

ANA PAULA MATIOLI DELSIN

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA DE
DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *MIKANIA*.**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção de grau
de Mestre em Odontologia, área de
concentração em Farmacologia, Anestesiologia
e Terapêutica.**

PIRACICABA

2004

ANA PAULA MATIOLI DELSIN

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA DE
DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *MIKANIA*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de grau de Mestre em Odontologia, área de concentração em Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientação: Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

Co-orientação: Profa. Dra. Mary Ann Foglio

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

**PIRACICABA
2004**

Ficha Catalográfica

D387e Delsin, Ana Paula Matioli.
Estudo químico e avaliação antiproliferativa de diferentes espécies
do gênero *Mikania*. / Ana Paula Matioli Delsin. -- Piracicaba,
SP : [s.n.], 2004.
xi, 84f. : il.

Orientadores : Prof^a Dr^a Vera Lúcia Garcia Rehder,
Prof^a Dr^a Mary Ann Foglio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

**1. Plantas medicinais. 2. Câncer. I. Rehder, Vera
Lúcia Garcia. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. IV. Título.**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

*Aos meus pais, Oscar e Maria do Carmo, em
reconhecimento ao esforço e dedicação em favor
da minha educação. Vocês são meus eternos
orientadores!*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder pelos conhecimentos transmitidos, confiança, apoio e amizade dedicada durante esta jornada.

À Profa. Dra. Mary Ann Foglio que com as revisões, discussões e sugestões incentivou o desenvolvimento desse trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela estrutura, à todos os professores do PPGO, pelos ensinamentos ministrados nas disciplinas e a Elisa por cuidar de toda a burocracia.

À todos os amigos da PPGO: Marcos, Filipe, Simone, Regiane, Ramiro, Rogério, Ana Paula Giovana, Rodrigo, Laura, Roberta, Sinvaldo, Karina, Marcelo, Juliana, Gilson e Fabiano.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA por ceder seus laboratórios, equipamentos e funcionários para que esse trabalho pudesse ser concluído.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e sua equipe por realizaram as análises farmacológicas e pela motivação para o desenvolvimento de futuros trabalhos.

Aos queridos amigos do CPQBA: Adilson, Adriana, Aline, Sinésio, André, Lucília, Leandro, Viviane, Marili, Rodney, Rodolfo, Daniel, Eduardo, Benício, Glyn, Marta e Carmem, pela ajuda técnica, sugestões, críticas e pelos momentos de diversão.

Ao Rodrigo que tolerou as minhas ausências e crises durante esse período. Agradeço por ter tido paciência e compreensão, ajudando-me a alcançar mais um objetivo.

Aos meus familiares e amigos, por mais belas que sejam as palavras ditas, sempre serão insuficientes para traduzir meus sentimentos em relação a vocês.

A Deus, por ter me dado as condições físicas e espirituais para que eu chegasse até aqui.

E a todas as pessoas que, apesar de não terem seu nome aqui, pois demais extensa se tornaria a lista, contribuíram na elaboração desta dissertação.

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".

Fernando Pessoa

ABREVIATURAS

CO ₂	Dióxido de Carbono
CC	Coluna Clássica
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CS	Coluna seca
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DMSO	Dimetilsulfóxido
ED	Extrato diclorometânico
EDMa	Extrato diclorometânico de <i>M. argyreiae</i>
EDMaM	Extrato diclorometânico de <i>M. argyreiae</i> Metilado
EDMgI	Extrato diclorometânico de <i>M. glomerata</i> de Iguape
EDMgIM	Extrato diclorometânico de <i>M. glomerata</i> de Iguape Metilado
EDMgP	Extrato diclorometânico de <i>M. glomerata</i> de Picinguaba
EDMgPM	Extrato diclorometânico de <i>M. glomerata</i> de Picinguaba Metilado
EDMh	Extrato diclorometânico de <i>M. hirsutissima</i>
EDMhM	Extrato diclorometânico de <i>M. hirsutissima</i> Metilado
EDMII	Extrato diclorometânico de <i>M. laevigata</i>
EDMIIM	Extrato diclorometânico de <i>M. laevigata</i> Metilado
EEMh	Extrato etanólico de <i>M. hirsutissima</i>
EHA	Extrato Hidroalcoólico

EHAMa	Extrato Hidroalcoólico de <i>M. argyreae</i>
EHAMgI	Extrato Hidroalcoólico <i>M. glomerata</i> de Iguape
EHAMgP	Extrato Hidroalcoólico de <i>M. glomerata</i> de Picinguaba
EHAMh	Extrato Hidroalcoólico de <i>M. hirsutissima</i>
EHAMII	Extrato Hidroalcoólico de <i>M. laevigata</i>
He	Hélio
IC	Inibição de Crescimento
IQ-UNICAMP	Instituto de Química da UNICAMP
IV	Infravermelho
Ma	<i>Mikania argyreae</i>
MgI	<i>Mikania glomerata</i> de Iguape
MgP	<i>Mikania glomerata</i> de Picinguaba
Mh	<i>Mikania hirsutissima</i>
MII	<i>Mikania laevigata</i> de Iguape
NCI	National Cancer Institute
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
RMN- ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SFB	Soro Fetal Bovino Inativado
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3. PROPOSIÇÃO.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1- Obtenção do Material Vegetal.....	13
4.2 - Metodologia aplicada ao estudo fitoquímico.....	15
4.2.1 – Preparação dos Extratos.....	15
4.2.2 - Fracionamento dos extratos diclorometânicos.....	17
4.2.3 – Análise cromatográfica dos extratos e frações.....	18
4.2.4 – Purificação do EEMh.....	19
4.2.5 – Determinação Estrutural do Composto Isolado.....	19
4.3 - Metodologia aplicada ao estudo farmacológico.....	20
4.3.1 –Linhagens celulares.....	20
4.3.2 – Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa.....	21
4.3.3 – Análise dos resultados.....	25
5. RESULTADOS.....	27
5.1 - Avaliação Fitoquímica.....	27
5.1.1 – Rendimento dos extratos.....	27

5.1.2 – Análise dos extratos por CCD.....	28
5.1.3 – Análise dos extratos por GC-EM.....	31
5.1.4 – Purificação e Isolamento do ácido diterpênico.....	41
5.1.5 – Identificação do ácido diterpênico isolado.....	43
5.2 - Avaliação Farmacológica.....	47
6. DISCUSSÃO.....	57
6.1 – Fitoquímica.....	57
6.2- Ensaios de atividade antiproliferativa.....	59
7. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO I.....	70
ANEXO II.....	81

RESUMO

O gênero *Mikania* possui mais de 430 espécies e distribui-se pelas regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul. A partir de resultados promissores obtidos em estudos químicos e farmacológicos realizados anteriormente com duas espécies do gênero *Mikania*, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólico e diclorometânico e frações diclorometânicas das espécies *Mikania argyreae*, *M. glomerata* (Iguape), *M. glomerata* (Picinguaba), *M. laevigata* (Iguape) e *M. hirsutissima* em linhagens de células neoplásicas humanas, avaliar a composição química das espécies selecionadas e isolar novos compostos. Os extratos foram preparados a partir das plantas secas e moídas utilizando extração em dispersor. A avaliação da composição química foi realizada por métodos cromatográficos, destacando-se a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Os ensaios para avaliação antiproliferativa foram realizados em placas de 96 orifícios e os extratos foram diluídos em 4 concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL). A dosagem de proteínas foi realizada por coloração com sulforrodamina B e leitura espectrofotométrica em 560 nm. Os estudos fitoquímicos revelaram pequenas variações na composição química entre as espécies, com destaque para a *M. hirsutissima* da qual foi isolado o ácido pimaridiênico, não descrito para essa espécie e ausente nas demais. Este composto foi isolado por processos cromatográficos de colunas seca e clássica e identificado por métodos espectroscópicos utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13, espectrometria de massas e infravermelho. A avaliação da atividade antiproliferativa demonstrou que os extratos de *M. glomerata* (Iguape e Picinguaba) apresentaram perfis distintos entre si, a *M. hirsutissima* apresentou efeito citocida na maior concentração testada, para os extratos brutos e frações com características polares e o ácido pimaridiênico apresentou atividade antiproliferativa diferente dos ácidos diterpênicos caurenóico e cupressênico, anteriormente testados, demonstrando relação intrínseca com as diferenças presentes nas estruturas de suas moléculas.

ABSTRACT

The genera *Mikania* possess over 430 species and is distributed throughout the tropical regions of Africa, Asia and South America. Previous chemical and pharmacological results with two *Mikania* species prompted us to evaluate *Mikania argyreiae*, *M. glomerata* (Iguape), *M. glomerata* (Picinguaba), *M. laevigata* (Iguape) and *M. hirsutissima* hydroalcoholic, dichloromethane and dichloromethane fractions activity by *in vitro* antiproliferative assay with neoplastic human cells, in order to isolate and identify the active compounds responsible for the pharmacological activity under study. The extracts were prepared from dry grinded plants. The evaluation of the chemical composition was carried out by chromatographic methods. The antiproliferative assay were carried out in 96 well plates employing four extract concentration (0,25; 2,5; 25 and 250 µg/mL). The dosage of proteins was carried through by coloration with sulforrodamine B and espectrofotometric reading in 560 nm. The phytochemistry studies had disclosed small variations in the chemical composition between the species, with prominence for the *M. hirsutissima* of which was isolated the pimaridienic acid, not described previously for this species and absente in the others. This acid was isolated by dry column and classic chromatography and identified by spectroscopic methods using ¹³CNMR and ¹HNMR techniques, mass and infrared spectroscopy. The antiproliferative activity evaluation demonstrated that the *M. glomerata* (Iguape and Picinguaba) extracts presented different profiles between the same species from different origins. *M. hirsutissima* crude extract and polar fractions presented inhibited growth at the highest concentration and pimaridienic acid presented a different antiproliferativa activity compared to caurenolic and cupressenic diterpenic acids, previously tested, demonstrating an intrinsic relationship with the chemical structure.

1. INTRODUÇÃO

As plantas e substâncias de origem animal são utilizadas para fins curativos pela humanidade desde os tempos antigos e, a partir do século XX, com o desenvolvimento da química os medicamentos de origem sintética ocuparam aos poucos o lugar das plantas medicinais. Apesar disso, nos últimos anos, vem ocorrendo um retorno ao uso de produtos naturais e medicamentos elaborados a partir destes, o que se deve à escassez de descobertas de moléculas farmacologicamente ativas pelos processos tradicionais de síntese.

A investigação de plantas medicinais utilizadas popularmente resultou em alguns avanços terapêuticos e 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) (CALIXTO , 2000).

Segundo a Organização Mundial da Saúde pelo menos 80% da população dos países em desenvolvimento dependem da "medicina tradicional" para o tratamento de problemas de saúde, e 85% deste total utiliza plantas medicinais no tratamento das mais diversas doenças (CALIXTO *et al*, 1998). Isto significa, segundo o órgão da ONU, que cerca de 4 bilhões de pessoas no mundo, dependem de remédios à base de plantas medicinais.

As plantas medicinais são utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento e prevenção. Existe uma tendência para o aumento do uso destas plantas e isto seria de grande utilidade principalmente nos países em desenvolvimento,

como no Brasil, que apresenta uma grande biodiversidade e onde a população carente poderia ter acesso a formas terapêuticas de custos mais baixos em relação a medicamentos industrializados (ISRAELSON, 1991). Muitos estudos também estão sendo realizados no intuito de identificar e isolar os princípios ativos presentes nestes extratos naturais, para que estes novos compostos isolados quimicamente, se efetivos na sua ação, possam ser sintetizados e utilizados no controle e prevenção de doenças.

Dentre as plantas de interesse medicinal, destaca-se a do gênero *Mikania* (família *Compositae*, tribo *Eupatorieae*) ultrapassa 430 espécies, embora o banco de dados do Index Kweensis inclua 694 nomes de *Mikania*, sendo que muito desses nomes resultem em sinonímia de espécies do próprio gênero e algumas vezes até de outro gênero. Distribuem-se pelas regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul (Argentina, Paraguai, Uruguai). No Brasil ocorrem 192 espécies e duas delas estão oficializadas na Farmacopéia Brasileira: *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania hirsutissima* DC (FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1959). São encontradas principalmente nas regiões sul e sudeste, desenvolvendo-se como trepadeira arbustiva, lenhosa, apresentando caule cilíndrico e ramoso, florescendo de agosto à outubro.

A importância do estudo da atividade antiproliferativa de plantas medicinais está relacionada com o fato do câncer ser um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. A cada ano, segundo dados da OMS, o câncer atinge 9 milhões de pessoas, levando a óbito 5 milhões de pacientes. No Brasil, o número de casos de câncer aumenta a cada ano e no Sudeste brasileiro, os tumores malignos representam a segunda maior causa de óbitos, sendo superadas apenas por doenças cardiovasculares (MENDONÇA, 1992).

2. REVISÃO DE LITERATURA

O aumento da incidência de câncer está relacionado com aumento da expectativa de vida da população, pois o aparecimento dessa doença é favorecido com o envelhecimento do organismo (CAIRNS, 1981; SIKORA, 1999).

Na população mundial, as neoplasias mais prevalentes são as de pulmão entre os homens e as de mama entre as mulheres, sendo que a crescimento percentual relativo na incidência de câncer nos últimos 25 anos foi de 75% (Ministério da Saúde, 1999). Atualmente são conhecidos mais de cem tipos de câncer, diferenciados pela etiologia, processo de evolução e forma de tratamento e por isso, o câncer não pode mais ser considerado como uma única doença (CALABRESI & CHABNER, 1996; COELHO, 1998).

A célula cancerígena caracteriza-se pela alteração de função em consequência da incompleta diferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástase. A origem dessa célula é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos (BRETANI *et al.*, 1998; SIMPSON *et al.*, 1998).

Apesar da grande evolução do conhecimento a respeito deste conjunto de doenças, tal progresso não refletiu de maneira proporcional o desenvolvimento de técnicas eficazes de prevenção, tratamento e cura. De uma forma geral, o tratamento do câncer pode ser

realizado através de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. De acordo com o tipo e estágio de moléstia, o sucesso do tratamento geralmente é conseguido com a associação desses três tipos de tratamento. 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). No entanto, a quimioterapia é o tratamento que oferece freqüentemente o aparecimento de diferentes graus de toxicidade aos tecidos não tumorais, em consequência da baixa seletividade dos antineoplásicos. Outro problema da quimioterapia é a possibilidade de resistência aos medicamentos, que conduz o tratamento para o uso combinado de drogas aumentando a probabilidade de efeitos colaterais tóxicos (CALABRESI & CHABNER, 1996).

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 dos alcalóides vimblastina e vincristina (FIG. 1), os quais são de grande utilidade no tratamento tanto de neoplasias de origem mielóide e linfóide (leucemias e linfomas) como de tumores ditos como sólidos (HAMBURGUER & HOSTETTMANN, 1991; FELLOWS, 1995; CRAGG & NEWMAN 1999).

Outra descoberta importante nesta área foi o paclitaxel ou taxol (FIG. 1), um sesquiterpeno isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*), em 1971 (WANI *et al*, 1971). Estudos clínicos iniciais revelaram que essa substância era capaz de induzir a regressão de alguns tipos de câncer de mama e de ovário, resistentes à terapia tradicional (ROWINSKY *et al*, 1995). Como essa substância é 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 em 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 & NEWMAN, 1999; PHILLIPSON, 1999).

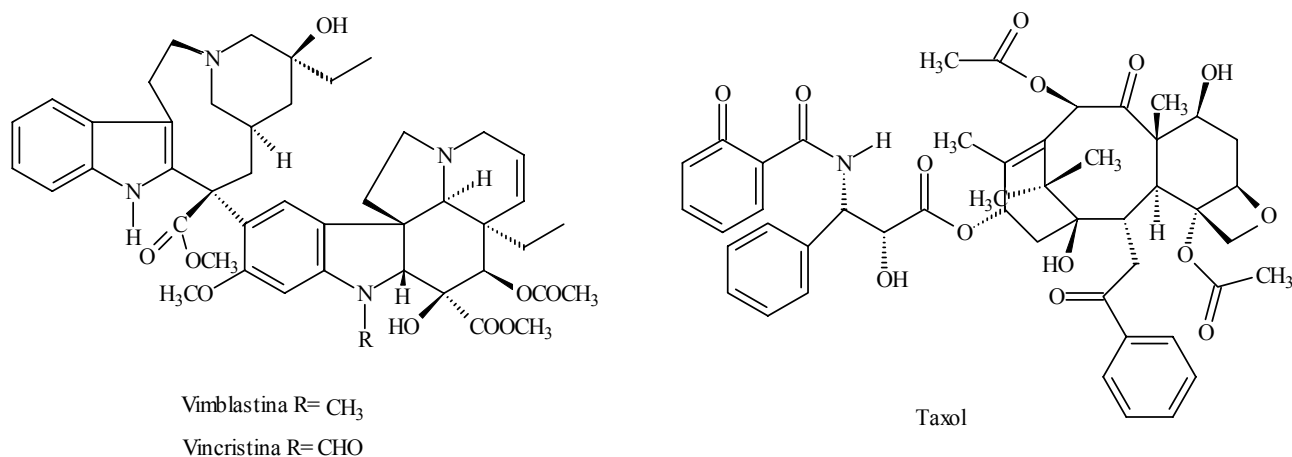


FIGURA 1 – Estruturas de origem natural ativas no tratamento do câncer (HAMBURGUER & HOSTETTMANN, 1991; WANI *et al*, 1971).

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 (CRAAG & NEWMAN, 1999). O Instituto Nacional do Câncer (NCI) estudou cerca de 33 mil amostras 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 & HOSTETTMANN 1991; CRAAG & NEWMAN 1999).

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 protéicos de células fixadas com ácido tricloroacético (TCA), sendo assim um ensaio independente do metabolismo celular (SKEHAN & FRIEDMAN, 1985). Esta metodologia promove uma quantificação sensível de proteínas de modo linear com o número de células da cultura (SKEHAN 1990).

O Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA/UNICAMP vem desenvolvendo nos últimos anos, pesquisas com diversas plantas

medicinais. Dentre as pesquisas realizadas com plantas do gênero *Mikania*, foi dado prioridade ao estudo químico das espécies *M. laevigata* (Campinas) e *M. glomerata* (Itatiaia), onde foram isolados e identificados alguns compostos (FIG. 2). Destes compostos a cumarina apresentou potencial atividade antiulcerogênica (BIGHETTI *et al*, 2003) e os ácidos caurenóico e cupressênico apresentaram atividade antimicrobiana para *Streptococcus* do grupo *mutans* (YATSUDA *et al*, 2002), *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecium*, *Salmonella choleraesuis* e *Bacillus subtilis* (DELSIN *et al*, 2003; REHDER *et al*, 2000).

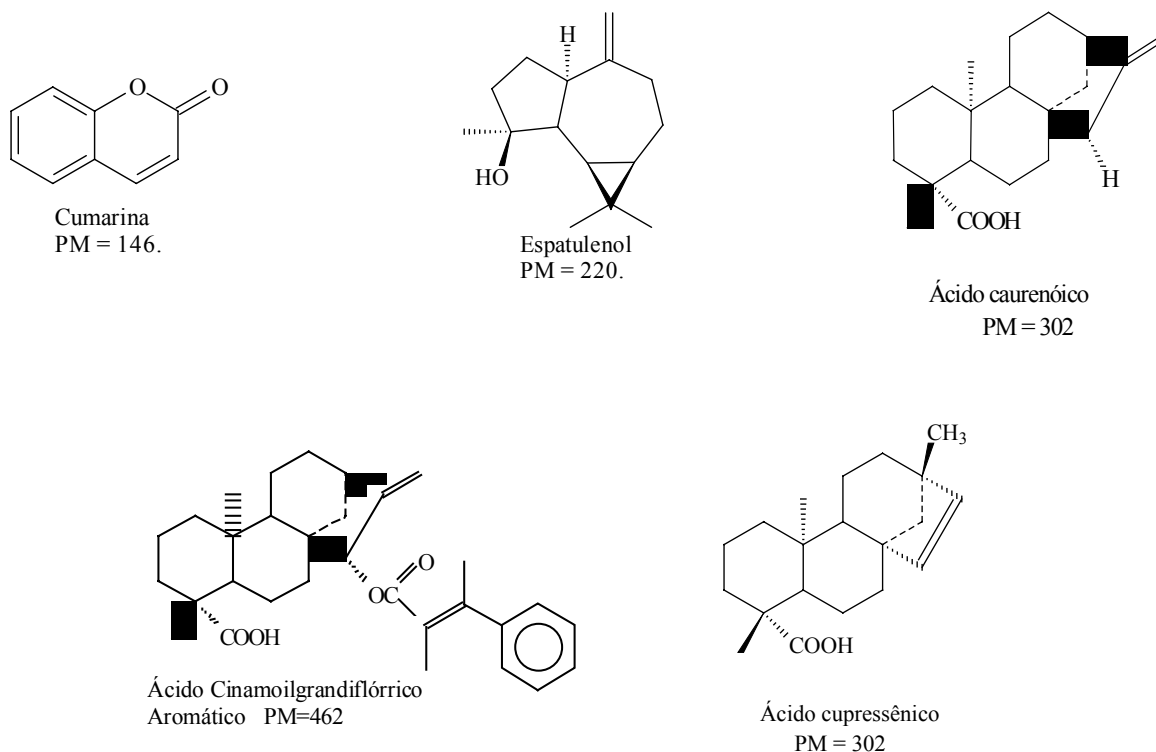


FIGURA 2 – Constituintes químicos presentes em algumas espécies do gênero *Mikania*.

Alguns dos compostos isolados nos estudos prévios foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa de células neoplásicas humanas e verificaram-se bons resultados principalmente para os ácidos diterpênicos caurenóico e cupressênico. Os gráficos referentes à curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa desses compostos estão relacionados no anexo I (GRAF. 14-20).

Algumas espécies do gênero *Mikania* fazem parte da coleção do banco de germoplasma do CPQBA, que provêm de diversos locais de coleta. Entre essas plantas foram selecionadas 4 espécies para a realização desse trabalho que serão descritas a seguir:

A *M. glomerata* Sprengel é conhecida usualmente com os nomes de guaco, guaco liso, guaco de cheiro e cipó caatinga (LUCAS, 1942; OLIVEIRA *et al.*, 1984). O uso medicinal do guaco é antigo, sendo empregado empiricamente por infusão ou extrato hidroalcoólico das folhas como expectorante, no tratamento de febre, sífilis, reumatismo, neuralgia, dores, gripes e doenças do sistema respiratório (PIO CORRÊA, 1942).

A *M. laevigata* Schultz Bip (ex Baker) é conhecida como guaco ou guaco cheiroso e assemelha-se a *M. glomerata* Sprengel, sendo freqüentemente comercializado como tal. No entanto, essa espécie possui folhas não lobadas a levemente lobadas enquanto que a *M. glomerata* apresenta folhas lobadas (MORAES, 1997). Quando cortada, produz aroma característico (cheiro de baunilha), que pode ser percebido mesmo depois de seca. Suas folhas são utilizadas sob a forma de xarope na medicina popular em resfriados, bronquites e tosses crônicas.

