

Ao longo da história a busca por novos compostos farmacologicamente ativos mudou não  
apenas a qualidade de vida do homem como também sua concepção de mundo:  
de espíritos a moléculas  
da vontade divina a mecanismos de ação  
dos dogmas religiosos a paradigmas científicos  
da assinatura divina a grupos farmacofóricos

## **Capítulo 3**

### 3.1- Introdução

#### 3.1.1- Atividade Biológica e Metabólitos Secundários

O termo “Metabólitos Secundários” foi inicialmente cunhado para designar os compostos que não possuíam, aparentemente, nenhuma função relevante para os organismos que os produzem.

Porém, esse dispêndio “desnecessário” de recursos por parte dos produtores desses metabólitos contrariava o *Principe de La Moindre Action* ou Princípio da Mínima Ação enunciado por Pierre Louis Moreau de Maupertuis em 1744 (MOREIRA, 1999). Esse princípio, utilizado primordialmente para explicar a trajetória de um raio de luz refratado e, segundo o qual a natureza minimiza a todo custo o gasto de energia, isto é, não faz nada em vão, foi disseminado para outras áreas da física e posteriormente para outros campos do conhecimento como as ciências humanas, a biologia e química, tornando-se um dos grandes paradigmas do conhecimento humano (PORTAL PRANDIANO: MATEMÁTICA APLICADA À VIDA, 2005; ATTILA, 2002). Foi provavelmente apoiado nesse princípio que pesquisadores passaram a indagar sobre a razão da produção desses metabólitos secundários.

Assim, começaram a surgir as explicações que hoje conhecemos sobre a função desses metabólitos na natureza dentre as quais pode-se destacar:

- comunicação química: como é o caso da muscopiridina, alcalóide produzido pelo veado almiscareiro para demarcar território (MANN *et alii*, 1993);
- defesa: em decorrência do “sabor amargo” de certos compostos (como os alcalóides), tornando o seu produtor desagradável ao paladar dos predadores (MANN *et alii*, 1993);

- sinalização: como a tetrodotoxina, produzida por bactérias que vivem em simbiose nas vísceras do baiacú, que é expelida pela fêmea sobre os ovos com a finalidade de guiar o macho para a fecundação dos mesmos. A tetrodotoxina ainda acumula o papel de defesa, pois causa paralisia nos predadores desse peixe (UNIVERSITY OF BRISTOL, 2002).

De acordo com o conhecimento atual, esses mecanismos foram otimizados, ao longo do tempo, através de seleção natural.

Apesar do processo evolutivo implicar em mudanças, algumas moléculas como por exemplo DNA, sistemas enzimáticos (ex.:citocromo P450) e canais de  $\text{Na}^+$ , que permaneceram conservadas na natureza e que são comuns a todos os seres vivos. Como essas macromoléculas fazem parte dos sistemas que controlam a fisiologia dos organismos, inclusive em humanos, pode-se justificar de maneira racional a pesquisa de produtos naturais com atividade biológica não sendo necessário utilizar apenas a constatação fenomenológica.

### **3.1.1.1- Atividade Farmacológica dos Alcalóides**

A atividade farmacológica dos alcalóides se confunde com a própria história do homem. Ao longo dos anos foi acumulado grande conhecimento sobre esses compostos através de tentativa e erro, superstição, religião e por último, métodos científicos modernos como por exemplo o isolamento biomonitorado de alcalóides e QSAR.

Dentro dos exemplos mais famosos estão a atropina (antiespasmódico), morfina (analgésico opióide), cocaína (estimulante e anestésico local) tubocurarina (miorelaxante), colchicina (tratamento da gota), ajmalicina (antiarritmico) e a vimblastina, utilizada no tratamento do câncer (RANG *et alii*, 2001).

Como esses compostos apresentam não só estruturas distintas bem como atividades biológicas, é comum a atribuição de causa e efeito entre esses dois fatores. No entanto, na maioria dos casos a atividade farmacológica depende também da presença de um ou mais átomos de nitrogênio em sua molécula, que conferem um caráter anfifílico aos alcalóides que está intimamente relacionado com sua atividade farmacológica. Isso porque, quando sob a forma de base livre, o alcalóide possui caráter mais lipofílico do que sua forma protonada, facilitando a permeação por membranas biológicas. Porém, no meio intracelular desempenham sua atividade biológica quando estão na forma protonada (FARMACOLOGIA, 2005).

