

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de benzofenonas
isoladas de *Hypericum carinatum* Griseb.

Amanda Valle Pinhatti

Porto Alegre, dezembro de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de benzofenonas
isoladas de *Hypericum carinatum* Griseb.

Amanda Valle Pinhatti

Trabalho de Conclusão
da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof.^a Dr.^a Gilsane Lino von Poser

Orientadora

Msc. Caroline Brunetto de Farias

Co-orientadora

Porto Alegre, dezembro de 2010

A terra é a mãe e a tumba da natureza, ministra a morte, e assim, se presta a cura. Filhos de várias espécies, no seu seio a mamar encontraram, sem receio; uns, por várias virtudes, excelentes; cada um com a sua, todos diferentes. Oh! é admirável a potente graça que há nas ervas, na flor, na pedra crassa, pois não há nada existente na terra que seja tão vil, que não retire dela qualquer benefício, como não há nada de bom que desviado da finalidade não se volte contra a sua própria natureza; a própria virtude se transforma em vício quando desvirtuada, e o vício, às vezes, pela ação é dignificado.

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocado no momento certo as pessoas certas no meu caminho. Este TCC só foi possível, pois contei com a ajuda de muitas pessoas especiais, cada uma de sua maneira, contribuiu de forma essencial para o desfecho desta etapa.

Meus pais, Júlio e Liane que me deram muito amor e demais subsídios necessários para andar com meus próprios passos. Agradeço por sempre incentivarem meus estudos, por me ensinarem a viver na bondade e os benefícios de seguir uma conduta ética. A minha mana pelo carinho.

A Dr^a. Ester Dalbem, que além de uma ótima professora de química durante o Ensino Médio, me ajudou nos estudos para o vestibular e se tornou peça chave na minha escolha de cursar Farmácia.

A grande amiga e conterrânea, minha banca, Dr^a. Natasha Maurmann, que tive o prazer de conhecer no início da faculdade por intermédio de nossos pais e que foi um verdadeiro anjo que me abriu várias portas, a quem sou imensamente grata.

Uma dessas portas foi a do Laboratório de Biotecnologia Vegetal onde tive a felicidade de ter como orientadora de Iniciação Científica a Prof^a. Sandra Rech que foi um exemplo de pesquisadora e me proporcionou a construção de bases sólidas no pensamento científico. Agradeço suas lições e a compreensão que tivestes comigo nestes 3 anos e a Jé que me deu uma super mão com o CLAE.

Agradeço a parceria com o pessoal do laboratório de Farmacognosia. A Gil, minha orientadora neste trabalho, que me guiou na formulação deste tema e me oportunizou trabalhar com a espécie *Hypericum*, que tanto tenho carinho, além de me dar várias dicas. Ao doutorando Maikon que me fez refletir em todos os momentos com suas inquisições sempre pertinentes e me ensinou a olhar meus resultados com bons olhos. A Sati e a Flávia que me ajudaram na parte do isolamento e foram super parceiras durante as colunas.

Ao pessoal do ICI, que pela indicação da Nata me receberam de braços abertos, especialmente a Carol Farias, minha co-orientadora que confiou no meu trabalho e sempre me incentivou e me ensinou muita coisa. A Ana que foi sempre tão gentil e me ajudou no projeto para o FIPE; a Carol Nör pelo seu caderno e pelas explicações, assim como a Débora Flores, obrigada por me deixarem acompanhar seus experimentos e ao Tiago, Rafa e Débora Prusch pela ajuda no cultivo das células.

Agradeço também a Prof^a. Ivana Grivicich pela disposição em avaliar meu trabalho.

RESUMO

O câncer é uma das principais patologias que atinge o ser humano. Nas últimas décadas as descobertas de maior impacto nesta área tiveram origem na investigação de compostos de origem natural que forneceram um número significativo de substâncias que chegaram a etapa de ensaio clínico. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiproliferativa de duas benzofenonas (carifenona A e carifenona B) isoladas de *Hypericum carinatum* Griseb., planta nativa do sul do Brasil cujo do extrato hexânico demonstrou ser citotóxico para as linhagens de câncer colorretal, HT-29; pulmão, H-460 e glioblastoma, U-373, sendo relatada atividade antitumoral para esta classe de compostos. O isolamento das carifenonas foi realizado a partir de extratos obtidos por fluido supercrítico (2,5 g) submetidos à coluna cromatográfica eluida com hexano /acetato de etila em concentrações crescentes de polaridade e purificados em placa de sílica gel G60₂₅₄ tendo seu perfil cromatográfico obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Placas de 96 poços contendo células e meio de cultura foram tratadas com diferentes concentrações da carifenona A e B ressuspensas em dimetil sulfoxido (DMSO) e com a associação destes compostos ao quimioterápico irinotecano para verificação de possível efeito sinérgico. Após o período de 48h foi analisada a viabilidade celular pelo método de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Spectra MAX 190) utilizando-se 50µL de DMSO como solvente, no comprimento de onda de 492nm. A significância estatística dos resultados foi determinada por análise de variância One-Way (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, utilizando o software para cálculos estatísticos SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 12.0®. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados demonstraram que as carifenonas diminuem a viabilidade em três das quatro linhagens testadas, na dose de 100µg/mL e possuem um interessante efeito na linhagem celular HT- 29, quando combinados com o quimioterápico irinotecano.

Palavras-chave: *Hypericum carinatum*, isolamento, carifenonas, atividade antiproliferativa, associação com irinotecano.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Flor de <i>Hypericum carinatum</i> | 16 |
| Figura 2. Estrutura molecular carifenona A (1) e carifenona B (2)..... | 16 |
| Figura 3. CDD das frações obtidas por coluna cromatográfica | 21 |
| Figura 4. Perfil cromatográfico da carifenona A | 22 |
| Figura 5. Perfil cromatográfico da carifenona B | 22 |
| Figura 6. Viabilidade de células de tumor colorretal, SW-620, tratadas com carifenona A.... | 23 |
| Figura 7. Viabilidade de células de tumor colorretal, HT-29, tratadas com carifenona A..... | 23 |
| Figura 8. Viabilidade de células de glioma, U-251, tratadas com carifenona A..... | 24 |
| Figura 9. Viabilidade de células de tumor de ovário, OVCAR, tratadas com carifenona A... 24 | |
| Figura 10. Viabilidade de células de tumor de ovário, OVCAR, tratadas com carifenona B. 25 | |
| Figura 11. Viabilidade de células de tumor colorretal, SW-620, tratadas com carifenona B.. 25 | |
| Figura 12 . Viabilidade de células de tumor colorretal, HT-29, tratadas com carifenona B .. 26 | |
| Figura 13. Viabilidade de células de glioma, U-251, tratadas com carifenona B | 26 |
| Figura 14. Avaliação da combinação entre a carifenona A e o quimioterápico irinotecano na linhagem tumoral de colorretal, HT-29 | 28 |
| Figura 15. Avaliação da combinação entre a carifenona B e o quimioterápico irinotecano na linhagem tumoral de colorretal, HT-29..... | 28 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 08 |
| 1.1 Produtos naturais como fontes de novos fármacos | 08 |
| 1.2 Dados sobre o câncer | 10 |
| 1.2.1 Câncer de cólon e reto (CCR)..... | 11 |
| 1.2.2 Câncer de ovário | 12 |
| 1.2.3 Gliomas | 12 |
| 1.3 Atividade antiproliferativa do gênero <i>Hypericum</i> | 13 |
| 1.4 Atividade antiproliferativa das benzofenonas | 14 |
| 1.5 <i>Hypericum carinatum</i> | 15 |
| | |
| 2 OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Objetivo geral | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos | 17 |
| | |
| 3 METODOLOGIA | 18 |
| 3.1 Revisão bibliográfica | 18 |
| 3.2 Material vegetal | 18 |
| 3.3 Isolamento das carifenonas de <i>H. carinatum</i> | 18 |
| 3.4 Cromatografia de líquida de alta eficiência- CLAE | 19 |
| 3.5 Cultivo celular | 19 |
| 3.6 Tratamentos | 19 |
| 3.7 Método do MTT | 20 |
| 3.8 Destino dos resíduos da pesquisa | 20 |
| 3.9 Análise estatística | 20 |
| | |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| | |
| CONCLUSÃO | 30 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 31 |

INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais como fontes de novos fármacos

A natureza é uma fonte muito atrativa na busca por novos fármacos devido a sua vasta diversidade química, encontrada em milhões de espécies de plantas, animais, organismos marinhos (Patel et al., 2010).

Desde a antiguidade as plantas têm fornecido uma série de compostos candidatos a utilização terapêutica. O primeiro registro escrito do uso de plantas medicinais é datado de 2600 a.C. por povos sumerianos e akadianos (Samuelsson, 1999), foi relatado no “Ebers Papyrus” o mais antigo registro farmacêutico conhecido (1500 a.C.), no qual egípcios documentaram mais de 700 drogas utilizadas na época e na Matéria Médica chinesa de 1100 a.C. que descreveu o uso de mais de 600 plantas medicinais (Farnsworth et al., 1985; Cragg e Newman, 2005).

Independentemente da existência de uma grande quantidade de drogas sintéticas, as plantas permanecem no século XXI parte integrante nos cuidados de saúde em diferentes países, especialmente aqueles em desenvolvimento (Newman et al., 2003 e Calixto, 2005).

O desenvolvimento de fármacos com base em compostos naturais quando comparada com a triagem de compostos racionalmente projetados fornece uma maior diversidade de compostos químicos com estruturas privilegiadas, selecionadas por mecanismos evolutivos durante um período de milhões de anos (Harvey, 1999).

As estratégias de desenvolvimento de fármacos com base em compostos naturais apresentam uma série de obstáculos, como por exemplo, problemas de aquisição devido à inacessibilidade dos locais de coleta ou identificação do material vegetal, dificuldades com o isolamento e produção dos ativos farmacológicos, além de sérios conflitos jurídicos sobre a propriedade intelectual (Mans et al., 2000). Mesmo assim, a triagem de produtos naturais parece ser mais provável no fornecimento de compostos de sucesso.

Os países latino-americanos possuem grande parte da biodiversidade do mundo, sendo cerca de 22% de todas as plantas e microorganismos existentes encontrados no Brasil. Apesar da grande riqueza em recursos naturais, esta não é usufruída corretamente, em benefício do próprio desenvolvimento, ao contrário, em função da exploração descontrolada, a maioria das áreas de relevante biodiversidade estão sendo reduzidas ano após ano e importantes espécies de animais e de plantas estão desaparecendo (Calixto, 2005).

Atualmente, o comércio de medicamentos fitoterápicos no Brasil movimentava cerca de 260 milhões de dólares ao ano. No entanto, poucas plantas foram cientificamente estudadas para a avaliação da sua qualidade, segurança e eficácia (Calixto, 2005).

A maioria das plantas produz um vasto número de metabólitos secundários sintetizados por vias complexas que são reguladas de maneiras altamente sofisticadas (Yazaki et al., 2004) contribuindo na interação destas com o ecossistema. Esses metabólitos têm sido descritos como antibióticos, antifúngicos, antivirais, capazes de proteger as plantas contra patógenos (fitoalexinas), como agentes anti-germinativos ou tóxicos para outras plantas (alelopatia) e como compostos que absorvem a radiação UV, evitando sérios danos às folhas (Li et al., 1993), além de possuírem outras importantes atividades farmacológicas.

