

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JACIANA DOS SANTOS AGUIAR

ESTUDOS DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTICÂNCER DE
***Erythroxylum caatingae* Plowman E *Erythroxylum subrotundum* A. St - Hil.**

RECIFE

2011

JACIANA DOS SANTOS AGUIAR

**ESTUDOS DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTICÂNCER DE
Erythroxylum caatingae Plowman E *Erythroxylum subrotundum* A. St - Hil.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração – Biologia Química para a Saúde.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Silene Carneiro do Nascimento

COORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

RECIFE

2011

Aguiar, Jaciana dos Santos

Estudos das atividades antimicrobiana e anticâncer de *Erythroxylum caatingae* Plowman e *Erythroxylum subrotundum* A. St-Hil/ Jaciana dos Santos Aguiar. – Recife: O Autor, 2011.

113 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Silene Carneiro do Nascimento

Coorientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas. Biologia Química para a
Saúde, 2011.**

Inclui bibliografia e anexos

1. Erythroxylum 2. Câncer 3. Apoptose I. Título.

583.79

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-209

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Parecer da Comissão Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado de
JACIANA DOS SANTOS AGUIAR

ESTUDOS DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTICÂNCER DE
Erythroxyllum caatingae Plowman E *Erythroxyllum subrotundum* A. St - Hil.

A Comissão Examinadora, compostas pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a doutoranda **JACIANA DOS SANTOS AGUIAR** como:

Recife, 15 de fevereiro de 2011

Profª Dra. Silene Carneiro do Nascimento – UFPE
Orientadora – Membro interno

Profª Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – UFPE
Membro interno

Prof. Dr. Sebastião José de Melo – UFPE
Membro interno

Profª Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque – UFPE
Membro externo

Profª Dra. Maria Teresa/Jansen de Almeida Catanho – UFPE
Membro externo

*Dedico aos meus pais,
Walter e Elisabeth
Aguiar, por sempre
acreditarem em mim e
pelo incentivo em todos os
momentos de fraqueza.*

AGRADECIMENTOS

A eterna Professora Silene Carneiro do Nascimento por mais quatros anos de ensinamentos, paciência e carinho.

A amiga e Professora Teresinha Gonçalves da Silva pela compreensão, pela paciência, pela confiança e pela valiosa orientação.

À Adenilda Eugênia de Lima pelo profissionalismo e pela amizade.

À Maria Susete Mendonça pelos valiosos momentos de alegria e desabafo. Obrigada pelos ensinamentos tanto de técnicas laboratoriais e da vida.

À Maria do Desterro Rodrigues pelo profissionalismo e por ensinar-me as técnicas da cultura de células. Sem esquecer das nossas conversas descontraídas e de aprendizagem.

A Maria Suely Cavalcanti pelo apoio, carinho, amizade, momentos de alegria e descontração.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Departamento de Antibióticos pelo uso de suas instalações e equipamentos em especial as Profas Glícia Maria Torres Calazans, Ana Maria Souto Maior, Ester Gouveia e Janete Magali de Araújo.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Antibióticos pela ajuda e atenção dedicadas.

Aos amigos do Laboratório de Biosensaios e Pesquisa Farmacêutica (LBPF): Thiago Ubiratan Lins e Lins, Iane Vasconcelos Bezerra, Diana Jussara Malta, Marília Sitônio, Ingrid Campos, Larissa Cardoso, Sandrine Arruda, Tatiane Bezerra, Adamares, Luana Laranjeira e Carslon Júnior pela ajuda nos experimentos e pelos momentos alegria e descontração. Obrigada também aos amigos que passaram pelo LBPF: Sílvia Rafaelli, Rodrigo, Thiago Marques, Juliana Dantas, Katariny Castro, Sirlene Lucena, Anne Cecília Nascimento, Clarissa França e Clayton Galvão.

Ao amigo André Luiz Barros pelas inúmeras ajudas nos experimentos e formatação de figuras.

Aos colegas da pós-graduação em Ciências Biológicas pelos poucos momentos compartilhados nas disciplinas.

A Leucio Duarte Vieira Filho e Antônio Fernando de Melo de Vaz pelos ensinamentos em estatística.

A Érika Santos Nunes pelos momentos enriquecedores de realização e discussão dos experimentos.

As Professoras Ivone Antônia Sousa e Maris Joselice e Silva pela doação de fármacos padrões.

A Professora Kêsia Xisto Fonseca Ribeiro de Sena e Rosilma de Oliveira Araújo pela realização da atividade antimicrobiana.

A André Marianno Batista e Professora Maria Madalena Pessoa Guerra pela realização dos testes apoptóticos.

A Steno Lacerda de Oliveira e Professor Josean Fachine Tavares pelo fornecimento dos extratos e pela disponibilidade constante de ajuda;

Aos meus familiares pela força e paciência;

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Muito obrigada!

RESUMO

Erythroxyllum é o maior gênero da família Erythroxyllaceae, compreendendo cerca de 250 espécies que são amplamente distribuídas em todos os trópicos, mas com grandes áreas de diversidade na América do Sul, África, Ilha de Madagascar, sudeste da Ásia e Austrália. Devido à escassez de estudo das espécies *Erythroxyllum caatingae* e *Erythroxyllum subrotundum*, este trabalho teve como objetivo avaliar as ações antimicrobiana, citotóxica e antitumoral destas plantas, bem como investigar o mecanismo de morte celular subjacente. A partir do extrato metanólico do caule de *E. caatingae* foram obtidas sete fases (acetato: metanol nas proporções 60:40, 80:20, 90:10 e 95:5; fase acetato, fase clorofórmica e hexânica), uma fração de alcalóides totais e três alcalóides isolados (3 α -(3',4',5'-trimetoxi)-6 β -benzoilnitropano; 3 α -(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzoiloxi)-6 β -benzoiloxitropano; 3 α ,6 β -(dibenzoiloxitropano). A partir do extrato metanólico das partes aéreas de *E. subrotundum* foram obtidas as fases hidroalcoólica, acetônica, hexânica e acetato de etila. Os extratos e as fases foram testados em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo pelo método de difusão em disco de papel. As bactérias Gram-negativas não foram sensíveis aos extratos e fases testadas. Com relação às bactérias Gram-positivas, a fase acetato de *E. subrotundum* foi a mais ativa, mostrando halos de inibição em *Staphylococcus aureus* (13,0 \pm 0,0 mm), *Micrococcus luteus* (18,5 \pm 0,7 mm), *Mycrobacterium smegmatis* (17,0 \pm 0,0 mm) e *Enterococcus faecalis* (12,0 \pm 0,0 mm). As bactérias Gram-positivas mais sensíveis a todas as fases de *E. caatingae*, exceto a fase hexânica, foram *M. luteus* e *M. smegmatis* que mostraram halos de inibição de 13,5 \pm 0,7 mm a 29,5 \pm 0,7 mm e 14,0 \pm 1,4 mm a 30,0 \pm 0,0 mm, respectivamente. Nos ensaios de citotoxicidade com MTT apenas a fase hexânica de *E. subrotundum* inibiu a proliferação celular de NCI-H292 (26,30 \pm 1,08 μ g/mL), K562 (32,50 \pm 1,69 μ g/mL) e Carcinoma de Ehrlich (27,39 \pm 1,43 mm). As fases acetato: metanol (80:20, 90:10 e 95:5), acetato e clorofórmica de *E. caatingae* inibiram a proliferação celular de linhagens cancerígenas NCI-H292, HEp-2 e K562. O alcalóide 3 α - (3',4',5'-trimetóxi) - 6 β -benzoilnitropano mostrou citotoxicidade apenas em NCI-H292. Nenhuma das fases que apresentaram citotoxicidade em linhagens cancerígenas provocou a hemólise nos eritrócitos de camundongos. A marcação por Anexina V-FITC e JC-1 foi utilizada para verificar o mecanismo de ação das fases de *E. caatingae* que apresentaram citotoxicidade menor que 30 μ g/mL em células leucêmicas. Os resultados da Anexina V-FITC mostraram que as fases acetato: metanol (95:5), acetato, clorofórmica e 3 α -(3',4',5'-trimetoxi)-6 β -benzoilnitropano, aumentaram significativamente o número de células em apoptose em 53,0%, 74,8%, 61,7% e 65,0%, respectivamente, em relação ao controle. A marcação com JC-1 mostrou que as fases acetato: metanol (95:5), acetato, clorofórmica e 3 α -(3',4',5'-trimetoxi)-6 β -benzoilnitropano apresentaram 63,8%, 59,2%, 50% e 27,0%, respectivamente, de células em apoptose pela via intrínseca. O extrato metanólico de *E. caatingae* (100, 200 e 400 mg/Kg) apresentou inibição do crescimento do Sarcoma 180 em 59,4 a 66,4% em relação ao controle. As fases acetato: metanol (95:5), acetato e clorofórmica de *E. caatingae* mostram-se bastante promissoras em induzir apoptose em células leucêmicas, direcionando os estudos para avaliação das vias apoptóticas envolvidas e isolamento dos constituintes químicos responsáveis por tal atividade.

Palavras-chave: *Erythroxyllum caatingae*; *Erythroxyllum subrotundum*; Atividade antimicrobiana, Atividade Antitumoral; Apoptose.

ABSTRACT

Erythroxylum is the largest genus in the family Erythroxylaceae and comprises about 250 species, which are widely distributed in the tropics, but with large areas of diversity in South America, Africa, Madagascar Island, Asia Southeast and Australia. Due to the lack of study of the species *Erythroxylum caatingae* and *Erythroxylum subrotundum*, this study was aim of this study was to evaluate the antimicrobial, cytotoxic e antitumoral activity this plants, as well as and to investigate the underlying mechanism of cell death. From the methanol extract of stem *E. caatingae* was obtained seven phases (acetate: methanol 60:40, 80:20, 90:10 and 95:5; acetate, chloroform and hexane), a fraction of total alkaloids and three alkaloids (3 α -(3',4',5'-tryimethoxy)-6 β -benzoylonytropane;. 3 α -(3',5'dimetoxi-4'-hydroxybenzoyloxy)-6 β -benzoyloxytropane; 3 α ,6 β -(dybemzoyloxytropane). From the methanol extract of aerial parts of *E. subrotundum* were obtained the hydroalcoholic, acetone, hexane and ethyl acetate phases. The extracts and the phases were tested on Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungus by disc diffusion method on paper. Gram-negative bacteria were not sensitive substances tested. With respect Gram-positive bacteria the acetate phase the *E. subrotundum* was the most active, showing the inhibition halos of *Staphylococcus aureus* (13.0 \pm 0.0 mm), *Micrococcus luteus* (18.5 \pm 0.7 mm), *Mycrobacterium smegmatis* (17.0 \pm 0.0 mm) and *Enterococcus faecalis* (12.0 \pm 0.0 mm). The bacteria most sensitive phases of *E. caatingae*, except the acetate phase, were *M. luteus* and *M. smegmatis* which showed that the inhibition halos of 13.5 \pm 0.7 to 29.5 \pm 0.7 mm and 14.0 \pm 1.4 to 30.0 \pm 0.0 mm, respectively. For *E. subrotundum* the acetate phase was the most active, showing the inhibition of *Staphylococcus aureus* (13.0 \pm 0.0 mm), *M. luteus* (18.5 \pm 0.7 mm), *M. smegmatis* (17.0 \pm 0.0 mm) and *E. faecalis* (12.0 \pm 0.0 mm). In the MTT cytotoxicity assays only the hexane phase *E. subrotundum* inhibited cell proliferation of NCI-H292, K562 and Ehrlich tumor (27.39 \pm 1.43 mm). The acetate: methanol (80:20, 90:10 and 95:5), acetate and chloroform phases of the *E. caatingae* inhibited cell proliferation of cancer lines of NCI-H292, HEp-2 and K562. The alkaloid 3 α -(3',4',5'-trymethoxy)-6 β -benzoylonytropane shown only cytotoxicity in NCI-H292. None of the substances that showed cytotoxicity on cancerous strains caused hemolysis in erythrocytes of mice. Stained with Annexin V-FITC and JC-1 was used to verify the mechanism of action of substances that *E. caatingae* cytotoxic less than 30 μ g/mL in leukemic cells. The results of Annexin V-FITC showed that the acetate: methanol (95:5), acetate and chloroform phases and 3 α -(3',4',5'-trymethoxy)-6 β -benzoylonytropane significantly increased the number of apoptotic cells by 53.0%, 74.8%, 61.7% and 65.0% respectively compared to control. The labeling with JC-1 showed that the acetate: methanol (95:5), acetate and chloroform phases and alkaloid exhibited 63.8%, 59.2%, 50% and 27.0% respectively, of apoptosis cells by intrinsic pathway. The methanol extract of *E. caatingae* (100, 200 and 400 mg/Kg) showed significant inhibition of growth of Sarcoma 180, with 59.4 to 66.4% compared to control. The acetate: methanol (95:5), acetate and chloroform phases were revealed as quite promising in inducing apoptosis in leukaemia cells, directing the study to the evaluation of the apoptotic means involved and isolation of the chemical constituents responsible for such activity.

Keywords: *Erythroxylum caatingae*; *Erythroxylum subrotundum*; Antimicrobial Activity Antitumoral Activity; Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Ciclo celular	16
Figura 2: Ciclo celular com os pontos de controle	17
Figura 3: Regulação do ciclo celular.	17
Figura 4: Diferenças morfológicas de necrose e apoptose	20
Figura 5: Via intrínseca da ativação da apoptose	22
Figura 6: Via extrínseca de ativação da apoptose	23
Figura 7: Vias de apoptose	24
Figura 8: Angiogênese	29
Figura 9: Estimativas para o ano de 2010 de número de casos por câncer, segundo a localização primária	32
Tabela 1: Fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos	29

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Ciclo celular	15
3.2 Morte celular	18
3.2.1 Autofagia	20
3.2.2 Necrose	19
3.2.3 Mitose catastrófica	19
3.2.4 Senescência	19
3.2.5 Apoptose	19
3.3 Câncer	25
3.3.1 Fatores de risco	25
3.3.2 Características do câncer	26
3.3.2.1 <i>Autosuficiência nos sinais de crescimento</i>	26
3.3.2.2 <i>Insensibilidade aos inibidores de crescimento</i>	27
3.3.2.3 <i>Evasão a apoptose</i>	28
3.3.2.4 <i>Potencial replicativo ilimitado</i>	28
3.3.2.5 <i>Angiogênese sustentada</i>	28
3.3.2.6 <i>Invasão tecidual e metástase</i>	30
3.3.2.7 <i>Inflamação</i>	30
3.3.3 Tipos de câncer	30
3.3.4 Epidemiologia	32
3.3.5 Terapia do câncer	32
3.3.6 Antineoplásicos derivados de planta	34
3.4 Antibióticos	35
3.5 Família Erythroxylaceae	37
3.5.1. Atividades biológicas do gênero <i>Erythroxylum</i>	38
3.5.2 Estudo fitoquímico do gênero <i>Erythroxylum</i>	40

REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO II	45
4 ARTIGO CIENTÍFICO I	51
Tropane Alkaloids from <i>Erythroxylum caatingae</i> Plowman.	52
5 ARTIGO CIENTÍFICO II	62
Antimicrobial, cytotoxic and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from stem of <i>Erythroxylum caatingae</i> Plowman.	63
6 ARTIGO CIENTÍFICO III	93
Antimicrobial and cytotoxic activities of <i>Erythroxylum subrotundum</i> A. St.-Hil.	94
7 CONCLUSÕES	107
ANEXOS	109
ANEXO A - Fluxograma 1: Marcha para extração e isolamento dos alcalóides do caule de <i>Erythroxylum caatingae</i> .	110
ANEXO B - Alcalóides isolados do caule de <i>Erythroxylum caatingae</i> .	111
ANEXO C – Fluxograma 2: Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto das partes aéreas de <i>Erythroxylum subrotundum</i> .	113

Capítulo I

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento na quimioterapia antimicrobiana teve início na década de 30 com a descoberta das sulfonamidas e as penicilinas. Porém nas décadas subseqüentes de 50 e 70, epidemias por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina e outras linhagens multiresistentes (MRSA) chamaram a atenção para o problema da resistência adquirida aos antimicrobianos. Em razão ao grande aumento da resistência de micro-organismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, surge a preocupação na procura de novas alternativas terapêuticas. As plantas medicinais estão dentre os produtos naturais de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las no tratamento, cura e prevenção de doenças e por proporcionarem grandes chances de se obter moléculas protótipos devido a diversidade de seus constituintes (SILVA et al. 2007, VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A pesquisa por agentes anticâncer obtidos a partir de plantas, começou em 1950 com o descobrimento e o desenvolvimento dos alcalóides da vinca, como a vimblastina e a vincristina, e através do isolamento de podofilotoxinas citotóxicas. Como resultado, o Instituto do Câncer dos Estados Unidos iniciou, em 1960, um extensivo programa de coletas de plantas, focando principalmente em plantas de regiões temperadas. Isto conduziu a descoberta de novas moléculas que mostraram ampla atividade citotóxica (CASSADY; DOUROS, 1980), incluindo os taxanos e camptotecinas. No entanto, o desenvolvimento destes como agentes clinicamente ativos duraram cerca de 30 anos, de 1960 a 1990 (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Cerca de 25 % dos medicamentos utilizados são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese. Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos cerca de 25 % dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas. Na última década, registrou-se um aumento expressivo no interesse em substâncias derivadas de espécies vegetais (FOGLIO, 2006).

O interesse da pesquisa nas espécies *Erythroxylum subrotundum* e *Erythroxylum caatingae* é justificado pelo valor medicinal do gênero *Erythroxylum* por fornecer alcalóides e extratos que em estudos anteriores já revelaram inibição do crescimento das células KB-V1 e atividade antifúngica em *Candida albicans*. Existem outros alcalóides extraídos de plantas já utilizados na clínica como a vincristina e a vimblastina isoladas de *Cataranthus roseus* usadas no tratamento de câncer de útero, de mama, leucemia e linfoma. O taxol extraído de *Taxus brevifolia* utilizado no câncer de ovário entre outros. Mesmo quando a cura é impossível, os

sintomas freqüentemente podem ser aliviados com a terapia paliativa, melhorando a qualidade e a sobrevida do indivíduo. O reconhecimento histórico, químico e biológico, relacionado ao gênero *Erythroxylum* e a ausência de estudos das espécies justifica a escolha dessas plantas e direciona a avaliação biológica para atividades antimicrobiana e antineoplásica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar as ações antimicrobiana e antitumoral e mecanismos de morte celular de *Erythroxyllum caatingae* Plowman e *Erythroxyllum subrotundum* A. St.-Hil.

2.2 Específicos

- Isolar alcalóides de *Erythroxyllum caatingae*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *E. subrotundum* e *E. caatingae* frente a bactérias e fungo;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos, fases orgânicas, fração e alcalóides de *E. caatingae* em células cancerígenas humana;
- Avaliar a inibição da proliferação dos extratos e fases orgânicas de *E. subrotundum* em células cancerígenas humana e murina;
- Verificar a atividade hemolítica das substâncias de *E. subrotundum* e *E. caatingae* que apresentaram citotoxicidade em células cancerígenas humana;
- Estudar os possíveis mecanismos de morte celular causada por *E. caatingae*;
- Analisar a atividade antitumoral do extrato metanólico de *E. caatingae* em Sarcoma 180.

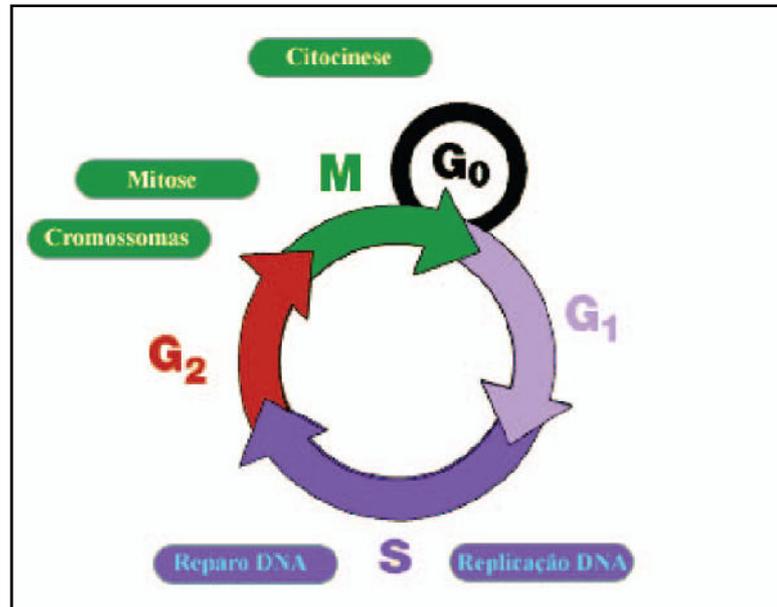
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ciclo celular

A única maneira de formar uma nova célula é duplicando uma célula já existente. Todos os micro-organismos vivos, da bactéria unicelular aos mamíferos multicelulares, são produtos de repetidos ciclos de crescimento e divisão celular que remontam aos primórdios da vida na Terra. Uma célula se reproduz ao executar uma seqüência organizada de eventos em que ela duplica seu conteúdo e então se divide em duas. O conjunto mínimo de processos que uma célula tem de executar é aquele que lhe permite realizar sua tarefa fundamental: a transmissão da informação genética à próxima geração de célula. Para produzir duas células-filhas geneticamente idênticas, o DNA de cada cromossomo deve ser replicado e distribuído às células filhas (ALBERTS et al., 2010).

O ciclo celular compreende os processos de duplicação do DNA e divisão celular (mitose) resultando na produção de nova célula (BELIZARIO, 2002). O ciclo é dividido em duas etapas principais: interfase e mitose (M) (Figura 1). A interfase é um período de intenso metabolismo para a célula e inclui a fase G₁, S e G₂. A fase G₁ é caracterizada pelo reinício da síntese de RNA e proteínas, que estavam interrompidas durante a mitose. Essa é a fase mais longa do ciclo e onde a célula decide se continua proliferando ou interrompe a fase G₁ e entra em estado quiescente (G₀). Na fase S (síntese) ocorre a replicação do DNA seguindo para a fase G₂ que é caracterizada pelo crescimento celular e pela síntese de proteínas em preparação para a mitose. Na mitose ocorre a separação dos cromossomos filhos e a divisão da célula em duas (PERES; CURY, 2005; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN et al., 2003).

Figura 1- Ciclo celular.

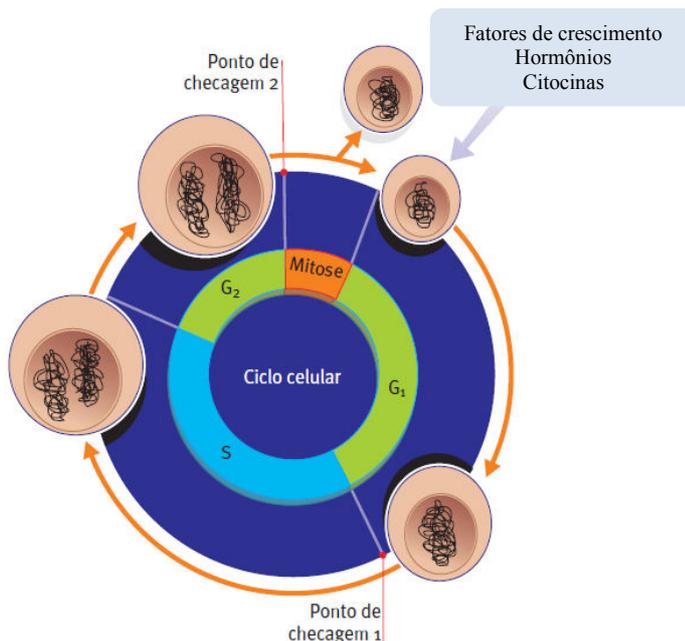


Fonte: Almeida et al., 2005

Para iniciar o ciclo, a célula em repouso (fase G₀) é estimulada por fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaqueta – PDGF e fator de crescimento epidermal – EGF), hormônios esteroidais e citocinas, todos produzidos pela própria célula ou por células vizinhas. Esses fatores ligam-se aos receptores de membrana celular, provocando uma série de reações químicas e eventos morfológicos (BELIZARIO, 2002; FOSTER, 2008).

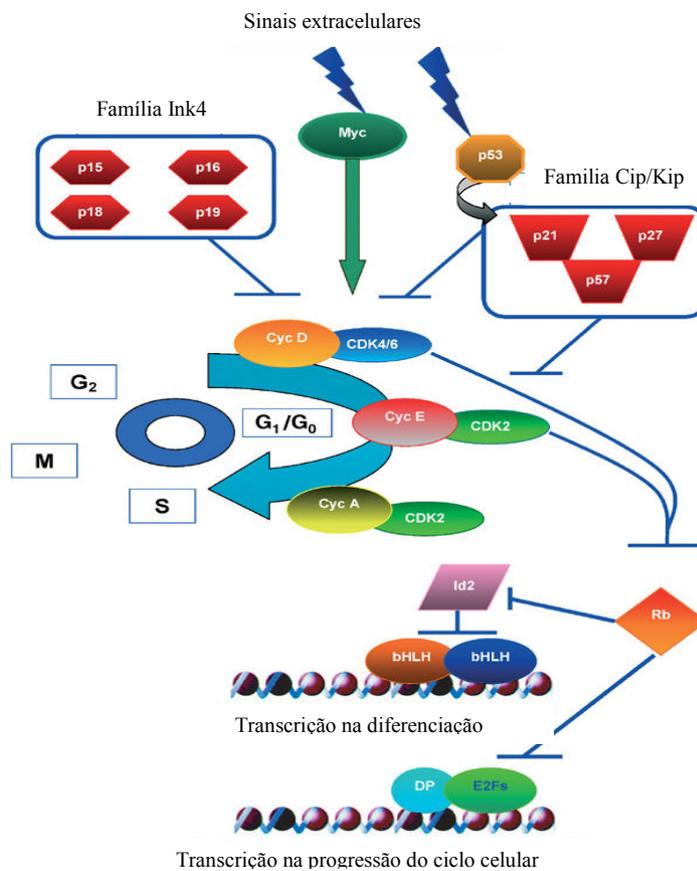
Estas reações e eventos são interrompidos nos pontos de controle (Figura 2), durante a transição das fases G₁/S e G₂/M (BELIZARIO, 2002) sendo esses pontos controlados por quinases dependentes de ciclina (Cdk). Cdk é composta de uma ciclina (proteínas estruturais) e uma quinase (enzima). Cdk2, Cdk4 e cdc2 são expressos em mamíferos, juntamente com ciclinas D, E, A e B. A atividade da Cdk é verificada pelas proteínas inibidoras do ciclo celular, cdk inibidoras (CKI). Existem duas famílias distintas cki são ink4 que inclui p15, p16, p18, p19 (inibe cdk4 e 6), e família Cip/Kip que inclui p21, p27, p57 (inibe cdk e complexo ciclina) (FOSTER, 2008) (Figura 3).

Figura 2 - Ciclo celular com os pontos de controle.



Fonte: adaptado de Belizario, 2002.

Figura 3 - Regulação do ciclo celular.



Fonte: adaptado de Galderisi; Jori; Giordano, 2003.

