



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Luciana Muratori Costa

**Investigação de atividades biológicas das riparinas A, B, C, D, E e
F: Citotoxicidade, atividade antioxidante e potencial
antiesquistossoma**

TERESINA, PIAUÍ

AGOSTO, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Luciana Muratori Costa

**Investigação de atividades biológicas das riparinas A, B, C, D,
E e F: Citotoxicidade, atividade antioxidante e potencial
antiesquistossoma**

Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso submetida ao Curso de Graduação em Farmácia Generalista do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do grau de Graduado em Farmácia Generalista.

Orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

TERESINA, PIAUÍ

AGOSTO, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Luciana Muratori Costa

**Investigação de atividades biológicas das riparinas A, B, C, D, E e
F: Citotoxicidade, atividade antioxidante e potencial anti-
esquistossoma**

Defesa: 29/09/2013

Trabalho de Conclusão de Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas – UFPI (Orientador)

Assinatura: _____

Prof. Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez – UFPI (Examinador Interno)

Assinatura: _____

Prof.^a MSc. Jéssica Pereira Costa – UESPI (Campus de Parnaíba) (Examinador Externo)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**REITOR**

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof.^a Dr.^a Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE GRADUAÇÃO

Profa. Dra. Maria do Socorro Leal Lopes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof.^a Dr.^a Regina Ferraz Mendes

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof.^a Dr.^a Lina Gomes Santos

COORDENADOR DO CURSO DE FARMÁCIA

Prof.^a Dr.^a Eilika Andréia Feitosa Vasconcelos

VICE-COORDENADOR DO CURSO DE FARMÁCIA

Prof.^a Dr.^a Waleska Ferreira de Albuquerque

SUMÁRIO

Resumo	10
Abstract.....	11
1. Introdução.....	12
1.1 Objetivos.....	14
1.1.1 Objetivos Gerais	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
1.2 Justificativa.....	15
2. Referencial teórico.....	17
3. Material e métodos	24
3.1 Preparação das Riparinas.....	24
3.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H RMN) e de Carbono (^{13}C RMN)	25
3.3 Testes contra <i>Schistosoma</i>	26
3.3.1 Cultura e manutenção dos parasitas.....	26
3.3.2 Ensaio anti-esquistossoma <i>in vitro</i>	26
3.3.3 Avaliação da aptidão reprodutiva de esquistossomas adultos	27
3.3.4 Estudo de Microscopia confocal de varredura a laser	27
3.3.5 Análise estatística	27
3.4 Testes do potencial antioxidante <i>in vitro</i> e citotoxicidade	27
3.4.1 Amostras	27
3.4.2 Avaliação do potencial sequestrador contra o radical hidroxila	28
3.4.3 Avaliação do potencial antioxidante das riparinas contra a produção de TBARS	28
3.4.4 Avaliação do potencial sequestrador das riparinas contra o óxido nítrico (NO)	29
3.4.5 Citotoxicidade contra linhagens de células tumorais	29
3.4.6 Análises estatística	30

4. Resultados e discussão	31
4.1 Testes antioxidante <i>in vitro</i> e de citotoxicidade frente a células tumorais	32
4.2 Testes anti-esquistossoma.....	39
5. Conclusão	55
Referências	56

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados de ^1H RMN dos derivados das riparinas (Rip A, B, C, D, E e F) em DMSO-d6 (200 ppm).	31
Tabela 2. Dados de ^{13}C RMN dos derivados das riparinas (Rip A, B, C, D, E e F) em DMSO-d6 (200 ppm).	31
Tabela 3. Potencial antioxidante <i>in vitro</i> das Riparina A-F na produção de TBARS, remoção de radical hidroxila e formação de nitrito.	33
Tabela 4. CE_{50} do potencial antioxidante <i>in vitro</i> das Riparinas A, B e C na produção de TBARS, remoção de radical hidroxila (OH) e formação do íon nitrito.	34
Tabela 5. CE_{50} do potencial antioxidante <i>in vitro</i> das Riparinas D, E e F na produção de TBARS, remoção de radical hidroxila (OH) e formação do íon nitrito.	35
Tabela 6. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em duas linhagens tumorais testadas na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$.	36
Tabela 7. Percentagem da liberação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH) na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$	37
Tabela 8. Efeito <i>in vitro</i> da riparina I contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	40
Tabela 9. Efeito <i>in vitro</i> da riparina III contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	41
Tabela 10. Efeito <i>in vitro</i> da riparina A contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	42
Tabela 11. Efeito <i>in vitro</i> da riparina B contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	43
Tabela 12. Efeito <i>in vitro</i> da riparina C contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	44
Tabela 13. Efeito <i>in vitro</i> da riparina D contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	45
Tabela 14. Efeito <i>in vitro</i> da riparina E contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	46
Tabela 15. Efeito <i>in vitro</i> da riparina F contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	47

Lista de figuras

Figura 1. Efeito da riparina III no tegumento de machos de <i>S. mansoni</i> .	49
Figura 2. Efeito da riparina B no tegumento de machos de <i>S. mansoni</i> .	50
Figura 3. Efeito da riparina C no tegumento de machos de <i>S. mansoni</i> .	51
Figura 4. Efeito da riparina E no tegumento de machos de <i>S. mansoni</i> .	52
Figura 5. Efeito da riparina F no tegumento de machos de <i>S. mansoni</i> .	53
Figura 6. Efeito da Riparina E sobre a oviposição de ovos de <i>S. mansoni</i> .	54

Lista de siglas

OMS	Organização Mundial de Saúde
EM	Esquistossomose Mansônica
ATP	Adenisina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Rip	Riparina
PF	Ponto de fusão
RMPI 1640	Meio de cultura tecidual - <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico
NO	Óxido Nítrico
LDH	Enzima citoplasmática lactato desidrogenase
CVN	Captação do Vermelho Neutro
MTT	Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
CAN	Ácidos Nucleicos Totais
MPP	Metaloproteinases da Matriz
ECM	Matriz Extracelular
OH	Radical Hidroxila
MDA	Malonaldeído
AAPH	2,2'-azobis-(2-amidinopropano)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROS	Espécies Reativas derivadas do Oxigênio
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50%
CI ₅₀	Concentração Inibitória para 50% das células

Resumo

COSTA, L. M. **Investigação de atividades biológicas das riparinas A, B, C, D, E e F: Citotoxicidade, atividade antioxidante e potencial antiesquistossoma**. PI, 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

O uso de produtos naturais bioativos no desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica se depara, em geral, com o baixo rendimento dos processos extrativos e a baixa concentração das substâncias selecionadas nas fontes naturais, o que pode inviabilizar a exploração comercial. Todavia, a síntese dessas substâncias e de seus derivados ou até análogos pode criar um atalho nesse processo, facilitando a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. Nesse contexto, no fruto verde da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) podem ser encontrados os alcalóides riparina I, II e III, com atividades farmacológicas documentadas. Visando otimizar sua utilização, esses compostos passaram a ser sintetizados e por meio da reação de Schotten Bauman foram sintetizados também análogos, as riparinas A, B, C, D, E e F. O objetivo do trabalho foi investigar as possíveis atividades biológicas das riparinas A-F, por meio dos testes de potencial antioxidante *in vitro*, citotoxicidade nas linhagens de células tumorais HEP-2 e HT29 e atividade antiesquistossoma. Os resultados mostram que as riparinas exercem um potencial antioxidante, em todas as concentrações testadas, contra os radicais peróxido, um forte potencial sequestrante contra o radical hidroxila e um efeito sequestrante contra o óxido nítrico (NO), havendo uma diminuição significativa na produção desse composto pelas riparinas em todas as concentrações testadas. A Riparina F foi citotóxica em todas as linhagens de células tumorais testadas. As riparinas C, D e E apresentaram inibição do crescimento celular nas linhagens HL60 e HEP-2, sugerindo um potencial antitumoral para essas substâncias. As riparinas podem ser eficazes no combate ao *S. mansoni*, principalmente as riparinas B (200 µg/mL), riparina C (300 µg/mL), riparina E (50 µg/mL), riparina F (100 µg/mL) e riparina III (100 µg/mL) que tiveram a máxima efetividade com morte, redução da atividade motora e alteração tegumentar extensiva nas primeiras 24 h. As riparinas A-F apresentaram efeito antioxidante e antitumoral nas condições testadas, além de ter sido eficaz contra o *S. mansoni*, sendo, portanto, substâncias promissoras para o desenvolvimento de um medicamento.

Palavras-chave: Análogos sintéticos, *Aniba riparia*, Plantas medicinais.

Abstract

COSTA, L. M. **Investigation on the biological activities of riparins A, B, C, D, E e F: cytotoxicity, antioxidant activity and schistosomicidal potential.** PI, 2013. 60 p. End of Course Work (Bachelor of Pharmacy) - Federal University of Piauí, Teresina, 2013.

Medicinal plants and their products are important tools in combating diseases, however, the knowledge about many species is still limited to the traditional use, studies are needed to investigate their biological activities and toxicity. By using bioactive natural products in drug development the pharmaceutical industry faces in general, low yields of extractive processes and low concentration of selected substances in natural sources, which can impair the commercial use. However, the synthesis of these substances and their derivatives or analogs can even create a shortcut in this process, facilitating research and development. In the green fruit of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) there are alkaloids called riparin I, II and III, with well-documented pharmacological activities. In order to optimize the use of these compounds, they were synthesized and through the Schotten Bauman reaction analogues were also synthesized, the riparins A, B, C, D, E and F. In this work the riparins A-F were investigated for their potential biological activities: antioxidant activity *in vitro*, cytotoxicity in the tumor cell lines HEP-2 and HT29 and anti-schistosome activity. The riparinas exert significant antioxidant potential, at all concentrations tested against peroxy radicals, a strong potential against hydroxyl radical scavenger and also a significant scavenging effect against nitric oxide (NO) was detected, with a significant decrease in the production of this compound by riparinas at all concentrations tested. Riparin F was cytotoxic in all tumor cell lines tested. The riparins C, D and E also exhibited cell growth inhibition on human HL60 and Hep-2, suggesting a potential antitumor of these substances. The riparins were found effective in combating *S. mansoni*, especially riparin B (200 / ml) riparin C (dose of 300 mg / ml) riparin E (dose of 50 mg / mL) riparin F (dose of 100 mg / ml) and riparin III (dose 100 mg / mL), which had the maximum effectiveness with death, reduced motor activity and significant cutaneous extensive changes in the first 24 h. The riparinas AF showed antioxidant and antitumor activities in the conditions tested, they were also effective against *S. mansoni* and are, thus, promising substances for drug development.

Keywords: *Aniba riparia*, Medicinal plants, Synthetic analogs.

1. Introdução

As plantas medicinais e seus produtos são ferramentas muito antigas no combate a enfermidades, na forma de unguentos, infusões, decoctos, entre outras formas. Essa cultura evoluiu desde a antiguidade até os dias atuais, sendo atualmente um dos principais focos da indústria farmacêutica (GASPAR, 2008). Entretanto, o conhecimento sobre muitas espécies ainda se limita ao uso tradicional pela população, sendo necessários estudos para investigar suas atividades biológicas e toxicidade para promover o uso eficaz e seguro desses produtos na forma de medicamento (BRASIL, 2006).

A resposta a essa demanda crescente por substâncias estruturalmente inovadoras para avaliação farmacológica, estabeleceu um novo paradigma na busca por compostos-protótipo e na otimização/desenvolvimento dos já existentes, respeitando a proposta de utilização sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento da indústria nacional, assegurando acesso e o uso correto de plantas medicinais, fitoterápicos e análogos pela população (BRASIL, 1996).

A obtenção dos compostos isolados de plantas é muitas vezes dispendiosa e com baixo rendimento, devido à baixa concentração das substâncias selecionadas nas fontes naturais. Isso muitas vezes inviabiliza a exploração dessas pela indústria, dificultando o processo de desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais bioativos. Porém, a síntese dessas substâncias e de seus derivados de forma planejada, permite frequentemente que seja estabelecido o farmacóforo e que o perfil biológico seja modulado, representando uma oportunidade para a atuação de agentes químicos orgânicos sintéticos e semissintéticos (COSTA, 2009).

Em meio a essa busca de alternativas para o tratamento de doenças com grande impacto na saúde pública, alcaloides do tipo alcalamida foram isolados do fruto verde da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), as riparinas I, II e III. Esses compostos possuem atividades farmacológicas comprovadas em estudos pré clínicos, como as atividades ansiolítica, antidepressiva e anticonvulsivante (LEITE, 2008), além de ser eficaz como antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus* (CATÃO et al., 2010).

Dessa forma, foram preparados novos derivados das riparinas, denominadas A e B e a partir da condensação dos ésteres metílicos com as fenetilaminas substituídas, foram obtidas as riparinas C, D, E e F. Os análogos das riparinas foram obtidos utilizando uma metodologia simples e de resultados seguros (GUTIERREZ, 2007) com viabilização de exploração comercial dessas novas moléculas pela indústria farmacêutica, diante da disponibilidade

independente da concentração da substância selecionada nas fontes naturais. Assim, tendo em vista que as riparinas naturais tem amplo potencial terapêutico, é importante realizar uma triagem das possíveis atividades farmacológicas das riparinas A-F, como por exemplo atividade antitumoral, antioxidante e antiesquistossoma

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um estudo pré-clínico para avaliar possíveis atividades biológicas das Riparinas A, B, C, D, E e F, bem como investigar a citotoxicidade das riparinas frente a células tumorais, realizar testes de atividade antioxidante *in vitro* e avaliação da suscetibilidade de *Schistosoma mansoni* às riparinas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar um levantamento bibliográfico das atividades farmacológicas e estudos sobre as riparinas I, II e III;
- Investigar a atividade antioxidante *in vitro* das riparinas A-F;
- Avaliar a citotoxicidade das riparinas A-F frente a duas linhagens de células tumorais (HEP-2 e HT29);
- Determinar os efeitos das riparinas A-F sobre a motilidade, integridade do tegumento e sobrevivência de *Schistosoma mansoni*;
- E por fim, determinar os efeitos das riparinas I, II e III sobre a motilidade, integridade do tegumento e sobrevivência de *Schistosoma mansoni*.

