

ANÁLISE CITOTÓXICA E FITOQUÍMICA DE *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith

Silvia Catarina Salgado Oloris¹; Mirna Samara Dié Alves²; Maria Jocileide de Medeiros Marinho³; Mário Luan Silva de Medeiros^{4*}

¹Doutora, Serviço de Virologia e Riquetsioses, Instituto Otávio Magalhães, Fundação Ezequiel Dias, R. Conde Pereira Carneio, 80, Gameleira, Belo Horizonte, CEP 30510-010, Minas Gerais, Brasil.

²Mestrando, Faculdade Ciências da Saúde. Laboratório de Biologia Celular e Molecular. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, R. Miguel Antonio da Silva Neto s.n, Aeroporto, Rio Grande do Norte, Mossoró CEP 59607-360, Brasil. *marioluan@oi.com.br

³Graduanda, Laboratório de Imunologia e Parasitologia Molecular. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, R. Francisco Mota 572, Costa e Silva, Rio Grande do Norte, Mossoró, CEP 59625-900, Brasil.

⁴Mestre, Faculdade Ciências da Saúde. Laboratório de Biologia Celular e Molecular. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, R. Miguel Antonio da Silva Neto s.n, Aeroporto, Rio Grande do Norte, Mossoró CEP 59607-360, Brasil. *marioluan@oi.com.br

RESUMO

O estudo tem como objetivo analisar em modelo experimental *in vitro* o efeito citotóxico do extrato etanólico de folhas da espécie *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith sobre a linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3), como também qualificar a presença de metabólitos secundários com o estudo fitoquímico do mesmo extrato. As folhas da planta foram coletadas na Floresta nacional de Açu/RN, Brasil, sendo então secas, trituradas e submersas em etanol absoluto por 48h e a solução evaporada em evaporador rotativo a 55° C. A análise fitoquímica do extrato foi realizada. Já a viabilidade celular realizada pelo teste de exclusão do corante azul de tripan e o efeito citotóxico pelo bioensaio de MTT, nas concentrações 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 100 µg/mL. A análise estatística realizada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida de pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Foi encontrado na análise fitoquímica a presença dos metabólitos: taninos e flavonoides. Já as concentrações 500 µg/mL e 100 µg/mL apresentaram maior efeito citostático e citotóxico sob as células de câncer de próstata, comparado com o controle positivo contendo 5 µg/mL de doxorubicina. O extrato etanólico das folhas da espécie *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith nas concentrações de 500 µg/mL e 100 µg/mL, apresentou ação antiproliferativa e citotóxica sob as células da linhagem PC-3 nas condições experimentais testadas. Como também a presença de taninos e flavonoides.

Descritores: Bignoniaceae, Próstata, Efeito Citotóxico.

ANALYSIS CYTOTOXIC AND PHYTOCHEMICAL OF *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith

ABSTRACT

The study aims to analyze the cytotoxic effect of ethanol extract of leaves of *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith in an experimental model *in vitro* using the cell line of human prostate adenocarcinoma (PC-3), as well as qualify the presence of secondary metabolites through the phytochemical study of the same extract. The plant's leaves were collected in the National Forest of Açu/RN, Brazil, and then dried, crushed and immersed in absolute ethanol for 48h, the solution was then evaporated in a rotary evaporator at 55 °C. Phytochemical analysis of the extract was performed. Cell viability was tested through trypan blue exclusion test and the cytotoxic bioassay was done by MTT assay using 1000 µg/mL, 500 µg/mL and 100 µg/mL of the extract. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA), two-way, followed by Tukey's post-test of multiple comparison. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant. Phytochemical analysis revealed the presence of the following metabolites: condensed tannins and flavonoids. Extract concentrations, 500 µg/mL and 100 µg/mL showed higher cytostatic and cytotoxic effect on the prostate cancer cells, compared with the positive control, containing 5 µg/mL of doxorubicin. The ethanol extract of the leaves of *Arrabidaea pulchra* (Cham.)

Sandwith species at the concentrations of 500 µg/mL and 100 µg/mL, showed an anti-proliferative and cytotoxic effect on the PC-3 cell line in the experimental conditions tested. As well as the presence of tannins and flavonoids.