A homeostase celular é regulada pela proliferação, interrupção do crescimento e apoptose. Mecanismos de controle eficiente são apresentados quando é detectado danos nas células, ocorrendo a destruição das células danificadas, ajudando a minimizar a progressão maligna. Essa destruição pode ser de duas formas distintas: a necrose e a apoptose. Defeitos nos pontos de controle podem levar a um acúmulo de anormalidades do DNA e posterior perturbações patológicas. Portanto, as células-alvo que são predispostas a lesões genéticas podem levar a doenças malignas nas fases iniciais de carcinogênese (FOSTER, 2008).

No câncer, há alterações fundamentais no controle genético da divisão celular, resultando em uma proliferação celular descontrolada. Mutações ocorrem principalmente em duas classes de genes: proto-oncogenese e genes supressores de tumor. Em células normais, os produtos de proto-oncogenes agem em diferentes níveis que estimulam a proliferação celular (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

O crescimento descontrolado que as neoplasias apresentam decorrem de ativação de proto-oncogenes (c-Myc, c-Fos e c-Ras) envolvidos no controle positivo do ciclo celular ou do aumento no número de cópias, à mutação ou à deleção de proto-oncogenes (p53, Rb, p19, p21, p27, BAX e BCL-2) envolvidos no controle negativo do ciclo e na regulação da apoptose (BELIZARIO, 2002).

Interrupção do crescimento pelos genes supressores de tumor, do reparo do DNA e da apoptose são vias essenciais para o desenvolvimento do câncer. O gene supressor de tumor, p53, é descrito como o “guardião do genoma” uma vez que desempenha um papel importante na proteção do genoma contra a proliferação de células mutadas. Mutações dos genes supressores de tumor permitem que as células danificadas prossigam no ciclo celular, dando origem ao desenvolvimento de células tumorais (FOSTER, 2008).

3.2 Morte celular

A morte celular pode ser classificada de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: autofagia, necrose, mitose catastrófica; senescência e apoptose. (GRIVICICH; REGNER; ROCHA 2007).

3.2.1 Autofagia

É um processo programado geneticamente e conservado evolutivamente que degrada proteínas celulares e organelas (HIPPERT; O'TOOLE; THORBURN, 2006) decorrente da

resposta a um estresse metabólico. Durante a autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas por membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos. Estes irão se fundir com os lisossomos e o conteúdo dos autofagossomos será degradado pelas hidrolases lisossomais (GRIVICICH; REGNER; ROCHA 2007). Fluxo de autofagia excessiva ou desequilibrada pode estar associada com a toxicidade celular e pode contribuir para o desenvolvimento de condições patológicas (LIANG et al., 2010).

3.2.2 Necrose

As células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local. É considerada uma resposta passiva à injúria celular, entretanto pode ser regulada geneticamente (GRIVICICH; REGNER; ROCHA 2007).

3.2.3 Mitose catastrófica

É um tipo de morte celular que ocorre durante a mitose, como resultado de danos no DNA ou falha na formação do fuso acoplado à debilitação de diferentes mecanismos dos pontos de controle que normalmente detem a progressão para mitose (CASTEDO et al., 2004).

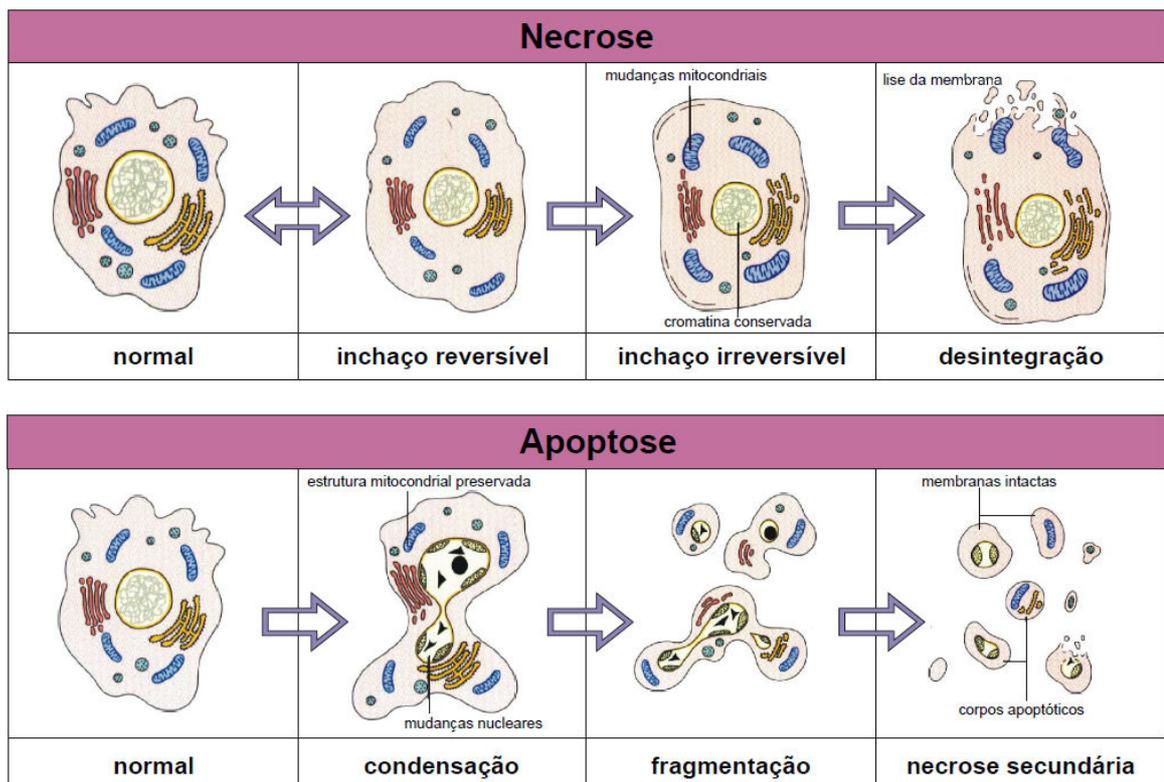
3.2.4 Senescência

Ocorre por meio de uma programação genética que envolve deterioração dos telômeros e ativação de genes supressores tumorais. Senescência celular limita a capacidade de replicação das células, evitando assim a proliferação de células que estão em diferentes estágios de malignidade. É um processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento (DIMRI, 2005; GRIVICICH; REGNER; ROCHA 2007).

3.2.5 Apoptose

Ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa e despolarização na membrana mitocondrial. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular (corpos apoptóticos). Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório. Outras características da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA e alterações da assimetria de fosfolipídios da membrana plasmática (ANAZETTI; MELO, 2007; GRIVICICH; REGNER; ROCHA 2007) (Figura 4).

Figura 4 - Diferenças morfológicas de necrose e apoptose.



Fonte: Biogeny®.

Diversos fatores intra e extracelulares podem desencadear a apoptose, entre eles: defeito no ciclo celular, ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, carência de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes, níveis aumentados de espécies reativas do

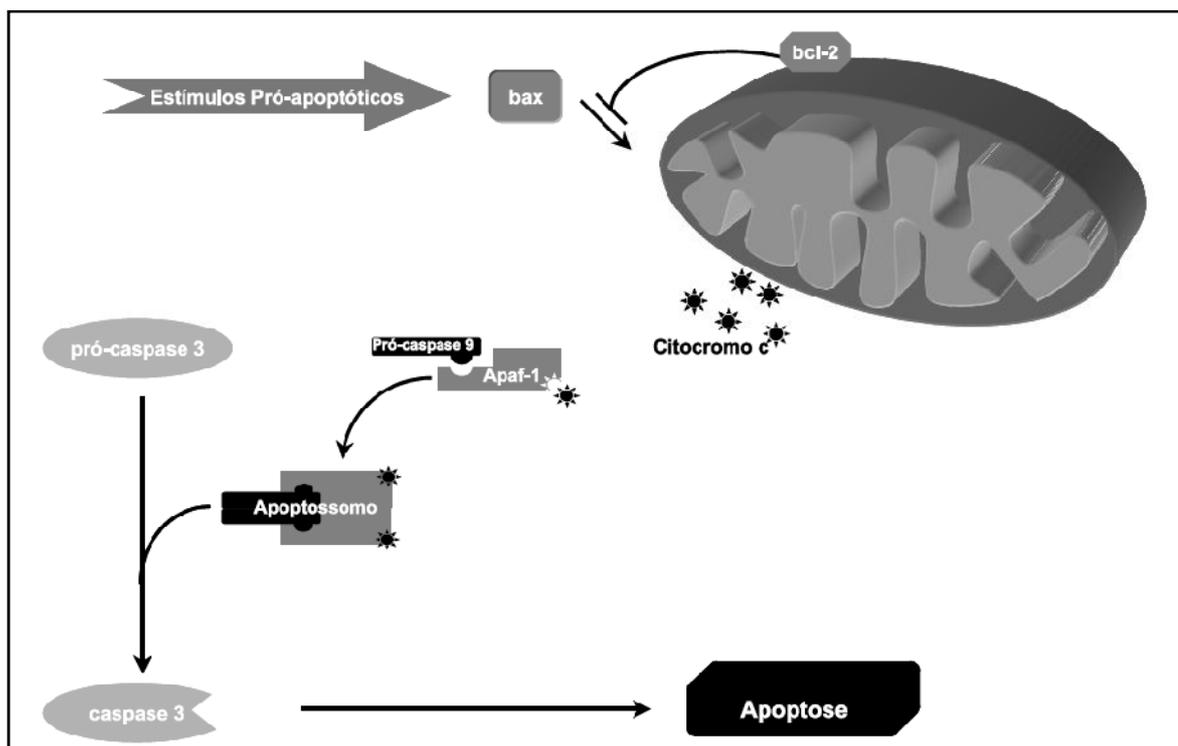
oxigênio e hipóxia. A apoptose pode ser induzida por estímulos ativando a via extrínseca (citoplasmática ou via receptor de morte), pela via intrínseca (mitocondrial) (PERIK et al., 2005; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). As duas vias podem estar interconectadas e as moléculas de uma via pode influenciar na outra. Existe uma via adicional que envolve a célula T citotóxica e perforina-granzima-dependente, mantendo a célula. O caminho perforina/granzima pode induzir a apoptose, quer através de granzima B ou granzima A. As vias extrínsecas, intrínsecas e granzima B convergem no mesmo terminal, ou caminho de execução (ELMORE, 2007).

Cada uma destas vias requer específicos desencadeamentos para iniciar uma cascata de energia dependente de eventos moleculares. As caspases são proteases que pertencem a família das cisteínas proteases, tendo a capacidade de reconhecer e clivar os substratos que possuam resíduos de asparato e são expressas na forma de pró-caspases inativas na maioria das células. Uma vez ativadas, as caspases podem ativar outras pró-caspases permitindo o início de uma cascata de protease (ELMORE, 2007). As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando a condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolípidios de membrana que irão sinalizar para as células serem fagocitadas pelos macrófagos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Estas proteases formam uma família, composta por três grupos funcionais: caspases iniciadoras que ativam outras caspases (2, 8, 9 e 10); caspase efetoras ou executoras que são ativadas pelas iniciadoras e clivam proteínas chave que processam a apoptose (3, 6 e 7); e o terceiro grupo que possui função inflamatória (1, 4 e 5) (PERES; CURY et al., 2005). Além dessas foram identificadas a caspase 11 que regula a apoptose e a maturação das citocinas durante o choque séptico, a caspase 12 que medeia apoptose específica endoplasmática e citotoxicidade por β -amilóide; caspase 13 que é de um gene bovino e caspase 14 que é altamente expressa em tecidos embrionários (ELMORE, 2007). Após um sinal de morte celular, as caspases são ativadas por clivagem proteolítica. Essas enzimas podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte, pois esses domínios também existem nas caspases e a presença deles permite essa interação (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular e os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (Bax, Bak, Bid). Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna e a transição da permeabilidade mitocondrial. Ao mesmo tempo, a água

do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e conseqüente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma. Ocorre também a perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS). O aumento nos níveis de EROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso da membrana interna. Durante a apoptose ocorre a formação de um megaporo que contém diversas proteínas e abrange as membranas interna e externa da mitocôndria, por onde ocorre a liberação do citocromo *c* para o citoplasma onde participa da ativação da apoptose. Quando no citosol, o citocromo *c* forma um complexo com a APAF- 1 (fator de ativação de protease associada a apoptose 1) e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA 2007) (Figura 5).

Figura 5 - Via intrínseca da ativação da apoptose.

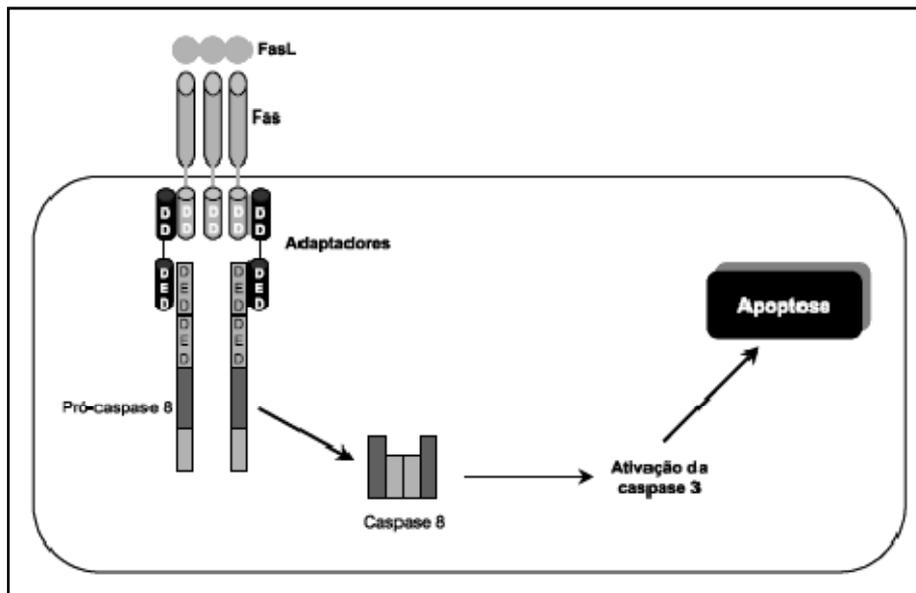


Fonte: Grivicich; Regner; Rocha 2007.

A via extrínseca (figura 6) envolve interação mediada por receptores transmembrânicos, que são receptores de morte da família do fator de necrose tumoral (TNF) (ELMORE, 2007). Todos os membros da família de receptores de TNF possuem um domínio extracelular rico em cisteína e domínio citoplasmático com 80 aminoácidos chamados de

domínio de morte (DD) (ELMORE, 2007; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA 2007). Os ligantes e receptores de morte são FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR,4 and Apo2L/DR5 (ELMORE, 2007).

Figura 6 - Via extrínseca de ativação da apoptose.

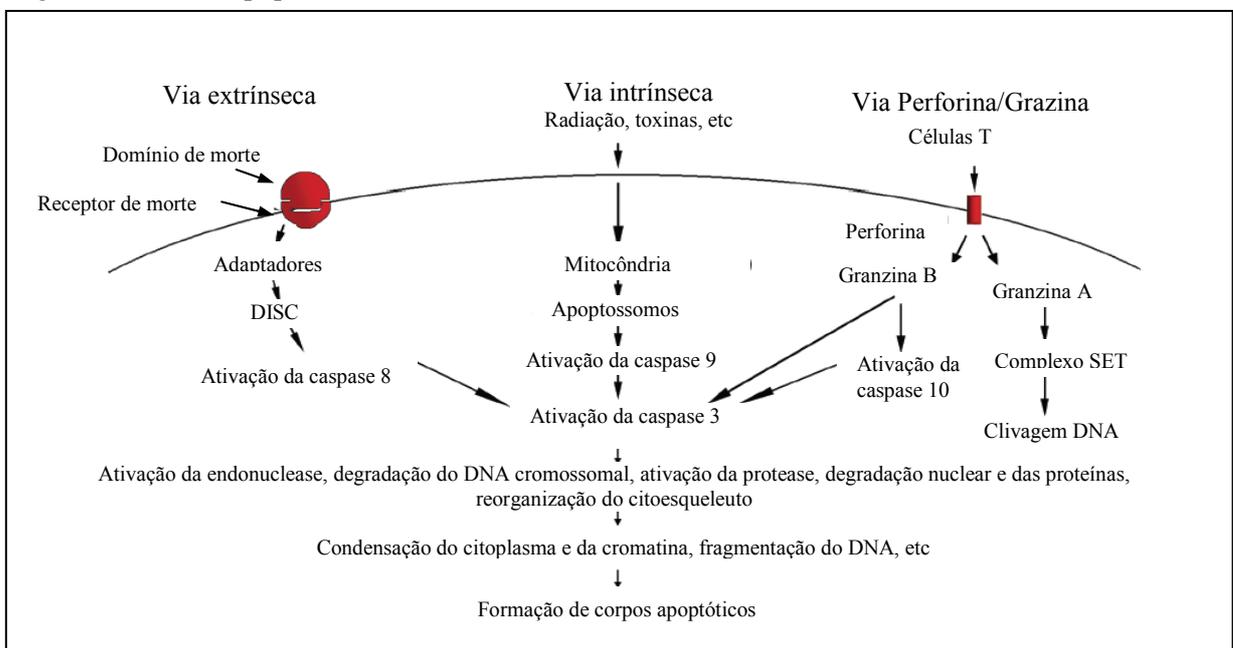


Fonte: Grivicich; Regner; Rocha, 2007

Os linfócitos T citotóxicos (CTL) são capazes de matar as células alvo através da via extrínseca e interação FasL/FasR (principal método de apoptose induzida por CTL), porém os CTL também são capazes de exercer seus efeitos citotóxicos em células tumorais e células infectadas por vírus através de uma via que envolve a secreção da molécula de perforina que forma poros transmembranares com uma liberação exocítica de grânulos contendo granzima A e B, através do poro na célula-alvo. Granzima B irá decompor proteínas em resíduos de aspartato e ativar pró-caspase-10 e decompor fatores como ICAD (inibidores de caspase DNase ativada). Granzima B pode utilizar a via mitocondrial para amplificação do sinal de morte por clivagem de Bid e indução de liberação do citocromo c e ainda a granzima B pode ativar diretamente caspase-3. Granzima A também é importante para a célula T citotóxica induzir apoptose e ativa caspase vias independentes. Uma vez na célula, granzima A ativa o corte do DNA via DNase NM23-H1 (produtos do gene supressor de tumor). Esta DNase tem um importante papel na vigilância imunológica para prevenir o câncer através da indução da

apoptose de células tumorais. A proteína nucleossômica, SET, inibe o gene NM23-H1. Granzima A cliva o complexo SET liberando assim a inibição da NM23-H1, resultando na degradação do DNA apoptótico. Além de inibir NM23-H1, o complexo conjunto tem importantes funções na estrutura da cromatina e reparo do DNA. As proteínas que compõem este complexo (SET, Ape1, pp32 e HMG2) trabalham juntas para proteger a estrutura da cromatina e DNA. Portanto, a inativação do complexo granzyme A contribui para a apoptose bloqueando a manutenção do DNA e da integridade da cromatina (Figura 7) (ELMORE, 2007).

Figura 7 - Vias de apoptose.



Fonte: adaptado de Elmore, 2007.

A morte celular programada participa de vários processos fisiológicos vitais, como o desenvolvimento embrionário, a involução da glândula mamária após o período de amamentação, o controle da proliferação de tumores e a regulação de populações do sistema imune. Alterações nos genes responsáveis pelo desencadeamento do processo apoptótico podem ocasionar diversas patologias (ANAZETTI; MELO, 2007).

A apoptose não é apenas um mecanismo para controlar o número e tamanho de células do tecido, mas também para remover células infectadas, danificadas, ou células estressadas do organismo. No entanto, existem alguns vírus e bactérias que inibem os mecanismos de apoptose, como o câncer cervical de alto risco que é alvo da inibição viral na apoptose. A maioria dos cânceres estão associados à resistência à iniciação de apoptose, especificamente àqueles que apresentam mutações do gene p53 (MARTINEZ; REIF; PAPPAS, 2010).

Anormalidades na regulação da morte celular pode ser um importante componente de doenças como o câncer, síndrome linfoproliferativa auto-imune, AIDS, isquemia e doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica) (ELMORE, 2007) e lesões secundárias após isquemia, osteoporose, entre outras patologias (ANAZETTI; MELO, 2007).

3.3 Câncer

Os termos câncer, neoplasia maligna e tumor maligno são sinônimos e distinguem-se dos tumores benignos pela sua propriedade de desdiferenciação, poder de invasão e capacidade de metastatizar-se (RANG et al., 2007) através do sangue e do sistema linfático (INCA 2010). O desenvolvimento do câncer é um processo complexo em estágios múltiplos, envolvendo geralmente mais de uma alteração genética e, também muitos outros fatores (BERNARDI; JACQUES-SILVA; LENZ 2003).

3.3.1 Fatores de risco

O câncer pode ser causado em uma das três formas: alimentação incorreta, predisposição genética e através do ambiente. Pelo menos 35% de todos os cânceres no mundo são causados por uma alimentação incorreta e quando se adiciona álcool e cigarros, o percentual pode aumentar para 60%. A predisposição genética ao câncer é de aproximadamente 20% sendo a maioria dos cânceres associados a uma série de carcinógenos ambientais (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003).

A maioria dos cânceres humanos resultam da exposição a carcinógenos ambientais, que incluem tanto naturais como produtos químicos sintéticos, irradiação e vírus (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003). Entende-se por ambiente, o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (indústrias químicas), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) e o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos). As mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e estilos de vida adotados pelas pessoas podem determinar os diferentes tipos de câncer (ALMEIDA et al., 2005).

Cancerígenos na dieta que desencadeiam a fase inicial compreendem moldes e produção de aflatoxinas (por exemplo, em amendoim e milho), nitrosaminas (em carnes defumadas e outros produtos curados), as gorduras e óleos, álcool, aditivos e conservantes. Uma combinação de alimentos pode ter um efeito cumulativo, e quando a dieta errada é

adicionado a um ambiente poluído, o tabagismo, radiação UV, radicais livres, falta de exercício físico e stress, o palco está montado para danos no DNA e progressão do câncer (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003). As duas formas mais importantes para reduzir o risco de câncer são a prevenção de agentes biológico, químico e físico que causam câncer e aumento de consumo de alimentos que protegem contra o câncer. Aproximadamente, 30% a 40% da incidência de câncer são evitáveis pelo consumo de uma alimentação saudável, atividade física regular e manutenção do peso corporal ideal, e mais de 20% por consumir vegetais e frutas (AMIN et al., 2009).

São raros os casos de cânceres que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos, apesar do fator genético exercer um importante papel na oncogênese. Um exemplo são os indivíduos portadores de retinoblastoma que, em 10% dos casos, apresentam história familiar deste tumor (INCA, 2010).

Alguns tipos de câncer de mama, estômago e intestino parecem ter um forte componente familiar, embora não se possa afastar a hipótese de exposição dos membros da família a uma causa comum. Determinados grupos étnicos parecem estar protegidos de certos tipos de câncer: a leucemia linfocítica é rara em orientais, e o sarcoma de Ewing é muito raro em negros (INCA, 2010).

3.3.2 Características do câncer

Hanahan e Weinberg (2000) propuseram seis alterações fundamentais na fisiologia celular que governariam a transformação de uma célula normal em cancerígena: autosuficiência nos sinais de crescimento; insensibilidade aos inibidores de crescimento; evasão da apoptose; potencial replicativo ilimitado; angiogênese mantida; invasão tecidual e metástase. Em 2009, Mantovani adicionou mais uma alteração, a inflamação.

3.3.2.1 Autosuficiência nos sinais de crescimento

As células normais exigem sinais de crescimento mitogênicos antes que elas possam passar de um estado quiescente para um estado proliferativo ativo. Estes sinais são transmitidos para a célula por receptores transmembrânicos que ligam distintas classes de moléculas sinalizadoras: fatores de crescimento difusíveis, componentes da matriz extracelular e moléculas de adesão/interação célula a célula (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

As células tumorais adquirem a capacidade de produzir seus próprios fatores de crescimento, reduzindo assim sua dependência de estímulo de seu microambiente do tecido normal. Esta libertação de sinais derivados da dependência exógena interrompe o mecanismo homeostático que opera normalmente para garantir um comportamento adequado de vários tipos de células dentro de um tecido (HANAHAN; WEINBERG, 2000; TEIXEIRA, 2007).

Células cancerígenas exploram três estratégias para a conquista da autosuficiência: produzem e liberam fatores de crescimento que estimulam os seus próprios receptores (sinalização autócrina) e seus vizinhos imediatos (sinalização parácrina); altera o número, a estrutura ou função dos receptores de fator de crescimento em sua superfície, de tal forma que eles são mais propensos a enviar um sinal de crescimento para o núcleo; desregulação da via de sinalização do receptor de fator de crescimento para que ele seja permanentemente ativado (HARRINGTON, 2007).

3.3.2.2 *Insensibilidade aos inibidores de crescimento*

Dentro de um tecido normal, vários sinais antiproliferativos operaram para manter a quiescência celular e a homeostase do tecido; estes sinais incluem inibidores de crescimento solúveis e inibidores imobilizados incorporados na matriz extracelular e na superfície das células vizinhas. Estes sinais inibidores do crescimento, como os seus homólogos positivamente ativados, são recebidos por receptores transmembrânico de superfície celular acoplados a circuitos de sinalização intracelular (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Sinais antiproliferativo podem bloquear a proliferação por dois mecanismos distintos. As células podem ser forçadas a sair do estado proliferativo para o estado quiescente (G_0) a partir da qual podem emergir em algum momento futuro, quando sinais extracelulares permitirem ou as células podem ser induzidas a entrar no estágio pós-mitose. Esses sinais são mediados por ligantes, TGF- β (fator de crescimento de transformação β) e sinais enviados para o núcleo via mensageiros secundários (HANAHAN; WEINBERG, 2000; TEIXEIRA, 2007). Esses caminhos são principalmente envolvidos no controle do ciclo celular e seus efeitos são mediados através de proteínas que incluem proteínas retinoblastoma (Rb), ciclinas, cinases dependentes de ciclinas (CDK) e seus inibidores (CDKi). Anormalidades nos sinais antiproliferativo são extremamente comum no câncer e desempenham um papel em ajudar as células cancerosas de progredir através do ciclo celular. Portanto a perda de Rb e membros da família CDKi e superexpressão de certas ciclinas e CDK ocorrem em vários tipos de tumores (HARRINGTON, 2007).

3.3.2.3 *Evasão a apoptose*

Células normais sucessivamente verificam sua viabilidade através do equilíbrio de sinais antiapoptótico e pró-apoptótico que recebem. Em células normais o dano no DNA leva ao bloqueio da proliferação (interrupção do ciclo celular) quando o potencial de reparo é avaliado. Se o nível do dano excede a capacidade de reparo, o equilíbrio dos sinais antiapoptótico e pró-apoptótico é perdido e as células sofrem apoptose. Isso impede danos no DNA e evita o risco das mutações serem transmitidas aos descendentes na divisão celular (HARRINGTON, 2007).

Evasão de apoptose é uma das marcas do câncer humano que promovem a formação e progressão tumoral, bem como resistência ao tratamento (FULDA, 2010). A perda da via de sinalização apoptótica é um evento extremamente comum no câncer. Os dois genes mais conhecidos envolvidos na apoptose são p53 (supressor tumoral) e bcl-2 (oncogene). As células cancerosas são capazes de escapar da apoptose através da capacidade de ignorar os sinais enviados através da via extrínseca ou por reconfiguração do balanço intracelular das moléculas pró e antiapoptóticas (HARRINGTON, 2007).

