

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

Caracterização da droga *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) e fracionamento  
biomonitorado de seus constituintes ativos

LEONARDO NOBORU SEITO

**Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências, Campus de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de  
Doutor no Programa de PG em Biologia  
Geral e Aplicada**

**BOTUCATU - SP  
2008**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**CÂMPUS DE BOTUCATU**

Caracterização da droga *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) e fracionamento  
biomonitorado de seus constituintes ativos

**LEONARDO NOBORU SEITO**

**PROF DR LUIZ CLAUDIO DI STASI**

**Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências, Campus de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de  
Doutor no Programa de PG em Biologia  
Geral e Aplicada**

**BOTUCATU - SP**

**2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Seito, Leonardo Noboru.

Caracterização da droga *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) e fracionamento biomonitorado de seus constituintes ativos / Leonardo Noboru Seito. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2008

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Assunto CAPES: 20300000

1. Botânica 2. Bignoniaceae 3. Plantas medicinais - Uso terapêutico

CDD 615.32

Palavras-chave: Antioxidante; Antitumoral; Doença inflamatória intestinal; Flavonóides; Imunomodulador; *Zeyheria montana*

## **Prólogo**

Durante o período relativo ao meu doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada pude desenvolver inúmeras atividades junto ao Laboratório de Fitomedicamentos (LaFit-Botu) que permitiram enriquecer minha formação profissional:

**I. Participação no Projeto Quilombolas (2005)**, do Instituto para o Desenvolvimento e a Produção Florestal/Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

### **II. Participação em cursos:**

(2005) Curso de extensão: Fitogeografia e gestão do meio ambiente.

### **III. Estágio no exterior:**

(2005) Estágio nos laboratórios do Departamento de Farmacologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Granada – Espanha, no período de 31 de outubro a 01 de dezembro de 2005.

### **IV. Cumprimento do estágio de docência:**

(2006) Realização do estágio de docência na disciplina de Farmacologia, no curso de Nutrição deste Instituto.

### **V. Participação em eventos científicos:**

(2005) Simpósio: Plantas medicinais no Brasil – o pesquisador brasileiro consegue estudá-las?

(2005) I Simpósio da PG-BGA

(2006) XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil

(2006) I Encontro Nacional sobre Ética na Experimentação Animal

(2006) II Simpósio da PG-BGA

(2007) VI Workshop da Pós-Graduação

(2007) III Simpósio da PG-BGA

(2008) VII Workshop da Pós-Graduação

## VI. Resumos em Anais de Congressos:

MORAES, T.M.; SILVA, M.A.; **SEITO, L.N.**; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Atividade antioxidante e antisecretora do extrato metanólico de *Leiothrix flavecens* (EMLF)**. In: XVI Congresso Ítalo-Latinoamericano de Etnomedicina, La Plata – Argentina, 4 a 8 de setembro de 2007.

**SEITO, L.N.**, ARAKAWA, N.S., DA COSTA, F.B., BASTOS, J.K., DI STASI, L.C. **Fracionamento monitorado por avaliação de atividade antioxidante *in vitro* de *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae)**. In: XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Salvador-BA, 19 a 22 de setembro de 2006.

WITAICENIS, A., FADEL, G., CESTARI, S.H, RODRIGUES, P., **SEITO, L.N.**, VASCONCELOS, P.C.P., PELLIZZON, C.H., DI STASI, L.C. **Atividade antiinflamatória intestinal da cumarina (1,2-benzopirona) no modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS em ratos** In: XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Salvador-BA, 19 a 22 de setembro de 2006.

CESTARI, S.H., RODRIGUES, P. WITAICENIS, A., FADEL, G., **SEITO, L.N.**, PELLIZZON, C.H., DI STASI, L.C. **Atividade antiinflamatória intestinal da escoparona (6-7-dimetoxicumarina) no modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS em ratos**. In: XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Salvador-BA, 19 a 22 de setembro de 2006.

RODRIGUES, P. WITAICENIS, A., CESTARI, S.H., FADEL, G., **SEITO, L.N.**, PELLIZZON, C.H., DI STASI, L.C. **Atividade antiinflamatória intestinal da dafnetina (7-8-dihidroxicumarina) no modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS em ratos**. In: XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Salvador-BA, 19 a 22 de setembro de 2006.

## VI. Trabalhos publicados como colaborador:

WITAICENIS, A., ROLDÃO, E.F., **SEITO, L.N.**, ROCHA N.P., DI STASI, L.C. **Pharmacological and toxicological studies of *Drimys angustifolia* Miers. (Winteraceae)**. Journal of Ethnopharmacology, 111(3): 541-546, 2007.

LUCHINI, A.C., RODRIGUES-ORSI, P., CESTARI, S.H., **SEITO, L.N.**, WITAICENIS, A., PELLIZZON, C.H., DI STASI, L.C. **Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis**. Biol Pharm Bull. 31(7):1343-1350, 2008.

DE PAULA FERREIRA, M., NISHIJIMA, C.M., **SEITO, L.N.**, DOKKEDAL, A.L., LOPES-FERREIRA, M., DI STASI, L.C., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C.A. **Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide**. J Ethnopharmacol. 117(1):170-174, 2008.

ROLDÃO, E.D., WITAICENIS, A., **SEITO, L.N.**, HIRUMA-LIMA, C.A., DI STASI, L.C. **Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae)**. J Ethnopharmacol. 119:94-98, 2008.

## **VII. Outras atividades:**

(2007) Co-orientação da aluna **Andréa Costa Fruet** em monografia entregue para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. A aluna de iniciação científica foi acompanhada, recebendo treinamento em técnicas de coleta, limpeza, secagem e pulverização de plantas, assim como no preparo dos extratos vegetais. O acompanhamento das atividades também incluiu o planejamento experimental, a padronização e a realização de experimentos, assim como a análise dos resultados e a redação científica. Título da monografia: *Atividade antitirosinásica e antioxidante de plantas do Cerrado e da Mata Atlântica.*

(2007) Participação na comissão organizadora do VI Workshop da Pós-graduação em Ciências Biológicas, ocorrido dos dias 30 de março a 01 de abril de 2007.

(2007) Participação na comissão organizadora do III Simpósio do programa de pós-graduação em Ciências Biológicas – Biologia Geral e Aplicada, ocorrido no dia 29 de novembro de 2007.

(2008) Participação na comissão organizadora do VII Workshop da Pós-graduação em Ciências Biológicas, ocorrido dos dias 24 a 26 de abril de 2008.

## **Introdução**

Antes de abordar o assunto mais diretamente associado ao presente trabalho, apresento breves ponderações que, no entanto, considero de grande relevância na formação de uma opinião e na conduta a respeito da atividade que ora abraço – a pesquisa de plantas medicinais. As considerações apresentadas não têm a pretensão de ser um trabalho de revisão; é, tão somente, uma abordagem de notícias recentes divulgadas nos diferentes meios de comunicação.

### **Plantas medicinais, Ciência, Brasil e mundo**

O estudo de plantas medicinais se justifica por diversas razões interligadas e contextualizadas numa sociedade em que interesses divergentes se chocam. Citando brevemente aspectos que atualmente se encontram no foco de grandes discussões, ressaltamos as questões sociais e culturais, relacionadas com o conhecimento popular e o uso tradicional de plantas, mediante o uso que a indústria faz dessas informações para gerar produtos de rápido retorno financeiro, sem o devido retorno social; no contexto econômico, a geração de produtos e empregos, e as mudanças nas concepções de mercado e consumo; no ambiental, as questões relativas à conservação, ao uso racional e ao manejo sustentável de recursos naturais, especialmente, aqueles relacionados à biodiversidade; no político, a atuação do poder público para equilibrar crescimento econômico e o desenvolvimento humano, cada vez mais atrelado às questões ambientais; e mais recentemente, as questões normativas referentes ao acesso a recursos genéticos visando (ou não) a bioprospecção – principalmente quando do envolvimento de conhecimento tradicional associado. O conjunto dessa problemática permeia toda a atividade científica afetando, especialmente, àqueles que desenvolvem pesquisas com plantas medicinais. A situação exige profunda conscientização sobre o contexto em que fazemos ciência na atualidade – por maiores que sejam as dores de cabeça resultantes.

Em função disso, a pesquisa dedicada ao estudo da biodiversidade, sob os mais diversos aspectos, assume papel estratégico; principalmente, considerando-se a riqueza de biomas do Brasil, as diversas comunidades neles inseridas, as deficiências na área de saúde pública, e a pobreza. Recentemente, a ex-ministra do Meio Ambiente, senadora Marina Silva, em conferência na 60ª reunião anual da SBPC, reafirmou a importância da pesquisa para as políticas destinadas à Amazônia – “Não há como combinar

preservação e desenvolvimento econômico e social da Amazônia, senão com soluções advindas das atividades de ciência e tecnologia – e para isso temos um aporte científico e tecnológico de alta qualidade”. Ainda assim, os estudos em botânica, zoologia, ecologia, antropologia e áreas inter- e multidisciplinares, como a etnofarmacologia, necessitam de maior amparo governamental, e medidas que facilitem atividades de excelência em pesquisa no país. Apesar das dificuldades encontradas pelos cientistas brasileiros, tendo-se em vista os rigores da legislação vigente (Medida Provisória 2.186-16 de 2001), e mesmo do atual anteprojeto de lei que há pouco esteve sob consulta pública, a pesquisa científica prossegue em meio a grandes discussões para se encontrar propostas e caminhos.

O processo tem sido demorado, mas o atual momento é propício, considerando-se as discussões internacionais em torno das questões econômicas e sociais, e da necessidade de conciliar proteção ambiental e desenvolvimento econômico, numa época em que se evidenciam os efeitos do aquecimento global, principalmente, sobre o patrimônio humano. Por mais que as opiniões entre o poder público e a comunidade acadêmica se desencontrem, concordam sob outros aspectos, em se tratando da necessidade de se conciliar preservação ambiental, atendimento às necessidades de comunidades tradicionais em áreas de proteção ambiental, e o papel da produção científica e tecnológica como grande colaboradora no direcionamento de ações. Contudo, a viabilização dessas ações depende da resolução do problema do oportunismo e do clientelismo político, que distorcem as finalidades das coisas.

O Brasil é considerado o país detentor dos maiores números referentes à diversidade biológica no planeta; uma informação que tem sido enfatizada pelos meios de comunicação, frente à crescente preocupação mundial com o aquecimento global e com medidas visando ao seqüestro de carbono da atmosfera. Mas as questões que dizem respeito à preservação ambiental transcendem o impositivo do desequilíbrio ecológico e climático, considerando-se a pobreza estrutural gerada pelo modelo de sociedade capitalista e globalizada. As condições de pobreza e os baixos níveis de instrução em diversos países (africanos, asiáticos e latino-americanos) estão estreitamente relacionados à crescente pressão ambiental – quer seja pela ocupação espacial inapropriada, quer seja pela exploração predatória de recursos naturais motivada pelas necessidades de trabalho e subsistência, ou, ainda, pela expansão das fronteiras da agropecuária, como ocorre no Brasil. Isso faz de toda a sociedade, ricos e pobres, instruídos ou ignorantes, co-responsáveis pelas condições de vida no planeta. No



entanto, as responsabilidades são relativas e, naquilo que concerne aos detentores de instrução e cultura, cabe um importante papel educativo na sociedade, quer seja na difusão do conhecimento e na formação de pessoal, quer seja colaborando na construção de uma estrutura multi-setorial (poder público, iniciativa privada, universidades e organizações civis) para um modelo mais sustentável (e solidário) de desenvolvimento.

Considerando-se que a produção científica e tecnológica nacional está basicamente atrelada aos programas de pós-graduação nas instituições públicas de ensino superior, a formação de mestres e doutores é atividade de grande relevância no atual panorama dos fatores necessários para o desenvolvimento do país. Em relação às nações do hemisfério Norte, as universidades e os programas de pós-graduação de excelência são antigos e bem consolidados pela tradição, havendo importante integração entre a academia e a iniciativa privada. No Brasil, conforme dados da CAPES, a pós-graduação teve início em meados da segunda metade do século passado, seguindo as mesmas influências européias que nortearam a estruturação das universidades no país. Desde então, algumas gerações de novos professores e cientistas, formados em território nacional, deram início à nossa própria tradição científica. Mas, sua maior colaboração ainda está se definindo, neste país reconhecido internacionalmente pelos grandes contrastes.

Seguindo a vocação que as condições naturais nos apresentam, e a herança cultural que os povos indígenas, europeus e africanos nos legaram, o estudo de plantas úteis no Brasil apresenta-se como importante fonte de material para a pesquisa científica e tecnológica. Em especial, a pesquisa de plantas medicinais na busca por novos fármacos e na padronização de medicamentos – quer seja na forma de fitofármacos, quer seja na forma de fitoterápicos padronizados – assume importante papel, considerando-se as cifras monetárias geradas pela indústria farmacêutica no mundo e as deficiências na área de saúde pública no país. Recentemente, foi lançado no Brasil o primeiro medicamento considerado genuinamente nacional – o fitoterápico Acheflan® (Aché), do qual se espera um faturamento anual ao redor de R\$ 1 bilhão, conforme artigo de Maurício Capela na revista Istoé Dinheiro. O empreendimento necessitou a aplicação de cerca de R\$ 100 milhões ao longo de 16 anos, firmando-se acordos com departamentos de pesquisa da Unicamp, USP, UFSC e UFRJ, para transformar *Cordia verbenacea* (popularmente chamada de “erva-baleeira”) em pomada. Das comunidades tradicionais da Mata Atlântica, a “erva-baleeira” veio ao mundo como importante marco histórico na pesquisa em plantas medicinais no Brasil. Resta saber de que forma virá o

retorno a que essas comunidades têm o direito, e o que essa descoberta vai representar em termos de preservação e recuperação do bioma Mata Atlântica. Nestes tempos em que se discute a importância da pesquisa em novos medicamentos como enfoque estratégico para o desenvolvimento do país, a formação de pessoal de nível superior nas universidades já vem realizando sua contribuição. Mas, o conhecimento que nos serve de ponto de partida vem das parcelas mais humildes da população, e conhecer essa realidade é fundamental para uma ação conscienciosa na pesquisa científica. Não podemos deixar de ter em mente que, antes de ajudar a gerar divisas, a ciência é atividade humana e deve trabalhar pela melhoria da qualidade de vida e minoração do sofrimento – caso contrário, continuará concorrendo nas mesmas falhas que ocasionam os episódios trágicos persistentes em todo o mundo. A inversão de valores que impregnam o mercado financeiro e a economia mundial não cabe à ciência, que deveria nos levar a uma atividade mais humilde e solidária, contribuindo com o que de melhor pode fazer – questionando, transformando e progredindo juntamente ao pensamento humano.

### **Dor de barriga e catarse científica**

De acordo com dados clássicos divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 65% da população mundial recorre à medicina tradicional no atendimento às suas necessidades primárias de saúde, podendo-se seguramente presumir que a maior parte das terapias tradicionais envolve o uso de plantas medicinais (Farnsworth, 1985; Fabricant & Farnsworth, 2001). A OMS estima que cerca de 50% das pessoas no mundo não tem acesso regular a medicamentos básicos, recorrendo à medicina tradicional e às plantas medicinais locais (WHO, 1995). Em 1997, foi estimado que cerca de 20% da população mundial vive em condições de extrema pobreza e não possui acesso a medicamentos básicos (WHO, 1997), como podemos observar em países pobres e em várias regiões de países em desenvolvimento, como o Brasil.

Além dessas questões, outro aspecto de grande relevância ao estudo de plantas medicinais está relacionado à necessidade constante de busca por opções terapêuticas no tratamento de várias doenças que demandam atenção. Quanto a isso, as constatações relativas à saúde pública ainda são preocupantes, considerando-se as inúmeras doenças negligenciadas que acometem as parcelas mais pobres da população (WHO, 2007), as

doenças emergentes e re-emergentes, e as doenças crônicas, sem tratamento adequado (WHO, 1995). Proporcionar lenitivo à população carente, oferecendo alternativas seguras, eficazes e acessíveis no tratamento de doenças, é uma grande contribuição que a pesquisa científica não deve perder de vista.

No presente trabalho, enfocamos uma doença cuja prevalência é significativa em países desenvolvidos (Loftus, 2004; Hanauer, 2006), e cuja incidência tem aumentado no Brasil, apesar dos poucos dados disponíveis (Souza et al., 2002) – as doenças inflamatórias intestinais (DII). As duas principais condições patológicas nessa categoria são a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Ambas se caracterizam por apresentarem um caráter crônico e recidivante, exigindo, nos casos severos, intervenção cirúrgica (Hwang & Varma, 2008).

As DII apresentam um quadro clínico de severidade variada. Contudo, o comprometimento da qualidade de vida dos pacientes é um dos principais aspectos dessas doenças. Os episódios de reativação do processo inflamatório são imprevisíveis e impossibilitam a realização das atividades cotidianas normais, requerendo longos períodos de recuperação (Borgaonkar & Irvine, 2000; Reinisch et al., 2007). Além disso, diversas complicações correlacionadas podem agravar o quadro mórbido, como o desenvolvimento de câncer de cólon (Clevers, 2004).

Apesar de ainda não se saber a etiologia das DII, muito já se avançou na compreensão de seus mecanismos fisiopatológicos. A característica mais marcante das DII é a desregulação e exacerbação da resposta imune aos antígenos da luz intestinal (Steidler, 2001; Sartor, 2004), havendo uma grande ativação das células inflamatórias e produção de metabólitos reativos do oxigênio e do nitrogênio (Pavlick et al., 2002). A causa da desregulação da resposta imune contra a microbiota intestinal ainda não foi esclarecida (Steidler, 2001; Sartor, 2004), mas já foram detectados fatores genéticos e ambientais predisponentes (Danese et al., 2004; Ferguson et al., 2007). Maiores investigações estão sendo direcionadas para esclarecer a participação do “estresse” na precipitação da doença, assim como nos episódios de reativação, por mecanismos neuroimunoendócrinos que ainda precisam ser mais bem elucidados (Straub et al., 2002; Niess et al., 2002; Mawdsley & Rampton, 2005).

Enquanto o conhecimento sobre a fisiopatologia das DII avança, a terapêutica ainda envolve o uso de 5-aminossalicilatos, corticóides, azatioprina e mercaptopurinas (Baumgart & Sandborn, 2007; Summers, 2007). Mas, apesar de serem considerados medicamentos satisfatoriamente eficazes e conhecidos, apresentam uma grande gama de

efeitos adversos e indesejáveis, principalmente, pela necessidade de uso prolongado (Stein & Hanauer, 2000; Ardizzone & Bianchi Porro, 2002). Em virtude disso, outros enfoques terapêuticos resultaram em tratamentos direcionados contra elementos envolvidos com a ativação e o recrutamento de células inflamatórias, dentro do que se convencionou denominar terapia biológica (Sands, 1997; Sandborn & Targan, 2002). Essa forma de tratamento utiliza anticorpos monoclonais contra alvos como o TNF $\alpha$  ou a cadeia  $\alpha_4$  de moléculas de adesão, como o infliximab e o natalizumab, respectivamente (Sandborn & Targan, 2002; Danese et al., 2008). O uso da terapia biológica no tratamento dos casos severos das doenças inflamatórias intestinais pode ser uma opção terapêutica eficaz, contudo, de preços proibitivos. Além disso, dados recentes nos trazem relatos sobre efeitos adversos e indesejáveis, como imunossupressão e aumento da suscetibilidade a infecções oportunistas (Toruner et al., 2008; Vige et al., 2008). Dessa forma, a busca de novas opções terapêuticas para as DII continua sendo um desafio aos pesquisadores.

Novas drogas têm sido buscadas nas pesquisas com produtos naturais, ainda que os processos de síntese e semi-síntese venham dando sua contribuição na produção de medicamentos. Atualmente, estamos observando o advento dos processos biotecnológicos, decorrentes dos avanços do conhecimento em biologia molecular e na cultura de células animais e vegetais. No entanto, a busca de compostos ativos a partir de produtos naturais ainda constitui a principal fonte de novos medicamentos, assim como de novos protótipos farmacológicos (Fabricant & Farnsworth, 2001). Nada menos a se esperar, considerando-se que as estimativas sobre o número de espécies vegetais no mundo oscilam ao redor de 250 mil, variando entre 215 mil a 500 mil (Fabricant & Farnsworth, 2001), e que a maior parte dessas espécies se encontra em biomas tropicais úmidos e altamente complexos, derivando disso uma diversidade química muito superior àquela produzida pela síntese orgânica (Henkel et al., 1999; Müller-Kuhrt, 2003). Adicionalmente, estima-se que apenas entre 5–15% das plantas superiores foram sistematicamente estudadas para a presença de compostos ativos, havendo grande parcela não estudada da biodiversidade (Pieters & Vlietinck, 2005). Considerando-se esse imenso conjunto de possibilidades inexploradas, uma abordagem adequada de estudos pode proporcionar um maior êxito na descoberta de novas drogas.

Os estudos fitoquímicos monitorados por bioensaios ainda constituem a estratégia mais importante na prospecção de novos compostos ativos e, nos países em desenvolvimento, para a validação de fitoterápicos (Pieters & Vlietinck, 2005). No

entanto, a abordagem de estudo deve ser criteriosa, considerando-se, dentre outras coisas, a utilização de técnicas *in vitro* que se correlacionem com os ensaios *in vivo* nos quais os compostos isolados serão testados (Houghton et al., 2007). No caso das DII, a intensa infiltração de leucócitos e a produção de radicais livres desempenham importante papel nas vias finais de lesão tecidual (Pavlick et al., 2002). Desse modo, propusemos o estudo fitoquímico biomonitorado pela atividade antioxidante *in vitro*, complementada pela avaliação da atividade imunomoduladora sobre macrófagos *in vitro*, como forma de isolar e identificar compostos com possível atividade no modelo de inflamação intestinal. Os compostos isolados foram testados sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) de macrófagos em cultura, previamente à avaliação da atividade no modelo de colite induzida pelo ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS), considerando-se que tais citocinas são importantes na iniciação, amplificação e perpetuação do processo inflamatório nas DII (Reinecker et al., 1993; Atreya et al., 2008).

A planta selecionada para o estudo foi *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae), uma espécie típica do cerrado, e de uso popular como antibleorrágico, anti-sifilítico, e no tratamento de afecções da pele (Rodriguez & Carvalho, 2001; de Souza & Felfili, 2006). Um grande número de espécies da família Bignoniaceae é utilizado pela medicina popular no tratamento de várias doenças (Gentry, 1992), e as naftoquinonas presentes em muitas espécies da família (Hegnauer, 1989 *apud* Ping et al., 2004) podem ser os compostos responsáveis pelas diferentes atividades relatadas. Diversas naftoquinonas derivadas do lapachol e da lapachona apresentam uma grande variedade de atividades biológicas e há bastante tempo vêm sendo estudadas como antitumorais (Reinicke et al., 2005; Bentle et al., 2006; Maeda et al., 2008), antiinflamatórias (Tzeng et al., 2003; Moon et al., 2007), antimicrobianas (Machado et al., 2003; Pereira et al., 2006) e antiprotozoárias (Andrade-Neto et al., 2004; Lima et al., 2004; Pérez-Sacau et al., 2005). Recentemente, estudos da atividade antitumoral da  $\beta$ -lapachona têm recebido novo enfoque por sua ação inibidora sobre as topoisomerasas I e II (Bentle et al., 2006), além de ter sido elucidado que a atividade antiinflamatória *in vitro* da  $\beta$ -lapachona e de outras naftoquinonas decorre da inibição na ativação do fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) (Tzeng et al., 2003; Shin et al., 2006; Moon et al., 2007), o que pode reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ .

No entanto, outros compostos fenólicos podem contribuir com os efeitos descritos, e os flavonóides também podem estar envolvidos. Diversos trabalhos têm

demonstrado importantes atividades de flavonóides, tais como antioxidante e antimicrobiano (Heinonen, 2007; Sang et al., 2005), antitumoral (Li et al., 2007; Fresco et al., 2006), antiangiogênico (Oak et al., 2005), antifúngico, antiviral (Friedman, 2007) e antiinflamatório (Middleton, 1998; Dryden et al., 2006). Nas DII, diferentes compostos fenólicos como os glicosídeos de flavonóide quercitrina (Sánchez de Medina et al., 1996; Sánchez de Medina et al., 2002; Comalada et al., 2005), rutosídeo (Gálvez et al., 1997; Cruz et al., 1998; Kwon et al., 2005), diosmina e hesperidina (Crespo et al., 1999), e outros polifenóis como o picnogenol (Mochizuki & Hasegawa, 2004) e a teaflavina-3,30-digalato (Ukil et al., 2006) demonstraram efeitos benéficos na prevenção da colite em modelo agudo e modelo com recidiva. Desse modo, não seria de se estranhar que as atividades descritas para os extratos brutos de várias espécies possam também decorrer da ação de outras classes de compostos secundários; no caso de espécies da família Bignoniaceae, além das naftoquinonas, os flavonóides.

O presente trabalho se fundamentou em todas as ponderações apresentadas. As etapas do estudo foram organizadas na forma de capítulos, conforme o conjunto de dados pertinentes aos objetivos propostos. Logo, o Capítulo 1 aborda a triagem inicial de atividade antioxidante *in vitro* e a seleção do extrato de folhas de *Z. montana*, que foi submetido ao fracionamento biomonitorado visando ao isolamento dos compostos antioxidantes. Tais compostos foram avaliados sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos *in vitro*, e testados no modelo de inflamação intestinal induzida pelo TNBS. No Capítulo 2, três flavonóides isolados foram avaliados em teste antiproliferativo *in vitro*, utilizando-se nove linhagens de células tumorais humanas, constantes no painel de células tumorais do NCI para investigação de novos quimioterápicos contra o câncer. No Capítulo 3, a descrição geral de materiais de métodos e os resultados dos experimentos estão apresentando nos Anexos A e B, respectivamente. Nos anexos do Capítulo 3 se encontram descritos outros experimentos que foram desenvolvidos durante o doutorado, mas que não prosseguiram por razões relacionadas à ausência de atividade, ou a questões relacionadas ao desenrolar dos estudos fitoquímicos. Testes iniciais para avaliação de atividade contra *Giardia duodenalis* e *Trypanosoma cruzi* não resultaram positivos, de modo que os estudos não tiveram prosseguimento. Por sua vez, os resultados da avaliação de atividade antiulcerogênica são dados preliminares que poderão ser considerados em futuros estudos com *Z. montana*.

Por fim, ao final desta tese se encontram as conclusões gerais e as ponderações finais a respeito das atividades desenvolvidas.

## **Referências**

Andrade-Neto, V.F.; Goulart, M.O.F.; Filho, J.F.S.; Silva, M.J.; Pinto, M.C.F.R.; Pinto, A.V.; Zalis, M.G.; Carvalho, L.H. and Krettly, A.U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol,  $\beta$ -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 14:1145–1149, 2004.

Ardizzone, S. and Bianchi Porro, G. Comparative tolerability of therapies for ulcerative colitis. **Drug Safety**, 25(8):561-582, 2002.

Atreya, I.; Atreya, R. and Neurath, M.F. NF- $\kappa$ B in inflammatory bowel disease. **Journal of Internal Medicine**, 263:591-596, 2008.

Baumgart, D.C. & Sandborn, W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **The Lancet**, 369:1641–1657, 2007.

Bentle, M.S.; Bey, E.A.; Dong, Y.; Reinicke, K.E. and Boothman, D.A. New tricks for old drugs: the anticarcinogenic potential of DNA repair inhibitors. **Journal of Molecular Histology**, 37:203–218, 2006.

Borgaonkar, M.R. & Irvine, E.J. Quality of life measurement in gastrointestinal and liver disorders. **Gut**, 47:444-454, 2000.

Clevers, H. At the crossroads of inflammation and cancer. **Cell**, 118:671-674, 2004.

Danese, S.; Sans, M. and Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmunity Reviews**, 3:394-400, 2004.

Danese, S.; Angelucci, E.; Malesci, A. and Caprilli, R. Biological agents for ulcerative colitis: hypes and hopes. **Medical Research Reviews**, 28(2):201-218, 2008.

de Souza, C.D. & Felfili, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 20(1):135-142, 2006.

Dryden, G.W.; Song, M. and McClain, C. Polyphenols and gastrointestinal diseases. **Current Opinion in Gastroenterology**, 22:165-170, 2006.

Fabricant, D.S. and Farnsworth, N.R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. **Environmental Health Perspectives**, 109:S69-S75, 2001.

Farnsworth, N.R.; Akerele, O.; Bingel, A.S.; Soejarto, D.D. and Guo, Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, 63(6):965-981, 1985.

Ferguson, L.R.; Shelling, A.N.; Browning, B.L.; Huebner, C.; Petermann, I. Genes, diet and inflammatory bowel disease. **Mutation Research**, 622:70-83, 2007.

Fresco, P.; Borges, F.; Diniz, C. and Marques, M.P. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. **Medicinal Research Reviews**, 26:747-766, 2006.



Friedman, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Molecular Nutrition & Food Research**, 51:116-134, 2007.

Gentry, A.H. A synopsis of Bignoniaceae ethnobotany and economic botany. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 79:53-64, 1992.

Hanauer, S.B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory Bowel Diseases**, 12:S3-S9, 2006.

Heinonen, M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective. **Molecular Nutrition & Food Research**, 51:684-691, 2007.

Henkel, T.; Brunne, R.M.; Müller, H. and Reichel, F. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, 38(5):643-647, 1999.

Houghton, P.J.; Howes, M.-J.; Lee, C.C. and Steventon, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, 110:391-400, 2007.

Hwang, J.M. and Varma, M.G. Surgery for inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, 14(17):2678-2690, 2008.

Li, Y.; Fang, H. and Xu, W. Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, 7:663-678, 2007.

Lima, N.M.; Correia, C.S.; Leon, L.L.; Machado, G.M.C.; Madeira, M.F.; Santana, A.E.G.; Goulart, M.O.F. Antileishmanial activity of lapachol analogues. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99(7): 757-761, 2004.

Loftus, E.V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, 126:1504-1517, 2004.

Machado, T.B.; Pinto, A.V.; Pinto, M.C.F.R.; Leal, I.C.R.; Silva, M.G.; Amaral, A.C.F.; Kuster, R.M. and Netto-dos Santos, K.M. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 21:279-284, 2003.

Maeda, M.; Murakami, M.; Takegami, T. and Ota, T. Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 229:232–238, 2008.

Mawdsley, J.E. and Rampton, D.S. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. **Gut**, 54:1481-1491, 2005.

Middleton Jr, E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 439:175-182, 1998.

Moon, D.-O.; Choi, Y.H.; Kim, N.-D.; Park, Y.M. and Kim, G.-Y. Anti-inflammatory effects of  $\beta$ -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, 7:506–514, 2007.

Müller-Kuhrt, L. Putting nature back into drug discovery. **Nature Biotechnology**, 21(6):602, 2003.

Niess, J.H.; Mönnikes, H.; Dignass, A.U.; Klapp, B.F. and Arck, P.C. Review on the influence of stress on immune mediators, neuropeptides and hormones with relevance for inflammatory bowel disease. **Digestion**, 65:131-140, 2002.

Oak, M.H.; El Bedoui, J. and Schini-Kerth, V.B. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 16:1-8, 2005.

Pavlick, K.P.; Laroux, F.S.; Fuseler, J.; Wolf, R.E.; Gray, L.; Hoffman, J.; Grisham, M.B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology and Medicine**, 33:311-322, 2002.

Pereira, E.M.; Machado, T.B.; Leal, I.C.R.; Jesus, D.M.; Damaso, C.R.A.; Pinto, A.V.; Gambiagi-de Marval, M.; Kuster, R.M.; Santos, K.R.N. *Tabebuia avellanadae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 5:5, 2006.

Pérez-Sacau, E.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A.G.; Yapu, D.G. and Turba, A.G. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and  $\beta$ -lapachone. **Chemistry & Biodiversity**, 2:264-274, 2005.

Pieters, L. and Vlietinck, A.J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, 100:57-60, 2005.

Ping, H.; Karagianis, G.; Shanxin, W. and Waterman, P.G.  $\alpha$ -Lapachone and other naphthoquinones from the heartwood of *Paulownia kawakamii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 32:1047-1049, 2004.

Reinecker, H.-C.; Steffen, M.; Witthoef, T.; Pflueger, I.; Schreiber, S.; MacDermott, R.P. and Raedler, A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 $\beta$  by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. **Clinical and Experimental Immunology**, 94:174-181, 1993.

Reinicke, K.E.; Bey, E.A.; Bentle, M.S.; Pink, J.J.; Ingalls, S.T.; Hoppel, C.L.; Misico, R.I.; Arzac, G.M.; Burton, G.; Bornmann, W.G.; Sutton, D.; Gao, J. and Boothman, D.A. Development of  $\beta$ -lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 levels. **Clinical Cancer Research**, 11(8):3055-3064, 2005.

Reinisch, W.; Sandborn, W.J.; Bala, M.; Yan, S.; Feagan, B.G.; Rutgeerts, P.; Radford-Smith, G.; Xu, S.; Eisenberg, D.; Olson, A. and Colombel, J.F. Response and remission

are associated with improved quality of life, employment and disability status, hours worked, and productivity of patients with ulcerative colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, 13:1135-1140, 2007.

Rodriguez, V.E.G. & Carvalho, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, 25(1):102-123, 2001.

Sandborn, W.J. and Targan, S.R. Biologic Therapy of Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, 122:1592-1608, 2002.

Sands BE. Biological therapy for inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Disease**, 3:95-113, 1997.

Sang, S.; Hou, Z.; Lambert, J.D. and Yang, C.S. Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. **Antioxidants & Redox Signaling**, 7:1704-1714, 2005.

Sartor, R.B. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. **Gastroenterology**, 126:1620-1633, 2004.

Shin, H.-M.; Lee, Y.R.; Chang, Y.S.; Lee, J.-Y.; Kim, B.H.; Min, K.R. and Kim, Y. Suppression of interleukin-6 production in macrophages by furonaphthoquinone NFD-37. **International Immunopharmacology**, 6:916-923, 2006.

Souza, M.H.L.P.; Troncon, L.E.A.T.; Rodrigues, C.M.; Viana, C.F.G.; Onofre, P.H.C.; Monteiro, R.A.; Passos, A.D.C.; Martinelli, A.L.C. and Meneghelli, U.G. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um Hospital Universitário do Sudeste do Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, 39(2):98-105, 2002.

Steidler, L. Microbiological and immunological strategies for treatment of inflammatory bowel disease. **Microbes and Infections**, 3:1157-1166, 2001.

Stein, R.B. and Hanauer, S.B. Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. **Drug Safety**, 23(5):429-448, 2000.

Straub, R.H.; Herfarth, H.; Falk, W.; Andus, T.; Schölmerich, J. Uncoupling of the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in inflammatory bowel disease? **Journal of Neuroimmunology**, 126:116-125, 2002.

Summers, R.W. Novel and Future Medical Management of Inflammatory Bowel Disease. **Surgical Clinics of North America**, 87:727-741, 2007.

Toruner, M.; Loftus Jr, E.V.; Harmsen, W.S.; Zinsmeister, A.R., Orenstein, R.; Sandborn, W.J.; Colombel, J.-F. and Egan, L.J. Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, 134:929-936, 2008.

Tzeng, H.-P.; Ho, F.-M.; Chao, K.-F.; Kuo, M.-L.; Lin-Shiau, S.-Y. and Liu, S.-H.  $\beta$ -lapachone reduces endotoxin-induced macrophage activation and lung edema and

mortality. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 168:85-91, 2003.

Viget, N.; Vernier-Massouille, G.; Salmon-Ceron, D.; Yazdanpanah, Y. and Colombel, J.-F. Opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease: prevention and diagnosis. **Gut**, 57:549-558, 2008.

WHO, **The World Health Report. Bridging the Gaps**. WHO, Geneva, pp.118, 1995.

WHO, **The World Health Report. Conquering Suffering, Enriching Humanity**. WHO, Geneva, pp.162, 1997.

WHO, **Report of the global partners' meeting on neglected tropical diseases**. WHO, Geneva, pp.87, 2007.

## **Biochemical Pharmacology**

### **Research article**

Bioassay-guided isolation of flavonoids from *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) for anti-inflammatory tests in experimental colitis model

Leonardo Noboru Seito<sup>1</sup>, Paulo Cesar de Paula Vasconcelos<sup>2</sup>, Hélio Kushima<sup>2</sup>, José Maurício Sforcin<sup>3</sup>, Jairo Kenupp Bastos<sup>4</sup>, Clélia Akiko Hiruma-Lima<sup>2</sup>, Luiz Claudio Di Stasi<sup>1</sup>.

### **Affiliation**

<sup>1</sup>Laboratory of Phytomedicine, Pharmacology Department, Biosciences Institute, CP 510, UNESP – São Paulo State University, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Physiology Department, Biosciences Institute, CP 510, UNESP – São Paulo State University, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, CP 510, UNESP, – São Paulo State University, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 14040-903, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

### **Correspondence**

Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, Laboratory of Phytomedicines, Department of Pharmacology, Instituto de Biociências, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, 18618-000, SP, Brazil, E-mail: [ldistasi@ibb.unesp.br](mailto:ldistasi@ibb.unesp.br) Fone: +55 21 14 38116253.

## Abstract

Research on new active compounds and therapy approaches have long been undertaken for chronic diseases such as the inflammatory bowel diseases (IBD), and research on medicinal plants may lead to important findings. Considering the marked role of leukocytes and reactive oxygen species in IBD pathogenesis, the present work was an effort in the search for antioxidant compounds from *Zeyheria montana* with *in vitro* immunomodulatory effect for anti-inflammatory activity subsequent tests in TNBS-induced rat colitis. We isolated two major flavonoids FVN625 and FVN1087, which markedly reduced IL-1 $\beta$  and IL-6 basal secretion of macrophages *in vitro*. In TNBS-induced colitis in rats, both FVN625 and FVN1087 efficiently counteracted the GSH depletion, but were not able to prevent the severe inflammatory response in rats, since the tested compounds did not avoid the augment in tissue myeloperoxidase and alkaline phosphatase, as well as the gross damage. Some considerations should be taken about the directions given to studies with polyphenols in colitis. The IBD still require efforts for comprehension of the pathophysiological mechanisms and for more efficient disease management – as new drugs or improving complementary therapy for the actually employed medicines. Although our antioxidant bioassay-guided fractionation of a plant extract had led to the isolation of immunomodulatory known flavonoids, such an approach was appropriate for the identification of medicinal plant-derived polyphenols, which are increasingly shown to display important roles in modulating the intestinal inflammatory process.

**Key-words:** inflammatory bowel disease, TNBS, *Zeyheria montana*, antioxidant, immunomodulatory, flavonoids

## 1. Introduction:

The search for new active compounds with potential use on therapy is particularly important for many chronic conditions like the inflammatory bowel diseases (IBD). The two main pathological conditions in the IBD are the ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Both diseases are characterized by a deregulated immune response to intestinal microbiota (Steidler, 2001; Sartor, 2004). UC appears to be predominantly a Th2 driven response, while CD seems to involve Th1 pattern of

cytokines (Papadakis & Targan, 2000). Despite the advances on the understanding of the IBD pathophysiological mechanisms, the etiology and stimuli that precipitate disease's relapses are still unknown for these incurable illnesses (Steidler, 2001), which morbidity worsens with the development of colorectal cancer (Clevers, 2004). In Brazil, data are not well documented, but it has been reported about 257 cases from 1980 to 1999 at the University Hospital, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, with increasing incidence (Souza et al., 2002). In developed countries the prevalence is high but stabilized, and in the United States the IBD affects about 1 million individuals, with about 30,000 new cases reported each year (Hanauer, 2006).

Therapeutical options for IBD are effective in mild to moderate cases, and the main drugs in use, 5-aminosalicylic acid (5-ASA) and corticoids, are still the choices to IBD treatment, but are ineffective in severe cases and are not appropriate to long-term use for relapses avoidance (Baumgart & Sandborn, 2007). Recently, the biological therapy with anti-TNF $\alpha$  or anti- $\alpha_4$  integrin monoclonal antibodies – i.e., infliximab or natalizumab respectively - is arising as effective treatment for remission of severe IBD cases (Baumgart & Sandborn, 2007; Danese et al., 2008). However, it is such an expensive option, and recent reports are bringing out the undesirable effects related to patients augmented susceptibility to infectious diseases like occurs to immunosuppressive drugs (Toruner et al., 2008; Viget et al., 2008). Thus, the IBD management still requires the search of new drugs and therapeutic approaches. In terms of active substances and lead compounds, medicinal plants continue as the main source for researchers.

*Zeyheria montana* is a Brazilian Cerrado Bignoniaceae species, popularly known as “bolsa-de-pastor”, and its roots are used for the treatment of skin affections, and also as anti-syphilitic and anti-blenorrhagic (Rodriguez & Carvalho, 2001; de Souza & Felfili, 2006). A great number of Bignoniaceae species are used in the folk medicine to the treatment of several diseases (Gentry, 1992), and the naphthoquinones present in many species of the family (Hegnauer, 1989 *apud* Ping et al., 2004) could be responsible for different activities. However, other polyphenols might contribute to the observed effects, and flavonoids are likely to be involved. Flavonoids have been shown to display interesting biological activities such as antioxidant, antimicrobial (Heinonen, 2007; Sang et al., 2005), antitumoral (Li et al, 2007; Fresco et al., 2006), antiangiogenic (Oak et al., 2005), antifungal, antiviral (Friedman, 2007) and anti-inflammatory ones

(Middleton, 1998; Dryden et al., 2006), as well as activity in experimental IBD models (Sánchez de Medina et al., 1996; Gálvez et al., 1997; Crespo et al., 1999).

Considering that leukocyte recruitment and the reactive oxygen species have a marked role to IBD pathogenesis (Pavlick et al., 2002), the present work was an effort in the search for medicinal plant derived antioxidant compounds with inflammation modulatory activity for further tests in rat model of trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)-induced colitis.

## **2. Material & methods:**

### 2.1. Plant collection and identification

Leaves, stems and roots of *Z. montana* were collected in March 2005, in remainders of the Cerrado vegetation in Rubião Jr District, Botucatu city, State of São Paulo, Brazil. A voucher specimen (number 25660) was deposited at the Herbarium “Irina Delanova Gemtchújnicov” – BOTU, Botucatu, São Paulo State University, for correct identification.

### 2.2. Animals

Male Balb/C mice (5 weeks old) and Wistar rats (7 weeks old) were purchased from the UNESP Central Animal House (Botucatu, São Paulo, Brazil). They were housed in cages in a laminar airflow room maintained in temperature of  $22 \pm 1$  °C and relative humidity of  $55 \pm 10\%$  throughout the study. Experimental protocols meet the “Guidelines of Animal Experimentation” approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation of the Institute of Biosciences, State University of São Paulo (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brazil.

### 2.3. Brain lipid peroxidation assay

The antioxidant assay was based on the classic determination of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in tissue homogenates. Rat brains were homogenized in phosphate buffered saline (PBS,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM, pH 6.0) (1:4, w/v) and then centrifuged in 3000 rpm for 15 minutes. The supernatant



was collected and diluted in PBS (1:10) before use in antioxidant assay adapted from Gálvez et al. (1995). Different 1 mL aliquots of brain lipid supernatant were incubated with test substance or DMSO20% in the presence of ferrous sulfate and ascorbic acid solution (100 $\mu$ M). IC<sub>50</sub> for inhibition of lipoperoxidation was determined for all test extracts and quercetin was used as the reference antioxidant compound.

#### 2.4. Antioxidant bioassay-guided fractionation of *Z. montana* extracts

Leaf, stem and root extracts of *Z. montana* were prepared by cold maceration in methanol (150g of dried and pulverized material), filtered and concentrated. The extracts were initially assayed for antioxidant activity in brain homogenate as previously described. The leaf methanol extract was further subjected to fractionation procedures. Dried and pulverized leaves of *Z. montana* (750 g) were cold macerated in methanol for 72 hours and then filtered. The plant material was further extracted three times each 24 hours and the total filtrate was reduced to 10% of the original volume. Distilled water was added to the concentrated extract till a 70% methanolic solution, which was filtered thereafter. The hydromethanolic extract was initially partitioned with hexane, and the hydromethanolic phase was concentrated to about half of the volume. In the sequence, it was partitioned with dichloromethane, ethyl acetate and butanol. All extracts were submitted to antioxidant assay and the dichloromethane (DCM) extract was selected to column fractionation.

Dichloromethane extract (15 g) was subjected to classical column chromatography (31 x 6.5 cm) over silicagel 60 (230-400 Mesh) with increasing gradient elution of mixture of hexane/ethyl acetate (9:1, 8:2, 7:3, 1:1), followed by ethyl acetate and ethyl acetate/methanol (1:1). The fractions (1102 samples of 75 mL) were grouped in 25 fractions, monitored by thin layer chromatography (TLC, 20 x 20 cm, 0.25 mm, 60 GF<sub>254</sub>). All fractions were screened for antioxidant activity, and fractions ZM625 and ZM1087 were selected for compounds isolation.

#### 2.5. Isolation and identification of flavonoids (FLV) from *Z. montana* leaves

Fractions ZM625 and ZM1087 were subjected to recrystallization procedure which resulted in uncolored rectangular (1.2 g) and yellow needle (1.8 g) crystals respectively. These compounds were designated as FLV625 (**1**) and FLV1087 (**2**), and

were identified by means of  $^1\text{H-NMR}$  and comparisons to those of the authentic compounds in literature.

## 2.6. *In vitro* immunomodulatory assay

Peritoneal macrophages were obtained by inoculation of cold PBS in the abdominal cavity. After a soft abdominal massage, the peritoneal liquid was collected and put in sterile plastic tubes (Falcon) and centrifuged at  $200 \times g$  for 10 minutes. Cells were stained with neutral red (0.02%), incubated for 10 minutes at  $37^\circ\text{C}$  and counted in a hemacytometer, in order to obtain a final concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml. Cells were re-suspended in cell culture medium (RPMI1640 supplemented with 5% fetal calf serum, 2mM L-glutamine, 20mM HEPES,  $2.5 \times 10^{-5}\text{M}$  2-mercaptoethanol – Sigma), and cultured in a 96-welled flat-bottomed plate (Corning) at a final concentration of  $2 \times 10^5$  cells per well. Cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  and after 2 hours, non-adherent cells were removed and macrophages were reincubated ( $37^\circ\text{C}$ ) for 24 hours (Orsi et al., 2000).

