

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**QUÍMICA ORGÂNICA**

**DISSERTAÇÃO**

**Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e  
*Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da  
correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade  
da piperina e derivados sintéticos**

**Kenia Pissinate**

**2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
ORGÂNICA**

***Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*.***  
**Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da**  
**piperina e derivados sintéticos**

**KENIA PISSINATE**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Aurea Echevarria**

*e Co-orientação do Professor*  
**Marco Edilson Freire de Lima**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
Curso de Pós-Graduação em  
Química Orgânica, Área de  
Concentração em Química  
Medicinal

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2006

583.952

P679a

T

Pissinate, Kenia, 1979

Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*: estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos / Kenia Pissinate - 2006.

xvi, 110 f. : il.

Orientadora: Aurea Echevarria.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas.

Bibliografia: f. 86-93.

1. Pimenta-do-reino - Toxicologia - Teses. 2. *Struthanthus marginatus* - Teses. 3. Carcinoma de Ehrlich - Teses. 4. Química farmacêutica - Teses. I. Echevarria, Aurea, 1950. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Exatas. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

**KENIA PISSINATE**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, área de Concentração em Química Medicinal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ----/----/-----

---

Dra. Aurea Echevarria. DEQUIM-UFRRJ  
(Orientadora)

---

Dr. Marco Edilson Freire de Lima. DEQUIM-UFRRJ  
(Co-orientador)

---

Dr. Célio Geraldo Freire de Lima. IBCCS-UFRRJ

---

Dr. José Daniel Figueroa Villar. IME-RJ

---

Dra. Helena Regina Pinto Lima. IB-UFRRJ.  
(Suplente)

**Aos meus pais  
Maria da Glória Modenese Pissinate e  
Orlando Domingos Pissinate  
Dedico com amor**

**À prof<sup>a</sup>. Dra. Áurea Echevarria com carinho, respeito e admiração,** pelas oportunidades oferecidas, amizade, paciência e, principalmente, pelos conhecimentos adquiridos, sobretudo quanto aos atos de humanidade e compreensão.

**Meu eterno agradecimento.**

## AGRADECIMENTOS

Aos *meus pais* pela confiança e acalento ao longo dos meus desafios, principalmente durante este momento.

Ao *meu bem* pelo carinho e compreensão ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos e companheiros de profundas reflexões *Alexandre, Ari e Heloísa* pelo carinho no desalento, pelos pensamentos lúdicos e sinceros que suavizaram meu caminho.

Ao professor Dr. *Marco Edilson Freire de Lima* pela colaboração com os compostos usados neste trabalho, pela amizade, oportunidade, incentivo e, principalmente pelos conhecimentos adquiridos.

Ao professor Dr. *Célio G. Freire de Lima* pelas oportunidades e colaboração prestada na execução dos ensaios para a averiguação do tipo de morte celular e, principalmente pelo carinho com que sempre fui recebida.

Ao *Alexandre G. Christo*, Dra *Rejan R Guedes-Bruni* e a Dra. *Regina Helena P. Andreata* pela colaboração na identificação da espécie.

Aos *professores* da pós-graduação.

Aos amigos do laboratório 22 e 29: *Myrtes, Cláudio, Amanda, Dílson, Ana Paula, Amanda, Silvana* pela amizade e solidariedade nos momentos bons e ruins ao longo deste trabalho.

A *Andressa Esteves de Souza* pela paciência e tolerância nos dias difíceis.

Aos colegas da pós-graduação em especial ao *Cleber, Andréia Rosane, Regina, Eliete, Rodney, Welinson, Catarina, Anivaldo, Mario Sérgio, Luciano, Marli e Virgínea* pela amizade.

Aos *amigos do Laboratório de Biologia Imunitária* do Instituto de Biofísica da UFRJ pelo companherismo, receptividade, em especial a *Roberta, Fabrício, Suzana, Landi, Alessandra, Marise, Ana, Carla, Flávia, Tatiana, Juliana e Lindomar* pela amizade e ajuda nos momentos difíceis.

Ao Dr *Kildare Miranda* pela realização das fotografias de microscopia eletrônica e a *Dra. Cristina Takiha* pela colaboração e confecção das lâminas colorimétricas.

Aos *funcionários da química* pelo apoio na realização desta pesquisa.

Aos companheiros do alojamento da pós-graduação em especial ao *José Dias, Nilza, Adailde, Fabiana, Caroline, Mariella e Elisangela*, pela amizade, apoio e descontração.

Aos *amigos* que indiretamente compartilharam comigo este momento, contribuindo para meu otimismo, perseverança, perspicácia e sensatez.

Ao *CNPq* pelo financiamento.

Ao *DPPG- Química Orgânica* e a *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* pela oportunidade oferecida.

**Meus sinceros agradecimentos.**



## RESUMO

**PISSINATE, Kenia. Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos.** 2006. 128p Dissertação (Mestrado em Química Orgânica, Química Medicinal). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

Neste trabalho foi realizado o estudo químico e biológico de duas plantas. Dos frutos da espécie *Piper nigrum*, conhecida como pimenta do reino, de grande importância econômica, ecológica e farmacêutica, foi preparado o extrato etanólico, do qual se obtém a piperina, amida majoritária e protótipo para a síntese de análogos e derivados sintéticos. O extrato, a piperina, análogos e derivados foi avaliado, quantitativamente, frente ao carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC) quanto a suas propriedades citotóxicas. Obteve-se um valor inibitório da viabilidade celular do EAC em aproximadamente 49 % para o extrato bruto de *P. nigrum*, a uma concentração de 25µg/ml, enquanto que o valor do IC<sub>50</sub> da piperina foi igual a 108,23µM, menos citotóxica que alguns dos seus análogos e derivados ensaiados. Também foram analisados os possíveis mecanismos de morte celular induzido pela piperina, derivados e análogos, através da expressão de fosfatidilserina e da desidrogenase láctica. O estudo da atividade citotóxica destes compostos foi correlacionado com os seus respectivos parâmetros hidrofóbicos: a refratividade molar ( $R_{Mw}$ ) e os valores calculados teóricos do coeficiente de partição P ( $ClogP$ ). A outra planta analisada foi a espécie *Struthanthus marginatus*, uma erva de passarinho da região tropical, pouco estudada em relação a *Visco album*, planta muito conhecida e estudada na Europa devido a suas propriedades farmacológicas, principalmente sua ação antitumoral. Com esta planta foram elaborados estudos de prospecção química dos extratos hidroalcóolicos das folhas, caules e haustórios nos quais puderam ser detectadas qualitativamente diferentes classes de metabólitos especiais, como taninos, flavonóides e alcalóides, em diferentes intensidades. A avaliação da atividade citotóxica desta erva de passarinho, foi realizada a partir das frações obtidas de diferentes polaridades.

**Palavras chave:** Piperina, *Struthanthus marginatus*, hidrofobicidade, Ehrlich, carcinoma, citotoxicidade.

## ABSTRACT

**PISSINATE, Kenia. Cytotoxic activity of *Piper nigrum* and *Struthanthus marginatus*. A preliminary study of the correlation between the cytotoxicity and hydrophobicity of piperine and its synthetic derivatives.** 2006. 109p. Dissertation (Master Science in Organic Chemistry, Medicinal Chemistry) Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

Chemical and biological studies of two plants were realized. The species *Piper nigrum*, commonly known as black pepper, is of great economic, ecological and pharmaceutical importance. Piperine, amide majority and prototype for the synthesis of analogous derivatives was obtained from the ethanolic extract of dried black pepper seeds. Cytotoxic properties of the extract, piperine, its analogous and derivatives were quantitatively evaluated against Ehrlich ascites carcinoma (EAC). The inhibitory value for cell viability of the EAC was approximately 49% for extract concentration of 25µg/ml. Piperine was less cytotoxic than its analogous and derivatives and its IC<sub>50</sub> value was 108.23µM. Possible mechanisms for cellular death induced by piperine, analogous and derivatives were analysed through expression of phosphatidylserine and of the lactate dehydrogenase. The cytotoxic activity of the above mentioned compounds were correlated with their hydrophobic parameters: molar refractivity ( $R_{Mw}$ ) and theoretical partition coefficient ( $ClogP$ ) values. The other plant analysed was *Struthanthus marginatus*, tropical mistletoe species, less studied than *Visco album*, a very known and studied plant in Europe, due to its pharmaceutical properties and antitumoral activity. Chemical screening of hydro-alcoholic extracts of leaves, stem and haustorium of this plant were realized. Different classes of special metabolites such as tannins, flavonoids and alkaloids were detected in different intensities. The cytotoxic evaluation of this mistletoe was realized in fractions of different polarities.

**Key words:** Piperine, *Struthanthus marginatus*, hydrophobicity, Ehrlich, cytotoxicity.

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

% inib.	percentagem de inibição
ADN	ácido desoxirubonucleico
ATP	trifosfato de adenosina
C <sub>aq</sub>	concentração na fase aquosa
CCF	cromatografia em camada fina;
ClogP	logarítimo do coeficiente de partição obtido teoricamente
C <sub>oc</sub>	concentração na fase orgânica (octanol);
dp	desvio padrão;
EAC	carcinoma ascítico de Ehrlich;
F <sub>1</sub> -AcOEt	primeira fração em acetato de etila
F <sub>2</sub> -AcOEt	segunda fração em acetate de etila
F-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	fração em diclorometano
F-MeOH	fração em metanol
LDH	desidrogenase láctica;
logP	logaritmo do valor do coeficiente de partição;
MDR	resistência à multiplas drogas
ml	mililitro
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
n	número de pontos;
nm	nanômetro
°C	graus Celcius
P	coeficiente de partição
PS	fosfatidilserina
QSAR	relação quantitativa entre a estrutura e a atividade
r	coeficiente de correlação;
r <sup>2</sup>	coeficiente de reta global;
R <sub>f</sub>	fator de retenção
R <sub>M</sub>	refratividade molar
R <sub>Mw</sub>	refratividade molar em 100% de fase aquosa
rpm	rotação por minuto
SAR	relação entre a estrutura e a atividade
vol	volume
µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DE <i>PIPER</i> NOS ESTADOS BRASILEIROS E AS PRINCIPAIS INDICAÇÕES NA MEDICINA POPULAR. ....	9
<b>TABELA 2.</b> DISTRIBUIÇÃO DE PIPERINA NAS FOLHAS, CAULES E FRUTOS DA ESPÉCIE <i>PIPER NIGRUM</i> . ....	19
<b>TABELA 3.</b> CITOTOXICIDADE DA PIPERINA EM CULTURAS DE CÉLULAS DE L292, DLA E EAC. ....	23
<b>TABELA 4.</b> EXTRATOS HIDROALCÓOLICOS OBTIDOS DOS HAUSTÓRIOS, CAULE E FOLHAS DE <i>STRUTHANTHUS MARGINATUS</i> . ....	49
<b>TABELA 5.</b> VALORES MÉDIOS DE $R_F$ DETERMINADOS PARA A PIPERINA E SEUS DERIVADOS. ....	53
<b>TABELA 6.</b> VALORES DE $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) DA PIPERINA, ANÁLOGOS E DERIVADOS SINTÉTICOS. ....	60
<b>TABELA 7.</b> VALORES DA % DE LIBERAÇÃO ESPECÍFICA DE LDH DAS CÉLULAS EAC FRENTE À PIPERINA, ANÁLOGOS E DERIVADOS E, SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES. ....	70
<b>TABELA 8.</b> VALORES DOS COEFICIENTES DE PARTICIPAÇÃO TEÓRICOS ( $CLOGP$ ) DA PIPERINA, SEUS DERIVADOS E ANÁLOGOS. ....	73
<b>TABELA 9.</b> VALORES DE $R_M$ DETERMINADOS PARA A PIPERINA, SEUS DERIVADOS E ANÁLOGOS SINTÉTICOS. ....	75
<b>TABELA 10.</b> VALORES DE $R_{MW}$ DETERMINADOS PARA A PIPERINA, SEUS DERIVADOS E ANÁLOGOS SINTÉTICOS. ....	76
<b>TABELA 11.</b> RESULTADOS DA TRIAGEM DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS ESPECIAIS NA ESPÉCIE <i>STRUTHANTHUS MARGINATUS</i> . ....	83
<b>TABELA 12.</b> ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FRAÇÕES DE <i>STRUTHANTHUS MARGINATUS</i> FRENTE ÀS CÉLULAS DO CARCINOMA DE EHRLICH. ....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS ISOLADOS DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	4
<b>FIGURA 2.</b> PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS ESPECIAIS, MAJORITÁRIOS, CITANDO ALGUNS EXEMPLOS PRESENTES NO GÊNERO <i>PIPER</i> . AMIDAS: PIPERINA (1) E CEFARADIONA A (2); <i>PROPENILFENÓIS</i> : SAFROL (3) E EUGENOL (4); <i>LIGNANAS</i> : SESAMINA (5); <i>NEOLIGANANAS</i> : KADSURINA A (6); <i>TERPENOS</i> : TRANSFITOL (7) E TERPINOLENA (9); <i>KAVAPIRONAS</i> : METISTICINA (8); <i>DIHIDROCHALCONAS</i> : ASEBOGENINA (10); <i>FLAVONA</i> : 7,4'-DIMETIOXI-5,3'-DIHIDROXIFLAVONA (11); <i>OUTROS</i> : DOPAMINA (12). ....	12
<b>FIGURA 3.</b> ESTRUTURA DAS NOVAS CICLOPENTENEDIONAS (13), (14) E (15), E DA COUMARINA (16) ISOLADAS DE <i>P. CARNICONNECTIVUM</i> .....	13
<b>FIGURA 4.</b> ESPÉCIE <i>PIPER NIGRUM</i> . ....	14
<b>FIGURA 5.</b> GRÃOS DE PIMENTA DO REINO SECOS: VERDES (1), PRETOS (2) E BRANCOS (3). GRÃOS DE PIMENTA DO REINO DE CONSERVA: VERDES (4) E VERMELHOS (5). ....	16
<b>FIGURA 6.</b> ESTRUTURAS DE ALGUMAS AMIDAS/ALCALÓIDES ISOLADAS DE <i>P. NIGRUM</i> .....	17
<b>FIGURA 7.</b> PIPERINA E SUAS TRÊS FORMAS ISOMÉRICAS. ....	18
<b>FIGURA 8.</b> DISTRIBUIÇÃO BIOGEOGRÁFICA DA FAMÍLIA LORANTHACEAE.....	25
<b>FIGURA 9.</b> ESTRUTURA DOS METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DA ESPÉCIE <i>SCURRULA ATROPURPUREA</i> .....	26
<b>FIGURA 10.</b> ESTRUTURA DA QUERCETINA (45), 4''-O-ACETILQUERCITRINA (46), CATEQUIN-4- $\beta$ -OL (47) E PERSEITOL (48) ISOLADOS DE <i>LIGARIA CUNIFOLIA</i> . ....	27
<b>FIGURA 11.</b> <i>STRUTHANTHUS MARGINATUS</i> . ....	31
<b>FIGURA 12.</b> HAUSTÓRIOS, RAÍZES MODIFICADAS DAS PLANTAS DO GÊNERO <i>STRUTHANTHUS</i> . ....	32
<b>FIGURA 13.</b> ESTRUTURAS DOS METABÓLITOS ESPECIAIS OBTIDOS DO ESTUDO DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	35
<b>FIGURA 14.</b> ALGUMAS ESTRUTURAS DOS ALCALÓIDES ISOLADOS DAS PLANTAS MEDICINAIS, DERIVADOS SEMI-SINTÉTICOS E ALGUNS ANÁLOGOS.....	38
<b>FIGURA 15.</b> PIPERINA, DERIVADOS E ANÁLOGOS.....	46
<b>FIGURA 16.</b> DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE $R_F$ .....	52
<b>FIGURA 17.</b> PIPERINA 1 E SEUS ANÁLOGOS DE MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL... ..	57
<b>FIGURA 18.</b> ESTRUTURA DAS AMIDAS ALCALÓIDAIAS SINTETIZADAS A PARTIR DO EUGENOL E DO SAFROL. ....	58
<b>FIGURA 19.</b> REDUÇÃO DO SAL TETRAZÓLIO (MTT) À FORMAZANA.....	60
<b>FIGURA 20.</b> SUB-POPULAÇÕES DE CÉLULAS DO EAC OBSERVADAS NO CITÔMETRO DE FLUXO APÓS 24H DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE. ....	63
<b>FIGURA 21.</b> EXPRESSÃO DA ANEXINA V NA SUB-POPULAÇÃO A DE CÉLULAS DO EAC APÓS 24H DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE. ....	65

<b>FIGURA 22.</b> EXPRESSÃO DA ANEXINA V NA SUB-POPULAÇÃO B DE CÉLULAS DO EAC APÓS 24H DO ENSAIO DE CITOTOXIDADE. ....	68
<b>FIGURA 23.</b> EXPRESSÃO DA ANEXINA V NO CONJUNTO ENVOLVENDO AMBAS SUB-POPULAÇÕES DE CÉLULAS DO EAC APÓS 24H DO ENSAIO DE CITOTOXIDADE. ....	69
<b>FIGURA 24.</b> ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ANEXINA V E LDH DAS CÉLULAS DO EAC FRENTE ÀS MÁXIMAS CONCENTRAÇÕES DAS AMIDAS ALCALOIDÁIS. AS BARRAS INDICAM AS PERCENTAGENS: DA SUB-POPULAÇÃO A (A), DA SUB-POPULAÇÃO B (B) E DO CONJUNTO DE SUB-POPULAÇÕES, A E B, (C) DE CÉLULAS MARCADAS COM ANEXINA V, DETECTADAS NO CITÔMETRO DE FLUXO E; DE LIBERAÇÃO ESPECÍFICA DE LDH. ESTES ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM CULTURAS INDEPENDENTES, APÓS 24 H. ....	71
<b>FIGURA 25.</b> CORRELAÇÃO ENTRE O $R_{MW}$ E O $CLOGP_{TEÓRICO}$ PARA TODOS OS COMPOSTOS ANALISADOS.....	78
<b>FIGURA 26.</b> CORRELAÇÃO ENTRE O $R_{MW}$ E O $CLOGP$ TEÓRICO DOS COMPOSTOS ANALISADOS, COM EXCEÇÃO DOS 53, 54, E 56.....	79
<b>FIGURA 27.</b> GRÁFICOS A E B REPRESENTANDO A CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE $IC_{50}$ COM OS PARÂMETROS HIDROFÓBICOS $CLOGP$ E $R_{MW}$ , RESPECTIVAMENTE. ....	80
<b>FIGURA 28.</b> GRÁFICOS A E B REPRESENTANDO A CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE $IC_{50}$ COM OS PARÂMETROS HIDROFÓBICOS $CLOGP$ E $R_{MW}$ , RESPECTIVAMENTE, DOS COMPOSTOS 1, 49, 53, 55, 56, 57 E 58.....	80
<b>FIGURA 29.</b> GRÁFICO REPRESENTANDO A CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE $IC_{50}$ COM O PARÂMETROS HIDROFÓBICO $CLOGP$ , ENVOLVENDO 1, 50, 51, 52, 54 E 55.....	81

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>ESQUEMA 1. FORMAÇÃO DA PIPERIDINA. ....</b>	<b>19</b>
<b>ESQUEMA 2. ROTA BIOSINTÉTICA DA PIPERINA. ....</b>	<b>20</b>
<b>ESQUEMA 3. FORMAÇÃO DO CÂNCER E DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASE.....</b>	<b>39</b>
<b>ESQUEMA 4. OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO DE <i>S. MARGINATUS</i> PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS. ....</b>	<b>50</b>
<b>ESQUEMA 5. DETERMINAÇÃO DA DESIDROGENASE LÁCTICA.....</b>	<b>55</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Importância do Estudo das Plantas Medicinais .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 A Família Piperaceae.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 O gênero <i>Piper</i> .....	7
1.2.2 A espécie <i>Piper nigrum</i> L.....	14
<b>1.3 A Família Loranthaceae.....</b>	<b>24</b>
1.3.1 O gênero <i>Struthanthus</i> .....	30
1.3.2 A espécie <i>Struthanthus marginatus</i> .....	31
<b>1.4 As Plantas Medicinais na Quimioterapia do Câncer .....</b>	<b>33</b>
1.4.2 Os alcalóides na quimioterapia do câncer .....	36
1.4.1 O câncer .....	39
<b>2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO .....</b>	<b>42</b>
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Equipamentos .....</b>	<b>44</b>
3.1.1 Preparação dos extratos .....	44
3.1.2 Ensaio biológico .....	44
<b>3.2 Reagentes e Solventes .....</b>	<b>45</b>
3.2.1 Preparação dos reagentes específicos para triagem fitoquímica.....	45
3.2.2 A piperina, análogos e derivados.....	46
3.2.3 Cromatografia em camada fina e de coluna filtrante .....	47
3.2.4 Ensaio biológico .....	47
<b>3.3 Material Vegetal .....</b>	<b>47</b>
3.3.1 Obtenção do extrato de <i>Piper nigrum</i> (Piperaceae).....	47
3.3.2 Obtenção dos extratos de <i>Struthanthus marginatus</i> (Loranthaceae).....	47
<b>3.4 Separação Cromatográfica .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5 Triagem Fitoquímica .....</b>	<b>51</b>
<b>3.6 Determinação dos Parâmetros Hidrofóbicos .....</b>	<b>51</b>



3.6.1 Método cromatográfico .....	51
3.6.2 <i>Clog P</i> .....	53
<b>3.7 Ensaios Biológicos.....</b>	<b>54</b>
3.7.2 Determinação da atividade citotóxica.....	54
3.7.3 Ensaio em citômetro de fluxo.....	54
3.7.4 Ensaio com a desidrogenase láctica (LDH).....	55
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Estudo da Espécie <i>Piper nigrum</i>, Piperina, Análogos e Derivados .....</b>	<b>57</b>
4.1.1 Atividade biológica .....	59
4.1.2 Estudo dos parâmetros hidrofóbicos .....	72
4.1.3 Estudo das correlações entre a hidrofobicidade versus a atividade biológica.....	79
<b>4.2 Estudo dos Extratos Obtidos da Espécie <i>Struthanthus marginatus</i> .....</b>	<b>82</b>
4.2.1 Ensaio de quimioprospecção .....	82
4.2.2 Obtenção e estudo das atividades citotóxica das frações de <i>S. marginatus</i> .....	84
<b>5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>86</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso dos produtos naturais, especialmente os derivados das plantas medicinais, para prover o alívio de doenças, é reconhecido tradicionalmente por mais de cinco milênios em várias civilizações. No decorrer dos anos, o estudo destes produtos tem contribuído enormemente para o desenvolvimento de diversos fármacos com importantes aplicações terapêuticas, correntemente utilizadas na medicina moderna, dos quais, aproximadamente 25 % são derivados direta ou indiretamente de plantas superiores (CALIXTO *et al*, 2005).

Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelo ao estudo de plantas, principalmente a partir do século 19, quando foram registradas as primeiras investigações sobre os vegetais, com base científica. Isto resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, já então conhecidos como medicinais (MOTANARI & BOLZANI, 2001).

Depois de algumas décadas, no século 20, a química de produtos naturais passou a representar a principal linha de pesquisa para as descobertas de novos agentes anticarcinogênicos (CRAGG & NEWMAN, 2005; CRAGG *et al*, 1997). Entre 1983 e 1994, muitos dos medicamentos de origem natural aprovados para o tratamento do câncer foram compostos oriundos do metabolismo de vegetais superiores (CORDELL, 1995).

O câncer é uma das mais terríveis doenças do século 20 e vem se expandindo, aumentando as incidências de casos no século 21. No entanto, recentemente, uma grande ênfase tem sido dada às pesquisas e à medicina alternativa, envolvendo plantas medicinais pertencentes a diferentes grupos etnobotânicos, com intuito de complementar as formas de se administrar esta doença (BALACHANDRAN, 2005).

## 1.1 Importância do Estudo das Plantas Medicinais

As plantas medicinais têm sido usadas pelo homem desde as grandes civilizações antigas, como a chinesa, indiana e norte africana, conforme evidenciam alguns manuscritos remanescentes, principalmente quanto à naturalidade do homem na utilização das plantas para o tratamento de uma ampla variedade de doenças (PHILLIPSON, 2001).

No entanto, os princípios ativos das plantas começaram a serem isolados a partir do século 19 e, um marco particular foi a descoberta da quinina (Figura 1), isolada da casca da *Chinchona* pelos cientistas franceses Caventou e Pelletier (PHILLIPSON, 2001).

Desde então, até anteceder a Grande Guerra Mundial, no século 20, uma série de produtos naturais isolados de vegetais superiores tornaram-se agentes clínicos e; numerosos deles ainda são usados nos dias de hoje, por exemplo: os alcalóides, morfina e codeína, extraídas do ópio (do látex dessecados dos frutos imaturos de *Papaver soniferum*), a digoxina isolada das folhas de plantas do gênero *Digitalis*, a atropina (derivada da hiosciamina) e a hioscina presentes em espécies da família Solanaceae, ilustrados na Figura 1 (PHILLIPSON, 2001).

O surgimento dos antibióticos produzidos pela fermentação microbiana aliada ao desenvolvimento marcante de fármacos sintéticos produzidos pela indústria farmacêutica, logo depois da Grande Guerra, foram causas marcantes do declínio do uso das plantas medicinais e conseqüentemente, no investimento em fármacos de origem vegetal (MOTANARI & BOLZANI, 2001).

Assim, nos anos pós-guerra, foram relativamente raras as descobertas de novas drogas de vegetais superiores com considerável importância, exceto a reserpina (Figura 1), isolada das espécies de *Rauwolfia*, precursora dos agentes tranqüilizantes e, os alcalóides, vincristina e vinblastina (Figura 1), da espécie *Catharanthus roseus* que foram efetivos na quimioterapia do câncer (PHILLIPSON, 2001).

Entretanto, nas últimas décadas do século 20, uma importante mudança de paradigma das sociedades ocidentais fez com que os produtos das plantas passassem novamente a ocupar papel de destaque por grande contingentes das populações dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (MOTANARI & BOLZANI, 2001).

Principalmente, para a indústria farmacêutica motivada pelas descobertas dos agentes quimioterápicos eficazes como a vincristina e a vinblastina além; da podofilotoxina obtida da espécie *Podophyllum peltatum* e, os análogos etoposída e teniposída; do taxol isolado da casca de *Taxus brevifolia* e; da artemisinina, um princípio

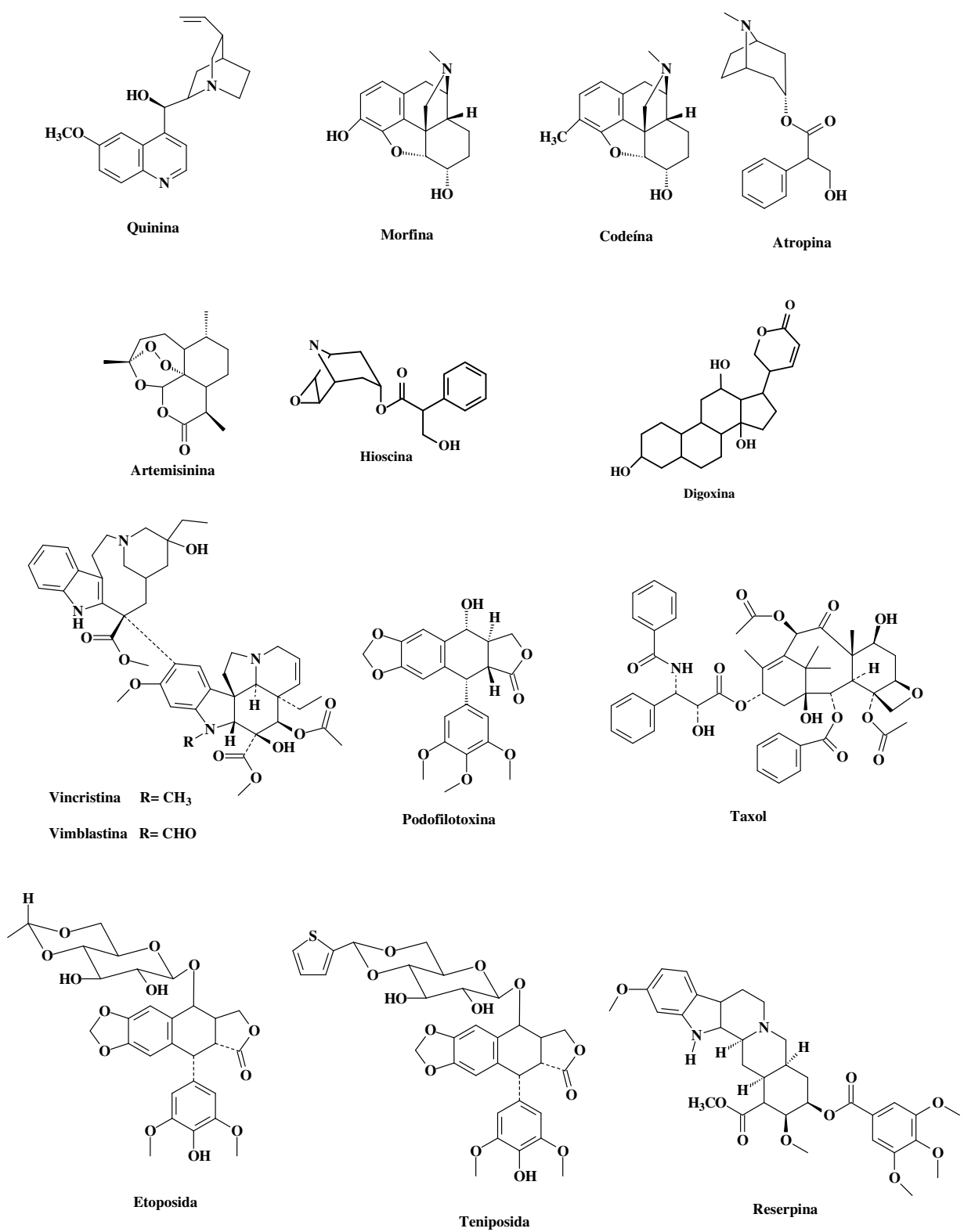
ativo extraído da planta *Artemisia annua*; reativando o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, conforme ilustra a Figura 1 (MOTANARI & BOLZANI, 2001). Iniciando-se a busca por substâncias naturais bioativas de estrutura molecular complexa, com a presença de centros assimétricos; estruturas complexas muito difíceis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional (MOTANARI & BOLZANI, 2001).

