UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

VANESSA HELENA DA SILVA SOUZA

ATIVIDADE ANTICÂNCER E ANTIEDEMATOGÊNICA DE EXTRATOS E FRAÇÕES ATIVAS OBTIDOS DE *Imperata brasiliensis* Trin.

Campinas
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

VANESSA HELENA DA SILVA SOUZA

ATIVIDADE ANTICÂNCER E ANTIEDEMATOGÊNICA DE EXTRATOS E FRAÇÕES ATIVAS OBTIDOS DE *Imperata brasiliensis* Trin.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica. Área de Ciências Básicas.

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Campinas
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

So89a

Souza, Vanessa Helena da Silva
Atividade anticâncer e antiedematogênica de extratos e frações ativas obtidos de *Imperata brasiliensis* Trin / Vanessa Helena da Silva Souza. Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : João Ernesto de Carvalho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Agentes antineoplásicos. 2. Agentes antiinflamatórios. 3. Atividade antioxidante. 4. Câncer. I. Carvalho, João Ernesto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Antiedematogenic and anticancer activity of extracts and active fractions obtained from *Imperatabrasiliensis*Trin

Keywords:
- Antineoplastic agents
- Antiinflamatory agents
- Antioxidant activity
- Cancer

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:
Profº. Drº. João Ernesto de Carvalho
Profº. Drº. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues
Profº. Drº. Maria de Fátima Cepa Matos

Data da defesa: 24-02-2011

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Vanessa Helena da Silva Souza

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Membros:

1. Profª. Drª. Maria de Fátima Cepa Matos
2. Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues
3. Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/02/2011

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Deus**, onipresente em minha vida, que norteia meus passos e protege aos que amo!

Aos meus pais, **Maria Rita e Lázaro**, exemplos de honestidade, luta e perseverança. Pelo amor incondicional, apoio nos momentos difíceis e palavras de incentivo. Nunca conseguirei retribuir tamanha dedicação !

Aos meus irmãos **Viviane e Vinicius**, pessoas imprescindíveis em minha vida, por todos os finais de semana divertidos, pelas brincadeiras "bobas" que me tiravam um sorriso quando estava endurecendo minha expressão. Que Deus os abençoe e os preserve assim, eternas crianças.

Ao meu querido noivo **Guto**, companheiro de todas as horas, pela compreensão quando estive ausente, pela paciência quando me mostrei impaciente, pelo amor e dedicação. Ao seu lado sou muito feliz !

A **Angélica e Pistelli** pelas comidinhas prontas quando eu estava sem tempo, pela boa música para aliviar o "stress" e pelo carinho.

Àos meus irmãos de coração, **Michelle, Gaby, Vivi, Humberto e Fernando**, que são a prova de que a amizade verdadeira é nutrida de amor, respeito, preocupação, participação e muito carinho. Que nossa amizade seja sempre preservada e fortalecida. Amo vocês!

Aos **amigos da DFT**, Débora, Lary, Giovana Fiorito, Karin, Giovana Longato, Cris, Lauren, Didi, Vinicius, Paulinha, Erikinha, Taty, pela contribuição ao meu crescimento intelectual e pessoal em especial às mulheres guerreiras do laboratório **Sica e Ana Possenti** que estiveram presentes no decorrer do trabalho e contribuiram com sua solicitude, experiência e bom humor.

Aos **amigos da DFITO**, Leila, Fabrício, Inês, Leilane, Karina, Núbia, Sidney, Caio, Ilza, pelo apoio técnico e pelas boas risadas.

Gostaria de agradecer especialmente à **Dra. Ana Lúcia Tasca G. Ruiz e Dra. Mary Ann Foglio** pela co-orientação do trabalho desenvolvido, colaboração profissional e por serem sempre grandes amigas dedicadas e preocupadas. Que Deus as abençoe e as preserve maravilhosas sempre.

Ao Dr**. Rodney Alexandre Rodrigues, Dra. Maria de Fátima Cepa Matos, Dr. Huberto M. Spíndola e Dra. Patrícia C. Dias** pela participação como membros das bancas de qualificação e defesa. A colaboração foi imprescindível para a finalização e melhoramento deste trabalho.

Ao meu orientador **Dr. João Ernesto de Carvalho** pelo apoio, credibilidade e paciência.

Ao programa de pós-graduação em clínica médica da Faculdade de ciências médicas da Unicamp.

Por fim, meus agradecimentos às agências de fomento CNPq, Capes e FAPESP pelo suporte financeiro.

DEDICATÓRIA

À minha avó Maria Marzali (*in memoriam*). que dedicou sua vida à educação de seus filhos e netos e construiu um alicerce sólido de respeito e união da família. Mulher de fibra que nos ensinou valores e prioridades. Meu mais sincero respeito e minha profunda saudade.

...Sua benção, Te amo!

EPÍGRAFE

Para mim, sábio não é aquele que proclama palavras de sabedoria, mas sim aquele que demonstra sabedoria em seus atos.

(São Gregório).

LISTA DE ABREVIATURAS

786-0	Linhagem celular de tumor Renal
AINEs	Anti-inflamatórios não Esteróides
B16F10	Linhagem celular de tumor Melanoma murino
BAW	Eluente de alta polaridade: Butanol/ácido acético/ água 6:1:2 (v/v)
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp
CEME	Central de Medicamentos do Ministério da Saúde
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COX	Prostaglandina Sintase ou Cicloxigenase
CPMA	Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical Livre - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EBOH	Extrato Bruto Hidroetanólico
EC_{50}	Concentração necessária de antioxidante para diminuir em 50% DPPH
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético, Agente Quelante
F- Napo	Fração Neutra Apolar
F-Ácida_PPT	Fração precipitada de Ácidos Orgânicos
F-Ácida_S	Fração sobrenadante de Ácidos Organicos
FAE	Fração Acetato de Etila proveniente do Extrato Bruto Hidroetanólico
F-Alc	Fração enriquecida em compostos alcaloídicos
FAQ	Fração Aquosa proveniente do Extrato Bruto Hidroetanólico
FJ-Pb	Fração J tratada com Acetato de Chumbo
HT29	Linhagem celular de tumor de Cólon
i.p.	Via de administração Intraperitoneal
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K-562	Linhagem celular de tumor Leucemia
M14	Linhagem celular de tumor Melanoma

MALME-3M	Linhagem celular de tumor Melanoma
MCF7	Linhagem celular de tumor de Mama
NCI/ADR-RES	Linhagem celular de tumor de Ovário resistente à múltiplas drogas
NCI-H460	Linhagem celular de tumor de pulmão tipo não pequenas células
NF-Kβ	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVCAR-03	Linhagem celular de tumor de Ovário
PBS	Solução Tampão fosfato-salino
PC-3	Linhagem celular de tumor de Próstata
RNI	Nitrogênio Reativos Intermediários
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	Solução nutritiva para o crescimento celular.
SFB	Soro Fetal Bovino (Suplementa o Meio RPMI)
SKMEL-2	Linhagem celular de tumor Melanoma
SKMEL-28	Linhagem celular de tumor Melanoma
SRB	Sulforrodamina B, pigmento que cora proteínas dentro das células
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TCA	Ácido Tricloroacético
TEC_{50}	O tempo necessário para alcançar o EC_{50}
TGI	Concentração de amostra necessária para inibir 100% do crescimento celular
U-251	Linhagem celular de tumor Gioblastoma
UACC-257	Linhagem celular de tumor Melanoma
UACC-62	Linhagem celular de tumor Melanoma
v.o.	Via de administração Oral

RESUMO

A utilização de plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico para muitas comunidades e grupos étnicos. A espécie *Imperata brasiliensis* Trin. (Poaceae), com ampla distribuição no Brasil, é utilizada na medicina popular como analgésico e diurético, porém pouco se conhece sobre seu potencial farmacológico. Este trabalho propôs trabalhar com o Extrato Bruto Hidroetanólico e Frações originadas por procedimentos fitoquímicos de partição e fracionamentos, a fim de identificar possíveis classes de compostos responsáveis pela ação antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas e murinas, bem como avaliar sua atividade anticâncer e antiedematogênica em modelos *in vivo.* Nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* a Fração FAE demonstrou atividade e portanto foi fracionada originando as principais Frações I e J que após análises cromatográficas e de refracionamento demonstraram ser mais ativas que a Fração de origem (FAE) com maior seletividade para linhagens de melanoma e a atividade citotoxica *in vitro* foi atribuída a presença de compostos fenólicos e terpênicos atuando sinergicamente. Em modelo anticâncer de tumor de Ehrlich em camundongos a Fração FAE se mostrou ineficiente. Foi avaliado também a atividade antiedematogênica *in vivo* para das Frações FAE, I e J que demonstraram potencial atividade, especialmente para a FAE 100mg/Kg e Fração J 100mg/Kg. Posteriormente a Fração FAE foi submetida a avaliação antinociceptiva em três protocolos distintos para avaliação de dor inespecífica, dor neurogênica de origem periférica e central onde observou-se um comportamento analgésico inespecífico da Fração FAE sem nenhuma atividade sobre dor de origem neurogênica, resultado que sustentou a possível ação antinflamatória de substâncias presentes nas frações de *I. brasiliensis.*

ABSTRACT

The use of medicinal plants often simbolizes the only therapeutic source for many comunities and ethnic groups. The plant species *Imperata brasiliensis* Trin. (Poaceae), broad distributed in Brazil, is used in popular medicine as analgesic and diuretic, although little is known about its pharmacological potential. This project proposed to work with the hidroethanolic crude extract and the active fractions originated from pthytochemical procedures of biomonitored fractioning and partioning, in order to identify possible classes of compounds responsible for the antiproliferative activity in human and murine cancer cell lines, and also its anticancer and antiedematogenic activity *in vivo* models. In vitro antiproliferative assays demonstrated that the fraction FAE is active, which was further fractionated yielding fractions I and J, which after chromatographic analysis proved to be more active than the origin fraction (FAE), presenting selectivity for melanoma cell lines. The *in vitro* citotoxic activity was attributed to the presence of fenolic and terpenic compounds acting sinergically. In the murine model Solid Ehrlich Tumor, fraction FAE demonstrated to be inefficient. The antiedematogenic activity was also evaluated *in vivo* for fractions FAE, I and J, which showed potential interesting results, especially for FAE 100mg/kg and fraction J 100mg/kg. Posteriorly, fraction FAE was submitted to an antinociceptive evaluation, in three distinct protocols of inespecific, periferic and central neurogenic pain, in which an inespecific analgesic behavior was observed with the fraction FAE. No other neurogenic pain was observed, suggesting the possible antiinflamatory acitivity of the substances present in the active fractions of *I. brasiliensis*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 5

1.1. CÂNCER 5

1.2. CÂNCER E INFLAMAÇÃO 9

1.3. PLANTAS MEDICINAIS 12

1.4. O GÊNERO IMPERATA 14

2. OBJETIVOS 17

3. MATERIAL E MÉTODOS 19

3.1. ESTUDO FITOQUÍMICO DE Imperata brasiliensis Trin. 19

3.2. COLETA 19

3.3. PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL 20

3.4. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO 20

3.5. FRACIONAMENTO DO EXTRATO EBOH 21

3.5.1. Partição líquido / líquido do EBOH 21

3.6. CROMATOGRAFIA EM COLUNA FILTRANTE DA FRAÇÃO FAE 22

3.6.1. Tratamento da Fração J com Acetato de Chumbo 23

3.6.2. Cromatografia em Camada Delgada 24

3.6.3. Extração Ácido-base da Fração híbrida I +J 25

3.7. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO 26

3.7.1. Ensaios Antiproliferativo em Células Tumorais Humanas 26

3.7.2. Ensaio de Atividade Antiproliferativa de Extrato e Frações obtidos de *I. brasiliensis.* 29

3.7.3. Ensaio de Atividade Antioxidante - DPPH 32

3.7.4. Ensaio de Capacidade Redutora – Folin Ciocalteu 33

3.8. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS IN VIVO 33

3.8.1. Avaliação de Toxicidade aguda em Roedores 34

3.8.2. Atividade Antitumoral em modelo de Tumor Sólido de Ehrlich. 34

3.8.3. Atividade Antiedematogênica - Modelo de Edema de Pata Induzido por Carragenina. 36

3.8.4. Contorções abdominais induzidas por ácido acético 37

3.8.5. Teste de algesia induzida por calor 37
3.8.6. Teste de algesia induzida por capsaicina 38

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA 38
4. RESULTADOS 40

4.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO 40

4.2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA IN VITRO 40
4.2.1. Atividade Antiproliferativa *in vitro* do Quimioterápico Doxorrubicina 41
4.2.2. Atividade antiproliferativa in vitro do extrato EBOH 42

4.3. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA POR PARTIÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO DO EXTRATO EBOH. 43
4.3.1. Atividade Antiproliferativa in vitro das Frações FAE e FAQ 44

4.4. CROMATOGRAFIA EM COLUNA FILTRANTE DA FRAÇÃO FAE. 46
4.4.1. Atividade Antiproliferativa *in vitro* das Frações A-N, obtidas por Cromatografia de Coluna Filtrante a partir da Fração FAE 47

4.5. TRATAMENTO DA FRAÇÃO J COM ACETATO DE CHUMBO 54
4.5.1. Atividade antiproliferativa *in vitro* com a Fração J-Pb 55

4.6. ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DE FRAÇÕES ATIVAS DE I. brasiliensis. 57

4.7. EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE DAS FRAÇÕES I+J 60
4.7.1. Atividade antiproliferativa *in vitro* com as frações I e J e provenientes da extração ácido-base. 60
4.7.2. Atividade das Frações ativas de *I. brasiliensis* em ensaio antiproliferativo *in vitro* com diferentes linhagens de melanoma. 65

4.8. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE FRAÇÕES ATIVAS DE I. brasiliensis. 69
4.8.1. Folin-Ciocalteu 69
4.8.2. DPPH 69

TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN VIVO* 70

4.9. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA ORAL DO EXTRATO EBOH EM CAMUNDONGOS (HIPOCRÁTICO) 70

4.10. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA ORAL DA FRAÇÃO FAE EM CAMUNDONGOS .. 71

4.11. ATIVIDADE ANTICÂNCER DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) 71

4.12. ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DA FRAÇÃO FAE E FRAÇÃO J 73

4.13. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA 77
4.13.1. Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético 77
4.13.2. Teste de Algesia Induzida por Capsaicina 78
4.13.3. Teste de algesia induzida por calor 78
5. DISCUSSÃO 81
6. CONCLUSÕES 94
7. REFERÊNCIAS 96

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

A definição científica para câncer é neoplasia, especificamente quando refere-se aos tumores malignos. É caracterizada pelo crescimento descontrolado de células alteradas, as quais se destacam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos próximos ou distantes (Hanahan & Weinberg, 2000). A palavra câncer, do grego *karkinos*, foi dada por Hipócrates e significa "caranguejo". Esta definição deve ter sido empregada em analogia ao perfil de crescimento infiltrante que lembra o comportamento do crustáceo, que fixa-se em seu habitat, com o auxílio de suas pernas, introduzindo-as na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção (Almeida et al., 2005).

Por ser um estigma de mortalidade e dor, o câncer é uma das doenças que mais causam pavor à sociedade. O termo é genericamente empregado para definir um conjunto de doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células, a invasividade e a tendência de ser agressiva e muitas vezes incontrolável (INCA, 2010).

A complexidade da doença caracteriza-se por diversas alterações que podem levar a ativação de vias associadas a vários genes que controlam positivamente a sobrevivência e proliferação celular, como os oncogenes; ou a inativação de genes que controlam negativamente estes processos, como os genes supressores de tumor; ou ainda, a disfunção em genes que controlam a estabilidade genômica como os genes de reparo do DNA. Sua complexidade é entendida como a soma de alterações genéticas e epigenéticas que corroboram para a ineficiência da homeostasia celular (Tortelli-Júnior, 2008), influenciada na grande maioria dos casos por fatores ambientais (Park et al., 2010).

Uma das descobertas mais importantes que surgiram durante as últimas três décadas, é que o câncer é uma doença que pode ser evitada adotando-se posturas profiláticas (Almeida et al., 2005). Assim, fica evidente a necessidade de promover a conscientização da população sobre os reais fatores que podem ser considerados de risco e quais medidas devem ser tomadas para haver a manutenção da saúde do indivíduo. Estudos demonstram que, com exceção do câncer infantil, praticamente 80% de todos os cânceres registrados devem-se a fatores ambientais ou adquiridos, como o tabagismo, a dieta, radiação solar ou ionizante e organismos infecciosos como vírus e bactérias, entre outros e só 20% dos casos são causados por fatores internos, tais como mutações hereditárias, hormônios e condições imunológicas (Prasad et al., 2010).

Hanahan e Weinberg (2000) descrevem as seis principais alterações funcionais que caracterizam a malignização de uma célula tumoral e o desenvolvimento do câncer, são elas: anomalias na regulação do ciclo celular e a perda de controle da mitose; replicação ilimitada, contornando a senescência e tornando-se imortal; evasão apoptótica, que garante à célula proliferação sustentada em diferentes microambientes; angiogênese sustentada, garantindo a nutrição do tumor e seu desenvolvimento; invasão de tecidos, metástase e crescimento auto-suficiente, como consequência da soma das alterações anteriormente citadas. As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções (Almeida et al., 2005).

O câncer configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, embora dados da IARC -*International Agency for Research on Cancer* demonstrem que grande parte das ocorrências de câncer prevaleçam em regiões menos desenvolvidas do mundo (INCA, 2010). Segundo dados da

Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda causa de morte dos países desenvolvidos sendo superada apenas pelas doenças cardiovasculares (Jemal et al., 2009) e se tornou uma das mais importantes patologias do mundo por apresentar mais de 12 milhões de casos por ano com cerca de 7,5 milhões de mortes (WHO, 2010).

Segundo relatório recente da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. No Brasil, no ano de 2008, ocorreram em média 320 mil novos casos de câncer e cerca de 190 mil mortes, sendo os óbitos por câncer de próstata e pulmão os de maior incidência para o sexo masculino e mama e colo de útero os de maior incidência para o sexo feminino. As estimativas, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Como representado na Figura 1, os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, continuarão sendo os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (INCA, 2010).

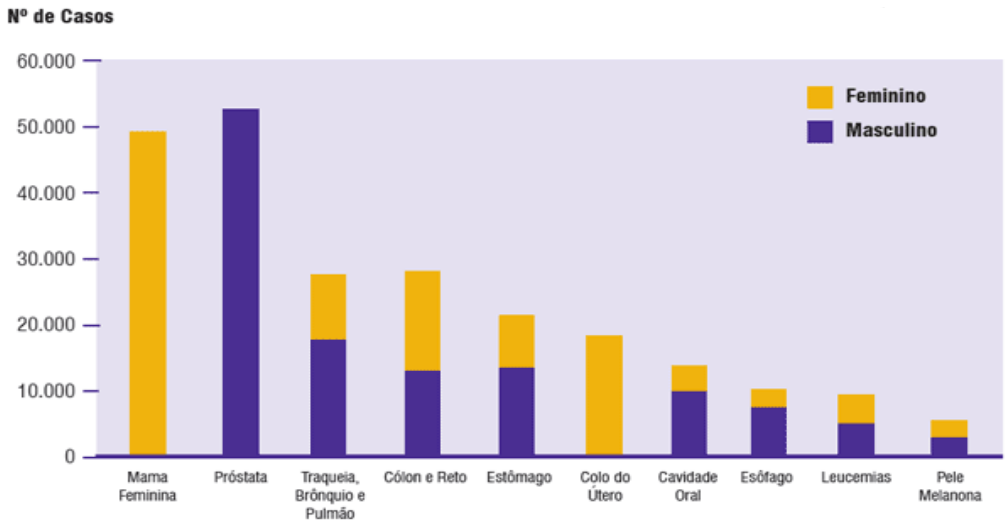


Figura 1. Gráfico ilustrativo dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010/2011 na população brasileira (Fonte: INCA)

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: a cirurgia, eficiente em erradicar tumores quando não há metástase; a radioterapia, comumente usada em associação à cirurgia para aumentar a eficiência do tratamento e a quimioterapia, esta última com o objetivo primário de destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto sadias (Almeida et al., 2005).

A quimioprevenção compreende uma série de intervenções, farmacológicas e/ou relacionadas aos hábitos alimentares, com o objetivo de evitar, bloquear ou reverter um processo patogênico. No caso específico do câncer, o processo de carcinogênese envolve três etapas, a saber, iniciação, promoção e progressão (Chen & Kong, 2004).

De acordo com a OMS, estimativas recentes sugerem que a prevalência global de utilização e preparados de plantas é de até 63% entre os pacientes com câncer corroborando com o considerável crescimento de interesse por produtos naturais no mundo ocidental (Siu, 2010). Dada a enorme biodiversidade do planeta, parece provável um futuro promissor para os produtos naturais, na verdade, muito mais provável do que para compostos obtidos a partir de síntese. Exemplos desse potencial estão na descoberta de substâncias como os alcalóides vincristina e vimblastina, provenientes da planta *Catharanthus roseus*, que ligam-se à tubulina, impedindo a célula de criar o fuso mitótico, do qual precisa para promover a movimentação cromossômica à medida que se dá a divisão. Este é um modo de acção similar à colchicina. O paclitaxel da *Taxus brevifolia L*. estabiliza os microtúbulos e, como resultado, interfere com a repartição normal dos microtúbulos durante a divisão celular. (Pezzuto, 1997; Ma & Wang, 2009).

O desenvolvimento de novos quimioterápicos é uma das principais linhas de pesquisas e uma promissora fonte alternativa de drogas anticâncer, pois atualmente mais de 60% dos agentes utilizados para o tratamento do câncer são oriundos de produtos naturais (Cragg & Newman, 2009). Grande número de fitofármacos tem demonstrado ação antiproliferativa em diversos modelos experimentais através de alterações na via de transdução de sinais que modula a expressão gênica, a progressão do ciclo celular, na proliferação, na morte celular, no metabolismo e na apoptose (HemaIswarya & Doble, 2006).

Outra importante classe de agentes anticâncer clinicamente ativos são a camptotecina e seus derivados extraídos da árvore ornamental chinesa *Camptotheca acuminata.* A camptotecina foi primeiramente testada como sal sódico, mas foi abandonada por promover toxicidade severa da bexiga em testes clínicos, pesquisas posteriores levaram ao desenvolvimento de derivados mais eficazes, Topotecan e Irinotecano. Esses compostos inibem a topoisomerase I e atualmente são utilizados no tratamento de câncer de ovário e cólon. (Cragg & Newman, 2005). Semelhante à camptotecina, as epipodofilotoxinas (etoposida e teniposida), isoladas de *Podophyllum peltatum*, são substâncias inibidoras da topoisomerase II. As topoisomerase I e II são responsáveis por facilitar o descondensamento da dupla fita de DNA durante a divisão celular (Srivastava et al., 2005; Takimoto, 1997).

1.2. CÂNCER E INFLAMAÇÃO

Inflamação é uma resposta orgânica a uma agressão sofrida onde as principais características da inflamação são vermelhidão, calor, inchaço, dor, e por vezes, perda de movimento ou de função. A inflamação é uma resposta necessária para combater infecções virais, promover reparação tecidual e suprimir a iniciação e/ou a progressão do tumor (Yue et al., 2010).

A resposta inflamatória no câncer é provavelmente causada pela morte celular gerada pela necrose no núcleo da massa tumoral devido à deficiência de oxigênio e nutrientes. A morte celular contínua com infiltração de células inflamatórias durante o desenvolvimento do tumor é acompanhada da produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, favorecendo a proliferação celular e consequentemente o aumento da massa tumoral (He & Karin, 2011).

A maioria, senão todos os tumores sólidos são infiltrados com células imunes e inflamatórias (Grivennikov & Karin, 2010), isto pode representar uma resposta antitumoral em curso ou ser um sinal de subversão do sistema imunitário, pelo tumor, em seu próprio benefício. A relação entre câncer e inflamação não é recente, pois Rudolf Virchow em 1863, após observar a presença de leucócitos dentro dos tumores, pressupôs que o câncer era originado em locais que apresentavam inflamação crônica e, em parte, baseou sua hipótese no aumento da proliferação celular que algumas classes de agentes irritantes causavam em conjunto com o dano tecidual e a inflamação persistente (Balkwill & Mantovani, 2001; Grivennikov et al., 2010). Apesar de estar claro que somente a proliferação celular não causa câncer, a divisão celular sustentada em um meio rico em células inflamatórias, fatores de crescimento e agentes causadores de dano ao DNA, certamente potencializam e promovem riscos de ocorrência tumoral. Durante o dano tecidual, a proliferação celular é aumentada enquanto o tecido se regenera e então o agente agressor é totalmente removido e o processo de reparo se completa. No entanto, células em proliferação com dano em DNA continuam a proliferar-se em microambientes ricos em células inflamatórias e fatores de crescimento (Stuelten et al., 2008). De certo modo, é possível considerar que tumores agem como um ferimento que falhou ao cicatrizar (Dvorak, 1986).

Apesar das primeiras indicações de uma possível ligação entre inflamação e câncer ter ocorrido no séc XIX, somente durante a última década que se obteve a prova clara que a inflamação desempenha um papel importante na tumorigênese e alguns dos mecanismos moleculares subjacentes foram elucidados (Grivennikov et al., 2010).

A iniciação do tumor é um processo no qual as células normais adquirirem característica mutacional e tornam-se capazes de iniciar um caminho tumorigênico, proporcionando o crescimento e sobrevivência às celulas vizinhas. É sugerido que um microambiente inflamatório pode aumentar as taxas de mutação, além de aumentar a proliferação de células mutantes. As células inflamatórias ativadas servem como fontes de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio reativos intermediários (RNI) que são capazes de danificar o DNA (Grivennikov et al., 2010). Além disso, a inflamação pode resultar em mudanças epigenéticas que favorecem a iniciação do tumor onde foi observado que citocinas produzidas por células do sistema imunológico ativam fatores de transcrição importantes, como NF-kB, ou STAT3, em células pré-malignas a fim de controlar processos pró-mutagênicos incluindo a sobrevivência, proliferação, crescimento, angiogênese e invasão. Como resposta NF-kB e STAT3 induzem a produção de quimiocinas que atraem mais células inflamatórias que sustentam a inflamação associada ao tumor (Aggarwal & Gehlot, 2009; Grivennikov et al., 2010).

Talvez a melhor evidência para o significado da inflamação durante a progressão neoplásica venha de estudos onde foi avaliado o risco de câncer em pacientes que utilizaram a aspirina e outros anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) por um longo período. Muitos dados indicam que o uso destas drogas reduz o risco de ocorrência do câncer de cólon em 40-50%, e pode ser preventivo para os de pulmão, esôfago e estômago (Baron & Sandler, 2000; Garcia-Rodriguez & Huerta-Alvarez, 2001). A capacidade dos

AINEs em inibir as ciclo-oxigenases (COX-1 e 2) é a base de seu mecanismo de quimioprevenção (Thun et al., 2004) e tem demonstrado atividade potencial na prevenção de várias formas de tumores malignos sólidos, incluindo cancros do cólon, mama, pulmão e próstata (Horn & Fentiman, 2010).

Células que medeiam a resposta inflamatória liberam fatores parácrinos e autócrinos que estimulam a proliferação celular, inibem apoptose e induzem a angiogênese. Estes fatores podem acelerar a mutagênese, promover a sobrevivência e a proliferação de células mutadas e aumentar a probabilidade de um clone particular de células adquirir mutações genéticas para se tornar invasivo e metastático (Tun et al., 2004). Os antiinflamatórios não esteroidais estimulam a apoptose e inibem a angiogênese, dois mecanismos que suprimem o crescimento tumoral (Thun et al., 2002).