Peritoneal macrophages were treated with 0.242, 0.605, 1.21 or  $2.42\mu\text{g/mL}$  of FVN625 or FVN1087, dissolved in DMSO 0.2% in supplemented RPMI medium, and effects on pro-inflammatory cytokines (IL- $1\beta$  and IL-6) secretion were compared to basal secretion of non-treated cells after ELISA dosages (BD Biosciences, USA).

## 2.7. TNBS-induce acute colitis in rats

Colitis was induced by the method originally described by Morris et al. (1989) Animals were fasted overnight and anaesthetized with halothane. Under anesthesia, they were given 10 mg of TNBS dissolved in a 0.25 ml 50% ethanol (v/v) by means of a Teflon cannula inserted 8 cm through the anus. Rats from the non-colitic (normal) group received 0.25 ml of phosphate buffered saline. The protocol in the sequence was followed:

### 2.7.1. Acute colitis

Rats (n=6) were orally given 5, 10 or 25 mg/Kg/day of FVN625 or FVN1087 for 48, 24 and 2 hours before colitis induction as well as 24 hours thereafter. Test

compounds were suspended in methylcellulose and administered by means of an oesophageal catheter (volume: 5 ml/Kg). Rats from non-colitic and colitic control groups (n=6) were orally administered with vehicle. Animal body weights, occurrence of diarrhoea (as detected by perianal fur soiling) and total food intake for each group were daily recorded. Animals from all groups were killed 48 h after colitis induction by an overdose of halothane.

The colonic segments were obtained after laparotomy and the eventual occurrence of adhesions between the colon and adjacent organs was recorded. They were placed on an ice-cold plate, cleaned apart from adipose tissue and mesentery, and blotted on filter paper, and the colon was weighed and its length measured under a constant load (2 g). Each colon was longitudinally opened and scored for macroscopically visible damage on a 0-10 scale by two observers unaware of the treatment, according to the criteria described by Bell et al. (1995) (Table 1). In sequence it was longitudinally divided in different pieces to be used for the biochemical determinations of myeloperoxidase (MPO) activity, alkaline phosphatase (AP) activity and total glutathione (GSH) content.

#### 2.7.2. Biochemical determinations

MPO activity was determined spectrophotometrically, according to the technique described by Krawisz et al. (1984). The MPO results were expressed as U/g of wet tissue (1 unit of MPO activity is defined as that degrading 1  $\mu$ mol hydrogen peroxide per minute at 25°C). Determination of AP activity was performed spectrophotometrically using disodium nitrophenylphosphate (5.5 mM) as substrate in 50 mM glycine buffer with 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and pH=10.5 (Bessey et al., 1946). The AP enzymatic activity is expressed as mU/mg of protein. Total GSH content was quantified with the recycling assay described by Anderson et al. (1985), and the results were expressed as nmol/g of wet tissue.

#### 2.8. Statistics

All results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Differences between means were tested for statistical significance using one-way analysis of variance (ANOVA) and *post hoc* least significance tests. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

### 3. Results:

Compounds **1** (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>) and **2** (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>) were identified as 3'-hydroxy-5,7,4'-trimethoxyflavone and FVN1087 respectively (Figure 1), by comparison of their <sup>1</sup>H NMR data with those previously published ( ).

The bioassay-guided phytochemical study of *Z. montana* extracts allowed the identification of two flavonoids. In the initial tests, the IC<sub>50</sub> values of the leaf extract was 11.49 ± 1.15 µg/mL and quercetin was 1.05 ± 0.004 µg/mL. Neither the stem nor the root extracts inhibited lipid peroxidation. In the sequence, we tested the extracts obtained by partition of the leaf crude extract, and the active ones were the dichloromethane (DCM) and the ethyl acetate with IC<sub>50</sub> of 9.03 ± 0.02 µg/mL and 59.57 ± 0.32 µg/mL, respectively, while quercetin was 1.65 ± 0.03 µg/mL. Thereafter, of the 25 fractions tested, 11 presented antioxidant activity, and three of them were selected for compound isolation, accordingly to the IC<sub>50</sub> values and the chromatograms determined by thin layer chromatography (not shown). Thus, the chosen fractions were the ZM625 and ZM1087, which presented IC<sub>50</sub> values of 13.19 ± 1.20 µg/mL and 2.01 ± 0.08 µg/mL, respectively, while quercetin was 1.31 ± 0.02 µg/mL.

The fractions ZM625 and ZM1087 were then submitted to recrystallization, and the isolated flavonoids FVN625 and FVN1087 showed antioxidant IC<sub>50</sub> of 45.43 ± 0.46 and 1.14 ± 0.01 µg/mL, respectively, while quercetin, 1.10 ± 0.03 µg/mL.

Both compounds - FVN625 and FVN1087 - reduced the basal secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1β and IL-6 in all tested concentrations (Table 2). Treatment with 1.21 µg/mL of FVN625 and FVN1087 showed the best inhibitory effects on pro-inflammatory cytokine secretion. FVN625 and FVN1087 reduced the basal secretion of IL-1β in 91.5% and 72.7% respectively, and similarly reduced the basal secretion of IL-6 in 44.5%.

Intracolonic administration of TNBS resulted in colonic inflammation, which was evidenced after 48 h with severe necrosis of the mucosa, bowel wall thickening and hyperaemia. Treatments with the isolated compounds did not prevent the increase in colonic weight/length ratio and reduction in food intake when compared to colitic control rats (data not shown). The signs of diarrhoea were detected in 80% of the colitic animals. In consequence, a significant reduction in body weight was observed in colitic control animals, which was not different from the treated groups.

The colonic damage was biochemically characterized by a 20-fold increase in colonic MPO activity, as an index of neutrophil infiltration, and by a 2-fold increase in AP activity, as well as significant colonic GSH depletion (Table 3). We found that 10 and 25 mg/Kg of either FVN625 or FVN1087 counteracted the GSH depletion in up to 71.1%, but were not able to prevent the inflammatory response in rats, since the tested compounds did not inhibit the augment in tissue MPO and AP activities, in accordance to the gross lesion observed.

#### **4. Discussion**

The inflammatory bowel diseases (IBD) demand constant attention, and the search on new therapeutic options is required considering the need of surgery for unsatisfactory treatment, the adverse effects of long-term use drugs, and the prohibitive prices of the recent treatments named biological therapy, which employ monoclonal antibodies against different elements of the inflammatory process (Danese et al., 2008; Baumgart & Sandborn, 2007). In addition, the IBD represent a serious burden to patients' lives, as they are restricted in developing normal activities (Borgaonkar & Irvine, 2000; Reinisch et al., 2007). In this way, research on medicinal plants could contribute to the achievement of more appropriate disease management, improving life and health conditions of patients.

In the present work, we conducted an *in vitro* antioxidant bioassay-guided study for the isolation of compounds to further tests for *in vitro* immunomodulation, and TNBS-induced colitis in rats thereafter. Adopting this procedure we isolated two flavonoids from the leaf dichloromethane extract of *Z. montana*, which also inhibited the secretion of macrophage's pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6. The identification of immunomodulatory flavonoids through *in vitro* models was suitable to *in vivo* tests in rat model of TNBS-induced colitis, since polyphenols present important roles in the modulation of various cell functions in inflammatory diseases and cancer (Shapiro, 2007; Stevenson & Hurst, 2007).

Different mediators participate in IBD pathophysiology and the cytokines produced by leukocytes are important to the subsequent alterations that lead to tissue damage as extensively reviewed (Nielsen & Rask-Madsen, 1996; Neuman, 2007). IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  are pro-inflammatory cytokines secreted by lamina propria mononuclear cells isolated from IBD patients, and are involved in the initiation,

amplification and perpetuation of the inflammatory response (Reinecker et al., 1993; Atreya et al., 2008). These cytokines were shown to be expressed after nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) activation, which is a pleiotropic transcription factor that controls transcriptional activity of various promoters of pro-inflammatory cytokines, cell surface receptors, transcription factors, and adhesion molecules (Neurath et al., 1998; Atreya et al., 2008), cyclooxygenase-2 (Gupta & Du Bois, 2001; Ikawa et al., 2001) and inducible nitric oxide synthase (Aktan, 2004), that are all involved in intestinal inflammation. In addition, pro-inflammatory cytokine-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by NF $\kappa$ B pathway is increasingly related to patient development of colorectal cancer (Gupta & Du Bois, 2001; Ikawa et al., 2001). In such manner, immunomodulatory compounds that reduce pro-inflammatory cytokine secretion or inhibit NF $\kappa$ B pathway activation could help in IBD management and chemoprevention of colorectal cancer.

The biological effects of flavonoids have been classically associated to their antioxidant properties and their ability to inhibit enzymes, but recently it has been demonstrated that flavonoids appear to strongly influence cell-signaling pathways and gene expression with relevance to various diseases like inflammatory disorders and cancer (Stevenson & Hurst, 2007; López-Posadas et al., 2008). Several studies suggest that flavonoid properties may be mediated through the regulation of the NF $\kappa$ B (Nicholas et al., 2007; Kalra et al., 2007), nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 (Tanigawa et al., 2007; Yao et al., 2007) and MAP kinase (Chae et al., 2007, Yao et al., 2007) pathways. The isolated antioxidant flavonoids FVN625 and FVN1087 were tested on macrophages pro-inflammatory cytokines secretion, previously to *in vivo* model evaluation. Pre-treatment of cells with both compounds reduced IL-1 $\beta$  and IL-6 basal secretion in all tested concentrations, suggesting a possible interference in NF $\kappa$ B pathway *in vitro*. However, it still has to be investigated whether NF $\kappa$ B pathway is involved in macrophage inhibition of the isolated flavonoids.

Phenolic compounds like flavonoids and coumarins, as well as polyphenols enriched extracts like propolis solutions have been extensively studied as effective anti-inflammatory agents (Fylaktakidou, 2004; Comalada, 2006; Sforcin, 2007). In IBD, different phenolic compounds like flavonoid glucosides (Sánchez de Medina et al., 1996; Gálvez et al., 1997; Cruz et al., 1998; Crespo et al., 1999; Sánchez de Medina et al., 2002; Kwon et al., 2005; Comalada et al., 2005), the isocoumarin paepalantine (Di Stasi et al., 2004), coumarin and 4-hydroxycoumarin (Luchini et al., 2008) and other polyphenols like pycnogenol (Mochizuki & Hasegawa, 2004) and theaflavin-3,30-

digallate (Ukil et al., 2006) were shown to present beneficial effects in acute and relapse colitis models. Kwon et al. (2005) demonstrated that food supplementation with rutin, but not the aglycone quercetin, could protect against dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis. However, the reason for such a difference between flavonoid aglycone and glucoside actions still had to be elucidated. So, in the sequence, Comalada et al. (2005) elegantly demonstrated that the glucoside quercitrin protects against the DSS-induced colitis after glucoside hydrolysis by intestinal microbiota releasing the aglycone quercetin, which is suggested to exert the anti-inflammatory activity by modulating macrophage NF $\kappa$ B activation. The presently tested flavonoids are not glucosides and such feature could be associated to the observed low effective results in TNBS-induced colitis. The effective concentrations in the inflamed colon segment might be a possible explanation to the beneficial effects of flavonoid glucosides. Unlike, flavonoid aglycones appear not to reach the necessary local effective concentration due to upper intestine absorption and blood stream dissemination (Comalada et al., 2005).

We found that the isolated immunomodulatory flavonoids counteracted the GSH depletion induced by inflammatory process, but pre-treatments with those compounds did not prevent the acute damage induced by a single intracolonic instillation of TNBS, as noted by the gross damage evaluation. There was not a preventative effect when analyzing the lesion score and length of the colons, the diarrhoea incidence and the weight loss of treated animals.

According to clinical and experimental observations, some biochemical markers of the intestinal inflammatory response are also indicative of tissue damage (Morris et al., 1989). Myeloperoxidase (MPO), an enzyme predominantly found in the azurophilic granules of neutrophils, is a marker of neutrophil infiltration, and its activity measurement has been widely used to detect intestinal inflammatory process (Yamada et al., 1992; Villegas et al., 2003). A reduction in MPO activity can be interpreted as a manifestation of the anti-inflammatory property of a tested compound (Veljaca et al., 1995). Another one is the alkaline phosphatase (AP), which has been considered a phenotypic marker of differentiation up-regulated in experimental chronic diarrhoea (Cooper & Steplewski, 1988). Despite the protection on tissue GSH levels, we found that the treatments with FVN625 or FVN1087 were neither effective to reduce MPO nor AP activities.

Even if being rather a single finding, the elevation of GSH levels *per se* is interesting information for polyphenols further evaluations in IBD and in

chemoprevention of colorectal cancer. We found that the flavonoids protected the colonic GSH levels in more than 90%, and it could be partly attributed to the flavonoids' antioxidant activity. However, the compounds significantly prevented the GSH depletion without affecting the inflammatory process, as evidenced by the MPO and AP activities compared to the control colitic group. Thus, another molecular pathway could be activated providing the main mechanism for prevention of GSH depletion.

As recently reviewed by Lee & Johnson (2004), an augment on GSH biosynthetic enzymes could result from the activation of the Nrf2-antioxidant responsive element (ARE) pathway, which leads to the expression of various enzymatic systems, related to detoxification and control of the oxidative stress. The Nrf2-ARE pathway activation is due to the production of reactive oxygen species or electrophiles that dissociate the Nrf2 from the cytoskeleton-associated protein (Keap1), allowing translocation to the nucleus and the transcriptional activation of ARE-driven genes. The influence of polyphenols in Nrf2-ARE pathway is a recent approach to studies on the mechanisms by which dietary polyphenols are beneficial to health and, as suggested by Tanigawa et al. (2007), quercetin not only may activate the pathway, but also may up-regulate Nrf2 expression. Several polyphenols like (-)-epigallocatechin-3-gallate (Na & Surh, 2008), chlorogenic acid (Feng et al., 2005) and curcumin (Balogun et al., 2003) are also involved in Nrf2 activation. These considerations support a role to the Nrf2-ARE pathway to polyphenols actions, and indicate an approach to be more investigated in other colitis experimental protocols. Additionally, considering the better effectiveness of drugs locally delivered to the damaged colonic segment (Nakase et al., 2001) and that flavonoid glucosides, but not the aglycones, were effective in DSS colitis model (Comalada et al., 2005), we should also consider a polyphenol delivery system for future evaluations in experimental colitis.

Shapiro et al. (2007), pointed that a divergent effect on NFkB and Nrf2 by phenolic compounds could inhibit the synthesis of potentially injurious mediators while augmenting that of antioxidative and anti-inflammatory ones, and consequently preventing malignant transformation of cells in recurrent inflammatory sites. Indeed, Lee et al. (2007) demonstrated such a mechanism for the synthetic 2',4',6'-tris(methoxymethoxy) chalcone in mice model of TNBS-induced colitis. Since antioxidant compounds and enhanced tissue levels of GSH could contribute to a more



efficient resolution of the inflammatory process (Sido et al., 1998), it would be interesting testing the isolated flavonoids for colitis remission.

In summary, the antioxidant bioassay-guided fractionation allowed us the isolation of two *in vitro* immunomodulatory flavonoids. Even if they are not glucosides and despite the absence of preventative effect in acute colitis model, the finding of GSH-protected tissue amounts is interesting and deserves further elucidations about flavonoids-induced Nrf2 activation in structure-activity relationship studies. Additionally, as the combination of Nrf2-activating and NFkB-inhibiting polyphenols appears suitable as an approach to improve the IBD management, the high molecular weight polyphenols like some oligomers and tannins, present in food and different medicinal plants used in the treatment of diarrhoea, are interesting plant-derived compounds to be further investigated.

## References

Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sci**, 2004;75:639-653.

Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymol**, 1985;113:548-555.

Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF- $\kappa$ B in inflammatory bowel disease. **J Intern Med**, 2008;263:591-596.

Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. **Biochem J**, 2003;371:887-895.

Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, 2007;369:1641–1657.

Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 1995;268(4):G622-G630.

Bessey OA, Lowry OH, Brook MJ. Method for rapid determination of alkaline phosphatase. **J Biol Chem**, 1946;164:321-329.

Borgaonkar MR, Irvine EJ. Quality of life measurement in gastrointestinal and liver disorders. **Gut**, 2000;47:444-454.

Chae YJ, Kim CH, Ha TS, Hescheler J, Ahn HY, Sachinidis A. Epigallocatechin-3-O-gallate inhibits the angiotensin II-induced adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cell via inhibition of MAPK pathways. **Cell Physiol Biochem**, 2007;20:859-866.

Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer. **Cell**, 2004;118:671-674.

Comalada M, Ballester I, Bailón E, Sierra S, Xaus J, Gálvez J, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure–activity relationship. **Biochem Pharmacol**, 2006;72:1010-1021.

Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gálvez J, Zarzuelo A. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- $\kappa$ B pathway. **Eur J Immunol**, 2005;35: 584-592.

Cooper HS, Steplewski Z. Immunohistologic study of ulcerative colitis with monoclonal antibodies against tumor-associated and/or differentiation antigens. **Gastroenterology**, 1988;95(3):686-693.

Crespo ME, Gálvez J, Cruz T, Ocete MA, Zarzuelo A. Antiinflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. **Planta Medica**, 1999;65:651-653.

Cruz T, Gálvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. **Life Sci**, 1998;62(7):687-695.

Danese S, Angelucci E, Malesci A, Caprilli R. Biological agents for ulcerative colitis: hypes and hopes. **Med Res Rev**, 2008;28(2):201-218.

de Souza CD, Felfili JM. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, 2006;20(1):135-142.

Di Stasi LC, Camuesco D, Nieto A, Vilegas W, Zarzuelo A, Gálvez J. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Medica**, 2004;70:315-320.

Dryden GW, Song M, McClain C. Polyphenols and gastrointestinal diseases. **Curr Opin Gastroenterol**, 2006;22:165-170.

Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M. Inhibition of activator protein-1, NF- $\kappa$ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. **J Biol Chem**, 2005;280(30): 27888-27895.

Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MP. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. **Med Res Rev**, 2006;26:747-766.

Friedman M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Mol Nutr Food Res**, 2007;51:116-134.

Fylaktakidou K, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaidis, DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. **Curr Pharm Des**, 2004;10:3813-3833.

Gálvez J, Cruz T, Crespo E, Ocete MA, Lorente MD, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A. Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. **Planta Medica**, 1997;63:409-414.

Gálvez J, De La Cruz JP, Zarzuelo A, Sánchez De La Cuesta F. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, 1995;51:127-133.

Gentry AH. A synopsis of Bignoniaceae ethnobotany and economic botany. **Ann Mo Bot Gard**, 1992;79:53-64.

Gupta RA, Du Bois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. **Nat Rev Cancer**, 2001;1:11-21.

Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflamm Bowel Dis**, 2006;12:S3-S9.

Heinonen M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective. **Mol Nutr Food Res**, 2007;51:684-691.

Ikawa H, Kameda H, Kamitani H, Baek SJ, Nixon JB, Hsi LC, Eling TE. Effect of PPAR activators on cytokine-stimulated cyclooxygenase-2 expression in human colorectal carcinoma cells. **Exp Cell Res**, 2001;267:73-80.

Kalra N, Seth K, Prasad S, Singh M, Pant AB, Shukla Y. Theaflavins induced apoptosis of LNCaP cells is mediated through induction of p53, down-regulation of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinases pathways. **Life Sci**, 2007;80:2137-2146.

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. **Gastroenterology**, 1984;84:1344-1350.

Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice:

attenuation of pro-inflammatory gene expression. **Biochem Pharmacol**, 2005;69:395-406.

Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. **J Biochem Mol Biol**, 2004;37(2):139-143.

Lee SH, Sohn DH, Jin XY, Kim SW, Choi SC, Seo GS. 2',4',6'-Tris(methoxymethoxy) chalcone protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis and blocks tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced intestinal epithelial inflammation via heme oxygenase 1-dependent and independent pathways. **Biochem Pharmacol**, 2007;74:870-880.

Li Y, Fang H, Xu W. Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents. **Mini Rev Med Chem**, 2007;7:663-678.

López-Posadas R, Ballester I, Abadía-Molina AC, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochem Pharmacol**, doi:10.1016/j.bcp.2008.06.001, 2008.

Luchini AC, Rodrigues-Orsi P, Cestari SH, Seito LN, Witaicenis A, Pellizzon CH, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biol Pharm Bull**, 2008;31(7):1343-1350.

Middleton Jr E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Adv Exp Med Biol**, 1998;439:175-182.

Mochizuki M, Hasegawa N. Therapeutic efficacy of pycnogenol in experimental inflammatory bowel diseases. **Phytother Res**, 2004;18:1027-1028.

Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, SzewcZuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, 1989;96(3):795-803.

Na H-K, Surh Y-J. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. **Food Chem Toxicol**, 2008;46:1271-1278.

Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Uose S, Ohana M, Uchida K, Nishi T, Debrececi A, Itoh T, Kawanami C, Iwano M, Ikada Y, Chiba T. An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **J Pharmacol Exp Ther**, 2001;297(3):1122-1128.

Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. **Transl Res**, 2007;149:173–186.

Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF- $\kappa$ B in immune and inflammatory responses in the gut. **Gut**, 1998;43:856-860.

Nicholas C, Batra S, Vargo MA, Voss OH, Gavrilin MA, Wewers MD, Guttridge DC, Grotewold E, Doseff AI. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality *in vivo* and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF- $\kappa$ B through the suppression of p65 phosphorylation. **J Immunol**, 2007;179:7121-7127.

Nielsen, O.H. & Rask-Madsen, J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, 31(S216):149-159, 1996.

Oak MH, El Bedoui J, Schini-Kerth VB. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. **J Nutr Biochem**, 2005;16:1-8.

Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, Bankova V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, 2000;6:205-219.

Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Annu Rev Med**, 2000;51:289-298.

Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Rad Biol Med**, 2002;33:311-322.

Ping H, Karagianis G, Shanxin W, Waterman PG.  $\alpha$ -Lapachone and other naphthoquinones from the heartwood of *Paulownia kawakamii*. **Biochem Syst Ecol**, 2004;32:1047-1049.

Reinecker H-C, Steffen M, Witthoeft T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 $\beta$  by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. **Clin Exp Immunol**, 1993;94:174-181.

Reinisch W, Sandborn WJ, Bala M, Yan S, Feagan BG, Rutgeerts P, Radford-Smith G, Xu S, Eisenberg D, Olson A, Colombel JF. Response and remission are associated with improved quality of life, employment and disability status, hours worked, and productivity of patients with ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis**, 2007;13:1135-1140.

Rodriguez VEG, Carvalho DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, 2001;25(1):102-123.

Sánchez de Medina F, Gálvez J, Romero JA, Zarzuelo A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, 1996;278:771-779.

Sánchez de Medina F, Vera B, Gálvez J, Zarzuelo A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life Sci**, 2002;70:3097-3108.