Esta retomada às pesquisas com os produtos naturais, principalmente de origem vegetal, nos últimos anos, acarretou em uma estratégica mudança dentro do estudo químico destas moléculas, incluindo técnicas mais rápidas e precisas quanto ao isolamento e elucidação estrutural, avaliação biológica, semissíntese e a biossíntese para a descoberta de novas moléculas com aplicações medicinais (CORDELL, 1995).

Uma alternativa para a descoberta de novas drogas naturais promissoras, a qual tem sido adotada pelas indústrias farmacêuticas é a química combinatória e o fracionamento guiado por bioensaio (MOTANARI & BOLZANI, 2001). Esses métodos permitem o acesso a uma série pré-selecionada de diversas moléculas naturais, estruturalmente favoráveis, fundamentadas em torno de um composto comum, fornecendo uma ampla “biblioteca” de moléculas em um curto espaço de tempo (PATERSON & ANDERSON, 2005).

Outros esforços, envolvendo a química orgânica sintética, têm sido a preparação de análogos de produtos naturais capazes de corresponderem de forma mais efetiva do que seus precursores à ação biológica. Todavia, a modificação estrutural, como a transformação de um grupo funcional, nos produtos naturais tem a vantagem de fornecer análogo de forma mais rápida, embora seja limitada em termos de variedades de compostos (PATERSON & ANDERSON, 2005).

No entanto, em alguns países detentores de uma fantástica biodiversidade, como o Brasil, as pesquisas com plantas medicinais ainda estão centradas no âmbito das universidades e institutos de pesquisas onde se desenvolve essencialmente a fitoquímica básica, embora existam vários grupos envolvidos na busca de princípios ativos de plantas. As indústrias farmacêuticas não investem nestas pesquisas, sendo que, cerca de 85% das indústrias transnacionais sediadas no Brasil praticam toda a pesquisa de descoberta e desenvolvimento de fármacos em seus países de origem (MOTANARI & BOLZANI, 2001).



**Figura 1.** Estruturas de compostos isolados das plantas medicinais.

São várias as utilidades dos produtos naturais, principalmente os oriundos das plantas, quer sejam como suplementos na alimentação, intermediários usados nas indústrias ou medicamentos (MOTANARI & BOLZANI, 2001), quer sejam no uso *in natura* das plantas medicinais como o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL *et al.*, 2002).

Portanto, a seguir, serão apresentados tópicos envolvendo as famílias, os gêneros e alguns metabólitos especiais referentes às duas espécies das plantas estudadas nesta dissertação de mestrado, visando, principalmente, a busca de novos agentes para a quimioterapia do câncer.

## 1.2 A Família Piperaceae

A família Piperaceae abrange uma das mais relevantes e antigas especiarias, a pimenta, comercializada de Malabar, uma região na costa oeste do sul Índia, para diversos países. A pimenta também é mencionada, em alguns manuscritos romanos do Século 5, como um importante bem econômico da cidade de Roma (MOBOT, 2005). Hoje, esta família botânica compreende um amplo número de espécies importantes, economicamente, devido suas propriedades como condimentos e medicinais; além da vasta maioria, sem valor econômico, mas extremamente relevantes ecologicamente.

Esta família pantropical é composta por alguns gêneros, cujos principais são: *Lepianthes*, *Sarcorhachis*, *Ottonia*, *Pothomorphe*, *Peperomia* e *Piper*. Destes, os maiores gêneros são os dois últimos citados, contendo cada um cerca de mil espécies. O gênero *Piperomia* é caracterizado em sua morfologia, principalmente, como plantas pequenas, suculentas, muitas vezes epífitas. Enquanto que o gênero *Piper* é composto por plantas lenhosas, incluindo arbustos, trepadeiras e pequenas árvores (DYER *et al.*, 2004).

A família Piperaceae, no Brasil, é representada, praticamente, em todos os estados do país, principalmente, pela espécie *Piper nigrum*, a pimenta do reino, que fora introduzida no século 17 pelos portugueses (EMBRAPA, 2005). Dentre os estados do nordeste brasileiro, tomando-se apenas o estado do Ceará como exemplo, além da espécie *Piper nigrum*, são compreendidos outros 35 *taxas* da família Piperaceae distribuídos em quatro gêneros: *Ottonia*, *Pothomorphe*, *Peperomia* e *Piper* (GUIMARÃES & GIORDANO, 2004).

Muitas destas espécies são utilizadas popularmente como condimento, principalmente os frutos; como ornamentação; e como medicinais através de chás, infusão, banhos aromáticos tanto das raízes quanto do caule e dos frutos, estes, muitas vezes, na forma seca ou moída, são empregados para o tratamento de um amplo espectro de doenças (GUIMARÃES & GIORDANO, 2004).

### 1.2.1 O gênero *Piper* L.

O gênero *Piper* da família Piperaceae tem mais de 1000 espécies que se distribuem geograficamente pelas regiões subtropicais (DYER *et al.*, 2004), tropicais e temperadas dos dois hemisférios (GUIMARÃES & GIORDANO, 2004). Este gênero apresenta uma das maiores diversidades de táxons nos países neotropicais, em que corresponde a cerca de 2/3 de todas as espécies neles descritas. Muitas plantas deste gênero crescem em florestas quentes, úmidas e com alto índice pluviométrico. Aproximadamente, 300 espécies são endêmicas do sudeste da Ásia, incluindo o leste das ilhas da Índia e o norte da Austrália. Apenas duas espécies são nativas da África. Na América Central, há ocorrência de cerca de 90 espécies na Península Osa na Costa Rica, como também em alguns países da América do Sul (DYER *et al.*, 2004).

No Brasil, ocorrem cerca de 266 espécies do gênero *Piper*, das quais 13 espécies e 4 variedades foram descritas apenas no estado do Ceará, embora praticamente todas também ocorram em outros estados nacionais (GUIMARÃES & GIORDANO, 2004). A Tabela 1 sumariza a ocorrência e as principais atividades medicinais das diversas espécies do gênero *Piper* nos estados brasileiros.

A maioria das espécies deste gênero não tem valor econômico, embora apresentem uma grande importância ecológica dentro do seu *habitat* natural, principalmente nas florestas úmidas. As folhas das plantas do gênero *Piper* servem de alimento para uma série de insetos herbívoros, enquanto que os frutos amadurecidos nutrem uma variedade de animais frugívoros, por exemplo, morcegos e pássaros (DYER *et al.*, 2004).

No entanto, algumas plantas do gênero *Piper* são economicamente muito importantes. Um exemplo é a espécie *P. methysticum* cujas raízes são fontes de “kava”, substância da classe das kavapironas, usada tradicionalmente na Polinésia como uma bebida narcótica, hoje, esta planta é de interesse para as indústrias na formulação de sedativos. Outras espécies complacentes como *P. cubeba*, *P. longum* e *P. auritum* são usadas localmente como condimentos ou medicinais. Uma das mais proeminentes é a espécie *P. nigrum*, originalmente da Índia, foi importante nos primeiros negócios estabelecidos entre a Europa e a Ásia, sendo hoje, a principal fonte de pimenta preta e é amplamente utilizada pela humanidade como condimento (DYER *et al.*, 2004).



Recentemente, foi identificado, particularmente em *P. longum*, *P. auritum*, e *P. hispidinervum* um dos principais óleos voláteis brasileiros, o safrol (Figura 2) explorado economicamente em Rondônia por indústrias químicas (SIMÕES *et al.*, 2004). Em algumas espécies como na *P. hispidinervum*, o safrol tem uma elevada concentração, atingindo de 83 a 93% dos óleos essenciais caracterizados (DYER *et al.*, 2004).

**Tabela 1.** Distribuição geográfica das espécies do *Piper* nos estados brasileiros e as principais indicações na medicina popular.

<b>Espécies</b>	<b>Distribuição Geográfica</b>	<b>Propriedades medicinais</b>
<b><i>Piper marginatum</i> Jacq.</b>	Amazonas, Pará, Ceará, Paraíba e Pernambuco	Seus frutos são usados como substitutos da pimenta-do-reino, utilizando-os como condimento. Também é usada sob a forma de chá, considerada antiespasmódica para afecções do fígado e do baço; segundo os índios quando amassadas, são utilizadas para aliviar coceiras das picadas de insetos.
<b><i>Piper amalago</i> (Jacq.) Yunck.</b>	Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso	Suas folhas são usadas sob a forma de cataplasmas ou, através do cozimento, são empregadas em banhos ou chás, devido suas propriedades sudoríferas acentuadas. São úteis ainda para os males do estômago. Os frutos são estimulantes além de serem usados para o tratamento das cardialgias, no tratamento de reumatismos.
<b><i>Piper cernuum</i> Vell.</b>	Amazonas, Ceará, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina	O suco das espigas, em aguardente, é de uso interno contra mordedura de cobra e o bagaço misturado com raízes pode ser aplicado sobre o ferimento produzido pelo animal. A raiz é considerada um medicamento sialagogo e diurético. O pó resultante das espigas secas é útil para tratamento de gonorréias crônicas e leucorréias.
<b><i>Piper tuberculatum</i> Jacq.</b>	Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso	No Ceará é conhecida como pimenta-de-macaco ou pimenta-longa, considerada planta medicinal como estimulante e carminativa.
<b><i>Piper arboreum</i> Yunck.</b>	Amazonas, Ceará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso	Sob a forma de chá e banhos aromáticos é a planta usada contra reumatismos, bronquites, resfriados e gripes fortes, sendo ainda carminativa e emoliente. As folhas tem óleo de sabor picante, com aroma semelhante ao do hortelã-pimenta, sendo empregadas como sudoríficas e afrodisíacas. Também são utilizadas nas dores de garganta e dentes.
<b><i>Piper divaricatum</i> G. Mey.</b>	Amazonas, Amapá, Pará, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Mato Grosso	A raiz é aromática, de sabor forte, semelhante ao do gengibre. As folhas e as raízes, quando em infusão, são empregadas internamente contra dores reumáticas e cólicas, e, quando cozidas, são utilizadas sob a forma de banhos antireumáticos.

Continuação da Tabela 1

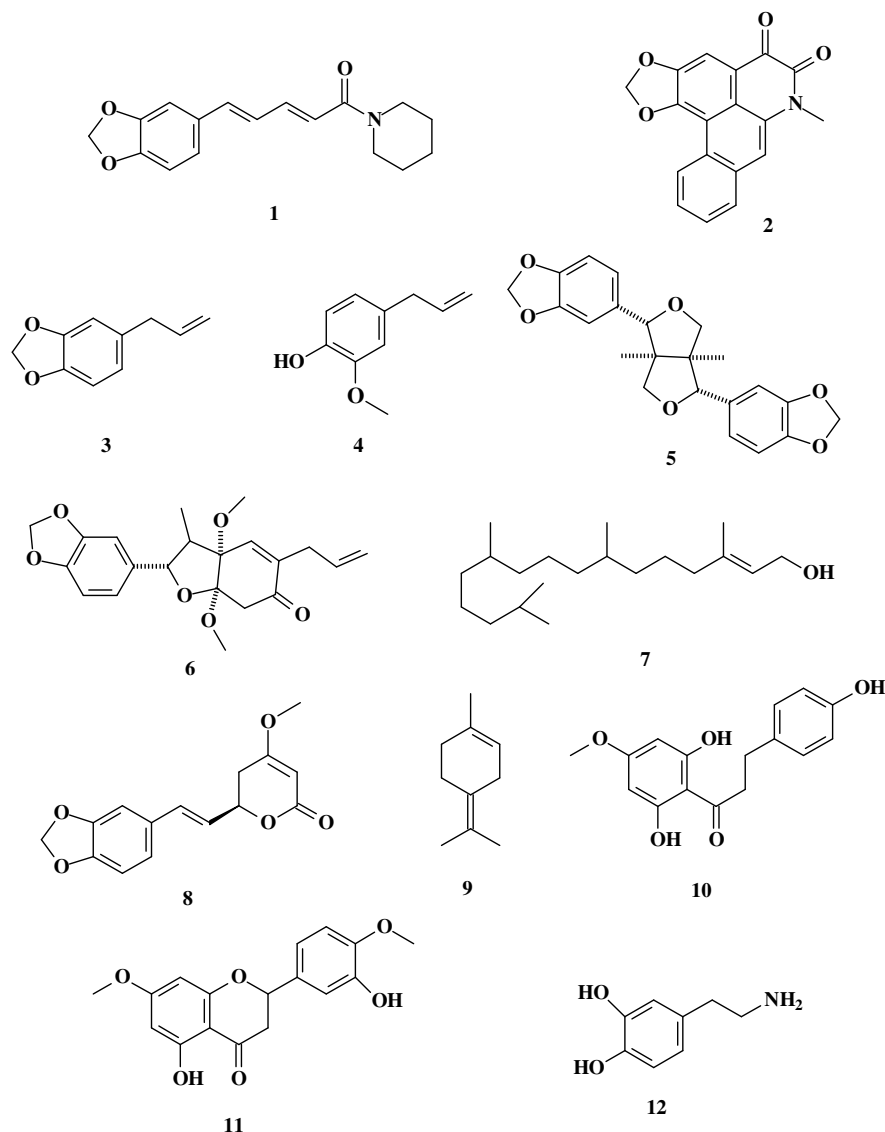
<b>Espécies</b>	<b>Distribuição Geográfica</b>	<b>Propriedades medicinais</b>
<i>Piper bartlingianum</i> Miq.	Amazonas, Amapá, Pará, Ceará	Não descritas
<i>Piper rufipilum</i> Yunck.	Endêmica no estado do Ceará	Não descritas
<i>Piper crassinervium</i> Kunth	Amazonas, Ceará, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina	Não descritas
<i>Piper mollicomum</i> Kunth, Linnaea	Ceará, Paraíba, Pernambuco, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso e Goiás	Os frutos são úteis para problemas estomacais, sendo também muito usados em doenças venéreas. Suas raízes são utilizadas como mastigatórios para anestesiarem as dores de dentes.
<i>Piper dilatatum</i> Rich.	Amazonas, Amapá, Pará, Maranhão, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso	Não descritas
<i>Piper aduncum</i> L.	Amazonas, Amapá, Pará, Mato Grosso, Ceará, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná	As folhas são utilizadas sob a forma de chá contra apatia intestinal e males estomacais. São adstringentes e diuréticos, sendo um hemostático poderoso usado em feridas, úlceras e leucorréias. Suas espigas curvas e aromáticas contêm taninos, essências e resinas. A infusão das folhas é usada como estomáquica, balsâmica, adstringente e desobstruente do fígado.
<i>Piper hispidum</i> Sw.	Amazonas, Pará, Ceará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso	As folhas, as raízes e os frutos são adstringentes, diuréticos e estimulantes, empregados como desobstruente do fígado. Também é utilizada para deter hemorragias traumáticas. As folhas são utilizadas sob a forma de banhos contra as hemorróidas, reumatismos e desinterias, quando frescas são usadas como emplastos em hernia de umbigo de crianças, tendo o mesmo uso no estado seco e reduzido a pó, sendo ainda consideradas hemostáticas. Os frutos são antiblenorrágicos.
<i>Piper carniconectivum</i> L.	Amazonas, Rondônia	Usado na medicina popular e como bioprodutor de óleo essencial.

Assim como o safrol e alguns propenilfenóis como o eugenol e a miristicina (Figura 2), compostos com estruturas relativamente simples, são comuns a outras plantas e estão presentes no gênero *Piper* (DYER *et al.*, 2004).

O gênero *Piper* tem uma grande diversidade de metabólitos especiais, abrangendo em torno de 667 compostos diferentes, caracterizados através de investigações fitoquímicas de apenas 112 espécies estudadas, as quais correspondem aproximadamente 10% do total de espécies conhecidas. Estes metabólitos especiais se distribuem nas seguintes classes de substâncias: 190 alcalóides/amidas, 49 lignanas, 70 neolignanas, 97 terpenos, 39 propenilfenóis, 15 esteróides, 18 kavapironas, 17 chalconas/dihidrochalconas, 16 flavonas, 6 flavanonas, 4 piperolídeos e 146 miscelâneas de compostos não muito comuns dentro do grupo majoritário dos metabólitos especiais (DYER *et al.*, 2004).

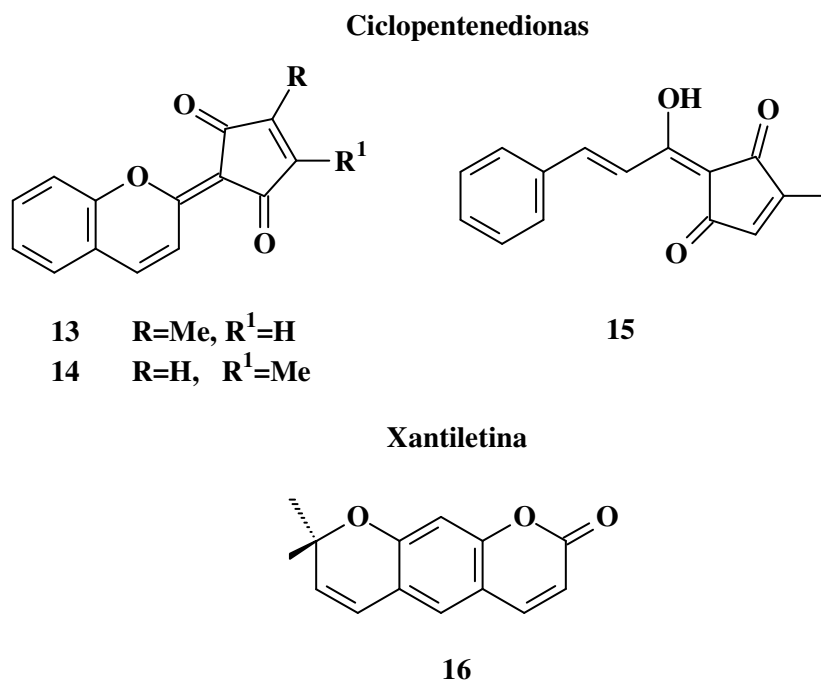
Muitas destas classes de compostos têm sido investigadas quanto às várias atividades biológicas, atribuindo a muitas espécies propriedades farmacológicas (DYER *et al.*, 2004). Dentre as atividades farmacológicas identificadas neste gênero, encontram-se suas propriedades antitumorais (SIMÕES *et al.*, 2004) e antiinflamatórias (STÖHR, 2001).

As bioatividades destes metabólitos têm consentido a algumas plantas sua utilização oficial por mais de 2000 anos na tradicional na medicina Chinesa (STÖHR, 2001), assim como, entre povos do continente Americano, principalmente, por tribos indígenas da floresta Amazônica (GUIMARÃES & GIORDANO, 2004).



**Figura 2.** Principais classes de metabólitos especiais, majoritários, citando alguns exemplos presentes no Gênero *Piper*. *Amidas*: piperina (1) e cefradiona A (2); *Propenilfenóis*: safrol (3) e eugenol (4); *Lignanas*: sesamina (5); *Neoligananas*: kadsurina A (6); *Terpenos*: transfitol (7) e terpinolena (9); *Kavapironas*: metisticina (8); *Dihidrochalconas*: asebogenina (10); *Flavona*: 7,4'-dimetioxi-5,3'-dihidroxi-flavona (11); *Outros*: dopamina (12).

Recentes investigações fitoquímicas com as raízes da espécie *P. carniconnectivum*, coletada no estado de Rondônia, contribuíram para a descoberta de três novas ciclopentadionas **13-15** e o isolamento de uma coumarina, conhecida, xantiletina **16** (Figura 3) (FACUNDO *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Estrutura das novas ciclopentenedionas (**13**), (**14**) e (**15**), e da coumarina (**16**) isoladas de *P. carniconnectivum*.

### 1.2.2 A espécie *Piper nigrum* L.

A *Piper nigrum* L. (Figura 4), espécie tipo do gênero *Piper* (GUIMARÃES & GIORDANO, 2004), é uma das mais conhecidas dentre as mais de 1000 espécies da família Piperaceae, devido ao seu valor comercial, econômico, e a sua importância medicinal (WEI *et al.*, 2005).

Originária da floresta de Kerala, sul da Índia, os frutos de *Piper nigrum* constituem a especiaria que mais atraiu os comerciantes no final do século 15, principalmente os portugueses, após a descoberta da rota mais curta para a Índia partindo da Europa (EMBRAPA, 2005). Os portugueses passaram a dominar este produto o qual é conhecido, popularmente, nos países de língua portuguesa como pimenta-do-reino (EMBRAPA, 2005) e também denominada, pelos espanhóis, de pimenta preta e, pelos ingleses, de *pepper* (BARRETO-JUNIOR, 2005).



**Figura 4.** Espécie *Piper nigrum*.

A introdução da pimenta-do-reino, no Brasil, pelos colonos portugueses no séc. 17, ficou restrita aos estados do litoral brasileiro que só foi estabelecida como cultivo racional após a introdução da cultivar Cingapura (ecotipo de Kuching) por imigrantes japoneses, em 1933. Mais tarde, os japoneses e os brasileiros introduziram o sistema de cultivo intensivo praticado na Malásia, tornando o Brasil auto-suficiente, em 1950. Hoje, é cultivada em mais de 100 municípios nos Estados do Pará, Espírito Santo, Bahia, Maranhão, Ceará, Paraíba e,

recentemente, no Estado do Amapá, alcançando o Brasil no ano de 2004 uma produção de 30.000 toneladas por hectare/ano (EMBRAPA, 2005).

A pimenta do reino é uma das únicas especiarias cujos frutos podem ser comercializados em quatro diferentes versões de grãos de pimenta: preta, branca, verde e vermelha (Figura 5). A pimenta tipo preta, mais comum, é o fruto em sua maioria amadurecido, debulhado das espigas e secado ao sol ou com auxílio de um secador elétrico (UNI-GRAZ, 2005).

Os frutos totalmente amadurecidos são usados para produzir a pimenta branca isenta do invólucro externo (exocarpo e mesocarpo) o qual confere o aroma a pimenta, por conter uma parte dos compostos voláteis e açúcares. Comumente, o processo para remoção do invólucro consiste em umedecer as espigas, não debulhadas, encharcando-as por uma semana em tanques de água corrente, para que o mesocarpo se desintegre do endocarpo. O grão remanescente é seco e o sólido branco pulverizado (endocarpo) é chamado de pimenta branca, tão pungente quanto à pimenta preta (UNI-GRAZ, 2005).

Pimenta verde, pouco pungente e de sabor “fresco”, é uma das formas de se comercializar a pimenta do reino, principalmente, em Madagascar para o consumo como condimento. Os frutos verdes são recolhidos das espigas, antes de iniciar o processo de fermentação, e imediatamente colocados em conservas de salmoura ou vinagre. As conservas também podem ser feitas com os frutos maduros originando a pimenta tipo vermelha, uma mercadoria muito rara, considerada mais pungente do que a pimenta preta e com o frescor de pimenta verde, é produzida em Kerala, sul da Índia (UNI-GRAZ, 2005).





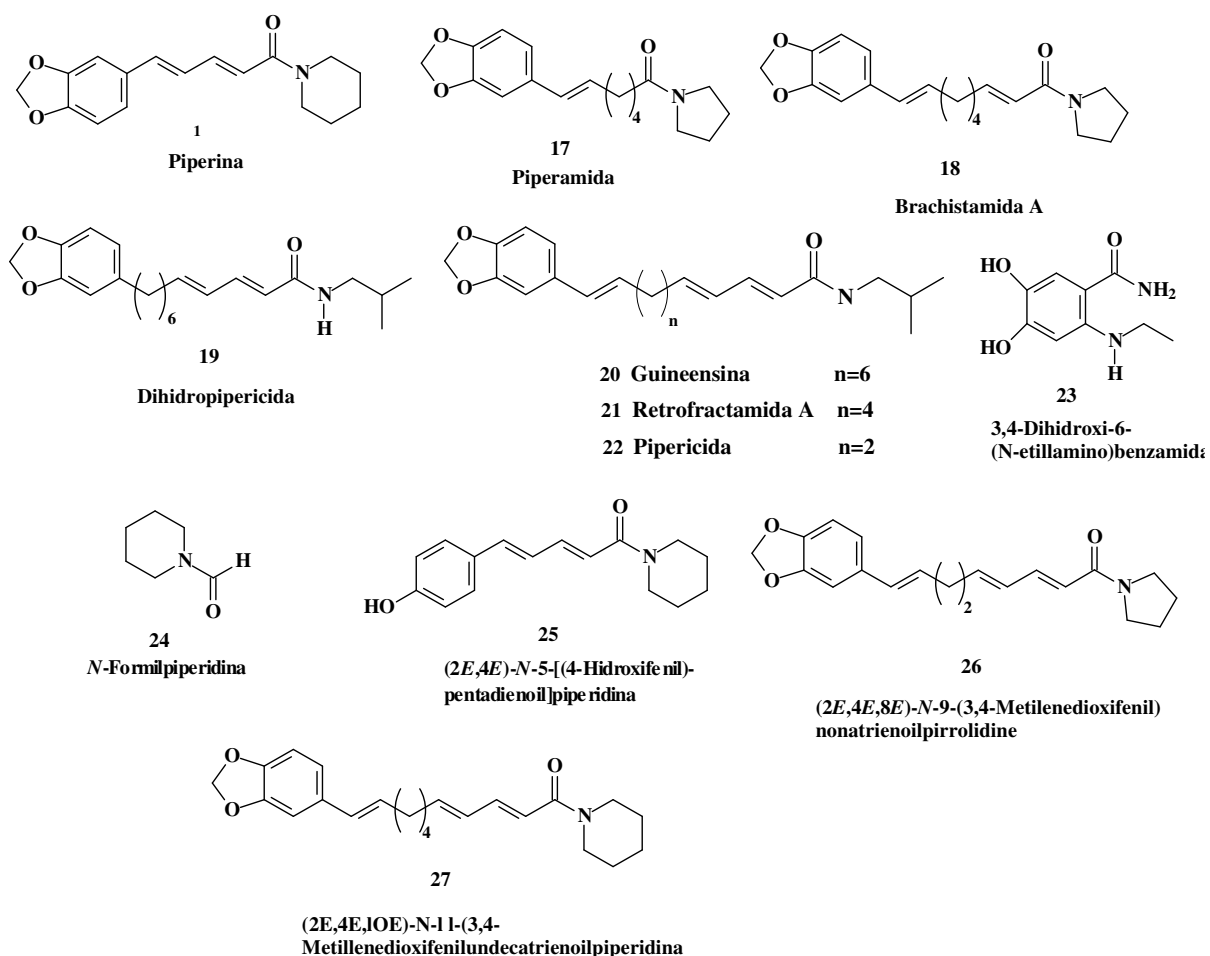
**Figura 5.** Grãos de pimenta do reino secos: verdes (1), pretos (2) e brancos (3). Grãos de pimenta do reino de conserva: verdes (4) e vermelhos (5).

A espécie *P. nigrum* é uma planta perene com caule liso, redondo, nodoso e ramificado; as folhas são inteiras, lâminas ovaladas, ápice agudo, coriáceas e com sete nervuras principais; as flores são pequenas, brancas, dispostas em espigas; os frutos são globulares, vermelhos quando maduros que ao secarem possuem uma superfície grossa e rugosa (MOBOT, 2005).

As investigações fitoquímicas realizadas, ao longo das últimas décadas, em *P. nigrum* revelaram uma ampla variedade de metabólitos especiais presentes nesta espécie, os quais se distribuem em diferentes classes de compostos: amidas/alcalóides, propenilfenóis, lignanas, neoliganana, terpenos, flavonas e miscelâneas de compostos, dos quais alguns são encontrados apenas nesta espécie (PARMAR *et al.*, 1997).

Recentes averiguações realizadas com os frutos desta espécie resultaram no isolamento de novos metabólitos especiais, atingindo um total de 35 amidas (WEI *et al.*, 2004) e; das raízes, 39 amidas alcaloidáis e 21 bisamidas (WEI *et al.*, 2005).

Muitas das amidas alcaloidáis isoladas da pimenta do reino (Figura 6), diante de investigações biológicas, têm apresentado importantes atividades. Por exemplo, a pipericida **22** tem apresentado propriedade inseticida frente ao *Callosobruchus chinensis*, assim como a di-hidropipericida e a guineensina, também são tóxicas ao macho desta espécie. As amidas guineensina, pipericida e retrofractamida A apresentaram toxidez aos mosquitos das espécies *Culex pipiens pallens*, *Aedes togoi* e *Aedes aegypti*, enquanto que outras como a piperina apresentam propriedade antipirética, analgésica e antiinflamatória (PARMAR *et al.*, 1997).

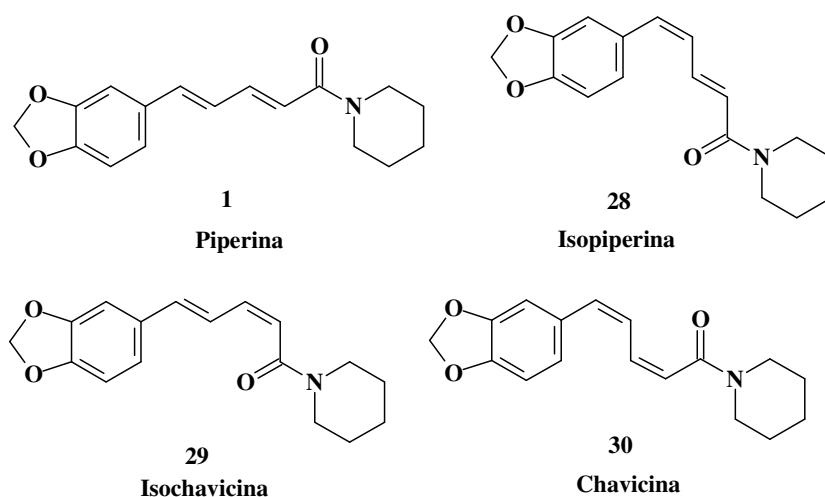


**Figura 6.** Estruturas de algumas amidas/alcalóides isoladas de *P. nigrum*.

Neste trabalho de dissertação de mestrado, a piperina foi o alvo de nossos estudos devido esta amida/alcalóide ser o metabólito majoritário da espécie *P. nigrum*, de fácil extração, podendo ser obtida com bom rendimento, através da preparação do extrato etanólico dos frutos secos da pimenta do reino, com auxílio do extrator de Soxhlet. Outro fato relevante que fez desta espécie um dos objetos de estudos deste trabalho, é ser o Brasil um dos maiores produtores deste condimento. Portanto, a piperina será o objeto de maior destaque quanto às suas propriedades e ocorrências.