Como principais constituintes químicos da *M. glomerata* e *M. laevigata*, cita-se a presença de cumarina, ácido caurenóico, ácido cupressênico, ácido cinamoilgrandiflórico, estigmasterol (OLIVEIRA *et al*, 1984; VENEZIANI *et al*, 1999), germacrolídeos (AGUINALDO *et al*, 1995; CUENCA *et al*, 1990; GUTIERREZ *et al*, 1988), flavonóides (MURADIAN *et al* 1977), lactonas sesquiterpênicas (CUENCA *et al* 1988, 1992; 1993; HERZ *et al* 1967, 1970, 1977, 1985; DIAZ *et al* 1992; ZAMORANO *et al*, 1995), triterpenos (KIANG *et al*, 1965), sesquiterpenos (CASTRO *et al*, 1986), dentre outros.

A *M. hirsutissima* DC é conhecida popularmente como Cipó Cabeludo, Guaco-Cabeludo, Erva Dutra e Cipó-almécega-cabeludo. Essa espécie difere das outras espécies de *Mikania* por possuir folhas pilosas, além de produzir uma resina de cheiro semelhante à resina de almécega (COSTA, 1972). Também cita-se a presença de óleo essencial, taninos (LIBERALLI, 1933; CRUZ & LIBERALLI, 1938) ácidos caurenóico e 16-hidro-caurenóico, cumarina e sesquiterpenos (OHKOSHI *et al*, 1999; RODRIGUES, 1998). O Cipó cabeludo é usado extensamente na medicina brasileira para tratar distúrbios do sistema renal (diurético), hemorragia, diarreia, reumatismo e gota (CRUZ, 1995). Um composto cíclico isolado, chamado por micaniahumuleno, apresentou inibição *in vitro* de células leucêmicas de rato (FUJIMOTO, 1995).

A *M. argyrea* DC é muitas vezes confundida com a *M. hirsutissima*, mas diferencia-se principalmente pela bráctea subinvolucral de 3,3–3,5 mm de comprimento, glabra, com ápice piloso enquanto que na *M. hirsutissima* a bráctea subinvolucral é maior (4-5 mm de comprimento) e inteiramente pilosa (MORAES, 1997). Não há dados na literatura sobre ações farmacológicas, uso popular desta planta.

3. PROPOSIÇÃO

Com base nos resultados promissores de atividade antiproliferativa obtidos para os compostos isolados de *M. laevigata* (Campinas) e *M. glomerata* (Itatiaia) e o interesse em estudar essas espécies coletadas em diferentes acessos e outras espécies do gênero *Mikania*, o presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a composição química das espécies *M. argyreiae*, *M. glomerata* (Iguape), *M. glomerata* (Picinguaba), *M. laevigata* (Iguape) e *M. hirsutissima* por métodos cromatográficos e espectrométricos e fazer uma triagem na busca de novas substâncias.
- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos e frações das espécies selecionadas em linhagens de células neoplásicas humanas.
- Purificar, identificar e avaliar atividade antiproliferativa de novos compostos.
- Relacionar os resultados obtidos com a estrutura dos constituintes químicos presentes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Obtenção do Material Vegetal

As espécies de *Mikania* em estudo foram cultivadas no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP, na cidade de Paulínia - São Paulo. As espécies provêm de coletas feitas em diferentes locais (TAB 1) que foram identificadas e suas respectivas exsiccatas encontram-se depositadas no herbarium do Instituto de Biologia da UNICAMP.

TABELA 1: Espécies de *Mikantias* em estudo, número na coleção do CPQBA e local de coleta

Nome	Nº na coleção	Local de coleta
<i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip (MII)	41	Iguape – SP
<i>Mikania glomerata</i> Sprengel (MgI)	33	Iguape – SP
<i>Mikania glomerata</i> Sprengel (MgP)	09	Picinguaba – SP
<i>Mikania argyreae</i> DC (Ma)	26	Ubatuba - SP
<i>Mikania hirsutissima</i> DC (Mh)	37	Mogi Guaçu/ Campininha - SP

O material vegetal foi seco em estufa (Fabbe, modelo 170) com ventilação a 45°C e, depois de seco foi moído em um triturador de facas (Metalurgica Roma[®], modelo MR-30).



M. argyreia DC



M. hirsutissima DC



M. laevigata Schultz Bip
(Iguape)



M. glomerata Sprengel (Iguape)



M. glomerata Sprengel
(Picinguaba)

FIGURA 3 - Exsicatas das espécies de *Mikania* estudadas.

4.2 – Metodologia aplicada ao estudo fitoquímico

4.2.1 – Preparação dos extratos

A partir das folhas da Ma, MII, MgI, MgP e Mh foram preparados 2 tipos de extratos: diclorometânico e hidroalcoólico (FIG. 4). Os extratos de diclorometano e hidroalcoólico foram preparados seguindo-se protocolo do NCI para ensaios de determinação de atividade antiproliferativa.

Os extratos de diclorometano foram preparados a partir de 20 g de planta seca e moída, extraídos com 150 mL de CH₂Cl₂ em dispersor mecânico (Ultra-Turrax®, modelo T-25) por 2 minutos. Após filtração, esse processo foi repetido mais uma vez e os dois extratos foram concentrados em evaporador rotativo à vácuo até eliminação de todo solvente.

Os extratos hidroalcoólicos foram preparados a partir do resíduo da extração diclorometânica (resíduo 2) com 150 mL solução de etanol e água (70:30), com uso de dispersor por 2 minutos. Após filtração, repetiu-se o procedimento mais uma vez e os dois extratos foram concentrados em evaporador rotativo até eliminação de todo etanol seguido de liofilização.

No processo de isolamento de um composto da *M. hirsutissima*, utilizou-se extrato etanólico que foi preparado a partir de 20g da planta seca moída com 150 mL de etanol e uso de dispersor por 2 minutos. Após filtração, repetiu-se o procedimento e o extrato foi

concentrado em evaporador rotativo até eliminação de todo etanol, resultando em EEMh que foi utilizado no processo de purificação das substâncias de interesse.

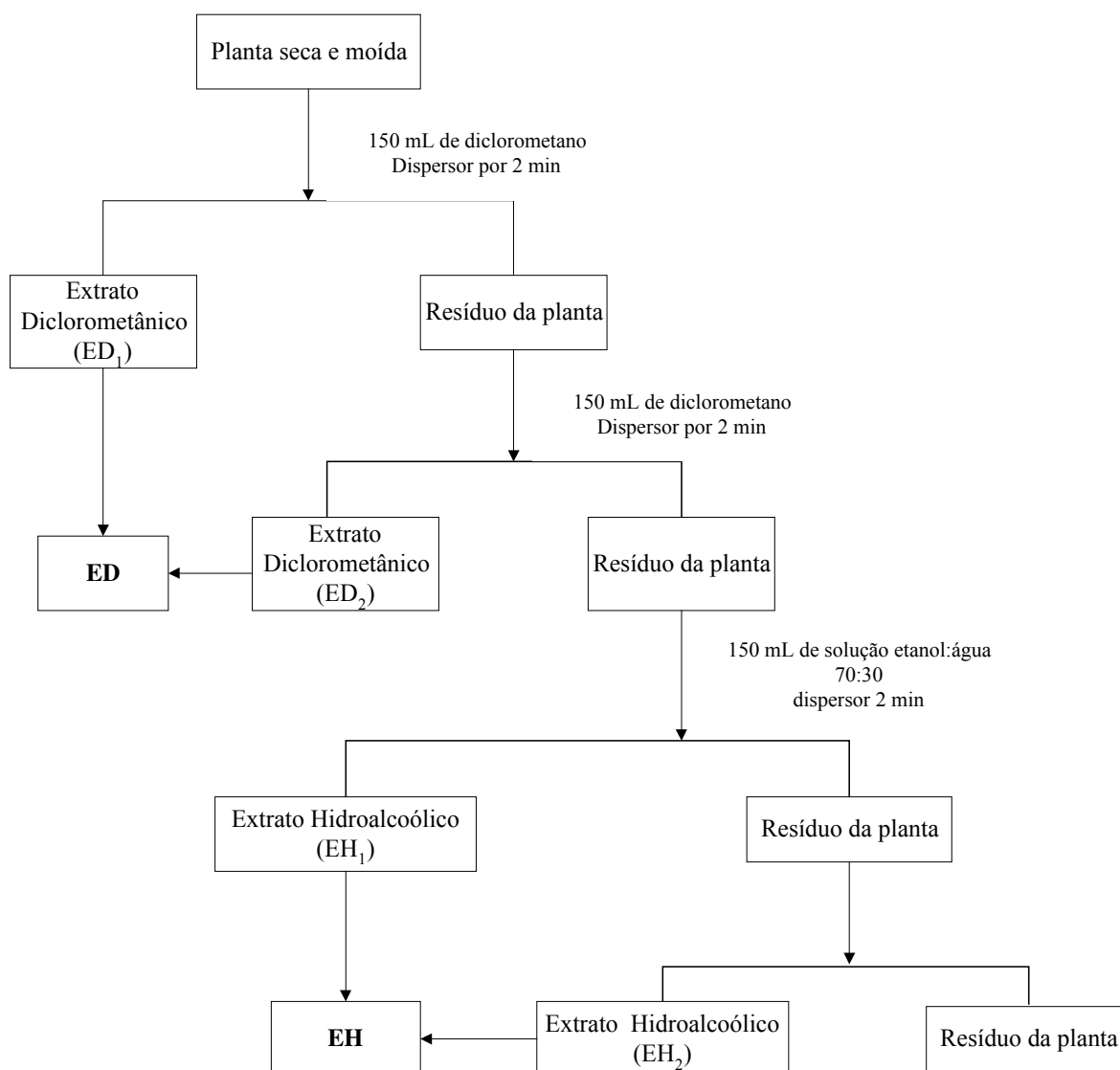


FIGURA 4 - Fluxograma de obtenção dos extratos diclorometânicos e hidroalcoólicos de *M. argyreae*, *M. laevigata* (Iguape), *M. glomerata* (Iguape), *M. glomerata* (Picinguaba) e *M. hirsutissima*..

4.2.2 – Fracionamento dos extratos de diclorometano

Os extratos de diclorometano das espécies em estudos, exceto EDMII, foram fracionados em coluna seca, utilizando uma membrana de celulose ($\varnothing = 2$ cm, 20 cm de altura). As colunas foram empacotadas com sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh) e eluídas com Hexano: acetato de etila 80:20. O eluente foi definido após análises dos extratos por CCD. Após eluição, as colunas foram divididas em 4 partes de 5 cm cada, denominadas de 1 a 4, além da papa. As frações foram extraídas com acetato de etila, filtradas em funil de placa porosa, evaporadas sob vácuo e analisadas por CCD (FIG 5).

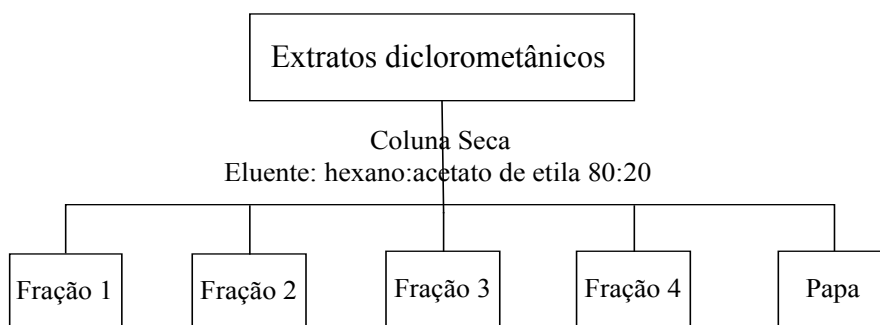


FIGURA 5 - Fluxograma de fracionamento dos extratos diclorometânicos por cromatografia de coluna seca.

4.2.3 – Análise cromatográfica dos extratos e frações

Cromatografia em camada delgada (CCD)

Todos os extratos, frações e substâncias isoladas das espécies de *Mikania* estudadas foram analisados através do método de CCD. Utilizou-se cromatoplasacas de alumínio (Merck – artigo 5554). Os eluentes utilizados foram: hexano: acetato de etila 80:20, 70:30, diclorometano e acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água 100:11:11:27, definidos de acordo com o tipo de separação desejada em cada amostra. A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada Ultravioleta – UV a 254 e 366 nm, seguida de pulverização com solução do revelador anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído 50,0:1,0:0,5 v/v) ou solução NP (difenilboriloxietilamina 1%) e aquecimento em estufa a 100°C por 5 minutos.

Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Alíquotas das amostras dos extratos diclorometânicos foram previamente metiladas com solução de diazometano em éter etílico para serem analisadas por CG-EM. Essa reação é necessária pois transforma-se ácidos carboxílicos em ésteres metílicos, diminuindo seu ponto de ebulição, tornando os compostos mais voláteis facilitando a detecção.

As análises foram realizadas no cromatógrafo HP 5890 série II, acoplado com um detetor seletivo de massas HP5971. A coluna utilizada foi uma HP-5 (25 m X 0,2 mm X 0,33 mm). As condições de análise foram:

Temperatura de injeção: 250°C;

Temperatura do detetor: 300°C;

Programa de temperatura: 110°C (2 min), 5°C/min, 300°C (5 min)

Injetor modo *split*: razão 1:40;

Gás de arraste (He): 1,0 mL/min

4.2.4 – Purificação do EEMh

O EEMh foi purificado através de técnicas cromatográficas de coluna seca (CS) e de coluna clássica (CC), para o isolamento de um ácido diterpênico detectado pelas análises de CCD e CG-EM.

Para a coluna clássica utilizou-se coluna de vidro com 45 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro. As colunas foram empacotadas com sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh a altura de 20 cm) e diclorometano. Foram obtidas 64 frações que foram analisadas por CCD e as semelhantes agrupadas e concentradas em evaporador rotativo até eliminação do solvente, obtendo-se as massas das frações. Como fase móvel foi utilizado diclorometano.

4.2.5 - Determinação Estrutural do Composto Isolado

A determinação estrutural do composto isolado foi feita por métodos espectroscópicos utilizando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13 (RMN-¹H e RMN-¹³C), Espectrometria de Massas e Infravermelho.

Os espectros de RMN foram obtidos a 300 MHz para hidrogênio e 77,4 MHz para C-13. Estas análises foram feitas na Central Analítica do IQ-UNICAMP. A amostra foi dissolvida em CDCl₃ e tetrametilsilano utilizado como padrão interno.

Os espectros de massas foram obtidos no HP5971 série II acoplado ao cromatógrafo a gás HP5890. Os espectros de IV foram obtidos em equipamento Infravermelho com transformador de FOURIER-FTIR-JASCO.

4.3 – Metodologia aplicada ao estudo farmacológico

4.3.1 – Linhagens celulares

As linhagens celulares cedidas pelo NCI dos EUA, e utilizadas na triagem da atividade antiproliferativa estão relacionadas na tabela 2. Estas foram cultivadas, sob condições estéreis, em meio de cultura denominado RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB). Todas as linhagens celulares foram mantidas congeladas no laboratório, e para a manutenção das células foram feitos repiques periódicos. As linhagens são utilizadas até a 20^a geração.

TABELA 2: Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa

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

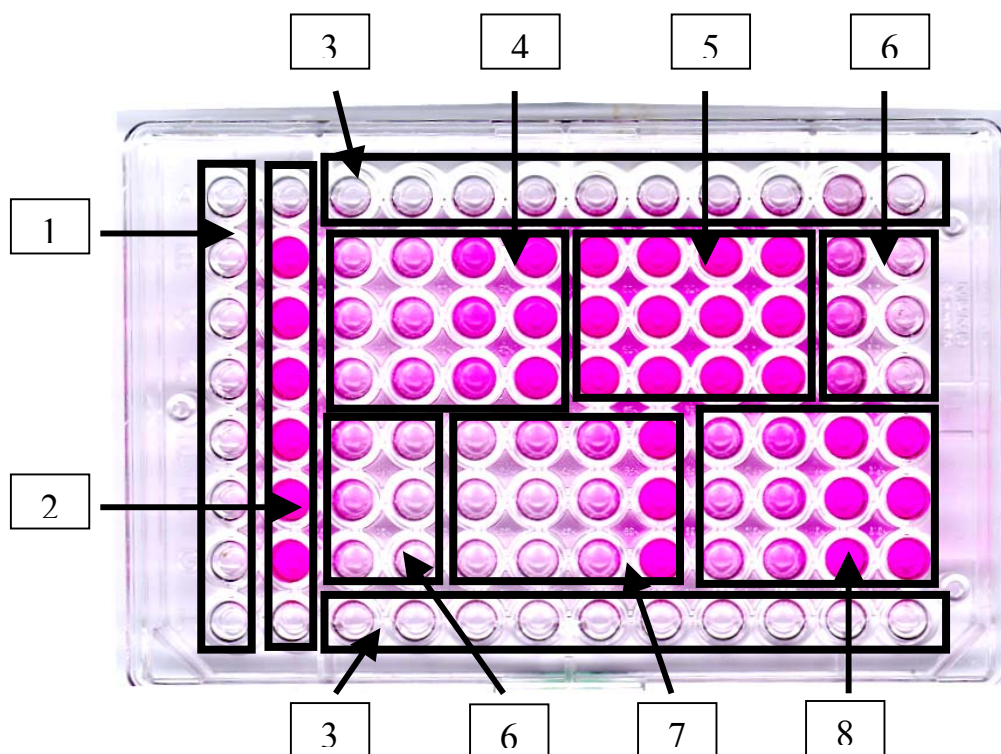
4.3.2 – Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa

Primeiramente, em placas com 96 orifícios ou poços (Nunc[®]) foram adicionados 100 µL de células em meio RPMI/SFB acrescido de 50 µg/mL de gentamicina (Schering Plough[®]), em densidades de inoculação pré-determinadas e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido. A densidade ideal de inoculação de cada linhagem celular foi otimizada através de determinação das curvas de crescimento celular em pesquisas anteriores (KOHN, 2001) e está relacionada na tabela 3.

TABELA 3: Densidade ideal de inoculação das linhagens celulares neoplásicas humanas

Linhagem celular	Densidade de Inoculação
K-562	$6,0 \times 10^4$ cel/mL
OVCAR	$7,0 \times 10^4$ cel/mL
786-0	$5,0 \times 10^4$ cel/mL
PCO-3	$4,5 \times 10^4$ cel/mL
HT-29	$5,0 \times 10^4$ cel/mL
NCI-460	$4,0 \times 10^4$ cel/mL
MCF-7	$6,0 \times 10^4$ cel/mL
NCI-ADR	$5,0 \times 10^4$ cel/mL
UACC-62	$4,0 \times 10^4$ cel/mL

As amostras dos estratos e frações foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 100 µg/mL resultando em soluções estoques. Estas soluções foram diluídas 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina. Adicionaram-se 100 µL do extrato ou fração a serem testados nas placas com 96 orifícios nas concentrações de 0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL em triplicata (FIG. 6), exceto na placa T0, que é a placa controle no tempo zero. A placa T0 foi fixada e lida, determinando assim a quantidade de células presentes no momento em que os extratos foram colocados, enquanto as demais placas foram incubadas por 48 horas nas mesmas condições.



- | | |
|---|---|
| 1 | Branco do meio de cultura (RPMI + SFB) |
| 2 | Branco da suspensão celular (linhagem celular + meio de cultura) |
| 3 | Branco das amostras testadas (extrato ou fração) |
| 4 | Suspensão celular na presença da amostra 1 em 4 concentrações distintas |
| 5 | Suspensão celular na presença da amostra 2 em 4 concentrações distintas |
| 6 | Suspensão celular na presença da amostra 3 em 4 concentrações distintas |
| 7 | Suspensão celular na presença da amostra 4 em 4 concentrações distintas |
| 8 | Suspensão celular na presença da amostra 5 em 4 concentrações distintas |

FIGURA 6 – Distribuição das substâncias na placa de 96 orifícios para a realização do ensaio de atividade antiproliferativa

Após incubação por 48 horas, as placas foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para as células aderidas e 80% para as células em suspensão. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C. Depois desses processos as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio de cultura, soro fetal bovino e metabólitos secundários. As placas foram mantidas à temperatura ambiente até secagem completa.

Em seguida, as placas foram coradas pela adição de 50 µL de sulforrodamina B Sigma® (SRB) a 0,4 % (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1% e incubadas a 4°C, durante 30 minutos (SKEHAN *et al.*, 1990). Após esse período, as placas 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 µM 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 (FIG 7). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e como controle positivo utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina.

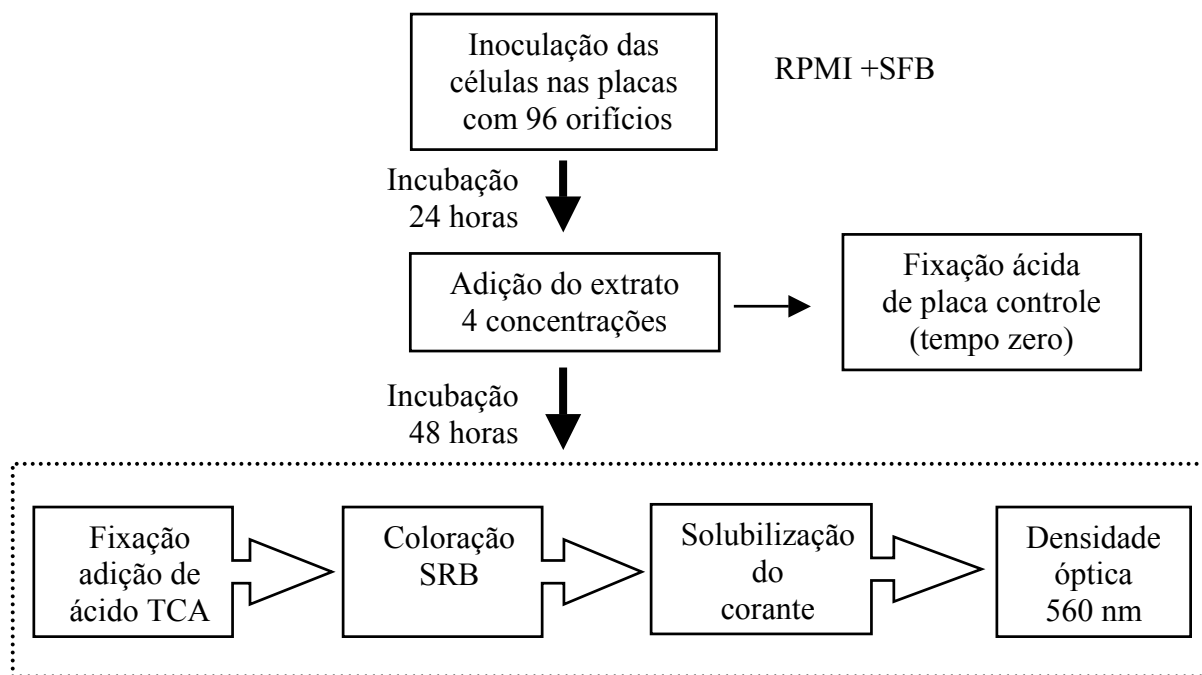


FIGURA 7 – Fluxograma do ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa.

4.3.3– 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.

- Se $T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresenta IC.
- 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 a média da absorbância das células não tratadas e T0 é a média de absorbância do 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 concentração-dependente, maior que 50% e linhagem seletiva, isto é, atividade preferencial para um único tipo de célula neoplásica ou com efeito citostático e/ou citocida bem distintos entre as linhagens celulares.