1.2 Justificativa

O Brasil, devido a sua rica flora e fauna, é considerado o detentor da maior biodiversidade do planeta que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais e tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2006). A pesquisa de plantas medicinais para seu correto uso e segurança é estimulada desde 1978 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), dada a relevância destas na saúde pública em países em desenvolvimento.

Ainda que a pesquisa com plantas medicinais seja de suma importância, muitas vezes sua exploração comercial é dificultada devido ao baixo rendimento nos processos extrativos. Assim, a síntese de compostos de interesse encontrados em plantas ou mesmo de análogos é uma alternativa a esse obstáculo, já que há o benefício da atividade biológica sem os mesmos custos e a demora de obtenção do produto natural. Além disso, a síntese de análogos permite a otimização da atividade encontrada, pois há a possibilidade de síntese de uma molécula com propriedades semelhantes, porém com grupos em posições diferentes, descartando características desinteressantes e aumentando o potencial terapêutico do composto (COSTA, 2009).

Os alcalóides do tipo alcalamida encontrados no fruto verde da *Aniba riparia* (riparinas I, II e III) tem registro de diversas atividades biológicas de grande relevância, como atividades sobre o SNC, efeitos ansiolíticos e antidepressivos (riparinas II e III), sem afetar a locomoção dos animais testados. Atividade antinociceptiva (riparina I) e anti-inflamatória (riparinas I e II), além de atividade antimicrobiana, com destaque para a riparina III (MELO et al., 2006; SOUSA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2009; CATÃO, et al., 2010; LEITE et al., 2011; SOUSA et al., 2011). Diante desse contexto, foram sintetizadas as riparinas I, II e III através da reação de Schotten Bauman, um método rápido, seguro e com bom rendimento. Em vista disso, foram sintetizados também análogos das riparinas naturais, as riparinas A, B, C, D, E e F.

O Brasil vem passando por um momento de transição em relação ao perfil epidemiológico da população. A intensa industrialização do país, os novos hábitos de alimentação dos brasileiros frente a uma jornada de trabalho mais intensa, fazem com que as pessoas se exponham mais a agentes carcinogênicos e, além disso os avanços na medicina e maior facilidade no diagnóstico de muitas doenças fez com que a expectativa de vida da população foi superior 3,03 anos na última década. Como resultado, as mortes por doenças

infectocontagiosas diminuíram e doenças crônicas e o câncer tiveram maior incidência, tomando uma importância maior no contexto nacional e despertando o interesse na busca de alternativas no tratamento que sejam eficazes e menos agressivos (IBGE, 2009; INCA/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Ao mesmo tempo, existem no Brasil ainda muitas regiões carentes de saneamento básico, o que faz com que apesar de em seus grandes centros urbanos ser comparável aos países desenvolvidos em avanços tecnológicos, ainda tenha alta incidência de doenças endêmicas, como a esquistosomose (BRASIL, 2005; IBGE, 2009). Assim, diante do que foi explicitado, é importante a pesquisa das potencialidades terapêuticas das riparinas A-F. Visando cumprir com esse papel, foi investigada nesse trabalho a atividade antioxidante *in vitro* das riparinas, além da suscetibilidade de vermes adultos *Schistosoma mansoni* às riparinas e sua citotoxicidade frente duas linhagens de células tumorais.

2. Referencial teórico

Família Lauraceae

A família Lauraceae é largamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. É constituída por 52 gêneros e 2000 a 3000 espécies (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007). É uma família muito grande e de vasta exploração comercial, tendo registros de seu uso datados desde 2800 a.C. Esses precedentes da História antiga influenciaram o nome de muitos dos gêneros utilizados na época, como *Laurus* L., por exemplo, vem do celta “lauer” que significa verde ou ainda “laus” que significa louvor e o gênero *Phoebe*, tem o seu nome relacionado ao deus grego Apolo. Outras espécies utilizadas desde a Grécia antiga são as pertencentes ao gênero *Cinnamomum* Schaeffer, que significa “caneleira” em grego (MARQUES, 2001).

As plantas da família Lauraceae e seus produtos são empregados em diversos ramos, como na culinária, em marcenaria e construção civil, na fabricação de papel, na indústria de perfumaria e ainda na indústria química e medicina popular. Na culinária há vários itens famosos que pertencem a família Lauraceae, como o fruto da *Persea gratissima* L., mais conhecido como abacate, ou as cascas de espécies do gênero *Cinnamomum*, popularmente conhecida como canela. As espécies arbóreas são comuns na marcenaria e os gêneros que estão frequentemente relacionados a essa atividade são *Ocotea* e *Aniba*. O gênero *Ocotea* também é bastante representativo quanto ao uso medicinal, é fonte de neolignanas e alcaloides benzilisoquinolinas, além disso apresenta uma grande quantidade de óleos essenciais (MARQUES, 2001; CABRAL et al, 2010).

Há registros do potencial uso terapêutico de neolignanas isoladas de plantas da família Lauraceae, como inibidor da agregação plaquetária e também como anti-inflamatório ao inibir as enzimas cicloxigenase 1 e 2 (COX-1 e 2) e lipoxigenase (LOX). As neolignanas também são ativas contra as formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* em ensaios *in vivo*. Espécies dos gêneros *Nectandra* Rol. ex Rottb., *Licaria* Aubl. e *Aniba* Aubl. também apresentam neolignanas (MARQUES, 2001; COY; CUCA; SEFKOW, 2009; CABRAL et al, 2010). O gênero *Aniba* também tem grande representatividade quanto a presença de óleos essenciais e outras substâncias bioativas, como será apresentado na sessão a seguir.

Gênero *Aniba*

O gênero *Aniba* destaca-se por seu valor econômico devido à constituição do seu óleo essencial, abundante principalmente na casca e no lenho. As aproximadamente 40 espécies de *Aniba* ocorrentes no Brasil podem ser divididas em 3 grupos, de acordo com a natureza química do constituinte predominante no óleo essencial: o grupo do linalol (*A. roseodora*, *A. duckei*); o grupo do benzoato (*A. fragans*, *A. firmula*, *A. gardneri* (Meiss.) Mez, *A. burchelli* Kosterm., *A. parviflora*, *A. permolis* (Nees) Mez, *A. guianensis* Aubl.) e o grupo do alibenzeno (*A. canellita*, *A. hostmanniana* (Nees) Mez, *A. pseudocoto* (Reesby) Kosterm.). *A. burchelli* apresenta, além do benzoato de benzila, alto teor de alibenzenos e até um propenilbenzeno (MARQUES, 2001). A *A. riparia* possui alcaloides do tipo alcalamida, conhecidos por suas potencialidades terapêuticas.

Aniba riparia (Ness) Mez

A *Aniba riparia* (Ness) Mez, árvore da família Lauraceae, considerada uma das mais primitivas famílias pode ser destacada pela sua importância econômica, sendo algumas espécies utilizadas na medicina popular e nas indústrias de cosméticos e produtos químicos, dela pode ser obtido um extrato dos frutos e dos cálices persistentes que possuem atividade farmacológica comprovada cientificamente (MARQUES, 2001).

Do ponto de vista fitoquímico, *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), apresenta uma classe especial de alcaloides contendo uma função alcalamida. Após a elucidação estrutural de um dos seus compostos o (O-metil)-N-(2-hidroxibenzoil) tiramina foi verificado que, biogeneticamente, esta molécula é resultado da condensação de duas substâncias: o éter metílico da tiramina, agente simpaticomimético, e o ácido salicílico, agente queratolítico e antimicótico (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Foram encontrados flavonóides, benzoilbenzoatos e benzaldeídos em estudos químicos realizados nas cascas do caule de *A. riparia*. Estudos demonstraram também que há a presença de neoglicanas, benzilbenzoatos, feniletilaminas (O-metil-tiramina) e que estes alcaloides, especificamente alcalamidas (feniletilamidas do ácido benzóico) estão presentes no fruto verde da planta (FERNANDES et al., 1978; FRANÇA et al., 1976; BARBOSA-FILHO et al., 1987).

Conhecida popularmente como “louro” esta planta tem o centro da sua diversidade na Amazônia e nas Guianas, podendo estender-se para os Andes, para as montanhas do norte da Venezuela, leste e sul do Brasil. Estudos mostram também um significativo potencial

ansiolítico conferido aos, alcaloides isolados da *A. riparia*, estando estes desprovidos dos efeitos sedativo, e portanto, com menos efeitos colaterais que os benzodiazepínicos clássicos (SOUSA et al., 2008). Esses alcaloides foram denominados riparinas em homenagem ao nome da espécie e suas propriedades são detalhadas na próxima sessão.

Riparinas

A atividade ansiolítica e antidepressiva foi atribuída aos alcalóides isolados do fruto verde da *A. riparia*, denominados riparinas. A riparina III testada em modelos animais nos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, rota rod, tempo de sono induzido por barbitúricos, suspensão pela cauda e nado forçado, demonstraram potencial ansiolítico e antidepressivo, especialmente associado a elevação do tempo de sono induzido por barbitúricos (SOUSA et al., 2004)

Estudos para elucidar o mecanismo de ação da riparina III para atividade antidepressiva fornece em seus resultados uma relação do efeito com a interação com os sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos (α_1 e α_2) e dopaminérgicos (receptores de dopamina D₂) (MELO et al., 2013)

Resultados semelhantes foram obtidos em testes com a riparina II, também isolada do fruto verde de *A. riparia* e administrada a ratos machos, em doses de 25, 50 e 75 mg/Kg, previamente ao teste no labirinto em cruz elevado, em campo aberto, no rota rod e na placa perfurada. Estes estudos mostram que a riparina II, assim como a riparina III quando submetidas a estes testes, apresentam efeitos ansiolítico no labirinto em cruz elevado e na placa perfurada, sem comprometer a atividade locomotora analisada nos outros testes (MELO et al., 2006; SOUSA et al., 2007).

A atividade antinociceptiva de constituintes da *A. riparia* também foi analisada em testes com a riparina I em modelos comportamentais de dor induzida química e termicamente em roedores. Os resultados obtidos sugerem que a riparina I apresenta atividade antinociceptiva relacionada a mecanismos periféricos (via do óxido nítrico) e mecanismos centrais, descartando o envolvimento do sistema opióide (ARAÚJO et al., 2009).

As atividades anti-inflamatória e antimicrobiana também são atribuídas as riparinas. As riparina I e II provocaram a redução do edema de pata de roedores induzido por carragenina, o que configura um potencial anti-inflamatório (LEITE et al., 2011; SOUSA et al., 2011). Foi relatado ainda que o grau de hidroxilação do radical benzoflo aumenta a

atividade anti-inflamatória, o que pode ser relevante para uma análise de potencial estrutural das riparinas.

A atividade antimicrobiana foi testada para as três riparinas (I, II e III) em amostras de *Staphylococcus aureus*. As riparinas I e II apresentaram halos de inibição do crescimento semelhantes (9 mm), mas apenas a partir de uma concentração inicial de 400 µg/mL, o que demonstra potencial inferior ao apresentado pela riparina III que apresentou atividade curagênica, uma vez que eliminou a resistência para a penicilina na linhagem 319U numa frequência de 61,7%. Nessa linhagem, também, foi evidenciada a perda da capacidade de expressar a enzima coagulase. A riparina III apresentou ainda atividade antiplasmidial e a capacidade de modificar a expressão de fatores de virulência (CATÃO et al., 2010).

Nos testes com cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes foi constatado que as riparinas, apesar de suas diferenças estruturais, apresentaram atividades antimicrobianas semelhantes. No entanto, a riparina III (O-metil-N-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina) foi a que apresentou maior potencial antimicrobiano. Todas as cepas de *S. aureus* testadas demonstraram ser mais susceptíveis à ação das riparinas do que as cepas de *E. coli* (CATÃO et al., 2005).

A ação miorelaxante foi atribuída as riparinas I e III e um comparativo estrutural e eletrônico das moléculas permitiram analisar as diferenças potenciais na intensidade da atividade miorelaxante e farmacológicas pelo possível mecanismo de ação que permitem à riparina III pela sua estrutura planar e seu extenso deslocamento de elétrons que pode potencializar a sua atividade miorelaxante quando comparada a riparina I (MARQUES, 2005). Devido à potencialidades terapêuticas das riparinas I, II e III, seus análogos sintéticos (riparinas A-F) foram testadas quanto a algumas atividades biológicas: atividades antiesquistossoma, antioxidante e antitumoral.

Esquistossomose mansônica

A esquistossomose mansônica (EM) é uma enfermidade parasitária desencadeada pelo helminto *Schistosoma mansoni* e é uma importante doença no contexto da saúde pública brasileira (SOUSA; VITORINO; COSTA, 2011). Encontra-se distribuída principalmente em regiões tropicais. Nos continentes americano e africano é observada em mais de 70 países, com prevalência mundial estimada em 207 milhões de indivíduos (TAVARES; MARINHO, 2007).

O Ministério da Saúde estimou em 2,5 milhões o número de pacientes com EM no Brasil (BRASIL, 2005). No entanto, há relatos de um impacto epidemiológico ainda maior, referindo a existência de seis a sete milhões de indivíduos acometidos anualmente pela doença no país, a maioria destes localizados nos estados do Nordeste, onde as condições de saneamento são ainda precárias, fator que contribui para a transmissão da doença (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

Trata-se de uma doença, inicialmente assintomática, que pode evoluir para formas clínicas extremamente graves e levar o paciente ao óbito. A grande prevalência associada a gravidade das formas clínicas dessa, conferem a esquistossomose uma grande relevância como problema de saúde pública (BRASIL, 2005). Todavia, as opções de tratamento não são proporcionais ao impacto dessa doença, pertencendo ao grupo das doenças negligenciadas, que não despertam o interesse das indústrias farmacêuticas e nem dos setores públicos dos países desenvolvidos, que praticamente não investem na pesquisa de novos fármacos para servir a parcela da população com baixo poder aquisitivo, já que estes estão mais expostos aos fatores de risco (O'CONNELL, 2007).