Muitos tipos de câncer se desenvolvem a partir de sítios de inflamação, sendo esta muitas vezes responsável pela tumorigênese, transformação celular, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (Aggarwal et al., 2006; Mantovani, 2007).

1.3. PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais correspondem, incontestavelmente, às mais antigas armas empregadas no tratamento de enfermidades humanas. A dor fez com que o homem buscasse o analgésico; a doença o remédio, portanto, é fácil inferir que o uso de plantas no combate a doenças seja tão antigo quanto à própria humanidade (Fuck et al., 2005). Ao longo dos séculos a natureza contribuiu com fontes de cura para as necessidades básicas dos seres humanos e as espécies vegetais foram muito utilizadas como forma de tratamento, inicialmente em sua forma bruta, como tinturas, chás, e outras formulações (Balick & Cox, 1996; Malhotra & Singh, 2009).

Frequentemente, espécies vegetais são utilizadas com o intuito de substituir ou auxiliar terapias convencionais no tratamento de várias doenças. Entre outros fatores, a preferência no uso das plantas medicinais decorre da facilidade de obtenção e do baixo custo. Porém, sabe-se que plantas medicinais apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas, justificando a necessidade de um aprofundamento no conhecimento das propriedades das espécies vegetais e sua utilização na formulação de medicamentos (Simões et al., 2007).

Considerando a ampla variedade de espécies vegetais, bem como a riqueza étnico-cultural, as plantas medicinais ocupam posição de destaque no que diz respeito ao tratamento da população, assim, o conhecimento empírico acumulado durante séculos propiciou o desenvolvimento dos primeiros medicamentos (Fuck et al, 2005). Nos dias de hoje, estima-se que 65% de pessoas, em todo o mundo, usam produtos obtidos de plantas medicinais como forma primária de tratamento para suas doenças, fato que corrobora na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (Cragg et al., 2009). Estima-se que do total de 252 drogas na lista de medicamentos essenciais da OMS, 11% é exclusivamente de origem vegetal (Sahoo et al., 2010). Segundo alguns autores, 44% dos novos medicamentos aprovados entre os anos 2000 e 2006 são originários de produtos naturais, coincidindo com o crescimento de publicações nesta linha de pesquisa nas principais revistas científicas das áreas de química e farmacologia (Calixto, 2003, Cragg et al., 2009).

Como salientado, apesar do domínio da síntese química, a pesquisa, desenvolvimento e utilização de produtos naturais como agentes terapêuticos, especialmente os derivados de plantas, aumentaram nos últimos anos (Harvey, 2007). Estudos sobre produtos naturais como fonte de novas drogas entre os anos de 1981 e 2008, relatam a existência de 1024 moléculas de baixo peso molecular (com potencial

farmacológico) sendo que 67% são de origem sintética; destas 18% correspondem a moléculas sintéticas com grupos farmacofóricos derivados diretamente de produtos naturais e 13 % a compostos sintéticos capazes de competir com produtos naturais pelo sítio de ação. Sendo assim, apenas 36% podem ser considerados verdadeiramente de origem sintética pura (Cragg et al., 2009).

O Brasil possui uma rica biodiversidade, sendo a mais rica flora em todo o mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas, cerca de 19% da flora mundial (Giulietti et al., 2005; Juiz et al., 2010), fato que se explica porque em quase todos os grupos de organismos a diversidade de espécies aumenta em direção aos trópicos. Porém, apesar dessa grande biodiversidade, apenas uma pequena parcela das espécies vegetais foi estudada em busca de compostos bioativos (Simões et al., 2007).

1.4. O GÊNERO IMPERATA

O gênero Imperata, pertencente à família Poaceae, compreende espécies consideradas plantas daninhas por invadir pastagens e áreas cultivadas (Carvalho et al., 2000). Dentre as mais de 20 espécies desse gênero, a espécie mais estudada é *Imperata cylindrica* Beauv , conhecida como *Chigaya*, é comum em países da Ásia (Park, 2004; Johnson, 2006;). Estudos fitoquímicos de extratos dos rizomas desta espécie resultaram no isolamento de princípios ativos com atividades farmacológicas tais como: imperaneno, composto fenólico com atividade antiagregante plaquetária (Matsunaga et al., 1994a); cilindreno, sesquiterpenóide com atividade vasodilatadora (Matsunaga et al., 1994b); cilindol A e B, compostos com potencial atividade anti-inflamatória (Matsunaga et al., 1994c); graminona A e B, lignanas com atividade vasodilatadora (Matsunaga et al., 1994d) e mais

recentemente, cromonas com atividade neuroprotetora, com ação na supressão neurotóxica induzida pelo glutamato em células corticais de ratos (Yoon,et al, 2006)

No Brasil, destaca-se a espécie *Imperata brasiliensis* Trin. (sinonímia: *Imperata exaltata* Brong.(Quattrocchi, 2006), conhecida popularmente como sapé, capim-sapé, sapé-macho, capim-estrepe, capim-agreste, capim-massapé (Lorenzi, 1991; Carvalho et al., 2000), com ampla distribuição geográfica. A espécie tem como domínio fitogeográfico a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e maior distribuição geográfica no Nordeste, Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo) (Figueiras, 2010).

A *I. brasiliensis* é utilizada na medicina popular brasileira como diurética, analgésica (Lorenzi, 1991; Albuquerque et al., 2007) hipotensora, antipirética, anti-inflamatória e antiespasmódica (Rodrigues, 2006) e a droga vegetal, obtida a partir de seus rizomas, é citada na 1º edição da Farmacopéia Brasileira (Brandão et al., 2008).

Moradores da cidade de Baependi-MG relatam que o consumo do chá dos rizomas desta espécie promove uma melhora na atividade sexual (Roberto Link, 2008). A adesão local da população pode ser considerada como indicativo de reprodutibilidade na resposta farmacológica esperada, portanto faz-se necessário a valorização dos conhecimentos populares das comunidades envolvidas (Fuck et al., 2005).

Um estudo clínico realizado pelo Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais, da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde (PPPM/Ceme/Brasil) para avaliar atividade anti-hipertensiva de outra espécie revelou que, dentre elas, o chá de *I. brasiliensis*, empregado como placebo, apresentou efeito hipotensor sem ocorrência de efeitos adversos (Rodrigues, 2006).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Realizar estudo fitoquímico preliminar da espécie *I. brasiliensis*, usando técnicas cromatográficas, como métodos de fracionamento e monitoramento;

- Avaliar atividade antiproliferativa de extratos e frações ativas da espécie em cultura de células tumorais humanas e murinas;

- Correlacionar atividade antiproliferativa observada *in vitro* com a possível atividade anticâncer *in vivo* usando como modelo experimental o Tumor sólido de Ehrlich.

- Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva das frações ativas em modelos *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Imperata brasiliensis* Trin.

Os estudos fitoquímicos foram realizados nas dependências do CPQBA – UNICAMP, na Divisão de Fitoquímica, sob supervisão da Profª. Drª. Mary Ann Foglio.

3.2. COLETA

A espécie *Imperata brasiliensis* Trin. (Figura 2) foi coletada em Junho/2008 na cidade de Baependi-MG a 893m de altitude (Sul -21º57'32'' Oeste 44º53'24'') e sua exsicata depositada na Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas, e Agrícolas (CPQBA), da Universidade Estadual de Campinas, sob registro 2034, nº 1.324.

Figura 2. Ilustração das partes aéreas e rizomas de *I. brasiliensis.* (Fonte: http://floradobrasil.jbrj.gov.br)

3.3. PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Os rizomas de *I. brasiliensis* foram secos em estufa a 40°C (Fabbe, modelo 170) com ventilação por 48 horas e moídos em triturador de facas.

3.4. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO

Uma amostra (m=100g) de rizomas secos e moídos de *I. brasiliensis* foi submetida à extração por maceração dinâmica a frio com mistura de etanol:água (7:3), na proporção de solvente:planta (5:1), durante três períodos de 4 horas cada. Os filtrados recolhidos foram reunidos e submetidos à evaporação do etanol sob vácuo em temperatura aproximada de 40ºC. Posteriormente, a água residual foi liofilizada originando o extrato bruto hidroetanólico (EBOH) (Figura 3). Os ensaios *in vivo* exigiram maior quantidade de massa de EBOH que foi obtida em diversas extrações, realizadas de acordo com a necessidade.

Figura 3. Fluxograma dos processo de obtenção do extrato EBOH pelo método de maceração dinâmica com etanol 70%.

3.5. FRACIONAMENTO DO EXTRATO EBOH

3.5.1. Partição líquido / líquido do EBOH

Parte do extrato EBOH foi retomada em água destilada na concentração de 100mg/mL e submetida à extração por partição líquido/líquido com acetato de etila (Merck®, Darnstadt, Germany). Partes iguais de amostra e solvente foram colocadas em funil de separação e submetidas à agitação vigorosa com posterior repouso até total separação das fases. Repetiu-se três vezes o processo, com renovação do solvente, proporcionando o esgotamento das subtâncias a serem carreadas do extrato EBOH. Como resultado obteve-se uma fase aquosa e uma fase orgânica que foram filtradas e submetidas à eliminação do solvente por ação de vácuo e temperatura em rotaevaporador para posterior liofilização originando respectivamente a Fração Aquosa (FAQ) e a Fração Acetato de Etila (FAE) (Figura 4).

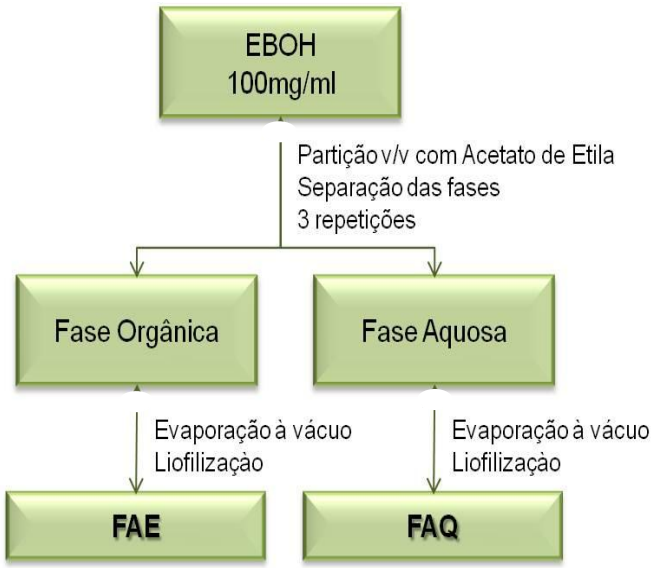


Figura 4. Fluxograma do processo de obtenção das frações FAE e FAQ a partir do Extrato EBOH .

3.6. CROMATOGRAFIA EM COLUNA FILTRANTE DA FRAÇÃO FAE

Uma alíquota da Fração FAE foi fracionada pela técnica de cromatografia em coluna filtrante, utilizando-se como fase estacionária silicagel 60®(Merck, 0,063-0,200mm) em funil de placa porosa, na proporção de 1:3 (amostra/sílica) (Figura 5). A coluna foi eluída com os solventes hexano P.A. (Merck®, Darnstadt, Germany) diclorometano (Merck®, Darnstadt, Germany) P.A. e metanol P.A.(Merck®, Darnstadt, Germany), utilizados no volume de 100mL em cada gradiente de concentração. As frações recolhidas a cada 50 ml originaram 42 frações, que foram reunidas em 11 grupos (Tabela 1) conforme características observadas por cromatografia de camada delgada (CCD) sob vaporização de Anisaldeído 2% e posterior aquecimento a 100ºC por 2 minutos.

Figura 5. Foto ilustrativa de coluna cromatográfica filtrante em escala laboratorial (Servat, 2010).

Tabela 1. Relação entre gradiente de concentração de solventes utilizados para eluir a coluna cromatográfica e frações obtidas.

GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO	FRAÇÕES RECOLHIDAS	AMOSTRA FINAL
Hex 100% - Dic / Met 10%	1 - 3	Fração A
Dic / Met 10% - Dic 100%	4 - 5	Fração B
Dic / Met 0,2%	6 - 8	Fração C
Dic / Met 0,4%	9 - 10	Fração D
Dic / Met 0,6 % - 0,8 %	11 - 14	Fração E
Dic / Met 1,0 % - 2,0 %	15 - 18	Fração F
Dic / Met 2,0 %	19	Fração G
Dic / Met 2,5 %	20	Fração H
Dic / Met 2,5 % - 3,5 %	21 – 24	Fração I
Dic / Met 3,5 % - 4,5 %	25 – 28	Fração J
Dic / Met 4,5 % - 6,0 %	29 – 33	Fração K
Dic / Met 6,0 % - 6,5 %	34 – 35	Fração L
Dic / Met 7,0 % - 8,0 %	36 – 41	Fração M
Met 100%	42	Fração N

Hex-Hexano, **Dic**-Diclorometano, **Met**-Metanol

3.6.1. Tratamento da Fração J com Acetato de Chumbo

A Fração J (m=200mg) foi dissolvida em 10 mL de etanol P.A. (Merck®, Darnstadt, Germany) com ajuda de aparelho de ultrassom. Em seguida, foram adicionados 50 mL de solução básica de acetato de chumbo a 10%. A mistura foi refrigerada (4º C) durante 24h e em seguida filtrada sob vácuo em funil de placa porosa preenchido com 10g de terra diatomacea (Celite®). A fase aquosa foi extraída com acetato de etila por 3x, em funil de separação, dando origem à Fração acetato (FJ-Pb) (Figura 6).

Figura 6. Fluxograma do processo de tratamento da Fração J com acetato de chumbo originando a Fração FJ-Pb, livre de graxas e compostos fenólicos.

3.6.2. Cromatografia em Camada Delgada

Extratos brutos e frações foram monitorados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de alumínio de 20 cm x 20 cm com fase estacionária de sílica com tamanho (cromatofolha–alumínio CCF-C/25, Merck) com pontos de aplicação a 1 cm da margem inferior da placa. Como fase móvel foi utilizada a mistura de diclorometano/metanol 3% para eluir amostras apolares e BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5) para eluir amostras com caracteristicas polares. As cromatofolhas foram observadas sob incidência de luz UV, a 254 e 366nm e posteriormente reveladas com diferentes reagentes químicos: $FeCl_3$ 2% (compostos fenólicos), Anisaldeido 1% (compostos terpênicos), Dragendorff (alcalóides) e DPPH 2% (compostos com capacidade de sequestrar radicais livres) (Wójciak-Kosior et al., 2008).

3.6.3. Extração Ácido-base da Fração híbrida I +J

Uma alíquota das Frações I e J foram unidas e submetida à separação de seus constituintes químicos conforme o grau de ionização onde utilizou-se um funil de separação e reagentes ácidos e alcalinos conforme representado na figura 7. Diluiu-se 100 mg da Fração I e 100mg da Fração J em 50mL de solvente acetato de etila P.A. e posteriormente extraiu-se com uma solução aquosa ácida (HCl 10% v/v) por 3x originando a Fase orgânica e a Fase aquosa I. Esta última teve o pH ajustado para 8 com NH_4OH concentrado e foi extraída com acetato de etila v/v por 3x obtendo a Fração enriquecida em compostos alcaloídicos. A Primeira Fase Orgânica foi então extraída 3x com solução de NH_4OH 1N originando a Fase Acetato e a Fase Aquosa II , a primeira contendo compostos não Ionizáveis denominada Fração Neutra Apolar e a segunda que teve seu pH ajustado para 5 e foi extraída com acetato de etila (3x v/v) originando a Fração Ácidos Orgânicos.

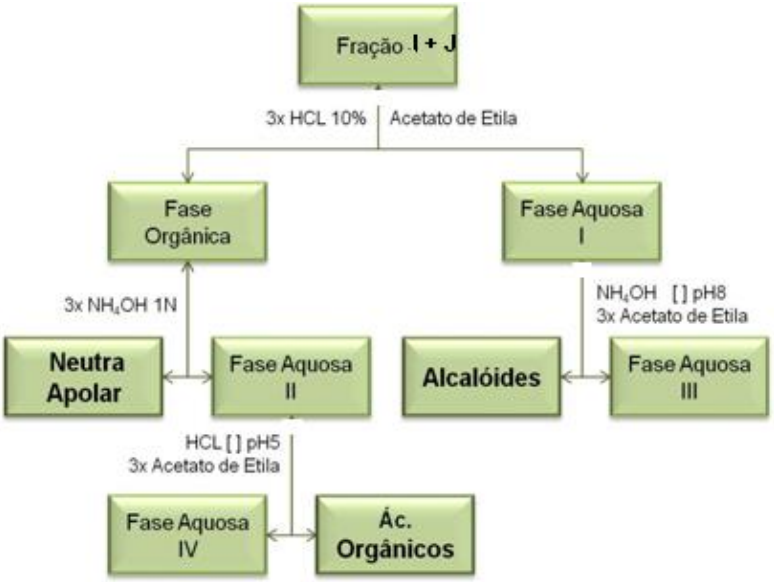


Figura 7. Fluxograma da extração ácido-base da Fração híbrida I+J, originando as frações F-Alc, F-Napo, F-Ácida_PPT e F-Ácida_S

3.7. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*

3.7.1. Ensaios Antiproliferativo em Células Tumorais Humanas

Células

As linhagens celulares originárias de neoplasias humanas, cedidas pelo *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos, utilizadas neste protocolo foram: Melanomas (UACC-62, SKMEL-2, SKMEL-28, MALME-3M, UACC-257 E M14), Ovário (OVCAR-03), Ovário resistente (NCI-ADR/RES), Mama (MCF-7), Pulmão (NCI-460), Rim (786-O), Próstata (PC-03), Cólon (HT-29), Glioblastoma (U251) e Leucemia (K-562) (Tabela 2). A linhagem B16F10 foi doada pelo Professor Dr. Roger Chamas (USP). Todos os procedimentos abaixo foram realizados sob condições estéreis em câmara de segurança biológica (Fluxo Laminar Veco®, Classe IIB2).

Para descongelamento, o criotubo contendo as células foi mantido à temperatura ambiente, e seu conteúdo transferido para um tubo de centrífuga de 15mL. O volume foi completado para 10mL com meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®, NY, USA) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, NY, USA) e centrifugado a 2000rpm (rotações por minuto) por 4 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado contendo as células foi ressuspendido cuidadosamente para evitar a formação de grumos, em 5mL de RPMI/SFB. A solução (5mL) celular foi transferida para frascos de manutenção de $25cm^3$ (T25) e incubada a 37ºC em atmosfera de 5% de CO_2, em ambiente úmido.

Cultivo Celular

As células foram mantidas em frascos de 25cm^3, com 5mL de meio RPMI/SFB e repicadas quando a monocamada celular atingia cerca de 80% de confluência em meio RPMI/SFB. Para as células em suspensão (K562 - leucemia) o repique foi realizado pela retirada de um volume previamente determinado de um frasco de manutenção e transferido para outro, sendo completado o volume para 5 mL, no caso de frascos de culturas de 25cm^2 (T25) e 10mL para os frascos de 75cm^2 (T75). A diluição utilizada foi dependente das características de cada linhagem celular ou ainda dos objetivos dos experimentos realizados. Estes frascos foram incubados a 37ºC em atmosfera de 5% de CO_2 em ambiente úmido.

Para células aderidas, cujo crescimento ocorre em monocamada, foi necessária a tripsinização, ou seja, o despreendimento das mesmas do frasco através de ação enzimática. Após a aspiração do meio de cultura, foram adicionados 500µL de tampão de Hank's (Sigma Chemical Co®, St Louis, MO, USA) banhando toda a monocamada celular por 10 vezes consecutivas. Este líquido foi aspirado e então adicionado 500µL de tripsina-EDTA (2,5g/L) a 37ºC. O frasco foi incubado entre 25 e 30 segundos, sendo logo em seguida banhado com RPMI/SFB. A partir deste ponto, quando as células se apresentaram em suspensão, foi utilizado o mesmo procedimento para as células leucêmicas.

Tabela 2. Painel das Linhagens celulares e DI utilizadas nos testes de atividade antiproliferativa *in vitro*, esclarecendo a origem e o tipo celular.

Nome	Tipo Celular	Origem	DI (x 10^4 células/ mL)
NCI-H460	Pulmão	Endoderme	4.0
MCF7	Mama	Ectoderme	6.0
NCI/ADR-RES	Ovário resistente*	Mesoderme	5.0
HT29	Cólon	Endoderme	4.0
PC-3	Próstata	Mesoderme	5.0
OVCAR-03	Ovário	Mesoderme	7.0
786-0	Renal	Mesoderme	4.5
K562	Leucemia	Endoderme	6.0
U251	Gioblastoma	Ectoderme	5.0
UACC-62	Melanoma	Ectoderme	5.0
UACC-257	Melanoma	Endoderme	5.0
SKMEL-2	Melanoma	Ectoderme	5.0
SKMEL-28	Melanoma	Ectoderme	5.0
MALME-3M	Melanoma	Ectoderme	5.0
M14	Melanoma	Ectoderme	5.0
B16F10	Melanoma murino	Ectoderme	5.0

DI: densidade de inoculação, * Linhagem que expressa fenótipo de resistência a múltiplos fármacos.

Diluição das Amostras

Extratos e Frações obtidos de *I. brasiliensis* foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1g/mL. Para a adição na cultura de células, estas soluções foram diluídas em pelo menos 400 vezes em RPMI/SFB/penicilina-estreptomicina, evitando-se assim a toxicidade do DMSO.

3.7.2. Ensaio de Atividade Antiproliferativa de Extrato e Frações obtidos de *I. brasiliensis.*

Foram plaqueados 100 μL/compartimento de células em meio RPMI/SFB/ acrescido de 1mL/L de penicilina:estreptomicina (1000U/mL: 1000μg/mL, Nutricell®), nas suas respectivas densidades de inoculação (Tabela 2), em placas de 96 compartimentos que a seguir foram incubadas por 24 horas a 37 ºC em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido. Após este período, uma placa controle (T_0) foi fixada através da adição de 50 μL/compartimento de ácido tricloroacético a 50% (p/v) para determinação da quantidade de proteínas no momento da adição das drogas. Nas demais placas, as amostras foram adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 μg/mL, (100 μL/compartimento) em triplicata, e a seguir foram incubadas por 48 horas (Figura 8).

Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 μg/mL (100 μL/compartimento) em triplicata. Após este período, as células foram fixadas com 50 μL de ácido tricloroacético a 50% (TCA).

Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4ºC e, em seguida, submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada, para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após lavagem, as placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa.

As placas foram então coradas pela adição de 50 μL/compartimento do corante protéico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1% e incubadas a 4 ºC, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1%. Após secagem à temperatura

ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com solução de Trizma Base (10μM, pH 10,5) e a leitura espectrofotométrica da absorbância realizada em 540 nm por leitor de microplacas (Sacoman et al., 2008).

A sulforrodamina B é um corante protéico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada à proteína, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (Skehan et al., 1990). Os desenhos das placas controle (T_0) e tratada estão ilustrados nas Figuras 8 e 9.

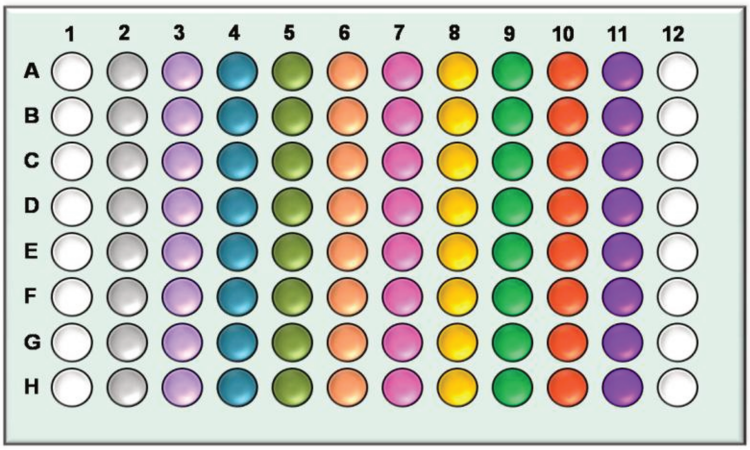


Figura 8. Ilustração da placa T_0 onde ○ cinza representa o controle do meio de cultura (compartimento contendo apenas meio com soro fetal bovino). Cada coluna colorida ilustra uma linhagem em sua respectiva densidade de inoculação.

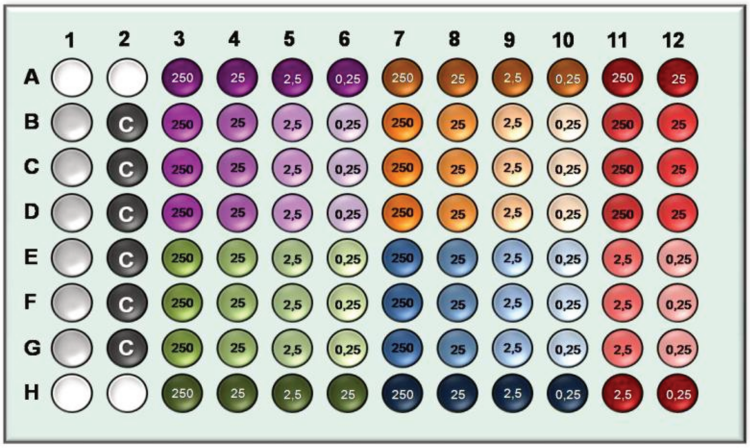


Figura 9. Ilustração da placa teste. A primeira coluna cinza representa o controle do meio de cultura (branco do meio). A segunda coluna cinza-escura representa o controle de células tumorais. Os compartimentos coloridos nas extremidades da placa , , , e , o controle das substâncias-teste (branco da amostra) nas concentrações de 250; 25; 2,5 e 0,25 μg/mL e as respectivas cores em tons mais claros referem-se às concentração da amostra testada.

Análise de Resultados do Ensaio Antiproliferativo

Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias dos compartimentos contendo células na presença das amostras em teste, descontando-se seus respectivos brancos, que são compartimentos contendo apenas amostra. Já a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada de acordo com as seguintes fórmulas, baseadas na descrição de Monks et al. (1991) com pequenas modificações na terminologia empregada.

Se $T_A > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular, se $T_A \geq T_0 \leq T_1 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T_A - T_0)/ (T_1 - T_0)]$ e se $T_A \leq T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T_A - T_0)/ T_0]$, onde : T_A = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula, T_1 = absorbância do controle de células na placa teste, e T_0 = absorbância do controle de células na placa T_0.

Com esses valores, foram elaborados gráficos relacionando o crescimento celular (em porcentagem) com a concentração da amostra em teste. Os valores abaixo de 50% e acima de zero representam inibição de crescimento (atividade citostática), enquanto os valores que atingem o zero representam inibição total de crescimento (TGI – *total growth inibition*) (Itharat et al., 2004). Os valores negativos, abaixo de zero, representam morte celular (atividade citocida), pois a quantidade de células aferida pela absorbância no final do experimento, nesse caso, é menor da que a plaqueada no inicio do experimento (absorbância do T_0). A concentração efetiva necessária para inibir 100% do crescimento celular (TGI) foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, empregando-se software Origin.