3.3.2.4 *Potencial replicativo ilimitado*

Células somáticas normais podem sofrer divisões celulares finitas antes de entrarem no período de senescência replicativa. Esse processo ocorre como um resultado de células incapazes de replicar as extremidades de seus cromossomos (telômeros) em cada divisão. Portanto, ao longo do tempo os telômeros ficam progressivamente mais curtos. Nas células malignas a estrutura e o comprimento dos telômeros são mantidos pela transcriptase reversa da telomerase (HARRINGTON, 2007; KELLAND, 2007)

3.3.2.5 *Angiogênese sustentada*

Em tecidos normais a angiogênese é realizada por um equilíbrio entre os fatores positivos (pró-angiogênicos) e negativos (antiangiogênicos) (Tabela 1). O crescimento do câncer está intimamente relacionado à sua capacidade de garantir o fornecimento de sangue que é adquirido por corromper o balanço entre fatores pró-angiogênico e antiangiogênico. O câncer aumenta a produção de proteínas pró-angiogênica como o fator de crescimento

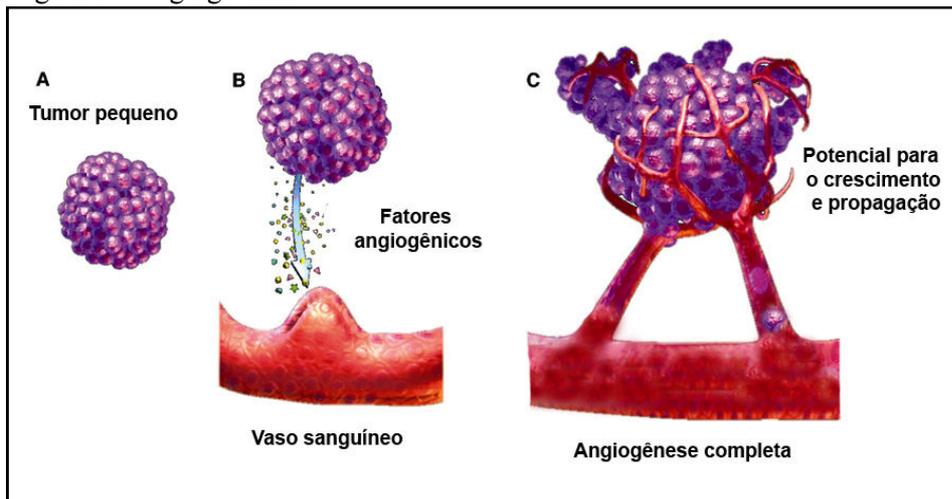
endotelial vascular (VEGF) e/ou por diminuir a produção das proteínas anti-angiogênicas como a trombospondina-1 (HARRINGTON, 2007) (Figura 8).

Tabela 1 - Fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos

Fatores pró-angiogênicos
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)
Fator de crescimento fibroblasto básico (bFGF)
Fator de crescimento fibroblasto ácido (aFGF)
Fator de crescimento de transformação α e β (TGF- α , TGF- β)
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)
Fator de necrose tumoral α (TNF- α)
Fatores antiangiogênicos
Angiostatina
Endostatina
Trombospondina 1 e 2 (TPS-1, TPS-2)
Interleucinas (IL-1 β , IL-12, IL-18)
Anti-trombina III

Fonte: Harrington 2007

Figura 8 - Angiogênese.



Fonte: Adaptado de Siemann, 2002.

3.3.2.6 *Invasão tecidual e metástase*

Os tumores malignos são caracterizados por sua capacidade de invadir anatomicamente tecidos normais distantes e crescerem. Durante este processo altamente seletivo, as células tumorais deixam seu local principal e disseminam por várias vias, como os vasos sanguíneos e linfáticos. Ocorre a digestão enzimática da matriz extracelular seguida pela motilidade específica direcionada; as células penetram nos vasos e ocorre a embolização do tumor; sobrevivem na circulação até a chegada no local da metástase que pode ser escolhido com fornecimento de ambiente favorável de fatores de crescimento apropriados; aderem ao endotélio dos vasos sanguíneos e são extravasadas dos vasos e então começa a proliferar e invadir o novo local (HARRINGTON, 2007; MANTOVANI 2009).

Nem todas as células cancerosas podem metastatizar, porque a metástase depende tanto das propriedades intrínsecas das células tumorais quanto de fatores derivados do microambiente tumoral (MANTOVANI, 2009).

3.3.2.7 *Inflamação*

A inflamação é um processo fisiológico em resposta ao dano tecidual resultante da infecção do patógeno, irritação química e/ou ferimento. No estágio inicial da inflamação, os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o local inflamado. Como a inflamação progride linfócitos e outras células inflamatórias são ativadas e atraídas para o local inflamado por uma rede de sinalização envolvendo um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Todas as células recrutadas para o sítio inflamatório contribuem para a degradação dos tecidos e são beneficiadas pelo fortalecimento e manutenção da defesa contra a infecção (LU; OUYANG; HUANG, 2006).

A proliferação de células em si não causa câncer mas a proliferação celular sustentada em um ambiente rico em células inflamatórias (neutrófilos, mastócitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos e mastócitos), fatores de crescimento, estroma ativado, mediadores (citocinas e quimiocinas) e agentes promotores que danificam o DNA certamente potencializa e/ou promove neoplasias (COUSSENS; WERB, 2010; LU; OUYANG; HUANG, 2006).

3.3.3 Tipos de câncer

O câncer é classificado de acordo com o tipo de célula normal que o originou, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Isso é o que pode se chamar de classificação primária. Pelo que se sabe sobre classificação primária do câncer, quase todos os tipos podem ser colocados em um dos seguintes grupos, onde o sufixo – *oma* significa literalmente tumor (ALMEIDA et al., 2005).

A maioria de tumores humanos se desenvolve a partir de tecidos epiteliais. O epitélio são camadas de células que delineam as paredes de cavidades e canais. Abaixo das camadas de células epiteliais encontra-se uma membrana basal, ela separa as células epiteliais de suas subcamadas de células de tecido conjuntivo de suporte (estroma). A membrana basal é um tipo celular especializado de matriz extracelular e é formada por proteínas secretadas pelas células epiteliais. Os epitélios semeiam os tipos de cânceres humanos mais comuns, carcinomas. Muitos epitélios também possuem células especializadas que secretam substâncias nos ductos e cavidades que eles revestem gerando os adenocarcinomas (WEINBERG, 2008).

Há tumores malignos que se desenvolvem a partir de tecidos não epiteliais, sendo a principal classe derivados do tecido conjuntivo, sarcomas. Os sarcomas são derivados de diversos tipos de células mesenquimais (fibroblastos, adipócitos, osteoclastos e miócitos). Outro grupo de câncer não epitelial se desenvolve a partir de diversos tipos de células do sangue (hematopoético) conhecido como leucemias, incluindo as células do sistema imune, os linfomas. E o último grupo de câncer não epitelial se desenvolve a partir de células que formam componentes do sistema nervoso central e periférico, neuroectodermis. Nem todos os tumores se encaixam perfeitamente a esses grupos, por exemplo, os melanomas que são derivados de melanócitos (WEINBERG, 2008).

3.3.4 Epidemiologia

A incidência do câncer cresce no Brasil, como em todo o mundo, num ritmo que acompanha o envelhecimento populacional decorrente do aumento da expectativa de vida. É um resultado direto das grandes transformações globais das últimas décadas, que alteraram a situação de saúde dos povos pela urbanização acelerada, novos modos de vida, novos padrões de consumo. Importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população (INCA, 2009).

O Instituto Nacional do Câncer estima a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer no Brasil para o ano de 2010. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não

melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do cólon do útero no sexo feminino (Figura 9).

Figura 9 - Estimativas para o ano de 2010 de número de casos por câncer, segundo a localização primária.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	52.350	-	52.350
Mama Feminina	-	49.240	49.240
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.800	9.830	27.630
Cólon e Reto	13.310	14.800	28.110
Estômago	13.820	7.680	21.500
Colo do Útero	-	18.430	18.430
Cavidade Oral	10.330	3.790	14.120
Esôfago	7.890	2.740	10.630
Leucemias	5.240	4.340	9.580
Pele Melanoma	2.960	2.970	5.930
Outras Localizações	59.130	78.770	137.900
Subtotal	182.830	192.590	375.420
Pele não Melanoma	53.410	60.440	113.850
Todas as Neoplasias	236.240	253.030	489.270

Fonte: INCA, 2009.

3.3.5 Terapia do câncer

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea (INCA, 2010). O tratamento da maioria dos casos de câncer consiste na combinação de diferentes técnicas (BRANDÃO et al., 2010; INCA, 2010).

Os agentes antineoplásicos atualmente utilizados, em particular os que são citotóxicos, afetam, em sua maioria, apenas uma das características das células cancerosas, o processo de divisão celular, sendo, portanto, apenas antiproliferativos. Esses fármacos não exercem nenhum efeito inibitório específico sobre o poder invasivo, a perda da diferenciação ou o poder metastático. Além disso, como seu efeito principal é exercido sobre a divisão celular, eles irão afetar todos os tecidos normais que se dividem rapidamente, produzindo então, em maior ou menor grau, os conhecidos efeitos colaterais de uma quimioterapia (BERNARDI, JACQUES-SILVA, LENZ 2003). Efeitos colaterais como diarreias, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade as infecções (BRANDÃO et al., 2010). Em certas circunstâncias, os próprios agentes antineoplásicos podem ser carcinogênicos (BERNARDI, JACQUES-SILVA, LENZ 2003).

Além de destruir ou remover células malignas as pesquisas buscam novas terapias como inativar componentes da via de sinalização do oncogênese; restaurar a função dos genes de supressão tumoral; empregar inibidores da proliferação específicos dos tecidos; inibir o crescimento, a invasão e a metástase do tumor; melhorar a resposta imune do hospedeiro e reverter à resistência aos fármacos (RANG et al., 2007).

A inativação dos componentes da via de sinalização do oncogênese pode ser através dos inibidores dos receptores do fator de crescimento ao receptor como EGF (fator de crescimento epidermal), RTKs (tiosina-quinase), inibidores de Ras (BERNARDI, JACQUES-SILVA, LENZ 2003; RANG et al., 2007).

Talvez agentes que inibiam a apoptose podem ser vantajoso em conjugação com quimioterapia ou radioterapia para a redução da dose limite e efeito da apoptose em células normais. Dentre estes agentes temos: ligantes de receptores de morte, antagonistas da família Bcl-2, complexo p53-MDM2 entre outros (GERL; VAUX, 2005).

A terapia gênica tem como abordagens promissoras: restaurar mecanismos protetores como p53; inativar a expressão de oncogenes; fornecer um gene para células malignas, tornando-as sensíveis as drogas; fornecer um gene as células hospedeiras sadias para protegê-las da quimioterapia; marcar células cancerosas com genes para torná-las imunogênicas (BERNARDI, JACQUES-SILVA, LENZ 2003).

Os inibidores de matriz metaloproteinase e da angiogênese podem inibir o crescimento, a invasão e a metástase do tumor. As metaloproteinases, que são uma família de endopeptidases, estão envolvidas, tanto na invasão, quanto nas metástases dos cânceres, por terem a capacidade de degradar os componentes da matriz extracelular. O marimastat é uma droga que inibe essa enzima. Os inibidores da angiogênese atuam em reguladores endógenos (angiogenina, VEGF e FGF), a fim de impedir a irrigação do tumor. Um exemplo desse inibidor é a talidomida (BERNARDI, JACQUES-SILVA, LENZ 2003; PAN et al., 2008; RANG et al., 2007).

As células podem desenvolver resistência a uma droga ou resistência cruzada a outras drogas, fenômeno conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR) (BERNARDI, JACQUES-SILVA, LENZ 2003) Este fenômeno de pode estar relacionado a uma série de fatores: o transporte da droga através da membrana plasmática, alteração nas enzimas-alvo, alteração no metabolismo da droga, aumento na reparação do DNA e incapacidade para sofrer apoptose. Dentre estes, o primeiro é a principal forma de resistência e está relacionado com a presença de bombas que transportam ativamente o quimioterápico para fora da célula (bombas de efluxo), este fenômeno pode ser explicado pela existência de uma glicoproteína

de membrana celular (glicoproteína-P) (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA et al., 2010; FORMARIZ, et al., 2004).

As principais pesquisas estão concentradas na exploração de fármacos ativos que são utilizados em função de uma atividade farmacológica principal, mas que têm como propriedade secundária a capacidade de reverter o fenômeno MDR. Para exemplificar, pode-se citar o verapamil, nifedipina, amiodarona, trifluoperazina, quinina e a ciclosporina A, todos classificados como moduladores de primeira geração (BERNARDI, JACQUES-SILVA, LENZ 2003; HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA et al., 2010).

Muitos dos inibidores da P-gp só é utilizado em doses bastante altas, apresentando muitas vezes um nível de toxicidade bastante elevado. A segunda geração de moduladores inclui o biricodar, valsopodar, dexverapamil, dexniguldipina, e derivados da indolizilsulfona e triazinoaminopiperidina. Estes, compostos, embora mais potentes e menos tóxicos que os de primeira geração, apresentam algumas limitações como o biridacor e o valsopodar inibem o metabolismo do quimioterápico paclitaxel, via citocromo P450A4. A terceira geração de moduladores é constituída por inibidores como o elacridar e tariquidar, que não apresentam interações farmacocinéticas com quimioterápicos e mostraram alta potência e especificidade para a P-gp (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA et al., 2010).

3.3.6 Antineoplásicos derivados de planta

A procura por moléculas cada vez mais potentes e menos tóxicas é constante, tendo como grande fornecedor a natureza. As plantas são consideradas fonte nobre de moléculas para o tratamento de várias formas de câncer e, mesmo que a molécula isolada do vegetal não possa ser usada diretamente como medicamento, pode servir de modelo para síntese ou para gerar um pró-fármaco para o desenvolvimento de novos agentes (BRANDÃO et al., 2010).

Existem vários registros históricos sobre a utilização das plantas para tratamento de doenças desde 4.000 a.C. O primeiro registro médico depositado no Museu da Pensilvânia é datado de 2.100 a.C. e inclui uma coleção de fórmulas de trinta diferentes drogas de origem vegetal, animal ou mineral. O manuscrito Egípcio “Ebers Papyrus” (1.500 a.C.) contém 811 prescrições e 700 drogas e o primeiro texto Chinês sobre plantas medicinais (500 a.C.) relata nomes, doses e indicações de uso de plantas para tratamento de doenças. Algumas dessas plantas ainda são utilizadas, como Ginseng (*Panax spp*), *Ephedra spp*, *Cassia spp* e *Rheum palmatum L.*, inclusive como fontes para indústrias farmacêuticas (DUARTE, 2006).

Entre o período de 1960 a 1986, no programa de avaliação de substâncias antitumorais de origem vegetal do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos foram investigados 108.330 extratos obtidos de 35.000 espécies vegetais, 2.935 espécies revelaram atividade biológica. Das 2.000 substâncias cristalinas isoladas e testadas, 95 foram selecionadas para investigações especiais e 11 aprovadas para testes contra diversos tumores. Entre tais substâncias foram indicadas a brucetina, a maitansina, o colubrinol, a indicina-N-óxido, o triptidolido, o taxol, a homo-harringtonina, elipticina, bouvardina (BRAZ FILHO, 2010) e o lapachol (ARAÚJO, ALENCAR, ROLIM NETO 2002).

Os alcalóides vincristina e vimblastina isolados da espécie *Catharanthus roseus*, destacam-se como dois dos mais importantes agentes quimioterapêuticos de uso clínico corrente contra o câncer, seguidos pelos produtos semissintéticos etoposido e teniposido, obtidos de epipodofilotoxina isolado das espécies *Podophyllum peltatum* e *P. endoii* (BRAZ FILHO, 2010).

O Brasil conta, atualmente, com grupos de pesquisa empenhados em investigações de substâncias naturais anticancerígenas e outras atividades biológicas dentre elas: A naftoquinona denominada lipsidoquinona, isolada de *Lippia sidoides*; diploflavona isolada de *Diplotropis ferruinea*; biflavonoides isolados das espécies *Ouratea hexasperma* e *Ouratea semiserrata*; as witaflavinas isoladas das folhas de *Acnistus arborescens* (BRAZ FILHO, 2010).

3.4 Antibióticos

São substâncias naturais (produzidas por bactérias, fungos, actinomicetos) ou sintéticas que inibem o crescimento dos microrganismos ou podem eventualmente destruí-los. Classificados em bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GOODMAN; GILMAN, 1996; GUIMARAES, MOMESSO, PUPO, 2010).

No século XIX a possibilidade das bactérias serem causadores de processos infecciosos começou a ser discutida, com o surgimento dos experimentos de Louis Pasteur que demonstrou que algumas linhagens de bactérias eram importantes para processos de fermentação e, também, que as bactérias eram de ampla distribuição pelo meio ambiente. Após a segunda metade do século XIX, cientistas identificaram micro-organismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifóide (GUIMARAES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Então as pesquisas foram conduzidas na busca de agentes químicos que apresentassem atividade antibiótica. O grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928. A atividade da penicilina era superior à das sulfas e a demonstração que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antibióticos: a prospecção em culturas de micro-organismos, especialmente fungos e actinobactérias (GUIMARAES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Entre os anos 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram-positiva: β -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) e outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina B). Neste período apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida, trimetopim e metronidazol (GUIMARAES, MOMESSO, PUPO, 2010). O pesquisador Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima em 1956 encontrou atividade antimicrobiana do ipê-roxo frente a cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. Verificou também que à medida que se eleva o grau de pureza do Lapachol, diminui-se progressivamente a atividade antimicrobiana do Lapachol (ARAÚJO, ALENCAR, ROLIM NETO 2002; FONSECA et al., 2003.).

Desde o início dos anos 80 o número de antimicrobianos em fase de desenvolvimento diminuiu consideravelmente enquanto que a resistência dos micro-organismos aos mesmos tem crescido de forma imensurável, porque eles estão cada vez mais desenvolvendo uma série de novos mecanismos de resistência. O estudo da resistência bacteriana, geralmente é baseado em micro-organismos de importância epidemiológica, tais como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e fungos leveduriformes, responsáveis por diferentes processos etiológicos tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunodeprimidos (ANTUNES et al., 2006).

O uso constante de antibióticos tem provocado uma série de problemas dentre os quais se destacam o desequilíbrio da ecologia humana e a resistência microbiana, fazendo com que se busquem novos antibióticos que sejam eficazes, abrindo caminhos para a evolução das pesquisas, pois o desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano vem acompanhado pela resistência dos micro-organismos (ANTUNES et al., 2006). A busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, vem ganhando importância nas indústrias farmacêuticas (DUARTE, 2006).

Atualmente, o uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África. Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (DUARTE, 2006).

Na busca de novos antimicrobianos devemos enfatizar aqueles de origem vegetal, uma vez que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta e que muitas plantas já vêm sendo vastamente usadas e testadas há centenas de anos com as mais diversas finalidades por populações do mundo inteiro. A maior parte da população brasileira (80%) consome apenas 37% dos medicamentos disponíveis, dependendo quase que exclusivamente de medicamentos de origem natural. Para isso, antes da determinação das frações ativas por métodos bioquímicos sofisticados, agora disponíveis, torna-se necessário e útil o uso preliminar de métodos de triagem de domínio popular ou das farmácias homeopáticas como macerados, chás, extratos aquosos, alcoólicos e outros. Deve-se lembrar que os princípios ativos podem estar presentes em diferentes frações de um composto ou mesmo que um princípio ativo seja liberado só após a ação metabólica do animal (FERRONATO et al., 2007).

3.5 Família Erythroxylaceae

A família Erythroxylaceae abrange quatro gêneros, *Aneulophus* Benth, *Nectaropetalum* Engl, *Pinacopodium* Exell & Mendonça e *Erythroxylum* P. Browne, facilmente distinguidos pela característica das folhas e flores. *Erythroxylum* é o maior gênero e compreende cerca de 200 espécies, que são amplamente distribuídas em todos os trópicos, mas com grandes áreas de diversidade na América do Sul, África, Ilha de Madagascar, sudeste da Ásia e Austrália (BRACHET et al., 1997, GRIFFIN; LIN, 2000, ZANORALI et al., 2003b; BARREIROS et al., 2005; BROCK et al., 2005; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006). No Brasil foi descrita a ocorrência de 130 espécies em ambientes florestais e de Cerrado (BIERAS; SAJO, 2004). Os outros três gêneros, *Aneulophus*, *Nectaropetalum* e *Pinacopodium*, possuem poucas espécies e apresentam distribuição exclusiva na África (PLOWMAN; BERRY, 1999; DALY, 2004).

No Estado da Paraíba foram registradas 13 espécies: *E. caatingae* Plowman, *E. citrifolium* A. St.-Hil, *E. nummularia* Peyr., *E. paufferrense* Plowman, *E. passerinum* Mart., *E.*

pulchrum A. St.-Hil., *E. pungens* O.E. Schulz, *E. revolutum* Mart., *E. simonis* Plowman, *E. suberosum* var. *denudatum* O.E. Schulz, *E. subrotundum* A. St.-Hil. e *E. squamatum* Sw. encontradas nas diversas formações do Estado, como as florestas úmidas da Mata Atlântica, Brejos de Altitude, Matas Serranas, Restingas e áreas mais secas da Caatinga, como o Cariri Paraibano (LOIOLA et al., 2007).

O interesse pelo gênero intensificou-se no século XIX, após a descoberta das atividades farmacológicas apresentadas pelas folhas de *Erythroxylum coca* Lam., que secularmente eram empregadas pelos indígenas da região andina da América do Sul. A cocaína, um alcalóide natural produzido por *E. coca* foi empregado como anestésico local em pequenas cirurgias. Entretanto, a cocaína ganhou notoriedade por sua atividade psicoativa no Sistema Nervoso Central, tornando-se um dos grandes problemas de saúde pública da atualidade (LOYOLA et al., 2007). Apenas espécies de interesse econômico são cultivadas, variedades de *E. coca* e *E. novogranatense*, devido ao seu conteúdo de cocaína, que pode atingir até 2% da massa seca de folhas. A cocaína é acumulada nas folhas de *E. coca* e *E. novogranatense* mas pode ocorrer traços em outras espécies (BROCK et al., 2005; BIERE et al., 2006).

3.5.1. Atividades biológicas do gênero *Erythroxylum*

O gênero é constituído por diversas plantas, as quais são usadas na medicina tradicional no tratamento de infecções bacterianas e/ou virais da pele, amenorréia, hemorragia, distúrbios renais e respiratórios, gripes, sinusite, dores de estômago, para combater a fadiga e a sensação de fome e como estimulante. (SILVA et al., 2001; RODEIRO et al., 2008a).

As espécies *E. catuaba* e *E. vacciniifolium* são tradicionalmente descritas como catuaba e usadas como estimulante do sistema nervoso central e afrodisíaca (ZANOLARI et al., 2003a,b). *E. argentinum* conhecida popularmente como erva de pombo ou cocão, é utilizada no tratamento de sinusite, estômago e gripe (CHAVES et al. 1988, ZUANAZZI et al., 2001). *E. moonii* e *E. zeylanicum* são utilizadas como anti-helmíntica (RAHMAN et al., 1998; BRIGMANN et al., 2000), sendo *E. moonii* usada também para supuração de furúnculos e abscessos (RAHMAN et al., 1998). *E. pervillei* possui vários usos folclóricos, inclusive como um veneno de peixes e para tratar a dor abdominal e tumores (SILVA et al. 2001). As folhas e raízes de *E. emarginatum* são usados para alívio da dor, sendo as folhas também são usadas

para aumentar o desejo sexual (NISHIYAMA et al., 2007). *E. sideroxyloides* é usada no tratamento de infecções da garganta, febre e cálculos renais (SOOBRAATTEE et al., 2008).

Mistura de ervas utilizadas na medicina tradicional de Cuba foram investigadas através de entrevistas com 130 pessoas das províncias de Santiago, de Cuba e Guantánamo. Cento e setenta espécies e outros produtos são usados em 199 fórmulas. Dentre as espécies mais citadas encontra-se *E. havanense*. Misturas contendo raízes de *E. havanense* são utilizadas para pedras na vesícula, cálculo renal, reumatismo, artrose, pneumonia, catarro, tuberculose, dor muscular e doenças venéreas (CANO; VOLPATO 2004).

Existem poucos estudos com comprovação farmacológica do gênero *Erythroxyllum* entre eles, a atividade antiinflamatória induzida por carragenina em ratos e analgésica pelo teste da placa quente em camundongos dos extratos hidroalcolico de *E. argentinum* verificada por Chaves et al. (1988).

Extratos alcalinos da casca de *E. catuaba* apresentaram ação protetora contra infecções letais de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, inibição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e contra infecções oportunas em pacientes com HIV (MANABE et al., 1992).

Cientistas japoneses sugerem que as folhas de *E. lucidium* podem apresentar atividade anti-herpes viral e estudos mostraram que extrato metanólico foi inativo na inibição tumoral e no teste de intercalação com DNA (BRACHET et al., 1997).

Quanto à toxicidade, o extrato de *E. lucidium* e *E. confusum* foram atóxico no ensaio com *Artemia salina* (BRACHET et al., 1997; MARTINEZ-HORMAZA et al., 2006), porém a ingestão dos frutos de *E. deciduum* apresentaram toxicidade em ovinos (COLODEL et al., 2004).

O extrato alcoólico de *E. moonii* mostrou atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Curvularia lunata*, *Penicillium notatum*, *Alternaria solani*, *Epidermophyton floccosum*, *Dutarium rotatum*, *Microsporurn canis* e *Ascomycetes sp.* Porém, não apresentou atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium hofmanni*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pseudomalliae*, *Aeromonas sobriai*, *Shigella boydii* e *Escherichia coli* nas concentrações de 100 e 200µg/mL (RAHMAN et al., 1998).

A atividade citotóxica de *Erythroxyllum* foi descrita inicialmente em 2001 por Silva e colaboradores em células de carcinoma e adenocarcinoma. O estudo mostrou que o extrato metanólico e os alcalóides tropanos de *E. pervillei* inibiram o crescimento de células KB - V1 (carcinoma de cérvix humana resistente a multidrogas) na presença de vimblastina, sendo muito menos citotóxica para células KB-V1 na ausência de vimblastina ou células KB

(carcinoma epidermóide oral). Os alcalóides isolados da espécie, pervillene B e C, apresentaram citotoxicidade em adenocarcinoma do ovário (SKOV3) e adenocarcinoma do ovário resistente a multidrogas (SKVLB) incubadas com adriamicina. No ano seguinte, alcalóides isolados do caule de *E. rotundifolium* também apresentaram citotoxicidade em células KB - V1 resistente a multidrogas e células KB - V1 resistente a multidrogas incubadas com vinblastina (CHAVEZ et al., 2002).

Recentemente, diterpenos isolados do extrato acetato de etila de *E. passerinum* apresentou atividade inseticida contra *Aedes aegypti* (BARREIROS et al., 2007). Extratos de *E. minutifolium* e *E. confusum* produziram um efeito citotóxico significativo em hepatócitos de ratos, atividades anti-inflamatória e antimicrobiana (RODEIRO et al., 2008a,b). E a espécie *E. sideroxyloides* mostrou alto efeito protetor em peroxidação de lipídios (SOOB RATTEE et al., 2008).

3.5.2 Estudo fitoquímico do gênero *Erythroxylum*

O gênero *Erythroxylum* é caracterizado pela presença de alcalóides, taninos, terpenos, fenilpropanoides e flavonóides, mas com maior abundância de alcalóides tropanos (CHAVEZ et al., 1996; ZUANAZZI et al., 2001; KHATTAK et al., 2002; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006; OLIVEIRA et al. 2010).

