

LUCIANA KONECNY KOHN

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA
DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES DE
Aspidosperma tomentosum Mart.**

**CAMPINAS
2001**

LUCIANA KONECNY KOHN

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA
DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES DE
Aspidosperma tomentosum Mart.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, área de concentração Clínica
Médica

Orientador
Prof. Dr. Paulo Eduardo Pizão
FCM / UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**CAMPINAS
2001**

III



648907008

IDADE BC
 CHAMADA: UNICAMP
K827a
 Ex. 44289
 JMBG BC/ 16-392101
 ROC. 16-392101
 C ☐ D ☒
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 09/05/01
 N.º CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

CM-00154026-0

K827a

Kohn, Luciana Konecny

Atividade antiproliferativa do extrato bruto e das frações de
Aspidosperma tomentosum Mart. / Luciana Konecny Kohn.
 Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador: Paulo Eduardo Pizão

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas.

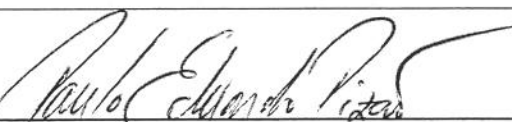
1. Câncer . 2. Plantas Medicinais. I. Paulo Eduardo Pizão. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
 III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

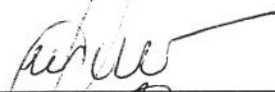
Orientador(a): *Prof.Dr. Paulo Eduardo Pizão*

Membros:

1. Prof.Dr. Paulo Eduardo Pizão



2. Profa.Dra. Wanda Pereira Almeida



3. Prof.Dr. João Ernesto de Carvalho



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data:

" De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estava sempre começando,

A certeza de que era preciso continuar

e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,

Fazer da queda um passo de dança

do medo, uma escada,

do sonho uma ponte,

da procura, um encontro."

Fernando Pessoa

À Deus por me criar e me dar forças para
superar as dificuldades.

Aos meus pais, Valter e Milce, pelo constante apoio e carinho; pelas vezes que abdicaram de seus sonhos para que os sonhos de seus filhos se tornassem realidade.

À minha irmã, Cristiane, pelo amor e carinho sempre presentes.

Ao Denilson pelo seu amor, força e paciência incondicionais, que nos momentos mais difíceis me fizeram caminhar.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Pizão, pela
oportunidade concedida e confiança em
mim depositada, contribuindo para meu
crescimento pessoal e científico.

Agradecimentos

Ao CPQBA/UNICAMP, pelo oferecimento de suas instalações para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela inserção no programa de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pelo apoio, orientação e amizade demonstrados em todos esses anos de convivência.

À Dra. Mary Ann Foglio, pela realização do trabalho fitoquímico, além do apoio e amizade sempre presente, principalmente nos momentos mais difíceis.

À Márcia Aparecida Antônio, pelo companheirismo, amizade presente em todos esses anos, além da colaboração indispensável na realização deste trabalho.

À Ana Possenti, Aparecida Érica Bighetti e Patrícia Corrêa Dias, pelo apoio e amizade sempre presente.

Aos botânicos Prof^a. Dr^a M. Carmen E. do Amaral e pelo Prof. Dr. Volker Bittrich do Departamento de Botânica do IB – UNICAMP pela realização da coleta e identificação botânica do espécime vegetal estudado.

Aos amigos Sirlene Válerio Tinti, Maria Carolina Bayeux Leme Oliveira, Carina Denny, José Ricardo Domingues, Alik Teixeira Fernandes, Maria Susana Corrêa Alves da Cunha e Helena Muller Queiroz, que de uma forma ou de outra contribuíram para este trabalho.

À Erica Ferreira Silva, Flávia Tatiane Navarro Fachini e Thaís Moreno de Castro, pela colaboração no processamento fitoquímico da espécie vegetal estudada.

À Renata Maia, secretária do Curso de Pós-Graduação da Clínica Médica da FCM/UNICAMP, pela disposição e atenção constantes em todos os momentos,

A todos os amigos que de alguma forma, colaboraram no desenvolvimento desse trabalho, muito obrigada!

Lista de Gráficos

GRÁFICO 1: Curva de crescimento da linhagem celular K-562.	63
GRÁFICO 2: Curva de crescimento da linhagem celular MCF 7.	64
GRÁFICO 3: Curva de crescimento da linhagem celular NCI-ADR.	65
GRÁFICO 4: Curva de crescimento da linhagem celular UACC-62.	66
GRÁFICO 5: Curva de crescimento da linhagem celular NCI-460.	67
GRÁFICO 6: Curva concentração atividade da ação antiproliferativa do 5-fluorouracil sobre linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição	68
GRÁFICO 7: Curva concentração atividade da ação antiproliferativa do irinotecan sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.	69
GRÁFICO 8: Curva concentração atividade da ação antiproliferativa da doxorubicina sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição. . .	70
GRÁFICO 9: Atividade antiproliferativa do extrato bruto diclorometânico obtidos das partes aéreas secas de <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	72
GRÁFICO 10: Atividade antiproliferativa do extrato bruto etanólico obtido das partes aéreas fresca de <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	73

GRÁFICO 11: Atividade antiproliferativa da fração apolar obtidos a partir do extrato bruto diclorometânico de <i>Aspidosperma. tomentosum</i> Mart.	74
GRÁFICO 12: Atividade antiproliferativa da fração de média polaridade apolar obtidos a partir do extrato bruto diclorometânico de <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart..	75
GRÁFICO 13: Atividade antiproliferativa da fração polar apolar obtidos a partir do extrato bruto diclorometânico de <i>Aspidosperma. tomentosum</i> Mart..	76
GRÁFICO 14: Atividade antiproliferativa da fração alcaloídica apolar obtidos a partir da fração de média polaridade.	77
GRÁFICO 15: Atividade antiproliferativa da fração terpênica apolar obtidos a partir da fração de média polaridade.	78

Lista de Tabelas

TABELA 1: Drogas utilizadas em quimioterapia antineoplásica.	26
TABELA 2: Linhagens celulares utilizadas nos ensaios antiproliferativos.	45
TABELA 3: Concentrações celulares utilizadas na realização da curva de crescimento celular.	46
TABELA 4: Concentração das drogas utilizadas na curva de concentração atividade das drogas de referência.	49
TABELA 5: Rendimento dos extratos brutos e frações obtidas a partir das partes aéreas de <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.. . . .	55
TABELA 6: Densidade de inoculação das linhagens celulares tumorais humanas determinadas para os ensaios antiproliferativos.	67
TABELA 7: Curva concentração atividade das linhagens tumorais em presença do 5-fluorouracil.	106
TABELA 8: Curva concentração atividade das linhagens tumorais em presença do irinotecan.	107
TABELA 9: Curva concentração atividade das linhagens tumorais em presença da doxorubicina.	108

TABELA 10: Atividade antiproliferativa dos extratos brutos da <i>Aspidosperma</i> <i>tomentosum</i> Mart.	109
TABELA 11: Atividade Antiproliferativa do Extrato Bruto Diclorometânico Planta Seca Obtidos a partir da <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	110
TABELA 12: Atividade Antiproliferativa do Extrato Bruto Etanólico Planta Seca Obtidos a partir da <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	111
TABELA 13: Atividade Antiproliferativa da Fração Apolar Resultante da Separação por Coluna Clássica do Extrato Bruto Diclorometânico Planta Seca Obtidos a partir da <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	112
TABELA 14: Atividade Antiproliferativa da Fração Média Polaridade Resultante de Separação por Coluna Clássica do Extrato Bruto Diclorometânico Planta Seca Obtidos a partir da <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	113
TABELA 15: Atividade Antiproliferativa da Fração Polar Resultante de Separação por Coluna Clássica do Extrato Bruto Diclorometânico Planta Seca Obtidos a partir da <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	114
TABELA 16: Atividade Antiproliferativa da Fração Rica em Alcalóides Resultante de Separação Ácido / Base da Fração de Média Polaridade da <i>Aspidosperma</i> <i>tomentosum</i> Mart.	115
TABELA 17: Atividade Antiproliferativa da Fração Rica em Terpenos Resultante de Separação Ácido / Base da Fração de Média Polaridade da <i>Aspidosperma</i> <i>tomentosum</i> Mart.	116

Lista de Figuras

FIGURA 1: Detalhe de um exemplar de <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart. coletada na Estação Experimental Fazenda da Campininha, Mogi-Guaçu, São Paulo. . . .	12
FIGURA 2: Fluxograma de obtenção dos extratos brutos diclorometânico e etanólico, a partir do material vegetal seco	34
FIGURA 3: Fluxograma de obtenção do extrato bruto etanólico a partir da planta fresca.	35
FIGURA 4: Fluxograma de fracionamento do extrato bruto diclorometânico do material vegetal fresco para obtenção das frações polar, média polaridade e apolar. .	36
FIGURA 5: Fluxograma de fracionamento da fração de média polaridade para obtenção das frações ricas em terpenos e alcalóides	37
FIGURA 6: Fotomicrografia óptica em aumento de 100 vezes, de cultura em suspensão da linhagem celular tumoral K-562.	40
FIGURA 7: Fotomicrografia óptica, em aumento de 320 vezes, de cultura em suspensão da linhagem celular tumoral K-562.	40
FIGURA 8: Fotomicrografia óptica, em aumento de 100 vezes, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral NCI-460.	41

FIGURA 9: Fotomicrografia óptica, em aumento de 200 vezes com fase, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral NCI-460.	41
FIGURA 10: Fotomicrografia óptica, em aumento de 100 vezes, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral MCF 7.	42
FIGURA 11: Fotomicrografia óptica, em aumento de 200 vezes, com fase, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral MCF 7.	42
FIGURA 12: Fotomicrografia óptica, em aumento de 100 vezes, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral NCI-ADR.	43
FIGURA 13: Fotomicrografia óptica, em aumento de 200 vezes, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral NCI-ADR.	43
FIGURA 14: Fotomicrografia óptica, em aumento de 100 vezes, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral UACC-62.	44
FIGURA 15: Fotomicrografia óptica, em aumento de 200 vezes, com fase, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral UACC-62.	44
FIGURA 16: Esquema da placa controle.	49
FIGURA 17: Esquema da placa teste.	50

FIGURA 18: Cromatografia de camada delgada dos extratos brutos diclorometânico e etanólico, obtidos a partir das partes aéreas secas de <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart. e das frações frações apolar, média polaridade e polar obtidas a partir do processamento fitoquímico do extrato bruto diclorometânico.	56
FIGURA 19: Cromatografia de camada delgada dos extratos brutos diclorometânico e etanólico, obtidos a partir das partes aéreas secas de <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart. e das frações frações apolar, média polaridade e polar obtidas a partir do processamento fitoquímico do extrato bruto diclorometânico.	57
FIGURA 20: Cromatografia de camada delgada da fração rica em alcalóides.	58
FIGURA 21: Cromatografia de camada delgada da fração rica em alcalóides.	59
FIGURA 22: Cromatografia de camada delgada da fração rica em terpenos.	60
FIGURA 23: Perfil cromatográfico da fração rica em terpenos, obtida da fração de média polaridade de <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart., em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.	61

Lista de Abreviaturas

5 FU	5-Fluorouracil
CCD	Cromatografia em camada delgada
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CO ₂	Gás carbônico
CPT-11	Irinotecan
DI	Densidade de inoculação
DNA	Ácido desoxidoribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EBDS	Extrato bruto diclorometânico obtido da planta seca
EBEF	Extrato bruto etanólico obtido da planta fresca
EBES	Extrato bruto etanólico obtido da planta seca
FA	Fração apolar
FMA	Fração rica em alcalóides
FMP	Fração de média polaridade
FP	Fração polar
FT	Fração rica em terpenos
HCl	Ácido clorídrico
K-562	Linhagem celular representativa de leucemia

MCF 7	Linhagem celular representativa de neoplasia de mama
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio anidro
NCI	National Cancer Institute (Estados Unidos)
NCI-460	Linhagem celular representativa de neoplasia de pulmão tipo não pequenas células
NCI-ADR	Linhagem celular representativa de neoplasia de mama que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas
RPMI	Meio de cultura RPMI 1640
RPMI/SFB	Meio de cultura suplementado de 5% de soro fetal bovino inativado
SFB	Soro fetal bovino inativado
SRB	Sulforrodamina B
T0	Placa controle
T1	Placa teste
TCA	Ácido tricloroacético
UACC-62	Linhagem celular representativa de melanoma

Sumário

1. Resumo	01
2. Introdução	05
3. Objetivo	13
4. Revisão Bibliográfica	15
5. Metodologia	31
A. Processamento fitoquímico	32
1. Obtenção dos extratos brutos	32
1.1. Coleta	32
1.2. Preparação do material vegetal	33
1.3. Preparação dos extratos brutos	33
1.4. Fracionamento do extrato bruto	35
1.5. Fracionamento da fração de média polaridade	36
1.6. Análise por cromatografia em camada delgada	38
1.7. Análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	38
B. Ensaios farmacológicos	39
1. Células	39
2. Cultura celular	45
3. Curva de crescimento para determinação da densidade de inoculação	46

4. Ensaio de sulforrodamina B.	47
5. Determinação da curva concentração-resposta das drogas padrão.	48
6. Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa das substâncias-testes.	51
6.1. Diluição das amostras	51
7. Curva concentração atividade das amostras ativas	51
8. Análise dos resultados	52
6. Resultados.	53
1. Processamento fitoquímico.	55
1.1. Rendimento dos extratos brutos e frações obtidas a partir das partes aéreas de <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart	54
1.2. Cromatografia em camada delgada	55
1.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	61
2. Testes farmacológicos.	62
2.1. Curvas de crescimento para a determinação da densidades de inoculação	63
2.2. Curvas concentração atividade das drogas consideradas como padrão	68
2.3. Atividade antiproliferativa dos extratos brutos da <i>Aspidosperma</i> <i>tomentosum</i> Mart.	71
2.3.1. Atividade antiproliferativa dos extratos brutos etanólico e diclorometânico em concentração única	71
2.3.2. Curva concentração atividade do extrato bruto diclorometânico obtido das partes aéreas da planta seca de <i>A. tomentosum</i> Mart.	72

2.3.3. Curva concentração atividade do extrato bruto etanólico obtido das partes aéreas frescas de <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	73
2.4. Atividade Antiproliferativa das Frações Obtidas do Fracionamento do extrato bruto diclorometânico da <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	74
2.4.1. Curva concentração atividade da fração apolar	74
2.4.2. Curva concentração atividade da fração de média polaridade	75
2.4.3. Curva concentração atividade da fração polar	76
2.5. Atividade antiproliferativa das frações obtidas a partir da fração de média polaridade da <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	77
2.5.1. Curva concentração atividade da fração alcaloídica obtida a partir da Fração de Média Polaridade	77
2.5.2. Curva concentração atividade da fração terpênica obtida a partir da fração de média polaridade	78
7. Discussão	79
8. Conclusões	87
9. Summary	89
10. Referências Bibliográficas	93
10. Anexo I	105

Resumo

Resumo

Neste trabalho está descrita a avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos e frações da *Aspidosperma tomentosum* Mart, árvore originária do cerrado, popularmente conhecida como “peroba do campo”, sendo seu tronco utilizado como madeira e as sementes utilizadas em trabalhos artesanais. A atividade antiproliferativa foi determinada através do método da sulforrodamina B (SRB), utilizando cinco linhagens tumorais humanas: K-562 (leucemia), MCF 7 (mama), NCI-ADR (mama, expressando fenótipo de resistência a múltipla drogas), NCI-460 (pulmão) e UACC-62 (melanoma).

Foram estudadas as atividades antiproliferativas dos extratos diclorometânico e etanólico da espécie vegetal *Aspidosperma tomentosum* Mart. Os extratos brutos inibiram, de forma

concentração-dependente, o crescimento das linhagens MCF 7, UACC62, NCI-ADR e NCI-460. Comparativamente ao extrato etanólico, o extrato diclorometânico apresentou uma maior atividade antiproliferativa nestas linhagens inclusive com efeito citocida sobre a linhagem MCF 7, na concentração de 125 µg / mL . Foi constatado que neste ensaio, os extratos brutos não inibiram significativamente o crescimento da linhagem K-562 na maior concentração utilizada.

O extrato diclorometânico bruto foi particionado por cromatografia em coluna seca fornecendo as frações denominadas Fração Apolar (FA), Fração de média polaridade rica em terpenos (FMT), Fração de média polaridade rica em alcalóides (FMA) e a Fração Polar (FP). FMT diminuiu de forma concentração-dependente o crescimento das linhagens testadas, com maior seletividade para MCF 7 e NCI-460, enquanto que FP não demonstrou seletividade celular, tendo inibido todas as linhagens de forma concentração-dependente, apresentando efeito citocida na concentração de 125 µg/mL. As frações FA e FMA não apresentaram inibição significativa nas doses testadas. Estes dados sugerem que o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(eis) pela atividade antiproliferativa estão concentrados na FMT.

Introdução

Introdução

De acordo com registros encontrados na China e na Índia, as plantas medicinais foram utilizadas de forma empírica por mais de 5 mil anos. Os primeiros estudos realizados durante o século XIX resultaram no isolamento de alguns alcalóides, como por exemplo morfina, estricnina e quinino. A partir destas descobertas, a avaliação farmacológica de plantas medicinais foi intensificada (Hamburguer e Hostettmann 1981).

Até meados do século XX, os medicamentos de origem vegetal constituíam a base da terapia medicamentosa e o desenvolvimento da síntese química introduziu rapidamente novas drogas na terapêutica. A investigação de plantas medicinais utilizadas popularmente resultou em alguns

avanços terapêuticos e atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética, 25% são provenientes de plantas, isolados diretamente ou produzidos por semi-síntese, a partir de um precursor vegetal e os 25% restantes referem-se às outras fontes de produtos naturais (marinhos, microbiológicos, entre outros). Alguns exemplos de fármacos obtidos de espécies vegetais são os glicosídeos cardiotônicos (digitálicos), agentes colinérgicos (pilocarpina), anticolinérgicos (alcalóides da beladona), analgésicos (ópio), antihipertensivos (reserpina) e antimaláricos (artemisinina) (Clark 1996; Pezzuto 1997).

O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas de origem vegetal tem aumentado significativamente nos últimos anos. Várias empresas privadas e organizações governamentais têm instituído projetos de pesquisa nesta área. É importante salientar que, na década de 70, nenhuma das maiores empresas farmacêuticas do mundo mantinha qualquer programa de pesquisa na área de produtos naturais e, atualmente, pelo menos metade delas, tem como prioridade a pesquisa de novos fármacos a partir de espécies vegetais (Fellows 1995).

Dentre as diversas patologias, as neoplasias estão em destaque, visto que são consideradas um problema de saúde pública, pois representam a segunda maior causa de morte por doenças na maioria dos países, sendo superadas apenas por aquelas cardiovasculares. A cada ano, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer atinge 9 milhões de pessoas, levando a óbito 5 milhões de pacientes. Na população mundial, as neoplasias mais prevalentes são as de pulmão entre os homens e as de mama entre as mulheres, sendo que a variação percentual relativa na incidência de câncer nos últimos 25 anos foi de 75% (Ministério da Saúde 1999).

Já no Brasil, a partir da década 30, com a queda da mortalidade causada pelas doenças infecciosas e parasitárias têm-se observado um perfil de mortalidade similar àquele de países desenvolvidos. A última informação sobre a mortalidade no Brasil data de 1997, na qual o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) registrou 106.990 mortes por câncer (11,84%) superadas pelas doenças cardiovasculares (27,63%) e por causas externas (28,67%) (Ministério da Saúde 1999). O aumento da incidência de câncer é, principalmente, consequência do aumento da expectativa de vida da população, pois o aparecimento dessa patologia é favorecido com o envelhecimento do organismo entre outros (Cairns 1981).

Atualmente, são conhecidos mais de cem tipos de câncer, diferenciados pela etiologia, história natural e forma de tratamento. Apesar da grande evolução do conhecimento a respeito deste conjunto de patologias, tal progresso não refletiu de maneira proporcional o desenvolvimento de técnicas eficazes de prevenção, tratamento e cura. Em relação ao tratamento das neoplasias, a introdução da quimioterapia aumentou significativamente os índices de cura de alguns tumores, em especial as neoplasias hematológicas, as quais não eram controladas com sucesso pelo emprego da cirurgia ou radioterapia (Bonadona 1990).

Por outro lado, a existência de células neoplásicas que apresentam mecanismos de resistência aos agentes quimioterápicos e a baixa seletividade destes fármacos, resultando em diferentes graus de toxicidade aos tecidos não tumorais, são fatores limitantes do sucesso do tratamento antineoplásico. Nas últimas quatro décadas o desenvolvimento de novos fármacos eficazes no tratamento de tumores malignos revolucionou o protocolo clínico (Rang e col 1995). O avanço na descoberta de novas drogas antitumorais ocorreu a partir da Segunda Guerra Mundial, com o

avanço das pesquisas de antibióticos e aprimoramento nas técnicas de cultura de tecido e de microorganismos (Hamburguer 1981).

Entre os quimioterápicos provenientes de espécies vegetais podemos destacar os alcalóides obtidos da *Catharanthus roseus*, conhecida também como *Vinca rosea*, utilizada pela população de Madagascar no tratamento do diabetes. Durante os testes de atividade hipoglicemiante, os extratos dessa espécie produziram granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais, sugerindo avaliação em modelos de leucemias e linfomas. A confirmação da atividade antitumoral nesses modelos levou ao isolamento da vimblastina e vincristina, as quais são de grande utilidade no tratamento tanto de tumores hematológicos (leucemias e linfomas) como de tumores ditos como sólidos (pulmão) (Hamburguer e Hostettmann, 1981; Fellows 1995; Cragg e Newman 1999).

Outra descoberta importante nesta área foi o paclitaxel (Taxol), isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*), em 1971 (Wani e col 1971). Estudos clínicos iniciais revelaram que essa substância era capaz de regredir o câncer de mama e de ovário, resistentes à terapia tradicional (Rowinsky e col 1995). Como essa substância teria que ser extraída de espécies que levam décadas para o seu crescimento, a introdução dessa droga na terapêutica só foi possível a partir do desenvolvimento da síntese química, de extrema complexidade, e pela descoberta de precursores obtidos de fontes renováveis. Essas dificuldades adiaram a introdução do paclitaxel na terapêutica para a década de 90. Além do tratamento do câncer de mama e ovário, essas drogas estão sendo avaliadas no câncer de pulmão, esôfago, cabeça e pescoço, sendo que atualmente o

docetaxel é considerado como composto que utilizado isoladamente tem a maior eficácia no tratamento do câncer de mama metastático (Cragg e Newman, 1999; Phillipson, 1999).

No final de 1940 foram isolados dois alcalóides de espécies do gênero *Podophyllum*, que eram utilizadas pelas populações nativas da América e da Ásia no tratamento do câncer de pele e verrugas. No entanto os resultados experimentais com esses alcalóides não foram encorajadores. Mais tarde, foram obtidos por semi-síntese dois derivados desses alcalóides, a etoposida e a teniposida, cujos estudos experimentais permitiram a introdução dessas drogas na terapia do câncer (Hamburguer e Hostettmann 1991; Cragg e Newman 1999; Phillipson 1999).

O potencial da descoberta e desenvolvimento de novas drogas a partir de extratos vegetais ainda é considerado pouco explorado. Estima-se que existam cerca de 250 a 500 mil espécies vegetais e somente 5 a 15% destas foram estudadas do ponto de vista farmacológico (Graag e Newman 1999). O Instituto Nacional do Câncer (NCI) estudou cerca de 114 mil plantas entre 1960 a 1982, resultando em 23 substâncias ativas, mas ainda existem 20 mil extratos que deverão ser submetidos a testes de avaliação da atividade antitumoral (Hamburguer e Hostettmann 1991; Graag e Newman 1999).

O Brasil possui uma grande diversidade de espécies vegetais localizadas em diferentes regiões com diferentes tipos de vegetação tais como a Amazônia, a Floresta Atlântica e o Cerrado. O Cerrado é uma região típica brasileira ocupando 25% do território nacional, sendo encontrado nas regiões Norte, Nordeste, Central e Sul do país. Nesta região, a baixa fertilidade do solo e o predomínio de uma longa estação de seca condiciona o desenvolvimento de uma vegetação peculiar, semelhante à savana. Seus espécimes vegetais são de porte baixo, facilitando a coleta e a identificação botânica

(Ferri 1969; Guimarães 1997 e 1980). Por estes motivos estas plantas são de fácil adaptação e cultivo, podendo assim ser cultivadas em larga escala (Siqueira 1980).

Através da triagem antitumoral de várias espécies vegetais provenientes do Cerrado, realizada na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (projeto FAPESP nº 95/09607-5), foi selecionada a *Aspidosperma tomentosum* Mart. (FIGURA 1) para a realização deste trabalho.

A *Aspidosperma tomentosum* Mart. é uma árvore da família da Apocynaceae que ultrapassa 2,5m de altura, tronco e ramos recobertos por uma espessa capa, com sulcos de extensão, podendo possuir cicatrizes de folhas que caíram. As folhas são alternadas, sésseis, oblonga-obovadas e oblongo-elípticas, fortemente pilosas em ambas as faces, quando adultas atingem 15 cm ou mais. As flores são muito pequenas, tomentosas e reunidas em inflorescência cimosas. Os frutos têm paredes aveludadas e sementes alada. A Planta cortada exuda um abundante látex. Esta espécie vegetal é encontrada em matas e cerrados do Brasil extra-amazônico (exceto Nordeste e Rio Grande do Sul), Bolívia, Paraguai e Venezuela (Pio Corrêa 1942).

Popularmente, a *Aspidosperma tomentosum* Mart. é conhecida como Peroba do Campo. Seu tronco é utilizado como madeira e as sementes são utilizadas na confecção das “Flores de Brasília” (Ferri 1969).



FIGURA 1: Parte do exemplar de *Aspidosperma tomentosum* Mart coletada na Estação Experimental Fazenda da Campininha, Mogi-Guaçu, São Paulo.

Objetivo

Objetivo

Este projeto de pesquisa teve como objetivo:

- Avaliar atividade antiproliferativa de extratos brutos da espécie vegetal *Aspidosperma tomentosum* Mart., em modelo de cultura de células tumorais humanas.
- Determinar as frações farmacologicamente ativas nos modelos de cultura de células tumorais humanas, isolar e caracterizar quimicamente o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(eis) por esta atividade.

