2005; Melo et al., 2006). Os resultados determinados

nesta linhagem celular asseguram a avaliação da toxicidade do composto sem metabolização pela via do sistema citocromo P450. Embora existam algumas limitações na determinação da toxicidade em células V79, a avaliação dos resultados desses testes é muito reprodutível (Fresnhey, 2005), sendo possível, estabelecer relações entre a citotoxicidade e a toxicidade aguda oral em animais experimentais, podendo-se determinar os valores de DL_{50} (dose letal) através da cultura celular (Halle et al., 1992; Rodriguez et al., 1999).

LINHAGENS LEUCÊMICAS

HL60

A linhagem celular HL60 foi isolada de paciente com leucemia promielocítica aguda (LPA), o subtipo M3 da leucemia mieloide aguda (Collins, 1987), caracterizado pelo envio de promielócitos para o sangue periférico. Estas células proliferam continuamente em culturas em suspensão, consistindo morfológica e histoquimicamente, predominantemente em promielócitos, dos quais cerca de 4-15% apresentam características morfológicas de células mielóides mais maduras: mielócitos, metamielócitos e leucócitos polimorfonucleares (PMN) (Breitman, 1990).

U937

A linhagem de células da leucemia monocítica U937 foi estabelecida a partir de células malignas obtidas do sangue periférico de um paciente, por efusão pleural, com linfoma histiocítico difuso (McCollum et al., 2005). Estas células mieloleucêmicas foram derivadas de um linfoma de non-Hodgkin por Sundstrom & Nilsson, (1976). Estudos desde o final da década de 70 têm mostrado que essas células apresentam um bloqueio na diferenciação de progenitores monocíticos e

podem ser induzidas a diferenciação terminal monocítica por misturas de sobrenadantes de cultura de linfócitos humanos, forbol ésteres, vitamina D3, interferon gama, fator de necrose tumoral (TNF) e ácido retinóico. Portanto, constituem um modelo para estudos *in vitro* de indução de diferenciação monócito/macrófago.

K562

A linhagem celular K562 foi isolada a partir de paciente com leucemia eritróide aguda, subtipo M6 da leucemia mieloide aguda, caracterizado pela presença de eritroblastos no sangue periférico (Lozzio & Lozzio, 1975a). A população celular tem sido caracterizada como altamente não diferenciada em série granulocítica (Lozzio & Lozzio, 1975b). Estudos das propriedades de superfície de membrana concluíram que as células K562 constituíam uma linhagem de eritroleucemia humana (Anderson et al., 1979). Os blastos K562 são multipotenciais, células hematopoiéticas malignas que diferenciam-se espontaneamente na presença de progenitores de séries eritrocíticas, granulocíticas e monocíticas (Lozzio et al., 1981).

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *in vitro*

O termo citotoxicidade designa a medida do potencial de um agente causar injúria celular. Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis para a definição da citotoxicidade basal, assim como no estabelecimento do intervalo de concentração no qual o agente tóxico atua. Detalhes importantes sobre os parâmetros citotóxicos envolvidos, como genotoxicidade, indução de mutações ou morte celular programada são determinados nestes tipos de testes. Com o estabelecimento da dose onde 50%

das células são afetadas (IC_{50}) é possível comparar quantitativamente a resposta de um mesmo composto em diferentes sistemas, ou de vários compostos em um único sistema (Eisenbrand et al., 2002; Melo et al., 2004). Além disso, a avaliação da citotoxicidade é de grande importância para a área médica e farmacológica, devido à sua resposta sobre mecanismos de ação das substâncias (Kirland et al., 2007).

Embora o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), norma ISO 10993 exija que o ensaio de citotoxicidade *in vitro* seja o primeiro teste realizado para a avaliação da biocompatibilidade de uma nova substância antes de seu uso, normalmente os países desenvolvidos são os únicos a realizá-lo, salvo algumas exceções como o Brasil (Rogerio et al., 2003).

Os testes *in vitro* apresentam grande vantagem em relação aos testes *in vivo* devido ao custo reduzido, controle das variáveis do experimento e rapidez na obtenção dos resultados. Devido a essas características, os ensaios *in vitro* direcionam os testes *in vivo*, mostrando, por exemplo, qual organela mais afetada e que, conseqüentemente merece maior atenção e também direcionando quase que precisamente os valores de DL_{50} , mostrando cada vez mais sua grande reprodutibilidade (Rodriguez et al., 1999).

Os biomarcadores celulares dos testes de citotoxicidade são baseados, principalmente, na perda da permeabilidade seletiva celular, na redução da função mitocondrial, nas mudanças na morfologia e replicação celular (Aoyama et al., 2000).

Um dos exemplos de teste de permeabilidade celular é o que avalia a incorporação do corante Vermelho Neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de

fenanzina). Esse teste consiste na habilidade de células viáveis incorporarem e ligarem o corante. Sua característica ligeiramente catiônica permite ao corante penetrar na membrana celular por difusão passiva não-iônica, concentrando-se nos lisossomas, onde se fixa através de ligações eletrostáticas a grupos aniônicos (Repetto et al., 1993). A avaliação da viabilidade é feita espectroscopicamente, sendo diretamente proporcional à absorbância, ou seja, quanto maior a coloração, maior será a absorbância e maior a quantidade de células viáveis (Melo et al., 2006; Rudzota et al., 2009)

O teste da redução do MTT [brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium] avalia a viabilidade mitocondrial, uma vez que é reduzido pelas mitocôndrias viáveis. Essa redução resultará em um precipitado insolúvel em água, o formazan. A avaliação da viabilidade, assim como do vermelho neutro, é feita espectroscopicamente e também é diretamente proporcional à absorbância, podendo o formazan formado ser diluído em álcool absoluto (Ahmadian et al., 2009).

O teste que permite uma determinação direta do número de células é a quantificação de ácidos nucleicos, visto que a concentração de DNA e RNA nas células é proporcional ao número de células (Aoyama et al., 2000).

A exclusão do Azul de Tripán é um teste microscópico, que observa as modificações morfológicas das células e também permite a diferenciação de células viáveis na hora da contagem celular, devido ao fato do corante penetrar em células que apresentam lise na membrana celular (Loveland *et al.*, 1992; Renzi *et al.*, 1993).

FITOQUÍMICOS

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e, por um longo tempo, produtos minerais, plantas e animais foram as principais fontes de medicamentos (Musthaba et al., 2009) A revolução industrial e o desenvolvimento da química orgânica proporcionaram o uso intenso de produtos sintéticos para fins terapêuticos, devido a estes serem obtidos por síntese orgânica e modificações estruturais em moléculas conhecidas aumentando a potência e a eficácia (Rates et al.; 2007). As plantas são fontes importantes na obtenção de produtos naturais com atividades biológicas, muitos dos quais se constituem modelo para a síntese de um vasto número de fármacos. Estes compostos, encontrados na natureza, demonstram uma gama enorme de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas.

Observa-se um interesse crescente em terapias alternativas e produtos naturais, especialmente vegetais com finalidades terapêuticas. Este interesse é devido: a insuficiência de fármacos sintéticos para várias doenças, efeitos colaterais dos mesmos, ao elevado custo do tratamento, à dificuldade da indústria em obter novos agentes terapêuticos, ao elevado custo de pesquisa e à produção de novas moléculas biologicamente ativas, entre outros motivos. Assim, aliados a estes fatores, encontra-se o dito popular de que o “natural não faz mal” aumentando a busca por procurar plantas medicinais e suas propriedades de cura (Nogueira et al., 2005).

O reino vegetal tem sido então uma das mais ricas fontes de substâncias orgânicas, contribuindo de forma significativa para o fornecimento de

metabólitos secundário, dos quais muito têm sido utilizados como medicamento, cosméticos, alimentos, agroquímicos, etc (Nogueira *et al.*, 2005). Desta forma, a fitoterapia atingiu um notável crescimento, assim como, também, o estudo dos metabólitos produzidos pelas plantas, os quais desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da química sintética.

Os fitoquímicos são substâncias biologicamente ativas presentes em plantas que lhes conferem cor, sabor, odor e proteção contra patógenos. Nos últimos anos, pesquisadores descobriram que estes compostos químicos também protegem nosso organismo contra doenças. Estudos têm revelado de forma consistente que a ingestão de frutas e verduras de forma freqüente contribui para reduzir o risco de doenças cardíacas, doenças degenerativas (ex: perda da visão) e da maioria dos tipos de câncer. Consequentemente, centenas de constituintes de plantas têm sido estudados de forma minuciosa, para avaliar o seu potencial na prevenção do câncer e de outras doenças degenerativas (Ohara et al., 2006).

Diversos fitoquímicos atuam como poderosos agentes antioxidantes, protegendo as células e órgãos da ação destrutiva das espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas espécies reativas de oxigênio são produzidas no organismo por diversos fatores tais como: consumo de cigarro, exposição a raios X, poluentes do ar, luz solar e, ainda, como subprodutos de nosso metabolismo. As EROs são capazes de oxidar moléculas em nosso organismo causando a destruição e envelhecimento de nossas células. No decorrer da idade, estas espécies reativas estão envolvidas em uma série de problemas que vão desde a catarata até o câncer.

Atualmente, sabe-se que as substâncias antioxidantes atuam neutralizando estas espécies, diminuindo a sua ação destrutiva (Ohara et al., 2006).