Key-words: Bignoniaceae, Prostate, Cytotoxic Effect.

INTRODUÇÃO

Os vegetais são uma das fontes mais promissoras de estudos de compostos químicos com efeito antitumoral. Os estudos a respeito de novas drogas provenientes desses organismos representa uma alternativa promissora na bioprospecção de novos agentes anticâncer, e/ou podendo haver o melhoramento na eficácia do medicamento diminuindo por muitas vezes muitos efeitos adversos (1,2).

Com isso, podemos destacar a espécie vegetal *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith, da família Bignoniaceae, a qual é uma liana que apresenta cálice membranáceo com tricomas multicelulares com ápice glandular avermelhado, distribuídos por toda a inflorescência, conferindo à essa espécie uma cor acastanhada (3). No Brasil, plantas pertencentes a essa família são encontradas da Amazônia até o Rio Grande do Sul, não possuindo um habitat único.

Em relação aos estudos químicos realizados com a espécie *A. pulchra*, foi isolado o ácido ursólico, a partir de suas folhas e caule, tendo este apresentado atividade tripanossomicida (4), foi evidenciado ainda um efeito antiviral contra o vírus da dengue (5), como também foi analisado o efeito tóxico de extrato hidroalcoólico formulado a partir de folhas, demonstrando ausência de toxicidade em modelo experimental *in vivo* (6).

Havendo assim poucos relatos experimentais de efeitos biológicos relacionados ao gênero *Arrabidaea*, sendo a espécie mais analisada a *Arrabidaea chica*. Dela já foram isolados compostos como: flavonoides, antocianinas, taninos, fitosteróis e pigmentos utilizados em cosméticos, tais como carajurona, carajurina e 3-deoxiantocianidina, e já foram demonstradas atividades tripanossomicidas, antifúngicas e antitumorais *in vivo* para tumor sólido de Ehrlich (2,7,8). Diante do exposto, o estudo objetivou analisar em modelo experimental *in vitro* o efeito citotóxico do extrato etanólico de folhas da espécie *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith sobre a linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3), como também qualificar, com o estudo fitoquímico, a presença de alguns metabólitos secundários de importância biológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

As folhas de *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith foram coletadas na Floresta Nacional de Açu do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Estado

do Rio Grande do Norte, Brasil) sob consentimento do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO processo 29755), sendo a espécie identificada pelo referido instituto.

Preparação do extrato

As folhas foram secas à temperatura ambiente (24-35° C) em local sombreado por 15 dias, sendo então trituradas obtendo-se o peso seco de 308 g, posteriormente fixado em etanol absoluto por 48 horas sendo a solução filtrada em papel de filtro, repetindo-se o processo por 4 vezes. Em seguida, toda a solução foi evaporada em evaporador rotatório a vácuo (QUIMIS™) a uma temperatura de 55° C, obtendo-se o extrato etanólico (EE), o qual foi liofilizado (Liofilizador LS 42 300 – Terroni™) e armazenado em freezer a -20° C.

Análise fitoquímica

Os testes químicos para a detecção dos diversos metabólitos secundários como: os taninos, os flavonoides, as saponinas, os fenóis, as antocianinas, as antocianidinas, as leucoantocianinas, as catequinas e as flavonas, foram realizados de acordo com Matos(9).

Manutenção da linhagem PC-3

A linhagem de câncer de próstata PC-3 foi doada pelo Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. As células foram mantidas em incubadora (Revco™) a 37°C, 5% de CO₂, em atmosfera umidificada, em garrafas de cultura de 25 cm² (TPP®) com meio RPMI 1640 (Gibco®) completo suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS, Gibco®) e 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen®).

Ensaio da Viabilidade Celular

A viabilidade celular determinou-se pelo teste de exclusão do corante vital azul de tripan em células PC-3 (câncer de próstata) durante um período de incubação de 24 horas. As células foram distribuídas em placa de 96 poços de cultura estéreis de poliestireno contendo (1 x 10⁴ células/mL) e as concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 100 µg/mL do EE. Após o período de incubação as células foram contadas em câmara de Neubauer, sendo o teste realizado em duplicata. Considerou-se como controle poços contendo somente as células e o meio de cultura RPMI-1640.

