

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Cristiana Madjarof

Atividade Antitumoral dos Extratos e Frações Obtidos de
Didymopanax vinosum (Araliaceae)

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e
Estrutural na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Campinas, 14 de maio de 2004

Banca Examinadora

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Assinatura

Prof. Dra. Selma Candelária Genari

Assinatura

Prof. Dra. Renata dos Santos Coleghini

Assinatura

Prof. Dra. Maria Alice da Cruz Hofling

Assinatura

*“Realize seus sonhos com a naturalidade de um rio
que sabe por onde corre, e não para que alguém o aplauda”.*

Roberto Shinyashiki

À minha família e amigos eu dedico este trabalho.

Agradeço,

À Maria Iraci, minha mãe, pelo apoio ao longo de todos os anos de minha vida.

À Estefano, meu pai, por me incentivar a continuar estudando, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos irmãos Vitor e Otavio pelo carinho.

Ao meu orientador João Ernesto de Carvalho por simplesmente confiar no meu trabalho.

A Dra. Mary Ann Foglio, pela orientação de grande parte do trabalho.

A Luciana Konecny Kohn, Márcia Aparecida Antônio e Sirlene Valério Tinti pela paciência e colaboração nos experimentos realizados.

Aos colegas de trabalho, Luciana Jankowsky, Maria Carolina Bayeux, Marina Siqueira, Alik Teixeira, Carina Denny, Karin Maia, Érika Bighetti, Patrícia Corrêa Dias, Ana Possenti, Sirlene Valério Tinti, pelo apoio e amizade no ambiente de trabalho.

Aos funcionários da Divisão de Fitoquímica do CPQBA-UNICAMP, Rodney, Ilza e Renata, pelos ensinamentos e agradável convivência.

À todos os estagiários da Divisão de Fitoquímica, em especial Ana Paula, Pedro, Eduardo, Carla, que me deram "os toques", necessários para realização do trabalho, além da amizade é claro.

As amigas Cristina Sazima, Joana Cunha e Luciana Jankwosky pela convivência e carinho durante todos esses anos.

À Guilherme Denzin, por estar presente em muitos momentos de minha vida.

À Pedro Fernando por proporcionar alegria em minha vida ao longo deste trabalho.

Aos meus pequenos, Mel, Millie e Wave pela companhia e distração em todos os momentos.

Ao Departamento de Biologia Celular

A Lilian Alves Senne Panagio, secretária do Departamento de Biologia Celular, pela "super" ajuda e dedicação.

À Capes pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos os amigos que moram no meu coração e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Índice

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	18
OBJETIVOS	33
MATERIAL E MÉTODOS	35
1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	36
2. PREPARAÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS DE <i>Didymopanax vinosum</i>	36
3. TRIAGEM FITOQUÍMICA	38
4. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO A FRIO (EBHF) EM COLUNA SECA	39
5. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO POLAR (FP) EM COLUNA CLÁSSICA	39
6. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO A FRIO (EBHF) POR PARTIÇÃO EM FUNIL DE SEPARAÇÃO	40
7. HIDRÓLISE DA FASE AQUOSA (F1)	40
8. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	41
9. ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Didymopanax vinosum</i>	42
RESULTADOS	50
1. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO	51

2. TRIAGEM FITOQUÍMICA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO A FRIO (EBHF) _____	53
3. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO A FRIO (EBHF) EM COLUNA SECA. _____	54
4. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO POLAR (FP) EM COLUNA CLÁSSICA _____	55
5. FRACIONAMENTO DO EBHF POR PARTIÇÃO EM FUNIL DE SEPARAÇÃO _____	56
6. HIDRÓLISE DA FRAÇÃO AQUOSA (F1) _____	57
7. TESTES FARMACOLÓGICOS _____	58
8. CÁLCULO DA IC50 (Concentração que inibe 50% do crescimento) _____	72
DISCUSSÃO _____	73
CONCLUSÃO _____	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	86

Lista de Figuras

- Figura 1:** Foto das folhas da espécie *Didymopanax vinosum* coletada na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, Fazenda Campininha.....32
- Figura 2:** Foto de quatro linhagens celulares: Cólon (HT-29) , Melanoma (UACC-62), Mama resistente (NCI-ADR) e Próstata (PC-03).....45
- Figura 3:** Foto de quatro linhagens tumorais humanas: Ovário (OVCAR-03), Renal (786-0), Pulmão (NCI-460), Mama (MCF-7).....46
- Figura 4:** Esquema de uma placa de 96 compartimentos corada com SRB, onde A, B, C, D e E representam as amostras colocadas em triplicata nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250µg/ml.....48
- Figura 5:** Fluxograma da obtenção dos Extratos Brutos diclorometano (EBD) e etanólico (EBE) das folhas frescas de *Didymopanax vinosum*.....51
- Figura 6:** Fluxograma da obtenção dos Extratos Brutos Hidroalcoólicos a frio (EBHf) e a quente (EBHq) das folhas secas de *Didymopanax vinosum*.....52

Figura 7: Fluxograma e placa cromatográfica do fracionamento do (EBHf) em coluna seca. onde FP, FMP e FAP representam as frações polares, de média polaridade e apolar respectivamente.....	54
Figura 8: Fluxograma e placa cromatográfica da purificação da fração polar (FP) em coluna clássica.....	55
Figura 9: Fluxograma do fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico a Frio (EBHf) por partição em funil de separação.....	56
Figura 10: Fluxograma e placa cromatográfica dos produtos da hidrólise da fração aquosa (F1).....	57
Figura 11: Curva concentração-resposta da Doxorubicina sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da droga utilizada.....	58
Figura 12: Curva concentração-resposta do Extrato Bruto Diclorometânico das (EBD) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.....	59

Figura 13: Curva concentração-resposta do Extrato Bruto Etanólico (EBE) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.....60

Figura 14: Curva concentração-resposta do Extrato Bruto Hidroalcoólico a frio (EBHf) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.....61

Figura 15: Curva concentração-resposta da fração polar (FP) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.....62

Figura 16: Curva concentração-resposta da fração de média polaridade (FMP) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.....63

Figura 17: Curva concentração-resposta da fração apolar (FAP) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.....64

Figura 18: Curva concentração-resposta da fração (F7%) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.....65

Figura 19: Curva concentração-resposta da fração (F30%) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.....	66
Figura 20: Curva concentração-resposta da fração (F50%) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.....	67
Figura 21: Curva concentração-resposta da fração (F1) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.....	68
Figura 22: Curva concentração-resposta da fração (F2) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.....	69
Figura 23: Curva concentração-resposta da fração Hidrolisada (FH) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.....	70
Figura 24: Curva concentração-resposta da fração orgânica hidrolisada (FOH) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.....	71

Lista de Tabelas

Tabela 1: Reagentes utilizados na triagem fitoquímica.....	38
Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas nos ensaios antiproliferativo.....	43
Tabela 3: Densidade de inoculação das células.....	44
Tabela 4: Resultados da triagem fitoquímica do EBHf.....	53
Tabela 5: Valores da IC 50 (µg/ml) do EBHf de <i>D. vinosum</i> e da F1 obtida desse extrato.....	72

Resumo

A maioria dos agentes utilizados na quimioterapia acabam por apresentar melhor atividade “antiproliferativa” do que “anticâncer” evidenciando a necessidade de ensaios para a triagem de drogas menos tóxicas, mais seletivas e eficazes para o tratamento dessa doença. A grande diversidade de espécies vegetais com potencial terapêutico presente nos ecossistemas brasileiros, em destaque para os da Amazônia e Cerrado, fornece material para estudos especializados na procura de novas drogas para diferentes doenças, dentre elas o câncer. Uma das espécies do Cerrado, a *Didymopanax vinosum* (Araliaceae) foi selecionada para estudo da atividade antiproliferativa “*in vitro*” em cultura de células tumorais humanas de Leucemia (K-562), Próstata (PC0-3), Renal (786-0), Ovário (OVCAR-03), Melanoma (UACC-62), Cólon (HT-29), Pulmão (NCI-460), Mama (MCF-7) e Mama resistente (NCI-ADR). Inicialmente foram obtidos os Extratos Brutos Diclorometano (EBD), Etanólico (EBE) e Hidroalcoólico a frio (EBHf) das folhas de *Didymopanax vinosum*, os quais foram previamente avaliados, sendo o EBHf considerado mais ativo. A fração aquosa (F1) obtida a partir do EBHf, por partição em funil de separação, apresentou atividade citotóxica significativa, a qual parece estar associada a presença de flavonóides glicosilados evidenciados após hidrólise da mesma.

Abstract

Most of the chemotherapeutic agents present an “antiproliferative” activity rather than an “anticancer” one. For this reason, there is a growing need for less toxicity and more efficacy and selectivity in antineoplastic drugs. For the last decades, several plant-derived compounds have been successfully used in the treatment of cancer. Due to the great diversity of Brazilian ecosystems, the *Cerrado* is a rich source of new drugs for many diseases including cancer. In this study, the species *Didymopanax vinosum* was selected through the *in vitro* antiproliferative assay using nine human tumor cell lines: leukemia (K-562), prostate (PC0-3), kidney (786-0), ovary (OVCAR-03), melanoma (UACC-62), colon (HT-29), lung (NCI-460), breast (MCF-7) and multi-drug resistant breast cells (NCI-ADR). The crude hidroalcoholic extract (EBHf) obtained from the leaves of *D. vinosum* was achieved by mechanic extraction with ethanol 70%, this extract was partitioned using H₂O / ethil acetate guiving an aqueous (F1) and an organic (F2) fractions. F1 presented the most significant antiproliferative activity which seems to be related to the presence of glycolytic flavonoids, revealead by its chemical hydrolysis.

Introdução

As informações sobre o câncer crescem rapidamente, visto que não consiste numa só doença, e sim em um conjunto de mais de 200 doenças distintas, com multiplicidade de causas, história natural e diferentes formas de tratamento tornando-se um problema de saúde pública merecedor de maior atenção científica (Love, 1991).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano surgem dez milhões de novos casos e cinco milhões de pessoas vão a óbito em decorrência dessa doença. No Brasil, o câncer constitui a segunda causa de morte por doenças, sendo a primeira representada pelas doenças cardiovasculares, acometendo cerca de cem mil indivíduos anualmente, com ligeira predominância do sexo masculino. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 1994, dos casos de óbitos relatados, 10,86% foram por câncer, 53,81% em homens e 46,05% em mulheres. A partir de 2020, 20 milhões de pacientes, a cada ano, serão vítimas dessa doença sendo que 70% da população, reside em países onde os recursos para o controle do câncer são insuficientes (Ministério da Saúde, 2000 ; OMS, 1997).

O câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pela perda de controle da proliferação celular, ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástases para tecidos distantes. Esta perda de controle, é consequência direta de danos causados aos mecanismos de regulação do ciclo celular bem como, aos genes que nele atuam. Sendo assim, a malignidade de uma célula é resultado de mutações no material genético, que podem ser hereditárias ou adquiridas somaticamente pela exposição a uma variedade de fatores ambientais podendo ser estes químicos, físicos e

biológicos. O aumento da expectativa de vida da população mundial representa também, maior possibilidade de desenvolvimento dessa doença (Montesano & Hall, 2001).

A predisposição hereditária ao câncer pode ser direta quando os genes alterados são transmitidos ou quando os distúrbios que levam à doença são herdados como um efeito secundário (Ponder, 1990).

A maioria dos carcinogênicos químicos reagem diretamente com o DNA promovendo modificações genéticas sendo assim denominados de genotóxicos. Por outro lado carcinogênicos não-genotóxicos são capazes de induzir a carcinogênese, sem qualquer alteração estrutural no DNA. Estes atuam por meio de mecanismos epigenéticos alterando o fenótipo da célula, promovendo seu crescimento e induzindo a proliferação celular (Weisburger, 2001)

Quanto à carcinogênese física, existem evidências que apontam a radiação, como um dos agentes etiológicos do câncer representando 2% do total de mortes por esta doença, estando a maioria dos casos atribuídos ao melanoma (câncer de pele) desencadeado pelos raios ultravioletas (UV) da irradiação solar. (Trichopoulos et al., 1996).

A carcinogênese biológica deve-se a capacidade de diferentes agentes biológicos como parasitas e vírus, atuarem na transformação maligna da célula. Estes integram seus DNAs ou RNAs no DNA da célula hospedeira promovendo alteração no seu conteúdo genético. Condições ambientais como temperatura, radiação, hipóxia, nutrientes e administração de

certas drogas podem influenciar no comportamento da célula, na sua diferenciação e proliferação, na capacidade de se tornar oncogênica, de sobreviver ou morrer por apoptose (Tiligada et al, 2002)

A inativação de genes supressores tumorais e a ativação de proto-oncogênes em oncogenes (genes que conferem malignidade a uma célula), podem ser citados como duas categorias principais de alteração genética que levam a um câncer. Os produtos dos genes p53 e RB, ambos genes supressores tumorais, desempenham papel importante nesse mecanismo, sendo que a maioria dos cânceres humanos, estão associados a mutações no gene supressor tumoral p53. Este age impedindo a propagação de células geneticamente modificadas, regulando genes que participam do controle do ciclo celular, reparo do DNA e morte celular programada. Com a perda homozigota desse gene, não há reparo do DNA danificado, as mutações tornam-se fixas na célula em divisão e a célula segue, então, uma via unidirecional que leva a uma transformação maligna (Smith et al, 2003).

A ativação dos proto-oncogenes, pode ser considerada uma das razões pelas quais as células cancerosas apresentam proliferação incontrolada. Os proto-oncogenes estão envolvidos no crescimento e diferenciação celulares e podem ser convertidos em oncogenes ativos por certos vírus, como também em consequência de mutações pontuais, ampliações de genes ou translocações cromossômicas (Perantoni, 1998).

As células tumorais apresentam alguns aspectos que as diferenciam das células normais: (1) Elas não são dependentes de fatores de crescimento como as células normais, visto que são

capazes de secretar seus próprios fatores de crescimento para estimular a proliferação; (2) Células normais requerem contato com a superfície do meio extracelular para poderem crescer, enquanto que células tumorais são independentes de ancoragem; (3) em cultura, células normais possuem inibição por contato formando uma monocamada, enquanto que as tumorais, freqüentemente crescem umas sobre as outras; (4) Células tumorais são menos aderentes que as normais; (5) Células normais param de proliferar quando atingem certa densidade mas as tumorais continuam a proliferar. (Macdonald & Ford, 2000).

As neoplasias são classificadas em benignas e malignas, possuindo dois componentes básicos: (1) células neoplásicas proliferantes que constituem *o parênquima*, e (2) *o estroma de suporte*, constituído de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Quase todos os tumores benignos crescem como massas coesivas em expansão, que permanecem localizadas em seu sítio de origem, porém sem capacidade de infiltração, invasão ou metástases para locais diferentes (Cotran, 2000).

Em geral, os tumores benignos possuem crescimento e expansão lenta, e habitualmente são envolvidos por uma faixa de tecido conjuntivo denominada cápsula fibrosa. Esse encapsulamento tende a conter a neoplasia benigna como massa isolada, facilmente palpável e móvel, passível de enucleação cirúrgica. Os tumores malignos são, em sua maioria, não encapsulados e invasivos, o que dificulta a sua ressecção cirúrgica. A invasão dos cânceres permite a sua penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, proporcionando assim, a oportunidade de disseminação ou metástase. A falta de diferenciação ou anaplasia é considerada uma característica básica

da transformação maligna e sua velocidade de crescimento está relacionada com o nível de diferenciação, de modo que os tumores malignos crescem, em sua maioria, mais rapidamente do que as lesões benignas (Cotran, 2000).

O desenvolvimento do câncer pode ser descrito em três etapas básicas denominada de iniciação, promoção e progressão. A iniciação caracteriza-se pela alteração permanente e irreversível no material da célula. Assim, as mutações são fixadas durante a proliferação celular e a célula “iniciada” pode se tornar maligna, se receber ou não estímulos promotores de malignidade (Hemminki, 1993).

Por outro lado a promoção não envolve mudanças moleculares na estrutura do DNA, sendo definida como uma etapa operacionalmente reversível, de longa duração onde ocorre expansão clonal das células. Por fim, a progressão do câncer é descrita pela evolução e instabilidade cariotípica, onde a estrutura do genoma das células está relacionada com o aumento da taxa de proliferação, caráter invasivo e alterações bioquímicas nas mesmas (Pitot & Dragan, 1991).