O processo de formação de EROs no organismo não pode ser completamente evitado, pois é ativado de forma frequente através das funções normais do nosso metabolismo tais como a respiração. As EROs são também formadas pela oxidação dos lipídeos, por fatores externos incluindo exercícios físicos excessivos, estresse emocional, exposição ao sol e a ingestão de aditivos alimentares, principalmente, conservantes. A ação destas espécies no organismo é cumulativa e em cadeia, ou seja, um radical livre atua sobre uma determinada molécula, roubando-lhe um elétron; tal molécula se torna reativa e irá atacar outra e assim sucessivamente, formando uma reação em cadeia que pode se repetir milhões de vezes em um único dia. Essa criação contínua de radicais livres pode causar sérios danos em proteínas e membranas celulares, comprometendo as defesas naturais do organismo, o próprio DNA e tornar o organismo susceptível a problemas cardiovasculares, câncer e numerosas outras disfunções (Ohara, 2006; Ulrich-Merzenich et al., 2009; Landrisana et al., 2009).

A atividade destrutiva dos radicais livres se deve principalmente ao fato desses compostos possuírem um ou mais elétrons desemparelhados, tornando-os instáveis e, conseqüentemente, muito reativos. Os “alvos” preferidos de ataque destes radicais são células ou tecidos saudáveis do nosso organismo. Diversas doenças ou respostas biológicas desfavoráveis estão ligadas à presença de radicais livres ou a outras espécies oxigenadas reativas (Gough, 2009).

Os fitoquímicos aparentemente interferem no estágio inicial do câncer, alguns deles atuam inibindo enzimas que ativam os genes envolvidos no câncer ou prevenindo a formação de substâncias carcinogênicas. Outros fitoquímicos bloqueiam a ação de compostos carcinogênicos que destroem células, tecidos e órgãos, ou ainda ajudam o organismo a produzir enzimas que destroem as substâncias carcinogênicas. Alguns bloqueiam a disseminação do câncer no organismo interferindo na reprodução das células expostas às substâncias cancerígenas (Siqueira et al., 1998).

Dentre as diversas classes de fitoquímicos encontram-se os flavonóides, alcalóides, terpenos, sapogeninas esteroidais, lignóides e riparinas. Usualmente, estas classes de fitoquímicos são potentes antioxidantes, devido à presença de duplas conjugadas em suas moléculas, permitindo a estabilização de espécies reativas de oxigênio. Por possuírem largo espectro de atividades biológicas e farmacológicas, têm recebido ampla atenção dos pesquisadores (Bisht et al., 2009). Têm sido utilizados no tratamento de vários tipos de doenças, tais como *diabetes mellitus*, alergias e úlceras pépticas, podem ser sintéticos ou naturais (Patil et al., 2009). Estudos toxicológicos têm demonstrado que os antioxidantes sintéticos podem provocar efeitos indesejáveis em animal, indicando a necessidade de pesquisas sobre a utilização de antioxidantes naturais. Por outro lado, inúmeros antioxidantes naturais têm sido consumidos sem o devido conhecimento de suas propriedades benéficas, bem como de eventuais efeitos colaterais (Marcano et al., 2007). Na área cosmética os flavonóides são usados na formulação de cremes antiidade e filtro solar.

CLASSE DOS LIGNÓIDES

São compostos naturais que apresentam como o esqueleto molecular o grupo fenilpropânico e podem ser extraído de plantas provenientes da flora da região norte e nordeste do Brasil. Os lignóides possuem atividade aleloquímica fato que contribuiu para a investigação das possíveis aplicações farmacêuticas. Além disso, possuem distribuição universal nas espécies lenhosas e uma variedade imensa de metabólitos, devido às diversas reações entre seus precursores (Cabral et al., 2007). Esta classe de substâncias tem atraído o interesse pelos efeitos biológicos em diferentes organismos, em níveis moleculares, fisiológicos, enzimáticos e farmacológicos (Cabral et al., 2007).

Dentro dessa classe de fitoquímicos encontramos o Dimethoxymagnolol, Grandisina e langambina que foram submetidos a avaliação da citotoxicidade para o presente trabalho.

DIMETHOXYMAGNOLOL

O dimethoxymagnolol (Figura 1) foi sintetizado a partir do magnolol pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica de Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O magnolol apresenta efeito protetor contra a indução de estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio em células epiteliais humanas. (Yao et al., 2009). Além disso, o magnolol apresenta efeito antiinflamatório e analgésico. Apesar destes efeitos terapêuticos comprovados o magnolol em alta concentração induz a hepatotoxicidade *in vitro* em condições de privação de soro

fetal bovino . O efeito hepatotóxico é mediado pela indução de morte celular por apoptose (Lin et al., 2009).

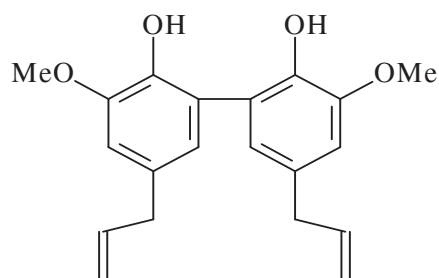


Figura 1: Estrutura do Dimethoxymagnolol

GRANDISINA

A *Virola surinamensis*, da família das *Myristicaceae*, é conhecida popularmente por ucuúba branca ou ucuúba de igapó. São comumente encontradas nas matas alagáveis da Região amazônica (RODRIGUES et al., 1980). A espécie botânica *Virola surinamensis* possui fitoconstituintes como as neolignanas virolina, surinamensina, veraguensina e grandisina. A grandisina é uma neolignana cuja estrutura molecular encontra-se representada na figura 2.

Ela é um composto natural, extraído também da *Licaria aurea*, um grupo de espécies arbóreas do gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) com ramos e folhas de coloração ferruginosa (canela-ferrugem, canela-amarela) (Pedralli et al., 1996).

Este lignóide está presente em diversas espécies de vegetais da flora do norte e do nordeste brasileiro usado na medicina popular no tratamento de desordens hepáticas, cólicas, inflamação, reumatismo e dispepsias. Já foram demonstradas experimentalmente, diferentes propriedades biológicas deste composto, tais como: atividade antiviral, sendo que alguns mecanismos de ação são semelhantes ao aciclovir e ganciclovir; ação anti-reumática e, ação anti- psorítica (Di Stansi, 2003).

Em estudos já realizados, foi comprovado o potencial genotóxico da grandisina em doses elevadas. Por outro lado, nas menores doses observou-se que ela preveniu a fragmentação cromossômica, induzida pela ciclofosfamida, apresentando um potencial quimioprotetor dose-dependente. Estes resultados abrem novas perspectivas de aplicações terapêuticas da grandisina (Oliveira Junior et al., 2007).

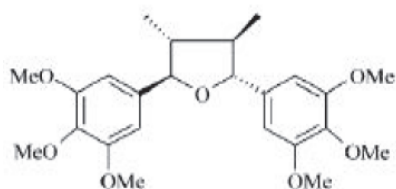


Figura 2: Estrutura da Grandisina

LANGAMBINA

Ocotea duckei é uma espécie nativa do nordeste brasileiro, conhecida popularmente como "Louro-de-cheiro". É rica em alcalóides, lignanas e

óleos essenciais (Figura 3). Um dos constituintes mais importantes obtidos de *Ocotea duckei* é a langambina, que têm demonstrado várias atividades farmacológicas como: antagonista do receptor do fator de agregação plaquetária (PAF) responsável pelo controle de prevenção de hemorragias (WILLIAMSON et al., 2003) possuindo também efeito protetor contra colapso cardiovascular que é a designação geral conotando a perda de fluxo sanguíneo efetivo devido a disfunção aguda do coração e /ou da circulação periférica (Monte et al., 2008)). Inibe as manifestações clínicas das reações inflamatórias anormais, perante substâncias (alérgenos) que habitualmente não deveriam produzi-la. A langambina também tem efeito analgésico que alivia dores causadas por diversos motivos (Monte et al., 2008) demonstraram a atividade leishmanicida superior ao glucantime, fármaco de referência usado no tratamento da leishmaniose.

A langambina também induz a morte celular por apoptose em células tumorais coloreticais através da modulação da proteína anti-apoptótica bcl (Hausott et al., 2003).

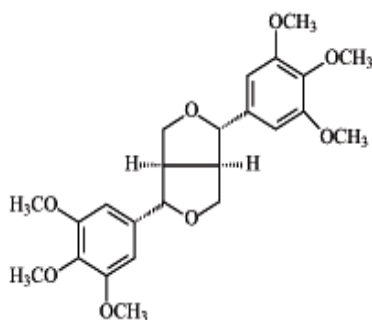


Figura 3: Estrutura da langambina

CLASSE DAS RIPARINAS

A *Aniba riparia* é uma espécie de planta conhecida popularmente como “louro”, tendo como centro da sua diversidade a Amazônia e Guianas, podendo estender-se para os Andes, as montanhas do norte da Venezuela e, leste e sul do Brasil. Foram isolados alcalóides do extrato de louro, do tipo alcalmidas, que foram chamadas de riparinas. Estas se dividem em vários grupos, sendo os grupos que serão utilizados nesse trabalho: riparina I (éter metílico de *N*-benzoil tiramina), riparina II (éter metílico de *N*-2-hidroxibenzoil tiramina) e riparina III (éter metílico de *N*-2,6-dihidroxi-benzoil tiramina).

As riparinas I, II e III (figuras 6, 7 e 8), apresentam efeitos ansiolíticos desprovidos dos efeitos sedativo e/ou relaxante muscular, apresentam efeito terapêutico similares aos apresentados pelos benzodiazepínicos clássicos, porém com menos efeitos colaterais (Sousa et al., 2005).