As plantas, através de programas de rastreamento bioguiado ou pela busca ao acaso a partir da observação, descrição e investigação experimental de drogas utilizadas tradicionalmente e de suas atividades biológicas, possuem uma posição importante na descoberta de novos fármacos (Rivier e Bruhn, 1979). A incorporação de novos antitumorais à terapêutica tem sido apontada como argumento demonstrativo dessa potencialidade e, de fato, nas últimas décadas, as descobertas de maior impacto nessa área tiveram origem na investigação de produtos de origem vegetal que forneceram um número significativo de substâncias ativas que chegaram à fase de ensaios clínicos (Gragg et al., 1997, Patel et al., 2010).

Segundo Fabricant e Farnsworth (2001) pode-se utilizar plantas como fonte de agentes terapêuticos pelo isolamento de compostos para o uso direto como medicamento como a digoxina, morfina, reserpina, taxol, vimblastina, vincristina; pela produção de compostos bioativos a partir de estruturas novas ou conhecidas, através da semi-síntese, de forma a aumentar a atividade e ou diminuir a toxicidade como a metformina, nabilona e verapamil; e pela utilização da planta inteira ou parte desta como um fitoterápico, como o tanaceto, ginkgo biloba, erva de são joão e saw palmetto.

A tendência terapêutica, desde a metade do século XIX, tem sido a utilização de substâncias isoladas em substituição aos extratos vegetais que apresentam alguma propriedade terapêutica comprovada e tenham seus constituintes ativos identificados. Tal posicionamento leva em consideração vantagens como o da constância de composição, ausência de qualquer outra substância ativa, além daquela determinante da atividade e maior facilidade para o controle da qualidade, em relação aos produtos de composição complexa e não conhecida completamente (Simões, 1999).

1.2 Dados sobre o câncer

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, em 2007 segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) correspondeu a 7,9 milhões de mortes (cerca de 13% das mortes) e é projetado que este número continue crescendo com uma estimativa de 12 milhões de mortes em 2030.

No Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no sistema de informações sobre mortalidade.

Entre os pacientes com câncer no Brasil, o uso da medicina complementar e alternativa, representadas principalmente por plantas, variam entre 30-75%, isto, por sua vez, faz com cresça o interesse na busca de possíveis agentes anticancerígenos da flora de diferentes países (INCA, 2009).

Existem vários compostos derivados de plantas que são utilizados como agentes antineoplásicos como a vimblastina, vincristina, etoposídeo, teniposídeo, taxol, taxotere, topotecano e irinotecano e navelbine (Wang et al., 1997).

A vimblastina e vincristina, dois alcalóides naturais, são as mais importantes drogas utilizadas no tratamento de linfomas e leucemias, respectivamente, isolados de *Catharanthus roseus* (Barnett, 1978).

O etoposídeo e teniposídeo são derivados semi-sintéticos de epipodofilotoxina e são usados no tratamento de linfomas e em câncer brônquico e testicular (Cragg e Newman, 2005; Harvey, 1999).

A descoberta do paclitaxel (Taxol®), retirado da casca do *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), significativamente ativo contra câncer de ovário, câncer de mama avançado é outra evidência de sucesso no descobrimento de novas drogas a partir de produtos naturais (Rowinsky et al., 1992), sendo que seu análogo semi-sintético, taxotere, também apresenta atividade (Ringel e Horwitz, 1991).

O alcalóide natural camptotecina obtido da árvore chinesa *Camptotheca acuminata* é um exemplo de composto que tem sofrido modificações estruturais no desenvolvimento de agentes quimioterápicos de maior uso (Wall et al., 1976), como os semi-sintéticos irinotecano e topotecano que foram aprovados no tratamento de câncer de colorretal avançado e na segunda linha de tratamento em carcinomas ovarianos, respectivamente. Esses agentes também são ativos contra vários outros tumores como o carcinoma de pulmão, cérvix e ovário (Bertino, 1997; Creemers et al., 1996).

O conceito de combinação de quimioterápicos está sendo redefinido como um novo tratamento disponível e uma alternativa em muitos cânceres que desenvolvem resistência. O uso de múltiplos fármacos com diferentes mecanismos de ação, agindo em diferentes etapas de uma mesma via, levam a maior porcentagem de morte celular e dificultam as células se tornarem resistentes. Mesmo que a probabilidade de desenvolvimento de uma mutação de resistência a um fármaco seja relativamente alta, o aparecimento simultâneo de mutações contra vários fármacos diferentes é menos provável. Outro benefício da associação de quimioterápicos é poder reduzir os efeitos adversos utilizando doses mais baixas e alcançar um aumento global da morte celular (Golan, 2007).

No final da última década, a disponibilidade de novos fármacos levou ao desenvolvimento de combinações que deram um substancial aumento na porcentagem de resposta em alguns tipos de tumores até recentemente considerados intratáveis. Estes incluem malignidades comuns, como câncer de pulmão, câncer de cólon avançado (Giaccone, 1995; Van Moorsel et al., 1997a; Peters e Köhne, 1999) e a leucemia linfoblástica aguda (LLA) em crianças, onde combinações de quimioterápicos são curativas, com sobrevivência acima de 80%, embora cada agente possua uma pequena atividade individual (Pui e Evans, 1999).

Porém, apesar de todo avanço nesta área, necessita-se de agentes antineoplásicos mais efetivos, uma vez que os tumores mais comuns em adultos são resistentes aos agentes neoplásicos disponíveis, sendo a maioria com ação limitada a tumores não-sólidos e com um pequeno impacto na sobrevida dos pacientes (Yarbro e Chabner, 1992).

1.2.1 Câncer de cólon e reto (CCR)

O carcinoma colorretal é um dos tumores malignos mais comuns nos países ocidentais. Cerca de 9,4% (um milhão) de todos os casos de câncer são de cólon e reto (INCA, 2010).

A maioria dos tumores colorretais, 95%, são adenocarcinomas, tumores malignos originados das células epiteliais ductais ou glandulares, com múltiplos graus de diferenciação, podendo ser classificados em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados (Guimarães e Rosa, 2008). Eles representam um grande desafio, uma vez que grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino, denominados adenomas.

Os pólipos adenomatosos são classificados em três subtipos, com base na arquitetura epitelial, adenomas tubulares, vilosos e túbulo-vilosos e causam sintomas relativamente precoces, como anemia e sangramento oculto nas fezes, estágio em que geralmente são

curáveis pela retirada cirúrgica, porém se não tratados desenvolvem para carcinoma colorretal (Robbins e Cotran, 2005), embora algumas lesões displásicas possam degenerar em direção à malignidade sem passar por um estágio polipóide.

O carcinoma colorretal tem distribuição mundial, com taxas de óbitos mais altas nos Estado Unidos, Austrália e Nova Zelândia e países do Leste Europeu. Sua incidência é consideravelmente menor, até 10 vezes, no México, na América do Sul e na África. Fatores ambientais, particularmente hábitos alimentares, estão relacionados com tais contrastes geográficos de incidência (Robbins e Cotran, 2005).

O número de casos novos estimado para o Brasil no ano de 2010 é de 13.310 em homens e de 14.800 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres com incidência estimada entre os 60 e 79 anos de idade, sendo que menos de 20% dos casos ocorrem antes dos 50 anos (Guimarães, 2006).

O tratamento deste tipo de câncer depende do tamanho, extensão, localização e condições gerais do paciente. Todos os tumores colorretais propagam-se por extensão direta para as estruturas adjacentes, para linfonodos e vasos sanguíneos, por meio de metástases. Em ordem crescente comuns de disseminação metastática estão os linfonodos regionais, fígado, pulmões e ossos, seguido de vários outros locais. Em geral, quando detectada, a doença já se disseminou além da faixa cirúrgica curativa em 20 a 30% dos pacientes (Robbins e Cotran, 2005).

As diferentes formas de tratamento, cirurgia, radioterapia e quimioterapia, podem ser empregadas de maneira combinada ou isolada.

O uso de quimioterápicos e mais recentemente a terapia molecular alvo-dirigida, que tem avançando na compreensão dos mecanismos que levam um tecido normal a sofrer malignização, entendendo suas características moleculares e expressões fenotípicas, devem ser considerados os responsáveis pela melhora da sobrevida mediana, de menos de um ano para mais de 24 meses, no caso de doença metastática. O 5-fluoracil é o quimioterápico mais antigo e utilizado, muitas vezes em associação ao leucovorin, embora também sejam bastante utilizados, o irinotecano, oxaliplatina, capecitabina, bevacizumabe e cetuximabe (Guimarães, 2006; Waldner e Neurath, 2010).

1.2.2 Câncer de ovário

O câncer de ovário é o tumor ginecológico mais difícil de ser diagnosticado e o de menor chance de cura. Cerca de 75% dos cânceres nesse órgão apresentam-se em estágio

avanzado no momento do diagnóstico. A maioria dos tumores de ovário são carcinomas epiteliais (câncer que se inicia nas células da superfície do órgão), o mais comum, ou tumor maligno de células germinativas (que dão origem aos espermatozoides e aos ovócitos).

Na fase inicial, o câncer de ovário não causa sintomas específicos. À medida que o tumor cresce, pode causar pressão, dor ou inchaço no abdômen, pelve, costas ou pernas; náusea, indigestão, gases, prisão de ventre ou diarreia e cansaço constante. A maioria desses sintomas não significa que a mulher tem tumor de ovário, mas serve de alerta para que ela procure um médico (dados INCA, 2010).

Mais de 80% dos tumores epiteliais malignos de ovário são encontrados em mulheres pós-menopausa, sendo relativamente incomum antes dos 50 anos (Guimarães, 2006).

Os mais ativos quimioterápicos conhecidos para tratamento de tumores de ovário de origem epitelial são os derivados da platina, como por exemplo a cisplatina, carboplatina e a oxaliplatina, isolados ou em combinação com outras drogas, como a ciclofosfamida, doxorrubicina, fluoracil, metotrexato, vimblastina e paclitaxel (Guimarães, 2006).

1.2.3 Gliomas

Glioma é o termo utilizado para designar um grupo heterogêneo de tumores originários das células da glia encefálica, classificados de forma mais genérica em astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e os gliomas mistos, oligoastrocitomas (Louis et al., 2007).

Os gliomas correspondem à aproximadamente 70% de todos os tumores cerebrais. Dentre os gliomas, os astrocitomas são os mais comuns e, entre estes, os glioblastomas multiformes são os que acometem a maioria dos pacientes (Flores, 2009).

Glioblastomas, o mais maligno de todos os tumores da linhagem astrocitária, consiste em uma diferenciação astrocitária reduzida. Isto inclui fatores histopatológicos, como atividade mitótica, polimorfismo celular, trombose vascular, proliferação microvascular e necrose (Brandes et al., 2008). Aproximadamente 60% dos pacientes com diagnóstico de glioblastoma possuem idade entre 55 e 74 anos e a relação de incidência entre homens e mulheres é de 3:2 (Brandes et al., 2008).

Gliomas malignos são 40% mais comuns em homens do que em mulheres e a idade média de pacientes diagnosticados com glioblastomas é de 64 e de 45 anos para os casos de gliomas anaplásicos (Fisher et al., 2007).

Aproximadamente 5% dos pacientes com gliomas malignos têm histórico de glioma familiar. No entanto, para a maior parte dos casos familiares não é identificada a causa genética (Wen e Kesari, 2008.)