Existem três abordagens principais para lidar com o câncer: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, e o papel de cada uma delas depende do tipo de tumor e de seu estágio de desenvolvimento. A cirurgia foi a primeira modalidade de tratamento que significativamente alterou o curso de uma neoplasia e consiste na retirada física do tecido maligno sendo eficiente somente nos casos em que o tumor é circunscrito, anatomicamente favorável e não apresenta metástases. A radioterapia é utilizada para tumores localizados

que não puderam ser extraídos totalmente ou aqueles que apresentaram alta taxa de recidivas locais após a cirurgia. Essa técnica consiste em expor as células malignas à radiação ionizante, pois ela possui características físicas que promovem a ionização do meio incidente, alterando as macromoléculas que são indispensáveis às funções vitais, levando às células à morte. A radioterapia é somente efetiva nas células que estão em divisão, possuindo graves efeitos colaterais, provocando lesões nos tecidos normais e adjacentes (Rang, 1995).

A quimioterapia, é um dos métodos mais utilizados e consiste no uso de agentes citotóxicos ou anti-hormonais, que eliminam as células neoplásicas diminuindo assim o crescimento da massa tumoral e a proliferação desordenada das células. A quimioterapia com fármacos citotóxicos, os quais danificam ou matam as células, é o principal método de tratamento de alguns cânceres, mas tem tido uso crescente como adjuvante da cirurgia ou da radioterapia em vários tipos de tumor. A introdução da quimioterapia aumentou significativamente os índices de cura de alguns tumores, em especial das neoplasias hematológicas, as quais não eram controladas com sucesso pelo emprego da cirurgia ou radioterapia (Mans, 2000).

Dentre principais fármacos citotóxicos estão os agentes alquilantes, os antimetabólitos, os antibióticos citotóxicos e compostos naturais. Os agentes alquilantes formam ligações covalentes com o DNA, impedindo assim sua replicação. Os antimetabólitos bloqueiam ou subvertem uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese de DNA. Os antibióticos citotóxicos, de origem microbiana, impedem a divisão de células de mamíferos e os

compostos naturais como os alcalóides da vinca, afetam especificamente a função dos microtúbulos e, portanto a formação do fuso mitótico (Rang, 1995)

A maioria dos agentes utilizados na quimioterapia atuam inibindo a síntese de DNA ou mecanismos de replicação celular, mas acabam por apresentar melhor atividade “antiproliferativa” do que “anticâncer”. Sendo assim, a seletividade entre células normais e tumorais torna-se modesta e os efeitos colaterais acentuados. Além disso, a toxicidade dessas drogas limitam seu uso já que a maioria dos cânceres humanos são quimioresistentes e ainda, podem causar danos ao DNA de células normais induzindo a formação de uma segunda neoplasia (Garrett & Workman, 1999)

Consequentemente, torna-se evidente a necessidade de ensaios para a triagem de drogas menos tóxicas, mais seletivas e eficazes para o tratamento dessa doença, além de um melhor conhecimento do comportamento do tumor a ser tratado, envolvendo a biologia celular e molecular dos mesmos (Nam & Parang, 2003).

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas por povos de varias civilizações há mais de cinco mil anos. Chineses, indianos, e africanos, utilizavam plantas para a cura de uma variedade de doenças. Na china, por volta de 140 novas drogas foram descobertas a partir de plantas medicinais (Zhang, 2002).

A investigação de plantas medicinais utilizadas popularmente resultou em alguns avanços terapêuticos e atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética,

sendo 25% provenientes de plantas (Rates, 2001). Segundo Cox (1994), 80% da população mundial residente em países subdesenvolvidos, utilizam plantas como fonte de medicamentos e 20% dos indivíduos de países desenvolvidos recorrem as mesmas para o tratamento de diversas doenças .

O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas, de origem vegetal, tem aumentado significativamente nos últimos anos e com isso, várias empresas privadas e organizações governamentais têm instituído projetos de pesquisa nesta área (Calixto, 2000). Este interesse, deve-se também a grande eficácia clínica de algumas substâncias antitumorais obtidas de plantas, como os alcalóides vimblastina e vincristina, extraídos da espécie *Cataranthus roseus*, drogas de grande utilidade no tratamento tumores hematológicos. Outra substância isolada foi o Taxol extraído de *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata* cujos estudos clínicos revelaram a sua capacidade na regressão do câncer de mama e ovário (Craag & Newman 1999; Wani et al., 1971; Philipson 2001).

No final de 1940 foram isolados dois alcalóides de espécies pertencentes ao gênero *Podophyllum*, que eram utilizadas pelas populações nativas da América e da Ásia no tratamento do câncer de pele e verrugas. Mais tarde, foram obtidos por semi-síntese dois derivados desses alcalóides, o etoposídeo e o teniposídeo, cujos estudos experimentais permitiram a introdução dessas drogas na terapia do câncer (Cragg & Newman, 1999)

Os produtos, de origem vegetal, podem atuar de forma similar a medicamentos alopáticos possuindo também efeitos colaterais, sendo necessário reunir conhecimentos popular e

científico para garantir a segurança e eficácia desses produtos (Wargovich, 2001). Atualmente, parte da população dos países em desenvolvimento fazem uso rotineiro de plantas medicinais, desconhecendo os riscos envolvidos (Philipson, 2001).

Empresas nacionais empregam matéria prima vegetal diretamente na elaboração de seus medicamentos. No Brasil, 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis, o restante encontra nos produtos de origem vegetal, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (Di Stasi, 1996).

A rica biodiversidade do Brasil se distribui em diferentes regiões como a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado. O Cerrado compreende 25% do território brasileiro e se caracteriza pela baixa fertilidade do solo e predomínio de uma longa estação seca, que condicionam o desenvolvimento de um tipo peculiar de vegetação, muito atraente pela riqueza em espécies medicinais e pela beleza dos aspectos estéticos que apresenta (Ferri, 1969). A grande diversidade de espécies presente nesse ecossistema fornece material para a realização de estudos especializados na procura de novas drogas para diferentes doenças, dentre elas o câncer (Mans et al., 2000).

Contudo, o potencial de exploração de plantas como fonte de novas drogas ainda é pequeno. Estima-se que existam cerca de 250 a 500 mil espécies de plantas e que apenas uma pequena porcentagem, de 5% a 15% destas foram estudadas do ponto de vista farmacológico (Craag & Newman, 1999).

A existência de uma ampla variedade de compostos sintetizados pelas plantas é um dos maiores obstáculos encontrados nos estudos fitoquímicos e farmacológicos de espécies vegetais. Alterações no ambiente, clima, stress bem como de estímulos físicos e químicos, podem alterar qualitativa e quantitativamente a produção de metabólitos ativos, em plantas, designados de metabólitos secundários. Estes compostos não estão ligados diretamente à manutenção da vida do vegetal, mas garantem vantagens para sua sobrevivência contribuindo para a perpetuação da espécie em seu ecossistema (Cordell, 2000).

Dentre os metabólitos secundários de importância farmacológica, os flavonóides se destacam por apresentarem propriedades antioxidantes, antimutagênica, anticarginogênica, antiinflamatória e antimicrobiana (Ferguson, 2001). Um agente que vem sendo estudado com propriedade anti-câncer, é o flavopiridol, um flavonóide sintético isolado das folhas e ramos de *Amoora rorituka* e mais tarde de *Dysoxylum binectariferum* (Maliaceae). Este composto representa o primeiro agente anti-câncer descoberto que interfere na progressão do ciclo celular (Sedlacek, 1996).

Nos Estados Unidos, entre 1983 e 1994, 60% dos medicamentos anticancerígenos aprovados eram de origem natural sendo grande parte deles compostos do metabolismo secundário de vegetais superiores (Cragg et al., 1999).

Com o aprimoramento da metodologia de cultura de células foi possível, no final da década de 80, o desenvolvimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, possibilitando a existência de uma metodologia para triagem *in vitro*. Com esse objetivo, o

Nacional Câncer Institute (NCI/EUA) desenvolveu um painel de células cancerígenas que atualmente conta com 60 linhagens oriundas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoético (leucemia). Tal metodologia permite a avaliação de drogas nos diversos tipos de células neoplásicas, com maior especificidade (Boyd, 1989).

Testes *in vitro* utilizando-se cultura de células tumorais são extremamente importantes na pesquisa de anticancerígenos visando a procura de novas moléculas que inibam o crescimento destas células. Testes de toxicidade realizados com células KB (Células de carcinoma da epiderme humana) e Vero (células da epiderme de rim de macaco verde africano) conduziu ao isolamento de uma série de acetogeninas citotóxicas , tornando-se um exemplo do emprego de testes biológicos utilizando cultura de células para a descoberta de novos compostos antitumorais (Queiroz et.al, 1999). Modelos de screening de citotoxicidade contribuem para a seleção de plantas com potencial antineoplásico fornecendo dados preliminares para trabalhos futuros (Itharat et al., 2004).

Nos últimos anos o Centro Pluridisciplinar em Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícola (CPQBA-Unicamp), através de projetos financiados pelo CNPq (630009/95-3), Fapesp(95/09607-5) e verbas obtidas com a prestação de serviços, desenvolveu dois projetos de avaliação do potencial anticâncer de espécies vegetais da Amazônia e do Cerrado do Estado de São Paulo. Parte dos recursos obtidos foram utilizados para implantação de um Laboratório de Cultura de Células Tumorais Humanas. As linhagens tumorais foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) e dessa maneira foi possível o

desenvolvimento da mesma metodologia utilizada por esse Centro de Pesquisas. O método de ensaio em cultura de células tumorais humanas, pela sua rapidez, é muito útil para monitorar o processo de fracionamento e isolamento dos princípios ativos a partir de extratos vegetais.

Dentre as espécies do Cerrado, foi selecionada para este trabalho a *Didymopanax vinosum* (Araliaceae) conhecida como mandioquinha do campo, de forma arbustiva com até 3 metros, toda revestida de fino indumento aveludado de cor castanha; folhas compostas digitadas, folíolos oblongos ou ovais oblongos, agudos, coreáceos, rígidos, pubescentes na página inferior; flores pequenas e pálidas, dispostas em umbelas paniculadas, grandes; fruto drupa pequeno (Pio Corrêa, 1984). Os extratos e frações obtidos a partir de suas folhas, (Figura 1) foram testadas em nove linhagens de células tumorais de Leucemia (K.562), Cólon (HT.29), Renal (786.0), Melanoma (UACC), Ovário (OVCAR), Mama (MCF.7), Mama resistente (NCI.ADR), Pulmão (NCI.460) e Próstata (PC.03).

O estudo de uma nova droga de origem vegetal, deve ser multidisciplinar envolvendo ciências básica como botânica, química, farmacologia, incluindo a toxicologia, sendo de fundamental importância, o emprego da tecnologia farmacêutica no desenvolvimento de um novo fármaco incluindo os de origem vegetal (Petrovick et al, 1997; Sharapin, 1997).

Estudos botânicos aliados aos farmacológicos são de vital importância para a seleção de plantas passíveis de serem investigadas quanto a sua utilidade medicinal. Esta abordagem mostra-se mais eficiente na descoberta de novas drogas, em contraste com outras abordagens,

como triagens fitoquímicas, *screening* biológico massivo ou de plantas coletadas ao acaso e ainda investigações fitoquímicas com o objetivo de identificar novos compostos químicos.

Para determinação do potencial de uma planta, é necessário primeiramente resgatar informações, sejam estas populares ou científicas, identificar as espécies e sua disponibilidade para pesquisa, levando em consideração a preservação natural destas no meio ambiente. O valor econômico da preservação de plantas medicinais inclui diversos benefícios sociais, tais como atividades ligadas ao plantio, processamento e comercialização, melhores condições de assistência de saúde, além da possibilidade da substituição de fármacos importados, do surgimento de modelos para a síntese de novos fármacos e ainda permitir a conservação dos recursos genéticos como fonte potencial para doenças ainda desconhecidas (Elisabetsky, 1987 & Rates, 2001).



Figura 1: Foto das folhas da espécie *Didymopanax vinosum* coletada na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, Fazenda Campininha.

Objetivos

- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos brutos obtidos da espécie *Didymopanax vinosum*.
- Monitorar, através dos testes *in vitro*, o processo de fracionamento do extrato bruto ativo.
- Identificar as principais classes de compostos envolvidos na atividade antiproliferativa.

Material e Métodos

1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

1.1. Coleta

O material vegetal foi coletado na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, Fazenda Campininha e identificado pelos botânicos Prof^a. Dr^a Maria do Carmo E. do Amaral e pelo Prof. Dr. Volker Bittrich do Departamento de Botânica do IB/UNICAMP. As exsicatas da espécie estudada foram depositadas no herbarium da mesma Instituição.

1.2. Preparação do Material Vegetal

As folhas de *D. vinosum* foram moídas com gelo seco em moinho (Stephen, modelo UM 40) e armazenadas em freezer para conservação de suas propriedades.

2. PREPARAÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS DE *Didymopanax vinosum*

2.1. Preparação dos Extratos Brutos Diclorometano e Etanólico

O material vegetal moído foi submetido a um processo de maceração dinâmica com diclorometano durante 1 hora. Os filtrados desta extração foram recolhidos e filtrados. O solvente orgânico foi então eliminado sob vácuo numa temperatura de aproximadamente 40°C fornecendo então o extrato bruto diclorometano (EBD).

O resíduo vegetal deste processo foi retomado em etanol 95% e extraído por maceração até esgotar a planta. Os filtrados foram recolhidos e o solvente orgânico foi evaporado, numa temperatura de aproximadamente 55⁰ C fornecendo então, o extrato bruto etanólico (EBE) .

2.2. Preparação do Extrato Bruto Hidroalcoólico

As Folhas moídas foram secas, em estufa (Fabbe, modelo 170). Uma parte, do material foi extraído, a frio, por maceração dinâmica, com etanol 70%. O filtrado foi evaporado e posteriormente liofilizado, para remoção da água, obtendo-se o extrato bruto hidroalcoólico a frio (EBHf) . Outra parte do material foi extraído a quente, através do aquecimento em balão de vidro acoplado a um condensador de refluxo por 2 horas, resultando no extrato bruto hidroalcoólico a quente (EBHq) .

3. TRIAGEM FITOQUÍMICA

O extrato bruto hidroalcoólico a frio (EBHf), extrato considerado mais ativo, foi submetido a uma triagem fitoquímica para a verificação dos principais grupos químicos. As amostras foram aplicadas em cromatoplasas de Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck)[®] para separação dos compostos químicos presentes. As placas foram eluídas com um gradiente de clorofórmio: metanol 10% e reveladas com reagentes específicos para cada classe de compostos (Tabela 1).

Tabela 1: Reagentes utilizados na triagem fitoquímica.

COMPOSTOS	REAGENTES
Alcalóides	Dragendorf
Flavonóides	PEG (Polietinoglicol)
Triterpenos	Anisaldeído
Saponinas	Índice de espuma
Taninos	Ferricianeto de potássio 1%

4. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO A FRIO (EBHF) EM COLUNA SECA

Um grama (1g) do EBHf foi purificado por cromatografia em coluna seca, utilizando silicagel como fase estacionária, colocada em uma membrana de celulose ($\varnothing=2\text{cm}$, 20cm de altura) sendo eluída com 100ml de diclorometano/metanol 5%. Esta coluna foi cortada em três partes (de acordo com o padrão de faixas visualizadas em UV), resultando em 3 frações denominadas de fração polar (FP), fração de média polaridade (FMP) e fração apolar (FAP).

5. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO POLAR (FP) EM COLUNA CLÁSSICA

Uma coluna de vidro de foi empacotada com 3g sílica (fase estacionária) sendo esta eluída com hexano 100% até sua compactação. A fração FP (150mg) foi adicionada à coluna e eluída com solvente de polaridade crescente: Hexano / Diclorometano com gradiente de variação de 10% até diclorometano 100%. A partir deste ponto, a coluna foi eluída com Diclorometano / Metanol com gradiente de variação de 1% até Diclorometano / Metanol 10%, passando para um gradiente de 10% até metanol puro. Resultaram desta purificação 9 frações, as quais foram agrupadas conforme seus perfis cromatográficos: FD (Diclorometano puro), F5% (Dicloro/Metanol 5%), F7%, F9%, F15%, F20%, F30%, F50%, FM (metanol puro).

6. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO A FRIO (EBHF) POR PARTIÇÃO EM FUNIL DE SEPARAÇÃO

O EBHF (1g) foi ressuspendido em 50ml de água e extraído por três vezes consecutivas com 50ml de acetato de etila em funil de separação. A fase aquosa foi liofilizada resultando na fração aquosa (F1). A fase orgânica resultante das três extrações com acetato de etila foi evaporada resultando na fração orgânica (F2).