Bioensaio de citotoxicidade pelo método MTT

A citotoxicidade das concentrações do extrato etanólico foi verificada em

linhagem celular PC-3 (câncer de próstata) usando do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-íol)-2, difeniltetrazólio, Anresco®), ensaio descrito por Mosmann⁽¹⁰⁾, por 24 horas de incubação a 37°C, 5% de CO₂, em atmosfera umidificada. Para tanto, 5 x 10⁴ células/placa foram cultivadas em placas de cultura estéreis de poliestireno (35 x 10 mm) contendo meio de cultura RPMI-1640 e as concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 100 µg/mL do (EE). Ao término do período de incubação o meio foi retirado e acrescentado a solução de MTT, sendo as células incubadas por mais 3 horas. Em seguida, a solução total foi removida e um volume de 1 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) acrescentado. A leitura da absorbância realizou-se no espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu™) a 570nm. A doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo e meio contendo somente a concentração de células como controle negativo.

Análise Estatística

As comparações entre os tratamentos foram avaliadas usando análise de variância (ANOVA) de duas vias nos ensaios com as células PC-3, seguida de pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Valores de p ≤ 0.05 foram considerados significantes. Para as análises e elaboração dos gráficos, utilizou-se como ferramenta o software GraphPadPrism® versão 6 para Windows (San Diego, Califórnia, USA). Os dados sendo apresentados na forma de média ± erro padrão.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Análise Fitoquímica

A prospecção fitoquímica dos produtos naturais de origem vegetal tem como objetivo verificar, de forma qualitativa, a presença dos metabólitos secundários na composição química do extrato elaborado (9).

A análise fitoquímica do extrato etanólico de *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith, mostrou a presença de taninos condensados e flavonoides do tipo flavonas (Tabela 1).

TABELA 1- Análise Fitoquímica de extrato etanólico de *A. pulchra*.

Constituintes	Presente/ Ausente
Fenóis e Taninos	Presença de Taninos
Antocianinas e Antocianidinas	Ausente
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	Presença somente de Flavonas
Chaconas e Auronas	Ausente
Flavonóis	Presente
Leucoantocianidinas	Ausente
Catequinas	Ausente
Flavononas	Presente

Análise fitoquímica do extrato etanólico de *Arrabidaea pulchra*, mostrando a presença para as condições experimentais testadas, a presença de taninos e flavonoides. Na mistura com vários constituintes reativos, a presença de um pode mascarar a indicação da presença de outro.

Doenças como o câncer, esclerose múltipla, arteriosclerose estão relacionadas à presença excessiva de radicais livres. Nesse contexto, vários taninos possuem a ação de capturar radicais livres e transforma-los em radicais estáveis, promovendo assim um efeito quimiopreventivo no processo de carcinogênese, sendo esse efeito contrariado por alguns grupos de pesquisa(11).

Dos constituintes presentes no extrato analisado, os flavonoides apresentam atividade antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, citostática, antiangiogênica, dentre outras de acordo com diversos estudos(12–15).

Os flavonoides, em dieta humana, reduzem os riscos de diversos cancers, principalmente os que sofrem interferência hormonal, como o câncer de mama e o câncer de próstata, tendo sua estrutura química como uma fonte inspiradora para novos quimioterápicos(13).

O estudo da composição química dos vegetais é por muitas vezes interferida pela grande multiplicidade dos constituintes de ordem química, sendo a sua análise fitoquímica dificultada. A presença de componentes com propriedades físicas muito próximas, ou a quantidade de determinados compostos químicos, podem encobrir a efetivação da análise química (9).

Viabilidade Celular

O corante azul de tripan permite distinguir as células viáveis das não viáveis,

pela incorporação, via membrana plasmática, do corante de cor azul(16).

Nesse sentido, a viabilidade celular analisada pelo teste de exclusão do corante azul de tripan mostrou, para as concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 100 µg/mL do extrato etanólico de *Arrabidaea pulchra*, que houve uma redução significativa no número de células após 24 horas de incubação. Sendo a concentração 100 µg/mL a que apresentou o maior efeito sob a proliferação das células de câncer de próstata, comparando com as células não tratadas, sendo assim considerada uma concentração que acarreta um efeito citostático e/ou citotóxico sob as células de câncer de próstata *in vitro* (Figura 1).