3.7.3. Ensaio de Atividade Antioxidante - DPPH

O ensaio de DPPH foi desenvolvido como descrito por Brand-Williams e colaboradores (1995) e modificado por Brem et al., (2004). Em placa de 96 compartimentos, as amostras sucessivamentes diluidas (100μL/compartimento, 0.25, 2.5, 25 e 250μg/mL), em quadriplicata, receberam solução de DPPH (40μM em etanol, 100 μL/ compartimento) e a absorbância foi medida a 515nm em leitor de microplaca (VERSAmax, Molecular Devices). Os resultados foram determinados a cada 5 minutos durante 150 min para avaliar a cinética da reação. A porcentagem de DPPH restado foi calculada como: $\%DPPH_{res} = 100 \times ([DPPH]_{amostra}/[DPPH]_{branco})$. Fez-se uma curva de calibração do Trolox.

Obteve-se então um gráfico de porcentagem de DPPH livre *versus* concentração necessária de antioxidante para diminuir em 50% (EC_{50}). O tempo necessário para alcançar o EC_{50} (TEC_{50}) foi verificado experimentalmente e correlacionado com a eficiência antirradicalar (Jiménez-Escrig et al., 2000), que foi calculada como: $AE=1/(EC_{50} \times TEC_{50})$.

3.7.4. Ensaio de Capacidade Redutora – Folin Ciocalteu

Este ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo publicado por Prior e colaboradores (2005), com pequenas modificações. Uma alíquota de 10μL da amostra (1mg/mL) foi diluído em água destilada (600μL). A seguir esta solução foi aplicada em uma placa de 96 compartimentos (150μL/compartimentol), em triplicata, e a seguir foi adicionada a solução de Folin-Ciocalteu (12.5μL), carbonato de sódio (37.5μL, 1M) e água (50μL). Após incubação a 37°C durante 2h, a absorbância foi medida a 725nm em leitor de microplaca (VERSA Max, Molecular Devices). Uma curva padrão de ácido gálico foi feita e os resultados foram expressos em equivalente de mg de ácido gálico por grama de amostra.

3.8. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS *IN VIVO*

Os animais utilizados foram adquiridos do Biotério Central do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas.

Os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas identificadas em sala com temperatura e umidade controladas (22 ± 2ºC, 12-h luz/escuro) e aclimatados em laboratório por um período mínimo de sete dias antes do início dos estudos. Os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Unicamp (CEEA) sob registro nº1416-1, nº2024-1, nº2025-1, nº2026-1, nº2027-1

3.8.1. Avaliação de Toxicidade aguda em Roedores

Grupos de camundongos Swiss machos (n=3) foram tratados por via oral (v.o.) e por via intraperitoneal (i.p.), com o extrato bruto EBOH e Frações FAE e J de *I. brasiliensis* nas doses de 100, 300, 500, 1000 e 2000mg/Kg, em veículo salina (0.9% NaCl). Após a administração, os animais foram observados durante as primeiras quatro horas e diariamente pelo período de 14 dias. Foram avaliados sinais de toxicidade geral, como os efeitos na locomoção, comportamento (agitação, letargia, agressividade), respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades, piloereção e mortalidade. A ocorrência de morte dos animais foi anotada para cada dose administrada. No 15º dia, todos os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, seguida de necropsia e observação macroscópica dos órgãos. A metodologia segue o protocolo da OECD 423 (Botham, 2004)

3.8.2. Atividade Antitumoral em modelo de Tumor Sólido de Ehrlich.

Manutenção e preparo das células

As células de Ehrlich foram descongeladas, ressuspensas em tampão fosfato-salina (PBS) e centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular novamente ressuspendido em PBS, num volume suficiente para que cada animal recebesse $8,75x10^5$ células numa proporção de 10 mL/Kg (i.p.). Dois animais receberam essas células e foram considerados doadores, e após sete dias sofreram eutanásia por deslocamento cervical e seu líquido ascítico coletado e submetido a processamento.

Foram coletados 2 mL de líquido ascítico, adicionados a 2 mL de ficoll, e a mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 15 min., a 18 °C, para precipitar granulócitos e eritrócitos e obter as células tumorais. Nessas condições formou-se um anel celular, que foi coletado, ressuspendido em PBS e submetido à centrifugação, nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* livre de hemácias e células brancas ressuspendido em PBS em quantidade suficiente para a inoculação de $2,5x10^6$ células/ 60 μL na pata direita de cada animal.

Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/C, pesando entre 20-25 g,). Os grupos experimentais (n = 10) foram mantidos com ração e água fornecidos *ad libitum,* em gaiolas individuais identificadas.

Procedimento

Os animais foram pesados e o volume basal da pata traseira direita de cada animal mensurada em aparelho pletismômetro. As células tumorais, obtidas como descrito anteriormente, foram diluídas em tampão fosfato (PBS) e inoculadas no coxim plantar da pata traseira direita dos camundongos, na densidade de $2,5x10^6$ / animal. Após 24 horas, os animais foram divididos em grupos (n=10) e tratados por via intraperitoneal (i.p.), sendo os grupos: controle negativo (salina), controle positivo (5-Fluoracil 10mg/Kg) e os grupos experimentais FAE nas doses de 30, 100 e 300mg/Kg. No 15º dia de teste os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical (Nascimento et al., 2006; Verçosa JR et al., 2007). Dessa forma, o parâmetro avaliado foi a variação do volume do tumor nas datas do tratamento ($Volume_{pata} - Volume_{pata\ basal}$) = $Volume_{tumor.}$

3.8.3. Atividade Antiedematogênica - Modelo de Edema de Pata Induzido por Carragenina.

Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss*, pesando entre 25-30g. Os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas individuais identificadas e com ração e água fornecidos *ad libitum.*

Os animais foram divididos em cinco grupos (n=10) e tratados por via oral (v.o.): controle negativo (salina), controle positivo (Piroxicam, 20 mg/Kg) e grupos experimentais (FAE 30, 100, 300 mg/Kg tratamento dose única e repetidas doses (diário) de 100mg/Kg. A inflamação foi induzida nas patas por meio da administração de carragenina, na concentração de 2%, diluída em salina e administrada em 60µL. Uma hora antes da indução de inflamação o volume das patas traseiras direitas foi mensurado e as demais medições realizadas nos tempos 1:30h, 3:00h, 4:30, 6:00, 24h, 48h e 72h, considerando os tempos até 6:00 (fase inicial) e 24h, 48h e 72h (fase tardia), seguindo protocolo de Nunes e colaboradores (2007). Após 72 horas os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Dessa forma, foi avaliada a variação do volume da pata traseira direita, tendo como controle o volume basal antes da indução da inflamação.

Para o cálculo da % de redução do volume do edema, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$(\text{Volume}_{\text{pata direita}} - \text{Volume}_{\text{pata direita basal}}) \times 100 = \text{Volume}_{\text{edema}}$$

$$[(V_{\text{edema veículo}} - V_{\text{edema grupo}})/ V_{\text{edema veículo}} \times 100] = \% \text{ de redução}$$

3.8.4. Contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético foi realizado como descrito por Spíndola e colaboradores (2010). Grupos experimentais de camundongos (*Swiss*) (n=8) foram tratados com o veículo, indometacina 30 mg/Kg, e FAE nas doses de 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/Kg, pelas vias intraperitoneal (i.p.) e via oral (v.o.). Após 30 e 60 minutos respectivamente, os animais receberam ácido acético (0,8% 0,1 mL/10g, i.p.). As contorções da parede abdominal, seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas, foram contadas, imediatamente após injeção do ácido acético, cumulativamente durante 15 minutos, determinando a atividade antinociceptiva por comparação ao controle negativo (Koster et al., 1959; Vacher et al., 1964).

3.8.5. Teste de algesia induzida por calor

Foram utilizados grupos de 8 camundongos (Swiss). Para este teste, os camundongos foram previamente submetidos ao estímulo álgico 24h antes do teste a fim de selecionar os mais responsivos. O valor basal, de reação ao estímulo térmico, foi obtido em duplicata (com 30 min de intervalo) colocando os animais individualmente em placa quente de temperatura controlada de 56 ± 0,1ºC onde foram submetidos ao estímulo por temperatura, até que apresentasse o reflexo doloroso (lamber as patas dianteiras e/ou traseiras) sendo anotado o tempo de reação com uso de cronômetro. Os animais foram então tratados, via intraperitoneal, com solução de NaCl 0,9%, morfina (10 mg/Kg) e Fração FAE nas doses de 10, 30, 100 e 300mg/Kg e a resposta foi novamente avaliada após 30, 60, 90 e 120 minutos da administração das drogas O tempo máximo de contato do animal com a placa quente é de 20 s (tempo de corte) para evitar lesões nas patas.

3.8.6. Teste de algesia induzida por capsaicina

Grupos de camundongos Swiss machos (n=8) foram tratados por via intraperitoneal com solução de NaCl 0,9%, e com a Fração FAE nas doses de 30, 100 e 300mg/kg. Após 60 minutos, foi administrada solução de capsaicina (1,6 µg/pata) na região subplantar da pata posterior direita dos animais. O tempo que os animais permaneceram lambendo as patas, por um período de cinco minutos, é indicativo de nocicepção. Este teste só avalia dor de origem neurogênica.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes foram expressos como médias ± erro padrão das médias (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan. Valores de *p* menores que 0,05 ($p \leq 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

FITOQUÍMICA E BIOMONITORAMENTO

4.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO

Para o cálculo do rendimento de extração, 100 g de rizomas secos e moídos de *I. brasiliensis* foram submetidos à maceração dinâmica em etanol 70% por três períodos de quatro horas com renovação do solvente extrator. Depois de filtrado e evaporado todo o solvente a massa de extrato EBOH obtida foi de 0,620g, obtendo-se um rendimento médio de 0,6% sob as condições descritas. Posteriormente novas extrações foram realizadas a fim de obter massa de EBOH suficientes para realização de diversos ensaios.

4.2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*

As Figuras a seguir (gráficos) correlacionam a procentagem de crescimento celular e a concentração das amostras, controle positivo (doxorrubicina) e extratos brutos e frações obtidos de *I. brasiliensis*, testadas em cultura de celulas tumorais humanas e murinas. Os valores abaixo de 100% e acima de zero representam inibição de crescimento enquanto os negativos (abaixo de zero) representam morte celular, onde a quantidade de células (aferida pela absorbância no final do experimento), é menor do que aquela que iniciou o experimento (absorbância do T0).

4.2.1. Atividade Antiproliferativa *in vitro* do Quimioterápico Doxorrubicina

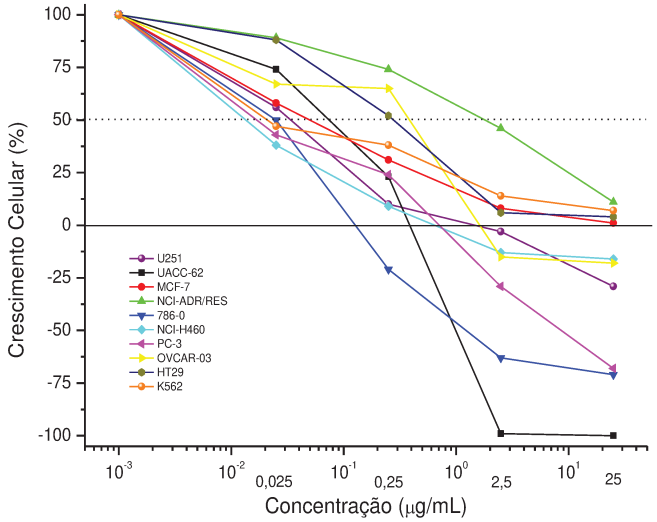


Figura 10. Gráfico da atividade antiproliferativa da doxorrubicina em cultura de células tumorais humanas relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração do fármaco, após 48 h de incubação.

O quimioterápico doxorrubicina (Figura 10) (Tecnofarma International®, Uruguai), produziu inibição de crescimento para todas as linhagens e morte celular para melanoma (UACC-62 / 0,32µg/mL), próstata (PC-03 / 0,56 µg/mL) e mama (MCF-7 / 10,04 µg/mL) na concentração de 2,5µg/mL e rim (786-0 / 0,16µg/mL) na concentração de 0,25µg/mL. A linhagem ovário resistente (NCI-ADR/RES / 42,24 µg/mL) foi a linhagem com menor sensibilidade à doxorrubicina tendo validado o experimento, pois esta é uma linhagem que apresenta resistência à múltiplas drogas. Os valores de TGI (concentração que inibe o crescimento celular em 100%) da doxorrubicina foram calculados e apresentados na Tabela 3, onde é possível concluir a maior seletividade para as linhagens de rim, melanoma e próstata, nesse experimento.

Tabela 3. Valores de TGI do quimioterápico doxorrubicina em teste de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas (µg/mL)

Linhagem celular	U251	UACC-62	MCF7	NCI/ADR	786-0	NCI-H460	PC-O3	OVCAR-03	HT-29	K562
TGI (µg/mL)	1,75	0,32	10,04	42,24	0,16	1,59	0,56	4,18	13,21	19,01

4.2.2. Atividade antiproliferativa in vitro do extrato EBOH

Na Figura 11 observa-se que o extrato hidroetanólico (EBOH) apenas produziu inibição de crescimento na concentração mais elevada, sem morte celular o que demonstrou a baixa toxicidade em cultura de células.

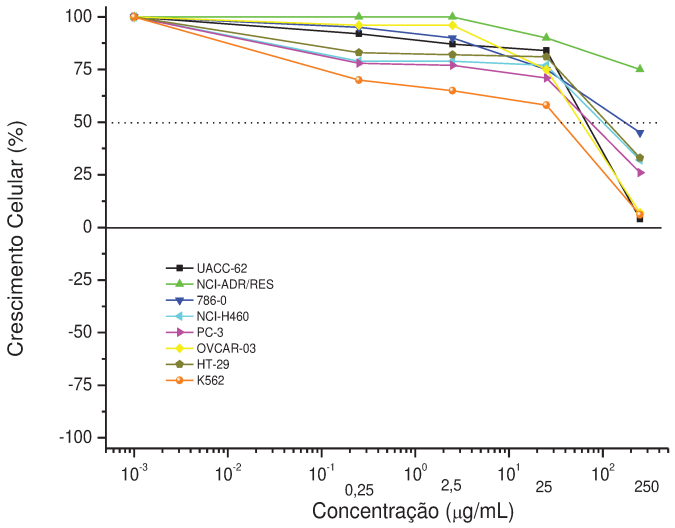


Figura 11. Gráfico de atividade antiproliferativa do extrato bruto hidroetanólico obtido de rizomas secos de *Imperata brasiliensis* em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

4.3. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA POR PARTIÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO DO EXTRATO EBOH.

Dez gramas do extrato bruto hidroetanólico foram diluídos em 100 mL de água, transferidos para um funil de separação e sumetidos a extração líquido/líquido sob agitação com o mesmo volume de acetato de etila. O procedimento foi realizado com a renovação do solvente acetato de etila por três vezes e o rendimento final foi igual a (m=980mg) 9,8%. Esta metodologia permitiu uma prévia separação de compostos químicos com polaridades distintas e originou duas frações que foram denominadas de Fração acetato de etila (FAE), composta por substâncias com menor polaridade e Fração aquosa (FAQ) com componentes mais polares.

Ambas as frações foram submetidas à análise por cromatografia de camada delgada (CCD) e reveladas por pulverização de solução de anisaldeído 2% (Figura 12). Considerando o perfil cromatográfico das frações, observou-se que grande parte dos compostos foi extraída pelo acetato de etila e concentrado na Fração FAE. As frações foram submetidas ao ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro* visando biomonitorar sua atividade em linhagens celulares tumorais.

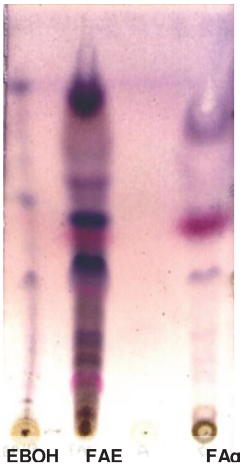


Figura 12. Placa cromatográfica de fase estacionária sílica gel na qual se aplicou as amostras: Extrato EBOH, Fração FAE e Fração FAQ, as duas últimas obtidas por partição líquido/líquido do extrato EBOH com solvente acetato de etila. Fase móvel- diclorometano/metanol 97:3, revelador anisaldeído 2% com posterior exposição à temperatura de 150ºC por 2 min.

4.3.1. Atividade Antiproliferativa in vitro das Frações FAE e FAQ

A Figura 13 representa a curva concentração-resposta da Fração FAE em linhagens celulares tumorais. A análise do gráfico mostrou que, quando comparada ao extrato EBOH (Figura 11) a Fração foi mais potente, sendo citocida na concentração 250µg/mL. Conforme consta na Tabela 4 a Fração apresentou seletividade para as linhagens de mama (MCF7 / 48,26µg/mL), rim (786-0 / 30,09µg/mL), melanoma (UACC-62 / 83,87µg/mL) e cólon (HT29 / 140,36µg/mL). A Fração FAQ (Figura 14), por sua vez, não exibiu atividade sobre as células.

Tabela 4. Valores de TGI (µg/mL) da Fração FAE e Fração FAQ.

	NCI-H460	MCF7	NCI/ADR	HT29	PC-3	UACC-62	OVCAR-03	786-0
FAE	>250	48,26	>250	140,36	57,23	83,87	>250	30,09
FAQ	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

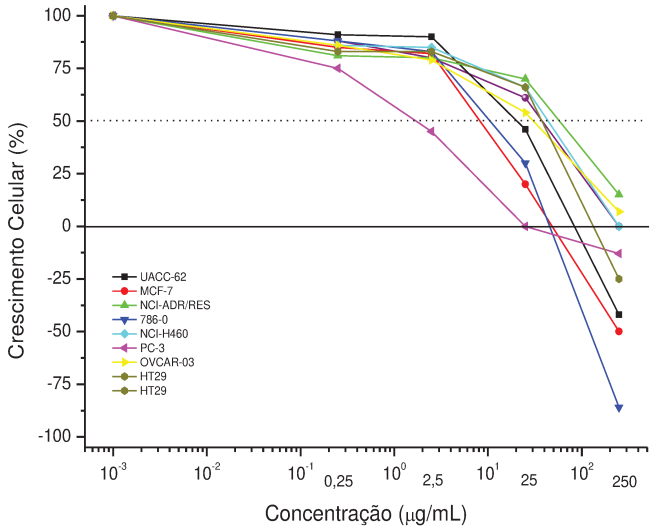


Figura 13. Gráfico de atividade antiproliferativa da FAE, obtida do extrato bruto hidroetanólico, em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

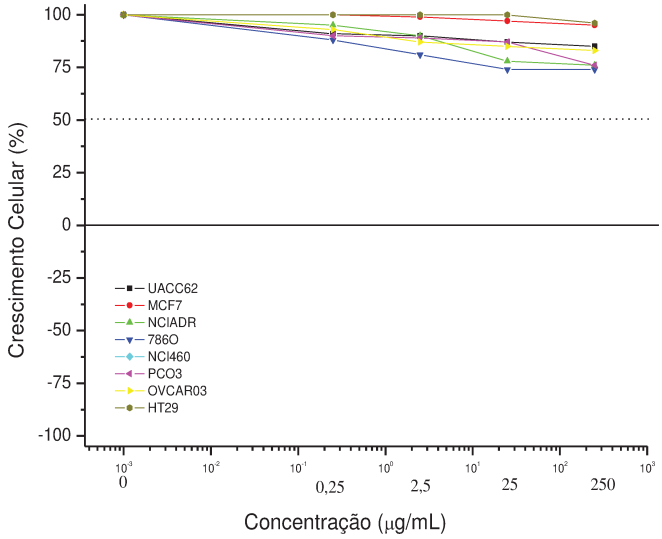


Figura 17. Gráfico de atividade antiproliferativa da FAQ, obtida do extrato bruto hidroetanólico, em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

4.4. CROMATOGRAFIA EM COLUNA FILTRANTE DA FRAÇÃO FAE.

Para a realização de um novo fracionamento fez-se necessário repetir o procedimento de obtenção da FAE que foi então submetida ao fracionamento pela técnica de cromatografia em coluna filtrante e as frações resultantes biomonitoradas. Sendo assim, uma amostra da Fração FAE (m=10g) foi extraída com eluentes de diferentes polaridade sendo eles Hexano, Diclorometano e Metanol em diferentes gradientes de concentração. As frações foram coletadas a cada 50 mL resultando em 42 frações, conforme descrito na Tabela 1, que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em 14 grupos (Figura 15).

Os rendimentos (% de massa obtida, em relação à Fração de origem) encontram-se descritos na Tabela 5.

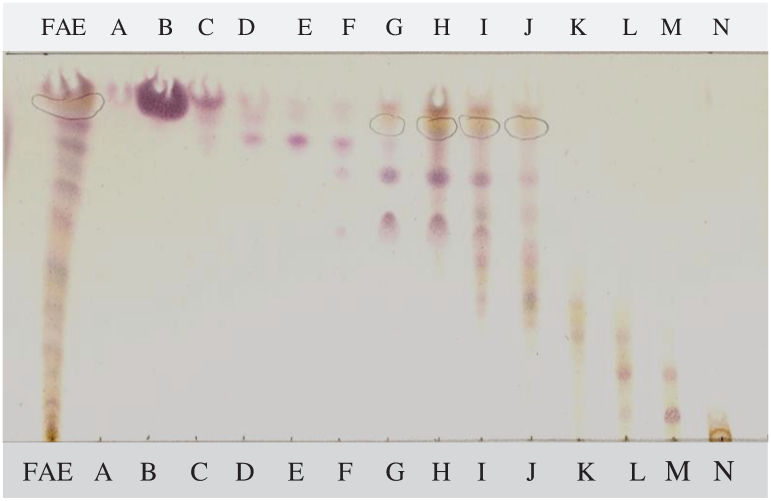


Figura 15. Cromatografia de camada delgada das frações A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N provenientes do fracionamento da Fração FAE. Fase móvel da CCD - diclorometano/metanol 97:3, revelador anisaldeído 2% com posterior exposição à temperatura de 150ºC por 2 min.

Tabela 5. Rendimento (%) das Frações obtidas por cromatografia em coluna filtrante da Fração Acetato de Etila (FAE).

FRAÇÕES	RENDIMENTO (%)
Fração A	0,50
Fração B	3,40
Fração C	13,00
Fração D	0,43
Fração E	1,00
Fração F	1,20
Fração G	0,60
Fração H	1,00
Fração I	7,00
Fração J	12,00
Fração K	9,50
Fração L	4,00
Fração M	1,00
Fração N	31,00

4.4.1. Atividade Antiproliferativa *in vitro* das Frações A-N, obtidas por Cromatografia de Coluna Filtrante a partir da Fração FAE

As 14 frações obtidas da Fração acetato de etila (FAE) pelo método cromatográfico de coluna filtrante foram nomeadas sequencialmente de A a N conforme Figura 15, sendo que a polaridade dos compostos obtidos foi crescente à medida que se aumentou o gradiente de concentração dos solventes conforme Tabela 1.

Nos gráficos das Frações A e B (Figura 16) fica evidente a inatividade de ambas frente às linhagens celulares tumorais .

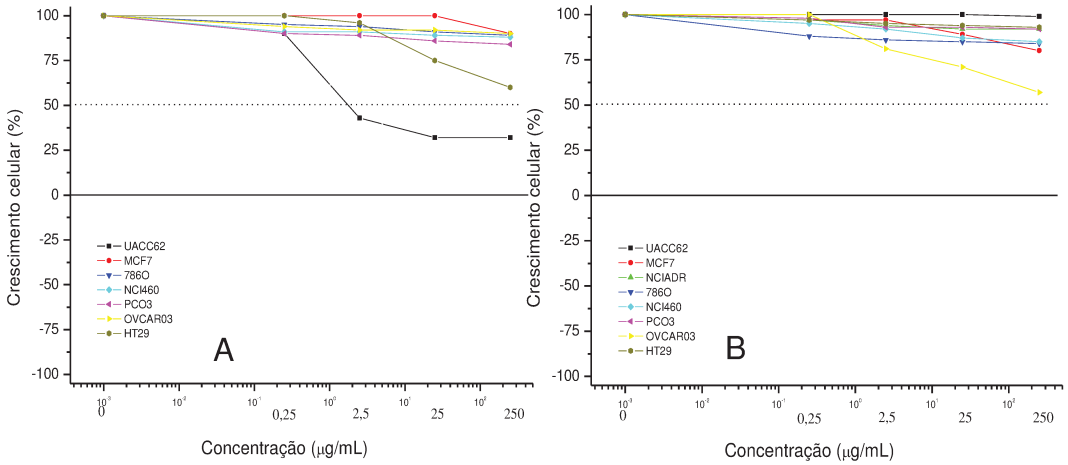


Figura 16. Gráficos de atividade antiproliferativa das Frações A e B,. Ensaio realizado em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição. Nos gráficos, as letras representam os nomes das amostras. Gradiente de concentração dos eluentes Hexano100%- Diclorometano100%.

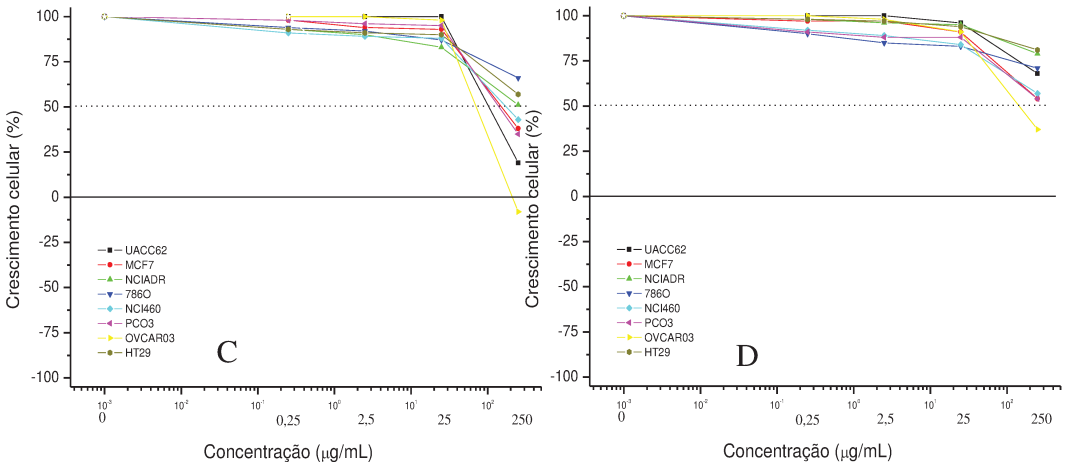


Figura 17. Gráficos de atividade antiproliferativa das Frações C e D. Teste realizado em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição. Nos gráficos, as letras representam os nomes das amostras. Gradiente de concentração dos eluentes Dic/Met 0,2% - Dic/Met 0,4%.

A Figura 17 retrata o perfil de ação das frações C e D em protocolo de atividade antiproliferativa *in vitro*, onde, a Fração C não demonstrou atividade citocida para nenhuma linhagem celular e apresentou atividade citostática na maior dose (250µg/mL) para as linhagens de ovário (OVCAR) e melanoma (UACC-62), enquanto isso a Fração D foi inativa.

A Fração E apresentou um perfil predominantemente citostático para as linhagens: mama (MCF-7) e pulmão (NCI-H460) na maior concentração 250µg/mL (Figura 18 E) sem atividade para as outras linhagens. A primeira Fração com potencial citocida às celulas foi a Fração F (Tabela 6) com atividade para as linhagens de próstata (PC-03 TGI=44,12µg/mL), ovário resistente (NCI-ADR TGI=63,34 µg/mL) e pulmão (NCI-H460 TGI=62,43µg/mL) (Figura 18 F).