7. HIDRÓLISE DA FASE AQUOSA (F1)

A fração aquosa foi submetida a uma hidrólise para detectar a presença de compostos glicosilados. Esta fração foi ressuspendida em 100 ml de água destilada sendo então adicionado 20ml de ácido clorídrico 20% (HCl). Esta solução foi colocada em refluxo por 1hora, para hidrólise. Após este tempo, a fração aquosa foi neutralizada com hidróxido de amônio (NH_4OH) e extraída novamente com 100ml de acetato de etila por três vezes consecutivas.

A fase orgânica pós-hidrólise, resultante das três extrações, foi evaporada, resultando na fração orgânica hidrolisada (FOH). A fase aquosa pós-hidrólise foi liofilizada obtendo-se então a fração aquosa hidrolisada (FH).

8. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

8.1. Células

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho, são originárias de neoplasias humanas e foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos EUA. Estas linhagens foram enviadas congeladas para o laboratório do CPQBA, e o primeiro passo realizado foi o descongelamento das células. Todos os procedimentos abaixo foram realizados sob condições estéreis (Fluxo Laminar Veco[®], Classe IIB2).

Para descongelamento das células, o criotubo que continha as células foi mantido à temperatura ambiente, e seu conteúdo transferido para um tubo de centrifuga de 15 ml. O volume foi completado para 10 ml com meio de cultura RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). O tubo foi centrifugado a 4° C e 2000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o “*pellet* celular” ressuspensionado cuidadosamente para evitar a formação de grumos, com 5 ml de RPMI/SFB. A solução celular foi transferida para frascos de manutenção de 25cm² (T25) com 5 ml de RPMI-1640 /SFB e incubada a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂ em ambiente úmido. Estas linhagens podem ser observadas na Tabela 2 e Figuras 2 e 3.

9. ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Didymopanax vinosum*

9.1. Plaqueamento de Células

A avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada nas 9 linhagens tumorais humanas apresentadas na Tabela 2. No primeiro dia de experimento, foi feito o plaqueamento de células nas placas de 96 wells. Cada linhagem celular foi inoculada em uma placa, totalizando 9 placas. Em uma outra placa, a placa controle (T0), foram inoculadas todas as linhagens celulares.

Para células aderidas, cujo crescimento ocorre em monocamada, foi necessário a tripsinização ou seja, o desprendimento das mesmas do frasco através de ação enzimática.

Após a aspiração do meio de cultura, foi adicionado 0,5 ml de tampão de Hank's banhando toda a monocamada celular por 10 vezes consecutivas. Este líquido foi aspirado e então adicionado 0,5 ml de tripsina a 37°C. O frasco foi incubado de 25 a 30 segundos sendo logo em seguida banhado com 5ml de meio RPMI/SFB/gentamicina. A partir deste ponto, as células se apresentam em suspensão. A linhagem K.562 (leucemia) não precisa passar por esta etapa pois já se encontra em suspensão.

Os frascos foram agitados delicadamente e uma alíquota foi retirada e colocada na Câmara de Neubauer para contagem do número de células. De acordo com a densidade de

inoculação de cada linhagem (determinadas pelo NCI) (Tabela 3), foi calculado a quantidade de meio necessária para diluição das células a serem inoculadas. Esta diluição foi feita em tubos estéreis de 50ml. Foram inoculadas 100µl de solução celular na placas de 96 wells e estas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

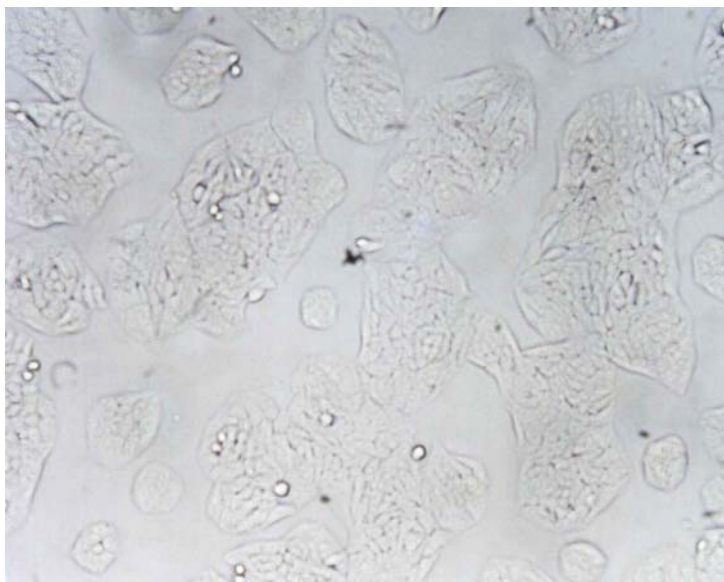
Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas nos ensaios antiproliferativo.

Tipo celular	Nome	Tipo de cultura
Leucemia	K-562	Suspensão
Ovário	OVCAR-03	Aderida
Renal	786-0	Aderida
Próstata	PC0-3	Aderida
Cólon	HT-29	Aderida
Pulmão	NCI-460	Aderida
Mama	MCF-7	Aderida
Mama Resistente	NCI-ADR	Aderida
Melanoma	UACC-62	Aderida

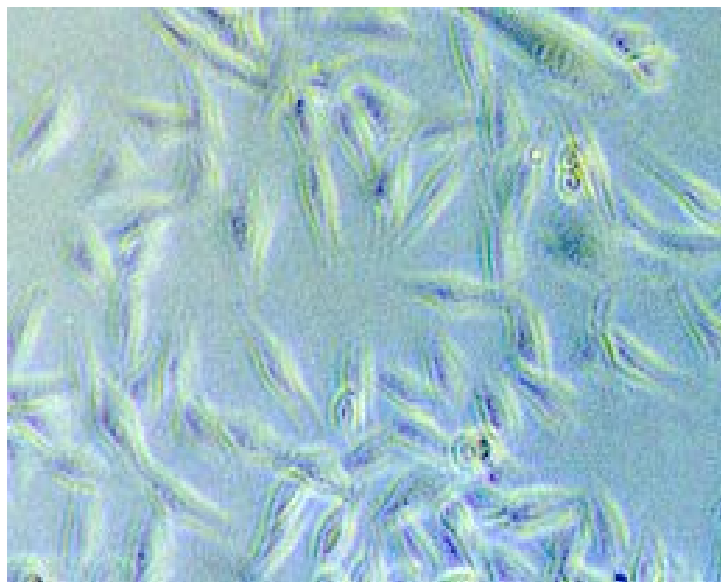
Tabela 3: Densidade de inoculação das células

Linhagens	Densidade de inoculação
K.562	6×10^4
OVCAR	7×10^4
C786.0	5×10^4
PC0.3	$4,5 \times 10^4$
HT.29	5×10^4
NCI.460	4×10^4
MCF.7	6×10^4
NCI ADR	5×10^4
UACC.62	4×10^4

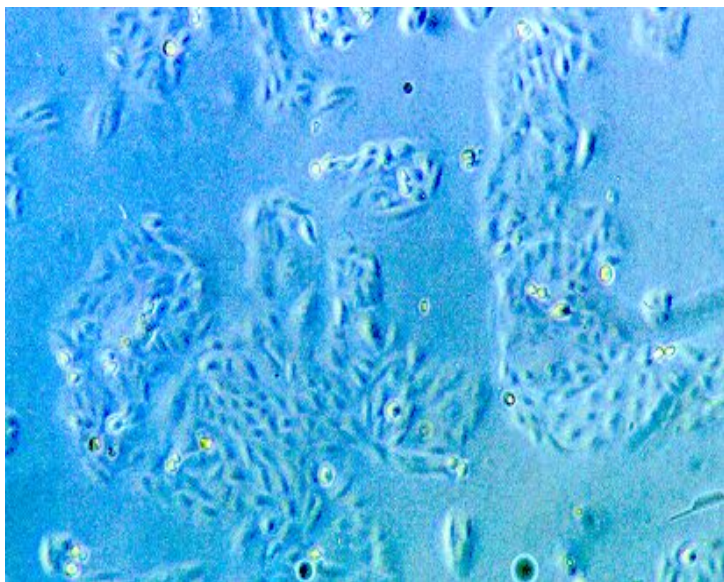
Cólon (HT-29)



Melanoma (UACC-62)



Mama resistente (MCF 7)



Próstata (PC-03)

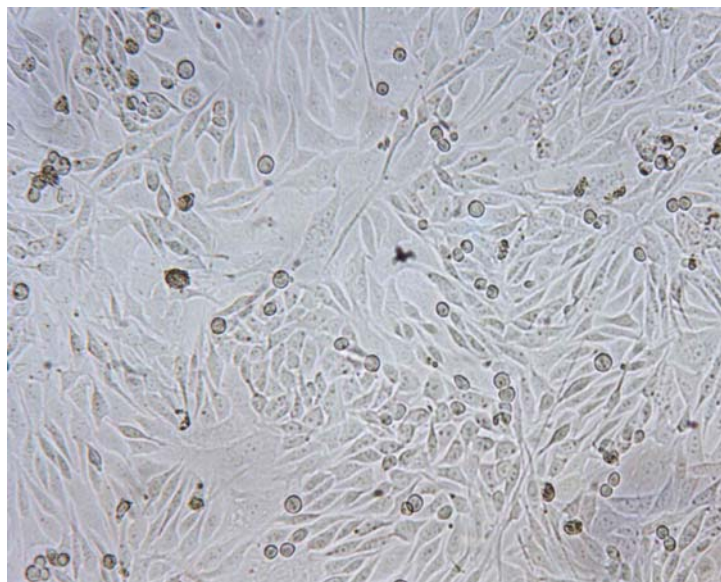
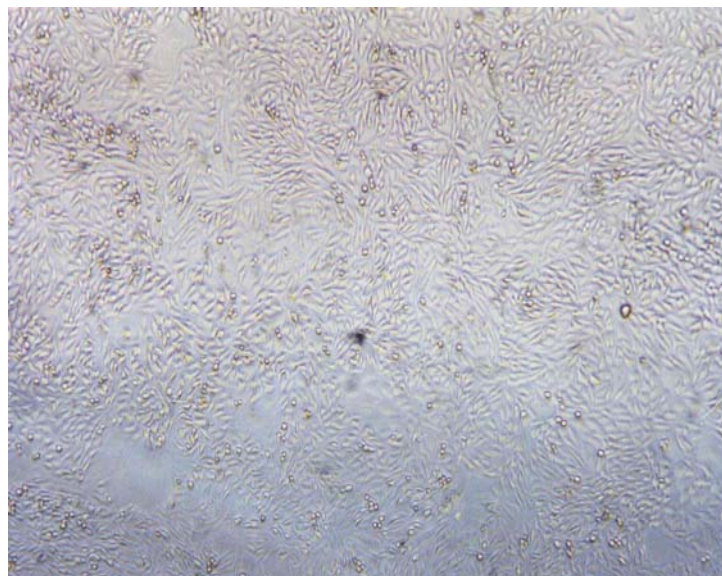


Figura 2: Foto de quatro linhagens celulares: Cólon (HT-29) , Melanoma (UACC-62), Mama resistente (NCI-ADR) e Próstata (PC-03).Aumento 200X.

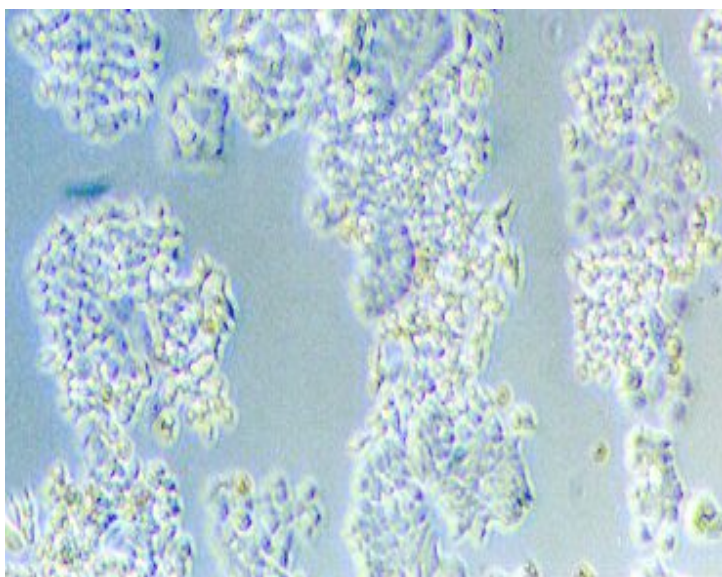
Ovário (OVCAR-03)



Rim (786-0)



Pulmão (NCI-460)



Mama (MCF-7)

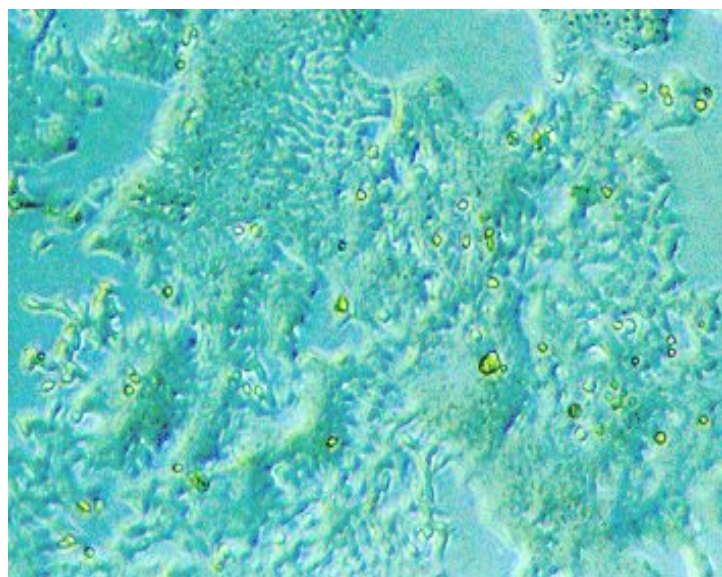


Figura 3: Foto de quatro linhagens tumorais humanas: Ovário (OVCAR.03), Renal (786.0), Pulmão (NCI 460), Mama (MCF.7). Aumento 200X.

9.2. Diluição e Aplicação das Amostras

Os extratos e frações (amostras) foram diluídos em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 0,1g/ml resultando em soluções estoques. Para a adição nas placas, as amostras foram diluídas pelo menos 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina.

As amostras (100µl) foram adicionadas nas placas de 96 compartimentos, exceto na T0 (Placa controle), nas concentrações 0,25; 2,5; 25; 250µg/ml (Figura 4). Neste momento, foi realizada a fixação da placa T0, com a adição de 50 µl de ácido tricloroacético a 50% (TCA) determinando assim, a quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram colocadas.

As demais placas foram incubadas por 48 horas. Após este período, o experimento foi interrompido para a fixação das placas com a adição de 50 µl de ácido tricloroacético a 50% (TCA) para as células aderidas e 80% para as células em suspensão. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas pôr 1 hora a 4°C e então submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, sendo mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

9.3. Ensaio de SRB (Sulforrodamina B)

Esse ensaio avalia a inibição de crescimento por um método colorimétrico que estima indiretamente o número de células presentes corando o total de proteína celular utilizando o corante SRB (Skehan et al., 1990)

As placas foram coradas pela adição de 50µl de SRB (corante protéico) a 0,4 % (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1 %. Estas foram incubadas a 4 °C, por 30 minutos e então lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1% e secas em temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado por adição de 150µl de Trizma Base (10µM). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi feita em um leitor de microplacas. (ELISA – Molecular Devices Versa Max Microplate Reader.) (Figura 4).

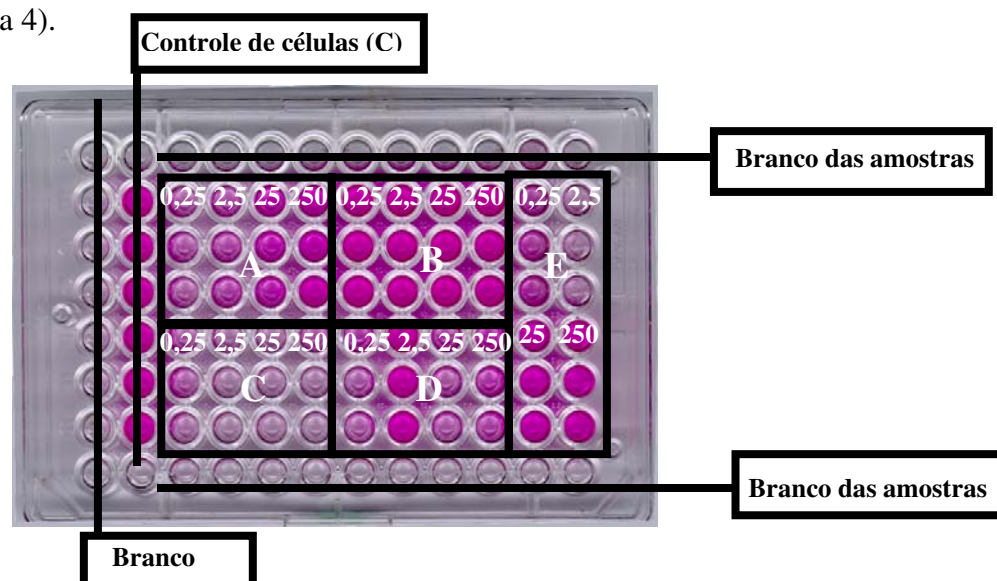


Figura 4: Esquema de uma placa de 96 compartimentos corada com SRB, onde A, B, C, D e E representam as amostras colocadas em triplicata nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/ml.