Riparina I

A riparina I é um composto natural extraído da *Aniba riparina* *Lauraceae* planta nativa da mata amazônica na qual pode ser extraída do fruto e do cálice (Barbosa-Filho et al., 1987). Possui ação antibiótica, tendo sido isolada pela primeira vez no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba.

Entre outras ações estudadas foi demonstrada que a riparina I é capaz de induzir efeito espasmolítico principalmente, devido à inibição de influxo de íons cálcio para o meio intracelular e da inibição da liberação dos estoques intracelulares

de cálcio, não envolvendo a participação da geração de AMPc (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Apresenta um efeito hipotensor e bradicárdico transitório, devido a uma ação que parece envolver, principalmente, um componente de origem parassimpática a nível cardíaco (Souza et al., 2005).

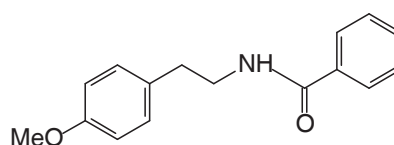


Figura 6: Estrutura da Riparina I ((O-Methyl)-N-Benzoyltyramine)

Riparina II

Extraída da *Aniba riparina Lauraceae*, tem como principal ação farmacológica o relaxamento muscular. Essas moléculas produzem relaxamento no músculo liso que são encontrados nos órgãos internos do corpo humano e uma de suas funções é controlar o diâmetro das veias. Sabe-se que as substâncias que relaxam o músculo liso, reduzem a pressão sanguínea o que pressupõe que elas podem ser úteis no tratamento da hipertensão e arteriosclerose (Barbosa-Filho et al., 1987).

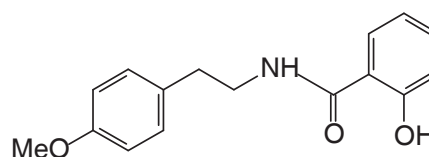


Figura 7: Estrutura da Riparina II ((O-Methyl)-N-(2-Hydroxybenzoyl)-tyramine)

Riparina III

A Riparina III também extraída da *Aniba Riparina*, além de ser um potente relaxante muscular do músculo esquelético liso, apresenta também atividades ansiolíticas e antidepressivas (Souza et al., 2005).

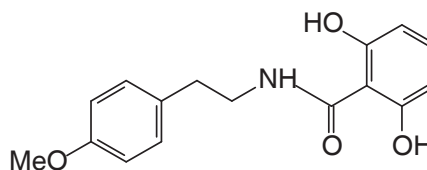


Figura 8: Estrutura da Riparina III ((*O*-Methyl)-*N*-(2,6-Dihydroxybenzoyl)-tyramine)

Tendo em vista as propriedades farmacológicas destes fitoquímicos é interessante verificar a relação efeito biológico *versus* toxicidade, utilizando linhagens leucêmicas e células V79, respectivamente.

OBJETIVO

Testar compostos de diferentes finalidades para avaliar citotoxicidade previamente em células V79 para uma determinação posterior da citotoxicidade em células leucêmicas.

.

CAPÍTULO 1: Artigo submetido a *Journal of Pharmacy and Pharmacology*

Phytochemicals Inhibit Cell Growth in Human Leukemia Cells

Iasmin Rosanne Ferreira^{a, b}, Marianna Vieira Sobral Castello-Branco^c, Josean Fechine Tavares,^c
Marcelo Sobral da Silva,^c José Maria Barbosa-Filho^c and Patrícia S. Melo^{a, b}

^aFaculdade de Ciências Aplicadas, UNICAMP, Limeira, SP, 13484-350, Brazil.

^bFaculdades Integradas Metropolitanas de Campinas, METROCAMP, Rua Sales de Oliveira, 1661, Vila Industrial, Campinas, São Paulo, Brazil.

^cPrograma de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 58051-970 - Brazil.

Abstract

Compounds found in nature, show an enormous range of diversity in terms of structure and pharmacologic activities. Plants play a surprisingly important source of new treatments for cancer, despite advances in chemical synthesis. Thus the aim of this study was to evaluate six phytomedicine belonging to the class of lignoid (dimethoxymagnolol, grandisin and yangambin) and riparins (I, II and III) with and without glutathione supplementation (GSH – 1mM) in three leukemic lines, K562, U937 and HL60. The cell viability was evaluated by MTT reduction assay in leukemic cells treated with the phytochemicals (with or without GSH supplementation). In the U937 cell IC_{50} values found were 100 μ M, 30 μ M and 500 μ M in the cells treated with dimethoximagnolol, grandisin and yangambin, respectively and 60, 25 and 15 μ M (riparin I, II and III, respectively). In K562 cells the treatment with riparins were the most effective class of compounds studied since it was determined IC_{50} values of 125, 27 and 15 μ M (riparin I, II and III, respectively). Different values were determined in the HL60 cells treated with riparins (140, 100 and 75 μ M for riparin I, II and III, respectively). GSH ameliorated only the toxic effects evaluated in U937 cell treated with riparin II, since it was not observed different results in the others cell lines treated with the studied compounds plus GSH. The cytotoxicity of phytochemicals was also assessed in a permanent lung fibroblast cell line (V79) culture that are cells commonly used for cytotoxicity studies. All the phytochemicals investigated, with the yangambin exception, were less cytotoxic to V79 cells than to leukemic cells. These results indicate a positive pharmacologic application since the leukemic activity was major than to the toxic effects evaluated in the V79 cells. All the compounds investigated in this work has antitumoral effects, however the action mechanism of riparin II is different on U937 cell since GSH supplementation protected the toxic effects. Probably, riparin II triggered cell death by stress oxidative pathway.

Key Words: phytochemicals, leukemic cell, MTT reduction

Introduction

Cancer is a principal cause of death worldwide, being the main reason for the search for new anticancer agents, mainly from natural origin, which has become an important research approach [1]. Investigations of *in vitro* cultured acute myelogenous leukemia (AML) cell lines have contributed for the characterization of cells, differentiation and cell death by apoptosis, and mainly for the understanding of chemotherapy effects [2]. Human cell lines derived from myeloid leukemias have been widely used as models to study the molecular control of hematopoietic cell proliferation and differentiation. Therefore, performing *in vitro* screening, in order to discover cytotoxic agents against cancer cell lines remains a major goal of anticancer research.

While chemotherapy is one of the most extensively studied methods in anti-cancer therapies, its efficacy and safety remain a primary concern as toxicity and other side effects of chemotherapy are severe. Moreover, multi-drug resistant cancer is even a bigger challenge. Medicinal herbs are main sources of new drugs. Newman et al. [3] reported that more than half of the new chemicals approved between 1982 and 2002 were derived directly or indirectly from natural products. Paclitaxel, camptothecin, vinca alkaloids and etoposide are anticancer compounds originally extracted from plants [4], [5].

The family Lauraceae is a predominantly arboreal of around 60 genera and 1100 species, its principal centers of distribution is Brazil and Southeast Asia. Several species have been used as perfume, woodwork and spices; secondary metabolites have been of substantial phytochemical and pharmacological interest. *Ocotea duckei*, popularly known as “Louro de cheiro”, “Louro pimenta” and “Louro canela” [6] and, *Aniba riparia* popularly known as “louro” are members of the Lauraceae family. Barbosa-Filho and collaborators [7], [8], isolated

from the leaves of *Ocotea duckei* and *Licaria alba* yangambin and grandisin, respectively. Grandisin has different biological properties, such as antiviral activity, some mechanisms of action are similar to acyclovir and ganciclovir and, anti-rheumatic and anti-psoriasis actions [9]. Yangambin has been demonstrated has several pharmacological activities such as receptor antagonist of platelet activating factor (PAF), analgesic and antileishmanial activities [10]. The yangambin also induces cell death by apoptosis in colorectal tumor cells by modulating the anti-apoptotic protein bcl-2 [11], inhibited the growth of Ehrlich ascites tumoral *in vivo* prolonging host survival mediated via apoptosis and antiangiogenic activity [12] and shows low cytotoxicity to murine macrophages [13]. *Aniba riparia* is found in Amazonia and in the Guianas, possessing in their extracts alkaloids with antimicrobial activities [14]. Riparin I (methyl ether of N-benzoyl tyramine), riparin II (methyl ether of N-2-hydroxy-benzoyl tyramine) and riparin III (methyl ether of N-2, 6-dihydroxy-benzoyl tyramine) were isolated from green fruits of *Aniba riparia*. Riparin I, II and III have anxiolytic devoid of sedative and / or muscle relaxant therapeutic effect similar to the showed by classical benzodiazepines, but with fewer side effects [15]. Pharmacokinetic studies are being conducted with riparin I, II and III. Blood matrix effects for Wistar rats were determined [16].

Magnolol, a natural compound has been reported to have wide spectrum of biological effects such as antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and antiproliferative effects in several tumor cells as cited by Rasul and collaborators (2012)[17]. The magnolol had a protective effect in human epithelial cells induced to oxidative stress by hydrogen peroxide [18]. In addition, the magnolol has analgesic and anti-inflammatory effect. Despite these proven therapeutic effects in high concentration magnolol induces hepatotoxicity *in vitro* under conditions of serum deprivation. The hepatotoxic effect is mediated by the induction of cell

death by apoptosis [19]. The dimethoxymagnolol investigated in this study was synthesized from magnolol.

As a very valuable source for novel chemotherapeutic agents, natural plant compounds exhibit effective antitumour activities with a wide range of mechanisms. In the present study, we used human leukemia cell lines, including HL60, U937 and K562, to investigate the anticancer effects of lignoids (dimethoxymagnolol, grandisin and yangambin) and riparins (I, II and III) in terms of growth inhibition.