Para exemplificar essa dependência pode-se citar a cocaína e seus análogos sintéticos, utilizados como anestésicos locais. Em situações normais esses anestésicos são administrados em tecidos nos quais o pH do meio extracelular fará com que o alcalóide permaneça sob a forma de base livre, favorecendo assim a sua penetração para o interior do neurônio. No meio intracelular ocorre a protonação do anestésico, que se liga aos canais de sódio dependentes de voltagem, impedindo o influxo de íons  $\text{Na}^+$  e conseqüentemente bloqueando a condução do impulso elétrico pelo neurônio (FARMACOLOGIA, 2005; FRACETO *et alii*, 2004). Porém, em situações nas quais o tecido a ser anestesiado apresenta pH abaixo do normal (ex.: quadros inflamatórios) o alcalóide é protonado no meio extracelular levando a diminuição, ou até mesmo perda de sua atividade farmacológica (RANG *et alii*, 2001).

### 3.1.1.1.1- Os Alcalóides Indólicos

Assim como ocorre em relação aos aspectos estruturais, os alcalóides indólicos apresentam em termos de propriedades farmacológicas considerável diversidade, como pode ser visto através dos exemplos terapêuticos da Tabela 17.

Tabela 17 - Atividade farmacológica de alguns alcalóides indólicos (DEF 2002/03)

Alcalóide	Propriedade Farmacológica
Ergometrina	Estimulante da contração uterina
loimbina	Vasodilatador
Reserpina	Anti -hipertensivo
Vincristina	Antitumoral

Dessa maneira, o estudo dos alcalóides sempre teve um interesse ligado à suas propriedades farmacológicas (Figura 97).

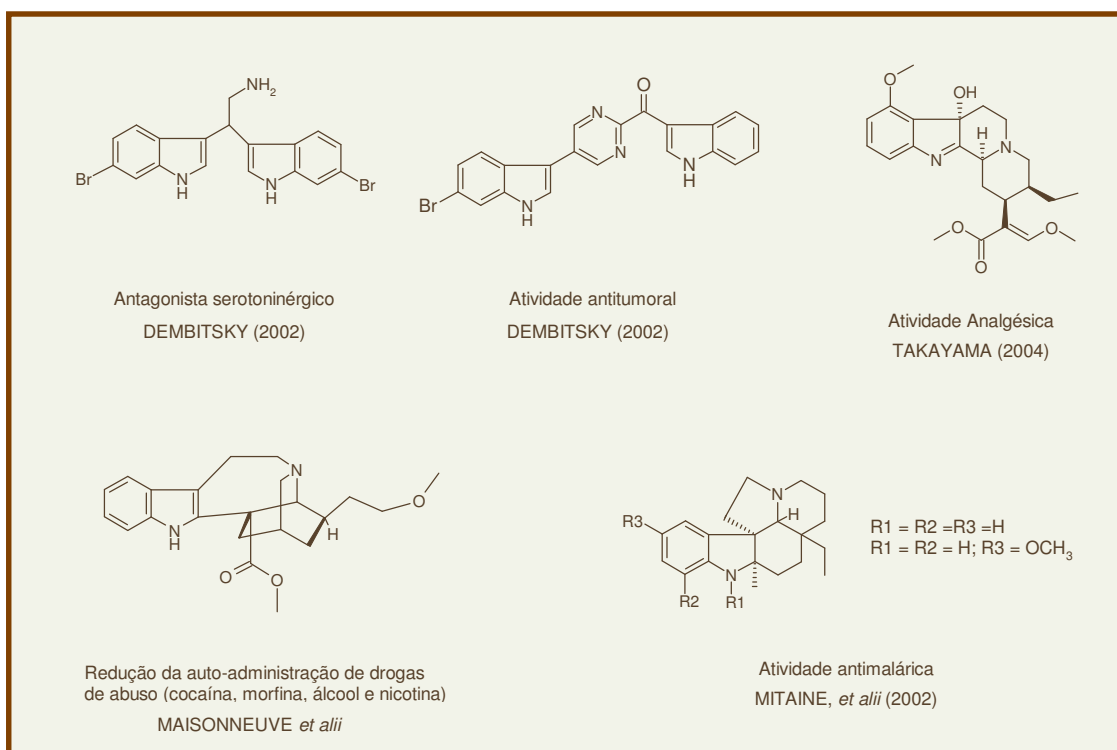


Figura 97 - Alcalóides indólicos e suas propriedades farmacológicas

Como descrito no capítulo anterior, o gênero *Aspidosperma* apresenta-se como uma importante fonte para essas substâncias. Assim, é de se esperar que se encontre exemplos de alcalóides biologicamente ativos obtidos de membros pertencentes a esse gênero, como por exemplo a ioimbina, obtida de *Aspidosperma quebracho-blanco* e *A. ramiflorum*, que apresenta atividade antagonista frente aos receptores adrenérgicos, sendo por isso utilizada no tratamento da impotência, (SPERLING *et alii*, 2002), a razinilama, identificado com o presente trabalho nas sementes e arilos de *A. tomentosum*, que exibe atividade antimitótica (MORITA *et alii*, 2005) e os análogos da aspidospermidina, isolados de *A. megalocarpon* e de *A. pyrifolium*, que exibem atividade antiplasmodica (A.-C. MITAINE-OFFER *et alii*, 2002).