9.4. Análise dos Resultados

Foram calculadas as médias das absorbâncias em ELISA (Molecular Devices Versa Max Microplate Reader) descontadas de seus respectivos brancos e através das fórmulas abaixo, foi determinada a inibição de crescimento (IG) de cada amostra testada. Os resultados obtidos foram analisados, considerando-se:

Se $T > C$, existiu estimulação do crescimento celular.

Se $T \geq T_0$, mas $< C$, existiu uma atividade citostática e a fórmula utilizada será $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$

Se $T < T_0$, existiu atividade citocida e a fórmula utilizada será $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$

Onde, T é a média da absorbância da célula tratada, C é o controle de célula e T_0 é o controle das células no dia da adição das drogas. Finalmente, também foi possível subtrair o resultado obtido de 100%, obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento (IC). As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma dose dependente.

Resultados

1. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO

1.2.Obtenção dos Extratos Brutos de *Didymopanax vinosum*.

O processo de obtenção dos extratos brutos Diclorometano, Etanólico e Hidroalcoólico (a frio e a quente) (EBD, EBE , EBHf e EBHq) a partir das folhas de *Didymopanax vinosum* estão representados nas figura 5, 6, e 7.

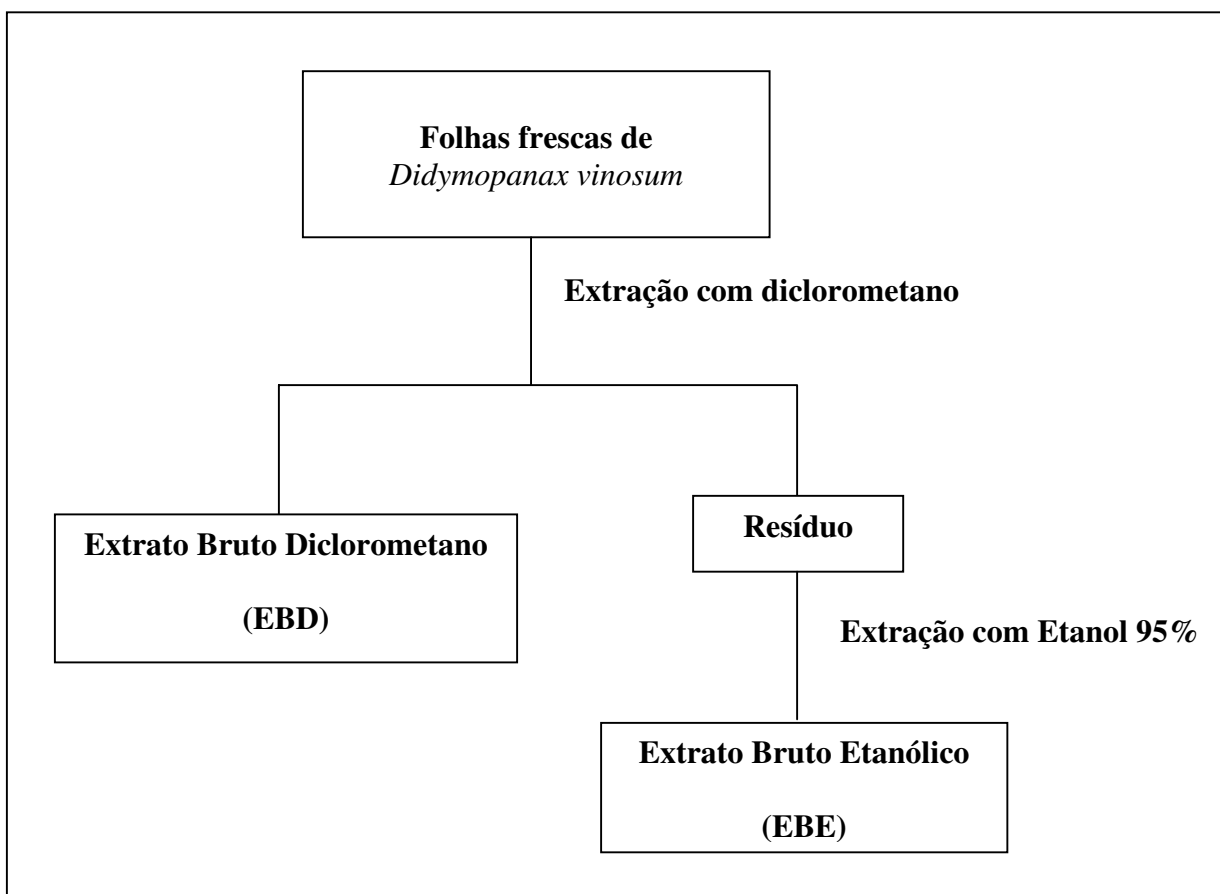


Figura 5 : Fluxograma da obtenção dos Extratos Brutos diclorometano (EBD) e etanólico (EBE) das folhas frescas de *Didymopanax vinosum*.

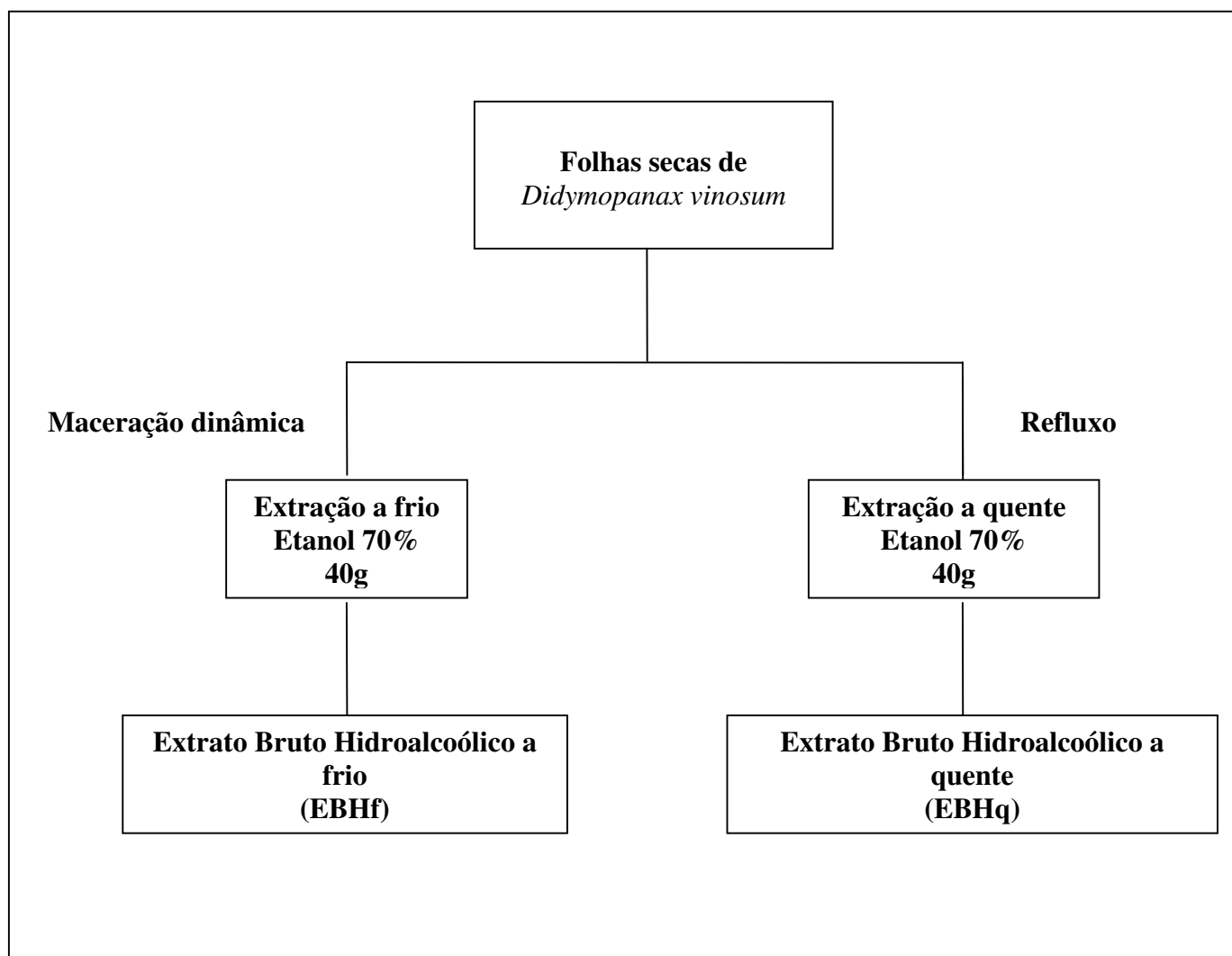


Figura 6: Fluxograma da obtenção dos Extratos Brutos Hidroalcoólicos a frio (EBHf) e a quente (EBHq) das folhas secas de *Didymopanax vinosum*.

2. TRIAGEM FITOQUÍMICA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO A FRIO (EBHF)

O EBHF, considerado o mais ativo, foi triado fitoquimicamente por cromatografia de camada delgada para visualização dos principais compostos químicos. Os resultados podem se vistos na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados da triagem fitoquímica do EBHF.

COMPOSTOS	REAGENTES	RESULTADO
Alcalóides	Dragendorf	Negativo
Flavonóides	PEG (Polietinoglicol)	Positivo
Triterpenos	Anisaldeído	Positivo
Saponinas	Índice de espuma	Positivo
Taninos	Ferricianeto de potássio 1%	Positivo

3. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO A FRIO (EBHF) EM COLUNA SECA.

O fracionamento do EBHf em coluna seca resultou em três frações: fração polar (FP), fração de média polaridade (FMP) e fração apolar (FA). A separação dos compostos presente nas frações pode ser vista na placa cromatográfica deste fracionamento, revelada com anisaldeído (figura 7).

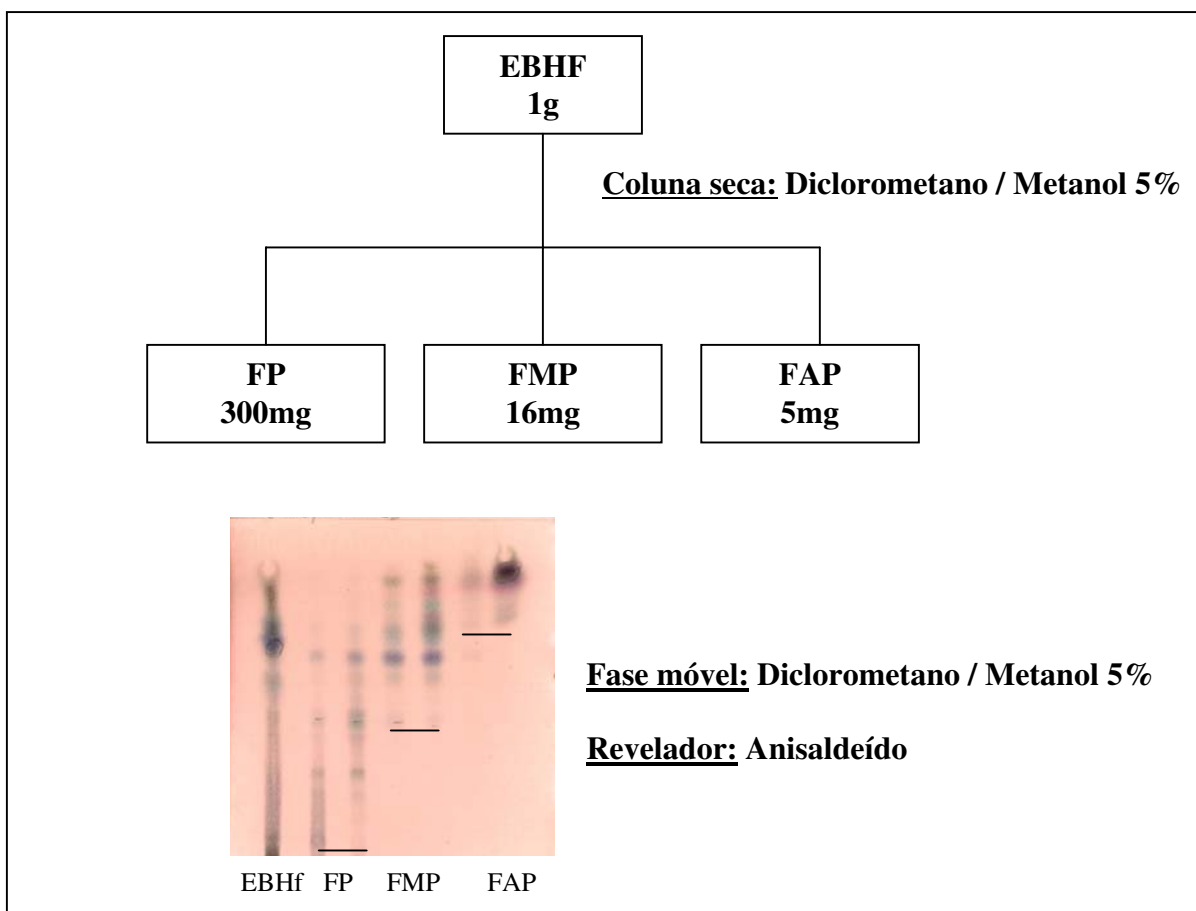


Figura 7: Fluxograma e placa cromatográfica do fracionamento do (EBHf) em coluna seca. onde FP, FMP e FAP representam as frações polares, de média polaridade e apolar respectivamente.

4. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO POLAR (FP) EM COLUNA CLÁSSICA

A purificação da FP em coluna clássica resultou em nove frações: FD (Diclorometano puro), F5%(Dicloro/Metanol 5%), F7%, F9%, F15%, F20%, F30%, F50%, FM (metanol puro). A separação dos compostos presente nas frações pode ser vista na placa cromatográfica deste fracionamento revelada com anisoaldeído (figura 8).

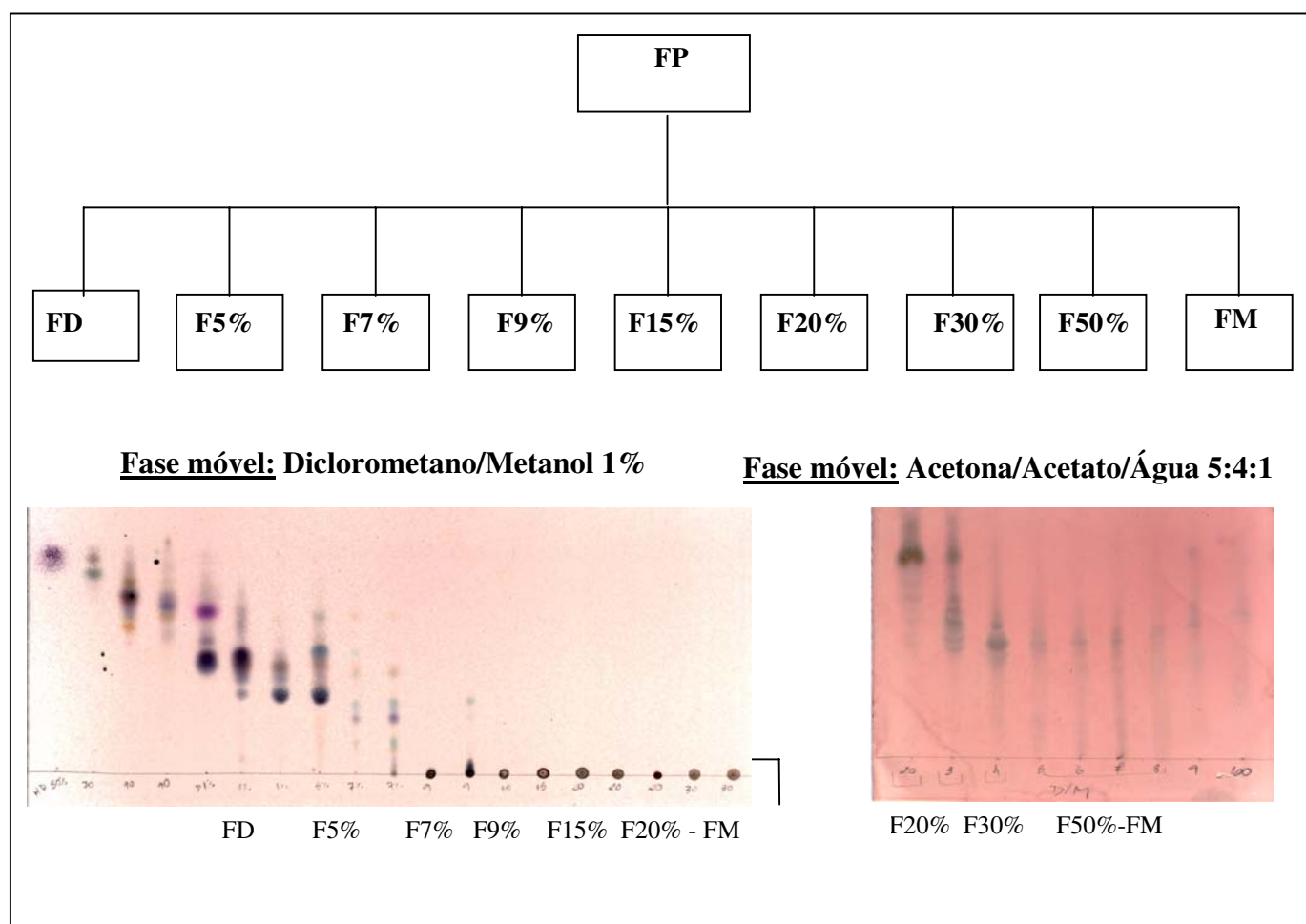


Figura 8 : Fluxograma e placa cromatográfica da purificação da fração polar (FP) em coluna clássica.