Experimental

Chemicals and cell lines

Grandisin was obtained by a soxhlet extraction of fresh calyces (1 kg) of the *Licaria aurea*. The residue (88.2 g) was again partitioned. The CHCl_3 extract (28 g) was submitted to silica gel CC. Elution with C_6H_6 and crystallization from Et_2O -MeOH gave grandisin **1** (12 g) [20]. The chemical purity of grandisin was determined by high-performance liquid chromatography.

The dried and ground leaves and stem bark (5 kg) of the *Ocotea duckei* were extracted with 95% EtOH at room temperature for three days. The ethanolic extract (EtOH) was concentrated under vacuum. The crude EtOH extract was stirred in a solution of 10% acetic acid and filtered over celite, the precipitate was discarded and the filtrate was extracted with CHCl_3 . After concentration under vacuum the CHCl_3 extract was called **CFApH** (Chloroform Fraction Acid pH). The deffated acetic solution was made alkaline with NH_4OH to pH 9 and extracted with CHCl_3 . The residue of this CHCl_3 extract was called **CFBpH** (Chloroform

Fraction Basic pH). **CFApH** was dissolved in MeOH and left in a freezer for 24 hours, the precipitate, after recrystallization in MeOH, yielded 3 g (0.06%) of yangambin **2** [8].

Riparin I, II and III **3-5** were obtained by organic synthesis and donated by PhD José Maria Barbosa Filho of the Paraíba Federal University of Brazil, in accordance with the methodology described in the literature [21].

Eugenol was obtained by a Soxhlet extraction of cloves oil from *Caryophyllus aromaticus*. Pure dimethoxymagnolol **6** was obtained by a single chemical reaction by treating eugenol with potassium ferricyanide according to previously described procedures [22]. The chemical purity of dimethoxymagnolol (more than 98%) was determined by high performance liquid chromatography.

Leukemic cells: the leukemia cells (HL60, U937 and K562) were grown in suspension at 37 °C in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air. To assess viability, the cells were seeded (3×10^5 /ml) in 96-well plates and incubated with different concentrations of phytochemicals for 72 h. The compounds were first dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted in supplemented medium. The final content of DMSO in the test medium and controls was 0.1%. Cell viability was determined by reduction of 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT). To assess the protective effect of reduced glutathione (GSH), leukemic cells were seeded in the same conditions in 96-well plates containing in the treatment medium the supplementation of 1 mM GSH.

V79 cells: the cytotoxicity of phytochemicals was assessed in a permanent lung fibroblast cell line (V79) culture [23] that are commonly cells used for cytotoxicity studies. V79 fibroblasts were grown as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU of penicillin/ml and 100 µg/ml of streptomycin in a humidified incubator with 5% CO₂ in air at 37 °C. The cells were plated at a density of 3 x10⁴ cells/ml in 96-well plates. Forty-eight hours after cell seeding, semiconfluent cultures were exposed to different concentrations of the compounds in study (0 - 500 µM). The cells were exposed for 24h to the test medium with or without the compounds studied (control). Each concentration was tested in six replicates in each of three separate experiments. At the end of the incubation, three independent endpoints for cytotoxicity, MTT reduction, DNA content and neutral red uptake, were evaluated.

Neutral red uptake (NRU)

The NRU was measured by the method of Borefreund and Puerner [23]. Briefly, cells were washed once with PBS after removal of the culture medium. After 4 h of incubation with serum-free medium containing neutral red (50 µmol/L), the cells were washed in PBS, followed by the addition of 0.1 ml of a solution of 1% acetic acid and ethanol (50%) to each well to fix the cells and to remove the neutral red from the solution. The plates were shaken gently for 20 min on a plate shaker, and the absorbance of the solution was read at 540 nm (VersaMaxk, Tunable Microplate Reader).

Methylthiazoletetrazolium (MTT) reduction

The MTT reduction assay was performed as described by Denizot and Lang [24]. Briefly,

cells were washed once with PBS before adding 0.1 ml of serum-free medium containing 0.05% of MTT salt to each well. After incubation for 5h, the culture medium was removed and 0.1 ml of ethanol was added to each well to solubilize the formazan formed. The plates were shaken gently for 10 min and the absorbance was measured at 570 nm (VersaMaxx, Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, Co., Sunnyvale, CA, USA).

DNA content

The assay for the estimation of DNA content present in the cell culture was performed as described by Cingi *et al.* [25]. After the MTT assay, the culture medium was removed which contains the MTT dye and the AgNP_{bio} solution. The cells were washed with PBS - Ca²⁺ (PBS Ca²⁺ in mM: 136.9 NaCl; 2.8 KCl; 7.99 NaHPO₄; 1.47 KH₂PO₄; 1.24 CaCl₂, 0.5 MgCl₂ - 6 H₂O) fixed with aqueous trichloroacetic acid (TCA) 5%, washed 2 times with ethanol (all solutions cold) and air dried. For cell lysis, was added NaOH 0.5 M (0.1mL/well) for 1 hour at 37°C and the solution absorbance of NaOH in the wells read using spectrophotometer at 260nm.

In vitro cell-growth inhibition assays

The cell viability experiments were performed at least three times with six replicates each time. The IC₅₀ values were calculated after expressing the results as percentage of the controls and were determined graphically from the concentration-response curves.

Results and Discussion

The V79 cells are fibroblasts derived from Chinese hamster lung and are widely used in mutagenicity and cytotoxicity tests. The evaluation of the toxicity V79 allows establishing the relationship between cytotoxicity and acute oral toxicity in experimental animals, it possible to determine the values of the DL₅₀ (dose lethal 50) by this route [26], [27].

All the studied substances exhibited different concentration-dependent inhibitory effects on the proliferation of leukemic cells. Dimethoxymagnolol was the most growth-inhibitory in U937 cells as shown in Table 1, since it was determined an IC₅₀ value of 100 μ M by MTT reduction assay. Incubation of cells with dimethoxymagnolol supplemented with GSH did not change significantly the cytotoxic effects (IC₅₀ of 110 μ M). Similar results were observed in HL60 cells, however the IC₅₀ was around 250 μ M. Table 2 shows the IC₅₀ values determined in V79 cells with three different cell viability assays (neutral red uptake, MTT reduction and DNA content). According to these results dimethoxymagnolol was more cytotoxic evaluated by MTT assay (IC₅₀ = 114 μ M) than to the others viability assays (IC₅₀ of 238 μ M in the NRU assay and DNA content diminished in 40% in the cells treated with the major concentration used – 500 μ M). In the K562 cells treated with dimethoxymagnolol the IC₅₀ values were 250 μ M (without GSH) and 300 μ M (plus 1 mM GSH). Ikai and collaborators (2006)[28] determined an IC₅₀ of 27 μ M in U937 cells treated with magnolol evaluated by trypan blue exclusion test. They reported that magnolol induced apoptosis mediated via the intrinsic pathway with release of apoptosis inducing factor (AIF) with a decreased membrane potential mitochondrial. A similar inhibitory effect was found for grandisin using the MTT viability assay (IC₅₀ = 30 μ M) in U937 cells (with or without GSH supplementation) according to Table 1. It was obtained IC₅₀ value of 60 μ M in the HL60 cells treated with grandisin and GSH supplementation did not alter the

cytotoxic effects. However grandisin showed a slow cytotoxic effect in the K562 cells (IC_{50} of 250 and 300 μM , without and with GSH, respectively). According to Table 2 IC_{50} values determined in V79 cells treated with grandisin were around 200 μM in all the viability assays carried out, indicating that the toxicity to leukemic cells is major than to fibroblasts cells, excepting to K562 cells. These differences in the cells susceptibilities are interesting since the grandisin showed a potential pharmacological effect.

Table 1 shows that yangambin was slightly toxic in all leukemic cell lines investigated in this study, since it was determined the IC_{50} only in the major concentration used (500 μM). In all cell lines treated with yangambin, the GSH did not interfere with the cytotoxic effects. Comparing to the results showed in table 2 (IC_{50} of 190, 350 and 119 μM evaluated by MTT, NRU and DNA content, respectively) yangambin was more cytotoxic to fibroblast cells than to leukemic cells.

As shown in Table 1 the riparin I was more cytotoxic to K562 and U937 cells than to HL60 cells (IC_{50} values of 125, ~60 and 140 μM , respectively). Supplementation with GSH did not change the cytotoxic effects. Table 2 shows that riparin I was more cytotoxic in V79 cells evaluated by DNA content than to the others viability assays (182 μM *versus* 231 and 321 μM determined by MTT and NRU assays, respectively). According to these results Riparin I is more cytotoxic to leukemic cells than to fibroblasts.

According to Table 1 riparin II was more effective in K562 and U937 (IC_{50} = 27 μM and 25 μM , respectively) than in HL60 cells (IC_{50} = 100 μM). Supplementation with GSH protected the cytotoxic effects in U937 cells treated concomitant with riparin II, probably indicating that the action mechanism is mediated via oxidative stress. IC_{50} determined in V79 cells were 259, 222 and 96 μM evaluated by MTT, NRU and DNA content, respectively. These results

demonstrating a great antileukemic activity and a reduced toxicity to a cell line used to estimate *in vivo* toxicity.

Similar results were obtained in the leukemic cells treated with riparin III (IC₅₀ around 15 μ M in the K562 and U937 cells, with or without GSH). In the HL60 cells the IC₅₀ values obtained after treatment with riparin III were 75 and 80 μ M (without and with GSH, respectively). Comparing to the results showed in the Table II (IC₅₀ of 128, 218 and > 500 μ M evaluated by MTT, NRU and DNA content, respectively), riparin III was less cytotoxic to V79 cells than to leukemic cells.