Segundo o INCA em um período de quatro anos (1994 a 1998), os tumores encefálicos encaminhados aos hospitais do instituto foram de 90, correspondendo a 1,4% do total de casos de câncer neste período.

O prognóstico para gliomas malignos recorrentes é de sobrevida média de 3-9 meses sendo que os quimioterápicos utilizados atualmente, aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2005, são a temozolamida, utilizado durante ou após a radioterapia (Sathornsumetee e Rich, 2008) e as nitrosureias que produzem benefícios modestos. Contudo, estão sendo realizados estudos com bevacizumabe e irinotecano (Vredenburgh et al., 2007).

1.3 Atividade antiproliferativa do gênero *Hypericum*

O nome “*Hypericum*” é de origem grega, “Hyp” significa acima e “ericum”, imagem, por serem plantas ofertadas a figuras religiosas a fim de afastar os maus espíritos, sendo seu uso já relatado no século II a.C. como cicatrizante, anti-séptico e antiinflamatório (Robson, 1977).

Atualmente a intensa pesquisa com espécies deste gênero, motivadas especialmente pelas atividades atribuídas ao seu principal representante, *Hypericum perforatum*, tem levado a descoberta de muitas moléculas bioativas (Hu e Sim, 1999, Ferraz et al., 2005b).

Em extratos metanólicos de *H. perforatum* foi verificada atividade frente a células de carcinoma prostático implantadas em camundongos (Martarelli et al., 2004). O extrato lipofílico desta planta também demonstrou significativa toxicidade frente a linhagens de tumor de bexiga T24 e NBT-II (Skalkos et al., 2005).

A capacidade antiproliferativa também foi investigada para outras espécies de *Hypericum*. Extratos metanólicos de *H. hookerianum* que demonstraram possuir atividade antiproliferativa *in vitro* (Vijayan et al., 2003a) foram testados *in vivo* e indicaram um aumento na sobrevida de animais com tumor ascítico e uma diminuição no peso tumoral, demonstrando ser um potente agente antitumoral (Dongre et al., 2007).

Extratos metanólicos de partes aéreas de *H. mysorensense* e *H. patulum* demonstraram atividade citotóxica *in vitro* nas linhagens celulares de carcinoma de epitélio de laringe, HEp-2; rabiomiossarcoma maligno, RD e de macaco verde africano normal, Vero, e atividade antitumoral em células de linfoma ascítico de Dalton, DLA e HEp-2 (Vijayan et al., 2003b). Na espécie *H. sampsonii* foram isoladas duas benzofenonas, a Sampsoniones I e J que

apresentaram citotoxicidade frente à linhagem celular de P388 de leucemia (Hu e Sim, 1999), já benzofenonas preniladas isoladas de *H. scabrum* demonstraram moderada atividade frente a diferentes linhagens tumorais (Tanaka et al., 2004).

Existem programas como o da fundação South-American Office for Anti-Cancer Drug Development (SOAD), localizado em Porto Alegre que visam a obter e testar compostos isolados de plantas da América do Sul (Mans et al., 2000), sendo uma das classes de interesse deste grupo, justamente as plantas do gênero *Hypericum*.

Neste contexto foram avaliados extratos semi-purificados de 7 espécies de *Hypericum* nativas do sul brasileiro (*H. connatum*, *H. myrianthum*, *H. piriari*, *H. polyanthemum*, *H. caprifoliatum* e *H. carinatum*) e determinados seus IC₅₀ (concentração da substância que fornece 50% de inibição), demonstrando melhores resultados em frações hexânicas (Ferraz et al., 2005a). Com base nesses resultados foi realizada a purificação de frações que apresentam doses de IC₅₀ de 30-40µg/ml. Algumas das substâncias isoladas revelaram ser da classe dos benzopiranos e demonstram atividade na linhagem celular de glioblastoma, U-373 em doses menores que 10µg/mL, sendo interessante prosseguir estudos com isolamento e teste destas substâncias (Ferraz et al., 2005b; Grivicich et al., 2008).

1.4. Atividade antiproliferativa das benzofenonas

Como produtos naturais de plantas, as benzofenonas são importantes tanto do ponto de vista biossintético, pois estão envolvidas na biossíntese de xantonas, quanto do ponto de vista farmacológico, uma vez que várias atividades tem sido descritas por esta classe de compostos.

O garcinol e derivados do isogarcinol obtidos de *Garcinia assigu* demonstraram um forte potencial quimiopreventivo em células tumorais de Raji (Ito et al., 2003). Compostos similares foram isolados a partir *G. xanthochymus* e inibiram o crescimento de células de câncer de colorretal HCT- 116, HT- 29 e SW-480 (Protiva et al., 2008).

Em um estudo recente Murata e colaboradores (2010), demonstraram que as benzofenonas garciniafenona e 7-epiclusianona possuem uma significativa atividade antiproliferativa *in vitro* de forma dose-dependente. Já as benzofenonas gutiferonas A e G, de *G. macrophylla* demonstraram fraca atividade contra células tumorais de ovário humano A2780 (Williams et al., 2003).

1.5 *Hypericum carinatum*

A espécie *Hypericum carinatum* Griseb. (Fig. 1) é um subarbusto nativo do município gaúcho de Glorinha que teve avaliado seu potencial antiproliferativo no estudo de Ferraz e

colaboradores (2005a), demonstrando atividade no extrato hexânico, com doses de IC₅₀ de 23,24; 20,31 e 18,41µg/mL em linhagens de câncer colorretal, HT-29, câncer de pulmão H-460 e de glioblastoma, U-373, respectivamente.



Figura. 1. Aspecto de partes aéreas de *Hypericum carinatum* Griseb.
Autor: Gilsane von Poser

Neste mesmo ano, esta espécie teve isolada de suas partes aéreas duas benzofenonas (Fig. 2), denominadas carifenona A e carifenona B (Bernardi et al., 2005) da classe das benzofenonas simples.

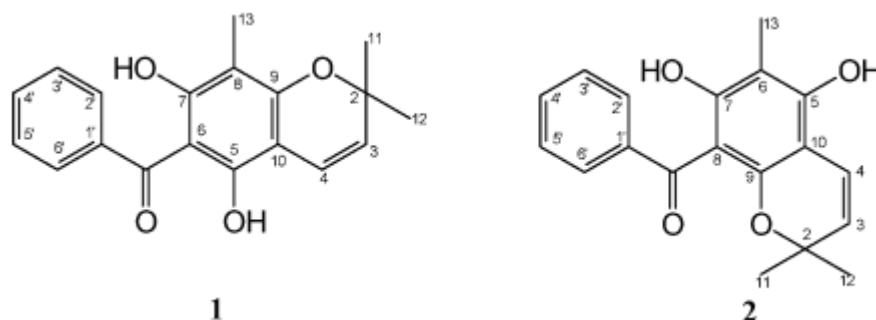


Figura.2. Estrutura molecular da carifenona A (1) e carifenona B (2).

As benzofenonas simples caracterizam-se por um padrão de substituição com radical hidroxila (OH) e metoxila (OMe), sendo usualmente encontradas no vegetal juntamente com a xantona análoga, embora seja mais comum em espécies da família Guttiferae a presença de benzofenonas mais complexas, geralmente substituídas por prenilas (Delle Monache et al., 1991; Fuller et al., 1999).

As benzofenonas simples são muito raras, só encontradas nesta espécie e nas espécies *G. assigu* e *G. lancilimba*, denominada macurina, não tendo muitos relatos de atividade para este tipo de benzofenona, além da atividade antioxidante das carifenonas (Bernardi et al., 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Visto a importância de estudos com plantas na busca de compostos bioativos no desenvolvimento de medicamentos para doenças de grande impacto social e do difícil tratamento do câncer, bem como a intensa pesquisa com plantas do gênero *Hypericum* e o conhecimento da atividade antiproliferativa de algumas benzofenonas, este trabalho teve como objetivo o isolamento das benzofenonas, carifenona A e carifenona B da espécie nativa do sul do Brasil, *Hypericum carinatum* Griseb. e teste *in vitro* em diferentes linhagens tumorais para avaliação da atividade antiproliferativa, bem como a associação destas com quimioterápicos já utilizados na clínica para verificação de um possível efeito sinérgico.

2.2 Objetivos específicos

- Isolamento da carifenona A e carifenona B de *H. carinatum*;
- avaliação do perfil cromatográfico da carifenona A e carifenona B por CLAE;
- manutenção das linhagens celulares HT-29, U-251, SW 620 e OVCAR 3;
- avaliação da atividade da carifenona A sobre a proliferação celular das linhagens celulares de câncer colorretal, HT-29 e SW-620; câncer de ovário, OVCAR 3 e glioblastoma, U-251;
- avaliação da atividade da carifenona B sobre a proliferação celular das linhagens celulares de câncer colorretal, HT-29 e SW- 620; câncer de ovário, OVCAR e glioblastoma, U-251;
- avaliação da combinação entre a carifenona A e agentes quimioterápicos sobre a proliferação celular da linhagem de câncer colorretal, HT-29;
- avaliação da combinação entre a carifenona B e agentes quimioterápicos sobre a proliferação celular da linhagem câncer colorretal, HT-29.

3 METODOLOGIA

O isolamento das carifenonas foi realizado no Laboratório Farmacognosia, na Faculdade de Farmácia da UFRGS, sob a orientação da professora doutora Gilsane Lino von Poser e colaboração do doutorando Francisco Maikon Corrêa de Barros. A preparação de soluções químicas, amostras biológicas e testes de proliferação celular foram realizados no Laboratório de Pesquisas em Câncer, Centro de Pesquisas Experimentais, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sob a co-orientação da doutoranda Caroline Brunetto de Farias.

3.1 Revisão bibliográfica

O levantamento bibliográfico da atividade antiproliferativa de plantas do gênero *Hypericum*, bem como o de benzofenonas foram realizadas nas bases de dados Scopus, Science Direct, Pubmed, Bireme e Scielo no período de março à novembro de 2010.

3.2 Material vegetal

As partes aéreas de *H. carinatum* Griseb foram coletadas em janeiro de 2008, durante o período de floração, no município de Glorinha, Rio Grande do Sul. A exsicata ICN Bordignon 1520 foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFRGS, Instituto de Biociências, para identificação e registro do material vegetal. Após o procedimento de secagem à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as partes aéreas foram moídas em moinho de facas e submetidas à extração.

3.3 Isolamento das carifenonas de *H. carinatum*

Frações obtidas (2,5g) a partir da extração por fluido supercrítico cedidas pelo doutorando Francisco Maikon Corrêa de Barros, foram ressuspensas em hexano e submetidas à cromatografia em coluna, com gel de sílica como fase estacionária e eluídas com misturas de hexano e acetato de etila, em aumento gradual de polaridade, como fase móvel. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório em temperatura inferior a 50°C e monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) analítica. As frações de interesse foram submetidas a purificação através de CCD preparativa usando como eluentes hexano:acetato de etila (9:1) sendo armazenadas em frascos protegidos da luz e sob refrigeração.

3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As carifenonas suspensas em 100% de dimetil sulfóxido (DMSO) foram diluídas a concentração de 1mg/mL em água estéril e filtradas em membrana hidrofóbica de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,22 μ m (Merck®). Na análise utilizou-se coluna C18 Waters Nova-Pack® (4 μ m, 3,9 x 150mm) acoplada a pré-coluna Waters Nova-Pack® C18 60A (3,9 X 20 mm), bomba Shimadzu®, detector ultravioleta Shimadzu® em 220nm e 270nm, fase móvel isocrática composta por acetonitrila:água (60:40) e fluxo de 1mL/min.