5. FRACIONAMENTO DO EBHF POR PARTIÇÃO EM FUNIL DE SEPARAÇÃO

O fracionamento do EBHf por partição em funil de separação está representado na figura 9.

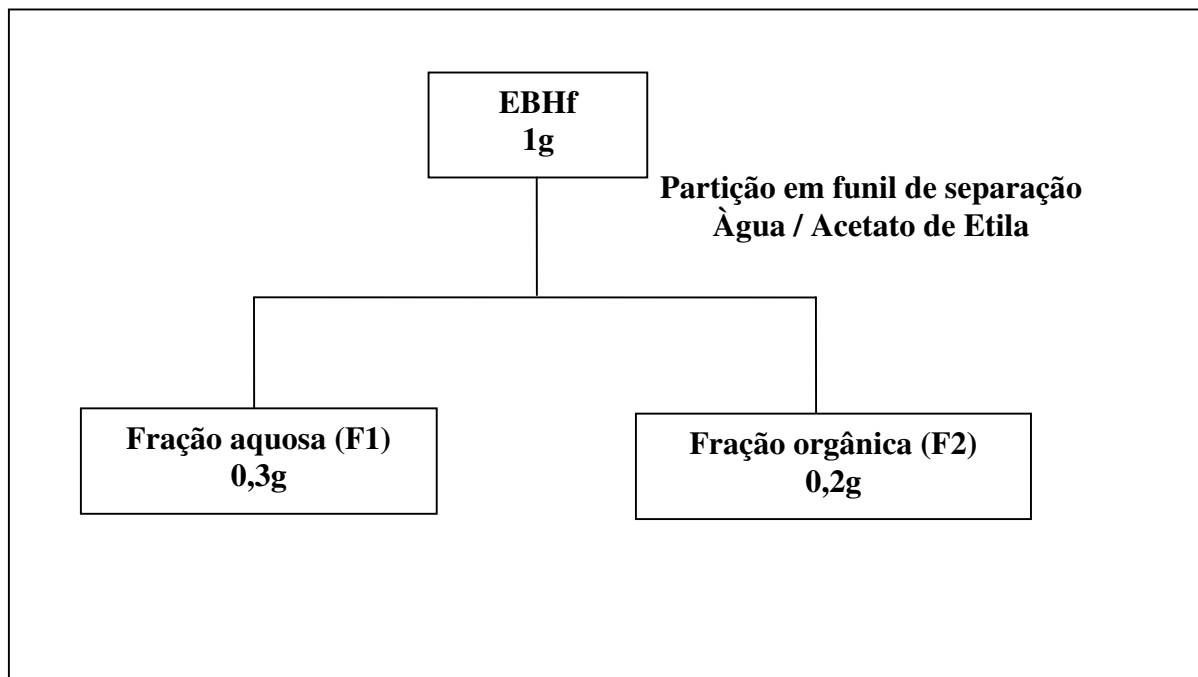


Figura 9: Fluxograma do fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico a Frio (EBHf) por partição em funil de separação.

6. HIDRÓLISE DA FRAÇÃO AQUOSA (F1)

A hidrólise da F1 está representada na figura 10.

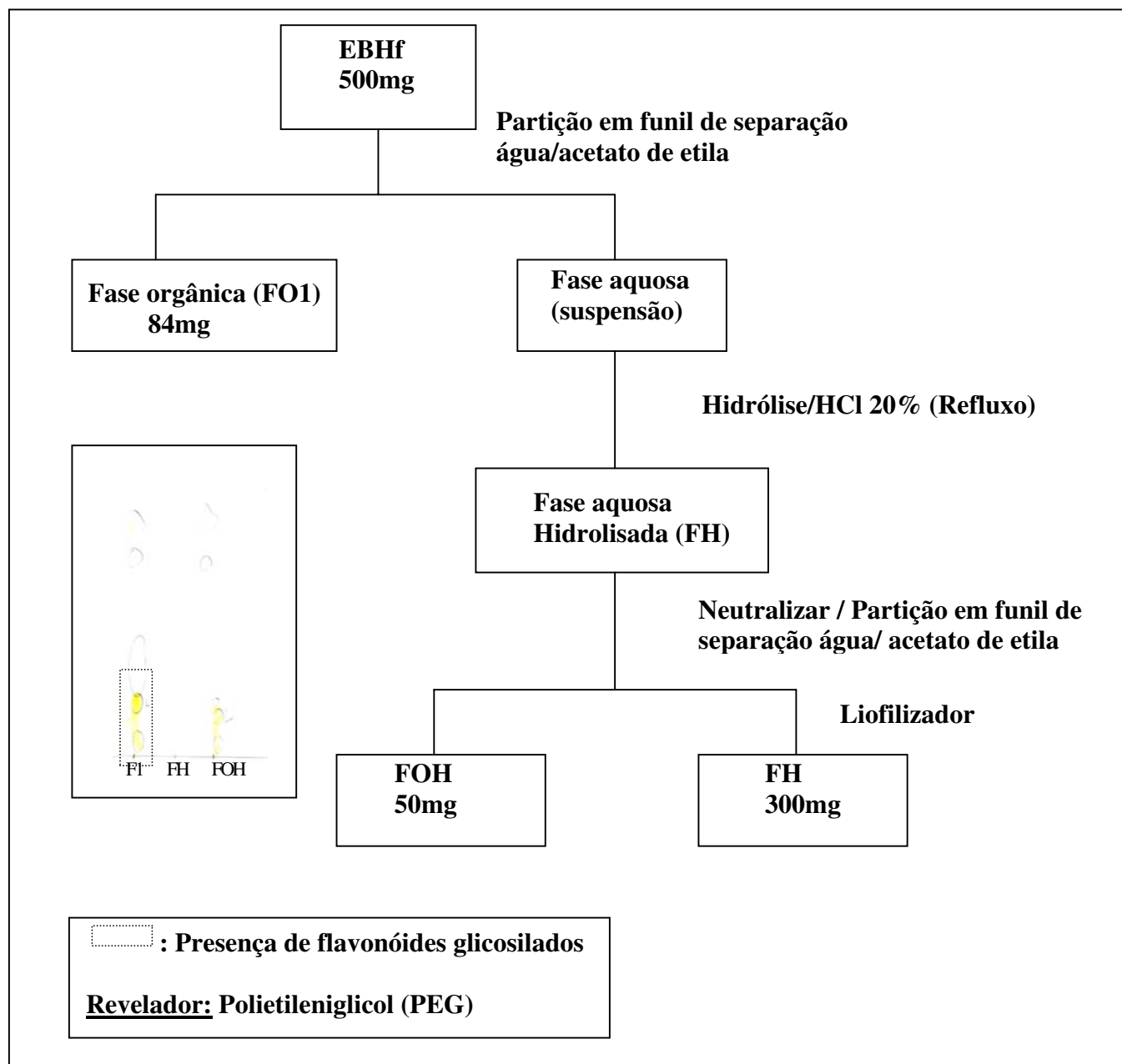


Figura 10: Fluxograma e placa cromatográfica dos produtos da hidrólise da fração aquosa (F1).

7. TESTES FARMACOLÓGICOS

7.1. Atividade Antiproliferativa da Doxorrubicina (Controle)

A figura 24 representa a curva concentração-resposta da doxorrubicina, droga utilizada como controle positivo, sobre as linhagens celulares, que apresentou atividade citostática para todas as linhagens celulares na concentração de 2,5µg/ml com exceção da linhagem de mama resistente (NCI.ADR). Na concentração de 25µg/ml foi citocida para melanoma (UACC) e pulmão NCI.460) e na concentração maior, para melanoma (UACC), pulmão (NCI. 460) leucemia (K.562) e rim (786.0).

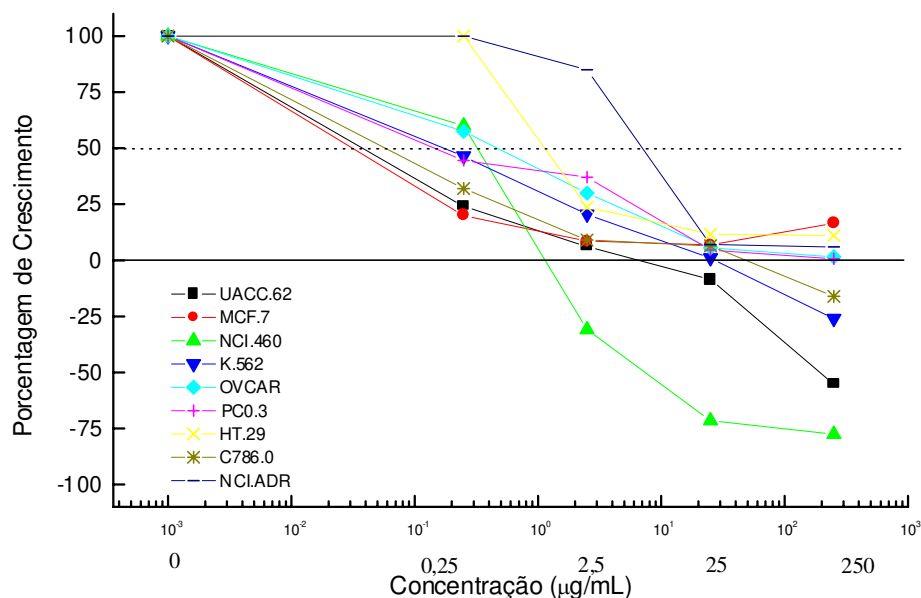


Figura 11: Curva concentração-resposta da Doxorrubicina sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da droga utilizada.

7.2. Atividade Antiproliferativa dos Extratos Brutos Diclorometânico (EBD) Etanólico (EBE) e Hidroalcoólico (EBHf).

A figura 12 representa a curva concentração-resposta do Extrato Bruto Diclorometânico das folhas (EBD) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento das células e a concentração de extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que este extrato apresenta atividade citostática, inibição do crescimento (abaixo de 50%), em algumas linhagens celulares como leucemia (K562), Mama resistente (NCI-ADR), próstata (PC0.3), e melanoma (UACC.62), na concentração de 25 µg/ml e citocida (abaixo de zero) para a linhagem celular de leucemia na concentração mais elevada.

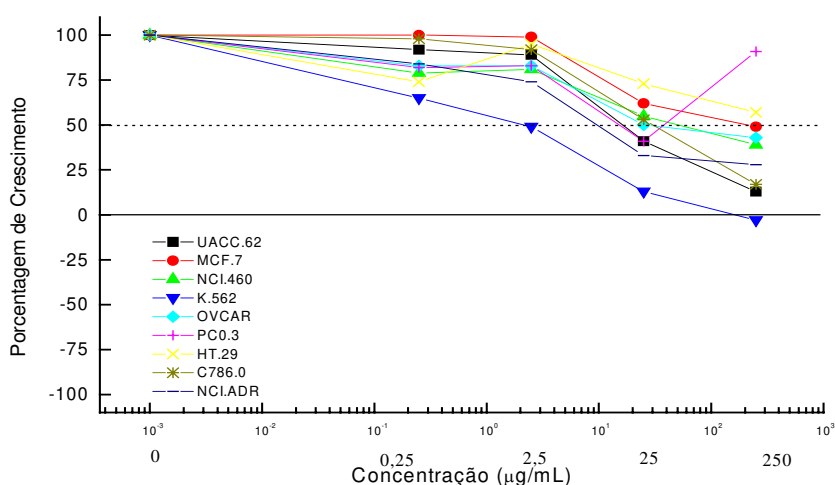


Figura 12: Curva concentração-resposta do Extrato Bruto Diclorometânico das (EBD) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

A figura 13 representa a curva concentração-resposta do Extrato Bruto Etanólico (EBE) sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que este extrato apresenta atividade citostática sobre todas as linhagens celulares, na concentração de 25µg/ml com exceção da linhagem de cólon (HT.29). Na concentração de 250µg/ml ocorreu atividade citostática para todas as linhagens, apresentando seletividade citocida para a linhagem renal (C786.0) e leucêmica (K562).

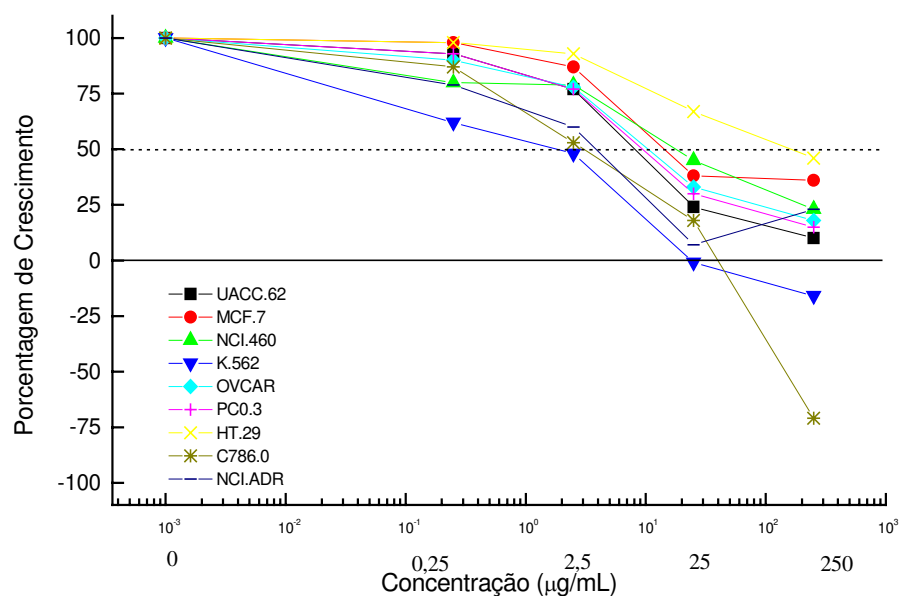


Figura 13: Curva concentração-resposta do Extrato Bruto Etanólico (EBE) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

A figura 14 representa a curva concentração-resposta do Extrato Bruto Hidroalcoólico a frio (EBHf) sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que este extrato apresenta atividade citostática, para as linhagens celulares de mama (MCF.7), próstata (PC0.3), renal (C786.0) e cólon (HT.29), na concentração de 2,5 μ g/ml e citocida para todas linhagens celulares com excessão da linhagem de mama resistente (NCI-ADR) e pulmão (NCI.460) na concentração de 25 μ g/ml. Na concentração mais elevada, somente a linhagem de pulmão (NCI.460) foi resistente a morte celular.