Em relação às espécies estudadas, foram encontrados apenas dois relatos sobre a atividade farmacológica de seus alcalóides. FERREIRA *et alii* (2004) verificaram a atividade leishmanicida do extrato de alcalóides totais das cascas do tronco de *A. ramiflorum*, enquanto SILVA *et alii* (2005) relataram a atividade tripanomicida da uleína, presente no extrato de alcalóides totais do caule de *A. tomentosum*.

Diversos isômeros da ioimbina isoladas de outras espécies, também descritos em *A. ramiflorum*, foram analisados quanto a sua atividade leishmanicida (Staerk *et alii*, 2000).

Dentro desse contexto, foram analisados os extratos de alcalóides totais, suas frações, e também a mistura obtida com a degradação da quebrachamina, em relação à atividade antifúngica, antibacteriana e antitumoral.

### **3.2- Materiais e Métodos**

Os experimentos para avaliação de atividade antibacteriana e antitumoral dos extratos foram conduzidos pela Professora Doutora Ivana Suffredini, no Laboratório de Extração da Universidade Paulista (UNIP), dirigido pelo Doutor Dráusio Varela.

Já os ensaios antifúngicos foram realizados em colaboração com as Professora Doutora Márcia Melhem e a Doutora M. Valderez Szeszs, do setor de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL).

#### **3.2.1- Atividade Antibacteriana**

##### **3.2.1.1- Preparo das Amostras**

Os extratos de alcalóides foram diluídos em DMSO até a concentração de 4 mg/mL, sendo que essa solução foi diluída com água até que a concentração do extrato fosse de 2 mg/mL.

##### **3.2.1.2- Obtenção do Inóculo**

O inóculo foi feito com uma suspensão de concentração de 0,5 McFarland (ou  $10^8$  UFC/mL), preparado a partir de colônias bacterianas recém obtidas e diluídas a uma concentração de 300 UFC/mL (SUFFREDINI *et alii*, 2004). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Sau), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Ecol), e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Efae) foram as cepas de bactérias utilizadas. O inóculo bacteriano de cada cepa foi obtido de colônias frescas, cultivadas em placas de Petri em meio ágar Müeller Hinton. Inicialmente obteve-se a suspensão de bactérias em soro fisiológico até concentração de 5 McFarland, ou  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, sendo essa concentração conferida através da técnica de contagem bacteriana.

### 3.2.1.3- Ensaio Antibacteriano

Para o ensaio 190  $\mu\text{L}$  da suspensão de microrganismos, de concentração de 300 UFC/mL de meio, foram colocados em cada poço de uma microplaca. Em seguida, 10  $\mu\text{L}$  de solução de extrato foram adicionados aos poços, completando o volume para 200  $\mu\text{L}$ . As placas foram colocadas em incubadora a 35° C por 18 a 20 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Essa triagem inicial objetivou selecionar os extratos ativos em concentrações inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados foram analisados visualmente.

Os resultados são considerados relevantes quando o extrato tem capacidade de inibir o crescimento bacteriano em doses  $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ . A partir daí, os extratos selecionados, ou seja, os que não apresentaram crescimento, são submetidos a uma subcultura em meio Ágar Müller-Hinton (Oxoid<sup>®</sup>, Basingstoke, Hampshire, England), para que seja feita a avaliação do crescimento para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). As determinações de CIM e de CBM foram feitas utilizando-se concentrações de extratos que variaram segundo uma escala pré-determinada para cada caso, superiores e inferiores àquela na qual foi observado meio límpido (SUFFREDINI *et alii*, 2004).

Seguindo o mesmo critério de avaliação, considerou-se a CIM como aquela em cuja subcultura houve crescimento bacteriano, e CBM como aquela que não houve crescimento bacteriano na sub-cultura em Müller-Hinton agar (SUFFREDINI *et alii*, 2004).