3.5. Cultivo celular

As linhagens celulares humanas utilizadas foram as de câncer colorretal (HT-29 e SW-620), glioblastoma multiforme (U-251) e ovário (OVCAR 3), obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, EUA), as quais já estavam disponíveis no Laboratório de Pesquisas em Câncer no Centro de Pesquisas do HCPA. As células foram mantidas em frascos de cultura de 25cm³ em incubadora com atmosfera de 5% de gás carbônico, a temperatura de 37 °C, com umidade relativa mínima de 95%, contendo 4mL de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Grand Island, New York, EUA) ou meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, Gibco) com adição de 10 a 15% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 0,1% de fungizona e 0,125% de gentamicina 2% de glutamina e, 1% de ampicilina (Morrone et al, 2003; Farias et al., 2008; Schmitd et al., 2009).

3.6 Tratamentos

Para os testes de atividade antiproliferativa as carifenonas A e B, isoladas de *H. carinatum*, foram dissolvidas em DMSO e posteriormente diluídas em meio de cultura com concentração final de DMSO de 0,25% (v/v) na dose de 100 μ g/mL e a partir desta foram obtidas a dose de 25 μ g/mL (0,062% DMSO) e a dose de 6,25 μ g/mL (0,016% DMSO). Para realização dos testes de verificação de possível sinergismo entre as carifenonas e o quimioterápico, foram utilizadas diferentes combinações entre dose efetiva e não efetiva desses compostos. As doses escolhidas das carifenonas foram obtidas em experimento anterior e do Tecnotecal (irinotecano) por uma curva de dose realizada previamente com a linhagem HT-29. As diluições foram realizadas com meios de cultura para obtenção das doses desejadas.

3.7. Método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

Para avaliar a citotoxicidade e a viabilidade celular foi utilizada a análise colorimétrica com o corante MTT que na forma oxidada possui coloração amarela, porém quando reduzido desenvolve coloração azul. Essa redução é produzida por desidrogenases mitocondriais de células ditas viáveis (Peres e Curi, 2005).

As células foram cultivadas em placas de 96 poços em concentrações de 5×10^3 a 7×10^3 células por poço em meio de cultura DMEM (U-251 e SW-620) ou RPMI 1640 (HT-29 e OVCAR 3) suplementado, mantidas sob incubação por 24 horas.

Passado este período, foi descartado o meio de cultura e foram efetuados os tratamentos, permanecendo por 48 horas sob incubação, sendo então o meio de cultura removido e as células lavadas com 100 μ L de solução salina (HBSS). Em cada poço, adicionou-se 100 μ L de uma solução com o reagente MTT e o meio de cultura (Sigma Aldrich, Brasil) na concentração de 5mg/mL, ficando a placa sob incubação com compostos durante 3 horas à 37°C. Em seguida, o meio foi cuidadosamente removido e a placa mantida em temperatura ambiente cerca de 24 horas até que estivesse completamente seca. Depois, adicionou-se 50 μ L de DMSO em cada poço e fez-se imediatamente a leitura em leitor de ELISA no comprimento de onda de 492nm.

3.8 Destino dos resíduos da pesquisa

Resíduos, tais como materiais contaminados e resíduos de quimioterápicos foram depositados em sacos plásticos brancos para destinação apropriada segundo a rotina do HCPA.

3.9 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicates e os resultados expressos como média e erro padrão da média (EPM). A significância estatística dos resultados foi determinada por análise de variância de uma via *One-Way* (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, utilizando o software para cálculos estatísticos SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 12.0®. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes e o nível de significância representado por *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ e ***, $P < 0$ em relação ao controle.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realização do isolamento das carifenonas, uma vez que são facilmente suscetíveis a degradação (Albering, 2006; Piccinelli et al., 2009) optamos por trabalhar com a mistura hexano e acetato de etila, solventes em que demonstram ser mais estáveis, além de apresentarem boa separação (Baggett et al., 2005; Nguyen et al., 2005; Wabo et al., 2010).

Obtivemos sucesso na realização da primeira cromatografia em coluna, partindo de 2,5 g de frações de *H. carinatum*, extraídas anteriormente por fluido supercrítico, com a obtenção de 38,5mg da carifenona B (rendimento de 1,54%) extraída pura na fração 21 da CCD (mancha amarelada na Figura 3) na forma de cristais amarelos, apresentando fator de retenção (Rf) de 0,17 no sistema hexano:acetato de etila (9:1).

As frações 10 a 19 em que foi verificada a presença de carifenona A (manchas esverdeadas presentes na Fig.3), através do monitoramento por CCD, foram reunidas (520,9 mg) e submetidas a uma nova cromatografia em coluna. As frações de interesse coletadas desta coluna foram aplicadas em placa de sílica gel para realização de CCD preparativa para purificação das amostras. Obtivemos assim, 4,4mg da carifenona A (rendimento de 0,18%), na forma de óleo viscoso amarelo com Rf de 0,27 no sistema hexano:acetato de etila (9:1).



Figura. 3. Cromatografia em camada delgada, fase móvel hexano:acetato de etila (9:1) das frações obtidas por cromatografia em coluna.

O perfil cromatográfico das amostras foi realizado por CLAE. Os cromatogramas apresentaram picos bem definidos, não sendo observada a presença de outras substâncias no comprimento de onda utilizado (220nm e 270nm). O tempo de retenção apresentado pela carifenona A foi de 21,14 min. (Fig. 4) e da carifenona B de 17,19 min. (Fig. 5) em fase móvel composta por acetonitrila:água (60:40).

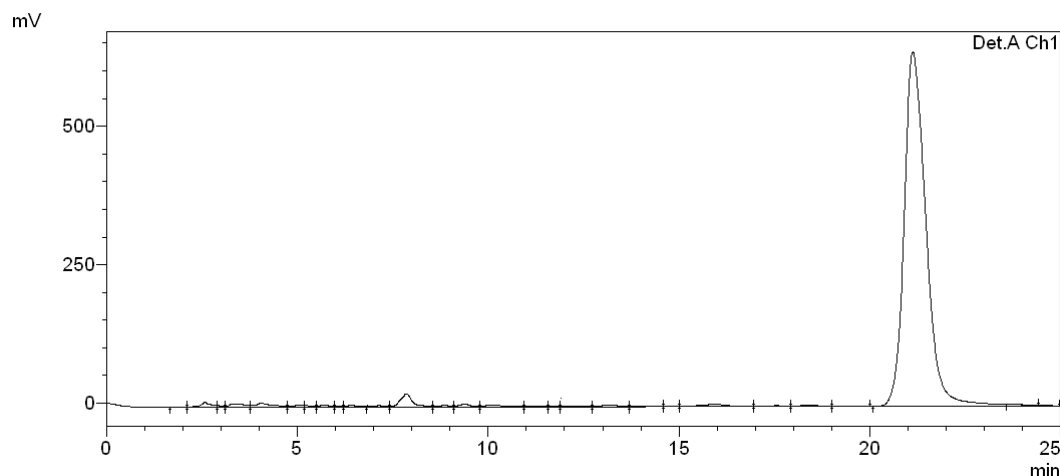


Figura 4. Perfil cromatográfico da carifenona A, fase móvel composta por acetonitrila:água (60:40), obtido por CLAE.

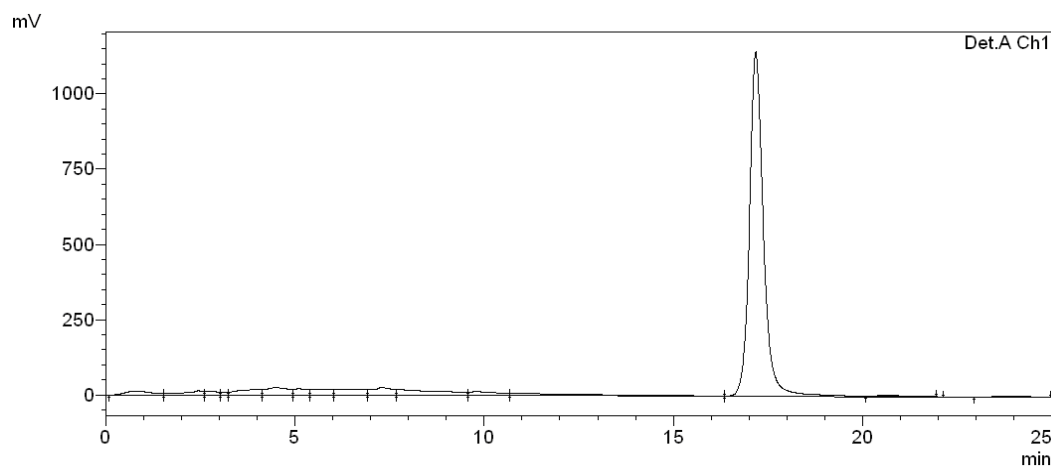


Figura 5. Perfil cromatográfico da carifenona B, fase móvel composta por acetonitrila:água (60:40), obtido por CLAE.

Os experimentos realizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre foram financiados pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) que concede auxílio financeiro para projetos de pesquisa, divulgação, realização de eventos e desenvolvimento de recursos humanos em pesquisa.

Os resultados do efeito da carifenona A e da carifenona B sobre a viabilidade celular das linhagens de câncer colorretal (HT-29 e SW-620) foram apresentados sob forma de pôster na sessão gastro-intestinal do VI Congresso Franco Brasileiro de Oncologia.

No desenvolvimento de agentes antineoplásicos, o potencial de citotoxicidade dos compostos é avaliado em linhagens celulares tumorais por parâmetros que incluem desde a morte celular até a alteração de seu metabolismo (Freshney, 1994; Keawpradub et al., 1999).

O teste de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células tumorais tem se tornado importante para a avaliação de agentes anticâncer, incluindo aqueles provenientes de produtos naturais, sendo também muito utilizado como método alternativo aos testes farmacológicos

em órgãos isolados, e tem, pelo menos durante a fase de triagem, reduzido a experimentação *in vivo* em animais (Hamburger e Hostettmann, 1991; Cingi et al., 1991).

As linhagens tumorais selecionadas para os experimentos foram as de colorretal, ovário e glioma por possuírem baixa resposta aos quimioterápicos atuais e pela fácil manutenção do cultivo celular.

Quando testamos o efeito da carifenona A nas linhagens tumorais de colorretal verificamos que na linhagem SW-620 ocorreu uma diminuição na proliferação celular de cerca de 15%, na dose de 100 μ g/mL, enquanto que em doses mais baixas foi observado aumento da viabilidade (Fig. 6). Esse perfil também foi verificado nos testes com a linhagem HT-29, embora a diminuição da viabilidade celular, 52% na dose de 100 μ g/mL, tenha ocorrido de forma mais efetiva, sendo esta a linhagem que melhor respondeu a este composto e as menores doses não apresentaram diferença estatística significativa na viabilidade celular em relação ao controle (Fig. 7).