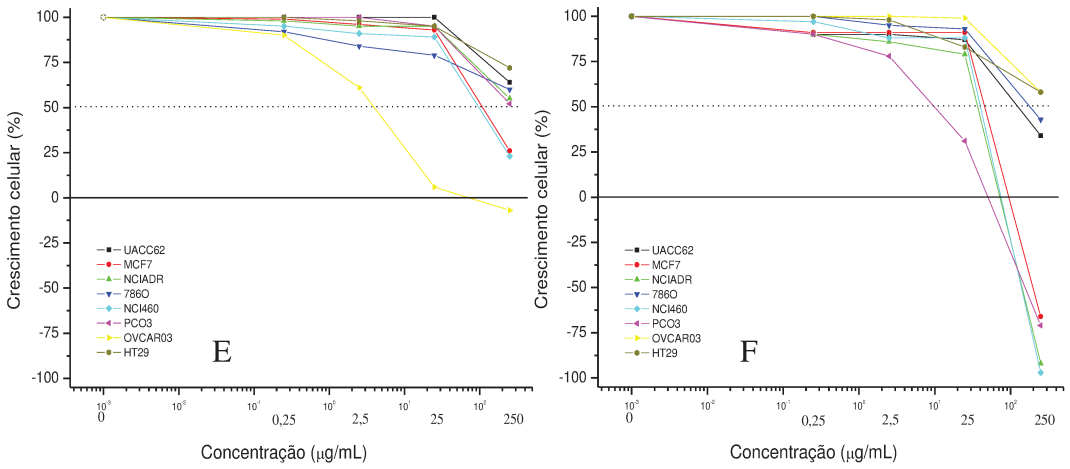


Figura 18. Gráficos de atividade antiproliferativa das Frações E e F. Teste realizado em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição. Nos gráficos, as letras representam os nomes das amostras. Gradiente de concentração dos eluentes Dic/Met 0,6% - Dic/Met 2,0%.

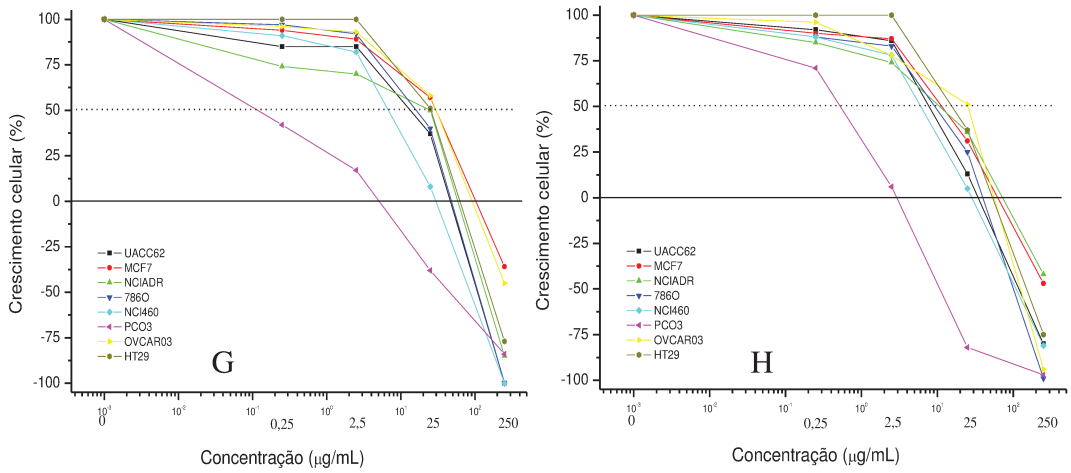


Figura 19. Gráficos de atividade antiproliferativa das Frações G e H. Teste realizado em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição. Nos gráficos, as letras representam os nomes das amostras. Gradiente de concentração dos eluentes Dic/Met 2,0% - Dic/Met 2,5%.

As frações G e H produziram inibição de crescimento e morte celular para todas as linhagens com boa correlação entre concentração e efeito. Observando os gráficos (Figura 19 G e 19 H) nota-se seletividade para a linhagem de próstata (PC-03) na concentração de 25µg/mL com TGI (3,52 e 2,56 µg/mL) respectivamente.(Tabela 6) Na maior concentração (250µg/mL) as duas frações produziram morte celular em todas as demais linhagens celulares. Os perfis das Frações são bastante semelhantes e seus valores de TGI próximos.

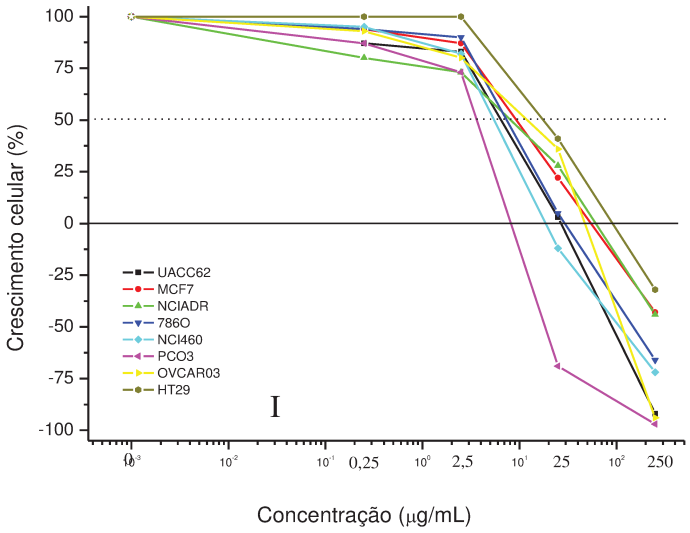


Figura 20. Gráficos de atividade antiproliferativa da Fração I em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição. Nos gráficos, as letras representam os nomes das amostras. Gradiente de concentração dos eluentes Dic/Met 2,5% - Dic/Met 3,5%

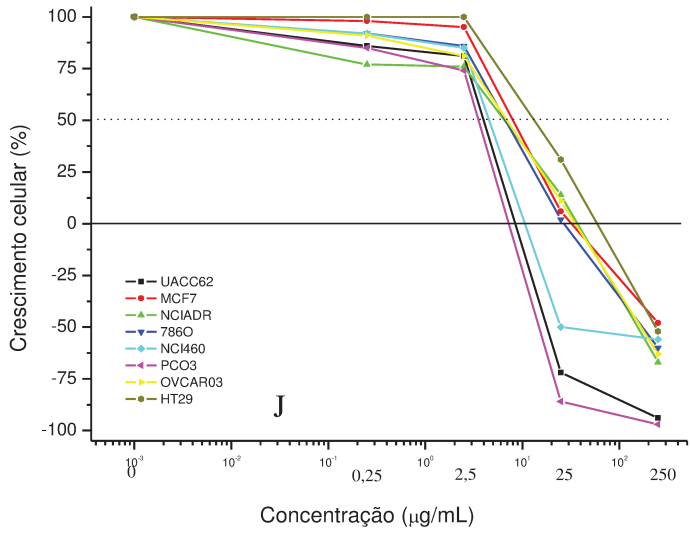


Figura 21. Gráficos de atividade antiproliferativa da Fração J em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição. Nos gráficos, as letras representam os nomes das amostras. Gradiente de concentração dos eluentes Dic/Met 3,5% - Dic/Met 4,5%.

No processo de fracionamento por cromatografia de coluna filtrante duas frações apresentaram melhor atividade e demonstraram ação antiproliferativa mais potente, que somados ao rendimento tornaram-nas mais promissoras. As Frações I (Figura 20) e J (Figura 21) produziram inibição de crescimento e morte celular para todas as linhagens e relativa seletividade para próstata (PC-03 TGI=8,27 µg/mL e 6,64 µg/mL) e melanoma (UACC-62 TGI=25,19 µg/mL e TGI=8,90µg/mL) respectivamente. Sendo assim estas frações foram selecionadas para dar continuidade aos estudos de atividade anticâncer.

Os gráficos de atividade antiproliferativa das frações subsequentes à Fração J, são apresentados a seguir, no entanto, vale ressaltar que as amostras não selecionadas para continuidade deste trabalho foram preservadas.

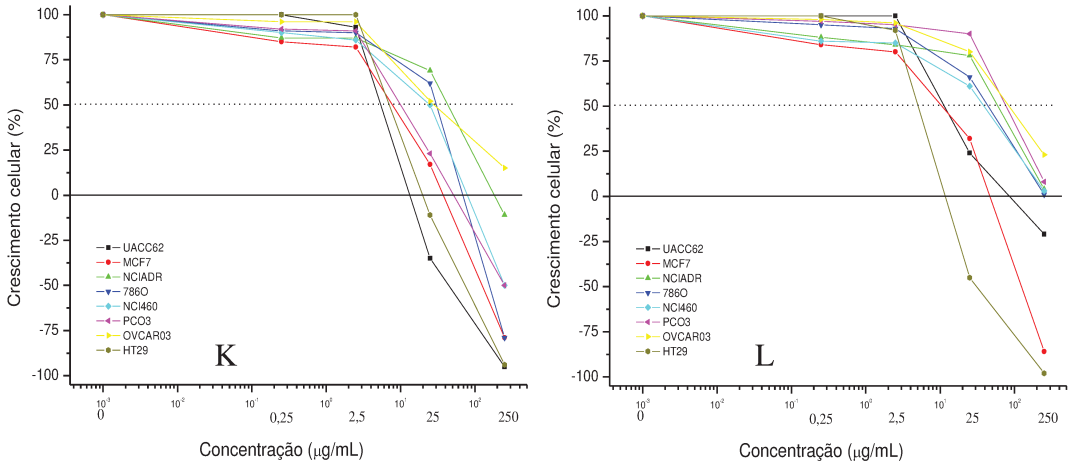


Figura 22. Gráficos de atividade antiproliferativa das Frações K e L em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição. Nos gráficos, as letras representam os nomes das amostras. Gradiente de concentração dos eluentes Dic/Met 4,5% - Dic/Met 6,5%.

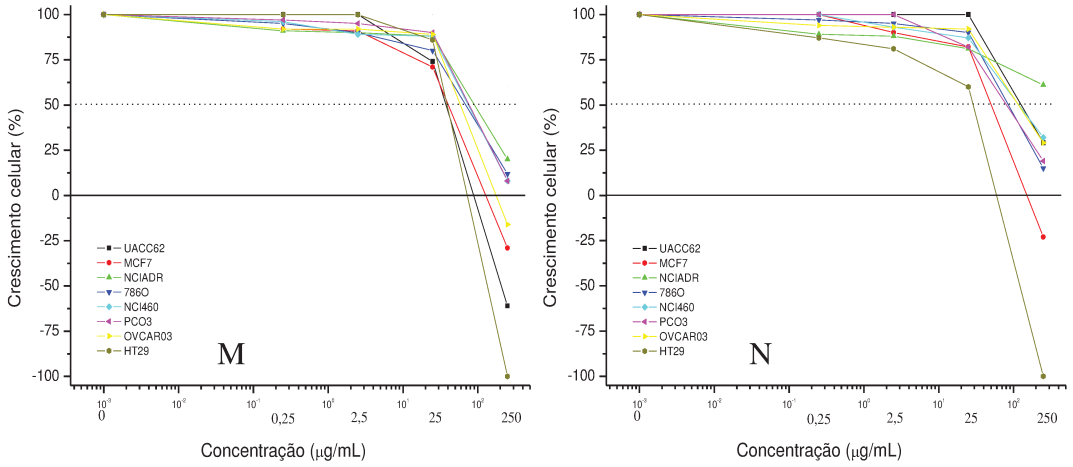


Figura 23. Gráficos de atividade antiproliferativa das Frações M e N. Ensaio realizado em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra. Nos gráficos, as letras representam os nomes das amostras, após 48 h de exposição. Gradiente de concentração dos eluentes Dic/Met 7,0% - Dic/Met 8,0% para M e Metanol 100% para N.

As últimas frações originadas do mesmo procedimento, foram K, L, M e N, onde a Fração K (Figura 22) manteve o perfil de atividade citocida, porém com perda de eficiência para as linhagens ovário resistente (NCI-ADR) e de ovário (OVCAR-03) (Tabela 6). A ação citocida sobre as linhagens de colon (HT-29) e mama (MCF-7) foi intensificada demonstrando valores de TGI (22,39µg/mL e 33,40µg/mL) respectivamente.

A Fração L demonstrou melhor atividade sobre as linhagens tumorais de colon (HT-29 TGI=14,57µg/mL) e mama (MCF-7 TGI=40,07µg/mL). Por fim, as amostras M e N (Figura 23) demonstraram menor atividade sobre a maioria das linhagens tumorais, prevalescendo uma atividade citostática .

Tabela 6. Valores de TGI (µg/mL) a Doxorrubicina (quimioterápico controle), Fração Acetato de Etila do Extrato hidro-etanólico (FAE) e Frações ativas obtidas por cromatografia de coluna filtrante a partir da a FAE .

	DOXO	FAE	Fr- F	Fr- G	Fr- H	Fr- I	Fr- J	Fr- K	Fr- L	Fr- M	Fr- N
NCI-H460	1,59	>250	62,43	26,82	26,42	21,79	12,34	77,52	>250	>250	>250
MCF7	10,04	48,26	113,43	106,11	61,90	57,73	42,53	33,40	40,07	138,74	168,30
NCI/ADR	42,24	>250	63,34	50,94	67,97	56,99	33,33	193,66	>250	31,36	>250
HT29	13,21	140,36	>250	56,69	48,37	96,54	60,10	22,39	14,57	>250	40,84
PC-3	0,56	57,23	44,12	3,52	2,56	8,27	6,64	53,21	>250	>250	>250
UACC-62	0,32	83,87	>250	35,88	31,72	25,19	8,90	16,35	97,50	93,56	>250
OVCAR-3	4,18	>250	>250	94,11	45,55	39,35	34,97	>250	>250	196,82	>250
786-0	0,16	30,09	>250	35,03	33,34	32,04	32,02	63,25	>250	>250	>250

4.5. TRATAMENTO DA FRAÇÃO J COM ACETATO DE CHUMBO

Devido ao seu perfil de atividade com baixos valores de TGI, a Fração J foi submetida à limpeza com acetato de chumbo originando a Fração J-Pb enriquecida em compostos terpênicos. A Figura 27 ilustra a análise cromatográfica (CCD) das amostras, onde a Fração J-Pb é livre de graxas e compostos fenólicos.

Figura 24. Placa cromatográfica de fase estacionária sílica gel na qual se aplicou a Fração J, proveniente da FAE e a Fração J-Pb, resultado da limpeza com acetato de chumbo. Fase móvel- diclorometano/metanol 97:3, revelador anisaldeído 2% com posterior exposição à temperatura de 150ºC por 2 min.

4.5.1. Atividade antiproliferativa *in vitro* com a Fração J-Pb

No gráfico (Figura 25 e Tabela 7) observa-se a curva concentração-resposta da Fração J-Pb que, quando comparada à amostra de origem (Fração J - Figura 21), exibiu um perfil de atividade menos potente. No entanto, para as linhagens de próstata (PC-3), melanoma (UACC-62) e pulmão (NCI-460), a seletividade foi mantida sugerindo que a atividade citocida para estas linhagens citadas pode estar relacionada aos compostos terpênicos.

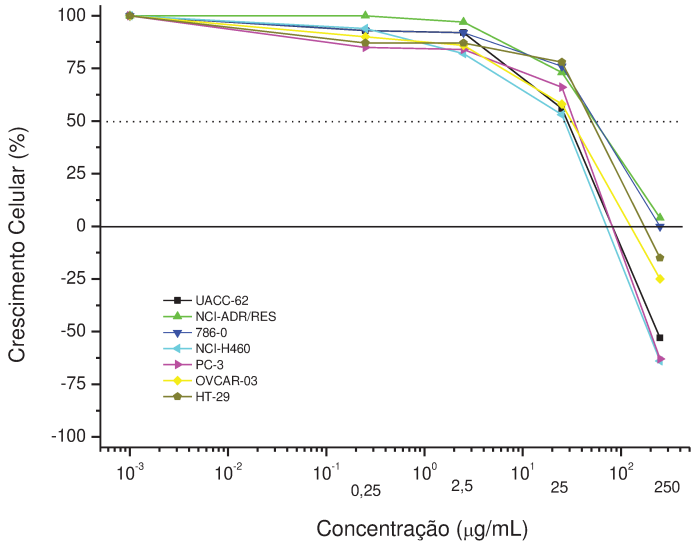


Figura 25. Gráfico da atividade antiproliferativa da Fração J-Pb. Ensaio realizado em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

Tabela 7. Valores de TGI (µg/mL) da Doxorrubicina (quimioterápico controle), Fração Acetato de Etila do Extrato hidro-etanólico (FAE), Fração J e Fração J-Pb.

	DOXO	FAE	Fr- J	Fr-J-Pb
NCI-H460	1,59	>250	12,34	67,07
MCF7	10,04	48,26	42,53	-----
NCI/ADR-RES	42,24	>250	33,33	>250
HT29	13,21	140,36	60,10	185,75
PC-3	0,56	57,23	6,64	80,96
UACC-62	0,32	83,87	8,90	81,74
OVCAR-03	4,18	>250	34,97	130,68
786-0	0,16	30,09	32,02	>250

4.6. ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DE FRAÇÕES ATIVAS DE *I. brasiliensis.*

As frações de *I. brasiliensis* com melhor perfil de atividade foram submetidas a análise qualitativa preliminar por meio de Cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando diferentes reveladores. Sendo assim, as frações FAE, Fr-F, Fr-G, Fr-H, Fr-I, Fr-J e Fr-J-Pb e seus perfis cromatográficos estão representadas nas figuras 26,27,28 e 29.

Na Figura 26 verificou-se que a FAE apresentou manchas violetas e marrons (Rf- 0,58 e 0,79 respectivamente) que também estão presentes nas frações Fr-G, Fr-H, Fr-I e Fr-J seguindo o mesmo fator de retenção (Rf), no entanto após a tratamento da Fr-J com acetato de chumbo (Fr-J-Pb) observou-se uma melhor separação das bandas, e a retirada de compostos apolares como graxas e clorofila.

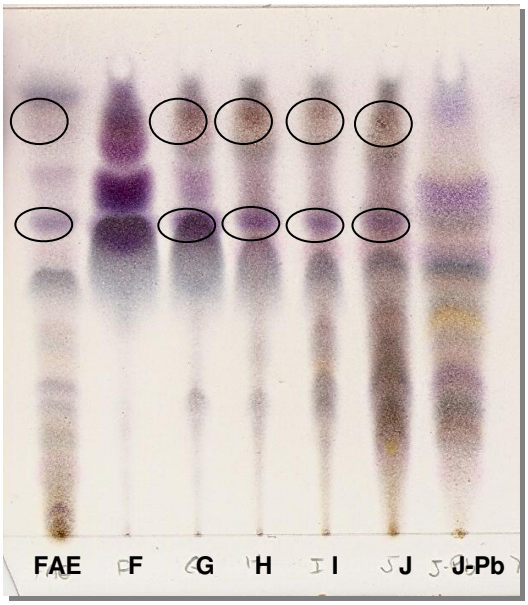


Figura 26. Placa cromatográfica de fase estacionária sílica com amostras obtidas a partir do fracionamento da FAE. Fase móvel- diclorometano/metanol 97:3, revelador anisaldeído 2% com posterior exposição à temperatura de 150ºC por 2 min.

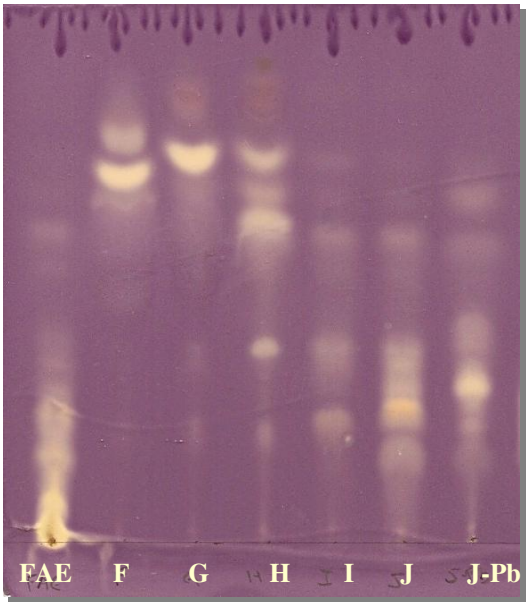


Figura 27. Placa cromatográfica de fase estacionária sílica com amostras obtidas a partir do fracionamento da FAE. Fase móvel- diclorometano/metanol 97:3, revelador DPPH 2% . Placa após 5 minutos de imersão em revelador.

A placa cromatográfica que foi imersa em solução de DPPH 2% (Figura 27) revelou que a amostra FAE possui a capacidade de sequestrar radicais livres, o que se repetiu nas amostras originadas a partir dela. Observando a Fração J e a Fração J-Pb podemos sugerir que a capacidade antioxidante da amostra se deve a presença de compostos de polaridade intermediária, uma vez que o perfil se repetiu na segunda amostra (J-Pb), a qual sofreu a retirada de compostos mais apolares e fenólicos, como podemos observar na placa cromatográfica representada na figura 29.

As mesmas amostras foram submetidas à revelação com nebulização de solução Dragendorff onde foi observado uma única banda alaranjada (Rf-0,77) para a Fração J-Pb e demonstrou que estes compostos foram concentrados após a limpeza da amostra (Figura 28).

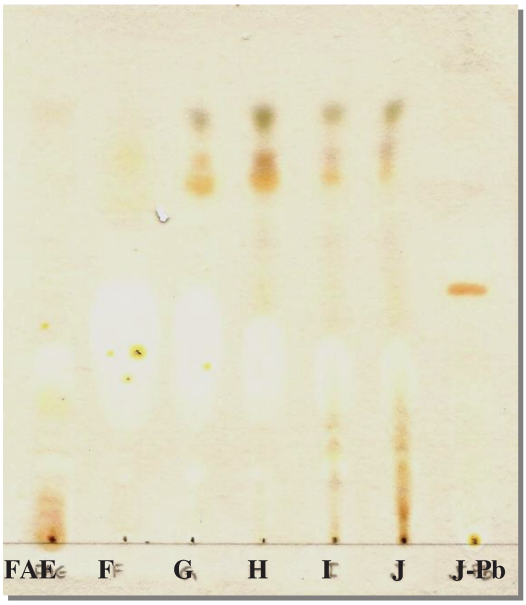


Figura 28. Placa cromatográfica de fase estacionária sílica com amostras obtidas a partir do fracionamento da FAE. Fase móvel- diclorometano/metanol 97:3, revelador Dragendorff.

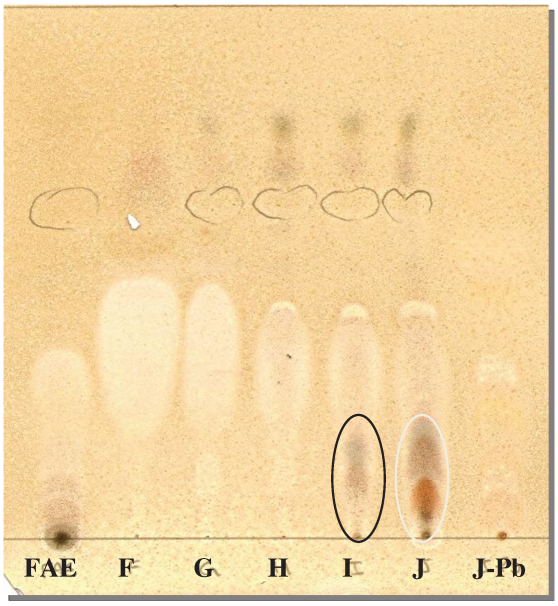


Figura 29. Placa cromatográfica de fase estacionária sílica com amostras obtidas a partir do fracionamento da FAE. Fase móvel- diclorometano/metanol 97:3, revelador Cloreto Férrico.

4.7. EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE DAS FRAÇÕES I+J

Baseado nos resultados obtidos no teste de bioatividade, em protocolo de atividade antiproliferativa *in vitro*, reuniu-se uma alíquota das Frações I e J que foram submetidas à extração ácido-base com o objetivo de separar os compostos presentes de acordo com a característica química dos mesmos e avaliar a presença de compostos alcalóides, observados na CCD (Figura 28). Sendo assim 200mg (100mg F-I + 100mg F-J) da Fração J foram extraídos conforme o esquema (Figura 7) resultando na Fração enriquecida em substâncias básicas denominada Fração alcalóides (F-Alc, - rendimento 7mg ou 3,5%), a Fração livre das bases foi denominada Neutra Apolar (F- NApo - rendimento 12mg ou 6%) e a Fração enriquecida em Ácidos Orgânicos (F- Ácida - rendimento 18,3mg ou 9,2%). No momento da evaporação do solvente a Fração ácida apresentou um precipitado branco, portanto esta foi separada em precipitado e sobrenadante gerando duas novas frações F-Ácida_PPT e F-Ácida_S.

4.7.1. Atividade antiproliferativa *in vitro* com as frações I e J e provenientes da extração ácido-base.

Ao unir as frações I e J (Figura 30) notou-se que houve uma diminuição na potência de atividade sobre linhagens tumorais demonstrando que as Frações I e J, separadamente, são melhores e mais seletivas. O resultado sugeriu ainda que não houve sinergismo, além da possibilidade de ter acontecido uma diluição dos compostos ativos. Os valores de TGI são apresentados na Tabela 8.

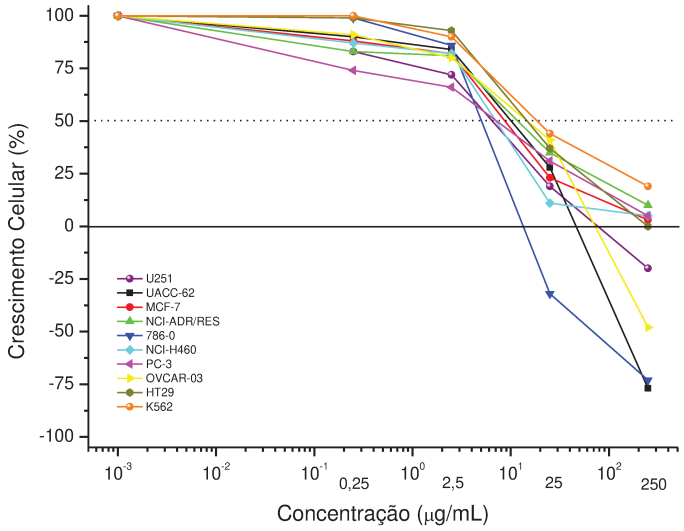


Figura 30. Gráfico da atividade antiproliferativa da Fração I+J em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

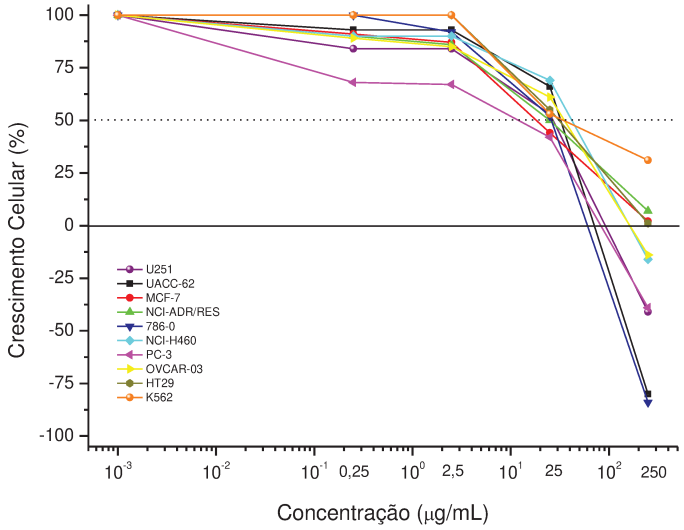


Figura 31. Gráfico da atividade antiproliferativa da Neutra Apolar (F- Napo) em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

Na Figura 31, a Fração neutra apolar, rica em compostos não ionizáveis, apresentou uma atividade mais potente exibindo valores de TGI (Tabela 8) menores principalmente para as linhagens de melanoma (UACC-62 TGI=65,59µg/mL) e próstata (PC-03 TGI=75,08µg/mL).