5. RESULTADOS

5.1 – Avaliação Fitoquímica

5.1.1 – Rendimento dos extratos

Os pesos e os rendimentos dos extratos obtidos das 5 espécies de *Mikania* estão representados na tabela 4.

TABELA 4: Rendimentos dos extratos diclorometânicos e extratos hidroalcóolicos obtidos das diferentes espécies de *Mikania*.

Planta	Rendimento do ED (%)	Rendimento do EHA (%)
<i>M. argyreiae</i> DC	9,9	17,6
<i>M. laevigata</i> (Iguape)	7,2	17,6
<i>M. glomerata</i> (Iguape)	6,6	9,4
<i>M. glomerata</i> (Picinguaba)	9,8	17,8
<i>M. hirsutissima</i> DC	5,3	21,0

5.1.2 – Análise dos extratos por CCD

Os extratos diclorometânicos e hidroalcóolicos obtidos para as diferentes espécies de *Mikania*, foram analisados por CCD em diferentes eluentes e reveladores para permitir a visualização dos componentes da mistura. Na figura 8 está apresentada a placa dos extratos diclorometânicos.



FIGURA 8 - CCD do EDMa, EDMII, EDMgI, EDMh, EDMgP eluída com hexano:acetato de etila 80:20 e revelada com solução de anisaldeído.

A figura 9 representa a placa dos extratos hidroalcólicos eluídos com acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água 100:11:11:27 e revelada com solução NP (difenilboriloxietilamina 1%).

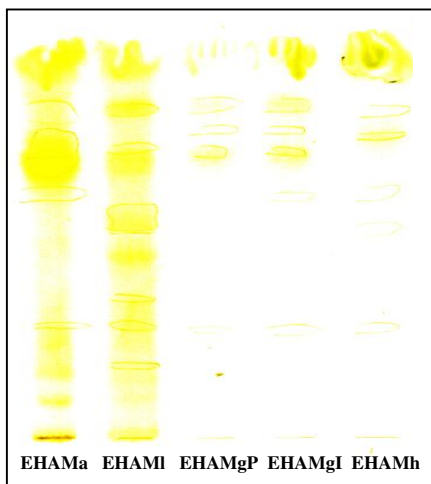


FIGURA 9 - CCD do EHAMa, EHAMI, EHAMgP, EHAMh e EHAMgI eluída com acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água 100:11:11:27 e revelada com solução NP (difenilboriloxietilamina 1%).

Os extratos hidroalcólicos (FIG 9) foram analisados por CCD utilizando eluente e revelador específico para flavonóides, onde verificou-se que a *M. argyreae* e *M. laevigata* de Iguape apresentaram maior concentração de compostos fenólicos.

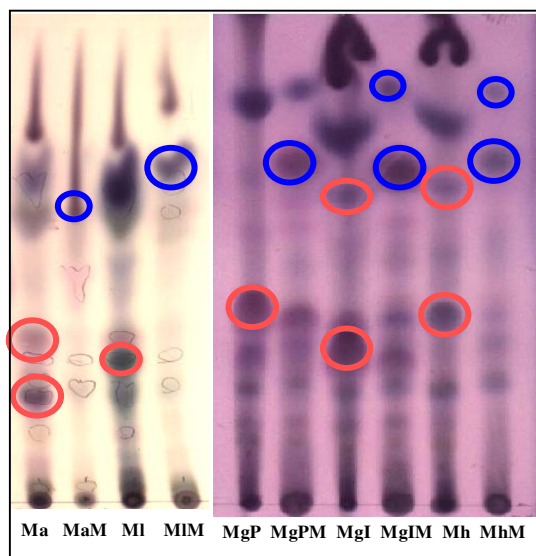


FIGURA 10 - CCD do EDMa, EDMLI, EDMgP, EDMgI e EDMh e suas respectivas alíquotas metiladas EDMaM, EDMIM, EDMgPM, EDMgIM e EDMhM eluída com hexano:acetato de etila 80:20 e revelada com solução de anisaldeído. Grupos ácidos (círculos vermelhos) que tornaram-se ésteres (círculos azuis) pela reação com diazometano.

A presença de ácidos diterpênicos foi confirmada através de reação de metilação com solução de diazometano, onde os grupos ácidos presentes foram transformados em grupos ésteres, diminuindo sua polaridade e alterando seus R_f 's (FIG. 10).

5.1.3 - Análise dos extratos por CG-EM

Os extratos diclorometânicos das espécies em estudo e suas respectivas alíquotas metiladas foram analisados por CG-EM e seus cromatogramas serão apresentados a seguir (FIG 11- 20).

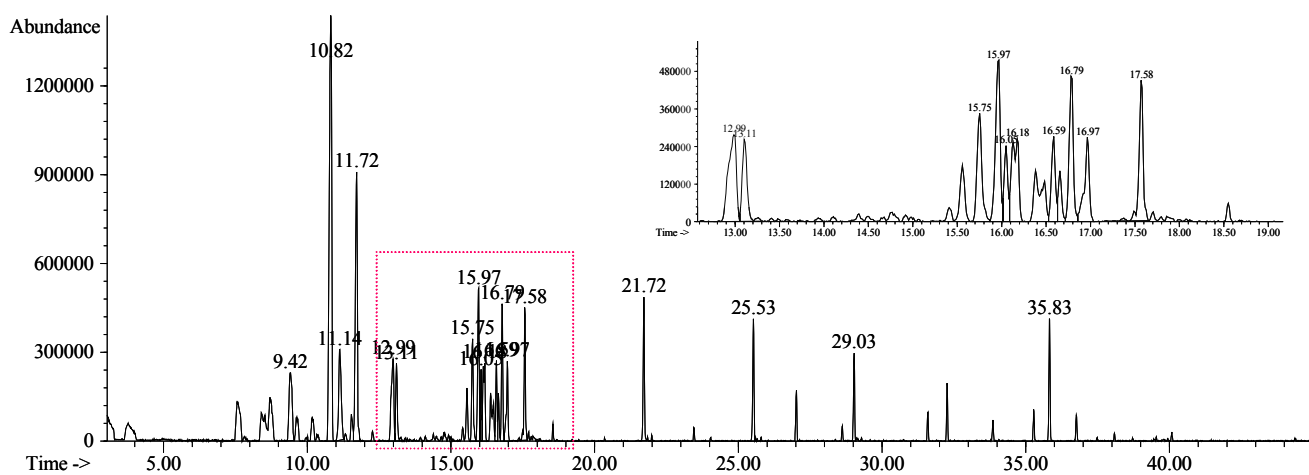


FIGURA 11 - Perfil cromatográfico do EDMa.

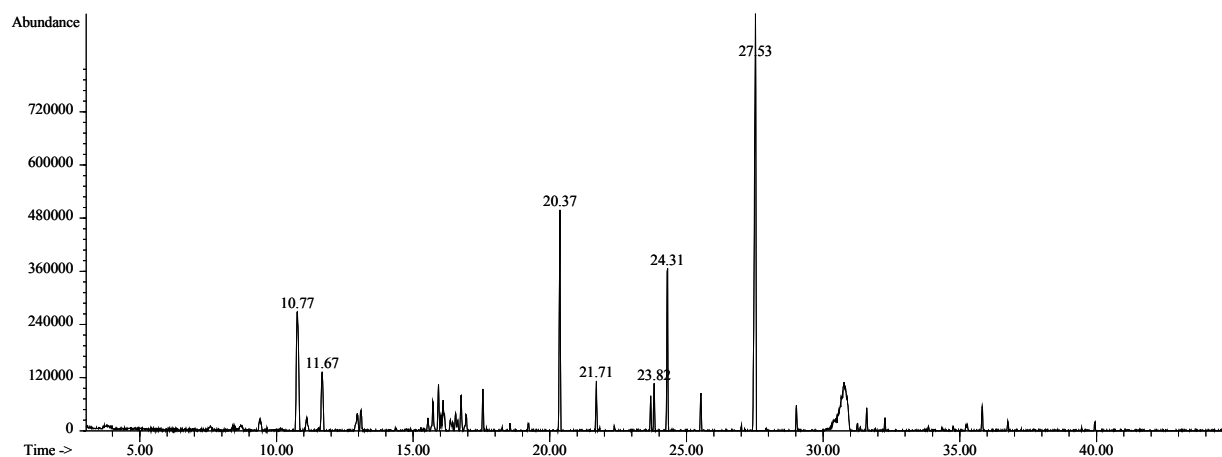


FIGURA 12 - Perfil cromatográfico do EDMaM.

TABELA 5: Principais compostos detectados por CG-EM e identificados pela biblioteca Wiley 138 e padrões de substâncias isoladas, referentes aos EDMa e EDMaM.

Composto	PM	t _R	EDMa	EDMaM
β-Cubebeno	204	10.81	+	+
Biclicogermacreno	204	11.14	+	-
Isômero Nonilfenol	220	15.97	+	-
δ-Cadineno	220	11.72	+	+
Éster metílico do ácido Hexadecanóico	270	20.37	-	+
Éster metílico do ácido Octadecanóico	298	24.31	-	+
Éster metílico do ácido Caurenóico	316	27.53	-	+

Eicosano	410	35.83	+	+
----------	-----	-------	---	---

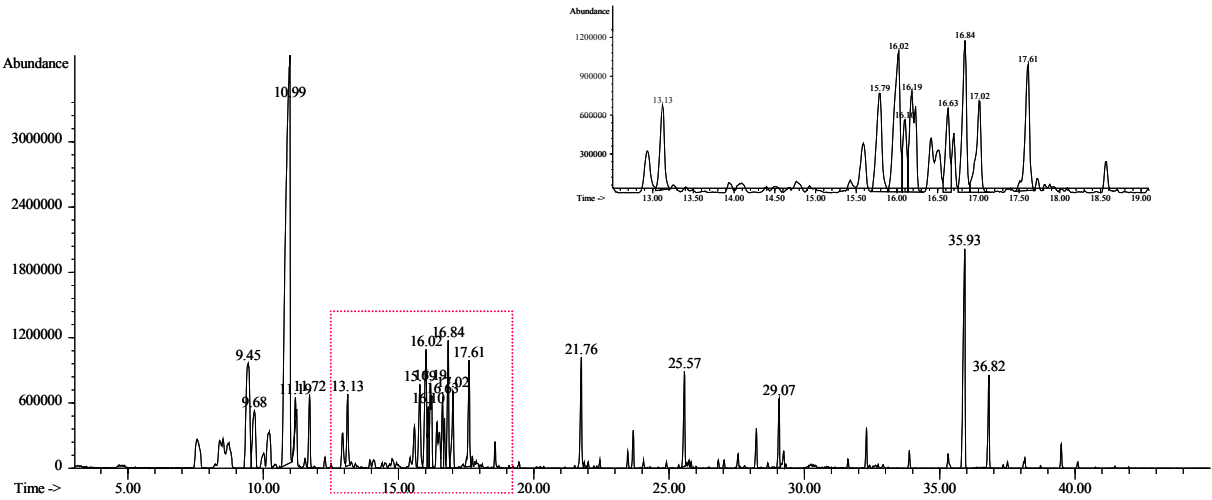


FIGURA 13 - Perfil cromatográfico do EDMII.

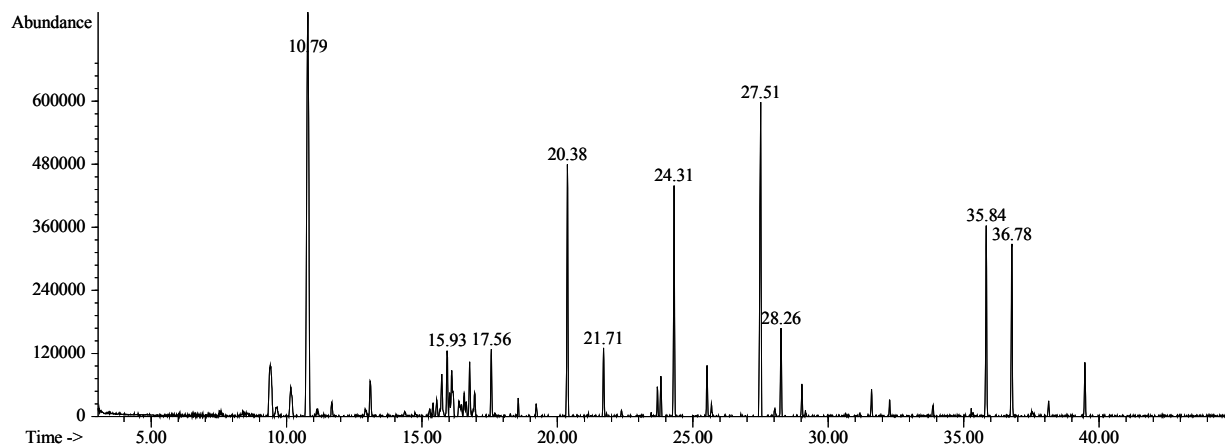


FIGURA 14 - Perfil cromatográfico do EDMIIIM.

TABELA 6: Principais compostos detectados por CG-EM e identificados pela biblioteca Wiley 138 e padrões de substâncias isoladas, referentes aos EDMII e EDMIIIM

Composto	PM	t _R	EDMII	EDMIIIM
β -Cariofileno	204	9.45	+	-
Germacreno-D	204	9.68	+	-
β -Cubebeno	204	10.99	+	+
Biclicogermacreno	204	11.19	+	-
δ -Cadineno	204	11.72	+	-
Nonilfenol	220	16.02	+	-
Isômero Nonilfenol	220	16.19	+	-
3-Eicoseno	280	21.76	+	+
Éster metílico do ácido Hexadecanóico	270	20.38	-	+
Éster metílico do ácido Octadecanóico	298	24.31	-	+
Éster metílico do ácido Caurenóico	316	27.51	-	+
Eicosano	430	35.93	+	+

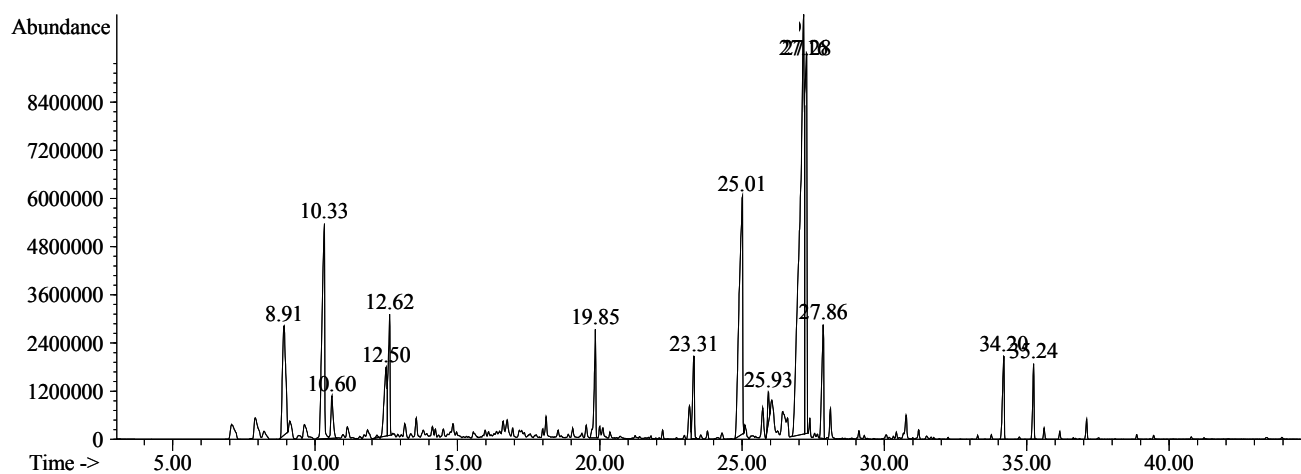
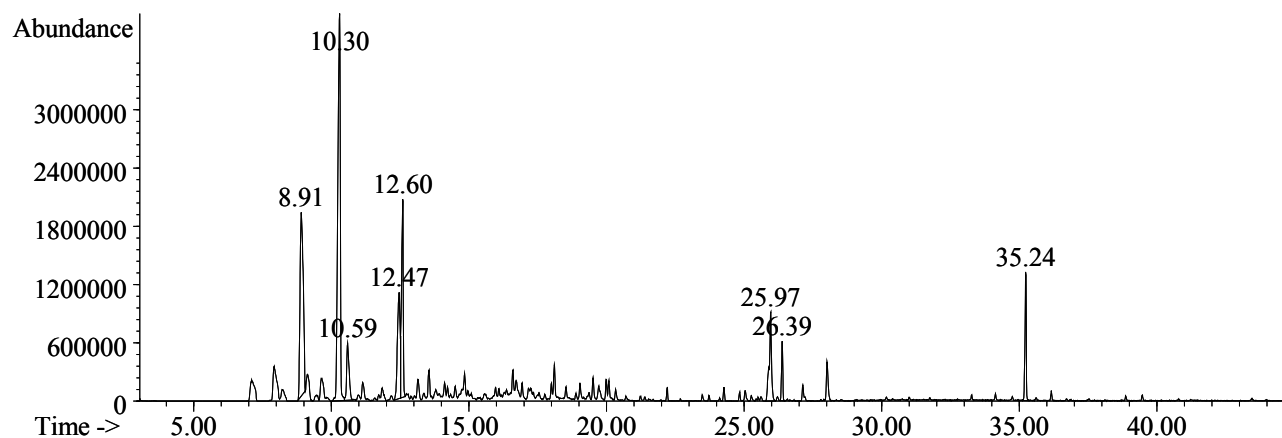


FIGURA 15 - Perfil cromatográfico do EDMgI.

FIGURA 16 - Perfil cromatográfico do EDMgIM.

TABELA 7: Principais compostos detectados por CG-EM e identificados pela biblioteca Wiley 138 e padrões de substâncias isoladas, referentes aos EDMgI e EDMgIM.

Composto	PM	t _R	EDMgI	EDMgIM
β-Cariofileno	204	8.91	+	+
β-Cubebeno	204	9.13	+	+
α-Humuleno	204	9.65	+	+
Germacreno-D	204	10.30	+	+
Biciclogermacreno	204	10.59	+	+
Espatulanol	220	12.47	+	+
Éster do ácido Hexadecanóico	270	19.84	-	+
Éster do ácido 10,13-Octadecadienóico	294	23.14	-	+
Éster metílico do ácido cupressênico	316	25.01	-	+
Caurenol	288	25.97	+	-
Éster metílico diterpênico	316	27.17	-	+
Éster metílico do ácido caurenóico	316	27.26	-	+
Éster metílico do ácido grandiflórico	332	30.76	-	+
Eicosano	410	35.24	+	+

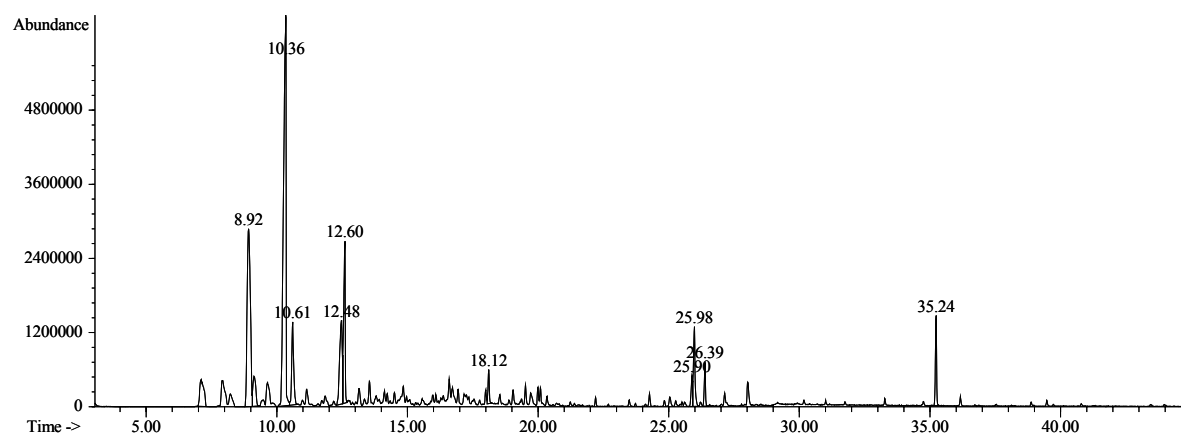


FIGURA 17 - Perfil cromatográfico do EDMgP.

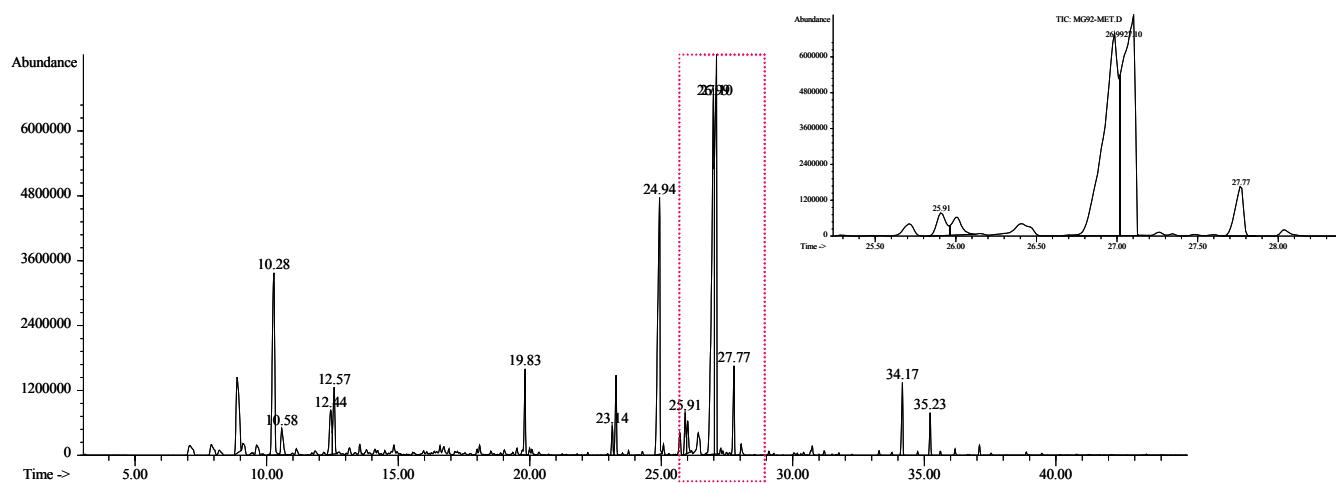


FIGURA 18 - Perfil cromatográfico do EDMgPM.

TABELA 8: Principais compostos detectados por CG-EM e identificados pela biblioteca Wiley 138 e padrões de substâncias isoladas, referentes aos EDMgP e EDMgPM.