Revisão Bibliográfica

Revisão Bibliográfica

A ocorrência de tumores malignos foi descrita em figuras e/ou documentos por muitas civilizações antigas da Ásia, América do Sul e Egito, sendo confirmado através do diagnóstico de osteosarcomas em múmias egípcias. As civilizações, até a idade média, atribuíam a causa desta doença aos Deuses. Por volta do ano 500 A.C., Hipócrates descreveu a primeira teoria relacionando o câncer, uma doença de mau prognóstico, com o desequilíbrio entre os líquidos pretos (baço) e os outros três líquidos corpóreos: sangue, bile e catarro. O primeiro estudo científico data de 1775 quando Sir Percival Pott, médico inglês, descreveu que os meninos que limpavam as chaminés morriam aos 20 anos com câncer na bolsa escrotal. Este estudo não só associou a neoplasia a um agente causador (fuligem da chaminé) como também sugeriu uma

latência entre a exposição ao carcinógeno e o aparecimento da mesma. Virchow, um patologista eminente do século XIX, publicou que todas as células eram provenientes de uma célula matriz, estabelecendo a origem celular monoclonal do câncer. Todas as pesquisas direcionadas para a descoberta da cura do câncer e melhor entendimento desta patologia foram baseadas nesta teoria (Hill e Tannock 1992; Coelho 1998).

Análises epidemiológicas revelaram diferenças internacionais na incidência dos vários tipos de tumores. As neoplasias de mama, cólon e próstata mostram alta ocorrência na Europa e América do Norte e baixa na Ásia; já o carcinoma de fígado é comum em todo o mundo, exceto na Europa e América do Norte e, finalmente, o de esôfago, estômago e cérvix apresentam maior incidência nos países desenvolvidos (Boyd 1992, Hamada 1998).

As células neoplásicas apresentam quatro características principais que as distinguem das células normais: proliferação incontrolada, perda da função em consequência da ausência de diferenciação, invasão e destruição dos tecidos adjacentes. A origem dessa célula é consequência de mutações, que podem ser hereditárias ou adquiridas somaticamente como resultado de processos endógenos ou exposição a uma variedade de fatores ambientais, químicos, físicos e biológicos (Coelho 1998).

As neoplasias são classificadas em benignas e malignas. Os tumores benignos possuem células diferenciadas com crescimento geralmente lento e expansivo. Apresentam poucas mitoses e, na maioria das vezes, são encapsulados, não são capazes de originar metástases e, por apresentar apenas complicações locais, dificilmente levam o paciente a óbito. Ao contrário, os tumores

malgnos, geralmente são pouco diferenciados e não são encapsulados. Apresentam crescimento invasivo, podendo originar metástases em outros órgãos e freqüentemente provocam a morte do paciente (Mellors 1999).

Independente da origem da neoplasia, as células malignas apresentam baixa estabilidade genética e sofrem alterações genômicas freqüentes, originando novos clones mutantes com vantagens sobre a capacidade de proliferação. Deste modo, com o crescimento tumoral há um aumento no número de subpopulações e quando a doença se tornar clinicamente detectável, suas células serão extremamente heterogêneas (Foulds 1975; Cairns 1975; Norton 1985; Von Hoff 1985).

Qualquer célula normal pode se transformar em neoplásica, desde que ela apresente divisão celular. O desenvolvimento de um tumor é um processo de múltiplos estágios que necessitam da soma dos eventos para resultar em uma neoplasia. O processo carcinogênico envolve interações complexas entre fatores exógenos (ambientais e vírus) e/ou endógenos (genéticos e hormonais), os quais são denominados de carcinógenos (Champbel 1999).

A ação dos carcinógenos sobre a célula resulta em um dano genético (mutação) ou epigenético (alteração no padrão de expressão gênica), com efeito cumulativo durante a vida do indivíduo até a expressão do fenótipo final, isto é, ocorrência do tumor. Análises matemáticas sugerem que são necessárias de três a quatro alterações genéticas para ocorrer uma leucemia e de seis a sete para um carcinoma (Champbel 1999).

Os carcinógenos são divididos em três classes:

- Físicos: radiações ultravioleta, eletromagnética e ionizante, os quais causam lesão direta no DNA;
- Biológicos: vírus, pertencentes às famílias Poxviridae, Herpesviridae, Adenoviridae, Papoviridae, Hepadnaviridae e Retroviridae, que estimulam a proliferação da célula infectada, alteram a resposta imune ou ainda causam mutações no genoma celular e,
- Químicos: agentes químicos, na sua forma inalterada ou seus metabólitos resultantes de biotransformação, que apresentam em suas moléculas centros eletrofílicos os quais interagem com o DNA, levando a alterações genômicas. Dentre estas substâncias estão os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, N-nitrosaminas e as aminas aromáticas (Archer 1992, Champbell 1999)

A primeira etapa da carcinogênese é a iniciação, na qual um potente agente mutagênico causa uma mutação no DNA celular (fenômeno celular). Este evento não resulta no desenvolvimento da patologia, isto somente ocorrerá quando esta célula mutada dormente sofrer um evento epigenético. A próxima fase é a promoção, que possui duração variável, ocorrendo uma série de efeitos reversíveis que facilitam a expressão do fenótipo iniciado (fenômeno tissular). A etapa final é a progressão, que envolve ciclos sucessivos de mutações, ocorrendo o rearranjo cromossomal o qual ativa o proto-oncogene ou suprime um gene supressor tumoral, iniciando a divisão descontrolada da célula tumoral (fenômeno sistêmico) (McKinnell 1998).

Para o desenvolvimento da neoplasia é necessário que ocorram mutações genômicas sucessivas, porém alguns indivíduos já possuem alterações no seu fenótipo proveniente das células

germinativas, tornando-se assim mais susceptíveis. O fato de que as células normais contêm genes com a capacidade de inibir a transformação maligna foi descrito originalmente por Harris et al. (1969).

Existem duas categorias de alterações genéticas que podem levar ao desenvolvimento de um câncer. Uma delas refere-se à inativação de genes supressores tumorais, já que estes codificam proteínas que bloqueiam o ciclo celular, retornando a célula para o estado quiescente ou promovendo a morte celular programada (apoptose), quando esta apresentar algum dano no seu DNA. Desta forma, a inativação desse gene leva à perda da regulação do crescimento celular e, portanto, esta mutação é oncogênica (Pearson e Van Der Luijt 1998). É possível que o evento chave da carcinogênese seja a perda da função dos genes supressores tumorais (DeVita 1995; Perantoni 1998, Bretani 1998).

Outra categoria de alteração genética é a ativação de proto-oncogenes em oncogenes, que codificam proteínas responsáveis pela regulação e promoção do ciclo celular, tais como fatores de crescimento e seus receptores, enzimas e proteínas envolvidas no controle da proliferação e diferenciação celular (Miller e cols. 1990). Assim, quando estes são ativados através de translocações cromossômicas, amplificações gênicas ou mutações pontuais, os proto-oncogenes se transformam em oncogenes e estes podem conferir autonomia de crescimento às células (Hackford 1993; Perantoni 1998).

A apoptose é um processo dependente de energia caracterizado pela rápida ocorrência de distintas alterações morfológicas e bioquímicas. Estas alterações consistem em formação de vesículas

citoplasmáticas, condensação da cromatina e da membrana nuclear, clivagem da cromatina por endonucleases, as quais são somente ativadas no processo apoptótico e finalmente a fragmentação do DNA com a morte celular. Existem oncogenes, como por exemplo o *bcl-2*, que codificam proteínas antiapoptóticas inibindo assim este processo (Kessler 1999; Pierce 1998).

Para o desenvolvimento do nódulo tumoral e o aparecimento de metástases há necessidade de um suprimento adequado de sangue, o qual é obtido através da formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes nos tecidos circunvizinhos (Folkman 1976, Furcht 1986). Este processo é conhecido como neovascularização ou angiogênese (Folkman 1992). A angiogênese raramente ocorre em um indivíduo normal (Folkman 1985; Furcht 1986; Folkman 1992; Bouck 1990), isto porque as células normais secretam baixas concentrações de indutores e altos níveis de inibidores angiogênicos, enquanto que as células tumorais o fazem ao contrário (Bouck 1990; Augustin 1998).

O processo angiogênico irá favorecer a disseminação celular, que pode ocorrer preferencialmente por duas vias, através dos vasos sanguíneos e pelo sistema linfático. Os carcinomas preferem o sistema linfático enquanto que os sarcomas utilizam a via hematogênica. Os órgãos mais comuns para ocorrer as metástases são o pulmão, fígado, nódulos linfáticos, ossos e cérebro, porém pode-se dizer que a metástase ocorrerá no primeiro capilar que a célula terá que passar. O tumor secundário é a primeira causa morte dos pacientes com câncer, pois estas células geralmente apresentam resistência aos tratamentos utilizados (Kohn 1991, Folkman 1995; Ellis 1996).

A progressão tumoral é um processo sequencial e seletivo, que abrange três fases: a saída das células neoplásicas do órgão de origem através da circulação (sangüínea ou linfática), adesão da célula circulante a elementos endoteliais ou subendoteliais do órgão invadido e a penetração da mesma ao estroma intersticial do órgão sede da metástase ou tumor secundário (Champbell 1999; Kessler 1999). Somente alguns clones tumorais possuem o fenótipo metastático para a expressão das moléculas envolvidas em adesão celular à matriz extracelular (Liotta e cols. 1991; Weidner 1993; Brentani e cols. 1998).

O prognóstico do paciente com câncer depende, fundamentalmente, dos aspectos biológicos do tumor, do diagnóstico precoce e do planejamento terapêutico correto. Este último item sempre representaram um grande desafio para os médicos, pois as armas terapêuticas disponíveis continuam sendo a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e mais recentemente está surgindo a bioterapia (Lopes 1998).

A cirurgia foi a primeira modalidade de tratamento que significativamente alterou o curso de uma neoplasia e consiste na retirada física do tecido maligno sendo eficiente somente nos casos em que o tumor é circunscrito, anatomicamente favorável e não apresentar metastases. Atualmente, mais de 60% dos pacientes com câncer são tratados cirurgicamente, sendo utilizada no diagnóstico e no estadiamento de mais de 90% de todos os tumores (Lopes 1998). Os aspectos positivos envolvem a cura de um número significativo de neoplasias localizadas, não apresentar efeito carcinogênico, não causar resistência biológica e permite a análise mais adequada do estadiamento da doença. Os aspectos negativos são iguais ao de qualquer cirurgia tais como: problemas com anestesia, infecção, causar deformidades ou perda das funções e não poder curar os casos de doenças

disseminadas (Lopes 1998; Parchment 1998; Novaes 1998). Este método vem sendo aprimorado para se obter a maior preservação possível do órgão atingido, minimizando o processo invasivo. A associação prévia com radioterapia e/ou quimioterapia tem permitido a realização de cirurgias conservadoras dando ao paciente uma melhor qualidade de vida sem prejuízo da sobrevida. As novas técnicas utilizam-se de robôs e computadores associados a sistemas virtuais de imagem (Sikora 1998).

A radioterapia é utilizada para tumores localizados que não puderam ser extraídos totalmente ou aqueles que apresentam alta taxa de recidivas locais após a cirurgia. Esta técnica consiste em expor as células malignas à radiação ionizante, pois ela possui características físicas que promovem a ionização do meio incidente, alterando as macromoléculas que são indispensáveis às funções vitais, levando a célula à morte (Lopes 1998). A radioterapia é somente efetiva nas células que estão em divisão, possuindo graves efeitos colaterais, provocando lesões nos tecidos normais adjacentes (Parchment, 1998; Sasse, 1999). O tratamento utiliza uma fonte radioativa colocada à distância do paciente (teleterapia) ou diretamente no tumor (braquiterapia), cada qual com indicações específicas. Atualmente utiliza-se computadores com analisador de imagem para otimizar o processo e obter a melhor ação física e biológica dos raios emitidos (Sikora 1999).

A bioterapia consiste na utilização dos conhecimentos da fisiopatologia dos tecidos malignos e normais para melhor controlar a doença. Assim o tratamento apresentará o mínimo de efeito colateral possível (Parchment 1998, Yamaguchi 2000). Esta nova modalidade de tratamento abrange as seguintes linhas de pesquisa:

- Imunoterapia: descobrir alvos nas células tumorais que se tornem antígenos específicos para os anticorpos, proporcionado a produção de vacinas (Boyle e Costelo 1998, Blankenstein 1999)
- Inibição de sinais de transdução celular: desenvolvimento de antagonistas para fatores de crescimento, inibição do receptor de tirosina quinase, inibição da ação do oncogene ras (Boyle e Costelo 1998)
- Inibição do ciclo celular: inibição das quinases dependentes de ciclinas (CDK4) (Boyle e Costelo 1998)
- Ativação da apoptose: aumento da expressão do proto-oncogene *bcl-2* (Boyle e Costelo 1998)
- Inibição da angiogênese: inibição dos receptores de tirosina quinase do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e já existem algumas drogas como TNP470 e a talidomida, antagonistas da cascata angiogênica (Boyle e Costelo 1998; Augustin 1998)
- Inibir a metástase: inibição das metaloproteinases (MTPS) (Boyle e Costelo 1998)

A quimioterapia evoluiu rapidamente desde que o primeiro paciente foi tratado com a mostarda nitrogenada em 1942. O grande avanço na quimioterapia ocorreu a partir da segunda metade deste século e atualmente tem-se cerca de 35 drogas licenciadas para uso na América do Norte (Erllichman 1996). Este tratamento é um dos mais utilizados e consiste na utilização de agentes citotóxicos ou anti-hormonais, que eliminam as células neoplásicas, diminuindo assim o crescimento da massa tumoral e a proliferação desordenada. As grandes classes de drogas incluem os agentes alquilantes, antimetabólitos e compostos sintéticos e naturais entre outros. A quimioterapia pode ser utilizada sozinha ou em conjunto com outro tipo de tratamento (Tannock 1992; Parchment 1998), porém é efetiva somente em células em divisão e as drogas podem gerar mecanismos de resistência. Os principais efeitos colaterais são náusea, vômito, alopecia, feridas na

boca, febre e diarreia (Verweij e Jonge 2000). As drogas quimioterápicas mais utilizadas na clínica estão relacionadas na tabela 1.

Um dos grandes problemas dos agentes quimioterápicos é a resistência a drogas. A resistência pode ser classificada como primária (presente quando o fármaco é administrado pela primeira vez) ou adquirida (desenvolvendo-se durante a quimioterapia), podendo ser resultante da adaptação celular ou de mutações (Rang e cols. 1995). A natureza dos processos bioquímicos mediadores do fenômeno da resistência varia de acordo com o tipo de quimioterápico em questão (Pizão e Pinedo 1990).

Um dos mecanismos mais estudados na atualidade é denominado “resistência múltipla” (“*multidrug resistance*” ou MDR) (Gottesman 1993; Lum e Gosland 1995). Através deste mecanismo, células tumorais expostas a um único tipo de quimioterápico tornam-se, simultaneamente, resistentes a quimioterápicos de natureza química diversa e que apresentam mecanismos de ação completamente distintos. Foi demonstrado que, na maioria dos casos, este fenômeno pode ser explicada pela existência de uma glicoproteína de membrana celular, denominada P-glicoproteína (Pgp) (Marie 1995; Leighton e Goldstein 1995), que atua como uma bomba de efluxo, resultando num decréscimo da concentração intracelular do quimioterápico, assim como de outras substâncias de ocorrência natural (Kane e cols. 1990; Di Pietro e cols. 1999).

Tabela 1 - Drogas utilizadas em quimioterapia antineoplásica .

Classe	Principais Representantes	Principal Mecanismo de Ação
Derivados platínicos	Cisplatina	Ligação cruzada com DNA
	Carboplatina	
Agentes alquilantes	Ciclofosfamida	Ligações cruzadas com DNA
	Efosfamida	
Alcalóides naturais	Vincristina	Inibição da formação de microtúbulos
	Vinblastina	
Antimetabólitos	Fluoruracila	Inibição da síntese e metabolismo do DNA
	Metotrexato	
Antibióticos	Doxorrubicina	Intercala-se ao DNA
	Bleomicina	Fragmentação do DNA
Outras drogas	Paclitaxel	Estimula a polimerização e
	Docetaxel	estabilização de microtúbulos
	Mitoxantrona	Inibição da síntese de DNA
	Irinotecam	Inibição da topoisomerase I
	Topotecana	
	Etoposida	Inibição topoisomerase II e síntese de DNA
Hormônios	Tamoxifen	Anti-estrogênio
	Oestrogenos (fosfestrol)	Bloqueia efeito androgenos

Infelizmente, além da “resistência múltipla” e de alterações nos processos de biotransformação dos quimioterápicos, muitos outros mecanismos de resistência também podem ser desenvolvidos pelas células tumorais e estão descritos na literatura. Dentre eles, destacam-se:

- aumento dos níveis de glutathione S-transferase, uma enzima com a função fisiológica de proteger as células dos danos induzidos por radicais livres, levando a resistência a agentes alquilantes, cisplatina e antraciclinas (Morrow e Cowan 1990; O'Dwyer e cols. 1995);
- alterações nas moléculas de topoisomerase II, que podem levar à resistência a antraciclinas e epipodofilotoxinas (Beck e cols. 1987; Epstein, 1988);
- alterações na estrutura das tubulinas, levando a um aumento da resistência aos compostos taxóides e aos alcalóides da *Vinca* (Goldstein e Ozols 1993);
- aumento da expressão da timidilato-sintase, que pode resultar em resistência ao 5-fluorouracil (Schimke 1984);
- aumento da produção de diidrofolato-redutase e subsequente resistência ao metotrexato (Schimke 1984) e ,
- desenvolvimento de mecanismos de reparo do DNA (Leighton & Goldstein, 1995), como a produção da eficiente proteína alquiltransferase O⁶-alquilguanina, que contribui para a resistência a nitrosuréia, triazina e agentes alquilantes (Gerson e Willson 1995).

Por estes motivos as metodologias utilizadas para a descoberta de novas drogas contra o câncer vêm sendo aprimoradas. Os primeiros programas de pesquisa de novas drogas antitumorais utilizavam exclusivamente leucemias murinas como modelos de triagem laboratorial. Esta metodologia foi selecionada por apresentar alta reprodutibilidade e produtividade, resultados quantitativos e de baixo custo. Um dos importantes centros de pesquisa que adotou este programa

de triagem foi o *National Cancer Institute* (NCI - USA). Nesta ocasião, a leucemia murina L1210 passou a ser empregada como o único modelo padrão para a seleção de novas drogas antitumorais (Johnson 1990).

Posteriormente, uma nova leucemia murina foi implementada, a P388, por apresentar maior sensibilidade às drogas disponíveis na época (Grindey 1990). Com isso, houve um grande desenvolvimento teórico e foram definidos importantes conceitos relativos a quimioterapia (Hamburguer 1981), assim como várias drogas foram descobertas, muitas das quais ainda são úteis na terapêutica antineoplásica atual (Shoemaker 1986). Entretanto, esta leucemia murina (P388) apresentava uma alta sensibilidade às substâncias que interferem com a síntese de DNA e consequentemente, ocorreu um repetitivo isolamento de substâncias com o mesmo mecanismo de ação, apesar de apresentarem estruturas químicas distintas (Corbett 1987).

Tal estratégia aparentemente gerou uma seleção tendenciosa (doença-orientada) de compostos ativos, principalmente contra aqueles tumores humanos que foram melhores representados pelos modelos tumorais murinos (linfomas e leucemias), resultando em um baixo índice de eficiência e consequente estagnação no desenvolvimento de novas drogas antitumorais principalmente em relação aos tumores sólidos (pulmão, mama, cólon, fígado) (Grindey 1990).

Na tentativa de aprimorar a triagem antitumoral, foi implementada uma nova estratégia, que consistia em realizar uma pré-seleção com a leucemia murina P388 e em testes posteriores utilizavam-se 5 linhagens celulares murinas (melanoma B16, pulmão Lewis, cólon 26, cólon 38 e

mamário CD8F1) e 3 linhagens humanas (mama MX1, pulmão LX1 e colo CX1) (Goldin e cols. 1981; Grindey 1990)

Mais recentemente, com o avanço das pesquisas de antibióticos e com o aprimoramento das técnicas de cultura de tecidos e de microorganismos, foram desenvolvidos modelos experimentais *in vitro*, tornando possível a avaliação da quimiossensibilidade de microorganismos, células normais e tumorais (Hamburguer 1981).

Porém, os ensaios *in vitro* ainda apresentavam, no início da década de 70, vários problemas técnicos; tais como: crescimento celular inadequado em cultura ou ausente (apenas 66% dos espécimes celulares se desenvolviam *in vitro*), contaminações frequentes, ausência de padronização do tempo de exposição às drogas e de sua concentração utilizada e dificuldade na quantificação dos resultados (Hamburguer 1981).

Através de uma análise de todos os resultados obtidos até a década de 80 foi possível o desenvolvimento de um novo painel de linhagens celulares utilizando modelos experimentais *in vitro* (Grindey 1990; Muggia 1987). Este painel era formado por 60 linhagens celulares diferentes, buscando a representação de importantes neoplasias, tais como as de pulmão, cólon, ovário, cérebro, medula, pele, mama e próstata.

Segundo Grindey (1990), com a utilização dos ensaios *in vitro* foram identificadas 79 substâncias antineoplásicas, as quais foram inativas no modelo das leucemias murinas. A análises destes dados

revelaram que os ensaios *in vitro* são mais específicos e sensíveis que aqueles das leucemias (Grindey e cols. 1990).

Atualmente o NCI utiliza em sua triagem inicial apenas cinco linhagens de células tumorais humanas que são K-562 (leucemia), MCF 7 (mama), NCI-ADR (mama resistente), NCI-460 (pulmão) e UACC-62 (melanoma). Estas células foram selecionadas, pois são os tipos de tumores mais frequentes nos Estados Unidos. A metodologia utilizada é a da Sulforrodamina B (SRB) que é uma aminoxantina de coloração rosa brilhante que apresenta em sua molécula dois grupos sulfônicos. Por ser um corante aniônico, em meio levemente ácido, é capaz de ligar-se a terminações básicas de aminoácidos proteicos de células fixadas com ácido tricloroacético (TCA), sendo assim um ensaio independente do metabolismo celular (Flores 1978, Skehan e Friedman 1985). Esta metodologia promove uma quantificação sensível de proteínas de modo linear com o número de células da cultura (Skehan 1990)

O ensaio de SRB é consideravelmente rápido, simples e apresenta sensibilidade comparável àquelas das metodologias fluorescentes (Van Lambalgen e Lelieveld 1987; McCaffrey e cols. 1988) e superior aos ensaios que utilizam corantes visíveis, mesmo em baixas concentrações celulares (1000 a 2500 células por compartimento) (Skehan 1990). A linearidade da curva de densidade ótica (OD) versus concentração do corante é em torno de 1.5 - 2.0 OD por unidade e a coloração se desenvolve rapidamente, podendo ser medida em um amplo intervalo de leitura de 490-564 nm (Skehan 1990). Este modelo vem sofrendo validação muito extensa, já que é largamente utilizado pelo NCI, estando sujeito a testes contínuos.

Metodologia

Metodologia

A. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO

1. Obtenção dos extratos brutos

1.1. Coleta

Foram utilizadas as partes aéreas (folhas) da espécie vegetal *Aspidosperma tomentosum* Mart. O material vegetal foi coletado na cidade de Mogi-Guaçu, Fazenda Campininha, reserva de cerrado em dezembro de 1997. Essa espécie vegetal foi identificada e a exsicata da *Aspidosperma tomentosum*

Mart. encontra-se depositada no herbarium do IB/UNICAMP, UEC-267. A figura 1 mostra um exemplar de *Aspidosperma tomentosum* Mart.

1.2. Preparação do material vegetal

O material vegetal foi seco em estufa (Fabbe, modelo 170) com ventilação a 45 °C. Por apresentar resina leitosa, foi separado metade do material para extração a fresco (vide abaixo).

O material vegetal seco foi moído em um triturador de facas (Metalurgica Roma[®], modelo MR-30). O material fresco foi moído com gelo seco em moinho (Stephen[®], modelo UM 40).

1.3. Preparação dos extratos brutos.

Cinquenta gramas do pó foram submetido ao processo de maceração com 400 mL de diclorometano (Merck[®]) durante 24 h, por três vezes consecutivas. Os filtrados recolhidos foram misturados, tratados com Na₂ SO₄ (Merck[®]), filtrados e evaporados sob vácuo a 40 °C, fornecendo 7,47g de extrato bruto diclorometano (EBDS) com rendimento de 15%.

O resíduo vegetal do processo de maceração com diclorometano foi retomado e submetido ao processo de maceração com 400 mL de etanol 95% (Merck[®]) durante 24 h por três vezes consecutivas. Os filtrados recolhidos foram misturados, tratados com Na₂ SO₄, filtrados e evaporados sob vácuo a 55 °C até completa eliminação do etanol, sendo posteriormente liofilizado, resultando em 11,2g de extrato

bruto etanólico (EBES) com rendimento de 22% . Estes procedimentos estão esquematicamente ilustrados na figura 2.

A planta fresca foi extraída com 400 mL de etanol 95% (Merck®) durante 24 h, por três vezes consecutivas. Os filtrados recolhidos foram misturados, filtrados e evaporados sob vácuo a 55 °C até completa eliminação do etanol, sendo posteriormente liofilizado, resultando em 8,6 g de extrato etanólico bruto (EBEF) com rendimento de 17%. Este procedimento está esquematicamente ilustrado na figura 3.