A Fração constituída de Ácidos orgânicos sofreu precipitação e seu precipitado foi testado separadamente do sobrenadante. Analisando as Figuras 32 e 34 podemos observar que o sobrenadante da Fração ácida (F-Ácida_S) foi mais ativo que o seu precipitado, porém menos potente que a Fração Neutra apolar.

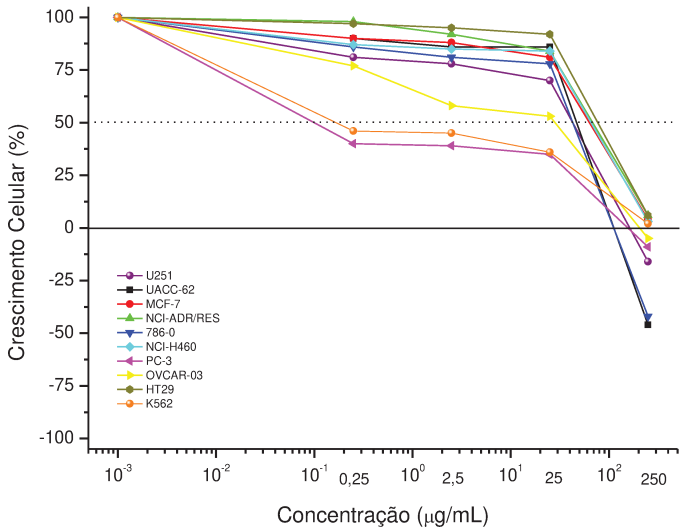


Figura 32. Gráfico da atividade antiproliferativa da Fração ácida sobrenadante (F-Ácida_S). Ensaio realizado em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

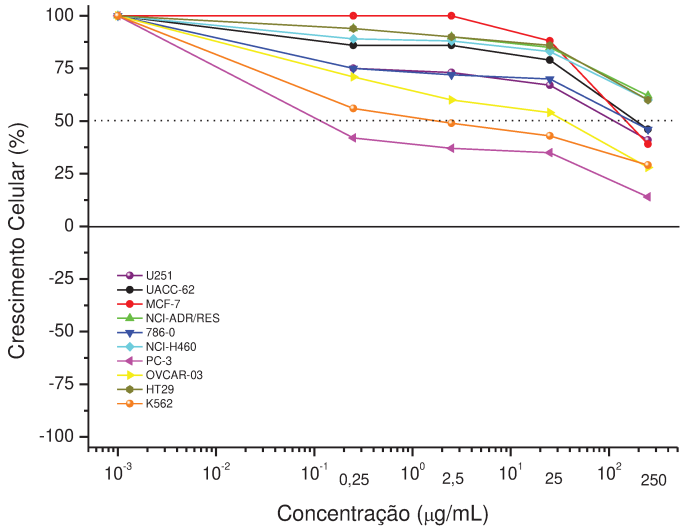


Figura 33. Gráfico da atividade antiproliferativa da Fração ácida precipitado (F-Acida_PPT). Ensaio realizado em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

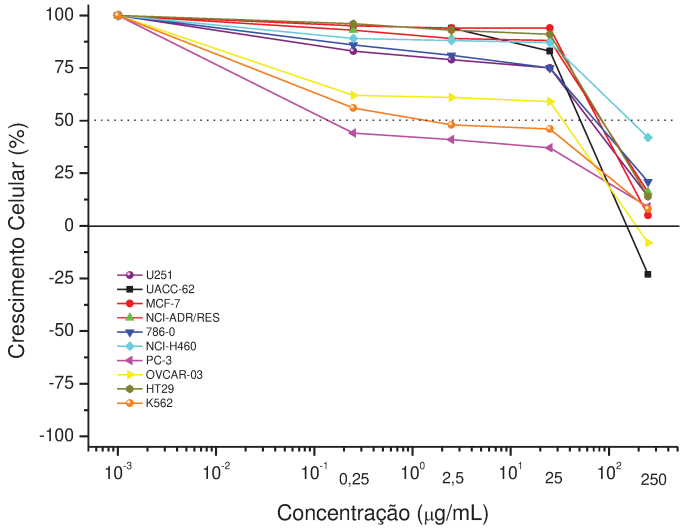


Figura 34. Gráfico da atividade antiproliferativa da Fração enriquecida em alcalóides (F-Alc). Ensaio realizado em cultura de células tumorais humanas correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

A Fração básica enriquecida com compostos alcaloídicos (F-Alc) (Figura 34) não apresentou citotoxicidade para as linhagens celulares. Os valores de TGI (Tabela 8) sugerem que não são compostos com característica química básica os responsáveis pela atividade antiproliferativa *in vitro.*

Tabela 8. Valores de TGI (µg/mL) da Doxorrubicina (quimioterápico controle), Fração Acetato de Etila do Extrato hidro-etanólico (FAE), Fração I+J, Fração Alcaloídica (F-Alc), Fraçãp Neutra Apolar (F-NApo) e Fração ácidos orgânicos (Precipitado = PPT e Sobrenadante = Ácida-S)

	DOXO	**FAE**	**Fr- I+J**	**F-Alc**	**F- NApo**	**F- Ácida**	
						F-Ácida_PPT	**F-Ácida_S**
NCI-H460	1,59	>250	179,10	>250	172,76	>250	>250
MCF7	10,04	48,26	203,25	>250	249,07	>250	>250
NCI/ADR-RES	>25	>250	>250	>250	>250	>250	>250
HT29	13,21	140,36	205,38	>250	240,72	>250	>250
PC-3	0,56	57,23	>250	>250	75,08	>250	178,96
UACC-62	0,32	83,87	40,83	170,32	65,59	>250	130,42
OVCAR-03	4,18	>250	68,77	>250	172,42	>250	>250
786-0	0,16	30,09	15,79	>250	172,76	>250	122,51
K-562	19,01	---	>250	>250	>250	>250	>250
U-251	1,75	---	84,82	>250	91,59	>250	175,90

4.7.2. Atividade das Frações ativas de *I. brasiliensis* em ensaio antiproliferativo *in vitro* com diferentes linhagens de melanoma.

As Frações I, J e K, a mistura das Frações I e J e sua derivada Fração neutra apolar, todas provenientes do fracionamento da FAE, apresentaram um menor valor de TGI para a linhagem de melanoma (UACC-62) (Tabelas 5 e 7). Sendo assim, a mistura das Frações I+J foi novamente submetida ao teste antiproliferativo, desta vez, em linhagens de melanomas humano e murino somente. A escolha da Fração foi devido ao rendimento das mesmas e a possibilidade de as avaliarmos posteriormente em ensaios *in vivo*.

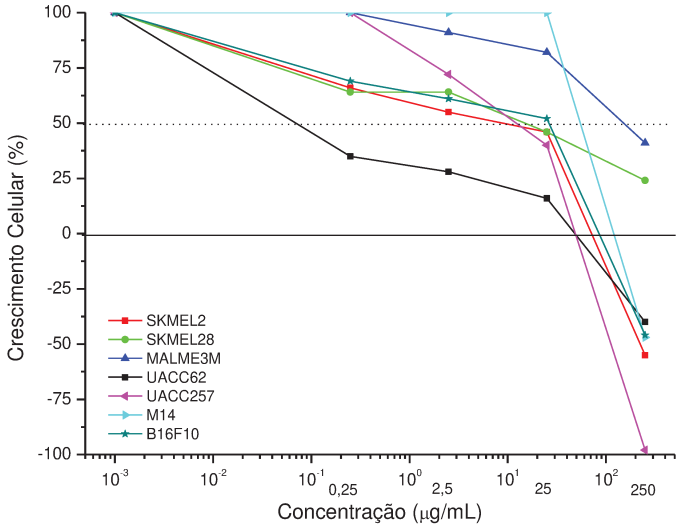


Figura 35. Gráfico da atividade antiproliferativa da Fração Acetato de Etila (FAE) em cultura de células tumorais de melanoma humano e murino, correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

A Fração acetato de etila (FAE) apresentou citotoxicidade na maior dose (250µg/mL) para grande parte das linhagens testadas com melhor atividade sobre a

linhagem de melanoma (UACC-257 TGI=39,53µg/mL) (Tabela 9) e (UACC-62 TGI=22,34µg/mL (Figura 35). A FAE também produziu inibição de crescimento e morte celular para a linhagem de melanoma murino B16-F10 (TGI=73,53 µg/mL; Tabela 9), o que viabiliza posteriores estudos *in vivo*.

A Fração I+J (Figura 36) , quando testada sobre o painel de linhagens de melanomas humanos e murino apresentou um potente perfil de atividade antiproliferativa e menores valores de TGI em relação a Fração FAE (Tabela 9), além de uma maior seletividade para as linhagens de melanoma UACC-257, SKAMEL-2, M-14 e melanoma murino B16F10.

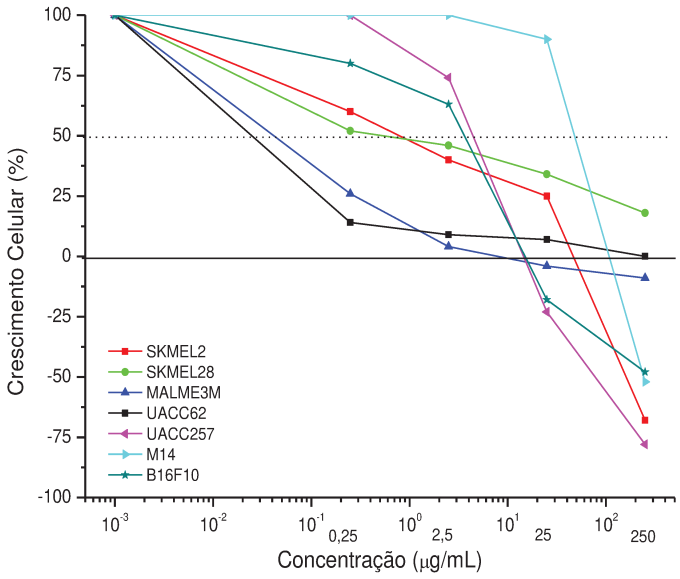


Figura 36. Gráfico da atividade antiproliferativa das frações I + J em cultura de células tumorais de melanoma humano e murino, correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

Tabela 9. Valores de TGI (µg/mL) Fração Acetato de Etila do Extrato hidro-etanólico (FAE) e Fração híbrida I+J obtidas por cromatografia de coluna filtrante da FAE**.**

Linhagem	FAE	Fração I + J
SKAMEL – 2	53,35	23,30
SKAMEL – 28	>250	>250
MALME-3M	>250	18,21
UACC – 62	22,34	39,54
UACC – 257	39,53	16,56
M – 14	227,64	130,81
B16F10	73,53	21,35

Conforme demonstrado anteriormente (Figura 30), a amostra contituída das Frações I + J apresentou perda da potência e baseado nesta informação, outro teste foi realizado, desta vez constando apenas da linhagem celular de melanoma murino (B16F10), no intuito de possibilitar a projeção dos resultados obtidos no ensaio antiproliferativo *in vitro* para modelos de avaliação anticâncer *in vivo*.

No grafico 37 foi observado que todas as amostras apresentaram atividade citocida sobre a linhagem B16F10. A FAE foi menos ativa em relação as suas Frações (I, J e Fração I+J) onde a Fração I (TGI=9,65 µg/mL) foi mais potente que a Fração J (TGI=20,26 µg/mL), no entanto, quando unidas (Fração híbrida I+J) houve uma discreta perda da potência (TGI=21,35µg/mL, Tabela 10).

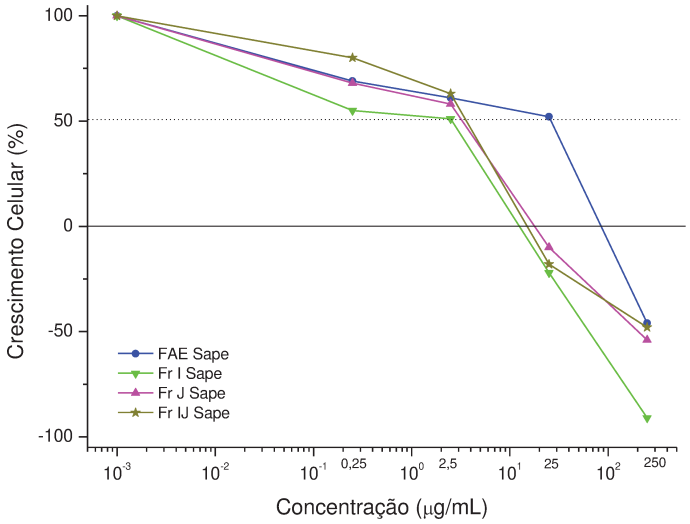


Figura 37. Gráfico da atividade antiproliferativa em linhagem tumoral de melanoma murino (B16F10) da Fração Acetato de Etila (FAE) , Fração I, Fração J e Fração híbrida I+J. O ensaio correlaciona a porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra, após 48 h de exposição.

Tabela 10. Valores de TGI (µg/mL) de ensaio antiproliferativo somente em linhagem tumoral de melanoma murino (B16F10) da Fração Acetato de Etila (FAE) , Fração I, Fração J e Fração híbrida I+J obtidas por cromatografia de coluna filtrante a partir da a FAE**.**

	B16F10
Frações	**TGI (µg/mL)**
FAE	73,53
Fração I	9,65
Fração J	20,26
Fração I + J	21,35

4.8. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE FRAÇÕES ATIVAS DE *I. brasiliensis.*

4.8.1. Folin-Ciocalteu

O método nos permitiu quantificar os compostos fenólicos totais de cada Fração e do extrato EBOH e medir a capacidade redutora das amostras testadas. Os resultados estão expressos em miligramas de ácido gálico por grama de amostra e demonstram maior concentração de compostos fenólicos na Fração FAE (304,55 ± 4,51 mg Gac/ g extrato, Tabela 11).

4.8.2. DPPH

Bseado na avaliação por CCD, submetemos o extrato EBOH e frações ativas ao teste de DPPH tendo-se como base o protocolo descrito por Brem e colaboradores e empregando-se ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 carboxílico (Trolox) como controle positivo. A curva de calibração do DPPH permitiu estabelecer a correlação entre a absorbância observada em 515nm e a concentração de DPPH livre na amostra.

Os valores de absorbância obtidos para as amostras estão descritos na Tabela 11, assim como o cálculo de concentração efetiva (CE_{50}) e da eficiência antiradicalar . A reação com DPPH demonstrou um comportamento cinético rápido (TEC50 ≤ 5min) para o extrato EBOH e Fração FAE e um comportamento intermediário (TEC50 > 5min e ≤ 30min) para as Fração híbrida I+J.

Tabela 11. Resultado da atividade Antioxidante de frações ativas de *I. brasiliensis* avaliado pelos métodos DPPH e FCR (Folin Ciocalteu).

	DPPH [a]			FCR [a] (mg Gac/ g extrato)
	EC $_{50}$ (µg/mL)	**TEC $_{50}$ (min)**	**EA**	
EBOH	65.87 ± 16.49	0.1	0.18 ± 0.05	97.01 ± 3.09
FAE	29,64 ± 0,93	0,1	0,33 ± 0,01	304,55 ± 4,51
Frações I + J	1,80 ± 0,04	5	0,11 ± 0,002	164,12 ± 1,28
Trolox	5,40 ± 0,58	0,1	1,89 ± 0,22	

[a] Resultados expressos em média±erro da média.; EC50: quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%; TEC50: tempo necessário para atingir o estado estacionário para EC50; EA: Eficiência antirradicalar [EA = 1/(EC50 ×TEC50)]; GAc: Ácido gálico, * Classificação proposta por Jiménez-Escrig e colaboradores.

TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN VIVO*

4.9. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA ORAL DO EXTRATO EBOH EM CAMUNDONGOS (HIPOCRÁTICO)

O extrato hidroetanólico foi submetido ao ensaio de toxicidade aguda para a avaliação de seu perfil toxicológico em curto prazo de administração, onde as alterações comportamentais sistemáticas observadas foram: atividade geral, frênito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto cauda, contorção, reflexo endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, *straub,* hipnose, anestesia, lacrimejamento, micção, defecação, piloereção, hipotermia,

respiração, cianose, hiperemia e morte. Todas as observações foram realizadas em intervalos variados logo após a administração da droga (10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h e 24 h) e periodicamente até o 14º dia. De acordo com os parâmetros analisados não se constatou sinal algum de toxicidade nos camundongos tratados com extrato EBOH nas doses de 100, 300, 500, 1000 e 2000 mg/Kg. A necrópsia foi realizada sem constatação de qualquer alteração macroscópica nos órgãos dos animais.

4.10. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA ORAL E INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO FAE EM CAMUNDONGOS

A toxicidade oral aguda foi realizada conforme o Guia OECD-423/2001 *Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method* (OECD, 2001), que determina as doses a serem utilizadas no estudo e o número de animais por dose. A administração única nas doses de 100, 300, 500, 1000 e 2000mg/Kg da Fração FAE e Fração J tanto por via oral quanto intraperitoneal, não produziram mortalidade ou quaisquer distúrbios comportamentais nos animais que foram observados ao longo de 14 dias.

4.11. ATIVIDADE ANTICÂNCER DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE)

De acordo com a Figura 38 a Fração FAE não reduziu o tumor na pata dos animais em nenhuma das doses administradas, permitindo que a evolução deste fosse estatísticamente igual ao controle salina. Tais dados podem ser confirmados na Figura 39 que mostra o peso relativo do tumor no final do experimento, onde todos os grupos tiveram crescimento relativamente homogêneo.

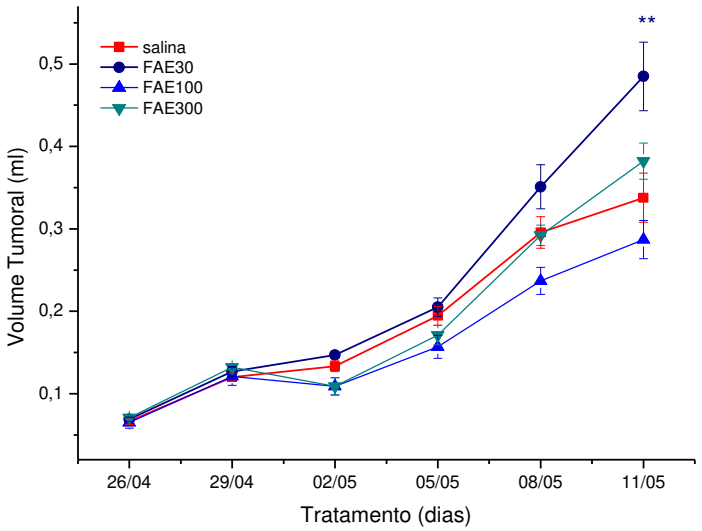


Figura 38. Variação do volume do tumor de pata de camundongo induzido por células de tumor de Ehrlich durante o tratamento, via i.p., dos diferentes grupos experimentais. **p≤0,01

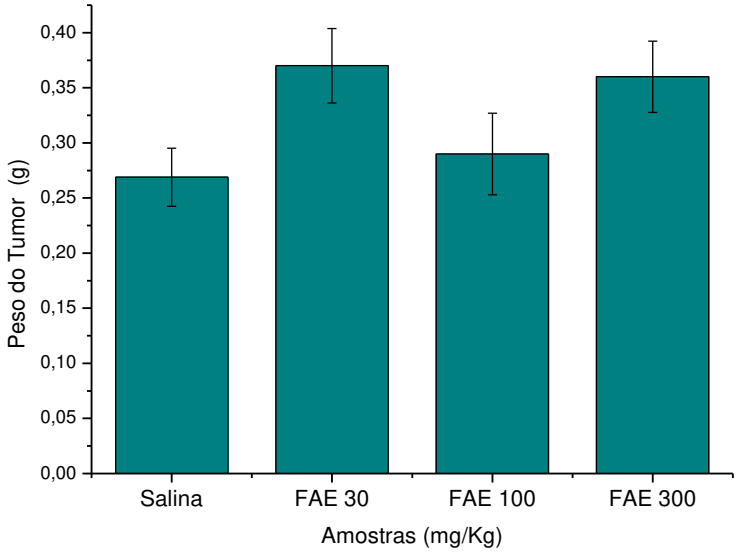


Figura 39. Peso do tumor de pata de camundongo induzido por células de tumor de Ehrlich.

A Fração acetato de etila (FAE), embora tenha apresentado atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas e murinas, não reproduziu a mesma atividade quando administrada aos animais.

4.12. ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DA FRAÇÃO FAE E FRAÇÃO J

A atividade antiedematogênica foi avaliada através de modelo de edema de pata induzido por carragenina. Considerou-se como parâmetro de avaliação a porcentagem de redução do volume do edema no 1º pico de inflamação (6h) fase aguda e no segundo pico de inflamação (72h) fase tardia.

No tempo de 6 horas de avaliação todas as doses da Fração FAE demonstraram reduzir o edema (Figura 40 e Tabela 12) em 55, 70 e 44% para as doses de 30, 100 e 300 mg/Kg, respectivamente. As doses de FAE 30mg/Kg e 300mg/Kg se mostraram estatísticamente semelhantes e menos ativas que as doses de FAE 100mg/Kg e FAE 100mg/Kg DR (dose repetida).

Ao compararmos as doses de FAE 100mg/Kg e FAE 100mg/Kg DR notou-se que ambas mantiveram o mesmo comportamento e não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 41)

Na fase tardia da inflamação, 72h, todas as amostras administradas não demonstraram atividade antiedematogênica, no entanto a FAE 100mg/Kg DR reduziu o edema em 36% em comparação ao controle salina (Tabela 12).

Tabela 12. Resultado da atividade antiedematogênica da Fração FAE. Volume do edema de pata (µL) induzido por carragenina com pico de inflamação após 6 h de tratamento e após 72 h.

	PICO DE 6 HORAS		PICO DE 72 HORAS	
	Média ± EPM	**% de redução**	**Média ± EPM**	**% de redução**
Salina	0,115 ± 0,0063		0,1250 ± 0,0067	
FAE 30 mg/Kg	0,0520 ± 0,0066 ***	54,78%	0,0930 ± 0,0139	25,6%
FAE 100mg/Kg	0,0350 ± 0,0026 ***	69,5%	0,1010 ± 0,0102	19,2%
FAE 300 mg/Kg	0,0650 ± 0,0071 ***	43,47%	0,1220 ± 0,0130	2,4%
FAE 100mg/Kg DR	0,0260 ± 0,0037 ***	77,3%	0,0800 ± 0,0059 **	36%

**p≤0,01; ***p≤0,001. Teste de Duncan, p≤0,05 (ANOVA). DR = dose repetida

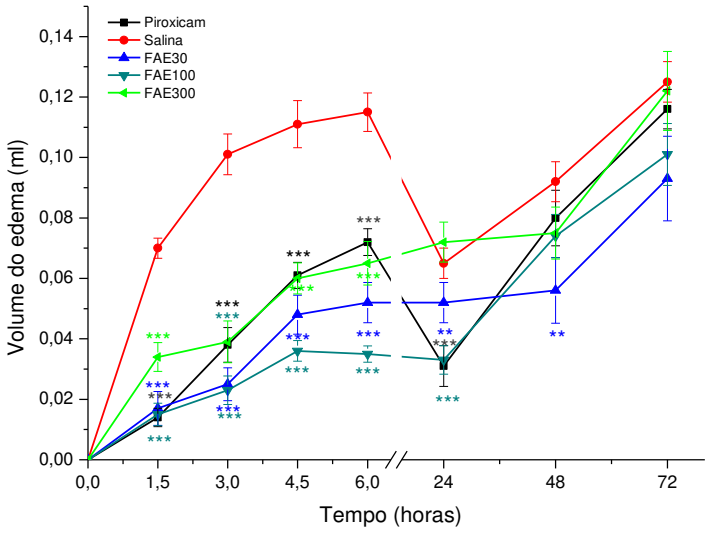


Figura 40. Gráfico apresentando a variação do volume das patas de camundongos em modelo de inflamação induzido por carragenina em animais tratados nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg da Fração FAE . O Piroxicam 20mg/Kg foi utilizado como controle positivo. **p≤0,01; ***p≤0,001. Teste de Duncan, p≤0,05 (ANOVA).

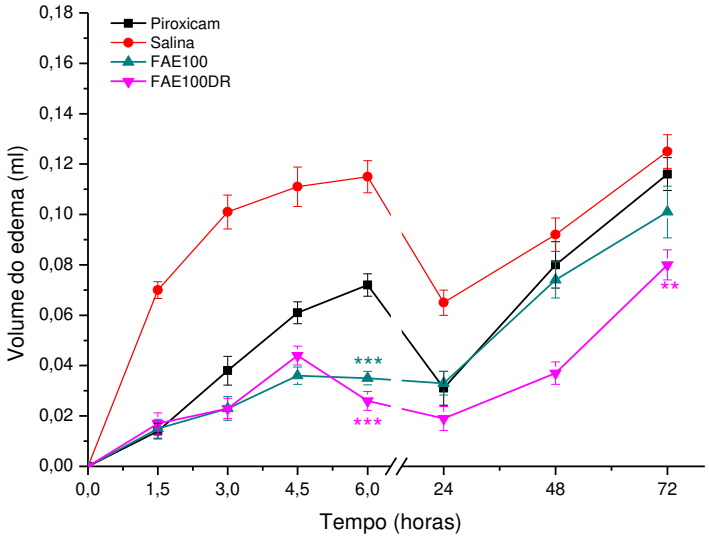


Figura 41. Gráfico apresentando a variação do volume das patas de camundongos em modelo de inflamação induzido por carragenina em animais tratados com FAE em dose única (FAE 100) e em doses repetidas (FAE 100DR). O Piroxicam 20mg/Kg foi utilizadocomo controle positivo.

Em função da atividade antiedematogênica demonstrada pela Fração FAE, sua Fração J, a qual se mostrou mais promissora no ensaio antiproliferativo, também foi submetida à avaliação antiedematogênica.

Na Tabela 13 nota-se que a Fração J nas doses de 30, 100 e 300mg/Kg demonstrou ser eficiente em conter a inflamação no primeiro pico (6h). Todas as doses administradas foram estatísticamente diferentes do controle negativo Salina. A Fração J na dose de 100mg/Kg equiparou-se à ação do Piroxicam (fármaco AINE's padronizado) sendo a mais ativa do experimento. Nota-se também que neste ensaio nenhuma amostra foi efetiva no pico de inflamação tardia (72h) (Gráfico 42)

Tabela 13. Resultado da atividade antiedematogênica da Fração J nas doses de 10, 30 e 100mg/Kg. Volume do edema de pata (µL) induzido por carragenina com pico de inflamação após 6 h de tratamento e após 72 h.