Composto	PM	t _R	EDMgP	EDMgPM
α -Terpineno	204	7.10	+	-
α -Cubebeno	204	7.92	+	-
β -Cariofileno	204	8.92	+	+
Germacreno D	204	10.36	+	+

Espatulanol	220	12.48	+	+
Ester metílico do ácido Hexadecanóico	270	19.83	-	+
Ester metílico do ácido 9,12 -Octadecadienóico	294	23.14	-	+
Éster metílico do ácido 9,12,15, Octadecatrienóico	292	23.28	-	+
Éster metílico do ácido cupressênico	316	24.94	-	+
Caurenol	288	25.98	+	-
Éster metílico diterpênico	316	26.99	-	+
Éster metílico do ácido caurenóico	316	27.10	-	+
Eicosano	410	35.24	+	+

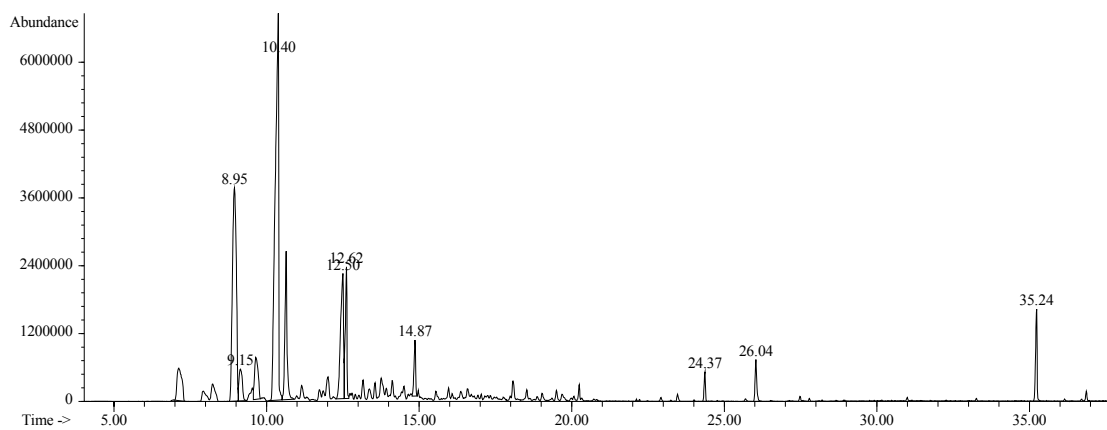


FIGURA 19 - Perfil cromatográfico do EDMh.

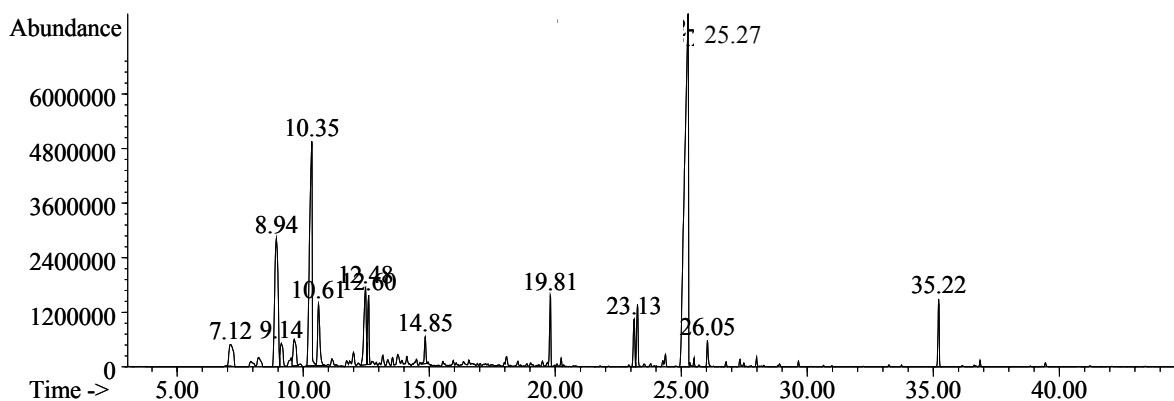


FIGURA 20 - Perfil cromatográfico do EDMhM.

TABELA 9: Principais compostos detectados por CG-EM e identificados pela biblioteca Wiley 138 e padrões de substâncias isoladas, referentes aos EDMh e EDMhM.

Composto	PM	t _R	EDMh	EDMhM
β -Cariofileno	204	8.95	+	+
α -humuleno	204	9.64	+	-
Germacreno D	204	10.40	+	+
Biciclogermacreno	204	10.64	+	-
δ -Cadineno	204	11.15	+	-
Espatuleno	220	12.50	+	+
Ester metílico do ácido Hexadecanóico	270	19.81	-	+
Ester metílico do ácido 9,12 -Octadecadienóico	294	23.13	-	+
Éster metílico do ácido 9,12,15, Octadecatrienóico	292	23.27	-	+
Éster metílico do ácido diterpênico	316	25.27	-	+

Eicosano	410	35.24	+	+
----------	-----	-------	---	---

TABELA 10: Principais compostos detectados por CG-EM e identificados pela biblioteca Wiley 138 e padrões de substâncias isoladas, referentes aos extratos diclorometânicos não metilados de *M. argyreiae*, *M. laevigata* (Iguape), *M. glomerata* (Iguape), *M. glomerata* (Picinguaba) e *M. hirsutissima*.

Composto	EDMa	EDMII	EDMgI	EDMgP	EDM
â-Terpineno	-	-	-	+	-
â-Cubebeno	-	-	-	+	-
â-Cariofileno	-	+	+	+	+
â-Cubebeno	+	+	+	-	-
â-Humuleno	-	-	+	-	+
Germacreno-D	-	+	+	+	+
Biciclogermacreno	+	+	+	-	+
Isômero Nonilfenol	+	+	-	-	-
ã-Cadineno	+	+	-	-	+
Espatulanol	-	-	+	+	+
Éster metílico do ácido Hexadecanóico	+	+	+	+	+

5.1.4 – Purificação e Isolamento do ácido diterpênico

Através dos resultados das análises por CCD e CG-EM do extrato diclorometânico da *M. hirsutissima* observou-se a presença de um ácido diterpênico com características diferentes dos ácidos detectados nas outras espécies de *Mikania*. Esse ácido foi purificado por processos cromatográficos a partir do extrato etanólico (FIG.21-23) e depois de isolado foi comparado com padrões de ácidos diterpênicos conhecidos isolados de *M.laevigata* e *M. glomerata* (FIG.24).

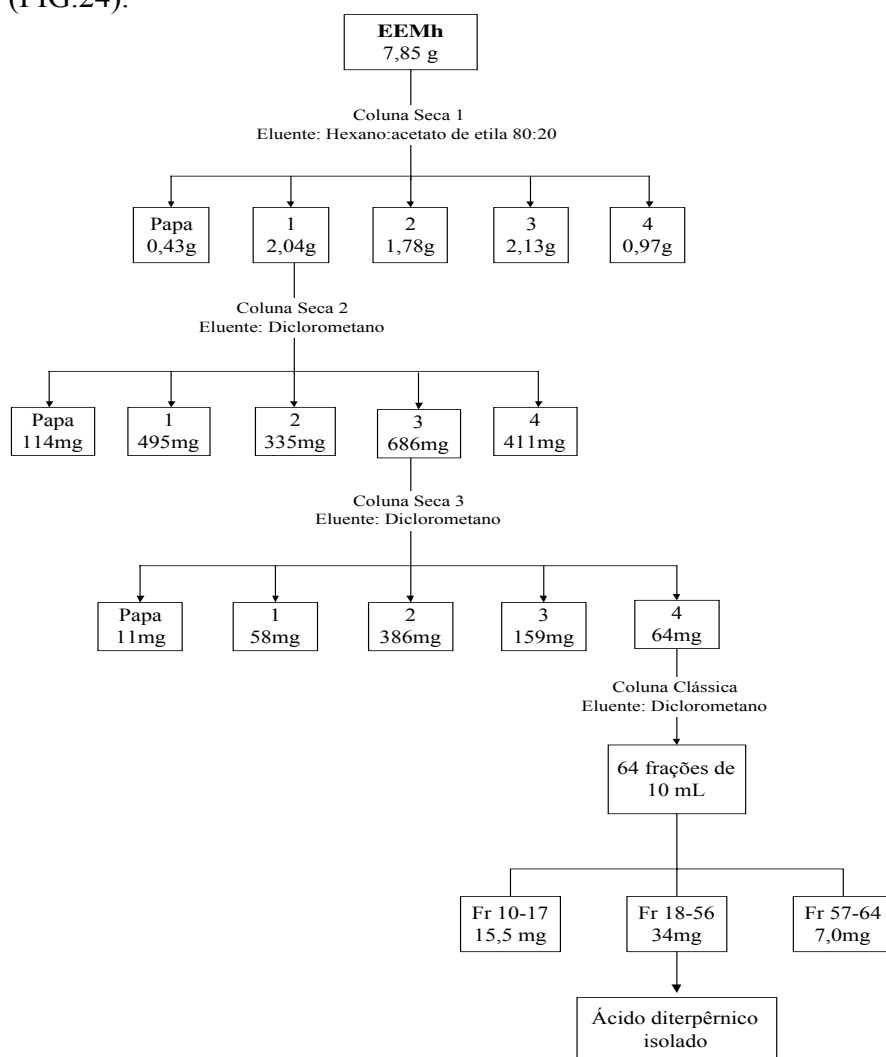


FIGURA 21 – Fluxograma das etapas de purificação do ácido diterpênico a partir do EEMh.

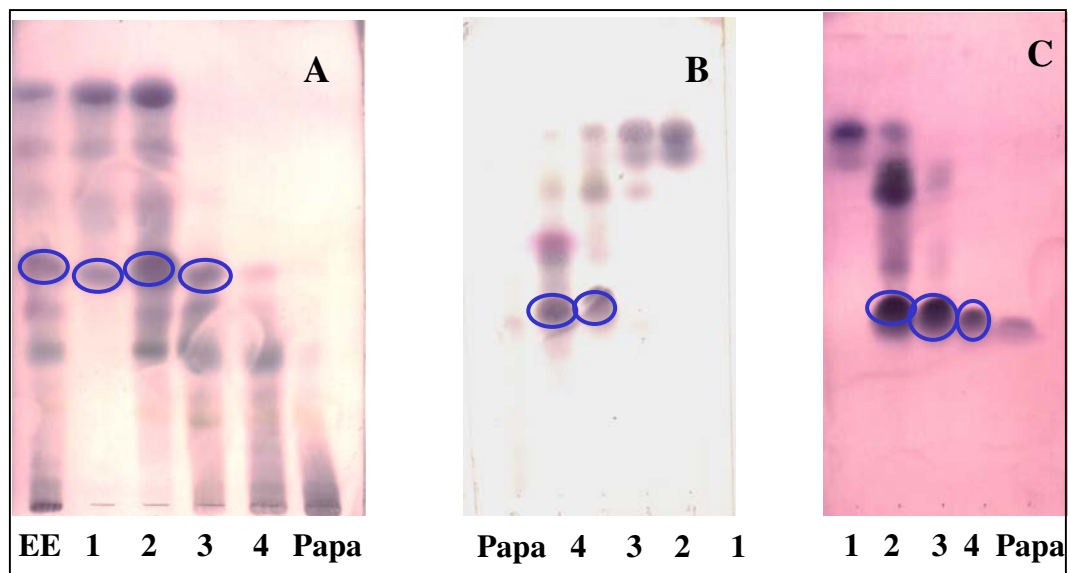
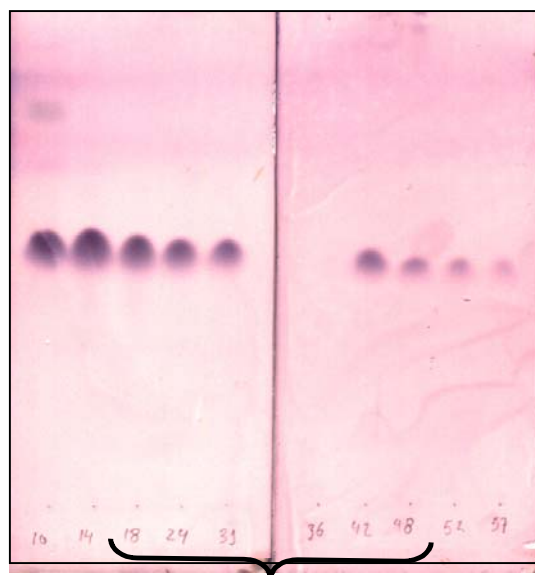


FIGURA 22 – CCD da CS1 (A), CS2 (B) e CS3 (C) utilizada no processo de purificação e isolamento do ácido diterpênico.



Fr 18-56

FIGURA 23 – CCD das frações da Coluna Clássica utilizada no processo de purificação e isolamento do ácido diterpênico.



FIGURA 24 – CCD da comparação entre o EDMh, ácido diterpênico isolado da *M. hirsutissima* (ác. Pim), ácido caurenóico (ác. caur) e ácido cupressênico (ác. cupres). Placa impregnada com solução de AgNO_3 1%, eluída com hexano:acetato de etila 80:20 e revelada com solução de anisaldeído.

Na comparação, por CCD, do ácido diterpênico isolado com padrões dos ácidos caurenóico e cupressênico (FIG. 24) observou-se que a mancha do ácido isolado é cinza-azulada e as manchas dos padrões são em tons de rosa.

5.1.5 - Identificação do ácido diterpênico isolado

As figuras 25 e 26 representam o cromatograma do composto isolado e o espectro de massas do ácido diterpênico metilado, respectivamente.

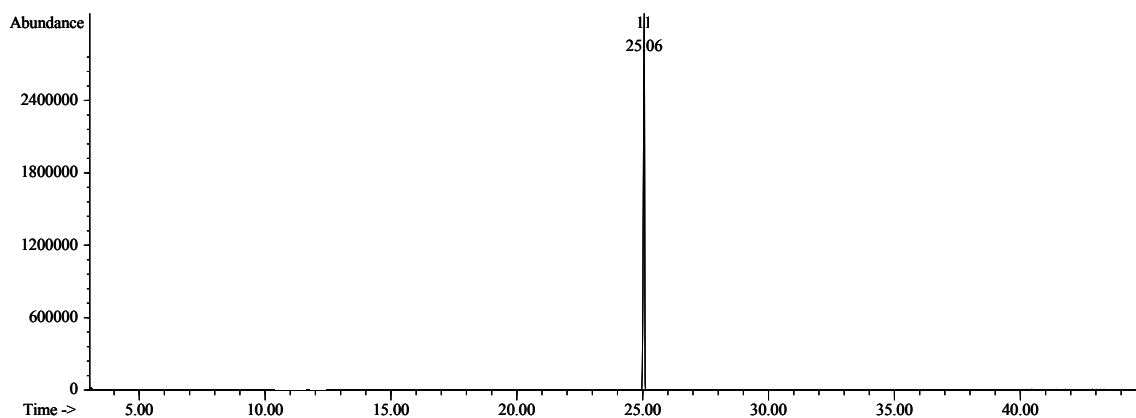


FIGURA 25 - Perfil cromatográfico do composto isolado metilado da *M hirsutissima*.

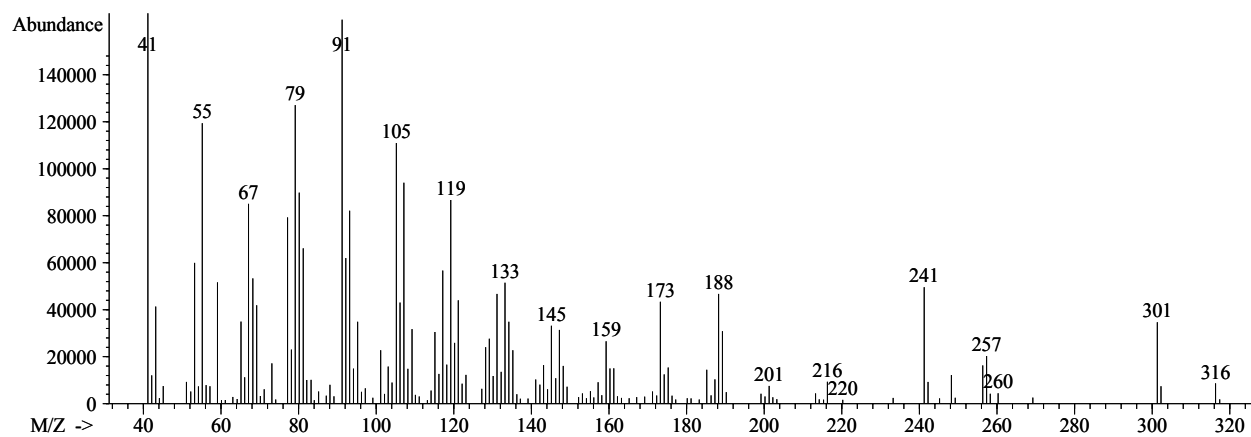


FIGURA 26 – Espectro de massas do éster metílico do ácido diterpênico isolado ($t_R = 25.06$ min) de *M. hirsutissima*.

Nas figuras 27 e 28 estão apresentados os espectros de massas dos ésteres metílicos do ácido caurenóico e cupressênico isolados de *M. laevigata* (Campinas).

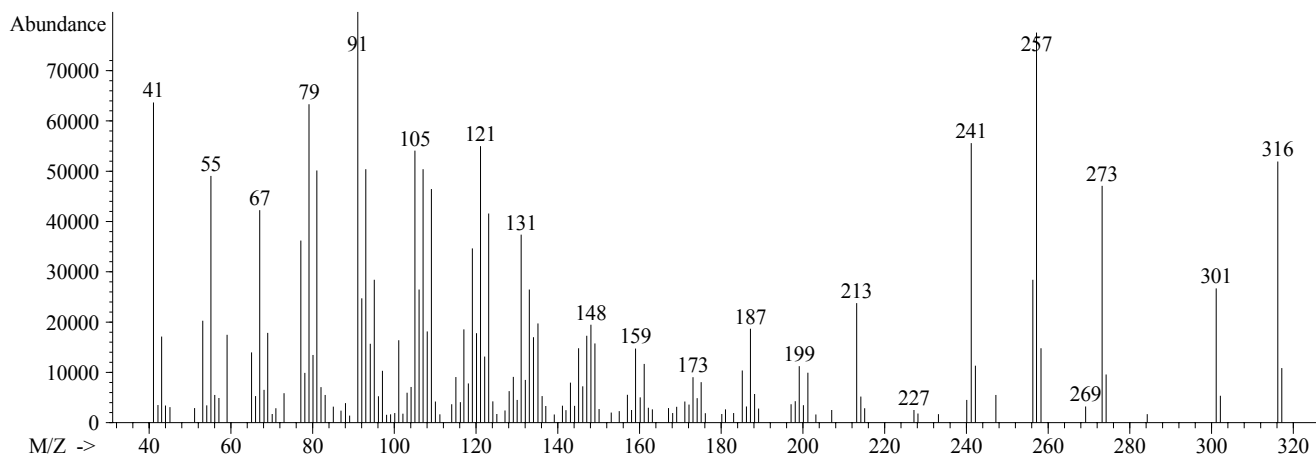


FIGURA 27 – Espectro de massas do éster metílico do ácido caurenóico ($t_R = 31.34\text{min}$) isolados anteriormente de *M. laevigata* (Campinas).

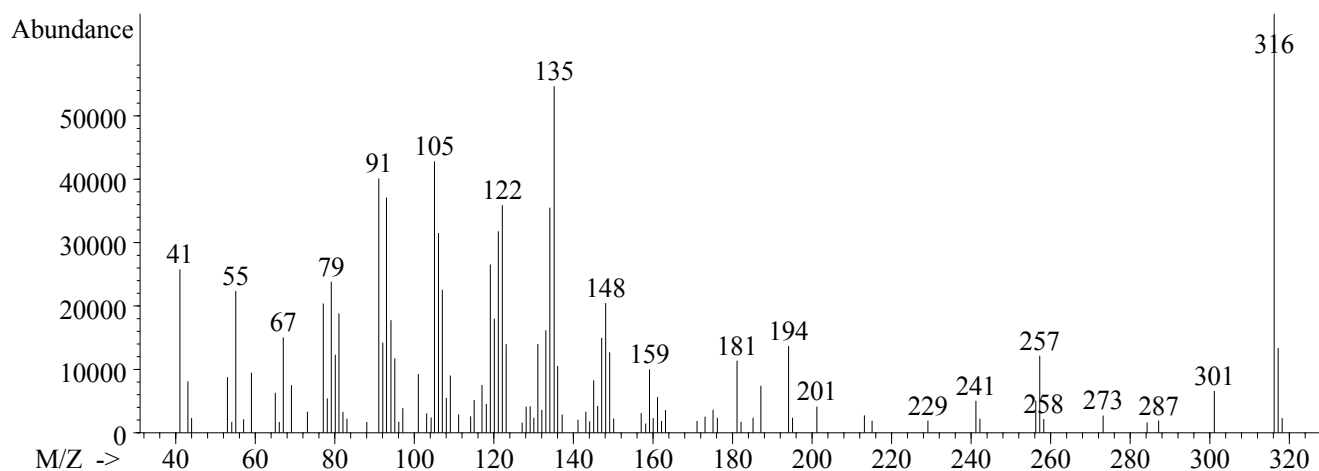


FIGURA 28 – Espectro de massas do éster metílico do ácido cupressênico ($t_R = 29.20\text{min}$) isolados anteriormente de *M. laevigata* (Campinas).

Na comparação entre os espectros de massas do éster metílico do ácido diterpênico isolado (FIG. 26) e dos padrões dos ésteres metílicos dos ácidos caurenóico e cupressênico (FIG. 27 e 28) foi possível verificar diferenças entre as fragmentações observadas para cada composto.

Para a determinação da estrutura desse ácido foram analisados os espectros de RMN¹H e RMN¹³C (apresentados no anexo II) comparando os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos¹³ com dados descritos na literatura para diferentes ácidos diterpênicos (KNUDSEN, 1986; CONCEIÇÃO, 1982; CONNOLLY, 1991), a partir dos quais foi possível identificar esse ácido como sendo o ácido pimaridiênico, isolado de *M. triangularis* (KNUDSEN, 1986) e que possui a seguinte estrutura molecular.

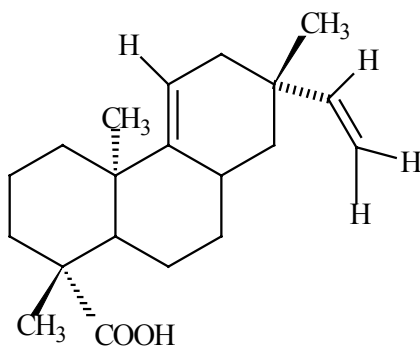


FIGURA 29 - Estrutura molecular proposta para o ácido diterpênico isolado.

5.2 – Avaliação Farmacológica

A atividade antiproliferativa das espécies estudadas foi avaliada utilizando extratos hidroalcoólicos e diclorometânicos e com frações resultantes de coluna seca dos extratos diclorometânicos. O controle positivo foi o quimioterápico doxorrubicina (GRAF. 1).