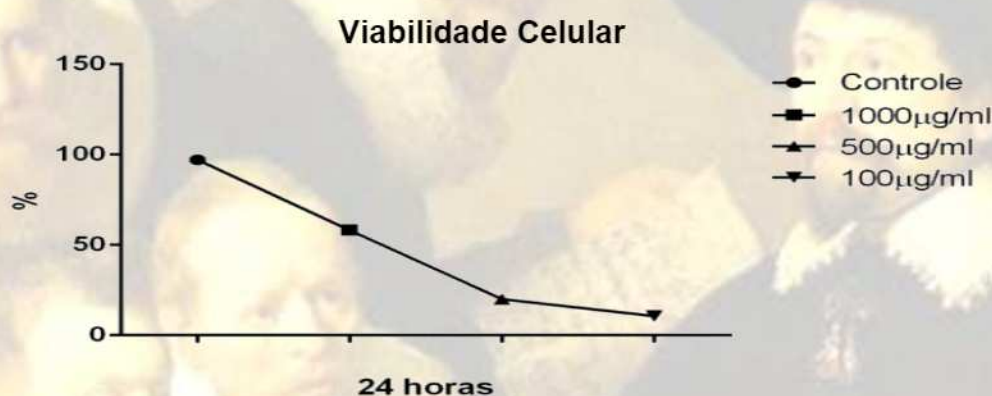


FIGURA 1- Viabilidade celular pelo método de exclusão pelo corante azul de tripan em linhagem PC-3 do EE de *A. pulchra* incubados por 24 horas. $p < 0.05$.

A mesma figura (Figura 1) mostra que houve uma diminuição na proliferação celular superior a 64%, tendo como parâmetro o controle contendo somente as células, quando se utilizou da concentração de 1000 µg/mL do extrato etanólico e abaixo de 15% para a concentração de 500 µg/mL, mostrando que a concentração de 500 µg/mL acarretou um efeito na inibição da proliferação celular capaz de provocar paralização muito maior que 50% do crescimento celular.

Tendo como o tempo de dobramento, para a linhagem PC-3 (câncer de próstata) nas condições de manutenção estabelecidas pelo nosso grupo de pesquisa, de aproximadamente 14 horas (Figura 2) e de declínio celular entre 36 e 48 horas, a escolha de 24 horas de incubação das células para o teste de viabilidade celular corrobora com o tempo estimado para a verificação do efeito inibitório da proliferação celular, já que estas células normalmente têm um tempo de dobramento de 10 a 14 horas (17).

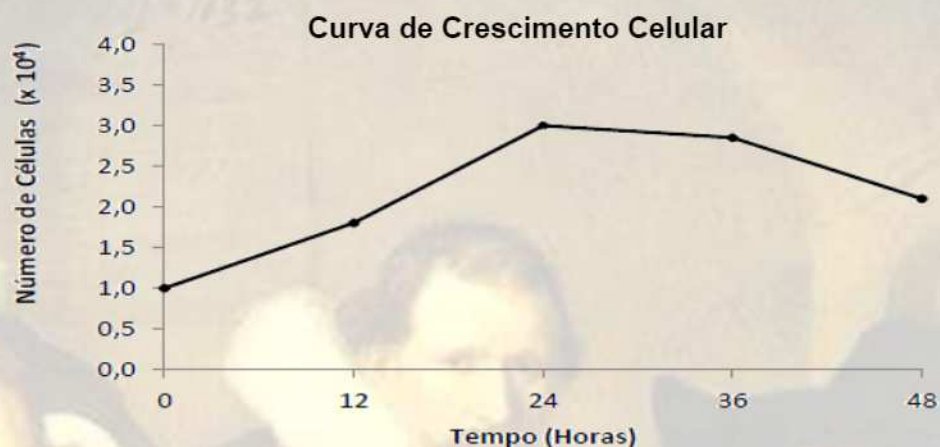


FIGURA 2: Curva de crescimento das células PC-3 estabelecida e padronizada no Laboratório de Cultura Celular da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Assim sendo, é importante estabelecer uma fase inicial G_0 igual para toda a concentração celular utilizada no teste, a fim de padronizar a fase em que as células se encontram quanto ao efeito das concentrações testadas, permitindo assim o início dos estudos do mecanismo de ação da substância analisada.