Sang S, Hou Z, Lambert JD, Yang CS. Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. **Antioxid Redox Signal**, 2005;7:1704-1714.

Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. **Gastroenterology**, 2004;126:1620-1633.

Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. **J Ethnopharmacol**, 2007;113:1-14.

Shapiro H, Singer P, Halpern Z, Bruck R. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and pancreatitis. **Gut**, 2007;56:426-436.

Sido B, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C, Dröge W. Impairment of glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, 1998;42:485-492.

Souza MHLP, Troncon LEAT, Rodrigues CM, Viana CFG, Onofre PHC, Monteiro RA, Passos ADC, Martinelli ALC, Meneghelli UG. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um Hospital Universitário do Sudeste do Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2002;39(2):98-105.

Steidler L. Microbiological and immunological strategies for treatment of inflammatory bowel disease. **Microbes and Infections**, 2001;3:1157-1166.

Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? **Cell Mol Life Sci**, 2007;64:2900-2916.

Tanigawa S, Fujii M, Hou D-X. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. **Free Rad Biol Med**, 2007;42:1690-1703.

Toruner M, Loftus Jr EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Orenstein R, Sandborn WJ, Colombel J-F, Egan LJ. Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, 2008;134:929-936.



Ukil A, Maity S, Das PK. Protection from experimental colitis by theaflavin-3,30-digallate correlates with inhibition of IKK and NF-kappaB activation. **Br J Pharmacol**, 2006;149:121-131.

Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduced trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, 1995;272(1):417-422.

Viget N, Vernier-Massouille G, Salmon-Ceron D, Yazdanpanah Y, Colombel J-F. Opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease: prevention and diagnosis. **Gut**, 2008;57:549-558.

Villegas I, La Casa C, Orjales A, de la Lastra CA. Effects of dosmalfate, a new cytoprotective agent, on acute and chronic trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. **Eur J Pharmacol**, 2003;460:209-218.

Yamada Y, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative analysis of two models of colitis in rats. **Gastroenterology**, 1992;102(5):1524-1534.

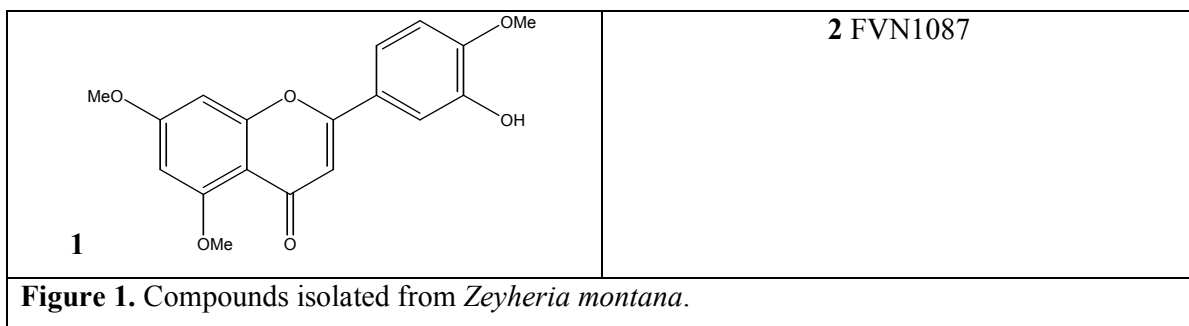
Yao P, Nussler A, Liu L, Hao L, Song F, Schirmeier A, Nussler N. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. **J Hepatol**, 2007;47:253-261.

### **Acknowledgements**

The authors express their gratitude to Mr Nilton Syogo Arakawa and Mrs Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado who kindly assisted us in the structure elucidation of the compounds. This work was supported by grants from Capes and Fapesp.

**Table 01.** Criteria for Assessment of Macroscopic Colonic Damage.

Score	Criteria
0	No damage
1	Hyperemia, no ulcers
2	Linear ulcer with no significant inflammation
3	Linear ulcer with inflammation at one site
4	≥ 2 sites of ulceration/inflammation
5	≥ 2 major sites of ulceration and inflammation or one site of ulceration/inflammation extending > 1 cm along the length of the colon
6-10	If damage covers > 2 cm along the length of the colon, the score is increased by 1 for each additional centimeter of involvement



**Table 2.** Immunomodulatory effects of FVN625 and FVN1087 on the secretion of pro-inflammatory cytokines of balb-c peritoneal macrophages.

<b>Group</b>	<b><i>IL-1</i> (pg/ml)</b>	<b><i>IL-6</i> (pg/ml)</b>
Non-treated (basal secretion)	25.36 ± 0.25	1123.80 ± 13.84
Control DMSO 0.2%	21.07 ± 0.53	1210.70 ± 0.06
FVN625 – 0.242 µg/ml	11.04 ± 1.09**	671.39 ± 31.99**
FVN 625 – 0.605 µg/ml	7.03 ± 0.40**	652.85 ± 13.45**
FVN 625 – 1.21 µg/ml	2.14 ± 0.00**	623.75 ± 47.54**
FVN 625 – 2.42 µg/ml	9.54 ± 1.27**	717.21 ± 50.91**
FVN 1087 – 0.242 µg/ml	9.31 ± 0.63**	719.52 ± 16.13**
FVN 1087 – 0.605 µg/ml	-----	866.57 ± 33.03**
FVN 1087 – 1.21 µg/ml	6.91 ± 2.62**	623.55 ± 15.85**
FVN 1087 – 2.42 µg/ml	7.06 ± 1.62**	883.20 ± 49.67**
LPS (stimulated secretion)	145.55 ± 12.66	23379.09 ± 761.81

Data are expressed as mean ± standard error. \*\*p<0.01 comparison to non-treated group (basal secretion).

**Table 3.** Effects of FVN625, FVN1087 and sulfasalazine on tissue GSH, and on the activities of tissue MPO and AP in TNBS-induced acute colitis.

<b>Group</b>	<b><i>total GSH</i></b> <b><i>(nmol/g tissue)</i></b>	<b><i>MPO activity</i></b> <b><i>(U/g tissue)</i></b>	<b><i>AP activity</i></b> <b><i>(mU/mg protein)</i></b>
Non-colitic	1123.4 ± 41.71**	79.82 ± 3.55**	4.43 ± 0.27**
Colitic control	722.80 ± 65.26	1646.00 ± 145.73	10.11 ± 0.80
FVN 625 - 5 mg/Kg	777.34 ± 84.21	1218.50 ± 245.28	9.92 ± 0.90
FVN 625 - 10 mg/Kg	1041.80 ± 110.21*	1776.10 ± 179.30	11.85 ± 1.60
ZM625- 25 mg/Kg	1149.80 ± 100.91**	1872.60 ± 373.48	12.35 ± 1.49
FVN 1087 - 5 mg/Kg	848.28 ± 48.45	1228.90 ± 254.07	12.41 ± 1.11
FVN 1087 - 10 mg/Kg	1061.30 ± 43.92**	1008.90 ± 216.17	12.94 ± 0.92
FVN 1087 - 25 mg/Kg	1007.70 ± 99.47*	1623.10 ± 160.45	13.14 ± 1.79
Sulfasalazine - 100 mg/Kg	1079,90 ± 61.04**	1540.40 ± 219.77	8.93 ± 0.89

Data are expressed as mean ± S.E.M. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. colitic control group.

## **Phytotherapy Research**

### **Short communication**

#### **Antiproliferative activity of three flavonoids isolated from *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) leaves**

Leonardo Noboru Seito<sup>1</sup>, Ruiz, A.L.T.G.<sup>2</sup>, Debora Vendramini-Costa<sup>2</sup>, Sirlene V. Tinti<sup>2</sup>, Jairo Kenupp Bastos<sup>3</sup>, João Ernesto de Carvalho<sup>2</sup>, Luiz Claudio Di Stasi<sup>1</sup>.

#### **Affiliation**

<sup>1</sup>Laboratory of Phytomedicines, Department of Pharmacology, Instituto de Biociências, 18618-000, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, P.O. Box 6171, 13083-970, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 14040-903, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

#### **Correspondence**

Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, Laboratory of Phytomedicines, Department of Pharmacology, Instituto de Biociências, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, 18618-000, SP, Brazil, E-mail: [ldistasi@ibb.unesp.br](mailto:ldistasi@ibb.unesp.br) Fone: +55 21 14 38116253.

## Resumo

In the present study we isolated three major (known?) flavonoids 3'-hydroxy-5,7,4'-trimethoxyflavone (**1**), 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavanone (**2**) and FVN1087 (**3**) from *Zeyheria montana* dichloromethane leaf extract. Naphthoquinones are commonly attributed to be the active antitumour compounds in Bignoniaceae species. We presently show the antiproliferative activity of three major flavonoids from *Z. montana*. Isolation and purification were conducted with the application of column chromatography and structures were assigned by spectral analysis (NMR <sup>1</sup>H). Compounds **1–3** were evaluated for cytotoxic activities against human tumour cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (breast expressing phenotype multiple drugs resistance), 786-0 (renal), NCI-H460 (lung, non-small cells), PC-3 (prostate), OVCAR-3 (ovarian), HT-29 (colon) and K562 (leukemia) *in vitro*. The flavonoid (**2**) showed cytotoxicity against almost all cell lines, and selectivity against human NCI-ADR/RES and PC-3 cell lines, with total growth inhibition concentration ranging from 12.67 to 28.09 µg/mL.

**Keywords:** *Zeyheria montana*, Bignoniaceae, flavonoids, antiproliferative activity

## 1. Introduction

*Zeyheria montana* (Bignoniaceae) is a species from the Brazilian Cerrado. The plant is used in folk medicine as antibleorrhagic and anti-syphilitic, and for the treatment of skin affections (Rodriguez and Carvalho, 2001; de Souza and Felfili, 2006). Lapachol- and lapachone-derived naphthoquinones are compounds with important pharmacological activities and were isolated from *Z. montana* roots by Jácome *et al.*, 1999, which are old known compounds with antitumour activity (Bentle *et al.*, 2006). From another species, *Zeyheria tuberculosa*, it was isolated flavonoids and naphthoquinones (Kutney and Hanssen, 1971; Weinberg *et al.*, 1976).

Inflammation and cancer are closely related events (Clevers, 2004) and a great body of evidence indicates the involvement of nuclear factor kappa B (NFκB) activation by pro-inflammatory cytokines in tumorigenesis (Karin, 2002). The polyphenols are compounds with important antioxidant and anti-inflammatory activities, and they appear to modulate the inflammatory process by inhibition of the NFκB pathway

(Shapiro *et al.*, 2007). Thus, flavonoids in Bignoniaceae species could contribute to the naphthoquinones effects in the reported antitumour use in folk medicine.

Considering the inhibitory effect of polyphenols on pro-inflammatory cytokine secretion and chemoprevention of cancer (Shapiro *et al.*, 2007; Lambert and Yang, 2007), the present study was a preliminary evaluation of the *in vitro* antiproliferative effect of three flavonoids isolated from *Z. montana* leaves against nine different human cancer cell lines.

## 2. Material and methods

**Plant material.** *Z. montana* leaves were collected in the Cerrado vegetation at Rubião Júnior District, Botucatu, São Paulo State, Brazil. The species was identified at Department of Botany, São Paulo State University, where a voucher specimen (number 25660) was deposited.

**Extraction and isolation.** Dried and pulverized leaves of *Z. montana* (750 g) were cold macerated in methanol for 72 hours, filtered, and extracted three more times each 24 hours. The total filtrate was concentrated and distilled water was added for the partitioning procedure with hexane and dichloromethane (DCM). 15 g of DCM extract was subjected to a silicagel 60 (230-400 Mesh) column chromatography (31 x 6.5 cm) using gradient elution of hexane/ethyl acetate (9:1, 8:2, 7:3, 1:1), followed by pure ethyl acetate and ethyl acetate/methanol (1:1). The fractions (1102 samples of 75 mL) were gradually grouped in 25 fractions after thin layer chromatography (TLC, 20 x 20 cm, 0.25 mm thickness, 60 GF<sub>254</sub>). Fractions ZM625, ZM882 and ZM1087 presented crystals and were selected for compounds isolation. The compounds **1** (1.2 g), **2** (0.105 g) and **3** (1.8 g) were respectively isolated from fractions ZM625, ZM882 and ZM1087 by recrystallization procedure. The structures were elucidated by <sup>1</sup>H-NMR (Table 1) and comparisons to those of the authentic compounds in literature.

**Cell lines and culture medium.** Human tumour cell lines UACC62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI 460 (lung, non-small cells), OVCAR03 (ovarian), PC-3 (prostate), HT-29 (colon), 786-0 (renal) and NCI-ADR (breast expressing phenotype multiple drugs resistance) were kindly provided by the National Cancer Institute (NCI). Stock cultures



were grown in medium containing 5 mL RPMI 1640 (Gibco BRL) supplemented with 5% fetal bovine serum. Gentamicin (50 µg/mL) was added to the experimental cultures.

**Cytotoxicity assay.** Cells in 96-well plates (100 µL cells/well) were exposed to sample concentrations in DMSO RPMI (0.25, 2.5, 25 and 250 µg/mL) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 48 h. The final DMSO concentration did not affect cell viability. Afterwards the cells were fixed with 50% trichloroacetic acid and cell proliferation determined by spectrophotometric quantification (540 nm) of cellular protein content using sulforhodamine B assay (Skehan *et al.*, 1990). Growth inhibition 50 (GI<sub>50</sub>) and Total growth inhibition (TGI) values were determined through non-linear regression analysis (Tables 2 and 3).

### 3. Results and Discussion

Compounds **1** (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>), **2** (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>) and **3** (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>) were identified as 3'-hydroxy-5,7,4'-trimethoxyflavone (**1**), 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavanone (**2**) and FVN1087 (**3**) respectively (Figure 1), by comparison of their <sup>1</sup>H NMR data with those previously published. The effects of these flavonoids on cancer cell lines proliferation and some considerations on structure-activity relationships are discussed below.

The tested flavonoids exhibited antiproliferative activity in different ranges of concentrations. Both flavones (**1** and **3**) displayed similar effects in cell lines proliferation, but the flavanone (**2**) presented more pronounced effect, inhibiting 50% of cell growth (Table 2). Interestingly all compounds appear to show selectivity against NCI-ADR/RES and K562 cell lines, with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.05–7.29 µg/mL. However, considering the total growth inhibition, the flavanone exhibited a better effect (TGI 12.67–191.31 µg/mL) compared to the flavones (>250 µg/mL), and it displayed selectivity against human NCI-ADR/RES and PC-3 cell lines, with total growth inhibition concentration ranging from 12.67 to 28.09 µg/mL (Table 3).

As pointed by Pouget *et al.* (2001), the presence of methoxy groups at positions 5 and/or 7 in the flavanone appear to improve the activity against MCF-7 cells, but the substitution by a hydroxyl moiety at position 5 drastically reduced the activity. We found that 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavanone presented a better activity compared to the flavones. Thus, the presence of a second methoxy group at position 6 seems to restore the antiproliferative activity to the 5-hydroxy-7-methoxyflavanone against

MCF-7, and we found it was not restricted to this cell line in the present study. Unlike the absence of activity of 5,7-dimethoxyflavones (Pouget *et al.*, 2001), we found that both flavones were able to inhibit cell proliferation and it is likely to be due to the presence of hydroxyl and/or methoxy groups in the B ring of the isolated flavones.

The antiproliferative effects of flavonoids on breast and prostate cancer cells could be similar to the effects attributed to the phyto-estrogens, considering the structural similarities between isoflavones and other flavonoids (Zand *et al.*, 2002). Epidemiological studies indicate differences in the incidence of breast and prostate cancer in Western and Eastern people, which is related to soy consumption in diet (Adlercreutz, 2002; Magee and Rowland, 2004). However, the anticancer mechanisms of phyto-estrogens still have to be better elucidated, and the actions of other flavonoids also have to be better understood to ensure a safe use to cancer chemoprevention (Magee and Rowland, 2004).

Flavonoids possess antiproliferative effect in different cell lines, and it would not be predicted on the basis of their chemical composition or structure (Kuntz *et al.*, 1999). Indeed, we found that the tested flavonoids presented varying degrees of inhibition in different cell lines' growth. Thus, flavonoids appear to have common mechanisms on antiproliferative effect and, as recently suggested, the inhibition in the NF $\kappa$ B pathway might display a role to polyphenols activity (Lambert and Yang, 2007). Considering both flavonoids and naphthoquinones can cause inhibition in cell proliferation, the occurrence of synergic effect in cancer might be considered in further studies with Bignoniaceae species extracts and isolated compounds.

In conclusion, all flavonoids isolated from *Z. montana* presented antiproliferative activity in varying degrees, suggesting that different polyphenols in Bignoniaceae species could display the referred effect by folk medicine.

### **Acknowledgements**

The authors express their gratitude to Mr Nilton Syogo Arakawa and Mrs Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado who kindly assisted us in the structure elucidation of the compounds. This work was supported by grants from Capes and Fapesp.

#### 4. References

Adlercreutz H. 2002. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol*, 3: 364-373.

Bentle MS, Bey EA, Dong Y, Reinicke KE, Boothman DA. 2006. New tricks for old drugs: the anticarcinogenic potential of DNA repair inhibitors. *J Mol Histol*, 37: 203-218.

Clevers H. 2004. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell*, 118: 671-674.

de Souza CD, Felfili JM. 2006. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, 20(1): 135-142.

Jácome RLRP, Oliveira AB, Raslan DS, Müller A, Wagner H. 1999. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. (bolsa-de-pastor). *Quím Nova*, 22(2): 175-177.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z-W. 2002. NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2: 301-310.

Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. 1999. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr*, 38: 133-142.

Kutney JP, Hanssen HW. 1971. 5,6,7-Trimethoxyflavone and 5,6,7,8-tetramethoxyflavone from *Zeyhera tuberculosa*. *Phytochemistry*, 10(12): 3298-3302.

Lambert JD, Yang CS. 2007. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr*, 133: 3262S-3267S.

Magee PJ, Rowland IR. 2004. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr*, 91: 513-531.

Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly J-P, Delage C, Chulia A-J. 2001. Flavonoids: structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 11: 3095-3097.

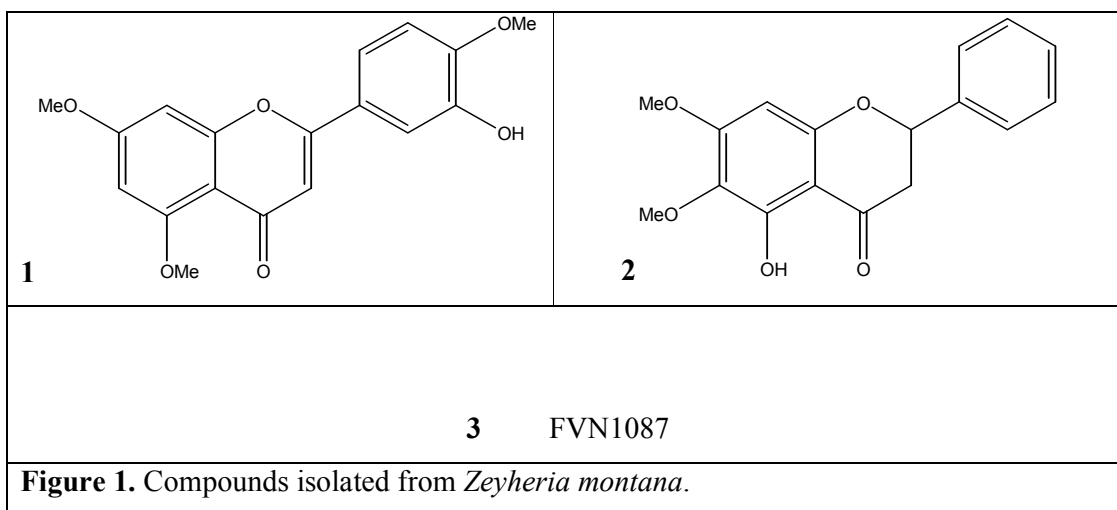
Rodriguez VEG, Carvalho DA. 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, 25(1): 102-123.

Shapiro H, Singer P, Halpern Z, Bruck R. 2007. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and pancreatitis. *Gut*, 56: 426-436.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82: 1107-1118.

Weinberg MLD, Gottlieb OR, Oliveira GG. 1976. Naphthoquinones from *Zeyhera tuberculosa*. *Phytochemistry*, 15(4): 570.

Zand RSR, Jenkins DJA, Brown TJ, Diamandis EP. 2002. Flavonoids can block PSA production by breast and prostate cancer cell lines. *Clin Chim Acta*, 317: 17-26.



**Table 1.** <sup>1</sup>H NMR for compounds **1** and **2**.

<b>Hydrogen</b>	<b>Compound 1</b>	<b>Compound 2</b>	<b>Compound 3</b>
<b>H-2</b>	-	5,40	
<b>H-3 <i>ax</i></b>	6,66	3,03	
<b>H-3 <i>eq</i></b>	-	2,78	
<b>H-6</b>	7,88-7,91	-	
<b>H-8</b>	7,88-7,91	6,15	
<b>H-2'</b>	7,42-7,48	7,34-7,45	
<b>H-3'</b>	7,42-7,48	7,34-7,45	
<b>H-4'</b>	-	7,34-7,45	
<b>H-5'</b>	-	7,34-7,45	
<b>H-6'</b>	7,42-7,48	7,34-7,45	
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3,90	3,88 (s)	
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3,95	3,94 (s)	
<b>OCH<sub>3</sub></b>	4,09	-	
<b>OH-5</b>	-	11,60	

<b>Table 2. Growth Inhibition 50 – necessary concentration for inhibition of 50% of cell growth<sup>a</sup></b>				
	<b>GI<sub>50</sub> (µg/mL)<sup>b</sup></b>			
<b>Cell line</b>	<b>Compound 1</b>	<b>Compound 2</b>	<b>Compound 3</b>	<b>Doxorubicin</b>
UACC-62	>250	29,42	61,23	0,05
MCF-7	110,60	23,03	>250	0,03
NCI-ADR/RES	0,05	0,19	0,06	0,16
786-0	>250	79,11	50,03	1,09
NCI-H460	129,62	>250	14,71	0,47
PC-3	226,70	25,42	>250	0,02
OVCAR-3	120,19	22,13	75,80	0,06
HT-29	>250	50,69	>250	0,24
K562	5,05	0,96	7,29	14,95

<sup>a</sup> Assessed by the SRB assay.

<sup>b</sup> GI<sub>50</sub> values (concentration eliciting 50% inhibition) were determined through non-linear regression analysis; dose range tested: 0.25 to 250 µg/mL; positive control was doxorubicin.

<b>Table 3. Total Growth Inhibition – necessary concentration for 0% of cell growth<sup>a</sup></b>				
Cell line	TGI <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>b</sup>			
	Compound 1	Compound 2	Compound 3	Doxorubicin
UACC-62	>250	31,57	>250	0,31
MCF-7	>250	35,76	>250	1,70
NCI-ADR/RES	>250	12,67	>250	>25
786-0	>250	185,90	>250	>25
NCI-H460	>250	>250	>250	>25
PC-3	>250	28,09	>250	1,07
OVCAR-3	>250	40,77	>250	>25
HT-29	>250	191,31	>250	>25
K562	>250	>250	>250	>25

<sup>a</sup> Assessed by the SRB assay.