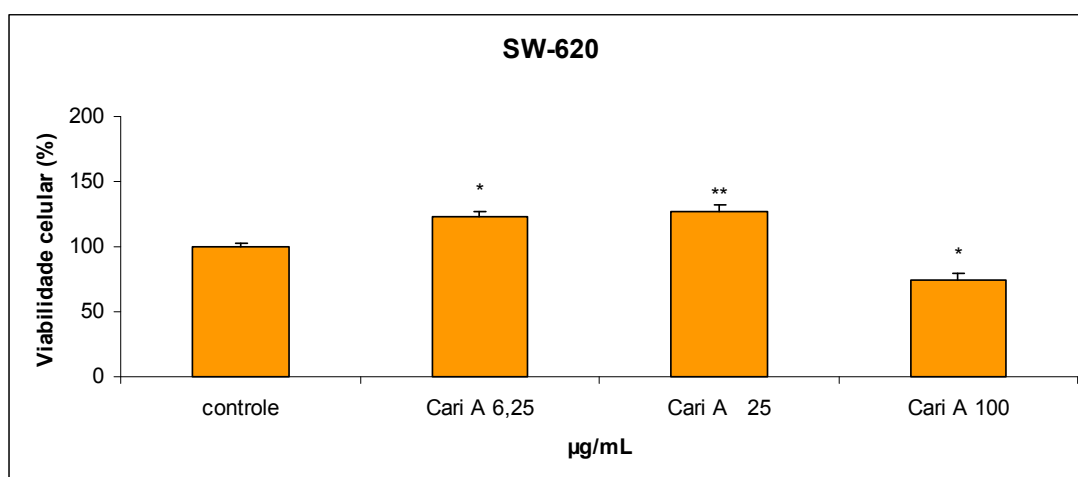


Figura 6. Perfil de viabilidade celular da carifenona A testada pelo método de MTT na linhagem celular câncer colorretal, SW-620. Valores de $P < 0,05 = *$ e $P < 0,01 = **$ comparativamente com controle.

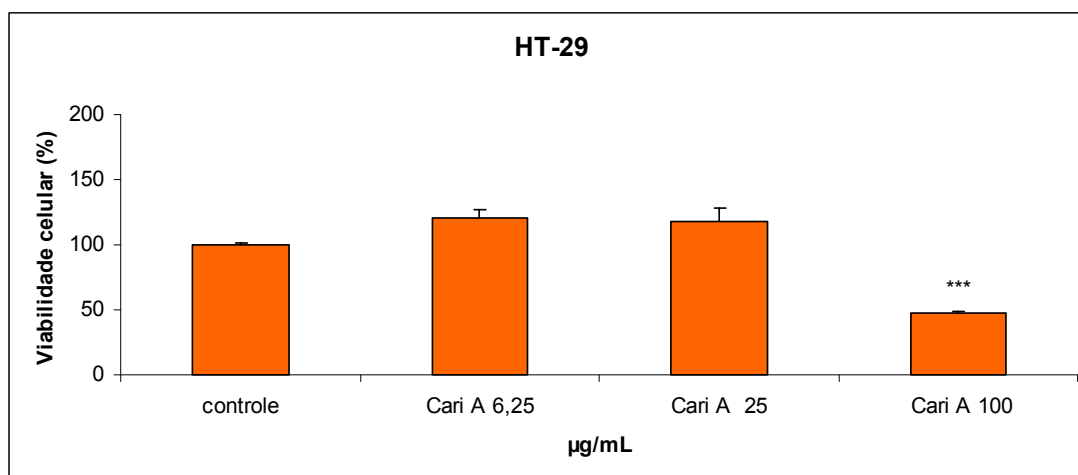


Figura 7. Perfil de viabilidade celular da carifenona A testada pelo método de MTT na linhagem celular de câncer colorretal, HT-29. Valores de $P < 0,001 = ***$ comparativamente com controle.

O efeito positivo de benzofenonas já tinha sido verificado em linhagens celulares de câncer de colorretal humanas no trabalho de Protiva e colaboradores (2008) onde benzofenonas isoladas de *Garcinia xanthochymus* foram testadas em três linhagens tumorais, HCT-116, HT-29 e SW-480, sugerindo que o efeito esteja associado à interferência na membrana mitocondrial e na subsequente ativação das vias de estresse/apoptose no retículo endoplasmático e no gene de resposta ao estresse celular regulando negativamente a atividade de TSC/mTOR.

Na linhagem de glioblastoma, U-251 (Fig. 8) ocorreu uma diminuição na proliferação celular em cerca de 50% na dose de 100µg/mL, já na linhagem celular de tumor de ovário, OVCAR, a carifenona A demonstrou ser dose-dependente, porém somente ativa na dose testada de 100µg/mL (Fig. 9).

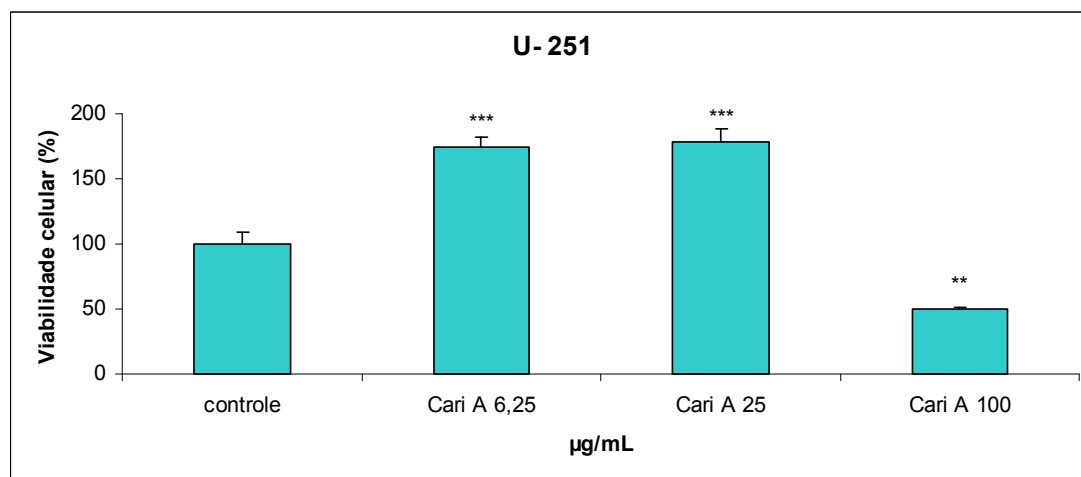


Figura.8. Perfil de viabilidade celular da carifenona A testada pelo método de MTT na linhagem celular de glioma, U-251. Valores de $P < 0,01 = **$ e $P < 0,001 = ***$ comparativamente com controle.

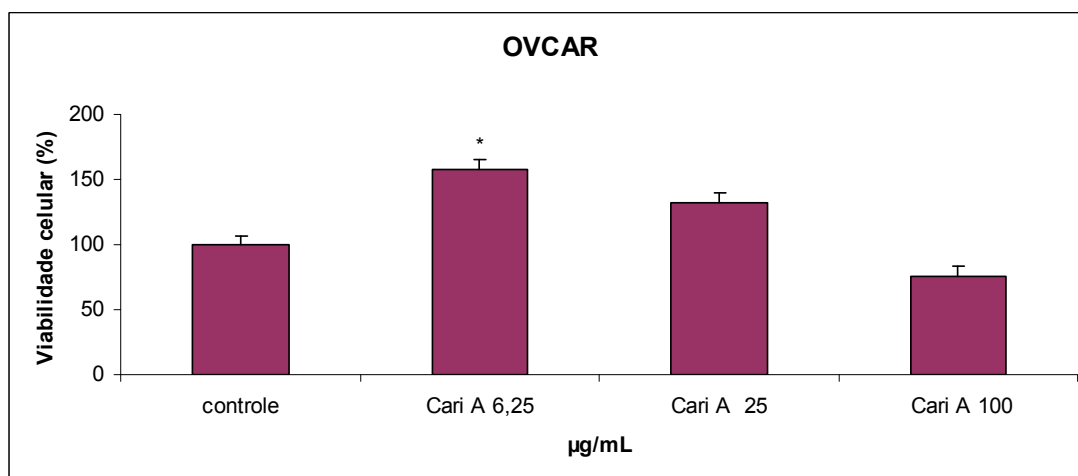


Figura.9. Perfil de viabilidade pelo método de MTT de células de tumor de ovário, OVCAR, tratadas com carifenona A. Valores de $P < 0,05 = *$.

Vários estudos indicam que o estresse oxidativo está associado ao processo carcinogênico devido a sua capacidade de causar mutação no DNA e modificações nas proteínas (Ito et al., 2003). Sabemos de estudos anteriores que a carifenona A possui moderada atividade antioxidante (Bernardi et al., 2005), o que poderia estar relacionado a sua capacidade antiproliferativa.

Nas linhagens OVCAR (Fig. 10) e SW-620 (Fig. 11) não foi verificada a influência da carifenona B na diminuição da viabilidade celular, uma vez que os resultados não diferiram significativamente.

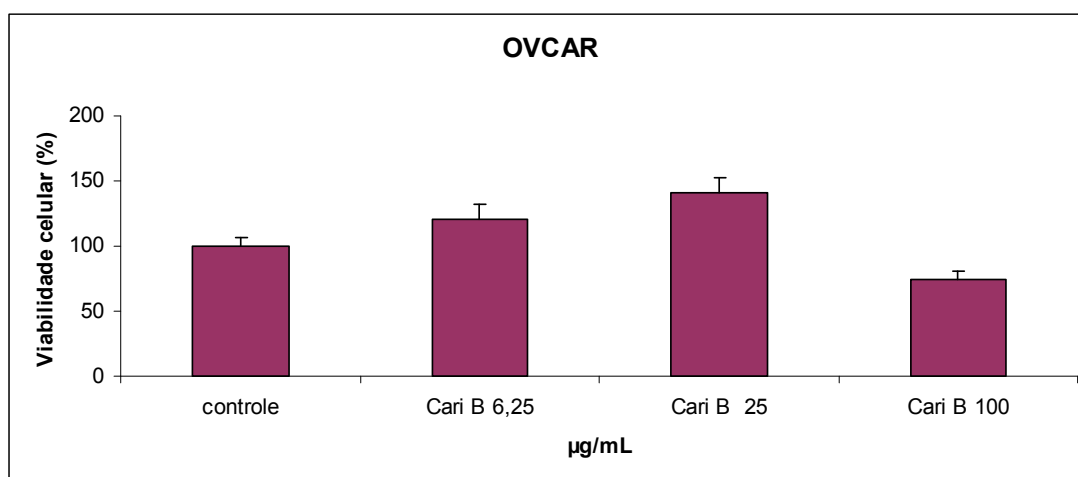


Figura.10. Perfil de viabilidade celular da carifenona B testada pelo método de MTT na linhagem celular de tumor de ovário, OVCAR.