Através de estudos fitoquímicos do gênero *Erythroxylum* foram isolados alcalóides (JOHNSON et al. 1996; CHAVEZ et al., 1996; BRACHET et al., 1997; GRIFFIN; LIN, 2000; KHATTAK et al., 2002; BROCK et al., 2005) dentre eles, alcalóides tropanicos (CHRISTEN et al., 1995; RAHMAN et al., 1998; PAYO-HILL et al., 2000; BRINGMANN et al., 2000; KHATTAK et al., 2002; ZANOLARI et al., 2003a; CHIN et al., 2006; NISHIYAMA et al., 2007); flavonóides (JOHNSON; SCHMIDT; NORMAN, 1998; JOHNSON et al., 2003; SANTOS; LIMA; SILVEIRA, 2003; BARREIROS et al., 2005; KANCHANAPOOM et al., 2005; SOOB RATTEE et al., 2008), terpenos (BARREIROS et al., 2005, 2007; SANTOS et al., 2005), acetofenonas (KANCHANAPOOM et al., 2005), compostos fenólicos e proantocianidinas (SOOB RATTEE et al., 2008).

Alcalóide tropanico é uma classe importante de produtos naturais devido à sua ação analgésico, anestésico, anticolinérgico, antiemético, anti-hipertensivo, parasimpaticolítica e para diminuir as dores da uretra, cálculo renal, bronco espasmo e asma brônquica (OLIVEIRA et al., 2010). Em doses altas promovem estimulação seguida de depressão e em doses baixas diminuem a secreção salivar, brônquica e a sudorese. Dependendo da dose,

levam a alucinações percebidas como realidade pelo sujeito, que pode conversar com pessoas ausentes e ver objetos ou animais que não existem (MARTINEZ; ALMEIDA; PINTO, 2009).

Atualmente, medicamentos contendo alcalóides tropânicos são utilizados para diminuir cólicas renais, espasmos brônquicos e espasmos do trato gastrintestinal e, também, como anestésicos locais e antídotos em envenenamentos por inseticidas das classes dos organofosforados e dos carbanatos (MARTINEZ; ALMEIDA; PINTO, 2009).

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396p.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- AMIN, A. R. M. R.; KUCUK, O.; KHURI, F. R.; SHIN, D.M. Perspectives for Cancer Prevention With Natural Compounds. **Journal of clinical oncology**, v. 27, n.16 , p. 2712 – 2725, 2009.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.
- ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S.V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, 2006.
- ARAÚJO, E. L., ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 57-59, 2002.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; DAVID, J. P. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 537–540, 2005.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. A.; LOPES, L. M. X.; SÁ, M. S.; COSTA, J. F.O.; ALMEIDA, M. Z.; QUEIROZ, L. P.; SANT'ANA, A. E. G. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1735–1739, 2007.
- BELIZARIO, J. E. O próximo desafio: reverter o câncer. **Ciência hoje**, v. 31, n. 184, p. 50 – 57, 2002.
- BERNARDI, A., JACQUES-SILVA, M. C., LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma**, v. 15, n. 9-10, p. 61-63, 2003.
- BIERAS, A. C.; SAJO, M. G. Ontogenia foliar de três espécies de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) ocorrentes no Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.1, p.71-77, 2004.
- BIERE, S.; BRACHET, A.; VEUTHEY, J. V.; CHRISTEN, P. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 439–447, 2006.

BOIAGENCY. **Apoptose e Inflamação**. Bioagency 2010. Disponível em: <<http://www.bioagency.com.br>>. Acesso em: 01 out. 2010.

BRACHET, A.; MUNÔZ, O.; GUPTA, M.; VEUTHEY, J. L.; CHRISTEN, P. Alkaloids of *Erythroxylum lucidum* stem-bark. **Phytochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1439-1442, 1997.

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

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010

BRIGMANN, G.; GUENTH, C.; MUEHLBACHERA, J.; GUNATHILAKE, M. D. L.P.; WICKRAMASINGHE, A. Tropane alkaloids from *Erythroxylum zeylanicum* O.E. Schulz (Erythroxylaceae). **Phytochemistry**, v. 53, p. 409-416, 2000.

BROCK, A.; BIERI, S.; CHRISTEN, P.; DRAGER, B. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1231–1240, 2005.

CANO, J. H. VOLPATO, G. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 293–316, 2004.

CASSADY J.M.; DOUROS J.D. **Anticancer Agents Based on Natural Product Models**, Academic Press, New York, 1980.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J. L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K., MEDEMA, R.; KROEMER, G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, p. 2825–2837, 2004.

CHAVES, C. G.; SCAHPOVAL, E. E. S.; ZUANAZZI, J. A.; DIEHL, E.; SIQUEIRA, N. C. S.; HENRIQUES, A. T. *Erythroxylum argentinum*: assays for anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 117 – 120, 1988.

CHAVEZ, J. P. SANTOS, I. D.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal* Costae. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 941-943, 1996.

CHAVEZ, D.; CUI, B.; CHAI, H-B.; GARCIA, R.; MEIJA, M.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Reversal of multidrug resistance by tropane alkaloids from the stems of *Erythroxylum rotundifolium*, **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 606-610, 2002

CHIN, Y. W.; JONES, W. P.; WAYBRIGHT, T. J.; MCCLOUD, T. G.; RASOANAIVO, P.; CRAGG, G. M.; CASSADY, J. M.; KINGHORN, A. D. Tropane aromatic ester alkaloids from a large-scale re-collection of *Erythroxylum pervillei* stem bark obtained in Madagascar. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 414-417, 2006.

CHRISTEN, P.; ROBERTS M. F.; J.; PHILLIPSON, D.; EVANS, W. C. Alkaloids of *Erythroxylum monogynum* root-bark. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 1053-1056, 1995.

COLODEL, M. E.; SEITZ, A. L.; SCHMITZ, M.; BORBA, M. R.; RAYMUNDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Intoxicação por *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 165-168, 2004.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-79, 2005.

DALY, D. Erythroxylaceae. In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HELAD, S. V. **Flowering Plants of Neotropics**. USA, The New York Botanical Garden. Princeton University Press. 2004, Pp.143-145

DIMRI, G. P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, v. 7, n. 6, p. 505–512, 2005.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495 – 516, 2007.

FERRONATO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae) **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n. 2, p. 224-230, 2007.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência**, n.7, 2006.

FONSECA; S. G. C.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P. Lapachol: química, farmacologia e métodos de dosagem. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, n. 1, p. 9-16, 2003.

FORMARIZ, T. P.; WANCZINSKI, B. J.; SILVA JÚNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; Oliveira, A. G.. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**, v.16, n. 1-2, 2004.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144 -149, 2008.

FULDA, S. Evasion of Apoptosis as a Cellular Stress Response in Cancer. **International Journal of Cell Biology**, p.1-6, 2010.

GALDERISI, U.; JORI, F. P.; GIORDANO, A. Cell cycle regulation and neural differentiation. **Oncogene**, v. 22, p. 5208–5219, 2003.

GERL, R. VAUX, D. L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 2, p. 263 -270, 2005.

GOOLDMAN, L.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, c1996. 1436 p.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; VÉLEZ-CASTRO, H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, K. L.; PAYO-HILL, A. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 539 -542, 2006

GRIFFIN, W. J.; LIN, G. D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane Alkaloids. **Phytochemistry**, v. 53, p. 623-637, 2000.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUIMARAES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HARRINGTON, K. J. Biology of cancer. **Medicine**, v. 36, n. 1, p. 1-4, 2007.

HIPPERT, M. M.; O'TOOLE, P. S.; THORBURN, A. Autophagy in Cancer: Good, Bad, or Both? **Cancer Research**, v. 66, p. 9349-9351, 2006.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v.33, n.10, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 04 out. 2010.

_____. **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil Rio de Janeiro: INCA, 2009. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa>>. Acesso em: 04 out. 2010.

JOHNSON, E. L. Alkaloid content in *Erythroxylum coca* tissue during reproductive development. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 35-38, 1996.

JOHNSON, E. L.; SCHMIDT, W. F., NORMAN, H. A. Flavonoids as markers for *Erythroxylum* Taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxillense*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.26, p. 743-759, 1998.

JOHNSON, E. L.; SAUNDERS, J. A.; MISCHKE, S.; HELLING, C. S.; EMCHEET, S. D. Kaempferol (rhamnosyl) glucoside, a new flavonol from *Erythroxylum coca*. var. *ipadu*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 59-67, 2003.

KANCHANAPOOM, T.; NOIARSA, P.; TIENGTHAM, P.; OTSUKA, H.; RUCHIRAWAT, S. Acetophenone Diglycosides from *Erythroxylum cambodianum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin.**, v. 53, n. 5, p. 579 -581, 2005.

KELLAND, L. Targeting the Limitless Replicative Potential of Cancer: The Telomerase/Telomere Pathway. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 17, 2007.

KHATTAK, K. F. ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, M. I.; HEMALAL, K. D.; TILLEKERATNE, L. M. New Tropane Alkaloids from *Erythroxylum moonii*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 929-931, 2002.

LIANG, C. Negative regulation of autophagy. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, p.1807-1815, 2010.

LOIOLA, M. I.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; QUEIROZ, R. T. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 473-487, 2007.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. **Molecular Cancer Research**, v. 4, p. 221-233, 2006.

MANABE, H. Effects of Catuaba extracts on microbial and HIV infection. **In Vivo**, v. 6, n. 2, p. 161-165, 1992.

MANTOVANI, A. Inflaming metastasis. **Nature**, v. 457, p. 36, 2009.

MARTINEZ-HORMAZA, I.; QUINTERO-RODRÍGUEZ, G.; MÁRQUEZ-MONTIEL, L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; ÁLVAREZ-REYES, A.; ZARRAGOITÍA, A. Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de *Erythroxylum confusum* Britt. mediante el Método de la *Artemia salina*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 429-431, 2006.

MARTINEZ, S. T.; ALMEIDA, M. R.; PINTO, A. C. Alucinógenos naturais: um vôo da Europa medieval ao Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2501-2507, 2009.

MARTINEZ, M. M.; REIF, R. D.; PAPPAS, D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. **Analytical Methods**, v. 2, p. 996-1004, 2010.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; SONODA, M.; IWASA, K.; KATO, A.; JUMA, F. D.; MATHENGE, S. G.; MUTISO, P. B. C. Tropane alkaloids from *Erythroxylum emarginatum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, p. 56-58, 2007.

OLIVEIRA, S. L.; SILVA, M.S.; TAVARES, J. F.; SENA-FILHO, J. G.; LUCENA, H. F. S.; ROMERO, M. A. V.; BARBOSA-FILHO, J. M. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum* Genus: Distribution and Compilation of ¹³C-NMR Spectral Data. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 302 - 326, 2010.

PAN, J.; JIN, P.; YAN, J.; KABELITZ, D. Anti-angiogenic active immunotherapy: a new approach to cancer treatment. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 57, p. 1105-1114, 2008.

PAYO-HILL, A. L.; DOMINGUEZ, R. S.; SUAREZ, M.O.; BATISTA-BAEZ, M.; VELEZ CASTRO, H.T.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R.. Tropane alkaloids from the leaves and stem bark of *Erythroxylon alaternifolium* and *Erythroxylon rotundifolium*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 927-932, 2000.

PERES, C. M.; CURY, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283p.

PERIK, P. J.; VRIESB, E. G.; GIETEMAB, J. A.; VAN DER GRAAF, W. T. A.; SLEIJFER, D. T.; SUURMEIJER, A. J.H.; VELDHUISEN, D.J. V. The dilemma of the strive for apoptosis in oncology: mind the heart. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 53, p. 101–113, 2005.

PLOWMAN, T.; BERRY, P. **Erythroxylaceae**. In: J. Steyermark, P. Berry, B. Holst & K. Yatskievych, editors. *Flora of the Venezuelan Guayana*, v. 5, p. 59–71. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. 1999

RAHMAN, A. U.; KHATTAK, K. F.; NIGHAT, F.; SHABBIR, M.; HEMALAL, K. D.; TILLEKERATNE, L. M. Dimeric tropane alkaloids from *Erythroxylum moonii*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 2, p. 377-383, 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 829p.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 1–13, 2003.

RODEIRO, I.; DONATO, M. T.; LAHOZ, A.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J.A.; LAGUNA, A.; CASTELL, J.V.; DELGADO, R.; M.J.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Modulation of P450 enzymes by Cuban natural products rich in polyphenolic compounds in rat hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 172, p. 1-10, 2008a.

RODEIRO, I.; DONATO, M.T.; MARTÍNEZ, I.; HERNÁNDEZ, I.; GARRIDO, G.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J.A.; MENÉNDEZ, R.; LAGUNA, A.; CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Potential hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1242–1249, 2008b.

SANTOS, C. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Micromolecular secondary metabolites of *Erythroxylum barbatum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p. 661–664, 2003.

SANTOS, C. C.; LIMA, M. A. S.; BRAZ-FILHO, R.; SIMONE, C. A.; SILVEIRA, E. R. NMR assignments and X-ray diffraction spectra for two unusual kaurene diterpenes from *Erythroxylum barbatum*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 1012-1015, 2005.

SIEMANN, D. W. Vascular targeting agents. **Horizons in Cancer Therapeutics: From Bench to Bedside**. v.3, n.2, p. 4-15. 2002

SILVA, G. L.; Cui, B.; CHÁVEZ, D.; YOU, M.; CHAI, H.B.; RASOANAIVO, P.; LYNN, S. M.; O'NEILL, M. J.; LEWIS, J. A.; BESTERMAN, J. M.; MONKS, A.; FARNSWORTH, N. R. CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Modulation of the Multidrug-Resistance Phenotype by New Tropane Alkaloid Aromatic Esters from *Erythroxylum pervillei*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p.1514-1520, 2001

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR J. P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M. S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572-577, 2007.

SOOBRAATTEE, M. A.; BAHORUN, T.; NEERGHEEN, V. S.; GOOGOLLYE, K.; ARUOMA, O. I. Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 45-56, 2008.

TEIXEIRA, M. Explicação diversa para a origem do câncer, com foco nos cromossomos, e não nos genes, ganha corpo no *establishment* científico. **Revista Latinoamericana Psicopatologia Fundamnetal**, v. 10, n. 4, p. 664-676, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, **Cell Proliferation**, v. 36, p. 131-149, 2003.

WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 864p.

ZANOLARI, B.; WOLFENDER, J.-L.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F.; PAULO M.Q.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography–UV detection–multiple mass spectrometry and liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1020, p.75-79, 2003a.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. Q.; HOSTETTMANN, K. Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 497-502, 2003b.

ZUANAZZI, J. A. S.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil, **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 819-825, 2001

Capítulo II

4 ARTIGO CIENTÍFICO I

Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman

Artigo publicado **Chemistry & Biodiversity**

Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* PLOWMAN

by Steno L. de Oliveira^{a)}, Josean E. Tavares^{a)}, Marianna V. S. Castello Branco^{a)},
 Hellane F. S. Lucena^{a)}, José M. Barbosa-Filho^{b)}, Maria de F. Agra^{a)}, Silene C. do Nascimento^{b)},
 Jaciana dos S. Aguiar^{b)}, Teresinha G. da Silva^{b)}, Carlos A. de Simone^{c)}, João X. de Araújo-Júnior^{c)},
 and Marcelo S. da Silva^{a, d)}

^{a)} Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, C. P. 5009, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil
 (phone : +55 83 32167427; fax: + 55 83 3216 7365; marcelosobral@lft.ufpb.br)

^{b)} Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^{c)} Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió, AL, Brazil

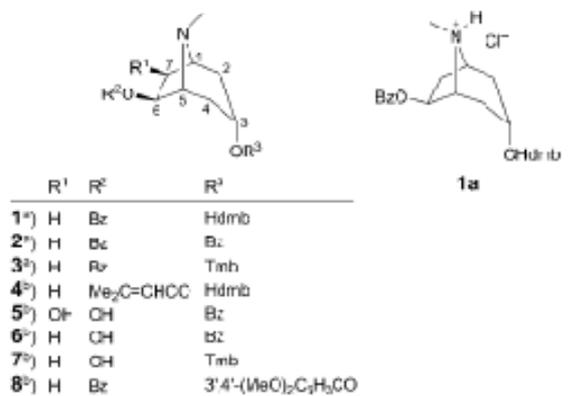
^{d)} ESENFAR, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió, AL, Brazil

Three tropane alkaloids, **1–3**, were isolated from *Erythroxylum caatingae*, i.e., 6 β -benzoyloxy-3 α -[(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyl)oxy]tropane (**1**), a new tropane alkaloid, along with the known alkaloids 3 α ,6 β -dibenzoyloxytropane (**2**) and 6 β -benzoyloxy-3 α -[(3,4,5-trimethoxybenzoyl)oxy]tropane (catuabine B; **3**). Their structures were determined by 2D- (¹H and ¹³C) NMR. By LC/ESI-MS/MS analysis of the fractions of alkaloids **1–3**, it was possible to detect five more alkaloids, **4–8**, two of these, **4** and **8**, possibly being new natural products. X-Ray crystallography of the chloride derivate of **1**, i.e., 6 β -benzoyloxy-3 α -(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyloxy)tropane hydrochloride (**1a**) confirmed the structure of **1**. Cytotoxicity was tested against the cell lines HEP-2, NCI-H292, and KB for the MeOH extract and alkaloid **3**, and antitumor activity was tested against Sarcoma 180 only for the MeOH extract.

Introduction. – The family Erythroxylaceae comprises four genera and ca. 240 species with pantropical distribution, with its main centers of diversity and endemism in Venezuela, Brazil, and Madagascar. The Erythroxylaceae consist of the genera *Aneulophus*, *Erythroxylum*, *Nectaropetalum*, and *Pinacopodium*, where *Erythroxylum* is the largest and most representative genus, with ca. 230 species and wide distribution in the tropical regions of the world, and South America is the center of diversity and endemism. *Erythroxylum caatingae* is a species with distribution restricted to the Northeast Brazil, being only recorded for the states of Bahia, Ceara, Paraíba, Pernambuco, and Rio Grande do Norte [1].

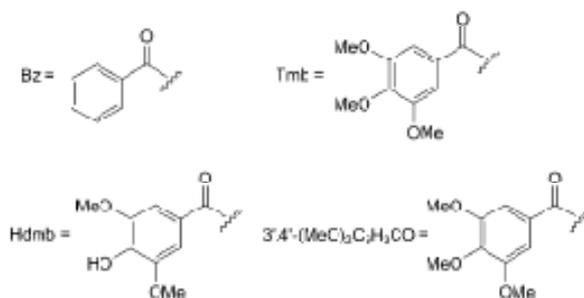
Tropane alkaloids occur frequently in the families Convolvulaceae, Erythroxylaceae, Proteaceae, Rhizophoraceae, and Solanaceae and have occasionally been reported in plants of the families Brassicaceae, Euphorbiaceae, and Oleaceae [2]. Recently, 17 tropane alkaloids were reported from *E. vacciniifolium*, collected in Paraíba (Brazil) [3][4]. Studies with the CHCl₃ extract of *E. pervillei* and *E. rotundifolium* revealed cytotoxicity against the multidrug-resistant (MDR) cell line KB-V1 in the presence of vinblastine [2–5]. Recently, we described a new trachylobane diterpene and its cytotoxicity against V79 cells and rat hepatocytes [6]. As part of a continuing investigation of new bioactive molecules from plants of Paraíba (Brazil), we describe here the isolation and structural identification of three tropane alkaloids,

among which 6 β -benzoyloxy-3 α -(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyloxy)tropane (**1**) is a new tropane alkaloid, whereas 3 $\alpha,6\beta$ -dibenzoyloxytropane (**2**) and 6 β -benzoyloxy-3 α -(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)tropane (catuabine B; **3**) are known compounds. The hydrochloride of **1**, i.e., **1a**, was obtained by acidification with HCl. Furthermore, it was possible to detect, in the fractions of alkaloids **1–3**, five additional alkaloids, **4–8**, partially characterized by LC/ESI-MS/MS. Cytotoxicity of the MeOH extract and alkaloid **3** against HEP-2, NCI-H292, and KB cells, and *in vivo* antitumor activity of the MeOH extract of *E. caatingae* in the presence of methotrexate were determined.



^{a)} Compounds identified by NMR.

^{b)} Compounds partially identified by LC/ESI-MS/MS



Results and Discussion. – Compound **1** was isolated as an amorphous solid, with a melting point of 220–223°. HR-MS exhibited a molecular ion at m/z 442.1848 ($[M+H]^+$; calc. 442.1866), compatible with the molecular formula $C_{24}H_{27}NO_7$. The IR spectrum showed absorptions at 3425 (OH), and 1724 and 1277 cm^{-1} characteristic of an ester group. The ^{13}C -NMR spectrum of **1** showed signals at $\delta(C)$ 60.1 (C(1)), 65.7 (C(5)), and 40.1 (MeN), characteristics of a tropane skeleton. In addition, the signals at $\delta(C)$ 67.3 and 79.7 are compatible with the tropane skeleton substituted at C(3) and C(6) [7]. The HSQC spectrum showed direct correlations between $\delta(C)$ 60.1 (C(1)) and $\delta(H)$ 3.45 (H–C(1)), and 65.7 (C(5)), and 3.43 (H–C(5)). The presence of two COO groups was supported by the signals at $\delta(C)$ 165.5 and 166.0. The 1H -NMR

spectra revealed signals of two O-bearing CH groups at $\delta(\text{H})$ 5.34 ($\text{H}_\beta\text{-C}(3)$) and 5.93 ($\text{H}_\alpha\text{-C}(6)$), two O-bearing CH groups at $\delta(\text{H})$ 3.45 ($\text{H-C}(1)$) and 3.43 ($\text{H-C}(5)$), three O-bearing CH_2 groups at $\delta(\text{H})$ 2.29 and 2.37 ($\text{H}_{\alpha\alpha}\text{-C}(2)$ and $\text{H}_{\alpha\alpha}\text{-C}(4)$, resp.), 1.82 and 2.03 ($\text{H}_{\alpha\alpha}\text{-C}(2)$ and $\text{H}_{\alpha\alpha}\text{-C}(4)$, resp.), and 2.33 and 2.82 ($\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$ and $\text{H}_\beta\text{-C}(7)$, resp.), and a MeN group at $\delta(\text{H})$ 2.46. The complete assignment of all the C- and H-atoms is compiled in Table 1. The relative configuration of **1** was established by the signal at $\delta(\text{H})$ 5.34 (br. *t*, $\text{H-C}(3)$) with a coupling constant of $J = 5.0$ Hz indicating the α -orientation of the substituent at C(3) [3]. On the other hand, the relative configuration of the substituent at C(6) was established by the analysis of multiplicity and of the coupling constants of $\text{H-C}(6)$. $\text{H-C}(6)$ ($\delta(\text{H})$ 5.93) showed two couplings (*dd*, $J = 3.0, 7.5$) with the two H-atoms with signals at $\delta(\text{H})$ 2.82 and 2.33 ($\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$ and $\text{H}_\beta\text{-C}(7)$, resp.) and did not show any coupling with the signal of $\text{H-C}(5)$ ($\delta(\text{H})$ 3.43). This observation is in line with the β -orientation of the substituent, and a dihedral angle of 90° between H-atoms $\text{H-C}(5)$ and $\text{H}_\alpha\text{-C}(6)$ [3]. These data were corroborated by X-ray crystallography of **1a** (Figs. 1 and 2). The chemical shifts $\delta(\text{H})$ 8.01 (*dd*, $J = 1.0, 7.5$, $\text{H-C}(2''\text{,}6'')$), 7.43 (*t*, $J = 7.5$, $\text{H-C}(3'',5'')$), and 7.55 (*t*, $J = 7.5$, $\text{H-C}(4'')$) are characteristic of a benzoyloxy (BzO) group. The chemical shifts at $\delta(\text{H})$ 7.32 (*s*, $\text{H-C}(2',6')$) and

Table 1. NMR Data for Compound **1**^{a)}

Position	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$	HMBC	$^1\text{H}/^1\text{H-COSY}$
1	60.12	3.45 (<i>m</i>)	Me	
2 _{α}	34.59	2.29 (<i>m</i>)	H-C(7)	H-C(1)
2 _{η}		1.82 (br. <i>d</i> , $J = 15.0$)		
3 _{β}	67.28	5.34 (br. <i>t</i> , $J = 5.0$)	H-C(2)/H-C(4)	
4 _{α}	33.25	2.37 (<i>m</i>)		
4 _{η}		2.03 (br. <i>d</i> , $J = 15.0$)		
5	65.74	3.43 (<i>m</i>)	Me/H-C(3)/H-C(7)	H-C(4)
6 _{α}	79.69	5.93 (<i>dd</i> , $J = 3.0, 7.5$)	H-C(7)	
7 _{α}	36.73	2.82 (<i>dd</i> , $J = 7.5, 14.0$)		
7 _{β}		2.33 (<i>m</i>)		
1'	121.15		H-C(2'')/H-C(6'')	
2'	106.55	7.32 (<i>s</i>)	H-C(6')	
3'	146.97		MeO/H-C(2)	
4'	139.60			
5'	146.97		MeO/H-C(6')	
6'	106.55	7.32 (<i>s</i>)	H-C(2')	
7'	165.46		H-C(3)	
1''	130.28		H-C(3'')/H-C(5'')	
2''	129.46	8.01 (<i>dd</i> , $J = 1.0, 7.5$)	H-C(4'')/H-C(6'')	H-C(3)
3''	128.34	7.43 (<i>t</i> , $J = 7.5$)	H-C(5'')	H-C(2)
4''	132.92	7.55 (<i>t</i> , $J = 7.5$)	H-C(2'')/H-C(6'')	
5''	128.34	7.43 (<i>t</i> , $J = 7.5$)	H-C(3'')	H-C(6)
6''	129.46	8.01 (<i>dd</i> , $J = 1.0, 7.5$)	H-C(2'')/H-C(4'')	H-C(5)
7''	166.00		H-C(2'')/H-C(6'')	
MeN	40.07	2.46 (<i>s</i>)		
MeO	56.50	4.00 (<i>s</i>)		

^{a)} CDCl₃; at 500 MHz for $^1\text{H-NMR}$ and 125 MHz for $^{13}\text{C-NMR}$.