		PICO DE 6 HORAS		PICO DE 72 HORAS
	Média ± EP	**% de redução**	**Média ± EP**	**% de redução**
Salina	0,149 ± 0,00458		0,184 ± 0,02186	
PIROXICAM 20mg/Kg	0,079 ± 0,00912***	47% [c]	0,163 ± 0,0239	11,4%
Fr- J 10mg/Kg	0,109 ± 0,00348**	26,8%	0,129 ± 0,02282	29,5%
Fr-J 30mg/Kg	0,081 ± 0,00504**	45,6%	0,139 ± 0,02287	24,4%
Fr-J 100mg/Kg	0,075 ± 0,0076***	49,6% [c]	0,142 ± 0,0201	21,11%

**p≤0,01; ***p≤0,001. Teste de Duncan, p≤0,05 (ANOVA). [c] = equivalência estatística . EP=erro padrão da média.

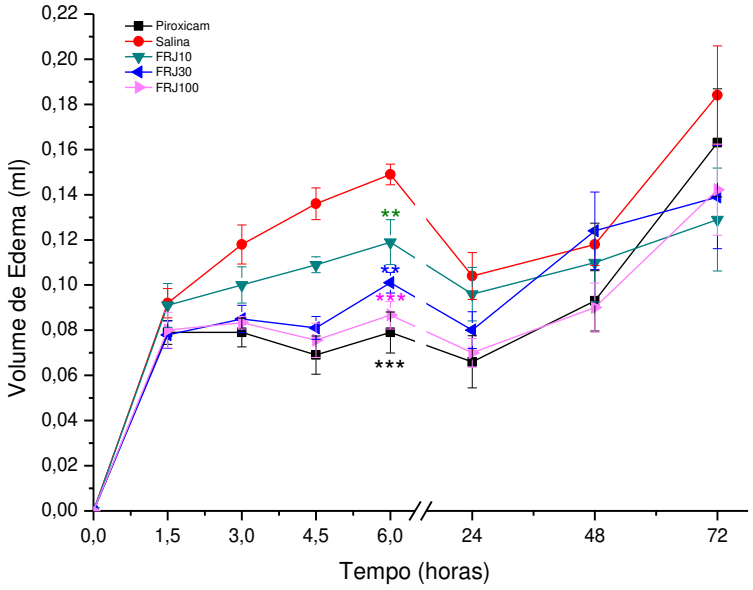


Figura 42. Gráfico apresentando a variação do volume das patas de camundongos em modelo de inflamação induzido por carragenina em animais tratados com a Fração J nas doses de 10, 30 e 100 mg/Kg. O Piroxicam 20mg/Kg foi utilizado como controle positivo. **p≤0,01; ***p≤0,001. Teste de Duncan, p≤0,05 (ANOVA)

4.13. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.13.1. Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

Após verificar atividade antiedematogênica, a Fração FAE foi submetida ao ensaios das contorções abdominais induzidas por acido acético para avaliar possível atividade antinociceptiva relacionada. Conforme demonstra a Figura 43, a FAE na dose de 1000mg/Kg inibiu quase totalmente as contorções abdominais, e a dose de 100mg/Kg, mais efetiva em outros testes, obteve uma inibição de 71% . O perfil de atividade verificado foi dose-dependente

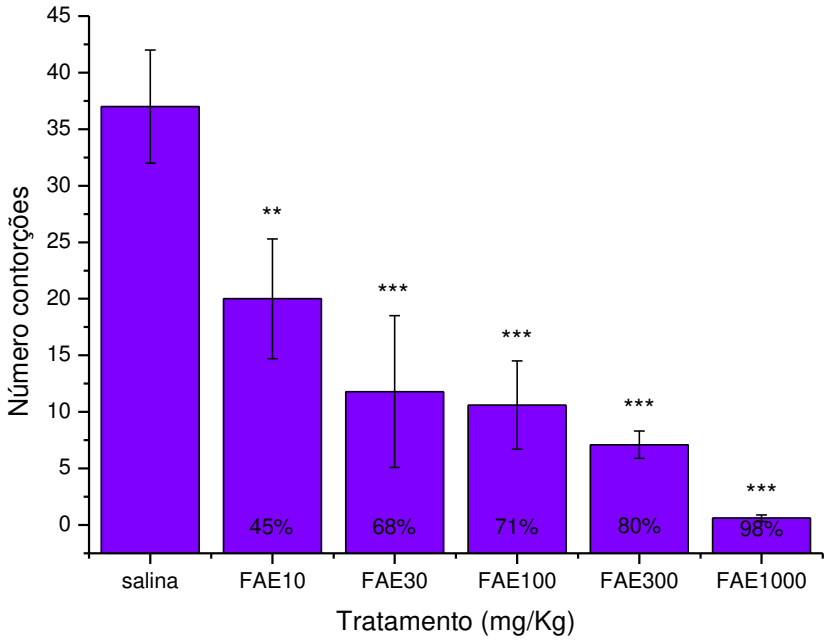


Figura 43. Gráfico demonstrando os resultados do ensaio das contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8% em salina) em camundongos previamente tratados (30 min.) pela via intraperitoneal com o veículo Salina e Fração FAE nas doses de 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/Kg. Os resultados são expressos em média ± erro padrão (n=8) (ANOVA= **p≤0,01; ***p≤0,001).

4.13.2. Teste de Algesia Induzida por Capsaicina

Neste modelo de avaliação de analgesia a Fração FAE, nas doses de 30, 100 e 300mg/Kg, não demostrou atividade.

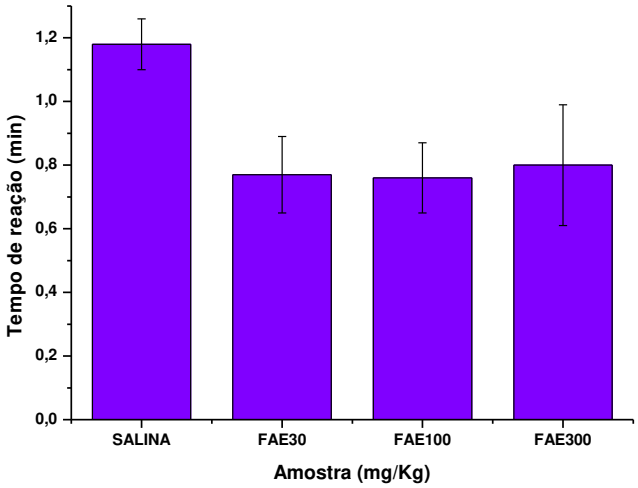


Figura 44. Gráfico demonstrando ação da capsaicina (1,6 µg/pata) na pata posterior de camundongos previamente tratados (60 min) via intraperitoneal com salina (NaCl 0,9%) e Fração FAE nas doses de 30, 100 e 300mg/kg. As colunas indicam as médias ± erro padrão(n=8)

4.13.3. Teste de algesia induzida por calor

No teste da placa quente, utilizou-se a Fração FAE nas doses de 10,30, 100 e 300mg/Kg, no entanto, o limiar de resposta ao estímulo térmico do aparelho foi semelhante para todos os animais dos grupos testados, sendo assim, o resultado foi negativo

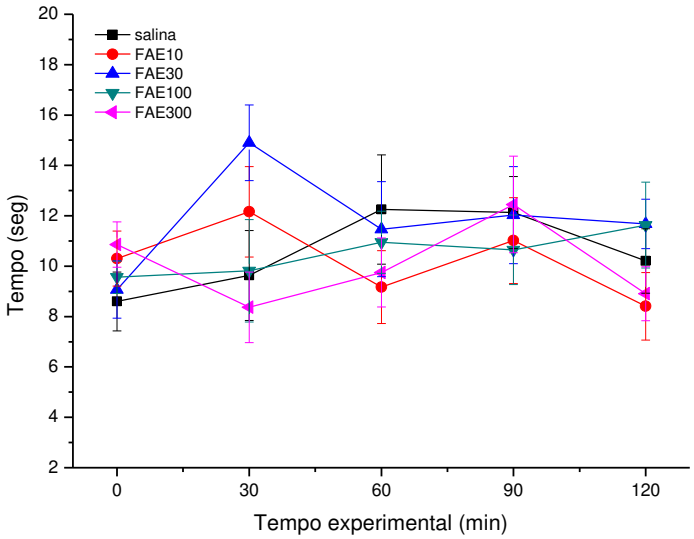


Figura 44. Gráfico apresentando comportamento responsivo à dor mediante um estímulo àlgico em animais. Resultados exibidos em Tempo (segundos) avaliado em quantro momentos 30, 60, 90 e 120 minutos após administração das amostras Morfina 10mg/Kg e Fração FAE nas doses de 10, 30, 100 e 300mg/Kg. Os resultados são expressos em média ± erro padrão (n=8) (ANOVA ***p≤0,001).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As plantas medicinais desempenham um papel essencial e contínuo no cuidado da saúde de diferentes culturas e segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que 65% da população mudial dependa de medicamentos derivados de espécies vegetais para promoção do cuidado e cura de doenças. Pesquisa realizada com compostos puros derivados de plantas revela que 80% de 122 compostos obtidos de espécies vegetais são provenientes do conhecimento e uso popular e derivaram de somente 94 espécies diferentes (Cragg et al., 2009).

O câncer, e seu processo de cura, sempre foram um grande mistério e, portanto, objeto de investigação. Embora o processo neoplásico tenha sido reconhecido há séculos, os conhecimentos sobre os mecanismos biológicos de transformação e progressão tumoral eram escassos até acontecerem as primeiras descobertas da medicina molecular em meados do século XX. Fármacos e terapias imunológicas se transformaram no foco dos esforços para a cura do câncer e, desde então, a pesquisa científica tornou-se multidisciplinar e tem trabalhado em conjunto na busca por medicamentos mais efetivos para o tratamento de tumores (Chabner e Roberts JR, 2005).

Segundo os autores Ma & Wang (2009), em 1960 o NCI (*National Cancer Institute*), iniciou um programa de triagem em larga escala para agentes anticâncer derivados de plantas. Nos últimos 50 anos, mais de 100.000 compostos foram examinados, mas apenas sete medicamentos antineoplásicos derivados de plantas foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para a aplicação clínica. Esses dados mostram a necessidade de maior exploração e investigação de novas moléculas (Cragg et al., 2009).

A espécie *Imperata brasiliensis* Trin., embora utilizada para diversos fins na medicina popular, é pouco explorada cientificamente (Diniz, 2006), isso pode ser devido ao fato de pertencer a um gênero cujo comportamento é invadir plantações caracterizando um perfil daninho e que na grande maioria das vezes não desperta interesse científico. Um filósofo americano do século XIII definiu uma erva daninha como uma planta cujas virtudes ainda não foram descobertas (Cordell et al., 2001). Os estudos preliminares realizados com a espécie, descritos neste trabalho, poderão servir para nortear futuras investigações, bem como garantir informações à população que a utiliza. As técnicas fitoquímicas empregadas para a extração foram minusciosamente padronizadas, resultando em um procedimento eficiente, minimizando a possibilidade de proliferação por microorganismos e mimetizando o uso popular da espécie (Albuquerque et al, 2007).

Primeiramente realizou-se a extração dos rizomas secos e triturados de *I. brasiliensis* com etanol:água (7:3) originando o extrato hidroetanólico (EBOH) que posteriormente foi submetido a partição com solvente acetato de etila, de polaridade intermediária, a fim de se separar em duas frações os compostos com características químicas distintas, resultando nas frações acetato de etila (FAE) e aquosa (FAQ).

A triagem inicial da atividade antiproliferativa da espécie em cultura de células tumorais humanas, foi realizada com o extrato EBOH e suas frações FAE e FAQ onde o primeiro apresentou somente discreta atividade citostática às células tumorais, exibindo valores de TGI>250µg/mL para todas as linhagens. A Fração acetato de etila (FAE) obtida no procedimento de partição do extrato EBOH apresentou atividade citocida na maior dose, com maior seletividade na dose de 250µg/mL para linhagem de rim (786-0) e mama (MCF-7). A Fração aquosa (FAQ), proveniente do mesmo procedimento não apresentou atividade

sobre as linhagens sugerindo que os compostos mais ativos foram concentrados na Fração mais apolar potencializando o efeito sobre as células.

Segundo Rang & Dale (2007) a lipossolubilidade é o principal fator que determina a taxa de difusão da substância, sendo o peso molecular menos importante, fato que corrobora com a atividade da Fração FAE, enriquecida com compostos de características mais lipossolúveis, o que pode determinar para a amostra uma capacidade de permear mais facilmente as membranas e interagir com sítios de ligação. O perfil cromatográfico da FAE foi acompanhado por cromatografia de camada delgada (CCD), determinando a necessidade de um novo fracionamento.

A investigação de constituintes químicos representa, muitas vezes, um estímulo motivador da curiosidade, já que possibilita o conhecimento prévio dos extratos e indica a natureza das substâncias presentes, facilitando a escolha de técnicas de fracionamento cromatográfico (Maciel et al, 2002). Para selecionarmos os compostos responsáveis pela atividade citocida da Fração FAE, esta foi então submetida a fracionamento por cromatografia de coluna filtrante para uma separação mais refinada de seus constituintes, utilizando como extratores, solventes de polaridades diferentes em gradientes de concentrações variadas.

O procedimento originou 14 novas frações, com perfis cromatográficos distintos. As frações obtidas foram posteriormente submetidas ao ensaio de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas. Como diversas linhagens celulares apresentam sensibilidades diferentes frente a compostos citotóxicos, o uso de mais de uma linhagem celular é necessário para a detecção de substâncias com atividade seletiva (Skehan et al, 1990). Das 14 Frações testadas, duas frações de polaridade intermediária se destacaram,

quanto ao perfil citocida, frente às linhagens celulares tumorais humanas, demonstrando uma melhor atividade quando comparadas à Fração que as originou (Fração FAE). A comparação do comportamento gráfico das frações correlacionado com os eluentes utilizados na cromatografia de coluna filtrante, mostrou que à medida que aumentou-se a polaridade das amostras, melhores foram os perfis de atividades e maior foi a potência sobre as células tumorais em protocolo de atividade *in vitro*.

A Fração I exibiu uma maior seletividade para as linhagens de próstata (PC-3) TGI=8,27µg/mL, ovário (OVCAR-03) TGI=39,35µg/mL e melanoma (UACC-62) TGI=25,19 µg/mL e a Fração J mostrou-se mais potente para as linhagens melanoma (UACC-62) TGI=8,90 µg/mL próstata (PC-3) TGI=6,64 µg/mL e pulmão (NCI-460) TGI=12,34 µg/mL. As Frações I e J assemelham-se quando avaliadas em CCD, o que explica a proximidade dos valores de TGI e a seletividade para linhagens específicas.

Para retirar compostos como graxas e clorofila, a Fração J foi submetida ao tratamento com solução básica de acetato de chumbo, onde houve a precipitação dos compostos fenólicos (Simões et al., 2004) obtendo-se uma Fração enriquecida em compostos terpênicos, denominada Fração J-Pb, que foi então submetida a avaliação em ensaio antiproliferativo *in vitro.*

Os valores de TGI da Fração J, demonstraram que esta é mais potente do que as frações FAE (Fração de origem) e a Fração J-Pb. No entanto a Fração J-Pb, manteve a seletividade para as linhagens de pulmão (NCI-460), próstata (PC-3) e melanoma (UACC-62) sugerindo que os compostos terpênicos possam estar envolvidos nesta atividade. Os terpenos formam uma grande família de compostos derivados de unidades de isopreno e muitos terpenóides são conhecidos por sua atividade anticâncer, sendo os taxóides os mais

famosos, usados no tratamento de câncer de mama, pulmão, ovário e próstata, que agem nos microtúbulos, impedindo a proliferação celular (Marchetti, 2008).

Dados da literatura relatam a presença do composto cilindrene, um sesquiterpenóide com atividade vasodilatadora, na espécie *Imperata cylindrica* (Matsunaga et al, 1994b), comumente confundida com a *I. brasiliensis.* Outros compostos, como fenólicos, lignanas e cromonas com atividades biológicas correlacionadas são citados sobre a *I. cylindrica*, no entanto nada havia sido descrito sobre sua atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas. Os resultados preliminares até agora descritos sobre a *I. brasiliensis* são inéditos e indicam a necessidade de uma investigação mais minusciosa.

Paralelamente aos testes antiproliferativos, as amostras ativas, originadas da Fração FAE, foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) sob ação de diferentes reveladores como Anisaldeído 2%, Cloreto Férrico, Dragendorff e DPPH 2% a fim de monitorar os processos de fracionamento e caracterizar os possíveis compostos presentes nas amostras. As placas reveladas com solução de cloreto férrico e anisaldeído demonstram que ao fracionarmos a FAE hove a concentração de compostos fenólicos nas frações I e J os quais não estavam presentes na Fração J-Pb, tal fato valida os procedimentos de precipitação de compostos juntamente com acetato de chumbo.

A placa cromatográfica borrifada com solução de Dragendorff revelou manchas laranjas sugerindo a presença de alcalóides. É importante perceber que, embora os alcalóides das plantas compreendam cerca de 15,6% de produtos naturais conhecidos, constituem quase 50% dos produtos derivados de plantas naturais de importância farmacêutica e biológica (Cordell et al., 2001)

Tendo em vista a heterogeneidade química, os alcalóides não podem ser identificados com apenas um único critério cromatográfico e faz-se necessário uma extração específica a fim de obter frações enriquecidas com compostos químicos distintos (Simões et al, 2007). Sendo assim, as frações I e J foram reunidas em virtude da semelhança cromatográfica e pelo perfil de atividade, para a realização de extração ácido-base, utilizada para a obtenção de alcalóides. Esse processo deu origem a três frações com características distintas: a Fração enriquecida em alcalóides, a Fração neutra apolar também enriquecida em terpenos e a Fração enriquecida em ácidos orgânicos, que foram avaliadas em cultura de celulas tumorais humanas.

A Fração enriquecida em alcalóides não apresentou atividade significante em cultura de células tumorais, sugerindo que a atividade biológica desses compostos deva ser avaliada em outros modelos experimentais. É importante salientar que, a família Poaceae compreende cerca de 800 gêneros com quase 8.000 espécies diferentes das quais apenas 53 espécies tiveram um composto alcaloídico isolado com atividade biológica descrita (Cordell et al., 2001).

As Frações enriquecidas em ácidos orgânicos também não demonstraram qualquer atividade antiproliferativa em cultura de celulas tumorais, já a Fração Neutra Apolar produziu efeito antiproliferativo com seletividade para as linhagens de próstata (PC-3) e malanoma (UACC-62), sugerindo a participação compostos terpênicos nessa atividade.

A Fração FAE apresentou citotoxicidade na maior dose (250µg/mL) para parte das linhagens testadas e exibiu seletividade para a linhagem de melanoma (UACC-257 TGI=39,53µg/mL) e (UACC-62 TGI=22,34µg/mL). A FAE também produziu inibição de crescimento e morte celular para a linhagem de melanoma murino B16-F10 (TGI=73,53

µg/mL). A Fração híbrida I+J apresentou um potente perfil de atividade antiproliferativa com menores valores de TGI quando comparados aos da Fração FAE. Os resultados obtidos em testes *in vitro* apontam para a importância em dar continuidade no estudo *in vivo* em modelo *de avaliação de a*tividade antimetastática com a linhagem celular B16-F10 (Esse modelo encontra-se em fase de padronização no momento, bem como a metodologia de extração do pigmento melanina dos pulmões metastizados). O melanoma é um dos tumores de mais rápido crescimento com elevada taxa de metástase. Embora suas causas sejam difíceis de determinar, a exposição solar e a suscetibilidade genética são consideradas os principais fatores envolvidos nesse processo (Sosman, 2009).

A placa cromatográfica, revelada com DPPH 2%, foi analisada e observou-se que grande parte das amostras revela potencial capacidade de sequestrar radicais livres, o que pode ser atribuído principalmente aos compostos fenólicos que são descritos como potenciais antioxidantes (Wojdyło et al., 2007; Jaromir et al., 2010). A presença de compostos fenólicos foi confirmada por revelação com cloreto férrico 2%. Sendo assim, o extrato EBOH e as frações FAE e I+J (unidas) foram submetidas a avaliação da capacidade redutora em ensaios de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e capacidade antioxidante por Folin-Ciocalteau (FCR).

O papel dos radicais livres como o radical superóxido, radical hidroxila e outros, tem sido relacionado ao desenvolvimento de inúmeras doenças, incluindo o câncer e doenças cardiovasculares. Compostos fenólicos, são encontrados nos mais diversos tipos de plantas e são conhecidos por seus inúmeros efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e potencial efeito anticarcinogênico (Aljadi & Kamaruddin, 2004). Os compostos antioxidantes são substâncias potencialmente quimiopreventivas pois podem prevenir a ocorrência de mutação no DNA, agindo sobre a fase de iniciação do

tumor, e com isso reduzem o risco de ocorrência de lesões neoplásicas (Ohshima et al., 2004).

O método de FCR permite avaliar a capacidade antioxidante e permite mensurar concentração de fenólicos totais, é um método rápido, onde a absorção do grupo cromóforo é realizada em 730nm o que reduz a interferência de substância coradas presentes na amostra, além de ser uma metodologia que permite quantificar fenólicos totais na amostra (Prior et al., 2005). O EBOH e a Fração FAE foram as amostras com maior potencial de sequestrar radicais livres demonstrando maior enficiência antiradicalar sendo a amostra FAE com maior concentração de compostos fenólicos (304,55 ± 4,51 mg Gac/ g extrato)

Os ensaios colorimétricos de FCR e DPPH demonstraram que o EBOH possui ação antioxidante moderada e ao confrontarmos com outros resultados ja analisados podemos inferir que esta ação possa estar relacionada à presença de compostos fenólicos e terpenos, que tem a capacidade de combater espécies reativas de oxigênio (ROS). Segundo Aljadi & Kamaruddin, 2004 as ROS desestabilizam a ação do oxido nítrico (NO) interferindo em suas ações biológicas como o vasorelaxamento por aumento de AMPc no endotélio vascular. Em contrapartida, o uso de substâncias potencialmente antioxidantes como no caso de extratos aquosos de *I. brasiliensis* poderiam, por meio da diminuição de ROS, promover uma atividade hipotensora o que corrobora com a descrição na literatura (Rodrigues, 2006).

As Frações que apresentaram melhor atividade atiproliferativa foram selecionadas para posteriores ensaios em animais. Os modelo de avaliação *in vivo* são importantes para confirmar a atividade anticâncer observada previamente em cultura de células tumorais, transpondo obstáculos e limitações dos modelos *in vitro* (Smith et al., 2005).

De acordo com o protocolo da OECD-423, antes de iniciarmos qualquer ensaio farmacológico *in vivo*, é necessário que as amostras sejam submetidas à avaliação de toxicidade aguda em roedores com doses pré-determinadas a fim de inferir o risco que a amostra oferece e adequar as doses aos protocolos posteriores. Baseado no protocolo, o extrato bruto EBOH, Fração FAE, Fração I e J, foram submetidos ao ensaio de triagem hipocrático onde não foram observados efeitos tóxicos mesmo nas maiores doses, no entanto para se garantir a inesistência de toxicidade das amostras é necessário cumprir demais exigências previstas como ensaios de toxicidade doses-repetidas até 90 dias de tratamento.

A metodologia utilizada para o teste de avaliação anticâncer *in vivo* foi o ensaio de tumor sólido de Ehrlich, que permite avaliar a ação sistêmica da amostra, inoculando o tumor no coxim plantar do animal e os tratamentos são realizados pela via intraperitoneal (i.p.). A avaliação periódica do volume do tumor com o uso do aparelho pletismômetro permite o acompanhamento da evolução do tumor nos grupos testados e uma adequação de doses e/ou tratamentos em caso de toxicidade aparente ou ineficiência. Neste protocolo a Fração FAE, administrada nas doses de 30, 100 e 300mg/Kg, foi ineficiente no combate ao tumor não reproduzindo a atividade observada nos ensaios antiproliferativos *in vitro*. Esse resultado pode ter sido consequência de baixa biodisponibilidade dos princípios ativos, mas outros estudos *in vivo* deverão ser realizados para avaliar essa possibilidade.É possível que as frações derivadas da FAE possam apresentar melhor atividade antitumoral e promover a redução da massa neoplásica com eficiência, no entanto, esse estudo não foi possível por restrição de massa suficiente das amostras I e J.

A inflamação contribui para o desenvolvimento câncer e até mesmo predispõe à carcinogênese. Esta hipótese é confirmada por estudos clínicos e epidemiológicos que identificaram as infecções crônicas e inflamações como principais fatores de risco para vários tipos de câncer. Coletivamente, estima-se que as infecções subjacentes e as reações inflamatórias estejam relacionadas com 15-20% de todos os cânceres com morte. Além disso, estudos de base populacional demonstraram que o uso prolongado da aspirina ou outras substâncias selectivas para COX-2 retardam o crescimento de adenomas pré-malignos e também podem reduzir a incidência de diferentes formas de neoplasia (Mantovani & Pierotti, 2008). Sendo assim, a atividade antiedematogênica das Frações FAE e J, foram avaliada em modelo de inflamação de pata produzido pela injeção de carragenina.

De acordo com trabalhos anteriores (Nunes et al., 2007), dois picos de inflamação induzida pela carragenina em camundongos são esperados ao longo do experimento: o primeiro pico corresponde à fase inicial (6 horas) e o segundo pico à fase tardia (72 horas). A Fração FAE apresentou uma ação antiedematogênica nas doses de 30, 100, 300mg/Kg e 300mg/Kg (dose diária) na primeira fase do processo inflamatório apresentando redução de 54,7%, 69,5% e 43,4% respectivamente com relevância estatística de $p \leq 0,001$ em relação à salina. O pico de inflamação tardia (72 horas), não foi influenciado pelas Frações administradas em dose única (FAE 30,100 e 300mg/Kg) mas houve redução de 36% com a dose de 300mg/Kg administradas durante os 4 dias de avaliação, fato que pode estar relacionado à manutenção da biodisponibilidade da amostra no organismo animal pelo período total de avaliação do edema.

A avaliação da atividade antiedematogênica da Fração J, nas doses de 10, 30 e 100mg/Kg, apontou a redução do edema das patas dos animais no pico de 6h, em 26,8%, 45,6% para as doses de 10 e 30 mg/Kg respectivamente com $p \leq 0,01$. A Fração J na dose de

100mg/Kg foi a mais eficiente, com redução de 49,6% e p≤0,001, equivalendo-se estatísticamente ao fármaco controle positivo Piroxicam (20mg/kg) que demontrou redução de 47% em relação ao grupo Salina. O Piroxicam é um representante clássico dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE's). Nunhuma das doses foi eficiente após 72h.

A dor é um fator que quase sempre está associado a câncer e é um dos principais meios de comprometimento da qualidade de vida do paciente oncológico, que além de sofrer consequências da patologia, tende a sofrer com reações adversas provocadas pelas associações medicamentosas, dentre elas os analgésicos.

No ensaio *in vivo*, utilizando o modelo de antinocicepção, de contorções abdominais em camundongos, a Fração FAE (i.p.) apresentou redução significativa das contorções em todas as doses administradas desde a menor (30mg/Kg) até a maior dose (1000mg/Kg), configurando uma curva dose-resposta que nos chamou a atenção para a possibilidade de ação analgésica da Fração. Neste modelo, é possível avaliar se o extrato promove ou não analgesia, seja para dor neurogênica periférica, central ou inflamatória, no entanto é um teste inespecífico e insuficiente para classificar uma substância como potencialmente analgésica.