Bioensaio de MTT

A determinação do efeito citotóxico de compostos naturais em modelos experimentais *in vitro* vem trazendo grandes contribuições para a descoberta de novos agentes anticâncer(18). O interesse na utilização desses modelos experimentais é intensificado pelo curto tempo para obtenção dos resultados e reprodutibilidade, como também pela grande economia e fornecimento de informações diversas sobre mecanismos moleculares(19,20).

O bioensaio utilizado para verificar o efeito citotóxico dos compostos testados baseia-se no uso do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-íol)-2,difeniltetrazólio) que forma-se em sal de formazan de cor púrpura na presença da enzima mitocondrial succinato desidrogenase marcando, desse modo, as células que apresentam atividade metabólica (21).

Para as concentrações testadas do extrato etanólico de *Arrabidaea pulchra*, o bioensaio revelou que essa espécie apresenta compostos com efeito citotóxico sob células da linhagem PC-3 (câncer de próstata) *in vitro*, após 24 horas de incubação. A figura 3 mostra que as concentrações 500 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ possui efeito antiproliferativo acima de 50% do efeito citotóxico da concentração de doxorrubicina (5 $\mu\text{g/mL}$) utilizada como controle positivo, tendo efeito citotóxico superior ao da droga

padrão.

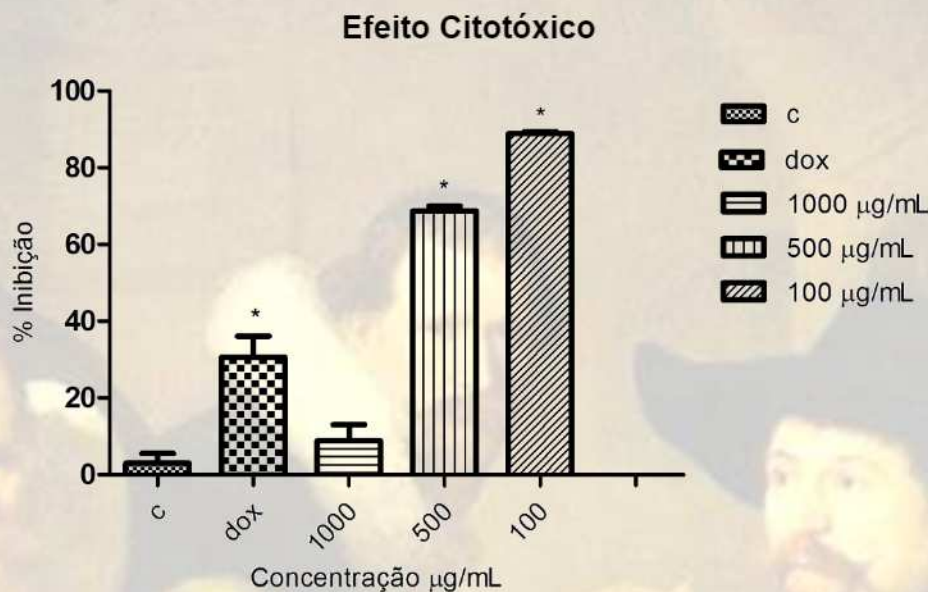


FIGURA 3: Efeito citotóxico do EE de *A. pulchra* sobre células da linhagem PC-3 por um período de 24 horas de incubação. * $p < 0.05$.

Muito se discute sobre a importância da utilização de plantas medicinais na utilização de novos agentes terapêuticos, havendo assim uma grande ocorrência de agentes quimioterápicos agindo contra o câncer, provenientes de produtos naturais (22,23). Esses novos compostos anticâncer devem desencadear diferentes mecanismos de ação no organismo a fim de serem capazes de atuar especificamente, na inibição da polimerização da tubulina (atuando no DNA), bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares, entre outros (1).

Nesse estudo, os compostos do extrato podem ter interferido na formação da integridade da membrana plasmática da célula impedindo a sua sobrevivência, ocorrendo uma associação à membrana pela polaridade apresentada pela composição total do extrato. Já a interação das concentrações do extrato com os diversos receptores na célula podem ter interferido diretamente na farmacodinâmica, já que ela depende tanto da concentração da substância administrada quanto da disponibilidade de receptores específicos para a mesma (24). Explicando assim o maior efeito citotóxico ter sido provocado pela menor concentração.