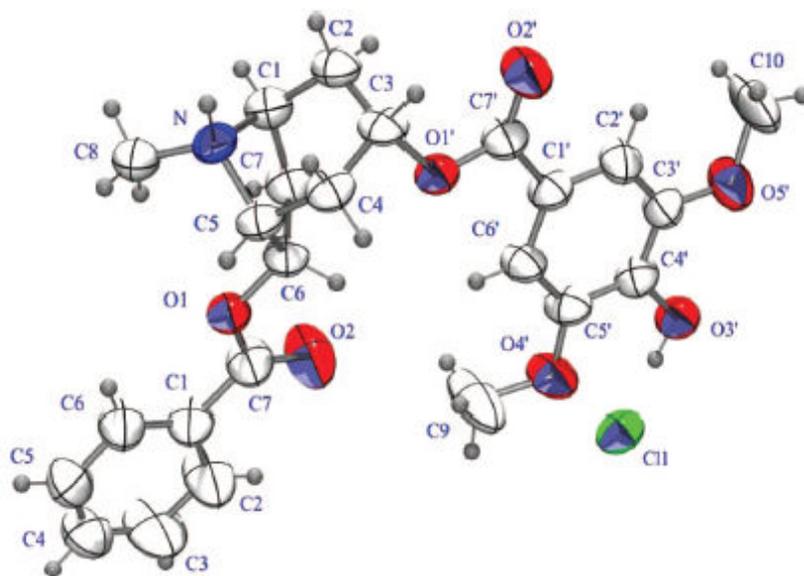


Fig. 1. An ORTEP3 projection of the molecule **1a**, showing the atom numbering and displacement ellipsoids at the 50% probability level

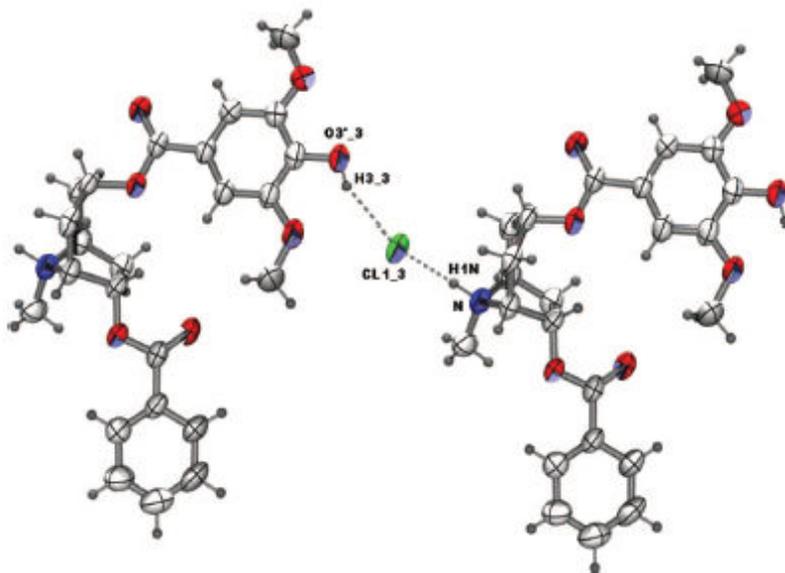


Fig. 2. H-Bonding interactions in the crystal packing

4.00 (2 MeO) are characteristic of a 3',5'-dimethoxybenzoyloxy (Hdmb) group. The HMBC spectrum showed correlations between C(3') and C(5') ($\delta(C)$ 147.0) and MeO groups ($\delta(H)$ 4.00). Therefore, compound **1** was identified as 6 β -benzoyloxy-3 α -(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyloxy)tropane, a new tropane alkaloid.

Compound **1a** was obtained as white crystals, with a melting point of 196–198°. Analysis of the 1H - and ^{13}C -NMR data showed chemical shifts compatible with a 3,6-disubstituted tropane skeleton. Unlike alkaloid **1**, derivative **1a** showed chemical shifts for H–C(1) at $\delta(H)$ 4.11 and H–C(5) at $\delta(H)$ 4.12. These chemical shifts are compatible with those of cocaine hydrochloride [8] (Table 2). The structure of **1a** was established by X-ray crystallography (Figs. 1 and 2).

Table 2. NMR Data for Compounds **1a**, **2**, and **3**^{a)}

Position	1a		2		3	
	$\delta(C)$	$\delta(H)$	$\delta(C)$	$\delta(H)$	$\delta(C)$	$\delta(H)$
1	67.18	4.11 (br. s)	59.92	3.42 (m)	60.03	3.43 (m)
2 _{ax}	33.02	2.40 (br. d, $J=15.5$)	34.65	2.26 (m)	34.66	2.26 (m)
2 _{eq}				1.82 (br. d, $J=15.0$)		1.83 (br. d, $J=15.0$)
3 _β	64.48	5.46 (br. t, $J=4.5$)	67.57	5.34 (br. t, $J=5.0$)	67.65	5.34 (br. t, $J=5.0$)
4 _{ax}	34.14		33.16	2.29 (m)	33.31	2.33 (m)
4 _{eq}		2.20 (br. d, $J=16.0$)		2.06 (br. d, $J=15.0$)		2.03 (br. d, $J=15.0$)
5	63.10	4.12 (br. s)	65.85	3.39 (br. s)	65.74	3.42 (m)
6 _α	35.40	6.09 (dd, $J=3.0, 8.0$)	80.10	5.87 (dd, $J=3.0, 7.5$)	79.84	5.92 (dd, $J=3.0, 7.0$)
7 _α	74.85	3.19 (dd, $J=8.0, 15.0$)	36.16	2.78 (dd, $J=7.5, 14.5$)	36.69	2.80 (dd, $J=7.0, 15.0$)
7 _β		2.51 (m)		2.33 (m)		2.30 (m)
		Hdmb		Bz		Tmb
1"	119.75		130.41		125.38	
2", 6"	106.58	7.35 (s)	129.50	8.11 (dd, $J=1.5, 8.0$)	106.63	7.39 (s)
3", 5"	147.12		128.58	7.49 (t, $J=8.0$)	153.13	
4"	140.25		133.00	7.58 (m)	153.13	
7"	164.98		165.70		165.32	
		Bz		Bz		Bz
1"	128.51		130.37		130.31	
2", 6"	129.44	7.98 (br. d, $J=7.5$)	129.48	8.03 (dd, $J=1.5, 8.0$)	129.48	8.02 (dd, $J=1.5, 8.5$)
3", 5"	128.67	7.49 (t, $J=7.5$)	128.32	7.43 (t, $J=8.0$)	128.35	7.42 (t, $J=8.0$)
4"	133.89	7.63 (t, $J=7.0$)	132.89	7.53 (m)	132.94	7.55 (t, $J=7.5$)
7"	165.10		166.37		166.05	
MeN	40.34	3.10 (s)	40.11	2.60 (s)	40.16	2.60 (s)
m-MeO					56.31	3.98 (s)
p-MeO	56.41	4.00 (s)			60.89	3.92 (s)

^{a)} CDCl₃; at 500 MHz for 1H -NMR and 125 MHz for ^{13}C -NMR.

Compound **2** was isolated as white crystals, with a melting point of 119–121°. The MS showed a molecular-ion peak of m/z 366.1 ($[M+H]^+$), compatible with the molecular formula C₂₂H₂₃NO₄. The 1H - and ^{13}C -NMR spectra exhibited chemical-shift values similar to those for **1** (Table 1), the chemical shifts of which are in line with a tropane skeleton disubstituted at C(3) and C(6). The principal difference between the

NMR data of compounds **1** and **2** is the type of substituent at C(3). The signals at $\delta(\text{H})$ 8.11 (*dd*, $J = 1.5, 8.0$, H–C(2',6')), 7.49 (*t*, $J = 8.0$, H–C(3',5')), and 7.58 (*t*, $J = 7.5$, H–C(4')) are compatible with a BzO group at C(3) (Table 2). The HMBC spectrum showed long-range correlations between signals at 165.7 with 5.34 (H _{β} –C(3)), and 166.4 with 5.87 (H–C(6)), defining the chemical shifts of the CO groups C(7') and C(7''), respectively. Thus, compound **2** was identified as 3 α ,6 β -dibenzoyloxytropine.

Compound **3** was isolated as white crystals, with a melting point of 154–157°. The MS showed a molecular-ion peak of m/z 456.1 ($[M+H]^+$), compatible with the molecular formula C₂₂H₂₉NO₇. The ¹H- and ¹³C-NMR spectra of this alkaloid also displayed chemical-shift values similar to those for alkaloids **1** and **2**, but the signals at 7.39 (*s*, 2 H), 3.98 (*s*, 6 H), and 3.92 (*s*, 3 H) indicated that the substituent at C(3) is a 3,4,5-trimethoxybenzoyloxy group (Table 2). The HMBC spectrum showed correlations between the signals of C(7') ($\delta(\text{C})$ 165.3) and H–C(3) ($\delta(\text{H})$ 5.34), and between the signals of C(7'') ($\delta(\text{C})$ 166.1) and H–C(6) ($\delta(\text{H})$ 5.92). The relative configuration of **3** was assigned as in compound **1**. Thus, the structure of compound **3** is 6 β -benzoyloxy-3 α -(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)tropine (catuabine B).

The ¹H- and ¹³C-NMR spectra of the fractions of alkaloids **1–3** showed the presence of other constituents in smaller proportions. In an attempt to identify these constituents, these fractions were analyzed by LC/ESI-MS/MS (Table 3). Supported by the fragmentation model of alkaloid **1** (Scheme), it was possible to partially identify alkaloids **4–8**. The selective MS² of the three fractions analyzed showed ions at m/z 140.1 and 122.2, suggesting the presence of disubstituted tropane alkaloids [9]. The chromatogram of total ions of fraction of **1**, showed three peaks, with the molecular-ion peaks at m/z 420.1, 442.1, and 366.1, where the largest component ion, with the peak at m/z 442.1, was identified as alkaloid **1**. The MS² experiment of the ion with the peak at m/z 420.1 resulted in the formation of ions with peaks at m/z 320.2 and 222.1, among others. These fragments [420.1 → 320.2] and [420.1 → 222.1] are compatible with the loss of the Me₂CCHCO and Hdmb substituents from the tropane ring, respectively, suggesting the molecular formula C₂₂H₂₉NO₇ for compound **4**. Similarly, for fraction of **2**, the chromatogram of total ions showed three peaks with molecular-ion peaks at m/z 278.1, 262.1, and 366.1, where the largest component ion, with the peak at m/z 366.1, was identified as alkaloid **2**. The MS² experiment of the ion with the peak at m/z 278.1 resulted in the formation of ions with peaks at m/z 156.1 and 138.1, among others. These fragments [278.1 → 156.1 → 138.1] are compatible with the loss of the BzO and OH substituents, respectively, suggesting the molecular formula C₁₅H₁₉NO₄ for compound **5**. The MS² experiment of ion with the peak at m/z 262.1 resulted in the formation of ions with peaks at m/z 140.1 and 122.2, among others. These fragments [262.1 → 140.1 → 122.1] are compatible with the loss of the BzO and OH substituents, suggesting the molecular formula C₁₅H₁₉NO₃ for compound **6**. The chromatogram of total ions of fraction of **3**, showed four peaks with molecular-ion peaks at m/z 262.1, 352.1, 426.1, and 456.1, where the largest component ion, with the peak at m/z 456.1, was identified as alkaloid **3**. The MS² experiment of the ion with the peak at m/z 352.1 resulted in the formation of ions with peaks at m/z 195.0 and 140.2, among others. The fragment [352.1 → 140.2] is compatible with the loss of the substituent Tmb, thus suggesting the molecular formula C₁₀H₁₁NO₄ for compound **7**. The MS² experiment of the ion with the peak at m/z 426.1, resulted in the formation of ions with peaks at m/z 304.1 and 122.2,

among others. These fragments [426.1 → 304.1 → 122.2] are compatible with the loss of the BzO and Dmb substituents, suggesting the molecular formula $C_{24}H_{27}NO_6$ for compound **8**. Thus, of the alkaloids only partially characterized, **4** and **8** are possibly new natural products.

Scheme. Proposed Fragmentation of Alkaloid **1**

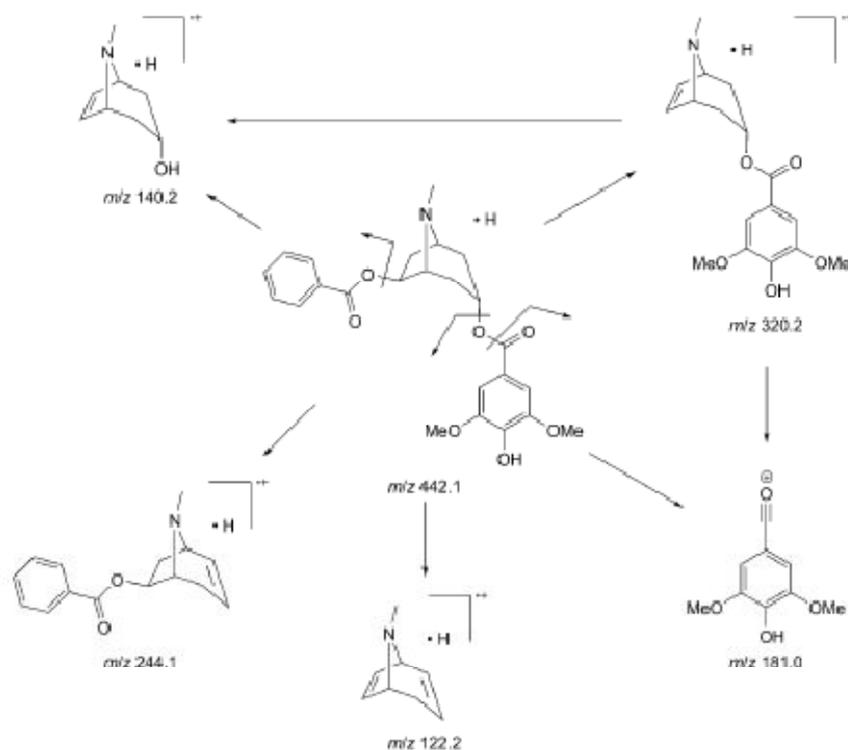


Table 3. LC/MS/MS Data for Each Ion Analyzed and Its Fragmentations

Alkaloid	Peak No.	M^+	MS^2 Fragments
1	1	420	320, 222, 181, 140, 122
	2	442	320, 244, 181, 140
	3	366	244, 122
2	1	278	156, 138, 94
	2	262	140, 122, 91
	3	366	244, 122
3	1	262	140, 105
	2	352	195, 140, 122
	3	426	244, 165, 140, 122
	4	456	244, 195, 167

The cytotoxic activities of the MeOH extract of *Erythroxylum caatingae* stems and alkaloid **3** were evaluated against human cancer cell lines (HEp-2, NCI-H292, and KB). Alkaloid **3** exhibited significant cytotoxicity only against NCI-H292 ($IC_{50} = 50 \mu\text{g/ml}$), and the MeOH extract of *E. caatingae* stems was inactive against all cell lines tested ($IC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$).

The effects of MeOH extract of *E. caatingae* stems on mice transplanted with Sarcoma 180 are shown in Table 4. There was a significant reduction in tumor weight in animals treated with different doses. These reductions gave tumor inhibition percentages of 59.4 to 66.4%. The MeOH extract tested showed IC_{50} values greater than $10 \mu\text{g/ml}$ for all tumor cell lines tested, suggesting that the *in vivo* anticancer properties were not related to direct antiproliferative effects.

Table 4. *In vivo* Antitumor Activity against Sarcoma 180 Using MeOH Extract of *Erythroxylum caatingae* Stems^{a)}

Compound	Dose [mg/kg]	Weight of tumor [g]	Inhibition [%]
MeOH extract of stems	100	0.698 ± 0.05	59.4
	200	0.577 ± 0.10	66.4
	400	0.614 ± 0.11	64.3
Methotrexate	2.5	0.659 ± 0.08	61.7
Control	–	1.718 ± 0.20	–

^{a)} Data are presented as means ± SEM for seven animals. *: $P < 0.05$ compared with control group.

The authors thank the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for financial support, *Vicente Carlos de O. Costa* (UFPB) for the NMR spectra, and *Norberto P. Lopes* (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto) for recording the mass spectra. The *Escola de Enfermagem e Farmácia/Instituto de Química e Biotecnologia* (UFAL) helped carry out the X-ray crystallography. Mr. *P. Wehrung* of the *Plateforme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg* (PCBiS) IFR 85 and Mrs. *M. Schmitt*, *Laboratoire de Pharmacochimie, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, F-67400 Illkirch*, helped to perform the LC/ESI-MS/MS.

Experimental Part

General. M.p.: *Microquímica* digital melting-point apparatus, model *MQAPF-302*, with the Pt block in a *REICHERT Kofler*-type light microscope, model *R3279*, with a temp. that varies from 0 to 350°; values uncorrected. IR Spectra: *BOMEM SERIE 100 MB* spectrometer, in the range of 4000–400 cm^{-1} , with KBr pellets (0.5 mg of the sample/100 mg of KBr). NMR Spectra: *VARIAN-NMR SYSTEM* spectrometer, operating at 500 MHz for ^1H and at 125 MHz for ^{13}C ; recorded in CDCl_3 , with TMS as internal standard. LC/ESI-MS/MS: *HPLC Agilent 1200RRLC* and *Bruker HCT Ultra* mass spectrometer. X-Ray crystallography: *Enraf-Nonius Kappa-CCD* diffractometer.

Plant Material. The stems of *Erythroxylum caatingae* were collected in Picui, Paraíba, Brazil. The botanical material was identified by *M. F. A.* A dried specimen was deposited with the Herbario Prof. *L. P. Xavier* (JPB), Universidade Federal da Paraíba, under the identification label AGRA 5666.

Extraction and Isolation. The crude MeOH extract (500 g) was dissolved in H_2O and defatted with hexane. The defatted aq. extract was acidified with 3% HCl by mechanical mixing and filtered through *Celite*, yielding a residue that was discarded and an acidic soln. This acidic soln. was extracted with CHCl_3 ($3 \times 500 \text{ ml}$) resulting in an acidic CHCl_3 phase and an aq. phase that was neutralized to pH 7.0 with NH_4Cl . The aq. phase at pH 7.0 was then extracted with CHCl_3 to yield an aq. phase and basic CHCl_3 .

phase *FAT* (4.0 g), which was submitted to column chromatography (CC) utilizing SiO_2 as the stationary phase, and CHCl_3 and MeOH as the eluents alone or in binary mixtures with increasing polarity. The result were 55 fractions of 100 ml. The 55 fractions were monitored by TLC, eluted with various solvent systems (CHCl_3 and/or $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ in order of increasing polarity) in chambers pre-saturated with NH_3 vapor, revealed with *Dragendorff's* reagent, and placed in 21 groups based on their R_f values. Frs. 25, 45, and 46 were submitted to repeated recrystallization with acetone and Et_2O , to yield compounds **1**, **2**, and **3**. Compound **1** was acidified with HCl to yield the alkaloid hydrochloride, referred to as **1a**.

6 β -Benzoyloxy-3 α -(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyloxy)tropane (= (3S,6S)-8-Methyl-6-[(phenylcarbonyloxy]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate; 1). White crystals. IR (KBr): 3425 (OH), 1724 (C=O), 1277. ^1H - and ^{13}C -NMR: see Table 1. ESI-MS: 442 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 320 ($[\text{M}-\text{BzOH}]^+$), 244 ($[\text{M}-\text{HdmbOH}]^+$), 181 ($[\text{M}-\text{BzOH}-\text{C}_6\text{H}_5\text{ON}]^+$), 140 ($[\text{M}-\text{HdmbOH}-\text{C}_7\text{H}_5\text{O}]^+$).

3 α ,6 β -Dibenzoyloxytropane (= (3S,6S)-8-Methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-3,6-diyl Dibenzoate; 2). White crystals. IR (KBr): 1724 (C=O), 1600–1585 (C=C). ^1H - and ^{13}C -NMR: see Table 2. ESI-MS: 366 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 244 ($[\text{M}-\text{BzOH}]^+$), 122 ($[\text{M}-\text{BzOH}-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}]^+$).

Catuabine B (= 6 β -Benzoyloxy-3 α -(3,4,5-trimethoxybenzyloxy)tropane (= (3S,6S)-8-Methyl-6-[(phenylcarbonyloxy]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl 3,4,5-Trimethoxybenzoate; 3). White crystals. IR (KBr): 1709 (C=O), 1600–1585 (C=C), 1281. ^1H - and ^{13}C -NMR: see Table 2. ESI-MS: 456 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 334 ($[\text{M}-\text{BzOH}]^+$), 244 ($[\text{M}-\text{BzOH}-3\text{MeO}]^+$), 195 ($[\text{M}-\text{BzOH}-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}]^+$).

*X-Ray Crystallographic Analyses*¹⁾. X-Ray diffraction data collections were performed on an *Enraf-Nonius Kappa-CCD* diffractometer (95-mm CCD camera on κ -goniostat) using graphite monochromated $\text{MoK}\alpha$ radiation (0.71073 Å), at r.t. Data collections were carried out using the COLLECT software [10] up to 50° in 2 θ . Final unit-cell parameters were based on 9048 reflections. Integration and scaling of the reflections, and correction for *Lorentz* and polarization effects were performed with the HKL DENZO-SCALEPACK system of programs [11]. The structure of the compound was solved by direct methods with SHELXS-97 [12]. The models were refined by full-matrix least squares on F^2 using SHELXL-97 [13]. The program ORTEP-3 [14] was used for graphic representation and the program WINGX [15] to prepare materials for publication. All H-atoms were located by geometric considerations placed ($d(\text{C}-\text{H})=0.93-0.98$ Å) and refined as riding with $U_{\text{iso}}(\text{H})=1.5 U_{\text{eq}}(\text{C}-\text{methyl})$ or 1.2 U_{eq} (other). An ORTEP-3 diagram of the molecule is shown in Fig. 1, and Table 5 contains the main crystallographic parameters.

The compound crystallized with one Cl-atom that forms $\text{N}-\text{H1N}\cdots\text{Cl1}^i$ and $\text{O3}^i-\text{H3}\cdots\text{Cl1}^{ii}$ H-bonding interactions, where: $[i=x+1/2, y+1/2, z; ii=x, y, z]$ and $\text{H1N}\cdots\text{Cl1}^i=2.065(2)$ Å; $\text{N}-\text{H1N}\cdots\text{Cl1}^i=178^\circ$ and $\text{H3}\cdots\text{Cl1}^{ii}=2.477(1)$ Å; $\text{O3}^i-\text{H3}\cdots\text{Cl1}^{ii}=140^\circ$ (Fig. 2).

Cytotoxicity Assay. NCI-H292 (human lung mucocoeperidmoid carcinoma cell line), HEP-2 (human larynx epidermoid carcinoma cell line), and KB (human mouth epidermoid carcinoma cell line) cells were obtained from the *Adolph Lutz* Institute (São Paulo, Brazil) and were maintained in DMEM (= *DulBecco's* Modified *Eagle's* Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1000 IU/ml of penicillin, and 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of streptomycin, and 1% of 200 mM glutamine at 37° with 5% CO_2 . Cytotoxicity was evaluated with the colorimetric MTT (= 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay [16][17]. Cell suspensions were diluted to 10^5 cells/ml and were distributed in 96-well culture plates (220 μl in each well), which were incubated for 24 h at 37° in a humidified incubator with 5% CO_2 . After 24 h, 22 μl of MeOH extract of *Erythroxylum caatingae* stems and alkaloid **3** were added, and the plates were incubated again at 37°. At the end of this period, the culture medium with excess MTT was removed, and 100 μl of DMSO were added to each well to dissolve the formazan crystals. The optical density (OD) of the wells was measured at 595 nm with an ELISA plate reader and compared to the control.

1) Crystallographic data have been deposited with the *Cambridge Crystallographic Data Center* as supplementary publication No. CCDC-711367. Copies of available material can be obtained, free of charge, upon request through the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CH21EZ, UK (fax: +44-1223-336-033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk or <http://www.ccdc.cam.ac.uk>).

Table 5. Crystal Data and Structure Refinement for Compound **1a**

Empirical formula	C ₂₄ H ₂₈ ClNO ₇
Formula weight [g mol ⁻¹]	477.92
Temp. [K]	295(2)
Crystal dimensions [mm]	0.19 × 0.17 × 0.13
Crystal system	Monoclinic
Space group	C2
Unit cell dimensions	
<i>a</i> [Å]	22.5640(13)
<i>b</i> [Å]	14.8870(5)
<i>c</i> [Å]	8.3820(5)
β [°]	97.135(2)
<i>V</i> [Å ³]	2793.8(2)
<i>Z</i>	4
<i>A</i> (MoK _α) radiation [Å]	0.71073
<i>ρ</i> _{calc} [Mg m ⁻³]	1.136
<i>μ</i> (MoK _α) [mm ⁻¹]	0.174
<i>F</i> ₀₀₀	1008
θ Range for data collection [°]	2.5–27.5
Index range	–23 ≤ <i>h</i> ≤ 29, –15 ≤ <i>k</i> ≤ 19, –8 ≤ <i>l</i> ≤ 10
Reflections collected	9939
Independent reflections [<i>R</i> _{int}]	5809 [0.024]
Reflections with <i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)	4374
Number of parameters refined	299
<i>R</i> [<i>F</i> ² > 2σ(<i>F</i> ²)]	0.085
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.07
Residual electron density [e Å ⁻³]	0.93

Animals. Female Swiss albino mice (*Mus musculus*), 60-d-old and weighing 25 ± 5 g, were obtained from the animal house of the Departamento de Antibióticos, UFPE, Brazil. The animals were housed under standard environmental conditions of temp., humidity, and under a light-dark cycle of 12 h. The mice were fed animal house diet (LABINE Purina, Brazil) and given water *ad libitum*. The animals were treated according to the ethics principles of animal experimentation of COBEA (Colegio Brasileiro de Experimentação Animal), Brazil. The Animal Studies Committee of the Universidade Federal de Pernambuco approved the experimental protocols (No. 23076.012173/2007-77).

Antitumor Assay. Sarcoma 180 tumor cells were maintained in the peritoneal cavities of the Swiss mice in the Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos from the Departamento de Antibióticos, UFPE, Brazil. Ascitic tumor cells (suspension of 5 × 10⁶ cells) were injected subcutaneously in the axillary region of healthy animals previously weighed, and the mice were divided into experimental groups (*n* = 7) [18]. Twenty-four hours after inoculation, MeOH extract of *E. caatingae* stems (100, 200, and 400 mg/kg) was dissolved in normal saline soln. with cremophor EL (2%) and administered intraperitoneally for 7 d in mice transplanted with Sarcoma 180 tumor. Methotrexate (2.5 mg/kg) was used as the positive control. The negative control received the vehicle only. On day 8, the mice were weighed and euthanized. The tumors were dissected and weighed. The percentage of tumor inhibition was calculated in accordance with [19] as: $TWI = (C - T)/C \times 100$, where *C* is the weight of the control tumor and *T* is the weight of the treated tumor.

Statistical Analysis. Data are reported as means ± standard error of the mean (SEM) of *n* experimental animals. Statistical differences were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant if *P* < 0.05.