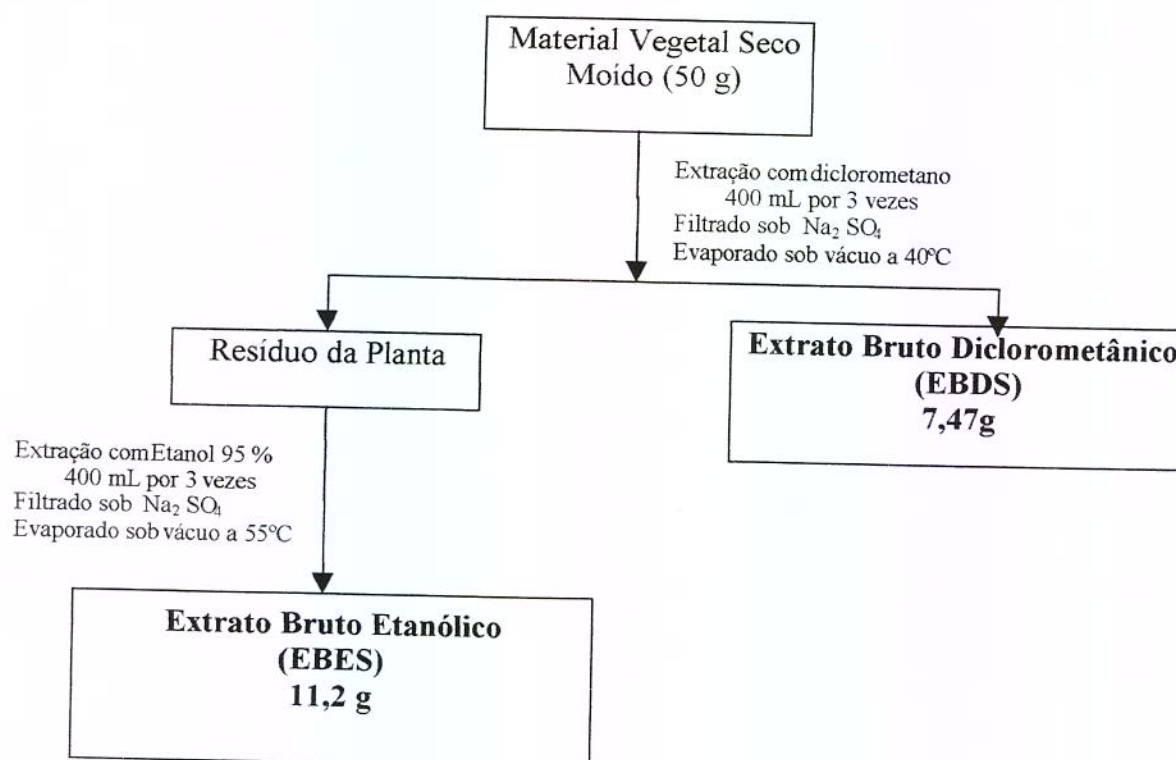


FIGURA 2: Fluxograma de obtenção dos extratos brutos diclorometânico e etanólico, a partir do material vegetal seco.

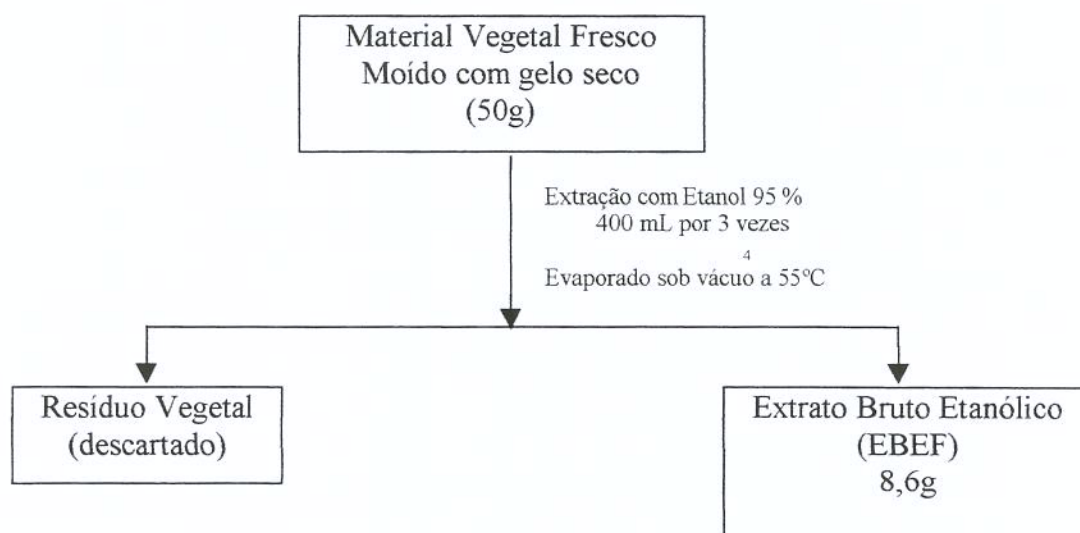


FIGURA 3: Fluxograma de obtenção do extrato bruto etanólico a partir da planta fresca.

1.4. Fracionamento do extrato bruto diclorometânico

O extrato bruto diclorometânico (3 g) foi purificado por cromatografia em coluna seca utilizando silicagel (Merck®) como fase estacionária, colocada em um tubo de celulose ($\varnothing = 2$ cm, 15 cm de altura). Esta coluna foi eluída com uma mistura de clorofórmio:metanol 5% (Merck®). A coluna foi cortada em três frações de 5 cm, as frações foram extraídas com etanol 95% e separada da sílica por filtração em funil de placa porosa. Os filtrados foram evaporados sob vácuo a 55 °C, resultando em 3 frações distintas denominadas fração apolar (FA) (0,1g), de média polaridade (FM) (0,8g) e polar (FP) (1,75g) com rendimento de 3,8; 30,2 e 66% respectivamente (figura 4).

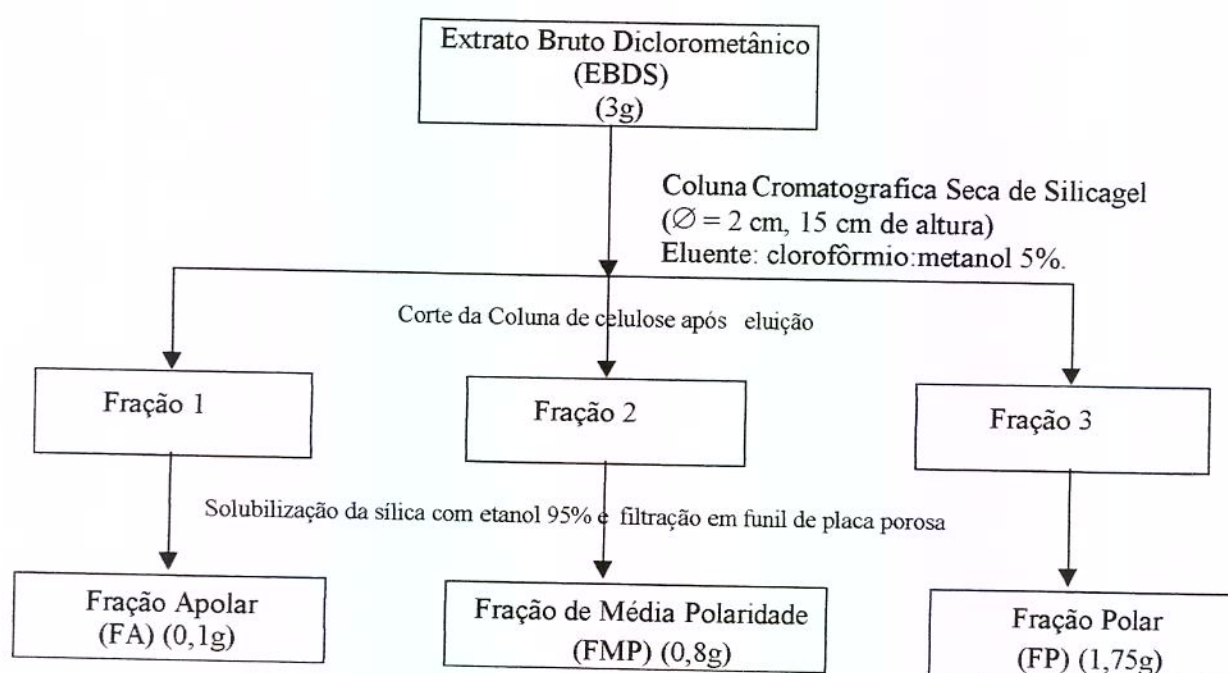


FIGURA 4: Fluxograma de fracionamento do extrato bruto diclorometânico do material vegetal fresco (EBES) para obtenção das diferentes frações.

1.5. Fracionamento da fração de média polaridade

A fração de média polaridade (1,76g) foi ressuspensa em 30 mL de acetato de etila (Merck®) e extraída por três vezes consecutivas com 15 mL de ácido clorídrico (HCl - Merck®) 1 N. A fração orgânica foi lavada com água, seca sobre Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada sob vácuo a 40 °C, fornecendo 1,72g de uma fração rica em terpenos (FMT) com rendimento de 97,7%. A fração aquosa foi basificada com hidróxido de amônio, até aproximadamente pH=9 e extraída por três vezes consecutivas com 15 mL de diclorometano fornecendo 0,04g de uma fração rica em alcalóides (FMA) com rendimento de 2,3%, que foi evaporada sob vácuo a 40 °C. Este procedimento está esquematizado na figura 5.

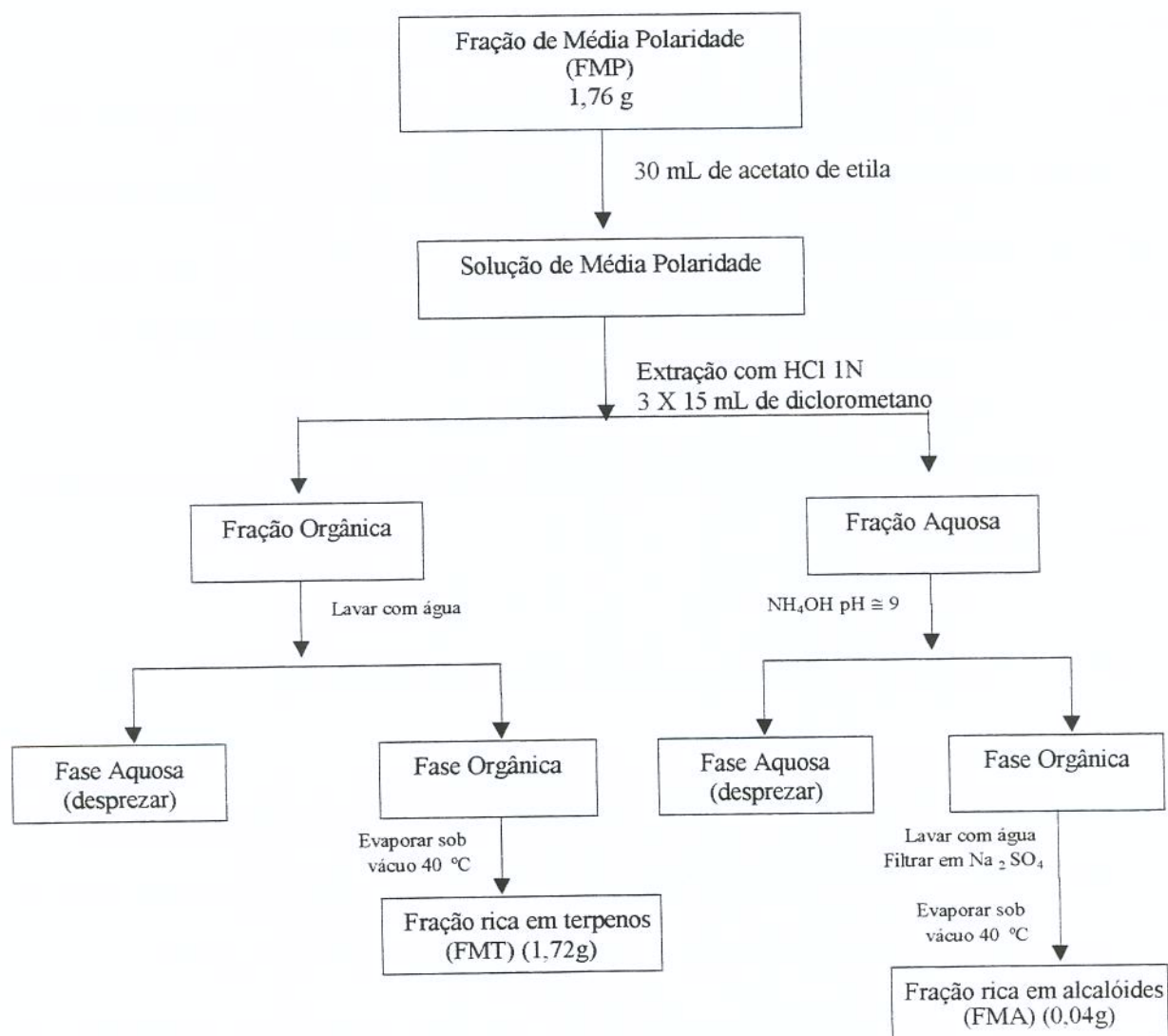


FIGURA 5: Fluxograma de fracionamento da fração de média polaridade para obtenção das frações enriquecidas em terpenos e alcalóides.

1.6. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD):

Foram aplicadas as amostras em cromatoplasmas de Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck®) e eluídas com uma mistura de clorofórmio:metanol 5%. A separação dos componentes foi visualizada com revelador de anisaldeído (ácido acético : ácido sulfúrico : anisaldeído; 50:1:0,5) e Dragendorff. Este reativo para revelação de alcalóides foi preparado a partir da dissolução de 8 g de subnitrato de bismuto pentaidratado em 20 mL de ácido nítrico, adicionado à solução de 27,2 g de iodeto de potássio dissolvido em 50 mL de água. Esta mistura foi posteriormente completada para 100 mL de água.

As placas borrifadas com solução de anisaldeído foram aquecidas em estufa (110 °C, 5 min) para a visualização das manchas.

1.7. Análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

As frações e substâncias puras foram diluídas em acetato de etila ou metanol e analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a detector de massas (CG Hewlett Packard 5890, série II) diretamente acoplado a um detector seletivo de massa Hewlett Packard 5970, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, 30m x 0,25mm, DB-1 ou DB-5, ou similares). As condições de análise foram: temperatura de injeção: 250 °C; temperatura do detector: 300 °C; programa de temperatura: 40 (2min)-240 °C, 5 °C/min, 240-300 °C, 10 °C/min; com ou sem razão de *split* 1:100 (dependendo da concentração da amostra); gás de arraste He 0,7 bar, 1 mL / min; volume da amostra 1-2 µL.

B. TESTES FARMACOLÓGICOS

1. Linhagens celulares

As linhagens celulares cedidas gentilmente pelo NCI e utilizadas na triagem da atividade antiproliferativa estão relacionadas na tabela 2, onde também está descrito o padrão de crescimento (células aderidas ou em suspensão) de cada tipo celular. Estas foram cultivadas em RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado 5% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Gibco[®]).

Todas as linhagens celulares foram enviadas congeladas para o nosso laboratório. O primeiro passo realizado foi o descongelamento e a multiplicação das células em cultura. Posteriormente, foi realizado o congelamento em nitrogênio líquido para a obtenção de estoques destas linhagens celulares. As células em cultura foram fotografadas (Figuras 6 a 15) para uma avaliação geral de sua morfologia e detecção de eventual contaminação cruzada.

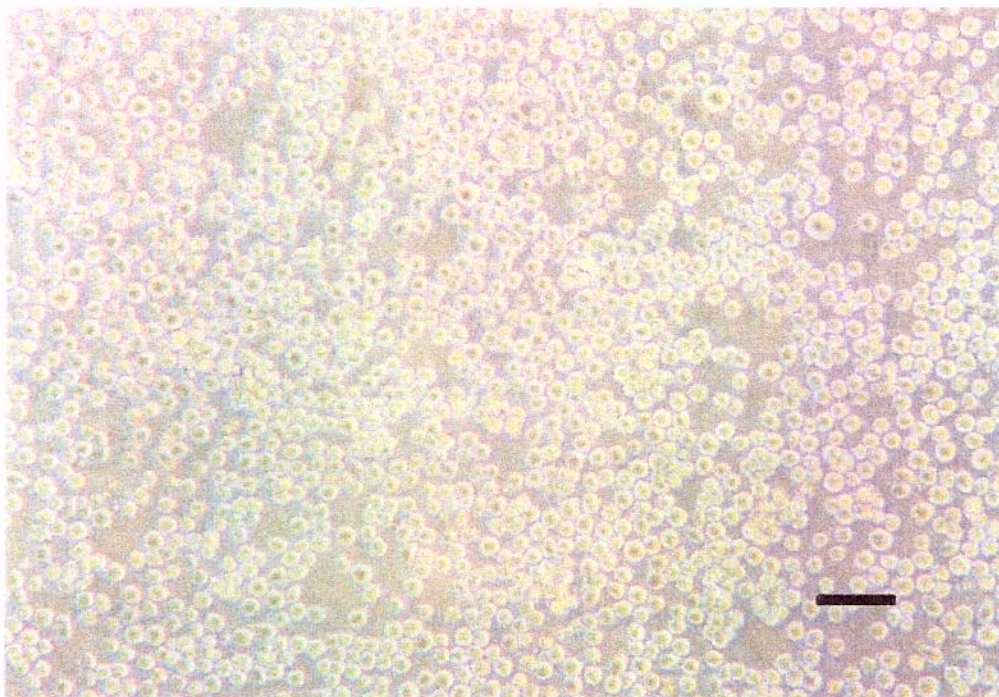


FIGURA 6: Fotomicrografia óptica, em aumento de 100x, de cultura em suspensão da linhagem celular tumoral K-562.
Barra de escala = 100 μ m.

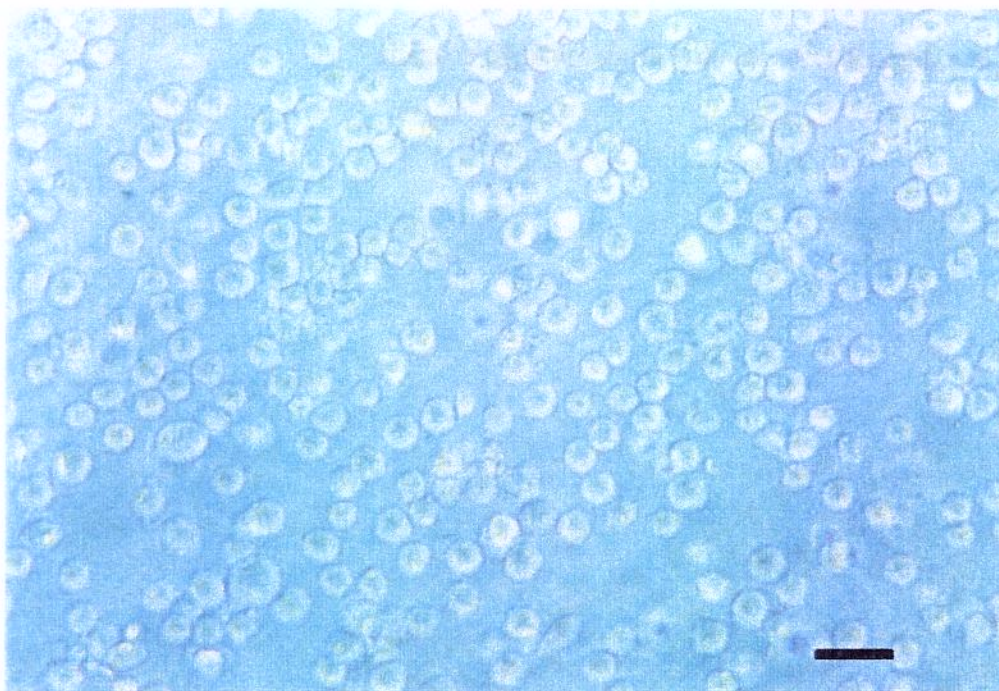


FIGURA 7: Fotomicrografia óptica, em aumento de 320x, de cultura em suspensão da linhagem celular tumoral K-562.
Barra de escala = 320 μ m.

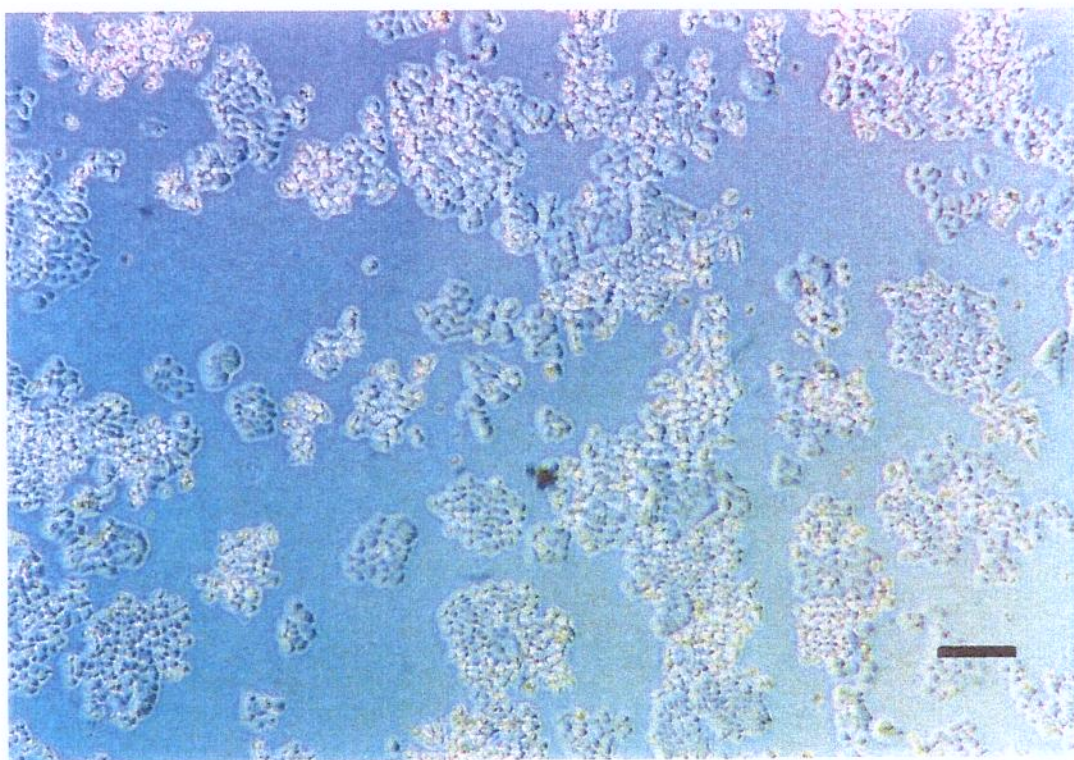


FIGURA 8: Fotomicrografia óptica, em aumento de 100x, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral NCI - 460.
Barra de escala = 100 μ m.

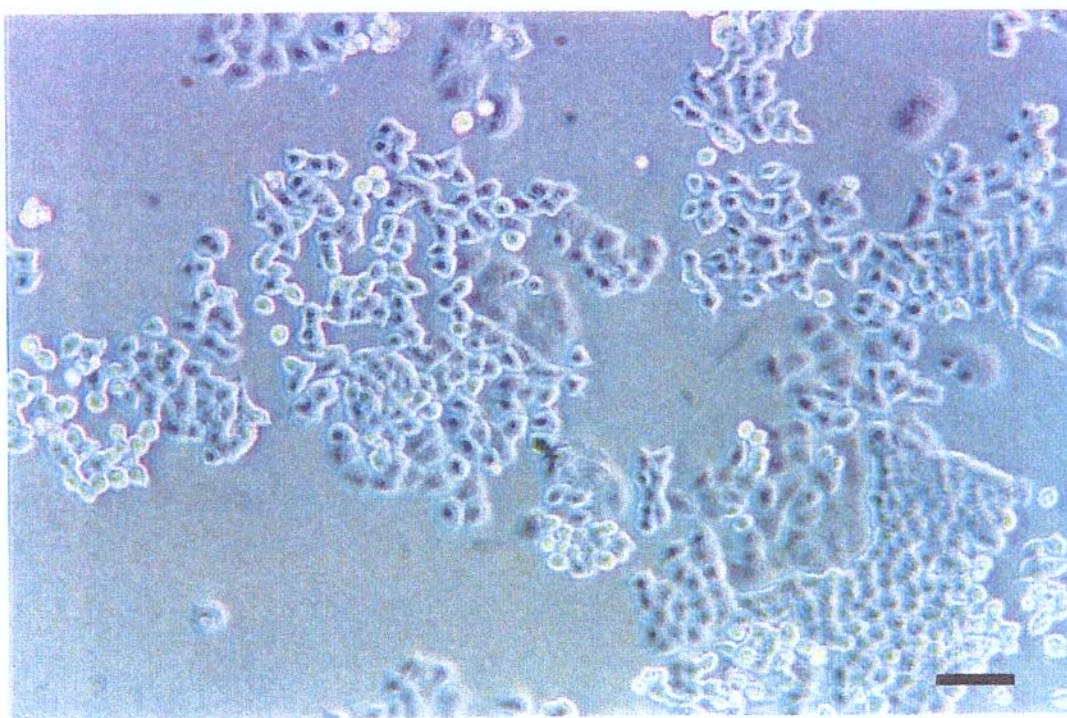


FIGURA 9: Fotomicrografia óptica, em aumento de 200x com fase, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral NCI - 460.
Barra de escala = 200 μ m.

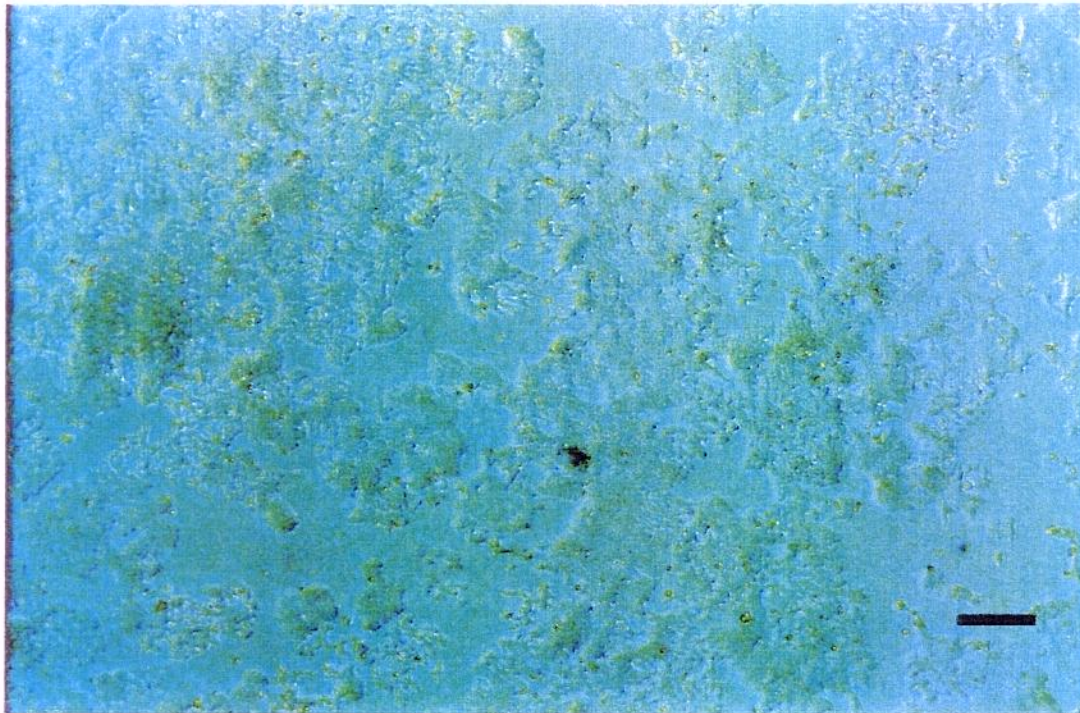


FIGURA 10: Fotomicrografia óptica, em aumento de 100x, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral MCF 7.
Barra de escala = 100 μ m.