### **3.2.2- Atividade Antifúngica**

#### **3.2.2.1- Preparo das Amostras**

Os extratos de alcalóides utilizados no experimento foram diluídos em DMSO até que fosse atingida concentração de 4 mg/mL. A solução obtida foi diluída com água até concentração final de 2 mg/mL. Por fim, essa solução sofreu diluição seriada, em DMSO:H<sub>2</sub>O (1:1), até as seguintes concentrações: 1000, 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL.

#### **3.2.2.2- Obtenção do Inóculo**

Inicialmente prepararam-se suspensões de microrganismos recém-repicados de concentração igual a 10<sup>6</sup> UFC/mL (0,5 McFarland) das seguintes leveduras: isolados de *Cryptococcus neoformans* resistente à fluconazol (32L/04 IAL e 299L/02 IAL) e 4 cepas de espécies de *Candida*: *C. albicans* (12-A ICB USP), *C. haemulonii* (32/04 IAL), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC22019). Para os testes feitos com os alcalóides totais de todos os materiais vegetais, exceto aqueles obtidos a partir dos arilos de *A. tomentosum*, fez-se a diluição do inóculo até concentração de 5 x 10<sup>2</sup> UFC/mL em meio RPMI 1640 conforme sugerido pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORIAL STANDARDS, 2002).

Devido ao baixo crescimento das cepas de *C. neoformans*, optou-se por fazer a diluição do inóculo em meio RPMI 1640 acrescido de 2% de glicose, para o ensaio antifúngico feito com os alcalóides isolados e também com o extrato de alcalóides totais dos arilos de *A. tomentosum*.

### **3.2.2.3- Ensaio Antifúngico**

Após diluição, adicionou-se 190 µL do inóculo diluído aos poços de microplacas. Em seguida, foram adicionadas 10 µL de cada uma das diluições do extrato de alcalóides e de suas frações aos poços das microplacas, que continham o inóculo, completando o volume para 200 µL. As placas foram incubadas a 35° C por 24 horas para as leveduras do gênero *Candida* e 48 horas para as duas espécies de *Cryptococcus*. Ao final desses períodos, fez-se a leitura das placas em leitor espectrofotométrico de microplacas. A diluição na qual a leitura foi igual a metade da observada para o controle negativo (constituído pelo inóculo nas mesmas condições, mas sem nenhum fator de inibição) foi considerada a Concentração Inibitória de 50% da população (CI<sub>50</sub>).

De acordo com o protocolo sugerido pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORIAL STANDARDS (2002) considera-se que uma substância é ativa quando a mesma apresenta  $CI_{50} \leq 64 \mu\text{g/mL}$ . Esse mesmo valor foi considerado para determinar a atividade dos extratos de alcalóides totais, já que a norma não contempla ensaio com misturas complexas como estas.

### **3.2.3- Atividade Antitumoral**

#### **3.2.3.1- Preparo das Amostras**

As amostras (extratos de alcalóides totais, alcalóides isolados e quebrachamina irradiada com luz UV) foram diluídas em DMSO até que fosse atingida a concentração de aproximadamente 80mg/mL, que foi em seguida diluída com água destilada até uma concentração próxima de 40mg/mL. As concentrações

dos extratos de alcalóides totais utilizados no ensaio serão descritas em conjunto com os resultados do ensaio.

### **3.2.3.2- Cultura Celular**

Linhagens de células tumorais humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e carcinoma de próstata (PC-3) foram cultivadas em frascos de cultura de tecidos (Coastar), com meio RPMI-1640 acrescido de 5 % de soro fetal bovino (ambos Biowhitaker) e 1 % de L-glutamina (Sigma). Os frascos foram mantidos em incubadora (Forma) a 37<sup>o</sup> C com 5 % de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade relativa. Ao término do período de incubação, fez-se a determinação da concentração celular, que foi posteriormente ajustada através de diluição com o próprio meio de cultura, àquela utilizada no ensaio, ou seja, 10.000 células/mL para MCF-7 e 7.500 células/mL para PC-3. Para tanto, fez-se a contagem das células em câmara de Neubauer de acordo com o método de exclusão por azul de trypan.

### **3.2.3.3- Determinação da Atividade Antitumoral**

As células foram inicialmente pré-incubadas a 37<sup>o</sup> C em meio RPMI-1640 acrescido de 5 % de soro fetal bovino (ambos Biowhitaker) e 1 % de L-glutamina (Sigma) por um período de 24 horas.