REFERENCES

- [1] M. I. B. Loliola, M. F. Agra, G. S. Baracho, R. T. de Queiroz, *Acta Bot. Bras.* **2007**, *21*, 473.
- [2] D. Chávez, B. Cui, H.-B. Chai, R. García, M. Mejía, N. R. Farnsworth, G. A. Cordell, J. M. Pezzuto, A. D. Kinghorn, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 606.
- [3] B. Zanolari, D. Guilet, A. Marston, E. F. Queiroz, M. Q. Paulo, K. Hostettmann, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 497.
- [4] B. Zanolari, D. Guilet, A. Marston, E. F. Queiroz, M. Q. Paulo, K. Hostettmann, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1153.
- [5] G. L. Silva, B. Cui, D. Chávez, M. You, H.-B. Chai, P. Rasoamatoivo, S. M. Lynn, M. J. O'Neill, J. A. Lewis, J. M. Besteman, A. Monks, N. R. Farnsworth, G. A. Cordell, J. M. Pezzuto, A. D. Kinghorn, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1514.
- [6] J. F. Tavares, K. F. Queiroz, M. V. B. Silva, M. F. F. M. Diniz, J. M. B. Filho, E. V. L. da-Cunha, C. A. de Simone, J. X. de A. Júnior, P. S. Melo, M. Haun, M. S. da Silva, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 960.
- [7] S. L. Oliveira, M. S. da Silva, J. F. Tavares, J. G. Seria-Filho, H. F. S. Lucena, M. A. V. Romero, J. M. Barbosa-Filho, *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 302.
- [8] J. F. Muhtadi, A. A. Al-Badr, in 'Analytical Profiles of Drug Substances', Ed. K. Florey, Academic Press, New York, 1986, Vol. 15, pp. 151–229.
- [9] B. Zanolari, J.-L. Wolfender, D. Guilet, A. Marston, E. F. Queiroz, M. Q. Paulo, K. Hostettmann, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1020*, 75.
- [10] Enraf-Nonius COLLECT, Nonius BV, Delft, The Netherlands, 1997–2000.
- [11] Z. Otwinowski, W. Minor, in 'Methods in Enzymology', Eds. C. W. Carter, R. M. Sweet, Academic Press, New York, 1997, Vol. 276, pp. 307–326.
- [12] G. M. Sheldrick, SHELXS-97, Program for Crystal Structure Resolution, University of Göttingen, Göttingen, 1997.
- [13] G. M. Sheldrick, SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Göttingen, 1997.
- [14] L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565.
- [15] L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *32*, 837.
- [16] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
- [17] M. C. Alley, D. A. Scudiero, A. Monks, M. L. Hursey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbott, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker, M. R. Boyd, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 589.
- [18] R. M. Ribeiro-Costa, A. J. Alves, N. P. Santos, S. C. Nascimento, E. C. P. Gonçalves, N. H. Silva, N. K. Honda, N. S. Santos-Magalhães, *J. Microencapsul.* **2004**, *21*, 371.
- [19] Z. Machón, L. Kuczynski, J. Giełdanowski, Z. Wiczorek, M. Zimecki, B. Błaszczuk, M. Mordarski, J. Wiczorek, L. Fiszer-Maliszewska, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **1981**, *29*, 217.

Received December 1, 2009

5 ARTIGO CIENTÍFICO II

Antimicrobial, cytotoxic and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman.

Artigo submetido a **Food and Chemical Toxicology**

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1

**Antimicrobial, cytotoxic and proapoptotic activities of extract, fractions
and isolated compounds from stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman**

Jaciana S. Aguiar^a, Rosilma O. Araújo^a, Maria D. Rodrigues^a, Késia X. F. R. Sena^a, André
M. Batista^b, Maria M. P. Guerra^b, Steno L. Oliveira^c, Josean F. Tavares^c, Marcelo S. Silva^c,
Silene C. Nascimento^a, Teresinha Gonçalves-Silva^{a*}.

^aDepartamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife,
PE, Brazil.

^bDepartamento de Medicina Veterinária, Área de Reprodução, Universidade Federal Rural
de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

^cDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica,
Universidade Federal da Paraíba, Cx. Postal 5009, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

*Correspondence to: Dra. Teresinha Gonçalves-Silva. Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Antibióticos. Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária, Recife,
Pernambuco, Brasil. CEP: 50670-901. Phone: +55 31 81 2126 8347; Fax: + 55 31 81 2126
8346. E-mail: teresinha.goncalves@pq.cnpq.br

ABSTRACT

In the study, we have examined the antimicrobial and cytotoxic activities of the methanol extract, the phases, a fraction of total alkaloids and two alkaloids isolated from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. All test phases, except the hexane phase, showed antimicrobial activity on Gram-positive bacteria and fungi. The acetate: methanol (95:5), acetate, chloroform and hexane phases show the highest cytotoxicity activity against the NCI-H292, HEp-2 and K562 cell lines using MTT. The absence of hemolysis in the erythrocytes of mice was observed in these phases and 6 β -Benzoyloxy-3 α -(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)tropane (catuabine B). Staining with Annexin V-FITC and JC-1 was used to verify the mechanism of action of the compounds of *E. caatingae* that showed cytotoxicity less than 30 μ g/mL in leukemic cells. After 48 h of incubation, we observed that the acetate:5% methanol, acetate, and chloroform phases, as well as the catuabine B, increased in the number of cells in early apoptosis, from 53.0 to 74.8%. An analysis of the potential of the mitochondrial membrane by incorporation of JC-1 showed that most cells during incubation of the acetate: methanol (95:5) and acetate phases (63.85 and 59.2%) were stained, suggesting the involvement of an intrinsic pathway of apoptosis.

Keywords: Erythroxylaceae, antimicrobial activity, cytotoxicity, alkaloids, hemolytic activity, apoptosis.

1. Introduction

The research with medicinal plants aiming at the development of phytotherapeutic medicines and the promotion of the rational use of these products by the population of developing countries like Brazil, have a great importance not only in the socio-economic aspects but also because they enable a greater knowledge of the culture of such people and a better utilization of the biodiversity of the respective countries (Brandão et al., 2006). Approximately 25% of the medicines prescribed in the industrialized countries originate from plants and about 120 compounds of natural origin, obtained from approximately 90 species of plants, are used in modern therapy. In Brazil, approximately 80,000 species of plants are described, offering a wide range of raw material for the discovery of new drugs (Yunes and Calixto, 2006).

It is well established that plants have always been useful sources of antitumor or cancer prevention compounds. Approximately more than 60% of currently used anticancer chemotherapeutic drugs are derived in one way or another from natural sources, including plants. The search for anticancer agents from plant sources began in the 1950s with the discovery and development of the vinca alkaloids, vinblastine and vincristine, isolated from *Catharanthus roseus*, and etoposide and teniposide, the semisynthetic derivatives of epipodophyllotoxin, isolated from *Podophyllum peltatum* and *P. endoi* (Cragg and Newman, 2005).

The indiscriminate use of antibiotics has led to antibiotic resistance in many pathogenic microorganisms and has led researchers to seek new antibiotics that are effective. Several alternatives have been suggested to solve this problem such as the search for new antimicrobials in plant species (Cechinel-Filho, 2000). Since the early 1980s, the

1
2
3
4
5 number of drugs in development has decreased considerably while the resistance of
6
7
8 microorganisms, due to the constant use of antibiotics, has grown immensely. This is
9
10 because series of new mechanisms of resistance are constantly being developed. The study
11
12 of bacterial resistance is usually based on microorganisms of epidemiological significance,
13
14 such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and fungi,
15
16 which are responsible for different etiological processes in both immunocompetent and
17
18 immunosuppressed patients (Antunes et al., 2006)
19
20

21
22 The Erythroxylaceae family comprises approximately 250 species distributed across
23
24 four genera, *Aneulophus* Benth, *Nectaropetalum* Engl., *Pinacopodium* Exell and Mendonça
25
26 and *Erythroxylum* P. Browne (Barreiros et al., 2005; Loiola et al., 2007). The genus
27
28 *Erythroxylum* consists of approximately 200 species diversely distributed over South
29
30 America, Africa and the island of Madagascar (Santos et al., 2003). It has been used in
31
32 many ethnomedical practices as an anti-inflammatory agent, an antibacterial agent and a
33
34 tonic for its stimulant properties and as a powerful diuretic for liver, renal and vesicular
35
36 afflictions. *Erythroxylum* has been used to treat venereal diseases, rheumatism, arthrosis,
37
38 respiratory affections, amenorrhea and hemorrhages (Silva et al., 2001). In Brazil, the
39
40 family is represented by the genus *Erythroxylum*, with approximately 114 species, and there
41
42 are 13 species registered in state of Paraíba (Loiola et al., 2007).
43
44
45
46
47
48

49 The genus is characterized by the presence of tropane alkaloids, tannins, terpenes,
50
51 flavonoids and phenylpropanoids (Chim et al., 2006; Zuanazzi et al., 2001). Tropane
52
53 alkaloids are an important class of natural products because of their analgesic, anesthetic,
54
55 anticholinergic, antiemetic, antihypertensive, parasympatholytic, and other pharmacological
56
57 properties (Khattak et al., 2002).
58
59
60
61
62
63
64
65

The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial and cytotoxic activities of the methanol extract phases and two alkaloids isolated from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. For the evaluation of the antimicrobial activity, the following phases were tested against Gram-positive and Gram-negative bacteria and against fungi: the acetate phase (AcOEt), various ratios of acetate:methanol, chloroform (CHCl₃) and hexane (C₆H₁₂). The antiproliferative activity was tested against tumor cell lines (NCI-H292, K562 and HEP-2) and the hemolytic activity was measured for the methanol extracts, its phases and alkaloids. Another set of experiments was performed with K562, which was used to investigate the mechanisms involved in the antitumor activity of the phases and the alkaloids of *E. caatingae*.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The stems of *E. caatingae* were collected in Picuí, Paraíba, Brazil. The botanical material was identified by Prof. Dr. Maria de Fátima Agra of the Laboratory of Pharmaceutical Technology, Federal University of Paraíba. A dried specimen was deposited in the herbarium of Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) of the Federal University of Paraíba under the identification label AGRA 5666.

2.2. Chemicals

Phosphate buffered saline (PBS), penicillin-streptomycin liquid and DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) were purchased from Gibco. MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) was purchased from

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

6

Invitrogen. Eposide (Etoposide) was purchased from Blausiegel. Fetal bovine serum (FBS), glutamine, Triton X-100 and JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) were purchased from Sigma-Aldrich Brazil. The Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit was purchased from Calbiochem. DMSO (Dimethyl sulfoxide), CaCl₂, NaCl, and paraformaldehyde were purchased from Vetec. Mueller Hinton Agar and Sabouraud were purchased from Difco, and kanamycin and ketoconazole were purchased from Cecon.

2.3. Extraction and isolation

The crude methanol extract (500 g) was dissolved in water and defatted with hexane. The defatted aqueous extract was acidified with 3% HCl with mechanical mixing and filtered through Celite, which yielded a residue, which was discarded, and an acidic solution. The acidic solution was extracted with CHCl₃ (3 x 500 mL), which resulted in an acid chloroform phase and an aqueous phase that was neutralized to pH 7.0 with ammonium hydroxide. The aqueous phase, at pH 7.0, was extracted with CHCl₃ to yield an aqueous phase and the basic chloroform phase (4.0 g), which was submitted to column chromatography (CC) using a silica gel as the stationary phase and CHCl₃ and MeOH as the eluents, which were used either independently or in binary mixtures with increasing polarity. The result was 55 fraction of 100 mL. The 55 fraction were monitored by thin layer chromatography (TLC) and eluted with various solvent systems (CHCl₃ and/or CHCl₃-MeOH in order of increasing polarity) in chambers that were pre-saturated with NH₃ vapor. They were then revealed with Dragendorff's reagent and placed in 21 groups based on their R_f. Fraction 25, 45 and 46 were submitted to repeated recrystallization with

1
2
3
4
5
6 acetone and ether to obtain alkaloids. The elucidation of the chemical structures was
7 described by Oliveira et al. (2011). 6 β -Benzoyloxy-3 α -(3,4,5-
8 trimethoxybenzoyloxy)tropane (Catuabine B) and 3 α ,6 β -dibenzoyloxytropane were also
9 isolated. The following extracts were all tested: the methanol extract of the stem of *E.*
10 *caatingae* (MEEC) and the AcOEt: MeOH (60:40), AcOEt: MeOH (80:20), AcOEt: MeOH
11 (90:10), AcOEt: MeOH (95:5), AcOEt, CHCl₃, and the hexane phases, as well as the total
12 alkaloids fraction.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 2.4. Microorganisms

25 The microorganisms, which were from the Antibiotics Department collection of the
26 Federal University of Pernambuco were as follows: *S. aureus*, UFPEDA 01; *Bacillus*
27 *subtilis*, UFPEDA 16; *Enterococcus faecalis*, UFPEDA 138; *Micrococcus luteus*, UFPEDA
28 06; *Escherichia coli*, UFPEDA 224; *P. aeruginosa*, UFPEDA 39; *Serratia marcescens*,
29 UFPEDA 398; *Mycobacterium smegmatis*, UFPEDA 71; and *Candida albicans*, UFPEDA
30 1007, and these were used in the antimicrobial activity assays.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 2.5. Cell lines and cell culture

45 The cell lines used for the *in vitro* cytotoxicity tests were K562 (human chronic
46 myelocytic leukemia), NCI-H292 (human lung mucoepidermoid carcinoma cells) and HEP-
47 2 (human larynx epidermoid carcinoma cells), and these were obtained from the Adolph
48 Lutz Institute (São Paulo, Brazil). The cells were maintained in DMEM supplemented with
49 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL
50 streptomycin at 37°C with 5% CO₂.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2.6. Animals

Three Swiss mice (female, 25-30 g), obtained from the central animal house of the Federal University of Pernambuco, Brazil, were used. The animals were housed in cages with free access to food and water. All animals were kept under a 12 h light:12 h dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). The animals were treated according to the ethical principles of animal experimentation of Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), Brazil. The Animal Studies Committee of the Federal University of Pernambuco approved the experimental protocols (Number 23076.012173/2007-77).

2.7. Antimicrobial activity

Antimicrobial activity was verified *in vitro* by the method of diffusion in paper record (Bauer et al., 1966). The microorganisms were standardized with an optical density of McFarland 0.5 in physiological solution, which corresponds to a concentration of approximately 10^7 UFC/mL for yeast and filamentous fungi and 10^8 UFC/mL for bacteria. On the inoculated medium, Mueller Hinton Agar (*S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. marcescens*), glucose extracts of yeast (*E. faecalis* e *M. smegmatis*) and Sabouraud (*C. albicans*), and discs of barren paper (6 mm) were absorbed with 10 μ L of the methanol extract solution from the stem of *E. caatingae* and its phases (200,000 μ g/mL) and were placed on the agar. After placing the discs, the plates were incubated for 24 h and 48 h at 30°C and 35°C, respectively. The antibiotics Kanamycin and Ketoconazole were used as standards at 30 μ g/disc and 300 μ g/disc, respectively.

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bacteriostatic Concentration (MBC) were applied to the substances that showed halos larger than 12 mm

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

by serial dilutions in half-solids (Carvalho et al., 2002). Aliquots of different volumes (0.03-1.0 mL) of the solutions at 20,000 µg/mL were placed in Petri dishes and homogenized with 10 mL of the appropriate culture medium. The microorganisms were streaked on the surface of the medium, and the plates were incubated at 35°C and 30°C for 24 h and 48 h, respectively. For values over 1,000 µg/mL, the extract was considered inactive (Holetz et al., 2002).

2.8 Cell viability assay (MTT Assay)

The cytotoxicity of the methanol extract of the stems of *E. caatingae* and its phases were tested against the K562, NCI-H292 and HEP-2 tumor cell lines. For these experiments, the cells were plated in 96-well plates (10^5 cells/mL for adherent cells or 0.3×10^6 cells/mL for suspended cells). After 24 h, the extracts, phases (6.25-50 µg/mL) and alkaloids (1.25-10 µg/mL) dissolved in DMSO were added to each well and incubated for 72 h. Control groups received DMSO. Etoposide (1.25-20 µg/mL) was used as a positive control. The growth of the tumor cells was quantified by the ability of the living cells to reduce yellow tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to a blue formazan product (Mosmann 1983; Alley et al., 1988). At the end of the 72 h incubation period, MTT (5.0 mg/mL) was added to the plate. After three hours for the suspended cells or two hours for the adherent cells, the formazan product from the reduction of MTT was dissolved in DMSO, and the absorbance was measured using a multi-plate reader. The effect of the drug was quantified as the percentage of control absorbance the reduced dye at 450 nm (Multi-plate Reader Thermoplate).

2.9. Hemolytic assay

The hemolytic assay was performed in 96-well plates following the method previously described by Costa-Loufo et al. (2005). Each well received 100 μ l of a 0.85% NaCl solution containing 10 mM CaCl_2 . The first well served as the negative control and only contained the vehicle (10% DMSO). The second well contained 100 μ L of the test substance that was diluted 1:2. The extracts were tested at concentrations ranging from 15.62 to 2000 μ g/mL. The serial dilution continued until the 11th well. The last well received 20 μ L of 0.1% Triton X-100 (in 0.85% saline) to obtain 100% hemolysis (positive control). Each well received 100 μ L of a 2% suspension of mouse erythrocytes in 0.85% saline containing 10 mM CaCl_2 . After incubation at room temperature for 30 min and centrifugation, the supernatant was removed, and the released hemoglobin was measured by spectroscopic absorbance at 450 nm. Extracts with an EC_{50} value lower than 200 μ g/mL were considered to be active.

2.10. Annexin/PI cell death assay

Cellular apoptosis was stained with Annexin V and propidium iodide (PI) using an Annexin V - FITC kit (Calbiochem) following the protocol provided by the manufacturer. The suspension of K562 cells (0.3×10^6 cells/mL) was seeded into 96-well plates. The plates were incubated at 37°C with 5% CO_2 for 24 h. After this period, the phases and alkaloids that presented cytotoxicity were added at the concentration that was equal to the IC_{50} value. After 48 h of treatment, the cells were stained with Annexin V and PI following the manufacturer's recommended protocol and were analyzed by an epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) at 1000x magnification under an oil

immersion with an emission filter of LP 515 nm and excitation filter of BP 450-490 nm. A minimum of 200 cells were counted in each sample

2.11. Measurement of the mitochondrial membrane potential

Mitochondrial depolarization was evaluated by the incorporation of JC-1. This assay was performed as previously described, with some modifications (Guthrie and Welch, 2006). The JC-1 probe is freely permeable to cells and undergoes reversible transformation from a monomer to an aggregate form (Jagg). The suspension of K562 cells (0.3×10^6 cells/mL) was seeded into 96-well plates. The plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 h. The phases that presented cytotoxicity were added at a final concentration equal to the IC₅₀ value. After 48 h of treatment, 50 µL was collected, incubated with JC-1 (0.15 mM in DMSO) for 10 min in the dark and then washed two times with PBS. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde, mounted on a glass slide and observed under an epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) with 1000x magnification under an oil immersion with an emission filter of LP 515 nm and an excitation filter of BP 450-490 nm. A minimum of 200 cells were counted in each sample. The cells stained in red were classified as having a high potential mitochondrial membrane, while those stained in green were classified as having a low potential membrane.

2.12. Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm S.D. The IC₅₀ and EC₅₀ values and their 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression using SigmaPlot 11.0. The

1
2
3
4
5 differences between the experimental groups were compared by one-way analysis of
6 variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls test; the significance level was set at 1%.
7
8
9

10 11 12 **3. Results and discussion**

13
14 From the crude methanol extract of *E. caatingae* were isolated two alkaloids, 6 β -
15 Benzoyloxy-3 α -(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)tropane (catuabine B) and 3 α ,6 β -
16 dibenzoyloxytropane, whose isolation and elucidation of chemical structures were
17 described by Oliveira et al. (2011). The following extracts were all tested: the methanol
18 extract of the stem of *E. caatingae* (MEEC) and the AcOEt: MeOH (60:40), AcOEt: MeOH
19 (80:20), AcOEt: MeOH (90:10), AcOEt: MeOH (95:5), AcOEt, CHCl₃, and the hexane
20 phases, as well as the total alkaloids fraction.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 The study of the antimicrobial activity of the extracts and phases of *E. caatingae*
32 were performed in gram-positive and gram-negative bacteria, as well as with fungi, by the
33 disc diffusion method. All test phases, except the hexane phase, showed antimicrobial
34 activity on Gram-positive bacteria and fungi. The bacteria that were the most sensitive to
35 the phases tested were *M. luteus* and *M. smegmatis*, with each showing inhibition zones of
36 13.5 \pm 0.7 to 29.5 \pm 0.7 mm and 14.0 \pm 1.4 to 31.5 \pm 1.4 mm, respectively. The AcOEt:
37 MeOH (80:20), AcOEt: MeOH (90:10), AcOEt: MeOH (95:5) and the CHCl₃ phases
38 showed significant inhibition zones of 18.0 \pm 0.0 to 19.0 \pm 1.4 mm for *C. albicans* (Table
39 1). Evaluation of the minimum inhibitory concentration of the extract and phases of *E.*
40 *caatingae* (zone of inhibition > 12 mm) showed significant inhibitory concentrations for *S.*
41 *aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *E. faecalis* and *C. albicans*. However, the
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 lowest values of the MIC and MBC against *M. luteus* went to the AcOEt: MeOH with 10%
6 and 5% MeOH and CHCl₃ phases (Tables 1 and 2).
7
8
9

10
11
12 Insert table 1 and 2
13
14
15
16

17
18 Plants are an important source of potentially useful structures for the development
19 of new chemotherapeutic agents. The first step in determining the presence of new
20 chemotherapeutic agents is through *in vitro* antibacterial activity assays. Many reports are
21 available on the antiviral, antibacterial, antifungal, anthelmintic, antitumor and anti-
22 inflammatory properties of plants. Some of these observations have proven helpful in the
23 identification of the active principle compounds responsible for such activities and in the
24 development of drugs for therapeutic use in humans (Mahesh and Satish, 2008).
25
26
27
28
29
30
31

32
33 There are a few reports of the antimicrobial activity of the genus *Erythroxylum*.
34 Among them, we highlight the alkaline extract of the bark of *Erythroxylum catuaba* that
35 has been shown to have a protective action against lethal infections of *E. coli* and *S. aureus*
36 (Manabe, 1992). However, Rahman et al. (1998) reported the absence of antibacterial
37 activity against *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* at the concentrations of 100
38 and 200 µg/mL and the presence of antifungal activity of the alcoholic extract of
39 *Erythroxylum moonii* against *C. albicans*. In our study, the absence of any antimicrobial
40 activity of *E. caatingae* against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* was also verified,
41 while the AcOEt: MeOH (80:20), AcOEt: MeOH (90:10), AcOEt: MeOH (95:5) and the
42 CHCl₃ phases inhibited the growth of *C. albicans*. However, the lowest values of MIC and
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

MBC went to the AcOEt: MeOH (90:10), AcOEt: MeOH (95:5) and chloroform phases against *M. luteus*.

The cytotoxicity of the 11 samples, including the extracts and phases, on the human tumor cell lines were evaluated after 72 h using MTT, and the results are presented in table 4. The AcOEt: 5% MeOH, AcOEt, CHCl₃ and hexane phases were the most active against the NCI-H292, HEp-2 and K562 cell lines. The most sensitive strains tested were the HEp-2 cell line, with an IC₅₀ value equal to $8.25 \pm 0.36 \mu\text{g/mL}$ for the CHCl₃ phase, and the K562 cell line, with an IC₅₀ value equal to $13.10 \pm 0.63 \mu\text{g/mL}$, $9.86 \pm 0.56 \mu\text{g/mL}$ and $11.21 \pm 0.46 \mu\text{g/mL}$ for the AcOEt: 5% MeOH, AcOEt and CHCl₃ phases, respectively. To verify whether the cytotoxicity observed was related to the injury of the cell plasma membrane, phases 3-8 (Table 3) and the catuabine B of *E. caatingae* were tested in the erythrocytes of mice. The absence of hemolysis was observed in all substances.

Insert table 3

The cytotoxic activity of *Erytroxylum* in carcinoma and adenocarcinoma cells was first described by Silva et al. (2001). That study showed that the methanolic extract and alkaloids of tropanes of *Erytroxylum pervillei* inhibited the growth of KB-V1 cells (human cervix carcinoma multidrug-resistant cells) in the presence of vinblastine and were much less cytotoxic to KB-V1 cells in the absence of vinblastine or KB cells (oral squamous cell carcinoma). The alkaloids of the species pervillene B and C showed cytotoxic activity in adenocarcinomas of ovary (SKOV3) cells and in adenocarcinomas of multidrug-resistant ovary (SKVLB) cells incubated with adriamycin. The following year, alkaloids isolated

1
2
3
4
5
6 from the stem of *Erytroxylum rotundifolium* were also found to be cytotoxic in KB-V1 cells
7
8 (Chaves et al., 2002).
9

10
11 Extracts of *Erytroxylum minutifolium* and *Erytroxylum confusum* produced a
12
13 significant cytotoxic effect in rat hepatocytes and displayed hepatoprotective, anti-
14
15 inflammatory and antimicrobial activities (Rodeiro et al., 2008). Among the few reports of
16
17 cytotoxicity of the genus *Erythroxylum*, our group found an absence of cytotoxicity in the
18
19 methanol extract of *E. caatingae* stems and in the catuabine B against human cancer cell
20
21 lines (HEp-2, NCI-H292 and KB) (Oliveira et al., 2011). However, this cytotoxicity test
22
23 showed that the AcOEt: MeOH (95:5), AcOEt, CHCl₃ and hexane phases were the most
24
25 active against the HEp-2, NCI-H292 and K562 cell lines. The extracts showed promising
26
27 activity, with IC₅₀ values ranging between 8.2–40.5 µg/mL. Most of these values were
28
29 within the cutoff point of the National Cancer Institute criteria for cytotoxicity (IC₅₀ < 30
30
31 µg/mL) in the screening of crude plant extracts, which indicates that these extracts are
32
33 promising for further purification and study (Mesquita et al., 2009).
34
35
36
37

38
39 Although we observed cytotoxic activity, the *E. caatingae* extracts and phases did
40
41 not possess any activity against the mouse erythrocytes. These data suggest that the
42
43 cytotoxic activity was not related to the lytic properties or the membrane instability induced
44
45 by the extracts.
46
47

48
49 K562 cells incubated with the AcOEt: 5% MeOH (5), acetate (6) and CHCl₃ phases
50
51 (7) and the catuabine B (10) were evaluated with the Annexin V-FITC kit by fluorescent
52
53 microscopy to verify that cell death was induced by apoptosis through the externalization of
54
55 phosphatidylserine. The doses chosen for the test were equal to the IC₅₀ values. After 48 h
56
57 of incubation, we observed that the AcOEt: MeOH (95:5) (13 µg/mL), AcOEt (9.8 µg/mL)
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 and CHCl_3 (11.2 $\mu\text{g/mL}$) phases, as well as the catuabine B alkaloid (10 $\mu\text{g/mL}$), all
6 increased the number of cells in early apoptosis ($\text{AnnV}^{\text{PE}}/\text{PI}^{\text{DE}}$) by 53.0%, 74.8%, 61.7%
7 and 65.0%, respectively, when compared to the control. These substances exhibited values
8 less than 1% of late apoptotic cells ($\text{AnnV}^{\text{DE}}/\text{PI}^{\text{DE}}$) and values less than 8% of cells in
9 necrosis ($\text{AnnV}^{\text{DE}}/\text{PI}^{\text{DE}}$) (Figures 1 and 2)

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20 Insert figures 1 and 2
21
22
23
24
25

26
27 Apoptosis is currently a subject of research interest, in part because tumor cells are
28 susceptible to death by apoptosis in response to the various drugs used in chemotherapy
29 (Lima et al., 2010).
30
31

32
33 Apoptosis is regulated by two major pathways: the extrinsic (receptor mediated) and
34 intrinsic (mitochondrial mediated) pathways. Due to the sensitivity of the intrinsic pathway,
35 tumors arise more often through this pathway than through the extrinsic pathway
36 (Johnstone et al., 2002). The extrinsic pathway involves execution through cell surface
37 death receptors, recruiting the Fas-associated death domain, which leads to the activation of
38 caspase 8 (Fesik, 2005). The intrinsic pathway requires a loss/disruption of the
39 mitochondrial membrane potential in the cells, which eventually may cause the initiation
40 and activation of apoptotic cascades. The cascade triggers the release of cytochrome c and
41 other apoptogenic molecules, such as Smac/DIABLO, from the mitochondria to the cytosol.
42
43 Once in the cytosol, cytochrome c binds to Apaf-1 and recruits and activates caspase-9 in
44 the apoptosome. Active caspase-9 cleaves and activates caspase-3, the caspase required to
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 complete the induction of apoptosis (Meeran et al., 2008). Therefore, we sought to
6
7 determine whether the phases that induced apoptosis were associated with the disruption of
8
9 the mitochondrial membrane potential in K562 cells. As shown in Figure 2a, the treatment
10
11 of K562 cells with the AcOEt: MeOH (95:5) (13 µg/mL), AcOEt (9.8 µg/mL) and CHCl₃
12
13 phases (11.2 µg/mL), as well as the catuabine B for 48 h resulted in an increase in the
14
15 number of cells in early apoptosis by 53.0, 74.8, 61.6 and 65.0%, respectively. These data
16
17 show that the main mechanism of cell death caused by the extracts is apoptosis, which
18
19 suggests the involvement of the intrinsic pathway.
20
21
22
23
24

25 To investigate the possible involvement of the mitochondrial pathway in apoptosis
26
27 induced by the products under study, the analysis of the mitochondrial membrane potential
28
29 by the incorporation of JC-1 was evaluated by fluorescence microscopy. The doses chosen
30
31 for the test were equal to the IC₅₀ values. After 48 h of incubation, we observed that the
32
33 AcOEt: MeOH (95:5), AcOEt and CHCl₃ phases, as well as the catuabine B (10), all showed
34
35 63.8%, 59.2%, 50.0% and 27.2% apoptotic cells, respectively (Figures 3 and 4).
36
37
38
39
40

41
42 Insert figures 3 and 4
43
44
45

46 To confirm the involvement of intrinsic pathway in cell death induced by the
47
48 treatment with the phases and the alkaloids isolated from *E. caatingae*, an analysis of the
49
50 mitochondrial membrane potential was made by the incorporation of JC-1. Cells treated
51
52 with the AcOEt: MeOH (95:5), AcOEt, and CHCl₃ phases, as well as the catuabine B for
53
54 48 h resulted in an increase in the number of green fluorescence-positive cells of 63.8, 59.2,
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6 50.0, and 27%, respectively, thus, confirming the disruption of the mitochondrial
7
8 membrane potential on treatment.
9

10
11 The intrinsic pathway requires the disruption of the mitochondrial membrane and
12
13 the release of mitochondrial proteins, such as cytochrome *c*, which work together with the
14
15 other two cytosolic protein factors, Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) and
16
17 procaspase-9, to promote the assembly of the caspase-activating complex (termed the
18
19 apoptosome), which in return induces the activation of caspase-9 and initiates the apoptotic
20
21 caspase cascade (Sum et al., 2004). In our study, the AcOEt: MeOH (95:5), AcOEt, and
22
23 CHCl₃ phases showed death by apoptosis, which mainly involved the mitochondrial
24
25 pathway, especially with the acetate phase
26
27
28
29
30

31 **4. Conclusion**

32
33 According to the results of investigations, methanol extract of the stem of
34
35 *Erythroxylum caatingae* and all tested phases, except the hexane phase, showed
36
37 antimicrobial activity on gram positive bacteria and fungi. The absence of hemolysis in the
38
39 erythrocytes of mice was observed in these phases and catuabine B. We observed that the
40
41 acetate:5% methanol, acetate, and chloroform phases, as well as the catuabine B induced
42
43 apoptosis in K562 cells. An analysis of the potential of the mitochondrial membrane by
44
45 incorporation of JC-1 showed that most cells during incubation of the acetate: methanol
46
47 (95:5) and acetate phases were stained, suggesting the involvement of an intrinsic pathway
48
49 of apoptosis.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acknowledgments

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest with this work.