## Piperina

As amidas alcaloidais constituem a classe mais abundante de metabólitos especiais dentro do gênero *Piper*, correspondendo, na espécie *P. nigrum*, cerca de 20% dos compostos já conhecidos (PARMAR *et al.*, 1997). Uma das mais importantes e das primeiras amidas isoladas - por Oerstedt em 1819 e determinada estruturalmente por LANDENBURG & SCHOLTZ em 1894 (EPSTEIN *et al.*, 1993) - é a piperina **1** (PARMAR *et al.*, 1997). Trata-se do isômero 2*E*,4*E* do esqueleto 5-(benzo[1,3-*d*]dioxol-5-il)-1-(piperidinil)-2,4-pentadien-1-ona. A piperina em algumas espécies apresenta-se, minoritariamente, nas três formas isoméricas: 2*Z*,4*E*, (isopiperina); 2*E*,4*Z* (isochavicina) e 2*Z*,4*Z* (chavicina), ilustradas na Figura 7 (BUDAVARI, 1996).



**Figura 7.** Piperina e suas três formas isoméricas.

A piperina, isolada das espécies: *P. acutisleginum*, *P. album*, *P. argyrophylum*, *P. attenuatum*, *P. aurantiacum*, *P. betle*, *P. callosum*, *P. chaba*, *P. cubeba*, *P. guineense*, *P. hancei*, *P. khasiana*, *P. longum*, *P. macropodum*, *P. nepalense*, *P. nigrum*, *P. novae hollandiae*, *P. peepuloides*, *P. retrofractum*, *P. sylvaticum*, *P. puberulum*, atinge uma concentração média de 5 % nas plantas. (PARMAR *et al.*, 1997). Em estudos mais recentes, pode-se obter a piperina na forma de cristais amarelo-claros da espécie *P. nigrum* com 7% de rendimento (RIBEIRO, 2004).

Na espécie *Piper nigrum*, a piperina se distribui tanto nas folhas e caules quanto nos frutos, onde ocorre em maior proporção (Tabela 2), sendo mais abundante nas partes secas do vegetal (SEMLER & GROSS, 1988).

**Tabela 2.** Distribuição de piperina nas folhas, caules e frutos da espécie *Piper nigrum*.

Material Vegetal		Piperina	
		(mg/g pfr) <sup>a</sup>	(mg/g ps) <sup>b</sup>
Raiz:	jovem	0,057	0,32
Folhas:	jovem	0,0006	0,0049
	madura	0,0002	0,0007
Caules:	jovem	0,0087	0,070
	madura	0,46	1,92
Frutos <sup>c</sup>	Pimenta preta	—	31,09 <sup>d</sup>
	Pimenta branca	—	2,25

<sup>a</sup> Miligrama por grama de peso fresco de pimenta

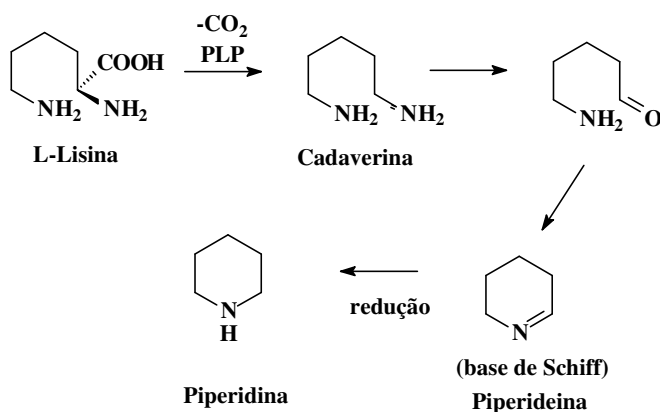
<sup>b</sup> Miligrama por grama de peso seco de pimenta

<sup>c</sup> Obtidos de amostras comerciais

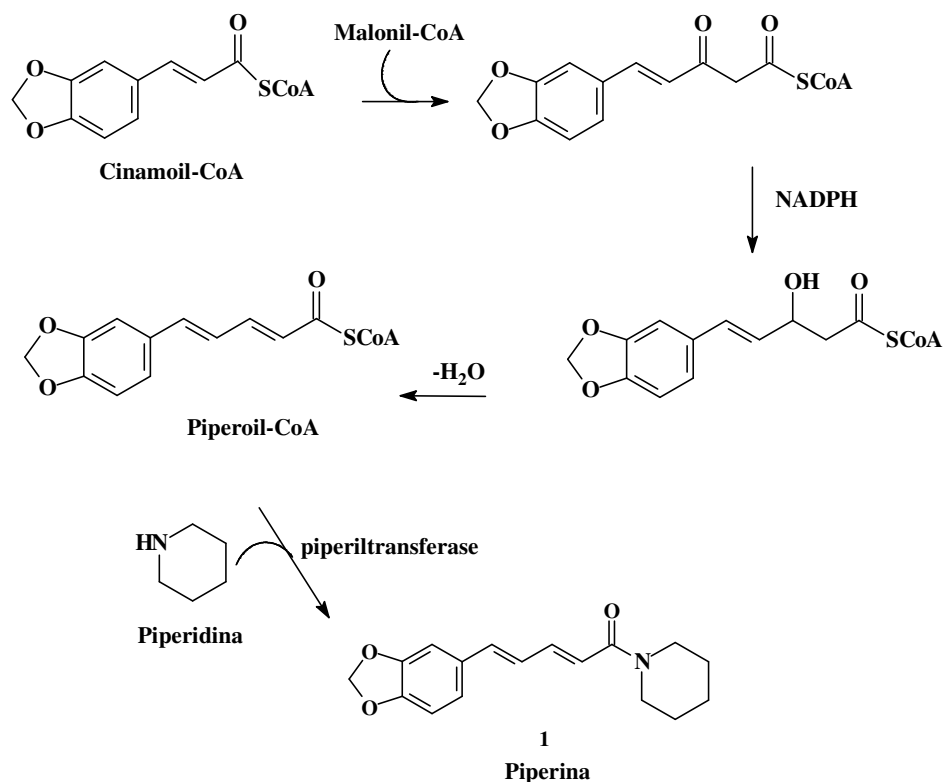
<sup>d</sup> Média dos valores encontrados das amostras de pimenta preta

### Biossíntese da piperina

A biossíntese da amida alcaloidais, piperina, envolve a formação do anel piperidínico o qual é originado após a perda do grupo carboxila da L-lisina, aminoácido precursor (Esquema 1). Posteriormente, ocorre a formação da porção do ácido pipérico (Esquema 2), derivado do cinamoil-CoA, cuja cadeia carbônica é estendida através da incorporação de uma unidade de malonil-CoA, a qual sofre posterior redução, via catálise enzimática, seguida por uma desidratação, formando o tioéster piperoil-CoA que reage com a piperidina originando a piperina (DEWICK, 2001).



**Esquema 1** - Formação da piperidina.



**Esquema 2.** Rota biossintética da piperina.

### Propriedades farmacológicas da piperina

Uma grande diversidade de atividades biológicas apresentada em estudos farmacológicos com a piperina a evidencia como uma das mais importantes amidas/alcalóides presente em espécies do gênero *Piper*, principalmente, na espécie *P. nigrum* na qual a piperina é um dos principais constituintes.

Extratos de *P. nigrum* têm sido usados na medicina tradicional Chinesa para o tratamento de doenças reumáticas e doenças do trato respiratório. Estudos prévios sugerem que estes extratos e alguns constituintes possuem propriedades inibitórias frente à enzima ciclooxigenase-1, importante para a formação de prostaglandinas cuja relevância é mediar o desenvolvimento de processos inflamatórios, como o reumatismo (GEITZ *et al.*, 1997).

STÖHR *et al.*, evidenciou que extratos de espécie *Piper* constituídas de amidas/alcalóides, principalmente de piperina, são promissores na inibição das enzimas ciclooxigenase-1 e lipoxigenase-5, fundamentais para o metabolismo do ácido araquidônico (STÖHR *et al.*, 2001). A enzima lipoxigenase-5 é responsável pela formação de leucotrienos proinflamatórios (SMITH, 1996).

Outros estudos com extrato de *P. nigrum*, miscigenado com piperina e outras amidas, indiciam a capacidade destes compostos de aumentar a proliferação de melanócitos, o que sugere sua aplicação no tratamento de vitiligo. VENKATASAMY *et al.* confirmaram que a piperina pura e seus análogos sintéticos são capazes de induzir a proliferação de linhagem de células melanócitas de ratos *in vitro* (VENKATASAMY *et al.*, 2004).

A piperina além de apresentar atividade antipirética, analgésica e antiinflamatória, como citado anteriormente, pode agir no sistema nervoso central, em animais de laboratório, como substância depressora, produzindo efeitos hipnóticos (JOHRI & ZUTSHI, 1992).

Estudos recentes evidenciaram a ação da piperina na inibição da atividade, em ratos, da enzima monoamina oxidase (MAO), responsável por catalisar a desaminação oxidativa de neurotransmissores como, por exemplo, serotonina e dopamina. As substâncias inibidoras da MAO são usadas no tratamento de distúrbios mentais, principalmente como antidepressivos e, na terapia das doenças de Parkinson e Alzheimer (LEE *et al.*, 2005).

Esta amida/alcalóide em ratos é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, podendo ser detectada no plasma branco em 15 minutos após a administração intravenosa (BAJAD *et al.*, 2002). Quando administrada oralmente, a piperina contribui para o aumento da permeabilidade das células intestinais (WEI, *et al.*, 2005), aumentando a biodisponibilidade de diferentes drogas como a curcumina, espateína, barbitúrios, propanol e teofilina (ATAL *et al.*, 1985; JOHRI & ZUTSHI, 1992). Possivelmente, por induzir alteração na dinâmica de lipídeos e proteínas, bem como, nas características da membrana plasmática, aumentando a microvilosidade e a fluidez, no epitélio (KHAJURIA *et al.*, 2002).

Também são descritas propriedades hepatoprotetora (WEI, *et al.*, 2005), atividade antiasmática (MAJUMDAR *et al.*, 1990), antifertilidade (PIYACHATURAWAT *et al.*, 1982), antimetastase (PRADEEP & KUTTAN, 2002) e o efeito inibidor na produção de óxido nítrico e no fator  $\alpha$  de necrose tumoral *in vitro* e *in vivo* (PRADEEP & KUTTAN, 1999) da piperina.

Ribeiro *et al.* observaram a ação da piperina e seus derivados sintéticos frente ao protozoário *Trypanosoma cruzi*; sendo que de todos os compostos ensaiados, a piperina apresentou os valores mais promissores de concentração inibitória de 50%, 4,91  $\mu$ M e 7,36  $\mu$ M frente às formas amastigota e epimastigota, respectivamente, quando comparados aos valores de IC<sub>50</sub> do Benznidazol, do qual se dispõe para o tratamento da doença de Chagas causada por este protozoário (RIBEIRO *et al.*, 2004).

A propriedade virucida da piperina, purificada dos frutos de *Piper nigrum*, foi observada frente ao vírus influenza A/Victoria/3/75, incubado em células MDCK. Neste ensaio, a amida natural exibiu significativa atividade, inibindo de 100 a 99,8% o vírus influenza A cujas concentrações variaram de 0,195 - 6,25µg/ml em ordem decrescente de diluição (COUCEIRO *et al.*, 2005).

### **Propriedades quimioterápicas da piperina frente ao câncer**

Alguns estudos têm evidenciado que a piperina auxilia na inibição das reações de oxidação tanto *in vitro* como *in vivo* causadas por radicais livres de forma a prevenir ou retardar os danos às células e aos tecidos. A suplementação desta amida na dieta de animais de laboratório contribui na redução do desenvolvimento do câncer, realçando sua atividade de antioxidante através do efeito inibidor ou quelante com o radical livre e espécie de oxigênio reativo (ROS) na proteção contra certos tipos de câncer (MITTAL & GRUPTA, 2000; BALAKOUL & ARUNA, 1993).

Diante do carcinógeno benzo(a)pireno capaz de induzir enormes quantidades de radicais livres e, conseqüentemente, a peroxidação de lipídeos em células do pulmão, estudos com a piperina mostraram seu efeito supressor frente ao carcinógeno, reduzindo a formação de radicais livres e a proliferação de células carcinogênicas no pulmão (SELVENDIRAN *et al.*, 2004 a; SELVENDIRAN *et al.*, 2004 b).

Respostas imunofarmacológicas da ação da piperina foram obtidas diante de estudos *in vitro* com células de melanoma B16F-10 no qual foi focalizado a ativação e a translocação de diferentes fatores de transcrição nuclear como o fator-kB (NF-kB), c-Fos, CREB, ATF-2 e a expressão de citocinas próinflamatórias (PRADEEP & KUTTAN, 2004).

Neste estudo, foi observado que 10 µg/ml de piperina são capazes de diminuir os níveis de produção de citocinas (IL-1β, IL-6, GM-CSF e TNF-α), cuja elevada expressão tem sido observada nestas células durante a metástase. Outros efeitos observados foram tanto a inibição na translocação dos fatores de transcrição NF-kB (subunidades p65, p50 e cRel), c-Fos, CREB, ATF-2, quanto a redução da proliferação do melanoma (PRADEEP & KUTTAN, 2004).

A avaliação do efeito imunorregulador da piperina foi realizado por SUNILA & KUTTAN (2004), os quais observaram que a piperina pode estimular o sistema hematopoiético e aumentar a proliferação de células tanto da medula óssea quanto de células

positivas à  $\alpha$ -esterase. Ainda neste estudo, foi observada a atividade antitumoral desta amida/alcalóide frente às culturas *in vitro* de células L929, do linfoma de Dalton (DLA) e do carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC) representada na Tabela 3 (SUNILA & KUTTAN, 2004).

**Tabela 3.** Citotoxicidade da piperina em culturas de células de L929, DLA e EAC.

Linhagem de células ( $10^6$ )	Efeito Citotóxico (%)	Concentração da piperina ( $\mu\text{g/ml}$ )
L929	100	50
DLA	100	250
EAC	100	500

SUNILA & KUTTAN, 2004

Além do estudo *in vitro* frente às células cancerígenas, foi avaliada a atividade antitumoral *in vivo*, utilizando-se a dose de 1,14 mg/animal de piperina, observando-se a inibição do desenvolvimento do tumor sólido em ratos induzido com o linfoma de Dalton em 37,3 %, e o aumento da expectativa de vida dos animais portadores do carcinoma ascítico de Ehrlich em até 58,8 % (SUNILA & KUTTAN, 2004).



### 1.3 A Família Loranthaceae

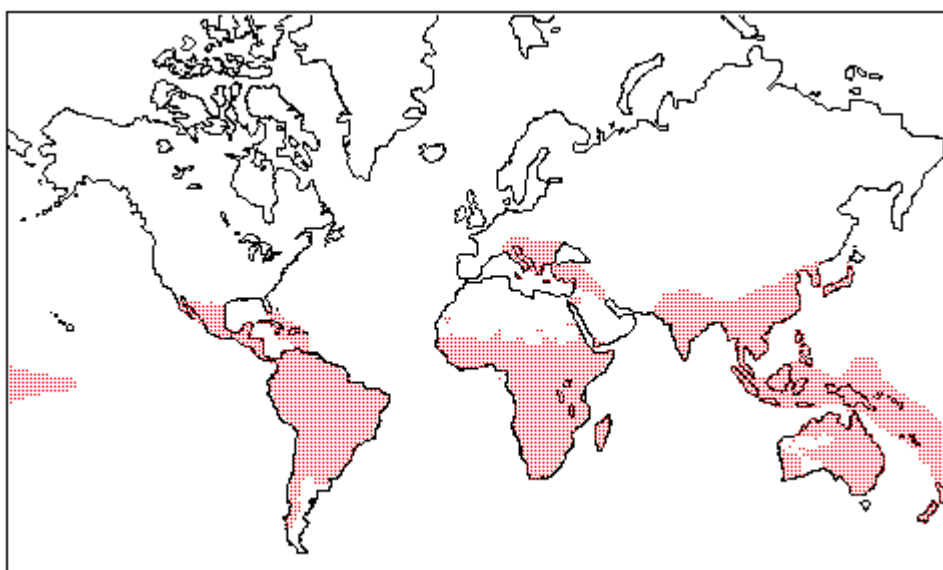
A família Loranthaceae pertence à ordem Santalales a qual compreende outras cinco famílias: Balanophoraceae, Eremolepdaceae, Olacaceae, Opiliaceae e Viscaceae. Todas são plantas que parasitam galhos de árvores ou arbustos e, de acordo com o grau de dependência nutricional, são categorizadas como hemiparasitas ou holoparasitas por atuarem nos sistemas condutores de seiva da planta hospedeira: xilema e floema, respectivamente (NICKRENT, 2001).

O maior número de espécies na ordem Santalales ocorre na família Loranthaceae, correspondendo a cerca de 900 espécies das 1436 existentes, compreendidas em 74 dos 89 gêneros. A segunda maior família é a Viscaceae, embora com apenas 7 gêneros, compreende 480 espécies que estão distribuídas, majoritariamente, dentro dos gêneros *Phoradendron* e *Viscum* (NICKRENT, 2001).

A maioria destas plantas possui em suas sementes uma substância chamada de visco que a permite fixar-se na planta hospedeira, após serem ingeridas e secretadas por pássaros, exceto as sementes dos gêneros *Nuytsia* e *Misodendrum* que são dispersas pelo vento. Devido ao fato dos pássaros serem os agentes dispersores das sementes das duas maiores famílias, Loranthaceae e Viscaceae, estas plantas são conhecidas popularmente como ervas de passarinho (NICKRENT, 2001).

A ordem Santalales possui uma ampla distribuição biogeográfica cuja ocorrência abrange tanto regiões tropicais quanto de clima temperado. Na Europa, o gênero *Viscum* e, na América do Norte, o gênero *Phoradendron*, ambos da família Viscaceae, representam a maioria das plantas parasitas, enquanto que a família Loranthaceae distribui-se pelos trópicos: Malásia, Austrália e América do Sul (NICKRENT, 2001), revelando-se pouco abundante em regiões temperadas (RIZZINI, 1968).

A família Loranthaceae abrange cerca de 40 gêneros e 1500 espécies distribuídas nas regiões subtropicais e tropicais em ambos os hemisférios (VENTURELLI, 1981), sendo a região tropical de maior ocorrência com 1400 espécies caracterizadas como arbustos eretos ou escandentes, clorofilados, hemiparasitas de árvores ou arbustos de dicotiledôneas e de coníferas, conforme ilustra a Figura 7 (BARROSO *et al.*, 1984).



**Figura 8.** Distribuição biogeográfica da família Loranthaceae ●

No Brasil, as espécies da família Loranthaceae ocorrem numa área muito abrangente, demonstrando uma redistribuição pelas Florestas Pluviais: Amazônica e Atlântica e, pelas regiões mais secas do país, Central e Nordeste (RIZZINI, 1968).

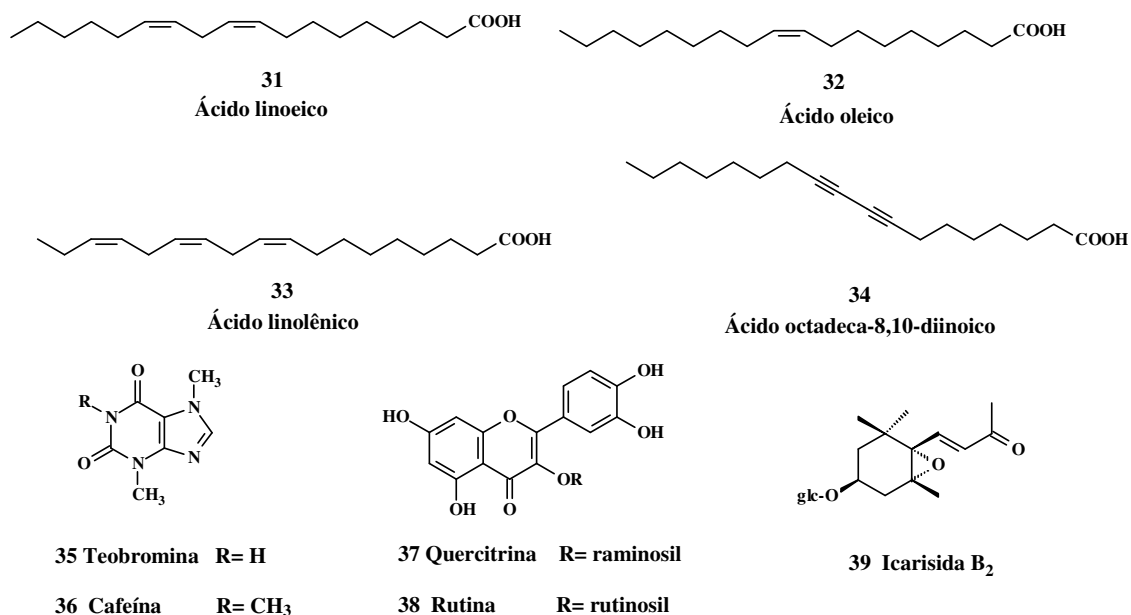
### **Estudo fitoquímico das ervas de passarinho**

As investigações fitoquímicas com espécies da família Loranthaceae iniciaram-se após os estudos com extratos de *Viscum album* (Viscaceae), espécies Tipo das ervas de passarinho na Europa, amplamente usados na medicina popular no tratamento do câncer, cujos componentes identificados relacionam-se com a redução de tumores. Dentre os componentes descritos em literatura, encontram-se: lectinas, viscotoxinas, proteínas, peptídeos, oligossacarídeos, alcalóides, compostos polifenóis e flavonóides presentes nesta planta (ZEE CHENG, 1997).

A presença de flavonóides e proantocianidinas na família Loranthaceae (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998) e outros metabólitos especiais como flavonas, lignanas e monoterpenos glicosilados (OHASHI *et al.*, 2003), despertou a atenção dos pesquisadores para o estudo fitoquímico dos extratos e das frações de algumas espécies, desta família, endêmicas e de uso medicinal local.

Na espécie *Scurrula atropurpurea*, uma planta parasita de *Thea sinensis*, espécie de chá muito comum na Indonésia, foram isolados alguns ácidos graxos: ácidos linoleico e oléico; chantonas: cafeína e teobromina; flavonóides glicosilados: quercitrina e rutina;

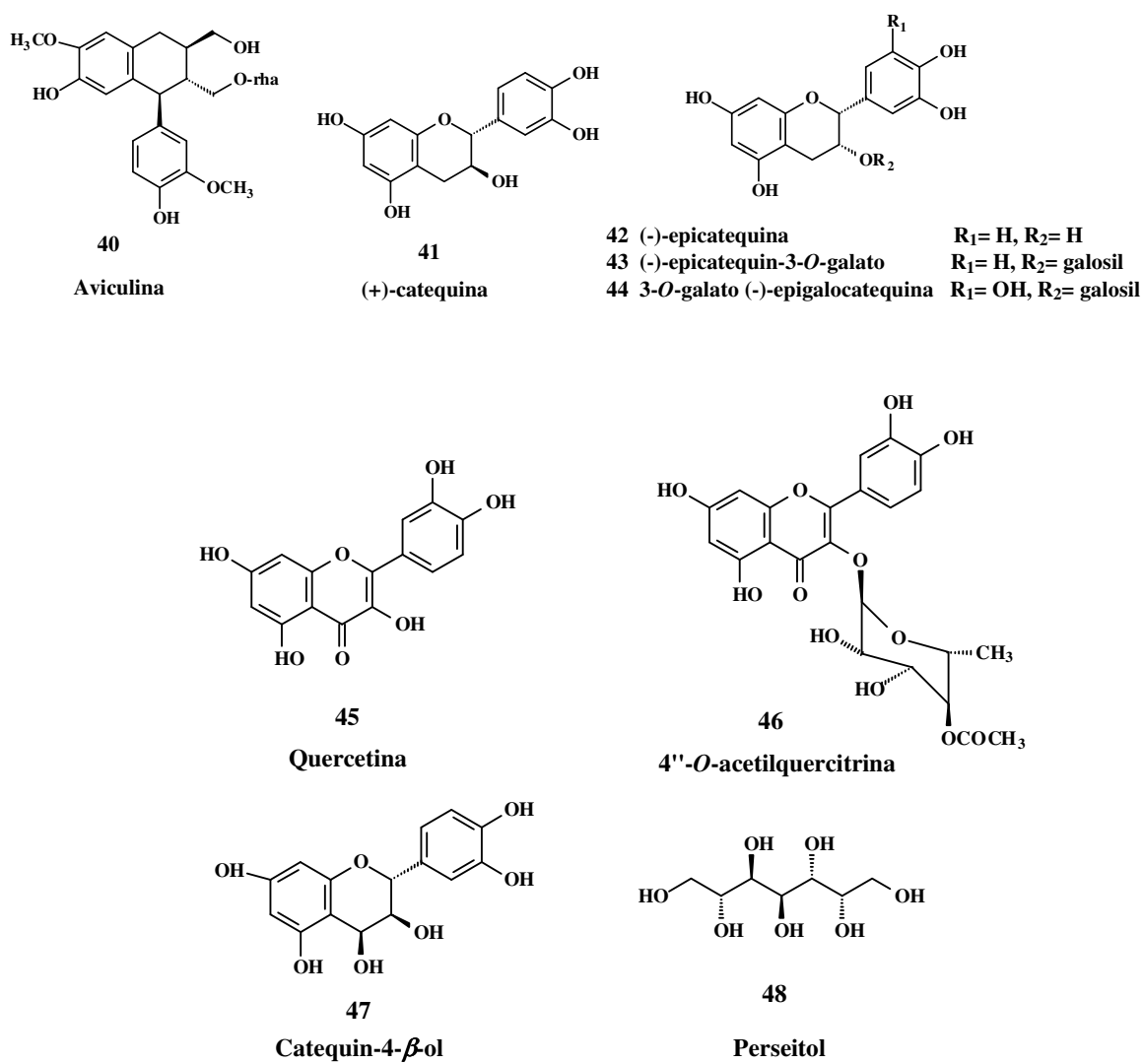
monoterpeno glicosilado: icarisida B; lignana glicosilada: aviculina e; flavonas: catequinas e epicatequinas, representados na Figura 8 (OHASHI *et al.*, 2003).



**Figura 9.** Estrutura dos metabólitos especiais isolados da espécie *Scurrula atropurpurea*.

A partir de outras espécies deste gênero, comuns na Indonésia como a *Scurrula fusca*, cuja planta hospedeira é *Ficus riedelii*, pôde-se isolar de suas folhas o perseitol (Figura 9) complexado com íons de potássio em uma razão molar de 20:1, respectivamente (ISHIZU *et al.*, 2001). Também foram isolados alguns flavonóides glicosilados como a quercetina e a 4''-O-acetilquercitrina (Figura 10), além da quercitrina, da fração de acetato de etila da espécie *Scurrula ferruginea* (LOHÉZIC-LE-DÉVÉHAT *et al.*, 2002).

Estudos com o extrato de caules e folhas da espécie *Ligaria cuneifolia*, na Argentina, evidenciaram a presença de quercetina livre ou monoglicosilada com xilose, raminose e arabinose na hidroxila da posição 3 do esqueleto flavonol. Além da catequina, epicatequina e do catequinoil, ilustrado na Figura 10 (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998).



**Figura 10.** Estrutura da quercetina (45), 4''-O-acetilquercitrina (46), catequin-4- $\beta$ -ol (47) e perseitol (48) isolados de *Ligaria cunifolia*.

## Importância das ervas de passarinho

Estas angiospermas hemiparasitas têm sido objetos de estudos de muitos pesquisadores a partir da metade do século passado, não somente pelo seu estilo de vida peculiar (SALATINO, 1993) e pelo impacto negativo frente à inviabilidade comercial de plantas ornamentais e frutos de cultivares, como também por apresentarem efeitos tóxicos e terapêuticos (NICKRENT, 2001).

A espécie *Viscum album* (Viscaceae) amplamente distribuída na Europa, na Ásia e também na América do Norte, a qual abrange uma lista de plantas hospedeiras representada por 452 espécies, apresentam-se causando impactos negativos devido a parasitar plantas com interesse comercial (BARNEY *et al.*, 1998). Na floresta de pinheiros do monte Parnis, na Grécia, 67,67% das árvores mais antigas foram infectadas por *V. album* a qual tem ocasionado, concomitantemente com a baixa precipitação pluvial durante os anos de 2000-2002, a redução do vigor e a predisposição destas árvores ao ataque de besouros, resultando na grande mortalidade dos pinheiros (TSOPELAS *et al.*, 2004).

Diante do uso terapêutico das plantas, as ervas de passarinho têm sido consideradas, popularmente, como tônico cardíaco administrada durante a febre tifóide, como narcótico e antiplasmódico. Na França, em 1682, foi considerada como remédio doméstico de grande poder curativo nos casos de epilepsia. Com grande reputação para o tratamento de convulsões epilépticas, estas plantas parasitas têm sido empregadas no tratamento de outros tipos de distúrbios do sistema nervoso como delírios, histerias, neuralgias, além de desordem urinária e de doenças cardíacas. Também têm sido usadas para deter hemorragias internas (BOTANICAL, 2005).

O extrato de *V. album* L. (Viscaceae) tem sido utilizado popularmente por décadas, na Europa, contra uma variedade de doenças como artrites, reumatismo e hipertensão, além do uso no tratamento de tumores epiteliais em humanos (STEIN, *et al.*, 1998). Este extrato tem sido utilizado no tratamento tanto de tumor benigno como maligno, especialmente na Alemanha, após o discurso do filósofo austríaco Rudolf Steiner (1861-1925) e do físico Ita Wegman (1876-1943), sugerindo o uso do extrato de *Viscum* como uma droga natural anti-câncer em 1920 (KIENLE, 1999; BOCCI, 1993).

Desde 1926, elaborações de extratos de ervas de passarinho têm sido utilizados clinicamente como adjuvantes na terapia do câncer e inúmeros estudos vêm sendo realizados desde então. A ação e o mecanismo da atividade antitumoral desta planta deve-se não somente

à inibição da proliferação celular, mas também por indução de citocinas e efeitos imunoadjuvantes, como atividade imunomoduladora (KUTTAN & KUTTAN, 1992).

As plantas da família Loranthaceae também são reconhecidas popularmente como portadoras de propriedades medicinais em diversos países, despertando os pesquisadores para o estudo de algumas espécies promissoras farmacologicamente. Determinadas atividades biológicas importantes têm sido atribuídas às suas espécies, dentre as mais citadas: antiviral, efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios e, ação antitumoral (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998).