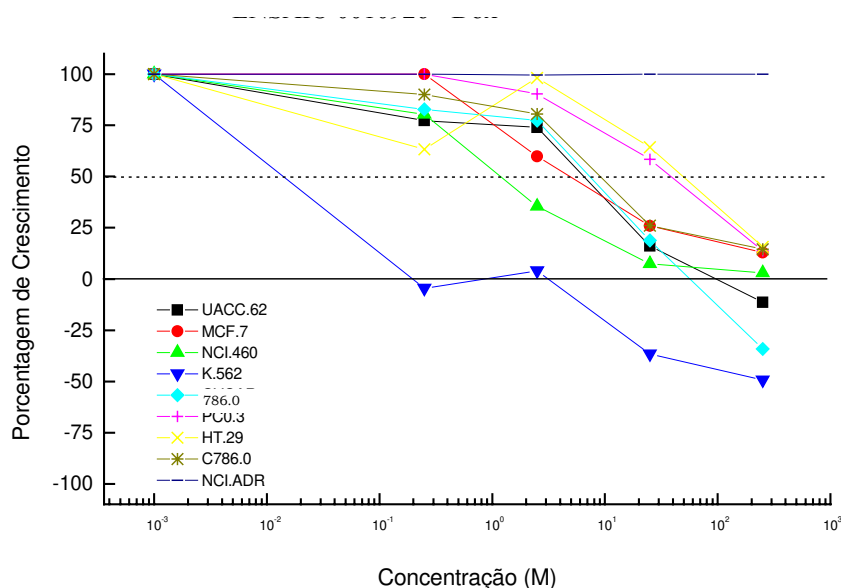


GRÁFICO 1 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da doxorrubicina sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

Os resultados referentes aos EHAMh, EDMh, frações diclorometânicas e ácido pimarediênico isolado da *M. hirsutissima* estão relacionados a seguir (GRAF. 2-7). Também estão apresentados os gráficos referentes ao EDMgI e suas frações (GRAF. 8-11) e as frações 1 e 2 do EDMgP (GRAF. 12 e 13), que apresentaram melhores resultados. Os gráficos obtidos para os demais extratos e frações das plantas avaliadas estão relacionados no anexo I (GRAF. 21-34).

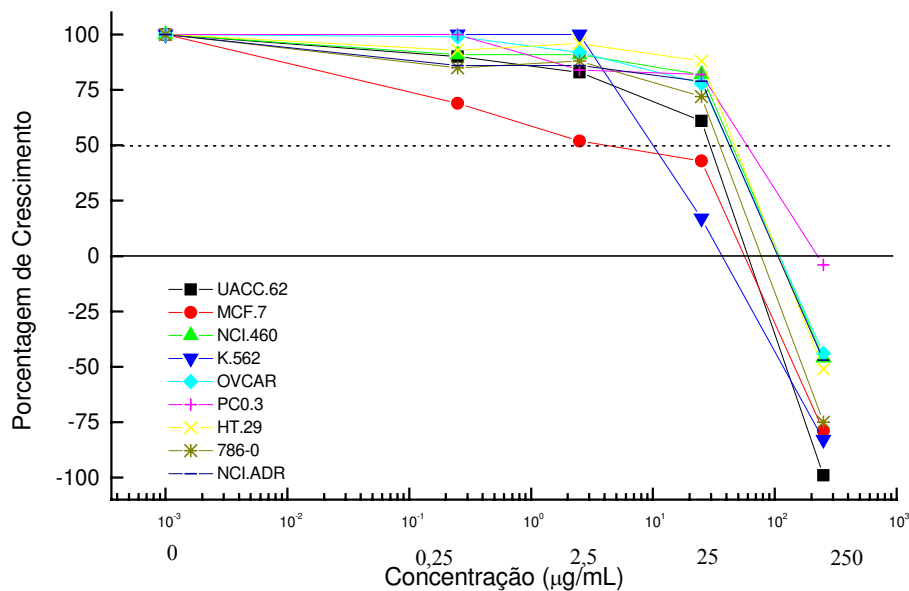


GRÁFICO 2 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do EHAmh sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

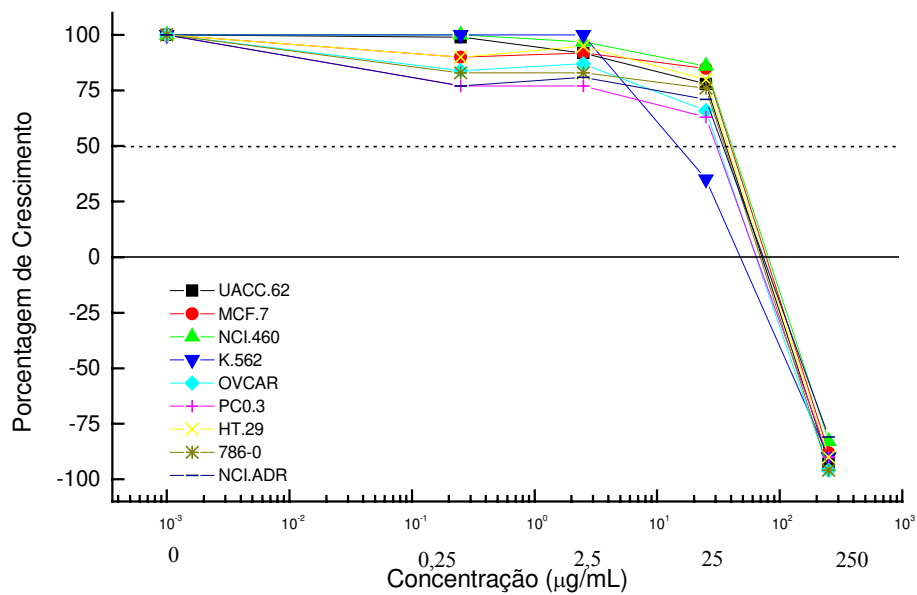


GRÁFICO 3 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do EDMh sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

O EHAMh (GRAF. 2) e EDMh (GRAF. 3) apresentaram atividade somente na maior concentração testada, tendo efeito citocida para todas as linhagens celulares avaliadas, e apesar de apresentarem perfis de atividade semelhantes, o ED foi fracionado pois sabia-se que esse extrato era rico em compostos terpênicos.

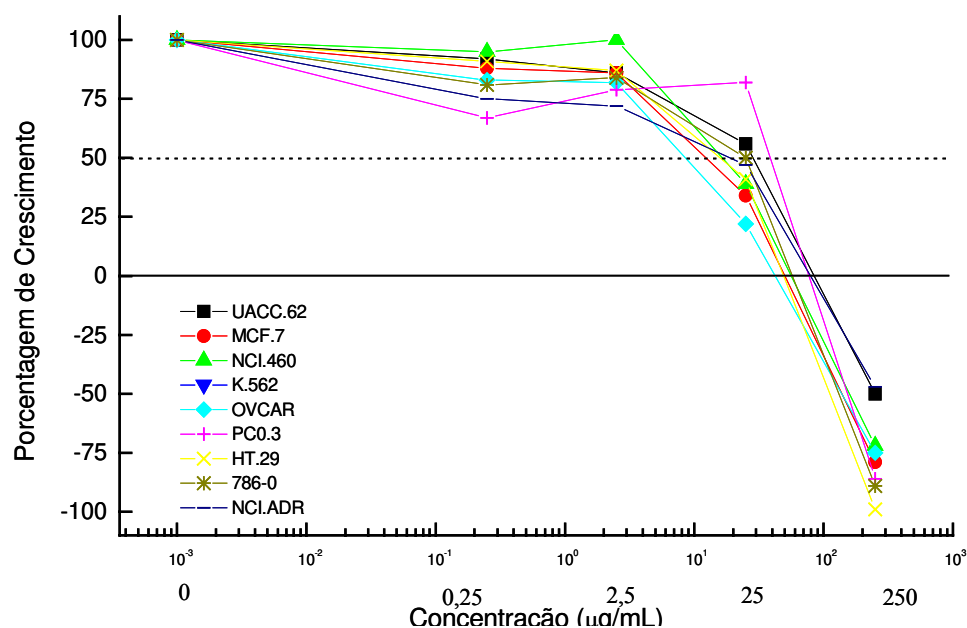


GRÁFICO 4 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 1 do EDMh sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

A fração 1 apresentou efeito citostático para as linhagens OVCAR, MCF-7, NCI-460, HT-29 e UACC-62 na concentração de 25 µg/mL e efeito citocida para todas as linhagens em 250 µg/mL (GRAF. 4).

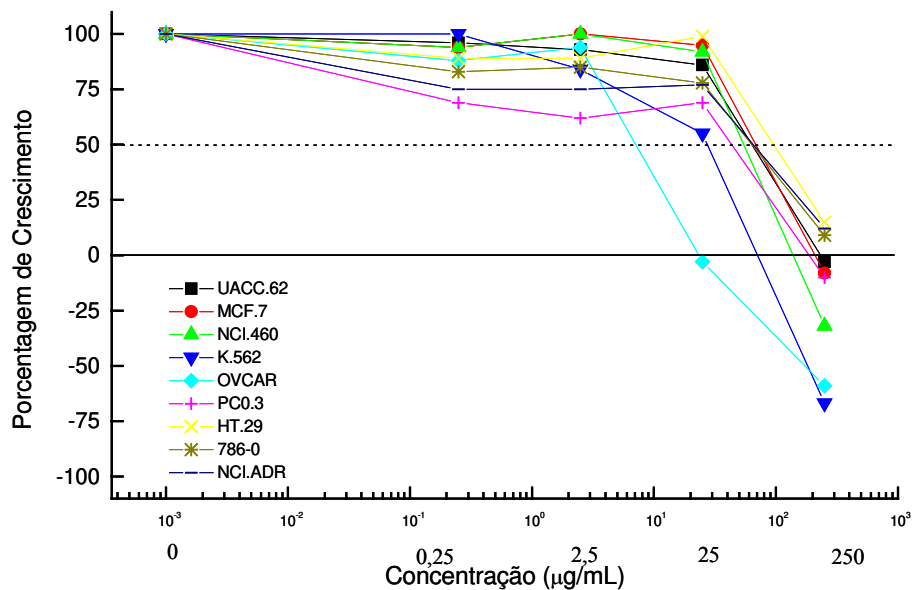


GRÁFICO 5 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 2 do EDMh sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

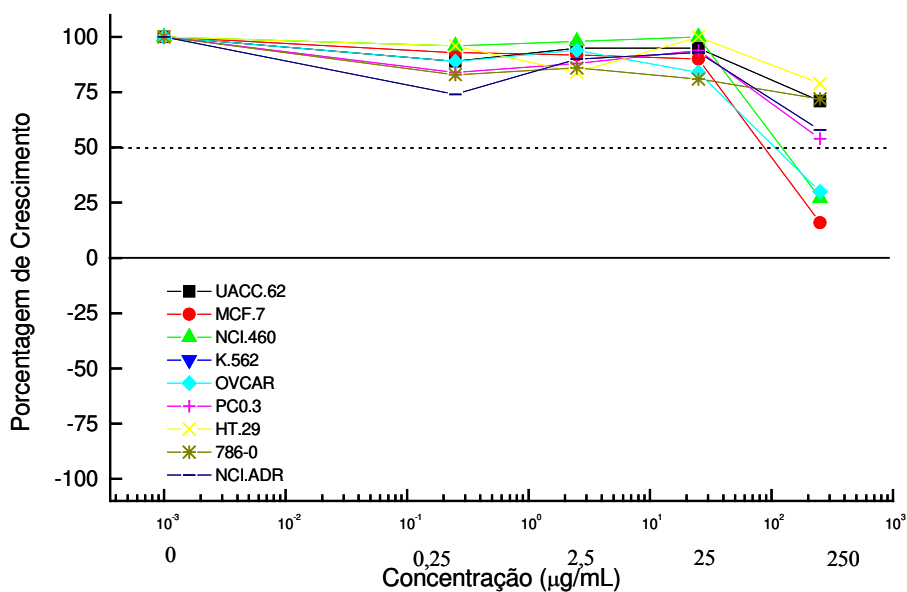


GRÁFICO 6 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 3 do EDMh sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

A fração 2 (GRAF. 5) apresentou menor potência em relação ao extrato bruto e a fração 1 e demonstrou seletividade para OVCAR (citocida a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$). A Fração 3 foi inativa para a maioria das linhagens tendo efeito citostático para MCF-7, OVCAR e NCI-460 somente na maior concentração (GRAF. 6).

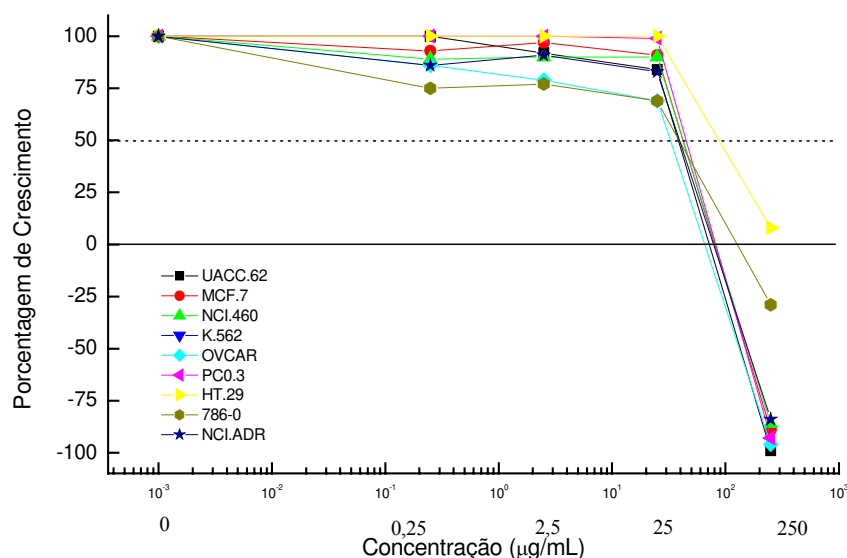


GRÁFICO 7 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do ácido pimaridiênico isolado do EEMh sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

O ácido pimaridiênico isolado apresentou ação antiproliferativa apenas na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, sendo citostática para HT-29 e citocida para as demais linhagens (GRAF. 7).

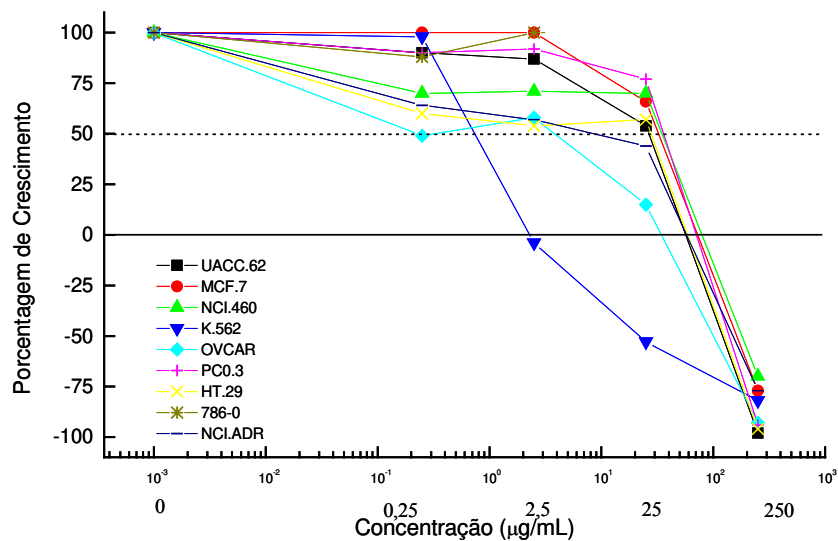


GRÁFICO 8 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do EDMgI sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

Os ensaios com *M. glomerata* Iguape revelaram que o EDMgI apresentou seletividade para K-562 (citocida a partir de 2,5 µg/mL), efeito citostático para OVCAR e NCI-ADR na concentração de 25 µg/mL, e para as demais linhagens teve atividade somente na maior concentração testada (GRAF. 8).

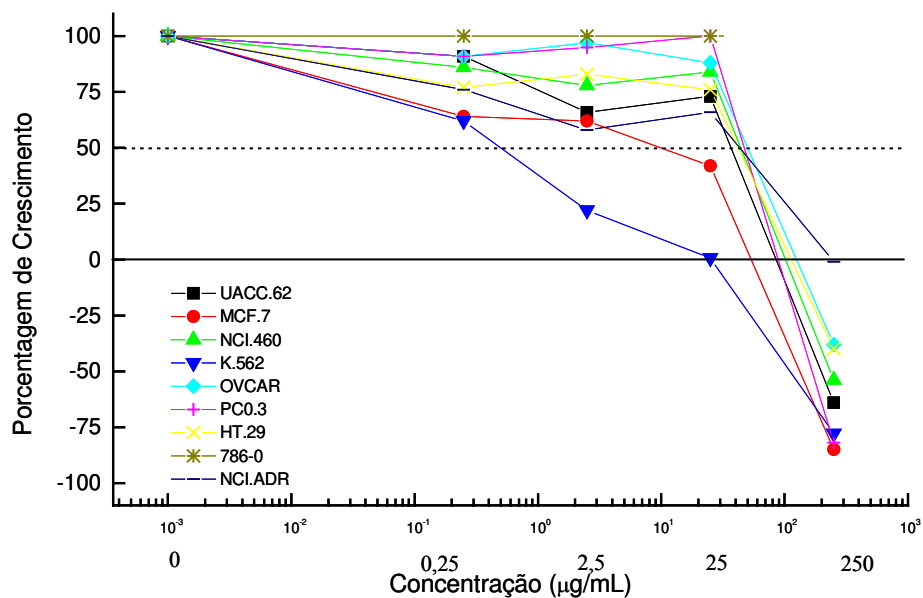


GRÁFICO 9 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 1 do EDMgI sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

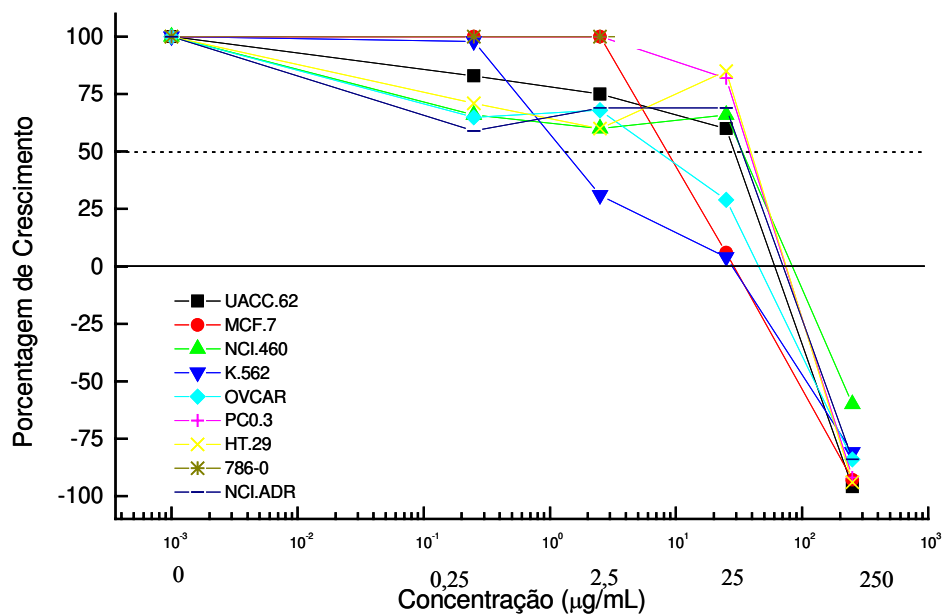


GRÁFICO 10 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 2 do EDMgI sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

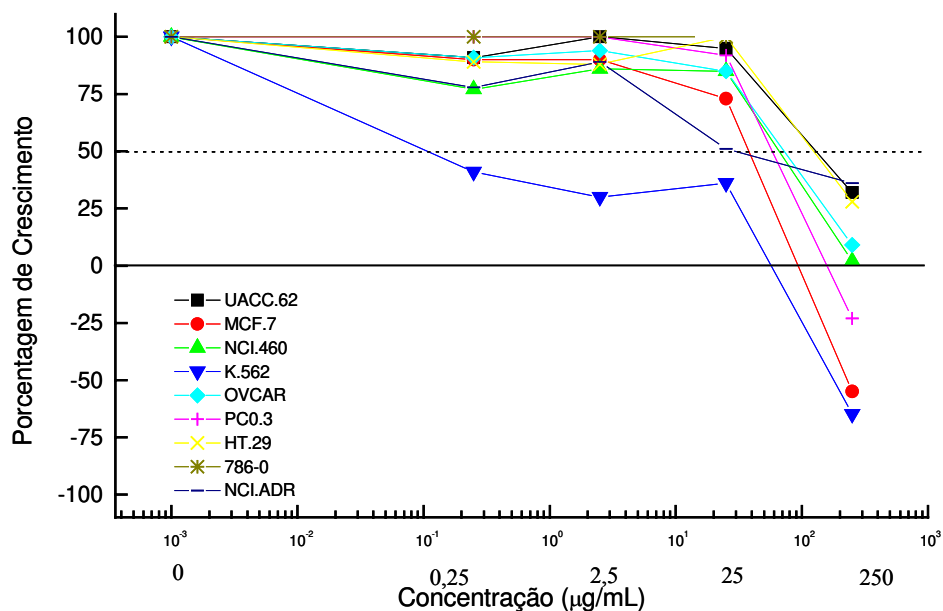


GRÁFICO 11 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 3 do EDMgI sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

A fração 1 do EDMgI demonstrou seletividade e atividade concentração-dependente para K-562 (citostática a partir de 2,5 µg/mL) e MCF-7 (citostática a partir de 25 µg/mL), e para todas as linhagens foi ativo apenas concentração de 250 µg/mL (GRAF. 9). A fração 2 apresentou comportamento similar a fração 1, diferenciando a atividade da linhagem OVCAR, que apresentou efeito citostático a partir de 25 µg/mL (GRAF.10). A fração 3 também foi seletividade para K-562 sendo citostática a partir de 0,25 µg/mL e para as demais linhagens atividade somente na maior concentração testada (GRAF. 11).