Ao final desse período, fez-se a adição de 10 µL da solução H<sub>2</sub>O:DMSO (1:1) contendo a amostra a ser ensaiada em 3990 µL de cada uma das suspensões celulares (MCF-7 e PC-3), sendo a concentração final da amostra de aproximadamente 100 µg/mL. A suspensão resultante foi incubada a 37 °C por um

período de 48 horas ao final das quais, fez-se a leitura dos resultados de acordo com a metodologia descrita a seguir.

As células viáveis foram fixadas em placas de 96 poços com solução de ácido tricloroacético 50% (80% para célula não aderente) mantida em contato com as células por uma hora, sob refrigeração. As microplacas foram lavadas 5 vezes com água corrente até remoção completa das células não fixadas. As placas foram mantidas ao ar por 24 horas, para secarem. A solução de sulfo-rodamina B (SRB, se liga a proteínas de células viáveis) 0,4% em ácido acético 1% foi adicionada às células, que foram coradas. O excesso de SRB foi retirado com solução de ácido acético (1%). Após a remoção do excesso, as placas foram novamente expostas ao ar para secarem. O corante foi então ressuspensão com tampão Tris e a placa lida em leitor espectrofotométrico de placas (Biotech) em 515 nm, no qual as atividades ópticas foram obtidas. A porcentagem de inibição (%IC) foi obtida a partir da fórmula:

$$\%IC = \left[ \frac{(T - T_0)}{(C - C_0)} \right] \times 100$$

sendo:

T e T<sub>0</sub>: os valores de transmitância final e inicial, respectivamente, e

C e C<sub>0</sub>: as concentrações celulares final e inicial, respectivamente.

Foram consideradas ativos os extratos ou compostos que, na concentração de 100 µg/mL, apresentam inibição maior ou igual a 90% (MONKS *et alii*, 1991).

Devido a problemas de solubilidade de todas amostras, estas foram ensaiadas em concentração que era cerca de três vezes inferior ao usual para esse teste.

### 3.3- Resultados e Discussão

#### 3.3.1- Atividade Antibacteriana

O resultado da determinação do CBM e do MIC para os extratos de alcalóides totais é mostrado na Tabela 18.

Tabela 18 - Determinação de CIM e CBM dos extratos de alcalóides totais de *A. tomentosum* e de *A. ramiflorum*

		Microorganismo			
Planta	Material vegetal	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)		<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	
		CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>A. tomentosum</i>	Folhas	250	250	200	750
	Ramos	>250	>250	>250	>250
	Sementes	>250	>250	>250	>250
	Arilos	>250	>250	>250	>250
<i>A. ramiflorum</i>	Pericarpo	>250	>250	>250	>250
	Arilos	>250	>250	>250	>250

Pela Tabela 18 vemos que o extrato de alcalóides totais de folhas de *A. tomentosum* foi o que apresentou resultado (200  $\mu\text{g/mL}$ ) mais próximo daquele considerado como possivelmente ativo (100  $\mu\text{g/mL}$ ), frente a *E. faecalis*. Assim, podemos concluir que nenhum dos extratos de alcalóides que apresentou potencial antibacteriano considerado relevante para a pesquisa de novos compostos a serem utilizados na quimioterapia de infecções bacterianas.

### 3.3.2- Atividade Antifúngica

Os resultados do ensaio antifúngico realizado com os extratos de alcalóides totais de *A. tomentosum* e *A. ramiflorum* estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19 - Atividade antifúngica dos extratos de alcalóides de *A. tomentosum* e *A. ramiflorum*

Espécie	Parte Utilizada	IC <sub>50</sub> (µg/mL)					
		<i>Cryptococcus</i>		<i>Candida</i>			
		<i>C. neoformans</i> *	<i>C. neoformans</i> **	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>A. ramiflorum</i>	Arilos	0,1	0,1	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>A. tomentosum</i>	Ramos	0,1	0,1	>1000	>1000	>1000	>1000
	Folhas	0,1	0,1	>1000	>1000	10	10
	Sementes	0,1	0,1	>1000	>1000	>1000	>1000
	Arilos	1	1	>1000	>1000	>1000	>1000

*C. neoformans*\* (32L/04 IAL); *C. neoformans*\*\* (299L/02 IAL); *C. albicans* (12-A ICB USP); *C. haemulonii* (32/04 IAL); *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC22019).

Todos os extratos de alcalóides totais foram ativos frente aos dois isolados clínicos de *C. neoformans*, isto é, CI<sub>50</sub> ≤ 64 µg/mL (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORIAL STANDARDS, 2002). Este resultado apresenta relevância, uma vez que esses isolados são resistentes ao fluconazol, que é um dos principais fármacos utilizados no combate das infecções causadas por essas leveduras.