Dentre as espécies desta família, a *Ligaria cuneifolia* é usada na medicina popular na Argentina como substituinte da *V. album* para o controle da pressão sanguínea. Estudos realizados com extratos de *L. cuneifolia* também sugerem que esta planta seja capaz de exercer efeitos imunomodulador em ratos, devido à estimulação da produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos e à inibição da proliferação tanto das células do baço tratadas com agentes mitogênicos (concanavalina A e polissacarídeos), quanto da linhagem de leucemia linfóide (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998).

O gênero *Scurrula*, na Indonésia, tem sido usado como infusão em fadigas e em patologias de câncer. Estudos prévios com a espécie *Scurrula ferruginea* revelou a presença de flavonóides como a quercetina, quercetrina e o 4-*O*-acetil-quercetrina, um possível marcador específico do gênero *Scurrula*, todos com potente atividade citotóxica frente a distintas linhagens de câncer humano como a leucemia K562 e o glioblastoma U251 (LOHÉZIC-LE-DÉVÉHAT *et al.*, 2002).

Outras espécies deste gênero, tradicionalmente conhecidas pelos povos indonésios, como a espécie *Scurrula fusca* em Sumatra na Ilha Sulawesi e; em Java, a espécie *Scurrula atropurpurea* são usadas para o tratamento de câncer (ISHIZU *et al.*, 2001; OHASHI *et al.*, 2003).

Conhecida como “benalu alus”, *Scurrula fusca* apresentou da extração de suas folhas um complexo formado por 20 moléculas de perseitol com um mol de íons de potássio numa conformação “zig-zag” com arranjo da cadeia carbônica planar. Este complexo, a uma concentração de  $10^{-4}$ M, exibiu um efeito inibitório na incorporação de leucina marcada com trítio de 40,3% nas células ascíticas do carcinoma de Ehrlich em camundongos, enquanto que o perseitol não apresentou atividade (ISHIZU *et al.*, 2001).

No entanto, para os mexicanos, a espécie *Psittacanthus calyculatus*, conhecida na Espanha como “muérdago verdadero”, é usada na medicina popular para o tratamento de hipertensão arterial. Estudos farmacológicos da resposta vasomotora da artéria aorta de ratos,

revelou que o extrato hidroalcoólico desta planta induz a liberação de componentes vasoconstrictores e a síntese/liberação de óxido nítrico no tecido endotelial (RODRÍGUEZ-CRUZ *et al.*, 2003).

### 1.3.1 O gênero *Struthanthus*

Dentre os 74 gêneros de erva de passarinho descritos na família Loranthaceae, o gênero *Struthanthus* possui cerca de 60 espécies próprias da América tropical, a grande maioria localizando-se na América do Sul e, em particular, no Brasil representado com 40 espécies próprias (RIZZINI, 1968).

Este gênero neotropical compreendido pelas espécies *S. cansjerifolius*, *S. costaricensis*, *S. leptostachyus*, *S. oerstedii*, *S. orbicularis*, entre outras, é bastante difundido no Brasil, nos Estados: Rio Grande do Sul, Paraná; além de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Bahia; principalmente a espécie *S. vulgaris*, planta própria das regiões de mata pluvial, apreciadora de temperaturas mais amenas, muito comum no sul e nas serras do leste (RIZZINI, 1968).

No campo da medicina popular, em diferentes países, espécies do gênero *Struthanthus* são usadas no tratamento de várias enfermidades, por exemplo, na Nicarágua *S. cassythoide* é indicada para dor em geral, febre, desordens respiratórias e pulmonares, erupção e feridas na pele (COE & ANDERSON, 1996). A espécie originária do Brasil e América Tropical, *S. flexicaulis*, possui atividades medicinais como energéticos e também é usada para o tratamento de leucorréia, bronquite e diversos tumores (VIEIRA, *et al.*, 2005).

Uma das ervas de passarinho mais comum, parasitando as árvores ornamentais e pomares, como laranjeiras e goiabeira no país, usada na medicina popular nas infecções das vias respiratórias, é a espécie *S. vulgaris* cujo extrato hidroalcoólico das folhas secas tem apresentado atividade antimicrobiana frente amostras de bactérias Gram positivas e Gram negativas (VIEIRA, *et al.*, 2005).

Na Colômbia, algumas ervas, incluindo as ervas de passarinho, são usadas pela população como antídoto nos casos de envenenamento por picada de cobra, acidente muito freqüente. Estudo com a planta *S. orbicularis* demonstrou, *in vitro*, que 25µg do extrato é capaz de neutralizar ou reduzir em 65% a formação de edemas causados pelo veneno da espécie *Bothrops asper*, com um tempo de coagulação inferior a 100 segundos (NÚÑEZ *et al.*, 2004).

Diante do amplo uso etnofarmacológico das ervas de passarinho, principalmente na Europa, e dos estudos fitoquímicos citados na literatura, evidenciando alguns metabólitos especiais presentes nestas plantas hemiparasitas como relevantes agentes quimioterápicos para o tratamento de várias doenças, incluindo o câncer; como também a abundância da ocorrência do gênero *Struthanthus* nas regiões tropicais, sobre tudo no Brasil, esta dissertação de mestrado enfocou a espécie *Struthanthus marginatus* amplamente disseminada no estado do Rio de Janeiro e pouco referenciada na literatura.

### 1.3.2 A espécie *Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume

A espécie *Struthanthus marginatus* (Figura 11), planta muito freqüente, principalmente, em área urbana é muito disseminada no Estado do Rio de Janeiro e, particularmente em Seropédica, juntamente com a espécie *S. vulgaris* as quais têm sido registradas parasitando as castanheiras, amendoeiras, mangueiras e várias leguminosas, como por exemplo, no entorno da Lagoa Rodrigo de Freitas (ANDREATA *et al.*, 2001).

Pertencente à família Loranthaceae, *Struthanthus marginatus* é uma espécie conhecida popularmente como as demais ervas de passarinho, devido seu modo peculiar de nutrição, parasitismo, e dispersão, viabilizado por pássaros.



**Figura 11.** *Struthanthus marginatus*.

Semelhante às outras espécies deste gênero, principalmente a *S. vulgaris*, a hemiparasita *S. marginatus* é uma planta que habita as partes aéreas de outros vegetais hospedeiros e os parasitam parcialmente, através de uma ou mais raízes modificadas



fisiológica e morfológicamente chamadas de haustórios (Figura 12). Ou seja, as raízes especiais desta espécie retiram água e sais minerais diretamente do hospedeiro, embora esta planta seja capaz de realizar fotossíntese (NICKRENT, 2001).



**Figura 12.** Haustórios, raízes modificadas das plantas do gênero *Struthanthus*.

Em relação à espécie *S. marginatus* não existem estudos fitoquímicos e farmacológicos descritos na literatura, bem como informações do uso na medicina popular.

#### 1.4 As Plantas Medicinais na Quimioterapia do Câncer

A busca por agentes anti-câncer de fonte vegetal iniciou-se, na realidade, nos anos de 1950 com a descoberta e desenvolvimento dos alcalóides da vinca, vincristina e vimblastina, e o isolamento do produto citotóxico podofilotoxina (Figura 13) (CRAGG & NEWMAN, 2005). Como resultado, O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) iniciou um extensivo programa de coleção de plantas em 1960, focado principalmente nas plantas da região temperada o que levou a descoberta de muitos compostos naturais com uma ampla atividade citotóxica (CASSADY & DOUROS, 1980), incluindo o taxol e a camptotecina (Figura 13) (CRAGG & NEWMAN, 2005).

Neste período foi obtida uma lista de mais de 3000 espécies de vegetais reportadas para o tratamento do câncer, descrita por Hartwell, embora, em muitos casos, o câncer se referia a uma “sólida inchação”, como calos, tumores, etc (RARTWELL, 1982).

Este programa de coleção de plantas foi terminado em 1982, porém o desenvolvimento de novas tecnologias empregadas na bioprospecção dos metabólitos especiais, conduziu ao restabelecimento da coleção de plantas e de outros organismos em 1986, com um foco nas regiões subtropicais e tropicais do mundo (CRAGG & NEWMAN, 2005).

No Brasil, o estudo de algumas espécies como as do gênero *Tabebuia* (família: Bignoniaceae), muito usadas, historicamente, pelas populações da região amazônica para o tratamento de diversas doenças como sífilis, febres, malária, infecções cutâneas e desordens estomacais, foi muito difundido a partir da década de 60 após a descoberta da eficácia dos extratos da casca destas plantas no tratamento do câncer (CRAGG & NEWMAN, 2005).

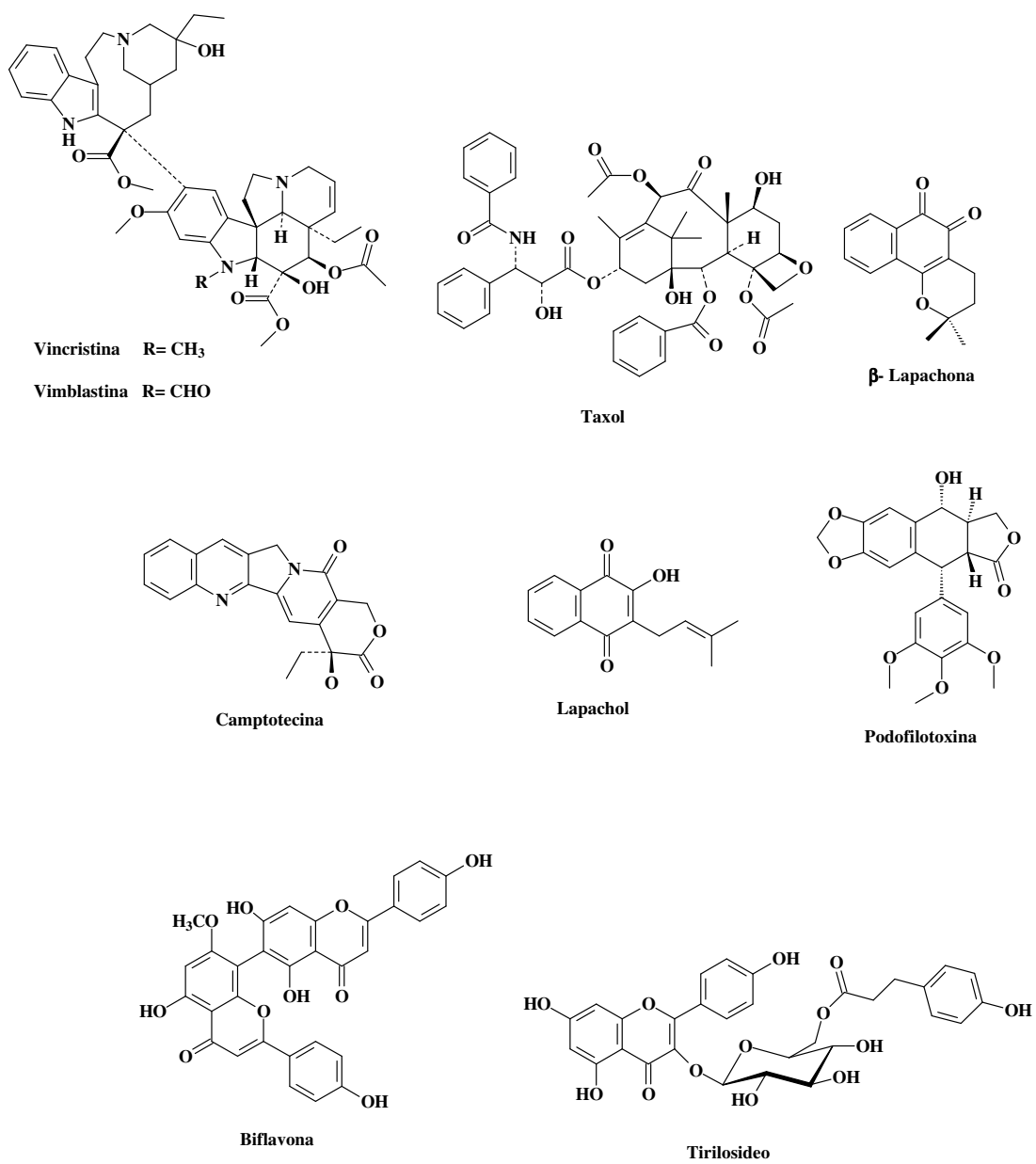
Partir de então, inúmeros compostos bioativos foram isolados das cascas do ipê-roxo, *Tabebuia heptaphylla*, sendo que a atividade antitumoral foi atribuída a alguns metabólitos especiais, principalmente, à naftoquinona lapachol e outras quinonas, como a  $\beta$ -lapachona que são, atualmente, objetos de interesse científico e tema de muitas investigações (SIMÕES *et al.*, 2004).

Outra importante classe dos metabólitos especiais que exibem relevantes atividades antitumoral e quimiopreventiva são os flavonóides, presentes em todas as plantas vasculares terrestres. Esta classe química, consumida pela humanidade nas dietas vegetais, presentes em maior proporção na forma glicosilada, possui propriedades

antioxidantes as quais são responsáveis pela proteção contra doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (ESTEVEES-SOUZA *et al.*, 2002).

Estudos das frações flavonoídicas da flora brasileira têm revelado novos agentes quimioterápicos, como a biflavona (Figura 13) obtida da espécie *Ouratea hexasperma* (família Ochnaceae), promissora na inibição da síntese do DNA e de proteínas das células do Sarcoma 180 (GRYNBERG *et al.*, 1994); como também, o flavonóide tirilosídeo (Figura 13) isolado da espécie *Solanum crinitum* (família Solanaceae) citotóxico às culturas celulares *in vitro* tanto do carcinoma ascítico de Ehrlich quanto da leucemia humana K562 (ESTEVEES-SOUZA *et al.*, 2002).

Assim, vários estudos vêm sendo realizados em plantas, sobre tudo as indicadas para combater diferentes tipos de doenças, principalmente o câncer por diversas civilizações milenares, por exemplo, o estudo das plantas na prevenção e supressão de vários tumores usadas na medicina tradicional indiana desde o século 7a.C. (BALANCHANDRAN & GOVINDARAJA, 2005).



**Figura 13.** Estruturas dos metabólitos especiais obtidos do estudo das plantas medicinais.

### 1.4.2 Os alcalóides na quimioterapia do câncer

Um grande número de plantas medicinais usadas popularmente possuem metabólitos especiais da classe dos alcalóides e são conhecidas por apresentarem-se como importantes agentes terapêuticos. Como exemplo, podem ser citadas várias espécies de leguminosas constituídas de isoflavonóides com potente atividade estrogênica, e espécies do gênero *Solanum* (Família Solanaceae) contendo alcalóides esteroidáis conhecidos por possuírem uma variedade de atividades biológicas, incluindo antifúngica, moluscicida a contra certos tipos de câncer de pele (ESTEVEZ-SOUZA *et al.*, 2002).

Os primeiros fármacos de origem vegetal para o avanço do uso clínico no tratamento do câncer foram os alcalóides vincristina e vimblastina, isolados da espécie *Catharanthus roseus* (família Apocynaceae), originária de Madagascar, a qual foi muito usada por várias culturas para o tratamento de diabetes (GUERITTE & FAHY, 2005).

Durante as investigações do extrato de vinca, no final da década de 50, como uma fonte potente de agente hiperglicêmico, foi verificada a diminuição da produção de células brancas pela medula óssea (SIMÕES *et al.*, 2004). Posteriormente, foi descoberta sua ação contra um tipo de leucemia, em ratos. Estes alcalóides foram isolados e são usados como agentes primariamente em combinação com outros agentes quimioterápicos para o tratamento de leucemias, linfomas, câncer de próstata, pulmão, mama e sarcoma de Kaposi; assim como seus análogos semi-sintéticos, vinorelbina e vindesina (CRAGG & NEWMAN, 2005).

Outro importante alcalóide usado clinicamente na quimioterapia do câncer é a camptotecina, isolada da espécie *Camptotheca acuminata* (família Nyssaceae), uma árvore ornamental chinesa (RAHIER *et al.*, 2005). No final da década de 50, foi verificada atividade antitumoral do extrato etanólico do tronco desta árvore (SIMÕES *et al.*, 2004); e na década de 70, camptotesina foi desenvolvida para o uso clínico pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (CRAGG & NEWMAN, 2005).

No entanto, devido à sua alta toxidez e a baixa solubilidade, a camptotecina foi abandonada, iniciando-se novas pesquisas na preparação dos derivados mais eficientes, o topotecano e o irinotecano, ambos usados atualmente no tratamento do câncer de ovário e de pulmão e, no câncer colo-retal, respectivamente (CRAGG & NEWMAN, 2005).

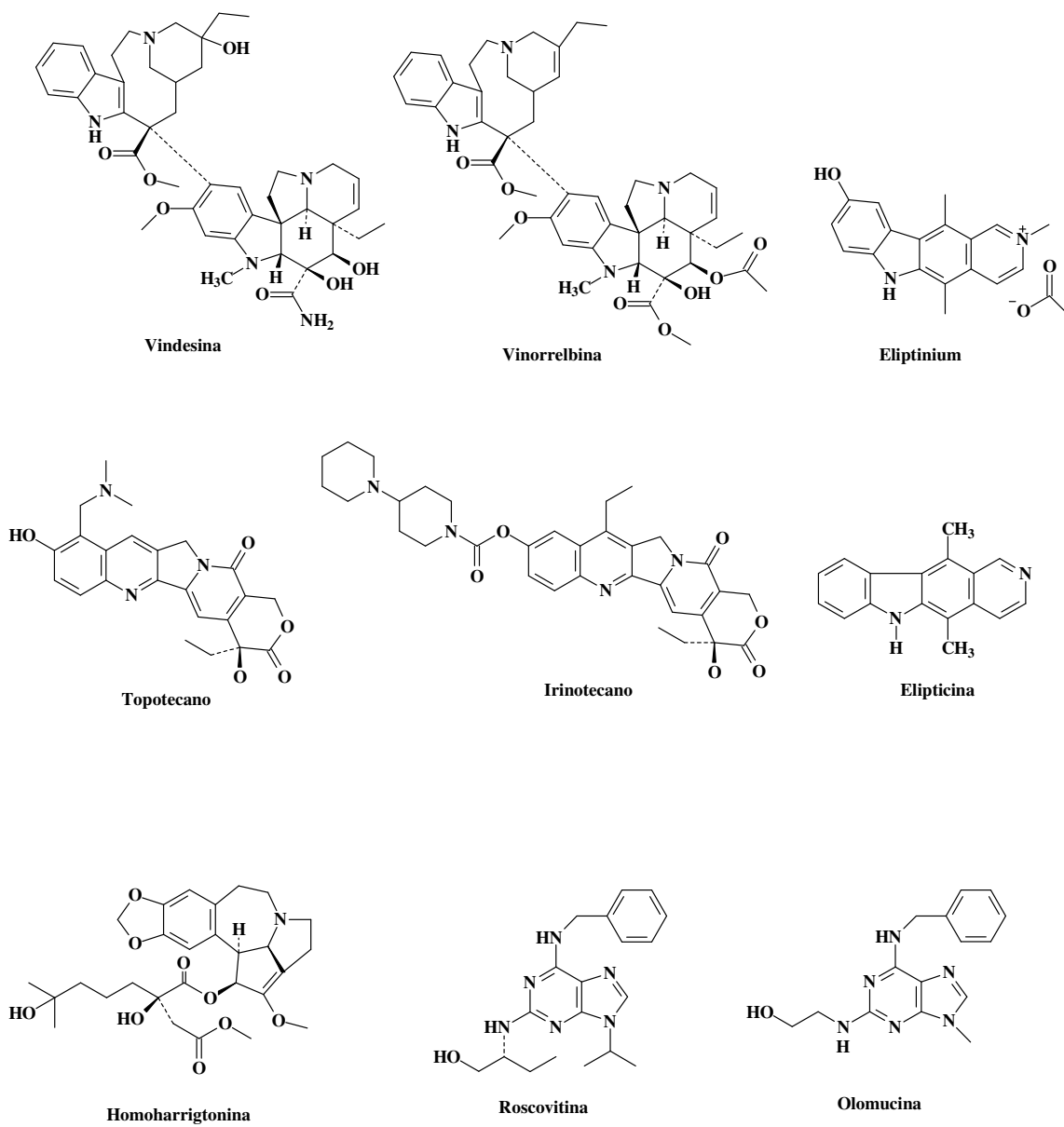
Outros compostos derivados das plantas (Figura 14), em uso como agentes anti-tumorais, da classe dos alcalóides são os: homo-harringtonina, isolado de uma árvore chinesa, a *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* (família Cephalotaxaceae) e; o eliptinium, um derivado da elipticina, substância isolada das espécies de vários gêneros da família

Apocynaceae. Na China, uma mistura racêmica de harringtonina e homo-harringtonina é usada para o tratamento de leucemia crônica e aguda, enquanto que na França, o eliptinium é comercializado para o tratamento de câncer de mama (CRAGG & NEWMAN, 2005).

A família dos bis-alcalóides conhecida genericamente como indirubina é o principal constituinte da espécie *Indigofera tinctoria*, um produto da medicina chinesa usado no tratamento de leucemia crônica. São moléculas derivadas dos alcalóides indólicos que conferem à planta a cor azul escura (púrpura), estes compostos foram os primeiros usados pelo homem como inibidores na síntese de proteínas importantes na regulação do ciclo celular (NEWMAN *et al.*, 2002).

A síntese de substâncias fundamentada nos agentes naturais com propriedades antitumorais, principalmente os alcalóides, tem-se mostrado promissora no desenvolvimento de novas drogas para o uso clínico. A roscovitina é um derivado resultante da modificação estrutural do alcalóide olomucina isolado do cotilédone de rabanete (*Raphanus sativus*, família Brassicaceae), é um inibidor do desenvolvimento do ciclo celular mais potente que seu precursor natural e, encontra-se na fase II dos testes clínicos na Europa (CRAGG & NEWMAN, 2005).

Muitos destes produtos naturais e seus derivados descobertos nos ensaios citotóxicos contra o crescimento de diversas linhagens de câncer têm mostrado sua ação através da interação com a tubulina, como a vincristina, vinblastina, colchicina, combretastatina e maitansina. No caso dos terpenos da classe dos taxanos, a ação citotóxica ocorre via “empacotamento” da tubulina, impedindo a despolimerização da mesma. Outra ação citotóxica é a inibição da enzima topoisomerase I, fundamental na síntese do DNA, exercida pelos derivados da camptotecina, topotecano e irinotecano (CRAGG & NEWMAN, 2005).

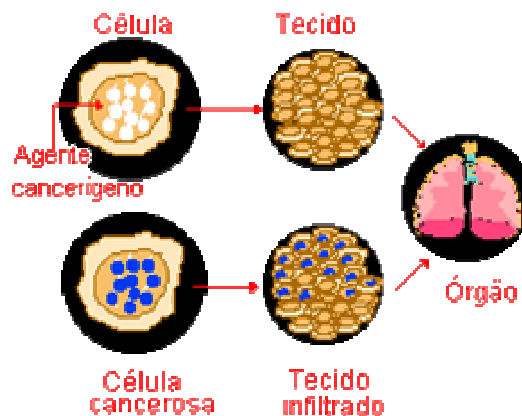


**Figura 14.** Algumas estruturas dos alcalóides isolados das plantas medicinais, derivados semi-sintéticos e alguns análogos.

### 1.4.1 O câncer

O câncer é uma terrível e antiga doença que no século 20 fora diagnosticada como um das principais causas de mortes e vem difundindo-se de forma contínua, aumentando sua incidência no século 21 (BALANCHANDRAN & GOVINDARAJA, 2005). Dados do INCA mostram que o envelhecimento da população indica um aumento na expectativa de vida no Brasil e, com isto, a maior incidência de doenças crônico-degenerativas (FONSECA *et al.*, 2000), dentre elas, o câncer o qual se encontra como a segunda causa de morte (INCA, 2006).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (Esquema 3). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (INCA, 2006).



**Esquema 3** - Formação do câncer e desenvolvimento de metástase.



Os diferentes tipos de câncer ocorrem em função da variada natureza das células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque esta é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma (INCA, 2006).

Investigações científicas multidisciplinares têm sido conduzidas com muitos esforços para combater esta doença, mas a cura perfeita ainda não foi conseguida dentro do mundo da medicina (BALANCHANDRAN & GOVINDARAJA, 2005).

Um dos maiores problemas para a cura de muitos pacientes é a resistência intrínseca ou adquirida de diversos tipos de câncer aos agentes quimioterápicos (HUANG *et al.*, 2003). Células tumorais resistentes a uma variedade de compostos citotóxicos, fenômeno conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR), são os maiores obstáculos para o sucesso da quimioterapia; além de envolver a resistência simultânea a um número de drogas relacionadas tanto funcionalmente como estruturalmente (WAGNER-SOUZA *et al.*, 2003).

Um dos mecanismos de resistência a múltipla drogas apresentada por linhagens de células tumorais está associado com a diminuição intracelular do acúmulo da droga e a presença de uma glicoproteína transmembrana de 170 KDa, glicoproteína-P (Pgp), a qual funciona como uma bomba dependente de energia (ATP) responsável pela extrusão de dentro da célula do agente quimioterápico (DEVITA *et al.*, 1993).

Entretanto, os agentes antineoplásicos conhecidos, são usados para o tratamento do câncer quando a cirurgia ou radioterapia não é possível ou é ineficaz, como adjuvantes para cirurgia ou em leucemias, como tratamento inicial. Sendo que a ação terapêutica destes agentes é curativa em poucos casos, porém exerce uma ação paliativa sobre os sintomas ou prolonga a vida dos doentes (FONSECA *et al.*, 2000).

Os fármacos podem atuar nas fases de replicação das células carcinogênicas envolvendo o ciclo celular: a fase pré-sintética (G1), a síntese de ADN (S), a pós-sintética (G2) e a mitose (M); sendo que os fármacos inespecíficos de fase agem sobre a célula durante todo o seu ciclo, enquanto que os específicos de fase atuam, preferencialmente, em uma ou mais fases fora do repouso (FONSECA *et al.*, 2000).

Alguns compostos antineoplásicos agem interrompendo a proliferação das células segundo características de suas estruturas químicas ou pela função em nível celular. Desta

forma, os agentes alquilantes podem reagir com os centros nucleofílicos de várias moléculas como proteínas e enzimas e, pelo seu caráter bifuncional ou trifuncional, permitem estabelecer ligações cruzadas com o ADN de cadeia dupla impedindo a replicação (FONSECA *et al.*, 2000).

Os agentes antimetabólicos, geralmente análogos às bases purinas, pirimidinas ou ao ácido fólico, exercem seus efeitos devido às semelhanças estruturais e funcionais com os metabólitos envolvidos na síntese dos ácidos nucleicos. Como são confundidos pela célula como metabólitos normais, tanto podem ser incorporados ao ácido nucleico e produzir códigos incorretos, como podem inibir as enzimas envolvidas na síntese dos ácidos nucleicos, inibindo a síntese de ADN e, conseqüentemente, levando à morte celular (FONSECA *et al.*, 2000).

Alguns fármacos antineoplásicos de origem natural podem agir tanto de forma inespecífica, atuando sobre as proteínas microtubulares e inibindo a mitose como os alcalóides da vinca e seus derivados semi-sintéticos; quanto de maneira mais específica, como os fármacos derivados do *Podophyllum*, capazes de formarem um complexo com a enzima DNA topoisomerase II, necessária para o término da replicação do ADN (FONSECA *et al.*, 2000).

Após sofrerem injúrias, a morte das células cacirnogênicas pode ocorrer, conforme os demais tecidos do organismo ou as doenças neurodegenerativas, ao longo de dois distintos processos: necrose e apoptose. A necrose ocorre como conseqüência de respostas imunológicas inflamatórias e patológicas do tecido injuriado implicando no rompimento da membrana plasmática e mitocondrial, rápida deterioração bioenergética, turgência e lise celular (BRAUER, 2003).

Ao contrário, apoptose envolve a morte programada da célula, um processo fisiológico em que não há formação de inflamação e requer energia (ATP) para manter a integridade celular, implicando na fragmentação nuclear e condensação da cromatina, estes quando retraídos, permite que todo material celular seja compartimentalizado dentro dos corpúsculos apoptóticos os quais são fagocitados por macrófagos e outras células adjacentes (BRAUER, 2003).

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Diante de estudos provenientes de pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório que tem como objetivo estudar plantas com possível utilização no tratamento do câncer e a preparação de moléculas potencialmente ativas, utilizando produtos naturais como precursores, este trabalho abrange uma série de experiências visando o estudo das espécies *Piper nigrum* (Piperaceae) e *Struthanthus marginatus* (Loranthaceae).

Estudos envolvendo nosso grupo de pesquisa relatam na literatura, evidências da atividade tóxica da piperina frente ao *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (RIBEIRO, *et al.*, 2004). Diante desses resultados outro trabalho de dissertação de mestrado, mais recente, envolveu a síntese de compostos análogos e derivados da piperina, os quais se mostraram ativos frente a este protozoário (BARRETO-JUNIOR, 2005). Assim, diante da similaridade na atividade de composto frente células tripanosomatídeas e tumorais, as quais apresentam um elevado fator de crescimento (DA SILVA, *et al.*, 2002), este trabalho direcionou o estudo da espécie *Piper nigrum*, da piperina e da série sintética para a avaliação da atividade citotóxica frente ao carcinoma ascítico de Ehrlich.

A utilização de extratos de ervas de passarinho, principalmente da espécie *Viscum album* (Viscaceae), para o tratamento de diversas doenças, especialmente contra o câncer é conhecido por mais de 80 anos na Europa (MANSKY *et al.*, 2003). Estudos recentes atribuem importantes propriedades anticarcinogênicas a esta espécie, o que tem conduzido às pesquisas mais recentes aos estudos químicos e biológicos de outras plantas parasitas. Diante dos relatos na literatura e da abundância da espécie tropical *Struthanthus marginatus* no Estado do Rio de Janeiro, foram preparados extratos desta planta para estudos químicos e biológicos quanto a sua citotoxicidade frente às células do EAC.