Durante o processo de otimização dos estudos de compostos bioativos, a potência da sua atividade é o principal parâmetro a ser observado. Porém, para evitar o insucesso de uma nova entidade química a farmacocinética deve ser considerada. Diante disso, a ADME (absorção, distribuição, metabolismo, excreção) deve ser analisada. Todavia, o estudo da mesma ocorre, na sua maioria, em experimentos *in*

vivo, ou seja, ainda na fase pré-clínica(20).

Diante do exposto, a forma de tratar o câncer baseia-se de modo geral na administração de agentes químicos (quimioterápicos), da ressecção cirúrgica ou da radioterapia, podendo haver muitas vezes uma associação entre essas formas de terapia (25). Contudo, o uso dessas terapias causa muita injúria, tendo como consequência a ineficácia do tratamento devido à grande replicação das células anormais(26). Desse modo, o efeito das drogas anticâncer é uma temática bastante discutida no âmbito científico tendo como repercussão o desenvolvimento de novas alternativas para o seu tratamento(2).

O estudo da viabilidade celular pelo teste do corante azul de tripan como também a citotoxicidade celular pelo bioensaio de MTT mostram informações sobre o metabolismo celular e a viabilidade celular, podendo ser aliado a outros meios para elucidar os mecanismos de ação das substâncias presentes na fração etanólica do extrato das folhas da espécie *Arrabidaea pulchra* sobre as células de câncer de próstata, como também sobre outras linhagens.

A transformação de uma célula normal para uma célula cancerígena envolve vários mecanismos, porém as fases do ciclo celular é um dos mais importantes e a sua compreensão é de extrema relevância para elucidar a etiologia do câncer e a forma de ação dos compostos antineoplásicos. De fato, os estudos do mecanismo de ação dos compostos anticâncer exigem uma compreensão sistêmica e uma classificação química dessas substâncias em relação ao seu mecanismo de ação não deve ser considerado precipitadamente (27).

Dos fármacos usados na terapia do câncer existem principalmente os que atuam dependentes do ciclo celular, chamados de fármacos ciclo-celular específicos, ou os que agem destruindo as células tumorais independente da fase do ciclo celular, chamados de fármacos ciclo-celular não específicos (28,29).

Os quimioterápicos antineoplásicos que interagem com o DNA vêm demonstrando uma ampla utilização clínica e comprova a grande importância e o enorme interesse acadêmico e tecnológico, contribuindo decisivamente na descoberta de compostos anticâncer mais eficientes e menos tóxicos (20,27).

Considerando os testes de viabilidade celular e o efeito citotóxico utilizando de modelo experimental *in vitro*, o extrato etanólico obtido a partir das folhas da espécie *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith nas concentrações de 500 µg/mL e 100 µg/mL, apresentou ação antiproliferativa e citotóxica sob as células da linhagem PC-3 (câncer de próstata) nas condições experimentais testadas. Sendo indicada também a presença

de metabólitos secundários taninos condensados e flavonoides. Nesse contexto, este estudo vem contribuindo na descoberta de novos composto bioativos com efeito anticâncer para futuras aplicações terapêuticas no combate ao câncer.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo nº 562854/2010-0, à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte (FAPERN) e à Floresta Nacional de Açu do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade pela autorização das folhas da planta (SISBIO processo 29755).