Thus, the present study showed that riparin II has notable antileukemic effects in U937 cells by inducing cell death by oxidative stress and reduced toxicity to fibroblasts. These data suggest that riparin II as a natural substance with growth inhibition effects on leukemia cells, merit further studies to examine its mechanism of action as antitumoral agent.

Acknowledgement

This work was supported by the Brazilian agencies CAPES and CNPq.

References

- [1] Tan W et al. Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. *Chin Med* 2011; 6(1):27-42.
- [2] Bruserud O, Wendelboe O. Biological treatment in acute myelogenous leukaemia: how should T-cell targeting immunotherapy be combined with intensive chemotherapy? *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1: 1005-1116.
- [3] Newman DJ et al. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. 2003; *J Nat Prod* 66(7): 1022-1037.
- [4] Amin A et al. Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *Int J Biomed Sci* 2009; 5(1):1-11.
- [5] Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol.* 2007; 9(12):767-776.
- [6] Barreto RC. O gênero *Ocotea* Aurl em Pernambuco. In: XXXVI Congresso Brasileiro de Botânica, São Paulo, 1990, 177-179.
- [7] Barbosa-Filho JM et al. *Ocotea duckei*: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 1999; 71: 231-238.
- [8] Barbosa-Filho JM et al. Neolignans from *Licaria áurea*. *Phytochemistry* 1989; 28: 2209–2211.
- [9] Di Stansi LC. Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Ed. UNESP, 2003.
- [10] Wiliamson LM. Consensus conference on platelet transfusion: How should the safety and efficacy of platelet transfusion be assured? *Revista Brasileira de Hemoterapia* 2003; 56-63.

- [11] Hausott B et al. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003; 129(10): 569-576.
- [12] Valadares MC et al. Cytotoxicity and antiangiogenic activity of grandisin. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61(12): 1709-1714.
- [13] Monte Neto RL et al. Yangambin cytotoxicity: a pharmacologically active lignan obtained from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). *Z Naturforsch C* 2008; 63(9-10): 681-686.
- [15] Sousa FC et al. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 78(1): 27-33.
- [17] Rasul A et al. Magnolol, a natural compound, induces apoptosis of SGC-7901 human gastric adenocarcinoma cells via the mitochondrial and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Oncol* 2012; 40(4): 1153-1161.
- [18] Yao K et al. Protective effect of magnolol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lens epithelial cells. *Am J Chin Med* 2009, 37(4): 785-796.
- [19] Lin YR et al. Antinociceptive actions of honokiol and magnolol in glutatergic and inflammatory pain. *J Biom Sci* 2009; 16(94): 1-10.
- [20] Barbosa-Filho JM et al. Chemical and Pharmacological Investigation of Solanum Species of Brazil – A Search for Solasodine and Other Potentially Useful Therapeutic Agents. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1991; 86(supl.II): 189 – 191.

- [21] Barbosa-Filho JM et al. Synthesis of several new phenylethylamides of substituted benzoic acids. *Quimica nova* 1990; 13(4): 332-334.
- [22] Dias AF. An improved high yield synthesis of dehydrodieugenol. *Phytochemistry* 1988; 27(9): 3008–3009.
- [23] Correa DHA et al. Dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex: Cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 2005; 510(1-2): 17-24.
- [24] Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89(2): 271-277.
- [25] Cingi MR et al. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: A multicentre approach. *Toxicol in Vitro* 1991; 5(2): 119-125.
- [26] Halle W, Spielmann H. Two procedures for the prediction of acute toxicity (LD_{50}) from cytotoxicity data. *Altern Lab Anim* 1992; pp. 40-49.
- [27] Rodriguez JA, Haun M. Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes. *Planta Medica* 1999; 65(6): 522-526.
- [28] Ikai T, et al. Magnolol-induced apoptosis is mediated via the intrinsic pathway with release of AIF from mitochondria in U937 cells. *Biol Pharm Bull.* 2006 Dec;29(12):2498-501.

Figure Legend

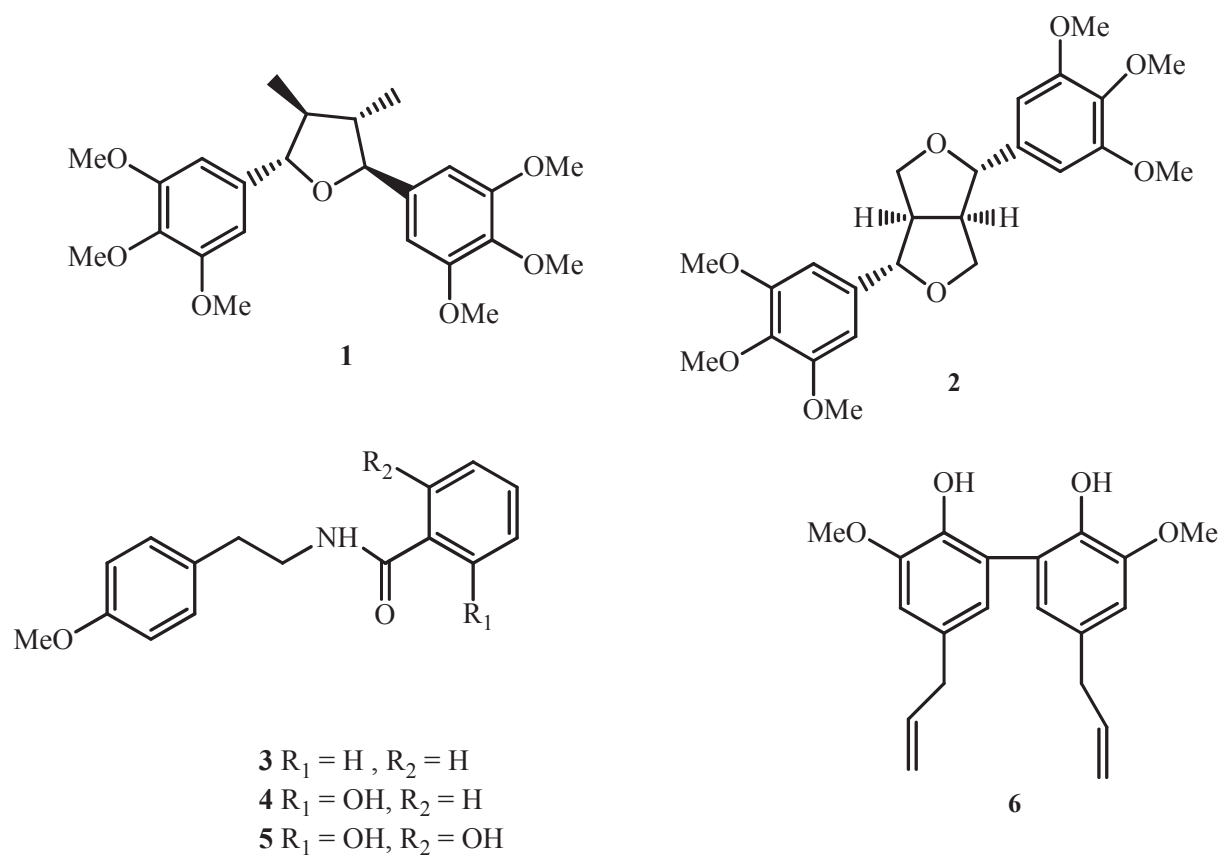


Fig. 1: .Structure of Grandisin (**1**), Yangambin (**2**), Riparin I (**3**), Riparin II (**4**), Riparin III (**5**) and Dimethoxymagnolol (**6**).

Table I. IC₅₀ values (μM) obtained in leukemic cells after treatment with the phytochemicals

PHYTOCHEMICALS	HL60		K562		U937	
	- GSH	+ GSH	- GSH	+ GSH	- GSH	+ GSH
Dimethoxymagnolol	250	250	250	300	100	110
Grandisin	60	60	250	300	30	30
Yangambin	500	500	500	500	500	500
Riparin I	140	140	125	125	60	60
Riparin II	100	100	27	30	25	*
Riparin III	75	80	15	15	15	20

*Not reach the IC₅₀ values in concentrations up to 500 μM.

Table II. IC₅₀ values (μM) obtained in V79 cells after treatment with the phytochemicals

PHYTOCHEMICALS	MTT (μM)	NRU (μM)	DNA (μM)
Dimethoxymagnolol	114	238	*
Grandisin	174	239	226
Yangambin	190	350	119
Riparin I	231	321	182
Riparin II	259	222	96
Riparin III	128	218	*

*Not reach the IC₅₀ values in concentrations up to 500 μM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente um dos debates mais discutidos na comunidade científica é a utilização de animais em experimentos laboratoriais. Apesar da reconhecida importância dos testes *in vivo* este tipo de abordagem experimental está sendo criticada pelo excessivo número de animais utilizados. Apesar do bem estar do animal e os objetivos científicos precisarem estar em harmonia, há discussões sobre os regulamentos e diretrizes institucionais com o intuito de revisar este assunto. Uma das soluções para o uso de animais em laboratório é a utilização de ensaios de toxicidade *in vitro*, recomendados fortemente na academia na realização de avaliações preliminares, com o intuito de se prever, ao menos em parte, os valores de DL_{50} *in vivo*.

A citotoxicidade de um composto pode ser verificada através de diferentes métodos, os quais avaliam de modo geral:

- a integridade da membrana (exclusão do corante azul de tripan e incorporação do vermelho neutro);
- síntese de macromoléculas e crescimento celular (conteúdo de ácidos nucléicos e quantificação de proteínas);
- atividade de enzimas e funcionamento de organelas (redução do MTT e incorporação do vermelho neutro);

De acordo com o exposto, analisamos a taxa de inibição de crescimento celular através da quantificação de ácidos nucléicos e, testes que avaliam as funções mitocondriais e lisossomais através dos ensaios de redução do MTT e incorporação do corante vermelho neutro, respectivamente.