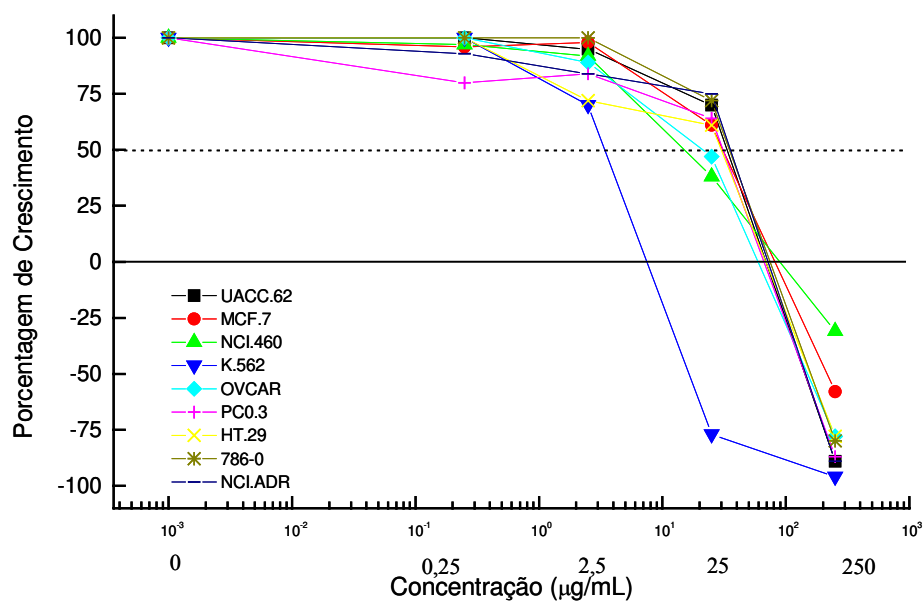


GRÁFICO 12 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 1 do EDMgP sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

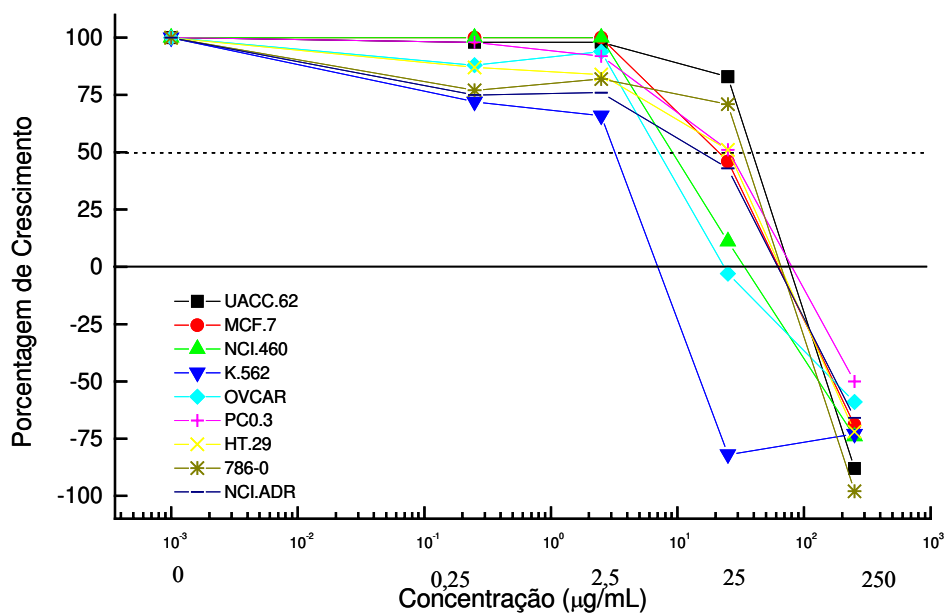


GRÁFICO 13 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 2 do EDMgP sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

As frações 1 e 2 resultante do ED da *M. glomerata* de Picinguaba destacaram-se por apresentar seletividade para K-562, sendo 10 vezes mais potente para esta em relação às demais linhagens, que apresentaram efeito citocida somente na concentração de 250 µg/mL (GRAF. 12 e 13).

6. DISCUSSÃO

6.1 – Fitoquímica

Através do estudo fitoquímico foi possível realizar um *screening* entre as diferentes espécies de *Mikania*, através de análises por CCD e CG-EM em busca de novos compostos.

A avaliação cromatográfica por CCD dos extratos diclorometânicos das diferentes espécies de *Mikania* (FIG. 8) demonstrou que as espécies são ricas em compostos terpênicos, caracterizado pela coloração de rosa a azul. As principais diferenças foram observadas para *M. hirsutissima* que apresentou uma substância de coloração azulada ausente nas demais.

Sabendo-se que as compostos terpênicos estavam enriquecidos nos ED, estes foram fracionados através de coluna seca (FIG. 5), com exceção de EDMII, proporcionando separação das substâncias em ordem de polaridade, fr 1 → mais polar, fr 2 e 3 → média polaridade e fr 4 → menos polar. Essas frações foram submetidas a ensaios para avaliação da atividade antiproliferativa.

Os extratos diclorometânicos e suas alíquotas metiladas foram analisados por CG-EM para identificação dos constituintes químicos. A reação de metilação é um processo de derivatização de radicais de ácidos carboxílicos à ésteres metílicos que tornam os compostos mais voláteis facilitando a detecção.

As análises por CG-EM foram qualitativas, e permitiram a identificação dos compostos através da análise dos espectros de massas obtidos que foram comparados com os espectros de massas da biblioteca Wiley (presente no equipamento utilizado) e com padrões de substâncias isoladas.

Os cromatogramas revelaram praticamente a mesma composição química entre as espécies estudadas, com algumas diferenças na intensidade entre os picos de mesmo tempo de retenção (FIG. 11, 13, 15, 17 e 19). Os dois acessos de *M. glomerata* estudadas (Iguape e Picinguaba), demonstraram que apesar das diferenças na anatomia de suas folhas e de pertencerem a localidades distintas, as variações químicas são muito pequenas.

As substâncias comuns em todas espécies estudadas foram, principalmente, β -Cubebeno, Germacreno-D e Eicosano (TAB. 5, 6, 7, 8 e 9). Os cromatogramas das amostras metiladas (FIG. 12, 14, 16, 18 e 20) revelaram a presença de ésteres metílicos de ácidos de cadeia longa ($t_R = 19,0$ a $25,0$ min) e ésteres metílicos de ácidos diterpênicos ($t_R = 25,0$ a $28,0$ min).

Dentre as diferentes espécies, a *Mikania hirsutissima* foi selecionada para estudos mais profundos pois apresentou um composto com $t_R = 25.06$ min e $PM = 316$, ausente nas outras espécies. Outro motivo para o isolamento desse novo ácido diterpênico deve-se à realização de ensaios *in vitro* de atividade antiproliferativa com os ácidos caurenóico e cupressênico onde se verificou que esses ácidos apresentaram perfil concentração-dependente e efeito citocida na concentração de $25 \mu\text{g/mL}$ para 5 linhagens células neoplásicas humanas (GRAF. 14 e 15).

As análises dos espectros de RMN¹H e RMN¹³C evidenciaram que o ácido diterpênico isolado pertence à classe dos pimaridianos e não dos cauranos como os ácidos caurenóico e cupressênico. Este ácido foi identificado como sendo o ácido pimaridiênico, que é descrito para a *M.triangularis* (KNUDSEN, 1986) e inédito para a *M. hirsutissima*.

6.2 – Ensaios de atividade antiproliferativa

O gráfico concentração-resposta é uma das formas onde melhor se visualiza a atividade antiproliferativa das amostras testadas. Com esse tipo de gráfico é possível verificar se a substância em questão possui efeito citostático (acima do ponto zero e abaixo de 50%), efeito citocida (abaixo do ponto zero) e/ou perfil concentração-dependente. O ponto zero do eixo das ordenadas representa a placa controle inicial (T_0), valor que é comparado com a média da absorbância do controle final (T) que representa 100% de crescimento celular (após 48 horas de incubação e na ausência das amostras testadas).

Foram avaliados os perfis de sensibilidade das linhagens celulares aos extratos hidroalcóolicos e diclorometânicos, frações diclorometânicas e ao ácido pimaridiênico isolado da *M. hirsutissima*.

Verificou-se que o ácido pimaridiênico apresentou perfil de inibição celular diferente dos ácidos caurenóico e cupressênico testados anteriormente (vide anexo I), o que pode ser explicado pela diferença estrutural entre esses compostos, a qual confere atividade concentração-dependente aos ácidos caurenóico e cupressênico. Na figura 30 é possível

verificar diferenças presentes na estrutura molecular dos ácidos que podem estar associadas aos diferentes perfis de atividade antiproliferativa.

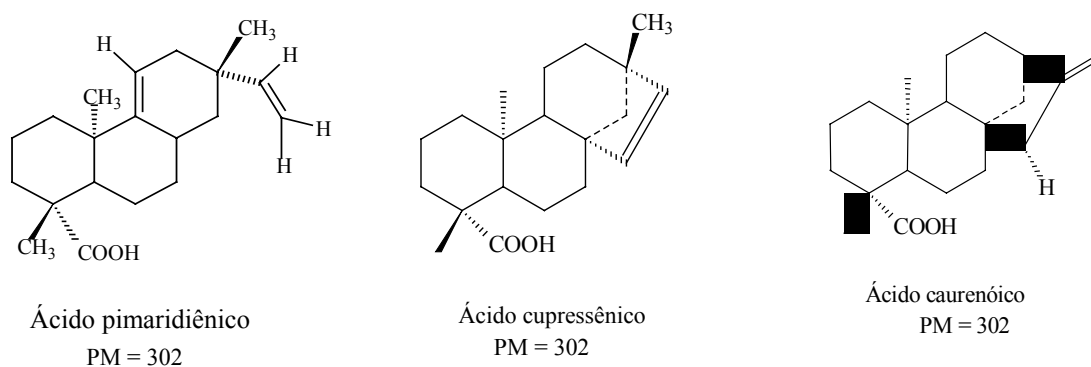


FIGURA 30 – Estruturas moleculares dos ácidos diterpênicos pimaridiênico, cupressênico e caurenóico.

A seletividade para a linhagem K-562 das *M. glomerata* (Iguape e Picinguaba) provavelmente está relacionado com a presença de ácido caurenóico, ácido cupressênico e espatulenol, que em testes anteriores apresentaram bons resultados.

7. CONCLUSÃO

Nesse projeto foi realizado um *screening* entre diferentes espécies de *Mikania* (*M. argyreiae*, *M. laevigata* de Iguape, *M. glomerata* de Iguape e de Picinguaba e *M. hirsutissima*) na busca de novas substâncias com atividade antiproliferativa, além de avaliar a constituição química de cada espécie.

No estudo fitoquímico verificou-se que:

- As análises dos cromatogramas e espectros de massas revelaram que existem diferenças na composição química entre as 4 espécies estudadas, e grande semelhança entre os dois acessos da *M. glomerata* variando apenas, os teores dos constituintes.
- Todas as espécies avaliadas apresentaram ácidos diterpênicos, ácidos de cadeia longa, eicosano e sesquiterpenos.
- A *M. hirsutissima* destacou-se por possuir um ácido diterpênico não descrito na literatura para esta espécie e ausente nas outras espécies estudadas, que foi identificado como o ácido pimaridiênico.

A avaliação da atividade antiproliferativa das espécies estudada demonstrou:

- Os extratos de *M. glomerata* (Iguape e Picinguaba) apresentaram atividade antiproliferativa distintas entre si, evidenciando a importância de um controle de

qualidade quanto ao teor dos constituintes químicos em plantas coletadas em locais diferentes.

- A *M. hirsutissima* apresentou efeito citocida na última concentração testada, para os extratos brutos e frações com características polares.
- O ácido pimaridiênico isolado da *M. hirsutissima* apresentou atividade antiproliferativa diferente dos ácidos caurenóico e cupressênico anteriormente testados, demonstrando relação intrínseca com as diferenças presentes nas estruturas de suas moléculas.

REFERÊNCIAS

AGUINALDO, A. M.; ABE, F.; YAMAUCHI, T.; PADOLINA, W.G. Germacranolides of *Mikania cordata*. *Phytochemistry*, v. 38, n. 6, p. 1441-1443, 1995.

BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; KOHN, L. K.; REHDER, V. L. G.; FOGLIO, M. A.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J. E. Antiulcerogenic Activity of Crude Hydroalcoholic Extract and Coumarin Isolated from *Mikania laevigata* Shultz Bip. (Manuscript # 02058-A), has been accepted for publication in *Phytomedicine*.

BONADONNA, G. Does chemotherapy fulfill its expectations in cancer treatment. *Ann. Oncol.*, v.1, p. 11-21, 1990.

BRETANI, R.R; CAHMMAS, R.; COELHO, FRG. Mecanismos de invasão e metástases. In: BRETANI, M.N.; COELHO, F.R.G.; IYEYASU, H. *et al. Bases da Oncologia*. 1ª ed., São Paulo: Livraria e Editora Marina, p. 91-98, 1998.

CAIRNS, J. The origin of human cancers. *Nature* 289, v. 353, p.7, 1981.

CALABRESI, P.; CHABNER, B.A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Companies, p. 903-907, 1996.

CALIXTO, J.B. Desenvolvimento de medicamentos: Ensaios pré-clínicos. *Médicos*, v. Set/Out., p. 22-25, 1998.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal and Biological Research*. v.33, p. 179-189, 2000.

CASTRO, V.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. Sesquiterpene lactones from *Mikania* Species. *Phytochemistry*, v. 25, n. 7, p. 1750-1752, 1986.

COELHO, F.R.G.O. Controle do câncer. In: Bretani, M.N., Coelho, F.R.G.; Iyeyasu, H.; Kowalski, L.P. *Bases da Oncologia*. 1ª ed., São Paulo: Livraria e Editora Marina, p. 91-98, 1998.

CONCEIÇÃO, M. *Plantas medicinais no ano 2000*. São Paulo: Tão, 1982. p. 135-136.

CONNOLLY, J.D.; HILL, R.A. *Dictionary of terpenoids*: Di-and higher terpenoids. London: Chapman & Hall, 1991. v.2, p. 922.

COSTA, A. F., *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 3v.

CRAGG, G. .M.; NEWMAN, D. J. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. *Cancer Investigation*, v.17, n. 2, p. 153-163, 1999.

CRUZ, J. P. G.; LIBERALLI, C. H. R. Contribuição ao Estudo Químico de *Mikania hirsutissima* DC. *Rev. Flora Méd.*, Rio de Janeiro, v.4, n. 7, p. 395-433, 1938.

CRUZ, G.L. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*. Bertrand: Rio de Janeiro, 1995.

CUENCA, M. D.; BORKOSKY, S.; CATALAN, C. A. N. *et al.* Sesquiterpene lactones of *Mikania minima*; *Phytochemistry*, Oxford, v.32, n.6, p. 1509-1513, 1993.

CUENCA, M. D.; BORKOSKY, S.; CATALÁN, C. A. N., DIAS, J.G., HERZ, W. A cadinanolide and other sesquiterpene lactones from *Mikania haenkeana*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 31, n. 10, p. 3521-525, 1992.

CUENCA, M.D.; CATALÁN, C.A.N.; KOKKE, W.C.M.C. 14, 15-Dihydroxygermacranolides and other constituents of *Mikania minima*. *J. Nat. Prod., Columbus*, v. 53, n. 3, p. 686-691, 1990.

CUENCA, M. D.; BARDON, A.; CATALÁN, C. A. N. *et al.* Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha*. . *J. Nat. Prod.*, Columbus, v. 51, n. 3, p. 625-626, 1988.

DELSIN, A.P.M., DUARTE, M.C.T., MELO, L.V., DELARMINA, C., MACHADO, A.L.M., SANTOS, C., REHDER, V.L.G. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico e ácidos diterpênicos isolados de *Mikania laevigata* Schultz Bip. In: Anais do XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2003. Águas de Lindóia, São Paulo: SBFTE, 2003. p.212 [Resumo 08-122].

DIAZ, J. G.; GOEDKEN, V. L.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Mikania rimachii* and *Mikania microptera*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 2, p. 597-608, 1992.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

- FELLOWS, L.E. *New drugs from natural sources*. London: IBC Technical Services, 1995.
- FUJIMOTO, Y., Extration of anticancer cyclic compound from *Mikania hirsutissima* stems or leaves. Apud: *Chem. Abstr.*, Columbus, v. 124, abstr. n. P37682d, 1995.
- GUTIERREZ, A. B.; OBERTI, J. C.; HERZ, W. Germacran-5,14,6,12-diolides from *Mikania urticifolia*. *Phytochemistry*, v. 27, n. 3, p. 938-939, 1988.
- HAMBURGUER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in Plants: The link between phitochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, p. 3864 – 3874, 1991.
- HERZ, W.; KULANTHAIVEL, P. Diterpenes and sesquiterpene lactones from *Mikania congesta*. *Phytochemistry*, v. 24, n. 8, p. 1761-1768, 1985.
- HERZ, W.; SANTHANAM, P. S.; SUBRAMANIAM, P. S. The structure of mikanolide, a new sesquiterpenedilactone from *Mikania scadens* (L) Willd. *Tetrahedron Letters*, v. 32, n. 2, p. 3111-3115, 1967.
- HERZ, W.; SUBRAMANIAN, P.S.; SANTHANAM, K.A.; HALL, A.L. Structure elucidation of sesquiterpene dilactones from *Mikania scadens* (L) Willd; *J. Org. Chem.*, v. 35, n. 5, p. 1453-1464, 1970.
- HERZ, W.; SUBRAMANIAM, P.S.; MURARI, R., *et al.* Micordilin, A complex elemanolide from *Mikania cordifolia*. *J.l Org. Chem.*, v. 42, n. 10, p. 1720-1725, 1977.
- ISRAELSON, L. The role of natural products in oral health care. *J. Clin. Dent.*, v. Spec. Iss: p. 5-6, 1991.

- INDEX KEWENSIS. Oxford: Clarendon Press, 1895-1990, v. 1, v. 2, v. 19, Supl. 1-19.
- KNUDSEN, F.S.; VILEGAS, W.; OLIVEIRA, F.; ROQUE, N.F. Pimaridiene diterpenes from *Mikania triangularis*. *Phytochemistry*, v. 25, n. 5, p. 1240-1242, 1986.
- KIANG, A. K.; SIM, K. Y.; GOH, J. Constituents of *Mikania cordata* (Burm. F.) Robinson B. L. (Compositae). *J. Chem. Soc.*, London, p. 6371-6374, 1965.
- KOHN, L.K. Atividade antiproliferativa do extrato bruto e das frações de *Aspidosperma tomentosum* Mart [dissertação]. Campinas, UNICAMP/FCM; 2001.
- LIBERALLI, C. H. Estudo químico da *Mikania hirsutissima*. *Ver. Soc. Brás. Quím.*, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 5-30, 1933.
- LUCAS, V. Estudo farmacognóstico do guaco. *Rev. Flora Med.*, Rio de Janeiro, v. 9, n. 3, p.101-132, 1942.
- MENDONÇA, G.A.S. Câncer no Brasil: um risco crescente. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 38, p. 167-176, 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. Sistema de informações sobre mortalidade, 1999. Disponível na Internet: <http://www.datasus.gov.br> , 20 de julho de 2000.
- MORAES, M.D. A família Asteraceae na Planície Litorânea de Picinguaba Município de Ubatuba – São Paulo [tese]. Campinas, UNICAMP/IB; 1997.

MURADIAN, J.; MOTIDOME, M.; FERREIRA, P.C. *et al.* Flavonols and (-) Kaur-16-en-19-oic acid from *Mikania hirsutissima* DC. *Rev. Latinoam. Quim*, Monterrey, v. 8, p. 88-89, 1977.

OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M. A.; AKISUE, M. K. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schultz Bip ex Baker. *Rev. Farm. Bioquím. USP-SP*, v. 20, n. 2, p. 169-183, 1984.

OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Studies on the Constituents of *Mikania hirsutissima* (Compositae). *Chem. Pharm. Bull.* v.47, n. 10, p. 1436-1438, 1999.

PHILLIPSON, J.D. New Drugs From Nature- It Could be Yew. *Phytoteraphy Research*, v. 13, p.2-8, 1999.

PIO CORRÊA, M. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. v. 3, p. 517-520. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1942.

REHDER, V.L.G.; DUARTE, M.C.T.; ALVES, A.; DELARMINA, C. Antimicrobial activities of extracts and isolated substances of *Mikania laevigata* Schultz Bip and *Mikania glomerata* Sprengel. In: Anais 22nd IUPAC Internacional Symposium on the Chemistry Natural Product, 2000. São Carlos, São Paulo v. 2, p1-1.

RODRIGUES, R.F.O. Estudo farmacognóstico comparativo de duas espécies conhecidas como cipó-almécega-cabeludo – *Mikania hirsutissima* DC e *Mikania malacolepsis* ROBINSON [tese]. São Paulo: USP/FCF, 1998.

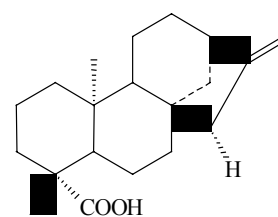
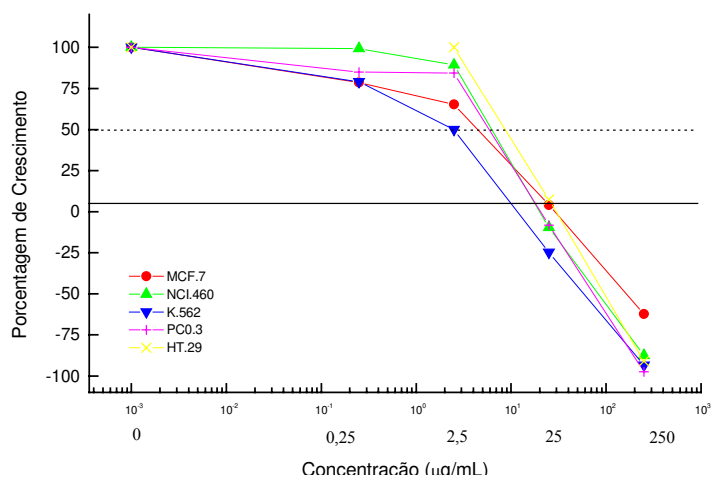
- ROWINSKY, E.K.; GILBERT, M.; MCGUERE, W.P. *et al.* Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. *J. Clin. Oncol.*, v. 9, p. 1692-1703, 1995.
- SIKORA, K. Developing a Global Strategy for Cancer. *Eur. J Cancer*, v. 35, n. 14, p. 1870-1877, 1999.
- SIMPSON, A.J.G.; CABALLERO, O.L.; DANI, S.U. Oncogeneses e genes supressores. In: BRETANI, M.N.; COELHO, F.R.G.; IYEYASU, H.; KOWALSKI, L.P. *Bases da Oncologia*. 1ª ed., São Paulo: Livraria e Editora Marina, p. 91-98, 1998.
- SKEHAN, P.; STORENG R.; SCUDIERO, D. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. National Cancer Institute*, v. 82, p. 1107-1118, 1990.
- SKEHAN, P.; FRIEDMAN, S.J. A rapid Naphthol Yelow S methods for mensuring the celular protein content of anchorage cultures. *In Vitro*, v. 21, p. 288-290, 1985.
- VENEZIANI, R.C.S.; OLIVEIRA, R.C.S. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. *Biochem Systm. Ecolog.*, v. 27, p. 99-102, 1999.
- WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGOON, P.; MCPHAIL, A.T. Plant antitumor agent. VI. The isolation and struture of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* v. 93, p. 2325-2327, 1971.

YATSUDA, R.; MENDONÇA, M.R.; DUARTE, S.; CURY., J.A.; REHDER, V.L.G.; KOO, H.; ROSALEN, P.L.; Effect of *Mikania* genus plant on the growth and cell adherence of *mutans streptococci*. *Journal of Dental Research*, Washington, v. 81, Fac Spec., 272, 2002.

ZAMORANO, G.; CATALAN, C.A.N.; DIAZ, J.G, HERZ, W. Sesquiterpene dilactones from *Mikania ypacarayensis*. *Phytochemistry*, v. 38, n. 5, p. 1257-1260, 1995.

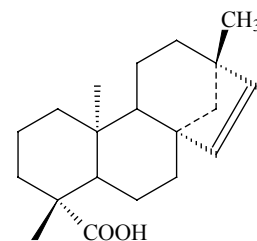
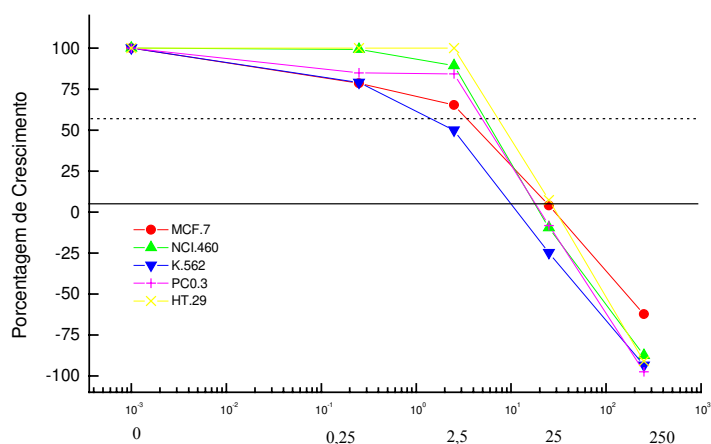
ANEXO I

A seguir serão apresentados os gráficos referentes aos compostos químicos isolados das espécies *M. laevigata* (Campinas) e *M. glomerata* (Itatiaia), em estudos anteriores pelo grupo de pesquisa do CPQBA.