Assim, os principais objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Avaliar a atividade citotóxica frente às células do carcinoma ascítico de Ehrlich do extrato alcoólico dos frutos da espécie *Piper nigrum* e da amida

majoritária, a piperina, como também das séries sintéticas dos derivados e análogos à amida natural;

✓ Evidenciar qual processo de morte celular é induzido pela ação citotóxica da piperina, seus análogos e derivados;

✓ Determinar os parâmetros hidrofóbicos ( $R_{Mw}$ ) e ( $ClogP$ ) para a piperina e seus derivados, correlacionando-os com sua atividade citotóxica frente as células do carcinoma ascítico de Ehrlich;

✓ Analisar qualitativamente a composição das principais classes de metabólitos especiais presentes nas folhas, caules e haustórios da espécie *Struthanthus marginatus*;

✓ Avaliar a atividade citotóxica dos extratos da espécie *Struthanthus marginatus* frente às células do carcinoma ascítico de Ehrlich.

## 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Equipamentos

#### 3.1.1 Preparação dos extratos

Foi utilizada a aparelhagem de Soxhlet para a obtenção do extrato do fruto de *Piper nigrum*.

O evaporador rotatório da marca Fisatom, modelo 802, foi utilizado para concentrar, sob vácuo, tanto o extrato do fruto de *Piper nigrum* quanto os extratos obtidos da espécie hemiparasita *Struthanthus marginatus*.

#### 3.1.2 Ensaio biológicos

O material biológico foi esterilizado em autoclave e os ensaios citotóxicos foram realizados em câmara de fluxo laminar contínuo estéril.

As culturas *in vitro* de células foram mantidas em câmara de CO<sub>2</sub> Shel Lab 2123TC.

A análise dos ensaios foi mensurada de acordo com as absorbâncias na região do visível, lidas em espectrofotômetros DMS 80 da Varian e leitora de Elisa Molecular Devices com filtro de 490 nm. Também foi usado o citômetro de fluxo Epics Elite (Couter, Hialeach, EUA) para análise de citometria.

A pesagem do material foi realizada em balança de precisão com quatro casas decimais da OHAUS.

Utilizou-se o microscópio Carl Zeiss para contagem de células e citocentrífuga CT12 para aderi-las às lâminas.

## 3.2 Reagentes e Solventes

### 3.2.1 Preparação dos reagentes específicos para triagem fitoquímica

As principais classes de metabólitos especiais de *Struthanthus marginatus* puderam ser evidenciadas através de reações que indicam sua presença ou ausência nos extratos analisados com os reagentes citados a seguir, assim como a preparação dos reagentes utilizados (Mattos, 1997).



#### Alcalóides

- ✓ Reagente de Dragendorff

Solução A: 0,85g de subnitrato de bismuto

10ml de ác. acético glacial

40ml de água destilada

Solução B: 8,0g de iodeto de potássio

20ml de água destilada

- ✓ Reagente de Mayer

1,4g de cloreto de mercúrio

5,0g de iodeto de potássio

100ml de água destilada



#### Glicosídeos cardíacos

- ✓ Reagente de Kedde

Solução I: 2,0g de ác. 3,5-dinitrobenzóico

100ml de metanol

Solução II: 5,7g de hidróxido de potássio

150ml de água destilada



#### Açúcares redutores

- ✓ Reagente de Fehling

Solução A: 17,32g de sulfato de cobre

250g de água destilada

Solução B: 86,5g de tartarato de sódio e potássio

62,5g de hidróxido de potássio

250ml de água destilada



#### Ácidos orgânicos

- ✓ Reagente de Pasková

Solução A: 0,075g de verde de bromo cresol

0,025g de azul de bromo fenol

100ml de metanol

Solução B: 0,25g de permanganato de potássio

0,5g de carbonato de sódio

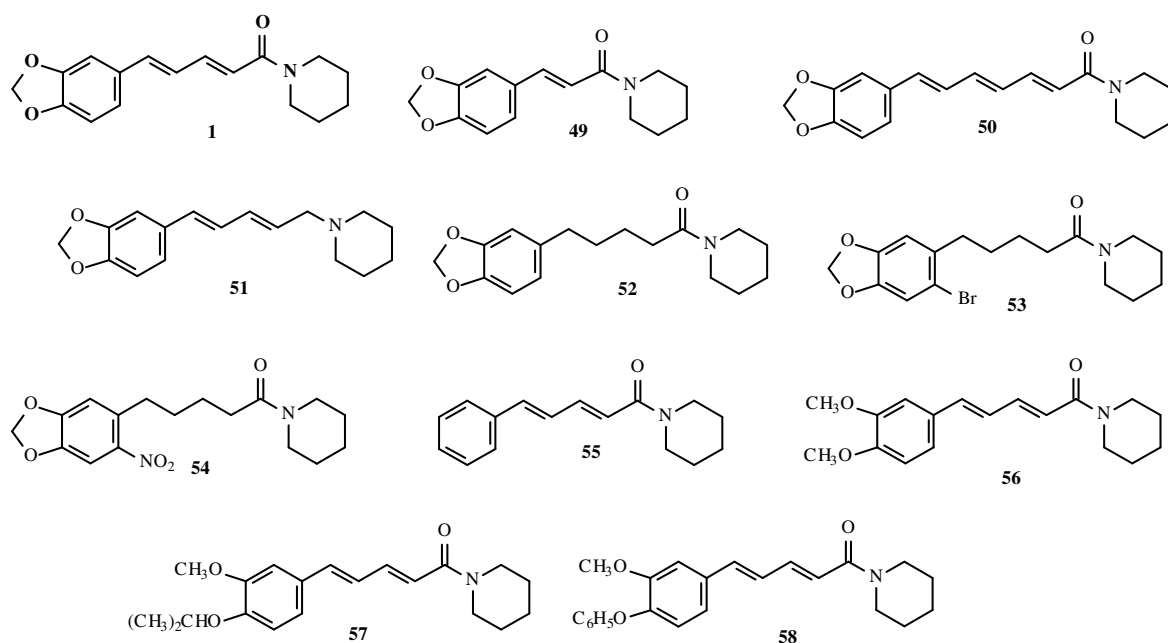
100ml de água destilada

🌈 Outros reagentes utilizados

HCl 1%, HCl conc., HCl 1N, NaOH 2N, NaOH 20%, MeOH, clorofórmio, cloridrato de hidroxilamina 10%, KOH em MeOH 10%, éter etílico, cloreto férrico 1%, solução de bórax, vanilina 1%, fita de magnésio.

### 3.2.2 A piperina, análogos e derivados

A amida natural, piperina, os seus análogos e derivados usados neste trabalho (Figura 15), foram isolados e sintetizados por Cleber Bomfim Barreto Junior, durante o seu trabalho de dissertação de mestrado no PPGQO da UFRRJ (BARRETO-JUNIOR, 2005).



**Figura 15.** Piperina, derivados e análogos.

### **3.2.3 Cromatografia em camada fina e de coluna filtrante**

Os solventes usados na cromatografia em camada fina e de coluna filtrante foram todos de grau P.A. da Vetec ou Grupo Química, sendo eles: acetona, diclorometano, acetato de etila e metanol.

### **3.2.4 Ensaios biológicos**

Nos ensaios para avaliação da atividade citotóxicas foram usados meio de cultura e reagentes da marca Aldrich e Sigma: RPMI 1640, soro fetal bovino, DMSO, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e isopropanol.

No ensaio de LDH fez-se o uso da solução tampão 140mM NaCl, 2,5mM CaCl<sub>2</sub> e 10mM HEPES (Sigma) e componentes do *kit* para determinação de desidrogenase láctica (Dols).

## **3.3 Material Vegetal**

### **3.3.1 Obtenção do extrato de *Piper nigrum* (Piperaceae)**

O extrato de *Piper nigrum* foi obtido a partir de 50g dos frutos secos de pimenta-do-reino adquirida no comércio local, após aproximadamente 4h de extração com 500ml de etanol P.A., auxiliada com aparelhagem de Soxhlet. A solução etanólica obtida, equivalente à 500ml, foi concentrada em evaporador rotatório até eliminar todo o solvente orgânico, resultando em um resíduo viscoso e aromático (RIBEIRO, 2004).

### **3.3.2 Obtenção dos extratos de *Struthanthus marginatus* (Loranthaceae)**

#### **Reconhecimento Botânico**

O espécime coletado por Pissinate, K. foi identificado pela pesquisadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regina Helena P. Andreatta da Universidade Santa Úrsula e sua exsiccata com o seguinte código de registro RB 415.504, foi confeccionada e depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB) pelo estudante Alexandre Gabriel Christo (UFRRJ), bolsista de iniciação científica do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rejan R. Guedes-Bruni do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.



### **Coleta e Moagem**

O material vegetal em estudo, a espécie *Struthanthus marginatus*, foi coletado no bairro Ecologia da cidade de Seropédica, Rio de Janeiro. Precisamente, esta erva de passarinho foi retirada da parte aérea da *Mangifera indica* (Anacardiaceae), planta hospedeira desta hemiparasita.

A planta *in natura*, caules, folhas e haustórios, foi lavada e seca à temperatura ambiente, em seguida, levada ao moedor mecânico, obtendo-se 810g de material vegetal pulverizado.

### **Extrato em acetato de etila**

O extrato da planta inteira foi obtido através da extração realizada via percolação a frio das 810g de *S. marginatus* secas e moídas com acetato de etila (5x 3l) e éter de petróleo (3x 2l), com o objetivo de extrair ao máximo os metabólitos contidos na planta.

Utilizou-se um balão de fundo chato de 6 litros no qual foram adicionadas, primeiramente, 810g do material vegetal e, sucessivamente, o acetato de etila (3x 3l) seguido do éter de petróleo (3x 2l), durante 24 horas para cada extração.

Após o tempo de cada percolação, utilizando um funil de separação de sólidos acoplado a uma mufa sustentada por uma haste, foi recolhido o material filtrado com um becher de 500ml e transferido para um balão de 1000ml o qual foi submetido a evaporação sob pressão reduzida.

Este procedimento repetiu-se até o término da última percolação com o éter de petróleo, obtendo-se no balão um volume de aproximadamente 200ml do extrato concentrado o qual foi dissolvido numa mistura de acetona/água (3/2) e estocado à 4°C para que ocorresse a precipitação de poucos pigmentos lipossolúveis (LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT *et al.*, 2002).

Posteriormente, com um funil de sólidos, o material foi novamente filtrado para separar a pequena porção de precipitado floculoso verde que havia se formado. A porção líquida foi submetida à evaporação sob pressão reduzida, obtendo-se finalmente 2,33g de extrato bruto concentrado.

### Extratos hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos (Tabela 4) das diferentes partes da erva de passarinho foram preparados para o estudo de triagem fitoquímica.

Os haustórios (30g), o caule (50g) e as folhas (50g) foram adicionados aos frascos contendo, respectivamente, 300, 500 e 500ml de solução aquosa constituída de 40% de etanol P.A. (v/v), após serem lacrados, os frascos ficaram reservados por sete dias ao abrigo da luz. Depois deste período, o material vegetal de cada frasco foi filtrado e a solução submetida à evaporação sob pressão reduzida para a obtenção do extrato bruto correspondente. Os extratos ainda pastosos foram levados à estufa com temperatura regulada a 40°C para secagem plena devido à grande quantidade de água.

**Tabela 4.** Extratos hidroalcoólicos obtidos dos haustórios, caule e folhas de *Struthanthus marginatus*.

EXTRATOS	Massa (g)	Rendimento (%)
Haustórios	3,313	4,98
Caule	2,859	6,52
Folhas	3,917	15,96

### 3.4 Separação Cromatográfica

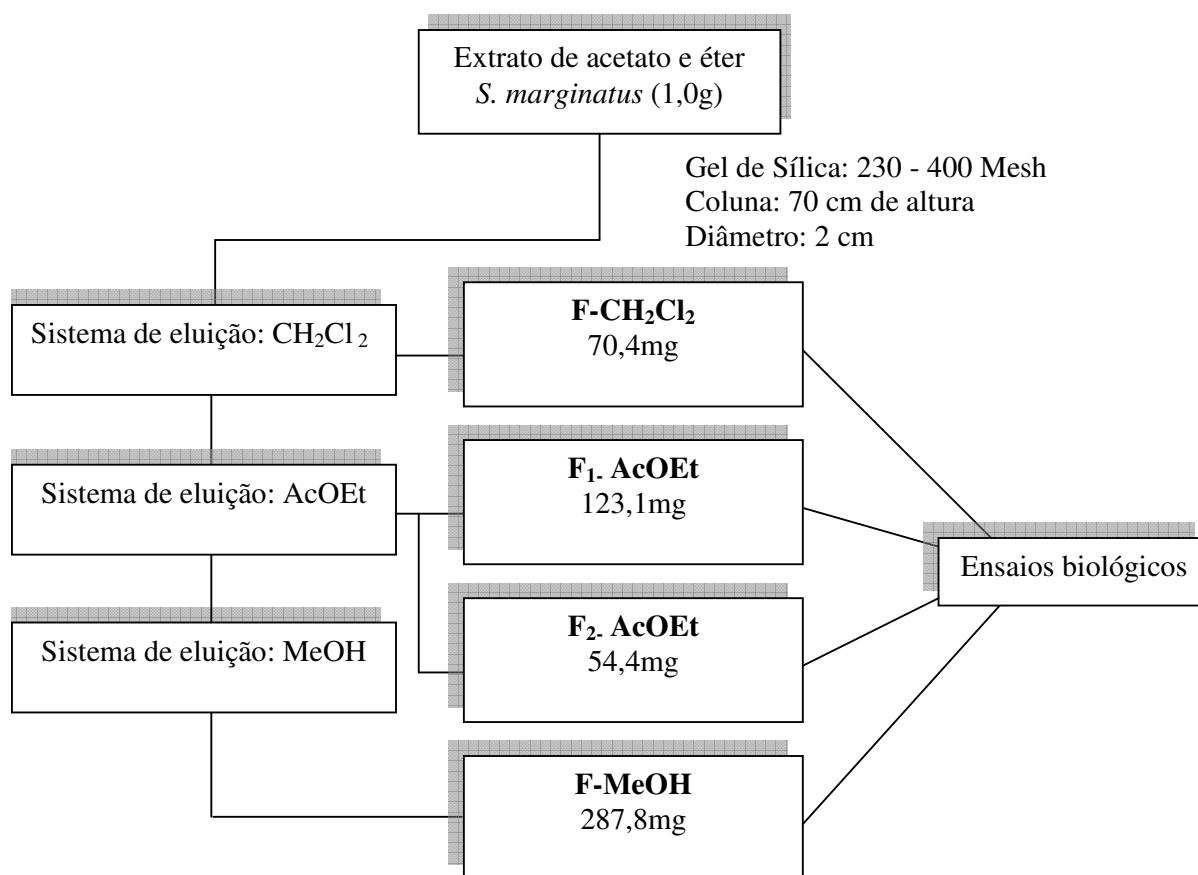
Das 2,33g do extrato concentrado obtido de *S. marginatus*, foram utilizados cerca de 1,00g em um sistema cromatográfico em coluna aberta cujo adsorvente usado foi o gel de sílica (230 - 400 Mesh), na fase fixa e, solventes com gradiente de polaridade, na fase móvel.

Preparou-se uma pastilha adicionando ao extrato bruto de erva de passarinho acetona para suspendê-lo, dissolvendo parte do extrato. Em seguida, acrescentou-se a sílica (230 - 400 Mesh) aos poucos até a obtenção da pasta úmida, que após a evaporação do solvente se caracterizou em uma pastilha.

A coluna foi preparada com o auxílio de um bastão de vidro com o qual foi colocado um algodão no fundo da coluna, posteriormente, com um funil de sólido foram adicionadas cerca de 35g da sílica de mesma granulometria umedecida com o diclorometano; em seguida, completou-se o volume da coluna com o mesmo solvente e abriu-se a torneira para poder homogeneizar a sílica. Adicionou-se a pastilha seca sobre a sílica embebida no solvente, finalizando com a adição de um algodão por cima da pastilha.

O extrato foi cromatografado para a obtenção das diferentes frações, usando como eluentes: inicialmente, o diclorometano (2l), obtendo a primeira fração (F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); posteriormente, adicionou-se o segundo eluente, o acetato de etila (3l), reservando a primeira metade uma fração (F<sub>1</sub>. AcOEt), e no término, uma terceira fração (F<sub>2</sub>. AcOEt) e; por último, a eluição foi realizada com metanol (3l), na qual resultou a quarta fração (F-MeOH) desta coluna (Esquema 1).

Através da cromatografia em camada fina, as frações foram agrupadas de acordo com a semelhança entre os fatores de retenção (*R<sub>f</sub>*) de suas amostras aplicadas e eluídas, segundo o solvente com a polaridade na qual foram coletadas. Obteve-se um total de 4 grupos classificados de acordo com o solvente no qual foram extraídos (Esquema 1).



**Esquema 4.** Obtenção das frações do extrato de *S. marginatus* para ensaios biológicos.

### 3.5 Triagem Fitoquímica

Os testes de bioprospecção hidroalcolico dos principais metabólitos especiais presentes na espécie *Struthanthus marginatus* foram realizados segundo metodologia descrita por MATTOS com os extratos de caule, folha e haustório, separadamente, utilizando os reagentes e as soluções descritos no item 3.2.1 (MATTOS, 1997).

### 3.6 Determinação dos Parâmetros Hidrofóbicos

#### 3.6.1 Método cromatográfico

Os valores de refratividade molar ( $R_M$ ) foram determinados por cromatografia de camada fina em fase reversa a partir da determinação dos valores de  $R_f$  (razão entre a distância percorrida pela amostra a partir do ponto de aplicação até o meio da mancha pela distância percorrida pela mistura de eluentes a partir do ponto de aplicação da amostra, Figura 16), mensurados com a utilização de placas de cromatografia em da marca Uniplate Analtec, RPS-F, 250 microns. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetona com solução tampão fosfato (0,01M; pH = 7,4) em oito concentrações diferentes as quais variaram de 35 a 70% em relação à acetona.

As soluções de aplicação foram preparadas utilizando-se 3mg de cada amostra em 1ml de acetona P.A.. A solução tampão utilizada foi preparada em um balão volumétrico de 1000ml no qual foram adicionadas 19,4ml da solução de fosfato de sódio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) a 0,1M e 30,6ml da solução de fosfato de sódio dibásico heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 0,1M. O volume final foi completado com água destilada e o pH da solução final foi determinado (MELLO, 2000).

Após preparadas as soluções, o procedimento deste experimento sucedeu-se em placas de CCF em fase reversa (20 x 20cm) onde foram aplicados 2 $\mu$ l de cada uma das soluções das amostras, com o auxílio de uma micro seringa de vidro. A aplicação foi a 2cm da base da placa e a altura máxima de migração das amostras sobre a mesma foi padronizado em 8cm. Após a evaporação dos solventes, através da lâmpada *mineralight* na região do ultra-violeta, os derivados foram detectados.

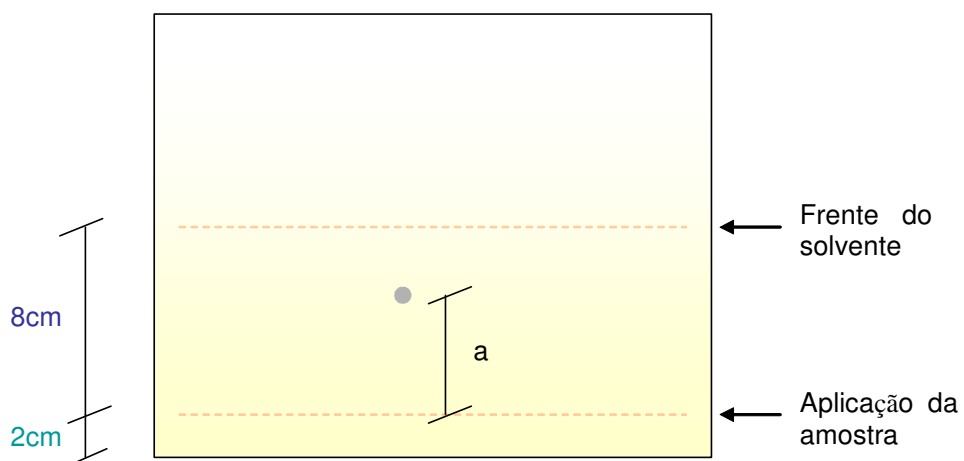
Os valores de  $R_f$  (Tabela 4) de cada amostra foram determinados, conforme a Equação 1 e em duplicata, a partir dos quais puderam ser calculados, através da Equação 2 (Figura 16), os valores de  $R_M$  (Tabela 9, Resultados e Discussão).

$$R_f = a/8$$

**Equação 1**

$$R_M = \log (1/ R_f - 1)$$

**Equação 2**



**Figura 16.** Determinação dos valores de  $R_f$ .

**Tabela 5.** Valores médios de  $R_f$  determinados para a piperina e seus derivados.

<i>Valores de <math>R_f</math></i>								
<b>% tampão fosfato: acetona</b>								
<b>Compostos</b>	<b>30:70</b>	<b>35:65</b>	<b>40:60</b>	<b>45:55</b>	<b>50:50</b>	<b>55:54</b>	<b>60:40</b>	<b>65:35</b>
<b>1</b>	0,937	0,887	0,837	0,700	0,675	0,650	0,450	0,362
<b>49</b>	0,937	0,925	0,875	0,787	0,787	0,737	0,587	0,525
<b>50</b>	0,937	0,812	0,775	0,512	0,587	0,412	0,325	0,150
<b>51</b>	0,437	0,412	0,325	0,312	0,287	0,212	0,112	0,075
<b>52</b>	0,937	0,850	0,700	0,662	0,662	0,550	0,387	0,362
<b>53</b>	0,937	0,787	0,775	0,512	0,487	0,350	0,275	0,162
<b>54</b>	0,937	0,850	0,787	0,625	0,612	0,487	0,400	0,287
<b>55</b>	0,937	0,875	0,850	0,650	0,637	0,537	0,437	0,312
<b>56</b>	0,937	0,900	0,762	0,762	0,750	0,700	0,600	0,487
<b>57</b>	0,937	0,837	0,787	0,637	0,562	0,487	0,400	0,287
<b>58</b>	0,937	0,725	0,725	0,525	0,387	0,237	0,237	0,125

Legenda da tabela:

**1-** piperina

**52-** amida THP

**56-** amida metil

**49-** derivado

**53-** Br THP

**57** amida isopropil

**50-** piperetina

**54-** nitro THP

**58-** amida benzil

**51-** dienoamina

**55-** amida fenil

### 3.6.2 *Clog P*

Os valores de *ClogP* foram obtidos, para todos os compostos, teoricamente através do programa de domínio público disponibilizado através da página “daylight” acessada na internet ([www.daylight.com/daycgi/clogp](http://www.daylight.com/daycgi/clogp)), capaz de simular o valor do coeficiente de partição logP obtido no sistema octanol/água.

### **3.7 Ensaios Biológicos**

#### **3.7.1 Células e animais**

As células utilizadas foram do carcinoma ascítico de Ehrlich, sendo mantidas em camundongos SW e BALBc, machos ou fêmeas, segundo normas éticas internacionais.

#### **3.7.2 Determinação da atividade citotóxica**

Os ensaios biológicos para avaliar a atividade citotóxica *in vitro* foram realizados segundo o modelo baseado no método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) o qual consiste na medida do dano induzido pela droga no metabolismo celular de glicídeos, principalmente, na atividade de desidrogenases (MOSMANN, 1983).

#### ***Procedimento***

Os ensaios em triplicata foram realizados em meio de RPMI suplementados com 5% de soro fetal bovino com até 0,5% de DMSO, em ordem decrescente de concentração. Para os extratos e as frações, a concentração usada variou de 12,5 a 100 µg/ml e, para a piperina e os compostos sintéticos, as concentrações variaram de 33 a 415µM, conforme o peso molecular de cada substância.

As culturas foram mantidas sob atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 48 h, em seguida, incubadas com 10 µl de MTT por 3h sob mesma condição atmosférica. Ao término deste tempo, adicionou-se 100 µl de isopropanol acidificado para dissolver a formazana formada. A leitura para avaliar a ação citotóxica foi realizada em espectrofotômetro de UV a 570nm, permitindo-nos calcular através da leitura de absorbância os valores de percentagem de inibição de cada composto ensaiado.

O valor de IC<sub>50</sub> (concentração que inibe em 50% o crescimento celular) de cada um dos compostos, extratos ou frações ensaiados foi obtido através do método de Reed & Muench (BIER, 1965).

#### **3.7.3 Ensaio em citômetro de fluxo**

A cultura de células do carcinoma ascítico de Ehrlich foi encubada com as drogas e mantida sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas. Após este tempo, foram reservadas amostras de 50µl de cada droga em *ependorff* no qual foram adicionados 200µl de solução tampão (10mM HEPES, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) para lavagem das células ensaiadas (PINHEIRO, 2004).

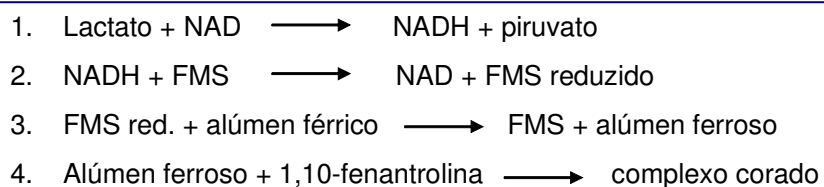
As amostras foram centrifugadas (1500 rpm/3 minutos) e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 570µl de tampão e 30µl de anexina, agitou-se, reservando a mistura por 20 minutos para que ocorresse a incorporação da anexina à glicoproteína P presente na membrana celular. Depois, foram transferidos 40µl de cada amostra para os tubos de análise no citômetro de fluxo, acrescidos de 100µl de tampão. Os dados foram analisados no programa WinMDI (multiple document interface flow cytometry application) versão 2.8, desenvolvido por Joseph Trotter, do The Scripps Research Institute (La Jolla, EUA) (PINHEIRO, 2004).

### 3.7.4 Ensaio com a desidrogenase láctica (LDH)

Após o tempo de 24h de incubação dos compostos com a cultura de células do carcinoma ascítico de Ehrlich sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, o sobrenadante da cultura celular ensaiada foi submetida ao sistema colorimétrico para determinação de desidrogenase láctica (LDH), utilizando-se o *kit* de Desidrogenase Láctica Doles, adaptado para o ensaio em microplacas de 96 poços (CHAVES, 2005).

#### *Procedimento*

As células foram centrifugadas e 50 µl do sobrenadante de cada amostra foi transferido à outra placa (96 poços), na qual foi adicionado 100µl da amostra 1 (indicada a seguir) reservando-a por 3 minutos à 37 °C para que o substrato lactato seja reduzido pela enzima LDH à piruvato. Em seguida, adicionou-se 100µl da amostra 2 (indicada a seguir), reservando por mais 9 minutos à 37 °C, para ocorrer a formação do complexo corado, conforme ilustra o Esquema 4.



**Esquema 5.** Determinação da desidrogenase láctica



A leitura para determinar a atividade da enzima LDH foi realizada em leitora de Elisa em filtro de 490nm e os resultados expressos como densidade óptica (OD), permitiram que fossem calculadas suas respectivas percentagens de liberação específica de LDH (Equação 3).

$$\% \text{ de lib. específica} = (\text{DO}_{\text{exp}} - \text{DO}_0 / \text{DO}_{100} - \text{DO}_0) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

$\text{DO}_{\text{exp}}$  = quantidade de LDH liberada, experimentalmente, quando as células foram tratadas com as drogas;

$\text{DO}_0$  = quantidade de LDH liberada espontaneamente;

$\text{DO}_{100}$  = quantidade de LDH liberada quando as células foram tratadas com 0,1% de Triton X-100.

As amostras com suas respectivas misturas de reagentes são descritas a seguir.

**Amostra 1:** solução estoque

250ml de alúmen férrico (ALF) ---- 4250ml (Vol. Final)

4000ml de substrato (lactato) -- 4250ml (Vol. Final)

**Amostra 2:** solução estoque

Difosfopiridino nucleótido (NAD)

Fenazina metossulfato (FMS)

Diluídos 1:20 (v/v) em água destilada

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

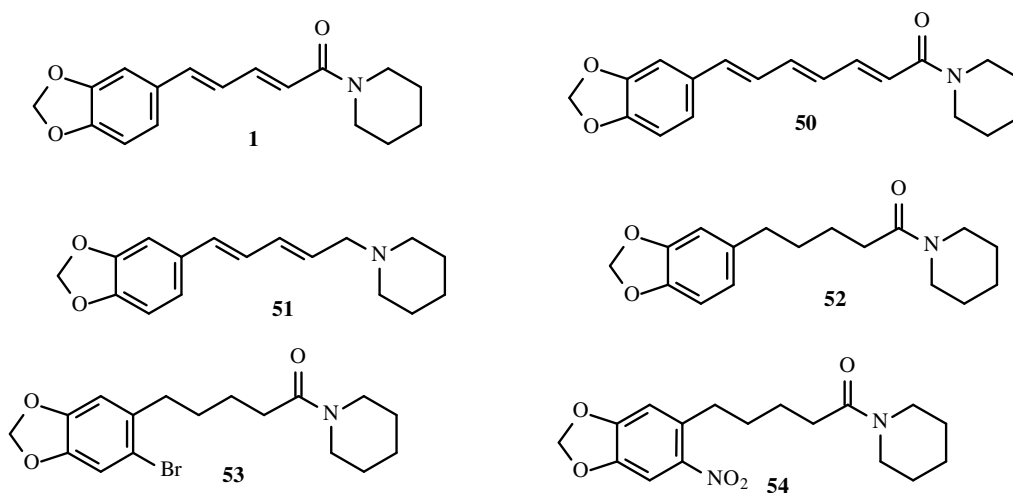
### 4.1 Estudo da Espécie *Piper nigrum*, Piperina, Análogos e Derivados

O extrato bruto de *Piper nigrum* e seu metabólito especial majoritário, a piperina isolada na forma de cristais amarelo-claros (RIBEIRO, 2004), foram ambos avaliados quanto à suas propriedades citotóxicas frente ao carcinoma de Ehrlich.

A literatura registra a atividade citotóxica, também frente ao carcinoma de Ehrlich, do extrato alcóolico da espécie *Piper longum* e da piperina pura, representada com os valores de  $IC_{50}$  equivalentes a  $100\mu\text{g/ml}$  para o extrato e, para a amida natural, encontra-se entre 100 a  $250\mu\text{g/ml}$ , concentração esta relativa a 15 e 85% de inibição do crescimento celular, respectivamente (SUNILA & KUTTAN, 2004).

