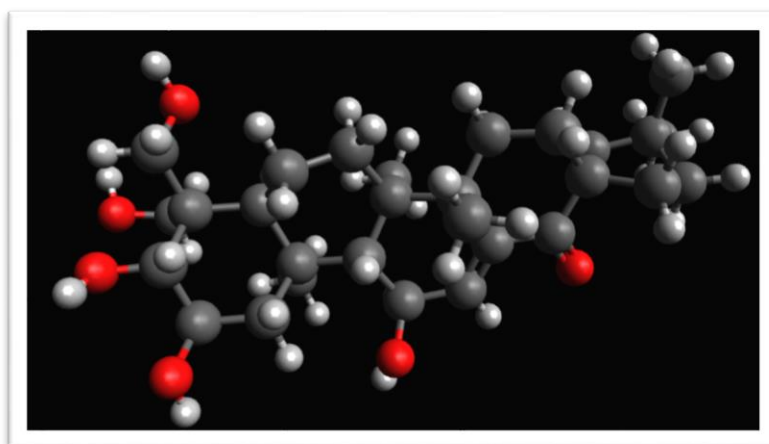


Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia

Isolamento e purificação do nortriterpeno phlomispurpentaolone a partir de raízes de *Phlomis purpurea* e determinação da sua atividade citotóxica nas linhas celulares HeLa e L929



Rúben Filipe Corvo Teixeira

Monografia

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor Alfredo Cravador

2015



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia

Isolamento e purificação do nortriterpeno phlomispurpentaolone a partir de raízes de *Phlomis purpurea* e determinação da sua atividade citotóxica nas linhas celulares HeLa e L929

Rúben Filipe Corvo Teixeira

Monografia

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor Alfredo Cravador

2015

Isolamento e purificação do norriterpeno phlomispurpentaolone a partir de raízes de *Phlomis purpurea* e determinação da sua atividade citotóxica nas linhas celulares HeLa e L929

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Rúben Filipe Corvo Teixeira)

Copyright© de Rúben Filipe Corvo Teixeira

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória

À minha família e amigos

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
Mas não esqueço de que minha vida
É a maior empresa do mundo...
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história...
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
Um oásis no recôndito da sua alma...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta...

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Após uma longa caminhada de cinco anos chega finalmente a hora de assinalar, oficialmente, os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles, que direta ou indiretamente, estiverem envolvidos nesta minha jornada académica.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Alfredo Cravador, não só pela confiança depositada em mim para a realização deste árduo projeto de investigação, como também por todos os conselhos e apoio prestados ao longo do decorrer da investigação. Não esquecendo também a importante ajuda na revisão desta tese.

Os meus sinceros agradecimentos à Professora Doutora Maria da Conceição Mateus, pela sua disponibilidade em ajudar-me em passos cruciais do projeto, nomeadamente, na realização de HPLC e na preparação da coluna cromatográfica, e também pelos esclarecimentos de dúvidas pontuais que iam surgindo.

À Professora Doutora Ana Lourenço, do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pela ajuda na determinação da rotação ótica de phlomispurpentaolone.

À Doutora Otília Vieira, do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, pela cedência das linhas de células tumorais HeLa e L929, utilizadas na presente investigação.

À Doutora Raquel Frade do Departamento de Química Farmacêutica e Terapêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pela sua disponibilidade e ajuda na realização dos ensaios de citotoxicidade.

A toda a equipa de investigação do Professor Doutor Alfredo Cravador, nomeadamente, a Cristiana Maia, Dina Neves e Marília Horta Jung, que me acompanharam na fase inicial do projeto e que me introduziram, de certa forma, na equipa.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento prestado, no âmbito do projeto PTDC/AGR-CFL/100217/2008.

À Dr.^a Rosário Lopes e à Eng.^a Catarina Pires do Gabinete Técnico do Departamento de Química e Física (DQF), pela sua paciência e disponibilidade, aquando das minhas regulares visitas a pedir para consultar a calendarização das aulas práticas e a solicitar reagentes e outros materiais laboratoriais (por vezes, até já ligeiramente fora dos seus horários de trabalho).

À Professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano e à sua equipa de investigação – Doutor Pedro Horta, Doutora Lília Cabral e Doutor Amin Ismael – pela oportunidade que me proporcionaram de poder contribuir para um projeto de investigação e de ver “*in loco*” como é trabalhar em equipa num projeto real e concreto. Tiveram um papel crucial, não só na minha aprendizagem na vertente da síntese química, como também no despontar do interesse pela área de investigação química, que constitui também ela uma possível saída profissional para os farmacêuticos, e que por vezes, cai no esquecimento.

Às auxiliares de apoio aos laboratórios – D. Eugénia, D. Luzia Alves e D. Maria João - pela simpatia e prontidão na resolução dos meus pedidos.

À Universidade do Algarve, em geral, e aos docentes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, em particular, por todo o conhecimento transmitido e apoio prestado, que permitiram aos poucos criar uma boa bagagem para ultrapassar os constantes desafios dos estágios curriculares.

Por último, mas não menos importante, um enorme OBRIGADO a todos os meus familiares, particularmente aos meus pais e avós, que sempre trabalharam afincadamente para me assegurar uma educação e futuro que nunca tiveram; que sempre me apoiaram nos bons e nos maus momentos; que sempre me ensinaram a lutar para atingir os meus objetivos, sem nunca desistir; pela pessoa que sou hoje e à pequena grande e humilde família a que pertenço!

Aos meus colegas de turma – André Simões, Bárbara Gonçalves, Bruna Paulino, Catarina Almeida, Catarina Sardinha, Daniela Peres, Diana Leal, Isa Barros, Inês Voyce, João Guarino, Jorge Pontes, Liliana Silva, Patrícia Amado, Patrícia Santos, Rita Martins, Wilson Veterano – que tive o privilégio de conhecer; com a grande maioria deles partilhei cinco longos anos repletos de momentos e aventuras que nem o mais puro etanol da famosa Rua do Crime conseguirá apagar. Vocês serão sempre a minha segunda família e como tal, cada um de vós merece, à sua maneira, um espaço neste capítulo.

À minha namorada, um agradecimento especial, não só por me ter aturado nestes últimos anos e por me ter apoiado sempre que precisei, como também pela indispensável e importante companhia durante as longas e intermináveis noites no laboratório, a realizar colunas cromatográficas.

Ao Núcleo de Estudantes de Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve (NECiFarm) pelos enormes desafios proporcionados ao longo dos três mandatos, dos quais fiz parte, e que me enriqueceram não só a nível pessoal como também a nível profissional. Apesar das centenas de horas dedicadas a um núcleo reconhecido pela sua imensa proatividade e ambição de representar e ajudar, na formação de qualidade - os alunos do curso de MICF da UAlg - o retorno para mim, em termos de competências desenvolvidas, foi de uma ordem de grandeza superior: trabalho em equipa, espírito de sacrifício, gestão de tempo e de stress, liderança, comunicação, estruturação e organização de eventos científicos, são apenas alguns exemplos de competências desenvolvidas neste caminho que foi o associativismo.

Resumo

O cancro constitui, atualmente, uma das principais preocupações em saúde, não só ao nível do incremento do arsenal terapêutico antineoplásico disponível, através da incansável procura de fármacos mais potentes e eficazes, como também ao nível socioeconómico, na tentativa de fazer chegar essas terapêuticas a todos os doentes oncológicos.

Ao longo dos séculos, as plantas revelaram-se preciosas fontes de novas moléculas, que estruturalmente modificadas no laboratório, ou não, resultaram por vezes na descoberta de novos e potentes fármacos.

Estudos recentes em espécies vegetais do género *Phlomis*, mostraram que produzem numerosos nortriterpenos, alguns com propriedades antiproliferativas. A marioila (*Phlomis purpurea* L) é uma herbácea, da família das *Lamiaceae*, existente no Sul de Portugal e de onde se pode extrair phlomispurpentaolone, um nortriterpeno pouco caracterizado farmacologicamente, até à data.

Neste trabalho, foi extraído, isolado e purificado phlomispurpentaolone a partir das raízes secundárias de *P. purpurea*. Foi determinada a atividade ótica deste nortriterpeno, para a qual foi registado um valor de +3.77, a $\lambda = 589.3$ nm.

Foram, também, realizados ensaios de citotoxicidade em duas linhas de células tumorais – HeLa e L929 – com o intuito de avaliar uma possível atividade antineoplásica daquele composto. Para a determinação da concentração inibitória média (IC₅₀) das células HeLa, foi utilizado o método *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, com posterior leitura das absorvâncias a 570 nm. Recorrendo ao software Graphpad, foi traçada a curva de toxicidade de phlomispurpentaolone e foi verificado que o valor de IC₅₀ relativo às células HeLa era de 22.63 ± 1.07 μ M. A partir do ensaio preliminar foi estimado um valor de IC₅₀, nas células L929, compreendido entre 50 e 100 μ M.

Em relação às células HeLa, o resultado obtido é toxicologicamente promissor, na medida em que é legítimo perspetivar uma potencialização da sua atividade

antiproliferativa otimizando a sua purificação e a modificação controlada da sua estrutura química.

Palavras-chave: *Phlomis purpurea*, phlomispurpentaolone, atividade ótica, ação antineoplásica, HeLa, L929.

Abstract

Nowadays, cancer is one of the main health concerns. The unending search for more potent and effective drugs, has led to a great increase of the available antineoplastic therapeutic arsenal. At the socioeconomic level, the major concern is the delivery of these therapies, for all cancer patients.

Over many centuries, plants have proven valuable sources of new molecules, which as such or chemically modified in the laboratory, resulted often in the discovery of new and stronger drugs.

Recent studies in plant species of the genus *Phlomis*, revealed the existence of numerous nortriterpenes, some of which having antiproliferative properties. Purple phlomis (*Phlomis purpurea* L) is a herbaceous of the family *Lamiaceae*, existing in southern Portugal and from which the nortriterpene phlomispurpentaolone can be extracted. Until recently, there were no pharmacological studies of this compound.

In the present work, phlomispurpentaolone was extracted, isolated and purified from *P. purpurea* secondary dried roots. The measured optical activity of this compound was +3.77, at $\lambda = 589.3$ nm. In addition, cytotoxicity assays on two tumor cell lines – HeLa and L929 – were performed in order to assess the possible antineoplastic action of phlomispurpentaolone. The Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide method was used to measure half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of HeLa cells. The absorbance was read at 570 nm and the phlomispurpentaolone toxicity curve was drawn using the GraphPad software. IC₅₀ was 22.63 ± 1.07 μ M. For L929 cells the value of IC₅₀ was estimated between 50 and 100 μ M on the basis of the preliminary assay.

For HeLa cells the result is promising as further purification and chemical controlled modification of phlomispurpentaolone could improve its antiproliferative activity.

Keywords: *Phlomis purpurea*, phlomispurpentaolone, optical activity, antineoplastic effect, HeLa, L929.

Índice

Declaração de autoria de trabalho	i
Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	vi
Abstract	viii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiv
Lista de Siglas e Abreviaturas	xv
Capítulo 1: Contextualização e Revisão da Literatura	1
1.1. Plantas do Género <i>Phlomis</i>	2
1.1.1. Distribuição geográfica.....	2
1.1.2. Aplicações terapêuticas	3
1.2. Nortriterpenos.....	4
1.2.1. Características gerais.....	4
1.2.2. Atividade biológica e caracterização estrutural de (17R)-2 α ,3 α ,11 α ,23,24- pentahydroxy-19(18 \rightarrow 17)-abeo-28-norolean-12-ene-18-one (phlomispurpentaolone)	7
1.2.3. Perspetivas futuras para a investigação.....	8
1.3. Doenças oncológicas e o seu impacto na Saúde Pública	9
1.4. Linhas de células tumorais HeLa e L929	12
1.5. Ensaios de citotoxicidade: Método MTT	12
1.6. Referências bibliográficas.....	14

Capítulo 2: Extração e isolamento do nortriterpeno phlomispurpentaolone das raízes de <i>P. purpurea</i> e determinação da sua atividade citotóxica nas linhas celulares HeLa e L929	17
2.1. Materiais e Métodos	18
2.1.1. Material biológico e Reagentes.....	18
2.1.2. Procedimento de extração	20
2.1.3. Análise HPLC.....	21
2.1.4. Extração líquido-líquido	23
2.1.5. Separação de phlomispurpentaolone por cromatografia preparativa em coluna	25
2.1.6. Ensaio de citotoxicidade	26
2.1.7. Determinação da atividade ótica	32
2.2 Resultados e Discussão.....	33
2.2.1. Procedimento de Extração	33
2.2.2. Análise HPLC.....	34
2.2.3. Extração líquido-líquido	35
2.2.4. Separação de phlomispurpentaolone por cromatografia preparativa em coluna	37
2.2.5. Ensaio de citotoxicidade	47
2.2.6. Determinação da atividade ótica	52
2.2.7. Limitações ao trabalho de investigação.....	53
2.3 Conclusões gerais e perspectivas futuras	54
2.4 Referências bibliográficas.....	57
Apêndices	58
Apêndice 1: composição do meio de cultura RPMI.	59
Apêndice 2: composição do meio HBSS (Hank's Balanced Salt Solution).	60

Índice de Figuras

Figura 1.1 <i>Phlomis purpurea</i> no período de floração	2
Figura 1.2 Ilustração da estrutura molecular de uma unidade isoprénica	4
Figura 1.3 Nortriterpenos isolados a partir de <i>Ziziphus mauritiana</i>	5
Figura 1.4 Nortriterpenos isolados a partir de <i>Celastrus hypoleucus</i>	6
Figura 1.5 Valores de IC ₅₀ (µg/mL) dos nortriterpenos 1-3 isolados de <i>Celastrus hypoleucus</i>	6
Figura 1.6 Modelo e estrutura moleculares de phlomispurpentaolone	8
Figura 1.7 Estrutura da pirâmide populacional em Portugal em 2011 e previsão para 2035	10
Figura 1.8 Previsão da evolução da incidência de cancro em Portugal de 2010 a 2030	11
Figura 2.1 Colheita de raízes de <i>Phlomis purpurea</i> crescendo no campus de Gambelas da Universidade do Algarve	18
Figura 2.2 Ilustração das diluições do extrato bruto em 10x (à esquerda) e em 100x (à direita)	22
Figura 2.3 Ilustração do equipamento HPLC utilizado	23
Figura 2.4 Extração líquido-líquido do Ensaio 1. A fase orgânica encontra-se em cima e a fase aquosa em baixo	24
Figura 2.5 Coluna cromatográfica: Esquema de montagem	26
Figura 2.6 Ensaio preliminar: Gama de concentrações escolhidas e respetivos volumes a pipetar para a placa de 96 poços. A preto estão discriminados os volumes de meio de cultura a adicionar, ao passo que a vermelho estão os volumes de solução-mãe	30

- Figura 2.7** Ensaio de toxicidade: Gama de concentrações escolhidas e respetivos volumes a pipetar para a placa de 96 poços. A preto estão discriminados os volumes de meio de cultura a adicionar, ao passo que a vermelho estão os volumes de solução-mãe 32
- Figura 2.8** Cromatografia em camada fina (TLC), em que “Ref.” é a referência (phlomispurpentaolone) e “Ext.” é o extrato etanólico bruto (EEB) 33
- Figura 2.9** Cromatogramas HPLC da amostra PP_10x, nos comprimentos de onda de 220,250 e 280 nm, respetivamente 34
- Figura 2.10** Cromatograma correspondente à análise a 250 nm. A seta indica o pico relativo ao momento da eluição de phlomispurpentaolone.... .. 35
- Figura 2.11** TLC da primeira extração líquido-líquido do ensaio preliminar. Do lado esquerdo da placa, foi aplicado o composto de referência (phlomispurpentaolone) e do lado direito, foi aplicada uma amostra da fase aquosa 36
- Figura 2.12** TLC da quinta extração líquido-líquido do ensaio preliminar. Do lado esquerdo da placa, foi aplicado o composto de referência (phlomispurpentaolone), no centro da placa foi aplicada uma amostra da fase orgânica e do lado direito, uma da fase aquosa. As setas identificam a mancha amarelada característica do composto-alvo ... 36
- Figura 2.13** Primeira coluna cromatográfica: Controlo da eluição de phlomispurpentaolone por TLCs 44
- Figura 2.14** Análise qualitativa da pureza do acetato de etilo recolhido na primeira coluna cromatográfica. Foi utilizado como eluente a mistura acetato de etilo:metanol (85%/15%) 44
- Figura 2.15** Cromatografia em camada fina (TLC) dos cristais de phlomispurpentaolone obtidos a partir da segunda coluna cromatográfica. Como eluente foi usada a mistura acetato de etilo:metanol (85%/15%) 47

Figura 2.16 Curva de toxicidade resultante da atividade antineoplásica da amostra R39-50. A viabilidade das células HeLa foi determinada mediante a utilização da ferramenta informática GraphPad 52