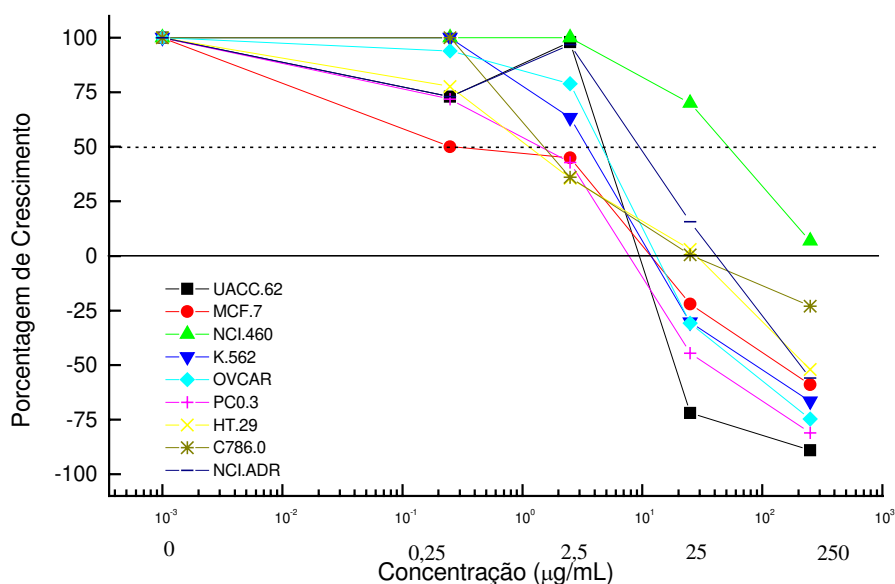


Figura 14: Curva concentração-resposta do Extrato Bruto Hidroalcoólico a frio (EBHf) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

7.3. Atividade Antiproliferativa da Fração Polar (FP), Fração de Média Polaridade (FMP) e Fração Apolar (FAP) Resultantes do Fracionamento do EBHf em Coluna Seca.

A figura 15 representa a curva concentração-resposta da fração polar (FP) sobre as linhagens celulares. Esta fração apresentou atividade citostática para todas as linhagens celulares e citocida para a linhagem celular de ovário (OVCAR) na concentração de 2,5µg/ml. Na concentração de 25µg/ml, apresentou atividade citostática para as linhagens de cólon (786.0), próstata (PCO.3), renal (HT.29), mama (MCF.7) e leucemia (K.562). Na concentração maior, ocorreu citotoxicidade de todas as linhagens com exceção da K.562.

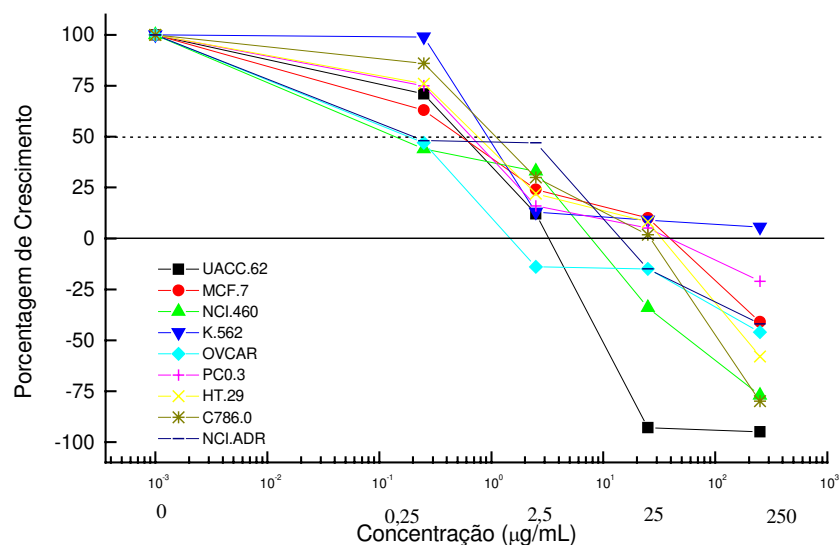


Figura 15: Curva concentração-resposta da fração polar (FP) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

A figura 16 representa a curva concentração-resposta da fração de média polaridade (FMP) sobre as linhagens celulares. Esta fração apresentou na concentração de 2,5 e 25 $\mu\text{g/ml}$, atividade citostática e seletiva para a linhagem celular de ovário (OVCAR). Na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$, apresentou atividade citocida para esta linhagem e também para melanoma (UACC).

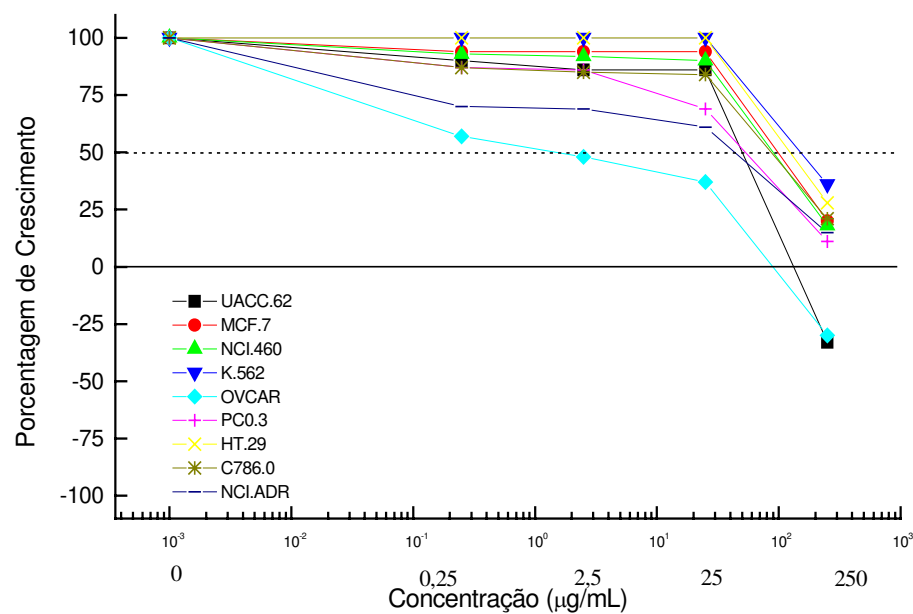


Figura 16: Curva concentração-resposta da fração de média polaridade (FMP) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

A figura 17 representa a curva concentração-resposta da fração apolar (FAP) sobre as linhagens celulares. Esta fração apresentou nas concentrações de 0,25; 2,5 e 25µg/ml, atividade citostática e seletiva para a linhagem celular de ovário (OVCAR). Na concentração de 250µg/ml, apresentou atividade citocida para esta linhagem e também para melanoma (UACC), rim (786.0), mama resistente (NCI.ADR).

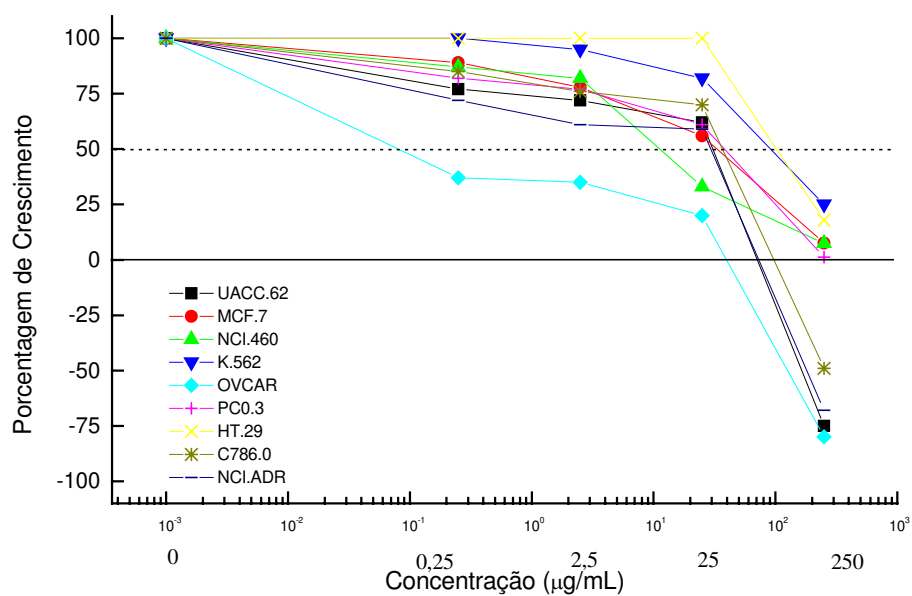


Figura 17: Curva concentração-resposta da fração apolar (FAP) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

7.4. Atividade Antiproliferativa das Frações Resultante do Fracionamento da Fração Polar (FP) em Coluna Clássica.

A figura 18 representa a curva concentração-resposta da fração dicloro/metanol 7% (F7%) sobre as linhagens celulares. Esta fração apresentou atividade citostática para todas as linhagens celulares na concentração de 25 µg/ml e seletividade citocida para as linhagens celulares de leucemia (K.562), melanoma (UACC). Na concentração de 250 µg/ml., apresentou atividade citocida para as linhagens de leucemia (K.562), melanoma (UACC). Renal (786.0) e pulmão (NCI.460).

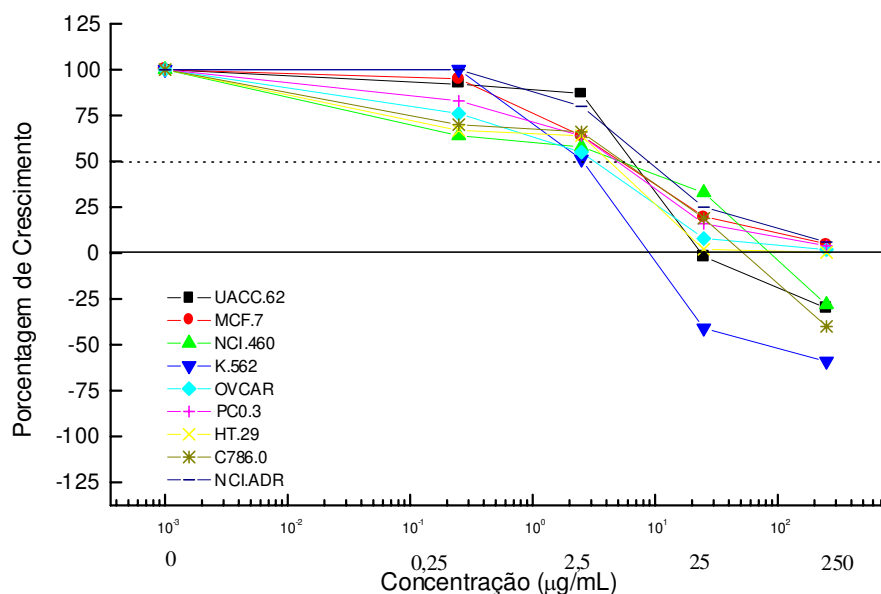


Figura 18: Curva concentração-resposta da fração (F7%) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

A figura 19 representa a curva concentração-resposta da fração dicloro/metanol 30% (F30%) sobre as linhagens celulares. Esta fração apresentou atividade citostática para todas as linhagens celulares na concentração de 25µg/ml sendo citocida para as linhagens celulares de leucemia (K.562), melanoma (UACC), cólon (HT.29) e mama resistente (NCI.ADR). Na concentração de 250µg/ml., apresentou atividade citocida para todas as linhagens.

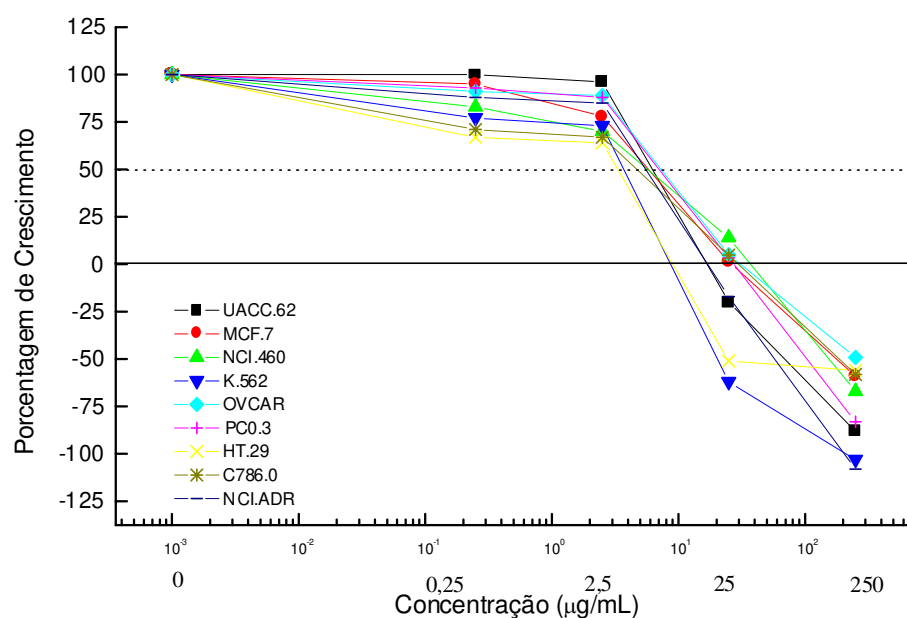


Figura 19: Curva concentração-resposta da fração (F30%) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

A figura 20 apresenta a curva concentração-resposta da fração dicloro/metanol 50% (F50%) sobre as linhagens celulares. Esta fração apresentou atividade seletiva para a linhagem celular de ovário (OVCAR), sendo citostática na concentração de 25µg/ml., e citocida na concentração de 250µg/ml.

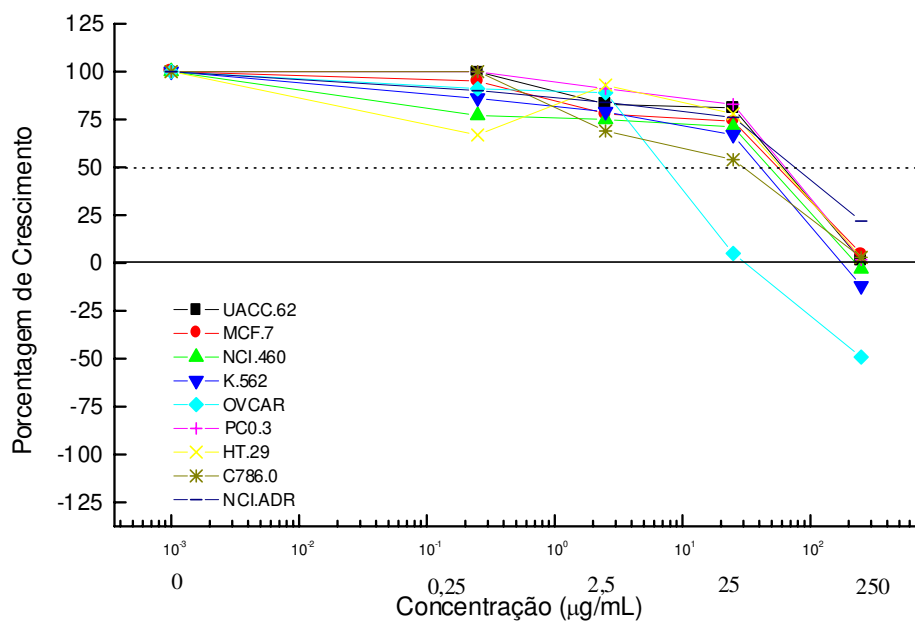


Figura 20: Curva concentração-resposta da fração (F50%) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

7.5. Atividade Antiproliferativa das Frações Aquosa (F1) e Orgânica (F2).

A figura 21 representa a curva concentração-resposta da fração (F1) sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que esta fração apresenta atividade citocida para as linhagens celulares de Próstata (PC0.3), leucemia (K.562), rim (C786.0), ovário (OVCAR), melanoma (UACC-62) e cólon (HT.29), na concentração de 25µg/ml e citocida para todas linhagens celulares com exceção da linhagem de mama resistente (NCI-ADR), na concentração maior.

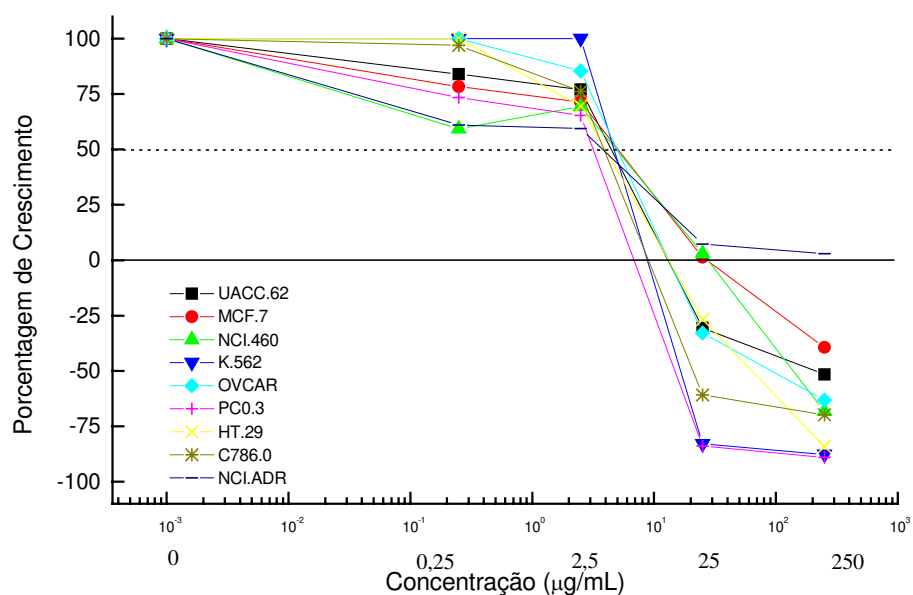


Figura 21: Curva concentração-resposta da fração (F1) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

A figura 22 representa a curva concentração-resposta da fração (F2) sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que esta fração apresenta atividade citostática para as linhagens celulares de próstata (PC0.3), leucemia (K.562), rim (C786.0), melanoma (UACC-62), mama (MCF.7) e cólon (HT.29), na concentração de 25µg/ml e citocida com seletividade para as linhagens celulares de próstata (PC0.3), leucemia (K.562), renal (C786.0) e ovário (OVCAR) na concentração maior.