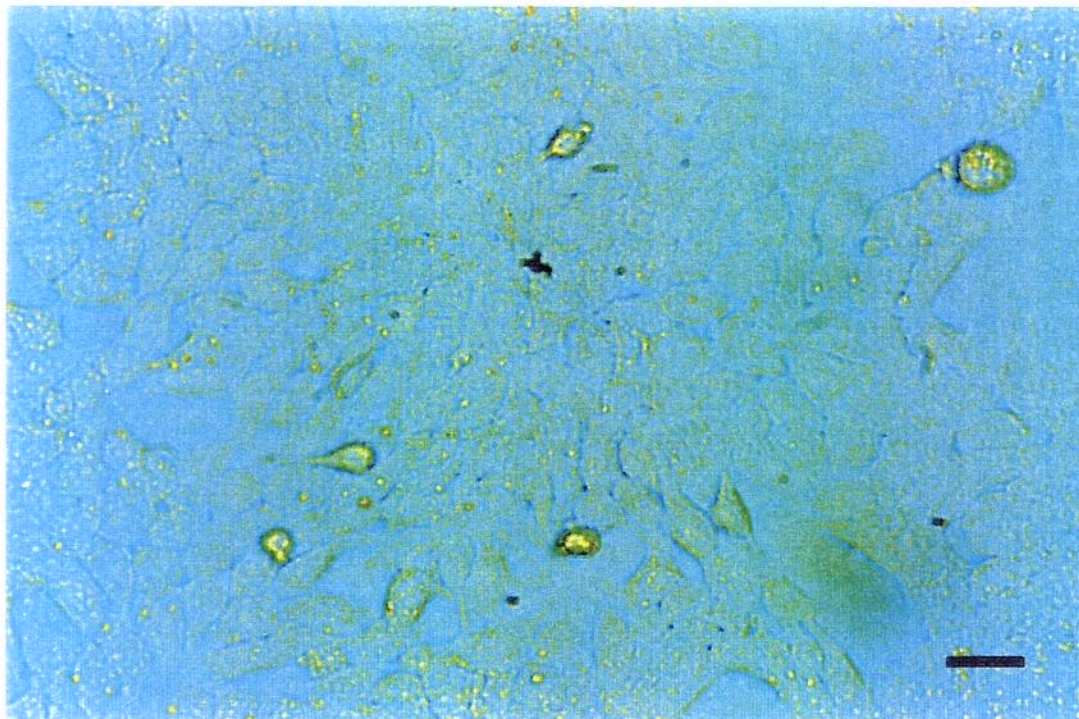


FIGURA 11: Fotomicrografia óptica, em aumento de 200x com fase, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral MCF 7.
Barra de escala = 200 μ m.

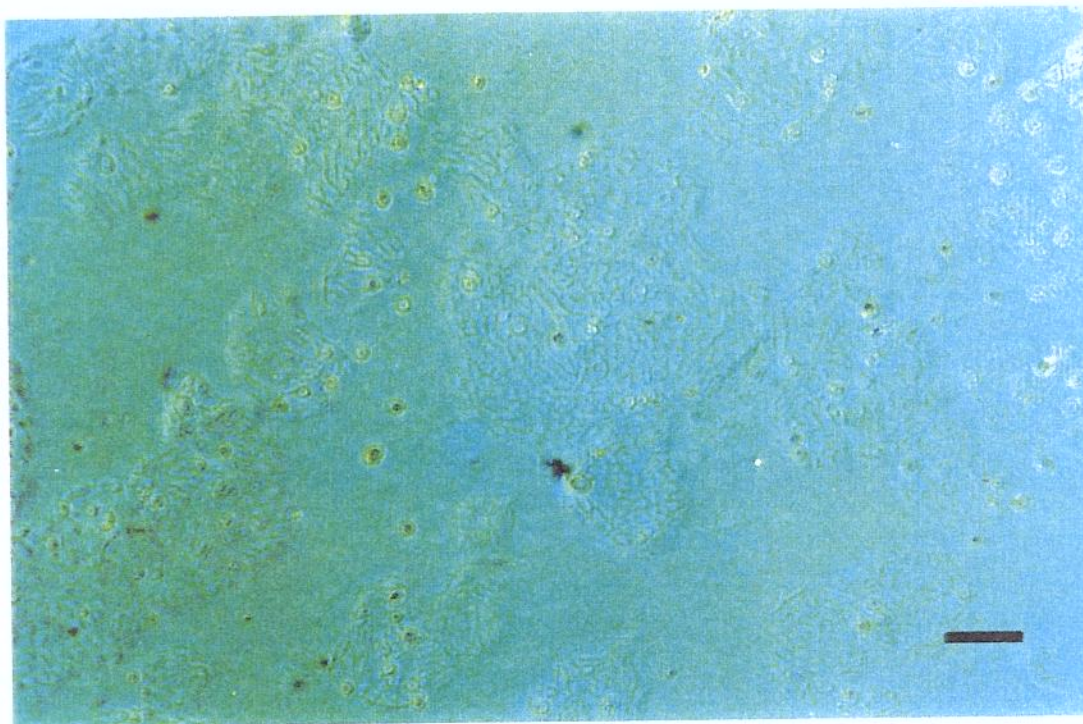


FIGURA 12: *Fotomicrografia óptica, em aumento de 100x, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral NCI-ADR. Barra de escala = 100 μ m.*

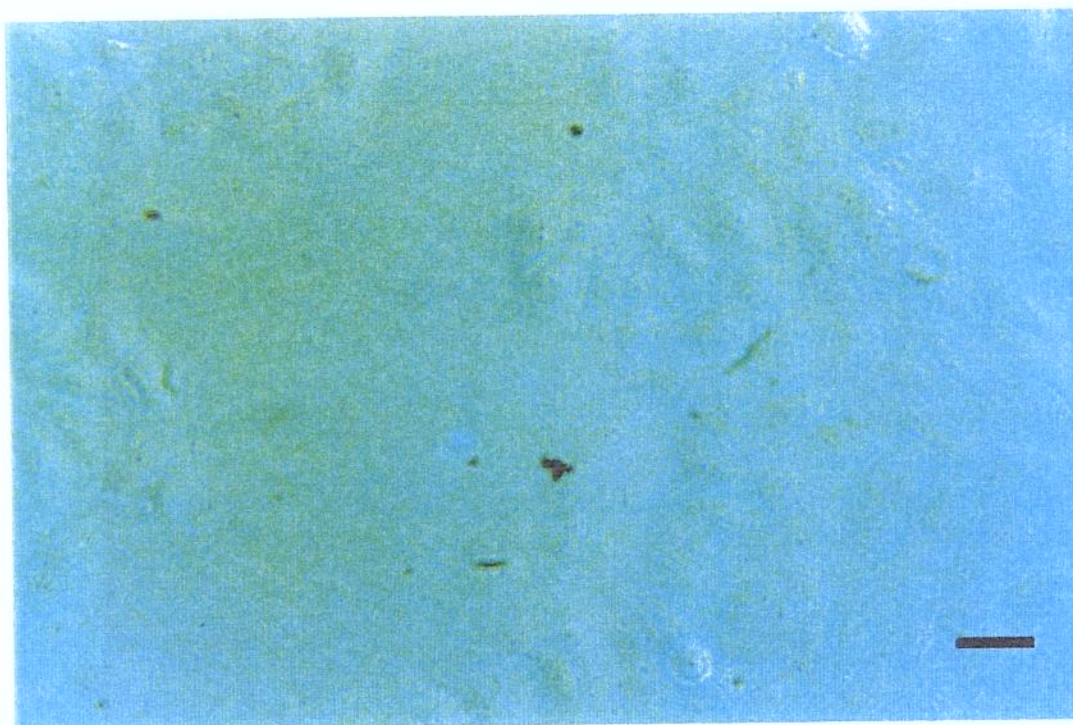


FIGURA 13: *Fotomicrografia óptica, em aumento de 200x, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral NCI-ADR. Barra de escala = 200 μ m.*



FIGURA 14: Fotomicrografia óptica, em aumento de 100x, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral UACC-62.
Barra de escala = 100 μ m.

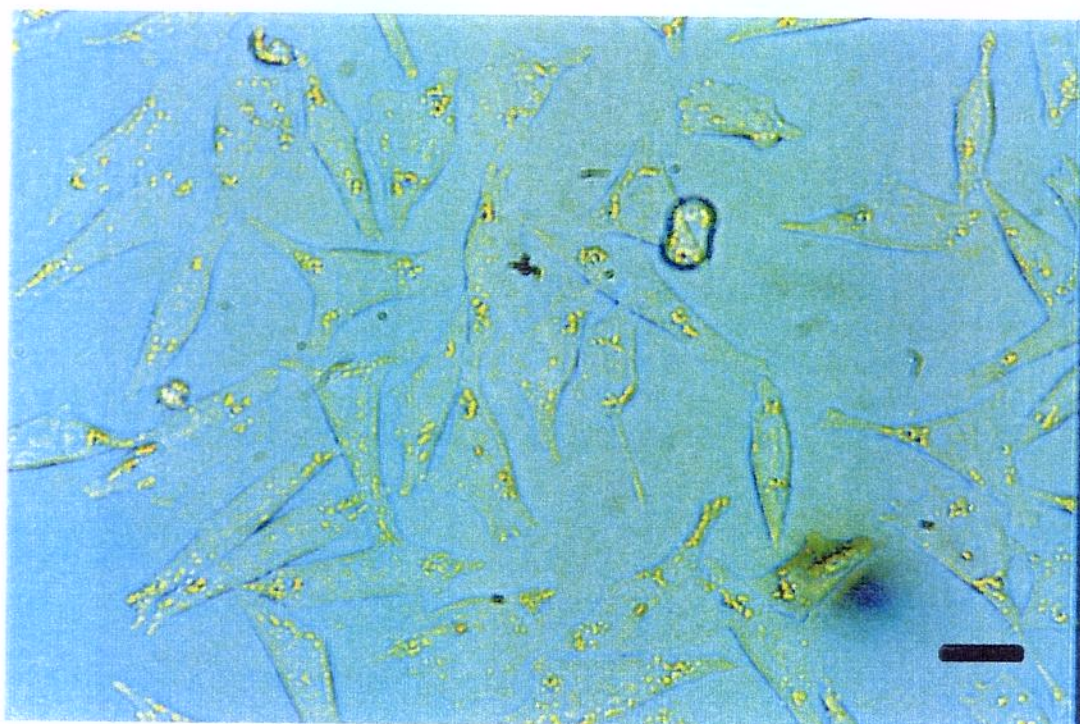


FIGURA 15: Fotomicrografia óptica, em aumento de 200x com fase, de cultura em monocamada da linhagem celular tumoral UACC-62.
Barra de escala = 200 μ m.

2. Cultura celular

As células foram mantidas em frascos de 25 cm² (Nunc®), com 5 mL de meio RPMI/SFB e repicadas quando a monocamada celular atingia cerca de 80% de confluência (uma vez por semana) em meio RPMI/SFB. Os frascos de cultura foram incubados a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

TABELA 2. Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de avaliação de atividade antiproliferativa.

Tipo celular	Nome	Tipo de cultura
Leucemia	K-562	Suspensão
Pulmão	NCI-460	Aderida
Mama	MCF 7	Aderida
Mama	NCI-ADR *	Aderida
Melanoma	UACC-62	Aderida

* linhagem celular que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

Todos os procedimentos descritos abaixo, foram realizados sob condições estéreis (Fluxo Laminar Veco®, Classe IIB2).

3. Curva de crescimento para a determinação da densidade de inoculação

Para a determinação da densidade ideal de inoculação de cada linhagem celular durante os testes de atividade antiproliferativa foram realizados experimentos para determinação das curvas de crescimento celular. Foram inoculados 100 μL de suspensões celulares em diferentes concentrações por compartimento, de acordo com a tabela 3, em placas de 96 compartimentos (Nunc®). No experimento foi utilizado RPMI/SFB, acrescido de 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Schering Plough®). Estas placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e 100% de umidade. Após este período, foram adicionados mais 100 μL /compartimento de RPMI/SFB/gentamicina, obtendo-se assim o volume final de 200 μL /compartimento. As leituras foram realizadas através do ensaio de sulforrodamina B (SRB) (Sigma®), descrito no item 4, decorridas 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação.

TABELA 3: Concentrações celulares utilizadas na realização da curva de crescimento celular

Linhagem celular	Concentrações em células/mL		
K-562	$1,0 \times 10^5$	a	$4,0 \times 10^4$
UACC-62	$1,5 \times 10^5$	a	$5,0 \times 10^4$
MCF 7	$7,5 \times 10^4$	a	$2,5 \times 10^4$
NCI-ADR	$7,5 \times 10^4$	a	$2,5 \times 10^4$
NCI-460	10×10^5	a	$5,0 \times 10^4$

4. Ensaio da sulforrodamina B (SRB)

Ao final dos testes, as placas de 96 compartimentos foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e foram fixadas com 50 μ L de uma solução a 50% ácido tricloroacético (TCA) para as células aderidas e 80% para as células em suspensão a 4 °C. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C.

As placas foram então submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários e mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Em seguida, as placas foram coradas pela adição de 50 μ L SRB a 0,4 % (peso/volume) dissolvidos em ácido acético a 1 %, e mantidas a 4 °C por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base (Sigma®) na concentração de 10 μ M e pH 10,5 por 5 minutos em ultrassom. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas (Labsystems Multiskan® MCC/340).

5. Determinação das curvas concentração-resposta das drogas padrão

Como drogas de referência foram utilizados os seguintes quimioterápicos: 5-fluorouracil (5-FU), irinotecam (CPT-11) (Rhône -Poulenc Rorer[®]) e doxorubicina (DOX) (Sigma[®]), gentilmente cedidas pelo ambulatório de quimioterapia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, nas concentrações relacionadas na tabela 4. No primeiro dia de experimento foram inoculados 100 μ L de células em RPMI/SFB/gentamicina nas concentrações pré-determinadas e incubadas por 24 horas. Após este período foram adicionados 100 μ L em diferentes concentrações (tabela 4) de cada droga segundo Figura 16, sendo então, realizada a leitura da placa controle (T_0), Figura 17, com o ensaio do SRB. As placas tratadas com as drogas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade por 48 horas, seguido da leitura final dos resultados com o ensaio de SRB.

A realização da placa controle inicial (T_0) é de fundamental importância, já que nos permite avaliar a absorbância que corresponde à quantidade de células no início do experimento e está representado no gráfico concentração-resposta como uma linha no ponto zero do eixo das ordenadas. Este valor é comparado com a absorbância do controle final (T_1) que corresponde à quantidade de células após 48 horas de incubação, na ausência da substância-teste, representando 100% de crescimento. Os experimentos são realizados em triplicadas e o desvio padrão da média entre as absorbâncias é inferior a 5%.

TABELA 4: Concentração das drogas utilizadas nas curvas de concentração-resposta às drogas de referência

Droga	Concentrações (mol/L)
DOX	10^{-8} a 10^{-4}
CPT 11	10^{-12} a 10^{-8}
5-FU	10^{-5} a 10^{-1}

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H		K	-562	UAC	C-62	MC	F 7	NCI	-ADR	NCI	-460	

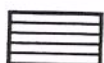
	Branco do meio de cultura (sem células)
	Suspensão celular da linhagem K-562
	Suspensão celular da linhagem UACC-62
	Suspensão celular da linhagem MCF 7
	Suspensão celular da linhagem NCI-ADR
	Suspensão celular da linhagem NCI-460

FIGURA 16: Esquema da Placa Controle (T0).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												



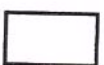
Branco do meio de cultura (sem células)



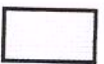
Branco da suspensão celular



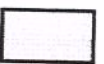
Branco da substância teste



Suspensão celular na presença da amostra 1 em 4 concentrações distintas



Suspensão celular na presença da amostra 2 em 4 concentrações distintas



Suspensão celular na presença da amostra 4 em 4 concentrações distintas



Suspensão celular na presença da amostra 3 em 4 concentrações distintas



Suspensão celular na presença da amostra 5 em 4 concentrações distintas

FIGURA 17: Esquema da Placa Teste (T1).

6. Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa das substâncias-teste

Foram inoculados 100 μ L de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos. Estas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

Decorridas 24 horas, foram adicionados 100 μ L do extrato a ser testado, de acordo com a Figura 17, sendo realizada neste momento, a leitura do T0, descrita na Figura 16. As demais placas foram incubadas por 48 horas. Após este período, foram realizadas as leituras pelo ensaio da SRB.

6.1. Diluição das amostras

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 0,1g/mL resultando em soluções estoque. As soluções estoque das amostras a serem adicionadas nas placas de 96 compartimentos dos experimentos foram então diluídas 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina, sendo assim obtida a concentração ideal de DMSO na solução final para ser adicionada nas células sem toxicidade, segundo Skehan e cols. 1990. A concentração final da amostra teste nos compartimentos da placa é 125 μ g/mL.

7. Curva concentração-resposta das substâncias teste ativas

As amostras que apresentaram inibição de crescimento maior que 50% na concentração máxima foram consideradas ativas, para se confirmar esta atividade as amostras foram retestadas em

diferentes concentrações a fim de relacionar a dose com o efeito antiproliferativo. A metodologia utilizada foi a mesma descrita anteriormente (item 6) para o ensaio de atividade antiproliferativa, porém foram adicionadas as amostras nas doses de 125; 62,5; 31,25 e 12,125 $\mu\text{g/mL}$. A diluição das amostras foi realizada em RPMI/SFB/gentamicina.

6. Análise dos resultados

Foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e através da fórmula abaixo foi determinada a inibição de crescimento (IC) de cada amostra testada.

$T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresenta IG.

Se $T \geq T_0$ mas $< C$, a droga foi citostática e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$

Se $T < T_0$ a droga é citocida e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$

Sendo que T é a média da absorbância da célula tratada C é o controle de célula e T_0 é o controle das células no dia da adição

O resultado obtido foi subtraído de 100% obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento dose dependente, maior que 50% e linhagem seletivo, isto é, atividade preferencial para um único tipo de célula tumoral ou com efeito citostático e/ou citocida bem distintos entre as linhagens celulares.

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas sendo que os resultados apresentados referem-se a um experimento representativo. O desvio padrão da média foi sempre inferior a 5%.

Resultados

Resultados

1. Processamento Fitoquímico

1.1. Rendimento dos extratos brutos e frações obtidas a partir das partes aéreas de *Aspidosperma tomentosum* Mart..

As partes aéreas da *Aspidosperma tomentosum* Mart. foram extraídas por tratamentos distintos para verificar se o processo de secagem alterava a atividade do extrato final. Parte do material coletado foi seco em estufa de ventilação forçada e moído em moinho de martelo fornecendo um pó fino que foi extraído a frio com diclorometano e em sequência com etanol 95%. O resto do material vegetal foi moído com gelo seco e extraído com etanol 95%. O extrato ativo foi

fracionado por cromatografia em coluna seca para determinarmos em que fração estava concentrada a substância responsável pela a atividade antiproliferativa. A fração que demonstrou atividade concentração-dependente foi submetida à partição ácido-básica para separarmos a fração alcaloídica, identificada pela análise de cromatografia de camada delgada. Os rendimentos obtidos destas extrações e das frações resultantes estão descritos na Tabela 5.

TABELA 5: Rendimento dos Extratos Brutos e Frações obtidas a partir das Partes Aéreas de *Aspidosperma tomentosum* Mart..

Amostra	Peso (g) do Material de Partida	Peso (g)	Rendimento (%)
EBDS	50	7,47	15,0
EBES	50	11,2	22,0
EBEF	50	8,6	17,0
FA	0,3	0,1	3,8
FMP	0,3	0,8	30,2
FP	0,3	1,75	66,0
FMT	1,76	1,72	97,7
FMA	1,76	0,04	2,3

1.2 Cromatografia de camada delgada

Os extratos brutos EBDS e EBES, obtidos do material vegetal seco e as frações FA, FMP e FP obtidas do processamento fitoquímico do extrato EBDS, foram analisados por cromatografia de camada delgada para permitir a visualização dos componentes da mistura.

Testaram-se vários sistemas de solventes para separação dos extratos e frações. O sistema de solventes que apresentou melhor resolução foi a mistura de clorofórmio : metanol 5%. As manchas foram visualizados utilizando reagentes químicos, o anisaldeído e o Dragendorff. Este último é um reagente específico para a visualização de alcalóides. Estes resultados estão demonstrados nas Figuras 18 a 22.

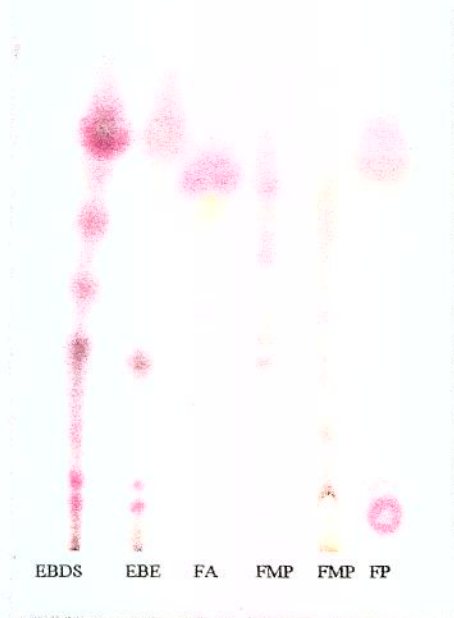


FIGURA 18: Cromatografia de camada delgada dos extratos EBDS e EBES, obtidos a partir das partes aéreas secas de *Aspidosperma tomentosum* Mart. e das frações FA, FMP e FP obtidas a partir do processamento fitoquímico do extrato EBDS, utilizando como sistema de solvente uma mistura de clorofórmio : metanol 5% e como revelador o anisaldeído.



FIGURA 19: Cromatografia de camada delgada dos extratos EBDS e EBES, obtidos a partir das partes aéreas secas de *Aspidosperma tomentosum* Mart. e das frações FA, FMP e FP obtidas a partir do processamento fitoquímico do extrato EBDS, utilizando como sistema de solvente a mistura de clorofórmio : metanol 5% e como revelador o Dragendorff.



FIGURA 20: Cromatografia de Camada Delgada da fração rica em alcalóides (indicada pela seta), utilizando como sistema solvente de uma mistura de clorofórmio : metanol 5% e como revelador o anisaldeído.

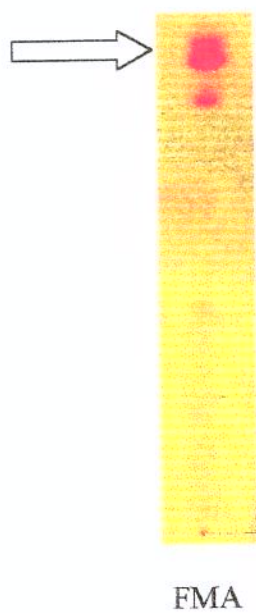


FIGURA 21: Cromatografia de Camada Delgada da fração rica em alcalóides (indicada pela seta), utilizando como sistema solvente de uma mistura de clorofórmio : metanol 5% e como revelador o Dragendorff.

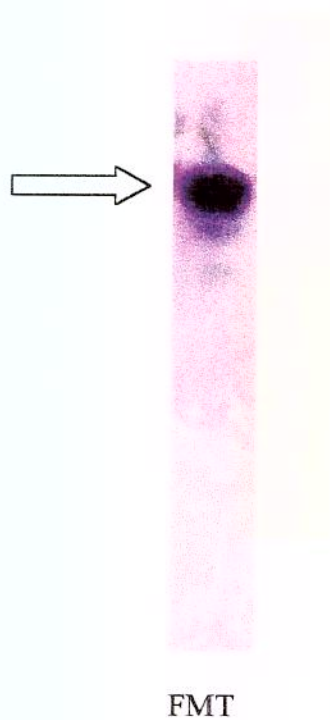


FIGURA 22: Cromatografia de Camada Delgada da fração rica em terpenos (indicada pela seta), utilizando como sistema solvente de uma mistura de clorofórmio : metanol 5% e como revelador o anisaldeído.

1.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A fração obtida a partir da fração de média polaridade que apresentou atividade antiproliferativa foi submetida à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O espectro de massas do componente principal desta fração sugeriu tratar-se de um terpeno, denominando-a fração terpênica (FMT). O cromatograma da FMT e o espectro de massas do componente principal estão ilustrados na Figuras 23.