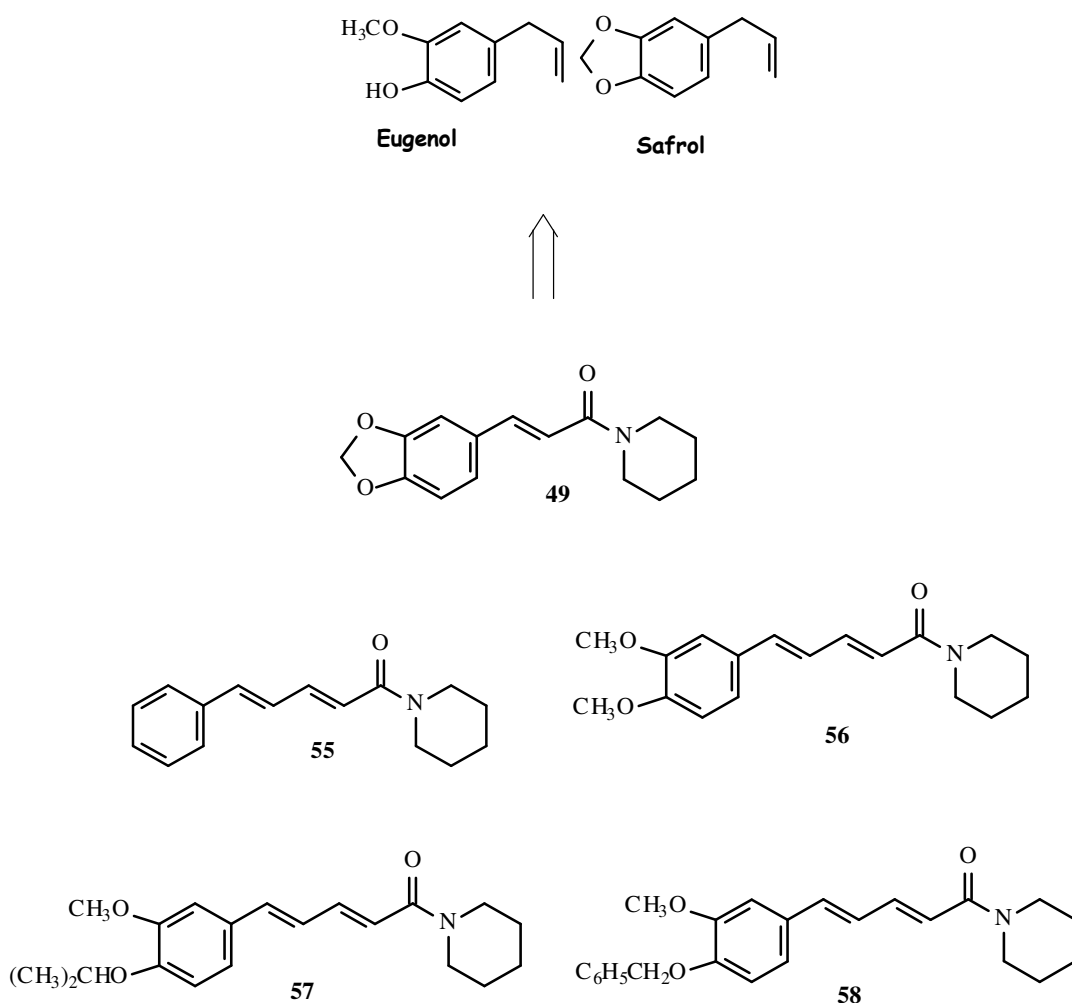
Os resultados obtidos, nesta dissertação, confirmam a citotoxicidade de espécies do gênero *Piper*, em particular a espécie *Piper nigrum*, sobretudo da amida natural, a piperina, que serão apresentados adiante.

Os análogos sintéticos da piperina **1**, ensaiados neste trabalho, apresentam as seguintes especificidades estruturais: a piperetina **50** com expansão quanto ao número de carbono da cadeia insaturada, a amida tetraidropiperina **52** com a cadeia carbônica saturada e, os derivados substituídos na posição 6 do anel aromático por bromo **53** e por um grupamento nitro **54** (Figura 17), foram obtidos por modificação estrutural a partir da piperina (BARRETO-JUNIOR, 2005), assim como a amina insaturada **51** (RIBEIRO, 2004).



**Figura 17.** Piperina **1** e seus análogos de modificação estrutural.

Outros derivados da amida natural, a amida cinamoil substituída **49**, a amida fenil sem a presença do grupamento metilenodioxí **55** e as amidas, com o anel metilenodioxí aberto e substituído por outros grupos alquilas, metil **56**, isopropil **57** e benzil **58** (Figura 18), foram sintetizados a partir do eugenol e safrol (BARRETO-JUNIOR, 2005), completaram os dez compostos analisados frente à atividade citotóxica, comparados à bioatividade da piperina.



**Figura 18.** Estrutura das amidas alcalóidais sintetizadas a partir do eugenol e do safrol.

#### **4.1.1 Atividade biológica**

O câncer, conforme citado na introdução desta dissertação, é uma terrível doença que se incide no século 21 exorbitantemente, e tem conduzido a intensas investigações científicas multidisciplinares visando seu controle e conseguir a cura .

Uma das formas para a compreensão dos mecanismos que envolvem o desenvolvimento de uma neoplasia são os estudos com os tumores experimentais de animais mantidos em laboratórios, através do transplante de células carcinogênicas a hospedeiros susceptíveis (VERLENGIA, 1994).

A utilização dos tumores experimentais, principalmente, o carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC), um tumor espontâneo da região mamária de camundongo fêmea, descrito por Ehrlich em 1906, foi um dos grandes avanços para a compreensão da neoplasia devido a sua conversão da forma sólida para a forma ascítica, possibilitando estudá-lo sob vários pontos de vista. Atualmente, o carcinoma de Ehrlich é considerado um modelo tumoral experimental, sendo utilizado na avaliação da atividade e do mecanismo de ação antitumoral de diferentes compostos (VERLENGIA, 1994).

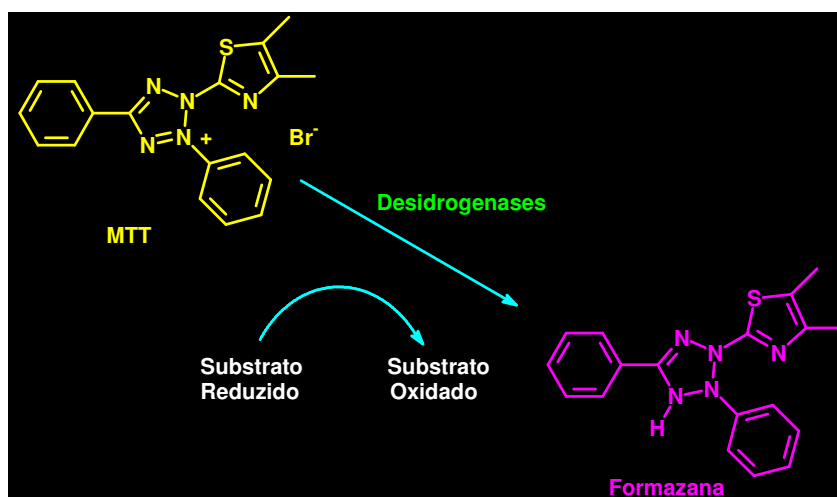
A atividade citotóxica da piperina, análogos e derivados, modificados sobre a função nitrogenada (amida), a cadeia lateral (tamanho e insaturação) e o padrão de substituição do anel aromático, foi avaliada frente às células do EAC (Tabela 6), visando à obtenção de novas substâncias potencialmente ativas contra o câncer.

#### **Avaliação da atividade citotóxica**

##### ***Método do MTT***

Os ensaios biológicos para determinar a atividade citotóxica *in vitro* foram realizados segundo o modelo baseado no método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), o qual consiste na medida do dano induzido pela substância no metabolismo celular de glicídeos, principalmente na atividade de enzimas desidrogenases (MOSMANN, 1983).

Desta forma, neste trabalho, a atividade celular foi quantificada através da redução do MTT à formazana correspondente (Figura 19), ocasionada indiretamente pela ação das enzimas desidrogenases presentes nas células viáveis. Os produtos formados pela atividade enzimática, NADH e NADPH, são responsáveis em reduzir o sal tetrazólio à formazana na medida em que não há perda da viabilidade celular.



**Figura 19.** Redução do sal tetrazólio (MTT) à formazana.

O valor de  $IC_{50}$  (concentração que inibe em 50% o crescimento celular) de cada um dos compostos ensaiados (Tabela 6) foi obtido através do método de Reed & Muench (BIER, 1965).

**Tabela 6.** Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) da piperina, análogos e derivados sintéticos.

Compostos	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$dp^*$
<b>1</b>	108,23	9,47
<b>49</b>	190,12	5,33
<b>50</b>	236,18	24,94
<b>51</b>	231,53	5,08
<b>52</b>	60,22	1,58
<b>53</b>	61,81	7,70
<b>54</b>	50,28	10,57
<b>55</b>	125,84	12,31
<b>56</b>	131,55	10,38
<b>57</b>	59,52	5,0
<b>58</b>	22,88	2,16

\* Valor do desvio padrão

Pôde-se observar a diminuição da atividade citotóxica frente às células do EAC para os compostos **49** e **50** que tiveram a cadeia alquênica expandida (6 carbonos) e reduzida (2 carbonos), respectivamente, quando comparados a amida natural **1** (4 carbonos).

A avaliação dos demais derivados e análogos à piperina nos quais foram mantidos os 5 átomos de carbono entre o núcleo metilenodioxiaril e o anel piperidínico, mostrou que a ausência do grupo carbonila em **51** acarretou na diminuição da atividade em relação a piperina.

A comparação entre os compostos com o grupamento amídico presente e com a cadeia alquênica (4 carbonos) hidrogenada **52**, **53** e **54**, revelou a diminuição do IC<sub>50</sub>, tornando-os mais ativos que a piperina. Também foi observada que a presença do grupo nitro na posição *orto* à cadeia alquênica no anel aromático faz do composto **54** ser o mais citotóxico dentre esta série.

No entanto, ao comparar a piperina **1** com o composto **55**, no qual a subunidade metilenodioxio é ausente, percebeu-se uma maior citotoxicidade frente às células do EAC para a amida natural, constatando-se a importância dos átomos de oxigênio para a atividade biológica. Assim, ao analisar a série **56**, **57** e **58** na qual é mantido o padrão de oxigenação ao núcleo metilenodioxiaril, porém com o anel metilenodioxio aberto, pôde-se observar que houve um incremento da atividade citotóxica entre os derivados **55** e **56** com a presença de grupamentos mais lipofílicos, respectivamente.

As observações descritas acima, a partir dos valores de IC<sub>50</sub>, conduziram-nos à determinação dos parâmetros hidrofóbicos (item 4.1.2) para o estudo preliminar da relação estrutura-atividade.

Os resultados para a avaliação da atividade citotóxica do extrato etanólico de *P. nigrum*, nos ensaios preliminares, apresentou percentagens de inibição 91%, 90%, 49% e 7% para as concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 µg/ml, respectivamente. Torna-se interessante destacar que o extrato de *P. nigrum* mostrou-se muito mais ativo que o extrato de *P. longum*, também ensaiado com as células do EAC, cuja concentração inibitória em 50%, encontra-se em 100 µg/ml (SUNILA & KUTTAN, 2004).

A diferença entre as faixas dos valores de IC<sub>50</sub> determinados entre os extratos de *P. nigrum* e *P. longum* pode ser devido à utilização de diferentes solventes extratores, sendo o metanol, utilizado por SUNILA & KUTTAN (2004) de maior polaridade que o etanol, usado neste trabalho. Isto, possivelmente acarretou aos extratos concentrações diferenciadas de metabólitos especiais, inclusive a própria piperina, uma vez que a percentagem de piperina

contida no extrato em ambas espécies é similar, podendo variar de 3-7% para *P. nigrum* e de 3-8% em *P. longum* (RIBEIRO, *et al.*, 2004; JAMES, 1999).

Assim, dos 11 compostos analisados, foram encaminhados para estudo quanto ao possível mecanismo de morte celular do EAC, os derivados **52**, **53**, **54**, **57** e **58** que apresentaram os menores valores de IC<sub>50</sub>, além da piperina.

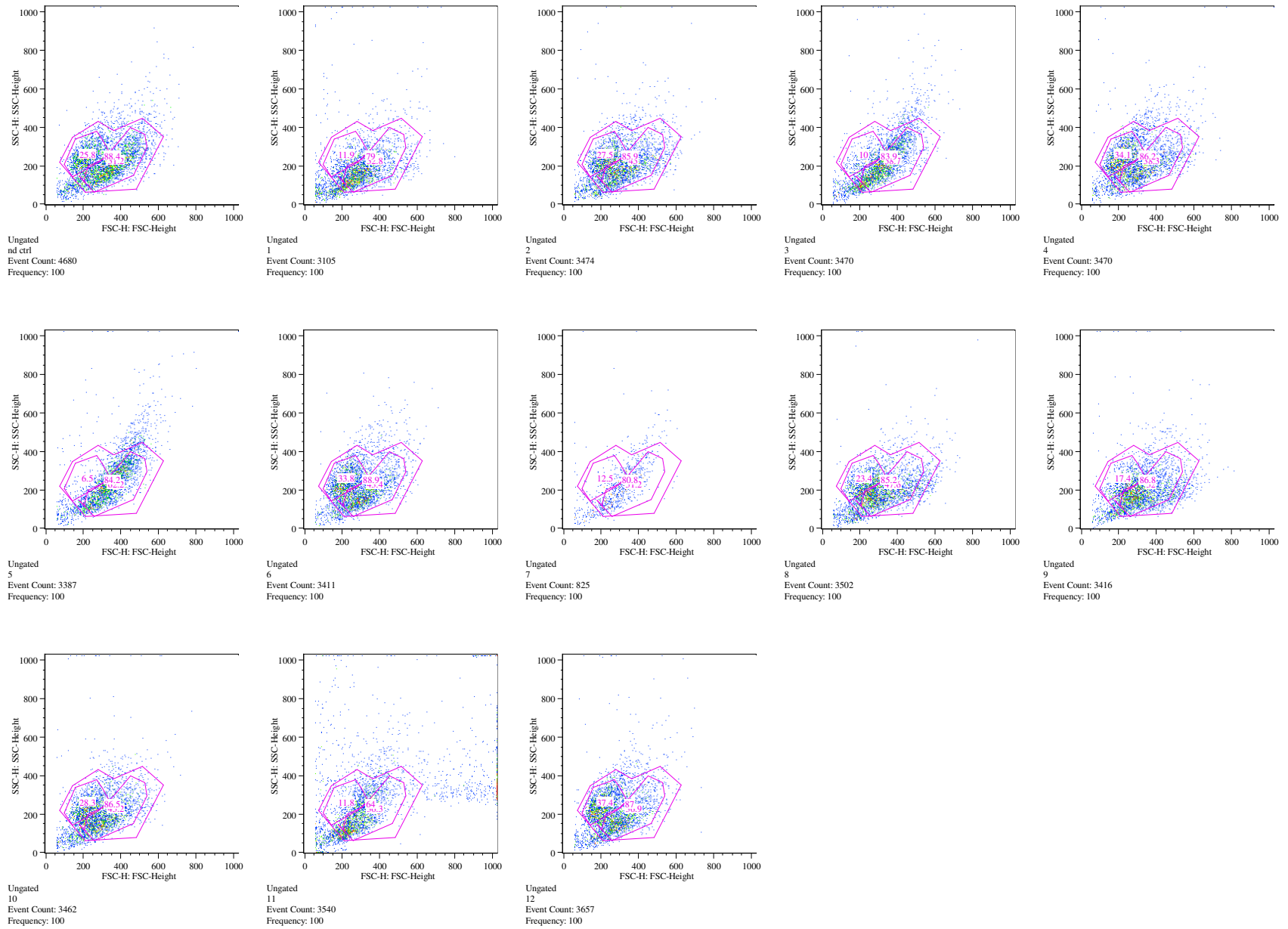
#### ***Avaliação do efeito citotóxico (apoptose x necrose)***

A avaliação da atividade citotóxica, visando o possível mecanismo de ação das amidas mais ativas foi realizada frente às células do carcinoma de Ehrlich, incubadas com anexina V e analisadas no citômetro de fluxo para serem quantificadas quanto à morte celular.

Pôde-se observar, no controle de células vivas (gráfico **controle**), através do perfil fenotípico, variando no tamanho (eixo y) e na granulometria (eixo x), a intensa presença de duas sub-populações de células do EAC. A sub-população A, com 25,8 % e a sub-população B, com 51,2 % de frequência em relação às 4680 células registradas pelo aparelho de citometria (Figura 20).

No gráfico 1 e 2 da Figura 20 estão representados os resultados dos ensaios de citotoxicidade das células do EAC frente a piperina nas concentrações de 351,2 e 44,01µM, respectivamente, indicando uma clara diminuição da sub-população A frente a maior dose ensaiada.

A presença e a redução da sub-população A também foi observada nos gráficos 3, 5, 7, 9, 11 cujas células do EAC foram ensaiadas frente as maiores concentrações dos compostos: **52**, **53**, **54**, **57** e **58**, respectivamente. Enquanto que a sub-população B esteve presente em todos os gráficos, diante tanto das maiores quanto das menores concentrações de cada composto ensaiado. (Figura 20).



**Figura 20.** Sub-populações de células do EAC observadas no citômetro de fluxo após 24h do ensaio de citotoxicidade.



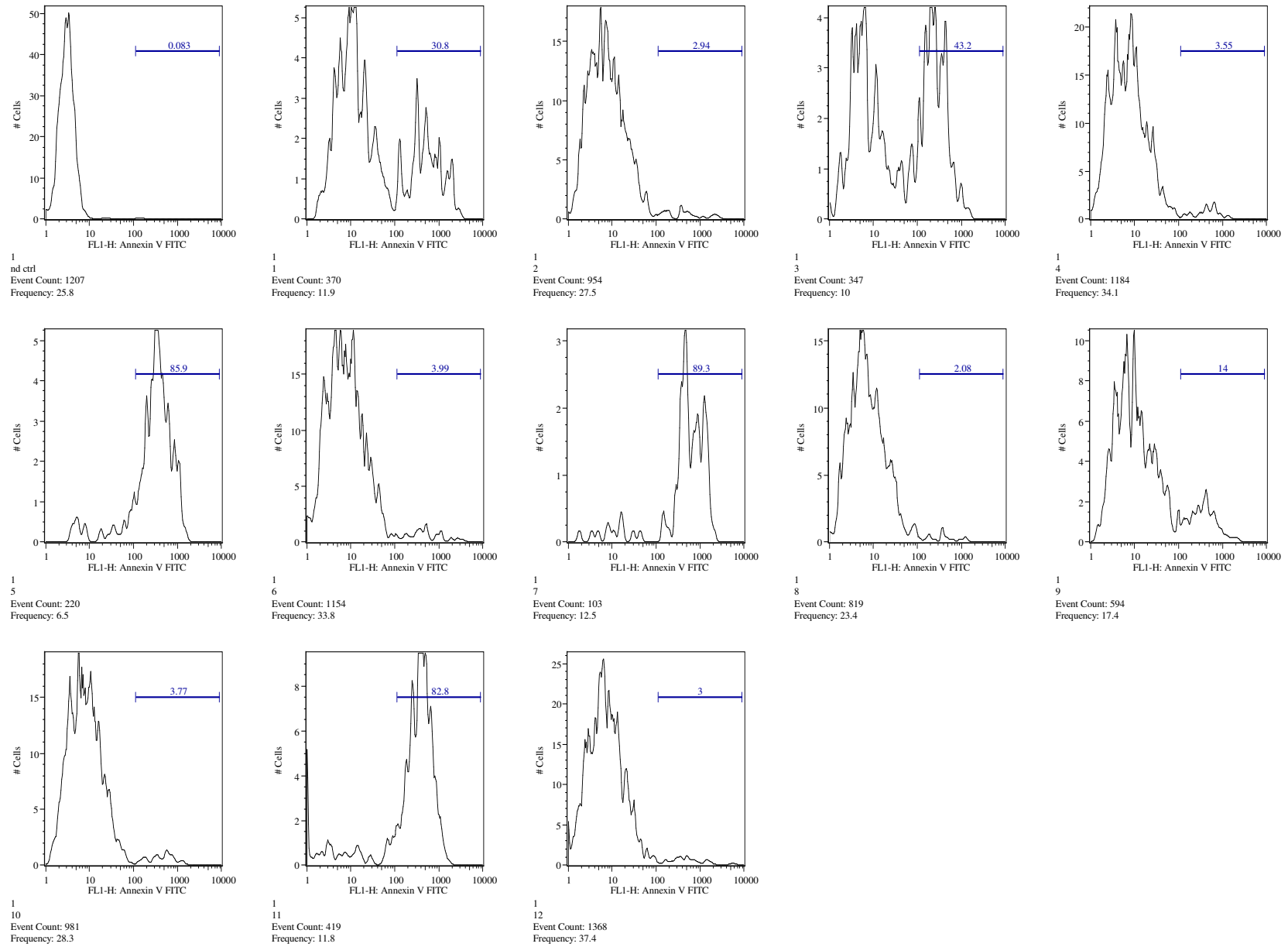
O estudo da natureza de morte celular foi realizado também utilizando a técnica de marcação com anexina V, marcador específico da fosfatidilserina, exposta externamente à membrana celular na qual está inserida, durante o processo de morte, principalmente por apoptose (BHATTACHARYYA *et al.*, 2003).

Assim, no estágio inicial de apoptose, quando a membrana celular ainda se encontra intacta, a fosfatidilserina (PS) é translocada para o lado extra-celular da membrana plasmática, tornando susceptível a marcação da anexina V a estas células, através do estabelecimento de ligação específica (WANG *et al.*, 2004).

Entretanto, a exposição externa da PS, um dos primeiros eventos característicos do processo apoptótico, tem sido reportado na literatura como não sendo específico para as células apoptóticas, mas também podendo ocorrer em células oncóticas (LECOEUR *et al.*, 2001). A oncose (necrose primária), um processo passivo degenerativo, foi definida como o primeiro estágio de necrose durante o aumento celular (MAJNO & JORIS, 1995). Portanto, devido à ruptura da membrana celular e, conseqüentemente, a exposição da fosfatidilserina, as células necróticas também podem ser marcadas com anexina V (BHATTACHARYYA *et al.*, 2003).

Os resultados dos ensaios das amidas mais citotóxicas frente às células do EAC, utilizando a marcação com anexina V, constataram a diferença na percentagem de células marcadas nas duas sub-populações, diante da maior e menor concentração de cada composto.

Na Figura 21, o gráfico **ctn** representa o controle de células vivas e a percentagem de células marcadas com anexina V de 0,083% da sub-população A. Esta figura também representa os gráficos 1, 3, 5, 7, 9 e 11 para a maior concentração e, os gráficos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 para a menor concentração referente as amidas **1, 52, 53, 54, 57 e 58**, respectivamente, sobre a sub-população A do EAC (Figura 21).



**Figura 21.** Expressão da anexina V na sub-população A de células do EAC após 24h do ensaio de citotoxicidade.

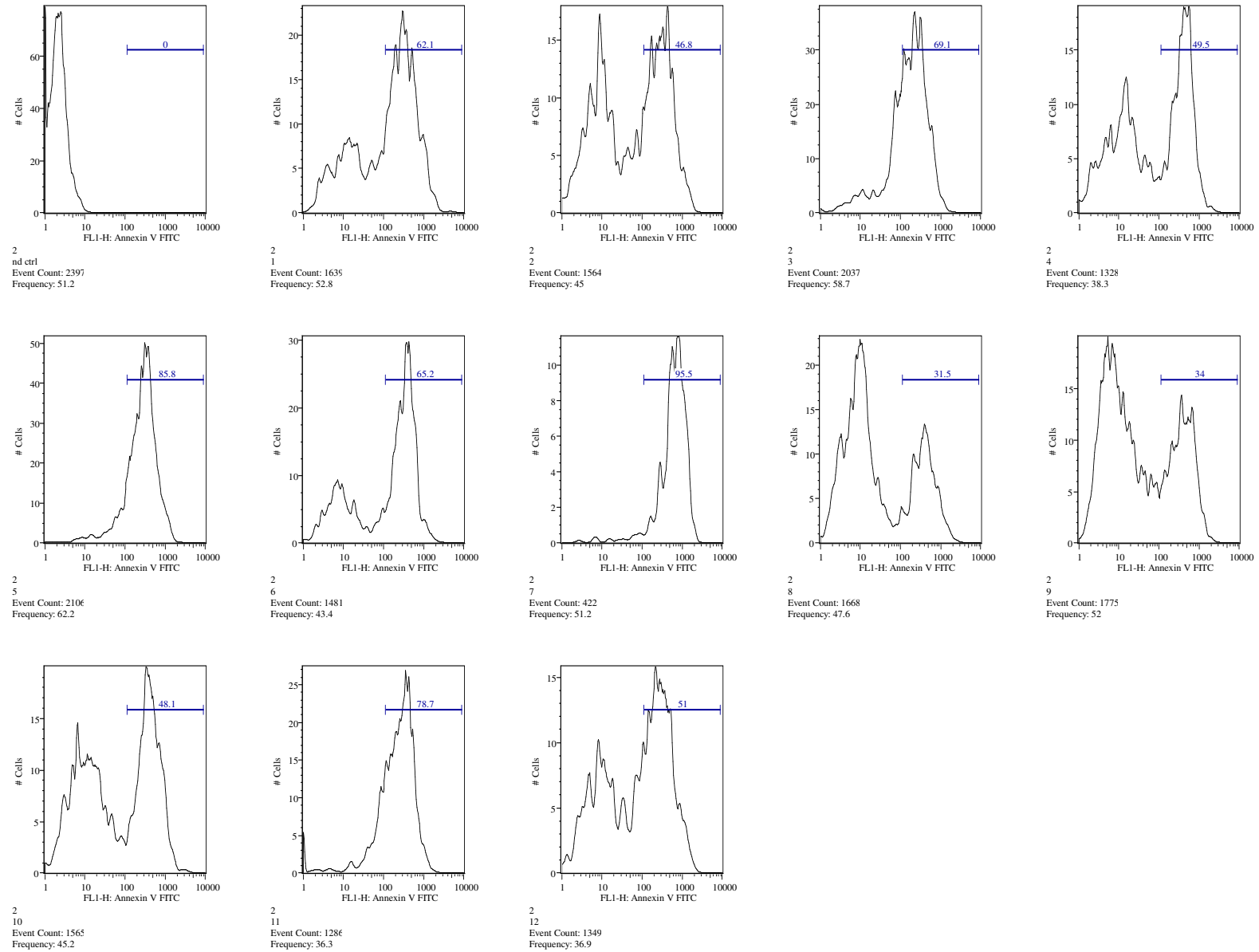
Na Figura 22, também estão representadas as percentagens de células do EAC marcadas com anexina V, porém referentes à sub-populações B, na qual se pôde observar que a maioria dos gráficos expressam anexina acima de 46%, tanto nas maiores quanto nas menores concentrações dos compostos ensaiados, exceto para o **54** (gráfico 8 e 9, Figura 22).

O conjunto envolvendo ambas as sub-populações é ilustrado na Figura 23, na qual estão representados os gráficos para cada composto ensaiado com suas maiores e menores concentrações frente à percentagem de expressão de anexina V nas células do EAC.

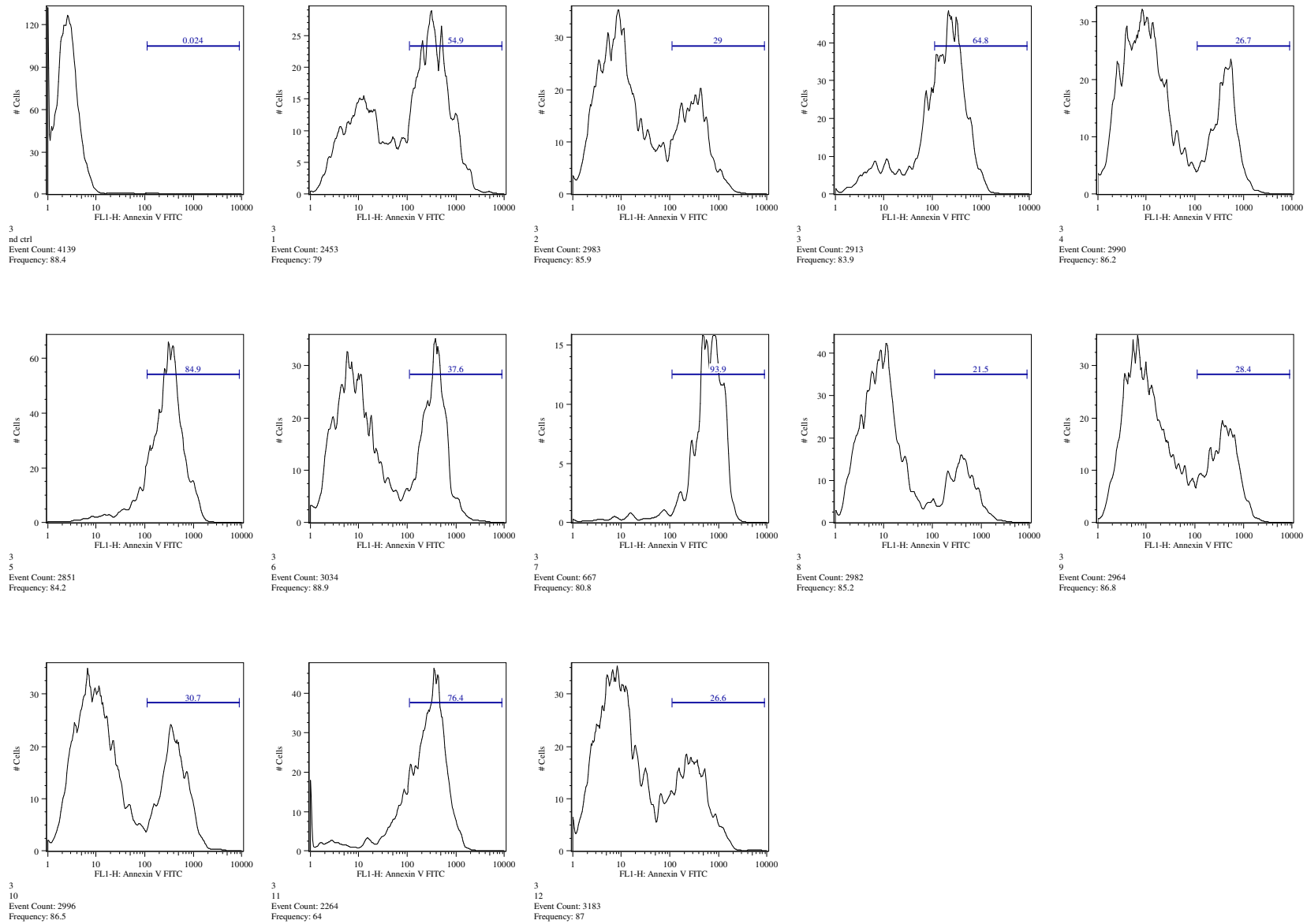
Apesar de terem sido realizados poucos ensaios utilizando a citometria de fluxo, os resultados preliminares indicam coerência com os obtido pelo método do MTT, apresentando a piperina e seus derivados o efeito citotóxico dependente da dose. A análise da Figura 23, a qual mostra a percentagem acima de 50% de células marcadas com anexina V, evidencia o início do processo de morte celular na cultura do EAC, após 24 horas de incubação com as amidas **1**, **52**, **53**, **57** e **58**.