A necessidade de desenvolvimento de medicamentos é ainda mais evidente em países nos quais as doenças negligenciadas são bastante prevalentes, como no Brasil. O praziquantel é o único fármaco utilizado para o tratamento das esquistossomoses, apesar de suas limitações, como a baixa eficácia no tratamento da esquistossomose mansônica aguda; baixa atividade sobre o *S. mansoni* na forma imatura e falha em tratamentos devido à ocorrência de resistência ou tolerância a esse fármaco (HOTEZ; ENGELS; FENWICK; SAVIOLI, 2010). Portanto, faz-se necessário a busca por alternativas terapêuticas com o desenvolvimento de drogas mais seguras e eficazes para o tratamento dessa infecção parasitária (MORAES, 2012).

Compostos isolados de plantas são, frequentemente, objetos de estudo nessa busca por alternativas no tratamento de diversas enfermidades por apresentarem grande potencial terapêutico (MARQUES, 2001). Um notável exemplo são os alcaloides isolados da *Aniba riparia* (Ness) Mez, as riparinas I, II e III já mencionadas, que possuem diversas potenciais atividades farmacológicas relatadas. Assim, é conveniente avaliar o potencial dessas no combate à esquistossomose, bem como dos análogos, as riparinas A-F.

Estresse oxidativo e câncer

O Estresse oxidativo retrata a existência de produtos chamados radicais livres (moléculas que possuem um elétron desemparelhado) (WIERNSPERGER, 2003). A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. A geração de radicais livres atua também no mecanismo de defesa antimicrobiana humana que se destina a destruir micro-organismos invasores, células tumorais e outras células alvos de remoção (FERNANDEZ et al., 2007; BARBOSA et al., 2010).

Por outro lado, os radicais livres podem ser extremamente tóxicos, danificando lipídios, proteínas, DNA e RNA celulares, levando a várias formas de lesão celular. Porém, as células possuem sistemas de defesa (proteínas quelantes de metais, enzimas de defesa, antioxidantes) para prevenir lesões causadas por radicais de oxigênio altamente reativos (ROS). Um desequilíbrio entre a taxa de geração e a capacidade de remoção celular de radicais livres causa um estresse oxidativo, que pode ser causa direta de uma patologia ou estar associado a uma forma de perpetuar o dano celular causado por outro processo patológico (FERNANDEZ et al., 2007).

Isso porque a oxidação de biomoléculas resultante da instalação do processo de estresse oxidativo tem como consequência a perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos. A cronicidade do processo em questão tem relevantes implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (BARBOSA et al, 2010).

E em relação às enfermidades citadas, o câncer é uma das que se destacam no contexto nacional e mundial. Nas últimas décadas, vêm ocorrendo no Brasil mudanças nas causas de mortalidade e morbidade, em conjunto com outras transformações demográficas, sociais e econômicas. Vários fatores explicam a participação do câncer na mudança do perfil de adoecimento da população brasileira. Entre eles, podemos citar: maior exposição a agentes cancerígenos, já que os atuais padrões de vida adotados em relação ao trabalho, à alimentação e ao consumo, de modo geral, expõem os indivíduos a fatores ambientais resultantes de

mudanças no estilo de vida das pessoas e do processo de industrialização cada vez mais intenso; prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional (redução do número médio de filhos por mulher em idade reprodutiva, melhoria das condições econômicas e sociais, refletindo também na melhoria de saneamento das cidades e evolução da medicina e o uso de antibióticos e vacinas); aprimoramento dos métodos para se diagnosticar o câncer; aumento no número de óbitos pela doença e a melhoria da qualidade e do registro da informação (INCA/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Atualmente, registra-se o aumento da incidência de cânceres associados ao melhor nível socioeconômico – mama, próstata e cólon e reto – ao mesmo tempo em que se observam taxas de incidência elevadas de tumores geralmente associados a condições sociais menos favorecidas – colo do útero, estômago, cabeça e pescoço (INCA/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) lançou uma estimativa para a incidência de câncer no ano de 2012, também válida para 2013. Estas apontam a ocorrência de 518.510 novos casos dessa doença em 2012, reforçando a magnitude do problema do câncer no Brasil.

Visto que o estresse oxidativo podem desencadear mutações, que por sua vez podem originar em neoplasias, é importante avaliar a capacidade antioxidante das riparinas, pois essa propriedade pode ser usada como preventiva de diversas doenças degenerativas e o câncer.

3. Material e Métodos

3.1 Preparação das Riparinas

As riparinas foram fornecidas pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da UFPI, onde os compostos foram preparados utilizando a metodologia de Gutierrez (2007).

Obtenção de Rip-A

Utilizando a reação de Schotten-Bauman, foram misturados em um balão de 50 mL 0,41 mL de cloreto de benzoíla e 0,89 mL de 2-feniletilamina com trietilamina. A mistura reacional sem solvente foi deixada em agitação magnética por 30 minutos a temperatura ambiente. Após purificação em cromatografia em coluna foi obtido 0,68 g. de N-fenetilbenzamida (Rip-A) com um rendimento de 84% (PF = 115°C).

Obtenção de Rip-B

Utilizando a mesma metodologia foi preparado o N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-B) a partir de 0,41 mL de cloreto de benzoíla e 1,2 mL de 3,4-dimetoxifenetilamina. A reação terminou em 30 min. Resultando em 0,82 g do composto denominado Rip-B. Rendimento de 80,44% (PF = 88,5-90°C).

Obtenção de Rip-C

A partir de 0,43 mL de salicilato de metila e 0,83 mL de feniletilamina, sob agitação magnética por 8 h e a temperatura ambiente, foram obtidos 0,52 g. de 2-hidroxi-N-fenetilbenzamida (Rip-C) com rendimento de 65% (PF = 93,6-95°C).

Obtenção de Rip-D

Em seguida foi preparada a 2-hidroxi-N-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-D), a partir de 0,43 mL de salicilato de metila com 1,12 mL de 3,4-dimetoxifenetilamina, sob agitação magnética e a temperatura ambiente por 6 h com rendimento de 33,68% (PF = 96°C).

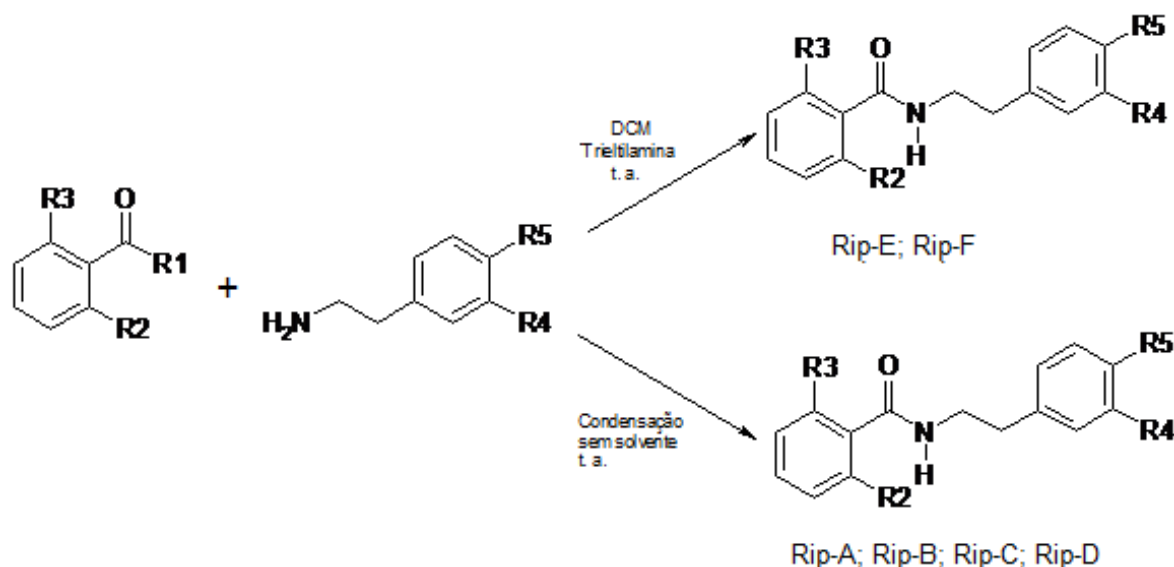
Obtenção de Rip-E

Para a preparação de 2,6-diidroxi-N-fenetilbenzamida (Rip-E), foram adicionados 0,75 mL de feniletilamina a uma solução de 0,5 g do éster do ácido 2,6-dihidroxibenzóico em 30 mL de diclorometano e 1 mL de trietilamina. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 5 h. Em seguida, a mistura foi neutralizada com HCl 2%. Foi feita a extração, então, com três porções (20 mL) de acetato de etila. As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas a vácuo. Foi obtido 0,58 g do composto denominado Rip-E com rendimento de 75% (PF = 154-155°C).

Obtenção de Rip-F

A N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-2,6-diidroxi-benzamida (Rip-F) foi preparada a partir da adição de 1 mL de 3,4-dimetoxifenetilamina, a uma solução de 0,5 g de 2,6-dihidroxibenzoato de metila em 30 mL de diclorometano e 1 mL de trietilamina. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 5 h. Em seguida foi neutralizada com HCl 2% e extraída com três porções de acetato de etila. As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em rotaevaporador. Foi obtido 0,66 g do composto denominado Rip-F com rendimento de 69% (PF = 166 °C).

No esquema a seguir está sumarizada a preparação dos análogos das riparinas



(Rip-A) R1= Cl; R2 = R3 = R4 = R5 = H

(Rip-B) R1= Cl; R2 = R3 = H; R4 = R5 = OCH3

(Rip-C) R1= OCH3; R2 = OH; R3 = R4 = R5 = H

(Rip-D) R1= OCH3; R2 = OH; R3 = H; R4 = R5 = OCH3

(Rip-E) R1= OCH3; R2 = R3 = OH; R4 = R5 = H

(Rip-F) R1= OCH3; R2 = R3 = OH; R4 = R5 = OCH3

3.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H RMN) e de Carbono (^{13}C RMN)

Os dados técnicos e as condições operacionais sobre os espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN unidimensionais e bidimensionais foram obtidos junto ao Centro Nordestino de Aplicação e uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), sob a coordenação do coordenado pelo Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. Os espectros foram obtidos em espectrômetros

Bruker, modelo Avance DPX-300 e modelo Avance DRX-500, operando na frequência do hidrogênio a 300 e 500 MHz, e na frequência do carbono a 75 e 125 MHz, respectivamente.

3.3 Testes contra *Schistosoma mansoni*

3.3.1 Cultura e manutenção dos parasitas

O ciclo de vida do *S. mansoni* (linhagem BH) é mantido em caramujo *Biomphalaria glabrata* e hamsters *Mesocricetus auratus* no Instituto Butantan (São Paulo, Brazil) de acordo com procedimentos padrões previamente descritos (MORAES, 2012). Após sete semanas, os espécimes adultos de *S. mansoni* foram recuperados de hamsters previamente infectados com 150 larvas cercárias por perfusão em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Invitrogen, São Paulo, Brasil) com heparina (SMITHERS; TERRY, 1965). A manutenção e cuidado dos animais experimentais obedeceu as diretrizes dos Institutos Nacionais de Saúde para uso de animais de laboratório e foram aprovadas pelo Conselho de Revisão Institucional do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil).

3.3.2 Ensaio anti-esquistossoma *in vitro*

Para preparação e cultura dos esquistossomas, os vermes foram lavados em meio RPMI 1640 mantido em pH 7,5 com HEPES 20 mM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL) e contendo 200 µg/mL de estreptomicina e 200 IU/mL de penicilina (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil). Após lavagem, um par de vermes adultos foram transferidos para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços (TPP, St. Louis, MO) contendo o mesmo meio a 37 °C em atmosfera a 5% de CO₂ como descrito anteriormente (DE MORAES et al., 2011; MORAES et al., 2011; VERAS et al., 2012).

Os ensaios *in vitro* com *S. mansoni* foram feitos como descrito na literatura (DE MORAES et al. 2011; MORAES et al. 2011; VERAS et al. 2012). Cada uma das riparinas foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO; 0,5 % concentração final; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e usada nas concentrações 12,5, 25, 50, 100 e até 1000 µg/mL caso não atinja 100% de mortes em concentrações mais baixas. O volume final em cada poço foi de 2 mL. O grupo controle foi feito em meio RPMI 1640 e meio RPMI 1640 com 0,5 % de DMSO como controle negativo e 10 µg/mL de praziquantel como controle positivo. Os parasitas foram mantidos por 120 h e monitorados a cada 24 h. O efeito da droga foi avaliado em um microscópio invertido (Nikon, Melville, NY) com ênfase nas mudanças na atividade motora

do verme, mudanças na morfologia/tegumento e taxa de mortalidade. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e foram repetidos pelo menos 3 vezes.

3.3.3 Avaliação da aptidão reprodutiva de esquistossomas adultos

A oviposição *in vitro* foi determinada pela contagem do número de ovos, como estabelecido em trabalhos anteriores (DE MORAES et al., 2011; MORAES et al., 2011; VERAS et al., 2012). Em suma, os casais de vermes adultos foram encubados em concentrações sub-letais das riparinas por até 120 h. As mudanças no pareamento dos machos as fêmeas e na oviposição foram examinadas diariamente através de um microscópio invertido. Os números cumulativos de ovos postos por cada casal de vermes foram estabelecidos somente para as culturas que continham vermes vivos, tanto machos quanto fêmeas.

3.3.4 Estudo de Microscopia confocal de varredura a laser

Para observar modificações morfológicas no tegumento dos parasitas adultos, os esquistossomas foram processados para microscopia confocal de varredura a laser como descrito anteriormente (DE MORAES et al. 2011; MORAES et al. 2011). Em síntese, no final do tratamento com a droga (120 h) ou no caso de morte, os parasitas foram fixados em uma solução álcool - formalina - ácido acético (AFA) e analisados em um microscópio confocal (LSM 510 META, Carl Zeiss, Standorf Göttingen, Vertrieb, Germany) a 488 nm de excitação e 505 nm de emissão (MORAES et al., 2009).