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 Gradiente de eluentes usados na HPLC (Fluxo de 0,800mL/min)...	23
Tabela 2.2 Determinação do número médio de células por quadrado do hematocítmetro ...	27
Tabela 2.3 Densidades celulares de cada solução inicial de células tumorais e respetivos volumes a pipetar ...	27
Tabela 2.4 Determinação do volume de solvente (DMSO) a adicionar à respetiva fração de phlomispurpentaolone, para a preparação da solução-stock ...	29
Tabela 2.5 Frações recolhidas durante a primeira coluna cromatográfica ...	38
Tabela 2.6 Frações recolhidas durante a segunda coluna cromatográfica ...	40
Tabela 2.7 Resultados das pesagens dos cristais de phlomispurpentaolone obtidos a partir dos diferentes grupos de frações...	46
Tabela 2.8 Resultados da análise qualitativa do ensaio preliminar ...	48
Tabela 2.9 Determinação da viabilidade das células HeLa sob efeito de diferentes concentrações de phlomispurpentaolone ...	50
Tabela 2.10 Determinação da rotação específica ($[\alpha]_{\lambda}^{T\text{ }^{\circ}\text{C}}$) de phlomispurpentaolone...	53

Lista de Siglas e Abreviaturas

DGS – Direção-Geral da Saúde

DMSO – Dimetilsulfóxido

DRX – Difração de raios-X

EBSE – Extrato bruto sem etanol

EEB - Extrato etanólico bruto

ESI/MS – Espectrometria de massa por ionização por eletropulverização

HBSS - *Hanks Balanced Salt Solution*

HPLC – *High-performance liquid chromatography*

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IC₅₀ - Concentração inibitória média

IV – Espectroscopia de Infravermelho

MTT - *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*

PP_10x - Amostra de EBSE diluída de 1:10

PP_100x - Amostra de PP_10x diluída de 1:10

RMN – Ressonância magnética nuclear

TLC – *Thin layer chromatography*

Capítulo 1

Contextualização e Revisão da Literatura

1.1. Plantas do Género *Phlomis*

1.1.1. Distribuição geográfica

O género *Phlomis*, pertencente à família Lamiaceae, é composto por mais de 100 espécies de plantas distribuídas pela Europa, Ásia e Norte de África. Estas plantas podem ser encontradas em regiões quentes como a China, Irão, Marrocos, no sul de Espanha e Portugal, entre outros países, sendo que quatro das sessenta e cinco espécies conhecidas, são nativas da Península Ibérica: *P. crinita*, *P. herba-venti*, *P. lychnitis* e a *P. purpurea* (Algieri *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2010).

Phlomis purpurea é uma herbácea endógena do sul da Península Ibérica e Marrocos, e é geralmente encontrada na orla de matagais, em locais secos, em zonas rochosas, em solos calcários, entre outras áreas. Em Portugal, pode apenas ser encontrada na zona sul e centro, sendo particularmente abundante no parque natural da Arrábida e no Algarve (Novais *et al.*, 2004).



Figura 1.1 *Phlomis purpurea* no período de floração.

1.1.2. Aplicações terapêuticas

Segundo a literatura, as diversas espécies de *Phlomis* têm sido usadas ao longo de várias décadas em fitoterapia, com inúmeras ações farmacológicas, nomeadamente: anti-inflamatórias, antioxidantes, antidiabéticas, antinocetivas, imunossupressoras, cicatrizantes, antimicrobianas, antineoplásicas, entre outras propriedades (Li *et al.*, 2010; Limem-Ben Amor *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008; Sarkhail, 2003; Wang *et al.*, 2014).

Estas inúmeras atividades farmacológicas derivam das centenas de diferentes compostos produzidos pelas diversas espécies de *Phlomis*, entre as quais se incluem os sesqui, di e triterpenos, as saponinas triterpénicas, os flavonóides, os iridóides, entre outros (Deng *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010; Limem-Ben Amor *et al.*, 2009; Sarkhail, 2003).

Estudos recentes sobre *Phlomis purpurea* (Algieri *et al.*, 2013; González-Tejero *et al.*, 1995; Pardo de Santayana *et al.*, 2005) têm vindo a demonstrar as propriedades fitoterapêuticas dos seus extratos e a justificar o seu uso, por parte das populações ancestrais, na medicina tradicional. Um outro estudo sobre esta espécie de *Phlomis* (Neves *et al.*, 2013) demonstra não só a sua atividade antifúngica, na medida em que esta planta consegue inibir significativamente o crescimento das diversas estruturas de *Phytophthora cinnamomi* (um oomiceto designado ainda, por vezes, como pseudo-fungo), como também a sua capacidade de reduzir o potencial de inóculo do solo, ou seja, a capacidade de reduzir a propagação da infeção nas plantas vizinhas.

Sendo Portugal um país de excelência na exportação de cortiça, obtida a partir dos sobreiros, e sendo a *P. cinnamomi* o agente patogénico responsável pela infeção e devastação dos mesmos, percebe-se rapidamente o enorme impacto quer ao nível económico, quer ao nível ambiental e de saúde, que os estudos sobre os constituintes e as atividades farmacológicas desta planta podem ter (Neves *et al.*, 2013).

1.2. Nortriterpenos

1.2.1. Características gerais

Os terpenos constituem uma enorme classe de compostos produzidos por diversas plantas e são classificados pelo número de unidades isoprénicas (C_5H_8) presentes na molécula (**Figura 1.2**).

Os triterpenos são compostos formados a partir de 6 unidades de isopreno e têm como fórmula molecular geral $C_{30}H_{48}$. Os nortriterpenos, por seu lado, são compostos com menos um grupo metilo (CH_3) e como tal, possuem 29 átomos de carbono na sua estrutura.

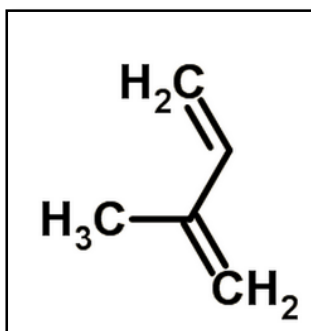


Figura 1.2 Ilustração da estrutura molecular de uma unidade isoprénica.

Nos últimos anos, inúmeras investigações com o intuito de isolar estas substâncias nortriterpénicas, bem como estudos de determinação das respetivas atividades farmacológicas têm sido realizados demonstrando a grande diversidade de ações terapêuticas destes compostos, nomeadamente, antioxidante (Shi *et al.*, 2014), anti-agregante plaquetar (Shi *et al.*, 2013), anti-HIV (Lo *et al.*, 2013), anti-HBV (Lei *et al.*, 2009), antineoplásicas (Tantry *et al.*, 2012).

Em 2012, investigadores chineses publicaram os seus trabalhos de isolamento e caracterização de três novos nortriterpenos (**Figura 1.3**) obtidos a partir da planta *Ziziphus mauritiana*. A citotoxicidade destes ácidos zizimauríticos foi testada em três linhagens de células tumorais – HeLa, A-549 e BGC-823 – assim como as suas propriedades antibacterianas e antifúngicas, testadas em *Staphylococcus aureus* e

Candida albicans, respetivamente. Os resultados obtidos demonstraram alguma ação antineoplásica por parte destes compostos, tendo-se obtido para um dos compostos nortriterpénicos valores de concentração mínima necessária para inibir a proliferação de 50% da população celular (IC_{50}) de 5,05 $\mu\text{g/mL}$, 5,36 $\mu\text{g/mL}$ e 6,24 $\mu\text{g/mL}$ para as linhas celulares tumorais A-549, HeLa e BGC-823, respetivamente. Ainda assim, estes valores de IC_{50} revelaram-se um pouco distantes dos obtidos pelo composto de referência utilizado – Taxol – com valores de IC_{50} de 0,02 $\mu\text{g/mL}$, 0,38 $\mu\text{g/mL}$ e 0,01 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente (Ji *et al.*, 2012).

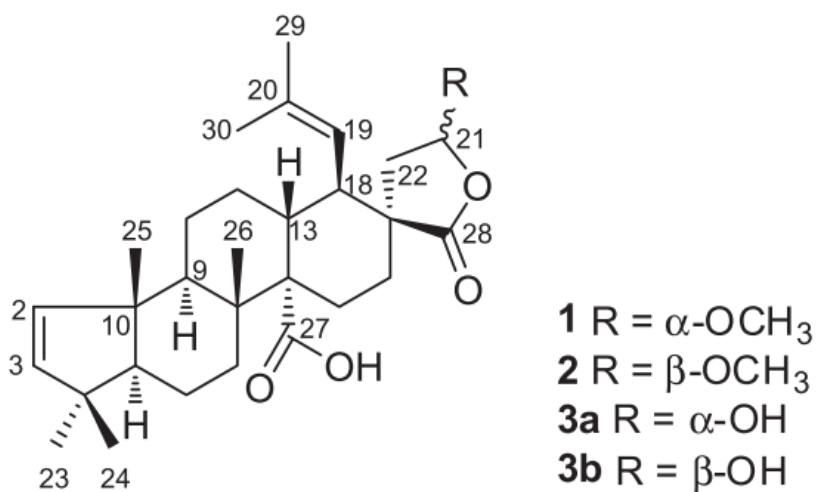


Figura 1.3 Nortriterpenos isolados a partir de *Ziziphus mauritiana*.

Fonte: Ji *et al.*, 2012.

A partir de *Celastrus hypoleucus*, uma espécie vegetal da família das Celastraceae usada na medicina tradicional chinesa para o tratamento da inflamação e de tumores, foram isolados nortriterpenos (**Figura 1.4**) que demonstraram *in vitro* propriedades antitumorais bastante promissoras. Esta atividade antineoplásica dos compostos foi testada em diversas linhas de células tumorais, como a P-388, A-549, HL-60 e a BEL-7402, tendo-se obtido para algumas das linhagens celulares valores de IC_{50} (**Figura 1.5**) inferiores aos do composto de referência – Etopósido – ou seja, uma melhor atividade antitumoral que a do Etopósido (Wang *et al.*, 2010).

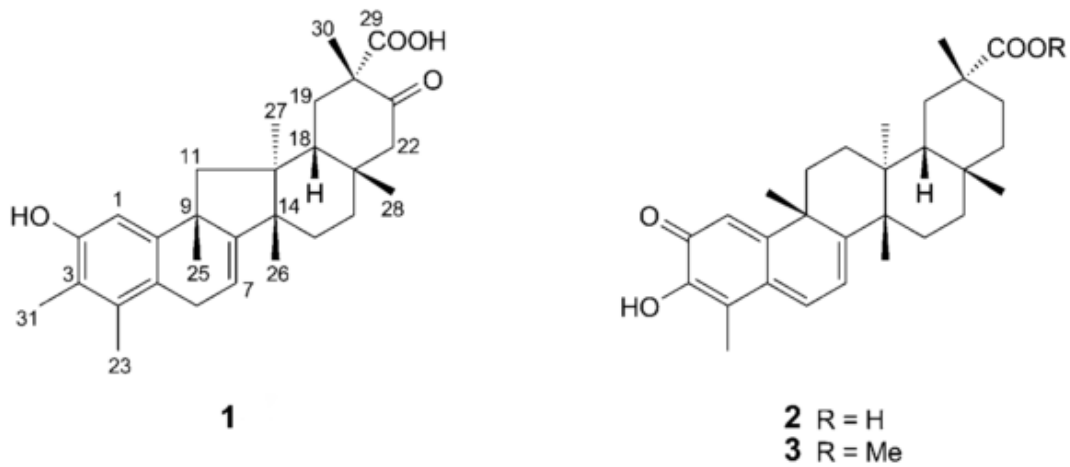


Figura 1.4 Nortriterpenos isolados a partir de *Celastrus hypoleucus*.

Fonte: Wang *et al.*, 2010.

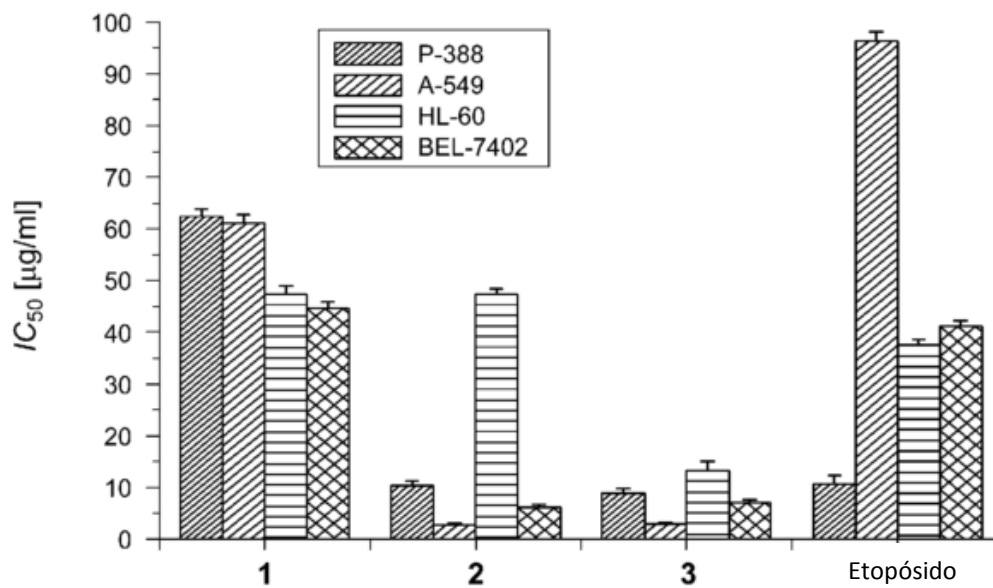


Figura 1.5 Valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos nortriterpenos 1-3 isolados de *Celastrus hypoleucus*.

Fonte: Wang *et al.*, 2010.

1.2.2. Atividade biológica e caracterização estrutural de *(17R)-2 α ,3 α ,11 α ,23,24-pentahydroxy-19(18 \rightarrow 17)-abeo-28-norolean-12-ene-18-one* (phlomispurpentaolone)

Tinha sido demonstrada, anteriormente, a atividade antimicrobiana *in vitro*, do extrato etanólico bruto (EEB) obtido das raízes secas de *Phlomis purpurea* contra o oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, agente patogénico responsável por uma enorme devastação de culturas agrícolas em todo o mundo (Neves *et al.*, 2013). Em 2013, foi isolada e purificada (Campos, 2013), a partir do EEB de *P. purpurea*, uma nova substância com atividade anti- *P. cinnamomi*, que foi, posteriormente, estruturalmente caracterizada por ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D, espectrometria de massa por ionização por eletropulverização (ESI/MS), espectroscopia de infravermelho (IV) e difração de raios-X (DRX), tendo a seguinte fórmula molecular: [C₂₉H₄₆O₆ (m/z 513,3 ([M+Na]⁺)). É um novo nortriterpeno: *(17R)-2 α ,3 α ,11 α ,23,24-pentahydroxy-19(18 \rightarrow 17)-abeo-28-norolean-12-ene-18-one*, que foi designado por phlomispurpentaolone (**Figura 1.6**) (Neves, 2014).

Dada a semelhança estrutural entre phlomispurpentaolone e alguns dos nortriterpenos supracitados, com atividades antitumorais promissoras (Secção 1.2.1), é de supor que possa existir, neste nortriterpeno em estudo, uma ação antineoplásica semelhante, o que justifica uma investigação nesse sentido.

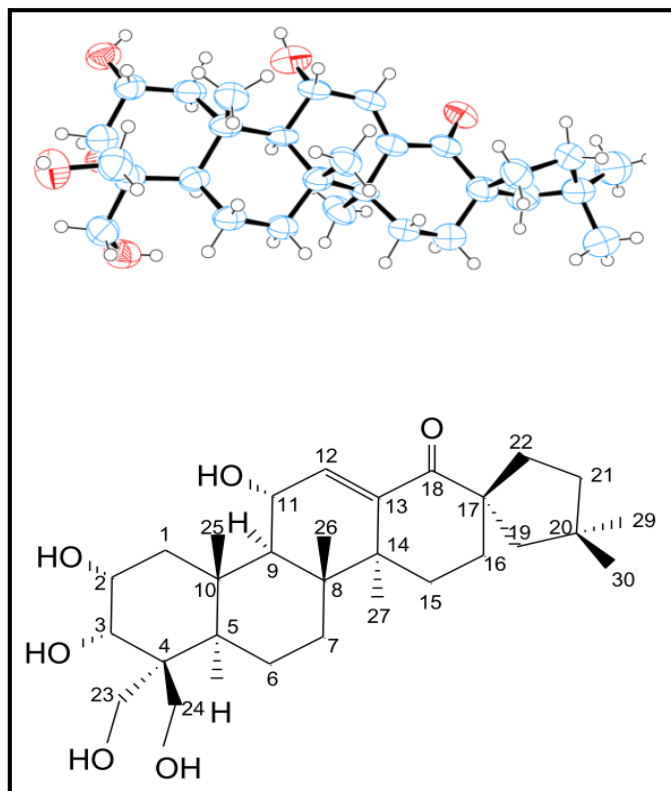


Figura 1.6 Modelo e estrutura moleculares de phlomispurpentaolone.