É possível que a sub-população A e a sub-população B de células do EAC estejam representando as fases  $G_0/G_1$  e  $G_2/M$  do ciclo celular, conforme foram quantificadas suas características morfológicas (tamanho x granulometria) através do citômetro de fluxo (Figura 20). ARIMURA, *et al.* (2005) e BHATTACHARYYA, *et al.* (2003) citaram em literatura o mesmo perfil morfológico (tamanho x granulometria) das células do EAC com os observados nesta dissertação, onde puderam caracterizar as fases do ciclo celular, juntamente com a análise do DNA.

Desta maneira, estas similaridades possibilitam deduzir que há uma seletividade destes compostos, inibindo de forma específica a proliferação das células do EAC, ao atuarem na sub-população A, reduzindo-a quando esta está sob a maior concentração da piperina e seus derivados.



**Figura 22.** Expressão da anexina V na sub-população B de células do EAC após 24h do ensaio de citotoxicidade.



**Figura 23.** Expressão da anexina V no conjunto envolvendo ambas sub-populações de células do EAC após 24h do ensaio de citotoxicidade.

### ***Ensaio com a desidrogenase láctica (LDH)***

A mensuração da atividade da enzima desidrogenase láctica (LDH), liberada no meio de cultura, tem sido utilizada para monitorar o grau de injúria celular (BERGMEYER *et al.*, 1965). O aumento da produção inicial de NADH, formado com a redução do lactato à piruvato no ciclo do crescimento celular, através da ação da LDH, conseqüentemente, leva a uma maior formação de complexo (Esquema 5, Material e Métodos), acarretando na elevação da leitura de absorbância, indicando a atividade da enzima (ARIMURA *et al.*, 2005).

O ensaio para mensurar o grau de injúria sofrido pelas células de EAC, diante da piperina **1** e derivados mais citotóxicos **52**, **53**, **54**, **57**, **58**, foi analisado de acordo com a atividade da enzima LDH presente no meio de cultura, após o ensaio de 24 horas (Tabela 7).

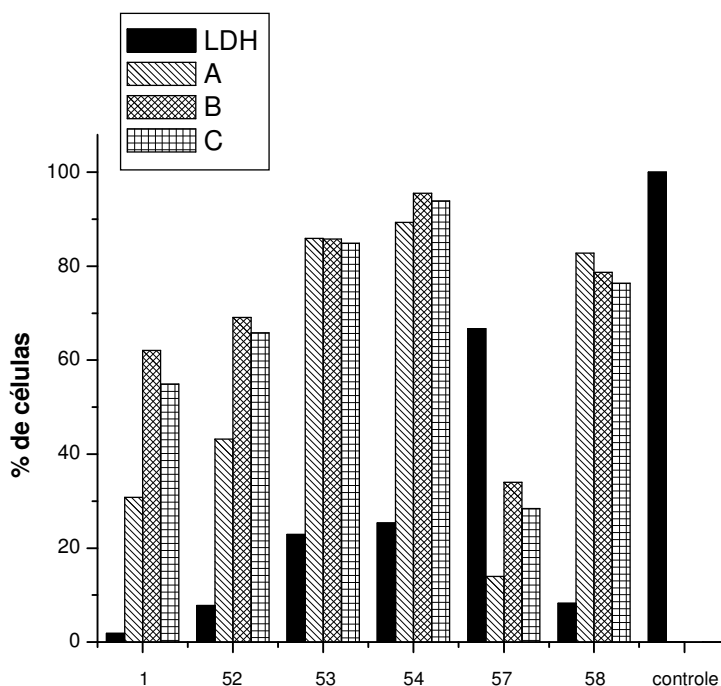
**Tabela 7.** Valores da % de liberação específica de LDH das células EAC frente à piperina, análogos e derivados e, suas respectivas concentrações.

<b>COMPOSTOS</b>	<b>% de LDH</b>	<b>Conc. (<math>\mu</math>M)</b>
<b>1</b>	1,86	351,2
<b>52</b>	7,76	345,7
<b>53</b>	22,90	272,28
<b>54</b>	25,38	299,06
<b>57</b>	66,73	303,55
<b>58</b>	8,25	264,91
<b>controle</b>	100	*

\* 10 $\mu$ l de Triton X-100 (10%) adicionado ao controle de células vivas para lise total da membrana plasmática das células do EAC.

A percentagem de liberação específica de LDH das células de EAC analisadas, após 24 horas, foi detectada diante da concentração máxima de cada composto utilizado no ensaio do MTT, sendo que estas concentrações estão muito acima dos seus respectivos valores de IC<sub>50</sub>. O composto **57**, entretanto, destacou-se das demais amidas alcaloidais com 66,73 % de liberação específica de LDH, evidenciando, diante desta alta concentração, que há injúria celular (YANG *et al.*, 2004), concomitantemente com a inviabilidade das células do EAC segundo a análise com o método do MTT, indicando a necrose como possível mecanismo de ação predominante.

Na tentativa de correlacionar os resultados obtidos pelos diferentes métodos na avaliação da morte celular, foi confeccionado um gráfico de barras envolvendo o percentual de expressão de anexina V e LDH nas células para os compostos **1**, **52**, **53**, **54**, **57** e **58** (Figura 24).



**Figura 24.** Análise da expressão de anexina V e LDH das células do EAC frente às máximas concentrações das amidas. As barras indicam as percentagens: da sub-população A (A), da sub-população B (B) e do conjunto de sub-populações, A e B, (C) de células marcadas com anexina V, detectadas no citômetro de fluxo e; de liberação específica de LDH. Estes ensaios foram realizados em culturas independentes, após 24 horas.

As células da sub-população A apresentaram a fosfatidilserina (ligada à anexina V) em percentuais acima de 50% quando ensaiadas com os compostos **53**, **54** e **58** e, percentuais inferiores a 45%, diante dos compostos **1**, **52**, e **57**. Enquanto que a sub-população B expressou PS, indicando processo de morte celular, nos compostos **1**, **52**, **53**, **54** e **58**, Evidenciou-se uma ação citotóxica específica para os compostos **1** e **52** sobre a sub-população B, podendo estas amidas estarem atuando apenas em uma fase do ciclo celular

Pôde-se observar entre os compostos **1**, **52**, **53** e **54** que a percentagem de liberação específica de LDH aumenta com o aumento da atividade citotóxica, respectivamente, sugerindo a presença de células oncóticas no tratamento com a maior concentração dos compostos.

As células tratadas com a piperina **1**, amida menos citotóxica, apresentaram a menor percentagem de liberação de LDH, diante da maior concentração, sugerindo que a amida natural induz a morte por apoptose às células do EAC. Enquanto que o derivado **57** sugere a predominância da morte por necrose, em função da maior liberação de LDH das células.

#### **4.1.2 Estudo dos parâmetros hidrofóbicos**

O caráter hidrofóbico ou a lipofilicidade de uma droga é fundamental para se entender sua ação biológica, principalmente quanto ao destino nos processos de absorção, distribuição, estocagem e eliminação nos sistemas biológicos (TAKÁSC-NOVÁC *et al.*, 1995).

De maneira mais específica, estes parâmetros físico-químicos permitem determinar com que facilidade a droga atravessa a membrana celular, podendo ser importantes no tipo de interação que envolve a ligação droga-receptor (FUJITA, 1984).

A mudança de substituintes ou de uma subunidade estrutural de uma substância pode levar a uma variação relevante quanto ao seu caráter hidrofóbico e, conseqüentemente, à sua atividade biológica.

Desta forma, é de fundamental importância a determinação da hidrofobicidade apresentada pela piperina e seus derivados sintéticos para o estudo da correlação quantitativa (*QSAR- Quantitative Activity Relationship*) ou qualitativa (*SAR- Structure Activity Relationship*) entre a estrutura química e a atividade biológica .

Os parâmetros hidrofóbicos determinados para o estudo de *QSAR* da piperina, derivados e análogos, neste trabalho foram: o coeficiente de partição *P* teórico (*ClogP*) e a refratividade molar ( $R_{Mw}$ ), obtida pelo método cromatográfico.

#### **Coefficiente de partição *P***

O coeficiente de participação *P* estudado para o sistema octanol/água, foi adotado como um dos principais parâmetros capaz de descrever o caráter hidrofóbico, sendo um modelo otimizado para o processo de transferência de droga entre a fase aquosa e não aquosa (LEO, *et al.*, 1971).

O caráter hidrofóbico de uma substância pode ser determinado, experimentalmente, pelo tradicional método “Shake Flash” (HERSEY *et al.*, 1989) ou, teoricamente, através de programas computacionais.

A distribuição relativa da droga, seu coeficiente de partição (*P*), pode ser obtido pela Equação 3 na qual  $C_{oct}$  é a concentração da droga na fase orgânica e  $C_{aq}$  é a concentração da mesma na fase aquosa tamponada. Assim, a razão de uma substância entre as duas fases será



de sua solubilidade diferenciada em cada fase. Portanto, as drogas mais hidrofóbicas terão maiores valores de  $P$ , sendo mais permeáveis à membrana plasmática (MELLO & ECHEVARRIA, 2006).

A determinação dos valores de  $\log P$  através do método “Shake Flask” é extremamente trabalhosa e requer uma grande quantidade de amostra o que nem sempre é conveniente, particularmente nos trabalhos envolvendo metabólitos especiais de plantas. Assim, a determinação do fator  $\log P$  através de cálculos teóricos tem se apresentado como uma alternativa conveniente e útil para os estudos de  $QSAR$  e  $SAR$ .

Neste trabalho de dissertação, os valores de  $ClogP$  dos compostos foram determinados teoricamente, utilizando um programa de domínio público acessado na página [www.daylight.com/daycgi/clogp](http://www.daylight.com/daycgi/clogp) e estão representados na Tabela 8.

Os valores obtidos para  $ClogP$  expressam a variação da hidrofobicidade devido as modificações estruturais de cada derivado sintético quando comparados com a piperina.

**Tabela 8.** Valores dos coeficientes de participação teóricos ( $ClogP$ ) da piperina, seus derivados e análogos.

COMPOSTOS	$ClogP_{teórico}$
1	3,313
49	2,859
50	3,917
51	4,152
52	2,951
53	3,885
54	2,893
55	3,348
56	3,006
57	3,844
58	4,774

### **Refratividade molar ( $R_{Mw}$ )**

Os parâmetros cromatográficos  $R_{Mw}$  e  $\log k_w$  obtidos por cromatografia em camada fina e por cromatografia líquida de alta eficiência, respectivamente, têm sido utilizados para expressar indiretamente a caráter hidrofóbico de derivados bioativos, sendo usados na substituição aos valores de  $\log P$  nos estudos de *QSAR* (MARTIN, 1978).

Dentre os parâmetros cromatográficos, a cromatografia de camada fina (CCF) em fase reversa é uma alternativa eficiente na determinação e avaliação da lipofilicidade das substâncias (MARTIN, 1978; HANSCH *et al.*, 1990).

Os parâmetros provenientes da distribuição de uma substância entre uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar, podem ser correlacionados com o coeficiente de partição, pois a hidrofobicidade de uma droga é conhecida como a força dirigente em um processo de distribuição, considerando seu caráter apolar em um ambiente polar (MELLO & ECHEVARRIA, 2006).

Assim, a mudança de substituintes ou de subunidades nas estruturas químicas análogas provoca alterações nos valores do  $R_f$  na cromatografia, permitindo, através da Equação 2, o uso da CCF de fase reversa para a obtenção dos valores de  $R_M$  (TOMILINSON, 1975).

$$R_M = \log (1/R_f - 1)$$

**Equação 2**

Portanto, de acordo com a natureza de seus substituintes ou subunidades, para cada derivado há uma relação linear entre os valores de  $R_M$  e a composição dos eluentes. Construindo-se um gráfico com os valores de  $R_M$  em função da concentração da fase aquosa (%) na mistura de eluentes, obtêm-se uma reta representada pela Equação 3. Esta correlação, quando extrapolada para 100% da fase aquosa, origina os valores de  $R_{Mw}$  que expressam ao efeito hidrofóbico (Mello, 2006).

$$R_{Mw} = a (\% \text{ solv. aquoso}) + b$$

**Equação 4**

Neste trabalho, os valores de  $R_{Mw}$  foram obtidos após a determinação dos valores de  $R_f$  da piperina e seus derivados sintéticos através da utilização de placas de cromatografia de camada fina em fase reversa (C-18) encubadas com uma mistura constituída de acetona/solução tampão fosfato pH = 7,4, cujo gradiente de concentração variou entre 30 a 60% (v/v) em relação ao tampão. Com os valores de  $R_f$  (s) (Tabela 4, Material e Métodos) puderam ser calculados os respectivos  $R_M$  (s) (Tabela 9) através da Equação 2.

**Tabela 9.** Valores de  $R_M$  determinados para a piperina, seus derivados e análogos sintéticos.

<i>Valores de <math>R_M</math></i>								
<b>% tampão fosfato: acetona</b>								
<b>Compostos</b>	<b>30:70</b>	<b>35:65</b>	<b>40:60</b>	<b>45:55</b>	<b>50:50</b>	<b>55:45</b>	<b>60:40</b>	<b>65:35</b>
<b>1</b>	-0,172	-0,897	-0,710	-0,367	-0,317	-0,288	0,087	0,246
<b>49</b>	-0,172	-1,091	-0,845	-0,567	-0,567	-0,447	-0,152	-0,043
<b>50</b>	-0,172	-0,636	-0,537	-0,020	-0,152	0,154	0,317	0,753
<b>51</b>	0,110	0,153	0,317	0,343	0,395	0,568	0,899	1,091
<b>52</b>	-0,172	-0,753	-0,367	-0,291	-0,291	-0,087	0,199	0,246
<b>53</b>	-0,172	-0,568	-0,537	-0,020	0,022	0,268	0,421	0,713
<b>54</b>	-0,172	-0,753	-0,567	-0,221	-0,197	0,022	0,176	0,395
<b>55</b>	-0,172	-0,845	-0,753	-0,268	-0,244	-0,064	0,110	0,343
<b>56</b>	-0,172	-0,954	-0,506	-0,505	-0,477	-0,367	-0,176	0,022
<b>57</b>	-0,172	-0,712	-0,567	-0,244	-0,108	0,022	0,167	0,395
<b>58</b>	-0,172	-0,421	-0,421	-0,043	0,199	0,507	0,507	0,845

Com a extrapolação para 100% da fase aquosa da mistura de eluentes, através da equação da reta obtida por regressão linear do gráfico dos valores de refratividade molar ( $R_M$ ) versus a percentagem de tampão na fase orgânica (% de tampão) (Equação 3), foram calculados os valores de  $R_{Mw}$  (Tabela 10) a partir das equações 5-15.

**Tabela 10.** Valores de  $R_{Mw}$  determinados para a piperina, seus derivados e análogos sintéticos.

COMPOSTOS	$R_{Mw}$	$r^a$
<b>1</b>	1,496	0,976
<b>49</b>	1,129	0,980
<b>50</b>	2,140	0,964
<b>51</b>	2,037	0,954
<b>52</b>	1,348	0,964
<b>53</b>	2,200	0,981
<b>54</b>	1,677	0,989
<b>55</b>	1,711	0,979
<b>56</b>	0,906	0,940
<b>57</b>	1,654	0,991
<b>58</b>	2,381	0,981

<sup>a</sup> Coeficiente de correlação linear

Composto 1

$$R_{Mw} = 0,0369 (\pm 0,0035) \% \text{ tampão} - 2,144 (\pm 0,1818)$$

**Equação 5**

$$r = 0,976 \quad dp = 0,094 \quad n = 7$$

Composto 49

$$R_{Mw} = 0,0332 (\pm 0,0029) \% \text{ tampão} - 2,1905 (\pm 0,1525)$$

**Equação 6**

$$r = 0,980 \quad dp = 0,079 \quad n = 7$$

Composto 50

$$R_{Mw} = 0,0432 (\pm 0,0053) \% \text{ tampão} - 2,1797 (\pm 0,2704)$$

**Equação 7**

$$r = 0,964 \quad dp = 0,140 \quad n = 7$$

Composto 51

$$R_{Mw} = 0,0300 (\pm 0,0041) \% \text{ tampão} - 0,9621 (\pm 0,2137)$$

**Equação 8**

$$r = 0,954 \quad dp = 0,110 \quad n = 7$$

Composto 52

$$R_{Mw} = 0,0309 (\pm 0,0037) \text{ \% tampão} - 1,7416 (\pm 0,1930)$$

**Equação 9**

$$r = 0,964 \quad dp = 0,100 \quad n = 7$$

Composto 53

$$R_{Mw} = 0,0432 (\pm 0,0037) \text{ \% tampão} - 2,1191 (\pm 0,1934)$$

**Equação 10**

$$r = 0,981 \quad dp = 0,100 \quad n = 7$$

Composto 54

$$R_{Mw} = 0,0369 (\pm 0,0024) \text{ \% tampão} - 2,0126 (\pm 0,1235)$$

**Equação 11**

$$r = 0,989 \quad dp = 0,064 \quad n = 7$$

Composto 55

$$R_{Mw} = 0,0392 (\pm 0,0035) \text{ \% tampão} - 2,2089 (\pm 0,1826)$$

**Equação 12**

$$r = 0,979 \quad dp = 0,094 \quad n = 7$$

Composto 56

$$R_{Mw} = 0,0266 (\pm 0,0043) \text{ \% tampão} - 1,7540 (\pm 0,2202)$$

**Equação 13**

$$r = 0,9400 \quad dp = 0,114 \quad n = 7$$

Composto 57

$$R_{Mw} = 0,0361 (\pm 0,0020) \text{ \% tampão} - 1,9559 (\pm 0,1049)$$

**Equação 14**

$$r = 0,991 \quad dp = 0,054 \quad n = 7$$

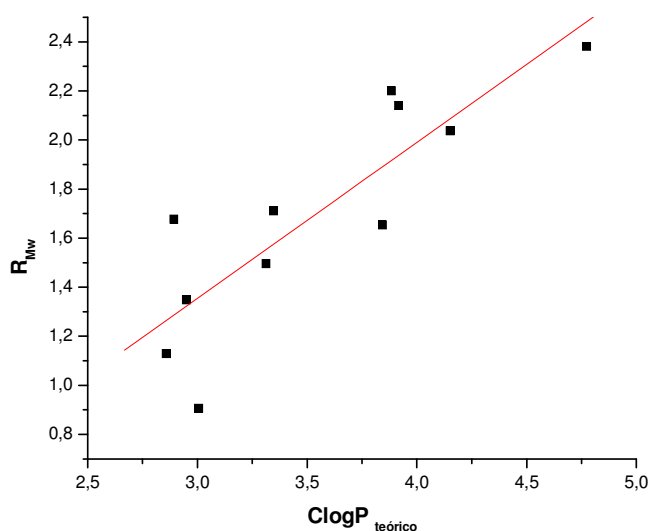
Composto 58

$$R_{Mw} = 0,0443 (\pm 0,0038) \text{ \% tampão} - 2,0487 (\pm 0,1982)$$

**Equação 15**

$$r = 0,981 \quad dp = 0,102 \quad n = 7$$

O gráfico correlacionando os parâmetros lipofílicos, o cromatográfico  $R_{Mw}$  com o  $ClogP$ , pode ser observado na Figura 23, indicando uma correlação linear com  $r= 0,85$ . Esse resultado pode ser justificado considerando-se a presença de derivados substituídos no anel aromático por grupos volumosos, o que pode influenciar no processo cromatográfico com a utilização da sílica. A equação 16 mostra a correlação considerando-se todos os compostos analisados.



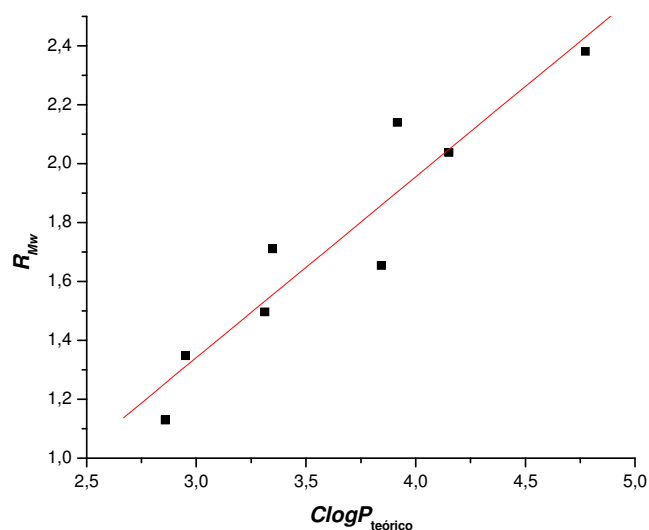
**Figura 25.** Correlação entre o  $R_{Mw}$  e o  $ClogP_{teórico}$  para todos os compostos analisados.

$$R_{Mw} = - 0,5528 (\pm 0,4672) + 0,6358 (\pm 0,1301) ClogP \text{ teórico}$$

**Equação 16**

$$R= 0,852 \quad SD= 0,255 \quad N= 11$$

No entanto, se os derivados **53**, **54**, **56** forem excluídos da correlação entre os dois parâmetros hidrofóbicos, será observada uma relação mais significativa, equação 17 (Figura 24,  $r = 0,94$ ). De fato, em **53** e **54**, a presença dos grupos bromo e nitro em posição *orto* à cadeia alquênica deve interferir de forma diferente quando comparado aos demais derivados no deslocamento cromatográfico, bem como ocorre com o derivado **56** que apresenta o anel metilenodióxi aberto e substituído com dois grupos metilas.



**Figura 26.** Correlação entre o  $R_{Mw}$  e o  $ClogP$  teórico dos compostos analisados, com exceção dos **53, 54, e 56**.

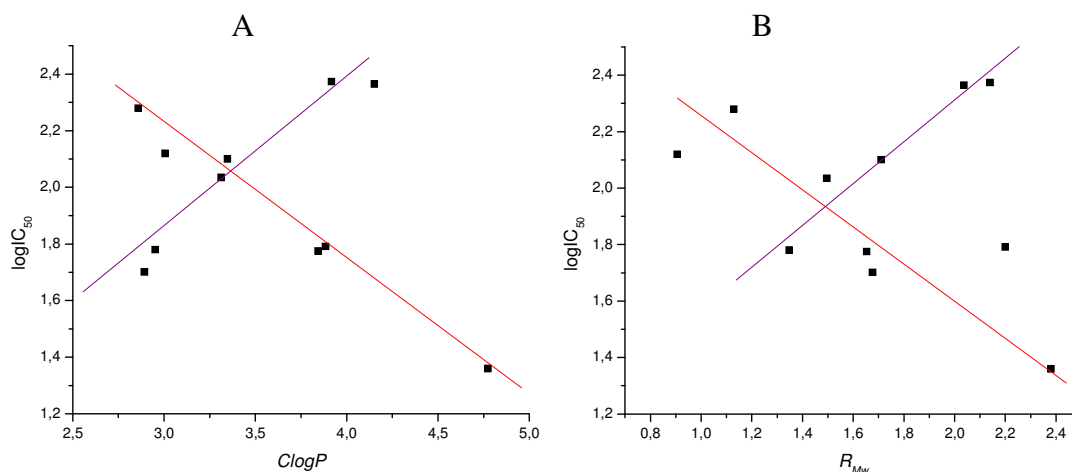
$$R_{Mw} = - 0,50 (\pm 0,33) + 0,61 (\pm 0,09) ClogP_{teórico}$$

**Equação 17**

$$r = 0,94 \quad dp = 0,15 \quad n = 8$$

#### 4.1.3 Estudo das correlações entre a hidrofobicidade versus a atividade biológica

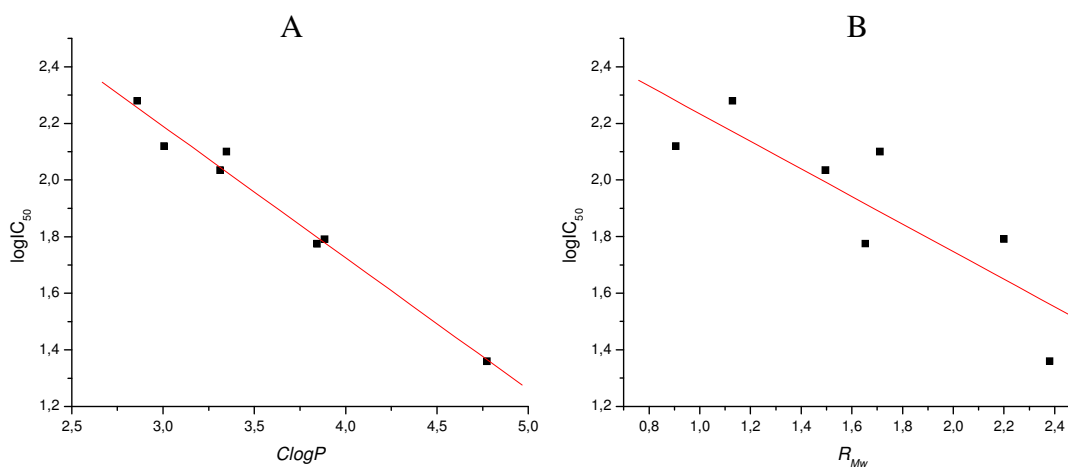
A análise das correlações entre os parâmetros hidrofóbicos de  $ClogP$  e  $R_{Mw}$  (Tabela 8 e 10, respectivamente) e os valores de  $\log IC_{50}$  mostrou uma dispersão de pontos nos gráficos, sendo não significativas, tanto para os valores de  $ClogP$  como para  $R_{Mw}$ , ao serem considerados todos os compostos (Figura 27). Possivelmente, o desvio da linearidade de alguns desses compostos deve-se à presença diferentes séries em relação ao padrão de modificação estrutural.



**Figura 27.** Gráficos A e B representando a correlação entre os valores de  $IC_{50}$  com os parâmetros hidrofóbicos  $ClogP$  e  $R_{Mw}$ , respectivamente.

No entanto, pôde-se observar nos gráficos A e B da Figura 27 a existência de duas séries de compostos que possuem linearidade: uma envolvendo **1, 49, 53, 55, 56, 57 e 58** e, a outra, constituída por **1, 50, 51, 52, 54 e 55**.

A primeira série citada composta por **1, 49, 53, 55, 56, 57 e 58**, com maior número de derivados, apresentou correlações lineares significativas (Equação 18) entre os valores de  $\log IC_{50}$  e  $ClogP$  ( $r=0,99$ ) e com  $R_{Mw}$  ( $r=0,84$ ), apresentados na Figura 28, gráficos A e B, respectivamente. As equações 18 e 19 indicam os efeitos observados nos gráficos da Figura 28. Este resultado evidencia a importância da propriedade lipofílica destas amidas para a atividade citotóxica, principalmente, entre os 4 compostos mais ativos **1, 53, 57 e 58** desta série.



**Figura 28.** Gráficos A e B representando a correlação entre os valores de  $IC_{50}$  com os parâmetros hidrofóbicos  $ClogP$  e  $R_{Mw}$ , respectivamente, dos compostos **1, 49, 53, 55, 56, 57 e 58**.



$$\log IC_{50} = 3,58 (\pm 0,1) - 0,46 (\pm 0,02) ClogP \text{ teórico}$$

**Equação 18**

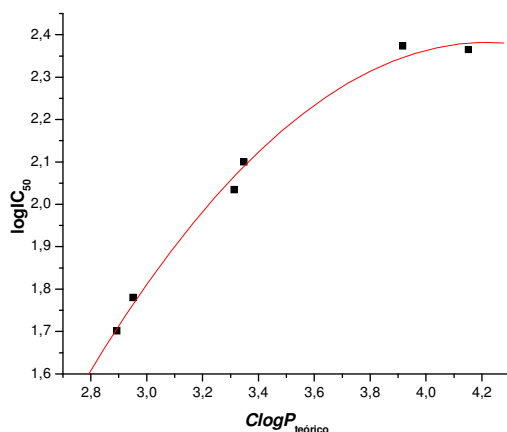
$$r = 0,99 \quad dp = 0,04 \quad n = 7$$

$$\log IC_{50} = 2,72 (\pm 0,23) - 0,48 (\pm 0,13) R_{MW}$$

**Equação 19**

$$r = 0,84 \quad dp = 0,18 \quad n = 7$$

A segunda série de compostos, cuja correlação foi significativa (Equação 20), está representada por **1**, **50**, **51**, **52**, **54** e **55**, ressaltando a hidrofobicidade como relevante para a atividade, mas em modelo quadrático, também muito comum nas análises de QSAR (HANSCH, 1999), conforme pode ser observada no gráfico da Figura 29 e Equação 20.



**Figura 29.** Gráfico representando a correlação entre os valores de IC<sub>50</sub> com o parâmetros hidrofóbico *ClogP*, envolvendo **1**, **50**, **51**, **52**, **54** e **55**.

$$\log IC_{50} = -0,38 (\pm 0,07) ClogP^2 + 3,23 (\pm 0,51) ClogP - 4,34 (\pm 0,07)$$

**Equação 20**

$$r^2 = 0,99 \quad dp = 0,02 \quad n = 6$$

Uma possível linearidade entre os diferentes compostos analisados poderia ser observada considerando-se outros parâmetros físico-químicos, como o efeito eletrônico e estérico, ou ainda, modelo proveniente do tratamento de regressão múltipla considerando esses fatores, além do fator hidrofóbico.