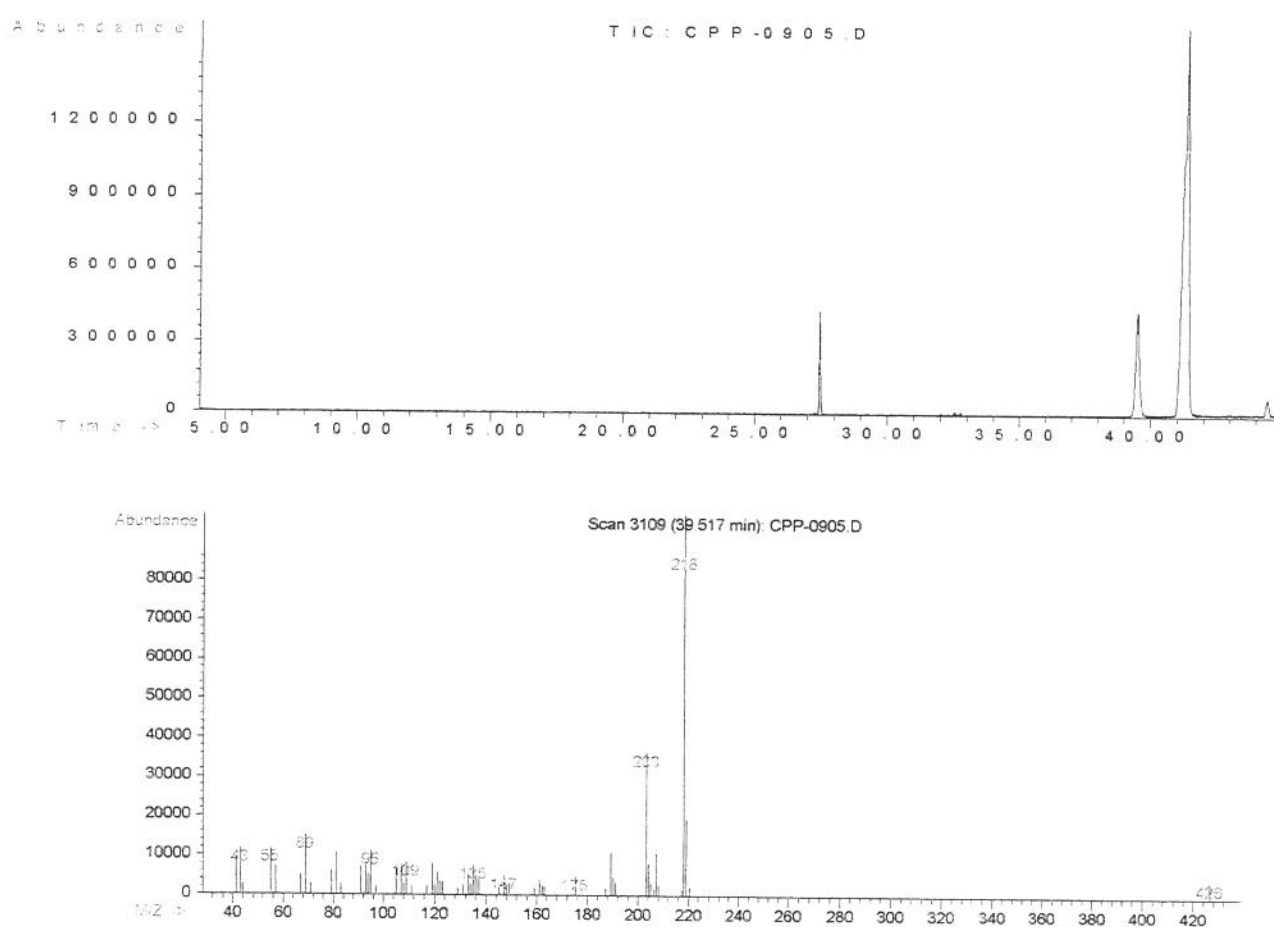


FIGURA 23: Perfil cromatográfico da fração rica em terpenos, obtida da fração de média polaridade de *Aspidosperma tomentosum* Mart., em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e o espectro de massa do composto principal.

2. Testes Farmacológicos

2.1. Curvas de crescimento para a determinação das densidades de inoculação (DI)

A determinação da DI ideal para cada linhagem celular foi determinada através da análise das curvas de crescimento. As diferentes concentrações de células utilizadas na realização deste experimento tem como finalidade determinar a concentração de célula para que a cultura na placa de 96 compartimentos esteja na fase exponencial do seu crescimento durante todo o período de incubação do teste (72 horas). Por esta razão foram realizadas as leituras com um período de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas utilizando diferentes concentrações celulares da mesma linhagem. Os resultados obtidos estão expressos nos gráficos 1, 2, 3, 4 e 5 os quais relacionam a média $\pm$ desvio padrão da absorbância de cada concentração celular com o tempo de incubação utilizado. A DI escolhida para a realização dos experimentos está descrita na tabela 6.

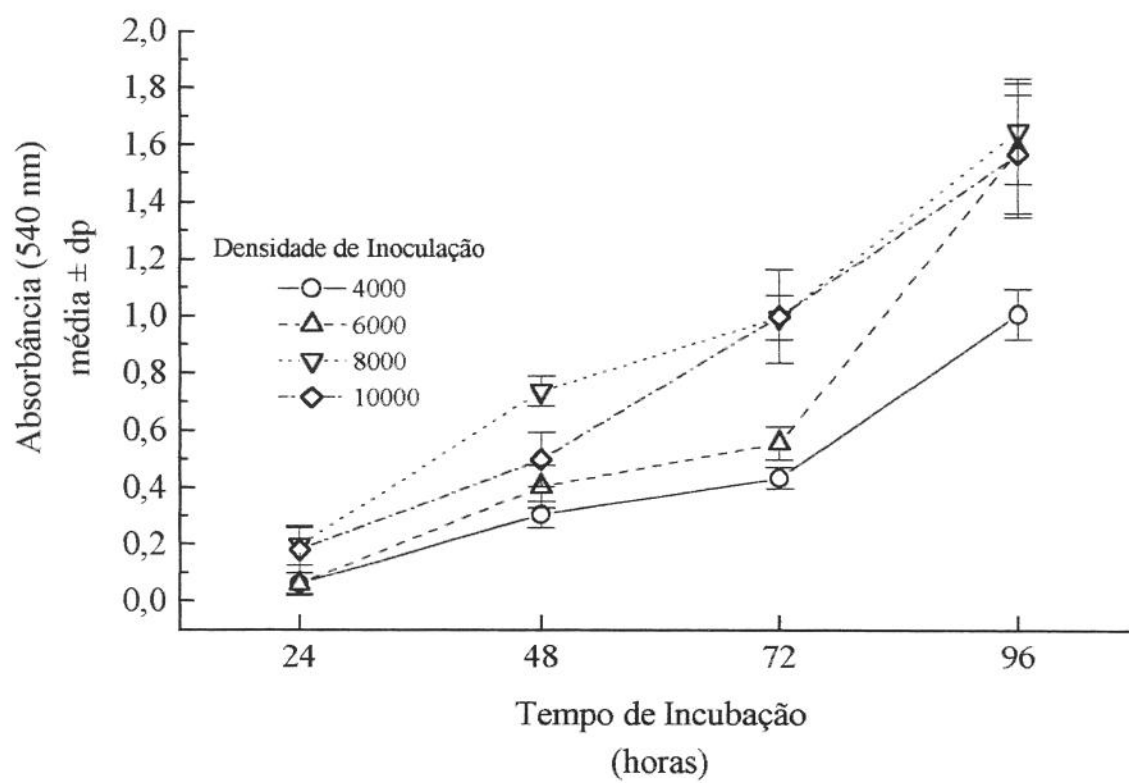


GRÁFICO 1: Curva de crescimento da linhagem celular K-562

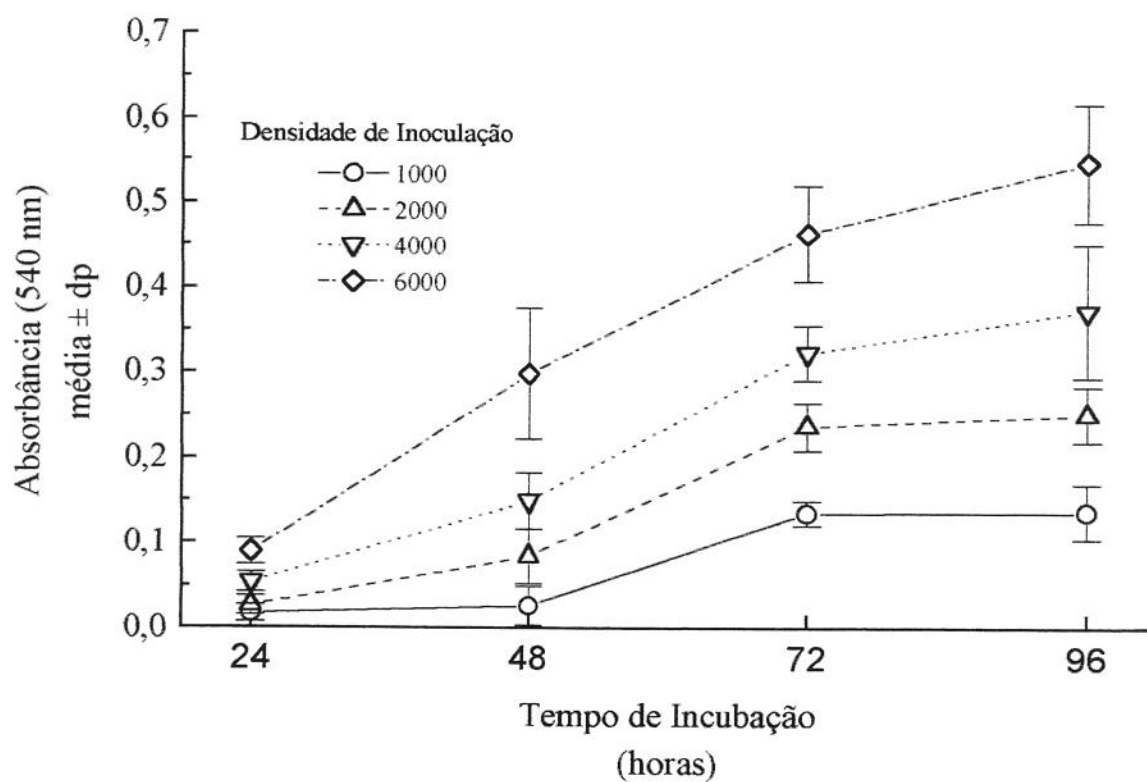


GRÁFICO 2: Curva de crescimento da linhagem celular MCF 7.

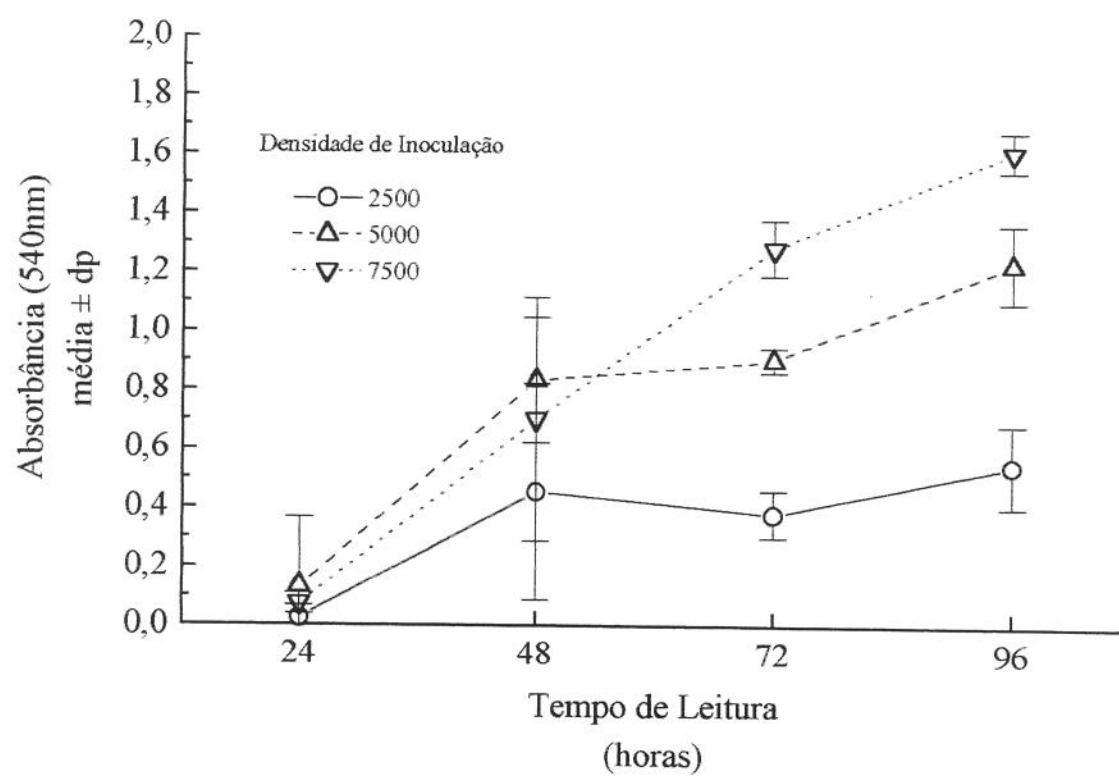


GRÁFICO 3: Curva de crescimento da linhagem celular NCI-ADR

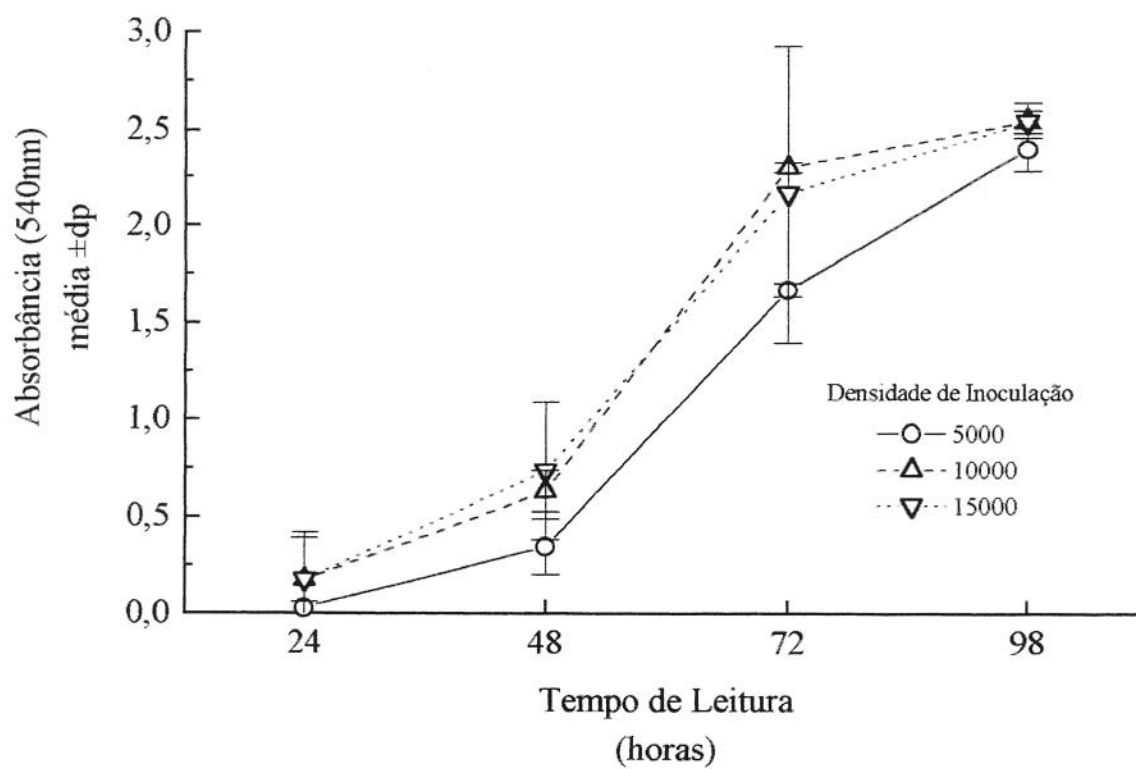


GRÁFICO 4: Curva de crescimento da linhagem celular UACC-62

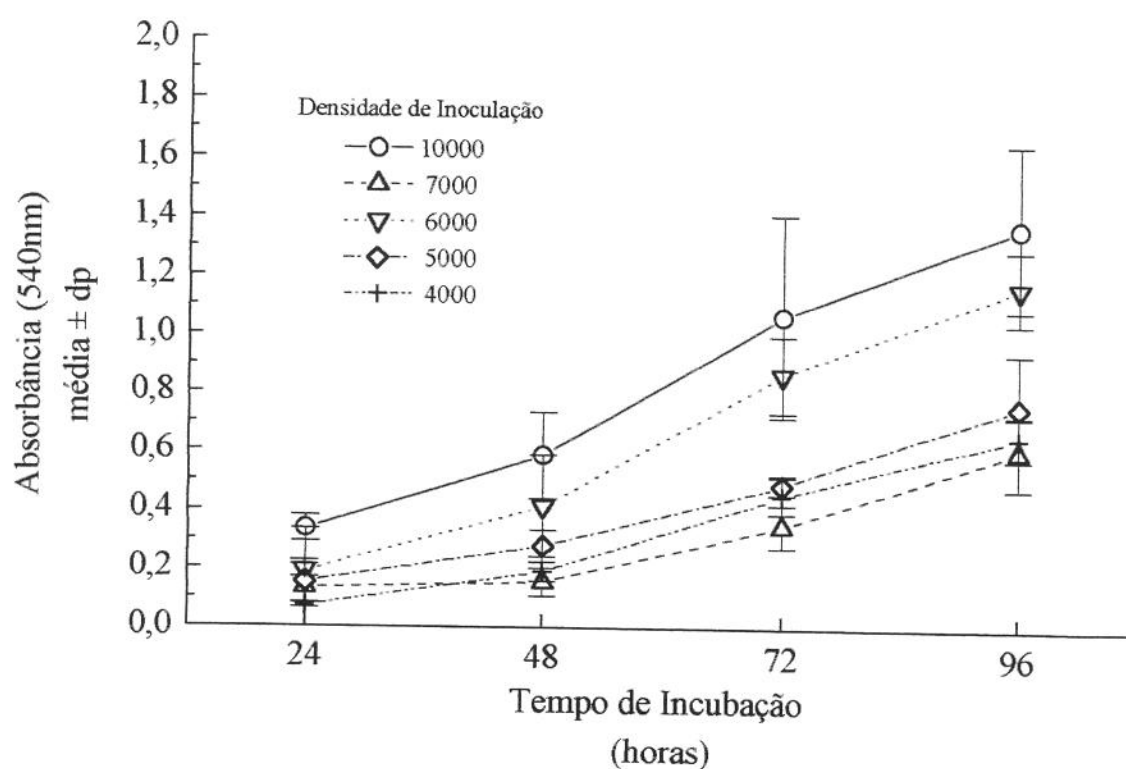


GRÁFICO 5: Curva de crescimento da linhagem celular NCI-460

TABELA 6: Densidade de inoculação das linhagens celulares tumorais humanas determinadas para os ensaios antiproliferativos

Linhagem celular	Densidade de Inoculação
K-562	$6,5 \times 10^3$
MCF 7	$6,5 \times 10^3$
NCI-ADR	$5,0 \times 10^3$
UACC-62	$3,0 \times 10^3$
NCI-460	$4,0 \times 10^3$

2.2. Curvas concentração-resposta das drogas padrão

Foram avaliados os perfis de quimiossensibilidade das linhagens celulares aos quimioterápicos: 5 fluorouracil (5 FU), irinotecan (CPT 11) e doxorubicina (DOX) com o objetivo de padronizar a resposta biológica das linhagens celulares a estas drogas. Esta determinação é utilizada como controle de qualidade das culturas. Os gráficos 6, 7 e 8 representam as curvas concentração-resposta das células em presença de diferentes concentrações de quimioterápico, as quais relacionam à porcentagem de crescimento das células e à concentração de droga utilizada. Nas tabelas 7, 8 e 9 do anexo I estão relacionados os dados brutos da média da absorbância $\pm$ desvio padrão seguido da porcentagem de inibição de crescimento.

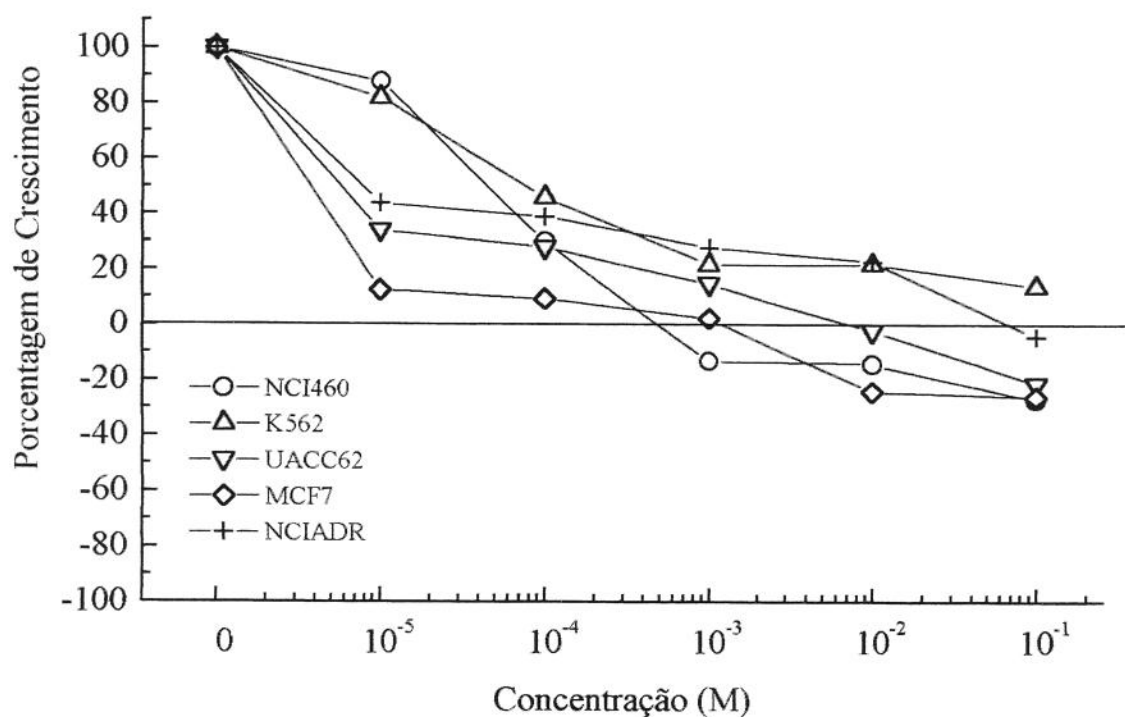


GRÁFICO 6: Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do 5 fluorouracil (5 FU) sobre linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

O 5 FU apresentou uma atividade antiproliferativa, concentração dependente, sobre as diferentes linhagens celulares utilizadas, porém sem nenhuma seletividade marcante. Com relação à linhagem celular NCI-ADR, esta droga foi capaz de apresentar efeito citocida, na maior concentração utilizada. Já a linhagem celular K-562 teve seu crescimento inibido em 85%, sem morte celular. Sobre as demais linhagens celulares, o 5 FU apresentou efeito citocida.

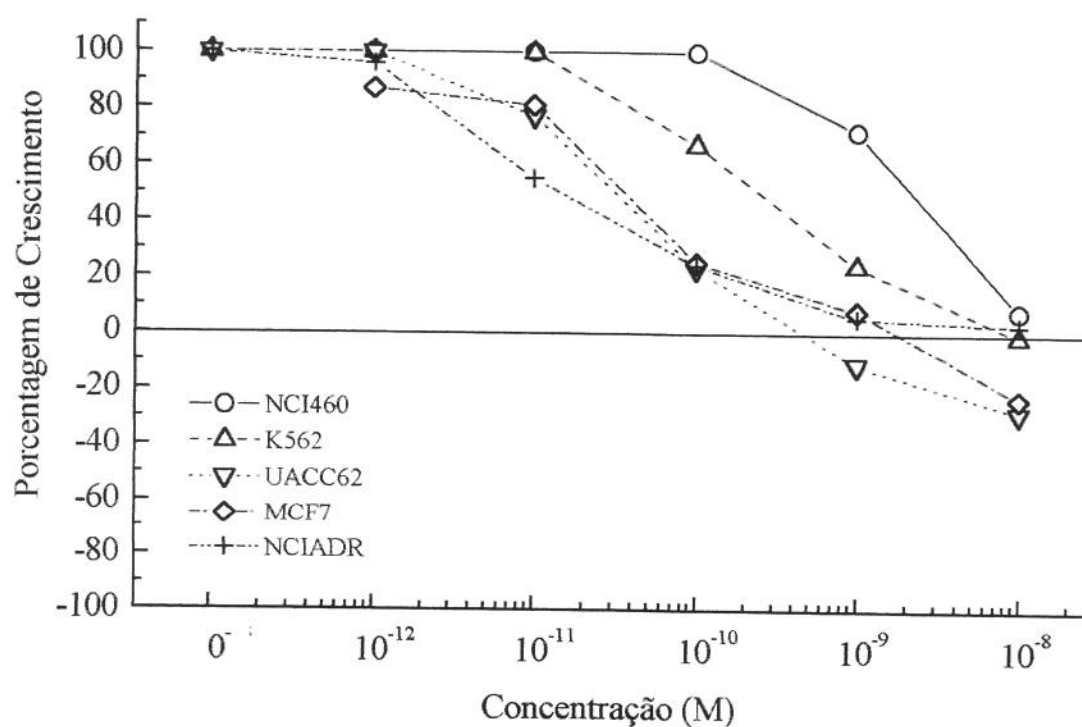


GRÁFICO 7: Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do irinotecan (CPT 11) sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

A menor concentração utilizada de CPT 11 não apresentou efeito antiproliferativo, entretanto as demais concentrações apresentaram um atividade concentração dependente, com atividade

citocida apenas na maior concentração utilizada. Já a linhagem celular NCI-460 teve seu crescimento inibido por este quimioterápico a partir da concentração de 10^{-10} M.