3.3.5 Análise estatística

A análise estatística foi feita com o programa GraphPad Prism (versão 5.0). As diferenças significativas foram determinadas pela análise one-way de variância e aplicando teste de Turkey para múltiplas comparações. Uma diferença na mediana foi considerada significativa no nível de 5%.

3.4 Testes do potencial antioxidante *in vitro* e citotoxicidade

3.4.1 Amostras

Para os testes antioxidante "*in vitro*" as amostras foram emulsionadas em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e testadas nas concentrações de 1, 5, 10, 25 e 100 µg/mL.

As amostras para os testes de citotoxicidade foram diluídas em DMSO puro estéril e testadas na concentração de 25 µg/mL.

3.4.2 Avaliação do potencial sequestrador contra o radical hidroxila

A formação de $\bullet\text{OH}$ (radical hidroxila) pela reação de Fenton foi quantificada utilizando a degradação oxidativa da 2-desoxirribose (LOPES; SCHULMAN; HERMES-LIMA, 1999). O princípio do ensaio e a quantificação do produto de degradação 2 desoxirribose, o malonaldeído (MDA), pela sua condensação com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).

Resumidamente, as reações típicas foram iniciadas pela adição de Fe^{2+} (FeSO_4 concentração de 6 mM final) para soluções contendo 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de H_2O_2 e 20 µL de tampão fosfato (pH 7,2). Para determinar a atividade antioxidante das riparinas contra o radical hidroxila, com testes isolados para cada uma das seis (Rip-A; Rip-B; Rip-C; Rip-D; Rip-E e Rip-F), nos quais foram testados nas concentrações de 1, 5, 10, 25 e 100 µg/mL. As amostras foram adicionadas ao sistema antes da adição do Fe^{2+} . As reações foram realizadas durante 15 min em temperatura ambiente e foram cessadas pela adição de ácido fosfórico 4% (v/v), seguido de TBA 1% (ácido tiobarbitúrico) (v/v, em 50 µL NaOH). As soluções foram aquecidas por 15 min a 95 °C, e em seguida, resfriado a temperatura ambiente. A absorbância foi medida em 532 nm e os resultados foram expressos como equivalentes do MDA formado por Fe^{2+} e H_2O_2 .

3.4.3 Avaliação do potencial antioxidante das riparinas contra a produção de TBARS

O ensaio TBARS foi aplicado para quantificar a peroxidação lipídica e adaptado de um método de TBARS que é usado para medir a capacidade antioxidante das riparina (Rip. A, B, C, D, E e F) usando homogenato de gema de ovo como substrato lipídico (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). A gema de ovo foi homogeneizada (1% p/v) em 20 mM tampão fosfato (pH 7,4), 1 mL do homogenato foi sonicado e, em seguida, homogeneizado com 0,1 mL das amostras em diferentes concentrações. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de dicloridrato de 2,2'-azobis-2-aminopropano (AAPH; 0,12 M). Controle foi avaliado com o veículo. As reações foram realizadas durante 15 min a 37 °C. Após o resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 x g por 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico) (0,67%) e aquecida a 95 °C durante 30 min. Após o resfriamento, a absorbância do meio reacional na presença das amostras foi

medida usando um espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas por AAPH sozinho (controle).

3.4.4 Avaliação do potencial sequestrador das riparinas contra o óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico foi gerado a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio em 20 mM tampão fosfato (pH 7,4). Uma vez gerado NO esse interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidos pela reação de Griess (BASU; HAZRA, 2006) A mistura de reação (1 mL) contendo 10 mM nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato e as riparinas em diferentes concentrações foram incubados a 37 °C durante 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL, foi tomada e homogeneizada com 0,5 mL de reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida em 540 nm. Porcentagem de inibição do óxido nítrico gerado foi medido por comparação dos valores de absorbância dos controles negativos (apenas 10 mM nitroprussiato de sódio e veículos) e as substâncias avaliadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito formado por NPS sozinho.

3.4.5 Citotoxicidade contra linhagens de células tumorais

Células: As linhagens tumorais utilizadas, HT29 (carcinoma de cólon - humano), HEP-2 (carcinoma de laringe humano) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al, 1990). É um método rápido, sensível e barato, descrito desde 1983 (MOSSMAN, 1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL. As riparinas A, B, C, D, E e F foram previamente dissolvidas em DMSO e diluídas em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais e adicionadas em placa de 96 poços (100 µL/poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram

adicionados 25 μ L da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas durante 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

3.4.6 Avaliação da citotoxicidade em RAW 264.7

Macrófagos murinos peritoneais da linhagem celular RAW 264.7 foram obtidos da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), e cultivados a 37 °C com 5% de CO₂ em DMEM-F12 suplementado com 10% SBF e gentamicina (50 μ g/mL).

Células RAW 264.7 (5 x 10⁵ células/mL) foram cultivadas e incubadas por 24h com as riparinas A, B, C, D, E e F na concentração final de 25 μ g/mL por 48h (MUZITANO et al, 2006). O teste de citotoxicidade foi efetuado utilizando o ensaio de LDH. A liberação de LDH (enzima citoplasmática lactato desidrogenase) foi determinada utilizando 50 μ L do sobrenadante da cultura acrescido de 100 μ L de solução de alumen férrico e substrato, a 37 °C por 3 min. Após esse período foi acrescentado 100 μ L da solução de NAD e fenazina metassulfato, sendo mantido a 37 °C por 5 min (Kit commercial Labrax). A concentração de LDH, esta oxiredutase que catalisa a interconversão do lactato e piruvato, por ser uma enzima citosólica estável, após o dano da membrana é liberada no ambiente celular o que representa uma indicação indireta de citotoxicidade, foi determinada colorimetricamente a 492nm. A liberação específica foi calculada como porcentagem dos controles (células não tratadas como controle negativo e células tratadas com 1% de Triton X-100 como controle positivo) (LANTTO et al, 2009).

3.4.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguido de testes *t*-Student-Neuman-Keuls como teste post hoc. Em todos os casos as diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$, as médias e respectivos erros padrões das médias foram analisados no programa Graph Pad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA).

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

4. Resultados e discussão

Após obtenção, as Riparinas Rip A-F foram identificadas e tiveram suas estruturas elucidadas a partir de informações levantadas em ^1H RMN e ^{13}C RMN (Tabelas 1 e 2), respectivamente (GUTIERREZ, 2007).

Tabela 1. Dados de RMN ^1H dos derivados das riparinas (Rip A, B, C, D, E e F) em DMSO-d₆ (200 ppm).

H	Rip-A	Rip-B	Rip-C	Rip-D	Rip-E	Rip-F
1	----	----	----	----	----	----
2	7,81 (dd 2,0;8,0)	7,82 (dd 1,8;7,8)	----	----	----	----
3	7,45(m)	7,45(m)	7,28(m)	6,86 (t 7,6)	7,24(m)	6,33 (d 8,4)
4	7,45(m)	7,45(m)	7,28(m)	6,86 (t 7,6)	7,24(m)	7,13 (t 8,2)
5	7,45(m)	7,45(m)	7,28(m)	7,38 (t 7,0)	7,24(m)	6,33(d 8,4)
6	7,81 (dd 2,0;8,0)	7,82 (dd 1,8;7,8)	7,66 (dd 1,4;8,1)	7,83 (d 7,6)	----	----
1'	----	----	----	----	----	----
2'	7,24(m)	6,81 (s)	7,28(m)	6,8 (s)	6,35 (d 8,0)	6,81 (s)
3'	7,24(m)	----	7,28(m)	----	7,24(m)	----
4'	7,24(m)	----	6,872 (t7,8)	----	7,24(m)	----
5'	7,24(m)	6,84 (d8,4)	7,28(m)	6,8 (d)	7,24(m)	6,75(d 8,0)
6'	7,24(m)	6,73 (dd2;8,0)	7,28(m)	6,73(dd1,8;8,2)	6,35 (d 8,0)	6,86 (d 8,0)
7'	2,83 (t 7,8)	2,77 (t 7,6)	2,86 (t 7,8)	2,78 (t 7,40)	2,84 (t7,4)	2,77 (t 7,2)
8'	3,47 (q 6,8)	3,46 (q 7,6)	3,52 (q 6,8)	3,50 (q 6,8)	3,58 (q 6,8)	3,56 (q 7,4)
N-H	8,57(sl)	8,552(s)	8,93 (t 5,4)	8,87 (t 5,6)	8,99 (t 4,8)	8,9 (sl)
2-OH	----	----	12,628 (s)	12,59 (s)	12,6 (s)	12,58 (s)
6-OH	----	----	----	----	12,6 (s)	12,58 (s)
3'-OMe	----	3,69 (s)	----	3,69 (s)	----	3,7 (s)
4'-OMe	----	3,69 (s)	----	3,69 (s)	----	3,7 (s)

Tabela 2. Dados de ^{13}C RMN dos derivados das riparinas (Rip A, B, C, D, E e F) em DMSO-d₆ (200 ppm).

C	Rip-A	Rip-B	Rip-C	Rip-D	Rip-E	Rip-F
1	134,64	134,67	115,26	115,33	102,50	102,50
2	127,11	127,06	160,03	159,99	160,23	160,23
3	128,65	128,19	117,37	117,37	107,17	107,18
4	131,04	132,02	133,60	133,60	133,32	133,34
5	128,65	128,19	118,54	118,55	107,17	107,18
6	127,11	127,06	127,67	127,71	160,23	160,23
1'	139,54	130,99	139,24	131,70	139,14	131,52
2'	128,24	112,61	128,63	112,55	128,44	112,48
3'	128,32	148,62	128,36	148,64	128,66	148,70
4'	126,07	147,25	126,17	147,31	126,28	147,34
5'	128,32	111,97	128,36	111,94	128,66	111,92
6'	128,24	120,48	128,63	120,50	128,44	120,49
7'	35,13	34,60	34,85	34,37	34,77	34,33
8'	40,90	41,01	40,54	40,69	40,19	40,29
N-H	----	----	----	----	----	----
2-OH	----	----	----	----	----	----
6-OH	----	----	----	----	----	----
3'-OMe	----	55,51	----	55,49	----	55,48
4'-OMe	----	55,33	----	55,32	----	55,33
C=O	166,18	166,15	168,87	168,79	170,00	169,95

Os análogos, a exemplo das riparinas naturais foram preparados para serem submetidos a *screenings* farmacológicos para a determinação de suas potenciais atividades farmacológicas e da relação estrutura/atividade desta classe de compostos.

A princípio os testes iniciais realizadas foram o potencial antioxidante “*in vitro*” e citotoxicidade em duas linhagens de células tumorais.

4.1 Testes antioxidante *in vitro* e de citotoxicidade frente a células tumorais

Em humanos, o desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes pode provocar uma série de desordens celulares, como a peroxidação lipídica, danos proteicos e enzimáticos, bem como alterações no DNA, as quais podem estar associadas a inúmeros processos deletérios, como o câncer, arterosclerose, diabetes mellitus, artrite reumatóide, distrofia muscular, catarata, desordens neurológicas, problemas respiratórios e o envelhecimento precoce (FLESchIN et al, 2000; HIRATA; SATO; SANTOS, 2004).

A instalação do processo de estresse oxidativo pode ocorrer pela existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Esse processo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O equilíbrio entre a produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROS) e as defesas antioxidantes determinam o grau de estresse oxidativo (STADTMAN, 1992). Há evidência significativa que a geração de espécies reativas com oxigênio e a resposta correspondente ao estresse oxidativo são fatores fundamentais para determinar, ou ao menos participar do processo de determinação da longevidade (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Os antioxidantes, além do seu tradicional uso como aditivo à alimentos para ajudar a protegê-los contra a deterioração e como estabilizadores em Combustíveis e Lubrificantes para evitar a oxidação, têm sido propostos como potenciais ferramentas preventivas e terapêuticas para combater os prejuízos e danos à saúde decorrentes do stress oxidativo, além de ser um instrumento na prevenção de doenças (MALDONADO et al, 2011).

A quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) demonstrou que as Riparinas (Rip A-F) exercem um potencial antioxidante significativo, em todas as concentrações testadas, contra os radicais peróxil gerados, protegendo os lipídios da oxidação,

como pode ser visto na **Tabela 3**. Resultado semelhante foi obtido com o trolox, um análogo sintético hidrofílico do α -tocoferol, que é largamente usado como padrão antioxidante.

Um forte potencial sequestrante contra o radical hidroxila também foi gerado *in vitro*, especialmente na concentração mais alta, semelhante ao resultado obtido com o trolox e sugestivo de potencial antioxidante.

As substancias demonstraram exercer ainda um efeito significativo sequestrador contra o óxido nítrico (NO), havendo uma diminuição significativa na produção desse composto pelas riparinas em todas as concentrações testadas.

Tabela 3. Potencial antioxidante “*in vitro*” das Riparina A-F na produção de TBARS, remoção de radical hidroxila e formação de nitrito.