Constata-se também que o extrato de alcalóides de folhas, além da atividade contra *C. neoformans*, apresentou atividade específica para duas espécies de *Candida* (*C. krusei* e *C. parapsilosis*).

Como os extratos de alcalóides totais de ramos e de folhas de *A. tomentosum* são constituídos basicamente por uleína e que o apenas o extrato de alcalóides das folhas ativo frente às cepas de *Candida*, admitiu-se que essa atividade (vista para

*Candida*) não poderia ser atribuída a uleína, pois do contrário, deveria ser observada também para o extrato de alcalóides de ramos.

A partir dessas informações, fez-se um novo ensaio utilizando os alcalóides majoritários e também a quebrachamina submetida à luz UV (Queb trans) para determinar se estes compostos apresentavam atividade frente a *C. neoformans* e ainda para confirmar a ausência de atividade da uleína contra as cepas de *Candida* sensíveis ao extrato de alcalóides das folhas de *A. tomentosum*. Os resultados desse ensaio são mostrados na Tabela 20.

Tabela 20 - Atividade antifúngica dos alcalóides de *A. tomentosum* e *A. ramiflorum*

		IC <sub>50</sub> (µg / mL)					
		<i>Cryptococcus</i>			<i>Candida</i>		
Espécie	Alcalóide	<i>C. neoformans</i> *	<i>C. neoformans</i> **	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>A. ramiflorum</i>	loimbina	0,1	0,1	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>A. tomentosum</i>	Uleína	0,1	0,1	>1000	>1000	>1000	>1000
	Queb	0,1	1	>1000	>1000	>1000	>1000
	Queb trans	0,1	1	>1000	>1000	>1000	>1000

*C. neoformans*\* (32L/04 IAL); *C. neoformans*\*\* (299L/02 IAL); *C. albicans* (12-A ICB USP); *C. haemulonii* (32/04 IAL);

*C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC22019).

Queb= quebrachamina; Queb trans: quebrachamina srrradiada com luz UV

Pelos resultados da Tabela 20 pode-se concluir que, de fato, os alcalóides majoritários são os responsáveis pela atividade observada contra os dois isolados clínicos de *C. neoformans*.

Embora os valores de CI<sub>50</sub> e de CIM representem medidas diferentes, pode-se ter uma idéia da ordem de grandeza dos resultados mostrados na Tabela 20, comparando com aqueles obtidos por OKUNADE *et alii* (1995), que determinaram a CIM da berberina, isolada de *Xanthorhiza simplicissima* (*Apocynaceae*), frente a *C.*

*neoformans*. Os autores observaram, para essa levedura, que a CIM de berberina era de 1,56 µg/mL. Além disso, esse alcalóide mostrou-se ativo frente a *Candida albicans* e *Mycobacterium intracellulare*, apresentando CIM de, respectivamente, 0,39 e 1,56 µg/mL.

Assim, tem-se que os valores de  $CI_{50}$  descritos na Tabela 20 apresentam a mesma ordem de grandeza do que aqueles descritos na literatura (OKUNADE *et alii*, 1994). Pode-se também concluir que a quebrachamina, a ioimbina e a uleína apresentam atividade antifúngica mais específica do que a berberina, já que esses alcalóides foram ativos contra uma única espécie de levedura.

Como a fração correspondente à uleína, que é o composto majoritário do extrato de alcalóides totais das folhas de *A. tomentosum*, apresentou-se ativo apenas em relação ao gênero *Cryptococcus*, conclui-se que a inibição do crescimento das duas espécies de *Candida* observado para o extrato de alcalóides totais é causada por algum dos alcalóides presentes em menor concentração nesse extrato ou ainda que seja decorrente de um sinergismo entre dois ou mais de seus componentes. Esse dado mostra que o alcalóide (ou grupo de alcalóides) presente no extrato das folhas de *A. tomentosum* é mais ativo do que a berberina (OKUNADE *et alii*, 1994).

Levando em consideração o rendimento obtido na extração dos alcalóides das sementes de *A. tomentosum* e pericarpos de *A. ramiflorum*, e a atividade antifúngica específica para as linhagens de *C. neoformans* resistentes à fluconazol, observada para os alcalóides majoritários obtidos a partir desses extratos, conclui-se que todos os materiais vegetais estudados são fontes para compostos com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.



### 3.3.3- Atividade Antitumoral

A Tabela 21 apresenta os resultados dos ensaios antitumorais dos extratos de alcalóides totais das duas espécies em questão.