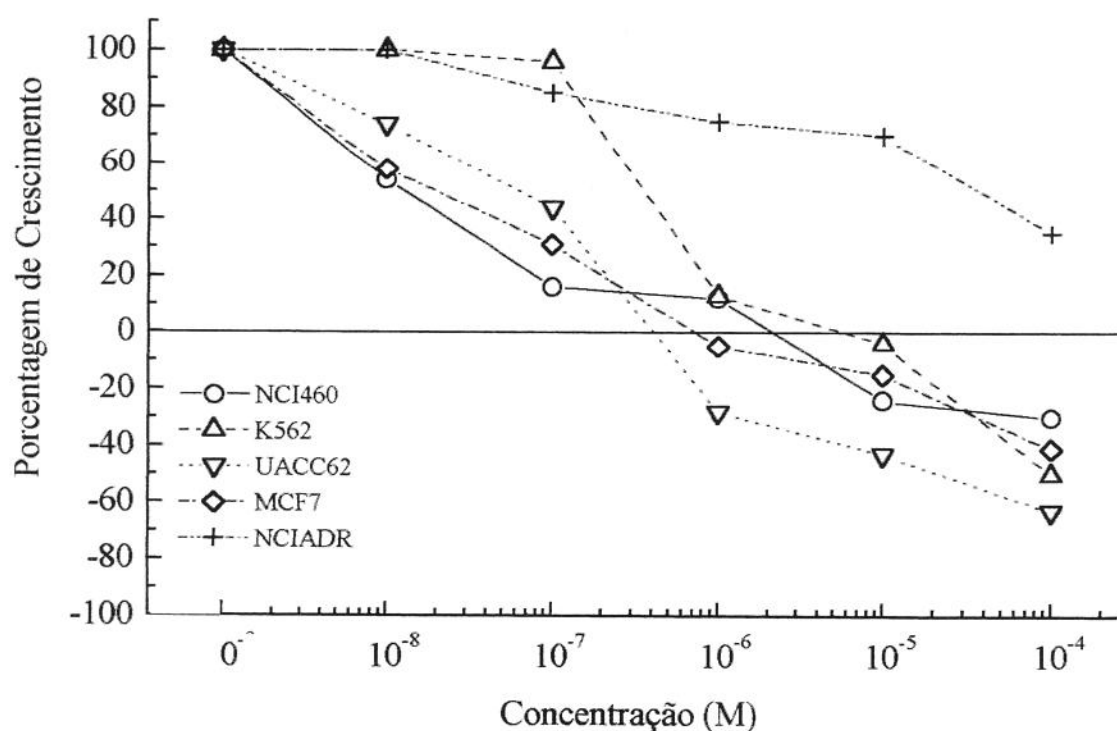


GRÁFICO 8: Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do doxorrubicina (DOX) sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

A doxorrubicina inibiu, de forma concentração dependente, as linhagens celulares, porém não apresentou seletividade. A linhagem NCI-ADR, que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas, não sofreu inibição significativa de seu crescimento, como era esperado pois está descrito que as células neoplásicas expressam o fenótipo de resistência a múltiplas drogas quando expostas a doxorrubicina (De Vita e cols. 1995).

2.3. Atividade antiproliferativa dos extratos brutos da *Aspidosperma tomentosum* Mart.

2.3.1. Atividade antiproliferativa dos extratos brutos etanólico (EBES e EBEF) e diclorometânico (EBDS) em concentração única

Os resultados estão relacionados na tabela 10 e expressos como porcentagem de crescimento celular, na presença dos extratos brutos de *Aspidosperma tomentosum* Mart. na concentração de 125 µg/ml. Na tabela 11 do anexo I estão relacionados os dados brutos da média da absorbância $\pm$ desvio padrão seguido da porcentagem de inibição de crescimento. O extrato bruto foi considerado ativo quando a inibição do crescimento foi maior que 50%. Portanto o EBDS foi o que apresentou melhor atividade quando comparado com o EBES e ambos não inibiram o crescimento da K-562. O EBEF apresentou um efeito similar ao de EBDS. Todos os extratos apresentaram efeito citocida apenas para a linhagem MCF 7.

TABELA 10: Atividade antiproliferativa dos extratos brutos da *Aspidosperma tomentosum* Mart.

Os resultados estão expressos em porcentagem de crescimento celular.

Linhagens	K-562	MCF 7	NCI-ADR	UACC-62	NCI-460
Grupos	(% crescimento)				
EBDS	70	-46	-1	6	2
Planta seca					
EBES	63	-36	68	29	51
Planta seca					
EBEF	97	-18	19	13	31
Planta fresca					

2.3.2. Curva concentração-resposta do extrato bruto diclorometânico (EBDS) obtido das partes aéreas da planta seca (PS) de *Aspidosperma tomentosum* Mart..

O gráfico 9 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto diclorometânico sobre as linhagens celulares em diferentes concentrações, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. A curva demonstrou que o EBDS possui atividade concentração dependente e é linhagem seletivo, tem efeito citostático sobre todas as linhagens e citocida contra as células MCF 7 e NCI-460. A tabela 11 do anexo I descreve os dados brutos da média da absorbância $\pm$ desvio padrão e a porcentagem de inibição de cada concentração de extrato.

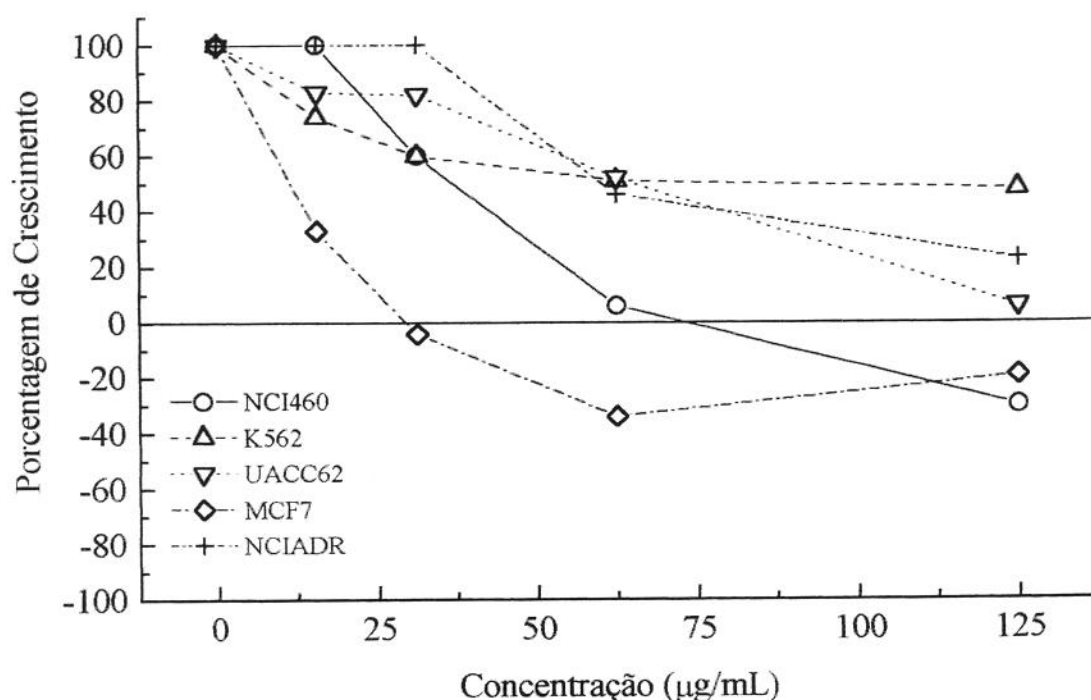


GRÁFICO 9: Atividade antiproliferativa do extrato bruto diclorometânico das partes aéreas secas de *Aspidosperma tomentosum* Mart..

2.3.3. Curva concentração-resposta do extrato bruto etanólico (EBES) obtido das partes aéreas seca de *Aspidosperma tomentosum* Mart..

O gráfico 10 representa a curva concentração-resposta das células em presença de diferentes concentrações do extrato bruto etanólico da planta seca., relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. O efeito antiproliferativo foi observado somente para a linhagem de MCF 7. A tabela 12 do anexo I descreve os dados brutos da média da absorbância $\pm$ desvio padrão e a porcentagem de inibição de cada concentração de extrato.

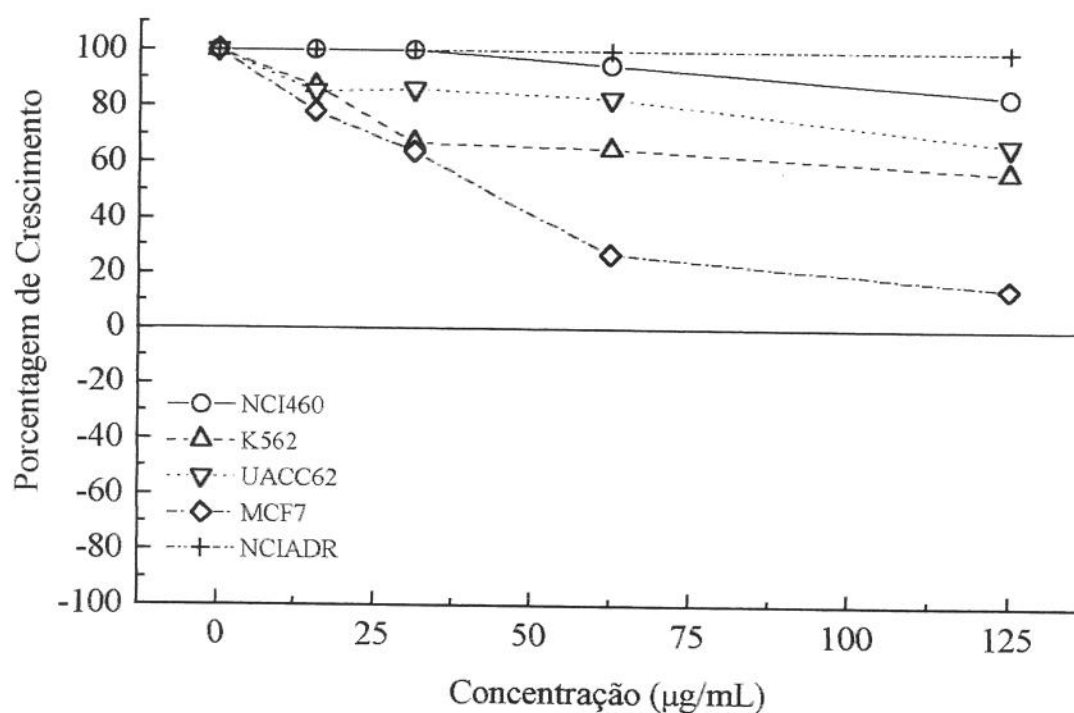


GRÁFICO 10: Atividade antiproliferativa do extrato bruto etanólico obtido das partes aéreas seca de *Aspidosperma tomentosum* Mart..

2.4. Atividade antiproliferativa das frações obtidas do fracionamento do extrato bruto diclorometânico da *Aspidosperma tomentosum* Mart.

2.4.1. Curva concentração-resposta da fração Apolar (FA)

O gráfico 11 representa a curva concentração-resposta da fração apolar do extrato bruto diclorometânico de *Aspidosperma tomentosum* Mart. sobre as células em diferentes concentrações, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de fração utilizada. A FA não inibiu o crescimento de nenhuma linhagem celular utilizada. A tabela 13 do anexo I descreve os dados brutos da média da absorbância $\pm$ desvio padrão e a porcentagem de inibição de crescimento de cada concentração utilizada.

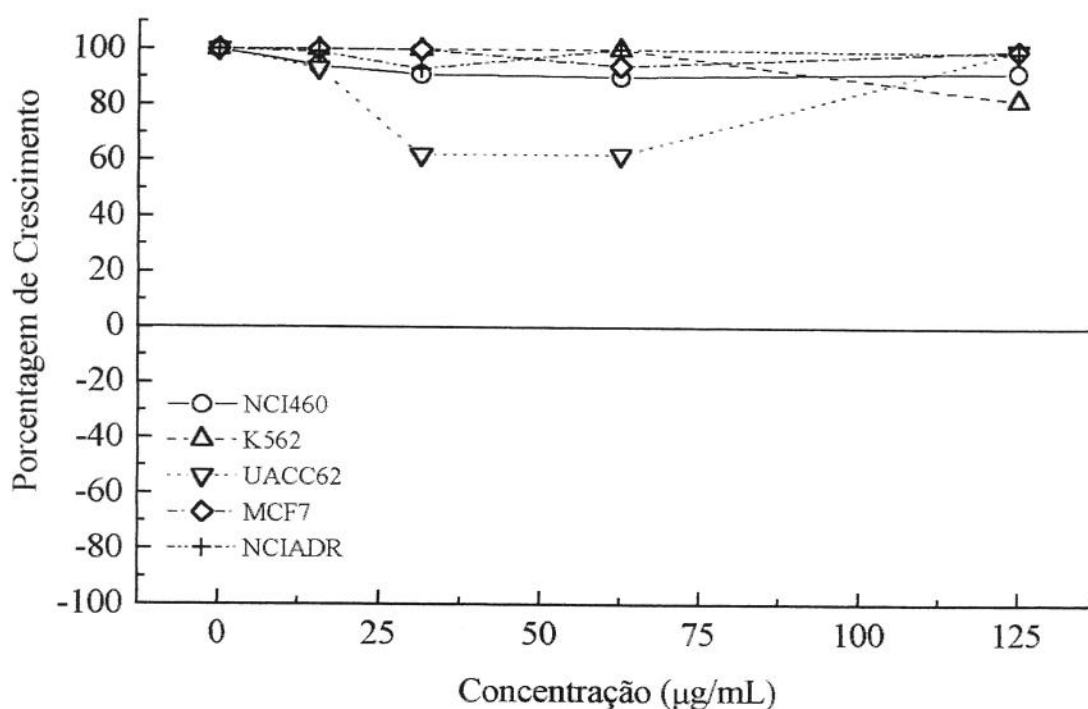


GRÁFICO 11: Atividade antiproliferativa da Fração Apolar de *Aspidosperma tomentosum* Mart..

2.4.2. Curva concentração-resposta da fração de média polaridade (FMP)

O gráfico 12 representa a curva concentração-resposta da fração de média polaridade obtida do extrato bruto diclorometânico sobre as linhagens celulares em diferentes concentrações da amostra, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de fração utilizada. A atividade antiproliferativa desta fração foi concentração dependente e linhagem seletiva, com efeito citocida para as linhagens de melanoma e pulmão. A tabela 14 do anexo I descreve os dados brutos da média da absorbância $\pm$ desvio padrão e a porcentagem de inibição de cada concentração utilizada.

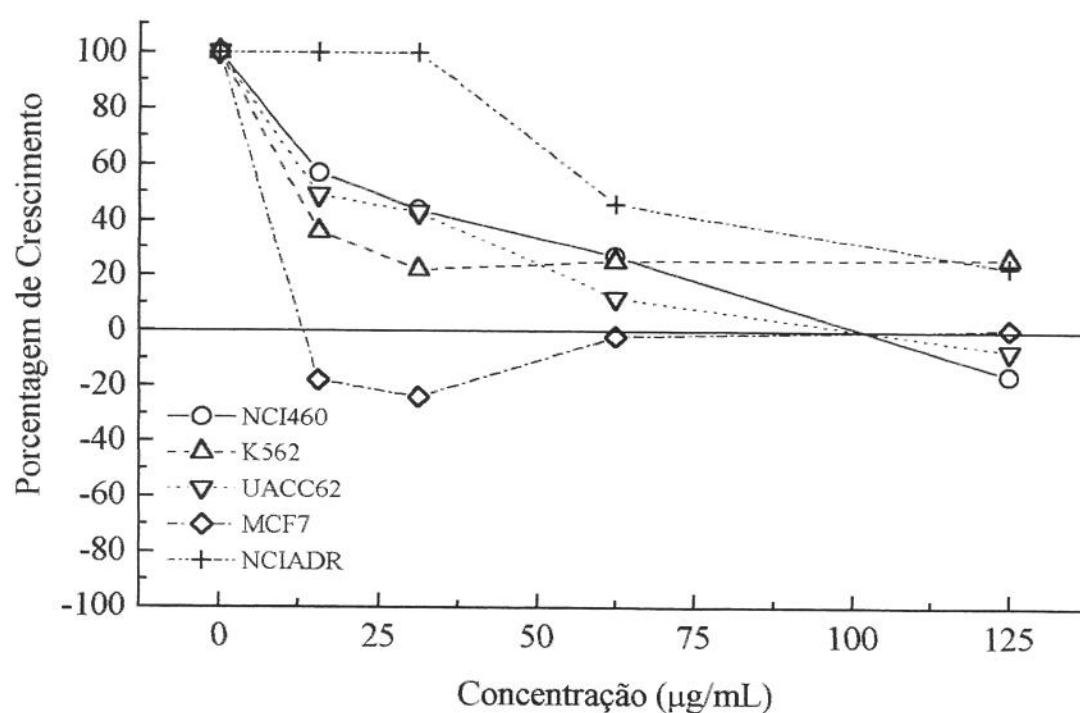


GRÁFICO 12: Atividade antiproliferativa da fração de média polaridade de *Aspidosperma tomentosum* Mart.

2.4.3. Curva concentração-resposta da fração polar (FP)

O gráfico 13 representa a curva concentração-resposta da fração polar do extrato bruto diclorometânico de *Aspidosperma tomentosum* sobre as linhagens celulares em diferentes concentrações, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de fração utilizada. A FP demonstrou atividade antiproliferativa não seletiva, concentração dependente, com efeito citostático em todas as concentrações testadas. A tabela 15 do anexo I descreve os dados brutos da média da absorbância $\pm$ desvio padrão e a porcentagem de inibição de crescimento de cada concentração utilizada.

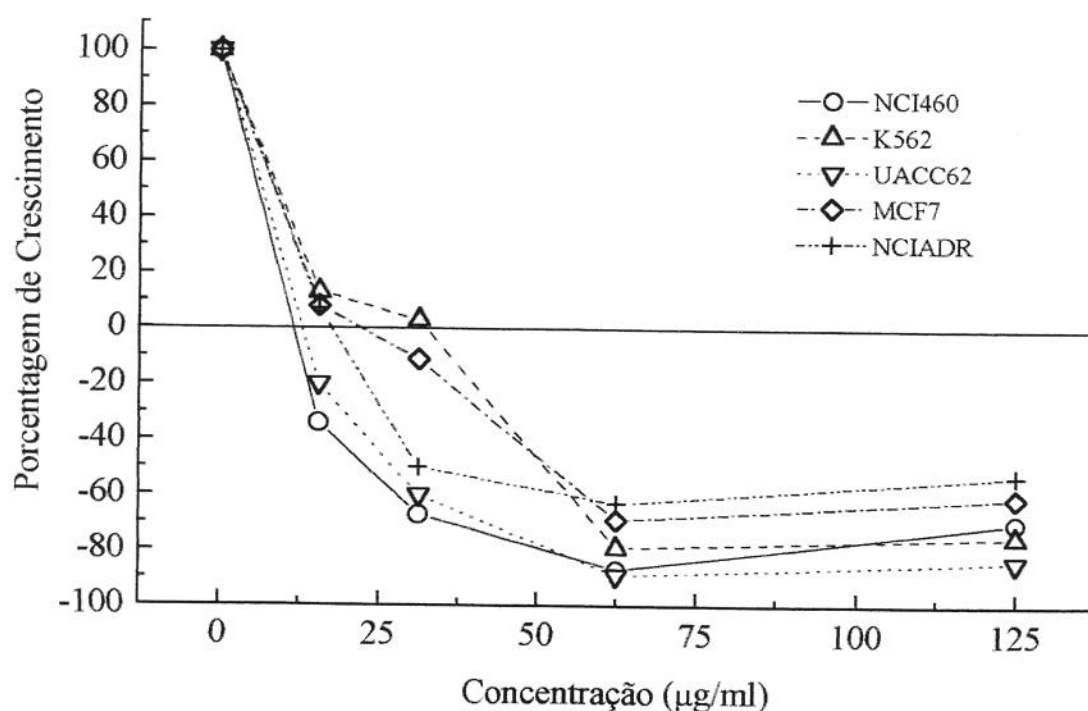


GRÁFICO 13: Atividade antiproliferativa da fração polar de *Aspidosperma tomentosum* Mart..

2.5. Atividade antiproliferativa das frações obtidas do fracionamento da fração de média polaridade da *Aspidosperma tomentosum* Mart.

2.5.1. Curva concentração-resposta da fração alcaloídica obtida do fracionamento da fração de média polaridade.

O gráfico 14 representa a curva concentração-resposta da fração alcaloídica obtida da fração de média polaridade sobre as linhagens celulares em diferentes concentrações, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de fração utilizada. A FMA apresentou efeito citostático significativo apenas na maior concentração testada e somente para as linhagem MCF 7. A tabela 16 do anexo I descreve os dados brutos da média da absorbância $\pm$ desvio padrão e a porcentagem de inibição de crescimento de cada concentração utilizada.

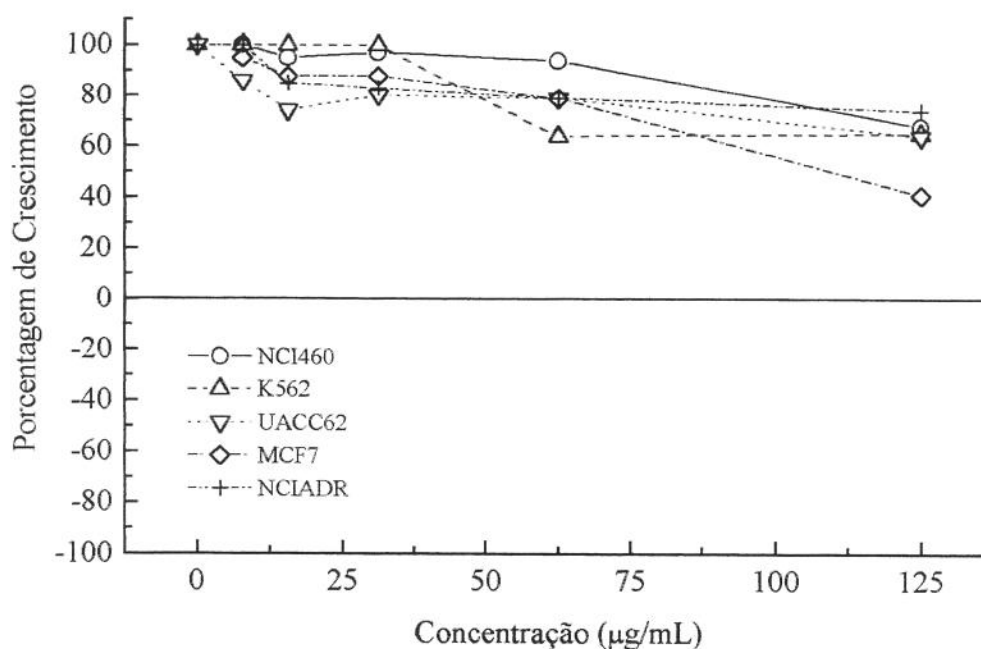


GRÁFICO 14: Atividade antiproliferativa da fração alcaloídica de *Aspidosperma tomentosum* Mart..

2.5.2. Curva concentração-resposta da fração terpênica obtida do fracionamento da fração de média polaridade.

O gráfico 15 representa a curva concentração-resposta da fração terpênica sobre as linhagens celulares em diferentes concentrações, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de fração utilizada. A atividade antiproliferativa desta fração foi concentração seletiva com efeito citostático e citocida para a linhagem de pulmão, porém sem inibição significativa do crescimento da UACC-62. A tabela 17 do anexo I descreve os dados brutos da média da absorbância $\pm$ desvio padrão e a porcentagem de inibição de crescimento de cada concentração utilizada.

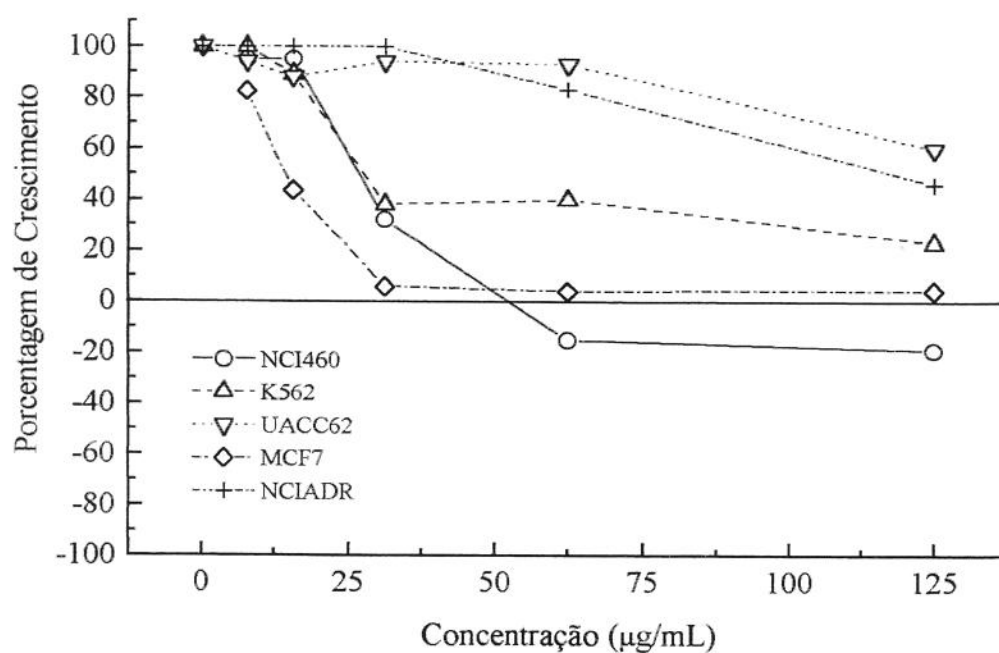


GRÁFICO 15: Atividade antiproliferativa da fração terpênica de *Aspidosperma tomentosum* Mart..

Discussão

Discussão

Nos últimos cinqüenta anos a pesquisa de novas drogas anticâncer introduziu na terapêutica cerca de 70 medicamentos, sendo que a maioria das drogas encontradas é útil em tumores de crescimento rápido, como as leucemias e linfomas. A insuficiência de drogas para o tratamento de tumores sólidos, provavelmente, é consequência dos modelos de triagem utilizados, já que historicamente foi realizada uma triagem de drogas tendenciosa para tumores hematológicos (Johnson, 1990; Cragg et al. 1994, Pessoa et al. 2000). Dessa forma, fica evidente a necessidade de modelos para a triagem de drogas orientadas para os tumores sólidos, através da utilização de metodologia que empregue células originárias de câncer humano (Cragg & Newman 1999, Boyd 1989).

A metodologia de triagem *in vitro*, preconizada pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos e utilizada neste trabalho, permite a avaliação das substâncias-teste em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade. Outra vantagem é sua rapidez, eficiência e reprodutibilidade dos resultados (Monks et al. 1991, Skehan et al. 1990).

Para o desenvolvimento deste trabalho, inicialmente foi realizada a padronização das linhagens de células tumorais humanas, através da caracterização do perfil de crescimento de cada linhagem celular, com a finalidade de determinar a densidade de inoculação a ser utilizada no experimento. Esta determinação é de fundamental importância, já que as células devem estar na fase exponencial de crescimento todo o experimento e o valor da leitura espectrofotométrica a 540 nm não pode ultrapassar a faixa de linearidade do ensaio (1,8 a 2,0 densidade óptica por unidade). Esta densidade de inoculação foi definida através de um experimento de curva de crescimento de cada linhagem celular, sendo selecionada aquela densidade que fornecesse o perfil de crescimento adequado.