Parâmetros	$\mu\text{g/mL}$	Veículo ¹	Sistema	Trolox ²	Rip-A	Rip-B	Rip-C	Rip-D	Rip-E	Rip-F
Produção de Nitrito (% induzida por NPS)	1	34,88±0,96	100,4±2,01*	40,2 ±2,80 ^a	75,1±1,31 ^a	75,8±1,02 ^a	69,3±1,07 ^a	72,6±1,81 ^a	65,9±1,30 ^a	74,9±2,27 ^a
	5	34,88±0,96	100,4±2,01*	40,2 ±2,80 ^a	29,1±0,61 ^a	34,1±1,85 ^a	34,9±0,23 ^a	32,2±1,45 ^a	37,7±0,95 ^a	35,3±0,96 ^a
	10	34,88±0,96	100,4±2,01*	40,2 ±2,80 ^a	29,2±2,05 ^a	29,1±2,00 ^a	22,9±1,31 ^a	28,9±1,74 ^a	25,1±1,37 ^a	21,5±0,98 ^a
	25	34,88±0,96	100,4±2,01*	40,2 ±2,80 ^a	24,3±0,62 ^a	23,1±0,97 ^a	19,8±0,83 ^a	24,7±1,77 ^a	20,1±0,71 ^a	19,9±0,71 ^a
	100	34,88±0,96	100,4±2,01*	40,2 ±2,80 ^a	20,4±1,20 ^a	20,6±0,98 ^a	16,5±1,44 ^a	17,3±2,38 ^a	15,4±1,11 ^a	17,3±0,22 ^a
Degradação de 2-desoxirribose (%)	1	13,96±0,96	100,2±1,35*	21,4 ±0,95 ^a	97,1±0,78 ^a	98,4±0,39 ^a	95,5±1,30 ^a	93,5±1,17 ^a	79,9±0,64 ^a	83,3±2,13 ^a
	5	13,96±0,96	100,2±1,35*	21,4 ±0,95 ^a	76,9±1,10 ^a	79,8±1,34 ^a	80,9±1,29 ^a	67,9±1,74 ^a	62,2±2,14 ^a	61,5±0,98 ^a
	10	13,96±0,96	100,2±1,35*	21,4 ±0,95 ^a	54,5±0,85 ^a	58,5±0,85 ^a	58,7±1,37 ^a	56,9±0,82 ^a	53,4±1,79 ^a	57,6±1,47 ^a
	25	13,96±0,96	100,2±1,35*	21,4 ±0,95 ^a	49,6±0,89 ^a	47,7±0,44 ^a	52,1±0,13 ^a	51,9±1,27 ^a	51,4±1,47 ^a	55,1±1,78 ^a
	100	13,96±0,96	100,2±1,35*	21,4 ±0,95 ^a	44,8±0,30 ^a	47,2±0,43 ^a	46,7±0,35 ^a	47,3±0,88 ^a	49,4±0,85 ^a	50,9±2,33 ^a
Níveis de TBARS (% AAPH)	1	18,38±1,84	99,90±1,32*	55,3 ±6,48 ^a	40,9±1,77 ^a	44,5±1,31 ^a	39,3±0,60 ^a	41,2±0,96 ^a	41,4±0,69 ^a	38,8±0,99 ^a
	5	18,38±1,84	99,90±1,32*	55,3 ±6,48 ^a	38,1±0,49 ^a	40,4±0,85 ^a	38,8±1,07 ^a	39,4±0,71 ^a	38,6±0,63 ^a	35,9±0,41 ^a
	10	18,38±1,84	99,90±1,32*	55,3 ±6,48 ^a	36,7±0,66 ^a	38,3±1,05 ^a	34,3±0,92 ^a	37,3±0,68 ^a	35,5±0,37 ^a	35,2±0,44 ^a
	25	18,38±1,84	99,90±1,32*	55,3 ±6,48 ^a	35,1±0,88 ^a	36,5±1,21 ^a	29,5±1,91 ^a	34,4±0,76 ^a	31,3±0,76 ^a	34,6±0,49 ^a
	100	18,38±1,84	99,90±1,32*	55,3 ±6,48 ^a	25,8±0,48 ^a	29,7±1,31 ^a	25,7±2,62 ^a	25,6±0,66 ^a	28,2±0,39 ^a	30,3±0,47 ^a

Dados numéricos foram submetidos ao programa Graph Pad Prism, versão 5.0 (GraphPad software Incorporated, San Diego, USA) * $p < 0.05$, comparado com o sistema (ANOVA e *t*-Student-Newman-Kewls como teste *post hoc*); ^a $p < 0.05$, comparado com o veículo (ANOVA e *t*-Student-Newman-Kewls como teste *post hoc*).¹ Tween 80 0.05% dissolvido em salina 0.9%. ² Trolox- 140 $\mu\text{g/mL}$.

As atividades antioxidantes *in vitro*, demonstradas nos testes das riparinas, podem ser exploradas para uma possível proteção *in vivo* de biomoléculas, contra danos causados pelos radicais livres. Compostos isolados de plantas medicinais estão sendo testados, por diversas metodologias, quanto a sua possível atividade antioxidante pelo potencial promissor de tal atividade biológica para bioprospecção de fármacos para o tratamento de doenças como

Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, doença de Huntington e alguns tipos de neoplasias. As propriedades antioxidantes têm se tornado um importante objeto de estudo para compostos naturais e/ou sintéticos (REED, 2011), como é o caso das riparinas.

Nesta busca por substâncias com atividades antioxidantes, estudos de triagem vêm sendo realizados em série, para avaliar este potencial em compostos isolados de plantas medicinais, em pesquisa realizada em 2007 com extrato etanólico de cinco plantas medicinais do semiárido piauiense (*Terminalia brasiliensis* Camb., *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc., *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire, *Qualea grandiflora* Mart. e *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore), foi verificado que à exceção da *C. prunifera*, as demais espécies não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no potencial como fontes de substâncias seqüestradoras de radicais livres, nem mesmo com relação aos controles positivos (SOUSA et al, 2007).

Triagens em série para atividade antioxidante refletem a inquietude dos pesquisadores em busca de compostos isolados de plantas medicinais que apresentem essa propriedade e fortalecem a importância da identificação de compostos naturais e/ou sintéticos com esses potenciais que devem ser explorados. As Riparinas, além de sua disponibilidade, pela viabilidade da síntese, demonstraram nos testes realizados essa promissora bioatividade.

Os resultados permitiram ainda calcular a concentração efetiva 50% (CE_{50}) em $\mu\text{L/mL}$ para cada uma das riparinas (Rip A-F) avaliadas, em cada um dos diferentes testes, sugerindo o potencial antioxidante dessas substâncias *in vitro*, conforme apresentado nas **Tabelas 4 e 5**.

Tabela 4. CE_{50} do potencial antioxidante “in vitro” das Riparinas A, B e C na produção de TBARS, remoção de radical hidroxila (OH) e formação do íon nitrito.

Riparinas	Riparina A			Riparina B			Riparina C		
Parametrs	Radical OH	Nitrito	TBARS	Radical OH	Nitrito	TBARS	Radical OH	Nitrito	TBARS
CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	1,501	0,8404	1,147	28,13	4,296	7,093	22,15	3,687	5,502
IC	0,81- 2,77	0,41- 1,69	0,59- 2,20	0,80-2,09	0,25-1,01	0,44-1,25	0,49- 2,20	0,17- 0,95	0,29-1,18
r^2	0,84	0,80	0,83	0,50	0,68	0,64	0,33	0,67	0,60

Legenda: CE_{50} : Concentração efetiva 50% em $\mu\text{g/mL}$, IC: Intervalo de confiança em $\mu\text{g/mL}$, r^2 : coeficiente de determinação.

Dados numéricos foram submetidos ao programa Graph Pad Prism program, versão 5.0 (GraphPad software Incorporated, San Diego, USA).

Tabela 5. CE₅₀ do potencial antioxidante “in vitro” das Riparinas D, E e F na produção de TBARS, remoção de radical hidroxila (OH) e formação do íon nitrito.

Riparins	Riparin D			Riparin E			Riparin F		
	Radical OH	Nitrito	TBARS	Radical OH	Nitrito	TBARS	Radical OH	Nitrito	TBARS
CE ₅₀ (µg/mL)	1,358	1,270	0,9958	10,60	1,878	5,307	9,593	2,021	2,554
IC	0,68- 2,71	0,69- 2,31	0,55- 1,80	0,51- 1,5	0,12-0,67	0,28-1,16	0,45-1,51	0,09- 0,70	0,082-0,89
r ²	0,81	0,85	0,85	0,54	0,69	0,60	0,52	0,68	0,58

Legenda: CE₅₀: Concentração efetiva 50% em µg/mL, IC: Intervalo de confiança em µg/mL, r²: coeficiente de determinação.

Dados numéricos foram submetidos ao programa Graph Pad Prism program, versão 5.0 (GraphPad software Incorporated, San Diego, USA).

Cálculos de CE₅₀ permitem comparar atividade antioxidante de cada substância por teste realizado, pois representam a concentração necessária de um ativo para que este exerça a atividade em questão sobre metade das amostras. Esse tipo de pesquisa vem divulgando a atividade antioxidante de compostos isolados de plantas medicinais, como em estudo desenvolvido em 2009, para avaliar a ação antioxidante de uma variedade de chás e condimentos mais consumidos no Brasil, averiguando atividade sequestradora de radicais livres DPPH em solução metanólica (MORAIS, et al, 2009).

Todas as amostras de Riparinas analisadas demonstraram atividade em suas diferentes concentrações, o que se assemelha aos resultados dos testes desenvolvidos no estudo mencionado, em que o chá de *Camelia sinensis* (não fermentada) foi o mais ativo com CE₅₀ = 0,14 mg/mL, tendo como principais compostos antioxidantes as epigalocatequinas e os condimentos mais ativos foram *Cinnamomum zeylanicum* (CE₅₀ = 0,37 mg/mL), *Eugenia aromatica* Baill (CE₅₀ = 0,46 mg/mL) e *Laurus nobilis* (CE₅₀ = 0,76 mg/mL), cujo principal antioxidante relatado foi o eugenol, um composto fenólico cuja eficácia já foi comprovada tanto “in vitro” como “in vivo” (ITO; MURAKAMI; YOSHINO, 2005). A semelhança dos resultados reforça a importância de aprofundar os testes *in vitro* e realizar os testes *in vivo* com as riparinas para bioprospecção de produtos farmacológicos que promovam a proteção de desordens celulares resultantes do estresse oxidativo. Além dessa avaliação inicial quanto ao potencial antioxidante foi realizada a investigação do potencial citotóxico.

Tornando as riparinas ainda mais promissoras, apresenta-se na **Tabela 6** o percentual de inibição do crescimento celular (IC%) em duas linhagens tumorais HT29 (*Human colon*

adenocarcinoma grade II cell line) e HEP-2 (*human epipharynx carcinoma target cells*), promovidos por essas substâncias quando testadas na concentração de 25 µg/mL.

Tabela 6. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em duas linhagens tumorais testadas na concentração de 25 µg/mL.

Riparinas	HT29		HEP-2	
	% inibição	Desvio	% inibição	Desvio
Riparina A	22,06	13,2	50,9	2,7
Riparina B	15,8	2,0	33,0	2,7
Riparina C	72,5	6,7	94,3	1,6
Riparina D	73,2	4,4	96,3	2,4
Riparina E	94,6	0,5	100,7	0,3
Riparina F	86,0	0,1	95,9	0,8

As amostras das riparinas com os respectivos (%) de inibição do crescimento celular para HEP-2: riparina C (94,3% ± 1,6); riparina D (96,3% ± 2,4); riparina E (100,7% ± 0,3) and riparina F (95,9% ± 0,8) demonstraram ser bastante ativas, uma vez que na escala de intensidade utilizada para avaliar a atividade de inibição do crescimento celular apresentaram percentual de inibição superior a 70%, enquanto as riparinas A (50,9% ± 2,7) e B (33,0% ± 2,7) apresentaram pouca ou nenhuma atividade de inibição.

A IC₅₀, apresentada na **Tabela 6**, representa a concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo. A Riparina F foi citotóxica em todas as linhagens de células tumorais testadas. As riparinas C, D e E também apresentaram nas linhagens HT29 e HEP-2 inibição do crescimento celular, sugerindo um potencial antitumoral a essas substâncias.

As pesquisas de avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral de substâncias derivadas de produtos naturais tem sido expressiva. *Tabernaemontana catharinensis* A. é uma planta medicinal que assim como a *A. riparia*, produz alcalóides, dentre estes destacam-se as heyneanine, coronaridina e voacangina, que tiveram sua atividade citotóxica testada em linhagens de células tumorais humanas, dentre elas a Hep-2. A Coronaridina foi a que exibiu maior atividade citotóxica na linhagem de carcinoma da laringe Hep-2 (IC₅₀ = 54,47 µg/mL) frente aos outros alcalóides testados (voacangina IC₅₀ = 159,33 µg/mL, e heyneanine IC₅₀ = 689,45 µg/mL) (RIZO et al., 2013). A inibição de crescimento celular por estes alcalóides, como pode ser observado, foi induzida em concentração bem mais elevadas do que as que podem observadas na **Tabela 6** obtidas com as riparinas. O estudo mencionado reforça o

mérito e a necessidade da investigação da coronaridina como um possível agente antitumoral, nesse contexto, as riparinas tornam-se ainda mais promissoras.

Testes dessa natureza foram desenvolvidos com as riparinas I, II e III sobre a citotoxicidade dessas alcamidas, em fibroblastos L929 e em macrófagos J774. Pode ser verificado, para ambas as linhagens celulares, que o período de 24 horas de incubação foi suficiente para causar os efeitos em função da concentração nos ensaios de redução do sal de tetrazólio (MTT), captação do vermelho neutro (CVN) e medida do conteúdo de ácidos nucléicos totais (CAN). Em todos os testes a riparina III foi a mais citotóxica. Não foram observadas alterações morfológicas capazes de sugerir apoptose ou necrose. Além disso, foi verificado que as alcamidas não promoveram perda da integridade da membrana celular, fragmentação do DNA e nem causaram parada em nenhuma das fases do ciclo celular. Dessa forma, pode ser sugerido que as riparinas I, II e III apresentam uma baixa toxicidade *in vitro* (SILVEIRA, 2007).

Para análise do potencial citotóxico das riparinas A-F foram realizados, ainda, testes para determinar o percentual de liberação de LDH. A medida do percentual de liberação de LDH é utilizado como parâmetro para avaliar o dano celular ou tecidual. A tabela 7 fornece os resultados obtidos pelas riparinas quando testadas na concentração de 25 µg/mL.