REFERÊNCIAS

1. Brandão HN, David JP, Couto RD, Nascimento JAP, David JM. Chemistry and pharmacology of antineoplastic chemoterapeutical derivatives from plants. *Quím Nova*. 2010;33(6):1359–69.
2. Ribeiro AFC, Telles TC, Ferraz VP, Souza-Fagundes EM, Cassali GD, Carvalho AT, et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Rev Bras Farmacogn*. 2012;22(2):364–73.
3. Silva MM, Queiroz LP. A família Bignoniaceae na região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sitientibus série Ciências Biológicas*. 2003. p. 3–21.
4. Leite JPV, Lombardi JA, Chiari E, Oliveira AB. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. *Rev Bras Farmacogn*. 2001;11(2):77–87.
5. Brandão GC, Kroon EG, Souza DER, Filho JDS, Oliveira AB. Chemistry and Antiviral Activity of *Arrabidaea pulchra* (Bignoniaceae). *Molecules*. 2013; 18(8):9919–32.
6. Silva ML, Lima JM, Oloris SCS. Efeito Toxicológico in vivo de Extrato Hidroalcoólico de *Arrabidaea pulchra* (CHAM.) SANDWITH. *Rev Conhecimento Online*. 2014;1:1–9.
7. Barbosa WLR, Pinto L do N, Quignard E, Vieira JM dos S, Jr S, Carrera JO, et al. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Rev Bras Farmacogn*. 2008; 18(4):544–8.
8. Takemura OS, Iinuma M, Tosa H, Miguel OG, Moreira EA, Nozawa Y. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. *Phytochemistry*. 1995;38(5):1299–300.
9. Matos FJA. Introdução a fitoquímica experimental. 3a ed. Fortaleza: Edições UFC; 2009. 150p.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2):55–63.
11. Monteiro JM, Albuquerque UP de, Araújo E de L, Amorim ELC de. Tannis: from chemistry to ecology. *Quím Nova*. 2005;28(5):892–6.
12. Chen J, Li Y, Yang L-Q, Li Y-Z, Nan Z-B, Gao K. Biological activities of flavonoids from pathogenic-infected *Astragalus adsurgens*. *Food Chem*. 2012;131(2):546–51.
13. Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact*. 2002;139(1):1–21.
14. Park KI, Park HS, Nagappan A, Hong GE, Lee DH, Kang SR, et al. Induction of the cell cycle arrest and apoptosis by flavonoids isolated from Korean *Citrus aurantium* L. in non-small-cell lung cancer cells. *Food Chem*. 2012;135(4):2728–35.
15. Salmela A-L, Pouwels J, Kukkonen-Macchi A, Waris S, Toivonen P, Jaakkola K, et al. The flavonoid eupatorin inactivates the mitotic checkpoint leading to polyploidy and apoptosis. *Exp Cell Res*. 2012;318(5):578–92.
16. Rocha DD. Estudo das atividades citotóxica e antitumoral de vitafisilinas isoladas de *Acnistus arborescens* [Internet]. 2008 [cited 2014 Oct 08]. Available from: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/2313>

17. Kochuparambil ST, Al-Husein B, Goc A, Soliman S, Somanath PR. Anticancer efficacy of simvastatin on prostate cancer cells and tumor xenografts is associated with inhibition of Akt and reduced prostate-specific antigen expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;336(2):496–505.
18. Jimenez PC, Wilke DV, Takeara R, Lotufo TMC, Pessoa C, de Moraes MO, et al. Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vancouveri* (Tunicata: Ascidiacea). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008;151(3):391–8.
19. Fornelli F, Minervini F, Logrieco A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *J Invertebr Pathol*. 2004;85(2):74–9.
20. Montanari CA, Bolzani V da S. Drug design based on natural products. *Quím Nova*. 2001;24(1):105–11.
21. Boeloni JN, Ocarino NM, Goes AM, Serakides R. Triiodothyronine does not increase osteogenic differentiation reduced by age in bone marrow mesenchymal stem cells of female rats. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol*. 2013;57(1):62–70.
22. Cordell GA, Quinn-Beattie ML, Farnsworth NR. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother Res PTR*. 2001;15(3):183–205.
23. Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther*. 2003;99(1):1–13.
24. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Farmacologia*. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. 829 p.
25. Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Alves APNN, Madeira SVF, Pessoa C, Moraes MEA, et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev Virtual Quím*. 2010;2(1):47–58.
26. Guimarães MCC, Silva IV, Rangel LBA. Anticorpos na terapia contra o câncer. *Rev Perspect Online*. 2008;5(2):96–100.
27. Almeida VL de, Leitão A, Reina L del CB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. *Quím Nova*. 2005;28(1):118–29.
28. Chabner BA, Calabresi P. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Goodman & Gilman - Manual de Farmacologia e Terapêutica. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 1995. p. 903–49.
29. Salmon SE. *Farmacologia Básica & Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan AS; 1998. p. 629–55.