Com o intuito de se verificar a citotoxicidade de alguns fitoquímicos (lignóides, e riparinas), foram realizadas culturas de células V79, U937, K562 e HL60. As células V79, U937, K562 e HL60, após processadas, foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias em estudo como descrito na Metodologia. Após o tratamento as células foram analisadas em relação a viabilidade celular através dos ensaios de determinação dos indicadores de citotoxicidade.

Os resultados referentes aos testes de citotoxicidade dos fitoquímicos frente às células V79, U937, K562 e HL60. serão apresentados a seguir.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada experimento foi feito pelo menos três vezes (seis repetições cada) e os resultados foram expressos em porcentagem (média + / - SD) dos controles. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA e pós-teste BONFERRONI, através do programa GraphPad® versão 5. O teste t de Student calculado pelo Origin® versão 8.0. Valor de probabilidade $P < 0,05$ foi considerado significativo.

CÉLULAS V79 – CITOTOXICIDADE DOS LIGNÓIDES

A Tabela 1 apresenta os resultados de citotoxicidade dos lignóides (Grandisina, yangambina e dimethoxymagnolol) em células V79. A Grandisina e o dimethoxymagnolol apresentaram valores similares de IC_{50} determinados através do teste de incorporação do vermelho neutro (em torno de 240 μM), entretanto valores

diferentes foram encontrados nos testes de redução do MTT (174 e 114 μM) e conteúdo de ácidos nucleídos (226 μM e superior a 500 μM), respectivamente nas células tratadas com grandisina e dimethoxymagnolol. A langambina apresentou valores de IC_{50} de 190, 350 e 119 μM , determinados pelos testes de redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucléicos, respectivamente.

Resultados da literatura (Monte Neto *et al.*, 2008) indicam que a langambina apresenta reduzida citotoxicidade em macrófagos (valores de IC_{50} de 383.3 μM e 504,3 μM , obtidos nos testes de redução do MTT e exclusão do azul de tripan, respectivamente). Monte e colaboradores também observaram, utilizando modelos de desenvolvimento embrionário com ouriço – do – mar, que a langambina possui efeitos antimitótico e teratogênico baixos, em concentrações inferiores à 1,025 μM .

Estes resultados indicam que a langambina e os outros lignóides são substâncias m potencial para serem utilizados na indústria farmacêutica, tendo em vista a reduzida citotoxicidade e os efeitos farmacológicos.

Os efeitos citotóxicos de produtos químicos são classificados como citotoxicidade geral ou basal, citotoxicidade seletiva ou órgão-específica e a citotoxicidade específica de funções celulares (Melo *et al.*, 2006). Nos fenômenos provenientes da citotoxicidade basal os valores de IC_{50} obtidos nos testes de viabilidade celular, avaliando diferentes alvos celulares, geralmente são similares. De acordo com estes critérios, os resultados obtidos com os lignóides devem ser classificados como fenômenos de citotoxicidade basal.

CÉLULAS V79 – CITOTOXICIDADE DAS RIPARINAS

Em relação ao conteúdo de ácidos nucleicos a riparina II foi duas vezes menos citotóxica do que a riparina I (IC_{50} de 96 e 192 μM , respectivamente para riparina I e II). Por outro lado, a riparina II foi mais citotóxica do que a riparina I avaliada pela incorporação de vermelho neutro (222 e 321 μM , respectivamente). A riparina III apresentou valores de IC_{50} de 128 e 218 μM nos testes de redução do MTT e incorporação do vermelho neutro. Aparentemente o efeito citotóxico está relacionado com a lipofilicidade da substância, ou seja, a riparina III apresentando duas hidroxilas é a menos citotóxica.

A tabela 1 sumariza os resultados determinados nas células V79 com as substâncias em estudo.

Tabela 1. Valores de IC_{50} obtidos nos tratamentos das células V79 com os fitoquímicos (lignóides e riparinas).

FITOQUÍMICOS	MTT (μM)	VN (μM)	DNA (μM)
Grandisina	174 +/- 15	239 +/- 5	226 +/- 4
langambina	190 +/- 12	350 +/- 10	119 +/- 16
Dimethoxymagnolol	114 +/- 9	238 +/- 5	*
Riparina I	231 +/- 6	321 +/- 10	182 +/- 6
Riparina II	259 +/- 7	222 +/- 15	96 +/- 9
Riparina III	128 +/- 10	218 +/- 12	*

* Não foi encontrado valores de IC_{50} em concentrações até 500 μM .

De acordo com estes resultados os valores de IC_{50} determinados para as diferentes classes de fitoquímicos em células V79 são similares a outras substâncias de uso terapêutico, tais como o diazepam (IC_{50} de 209 μM), propranolol (IC_{50} de 120 μM), indometacina (IC_{50} de 179 μM) e fenilbutazona (IC_{50} de 660 μM). Entretanto, outros fármacos encontrados no mercado apresentam valores de IC_{50} bem menores, como exemplos o benznidazole (2 mM) e ácido acetil salicílico (9 mM) (Rosenkranz *et al.*, 1992). Esta correlação de citotoxicidade similar entre os fitoquímicos e fármacos reforça a possível utilização terapêutica destas substâncias.

CÉLULAS LEUCEMICAS

Todas as substâncias estudadas exibiram efeitos tóxicos nas células leucêmicas, em diferentes concentrações, inibindo a proliferação das células leucêmicas. O Dimethoxymagnolol foi o mais tóxico nas células U937, como mostrado na Tabela 4, uma vez que foi determinado um valor de IC_{50} de 100 μM através ensaio de redução de MTT. O tratamento das células com dimethoxymagnolol suplementado com GSH não alterou significativamente os efeitos citotóxicos (IC_{50} de 110 μM). Resultados semelhantes foram observados em células HL60, entretanto o valor de IC_{50} determinado se encontra por volta de 250 μM .

Nas células K562 (Tabela 3) tratadas com dimethoxymagnolol os valores de IC_{50} foram 250 μM (sem GSH) e 300 μM (com 1 mM GSH) . Ikai e colaboradores (2006), determinaram o valor de IC_{50} por volta de 27 μM em células

U937 tratadas com magnolol, avaliado pelo teste de exclusão do azul de tripan. Neste estudo, os autores relataram que o magnolol induziu apoptose mediado através da via intrínseca - liberando o fator de indução de apoptose após a diminuição do potencial de membrana mitocondrial.

De acordo com a Tabela 4, um efeito inibitório semelhante foi encontrado para grandisina no ensaio de MTT ($IC_{50} = 30 \mu M$) em células U937 (com e sem a suplementação de GSH). Obteve-se o valor de IC_{50} de $60 \mu M$ nas células HL60 (Tabela 2) tratadas com grandisina, com e sem a suplementação de GSH. No entanto, grandisina mostrou um efeito citotóxico menor nas células K562 (Tabela 3) (IC_{50} de 250 e $300 \mu M$, sem e com a suplementação de GSH, respectivamente).

As Tabelas mostram que iangambina foi ligeiramente tóxica em todas as linhagens leucêmicas, uma vez que foi determinado o valor de IC_{50} só na maior concentração usada ($500 \mu M$). Em todas as linhagens de células tratadas com iangambina, a glutathione reduzida não interferiu com os efeitos citotóxicos.

De acordo com os resultados encontrados, a riparina I foi mais citotóxica para as células K562 e U937 do que para células HL60 (valores de IC_{50} de 125, ~ 60 e $140 \mu M$, respectivamente). A suplementação com GSH não alterou os efeitos citotóxicos

De acordo com os resultados, a riparina II foi mais eficaz nas células K562 e U937 ($IC_{50} = 27 \mu M$ e $25 \mu M$, respectivamente) do que em células HL60 ($IC_{50} = 100 \mu M$). A suplementação com GSH protegeu as células U937 (Tabela 4) dos efeitos da riparina II, indicando um mecanismo de ação mediada por estresse oxidativo.

Resultados semelhantes foram obtidos em células leucêmicas tratadas com riparina III (IC_{50} em torno de 15 μM em células K562 e U937, com ou sem a GSH). Nas células HL60 os valores de IC_{50} obtidos após o tratamento com riparina III foram de 75 e 80 μM (sem e com a GSH , respectivamente).

Tabela 2. Valores de IC_{50} obtidos nos tratamentos das células HL60 com os fitoquímicos (lignóides e riparinas).

PHYTOCHEMICALS	HL60		
	- GSH	+ GSH	Probabilidade
Dimethoxymagnolol	250+/- 10	250+/- 6	$p > 0,05$
Grandisina	60 +/- 9	60 +/- 5	$p > 0,05$
Iangambina	*	*	$p > 0,05$
Riparina I	140 +/- 5	140 +/- 2	$p > 0,05$
Riparina II	100 +/- 6	100 +/- 8	$p > 0,05$
Riparina III	75 +/- 15	80 +/- 7	$p > 0,05$

*Não foi encontrado valor de IC_{50} até a concentração de 500 μM .

Tabela 3. Valores de IC₅₀ obtidos nos tratamentos das células K562 com os fitoquímicos (lignóides e riparinas).