Tabela 7. Percentagem da liberação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH) na concentração de 25 µg/mL

Amostras	LDH	
	% Liberação	Desvio
Controle Negativo	3.13	0.68
Riparina A	28.13	3.02 ^a
Riparina B	17.31	1.71 ^a
Riparina C	87.35	2.37 ^a
Riparina D	83.12	1.04 ^a
Riparina E	96.91	0.15 ^a
Riparina F	91.01	0.19 ^a
Triton X-100 1%	99.96	1.21 ^a

Dados numéricos foram submetidos ao programa Graph Pad Prism program, versão 5.0 (GraphPad software Incorporated, San Diego, USA) ^ap<0.05, comparado ao controle negativo (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

Semelhante ao resultado obtido no ensaio de viabilidade celular através de MTT, nos ensaios de LDH as riparinas C; D; E; F apresentaram citotoxicidade para macrófagos RAW 264.7 e tiveram sua percentagem de liberação específica de LDH bastante similar ao observado no controle positivo (Triton X-100 1%), inclusive as riparinas A e B, que

mantiveram um percentual de liberação mais distante do obtido com o controle positivo foi estatisticamente significativo quando comparados as células controle negativo ($p < 0,05$).

A associação entre os testes de citotoxicidade e de atividade antioxidante são aplicáveis na busca por compostos com atividade biológica antitumoral. Estudo realizado para avaliar a atividade antitumoral do garcinol e seus dois produtos de reação (GDPPH-1 e GDPPH 2) sobre a indução de apoptose em células de linhagens tumorais da leucemia humana HL-60, foram analisados juntamente aos testes para averiguação da inibição da geração de óxido nítrico, dos efeitos sobre a atividade de MMP (correlacionadas com potencial de metástase) e os efeitos inibitórios antioxidantes (SANG et al, 2001). O interesse pela mutualidade desta pesquisa está relacionado a funcionalidade destas atividades no sistema biológico.

As células epiteliais normais exigem fixação de matriz para a sobrevivência, já as células tumorais para sobreviver fora da sua matriz extracelular (ECM) natural é dependente da formação de nichos de aquisição de matriz, e só se tornará realmente fora de controle orgânico quando adquirir a capacidade de degradar a matriz extracelular, sob o efeito da produção de enzimas proteolíticas, e de liberar fatores angiogênicos. Os fatores angiogênicos promoverão a vascularização da massa tumoral suprindo-a de oxigênio e nutrientes, indispensáveis a seu posterior crescimento (SCHAFER et al, 2009).

Embora a apoptose seja o mais rápido mecanismo para a eliminação de células sem fixação ECM adequada, relatórios recentes sugerem que processos não apoptóticos de morte, evitam a sobrevivência quando a apoptose é inibida na matriz de privação celular, sugerindo que a privação de matriz pode limitar o acesso de glicose durante a tumorigênese, e revela estratégias em que um tumor poderia escapar do estresse metabólico, devido a essas condições, estimulando o transporte de glicose e ou eliminando espécies reativas derivadas do oxigênio (SCHAFER et al, 2009). Tornando forte a relação entre a atividade antioxidante e a antitumoral.

O alto percentual de atividade citotóxica das riparinas A-F pode ser claramente expresso pela análise colorimétrica baseada na conversão do MTT, necessitando, porém, que o mecanismo de ação seja elucidado, bem como esclarecer o que desencadeou a inibição do crescimento celular por meio de novos testes.

4.2 Testes antiesquistossoma

A esquistossomose mansônica é uma enfermidade frequente nas regiões tropicais, inclusive no Brasil, no qual abrange 16 estados distribuídos principalmente nas regiões nordeste, sudeste e centro-oeste. A evolução dessa doença pode variar desde formas assintomáticas até as extremamente graves. As principais drogas disponíveis para a população para tratar a esquistossomose são o praziquantel e oxamniquina (BRASIL, 2005). Entretanto, devido ao desenvolvimento de resistência a esses medicamentos o tratamento dessa doença por essa via nem sempre é eficaz (COELHO et al., 1997; ISMAIL et al., 1999). Assim, pelas razões expostas, pesquisou-se o efeito *in vitro* das riparinas contra vermes adultos de *S. mansoni* para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Os resultados obtidos nos experimentos *in vitro* com as riparinas são demonstrados nas tabelas a seguir, referentes ao efeito letal sobre os vermes, redução de atividade motora e alteração tegumentar em termos percentuais e relativos a um período de incubação com observações realizadas nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 h. No geral, não foram observadas diferenças significativas na taxa de mortalidade entre machos e fêmeas, sugerindo que não há variações de mecanismo de ação das substâncias relativas ao gênero da espécie. Isso também foi observado em testes com acetato de carvacrolila (DE MORAES et al., 2013), porém há na literatura dados sobre a suscetibilidade maior de machos em relação a fêmeas em estudos com extrato de gengibre e com praziquantel (PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004; SANDERSON et al., 2012).

Foi observada uma variação dose/tempo dependente para todas as riparinas testadas. Nas primeiras 24 h as riparinas B (200 µg/mL), riparina C (dose de 300 µg/mL), riparina E (dose de 50 µg/mL), riparina F (dose de 100 µg/mL) e riparina III (dose de 100 µg/mL) apresentaram a máxima efetividade com morte, redução da atividade motora significativa e alteração tegumentar extensiva de 100% (percentagem relativa para os 20 vermes investigados). Outros estudos realizados acerca da suscetibilidade de *S. mansoni* frente a diversos compostos constataram que componentes de óleos essenciais, como o acetato de carvacrolila, causou 100% de morte nos vermes após 24 h quando expostos à dose de 25 µg/mL, já um peptídeo isolado da pele de sapo, dermaseptin 01 foi totalmente efetivo na dose de 100 µg/mL após 48 h. O piplartine, uma amida de origem vegetal provocou 100% de morte nos vermes nas primeiras 48 h na concentração de 12.6 µM e em 24 h na concentração de 15.8 µM, porém sem danos no tegumento. A partir de 315.1 µM há 100% de morte e de danos

morfológicos após 24 h. (DE MORAES, 2011; MORAES et al., 2011; DE MORAES et al., 2013).

A riparina B na dose de 25 µg/mL, a riparina E e a F na dose de 12,5 µg/mL mostraram efetividade máxima com morte de 100% dos vermes após 120 h de incubação. A riparina C na dose de 200 µg/mL e a III na dose de 25 µg/mL alcançaram os mesmos resultados após 96 h. As riparinas A, D e I não atingiram resultados de efetividade máxima com morte de 100% dos helmintos em nenhuma dose testada, independente do tempo de incubação.

A riparina I (**Tabela 8**) foi também testada nas concentrações de 125 µg/mL e 250 µg/mL, porém não apresentou nenhuma atividade de redução de atividade motora e/ou alteração tegumentar sobre os vermes de *S. mansoni*. Porém, a partir de 500 µg/mL induziu alterações na motilidade dos parasitas.

Tabela 8. Efeito *in vitro* da riparina I contra vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Período de incubação (h)	Morte dos vermes (%) ^a	Redução da atividade motora (%) ^a		Vermes com alteração tegumentar (%) ^a	
			Leve	Significativa	Parcial	Extensiva
Controle ^b 0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Praziquantel 5 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina I 500 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	30	0	30	0
	120	0	80	0	80	0
Riparina I 1000 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	30	0	10	0
	96	0	100	0	100	0
	120	60	0	100	40	60

^a Percentagens relativas para os 20 vermes investigados ^b Meio de cultura tecidual - Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640

A riparina III foi testada nas concentrações: 6,25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL e 100 µg/mL. A partir da dose de 12,5 µg/mL e 72h de incubação a riparina

III apresentou efeito deletério sobre o *S.mansoni*, tendo atingido sua efetividade máxima com morte de 100% dos vermes nas primeiras 24h de incubação na dose de 100 µg/mL (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito *in vitro* da riparina III contra vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Período de incubação (h)	Morte dos vermes (%) ^a	Redução da atividade motora (%) ^a		Vermes com alteração tegumentar (%) ^a	
			Leve	Significativa	Parcial	Extensiva
Controle ^b 0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Praziquantel 5 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina III 12,5 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	50	0	50	0
	96	0	100	0	100	0
	120	30	0	100	70	30
Riparina III 25 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	30	0	30	0
	72	20	80	20	80	20
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina III 50 µg/mL	24	0	10	0	0	0
	48	0	80	20	80	20
	72	60	40	60	40	60
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina III 100 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100

^a Percentagens relativas para os 20 vermes investigados

^b Meio de cultura tecidual - Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640

A riparina A não apresentou nenhuma atividade contra os vermes adultos de *S. mansoni* nas doses de 250 e 125 µg/mL, porém, discretas alterações puderam ser observadas

nas doses a partir de 500 µg/mL. O percentual máximo de mortes de vermes resultantes da incubação com riparina A foi de 40% e ocorreu na maior dose testada (1000 µg/mL) e após 120h de incubação (**Tabela 10**).

Tabela 10. Efeito *in vitro* da riparina A contra vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Período de incubação (h)	Morte dos vermes (%) ^a	Redução da atividade motora (%) ^a		Vermes com alteração tegumentar (%) ^a	
			Leve	Significativa	Parcial	Extensiva
Controle ^b 0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Praziquantel 5 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina A 500 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	20	0	0	0
	120	0	60	40	0	0
Riparina A 1000 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	60	20	0	60
	120	40	0	100	0	80

^a Percentagens relativas para os 20 vermes investigados

^b Meio de cultura tecidual - Roswell Park Memorial Institute (*RPMI*) 1640

A riparina B, apresentou efeito deletério sobre o verme em todas as doses testadas já nas primeiras 24h de incubação. Exibiu potencial de letalidade aos vermes testados na dose de 25 µg/mL após 120h de incubação e este potencial aumentou numa proporção tempo/dose dependente. Na dose de 200 µg/mL teve efetividade máxima já nas primeiras 24h de incubação, resultando na morte de 100% dos vermes incubados (**Tabela 11**).

Tabela 11. Efeito *in vitro* da riparina B contra vermes adultos de *S.mansoni*.

Grupos	Período de incubação (h)	Morte dos vermes (%) ^a	Redução da atividade motora (%) ^a		Vermes com alteração tegumentar (%) ^a	
			Leve	Significativa	Parcial	Extensiva
Controle ^b 0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Praziquantel 5 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina B 12,5 µg/mL	24	0	20	0	0	0
	48	0	80	0	20	0
	72	0	100	0	50	0
	96	0	0	100	100	0
	120	0	0	100	100	0
Riparina B 25 µg/mL	24	0	40	0	100	0
	48	0	100	0	100	0
	72	0	20	80	100	0
	96	0	0	100	60	40
	120	100	0	100	0	100
Riparina B 50 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	40	0	40	0
	72	0	0	100	0	100
	96	80	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina B 100 µg/mL	24	0	80	20	0	20
	48	60	0	100	0	80
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina B 200 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100

^a Percentagens relativas para os 20 vermes investigados

^b Meio de cultura tecidual - Roswell Park Memorial Institute (*RPMI*) 1640

A riparina C produziu letalidade, ainda que em baixo percentual (10%), a partir da dose de 50 µg/mL, atingindo efetividade máxima na dose de 200 µg/mL a partir de 96h de incubação (**Tabela 12**).

Tabela 12. Efeito *in vitro* da riparina C contra vermes adultos de *S.mansoni*.

Grupos	Período de incubação (h)	Morte dos vermes (%) ^a	Redução da atividade motora (%) ^a		Vermes com alteração tegumentar (%) ^a	
			Leve	Significativa	Parcial	Extensiva
Controle ^b 0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Praziquantel 5 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina C 25 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	40	0	40	0
	96	0	100	0	100	0
	120	0	100	0	100	0
Riparina C 50 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	90	10	50	0
	72	0	80	20	100	0
	96	0	40	60	100	0
	120	10	0	100	80	20
Riparina C 100 µg/mL	24	0	80	0	40	0
	48	0	30	70	60	20
	72	0	0	100	80	20
	96	0	0	100	30	70
	120	40	0	100	0	100
Riparina C 200 µg/mL	24	0	100	0	100	0
	48	0	100	0	70	30
	72	20	0	40	60	40
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina C 300 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100

^a Percentagens relativas para os 20 vermes investigados

^b Meio de cultura tecidual - Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640

A riparina D não foi letal aos vermes de *S. mansoni* em nenhuma das doses testadas, porém provocou redução da atividade motora e alteração tegumentar numa intensidade dose/tempo dependente a partir da concentração de 250 µg/mL (**Tabela 13**),

demonstrando um potencial deletério sobre o *S. mansoni*, que pode ter sua ação potencializada com associações.

Tabela 13. Efeito *in vitro* da riparina D contra vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Período de incubação (h)	Morte dos vermes (%) ^a	Redução da atividade motora (%) ^a		Vermes com alteração tegumentar (%) ^a	
			Leve	Significativa	Parcial	Extensiva
Controle ^b 0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Praziquantel 5 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina D 250 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	30	0	0	0
	120	0	70	0	70	0
Riparina D 500 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	10	0	0	0
	96	0	100	0	60	0
	120	0	90	10	100	0
Riparina D 1000 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	30	30	60	0
	96	0	50	50	100	0
	120	0	0	100	100	0

^a Percentagens relativas para os 20 vermes investigados

^b Meio de cultura tecidual - Roswell Park Memorial Institute (*RPMI*) 1640

A riparina E e F foram bastante efetivas e provocaram a morte de 100% dos vermes já na dose de 12,5 µg/mL, após 120h de incubação. Com a riparina E na concentração de 50 µg/mL a efetividade máxima foi obtida já nas primeiras 24h de incubação (**Tabela 14**), enquanto que com a riparina F, o mesmo resultado foi obtido na dose de 100 µg/mL (**Tabela 15**).

A correlação entre a atividade antioxidante e a ação sobre o verme também foi significativa tanto para riparina E ($r^2 = 0,977$; $p < 0,023$), quanto para a F ($r^2 = 0,976$; $p < 0,004$),

permitindo mais uma vez associar os efeitos antioxidante *in vitro* das riparinas contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), radical hidroxila e produção de óxido nítrico ao seu efeito contra vermes adultos de *S. mansoni*.