Fonte: Neves, 2014.

1.2.3. Perspetivas futuras para a investigação

Segundo investigadores chineses (Li *et al.*, 2010), até 2010 foi realizada uma investigação intensiva sobre as diferentes espécies de *Phlomis* e as respetivas propriedades terapêuticas, o que já conduziu ao isolamento de mais de 150 compostos. Contudo, algumas espécies de *Phlomis* não foram estudadas ou foram-no só parcialmente, o que perspectiva, no futuro, a possibilidade de se isolar novos compostos e de estudar as suas ações fitoterapêuticas.

Com base nos resultados obtidos para a sua atividade antitumoral, em função das estruturas dos compostos nortriterpénicos isolados a partir de diversas espécies de plantas do género *Phlomis*, pensa-se que as posições C-18 e C-21 tenham funções importantes para a atividade do composto, o que constitui uma boa referência para uma possível determinação futura do farmacóforo do composto phlomispurpentaolone (Liu *et al.*, 2008).

1.3. Doenças oncológicas e o seu impacto na Saúde Pública

A evolução do panorama da Oncologia a nível nacional e mundial, tem colocado enormes desafios aos sistemas de saúde. Por um lado, assiste-se a um aumento considerável das taxas de incidência devido às alterações significativas da estrutura da pirâmide populacional, onde se caminha para uma população cada vez mais envelhecida, e devido às alterações dos seus estilos de vida (**Figura 1.7 e 1.8**). Por outro, verifica-se, também, um aumento da demanda, e para cada doente individual, de mais meios técnicos e humanos (Miranda *et al.*, 2014).

O cancro assume-se como uma das doenças do futuro (e do presente) que para além de uma perspetiva clínica multidisciplinar, reclama uma abordagem político-social concertada, que se estende para além dos muros das estruturas de saúde. O controlo do cancro compreende diferentes vertentes, que vão da prevenção até ao diagnóstico e ao tratamento, passando pela investigação e pela formação (Miranda *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2002).

Segundo um relatório apresentado, em 2013, pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a incidência e a mortalidade mundial do cancro, em 2012, aumentou para os 14,1 milhões e 8,2 milhões, respetivamente, quando comparados com os dados de 2008, em que a incidência e a mortalidade mundial rondavam os 12,7 e 7,6 milhões, respetivamente (International Agency for Research on Cancer, 2013).

As disparidades existentes nos tratamentos oncológicos e nas próprias taxas de sobrevivência refletem não só a falta de diretrizes e algoritmos terapêuticos, que visem melhorar a relação custo-eficácia dos cuidados de saúde oncológicos, como também, segundo John Seffrin, da *American Cancer Society*, de uma falha coletiva na atualização dos direitos humanos universais, no que diz respeito ao acesso a essas terapêuticas (Parsi *et al.*, 2011).

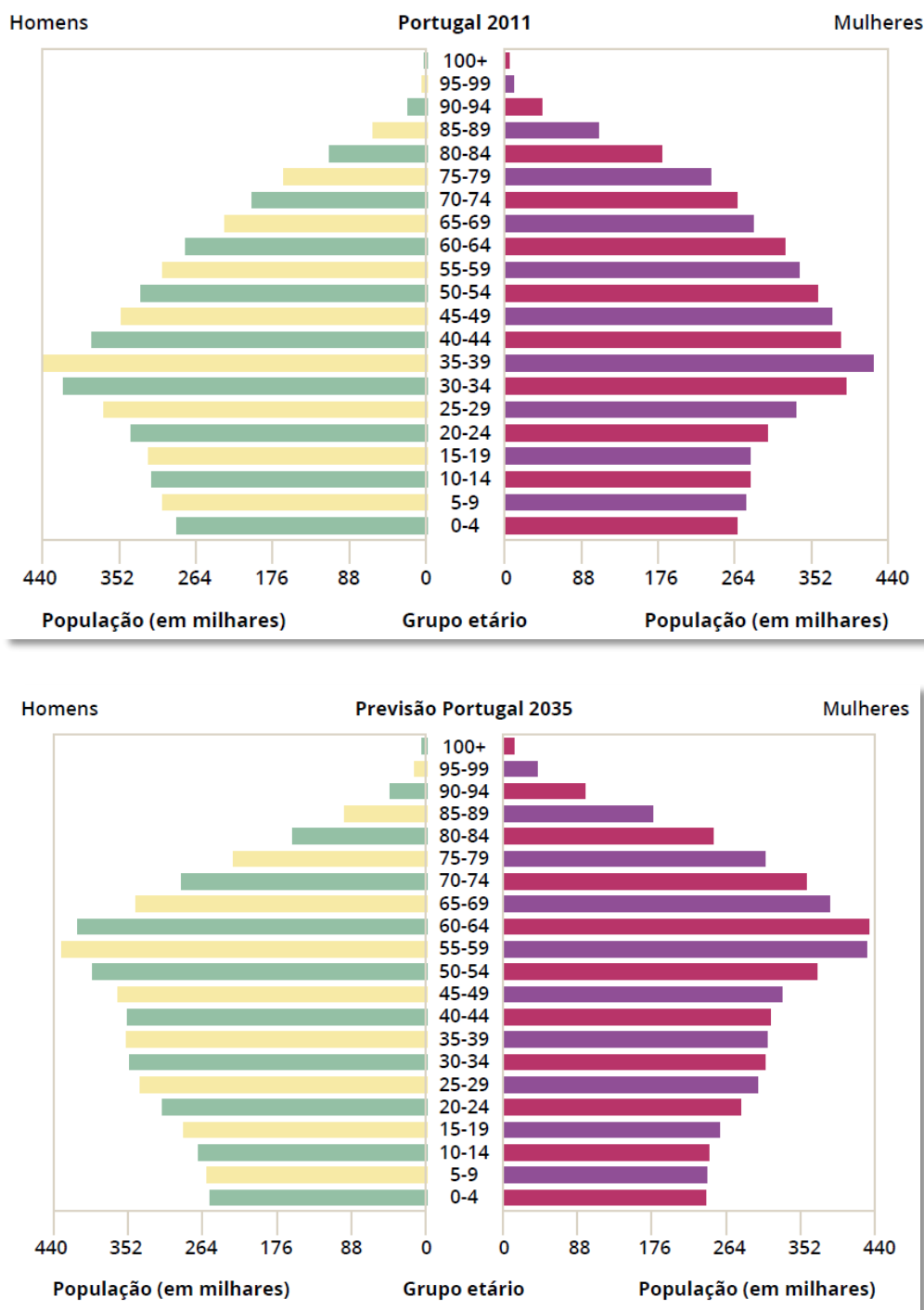


Figura 1.7 Estrutura da pirâmide populacional em Portugal em 2011 e previsão para 2035.

Fonte: Doença Oncológica em Números - 2014, Direção-Geral da Saúde (DGS).

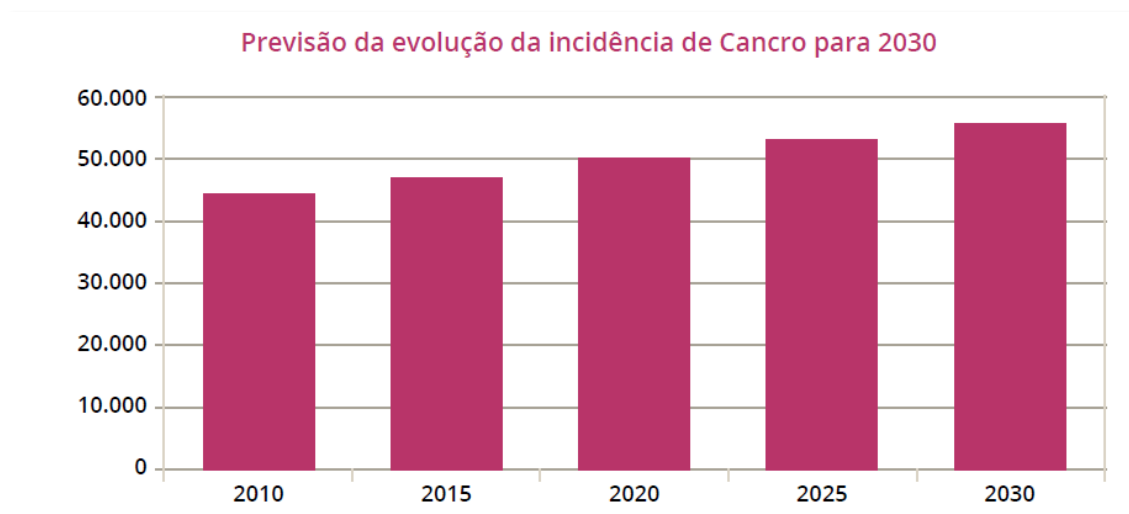


Figura 1.8 Previsão da evolução da incidência de cancro em Portugal de 2010 a 2030.

Fonte: Doença Oncológica em Números -2014, DGS.

Segundo o relatório de 2013 da IARC, anteriormente referido, é assinalada esta questão da desigualdade e da falta de acesso, dos países menos desenvolvidos, a recursos que possibilitem a deteção e diagnóstico precoce do cancro, assim como o acesso a terapêuticas eficazes no seu combate. Como argumento é apresentado o facto de os países desenvolvidos terem as maiores taxas de incidência de cancro, mas as maiores taxas de mortalidade recaírem nos menos desenvolvidos (International Agency for Research on Cancer, 2013).

A necessidade urgente de desenvolver metodologias que permitam uma deteção e diagnóstico precoces e a investigação de novos fármacos que permitam aumentar a eficácia das terapêuticas antineoplásicas atualmente existentes, são cruciais para a redução das elevadas taxas de incidência e de mortalidade oncológicas, que se estimam vir a aumentar ainda mais futuramente, e que trazem enormes custos para os Sistemas Nacionais de Saúde. Para além disso, é igualmente necessário o desenvolvimento de políticas que permitam que estes avanços terapêuticos não fiquem “blindados” apenas pelos países com maiores possibilidades económicas, mas que efetivamente cheguem a toda a população mundial.

1.4. Linhas de células tumorais HeLa e L929

A cultura celular é uma técnica caracterizada por permitir manter as células vivas em laboratório independentemente do organismo de origem. A utilização desta técnica possibilitou a melhor compreensão dos mecanismos moleculares da célula, contribuindo para avanços científicos importantes, por exemplo, na vertente da produção de vacinas e na biologia da célula tumoral (Burki, 2010).

As células HeLa foram as primeiras células tumorais de origem humana a serem mantidas num ambiente *in vitro*. A linhagem HeLa, deriva das células de um cancro cervical de uma mulher chamada Henrietta Lacks, à qual foi feita uma biópsia durante uma sessão de radioterapia em 1951, de que foram retiradas as referidas células. Desde então, têm sido usadas para estudar a fisiologia celular e a maquinaria básica comum a todas as células e mais de 65000 estudos científicos foram publicados (Hyman & Simons, 2011). Estas células estão classificadas com um nível 2 de biossegurança, de acordo com o Departamento de Saúde e dos Serviços Humanos dos Estados Unidos (U.S. Department of Health and Human Services, 2009).

A linhagem de células tumorais L929 é proveniente de fibroblastos de ratinhos e está classificada com um nível 1 de biossegurança, de acordo com o Departamento de Saúde e dos Serviços Humanos dos Estados Unidos (U.S. Department of Health and Human Services, 2009).

1.5. Ensaios de citotoxicidade: Método MTT

O método tradicional para a descoberta de fármacos anticancerígenos é o ensaio MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*) e é frequentemente usado para determinar a citotoxicidade, proliferação e ativação de potenciais agentes terapêuticos, baseados na atividade das enzimas desidrogenase mitocondriais celulares (Cory *et al.*, 1991; Mosmann, 1983).

A técnica MTT é muito utilizada para monitorizar os compostos citotóxicos durante o desenvolvimento da quimioterapia ou para controlar os efeitos indesejáveis

durante os estudos pré-clínicos (Riss *et al.*, 2004). O ensaio MTT foi primeiramente descrito por Mosmann (1983) e desde então tem sido alterado e otimizado (Hansen *et al.*, 1989).

O princípio deste método consiste na capacidade das células viáveis reduzirem o sal tetrazólio (que confere uma coloração amarelada à solução) em cristais de formazano, que por ser um composto insolúvel em água, vai precipitar no citosol celular e pode ser quantificado após lise celular. Estes cristais apresentam uma coloração púrpura e são solúveis em dimetilsulfóxido (DMSO), podendo a sua absorvência ser medida usando um espectrofotómetro a um comprimento de onda de 570 nm (Kim *et al.*, 2007).

A redução do tetrazólio em formazano é catalisada pelas desidrogenases mitocondriais das células, pelo que, as células mortas devido à ação de substâncias citotóxicas, por exemplo, não vão transformar a solução MTT. A intensidade da absorção constitui, por isso, uma medida da quantidade de células vivas (Scherliess, 2011).

Este tipo de ensaio de citotoxicidade está descrito como tendo inúmeras vantagens, entre as quais, a rapidez de análise, quantificação e gestão simultânea de várias amostras (Shimoyama *et al.*, 1989).

Normalmente, esta técnica gera um grande número de compostos candidatos e requer, por isso, a utilização de modelos animais que permitam, *in vivo*, testar a eficácia terapêutica, propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e a toxicidade desses compostos. Apenas 1% desses candidatos chegam ao mercado, pelo que, a realização de testes *in vivo* torna-se crucial, na medida em que vai permitir reduzir muito os custos e poupar tempo no processo de desenvolvimento destes fármacos anticancerígenos (Li *et al.*, 2012).

1.6. Referências bibliográficas

- Algieri, F., Zorrilla, P., Rodriguez-Nogales, A., Garrido-Mesa, N., Bañuelos, O., González-Tejero, M. R., Galvez, J. (2013). Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(3), 750–9.
- Burki, T. (2010). The Immortal Life of Henrietta Lacks. *The Lancet Oncology*, 11(7), 618.
- Campos, S. (2013). Isolamento do principio ativo presente no extrato de raízes de *Phlomis purpurea* com atividade anti-*Phytophthora cinnamomi*. Relatório de Licenciatura. Universidade do Algarve.
- Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., & Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications*, 3(7), 207–12.
- Deng, R.-X., Duan, W.-L., Liu, P., Yang, Y.-L., & Yin, W.-P. (2011). Secondary metabolites from the roots of *Phlomis umbrosa*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(3), 230–7.
- González-Tejero, M. R., Molero-Mesa, J., Casares-Porcel, M., & Lirola, M. J. M. (1995). New contributions to the ethnopharmacology of Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 45(3), 157–165.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E., & Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*, 119(2), 203–210.
- Hyman, A. H., & Simons, K. (2011). The new cell biology: Beyond HeLa cells. *Nature*, 480(7375), 34.
- International Agency for Research on Cancer (2013). Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14 . 1 million new cases in 2012 : Marked increase in breast cancers must be addressed. *International Agency for Research on Cancer, World Health Organization*.
- Ji, C.-J., Zeng, G.-Z., Han, J., He, W.-J., Zhang, Y.-M., & Tan, N.-H. (2012). Zizimauritic acids A-C, three novel nortriterpenes from *Ziziphus mauritiana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(20), 6377–80.
- Kim, E., Jeon, I. S., Kim, J. W., Kim, J., Jung, H.-S., & Lee, S. J. (2007). An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. *Oral Diseases*, 13(5), 495–9.