As células neoplásicas possuem o genoma instável, sofrendo mutações e gerando clones mutantes. Para monitorar a formação destes clones as células foram fotografadas, a fim de documentar as características morfológicas das células e de suas colônias. Adicionalmente, foi determinado o perfil de quimiossensibilidade das linhagens celulares a três quimioterápicos utilizados na clínica (5-FU, CPT 11 e DOX). Estes ensaios foram realizados periodicamente, a fim de assegurar a confiabilidade das culturas celulares, garantindo que as

mesmas não sofreram mutações, alterando a linhagem padrão. Adicionalmente, as culturas foram descartadas após 20 repiques.

A espécie vegetal estudada neste trabalho, a *Aspidosperma tomentosum* Mart., foi selecionada após uma triagem das espécies provenientes do cerrado brasileiro, em um projeto de pesquisa financiado pela FAPESP (Processo nº 95/09607-5).

Como a *Aspidosperma tomentosum* Mart. exsuda látex leitoso, parte do material, ainda fresco, foi moído na presença de gelo seco, com posterior extração com etanol a 95%, resultando no extrato codificado como EBEF. Estes cuidados foram necessários a fim de evitar a perda de substâncias termolábeis. Uma segunda parte do material vegetal foi seco em estufa, com a finalidade de impedir a hidrólise e bloquear o crescimento de microorganismos, os quais poderiam alterar as substâncias químicas presentes. A extração deste material com diclorometano forneceu um extrato (EBDS) rico em compostos de baixa polaridade. Quando o resíduo vegetal foi retomado e esgotado com etanol 95%, foi obtido um outro extrato (EBES) rico em substâncias de alta e média polaridade. Desta forma, foi possível garantir a extração das substâncias com diferentes perfis de polaridade, categorizando-as em extratos distintos.

Os extratos brutos obtidos de *Aspidosperma tomentosum* Mart. foram submetidos ao ensaio antiproliferativo *in vitro* utilizando linhagens tumorais humanas. A análise dos resultados demonstrou que EBDS apresentou uma melhor atividade antiproliferativa nestas linhagens, com ação citocida para a linhagem MCF 7, na concentração de 125µg/mL quando

comparado ao EBES, sendo que este inibiu somente o crescimento da MCF 7 e da UACC-62. Quando comparamos a atividade antiproliferativa de EBEF e EBDS, observamos que ambos inibiram o crescimento das linhagens MCF 7, UACC-62, NCI-ADR e NCI-460. Adicionalmente, estes extratos não inibiram significativamente o crescimento da linhagem K-562. Este fato é de fundamental importância já que a quimioterapia atual está deficitária em drogas para o tratamento de tumores sólidos.

Já que os perfis de atividade antiproliferativa do EBDS e do EBEF foram semelhantes, o extrato diclorometânico obtido a partir da planta seca foi selecionado para a continuidade dos estudos, a fim de facilitar o processamento fitoquímico.

A análise da curva concentração-atividade dos extratos EBDS e EBES demonstrou que o EBES, na maior concentração utilizada, apresentou atividade antiproliferativa e apenas o EBDS demonstrou atividade concentração-dependente. Por outro lado, a análise de cromatografia em camada delgada revelou a presença de substâncias na faixa de média polaridade apenas no EBDS.

Assim, o EBDS foi purificado em coluna cromatográfica seca, sendo obtidas três frações distintas denominadas Fração Apolar (FA), Fração de média polaridade (FMP) e Fração Polar (FP). Estas frações foram submetidos aos ensaios biológicos e determinamos que a FA não apresentou atividade antiproliferativa nas concentrações utilizadas, sendo portando excluída a possibilidade da substância responsável pela atividade antiproliferativa da *Aspidosperma tomentosum* Mart. apresentar características apolares. Já FMP apresentou

atividade antiproliferativa concentração-dependente e linhagem seletiva, sendo que a atividade foi marcante para as linhagens NCI-460, UACC-62 e MCF 7, sendo portanto esta fração submetida ao fracionamento fitoquímico.

A FP não demonstrou seletividade celular, apesar de inibir todas as linhagens de forma concentração-dependente, apresentando citotoxicidade na maioria das concentrações estudadas. Apesar desta fração poder ser considerada até mais eficaz que FMP, não apresentou seletividade celular e, portanto, não recebeu prioridade no fracionamento fitoquímico.

Dados bibliográficos mostram que os alcalóides, a exemplo daqueles extraídos da Vinca, apresentam importante atividade antiproliferativa. Devido ao fato de existirem relatos da presença de alcalóides na família *Apocynacea* (Scriperma et al., 1999), foi utilizado um método de extração ácido-base, direcionado para a extração de alcalóides, para fracionar a FMP. Este fracionamento resultou em duas frações, sendo a primeira denominada Fração de Alcalóides (FMA). Esta fração foi submetida à cromatografia em camada delgada com o revelador Dragendorff (específico para alcalóides), sendo confirmada a presença majoritária dos mesmos. Já a segunda fração foi submetida a análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas que constatou a presença de terpenos, sendo portanto codificada como Fração de Terpenos (FMT).

Estas duas últimas frações foram submetidas ao ensaio *in vitro* para avaliação de sua atividade antiproliferativa. Foi observado que a FMT diminuiu, de forma concentração-

dependente, o crescimento de todas as linhagens tumorais utilizadas, com maior seletividade para MCF 7 e NCI- 460, enquanto que FMA não apresentou atividade antiproliferativa significativa nas concentrações utilizadas, sendo assim descartada a possibilidade da atividade antiproliferativa estar relacionada com os alcalóides presentes nessa espécie, sugerindo que o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(eis) pela atividade antiproliferativa devem estar concentrados em FMT.

De forma geral, analisando todos os resultados obtidos, podemos inferir que a metodologia utilizada neste trabalho é capaz de detectar diferentes perfis de atividade antiproliferativa, revelando drogas com atividade seletiva ou célula-orientada, assim como a capacidade de inibição da proliferação das células (atividade citostática) ou ainda morte celular (atividade citocida).

A continuidade deste trabalho terá como objetivo o isolamento das substâncias presentes na fração enriquecida em terpenos, assim como a identificação daquela(s) responsável(eis) pela atividade antiproliferativa.

Conclusão

Conclusão

A análise dos dados obtidos neste projeto de pesquisa revelou que:

O extrato bruto diclorometânico obtido das folhas secas e moídas da *Asidosperma tomentosum* Mart. apresenta atividade antiproliferativa seletiva e concentração dependente sobre as linhagens tumorais utilizadas nesta triagem.

Estes dados sugerem que o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(eis) pela atividade antiproliferativa estão concentrados na fração enriquecida em terpenos.

Summary

Currently, over a hundred types of cancer are known, differentiated by etiology, natural history and form of treatment. Notwithstanding the great evolution of knowledge concerning this type of pathology, such progress has not been reflected in a proportional way in the development of efficient techniques of prevention and cure. The existence of neoplastic cells which present resistance mechanisms against chemotherapeutic agents and the low selectivity of these pharmaceuticals, resulting in different levels of toxicity to normal tissues, are limiting factors to the success of the antineoplastic treatment. Therefore, there is a great need for new and better

Summary

therapeutic resources, including new chemotherapeutic agents. This study evaluated the *in vitro* antiproliferative activity of crude extracts and fractions of *Aspidosperma tomentosum* Mart, a tree from the so-called *cerrado* woods, popularly known as “*peroba do campo*”. Antiproliferative activity was determined by the sulforhodamine B assay using five human cancer cell lines: K-562 (leukemia), MCF 7 (breast), NCI-ADR (breast expressing the multidrug resistance phenotype), NCI-460 (lung) and UACC-62 (melanoma). Cells were cultured in the presence of the test substance for 48 h. The exposure to dichloromethane and ethanol extracts from the *Aspidosperma tomentosum* Mart. resulted in concentration-dependent growth inhibition on MCF 7, UACC-62, NCI-ADR and NCI-460. Comparing to the ethanol extract, the dichloromethane extract presented a higher activity on these cell lines, including a cytotoxic effect against MCF 7 at a concentration of 125 µg/mL. The crude extracts did not significantly inhibit the growth of the K562 at maximum concentration tested. The crude dichloromethane extract was fractionated by column chromatography on silicagel, providing fractions denominated: unpolar (FA), terpenic medium polar (FMP), alkaloid medium polar (FMA) and polar fraction (FP). FMT exposure produced concentration-dependent growth inhibition of the cell lines. This effect was particularly evident against MCF 7 and NCI 460 cells, FP did not demonstrate cell line selectivity, having inhibited all the cell types in a concentration-dependent pattern. The FA and FMA fractions did not present significant growth inhibition activity within the tested concentrations. These results suggest the active principle(s) which is (are) responsible for the antiproliferative activity is (are) concentrated in the FMT and FP.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Archer, M.C.; *Chemical Carcinogenesis*. In: TANNOCK IF, HILL RP. *The Basic Science of Oncology*. New York, McGraw-Hill Companies, 1992. Cap. 7, p. 102 - 118.
- Augustin, H.G. Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci*, v. 19, n. 6, p. 216-22, 1998.
- Baker, J.F.; A Review of the importance of the p 53 gene in cancer research. [Online] disponível: <http://members.aye.net/~jfbaker/p53.html> Outubro 14, 1999.
- Beck, M.; Curtain, M.C.; Danks, M.K.; et al. Pharmacological, molecular and cytogenetic analysis of atypical multidrug resistant human leukemic cells. *Cancer Research*, v. 47, p.5455, 1987
- Bonadonna, G. Does chemotherapy fulfill its expectations in cancer treatment. *Ann. Oncol.*, v.1, p. 11-21, 1990.

- Bouck, N. Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells*, v. 2, n. 6, p. 179-185, 1990.
- Boyd, M.R. Status of the NCI Preclinical Antitumor Drug Discovery Screen. *Principles & Practice of Oncology*, v. 10, n. 3, p. 1-12, 1989.
- Boyd, N.F. *Epidemiology of Cancer*. In: TANNOCK IF& HILL RP. *The Basic Science of Oncology*. New York, McGraw-Hill Companies, 1992. Cap. 2, p. 7 - 22.
- Boyle, P. Global burden of cancer. *Lancet* , v.349 (suppl II), p. 23-26; 1987
- Boyle, T.; Costello, G. Cancer therapy: a move to the molecular level. *Chemical Society Reviews*, v27, p.251-261, 1998.
- Brasil, Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 2000. Disponível na Internet: <http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2000/introdução.html>, 20 de julho de 2000.
- Brentani, R.R. *Carcinogênese Química*. In: BRENTANI, MM; COELHO, FRG; IYEYASU, H.; KOWALSHI, L.P.. *Bases da Oncologia*. São Paulo, Livraria e Editora Marina, 1998. Cap. 12, p. 157 - 172.
- Brentani, R.R.; Chammas, R.; Coelho, F.R.G. *Mecanismos de Invasão e Metástases*. In: BRENTANI, MM; COELHO, FRG; IYEYASU, H.; KOWALSHI, L.P.. *Bases da Oncologia*. São Paulo, Livraria e Editora Marina, 1998. Cap. 7, p. 91 - 98.
- Buick, R.N.; Tannock, I.F.; *Properties of Malignant Cells*. In: TANNOCK IF, HILL RP. *The Basic Science of Oncology*. New York, McGraw-Hill Companies, 1992. Cap. 10, p. 139 – 153.
- Cairns, J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, v. 255, p. 197-201, 1975.
- Cairns, J. The origin of human cancers. *Nature*, v. 289, p 353-7, 1981.

- Calabresi, P. Chabner, B.A. *Chemotherapy of neoplastic diseases*. In: Gilman, A.G.; Goodman, L.S., ed. – *The Pharmacological Bases of Therapeutics*. 9ª ed.. New York McGraw-Hill Companies, p. 1225-1232, 1996.
- Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*, v. 33, n. 2, p. 179 - 89, 2000.
- Carbone, D.P. e Minna, J.D. Antioncogenes and human cancer. *Annu Rev Med*, v. 44, p. 451-64, 1993.
- Carson, D.A. e Ribeiro, J.M. Apoptosis and disease. *Lancet*, v. 341, n. 8855, p.1251-4, 1993.
- Chabner, B.A. In defense of cell-line screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, n. 13, p.1083-1085, 1990.
- Champbell, G.A Invasion and Metastasis. [Online] Disponível na internet
http://aeb.cvm.okstate.edu/vmed5264/invasion_and_metastasis.htm Outubro 18, 1999
- Champbell, G.A Molecular basis of neoplasia. [Online] Disponível na internet
http://aeb.cvm.okstate.edu/vmed5264/molecular_basis_of_neoplasia.htm Outubro 18, 1999
- Champbell, G.A. Carcinogens. [Online] Disponível na internet:
<http://aeb.cvm.okstate.edu/vmed5264/carcinogens.htm> Outubro 18, 1999
- Clark, A.M. Natural Products as a resourse for news drugs. *Pharm Res*, v.13, n.8, p.1133-44, 1996.
- Coelho, F.R.G. *Controle do Câncer*. In: Brentani, Mm; Coelho, Frg; Iyeyasu, H.; Kowalshi, L.P.. *Bases da Oncologia*. São Paulo, Livraria e Editora Marina, 1998. Cap. 1, p. 1 - 25.
- Corbett, T.H.; Valeriote, F.A.; Baker, L.H. Is the P388 murine tumor no longer adequate as a drug discovery model? *Investigational New Drugs*, v.5, p. 3-20, 1987.

- Cragg GM, Boyd MR, Cardellina II JH, et al.. *Ethnobotany and drug discovery: the experience of the U.S. National Cancer Institute*. In: *Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Ciba Foundation Symposium 185, edited by D.J. Chadwick, J. Marsh, Chichester, U.K., Wiley & Sons, 1994, p. 178-196.
- Cragg, G.M. e Newman, D.J. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. *Cancer Investigation*, v.17, n. 2, p. 153-163, 1999.
- DeVita, V.T.; et al. In: *Biologic therapy of cancer*. 2nd ed. Eds. V.T. DeVita, S. Hellman and S.A. Rosenberg. J.B. Lippincott, 1995, p. 84-89.
- Di Pietro, A.; Dayan, G.; Conseil, G.; et al. P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. *Braz J Med Biol Res*, v. 32, n. 8, p. 925-39, 1999.
- Ellis, L.M. e Filder, I.J. Angiogenesis and Metastasis.. *European Journal of Cancer* v. 32, n. 14, p. 2451-2460, 1996.
- Epstein, R.J. Topoisomerases in human disease. *Lancet*, v.1 p. 826, 1988.
- Fearon, R.R. et al. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science*, v.238, p.193, 1987.
- Fellows, L.E. *Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: future prospects* IN: Coombs JD, ed. *New drugs from natural sources*. London: IBC Technical Services, 1995.
- Ferri, M.G. *Plantas do Brasil. Espécies do cerrado*. Editora Edgard Blücher. São Paulo, 1969, p.12-13 and p 50-1.
- Folkman, J. Clinical Applications of research on angiogenesis. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital Boston*, v. 333, n. 26, p. 1757-1763, 1995.
- Folkman, J. Tumor Angiogenesis. *Advances. Cancer Research*, v. 43, p.175-203; 1985

- Folkman, J.; Cotran, R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Advances in Cancer research* v. 19, p. 207-248; 1976.
- Folkman, J.; Shing, Y.; Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, v.:246, n. 5, p.10931-10934; 1992.
- Foulds, L. *Neoplastic Development*. New York, Academic Press, 1975.
- Furcht, L.T. Critical factors controlling angiogenesis: Cell products, cell matrix, and growth factors. *Laboratory Investigation*, v. 55, n. 5, p.505-509, 1986.
- Gerson, S.L. e Wilson, K.V. O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. A target for the modulation of drug resistance. *Drug Resistance Clin. Oncol. Hematol.*, v. 9, n. 2, p. 431-449, 1995.
- Goldin, A.; Venditti, J.M.; McDonald, J.S.; et al. Current results of the screening program at the Division of Cancer Treatment National Cancer Institute. *European Journal Cancer*, v. 17, p. 129-142, 1981.
- Goldstein, L.J. e Ozols, R.F. *Drug resistance: mechanisms and clinical application*. In: *Handbook of chemotherapy in clinical oncology*. Eds. J.P. Armand, E. Cvikovic, J.P. Droz, S. Khoury. Jersey, Channel Islands, SCI, 1993.
- Gottesman, M.M. How cancer cells evade chemotherapy: Sisteeth Ricard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res.*, v. 53, p. 747-754, 1993.
- Graag, G.M. e Newman, D.J. Discovery and Developmente of natural Antineoplastic Agents from Natural Sources. *Cancer Investigation*, v.17, n.2, p.153-163, 1999.
- Grindey, G.B. Current status of cancer drug development: failure or limited sucess? *Cancer Cell.*, v. 2, n. 6, p. 163-171, 1990.

- Guimarães Ferri, M. Contribuição ao conhecimento da ecologia do cerrado e da Caatinga .
Estudo comparativo do balanço de águas e de sua vegetação. Boletim da Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras v.12, p. 1-170, 1975
- Guimarães Ferri, M. Vegetação Brasileira. Editora Itatiaia, Belo Horizonte, Reconquista do
Brasil New Series v. 26, p. 51-69, 1980
- Hackford, A.W. Biochemical markers for colorectal cancer. Diagnostic and therapeutic
implications. Surg Clin North Am, v. 73, n. 1, p. 85-102, 1993.
- Hamada, G.; *Epidemiologia*. In: BRENTANI, MM; COELHO, FRG; IYEYASU, H.; KOWALSHI,
L.P.. *Bases da Oncologia*. São Paulo, Livraria e Editora Marina, 1998. Cap. 3, p. 33 - 54.
- Hamburger, A.W. Use of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy. *Journal of the
National Cancer Institute*, v. 66, n. 6, 1981.
- Hamburguer, M.; Hostettmann, K.; Bioactivity in Plants: The link between phitochemistry and
medicine. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, p. 3864 – 3874, 1991.
- Harris, H. Genes and isozymes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, v. 174, n. :34, p. 1-31, 1969.
- Hill, R.P.; *Metastasis*. In: TANNOCK IF, HILL RP. *The Basic Science of Oncology*. New York,
McGraw-Hill Companies, 1992. Cap. 11, p. 178 - 195.
- Johnson, R.K. Screening methods in antineoplastic drug discovery. *Journal of the National
Cancer Institute*, v. 82, n.13, p. 1082-1083, 1990.
- Kane, S.E.; Pastan, I. e Gottesman, M.M. Genetic basis of multidrug resistance of tumor cells.
Bioenergetics and Biomembranes, v. 22, p. 593-596, 1990.
- Kessler, J. Neoplasia I- Introduction to Neoplasia. [Online] Disponível
<http://moose.uvm.edu/~jkessler/PATH301/301neopl.htm> Outubro 18, 1999-11-01.

- Kessler, J. Neoplasia II- Molecular pathology of Cancer. [Online] Disponível <http://moose.uvm.edu/~jkessler/PATH301/301neop2.htm> Outubro 18, 1999-11-01.
- Kohn, E.C. Invasion and Metástases: Biology and Clinical Potential . *Pharmac. Ther.* v. 52, p. 234-244, 1991
- Leighton, J.C. e Golstein, L.J. P-glycoprotein in adult solid tumors. Expression and prognostic significance. *Drug Resistance Clin. Oncol. Hemaotol.*, v. 9, n. 2, p. 251-273, 1995.
- Liotta, L.A.; Steeg, P.S. e Stetler-Stevenson, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: na imbalance of positive and negative regulation, *Cell*, v. 64, p. 327-336, 1991.
- Lopes, A. *Cirurgia Oncológica*. In: Brentani, Mm; Coelho, Frig; Iyeyasu, H.; Kowalshi, L.P.. *Bases da Oncologia*. São Paulo, Livraria e Editora Marina, 1998. Cap. 21, p. 427 - 440.
- Lum, B.L. e Gosland, M.P. MDR expression in normal tissues. Pharmacologi implications for the clinical use of P-glycoprotein inhibitors. *Drug Resistance Clin. Oncol. Hemaotol.*, v. 9, n. 2, p. 319-335, 1995.
- Mans, D.R.; Rocha, A.B.; Schwartzmann, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*, v. 5, n. 3, p. 185-98, 2000.
- Marie, J.P. P-glycoprotein in adult hematology malignancies. *Drug Resistance Clin. Oncol. Hemaotol.*, v. 9, n. 2, p. 239-249, 1995.
- McCafrey, T.A.; Agarwal, L.A.; Weksler ,B.B. A rapid fluorometric DNA assay for the measurement of cell density and proliferation in vitro . *In Vitro*, v. 24, p.247-252, 1998.
- McKinnell, R.; Cancer Genetics. In McKINNELL, RG, PARCHMENT, RE, PERANTONI, AO, PIERCE, GB, *The biological Basis of Cancer*. Cambridge, Cambridge University Press, 1998, Cap 4, p. 115-133.

- McKinnell, R.; Metastasis. In McKINNEL, RG, PARCHMENT, RE, PERANTONI, AO, PIERCE, GB, *The biological Basis of Cancer*. Cambridge, Cambridge University Press, 1998, Cap 2, p. 50-79.
- Mellors, R.C. Neoplasia. [Online] Disponível na internet
http://edcenter.med.cornell.edu/CUMC_PathNotes/Neoplasia/Neoplasia_03.html, Outubro 15, 1999
- Minden, M.D.; Pawson, A.J.; *Oncogenes*. In: TANNOCK IF, HILL RP. *The Basic Science of Oncology*. New York, McGraw-Hill Companies, 1992. Cap. 5, p. 61 - 87.
- Ministério da Saúde. DATASUS. Sistema de informações sobre mortalidade, 1999a. Disponível na Internet: <http://www.datasus.gov.br> , 20 de julho de 2000.
- Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P. et al. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 83, p. 757-766, 1991.
- Morrow, C.S. e Cowan, K.H. Glutathione S-transferase and drug resistance. *Cancer Cells*, v. 2, p. 15-22, 1990.
- Muggia, F.M. Closing the loop: provinding feedback on drug development. *Cancer Treatment Reports*, v. 71, n.1, p. 1-2, 1987.
- Norton, L. Implications of kinetic heterogeneity in clinical oncology. *Seminars in Oncology*, v. 12, n. 3, p. 231-249, 1985.
- Novaes, P.E.R. *Radioterapia*. In: Brentani, Mm; Coelho, Frg; Iyeyasu, H.; Kowalshi, L.P.. *Bases da Oncologia*. São Paulo, Livraria e Editora Marina, 1998. Cap. 22, p. 441 - 456.
- O'Dwyer, P.J. et al. Modulation of glutathione and related enzymes in reversal of reistance to anticancer drugs. *Drug Resistance Clin. Oncol. Hemaotol.*, v. 9, n. 2, p. 383-395, 1995.

- Pearson PL; Van der Luit RB The genetic analysis of cancer. *J Intern Med*, v. 243, n.6, p. 413-7, 1998.
- Perantoni, A.O.; Carcinogenesis. In McKINNEL, RG, PARCHMENT, RE, PERANTONI, AO, PIERCE, GB, *The biological Basis of Cancer*. Cambridge, Cambridge University Press, 1998, Cap 3, p. 79-115.
- Pessoa, C.; Silveira, E.R.; Lemos, T.G.L.; et al. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. *Phytotherapy Research*, v. 14, p. 187-191, 2000.
- Pezzuto, J.M. Plant Derived Anticancer Agents. *Biochemical Pharmacology*, v. 53, p. 121-33, 1997.
- Phillipson, J.D. New Drugs From Nature- It Could be Yew. *Phytoteraphy Research*, v. 13, p.2-8, 1999.
- Pierce, G.B.; The pathology of cancer. In McKINNEL, RG, PARCHMENT, RE, PERANTONI, AO, PIERCE, GB, *The biological Basis of Cancer*. Cambridge, Cambridge University Press, 1998, Cap 1, p. 14 - 50.
- Pinedo, H.M.; Giaccone, G. Chemotherapy. *Lancet*, v. 349, p. 7-9, 1997.
- Pio Corrêa, M. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, v. 5, p. 411. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1942.
- Pizão, P.E. e Pinedo, H.M. *Farmacología de la resistencia a las drogas antineoplásicas*. In: *Avancer en Oncología*. Eds. U. Veronesi, R. Chacon, G. Farante, p. 37-48, Color Efe, Buenos Aires, 1990.
- Ponder, B.A.J. et al. Direct examination of the clonality of carcionogen-induced epithelial dysplasia in chimeric mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 77, 967, 1986.

- Rang, H.P.; Dale, M.M. & Ritter, J.M. Cancer Chemotherapy. In: Pharmacology. 3rd ed. Churchill Livingstone. New York, USA, pp. 696-717, 1995.
- Rowinsky EK, Gilbert M, McGuere WP, Noe DA, Grochow LB, Forastiere AA, Ettinger DS, Lubejko BG, Clark B, Sartorius SE, Cornblath DR, Hendricks CB, Donehower RC. Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. *J. Clin. Oncol.* 9: 1692-1703, 1995.
- Schimke, R.T. Gene amplification in cultured cells. *Cell*, 37: 705-708, 1984.
- Scripsema, J. Dagnino, D., Gosmann, G. Alcalóides Indólicos In: Simões, C.M.O. , Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.^a, Petrovick, P.R., Farmacognosia da Planta ao Medicamento. Editora da UFSC, 1999 Cap.31, pg. 679-706.
- Shoemaker , R.H. New approaches to antitumor drug screening: the human tumor colony forming assay. *Cancer Treatment Reports*, 71(1): 9-12, 1986.
- Sikora K Developing a global strategy for cancer. *Eur J Cancer*, 1999 Dec, 35:14, 1870-7
- Simpson, A.J.G.; Caballero, O.L.; Dani, S.U.; Oncogenes e Genes Supressores. In: Brentani, Mm; Coelho, Frg; Iyeyasu, H.; Kowalshi, L.P.. *Bases Da Oncologia*. São Paulo, Livraria e Editora Marina, 1998. Cap. 4, p. 53 - 70.
- Siqueira, J.C.; Utilização popular das plantas do Cerrado. Edição Loyola, S.P. 1981
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*, 82 (13): 1107-1118, 1990.
- Skehan,P., Friedman,S.J. (1985). A rapid Naphthol Yellow S methods for mensuring the celular protein content of anchorage cultures. *In Vitro*, 21: 288-290.
- Tannock, I.F.; *Biological Properties of Anticancer Drugs*. In: Tannock If, Hill Rp. *The Basic Science of Oncology* New York, McGraw-Hill Companies, 1992. Cap. 17, p. 302 - 316.