Tabela 14. Efeito *in vitro* da riparina E contra vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Período de incubação (h)	Morte dos vermes (%) ^a	Redução da atividade motora (%) ^a		Vermes com alteração tegumentar (%) ^a	
			Leve	Significativa	Parcial	Extensiva
Controle ^b 0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Praziquantel 5 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina E 12,5 µg/mL	24	0	80	0	0	0
	48	0	100	0	20	0
	72	0	0	100	90	10
	96	40	0	100	0	40
	120	100	0	100	0	100
Riparina E 25 µg/mL	24	0	100	0	80	0
	48	0	0	100	70	30
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina E 50 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina E 100 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100

^a Percentagens relativas para os 20 vermes investigados

^b Meio de cultura tecidual - Roswell Park Memorial Institute (*RPMI*) 1640

Tabela 15. Efeito *in vitro* da riparina F contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Grupos	Período de incubação (h)	Morte dos vermes (%) ^a	Redução da atividade motora (%) ^a		Vermes com alteração tegumentar (%) ^a	
			Leve	Significativa	Parcial	Extensiva
Controle ^b 0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Praziquantel 5 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina F 6,25 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	20	0	20	0
	120	0	60	0	60	0
Riparina F 12,5 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	100	0	90	10
	96	10	40	60	20	80
	120	100	0	100	0	100
Riparina F 25 µg/mL	24	0	30	0	0	0
	48	0	20	80	50	20
	72	40	0	100	40	60
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina F 50 µg/mL	24	0	40	0	40	0
	48	0	100	0	100	0
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Riparina F 100 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100

^a Percentagens relativas para os 20 vermes investigados

^b Meio de cultura tecidual - Roswell Park Memorial Institute (*RPMI*) 1640

Além do efeito letal nos parasitas, comparativamente aos vermes controles incubados apenas em meio de cultura, as riparinas causaram alterações morfológicas no tegumento dos parasitas. Comparativamente a vermes controles incubados apenas em meio

RPMI, notou-se danos nos tubérculos dos helmintos, diretamente dependentes da concentração dos compostos, sobretudo com as riparinas III, B, C, E e F.

O efeito dos compostos metálicos no tegumento dos adultos de *Schistosoma mansoni* foi diariamente monitorado em microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência (ver tabelas). Entretanto, por microscopia de luz, a observação morfológica do tegumento dos parasitas não permite avaliar as alterações de forma detalhada. Nesse contexto, a fim de que seja realizada uma análise mais detalhada sobre o efeito dos compostos no tegumento de *S. mansoni*, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados com um microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510 META, Zeiss). Comparativamente a vermes controles incubados apenas em meio RPMI, notou-se danos nos tubérculos dos helmintos, diretamente dependentes da concentração dos compostos, sobretudo com as riparinas III, B, C, E e F (**Figuras 1 a 5**). Desta forma, os resultados deste estudo com *S. mansoni* mostraram que riparinas III, B, C, E e F reduziram a motilidade e causaram a morte dos parasitas com alterações morfológicas no tegumento, cujos efeitos são diretamente dependentes da concentração e do tempo de incubação. No geral, a morte dos parasitas está estreitamente associada às lesões no tegumento dos helmintos.

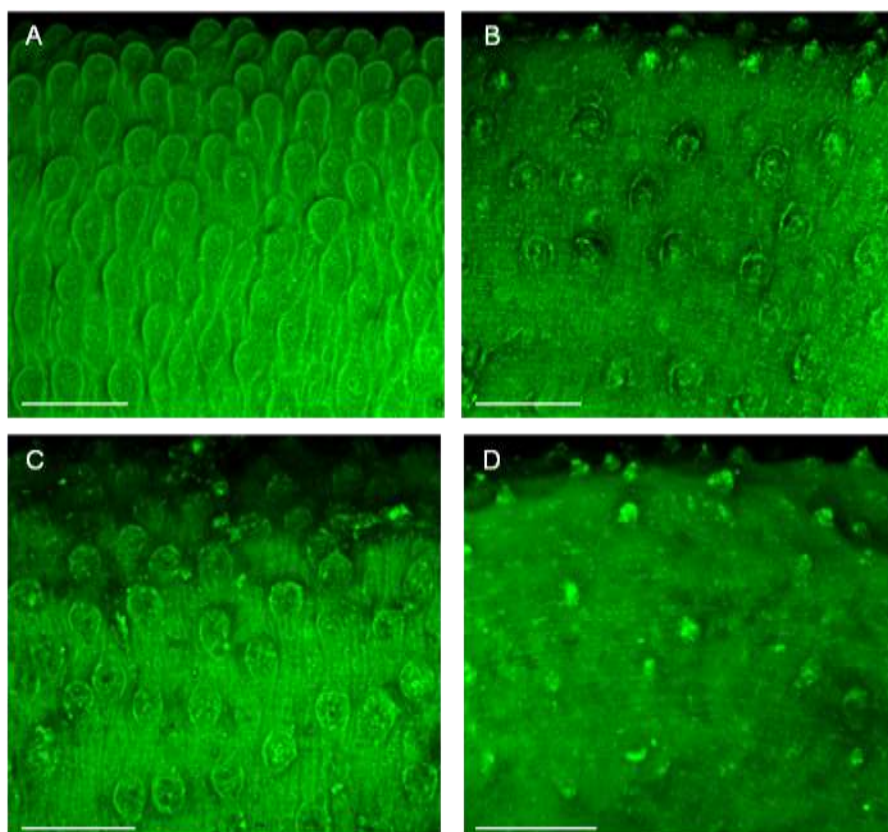


Figura 1 - Efeito da riparina III no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*. Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo riparina III em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados com microscópio confocal. **A**: controle negativo, sem adição de composto. **B**: controle positivo (praziquantel 5 µg/mL). **C**: riparina 25 µg/mL. **D**: riparina 100 µg/mL. **A-D**: Imagens tridimensionais. Barras = 50 µm.

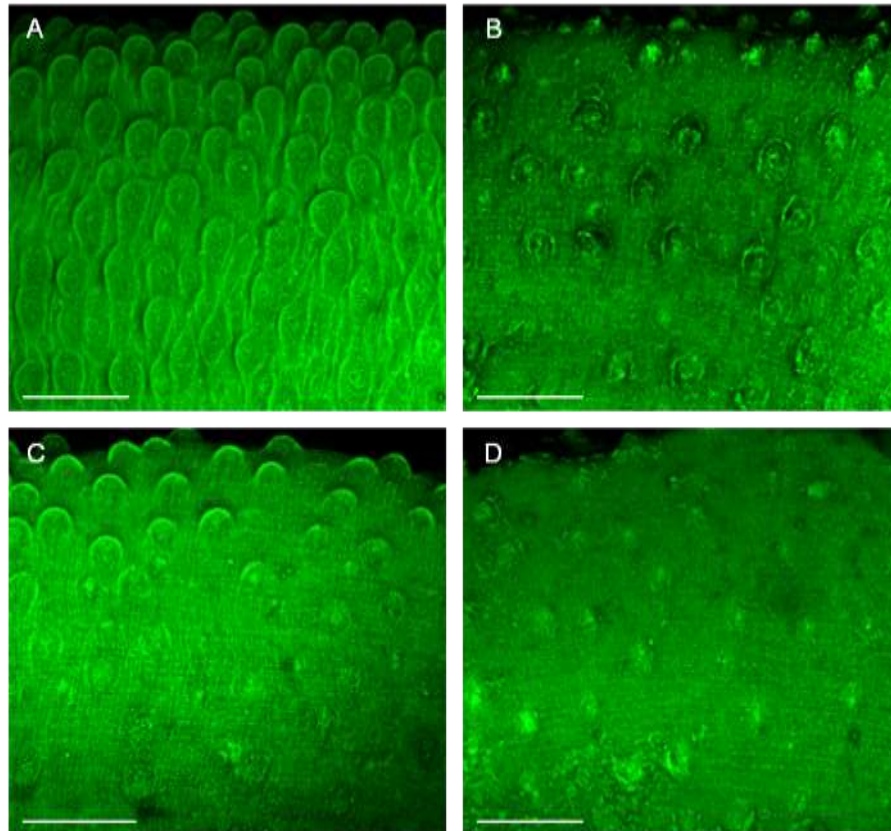


Figura 2 - Efeito da riparina B no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*. Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo riparina B em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados com microscópio confocal. **A**: controle negativo, sem adição de composto. **B**: controle positivo (praziquantel 5 µg/mL). **C**: Riparina 25 µg/mL. **D**: Riparina 100 µg/mL. **A-D**: Imagens tridimensionais. Barras = 50 µm.

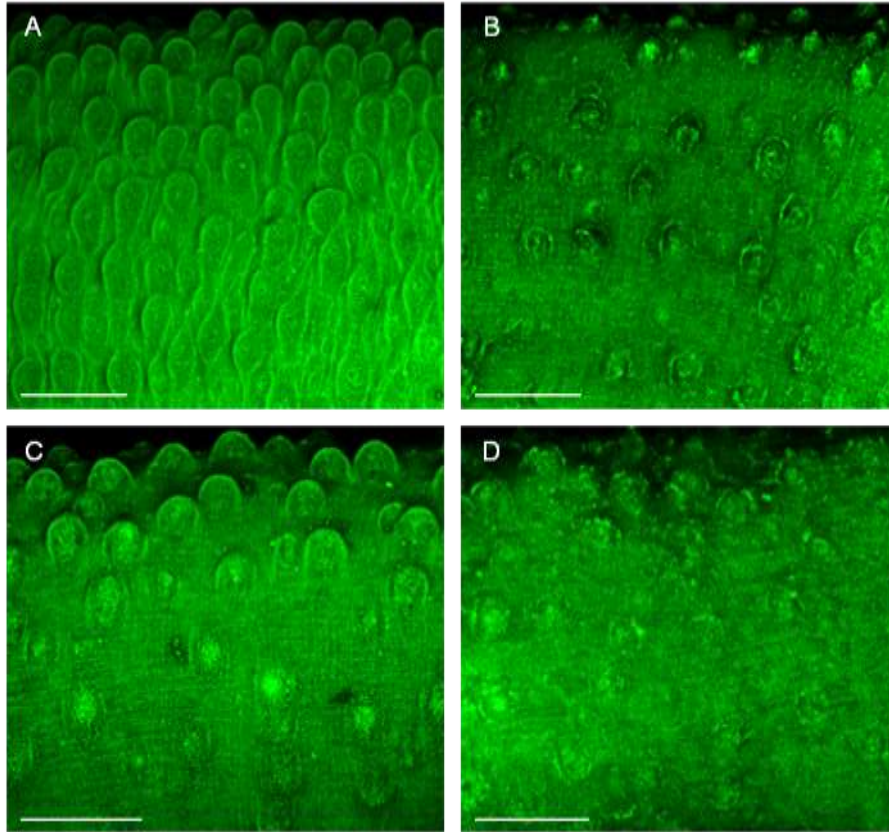


Figura 3 - Efeito da riparina C no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*. Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo riparina C em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados com microscópio confocal. **A**: controle negativo, sem adição de composto. **B**: controle positivo (praziquantel 5 µg/mL). **C**: riparina 200 µg/mL. **D**: riparina 300 µg/mL. **A-D**: Imagens tridimensionais. Barras = 50 µm.

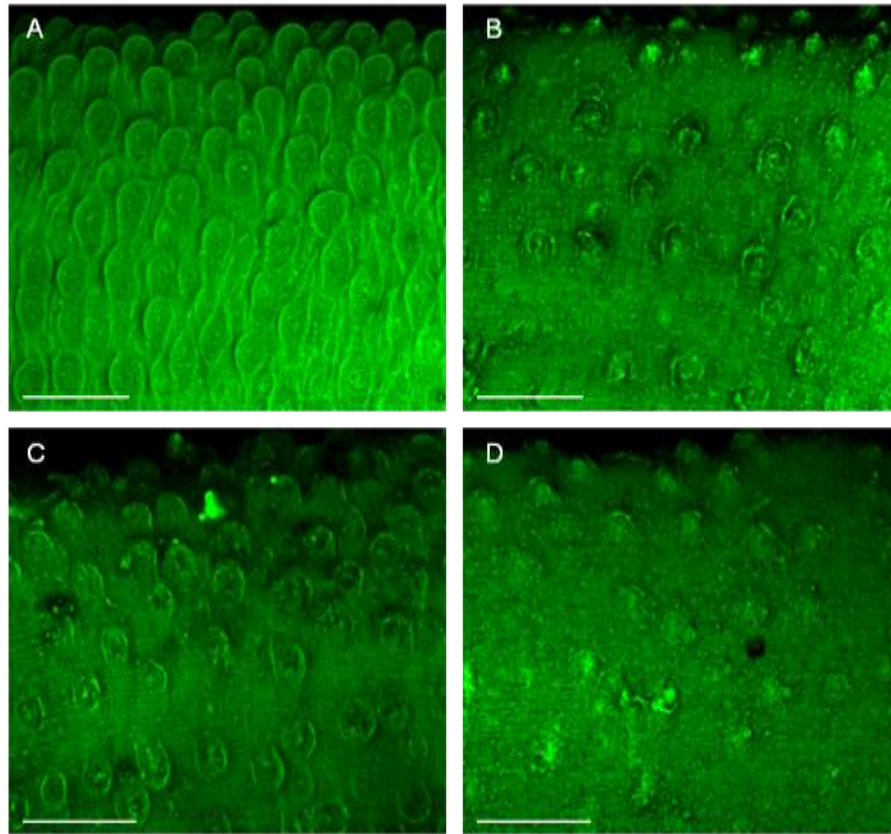


Figura 4. Efeito da riparina E no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*. Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo riparina E em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados com microscópio confocal. **A:** controle negativo, sem adição de composto. **B:** controle positivo (praziquantel 5 µg/mL). **C:** riparina 12,5 µg/mL. **D:** riparina 50 µg/mL. **A-D:** Imagens tridimensionais. Barras = 50 µm.