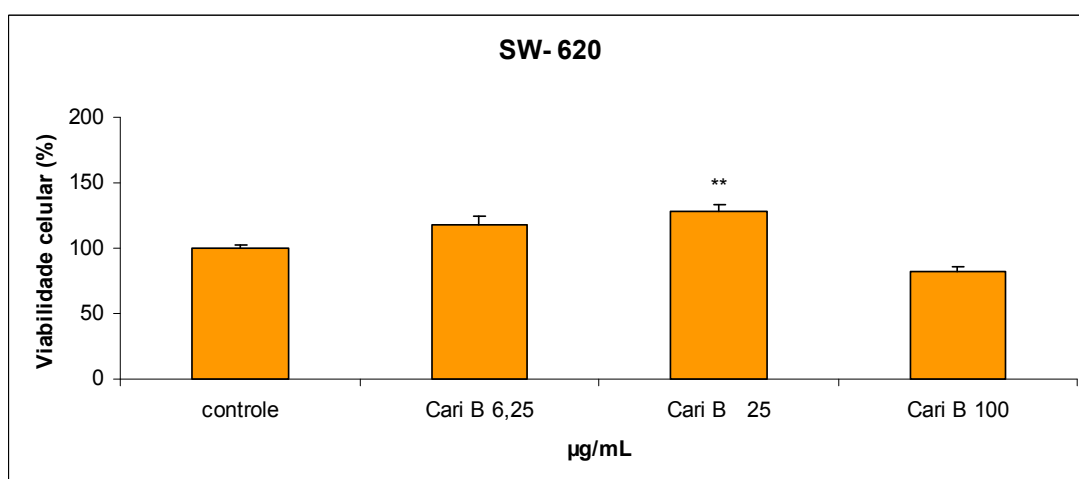


Figura.11. Perfil de viabilidade celular da carifenona B testada pelo método de MTT na linhagem celular de câncer colorretal, SW-620. Valores de $P < 0,01 = **$ comparativamente com o controle..

Na linhagem de câncer colorretal, HT- 29 e de glioblastoma, U-251 obtiveram diminuição na proliferação de cerca de 38% (Fig. 12) e 52% (Fig. 13) na dose de 100µg/mL.

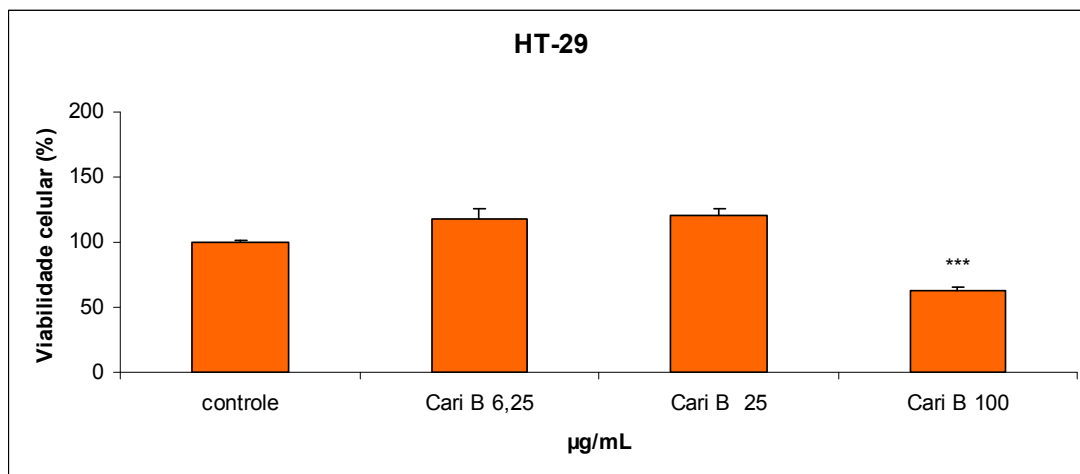


Figura.12. Perfil de viabilidade celular da carifenona B pelo método de MTT na linhagem celular de tumor de colorretal, HT-29. Valores de $P < 0,001 = ***$.

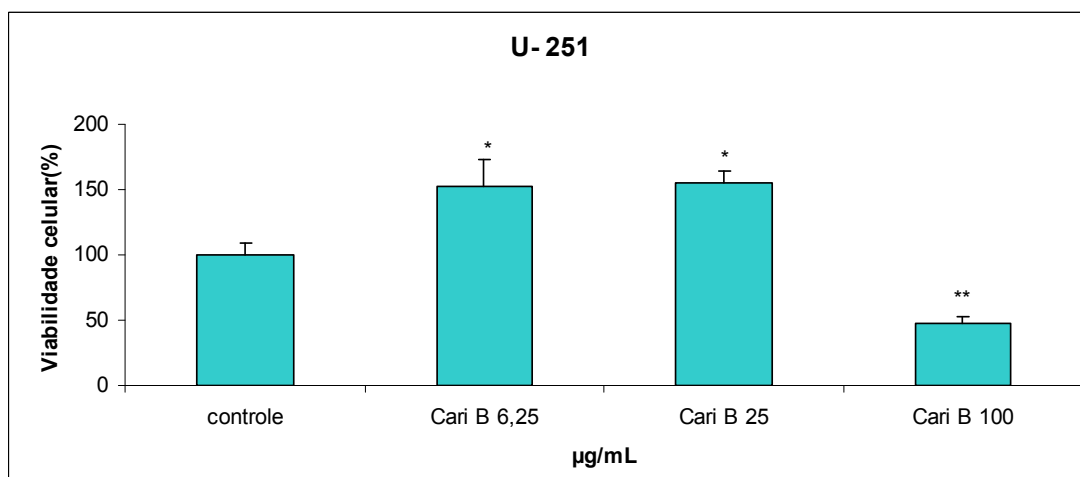


Figura.13. Perfil de viabilidade celular da carifenona B testada pelo método de MTT na linhagem celular de glioma, U-251. Valores de $P < 0,05 = *$ e $P < 0,01 = **$.

A partir desses resultados podemos inferir que as benzofenonas possuem uma leve capacidade antiproliferativa nas linhagens testadas e que a atividade apresentada pelo extrato hexânico, em estudos anteriores (Ferraz et al., 2005), possa estar relacionado a ação sinérgica com outras moléculas, como a uliginosina B, assim como demonstrado no trabalho de Roscetti e colaboradores (2004) que confirmou o interesse na espécie *H. perforatum* no tratamento do câncer e indicou a possível ação de outros agentes, além da hypericina, presentes no extrato total metanólico, que estariam agindo de maneira separada ou combinada.

Os agentes anticâncer são raramente utilizados sozinhos. Somente poucos tumores são sensíveis o suficiente para serem curados por um único agente. Uma quimioterapia efetiva

depende da identificação da combinação adequada para tratar cada tipo específico de tumor (Frei et al., 1998). Um modelo ideal deve satisfazer várias exigências; deve ser simples, mas robusto e deve considerar os diferentes perfis farmacocinéticos de cada droga.

Dizemos que a interação entre duas ou mais drogas é sinérgica se o efeito da combinação é maior que a soma algébrica do efeito de cada agente separadamente (Berenbaum, 1989). Se o efeito combinado da associação é inferior à soma de cada agente, então o antagonismo é identificado, enquanto que no caso de aditividade, o efeito da combinação aproxima-se da soma do efeito de cada droga isoladamente. Pode ocorrer também a modulação, que implica em um agente ativo ou inativo aumentar o efeito de um outro agente ativo (Leyland-Jones e O'Dwyer, 1986; Martin, 1987; Peters Groeningen e Van, 1991).

Dentre as linhagens testadas, a HT-29 foi a que melhor respondeu ao tratamento com as carifenonas, sendo então selecionada para a realização de testes para avaliar a combinação destas com o quimioterápico irinotecano, utilizado na clínica deste tipo câncer.

O irinotecano em combinação com 5-fluoracil e ácido folínico em bolus ou infusional constituem um padrão na terapia de pacientes com câncer de colorretal metastático (Vanhoefer et al., 2004). O mecanismo de ação do irinotecano envolve a inibição da DNA-topoisomerase I, interagindo de modo específico com esta enzima, impedindo a ruptura reversível de uma das cadeias do DNA, causando a estabilização de complexos durante a replicação do DNA, levando a morte celular (Stewart et al., 2004; Yang et al., 2005).

Os principais efeitos adversos do irinotecano são a diarreia, o vômito e a neutropenia. Diarréias severas causam desidratação, falhas renais e eventos tromboembólicos, além disso, a diarreia combinada com a neutropenia leva frequentemente a quadros de sepse. Essas complicações têm contribuído para a alta incidência de mortalidade para os pacientes tratados com irinotecano (Hu et al, 2006).

A chave para melhorar os resultados clínicos é aumentar a eficácia sem aumentar a toxicidade do tratamento, assim, muita atenção tem sido dada para combinação de irinotecano com agentes que não apresentam toxicidade ou que são, apenas parcialmente tóxicos (Vanhoefer et al., 2004).

Assim delineou-se um experimento com utilização de combinações de doses ativas e não ativas das carifenonas (doses obtidas pelo experimento anterior) e do quimioterápico irinotecano (obtidas por uma curva de doses previamente realizada) (Fig. 14 e 15).

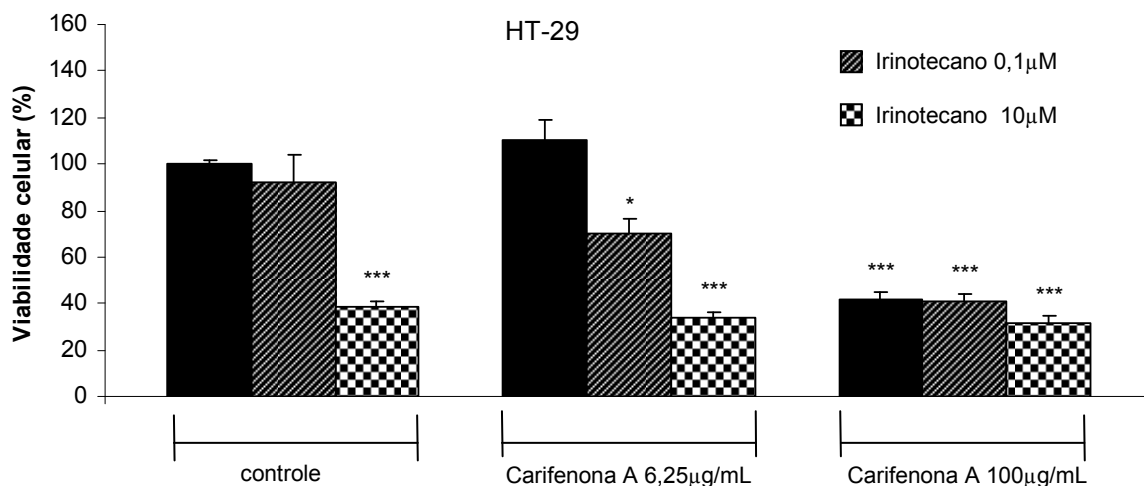


Figura 14. Teste de viabilidade celular pelo método de MTT, na linhagem de câncer colorretal, HT-29 para verificação de possível efeito sinérgico entre a carifenona A e o quimioterápico irinotecano. Valores de $p < 0,05 = *$ e $p < 0,001 = ***$ em relação ao controle.

O efeito da carifenona A na dose se 100µg/mL foi semelhante aquele do quimioterápico irinotecano na dose de 10µM, sendo que a associação de doses efetivas desses compostos resultou na modulação da proliferação celular com a diminuição da viabilidade em cerca de 70%, enquanto que na associação de doses não efetivas foi verificado o efeito sinérgico dos compostos, uma vez que sozinhos não apresentavam atividade (Fig. 14). Perfil semelhante foi verificado para carifenona B, embora a associação de doses não efetivas não tenha diminuído significativamente a proliferação celular (Fig. 15).