- Lei, C., Pu, J.-X., Huang, S.-X., Chen, J.-J., Liu, J.-P., Yang, L.-B., Sun, H.-D. (2009). A class of 18(13→14)-abeo-schiartane skeleton nortriterpenoids from *Schisandra propinqua* var. *propinqua*. *Tetrahedron*, *65*(1), 164–170.
- Li, M.-X., Shang, X.-F., Jia, Z.-P., & Zhang, R.-X. (2010). Phytochemical and biological studies of plants from the genus *Phlomis*. *Chemistry & Biodiversity*, *7*(2), 283–301.
- Li, Y., Huang, W., Huang, S., Du, J., & Huang, C. (2012). Screening of anti-cancer agent using zebrafish: comparison with the MTT assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *422*(1), 85–90.
- Limem-Ben Amor, I., Boubaker, J., Ben Sgaier, M., Skandrani, I., Bhourri, W., Neffati, A., Chekir-Ghedira, L. (2009). Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species. *Journal of Ethnopharmacology*, *125*(2), 183–202.
- Liu, P., Yao, Z., Zhang, W., Takaishi, Y., & Duan, H.-Q. (2008). Novel Nortriterpenes from *Phlomis umbrosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *56*(7), 951–5.
- Lo, I.-W., Lin, Y.-C., Liao, T.-C., Chen, S.-Y., Lin, P.-H., Chien, C.-T., Shen, Y.-C. (2013). Schisarisanolactones A and B: a new class of nortriterpenoids from the fruits of *Schisandra arisanensis*. *Food Chemistry*, *136*(2), 1095–9.
- Miranda, N., Portugal, C., Nogueira, P. J., Farinha, C. S., Soares, A., Alves, M. I., Afonso, D. (2014). *Portugal: Doenças Oncológicas em números – 2014*.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*(1-2), 55–63.
- Neves, D. (2014). Evaluation of the protective effect of *Phlomis purpurea* against *Phytophthora cinnamomi* in Fagaceae and of root metabolites involved. PhD Dissertation, Universidade do Algarve.
- Neves, D., Caetano, P., Oliveira, J., Maia, C., Horta, M., Sousa, N., Cravador, A. (2013). Anti-*Phytophthora cinnamomi* activity of *Phlomis purpurea* plant and root extracts. *European Journal of Plant Pathology*, *138*(4), 835–846.
- Novais, M. H., Santos, I., Mendes, S., & Pinto-Gomes, C. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, *93*(2-3), 183–95.
- Nunes, D. J. M., Costa, D. F. L. da, Natário, D. A., Morgado, D. V., Del Rio, A. M., Barata, D. F., Santos, D. C. (2002). *Rede de Referência Hospitalar de Oncologia*.

- Pardo de Santayana, M., Blanco, E., & Morales, R. (2005). Plants known as té in Spain: an ethno-pharmaco-botanical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(1-2), 1–19.
- Parsi, K., Bhattacharya, D., & List, J. (2011). The Dread Disease: Cancer in the Developing World. *Hastings Center Report*.
- Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev. Technol.* 2, 51–62.
- Sarkhail, P. (2003). Antinociceptive effect of *Phlomis olivieri* Benth., *Phlomis anisodonta* Boiss. and *Phlomis persica* Boiss. total extracts. *Pharmacological Research*, 48(3), 263–266.
- Scherliess, R. (2011). The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 411(1-2), 98–105.
- Shi, Y.-M., Wang, X.-B., Li, X.-N., Luo, X., Shen, Z.-Y., Wang, Y.-P., Sun, H.-D. (2013). Lancolides, antiplatelet aggregation nortriterpenoids with tricyclo[6.3.0.0(2,11)]undecane-bridged system from *Schisandra lancifolia*. *Organic Letters*, 15(19), 5068–71.
- Shi, Y.-M., Yang, J., Xu, L., Li, X.-N., Shang, S.-Z., Cao, P., Sun, H.-D. (2014). Structural characterization and antioxidative activity of lancifonins: unique nortriterpenoids from *Schisandra lancifolia*. *Organic Letters*, 16(5), 1370–3.
- Shimoyama, Y., Kubota, T., Watanabe, M., Ishibiki, K., & Abe, O. (1989). Predictability of *in vivo* chemosensitivity by *in vitro* MTT assay with reference to the clonogenic assay. *Journal of Surgical Oncology*, 41(1), 12–8.
- Tantry, M. A., Dar, J. A., Khuroo, M. A., & Shawl, A. S. (2012). Nortriterpenoids from the roots of *Paeonia emodi*. *Phytochemistry Letters*, 5(2), 253–257.
- U.S. Department of Health and Human Services. (2009). CDC - Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition.
- Wang, H., Tian, X., & Ying, G. Q. (2010). A New Nortriterpene from the Root of *Celastrus hypoleucus*. *Helvetica Chimica Acta*, 93(8), 1628–1633.
- Wang, Q.-S., Yang, L., Cui, W.-Y., Chen, L., & Jiang, Y.-H. (2014). Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of methanol extract from aerial part of *Phlomis younghusbandii* Mukerjee. *PLoS One*, 9(3), e89149.

Capítulo 2

Extração e isolamento do nortriterpeno phlomispurpentaolone das raízes de *P. purpurea* e determinação da sua atividade citotóxica nas linhas celulares HeLa e L929

2.1. Materiais e Métodos

2.1.1. Material biológico e Reagentes

- Raízes:

As raízes secundárias utilizadas no presente trabalho foram colhidas em Agosto de 2014, a partir de *Phlomis purpurea*, com cerca de 2 anos, como descrito por Neves *et al.*, (2013) (**Figura 2.1**).



Figura 2.1 Colheita de raízes de *Phlomis purpurea* crescendo no campus de Gambelas da Universidade do Algarve.

- **Células HeLa e L929:**

As células HeLa e L929 foram facultadas pelo Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra e conservadas em azoto líquido (a uma temperatura de -196°C , à pressão atmosférica) na Faculdade de Farmácia de Lisboa, até à realização dos ensaios de citotoxicidade.

- Químicos e Reagentes:

- Preparação da solução de revelação de anisaldeído usada na cromatografia em camada fina (TLC): foi usado etanol absoluto PA, da Panreac[®]; ácido sulfúrico 95-97%, da Riedel-de Haën[®]; ácido acético 99,8%, da Riedel-de Haën[®]; p-anisaldeído, da MERCK[®];

- Preparação do eluente das TLC's: foi usado acetato de etilo, da marca Valente e Ribeiro, Lda[®]; metanol, da marca Riedel-de Haën[®];

- Solventes usados na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC): foi usado acetonitrilo, da marca Sigma-Aldrich[®]; água purificada;

- Solventes usados na extração por solventes: foi usada água destilada; acetato de etilo, da marca Valente e Ribeiro, Lda[®], com um ponto de ebulição de 77,1°C;

- Preparação da amostra para a coluna: foi usado acetato de etilo, da marca Valente e Ribeiro, Lda[®]; sílica gel 60, da marca Merck[®] (0,040-0,063 mm; 230-400 mesh ASTM);

- Coluna cromatográfica: foi usado acetato de etilo HPLC grade, da marca Fisher Chemical[®]; areia do mar lavada, grão fino QP, da marca Panreac[®]; metanol para HPLC, da marca Riedel-de Haën[®];

- Ensaio de citotoxicidade: foi usado meio de cultura RPMI 1640, da marca Sigma-Aldrich[®] (composição detalhada em Apêndice 1); dimetilsulfóxido (DMSO), da marca Sigma-Aldrich[®]; solução HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*) (composição detalhada em Apêndice 2), da marca Sigma[®]; solução MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), da marca Sigma[®].

- Ensaio de atividade ótica: foi utilizado metanol de elevada pureza (99,9%), da marca Riedel-de Haën[®];

2.1.2. Procedimento de extração

O protocolo de extração foi adaptado a partir dos estudos de Carini *et al.*, (2001) (Carini *et al.*, 2001). As raízes secundárias e finas de cerca de 100 plantas de *P. purpurea* foram lavadas com água corrente e, posteriormente, secas com papel absorvente à temperatura ambiente (26°C) durante 48 h. De seguida, foram trituradas, com uma máquina trituradora da marca JOCEL®, modelo CH-7103 e pesadas numa balança analítica da marca PRECISA®, modelo 6200 D SCS. As raízes secas de *P. purpurea* foram divididas em agregados de 50 g, num total de 150 g.

A cada conjunto de 50 g de raízes secas foram adicionados 700 mL de uma solução etanólica aquosa a 70% (v/v), contendo 0,1% (m/v) de ácido ascórbico para evitar a oxidação e colocados em agitação durante 7 dias, num agitador da marca Labotron®, a uma velocidade de 100 rotações por minuto (RPM), de forma a assegurar a homogeneização do extrato.

Após os 7 dias de agitação, obteve-se um EEB, de coloração laranja-acastanhada, que foi posteriormente filtrado em papel absorvente, de maneira a permitir reter apenas as raízes trituradas e as impurezas do solo. Estes resíduos retidos, foram colocados novamente em agitação, durante 7 dias, e fez-se uma reextração dos mesmos utilizando o mesmo solvente, com o intuito de extrair a maior quantidade possível de phlomispurpentaolone.

Foi realizada uma TLC para aferir relativamente à presença do composto de interesse no EEB. Utilizou-se um sistema de eluentes constituído por acetato de etilo:metanol (97%/3%) e usou-se como referência o nortriterpeno isolado pela Doutora Dina Neves, durante o seu trabalho de doutoramento.

O etanol do EEB foi evaporado a 70°C num evaporador rotativo da marca Heidolph®, modelo WB 2000, e com o auxílio de uma bomba de vácuo da marca Büchi Vac®, modelo V-500, a 270 mmHg. Durante este processo é necessário ter especial atenção à possível formação de espuma, devido às saponinas presentes no EEB, e ao risco de haver absorção do extrato para o balão de recolha, pelo que foi utilizada uma

velocidade baixa de rotação. No caso de haver a formação de espuma, deve-se abrir imediatamente a torneira de vácuo até a espuma desaparecer.

- **Procedimento para a preparação da solução de revelação de anisaldeído usada nas TLC's:** foram adicionados lentamente e com agitação 10,93 mL de ácido sulfúrico concentrado a 290,6 mL de etanol. Posteriormente, adicionou-se 3,125 mL de ácido acético glacial e, por fim, 0,781 mL de p-anisaldeído. Após uma adequada agitação, homogeneização e arrefecimento da solução de revelação, esta foi transferida para um frasco de vidro âmbar, devido à sua fotossensibilidade (Londhe *et al.*, 2013).

2.1.3. Análise HPLC

- Preparação da solução de Extrato Bruto

Para a realização da análise por HPLC foram utilizados 10 mL de extrato bruto sem etanol (EBSE), que foram previamente filtrados sob vácuo, através de um filtro de fibra de vidro. Mais uma vez, foi tida particular atenção ao vácuo, pois a formação e ascensão da espuma, devido às saponinas, ao longo do kitasato poderia atingir o tubo de vácuo e perder-se parte do composto de interesse.

De seguida, foi colocada a solução filtrada de EBSE (10 mL) num frasco de vidro e foi diluída, sequencialmente, 10x (amostra PP_10x) e 100x (amostra PP_100x), com etanol a 10% (v/v) (**Figura 2.2**). Foram filtradas, novamente, as respetivas soluções diluídas, num filtro Millipore® 0,45 µm PVDF Hydrophilic, na ponta de uma seringa de 2,5 mL para esterilizar as amostras.

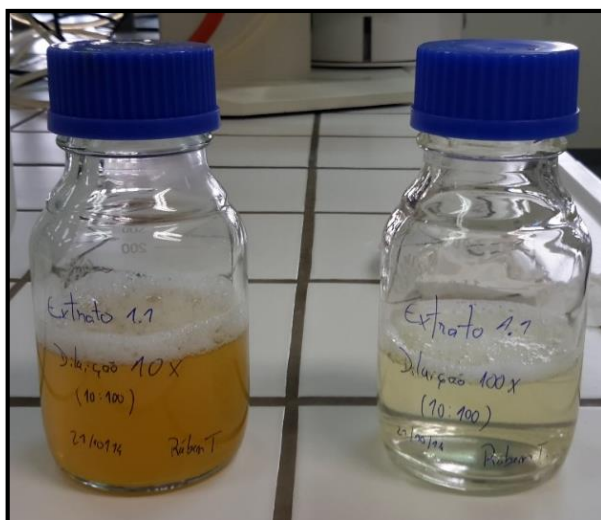


Figura 2.2 Ilustração das diluições do EBSE em 10x (à esquerda) e em 100x (à direita).

- Condições de análise

A análise HPLC do EBSE, foi realizada usando equipamento da marca Agilent Technologies®, modelo 1100 Series (**Figura 2.3**) e uma seringa de 25 μ L da marca Microliter™ Syringes.

O aparelho foi programado para um tempo de análise de 20 minutos e a fase móvel consistiu num gradiente de eluentes de acetonitrilo:água, de acordo com os dados ilustrados na **Tabela 2.1**. O fluxo utilizado foi de 0,800 mL/min.

Antes da aplicação das amostras foi lavada a microseringa três vezes, com a solução a inserir.



Figura 2.3 Ilustração do equipamento HPLC utilizado.

Tabela 2.1 Gradiente de eluentes usados na HPLC (Fluxo de 0,800 mL/min).

Tempo (min)	CH ₃ CN (%)	H ₂ O (%)
0	15	85
3	15	85
8	50	50
10	50	50
12	85	15
15	85	15
16	15	85

2.1.4. Extração líquido-líquido

Foi realizado um ensaio preliminar a fim de se otimizarem os volumes de solventes a adicionar ao EBSE. Foram adicionados 20 mL de acetato de etilo e 15 mL de água destilada por cada 5 mL de EBSE. A fase aquosa foi recolhida e realizou-se, posteriormente, uma nova extração com 20 mL de acetato de etilo. Em cada uma das extrações líquido-líquido e antes da recolha da fase aquosa, foi realizada uma TLC da

fase orgânica para aferir sobre a presença de composto-alvo, na referida fase. Foram realizadas cinco extrações líquido-líquido. No final, a fase aquosa foi também analisada por TLC para aferir sobre a possível existência de composto de interesse nesta fase.

O acetato de etilo, presente nas fases orgânicas recolhidas, foi evaporado a 85°C num evaporador rotativo da marca Heidolph®, modelo WB 2000, e com o auxílio de uma bomba de vácuo da marca Büchi Vac®, modelo V-500, a 680 mmHg, de forma a concentrar o composto-alvo. Após a realização do ensaio preliminar, foi iniciado o Ensaio 1 (**Figura 2.4**), onde foram utilizados 100 mL de EBSE, 400 mL de acetato de etilo e 300 mL de água destilada. Foram realizados no total doze ensaios, sendo que, por cada um deles foram feitas cinco extrações líquido-líquido.

Após a realização da extração líquido-líquido de cerca de 1700 mL de EBSE e da concentração da amostra, através da evaporação de todo o acetato de etilo, obteve-se 15,22 g de um resíduo de consistência muito viscosa e de cor acastanhada.



Figura 2.4 Extração líquido-líquido do Ensaio 1. A fase orgânica encontra-se em cima e a fase aquosa em baixo.

2.1.5. Separação de phlomispurpentaolone por cromatografia preparativa em coluna

- **Preparação da amostra para a coluna:** um terço do resíduo (cerca de 5,07 g) foi dissolvido em 60 mL de acetato de etilo e misturado com 15 g de sílica gel. Foi colocada a mistura no evaporador rotativo a 80°C e a 610 mmHg, de forma a evaporar todo o solvente e a impregnar a sílica com a amostra.

- **Preparação da coluna cromatográfica:** uma coluna cromatográfica com 40 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro foi empacotada usando fibra de vidro, na base, e adicionando cerca de 80 g de sílica e acetato de etilo lenta e uniformemente, de forma a evitar a formação de bolhas de ar, até três quartos da altura da coluna. Posteriormente, foi adicionada cuidadosamente e no topo da coluna, uma camada de areia (cerca de 0,5 cm), seguida da amostra impregnada em sílica (cerca de 2,5 cm), de maneira a serem obtidas camadas planas. Por fim, a coluna foi submetida a um fluxo constante de acetato de etilo de 2 mL/min, mediante a utilização de uma bomba de aplicação de pressão, da marca Shimadzu LC-6A Liquid Chromatograph® (**Figura 2.5**). O sistema de eluição foi escolhido com base na otimização feita por Campos (2013).

As frações foram recolhidas, evaporadas e, posteriormente, analisadas por TLC. De acordo com a literatura (Neves, 2014), o nortriterpeno é eluído entre os 4,5-6 L de solvente. Foram, por isso, recolhidas frações de volumes decrescentes: 0,5-2 L numa fase inicial, seguidas de frações de 100 mL e, por fim, frações de 50 mL até não se registar composto-alvo nas TLC's. A partir do momento em que se começou a eluir phlomispurpentaolone com poucas impurezas, foi adicionado ao acetato de etilo, 1% de metanol para acelerar a eluição (**Tabela 2.5**). Foram usados 9-10 L de eluente.

As frações contendo phlomispurpentaolone foram combinadas, de acordo com o seu grau de pureza, e o solvente totalmente evaporado até à secura.

O composto-alvo foi recristalizado em 1 mL de acetato de etilo. A solução foi colocada durante 24 h a 4°C, para favorecer a formação de precipitados. Os cristais de phlomispurpentaolone foram filtrados e, seguidamente, lavados com acetato de etilo frio.