<sup>b</sup> TGI values (concentration eliciting 0% of cell proliferation) were determined through non-linear regression analysis; dose range tested: 0.25 to 250 µg/mL; positive control was doxorubicin.



## **Anexo A: Descrição das atividades**

### **A. MATERIAL & MÉTODOS**

A prospecção de compostos com potencial atividade na inflamação intestinal teve início com a coleta das diferentes partes de *Z. montana* – folhas, ramos e a porção subterrânea. O material vegetal foi processado para o preparo dos extratos e para as etapas posteriores de estudo biomonitorado da atividade antioxidante, que resultaram no isolamento dos compostos testados sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos, e no modelo de inflamação intestinal em ratos. Os pormenores de cada passo se seguem nos tópicos descritos na seqüência.

#### **A.1. Coleta de *Z. montana***

Folhas, ramos e porção subterrânea de *Z. montana* foram coletados em março de 2005, em áreas remanescentes de cerrado no Distrito de Rubião Júnior, município de Botucatu, São Paulo. Uma segunda coleta de porções subterrâneas da planta foi realizada em agosto do mesmo ano. O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos e levado ao laboratório para secagem e pulverização. Porções de 100g de cada parte da planta foram pesadas e secas para a determinação dos rendimentos das drogas vegetais (folhas, ramos e raízes secas e pulverizadas), expressos em porcentagem de matéria seca (Folhas: 46%; Ramos: 43%; Raízes: 54.7%)

Amostras férteis foram herborizadas para identificação e depositadas no Herbário “Irina Delanova Gemtchújnicov” – BOTU.

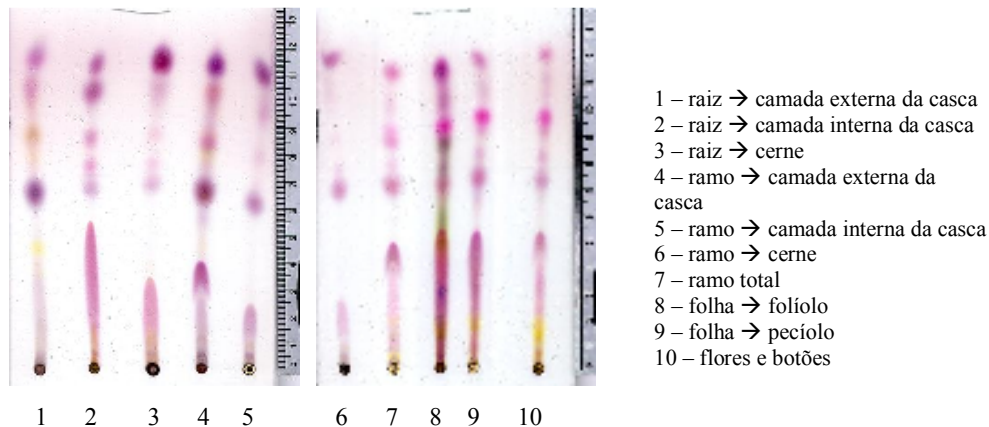
#### **A.2. Preparo dos extratos**

Folhas, ramos e porção subterrânea pulverizados foram extraídos com metanol puro por maceração a 4°C. O material pulverizado permaneceu em contato com o solvente por 72 horas, sendo, a seguir, filtrado sob vácuo. A torta foi re-submetida a mais 3 extrações, com intervalos de 24 horas. O volume total filtrado de cada parte (folhas, ramos ou raízes) foi concentrado com auxílio de evaporador rotativo, e o rendimento do extrato seco foi calculado relativamente à quantidade de matéria vegetal submetida ao processo extrativo, conforme se segue na Tabela 01.

**Tabela 01.** Rendimentos estimados dos extratos metanólicos de folhas, ramos e porção subterrânea de *Z. montana*.

<b>Parte da planta</b>	<b>Matéria vegetal seca (g)</b>	<b>Extrato seco (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Folhas	160	23	14.4%
Ramos	460	21	4.6%
Porção subterrânea	310	33	10.6%

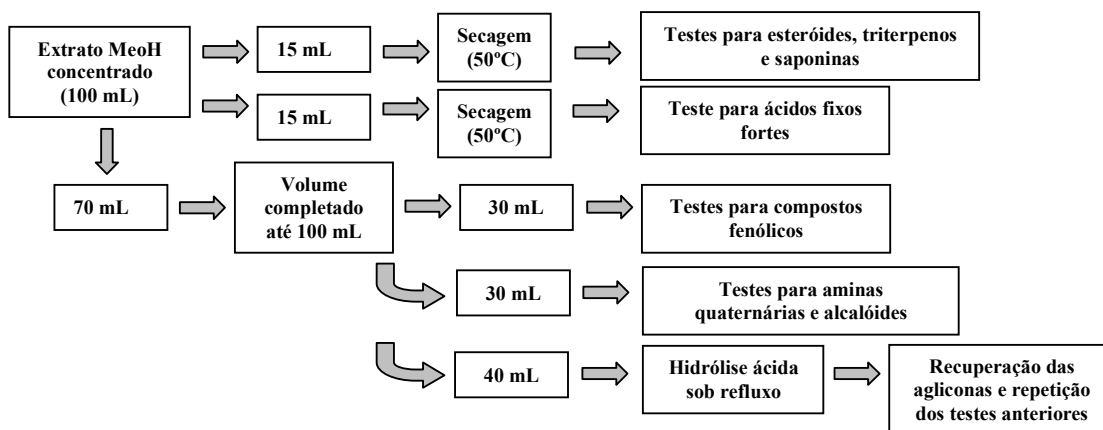
Para avaliação comparativa dos extratos, cromatogramas foram obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se, como fase estacionária, silicagel 60GF<sub>254</sub> e, como fase móvel, o sistema eluente constituído por hexano e acetato de etila (7:3), acrescido de 1 ml de álcool isopropílico para cada 100 ml de fase móvel. Após o desenvolvimento da CCD, o reagente anisaldeído sulfúrico foi borrifado sobre as placas para a revelação dos cromatogramas após aquecimento (Figura 01):



**Figura 01** Cromatogramas preliminares dos extratos de *Z. montana*, utilizando-se hexano/acetato de etila (7:3) + 1 ml de isopropanol/100 ml de eluente e anisaldeído sulfúrico como revelador.

### A.3. Perfil fitoquímico dos extratos de folhas, ramos e porção subterrânea

Extratos de folhas, ramos e porção subterrânea da planta foram preparados a partir de 50g de cada material seco e pulverizado, submetidos a extração por maceração a frio (4°C) com metanol puro. Após 4 extrações para exaustão das tortas, os extratos filtrados foram concentrados no evaporador rotativo até cerca de 100 mL. Duas alíquotas de 15 mL desses extratos foram secas em béqueres a 50°C em estufa. Aos 70 mL restantes foi adicionada água destilada para completar o volume até 100 mL. Dessa solução hidroalcoólica, 40 mL foram submetidas à hidrólise ácida (adição de HCl até pH 1 a 3) sob refluxo e duas alíquotas de 30 mL foram separadas para os demais testes, conforme fluxograma geral apresentado na Figura 02. Todas as amostras descritas foram submetidas às reações clássicas descritas na marcha fitoquímica de Matos (1988)<sup>1</sup>, para a detecção de classes gerais de compostos secundários.



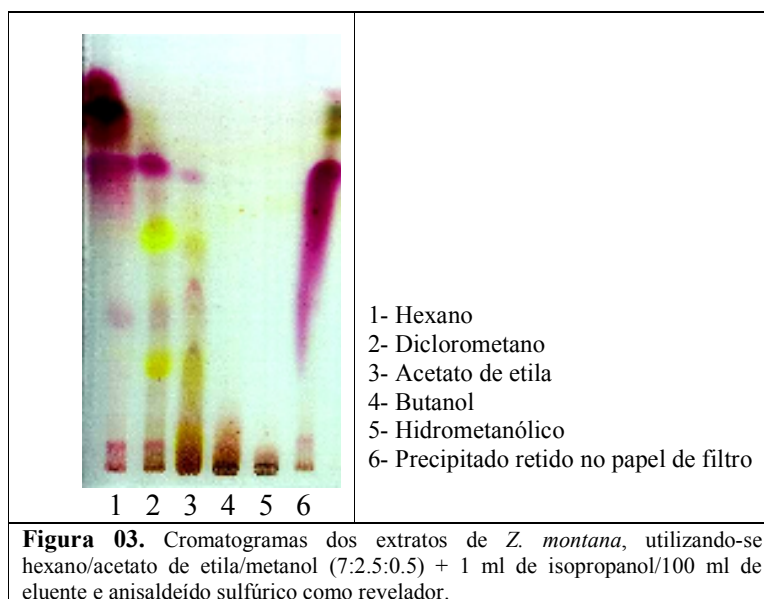
**Figura 02.** Fluxograma das etapas gerais descritas na marcha fitoquímica de Matos (1988).

<sup>1</sup> Matos, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Ed. Universidade do Ceará, Ceará, pp. 37-65, 1988.

#### A.4. Particionamento líquido/líquido do extrato metanólico de folhas:

Após a realização do processo extrativo a partir de folhas secas e pulverizadas, o volume total de extrato metanólico foi concentrado até 10% do volume original, sendo adicionada água destilada para obtenção de extrato hidrometanólico a 70%, seguido de filtração, anteriormente à realização do particionamento inicial com hexano. Nessa etapa, foram realizadas 4 extrações com volume de 150mL de hexano para cada 500mL de extrato, em funil de separação. Após a extração com hexano, a fase hidroalcoólica foi concentrada até 50% do próprio volume, sendo seqüencialmente extraída com diclorometano, acetato de etila e butanol, nas mesmas proporções utilizadas para o hexano.

Os extratos obtidos por particionamento também foram comparados por CCD (Figura 03), a fim de se estabelecer parâmetros qualitativos para repetições posteriores do processo. Os rendimentos estimados estão na Tabela 02:



**Tabela 02.** Rendimentos estimados dos extratos obtidos por particionamento do extrato preparado com 250g de folhas de *Z. montana*.

Extrato	Peso seco (g)	Rendimento (%)
Hexano	2.63	1.05
Diclorometano	6.31	2.52
Acetato de etila	0.56	0.22
Butanol	3.39	1.36
Hidrometanólico	4.20	1.68
Precipitado	5.56	2.22

### A.5. Fracionamento do extrato DCM por cromatografia líquida a vácuo (CLV)

6.34g de extrato DCM foi inicialmente fracionado por meio de CLV. Para tanto, 300g de sílicagel 60H foram utilizadas como fase estacionária. A seqüência de eluentes, em polaridade crescente, foi utilizada: hexano puro, hexano/acetato de etila (9:1), (8:2), (7:3), (1:1), acetato de etila puro, acetato de etila/metanol (1:1), metanol puro. Os solventes foram eliminados no evaporador rotativo e os sólidos foram observados. As frações acetato de etila puro e acetato de etila/metanol (1:1) apresentaram cristais, os quais puderam ser parcialmente limpos por recristalização a partir da fração acetato de etila.

A realização da CLV a partir de 6.34g de extrato DCM não permitiu uma boa separação dos compostos. Desse modo, a fim de também se obter material para a realização dos testes *in vivo*, outras extrações foram realizadas para o preparo de 15g de extrato DCM, submetido a fracionamento em coluna cromatográfica clássica.

### A.6. Fracionamento do extrato DCM em coluna cromatográfica clássica (CCC)

Para o fracionamento do extrato DCM em CCC, foi montada uma coluna com sílicagel 60 (230-400 Mesh) e hexano. 15g de extrato foram adsorvidos em 15g da mesma sílica utilizada para montar a coluna.

As fases móveis utilizadas obedeceram a gradiente de polaridade crescente, iniciando-se com hexano e acetato de etila na proporção de (9:1), prosseguindo-se com hexano e acetato de etila (8:2), (7:3), (1:1), acetato de etila puro, acetato de etila e metanol (1:1) e metanol puro. Ao longo de todo o processo de fracionamento, alíquotas de 75 mL foram sucessivamente separadas, concentradas e comparadas por CCD, para agrupamento das frações com o mesmo perfil de manchas. A CCD comparativa foi realizada com placas de sílicagel 60GF<sub>254</sub> e a fase móvel apropriada para a separação das “manchas” das diferentes alíquotas (frações), visualizadas no UV e, posteriormente, com anisaldeído sulfúrico.

Foram separadas 1102 frações de 75mL, as quais foram agrupadas em 25 frações afins. Destas, 3 possibilitaram o isolamento de flavonóides por recristalizações sucessivas. Os rendimentos das frações, assim como das substâncias isoladas, se encontram na Tabela 03.

**Tabela 03.** Rendimentos estimados das frações do extrato DCM de *Z. montana*, obtidas a partir de 600g de folhas secas.

Número da fração	Peso (g)	Rendimento (%)
1. ZM13	0.0041	0.0016
2. ZM16	0.0116	0.0046
3. ZM37	0.0361	0.0144
4. ZM50	0.0068	0.0027
5. ZM69	0.0906	0.0362
6. ZM79	0.0796	0.0318
7. ZM99	0.3136	0.1254
8. ZM123	0.5470	0.2188
9. ZM132	0.3669	0.1468
10. ZM183	0.7029	0.2812
11. ZM230	0.1278	0.0511
12. ZM241	0.0230	0.0092
13. ZM300	0.0986	0.0394
14. ZM365	0.1066	0.0426
15. ZM428	0.1523	0.0609

continuação

Número da fração	Peso (g)	Rendimento (%)
16. ZM625	1.9192	0.7677
17. ZM745	1.1784	0.4714
18. ZM788	0.0870	0.0348
19. ZM882	0.2464	0.0986
20. ZM948	0.1876	0.0750
21. ZM1013	0.1508	0.0603
22. ZM1029	0.1581	0.0632
23. ZM1087	1.6178	0.6471
24. ZM1101	0.0663	0.0265
25. ZM1102	4.3521	1.7408
<b>Compostos isolados</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>FVN625</b>	1.5806	0.63224
<b>FVN882</b>	0.1049	0.04196
<b>FVN1087</b>	1.2099	0.48396

### A.7. Análises espectroscópicas

A elucidação estrutural dos compostos isolados foi realizada por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e de carbono (RMN <sup>13</sup>C), espectrometria de massa, e comparação com a literatura.

Para este estudo, contamos com a colaboração do Prof. Dr. Jairo Kennup Bastos e Dr. Nilton Syogo Arakawa (à época, doutorando do laboratório de Farmacognosia) e da equipe que trabalha no laboratório de Farmacognosia da FCFRP/USP.

### A.8. Biomonitoramento por atividade antioxidante *in vitro*

A avaliação da atividade antioxidante se baseia na determinação colorimétrica do malonildialdeído (MDA) formado após a peroxidação lipídica induzida em membranas celulares. A peroxidação lipídica é classicamente determinada pela reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O modelo *in vitro* adotado neste estudo consiste de uma adaptação da técnica descrita por Gálvez e cols. (1995)<sup>2</sup>, na qual utiliza a fração F2 de homogenato de fígado de rato. A referida adaptação é a substituição da fração F2 do homogenato de fígado pelo sobrenadante do homogenato de cérebro de ratos Wistar. Todos os cérebros foram obtidos de ratos não submetidos a qualquer tratamento, mortos em outros protocolos experimentais nos laboratórios do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

Para o preparo do homogenato, cérebros de ratos foram brevemente lavados em solução salina 0.9% gelada e homogeneizados em tampão PBS (50mM, pH 6,0) na proporção de 1:4 (p/v), sob resfriamento constante, em homogeneizador do tipo Potter. O homogenato obtido foi centrifugado a 3000rpm/15min/4°C e o sobrenadante foi coletado em alíquotas de 1ml, congelados a -80°C para uso em curto prazo. Para a realização do ensaio, quantidade suficiente de alíquotas são descongeladas e diluídas na proporção de 1:10 em tampão PBS.

A reação de lipoperoxidação foi realizada em tubos de 2ml, do tipo eppendorf. A cada eppendorf foi adicionado 1ml de sobrenadante do homogenato de cérebro (SHC). Aos tubos controles 1 e 2 foram adicionados 50µL de DMSO20%; aos tubos da substância antioxidante de referência, 50µL das respectivas concentrações de quercetina (QC); aos tubos das substâncias teste, 50µL das respectivas concentrações. A seguir,

<sup>2</sup> Gálvez, J.; De La Cruz, J.P.; Zarzuelo, A.; Sanchez De La Cuesta, F. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. *Pharmacology*, 51:127-133, 1995.

adicionou-se 50µL da solução de sulfato férrico e ácido ascórbico (SFAA), conforme esquematizado na Tabela 04, submetendo-se os tubos à incubação em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Por fim, a cada tubo foi adicionado 500µL de uma solução de TBA 0.5% em ácido tricloroacético 20%, submetendo-se todos os tubos a aquecimento em banho-maria entre 70° a 90°C por cerca de 10 minutos. Ao final desse tempo, os tubos foram resfriados e centrifugados a 4000 rpm/15min/4°C, e alíquotas de 200µL foram utilizadas para leitura em placas de 96 poços em leitor de microplacas a 520 nm.

A atividade antioxidante de cada substância testada (extratos, frações e substâncias isoladas) foi determinada utilizando-se de 5 a 8 concentrações. Os resultados foram transformados em % de inibição da peroxidação lipídica em relação ao controle 3, que representa o máximo de lipoperoxidação. Após o cálculo das porcentagens de inibição, gráficos são elaborados para a determinação das concentrações que inibem em 50% a peroxidação lipídica (IC<sub>50</sub>).

**Tabela 04.** Organização do ensaio de lipoperoxidação *in vitro*.

Tubo	Nome	Tratamento
01.	Branco1	Somente SHC sem incubação
02.	Branco2	SHC + incubação 37°C
03.	Controle1	SHC + DMSO20% sem incubação
04.	Controle2	SHC + DMSO20% + SFAA 100µM + incubação 37°C
05.	Controle3	SHC + SFAA 100µM + incubação 37°C
06.	Curva-padrão	SHC + SFAA 10µM + incubação 37°C
07.	Curva-padrão	SHC + SFAA 20µM + incubação 37°C
08.	Curva-padrão	SHC + SFAA 40µM + incubação 37°C
09.	Curva-padrão	SHC + SFAA 60µM + incubação 37°C
10.	Curva-padrão	SHC + SFAA 80µM + incubação 37°C
11.	Curva-padrão	SHC + SFAA 100µM + incubação 37°C
12.	Curva-padrão	SHC + SFAA 120µM + incubação 37°C
13.	Curva-padrão	SHC + SFAA 140µM + incubação 37°C
14.	Referência	SHC + QC 2.5 µg/ml + SFAA 100µM + incubação 37°C
15.	Referência	SHC + QC 5.0 µg/ml + SFAA 100µM + incubação 37°C
16.	Referência	SHC + QC 10 µg/ml + SFAA 100µM + incubação 37°C
17.	Referência	SHC + QC 20 µg/ml + SFAA 100µM + incubação 37°C
18.	Referência	SHC + QC 40 µg/ml + SFAA 100µM + incubação 37°C
19.	Teste	SHC + Conc1 + SFAA 100µM + incubação 37°C
20.	Teste	SHC + Conc2 + SFAA 100µM + incubação 37°C
21.	Teste	SHC + Conc3 + SFAA 100µM + incubação 37°C
22.	Teste	SHC + Conc4 + SFAA 100µM + incubação 37°C
23.	Teste	SHC + Conc5 + SFAA 100µM + incubação 37°C
24.	Teste	SHC + Conc6 + SFAA 100µM + incubação 37°C
25.	Teste	SHC + Conc7 + SFAA 100µM + incubação 37°C
26.	Teste	SHC + Conc8 + SFAA 100µM + incubação 37°C

**Abreviaturas:** SHC (sobrenadante do homogenato de cérebro); SFAA (sulfato férrico e ácido ascórbico); QC (quercetina).

#### A.9. Atividade imunomoduladora *in vitro*

O ensaio foi realizado com um “pool” de macrófagos peritoneais de camundongos balb/c (n=15), provenientes da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP. Os animais foram mortos em câmara de CO<sub>2</sub> e os macrófagos peritoneais foram obtidos por meio de injeção de 3 a 5 mL de PBS gelado na cavidade abdominal, seguido de leve massagem abdominal por 30 segundos. O líquido peritoneal foi coletado em tubo plástico Falcon, repentinando-se o processo de lavagem por 3 a 4 vezes. A seguir, os tubos foram centrifugados a 200 x g, por 10 minutos. As células foram

ressuspendidas em 1 mL de meio completo para cultura de células (meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 20 mM de HEPES), e a concentração celular foi ajustada para  $2 \times 10^6$  células/mL. O volume final de suspensão foi distribuído em placas de microcultura, em alíquotas de 100  $\mu$ L, com posterior incubação a 37°C em tensão de 5% de CO<sup>2</sup>. Após 2 horas, as células não aderentes foram removidas e os macrófagos aderidos foram incubados a 37°C por mais 24 horas, anteriormente ao teste das substâncias<sup>3</sup>. O estudo foi realizado de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto.

Os flavonóides **1** (3'-hidroxi-5,7,4'-trimetoxiflavona) e **3** (FVN1087) foram testados nas concentrações finais de 0.242, 0.605, 1.21 e 2.42  $\mu$ g/ml, em DMSO a 0.2%. Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20°C para posteriores dosagens. As citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 foram dosadas por meio de kit de ELISA (BD Biosciences), conforme as instruções do kit. Os dados da atividade imunomoduladora *in vitro* foram comparados com a secreção basal de citocinas das células não tratadas.

#### **A.10. Atividade antiulcerogênica**

A triagem da atividade antiulcerogênica foi realizada no modelo de lesões gástricas induzidas pelo etanol absoluto em ratos<sup>4</sup>. O estudo foi realizado de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto.

A análise da atividade antiulcerogênica inicial foi realizada com os extratos de folhas, ramos e partes subterrâneas da planta. Posteriormente, foram testados os extratos obtidos pelo particionamento do extrato metanólico de folhas, quais sejam os extratos hexânico, diclorometânico, acetato de etila, butanólico e hidrometanólico. Nesses experimentos, os extratos foram testados nas doses de 100, 250 e 500mg/Kg (v.o.), e comparados ao grupo controle tratado com salina 0.9% ou tween80 a 12%, e ao grupo tratado com carbenoxolona, 100mg/Kg (v.o.), utilizada como a droga de referência.

Ratos submetidos a jejum de no mínimo 12 h, em caixas especiais para impedir coprofagia, foram utilizados nos testes. Os animais foram tratados 60 minutos antes de receberem 1 mL/animal de etanol absoluto, v.o. Decorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram mortos por deslocamento cervical e os estômagos foram removidos, abertos pela grande curvatura, limpos e prensados em placas de vidro para a digitalização das imagens dos estômagos.

As imagens dos estômagos foram analisadas em programa AVSoft Bioview Spectra, e os resultados foram expressos como área relativa de lesão (%), as quais foram convertidas em arcoseno para o tratamento estatístico apropriado.