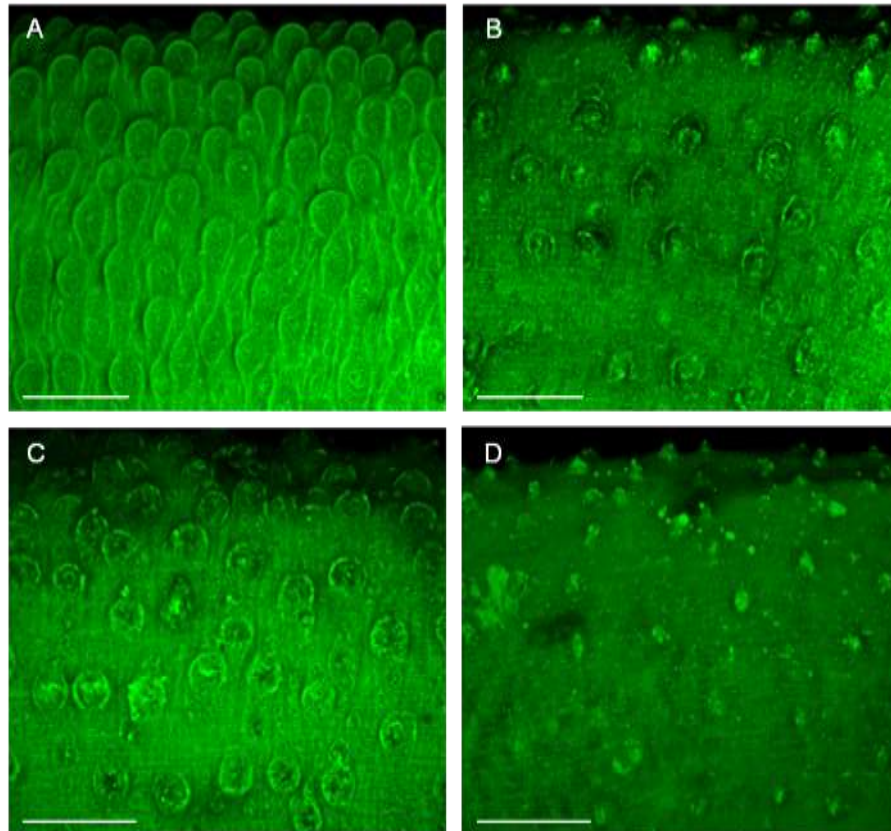


Figura 5 - Efeito da riparina F no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*. Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo riparina F em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados com microscópio confocal. **A**: controle negativo, sem adição de composto. **B**: controle positivo (praziquantel 5 µg/mL). **C**: riparina 12,5 µg/mL. **D**: riparina 50 µg/mL. **A-D**: Imagens tridimensionais. Barras = 50 µm.

O efeito da riparina na oviposição dos adultos de *S. mansoni* foi avaliado usando concentrações subletais das diferentes riparinas. A partir do monitoramento *in vitro* dos adultos acasalados de *S. mansoni*, pode ser observado que durante a incubação dos vermes adultos de *S. mansoni* com as Riparinas A e D o acasalamento de macho e fêmea foi mantido com a oviposição normal. Já com as Riparinas B e C a incubação manteve machos e fêmeas separados impedindo o acasalamento e consequentemente a oviposição. Por sua vez, a Riparina E, em doses mais altas >25µg/mL, os machos e fêmeas foram mantidos separados impedindo o acasalamento e consequentemente a oviposição normal. Nas concentrações subletais <12,5µg/mL os machos e fêmeas permaneceram ligados, porém houve redução da oviposição pelos sobreviventes (**Figura 6**). Com a riparina F nas concentrações subletais, os parasitas foram acoplados com normal oviposição. Somente a riparina E teve seus resultados expressos em gráfico uma vez que esta foi a riparina que apresentou melhores resultados quanto a oviposição.

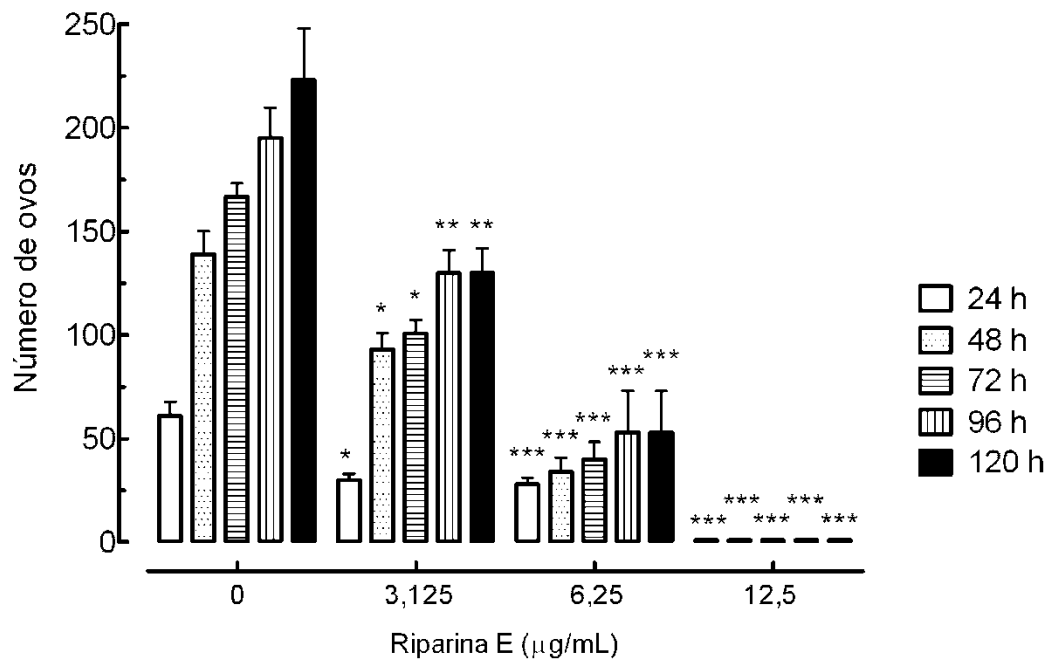


Figura 6 - Efeito da Riparina E sobre a oviposição de ovos de *S. mansoni*. Os valores estão representados pelas médias \pm desvio padrão (barras). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ comparado com o grupo sem tratamento.

A incubação com riparina I nas concentrações testadas, a partir de $250\mu\text{g/mL}$ a $1000\mu\text{g/mL}$ impediram o acasalamento e a oviposição adicional. Com a riparina III, a incubação na concentração de $6,25\mu\text{g/mL}$ ou mais, separou machos e fêmeas impedindo o acasalamento e oviposição.

Os resultados tornaram evidente que as riparinas A-F, especialmente as riparinas B, C, E e F, podem ser utilizadas como opção nas pesquisas de tratamento para esta doença negligenciada, por apresentar atividade anti-helmíntica satisfatória contra vermes adultos de *S. mansoni*, causando redução da oviposição e morte dos parasitas.

5. Conclusão

As riparinas testadas se mostraram efetivas nos testes de atividade realizados, principalmente as riparinas C, D, E e F nos testes de citotoxicidade e nos testes de atividade antioxidante, já as riparinas III, B, C, E e F foram efetivas contra o *S. mansoni*. Os resultados demonstram que as riparinas são promissoras para o desenvolvimento de um medicamento.

Referências

- BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R.; BARBOSA, R.C.S.B.C.; GIESBRECHT, A.M.; YOUNG, M.C.M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**. v. 26, n. 9, p. 2615-2617, 1987.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**. v. 20, p. 896-900, 2006.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**. v. 4, p. 14-19, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Portaria 116, de 08 de agosto de 1996**. Brasília: DOU, 1996; Seção I, p. 15198-15199
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed., p. 19-29. Brasília: Ministério da Saúde, 2005
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- CABRAL, M.M.O.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MAIA, G.L.A.; CHAVES, M.C.O.; BRAGA, M.V.; DE SOUZA, W.; SOARES, R.O.A. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**. v. 124, p. 319-324, 2010.
- CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L, (editores). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2008.
- CATÃO, R.M.R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 42, n. 1, p. 9-14, 2010.
- COY, E.D.; CUCA, L.E.; SEFKOW, M. COX, LOX and platelet aggregation inhibitory properties of Lauraceae neolignans. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 19, p. 6922-6925, 2009.
- COSTA, P.R.R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**. 2009,1, 1, 58.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; MIURA, L.M.; LEITE, J.R.; NAKANO, E.; KAWANO, T. Evaluation of the in vitro activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 548–558, 2011.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**. v. 186, p. 407-421, 1990.

FERNANDES, J.B.; GOTTHEB, O.R.; XAVIER, L.M. Chemosystematic implications of flavonoids in *Aniba riparia*. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 6, p.55-58, 1978.

FERNANDEZ, L.L.; FORNARI, L.H.T.; BARBOSA, M.V.; SCHRODER, N. Ferro e neurodegeneração. **Scientia Medica**. v. 17, n. 4, p. 218-224, 2007.

FINKEL, T; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v. 408, p. 239-247, 2000.

FLESCHEIN, S.; FLESCHEIN, M.; NITA, S.; PAVEL, E.; MAGEARU, V. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Roumanian Biotechnological Letters**. v. 5, p. 479-495, 2000.

FRANÇA, N.C.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T.; MENDES, P.H.; MAIA, J.G.S.; SILVA, M.L.; GOTTLIEB, H.E. Tri-o-methylgalangin from *Aniba riparia*. **Phytochemistry**. v. 15, p. 572-573, 1976

GASPAR, L. **Plantas Mediciniais**. Disponível em: <http://basilio.fundaj.gov.br/pesquisaescolar/index.php?option=com_content&id=627&Itemid=1>. Acesso em: Ago 2013.

GUTIERREZ, S.J.C. **Síntese do Bowdenol, um dihidrobenzofuranoide isolado de *Bowdichia virgilioides* e preparação de derivados da Riparina isolada de *Aniba riparia* com potencial atividade biológica**. 2007. 134f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). UFPB/CCS. João Pessoa, 2007

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**. v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. 23, 3, 418, 2004.

HOTEZ, P.J.; ENGELS, D.; FENWICK, A.; SAVIOLI L. Africa is desperate for praziquantel. **The Lancet Infectious Diseases**., v. 376, p. 496-498, 2010

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Indicadores Sociodemográficos e de Saúde no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. 152 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 94p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007.118 p.

ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food and Chemical Toxicology**. v. 43, p. 461-466, 2005.

LANTTO, T. A.; DORMAN, H.J. D.; SHIKOV, A. N.; POZHARITSKAYA, O. N.; MAKAROV, V.G.; TIKHONOV, V.P.; HILTUNEN, R.; RAASMAJA, A. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. **Food Chemistry**. v. 112, p. 936-946, 2009.

LEITE C. P. **Avaliação dos efeitos farmacológicos de (o-metil)-n-2-hidroxi-benzoil tiramina (riparina II) de *Aniba riparia* (nees) mez (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará: Fortaleza, CE, 2008

LOPES, G.K.; SCHULMAN, H.M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472,142-152, 1999

MALDONADO, O.S.; Lucas, R.; COMELLES, F.; GONZALEZ, M.J.; PARRA, J.L.; MEDINA, I; MORALES, J.C. Synthesis and characterization of phenolic antioxidants with surfactant properties: glucosyl- and glucuronosyl alkyl gallates. **Tetrahedron**. v. 67, p. 7268-7279, 2011.

MARQUES, C.A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**. v. 8, n.1, p.195, 2001.

MORAES, J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: Rodriguez-Morales AJ (ed) **Current Topics in Tropical Medicine**. Rijeka: Intech, p. 333–358, 2012.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P.O.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L.F.; KATO, M.J.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 357–364, 2011.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de farmacognosia**. v. 19, p. 315-320, 2009.

MORAES, J.; SILVA, M.P.; OHLWEILER, F.P.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v. 51, p. 77–82, 2009.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MUZITANO, M. F.; TINOCO, L. W.; GUETTE, C.; KAISER, C. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Assessment of antileishmanial activity of new and unusual flavonoids from *Kalanchoepinnata*. **Phytochemistry**. v. 67, p. 2071-2077, 2006.

O'CONNELL, D. Neglected diseases. **Nature**, v. 449, p. 157, 2007.

REED, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 51, 1302-1319, 2011.

RIZO, W.F.; FERREIRA, L.E.; COLNAGHI, V.; MARTINS, J.S.; FRANCHI, L.P.; TAKAHASHI, C.S.; BELEBONI, R.O.; MARINS, M.; PEREIRA, P.S.; FACHINET, A.L.. Cytotoxicity and genotoxicity of coronaridine from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC in a human laryngeal epithelial carcinoma cell line (Hep-2). **Genetics and Molecular Biology** [online]. v. 36, n. 1, 2013.

SANG, S.; PAN, M-H.; CHENG, X.; BAI, N.; STARK, R.E.; ROSEN, R.T.; LIN-SHIAU, S-Y.; LIN, J-K.; HO, C.T. Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol and their antitumor activities. **Tetrahedron**. v. 57, n. 50, p. 9931-9938, 2001.

SILVEIRA, A.L. **Toxicidade pré-clínica dos análogos das riparinas I, II e III utilizando modelos in vitro**. Dissertação (Mestrado). João Pessoa: UFPB/CCS, 2007.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T., BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J. The infection of laboratory hosts with Cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms. **Parasitology**, v. 55, p. 695–700, 1965.

SOUSA, C.M.M; SILVA, H.R.; VIEIRA JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; FÉLIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; BARBOSA FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008

SCHAFER, Z.T.; GRASSIAN, A.R.; SONG, L.; JIANG, Z.; GERHART-HINES, Z.; IRIE, H.I.; GAO, S.; PUIGSERVER, P.; BRUGGE, J.S. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. **Nature**. v. 461, p. 109-113, 2009.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation and aging. **Science**. v. 257, p. 1220-1224, 1992.

TAVARES, W.; MARINHO, L.A.C. **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2007

WIERNSPERGER, N.F. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. **Diabetes & Metabolism**. v. 29, n. 6, p. 579-585, 2003.