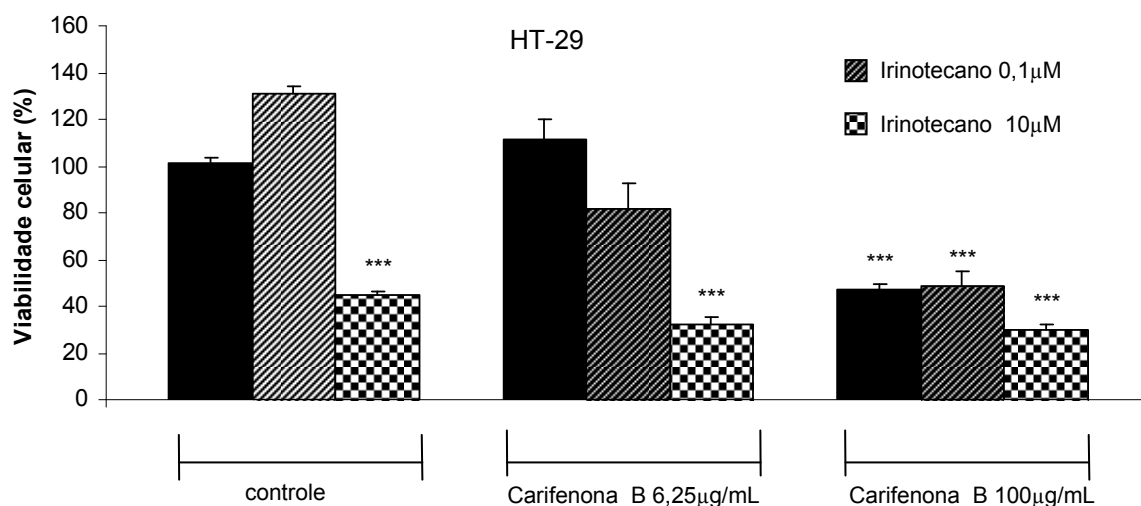


Figura 15. Teste de viabilidade celular pelo método de MTT, na linhagem de câncer colorretal, HT-29 para verificação de possível efeito sinérgico entre a carifenona B e o quimioterápico irinotecano. Valores de $P < 0,001 = ***$ comparativamente com o controle.

Estudos semelhantes já foram realizados visando a associação de compostos naturais como o 3-indol-carbinol (I3C) e o resveratrol (RE) no estabelecimento de agentes antiproliferativos contra o câncer de ovário, demonstrando interessante resultados com a associação das doses mais baixas 4 µg I3C+0.5 µg RE (Raj et al., 2008), bem como o sucesso da combinação do resveratrol com o antimetabólito 1-β-D-arabinofuranosilcitosina (Ara-C) ou com o composto tiazofurin em células humanas de leucemia promielocítica (Horvath et al., 2005).

O efeito sinérgico também foi observado, após a combinação de paeonol, um composto fenólico retirado das raízes de *Paeonia moutan*, com várias concentrações de cisplatina, diminuindo a viabilidade celular de duas linhagens tumorais esofágicas (Wan et al., 2008), assim como no estudo de Grivicich e colaboradores (2008) que demonstrou o efeito sinérgico de três benzopiranos isolados da espécie *H. polyanthemum*.

6. CONCLUSÃO

A obtenção de fármacos a partir de compostos naturais é um campo promissor que merece atenção e necessita ainda muito estudo.

Sendo o câncer uma doença grave e que atinge grande parte da população é importante que haja o empenho de pesquisadores no desenvolvimento de tratamentos mais efetivos e com menor impacto na qualidade de vida do paciente.

A utilização de moléculas isoladas ainda é uma das melhores maneiras de se obter um fármaco de confiança a partir de plantas.

Partindo destes conceitos e dos resultados obtidos em nossos experimentos podemos inferir que as benzofenonas possuem capacidade antiproliferativa nas maiores doses testadas em três das quatro linhagens testadas, tendo melhores resultados na linhagem de câncer colorretal, HT- 29.

Sabemos que poucos tumores são sensíveis o suficiente para serem curados por um único agente, assim, através de testes com a combinação das carifenonas e do quimioterápico irinotecano foi demonstrado que as carifenonas na dose de 100 μ g/mL apresentam semelhante inibição a do quimioterápico irinotecano na dose de 10 μ M e que a combinação de doses efetivas desses compostos levam a diminuição da viabilidade celular em cerca de 70%, sendo que a combinação de doses não efetivas de carifenona A e do irinotecano apresentou atividade devido ao efeito sinérgico entre elas.

Isso nos leva a propor que a atividade apresentada em estudos anteriores pelo extrato hexânico da espécie *H. carinatum* possa estar relacionado a ação sinérgica das benzofenonas com outras moléculas presentes no extrato, como a uliginosina B, derivado do floroglucinol., necessitando mais estudos para verificação desta hipótese. Como perspectivas para este trabalho, temos verificação da hipótese acima, bem como o estabelecimento do mecanismo de ação e a relação estrutura-atividade desses compostos.

6. REFERÊNCIAS

Albering, D.V. Estudo da constituição química de *Hypericum carinatum* (Guttiferae) e avaliação da atividade inseticida de *Hypericum polyanthemum*. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Baggett, S.; Protiva, P.; Mazzola, E. P.; Hui, Y.; Ressler, E. T.; Basile, M. J.; Weinstein, B.; Kennelly, E.J. Bioactive Benzophenones from *Garcinia xanthochymus* Fruits. *Journal of Natural Products*., v. 68, p. 354 -360, 2005.

Bannerman, R.H.O.; Burton, J.; Chen, W.C. *Traditional Medicine and Health Care Coverage: A Reader for Health Administrators and Practitioners*. Geneva:World Health Organization, 1983.

Barnett, C.J.; Cullinan, G.J.; Gerzon, K.; Hoying, R.C.; Jones, W.E.; Newlon, W.M.; Poore, G.A.; Robison, R.L.; Sweeney, M.J.; Todd, G.C.; Dyke, R.W.; Nelson, R.L. Structure-activity relationships of dimeric Catharanthus alkaloids 1. Deacetyl vinblastine amide (vindesine) sulfate. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 88, 1978.

Berenbaum, M.C. What is synergy? *Pharmacological Reviews*, v. 41, p. 93-141, 1989.

Bernardi, A.P.M.; Ferraz, A. B. F.; Albring, D. V.; Bordignon, S.A.L.; Schripsema, J.; Bridi, R.; Dutra-Filho, C. S.; Henriques, A. T.; von Poser, G. L. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 784-786, 2005.

Bertino, J.R. Irinotecan for colorectal cancer. *Seminars in Oncology*, v. 4, p. 18-23, 1997.

Brandes, A.A.; Tosoni, A.; Franceschi, E.; Reni, M.; Gatta, G.; Vecht, C. Glioblastoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. v.67, p.139-152, 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA): *Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, no Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2009. Disponível em:<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=BR>.

Acessado em 14 de outubro de 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. *Instituto Nacional do Câncer (INCA)*: Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2009. Disponível em http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=351. Acessado em 14 de outubro de 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. *Instituto Nacional do Câncer (INCA)*: Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2010. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5. Acessado em 14 de outubro de 2010.

Calixto, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 131-134, 2005.

Cimigi, M.R.; Angelis, I.; Fortunati, E. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. *Toxicology in vitro*, v. 5, p. 119-12, 1991.

Creemers, G.J.; Bolis, G.; Gore, M. Topotecan, an active drug in the second-line treatment of epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 14, p. 3056-3061, 1996.

Delle Monache, F; Delle Monache, G.; Gacs-Baits, E. Prenylated Benzophenones from *Clusia sandiensis*. *Phytochemistry*, v. 30, p. 2003-2005, 1991.

Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environmental Health Perspectives*, v.109, p. 69-75, 2001.

Farias, C.B.; Lima, R. C.; Lima, L. O.; Flores, D.G.; Meurer, L.; Brunetto, A. L.; Schwartzmann, G.; Roesler, R. Stimulation of Proliferation of U138-MG Glioblastoma Cells by Gastrin-Releasing Peptide in Combination with Agents That Enhance cAMP Signaling. *Oncology*, v. 75, p. 27-31, 2008.

Farnsworth, N.R.; Akerele, O.; Bingel, A.S.; Soejarto, D.D.; Guo, Z. Medicinal plant in therapy. *Bulletin of the World Health Organ*, v. 63, p. 965-981, 1985.

Ferraz, A. Faria, D. H. Benneti, M. N. Da Rocha , A. B. Schwartzmann, G. Henriques, A. von Poser, G. L. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. *Phytomedicine*, v. 12, p. 112-115, 2005a

Ferraz, A. B. F.; Grivicich, I.; von Poser, G. L.; Faria, D. H.; Kayser, G. B.; Schwartzmann, G.; Henriques, A. T.; Rocha, A. B. Antitumor activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. *Fitoterapia*, v. 76, p. 210-215, 2005b.

Fisher, J.L.; Schwartzbaum, J.A.; Wrensch, M.; Wiemels, J.L. Epidemiology of brain tumors. *Neurologic Clinics*. V.25, p. 867-890, 2007.

Flores, D.G. Receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) em gliomas: expressão, influência na proliferação celular e mecanismos de sinalização. Tese de doutorado/ Programa de Pós graduação em Biologia Celular e Molecular UFRGS. 2009.

Frei, E.; Elias, A.; Wheeler, C.; Richardson, P.; Hryniuk, W. The relationship between high-dose treatment and combination chemotherapy: the concept of summation dose intensity. *Clinical Cancer Research*, v. 4, p. 2027-2037, 1998.

Freshney, I.R. *Culture of animal cells. A manual of Basic Technique*. 3° ed. New York, Wiley-Liss, 1994.

Fuller, R.W.; Blunt, J.W.; Boswell, J.L. Cardellina, J.H.; Boyd, M.R. Guttiferone F, the first prenylated benzophenone from *Allanblackia Stuhlmannii*. *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 130-132, 1999.

Giaccone, G. New drugs in non-small cell lung cancer: an overview. *Lung Cancer*, v.12, p.155-162, 1995.

Golan, D. E.; Tashjian, A. H.; Armstrong, E, Galanter, J.M.; Armstrong, W.; Arnaout, R. A.; Rose, H. S. *Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy*. 2. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 578.

Gragg, G.M.; Newman, D.J.; Snader, K.M. Natural products in drug Discovery and development. *Journal of Natural Products*, v. 60, p. 52-60, 1997.

Gragg, G.M.; Newman, D.J. Plants as source of anticancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 72-79, 2005.

Grivicich, I.; Ferraz, A.; Faria, D.H.; Regner, A.; Schwartzmann, G.; Henriques, A.T.; von Poser, G.L.; Rocha, A.B. Synergistic Effect of Three Benzopyrans Isolated from *Hypericum polyanthemum* in U-373 MG Glioblastoma Cell Line. *Phytotherapy Research*, v. 22, p. 1577-1580, 2008.

Guimarães, J.R.Q. *Manual de Oncologia*. 2.ed. São Paulo: BBS Editora, 2006.

Hamburger, M.; Hostettmann, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

Harvey, A.L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 20, p. 196-198, 1999.

Horvath, Z.; Saikoa, P.; Illmer, C.; Madlener, S.; Hoechtl, T.; Bauer, W.; Erker, T.; Jaeger, W.; Fritzer-Szekeres, M.; Szekeres, T. Synergistic action of resveratrol, an ingredient of wine, with Ara-C and tiazofurin in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Experimental Hematology*, v. 33, p. 329-335, 2005.

Hu, L.H.; Sim, K.Y. Cytotoxic Polyprenylated Benzoylphloroglucinol Derivatives with an Unusual Adamantyl Skeleton from *Hypericum sampsonii* (Guttiferae). *Organic Letters*, v. 1, p. 879 -882, 1999.