Para confirmar a ação analgésica da Fração FAE, dois outros modelos *in vivo* foram realizados, sendo eles: avaliação de algesia induzida por exposição ao calor (placa quente) que avalia dor neurogênica central e o modelo de algesia induzida pela administração do agente capsaicina, que avalia dor neurogênica periférica. Após a análise dos resultados verificou-se que a Fração FAE não promoveu analgesia nos animais em nenhum dos protocolos de avaliação de dor neurogênica, sugerindo que, embora exista interferência da mesma em processos dolorosos é provável que sua ação esteja ligada a dor inflamatória. A

observação de tais resultados caracteriza a amostra FAE como rica em componentes que atuam em sinergismo, dentre eles compostos fenólicos e terpênicos, com capacidade anti-inflamatória.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que:

- Fração Acetato de Etila, obtida a partir do extrato bruto hidroetanólico dos rizomas de *I. brasiliensis* possui ação antiproliferativa *in vitro* ;
- Os compostos responsáveis pela ação antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas, são os compostos de média polaridade;
- A presença de compostos fenólicos e terpênicos , monitorados por procedimentos cromatográficos, sugerem que a ação antiproliferativa das frações FAE, I e J seja por sinergismo.
- A Fração FAE, embora tenha atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais, não reproduz sua atividade em modelo de câncer *In vivo;*
- As Frações FAE e J demonstraram ser potentes em linhagens tumorais de melanoma humanos e murino, havendo a necessidade de maiores análises em modelo de metástase por Melanoma B16F10 *in vivo*.
- A Fração FAE de *I. brasiliensis*, não possui atividade analgésica em dor de origem neurogênica, todavia, demonstra atividade anti-inflamatória em modelo *in vivo* de edema de pata.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

Aggarwal, B.B., Gehlot, P. 2009. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? Current Opinion in Pharmacology 2009, 9:351–369

Albuquerque, U. P., Monteiro, J. M., Ramos, M. A., Amorim, E. L. C., 2007. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. Journal of Ethnopharmacology 110, 76–91

Aljadi, A.M., Kamaruddin, M.Y.2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. Food Chemistry 85, 513–518

Almeida, V.L., Leitão, A., Reina, L.C.B., Montanari, C.A., Donnici, C.L. 2005. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular específicos e Ciclo-Celular não específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução Quim. Nova, Vol. 28, No. 1, 118-129.

Balick, M.J., Cox, P.A. 1997. Plants, People and Culture: the Science of Ethnobotany. New York: Scientific American Library, 228p.

Balkwill F, Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? The Lancet, 357: 539-545.

Baron, J.A. and Sandler, R.S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. Annual Reviews of Medicine, 51: 511-523, 2000.

Botham, P.A., 2004. Acute systemic toxicity - prospects for tiered testing strategies. Toxicology in vitro 18, 227–230

Brandão, M.G.L., Zanetti, N.N.S., Oliveira, G.R.R., Goulart, L.O. Monte-Mor, R.L. 2008. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopeia. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 18(1): 127-134.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluated antioxidant activity. Lebensm-Wiss u-Techol 28: 25-30.

Brem, B., Seger, C., Pacher, T., Hartl, M., Hadacek, F., Hofer, O., Vajrodaya, S., Greger, H. 2004. Antioxidant dehydrotocopherols as a new chemical character of Stemona species. Phytochemistry 65: 2719-2729.

Calixto, J. B. 2003. Biodiversidade como fonte de novos medicamentos. Ciência e Cultura, 55(3): 37-39.

Carvalho, M. M., Xavier, D. F., Freitas,V. P., Verneque, R. S., 2000. Correção da acidez do solo e controle do capim-sapé. Revista Brasileira de Zootecnia, 29(1):33-39.

Chabner, B.A., Roberts Jr, T.G. Chemotherapy and the war on cancer. Nature Reviews Cancer, 5: 65, 2005.

Chen C, Kong A-NT. 2004. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. Free Radical Biology & Medicine 36: 1505-1516.

Cordell, G.A., Quinn-Beattie, M.L. and Farnsworth, N.R. 2001. The potential of Alkaloids in Drug Discovery. Phytoterapy Research. 15, 183–205.

Cragg, G.M. & Newman, D.J. 2005. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. Journal of Ethnopharmacology, 100: 72-79.

Cragg, G.M. & Newman, D.J. 2009. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. Phytochemistry Reviews, 8: 313-331.

Diniz, L.R.L. 2006. Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da Ampelozizyphus amazonicus Ducke sobre a função renal. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduaçãoem Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia,Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto deCiências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Dvorak, H.F. Tumors: wounds that do not heal. The New England Journal of Medicine, 315: 1650-1659, 1986.

Figueiras, T.S. 2010. Imperata in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB013290).

Fuck, S.B., Athanazio, J.C., Lima, C.B., Ming, L.C. 2005. Herbal remedies used by residents of the urban areas from city of Bandeirantes, Paraná, Brazil Ciências Agrárias Londrina, 26:291-296

Garcia-Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiin-flammatory drugs. Epidemiology, 12: 88–93, 2001.

Giulietti, A.M., Harley, R.M., Queiroz, L.P., Wanderley, M.G.L., van de Berg, C. 2005. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. Conserv Biol 19: 632-639.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. Cell 140, 883–899

Harvey, A.L. 2007. Natural products as a screening resource. Current Opinion in Chemical Biology 2007, 11:480–484

He, G. and Karin, M. 2011. NF-κB and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. Cell Research 21:159-168

Hemalswarya S and Doble M. 2006. Potential Synergism of Natural Products in the Treatment of Cancer. Phytotherapy Research, 20:239-249.

Horn,S.L., Fentiman, I.S. 2010. The Role of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Chemoprevention of Breast Cancer Pharmaceuticals, 3, 1550-1560.

Instituto Nacional do Cancer (INCA), 2009. http://www.inca.gov.br

Itharat, A.; Houghton, P.J.; Eno-Amooquaye, E.; Burke, P.J.; Sampson, J.H.; Raman, A. 2004. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. Jounal of Ethnopharmacology. v. 90, p. 33-8.

Jaromir, L., Orsak, M., Hejtmankova, A., Kova rova, E. 2010. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected. Food Science and Technology. 43:52–58.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M. Cancer Statistics, 2009. CA A Cancer Journal for Clinicians, 59: 225-249, 2009.

Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Sánchez-Moreno, C., Saura-Calixto, F., 2000. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Journal of the Science of Food and Agriculture 80, 1686–1690.

Johnson, M.D., Gad, S.C., The Rat. *In*. Gad, S.C. 2006. Animal models in toxicology. CRC. 2º edition, 147-275

Juiz, P.J.L., Alves, R.J.C., Barros, T.F. 2010. Use of natural products as adjuvant in the treatment of periodontal disease. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 20(1): 134-139.

Koster, R., Anderson, M., Beer, E.J. 1959. Acetic Acid for analgesic screening. Federation Proceeding, 18: 412.

Lorenzi, H., 1991. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2ª.ed., Nova Odessa, SP: Plantarum. Pág.440.

Ma, X. and Wang, Z. 2009. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. Review. Drug Discovery Today . Vol 14: 23/24

Malhotra, S., Singh, A.P. 2009. A review of pharmacology of phytochemicals from Indian Medicinal Plants. The internet Journal of Alternative Medicine, 5(1): 1540-2584.

Mantovani, A., Pierotti, M.A. 2008. Cancer and inflammation: A complex relationship Editorial / Cancer Letters 267:180–181

Marchetti, G.M. Atividade anticâncer do extrato bruto e das frações das folhas de *Calea pnnatifida* Banks. [tese], UNICAMP- Instituto de Biologia, Campinas. Unicamp, 2008.

Matsunaga, K., Ikeda, M., Shibuya, M., Ohizuni, Y. 1994a. Imperanene, a novel phenolic compound with platelet aggregation inhibitory activity from *Imperata cylindrica*. Journal of Natural Products. 57(1), 1290-1293

Matsunaga, K., Ikeda, M., Shibuya, M., Ohizuni, Y. 1994c. Cylindol A, a novel biphenyl ether with a related compound from *Imperata cylindrica*. Journal of Natural Products, 57(9), 1290-1293

Matsunaga, K., Shibuya, M.; Ohizuni, Y. 1994b. Cylindrene, a novel sesquiterpenoid from *Imperata cylindrical* with inhibitory activity on contractions of vascular smooth muscle. Journal of Natural Products, 57(8), 1183-1184.

Matsunaga, K.; Shibuya, M.; Ohizuni, Y. 1994d. Graminone B, a novel lignan with vasodilative activity from *Imperata cylindrica* Journal of Natural Products, 57(12), 1183-1184.

Matsunaga, K.; Shibuya, M.; Ohizuni, Y. 1994d. Graminone B, a novel lignan with vasodilative activity from *Imperata cylindrica* Journal of Natural Products, 57(12), 1183-1184.

Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Groodich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. 1991. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Cell Lines. Journal of National Cancer Institute. v. 83, p. 757-766.

Nascimento, F.R.F., Cruz, G.V.B., Pereira, P.V.S., Maciel, M.C.G., Silva, L.A., Azevedo, A.P.S., Barroqueiro, E.S.B., Guerra, R.N.M. 2006. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by Chenopodium ambrosioides L. treatment. Life Sciences, 78: 2650-2653.

Nunes, F.P.B., Sampaio, S.C., Santoro, M.L., Sousa e Silva, M.C.C. 2007. Long-lasting anti-inflammatory properties of Crotalus durissus terrificus snake venom in mice. Toxicon. 49: 1090-1098.

OECD 2001. Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Accessed on 10th of December 2009. Head of Publications Service. http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf.

Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H., and Karin, M. 2010. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression.Cell 140, 197–208.

Park, J. H. *Medicinal Plants of Korea*; Shinil Publishing Co.: Seoul, 2004; p 101. *Apud* Yoon, J. S., Lee, M. K., Sung, S. H., Kim, Y. C., 2006. Neuroprotective 2-(2-Phenylethy) chromones of *Imperata cylindrica*. Journal of Natural Products. 69(2), 290-291

Pezzuto, J.M. 1997 Plant-derived anticancer agents. Biochemical Pharmacology, 53: 121-133.

Prasad, S., Phromnoi,K., Yadav,V.R., Chaturvedi,M.M., Aggarwal,B.B. 2010 Targeting Inflammatory Pathways by Flavonoids for Prevention and Treatment of Cancer. Planta Medica. 76: 1044–1063

Prior R. L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. J. Agric Food Chem. 53: 4290-4302.

Quattrocchi, U., 2006, CRC world dictionary of grasses: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology. vol. 2, 1097-1141

Rodrigues, A. G., Amaral, A. C. F., Ribeiro, J. E. G., Santos, M. G., Junior, N. L. N., 2006.The Phytotherapy in SUS and the Medicinal Plants Research Program of the Central of Medicines.Editora MS. 1-149

Sacoman, J., Monteiro, K.M., Possenti, A., Figueira, G.M., Foglio, M.A., Carvalho, J.E. 2008. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from Pothomorphe umbellata. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 41: 411-415.

Sahoo, N., Manchikanti, P., Dey, S. 2010. Review - Herbal drugs: Standards and regulation. Fitoterapia 81, 462–471

Simões, C.M.O, Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2007.

Siu, D. 2010. Natural products and their role in cancer therapy. Medical Oncology DOI 10.1007/s12032-010-9528-x.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D. 1990. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening, Journal of National Cancer Institute, 82 (13): 1107-1118.

Smith, J.A., Ngo H, Martin M.C, Wolf JK. 2005 An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. Gynecologic Oncology, 98: 141-145.

Sosman, J.A.& Margolin, K.A. 2009. Inside life of melanoma cell. Signaling, molecular insights and therapeutica targets. Curr. Oncology Reports, 11:505-411.

Srivastava, V., Negi, A.S., Kumar, J.K., Gupta, M.M., Suman,P.S.K. 2005. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. Review . Bioorganic & Medicinal Chemistry 13, 5892–5908.

Stuelten, C.H., Barbul, A., Busch, J.I., Sutton, E., Katz, R., Sato, M., Wakefield LM, Roberts AB, Niederhuber JE. Acute wounds accelerate tumorigenesis by a T Cell-dependent mechanism. Cancer Research, 68(18): 7278-7282

Takimoto CH. 1997. Topoisomerase Interactive Agents. In: DeVita Jr VT, Helman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles & Practice of Oncology, 5th Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 453-466.

Thun, M.J., Henley, S.J., Gansler, T. 2004. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. In: Chadwick DJ & Goode JA. Cancer and inflammation, Ontario, Novartis Foundation, 280p.

Thun, M.J., Henley, S.J., Patrono, C. 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic and clinical issues. Journal of National Cancer Institute, 94(4): 252-266

Tortelli-Júnior, T.C. 2008. Avaliação do papel da proibitina no desenvolvimento da resistência à cisplatina em linhagens de melanoma humano. Dissertação de mestrado. USP. p106

Vacher, P.J., Duchene-Marullaz, P.J., Barbot, P. A. 1964. Propes de quelques produits usuels comparaison de deux methodes detude des analgéiques, Med, Exp., 11:51-58 .

Verçosa Jr, D., Melo, M.M., Cassali, G.D., Dantas-Barros, A.M., Silva Jr, P.G.P. 2007. Influência de Agaricus blazei Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 59(1): 150-154, 2007.

Who. Bulletin Of The World Health Organization (WHO). Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. Geneva, 1-43, 1998.

Wójciak-Kosior, M., Oniszczuk, A., Sample Preparation of Phenolic Acids and TLC Analysis. In Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T. 2008. Thin layer chomatography in phytochemistry. CRC, vol.99, 332-359

World Health Organization. Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk. 2007. 1-92

Yoon, J. S., Lee, M. K., Sung, S. H., Kim, Y. C. 2006. Neuroprotective 2-(2-Phenylethy) chromones of *Imperata cylindrica*. Journal of Natural Products. 69(2), 290-291.

Yue, Q.X.,Liu, X., Guo, De-An. 2010. Microtubule-Binding Natural Products for Cancer Therapy Planta Medica. 76: 1037–1043.

APÊNDICE

1. Artigo submetido à revista Journal of Ethnopharmacology

Assessment of diuretic and natriuretic activity of *Imperata brasiliensis* Trin. in normotensive rats

Vanessa Helena da Silva Souza *[1,2], Ana Lucia Tasca Gois Ruiz [a], Sirlene Valério Tinti [a], Maria José Queiroz de Freitas Alves[3], Mary Ann Foglio [a], João Ernesto de Carvalho [a,b]

* Corresponding autor's - CPQBA, Universidade de Campinas (Unicamp - University of Campinas), C.P. 6171, CEP: 13083-970, Campinas (SP) - Brazil. Fax: 55 19 2139-2850, Telephone: 55 19 2139-2875, e-mail address: vanahelena@hotmail.com

[1] *CPQBA, Universidade de Campinas (Unicamp - University of Campinas), C.P. 6171, CEP: 13083-970, Campinas (SP) - Brazil.*
[2] *Departamento de Clínica Médica (Medical Clinic Department), Faculdade de Ciências Médicas (Faculty of Medical Sciences), C.P. 6111, Universidade de Campinas (Unicamp - University of Campinas), CEP: 13083-970, Campinas (SP) - Brazil.*
[3] *Departamento de Fisiologia (Physiology Department), Instituto de Biociências (Institute of Biosciences), Universidade Estadual Paulista (Unesp - State University of São Paulo), C.P. 510, CEP: 18618-000, Botucatu (SP) - Brazil.*

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Imperata brasiliensis* Trin. (Poaceae), widely distributed in Brazil, is popularly used as an analgesic and diuretic, but little is known about its pharmacological potential.

Aim of the study: The aim of this study was to investigate antioxidant, diuretic and natriuretic activities of hydroethanolic extract (EBOH) obtained from *I. brasiliensis* rhizomes in tests with normotensive rats.

Material and methods: Dried ground rhizomes were extracted by maceration with ethanol 70% resulting in EBOH, which was analyzed for chemical composition by TLC employing $FeCl_3$ (2%), Anisaldehyde (1%), Dragendroff, Mayer and DPPH (2%) as revealing agents. Antioxidant activity was assessed by DPPH colorimetric assay and total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteau reaction. Animals were orally treated with saline solution (0.4%, 10 mL/Kg, negative control), furosemide (15 mg/Kg, positive control) and EBOH (100, 300 and 1,000 mg/Kg) for 10 days and urine was collecte, during 15 h, d in the 1^{st} and 10^{th} day characterizing single (DU) and repeated doses (DR), respectively. Urine volume, electrolytes concentrations (Na^+ and K^+) and creatinine, which was also measured in plasma, were assessed.

Results: *I. brasiliensis* EBOH has phenolic compounds and potentially antioxidant substances. EBOH at a dose of 1,000 mg/Kg showed diuretic activity after administration of single dose and repeated doses, besides increasing potassium excretion, without altering significantly sodium excretion.

Conclusion: *I. brasiliensis* EBOH showed a diuretic profile, with no signs of toxicity when used at high repeated doses in animals. These results associated with its antioxidant properties stimulate further studies of pharmacological activities and investigation of its chemical composition. .**Keywords:** *Imperata brasiliensis*, Poaceae, diuretic, natriuretic, antioxidant.

INTRODUCTION

According to World Health Organization estimatives, cardiovascular diseases represent one of the main worldwide causes of death, resulting in approximately 40.6 million deaths, of which 46% (21.9 million) related to people under 70 years old (World Health Organization, 2007). Hypertension is an important factor for the development of cardiovascular diseases, strokes and kidney diseases. The most common strategies to treat hypertensive patients include the use of antihypertensive medications, with very different mechanisms of action, among which diuretics are the first choice drugs (Wright et al., 2007).

Nature provides for human beings a variety of substances that can often reduce the symptoms and be used for the treatment of diseases (Cragg et al., 2009), thus the empirical knowledge accumulated over centuries fostered the development of several drugs (Campos et al., 2009; Cragg & Newman, 2007) and popular medicine is commonly used both in treating diseases, such as hypertension and kidney diseases, and in new drugs development to control these diseases. Many vegetal species are known to have significant diuretic activity and the pharmacological effects of some of them have been demonstrated in animal tests (Wright et al., 2007).

The genus *Imperata* (family Poaceae) comprises species considered weeds by invading pastures and cultivated areas (Carvalho et al., 2000). In Brazil, we highlight the species *Imperata brasiliensis* Trin. (synonym: *Imperata exaltata* Brong.) (Quattrocchi, 2006) popularly known as sapé, capim-sapé, sapé-macho, capim-estrepe, capim-agreste, capim-massapé (thatch, grass thatch, thatch-male, crowfoot grass, wild grass, massapé grass) with wide geographical distribution, being very common in acid soils of coastline (Carvalho et al., 2000; Lorenzi, 1991).

I. brasiliensis is used in Brazilian popular medicine as diuretic and analgesic (Lorenzi, 1991, Albuquerque et al., 2007). The plant drug, obtained from *I. brasiliensis* rhizomes, is quoted in the 1st edition of the Farmacopéia Brasileira (Brandão et al.,

2008) and a clinical study conducted during the Program of Research on Medicinal Plants, of the Center of Drugs from the Ministry of Health (PPPM/Ceme/Brazil), revealed that *I. brasiliensis* infusion has an antihypertensive effect (Rodrigues, 2006).

Another species popularly used as diuretic, anti-inflammatory and antipyretic is *Imperata cylindrica* Beauv, known as "Chigaya" and common in Asia (Park, 2004). Phytochemical studies of *I. cylindrica* rhizomes resulted in the isolation of compounds with different pharmacological activities such as imperanene, a phenolic compound with antiplatelet activity (Matsunaga et al., 1994a); cylindrene, sesquiterpenoid with vasodilator activity (Matsunaga et al., 1994b); cylindol A and B, compounds with potential anti-inflammatory activity (Matsunaga, et al., 1994c); graminone A and B, lignans with vasodilator activity (Matsunaga et al., 1994d) and, more recently, chromones with neuroprotective activity, which demonstrated significativily suppression of glutamate-induced neurotoxicity in rat cortical cells (Yoon et al., 2006).

Based on existing scientific data on species of *Imperata* genus and on reports of *I. brasiliensis* popular uses, this work had aimed to assess the diuretic and natriuretic effects in normotensive rats orally treated with single and repeated doses of hydroethanolic extract (EBOH) obtained from *I. brasiliensis* rhizomes.

1. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material

2.1.1. Preparation of extract

I. brasiliensis rhizomes was collected in the city of Baependi (MG), Brazil, located 893 m above sea level (South - 21°57'32", West - 44°53'24") and voucher specimen have been deposited in the Herbarium of Multidisciplinary Center of Chemical, Biological, and Agricultural Research (CPQBA) of the University of Campinas (Unicamp), under registration CPMA 2034, No. 1324.

The rhizomes of *I. brasiliensis* were dried at 40 ºC for 48 h in a ventilated oven and then pulverized in a knives grinder. The extraction was performed with a mixture of 7:3 ethanol/water in 5:1 solvent/plant, by dynamic maceration for three periods of four hours each. After filtration and assembly of filtered parts, the extract was subjected to vacuum evaporation and freeze-drying, affording EBOH.

2.1.2. Preliminary phytochemical analysis

A preliminary qualitative analysis was carried out by thin layer chromatography (TLC) using silica-gel 60 F_{254} aluminum backed sheets (Merck) and butanol/acetic acid/water (BAW - 4:1:5) mixture as mobile phase. The detection was performed under UV light incidence (254 and 366 nm) and by using colorimetric revealers [$FeCl_3$ 2% (phenolic compounds), Anisaldehyde 1% (terpenic compounds), Dragendorff and Mayer (alkaloids) and DPPH 2% (compounds with the ability to scavenge free radicals)] (Wójciak-Kosior et al., 2008).

2.1.3. Folin-Ciocalteau reagent (FCR) determination of total phenolics

It was performed as described by Prior et al. (2005), with small modifications in order to use a microplate reader (Jorge et al., 2008). Briefly, a sample aliquot (10 µl, 1 mg/mL) was diluted in distilled water (600 µl). Then, this solution was applied in a 96-well plate (150 µl/well), in quadruplicate, and received Folin-Ciocalteau solution (12.5 µl, Sigma), sodium carbonate (37.5 µl, 1 M) and destilated water (50 µl). After 2 h-incubation at 37 ºC, absorbance was measured at 725 nm with a microplate reader (VERSA Max, Molecular Devices). A calibrated gallic acid standard curve was made and results were expressed as mg equivalents in gallic acid per gram of sample.

2.1.4. DPPH

Microplate DPPH assay was performed as described by Brand-Williams et al.. (1995) modified by Brem et al.. (2004). Briefly, in a 96-well plate successively sample dilutions (100 µl/well, 0.25, 2.5, 25 and 250 µg/mL), in triplicate, received DPPH solution (40 µM in ethanol, 100 µL/well) and absorbance was measured at 550 nm

with a microplate reader (VERSA Max, Molecular Devices). Results were determined each 5 min until 30 min in order to evaluate the kinetic behavior of the reaction. The percentage of remaining DPPH was calculated as follows: %DPPHrem =100× ([DPPH]sample/[DPPH]blank). The percentage of remaining DPPH against the standard concentration was then plotted in an exponential regression graph, to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% (EC_{50}). The time needed to reach the steady state to EC_{50} (TEC_{50}) was experimentally verified and in order to correlate TEC_{50} and EC_{50} the antiradical efficiency (Jimenez-Escrig et al., 2000) was calculated as follows: AE = 1/(EC_{50} ×TEC_{50}).

2.2. Laboratory animals

Adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), weighing between 150 and 200 g, and Swiss mice (*Mus musculus*), weighing between 20 and 30 g, provided by Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animals Science (CEMIB, Unicamp) were used. The experimental groups were kept in identified cages in a room with controlled temperature and humidity (22 ± 2 ºC, 12 h, light/dark) and acclimated in the laboratory for a minimum of seven days before the studies beginning. The experimental procedures were approved by the ethics committee on animal experimentation of Unicamp (CEUA, Unicamp) under registration N°. 1416-1 and 2027-1.

2.3. Acute Toxicity

Groups of male Swiss mice (n = 3) were orally or intraperitoneally treated with EBOH in doses of 100, 300, 500, 1,000 and 2,000 mg/Kg in saline vehicle (0.9% NaCl). After administration animals were observed during the first four hours and daily during 14 days. Death occurrence was noted for each dose in order to allow the LD_{50} calculation. On the 15th day all animals were euthanized by cervical dislocation, followed by necropsy and macroscopic observation of the organs (Botham, 2004; Pucci et al., 2010).

This study followed OECD Guidelines 423 (OECD, 2001), which shows good reproducibility, uses fewer animals and is able to classify the substances according to internationally accepted systems (Globally Harmonized System - GHS).

2.4. Experimental procedure of diuresis

Diuresis was assessed using the model described by Sripanidkulchai et al.. (2001) with small modifications. Normotensive Wistar rats were randomLy separated in five groups (n = 6) and individually placed in metabolic cages, 24 h before the experiment to acclimation, with free access to food and water. Before starting the experiment, animals were submitted to a 6 h-fasting. After four hours of the onset of fasting, all animals were orally treated with NaCl 0.4% solution (10 mL/Kg) in order to unifying body salinity (salinization step). Two hours after NaCl 0.4% treatment, animals were treated with Furosemide (Sanofi-Aventis, 15 mg/Kg, oral, positive control), NaCl 0.4% solution (10 mL/Kg, oral, negative control) or EBOH (100, 300 and 1000 mg/Kg, oral). Treatments were performed from day 1 (single dose) to day 10 (repeated dose), and fasting and salinization steps were only repeated on day 1 and day 10 of the experiment, when there was urine collection. The urine was collected from fasting animals, with free access to water for 15 h and the volume was measured in graduated cylinders. Creatinine and electrolytes (Na^+ and K^+) dosage were performed on Reflotron® Plus Roche and Electrolyte Analyzer 9180 Roche, respectively. Water intake, animals weight and apparent toxicity signs were assess daily. On the 10th day, after the end of urine collection, animals were anesthetized (ketamine 16 mg/Kg and xilasine 100 mg/Kg, intraperitoneal) to blood collection. Euthanasia was accomplished by anesthesia deepening followed by necropsy and macroscopic observation of the organs. Creatinine was dosage in plasma samples using Reflotron® Plus Roche equipment.

Two parameters were calculated correlating urinary volumes of treated group with those of negative control group. Diuretic action was calculated by ($V_{U\ treated\ group}$ / $V_{U\ negative\ control}$) while diuretic efficiency was determined by [($V_{U\ treated\ group}$ - $V_{U\ negative\ control}$)/ $V_{U\ negative\ control}$] x 100.

2.5. Preparation of blood plasma

Blood samples were collected by puncturing of the retro-orbicularis plexus in micro-centrifuge tube of 1.5 mL with capillaries containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 10 µg/mL. Plasma was obtained by centrifuging the sample (3,000 RPM/5 minutes) at 22 ± 2 ºC.

2.6. Statistical Analysis

The results were analyzed by variance test (ANOVA) followed by Duncan test considering as statistical difference $p \leq 0.05$.