#### **A.11. Atividade em modelo de inflamação intestinal aguda induzida por TNBS**

A avaliação das atividades antiinflamatória intestinal aguda e antidiarréica foram realizadas com os flavonóides com atividade imunomoduladora (*in vitro*) isolados do extrato DCM de *Z. montana*. Nesses ensaios, foram utilizados ratos Wistar machos de 180 a 200 g de peso, oriundos do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu, São

---

<sup>3</sup> Orsi, R.O.; Funari, S.R.C.; Soares, A.M.V.C.; Calvi, S.A.; Oliveira, S.L.; Sforcin, J.M. and Bankova, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, 6:205-219, 2000.

<sup>4</sup> Morimoto, Y.; Shimohara, K.; Oshima, S.; Sukamoto, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, the compared to those of terpenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology**, 57:495-505, 1991.

Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Unesp, durante pelo menos 4 semanas antes do início dos experimentos, com a temperatura ambiente controlada entre  $22 \pm 2$  °C e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os ratos foram alojados em caixas e separados em grupos de no máximo 7 animais por caixa, sendo alimentados com ração de manutenção PanLab S.I. e água filtrada *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto.

A indução da colite foi realizada pelo método descrito por Morris e cols. (1989)<sup>5</sup> com pequenas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e posteriormente anestesiados em cuba saturada com éter. Em seguida, foi realizada a administração retal (intracolônica) de 0,25 ml de uma solução de 10 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% v/v. A administração foi realizada com a ajuda de um catéter de teflon (diâmetro de 2 mm), introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm. Os animais foram mantidos em posição supina desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia.

A solução de TNBS foi preparada a partir de um liofilizado obtido da solução aquosa comercial de origem a 5% (p/v). Os animais do grupo controle não-colítico foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS.

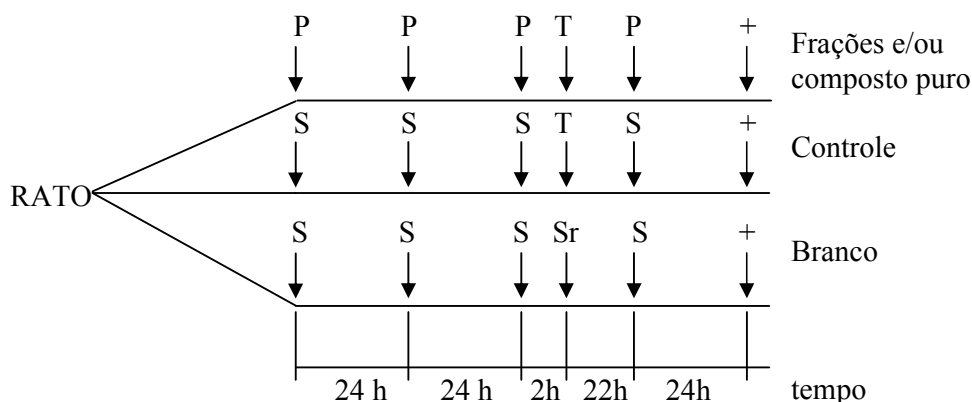
Foi realizado um delineamento experimental para determinação do efeito preventivo de distintas doses dos flavonóides na fase aguda da inflamação intestinal (48 horas), induzida por uma dose de 10 mg de TNBS diluído em etanol 50%. O delineamento experimental está esquematizado na Figura 04. Em experimentos independentes, cada flavonóide foi testado nas doses de 5, 10 e 25mg/Kg, por via oral. O flavonóide **1** (3'-hidroxi-5,7,4'-trimetoxiflavona) foi solubilizada em etanol puro e diluída com salina 0.9%, de forma a se obter a dose estabelecida, em solução alcoólica a 10%. Por sua vez, o flavonóide **2** (FVN1087), insolúvel no mesmo veículo, foi preparada na forma de suspensão em metilcelulose 1%.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em seis grupos experimentais, constituídos por um grupo controle não-colítico, um grupo controle colítico, um grupo tratado com 100mg/Kg (v.o.) de sulfassalazina, e os grupos tratados com as respectivas doses dos compostos isolados. Os tratamentos foram realizados 48, 24 e 2 horas antes da indução da colite, assim como 24 horas depois. Os animais dos grupos controles receberam 1 ml de metilcelulose 1% (v.o.) ou solução etanólica a 10% em salina (v.o.), seguindo a mesma pauta de tratamento usada para a administração das substâncias teste. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução da colite.

---

<sup>5</sup> Morris, G.P.; Beck, P.L.; Herridge, M.S.; Depew, W.T.; Szewczuk, M.R. and Wallace, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, 96(3):795-803, 1989.





**Figura 04.** Delineamento experimental do ensaio agudo de inflamação intestinal induzida pela administração intracolônica de 10 mg de TNBS. P- composto puro de *Z. montana*; T-TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico) por via intracolônica; S-Salina por via oral, Sr-Salina por via intracolônica, + morte dos animais.

### A.11.1. Obtenção das amostras

Ao final do experimento, 48 horas após a instilação intra-colônica de TNBS, os animais foram mortos por deslocamento cervical. Os animais foram dissecados para observação de eventuais adesões entre o cólon e órgãos adjacentes, o que pode ser indicativa tanto de perfuração da parede intestinal, como de proliferação de tecido conectivo da parede intestinal. A seguir, toda a extensão do cólon dos animais foi extraída, procedendo-se com a remoção de restos de tecido adiposo e de adesões mesentéricas. A seguir, o peso do órgão foi determinado e o comprimento do segmento foi aferido sob uma tensão constante de 2 g. O segmento colônico foi aberto longitudinalmente para exposição da superfície da mucosa sobre a placa e determinação do índice de lesão macroscópica, de acordo com método descrito por Bell e cols. (1995)<sup>6</sup> para a gravidade e para a extensão da lesão intestinal (Tabela 05). Esta avaliação foi realizada por um observador não envolvido com o experimento. Finalmente, o cólon foi dividido em 5 fragmentos longitudinais, dos quais um será destinado à dosagem de mieloperoxidase (MPO); outro, para a dosagem de glutathiona total (GSH+GSSG); outro, para a dosagem de fosfatase alcalina (FA); e os demais, congelados para eventuais repetições. As amostras foram pesadas e congeladas em freezer (-30°C) até o momento de uso. O fragmento para a dosagem de glutathiona total foi armazenado em 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v), com o objetivo de inibir sua degradação pela gama-glutamiltanspeptidase<sup>7</sup>.

<sup>6</sup> Bell, C.J.; Gall, D.G. and Wallace, J.L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, 268(4):G622-G630, 1995.

<sup>7</sup> Anderson, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, 113:548-555, 1985.

**Tabela 05.** Critérios de pontuação do índice de lesão macroscópica (ILM)

Escore	Critério
0	Sem prejuízo
1	Hiperemia, sem úlceras
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
3	Úlcera linear com inflamação em um sítio
4	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação
5	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação ou um sítio de inflamação maior que 1 cm ao longo da extensão do cólon
6-10	Se o prejuízo cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (o escore é aumentado em 1 ponto para cada centímetro adicional)

### **A.11.2. Determinações bioquímicas**

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogeneizados de mucosa intestinal colônica. A homogeneização foi realizada sob resfriamento, com ajuda de um homogeneizador do tipo potter, em recipiente de vidro de 10 ml de capacidade. Os detalhes das técnicas para dosagem de MPO, GSH e FA estão descritas a seguir.

### **A.11.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

A determinação da atividade da mieloperoxidase em fragmentos de cólon de rato foi realizada pelo método de Krawisz e cols. (1984)<sup>8</sup>. Utilizamos a atividade da mieloperoxidase como marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular.

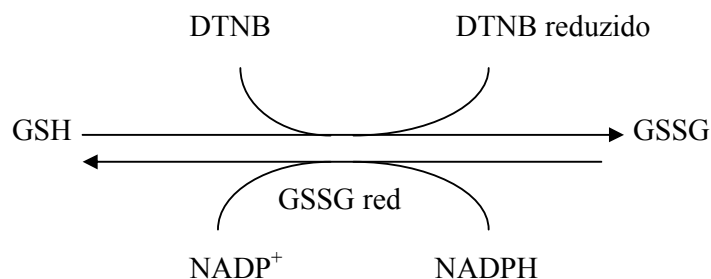
Após o descongelamento dos fragmentos reservados para esta dosagem, os mesmos foram colocados sobre uma placa de Petri com gelo e picados com tesoura e com 1 ml de tampão HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), durante 15 segundos. O tampão HTAB, atua como um detergente, facilitando a liberação da enzima MPO dos grânulos intracelulares dos neutrófilos, nos quais está armazenada. Em seguida o material picado foi transferido para um tubo de vidro, adicionando-se o restante de tampão, de modo a se obter uma proporção 1:20 (p/v), homogeneizando-se durante 45 segundos, sob resfriamento, usando o homogeneizador do tipo potter. O homogeneizado resultante foi dividido em 2 alíquotas de 1.0 ml, armazenadas em tubos tipo eppendorf. O material foi submetido a ultra-som por 10 segundos e a um triplo processo de congelamento-descongelamento. Após o último descongelamento, a alíquota foi centrifugada a 7000 x g por 5 minutos a 4°C. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µl do sobrenadante de cada amostra e 150 µl do tampão de reação (cloridrato de orto-dianisidina), distribuídos na placa de acordo com o protocolo de leitura no espectrofotômetro. O incremento de absorbância foi determinado a 450 nm, e a atividade da enzima mieloperoxidase foi calculada por interpolação em uma curva padrão, realizada com peroxidase de rábano (Sigma). Uma unidade de

<sup>8</sup> Krawisz, J.E.; Sharon, P. and Stenson, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology*, 84:1344-1350, 1984.

mieloperoxidase (U) se considera como aquela que degrada 1 nmol/min de peróxido de hidrogênio a 25°C. Os resultados são expressos como U/g de tecido.

#### A.11.4. Determinação do conteúdo de glutatona total (GSH+GSSG)

A determinação do conteúdo de glutatona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson (1985)<sup>9</sup>, que está baseado na oxidação total da glutatona reduzida (GSH) de uma amostra à sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada por colorimetria. A GSSG gerada é reduzida por ação da enzima glutatona redutase, na presença de NADPH. A GSH formada se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo (Figura 05), no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu conseqüente incremento de absorbância a 412 nm) é proporcional à quantidade total de glutatona (GSH+GSSG).



**Figura 05.** Esquema das reações que ocorrem na determinação do conteúdo de glutatona total nas amostras de cólon

Para efetuar a determinação bioquímica, foram utilizados os fragmentos de cólon congelados com ácido tricloroacético (TCA). As amostras, após descongelamento, foram picadas com tesouras durante 15 segundos, aproximadamente, sobre uma placa de Petri com gelo e posteriormente homogeneizadas com uma solução de TCA 5% em uma proporção final de 1:20 (p/v), usando um homogeneizador do tipo potter. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 2000 x g por 5 minutos a 4°C. Do sobrenadante, 20 µl de cada amostra foram colocados em poços de uma microplaca (96 poços), onde foram adicionados 140 µl de NADPH, 5 µl de PBS e 20 µl DTNB. A placa foi acondicionada no espectrofotômetro, onde foi incubada por 5 minutos a 30°C anteriormente à leitura. Após este período, 15µl de glutatona redutase foram adicionadas, registrando-se o incremento de absorbância a 412 nm no espectrofotômetro. A concentração de glutatona foi calculada a partir da pendente da curva obtida por interpolação em uma curva-padrão realizada com Glutatona (GSH) e os resultados foram expressos como nmol/g de tecido.

#### A.11.5. Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina

<sup>9</sup> Anderson, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, 113:548-555, 1985.

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foram realizadas pelos métodos clássicos descritos por Bessey e cols. (1946)<sup>10</sup>.

#### **A.12. Atividade antiproliferativa *in vitro***

O *National Cancer Institute* (NCI-US), um dos mais importantes centros de estudos sobre o câncer, preconiza a utilização de um painel de células tumorais humanas a fim de verificar a atividade antiproliferativa *in vitro*<sup>11</sup> de novas substâncias para uso em quimioterapia. Nesse experimento, uma das formas de se inferir a porcentagem de inibição de crescimento é através da leitura espectrofotométrica da absorbância de proteínas celulares coradas com Sulforrodamina B (SRB), um corante aniônico de coloração rosa brilhante. Esse corante é capaz de ligar-se às terminações básicas de aminoácidos protéicos de células vivas fixadas com ácido tricloroacético (TCA), sendo assim um ensaio independente do metabolismo celular e permitindo uma quantificação sensível de proteínas de modo linear com o número de células da cultura. O ensaio de SRB é consideravelmente rápido, simples e apresenta sensibilidade comparável àquelas das metodologias fluorescentes e superior aos ensaios que utilizam corantes visíveis, mesmo em baixas concentrações celulares (1000 a 2500 células por compartimento)<sup>12</sup>.

#### **A.13. Avaliação em painel de células tumorais humanas**

Os flavonóides **1** (3'-hidroxi-5,7,4'-trimetoxiflavona), **2** (5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavanona) e **3** (FVN1087) isolados foram avaliados quanto a sua atividade antiproliferativa em painel de células tumorais humanas sendo que a inibição de crescimento foi calculada a partir da dosagem de proteínas utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SBR). Foram empregadas linhagens de células tumorais apresentadas na Tabela 06. Estas linhagens foram gentilmente cedidas pelo NCI e foram mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm<sup>3</sup> (Nunc), com 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), e incubados a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

---

<sup>10</sup> Bessey, O.A.; Lowry, O.H. and Brook, M.J. Method for rapid determination of alkaline phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, 164:321-329, 1946.

<sup>11</sup> Chabner, B.A. and Roberts Jr, T.G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews - Cancer** 5(1): 65-72, 2005.

<sup>12</sup> Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S. and Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute** 82 (13):1107-1118, 1990.

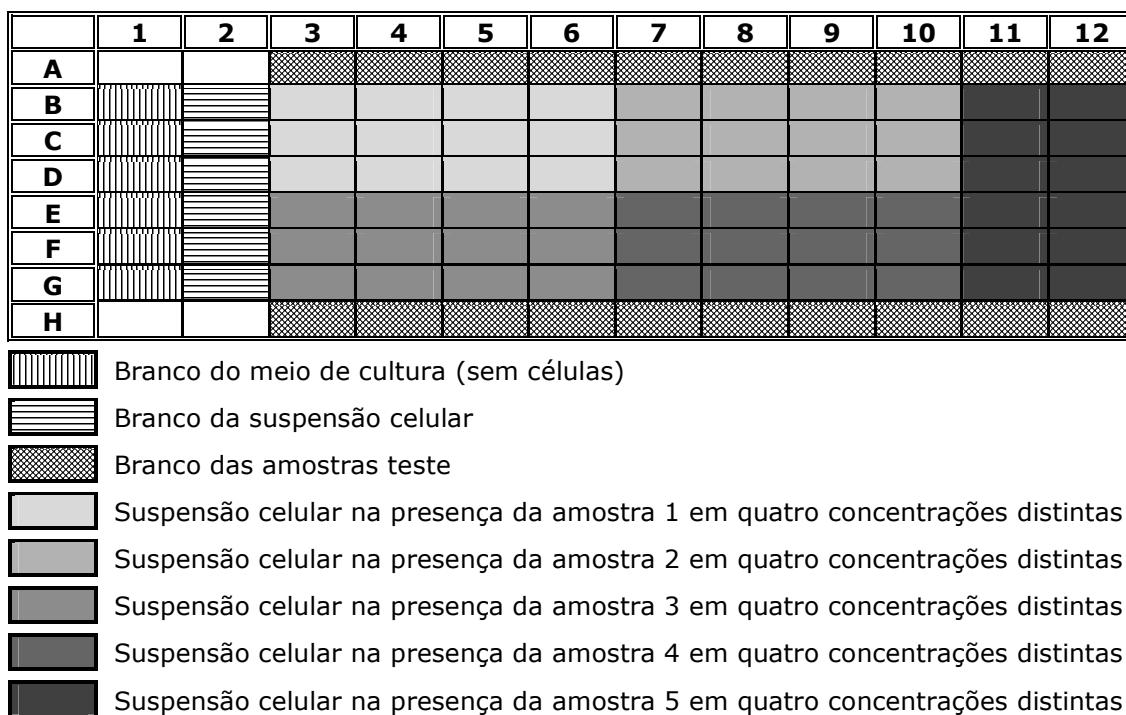
**Tabela 06.** Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

<b>Linhagem</b>	<b>Tipo Celular</b>	<b>Origem Embrionária</b>
K562 (Leucemia)	Linfoblástica	Mesênquima
NCI-H460 (Pulmão)	Epitelial	Endoderme
MCF-7 (Mama)	Epitelial	Ectoderme
NCI-ADR/RES (Ovário*)	Epitelial	Ectoderme
UACC-62 (Melanoma)	Fibroblástica	Ectoderme
786-O (Renal)	Epitelial	Mesoderme
HT-29 (Cólon)	Epitelial	Endoderme
OVCAR-3 (Ovário)	Epitelial	Mesoderme
PC-3 (Próstata)	Epitelial	Mesoderme

\* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos

Basicamente o ensaio de atividade antiproliferativa consistiu em inocular 100µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc), de uma suspensão com densidade de inoculação entre  $3 \times 10^4$  e  $6,5 \times 10^4$  cel/mL em meio RPMI/SFB acrescido de 50µg/mL de gentamicina (Schering Plus). Foi preparada também uma placa, denominada T<sub>0</sub>, onde cada linhagem celular foi inoculada em apenas seis compartimentos (100µL/compartimento), o que permitiu colocar todas as linhagens testadas em uma única placa.

Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 100µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) (Figura 6). Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico Doxorubicina nas mesmas concentrações das amostras em teste.



**Figura 06.** Desenho experimental da placa teste

Imediatamente após inocular as amostras nas placas teste, a placa  $T_0$  foi fixada com  $50\mu\text{L}$ /compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% e mantida por 1h a  $4^\circ\text{C}$ ; em seguida, ela foi lavada quatro vezes com água e deixada para seca a temperatura ambiente. Esta placa indicou a quantidade de células presentes nas placas teste no momento da inoculação das amostras.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com  $50\mu\text{L}$ /compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% e as placas teste foram incubadas por 1h a  $4^\circ\text{C}$ . A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários.

Depois de completamente secas, à temperatura ambiente, todas as placas foram coradas com  $50\mu\text{L}$ /compartimento de SRB 0,4% (p/v, em ácido acético 1%) e mantidas por 60 min a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma,  $10\mu\text{M}$ , pH 10,5). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração de cada amostra, a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

Se  $T > C \rightarrow$  estímulo de crescimento celular

Se  $T \geq T_0 < C \rightarrow$  atividade citostática:  $IC = 100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$

Se  $T < T_0 \rightarrow$  atividade citocida:  $IC = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

C = absorbância do branco de células

$T_0$  = absorbância do controle de células na placa  $T_0$ .

#### **A.14. Análise estatística**

Todos os resultados serão expressos como média e erro padrão da média. Para se determinar a significância estatística das diferenças entre as médias será utilizada a análise de variância (ANOVA). Os dados não-paramétricos serão avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância será estabelecido em  $p < 0,05$ .

#### **A.15. Nota sobre os ensaios pilotos para avaliação da atividade contra *Giardia duodenalis* e *Trypanosoma cruzi*.**

A atividade antiprotozoária dos flavonóides **1** e **2** foram avaliadas em culturas axênicas de *Giardia duodenalis* e *Trypanosoma cruzi*.

Os compostos foram testados nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  em meio de cultura TYI-S-33, modificado por Keister (1983)<sup>13</sup> contendo  $10^6$  trofozoítos de *Giardia duodenalis*. O crescimento celular foi avaliado por contagem em câmara de Neubauer 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento, e expresso como número de protozoários por mL.

A avaliação sobre a proliferação de *Trypanosoma cruzi* foi realizada em placas de 96 poços. Os compostos foram testados nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  em meio de cultura LIT (liver infusion tryptose) contendo  $5 \times 10^5$  epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* por poço (200  $\mu\text{L/poço}$ ). O crescimento celular foi avaliado por contagem em câmara de Neubauer, 24, 48 e 72 horas após o tratamento, e expresso como número de protozoários por mL.

---

<sup>13</sup> Keister, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 77:487-488, 1983.

## Anexo B1: Descrição das atividades

### B. RESULTADOS

#### B.1. Perfil fitoquímico

O perfil fitoquímico de uma droga vegetal é uma abordagem inicial que pode auxiliar nos estudos posteriores visando à identificação de compostos ativos. A tabela 07 traz os resultados dos testes para classes gerais de compostos secundários que incluem substâncias com importantes atividades farmacológicas.

**Tabela 07.** Principais compostos secundários detectados em *Z. montana*.

Metabólito secundário	Parte da planta	Detectado	Não detectado
Fenóis e taninos	Folhas		X
	Ramos		X
	Raízes		X
Flavonóides	Folhas	X	
	Ramos	X	
	Raízes		X
Catequinas	Folhas		X
	Ramos		X
	Raízes		X
Quinonas e/ou Antraderivados	Folhas		X
	Ramos		X
	Raízes	X	
Cumarinas	Folhas	X	
	Ramos	X	
	Raízes	X	
Ácidos fixos fortes	Folhas	X	
	Ramos	X	
	Raízes	X	
Alcalóides	Folhas	X	
	Ramos	X	
	Raízes	X	
Bases quaternárias	Folhas		X
	Ramos		X
	Raízes		X
Saponinas	Folhas	X	
	Ramos	X	
	Raízes	X	
Triterpenos	Folhas	X	
	Ramos	X	
	Raízes	X	
Esteróides	Folhas	X	
	Ramos	X	
	Raízes		X
Glicosídeos cianogênicos	Folhas		X
	Ramos		X
	Raízes		X



Considerando-se que *Z. montana* é uma espécie pertencente à família Bignoniaceae, seria esperada a detecção de quinonas na reação de Bornträger. No entanto, a reação para quinonas não foi característica, gerando dúvidas na interpretação da reação cromógena. O estudo fitoquímico biomonitorado permitiu o isolamento de flavonóides.

## B.2. Estudo fitoquímico monitorado por atividade antioxidante *in vitro*

De acordo com a avaliação inicial da atividade antioxidante dos extratos metanólicos de *Z. montana*, apenas o extrato de folhas inibiu a lipoperoxidação em homogenato de cérebro de ratos (Tabela 08). Desse modo, o extrato metanólico de folhas foi selecionado para o particionamento com diferentes solventes, em etapa subsequente.

**Tabela 08.** IC<sub>50</sub> dos extratos metanólicos de *Z. montana*.

Substância testada	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Extrato de folhas	11.49 ± 1.15
Extrato de ramos	ND
Extrato da porção subterrânea	ND
Quercetina	1.05 ± 0.004

ND = não determinado

Os estudos prosseguiram com a realização dos ensaios de lipoperoxidação com os extratos obtidos por particionamento líquido/líquido do extrato metanólico de folhas. Os extratos diclorometano e acetato de etila apresentaram atividade inibidora da lipoperoxidação, conforme apresentado na Tabela 09. No entanto, o extrato acetato apresentou uma IC<sub>50</sub> cerca de 6 vezes maior que o extrato diclorometano, indicando que o segundo priorizou os compostos antioxidantes.