## **4.2 Estudo dos Extratos Obtidos da Espécie *Struthanthus marginatus***

Com os extratos hidroalcoólicos obtidos separadamente das folhas, caules e haustórios da espécie *S. marginatus*, planta hemiparasita coletada sobre a espécie hospedeira *Mangifera indica*, foram realizados ensaios de prospecção das principais classes de metabólitos especiais. É importante destacar que poucos estudos químicos e biológicos têm sido reportados na literatura para este gênero e, principalmente para esta espécie.

A atividade biológica do extrato bruto desta erva de passarinho também foi avaliada, porém sua insolubilidade levou-nos a preparar frações com diferentes polaridades para prosseguir com os ensaios biológicos.

### **4.2.1 Ensaio de quimioprospecção**

O ensaio de quimioprospecção se trata de um roteiro analítico seqüencial elaborado com o objetivo de detectar a ocorrência de quantidades apreciáveis de diversos constituintes químicos em extratos de plantas com exceção dos protídeos, glicídios e outras substâncias macromoleculares (MATTOS, 1997).

No intuito de detectar os principais constituintes químicos micromoleculares na espécie *S. marginatus* e, principalmente, os de características mais polares nos quais se inserem algumas classes de metabólitos, por exemplo, os flavonóides isolados em outras ervas de passarinho como a quercetina e a quercetrina (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998; DÉVÉHAT *et al.*, 2002), foram preparados extratos hidroalcoólicos independentes das folhas, caules e haustórios para a análise qualitativa de sua composição química. Os resultados estão representados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Resultados da triagem dos principais metabólitos especiais na espécie *Struthanthus marginatus*.

Metabólitos Especiais	Caule	Extratos	
		Folhas	Haustório
1 Alcalóides	Positivo	Positivo	Positivo
2 Saponinas	Positivo	Positivo	Positivo
3 Esteróides e triterpenóides	Positivo	Positivo	Negativo
4 Taninos	Positivo	Positivo	Positivo
5 Depsídeos e depsidonas	Negativo	Negativo	Negativo
6 Flavonóides	Positivo	Positivo	Positivo
7 Catequinas	Positivo	Positivo	Positivo
8 Antraquinonas	Negativo	Negativo	Negativo
9 Cumarinas	Negativo	Negativo	Negativo
10 Sesquiterpenlactonas e lactonas	Negativo	Negativo	Negativo
11 Carotenóides e xantofilas	Negativo	Negativo	Negativo
12 Glicosídeos cardíacos	Negativo	Negativo	Negativo
13 Açúcares redutores	Positivo	Positivo	Positivo
14 Reação para polissacarídeos	Positivo	Positivo	Positivo
15 Purinas	Negativo	Negativo	Negativo
16 Proteínas e aminoácidos	Positivo	Positivo	Positivo
17 Ác. orgânicos	Negativo	Negativo	Positivo

Constatou-se, na prospecção dos três extratos hidroalcológicos independentes, a presença dos ácidos orgânicos apenas nos haustórios e a presença dos esteróides e triterpenóides nas folhas e caules, sendo que os esteróides foram mais intensamente evidenciados nos caules.

As classes das catequinas e dos flavonóides foram bastante expressivas nos teste realizados com os três extratos, sendo que a primeira classe foi observada no extrato do caule com uma maior intensidade. No entanto, a classe das saponinas foi marcante nas folhas.

Os alcalóides, em menor intensidade, açúcares redutores, polissacarídeos, proteínas e aminoácidos foram detectados nos três extratos analisados das diferentes partes do vegetal, assim como a abundância de taninos.

O presente estudo com a espécie *S. marginatus*, nos resultados preliminares, tem confirmado os dados da literatura que apresentam, apesar de poucas espécies estudadas, a família Loranthaceae e, principalmente esta planta, tão relevantes quanto às espécies da família Viscaceae, a qual é representada pela espécie *Viscum album*, planta extensamente estudada na Europa para o tratamento do câncer (MANSKY *et al.*, 2003).

#### 4.2.2 Obtenção e estudo das atividades citotóxica das frações de *S. marginathus*

Os extratos hidroalcóolicos das folhas, caules e haustórios foram preparados (item 3.3, Parte Experimental) visando também o monitoramento da atividade biológica dos prováveis constituintes químicos detectados nos ensaios de prospecção. No entanto, estes extratos foram insolúveis, inviabilizando os ensaios biológicos e, conseqüentemente, o biomonitoramento da atividade citotóxica.

Uma forte evidência para a insolubilidade dos extratos é a presença dos taninos, também detectados, em níveis relativamente altos, no córtex do caule e no tecido paliçádico das folhas da espécie *S. vulgaris* (SALATINO *et al.*, 1993), os quais são capazes de formar complexos insolúveis com proteínas, segundo relato da literatura (MARTIN & MARTIN, 1993).

Diante da insolubilidade dos extratos e da evidência da presença de flavonóides, segundo o ensaio de prospecção realizado neste trabalho, os estudos quanto à atividade biológica desta planta foram direcionados às frações preparadas segundo a marcha utilizada por LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT *et al.* (2002), com a qual estes autores isolaram três flavonóides da espécie *Scurrula ferruginea*, também pesrtencente à família Loranthaceae.

Do extrato de *S. marginartus*, proveniente da percolação a frio com acetato de etila e éter de petróleo, obtido com 0,26% de rendimento, foi utilizada 1g para ser cromatografado em coluna aberta com o objetivo de se obter as frações com diferentes polaridades para serem ensaiadas frente às células do carcinoma de Ehrlich.

A separação cromatográfica e a avaliação por CCF permitiu a reunião das frações em quatro grupos F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>-AcOEt, F<sub>2</sub>-AcOEt, F-MeOH.

A fração F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> com 7,04% de rendimento em relação ao extrato bruto, apresentou coloração amarela, enquanto que as frações obtidas com acetato de etila, F<sub>1</sub>-AcOEt e F<sub>2</sub>-AcOEt cujos rendimentos foram respectivamente 12,31% e 5,44%, apresentaram coloração amarelo-esverdeada a verde devido à presença de clorofila.

A fração metanólica F-MeOH foi obtida em rendimento de 28,78%, no entanto, observou-se através da cromatografia de camada fina uma maior concentração de substâncias diferentes, além da clorofila, apresentando uma coloração verde escuro.

Estas frações foram direcionadas aos ensaios biológicos.

Inicialmente, tentou-se realizar ensaios de toxicidez geral frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. No entanto, os resultados com o extrato bruto em éter de petróleo e acetato de etila e também os extratos hidroalcóolicos das folhas, caules e haustórios de *S. marginatus* foram insatisfatórios devido a sua baixa solubilidade em solução salina, apresentando um

precipitado floculoso de imediato. Assim as frações F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>-AcOEt, F<sub>2</sub>-AcOEt e F-MeOH, não foram ensaiadas frente ao microcrustáceo.

Os testes biológicos com as frações F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>-AcOEt e F<sub>2</sub>-AcOEt testadas de *S. marginatus*, frente ao carcinoma de Ehrlich, mostraram boa atividade citotóxica (Tabela 12), sendo que os valores de IC<sub>50</sub> se encontram-se na faixa entre 50 e 25 µg/ml. A fração metanólica ainda não foi ensaiada.

**Tabela 12.** Atividade citotóxica das frações de *Struthanthus marginatus* frente às células do carcinoma de Ehrlich.

Concentração (µg/ml)	Porcentagem de inibição (%)		
	F-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	F <sub>1</sub> -AcOET	F <sub>2</sub> -AcOET
100	100	100	93,89
50	100	100	71,56
25	6,87	22,51	10,49
12,5	0,0	0,0	0,0

A atividade citotóxica das frações de acetato de etila F<sub>1</sub>-AcOEt e F<sub>2</sub>-AcOEt, na concentração de 50 µg/ml, diferenciaram-se, possivelmente, devido a presença de clorofila, onde a fração F<sub>2</sub>-AcOEt, a mais clorofilada, mostrou-se menos ativa frente ao carcinoma de Ehrlich. Outra razão sugerida para tal distinção seria a presença de diferentes metabólitos em cada fração, claramente observada através da cromatografia de camada fina utilizada para a reunião das frações.

## 5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Diante da enorme contribuição das plantas superiores para o desenvolvimento de forma direta ou indireta de quimioterápicos a partir de seus metabólitos especiais, o estudo com as espécies *S. marginathus* e *P. nigrum*, nesta dissertação, indicam-nas como fonte promissora para o desenvolvimento de moléculas bioativas frente às células tumorais.

### *Pimenta do reino*

Neste trabalho, foi observado a atividade citotóxica frente às células do carcinoma ascítico de Ehrlich tanto para o extrato dos frutos de *Piper nigrum* quanto para a piperina. O estudo da citotoxicidade dos derivados sintéticos à amida natural mostrou que alguns derivados frente às células do EAC foram mais ativos que a piperina.

Demaneira em geral, as amidas mais citotóxicas frente às células do EAC evidenciaram a expressão da fosfatidilserina durante o processo de morte celular. No entanto, através de atividade de desidrogenase láctica das células ensaiadas, pôde-se constatar que alguns compostos são capazes de induzir a morte por necrose, enquanto que outros, como a piperina, podem levar a morte por apoptose.

A correlação dos parâmetros hidrofóbicos determinados com a atividade biológica dos compostos estudados foi linear para uma série de derivados e, quadrática para outra. Provavelmente, outros parâmetros físico-químicos estajam influenciando na bioatividade destes compostos frente às células do carcinoma ascítico de Ehrlich.

### *Erva de Passarinho*

No presente estudo com a espécie *Struthanthus marginathus*, pôde-se detectar a presença de importantes classes de metabólitos especiais como: esteróides, catequinas, flavonóides, taninos e alcalóides, expressos com diferentes intensidades nas determinadas partes do vegetal analisadas, bem como a citotoxicidade segundo a diferença de polaridade dos metabólitos presentes nas distintas frações.

Desta forma, este estudo se encontra em andamento, sendo o biomonitoramento das frações uma ferramenta importante para selecionar aquelas de maior atividade para posterior avaliação fitoquímica levando ao isolamento dos metabólitos bioativos, sendo em seguida avaliados frente às células tumorais.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREATA R. H. P.; DE PAULA, C. H. R.; ANDREATA, J. V. A vegetação da Lagoa Rogrigues de Freitas, Rj. **Eugeniana** XXV, 11-21, 2001
- ARIMURA, T.; KOJIMA-YUASA, A.; TATSUMI, Y.; KENNEDY, D. O.; MATSUI-YUASA, I. Involvement of Polyamines in Evening Primrose Extract-Induced Apoptosis in Ehrlich Ascities Tumor Cells. **Amino Acids**, v. 28, p. 21-27, 2005
- ATAL, C. K.; DUBEY, R. K.; SINGH, J. Biochemical Basis of Enhanced Drug Bioavailability by Piperine: Evidence that Piperine is a Potent Inhibitor of Drug Metabolism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 232, p. 258-262, 1985
- BAJAD, S.; SINGLA, A. K.; BEDI, K. L. Liquid Chromatographic for determination of Piperine in Rat Plasma: Application to Pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B**, v. 776, p. 245-249, 2002
- BALACHANDRAN, P.; GOVINDARAJAN, R. Cancer: An ayurvedic perspective. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 19-30, 2005.
- BALAKOUL, I.; ARUNA, K. Evaluation of the Liver Protective Potential of Piperine on Active Principle of Black and Long Pepper. **Planta Medica**, v. 59, p. 413-4119, 1993
- BALANCHANDRAN, P. ; GOVINDARAJA, R. Cancer- an Ayurvedic Perspective. **Pharmacological Research**, v.51, p. 9-30, 2005
- BARNEY, C. W.; HAWKSWORTH, F. G.; GEILS, B. W. Host of *Viscum album*. **European Journal of Forest Pathology**, v. 28, n. 3, p. 187-208, 1998
- BARRETO-JUNIOR, C. B.; Abordagem para a Síntese de Amidas Naturais Bioativas e seus Análogos. 2005. 178p. Dissertação de Mestrado – UFRRJ, Seropédica, RJ
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiosperma do Brasil**, v. 2, Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1984
- BERGMEYER, H. U.; BERNT, E.; HESS, B. Lactate Dehydrogenase. In: BERGMEYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**. ed. Academic Press , New York, p. 736-743, 1965
- BHATTACHARYYA, A.; CHOUDHURI, T. ; PAL, S. ; CHATTOPADHYAY, S. ; DALTA, G. K.; SA, G. ; DAS, T. ; Apoptogenic Effects of Black Tea on Ehrlich´s Ascites Carcinoma Cell. **Carcinogenesis**, v.24, p. 75-80, 2003
- BIER, O. Bacteriologia e Imunologia. ed 12. São Paulo: Edições Melhoramento. 1965
- BOCCI, V. Mistletoe (*Viscum album*) Lectins as Cytokine Inducers and Immunoadjuvant in Tumor Therapy. A review. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 7, p. 1-6, 1993

BOTANICAL. Mistletoe Disponível em:  
<http://botanical.com/botanical/mgmh/m/mistle40.html>. Acessado em: 14/03/2005

BRAUER, M. In Vivo Monting of Apoptosis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, p. 323-331, 2003

BUDAVARI, S. **The Merck Index: na Encyclopedia of Chemicals, Drugs, end Biologicals**. 2th ed.; Whitehouse Station, N. J: Merck, v. 1 (various pagings) 1996

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C. A. L.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of Natural to the Discovery of the Transient Receptor potential (TRP) Channels Family and their Functions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 106, p. 179-208, 2005

CASSADY, J. M.; DOUROS, J. D. **Anticancer Agents Base on Natural Products Models**. Ed. Academic Press, New York, 1980

CHAVES, S. P. 2005. Dissertação de Mestrado – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

COE, F. G.; ANDERSON, G. J. Screening of Medicinal Plants Usedby the Garifuna of Eastern Nicaragua for Bioactive Compostes. **Phytochemistry**, v. 60, p. 365-371, 1996

CORDELL, C. A. The discovery of Plant Anticancer Agents. **Chemistry and Industry**, v. 841, 1993

CORDELL, G. A. Changing Strategies in Natural Products Chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1585-1612, 1995

COUCEIRO, J. N. S. S.; DA-SILVA, P. M.; SANTOS, M. G. M.; RIBEIRO, T. S.; DE LIMA, M. E. F. Natural Piperine as a New Alternative Against Influenza Viruses. **Virus Reviews and Research**, v. 10, n. 1, p. 27-32, 2005

CRAGG, G. M.; NEWMAN, d. J. Plants As a Source of Anti-Cancer Agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-79, 2005

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in Drug Discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 52, 1997

DA SILVA, E. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; BRAZ, V. R.; FINKELSTEIN, L. C.; LEON, L. L.; ECHEVARRIA, A. Synthesis, and Biological Evaluation of New 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine Derivatives Against *Leishmania amazonensis* Promastigotes and amastigotes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 979-984, 2002

DAYLIGHT. Disponível em <http://www.daylight.com/daycgi/clogp/>. Acessado em: 04/11/2005

DE VITA, V. T. J.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: Principles & Practice of oncology**. J. B. Lippincott Company, 4<sup>th</sup> ed., v. 1, Philadelphia, 1993

DÉVÉHAT, F. L.; BAKHTIAR, A.; BÉZIVIN, C.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J. Antiviral and Cytotoxic Activities of Some Indonesian Pliants. **Fitoterapia**, v. 73, p. 400-405, 2002



DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach**. 2nd ed.; New York: Wiley, 2001. 500p

DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. **Piper: A Model Genus for Studies of Pytochemistry, Ecology, and Evolution**. Kluwer Academic Publisher/New York, 2004

EMBRAPA. Pimenta do reino. Disponível em: [http://bacuri.cpatu.embrapa.br/pimenta\\_do\\_reino/](http://bacuri.cpatu.embrapa.br/pimenta_do_reino/). Acessado em: 23/10/ 2005

EPSTEIN, W. W.; NETZ, D. F.; SEIDEL, J. L. Isolation of Piperine from Black Pepper. **Journal of Chemical Education**, v. 70, n. 7, p. 598-599, 1993

ESTEVES-SOUZA, A.; SILVA, T. M. S.; ALVES, C. C. F.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic Activities Against Ehrlich Carcinoma and Human K562 Leukaemia of Alkaloids and Flavonoid from Two *Solanum* Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 6, p. 838-842, 2002

FACUNDO, V. A.; SÁ, A. L.; SILVA, S. A. F.; MORAIS, S. M.; MATOS, C.R. R.; BRAZ-FILHO, R. Three New Natural cyclopentenedione Derivates from *Piper carniconnectivum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 1, p. 140-145, 2004

FERNÁNDEZ, T.; WAGNER, M. L.; VARELA, B. G.; RICCO, R. A.; HAJOS, S. E.; GURNI, A. A.; ALVAREZ, E. A Study of an Argentine mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 25-34, 1998

FUJITA, T. **Drugs Desing: Fact or Fantasy**. v 2, ed. Academic Press, London, 1984

GEITZ, J.; BEILE, A.; WILKENS, P.; AMERI, A.; PETERS, T. Antithrombotic Action of the Kava Pyrone (+)-Kavin Prepared from *Piper methysticum* on Humen Platelets. **Planta Medica**, v. 63, p. 27-30, 1997

GRYNBERG, N.F.; MARTORELLI, R. A.; CARVALHO, M. G. BRAZ-FILHO, R.; MOREIRA, I. C.; ECHEVARRIA, A. Inhibition of Murine Tumour Growth by Natural Biflavone and Mesoionic Compounds. In: XVI International Cancer Congress. 1994, New Delhi, India.

GUERITTE, F.; FAHY, J. The Vinca Alkaloids. In: CRAGG, G.M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. **Anticancer Agentes from Natural Products**. ed. Brunner – Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 47-70 (chapter 4), 2005

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estado de Ceará. **Rodriguesia**, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004

HANSCH, C.; SAMMERES, P. G.; TAYLOR, J. B. Hydrofobic Properties of Grugs, In **Comprehensive Medicinal Chemistry. The Ration Desing, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compouds**. Eds. Pergamon, new York, v. 4, p. 241, 1990

- HARTWELL, J. L. **Plants Used Against Cancer**. Quarterman, Lawrence, MA, 1982
- HERSEY, A.; HILL, A. P.; HYDE, R. M.; LIVINGSTONE, J. **Quantitative Structure-Activity Relationships**, v. 8, p. 828, 1989
- HUANG, Z.; TONG, Y.; WANG, J.; HANG, Y. MNR Studies of the Relationship Between the Changes of Membrane Lipids and the Cisplatin-Resistance of A549/DDP Cells. **Cancer Cell International**, v. 3, p.1-8, 2003
- INCA. Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>. Acessado em: 04/01/2006
- ISHIZU, T.; TSUJINO, E.; WINARNO, H.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. A Complex of Perseitol and K<sup>+</sup> Ion from *Scurrula fusca* (Loranthaceae), **Tetrahedron Letter**, v. 42, p.6887-6889, 2001
- JAMES, V., Piperine: the Treasured Alkaloid in *Piper longum*. **Spice Indiam**, v. 12, p. 9-12, 1999
- JOHRI, R. K.; ZUTSHI, U. An Ayurvedic Formulatin trikatu and its Constituents. **Journal of Ethnopharmacologyn**, v. 37, n.2, p. 85-91, 1992
- KHAJURIA, A.; THUSU, N.; ZUTSHI, U. Piperine Modulates Permeability Characteristics on Intestine by Inducing Alteration in membrane Dynamics: Influence on Brush Border Membrane Fluidity, Ultrastructure and Enzyme Kinetics. **Phytomedicine**, v. 9, p. 224-231, 2002
- KIENLE, G. S. The story behind mistletoe: a European Remedy From Anthroposophical Medicine. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 5, p. 34-46, 1999
- KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Immunomodulatory activity of a peptide isolated from *Viscum album* extract. **Immunological Investigations**, v. 21, p. 285-296, 1992
- LECOEUR, H.; PRÉVOST, M-C, GOUGEON, M-L. Oncosis is Associated With Expousure of Phosphatidylserine Residues on the Outside Layer of the Plasma Membrana: A Reconsideration of the Specificity of the Anexine V/propidium iodide Assay. **Cytometry**, v. 44, p. 65-72, 2001
- LEE, S. A.; HONG, S. S.; HAN, X. H.; HWANG, J. S.; OH, G. J.; LEE, K. S. Piperine from the Fruits of *Piper longum* with Inhibitory Effect on Monoamine Oxidase and Antidepressant-Like Activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** v. 53, n. 7, p. 832-835, 2005
- LEO, A.; HANSH, C.; ELKINS, D. **Chemical Reviews**, v. 71, n. 6, p. 525, 1971
- LOHÉZIC-LE-DÉVÉHAT, F.; TOMASI, S.; FONTANEL, D.; BOUSTIE, J. Flavonols from *Scurula ferruginea* Danser (Loranthaceae). **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, v. 57, p. 1092-1095, 2002.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V.F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinai: A Necessidade de estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-238, 2002

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 3-15, 1995

MAJUMDAR, A. M.; DHULEY, J. N.; DESHMUKH, V. K.; RAMAN, P.H.; NAIK, S. R. Anti-inflammatory Activity of Piperine. **Japanese Journal of Medicine and Science Biology**, v. 43, p. 95-100, 1990

MANSKY, P. J.; GREM, J.; WALLERSTEDT, D. B.; MONAHAN, B. P.; BLACKMAN, M. R. Mistletoe and Gemcitabine in Patients with Advanced Cancer: A Model for the Phase I Study Interactions in Cancer Therapy. **Integrative Cancer Therapies**, v. 2, n. 4, p. 345-352, 2003

MARTIN, Y. C. **Quantitative Drug Desing: A Critical Introduction**. Marcel Dekker, New york, 1978

MATTOS, J. F. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. ed. 2, Fortaleza, UFC, p. 141, 1997

MELLO, H.; ECHEVARRIA, A. Hydrophobicity Study for Some Pyrazolo-Pyridine by RP-TLC and RP-HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Technologies**, no prelo, 2006

MELLO, H. Síntese, Parâmetros Lipofílicos, Eletrônicos e Correlações de Estrutura x Atividade Antileishmania de 1H-pirazolo[3,4-b]piridinas. 2000. 166p. Dissertação de Doutorado – UFRRJ, Seropédica, RJ

MITTAL, R.; GRUPTA, R. L. *In vitro* Antioxidants Activity of Piperine. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 122, p. 163-167, 2000

MOBOT. Manual de plantas. Disponível em: <http://www.mobot.org/manual plantas/lista.html>. Acessado em: 14/03/2005

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Grow and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Jounal of Immunol Methods**, v. 65, p. 55, 1983

MOTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos Baseados em Produtos Naturais. **Química Nova**, v.24, n. 1, p. 105-111, 2001

NEWMAN, D. J. ; Cragg, G. M.; HOLBECK, S.; SAUSVILLE, E. A. Natural Products as Leads to cell cycle Pathway Targets in Cancer Chemotherapy. **Current Cancer Drug Targets**, v. 2, p. 279-308, 2002

NICKRENT, D. L. Encyclopedia of Life Sciences - Santalales (Mistletoe) Macmillan Reference Ltd, 2001. Disponível em [www.science.siu.edu/parasitic-plants/Loranthaceae/index.html](http://www.science.siu.edu/parasitic-plants/Loranthaceae/index.html), Acessado: 08/08/2001

OHASHI, K.; WINARNO, H.; MUKAI, M.; INOUE, M.; PRANA, M. S.; SIMANJUNTAK, P.; SHIBUYA, H. Cancer Cell Invasion Inhibitory Effects os Chemical Constituents in Pasatic Plants *Scurrula atropurpurea* (Loranthaceae), in: Indonesian Medicinal Plants. XXV, **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 3, p. 343-345, 2003

- PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the Genus Piper. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997
- PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 451-453, 2005
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal Plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001
- PINHEIRO, R. O. 2004. Dissertação de Doutorado – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ
- PIYACHATURAWAT, P.; GLINSUKON, T.; PEUGVICHA, A. Post-Coital Anti-Fertility Effect of Piperine. **Contraception**, v. 26, n. 6, p. 625-633, 1982
- PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Effect of Piperine on the Inhibition of Lung Metastasis Induced B16H-10 Melanoma Cells in mice. **Clinical and Experimental Metastasis**, v.19, p. 703-708, 2002
- PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Effect of Piperine on the Production of Nitric Oxide and TNF- $\alpha$  *in vitro* as well as *in vivo* B16H-10 Melanoma Cells in mice. **Immunopharmacology Immunotoxicol**, v. 25, p. 337-346, 1999
- PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Piperine is a Potent Inhibitor of Nuclear Factor-kB (NF-kB), c-Fos, CREB, ATF-2 and Proinflammatory Cytokine Gene Expression in B16F-10 Melanoma Cells. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1795-1803, 2004
- RAHIER, N. J.; THOMAS, C. J.; HECHT, S. M. Camptothecin and its Analogs. In: CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. **Anticancer Agents from Natural Products**. ed. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, P.5-22 (Chapter 2), 2005.
- RIBEIRO, T. S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; HEISE, N.; DE LIMA, M. E. F. Toxic Effects of Natural Piperine and its Derivatives on Epimastigotes and Amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 13, p. 3555-3558, 2004
- RIBEIRO, T. S.; Transformações Químicas no Alcalóide Natural Piperina e Avaliação da Atividade Tóxica sobre *Trypanosoma cruzi*. 2004. 162p. Dissertação de Mestrado – UFRRJ, Seropédica, RJ
- RIZZINI, C., T., **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, Santa Catarina, 1968
- RODRÍGUEZ-CRUZ, M. E.; PÉREZ-ORDAZ, L.; SERRATO-BARRAJAS, B. E.; JARÉZ-OROPEZA, M. A.; MASCHER, D.; PAREDES-CABAJAL, M. C. Endothelium-Dependent Effects of the Mistletoe *Psittacanthus caluculatus* on the Vasomotor Responses of Rat Aortic Rings. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 213-218, 2003
- SALATINO, A.; KRAUS J. E.; SALATINO, M. L. F. Contents and their Histological localization in young and adult parts of *Struthanthus vulgaris* Mart. (Loranthaceae). **Annals of Botany**, v. 72, p. 409-414, 1993

SELVENDIRAN, K.; BANU, S. M.; SAKTHISEKARAN, D. Protective Effect of Piperine on Benzo(a)Pyrene-Induced Lung Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. **Clinica Chimica Acta**, v. 350, p. 73-78, 2004 b

SELVENDIRAN, K.; SENTHILNATHAN, P.; MAGESH, V.; SAKTHISEKARAN, D. Modularory Effect of piperine on Mitochondrial Antioxidant system in Benzo(a)Pyrene-Induced Experimental Drug Carcinogenesis. **Phytomedicine**, v. 14, p. 85-89, 2004 a

SEMLER, U.; GROSS, G. G. Distritbution of Piperine in Vegetative Parts of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1566-1567, 1988

SIMÕES, C. M. O.; SCHENHEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5th ed. rev. Editora da UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2004

SMITH, L. J. Leukotrienes in Asthma. The Potential Therapeutic Role of antileukotriene agents. **Archives of Internal Medicine**, V. 1556, 2181-2189, 1996

STEIN, G. M.; SCHIETZEL, M.; BÜSSING, A. Mistletoe in Immunology and the clinic. **Anticancer Research**, v. 18, p. 3247-3250, 1998

STÖHR, J. R.; XIAO, P. G.; BAUER, R. Constituents of Chinese *Piper* Species and their Inhibitory Activity on Prostaglandin and Leukotriene Biosynthesis In Vitro. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 75, p. 133-139, 2001

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor Activity of *Piper Longum* Linn. And Piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 339-346, 2004

TAKÁSC-NOVÁC, K.; JÓZAN, M.; SZÁSZ, G. Lipophilicity of Amphoteric Molecules Expressed for the True Partition Coefficient. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 47-55, 1995

TOMILINSON, E. **Journal of Chromatography**, v. 113, p.1, 1975

TSOPELAS, P.; ANGELOPOULOS, A.; ECONOMOU, A.; SOULIOTI, N. Mistletoe (*Viscum album*) in the fir Forest of Mount Parnis, Greece. **Forest Ecology and Management**, v. 202, p. 59-65, 2004

UNI-GRAZ. Pepper (*Piper nigrum* L.) Disponível em: [http://www.uni-graz.at/~katzer/engl/generic\\_frame.html?Pipe\\_nig.html](http://www.uni-graz.at/~katzer/engl/generic_frame.html?Pipe_nig.html). Acessado em: 10/11/2005

VENKATASAMY, R.; FAAS, L.; YOUNG, A. R.; RAMAN, A.; HIDER, R. C. Effects of Piperine Analogues on Stimulation of Melanocyte Proliferation and Melanocyte Differentiation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 1905-1920, 2004

VENTURELLI, M. Estudos Sobre *Struthanthus vulgaris* Mart.: Anatomia do Fruto e da Semente e Aspecto de Germinação e Crescimento. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 131- 147, 1981.

VERLENGIA, R. Estudo do Perfil de Eletroforese e Imunoeletroforese em Camundongos Portadores do Tumor de Ehrlich. 1994. 129p. Dissertação de Mestrado – Univ. Estadual de Campinas, Piracicaba, SP

VIEIRA, O. A. C. ; SANTOS, M. H.; SILVA, G. A.; SIQUEIRA, A. M. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 149-154, 2005

WAGNER-SOUZA, K.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; RODRIGUES, L. A. P.; REIS, M.; RUMJANEK, V. Resistance to Thapsigargin-Induced Intracellular calcium Mobilization in a Multidrug Resistant Tumour Cell Line. **Molecula and Cellular Biochemistry**, n. 252, p.109-116, 2003

WEI, K.; LI, W.; KOIKE, K.; PEI, Y.; CHEN, Y.; NIKAIDO, T. New Amide Alkaloids from the Roots of *Piper nigrum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1005-1009, 2004

WEI, K.; WEI, L.; KOIKE, K.; CHEN, Y.; NIHAIDO, T. Nigramides A-S, dimeric Amide Alkalods from the Roots of *Piper nigrum*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 1164-1176, 2005

YANG, Y. W.; WU, C. A.; MORROW, W. J. W. Cell Death Induced by Vaccine Adjuvants Containing Surfactants. **Vaccine**, v. 22, p.1524-1536, 2004

ZEE CHENG, R. K. Y., Anticancer Research on Loranthaceae Plants. **Drug Future**, v. 22, p. 519-530, 1997