Tabela 21 - Atividade antitumoral dos extratos de alcalóides totais de *A. tomentosum* e de *A. ramiflorum*

Espécie	Origem do Extrato de Alcalóides Totais	Concentração Final (µg/mL)	Porcentagem de Inibição de Crescimento	
			*MCF-7	**PC-3
<i>A. tomentosum</i>	Folhas	37,5	60	53
	Ramos	38,3	80	89
	Sementes	35,8	0	0
	Arilos	37,5	81,2	77,6
<i>A. ramiflorum</i>	Pericarpos	35,8	50	63
	Arilos	37,5	0	0

MCF-7: Linhagem Celular de Câncer de Mama; \*\*PC-3: Linhagem Celular de Câncer de Próstata

Vemos pela Tabela 21 que todos os extratos de alcalóides totais, com exceção daqueles obtidos das sementes de *A. tomentosum* e dos arilos de *A. ramiflorum*, inibiram o crescimento das duas linhagens celulares utilizadas no ensaio, mesmo sendo utilizada uma concentração equivalente a cerca de um terço daquela padronizada pelo ensaio. Porém como a relação dose/resposta nem sempre é linear, não se pode afirmar que na concentração de 100 µg/mL a inibição seria maior do que a obtida.

Assim, pode-se dizer apenas que o extrato de alcalóides totais dos ramos e dos arilos de *A. tomentosum* foram os que apresentaram próxima de 90%, valor utilizado como ponto de corte em ensaios de triagem.

Em relação aos alcalóides de *A. ramiflorum* temos que apesar dos dois extratos de alcalóides totais, serem compostos basicamente por  $\beta$ -ioimbina, aquele obtido das sementes apresentou atividade antitumoral enquanto o dos arilos não. Uma explicação plausível para essa observação é de que o composto ativo presente nas sementes está ausente nos arilos ou em concentração abaixo da necessária para que seja manifestada a atividade, descartando assim a possibilidade da atividade observada ser proveniente da  $\beta$ -ioimbina.

Esse mesmo raciocínio pode ser aplicado na comparação entre as atividades dos extratos de alcalóides totais das sementes e arilos de *A. tomentosum*. Sabendo que os alcalóides totais desses dois materiais vegetais apresentam quebrachamina em alta quantidade e que foi observada atividade antitumoral apenas para os alcalóides dos arilos, podemos inferir que este alcalóide (quebrachamina) não é responsável pela atividade pois do contrário, observa-se-ia atividade para os extratos de alcalóides originados tanto a partir das sementes quanto dos arilos.

Em relação a atividade observada para folhas e ramos de *A. tomentosum* encontramos uma situação contrária às anteriores, isto é, ambos os extratos apresentaram atividade antitumoral e também possuem um alcalóide majoritário (uleína) ao qual, diante dos resultados obtidos, poderia ser o responsável pela atividade dos extratos de alcalóides estudados.

Para confirmar tal atribuição e a ausência de atividade da quebrachamina e da  $\beta$ -ioimbina realizou-se um novo ensaio, seguindo a mesma metodologia utilizada no ensaio anterior, desta vez com os alcalóides isolados e também com a quebrachamina exposta à luz UV. Os valores obtidos no ensaio são mostrados na Tabela 22.

Tabela 22 - Atividade antitumoral dos alcalóides de *A. tomentosum* e de *A. ramiflorum*

Porcentagem de Inibição de Crescimento						
Linhagem Celular						
Espécie	Material Vegetal	Alcalóide (s)	Concentração Final ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Final ( $\mu\text{mol/L}$ )	*MCF-7	**PC-3
<i>A. tomentosum</i>	Ramos	Uleína	37,5	140	0	0
	Sementes	Quebrachamina	37,5	133	0	0
		Queb trans*	37,5	nd	0	0
<i>A. ramiflorum</i>	Sementes	Ioimbina	37,5	106	0	0

\*MCF-7: Linhagem Celular de Câncer de Mama; \*\*PC-3: Linhagem Celular de Câncer de Próstata

\*Quebrachamina exposta à luz UV; nd: não determinado

Pelos resultados apresentados na Tabela 22 vemos que na concentração utilizada no ensaio (128  $\mu\text{mol/L}$  em média), nenhum dos alcalóides majoritários apresentou atividade antitumoral, quando analisados isoladamente. Para o caso específico da  $\beta$ -ioimbina, corrobora o estudo feito STÆRK *et alii* (2000), no qual não foi observada atividade antitumoral importante de isômeros de ioimbina.