PM = 302

GRÁFICO 14 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do ácido caurenóico sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.



PM = 302

GRÁFICO 15 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do ácido cupressênico sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

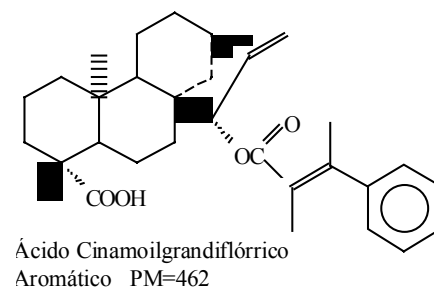
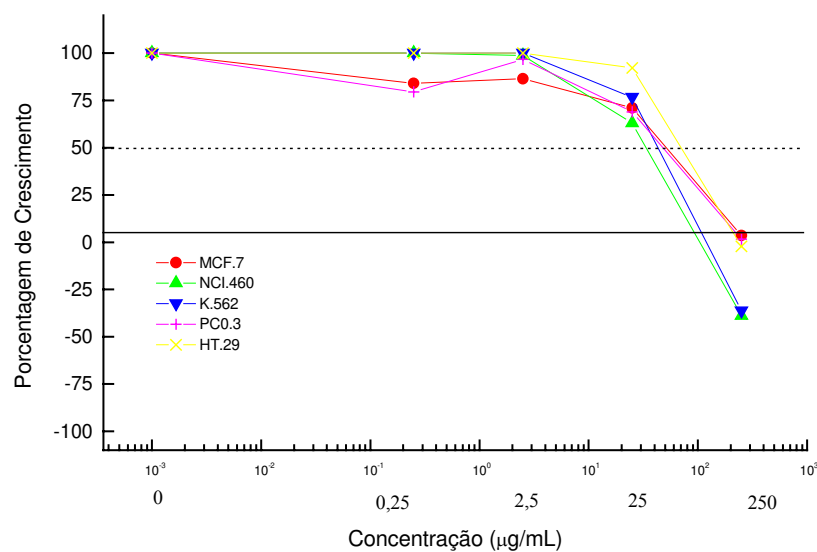


GRÁFICO 16 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do ácido cinamoilgrandiflórico sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

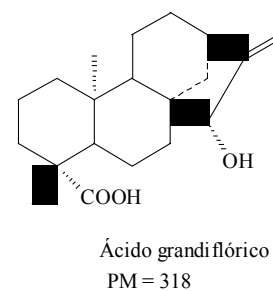
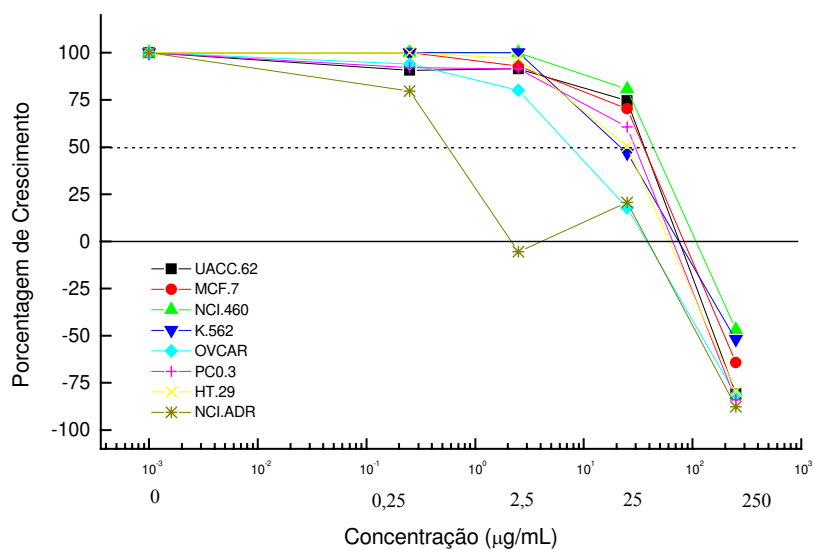
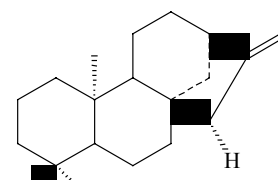
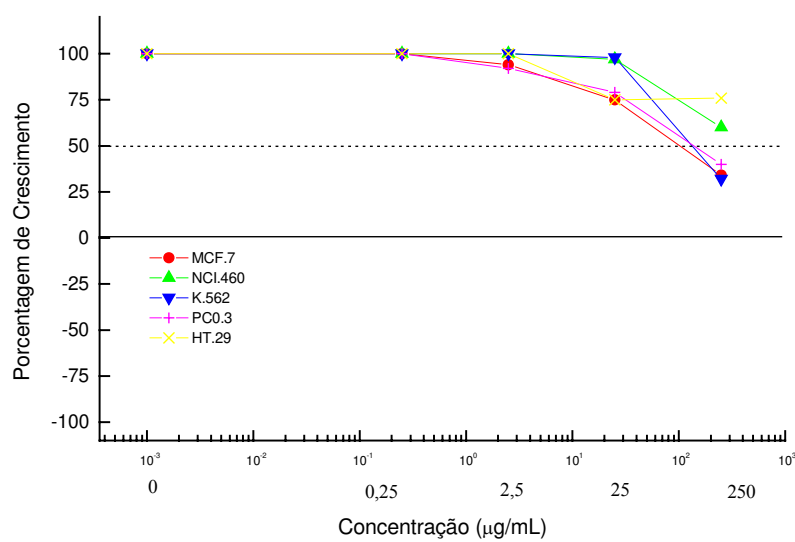
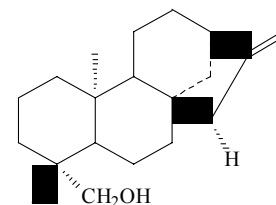
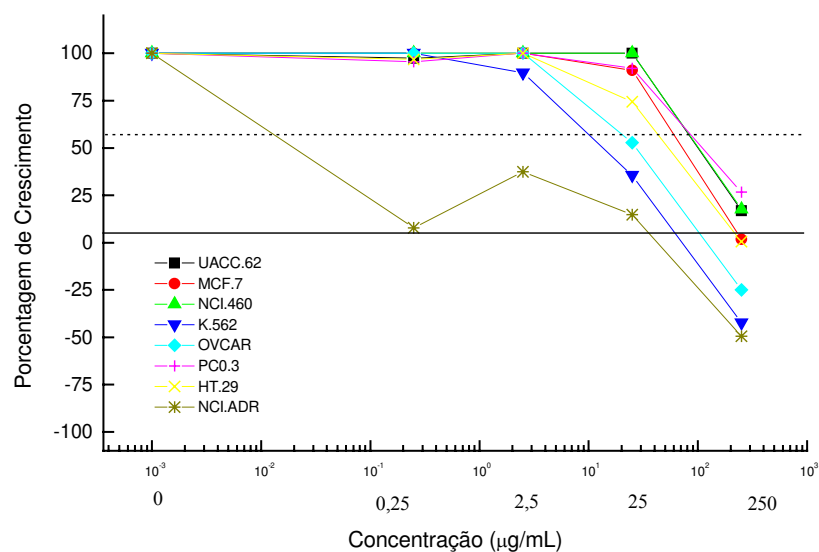


GRÁFICO 17 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do ácido grandiflórico sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.



Caureno PM = 272

GRÁFICO 18 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do caureno sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.



Caurenol
PM= 288

GRÁFICO 19 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do caurenol sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

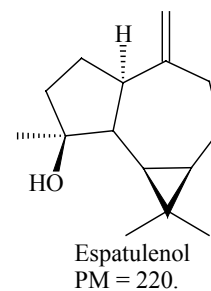
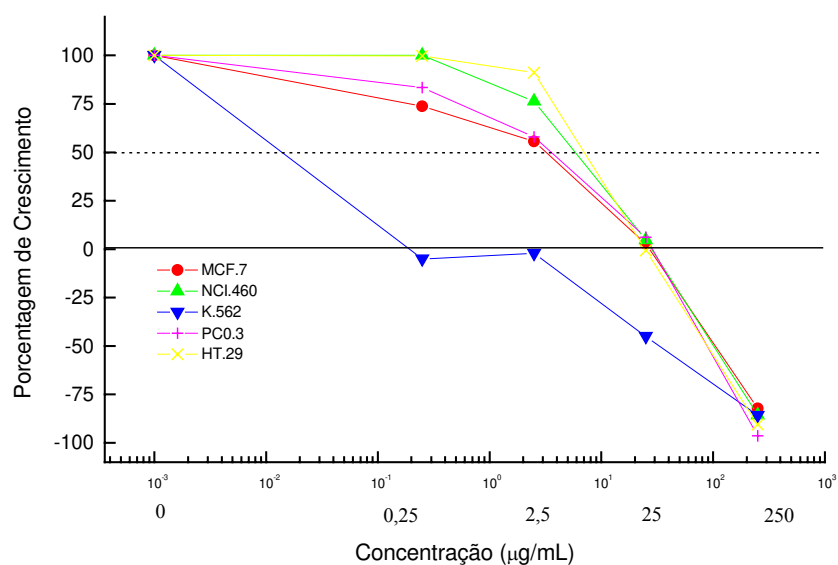


GRÁFICO 20 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do espatulenol sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

Gráficos obtidos da avaliação antiproliferativa para os extratos hidroalcóolicos e diclorometânicos e frações diclorometânicas resultantes de coluna seca para *M. argyreiae*, *M. laevigata*, *M. glomerata* de Iguape e *M. glomerata* de Picinguaba (GRAF.21-36).

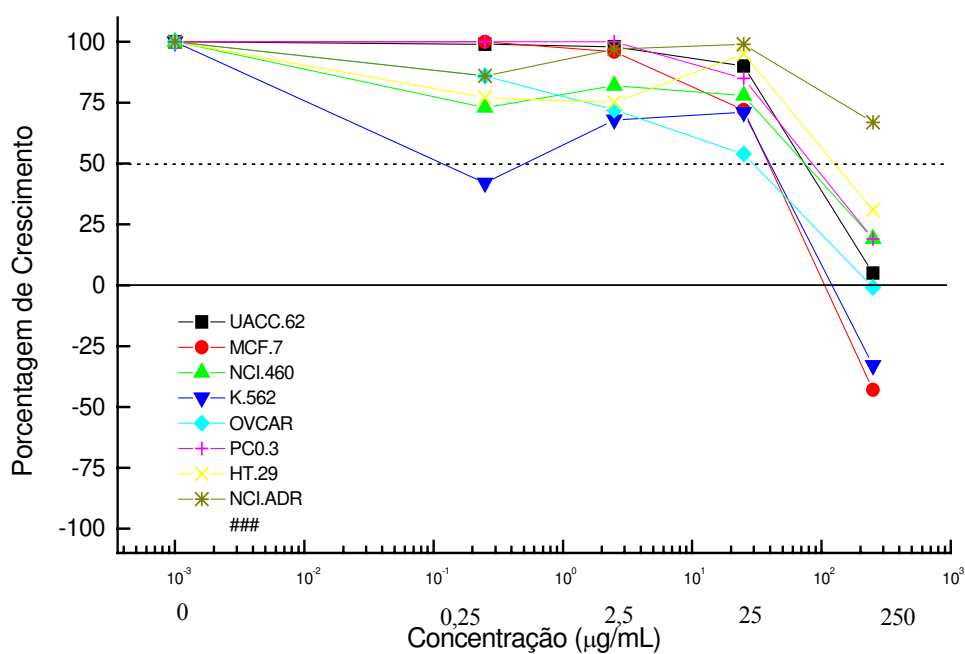


GRÁFICO 21 – Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do EHAMA sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

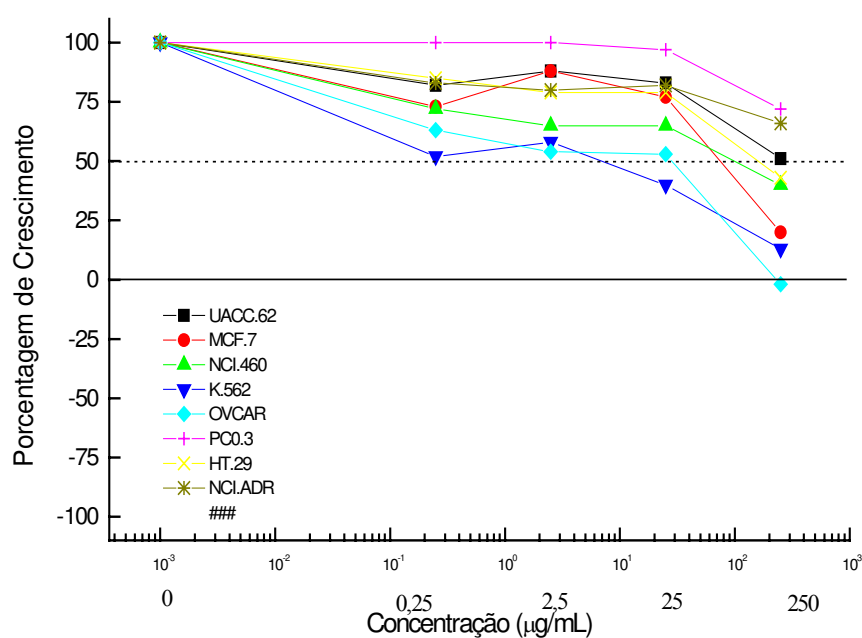


GRÁFICO 22 – Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do EDMa sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

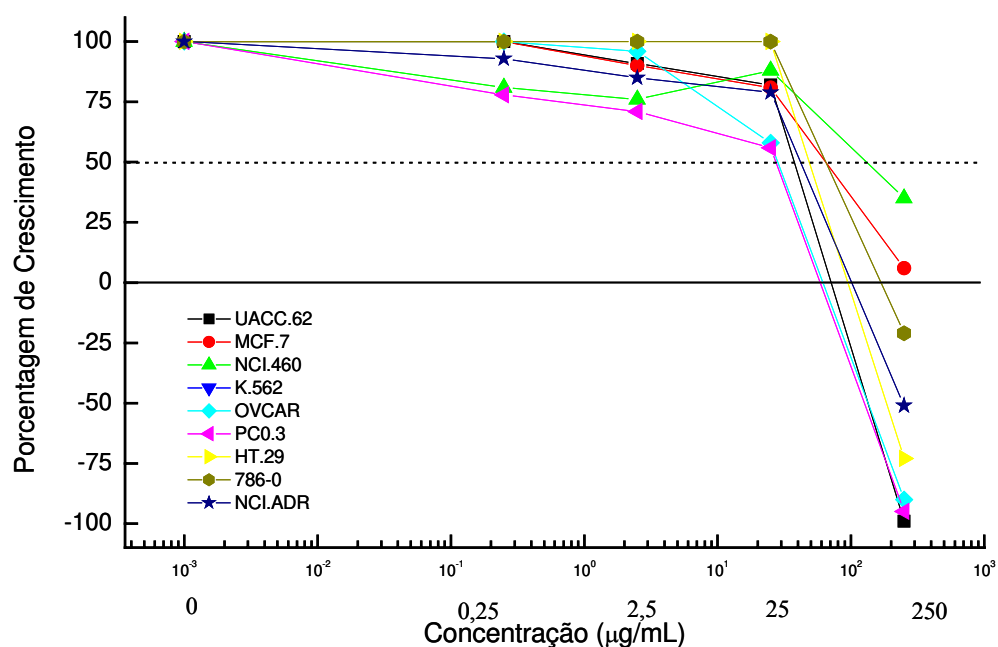


GRÁFICO 23 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 1 do EDMa sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

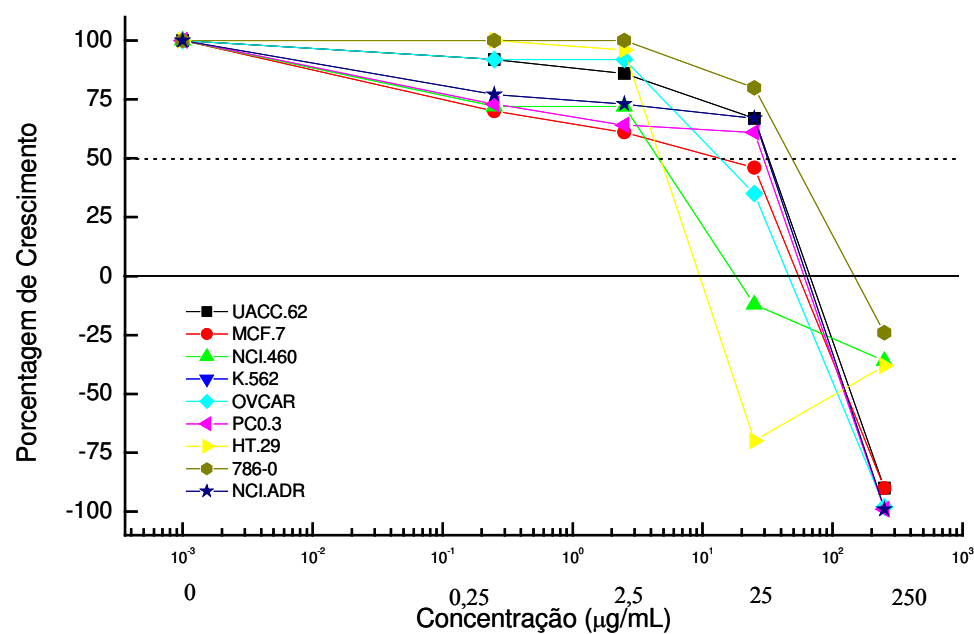


GRÁFICO 24 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 2 do EDMa sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

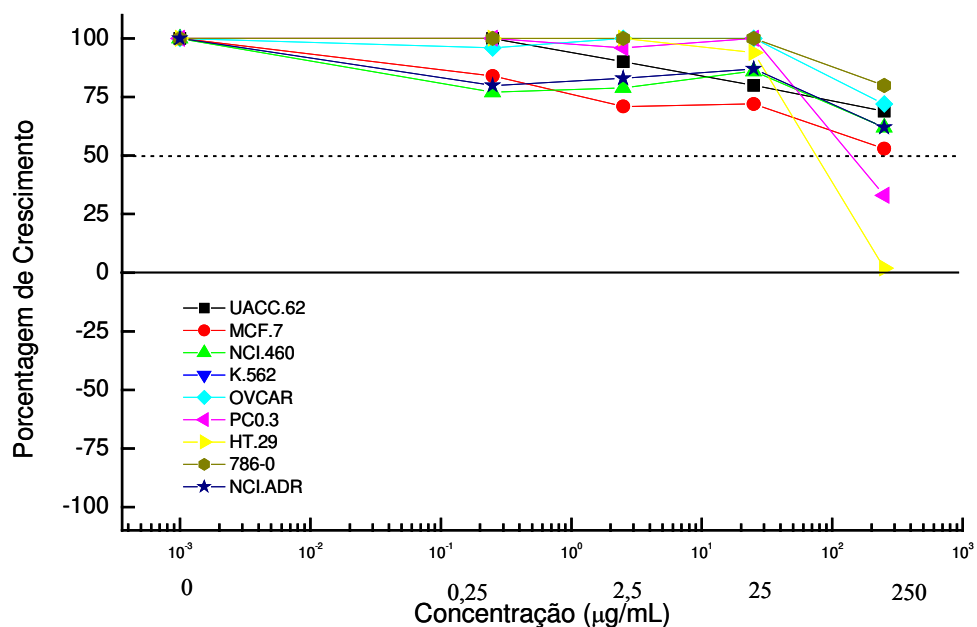


GRÁFICO 25 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 3 do EDMa sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

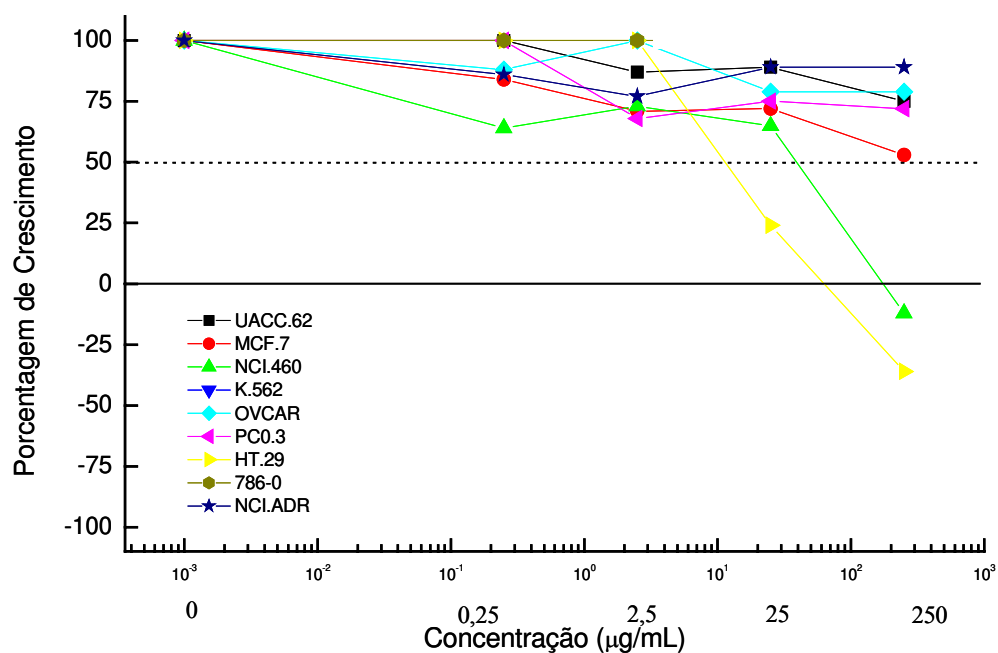


GRÁFICO 26 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 4 do EDMa sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

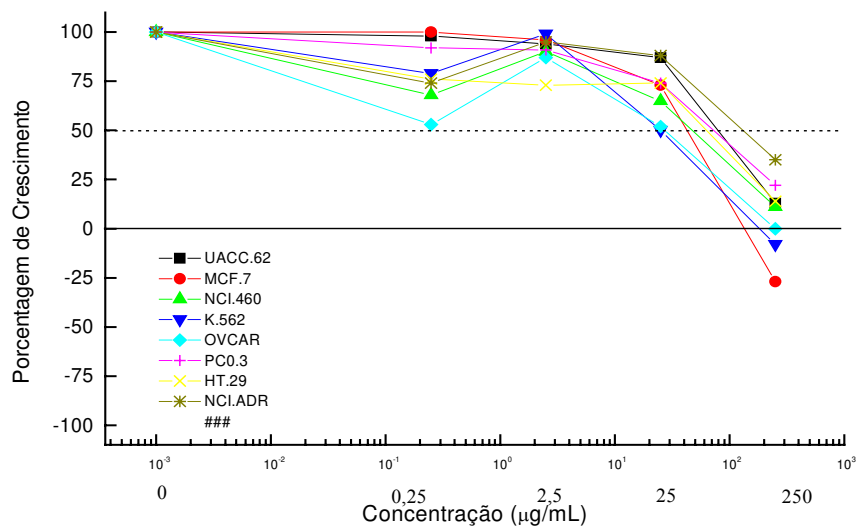


GRÁFICO 27 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do EHAMI sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