PHYTOCHEMICALS	K562		
	- GSH	+ GSH	Probabilidade
Dimethoxymagnolol	250 +/-5	300 +/- 6	p > 0,05
Grandisina	250 +/- 6	300+/- 9	p > 0,05
Iangambina	*	*	p > 0,05
Riparina I	125 +/- 7	125 +/- 10	p > 0,05
Riparina II	27 +/- 2	30 +/- 5	p > 0,05
Riparina III	15 +/- 5	15 +/- 6	p > 0,05

*Não foi encontrado valor de IC₅₀ até a concentração de 500 µM.

Tabela 4. Valores de IC₅₀ obtidos nos tratamentos das células U937 com os fitoquímicos (lignóides e riparinas).

PHYTOCHEMICALS	U937		
	- GSH	+ GSH	Probabilidade
Dimethoxymagnolol	100+/- 3	110+/-5	p > 0,05
Grandisina	30 +/- 1	30 +/-6	p > 0,05
Iangambina	*	*	p > 0,05
Riparina I	60 +/- 3	60 +/- 3	p > 0,05
Riparina II	25 +/- 5	*	p > 0,0001
Riparina III	15 +/- 2	20 +/- 4	p > 0,05

*Não foi encontrado valor de IC₅₀ até a concentração de 500 µM.

De acordo com esses resultados podemos discorrer que todos os fitoquímicos, com exceção da iangambina, foram mais citotóxicos nas células leucêmicas do que em fibroblastos (células V79). A riparina II mostrou a ativação de um mecanismo de morte diferente dos outros fitoquímicos em células U937, visto que não foi possível determinar o valor de IC₅₀ nas células suplementadas com GSH (25 µM em células U937 tratadas com riparina II sem GSH, e não foi encontrado valor de IC₅₀ com a suplementação até a concentração de 500 µM).

CONCLUSÃO GERAL

Em geral, os fitoquímicos testados foram menos citotóxicos em células V79 do que nas células leucêmicas usadas no atual trabalho, excetuando-se a iangambina.

De acordo com os valores de IC_{50} determinados em células V79 os valores de DL_{50} deverão se encontrar na faixa de 500 mg/Kg a doses superiores a 2000 mg/Kg.

Os efeitos antitumorais observados nas células U937 tratadas com riparina II nos indica que a morte celular se dá por estresse oxidativo. Esses dados sugerem a riparina II pode ser utilizada como um inibidor do crescimento desordenado das células leucêmicas, entretanto há necessidade de mais estudos para analisar o mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS:

Ahmadian S, Barar J, Saei AA, Fakheree MA, Omid Y. (2009). "Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay". J Vis Exp **26**: 1- 2.

Anderson LC, Nilsson K, Gahmberg CG. (1970). "K562 – A human erythroleukemic cell line". Int J Cancer **23**: 143-147.

Aoyama H, Melo PS, Granjeiro PA, Haun M, Ferreira CV. (2000). "Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts". Pharm Communication **6**: 331-334.

Barbosa Filho J M, Yoshida M, Gottlieb OR, Barbosa RCSBC, Giesbrecht AM, Young, MCM. (1987). "Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparian*." Phytochem **26**: 2615-2617.

Bernhard D, Schwaiger W, Crazzolara R, Tinhofer I, Kofler R, Csordas A. (2003). "Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells". Cancer Lett **195**: 193-199.

Borenfreund E, Puerner JA. (1984). "A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90)". J Tissue Cult Meth **9**: 7-9.

Breitman TR. (1990). "Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL60". Method Enzym **190**: 118-130.

Bruserud O, Wendelboe O. (2001). "Biological treatment in acute myelogenous leukaemia: how should T-cell targeting immunotherapy be combined with intensive chemotherapy? Expert Opin Biol Ther **1**: 1005-1116.

Cabral MMO, Mendonça PM, Gomes CMS, Barbosa – Filho JM, Queiroz MMC, Mello RP. (2007). "Biological activity od neolignans on the post- embryonic development of *Chryssomya megacephala*". Fitoterapia **78**: 20-24.

Chandler KJ, Barrier M, Jeffuy S. (2011). "Evaluation of 209 environmental chemical using a mouse stem cell adherent cell differentiation and cytotoxicity assay". PLoS One **1**-11.

Correa DHA, Melo PS, Carvalho CA, De Azevedo MBM, Duran N, Haun M. (2005). "Dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex: Cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes". Eur J Pharmacol **510**: 17-24.

Crosby L, Simmons J, Ellen W, William M, Morgan T, Kevin DA, Anthony. (2008). "Integrated Disinfection By-Products (DBP) Mixtures Research: Gene Expression Alterations in Primary Rat Hepatocyte Cultures Exposed to DBP Mixtures Formed by Chlorination and Ozonation/Postchlorination". J Toxicol Environ Health **71**: 59-63.

Di Stansi, LC. Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Ed. UNESP, 2003.

Denizot F, Lang R.(1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensivity and reliability". J Immunol Methods **89**: 271-277.

Dias AF. Adrenocortical hormones from hecogenin. (1990). In: II simposio Nacional de Farmacologia e Química de Produtos Naturais. pp.602 1990.

Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot, JC, Pieters R, Kleiner. (2002). "Food Chemistry Toxicology". J Methods *in vitro* toxicol **40**: 193-236.

Freshney RI. Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 5 ed. 2005.

Ghosh R, Girigoswami K. (2008). "NADH dehydrogenase subunits are overexpressed in cells exposed repeatedly to H₂O₂". Mut Res **638**: 352-358.

Gimenez IF, Anazetti MC, Melo PS, Haun M, Azevedo MMM, Durán N, Alves OL. (2005). "Cytotoxicity on V79 and HL60 cell lines by thiolated-beta-cyclodextrin-Au/Violacein nanoparticles". J. Biomedical Nanotech **1**: 1-7.

Giordano SR. Gestão ambiental no sistema agroindustrial. São Paulo. Ed. Pioneira, 2000. Pp 255-280. In: Economia & Gestão dos Negócios Agroalimentares.

Gough NR. (2009). Focus issue: "The long and short of redox sigaling ". Sci Signal **2**: 12.

Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. (1986). "Methods for preparation of adult and fetal hepatocytes". In: Isolated and Cultured Hepatocytes. Les Editions INSERM, Paris and John Libbey Eurotext, London. 1-12. 1986.

Halle W, Spielmann H.(1992). "Two procedures for the prediction of acute toxicity (LD₅₀) from cytotoxicity data". Alternative to Laboratory Animals Assays **20**: 40-49.

Harris C. (2012). "Overview of in vitro models in developmental toxicology". Methods Mol Biol **889**: 105-113.

Junqueira & Carneiro. Biologia Celular e Molecular 9 ed., 2012.

Katzer A, Marquardt H, Westendorf J, Wening JV, Von FG. (2002). Polyetheretherketone — cytotoxicity and mutagenicity *in vitro*. Biomaterials **23**: 337-340.

Kim B, Ejaz S, Chekarova I, Sukura A, Ashraf M. (2008). "Cytotoxicity of fumonisin B(1) in spheroid and monolayer cultures of rat hepatocytes". Drug Chem Toxicol **31**: 339-352.

Kirland D, Pfuhler S, Tewats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Ehajouji AA, Marzi D, Maurici D, Meunier JR, Muller L, Nohynek G, Parry E, Thybaud V, Tice R. (2007). "How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow – up animal test : report of an EVCAM workshop". Mutat Research **628**: 31-55.

Kumar P, Sharma B, Bakshi N. (2009). Biological activity of alkaloids from Solanum deucamara L. Nat Prod Res **23**: 19-23.

Landriscina M, Maddalena F, Laudiero G, Esposito F. (2009). "Adaptation to oxidative stress, chemoresistance and cell survival". Antioxid Redox Sign **11**:59-71.

Lake BG, Prince RJ, Giddings AM, Walters DG.(2009). "*In vitro* assays for induction of drug metabolism". Methods Mol Biol **481**: 47-58.

Lin YR, Chen HH, Lin YC, Ko CH, Chan MH. (2009). "Antinociceptive actions of honokiol and magnolol n glutamatergic and inflammatoty pain". J Biomed.Sci **18**: 94.

Loveland BE, Johns TC, Mackay IR, Vaillant F, Wang ZX, Hertzog P. (1992). "Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative". Biochem Int **27**: 501-510.

Lozzio BB, et al. (1981). "A multipotential leukemia cell line (K562) of human origin". Proc Soc Exp Biol Med **166**: 546-550.

Lozzio CB and Lozzio BB. (1975a). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome". Blood **45**: 321-334.

Lozzio CB and Lozzio BB. (1975b). "Properties and usefulness of the original K562 human myelogenous leukemia cell line". Leuk Res **3**: 363-370.

Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica Orgânica. 1^a. ed. Venezuela, 2007.

Mathijs K, Kinhuis AS, Brauers KJ, Jennen DG, Lahoz A, Kleijnans JC, VanDelft JH. (2009). "Assessing the metabolic competence of sandwich-cultured mouse primary hepatocytes". Drug Metab Dispos **37**: 305-1311.

McCollum G, Keng PC, States JC, McCabe MJ. (2005). "Arsenite delays progression through each cell cycle phase and induces apoptosis following G(2)/M arrest in U937 myeloid leukemia cells". J Pharmacol Exp Therap **2**: 877-887.

Melo PS, Maria SS, Vidal BC, Haun M, Durán N. (2000). "Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells". In vitro Cell Dev Biol – Animal **36**: 539-543.

Melo PS, Durán N, Haun M. (2002). "Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells". Toxicology **188**: 261-274.

Melo PS, Justo GZ, Durán N, Haun M. (2004). "Natural killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives". Eur J Pharmacol **487**: 47-54.