Hu, Z.P.; Yang, X.X.; Chan, S.Y.; Xu, A.L.; Duan, W.; Zhu, Y.Z.; Sheu, F.S; Boelsterli, U.A.; Chan, E.; Zhang, Q.; Wang, J.C.; Rachel, P. L.; Koh, H. L.; Huang, M.; Zhou, S.F. St. John's wort attenuates irinotecan-induced diarrhea via down-regulation of intestinal pro-inflammatory cytokines and inhibition of intestinal epithelial apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 216, p.225-237, 2006.

Ito, C.; Itoigawa, M.; Miyamoto, Y.; Onoda, S.; Rao, K.S.; Mukainaka, T.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H. Polyprenylated benzophenones from *Garcinia assigu* and their potential cancer chemopreventive activities. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 206-209, 2003.

Keawpradub, N.; Eno-amooquaye, E.; Burke, P.J. Cytotoxic activity of indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. *Planta Medica*, v. 65, p. 311-315, 1999.

Leyland-Jones, B, O'Dwyer, P. Biochemical modulation: application of laboratory models to the clinic. *Cancer Treatment Reports*, v. 70, p. 219-229, 1986.

Li, J.; Ou-Lee, T.M.; Raba, R.; Amundson, R.G.; Last, R.L. Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. *Plant Cell*, v. 5, p. 171-179, 1993.

Lien-Hoa, N.; Nguyen, D.; Venkatraman, G.; Sim, K.Y.; Harrison, L. J.. Xanthonenes and benzophenones from *Garcinia griffithii* and *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry*, v. 66 p. 1718-1723, 2005.

Liu, C.; Crawford, J.M. O trato gastrointestinal. In: Robbins e Cotran (Ed). *Patologia- Bases Patológicas das Doenças*. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 900-909.

Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Cavenee, W.K.; Burger, P.C.; Jouvett, A. Scheithauer, B. W.; Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of central nervous system. *Acta Neuropathology*, v. 114, p. 97-109, 2007.

Mans, D.R.A.; Rocha, A.B.; Schwartzmann, G. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. *Oncologist*, v. 5, p. 185-198, 2000.

Martarelli, D.; Martarelli, B.; Pediconi, D.; Nabissi, M.I.; Perfumi, M; Pompei, P. *Hypericum perforatum* methanolic extract inhibits growth of human prostatic carcinoma cell line orthotopically implanted in nude mice. *Cancer Letters*, v. 210, p. 27-33, 2004.

Martin, D. S. Biochemical modulation: perspectives and objectives. In K. R. Harrap & T. A. Connors (Eds.), *Proceedings of the 8th Bristol-Myers Symposium on Cancer Research. New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy*. London: Academic Press. (1987), p. 113-162.

Morrone, F. B., Jaques-Silva M. C.; Horn, A.; Bernardi, A. P.; Schwartzmann, G.; Rodnight, R.; Lenz G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *Journal of Neurooncology*, v. 64, p. 211-218, 2003.

Murata, R. M.; Yatsuda, R.; Santos, M. H.; Kohn, L. K.; Martins, F. T.; Nagem, T. J.; Alencar, S. M.; Carvalho, J. E.; Rosalen, P. L. Antiproliferative Effect of Benzophenones and their Influence on Cathepsin Activity. *Phytotherapy Research*, v. 24. p. 379-383, 2010.

Newman, D.J.; Gragg, G.M.; Snader, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981 2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1022 -1037, 2003.

Patel, B.; Sattwik das, Ravi Prakash, Mohammad Yasir. Natural Bioactive Compound with Anticancer Potential. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, v. 1, p. 32-41, 2010.

Peres, C. M.; Curi, R. *Como cultivar células?* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

Peters, G. J., Van Groeningen, C. J. Clinical relevance of biochemical modulation of 5-fluorouracil. *Annals of Oncology*, v. 2, p. 469-480, 1991.

Peters, G. J.; Köhne, C. H. *Fluoropyrimidines as antifolate drugs*. In A. L. Jackman (Ed.), *Antifolate Drugs in Cancer Therapy* (pp. 101–145). Totowa: Humana Press Inc. (1999).

Piccinelli, A. L.; Campone, L.; Dal Piaz, F.; Cuesta-Rubio, O.; Rastrelli, L. Fragmentation Pathways of Polycyclic Polyisoprenylated Benzophenones and Degradation Profile of Nemorosone by Multiple-Stage Tandem Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, v. 20, p. 1688-1698, 2009.

Protiva, P.; Hopkins, M.E.; Baggett, S.; Yang, H.; Lipkin, M.; Holt, P.R.; Kennelly, E.J.; Bernard, W.I.. Growth inhibition of colon cancer cells by polyisoprenylated benzophenones is associated with induction of the endoplasmic reticulum response. *International Journal of Cancer*, v. 123, p. 687-694, 2008.

Pui, C. H., & Evans, W. E. Acute lymphoblastic leukemia in infants. *Journal of Clinical Oncology*, v. 17, p. 438-440, 1999.

Raj ,M.H.G.; Elmageed, Z.Y.A.; Zhou, J.; Gaur, R.L.; Nguyen, L.; Azam, G. A.; Braley, P.; Rao, P.N.; Fathi, I.M.; Ouhtit, A. Synergistic action of dietary phyto-antioxidants on survival and proliferation of ovarian cancer cell. *Gynecologic Oncology*, v. 110, p. 432-438, 2008.

Ringel, I.; Horwitz, S.B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 83, p. 288-291, 1991.

Rivier L, Bruhn J. Editorial. *Journal of Ethnopharmacology*, v.1, 1979.

Robson, N.K.B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). *Bulletin of the British Museum*, v. 5, p. 293-355, 1977.

Roscetti, G.; Franzes, O.; Comandini, A.; Bonmassar, E. Cytotoxic Activity of *Hypericum perforatum* L. on K562 Erythroleukemic Cells: Differential Effects between Methanolic Extract and Hypericin. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 66-72, 2004.

Rowinsky, E.K.; Onetto, N.; Canetta, R.M.; Arbuck, S.G. Taxol-the 1st of the texanes, an important new class of anti-tumor agents. *Seminars in Oncology*, v. 19, p. 646-652, 1992.

Samuelsson G. *Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy*. 4.ed. Stockholm, Swedish Pharmaceutical Press, 1999.

Sathornsumetee, S.; Rich, J.N. Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1142, p. 108-132, 2008.

Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Petrovick, P.R. Produtos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Medicamentos. In: Simões, C.M.O.(Ed). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 1.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 1999. p. 305-306.

Schmidt, R.; Diba, K.; Leibold, C.; Schmitz, D.; Buzsáki, G.; Kempter, R. Single-trial phase precession in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, v. 29, p. 13232-13241, 2009.

Stewart, C.F.; Leggas, M.; Schuetz, J.D.; Panetta, J.C.; Cheshire, P.J.; Peterson, J.; Daw, N.; Jenkins, J.J.; Gilbertson, R.; Germain, G.S.; Harwood, F.C.; Houghton, P.J. Gefitinib enhances the antitumor activity and oral bioavailability of irinotecan in mice. *Cancer Research*, v. 64, p. 7491-7499, 2004.

Skalkos, D.; Stavropoulos, N.E.; Tsimaris, I.; Gioti, E.; Stalikas, C.D.; Nseyo, U.O.; Ioachim, E.; Agnantis, N.K. The lipophilic extract of *Hypericum perforatum* exerts significant cytotoxic activity against T24 and NTB-II urinary bladder tumor cells. *Planta medica*. v. 71, p. 1030-1035, 2005.

Tanaka, H.; Takaishi, Y.; Shikishima, Y.; Nakanishi, Y.; Bastow, K.; Lee, K.H.; Honda, G.; Ito, M.; Takeda, Y.; Kodzhimatov, O.K.; Ashurmetov, O. Prenylated benzophenones and xanthenes from *Hypericum scabrum*. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 1870-1875, 2004.

Van Moorsel, C. J. A.; Peters, G. J.; Pinedo, H.M. Gemcitabine: future prospects of single agent and combination studies. *Oncologist*, v. 2, p.127-134, 1997.

Vanhoefer, U.; Rougier, P.; Borner, M.; Muñoz, A.; Van Laethem, J.L.; Sobrero, A. Irinotecan in combination with new agents. *European Journal of Cancer Supplements*, v. 2, p. 14-20, 2004.

Vijayan, P.; Vinod, K.S.; Badami, S.; Mukherjee, P.K.; Dhanaraj, S.A.; Suresh, B. Selective *in vitro* cytotoxicity of *Hypericum hookerianum* towards cancer cell lines. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, v. 3, p. 141-146, 2003a.

Vijayan, P.; Vinod, K. S.; Dhanaraj, S. A.; Mukherjee, P. K.; Suresh B. *In vitro* Cytotoxicity and Antitumour Properties of *Hypericum mysorensense* and *Hypericum patulum*. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 952-956, 2003b.

Vredenburg, J. J.; Desjardins, A.; Herndon, J. E.; Dowell, J. M.; Reardon, D. A.; Quinn, J. A.; Rich, J. N. Sathornsumetee, Sith; Gururangan, S.; Wagner, M.; Bigner, D. D.; Friedman, A. H.; Friedman, H. S.. Phase II Trial of Bevacizumab and Irinotecan in Recurrent Malignant Glioma. *Clinical Cancer Research*, v. 13 p. 1253-1259, 2007.

Yarbro, J.W. *The scientific basis of cancer chemotherapy*. In: Perry, M.C. *The Chemotherapy Source Book*. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 2-14, 1992.

Yazaki, K. Handbook of Plant Biotechnology In: Klee, H. and Christou, P. (Ed) *Natural Products and Metabolites*. John Wiley & Sons Ltd., 2004. p. 811–857.

Wabo, H.K.; Kikuchi, H.; Katou, Y.; Tane, P; Oshima, Y. Xanthones and a benzophenone from the roots of *Pentadesma butyracea* and their antiproliferative activity. *Phytochemistry Letters*, v. 3, p. 104-107, 2010.

Waldner, M. J.; Neurath, M. F. The molecular therapy of colorectal cancer. *Molecular Mechanisms and New Therapeutic Targets in Human Carcinogenesis*. V. 13, p. 171-178, 2010.

Wall, M.E.; Wani, M.C.; Cook, C.E.; Palmer, K.H.; McPhail, A.T.; Sim, G.A. Noval antitumor agents from higher plants. *Journal of American Chemistry Society*, v. 88, p. 3808, 1976.

Wan, X.A.; Sun, G.P.; Wang, H.; Xu, S.P.; Wang, Z.G.; Liu, S.H. Synergistic effect of paeonol and cisplatin on oesophageal cancer cell lines. *Digestive and Liver Disease*, v. 40, p. 531-539, 2008.

Wang, H.K.; Lee, K.H. Plant-derived anticancer agents and their analogs currently in clinical use or in clinical trials . *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, v. 38, p. 225, 1997.

Wen, P.; Kesari, S. Malignant gliomas in adults. *The New England Journal of Medicine*. V. 359., p. 492-507, 2008.

Williams, R.B., Hoch, J.; Glass, T.E.; Evans, R.; Miller, J.S.; Wisse, J.H.; Kingston, D.G.I. A novel Cytotoxic guttiferone analogue from *Garcinia macrophylla* from the Suriname rainforest. *Planta Medica*, v. 69, p. 864-866, 2003.