2. RESULTS

3.1. Phytochemical Analysis

Preliminary TLC screening experiments were performed to evaluate the presence of same class of natural compounds and to test antiradical activity of Eboh. Eboh presented many blue and/or purple spots colored by anisaldehylde, suggesting a presence of terpenes and/or steroids, while EBOH TLC also showed brown spots nearby the origin colored by FeCl3 and orange spots on the bottom of TLC by Dragendorff suggesting presence of phenolic compounds of high polarity and alkaloid of lower polarity, respectively. Moreover, after staining TLC-plate with DPPH, yellow spots on purple bacKground suggested the existence of antiradical substances. It was interesting to notice that DPPH revealed spots shared Rf with those revealed by Anisaldehyde suggesting the presence of terpenoids with free radical scavenger ability.

3.2. Antioxidant activity and total phenolic compounds

The results of FCR and DPPH assays performed with EBOH of *I. brasiliensis* are summarized in Table 1. The reaction with DPPH showed a fast kinetic behavior (TEC_{50} ≤ 5min). The quantification of total phenolic compounds was expressed as milligrams of gallic acid per gram of crude extract and was 97.01 ± 3.09. These results indicate a moderate antioxidant activity of the crude extract.

3.3. Acute toxicity

The acute oral toxicity was performed according to Guide OECD-423/2001 "Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method" (OECD, 2001), which determines the doses to be used and the number of animals per dose in the study. The administration of doses of 100, 300, 500, 1,000 and 2,000 mg/Kg of EBOH of *I. brasiliensis*, both orally as intraperitoneally, produced no mortality or behavioral disorders in animals after 14-day observation.

3.4. Diuretic and natriuretic activity, single dose and repeated doses

3.4.1. Water consumption and body weight

The daily assessment of animal body weight and water consumption of all groups throughout the experiment showed no significant variations.

3.4.2. Volume of urine

Table 2 shows the urine volumes (mean ± s.e.m.) collected on day 1 (DU) and day 10 (DR) for a period of 15 hours. In single dose, both treatments with Furosemide 15 mg/Kg and EBOH 1,000 mg/Kg significantly increased urine volume (9.85 ± 0.45 and 9.08 ± 1.39 mL, respectively) compared to negative control group (6.53 ± 0.75 mL). After ten days of treatment, the same profile was observed with urine volume increasing in groups Furosemide (17.6 ± 19.1 mL) and EBOH 1,000 mg/Kg (14.6 ± 1.02 mL) compared to negative control group (10,06 ± 0.79 mL). No statistical

differences were observed among animals treated with doses of 100 and 300 mg/Kg of EBOH relative to saline, both on DU and DR.

3.4.3. Natriuresis

First, electrolytes concentration were measured in EBOH resulting in Na^+ = 129 mg/Kg and K^+ = 83 mg/Kg, expressed as mg/Kg of crude extract. Electrolytes concentration, expressed as mean ± SEM, in urines collected for 15 hours were presented in Table 3. Animals treated with furosemide (15 mg/Kg) showed a increasing in Na^+ excretion in both treatments (DU 92.66 ± 2.48 and DR 75.66 ± 1.45) compared to saline group (37.83 ± 3.06 and 46.33 ± 3.38). This result was expected by stablished mecanism of action for furosemide. Animals treated with EBOH, both 300 and 1,000 mg/Kg, did not present statistically difference from saline group related to Na^+ excretion. On the other hand, animals treateds with EBOH 100 mg/Kg showed a significant increasing on Na^+ excretion (DU 106.33 ± 7.27), in a similar Furosemide profile. There was a significant increasing of K^+ excretion in animals treated with EBOH 100 (DU 170.66 ± 7.19) and 1,000 mg/Kg (DU 145.91 ± 5.22 and DR 142.25 ± 6.84) compared with saline group (DU 37.83 ± 3.06 and DR 98.35 ± 4.35).

3.5. Creatinine concentration in blood and urine

It was not observed that both control and EBOH (100, 300 and 1,000 mg/Kg) groups showed serum creatinine under 0.5 mg/dl, remaining among reference values for species (0.1-0.8 mg/dl) (Johnson & Gad, 2006). As described in Table 4, only animals treated with EBOH 300 mg/Kg showed statistic difference ($p \leq 0.05$) in creatinine concentration of urine when compared to negative control group (58.83 ± 3.76 and 43.00 ± 4.78).

3. DISCUSSION AND CONCLUSION

In this study EBOH of *I. brasiliensis* showed LD_{50} > 2,000 mg/Kg demonstrating low toxicity at acute dose and supporting using dose of 1,000 mg/Kg as the highest dose in diuresis protocol. The protocol used assess acute toxicity in order to classify samples according to their potential of toxicity or lethality (Pucci et al., 2010). In order to have their results considered by the regulatory agencies of the countries, it is essential that these tests are conducted according to internationally accepted protocols, such as those published by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001). According to Rodrigues (2006) the tea of *I. brasiliensis*, used as a placebo in a hipertension clinical research, even when administered for relatively long period, no harmful effect was observed in patients, but *I. brasiliensis* tea caused hypotension, which resulted in the suspension of placebo group by researches.

The hydroethanolic extraction of rhizomes of *I. brasiliensis* resembled the popularly held extraction method, which is an aqueous infusion, in order to extract compounds of similar polarities. Qualitative analysis by TLC of EBOH demonstrated the presence of phenolic compounds, which were subsequently quantified by the Folin-Ciocalteau method (Table 1). Phenolic compounds represent a broad class that has several biological activities, including antioxidant one (Jaromir et al., 2010). The presence of phenolic compounds was confirmed by revelation with which also showed the presence. EBOH was also analyzed by revelation with Anisaldehyde 1% and DPPH 2% suggesting the presence of terpenoids and compounds with free radical scavenger ability, respectively.

Comparing the results obtained with the colorimetric assays of FCR and DPPH (Table 1) we can infer that EBOH has moderate antioxidant action and that this action is due to the presence of phenolic compounds including terpenes, which can act in the fight against reactive oxygen species (ROS). According to Aljada & Kamaruddin, 2004, ROS destabilize the action of nitric oxide (NO) interfering in their biological actions such as vasorelaxation by increasing AMPc in vascular endothelium. In

contrast, the use of potentially antioxidant substances, as in the case of aqueous extracts of *I. brasiliensis*, by decreasing ROS, could promote a hypotensive activity, which agrees with the description in the literature (Rodrigues, 2006). Experimental studies have shown that the administration of teas, rich in phenolic compounds with antioxidant activity, in laboratory animals significantly reduce blood pressure (Araújo et al., 2005). According to Matsunaga, et al., 1994b sesquiterpenes with vasodilator activity were isolated in the species *I. cylindrica*, suggesting the need of better investigation of these compounds in the species *I. brasiliensis*.

The diuretic capacity of the hydroethanolic extract of *I. brasiliensis* in concentrations of 100, 300 and 1,000 mg/Kg (oral) was compared with the saline and furosemide controls, a drug widely used in therapy (Lahlou et al., 2007). The results show that EBOH promoted a dose-dependent excretion of urine volume with the highest dose (1,000 mg/Kg) statistically significant in both evaluations (DU and DR) compared to negative control group (Figure 1) without, however, increase the intake of water throughout the experiment (Table 3). The result suggests a mild diuretic profile of the species and confirms data collected from its popular use (Rodrigues, 2006).

Comparing this result with the natriuretic profile of the extract we found that increased diuresis did not occur due to increased excretion of electrolyte Na^+, suggesting a different action mechanism of the drug reference Furosemide (Figure 2), but the dose of 1,000 mg/Kg significantly increase the excretion of K^+ when given in repeated doses. In this case the natriuretic behavior may result from daily and cumulative intake of potassium present in EBOH (1,000 mg/Kg) (Figure 3) whose content (K^+ = 87.3 mg/Kg), although authors such as Galati and colleagues (2002) cite no correlation between the concentration of electrolytes of extract and diuresis caused by it.

At a dose of 100 mg/Kg the extract showed an atypical behavior, promoting lesser excretion of urine, but a higher concentration of Na^+ and K^+ in the first dose (DU) with a subsequent decrease of this excretion in repeated doses (DR). Calabrese

(2008) describes this phenomenon as a response of over-compensation to an imbalance of homeostasis, characterized by pharmacological stimulation at lower doses and the establishment of equilibrium with repeated administrations. It is important to pay attention to the hormetic behavior of the substances present in medicinal plants popularly used, which besides the pharmacological effect may promote a potential toxic effect at lower doses (Woude et al., 2005). However, repeated administration of EBOH in several doses did not produce any change in animals that could be considered as evidence of toxicity.

The results suggest that EBOH is potentially diuretic and presents low toxicity, portraying it as a promising plant drug among the plants with diuretic action, as opposed to the antidiuretic effect of species *I. cylindrica*. However, other studies, such as a drill by promoting substances of this pharmacological activity and action mechanisms of these, are required, as well as performing experiments for an extended period, in a similar way to drugs that are used in therapy for hypertension and cardiovascular diseases. Wright (2008) and colleagues suggest the need of assessing the results, their relevance and safety for the population, since the natural medications with diuretic properties are used in chronic diseases, like hypertension. Thus, the results described in this work stimulate further studies with *I. brasiliensis* for assessment of its pharmacological properties and elucidation of its chemical properties.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to FAPESP and CNPq for financial support. VHSS, JEC, and MAF wish to thanks CNPq for scholarchip and research fellowship, respectively.

REFERENCES

Albuquerque, U. P., Monteiro, J. M., Ramos, M. A., Amorim, E. L. C., 2007. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. Journal of Ethnopharmacology 110, 76–91.

Aljadi, A. M., Kamaruddin, M. Y. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. Food Chemistry 85, 513–518.

Araújo, P. W. B., Quintans, Jr. L. J., Vasconcelos, H. D., Almeida, J. R. G. S. 2005. Flavonoide and hypertension. Revista Brasileira de Hipertensão, vol.12(3): 188-189.

Botham, P. A., 2004. Acute systemic toxicity - prospects for tiered testing strategies. Toxicology *in vitro* 18, 227–230.

Brandão, M. G. L., Zanetti, N. N. S., Oliveira, G. R. R., Goulart, L. O. Monte-Mor, R. L. 2008. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopeia. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 18(1): 127-134.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluated antioxidant activity. LWT- Food Science and Technology 28, 25–30.

Brem, B., Seger, C., Pacher, T., Hartl, M., Hadacek, F., Hofer, O., Vajrodaya, S., Greger, H., 2004. Antioxidant dehydrotocopherols as a new chemical character of Stemona species. Phytochemistry 65, 2719–2729.

Calabrese, E. J. 2008. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists - Critical Review. Environmental toxicology and chemistry, vol. 27(7): 1451–1474.

Campos, K. E., Balbi, A. P. C., Alves, M. J. Q., 2009. Diuretic and hypotensive activity of aqueous extract of parsley seeds (*Petroselinum sativum* Hoffm.) in rats. Brazilian Journal of Pharmacognosy 19: 41-45.

Carvalho, M. M., Xavier, D. F., Freitas, V. P., Verneque, R. S., 2000. Correção da acidez do solo e controle do capim-sapé. Revista Brasileira de Zootecnia, 29(1):33-39.

Cragg, G. M., Grothaus, P. G., Newman, D. J., 2009. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. Chemical Reviews. 109(7), 3012-3043.

Galati, E. M., Tripodo, M. M., Trovato, A., Miceli, N., Monforte, M. T. 2002. Biological effect of Opuntia ficus indica (L.) Mill. (Cactaceae) waste matter. Note I: diuretic activity, Journal of Ethnopharmacology 79, 17–21.

Gasparotto-Junior, A.; Boffo, M. A., Lourenço, E. L. B., Stefanello, M. E. A., Kassuya, C. A. L., Marques, M. C. A., 2009. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. Journal of Ethnopharmacology. 122, 517–522.

Gragg, G. M. & Newman, D. J. 2007, Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 1ª edição. Ed. Univale.

Jaromir, L., Orsak, M., Hejtmankova, A., Kova rova, E. 2010. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected. Food Science and Technology. 43:52–58.

Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Sánchez-Moreno, C., Saura-Calixto, F., 2000. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Journal of the Science of Food and Agriculture 80, 1686–1690.

Johnson, M. D., Gad, S. C., The Rat. *In*. Gad, S.C. 2006. Animal models in toxicology. CRC. 2nd edition, 147-275.

Jorge M. P., Madjarof C., Ruiz A. L. T. G., Fernandes A. T., Rodrigues R. A. F., de Oliveira Sousa I. M., Foglio M. A., de Carvalho J. E. 2008. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. Journal of Ethnopharmacology, 118 (3), 361-366.

Lahlou S., Tahraoui A., Israili Z., Lyoussi B., 2007. Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. Journal of Ethnopharmacology 110, 458–463.

Lorenzi, H., 1991. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2ª ed., Nova Odessa, SP: Plantarum. Pg. 440.

Matsunaga, K., Ikeda, M., Shibuya, M., Ohizuni, Y. 1994a. Imperanene, a novel phenolic compound with platelet aggregation inhibitory activity from *Imperata cylindrica*. Journal of Natural Products. 57(1), 1290-1293.

Matsunaga, K., Ikeda, M., Shibuya, M., Ohizuni, Y. 1994c. Cylindol A, a novel biphenyl ether with a related compound from *Imperata cylindrica*. Journal of Natural Products, 57(9), 1290-1293.

Matsunaga, K., Shibuya, M.; Ohizuni, Y. 1994b. Cylindrene, a novel sesquiterpenoid from *Imperata cylindrical* with inhibitory activity on contractions of vascular smooth muscle. Journal of Natural Products, 57(8), 1183-1184.

Matsunaga, K.; Shibuya, M.; Ohizuni, Y. 1994d. Graminone B, a novel lignan with vasodilative activity from *Imperata cylindrica* Journal of Natural Products, 57(12), 1183-1184.

OECD 2001. Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Accessed on 10th of December, 2009. http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf. Head of Publications Service.

Park, J. H. *Medicinal Plants of Korea*; Shinil Publishing Co.: Seoul, 2004; p 101. *Apud* Yoon, J. S., Lee, M. K., Sung, S. H., Kim, Y. C., 2006. Neuroprotective 2-(2-Phenylethy) chromones of *Imperata cylindrica*. Journal of Natural Products. 69(2), 290-291.

Prior R. L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. J. Agric Food Chem. 53: 4290-4302.

Pucci, L. L., Cunha, L. C., Trasvenzol, L. M., Paula, J. R., Bozinis M. C. V., Freitas, P. C. M. 2010. Avaliação da toxicidade aguda oral e da atividade diurética da *Rudgea viburnoides* (Cham) Benth. (congonha-de-bugre). Latin American Journal of Pharmacy. 29(1):30-37.

Quattrocchi, U., 2006, CRC world dictionary of grasses: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology. vol. 2, 1097-1141.

Rodrigues, A. G., Amaral, A. C. F., Ribeiro, J. E. G., Santos, M. G., Junior, N. L. N., 2006.The Phytotherapy in SUS and the Medicinal Plants Research Program of the Central of Medicines. Editora MS. 1-149.

Sripanidkulchai, B., Wongpanich, V., Laupattarakasem, P., Suwansaksri, J., Jirakulsomchok, D. 2001. Diuretic effects of selected Thai indigenous medicinal plants in rats. Journal of Ethnopharmacology 75, 185–190.

Vergara, R., Minno, M. C., Minno, M., Soltis, D. E., Soltis, P. S. 2008. Preliminary Study Using ISSRs to Differentiate *Imperata* Taxa (Poaceae: Andropogoneae) Growing in the US .Southeastern Naturalist. 7(2):267–276.

Wójciak-Kosior, M., Oniszczuk, A., Sample Preparation of Phenolic Acids and TLC Analysis. *In* Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T. 2008. Thin layer chromatography in phytochemistry. CRC, vol.99, 332-359.

World Health Organization. Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk. 2007. 1-92.

Woude, H., Alink, G. M., Rietjens, I.M.C.M. 2005. The Definition of Hormesis and its Implications for *in vitro* to *in vivo* Extrapolation and Risk Assessment. Critical Reviews in Toxicology. 35:603–607.

Wright, C. I., Van-Buren, L., Kroner, C. I., Koning, M. M. G., 2007. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. Journal of Ethnopharmacology. 114, 1–31.

Yoon, J. S., Lee, M. K., Sung, S. H., Kim, Y. C. 2006. Neuroprotective 2-(2-Phenylethy) chromones of *Imperata cylindrica*. Journal of Natural Products. 69(2), 290-291.

Table1: Antioxidant results of *Imperata brasiliensis* extract measured by DPPH and FCR assay

	DPPH [a]			FCR [a] (mg Gac/g extract)
	EC_{50}	TEC_{50}	AE	
I. brasiliensis	65.87 ± 16.49	0.1	0.18 ± 0.05	97.01 ± 3.09
Trolox	2.73 ± 0.10	0.1	3.68 ± 0.14	

[a] Results expressed as mean ± S.E.M.; EC_{50}: amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50%; TEC_{50}: time needed to reach the steady state to EC_{50}; AE: antiradical efficiency [AE = $1/(EC_{50} \times TEC_{50})$]; Gac: gallic acid.

Table 2: Volume of urine collected for 15 hours after treatment DU and DR.

Treatment	Dose (mg/Kg)	Daily water consumption[1] (mL)	Urine volume[2] (mL)		Diuretic action[a]		Efficiency (%) [b]	
			DU	DR	DU	DR	DU	DR
Saline		34.83 ± 2.56	6.53 ± 0.75	10.06 ± 0.79	1.00	1.00	0.0	0.0
Furosemide	15	33.83 ± 2.31	9.85 ± 0.45*	17.6 ± 1.19***	1.51	1.75	50.8	75.5
EBOH	100	34.33 ± 2.42	5.16 ± 0.75	9.58 ± 0.96	0.79	0.95	-20.9	-4.8
EBOH	300	32.83 ± 1.94	7.88 ± 0.19	12.5 ± 1.39	1.21	1.25	20.7	25.0
EBOH	1000	28.66 ± 3.77	9.08 ± 1.39*	14.6 ± 1.02**	1.39	1.48	39.0	48.2

[1] e [2] Results expressed as mean ± S.E.M.; [a] Diuretic action = urinary excretion of treated group / urinary excretion of saline group; [b] Diuretic efficiency = % increased diuresis relating to the saline group. $^{*}P \leq 0.05$ $^{**}P \leq 0.01$ $^{***}P \leq 0.001$

Table 3: Excretion of electrolytes after treatment DU and DR.

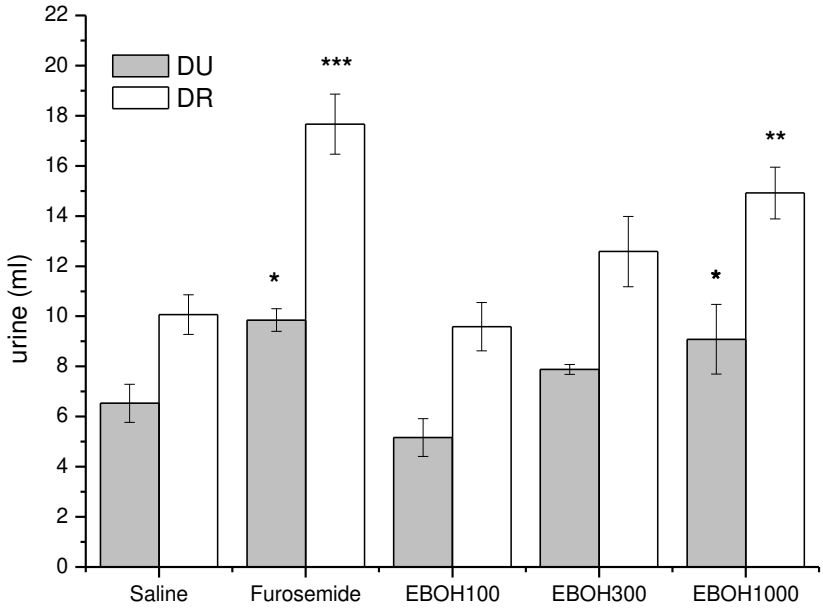
Treatment	Dose (mg/Kg)	Na^+ (mmol/l)		K^+ (mmol/l)	
		DU	DR	DU	DR
Saline		37.83 ± 7.49	46.33 ± 8.29	112.41 ± 18.04	98.35 ± 10.67
Furosemide	15	92.66 ± 6.08***	75.66 ± 3.55***	146.83 ± 14.89	78.08 ± 4.16
EBOH	100	106.33 ± 17.81***	61.33 ± 5.29	170.66 ± 17.62*	92.83 ± 5.20
EBOH	300	39.83 ± 4.72	40.50 ± 5.87	145.33 ± 14.28	116.5 ± 6.09
EBOH	1000	47.33 ± 8.60	42.16 ± 8.93	145.91 ± 12.81	142.25 ± 16.76**

Results expressed as mean ± S.E.M. *$P \leq 0.05$ **$P \leq 0.01$ ***$P \leq 0.001$

Table 4: Excretion of creatinine after treatment DR.

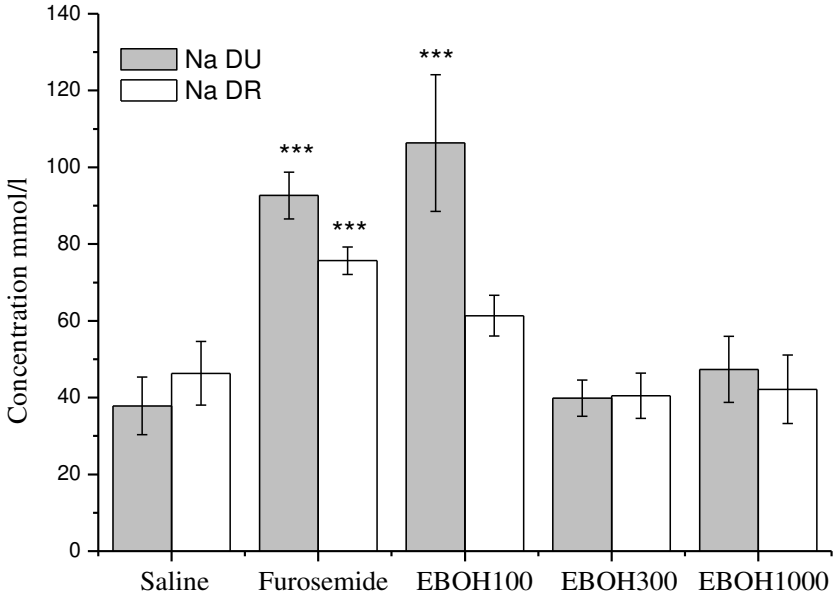
Treatment	Dose (mg/Kg)	Creatinine concentration (mg/dl)	
		Plasma	Urine[1]
Saline		≤0.5mg/dl	43.00 ± 4.78
Furosemide	15	≤0.5mg/dl	33.59 ± 5.87
EBOH	100	≤0.5mg/dl	41.91 ± 5.89
EBOH	300	≤0.5mg/dl	58.83 ± 3.76*
EBOH	1000	≤0.5mg/dl	52.37 ± 4.29

[1] Results expressed as mean ± S.E.M.; *$P \leq 0.05$ **$P \leq 0.01$ ***$P \leq 0.001$



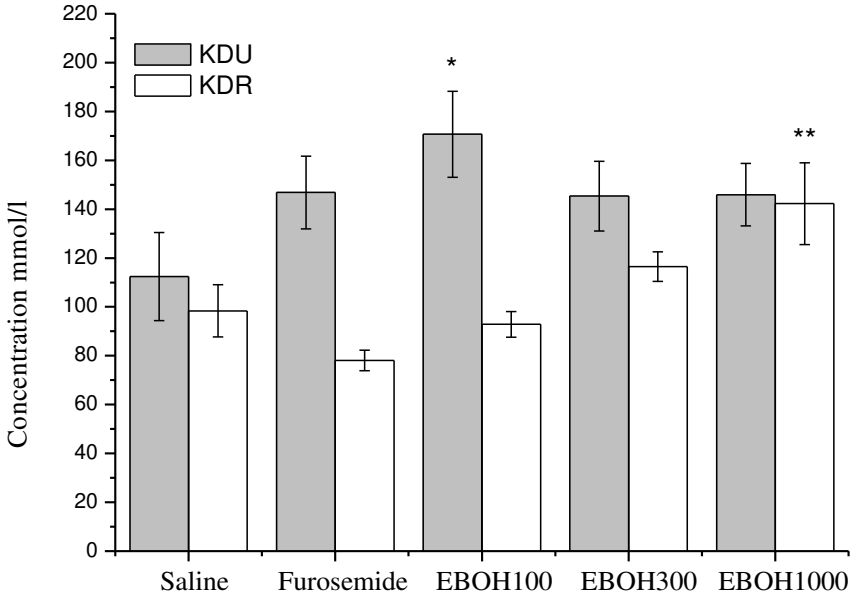
Volume of urine excreted after treatment (oral) DU and DR with hydroethanolic extract of *I. brasiliensis*, EBOH 100, 300 and 1,000 mg/Kg compared to saline 0.4% and Furosemide 15 mg/Kg. $^{*}P \leq 0.05$ $^{**}P \leq 0.01$ $^{***}P \leq 0.001$

Fig 1



Excretion of electrolytes Na^+ in urine after administration (oral) single dose (DU) and repeated doses (DR) with hydroethanolic extract.

Fig 2



Excretion of electrolytes K^+ in urine after administration (oral) single dose (DU) and repeated doses (DR) with hydroethanolic extract.

Fig 3

ANEXOS

UNICAMP

CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **1416-1**, sobre **"Avaliação da atividade afrodisíaca da espécie *Imperata brasiliensis Trin*"** sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Vanessa Helena da Silva Souza** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de **19 de dezembro de 2007**.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **1416-1**, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on **december 19, 2007**.

Campinas, 19 de dezembro de 2007.

Prof. Dr. Stephen Hyslop
Presidente em exercício

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3289-3124
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2024-1**, sobre **"Atividade antinociceptiva de frações obtidas de *Imperata brasiliensis* Trin"**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Vanessa Helena da Silva Souza**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **09 de novembro de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2024-1**, entitled **"Antinociceptive activity of fraction from *Imperata brasiliensis* Trin"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **November 9, 2009**.

Campinas, 16 de novembro de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2025-1**, sobre **"Atividade antinflamatória de frações obtidas de *Imperata brasiliensis* Trin"**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Vanessa Helena da Silva Souza**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **09 de novembro de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2025-1**, entitled **"Anti-inflammatory activity of fraction from *Imperata brasiliensis* Trin"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **November 9, 2009**.

Campinas, 16 de novembro de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2026-1**, sobre **"Atividade anticâncer de extratos e frações obtidas de *Imperata brasiliensis* Trin"**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Vanessa Helena da Silva Souza**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **09 de novembro de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2026-1**, entitled **"Anticancer activity of crude extract and fraction from *Imperata brasiliensis* Trin"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **November 9, 2009**.

Campinas, 16 de novembro de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2027-1**, sobre **"Avaliação de atividade diurética de extrato obtido de *Imperata brasiliensis* Trin"**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Vanessa Helena da Silva Souza**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **09 de novembro de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2027-1**, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **November 9, 2009**.

Campinas, 16 de novembro de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **2046-1**, sobre **"Avaliação da atividade antimetastática de frações ativas de *Imperata brasiliensis* em melanoma B-16F10"**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Vanessa Helena da Silva Souza / Gabriela Menezes Marchetti**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **14 de dezembro de 2009**.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **2046-1**, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **December 14, 2009**.

Campinas, 14 de dezembro de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/