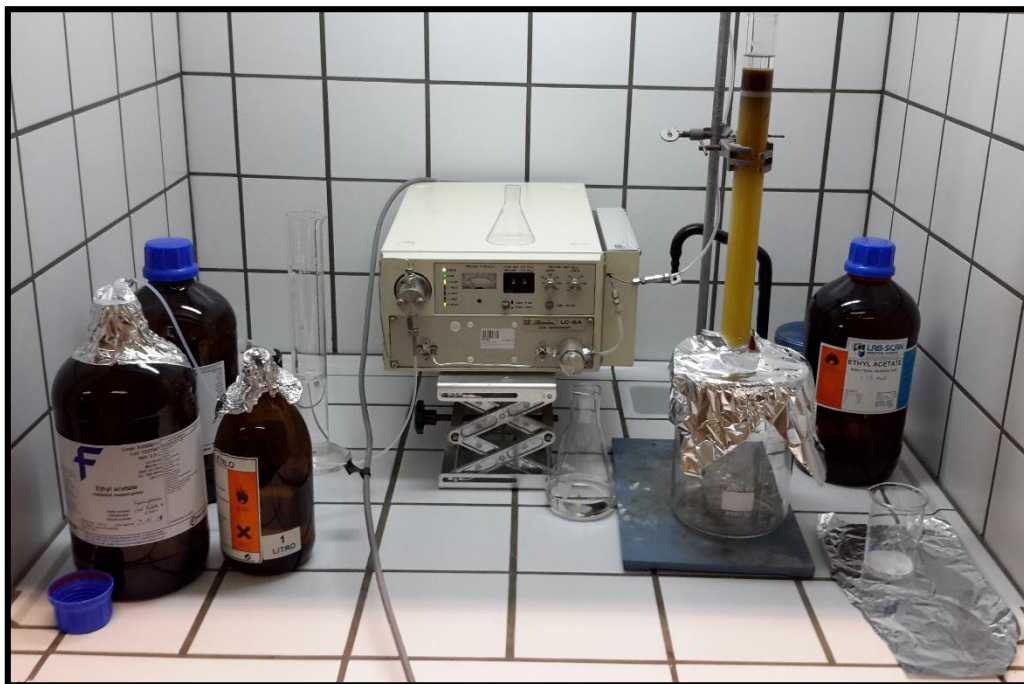


Figura 2.5 Coluna cromatográfica: Esquema de montagem.

2.1.6. Ensaios de citotoxicidade

As amostras de células tumorais HeLa e L929, cedidas pela entidade referida na secção 2.1.1., foram adicionadas ao meio de cultura RPMI e colocadas a incubar a 37°C, em 5% de CO₂, numa incubadora da marca Thermo Electron Corporation®, modelo HERA Cell 150, de forma a assegurar a aderência à superfície do frasco e permitir a iniciação do seu ciclo proliferativo. Passadas 72 horas de incubação, foi removido o meio de cultura e foi adicionada a solução de Tripsina-EDTA, para facilitar o processo de remoção das células da superfície do frasco.

Fez-se uma diluição de 1:10 das células obtidas para facilitar a sua contagem no hematócrito (Sigma-Aldrich®). As contagens das células tumorais foram feitas num

microscópio ótico da marca Nikon®, modelo Eclipse TS100, tendo sido realizadas contagens de 4 quadrados do hematocitômetro (**Tabela 2.2**).

Tabela 2.2 Determinação do número médio de células em cada quadrado do hematocitômetro.

	HeLa	L929
1º quadrado	3	5
2º quadrado	2	7
3º quadrado	8	4
4º quadrado	7	5
Média	5	5,25

Foi, em seguida, determinado o número de células por mm^3 e a densidade celular (**Tabela 2.3**).

Tabela 2.3 Densidades celulares de cada solução inicial de células tumorais e respectivos volumes a pipetar.

	Células/ mm^3	Densidade Celular (células/mL)	V_1 (mL)
HeLa	500	5×10^5	2,4
L929	525	$5,25 \times 10^5$	2,29

A definição do valor de densidade celular a utilizar é um parâmetro muito importante neste tipo de testes, pois ao passo que uma densidade celular excessiva pode resultar em condições desfavoráveis para a proliferação das células na placa de 96

poços, uma muito baixa pode comprometer a determinação da viabilidade das mesmas, devido à proliferação pouco significativa. A densidade celular deve então ser estabelecida de acordo com a taxa de proliferação das linhas de células tumorais utilizadas no ensaio.

Com base na densidade celular determinada para as linhas de células tumorais HeLa e L929 e tendo em consideração o facto de que o valor mais favorável para se colocar na placa de 96 poços é de 10^5 células/mL e de que o volume a colocar em cada poço era de 100 μ L, verificou-se que no final seriam necessários cerca de 9,6 mL de solução de células para perfazer todos os poços. Contudo, para ter uma boa margem de segurança e prevenir algum possível imprevisto técnico, foi estipulado o volume de 12 mL. Considerando a fórmula seguinte:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

em que V_1 é o volume que é necessário pipetar a partir da solução inicial de células, C_1 a densidade celular determinada para cada linhagem de células, C_2 a densidade celular estabelecida para aplicar na placa de 96 poços e V_2 o volume necessário para perfazer os 96 poços da placa, pode ser determinado o volume de células necessário pipetar a partir da solução inicial de células (**Tabela 2.3**).

A solução-mãe (1×10^5 células/mL) foi misturada e uniformizada, de forma a assegurar o mesmo número de células em cada poço e, posteriormente, foram adicionados 100 μ L da respetiva solução a cada poço da placa de 96 poços. Foi realizada uma placa para cada linha de células tumorais.

Para a preparação das soluções-stock, constituídas por phlomispurpentaolone e o solvente dimetilsulfóxido (DMSO), foram primeiramente escolhidas as frações de phlomispurpentaolone mais puras (R39-50 e R51-62), para serem testadas nas linhas de células tumorais.

As massas de cada fração foram pesadas numa balança analítica, da marca PRECISA®, modelo 6200 D SCS. A partir da massa molecular de phlomispurpentaolone

(490,671 g/mol), das respetivas massas do composto presentes nas frações usadas, e da concentração final definida para a solução-stock – 15 mM – foram determinados os volumes de DMSO necessários para a preparação das referidas soluções (**Tabela 2.4**).

Tabela 2.4 Determinação do volume de solvente (DMSO) a adicionar à respetiva fração de phlomispurpentaolone, para a preparação da solução-stock.

	Massa (mg)	n (mmol)	Volume DMSO (mL)
R39-50	7,5	$1,52 \times 10^{-2}$	1,02
R51-62	1,1	$2,24 \times 10^{-3}$	0,149

Devido ao facto de o DMSO ser tóxico para as células em concentrações superiores a 1% (volume/volume), realizou-se uma diluição de 1:100 da solução-stock. Foram, por isso, retirados 20 μ L de solução-stock e adicionados a 1980 μ L de meio de cultura, de forma a obter uma nova solução-stock de concentração 150 μ M.

Foram preparadas três novas soluções-stock (150 μ M): uma para a fração R39-50, outra para a fração R51-62 e outra para o solvente DMSO, esta última formada por 20 μ L de solvente puro e 1980 μ L de meio de cultura.

De acordo com os resultados de investigações prévias, realizadas sobre nortriterpenos de outras espécies de *Phlomis* (Liu *et al.*, 2008), foi estabelecida uma gama de concentrações (não otimizadas) de phlomispurpentaolone a aplicar na placa de 96 poços, durante o ensaio preliminar. As concentrações definidas foram obtidas a partir de diluições das soluções-stock, estando os respetivos volumes de solução-stock e de meio de cultura indicados na **Figura 2.6**. De notar, também, que para o ensaio preliminar, foram realizados triplicados de cada concentração.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B	X	5µM	20µM	40µM	50µM	100µM	150µM	X	5µM	20µM	40µM	X
C	X	96,7µL	86,7µL	73,4µL	66,7µL	33,4µL	-	X	96,7µL	86,7µL	73,4µL	X
D	X	3,3µL	13,3µL	26,6µL	33,3µL	66,6µL	150µL	X	3,3µL	13,3µL	26,6µL	X
E	X	50µM	100µM	150µM	X	5µM	20µM	40µM	50µM	100µM	150µM	X
F	X	66,7µL	33,4µL	-	X	96,7µL	86,7µL	73,4µL	66,7µL	33,4µL	-	X
G	X	33,3µL	66,6µL	150µL	X	3,3µL	13,3µL	26,6µL	33,3µL	66,6µL	150µL	X
H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Legenda	X : Foram aplicados 100 µL de meio de cultura
	Foi utilizada a solução-stock correspondente à fração R39-50
	Foi utilizada a solução-stock correspondente à fração R51-62
	Foi utilizada a solução-stock de DMSO a 1%

Figura 2.6 Ensaio preliminar: Gama de concentrações escolhidas e respetivos volumes a pipetar para a placa de 96 poços. A preto estão discriminados os volumes de meio de cultura a adicionar, ao passo que a vermelho estão os volumes de solução-stock.

Como se pode verificar na **Figura 2.6**, os poços das extremidades da placa de 96 poços não foram utilizados para colocar amostra. Nestes poços foram apenas colocados 100 µL de meio de cultura, devido ao facto de se registar, nestas regiões da placa de 96 poços, uma maior evaporação do meio de cultura, que iria interferir na reprodutibilidade dos resultados. As placas foram colocadas a incubar durante 24 horas.

Após o período de incubação das células do Ensaio Preliminar, a 37°C e a 5% de CO₂, foi realizada uma análise qualitativa, num microscópio ótico, da marca Nikon®, modelo Eclipse TS100, para verificar o estado das respetivas linhas celulares.

Posteriormente, foi elaborada a planificação do ensaio biológico seguinte, onde foi utilizada a linha de células tumorais HeLa, com uma densidade celular de 5×10^4 células/mL, a fração de amostra mais pura (R39-50) e a gama de concentrações entre 10-100 μ M. Neste ensaio de toxicidade foram feitas 6 réplicas de cada concentração (**Figura 2.7**).

Após 72 horas de incubação das células HeLa, a 37°C e a 5% de CO₂, estas foram previamente submetidas a uma lavagem com 150 μ L de uma solução salina – HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*) – com o objetivo de assegurar a completa remoção de phlomisipurpentaolone do meio, antes de se adicionar a solução MTT. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L de solução de MTT e, após 4 horas de incubação das células tratadas com a solução de MTT, foi realizada a leitura num espectrofotómetro leitor de placas, da marca BMG LABTECH®, modelo SPECTROstar Omega, a um comprimento de onda de 570 nm.

Todos os procedimentos executados durante a realização dos ensaios de citotoxicidade foram elaborados numa câmara de fluxo de ar laminar vertical, de nível 2 de segurança biológica, da marca Telstar® Bio II Advanced.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B	X	10µM	20µM	25µM	30µM	35µM	40µM	45µM	50µM	100µM	X	X
C	X	93,33µL	86,7µL	83,34µL	80,00µL	76,64µL	73,34µL	69,97µL	66,67µL	33,34µL	X	X
D	X	6,67µL	13,3µL	16,66µL	20,00µL	23,36µL	26,66µL	30,03µL	33,33µL	66,66µL	X	X
E	X										X	X
F	X										X	X
G	X										X	X
H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Legenda	X : Foram aplicados 100 µL de meio de cultura
	Foi utilizada a solução-stock correspondente à fração R39-50

Figura 2.7 Ensaio de toxicidade: Gama de concentrações escolhidas e respetivos volumes a pipetar para a placa de 96 poços. A preto estão discriminados os volumes de meio de cultura a adicionar, ao passo que a vermelho estão os volumes de solução-stock.

2.1.7. Determinação da atividade ótica

Para a determinação da atividade ótica de phlomispurpentaolone foi utilizado um polarímetro da marca PERKIN-ELMER®, modelo 241MC. Primeiramente, foram dissolvidas 7,5 mg da amostra mais pura (fração R38-50) em 1 mL de metanol HPLC e calibrou-se o polarímetro com metanol HPLC. A seguir, foram realizadas as leituras de rotação ótica tendo em consideração as seguintes condições: utilizou-se uma célula de quartzo, de capacidade de 1 mL; 20-40 µA de energia; uma lâmpada de sódio (589,3 nm) e uma lâmpada de mercúrio (435, 546 e 578 nm) como fontes de luz; as leituras foram realizadas numa sala a 20°C.

O cálculo da rotação específica ($[\alpha]_{\lambda}^{T^{\circ}C}$) foi determinado segundo a fórmula:

$$[\alpha]_{\lambda}^{T^{\circ}C} = \frac{100 \alpha}{l c}$$

em que α é o ângulo de rotação, medido no polarímetro, l é o comprimento do tubo da amostra (em dm) e c é a concentração da amostra (g/100 ml de solução).

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1. Procedimento de extração

Phlomispurpentaolone cora de amarelo aquando da utilização de uma solução de revelação de anisaldeído, seguida de aquecimento (Neves, 2014). Com base na TLC realizada (**Figura 2.8**) aferiu-se que o composto alvo estava presente no EEB. No entanto, verificou-se também que houve um deslocamento diferente na placa de TLC para as manchas amareladas, correspondentes ao composto de interesse, o que pode ser justificado pelo facto da mobilidade de um determinado composto, em TLC, poder ser afetada pela natureza do solvente em que está dissolvido e colocado na placa cromatográfica.

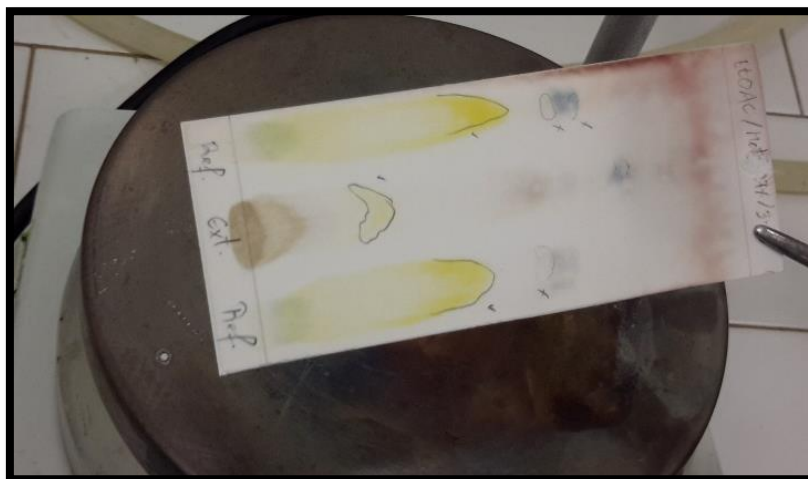


Figura 2.8 Cromatografia em camada fina, em que “Ref.” é a referência (phlomispurpentaolone) e “Ext.” é o extrato etanólico bruto (EEB).

2.2.2. Análise HPLC

Esta análise por HPLC teve como intuito confirmar a presença de phlomispurpentaolone na solução de EBSE. Sabe-se que o tempo de retenção do nortriterpeno alvo é de aproximadamente 12 minutos, nas condições referidas anteriormente, na secção 2.1.3.

A escolha do sistema de eluentes utilizado tem por objetivo eliminar, primeiramente, os compostos hidrofílicos, que vão ser arrastados pelo solvente aquoso, e posteriormente, arrastar os compostos hidrofóbicos, onde está incluído phlomispurpentaolone, com o eluente orgânico. À medida que a percentagem de acetonitrilo aumenta, os compostos apolares mais fortemente retidos na fase estacionária (hidrofóbica) utilizada, serão mais rapidamente arrastados para fora da coluna.

O aparelho regista três curvas durante a análise, cada uma relativa a um comprimento de onda específico: 220, 250 e 280 nm. Com base na análise das curvas para a amostra PP_10X, pode-se verificar que a que detém o pico mais limpo e bem definido, do composto alvo, é a correspondente aos 250 nm (**Figura 2.9 e 2.10**).

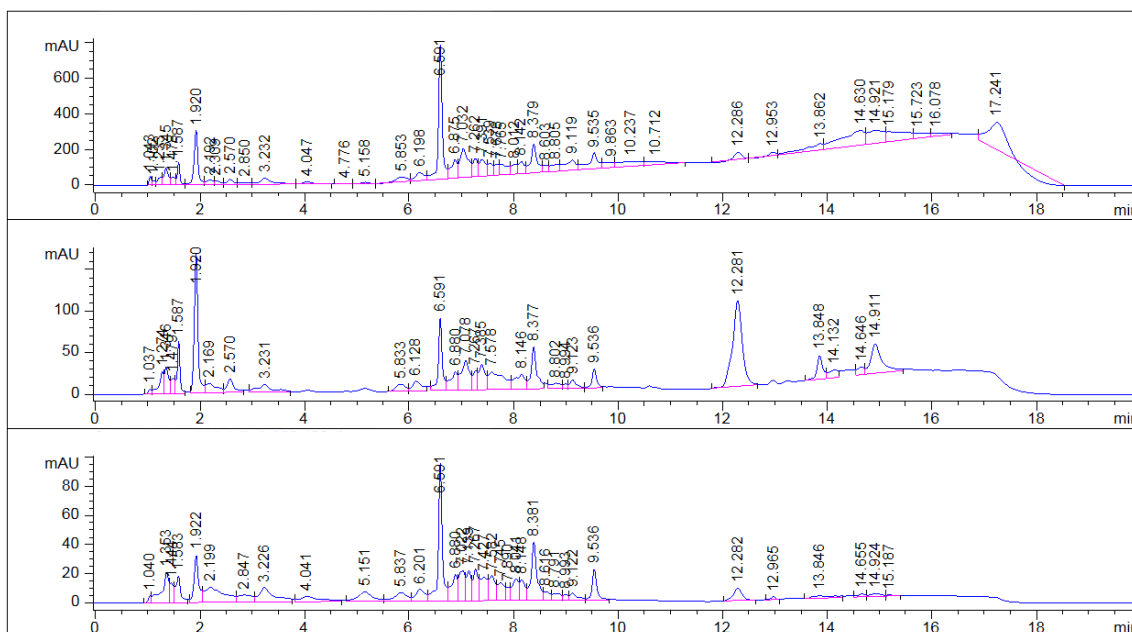


Figura 2.9 Cromatogramas HPLC da amostra PP_10X, a comprimentos de onda de 220,250 e 280 nm, respetivamente.