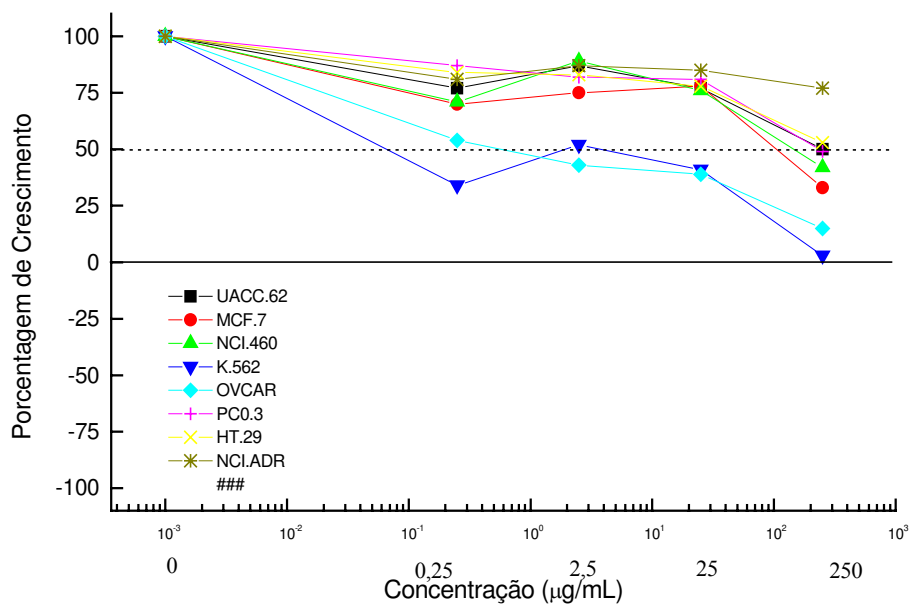


GRÁFICO 28 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do EDMII sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

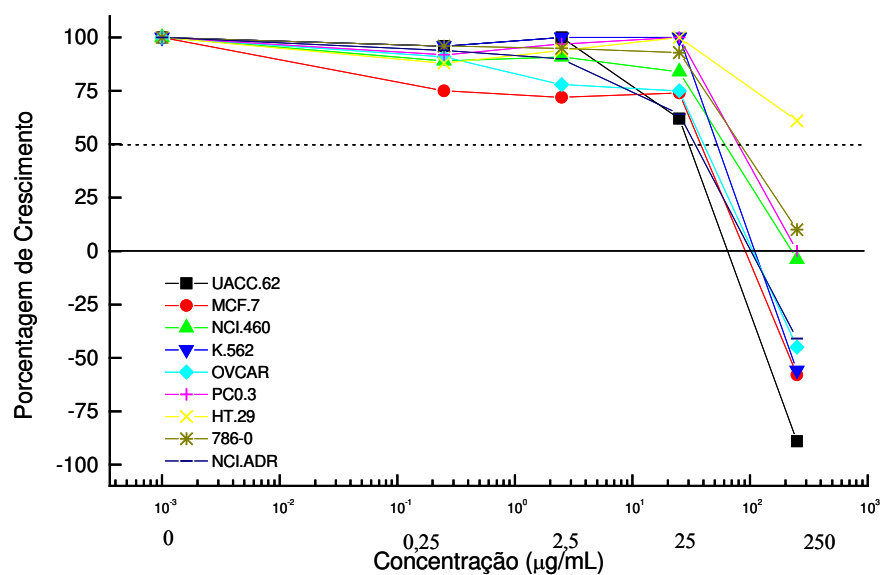


GRÁFICO 29 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do EHAMgI sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

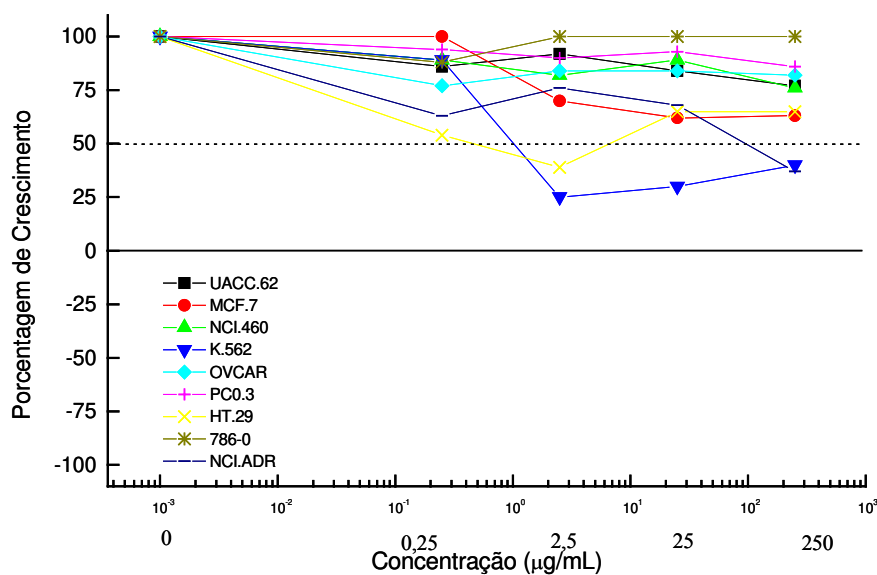


GRÁFICO 30 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 4 do EDMgI sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

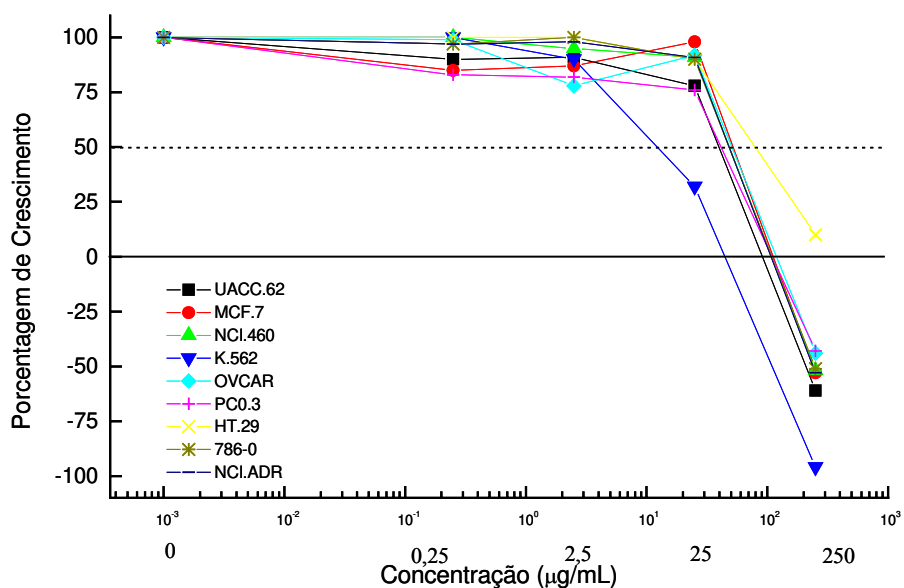


GRÁFICO 31 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do EHAMgP sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

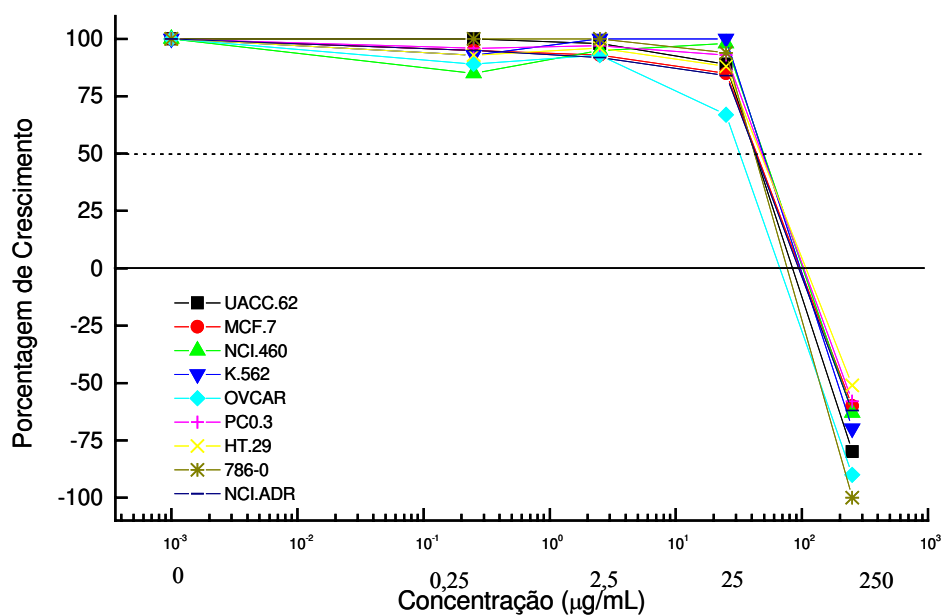


GRÁFICO 32 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do EDMgP sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

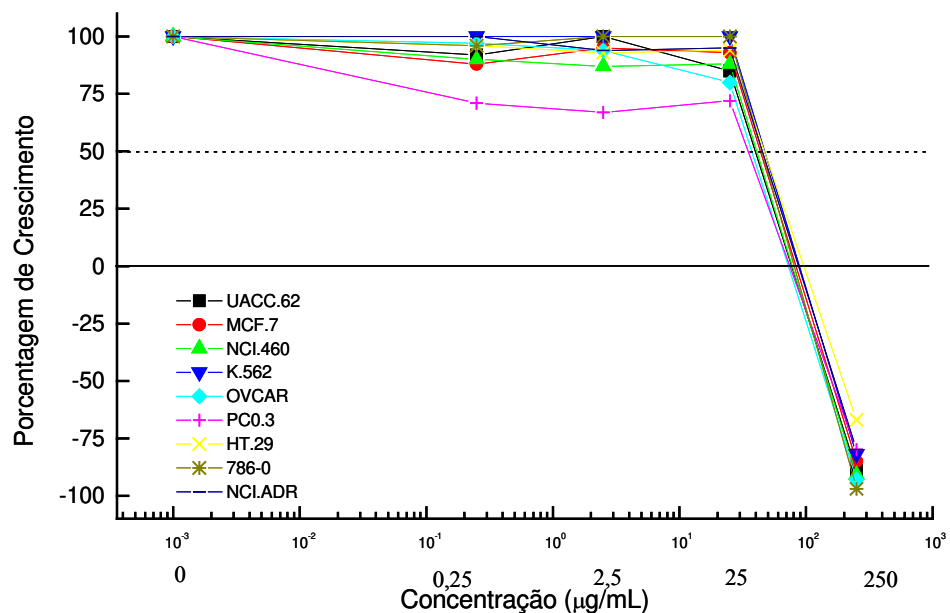


GRÁFICO 33 - Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 3 do EDMgP sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

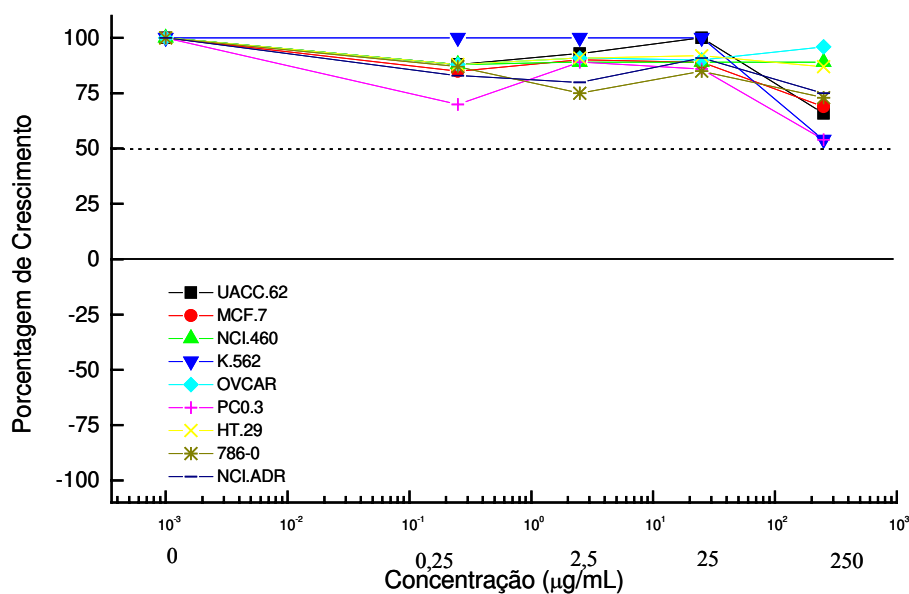


GRÁFICO 34- Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração 4 do EDMgP sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

ANEXO II

A seguir serão apresentados os espectros resultantes das análises de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (FIG. 31 e 32) e de Infravermelho (FIG. 33).

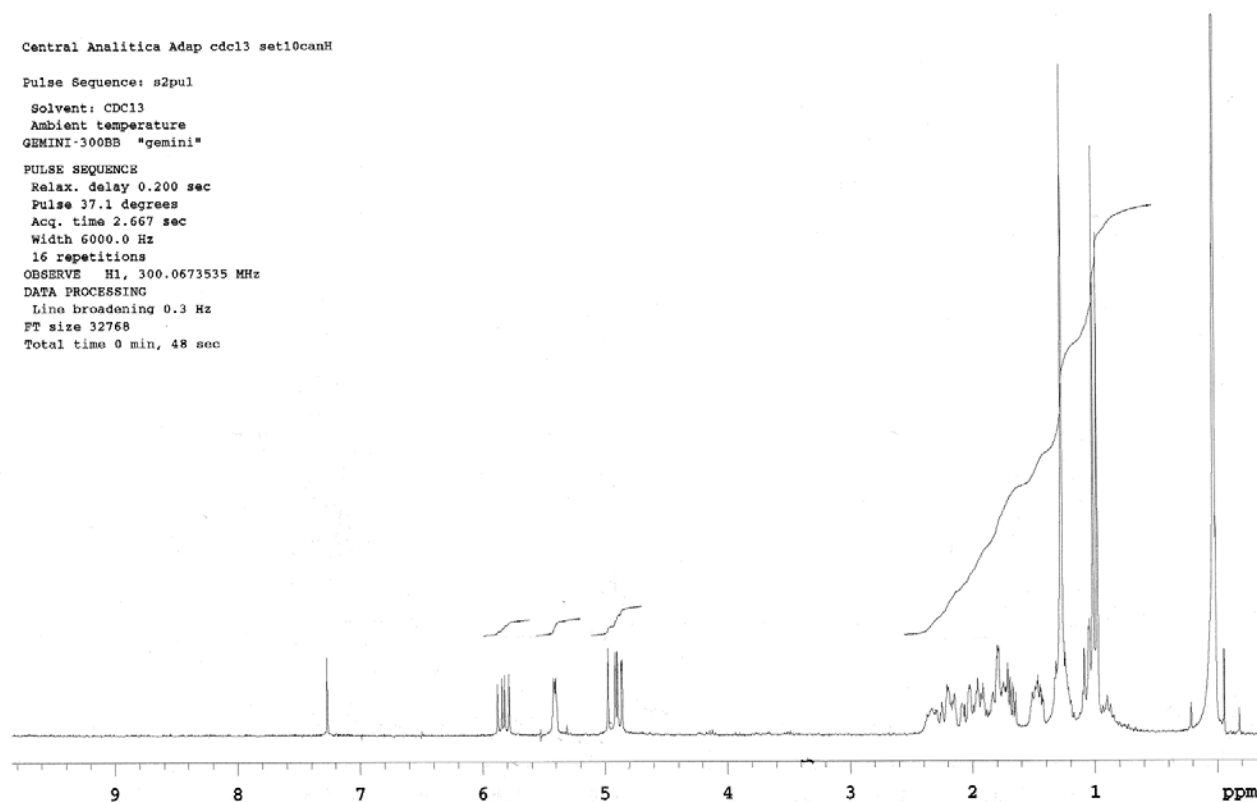


FIGURA 31 – Espectro RMN- ^1H do ácido pimariadiênico isolado da *M. hirsutissima*.

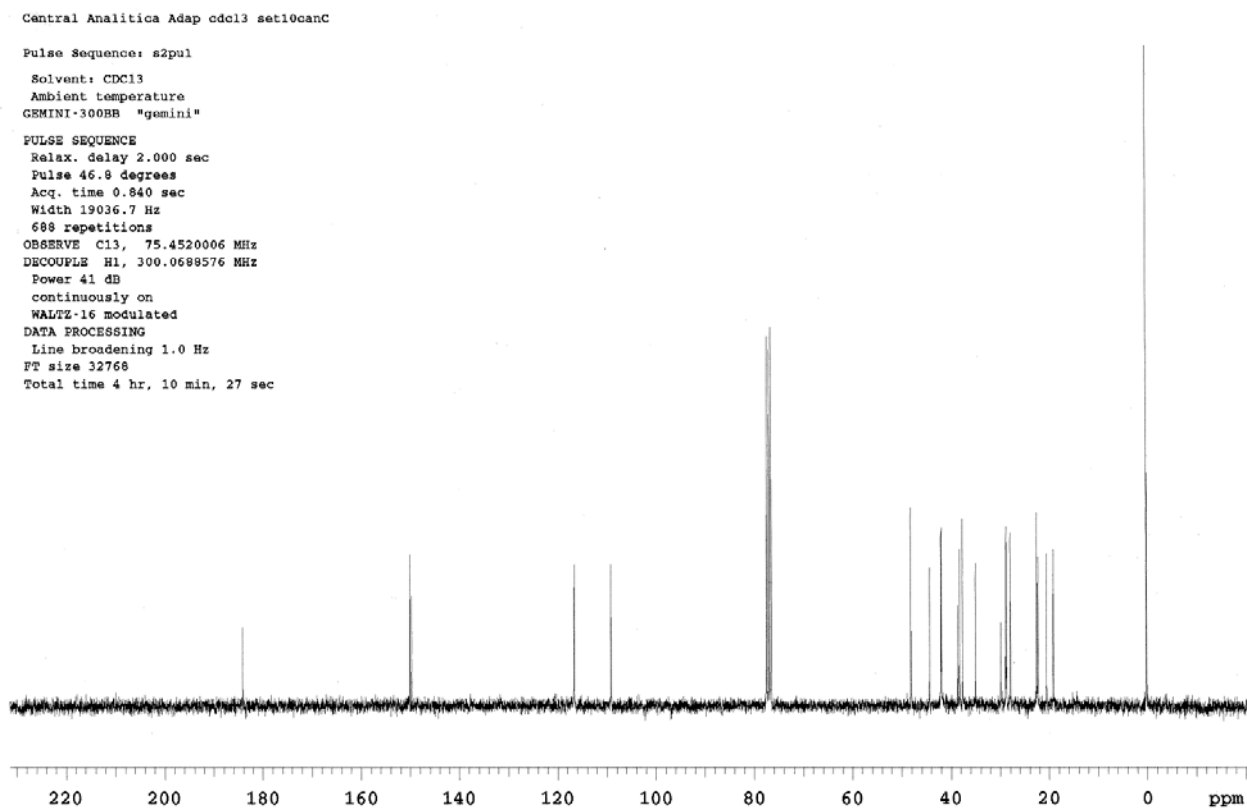


FIGURA 32 – Espectro de RMN- ^{13}C do ácido pimariidênico isolado da *M. hirsutissima*.

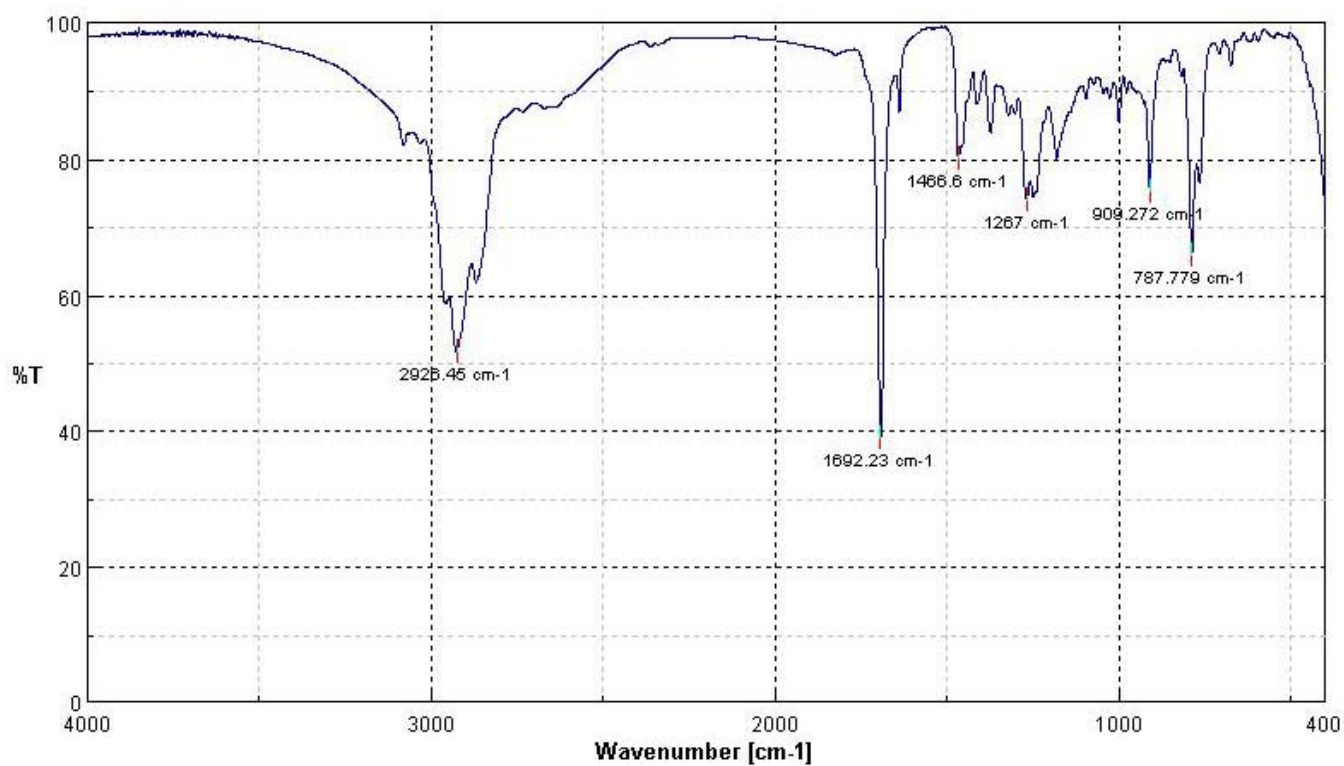


FIGURA 33 - Espectro de Infravermelho do ácido pimariidênico isolado da *M. hirsutissima*.