**Tabela 09.** IC<sub>50</sub> dos extratos obtidos pelo particionamento do extrato metanólico de folhas de *Z. montana*.

Substância testada	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Extrato Hexano	ND
Extrato Diclorometano	9.03 ± 0.02
Extrato Acetato de etila	59.57 ± 0.32
Extrato Butanol	ND
Extrato Hidrometanólico	ND
Quercetina	1.65 ± 0.03

ND = não determinado

O fracionamento preliminar por CLV não permitiu um bom desempenho na separação das flavonóides. Contudo, possibilitou o encaminhamento de amostras de

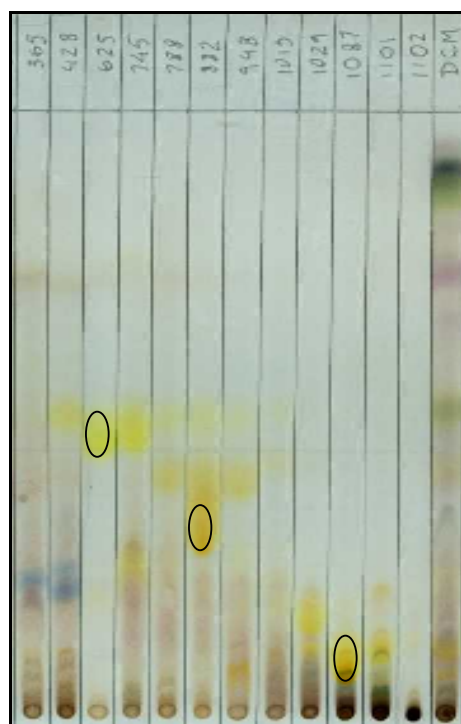
cristais de compostos majoritários para a espectrometria de RMN-<sup>1</sup>H, cuja leitura inicial forneceu sinais típicos de flavonóides. Com a finalidade de melhorar a separação dos compostos, extrato diclorometano foi preparado em maior quantidade para a realização de fracionamento por CCC. As frações resultantes, devidamente agrupadas por CCD, foram testadas no modelo de lipoperoxidação, e os resultados se encontram na Tabela 10.

A avaliação da atividade antioxidante das frações forneceu resultados coerentes com os cromatogramas obtidos por CCD (Figura 07), indicando que o fracionamento permitiu um enriquecimento satisfatório das frações com os compostos ativos. Com base em tais resultados, as frações ZM625, ZM882 e ZM1087 foram selecionadas para as etapas seguintes de isolamento dos compostos antioxidantes.

**Tabela 10.** IC<sub>50</sub> das frações obtidas do extrato diclorometano de folhas de *Z. montana*.

Fração agrupada	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
26. ZM13	ND
27. ZM16	ND
28. ZM37	ND
29. ZM50	ND
30. ZM69	ND
31. ZM79	ND
32. ZM99	ND
33. ZM123	ND
34. ZM132	ND
35. ZM183	ND
36. ZM230	ND
37. ZM241	ND
38. ZM300	ND
39. ZM365	51.03 ± 1.49
40. ZM428	23.84 ± 0.24
<b>41. ZM625</b>	<b>13.19 ± 1.20</b>
42. ZM745	26.30 ± 0.06
43. ZM788	13.93 ± 0.47
<b>44. ZM882</b>	<b>7.26 ± 0.06</b>
45. ZM948	9.28 ± 0.22
46. ZM1013	10.72 ± 0.32
47. ZM1029	6.13 ± 0.03
<b>48. ZM1087</b>	<b>2.01 ± 0.08</b>
49. ZM1101	5.22 ± 0.12
50. ZM1102	ND
<b>Referência quercetina</b>	<b>1.31 ± 0.02</b>

ND = não determinado



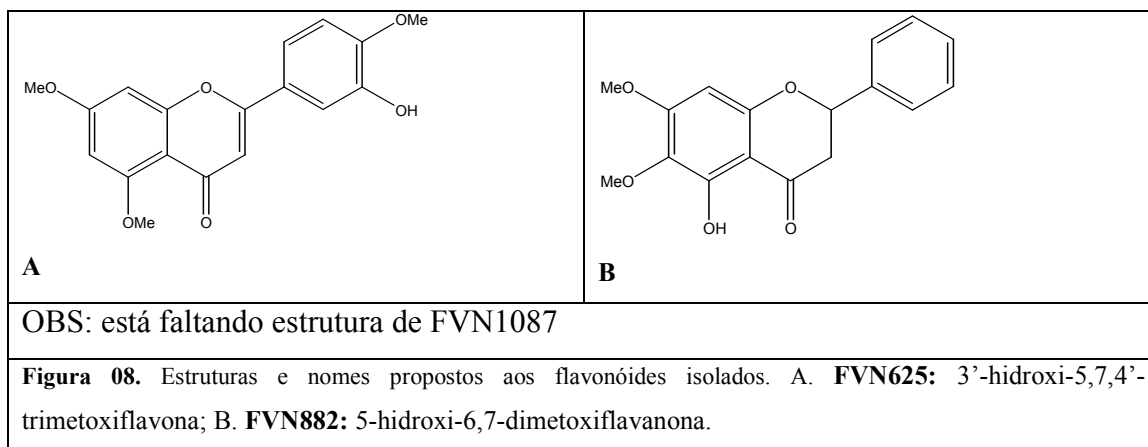
**Figura 07.** CCD comparativa das frações antioxidantes, utilizando-se a fase móvel constituída de hexano/éter/diclorometano (3:3:4) e revelador anisaldeído sulfúrico. Os contornos marcam os compostos posteriormente isolados.

A partir das frações ZM625, ZM882 e ZM1087 foram isoladas, por meio de processos sucessivos de recristalização, os compostos **1** (FVN625), **2** (FVN882) e **3** (FVN1087). Tais compostos foram testados no ensaio de lipoperoxidação e os resultados estão expressos na Tabela 11. Conforme demonstrado pela IC<sub>50</sub>, o flavonóide FVN625, após o processo de purificação por recristalização apresentou um decréscimo na atividade antioxidante. Essa redução na atividade pode estar relacionada com a remoção de outros compostos que também são antioxidantes, e que também estavam presentes nas frações adjacentes.

**Tabela 11.** IC<sub>50</sub> dos flavonóides isolados.

<b>Substância testada</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
FVN625	45.43 ± 0.46
FVN882	3.63 ± 0.04
FVN1087	1.14 ± 0.01
Quercetina	1.10 ± 0.03

Os compostos **1** (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>), **2** (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>) and **3** (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>) foram identificados como 3'-hidroxi-5,7,4'-trimetoxiflavona (**1**), 5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavanona (**2**) e FVN1087 (**3**) respectivamente, por comparação dos dados obtidos de <sup>1</sup>H NMR em relação à literatura. As estruturas dos compostos se encontram na Figura 08.



Os três flavonóides apresentaram atividade antioxidante *in vitro*. Contudo, apenas dois (FVN625 e FVN1087) foram obtidos em quantidade suficiente para a realização dos estudos *in vivo*, no modelo de inflamação intestinal induzida pelo TNBS em ratos.

### B.3. Avaliação da atividade imunomoduladora *in vitro*

Os flavonóides FVN625 e FVN1087 foram isolados em quantidade suficiente para a realização dos testes *in vivo*. Previamente à avaliação da atividade antiinflamatória intestinal em ratos, ambos compostos foram testados sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e IL-6) por macrófagos peritoneais de camundongos balb-c. Os resultados dos compostos testados em atividade imunomoduladora *in vitro* se encontram abaixo, na Tabela 12. A secreção de TNF $\alpha$  também foi avaliada. Porém, essa citocina não foi detectada no sobrenadante da secreção basal ou dos tratamentos (dados não mostrados). Estudos posteriores poderão ser realizados para avaliar a atividade antiinflamatória *in vitro*, assim como em outros modelos *in vivo* de inflamação.

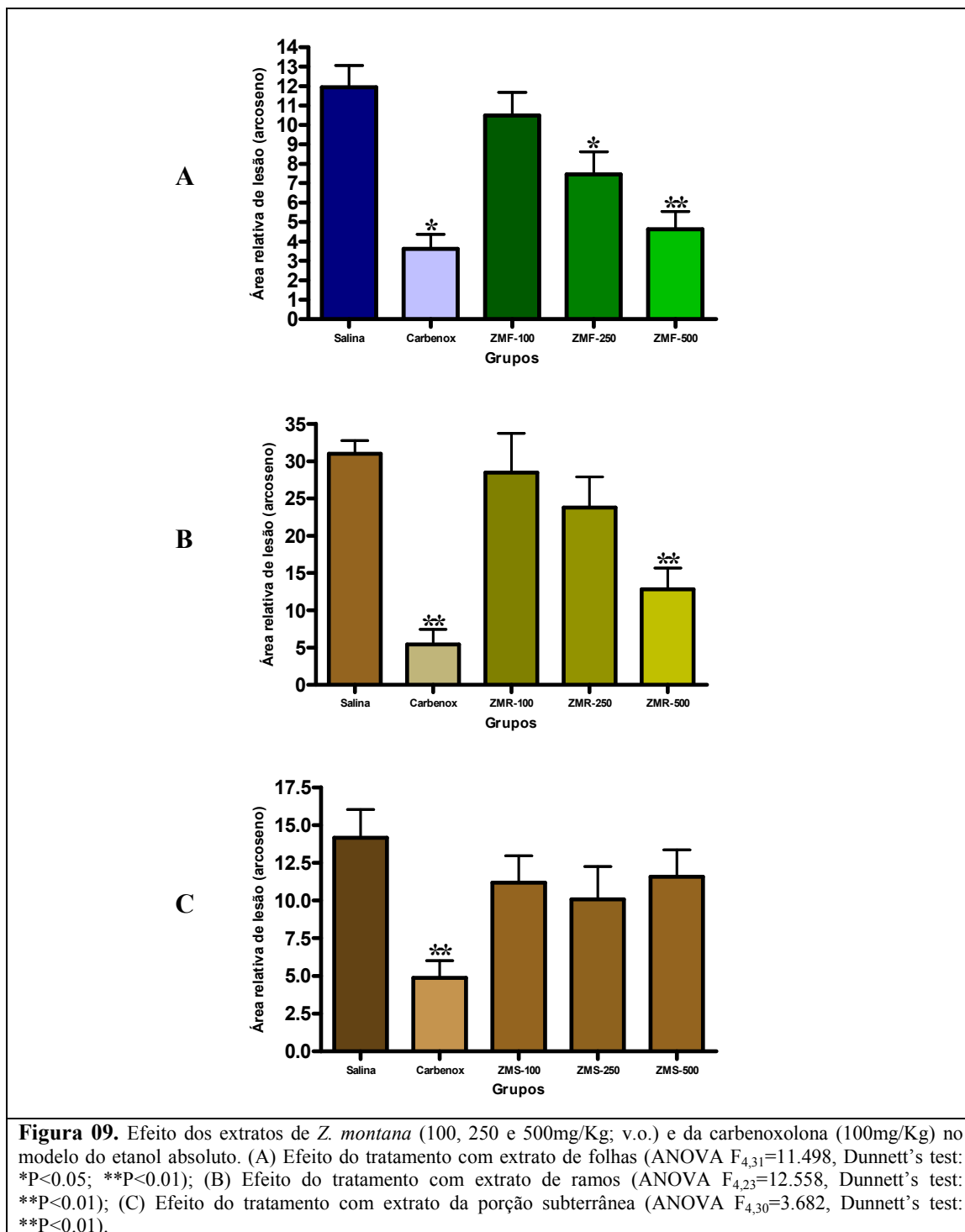
**Tabela 12.** Efeitos imunomoduladores de ZM625 e ZM1087 na secreção de citocinas pró-inflamatórias em cultivo primário de macrófagos peritoneais.

<i>Group</i>	<i>IL-1</i> (pg/ml)	<i>IL-6</i> (pg/ml)
Não-tratado (secreção basal)	25.36 ± 0.25	1123.80 ± 13.84
Controle DMSO 0.2%	21.07 ± 0.53	1210.70 ± 0.06
ZM625 – 0.242 µg/ml	11.04 ± 1.09**	671.39 ± 31.99**
ZM625 – 0.605 µg/ml	7.03 ± 0.40**	652.85 ± 13.45**
ZM625 – 1.21 µg/ml	2.14 ± 0.00**	623.75 ± 47.54**
ZM625 – 2.42 µg/ml	9.54 ± 1.27**	717.21 ± 50.90**
ZM1087 – 0.242 µg/ml	9.31 ± 0.63**	719.52 ± 16.13**
ZM1087 – 0.605 µg/ml	-----	866.57 ± 33.03**
ZM1087 – 1.21 µg/ml	6.91 ± 2.62**	623.55 ± 15.85**
ZM1087 – 2.42 µg/ml	7.06 ± 1.62**	883.20 ± 49.67**
LPS (secreção estimulada)	145.55 ± 12.66	23379.09 ± 761.81

Os dados estão expressos como média ± erro padrão. \*\*p<0.01 comparado ao grupo não-tratado (basal).

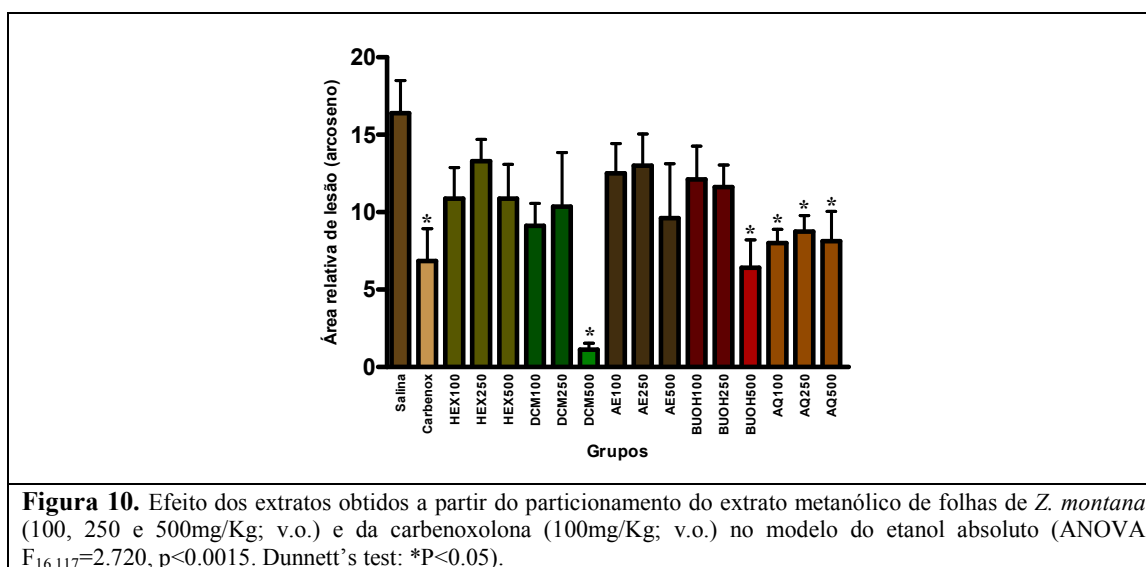
#### B.4. Avaliação da atividade antiulcerogênica

Todos os extratos iniciais preparados a partir de folhas, ramos e porção subterrânea de *Z. montana* foram testados em modelo de lesões gástricas induzidas pelo etanol absoluto. Dentre esses extratos, novamente, o de folhas apresentou melhor atividade, reduzindo a área de lesão gástrica em 37.59% e 61.22% nas doses de 100 e 250mg/Kg, respectivamente. No mesmo experimento, a carbenoxolona, na dose de 100mg/Kg, reduziu a área de lesão em 69.69%. Em seu respectivo experimento, o extrato de ramos, na dose de 500mg/Kg, reduziu a área de lesão em 58.64%, enquanto que a carbenoxolona a reduziu em 81.51%. Por sua vez, o extrato preparado com a porção subterrânea não apresentou atividade em qualquer das doses testadas (Figura 09).



Os extratos preparados por particionamento do extrato metanólico de folhas não apresentaram atividade antiulcerogênica conforme o esperado, considerando-se os ensaios de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, nos quais o extrato diclorometano apresentou os melhores resultados. Dentre os referidos extratos, testados no modelo de

lesões gástricas induzidas pelo etanol, o diclorometano e o butanol apresentaram atividade na dose de 500 mg/Kg, reduzindo a área de lesão em 93% e 60.8%, respectivamente. Por sua vez, o extrato aquoso foi ativo nas doses de 125, 250 e 500 mg/Kg, reduzindo, respectivamente, em 51.2%, 46.6% e 50.5% as lesões causadas pelo etanol absoluto (Figura 10).



### B.5. Avaliação da atividade antiinflamatória intestinal

Os flavonóides imunomoduladores *in vitro* foram testados no modelo de inflamação intestinal induzida pelo TNBS. Os resultados referentes à avaliação da atividade antiinflamatória intestinal se encontram nas tabelas que se seguem. As substâncias testadas protegeram os níveis de GSH (Tabela 2), contudo não melhoraram os dados de observação experimental, assim como a incidência de diarreia (dados não mostrados) e nem reduziram os níveis teciduais de MPO e AP dos grupos tratados (Tabela 2). Por outro lado, o tratamento com os flavonóides não piorou a inflamação nos animais, comparativamente ao grupo controle colítico.

O fracionamento monitorado por atividade antioxidante *in vitro* permitiu isolar três compostos majoritários do extrato diclorometânico (DCM) de *Z. montana*. As substâncias isoladas foram encaminhadas à espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e três compostos (FVN625, FVN882 e FVN1087) apresentaram sinais típicos de flavonóides. Contudo, ainda faltam

dados referentes ao RMN  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massa. Os estudos de elucidação estrutural ainda se encontram em andamento juntamente aos colaboradores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Os três flavonóides isolados inibiram a peroxidação lipídica induzida em homogenato de cérebros de ratos. Contudo, apenas os flavonóides designados como FVN625 e FVN1087 apresentaram rendimentos suficientes para a realização dos ensaios *in vivo* em modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) em ratos. As duas substâncias testadas apresentaram pouco efeito preventivo contra os danos teciduais causados pelo TNBS. O tratamento com os flavonóides não diminuiu o desenvolvimento das lesões nos grupos tratados, como notado pelos níveis de mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (AP) semelhantes aos do grupo controle colítico. A única exceção foi observada nos níveis teciduais de glutathiona (GSH), mantidos em quantidades semelhantes aos do grupo não-colítico.

**Table 13.** Efeitos de FVN625, FVN1087 e sulfasalazina nos níveis de GSH e nas atividades da MPO e AP na colite aguda induzida por TNBS.

<i>Group</i>	<i>GSH total (nmol/g tissue)</i>	<i>Atividade da MPO (U/g tissue)</i>	<i>Atividade da AP (mU/mg protein)</i>
Não-colítico	1123.4 ± 41.71**	79.82 ± 3.55**	4.43 ± 0.27**
Controle colítico	722.80 ± 65.26 <sup>++</sup>	1646.00 ± 145.73 <sup>++</sup>	10.11 ± 0.80 <sup>++</sup>
FVN625 - 5 mg/Kg	777.34 ± 84.21	1218.50 ± 245.28 <sup>++</sup>	9.92 ± 0.90 <sup>++</sup>
FVN625 - 10 mg/Kg	1041.80 ± 110.21*	1776.10 ± 179.30 <sup>++</sup>	11.85 ± 1.60 <sup>++</sup>
FVN625 - 25 mg/Kg	1149.80 ± 100.91**	1872.60 ± 373.48 <sup>++</sup>	12.35 ± 1.49 <sup>++</sup>
FVN1087 - 5 mg/Kg	848.28 ± 48.45	1228.90 ± 254.07 <sup>++</sup>	12.41 ± 1.11 <sup>++</sup>
FVN1087 - 10 mg/Kg	1061.30 ± 43.92**	1008.90 ± 216.17 <sup>++</sup>	12.94 ± 0.92 <sup>++</sup>
FVN1087 - 25 mg/Kg	1007.70 ± 99.47*	1623.10 ± 160.45 <sup>++</sup>	13.14 ± 1.79 <sup>++</sup>
Sulfasalazina - 100 mg/Kg	1079.90 ± 61.04**	1540.40 ± 219.77 <sup>++</sup>	8.93 ± 0.89 <sup>++</sup>

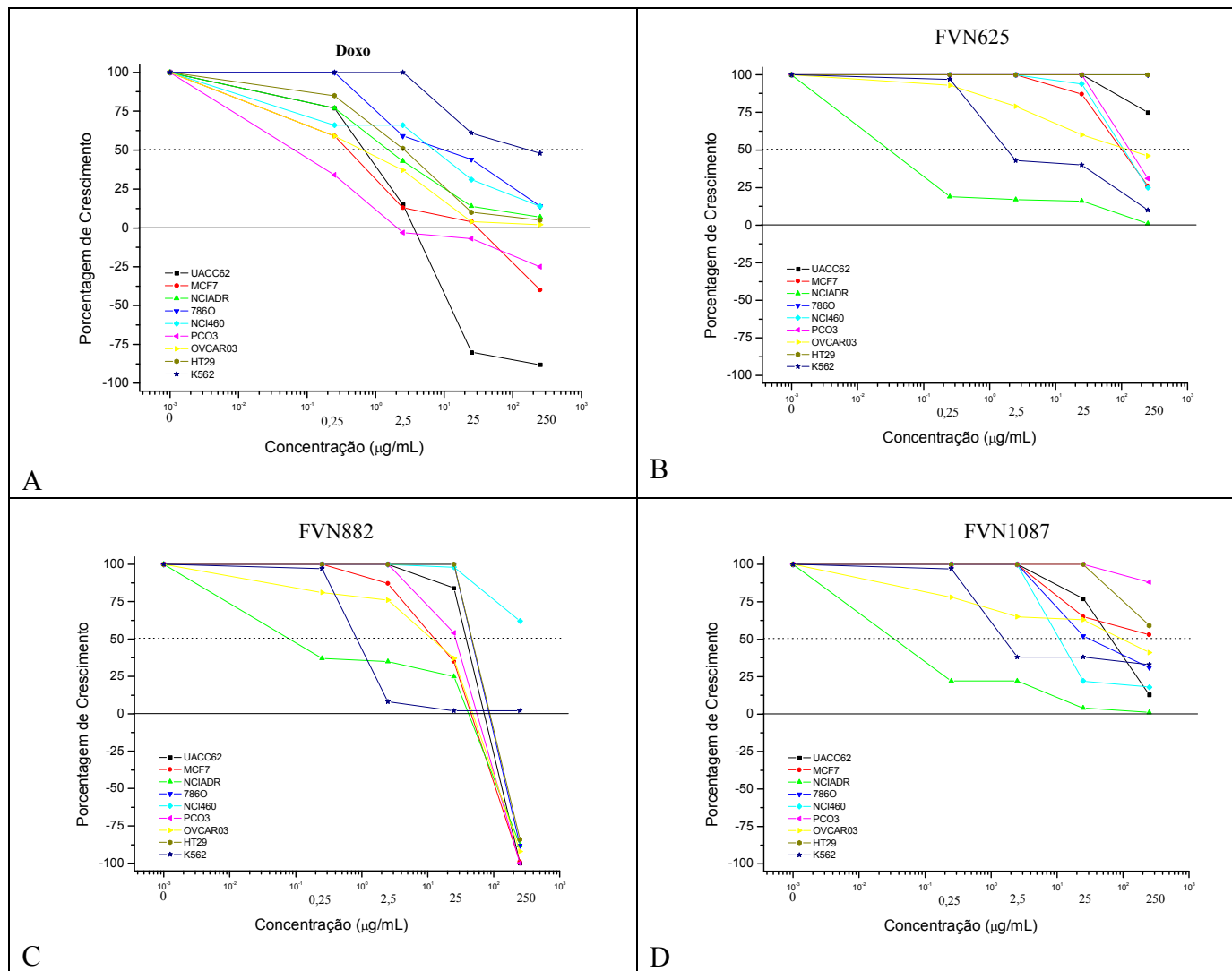
Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. \*p<0.05, \*\*p<0.01 comparado ao grupo colítico, <sup>+</sup>p<0.05, <sup>++</sup>p<0.01 comparado ao grupo não-colítico.