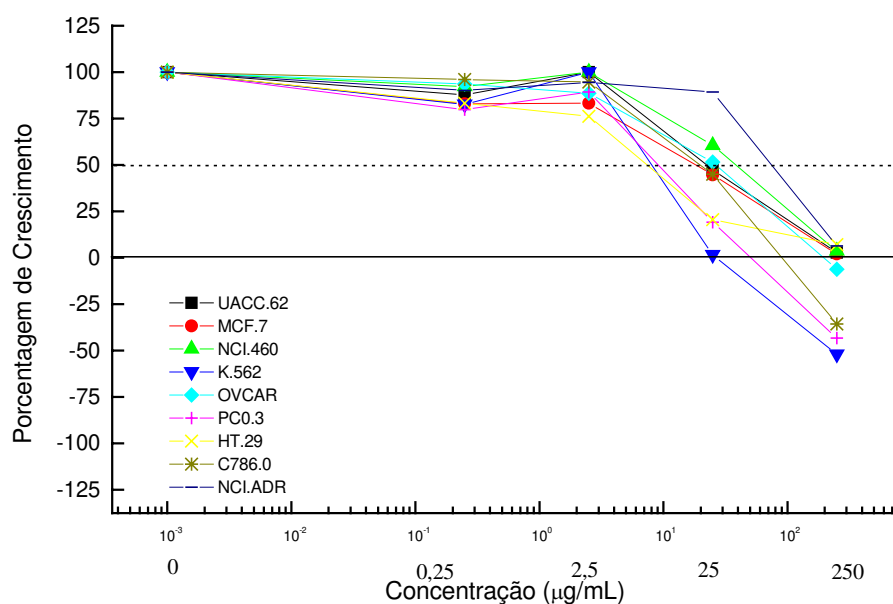


Figura 22: Curva concentração-resposta da fração (F2) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

7.6. Atividade Antiproliferativa da Fração Aquosa Hidrolisada (FH)

A figura 23, representa a curva concentração-resposta da fração Hidrolisada (FH) sobre as linhagens celulares. Esta fração demonstrou atividade citostática apenas para a linhagem de cólon (HT.29) nas concentrações de 25 e 250 µg/ml e citotóxica para leucemia (K.562) nas concentrações de 2,5, 25 e 250 µg/ml.

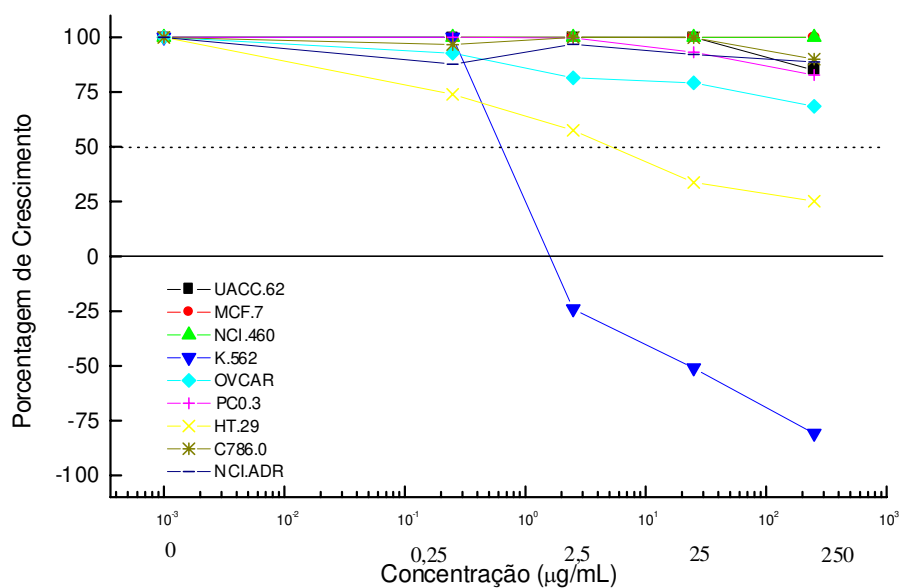


Figura 23: Curva concentração-resposta da fração Hidrolisada (FH) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

7.7. Atividade Antiproliferativa da Fração Orgânica Hidrolisada (FOH)

A figura 24 representa a curva concentração-resposta da fração (FOH) sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que esta fração apresenta atividade citostática para as linhagens celulares de leucemia (K.562), Ovário (OVCAR) e cólon (HT.29), na concentração de 25µg/ml e citocida para todas linhagens celulares na concentração de 250µg/ml.

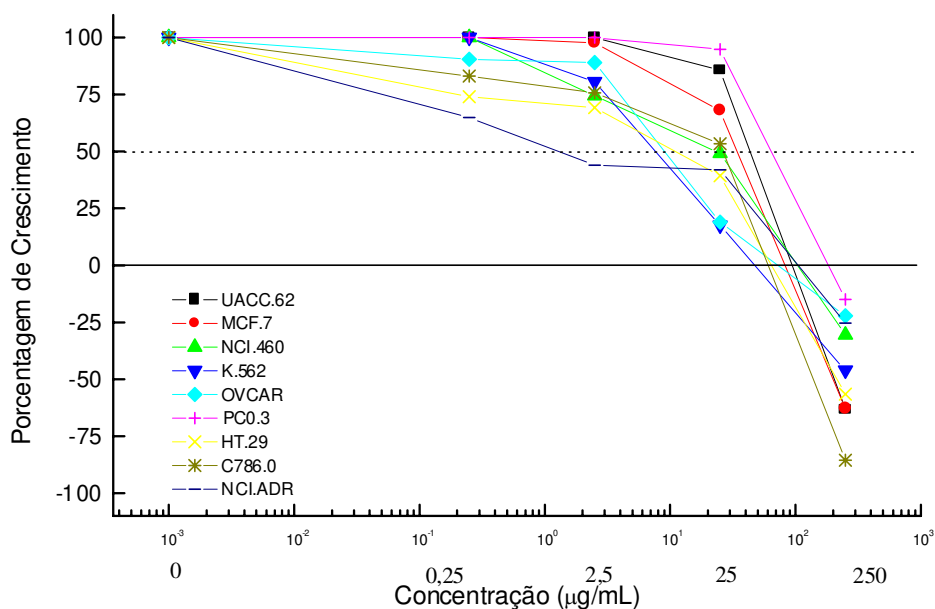


Figura 24: Curva concentração-resposta da fração orgânica hidrolisada (FOH) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

8. CÁLCULO DA IC₅₀ (Concentração que inibe 50% do crescimento)

Na Tabela 5 estão representadas as IC₅₀ do Extrato Bruto Hidroalcoólico a Frio (EBHf) e da Fração Aquosa (F1), das nove linhagens celulares. O EBHf e F1 foram considerados respectivamente, o extrato bruto e fração de maior atividade antitumoral.

Tabela 5: Valores da IC 50 (µg/ml) do EBHf de *D. vinosum* e da F1 obtida desse extrato.

	EBHf	F1
UACC	7,15	9,3
MCF.7	15,7	15,2
NCI.ADR	36	8,2
786.0	1,7	6,8
NCI.460	15,6	32,6
K.562	7,6	8,1
PC.03	9,05	7,4
OVCAR	11,7	9,2
HT.29	19,2	16,1

Discussão

No fim do século XIX e início do século XX, foram isolados os primeiros compostos de produtos vegetais, incluindo alcalóides como morfina, estricnina, quinina e outros, marcando uma nova era na obtenção de medicamentos e iniciando a pesquisa moderna com plantas medicinais (Philipson 2001).

A metodologia de triagem antiproliferativa *in vitro*, preconizada pelo NCI/EUA e utilizada neste trabalho realizado na divisão de farmacologia do CPQBA/UNICAMP, permite a avaliação de substâncias de origem vegetal em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade, rapidez, eficiência e reprodutibilidade (Skehan et al., 1990).

A espécie *Didymopanax vinosum* (Araliaceae) foi selecionada para estudo sendo seus extratos e frações submetidos a teste de atividade antiproliferativa em células tumorais humanas.

Inicialmente, foram obtidos os extratos brutos diclorometano (EBD), rico em compostos de baixa polaridade e etanólico (EBE), enriquecido em compostos de média e alta polaridade. Estes extratos foram submetidos a um prévio ensaio antiproliferativo e o EBE apresentou melhor atividade ocorrendo, na concentração de 25 µg/ml, efeito citostático (inibição do crescimento) para todas as linhagens, exceto para cólon (HT.29), e atividade citocida (morte celular) com seletividade para as linhagens de leucemia (K. 562) e rim (C786.0).

Para melhorar a eficiência na extração de compostos polares, o material vegetal, agora seco em estufa, foi extraído com etanol 70% a frio por maceração dinâmica, e a quente por refluxo. Dessa extração resultaram os extratos brutos hidroalcoólicos a frio (EBHf) e os extratos brutos hidroalcoólicos a quente (EBHq).

O EBHf apresentou melhor atividade em relação ao EBE sendo citostático para as linhagens celulares de mama (MCF.7), próstata (PC0.3), rim (C786.0) e cólon (HT.29), na concentração de 2,5µg/ml e citocida para todas linhagens celulares com exceção da linhagem de mama resistente (NCI-ADR), sendo portanto selecionado para o fracionamento. Através dos cálculos da IC50% foi verificado que esse extrato foi mais ativo para as linhagens de (UACC) melanoma , rim (786.0) leucemia (K.562) e próstata (PC.03).

O EBHf foi submetido a uma triagem fitoquímica por cromatografia de camada delgada para identificação das principais classes de compostos para assim, direcionar de uma forma mais adequada o fracionamento. Dentre os componentes presentes, foram obtidos resultados positivos para, taninos, saponinas, triterpenos, e flavonóides.

Taninos são compostos fenólicos e hidrossolúveis que estão associados primariamente com a defesa das plantas contra insetos e animais herbívoros, e que podem apresentar efeitos benéficos quando presentes na dieta de animais e humanos. Além disso, possuem algumas atribuições, funcionando como antiparasitários, em especial nematóides (Kang et.al., 2000), antimicrobiano, inibindo a atividade de vírus, bactéria, fungos e protozoário, incluindo

principalmente patógenos do trato digestivo (Chung et al., 1998). Esta classe de compostos possuem ainda efeitos antioxidantes, antiinflamatórios, estimulante sobre a angiogênese (Ferguson, 2001) e apoptose em células de leucemia (Yang et al, 2000).

O fracionamento do EBHf em coluna seca deu origem a 3 frações: a fração polar (FP), a de média polaridade (FMP), e apolar (AP) . Estas frações foram classificadas desta forma de acordo com o perfil cromatográfico apresentado na figura 7. A fração FP, rica em compostos polares, foi a que apresentou uma atividade mais significativa, sendo que já na concentração de 2,5µg/ml, demonstrou atividade citostática para todas as linhagens e citocida - seletiva para ovário (OVCAR). Na concentração de 25µg/ml, foi também citocida para mama resistente (NCI-ADR), pulmão (NCI.460) e melanoma (UACC) e na de 250µg/ml para todas as linhagens com exceção da linhagem de leucemia.

A FMP enriquecida com compostos de média polaridade apresentou na concentração de 2,5 e 25µg/ml, atividade citostática e seletiva para a linhagem celular de ovário (OVCAR). Na concentração de 250µg/ml, apresentou atividade citocida para esta linhagem e também para melanoma (UACC). A FAP constituída de compostos apolares demonstrou também, nas concentrações de 0,25; 2,5 e 25µg/ml, atividade citostática e seletiva para a linhagem celular de ovário (OVCAR) sendo citocida na concentração de 250µg/ml.

A purificação da FP realizada em coluna clássica resultou em 9 frações sendo as mais ativas a fração dicloro/metanol 7% (F7%), a F30% e a F50%. A F7% apresentou, na concentração de

25µg/ml, atividade citocida e seletiva para as linhagens celulares de leucemia (K.562), e melanoma (UACC) e na concentração de 250µg/ml, apresentou atividade citocida para as linhagens de leucemia (K.562), melanoma (UACC). Rim (786.0) e pulmão (NCI.460).

A F30% foi mais potente, sendo que na concentração de 25µg/ml, apresentou atividade citostática para linhagens de rim (786.0), pulmão (NCI.460), próstata, (PC.03) ovário (OVCAR) e mama (MCF.7) sendo citocida para leucemia (K.562), cólon (HT.29), mama resistente (NCI.ADR) e melanoma (UACC). Na concentração de 250µg/ml todas as linhagens apresentaram citotoxicidade.

A fração F50% apresentou atividade seletiva para a linhagem celular de ovário (OVCAR), sendo citostática na concentração de 25µg/ml, e citocida na concentração de 250µg/ml.

O Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHf) foi submetido a um novo fracionamento, na tentativa de se identificar os possíveis compostos polares, responsáveis pela atividade antiproliferativa da espécie *Didymopanax vinosum*.. Foi realizado então uma partição em funil de separação, utilizando como solventes acetato de etila (média polaridade) e água destilada (alta polaridade), resultando em duas novas frações: a fração aquosa (F1) e fração orgânica (F2).

Ambas as frações, apresentaram atividade antiproliferativa sendo que a F1 na concentração de 25µg/ml, teve efeito citocida para linhagens de ovário (OVCAR), próstata (PC0.3),

leucemia (K.562), melanoma (UACC.62), rim (HT.29), e cólon (786.0) enquanto que em F2, o efeito, na mesma concentração, foi somente citostático para estas linhagens.

A fração (F1) apresentou grande quantidade de saponinas, observadas pelo alto índice de espuma presente na amostra. As saponinas são glicosídeos de esteróides ou terpenos policíclicos, possuindo uma estrutura com característica hidrofóbica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares) que em solução aquosa, formam espuma persistente e abundante. Possuem elevada solubilidade em água e em alta concentração, podem causar ruptura de membrana ou induzir a apoptose, e ainda reagir com esteróides de membrana, alterando sua função causando arresto do ciclo celular (Simões, 1999 & Khalil, 1994).

As saponinas triterpênicas encontram-se predominantemente em dicotiledôneas da famílias Sapinaceae, Hippocastanaceae, Sapotaceae, Araliaceae, entre outras. Dentre os compostos isolados da espécie *Panax ginseng* (Araliáceae) encontram-se principalmente saponinas triterpênicas, que podem estar relacionados com seus efeitos farmacológicos (Schulz & Haensel, 1996).

A mesma espécie apresentou, em ensaios antiproliferativos, efeito citotóxico em células cancerígenas. Essa espécie tem sido utilizada na medicina tradicional da China, Japão e Coreia por pacientes com câncer (Chang et al, 2003). Segundo Konoshima et al (1999), o extrato da raiz da espécie *Panax ginseng* exibiu atividade antitumoral significativa em câncer de pele em ratos. A substância Ginsenoside Rh2 (G-Rh2) isolada da raiz da mesma espécie,

mostrou efeitos anti-proliferativos em certos tipos de cânceres, entre eles, o de mama. A mesma substância, em outros estudos, inibiu o crescimento de células de melanoma e a proliferação de várias linhagens celulares de câncer de ovário em ratos. (Oh et al, 1999).

Algumas classes de substâncias são características de uma família botânica, de um gênero ou mesmo de uma única espécie ou seja, se um produto natural apresentar atividades terapêuticas interessantes, será possível encontrar substâncias análogas em uma espécie do mesmo gênero ou da mesma família (Hostettmann, 1997).

A hidrólise da fração aquosa (F1) foi realizada para verificação de compostos glicosilados, no caso de flavonóides glicosilados. A presença destes compostos foi confirmada após realização deste processo químico.