Melo PS, Fabrin Neto JB, Moraes SG, Assalin MR, Durán N, Haun M. (2006). "Comparative toxicity of effluents processed by different treatments in V79 fibroblasts and the *Algae Selenastrum capricornutum*". Chemosphere **62**: 1207-1213.

Monte – Neto RL, Souza LMA, Dias CS, Barbosa Filho JM, Oliveira MR (2008). Yamgambin cytotoxicity : a pharmacologically active lignan obtained from *Octotea duckei vattimo* (Lauraceae). Zeithschrift Für Naturforschung C. 681- 686.

Musthaba SM, Baboota S, Ahmed S, Ahuja AJ. (2009). "Status of novel drug delivery technology for phytotherapeutics". Expert Opin Drug Deliv **6**: 625-63.

Nogueira CDR, Kato M, Mello RP, Queiroz MMC, Cabral MMO. Grandisina: uma alternativa de controle de dípteros muscóides transmissores de doenças nos animais e no homem.. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia (1-4 Novembro), 2005, Porto Alegre/RS. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005.

Ohara, Augusto. Radicais Livres: bons, maus e naturais. 1a. ed., 2006.

Ohno M, Motojima K, Okano T, Taniguchi A. (2009).” Induction of drug metabolizing enzymes by phenobarbital in layered co-culture of a human liver cell line and endothelial cells”. Biol Pharm Bull **32**: 813-817.

Oliveira Junior LM, Guerra MT, Vieira MS, Valadares MC. (2007). “Investigação do potencial mutagênico da grandisina”. REF **4**: 82-84.

Pairlard F, Finot F, Mouche I, Prenez A, Vericat JA. (1999). “Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new chemical entites”. Toxicol In Vitro **13**: 573-578.

Parkinson,A. In., Klaasen, C. D. Toxicology: The Basic Science of Poison. 2001.

Patil BS, Jayaprakasha GK, Chidamara R, Murthy NK, Vikram A. (2009). “Bioactive compounds: historical perspectives opportunities, and challenges”. J Agric Food Chem **57**: 842-860.

Pedralli G, Meyer ST. (1996). "Levantamento da vegetação aquática ("macrófitas") a das florestas de galeria na área da Usina Hidrelétrica de Nova Ponte, Minas Gerais". Bios **4**: 223-225.

Pfuhler S, Wolf HU. (2002). "Effects of the formaldehyde releasing preservatives dimethylol urea and diazolidinyl urea in several short-term genotoxicity tests". Mutat Res **15**: 136-147.

Rates B, Bemquerer MP, Richardson M, Borges MH, Morales RA, De Lima ME, Pimenta AM. (2007). "Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha): shedding light on venoms from a neglected group". Toxicon **49**: 810-826.

Renzi D, Valtolina M, Forster R. (1993). "The evaluation of a multi- endpoint cytotoxicity assay system". Alternative to Laboratory Animals Assays **21**: 89-93.

Repetto G, Sanz P. (1993). "Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: *In vitro* effects of 24 metals". Alternative to Laboratory Animals Assays **23**: 501-507.

Rodeiro I, Donato MT, Martinez I, Hernandez I, Garrido G, González-Lavaut JA, Menéndez R, Laguna A, Castell JV Gómez-Lexhon MJ. (2008). "Inhibition of human P450 enzymes by natural extracts used in traditional medicine". Phytother Res **23**: 279-282.

Rodriguez JA, Haun M. (1999). "Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes". Planta Med **65**: 522-526.

Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. (2003). "Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologías". Mat Res **6**: 317-320.

Rosenkranz HS, Matthews EJ, Klopmand G. (1992). "Relationships between cellular toxicity, the maximum tolerated dose, lipophilicity and electrophilicity". Environ Mol Mutagen **16**: 149 -177.

Rudzoks , Krejc IS ,Graebisch C, Herbarth O, Mueller A, Bauer M. (2009). Toxicity profiles of four metals and 17 xenobiotics in the human hepatoma cell line HepG2 and the protozoa *Tetrahymena pyriformis* – a comparison. Environ Toxicol **26**: 171 -186.

SilvaTMS, Agra MF, Bhttacharyya J. (2005). "Studies on the alkaloides of Solanum of northeastern Brazil". Rev Bras Farmacogn **15**: 292-293.

Silva TMS, Nascimento RJB, Batista MM, Agra MF, Camara CA. (2007). "Brine shrimp bioassay of some species of Solanum from Northeastern Brazil". Rev. Bras Farmacog **17**: 35-38.

Siqueira J M, Mauro DB, Pereira NFG, Garcez WS, Boaventura MAD. (1998). "Estudo fitoquímico de *Unonopsis Lindmanii* - *Annonaceae*, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia Slaina Leach*". Quím. Nova **21**: 185-187.

Sousa CFCTV; Melo AP, Monteiro VTM, Lima SJC, Gutierrez BA, Pereira JM, Barbosa-Filho SMM, Vasconcelos MF, Viana GSB. (2004). "Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice". Pharmacol Biochem Behav **78**: 27-33.

Sundstrom C, Nilsson K. (1976). "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)". Int J Cancer **17**: 565-577.

Wen Tan, Jinjian Lu, Mingqing Huang, Yingbo Li, Meiwan Chen, Guosheng Wu, Jian Gong, Zhangfeng Zhong, Zengtao Xu, Yuanye Dang, Jiajie Guo, Xiuping Chen, Yitao Wang. (2011). "Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs". Chin Med **6**: 27-42.

Ulrich-Merzenich G, Zeitler H, Vetter H, Kraft K. (2008). "Sinergy research: vitamins and secondary plant components in the maintenance of the redox-homeostasis and in cells signaling". Phytomedicine **16**: 2-16.

Wang Y, Chen Q, Zeng X. (2009). "Potentiometric biosensor for studying hydroquinone cytotoxicity in vitro". Biosens Bioelectron **25**: 1356-1362.

Williamson LM. (2003). "Consensus conference on platelet transfusion: How should the safety and efficacy of platelet transfusion be assured?" Rev Bras Hemoter **101**: 609-617.

Yang CI. Processo para produção de hecogenina a partir da fermentação anaeróbica do suco do sisal. Depósito de Patentes, 1984.

Yao K, Zhang L, Tang XJ, Zhang YD. (2009). "Protective effect of magnolol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lens epithelial cells". Am J Chin Med **37**: 785-796.

Zago MA, Falcão RP, Paquini R. Hematologia. Fundamentos e Prática. Atheneu. 1ª. Ed. 2001.

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSO

MICHELETTO, P. N. ; **FERREIRA, I. R.**; ALMEIDA, A. B.; CONTI, R. ; BATISTA, L. M. ;MELO, P. S. Cytotoxic evaluation of Caesalpinia pyramidalis extract in V79 cells. In: XLII Annual Meeting of SBBq, 2013, Foz do Iguaçu. XLII Annual Meeting of SBBq, 2013.

RIBEIRO, J. F.; **FERREIRA, I. R.**; MARCATO, P. D.; FAVARO, W. J. ; SCHRELLER, H. S.; SANTIN, G. A. ; MENEZES, E. W. ;MELO, P. S. In vitro toxicological effects of metallic nanoparticle-chemotherapeutic formulations. In: XLII Annual Meeting of SBBq, 2013, Foz do Iguaçu. XLII Annual Meeting of SBBq, 2013.

FERREIRA, I. R.; MELO, P. S. Cytotoxicity of phytochemicals in different leukemic cells and supplementation with GSH. In: XLII Annual Meeting of SBBq, 2013, Foz do Iguaçu. XLII Annual Meeting of SBBq, 2013.

FERREIRA, I. R.; MELO, P. S. Cytotoxic effect of phytochemicals in the K562 human leukemic cell line. In: XLI Annual Meeting of SBBq, 2012, Foz do Iguaçu. XLI Annual Meeting of SBBq, 2012.

SILVA, J. C.; **FERREIRA, I. R.**; MARCATO, P. D.; DURÁN, N.; ALVES, O. L.; MELO, P. S. Cytotoxic effect of biogenic silver nanoparticles in function of treatment times. In: XLI Annual Meeting of SBBq, 2012, Foz do Iguaçu. XLI Annual Meeting of SBBq, 2012.

DE PAULA, L. B.; **FERREIRA, I. R.**; SILVA, J. C.; MARCATO, P. D.; DURAN, N.; MELO, P. S. In vitro toxicological effects of silver nanoparticles. In: XLI Annual Meeting of SBBq, 2012, Foz do Iguaçu. XLI Annual Meeting of SBBq, 2012.

ARTIGOS PUBLICADOS

MARCATO, P. D.; ADAMI, L. F.; BARBOSA, R. M.; MELO, P. S.; **FERREIRA, I. R.**; DURÁN, N.; SEABRA, A.B. Development of a sustained-release system for nitric oxide delivery using alginate/chitosan nanoparticles. *Current Nanoscience*, v. 9, p. 1-7, 2013.

MARCATO, P. D.; PARIZOTTO, N. V.; MARTINEZ, D. S. T.; PAULA, A. J.; **FERREIRA, I. R.**; MELO, P. S.; DURÁN, N.; ALVES, O. L. New Hybrid Material Based on Layered Double Hydroxides and Biogenic Silver Nanoparticles: Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Impresso), v. 24, p. 266-272, 2013.

MARCATO, P. D.; NAKASATO, G.; BROCCHI, M.; Melo, P. S.; HUBER, S. C.; **FERREIRA, I. R.**; ALVES, O. L.; DURÁN, N. Biogenic Silver Nanoparticles: Antibacterial and Cytotoxicity Applied to Textile Fabrics. *Journal of Nano Research* (Online), v. 20, p. 69-76, 2012.