## B.6. Avaliação da atividade antiproliferativa

Todos os flavonóides testados apresentaram atividade antiproliferativa contra as diferentes linhagens de células tumorais humanas. Na Figura 11 podemos observar a seletividade dos compostos por determinadas linhagens celulares, representada pelo aspecto em “leque” das curvas de inibição. Dentre os três flavonóides, FVN882 apresentou o melhor efeito sobre a proliferação das células, tanto em termos de seletividade, nas concentrações menores, quanto em termos de atividade citocida na maior concentração testada (250 µg/mL). As tabelas 14 e 15 expressam os valores da concentração para



inibição do crescimento celular em 50% ( $GI_{50}$ ) e da concentração necessário para 0% de crescimento celular (TGI).



**Figura 11.** Perfil do crescimento de células tumorais humanas, 48 horas após o tratamento com 0.25, 2.5, 25 ou 250  $\mu\text{g/mL}$  dos flavonóides FVN625 (B), FVN882 (C) ou FVN1087 (D). O controle positivo foi a doxorubicina (A). Valores positivos acima do eixo y correspondem à atividade citostática; acima do eixo y, atividade citocida (citotóxica) dos compostos testados. Os dados foram obtidos de experimento representativo conduzido em triplicata.

<b>Tabela 14.</b> GI <sub>50</sub> : <i>Growth Inhibition 50</i> – concentração para inibição do crescimento celular em 50%									
GI <sub>50</sub> (µg/mL)									
	U	M	A	7	4	P	O	H	K
Doxorubicina	0,05	0,03	0,16	1,09	0,47	0,02	0,06	0,24	14,95
FVN882	29,42	23,03	0,19	79,11	>250	25,42	22,13	50,69	0,96
FVN625	>250	110,60	0,05	>250	129,62	226,70	120,19	>250	5,05
FVN1087	61,23	>250	0,06	50,03	14,71	>250	75,80	>250	7,29

U = UACC-62, M = MCF-7, A = NCI-ADR/RES, 7 = 786-0, 4 = NCI-H460, P = PC-3, O = OVCAR-3, H = HT-29, K = K562.

<b>Tabela 15.</b> TGI: <i>Total Growth Inhibition</i> – concentração necessário para 0% de crescimento celular									
TGI (µg/mL)									
	U	M	A	7	4	P	O	H	K
Doxorubicina	0,31	1,70	>25	>25	>25	1,07	>25	>25	>25
FVN882	31,57	35,76	12,67	185,90	>250	28,09	40,77	191,31	>250
FVN625	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
FVN1087	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

U = UACC-62, M = MCF-7, A = NCI-ADR/RES, 7 = 786-0, 4 = NCI-H460, P = PC-3, O = OVCAR-3, H = HT-29, K = K562.

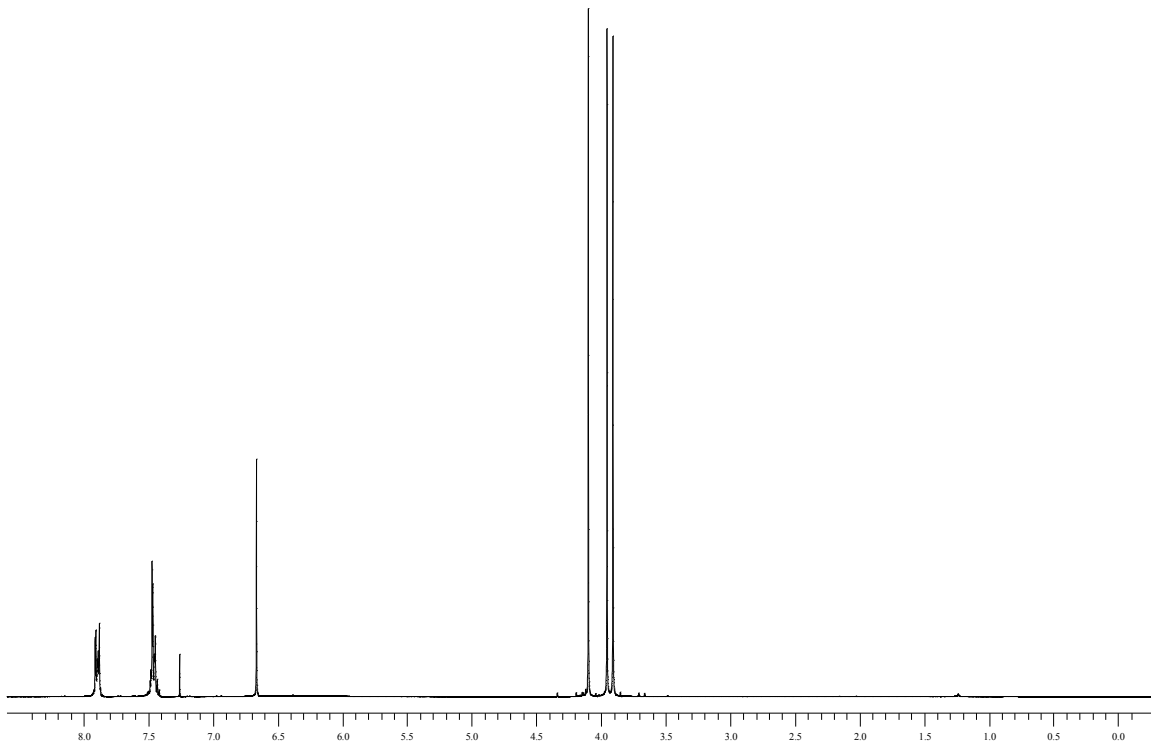
### **B.7. Nota sobre os ensaios pilotos para avaliação da atividade contra *Giardia duodenalis* e *Trypanosoma cruzi*.**

Os resultados preliminares dos ensaios pilotos sobre a proliferação de protozoários não demonstraram atividade sobre *Giardia duodenalis* e *Trypanosoma cruzi* (dados não mostrados).

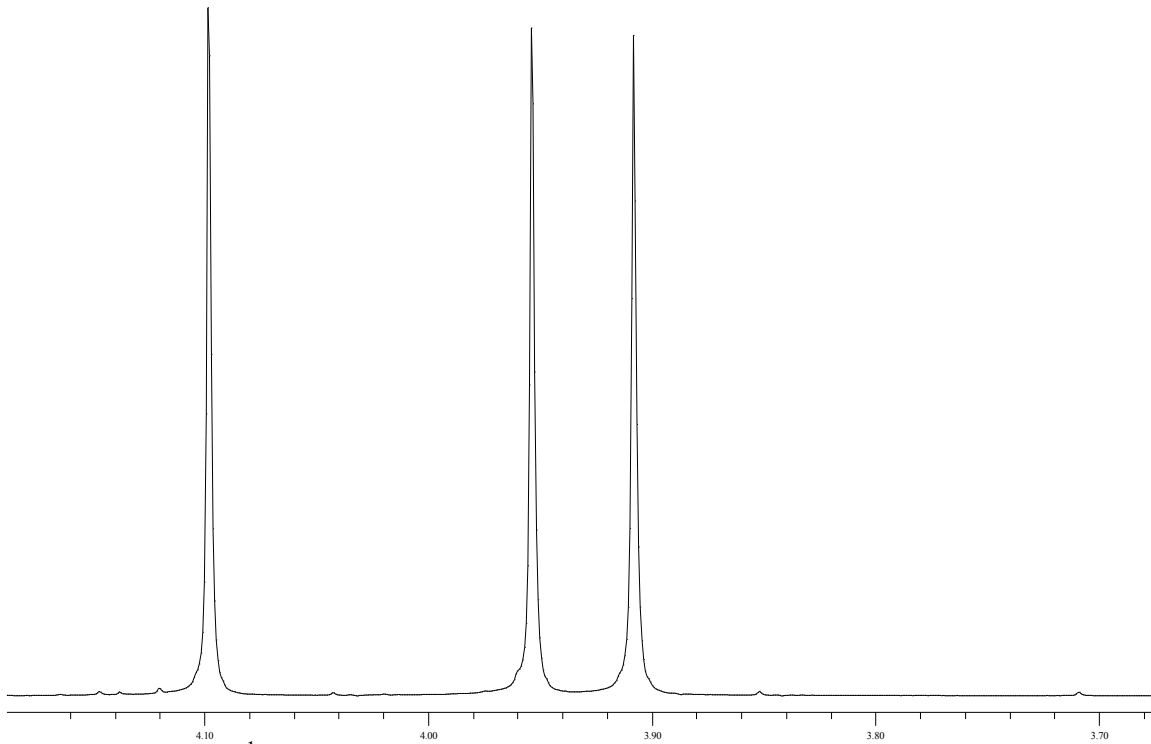
## **Anexo B2: Descrição das atividades**

Tabela RMN <sup>1</sup>H e espectros

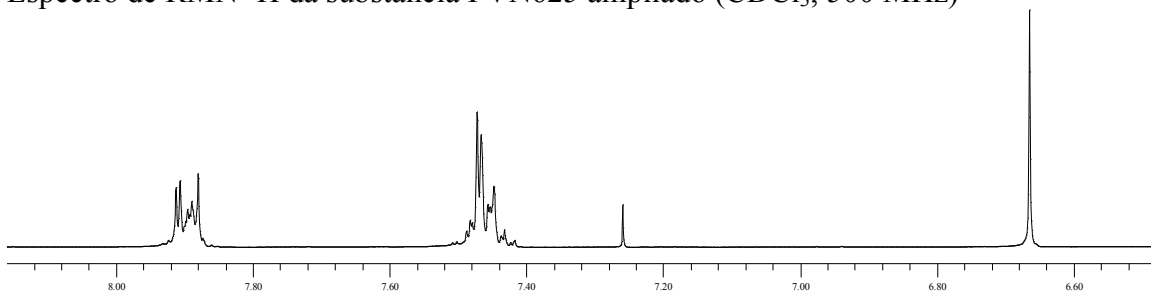
<b>Hidrogênio</b>	<b>FVN625</b>	<b>FVN882</b>	<b>FVN1087</b>
<b>H-2</b>	-	5,40	
<b>H-3 <i>ax</i></b>	6,66	3,03	
<b>H-3 <i>eq</i></b>	-	2,78	
<b>H-6</b>	7,88-7,91	-	
<b>H-8</b>	7,88-7,91	6,15	
<b>H-2'</b>	7,42-7,48	7,34-7,45	
<b>H-3'</b>	7,42-7,48	7,34-7,45	
<b>H-4'</b>	-	7,34-7,45	
<b>H-5'</b>	-	7,34-7,45	
<b>H-6'</b>	7,42-7,48	7,34-7,45	
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3,90	3,88 (s)	
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3,95	3,94 (s)	
<b>OCH<sub>3</sub></b>	4,09	-	
<b>OH-5</b>	-	11,60	



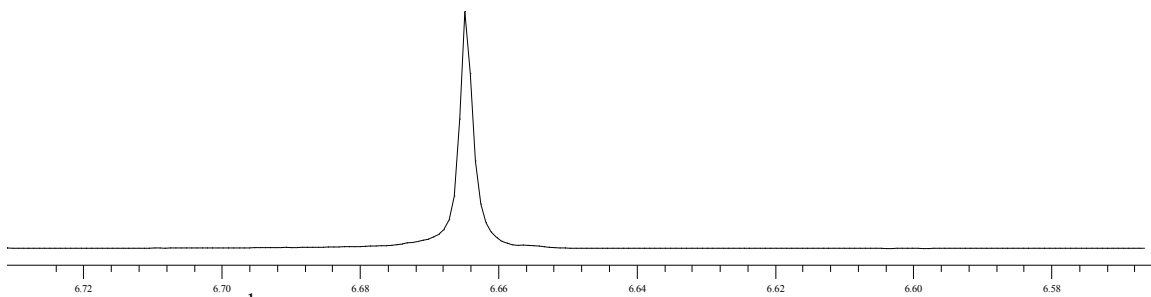
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância FVN625 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



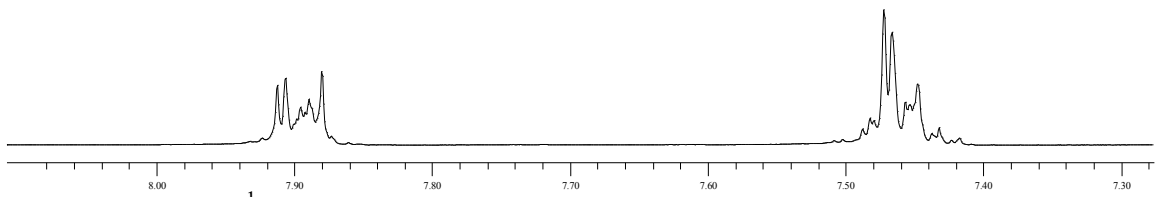
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância FVN625 ampliado ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



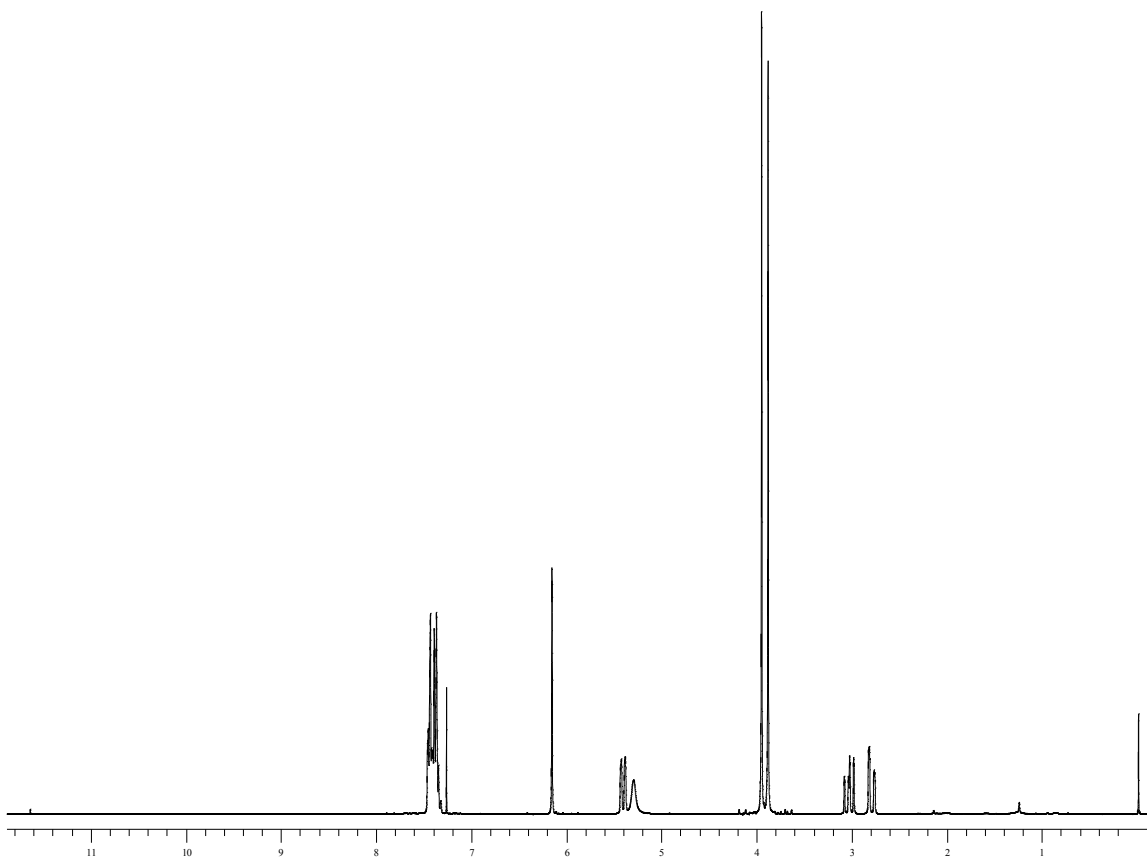
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância FVN625 ampliado ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



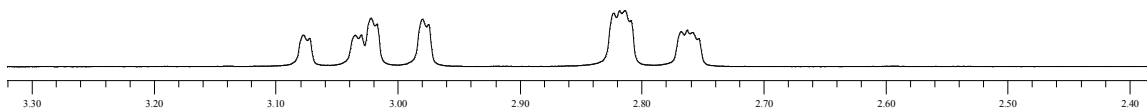
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância zm625 ampliado ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



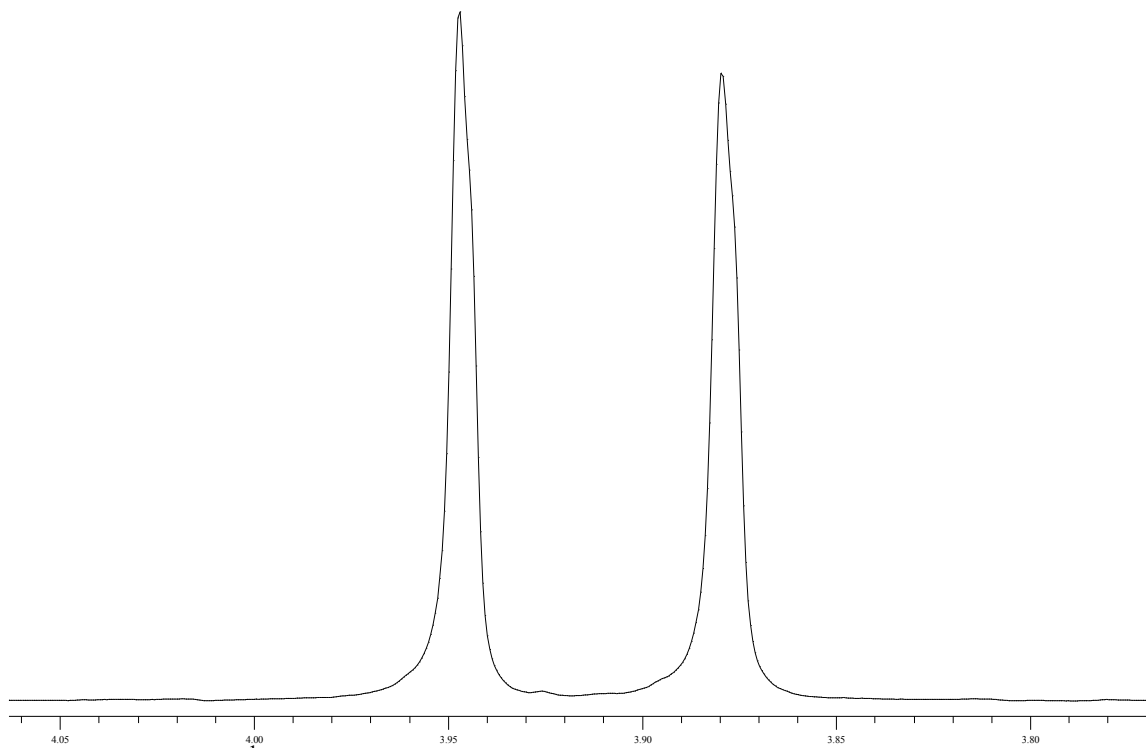
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância FVN625 ampliado ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



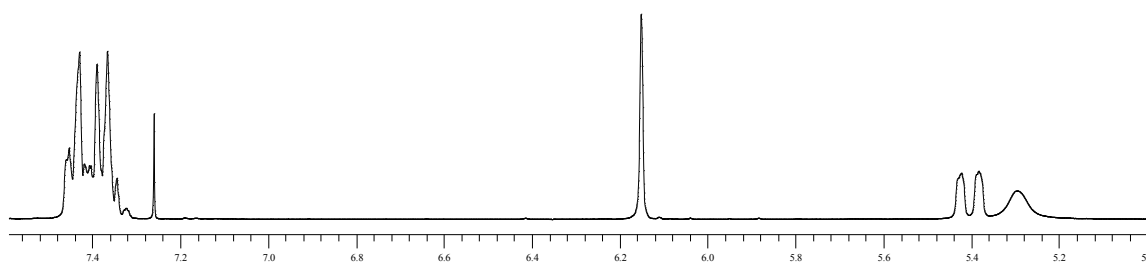
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância FVN882 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância FVN882 ampliado ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



Espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância FVN882 ampliado (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



Espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância FVN882 ampliado (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



## Conclusões

O estudo fitoquímico monitorado por atividade biológica foi uma abordagem segura para o isolamento de compostos ativos. Para tanto, a seleção de técnicas acessíveis, rápidas e relacionadas à atividade almejada é etapa de grande importância.

A abordagem fitoquímica biomonitorada permitiu o isolamento de flavonóides antioxidantes com atividade imunomoduladora sobre cultura de macrófagos peritoneais de camundongos. Contudo, a atividade imunomoduladora *in vitro* não implicou em redução do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos, mesmo havendo proteção dos níveis teciduais de glutathione. Isso pode estar relacionado ao fato dos flavonóides não estarem conjugados a açúcares - característica que pode retardar a absorção e proporcionar uma maior concentração no local da inflamação intestinal;

A atividade antiulcerogênica observada na triagem inicial não correspondeu especificamente ao extrato que priorizou os compostos antioxidantes, uma vez que o extrato aquoso, que não inibe lipoperoxidação, apresentou atividade em grau semelhante à carbenoxolona (100 mg/Kg) em todas as doses testadas. A dose de 500 mg/Kg do extrato diclorometano apresentou maior porcentagem de proteção, o que pode ser atribuído à presença de flavonóides antioxidantes. No entanto, a avaliação em outros modelos de úlceras gástricas poderá oferecer uma melhor compreensão dos mecanismos de ação;

Os flavonóides **1**, **2** e **3**, apresentam atividade antiproliferativa contra diferentes linhagens de células tumorais, havendo uma possível seletividade, considerando-se a GI<sub>50</sub>. Fazendo-se uma observação geral sobre a relação estrutura-atividade dos compostos isolados, há indícios de que a estrutura dos flavonóides esteja relacionada tanto à atividade inibidora de crescimento quanto à morte de células tumorais. Além disso, considerando-se os valores de TGI, o composto 2 apresentou seletividade para as linhagens NCI-ADR/RES (câncer de mama multi-resistente) e PC-3 (câncer de próstata), sugerindo uma ação semelhante à dos fito-estrógenos.