A fração aquosa hidrolisada (FH), não apresentou atividade significativa para as linhagens celulares, enquanto que a fração orgânica hidrolisada (FOH) mostrou atividade citostática para as linhagens de leucemia (K.562), rim (HT.29), mama resistente (NCI.ADR) e pulmão (NCI.460), na concentração de 25µg/ml e citocida para todas linhagens celulares na concentração de 250µg/ml.

As frações F1, FOH e FH , foram analisadas por cromatografia em camada delgada sendo nas duas primeiras, manchas amareladas foram visualizadas após revelação com polietilenoglicol (PEG), revelador específico para flavonóides. Já a FH, não apresentou

mesmo padrão, evidenciando que estes compostos não estavam presente na sua constituição (figura 10).

A atividade de F1 provavelmente deve estar associada à presença de flavonóides glicosilados enquanto que a atividade de FOH à flavonóides não glicosilados. Com a hidrólise de F1, houve quebra na conjugação glicosídeo-flavonóide e as agliconas resultantes tornaram-se mais solúveis em solvente orgânico (acetato de etila).

Os flavonóides são compostos polifenólicos complexos que apresentam um estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) (figura 25). Pertencem a família dos flavonóides os subgrupos flavonóis, flavanonas, antocianinas, flavonas e flavonóis sendo que as diferenças individuais resultam de uma variação no número e posição dos grupamentos hidroxilas, por modificações nos núcleos (saturação), e pelo grau de metilação e glicosilação, que afetam várias propriedades dos flavonóides, particularmente a hidrofobicidade (Harbone, 2000).

Estes compostos encontram-se na maioria, conjugados com açúcar (heterosídeos), os quais são mais solúveis em água do que aqueles não conjugados (agliconas) e requerem ação enzimática para quebra desse ligação, onde o açúcar é liberado e as agliconas são então absorvidas. A glicose é o carboidrato mais usual, mas outros resíduos de açúcar podem também ser encontrados (Hendrich et al, 1998).

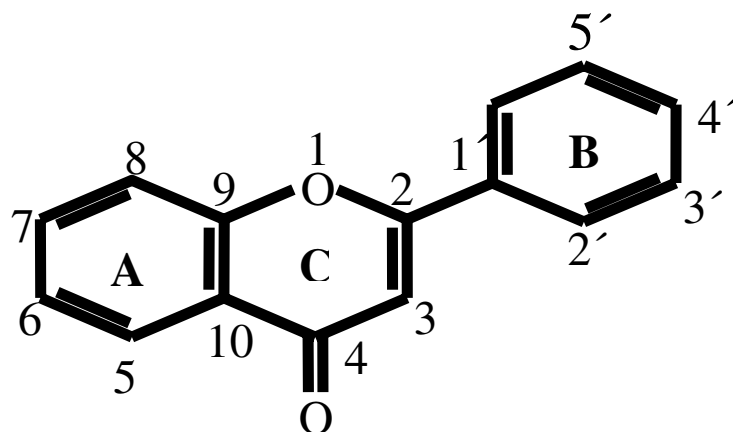


Figura 25: Estrutura básica de um flavonóide

Existem muitos trabalhos que descrevem os efeitos farmacológicos dos flavonóides, entre eles atividade antiinflamatória, imunomoduladora, antioxidante, diurética, antiespasmódica, antimicrobiana e anticancerígena (Middleton et al, 2000). Flavonóides reagem *in vitro* com peroxidonitrito, podendo ser considerados como agentes antiinflamatórios potenciais (Boveris et al., 2000).

Recentemente, uma atenção especial tem sido dirigida para esta classe de compostos pela habilidade que apresentam em inibir o ciclo celular, a proliferação, além de indução da apoptose e estímulo da resposta do sistema imune. Muitos flavonóides e isoflavonóides tem demonstrado inibição da proliferação celular em células tumorais humanas. Segundo Birt (2001), cinco flavonóides e dois isoflavonóides avaliados em cultura de células tumorais, apresentaram atividade antiproliferativa em linhagens de cólon (HT.29 e Caco-2), com mecanismo de indução de apoptose. Outros estudos realizados em cultura de células tumorais de leucemia (HL-60), mama (MCF.7), pescoço (A 549) revelaram a atividade desta classe de compostos.

Muitos estudos associam a importância dos antioxidantes naturais com a frequência reduzida de doenças cardíacas, diabetes e câncer. Compostos polifenólicos como os flavonóides, presentes em vegetais, frutas e outras ervas medicinais, parecem prevenir o câncer através de ação antioxidante, atuando também nas fases de iniciação, promoção e progressão do tumor (Yang et al., 2001).

Estes compostos são encontrados em grande quantidade no "chá verde" bebida bastante consumida na medicina Chinesa por conter propriedades anticâncer. Este chá é produzido a partir de folhas de *Camellia sinensis*, constituído basicamente por catequinas sendo a principal delas a epigalocatequina-3-galato (EGC-3 galato). Esta substância atua nas diferentes fases do desenvolvimento tumoral (iniciação, promoção e progressão) bem como no processo de angiogênese (vascularização do tumor) (Anoop, 2002). Os polifenóis presentes no chá podem ainda afetar os mecanismos apoptóticos através da supressão dos genes antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-x_L, os quais são superexpressos em células malignas (Leone, 2003)

A F1 ainda apresentou maior potência em relação a doxorubicina, droga utilizada como controle nos testes realizados. Este fármaco é um eficaz agente quimioterápico, sendo utilizado largamente tanto no tratamento de leucemias e linfomas, como também em muitos tumores sólidos. Possui como mecanismo de ação a capacidade de se ligar ao DNA, inibindo tanto a sua síntese quanto a de RNA, mas sua principal ação parece ser mediada por um efeito sobre a topoisomerase II, enzima associada a condensação do DNA. A doxorubicina

intercala-se ao DNA e estabiliza o complexo DNA-Topoisomerase II, fazendo com que o ciclo celular cesse nesse ponto (Epstein, 1998).

Alguns flavonóides como a quercetina, fisetina, miricetina, kampherol inibiram as topoisomerasas I e II. Estes compostos têm mostrado, em pesquisas recentes, ação terapêutica anticâncer onde atuam modificando, inibindo ou ativando uma série de enzimas em mamíferos, dentre elas as topoisomerasas humanas (Lopez et al, 2002).

Através dos resultados obtidos ao longo deste trabalho, foi possível relacionar a atividade antiproliferativa da fração aquosa (F1) obtida do Extrato Bruto Hidroalcoólico a frio (EBHf) de *D.vinosum* com a presença de flavonóides glicosilados, não descartando a possibilidade de estar também associada a grande quantidade de saponinas na amostra que podem ter agido como coadjuvante já que possuem efeito sobre membranas.

Conclusão

O extrato bruto hidroalcoólico (EBHf) obtido de *Didymopanax vinosum* foi considerado o mais ativo, em especial para as linhagens celulares de (UACC) melanoma, rim (786.0) leucemia (K.562) e próstata (PC.03).

A Triagem fitoquímica do EBHf revelou a presença de compostos polares como taninos, saponinas e flavonóides.

A fração aquosa (F1) foi considerada a mais ativa, sendo citotóxica para todas as linhagens celulares com exceção da linhagem mama resistente (NCI.ADR) Foi ainda mais potente que a doxurrubicina, droga empregada no tratamento quimioterápico.

A F1 revelou a presença de flavonóides glicosilados após hidrólise e uma grande quantidade de saponinas. Ambos os compostos foram associados a atividade antitumoral.

Referências Bibliográficas

- ANOOP, K. Green tea constituent epigallocatechin-3-galato inhibits angiogenic differentiation of human endothelial cells. *Arch. of Bioch. and Bioph*, 401: 29-37, 2002.
- BIRT, F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90: 157-177, 2001.
- BOVERIS, A.; ALVAREZ S.; ATNAIZ, SA.; VALDEZ, L. Handbook of antioxidant. Eds., 2000, p.351.
- BOYD, MR. Status of the NCI Preclinical Antitumor Drug Discovery Screen. *Princ. & Practice of Oncol.*, 10: 1-12, 1989.
- CALIXTO, JB. Efficacy, Safety, Quality Control, Marketing and Regulatory Guidelines for Herbal Medicines (Phytotherapeutic Agents). *Braz J. Med Biol Res*, 33: 179-189, 2000.
- CHUNG, K.; LU, Z.; CHOU, MW. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on growth of intestinal bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, 36: 1053-1060, 1998.
- COELHO, FRG. Controle do Câncer. In: BRENTANI, MM; COELHO, FRG.; IYEYASU, H.; KOWALSHI, LP. Bases da Oncologia. São Paulo: Marina, 1998. Cap.1, p. 1-25.
- CORDELL, GA Biodiversity and drug discovery - A symbiotic relationship. *Pytochemistry*, 55: 463-480, 2000.
- COTRAN, RS; KUMAR, V.; COLLINS, T: Patologia Estrutural e Funcional .In: Neoplasia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 8, p. 233-295.
- COX, PA. The ethnobotanical approach to drug discovery: strenghs and limitation. In: CHADWICK DJ, MARSH, J. CIBA Foundation Symposium 185 – Ethnobotany and the search for new drugs: John Wiley & Sons, 1994. p. 25-41.

- CRAGG, GM; NEWMAN, DJ. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Can. Investigation*, 17: 153-163, 1999.
- EPSTEIN, RJ. Topoisomerases in human disease. *Lancet* 1: 521-524, 1998.
- DI STASI, LC. Plantas medicinais : Arte e Ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996, 230 p.
- DRINKWATER, NR; SUGDEN, B. Mecanismos da Carcinogênese. In: Manual de Oncologia Clínica. 5. Ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 1991. p. 147-161.
- ELISABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. *Ciência e Cultura*, 39: 697-702, 1987.
- FERRI, MG. Plantas do Brasil. Espécies do Cerrado. São Paulo: Edgard Blücher, 1969. p.12-13 e 50-1.
- FERGUSON, LR. Role of polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.*, 475: 89-111, 2001.
- FORD, JM. Modulators of multidrug resistance. Preclinical Studies. *Drug Resist. Clin. Oncol. Hemaotol.*, 9: 337-361, 1995.
- GARRETT, MD.; WORKMAN, P. Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third millennium, *Eur. Journ. of Cancer*, 99: 280-284, 1999.
- HARBONE, JB; WILLIAMS, C. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504, 2000.
- HARVEY, AL. Advances in Drug Discovery Techniques. *John Wiley & Sons*, 1998.
- HEMMINKI, K. DNA adducts, mutation and cancer. *Carcinogenesis*, 14: 2007-12, 1993.

- HOSTETTMANN, K. Tout savoir sur le pouvoir des plantes, Editions Favre, Lousanne, 1997.
- ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.; AMOOQUAYE, E.; BURKE, PJ.; SAMPSON, J.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 33-39, 2004.
- KANG, KS.; KANG, BC.; LEE, BJ.; CHE, JH.; LI, GX.; TROSKO, JE.; LEE, YS. Preventive effect of epicatechin and ginsenoside Rb(2) on the inhibition of gap intracellular junctional communication by TPA and H₂O₂. *Cancer Letter*, 152: 97-106, 2000.
- KHALIL, AH.; EL-ADAWAY, TA. Isolation, identification and toxicity of saponins from different legumes. *Food Chem.* 50: 179-201, 1994.
- KONOSHIMA, T; TAKASAKI, M; TOKUDA, H; KYOTO. Anti-carcinogenic activity of the roots of *Panax notoginseng*. Japan: Pharmaceutical University. *Biol Pharm Bull*, 22: 1150-2, 1999.
- LEONE, M. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic bcl-2-family proteins. *Cancer res*, 63: 8118-8121, 2003.
- LOPEZ, M.; CORDERO, M. TORO, MV. AYUSO, MJ. Flavonoids as DNA Topoisomerase poisons. *Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 17: 25-29, 2002.
- LOVE, RR. Manual de Oncologia Clínica. 5. Ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 1991. p. 147-161.

- MANS, DR.; ROCHA, AB.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*, 5: 185-98, 2000
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil.. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. (Online). Disponível: <http://inca.org.br/epidemiologi/estimativa2000> (7 de outubro de 2000).
- MACDONALD, F.; FORD, CHJ. Molecular Biology of Cancer. BIOS Scientific Publishers: Oxford, 2000. p. 1-34.
- MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implication for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacological Reviews* 52: 673-751, 2000.
- MONTESANO, R; HALL, J. Environmental causes of human cancer. *Europ. J. of Cancer* 37: 67-67, 2001.
- NAM, N.H.; PARANG, K. Current targets for anticancer drug discovery. *Curr. Drug Target*, 4: 159-79, 2003.
- WHO. The World Health Report Geneva, 1997.
- OH, M; CHOI, YH; CHOI, S; CHUNG, H; KIM, K; KIM, SI; KIM, DK; KIM, ND. Anti-proliferating effects of ginsenoside Rh2 on MCF-7 human breast cancer cells. Korea: Department of Pharmacy, Pusan National University. *Int J Oncol.*, 14: 869-875, 1999.
- OLIVEIRA, AF; SALATINO A. Major constituents of the foliar epicuticular waxes of species from the Caatinga and Cerrado. Brasil: University of Sao Paulo, Institute of Biosciences. *Naturforsch*, 55: 688-92, 2000.

- PERANTONI, OA . Carcinogenesis. In McKINNELL, RG.; PARCHMENT, RE.;
PERANTONI, AO; PIERCE, GB., The biological Basis of Cancer. Cambrige.
University Press: Cambrige, 1998. Chapter 3, p.79-115.
- PHILLIPSON, JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, 56: 237-243,
2001.
- PITOT, HC.; DRAGAN, YP. Facts and theories concerning the mechanism of
carcinogenesis. *Faseb J.*, 5: 2280-2286, 1991.
- PIO CORRÊA, M. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Inst.
Bras. Desenv. Florestal. Rio de Janeiro, Vol. V, 1969. p.79.
- PONDER, BAJ. Inherited predisposition to cancer. *Trends Genet.*, 6: 213-218, 1990.
- QUEIROZ, EF.; ROBLOT, F.; LAPRÉVOTE, O; SERANI, L.; CAVÉ, A.
HOCQUEMILLER, R. A new monothetrahydrofuran acetogenin from the roots of
Annona spinesces . *Nat. Prod. Let.*, 13: 21, 1999.
- RANG, HP; DALE, MM.; RITTER, JM. Cancer Chemoterapy, In: Pharmacology. 3ed.
Churchill Livingstone, New York: p. 696-717, 1995.
- RATES, SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613, 2001.
- SEDLACEK, HH. CSECH, J, NAIK, RG. Flavopiridol, a new Kinase inhibitor for tumor
therapy. *Int. J. Oncol.*; 9: 1143-1168, 1996.
- SHULTZ, V.; HAENSEL, R. Rationale Phitotherapie. 3.ed.. Berlim: Spriger. 302-305,
1996.
- SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP.; GOSMANN, G.; MELLO, JCP.; MENTZ, L;
PETROVICK, P.R.. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora
da Universidade, p.603-608, 1999.

- SKEHAN, P. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 1107-1112, 1990.
- SMITH, ND; RUBENSTEIN, JN; EGGNER, SE, KOZLOWSKI, JM. The p53 suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J.Urol.*, 169: 1219-1228, 2003.
- TILIGADA, E. MILIGKOS, V. DELITHEOS, A. Cross –talk between celular stress, Cell Cycle and Anticancer Agents: Mechanistic Aspects. *Curr. Med. Chem. Anti-canc Agents*, 2: 553-566, 2002.
- TRICHOPOULOS, D.; LI, FP.; HUNTER, DJ. What causes cancer? *Sci. Amer.* 50-57, 1996.
- VERWEIJ, J.; JONGE, MJA . Achievments and Future of Chemotherapy. *European Jouurnal of Cancer*, 36: 1479-1497, 2000.
- WANI, MC; TAYLOR, HL; WALL, ME; COGOON, P; MCPHAIL, AT. Plant antitumor agent.VI. The isolation and struture of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc*, 93: 2325-2327, 1971.
- WARGOVICH, MJ.; WOODS, C.; HOLLIS, DM.; ZANDER, ME. Herbals, cancer prevention and health. *J. Nutr*, 131: 30345-30346, 2001.
- WEISBURGER, JH. Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future. *Mutation Research*, 480-481: 23-35, 2001.
- YANG, LL.; LEE, CY.; YEN, KY. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Letters*, 157: 65-76, 2000.

YANG, CS.; LANDAU, JM.; HUAN; MT.; NEWMARK, HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review Nutrition*, 21: 381-406, 2001.

ZHANG, JT. New Drugs Derived from Medicinal Plants. *Therapie*, 57: 137-150, 2002.