- Tannock, I.F.; *Experimental Chemoterapy*. In: Tannock If, Hill Rp. *The Basic Science of Oncology*.. New York, McGraw-Hill Companies, 1992. Cap. 19, p. 338 - 359.
- Tannock, I.F.; *Pharmacology of Anticancer Drugs*. In: Tannock If, Hill Rp. *The Basic Science of Oncology*. New York, McGraw-Hill Companies, 1992. Cap. 18, p. 317 - 338.
- Van Lambalgen, R., Lelieveld,P.(1987). The PIT method: An automated in vitro techniqe for drug toxicity testing . Invest. New Drugs, 5: 161-165.
- Verweij J., Jonge, MJA. Achievements and future of Chemoterapy. *European Journal of Câncer*, 36: 1479-1487, 2000.
- Von Hoff, D. D. Implications of tumor cell cancer heterogeneity for in vitro drug sensitivity testing. *Seminars in Oncology*, 12(3), 327-331, 1985.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Cogoon P, McPhail AT. Plant antitumor agent.VI.The isolation and struture of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* J. Am. Chem. Soc.:93,2325-2327, 1971.
- Weidner, N.; Tumor Angiogenesis: Review of current applications in tumor prognostication. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 10 (4): 302-313, 1993
- Yamaguchi, N.H.; Desenvolvimento de Novos Tratamentos para o Câncer: da Pesquisa Básica ao uso Clínico. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia*, São Paulo, nº 10, p.8 – 13, 2º trimestre 2000.

Anexo

Tabela 7: Curva dose resposta das linhagens tumorais em presença da 5 fluorouracil (5 FU) Os resultados estão expressos como a média $\pm$ dp da absorbância (540nm) e a inibição do crescimento em porcentagem

Grupos	Linhagens	K 562 ^a	MCF 7 ^b	NCI ADR ^c	UACC 62 ^d	NCI 460 ^e
	Concentração (M)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)
Controle TO	--	0,329 $\pm$ 0,061	0,392 $\pm$ 0,023	0,263 $\pm$ 0,018	0,452 $\pm$ 0,006	0,191 $\pm$ 0,001
Controle T1	--	1,994 $\pm$ 0,096**	1,525 $\pm$ 0,066**	0,713 $\pm$ 0,185 **	1,359 $\pm$ 0,026**	0,789 $\pm$ 0,054**
5 FU	10 ⁻¹	0,573 $\pm$ 0,043** (85)	0,288 $\pm$ 0,019** (-26)	0,250 $\pm$ 0,020 ** (-4)	0,355 $\pm$ 0,039** (-21)	0,139 $\pm$ 0,001** (-27)
	10 ⁻²	0,707 $\pm$ 0,044** (77)	0,296 $\pm$ 0,054** (-24)	0,367 $\pm$ 0,011** (77)	0,442 $\pm$ 0,091** (-2)	0,163 $\pm$ 0,001** (-14)
	10 ⁻³	0,694 $\pm$ 0,082** (78)	0,419 $\pm$ 0,071** (97,5)	0,393 $\pm$ 0,074** (71)	0,589 $\pm$ 0,024** (84)	0,272 $\pm$ 0,011** (86)
	10 ⁻⁴	1,094 $\pm$ 0,090** (54)	0,536 $\pm$ 0,068** (87)	0,438 $\pm$ 0,018** (60)	0,711 $\pm$ 0,030** (71)	0,372 $\pm$ 0,002** (70)
	10 ⁻⁵	1,710 $\pm$ 0,031 (17)	0,499 $\pm$ 0,169** (90)	0,461 $\pm$ 0,037** (56)	0,768 $\pm$ 0,076** (65)	0,718 $\pm$ 0,045** (12)

ANOVA: a: F_(31,93) = 119,25; b: F_(31,93) = 18,38; c: F_(31,93) = 27,09; d: F_(31,93) = 8,11; e: F_(22,55) = 176,28, p < 0,001, Teste de Duncan. * p < 0,05 e ** p < 0,001

Tabela 8: Curva dose resposta das linhagens tumorais em presença da Camptotecina (CPT11) Os resultados estão expressos como a média $\pm$ dp da absorbância (540nm) e a inibição do crescimento em porcentagem

Grupos	Linhagens	K 562 ^a	MCF 7 ^b	NCI ADR ^c	UACC 62 ^d	NCI 460 ^e
Concentração		Abs (média $\pm$ dp)	Abs (média $\pm$ dp)	Abs (média $\pm$ dp)	Abs (média $\pm$ dp)	Abs (média $\pm$ dp)
(M)		(% inibição)	(% inibição)	(% inibição)	(% inibição)	(% inibição)
Controle TO	--	0,329 $\pm$ 0,061	0,392 $\pm$ 0,023	0,263 $\pm$ 0,018	0,452 $\pm$ 0,006	0,191 $\pm$ 0,001
Controle T1	--	1,994 $\pm$ 0,096**	1,525 $\pm$ 0,066**	0,713 $\pm$ 0,185 **	1,359 $\pm$ 0,026**	0,789 $\pm$ 0,054**
	10 ⁻⁸	0,325 $\pm$ 0,014** (-1)	0,299 $\pm$ 0,025** (-23)	0,288 $\pm$ 0,027 ** (94)	0,151 $\pm$ 0,011** (-43)	0,240 $\pm$ 0,023** (91)
	10 ⁻⁹	0,729 $\pm$ 0,283** (76)	0,485 $\pm$ 0,028** (91)	0,465 $\pm$ 0,049* (55)	0,322 $\pm$ 0,003** (-28)	0,620 $\pm$ 0,027** (72)
CPT 11	10 ⁻¹⁰	1,454 $\pm$ 0,190 (32)	0,679 $\pm$ 0,001** (25)	0,603 $\pm$ 0,017 (24)	0,400 $\pm$ 0,003** (-11)	0,761 $\pm$ 0,111** (95)
	10 ⁻¹¹	2,222 $\pm$ 0,036** (0)	1,310 $\pm$ 0,026 (18)	0,699 $\pm$ 0,018 (3)	0,666 $\pm$ 0,006** (77)	0,790 $\pm$ 0,033 (0)
	10 ⁻¹²	2,199 $\pm$ 0,046** (0)	1,318 $\pm$ 0,062 (12)	0,700 $\pm$ 0,030 (3)	1,158 $\pm$ 0,044** (22)	0,793 $\pm$ 0,040 (0)

ANOVA: a: F_(37,93) = 119,25; b: F_(37,93) = 18,38; c: F_(37,93) = 27,09; d: F_(37,93) = 8,11; e: F_(22,55) = 176,28, p < 0,001, Teste de Duncan: * p < 0,05 e ** p < 0,001

Tabela 9: Curva dose resposta das linhagens tumorais em presença da doxorubicina Os resultados estão expressos como a média $\pm$ dp da absorbância (540nm) e a inibição do crescimento em porcentagem

Grupos	Linhagens	K 562 ^a	MCF 7 ^b	NCI ADR ^c	UACC 62 ^d	NCI 460 ^e
	Concentração (M)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)
Controle TO	--	0,329 $\pm$ 0,061	0,392 $\pm$ 0,023	0,263 $\pm$ 0,018	0,452 $\pm$ 0,006	0,191 $\pm$ 0,001
Controle TI	--	1,994 $\pm$ 0,096**	1,525 $\pm$ 0,066**	0,713 $\pm$ 0,185 **	1,359 $\pm$ 0,026**	0,789 $\pm$ 0,054**
	10 ⁻⁴	0,164 $\pm$ 0,038** (-50)	0,230 $\pm$ 0,031** (-41)	0,42 $\pm$ 0,012 ** (65)	0,166 $\pm$ 0,036** (-63)	0,133 $\pm$ 0,001** (-30)
	10 ⁻⁵	0,314 $\pm$ 0,056** (-4)	0,331 $\pm$ 0,029** (-15)	0,581 $\pm$ 0,014* (29)	0,256 $\pm$ 0,006** (-43)	0,145 $\pm$ 0,007** (-24)
DOX	10 ⁻⁶	0,547 $\pm$ 0,094** (86)	0,369 $\pm$ 0,008** (-5)	0,603 $\pm$ 0,076 (24)	0,324 $\pm$ 0,003** (-28)	0,167 $\pm$ 0,001** (-12)
	10 ⁻⁷	1,940 $\pm$ 0,103 (3)	0,751 $\pm$ 0,018** (68)	0,720 $\pm$ 0,006 (14)	0,857 $\pm$ 0,027** (55)	0,519 $\pm$ 0,011** (54)
	10 ⁻⁸	2,058 $\pm$ 0,064 (0)	1,054 $\pm$ 0,022* (41)	0,720 $\pm$ 0,002 (14)	1,128 $\pm$ 0,049 (25)	0,287 $\pm$ 0,013 (16)

ANOVA: a: F_(37,93) = 119,25; b: F_(37,93) = 18,38; c: F_(37,93) = 27,09; d: F_(37,93) = 8,11; e: F_(22,55) = 176,28; p < 0,001, Teste de Duncan: * p < 0,05 e ** p < 0,001

Tabela 10: Atividade antiproliferativa dos extratos brutos (EB) da *Aspidosperma tomentosum* Mart.. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ dp da absorbância (540nm) e a inibição do crescimento em porcentagem

Grupos	Linagens	K 562 ^a	MCF 7 ^b	NCI ADR ^c	UACC 62 ^d	NCI 460 ^e
Concentração (μ g/ml)		Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)
Controle TO	--	0,351 $\pm$ 0,030	0,218 $\pm$ 0,03	0,363 $\pm$ 0,028	0,183 $\pm$ 0,079	0,289 $\pm$ 0,005
Controle TI	--	0,987 $\pm$ 0,114**	0,566 $\pm$ 0,095**	0,977 $\pm$ 0,055 **	1,722 $\pm$ 0,083**	1,456 $\pm$ 0,074**
EB diloro	125	0,791 $\pm$ 0,047*	0,117 $\pm$ 0,002**	0,407 $\pm$ 0,005 **	0,264 $\pm$ 0,018**	0,302 $\pm$ 0,018**
Planta seca		(30)	(-46)	(-1)	(94)	(98)
EB EtOH	125	0,748 $\pm$ 0,047*	0,138 $\pm$ 0,034**	0,797 $\pm$ 0,045**	0,625 $\pm$ 0,011**	0,883 $\pm$ 0,045**
Planta seca		(37)	(-36)	(31,9)	(71)	(49)
EB EtOH	125	0,966 $\pm$ 0,186	0,178 $\pm$ 0,022**	0,519 $\pm$ 0,173**	0,374 $\pm$ 0,034**	0,650 $\pm$ 0,065**
Planta fresca		(3,3)	(-18)	(81)	(87)	(69)

ANOVA: a: F_(10,30) = 35,38; b: F_(10,30) = 293,05; c: F_(10,30) = 102,69; d: F_(10,30) = 102,69; e: F_(10,30) = 144,76; p < 0,001, Teste de Duncan: * p < 0,05 e ** p < 0,001

Tabela 11: Atividade antiproliferativa do EBD da *Aspidosperma tomentosum* Mart.. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ dp da absorbância (540nm) e a inibição do crescimento em porcentagem

Grupos	Linagens	K 562 ^a	MCF 7 ^b	NCI ADR ^c	UACC 62 ^d	NCI 460 ^e
	Concentração (μ g/ml)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)
Controle TO	--	0,031 $\pm$ 0,017	0,151 $\pm$ 0,022	0,258 $\pm$ 0,026	0,653 $\pm$ 0,007	0,181 $\pm$ 0,016
Controle TI	--	0,327 $\pm$ 0,021*	0,273 $\pm$ 0,026*	0,676 $\pm$ 0,012 *	2,081 $\pm$ 0,066*	1,016 $\pm$ 0,055*
EB dicloro	125	0,107 $\pm$ 0,003* (74)	0,099 $\pm$ 0,003* (-34)	0,243 $\pm$ 0,001 *	0,748 $\pm$ 0,023*	0,126 $\pm$ 0,009* (-30)
	62,5	0,149 $\pm$ 0,008* (60)	0,122 $\pm$ 0,004* (-19)	0,408 $\pm$ 0,045* (64)	1,405 $\pm$ 0,074* (47)	0,232 $\pm$ 0,013* (93)
	31,25	0,175 $\pm$ 0,057* (51)	0,145 $\pm$ 0,008* (-4)	0,578 $\pm$ 0,008* (23)	1,834 $\pm$ 0,019* (17)	0,689 $\pm$ 0,100* (39)
	15,625	0,183 $\pm$ 0,008* (48)	0,192 $\pm$ 0,042* (66)	0,697 $\pm$ 0,016 (0)	1,839 $\pm$ 0,133* (16)	1,025 $\pm$ 0,016 (0)

ANOVA: a: F_(5,21)=135,34; b: F_(5,21)=0,248; c: F_(6,25)=727,34; d: F_(15,14)=125,51; e: F_(5,23)=541,94; p < 0,001, Teste de Duncan: *p<0,001

Tabela 12: Atividade antiproliferativa do EBES da *Aspidosperma tomentosum* Mart.. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ dp da absorbância (540nm) e a inibição do crescimento em porcentagem

Grupos	Linhagens	K 562 ^a	MCF 7 ^b	NCI ADR ^c	UACC 62 ^d	NCI 460 ^e
	Concentração (μ g/ml)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)
Controle TO	--	0,351 $\pm$ 0,055	0,370 $\pm$ 0,023	0,363 $\pm$ 0,026	0,183 $\pm$ 0,079	0,289 $\pm$ 0,025
Controle T1	--	0,723 $\pm$ 0,110*	1,393 $\pm$ 0,025*	1,050 $\pm$ 0,077 *	1,101 $\pm$ 0,046*	1,538 $\pm$ 0,067*
EBES	125	0,565 $\pm$ 0,045* (43)	0,526 $\pm$ 0,020* (85)	1,084 $\pm$ 0,062 (0)	0,799 $\pm$ 0,065* (33)	1,345 $\pm$ 0,155* (15)
	62,5	0,593 $\pm$ 0,151 (34)	0,652 $\pm$ 0,002* (72)	1,057 $\pm$ 0,037 (0)	0,951 $\pm$ 0,010* (16)	1,476 $\pm$ 0,105 (5)
	31,25	0,602 $\pm$ 0,022 (32)	1,029 $\pm$ 0,016* (36)	1,084 $\pm$ 0,077 (0)	0,967 $\pm$ 0,006* (15)	1,599 $\pm$ 0,098 (0)
	15,625	0,676 $\pm$ 0,061 (13)	1,174 $\pm$ 0,083* (21)	1,184 $\pm$ 0,011 (0)	0,981 $\pm$ 0,199* (13)	1,616 $\pm$ 0,081 (0)

ANOVA: a: F_(9,28) = 15,13; b: F_(9,28) = 438,86; c: F_(9,28) = 254,39; d: F_(9,28) = 178,21; e: F_(9,28) = 485,95; p < 0,001, Teste de Duncan: *p < 0,001

Tabela 13: Tabela : Atividade antiproliferativa da fração apolar resultante de separação por coluna clássica do EBDS da *Aspidosperma tomentosum* Mart.. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ dp da absorbância (540nm) e a inibição do crescimento em porcentagem

Grupos	Linhas	K 562 ^a	MCF 7 ^b	NCI ADR ^c	UACC 62 ^d	NCI 460 ^e
	Concentração (μ g/ml)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)
Controle TO	--	0,107 $\pm$ 0,159	0,181 $\pm$ 0,022	0,047 $\pm$ 0,018	0,356 $\pm$ 0,12	0,118 $\pm$ 0,024
Controle TI	--	0,703 $\pm$ 0,107*	1,110 $\pm$ 0,110*	0,161 $\pm$ 0,036 *	0,748 $\pm$ 0,047*	1,073 $\pm$ 0,062*
	125	0,602 $\pm$ 0,177 (17)	1,115 $\pm$ 0,062 (0)	0,160 $\pm$ 0,018 (0,5)	0,571 $\pm$ 0,021* (0)	0,990 $\pm$ 0,006 (8)
Fração Apolar	62,5	0,779 $\pm$ 0,064 (0)	1,061 $\pm$ 0,038 (5)	0,167 $\pm$ 0,006 (0)	0,758 $\pm$ 0,006* (38)	0,968 $\pm$ 0,022 (10)
	31,25	1,078 $\pm$ 0,330 (0)	1,393 $\pm$ 0,323 (0)	0,153 $\pm$ 0,013 (7)	0,596 $\pm$ 0,192* (38)	1,064 $\pm$ 0,019 (0,9)
	15,625	0,842 $\pm$ 0,109 (0)	1,253 $\pm$ 0,130 (0)	0,159 $\pm$ 0,013 (1)	0,719 $\pm$ 0,206* (7)	1,009 $\pm$ 0,102 (6)

ANOVA: a: F_(21,55) = 44,97; b: F_(21,55) = 37,99; c: F_(21,55) = 46,67; d: F_(21,55) = 23,90; e: F_(21,55) = 313,446; p < 0,001, Teste de Duncan. *p < 0,001

Tabela 14: Atividade antiproliferativa da fração média polaridade resultante de separação por coluna clássica do EBDS da *Aspidosperma tomentosum* Mart.. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ dp da absorbância (540nm) e a inibição do crescimento em porcentagem

Grupos	Linhagens	K 562 ^a	MCF 7 ^b	NCI ADR ^c	UACC 62 ^d	NCI 460 ^e
	Concentração (μ g/ml)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)
Controle TO	--	0,044 $\pm$ 0,021	0,218 $\pm$ 0,023	0,221 $\pm$ 0,028	0,266 $\pm$ 0,014	0,154 $\pm$ 0,016
Controle T1	--	0,376 $\pm$ 0,110**	0,977 $\pm$ 0,165**	0,481 $\pm$ 0,015**	0,675 $\pm$ 0,100**	0,756 $\pm$ 0,071**
	125	0,125 $\pm$ 0,005** (77)	0,295 $\pm$ 0,012** (99)	0,281 $\pm$ 0,005** (76)	0,247 $\pm$ 0,027** (-7)	0,129 $\pm$ 0,012** (-16)
Fração Média	62,5	0,124 $\pm$ 0,008** (75)	0,188 $\pm$ 0,004** (-2)	0,342 $\pm$ 0,074** (53)	0,318 $\pm$ 0,112** (87)	0,249 $\pm$ 0,040** (72)
Polaridade (FMP)	31,25	0,130 $\pm$ 0,008** (74)	0,22 $\pm$ 0,051** (-24)	0,548 $\pm$ 0,066 (0)	0,445 $\pm$ 0,086* (56)	0,307 $\pm$ 0,065* (55)
	15,625	0,164 $\pm$ 0,008** (63,7)	0,295 $\pm$ 0,012** (-18)	0,530 $\pm$ 0,044 (0)	0,467 $\pm$ 0,131* (50,7)	0,352 $\pm$ 0,026 (42)

ANOVA: a: F_(17,43) = 15,68; b: F_(17,43) = 16,91; c: F_(17,43) = 27,09; d: F_(17,43) = 8,11; e: F_(17,43) = 8,86; p < 0,001, Teste de Duncan: * p < 0,05 e ** p < 0,001

Tabela 15: Atividade antiproliferativa da fração polar resultante de separação por coluna clássica do EBDS da *Aspidosperma**tomentosum* Mart.. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ dp da absorbância (540nm) e a inibição do

crescimento em porcentagem

Grupos	Linhagens	K 562 ^a	MCF 7 ^b	NCI ADR ^c	UACC 62 ^d	NCI 460 ^e
Concentração (μ g/ml)		Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)
Controle TO	--	0,116 $\pm$ 0,030	0,263 $\pm$ 0,022	0,371 $\pm$ 0,062	0,378 $\pm$ 0,019	0,237 $\pm$ 0,007
Controle T1	--	1,520 $\pm$ 0,126*	1,859 $\pm$ 0,074*	1,091 $\pm$ 0,026 *	1,590 $\pm$ 0,039*	1,736 $\pm$ 0,065*
	125	0,048 $\pm$ 0,001*	0,102 $\pm$ 0,025*	0,172 $\pm$ 0,005*	0,057 $\pm$ 0,009*	0,112 $\pm$ 0,006*
		(-75)	(-61)	(-53)	(-84)	(-70)
	62,5	0,040 $\pm$ 0,040*	0,080 $\pm$ 0,022*	0,135 $\pm$ 0,017*	0,041 $\pm$ 0,007*	0,048 $\pm$ 0,014*
		(-79)	(-69)	(-63)	(-89)	(-87)
Fração Polar	31,25	0,242 $\pm$ 0,025*	0,233 $\pm$ 0,004*	0,184 $\pm$ 0,005*	0,148 $\pm$ 0,011*	0,126 $\pm$ 0,002*
		(96)	(-11)	(-50)	(-60)	(-67)
(FP)	15,625	0,375 $\pm$ 0,054*	0,392 $\pm$ 0,013*	0,426 $\pm$ 0,035*	0,300 $\pm$ 0,005*	0,253 $\pm$ 0,044*
		(86)	(91)	(92)	(-20)	(-34)
	7,8125	0,442 $\pm$ 0,016*	0,531 $\pm$ 0,024*	0,574 $\pm$ 0,008*	0,894 $\pm$ 0,016*	0,492 $\pm$ 0,013*
		(81)	(82)	(71)	(57)	(91)

ANOVA: a: F_(41,100)=40,55 ; b: F_(41,100)=624,27; c: F_(41,100)=20,12, d: F_(41,100)=359,88; e: F_(41,100)=50,06; p < 0,001, Teste de Duncan: *p<0,001

Tabela 16: Atividade antiproliferativa da fração enriquecida em alcaloides resultante de separação ácido / base da fração de média polaridade da *Aspidosperma tomentosum* Mart.. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ dp da absorbância (540nm) e a inibição do crescimento em porcentagem

Grupos	Linagens	K 562 ^a	MCF 7 ^b	NCI ADR ^c	UACC 62 ^d	NCI 460 ^e
	Concentração (μ g/ml)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)
Controle TO	--	0,116 $\pm$ 0,030	0,263 $\pm$ 0,019	0,371 $\pm$ 0,062	0,378 $\pm$ 0,019	0,237 $\pm$ 0,007
Controle T1	--	1,520 $\pm$ 0,126*	1,859 $\pm$ 0,074*	1,091 $\pm$ 0,026 *	1,590 $\pm$ 0,039*	1,736 $\pm$ 0,065*
	125	1,049 $\pm$ 0,021*	0,898 $\pm$ 0,007*	0,911 $\pm$ 0,009	1,157 $\pm$ 0,045*	1,309 $\pm$ 0,007*
		(35)	(58)	(25)	(35)	(31)
	62,5	1,534 $\pm$ 0,296	1,471 $\pm$ 0,001*	0,947 $\pm$ 0,019	1,337 $\pm$ 0,012*	1,655 $\pm$ 0,059
		(0)	(20)	(20)	(20)	(5)
Fração	31,25	1,534 $\pm$ 0,007	1,617 $\pm$ 0,040*	0,971 $\pm$ 0,041	1,347 $\pm$ 0,017*	1,705 $\pm$ 0,045
Alcaloídica		(0)	(11)	(16)	(20)	(2)
(FMA)	15,625	1,737 $\pm$ 0,170	1,610 $\pm$ 0,020*	0,983 $\pm$ 0,017	1,280 $\pm$ 0,023*	1,677 $\pm$ 0,054
		(0)	(11)	(15)	(25)	(5)
	7,8125	1,306 $\pm$ 0,097	1,783 $\pm$ 0,015	1,135 $\pm$ 0,065	1,256 $\pm$ 0,035*	1,820 $\pm$ 0,125
		(0)	(4)	(0)	(22)	(0)

ANOVA: a: F_(41,100)=40,55 ; b: F_(41,100)=624,27; c: F_(41,100)=20,12; d: F_(41,100)=359,88; e: F_(41,100)=50,06; p < 0,001, Teste de Duncan: *p<0,001

Tabela 17: Atividade antiproliferativa da fração enriquecida em terpenos resultante de separação ácido / base da fração de média polaridade da *Aspidosperma tomentosum* Mart.. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ dp da absorbância (540nm) e a inibição do crescimento em porcentagem

Grupos	Linhagens	K 562 ^a	MCF 7 ^b	NCI ADR ^c	UACC 62 ^d	NCI 460 ^e
	Concentração (μ g/ml)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)	Abs (média $\pm$ dp) (% inibição)
Controle TO	--	0,032 $\pm$ 0,010	0,259 $\pm$ 0,019	0,262 $\pm$ 0,018	0,381 $\pm$ 0,004	0,258 $\pm$ 0,086
Controle T1	--	0,713 $\pm$ 0,126**	1,602 $\pm$ 0,074**	0,860 $\pm$ 0,019**	1,494 $\pm$ 0,046**	1,741 $\pm$ 0,059**
	125	0,187 $\pm$ 0,020* (77)	0,319 $\pm$ 0,005* (95)	0,540 $\pm$ 0,011* (53)	1,056 $\pm$ 0,024* (39)	0,207 $\pm$ 0,013* (-19)
	62,5	0,306 $\pm$ 0,071* (59)	0,314 $\pm$ 0,004* (95)	0,762 $\pm$ 0,011* (16)	1,427 $\pm$ 0,085* (6)	0,218 $\pm$ 0,003* (-15)
Fração Terpenos (FMT)	31,25	0,259 $\pm$ 0,054* (61)	0,338 $\pm$ 0,039* (94)	0,861 $\pm$ 0,015 (0)	1,434 $\pm$ 0,007 (11)	0,726 $\pm$ 0,110* (68)
	15,625	0,643 $\pm$ 0,060 (10)	0,846 $\pm$ 0,020* (56)	0,867 $\pm$ 0,001 (0)	1,367 $\pm$ 0,117 (11)	1,673 $\pm$ 0,050 (4)
	7,8125	0,846 $\pm$ 0,158 (0)	1,365 $\pm$ 0,054* (17)	0,904 $\pm$ 0,057 (0)	1,437 $\pm$ 0,028 (5)	1,672 $\pm$ 0,022 (4)

ANOVA: a: F_(9,30) = 58,42 ; b: F_(9,31) = 292,78; c: F_(9,31) = 196,15; d: F_(9,31) = 221,48; e: F_(9,31) = 906,38; p < 0,001, Teste de Duncan: **p < 0,001