A exemplo do que foi feito para a atividade antifúngica, far-se-á aqui a comparação entre as ordem de grandeza dos resultados obtidos no ensaio antitumoral e dos dados da literatura. LEWIN *et alii* (1995) obtiveram para a aspidospermidina e também análogos desta uma  $CI_{50}$  entre 0,7 e 150  $\mu\text{mol/L}$ . Já DAVID *et alii* (1997) descreveram a  $CI_{50}$  da razinilama como sendo igual a 0,5  $\mu\text{mol/L}$ ; essa atividade citotóxica também a aparece descrita nos trabalhos de MORITA *et alii* (2005).

A partir desses resultados pode-se construir a seguinte linha de raciocínio: como os extratos de alcalóides totais apresentaram atividade apesar da inatividade de seus constituintes majoritários, pode-se atribuir a inibição do crescimento celular

daqueles (extratos) a um ou mais alcalóides minoritários, sendo que nesse último caso ter-se-ia a ocorrência de sinergismo. Além disso, pode-se inferir que independente do número de compostos que apresentem atividade, esta deve ser pronunciada, uma vez que a proporção dos compostos minoritários nos extratos é baixa e também porque a concentração do extrato de alcalóides totais utilizada apresentou resultado positivo, mesmo sendo o ensaio conduzido com quantidade aproximadamente três vezes menor do que a preconizada pelo teste.

Outro dado interessante é que, apesar de apresentarem perfis alcaloídicos semelhantes, os pericarpos de *A. ramiflorum* apresentaram atividade antitumoral enquanto os arilos mostraram-se inativos, sendo o caso oposto, ou seja, alcalóides de arilos ativos e de sementes inativas, observado para *A. tomentosum*.

Para o caso dos alcalóides de *A. ramiflorum*, a explicação mais plausível é a de que o perfil dos alcalóides minoritários dos pericarpos seja diferente daquele presente nos arilos; logo, a atividade do primeiro pode ser atribuída a um alcalóide ou grupo de alcalóide que exista apenas nas sementes ou que esteja nos arilos numa concentração tal que não seja possível a observação da atividade do mesmo.

Já em relação à diferença de atividade observada para as sementes e arilos de *A. tomentosum* há duas possíveis explicações. Na primeira delas, a atividade do extrato seria causada por sinergismo entre alcalóides que estão ausentes ou em concentrações baixas no extrato de sementes. A outra possibilidade é de que a quebrachamina, presente em altas concentrações no extrato das sementes, inibiu a ação da razinilama através de antagonismo.

Infelizmente, dada a dificuldade de isolamento da razinilama em quantidades suficientes para a realização de ensaios capazes de determinar a origem desse resultado aparentemente discrepante, não foi possível se chegar a uma conclusão definitiva.

Os resultados obtidos com os ensaios feitos com a uleína também foram satisfatórios. Apesar disso, faz-se uma ressalva em relação a atividade tripanomocida desse alcalóide descrita por SILVA *et alii* (2005). Assim, seria interessante no futuro um estudo da uleína que contemplasse por exemplo avaliação de sua citotoxicidade em células humanas normais para se que possa conhecer mais a respeito de seu potencial farmacológico.

Assim, ao analisarmos os resultados de uma forma geral, temos que se por um lado os extratos de alcalóides não apresentaram atividade antibacteriana significativa, verificou-se que os alcalóides ioimbina, quebrachamina e uleína apresentaram atividade antifúngica específica frente à *C. neoformans* resistentes à fluconazol e também que o extrato de alcalóides das folhas de *A. tomentosum* apresenta um alcalóide (ou grupo de alcalóides) que possui interessante atividade frente à duas espécies de *Candida*. Por último, chegou-se a conclusão de que a atividade antitumoral verificada para os extratos de alcalóides totais das folhas, ramos e arilos de *A. tomentosum* e dos pericarpos de *A. ramiflorum* estavam relacionada aos alcalóides minoritários presentes em cada um desses extratos.

Dessa forma, pode-se dizer que a atividade antifúngica, pelo menos em relação à *C. neoformans*, está relacionada aos constituintes majoritários dos extratos de alcalóides totais enquanto a atividade antitumoral é um atributo dos componentes minoritários daqueles.

Conclui-se a partir desses resultados que a atividade farmacológica dos alcalóides presentes nas duas espécies estudadas é específica e além disso, alta, quando comparada com resultados obtidos por outros grupos de pesquisa; assim, tem-se que as duas espécies estudadas constituem fontes de moléculas que são modelos em potencial para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos e antitumorais.