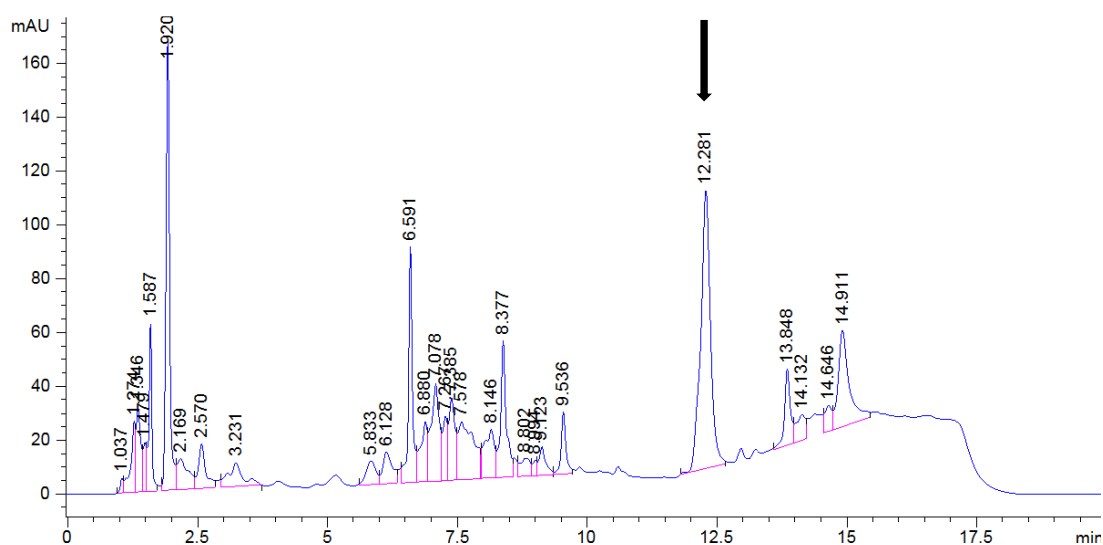


Figura 2.10 Cromatograma correspondente à análise a 250 nm. A seta indica o pico relativo ao momento da eluição de phlomispurpentaolone.

2.2.3. Extração líquido-líquido

Trabalhos anteriores (Neves, 2014) demonstraram através das técnicas de TLC e de HPLC-MS, que phlomispurpentaolone, derivado à sua estrutura maioritariamente apolar, se dissolve mais na fase orgânica, constituída por acetato de etilo, do que na fase aquosa.

Como se pode observar pela **Figura 2.11**, não é detetada na fase aquosa a mancha amarela característica de phlomispurpentaolone, o que indica que o composto já não está presente, ou que está presente mas muito diluído na respetiva fase.

Por outro lado, e tendo por base a TLC relativa à 5ª extração líquido-líquido do ensaio preliminar (**Figura 2.12**) verifica-se que se conseguiu extrair uma pequena quantidade de composto-alvo para a fase orgânica. Para além disso, é possível observar a presença de diversos outros compostos (impurezas) na fase orgânica.



Figura 2.11 TLC da primeira extração líquido-líquido do ensaio preliminar. Do lado esquerdo da placa, foi aplicado o composto de referência (phlomispurpentaolone) e do lado direito, foi aplicada uma amostra da fase aquosa.

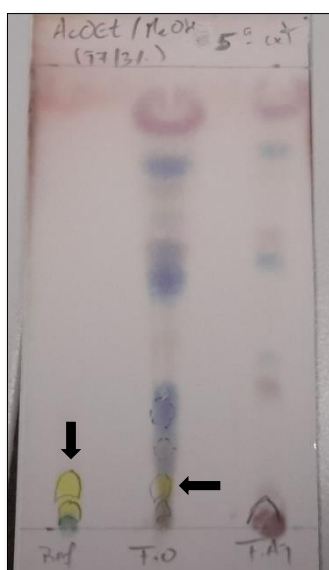


Figura 2.12 TLC da quinta extração líquido-líquido do ensaio preliminar. Do lado esquerdo da placa, foi aplicado o composto de referência (phlomispurpentaolone), no centro da placa foi aplicada uma amostra da fase orgânica e do lado direito, uma da fase aquosa. As setas identificam a mancha amarelada característica do composto-alvo.

2.2.4. Separação de phlomispurpentaolone por cromatografia preparativa em coluna

Preparação da amostra para a coluna cromatográfica

Durante o processo de evaporação do acetato de etilo e impregnação da sílica com a amostra, realizado no evaporador rotativo, teve-se especial atenção ao momento da completa secagem da sílica, de forma a evitar que esta fosse “sugada” pela ação do vácuo.

Coluna cromatográfica

Para a obtenção de uma boa separação e purificação do composto-alvo foi crucial a cuidada preparação da coluna cromatográfica. A fase de empacotamento da coluna com a sílica, por exemplo, é um dos fatores a ter em consideração, no qual a obtenção de uma coluna compacta e uniforme, ou seja, sem bolhas de ar é determinante para a rigorosa separação dos diversos compostos existentes na amostra. Outro fator crucial é a adição da areia à coluna, que deve ser lenta e permitir a formação de uma camada fina e uniforme. A areia vai ficar entre a sílica e a amostra e tem o objetivo de evitar que a camada de sílica seja danificada durante a adição da amostra e, conseqüentemente, que haja um alargamento das bandas, obstando à rigorosa separação e purificação do composto-alvo.

Para proceder ao isolamento e purificação de phlomispurpentaolone foram realizadas duas colunas cromatográficas. A recolha das frações foi feita de acordo com as condições referidas na secção 2.1.5, estando os dados discriminados nas **Tabelas 2.5 e 2.6**.

Tabela 2.5 Frações recolhidas durante a primeira coluna cromatográfica.

Recolha (R)	V_{Recolhido} (mL)	V_{Total Eluído} (mL)	Recolha (R)	V_{Recolhido} (mL)	V_{Total Eluído} (mL)
R1	1680	1680	R29	50	4606
R2	500	2180	R30	50	4656
R3	100	2280	R31	50	4706
R4	100	2380	R32	50	4756
R5	100	2480	R33	50	4806
R6	100	2580	R34	50	4856
R7	100	2680	R35	50	4906
R8	100	2780	R36	50	4956
R9	100	2880	R37	50	5006
R10	100	2980	R38	50	5056
R11	100	3080	R39	50	5106
R12	100	3180	R40	50	5156
R13	50	3230	R41	50	5206
R14	50	3280	R42	50	5256
R15	50	3330	R43	50	5306
R16	50	3380	R44	50	5356
R17	50	3430	R45	50	5406
R18	50	3480	R46	50	5456
R19	50	3530	R47	50	5506
R20	50	3580	R48	50	5556
R21	50	3630	R49	50	5606
R22	50	3680	R50	50	5656
R23	50	3730	R51	50	5706
R24	50	3780	R52	50	5756
R25	50	3830	R53	50	5806
R26	626	4456	R54	50	5856
R27	50	4506	R55	50	5906
R28	50	4556	Foi interrompida a eluição		

R56	50	5956	R82	50	8958
R57	50	6006	R83	50	9008
R58	50	6056	R84	50	9058
R59	50	6106	R85	50	9108
R60	50	6156	R86	50	9158
R61	50	6206	R87	50	9208
R62	50	6256	R88	50	9258
R63	100	6356	R89	50	9308
R64	222	6578	R90	50	9358
R65	100	6678	R91	50	9408
R66	100	6778	R92	50	9458
R67	50	6828	R93	50	9508
R68	50	6878	R94	50	9558
R69	50	6928	R95	50	9608
R70	50	6978	R96	50	9658
R71	50	7028	R97	50	9708
R72	50	7078	Foi interrompida a eluição		
R73	1430	8508			
R74	50	8558			
R75	50	8608			
R76	50	8658			
R77	50	8708			
R78	50	8758			
Foi adicionado 1% metanol					
R79	50	8808			
R80	50	8858			
R81	50	8908			

Tabela 2.6 Frações recolhidas durante a segunda coluna cromatográfica.

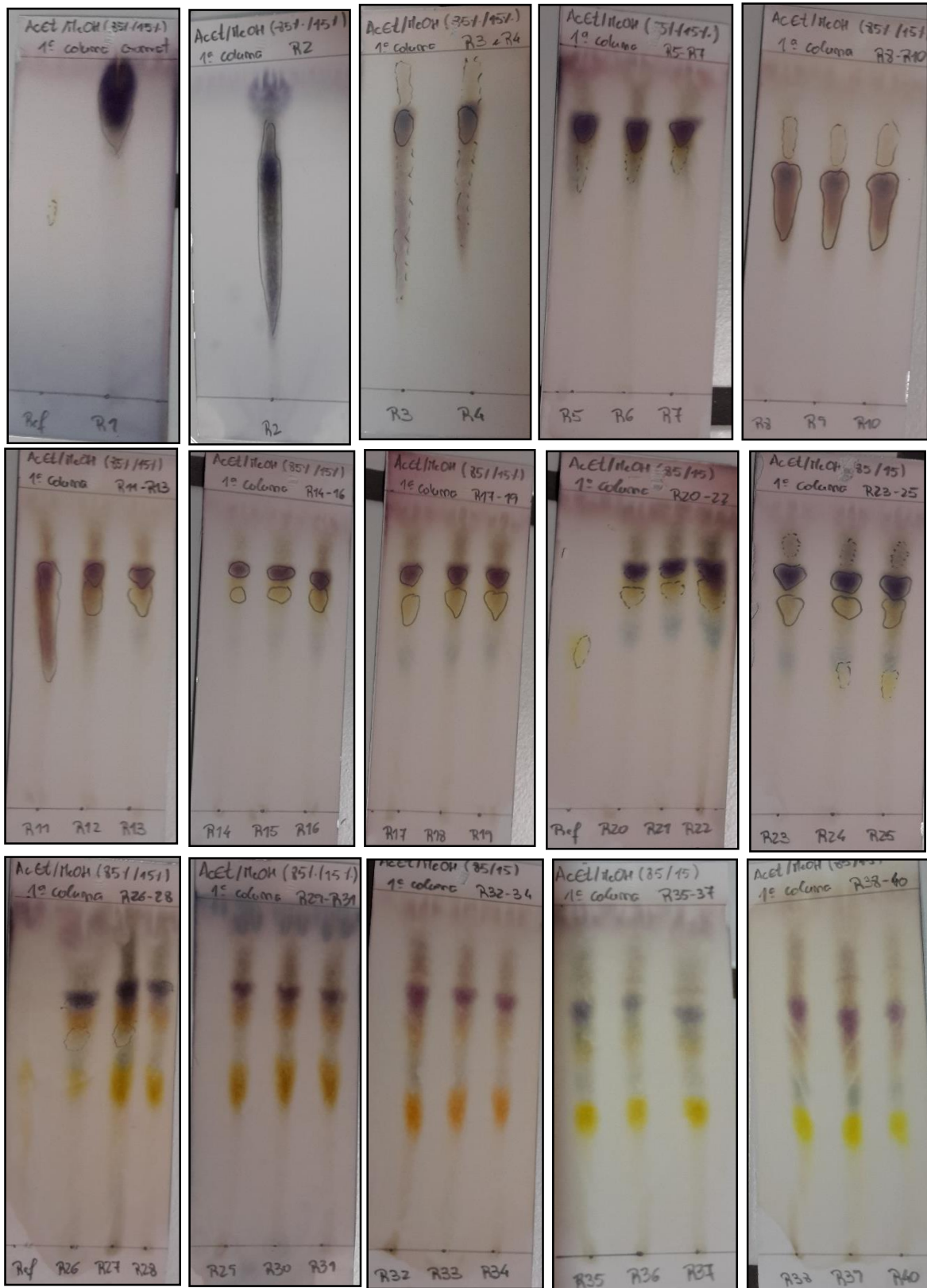
Recolha (R)	V_{Recolhido} (mL)	V_{Total Eluído} (mL)	Recolha (R)	V_{Recolhido} (mL)	V_{Total Eluído} (mL)
R1	1500	1500	R29	50	3708
R2	374	1874	R30	50	3758
R3	100	1974	R31	50	3808
R4	100	2074	R32	50	3858
R5	100	2174	R33	50	3908
R6	100	2274	Foi interrompida a eluição		
R7	100	2374	R34	50	3958
R8	100	2474	R35	50	4008
R9	100	2574	R36	50	4058
R10	100	2674	R37	50	4108
R11	50	2724	R38	50	4158
R12	50	2774	R39	50	4208
R13	50	2824	R40	50	4258
R14	50	2874	R41	50	4308
R15	50	2924	R42	50	4358
R16	134	3058	R43	50	4408
R17	50	3108	R44	50	4458
R18	50	3158	R45	50	4508
R19	50	3208	R46	50	4558
R20	50	3258	R47	50	4608
R21	50	3308	R48	50	4658
R22	50	3358	R49	100	4758
R23	50	3408	R50	50	4808
R24	50	3458	R51	50	4858
R25	50	3508	R52	50	4908
R26	50	3558	R53	50	4958
R27	50	3608	R54	50	5008
R28	50	3658	R55	50	5058

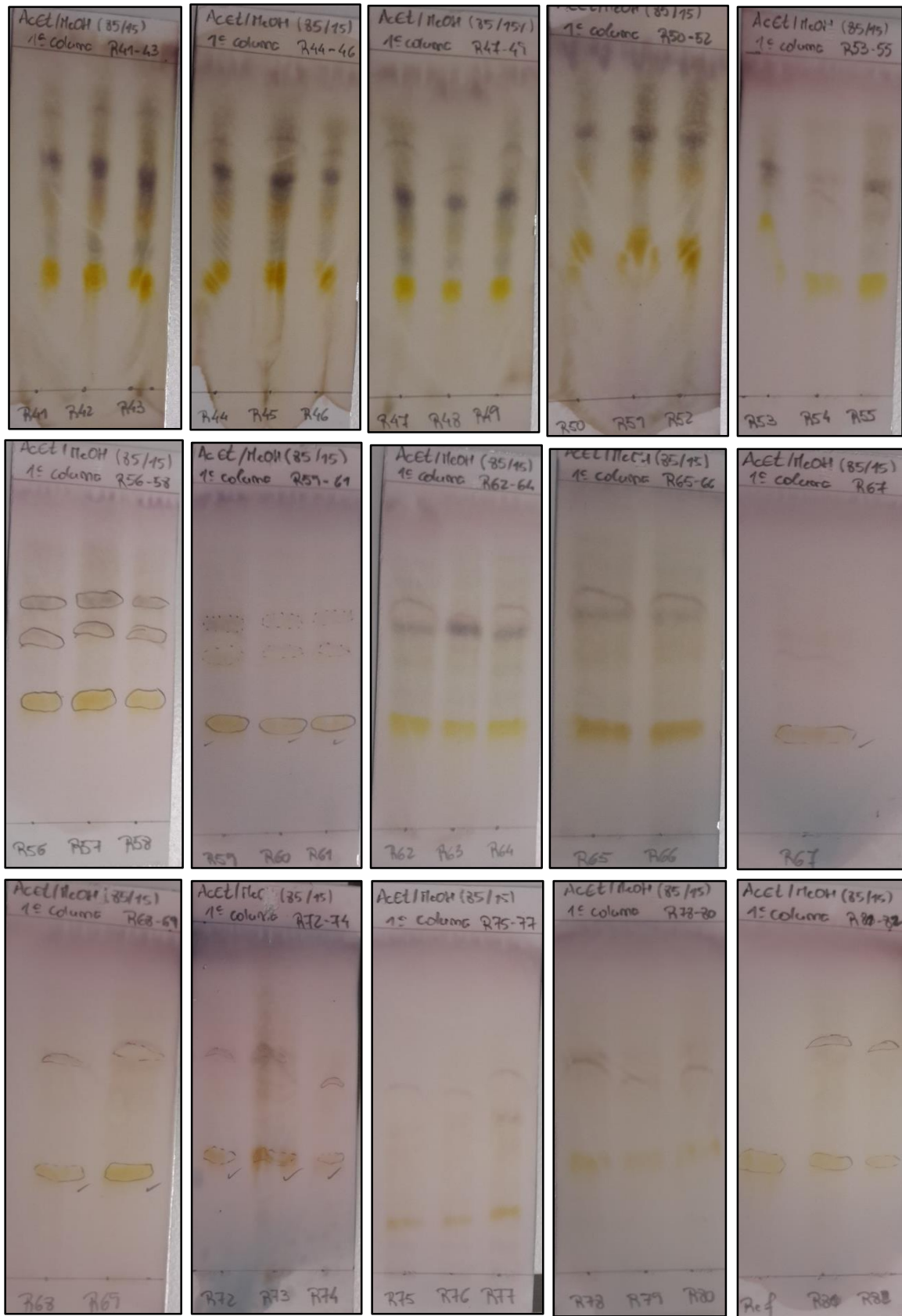
R56	50	5108	R74	50	6108
Foi interrompida a eluição			R75	50	6158
R57	50	5158	R76	50	6208
R58	50	5208	R77	100	6308
R59	50	5258	R78	50	6358
R60	50	5308	R79	50	6408
R61	50	5358	R80	50	6458
R62	50	5408	R81	50	6508
R63	150	5558	R82	50	6558
R64	50	5608	R83	50	6608
R65	50	5658	R84	50	6658
R66	50	5708	R85	50	6708
R67	50	5758	R86	50	6758
R68	50	5808	R87	50	6808
R69	50	5858	R88	100	6908
R70	50	5908	R89	100	7008
R71	50	5958	R90	100	7108
R72	50	6008	Foi interrompida a eluição		
R73	50	6058			

O controlo da eluição de phlomispurpentaolone foi feito com base na análise por TLC de cada uma das frações recolhidas. Atendendo à **Figura 2.13**, verifica-se que a partir da fração R24, começa a sair o composto de interesse, ainda que muito impuro. A partir da fração R72 regista-se uma melhoria significativa no grau de pureza do composto recolhido, pelo que a partir da fração R78 foi adicionado 1% de metanol ao eluente da coluna, de maneira a acelerar o arrastamento de phlomispurpentaolone.