References

- Alley, M.C., Scudiere, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48, 589-601.
- Antunes, R.M.P., Lima, E.O., Pereira, M.S.V., Câmara, C.A., Arruda, T.A., Catão, R.M.R., Barbosa, T.P., Nunes, X.P., Dias, C.S., Silva, T.M.S., 2006. Atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Braz J Pharmacogn.* 16, 517-524.
- Barreiros, M.L., David, J.M., Queiroz, L.P., David, J.P., 2005. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum mummularia*. *Biochem Syst Ecol.* 33, 537-540.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turk, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45, 493 - 496.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

20

- Brandão, M.G.L., Cosenza, G.P., Moreira, R.A., Monte-Mor, R.L.M., 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn.* 16, 408-420.
- Carvalho, A.A., Sampaio, M.C.C., Sampaio, F.C., Melo, A.F.M., Sena, K.X.F.R., Chiappeta, A.A., Iligino, J.S., 2002. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólico de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram negativas. *Lat Am J Pharm.* 21, 255-258.
- Cechinel Filho, V., 2000. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIOFAR/Univali. *Quim Nova.* 23, 680-685.
- Chavez, D., Cui, B., Chai, H.B., Garcia, R., Meija, M., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 2002. Reversal of multidrug resistance by tropane alkaloids from the stems of *Erythroxylum rotundifolium*. *J Nat Prod.* 65, 606-610.
- Costa-Lotufo, L.V., Cunha, G.M.A., Farias, P.A.M., Viana, G.S.B., Cunha, K.M.A., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Gramosa, N.V., Rao, V.S.N., 2002. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicol.* 40, 1231-1234.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., 2005. Plants as a source of anticancer agents. *J Ethnopharmacol.* 100, 72-79.
- Fesik, S.W., 2005. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 5, 876-885.
- Guthrie, H.D., Welch, G.R., 2006. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci.* 84, 2089-2100.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97, 1027-1031.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Lowe, S.W., 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 108, 153–164.
- Khattak, K.F., Atta-ur-Rahman, Choudhary, M.I., Hemalal, K.D., Tillekeratne, L.M., 2002. New Tropane Alkaloids from *Erythroxylum moonii*. *J Nat Prod*. 65, 929-931.
- Lima, A.P., Pereira, F.C., Vilanova-Costa, CAST., Mello, F.M.S., Ribeiro, A.S.B.B., Benfica, P.L., Valadares, M.C., Pavanin, L.A., Santos, W.B., Lacerda, E.P.S., 2010. The compound cis-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces caspase-mediated apoptosis in K562 cells. *Toxicol in Vitro*. 24, 1562–1568.
- Loiola, M.I.B., Agra, M.F., Baracho, G.S., Queiroz, R.T., 2007. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. *Acta Bot Bras*. 21, 473-487.
- Mahesh, B., Satish, S., 2008. Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens. *J Agric Sci*. 4, 839-843.
- Manabe, H., 1992. Effects of Catuaba extracts on microbial and HIV infection. *In Vivo*. 6, 161-165.
- Meeran, S.M., Katiyar, S., Katiyar, S.K., 2008. Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 229, 33–43.
- Mesquita, M.L., Paula, J.E., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Grougnet, R., Michel, S., Tillequin, F., Espindola, L.S., 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

22

plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethopharmacol.* 123, 439–445.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 16, 55–63.

Oliveira, S.L., Silva, M.S., Tavares, J.F., Branco, M.V.S.C., Lucena, H.F.S., Barbosa-Filho, J.M., Agra, M.F., Silva, T.G., Nascimento, S.C., Aguiar, J.S., Simone, C.A., Júnior, J.X.A., 2011. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. *Chem Biodivers.* 8, 155 – 165.

Rahman, A.U., Khattak, K.F., Nighat, F., Shabbir, M., Hemalal, K.D., Tillekeratne, L.M., 1998. Dimeric tropane alkaloids from *Erythroxylum moonii*. *Phytochemistry.* 48, 377-383.

Rodeiro, I., Donato, M.T., Lahoz, A., González-Lavaut, J.A., Laguna, A., Castell, J.V., Delgado, R., Gómez-Lechón, M.J., 2008. Modulation of P450 enzymes by Cuban natural products rich in polyphenolic compounds in rat hepatocytes. *Chem Biol Interact.* 172, 1-10.

Santos, C.C., Lima, M.A.S., Silveira, E.R., 2003. Micromolecular secondary metabolites of *Erythroxylum barbatum*. *Biochem Syst Ecol,* 31, 661–664.

Silva, G.L., Cui, B., Chávez, D., You, M., Chai, H.B., Rasoanaivo, P., Lynn, S.M., O'Neill, M.J., Lewis, J.A., Besterman, J.M., Monks, A., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 2001. Modulation of the Multidrug-Resistance Phenotype by New Tropane Alkaloid Aromatic Esters from *Erythroxylum pervillei*. *J Nat Prod.* 64, 1514-1520.

- 1
2
3
4
5 Sun, S.Y., Hail, Jr. N., Lotan, R., 2004. Apoptosis as a novel target for cancer
6 chemoprevention. *J Natl Cancer Inst.* 96, 662–672.
7
8
9
10 Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2001. *Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal*
11
12 *Moderna* (1st ed). Argos: Chapecó (SC), Brazil.
13
14
15 Zuanazzi, J.A.S., Tremea, V., Limberger, R.P., Sobral, M., Henriques, A.T., 2001.
16
17 *Alkaloids of Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. *Biochem*
18
19 *Syst Ecol* 29, 819–825.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table(1)

Table 1. Antimicrobial activity of the methanol extract of the stem of *Erythroxylum caatingae* and of its phases (2000 μ g/disc).

Microorganisms	Zone of inhibition (mm)								Kanamicin (30 μ g/disc)	Ketoconazole (300 μ g/disc)
	1	2	3	4	5	6	7	8		
<i>S. aureus</i>	10.5 \pm 0.7	10.0 \pm 0.0	11.0 \pm 0.7	12.0 \pm 0.0	12.0 \pm 0.0	0.0	10.5 \pm 0.7	0.0	28	-
<i>M. luteus</i>	21.5 \pm 2.1	26.0 \pm 1.4	28.5 \pm 0.7	28.5 \pm 0.7	29.5 \pm 0.7	13.5 \pm 0.7	26.0 \pm 0.0	0.0	34	-
<i>B. subtilis</i>	10.0 \pm 0.0	10.0 \pm 0.0	13.5 \pm 0.7	13.5 \pm 0.7	13.0 \pm 0.7	0.0	12.0 \pm 0.0	0.0	29	-
<i>M. smegmatis</i>	14.0 \pm 1.4	22.5 \pm 0.7	30.0 \pm 0.0	31.5 \pm 1.4	30.0 \pm 0.0	15.0 \pm 0.0	15.0 \pm 0.0	0.0	40	-
<i>E. faecalis</i>	0.0	0.0	11.5 \pm 0.7	11.5 \pm 0.7	12.5 \pm 0.7	0.0	17.0 \pm 0.0	0.0	13	-
<i>E. coli</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15	-
<i>S. marcescens</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15	-
<i>P. aeruginosa</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20	-
<i>C. albicans</i>	0.0	0.0	19.0 \pm 1.4	19.0 \pm 1.4	18.0 \pm 1.4	0.0	18.0 \pm 0.0	0.0	-	24

1. Methanol extract of stem of *E. caatingae* (MEEC); 2. AcOEt:MeOH (60:40); 3. AcOEt:MeOH (80:20); 4. AcOEt:MeOH (90:10); 5. AcOEt:MeOH (95:5); 6. AcOEt; 7. CHCl₃; 8. Hexane phase. Mean \pm SD.

Table(2)

Table 2. Values the minimum inhibitory concentration of the methanol extract of the stem of *Erythroxylum caatingae* and of its phases.

Microorganisms	Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL)						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>S. aureus</i>	n.t.	n.t.	n.t.	250	250	n.t.	n.t.
<i>M. luteus</i>	250	250	n.t.	<31.25	<31.25	250	<31.25
<i>B. subtilis</i>	n.t.	n.t.	n.t.	250	250	n.t.	125
<i>M. smegmatis</i>	500	500	n.t.	125	125	1000	125
<i>E. faecalis</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	500	n.t.	500
<i>C. albicans</i>	n.t.	n.t.	n.t.	250	125	n.t.	125

1. Methanol extract of stem of *E. caatingae* (MEEC); 2. AcOEt:MeOH (60:40); 3. AcOEt:MeOH (80:20); 4. AcOEt:MeOH (90:10); 5. AcOEt:MeOH (95:5); 6. AcOEt. 7. CHCl₃, n.t. – no tested.

Table(3)

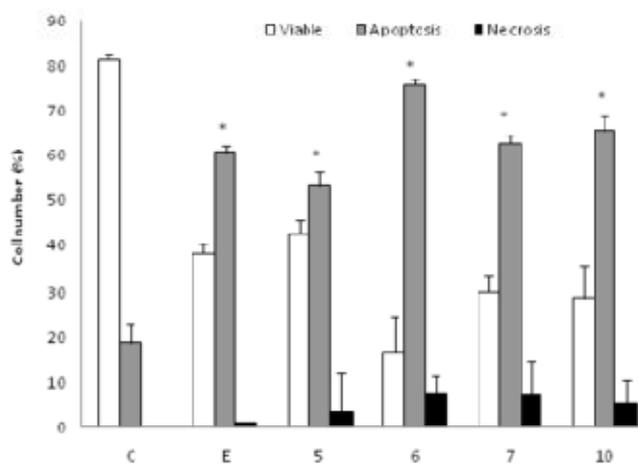
Table 3. Cytotoxic and hemolytic activity de *Erythroxylum caatingae*.

Extract / Phases	Cell line, IC ₅₀ (µg/mL)			EC ₅₀ (µg/mL)
	Hep-2	NCI-H292	K562	
1	nd	nd	nd	nt
2	nd	nd	nd	nt
3	nd	25.76±1.71	nd	> 2000
4	nd	25.50±1.08	nd	> 2000
5	40.59±0.77	28.19±2.09	13.10±0.63	> 2000
6	34.12±1.01	20.37±0.75	9.86±0.56	403.24 ± 9.64
7	8.25±0.36	34.39±1.71	11.21±0.46	1036.52 ± 35.17
8	31.42±1.01	15.79±1.01	33.58±1.33	510.00 ± 3.60
9	nd	nd	nd	nt
10	nd	nd	9.36±0.77	> 250
11	nd	nd	nd	nt
Etoposide	6.10±0.19	2.75±0.10	4.48±0.23	nt

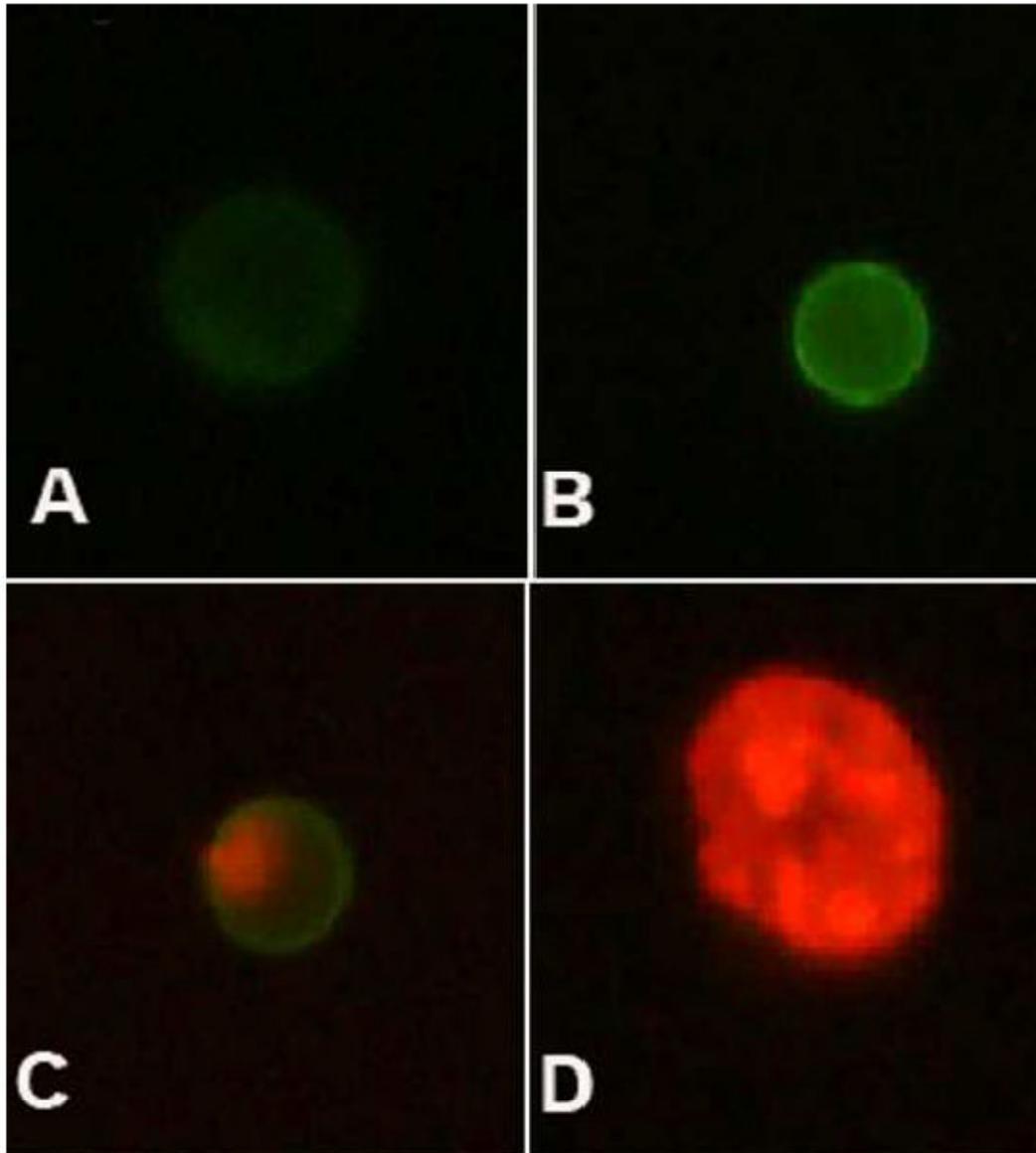
1. Methanol extract of stem of *E. caatingae* (MEEC); 2. acetate: methanol phase 40% (AcOEt:MeOH 40%); 3. acetate: methanol phase 20% (AcOEt:MeOH 20%); 4. acetate: methanol phase 10% (AcOEt:MeOH 10%); 5. acetate: methanol phase 5% (AcOEt:MeOH 5%); 6. acetate phase (AcOEt); 7. chloroform phase (CHCl₃); 8. hexane phase (C₆H₆); 9. Phase total of alkaloids; 10. (catusabine B); 11. 3α,6β-dibenzoyloxytropone n.d. – not determined. n.t. – not tested. The IC₅₀ and EC₅₀ and its 95% confidence interval (CI 95%) were obtained by non-linear regression.

Figure(1)
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 1

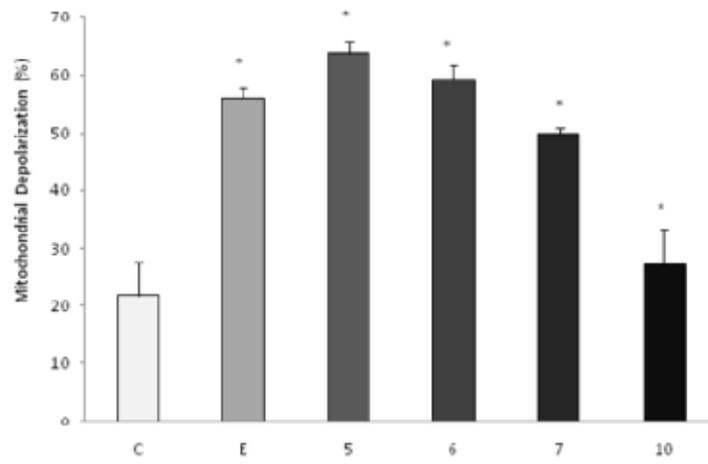


Figure(2)
[Click here to download high resolution image](#)

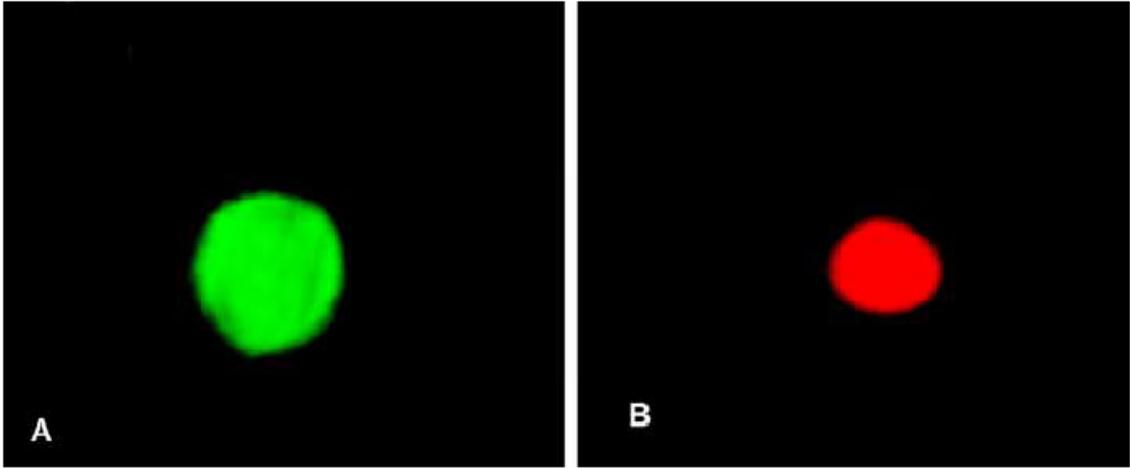


Figure(3)
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 3



Figure(4)
[Click here to download high resolution image](#)



6 ARTIGO CIENTÍFICO III

Antimicrobial and cytotoxic activities of *Erythroxylum subrotundum* A. St.-Hil.

Artigo a ser submetido ao periódico **Revista Brasileira de Farmacognosia**

Antimicrobial and cytotoxic activities of *Erythroxylum subrotundum* A. St.-Hil.

Jaciana S. Aguiar¹; Kêsia X. F. R. Sena¹; Rosilma O. Araújo¹, Steno L. Oliveira², Josean F. Tavares², Marcelo S. Silva², Silene C. Nascimento¹; Teresinha G. Silva^{1*}.

¹Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife-PE, Brazil

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Cx. Postal 5009, 58051-970, João Pessoa-PB, Brazil.

RESUMO

Erythroxylum é o maior gênero da família Erythroxylaceae e compreende cerca de 250 espécies, que são amplamente distribuídas em todos os trópicos, mas com grandes áreas de diversidade na América do Sul, África, Ilha de Madagascar, sudeste da Ásia e Austrália. O objetivo desse trabalho foi avaliar as ações antimicrobiana e citotóxica do extrato metanólico das partes aéreas de *E. subrotundum* e suas fases (hidroalcolica, acetônica, hexânica e acetato de etila). O extrato bruto e as fases foram testados em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo pelo método de difusão em disco de papel. As bactérias Gram-negativas não foram sensíveis as substâncias testadas. A fase acetato foi a mais ativa, mostrando halos de inibição em *Staphylococcus aureus* (13,0±0,0mm), *M. luteus* (18,5±0,7mm), *M. smegmatis* (17,0±0,0mm) e *E. faecalis* (12,0±0,0mm). Nos ensaios de citotoxicidade com MTT apenas a fase hexânica inibiu a proliferação celular de NCI-H292, K562 e Carcinoma de Ehrlich com CI₅₀ igual a 26,30±1,08 µg/mL, 32,50±1,69 µg/mL e 27,39±1,43 µg/mL, respectivamente. A citotoxicidade observada não está relacionada ao dano na membrana plasmática sugerindo que essa morte celular pode ser por apoptose.

Unitermos: *Erythroxylum subrotundum*, atividade antimicrobiana, atividade citotóxica, atividade hemolítica.

ABSTRACT

Erythroxylum is the largest genus in the family Erythroxylaceae and comprises about 250 species, which are widely distributed in the tropics, with large areas of diversity in South America, Africa, Madagascar, Southeast Asia and Australia. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and cytotoxic activities of methanol extracts of aerial parts and phases (hydroalcoholic, acetone, hexane and ethyl acetate) of *E. subrotundum*. The aerial extracts and phases were tested on Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi using the paper disc diffusion method. The Gram-negative bacteria were not sensitive to the substances tested. The acetate phase was the most active, showing inhibition of *Staphylococcus aureus* (13.0 ± 0.0 mm), *M. luteus* (18.5 ± 0.7 mm), *M. smegmatis* (17.0 ± 0.0 mm) and *E. faecalis* (12.0 ± 0.0 mm). In MTT cytotoxicity assays, only the hexane phase inhibited cell proliferation of NCI-H292, K562 and Ehrlich carcinoma cells with IC₅₀ values equal to 26.30 ± 1.08 µg/mL, 32.50 ± 1.69 µg/mL and 27.39 ± 1.43 µg/mL, respectively. The cytotoxicity observed was not related to damage to the plasma membrane, suggesting that this cell death may be caused by apoptosis.

Keywords: *Erythroxylum subrotundum*, antimicrobial activity, cytotoxic activity, hemolytic activity.

INTRODUCTION

The family Erythroxylaceae includes the following four genera: *Aneulophus* Benth, *Nectaropetalum* Engl, *Pinacopodium* Exell & Mendonça and *Erythroxylum* P. Browne. *Erythroxylum* is the largest genus and comprises about 200 species, which are widely distributed in the tropics, with large areas of diversity in South America, Africa, Madagascar, Southeast Asia and Australia (Brachet et al., 1997; Griffin & Lin, 2000; Zanorali et al., 2003; Barreiros et al., 2005; Brock et al. 2005; González-Guevara et al. 2006). *Erythroxylum* is composed of several plants that are used in traditional medicine in the treatment of bacterial and/or viral infections of the skin, amenorrhea, hemorrhage, renal and respiratory infections, influenza, sinusitis and upset stomach. *Erythroxylum* has also been used to combat fatigue and hunger and as a stimulant (Silva et al., 2001; Rodeiro et al., 2008).

Extracts of *E. pervillei* were shown to significantly inhibit the growth of a multidrug-resistant (MDR) KB-V1 cell line in the presence of vinblastine; however, these extracts were much less cytotoxic to KB-V1 cells in the absence of VLB or to normal KB cells. The alkaloids isolated from this species, pervillene B and C, showed cytotoxicity in ovarian adenocarcinoma (SKOV3) and multidrug-resistant ovarian adenocarcinoma (SKVLB) cell lines incubated with adriamycin (Silva et al., 2001). Alkaloids isolated from the roots of *E. rotundifolium* also showed cytotoxicity in the multidrug-resistant KB-V1 cell line in the presence of vinblastine (Chavez et al., 2002). Extracts of *E. catuaba* effectively protected mice from lethal infections of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Manabe et al., 1992). Additionally, the alcoholic extract of *E. moonii* showed strong antifungal activity against *Candida albicans* (Rahman et al., 1998).

Because of the large increase in pathogen resistance to multiple drugs and due to the indiscriminate use of antimicrobials, new therapeutic drugs are needed to treat microbial infections. Medicinal plants are among the natural products of great therapeutic interest because the diversity of their constituents enables the development of drugs to treat, prevent and cure diseases (Silva et al. 2007, Veiga Junior et al., 2005).

Drug discovery from medicinal plants has also played an important role in the treatment of cancer. In fact, most new clinical applications of plant secondary metabolites and their derivatives over the last half century have been applied towards combating cancer. Of all available anticancer drugs developed between 1940 and 2002, 40% were natural products per se or natural product-derived, with another 8% considered to mimic natural products. Anticancer agents from plants currently in clinical use can be categorized into four main classes of compounds: vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, taxanes and camptothecins.