Com base numa análise qualitativa das TLCs efetuadas, foram agrupadas as frações da primeira coluna cromatográfica, que continham phlomispurpentaolone, de acordo com o seu grau de pureza: R29-43, R44-52, R53-58, R59-66, R67-78 e R78-97.

Isolamento e purificação do nortriterpeno phlomisipurpentaolone a partir de raízes de *Phlomis purpurea* e determinação da sua atividade citotóxica nas linhas celulares HeLa e L929





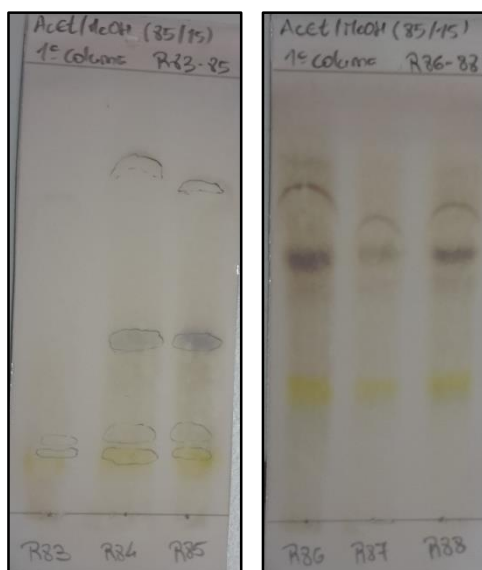


Figura 2.13 Primeira coluna cromatográfica: Controlo da eluição de phlomispurpentaolone por TLCs.

A pureza do acetato de etilo recuperado foi analisada através de uma TLC, para inferir relativamente à sua possível utilização durante a segunda coluna cromatográfica. Verificou-se que o solvente não estava contaminado (**Figura 2.14**).



Figura 2.14 Análise qualitativa da pureza do acetato de etilo recolhido na primeira coluna cromatográfica. Foi utilizado como eluente a mistura acetato de etilo:metanol (85%/15%).

Antes da realização da segunda coluna cromatográfica, foi testada, também, a eficácia duma TLC preparativa para separar as impurezas do composto de interesse,

utilizando como eluente, o acetato de etilo e, como amostra, a fração mais impura obtida na primeira coluna (R29-43). Foi verificado que phlomisipurpentaolone e as impurezas não se separam adequadamente, pelo que foi abandonada esta alternativa de purificação de phlomisipurpentaolone.

Com base na observação das TLCs analíticas realizadas durante a primeira coluna cromatográfica, em que o sistema de eluentes acetato de etilo:metanol (85%/15%), proporcionou uma razoável separação dos diferentes compostos contidos em cada fração, foi elaborada uma alteração ao protocolo da separação cromatográfica: passou a ser utilizado acetato de etilo:metanol (85%/15%) desde o início. Além disso, também foi diminuído o tamanho da camada de amostra, que passou para os 2 cm, de maneira a não sobrecarregar demasiado a coluna cromatográfica.

Com base na observação das TLCs efetuadas durante a segunda coluna cromatográfica, foram agrupadas as frações, que continham phlomisipurpentaolone, de acordo com o seu grau de pureza: R30-38, R39-50, R51-62, R63-90.

Como se pode constatar pelas TLCs anteriormente apresentadas, nenhuma das frações recolhidas apresentou um grau de pureza absoluto, o que revela que uma simples coluna cromatográfica não é o suficiente para conseguir isolar phlomisipurpentaolone dos restantes compostos, presentes nas raízes de *P. purpurea*. Contudo, e de forma a assegurar o maior grau de pureza do composto de interesse, os diferentes grupos de frações, recolhidas em ambas as colunas, foram submetidos a um processo de recristalização, seguido de filtração. Em seguida, os cristais de phlomisipurpentaolone obtidos a partir de cada grupo de frações foram rigorosamente pesados numa balança analítica e analisados por TLC (**Tabela 2.7 e Figura 2.15**).

Tabela 2.7 Resultados das pesagens dos cristais de phlomispurpentaolone obtidos a partir dos diferentes grupos de frações.

Primeira coluna cromatográfica	
Fração	Massa (mg)
R29-43	5,5
R44-52	3,3
R53-58	1,2
R59-66	0,3
R67-78	1,1
R79-82	0,8
R83-97	0,8
Segunda coluna cromatográfica	
Fração	Massa (mg)
R30-38	0,8
R39-50	7,5
R51-62	4,7
R63-90	4,4

Constatou-se que as frações resultantes da primeira coluna cromatográfica continham mais impurezas (ainda que em ínfimas quantidades) do que as frações obtidas na segunda coluna. A fração mais pura (R39-50) foi escolhida para ser submetida aos testes de rotação ótica e ensaios de citotoxicidade.

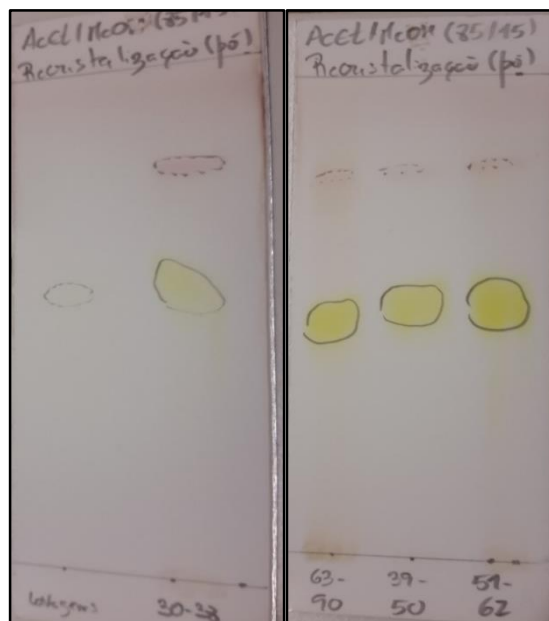


Figura 2.15 Cromatografia em camada fina (TLC) dos cristais de phlomisipurpentaolone obtidos a partir da segunda coluna cromatográfica. Como eluente foi usada a mistura acetato de etilo:metanol (85%/15%).

2.2.5. Ensaios de citotoxicidade

As células necessitam de cerca de 24 h para aderirem adequadamente à superfície do frasco e poderem iniciar o seu ciclo proliferativo. Só após a completa aderência das mesmas é que se pode substituir o meio de cultura. O meio de cultura utilizado – RPMI – possui na sua composição um indicador de pH – Vermelho de Fenol – que nos ensaios biológicos tem como principal função indicar o estado do meio de cultura. Este indicador apresenta uma coloração avermelhada em ambientes alcalinos e amarelada em ambientes ácidos.

À medida que as células se dividem e executam as suas atividades metabólicas, o consumo de nutrientes existentes no meio aumenta, assim como a quantidade de substâncias resultantes do metabolismo que são libertadas no mesmo, tornando o meio mais ácido. Esta coloração amarelada é indicadora de que se deve substituir o meio de cultura, de forma a evitar que as células morram.

Após a incubação inicial das células tumorais e obtenção de uma completa aderência das mesmas à superfície do frasco, adicionou-se a solução de Tripsina-EDTA,

precisamente para proporcionar o efeito oposto nas células. Durante o processo de remoção das células da superfície do frasco e antes da adição da solução de Tripsina-EDTA, é essencial uma lavagem com Tripsina-EDTA diluída em PBS, visto que o meio de cultura RPMI possui 0,5% de soro na sua composição e este último inibe a atividade da enzima. Assim, após a eliminação do meio de cultura RPMI, é crucial efetuar uma lavagem que assegure a remoção de vestígios de soro do frasco.

A lavagem do frasco com a Tripsina-EDTA diluída em PBS é um procedimento seguro, na medida em que é tão rápido que não coloca em risco a libertação das células da superfície do frasco.

Nos ensaios biológicos o ideal seria obter uma atividade citotóxica do composto de interesse que se traduzisse em IC_{50} na ordem dos nM. Contudo, pode-se considerar como interessante uma citotoxicidade que corresponda a $IC_{50} \leq 20 \mu M$.

A observação das placas ao microscópio ótico, realizada durante o ensaio preliminar, teve como intuito inferir sobre a adequabilidade da gama de concentrações utilizada, ou seja, verificar para que valor de concentração de amostra, se deteta atividade citotóxica. Os resultados desta análise qualitativa encontram-se indicados na **Tabela 2.8**.

Tabela 2.8 Resultados da análise qualitativa do ensaio preliminar.

	HeLa	L929	
Fração R39-50	C $\geq 20 \mu M$, todas as células estavam mortas	C = 50 μM, algumas células estavam vivas	C $\geq 100 \mu M$, todas as células estavam mortas
Fração R51-62	C $\geq 100 \mu M$, todas as células estavam mortas	C = 50 μM, algumas células estavam vivas	C $\geq 100 \mu M$, todas as células estavam mortas
DMSO a 1%	Não foi detetado qualquer efeito sobre a viabilidade das células		

Com base na tabela anterior verifica-se que, para as células tumorais L929, a citotoxicidade das amostras (R39-50 e R51-62) só é registada a partir de concentrações de 100 μM , concentração para a qual todas as células L929 estão mortas. Como a concentração imediatamente antes, dentro da gama de concentrações estabelecida, para a qual ainda se encontram células vivas é a de 50 μM , pode-se inferir que o IC_{50} de phlomispurpentaolone para as células L929 está compreendido entre 50 e 100 μM .

Por outro lado, nas células HeLa, foram obtidos resultados diferentes para as frações de phlomispurpentaolone utilizadas. Para a fração mais pura do composto (R39-50), a concentração de 20 μM foi suficiente para matar todas as células tumorais, ao passo que para a fração menos pura (R51-62) a mesma ação foi obtida numa concentração de 100 μM .

Relativamente ao controlo feito sobre o solvente DMSO a 1%, não se registaram diferenças relativamente aos poços controlo, o que demonstra que este solvente não tem qualquer ação citotóxica nas células, a esta concentração.

Perante os resultados do ensaio preliminar decidiu-se realizar um novo ensaio biológico apenas nas linhas de células tumorais HeLa e utilizando a amostra mais pura e com melhor atividade citotóxica (IC_{50} compreendido entre 5-20 μM), ou seja, usando a fração R39-50.

Como foi obtido um $\text{IC}_{50} > 20 \mu\text{M}$ para as células L929 e, tendo em conta que uma atividade citotóxica é considerada toxicológica e terapeuticamente interessante se for abaixo dos 20 μM , decidiu-se não voltar a testar a amostra nesta linha de células tumorais.

Como foi anteriormente referido, durante a planificação do ensaio biológico foi definida uma gama de concentrações entre 10 e 100 μM . Este intervalo de concentrações deve ser rigorosamente estabelecido, de forma a conseguir englobar o máximo de pontos que se situem acima e abaixo do IC_{50} e, simultaneamente, que sejam relativamente próximos a este mesmo valor, para permitir acompanhar o decréscimo de viabilidade das células e construir um gráfico de onde se possa, através de ferramentas informáticas (GraphPad), estipular o valor de IC_{50} do composto alvo.

No ensaio de toxicidade foram feitas 6 réplicas de cada concentração e posteriormente, selecionados os melhores resultados para reduzir o desvio-padrão experimental. Para além disso, como foi demonstrado no ensaio preliminar que o DMSO não tinha ação citotóxica sobre as células HeLa à concentração utilizada, optou-se por não se repetir esse controlo (**Figura 2.7**).

Com base na média das absorvâncias registadas, determinou-se a viabilidade das células HeLa (**Tabela 2.9**) e, através da ferramenta informática GraphPad, foi construída uma curva de toxicidade a partir da qual foi estipulado o valor de IC₅₀. (**Figura 2.16**).

Tabela 2.9 Determinação da viabilidade das células HeLa sob efeito de diferentes concentrações de phlomispurpentaolone.

Ensaio de toxicidade: extrato R39-50							
Concentração (μM)	Absorvância (a 570 nm)						Viabilidade HeLa
10	0,963	0,870	1,142	0,881	1,133	1,196	1,031 \pm 0,143
20	0,591	0,634	0,962	0,686	0,813	0,706	0,732 \pm 0,135
25	0,517	0,498	0,485	0,512	0,299	0,461	0,462 \pm 0,082
30	0,344	0,301	0,300	0,371	0,357	0,317	0,332 \pm 0,030
35	0,254	0,230	0,068	0,309	0,223	0,204	0,215 \pm 0,081
40	0,108	0,077	0,065	0,126	0,044	0,062	0,080 \pm 0,031
45	0,022	0,031	0,027	0,035	0,030	0,033	0,030 \pm 0,005
50	0,014	0,015	0,015	0,017	0,015	0,017	0,016 \pm 0,001
100	0,014	0,015	0,017	0,017	0,015	0,018	0,016 \pm 0,001

Com base na ferramenta GraphPad, foi obtido, para a linha de células tumorais HeLa, um valor de IC₅₀ de phlomispurpentaolone de $22,63 \pm 1,07 \mu\text{M}$.

Comparando o valor de IC₅₀ previsto no ensaio preliminar com o valor obtido no ensaio definitivo, a partir da curva de toxicidade desenhada, verifica-se uma inconsistência de resultados. Segundo a análise qualitativa, durante o ensaio preliminar, a esmagadora maioria das células HeLa encontravam-se mortas sob ação de 20 μM de phlomispurpentaolone, presente na fração R39-50. Por outro lado, para concentrações de 5 μM , quase todas as células HeLa eram viáveis, pelo que, esperava-se um valor de IC₅₀ compreendido no intervalo de 5-20 μM .

Foi planejado e realizado um ensaio de citotoxicidade para uma gama de concentrações de 2-20 μM . Contudo, antes de se avançar para o método MTT foi realizada uma nova análise qualitativa, ao microscópio ótico, para aferir a viabilidade das células HeLa. Foi verificado que, ao contrário dos resultados obtidos no ensaio preliminar, para uma concentração de 20 μM a viabilidade das células HeLa era maior, na medida em que o valor de IC₅₀ poderia ser superior a 20 μM .

Foi realizada então uma reestruturação do ensaio toxicológico e definida uma nova gama de concentrações: 10-100 μM . Tendo em conta que as condições laboratoriais, impostas na realização de qualquer ensaio, foram semelhantes, poder-se-á assinalar apenas como possível justificação para a inconsistência de resultados referida, a precária análise qualitativa utilizada no ensaio preliminar.

Tendo em consideração o resultado obtido para a atividade citotóxica de phlomispurpentaolone na fração R39-50, podemos concluir que o valor de IC₅₀ é promissor, na medida em que um valor interessante em toxicologia ronda os 20 μM . No entanto, há que referir que para obter valores de IC₅₀ mais fidedignos, ter-se-á, futuramente, que purificar a 100% o nortriterpeno para aferir o valor real da sua atividade antiproliferativa. Não sendo o composto 100% puro, a pequena quantidade de impurezas existentes na amostra, pode estar a exercer um efeito sinérgico, ou não, na atividade do mesmo e, logo, a interferir no rigor do valor de IC₅₀ obtido.