Numerous derivatives of all four classes have been synthesized, and some are currently in clinical use. All of these natural products have led to significant biological discoveries related to their unique mechanisms of action (Balunas & Kinghorn, 2005).

The aim of this study was to evaluate the activity against Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi as well as the cytotoxic effect of extracts of the aerial parts of *E. subrotundum* and of its phases.

MATERIAL AND METHODS

Botanical materials and extract preparation

The aerial parts of *Erythroxylum subrotundum* were collected in the city of Maturéia, Pico do Jabre, Paraíba, Brazil. The botanical material was identified by Dr. Maria de Fátima Agra of the Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A dried specimen was deposited in the herbarium of Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) of the Universidade Federal da Paraíba under the identification label AGRA 4958.

The plant material was dried in a greenhouse with circulating air at a temperature of 40°C for 72 h and then triturated and ground in a mechanical mill. The powder obtained (4 kg) underwent macerated exhaustion with 95% ethanol for 72 h. After exhaustive extraction, the extracted solution was concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure and a temperature of 35°C. This produced a crude ethanol extract (500 g), which was subjected to a liquid/liquid partition.

The crude methanol extract was dissolved in a methanol-water solution (7:3) and subjected to successive liquid/liquid partitions with solvent in order of increasing polarity, providing the hexane, chloroform and ethyl acetate phases.

Animals

Swiss mice (female, 25–30 g) obtained from the central animal house of Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, were used. The animals were housed in cages with free access to food and water. All animals were maintained on a 12 h:12 h light–dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). The animals were treated according to the ethical principles of animal experimentation of COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, Brazil). The Animal Studies Committee of Universidade Federal do Pernambuco approved the experimental protocols (Number 23076.012173/2007-77).

Antimicrobial activity

The following microorganisms were obtained from the Departamento de Antibióticos collection of Universidade Federal de Pernambuco: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium smegmatis* and *Candida albicans*.

Antimicrobial activity was verified *in vitro* using the paper disc diffusion method (Bauer et al., 1966). The concentration of the microorganisms was standardized to an optical density of 0.5 McFarland units in physiological solution (Barry, 1986; Koneman, 1997), which corresponds to a concentration of approximately 10^7 UFC/mL for yeast and filamentous fungi and 10^8 UFC/mL for bacteria. The following media were used: Mueller Hinton Agar was inoculated with *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. marcescens*; glucose extract of yeast was inoculated with *E. faecalis* and *M. smegmatis* and Sabouraud was inoculated with *C. albicans*. Discs of barren paper (6 mm) were placed on the inoculated media, and 10 μ L of the methanol and phase extracts from the aerial parts of *E. subrotundum* (200.000 μ g/mL) were applied to the discs. After the placing of the discs, the plates were incubated for 24 h and 48 h at 30°C and 35°C. The antibiotics kanamycin and cetoconazole were used as standards at concentrations of 30 μ g/disc and 300 μ g/disc, respectively.

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bacteriostatic Concentration (MBC) was applied to the substances that showed halos larger than 12 mm using serial dilutions in half solid (Carvalho et al., 2002). Aliquots of different volumes (0.03 – 1.0 mL) of a 20.000 μ g/mL solution were placed in Petri dishes and homogenized with 10 mL of the appropriate culture medium. The microorganisms were sown in streaks on the surface of the medium, and the plates were incubated at 35°C and 30°C for 24 h and 48 h. The extract was considered inactive at values greater than 1.000 μ g/mL (Holetz et al., 2002).

MTT assay

The cytotoxicity of the methanol and phase extractions of the aerial parts of *E. subrotundum* in human and murine cancer lines was verified by the ability of living cells to reduce MTT to the formazan product (Mosmann, 1983; Alley et al., 1988).

Cytotoxic activity in human cancer lines

The cell lines K562 (human chronic myelocytic leukemia), NCI-H292 (human lung mucoepidermoid carcinoma) and HEp-2 (human larynx epidermoid carcinoma) were obtained from the Adolph Lutz Institute (São Paulo, Brazil). The cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C with 5% CO₂.

The cells were plated in 96-well plates (10^5 cells/mL for adherent cells or 0.3×10^6 cells/mL for suspended cells). After 24 h, extracts and phases (6.25 – 50 µg/mL) dissolved in DMSO were added to each well and incubated for 72 h. Control groups received DMSO alone. Etoposide and doxorubicin (1.25 - 20µg/mL) were used as positive controls. The growth of tumor cells was quantified by the ability of living cells to reduce the yellow tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) to a blue formazan product (Mosmann, 1983; Alley et al., 1988). At the end of the 72 h incubation, MTT (5.0 mg/mL) was added to the plate. Three hours later for suspended cells and 2 h later for adherent cells, the formazan product from the MTT reduction was dissolved in DMSO. The optical density (OD) of the wells was measured at 450 nm with an ELISA plate reader and compared to the control.

Cytotoxic activity in murine cancer lines

The murine Ehrlich Carcinoma (EC) cells were retained in the intraperitoneal cavity of mice. The cells were centrifuged (1000 rpm for 10 min), the supernatant was discarded and cells were resuspended in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C with 5% CO₂.

Tumor cells were seeded (2×10^6 cells/mL) in 96-well plates and incubated with the test substances (6.25 to 50 µg/mL). After 24 h, 10 µL of MTT (5.0 mg/mL) was added to each well and incubated for 4 h. The supernatant was then discarded and 100 µL of DMSO was added (Oliveira et al., 2010). The optical density (OD) of the wells was measured at 450 nm with an ELISA plate reader and compared to the control.

Hemolytic assay

Hemolytic assays were performed in 96-well plates, following the method described by Costa-Lotufo et al. (2005). Each well received 100 µl of 0.85% NaCl solution containing 10 mM CaCl₂. The first well was a negative control that contained only vehicle (10% DMSO), and in the second well, 100 µl of test substance diluted in half was added. The extracts were tested at concentrations ranging from 15.62 to 2000 µg/ml. The serial dilution

continued until the 11th well. The last well received 20 μ l of 0.1% Triton X-100 (in 0.85% saline) to obtain 100% hemolysis (positive control). Then, each well received 100 μ l of a 2% suspension of mouse erythrocytes in 0.85% saline containing 10 mM CaCl₂. After incubation at room temperature for 30 min and subsequent centrifugation, the supernatant was removed and the released hemoglobin was measured by a spectrometer at an absorbance of 450 nm. Extracts with an EC₅₀ value lower than 200 μ g/mL were considered active.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.D. The IC₅₀ and EC₅₀ values and their 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression using the SigmaPlot program 11.0.

RESULTS AND DISCUSSION

The emergence of antibiotics prevented the spread of bacterial diseases and enabled the treatment of thousands of individuals. However, the first recorded case of bacterial resistance was reported only a few years after the onset of the clinical use of penicillin. Several technological measures have been suggested to solve the problem of multidrug-resistant bacteria, including the search for new drugs or prototypes derived from plant species (Silva et al., 2010). However, the discovery of new antibiotics to circumvent bacterial resistance has achieved limited success, despite the considerable efforts of the scientific community.

Plants are an important source of potentially useful structures for the development of new chemotherapeutic agents. To identify potential therapeutic plant compounds, we first need to conduct *in vitro* antibacterial activity assays (Mahesh & Satish, 2008).

The antimicrobial activity of methanol and phase extracts from *E. subrotundum* was determined in Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi by the disc diffusion method. The methanol extract and the hexane phase were active against all microorganisms tested. However, the acetate phase was the most active, showing significant zones of inhibition in *S. aureus* (13.0 \pm 0.0mm), *M. luteus* (18.5 \pm 0.7 mm), *M. smegmatis* (17.0 \pm 0.0 mm) and *E. faecalis* (12.0 \pm 0.0 mm) (Table 1). The MIC and MBC values against sensitive organisms in antimicrobial testing are presented in Table 2. The results show that the hexane phase had the lowest MIC and MBC against *M. luteus* (125 μ g/mL and 500 μ g/mL, respectively). There are few reports of antimicrobial activity of the genus *Erythroxylum*. In one study, the alkaline extract of the bark of *E. catuaba* was shown to have protective action against lethal infections of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Manabe et al., 1992).

However, Rahman and colleagues (1998) reported an absence of antibacterial activity against *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* at concentrations of 100 and 200 µg/mL; in contrast, they demonstrated the antifungal activity of alcoholic extract of *Erythroxylum moonii* against *Candida albicans*.

Table 1

Table 2

Cytotoxicity is the initial effect that is indicative of antitumor activity observed in most chemotherapeutic treatments (Oliveira et al., 2010). The method of MTT reduction provides information about mitochondrial function by assessing the activity of succinate dehydrogenase (Mosmann, 1983). The cytotoxicity of the five samples, including extracts and phases, on human murine tumor cell lines was evaluated using the MTT method, and the results are presented in Table 3. The significant inhibition of cell proliferation was only observed in the hexane phase in NCI-H292 cells and Ehrlich tumors with IC₅₀ values equal to 26.30 ± 1.80 µg/mL and 27.39 ± 1.43 µg/mL, respectively. Most of these values were within the cutoff point of the National Cancer Institute criteria for cytotoxicity (IC₅₀ < 30 µg/mL) in the screening of promising crude plant extracts for further purification (Mesquita et al., 2009). To verify whether the cytotoxicity observed was related to membrane disruption, the hexane phase was tested for its ability to induce lysis of mouse erythrocytes, but hemolysis was not observed. These data suggest that the cytotoxic activity of the hexane phase was not related to the lytic properties or membrane instability induced by this phase.

Table 3

The experimental model of Ehrlich ascites tumors has been widely used in studies seeking to elucidate mechanisms of antitumor action of new substances. This model is easy to manage, easily transplantable and allows tumor growth in solid, subcutaneous tissue and ascites fluid in the peritoneal cavity of animals (Chen & Watkins, 1970; Oliveira et al., 2010).

Previous studies have shown that extracts and alkaloids of tropanes of *Erythroxylum sp.* display cytotoxicity in cell lines. The methanol extract and alkaloids of tropanes of *E. pervillei* inhibited the growth of KB-V1 cells (human cervix carcinoma multidrug-resistant) in the presence of vinblastine; however, these compounds were much less cytotoxic to KB-V1

cells in the absence of vinblastine or to KB cells (oral squamous cell carcinoma). The alkaloids of this species, pervillene B and C, showed cytotoxicity in ovarian adenocarcinoma (SKOV3) and multidrug resistant adenocarcinoma (SKVLB) cell lines incubated with adriamycin (Silva et al., 2001). Alkaloids isolated from the stem of *E. rotundifolium* also showed cytotoxic activity in KB-V1 cells (Chavez et al. 2002).

This study revealed that the hexanic phase of *E. subrotundum* contains promising active compounds. Further studies are necessary for the chemical characterization of the active compounds and more extensive biological evaluation of these compounds.

REFERENCE

- Alley MC, Scudiere DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48: (589-601).
- Balunas MJ, Kinghorn AD 2005 Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci* 78: (431 – 441).
- Barreiros ML, David JM, Queiroz LP, David JP 2005. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. *Bioch. Syst. Ecol.* 33: (537–540).
- Barry, A.L. 1986. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: theoretical considerations. In: Lorian V (ed) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins. pp.13.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turk M 1966. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. *Am J Clin Pathology* 45: (493 – 496).
- Brachet A, Munõz O, Gupta M, Veuthey J, Christen P 1997. Alkaloids of *Erythroxylum lucidum* stem-bark. *Phytochemistry* 46: (1439-1442).
- Brock A, Bieri S, Christen P, Drager B 2005. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. *Phytochemistry* 66: (1231–1240).
- Carvalho AA, Sampaio MCC, Sampaio FC, Melo AFM, Sena KXFR, Chiappeta AA, Higino JS 2002. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólico de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-negativas. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 21: (255-258).

- Chavez D, Cui B, Chai HB, Garcia R, Meija M, Farnsworth NR, Cordell GA, Pezzuto JM, Kinghorn AD 2002. Reversal of multidrug resistance by tropane alkaloids from the stems of *Erythroxylum rotundifolium*. *J Nat Prod* 65: (606-610).
- Chavez JP, Santos ID, Cruz FG, David JM 1996. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal* Costae. *Phytochemistry* 41: (941-943).
- Chen L, Watkins JF 1970. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich Ascites Tumour Cells. *Nature* 225: (734-735).
- Costa-Lotufo, LV, Cunha, GMA, Farias, PAM, Viana, GSB, Cunha, KMA, Pessoa, C, Moraes, MO, Silveira, ER, Gramosa, NV, Rao, VSN 2002. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon* 40: (1231-1234).
- González-Guevara JL, Veélez-Castro H, González-García KL, Payo-Hill AL, González-Lavaut JA, Molina-Torres J, Prieto-González S 2006. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 34: (539-542).
- Griffin WJ, Lin GD 2000. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane Alkaloids. *Phytochemistry* 53: (623-637).
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: (1027-1031).
- Khattak KF, Atta-ur-Rahman Choudhary MI, Hemalal KD, Tillekeratne LM 2002. New Tropane Alkaloids from *Erythroxylum moonii*. *J. Nat. Prod.* 65: (929-931).
- Koneman, EW. 1997. *Diagnóstico microbiológico*. J. B. Lippincott Co., México.
- Mahesh B, Satish S 2008 Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences* 4: (839-843).
- Manabe H 1992. Effects of Catuaba extracts on microbial and HIV infection. *In Vivo* 6: (161-165).

- Mesquita ML, Paula JE, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 123: (439–445).
- Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation. *J. Immunol. Methods* 16: (55–63).
- Oliveira LP, Pinheiro RC, Vieira MS, Paula JR, Bara MT, Valadares MC 2010. Atividade citotóxica e angiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20: 201-207.
- Oliveira SL, Tavares JF, Branco MVSC, Lucena HFS, Barbosa-Filho JM, Agra MF, Nascimento, SC, Aguiar, JS, Silva TG Simone CA, Araújo Júnior JX, Silva MS 2011. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. *Chem. Biodiversity* 8: (155-165).
- Rahman AU, Khattak KF, Nighat F, Shabbir M, Hemalal KD, Tillekeratne LM 1998. Dimeric tropane alkaloids from *Erythroxylum moonii*. *Phytochemistry* 48: (377-383).
- Rahman AU, Khattak KF, Nighat F, Shabbir M, Hemalal KO, Tillekeratne LM 1998. Dimeric tropane alkaloids from *Erythroxylum moonii*. *Phytochemistry* 48: 377-383.
- Rodeiro I, Donato MT, Lahoz A, González-Lavaut JA., Laguna A, Castell JV, Delgado R, Gómez-Lechón MJ 2008. Modulation of P450 enzymes by Cuban natural products rich in polyphenolic compounds in rat hepatocytes. *Chem-Biol Interact.*172: (1-10).
- Silva CV, Reis ALV, Ferrer SR, Guerreiro HMN, Barros TF, Velozo ES 2010. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20: (355-360).
- Silva GL, Cui B, Chávez D, You M, Chai HB, Rasoanaivo P, Lynn SM, O'Neill MJ, Lewis JA, Besterman JM, Monks A, Farnsworth NR, Cordell GA, Pezzuto JM, Kinghorn AD 2001. Modulation of the Multidrug-Resistance Phenotype by New Tropane Alkaloid Aromatic Esters from *Erythroxylum pervillei*. *J. Nat. Prod.* 64: (1514-1520).
- Silva JG, Souza IA, Higino JS, Siqueira-Junior JP, Pereira JV, Pereira MSV 2007. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: (572-577).

Veiga Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Quim. Nova* 28: (519-528).

Zanolari B. et al 2003. Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. *J. Nat. Prod.* 66: (497-502).

Zuanazzi JAS, Tremea V, Limberger RP, Sobral M, Henriques AT 2001. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: (819–825).

Table 1

Antimicrobial activity of the methanol extract of the aerial parts of *Erythroxyllum subrotundum* and of its phases (2000µg/disc).

Microorganisms	Zone of inhibition (mm)					Kanamicin (30µg/disc)	Cetoconazole (300µg/disc)
	1	2	3	4	5		
<i>S. aureus</i>	0.0	0.0	0.0	13.0±0.0	10.0±0.0	28	
<i>M. luteus</i>	0.0	0.0	0.0	18.5±0.7	13.5±2.1	34	
<i>B. subtilis</i>	0.0	0.0	0.0	11.5±0.7	0.0	29	
<i>P. aeruginosa</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20	
<i>M. smegmatis</i>	0.0	0.0	16.0±0.0	17.0±0.0	0.0	40	
<i>E. faecalis</i>	0.0	0.0	11.5±0.7	12.0±0.0	0.0	13	
<i>E. coli</i>	0.0	0.0	0.0	11.0±0.0	0.0	15	
<i>S. marcescens</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15	
<i>C. albicans</i>	0.0	0.0	18.0±0.0	0.0	0.0	-	24

1. Methanol extract of the aerial parts of *E. subrotundum*; 2. Hexane phase; 3. Chloroformic phase; 4. Acetate phase; 5. Hydroalcoholic phase. Mean ±SD

Table 2

Values the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bacteriostatic Concentration (MBC) of the phases of *Erythroxyllum subrotundum*.

Micro-organismos	3		4		5	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i>	n.t.	n.t.	2000	2000	n.t.	n.t.
<i>M. luteus</i>	n.t.	n.t.	125	500	500	1000
<i>B. subtilis</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>P. aeruginosa</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>M. smegmatis</i>	250	1000	250	2000	n.t.	n.t.
<i>E. faecalis</i>	n.t.	n.t.	2000	2000	n.t.	n.t.
<i>E. coli</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>S. marcescens</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>C. albicans</i>	500	1000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

3. Cloroformic phase; 4. Acetate phase; 5. Hydroalcoholic phase. Mean ±SD. n.t. – not tested.

Table 3

Cytotoxic and hemolytic activity of the methanol extract of the aerial parts of *Erythroxylum subrotundum*.

Substances	IC ₅₀ (µg/mL)			EC ₅₀ (µg/mL)	
	HEp-2	NCI-H292	K562	EC	
Methanol extract	nd	nd	nd	nd	nt
Acetate phase	nd	nd	nd	nd	nt
Chloroformic phase	nd	nd	nd	nd	nt
Hexanic phase	nd	26.30±1.08	32.50±1.69	27.39±1.43	> 2000
Hydroalcoholic phase	nd	nd	nd	nd	nt
Etoposide	6.10±0.19	2.75±0.10	4.48±0.23	nd	nt
Doxorubicin	5.29±2.19	4.89±1.71	nd	3.99±0.19	nt

n.d. – not determined. n.t. – not tested. The IC₅₀ and EC₅₀ and its 95% confidence interval (CI 95%) were obtained by non-linear regression.

7 CONCLUSÕES

- **Isolamento dos alcalóides**

A partir do extrato metanólico do caule de *Erythroxylum caatingae* foram isolados três alcalóides: (3 α -(3',4',5'-trimetoxi)-6 β -benzoilnitropano); 3 α -(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzoiloxi)-6 β -benzoiloxitropano; 3 α ,6 β -(dibenzoiloxitropano);

- **Atividade Antimicrobiana**

O extrato bruto e as fases de *Erythroxylum caatingae*, exceto a fase hexânica apresentaram atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positiva e fungo. As bactérias mais sensíveis foram *M. luteus* e *M. smegmatis*;

Apenas as fases acetato, clorofórmica e hidroalcoólica de *Erythroxylum subrotundum* apresentaram atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas;

- **Atividade Citotóxica**

O extrato metanólico de *E. caatingae* não apresentou citotoxicidade frente as linhagens tumorais humana KB, NCI-H292, HEp-2 e K562.

As fases acetato: metanol (95:5), acetato, clorofórmica e hexânica de *E. caatingae* apresentaram citotoxicidade frente a HEp-2, NCI-H292 e K562.

O alcalóide 3 α - (3', 4', 5'-trimetoxi) - 6 β - benzoilnitropano só apresentou citotoxicidade em linhagem de células K562.

As fases acetato: metanol (80:20) e (90:10) de *E. caatingae* foram citotóxica frente às linhagens NCI-H292;

Apenas a fase hexânica de *E. subrotundum* apresentou citotoxicidade frente a NCI-H292, K562 e Carcinoma de Ehrlich;

- **Atividade Hemolítica**

As substâncias que apresentaram citotoxicidade em linhagens tumoral humana e murina não causaram hemólise em eritrócitos de camundongos;

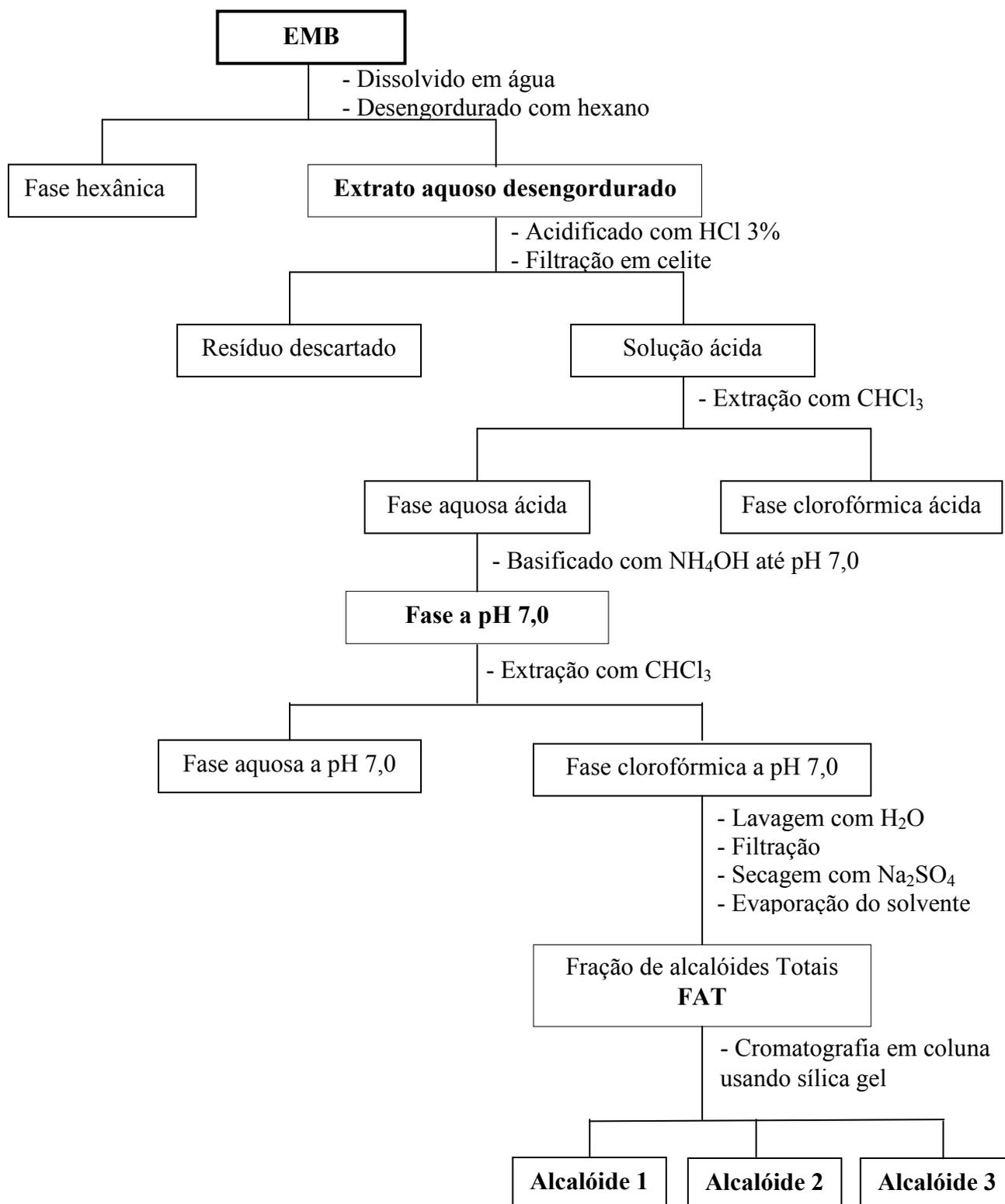
- **Mecanismo de ação envolvendo atividade citotóxica**

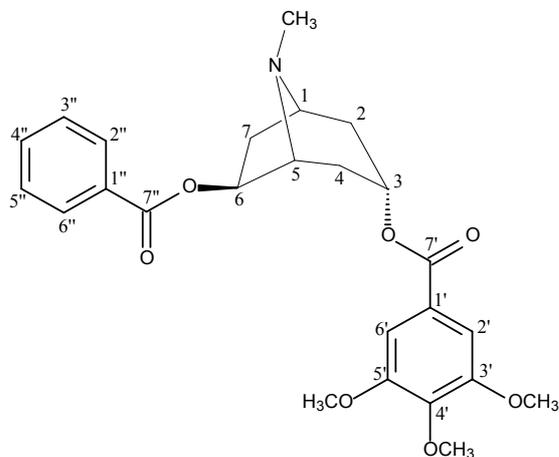
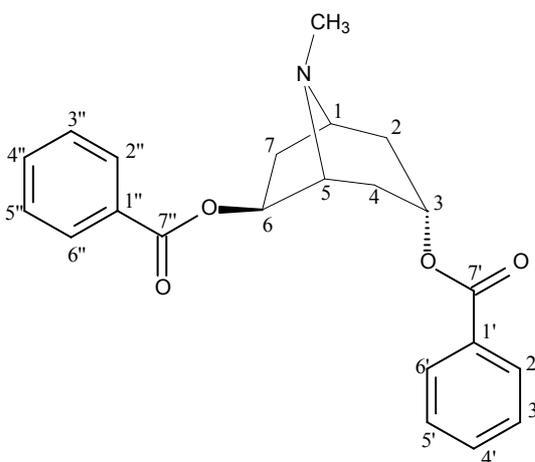
A citotoxicidade verificada da espécie *E. caatingae* foi induzida por apoptose com participação da via intrínseca (via mitocondrial);

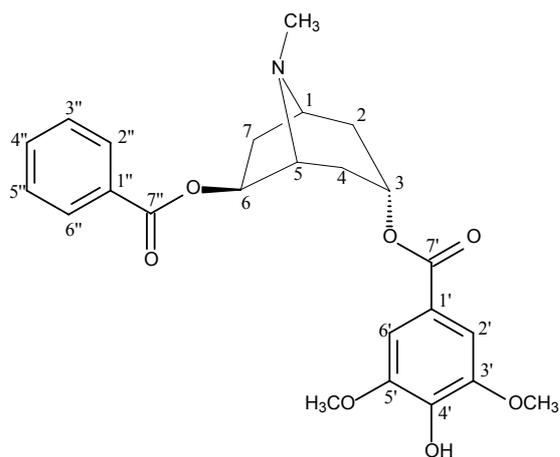
- **Atividade Antitumoral**

O extrato metanólico de *E. caatingae* inibiu o crescimento do Sarcoma 180 *in vivo*.

ANEXO A – Fluxograma 1: Marcha para extração e isolamento dos alcalóides do caule de *Erythroxylum caatingae*



ANEXO B – Alcalóides isolados do caule de *Erythroxylum caatingae*.**Alcalóide 1** - 3 α -(3',4',5' trimetoxibenzoiloxi)-6 β -beniloxitropano**Alcalóide 2** - 3 α ,6 β -dibenzoyloxytropano



Alcalóide 3 - 3 α - (3',5' dimetoxi - 4' - hidroxibenzoiloxi)-6 β -benzoiloxitropano

ANEXO C – Fluxograma 2: Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto das partes aéreas de *Erythroxylum subrotundum*