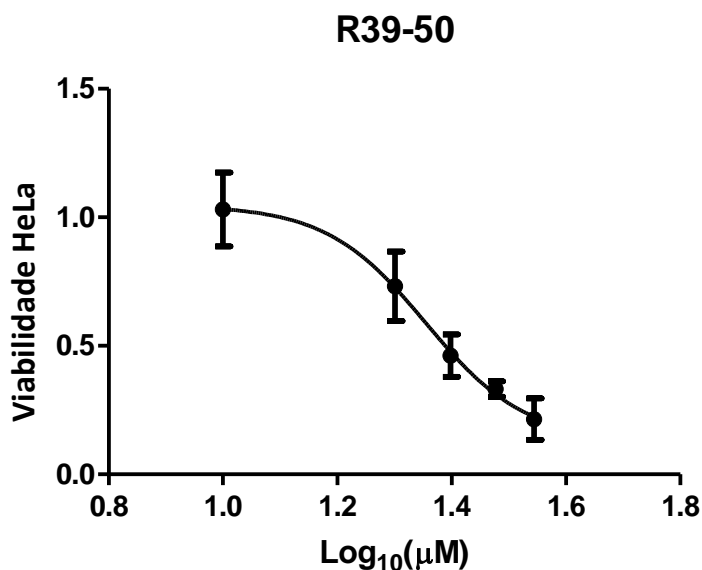


Figura 2.16 Curva de toxicidade resultante da atividade antineoplásica da amostra R39-50. A viabilidade das células HeLa foi determinada mediante a utilização da ferramenta informática GraphPad.

2.2.6. Determinação da atividade ótica

Em primeiro lugar foi realizada a leitura da atividade ótica de phlomisipurpentaolone, utilizando como fonte de luz uma lâmpada de sódio, ou seja, a um comprimento de onda $\lambda = 589,3$ nm e posteriormente, a leitura com a lâmpada de mercúrio nos comprimentos de onda $\lambda = 435$, $\lambda = 546$ e $\lambda = 578$ nm. Os resultados dessas leituras, e a determinação da rotação específica do nortriterpeno em estudo, encontram-se descritos na **Tabela 2.10**.

Durante a leitura da rotação ótica de phlomisipurpentaolone surgiram alguns imprevistos que impossibilitaram a realização da mesma nas condições ideais, nomeadamente: o facto de não se ter conseguido solubilizar toda a massa da fração R38-50 (7,5mg) em metanol. Formou-se um pequeno precipitado que não foi pipetado e colocado na célula de quartzo do polarímetro; a amostra colocada na célula de quartzo estava ligeiramente turva, o que dificultou a estabilização do polarímetro e, conseqüentemente, a leitura do valor de rotação ótica. O facto da amostra não estar totalmente pura (tal como foi referido em secções anteriores) pode ter interferido nos

valores de rotação ótica lidos no polarímetro, visto que, se as impurezas forem também compostos quirais, vão certamente desviar a luz polarizada e ter influencia no valor registado no polarímetro.

Tabela 2.10 Determinação da rotação específica ($[\alpha]_{\lambda}^{20^{\circ}\text{C}}$) de phlomispurpentaolone.

Leitura da Atividade Ótica utilizando a lâmpada de sódio					
λ (nm)	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média das Leituras	$[\alpha]_{\lambda}^{20^{\circ}\text{C}}$
589,3	+0,032	+0,027	+0,026	+0,0283	+3,77
Leitura da Atividade Ótica utilizando a lâmpada de mercúrio					
λ (nm)	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média das Leituras	$[\alpha]_{\lambda}^{20^{\circ}\text{C}}$
435	+0,020	+0,023	+0,026	+0,023	+3,07
546	-0,135	-0,148	-0,127	-0,1366	-18,21
578	-0,138	-0,149	-0,150	-0,1456	-19,41

2.2.7. Limitações ao trabalho de investigação

A presente investigação, por envolver um composto novo, apresentou algumas limitações inerentes à pouca informação existente. No entanto, ao longo da realização da mesma foram, inevitavelmente, surgindo outras limitações, que devem ser tidas em consideração e serão seguidamente explicitadas.

Por exemplo, durante os ensaios de citotoxicidade e no cálculo dos volumes a pipetar a partir das soluções iniciais de células tumorais, a utilização de uma densidade celular de 10^5 células/mL, pode ser sujeita a otimização. Segundo a literatura, sabe-se que para as células HeLa e L929 este valor de densidade celular resulta bem. No entanto, é sempre necessário ajustar ao máximo este parâmetro em função do tempo de duplicação característico de cada linha de células tumorais.

Outra limitação é a de assumir que o composto está 100% puro para a realização dos cálculos do número de moles existentes na fração utilizada. Como possíveis repercussões, temos o facto de os resultados de citotoxicidade não serem completamente fidedignos, pois a presença de impurezas, mesmo que em ínfimas quantidades, pode alterar a atividade biológica do composto, quer de forma sinérgica ou não. Também, uma possível interferência nos valores de rotação ótica registados no polarímetro pode ter ocorrido, visto que, se as impurezas forem compostos quirais poderão desviar o plano da luz polarizada e impossibilitar a leitura rigorosa do valor real da rotação específica de phlomisipurpentaolone.

A enorme dificuldade inerente a uma extração, isolamento e purificação de um qualquer composto a partir de uma espécie vegetal, que incorpora inúmeras substâncias na sua composição, constituiu, também ela, uma limitação ao presente trabalho de investigação.

2.3 Conclusões gerais e perspetivas futuras

A fitoterapia surgiu há milhares de anos a partir do momento em que o Homem começou a utilizar as plantas como meio para tratar das suas afeções. O conhecimento acumulado ao longo dos séculos, com a medicina tradicional e as possíveis aplicações terapêuticas das plantas, permitiu, conjuntamente com o desenvolvimento tecnológico, iniciar a investigação numa outra perspetiva: a de isolar os diversos constituintes das plantas e estudar as suas propriedades farmacológicas. Esta nova perspetiva de investigação científica tem conduzido ao longo dos anos, à descoberta de moléculas inovadoras e, logo, de novos fármacos.

Atualmente, reconhece-se que as plantas constituem uma enorme fonte de potenciais fármacos. Por exemplo, a partir das raízes de *P. purpurea* é possível extrair um nortriterpeno com propriedades antimicrobianas e antiproliferativas: phlomisipurpentaolone.

O cancro é uma das principais preocupações mundiais atuais, em saúde, e mata anualmente mais de 8 milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar deste número já

ter sido maior, as estatísticas inerentes à temática da Oncologia continuam a justificar gritantemente a intensa investigação na vertente oncológica, onde os esforços dos cientistas para ampliar o arsenal terapêutico antineoplásico têm sido enormes (GLOBOCAN, 2012).

No presente trabalho de investigação, foi possível extrair, isolar e purificar um nortriterpeno com uma atividade antineoplásica promissora. A partir de ensaios de citotoxicidade em duas linhas de células tumorais - HeLa e L929 - utilizando o método MTT mostrou-se que phlomispurpentaolone foi capaz de parar a divisão das referidas células. Contudo, no ramo farmacêutico o ideal é ter um fármaco potente, ou seja, que atue terapêuticamente na menor dosagem possível; neste trabalho aferiu-se que phlomispurpentaolone tinha um efeito toxicologicamente razoável apenas para as células HeLa: IC₅₀ de 22,63 ± 1,07 µM.

Sendo este composto um novo nortriterpeno e, sabendo que apresenta quiralidade, foi também, realizada a determinação da sua rotação específica a diferentes comprimentos de onda, tendo-se registado uma rotação específica de +3,77 a 589,3 nm.

Relativamente à questão da completa purificação de phlomispurpentaolone, fator que constituiu alguma limitação à presente investigação, futuramente, e para assegurar a determinação do valor real de IC₅₀, ter-se-á de purificar totalmente o composto-alvo e voltar a testar a atividade citotóxica nas linhas de células tumorais. E, caso essa atividade antiproliferativa seja mais interessante do que a obtida, considerar, ainda, a possibilidade de otimizar essa atividade, alterando no laboratório, a sua estrutura molecular.

Tendo em conta que na área da terapêutica antineoplásica o ideal é ter um fármaco que seja capaz de destruir apenas as células tumorais, sendo inerte para as normais, um fator muito importante a considerar, em ensaios futuros e durante a determinação da atividade citotóxica, é a realização de ensaios biológicos em células humanas saudáveis (não cancerígenas).

O peixe zebra é um importante modelo animal frequentemente utilizado em estudos de âmbito imunológico, genético, *screening* de fármacos, entre outros, derivado

ao seu reduzido tamanho, baixos custos de manutenção, rápido desenvolvimento, à sua transparência e devido à presença de inúmeras moléculas semelhantes às dos mamíferos. Este potente modelo animal não é só usado para determinar a atividade de *lead compounds*, mas também para investigar novos alvos terapêuticos e contribuir para a otimização de fármacos. (Gerhard, 2003; Stoletov *et al.*, 2008).

De acordo com a literatura (Li *et al.*, 2012), o método do peixe zebra é mais sensível que o método MTT, pois este último só pode ser usado para determinar a citotoxicidade, proliferação e ativação em linhas celulares, ao passo que no método *in vivo*, no peixe zebra, é tido em consideração o efeito do composto num microambiente diferente e mais próximo do microambiente real. O peixe zebra apresenta moléculas envolvidas nos mecanismos de apoptose - caspases, p53, bcl2 - similares às humanas, constituindo por isso, um modelo animal de excelência para a realização de testes de fármacos indutores da apoptose.

Futuramente, caso se consiga otimizar a atividade citotóxica do nortriterpeno phlomispurpentaolone, o ensaio no peixe zebra pode ser uma ótima opção para complementar os ensaios de citotoxicidade pelo método MTT em linhas de células tumorais.

2.4 Referências bibliográficas

- Carini, M., Aldini, G., Furlanetto, S., Stefani, R., & Facino, R. M. (2001). LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 517–526.
- Gerhard, G. S. (2003). Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Experimental Gerontology*, 38(11-12), 1333–1341.
- Li, Y., Huang, W., Huang, S., Du, J., & Huang, C. (2012). Screening of anti-cancer agent using zebrafish: comparison with the MTT assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(1), 85–90.
- Liu, P., Yao, Z., Zhang, W., Takaishi, Y., & Duan, H.-Q. (2008). Novel Nortriterpenes from *Phlomis umbrosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 56(7), 951–5.
- Londhe, S. V., & Nanaware, S. M. (2013). HPTLC method for simultaneous analysis of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana*. *Journal of AOAC International*, 96(1), 24–26.
- Neves, D. (2014). Evaluation of the protective effect of *Phlomis purpurea* against *Phytophthora cinnamomi* in Fagaceae and of root metabolites involved. PhD Dissertation, Universidade do Algarve.
- Neves, D., Caetano, P., Oliveira, J., Maia, C., Horta, M., Sousa, N., Cravador, A. (2013). Anti-*Phytophthora cinnamomi* activity of *Phlomis purpurea* plant and root extracts. *European Journal of Plant Pathology*, 138(4), 835–846.
- Organização Mundial de Saúde: GLOBOCAN 2012. Acedido em 31 de agosto de 2015, em <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- Stoletov, K., & Klemke, R. (2008). Catch of the day: zebrafish as a human cancer model. *Oncogene*, 27(33), 4509–20.

Apêndices

Apêndice 1: composição do meio de cultura RPMI. Retirado de SIGMA-ALDRICH.

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757
email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

Product Information

RPMI-1640 Media

RPMI-1640 medium was developed by Moore et al., at Roswell Park Memorial Institute, hence the acronym RPMI. The formulation is based on the RPMI-1630 series of media utilizing a bicarbonate buffering system and alterations in the amounts of amino acids and vitamins.

RPMI-1640 medium has been used for the culture of human normal and neoplastic leukocytes. RPMI-1640 when properly supplemented, has demonstrated wide applicability for supporting growth of many types of cell cultures, including fresh human lymphocytes in the 72-hour phytohemagglutinin (PHA) stimulation assay.

COMPONENT	R0883 [1×] g/L	R1145 [10×] g/L	R1383 [powder] g/L	R1780 [1×] g/L	R2405 [1×] g/L	R6504 [powder] g/L	R8758 [1×] g/L
Inorganic Salts							
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.1	1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
MgSO ₄ (anhydrous)	0.04884	0.4884	0.04884	0.04884	0.04884	0.04884	0.04884
KCl	0.4	4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
NaHCO ₃	2	–	–	2	2	–	2
NaCl	8	80	8	8	8	8	8
Na ₂ HPO ₄ (Anhydrous)	0.8	8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Amino Acids							
L-Alanyl-L-Glutamine	–	–	–	–	0.4344	–	–
L-Arginine · HCl	0.2	2	0.2	–	0.2	0.2	0.2
L-Asparagine · H ₂ O	–	–	0.05	–	–	0.05	–
L-Asparagine	0.05	0.05	–	0.05	0.05	–	0.05
L-Aspartic Acid	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
L-Cystine · 2HCl · H ₂ O	0.0852	0.852	0.0852	0.0852	0.0852	0.0852	0.0852
L-Glutamic Acid	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
L-Glutamine	–	–	0.3	0.3	–	0.3	0.3
Glycine	0.01	0.1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
L-Histidine · HCl · H ₂ O	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
Hydroxy-L-Proline	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
L-Isoleucine	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
L-Leucine	0.05	0.5	0.05	–	0.05	0.05	0.05
L-Lysine · HCl	0.04	0.4	0.04	–	0.04	0.04	0.04
L-Methionine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
L-Phenylalanine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
L-Proline	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
L-Serine	0.03	0.3	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
L-Threonine	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
L-Tryptophan	0.005	0.05	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
L-Tyrosine · 2Na · 2H ₂ O	–	–	0.02883	–	–	0.02883	–
L-Tyrosine	0.02184	0.2184	–	0.02184	0.02184	–	0.02184
L-Valine	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Vitamins							
D-Biotin	0.0002	0.002	0.0002	0.002	0.0002	0.0002	0.0002
Choline Chloride	0.003	0.03	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Folic Acid	0.001	–	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
myo-Inositol	0.035	0.35	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035
Niacinamide	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
p-Aminobenzoic Acid	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
D-Pantothenic Acid · ½Ca	0.00025	0.0025	0.00025	0.00025	0.00025	0.00025	0.00025
Pyridoxine · HCl	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Riboflavin	0.0002	0.002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
Thiamine · HCl	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Vitamin B ₁₂	0.000005	0.00005	0.000005	0.000005	0.000005	0.000005	0.000005
Other							
D-Glucose	2	20	–	2	2	2	2
Glutathione (reduced)	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Phenol Red · Na	0.0053	0.05	0.0053	–	0.0053	0.0053	0.0053
ADD							
L-Glutamine	0.3	0.3 at 1×	–	–	–	–	–
NaHCO ₃	–	2.0 at 1×	2	–	–	2	–

Apêndice 2: composição do meio HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Retirado de SIGMA-ALDRICH.



Product Information

Hanks' Balanced Salt Solution

HBSS Modified, with phenol red, without calcium, without magnesium
CATALOG NO. 55021C

Description

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) is designed for use with cells maintained in non-CO₂ atmospheric conditions. For cell dissociation procedures, use HBSS Modified, which is formulated without calcium and magnesium salts.

Formulation

Component (all components measured in mg/L)	
INORGANIC SALTS	
Potassium chloride	400.000
Potassium phosphate monobasic anhydrous	60.000
Sodium bicarbonate	350.000
Sodium chloride	8000.000
Sodium phosphate dibasic heptahydrate	90.000
OTHER	
Dextrose anhydrous	1000.000
Phenol red sodium salt	10.620

Precautions

Use aseptic technique when handling or supplementing this buffer after filtration. This product is for further manufacturing use. THIS PRODUCT IS NOT INTENDED FOR HUMAN OR THERAPEUTIC USE.

Storage

Store medium at 15 to 30 C. Do not use after the expiration date.

Indications of Deterioration

Buffer should be clear of particulates and flocculent material. Do not use if liquid buffer is cloudy or contains precipitate. Other evidence of deterioration may include color change or degradation of physical or performance characteristics.

Preparation Instructions

Supplements, such as antibiotics, can be added to the sterilized solution using aseptic technique. Storage conditions and shelf life of the supplemented product may be affected by the nature of the supplements.

Characteristics

Appearance

Clear red solution

Endotoxin (LAL)

≤ 1.0 EU/mL

Osmolality (as supplied)

260 - 300 mOsm/kg H₂O

pH (as supplied)

7.0 - 7.4

Sterility

No microbial growth detected

References

1. Hanks, J. H. and Wallace, R. E., *PSEBM* (1949) 71:196.